

รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์



การประเมินฤทธิ์ด้านการอักเสบของสารสกัด

แกมมา-โอไรซานอลจากรำข้าวดำไทย

Evaluation of Anti-inflammatory Activity of
Gamma-Oryzanol Extracts from Thai Purple Rice Bran

โดย

รองศาสตราจารย์ ดร. ภกญ.บุษบัน ศิริธัญญาลักษณ์

หัวหน้าโครงการวิจัย

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

Copyright © by Chiang Mai University

All rights reserved

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากงบประมาณเงินรายได้ ประจำปี ๒๕๕๓

คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณคณะกรรมการเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ที่อนุมัติงบประมาณเงินรายได้ ประจำปี พ.ศ.2553 แก่คณะผู้วิจัย จึงทำให้โครงการนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี และใคร่ขอขอบคุณที่ช่วยสนับสนุนในด้านสถานที่และเครื่องมืออุปกรณ์ในการดำเนินการวิจัย

ขอขอบคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ไชยวัฒน์ ไชยสุต ที่คอยให้คำปรึกษาเรื่องการทดสอบฤทธิ์ด้านการอักเสบผ่านการยับยั้งการสร้างไนตริกออกไซด์และ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุนีย์ จันทร์สกาว่า ที่คอยให้คำปรึกษาเรื่องการสกัดแยกสารสกัดแกมมา-ไฮโรซานอลจากรำข้าวเก่า

สุดท้ายนี้ขอขอบคุณ Dr.Francoise RAYNAUD และนักศึกษาปริญญาเอก Rafika JARRAY จาก Laboratoire de Chimie et Biochimie Pharmacologiques et Toxicologiques-UMR 8601, Institut interdisciplinaire des Sciences du Vivant des Saints-Pères, Université Paris Descartes นครปารีส ประเทศฝรั่งเศส ที่คอยให้คำปรึกษาและแนวทางในการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพในเซลล์มะเร็ง

พฤษภาคม พ.ศ.2554

คณะผู้วิจัย

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

บทคัดย่อ

ชื่อเรื่อง	การประเมินฤทธิ์ด้านการอักเสบของสารสกัดแกมม่า-โอโรซานอล จากรำข้าวเก่าไทย
ผู้วิจัย	รองศาสตราจารย์ ดร.บุษบัน ศิริวัณณญาณลักษณ์ ภาควิชาวิทยาศาสตร์เภสัชกรรม คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
คำสำคัญ	ฤทธิ์ด้านการอักเสบ, ไนตริกออกไซด์, แกมม่า-โอโรซานอล

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อประเมินฤทธิ์ด้านการอักเสบผ่านการยับยั้งการสร้างไนตริกออกไซด์จากเซลล์ mouse macrophage RAW 264.7 ของสารสกัดแกมม่า-โอโรซานอลที่สกัดจากรำข้าวเก่าและรำข้าวแดงสายพันธุ์พื้นเมืองของไทย โดยทำการเก็บตัวอย่างข้าวเก่าเจดีย์โคะ (BR-1) ข้าวเก่าปิ้ง (BR-2) และข้าวเก่าต่อ (BR-3) จากจังหวัดตาก ตัวอย่างข้าวแดงจอมทอง (BR-4) ข้าวแดงดอยหล่อ (BR-5) และข้าวแดงอมก๋อย (BR-6) จากจังหวัดเชียงใหม่ นำรำข้าวที่ได้มาสกัดแยกสารสกัดหยาบน้ำมัน (crude rice bran oil) ด้วยเทคนิคการสกัดแบบซอกหักเล็ท จากนั้นจึงนำมาแยกสารสกัดแกมม่า-โอโรซานอลด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี วิเคราะห์ปริมาณแกมม่า-โอโรซานอลในสารสกัดแกมม่า-โอโรซานอลด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (reverse-phase HPLC) พบว่าสารสกัดแกมม่า-โอโรซานอลที่แยกสกัดจากรำข้าวทั้ง 6 ชนิดมีปริมาณแกมม่า-โอโรซานอลอยู่ในช่วงระหว่าง 1.17 – 10.80% สารสกัดแกมม่า-โอโรซานอลจากรำข้าวแดงจอมทองมีปริมาณแกมม่า-โอโรซานอลสูงที่สุด ($10.80 \pm 0.25\%$) ตามมาด้วยรำข้าวเก่าปิ้ง ($8.33 \pm 0.13\%$) รำข้าวเก่าต่อ ($8.20 \pm 0.23\%$) รำข้าวแดงดอยหล่อ ($6.93 \pm 0.05\%$) รำข้าวแดงอมก๋อย ($6.25 \pm 0.17\%$) และรำข้าวเก่าเจดีย์โคะ ($1.17 \pm 0.11\%$) ตามลำดับ จากนั้นจึงคัดเลือกสารสกัดแกมม่า-โอโรซานอลที่มีปริมาณแกมม่า-โอโรซานอลมากกว่าร้อยละ 5 มาทำมาตรฐานของสารสกัด (standardization) และนำสารสกัดแกมม่าโอโรซานอลมาทดสอบฤทธิ์ด้านการอักเสบผ่านกลไกการยับยั้งการสร้างไนตริกออกไซด์จากเซลล์ mouse macrophage RAW 264.7 ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS และ IFN- γ เปรียบเทียบกับสารมาตรฐานแกมม่า-โอโรซานอลและสารมาตรฐานเคอร์คูมิน โดยสามารถเรียงลำดับความสามารถในการยับยั้งการสร้างไนตริกออกไซด์จากเซลล์ mouse macrophage RAW 264.7 สารมาตรฐานเคอร์คูมินมีความสามารถยับยั้งการสร้างไนตริกออกไซด์ได้สูงที่สุดโดยมีความเข้มข้นที่สามารถการยับยั้งการสร้างไนตริกออกไซด์ได้

ร้อยละ 50 (50% Inhibition concentration) = $11.78 \pm 1.59 \mu\text{g/ml}$ ตามมาด้วยสารสกัดแกมมา-โอโรซานอลจากรำข้าวเก่าบั้ง (BR-2, $23.69 \pm 1.87 \mu\text{g/ml}$) สารมาตรฐานแกมมา-โอโรซานอล ($24.12 \pm 1.67 \mu\text{g/ml}$) สารสกัดแกมมา-โอโรซานอลจากรำข้าวเก่าต่อ (BR-3, $24.66 \pm 2.31 \mu\text{g/ml}$) สารสกัดแกมมา-โอโรซานอลจากรำข้าวแดงจอมทอง (BR-4, $26.92 \pm 2.23 \mu\text{g/ml}$) สารสกัดแกมมา-โอโรซานอลจากรำข้าวแดงดอยหล่อ (BR-5, $34.20 \pm 2.14 \mu\text{g/ml}$) และสารสกัดแกมมา-โอโรซานอลจากรำข้าวแดงอมก๋อย (BR-6, $41.22 \pm 3.09 \mu\text{g/ml}$) ตามลำดับ โดยช่วงความเข้มข้นที่ใช้ทดสอบฤทธิ์ด้านการอักเสบไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ mouse macrophage RAW 264.7 จากการวิเคราะห์ทางสถิติพบว่าความเข้มข้นที่สามารถยับยั้งการสร้างไนตริกออกไซด์ได้ร้อยละ 50 ของสารมาตรฐานแกมมา-โอโรซานอล สารสกัดแกมมา-โอโรซานอลจากรำข้าวเก่าบั้ง รำข้าวเก่าต่อและรำข้าวแดงจอมทองมีค่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความน่าเชื่อมั่น 95% ข้อมูลที่ได้จากการศึกษาวิจัยครั้งนี้จะใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการศึกษาฤทธิ์ด้านการอักเสบของสารสกัดแกมมา-โอโรซานอลในกลไกระดับโมเลกุลต่อไป

ABSTRACT

TITLE Evaluation of Anti-inflammatory Activity of Gamma-Oryzanol
from Thai Purple Rice Bran

RESEARCHER Associate Prof. Dr. Busaban Sirithunyalug
Department of Pharmaceutical Sciences
Faculty of Pharmacy, Chiang Mai University

KEYWORDS Anti-inflammatory activity, Nitric oxide, Gamma-oryzanol

This study was carried out to evaluate anti-inflammatory activity through the inhibition of nitric oxide production from mouse macrophage RAW 264.7 cell line of gamma-oryzanol extracts from Thai purple rice bran and red rice bran. Three cultivars of Thai purple rice were collected from Tak province, namely Kum Jadeekho (BR-1), Kum Boun (BR-2) and Kum Tor (BR-3). Three cultivars of Thai red-rice were collected from Chiang Mai province, namely Khao' Dang Jom Thong (BR-4), Khao' Dang Doi Lo (BR-5) and Khao' Dang Omkoi (BR-6). Crude rice bran was extracted to rice bran oil by Soxhlet's extraction technique. Then, crude rice bran oils were semi-purified by column chromatography to obtain the gamma-oryzanol rich extracts. The amount of gamma-oryzanol was analyzed by the reverse-phase HPLC. Gamma-oryzanol extracts from rice bran of 6 cultivars have gamma-oryzanol content between 1.17–10.80%. Gamma-oryzanol extract from Khao' Dang Jom Thong rice bran exhibited the highest gamma-oryzanol content ($10.80 \pm 0.25\%$), followed by Kum Boun rice bran ($8.33 \pm 0.13\%$) Kum Tor rice bran ($8.20 \pm 0.23\%$) Khao' Dang Doi Lo rice bran ($6.93 \pm 0.05\%$) Khao' Dang Om Koi rice bran ($6.25 \pm 0.17\%$) and Kum Jadeekho ($1.17 \pm 0.11\%$), respectively. Then, gamma-oryzanol extracts with gamma-oryzanol content more than 5% were selected to standardization before evaluation of anti-inflammatory activity through nitric oxide production from mouse macrophage RAW 264.7 cell line induced by lipopolysaccharide and interferon- γ . The activities were compared to gamma-oryzanol and curcumin. Curcumin exerted the highest inhibition on nitric oxide production with 50% inhibition concentration value of $11.78 \pm 1.59 \mu\text{g/ml}$, followed by gamma-oryzanol extract from Kum Boun rice bran (BR-

2, $23.69 \pm 1.87 \mu\text{g/ml}$), standard gamma-oryzanol ($24.12 \pm 1.67 \mu\text{g/ml}$), gamma-oryzanol extract from Kum Tor rice bran (BR-3, $24.66 \pm 2.31 \mu\text{g/ml}$), gamma-oryzanol extract from Khao' Dang Jom Thing rice bran (BR-4, $26.92 \pm 2.23 \mu\text{g/ml}$), gamma-oryzanol extract from Khao' Dang Doi Lo rice bran (BR-5, $34.20 \pm 2.14 \mu\text{g/ml}$) and gamma-oryzanol extract from Khao' Dang Om Koi rice bran (BR-6, $41.22 \pm 3.09 \mu\text{g/ml}$), respectively. The concentrations used to evaluate anti-inflammatory activity did not exhibit cytotoxic activity in mouse macrophage RAW 264.7. The 50% Inhibition concentration value of gamma-oryzanol and gamma-oryzanol extract from Kum Boun rice bran (BR-2), Kum Tor rice bran (BR-3) and Khao' Dang Jom Thong (BR-4) were insignificantly different at 0.05 level. Further investigations will determine the anti-inflammatory activity to understand the mechanism at molecular level.

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	i
บทคัดย่อ	ii
Abstract	iv
สารบัญ	vi
สารบัญตาราง	vii
สารบัญรูป	viii
บทที่ 1 ที่มีและความสำคัญของปัญหาการทดลอง	1
บทที่ 2 ทบทวนวรรณกรรม	3
บทที่ 3 การทดลอง	14
บทที่ 4 ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง	21
บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง	37
เอกสารอ้างอิง	38

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

Copyright© by Chiang Mai University

All rights reserved

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1 %yield ของสารสกัดหยาบน้ำมันรำข้าว (crude rice bran oil)	21
ตารางที่ 2 %yield ของสารสกัดแกมมา-โอโรซานอล	22
ตารางที่ 3 ร้อยละของแกมมา-โอโรซานอลในสารสกัดแกมมา-โอโรซานอล	28
ตารางที่ 4 ความเป็นพิษต่อเซลล์ mouse macrophage RAW 264.7	29
ตารางที่ 5 50% Inhibition concentration ของสารสกัดแกมมา-โอโรซานอล	35

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
 Copyright© by Chiang Mai University
 All rights reserved

สารบัญรูป

	หน้า
รูปที่ 1 สารสำคัญหลักที่พบในแกมม่า-โอโรซานอล	5
รูปที่ 2 HPLC โครมาโทแกรมของสารสำคัญที่พบในแกมม่า-โอโรซานอล	7
รูปที่ 3 ปฏิกริยาของ Griess reagent system	10
รูปที่ 4 HPLC โครมาโทแกรมของสารมาตรฐานแกมม่า-โอโรซานอลความเข้มข้น 25 ppm	23
รูปที่ 5 HPLC โครมาโทแกรมของสารมาตรฐานแกมม่า-โอโรซานอลความเข้มข้น 50 ppm	23
รูปที่ 6 HPLC โครมาโทแกรมของสารสกัดแกมม่า-โอโรซานอล ที่ได้จากวัฏภาคเคลื่อนที่ 9:1	24
รูปที่ 7 HPLC โครมาโทแกรมของสารสกัดแกมม่า-โอโรซานอล ที่ได้จากวัฏภาคเคลื่อนที่ 7:3	25
รูปที่ 8 HPLC โครมาโทแกรมของสารสกัดแกมม่า-โอโรซานอล ที่ได้จากวัฏภาคเคลื่อนที่ 1:1	25
รูปที่ 9 HPLC โครมาโทแกรมของสารสกัดแกมม่า-โอโรซานอลจากรำข้าวเก่าปิ้ง (BR-2)	26
รูปที่ 10 HPLC โครมาโทแกรมของสารสกัดแกมม่า-โอโรซานอลจาก รำข้าวแดงจอมทอง (BR-4)	26
รูปที่ 11 กราฟมาตรฐานของสารมาตรฐานแกมม่า-โอโรซานอล	27
รูปที่ 12 ความเป็นพิษต่อเซลล์ mouse macrophage RAW 264.7 ของสารสกัด แกมม่า-โอโรซานอล สารมาตรฐานแกมม่า-โอโรซานอลและสารมาตรฐานเคอร์คูมิน	30
รูปที่ 13 กราฟมาตรฐานของโพแทสเซียมไนไตรต์	31
รูปที่ 14 Dose response curve ของสารสกัดแกมม่า-โอโรซานอลจากรำข้าวเก่าปิ้ง (BR-2) ในการยับยั้งการสร้างไนตริกออกไซด์	31
รูปที่ 15 Dose response curve ของสารสกัดแกมม่า-โอโรซานอลจากรำข้าวเก่าต่อ (BR-3) ในการยับยั้งการสร้างไนตริกออกไซด์	32
รูปที่ 16 Dose response curve ของสารสกัดแกมม่า-โอโรซานอลจากรำข้าวแดงจอมทอง (BR-4) ในการยับยั้งการสร้างไนตริกออกไซด์	32
รูปที่ 17 Dose response curve ของสารสกัดแกมม่า-โอโรซานอลจากรำข้าวแดงดอยหล่อ (BR-5) ในการยับยั้งการสร้างไนตริกออกไซด์	33
รูปที่ 18 Dose response curve ของสารสกัดแกมม่า-โอโรซานอลจากรำข้าวแดงอมก๋อย (BR-6) ในการยับยั้งการสร้างไนตริกออกไซด์	33

สารบัญรูป (ต่อ)

หน้า

รูปที่ 19 Dose response curve ของสารมาตรฐานแกมมา-ไอโซซานอล ในการยับยั้งการสร้างไนตริกออกไซด์	34
รูปที่ 20 Dose response curve ของสารมาตรฐานเคอร์คูมิน ในการยับยั้งการสร้างไนตริกออกไซด์	34



ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

Copyright© by Chiang Mai University

All rights reserved

บทที่ 1

ที่มาและความสำคัญของปัญหาการทดลอง

ไนตริกออกไซด์ (nitric oxide, NO) เป็นอนุมูลที่ถูกสร้างขึ้นในร่างกายจาก L-arginine โดยเอนไซม์ nitric oxide synthase (NOS) ซึ่งมีทั้งหมด 3 ไอโซฟอร์ม คือ inducible NOS (iNOS), endothelial NOS (eNOS) และ neuronal NOS (nNOS) มีการศึกษาวิจัยพบว่าการหลั่งไนตริกออกไซด์จากแมคโครฟาจ (macrophage) ในการตอบสนองต่อกระบวนการอักเสบผ่านการกระตุ้น iNOS และยังพบว่าไนตริกออกไซด์สามารถกระตุ้นเอนไซม์ cyclooxygenase-2 (COX-2) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ใช้ในการผลิต prostaglandins ซึ่งเป็นสารสื่อกลางที่สำคัญในกระบวนการอักเสบและยังพบว่าสามารถกระตุ้นการผลิต interleukin-1 (IL-1) และ tumor necrosis factor (TNF) ซึ่งเป็น cytokines ที่มีบทบาทสำคัญในการอักเสบ ไนตริกออกไซด์ยังสามารถสร้างความเสียหายต่อดีเอ็นเอในภาวะที่มีออกซิเจนโดยทำปฏิกิริยากับออกซิเจนเกิดเป็นไนโตรเจน ไตรออกไซด์ (N_2O_3) แล้วสามารถเข้าทำลายดีเอ็นเอโดยการเกิดปฏิกิริยา deamination

เมื่อระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายตอบสนองต่อกระบวนการอักเสบ จะทำให้เกิดการเหนี่ยวนำเซลล์ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ ได้แก่ แมคโครฟาจ (macrophage), อีโอซิโนฟิล (eosinophil) และนิวโทรฟิล (neutrophil) เป็นต้น ให้เคลื่อนที่มายังบริเวณที่เกิดการอักเสบ ในขณะเดียวกันเซลล์เหล่านี้ก็จะกระตุ้นให้อนุมูลอิสระจำนวนมาก ได้แก่ อนุมูลอิสระไฮดรอกซิล (hydroxyl) ซูเปอร์ออกไซด์ (superoxide) ไนตริกออกไซด์และเปอร์ออกซีไนไตรท์ (peroxynitrite) เป็นต้น ซึ่งอนุมูลอิสระเหล่านี้ไม่เพียงแต่ทำลายเซลล์ที่เกิดการอักเสบเท่านั้น ยังสามารถเปลี่ยนแปลงสารชีวโมเลกุลต่างๆ ชนิด ได้แก่ ดีเอ็นเอ โปรตีนและไขมันในเซลล์ร่างกายด้วยเช่นกัน ซึ่งสามารถทำให้ดีเอ็นเอเสียหายด้วยปฏิกิริยาต่างๆ เช่น deamination, alkylation, oxidation และ nitration หรือทำลายโครงสร้างของดีเอ็นเอ (DNA strand break) ซึ่งนำไปสู่การกลายพันธุ์จึงมีโอกาสพัฒนาในการเกิดมะเร็งได้ มีการศึกษาพบว่าอนุมูลอิสระเปอร์ออกซีไนไตรท์ ซึ่งเป็นอนุมูลอิสระที่เกิดจากการทำปฏิกิริยาของอนุมูลอิสระซูเปอร์ออกไซด์และไนตริกออกไซด์สามารถทำลายดีเอ็นเอได้มากกว่าไนตริกออกไซด์ในความเข้มข้นที่เท่ากัน โดยพบว่าไนตริกออกไซด์สามารถเข้าทำปฏิกิริยากับ adenine, guanine และ cytosine ส่วนเปอร์ออกซีไนไตรท์สามารถเข้าทำปฏิกิริยากับ guanine เพียงอย่างเดียว โดยทำปฏิกิริยาแบบ oxidation และ nitration ได้ผลิตภัณฑ์เป็น 8-oxodGua และ 8-nitroGua และยังสามารถทำปฏิกิริยาโดยตรงกับส่วนที่เป็นน้ำตาลของดีเอ็นเอทำให้เกิด Strand break ได้และยังพบว่าอนุมูลอิสระเหล่านั้นมีบทบาทสำคัญในกระบวนการก่อมะเร็งในระยะต่างๆ เช่น initiation, promotion และ progression เป็นต้น สำหรับการอักเสบเรื้อรัง (chronic inflammation) มีความสัมพันธ์กับการเกิดมะเร็งโดยเฉพาะมะเร็งลำไส้ใหญ่และไส้ตรง มีการศึกษาวิจัยพบว่ายาที่สามารถยับยั้งเอนไซม์ COX-2 ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยา

การสังเคราะห์ prostaglandin (PGs) จาก arachidonic acid ได้แก่ ยากลุ่มแอสไพรินและ Non-Steroidal Anti-inflammatory Drugs (NSAIDs) เป็นสารที่สามารถป้องกันการก่อมะเร็งในโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่และไส้ตรงได้ (Chun *et al.*, 2004)

ข้าวถือเป็นพืชเศรษฐกิจและเป็นอาหารหลักของคนไทย ประเทศไทยและประเทศในแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้เป็นผู้ผลิตข้าวแหล่งใหญ่ที่ส่งออกไปจำหน่ายยังประเทศต่างๆ ทั่วโลก ข้าวที่คนไทยนิยมบริโภคเป็นอาหารหลักประจำวันเป็นข้าวที่ผ่านการขัดสีเอาเยื่อหุ้มเมล็ดข้าวหรือที่เรียกว่า รำข้าวและจมูกข้าว ซึ่งอุดมด้วยคุณค่าสารอาหารรวมถึงวิตามินและแร่ธาตุที่มีประโยชน์ต่อสุขภาพมากมายออกไป เมื่อนำรำข้าวและจมูกข้าวมาสกัดจะได้น้ำมันรำข้าวและจมูกข้าว สารธรรมชาติที่พบในน้ำมันรำข้าวและจมูกข้าว ได้แก่ แกมมา-โอไรซานอล วิตามินอีกลุ่มโทโคไตรอีนอล (Tocotrienol) ไฟโตสเตอรอล (Phytosterol) และกรดไขมันกลุ่มโอเมก้า 9-6-3 โดยน้ำมันรำข้าวและจมูกข้าวมีคุณประโยชน์มากมาย โอไรซานอลเป็นสารที่มีคุณประโยชน์มากมาย เช่น ลดความเสี่ยงของโรคหัวใจและหลอดเลือด ลดความเสี่ยงการเกิดมะเร็ง ยับยั้งการเกิด Platelet Aggregation ลดโคเลสเตอรอลและต้านออกซิเดชัน เป็นต้น โดยเฉพาะแกมมา-โอไรซานอล (Gamma-Oryzanol) ซึ่งเป็นรูปแบบที่มีฤทธิ์ได้ดีที่สุด โดยมีการประเมินประสิทธิภาพของรำข้าวในการป้องกันมะเร็งลำไส้ในหนูทดลอง พบว่าหนูทดลองที่กินรำข้าวสามารถลดจำนวน Intestinal adenoma ได้ถึง 51% เมื่อเปรียบเทียบกับหนูทดลองในกลุ่มที่ได้รับอาหารปกติ (Verschoyle *et al.*, 2007) นอกจากนี้ยังมีรายงานวิจัยพบว่าสารกลุ่มโทโคฟีรอลและโทโคไตรอีนอล (tocopherol and tocotrienol) สารในกลุ่มนี้มีรายงานฤทธิ์ต้านออกซิเดชันและฤทธิ์ด้านการอักเสบ โดยมีรายงานวิจัยพบว่าโทโคไตรอีนอลเป็นสารที่มีฤทธิ์ด้านการอักเสบผ่านกลไกการยับยั้งการกระตุ้น transcription factor NF- κ B ทั้งยังสามารถป้องกันการเกิดโรคหลอดเลือดหัวใจในหนูที่เป็นเบาหวานอีกด้วย

ปัจจุบันพบว่าอุบัติการณ์ของมะเร็งลำไส้ใหญ่และไส้ตรงมีแนวโน้มสูงขึ้นเรื่อยๆ อาจเป็นผลเนื่องมาจากพฤติกรรมการบริโภคได้เปลี่ยนแปลงไป โดยหันไปให้ความนิยมกับอาหารประเภทแป้งไขมันและเนื้อสัตว์ รวมทั้งมีโอกาสสัมผัสกับสารก่อมะเร็งมากขึ้น เช่น สารเคมีและสารพิษในอาหาร ควินบุรี รังสี สารพิษจากเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค เป็นต้น จากที่กล่าวมาข้างต้นแสดงให้เห็นว่าการอักเสบเรื้อรังของระบบทางเดินอาหารมีความสัมพันธ์กับการก่อมะเร็งลำไส้ใหญ่และไส้ตรง

คณะผู้วิจัยเห็นว่าประเทศไทยมีพันธุ์ข้าวหลากหลายสายพันธุ์ ไม่ว่าจะเป็นข้าวขาว ข้าวแดง และข้าวดำ ทั้งยังขาดข้อมูลการวิจัยทางวิทยาศาสตร์รองรับศักยภาพในการป้องกันการก่อมะเร็งผ่านกลไกการยับยั้งการอักเสบ คณะผู้วิจัยจึงมีความสนใจศึกษาศักยภาพในการป้องกันการก่อมะเร็ง (chemoprevention) ผ่านกระบวนการอักเสบโดยกลไกการยับยั้งการสร้างไนตริกออกไซด์จากเซลล์ mouse macrophage RAW 264.7 ของสารสกัดแกมมาโอไรซานอลจากรำข้าวเก่าและรำข้าวแดงของไทย

บทที่ 2

บททวนวรรณกรรม

ข้าว

ข้าวเป็นพืชอาหารที่สำคัญชนิดหนึ่งของโลก โดยเฉพาะประเทศในภูมิภาคเอเชียที่นิยมรับประทานข้าวเป็นอาหารประจำวันมากกว่าในภูมิภาคอื่นๆ ของโลก การผลิต บริโภคและการค้าข้าวส่วนใหญ่จึงกระจุกตัวอยู่ในทวีปเอเชีย ข้าวเป็นพืชในเขตร้อนซึ่งต้องการอุณหภูมิและความชื้นสูงในการเจริญเติบโต ประเทศไทยจึงเป็นประเทศหนึ่งที่เหมาะสมกับการปลูกข้าว พันธุ์ข้าวของไทยเป็นที่นิยมของประชากรที่บริโภคข้าวทั่วโลก อีกทั้งภูมิอากาศและภูมิประเทศของประเทศไทยเหมาะกับการเจริญเติบโต แต่ข้าวที่ผลิตได้ส่วนใหญ่จะใช้ในการบริโภคภายในประเทศ ทำให้มีข้าวเพียงร้อยละ 6 เท่านั้นที่เข้าสู่ตลาดการค้าข้าวระหว่างประเทศ โดยประเทศที่มีบทบาทมากที่สุดในการส่งออกข้าว คือประเทศไทย รองลงมาคือ อินเดีย เวียดนาม จีนและพม่า ตามลำดับ โดยประเทศไทยส่งออกข้าวปีละประมาณ 7 ล้านตัน เป็นสัดส่วนประมาณร้อยละ 36 ของการส่งออกข้าวทั้งหมดทั่วโลก จึงนับได้ว่าข้าวเป็นพืชเศรษฐกิจหลักที่สำคัญของประเทศ ซึ่งสมควรอย่างยิ่งที่จะได้รับการส่งเสริมในด้านการเพาะปลูก

ข้าวที่นำมาปลูกเป็นอาหารนั้นแบ่งออกได้เป็น 2 ชนิด คือ ข้าว *Oryza sativa* L. ปลูกในทวีปเอเชียและ *Oryza glaberrima* Steud ปลูกในทวีปแอฟริกา แต่ข้าวที่ค้าขายกันในตลาดโลกเกือบทั้งหมดเป็นข้าวที่ปลูกจากแถบเอเชีย ซึ่งข้าวชนิดดังกล่าวยังสามารถแบ่งได้ตามแหล่งปลูกอีก คือ

ข้าวอินดิกา (*Indica*) มีลักษณะเมล็ดยาวรี ต้นสูง เป็นข้าวที่ปลูกในเอเชียเขตร้อน (tropical race) ตั้งแต่เวียดนาม ฟิลิปปินส์ ไทย อินโดนีเซีย ศรีลังกา ตอนใต้ของอินเดียและลุ่มแม่น้ำแยงซีเกียงของประเทศจีน ข้าวพันธุ์นี้ค้นพบครั้งแรกในประเทศอินเดียและต่อมาได้พัฒนาไปปลูกที่ทวีปอเมริกา

ข้าวจาปอนิกา (*Japonica*) เป็นข้าวที่ปลูกในเขตอบอุ่น เช่น ประเทศจีน ญี่ปุ่น เกาหลี มีลักษณะเมล็ดป้อมกลมรี ต้นเตี้ย

ข้าวจาวานิกา (*Javanica*) มีลักษณะต้นสูง เมล็ดป้อมใหญ่ สันนิษฐานว่าจะเป็นผลจากการคัดเลือกข้าวพวกอินดิกา ปลูกในประเทศอินโดนีเซียและฟิลิปปินส์ แต่ไม่ได้รับความนิยมเพราะให้ผลผลิตต่ำ

จากสภาพความผันแปรทางภูมิศาสตร์และภูมิอากาศ ประกอบกับการคัดเลือกของมนุษย์ ทำให้มีพันธุ์ข้าวทั่วโลกประมาณ 120,000 สายพันธุ์ สำหรับข้าวที่ปลูกในไทยเป็นพันธุ์ข้าวเมล็ดยาว คือ ข้าวอินดิกา แต่ประกอบด้วยหลายสายพันธุ์ทั้งที่มีการพัฒนาขึ้นใหม่และข้าวพันธุ์พื้นเมืองซึ่งมีอยู่ประมาณ 3,500 สายพันธุ์ ซึ่งมีข้าวป่า ข้าวพื้นเมืองและข้าวที่ผสมโดยมนุษย์ขึ้นมาใหม่ แต่ข้าว

พันธุ์ที่สร้างชื่อเสียงให้กับไทยมากที่สุด คือ ข้าวหอมมะลิ ข้าวมีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Oryza sativa* L. จัดเป็นธัญพืชในวงศ์ Poaceae เป็นแหล่งอาหารหลักที่ให้คาร์โบไฮเดรตเพื่อเพิ่มพลังงาน นอกจากการเป็นอาหารในชีวิตประจำวันของประชากรส่วนใหญ่ของโลกแล้ว ยังมีการนำข้าวมาแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์อื่น เช่น ข้าวหมก ขนมไทยที่ใช้แป้งข้าวเหนียวและ/หรือแป้งข้าวเจ้า เครื่องดื่มประเภทแอลกอฮอล์และอื่น ๆ ข้าวที่ปลูกในประเทศไทยมีทั้งข้าวเจ้าและข้าวเหนียว ซึ่งต่างประกอบด้วยแป้งในปริมาณร้อยละ 80 – 90 สำหรับสารอาหารในข้าวที่รองจากคาร์โบไฮเดรต คือ โปรตีนในปริมาณร้อยละ 5 – 10 ส่วนที่เหลือเป็นไขมัน วิตามิน และเกลือแร่ รวมทั้งสารประกอบอื่น

รำข้าว

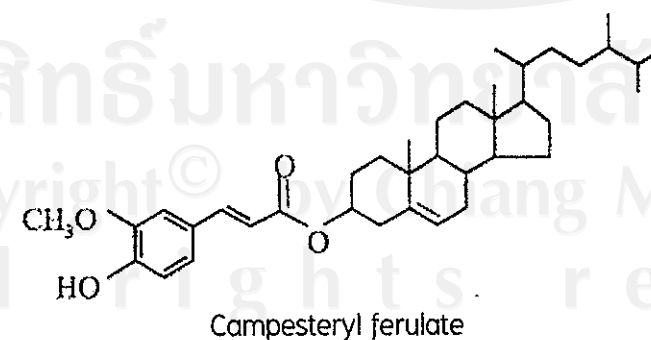
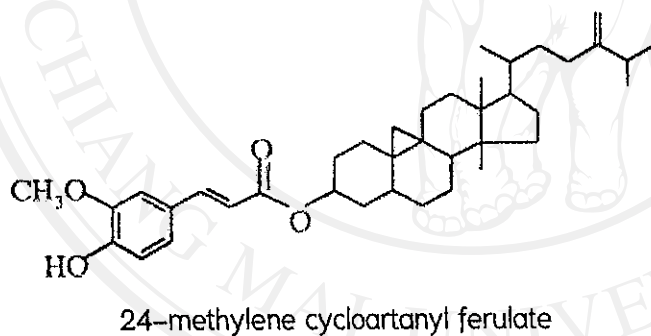
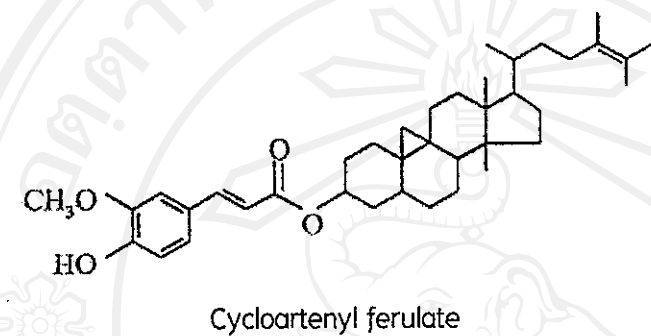
รำข้าวจะเป็นส่วนที่มีสารอาหารมากที่สุดในส่วนของ caryopsis และอุดมไปด้วยวิตามินและแร่ธาตุ ซึ่งกระบวนการสีข้าวมีผลต่อองค์ประกอบต่างๆ ในรำข้าว

รำข้าวอุดมไปด้วยสารอาหาร ซึ่งมีองค์ประกอบของโปรตีนร้อยละ 14 – 16 และยังพบมีการดอะมิโนไลซีน (lysine) ในปริมาณสูง คาร์โบไฮเดรตส่วนใหญ่มาจากเฮมิเซลลูโลสร้อยละ 8.7–11.4 เซลลูโลสร้อยละ 9–12.8 แป้งและเบต้า-กลูแคน (β -glucan) ร้อยละ 1% และไขมันอีกประมาณร้อยละ 3–4 รำข้าวเป็นแหล่งที่พบวิตามินอีสูง คือ ประมาณ 300 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม นอกจากนี้ในรำข้าวยังเป็นแหล่งสำคัญของโทโคโทเรโนล โพลิฟีนอลและฟลาโวนอยด์ นอกจากนี้ยังพบแร่ธาตุบางชนิด เช่น เหล็ก อลูมิเนียม แคลเซียม คลอรีน โซเดียม โพแทสเซียม แมกนีเซียม แมงกานีส ฟอสฟอรัส ซิลิกอน และสังกะสี เป็นต้น อย่างไรก็ตามองค์ประกอบของแร่ธาตุในรำข้าวจะขึ้นกับปริมาณสารอาหารในดินที่พืชเจริญเติบโต ภูมิอากาศและการให้ปุ๋ย สำหรับในสารสกัดหยาบจากรำข้าว (crude rice bran oil) ประกอบด้วย triacylglycerols ร้อยละ 68–71 diacylglycerols ร้อยละ 2–3 monoacylglycerols ร้อยละ 5–6 free fatty acids ร้อยละ 2–3 glycolipids (ส่วนใหญ่เป็น phosphatidylcholine, phosphatidylethanolamine และ phosphatidylinositol) ร้อยละ 5–7 waxes ร้อยละ 2–3 (McCaskill and Zhang, 1999; Sayre and Saunders, 1990)

โอไรซานอล (oryzanol)

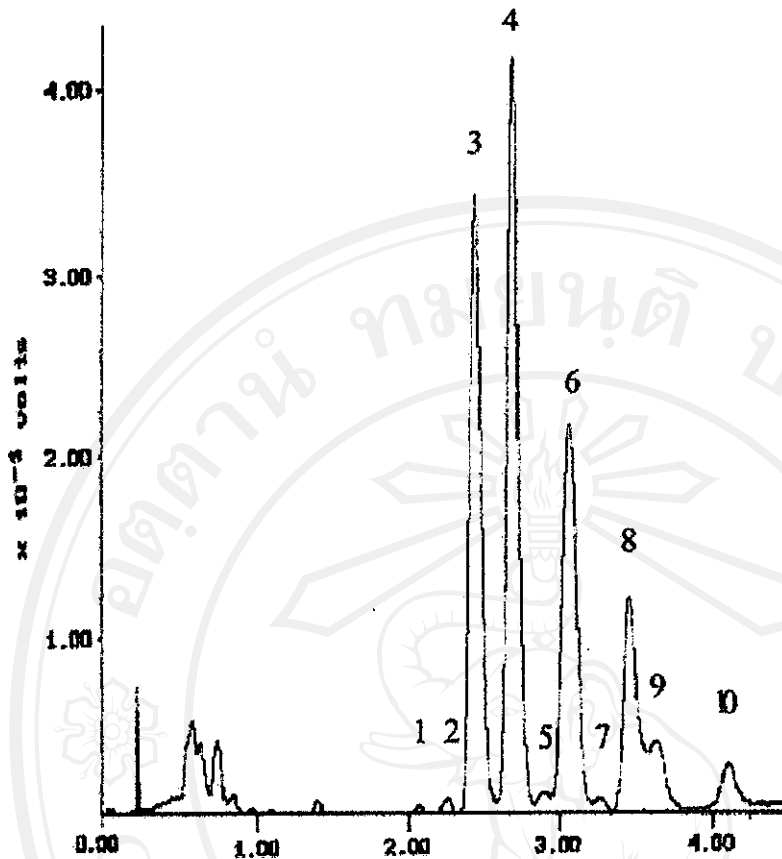
ในช่วงแรกเชื่อว่าโอไรซานอลเป็นสารเดี่ยว ต่อมาภายหลังจึงสามารถแสดงให้เห็นว่าเป็นสารผสมของกรดเฟอร์ูลิก (ferulic acid) ที่จับอยู่กับสเตอรอล (sterols) หรือไตรเทอร์พีนแอลกอฮอล์ (triterpene alcohols) ด้วยพันธะเอสเทอร์ ซึ่งมีชื่อเรียกอยู่ทั้งหมด 3 ชนิด คือ แอลฟา (α) เบต้า (β) และ แกมมา-โอไรซานอล (γ -oryzanol) ซึ่งแกมมา-โอไรซานอลเป็นรูปแบบที่พบมากที่สุด โดยสเตอรอลที่พบในส่วนประกอบของแกมมา-โอไรซานอลคือ campesterol และ

sitosterol และในส่วนของไตรเทอร์ปีนแอลกอฮอล์ที่พบคือ cycloartenol และ 24-methylene cycloartenol ดังแสดงในรูปที่ 1 มีนักวิทยาศาสตร์ได้ทำการศึกษาวิจัยพบว่าในน้ำมันรำข้าว (rice bran oil) มีปริมาณแกมมา-โอโรซานอลอยู่ระหว่างร้อยละ 1-3 ขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของข้าวและวิธีวิเคราะห์ที่ใช้ (Seetharamaiah และ Prabhakar, 1986) แหล่งธรรมชาติที่พบแกมมา-โอโรซานอลคือ รำข้าว แต่สารบางชนิดที่พบในแกมมา-โอโรซานอล เช่น sitostanyl ferulate, campestanyl ferulate ยังสามารถพบได้ในข้าวโพดและธัญพืช (Seitz LM, 1989)



รูปที่ 1 สารสำคัญหลักที่พบในแกมมา-โอโรซานอล

การพัฒนาเทคนิคสำหรับวิเคราะห์ปริมาณแกมมา-โอไรซานอลนั้นเริ่มขึ้นโดย Diack และ Saska ในปี ค.ศ.1994 โดยการใช้เทคนิค normal phase high performance liquid chromatography (HPLC) ซึ่งสามารถแยกแกมมา-โอไรซานอลได้เป็น 2 ส่วนสกัด (fractions) และแต่ละส่วนสกัดประกอบด้วยสารสำคัญอย่างน้อย 2 ชนิดหรือมากกว่านั้น การตรวจเอกลักษณ์และวิเคราะห์ปริมาณของสารสำคัญแต่ละชนิดในแกมมา-โอไรซานอลนั้นจึงเป็นเรื่องที่ยากอันเนื่องมาจากการแยกสกัดสารสำคัญแต่ละชนิดได้ไม่สมบูรณ์ นอกจากนั้นยังมีการใช้เทคนิค reverse-phase HPLC สามารถแยกสารสำคัญได้ 5 ชนิด (Norton RA, 1995) หรือ 6 ชนิด (Evershed et al., 1988; Rogers et al., 1993) จากนั้นจึงสามารถแยกสารสำคัญของแกมมา-โอไรซานอลได้สำเร็จจากน้ำมันรำข้าวโดยใช้เทคนิค preparative normal-phase HPLC ได้เป็นแกมมา-โอไรซานอลเข้มข้น (concentrated γ -oryzanol) จากนั้นจึงทำการแยกและลดการรบกวนจากสารอื่นด้วยเทคนิค reverse-phase HPLC ซึ่งสามารถแยกสารสำคัญได้ถึง 10 ชนิด คือ Δ^7 -stigmasteryl ferulate (1), stigmasteryl ferulate (2), cycloartenyl ferulate (3), 24-methylenecycloartanyl ferulate (4), Δ^7 -campestenyl ferulate (5), campestenyl ferulate (6), Δ^7 -sitostenyl ferulate (7), sitostenyl ferulate (8), campestanyl ferulate (9) และ sitostanyl ferulate (10) (ดังแสดงในรูปที่ 2) ซึ่งสารสำคัญหลัก 3 ชนิดที่พบในแกมมา-โอไรซานอลคือ cycloartenyl ferulate, 24-methylenecycloartanyl ferulate และ campestenyl ferulate (Zullaikah et al., 2009)



รูปที่ 2 HPLC โทรมาทาแกรมของสารสำคัญในแกมมา-ไฮโรซานอล

การอักเสบ

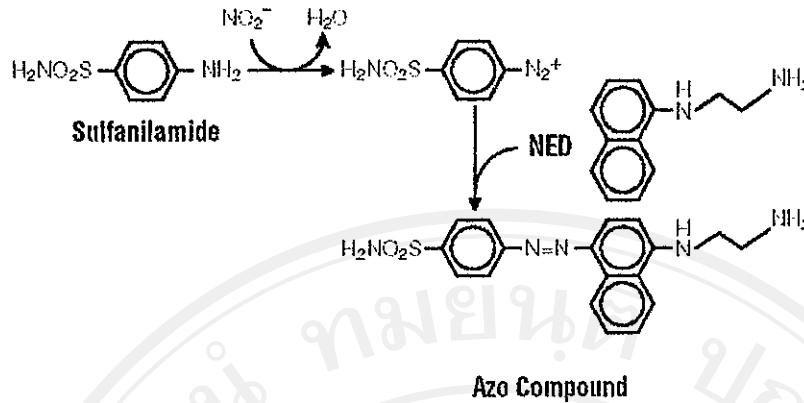
การอักเสบเป็นกระบวนการที่ค่อนข้างซับซ้อนที่เกิดขึ้นเมื่อเซลล์ได้รับอันตราย โดยพบว่าเกิดกระบวนการทั้งใน cellular phase และ fluid phase เป็นผลให้มีการขยายตัวของหลอดเลือดและทำให้เกิดการสูญเสียของเหลวจากหลอดเลือดเข้าสู่ช่องว่างระหว่างเซลล์ ทำให้มีอากาบวมเกิดขึ้น เม็ดเลือดขาวจะเคลื่อนตัวออกจากหลอดเลือดไปสู่บริเวณอักเสบและมี phagocytic activity พร้อมทั้งหลั่งสารสื่อกลางต่างๆ ที่เป็นอันตรายต่อเนื้อเยื่อออกมาและทำให้เกิดการอักเสบเพิ่มมากขึ้น สารสื่อกลางต่างๆ ที่หลั่งออกมาระหว่างการเกิดปฏิกิริยาตอบสนองที่ซับซ้อนนี้ ได้แก่ serotonin หรือ 5-hydroxytryptamine (5-HT), histamine, chemotactic factor ต่างๆ และ leukotrienes สารสื่อกลางเคมีที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการอักเสบอีกชนิดหนึ่งคือ prostaglandins ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ของ cyclooxygenase pathway ของ arachidonic acid metabolism มีส่วนเกี่ยวข้องกับการเกิดพยาธิสภาพการอักเสบและการใช้ มีหลักฐานพบว่าการหลั่ง prostaglandins เมื่อใดก็ตามที่เซลล์ได้รับอันตรายหรือบาดเจ็บและยังพบสารดังกล่าวในของเหลวที่เกิดจากการอักเสบ (inflammatory exudates) ด้วย

ไนตริกออกไซด์เป็นอนุมูลที่ถูกสร้างขึ้นในร่างกายจาก L-arginine โดยเอนไซม์ไนตริกออกไซด์ซินเทส (nitric oxide synthase, NOS) ไนตริกออกไซด์เป็นอนุมูลอิสระที่สามารถละลายน้ำได้สร้างขึ้นโดย activated macrophage และ endothelial cell ออกฤทธิ์สั้นและเฉพาะที่ มีฤทธิ์สำคัญในการส่งเสริมการอักเสบ ได้แก่ ทำให้หลอดเลือดขยายตัว เป็นต้น มีรายงานการวิจัยพบว่ามีการหลั่งไนตริกออกไซด์จาก macrophage เมื่อมีการตอบสนองต่อกระบวนการอักเสบ ทั้งยังพบว่าไนตริกออกไซด์สามารถกระตุ้นเอนไซม์ COX-2 ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ผลิต prostaglandins ซึ่งเป็นสารสื่อกลางที่สำคัญในกระบวนการอักเสบและยังพบว่าสามารถกระตุ้นการผลิต interleukin-1 (IL-1) และ tumor necrosis factor (TNF) ซึ่งเป็น cytokines ที่มีบทบาทสำคัญในการอักเสบ ไนตริกออกไซด์ยังสามารถสร้างความเสียหายต่อดีเอ็นเอในภาวะที่มีออกซิเจนโดยทำปฏิกิริยากับออกซิเจนเกิดเป็น N_2O_3 แล้วเข้าทำลายดีเอ็นเอโดยการเกิดปฏิกิริยา deamination ส่วนอนุมูลอิสระซูเปอร์ออกไซด์ (superoxide anion, $O_2^{\bullet-}$) เกิดจากการเติมอิเล็กตรอนให้แก่ออกซิเจน โดยพบว่าอนุมูลอิสระซูเปอร์ออกไซด์เกิดขึ้นในร่างกายจากการขนส่งอิเล็กตรอนในไมโทคอนเดรียและเกิดจากปฏิกิริยาการทำงานของเอนไซม์บางชนิดในตับจากกระบวนการกำจัดสารแปลกปลอม หากกระบวนการต่อต้านอนุมูลอิสระของร่างกาย (antioxidant defense system) ไม่สามารถขจัดอนุมูลอิสระไนตริกออกไซด์และซูเปอร์ออกไซด์ที่มีมากเกินไปได้ จะทำให้อนุมูลอิสระไนตริกออกไซด์ทำปฏิกิริยากับอนุมูลอิสระซูเปอร์ออกไซด์เกิดเป็นอนุมูลอิสระเปอร์ออกซีไนไตรท์ (peroxynitrite, $ONOO^-$) ซึ่งเป็นอนุมูลอิสระที่มีความแรงมากกว่าอนุมูลอิสระไนตริกออกไซด์และซูเปอร์ออกไซด์

เมื่อระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายตอบสนองต่อกระบวนการอักเสบ จะทำให้เกิดการเหนี่ยวนำเซลล์ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ ได้แก่ แมคโครฟาจ, อีโอซิโนฟิล และนิวโทรฟิล เป็นต้น ให้เคลื่อนที่มายังบริเวณที่เกิดการอักเสบ ในขณะที่เดียวกันเซลล์เหล่านี้ก็จะกระตุ้นให้ผลิตอนุมูลอิสระจำนวนมาก ได้แก่ อนุมูลอิสระไฮดรอกซิล ซูเปอร์ออกไซด์ ไนตริกออกไซด์และเปอร์ออกซีไนไตรท์ เป็นต้น ซึ่งอนุมูลอิสระเหล่านี้ไม่เพียงแต่ทำลายเซลล์ที่เกิดการอักเสบเท่านั้น ยังสามารถเปลี่ยนแปลงสารชีวโมเลกุลต่างๆ ชนิด ได้แก่ ดีเอ็นเอ โปรตีนและไขมันของเซลล์ร่างกายด้วยเช่นกัน การทำให้ดีเอ็นเอเสียหายด้วยปฏิกิริยาต่างๆ เช่น deamination, alkylation, oxidation และ nitration หรือทำลายโครงสร้างของดีเอ็นเอ (DNA strand break) สามารถนำไปสู่สาเหตุของการเกิดมะเร็งได้ มีการศึกษาพบว่าอนุมูลอิสระเปอร์ออกซีไนไตรท์สามารถทำลายดีเอ็นเอได้มากกว่าไนตริกออกไซด์ ในความเข้มข้นที่เท่ากัน โดยพบว่าไนตริกออกไซด์สามารถเข้าทำปฏิกิริยากับ adenine, guanine และ cytosine ส่วนเปอร์ออกซีไนไตรท์สามารถเข้าทำปฏิกิริยากับ guanine เพียงอย่างเดียว โดยทำปฏิกิริยาแบบ oxidation และ nitration ได้ผลิตภัณฑ์เป็น 8-oxodGua และ 8-nitroGua และยังสามารถทำปฏิกิริยาโดยตรงกับส่วนที่เป็นน้ำตาลของดีเอ็นเอทำให้เกิด strand break ได้ (Burney et al., 1999 and Murphy, 1999)

ในภาวะปกติไนตริกออกไซด์ทำหน้าที่เป็นทั้งสารสื่อกลาง (physiological messenger) และ effector molecule ในหลายๆ ระบบที่สำคัญของร่างกาย เช่น ระบบภูมิคุ้มกัน ระบบประสาท และระบบหัวใจร่วมหลอดเลือด นอกจากนี้ยังพบว่าในบางสภาวะหรือเมื่อมีพยาธิสภาพเกิดขึ้น ร่างกายจะสร้างไนตริกออกไซด์ในปริมาณที่มากกว่าปกติ เพื่อตอบสนองต่อสารกระตุ้นอักเสบหรือสารไมโตเจน (inflammatory or mitogenic stimuli) ที่ได้รับ ดังนั้นการตรวจพบปริมาณไนตริกออกไซด์ที่มากผิดปกติในร่างกาย ไม่ว่าจะเป็นที่บริเวณเนื้อเยื่อต่างๆ ปัสสาวะหรือในสารน้ำ/เลือด อาจบ่งบอกถึงการเกิดภาวะอักเสบหรือพยาธิสภาพในร่างกายได้ (Cuzzocrea et al., 2001) อย่างไรก็ตามการตรวจหาปริมาณไนตริกออกไซด์โดยตรงทำได้ค่อนข้างยาก เนื่องจากไนตริกออกไซด์เป็นสารที่ว่องไวต่อปฏิกิริยาเคมีและมีค่าครึ่งชีวิตสั้นมาก (half-life, $t_{1/2} \sim 4$ วินาที) ไนตริกออกไซด์ที่เกิดขึ้นในร่างกายจะถูกออกซิไดซ์อย่างรวดเร็วเกิดเป็นสารประกอบที่เสถียรมากขึ้น คือ ไนไตรท์ (nitrite, NO_2^-) และ ไนเตรท (nitrate, NO_3^-) การศึกษาส่วนใหญ่นิยมใช้การหาปริมาณไนไตรท์แทนการวัดระดับไนตริกออกไซด์โดยตรง เพราะสามารถทำได้ง่ายกว่าและที่น่าสนใจ คือ ในปัจจุบันการตรวจหาปริมาณไนไตรท์ที่ถูกสร้างขึ้นยังสามารถใช้เป็นดัชนีชี้วัดความสามารถในการต้านภาวะเครียดจากอนุมูลอิสระไนโตรเจนและภาวะการอักเสบของสารเคมีต่างๆ โดยเฉพาะอย่างยิ่งสารจากธรรมชาติได้

ปฏิกิริยาตรวจหาไนไตรท์ถูกคิดค้นโดยนักวิทยาศาสตร์ชาวเยอรมันชื่อ Griess ในปี ค.ศ. 1879 วิธีการนี้อาศัยปฏิกิริยาระหว่างไนไตรท์ sulfanilamide และ *N*-1-naphthylethylenediamine dihydrochloride ภายใต้สภาวะกรดฟอสฟอริก (phosphoric acid) ในสภาวะดังกล่าวจะเกิดสารประกอบสีม่วงซึ่งสามารถวัดการเปลี่ยนแปลงค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตรได้ด้วยเครื่อง spectrophotometer หรือ microplate reader จากนั้นจะทำการเปรียบเทียบค่าที่วัดได้กับค่าอัตราการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐาน sodium nitrite ปฏิกิริยาเคมีที่เกิดขึ้นแบ่งเป็นสองขั้นตอน คือ 1) ปฏิกิริยาระหว่างไนไตรท์และ sulfanilic acid ได้สาร intermediate diazonium salt และ 2) ปฏิกิริยาระหว่าง diazonium salt และ NED เกิดเป็นสารประกอบ azo derivative ที่มีสีม่วง ดังแสดงในรูปที่ 3



รูปที่ 3 ปฏิกิริยาของ Griess reagent system

ข้าวเป็นพืชเศรษฐกิจและเป็นอาหารหลักของคนไทย ในอดีตคนไทยนิยมบริโภคข้าวที่ผ่านการสีด้วยวิธีโบราณ เช่น การตำด้วยครกไม้ ใช้ครกกระเดื่อง ทำให้ได้ข้าวสารสีตามธรรมชาติ มีจมูกข้าวที่ให้ธาตุอาหารและช่วยป้องกันรักษาโรคบางชนิด ปัจจุบันข้าวสารที่รับประทานจะได้จากการสีของโรงสีข้าวขนาดใหญ่ ซึ่งสีข้าวได้รวดเร็วและปริมาณมาก ข้าวสารที่ได้เป็นข้าวขาว แต่ในทางตรงกันข้าม สิ่งที่มีประโยชน์ต่อร่างกายได้หายไป สิ่งที่มีประโยชน์ต่อร่างกายได้หายไปกับเปลือกข้าวและรำข้าว โดยเฉพาะโอไรซานอลซึ่งเป็นสารที่มีคุณประโยชน์มากมาย เช่น ลดความเสี่ยงของโรคหัวใจและหลอดเลือด ลดความเสี่ยงการเกิดมะเร็ง ยับยั้งการเกิด platelet aggregation ลดโคเลสเตอรอลและต้านออกซิเดชัน เป็นต้น โดยเฉพาะแกมมา-โอไรซานอล (gamma-oryzanol) ซึ่งเป็นรูปแบบที่มีฤทธิ์ได้ดีที่สุด มีการประเมินประสิทธิภาพของรำข้าวในการป้องกันมะเร็งลำไส้ในหนูทดลอง พบว่าหนูทดลองที่กินรำข้าวสามารถลดจำนวน intestinal adenoma ได้ถึง 51% เมื่อเปรียบเทียบกับหนูทดลองในกลุ่มที่ได้รับอาหารปกติ การศึกษาฤทธิ์ต้านออกซิเดชันและฤทธิ์ต้านการอักเสบของสารสกัดแกมมา-โอไรซานอลโดยส่วนใหญ่แล้วมีข้อมูลการศึกษาในหลอดทดลอง (in vitro study) โดยการวิเคราะห์ทางเคมี เนื่องจากการตรวจวิเคราะห์ทางเคมีมีข้อด้อยบางประการ บางครั้งสารที่สนใจนั้นแม้มีฤทธิ์ทางเคมีในหลอดทดลอง แต่มีสิ่งที่ไม่ได้ประเมินด้วย เช่น สารนั้นจะสามารถผ่านเข้าไปในเซลล์หรือไม่ สารนั้นจะเป็นพิษกับเซลล์หรือไม่ เป็นต้น ดังนั้นการประเมินทางเคมีอย่างเดียวจึงไม่อาจบอกความสามารถที่แท้จริงของสารทดสอบ การทดสอบโดยอาศัยเซลล์เพาะเลี้ยงในการตอบสนองจึงสามารถให้ข้อมูลเพิ่มเติมบางอย่างจากการวิเคราะห์ทางเคมี จากการที่เซลล์ monocytes และ macrophages เป็นเซลล์ที่มีความสามารถในการตอบสนองต่อสิ่งเร้า เช่น endotoxin, (lipopolysachharid: LPS), inflammatory cytokines, ultraviolet, arsenite และอื่นๆ ทำให้มีการสร้างไนตริกออกไซด์ออกมาจำนวนมาก ไนตริกออกไซด์ที่ปลดปล่อยจำนวนมากนี้เป็นตัวกลางของการก่อพยาธิสภาพต่างๆ ดังนั้นทางคณะผู้วิจัยจึงสนใจที่จะประเมินฤทธิ์ต้านการอักเสบของสารสกัดแกมมา-โอไรซานอลจากรำข้าวเก่าไทยโดยศึกษาผ่านกลไกยับยั้ง

การสร้างไนตริกออกไซด์ในเซลล์เพาะเลี้ยง โดยในการศึกษาวิจัยครั้งนี้จะใช้เซลล์ macrophage เป็นแบบทดสอบโดยกระตุ้นด้วย LPS เพื่อจำลองการกระตุ้นในภาวะอักเสบ จากนั้นทำการวัดปริมาณไนตริกออกไซด์ที่ปลดปล่อยออกมา โดยวัดในรูปของไนไตรท์ สารทดสอบที่สามารถยับยั้งการสร้างไนตริกออกไซด์ได้จะสามารถจัดว่าเป็นสารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและมีความสัมพันธ์กับภาวะอักเสบ

การศึกษาฤทธิ์ด้านการอักเสบมีการศึกษาได้จากหลายกลไก อันเนื่องมาจากกระบวนการอักเสบนั้นเกิดขึ้นผ่านหลายกลไก เช่น การศึกษาผ่านกลไกการยับยั้งเอนไซม์ COX-2 และการศึกษาผ่านกลไกการยับยั้งเอนไซม์ lipoxxygenase (LOX) โดยกลไกหนึ่งที่มีความสัมพันธ์กับทั้งฤทธิ์ต้านออกซิเดชันและฤทธิ์ด้านการอักเสบ คือ การขจัดและยับยั้งการสร้างไนตริกออกไซด์ ซึ่งได้มีการพัฒนาวิธีวิเคราะห์ไนไตรท์มาตั้งแต่ ค.ศ.1879 โดยการใช้ Griess reagent ซึ่งมี sulphanilamide และ naphthylethylenediamine dihydrochloride เป็นองค์ประกอบ โดยทำการตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 546 นาโนเมตร

Sreejayan และ Rao (1997) ได้ทำการศึกษาฤทธิ์ขจัดอนุมูลอิสระไนตริกออกไซด์ของเคอร์คูมินอยส์ในหลอดทดลอง โดยใช้ sodium nitroprusside (SNP) เป็นตัวสร้างไนตริกออกไซด์ โดยพบว่าเคอร์คูมินมีฤทธิ์ขจัดอนุมูลอิสระไนตริกออกไซด์ที่ดีอาจเนื่องมาจากสารดังกล่าวมีรายงานวิจัยเกี่ยวกับฤทธิ์ยับยั้งการอักเสบและมีฤทธิ์ต้านมะเร็งมาแล้ว

Nakagawa และ Yokozawa (2002) ได้ศึกษาฤทธิ์ขจัดอนุมูลอิสระไนตริกออกไซด์และซูเปอร์ออกไซด์ในหลอดทดลอง (*in vitro study*) ของชาเขียว พบว่าสารสกัดจากชาเขียวมีฤทธิ์ขจัดอนุมูลอิสระไนตริกออกไซด์และซูเปอร์ออกไซด์ที่สูง นอกจากนั้นยังได้ศึกษาฤทธิ์ดังกล่าวของสารบริสุทธิ์ที่ได้จากการแยกบริสุทธิ์สารสกัดชาเขียวจำนวน 7 ชนิด พบว่า (-)-epigallocatechin 3-O-gallate (EGCG), (-)-gallocatechin 3-O-gallate (GCG) และ (-)-epicatechin 3-O-gallate (ECG) มีฤทธิ์ที่ดีกว่า (-)-epigallocatechin (EGC), (+)-gallocatechin (GC), (-)-epicatechin (EC) และ (+)-catechin (C) ซึ่งฤทธิ์ดังกล่าวน่าจะมีความสัมพันธ์กับโครงสร้างของ flavan-3-ol ที่จับอยู่กับ gallic acid

Yen และ Lai (2003) ได้ทำการศึกษาผลการยับยั้ง reactive nitrogen species (RNS) ของ isoflavones และอาหารที่มีถั่วเหลืองเป็นส่วนประกอบ พบว่า isoflavone สามารถยับยั้งเอนไซม์ไนตริกออกไซด์ซินเทส ทั้งยังพบว่า isoflavone และสารสกัดจากอาหารที่มีถั่วเหลืองเป็นองค์ประกอบสามารถสามารถป้องกันการทำลายดีเอ็นเอจากอนุมูลอิสระเปอร์ออกซิไนไตรท์และไนตริกออกไซด์ได้ และยังสามารถยับยั้งการสร้างไนตริกออกไซด์จากเซลล์เพาะเลี้ยง RAW 264.7 ที่ถูกกระตุ้นด้วย

lipopolysaccharide อีกด้วย โดยแสดงให้เห็นว่าฤทธิ์ยับยั้ง reactive nitrogen species (RNS) ของสารสกัดจากอาหารที่มีถั่วเหลืองเป็นองค์ประกอบนั้นมีความสัมพันธ์กับปริมาณ isoflavone

Hu และคณะ (2003) ได้ทำการศึกษาส่วนสกัดที่มีสีจากข้าวดำในการยับยั้ง reactive oxygen species (ROS) และ reactive nitrogen species (RNS) โดยพบว่าส่วนสกัดที่มีสีของข้าวดำนั้นมีแอนโทไซยานินส์ (anthocyanin) เป็นองค์ประกอบคือ cyaniding 3-glucoside และ peonidin 3-glucoside ส่วนสกัดที่มีสีของข้าวดำยังแสดงฤทธิ์ป้องกันการทำลายดีเอ็นเอจากอนุมูลอิสระเปอร์ออกซิเดชันและไฮดรอกซิเดชัน ทั้งยังป้องกันการเกิดออกซิเดชันของ low-density lipoprotein (LDL) อีกด้วย และยังสามารถยับยั้งการแสดงออกของเอนไซม์ไนตริกออกไซด์ซินเทสในเซลล์เพาะเลี้ยง RAW 264.7 โดยไม่แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ ซึ่งแสดงให้เห็นถึงคุณสมบัติต้านออกซิเดชันและด้านการอักเสบของข้าวดำที่มีแอนโทไซยานินส์เป็นองค์ประกอบ

Zullaikah และคณะ (2009) ได้ทำการแยกโอไรซานอลจาก crude rice bran oil โดยการใช้เทคนิค crystallization 2 ขั้นตอน โดยในขั้นตอนแรกของการ crystallization โอไรซานอลจะถูกทำให้เข้มข้นในชั้นของของเหลวพร้อมกับกรดไขมัน (fatty acid), monoacylglycerol, squalene, tocopherols และ phytosterol ในขณะที่ในชั้นของของแข็งส่วนใหญ่จะประกอบด้วย triacylglycerol และ steryl ester จากนั้นจึงนำส่วนสกัดโอไรซานอลเข้มข้นมาทำ crystallization อีกครั้งหนึ่ง โดยการเติมเฮกเซนแล้วเก็บที่อุณหภูมิ 5 ± 1 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 48 ชั่วโมง จากนั้นจะได้ผลึกโอไรซานอลที่มีความบริสุทธิ์ร้อยละ 93-95 และมี %recovery อยู่ที่ร้อยละ 59

Butsat and Siriamornpun (2009) ได้ศึกษาฤทธิ์ต้านออกซิเดชันและวิเคราะห์ปริมาณสารกลุ่มฟีนอลิกในรำข้าว กข 105 จำนวน 3 ตัวอย่างจากทุ่งกุลาร้องไห้ โดยทำการศึกษาฤทธิ์ต้านออกซิเดชันด้วยวิธีการขจัดอนุมูลอิสระ DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging) และ ferric reducing ability power (FRAP) พบว่าส่วนสกัดจากรำข้าวแสดงฤทธิ์ต้านออกซิเดชันที่ดี และยังพบว่าในรำข้าวมีปริมาณแกมมา-โอไรซานอลและวิตามินอีสูง

Lai และคณะ (2009) ได้ทำการแยกสารสำคัญและศึกษาฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของรำข้าวญี่ปุ่น (*Japonica* rice bran) โดยพบว่าสารสกัด hexane, methanol และ ethyl acetate มีปริมาณสารกลุ่มฟีนอลิก โอไรซานอลและอนุพันธ์ของวิตามินอีสูง และพบว่าสารสกัด methanol แสดงฤทธิ์ยับยั้งการเกิด lipid peroxidation, ฤทธิ์ขจัดอนุมูลอิสระ DPPH และ FRAP สูงกว่าสารสกัด hexane และ ethyl acetate

Boonsit และคณะ (2010) ได้วิเคราะห์ปริมาณแกมมา-โอไรซานอลจากข้าวเหนียวเก่าพบว่าสารสกัดแกมมา-โอไรซานอลกึ่งบริสุทธิ์ (semi-purified γ -oryzanol) ของข้าวเหนียวเก่ามีปริมาณ

แถมมา-ไฮโรซานอลสูงกว่าข้าวขาวอย่างมีนัยสำคัญ โดยพบว่าข้าวท่าดอยสะเก็ดและข้าวท่าดอยมูเซอมีปริมาณแถมมา-ไฮโรซานอลสูง (72.95 และ 70.16 มิลลิกรัมต่อข้าวท่า 100 กรัม ตามลำดับ)

จากข้อมูลรายงานการวิจัยเบื้องต้นพบว่าสารสกัดจากข้าวและรำข้าวของไทย นั้นส่วนใหญ่จะมีการศึกษาวิจัยเฉพาะในหลอดทดลอง (*in vitro study*) โดยส่วนใหญ่เป็นการศึกษาฤทธิ์ต้านออกซิเดชันและยังพบว่าข้อมูลการวิจัยที่พบนั้นเป็นข้าวขาว สำหรับข้าวท่าและรำข้าวท่าสายพันธุ์พื้นเมืองยังขาดข้อมูลการศึกษาวิจัย ดังนั้นคณะผู้วิจัยจึงสนใจที่จะศึกษาศักยภาพของแถมมา-ไฮโรซานอลในรำข้าวท่าสายพันธุ์พื้นเมือง โดยเริ่มจากการศึกษาฤทธิ์ด้านการอักเสบผ่านการยับยั้งการสร้างไนตริกออกไซด์ในเซลล์เพาะเลี้ยงเพื่อใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการศึกษาในระดับสูงต่อไป

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

บทที่ 3

การทดลอง

1. สารเคมี

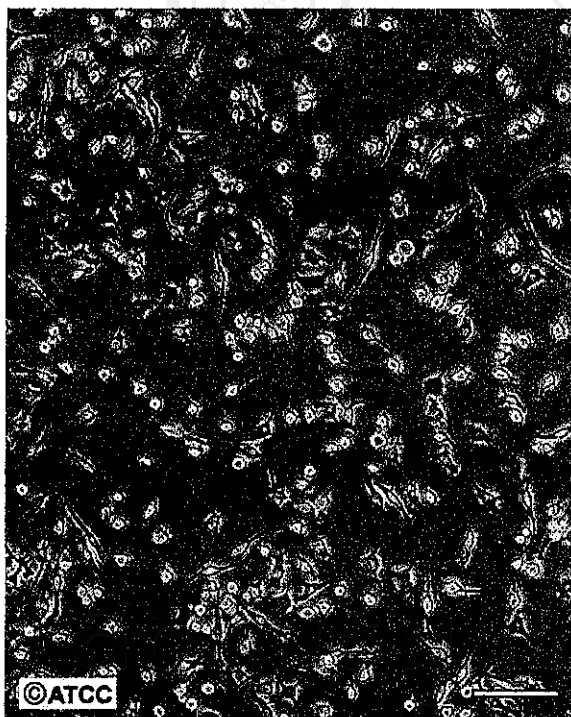
1. Absolute ethanol
2. Hexane
3. Ethyl acetate
4. Dimethyl sulfoxide (DMSO)
5. Acetonitrile (HPLC grade)
6. Methanol (HPLC grade)
7. Dichloromethane (HPLC grade)
8. Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)
9. Fetal Bovine Serum (FBS)
10. Penicillin/Streptomycin
11. Ethylene diamine tetraacetic acid (EDTA)
12. 0.05% Trypsin EDTA
13. Phosphate buffer saline (PBS) without Ca and Mg
14. Phosphate buffer saline (PBS) with Ca and Mg
15. น้ำปราศจากไอออน (Deionized water)
16. Potassium nitrite
17. Sulfanilamide
18. Lipopolysaccharides (LPS) from *E.coli* O128:B12
19. Murine Interferon -gamma (IFN- γ)
20. Cell proliferation reagent WST-1
21. Gamma-oryzanol (HPLC grade)
22. Silica gel GF254
23. naphthylethylenediamine dihydrochloride
24. Phosphoric acid

2. เซลล์มะเร็ง

Mouse macrophage cell line RAW 264.7 แสดงข้อมูลพื้นฐานของเซลล์มะเร็งจากสถาบัน American Type Culture Collection (ATCC)

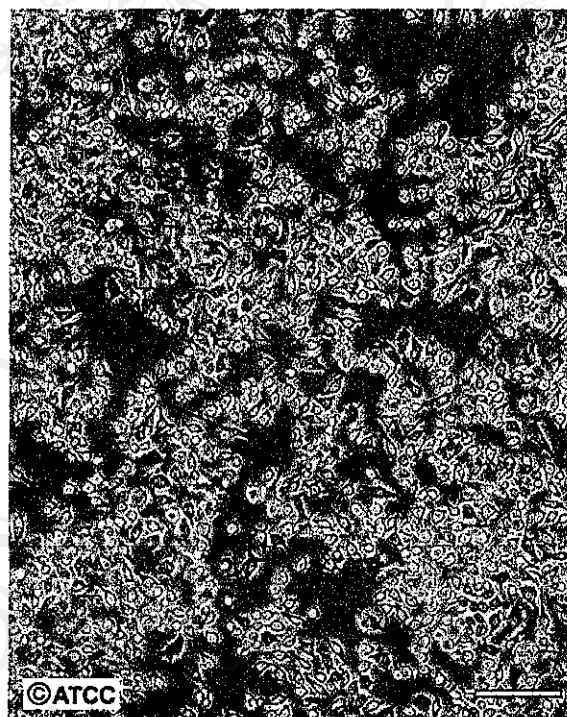
ATCC® Number	TIB-71™
สถาบัน	ATCC
Cell type	Macrophage, Abelson murine leukemia virus transformed
Disease	Abelson murine leukemia virus-induced tumor
Growth properties	adherent
Organism	<i>Mus musculus</i> (mouse)
Incubation	37 °C with 5% CO ₂

ATCC Number: **TIB-71**
Designation: **RAW-264.7**



Low Density

Scale Bar = 100µm



High Density

Scale Bar = 100µm

รูปที่ 1 เซลล์มะเร็งแมคโครฟลาจหนุ (Mouse macrophage cell line RAW264.7)

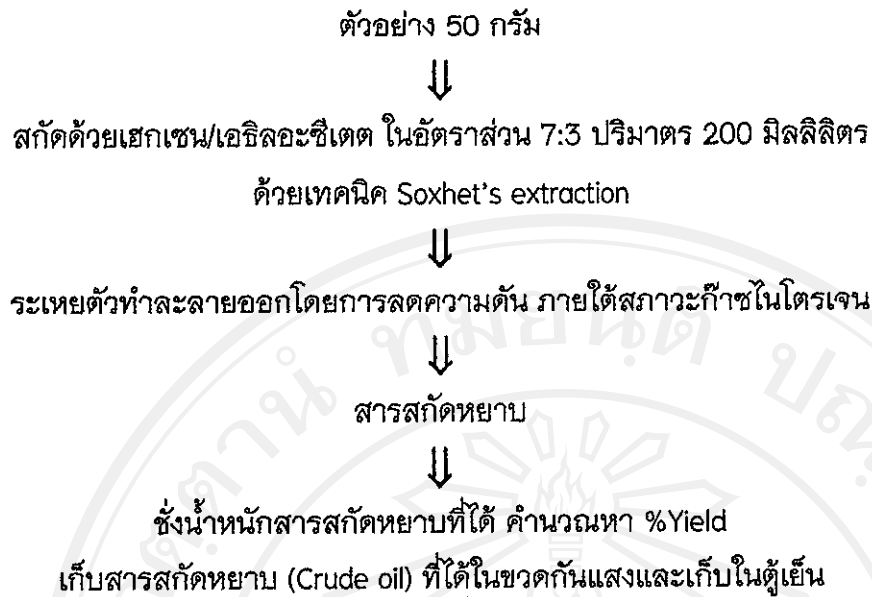
3. อุปกรณ์

1. เครื่องระเหยภายใต้การลดความดัน (rotary evaporator)
2. กล้องจุลทรรศน์ชนิดหัวกลับ (inverted microscope)
3. ตู้ป้อนชนิดมีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ (CO₂ Incubator)
4. ตู้ปลอดเชื้อ (laminar air flow hood)
5. หม้อนิ่งความดันสำหรับฆ่าเชื้อ (autoclave)
6. เครื่องวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH meter)
7. เครื่องชั่งวิเคราะห์ (analytical balance)
8. เครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วรอบสูง (centrifuge)
9. ตู้แช่แข็ง (freezer) -80 องศาเซลเซียส
10. ภาชนะสำหรับเลี้ยงเซลล์มะเร็ง
11. Microplate reader (96-well plates reader UV-Visible spectrophotometer)
12. High Performance Liquid Chromatography (HPLC)
13. Soxhlet's apparatus
14. Separation funnel
15. Vertical shaker
16. Multichannel pipette
17. 96-wells plate
18. Disposable seropipette
19. Pipette aid
20. Water bath
21. Liquid nitrogen tank
22. Column chromatography

4. วิธีทดลอง

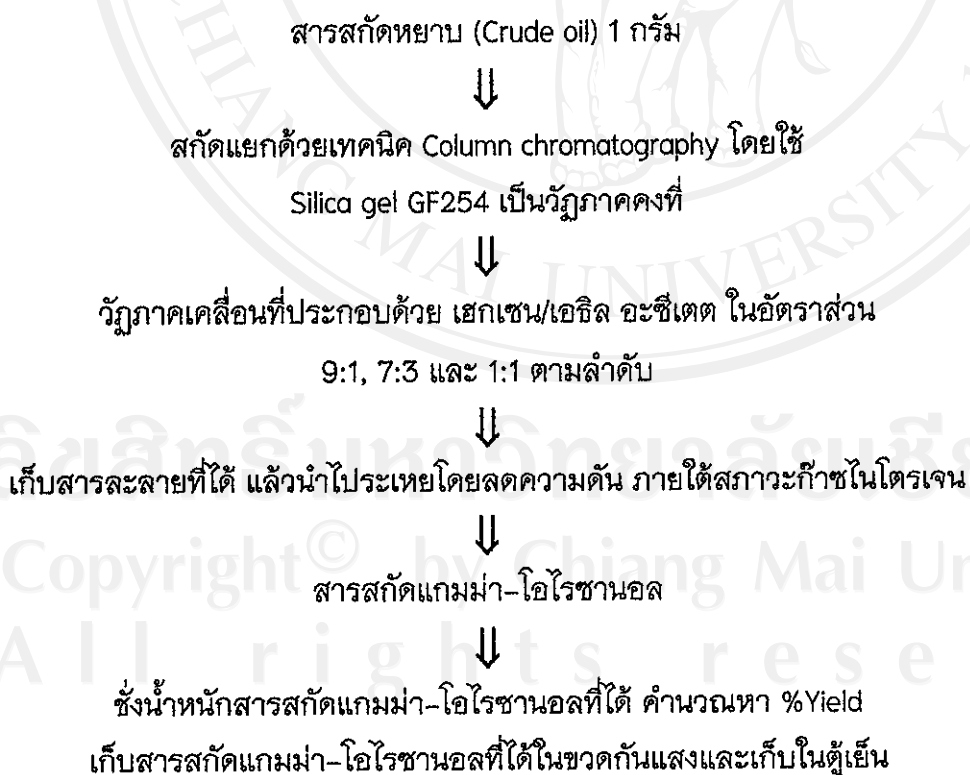
4.1 การสกัดสารสกัดหยาบ (Crude oil) จากรำข้าว

ข้าวกล้องสายพันธุ์พื้นเมืองจำนวน 3 ตัวอย่าง ประกอบด้วยข้าวกล้องเจ้าดีโค (BR-1) ข้าวกล้องเจ้าดีโค (BR-2) ข้าวกล้องเจ้าดีโค (BR-3) เก็บตัวอย่างในเขตพื้นที่จังหวัดตากและข้าวแดงอีกจำนวน 3 ตัวอย่าง ประกอบด้วยข้าวแดงจอมทอง (BR-4) ข้าวแดงดอยหล่อ (BR-5) และข้าวแดงอมก๋อย (BR-6) เก็บตัวอย่างในเขตพื้นที่จังหวัดเชียงใหม่ จากนั้นนำตัวอย่างมาผ่านกระบวนการสีข้าวเพื่อแยกเก็บตัวอย่างรำข้าว รำข้าวจะถูกเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ก่อนนำมาสกัด Crude oil



4.2 การเตรียมสารสกัดแกมมา-โอโรซานอล

สารสกัดแกมมา-โอโรซานอลเตรียมโดยการนำสารสกัดหยาบ (Crude oil) มาแยกส่วนโดยใช้เทคนิค Column chromatography ดังนี้



4.3 การวิเคราะห์ปริมาณแกมมา-โอโรซานอล

หลังจากได้สารสกัดแกมมา-โอโรซานอลแล้ว นำมาวิเคราะห์ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) โดยดัดแปลงวิธีของ Zullaikah และคณะ (2009) วัสดุเคลื่อนที่ประกอบด้วยเมทานอล อะเซทโทโรไนโตรลส์ ไดคลอโรมีเทนและกรดอะซิติก และใช้ UV detector ที่ความยาวคลื่น 330 นาโนเมตร หลังจากทราบปริมาณแกมมา-โอโรซานอลในสารสกัดแกมมา-โอโรซานอล จึงทำ Standardization สารสกัดแกมมา-โอโรซานอล จากนั้นคัดเลือกสารสกัดแกมมา-โอโรซานอลที่มีปริมาณแกมมา-โอโรซานอลมากกว่าร้อยละ 5 (สารสกัด) มาศึกษาฤทธิ์ยับยั้งการอักเสบผ่านกลไกการยับยั้งการสร้างไนตริกออกไซด์จากเซลล์ mouse macrophage RAW 264.7 ต่อไป

4.4 การเตรียมเซลล์มะเร็งสำหรับการทดลอง

4.4.1 การเลี้ยงเซลล์

ทำการเลี้ยงเซลล์ Mouse macrophage RAW 264.7 (ATCC TIB-71™) ในภาชนะพลาสติกสำหรับเลี้ยงเซลล์ (tissue culture flask) ขนาด 75 ลูกบาศก์เซนติเมตร ในอาหารเลี้ยงเซลล์ Complete D-MEM แล้วนำภาชนะพลาสติกสำหรับเลี้ยงเซลล์ไปบ่มในตู้อบชนิดมีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ภายใต้อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความชื้น 95% ในบรรยากาศที่มี 5% คาร์บอนไดออกไซด์ เซลล์จะเรียงตัวเป็น monolayer ทำการแบ่งเซลล์ (subculture) เมื่อดูผ่านกล้องจุลทรรศน์ชนิดหัวกลับแล้วพบว่าเซลล์มีการเจริญและแบ่งตัวในภาชนะพลาสติกสำหรับเลี้ยงเซลล์แล้ว 60-80%

4.4.2 การกระตุ้นการสร้างไนตริกออกไซด์

ในการกระตุ้นการสร้างไนตริกออกไซด์จะใช้ Lipopolysaccharide (LPS) และ Interferon- γ (IFN- γ) เป็นตัวกระตุ้น ดังนี้

ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ RAW 264.7 จำนวน 10,000 cells/well

ใน 96-wells plate เป็นเวลา 24 ชั่วโมง



ทำการเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ เติมอาหารเลี้ยงเซลล์ใหม่ที่มีสารสกัดแกมมา-โอโรซานอล

ที่ความเข้มข้นต่างๆ จากนั้นบ่มใน CO₂ Incubator นาน 1 ชั่วโมง



เติมสารละลาย LPS และ IFN- γ หลุมละ 10 μ l

หลุมที่ไม่ได้เติมกำหนดให้เป็นชุดควบคุม

↓
นำไปป้อนใน CO₂ Incubator นาน 24 ชั่วโมง
↓
แบ่งสารละลายหลุมละ 100 µl ลงใน 96-wells plate ใหม่เพื่อ
วิเคราะห์ปริมาณไนตริกออกไซด์

4.4.3 การวิเคราะห์ปริมาณไนตริกออกไซด์

อนุมูลอิสระไนตริกออกไซด์ที่สร้างมาจากเซลล์ RAW 264.7 นั้น จะทำปฏิกิริยากับ ออกซิเจนเกิดเป็นไนไตรท์ละลายอยู่ในอาหารเลี้ยงเซลล์ ซึ่งสามารถตรวจวิเคราะห์ได้ด้วย Griess reagent ที่ประกอบด้วย Sulfanilamide และ naphthylethylenediamine dihydrochloride ในอัตราส่วน 1:1

ผสมสารละลาย Sulfanilamide และ naphthylethylenediamine dihydrochloride
ในอัตราส่วน 1:1 (Griess reagent)

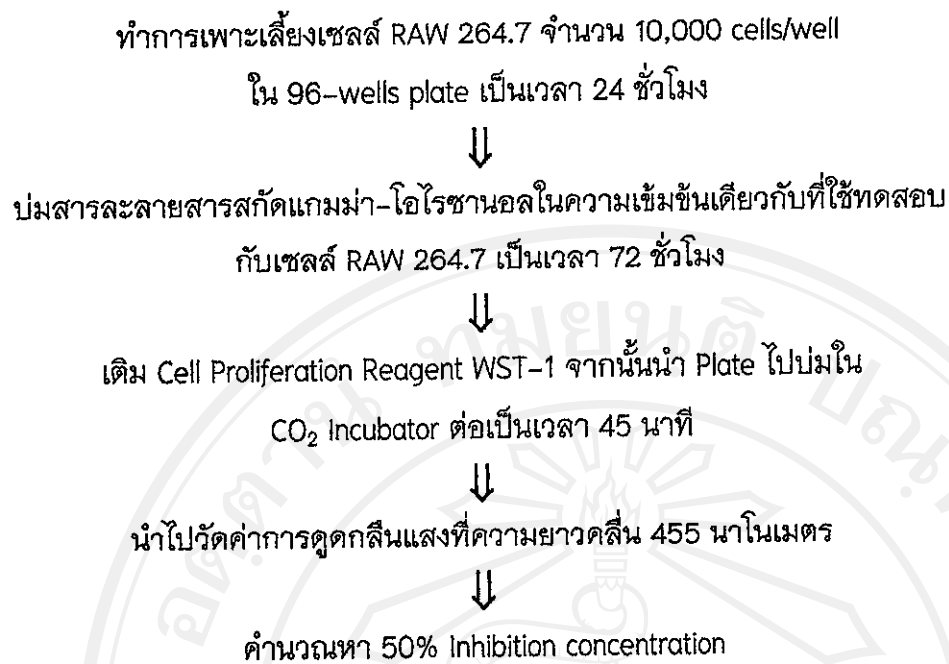
↓
เติม Griess reagent ลงหลุมละ 100 µl ใน 96-wells plate
รวมทั้งหลุมที่เติม KNO₂ ซึ่งเป็นหลุมสำหรับสร้างกราฟมาตรฐาน

↓
วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร

↓
สร้างกราฟมาตรฐาน %Inhibition และคำนวณหาค่า
50% inhibition concentration

4.4.4 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง

การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ RAW 264.7 มีวัตถุประสงค์เพื่อทดสอบในช่วงความเข้มข้นของสารสกัดแกมมา-ไฮโรซานอลที่ใช้ทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบโดยการยับยั้งการสร้างไนตริกออกไซด์ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ RAW 264.7 โดยใช้ Cell proliferation reagent (WST-1) เป็นสารที่ใช้วิเคราะห์เซลล์ที่มีชีวิต ซึ่งมีกลไกการเกิดปฏิกิริยาเช่นเดียวกับ MTT แต่ไม่จำเป็นต้องอาศัยตัวทำละลายผลึก formazan เหมือนกับการใช้ MTT ทั้งยังเกิดปฏิกิริยาได้เร็วกว่า MTT และสีที่เกิดขึ้นยังมีความคงตัวนานกว่า 12 ชั่วโมง สำหรับทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ RAW 264.7 โดยใช้ cell proliferation reagent WST-1 ดังนี้



บทที่ 4

ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. สารสกัดหยาบ (crude oil) จากรำข้าว

จากการสกัดรำข้าวทำสายพันธุ์พื้นเมืองจำนวน 3 ตัวอย่าง ประกอบด้วยรำข้าวเก่าเจดีย์โคะ (BR-1) รำข้าวเก่าปั้ง (BR-2) รำข้าวเก่าต่อ (BR-3) และข้าวแดงสายพันธุ์พื้นเมืองอีก 3 ตัวอย่าง ประกอบด้วย รำข้าวแดงจอมทอง (BR-4) รำข้าวแดงคอยหล่อ (BR-5) และรำแดงอมก๋อย (BR-6) ด้วยเทคนิค soxhlet's extraction โดยใช้เฮกเซน/เอธิลอะซีเตต ในอัตราส่วน 7:3 เป็นตัวทำละลาย เนื่องจากแกมมา-โอไรซานอลเป็นสารที่มีขี้ดต่ำ จึงสามารถแยกสกัดได้ด้วยตัวทำละลายที่มีขี้ดต่ำ หลังจากทำการสกัดด้วยเทคนิค soxhlet's extraction เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จึงนำสารละลายที่ได้มา กรองแล้วนำไประเหยด้วยเครื่องระเหยโดยการลดความดัน (rotary evaporator) จากนั้นเก็บสารสกัดหยาบน้ำมันรำข้าว (crude rice bran oil) ที่ได้ในภาชนะกันแสง ปริมาณสารสกัดหยาบน้ำมันรำข้าว (crude rice bran oil) ที่ได้ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 %yield ของสารสกัดหยาบน้ำมันรำข้าว (crude rice bran oil)

ตัวอย่าง	%yield
รำข้าวเก่าเจดีย์โคะ (BR-1)	4.98
รำข้าวเก่าปั้ง (BR-2)	5.67
รำข้าวเก่าต่อ (BR-3)	2.72
รำข้าวแดงจอมทอง (BR-4)	5.33
รำข้าวแดงคอยหล่อ (BR-5)	4.84
รำข้าวแดงอมก๋อย (BR-6)	2.84

2. สารสกัดแกมมา-โอไรซานอล

หลังจากได้สารสกัดหยาบน้ำมันรำข้าว (crude rice bran oil) จากรำข้าวแล้วจึงนำสารสกัดหยาบน้ำมันรำข้าวมาทำการแยกสารสกัดแกมมา-โอไรซานอลโดยใช้เทคนิคโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ (column chromatography) โดยใช้วัฏภาคเคลื่อนที่ที่มีขี้ดต่างกันเพื่อทำการแยกสารตามความมีขี้ดของสารสำคัญที่อยู่ในสารสกัดหยาบน้ำมันรำข้าว ซึ่งวัฏภาคเคลื่อนที่ประกอบด้วย เฮกเซน/เอธิลอะซีเตต ในอัตราส่วน 9:1, 7:3 และ 1:1 ตามลำดับ จากนั้นจึงเก็บสารละลายที่ได้ตาม

ความมีชีวะเพื่อนำไปประเหยโดยการลดความดันภายใต้สภาวะก๊าซไนโตรเจนเพื่อป้องกันการสลายตัวของแกมม่า-โอโรซานอล %yield ของสารสกัดแกมม่า-โอโรซานอลดังแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 %yield ของสารสกัดแกมม่า-โอโรซานอล

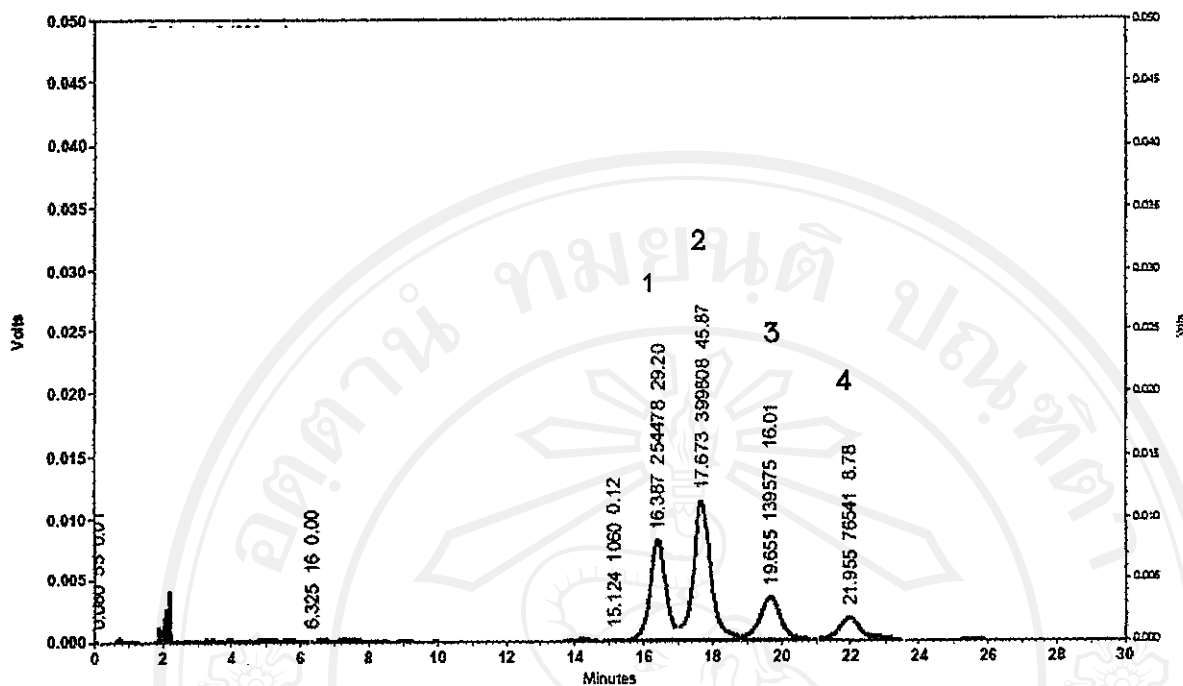
ตัวอย่าง	%yield สารสกัดแกมม่า-โอโรซานอล		
	9:1	7:3	1:1
รำข้าวเก่าเจดีย์โคะ (BR-1)	0.85	2.71	0.08
รำข้าวเก่าปิ้ง (BR-2)	2.78	2.50	0.10
รำข้าวเก่าต่อ (BR-3)	2.01	2.34	0.14
รำข้าวแดงจอมทอง (BR-4)	0.94	1.82	0.04
รำข้าวแดงดอยหล่อ (BR-5)	0.22	2.59	0.45
รำข้าวแดงอมก๋อย (BR-6)	0.95	1.46	0.14

หมายเหตุ %yield สารสกัดแกมม่า-โอโรซานอลคิดจากน้ำหนักรำข้าว

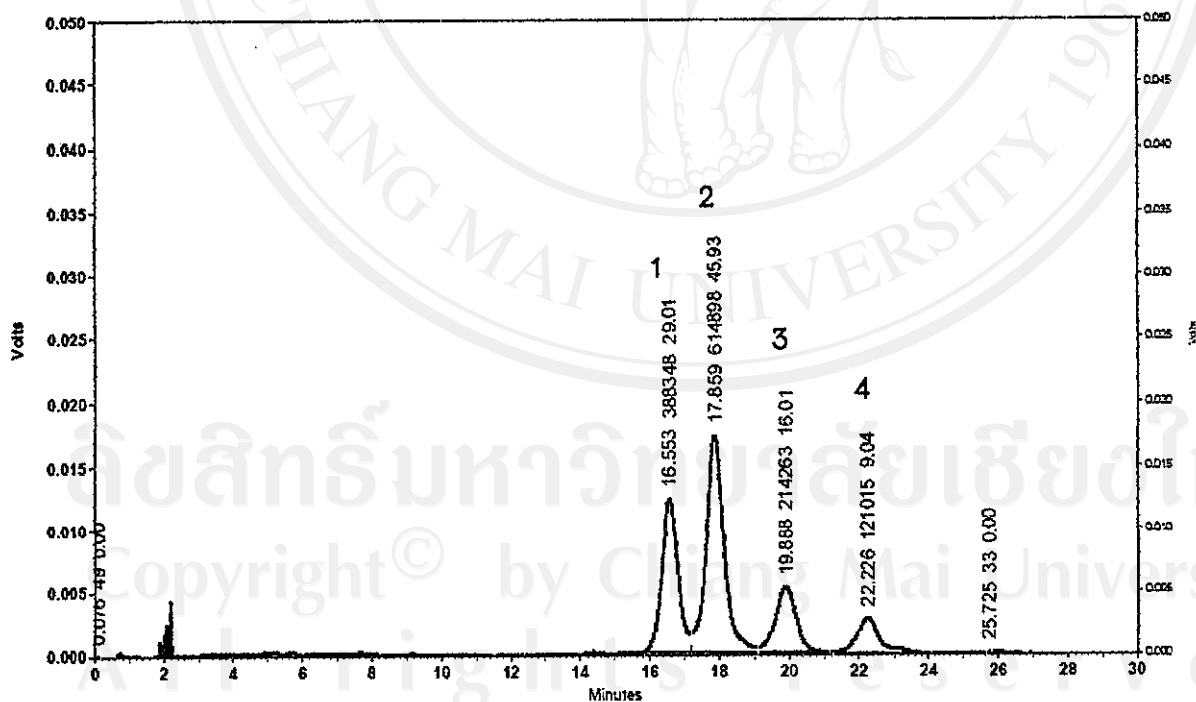
3. การวิเคราะห์ปริมาณแกมม่า-โอโรซานอล

การวิเคราะห์ปริมาณแกมม่า-โอโรซานอลในสารสกัดแกมม่า-โอโรซานอลที่สกัดแยกจากรำข้าวเก่าและข้าวแดงสายพันธุ์พื้นเมือง ดัดแปลงวิธีวิเคราะห์ของ Zullaikah *et al.* (2009) โดยใช้เทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถภาพสูง (HPLC) จากนั้นจึงเปรียบเทียบปริมาณของแกมม่า-โอโรซานอลในสารสกัดแกมม่า-โอโรซานอลกับกราฟของสารมาตรฐานแกมม่า-โอโรซานอล

จากการวิเคราะห์สารสกัดแกมม่า-โอโรซานอลในแต่ละวัฏภาคเคลื่อนที่ที่ใช้ พบว่าสารสกัดแกมม่า-โอโรซานอลที่ได้จากวัฏภาคเคลื่อนที่ในอัตราส่วน 7:3 มีปริมาณแกมม่า-โอโรซานอลสูงที่สุดและมีการปนเปื้อนของสารอื่นน้อยที่สุด (รูปที่ 7) สำหรับสารสกัดแกมม่า-โอโรซานอลที่ได้จากวัฏภาคเคลื่อนที่ 1:1 มีปริมาณแกมม่า-โอโรซานอลน้อยและมีการปนเปื้อนของสารอื่นเช่นกัน (รูปที่ 8) ส่วนสารสกัดแกมม่า-โอโรซานอลที่ได้จากวัฏภาคเคลื่อนที่ 9:1 ตรวจวิเคราะห์ไม่พบแกมม่า-โอโรซานอล (รูปที่ 6) ดังนั้นจึงเลือกสารสกัดแกมม่า-โอโรซานอลที่ได้จากวัฏภาคเคลื่อนที่ 7:3 ที่มีปริมาณแกมม่า-โอโรซานอลมากกว่าร้อยละ 5 มาทำ standardization ปริมาณแกมม่า-โอโรซานอลของสารสกัดแกมม่า-โอโรซานอลจากรำข้าวที่ได้จากวัฏภาคเคลื่อนที่ 7:3 ทั้ง 6 ตัวอย่างดังแสดงในตารางที่ 2



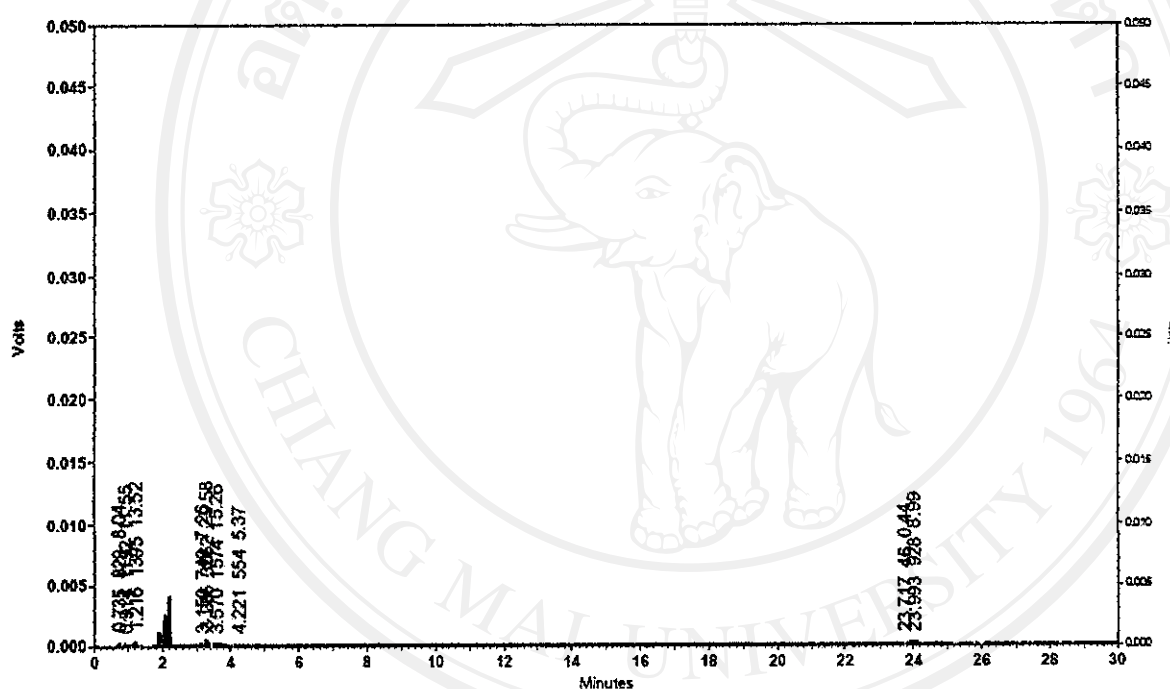
รูปที่ 4 HPLC โครมาโทแกรมของสารมาตรฐานแกมมา-ไอโรซานอลความเข้มข้น 25 ppm



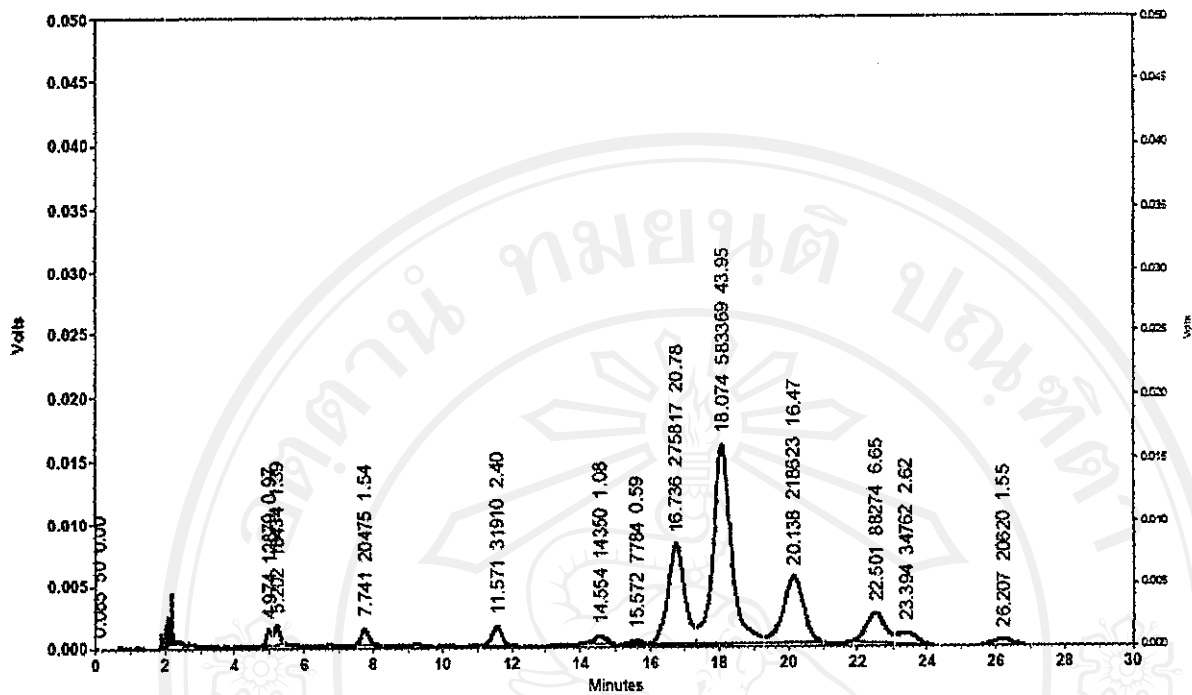
รูปที่ 5 HPLC โครมาโทแกรมของสารมาตรฐานแกมมา-ไอโรซานอลความเข้มข้น 50 ppm

จากรูปที่ 4 และ 5 แสดงให้เห็นว่าสารมาตรฐานแกมมา-ไอโรซานอลประกอบด้วยสารสำคัญหลักทั้งหมด 4 ชนิดดังนี้ cycloartenyl ferulate (1), 24-methylenecycloartenyl ferulate

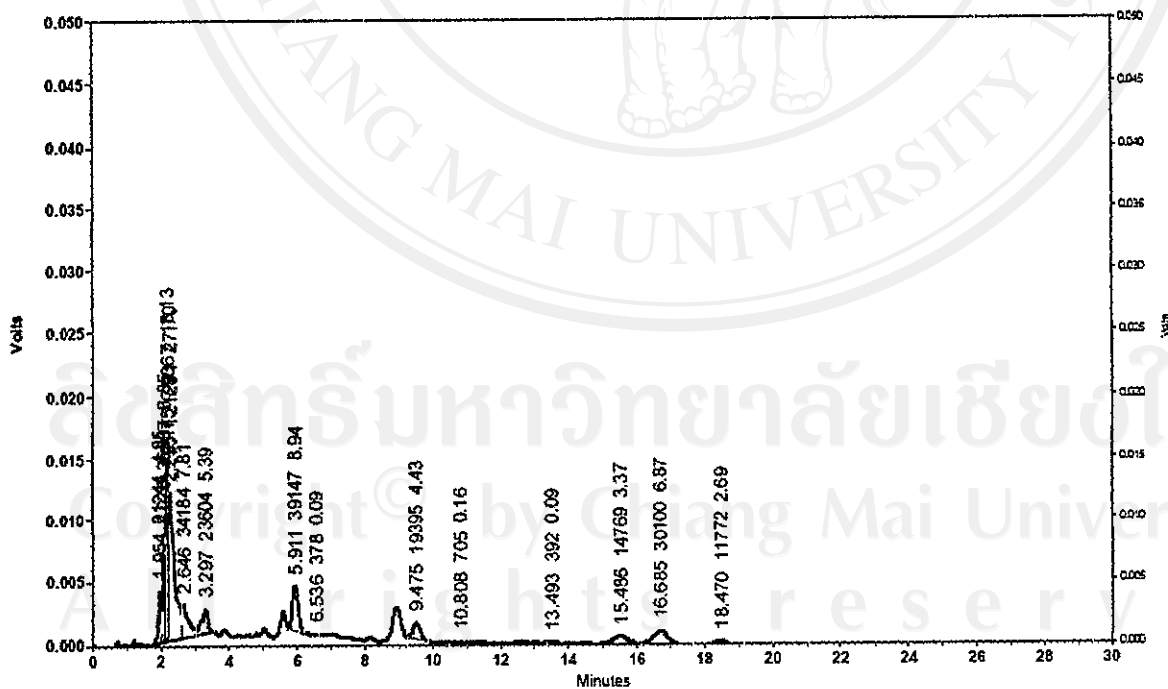
(2), campesteryl ferulate (3) และ sitosteryl ferulate (4) ตามลำดับ แต่มีนักวิทยาศาสตร์สามารถแยกสารสำคัญจากน้ำมันแกมมา-โอไรซานอลเข้มข้น (concentrated γ -oryzanol oil) จากรำข้าวได้ถึง 10 ชนิด ซึ่งประกอบด้วย Δ^7 -stigmastenyl ferulate, stigmasteryl ferulate, cycloartenyl ferulate, 24-methylenecycloartanyl ferulate, Δ^7 -campestenyl ferulate, campesteryl ferulate, Δ^7 -sitostenyl ferulate, sitosteryl ferulate, campestanyl ferulate และ sitostanyl ferulate ซึ่งสารสำคัญหลักที่พบในรำข้าวนี้ประกอบด้วย cycloartenyl ferulate, 24-methylenecycloartanyl ferulate และ campesteryl ferulate ดังแสดงมาแล้วในบทบทวนวรรณกรรม



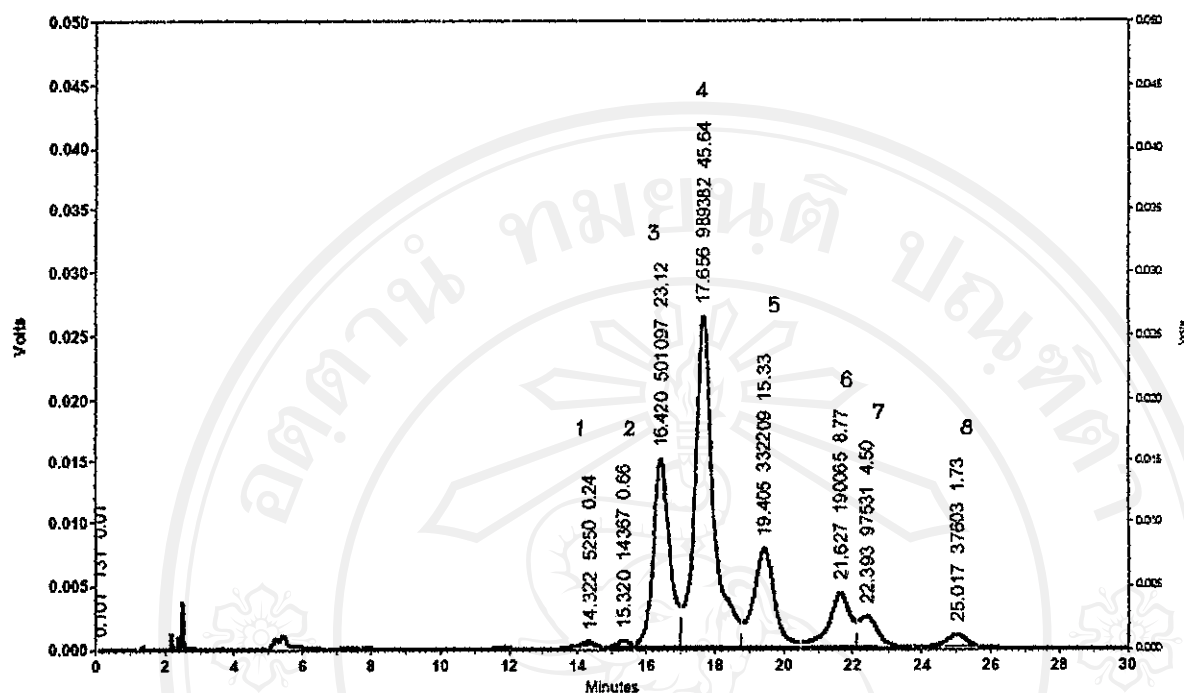
รูปที่ 6 HPLC โครมาโทแกรมของสารสกัดแกมมา-โอไรซานอลที่ได้จากวัฏภาคเคลื่อนที่ 9:1



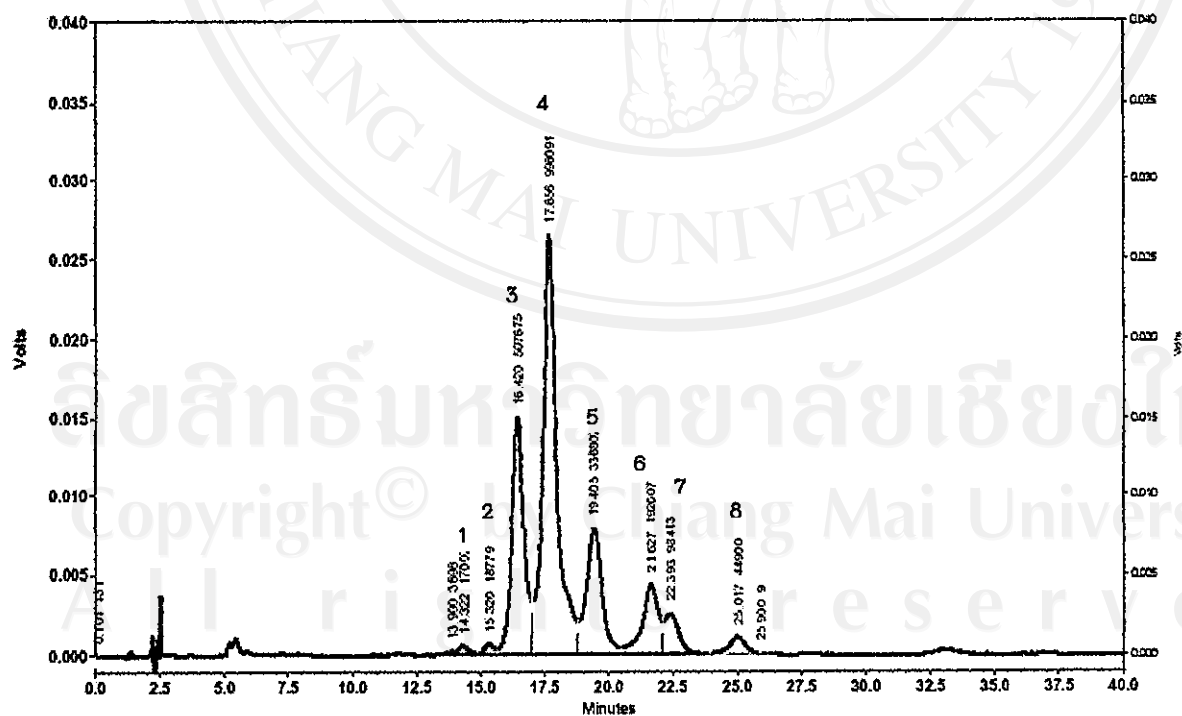
รูปที่ 7 HPLC โครมาโทแกรมของสารสกัดแกมม่า-ไอโรซานอลที่ได้จากวัฏภาคเคลื่อนที่ 7:3



รูปที่ 8 HPLC โครมาโทแกรมของสารสกัดแกมม่า-ไอโรซานอลที่ได้จากวัฏภาคเคลื่อนที่ 1:1



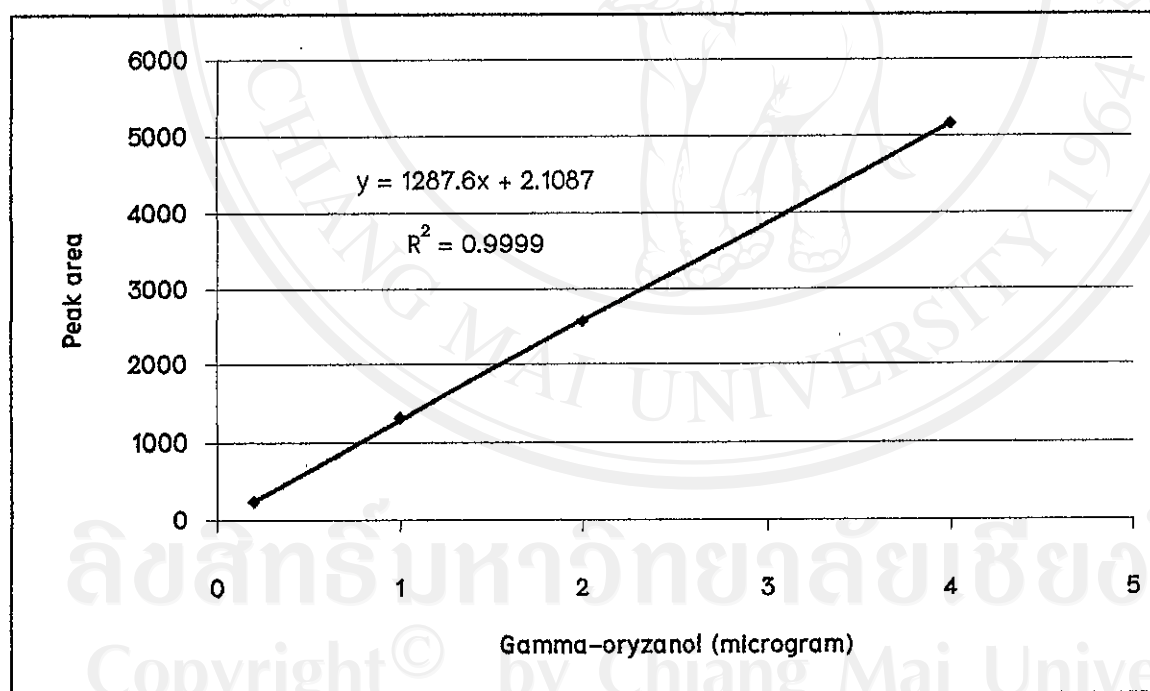
รูปที่ 9 HPLC โคโรมาโทแกรมของสารสกัดแกมมา-ไฮโรซานอลจากรำข้าวเก่าบึง (BR-2)



รูปที่ 10 HPLC โคโรมาโทแกรมของสารสกัดแกมมา-ไฮโรซานอลจากรำข้าวแดงจอมทอง (BR-4)

จากรูปที่ 9 แสดงให้เห็นว่าสารสกัดแกมม่า-โอไรซานอลจากรำข้าวเก่าบั้ง (BR-2) ประกอบด้วยสารสำคัญทั้งหมด 8 ชนิด เมื่อเปรียบเทียบค่า retention time กับสารมาตรฐานแกมม่า-โอไรซานอลแล้วพบว่าสารสกัดแกมม่า-โอไรซานอลจากรำข้าวเก่าบั้งประกอบด้วยสารสำคัญหลักทั้งหมด 3 ชนิดคือ cycloartenyl ferulate (3), 24-methylenecycloartanyl ferulate (4) และ campesteryl ferulate (5) สำหรับสารสำคัญอื่นที่พบในสารสกัดแกมม่า-โอไรซานอลจากรำข้าวเก่าสายพันธุ์ไทยนั้นต้องทำการศึกษาวิเคราะห์ต่อไป

จากรูปที่ 10 แสดงให้เห็นว่าสารสกัดแกมม่า-โอไรซานอลจากรำข้าวแดงจอมทอง ประกอบด้วยสารสำคัญทั้งหมด 8 ชนิดเช่นเดียวกับสารสกัดแกมม่า-โอไรซานอลที่ได้จากรำข้าวเก่าสายพันธุ์พื้นเมืองเช่นกัน โดยสารสกัดแกมม่า-โอไรซานอลจากรำข้าวแดงจอมทองประกอบด้วยสารสำคัญหลักทั้งหมด 3 ชนิดคือ cycloartenyl ferulate (3), 24-methylenecycloartanyl ferulate (4) และ campesteryl ferulate (5) สำหรับสารสำคัญอื่นที่พบในสารสกัดแกมม่า-โอไรซานอลจากรำข้าวเก่าสายพันธุ์ไทยนั้นต้องทำการศึกษาวิเคราะห์ต่อไปด้วยเช่นกัน



รูปที่ 11 กราฟมาตรฐานของสารมาตรฐานแกมม่า-โอไรซานอล

ตารางที่ 3 ร้อยละของแกมมา-โอโรซานอลในสารสกัดแกมมา-โอโรซานอล

ตัวอย่าง	ร้อยละของแกมมา-โอโรซานอลใน สารสกัดแกมมา-โอโรซานอล
รำข้าวเก่าเจดีย์โคะ (BR-1)	1.17 ± 0.11
รำข้าวเก่าปั้ง (BR-2)	8.33 ± 0.13
รำข้าวเก่าต๋อ (BR-3)	8.20 ± 0.23
รำข้าวแดงจอมทอง (BR-4)	10.80 ± 0.25
รำข้าวแดงดอยหล่อ (BR-5)	6.93 ± 0.05
รำข้าวแดงอมก๋อย (BR-6)	6.25 ± 0.17

จากการคำนวณหาปริมาณแกมมา-โอโรซานอลในสารสกัดแกมมา-โอโรซานอลที่ได้จากวัฏภาคเคลื่อนที่อัตราส่วน 7:3 แสดงให้เห็นว่าปริมาณแกมมา-โอโรซานอลในตัวอย่างทั้ง 6 ตัวอย่างอยู่ในช่วงร้อยละ 1.17 – 10.80 ซึ่งช่วงที่กว้างนี้อาจมีสาเหตุมาจากสายพันธุ์ข้าวขาวเก่าและข้าวแดงสายพันธุ์พื้นเมือง แหล่งปลูก เป็นต้น ดังนั้นจึงได้คัดเลือกสารสกัดแกมมา-โอโรซานอลของรำข้าวเก่าปั้ง (BR-2) รำข้าวเก่าต๋อ (BR-3) รำข้าวแดงจอมทอง (BR-4) รำข้าวแดงดอยหล่อ (BR-5) และรำข้าวแดงอมก๋อย (BR-6) มาทำ standardization ก่อนที่จะนำไปศึกษาฤทธิ์ด้านการอักเสบผ่านกลไกการยับยั้งการสร้างไนตริกออกไซด์ของเซลล์ mouse macrophage RAW 264.7 ต่อไป

4. การประเมินฤทธิ์ด้านการอักเสบผ่านการยับยั้งการสร้างไนตริกออกไซด์

เซลล์โมโนไซต์ (monocytes) และแมคโครฟาจเป็นเซลล์ที่มีความสามารถในการตอบสนองต่อสิ่งเร้า เช่น endotoxin (lipopolysaccharide: LPS), inflammatory cytokines, ultraviolet, arsenite และอื่นๆ ทำให้มีการสร้างไนตริกออกไซด์ออกมาจำนวนมาก ไนตริกออกไซด์ที่ปลดปล่อยจำนวนมากนี้เป็นตัวกลางของการก่อพยาธิสภาพต่างๆ ในการประเมินฤทธิ์ด้านการอักเสบผ่านกลไกการยับยั้งการสร้างไนตริกออกไซด์ในครั้งนี้จะใช้เซลล์ mouse macrophage RAW 264.7 เป็นแบบทดสอบโดยกระตุ้นด้วย LPS และ IFN- γ ในความเข้มข้นที่เหมาะสม เพื่อจำลองการกระตุ้นในภาวะอักเสบและทำการวัดปริมาณไนตริกออกไซด์ที่ปลดปล่อยออกมา โดยวัดในรูปของไนไตรท์โดยใช้ Griess reagent สารสกัดแกมมา-โอโรซานอลจากรำข้าวเก่าสายพันธุ์ไทยที่สามารถยับยั้งการสร้างไนตริกออกไซด์ได้จะสามารถจัดว่าเป็นสารที่มีฤทธิ์ด้านการอักเสบผ่านกลไกการยับยั้งการสร้างไนตริกออกไซด์ได้ โดยความเข้มข้นของสารสกัดแกมมา-โอโรซานอลที่ใช้

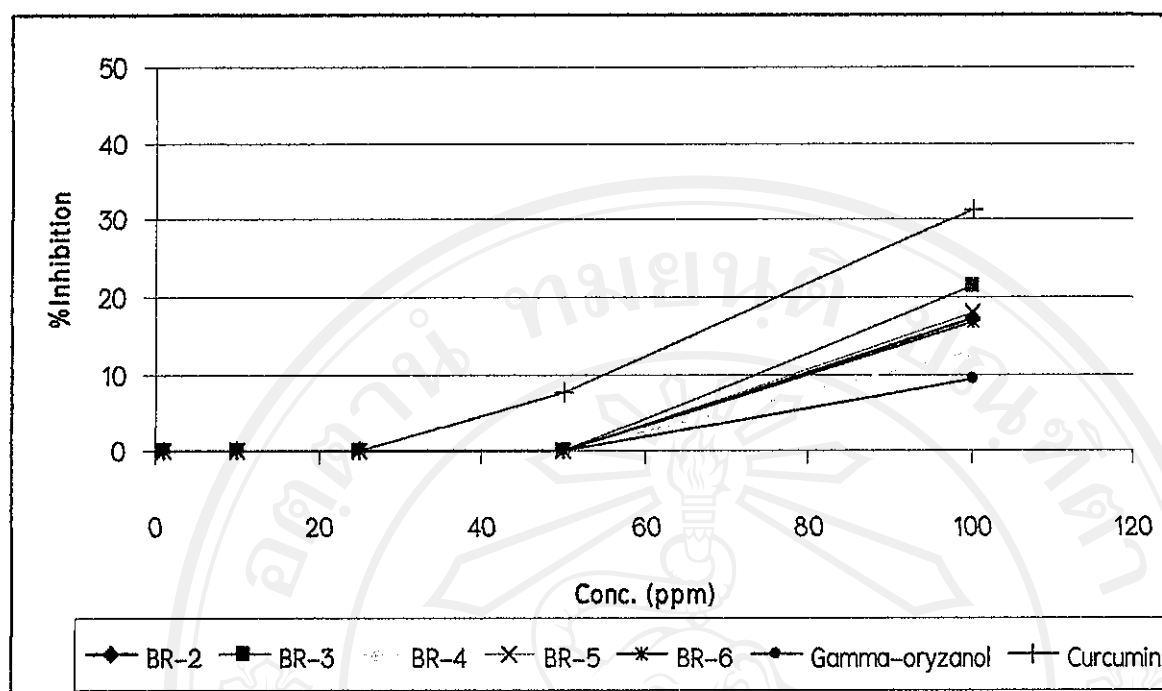
ในการทดสอบในครั้งนี้คือ 1, 10, 25, 50 และ 100 $\mu\text{g/ml}$ ความเข้มข้นที่ใช้ต้องตรวจความเป็นพิษต่อเซลล์ mouse macrophage RAW 264.7 ก่อนโดยใช้ cell proliferation reagent WST-1 โดยผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ mouse macrophage RAW 264.7 ดังแสดงในตารางที่ 4

ตารางที่ 4 ความเป็นพิษต่อเซลล์ mouse macrophage RAW 264.7

สารสกัดแกมมา-โอโรซานอล	ร้อยละความเป็นพิษต่อเซลล์ mouse macrophage RAW 264.7 ที่ความเข้มข้น				
	1 $\mu\text{g/ml}$	10 $\mu\text{g/ml}$	25 $\mu\text{g/ml}$	50 $\mu\text{g/ml}$	100 $\mu\text{g/ml}$
รำข้าวเก่าปิ้ง (BR-2)	0	0	0	0	17.34 ± 1.83
รำข้าวเก่าต่อ (BR-3)	0	0	0	0	21.55 ± 1.74
รำข้าวแดงจอมทอง (BR-4)	0	0	0	0	13.29 ± 1.21
รำข้าวแดงคอยหล่อ (BR-5)	0	0	0	0	18.09 ± 2.15
รำข้าวแดงอมก๋อย (BR-6)	0	0	0	0	16.87 ± 1.67
สารมาตรฐานแกมมา-โอโรซานอล	0	0	0	0	9.54 ± 1.17
สารมาตรฐานเคอร์คูมิน	0	0	0	7.83 ± 1.12	31.32 ± 1.88

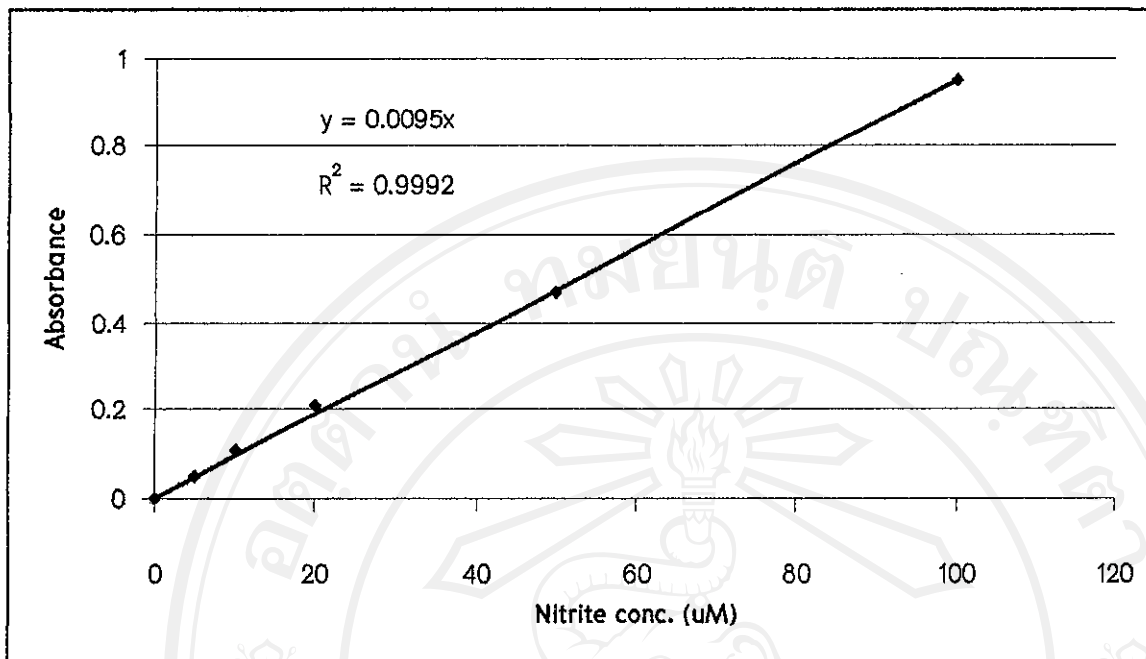
หมายเหตุ 0 คือ ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ mouse macrophage RAW 264.7

จากการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ mouse macrophage RAW 264.7 ด้วย cell proliferation WST-1 พบว่าสารสกัดแกมมา-โอโรซานอลจากรำข้าวเก่าปิ้ง (BR-2) รำข้าวเก่าต่อ (BR-3) รำข้าวแดงจอมทอง (BR-4) รำข้าวแดงคอยหล่อ (BR-5) รำข้าวแดงอมก๋อย (BR-6) และสารมาตรฐานแกมมา-โอโรซานอลแสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ mouse macrophage RAW 264.7 ที่ความเข้มข้น 100 $\mu\text{g/ml}$ โดยสารมาตรฐานเคอร์คูมินที่ใช้เป็นสารมาตรฐานอ้างอิง (standard reference) เริ่มแสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ mouse macrophage RAW 264.7 ที่ความเข้มข้น 50 $\mu\text{g/ml}$ ดังนั้นจึงเลือกทดสอบฤทธิ์ด้านการอักเสบผ่านการยับยั้งการสร้างไนตริกออกไซด์ของสารสกัดแกมมา-โอโรซานอลทั้ง 5 ตัวอย่าง รวมทั้งสารมาตรฐานแกมมา-โอโรซานอลที่ความเข้มข้น 1, 10, 25 และ 50 $\mu\text{g/ml}$ ส่วนสารมาตรฐานเคอร์คูมินเลือกทดสอบที่ความเข้มข้น 1, 10 และ 25 $\mu\text{g/ml}$



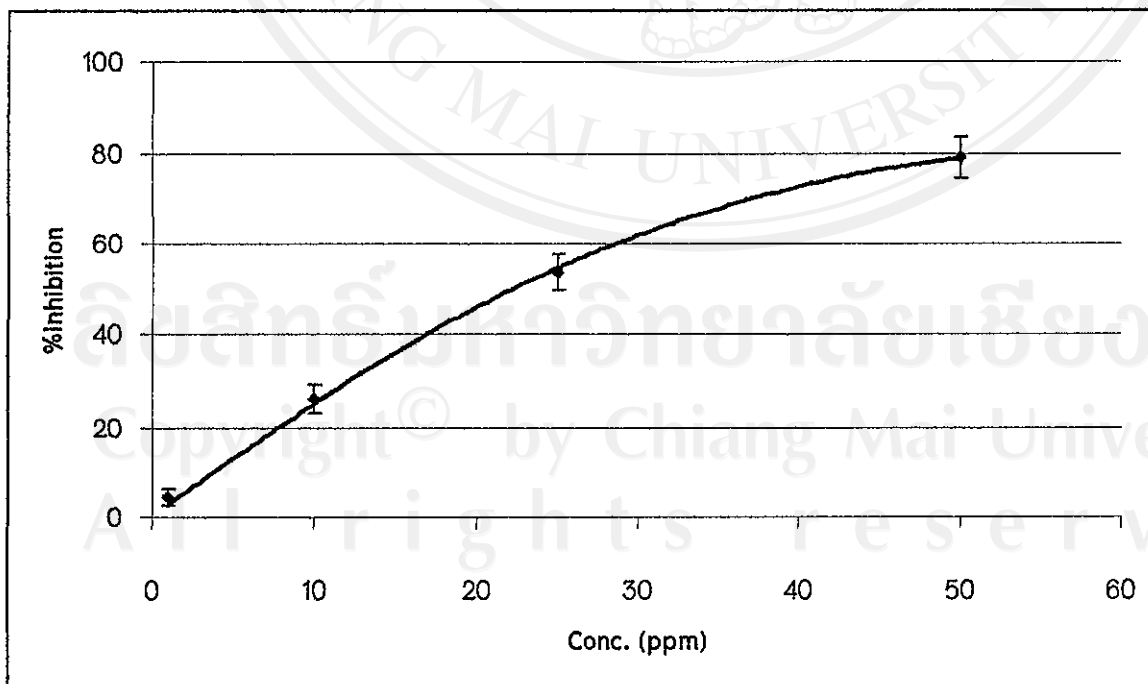
รูปที่ 12 ความเป็นพิษต่อเซลล์ mouse macrophage RAW 264.7 ของสารสกัดแกมมา-โอไรซานอล สารมาตรฐานแกมมา-โอไรซานอลและเคอร์คูมิน

เมื่อทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ mouse macrophage RAW 264.7 เรียบร้อยแล้วจึงนำสารสกัดแกมมา-โอไรซานอลที่สกัดจากรำข้าวเก่าเก่าปิ้ง (BR-2) รำข้าวเก่าต่อ (BR-3) รำข้าวแดงจอมทอง (BR-4) รำข้าวแดงคอยหล่อ (BR-5) รำข้าวแดงอมก๋อย (BR-6) สารมาตรฐานแกมมา-โอไรซานอลและสารมาตรฐานเคอร์คูมินมาทดสอบฤทธิ์ด้านการอักเสบผ่านกลไกการยับยั้งการสร้างไนตริกออกไซด์จากเซลล์ mouse macrophage RAW 264.7 โดยละลายสารสกัดแกมมา-โอไรซานอลและสารมาตรฐานที่จะให้ทดสอบด้วย dimethylsulfoxide (DMSO) แล้วเตรียมให้ได้ความเข้มข้นดังที่กล่าวมาแล้วข้างต้นด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ โดยเซลล์ mouse macrophage RAW 264.7 จะถูกกระตุ้นด้วย LPS ความเข้มข้น 50 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตรและ IFN- γ ความเข้มข้น 100 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นจึงทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร แล้วเปรียบเทียบค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้กับกราฟมาตรฐานของโพแทสเซียมไนไตรท์ (KNO_2)

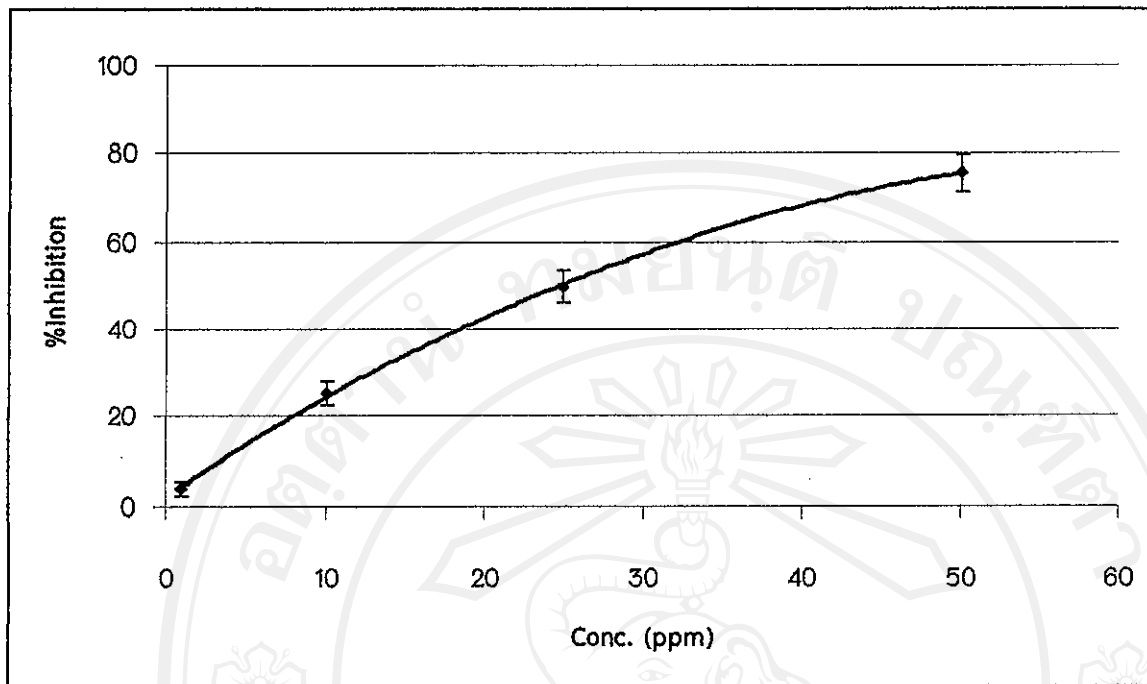


รูปที่ 13 กราฟมาตรฐานของโพแทสเซียมไนไตรท์

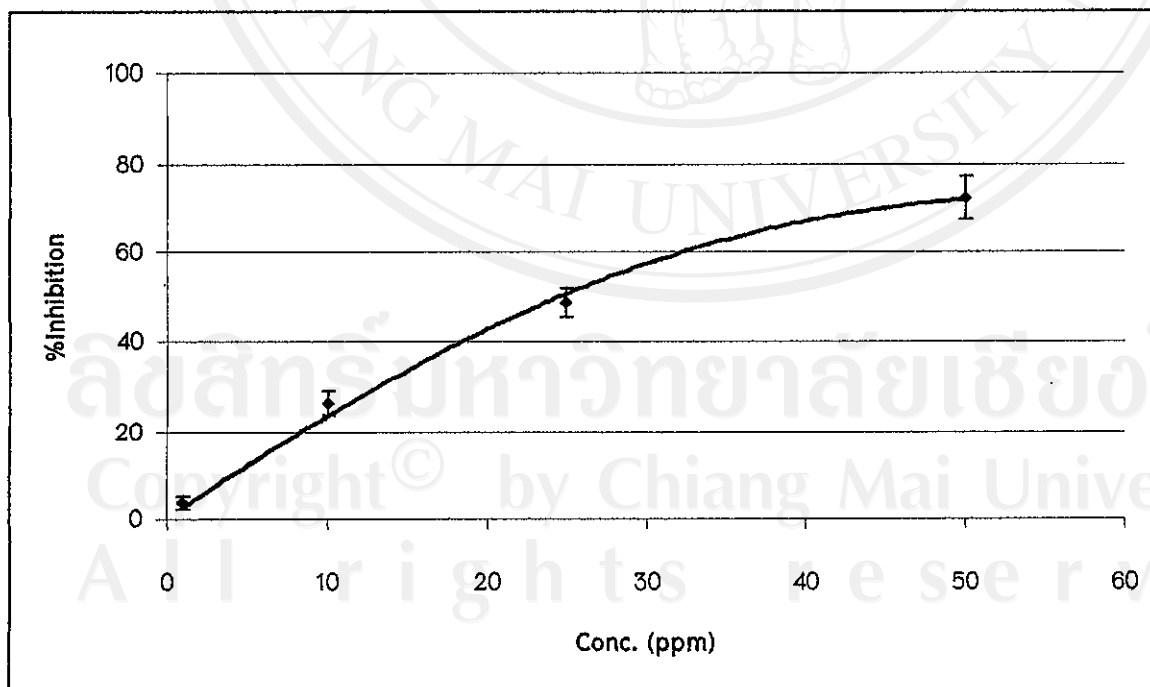
จากรูปที่ 13 แสดงกราฟเส้นตรงของสารมาตรฐานโพแทสเซียมไนไตรท์ โดยมีค่า $R^2 = 0.992$ และมีสมการเส้นตรง $y = 0.0095x$



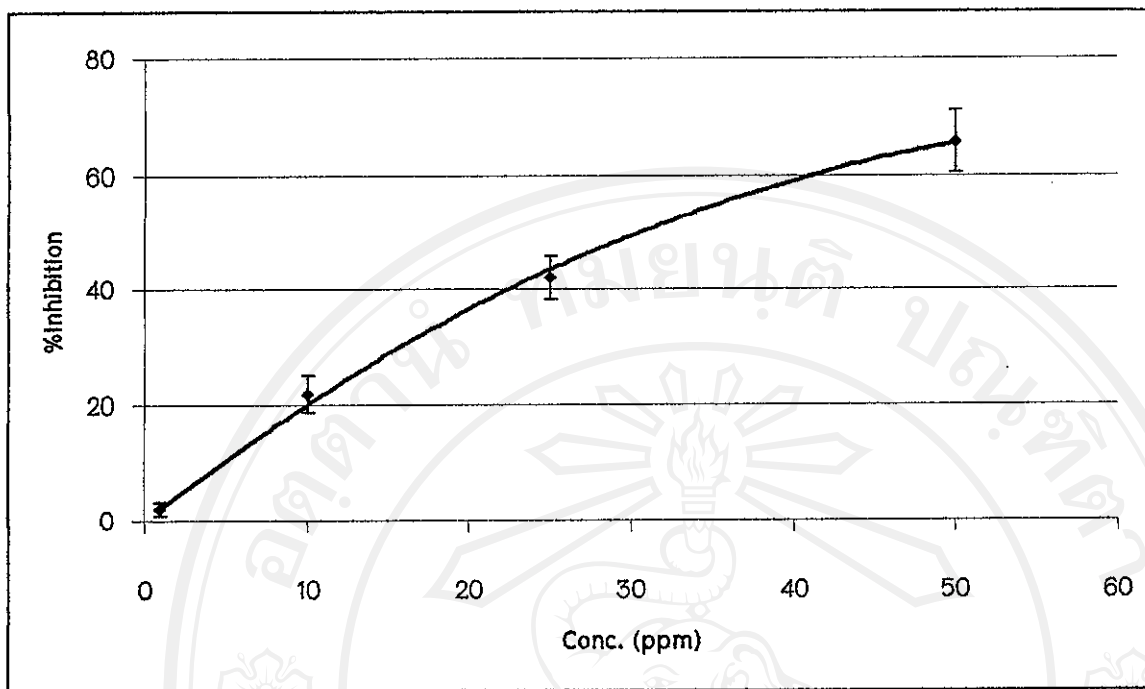
รูปที่ 14 Dose response curve ของสารสกัดแกมมา-ไฮโรซานอลจากรำข้าวกำปั้ง (BR-2) ในการยับยั้งการสร้างไนตริกออกไซด์



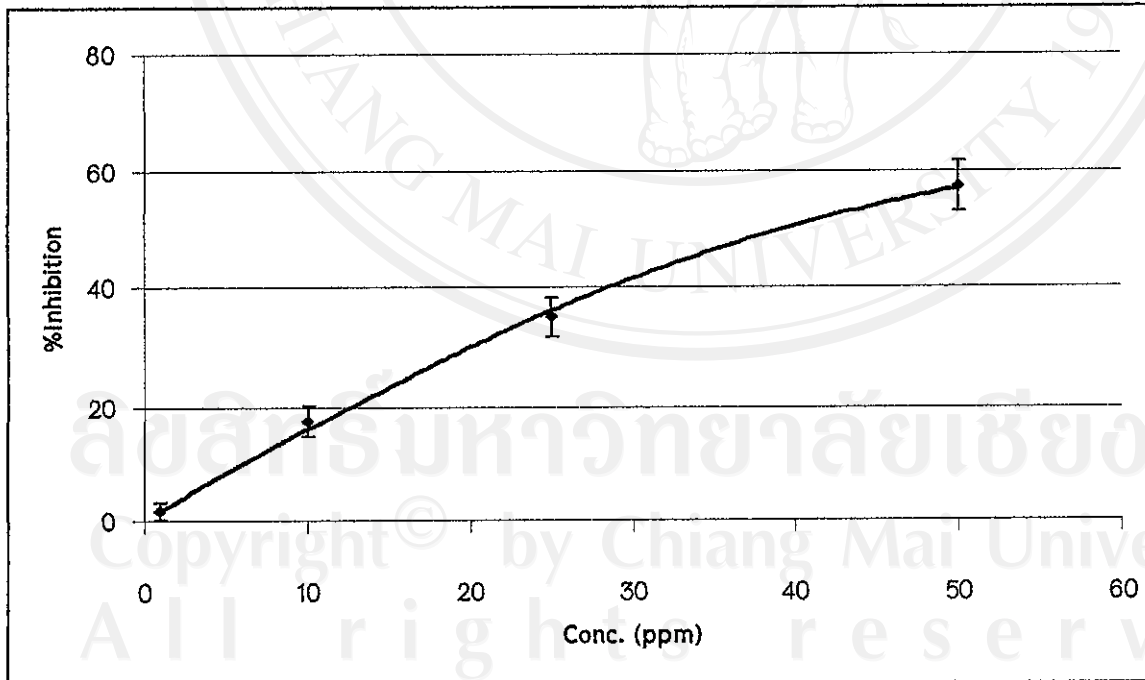
รูปที่ 15 Dose response curve ของสารสกัดแกมมา-ไอโรซานอลจากรำข้าวกำตอ (BR-3) ในการยับยั้งการสร้างไนตริกออกไซด์



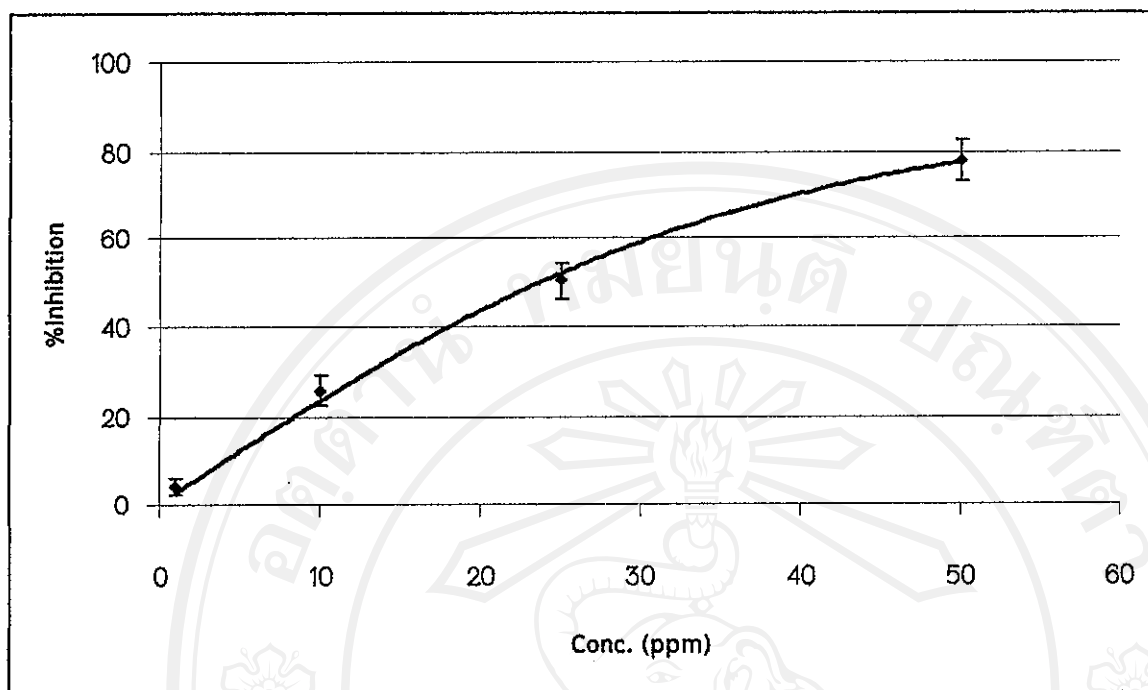
รูปที่ 16 Dose response curve ของสารสกัดแกมมา-ไอโรซานอลจากรำข้าวแดงจอมทอง (BR-4) ในการยับยั้งการสร้างไนตริกออกไซด์



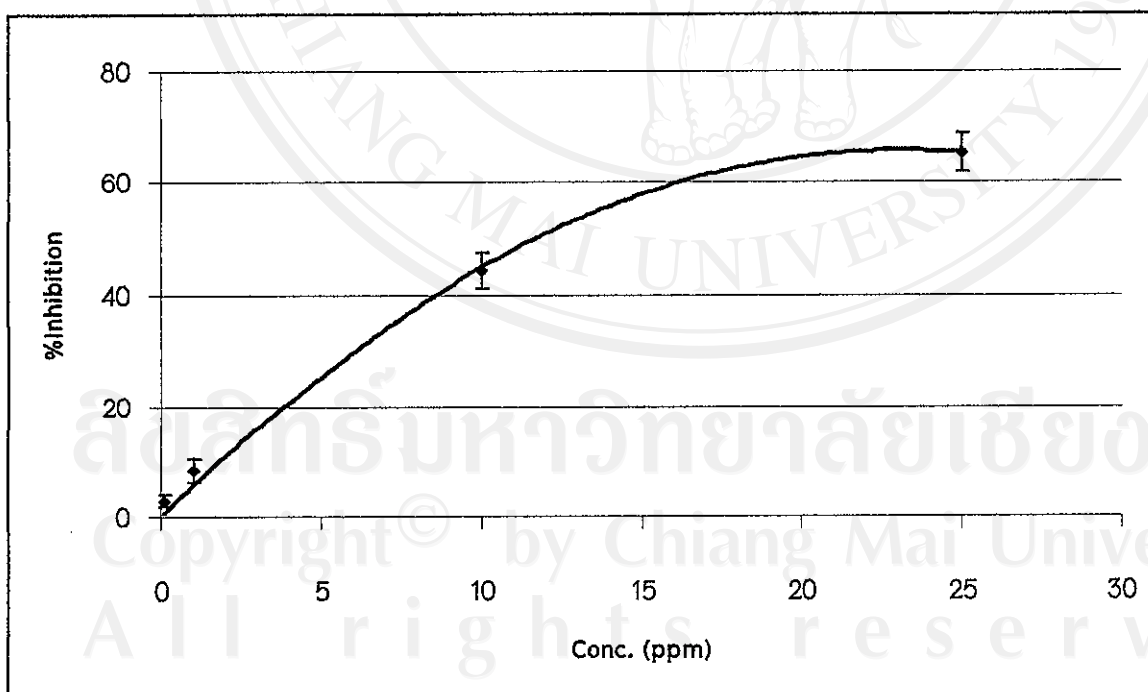
รูปที่ 17 Dose response curve ของสารสกัดแกมมา-ไอโรซานอลจากรำข้าวแดงดอยหล่อ (BR-5) ในการยับยั้งการสร้างไนตริกออกไซด์



รูปที่ 18 Dose response curve ของสารสกัดแกมมา-ไอโรซานอลจากรำข้าวแดงอมก๋อย (BR-6) ในการยับยั้งการสร้างไนตริกออกไซด์



รูปที่ 19 Dose response curve ของสารมาตรฐานแกมมา-โอไรซานอลในการยับยั้งการสร้างไนตริกออกไซด์



รูปที่ 20 Dose response curve ของสารมาตรฐานเคอร์คูมินในการยับยั้งการสร้างไนตริกออกไซด์

จากรูปที่ 14-20 แสดง Dose response curve ของสารสกัดแกมม่า-โอโรซานอลจากรำข้าว
 ก่ำปึ้ง (BR-2) รำข้าวกำต้อ (BR-3) รำข้าวแกงจอมทอง (BR-4) รำข้าวแดงดอยหล่อ (BR-5) รำข้าว
 แดงอมก๋อย (BR-6) สารมาตรฐานแกมม่า-โอโรซานอลและสารมาตรฐานเคอร์คูมิน ตามลำดับ ใน
 การยับยั้งการสร้างไนตริกออกไซด์ของเซลล์ mouse macrophage RAW 264.7 ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS
 และ IFN- γ จากรูปแสดงให้เห็นว่าสารตัวอย่างทั้งหมดสามารถยับยั้งการสร้างไนตริกออกไซด์ได้
 เพิ่มขึ้นตามความเข้มข้น โดยค่า 50% inhibition concentration ได้

ตารางที่ 5 50% Inhibition concentration ของสารสกัดแกมม่า-โอโรซานอล

สารสกัดแกมม่า-โอโรซานอล	50% Inhibition concentration ($\mu\text{g/ml}$)
รำข้าวกำปึ้ง (BR-2)	23.69 ± 1.87^b
รำข้าวกำต้อ (BR-3)	24.66 ± 2.31^b
รำข้าวแกงจอมทอง (BR-4)	26.92 ± 2.23^b
รำข้าวแดงดอยหล่อ (BR-5)	34.20 ± 2.14^c
รำข้าวแดงอมก๋อย (BR-6)	41.22 ± 3.09^d
สารมาตรฐานแกมม่า-โอโรซานอล	24.12 ± 1.67^b
สารมาตรฐานเคอร์คูมิน	11.78 ± 1.59^a

หมายเหตุ คำนวณที่ระดับความน่าเชื่อมั่น $\geq 95\%$

จากตารางที่ 5 ซึ่งแสดง 50% Inhibition concentration ของสารสกัดแกมม่า-โอโรซานอล
 พบว่าสารสกัดแกมม่า-โอโรซานอลมี 50% Inhibition concentration อยู่ระหว่าง 23.69 – 41.22
 $\mu\text{g/ml}$ โดยสามารถเรียงลำดับความสามารถในการยับยั้งการสร้างไนตริกออกไซด์จากเซลล์
 mouse macrophage RAW 264.7 จากสูงไปต่ำดังนี้ สารมาตรฐานเคอร์คูมิน (50% Inhibition
 concentration = $11.78 \pm 1.59 \mu\text{g/ml}$) > สารสกัดแกมม่า-โอโรซานอลจากรำข้าวกำปึ้ง (23.69
 $\pm 1.87 \mu\text{g/ml}$) > สารมาตรฐานแกมม่า-โอโรซานอล ($24.12 \pm 1.67 \mu\text{g/ml}$) > สารสกัดแกมม่า-
 โอโรซานอลจากรำข้าวกำต้อ ($24.66 \pm 2.31 \mu\text{g/ml}$) > สารสกัดแกมม่า-โอโรซานอลจากรำข้าว
 แดงจอมทอง ($26.92 \pm 2.23 \mu\text{g/ml}$) > สารสกัดแกมม่า-โอโรซานอลจากรำข้าวแดงดอยหล่อ
 ($34.20 \pm 2.14 \mu\text{g/ml}$) > สารสกัดแกมม่า-โอโรซานอลจากรำข้าวแกงอมก๋อย ($41.22 \pm$
 $3.09 \mu\text{g/ml}$) ตามลำดับ พบว่าค่า 50% Inhibition concentration ของสารมาตรฐานแกมม่า-โอโรซา

นอล สารสกัดแกมมา-ไอโรซานอลจากรำข้าวเก่าบึ่ง รำข้าวเก่าต่อและรำข้าวแดงจอมทองมีค่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความน่าเชื่อมั่น 95% โดยพบว่าสารมาตรฐานเคอร์คูมินออกฤทธิ์ยับยั้งการสร้างไนตริกออกไซด์จากเซลล์ mouse macrophage RAW 264.7 ได้ดีที่สุด มีค่า 50% Inhibition concentration = $11.78 \pm 1.59 \mu\text{g/ml}$ สำหรับข้อมูลการด้านการอักเสบผ่านกลไกการยับยั้งการสร้างไนตริกออกไซด์ของสารสกัดแกมมา-ไอโรซานอลที่สกัดจากรำข้าวเก่าและรำข้าวแดงสายพันธุ์พื้นเมืองจะเป็นประโยชน์ในการศึกษาฤทธิ์ด้านการอักเสบในระดับสูงต่อไป



ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

Copyright© by Chiang Mai University

All rights reserved

บทที่ 5

สรุปผลการทดลอง

จากการศึกษาปริมาณแกมมา-โอโรซานอลจากรำข้าวเก่าเจดีย์โคะ (BR-1) รำข้าวเก่าปิ้ง (BR-2) รำข้าวเก่าต่อ (BR-3) รำข้าวแดงจอมทอง (BR-3) รำข้าวแดงคอยหล่อ (BR-4) และรำข้าวแดงอมก๋อย (BR-6) พบว่าสารสกัดแกมมา-โอโรซานอลที่แยกสกัดจากรำข้าวทั้ง 6 ชนิดมีปริมาณแกมมา-โอโรซานอลอยู่ในช่วงระหว่าง 1.17 – 10.80% โดยสามารถเรียงลำดับปริมาณแกมมา-โอโรซานอลที่พบจากสูงไปต่ำได้ดังนี้ สารสกัดแกมมา-โอโรซานอลจากรำข้าวแดงจอมทอง ($10.80 \pm 0.25\%$) > รำข้าวเก่าปิ้ง ($8.33 \pm 0.13\%$) > รำข้าวเก่าต่อ ($8.20 \pm 0.23\%$) > รำข้าวแดงคอยหล่อ ($6.93 \pm 0.05\%$) > รำข้าวแดงอมก๋อย ($6.25 \pm 0.17\%$) > รำข้าวเก่าเจดีย์โคะ ($1.17 \pm 0.11\%$) จากนั้นจึงคัดเลือกสารสกัดแกมมา-โอโรซานอลที่มีปริมาณแกมมา-โอโรซานอลมากกว่าร้อยละ 5 มาทำ standardization จากนั้นจึงนำสารสกัดแกมมาโอโรซานอลมาทดสอบฤทธิ์ด้านการอักเสบผ่านกลไกการยับยั้งการสร้างไนตริกออกไซด์จากเซลล์ mouse macrophage RAW 264.7 ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS และ IFN- γ เปรียบเทียบสารมาตรฐานแกมมา-โอโรซานอลและสารมาตรฐานเคอร์คูมิน โดยสามารถเรียงลำดับความสามารถในการยับยั้งการสร้างไนตริกออกไซด์จากเซลล์ mouse macrophage RAW 264.7 จากสูงไปต่ำได้ดังนี้ สารมาตรฐานเคอร์คูมิน (50% Inhibition concentration = $11.78 \pm 1.59 \mu\text{g/ml}$) > สารสกัดแกมมา-โอโรซานอลจากรำข้าวเก่าปิ้ง ($23.69 \pm 1.87 \mu\text{g/ml}$) > สารมาตรฐานแกมมา-โอโรซานอล ($24.12 \pm 1.67 \mu\text{g/ml}$) > สารสกัดแกมมา-โอโรซานอลจากรำข้าวเก่าต่อ ($24.66 \pm 2.31 \mu\text{g/ml}$) > สารสกัดแกมมา-โอโรซานอลจากรำข้าวแดงจอมทอง ($26.92 \pm 2.23 \mu\text{g/ml}$) > สารสกัดแกมมา-โอโรซานอลจากรำข้าวแดงคอยหล่อ ($34.20 \pm 2.14 \mu\text{g/ml}$) > สารสกัดแกมมา-โอโรซานอลจากรำข้าวแดงอมก๋อย ($41.22 \pm 3.09 \mu\text{g/ml}$) ตามลำดับ ความเข้มข้นของสารสกัดแกมมา-โอโรซานอล สารมาตรฐานแกมมา-โอโรซานอลและเคอร์คูมินที่ใช้ทดสอบฤทธิ์ด้านการอักเสบไม่แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ mouse macrophage RAW 264.7 จากการวิเคราะห์ทางสถิติพบว่าค่า 50% Inhibition concentration ของสารมาตรฐานแกมมา-โอโรซานอล สารสกัดแกมมา-โอโรซานอลจากรำข้าวเก่าปิ้ง รำข้าวเก่าต่อ และรำข้าวแดงจอมทองมีค่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความน่าเชื่อมั่น 95% สำหรับข้อมูลการยับยั้งการสร้างไนตริกออกไซด์ของสารสกัดแกมมา-โอโรซานอลที่ได้จะใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานสำหรับการศึกษาฤทธิ์ด้านการอักเสบด้วยกลไกอื่นๆ ต่อไป

เอกสารอ้างอิง

1. Boonsit P, Pongpiachan P, Julsrigival S, Karladee D. (2010). Gamma oryzanol content in glutinous purple rice landrace varieties. *Chiang Mai University Journal of Natural Science*. 9(1): 151–157.
2. Burney S, Caulfield JL, Niles JC, Wishnok JS. (1999). The chemistry of DNA damage from nitric oxide and peroxynitrite. *Mutation Research*. 424: 37–49
3. Butsat S and Siriamornpun (2010). Antioxidant capacities and phenolic compounds of the husk, bran and endosperm of Thai rice. *Food Chemistry*. 119(2): 606–613.
4. Chen C and Kong AN. (2004). Dietary Chemopreventive compounds and ARE/EpRE signaling. *Free Radical Biological Medicine*. 36: 1505–1516.
5. Cuzzocrea S, Riley DP, Caputi AP, Salvemini D. (2001). Antioxidant therapy: a new pharmacological approach in shock, inflammation, and ischemia/reperfusion injury. *Pharmacology Review*. 53: 135–159.
6. Daick M and Saska M. (1994). Separation of vitamin E and γ -oryzanol from rice bran oil by normal-phase chromatography. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. 71: 1211–1217.
7. Deschner E, Ruperto J, Wong G, Newmark H. (1991). Quercetin and rutin as inhibitors of azoxymethanol-induced colonic neoplasia. *Carcinogenesis*. 12: 1191–1196.
8. Evershed RP, Spooner N, Prescott MC, Goad LJ. (1988). Isolation and characterization of intact steryl ferulate from seeds. *Journal of Chromatography*. 440: 23–35.
9. Hu C, Zawistowski J, Ling W, Kitts DD. (2003). Black rice (*Oryza sativa* L. indica) pigmented fraction suppresses both reactive oxygen species and nitric oxide in chemical and biological model system. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 51: 5271–5277.
10. Lai P, Li KY, Lu S, Chen HH. (2009). Phytochemicals and antioxidant activities of solvent extracts from *Japonica* rice bran. *Food Chemistry*. 117: 538–544.
11. McCaskill DR and Zhang F. (1999). Use of rice bran oil in foods. *Food Technology*. 53(2): 50–53.
12. Murphy MP. (1999). Nitric oxide and cell death. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1411: 401–414

13. Norton RA. (1995). Quantification of steryl ferulate and *p*-coumarate esters from corn and rice bran. *Lipids*. 30: 269–274.
14. Rogers EJ, Rice SM, Nicolosi RJ, Carpenter DR, McClelland CA, Romanczyk LJ. (1993). Identification and quantification of γ -oryzanol components and simultaneous assessment of tocols in rice bran oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. 70: 301–307.
15. Sayre B and Saunders R. (1990). Rice bran and rice bran oil. *Lipid Technology*. 2: 72–76.
16. Seetharamaiah GS and Prabhakar JV. (1986). Oryzanol content of Indian rice bran and its extraction from soap stock. *Journal of Food Science and Technology*. 23: 270–276.
17. Seitz LM. (1989). Stanol and sterol esters of ferulic and *p*-coumaric acids in wheat, corn, rye, and triticale. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 37: 662–667.
18. Sreejayan and Rao MNA. (1997). Nitric oxide scavenging by curcuminoids. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 49: 105–107.
19. Verschoyle RD, Greaves P, Cai H, Edwards RE, Steward WP, Gescher AJ. (2007). Evaluation of the cancer chemopreventive efficacy of rice bran in genetic mouse models of breast, prostate and intestinal carcinogenesis. *British Journal of Cancer*. 96: 248–254.
20. Yen GC and Lai HH. (2003). Inhibition of reactive nitrogen species effects in vitro and vivo by isoflavones and soy-based food extracts. *Journal of Agricultural and food chemistry*. 51: 7892–7900.
21. Zullaikah S, Melwita E, Ju YH. (2009). Isolation of oryzanol from crude rice bran oil. *Bioresource Technology*. 100: 299–302.