เทคนิคนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์ สำหรับการควบคุมคุณภาพของน้ำมันรำข้าวบีบเย็น

จิรดา สิงขรรัตน์[1*] ชุติมา พรเชิดฉาย[1] และ วิภารัตน์ เชื้อชวด ชัยสิทธิ์[2]

บทคัดย่อ

เทคนิคทางนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์ (NMR) ได้ถูกประยุกต์ใช้ตรวจสอบลักษณะเฉพาะของน้ำมันรำข้าวบีบเย็น จากวิสาหกิจชุมชนในประเทศไทย และวิเคราะห์หาปริมาณของน้ำมันชนิดอิ่มตัวและน้ำมันชนิดไม่อิ่มตัว พร้อมการวิเคราะห์เชิงคุณภาพด้วยการตรวจหาตำแหน่งของสัญญาณบีต้าคาร์บอนของไดเอซิลกลีเซอรัลและโมโนเอซิลกลีเซอรัล เพื่อบ่งบอกคุณภาพ และความสดใหม่ของน้ำมันตัวอย่าง พบว่าความถูกต้องของการใช้พื้นที่ใต้พีก ณ ตำแหน่งบีต้าคาร์บอนของไตรเอซิลกลีเซอรัล ที่ใช้เป็นทั้งความเข้มของสัญญาณอ้างอิงและสารมาตรฐานเทียบภายใน ด้วยผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนที่มีค่าเท่ากับหรือน้อยกว่า 0.05 ที่ระดับความมั่นใจของผู้วิจัยสูงกว่าร้อยละ 95 วิธีการนี้สามารถให้ผลการตรวจลักษณะเฉพาะของน้ำมันรำข้าวได้อย่างรวดเร็ว การประยุกต์ใช้เทคนิคนี้สามารถใช้ยืนยันคุณภาพน้ำมันรำข้าวให้กับอุตสาหกรรมการส่งออกน้ำมันรำข้าวของไทยให้เป็นที่พอใจกับผู้นำเข้าระดับสากล ผู้วิจัยพัฒนาเทคนิคการตรวจวัด เพื่อลดวิธีการทางเคมีที่ต้องอาศัยสารเคมี ซึ่งอาจมีการปนเปื้อนและความผิดพลาด ในขั้นตอนการปฏิบัติการควบคุมคุณภาพ สำหรับตัวอย่างที่วิเคราะห์ทันทีหลังผลิตเปรียบเทียบกับตัวอย่างที่เก็บไว้หนึ่งปี ให้ผลวิเคราะห์เชิงคุณภาพต่างกันบ่งถึงความสามารถในการวิเคราะห์หาความใหม่ของผลิตภัณฑ์ได้ ด้วยการวิเคราะห์สัญญาณที่เปลี่ยนแปลงของ ไดเอซิลกลีเซอรัลและสัดส่วนโมลที่ลดลงของ 1-โมโนเอซิลกลีเซอรัล เมื่อเก็บน้ำมันตัวอย่างไว้หนึ่งปี ผลงานวิจัยนี้ สามารถใช้ในการควบคุมคุณภาพและเป็นประโยชน์อ้างอิงสำหรับการประยุกต์ใช้ในการวิเคราะห์และพัฒนาน้ำมันรำข้าวบีบเย็นในอาหารเสริม เครื่องสำอางและอุตสาหกรรมการทางยาต่อไป

คำสำคัญ : น้ำมันรำข้าว, นิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์, การควบคุมคุณภาพ, ความใหม่ของผลิตภัณฑ์

---

[1] ภาควิชาเคมี, คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี, มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ศูนย์รังสิต

[2] ภาควิชาเคมี, คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยนเรศวร

[*] ผู้ติดต่อ, อีเมล์: jirada@tu.ac.th รับเมื่อ 31 สิงหาคม 2558 ตอบรับเมื่อ 27 พฤษภาคม 2559

Nuclear Magnetic Resonance technique for quality control of cold-pressed rice bran oil

Jirada Singkhonrat[1*] Chutima Ponchurdchai[1] and Wipharat Chuachuad Chaiyasit [2]

Abstract

A Nuclear Magnetic Resonance (NMR) method is developed and applied for fingerprint characterization of rice bran oil from Thai domestic production and quantitative determination of fatty acid compositions. Freshness evaluation was investigated by analysis of diacylglycerol or monoacylglycerol level in cold-pressed rice bran oil. The investigation using β-carbon intensity of triacylglycerol as reference peak and internal standard demonstrated that the method presented variance (Analysis of variance, $p \leq 0.05$) with high Level of Confidence (95%). This method allows rapid identification of rice bran oil in the market, claimed as cold-pressed rice bran oil from domestic production in Thailand. Applying NMR technique, Thai export industry of rice bran oils can meet satisfied specification by international importers without many wet, dirty and error prone chemical methods in Quality Control laboratory. Qualitative analysis of diacylglycerol or monoacylglycerol showed no signal in freshly samples, but revealed with slightly stronger peaks after one year storage, represent by proportion of 1,2-diacylglycerol and 1-monoacylglycerol in triacylglycerol which changed over time. Results obtained in this study will serve as quality control and useful reference for supplement development and pharmaceutical industry.

Keywords : Rice bran oil, Nuclear Magnetic Resonance, Quality Control, Product Freshness

[1] Department of Chemistry, Faculty of Science and technology, Thammasat University.

[2] Department of Chemistry, Faculty of Science, Naresuan University.

[*] Corresponding author, E-mail: jirada@tu.ac.th Received 31 August 2015, Accepted 27 May 2016

1. บทนำ

น้ำมันรำข้าวดิบ (*Oryza saltiva* L.) สกัดมาจากรำข้าว ซึ่งมีสารสำคัญที่มีประโยชน์นานาชนิดที่อยู่ในเยื่อหุ้มเมล็ดข้าวและจมูกข้าว (คิดเป็น 10% ของข้าวเปลือก) ได้รับความสนใจมากในผลิตภัณฑ์อาหารเสริม น้ำมันรำข้าวที่ผลิตขึ้นมาจำหน่ายนั้นประกอบด้วยไตรกลีเซอไรด์ 80-90% และสารสำคัญทางธรรมชาติที่มีคุณค่าสูงต่อร่างกายหลายชนิด ซึ่งแบ่งเป็นกลุ่มของสารได้ดังนี้ กลุ่มสารฟอสโฟไลฟิด (Phospholipids) ได้แก่ เลซิติน (Lecithin) เซฟฟาลิน (Cephalin) ไลโซเลซิติน (Lysolecithin) พบว่ามีความสำคัญในการนำไปสร้างและซ่อมแซมส่วนที่สึกหรอของเซลล์ประสาทสมอง และช่วยป้องกันเซลล์ประสาทจากสารที่เป็นพิษและอนุมูลอิสระต่างๆ ช่วยลดความเครียด และช่วยเสริมสร้างในด้านความจำ กลุ่มเซราไมด์ (Ceramide) ซึ่งเป็นส่วนประกอบที่สำคัญของชั้นใต้ผิวหนัง ช่วยทำให้ผิวหนังมีความยืดหยุ่น กลุ่มวิตามินอีธรรมชาติ เป็นสารที่อยู่ในรูปของโทโคเฟอรอล (Tocopherol) และโทโคไทรอีนอล (Tocotrienol) สารเหล่านี้ มีประโยชน์ต่อร่างกายในการสร้างและซ่อมแซมเซลล์ต่างๆของร่างกาย และยังช่วยทำให้ร่างกายมีภูมิคุ้มกันต่อโรคต่างๆ ช่วยป้องกันโรคโลหิตจางและยังช่วยต้านอนุมูลอิสระ [1] ซึ่งเป็นเหตุสำคัญของการเกิดโรคมะเร็ง กลุ่มกรดไขมันลิโนเลอิก (Linoleic Acid) หรือโอเมก้า 6 และกรดลิโนเลนิก (Linolenic Acid) หรือโอเมก้า 3 ที่เป็นกรดไขมันจำเป็นโดยมีอยู่ประมาณ 33% กลุ่มวิตามินบีรวม ซึ่งเป็นวิตามินที่ช่วยให้การทำงานของระบบประสาทดีขึ้น กลุ่มแกมมา – ออไรซานอล [2] (Gamma-Oryzanol, แสดงในรูปที่ 1) มีฤทธิ์ในการลดระดับคอเลสเตอรอลและไตรกลีเซอไรด์ทำให้ลดการตีบตันของหลอดเลือด เพิ่มการไหลเวียนของโลหิต และยังมีฤทธิ์ในการลดความเครียด ต้านอนุมูลอิสระ ต้านสารก่อมะเร็ง ส่งเสริมการทำงานของต่อมไร้ท่อ (endocrinological effects) นอกจากนี้ ยังเป็นสารอนุมูลอิสระและป้องกันแสงยูวี อย่างไรก็ตาม น้ำมันรำข้าวเกิดการหืนได้ง่ายมาก (rancidity) จึงเป็นปัญหาสำคัญของการใช้ประโยชน์จากรำข้าว ปริมาณไขมันและเอนไซม์ที่สูงของรำข้าวส่งผลต่อคุณภาพที่ต่ำลงอย่างรวดเร็ว

ประเทศไทยผลิตข้าวเพื่อการส่งออกเป็นอันดับหนึ่งของโลก ด้วยปริมาณส่งออกมากถึง 10 ล้านตันในปี 2557 [3] ขณะที่ น้ำมันรำข้าวผลิตเพื่อส่งออกนั้น มีปริมาณสูงถึง 95% และขายในประเทศเพียง 5% เนื่องจากราคาค่อนข้างสูง [3] ซึ่งเป็นผลมาจากกรรมวิธีการผลิตและวัตถุดิบค่อนข้างมีต้นทุนสูง ตลาดน้ำมันพืชในประเทศไทยทำตลาดก็ลำบากเพราะแข่งขันกันด้านราคาค่อนข้างสูง แต่ตลาดต่างประเทศจะแข่งขันกันเรื่องคุณภาพ สินค้าที่ส่งออกต้องพยายามพัฒนาทั้งคุณภาพและตัวของบรรจุภัณฑ์ต้องปรับปรุงให้รูปลักษณ์โดดเด่น โดยในต่างประเทศนำน้ำมันรำข้าวที่ไทยส่งออกถึง 40% ไปแปรรูปทำเป็นผลิตภัณฑ์อื่น ๆ เช่น เนยเทียม น้ำมันสลัด และดิปครีม (dripping) โดยใช้น้ำมันรำข้าวเป็นวัตถุดิบหลัก เพื่อตอบสนองความต้องการของผู้บริโภคที่ดูแลสุขภาพ [3] โดยวางขายเฉพาะในต่างประเทศ ไม่ได้ส่งมาขายที่ประเทศไทย เพราะเป็นตลาดที่มีลูกค้าเฉพาะกลุ่มและราคาสูง [4] แสดงให้เห็นว่าคุณค่าทางอาหารของรำข้าวได้รับการยอมรับและเป็นที่ต้องการที่สูงมากในต่างประเทศ ขณะที่ในประเทศยังมิได้ข้อมูลที่เผยแพร่ให้ความรู้แก่ประชาชนอย่างทั่วถึง ทำให้คนไทยยังไม่นิยมบริโภคของดีคุณภาพสูงของ

ไทยเอง เมื่อเทียบกับน้ำมันคุณภาพสูงอย่างน้ำมันมะกอก

น้ำมันรำข้าว (เกรดกลาง) ราคาขายปลีกโดยเฉลี่ยในท้องตลาดอยู่ที่ประมาณลิตรละ 35-50 บาท ปัจจุบันผลิตภัณฑ์น้ำมันพืชเกรดกลางมีสัดส่วนตลาดมากที่สุดประมาณร้อยละ 95 ของมูลค่าตลาดทั้งหมด ขณะที่ ในปัจจุบันผลิตภัณฑ์น้ำมันพืชเกรดพิเศษ (พรีเมี่ยม) เช่น น้ำมันมะกอก น้ำมันคาโนลา น้ำมันทานตะวัน และน้ำมันรำข้าว (เกรดพิเศษ) เป็นต้น ยังคงสัดส่วนตลาดภายในประเทศไม่มากนัก ทั้งนี้ ผู้ประกอบการในตลาดน้ำมันพืชเกรดกลางควรยกระดับสินค้าและปรับปรุงคุณภาพผลิตภัณฑ์ เพื่อขยายตลาดในกลุ่มผลิตภัณฑ์น้ำมันพืชพรีเมี่ยมเพิ่มมากขึ้น ตามแนวโน้มการแข่งขันในตลาดน้ำมันพืชพรีเมี่ยมที่ได้ทวีความรุนแรงเพิ่มขึ้น [4a]

ในปี 2553 ไทยนำเข้าน้ำมันพืชพรีเมี่ยมเป็นมูลค่า 580.58 ล้านบาท [4b] จากแนวโน้มความต้องการบริโภคน้ำมันพรีเมี่ยมที่ปรับตัวเพิ่มสูงขึ้น สะท้อนให้เห็นว่าผู้บริโภคเริ่มมีแนวโน้มเปลี่ยนแปลงพฤติกรรมการเลือกซื้อ โดยหันมาให้ความสำคัญกับการเลือกบริโภคผลิตภัณฑ์เพื่อสุขภาพ ผลิตภัณฑ์น้ำมันพรีเมี่ยมที่ไทยนำเข้ามากที่สุด คือ น้ำมันมะกอก มีมูลค่า 285.73 ล้านบาท หรือร้อยละ 48.78 ของมูลค่าการนำเข้าน้ำมันพืชที่ใช้ในการประกอบอาหารทั้งหมด รองลงมาคือ น้ำมันเมล็ดทานตะวันและดอกคำฝอย ซึ่งมีแนวโน้มขยายตัวเพิ่มขึ้น และมีความต้องการน้ำมันพืชดังกล่าวสูงขึ้น แต่ผู้ผลิตในประเทศไม่สามารถผลิตได้เพราะมีข้อจำกัดทางด้านวัตถุดิบที่ไม่มีเพาะปลูกในประเทศไทย แหล่งนำเข้าน้ำมันมะกอกส่วนใหญ่มาจากประเทศสเปนและอิตาลี ซึ่งเป็นประเทศที่ในกลุ่มที่ใช้เงินสกุลยูโร (Eurozone) ขณะที่ แหล่งนำเข้าน้ำมันรำข้าวส่วนใหญ่มาจากประเทศนิวซีแลนด์โดยร้อยละ 100 [4ab]

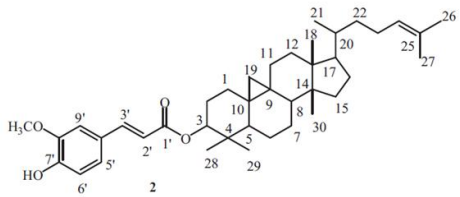
อย่างไรก็ตาม การเปลี่ยนแปลงทางด้านเศรษฐกิจ สังคมและการเมือง ล้วนส่งผลต่อระบบการผลิตภาคการเกษตรทั้งสิ้น รวมถึงภาวะวิกฤตที่อาจเกิดขึ้น ทำให้ต้องมีการจัดการด้านความมั่นคงอาหารในทุกระดับและจำเป็นจะต้องมีข้อมูลที่ถูกต้องและทันสถานการณ์ เพื่อสนับสนุนการจัดการระบบการผลิตอาหารที่มีคุณค่าทางโภชนาการสูงของชุมชนเกษตรเพื่อการพึ่งพาตนเองด้วยฐานวัฒนธรรมและทรัพยากร ตามยุทธศาสตร์ด้านความมั่นคงอาหาร ภายใต้คณะกรรมการอาหารแห่งชาติที่มีเป้าหมาย เพื่อให้ได้แหล่งอาหารที่มีคุณค่าทางโภชนาการสูงในประเทศสู่ระดับชุมชนเกษตรทำให้สามารถพึ่งพาตนเองได้ ดังนั้น การมีข้อมูลการทดสอบผลิตภัณฑ์ว่าปลอดภัยและมีคุณค่าทางอาหารจากผลิตภัณฑ์ในชุมชน จึงน่าจะเป็นทางเลือกที่ยั่งยืนต่อการบริโภคน้ำมันรำข้าวและผลิตภัณฑ์ต่อเนื่อง เพื่อสุขภาพที่ดีของประชากร แม้ว่าจะอยู่ในช่วงภาวะวิกฤต

ปัจจุบันอาหารกับสุขภาพได้รับความสนใจยิ่งโดยเฉพาะจากสื่อต่างๆ การบริโภคอาหารที่คุณภาพสูงก็เป็นผลดีต่อการป้องกันโรคภัยต่างๆ การพัฒนาผลิตภัณฑ์ทางอาหารและเครื่องสำอาง จึงสัมพันธ์กับการได้สูตรที่ให้ความเสถียรได้ดี ซึ่งเป็นเรื่องที่ท้าทาย [5] สำหรับน้ำมันรำข้าว อย่างไรก็ตาม ปัจจัยที่ส่งผลต่อการเสียสภาพของน้ำมันรำข้าวคือ การหืนจากการเกิดออกซิเดชันหรือการทำปฏิกิริยา ณ พันธะคู่ของไขมันไม่อิ่มตัว (oxidative rancidity) และน้ำหรือการสูญเสียกรดไขมันจากโมเลกุลของไขมัน (hydrolytic rancidity) โดยทั้งสองสามารถแก้ไขได้ด้วยการสกัดน้ำมันรำข้าวทันทีหลังจากสีข้าว [6] ซึ่งไม่ง่ายต่อการปฏิบัติจริง

การคงสภาพของรำข้าว ถูกนำมาปรับสภาพรำข้าวก่อนบีบหรือเข้ากระบวนการ โดยเฉพาะการใช้ความร้อน เพื่อทำให้เอนไซม์เสียสภาพนั่นเอง [7] ทั้งนี้ การบีบเย็น (cold pressed) ใช้กันมากตามชุมชนแหล่งผลิตข้าวของประเทศไทย สำหรับโรงงานขนาดเล็กและขนาดกลาง ซึ่งสามารถช่วยคงคุณสมบัติเดิมของรำข้าวได้อย่างดี โดยปราศจากสารเคมีและจัดเป็นกระบวนการที่ปลอดภัยกว่า มีรายงานว่าน้ำมันบีบเย็นดีต่อสุขภาพและป้องกันโรคบางชนิดได้ [8a] ทั้งนี้ การเพิ่มปริมาณผลผลิตสามารถทำได้ด้วยการใช้ความร้อนกับรำข้าวก่อนทำการบีบเย็น โดยไม่มีผลต่อคุณภาพของน้ำมันรำข้าว [9] โดยรายงานวิจัยที่ผ่านมาตรวจสอบคุณภาพของน้ำมันพืชจากปริมาณของกรดไขมันอิสระที่เพิ่มขึ้น เพราะการหลุดไปจากไตรเอซิลกลีเซอรัล ได้เป็นไดเอซิลกลีเซอรัล และ/หรือโมโนเอซิลกลีเซอรัล [8b] ผ่านการเสียสภาพ (hydrolytic & oxidative degradation) ทั้งนี้ การวิเคราะห์โดยทั่วไปนั้นใช้เวลานานและใช้ตัวอย่างที่ต้องผ่านการเตรียม ซึ่งอาจต้องใช้ปริมาณมากและอาศัยสารเคมีอื่นๆ อีกทั้ง ไม่สามารถระบุกระบวนการออกซิเดชันที่เกิดขึ้นอย่างชัดเจน

การหาเอกลักษณ์เฉพาะเป็นเทคนิคที่ใช้ศึกษาองค์ประกอบทางเคมีที่นิยมใช้โดยเฉพาะโครมาโตรแกรม อย่างเช่น HPLC fingerprint [10] ขณะที่ การหาเอกลักษณ์เฉพาะด้วยเทคนิคฟิวเรียทรานซ์ฟอร์มอินฟราเรด (FTIR) [11] และนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์ (NMR) [12] ก็ได้รับการพัฒนาสำหรับน้ำมันมะกอกขึ้นเพราะอาศัยปริมาณตัวอย่างที่น้อยกว่าและสามารถศึกษากลไกทางเคมีที่เปลี่ยนไปตามหมู่ฟังค์ชันได้ด้วย

ในงานวิจัยนี้ รายงานการประยุกต์ใช้นิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์ สำหรับการควบคุมคุณภาพน้ำมันรำข้าวด้วยลักษณะเฉพาะทางเคมีโดยเจาะจงน้ำมันที่อ้างว่าเป็น น้ำมันรำข้าวบีบเย็นและการระบุความใหม่ของผลิตภัณฑ์น้ำมันรำข้าว โดยเทคนิคนี้จะช่วยลดค่าใช้จ่ายและเวลาในการวิเคราะห์ เพื่อจำแนกคุณภาพและชนิดของน้ำมันได้ พร้อมการรายงานปริมาณของสารกลุ่มออไรซานอลที่เก็บไว้เป็นเวลา 1 ปี [8c]



รูปที่ 1 แสดงโครงสร้างของสารประกอบออริซินอล (cycloeucalenol *cis*-ferulate)

2. อุปกรณ์และวิธีการ

2.1 อุปกรณ์

เครื่องแก๊สโครมาโตรกราฟีเป็นรุ่น Shimadzu GC-2010 plus ที่ประกอบกับหัวฉีดแคปิลลารี่แบบปล่อย/ไม่ปล่อย (equipped with a split/splitless capillary injector) และต่อไปยังเครื่องดัดจับสัญญาณแมสเปคโตรเมทรี (mass spectrometer detector) การแยกอาศัยคอลัมน์รุ่น HP-INNOWAX (30 m x 0.25 mm x 0.25 μm) มีแก๊สตัวพาเป็นฮีเลียมด้วยความเร็วของการไหลที่ 1.41 ml/min ฉีดสารตัวอย่างด้วยปริมาตร 0.1 μL

เครื่องนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์ ที่ใช้เป็นเครื่อง Bruker Avance Spectrometer ใช้ 400-MHz สำหรับ ^{1}H spectra และ 75.47-MHz สำหรับ ^{13}C spectra

โดยวิเคราะห์ข้อมูลด้วยโปรแกรม Mnova (Mestrelab Research)

2.2 ตัวอย่างและตัวทำละลาย

ตัวอย่างน้ำมันรำข้าวได้มาจากโรงงานของชุมชนในจังหวัดลพบุรี (L-RBO) และยโสธร (Y-RBO, กลุ่มสหกรณ์วิสาหกิจชุมชนเกษตรอินทรีย์) นำส่งถึงห้องปฏิบัติการทันทีหลังจากผลิต บรรจุในภาชนะพลาสติกและปิดผนึก เช่นเดียวกับที่ขายในตลาด มีการแบ่งตัวอย่างเพื่อเปิดวิเคราะห์เริ่มต้น (t_0 โดยเรียกตัวอย่างว่า L-RBO1 และ Y-RBO1 ตามลำดับ) พร้อมแบ่งเก็บตัวอย่างในภาชนะที่ยังปิดผนึกด้วยบรรจุภัณฑ์ไว้ ณ อุณหภูมิต่ำกว่า 5 องศาเซลเซียส (ตู้เย็น) ในที่มืด 1 ปี ก่อนทำการวิเคราะห์ (t_{12} โดยเรียกตัวอย่างว่า L-RBO12 และ Y-RBO12 ตามลำดับ) ตัวทำละลายที่ใช้สำหรับโครมาโตรกราฟีคือเมทานอลและตัวทำละลายที่ใช้สำหรับนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์คือดิวเทเรเตทคลอโรฟอร์มและไดเมทิลซัลฟอไซด์-ดี 6 ยี่ห้อเมอร์ (deuterated chloroform และ dimethyl sulfoxide-d_6: Merck Co. Ltd.)

2.3 การวิเคราะห์ด้วยเทคนิคแก๊สโครมาโตรกราฟี-แมสเปคโตรเมทรี (Gas Chromatography-Mass Spectrometry หรือ GC-MS)

ตัวอย่างถูกวิเคราะห์ในรูปเอสเทอร์ โดยแปรรูปน้ำมันตัวอย่างเป็นอนุพันธ์ของเมทิลเอสเตอร์ โดยอาศัยสารละลายเมทานอลที่มีโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ร้อยละ 3 โดยมวล (3%wt Potassium hydroxide in methanol) จากนั้นแยกชั้นของกลีเซอรัลด้วยเครื่องเหวี่ยงความเร็วสูง กรองสารละลายเมทิลเอสเทอร์ด้วยไซรินจ์ 0.45 ไมครอนก่อนฉีดวิเคราะห์เข้า GC-MS โครมาโตรแกรมแสดงพีคและถูกระบุชนิดของน้ำมันด้วยผลของมวลโมเลกุลที่แสดงด้วยแมสเปคตรา เพื่อประมวลผลข้อมูลส่วนประกอบชนิดของน้ำมันเป็นร้อยละตามสัดส่วนโดยโมลของตัวอย่างที่เตรียมได้

2.4 การเตรียมตัวอย่างและการวิเคราะห์

2.4.1 นิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์ (Nuclear Magnetic Resonance หรือ NMR)

ละลายน้ำมันตัวอย่าง 70 มิลลิกรัมในตัวทำละลาย (600 ไมโครลิตรของ $CDCl_3$ ต่อ 1 หยดของ DMSO-d_6 โซนิเค 10 นาที หากละลายไม่สมบรูณ์) สามตัวอย่างถูกเตรียมขึ้นและบรรจุในหลอด NMR ที่มีขนาด 10 มม. สามหลอดที่ต่างกัน แต่ละหลอดถูกวิเคราะห์สามครั้งเพื่อยืนยันการทำซ้ำที่เชื่อถือได้ของการวัด

2.4.2 เครื่องตรวจวัดสารด้วยการดูดกลืนแสง (UV–vis Spectrophotometer) [13]

การวิเคราะห์ออริซานอลเชิงปริมาณ อาศัยเทคนิคทาง UV อาศัยเครื่อง (V-550, JASCO, Japan) โดยละลายตัวอย่างในเฮกเซน ตรวจวัดการดูดกลืนแสงช่วง 200-400 นาโนเมตร กราฟมาตรฐานของออริซานอลบริสุทธิ์มีความเข้มข้น 4–100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ณ ความยาวคลื่น λ_{314} ด้วย R^2 = 0.9954 และค่าสัมประสิทธิ์การทึบแสงจำเพาะ (the specific extinction coefficient) ดังนี้

$$E_{(314\,nm)} = (36.840.28)\ g^{-1}\ L\ cm^{-1}$$

2.5 การวิเคราะห์ข้อมูล

ก่อนวิเคราะห์เชิงปริมาณ ต้องให้พื้นที่ใต้พีคของกลีเซอรัล เป็นตำแหน่งและความเข้มของพีคเทียบอ้างอิง

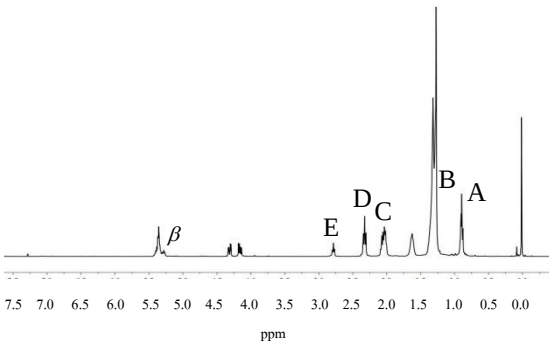
เช่น กรณีวิเคราะห์ปริมาณกรดไขมัน อาศัยการทำรูปแบบการเทียบความเข้มของสัญญาณ โดยอาศัยสัญญาณเรโซแนนซ์ของโปรตอน จากเบต้าโปรตอน ณ เมทิลีนิกของไตรเอซิลกลีเซอรัล (triacylglycerol O-CH_2-C**H**-O-) โอเลฟินิก (olefinic) บิส-อัลลิลิก (bis-allylic) และหมู่เมทิล ณ ปลายสายโซ่ของน้ำมัน (terminal CH_3) แสดงในรูปที่ 2 กรณีการวิเคราะห์ไดเอซิลกลีเซอรัล (DAG) และ/หรือโมโนเอซิลกลีเซอรัล (MAG) การทำรูปแบบการเทียบความเข้มของสัญญาณโดยต้องอาศัยสัญญาณเรโซแนนซ์ของคาร์บอนจากเบต้าเมทิลีนิกของไตรเอซิลกลีเซอรัล (triacylglycerol, O-CH_2-**C**H-O-) โดยรายงานเป็นสัดส่วนของความเข้มสัญญาณ

ตารางที่ 1 การหาสมการที่เหมาะสมสำหรับการหาปริมาณของกรดไขมันด้วยเทคนิก ^{1}H NMR

	Method A	**Method B**
Ln (%)	100 [B/ (A+B)]	100 [2B/3D]
L (%)	100 [(E/D)-2[B/(A+B)]]	100 [(3E-4B)/3D]
O (%)	100 {(C/2D) - (E/D) + [B/(A+B)]}	100 [Ln+L+S]*
S (%)	100 [1-(C/2D)]	100 [(4A+4B-3C)/6D]

หมายเหตุ วิธีการเอ อาศัยสัดส่วนเทียบจากหมู่เมทิล [15a] และวิธีการบี [15b] อาศัยสัดส่วนเทียบกับไฮโดรเจนอะตอม ณ เมทิลีนิกบนตำแหน่งอัลฟ้าของหมู่เอซิล

การคำนวณหาปริมาณสัดส่วนของโอเลอิก (O) ลิโอเลอิก (L) ลิโอเลนิก (Ln) และกรดไขมันอิ่มตัว (S) ในรูปของกรดอิสระ และหมู่เอซิลของกลีเซอรัลแสดงในตารางที่ 1 โดยตัวแปร A-E แสดงถึงความเข้มของสัญญาณดังแสดงในรูปที่ 2



รูปที่ 2 แสดงสเปคตรัม 400 MHz ^{1}H NMR ของน้ำมันรำข้าวบีบเย็นจากลพบุรี (L-RBO12)

A คือหมู่เมทิล ณ ปลายสายโซ่ของน้ำมันโอเลอิค (O), ลิโลเลอิก (L) และกรดไขมันอิ่มตัว (S) (terminal C**H**$_3$); B คือ หมู่เมทิล ณ ปลายสายโซ่ของน้ำมันลิโลเลนิก (Ln) (Linolenic terminal C**H**$_3$); C คือ โอเลฟินิก (olefinic, -C**H**$_2$CH=CHC**H**$_2$-); D คือ เมทิลีนิก ณ ตำแหน่งอัลฟา (methylenic hydrogen atom in α position, -C**H**$_2$-C=O) และ E คือบิส-อัลลิลิก (bis-allylic, = CHC**H**$_2$CH=) ทั้งนี้ การวิเคราะห์ดำเนินการทดสอบสามซ้ำ การวิเคราะห์ความแปรปรวนของข้อมูล (ANOVA) อาศัย Tukey HSD test

3. ผลการทดลองและการวิจารณ์ผล

3.1. ผลของ ^{1}H NMR fingerprint ของน้ำมันรำข้าว

ตัวแปรที่ใช้คือสภาวะความมีขั้วที่เพิ่มขึ้นของตัวทำละลายให้เหมาะสม เพื่อการกำหนดความเข้มสัญญาณเรโซแนนซ์ของโปรตอนจาก เบต้าโปรตอน ณ เมทิลีนิก

ของไตรเอซิลกลีเซอรัล (แสดงด้วย β ในรูปที่ 2) ให้เป็นพีคอ้างอิงได้สมบรูณ์เมื่อเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์ด้วย NMR กับ GCMS แสดงในตารางที่ 2 พบว่าไม่มีความแตกต่างอย่างเป็นนัยสำคัญ ให้ผลความใช้ได้ของวิธีการทดสอบที่น่าพอใจ

ผู้วิจัยพบว่าการวิเคราะห์ผลสัดส่วนของกรดไขมันชนิดต่างๆ อาศัยสมการ A นั้นให้ความคลาดเคลื่อนที่น้อยที่สุดด้วยค่า RSD ที่น้อยกว่า 0.7 อย่างไรก็ดี การอาศัยเทคนิคทาง NMR ไม่สามารถแยกและระบุความแตกต่างของกรดไขมันชนิดอิ่มตัวได้ แต่สเปกตรัมของ NMR สามารถแยกและระบุความแตกต่างของกรดไขมันชนิดไม่อิ่มตัวได้ดี ทั้งยังสามารถให้ผลเทียบเคียงเทคนิค GCMS และยังไม่ต้องผ่านขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างก่อนการวิเคราะห์ อีกทั้งยังใช้ปริมาณสารตัวอย่างที่น้อยกว่า 80 มิลลิกรัม พร้อมผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนที่มีค่าเท่ากับหรือน้อยกว่า 0.05 ที่ระดับความมั่นใจของผู้วิจัยสูงกว่าร้อยละ 95

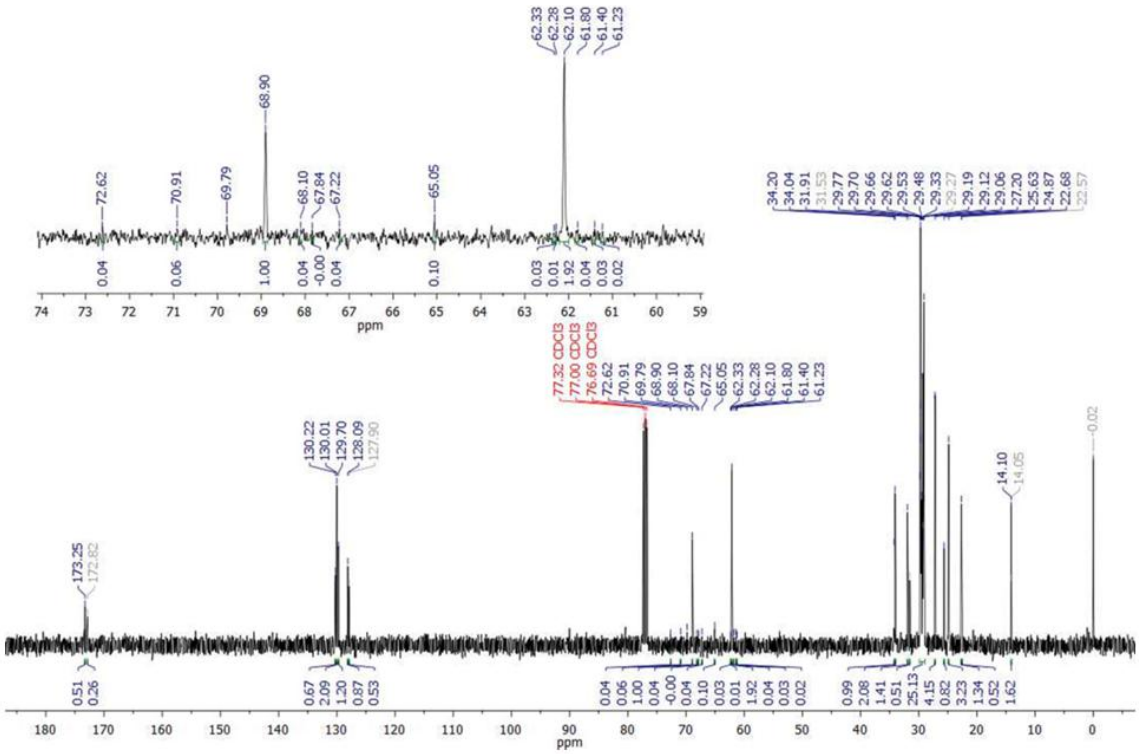
3.2 ผลของรูปแบบเฉพาะจากสัญญาณคาร์บอน 13 (^{13}C NMR fingerprint) ของน้ำมันรำข้าว

เนื่องจาก สัญญาณที่อ่อนและถูกรบกวนบริเวณช่วงสัญญาณ ณ ตำแหน่งที่แสดงกลีเซอรัลด้วยโปรตอน การอาศัยสัญญานของคาร์บอนสามารถติดตามการเปลี่ยนแปลงทางโครงสร้างของโครงสร้างหลักกลีเซอรัลได้อย่างดี ดังในรูปที่ 3 ด้วยสัญญาณคาร์บอนดังนี้ ^{13}C (acetone-d_6 400 MHz): glyceryl units: δ = 61.04 (1,2-DGA, HO-***C***H$_2$-CHOR-CH$_2$-OR), 61.80 (1-MGA, HO-***C***H$_2$-CHOH-CH$_2$-OR), 62.10 (TGA, RO-***C***H$_2$-CHOR-CH$_2$-OR), 62.28-62.33 (1,2-DGA & 1-MGA, RO-***C***H$_2$-CHOR(หรือ H)-CH$_2$-OH), 67.84 (2-MGA, HO-***C***H$_2$–CHOR-***C***H$_2$-OH), 65.02-65.05 (1,3-DGA,

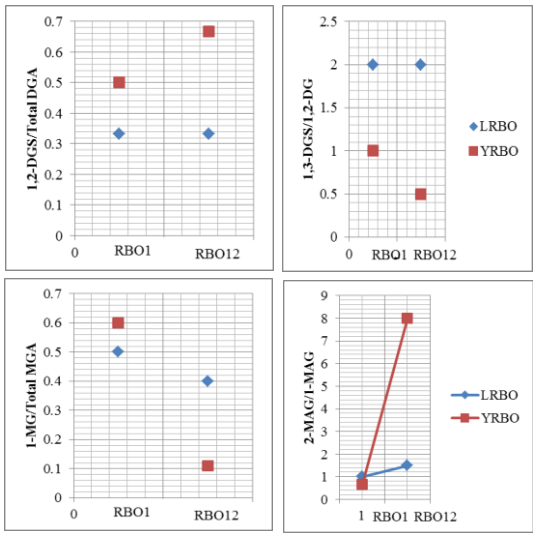
ตารางที่ 2 ข้อมูลการวิเคราะห์ผลสัดส่วนของกรดไขมันในตัวอย่างน้ำมันรำข้าวบีบเย็น (L-RBO12 และ Y-RBO12)

L-RBO12			
Acid types	**GC-MS***	**^{1}H NMR****	
		Method A	**Method B**
C14:0	0.65±0.10	+	+
C16:0	20.57±0.45	+	+
C18:0	4.47±0.44	+	+
Total	26.22±0.33	32.96±0.06	32.60±0.7
C18:1	42.22±0.33	45.30±0.33	45.69±0.42
C18:2	29.31±0.54	18.21±0.69	18.16±0.75
C18:3	2.25±0.03	3.53±0.42	3.56±0.45
Y-RBO12			
Acid types	GC-MS*	^{1}H NMR**	
		Method A	Method B
C14:0	0.65±0.10	+	+
C16:0	20.57±0.45	+	+
C18:0	4.47±0.44	+	+
Total	25.69±0.99	27.52±0.25	35.81±0.76
C18:1	44.15±1.56	47.86±0.12	39.80±0.73
C18:2	28.02±0.87	22.02±0.26	21.57±0.25
C18:3	2.13±0.14	2.59±0.14	2.82±0.17

หมายเหตุ: *เปอร์เซ็นของเมทิลเอสเตอร์จากไขมัน ** เปอร์เซ็นของไตรกลัเซอรัล (+) ไม่สามารถหาได้จากสมการ C14:0-แสดงกรดมิริสติก (myristic acid) C16:0-แสดงกรดปาล์มิติก (palmitic acic) C18:0-แสดงกรดสเตริก (stearic acid) C18:1-แสดงกรดโอเลอิก (oleic acid) C18:2-แสดงกรดลิโนเลอิก (linoleic acid) C18:3-แสดงกรดลิโนเลนิก (linolenic acid)



รูปที่ 3 แสดงสเปคตรัม ^{13}C NMR ของน้ำมันรำข้าวบีบเย็นจากยโสธร (Y-RBO1)



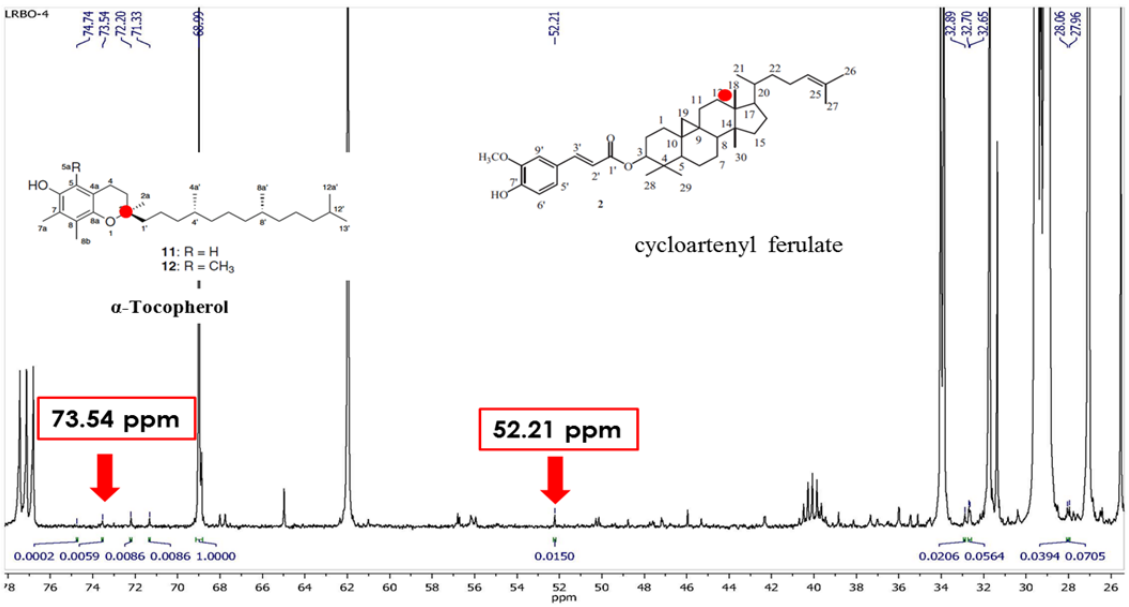
รูปที่ 4 แสดงผลของสัดส่วนโมลของไดเอซิลกลีเซอรัลและโมโนเอซิลกลีเซอรัลในน้ำมันรำข้าวบีบเย็น

RO-**C**H$_2$-CHOH-**C**H$_2$-OR), 67.22 (2-MGA, HO-CH$_2$-**C**HOR-CH$_2$-OH), 68.10 (1,2-DGA, RO-CH$_2$-**C**HOH-CH$_2$-OR), 68.90 (TGA, RO-CH$_2$-**C**HOR-CH$_2$-OR), 70.91 (1-MGA, HO-CH$_2$-**C**HOH-CH$_2$-OR), 72.62 (1,2-DGA, HO-CH$_2$-**C**HOR-CH$_2$-OR), fatty acid groups: δ 14.05-14.1 (t, **C**H$_3$), 22.57-22.68 (**C**H$_2$CH$_3$), 24.87 (**C**H$_2$-CH$_2$-COO-), 25.63 (-CH=CH-**C**H$_2$-CH=CH-), 27.2 (-**C**H$_2$-CH=CH-), 29.06-29.77, 31.53, 31.91 (**C**H$_2$CH$_2$), 34.01, 34.20 (CH$_2$-**C**H$_2$-COO-), 127.9, 128.09, 129.7, 130.01, 130.22 (**C**H=**C**H), 172.82, 173.25 (OO**C**R) จากผลวิเคราะห์แสดงลักษณะโครงสร้างของหลักของไขมันคือ ไตรเอซิลกลีเซอรัล และโครงสร้างรอง ในสัดส่วนที่ต่ำของไดเอซิลกลีเซอรัล และโมโนเอซิลกลีเซอรัล ทำให้สามารถใช้

สัญญาณติดตามการเปลี่ยนแปลงสัดส่วนของทั้งไดเอซิลกลีเซอรัล และโมโนเอซิลกลีเซอรัลต่อไตรไดเอซิลกลีเซอรัลได้

น้ำมันรำข้าวตัวอย่างจากยโสธรให้สัญญาณโครงสร้างหลักของกลีเซอรัลบนตำแหน่งบีตาของคาร์บอนที่ 72.6, 70.91, 68.10 และ 67.22 ppm สำหรับ 1,2-ไดเอซิลกลีเซอรัล 1-โมโนเอซิลกลีเซอรัล 1,3-ไดเอซิลกลีเซอรัแล 2-โมโนเอซิลกลีเซอรัล ตามลำดับ โดยรายงานผลสัดส่วนของโมลได้ดังรูปที่ 4 ที่แสดงให้เห็นว่าตัวอย่างจากลพบุรีให้ความคงสภาพของไดเอซิลกลีเซอรัลได้ดี อย่างไรก็ตาม LRBO12 แสดงสัดส่วนของ 1,3-ไดเอซิลกลีเซอรัลที่สูงกว่า YRBO12 โดยพบการเปลี่ยนแปลงไปในทิศทางที่ลดลงของ1,3-ไดเอซิลกลีเซอรัลในตัวอย่างจากยโสธร ซึ่งแสดงถึงเอนไซม์ที่ยังคงอยู่ในน้ำมันตัวอย่าง ขณะที่ พบสัดส่วนของโมโนเอซิลกลีเซอรัลที่มีทิศทางของการเปลี่ยนแปลงไปในทางเดียวกัน คือการลดลงของ 1-โมโนเอซิลกลีเซอรัล หรือเพิ่มขึ้นของ 2-โมโนเอซิลกลีเซอรัล ในตัวอย่างที่เก็บไว้นาน

เมื่อวิเคราะห์กับตัวอย่างที่เก็บไว้หนึ่งปี สัดส่วนโมลของโมโนเอซิลกลีเซอรัลแสดงการเปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งบ่งถึงความสามารถในการวิเคราะห์ใช้หาความใหม่ของผลิตภัณฑ์ได้ แสดงด้วยสัดส่วนโมลของ 1-โมโนเอซิลกลีเซอรัลที่ลดลง เทียบกับ 2-โมโนเอซิลกลีเซอรัล ขณะที่ การเปลี่ยนแปลงตามความสัมพันธ์สำหรับ 1,3-ไดเอซิลกลีเซอรัลที่ลดลง ยังไม่ชัดเจนเหมือนดังการรายงานในน้ำมันมะกอก เมื่อเก็บไว้เป็นเวลานาน ทั้งนี้ ตัวอย่างจากยโสธรให้การเปลี่ยนแปลงที่โดดเด่นต่อ 2-โมโนเอซิลกลีเซอรัลที่ลดลงด้วยสัดส่วนโมลของ 1-โมโนเอซิลกลีเซอรัลต่อโมโนเอซิลกลีเซอรัลทั้งหมด จาก 0.6 เป็น 0.1 ขณะที่ตัวอย่างของลพบุรี มีการเปลี่ยนแปลงในทิศทางเดียวกันแต่น้อยกว่าโดยลดลงจาก 0.5 เป็น 0.4



รูปที่ 5 แสดงสเปคตรัม ^{13}C NMR ของน้ำมันรำข้าวบีบเย็นจากลพบุรี (L-RBO12)

3.3 ผลการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีด้วยเทคนิค UV-vis ของสารในกลุ่มออริซินอลในน้ำมันตัวอย่าง

งานวิจัยนี้ แสดงให้เห็นว่า สามารถวิเคราะห์สารในกลุ่มออริซานอลและวิตามินอีในระบบนี้ได้ ด้วยผลเชิงคุณภาพพบสัญญาณที่สำคัญ ณ 52.21 ppm ของคาร์บอนตำแหน่งที่ 20 ของออริซานอลและ 73.54 ppm ของคาร์บอนตำแหน่งที่ 2 ของวิตามินอี บน ^{13}C NMR สเปคตรัม ดังรูปที่ 5 สำหรับการวิเคราะห์เชิงปริมาณอาศัยเทคนิคทาง UV พบความเข้มข้นเฉลี่ยของออริซานอลในน้ำมันรำข้าวบีบเย็น (RBO12) จากตัวอย่างที่มาจากจังหวัดลพบุรีและยโสธร อยู่ที่ร้อยละ 1.57±0.05 และ 1.89±0.10 โดยมวล ตามลำดับ เป็นที่น่าสนใจว่าผลจาก ^{13}C NMR ของ LRBO12 แสดงสัดส่วนของออริซานอลต่อไตรกลีเซอรัล อยู่ที่ร้อยละ 1.5 หากพิจารณาณ คาร์บอนตำแหน่งที่ 20 ของออริซานอล

4. สรุปผล

งานวิจัยนี้เป็นงานวิจัยแรกที่รายงานผลทางเคมีของน้ำมันรำข้าวบีบเย็นจากชุมชนเกษตร โดยอาศัยเทคนิคทาง NMR โดยผลสัญญาณโปรตอนลงสมการของวิธีเอสามารถเทียบได้กับวิธีการทดสอบด้วย GCMS ให้ระดับความเชื่อมั่น 95% ซึ่ง NMR ให้การติดตามผลที่รวดเร็วและสามารถให้ผลระดับโมเลกุล ทั้งยังให้ผลสัญญาณคาร์บอนที่สามารถติดตามการเปลี่ยนแปลงทางโครงสร้างจากไฮโดรไลลิสด้วยการแสดงสัดส่วนของโมโนกลีเซอรัลและไดกลีเซอรัลต่อไตรกลีเซอรัล โดยพบว่าน้ำมันรำข้าวที่เก็บไว้นานหนึ่งปีให้ค่า 1-โมโนกลีเซอรัลต่อโมโนกลีเซอรัลทั้งหมดในสัดส่วนที่ต่ำลงอย่างมีนัยยะสำคัญ ด้วยค่าที่ต่ำกว่า 0.5

การบริโภคน้ำมันรำข้าวดิบปราศจากการผ่านขบวนการใดๆหรือน้ำมันรำข้าวบีบเย็น สามารถบริโภคเป็นแหล่งสารอาหารที่สำคัญให้ร่างกายได้ด้วยผลการออกฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน โดยสามารถยืนยันด้วยผลการทดลองที่พบออริซานอลในปริมาณสูงถึง 15,700 และ 18,900 ppm สำหรับน้ำมันรำข้าวบีบเย็นที่เก็บไว้หนึ่งปีของตัวอย่างจากลพบุรีและยโสธรตามลำดับ อย่างไรก็ตาม เป็นที่ทราบกันดีว่าระยะเวลาการเก็บมีผลที่กำหนดคุณภาพของน้ำมันรำข้าว แต่ปัจจัยสำคัญที่แท้จริงนั้นคือกระบวนการผลิตที่ส่งผลต่อการเสียสภาพของน้ำมัน [15] นอกจาก NMR จะแสดงการพบสารในกลุ่มออริซินอลและวิตามินอีแล้ว ยังสามารถอ้างอิงถึงความเสถียรของผลิตภัณฑ์ตัวอย่าง และให้ข้อมูลที่เป็นการสนับสนุนคุณภาพผลิตภัณฑ์ชุมชนในประเทศไทยสามารถใช้เป็นเทคนิคยืนยันคุณภาพของสารอาหารที่สำคัญ

ผลงานวิจัยนี้ สามารถใช้การวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงของโมโนเอซิลกลีเซอรัลในการควบคุมคุณภาพและเป็นประโยชน์อ้างอิง สำหรับการประยุกต์ใช้น้ำมันรำข้าวบีบเย็นพัฒนาเป็นอาหารเสริมในสูตรตำรับเครื่องสำอางและอุตสาหกรรมการทางยาได้ต่อไป

5. กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัย จากงบประมาณแผ่นดิน ประจำปี 2558 มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ (เลขที่สัญญา 007/2558 - กองทุนวิจัยแห่งชาติ TU2558A1060212#111903) และขอขอบคุณ ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ สำหรับเครื่องมือ

และอุปกรณ์ที่จำเป็นต่อการวิจัย และศูนย์เครื่องมือกลาง คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ สำหรับการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค GC-MS (เลขสัญญาที่ CSIC 2557 จิรดา)

6. เอกสารอ้างอิง

[1] X. Zhang, Y. Shen, W. Prinyawiwatkul, J. King and Z. Xu, ”Comparison of the activities of hydrophilic anthocyanins and lipophilic tocols in black rice bran against lipid oxidation”, Food Chemistry 141(1), 2013, pp. 111–116.

[2a] A.F.G. Cicero and A. Gaddi, “Rice Bran Oil and γ-oryzanol in the Treatment of Hyperlipoproteinaemias and Other Conditions”, Phytotherapy Research 15(4), 2001, pp. 277–289.

[2b] G.E. Hirsch, M.M. Parisi, L.A. Martins, C.M. Andrade, F.M. Barbé-Tuana and F.T. Guma, “γ-oryzanol reduces caveolin-1 and PCGEM1 expression, markers of aggressiveness in prostate cancer cell lines”, Prostate 8(1), 2015, pp. 783-797.

[3] A. Thanonkaew, S. Wongyai, E.A. Decker and D.J. McClements, “Formation, antioxidant property and oxidative stability of cold pressed rice bran oil emulsion”, Journal of Food Science and Technology, 2015, pp. 9.

[4a] F.F. Ai, J. Bin, Z.M. Zhang, J.H. Huang, J.B. Wang, Y.Z. Liang, L. Yu and Z.Y. Yang, “Application of random forests to select premium quality vegetable oils by their fatty acid composition”, Food Chemistry 143, 2014, pp. 472–478.

[4b] Kasikorn research center, “Business analysis review on Rice bran oil”, Available : www.hooninside.com/news-etail.php?id=303847, 19 May 2016 (in Thai)

[5] R.J. Robbins, S.R. Bean, N. Calero, J. Munoz, P.W. Cox, A. Heuer and A. Guerrero, “Influence of chitosan concentration on the stability, microstructure and rheological properties of O/W emulsions formulated with high-oleic sunflower oil and potato protein”, Food Hydrocolloids, 30, 2013, pp. 152–162.

[6] N.R. Lakkakula, M. Lima and T. Walker, “Rice bran stabilization and rice bran oil extraction using ohmic heating”, Bioresource Technology, 92, 2004, pp. 157–161.

[7] S. Zullaikah, C.C Lai, S.R. Vali and Y.H. Ju, “A two-step acid-catalyzed process for the production of biodiesel from rice bran oil”, Bioresource Technology, 96, 2005, pp. 1889–1896.

[8a] F.S. Taha, S.M. Wagdy and F.A. Singer, “Comparison between antioxidant activities of phenolic extracts from different parts of peanut”, Life Science Journal, 9(2), 2012, pp. 207-215

[8b] D. Compton, K. Vermillion and J. Laszlo, “Acyl Migration Kinetics of 2-Monoacylglycerols from Soybean oil via ^{1}H NMR”, Journal of the American oil Chemists’Society, 84(4), 2007, pp. 343-348;

[8c] J.R. Morelló, M.J. Motilva, M.J. Tovar and M.P. Romero, "Changes in commercial virgin olive oil (cv Arbequina) during storage, with special emphasis on the phenolic fraction", Food Chemistry, 85(3), 2004, pp. 357-364.

[9] A. Thanonkaew, S. Wongyai, D.J. McClements and E.A. Decker, "Effect of stabilization of rice bran by domestic heating on mechanical extraction yield, quality, and antioxidant properties of cold-pressed rice bran oil (*Oryza saltiva* L.)", LWT - Food Science and Technology 48(2), 2012, pp. 231-236.

[10] J. Singkhonrat, "Development of the chromatographic fingerprint of Thai Medicinal plant for Diabetics", Laos Journal on Applied Science 1(1), 2006, pp. 644-50.

[11] A.F. Nurrulhiday, Y.B. Che-Man, A. Rohman, I. Amin, M. Shuhaimi and A. Khatib, "Authentication analysis of butter from beef fat using Fourier Transform Infrared (FTIR) spectroscopy coupled with chemometrics", International Food Research Journal 20(3), 2013, pp. 1383-1388.

[12] R.M. Alonso-Salces, M.V. Holland and C. Guillou, "H-NMR fingerprinting to evaluate the stability of olive oil", Food Control 22(12), 2011, pp. 2041-2046

[13] M.D. Guillén and A. Ruiz, "H nuclear magnetic resonance as a fast tool for determining the composition of acyl chains in acylglycerol mixtures", European Journal of Lipid Science and Technology 105(9), 2003, pp. 502-507.

[14] S. Zullaikah, E. Melwita and Y.H. Ju, "Isolation of oryzanol from crude rice bran oil", Bioresource Technology, 100(1), 2009, pp. 299-302.

[15a] A. Agiomyrgianaki, P.V. Petrakis and P. Dais, "Influence of harvest year, cultivar and geographical origin on Greek extra virgin olive oils composition: A study by NMR spectroscopy and biometric analysis", Food Chemistry 135(4), 2012, pp. 2561-2568

[15b] V. Rabiei, S. Ghorbani and H. Hajnajari, "Effect of temperature and storage period of olive (*Olea europaea cv*. Zard) fruit on olive oil quality", Journal of Food, Agriculture and Environment, 9(1), 2011, pp. 74-77.