

โครงการ การศึกษาศักยภาพด้านการเป็นแหล่ง  
ของสารประกอบที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพของ  
ผลิตภัณฑ์พลอยได้ที่เหลือจากการบีบเย็นน้ำมัน  
รำข้าวโดยการศึกษาองค์ประกอบทางเคมี

โดย ผศ. ดร. มณฑนา วีระวัฒนานกร

มิถุนายน 2561

สำนักงานหอสมุดแห่งชาติ  
เลขที่หนังสือ 0 5 ล.ก. 2564  
เลขทะเบียน 1034409  
เลขเรียกหนังสือ 2 TP  
684

.B5  
M2578  
Q559

สัญญาเลขที่ R2559B019

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การศึกษาศักยภาพด้านการเป็นแหล่งของสารประกอบที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพของผลิตภัณฑ์พลอยได้ที่เหลือจาก

การบีบเย็นน้ำมันรำข้าวโดยการศึกษาองค์ประกอบทางเคมี

คณะผู้วิจัย

ผศ. ดร. มณฑนา วีระวัฒนากร

อาจารย์ อมรลักษณ์ ปรีชาหาญ

ผศ. ดร. ขนิษฐา รุตรัตนมงคล

ดร. สุกีวรรณ เดชโยธิน

ดร. ศศิวิมล จิตรากร

คณะเกษตรศาสตร์ ทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยนเรศวร

สนับสนุนโดยงบประมาณแผ่นดินมหาวิทยาลัยนเรศวร

ปีงบประมาณ 2559

ชื่อโครงการ การศึกษาศักยภาพด้านการเป็นแหล่งของสารประกอบที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพของ

ผลิตภัณฑ์พลอยได้ที่เหลือจากการบีบเย็นน้ำมันรำข้าวโดยการศึกษาองค์ประกอบ

ทางเคมี

Investigating the ability to be the source of functional ingredients of waste

products from cold press- rice bran oil process through chemical

qualities and quantities

ระยะเวลาโครงการ

1 ปี

ชื่อหัวหน้าโครงการวิจัย : ผศ.ดร. มณฑนา วีระวัฒนากร

## 1. ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

ข้าวจัดเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศไทยเห็นได้จาก พื้นที่ปลูกข้าวประมาณ 60 ล้านไร่จากทั้งสี่ภาคของประเทศ ถึงแม้ว่าต้องเผชิญกับสถานการณ์ราคาข้าวตกต่ำ โดยราคาข้าวไทยเฉลี่ยอยู่ที่ประมาณ 390 เหรียญสหรัฐฯ ต่อดัน แต่ไทยส่งออกข้าวเป็นอันดับที่ 1 ของโลกปริมาณ 3.93 ล้านตัน ตามด้วยอินเดีย 3.74 ล้านตัน และเวียดนาม 2.4 ล้านตัน ในกระบวนการสีข้าวจะได้เมล็ดข้าวเป็นผลผลิตหลักกว่าร้อยละ 69.5 แล้ว และมีผลผลิตพลอยได้ที่เกิดขึ้นในระหว่างกระบวนการสีข้าวที่สำคัญคือ รำข้าวประมาณร้อยละ 10.5 ในขณะที่ประเทศไทยมีความได้เปรียบทางด้านวัตถุดิบจำนวนมาก การสร้าง “มูลค่าเพิ่ม” ให้กับสินค้าข้าว เพื่อให้ไทยมีจุดแข็งในการสร้างความแตกต่างให้กับข้าวไทยในเวทีโลก อีกทั้งยังเป็นการเพิ่มโอกาสการส่งออกให้กับข้าวไทยซึ่ง “น้ำมันรำข้าว” ก็นับเป็นหนึ่งในผลิตภัณฑ์แปรรูปจากข้าวที่สามารถสร้างมูลค่าเพิ่มได้เป็นอย่างดี ปัจจุบันการส่งออกน้ำมันรำข้าวของไทยมีการเติบโตที่ดี (ศูนย์วิจัยกสิกรไทย) ตามกระแสการตื่นตัวในการบริโภคอาหารเพื่อสุขภาพ โดยมีมูลค่าการส่งออกน้ำมันรำข้าวอยู่ที่ 1,600-1,700 ล้านบาท หรือขยายตัวร้อยละ 10-12 ตลาดส่งออกหลักคือ เกาหลีใต้ ออสเตรเลีย นิวซีแลนด์ สหรัฐอเมริกา และสหภาพยุโรป

กระบวนการบิบเย็นเป็นกระบวนการแปรรูปที่ใช้ในการสกัดน้ำมันรำข้าวเพื่อให้ได้น้ำมันที่มีคุณภาพที่ดีคงคุณค่าทางโภชนาการโดยเฉพาะอุดมด้วยสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพด้านส่งเสริมสุขภาพ ได้แก่ วิตามินอี (tocopherol และ tocotrienol) ไฟโทสเตอรอล (phytosterol) แกมมาออริซานอล (gamma-oryzanol) โพลีโคซานอล (policosanol) และ สควอลีน (squalene) และในกระบวนการสกัดน้ำมันด้วยวิธีดังกล่าวจะได้ปริมาณน้ำมัน 2% ทำให้เกิดของเหลือจากกระบวนการแปรรูปหรือรำสกัด 80

% นอกจากนี้กระบวนการทำให้น้ำมันรำข้าวบริสุทธิ์ (refining process) ที่ใช้ในโรงงานอุตสาหกรรมได้แก่ การฟอก การตีกัม การกำจัดกรด กลิ่น กำจัดไซ ทำให้เกิดผลิตภัณฑ์พลอยได้หรือของเหลือ เช่น กากจากการกรองน้ำมัน เป็นต้น การกำจัดไซ แต่ละปีมีของเหลือจากการทำน้ำมันรำข้าวให้บริสุทธิ์ประมาณ 100 ตันต่อปี และคุณค่าทางโภชนาการและสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพส่วนใหญ่จะถูกกำจัดออกไปจากน้ำมันรำ

ข้าวระหว่างการกระบวนการทำให้บริสุทธิ์ (refining process) เช่น แกมมาออร์ซานอล

ผลิตภัณฑ์พลอยได้ในกระบวนการผลิตน้ำมันรำข้าว น่าจะเป็นแหล่งของสารอาหารและสารที่ออกฤทธิ์ส่งเสริมสุขภาพ ดังกล่าวข้างต้นซึ่งน่าจะมีประโยชน์ต่อด้านเป็น functional ingredients ที่ประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร ยา และเครื่องสำอางได้ อย่างไรก็ตามในเบื้องต้นยังไม่ปรากฏข้อมูลเกี่ยวกับองค์ประกอบทางเคมีรวมทั้งคุณค่าทางโภชนาการและสารออกฤทธิ์ (bioactive compounds) ในรำสกัดและกากเหลือหรือผลิตภัณฑ์พลอยได้จากกระบวนการสกัดน้ำมันรำ ดังนั้นผู้วิจัยมีความสนใจศึกษาปริมาณ คุณค่าทางโภชนาการและสารออกฤทธิ์ (bioactive compounds) ของรำสกัดและกากที่เหลือจากกระบวนการสกัดน้ำมันรำข้าวแบบบิบบิเยนโดยเลือกใช้กระบวนการจาก กลุ่มผู้ผลิต 2 กลุ่มที่แตกต่างกัน คือ กลุ่ม วิสาหกิจน้ำมันรำข้าวชุมชน อ.ชุมแสง จ.นครสวรรค์ซึ่งใช้กระบวนการกรองในการทำให้น้ำมันบริสุทธิ์ และกลุ่มผู้ประกอบการที่เป็นบริษัท คือบริษัทลพบุรีน้ำมันพืชบิบบิเยน ต.ท่าหิน อ.เมือง จ. ลพบุรีซึ่งใช้กระบวนการทำให้น้ำมันรำข้าวบริสุทธิ์โดยใช้วิธีทางกายภาพและเคมี

4

## 2. วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1. ศึกษากระบวนการผลิตน้ำมันรำข้าวระดับกลุ่มวิสาหกิจชุมชนและระดับอุตสาหกรรม
2. เก็บกากที่เหลือจากการผลิตน้ำมันรำข้าวทุกจุดของทั้ง 2 ระดับการผลิต (สหกิจชุมชน อ.

ชุมแสง จ.นครสวรรค์ และ บริษัทลพบุรีน้ำมันพืชบีบเย็น ต.ท่าหิน อ.เมือง จ. ลพบุรี)

3. ศึกษาสมบัติการต้านอนุมูลอิสระของรำสกัดและผลิตภัณฑ์พลอยได้หรือของเหลือแต่ละ

จุดของกระบวนการทำน้ำมันรำข้าว

4. วิเคราะห์สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ได้แก่ วิตามินอี (tocopherol และ tocotrienol) ไฟ

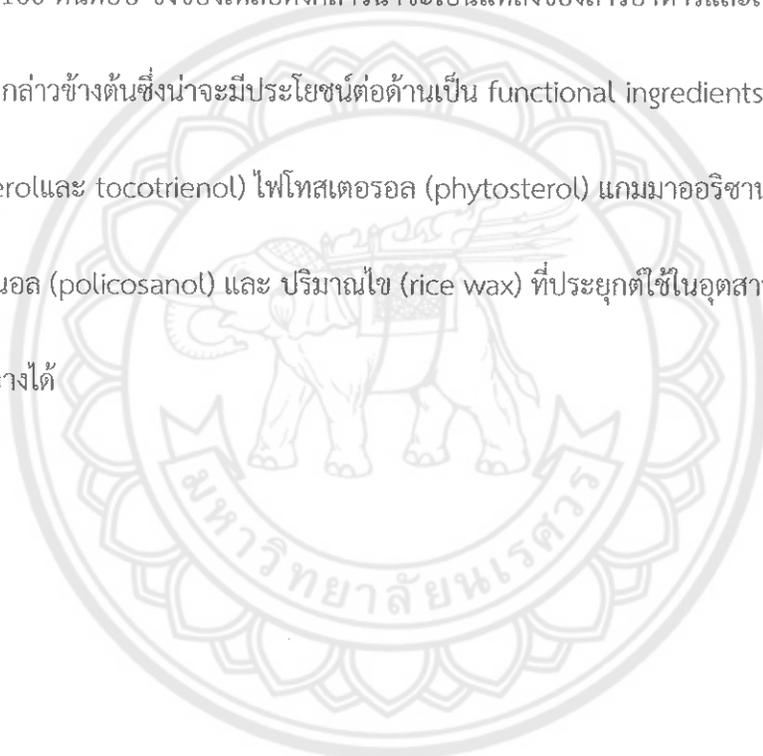
โทสเตอร์อล (phytosterol) แกมมาออริซานอล (gamma-oryzanol) โพลีโคซานอล (policosanol) และ

ปริมาณไข (rice wax)



### 3. สมมุติฐานและกรอบแนวคิดของโครงการวิจัย

ข้าวจัดเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศไทยเห็นได้จากพื้นที่ปลูกข้าวประมาณ 60 ล้านไร่ และส่งออกข้าวใหญ่เป็นอันดับ 1 ของโลก ไร่ข้าวคือผลิตผลพลอยได้ที่เกิดขึ้นในระหว่างกระบวนการสีข้าว น้ำมันรำข้าวก็นับเป็นผลิตภัณฑ์แปรรูปจากรำข้าวที่สร้างมูลค่าเพิ่มให้ข้าวและการส่งออกน้ำมันรำข้าวของไทยมีการเติบโตดีขึ้นเรื่อยๆแต่ละปีของเหลือจากการทำน้ำมันรำข้าวให้บริสุทธิ์ประมาณ 100 ตันต่อปี ซึ่งของเหลือดังกล่าวน่าจะเป็นแหล่งของสารอาหารและสารที่ออกฤทธิ์ส่งเสริมสุขภาพดังกล่าวข้างต้นซึ่งน่าจะมีประโยชน์ต่อต้านเป็น functional ingredients ได้แก่ วิตามินอี (tocopherol และ tocotrienol) ไฟโทสเตอรอล (phytosterol) แกมมาออริซานอล (gamma-oryzanol) โพลีโคซานอล (policosanol) และ ปริมาณไข (rice wax) ที่ประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร ยา และ เครื่องสำอางได้



## บทคัดย่อ

ข้าวเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศไทย ซึ่งประเทศไทยผลิตข้าวเปลือกได้มากกว่า 25 ล้านตันในปี 2558 เมื่อผ่านกระบวนการสีข้าวจะได้เป็นข้าวสารและมีผลพลอยได้ที่เป็นรำข้าวประมาณปีละ 2.88 ล้านตัน ซึ่งประกอบด้วยน้ำมันรำข้าวประมาณร้อยละ 12-23 เดิมรำข้าวใช้เป็นส่วนผสมของอาหารสัตว์ต่อมาได้มีการนำเอารำข้าวที่ได้ไปสกัดเป็นน้ำมันเพื่อใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร ผลิตภัณฑ์อาหารเสริม และผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง ในปี 2559 ไทยสามารถผลิตน้ำมันรำข้าวดิบได้ถึง 360,550 ตัน (The Office of Industrial Economics, 2017). น้ำมันรำข้าวเป็นน้ำมันที่นิยมบริโภคในระดับนานาชาติ อย่างไรก็ตาม อุตสาหกรรมน้ำมันรำข้าวก่อให้เกิดผลผลิตพลอยได้ซึ่งยังอุดมด้วยสารอาหารและสารโภชนเภสัชที่สำคัญซึ่งน่าจะเป็นแหล่งของสารดังกล่าวสำหรับอุตสาหกรรมอาหาร ยา และเครื่องสำอางได้ ดังนั้นวัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้เพื่อเปรียบเทียบสารโภชนเภสัชในผลผลิตพลอยได้จากอุตสาหกรรมผลิตน้ำมันรำข้าวจากทั้งแบบระบบโรงงานที่ใช้การสกัดด้วยตัวทำละลายและระบบที่ใช้การบีบเย็น ผลการทดลองพบว่าผลผลิตพลอยได้จากกระบวนการสกัดน้ำมันรำข้าวด้วยตัวทำละลายจากอุตสาหกรรมประกอบด้วยสารโภชนเภสัช  $\gamma$ -aminobutyric acid 97.37 mg/100 g ในรำสกัดน้ำมัน (defatted rice bran) และในกรดไขมันดิบ (rice acid oil) ประกอบด้วยวิตามินอีสูง (tocopherols, tocotrienols) ถึง 120.59 mg/100 g ปริมาณ  $\gamma$ -oryzanol ที่พบคือ 3,829.65 mg/100 g ปริมาณ phytosterol 599.40 mg/100 g และสารโพลีโคซานอล (policosanol) มากถึง 332.79 mg/100 g. นอกจากนี้ปริมาณรวมของสารโภชนเภสัชจากผลผลิตพลอยได้จากอุตสาหกรรมที่สกัดน้ำมันแบบใช้ตัวทำละลายมีมากกว่าที่พบในการสกัดแบบบีบเย็น ปริมาณรวมที่พบสารโภชนเภสัชจากผลผลิตพลอยได้ทั้งระบบบีบเย็นและสกัดด้วยตัวทำละลายคือ 8.3

kg/100 kg ซึ่งแสดงให้เห็นถึงศักยภาพของผลิตภัณฑ์ที่ได้จากอุตสาหกรรมน้ำมันรำข้าวในด้านการเป็นแหล่งของสารเภสัชกรรมเพื่อใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร ยา หรือเครื่องสำอางค์



## Abstract

Rice (*Oryza sativa* L.) is a valuable crop as an economic commodity in Thailand, as well as being the staple food crop in many countries. In Thailand, rice production was more than 25 million metric tons of paddy rice in 2015 and the rice milling process

leaves rice bran as a by-product which constitutes about 12-23 % of rice bran oil. In 2016,

Crude rice bran oil production in Thailand was around 360,550 metric ton. Rice bran oil (RBO) has become a popular oil globally. However, the RBO extraction process leaves various residue products, which contain bioactive substances of varying potency which could be significant sources of functional ingredients for both food production and pharmaceutical manufacture. The objective of our study was to compare the bioactive substances in various by-products derived from the two rice bran oil processing methods; solvent extraction and cold pressing. The residues from solvent extraction processing contained up to 97.37 mg/100 g of  $\gamma$ -aminobutyric acid in defatted rice bran, and the rice acid oil contained high levels of vitamin E (tocopherols, tocotrienols), up to 120.59 mg/100 g, as well as  $\gamma$ -oryzanol (3,829.65 mg/100 g), phytosterol (599.40 mg/100 g), and policosanol compounds (332.79 mg/100 g). All of these values are higher than in the residues derived from cold pressing. Importantly, high amounts of total nutraceuticals (8.3 kg/100 kg) were found in residues from both processing methods, indicating the

commercial potential of these residues as a source of functional ingredients for food production, as dietary supplements, and in pharmaceutical manufacture.๒



#### 4. เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

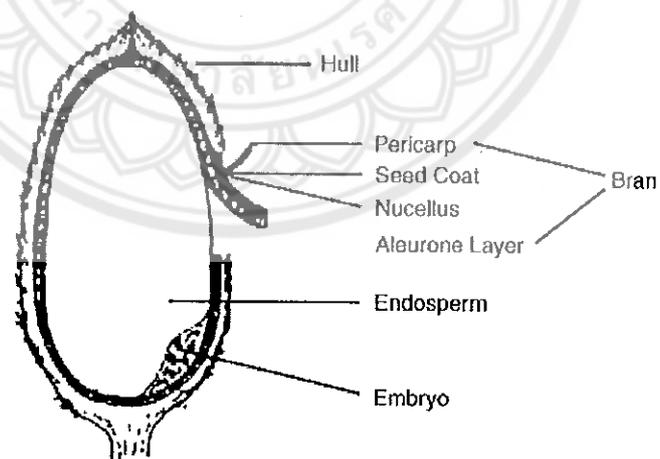
##### 4.1 ข้าว (*Oryza sativa* L.)

ข้าวเป็นพืชในสกุล (Genus) *Oryza* ซึ่งอยู่ในวงศ์ (Family) เดียวกับหญ้า โดยพืชสกุลข้าวมีชนิดปลูก (Cultivated species) 2 ชนิด และ ชนิดป่า (Wild species) 21 ชนิดและ มีการประมาณว่าทั่วโลกมีข้าวอยู่ประมาณ 120,000 สายพันธุ์ โดยข้าวชนิดที่คนไทยบริโภคคือ *Oryza sativa* L. ข้าวในแถบเอเชียมีการแบ่งย่อยออกเป็น 1) ข้าวจาปอนิกา (Japonica) หรือข้าวเมล็ดสั้น (*Oryza sativa* var. japonica) เป็นข้าวที่นิยมปลูกในประเทศแถบเอเชียตะวันออก เช่น จีน ญี่ปุ่น และ เกาหลี 2) ข้าวอินดิกา (Indica) หรือ ข้าวเมล็ดยาว (*Oryza sativa* var. indica) นิยมปลูกในแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้และอินโดนีเซีย และ 3) ข้าวจาวานิกา (Javanica) หรือข้าวชวา (*Oryza sativa* var. javanica) นิยมปลูกในประเทศอินโดนีเซีย (Rodkum, 2011) ประชากรประเทศไทยประมาณ 64.24 ล้านคนบริโภค ข้าวเป็นอาหารหลัก โดยข้าวที่ปลูกในประเทศไทย นั้นใช้บริโภคประมาณ 55 เปอร์เซ็นต์ และ ส่งออกประมาณ 45 เปอร์เซ็นต์ โดยประเทศไทยเป็นผู้ส่งออกข้าวอันดับต้น ๆ ของโลกมาเป็นเวลานานกว่า 1 ทศวรรษ ซึ่งสร้างรายได้ประมาณ 1,700 ถึง 1,900 ล้านดอลลาร์สหรัฐอเมริกาต่อปี (Vanichanont, 2004) ประเทศหลักที่นำเข้าข้าวจากประเทศไทยคือ อินโดนีเซีย ไนจีเรีย อิหร่าน สหรัฐอเมริกา และ สิงคโปร์ (Asia BioBusiness, 2006)

##### 4.1.1 องค์ประกอบของข้าว

ข้าวประกอบไปด้วยหลายส่วนด้วยกันโดยส่วนที่อยู่นอกสุดคือ เปลือกหุ้มเมล็ดหรือแกลบ (Hull หรือ Husk) ซึ่งจะหุ้มอยู่บริเวณเปลือกนอกของเมล็ดข้าว ถัดมาคือส่วนเมล็ดข้าวซึ่งประกอบด้วย

จมูกข้าว หรือคัพพะ (Embryo หรือ Germ) รำข้าว และเมล็ดข้าว (Endosperm) ดังแสดงในภาพที่ 1 รำข้าว หมายถึง ส่วนเยื่อหุ้มผล (Pericarp) เยื่อหุ้มเมล็ด (Seed coat) นิวเซลลัส (Nucellus) ชั้นแอลิวโรน (Aleurone) และจมูกข้าวหรือคัพพะของเมล็ดข้าว (germ, embryo) (Orthofer, 2005) รำข้าว ประกอบด้วย 11-15% โปรตีน 34-62% คาร์โบไฮเดรต 7-11% เส้นใย 7-11% ไขมัน 15-22% lipid รำข้าว ได้จากการสีข้าวซึ่งจะได้ประมาณ 8% ของน้ำหนักข้าวเปลือกทั้งหมด (Prasad, Sanjay, Khatokar, Vismaya, & Swamy, 2011) องค์ประกอบของรำข้าวขึ้นอยู่กับแหล่งที่มาของข้าว เทคนิคการสีข้าว และวิธีการทำให้เกิดความเสถียร (stabilization) ของข้าว รำข้าวเป็นแหล่งของสารต้านอนุมูลอิสระธรรมชาติ (natural antioxidant) ที่สำคัญ ได้แก่ โทโคฟีรอล (tocopherol) โทโคไตรอีนอล (tocotrienol) และออริซานอล (oryzanols) รำข้าวสามารถลดระดับคอเลสเตอรอลในเลือดได้โดยเฉพาะในส่วนของ low-density lipoprotein (LDL) ทำให้ลดความเสี่ยงของโรคหัวใจ (Prasad et al., 2011)



ภาพ 1 องค์ประกอบของเมล็ดข้าว (Orthofer, 2005)

ข้าว (*Oryza sativa* Linn.) เป็นผลผลิตทางการเกษตรที่สำคัญของเอเชีย จึงทำให้ข้าวเป็นอาหารที่สำคัญที่สุดของคนในเอเชีย ผลิตภัณฑ์หลักจากการสีข้าวคือเมล็ดข้าว (endosperm) ซึ่งมี

ประมาณ 70% และผลพลอยได้จากการสีข้าวประกอบด้วย แกลบข้าว (rice husk) 20% ซึ่งเป็นเปลือกของข้าวสาร รำข้าว (rice bran) 8% และจมูกข้าว (rice germ) 2% รำข้าวเป็นแหล่งผลิตน้ำมันรำข้าวหรือนำไปขายเป็นอาหารสัตว์ (Hoed et al., 2006) องค์ประกอบทางเคมีส่วนใหญ่ของน้ำมันรำข้าวคือ lipid คิดเป็นปริมาณ 15-22% ในรำข้าว โดยในน้ำมันรำข้าวประกอบด้วย 95.6% Saponifiable lipids อันได้แก่ glycolipid และ phospholipids และส่วนที่เหลือคือ 4.2% Unsaponifiable lipid ได้แก่ Bioactive

Phytochemicals เช่น Tocopherols/Tocotrienols (tocols: 1500-2000 ppm),  $\gamma$ -Oryzanol (10,000-20,000 ppm) และ phytosterols (15,000-20,000 ppm) และ Carotenoids

(Balachandran et al., 2008) Saponifiable lipids ส่วนใหญ่ คือ Triglycerides (TG) ซึ่งถูกไฮโดรไลซิสได้ง่ายหลังการขัดสีโดยมี Lipase enzyme เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาเกิดเป็น Glycerol และกรดไขมันอิสระ โดยน้ำมันรำข้าวที่ใช้สำหรับการบริโภคสามารถมีปริมาณกรดไขมันอิสระได้ไม่เกิน 0.1% โดยน้ำหนัก (Chen et al., 2008)

#### 4.1.2 กระบวนการสกัดน้ำมันรำข้าว

กระบวนการสกัดน้ำมันรำข้าวนั้นประกอบด้วย 2 ขั้นตอนที่สำคัญ คือ การทำเสถียรรำข้าว หรือน้ำมันรำข้าว มีจุดประสงค์เพื่อหยุดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของ Triglycerides เพื่อไม่ให้เกิดเป็นกรดไขมันอิสระ วิธีการที่ใช้โดยทั่วไปคือการอบแห้งและการใช้ไอน้ำ (Amarasinghe & Gangodavilage, 2004) อีกขั้นตอนหนึ่งคือการสกัดเพื่อแยกเอาน้ำมันรำข้าว (Lipid) เพื่อให้ได้ yield สูง มีกรดไขมันอิสระต่ำ การเปลี่ยนแปลงทางเคมีต่ำ มีการเจือปนของไข ยางเหนียว และโลหะต่ำ ซึ่งทำได้ 2 วิธีได้แก่การสกัดด้วยตัวทำละลายและการบีบเย็นหรือการกดอัด

1 กระบวนการสกัดน้ำมันรำข้าวโดยใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ (solvent extraction process)

การใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ในการสกัดน้ำมันรำข้าวนิยมใช้เฮกเซนเป็นตัวสกัด การสกัดด้วยวิธีนี้จะให้ yield สูง (98%) และปฏิบัติการง่าย (Amarasinghe, Kumarasiri, & Gangodavilage, 2009)

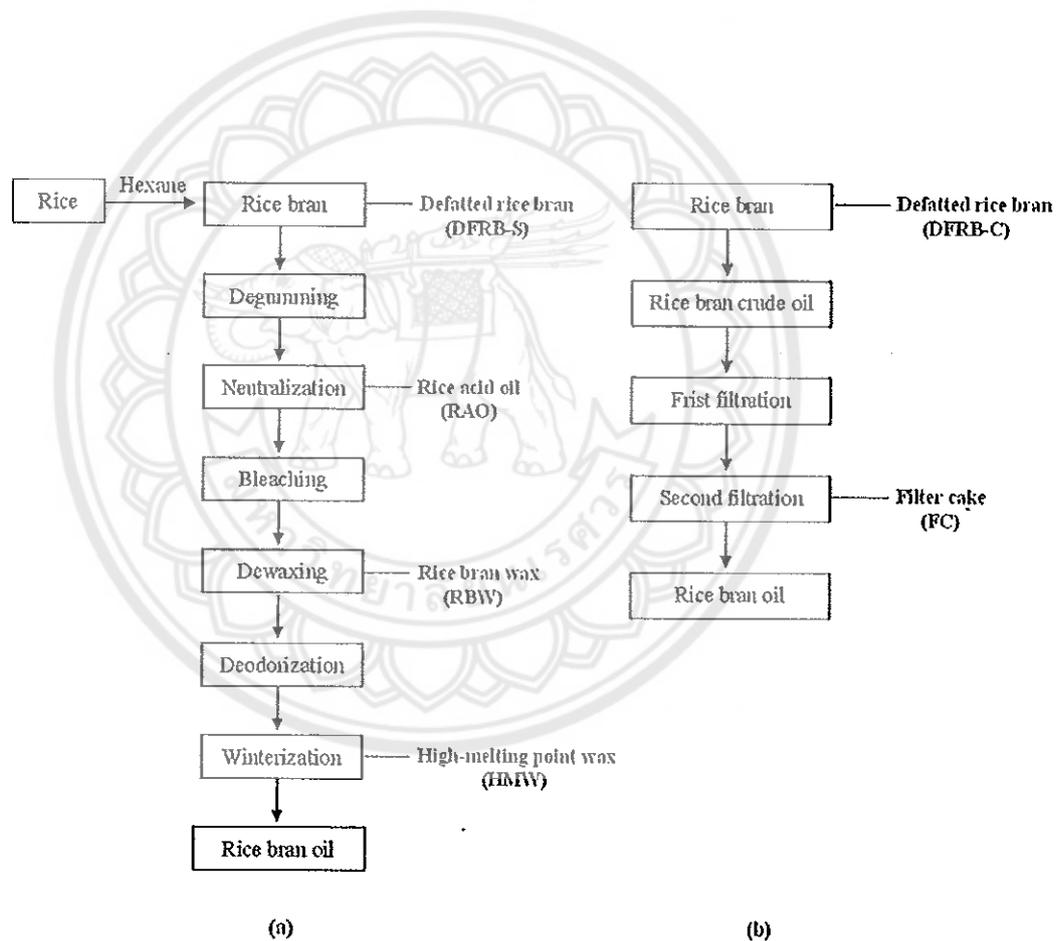
แต่ข้อเสียคือน้ำมันที่สกัดได้จะมีปริมาณกรดไขมัน (3-5%) ไซ (2-4%) และ ยางเหนียว (Phospholipids)

สูง (1-2%) จึงทำให้การสกัดน้ำมันรำข้าวด้วยวิธีนี้จำเป็นต้องผ่านกระบวนการอื่น ๆ ร่วมด้วย

กระบวนการสกัดน้ำมันรำข้าว (extraction) จะเริ่มจากรำข้าวจะถูกสกัดน้ำมันด้วยตัวทำละลาย (hexane) เพื่อสกัดให้น้ำมันในเมล็ดข้าวละลายออกมาผสมกับ hexane น้ำมันดิบที่ปนอยู่กับตัวทำละลาย เรียกว่า miscella จากนั้นทำการระเหยตัวทำละลายออกจากน้ำมันดิบโดยการให้ความร้อนกับ miscella ด้วยเครื่องระเหย evaporator และ stripping column เพื่อจะได้น้ำมันดิบ ต่อมาคือกระบวนการแยกยางเหนียว (degumming) โดยเติมน้ำร้อนและกรด citric หรือ กรด phosphoric แล้วใช้เครื่องเหวี่ยง (centrifuge) เพื่อทำให้ยางเหนียว (gum) ให้ตกตะกอน จะได้น้ำมันดิบและตะกอนยางเหนียว (gum) ต่อมาคือกระบวนการทำให้บริสุทธิ์ (refining) โดยเริ่มจากการทำให้เป็นกลาง (neutralization) เพื่อกำจัดกรดไขมันอิสระ (free fatty acid, FFA) โดยเติมโซดาไฟ (NaOH) ซึ่งเป็นด่าง เพื่อทำปฏิกิริยากับกรดไขมันอิสระ FFA ด้วยปฏิกิริยา saponification ได้สบู่ และทำการแยกเอาสบู่ (Soapstock) ออก (Bhosle & Subramanian, 2005) ต่อมาคือกระบวนการฟอกสี (bleaching) โดยเติมดินฟอกสี (activated carbon หรือ bleaching earth) เพื่อแยกรงควัตถุ (pigments) เช่น คลอโรฟิลล์ (chlorophylls) และแคโรทีนอยด์ (carotenoids) (Orthofer, 2005) กระบวนการต่อมาคือ การกำจัด

ไข (Wax) โดยการ Winterizing เป็นเก็บน้ำมันไว้ที่อุณหภูมิต่ำเพื่อให้ไขมันที่มีจุดหลอมเหลวสูงแยกออก  
 ทำให้น้ำมันที่เหลือมีจุดหลอมเหลวต่ำช่วยป้องกันการขุ่นของน้ำมันหรือการตกผลึกไขมันในระหว่างการ  
 เก็บในอุณหภูมิต่ำ (Pestana, Zambiazzi, Mendonça, Bruscatto, & Ramis-Ramos, 2009) และ  
 ขั้นตอนสุดท้ายคือ การกำจัดกลิ่น (deodorization) โดยการกลั่นที่อุณหภูมิสูง (distillation) ด้วยหอกลั่น

เพื่อกำจัดกลิ่นและกรดไขมันอิสระ (Yang et al., 2010) ดังแสดงในภาพที่ 2a



ภาพ 2 แผนภูมิแสดงกระบวนการผลิตน้ำมันรำข้าว (a) น้ำมันรำข้าวจากกระบวนการสกัดด้วยตัวทำละลาย (b) น้ำมันรำข้าวจากกระบวนการบีบเย็น

จมูกข้าว หรือคัพพะ (Embryo หรือ Germ) รำข้าว และเมล็ดข้าว (Endosperm) ดังแสดงในภาพที่ 1 รำข้าว หมายถึง ส่วนเยื่อหุ้มผล (Pericarp) เยื่อหุ้มเมล็ด (Seed coat) นิวเซลลัส (Nucellus) ชั้นแอลิวโรน (Aleurone) และจมูกข้าวหรือคัพพะของเมล็ดข้าว (germ, embryo) (Orthofer, 2005) รำข้าว

ประกอบด้วย 11-15% โปรตีน 34-62% คาร์โบไฮเดรต 7-11% เส้นใย 7-11% ไขมัน 15-22% lipid รำข้าว

ได้จากการสีข้าวซึ่งจะได้ประมาณ 8% ของน้ำหนักข้าวเปลือกทั้งหมด (Prasad, Sanjay, Khatokar,

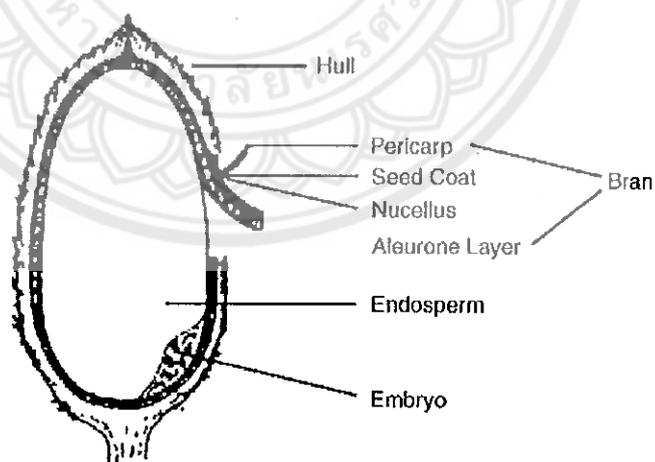
Vismaya, & Swamy, 2011) องค์ประกอบของรำข้าวขึ้นอยู่กับแหล่งที่มาของข้าว เทคนิคการสีข้าว และ

วิธีการทำให้เกิดความเสถียร (stabilization) ของข้าว รำข้าวเป็นแหล่งของสารต้านอนุมูลอิสระธรรมชาติ

(natural antioxidant) ที่สำคัญ ได้แก่ โทโคฟีรอล (tocopherol) โทโคไตรอีนอล (tocotrienol) และโอรี

ซานอล (oryzanols) รำข้าวสามารถลดระดับคอเลสเตอรอลในเลือดได้โดยเฉพาะในส่วนของ low-

density lipoprotein (LDL) ทำให้ลดความเสี่ยงของโรคหัวใจ (Prasad et al., 2011)



ภาพ 1 องค์ประกอบของเมล็ดข้าว (Orthofer, 2005)

ข้าว (*Oryza sativa* Linn.) เป็นผลผลิตทางการเกษตรที่สำคัญของเอเชีย จึงทำให้ข้าวเป็น

อาหารที่สำคัญที่สุดของคนในเอเชีย ผลิตภัณฑ์หลักจากการสีข้าวคือเมล็ดข้าว (endosperm) ซึ่งมี

ประมาณ 70% และผลพลอยได้จากการสีข้าวประกอบด้วย แกลบข้าว (rice husk) 20% ซึ่งเป็นเปลือกของข้าวสาร รำข้าว (rice bran) 8% และจมูกข้าว (rice germ) 2% รำข้าวเป็นแหล่งผลิตน้ำมันรำข้าวหรือนำไปขายเป็นอาหารสัตว์ (Hoed et al., 2006) องค์ประกอบทางเคมีส่วนใหญ่ของน้ำมันรำข้าวคือ lipid คิดเป็นปริมาณ 15-22% ในรำข้าว โดยในน้ำมันรำข้าวประกอบด้วย 95.6% Saponifiable lipids อันได้แก่ glycolipid และ phospholipids และส่วนที่เหลือคือ 4.2% Unsaponifiable lipid ได้แก่ Bioactive

Phytochemicals เช่น Tocopherols/Tocotrienols (tocols: 1500-2000 ppm),  $\gamma$ -Oryzanol (10,000-20,000 ppm) และ phytosterols (15,000-20,000 ppm) และ Carotenoids (Balachandran et al., 2008) Saponifiable lipids ส่วนใหญ่ คือ Triglycerides (TG) ซึ่งถูกไฮโดรไลซิสได้ง่ายหลังการขัดสีโดยมี Lipase enzyme เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาเกิดเป็น Glycerol และกรดไขมันอิสระ โดยน้ำมันรำข้าวที่ใช้สำหรับการบริโภคสามารถมีปริมาณกรดไขมันอิสระได้ไม่เกิน 0.1% โดยน้ำหนัก (Chen et al., 2008)

#### 4.1.2 กระบวนการสกัดน้ำมันรำข้าว

กระบวนการสกัดน้ำมันรำข้าวนั้นประกอบด้วย 2 ขั้นตอนที่สำคัญ คือ การทำเสถียรรำข้าว หรือน้ำมันรำข้าว มีจุดประสงค์เพื่อหยุดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของ Triglycerides เพื่อไม่ให้เกิดเป็นกรดไขมันอิสระ วิธีการที่ใช้โดยทั่วไปคือการอบแห้งและการใช้ไอน้ำ (Amarasinghe & Gangodavilage, 2004) อีกขั้นตอนหนึ่งคือการสกัดเพื่อแยกเอาน้ำมันรำข้าว (Lipid) เพื่อให้ได้ yield สูง มีกรดไขมันอิสระต่ำ การเปลี่ยนแปลงทางเคมีต่ำ มีการเจือปนของไข ยางเหนียว และโลหะต่ำ ซึ่งทำได้ 2 วิธีได้แก่การสกัดด้วยตัวทำละลายและการบีบเย็นหรือการกดอัด

## 1 กระบวนการสกัดน้ำมันรำข้าวโดยใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ (solvent extraction process)

การใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ในการสกัดน้ำมันรำข้าวนิยมใช้เฮกเซนเป็นตัวสกัด การสกัดด้วยวิธีนี้จะให้ yield สูง (98%) และปฏิบัติการง่าย (Amarasinghe, Kumarasiri, & Gangodavilage, 2009)

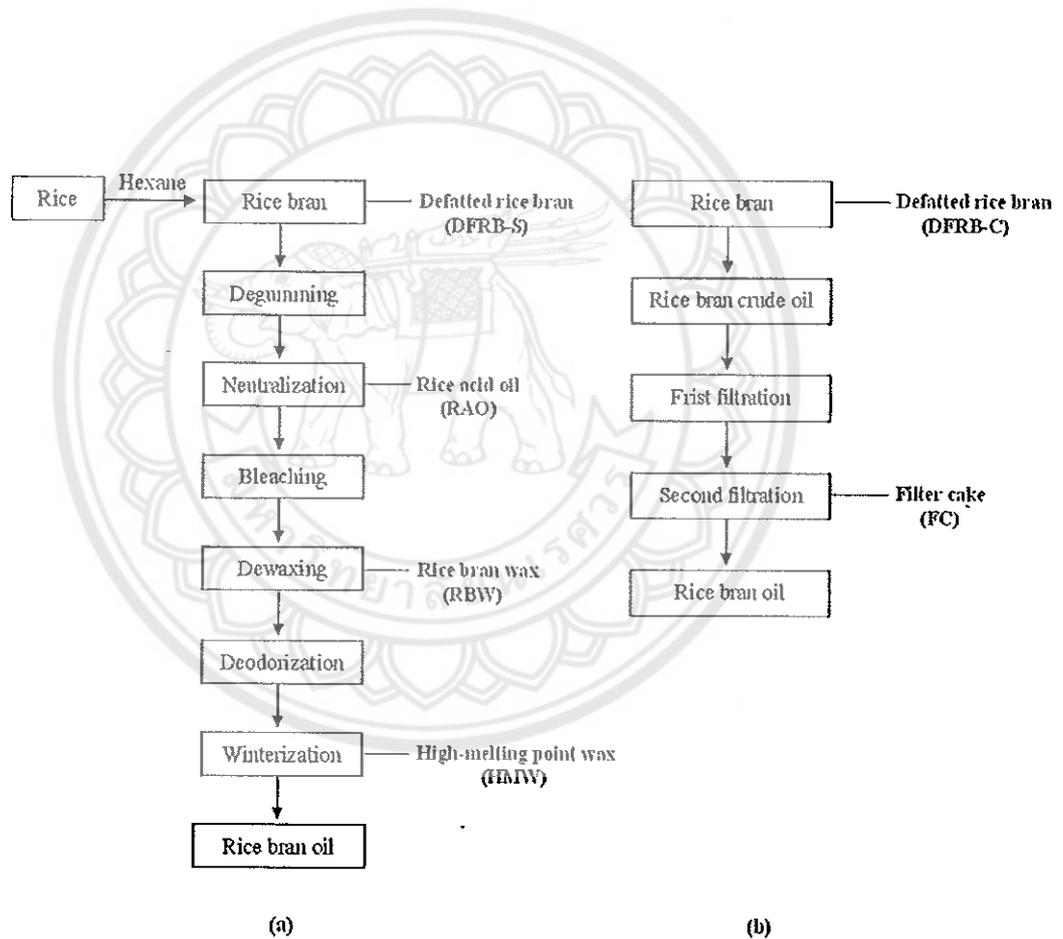
แต่ข้อเสียคือน้ำมันที่สกัดได้จะมีปริมาณกรดไขมัน (3-5%) ไซ (2-4%) และ ยางเหนียว(Phospholipids)

สูง (1-2%) จึงทำให้การสกัดน้ำมันรำข้าวด้วยวิธีนี้จำเป็นต้องผ่านกระบวนการอื่น ๆ ร่วมด้วย

กระบวนการสกัดน้ำมันรำข้าว (extraction) จะเริ่มจากรำข้าวจะถูกสกัดน้ำมันด้วยตัวทำละลาย (hexane) เพื่อสกัดให้น้ำมันในเมล็ดข้าวละลายออกมาผสมกับ hexane น้ำมันดิบที่ปนอยู่กับตัวทำละลาย เรียกว่า miscella จากนั้นทำการระเหยตัวทำละลายออกจากน้ำมันดิบโดยการให้ความร้อนกับ miscella ด้วยเครื่องระเหย evaporator และ stripping column เพื่อจะได้น้ำมันดิบ ต่อมาคือกระบวนการแยกยางเหนียว (degumming) โดยเติมน้ำร้อนและกรด citric หรือ กรด phosphoric แล้วใช้เครื่องเหวี่ยง (centrifuge) เพื่อทำให้ยางเหนียว (gum) ให้ตกตะกอน จะได้น้ำมันดิบและตะกอนยางเหนียว (gum) ต่อมาคือกระบวนการทำให้บริสุทธิ์ (refining) โดยเริ่มจากการทำให้เป็นกลาง (neutralization) เพื่อกำจัดกรดไขมันอิสระ (free fatty acid, FFA) โดยเติมโซดาไฟ (NaOH) ซึ่งเป็นด่าง เพื่อทำปฏิกิริยากับกรดไขมันอิสระ FFA ด้วยปฏิกิริยา saponification ได้สบู่ และทำการแยกเอาสบู่ (Soapstock) ออก (Bhosle & Subramanian, 2005) ต่อมาคือกระบวนการฟอกสี (bleaching) โดยเติมดินฟอกสี (activated carbon หรือ bleaching earth) เพื่อแยกรงควัตถุ (pigments) เช่น คลอโรฟิลล์ (chlorophylls) และแคโรทีนอยด์ (carotenoids) (Orthofer, 2005) กระบวนการต่อมาก็คือ การกำจัด

ไข (Wax) โดยการ Winterizing เป็นเก็บน้ำมันไว้ที่อุณหภูมิต่ำเพื่อให้ไขมันที่มีจุดหลอมเหลวสูงแยกออก  
 ทำให้น้ำมันที่เหลือมีจุดหลอมเหลวต่ำช่วยป้องกันการขุ่นของน้ำมันหรือการตกผลึกไขมันในระหว่างการ  
 เก็บในอุณหภูมิต่ำ (Pestana, Zambiasi, Mendonça, Bruscatto, & Ramis-Ramos, 2009) และ  
 ขั้นตอนสุดท้ายคือ การกำจัดกลิ่น (deodorization) โดยการกลั่นที่อุณหภูมิสูง (distillation) ด้วยหอกลั่น

เพื่อกำจัดกลิ่นและกรดไขมันอิสระ (Yang et al., 2010) ดังแสดงในภาพที่ 2a



ภาพ 2 แผนภูมิแสดงกระบวนการผลิตน้ำมันรำข้าว (a) น้ำมันรำข้าวจากกระบวนการสกัดด้วยตัวทำละลาย (b) น้ำมันรำข้าวจากกระบวนการบีบเย็น

## 2 กระบวนการสกัดน้ำมันรำข้าวโดยการบีบเย็น (cold pressed extraction process)

วิธีการสกัดน้ำมันรำข้าวแบบบีบเย็นจะช่วยรักษาคุณภาพของสารสำคัญในรำข้าวและจมูกข้าวได้อย่างครบถ้วนเป็นวิธีที่ให้น้ำมันที่มีคุณภาพดีที่สุด จึงเป็นวิธีที่เหมาะสมสำหรับการผลิตน้ำมันรำข้าว

และจมูกข้าวเพื่อใช้เป็นผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร และเนื่องจากการผลิตน้ำมันรำข้าวและจมูกข้าวด้วย

กระบวนการบีบเย็นใช้เวลานานและให้ผลผลิตต่ำจึงไม่เป็นที่นิยมในระดับอุตสาหกรรมอาหาร กระบวนการสกัดน้ำมันรำข้าวแบบบีบเย็น เริ่มจากทำการร่อนรำข้าวด้วยตะแกรงร่อนเพื่อนำส่วนที่ไม่ต้องการออก จากนั้นนำรำข้าวที่ได้นำมาบีบอัดด้วยแรงดันผ่านเครื่อง Screw Press โดยมีความร้อนระหว่างการบีบอัดที่ประมาณ 40-70 องศาเซลเซียส น้ำมันรำข้าวที่ผ่านการบีบแล้วจะผ่านกระบวนการกรองโดยการกรองแบบแรงดัน (Filter Press) โดยการกรองด้วยวิธีนี้สามารถกรองได้อย่างรวดเร็ว แต่อาจจะทำให้มีกากรำข้าวติดออกมาพร้อมกับน้ำมันรำข้าวทำให้น้ำมันไม่บริสุทธิ์และทำให้น้ำมันมีกลิ่นหืนได้ง่าย ดังนั้นน้ำมันรำข้าวจึงต้องทำการกรองอีกครั้งผ่านกระดาษกรอง (Filter Paper) ขนาด 2.5 ไมครอน และขั้นตอนสุดท้ายคือการนำน้ำมันรำข้าวที่ได้มาทำการฆ่าเชื้ออีกครั้งโดยการหมุนเหวี่ยงผ่าน UV sterilizer (Moreau & Kamal-Eldin, 2009) ดังแสดงในภาพ 2b การนำของเหลือจากกระบวนการผลิตน้ำมันรำข้าวในขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์เพื่อกำจัดสารที่ไม่ต้องการออกไป ในขณะที่เดียวกันก็ได้สารที่เป็นผลพลอยได้ที่มีคุณค่าซึ่งสามารถนำมาทำให้บริสุทธิ์และเพิ่มมูลค่าได้อีกทั้งนำไปใช้ประโยชน์ต่อได้ ดังแสดงในตาราง 1

ตาราง 1 Steps of chemical refining process for edible refined oil production and by-product

Step	Removable substance	By-product
Degumming	Phospholipids	Lecithin
Neutralization	Free fatty acids	$\gamma$ -Oryzanol
Bleaching	Pigments	
Dewaxing	Wax	Rice bran wax and policosanol
Deodorization	Flavor	Phytosterols and $\gamma$ -oryzanol

ที่มา Lilitchan & Aryasuk (2008)

#### 4.1.3 คุณประโยชน์ของน้ำมันรำข้าว

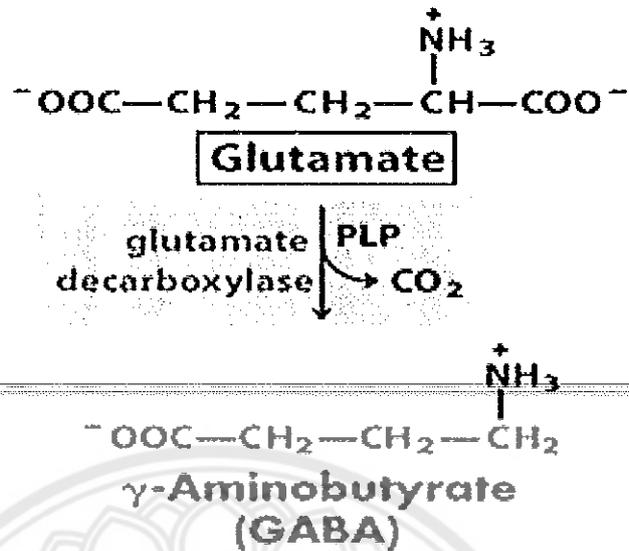
น้ำมันรำข้าวมีสารธรรมชาติในน้ำมันรำข้าวหลายชนิด ได้แก่  $\gamma$ -Oryzanol วิตามินอี กลุ่ม Tocotrienols, phytosterols และมีส่วนช่วยลดโคเลสเตอรอล ชนิดร้าย (LDL) รวมทั้งไตรกลีเซอไรด์ (Triglycerides) ในร่างกาย นอกจากนี้  $\gamma$ -Oryzanol ยังช่วยคงระดับหรือเพิ่มโคเลสเตอรอลชนิดดี (HDL) ในร่างกายด้วยส่งผลให้ช่วยป้องกันโรคหัวใจ และโรคภัยที่เกิดจากหลอดเลือดตีตันจึงช่วยป้องกันโรคที่เกิดจากการตีตันของหลอดเลือดได้ (Nagao et al., 2001) เช่น โรคหัวใจขาดเลือด หัวใจวาย หลอดเลือดตีตัน (Mellen, Walsh, & Herrington, 2008) อัมพฤกษ์ อัมพาต เป็นต้น นอกจากนี้สารต้านอนุมูลอิสระที่มีอยู่ในน้ำมันรำข้าวยังมีฤทธิ์ช่วยป้องกันและยับยั้งการเกิดโรคมะเร็ง (Kannappan, Ravindran, Prasad, Sung, & Yadav, 2010; Sun et al., 2009) ลดการเจริญเติบโตของเนื้องอก (Evans et al., 2010) อีกทั้งยังมีคุณสมบัติช่วยรักษาสมดุลของระบบประสาท บำรุงสมอง เสริมความจำ ป้องกันโรคสมองเสื่อม และโรคอัลไซเมอร์ และคุณสมบัติทางเครื่องสำอางช่วยบำรุงผิวพรรณให้ความชุ่มชื้น ยืดหยุ่นแก่

ผิวหนัง ลดเลือนริ้วรอย (Noboru & Yusho, 1970; Shugo, 1979) และมีส่วนช่วยปรับสมดุลของระบบ  
สตรีวัยทองและช่วยลดอาการร้อนวูบวาบ (Hot flashes) (Murase & Iishima, 1963)

#### 4.2 แกมมาอะมิโนบิวทิเรต ( $\gamma$ -aminobutyrate) หรือกาบา (GABA)

แกมมาอะมิโนบิวทิเรต ( $\gamma$ -aminobutyrate) หรือกาบา (GABA) เป็นกรดอะมิโนที่ผลิต

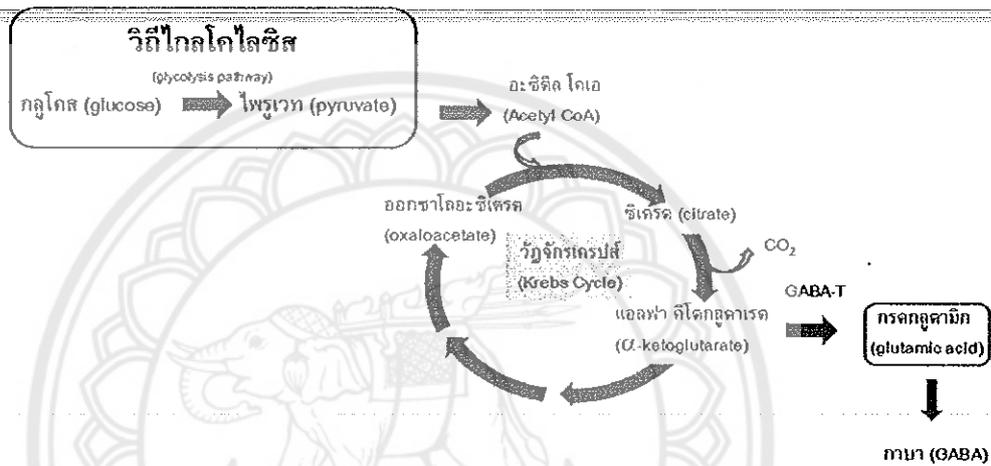
จากกระบวนการดีคาร์บอกซิเลชัน (decarboxylation) ของกรดอะมิโนกลูตามิก (glutamic acid) โดย  
การเร่งของเอนไซม์กลูตาเมตคาร์บอกซิเลส (glutamate decarboxylase) และ ใช้วิตามินบีหกในรูปไพริ  
ดอกซอลฟอสเฟต (pyridoxal phosphate; PLP) เป็นโคแฟกเตอร์ ดังแสดงในภาพ 3 (Lehninger,  
Nelson, & Cox, 1993) กาบามีสูตรโมเลกุลคือ  $C_4H_9NO_2$  น้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 103.12 g/mol มีจุด  
หลอมเหลวที่  $195^{\circ}C$  สาร GABA บริสุทธิ์มีลักษณะเป็นผงผลึกของแข็งสีขาว ละลายในน้ำได้ดีและละลาย  
ได้ในแอลกอฮอล์โมเลกุลเล็ก ๆ บางชนิด อาทิ methanol กับ ethanol แต่จะไม่ละลายในสารประเภท  
Organic solvent (Rodkum, 2011)



ภาพ 3 การสังเคราะห์สารกาบาจากกรดอะมิโนกลูตาเมต (Lehninger et al., 1993)

ปกติร่างกายมนุษย์จะได้รับสารกาบาจาก 2 ทาง คือ 1) จากอาหารที่มีปริมาณสารกาบาสูง ได้แก่ ใบชาแห้ง แดงเมลอน มะเขือเทศ กิมจิ (kimchi) ชอคโกแลต (chocolate) ข้าวกล้องงอก ฟักทอง และเต้าหู้ เป็นต้น และจากการวิเคราะห์สารกาบาที่มีปริมาณอะไมโลสแตกต่างกัน โดยใช้เครื่อง high pressure liquid chromatography (HPLC) พบว่า ปริมาณสารกาบา ในข้าวเจ้าชนิดที่มีอะไมโลสต่ำ (low amylose) อยู่ระหว่าง 31.0-37.2 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม ข้าวเจ้าชนิดอะไมโลสสูง (high amylose) มีอยู่ 21.4-28.8 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม ส่วนข้าวเหนียวมีปริมาณสารกาบาอยู่ในช่วงระหว่าง 29.6-72.8 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม (Tungrakul, 2007) 2) จากการสังเคราะห์ขึ้นเองในร่างกาย โดยการย่อยสลาย น้ำตาลกลูโคสผ่านกระบวนการไกลโคไลซิส เพื่อให้ได้ผลผลิตเป็นสารไพรูเวท จากนั้นสารไพรูเวทจะเข้าสู่วัฏจักรเครปส์ทำให้ได้สารตัวกลางคือ แอลฟา คีโตกลูตาเรต ( $\alpha$ -ketoglutarate) ที่สามารถนำไปใช้สำหรับการสังเคราะห์กรดกลูตามิกที่เป็นสารตั้งต้นสำหรับสารกาบา โดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์

GABA  $\alpha$ -oxoglutarate transaminase (GABA-T) (Olsen & DeLorey, 1999) (ดังแสดงในภาพ 4) โดยจะพบสารกาบาที่ร่างกายสังเคราะห์ขึ้นปริมาณสูงในสมอง ดังนั้นหากร่างกายได้รับกลูโคสก็จะส่งผลให้สมองมีการสร้างสารกาบาอันจะทำให้สมองเกิดการผ่อนคลายได้นอกจากการได้รับจากอาหารอีกทางหนึ่งเช่นกัน



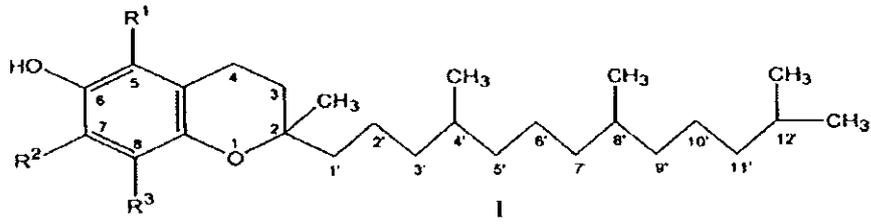
ภาพ 4 การสังเคราะห์สารกาบาจากน้ำตาลกลูโคสผ่านสารตัวกลางจากวัฏจักรเครปส์โดยการทำงานของเอนไซม์ GABA  $\alpha$ -oxoglutarate transaminase (GABA-T) (Thongekkaew, 2015)

GABA มีบทบาทสำคัญในการทำหน้าที่เป็นสารสื่อประสาทชนิดยับยั้ง (inhibitory neurotransmitter) ในระบบประสาทส่วนกลาง เป็นสารสื่อประสาทประเภทสารยับยั้ง (inhibitor) ชนิดที่ผ่านบริเวณเชื่อมต่อระหว่างเซลล์ประสาท จึงทำให้กระแสประสาทผ่านได้น้อยลง เพื่อรักษาสมดุลในสมองที่ได้รับการกระตุ้นทำให้สมองเกิดการผ่อนคลายและนอนหลับสบาย (Petroff, 2002; Schousboe & Waagepetersen, 2007) อีกทั้งยังช่วยกระตุ้นต่อมใต้สมองส่วนหน้า (anterior pituitary gland) ซึ่งทำหน้าที่ผลิตฮอร์โมนช่วยในการเจริญเติบโต (human growth hormone; HGH) ทำให้เกิดการสร้าง

เนื้อเยื่อกล้ามเนื้อ ทำให้กล้ามเนื้อเกิดความกระชับและเกิดสารป้องกันไขมันที่ชื่อ lipotropic ส่งผลในการช่วยป้องกันการสะสมไขมันในร่างกาย (Powers, Yarrow, McCoy, & Borst, 2008) และโรคสูญเสียความทรงจำ (อัลไซเมอร์) (Ito & Ishikawa, 2004) สุกทำช่วยรักษาโรคที่เกี่ยวกับระบบประสาท หรือจิตเภท (Schizophrenia) หลายโรค อาทิเช่น โรควิตกกังวล, โรคนอนไม่หลับ (Abdou et al., 2006; Yoto et al., 2012) เป็นต้น

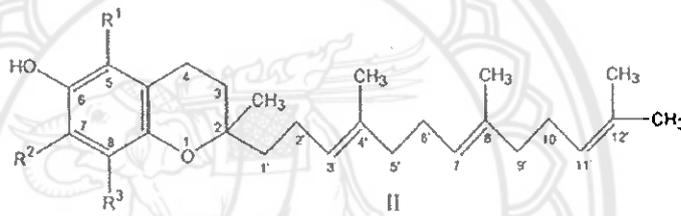
#### 4.3 วิตามินอี (Vitamin E)

วิตามินอี คือ จุลธาตุอาหาร (micronutrient) หรือสารอาหารที่มีความจำเป็นต่อร่างกายที่มีสมบัติด้านอนุมูลอิสระ ละลายได้ดีในไขมันและน้ำมัน วิตามินอีประกอบด้วยอนุพันธ์ของแอลฟา-, เบตา-, แกมมา- และเดลตา-โทโคฟีรอล ( $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - และ  $\delta$ -tocopherol) และอนุพันธ์ของ แอลฟา-, เบตา-, แกมมา- และเดลตา-โทโคไตรีนอล ( $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - และ  $\delta$ -tocotrienol) ดังภาพที่ 5 และ 6 ตามลำดับ ซึ่งในโครงสร้างของวงแหวน 6-chromanol ของกลุ่มโทโคฟีรอลจะถูกแทนที่ด้วยหมู่เมทิล (methyl group) ที่ตำแหน่ง 5, 7 และโดยที่ตำแหน่งที่ 2 เป็น  $C_{16}$  saturated side chain ส่วนกลุ่มโทโคไตรีนอลนั้นจะมีพันธะคู่ที่ตำแหน่ง 3', 7' และ 11' ของ side chain ซึ่งโทโคฟีรอลและโทโคไตรีนอลในรูปแบบเฉพาะต่าง ๆ นั้นจะแตกต่างกันที่จำนวนและตำแหน่งของหมู่เมทิลบนวงแหวน 6-chromanol โดยแอลฟา-โทโคฟีรอลและแอลฟา-โทโคไตรีนอลนั้นจะถูกแทนที่ด้วยหมู่เมทิล 3 หมู่ เบตา-โทโคฟีรอล เบตา-โทโคไตรีนอล แกมมา-โทโคฟีรอล และแกมมา-โทโคไตรีนอลจะถูกแทนที่ด้วยหมู่เมทิล 2 หมู่ และเดลตา-โทโคฟีรอล และเดลตา-โทโคไตรีนอลจะถูกแทนที่ด้วยหมู่เมทิล 1 หมู่ (Eitenmiller & Lee, 2004; Yoshida, Saito, Jones, & Shigeri, 2007)



$R^1 = R^2 = R^3 = H$	Tocol
$R^1 = R^2 = R^3 = CH_3$	$\alpha$ -Tocopherol
$R^1 = R^3 = CH_3; R^2 = H$	$\beta$ -Tocopherol
$R^1 = H; R^2 = R^3 = CH_3$	$\gamma$ -Tocopherol
$R^1 = R^2 = H; R^3 = CH_3$	$\delta$ -Tocopherol

ภาพ 5 แอลฟา-, เบตา-, แกมมา- และเดลตา-โทโคฟีรอล (Eitenmiller & Lee, 2004)



$R^1 = R^2 = R^3 = H$	Tocotrienol
$R^1 = R^2 = R^3 = CH_3$	$\alpha$ -Tocotrienol
$R^1 = R^3 = CH_3; R^2 = H$	$\beta$ -Tocotrienol
$R^1 = H; R^2 = R^3 = CH_3$	$\gamma$ -Tocotrienol
$R^1 = R^2 = H; R^3 = CH_3$	$\delta$ -Tocotrienol

ภาพ 6 แอลฟา-, เบตา-, แกมมา- และเดลตา-โทโคไตรอีนอล (Eitenmiller & Lee, 2004)

วิตามินอีบริสุทธิ์มีลักษณะขุ่นหนืด สีเหลือง ละลายได้ดีในน้ำมัน มีสูตรโมเลกุล  $C_{29} H_{50} O_2$

มวลโมเลกุล 430g/mol (Eitenmiller & Lee, 2004) วิตามินอีเป็นสารต้านอนุมูลอิสระธรรมชาติ ที่มี

บทบาทสำคัญในอุตสาหกรรมอาหาร ยา และเครื่องสำอาง โดยแอลฟา-โทโคฟีรอล เป็นสารต้านอนุมูล

อิสระที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพมากกว่า เบตา-โทโคฟีรอล แอลฟา-โทโคไตรอีนอล แกมมา-โทโคฟีรอล เบตา-โท

โคไตรอีนอล และเดลตา-โทโคฟีรอล ตามลำดับ (Cheong, Tan, Man, & Misran, 2008) ซึ่งในปัจจุบัน

ประเทศไทยต้องนำวิตามินอีเข้าจากต่างประเทศในราคาสูงมาก โทโคฟีรอลและโทโคไตรอีนอลเป็นสารต้านอนุมูลอิสระธรรมชาติที่มีบทบาทสำคัญในการเก็บรักษาอาหารและการป้องกันโรค ซึ่งโทโคฟีรอลและโทโคไตรอีนอลสามารถยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของเอซิลกลีเซอรอล (acylglycerol peroxidation) โดยการจับกับอนุมูลอิสระ สามารถยับยั้งการสังเคราะห์คอเลสเตอรอลในตับมีฤทธิ์เป็นสารต้านมะเร็งเพิ่มระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายและลดการเสื่อมสภาพของเซลล์ โทโคฟีรอลและโทโคไตรอีนอล

ยังทำหน้าที่เป็นสารต่อต้านการจับตัวแข็งของเลือดมีประสิทธิภาพในการฟื้นฟูสภาพผิวหนัง และสามารถป้องกันการเกิดโรคอัลไซเมอร์ในผู้สูงอายุ (Chu, Baharin, & Quek, 2002) นอกจากนี้ยังสามารถสามารถลดการอักเสบอันเนื่องมาจากการบวนการสร้างหลอดเลือดใหม่ของก้อนมะเร็ง (inflammatory angiogenesis) ใน microvascular endothelial cells ของมนุษย์ (Wells et al., 2010) และยังมีคุณสมบัติในการยับยั้งการเกิดเปอร์ออกไซด์ของกรดไขมันไม่อิ่มตัว (polyunsaturated fatty acid) ในเยื่อหุ้มของสิ่งมีชีวิต (biological membrane) (Choi & Lee, 2009)

#### 4.4 แกมมา-โอริซานอล ( $\gamma$ -oryzanol)

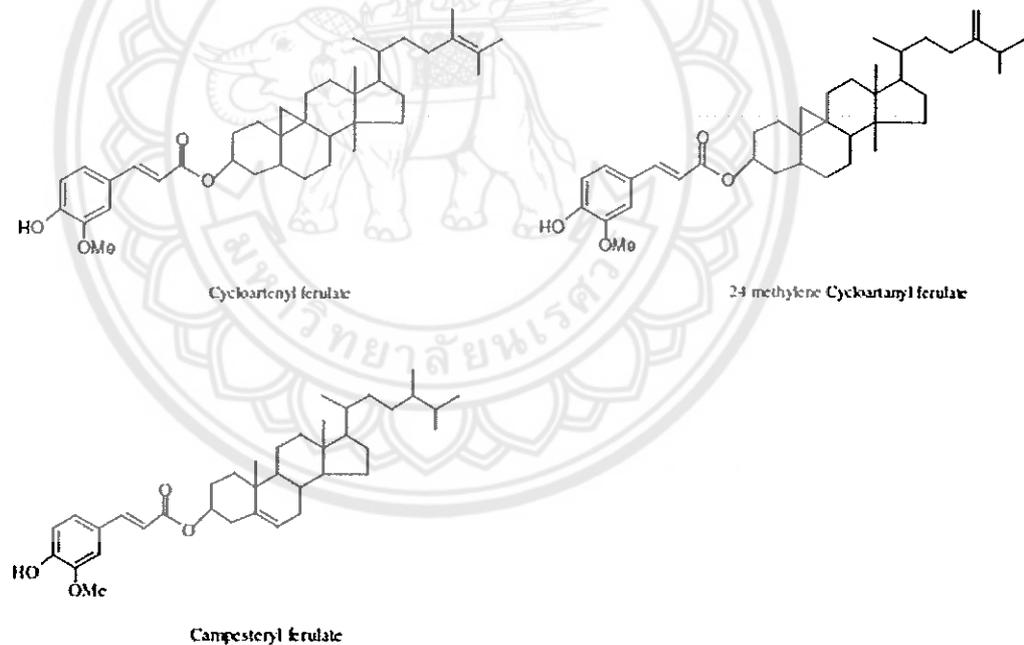
แกมมา-โอริซานอลค้นพบครั้งแรกในน้ำมันรำข้าวในปี ค.ศ. 1954 โดยนักวิทยาศาสตร์ชาวญี่ปุ่นชื่อ Tsuchiya, T. และ Kaneko, R. (Azrina, Maznah, & Azizah, 2008) มีสูตรโมเลกุล คือ  $C_{40}H_{58}O_4$  มวลโมเลกุล 602.9 แกมมา-โอริซานอลบริสุทธิ์จะมีลักษณะเป็นผงสีขาวหรือสีขาวยาวปนเหลืองอ่อน ๆ โปรงคล้ายแป้ง ไม่มีกลิ่น ละลายได้ดีในคลอโรฟอร์ม รองลงมาคืออีเทอร์ ละลายได้เล็กน้อยในเฮปแทนและไม่ละลายในน้ำ มีจุดหลอมเหลวสูงประมาณ  $161.2\text{ }^{\circ}\text{C}$  แต่ไม่ทนต่อแสงแดด (Park et al., 2013) มีทั้งหมด 10 อนุพันธ์ ซึ่งล้วนเป็นอนุพันธ์ของ ferulic acid ในจำนวนนี้มี 3 อนุพันธ์ที่มีความสำคัญในแง่

ของการออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ คือ cycloartenyl ferulate, 24-methylene cycloartenyl ferulate, campesteryl ferulate (Azrina et al., 2008) ดังแสดงในภาพ 7 แกมมา-โอริซานอลเป็นกลุ่มของสารประกอบเอสเทอร์ระหว่างกรดเฟอรูลิก (ferulic acid) และสเตอรอล (sterols) หรือไตรเทอร์ปีนแอลกอฮอล์ (triterpene alcohols) ชนิดต่าง ๆ โดยแกมมา-โอริซานอลเป็นสารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

ตามธรรมชาติเช่นเดียวกับโทโคฟีรอลและโทโคไตรอีนอล แต่มีประสิทธิภาพสูงกว่าวิตามินอี-แอลฟาโทโคฟี

รอล ( $\alpha$ -Tocopherol) ถึง 6 เท่า (D. Huang, Ou, Hampsch-woodill, Flanagan, & Deemer, 2002)

สามารถพบได้ในข้าวและพืชผักบางชนิด โดยพบมากในส่วนของเยื่อหุ้มเมล็ดและจมูกข้าว



ภาพ 7 แสดงโครงสร้าง cycloartenyl ferulate, 24-methylenecycloartenyl ferulate และ campesteryl ferulate (Patel & Naik, 2004)

จากการรวบรวมผลงานวิจัยทางด้านโภชนาการพบว่า การบริโภคโอริซานอลยังสามารถลดระดับคอเลสเตอรอลในเลือด (Gerhardt & Gallo, 1998) ลดการจับตัวของเกล็ดเลือด (Seetharamaiah,

Krishnakantha, & Chandrasekhara, 1990) ช่วยปรับสมดุลของสตรีวัยทอง (Murase & Iishima, 1963) และช่วยเพิ่มปริมาณกล้ามเนื้อ ในปัจจุบันโอรีซานอลยังมีความสำคัญมากขึ้นในการใช้เป็นยา อาหารเสริมสุขภาพและเครื่องสำอางเพราะมีคุณสมบัติที่สำคัญคือ มีประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระ ได้สูง ป้องกันแสงยูวี ทำให้ผิวหนังชุ่มชื้นและต้านการอักเสบ (Brigitte, 1995; Pizzorno, Pizzorno, & Murray, 2002)

#### 4.5 ไฟโตสเตอรอล (Phytosterols)

phytosterol เป็นสารจากธรรมชาติพบได้เฉพาะในพืช มีคุณสมบัติไม่ละลายในน้ำ ละลายได้ในน้ำมันและแอลกอฮอล์ มีโครงสร้างคล้ายกับ cholesterol ของมนุษย์แต่มีโซ่กิ่งที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 17 ต่างจากคอเลสเตอรอล ส่วนสแตนอลเป็นสเตอรอลอิมิตัวที่ไม่มีพันธะคู่อยู่ในโครงสร้างวงแหวน สเตอรอลในธรรมชาติอาจพบทั้งในรูปที่เกิดปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชันกับกรดไขมันหรืออยู่ในรูปแบบอิสระดัง ภาพ 8 ซึ่งแสดงโครงสร้างของสเตอรอลในพืชเปรียบเทียบกับคอเลสเตอรอล กลไกการออกฤทธิ์ของสารไฟโตสเตอรอลคือ สารนี้จะเข้าแข่งขันกับคอเลสเตอรอลในการดูดซึมจากลำไส้เล็ก ส่งผลให้คอเลสเตอรอลจากอาหารในลำไส้เล็กไม่สามารถเข้าสู่ร่างกายได้ จึงทำให้ปริมาณคอเลสเตอรอลในกระแสเลือดลดน้อยลงตามลำดับ โดยสเตอรอลจะถูกดูดซึมพร้อมกับคอเลสเตอรอลโดยเซลล์ลำไส้เล็กซึ่งมีโปรตีน Niemann-Pick C1 like 1 (NPC1L1) ซึ่งสเตอรอลเพียงจำนวนน้อยเท่านั้นที่จะถูกดูดซึม แต่ส่วนใหญ่จะถูกขับออกจากเซลล์ลำไส้เล็กโดย Adenosine-binding cassette G5/8 (ABCG5/8) พร้อมกับคอเลสเตอรอล ดังนั้นเมื่อร่างกายได้รับสเตอรอลมากขึ้นร่างกายก็จะขับคอเลสเตอรอลออกมาจากร่างกายมากขึ้นเช่นกัน (Somseemee, Morakot, & Sittiwet, 2014) phytosterol แบ่งออกเป็น 2 ประเภท หลักคือ 1) plant



สะสมทำให้หลอดเลือดตีบตันเป็นอุปสรรคของการไหลเวียนเลือด (Shaghghi, Abumweis, & Jones, 2013; Talati, Sobieraj, Makanji, Phung, & Coleman, 2010)

#### 4.6 Policosanol (โพลิโคซานอล)

โพลิโคซานอล (policosanol) คือกลุ่มของแอลกอฮอล์สายตรงยาว (long chain aliphatic alcohols) ที่มีความยาวคาร์บอน 20-36 อะตอม ( $C_{20}$ - $C_{36}$ ) (Irmak et al., 2006) โดยมีสารโดโคซานอล (docosanol,  $C_{22}$ ) เตตระโคซานอล (tetracosanol,  $C_{24}$ ) เฮกซะโคซานอล (hexacosanol,  $C_{26}$ ) ออกตะโคซานอล (octacosanol,  $C_{28}$ ) และไตรอะคอนทานอล (triacontanol,  $C_{30}$ ) เป็นองค์ประกอบหลักโดยมีสูตรโครงสร้างทางเคมีของโพลิโคซานอล (Lilitchan & Aryusuk, 2008) ดังแสดงในภาพ 9



ภาพ 9 โครงสร้างทางเคมีของ policosanol (U.S Nation Library of Medicine, 2017)

โพลิโคซานอลพบได้ในไขจากสัตว์และพืชบางชนิด เช่น ไขจากผึ้ง (bees wax) ไขรำข้าว (rice bran wax) ไขอ้อย (sugar cane wax) และไขคาร์นุบา (carnuba wax) เป็นต้น โดยปริมาณและองค์ประกอบของโพลิโคซานอลในไขแต่ละชนิดแตกต่างกันขึ้นอยู่กับวัตถุดิบที่นำมาสกัด เช่น ไขอ้อยมีโพลิโคซานอลที่มีความยาวคาร์บอน 24-34 อะตอม โดยมีออกตะโคซานอล (octacosanol ;  $C_{28}$ ) มากที่สุด 66% (Stuchlík & Žák, 2002) ในไขผึ้งพบโพลิโคซานอลที่มีความยาวคาร์บอน 18-34 อะตอม โดยมีไตรอะคอนทานอล (triacontanol ;  $C_{30}$ ) มากที่สุด 30.2% เป็นต้น (Bogdanov, 2009) ส่วนโพลิโคซานอลที่พบ

ในไขร่าข้าวมีความยาวสายคาร์บอน 22-36 อะตอม (C<sub>24</sub>-C<sub>38</sub>) โดยมีไตรอะโคทานอลมากที่สุดคิดเป็น 24.5 % (Puengtham, Aryasuk, Kittiratanapiboon, Jeyashoke, & Krisnangkura, 2008)

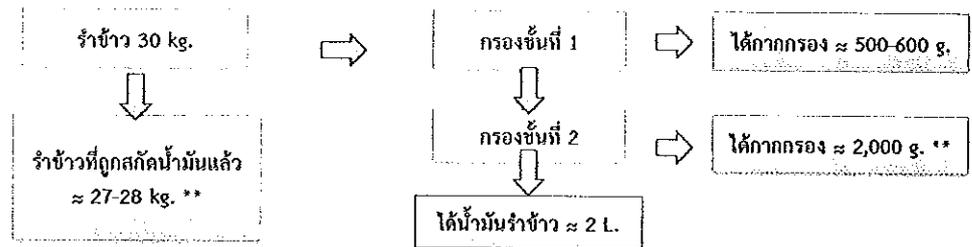
ปัจจุบันนักวิจัยเริ่มให้ความสนใจในการศึกษาถึงประโยชน์ของโพลีโคซานอลซึ่งพบว่าการบริโภค โพลีโคซานอลสามารถลดโคเลสเตอรอลชนิดร้าย (low-density lipoprotein cholesterol; LDL-C) ในขณะที่โคเลสเตอรอลชนิดดีเพิ่มขึ้น (high density lipoprotein cholesterol; HDL-C) (Hargrove, Greenspan, & Hartle, 2004) นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าโพลีโคซานอลสามารถป้องกันและรักษาโรคเกี่ยวกับหลอดเลือดหัวใจ (cardiovascular disease) (Varady, Wang, & Peter J.H. Jones, 2003) ช่วยยับยั้งการสังเคราะห์โคเลสเตอรอล (cholesterol biosynthesis) และเพิ่มการย่อยสลาย LDL (LDL decatabolism) (Menendez et al., 1994) ลดการรวมตัวของเกล็ดเลือด (platelet aggregation) ลดอันตรายของเยื่อหลอดเลือด (endothelial damage) และลดการสร้างโฟมเซลล์ (foam cell formation) (Arruzazabala, 1996; Carbajal, Arruzazabala, Valdés, & Más, 1998) สามารถยังยั้งการเกิดเปอร์ออกซิเดชันของไขมัน ป้องกันการเกิดเปอร์ออกซิเดชันของไลโปโปรตีนทั้งในส่วนของไขมันและโปรตีน (Menendez et al., 1994) และสามารถลดการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันใน LDL (LDL oxidation) (Menéndez et al., 2000; Menéndez, Fraga, Amor, González, & Más, 1999) ซึ่งเป็นสาเหตุนำไปสู่โรค atherosclerosis เป็นต้น สำหรับทางด้านความปลอดภัยของโพลีโคซานอล พบว่าโพลีโคซานอลไม่ก่อให้เกิดความผิดปกติของยีน (mutagen) และไม่เป็นสารก่อมะเร็ง (carcinogen) นอกจากนี้ยังพบว่าโพลีโคซานอลไม่มีพิษต่อยีนทั้งในเซลล์ร่างกายและเซลล์ที่กำลังเจริญเติบโต (Rendon et al., 1992)

## 5. วิธีดำเนินงานวิจัย

### 5.1. วัตถุประสงค์ที่ใช้ในการวิจัย

ในการศึกษาครั้งนี้ใช้ตัวอย่างจาก 2 โรงงานที่ผลิตน้ำมันรำข้าวซึ่งมีความแตกต่างกันในกระบวนการผลิตได้แก่ โรงงานลพบุรีน้ำมันพืชบีบเย็น จังหวัดลพบุรี ซึ่งผลิตน้ำมันรำข้าวแบบสกัดเย็นและน้ำมันที่ได้ไม่ผ่านกระบวนการทำให้บริสุทธิ์ (refining process) และบริษัทน้ำมันรำข้าวสุรินทร์จำกัด จังหวัดบุรีรัมย์ ซึ่งเป็นการผลิตน้ำมันรำข้าวโดยใช้ตัวทำละลายในการสกัดและน้ำมันที่ได้ผ่านกระบวนการทำให้บริสุทธิ์ (refining process) ซึ่งทั้งสองโรงงานมีวิธีการผลิตน้ำมันรำข้าวที่ต่างกัน จึงทำให้มีผลผลิตพลอยได้ที่เหลือจากกระบวนการผลิตแตกต่างกันและปริมาณสารเภสัชกรรมต่างกัน ได้แก่ Gamma - Amino butyric acid, Tocopherol, Tocotrienol, Oryzanol, Sitosterol, Campesterol, Stigmasterol

ผู้วิจัยได้เก็บตัวอย่างและศึกษากระบวนการผลิตน้ำมันของทั้งสองโรงงาน ณ จังหวัดลพบุรีและจังหวัดสุรินทร์ซึ่งกระบวนการผลิตแสดงดังรูปภาพ 10 ดังนี้



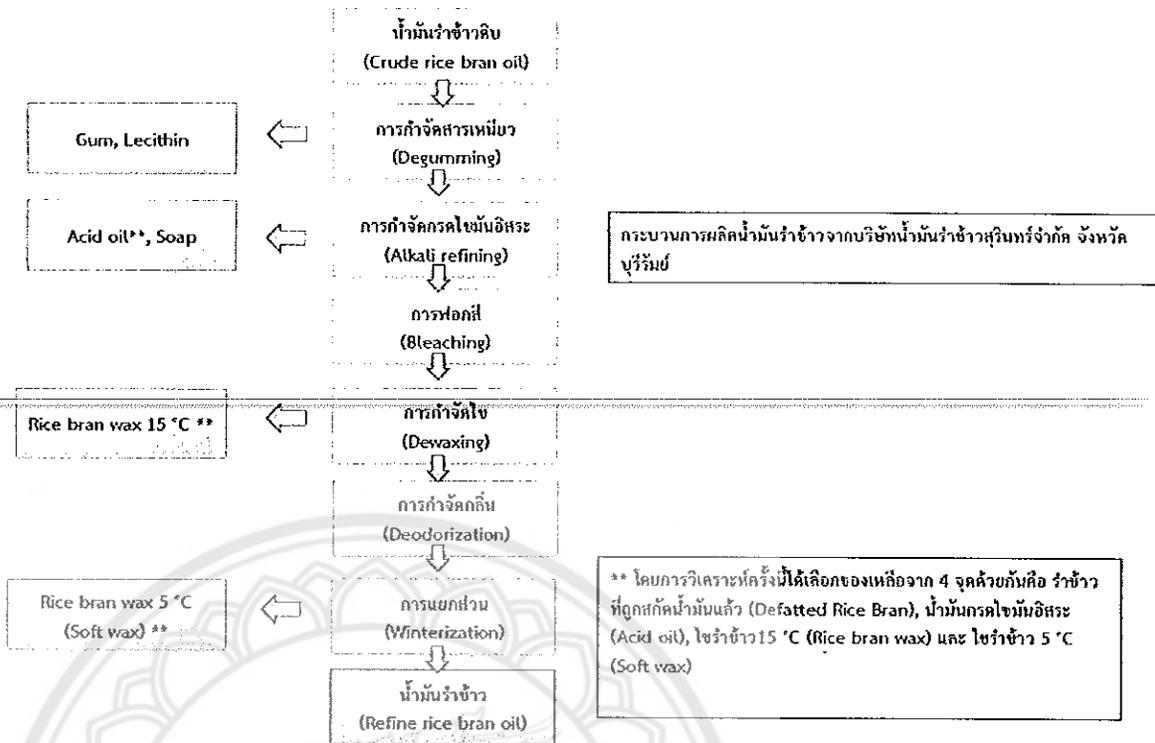
\*\* โดยการวิเคราะห์ครั้งนี้ได้เลือกของเหลือจาก 2 จุดด้วยกันคือ รำข้าวที่ถูกสกัดน้ำมันแล้ว และกากกรองชั้นที่ 2

ภาพ 10 กระบวนการผลิตน้ำมันรำข้าวบิเบียนจากโรงงานลพบุรีน้ำมันพืชบิเบียน จังหวัดลพบุรี

ตัวอย่างจากโรงงานน้ำมันพืชบิเบียน จ.ลพบุรี จำนวน 4 ตัวอย่าง คือ กากกรองชั้นที่ 2 จำนวน 2

lot และ รำสกัด จำนวน 2 lot





ภาพ 11 กระบวนการผลิต และผลิตภัณฑ์ได้จากกระบวนการผลิตน้ำมันรำข้าว บริษัทสุรินทร์

### น้ำมันรำข้าว

ตัวอย่างจากบริษัทน้ำมันรำข้าวสุรินทร์จำกัด จังหวัดบุรีรัมย์ จำนวน 3 ตัวอย่าง คือ รำสกัด, ไขรำ

ข้าว (Rice bran wax) และน้ำมันกรด (Acid oil) ซึ่งของเหลือจากทั้งสองแหล่งมีกระบวนการผลิตดังนี้

ดังนั้นผลิตภัณฑ์ได้จากโรงงานทั้งสองระบบที่ผู้วิจัยรวบรวมได้และใช้ในการศึกษามีจำนวน

ทั้งหมด 7 ตัวอย่างซึ่งทำการสำรวจและเก็บตัวอย่าง 2 ครั้ง วิเคราะห์ความชื้น Association of Official

Analytical Chemists (AOAC) (1995) ตัวอย่างที่ได้

ตารางแสดงตัวอย่างผลิตภัณฑ์ผลพลอยได้ที่เก็บจากโรงงานน้ำมันรำข้าวที่ใช้ในการทดลอง

RBO extraction system	By-products	Abbreviation
<b>Solvent extraction</b>		
	Defatted rice bran	DFRB-S
	Rice acid oil	RAO
	Wax	RBW
	High-melting point wax	HMW
<b>Cold-pressed extraction</b>		
	Defatted rice bran	DFRB-C
	Filtered cake	FC

RBO = rice bran oil

## 5. 2. วิเคราะห์สารเภสัชกรรมในน้ำมันรำข้าวที่ได้

### 5. 2.1. วิเคราะห์กรดแกมมาอะมิโนบิวทริก (GABA)

วิเคราะห์กรดแกมมาอะมิโนบิวทริก (GABA) ด้วยเครื่อง Gas Chromatography –Mass Spectrometry (GC-MS) ดัดแปลงตามวิธีของ Shigematsu et al (2010) โดยตัวอย่าง 3 กรัม และ Ethanol 70%

ปริมาณ 15 mL นำไปแช่เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 3000 rpm ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 นาที และทำ derivatization และ Purification โดยใช้ EZ:faast amino sample test kit for

GC/MS profiling of protein hydrolysates จากบริษัท Phenomenex (Torrance, CA) โดย

สารละลายตัวอย่างปริมาณ 100  $\mu$ l และ internal standard 50  $\mu$ l ผสมด้วยเครื่อง Vortex เป็นเวลา

30 วินาที สกัดด้วยใช้ solid phase extraction GABA ไว้ จากนั้นชะเรซินออกโดยใช้ Reagent (3A+3B)

ปริมาณ 200  $\mu$ l นำสารละลายที่ชะมาได้มา vortex เป็นเวลา 10 วินาที ผสมกับ Chloroform มา 50  $\mu$ l

จากนั้น vortex เป็นเวลา 30 วินาที เติม Iso-octane 90% ที่ผสมกับ Chloroform 10% ปริมาณ 100

$\mu\text{L}$  และนำไป vortex เป็นเวลา 30 วินาที จากนั้นทิ้งไว้เป็นเวลา 2 นาที แล้วจึงเติม Iso-octane 90% ที่ผสม Chloroform 10% ลงไปอีก 100  $\mu\text{L}$  แล้วจึง vortex เป็นเวลา 30 วินาที ตั้งทิ้งไว้จนแยกชั้นแล้วดูดสารละลายส่วนใสมา 150  $\mu\text{L}$  ใส่ในหลอด Insert แล้วปิดฝา

ทำการแยกและหาปริมาณของ GABA ด้วยคอลัมน์ Phenomenex (Zebron ZB-AAA

0.25 mm x 10 m i.d., ฟิล์มหนา 0.25  $\mu\text{m}$ ) ตัวอย่าง (2.0  $\mu\text{L}$ ) ฉีดเข้าเครื่องด้วย Agilent

technologies 7683 auto sampler และ split injector โดยตั้ง split ratio ไว้ที่ 1:15 อุณหภูมิถูก

โปรแกรมไว้ที่ 110  $^{\circ}\text{C}$  จากนั้นอุณหภูมิจะเพิ่มขึ้นทุก 30  $^{\circ}\text{C}$ /นาที จนถึง 300  $^{\circ}\text{C}$  และจะคงที่เป็นเวลา 2

นาที อุณหภูมิ Injector และ detector อยู่ที่ 320  $^{\circ}\text{C}$  flow rate อยู่ที่ 1.1 mL/นาที โดยฮีเลียมเป็นก๊าซ

นำพา และ Norvaline ใช้เป็น internal standard ทำการวิเคราะห์ GABA โดยใช้ retention time ของ

สารมาตรฐานและ literature data (AOCS, 1997)

5.2.2 วิเคราะห์ชนิดปริมาณวิตามินอีประกอบด้วยอนุพันธ์ของแอลฟา-, เบตา-, แกมมา- และ

เดลตา-โทโคเฟอรอล ( $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -, และ  $\delta$ -tocopherol) และ อนุพันธ์ของ แอลฟา-, เบตา-,

แกมมา- และเดลตา-โทโคไตรเอนอล ( $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -, และ  $\delta$ -tocotrienol) ด้วย Reverse-phase

High-performance liquid chromatography (RP-HPLC)

การวิเคราะห์ดัดแปลงจากวิธีของ Azrina et al (2008) และ Chen and Bergman (2005) โดย

ใช้ตัวอย่างจำนวน 1 กรัม เติม Chloroform + Methanol (3:2 v/v) ปริมาณ 15 mL ผสมด้วย Vortex

10 นาที ตั้งทิ้งไว้จนตกตะกอนเป็นเวลา 30 นาที ถึง 1 ชั่วโมง กรองผ่าน filter Nylon ขนาด 0.45

micron ใส่ลงใน micro centrifuged tube ให้มีปริมาณมากกว่า 500  $\mu\text{L}$  เติม mobile phase

(Acetonitrile : Methanol : Isopropanol, 25 : 70 : 5 +0.1 acetic acid) ปริมาณ 500  $\mu$ l ผสมให้

เข้ากัน ทำการการแยกและหาปริมาณ Ts, T3s ด้วย Agilent technologies 1100 Diode Array

Detector (DAD) ตัวอย่างปริมาตร 20  $\mu$ l ฉีดเข้าเครื่องด้วย Agilent technologies 1100 Auto injector

ที่อุณหภูมิ 40 °C ด้วยคอลัมน์ Luna CN 100A (4.6  $\times$  250 mm i.d., ฟิล์มหนา 5  $\mu$ m) mobile phase

ที่ใช้คือ 94% MeOH, 6% Deionized water, flow rate ที่ 1 mL/นาทีเป็นเวลา 12 นาที จากนั้นจะ

เปลี่ยน mobile phase เป็น Acetonitrile : Methanol : Isopropanol, 25 : 70 : 5 +0.1 acetic acid

และคงที่เป็นเวลา 8 นาที Tocopherol และ Tocotrienol ( $\delta$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  และ  $\alpha$  forms) ที่ wavelengths

298, 328 nm

### 5.2.3 วิเคราะห์แกมมาออริซานอล ( $\gamma$ -orizanal) โดย Liquid chromatography-mass

spectrometry (LC-MS)

ดัดแปลงตามวิธีของ Sakunpak et al (2014) โดยใช้ตัวอย่าง 1 กรัม เติม Chloroform +

Methanol (3:2 v/v) ปริมาณ 15 mL ผสมด้วยเครื่อง Vortex 10 นาที ตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 30 นาทีถึง 1

ชั่วโมง กรองผ่าน filter Nylon ขนาด 0.45 micron ให้มีปริมาณมากกว่า 500  $\mu$ l และเติม mobile

phase (Acetonitrile : Methanol : Isopropanol, 25 : 70 : 5 +0.1 acetic acid) ปริมาณ 500  $\mu$ l

ผสมให้เข้ากัน จากนั้นวิเคราะห์หาปริมาณของแกมมาออริซานอลด้วย Agilent technologies 1100

Diode Array Detector (DAD) ต่อเชื่อมกับ Agilent technologies 1100 auto injector และ Agilent

technologies LC/MSD SL ) โดยตัวอย่าง 20  $\mu$ L ฉีดเข้าไปในเครื่องและวิเคราะห์ที่อุณหภูมิ 40 °C ด้วย

คอลัมน์ Agilent Zorbax Eclipse XDB-C18 (4.6  $\times$  150 mm i.d., ฟิล์มหนา 5  $\mu$ m) โดยใช้ mobile

phase คือ acetonitrile, methanol และ isopropanol (25:70:5 v/v) flow rate ที่ 1 mL/นาที ที่ wavelengths 325 nm

#### 5.2.4. วิเคราะห์ชนิดและปริมาณไฟโตสเตอรอล (phytosterol)

วิธีวิเคราะห์ดัดแปลงจากวิธีของ Beveridge et al (2002) โดยการสกัดและการทำอนุพันธ์

trimethyl silyl ether (TMS) ด้วยเครื่อง Gas Chromatography – Mass Spectrometry (GC-MS) โดย

ตัวอย่าง 1 กรัม ผสมกับ Internal standard 0.1% (cholestane) 1 mL จากนั้นเติมโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ (60%) 2 mL, เอทานอล (95%) 2 mL, สารละลายเกลือ (1%) 2 mL และ สารละลาย pyrogallol ในเอทานอล (6%) 5 mL ลงใน Screw tube จากนั้นทำการ Saponification ภายใต้อากาศไนโตรเจน โดยต้ม Screw tube ที่อุณหภูมิ 70°C ใน water bath ทำการ Vertex ทุก ๆ 5 นาที รวมทั้งหมด 45 นาที จากนั้นทำให้เย็นในอ่างน้ำแข็งและเติมสารละลายเกลือ (1%) 15 mL สกัดด้วยสารละลายผสม Hexane + ethylacetate ( 9:1 v/v) ปริมาณ 15 mL โดยสกัดจำนวน 2 ครั้งด้วยกัน เก็บส่วนใสมาทำการระเหยด้วยก๊าซไนโตรเจนที่อุณหภูมิ 45°C จนแห้งสนิท นำตัวอย่างที่ทำแห้งแล้วมาทำ derivatization โดยการเติมสารละลายผสม *N,O*-Bis trifluoro acetamide (BSTFA) – Trimethyl chlorosilane (TMCS) 99:1 ปริมาณ 200  $\mu$ L และ Pyridine 100  $\mu$ L นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 60 °C เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำไปทำแห้งด้วยก๊าซไนโตรเจนนำตัวอย่างที่ทำแห้งแล้วมาละลายด้วย Hexane ปริมาณ 1 mL กรองด้วย Filter Nylon

การแยกและวิเคราะห์ปริมาณสเตอรอลด้วย Gas Chromatography – Mass Spectrometry

(GC-MS) ดัดแปลงจากวิธีของ Thanh et al (2006) การวิเคราะห์ด้วย GC-MS โดยใช้ Agilent

technologies 6890n คอลัมน์ DB-5 ms (0.25 mm x 30 m i.d., ฟิล์มหนา 0.25  $\mu\text{m}$ ) ตัวอย่าง (1  $\mu\text{l}$ ) ถูกฉีดเข้าเครื่องด้วย Agilent technologies 7683 auto sampler และ split injector (split ratio 1:50) อุณหภูมิถูกโปรแกรมไว้ที่ 100  $^{\circ}\text{C}$  เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นอุณหภูมิจะเพิ่มขึ้นทุก 10  $^{\circ}\text{C}$ /นาที จนถึง 300  $^{\circ}\text{C}$  และจะคงที่เป็นเวลา 14 นาที อุณหภูมิ Injector และ detector อยู่ที่ 270  $^{\circ}\text{C}$  flow rate อยู่ที่ 1.5 mL/นาที ฮีเลียมถูกใช้เป็นก๊าซนำพา Cholestane ถูกใช้เป็น internal standard ที่การ

วิเคราะห์เตอรอลโดยใช้ retention time ของสารมาตรฐานและ literature data (AOCS American Oil Chemists Society, 1997)

## 2.5 วิเคราะห์ปริมาณสารโพลีโคซานอลด้วยเครื่อง Gas Chromatography –Mass Spectrometry (GC-MS)

การสกัด PCs จากตัวอย่างที่มีไขมันมากจะทำการสกัดโดยการดัดแปลงวิธีของ Ishaka et al (2014) โดยใช้ตัวอย่างปริมาณ 1 กรัม ใส่ในหลอด polypropylene แล้วทำการ hydrolyzed ด้วย 10 mL 0.2 M NaOH (น้ำ: methanol 3:1 v/v) จากนั้นนำไป sonicate ด้วยเครื่อง Branson 8510 (Branson Ultrasonics Co., Connecticut, USA) ที่ 44 Hz, 250 W, อุณหภูมิ 60 $^{\circ}\text{C}$  เป็นเวลา 90 นาที จากนั้นนำสารที่ได้ไปสกัดด้วย toluene และทำให้เย็นที่อุณหภูมิ 2 $^{\circ}\text{C}$  แล้วจึงนำไปปั่นเหวี่ยง ที่ 4,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที ตูดส่วนใสแล้วกรองด้วย 0.45  $\mu\text{m}$  filter การสกัด PCs จากตัวอย่างที่มีไขมันต่ำ จะทำการสกัดโดยการดัดแปลงวิธีของ Asikin et al. (2008) ซึ่งจะทำการสกัดด้วย Soxhlet extractor โดยตัวอย่าง 5 g ใน thimbles (Whatman 33 mmx100 mm) ทำการสกัดด้วย 250 mL ของตัวทำละลายผสมของ hexane: methanolเป็นเวลา 12 ชั่วโมง จากนั้นทำการระเหยด้วย rotary evaporator

ที่อุณหภูมิ 40°C ตัวอย่างที่แห้งแล้วจะถูกชะด้วย toluene ปริมาณ 5 mL แล้วกรองด้วย 0.45  $\mu\text{m}$  filter การทำอนุพันธ์สำหรับการวิเคราะห์ PCs โดยการดัดแปลงวิธีของ Asikin et al. (2008) ตัวอย่างปริมาณ 200  $\mu\text{L}$  ผสมรวมกับ *N,O*-bis(trimethylsilyl)-trifluoroacetamide (BSTFA) with 1% trimethylchlorosilane (TMCS) ปริมาณ 100  $\mu\text{L}$  จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 50 °C เป็นเวลา 30 นาที

~~การแยกและหาปริมาณของ PCs จากการดัดแปลงวิธีของ Asikin et al. (2008) โดยการวิเคราะห์~~

ด้วย GC-MS โดยใช้ Agilent technologies 6890n คอลัมน์ DB-5ms (0.25 mm x 30 m i.d., ฟิมล์หนา 0.25  $\mu\text{m}$ ) โดย GC injector และ flame ionized detector จะถูกตั้งที่อุณหภูมิ 350°C ตัวอย่าง (1  $\mu\text{L}$ ) ฉีดเข้าเครื่องด้วย Agilent technologies 7683 auto sampler และ split injector (split ratio 1:10) อุณหภูมิถูกโปรแกรมไว้ที่ 150 °C จากนั้นอุณหภูมิจะเพิ่มขึ้นทุก 4 °C/นาที จนถึง 320 °C และจะคงที่เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นตัวอย่าง 0.3  $\mu\text{L}$  จะถูกฉีดเข้า MS detection (split ratio 1:10) ส่วน electron impact (EI) ion source และ transfer line จะถูกตั้งอุณหภูมิไว้ที่ 200 และ 280°C ionization energy ถูกตั้งที่ 70 eV. วิธีนี้ถูกใช้เป็นก้ำก้ำนำพาและทำการอ้างอิงผลวิเคราะห์ PCs โดยใช้ retention time ของสารมาตรฐานและ literature data

### การวิเคราะห์ข้อมูล

การศึกษาระดับปริญญาโททางกายภาพและเคมีของน้ำตาลอ้อยผางวางแผนการทดลองแบบfactorial in CRD  $3 \times 1 \times 3$  คือ ผงฟู 3 ระดับ น้ำตาลทราย 1 ระดับ และเวลาในการอบ 3 ระดับ การศึกษาอายุการเก็บผลิตภัณฑ์ในบรรจุภัณฑ์ 2 ชนิดวางแผนการทดลองแบบPaired Sample T-Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูปSPSS version 17.0



## 6. ผลการทดลอง

มีรายงานวิจัยได้แสดงถึงความสัมพันธ์ของสารพฤกษเคมีในพืชกับการส่งเสริมสุขภาพของผู้บริโภค ซึ่งทำให้เกิดการพัฒนาทางของอุตสาหกรรมสาร โภชนเภสัช (nutraceutical) ผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร (dietary supplement) และอาหารฟังก์ชัน (functional food) ผลิตผลพลอยได้จากโรงงานอุตสาหกรรมอาหารมีศักยภาพในการพัฒนาเป็น functional ingredients และผลิตผลพลอยได้จากโรงงานน้ำมันรำข้าวโดยเฉพาะในทวีปเอเชีย นับเป็นแหล่งที่สำคัญของสารโภชนเภสัช ดังนั้นงานวิจัยจึงมีวัตถุประสงค์เพื่อเปรียบเทียบสารโภชนเภสัชในผลิตผลพลอยได้จากโรงงานน้ำมันรำข้าวทั้งระบบใช้ตัวทำละลายในการสกัด และแบบบีบเย็น ตัวอย่างผลิตผลพลอยได้จากทั้งหมด 7 ตัวอย่าง แบ่งเป็น จากบริษัทน้ำมันรำข้าวสุรินทร์ จำกัด จังหวัดบุรีรัมย์ จำนวน 3 ตัวอย่าง คือ รำสกัด, ไซรำข้าว (Rice bran wax) และน้ำมันกรด (Acid oil) ตัวอย่างจากโรงงานน้ำมันพืชบีบเย็น จ.ลพบุรี จำนวน 4 ตัวอย่าง คือ กากกรองชั้นที่ 2 จำนวน 2 lot และ รำสกัด จำนวน 2 lot ดังนั้นผลิตผลพลอยได้จากโรงงานทั้งสองระบบที่ผู้วิจัยรวบรวมได้และใช้ในการศึกษามีจำนวนทั้งหมด 7 ตัวอย่าง

### 6.1 ปริมาณ GABA ของผลิตผลพลอยได้จากกระบวนการผลิตน้ำมันรำข้าว

ตาราง 1 แสดงปริมาณ GABA ในผลิตผลพลอยได้จากกระบวนการผลิตน้ำมันรำข้าวได้แก่ รำสกัดจากการบีบเย็น (DFRB-C) กากกรองจากการบีบเย็น (FC) รำสกัดจากการใช้ตัวทำละลาย (DFRB-S) ไซรำข้าวจากการใช้ตัวทำละลาย (RBW) น้ำมันกรดจากการใช้ตัวทำละลาย (RAO) และ ไซรำข้าวโมเลกุลสูง (HMW) ผลการทดลองพบว่าปริมาณกาบาสูงที่สุดพบใน DFRB-S คือที่ 97.36 mg/100g ตามมาด้วยใน

FC คือที่ 17.17 mg/100g) และ DRFB-C ที่ 12.04 mg/100g จากผลการทดลองพบว่าการสกัดน้ำมันรำข้าวด้วยระบบการใช้ตัวทำละลายทำให้เกิดการสูญเสียกาบาในรำสกัดมากกว่าการใช้การใช้น้ำมันรำข้าวสารกาบาเป็นกรดอะมิโนที่มีขี้และสามารถละลายในตัวทำละลายที่มีขี้ ดังนั้นกาบาจึงไม่สามารถสกัดได้ดีด้วยตัวทำละลายที่ไม่มีขี้ดังเช่นที่ใช้ในระบบผลิตน้ำมันรำข้าวซึ่งใช้เฮกเซนในการสกัดดังนั้นกาบาจึงคงเหลืออยู่ในรำสกัดเป็นจำนวนมาก ซึ่งผลการทดลองสอดคล้องกับ ผลิตผลพลอยได้ RAO RBW และ

HMW ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ที่มีขี้ต่ำ

**Table 1 - Moisture contents and GABA contents of DFRB-C, FC, DFRB-S, RAO, RBW and HMW**

By-products	Moisture content (%)	GABA (mg/100g)	
		Wet weight	Dried weight
DFRB-C	6.35±0.13 <sup>b</sup>	11.22±0.10 <sup>c</sup>	12.04±0.11 <sup>c</sup>
FC	2.87±0.10 <sup>c</sup>	16.60±0.22 <sup>b</sup>	17.18±0.23 <sup>b</sup>
DFRB-S	8.95±0.09 <sup>a</sup>	88.65±1.11 <sup>a</sup>	97.37±1.22 <sup>a</sup>
RAO	1.84±0.09 <sup>d</sup>	ND	ND
RBW	0.50±1.09 <sup>c</sup>	ND	ND
HMW	0.69±0.07 <sup>c</sup>	ND	ND

Each value represents the mean ±S.D.

ND indicated amount of detection lower than LOD.

Values with different superscript letters in a column are significantly different ( $P < 0.05$ ).

LOD = 1.08 ppm.

## 6.2 ปริมาณแกมมาโอริซานอล วิตามินอีและไฟโตสเตอรอลของผลิตผลพลอยได้จาก

กระบวนการผลิตน้ำมันรำข้าว

ปริมาณแกมมาโอริซานอลที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วย LC-MS แสดงในตาราง 2 ชนิดของแกมมาโอ

ริซานอลที่ตรวจพบคือ cycloartenyl ferulate (m/z 601.3), 24-methylene cycloartenyl ferulate

(m/z 615.3), campesteryl ferulate (m/z 575.3) และ  $\beta$ -sitosterol ferulate (m/z 589.3) ดังแสดง

ในภาพ 12 ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองของ Pestana และคณะ (2009) โดยทั่วไปแกมมาโอริซานอล

ประกอบด้วยเอสเทอร์ของทรานส์กรดเฟอรูลิกกับไฟโตสเตอรอลได้แก่ cycloartenol,  $\beta$ -sitosterol, 24-methylenecycloartenol และ campesterol

ปริมาณแกมมาโอริซานอลที่พบมากคือใน RAO ที่ 3,901.6 mg/100g ตามด้วยกากกรองจากการบีบเย็น (FC) ที่ 1,058.3 ,g/100g และ RBW ที่ 862.8 mg/100g (ตาราง 2) ชนิดของแกมมาโอริซานอลที่

พบเป็นหลักใน RAO คือ cycloartenyl ferulate และ 24-methylene cycloartenyl ferulate จากผล

การทดลองในขั้นตอน neutralization ในการผลิตน้ำมันรำข้าวของระบบที่ใช้ตัวทำละลายในการสกัดเป็น

ขั้นตอนที่ทำให้ เกิดการสูญเสีย แกมมาโอริซานอล จากน้ำมันไปในการผลิตผลพลอยได้ RAO ซึ่งผลการทดลอง

สอดคล้องกับผลการทดลองของ Pestana และคณะ ที่พบว่าปริมาณแกมมาโอริซานอล เกือบทั้งหมดจะถูก

ตกตะกอนในขั้นตอนการทำให้เป็นกลาง (neutralization step) ด้วยด่าง Yoon และ Kin รายงานการ

สูญเสียปริมาณแกมมาโอริซานอลเมื่อใช้ caustic soda หรือ ตัวทำละลาย solvents และไอน้ำในขั้นตอน

การทำน้ำมันรำข้าวให้บริสุทธิ์ในการกำจัดกรดไขมันอิสระ ด้วยเช่นกันโดยทำให้เกิดการสูญเสียถึงร้อยละ

12-59

ปริมาณวิตามินอีทั้งในรูปของ tocotrienol (T3s) และ tocopherol (Ts) แสดงในตาราง 2

ปริมาณสูงสุดของวิตามินอีพบใน RAO ที่ 120.6 mg/100g และพบต่ำสุดในรำสกัดที่ใช้ตัวทำละลาย

(DFRB-S)ที่ 6.5 mg/100g และ tocotrienol (T3s) เป็นรูปแบบของวิตามินอีที่พบเป็นหลักในผลิตภัณฑ์

ผลอยได้จากการผลิตน้ำมันรำข้าวเมื่อเปรียบเทียบกับรูปของ tocopherol (Ts) ปริมาณวิตามินอีในรูป

tocotrienol (T3s) สูงสุดพบใน RAO คือที่ 106 mg/100g รองลงมาคือ FC ที่ 97.4 mg/100g วิตามินอี

ในรูป tocopherol (Ts) ก็พบปริมาณสูงสุดใน RAO ที่ 60 mg/100g ซึ่งปริมาณวิตามินอี ในรูปดังกล่าว

เป็นปริมาณมากกว่าที่พบในน้ำมันรำข้าว (53 mg/100g) ไอโซฟอร์ม tocotrienol (T3s) ที่พบมากที่สุด คือ แกมมา-T3s ซึ่งพบปริมาณ 86.01 mg/100 g ใน RAO รองลงมาคือในรูป  $\alpha$ -T3s ซึ่งพบเป็นปริมาณ 18.45 mg/100 g ใน RBW

รำสกัดจากการใช้การบีบเย็นมีปริมาณแกมมาโอริซานอล (229.76 mg/100 g) และปริมาณวิตามินอีทั้งหมด (28.25 mg/100 g) มากกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับรำสกัดจากการใช้ตัวทำละลายในการสกัดน้ำมัน โดยทั่วไปพบน้ำมันรำข้าวประกอบด้วย แกมมา-oryzanol ที่ 1,599-1,666 mg/100 g และ วิตามินอีทั้งในรูป tocopherol และ tocotrienol ที่ 53 mg/100 g และ 82.5 mg/100 g ตามลำดับ ดังนั้นการสกัดน้ำมันรำข้าวด้วยตัวทำละลายซึ่งมีประสิทธิภาพในการสกัดน้ำมันแต่ในขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์ (refining process) ซึ่งมีหลายขั้นตอนเป็นปัจจัยสำคัญที่ทำให้เกิดการสูญเสียสารโภชนาจากน้ำมันรำข้าวไปสู่ผลิตภัณฑ์จากกระบวนการ เช่น RAO รำสกัดด้วยวิธีบีบเย็นน้ำมันรำข้าวเป็นผลิตภัณฑ์ได้ที่น่าสนใจในด้านการเป็นแหล่งของสารแกมมาโอริซานอลและปริมาณวิตามินอี

**Table 2 -  $\gamma$ -oryzanol, tocotrienol, tocopherol, and phytosterol contents of DFRB-C, FC, DFRB-S, RAO, RBW and HMW**

Chemical constituents	Types of by-products					
	DFRB-C	FC	DFRB-S	RAO	RBW	HMW
$\gamma$ -oryzanol (mg/100g)	229.76 $\pm$ 1.52d	1,058.28 $\pm$ 24.86b	39.39 $\pm$ 0.16e	3,901.59 $\pm$ 4.08a	862.80 $\pm$ 5.52c	35.38 $\pm$ 0.03e
<b>Tocotrienol</b>						
$\alpha$ -T3s	2.77 $\pm$ 0.10 <sup>c</sup>	8.51 $\pm$ 0.33 <sup>c</sup>	0.72 $\pm$ 0.01 <sup>f</sup>	14.73 $\pm$ 0.46 <sup>b</sup>	18.45 $\pm$ 0.30 <sup>a</sup>	5.38 $\pm$ 0.24 <sup>d</sup>
$\beta$ -T3s	ND	ND	ND	ND	ND	ND
$\gamma$ -T3s	19.45 $\pm$ 0.03 <sup>b</sup>	86.74 $\pm$ 0.99 <sup>a</sup>	2.85 $\pm$ 0.02 <sup>d</sup>	86.00 $\pm$ 0.79 <sup>a</sup>	17.38 $\pm$ 0.09 <sup>c</sup>	17.07 $\pm$ 0.04 <sup>c</sup>
$\delta$ -T3s	0.91 $\pm$ 0.07 <sup>d</sup>	2.12 $\pm$ 0.01 <sup>b</sup>	0.62 $\pm$ 0.05 <sup>e</sup>	6.19 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>	1.48 $\pm$ 0.07 <sup>c</sup>	0.92 $\pm$ 0.01 <sup>d</sup>
<b>Total T3s</b>	<b>23.14<math>\pm</math>0.01<sup>d</sup></b>	<b>97.38<math>\pm</math>1.33<sup>b</sup></b>	<b>4.20<math>\pm</math>0.08<sup>e</sup></b>	<b>106.93<math>\pm</math>1.25<sup>a</sup></b>	<b>37.33<math>\pm</math>0.46<sup>c</sup></b>	<b>23.38<math>\pm</math>0.18<sup>d</sup></b>
<b>Tocopherol</b>						
$\alpha$ -Ts	3.02 $\pm$ 0.18 <sup>c</sup>	8.27 $\pm$ 0.04 <sup>a,b</sup>	3.60 $\pm$ 2.81 <sup>c</sup>	9.33 $\pm$ 0.34 <sup>a</sup>	5.47 $\pm$ 0.17 <sup>b,c</sup>	ND
$\beta$ -Ts	ND	ND	ND	ND	1.35 $\pm$ 0.10 <sup>b</sup>	0.96 $\pm$ 0.05 <sup>a</sup>
$\gamma$ -Ts	1.57 $\pm$ 0.07 <sup>c</sup>	6.32 $\pm$ 0.27 <sup>a</sup>	0.76 $\pm$ 0.04 <sup>f</sup>	3.28 $\pm$ 0.11 <sup>d</sup>	3.89 $\pm$ 0.13 <sup>b</sup>	3.64 $\pm$ 0.08 <sup>c</sup>
$\delta$ -Ts	ND	ND	ND	1.03 $\pm$ 0.02 <sup>a</sup>	0.95 $\pm$ 0.01 <sup>b</sup>	0.67 $\pm$ 0.01 <sup>c</sup>
<b>Total Ts</b>	<b>4.60<math>\pm</math>0.19<sup>c</sup></b>	<b>14.59<math>\pm</math>0.20<sup>a</sup></b>	<b>4.37<math>\pm</math>2.77<sup>c</sup></b>	<b>13.65<math>\pm</math>0.47<sup>a,b</sup></b>	<b>11.67<math>\pm</math>0.13<sup>b</sup></b>	<b>5.29<math>\pm</math>0.13<sup>c</sup></b>
<b>Total (T3s+Ts)</b>	<b>28.25<math>\pm</math>0.20<sup>d</sup></b>	<b>112.42<math>\pm</math>1.35<sup>b</sup></b>	<b>6.47<math>\pm</math>0.27<sup>c</sup></b>	<b>120.59<math>\pm</math>1.72<sup>a</sup></b>	<b>49.00<math>\pm</math>0.33<sup>c</sup></b>	<b>28.67<math>\pm</math>0.31<sup>d</sup></b>
<b>Phytosterol (mg/100g)</b>						
Campesterol	0.47 $\pm$ 0.14 <sup>c</sup>	52.38 $\pm$ 2.69 <sup>b</sup>	0.34 $\pm$ 0.01 <sup>c</sup>	151.23 $\pm$ 3.27 <sup>a</sup>	0.73 $\pm$ 0.04 <sup>c</sup>	0.50 $\pm$ 0.12 <sup>c</sup>
Stigmasterol	2.61 $\pm$ 0.03 <sup>d</sup>	60.41 $\pm$ 2.80 <sup>b</sup>	0.74 $\pm$ 0.01 <sup>d</sup>	97.53 $\pm$ 2.41 <sup>a</sup>	21.77 $\pm$ 0.86 <sup>c</sup>	19.17 $\pm$ 0.89 <sup>c</sup>
$\beta$ -Sitosterol	1.64 $\pm$ 0.54 <sup>d</sup>	118.02 $\pm$ 6.38 <sup>b</sup>	0.38 $\pm$ 0.01 <sup>d</sup>	317.95 $\pm$ 4.76 <sup>a</sup>	66.83 $\pm$ 1.43 <sup>c</sup>	68.88 $\pm$ 1.49 <sup>c</sup>
Sitostanol	0.69 $\pm$ 0.20 <sup>d</sup>	13.15 $\pm$ 1.36 <sup>b</sup>	0.27 $\pm$ 0.01 <sup>d</sup>	32.68 $\pm$ 1.17 <sup>a</sup>	3.86 $\pm$ 0.77 <sup>c</sup>	4.21 $\pm$ 0.17 <sup>c</sup>
<b>Total</b>	<b>5.43<math>\pm</math>0.86<sup>d</sup></b>	<b>243.98<math>\pm</math>13.24<sup>b</sup></b>	<b>1.75<math>\pm</math>0.01<sup>d</sup></b>	<b>599.40<math>\pm</math>11.62<sup>a</sup></b>	<b>93.20<math>\pm</math>1.38<sup>c</sup></b>	<b>92.77<math>\pm</math>2.08<sup>c</sup></b>

Each value represents the mean  $\pm$ S.D.

Values in the table are expressed on a dry basis.

ND = amount detected lower than LOD.

LOD = 0.47 ppm. ( $\beta$ -T3s), 0.89 ppm. ( $\alpha$ -Ts), 0.40 ppm. ( $\beta$ -Ts), 0.49 ppm. ( $\delta$ -Ts). LOD = 0.08 ppm (campesterol), 0.03 ppm (stigmasterol), 0.20 ppm ( $\beta$ -sitosterol), 0.03 ppm sitostanol.

Values with different superscript letters in a row are significantly different ( $P < 0.05$ ).

ปริมาณ phytosterol ของผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการผลิตน้ำมันรำข้าวแสดงในตาราง 3 และโครมา

โตแกรมของ phytosterol แสดงในภาคผนวก ข. ผลการวิเคราะห์พบพีค 5 พีค ได้แก่ cholestane

(internal standard) (peak 1 tR 20.38 min), campesterol (peak 2,tR 23.43 min), stigmasterol

(peak 3,tR 23.68 min),  $\beta$ -sitosterol (peak 4,tR 24.35min) และ sitostanol (peak 5,tR

24.51min) ตำแหน่งของพีคคือ cycloartenyl ferulate (1), 24-methylene cycloartenyl ferulate (2), campesteryl ferulate (3),  $\beta$ -sitosteryl ferulate (4).

ปริมาณ phytosterol ทั้งหมดพบสูงสุดโน RAO ที่ 599.40 mg/ 100 g ลอดลงมาได้แก่ FC ที่ 243.98 mg/100g และไอโซฟอร์มที่พบเป็นหลักคือ  $\beta$ -sitosterol ตามด้วย stigmasterol และ

campesterol ซึ่งผลการทดลองสรุปได้ว่า RAO จากการสกัดน้ำมันด้วยตัวทำละลายและ FC จากการบีบ เย็นเป็นแหล่งที่สำคัญของ phytosterol

**Table 3 - Policosanol contents in residues form two different RBO process, obtained using GC-MS**

PCs (mg/100g)	Types of sample					
	DFRB-C	FC	DFRB-S	RAO	RBW	HMW
Docosanol (C22)	5.08±0.02 <sup>c</sup>	3.75±0.11 <sup>d</sup>	3.35 ±0.01 <sup>d</sup>	7.20±0.42 <sup>b</sup>	7.99±0.21 <sup>a</sup>	7.50±0.03 <sup>ab</sup>
Tetracosanol (C24)	21.56±0.55 <sup>c</sup>	24.24±2.02 <sup>c</sup>	13.94±0.94 <sup>d</sup>	52.36±2.38 <sup>a</sup>	53.80±0.10 <sup>a</sup>	45.06±1.50 <sup>b</sup>
Hexacosanol (C26)	1.83±0.03 <sup>d</sup>	11.56±0.16 <sup>c</sup>	1.72±0.50 <sup>d</sup>	10.63±0.11 <sup>c</sup>	42.75±1.94 <sup>a</sup>	13.82±0.77 <sup>b</sup>
Octacosanol (C28)	10.15±0.45 <sup>c</sup>	12.13±0.27 <sup>c</sup>	11.12±0.31 <sup>c</sup>	10.16±0.01 <sup>c</sup>	71.83±2.65 <sup>a</sup>	26.10±0.08 <sup>b</sup>
Triacosanol (C30)	6.91±0.17 <sup>c</sup>	24.30±0.70 <sup>c</sup>	6.66±0.13 <sup>c</sup>	18.96±0.32 <sup>d</sup>	156.41±2.99 <sup>a</sup>	76.92±3.08 <sup>b</sup>
<b>Total</b>	<b>45.55±0.14<sup>c</sup></b>	<b>76.00±3.29<sup>d</sup></b>	<b>45.55±0.14<sup>f</sup></b>	<b>99.33±3.24<sup>c</sup></b>	<b>332.79±7.27<sup>a</sup></b>	<b>169.44±0.91<sup>b</sup></b>

Each value represents the mean ±S.D.

Values in the table are expressed on a dry basis.

Values with different superscript letters in a row are significantly different ( $P < 0.05$ ).

### 6.3 ปริมาณโพลิโคซานอลของผลิตภัณฑ์ได้จากกระบวนการผลิตน้ำมันรำข้าว

รำข้าวเป็นแหล่งที่ดีของไขมันซึ่งประกอบด้วยสารโพลิโคซานอลหลากชนิดได้แก่ mainly docosanol (C22), tetracosanol (C24), hexacosanol (C26), octacosanol (C28) และ triacontanol (C30) ดังนั้น ทั้งน้ำมันรำข้าวและผลิตภัณฑ์ได้จากกระบวนการผลิตน้ำมันรำข้าวจึงเป็น

แหล่งสำคัญของสารดังกล่าว และรายงานวิจัยได้รายงานผลของสารโพลิโคซานอลต่อการลดคลอ

เรสเตอรอลในเลือด จากผลการทดลองในตารางที่ 3 พบว่าผลิตภัณฑ์จากการผลิตน้ำมันรำข้าวมี

ปริมาณโพลิโคซานอลหลากชนิด และ โครมาโตแกรมของการวิเคราะห์สารดังกล่าวโดย GC-MS

แสดงในภาคผนวก ข ซึ่ง รูปแบบของ fragment ที่วิเคราะห์คือ m/z 383 (qualifier ions, m/z 103,

384, 385), m/z 411 (qualifier ions, m/z 103, 412, 413), m/z 439 (qualifier ions, m/z 103,

440, 441), m/z 467 (qualifier ions, m/z 103, 468, 469), และ m/z 495 (qualifier ions, m/z

103, 496, 497) สำหรับ docosanol (C22-OH), tetracosanol (C24-OH), hexacosanol (C26-OH),

octacosanol (C28-OH), triacontanol (C30-OH)

ผลิตภัณฑ์ได้จาก RBW จากการสกัดด้วยตัวทำละลายพบปริมาณโพลิโคซานอลทั้งหมดสูงสุด คือที่ 332.79 mg/100 g รองลงมาคือ HMW พบที่ปริมาณ 169.44 mg/100 g และ RAO พบที่ปริมาณ 99.33 mg/100 g ซึ่งผลการทดลองสอดคล้องกับข้อมูลจาก Cravotto และคณะ (2004) ที่รายงานว่ารำข้าวเป็นแหล่งที่ดีของโพลิโคซานอล นอกจากนี้ยังสอดคล้องกับงาน Kim และคณะ (2012) Ishaka และคณะ (2014) ที่ระบุว่า โพลิโคซานอลที่พบหลักในรำข้าวคือ ในรูป octacosanol (C28-OH) and triacontanol

(C30-OH) ปริมาณโพลีโคซานอลในผลิตภัณฑ์ผลพลอยได้ RBW, HMW, RAO และ FC พบเป็นปริมาณที่สูงกว่าที่พบในน้ำมันรำข้าวจากการสกัดเย็น (74.9 mg/100 g)

รำสกัด (DFRB) เป็นผลิตภัณฑ์ผลพลอยได้หลักของอุตสาหกรรมน้ำมันรำข้าวทั้งแบบใช้ตัวทำละลายสกัดและแบบบีบเย็น ในงานวิจัยนี้พบปริมาณโพลีโคซานอลทั้งหมดเป็นปริมาณน้อยในรำสกัดเมื่อ

เปรียบเทียบกับผลิตภัณฑ์ผลพลอยได้อื่นๆ อย่างไรก็ตามงานวิจัยก่อนหน้านี้พบว่า การสกัดสารโพลีโคซานอลจาก

รำสกัดที่เหลือจากการการบีบเย็นน้ำมันรำข้าว ด้วยวิธีการ saponification และ purification ทำให้

ปริมาณ โพลีโคซานอลที่สูง คือที่ 6,005.28 mg/100 g ดังนั้นการสกัดและทำให้บริสุทธิ์เป็นขั้นตอนสำคัญ

ในการเพิ่มปริมาณสารโพลีโคซานอล ผลิตภัณฑ์ผลพลอยได้ RBW และ HMW จากการผลิตน้ำมันรำข้าวด้วย

การใช้ตัวทำละลายสกัดน้ำมันเป็นแหล่งที่ดีของสารโพลีโคซานอล

**Table 4 - The total comparative amount of bioactive compounds of the by-products from the solvent extraction and cold pressed extraction systems.**

Nutraceuticals	Solvent extraction system (mg/100g)	Cold pressed extraction system (mg/100g)
GABA	97.37	29.22
$\gamma$ - Oryzanol	4,839.16	1,288.04
Phytosterol	787.12	249.41
Vitamin E	204.73	140.67
Policosanol	647.11	121.55
<b>Total amount (kg/100 kg)</b>	<b>6.6</b>	<b>1.7</b>

Values in the table are expressed on a dry basis.

#### 6.4 ปริมาณสารโภชนเภสัชจากกระบวนการผลิตน้ำมันรำข้าวทั้งการสกัดเย็นและการใช้ตัวทำ

##### ละลายในการสกัดน้ำมัน

ปริมาณสารโภชนเภสัชที่เหลือในผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการผลิตน้ำมันรำข้าวทั้งแบบสกัดเย็นและแบบใช้ตัวทำละลาย เปรียบเทียบกันดังแสดงในตาราง 4 การสกัดด้วยตัวทำละลายจะประกอบด้วยการทำงานให้บริสุทธิ์หลายขั้นตอนเมื่อเทียบกับการสกัดแบบบีบเย็น ซึ่งทำให้เกิดความหลากหลายของสารโภชนเภสัชที่เหลือในปริมาณแตกต่างกันและแสดงถึงศักยภาพของการใช้เป็นแหล่งของสารโภชนเภสัชในอุตสาหกรรมอาหารฟังก์ชัน ผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร และอุตสาหกรรมยาและเครื่องสำอาง สารโภชนเภสัชดังกล่าวได้แก่ GABA,  $\gamma$ -oryzanol, phytosterol, vitamin E, และ policosanols เป็นปริมาณทั้งสิ้น 6.6 kg/100 kg ผลิตผลพลอยได้ ปริมาณ  $\gamma$ -oryzanol เป็นโภชนเภสัชหลักที่พบในผลิตผลพลอยได้จากระบบสกัดด้วยตัวทำละลาย 4,839.16 mg/100 g และในระบบสกัดเย็นที่ปริมาณรวม 1,288.04 mg/100 g นอกจากนี้สารโภชนเภสัช ได้แก่  $\gamma$ -oryzanol, phytosterol, PCs และ vitamin E ที่พบในผลิตผลพลอยได้ที่แสดงในตาราง 2 และ 3 แสดงบทบาทด้านลดความเสี่ยงการพัฒนาโรคหัวใจ ในประเทศไทยรำสกัดน้ำมันจัดเป็นผลิตผลพลอยได้ที่เหลือจากอุตสาหกรรมน้ำมันรำข้าวมากที่สุดถึง 640,000 ตันต่อปี (Report of International Conference on Rice Bran Oil 2017). ผลจากงานวิจัยนี้พบว่า ปริมาณรวมของสารโภชนเภสัชซึ่งได้แก่ GABA,  $\gamma$ -oryzanol, phytosterol, vitamin E, และ policosanols จากรำสกัด คือ 321.03 mg /100g สำหรับการบีบเย็นและ 181.45 mg/100 g จากการใช้ตัวทำละลายสกัดน้ำมัน (ตาราง 1-3) ดังนั้นสารโภชนเภสัชในรำสกัดจากอุตสาหกรรมน้ำมันรำข้าวคิดเป็น 3,200 ตันต่อปี (based on 640,000 ตันของรำสกัดในอุตสาหกรรม ดังนั้นผลิตผลพลอยได้จากอุตสาหกรรมน้ำมันรำข้าวจึงมีศักยภาพ

ในด้านการเป็นอีกแหล่งของสารโภชนเภสัชของประเทศและจะมีประโยชน์ต่ออุตสาหกรรม อาหารสุขภาพ ยา และเครื่องสำอางได้ และเป็นการเพิ่มมูลค่าข้าวไทยได้ และควรมีงานวิจัยที่เป็นการพัฒนาวิธีการสกัด และวิธีการทำให้สารโภชนเภสัชบริสุทธิ์มากขึ้นต่อไป



## เอกสารอ้างอิง

- Abdou, A. M., Higashiguchi, S., Horie, K., Kim, M., Hatta, H., & Yokogoshi, H. (2006). Relaxation and immunity enhancement effects of gamma-aminobutyric acid (GABA) administration in humans. *BioFactors*, 26(3), 201–8. <https://doi.org/10.1002/biof.5520260305>
- Abidi, S. L. (2001). Chromatographic analysis of plant sterols in foods and vegetable oils. *Journal of Chromatography A*, 935(1–2), 173–201. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(01\)00946-3](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(01)00946-3)
- Arruzazabala M. Effect of policosanol successive dose increases on platelet aggregation in healthy volunteers. *Pharmacol Res* 1996;34:181–5. doi:10.1006/phrs.1996.0086.
- Amarasinghe, B. M. W. P. K., Kumarasiri, M. P. M., & Gangodavilage, N. C. (2009). Effect of method of stabilization on aqueous extraction of rice bran oil. *Food and Bioproducts Processing*, 87(2), 108–114. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2008.08.002>
- Asikin Y, Takahashi M, Hirose N, Hou DX, Takara K, Wada K. Wax, policosanol, and long-chain aldehydes of different sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) cultivars. *Eur J Lipid Sci Technol* 2012;114:583–91. doi:10.1002/ejlt.201100300.
- Asikin Y, Chinen T, Kensaku T, Wada K. Determination of long-chain alcohol and aldehyde contents in the non-centrifuged cane sugar Kokuto. *Food Sci Technol Res* 2008;14:583–8.
- Azrina A, Maznah I, Azizah AH. Extraction and determination of Oryzanol in rice bran of mixed Herbarium UKMB; AZ 6807: MR 185 , AZ 6808: MR 211 , AZ6809: MR 29. *ASEAN Food J* 2008;15:89–96.
- Balachandran, C., Mayamol, P. N., Thomas, S., Sukumar, D., Sundaresan, A., & Arumughan, C. (2008). An ecofriendly approach to process rice bran for high quality rice bran oil using supercritical carbon dioxide for nutraceutical applications. *Bioresource Technology*, 99(8), 2905–2912. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.06.004>
- Beveridge THJ, Li TSC, Drover JCG. Phytosterol content in American ginseng seed oil. *J Agric Food Chem* 2002;50:744–50. doi:10.1021/jf010701v.
- Bhosle BM, Subramanian R. New approaches in deacidification of edible oils - A review. *J Food Eng* 2005;69:481–94. doi:10.1016/j.jfoodeng.2004.09.003.
- Bhatnagar AS, Prabhakar DS, Prasanth Kumar PK, Raja Rajan RG, Gopala Krishna AG. Processing of commercial rice bran for the production of fat and nutraceutical rich rice brokens, rice germ and pure bran. *LWT - Food Sci Technol* 2014;58:306–11. doi:10.1016/j.lwt.2014.03.011.

- Bhosle, B. M., & Subramanian, R. (2005). New approaches in deacidification of edible oils - A review. *Journal of Food Engineering*, 69(4), 481–494.  
<https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2004.09.003>
- Brigitte, K. (1995). Cosmetic sunscreen composition containing ferulic acid and gamma-oryzanol.
- Bogdanov, S. (2009). Beeswax: production , properties composition and control. In *Beeswax* (pp. 1–17). Bee Product Science.
- Chen MH, Bergman CJ. A rapid procedure for analysing rice bran tocopherol, tocotrienol and  $\gamma$ -oryzanol contents. *J Food Compos Anal* 2005;18:139–51.  
[doi:10.1016/j.jfca.2003.09.004](https://doi.org/10.1016/j.jfca.2003.09.004).
- Chen Z, Jiao R, Ma KY. Cholesterol-Lowering Nutraceuticals and Functional Foods Cholesterol-Lowering Nutraceuticals and Functional. *J Agric Food Chem* 2008;56:8761–73. [doi:10.1021/jf801566r](https://doi.org/10.1021/jf801566r).
- Cheong, J. N., Tan, C. P., Man, Y. B. C., & Misran, M. (2008). Gamma-Tocopherol nanodispersions: Preparation, characterization and stability evaluation. *Journal of Food Engineering*, 89(2), 204–209. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2008.04.018>
- Chu, B. S., Baharin, B. S., & Quek, S. Y. (2002). Factors affecting pre-concentration of tocopherols and tocotrienols from palm fatty acid distillate by lipase-catalysed hydrolysis. *Food Chemistry*, 79(1), 55–59. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(02\)00177-2](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(02)00177-2)
- Choi, Y., & Lee, J. (2009). Antioxidant and antiproliferative properties of a tocotrienol-rich fraction from grape seeds. *Food Chemistry*, 114(4), 1386–1390.  
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.11.018>
- Clement, J., Okine, L. K. N., Achel, G., Gyampo, O., Adjei, S., Nyarko, A. K., ... Edoh, D. A. (2013). Prospects of *Croton membranaceus* for Prostate Health. In American Chemical Society (Ed.), *African Natural Plant Products: Discoveries and Challenges in Chemistry, Health, and Nutrition* (Vol. 2, pp. 79–92). Washington, DC: ACS Symposium Series.]
- Cravotto G, Binello A, Merizzi G, Avogadro M. Improving solvent-free extraction of policosanol from rice bran by high-intensity ultrasound treatment. *Eur J Lipid Sci Technol* 2004;106:147–51. [doi:10.1002/ejlt.200300914](https://doi.org/10.1002/ejlt.200300914).
- Derakhshan-Honarparvar M, Hamed MM, Pirouzfard MK. Rice bran phytosterols of three widespread Iranian cultivars. *J Agric Sci Technol* 2010;12:167–72.
- Eitenmiller, R., & Lee, J. (2004). *Vitamin E food chemistry, composition, and analysis*. Marcel Dekker, Inc. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(95\)90913-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(95)90913-3)

- Francini-Pesenti F, Beltramolli D, Acqua DS, Brocadello F. Effect of sugar cane policosanol on lipid profile in primary hypercholesterolemia. *Phyther Res* 2008;22:318–22. doi:10.1002/ptr.
- Gerhardt, A. L., & Gallo, N. B. (1998). Full-fat rice bran and oat bran similarly reduce hypercholesterolemia in humans. *The Journal of Nutrition*, 128(5), 865–869.
- Gupta, A. K., Savopoulos, C. G., Ahuja, J., & Hatzitolios, A. I. (2011). Role of phytosterols in lipid-lowering: Current perspectives. *The Quarterly Journal of Medicine*, 104(4), 301–308. <https://doi.org/10.1093/qjmed/hcr007>
- Hargrove J., Greenspan P, Hartle D. Nutritional significance and metabolism of very long chain fatty alcohols and acids from dietary waxes. *Exp Biol Med* 2004;229:215–26.
- Hoed, V. Van, Depaemelaere, G., Ayala, J. V. V., Santiwattana, P., Verhe, R., & Greyt, W. De. (2006). Influence of chemical refining on the major and minor components of rice bran oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 83(4), 315–321
- Huang YP, Lai HM. Bioactive compounds and antioxidative activity of colored rice bran. *J Food Drug Anal* 2016;24:564–74. doi:10.1016/j.jfda.2016.01.004.
- Irmak S, Dunford NT, Milligan J. Policosanol contents of beeswax, sugar cane and wheat extracts. *Food Chem* 2006;95:312–8. doi:10.1016/j.foodchem.2005.01.009.
- Iqbal J, Minhajuddin M, Beg Z. Suppression of 7,12- imethylbenz[alpha]anthracene-induced carcinogenesis and hypercholesterolaemia in rats by tocotrienol-rich fraction isolated from rice bran oil. *Eur J Cancer Prev* 2003;12:447–53.
- Ishaka A, Imam MU, Mahamud R, Zuki ABZ, Maznah I. Characterization of rice bran wax policosanol and its nanoemulsion formulation. *Int J Nanome dicine* 2014;9:2261–9. doi:10.2147/IJN.S56999.
- Ito, S., & Ishikawa, Y. (2004). Marketing of value-added rice products in japan: germinated brown rice and rice bread. In *FFAO International Rice Year, 2004 Symposium* (pp. 1–10). Rome, Italy.
- Janikula M. Policosanol: a new treatment for cardiovascular disease? *J Clin Ther* 2002;7:203–17.
- Kannappan, R., Ravindran, J., Prasad, S., Sung, B., & Yadav, V. R. (2010).  $\gamma$ -Tocotrienol promotes TRAIL-induced apoptosis through reactive oxygen species / extracellular signal-regulated kinase / p53 – mediated upregulation of death receptors. *American Association for Cancer Research*, 9(August), 2196–2207. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-10-0277>
- Karladee D, Suriyong S.  $\gamma$ -Aminobutyric acid (GABA) content in different varieties of brown rice during germination. *ScienceAsia* 2012;38:13–7.

doi:10.2306/scienceasia1513-1874.2012.38.013.

- Kim JK, Park S-Y, Jung JY, Ha S-H, Lim S-H, Lee SM, et al. Policosanol content and composition of Korean rice (*Oryza sativa* L.) cultivars. *Cereal Chem* 2012;89:151–4.
- Kim JY, Seo WD, Park D, Jang KC, Choi K, Kim S, et al. Comparative Studies on Major Nutritional Components of Black Waxy Rice with Giant Embryos and Its Rice Bran. *Food Sci Biotechnol* 2013;22:121–8. doi:10.1007/s10068-013-0057-1.
- Kugler F, Graneis S, Schreiter PP, Stintzing FC, Carle R. Determination of free amino compounds in betalainic fruits and vegetables by gas chromatography with flame ionization and mass spectrometric detection. *J Agric Food Chem* 2006;54:4311–8. doi:10.1021/jf060245g.
- Lehninger, A. L., Nelson, D. L., & Cox, M. (1993). *Principles of biochemistry* (2nd ed.). New York: Worth publishers.
- Lerma-García MJ, Herrero-Martínez JM, Simó-Alfonso EF, Mendonça CRB, Ramis-Ramos G. Composition, industrial processing and applications of rice bran  $\gamma$ -oryzanol. *Food Chem* 2009;115:389–404. doi:10.1016/j.foodchem.2009.01.063.
- Lilitchan, S., & Aryasuk, K. (2008). Health benefits and production of policosanol from rice bran wax. *Journal of Public Health*, 38(3), 457–464.
- Liu Y, Yu J, Wang X. Extraction of policosanols from hydrolysed rice bran wax by high-intensity ultrasound. *Int J Food Sci Technol* 2008;43:763–9. doi:10.1111/j.1365-2621.2006.01232.x.
- Mellen, P. B., Walsh, T. F., & Herrington, D. M. (2008). Whole grain intake and cardiovascular disease: A meta-analysis. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*, 18(4), 283–290. <https://doi.org/10.1016/j.numecd.2006.12.008>
- Menendez, R., Fernandez, S., Del Rio, A., Gonzalez, R., Fraga, V., Amor, A., & Mas, R. (1994). Policosanol inhibits cholesterol biosynthesis and enhances LDL processing in cultured human fibroblasts. *Biological Research*, 27(3–4), 199–203.
- Menéndez, R., Fraga, V., Amor, A. M., González, R. M., & Más, R. (1999). Oral administration of policosanol inhibits in vitro copper ion-induced rat lipoprotein peroxidation. *Physiology and Behavior*, 67(1), 1–7. [https://doi.org/10.1016/S0031-9384\(99\)00004-9](https://doi.org/10.1016/S0031-9384(99)00004-9)
- Menéndez, R., Más, R., Amor, A. M., González, R. M., Fernández, J. C., Rodeiro, I., ... Jiménez, S. (2000). Effects of policosanol treatment on the susceptibility of low density lipoprotein (LDL) isolated from healthy volunteers to oxidative modification in vitro. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 50(3), 255–262. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2125.2000.00250.x>
- Moreau RA, Kamal-Eldin A. Introduction. In: Moreau RA, Kamal-Eldin A, editors. *Gourmet*

Heal. Spec. oils, vol. 1, Urbana, Illinois: AOCS Press; 2009, p. 1–13.

doi:10.1016/B978-1-893997-97-4.50004-8.

Murase, Y., & Iishima, H. (1963). Clinical studies of oral administration of gamma-oryzanol on climacteric complaints and its syndrome. *Obstetrics & Gynecology*, 12, 147–149.

Nagao, K., Sato, M., Takenaka, M., Ando, M., Iwamoto, M., & Imaizumi, K. (2001). Feeding unsaponifiable compounds from rice bran oil does not alter hepatic mRNA abundance for cholesterol metabolism-related proteins in hypercholesterolemic rats. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 65(2), 371–377.

<https://doi.org/10.1271/bbb.65.371>

Noboru, K., & Yusho, T. (1970). Oryzanol Containing Cosmetics. Japan: Japanese Patent 70:32078.

Normén L, Ellegard L, Brants H, Dutta P, Andersson H. A phytosterol database: Fatty foods consumed in Sweden and the Netherlands. *J Food Compos Anal* 2007;20:193–201. doi:10.1016/j.jfca.2006.06.002.

Orthoefer FT. Rice bran oil. In: Shahid F, editor. *Bailey's Ind. oil fat Prod.*, vol. 2. 6th ed., John Wiley & Sons, Inc; 2005, p. 465–89. doi: <http://dx.doi.org/10.1002/047167849X.bio015>.

Olsen, R. W., & DeLorey, T. M. (1999). *GABA Synthesis, uptake and release. in basic neurochemistry: molecular, cellular and medical aspects.* (6th ed.). Rome, Italy: Lippincott-Raven.

Park, J., Jang, E. Y., Kim, J. Y., Yi, B., Kim, M. J., Park, K. W., & Lee, J. (2013). Effects of visible light irradiation on the oxidative stability in rice bran. *Journal of Cereal Science*, 58(1), 178–181. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2013.05.004>

Perretti G, Miniati E, Montanari L, Fantozzi P. Improving the value of rice by-products by SFE. *J Supercrit Fluids* 2003;26:63–71. doi:10.1016/S0896-8446(02)00247-4.

Pestana-Bauer VR, Zambiazzi RC, Mendonça CRB, Beneito-Cambra M, Ramis-Ramos G.  $\gamma$ -Oryzanol and tocopherol contents in residues of rice bran oil refining. *Food Chem* 2012;134:1479–83. doi:10.1016/j.foodchem.2012.03.059.

Pestana VR, Zambiazzi RC, Mendonça CRB, Bruscatto MH, Ramis-Ramos G. The influence of industrial processing on the physico-chemical characteristics and lipid and antioxidant contents of rice bran. *Grasas y Aceites* 2009;60:184–93. doi:10.3989/gya.075108.

Pestana VR, Zambiazzi RC, Mendonça CRB, Bruscatto MH, Lerma-García MJ, Ramis-Ramos G. Quality changes and tocopherols and [gamma]-oryzanol concentrations in rice bran oil during the refining process. *J Am Oil Chem Soc* 2008:1013–9.

doi:10.1007/s11746-008-1300-4.

- Patel, M., & Naik, S. N. (2004). Gamma-Oryzanol from rice bran oil - A review. *Journal of Scientific and Industrial Research*, 63(7), 569–578.
- Petroff, O. A. C. (2002). GABA and glutamate in the human brain. *Neuroscientist*, 8(6), 562–573. <https://doi.org/Doi.10.1177/1073858402238515>
- Pizzorno, L., Pizzorno, J., & Murray, M. (2002). *Natural medicine instructions for patients*. New York: Churchill Livingstone.
- Powers, M. E., Yarrow, J. F., McCoy, S. C., & Borst, S. E. (2008). Growth hormone isoform responses to GABA ingestion at rest and after exercise. *Medicine and Science in Sports and Exercise*, 40(1), 104–110. <https://doi.org/10.1249/mss.0b013e318158b518>
- Pramai P, Abdul Hamid NA, Mediani A, Maulidiani M, Abas F, Jiamyangyuen S. Metabolite profiling, antioxidant, and  $\alpha$ -glucosidase inhibitory activities of germinated rice: nuclear-magnetic-resonance-based metabolomics study. *J Food Drug Anal* 2018;26:47–57. doi:10.1016/j.jfda.2016.11.023.
- Prasad MN, Sanjay K, Khatokar MS, Vismaya M, Swamy SN. Health benefits of rice Bran - A review. *J Nutr Food Sci* 2011;01:1–7. doi:10.4172/2155-9600.1000108.
- Puengtham, J., Aryusuk, K., Kittiratanapiboon, K., Jeyashoke, N., & Krisnangkura, K. (2008). Extraction purification and characterization of policosanol from Thai rice bran wax. *KMUTT Research and Development Journal*, 31(2), 305–318.
- Qureshi, A. A., Sami, S. A., & Khan, F. A. (2002). Effects of stabilized rice bran, its soluble and fiber fractions on blood glucose levels and serum lipid parameters in humans with diabetes mellitus Types I and II. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 13(3), 175–187. [https://doi.org/10.1016/S0955-2863\(01\)00211-X](https://doi.org/10.1016/S0955-2863(01)00211-X)
- Reisige K, Gorzelanny C, Daniels U, Moerschbacher BM. The C28 aldehyde octacosanal is a morphogenetically active component involved in host plant recognition and infection structure differentiation in the wheat stem rust fungus. *Physiol Mol Plant Pathol* 2006;68:33–40. doi:10.1016/j.pmpp.2006.05.006.
- Rendon, A., Rodriguez, M. ., Lopez, M., Garcia, H., Cajigas, A., Mas, R., & Fernandez, I. (1992). Policosanol: A study of its genotoxicity and teratogenicity in rodents. *Toxicology Letters*, 63, 249.
- Renuka Devi R, Arumughan C. Phytochemical characterization of defatted rice bran and optimization of a process for their extraction and enrichment. *Bioresour Technol* 2007;98:3037–43. doi:10.1016/j.biortech.2006.10.009.
- Revilla E, Santa C, Miramontes E, Bautista J, García-martínez A, Cremades O, et al.

- Nutraceutical composition , antioxidant activity and hypocholesterolemic effect of a water-soluble enzymatic extract from rice bran. *Food Res Int* 2009;42:387–93. doi:10.1016/j.foodres.2009.01.010.
- Rodkum, W. (2011). *Determination of Gamma-aminobutyric acid in GABA-rice by capillary electrophoresis*. Thammasat University.
- Sakunpak A, Suksaeree J, Pathompak P, Sermkaew N. Antioxidant individual  $\gamma$ -Oryzanol screening in cold pressed rice bran oil of different Thai rice varieties by HPLC-DPPH Method. *Int J Pharm Pharm Sci* 2014;6:2–7.
- Sawadikiat P, Hongsprabhas P. Phytosterols and  $\gamma$ -oryzanol in rice bran oils and distillates from physical refining process. *Int J Food Sci Technol* 2014;49:2030–6. doi:10.1111/ijfs.12506.
- Schousboe, A., & Waagepetersen, H. S. (2007). GABA: Homeostatic and pharmacological aspects. *Progress in Brain Research*, 160(February 2007), 9–19. [https://doi.org/10.1016/S0079-6123\(06\)60002-2](https://doi.org/10.1016/S0079-6123(06)60002-2)
- Seetharamaiah, G. S., Krishnakantha, T. P., & Chandrasekhara, N. (1990). Influence of oryzanol on platelet aggregation in rats. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*, 36, 291–297.
- Shaghghi, M. A., Abumweis, S. S., & Jones, P. J. (2013). Cholesterol-lowering efficacy of plant sterols/stanols provided in capsule and tablet formats: results of a systematic review and meta-analysis. *Journal of the Academy of Nutrition and Dietetics*, 113(11), 1494–1503. <https://doi.org/10.1016/j.jand.2013.07.006>
- Shigematsu TS, Murakami MM, Nakajima KN, Uno YU, Sakano AS, Narahara YN, et al. Bioconversion of Glutamic acid to  $\gamma$ -Aminobutyric acid ( GABA ) in Brown Rice Grains Induced by High Pressure Treatment. *Japan J Food Eng* 2010;11:189–99.
- Samad N. Rice bran oil prevents neuroleptic-induced extrapyramidal symptoms in rats: Possible antioxidant mechanisms. *J Food Drug Anal* 2015;23:370–5. doi:10.1016/j.jfda.2014.10.012.
- Shugo, M. (1979). Anti-dandruff and anti-itching shampoo. Japan: Japanese Patent 79:36306.
- Sun, W., Xu, W., Liu, H., Liu, J., Wang, Q., Zhou, J., ... Chen, B. (2009). Gamma-Tocotrienol induces mitochondria-mediated apoptosis in human gastric adenocarcinoma SGC-7901 cells. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 20(4), 276–284. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2008.03.003>
- Somseemee, O., Morakot, N., & Sittiwet, C. (2014). Analysis 1 of sterol content in jasmine rice ( *Oryza sativa* ). In *Mahasarakhm university research conference* (pp. 1–10).

Mahasarakham, Thailand.

- Talati, R., Sobieraj, D. M., Makanji, S. S., Phung, O. J., & Coleman, C. I. (2010). The comparative efficacy of plant sterols and stanols on serum lipids: a systematic review and meta-analysis. *Journal of the American Dietetic Association*, *110*(5), 719–726. <https://doi.org/10.1016/j.jada.2010.02.011>
- Thai rice exporters Association. Thai rice production, consumption, and stocks 2016. <http://www.thairiceexporters.or.th/production.htm> (accessed April 24, 2017).
- Thanh TT, Vergnes MF, Kaloustian J, El-Moselhy TF, Amiot-Carlin MJ, Portugal H. Effect of storage and heating on phytosterol concentrations in vegetable oils determined by GC/MS. *J Sci Food Agric* 2006;86:220–5. doi:10.1002/jsfa.2322.
- Thongekkaew, J. (2015). A greatly useful of GABA for health. *KKU Science Journal*, *43*(2), 205–211
- Vanichanont, P. (2004). Thai rice: Sustainable life for rice growers. In *Proceedings of the FAO Rice Conference, Rice in Global Markets* (pp. 113–117). Rome, Italy: FAO.
- Varady, K. A., Wang, Y., & Peter J.H. Jones. (2003). Role of policosanols in the prevention and treatment of cardiovascular disease. *Nutrition Reviews*, *61*(11), 376–383.
- Wells, S. R., Jennings, M. H., Rome, C., Hadjivassiliou, V., Papas, K. A., & Alexander, J. S. (2010). Alpha-, gamma- and delta-tocopherols reduce inflammatory angiogenesis in human microvascular endothelial cells. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, *21*(7), 589–97. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2009.03.006>
- Weerawatanakorn M, Tamaki H, Asikin Y, Wada K, Takahashi M, Ho CT, et al. Policosanols contents, volatile profile and toxicity test of granulated cane sugar enriched with rice bran materials. *Int Food Res J* 2017;24:1019–28.
- Xu Z, Hua N, Godber S. Antioxidant activity of tocopherols, tocotrienols, and γ-oryzanol components from rice bran against cholesterol oxidation accelerated by 2,2'-azobis(2-methylpropionamide) dihydrochloride. *J Agric Food Chem* 2001;49:2077–81. doi:10.1021/jf0012852.
- Yang, H., Yan, F., Wua, D., Huo, M., Li, J., Cao, Y., & Jiang, Y. (2010). Recovery of phytosterols from waste residue of soybean oil deodorizer distillate. *Bioresource Technology*, *101*(5), 1471–1476. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.09.019>
- Yoto, A., Murao, S., Motoki, M., Yokoyama, Y., Horie, N., Takeshima, K., ... Yokogoshi, H. (2012). Oral intake of Gamma-aminobutyric acid affects mood and activities of central nervous system during stressed condition induced by mental tasks. *Amino Acids*, *43*(3), 1331–1337. <https://doi.org/10.1007/s00726-011-1206-6>
- Yoshida, Y., Saito, Y., Jones, L. S., & Shigeri, Y. (2007). Chemical reactivities and physical

effects in comparison between tocopherols and tocotrienols: physiological significance and prospects as antioxidants. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 104(6), 439–45. <https://doi.org/10.1263/jbb.104.439>

Yoon SH, Kim SK. Oxidative stability of high-fatty acid rice bran oil at different stages of refining. *J Am Oil Chem Soc* 1994;71:227–9

Zhao K, Lin L, Li C, Du S, Huang C, Qin Y, et al. Measurement and Correlation of Solubility of  $\gamma$ -Aminobutyric Acid in Different Binary Solvents. *J Chem Eng Data* 2016;61:1210–20. doi:10.1021/acs.jced.5b00829.



ภาคผนวก ก



## วิธีวิเคราะห์คุณภาพทางเคมี ทางกายภาพ

### ปริมาณความชื้น

ชั่งตัวอย่าง 5 กรัม นำไปอบแห้งในตู้อบลมร้อน ที่อุณหภูมิ 105 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เมื่อครบเวลา ทิ้งให้เย็นใน desiccator ชั่งน้ำหนัก แล้วนำไปอบต่อ ทำซ้ำไปจนกว่าน้ำหนักแห้งกันน้อยกว่า 0.05

กรัม

$$\text{ปริมาณความชื้น (\%)} = \frac{\text{น้ำหนักตัวอย่างก่อนอบ} - \text{น้ำหนักตัวอย่างหลังอบ}}{\text{น้ำหนักตัวอย่างก่อนอบ}} \times 100$$



## การวิเคราะห์ปริมาณ Phytosterol โดยเทคนิค GC-MS

อ้างอิง Thanh, T. T., Vergnes, M. F., Kaloustian, J., El-Moselhy, T. F., Amiot-Carlin, M. J., & Portugal, H. (2006). Effect of storage and heating on phytosterol concentrations in vegetable oils determined by GC/MS. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 86(2), 220–225.  
<https://doi.org/10.1002/jsfa.2322>

คอลัมน์	Agilent DB-5ms fused silica capillary column (30 m×0.25 mm i.d.x film thickness 0.25 µm)
Detector	MS / SIM Mode
ปริมาณตัวอย่าง	1 µL / split ratio 1:50
อุณหภูมิ MS quad /MS source	150/ 230 °C
อุณหภูมิ inject	270 °C
อุณหภูมิ Transfer line	280 °C
อุณหภูมิ Detector	100 °C นาน 1 นาที และเพิ่มถึง 300 °C ด้วยอัตรา 10 °C/min คงที่ นาน 14 นาที
Carrier gas	Helium
อัตราการไหล	1.5 mL/min

Compound	Molecular target Ion, <i>m/z</i>	Qualifier ions, <i>m/z</i>
Cholestane (Std.)	374	147, 217, 357
Campesterol	382	129, 343, 367
Stigmasterol	484	129, 255, 394
<b>β</b> -sitosterol	486	129, 357, 396
Sitostanol	488	215, 383, 398

## การวิเคราะห์ปริมาณ Aminobutyric acid (GABA) โดยเทคนิค GC-MS

อ้างอิง	Shigematsu TS, Murakami MM, Nakajima KN, Uno YU, Sakano AS, Narahara YN, et al. Bioconversion of Glutamic acid to $\gamma$ -Aminobutyric acid ( GABA ) in Brown Rice Grains Induced by High Pressure Treatment. Japan J Food Eng 2010;11:189-99.
คอลัมน์	Zebron ZB-AAA column (10 m x 0.25 mm i.d x film thickness 0.25 $\mu$ m)
Detector	MS / SIM Mode
ปริมาณตัวอย่าง	2 $\mu$ L / split ratio 1:15
อุณหภูมิ MS quad /MS source	150/ 230 $^{\circ}$ C
อุณหภูมิ inject	250 $^{\circ}$ C
อุณหภูมิ Transfer line	310 $^{\circ}$ C
อุณหภูมิ Detector	110 $^{\circ}$ C เพิ่มถึง 150 $^{\circ}$ C ด้วยอัตรา 20 $^{\circ}$ C/min และเพิ่มถึง 300 $^{\circ}$ C ด้วยอัตรา 30 $^{\circ}$ C คงที่นาน 2 นาที
Carrier gas	Helium
อัตราการไหล	1.1 mL/min

Compound	Qualifier ions, $m/z$
Norvaline (Std.)	72, 116, 158
GABA	86, 112, 130, 231

## การวิเคราะห์ปริมาณ Policosanol โดยเทคนิค GC-MS

อ้างอิง	Asikin Y, Chinen T, Kensaku T, Wada K. Determination of long-chain alcohol and aldehyde contents in the non-centrifuged cane sugar Kokuto. Food Sci Technol Res 2008;14:583-8.
คอลัมน์	Agilent DB-5ms fused silica capillary column (0.25 mm x 30 m x film thickness 0.25 $\mu$ m)
Detector	MS / SIM Mode
ปริมาณตัวอย่าง	1 $\mu$ L / split ratio 1:10
อุณหภูมิ MS quad /MS source	150/ 230 $^{\circ}$ C
อุณหภูมิ inject	270 $^{\circ}$ C
อุณหภูมิ Transfer	280 $^{\circ}$ C
line	
อุณหภูมิ Detector	150 $^{\circ}$ C เพิ่มถึง 320 $^{\circ}$ C ด้วยอัตรา 4 $^{\circ}$ C/min และคงที่นาน 15 นาที
Carrier gas	Helium
อัตราการไหล	1.0 mL/min

Compound	Molecular target Ion, $m/z$	Qualifier ions, $m/z$
Docosanol (C <sub>22</sub> )	383	103, 383, 384, 385
Tetracosanol (C <sub>24</sub> )	411	103, 411, 412, 413
Hexacosanol (C <sub>26</sub> )	439	103, 439, 440, 441
Octacosanol (C <sub>28</sub> )	467	103, 467, 468, 469
Triacontanol (C <sub>30</sub> )	495	103, 495, 496, 497

## การวิเคราะห์ปริมาณ Gamma-Oryzanol โดยเทคนิค LC-MS

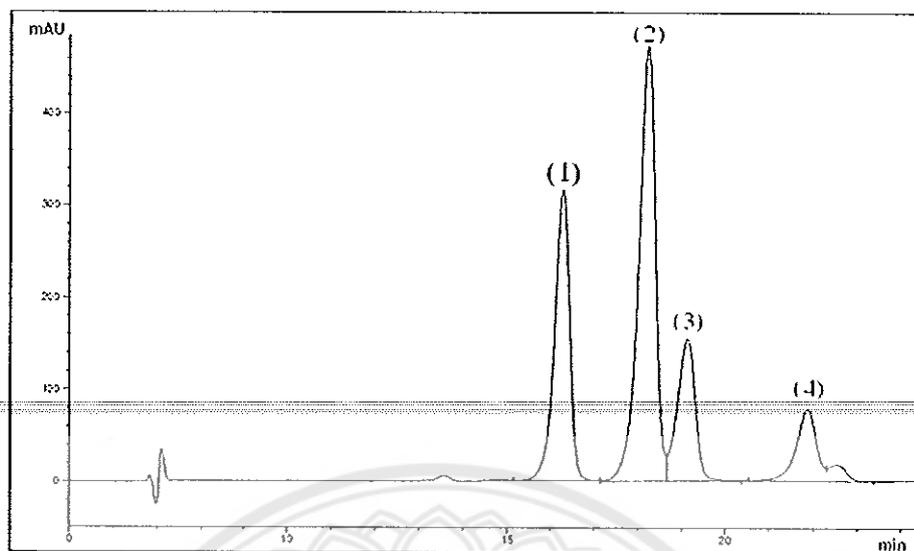
อ้างอิง	Sakunpak A, Suksaeree J, Pathompak P, Sermkaew N. Antioxidant individual $\gamma$ -Oryzanol screening in cold pressed rice bran oil of different Thai rice varieties by HPLC-DPPH Method. Int J Pharm Pharm Sci 2014;6:2-7.
คอลัมน์	Agilent Zorbax Eclipse XDB-C18 column (4.6 x 150 mm, 5 $\mu$ m)
Detector	Diode array detector (DAD)
ปริมาณตัวอย่าง	20 $\mu$ L
Mobile phase	acetonitrile, methanol and isopropanol (25:70:5 v/v)
อัตราการไหล	1.0 mL/min for 18 min
อุณหภูมิ inject	40 $^{\circ}$ C
Ionization Mode	API-ES
Capillary voltage	4,000 V
Nebuliser pressure	50 psi
Gas temperature	350 $^{\circ}$ C
Drying gas	13.01 /min
UV detection	298 and 325 nm
Scan Parameter	200-800 $m/z$

Compound	Molecular target Ion, $m/z$
Cycloartenyl ferulate	601.3
24-methylene cycloartenyl ferulate	615.3
Campesteryl ferulate	575.3
$\beta$ -sitosteryl ferulate	589.3

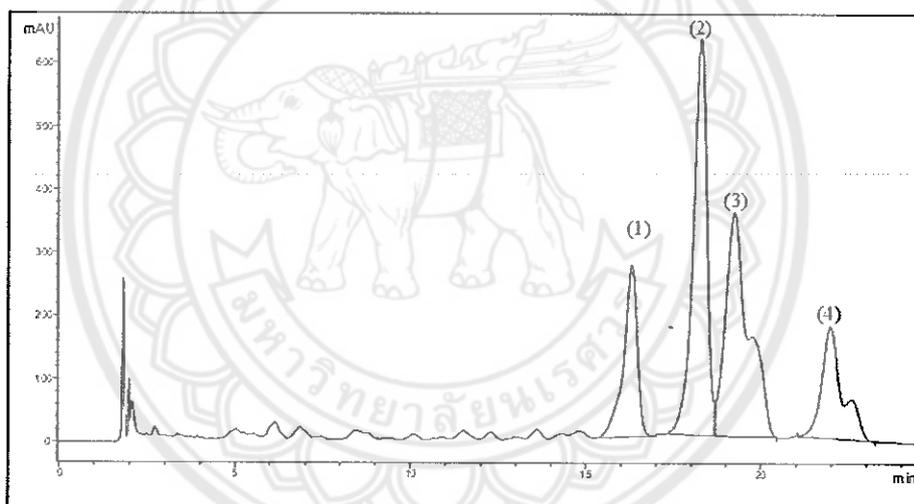
## การวิเคราะห์ปริมาณ Tocopherol และ Tocotrienol โดยเทคนิค RP-HPLC

อ้างอิง	Chen MH, Bergman CJ. A rapid procedure for analysing rice bran tocopherol, tocotrienol and $\gamma$ -oryzanol contents. J Food Compos Anal 2005;18:139-51. doi:10.1016/j.jfca.2003.09.004.
คอลัมน์	Luna CN 100A column (4.6 × 250 mm, 5 $\mu$ m).
Detector	Diode array detector (DAD)
ปริมาณตัวอย่าง	20 $\mu$ L
Mobile phase	- 94% MeOH and 6% deionized water - 25% acetonitrile, 70% MeOH, 5% IsOH, and 0.1% of aq acetic acid
อัตราการไหล	1.0 mL/min นาที่ที่ 0-12 - 94% MeOH and 6% deionized water นาที่ที่ 13-20 - 25% acetonitrile, 70% MeOH, 5% IsOH, and 0.1% of aq acetic acid
อุณหภูมิ inject	40 °C
UV/UV Vis detection	298 and 325 nm



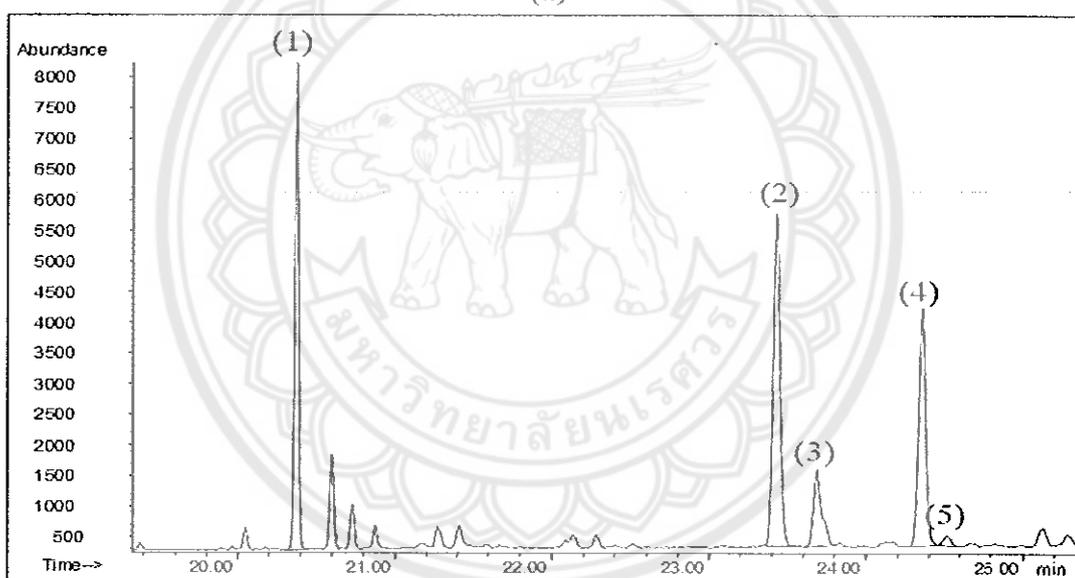
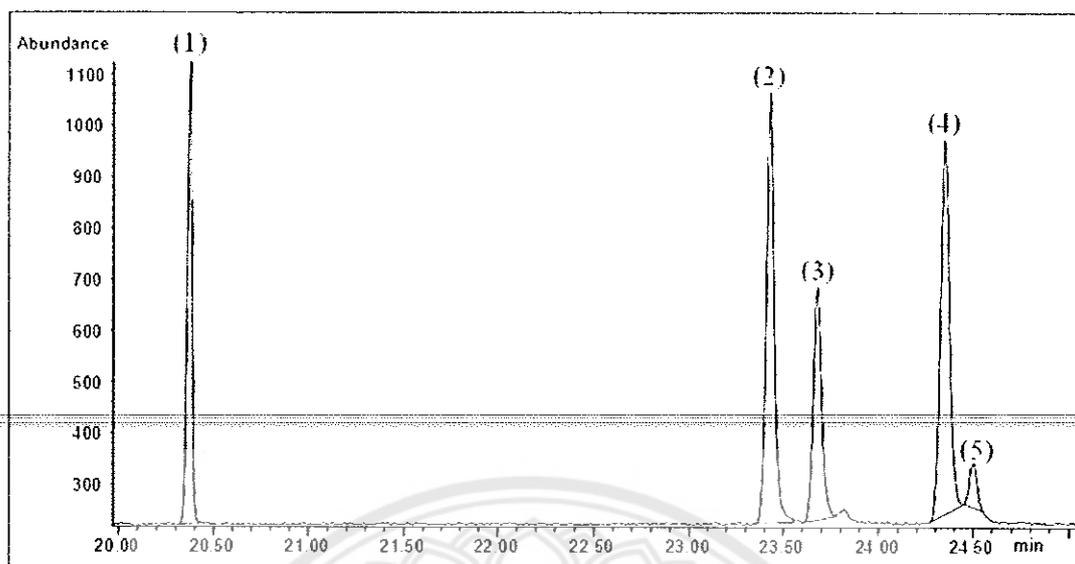


(a)



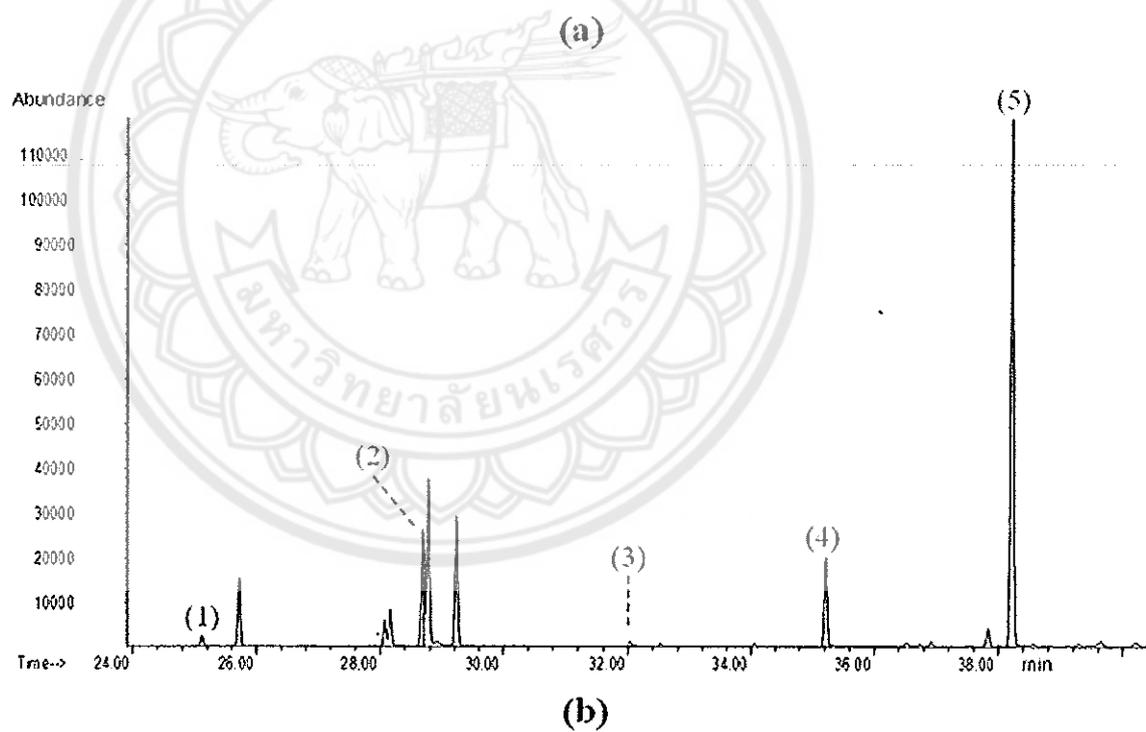
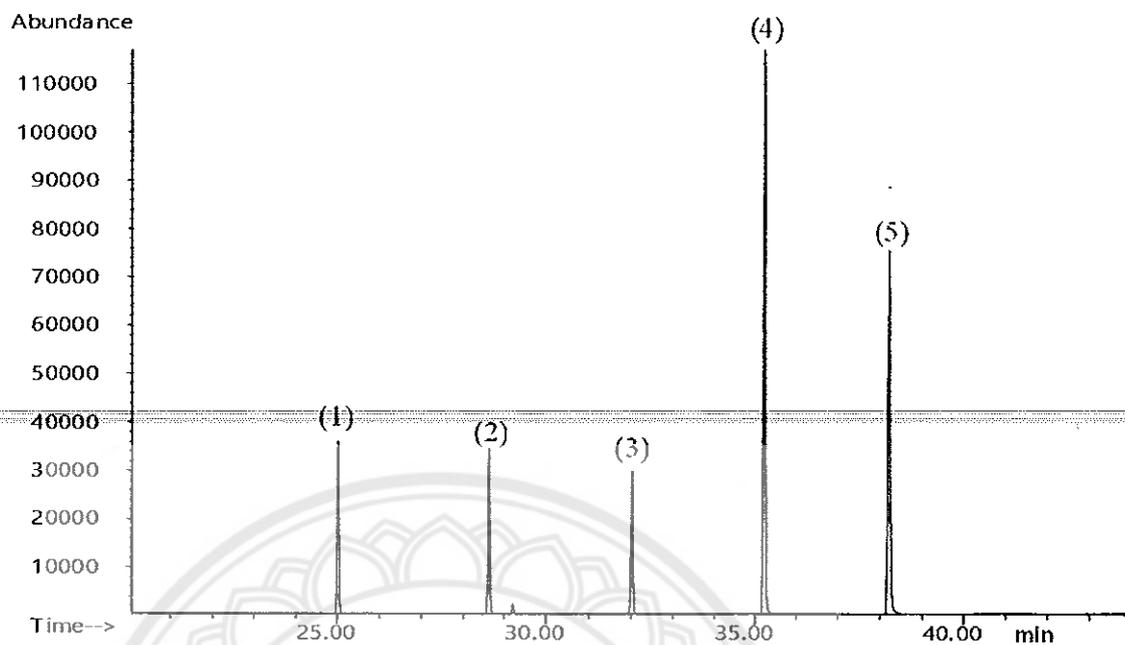
(b)

LC-MS chromatograms of  $\gamma$ -oryzanol standard compounds (a) RAO  $\gamma$ -oryzanol extract (b). The numbers on the peaks (a) correspond to the cycloartenyl ferulate (1), 24-methylene cycloartenyl ferulate (2), campesteryl ferulate (3),  $\beta$ -sitosteryl ferulate (4)



GC-MS chromatograms of phytosterol standard (a) FC phytosterol extract (b).

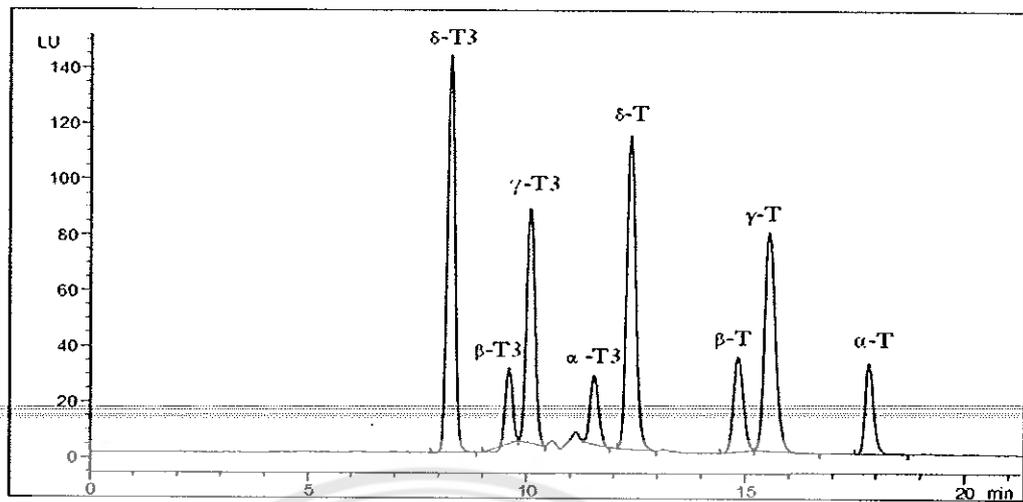
The numbers on the peaks correspond to cholestane as internal standard (1), campesterol (2), stigmasterol (3),  $\beta$ -sitosterol (4) and sitostanol (5).



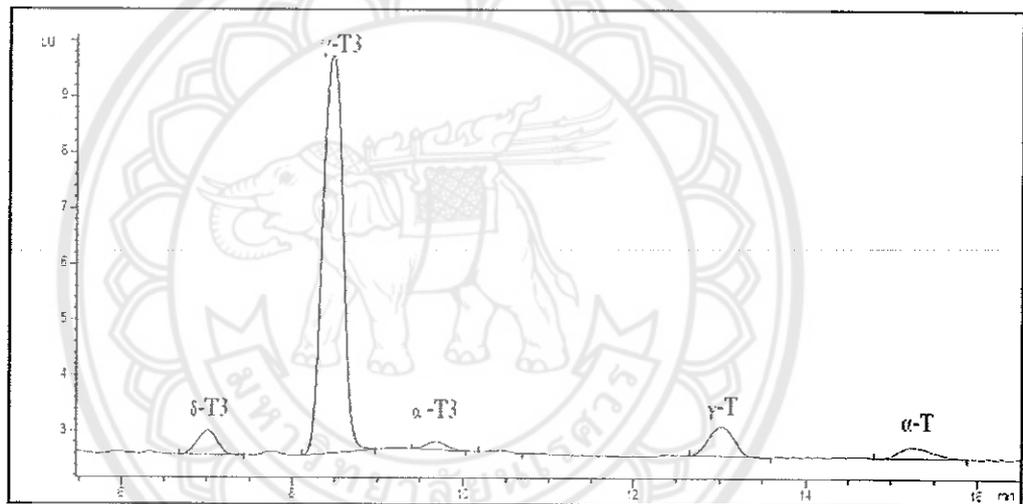
Chromatogram for PCs standards (a) and HPW PCs extract (b). Docosanol

(C22-OH) (1), Tetracosanol (C24-OH) (2), Hexacosanol (C26-OH) (3), Octacosanol

(C28-OH) (4), Triacontanol (C30-OH) (5).



(a)



(b)

Typical chromatograms for T3s and Ts standard compounds (a) DFRB-C T3s and Ts extract (b). Ts = tocopherol; T3s = tocotrienol; DFRB-C = defatted rice bran from cold pressed extraction process.

Manuscript Number: JFDA-D-17-00939

Title: Comparative study on amount of nutraceuticals in by-products from solvent and cold pressing methods of rice bran oil processing

Article Type: Original Article

Keywords: rice bran oil; by-products; nutraceutical; refining process; cold pressing process

Corresponding Author: Dr. monthana weerawatanakorn,

Corresponding Author's Institution: Naresuan University

First Author: Donporn Wongwaiwech

Order of Authors: Donporn Wongwaiwech; monthana weerawatanakorn; Somsak Tharatha; Chi-Tang Ho

Abstract: Rice bran oil (RBO) has become a popular oil globally. However, the RBO extraction process leaves various residue products, which contain bioactive substances of varying potency which could be significant sources of functional ingredients for both food production and pharmaceutical manufacture. The objective of our study was to compare the bioactive substances in various by-products derived from the two rice bran oil processing methods; solvent extraction and cold pressing. The residues from solvent extraction processing contained up to 97.37 mg/100 g of  $\gamma$ -aminobutyric acid in defatted rice bran, and the rice acid oil contained high levels of vitamin E (tocopherols, tocotrienols), up to 120.59 mg/100 g, as well as  $\gamma$ -oryzanol (3,829.65 mg/100 g), phytosterol (599.40 mg/100 g), and policosanol compounds (332.79 mg/100 g). All of these values are higher than in the residues derived from cold pressing. Importantly, high amounts of total nutraceuticals (8.3 kg/100 kg) were found in residues from both processing methods, indicating the commercial potential of these residues as a source of functional ingredients for food production, as dietary supplements, and in pharmaceutical manufacture.

Suggested Reviewers: Chih-Yu Lo  
foodsci.ncyu@gmail.com

Scientific Expertise: Flavor Research, Nutraceutical, Instrumental Analysis and

Analytical Chemistry.

Auemporn Prawan  
peuamd@kku.ac.th

Drug metabolism and Pharmacogenetics; Antioxidant research;  
Cancer research

Min-Hsiung Pan  
mhpan@ntu.edu.tw

Opposed Reviewers:



Department of Agro-Industry  
Faculty of Agriculture Natural Resources and Environment  
Naresuan University, Phitsanulok, Thailand  
65000  
Tel: 66-55-962735  
Fax: 66-55-962703

Dear Editor

Journal of Food and Drug Analysis

I am sending you our manuscript entitled "Comparative study on amount of nutraceuticals in by-products from solvent and cold pressing methods of rice bran oil processing" by Monthana Weerawatanakorn<sup>1</sup> as a corresponding author and Donporn Wongwaiwech<sup>1</sup>, Somsak Tharatha<sup>2</sup>, Chi-Tang Ho<sup>3</sup>, as co-authors. We would like to have the manuscript considered for publication in Journal of Food and Drug Analysis. We confirm that the manuscript has not been published elsewhere and is not under consideration by other journals. All authors have approved the manuscript and agree with its submission to the Journal. Please let me know of your decision at your earliest convenience.

With my best regards,



Monthana Weerawatanakorn, PhD

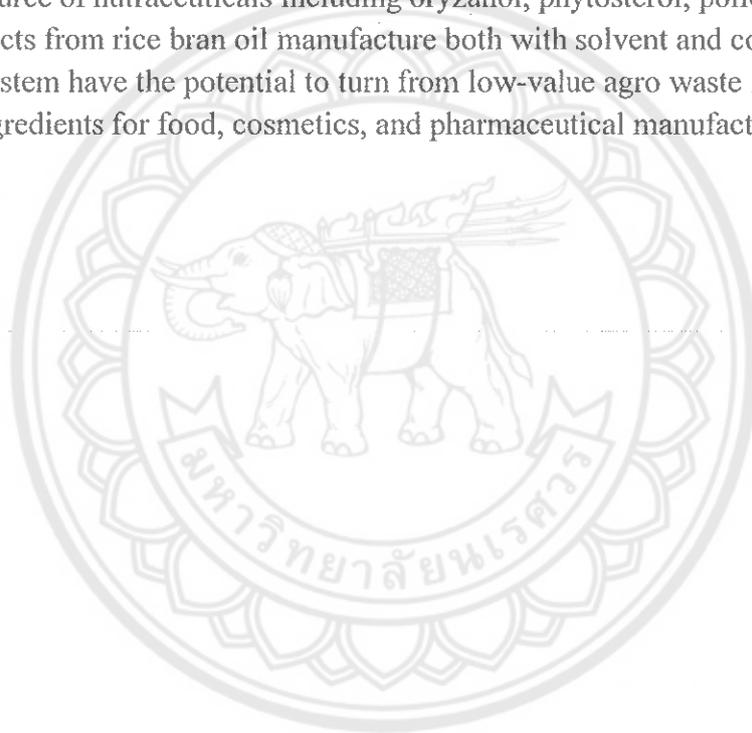
<sup>1</sup>Department of Agro-Industry, Faculty of Agriculture, Natural Resources and Environment, Naresuan University, Phitsanulok 65000, Thailand

<sup>2</sup>Central Laboratory (Thailand) Co., Ltd., 164/86 Moo 3, Donkaew, Maerim, Chiangmai 50180, Thailand

<sup>3</sup>Department of Food Science, Rutgers University, 65 Dudley Road, New Brunswick, New Jersey 08901, USA

## Highlights

1. Total nutraceuticals contents (6.6 kg/100 kg) found in by-products from solvent extraction and refining processes of rice bran oil production was higher than from cold pressed extraction process (1.7 kg/100 kg).
2. In Thailand, the total amount of bioactive substances including GABA,  $\gamma$ -oryzanol, phytosterol, vitamin E, and policosanols remained in defatted rice bran, the most abundant by-products discarded from rice bran oil manufacture, is estimated around 3,200 tons per year.
3. Gamma-oryzanol was found to be predominant bioactive component in the by-products from both rice bran oil processes. By products including filter cake, acid oil, and wax contain are interesting source of nutraceuticals including oryzanol, phytosterol, policosanol compound.
4. The by-products from rice bran oil manufacture both with solvent and cold pressed production system have the potential to turn from low-value agro waste into high-value functional ingredients for food, cosmetics, and pharmaceutical manufacture.



# Rice bran



Solvent extraction process

Rice bran crude oil

Degumming

Neutralization

Bleaching

Dewaxing

Deodorization

Winterization

COOKING RICE BRAN OIL

Cold-pressed extraction process

Rice bran crude oil

1st Filtration

2nd Filtration

Sterilize with UV sterilizer

FUNCTIONAL RICE BRAN OIL

A ton

of waste products

66 kg

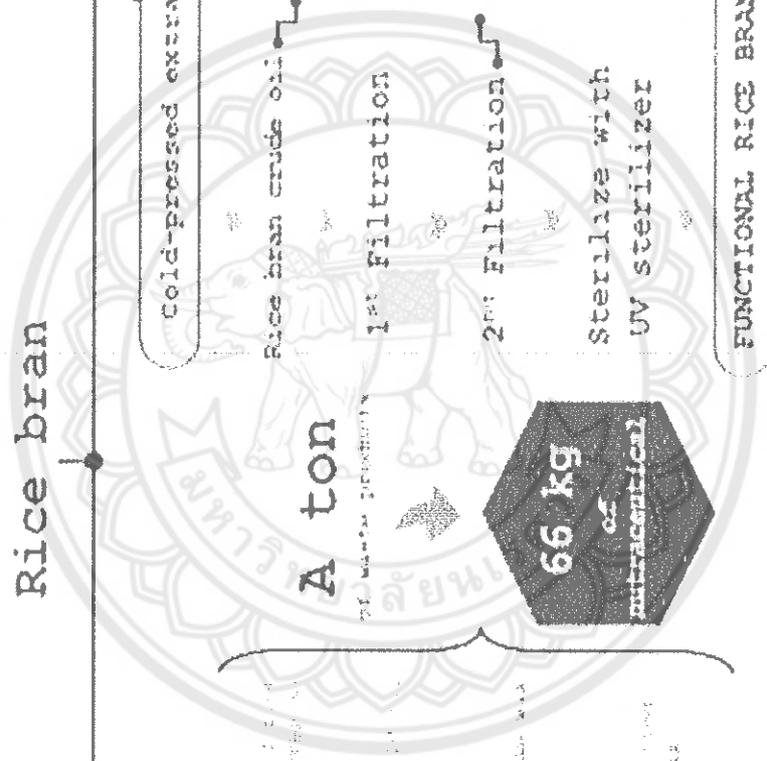
of nutraceutical

A ton

of waste products

17 kg

of nutraceutical



1 **Article category: Original article**

2

3 **Comparative study on amount of nutraceuticals in by-products**  
4 **from solvent and cold pressing methods of rice bran oil processing**

5

6 Donporn Wongwaiwech<sup>1</sup>, Monthana Weerawatanakorn<sup>1\*</sup>, Somsak Tharatha<sup>2</sup>, Chi-Tang Ho<sup>3</sup>

7 <sup>1</sup> Department of Agro-Industry, Naresuan University, 99 Moo 9, Tha Pho, Phitsanulok 65000,

8 Thailand

9 <sup>2</sup> Central Laboratory (Thailand) Co., Ltd., 164/86 Moo 3, Donkaew, Maerim, Chiangmai 50180,

10 Thailand

11 <sup>3</sup> Department of Food Science, Rutgers University, 65 Dudley Road, New Brunswick, New

12 Jersey 08901, USA

13

14 **Corresponding Author**

15 Monthana Weerawatanakorn

16 Department of Agro-Industry, Naresuan University, Phitsanulok 65000, Thailand

17 Tel.: +66 0629514194.

18 E-mail address: monthanac@nu.ac.th (M. Weerawatanakorn)

19

20

21

## 22 ABSTRACT

23 Rice bran oil (RBO) has become a popular oil globally. However, the RBO extraction  
24 process leaves various residue products, which contain bioactive substances of varying potency  
25 which could be significant sources of functional ingredients for both food production and  
26 pharmaceutical manufacture. The objective of our study was to compare the bioactive substances  
27 in various by-products derived from the two rice bran oil processing methods; solvent extraction  
28 and cold pressing. The residues from solvent extraction processing contained up to 97.37 mg/100  
29 g of  $\gamma$ -aminobutyric acid in defatted rice bran, and the rice acid oil contained high levels of  
30 vitamin E (tocopherols, tocotrienols), up to 120.59 mg/100 g, as well as  $\gamma$ -oryzanol (3,829.65  
31 mg/100 g), phytosterol (599.40 mg/100 g), and policosanol compounds (332.79 mg/100 g). All  
32 of these values are higher than in the residues derived from cold pressing. Importantly, high  
33 amounts of total nutraceuticals (8.3 kg/100 kg) were found in residues from both processing  
34 methods, indicating the commercial potential of these residues as a source of functional  
35 ingredients for food production, as dietary supplements, and in pharmaceutical manufacture.  
36  
37 **Keywords:** rice bran oil, by-products, nutraceutical, refining process, cold pressing process.  
38

## 39 1. Introduction

40 Rice (*Oryza sativa L.*) is a valuable crop as an economic commodity in many regions, as  
41 well as being the staple food crop in many countries. In Thailand, rice production was more than  
42 25 million metric tons of paddy rice in 2015 [1] and the rice milling process leaves rice bran as a  
43 by-product which constitutes about 12-23 % of rice bran oil [2]. Rice bran contains large  
44 amounts of varying nutraceuticals [3], meaning that the rice bran oil extracted and refined from  
45 rice bran is a nutritious oil, which has led to becoming a popular foodstuff consumed globally.  
46 Thailand has nine rice bran oil companies with fourteen of the extraction and refining factories  
47 and produce the crude rice bran oil about 140,000 ton or 4,200 million baht each year. More than  
48 640,000 ton of defatted rice bran are remained as low-value agro waste mainly used in the feed  
49 industries.

50 In Thailand, RBO produced from solvent (normally hexane) extraction is preferred as a  
51 cooking oil, after further refinement, while the oil produced by cold pressed extraction is  
52 considered to be a superior functional oil as a dietary supplement and medicinal purposes. After  
53 solvent extraction, further refining of the rice bran oil involves degumming, neutralization,  
54 bleaching, dewaxing and deodorizing to produce quality cooking oil, resulting in large amount of  
55 waste products left from the processes [4]. Degumming involves the removal of phospholipids  
56 and lipoproteins through hydration by water with citric or phosphoric acid [5]. Free fatty acids  
57 (FFAs) are removed by caustic soda (NaOH) in the neutralization process [6]. Rice acid oil  
58 (RAO) is the major waste product from these two steps. Then, the bleaching step is applied to  
59 remove the pigments (including chlorophylls and carotenoids) of the RBO by adsorption on  
60 activated carbon or bleaching earth [7]. A dewaxing and winterization steps follow by  
61 maintaining the oil at a low and very low temperature respectively to cause the solidified waxes

62 and other high melting point substances as well as high melting point wax are separated as waste  
63 products [4,7]. The cold pressed RBO is produced by compressing the rice bran through a  
64 mechanical screw press under mild heating ( $<50^{\circ}\text{C}$ ), and the resulting oil is then filtered through  
65 filter paper, to produce the refined functional oil [8]. Defatted rice bran and filter cake are the  
66 main by-products from this process.

67 During both processes, a considerable amount of by-product is produced, some of which  
68 contains more or less quantities of potential ingredients for functional food, nutraceuticals and  
69 pharmaceutical manufacture [9]. These ingredients include mainly of  $\gamma$ -oryzanol, tocotrienol,  
70 tocopherol, phytosterol lecithin, carotenoids and long-chain alcohols [10]. Rice bran wax (RBW)  
71 is also a rich source of aliphatic primary alcohols known as policosanols and many studies have  
72 shown that rice policosanols moderately decrease plasma cholesterol levels in  
73 hypercholesterolemic patients [11, 12], reduce platelet aggregation [13].

74 Understanding the bioactive compounds from rice bran lost into the waste product in the  
75 RBO processes, and the importance of these by-products as the source of functional ingredients,  
76 is important to and of benefit not only to the rice bran oil industry, but also to the associated  
77 industries of functional food, nutraceutical and pharmaceutical manufacture. The objective of the  
78 present study was therefore, first, to analyze the bioactive substances, including  $\gamma$  –  
79 aminobutyric acid (GABA), tocopherol, tocotrienol,  $\gamma$ -oryzanol, phytosterols, and the  
80 policosanol content, in the various by-products from the RBO processes, then to quantify and  
81 compare the amounts of these bioactive compounds extractable from the by-products from both  
82 the solvent extraction and cold pressed extraction processes.

83

## 84 2. Materials and Methods

### 85 2.1. Materials

86 Samples of the residue from processing RBO (cooking oil) using the solvent extraction  
87 were provided by Surin Bran Oil Co., Ltd (Buri Ram, Thailand), and other samples of by-  
88 products produced from the cold pressed extraction system were provided by at Lopburi  
89 Vegetable Oil Industries (Lopburi, Thailand). The samples from both organisations were  
90 collected directly from the processing line, immediately after each refining operation. The  
91 collected samples were kept in plastic containers at  $-20^{\circ}\text{C}$  until used.

92 The samples collected from the solvent extraction process were followed the scheme  
93 shown in Fig. 1a. Defatted rice bran (DFRB-S) was obtained by hexane extraction at  $50^{\circ}\text{C}$ ; rice  
94 acid oil (RAO) was obtained by the neutralization process; the dewaxing process at  $15^{\circ}\text{C}$   
95 produced wax (RBW) and high-melting point wax (HMW) was obtained in the winterization  
96 step at  $5^{\circ}\text{C}$ . The samples from the cold pressed extraction process were collected as the chart  
97 shown in Fig. 1b, composed of defatted rice bran from a screw press (DRFB-C), and filtered  
98 cake (FC); filtered through a  $0.25\ \mu\text{m}$  filter paper. The various final by-products used in this  
99 study are summarized in Table 1. In all cases, two different lots of samples were analyzed in  
100 triplicate.

101

102 **2.2. Reagents and standards**

103  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA) (PubChem CID: 119), 5 $\alpha$ -cholestane (PubChem CID:  
104 272895) and policosanols standards including docosanol (C22) (PubChem CID: 12620),  
105 tetracosanol (C24) (PubChem CID: 10472), hexacosanol (C26) (PubChem CID: 68171),  
106 octacosanol (C28) (PubChem CID: 68406) and triacontanol (C30) (PubChem CID: 68972) were  
107 purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Tocopherol and tocotrienol mixed  
108 solution standard were purchased from ChromaDex (Irvine, CA, USA). Total  $\gamma$ -oryzanol (98.5%)  
109 (PubChem CID: 5282164) standard was purchased from Tsuno Rice Fine Chemical Co., Ltd  
110 (Wakayama, Japan).

111 Derivatizing reagents and norvaline (PubChem CID: 65098) was from the Phenomenex  
112 (Torrance, CA, USA) EZ: faast amino sample test kit for GC/MS profiling of protein  
113 hydrolysates. The silylation reagent, *N,O*-bis(trimethylsilyl)-trifluoroacetamide (BSTFA)  
114 (PubChem CID: 5366669), with 1% trimethylchlorosilane (TMCS) (PubChem CID: 6397), and  
115 pyrogallol (PubChem CID: 1057) was purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).

116 Ethanol (PubChem CID: 702), sodium chloride (PubChem CID: 5234), hexane (PubChem  
117 CID: 8058), ethyl acetate (PubChem CID: 8857), chloroform (PubChem CID: 6212), toluene  
118 (PubChem CID: 1140), methanol (PubChem CID: 887) and acetonitrile (PubChem CID: 6342)  
119 were purchased from RCI Labscan (Bangkok, Thailand). 2-Propanol (PubChem CID: 3776),  
120 potassium hydroxide (KOH) pellets (PubChem CID: 14797) and pyridine (PubChem CID: 1049)  
121 were purchased from Merck Millipore (Darmstadt, Germany).

122

123

124

125 **2.3.  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA) analysis**

126 **2.3.1. Extraction of GABA**

127 Briefly, 3 g sample was placed in polypropylene tubes containing 15 mL of 70% (v/v)  
128 ethanol solution. The mixture was shaken for 1 h and then centrifuged at 3,000 rpm at 25 °C for 10  
129 min.

130 **2.3.2. Purification of extracts and derivatization of GABA**

131 Purification and derivatization were done with an EZ:faast amino acid test kit (Phenomenex)  
132 for GC/MS profiling of protein hydrolysates by following the instructions offered by the company  
133 with slightly modification. A 100  $\mu$ L volume of extract or standard solution and 50  $\mu$ L of internal  
134 standard (0.20 mM norvaline in 20 mM HCl) were pipetted into a glass vial and passed through a  
135 solid phase extraction tip (SPE) came with the "EZ:faast" kit. The amino compounds were eluted  
136 from the solid phase with alkaline eluting medium (200  $\mu$ L) composing of sodium hydroxide  
137 solution *n*-propanol and 3-picoline.

138 The obtained eluate was thoroughly mixed with an organic solution (50  $\mu$ L) consisting of  
139 chloroform as the derivatizing reagent by vortexing for 30 s. The derivates were then extracted  
140 by mixture of chloroform and isooctane (100  $\mu$ L) followed by vortexing for 30 s and the chemical  
141 reaction was then allowed to progress for 2 min. The derivates were then redissolved in a  
142 mixture of chloroform and isooctane (10/90, v/v). When the mixture was separated, the  
143 supernatant (150  $\mu$ L) was put into a GC vial for analysis. The derivatization was freshly  
144 performed.

145 **2.3.3. GABA GC-MS conditions**

146 GABA analysis was modified from method of Shigematsu et al [14] with modifications.  
147 GC-MS analysis was performed using a Zebtron ZB-AAA column (10 m  $\times$  0.25 mm i.d  $\times$  film

148 thickness 0.25  $\mu\text{m}$ , provided with the EZ:faast amino acid test kit). The 2  $\mu\text{L}$  of derivatized  
149 sample were injected into the GC-MS analysis (Agilent Technologies 5973, 6890N) using an  
150 ionization energy of 70 eV with a split ratio of 1:15. GABA were separated using programmed  
151 oven temperatures initially set at 110°C then raised to 150°C at a rate of 20°C/min; in the next  
152 phase the temperature was raised by 30°C/min up to 300°C and held for 2 min. The injector and  
153 detector temperatures were set at 320°C. Helium as the carrier gas was set at 1.1 mL/min. GABA  
154 were identified and quantified by a SIM (single ion monitoring) mode according to their  
155 retention times and MS spectra. Norvaline was used for the internal standard. Norvaline (158,  
156 72) and GABA (130, 144, 17) were identified and quantified according to their molecular target  
157 ion,  $m/z$ , retention time and EZ:faast mass spectral library (Phenomenex).

#### 158 *2.4. $\gamma$ -oryzanol, tocopherol (Ts) and tocotrienol (T3s) analysis*

##### 159 *2.4.1. Extraction of $\gamma$ -oryzanol, Ts and T3s*

160  $\gamma$ -oryzanol, Ts and T3s were determined using a modified method of Azrina et al [15].  
161 One gram of samples were extracted with 15 mL of chloroform and methanol mixture (3:2, v/v),  
162 then vortexed for 10 min, and the mixture allowed to react for 30 min following centrifugation  
163 (10 min, 2,500 rpm). The 500  $\mu\text{L}$  of supernatant was filtered using a 0.45  $\mu\text{m}$  syringe filter and  
164 the solution was added to 500  $\mu\text{L}$  of acetonitrile, methanol and isopropanol mixture (25:70:5  
165 v/v). An aliquot was injected onto the HPLC for Ts and T3s and LC-MS for  $\gamma$ -oryzanol.

##### 166 *2.4.2. $\gamma$ -oryzanol LC-MS conditions*

167 The identification and quantification of  $\gamma$ -oryzanol was performed with a LC-MS using a  
168 modification of the method of Sakunpak et al [16]. HPLC analysis was performed using an  
169 Agilent Technologies 1100 with diode array detector (DAD) connected to an Agilent  
170 Technologies 1100 auto injector. The sample was separated at 40 °C on an Agilent Zorbax

171 Eclipse XDB-C18 column (4.6 × 150 mm, 5 μm) using mobile phase consisting of acetonitrile,  
172 methanol and isopropanol (25:70:5 v/v) with a flow rate of 1 mL/min (18 min). Injection volume  
173 was 20 μL and The γ -oryzanol was determined by UV detection at wavelengths of 298 and 325  
174 nm. The mass spectrometer was an Agilent Technologies LC/MSD SL equipped with an  
175 electrospray ion source (ESI). The ESI-MS spectra were acquired in positive ionization mode  
176 with the follows: capillary voltage, 4000 V; nebuliser pressure, 50 psi; gas temperature, 350 °C;  
177 drying gas, 13.01/min and recorded on a mass range of  $m/z$  200-800. The γ -oryzanol was  
178 identified by Agilent Mass Hunter software and based on retention time indicated in the  
179 standards.

#### 180 **2.4.3. Ts and T3s RP-HPLC conditions**

181 The Ts and T3s components of rice bran lipid were separated by reverse-phase HPLC  
182 determined using method modified from Chen and Bergman [17]. The HPLC system consisted  
183 of an Agilent Technologies 1100 with diode array detector (DAD). The injection volume was 20  
184 μL and the samples were separated at 40 °C on a Luna CN 100A column (4.6 × 250 mm, 5 μm).  
185 The initial mobile phase conditions of extraction were 94% MeOH and 6% deionized water, at a  
186 flow rate of 1 mL/min, for 12 min. The mobile phase was then changed linearly to 25%  
187 acetonitrile, 70% MeOH, 5% IsOH, and 0.1% of aq acetic acid and held there for 8 min. The Ts  
188 and T3s (δ, β, γ and α forms) were determined by UV/UV-Vis detection at wavelengths of 298  
189 and 328 nm. The Ts and T3 were identified based on retention time indicated in the standards.

#### 190 **2.5. Phytosterol analysis**

##### 191 **2.5.1. Extraction of phytosterol**

192 The extraction was conducted based on methods of Beveridge et al [18] and Thanh et al  
193 [19] with some modification. A 1g sample was accurately weighed into a screw tube and spiked

194 with 1 mL internal standard into the matrix, followed by 2 mL of KOH (60%), 2 mL of ethanol  
195 95%, 2 mL of NaCl (10%) and 0.3 g of pyrogallol (antioxidant). The mixture was saponification  
196 under nitrogen (N<sub>2</sub>) and then incubated at 70°C for 45 min (vortexed every 15 min) to ensure  
197 complete saponification. After cooling the solution in an ice bath, the saponified portion was  
198 extracted with 15 mL of hexane: ethyl acetate (9:1, v/v) twice. The upper layer (unsaponifiables)  
199 was collected into a glass tube and the solvent evaporated to dryness under a stream of N<sub>2</sub> at 45  
200 °C.

### 201 **2.5.2. Phytosterol derivatization**

202 The sterols derivatization were prepared following a method modified from Beveridge et  
203 al [18]. The residue was mixed with 200 µL of *N,O*-bis(trimethylsilyl)-trifluoroacetamide  
204 (BSTFA) with 1% trimethylchlorosilane (TMCS) and 100 µL of pyridine, and heated at 60 °C  
205 for 30 min, then evaporated to dryness under a stream of N<sub>2</sub> at 45 °C. The residues were  
206 dissolved with 1 mL hexane and the solution was filtered using a 0.45 µm syringe filter and then  
207 transferred into a vial for GC-MS analysis.

### 208 **2.5.3. Phytosterol GC-MS conditions**

209 The quantification and identification of sterols was performed by a Gas chromatography–  
210 mass spectrometry (GC-MS) using a modified method of Thanh et al [19]. The fused silica  
211 capillary GC column was a DB-5ms (30 m×0.25 mm i.d.× film thickness 0.25 µm). Samples (1  
212 µL) were injected using an Agilent Technologies 7683 Auto Sampler and a split injector with a  
213 split ratio of 1:50. The sterols were separated using programmed oven temperatures originally set  
214 at 100 °C (1 min), then raised to 300 °C (14 min) at a rate of 10 °C/min. Helium was used as the  
215 carrier gas, at a flow rate of 1.5 mL/min. The ionization energy was set to 70 eV. The injector,  
216 MS quad temperatures, MS source and transfer line were 270, 150, 230, and 280 °C,

217 respectively. TMS-phytosterols were identified and quantified by a SIM (single ion monitoring)  
218 mode according to their retention times and MS spectra. Cholestane was used for the internal  
219 standard. The  $m/z$  ratios of the ions used for the quantitative analysis of the TMS; Cholestane  
220 (374), TMS; Campesterol (382), TMS; Stigmasterol (484), TMS;  $\beta$ -sitosterol (486) and TMS;  
221 Sitostanol (488)

## 222 **2.6. Policosanols (PCs) analysis**

### 223 **2.6.1. Extraction of PCs**

224 PCs were extracted from full-fatted samples (FC, RBW, RAO and HMW) following the  
225 method of Ishaka et al [20] with some modification. A 1g sample was placed into a  
226 polypropylene tube and hydrolyzed with 0.2 M NaOH (10 mL) prepared in methanol aqueous  
227 solution (1:3, v/v) following sonication (8510 Branson Ultrasonics Co., Danbury, CT, USA) 44  
228 Hz (250 W) at 60 °C (90 min). The hydrolyzed sample was then extracted with toluene, cooled  
229 down to 2 °C. After centrifugation at 4,000 rpm, the upper layer was collected into a glass tube  
230 and filtered using a 0.45  $\mu$ m filter.

231 PCs were extracted from the defatted samples (DFRB-C and DFRB-S) according to the  
232 method of Asikin et al [21]. The defatted sample (5 g) was extracted by Soxhlet method in  
233 cellulose thimbles (Whatman 33 mm $\times$ 100 mm) with the solvent mixture of hexane and methanol  
234 (20:1 v/v) for 18 h. The solvent mixture were then removed using a rotary vacuum evaporator at  
235 40°C. The obtained extracts were then diluted with toluene and filtered by syringe filter (0.45  
236  $\mu$ m) for further derivatization.

### 237 **2.6.2. PCs derivatization**

238 Samples of each of the PCs derivatives were prepared using a method modified from  
239 Asikin et al [22]. A 200  $\mu$ L extract sample was mixed with 100  $\mu$ L of *N,O*-bis(trimethylsilyl)-

240 trifluoroacetamide (BSTFA) with 1% trimethylchlorosilane (TMCS). The mixtures were heated at  
241 50 °C for 30 min. An aliquot of each was injected onto a GC-MS column.

### 242 *2.6.3. GC-MS conditions*

243 Separation, identification and quantification of the PCs were determined using the  
244 method modified from Asikin et al [22]. The PCs were identified by their trimethylsilyl

245 derivatives. Analysis was performed with an Agilent Technologies 6890 fitted with an Agilent  
246 DB-5ms fused silica capillary column (0.25 mm × 30 m × film thickness 0.25 µm). The GC  
247 injector was set at 350 °C. The sample volume of 1 µL was injected using an Agilent  
248 Technologies 7683 Auto Sampler with a split ratio of 1:10. The PCs were separated using  
249 programmed oven temperatures initially started at 150 °C and increased to 320 °C (15 min) at the  
250 rate of 4 °C/min. For MS detection, the electron impact (EI) ion source temperature was set to  
251 200 °C and the transfer line temperature set to 280 °C. Mass spectra were taken at 70 eV; a SIM  
252 mode (single ion monitoring) was set for identified and quantified TMS-PCs. TMS; docosanol  
253 (C<sub>22</sub>), TMS; tetracosanol (C<sub>24</sub>), TMS; hexacosanol (C<sub>26</sub>), TMS; octacosanol (C<sub>28</sub>) and TMS;  
254 triacontanol (C<sub>30</sub>) were identified and quantified according to their retention times and molecular  
255 target ion, *m/z* at 383, 411, 439, 467 and 495 respectively.

### 256 *2.7. Statistical analysis*

257 All data obtained in this study were analyzed statistically. The results are expressed as  
258 means ± standard deviation (SD) based on dry weight for the triplicate analyses on the same  
259 sample. Differences among average values were estimated by analysis of variance (ANOVA)  
260 with the application of Duncan's tests using SPSS 19 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Average  
261 values were considered significantly different when  $P \leq 0.05$ .

262

### 263 3. Results and discussion

264 The significant body of evidence associating dietary phytochemicals with health benefits  
265 has spurred the tremendous development of nutraceuticals, dietary supplements and functional  
266 food manufacture [23]. Given the evidence of the acceptability and availability of the by-  
267 products from the food processing industries, these are now considered as the significant sources  
268 of functional ingredients in secondary food processing industries [24], and the by-products from  
269 rice bran oil manufacture are one of the most promising sources since the growing number of  
270 RBO manufacturers especially in the South East Asian area, producing large amounts of agro-  
271 industrial by-products. However, the quantities of those bioactive compounds lost in unused  
272 waste product from these various rice bran oil extraction processes has not been studied in detail.  
273 This prompted us to compare the remaining amounts of the various bioactive compounds in the  
274 by-products from both the solvent extraction and cold pressed extraction processes.

#### 275 *3.1. GABA contents of the by-products from rice bran oil processing*

276 Table 2 presents GABA contents of waste products from rice bran oil process including  
277 DFRB-C, FC, DFRB-S, RBW, RAO and HMW. The highest level of GABA was found in  
278 DFRB-S (97.36 mg/100 g) followed by FC (17.17 mg/100 g) and DFRB-C (12.04 mg/100 g).  
279 Our results showed that solvent extraction by hexane caused a greater loss of GABA into DFRB  
280 than the cold pressed process. GABA is a polar non-protein amino acid compound [25] and is  
281 able to dissolve in strongly polar than in the moderate and weak polar solvents. According to the  
282 principle of “like dissolves like” [26], GABA cannot be extracted efficiently with high non polar  
283 solvents (hexane) and remains in the DFRB-S as a by-product of the process. The result and  
284 explanation here was also in accordance with the sample including RAO, RBW, and HMW  
285 which are the fat based byproducts from the solvent extraction process. FC and DFRB-C,

286 however, was produced by the cold pressing process which uses a mechanical machine to extract  
287 RBO, by crushing or pressing, resulting in these by-products containing some amount of GABA  
288 compared with the RBO by-products from the solvent extraction process.

289 *3.2. Gamma-oryzanol, tocotrienol (T3s), tocopherol (Ts), and phytosterol contents of the by-*  
290 *products from rice bran oil processing*

291 The amount of  $\gamma$ -oryzanol obtained by LC-MS is shown in Table 3. The  $\gamma$ -oryzanol peaks  
292 identified included cycloartenyl ferulate ( $m/z$  601.3), 24-methylene cycloartenyl ferulate ( $m/z$   
293 615.3), campesteryl ferulate ( $m/z$  575.3) and  $\beta$ -sitosteryl ferulate ( $m/z$  589.3) as indicated in Fig.  
294 2, which agreed with the results found by Pestana et al [4]. In general,  $\gamma$ -oryzanol is mainly  
295 composed of esters of trans-ferulic acid (hydroxycinnamic acid) with phytosterols predominantly  
296 including cycloartenol,  $\beta$ -sitosterol, 24-methylenecycloartenol and campesterol [10].

297 A significant amount of  $\gamma$ -oryzanol was found in RAO (3,901.59 mg/100 g) followed by  
298 FC (1,058.28 mg/100 g) and RBW (862.80 mg/100 g) (Table 3) and the major oryzanols found  
299 in RAO were cycloartenyl ferulate and 24-methylene cycloartenyl ferulate (Fig. 2b). The data  
300 shows that the neutralization step in the extract refining process of the RBO from the solvent  
301 extraction system caused significant loss of  $\gamma$ -oryzanol into the RAO. The result found is in  
302 agreement with the results reported by Pestana et al [4], thus strongly confirming that nearly all  
303 the  $\gamma$ -oryzanol was precipitated during the neutralization step. The strength of the alkali  
304 condition used during the refining process for the neutralization of the crude oil promoted  
305 carrying over of  $\gamma$ -oryzanol to the RAO. The loss of  $\gamma$ -oryzanol when using caustic soda or  
306 solvents and steam in the refining step of the high free fatty acid crude RBO was also reported by  
307 Yoon and Kim [27]. They found that 12-59% of the  $\gamma$ -oryzanol was lost during the refining  
308 process, using caustic substances [27]. This study strongly confirms that the gamma oryzanol

309 content in acid oil from refining process of RBO is high at 3.9% and it is worth turning acid oil  
310 to high value of gamma oryzanol source for medicinal and pharmaceutical manufacture.

311 The tocotrienol (T3s) and tocopherol (Ts) contents are shown in Table 3. The  
312 chromatograms found (Fig. 1S) (supplementary data) were in accordance with the data of Pestana-  
313 Bauer et al [5]. The maximum amount of total vitamin E (T3s+Ts) in the by-product from RBO  
314 process was 120.59 mg/100 g (RAO) whereas the minimum was 6.47 mg/100 g (DFRB-S).

315 Compared with tocopherol (Ts), the tocotrienol (T3s) form of vitamin E is the major form of  
316 vitamin E found in all by-products. The greater amount of T3s was found in RAO (106 mg/100  
317 g), followed by FC (97.38 mg/100 g) and the highest amount of Ts was also found in the RAO  
318 (60 mg/100 g). This was higher than the total concentration of Ts in crude RBO (53 mg/100 g)  
319 [7]. For this reason, it is of interest to recover both T3s and Ts from the RAO. The  $\beta$  form of both  
320 T3s and Ts were present in minor concentrations in the residues from RBO process. This data  
321 agreed with Pestana et al [28] and other authors confirming that  $\beta$ -tocopherol was present in minor  
322 concentrations in RBO. The most abundant of the T3s was  $\gamma$ -T3s that found in RAO (86.01  
323 mg/100 g), followed by  $\alpha$ -T3s found in RBW (18.45 mg/100 g) and  $\delta$ -T3s found in RAO (6.19  
324 mg/100 g) as indicated in Table 3.

325 Compared with from solvent extraction, the cold pressed extraction process left high  
326 amounts of the remaining  $\gamma$ -oryzanol (229.76 mg/100 g) and total vitamin E (28.25 mg/100 g) in  
327 the defatted rice bran (Table 3). Generally, crude RBO contains  $\gamma$ -oryzanol 1,599-1,666 mg/100  
328 g [29] and vitamin E in terms of tocopherol and tocotrienol 53 mg/100 g and 82.5 mg/100 g,  
329 respectively [7]. Therefore, solvent extraction appears to offer higher extraction efficiency, but  
330 the refining process of the solvent extraction system may cause a great loss of these bioactive  
331 compounds into the other waste, such as RAO from the neutralization step and wax from the

332 winterization step. Finally, the defatted rice bran as a by-product from cold pressed extraction  
333 method should receive much greater attention in terms of being a source of  $\gamma$ -oryzanol and  
334 vitamin E.

335 The phytosterol contents of the by-products from the RBO process are also listed in Table  
336 3 and the chromatograms of the phytosterol components of the standard and by-product RAO,

337 with the comparison with the mass spectra fragmentation pattern, are shown in Fig. 3 (a) & (b).

338 The five characteristic peaks were identified as cholestane (internal standard) (peak 1 *tR* 20.38  
339 min), campesterol (peak 2, *tR* 23.43 min), stigmasterol (peak 3, *tR* 23.68 min),  $\beta$ -sitosterol (peak  
340 4, *tR* 24.35min) and sitostanol (peak 5, *tR* 24.51min) and mass fragmentation pattern of individual  
341 phytosterols are indicated in Table 1S (supplementary data).

342 The highest amount of total phytosterol was found in RAO (599.40 mg/ 100 g) following  
343 by FC (243.98 mg/100g) and the most abundant phytosterol found was  $\beta$ -sitosterol, followed by  
344 stigmasterol and campesterol. The results are in agreement with other reports [29–31]. The  
345 phytosterol contents of RAO were in the same range as those reportedly found in RAO (457-564  
346 mg/100g) from the RBO refining process [29]. These results indicate that RAO produced from  
347 the solvent extraction system and FC produced from the cold pressed extraction system are both  
348 promising source of phytosterol as functional ingredients.

### 349 *3.3. Policosanol contents of the by-products from rice bran oil processing*

350 RB is a good source of waxes consisting of aliphatic primary alcohols, mainly docosanol  
351 ( $C_{22}$ ), tetracosanol ( $C_{24}$ ), hexacosanol ( $C_{26}$ ), octacosanol ( $C_{28}$ ) and triacontanol ( $C_{30}$ ), known as  
352 policosanols (PCs) [32–34]. Consequently, both RBO and the by-products from the RBO process  
353 retain significant amount of PCs. Many studies have reported the serum lipid-lowering properties  
354 of PCs which can be used as cholesterol lowering nutraceuticals [35–37]. In this study, the data

355 shown in Table 4 indicates the varying but significant amounts of PCs from various by-products  
356 of the RBO process. The PCs concentrations were calculated based on the peak area of each  
357 standard curve. Each PC component was identified by the mass fragment pattern of its derivative  
358 as the target ion in *m/z*. including *m/z* 383 (qualifier ions, *m/z* 103, 384, 385), *m/z* 411 (qualifier  
359 ions, *m/z* 103, 412, 413), *m/z* 439 (qualifier ions, *m/z* 103, 440, 441), *m/z* 467 (qualifier ions, *m/z*  
360 103, 468, 469), and *m/z* 495 (qualifier ions, *m/z* 103, 496, 497) for docosanol (C<sub>22</sub>-OH),  
361 tetracosanol (C<sub>24</sub>-OH), hexacosanol (C<sub>26</sub>-OH), octacosanol (C<sub>28</sub>-OH), triacontanol (C<sub>30</sub>-OH),  
362 respectively [21] as indicated by the GC-MS chromatograms (Fig. 4).

363 In comparison with other residues, RBW from the solvent extraction system presented  
364 the highest amount of PCs (332.79 mg/100 g) followed by HMW (169.44 mg/100 g) and RAO  
365 (99.33 mg/100 g). These data was confirmed by the report of Cravotto et al [32] and Ishaka et al  
366 [20], showing that rice bran is a good source of PCs. The data given in Table 4 also agrees with  
367 the study by Kim et al [38] and Ishaka et al [20] who indicated that the predominant PCs  
368 components in rice were octacosanol (C<sub>28</sub>-OH) and triacontanol (C<sub>30</sub>-OH). The PCs content of  
369 the by-products RBW, HMW, RAO and FC, is even higher than the PCs contents of RBO from  
370 the cold pressed extraction system (74.9 mg/100 g) (data not shown).

371 Defatted rice bran (DFRB) is the predominant by-product of rice bran oil (RBO) both by  
372 solvent and cold pressed extraction system [23]. In the current study, we identified only a low  
373 amount of PCs in the DFRB contained as compared with other by-products that we tested.  
374 However, our previous data showed that extraction of the defatted rice bran from the cold-  
375 pressed rice bran oil process by saponification and purification gave higher amounts of PCs at  
376 the level of 6,005.28 mg/100 g [39]. In this current follow-up study we showed that the further  
377 processing of the extracts by separation and purification increased the level of PCs and other

378 nutraceuticals in the by-products. The result demonstrated that RBW and HMW from RBO  
379 process from solvent extraction system are a significant source of PCs.

380 *3.5. Comparative amount of nutraceuticals of the by-products from the solvent extraction and*  
381 *cold pressed extraction systems.*

382 The total of bioactive compounds remaining in the by-products from the whole RBO

383 process, both the solvent extraction and cold pressed extraction systems, are shown in Table 5.

384 Compared with the cold pressed extraction system, the solvent extraction system with its various  
385 refining steps generated a variety of by-products with a huge amount of the bioactive compounds  
386 remaining. These included GABA,  $\gamma$ -oryzanol, phytosterol, vitamin E, and policosanols in 6.6

387 kg/100 kg waste products remained.  $\gamma$ -oryzanol is the major nutraceutical found in the by-

388 products from both the solvent extraction (4,839.16 mg/100 g) and the cold pressed extraction

389 (1,288.04 mg/100 g) system. The results also demonstrate that most of the nutraceuticals,

390 including  $\gamma$ -oryzanol, phytosterol, PCs, and vitamin E, found in the by-products (Table 3 and 4),

391 exhibit health benefits especially in terms of reducing the risk of cardiovascular disease [40,41].

392 In Thailand, defatted rice bran, the most abundant by-products, was discarded from manufacture

393 about 640,000 tons each year (Report of International Conference on Rice Bran Oil 2017). This

394 finding here showed that total amount of bioactive compound found in defatted rice bran from

395 cold pressing method was 321.03 mg /100g and from solvent extraction process was 181.45

396 mg/100 g (Table 2-Table 5). Consequently, total amount of nutraceuticals remained in defatted

397 rice bran, one type of many types of by products from rice bran oil manufactures, is estimated

398 around 3,200 tons per year (based on 640,000 tons of defatted rice bran). Making use of these

399 disposed materials is not only smart economics, but also good for environment. With some extra

400 processes including extraction and purification, these by-products can move from low-value agro

401 waste to high-value bioactive ingredients that could benefit the food, cosmetics and drug  
402 industries.

#### 403 **4. Conclusions**

404 Defatted rice bran from the solvent extraction process showed the highest amount of  $\gamma$ -  
405 aminobutyric acid (GABA) (97.37 mg/100 g). The highest amounts of  $\gamma$ -oryzanol (3,829.65  
406 mg/100 g), tocopherol (106.94 mg/100 g), tocotrienol (60.72 mg/100 g), and total phytosterol  
407 (599.40 mg/100 g) were found in RAO from solvent extraction process. The RBW derived from  
408 the dewaxing step of the solvent extraction system contained the highest amount of PCs (332.79  
409 mg/100 g). The predominant PCs of rice bran oil waste product were triacontanol (C30) followed  
410 by octacosanol (C28). Total nutraceuticals of the by-products from the solvent extraction system  
411 (6.6 kg/100 g) was higher than that from the cold pressed extraction system (1.7 kg/100 g).

#### 412 *Acknowledgements*

413 This study was carried out as part of project number R2559B019 of the National  
414 Research Council of Thailand. Many thanks to Mr. Roy Morien of the Naresuan University  
415 Language Centre for his editing assistance and advice on English expression in this document.

#### 416 *Conflicts of interest*

417 All authors have no conflicts of interest to declare.

418

#### 419 *References*

- 420 [1] Thai rice exporters Association. Thai rice production, consumption, and stocks 2016.  
421 <http://www.thairiceexporters.or.th/production.htm> (accessed April 24, 2017).
- 422 [2] Samad N. Rice bran oil prevents neuroleptic-induced extrapyramidal symptoms in rats:  
423 Possible antioxidant mechanisms. *J Food Drug Anal* 2015;23:370–5.

- 424 doi:10.1016/j.jfda.2014.10.012.
- 425 [3] Prasad MN, Sanjay K, Khatokar MS, Vismaya M, Swamy SN. Health benefits of rice  
426 Bran - A review. *J Nutr Food Sci* 2011;1:1–7. doi:10.4172/2155-9600.1000108.
- 427 [4] Pestana VR, Zambiazzi RC, Mendonça CRB, Bruscatto MH, Ramis-Ramos G. The  
428 influence of industrial processing on the physico-chemical characteristics and lipid and  
429 antioxidant contents of rice bran. *Grasas Y Aceites* 2009;60:184–93.  
430 doi:10.3989/gya.075108. [In Spanish, English abstract]
- 431 [5] Pestana-Bauer VR, Zambiazzi RC, Mendonça CRB, Beneito-Cambra M, Ramis-Ramos G.  
432  $\gamma$ -Oryzanol and tocopherol contents in residues of rice bran oil refining. *Food Chem*  
433 2012;134:1479–83. doi:10.1016/j.foodchem.2012.03.059.
- 434 [6] Bhosle BM, Subramanian R. New approaches in deacidification of edible oils - A review.  
435 *J Food Eng* 2005;69:481–94. doi:10.1016/j.jfoodeng.2004.09.003.
- 436 [7] Orthoefer FT. Rice bran oil. In: Shahid F, editor. *Bailey's Ind. oil fat Prod.*, vol. 2. 6th ed.,  
437 John Wiley & Sons, Inc; 2005, p. 465–89.  
438 doi:http://dx.doi.org/10.1002/047167849X.bio015.
- 439 [8] Moreau RA, Kamal-Eldin A. Introduction. In: Moreau RA, Kamal-Eldin A, editors.  
440 *Gourmet Heal. Spec. oils*, vol. 1, Urbana, Illinois: AOCS Press; 2009, p. 1–13.  
441 doi:10.1016/B978-1-893997-97-4.50004-8.
- 442 [9] Liu Y, Yu J, Wang X. Extraction of policosanols from hydrolysed rice bran wax by high-  
443 intensity ultrasound. *Int J Food Sci Technol* 2008;43:763–9. doi:10.1111/j.1365-  
444 2621.2006.01232.x.
- 445 [10] Lerma-García MJ, Herrero-Martínez JM, Simó-Alfonso EF, Mendonça CRB, Ramis-  
446 Ramos G. Composition, industrial processing and applications of rice bran  $\gamma$ -oryzanol.

- 447 Food Chem 2009;115:389–404. doi:10.1016/j.foodchem.2009.01.063.
- 448 [11] Reisinger K, Gorzelanny C, Daniels U, Moerschbacher BM. The C28 aldehyde octacosanal  
449 is a morphogenetically active component involved in host plant recognition and infection  
450 structure differentiation in the wheat stem rust fungus. *Physiol Mol Plant Pathol*  
451 2006;68:33–40. doi:10.1016/j.pmpp.2006.05.006.
- 452 [12] Hargrove J., Greenspan P, Hartle D. Nutritional significance and metabolism of very long  
453 chain fatty alcohols and acids from dietary waxes. *Exp Biol Med* 2004;229:215–26.
- 454 [13] Arruzazabala M. Effect of policosanols successive dose increases on platelet aggregation in  
455 healthy volunteers. *Pharmacol Res* 1996;34:181–5. doi:10.1006/phrs.1996.0086.
- 456 [14] Shigematsu TS, Murakami MM, Nakajima KN, Uno YU, Sakano AS, Narahara YN, et al.  
457 Bioconversion of Glutamic acid to  $\gamma$ -Aminobutyric acid ( GABA ) in Brown Rice Grains  
458 Induced by High Pressure Treatment. *Japan J Food Eng* 2010;11:189–99.
- 459 [15] Azrina A, Maznah I, Azizah AH. Extraction and determination of Oryzanol in rice bran of  
460 mixed Herbarium UKMB; AZ 6807: MR 185 , AZ 6808: MR 211 , AZ6809: MR 29.  
461 *ASEAN Food J* 2008;15:89–96.
- 462 [16] Sakunpak A, Suksaeree J, Pathompak P, Sermkaew N. Antioxidant individual  $\gamma$ -Oryzanol  
463 screening in cold pressed rice bran oil of different Thai rice varieties by HPLC-DPPH  
464 Method. *Int J Pharm Pharm Sci* 2014;6:2–7.
- 465 [17] Chen MH, Bergman CJ. A rapid procedure for analysing rice bran tocopherol, tocotrienol  
466 and  $\gamma$ -oryzanol contents. *J Food Compos Anal* 2005;18:139–51.  
467 doi:10.1016/j.jfca.2003.09.004.
- 468 [18] Beveridge THJ, Li TSC, Drover JCG. Phytosterol content in American ginseng seed oil. *J*  
469 *Agric Food Chem* 2002;50:744–50. doi:10.1021/jf010701v.

- 470 [19] Thanh TT, Vergnes MF, Kaloustian J, El-Moselhy TF, Amiot-Carlin MJ, Portugal H.  
471 Effect of storage and heating on phytosterol concentrations in vegetable oils determined  
472 by GC/MS. *J Sci Food Agric* 2006;86:220–5. doi:10.1002/jsfa.2322.
- 473 [20] Ishaka A, Imam MU, Mahamud R, Zuki ABZ, Maznah I. Characterization of rice bran  
474 wax policosanol and its nanoemulsion formulation. *Int J Nanomedicine* 2014;9:2261–9.  
475 doi:10.2147/IJN.S56999.
- 476 [21] Asikin Y, Takahashi M, Hirose N, Hou DX, Takara K, Wada K. Wax, policosanol, and  
477 long-chain aldehydes of different sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) cultivars. *Eur J*  
478 *Lipid Sci Technol* 2012;114:583–91. doi:10.1002/ejlt.201100300.
- 479 [22] Asikin Y, Chinen T, Kensaku T, Wada K. Determination of long-chain alcohol and  
480 aldehyde contents in the non-centrifuged cane sugar Kokuto. *Food Sci Technol Res*  
481 2008;14:583–8.
- 482 [23] Renuka Devi R, Arumughan C. Phytochemical characterization of defatted rice bran and  
483 optimization of a process for their extraction and enrichment. *Bioresour Technol*  
484 2007;98:3037–43. doi:10.1016/j.biortech.2006.10.009.
- 485 [24] Perretti G, Miniati E, Montanari L, Fantozzi P. Improving the value of rice by-products by  
486 SFE. *J Supercrit Fluids* 2003;26:63–71. doi:10.1016/S0896-8446(02)00247-4.
- 487 [25] Cho DH, Lim ST. Germinated brown rice and its bio-functional compounds. *Food Chem*  
488 2016;196:259–71. doi:10.1016/j.foodchem.2015.09.025.
- 489 [26] Zhao K, Lin L, Li C, Du S, Huang C, Qin Y, et al. Measurement and Correlation of  
490 Solubility of  $\gamma$ -Aminobutyric Acid in Different Binary Solvents. *J Chem Eng Data*  
491 2016;61:1210–20. doi:10.1021/acs.jced.5b00829.
- 492 [27] Yoon SH, Kim SK. Oxidative stability of high-fatty acid rice bran oil at different stages of

- 493 refining. *J Am Oil Chem Soc* 1994;71:227–9.
- 494 [28] Pestana VR, Zambiasi RC, Mendonc CRB, Bruscatto MH, Lerma-Garci'a MJ, Ramis-  
495 Ramos G. Quality changes and tocopherols and [gamma]-orizanol concentrations in rice  
496 bran oil during the refining process. *J Am Oil Chem Soc* 2008:1013–9.  
497 doi:10.1007/s11746-008-1300-4.
- 498 [29] Sawadikiat P, Hongsprabhas P. Phytosterols and  $\gamma$ -oryzanol in rice bran oils and distillates  
499 from physical refining process. *Int J Food Sci Technol* 2014;49:2030–6.  
500 doi:10.1111/ijfs.12506.
- 501 [30] Derakhshan-Honarparvar M, Hamedei MM, Pirouzifard MK. Rice bran phytosterols of  
502 three widespread Iranian cultivars. *J Agric Sci Technol* 2010;12:167–72.
- 503 [31] Normén L, Ellegard L, Brants H, Dutta P, Andersson H. A phytosterol database: Fatty  
504 foods consumed in Sweden and the Netherlands. *J Food Compos Anal* 2007;20:193–201.  
505 doi:10.1016/j.jfca.2006.06.002.
- 506 [32] Cravotto G, Binello A, Merizzi G, Avogadro M. Improving solvent-free extraction of  
507 policosanol from rice bran by high-intensity ultrasound treatment. *Eur J Lipid Sci Technol*  
508 2004;106:147–51. doi:10.1002/ejlt.200300914.
- 509 [33] Harrabi S, Boukhchina S, Mayer PM, Kallel H. Policosanol distribution and accumulation  
510 in developing corn kernels. *Food Chem* 2009;115:918–23.  
511 doi:10.1016/j.foodchem.2008.12.098.
- 512 [34] Irmak S, Dunford NT, Milligan J. Policosanol contents of beeswax, sugar cane and wheat  
513 extracts. *Food Chem* 2006;95:312–8. doi:10.1016/j.foodchem.2005.01.009.
- 514 [35] Chen Z, Jiao R, Ma KY. Cholesterol-Lowering Nutraceuticals and Functional Foods  
515 Cholesterol-Lowering Nutraceuticals and Functional. *J Agric Food Chem* 2008;56:8761–

- 516 73. doi:10.1021/jf801566r.
- 517 [36] Francini-Pesenti F, Beltramolli D, Acqua DS, Brocadello F. Effect of sugar cane  
518 policosanol on lipid profile in primary hypercholesterolemia. *Phyther Res* 2008;22:318–  
519 22. doi:10.1002/ptr.
- 520 [37] Janikula M. Policosanol: a new treatment for cardiovascular disease? *J Clin Ther*  
521 2002;7:203–17.
- 522 [38] Kim JK, Park S-Y, Jung JY, Ha S-H, Lim S-H, Lee SM, et al. Policosanol content and  
523 composition of Korean rice (*Oryza sativa* L.) cultivars. *Cereal Chem* 2012;89:151–4.
- 524 [39] Weerawatanakorn M, Tamaki H, Asikin Y, Wada K, Takahashi M, Ho CT, et al.  
525 Policosanol contents, volatile profile and toxicity test of granulated cane sugar enriched  
526 with rice bran materials. *Int Food Res J* 2017;24:1019–28.
- 527 [40] Iqbal J, Minhajuddin M, Beg Z. Suppression of 7,12- dimethylbenz[alpha]anthracene-  
528 induced carcinogenesis and hypercholesterolaemia in rats by tocotrienol-rich fraction  
529 isolated from rice bran oil. *Eur J Cancer Prev* 2003;12:447–53.
- 530 [41] Xu Z, Hua N, Godber S. Antioxidant activity of tocopherols, tocotrienols, and  $\gamma$ -oryzanol  
531 components from rice bran against cholesterol oxidation accelerated by 2,2'-azobis(2-  
532 methylpropionamide) dihydrochloride. *J Agric Food Chem* 2001;49:2077–81.  
533 doi:10.1021/jf0012852.
- 534

**Table 1 - The samples collected from rice bran oil process from solvent and cold-pressed extraction from 2 different companies**

RBO extraction system	By-products	Abbreviation
Solvent extraction	Defatted rice bran	DFRB-S
	Rice acid oil	RAO
	Wax	RBW
	High-melting point wax	HMW
Cold-pressed extraction	Defatted rice bran	DFRB-C
	Filtered cake	FC

535 RBO = rice bran oil

536



**Table 2 - Moisture contents and GABA contents of DFRB-C, FC, DFRB-S, RAO, RBW and HMW**

By-products	Moisture content (%)	GABA (mg/100g)	
		Wet weight	Dried weight
DFRB-C	6.35±0.13 <sup>b</sup>	11.22±0.10 <sup>c</sup>	12.04±0.11 <sup>c</sup>
FC	2.87±0.10 <sup>c</sup>	16.60±0.22 <sup>b</sup>	17.18±0.23 <sup>b</sup>
DFRB-S	8.95±0.09 <sup>a</sup>	88.65±1.11 <sup>a</sup>	97.37±1.22 <sup>a</sup>
RAO	1.84±0.09 <sup>d</sup>	ND	ND
RBW	0.50±1.09 <sup>c</sup>	ND	ND
HMW	0.69±0.07 <sup>c</sup>	ND	ND

537 Each value represents the mean ±S.D.

538 ND indicated amount of detection lower than LOD.

539 Values with different superscript letters in a column are significantly different ( $P < 0.05$ ).

540 LOD = 1.08 ppm.

541

542



**Table 3 -  $\gamma$ -oryzanol, tocotrienol, tocopherol, and phytosterol contents of DFRB-C, FC, DFRB-S, RAO, RBW and HMW**

Chemical constituents	Types of by-products					
	DFRB-C	FC	DFRB-S	RAO	RBW	HMW
$\gamma$ -oryzanol (mg/100g)	229.76 $\pm$ 1.52 <sup>d</sup>	1,058.28 $\pm$ 24.86 <sup>b</sup>	39.39 $\pm$ 0.16 <sup>e</sup>	3,901.59 $\pm$ 4.08 <sup>a</sup>	862.80 $\pm$ 5.52 <sup>c</sup>	35.38 $\pm$ 0.03 <sup>e</sup>
<b>Tocotrienol</b>						
$\alpha$ -T3s	2.77 $\pm$ 0.10 <sup>c</sup>	8.51 $\pm$ 0.33 <sup>c</sup>	0.72 $\pm$ 0.01 <sup>f</sup>	14.73 $\pm$ 0.46 <sup>b</sup>	18.45 $\pm$ 0.30 <sup>a</sup>	5.38 $\pm$ 0.24 <sup>d</sup>
$\beta$ -T3s	ND	ND	ND	ND	ND	ND
$\gamma$ -T3s	19.45 $\pm$ 0.03 <sup>b</sup>	86.74 $\pm$ 0.99 <sup>a</sup>	2.85 $\pm$ 0.02 <sup>d</sup>	86.00 $\pm$ 0.79 <sup>a</sup>	17.38 $\pm$ 0.09 <sup>c</sup>	17.07 $\pm$ 0.04 <sup>e</sup>
$\delta$ -T3s	0.91 $\pm$ 0.07 <sup>d</sup>	2.12 $\pm$ 0.01 <sup>b</sup>	0.62 $\pm$ 0.05 <sup>c</sup>	6.19 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>	1.48 $\pm$ 0.07 <sup>c</sup>	0.92 $\pm$ 0.01 <sup>d</sup>
<b>Total T3s</b>	<b>23.14<math>\pm</math>0.01<sup>d</sup></b>	<b>97.38<math>\pm</math>1.33<sup>b</sup></b>	<b>4.20<math>\pm</math>0.08<sup>e</sup></b>	<b>106.93<math>\pm</math>1.25<sup>a</sup></b>	<b>37.33<math>\pm</math>0.46<sup>c</sup></b>	<b>23.38<math>\pm</math>0.18<sup>d</sup></b>
<b>Tocopherol</b>						
$\alpha$ -Ts	3.02 $\pm$ 0.18 <sup>c</sup>	8.27 $\pm$ 0.04 <sup>a,b</sup>	3.60 $\pm$ 2.81 <sup>c</sup>	9.33 $\pm$ 0.34 <sup>a</sup>	5.47 $\pm$ 0.17 <sup>b,c</sup>	ND
$\beta$ -Ts	ND	ND	ND	ND	1.35 $\pm$ 0.10 <sup>b</sup>	0.96 $\pm$ 0.05 <sup>a</sup>
$\gamma$ -Ts	1.57 $\pm$ 0.07 <sup>c</sup>	6.32 $\pm$ 0.27 <sup>a</sup>	0.76 $\pm$ 0.04 <sup>f</sup>	3.28 $\pm$ 0.11 <sup>d</sup>	3.89 $\pm$ 0.13 <sup>b</sup>	3.64 $\pm$ 0.08 <sup>c</sup>
$\delta$ -Ts	ND	ND	ND	1.03 $\pm$ 0.02 <sup>a</sup>	0.95 $\pm$ 0.01 <sup>b</sup>	0.67 $\pm$ 0.01 <sup>c</sup>
<b>Total Ts</b>	<b>4.60<math>\pm</math>0.19<sup>c</sup></b>	<b>14.59<math>\pm</math>0.20<sup>a</sup></b>	<b>4.37<math>\pm</math>2.77<sup>c</sup></b>	<b>13.65<math>\pm</math>0.47<sup>a,b</sup></b>	<b>11.67<math>\pm</math>0.13<sup>b</sup></b>	<b>5.29<math>\pm</math>0.13<sup>c</sup></b>
<b>Total (T3s+Ts)</b>	<b>28.25<math>\pm</math>0.20<sup>d</sup></b>	<b>112.42<math>\pm</math>1.35<sup>b</sup></b>	<b>6.47<math>\pm</math>0.27<sup>c</sup></b>	<b>120.59<math>\pm</math>1.72<sup>a</sup></b>	<b>49.00<math>\pm</math>0.33<sup>c</sup></b>	<b>28.67<math>\pm</math>0.31<sup>d</sup></b>
<b>Phytosterol (mg/100g)</b>						
Campesterol	0.47 $\pm$ 0.14 <sup>c</sup>	52.38 $\pm$ 2.69 <sup>b</sup>	0.34 $\pm$ 0.01 <sup>c</sup>	151.23 $\pm$ 3.27 <sup>a</sup>	0.73 $\pm$ 0.04 <sup>c</sup>	0.50 $\pm$ 0.12 <sup>c</sup>
Stigmasterol	2.61 $\pm$ 0.03 <sup>d</sup>	60.41 $\pm$ 2.80 <sup>b</sup>	0.74 $\pm$ 0.01 <sup>d</sup>	97.53 $\pm$ 2.41 <sup>a</sup>	21.77 $\pm$ 0.86 <sup>c</sup>	19.17 $\pm$ 0.89 <sup>c</sup>
$\beta$ -Sitosterol	1.64 $\pm$ 0.54 <sup>d</sup>	118.02 $\pm$ 6.38 <sup>b</sup>	0.38 $\pm$ 0.01 <sup>d</sup>	317.95 $\pm$ 4.76 <sup>a</sup>	66.83 $\pm$ 1.43 <sup>c</sup>	68.88 $\pm$ 1.49 <sup>c</sup>
Sitostanol	0.69 $\pm$ 0.20 <sup>d</sup>	13.15 $\pm$ 1.36 <sup>b</sup>	0.27 $\pm$ 0.01 <sup>d</sup>	32.68 $\pm$ 1.17 <sup>a</sup>	3.86 $\pm$ 0.77 <sup>c</sup>	4.21 $\pm$ 0.17 <sup>c</sup>
<b>Total</b>	<b>5.43<math>\pm</math>0.86<sup>d</sup></b>	<b>243.98<math>\pm</math>13.24<sup>b</sup></b>	<b>1.75<math>\pm</math>0.01<sup>d</sup></b>	<b>599.40<math>\pm</math>11.62<sup>a</sup></b>	<b>93.20<math>\pm</math>1.38<sup>c</sup></b>	<b>92.77<math>\pm</math>2.08<sup>c</sup></b>

543 Each value represents the mean  $\pm$ S.D.

544 Values in the table are expressed on a dry basis.

545 ND = amount detected lower than LOD.

546 LOD = 0.47 ppm. ( $\beta$ -T3s), 0.89 ppm. ( $\alpha$ -Ts), 0.40 ppm. ( $\beta$ -Ts), 0.49 ppm. ( $\delta$ -Ts). LOD = 0.08 ppm (campesterol),

547 0.03 ppm (stigmasterol), 0.20 ppm ( $\beta$ -sitosterol), 0.03 ppm sitostanol.

548 Values with different superscript letters in a row are significantly different ( $P < 0.05$ ).

549

**Table 4 - Policosanol contents in residues from two different RBO process, obtained using GC-MS**

PCs (mg/100g)	Types of sample					
	DFRB-C	FC	DFRB-S	RAO	RBW	HMW
Docosanol (C22)	5.08±0.02 <sup>c</sup>	3.75±0.11 <sup>d</sup>	3.35 ±0.01 <sup>d</sup>	7.20±0.42 <sup>b</sup>	7.99±0.21 <sup>a</sup>	7.50±0.03 <sup>ab</sup>
Tetracosanol (C24)	21.56±0.55 <sup>c</sup>	24.24±2.02 <sup>c</sup>	13.94±0.94 <sup>d</sup>	52.36±2.38 <sup>a</sup>	53.80±0.10 <sup>a</sup>	45.06±1.50 <sup>b</sup>
Hexacosanol (C26)	1.83±0.03 <sup>d</sup>	11.56±0.16 <sup>c</sup>	1.72±0.50 <sup>d</sup>	10.63±0.11 <sup>c</sup>	42.75±1.94 <sup>a</sup>	13.82±0.77 <sup>b</sup>
Octacosanol (C28)	10.15±0.45 <sup>c</sup>	12.13±0.27 <sup>c</sup>	11.12±0.31 <sup>c</sup>	10.16±0.01 <sup>c</sup>	71.83±2.65 <sup>a</sup>	26.10±0.08 <sup>b</sup>
Triacosanol (C30)	6.91±0.17 <sup>c</sup>	24.30±0.70 <sup>c</sup>	6.66±0.13 <sup>c</sup>	18.96±0.32 <sup>d</sup>	156.41±2.99 <sup>a</sup>	76.92±3.08 <sup>b</sup>
<b>Total</b>	<b>45.55±0.14<sup>c</sup></b>	<b>76.00±3.29<sup>d</sup></b>	<b>45.55±0.14<sup>f</sup></b>	<b>99.33±3.24<sup>c</sup></b>	<b>332.79±7.27<sup>a</sup></b>	<b>169.44±0.91<sup>b</sup></b>

550

Each value represents the mean ±S.D.

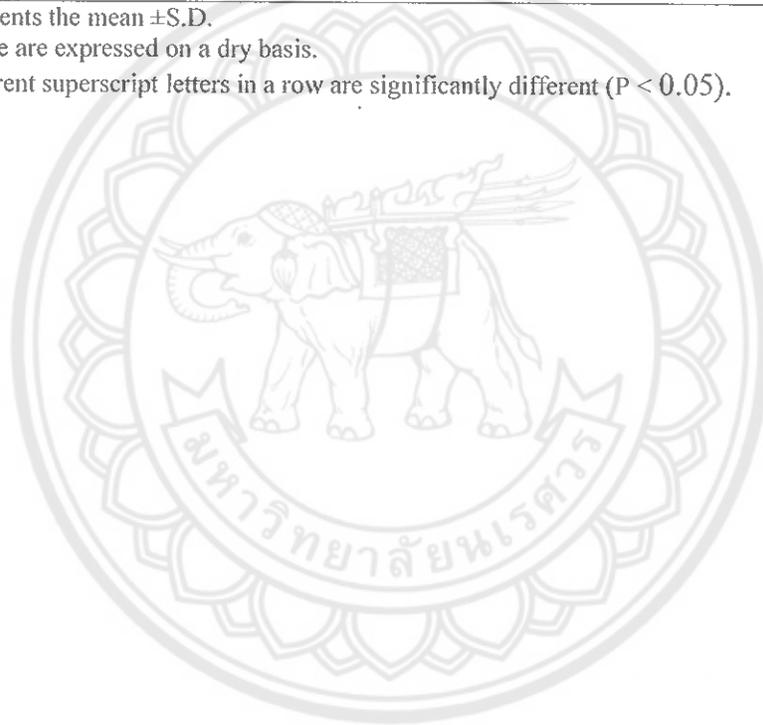
551

Values in the table are expressed on a dry basis.

552

Values with different superscript letters in a row are significantly different (P &lt; 0.05).

553



**Table 5 - The total comparative amount of bioactive compounds of the by-products from the solvent extraction and cold pressed extraction systems.**

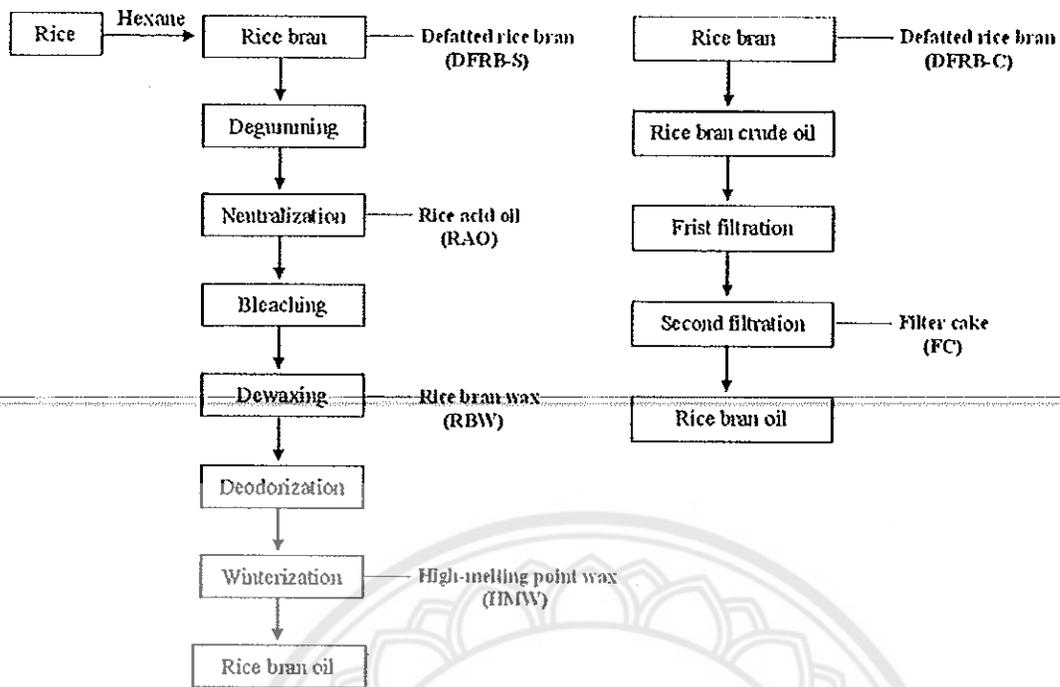
Nutraceuticals	Solvent extraction system (mg/100g)	Cold pressed extraction system (mg/100g)
GABA	97.37	29.22
$\gamma$ - Oryzanol	4,839.16	1,288.04
Phytosterol	787.12	249.41
Vitamin E	204.73	140.67
Policosanol	647.11	121.55
<b>Total amount</b>	<b>6.6</b>	<b>1.7</b>
	<b>(kg/100 kg)</b>	

Values in the table are expressed on a dry basis.

554  
555

556  
557





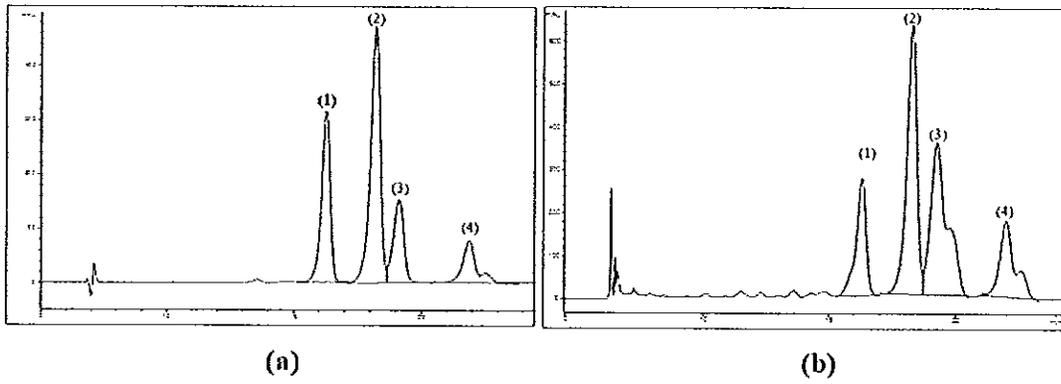
(a)

(b)

1

2 **Fig. 1 - Flow chart of rice bran oil (RBO) production (a) RBO from solvent extraction process (b) RBO from**  
 3 **cold pressed extraction process.**

4



5

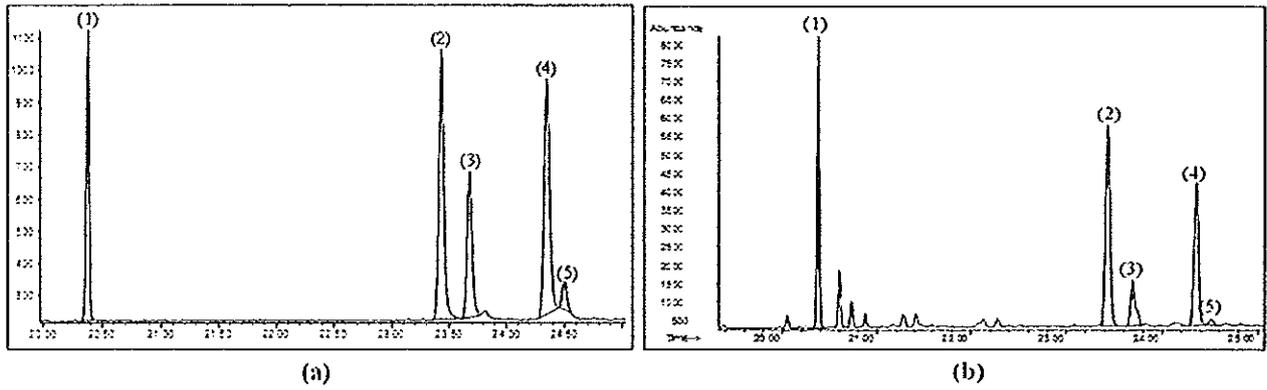
6 **Fig. 2 - LC-MS chromatograms of  $\gamma$ -oryzanol standard compounds (a) RAO  $\gamma$ -oryzanol extract (b). The**

7 **numbers on the peaks (a) correspond to the cycloartenyl ferulate (1), 24-methylene cycloartenyl ferulate (2),**

8 **campesteryl ferulate (3),  $\beta$ -sitosteryl ferulate (4).**

9



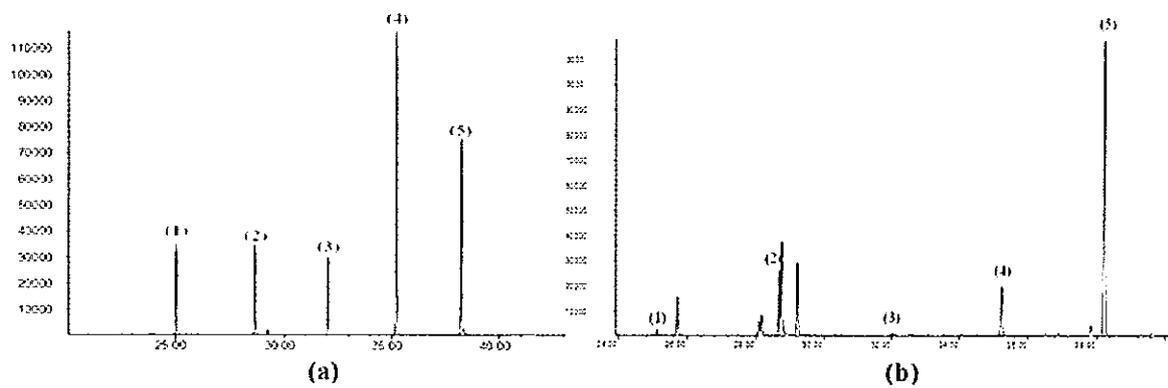


10

11 **Fig. 3 - GC-MS chromatograms of phytosterol standard (a) FC phytosterol extract (b). The numbers on the**  
 12 **peaks correspond to cholestane as internal standard (1), campesterol (2), stigmasterol (3),  $\beta$ -sitosterol (4) and**  
 13 **sitostanol (5).**

14





15

16 Fig. 4 - Chromatogram for PCs standards (a) and HPW PCs extract (b). Docosanol (C22-OH) (1),  
17 Tetracosanol (C24-OH) (2), Hexacosanol (C26-OH) (3), Octacosanol (C28-OH) (4), Triacontanol (C30-OH)  
18 (5).

19



## Supplementary data

Table 1S. Mass fragmentation pattern of trimethylsilyl phytosterol derivatives, obtained using GC-MS

Compound	Molecular target Ion, <i>m/z</i>	Qualifier ions, <i>m/z</i>
Cholestane	374	147, 217, 357
Campesterol	382	129, 343, 367
Stigmasterol	484	129, 255, 394
$\beta$ -sitosterol	486	129, 357, 396
Sitostanol	488	215, 383, 398



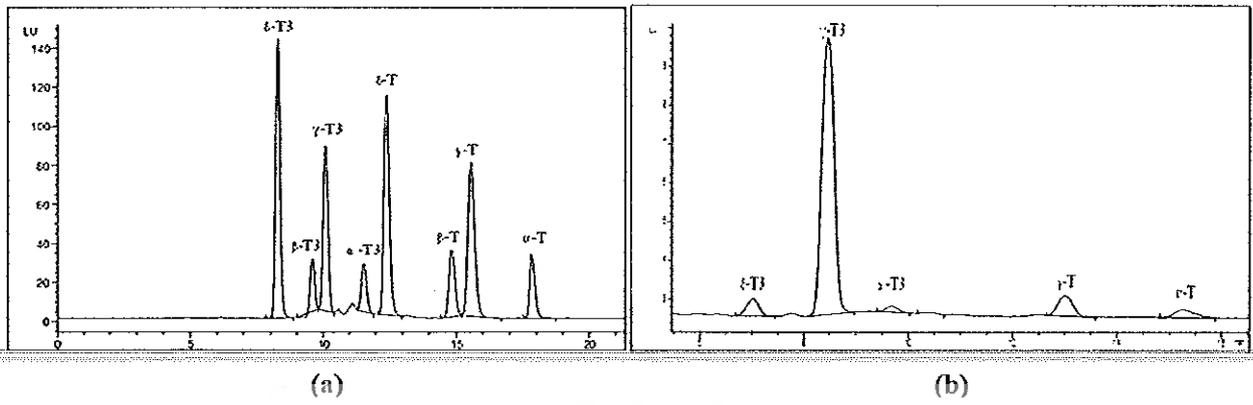
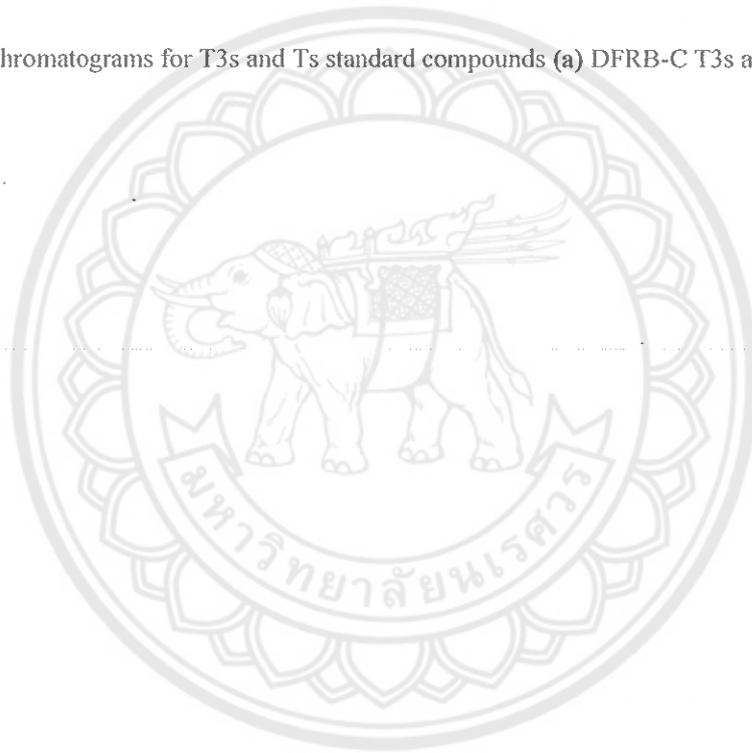


Figure 1S. Typical chromatograms for T3s and Ts standard compounds (a) DFRB-C T3s and Ts extract (b).



## Please wait...

If this message is not eventually replaced by the proper contents of the document, your PDF viewer may not be able to display this type of document.

You can upgrade to the latest version of Adobe Reader for Windows®, Mac, or Linux® by visiting [http://www.adobe.com/go/reader\\_download](http://www.adobe.com/go/reader_download).

For more assistance with Adobe Reader visit <http://www.adobe.com/go/acrreader>.

~~Windows is either a registered trademark or a trademark of Microsoft Corporation in the United States and/or other countries. Mac is a trademark of Apple Inc., registered in the United States and other countries. Linux is the registered trademark of Linus Torvalds in the U.S. and other countries.~~

