

อนุพันธ์ของออริซานอลในรำข้าวพันธุ์ทุ่งสงและรำข้าวเหนียวดำ



นางสาวรัชนี สมสวัสดิ์

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2549

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ORYZANOL DERIVATIVES IN THUNGSONG RICE BRAN
AND PURPLE GLUTINOUS RICE BRAN

Miss Ratchanee Somsawat



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Biotechnology

Faculty of Science


Chulalongkorn University

Academic Year 2006

Copyright of Chulalongkorn University


หัวข้อวิทยานิพนธ์	อนุพันธ์ของอริซานอลในรำข้าวพันธุ์ทุ่งสงและรำข้าวเหนียวดำ
โดย	นางสาวรัชณี สมสวัสดิ์
สาขาวิชา	เทคโนโลยีชีวภาพ
อาจารย์ที่ปรึกษา	รองศาสตราจารย์ ดร. สมใจ เพ็งปรีชา
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	นายประวิทย์ สันติวัฒนา

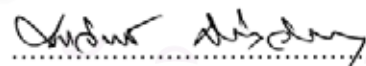
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้หัวข้อวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วน
หนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

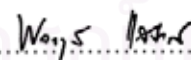

..... คณบดีคณะวิทยาศาสตร์
(ศาสตราจารย์ ดร. เปี่ยมศักดิ์ เมณะเศวต)

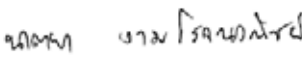
คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์


..... ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. ศิริรัตน์ กักผล)


..... อาจารย์ที่ปรึกษา
(รองศาสตราจารย์ ดร. สมใจ เพ็งปรีชา)


..... อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
(นายประวิทย์ สันติวัฒนา)


..... กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. พลกฤษณ์ แสงวณิช)


..... กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. นาทยา งามโรจนวณิชย์)

รชนี สมสวัสดิ์ : อนุพันธ์ของออริซานอลในรำข้าวพันธุ์ทุ่งสงและรำข้าวเหนียวดำ. (ORYZANOL DERIVATIVES IN THUNGSONG RICE BRAN AND PURPLE GLUTINOUS RICE BRAN)
 อ.ที่ปรึกษา : รศ.ดร. สมใจ เพ็งปรีชา, อ.ที่ปรึกษาร่วม : นายประวิทย์ สันติวัฒนา, 111 หน้า.

ศึกษาเปรียบเทียบอนุพันธ์ของออริซานอลที่สกัดได้จากรำข้าวพันธุ์ทุ่งสง และรำข้าวเหนียวดำที่ปลูกในประเทศไทย โดยนำรำข้าวมาสกัดด้วยเฮกเซน และทำให้ออริซานอลบริสุทธิ์ด้วยเทคนิคซิลิกา คอลัมน์ โครมาโทกราฟี และ HPLC จากนั้นจำแนกและระบุชนิดอนุพันธ์ของออริซานอลโดยใช้เทคนิค IR ¹H-NMR และ MS จากการวิจัยพบอนุพันธ์ของออริซานอล 4 ชนิดในรำข้าวพันธุ์ทุ่งสง และ 5 ชนิดในรำข้าวเหนียวดำ ซึ่ง 24-methylenecycloartanyl ferulate cycloartenyl ferulate และ sitosteryl ferulate เป็นอนุพันธ์ของออริซานอลที่พบในรำข้าวทั้งสองชนิด นอกจากนี้ยังพบ campesteryl ferulate ในรำข้าวพันธุ์ทุ่งสง และ (24R,S)-cycloart-25-ene-3 β ,24-diol-3 β trans-ferulate และ/หรือ cycloart-23Z-ene-3 β ,25-diol-3 β trans-ferulate และ 24-hydroxy-24-methylcycloartanyl trans-ferulate และ/หรือ 25-hydroxy-24-methylcycloartanyl trans-ferulate ในรำข้าวเหนียวดำอีกด้วย จากนั้นนำออริซานอลที่สกัดได้มาศึกษาประสิทธิภาพในการต่อต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant activity) เปรียบเทียบกับแอลฟา-โทโคฟีรอลและออริซานอลมาตรฐาน โดยศึกษาในระบบที่เร่งปฏิกิริยาโดย 2,2'-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH[•]) radical พบว่าออริซานอลที่สกัดได้จากรำข้าวทั้งสองพันธุ์มีประสิทธิภาพในการต่อต้านอนุมูลอิสระ และไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง

สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สาขาวิชา.....เทคโนโลยีชีวภาพ.....ลายมือชื่อนิติ.....
 ปีการศึกษา.....2549.....ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....
 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

4772433723 : MAJOR BIOTECHNOLOGY

KEY WORD: ORYZANOL / RICE BRAN / RICE BRAN OIL / ANTIOXIDANT

RATCHANEE SOMSAWAT : ORYZANOL DERIVATIVES IN THUNGSONG RICE BRAN AND PURPLE GLUTINOUS RICE BRAN. THESIS ADVISOR : ASSOC. PROF. SOMCHAI PENGPRECHA, Ph.D., THESIS COADVISOR : Mr. PRAVIT SANTIWATTANA, 111 pp.

Oryzanol contents of rice bran of Thai rice cultivars, i.e., Thungsong rice bran and purple glutinous rice bran were extracted individually using hexane, and were further purified by silica column chromatographic and high performance liquid chromatographic (HPLC) techniques. IR, ¹H-NMR and MS techniques were used for identification of oryzanol derivatives. 4 derivatives from Thungsong rice bran and 5 derivatives from purple glutinous rice bran were obtained, respectively. 24-methylenecycloartanyl ferulate, cycloartenyl ferulate and sitosteryl ferulate were found commonly in both rice bran. In addition, campesteryl ferulate was found in Thungsong rice bran and (24*R,S*)-cycloart-25-ene-3 β ,24-diol-3 β *trans*-ferulate and/or cycloart-23*Z*-ene-3 β ,25-diol-3 β *trans*-ferulate and 24-hydroxy-24-methylcycloartanyl *trans*-ferulate and/or 25-hydroxy-24-methylcycloartanyl *trans*-ferulate. Antioxidant activities of both extracted oryzanols were also performed, as compared with α -tocopherol and standard oryzanol in 2,2'-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH[•]) radical assay. Oryzanols obtained from both Thai rice cultivars possessed antioxidant activity and were not cytotoxic to cancer cell.

Field of study.....Biotechnology.....Student's signature *Ratchanee Somsawat*.....
 Academic year.....2006.....Advisor's signature *Somchai Pengprecha*.....
 Co-advisor's signature *Pravit Santiwattana*.....

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์เล่มนี้ สำเร็จลุล่วงได้ด้วยภาระเอาใจใส่ดูแล การให้ความช่วยเหลืออย่างดียิ่ง และการให้คำปรึกษาที่ดีตลอดการวิจัย จากอาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ คือ รองศาสตราจารย์ ดร.สมใจ เพ็งปรีชา และอาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม คือ คุณประวิทย์ สันติวัฒนา (กรรมการผู้จัดการ บริษัท น้ำมันบริโภคไทย จำกัด) นอกจากนี้ยังขออวยพรมาต่อมาตรฐานที่ใช้ในการวิจัยด้วย ผู้วิจัยจึงกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงมา ณ โอกาสนี้ด้วย

ขอบคุณประธานและคณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ทุกท่าน ที่ได้ให้คำแนะนำ และข้อคิดเห็นต่างๆ รวมถึงที่ได้สละเวลาช่วยเหลือในการสอบวิทยานิพนธ์และแก้ไขวิทยานิพนธ์ครั้งนี้ด้วย

ขอบคุณรองศาสตราจารย์ ดร.พลกฤษณ์ แสงวงษ์ ที่ให้ความช่วยเหลือและคำแนะนำในการวิเคราะห์ทางเทคนิคแมสสเปกโทรเมตรี

ขอบคุณครอบครัวปานประยูร (ณ จ.นครศรีธรรมราช) และครอบครัวจันทร์สุรีย์ (ณ จ.น่าน) ที่เอื้อเฟื้อรื้อข้าวพันธุ์ทุ่งสงและข้าวเหนียวดำในการวิจัยครั้งนี้

ขอบคุณ ดร. อัครวิทย์ กาญจนโอภาส และนายธีรศักดิ์ อนันตพงศ์ ภาควิชา เทคโนโลยีชีวภาพอุตสาหกรรม คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่ ที่ให้ความอนุเคราะห์ในการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง

ขอบคุณเจ้าหน้าที่ พี่ๆ เพื่อนๆ และน้องๆ ทุกคนในหลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และสมาชิกทุกคนในหน่วยวิจัยไบโอออร์แกนิกส์เคมี (RCBC) โดยเฉพาะคุณสุนิษา สุวรรณเจริญ คุณจำเรียง ธรรมธร คุณพัฒนภรณ์ ผลพิบูลย์ คุณเบญจพร เทียนสงค์ และคุณจิรพรรณ เจริญสินวรกุล ที่ให้ความช่วยเหลือในการทำวิจัย เป็นที่ปรึกษาและให้กำลังใจที่ดีเยี่ยมตลอดมา

ท้ายสุดนี้กราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูง สำหรับครอบครัว "สมสวัสดิ์" คือ คุณพ่อคุณแม่ และน้องๆ ที่คอยให้ความช่วยเหลือทั้งด้านกำลังใจ กำลังใจ และกำลังทรัพย์ จนทำให้วิทยานิพนธ์เล่มนี้สำเร็จสมบูรณ์ และคุณค่าจากวิทยานิพนธ์เล่มนี้ ผู้วิจัยขอมอบแด่ครอบครัวตลอดจนครูบาอาจารย์ทุกท่านที่เคยอบรมสั่งสอนผู้วิจัย หากมีข้อบกพร่องใดๆ ผู้วิจัยขอน้อมรับแต่เพียงผู้เดียว

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อวิทยานิพนธ์ภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อวิทยานิพนธ์ภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ญ
สารบัญรูป.....	ฎ
สารบัญแผนผัง.....	ฏ
สารบัญคำย่อ.....	ต
บทที่ 1 บทนำ.....	1
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	4
2.1 ข้าว.....	4
2.2 ไร่ข้าวและน้ำมันไร่ข้าว.....	6
2.3 ออริซานอล.....	8
2.4 ลักษณะทางชีววิทยาของออริซานอล.....	9
2.5 การพัฒนาการวิเคราะห์ออริซานอล.....	13
2.6 อิทธิพลของกระบวนการผลิตน้ำมันไร่ข้าวต่อออริซานอล.....	14
2.7 การศึกษาด้านพิษวิทยาและการก่อให้เกิดมะเร็งของออริซานอล.....	19
2.8 การศึกษาด้านเภสัชวิทยาของออริซานอล.....	22
2.9 ศักยภาพในการทำหน้าที่ของออริซานอลต่อสุขภาพของมนุษย์.....	24
2.9.1 ฤทธิ์ในการต่อต้านออกซิเดชัน.....	24
2.9.2 ความสามารถในการลดคอเลสเตอรอลในเลือดที่มีมากผิดปกติ.....	28
2.9.3 สมบัติอื่นๆ ที่มีผลต่อสุขภาพของมนุษย์.....	31
2.10 การประยุกต์ใช้ออริซานอล.....	33
บทที่ 3 วิธีการดำเนินการวิจัย.....	34
3.1 เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย.....	34
3.1.1 Fourier Transform Infrared Spectrophotometer (FT-IR).....	34
3.1.2 Nuclear Magnetic Resonance Spectrometer (NMR).....	34
3.1.3 Ultraviolet-Visible (UV-Vis) Spectrophotometer.....	34

3.1.4 Rotary Vacuum Evaporator.....	34
3.1.5 เครื่องเขย่า (Shaker).....	35
3.1.6 High Performance Liquid Chromatography (HPLC).....	35
3.1.7 Microplate Reader Spectrophotometer.....	35
3.1.8 Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometer (MALDI-TOF).....	35
3.2 สารเคมี.....	36
3.2.1 ตัวทำละลายอินทรีย์.....	36
3.2.2 สารเคมีอื่นๆ.....	36
3.3 ตัวอย่าง.....	36
3.4 การสกัดน้ำมันดิบรำข้าว.....	37
3.5 การประมาณปริมาณออริซานอล.....	37
3.6 การทำให้ออริซานอลบริสุทธิ์.....	37
3.6.1 การแยกออริซานอลในน้ำมันดิบรำข้าวพันธุ์ทุ่งสง.....	39
3.6.1.1 การแยกออริซานอลผสม TS1.....	39
3.6.2 การแยกออริซานอลในน้ำมันดิบรำข้าวเหนียวดำ.....	39
3.6.2.1 การแยกออริซานอลผสม PG1.....	43
3.7 การจำแนกและการระบุชนิดอนุพันธ์ของออริซานอล.....	43
3.8 การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของออริซานอล.....	43
3.8.1 การทดสอบฤทธิ์ในการต่อต้านออกซิเดชันของออริซานอลต่อ DPPH [•] radical.....	43
3.8.2 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง.....	47
บทที่ 4 ผลการวิเคราะห์ข้อมูลและอภิปรายผล.....	49
4.1 การสกัดน้ำมันดิบรำข้าว.....	49
4.2 การประมาณปริมาณออริซานอล.....	49
4.3 การจำแนกและการระบุชนิดอนุพันธ์ของออริซานอล.....	50
4.3.1 การจำแนกและการระบุชนิดอนุพันธ์ของออริซานอลจากรำข้าวพันธุ์ทุ่งสง.....	50

4.3.1.1 การจำแนกและการระบุชนิดอนุพันธ์ของ ออริซานอลผสม TS1.....	50
4.3.2 การจำแนกและการระบุชนิดอนุพันธ์ของออริซานอลจาก จำข้าวเหนียวดำ.....	57
4.3.2.1 การจำแนกและการระบุชนิดอนุพันธ์ของ ออริซานอลผสม PG1.....	57
4.3.3 การจำแนกและการระบุชนิดอนุพันธ์ของออริซานอลมาตรฐาน.....	63
4.4 การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของออริซานอล.....	69
4.4.1 การทดสอบฤทธิ์ในการต่อต้านออกซิเดชันของออริซานอลผสม ต่อ DPPH [•] radical.....	69
4.4.2 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง.....	70
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ.....	72
รายการอ้างอิง.....	73
ภาคผนวก.....	83
ภาคผนวก ก.....	84
ภาคผนวก ข.....	108
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....	111

สารบัญตาราง

ตาราง	หน้า
2.1 องค์ประกอบของน้ำมันดิบรำข้าว.....	7
2.2 องค์ประกอบของกลุ่มสารที่ระเหยไม่ไฟไม่ได้.....	8
2.3 โครงสร้างทางเคมีของอนุพันธ์ออริซานอลในรำข้าวที่มีการรายงานมาแล้ว.....	16
3.1 ลักษณะของลำดับส่วนต่างๆ ที่แยกได้จากน้ำมันดิบรำข้าวพันธุ์ทุ่งสง.....	42
3.2 ลักษณะของลำดับส่วนต่างๆ ที่แยกได้จากน้ำมันดิบรำข้าวเหนียวดำ.....	46
4.1 ปริมาณน้ำมันดิบรำข้าวในรำข้าวพันธุ์ทุ่งสงและรำข้าวเหนียวดำ.....	49
4.2 การประมาณปริมาณออริซานอลในรำข้าวพันธุ์ทุ่งสงและรำข้าวเหนียวดำ.....	50
4.3 IR absorption band ที่แสดงชนิดการสั่นของออริซานอลผสม TS1.....	51
4.4 ¹ H-NMR สเปกตรัมของ 24-methylenecycloartanyl ferulate ใน CDCl ₃ จากออริซานอลผสม TS1 และงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	52
4.5 ¹ H-NMR สเปกตรัมของ cycloartenyl ferulate ใน CDCl ₃ จากออริซานอลผสม TS1 และงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	53
4.6 ¹ H-NMR สเปกตรัมของ sitosteryl ferulate ใน CDCl ₃ จากออริซานอลผสม TS1 และงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	54
4.7 ¹ H-NMR สเปกตรัมของ campesteryl ferulate ใน CDCl ₃ จากออริซานอลผสม TS1 และงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	55
4.8 IR absorption band ที่แสดงชนิดการสั่นของออริซานอลผสม PG1.....	58
4.9 ¹ H-NMR สเปกตรัมของ 24-methylenecycloartanyl ferulate ใน CDCl ₃ จากออริซานอลผสม PG1 และงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	59
4.10 ¹ H-NMR สเปกตรัมของ cycloartenyl ferulate ใน CDCl ₃ จากออริซานอลผสม PG1 และงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	60
4.11 ¹ H-NMR สเปกตรัมของ sitosteryl ferulate ใน CDCl ₃ จากออริซานอลผสม PG1 และงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	61
4.12 IR absorption band ที่แสดงชนิดการสั่นของออริซานอลมาตรฐาน.....	64
4.13 ¹ H-NMR สเปกตรัมของ 24-methylenecycloartanyl ferulate ใน CDCl ₃ จากออริซานอลมาตรฐาน และงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	65
4.14 ¹ H-NMR สเปกตรัมของ cycloartenyl ferulate ใน CDCl ₃ จากออริซานอลมาตรฐาน และงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	66

4.15 $^1\text{H-NMR}$ สเปกตรัมของ sitosteryl ferulate ใน CDCl_3 จากออริซานอลมาตรฐาน และงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	67
4.16 $^1\text{H-NMR}$ สเปกตรัมของ campesteryl ferulate ใน CDCl_3 จากออริซานอลมาตรฐาน และงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	68
4.17 ประสิทธิภาพในการต่อต้านออกซิเดชันของออริซานอลผสมเปรียบ เทียบกับแอลฟา-โทโคฟีรอล.....	70
4.18 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งของออริซานอลผสม.....	71
1ก ตำแหน่ง proton ใน $^1\text{H-NMR}$ สเปกตรัมของ 24-methylenecycloartanyl ferulate cycloartenyl ferulate sitosteryl ferulate และ campesteryl ferulate ใน CDCl_3 จากออริซานอลผสม TS1 และงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	93
2ก ตำแหน่ง proton ใน $^1\text{H-NMR}$ สเปกตรัมของ 24-methylenecycloartanyl ferulate cycloartenyl ferulate และ sitosteryl ferulate ใน CDCl_3 จาก ออริซานอลผสม PG1 และงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	102

สารบัญรูป

รูปประกอบ	หน้า
2.1 ลักษณะของข้าวชนิดต่างๆ.....	5
2.2 โครงสร้างของเมล็ดข้าว.....	7
2.3 วิธีที่สังเคราะห์หรืออย่างย่อของเทอร์พีนอยด์ในพืช.....	10
2.4 โครงสร้างทางเคมีของ sterol with carbon numbering อนุพันธ์ของอริซานอล และคอเลสเตอรอล.....	11
2.5 วิธีกลไกการสร้างกรดเฟอรูลิกในพืช.....	12
2.6 HPLC โคโรมาโทแกรมของอริซานอล.....	15
2.7 โครงสร้างทางเคมีของกรดเฟอรูลิก และ urinary metabolites ของมัน.....	23
2.8 ความเสถียรของเรโซแนนซ์ของอนุมูลกรดเฟอรูลิก.....	27
2.9 กลไกการแข่งขันในการละลายระหว่างไฟโตสเตอรอลและคอเลสเตอรอล.....	31
4.1 โครงสร้างของอนุพันธ์อริซานอลจากรำข้าวพันธุ์ทุ่งสง.....	56
4.2 โครงสร้างของอนุพันธ์อริซานอลจากรำข้าวเหนียวดำ.....	62
1ก TLC pattern ของอริซานอลมาตรฐาน และอริซานอลผสม TS1.....	87
2ก TLC pattern ของอริซานอลมาตรฐาน และอริซานอลผสม PG1.....	87
3ก ยูวี โคโรมาโทแกรมของอริซานอลผสม TS1.....	88
4ก ยูวี โคโรมาโทแกรมของอริซานอลผสม TS1 และอริซานอลมาตรฐาน.....	88
5ก IR สเปกตรัมของอริซานอลผสม TS1.....	89
6ก IR สเปกตรัมของอริซานอลผสม TS1 และอริซานอลมาตรฐาน.....	90
7ก ¹ H-NMR สเปกตรัมของอริซานอลผสม TS1.....	91
8ก ¹ H-NMR สเปกตรัมของอริซานอลผสม TS1 และอริซานอลมาตรฐาน.....	92
9ก MS สเปกตรัมของอริซานอลผสม TS1.....	94
10ก MS สเปกตรัมของอริซานอลผสม TS1 และอริซานอลมาตรฐาน.....	94
11ก ยูวี โคโรมาโทแกรมของอริซานอลผสม PG1.....	95
12ก ยูวี โคโรมาโทแกรมของอริซานอลผสม PG1 และอริซานอลมาตรฐาน.....	95
13ก HPLC โคโรมาโทแกรมของอริซานอลผสม PG1.....	96
14ก HPLC โคโรมาโทแกรมของอริซานอลผสม PG1 และอริซานอลมาตรฐาน.....	97
15ก IR สเปกตรัมของอริซานอลผสม PG1.....	98
16ก IR สเปกตรัมของอริซานอลผสม PG1 และอริซานอลมาตรฐาน.....	99

รูปประกอบ	หน้า
17ก ¹ H-NMR สเปกตรัมของออร์ซิซานอลผสม PG1.....	100
18ก ¹ H-NMR สเปกตรัมของออร์ซิซานอลผสม PG1 และออร์ซิซานอลมาตรฐาน.....	101
19ก MS สเปกตรัมของออร์ซิซานอลผสม PG1.....	103
20ก MS สเปกตรัมของออร์ซิซานอลผสม PG1 และออร์ซิซานอลมาตรฐาน.....	103
21ก ยูวี โคโรมาโทแกรมของออร์ซิซานอลมาตรฐาน.....	104
22ก MS สเปกตรัมของออร์ซิซานอลมาตรฐาน.....	104
23ก HPLC โคโรมาโทแกรมของออร์ซิซานอลมาตรฐาน.....	105
24ก IR สเปกตรัมของออร์ซิซานอลมาตรฐาน.....	106
25ก ¹ H-NMR สเปกตรัมของออร์ซิซานอลมาตรฐาน.....	107
1ข ทฤษฎีในการต่อต้านออกซิเดชันของออร์ซิซานอลผสม TS1.....	109
2ข ทฤษฎีในการต่อต้านออกซิเดชันของออร์ซิซานอลผสม PG1.....	109
3ข ทฤษฎีในการต่อต้านออกซิเดชันของออร์ซิซานอลมาตรฐาน.....	110
4ข ทฤษฎีในการต่อต้านออกซิเดชันของแอลฟา-โทโคฟีรอล.....	110

สารบัญแนผนผัง

แผนผัง	หน้า
2.1 ระเบบวณการผลิผนน้ำมันรำข้าว.....	20
3.1 การสกดน้ำมันดิบรำข้าว.....	38
3.2 การสกดน้ำมันดิบรำข้าวพันธุทุ่งสง.....	40
3.3 วิธีิการแยกอริซานอลในน้ำมันดิบรำข้าวพันธุทุ่งสง.....	41
3.4 การสกดน้ำมันดิบรำข้าวเหนียวดำ.....	44
3.5 วิธีิการแยกอริซานอลในน้ำมันดิบรำข้าวเหนียวดำ.....	45
3.6 การทดสอบฤทธิิในการต่อต้านออกซิเดชันของอริซานอลผสม ต่อ DPPH [•] radical.....	48

สถาบันวิทยบรึการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญคำย่อ

คำย่อ

กก.	กิโลกรัม
ซม.	เซนติเมตร
ตร.ซม.	ตารางเซนติเมตร
มก.	มิลลิกรัม
มม.	มิลลิเมตร
มล.	มิลลิลิตร
AAPH	2,2'-azobis(2-methylpropionamide)dihydrochloride
br s	broad singlet (NMR สเปกตรัม)
br t	broad triplet (NMR สเปกตรัม)
°C	องศาเซลเซียส
CDCl ₃	ดิวเทอเวียเท็ด คลอโรฟอร์ม
¹³ C-NMR	คาร์บอน-13 นิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์
COSY	¹ H-H correlation spectroscopy
d	doublet (NMR สเปกตรัม)
dd	doublet of doublet (NMR สเปกตรัม)
δ	ค่า chemical shift
DMBA	7,12-dimethylbenz[a]anthracene
DPPH [•]	2,2'-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical
ε	molar absorptivity
HDL-C	high density lipoprotein cholesterol (คอเลสเตอรอลที่ดี)
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation
¹ H-NMR	โปรตอนนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์
HPLC	high performance liquid chromatography
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Coherence
Hz	เฮิรทซ์
IC ₅₀	ความเข้มข้นที่สามารถยับยั้งได้ร้อยละ 50
IR	อินฟราเรด สเปกโทรสโกปี
J	ค่า coupling constant (NMR สเปกตรัม)

คำย่อ

λ_{max}	ความยาวคลื่นที่ดูดกลืนแสงสูงสุด
LDL-C	low density lipoprotein cholesterol (คอเลสเตอรอลที่ไม่ดี)
m	multiple (NMR สเปกตรัม)
MHz	เมกะเฮิรตซ์
MS	แมสสเปกโตรเมตรี
MW	มวลโมเลกุล
NMR	นิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์
$[M+H]^+$	protonated molecular ion
ppm	หนึ่งในล้านส่วน
q	quartet (NMR สเปกตรัม)
s	singlet (NMR สเปกตรัม)
t	triplet (NMR สเปกตรัม)
TLC	thin layer chromatography (โครมาโทกราฟีแบบบาง)
TPA	12- <i>O</i> -tetradecanoylphorbol-13-acetate
UV	อัลตราไวโอเล็ต
VHDL-C	very high density lipoprotein cholesterol
Vis	วิสิเบิล
VLDL-C	very low density lipoprotein cholesterol

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 1

บทนำ

ข้าวเป็นสินค้าหลักของประเทศไทยในการส่งออกมายาวนาน เนื่องจากประเทศไทยอยู่ในเขตมรสุมเหมาะสำหรับการปลูกข้าว ประเทศไทยมีผืนนาทั่วประเทศ 60 ล้านไร่ จะผันแปรไปบ้างตามการเกิดภัยธรรมชาติ สามารถผลิตได้ทั้งข้าวไร่ ข้าวนาลุ่ม ข้าวนาดอน และมีข้าวพันธุ์ดีมากมายหลายชนิด โดยเฉพาะข้าวหอมมะลิซึ่งมีคุณภาพและสามารถปลูกได้เฉพาะในพื้นที่ประเทศไทยเท่านั้น และได้รับการยอมรับความนิยมบริโภคมากมาย ทั้งภายในประเทศและต่างประเทศ จากภาวะการผลิตข้าว ประเทศไทยปลูกข้าวมากที่สุด 10 อันดับแรก คือ จีน อินเดีย อินโดนีเซีย บังคลาเทศ เวียดนาม ไทย พม่า ญีปุ่น บราซิล และฟิลิปปินส์ ซึ่งประเทศไทยเป็นผู้ส่งออกข้าวอันดับ 1 ของโลก รองลงมาคือ เวียดนาม ปากีสถานและสหรัฐอเมริกา ตามลำดับ โดยในปี พ.ศ. 2548/49 มีปริมาณผลผลิตข้าวรวม 17.9 ล้านตันข้าวสาร หรือประมาณร้อยละ 30 ของผลผลิตข้าวโลก

รำข้าว เป็นผลพลอยได้จากการสีข้าว ประกอบด้วยส่วนของเยื่อหุ้มผล เปลือกหุ้มเมล็ด นิวเซลลูล์ และชั้นแอสลิวโรน ซึ่งในรำข้าวมีน้ำมันอยู่ประมาณร้อยละ 15-20 โปรตีนร้อยละ 12-16 คาร์โบไฮเดรตร้อยละ 34-52 เส้นใยหยาบร้อยละ 7-11 และเถ้าร้อยละ 7-10 โดยในแต่ละปีประเทศไทยมีผลพลอยได้เป็นรำข้าวประมาณร้อยละ 40 จะถูกนำไปสกัดน้ำมันเพื่อใช้เป็นน้ำมันเพื่อบริโภค ส่วนใหญ่จะถูกส่งออกในรูปของน้ำมันดิบ ซึ่งองค์ประกอบของน้ำมันดิบรำข้าว แบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่ๆ คือ กลุ่มสารที่สะพอนิไฟได้ (saponifiable) ประมาณร้อยละ 90-96 (ไตรกลีเซอไรด์ร้อยละ 83-86 ไดกลีเซอไรด์ร้อยละ 3-4 โมโนกลีเซอไรด์ร้อยละ 6-7 กรดไขมันอิสระร้อยละ 2-4 ไชร้อยละ 3-4 โกลโคลิพิดีร้อยละ 6-7 และฟอสโฟลิพิดีร้อยละ 4-5) และกลุ่มสารที่สะพอนิไฟไม่ได้ (unsaponifiable) และพบว่าสารกลุ่มที่สะพอนิไฟไม่ได้มีปริมาณสูงกว่าน้ำมันอื่นๆ อีกทั้งมีสารที่มีประโยชน์ต่อสุขภาพ เช่น วิตามินต่างๆ (เช่น วิตามินเอ และอี เป็นต้น) แร่ธาตุต่างๆ (เช่น แคลเซียม แมกนีเซียม เหล็ก ฟอสฟอรัส และโพแทสเซียม เป็นต้น) และออริซานอล เป็นต้น โดยเฉพาะออริซานอล พบในน้ำมันรำข้าวเท่านั้น ประมาณร้อยละ 1.1-2.6

ออริซานอล เป็นสารประกอบจำพวกเอสเทอร์ที่เกิดขึ้นเองตามธรรมชาติ ที่ประกอบด้วย โครงสร้างหลักสองส่วน คือ ส่วนของกรดเฟอรูลิก และส่วนของสเตอรอลพีชหรือไตรเทอร์พีน แอลกอฮอล์ ออริซานอลมีสมบัติในการลดระดับคอเลสเตอรอลในกระแสเลือด เป็นสารต้านอนุมูลอิสระ เป็นวัตถุกันเสียธรรมชาติที่นิยมใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร เป็นสารกันแดดในเครื่องสำอาง เพิ่มระดับฮอร์โมนเทสโทสเตอโรน ช่วยเพิ่มความแข็งแรงและสร้างกล้ามเนื้อ กระตุ้นการหลั่งฮอร์โมนแอนโดรฟิน ช่วยรักษาอาการผิดปกติของระบบประสาทและหญิงวัยหมดประจำเดือน นอกจากนี้ยังช่วยยับยั้งอาการอักเสบและยับยั้งการเกิดเนื้องอก ทั้งนี้ออริซานอลไม่ก่อให้เกิดความผิดปกติของยีน ไม่เป็นสารก่อมะเร็ง ไม่เป็นพิษหรือมีผลข้างเคียงในมนุษย์และสัตว์ จึงทำให้มีผู้สนใจศึกษาออริซานอลอย่างต่อเนื่องทั้งทางด้านเคมีและชีวภาพ อย่างไรก็ตาม การสกัด การทำให้บริสุทธิ์ และการวิเคราะห์อนุพันธ์ของออริซานอลยังมีปัญหาอยู่เนื่องจากเทคนิคที่ต่างกันอาจทำให้การวิเคราะห์อนุพันธ์ของออริซานอลต่างกัน ซึ่งวิธีการแยกอนุพันธ์ของออริซานอลส่วนใหญ่ประกอบด้วยขั้นตอนหลักๆ คือ การสกัดออริซานอลจากแหล่งธรรมชาติ การทำให้บริสุทธิ์โดยใช้เทคนิคทางโครมาโทกราฟี และการวิเคราะห์และระบุชนิดของอนุพันธ์ของออริซานอลโดยใช้เทคนิคทางโครมาโทกราฟีร่วมกับเทคนิคทางสเปกโทรสโกปี นอกจากนี้ยังมีส่วนใหญ่ที่ใช้ในการวิจัยเป็นรำข้าวผสมที่มาจากหลายสายพันธุ์ ทำให้มีความแตกต่างทั้งในเชิงปริมาณและคุณภาพ และในแต่ละสายพันธุ์ข้าวก็มีความแตกต่างทั้งปริมาณและชนิดอนุพันธ์ของออริซานอลตามแหล่งเพาะปลูกอีกด้วย

ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงสนใจศึกษาออริซานอลที่มีอยู่ในรำข้าวพันธุ์ทุ่งสงและรำข้าวเหนียวดำ เนื่องจากข้าวพันธุ์ทุ่งสงเป็นข้าวพันธุ์พื้นเมืองแถบภาคใต้ของประเทศไทย นิยมปลูกมากแถบจังหวัดสุราษฎร์ธานี นครศรีธรรมราช และพัทลุง และรำข้าวที่นำมาใช้ในงานวิจัยและป้อนเข้าโรงงานผลิตน้ำมันรำข้าวในประเทศไทยส่วนใหญ่เป็นรำข้าวแถบภาคกลาง ภาคเหนือ และภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ส่วนรำข้าวแถบภาคใต้ส่วนใหญ่แล้วจะนำไปใช้ประโยชน์ในด้านเกษตรกรรม เช่น เลี้ยงสัตว์ เพาะเห็ด เป็นต้น ส่วนข้าวเหนียวดำ มีรายงานการวิจัยในประเทศไทยว่ามีปริมาณออริซานอลอยู่มาก ซึ่งทั้งสองพันธุ์ข้าวยังไม่มีรายงานการพิสูจน์เอกลักษณ์อนุพันธ์ออริซานอลด้วยเหตุผลดังกล่าว จึงสนใจศึกษาออริซานอลในรำข้าวพันธุ์ทุ่งสงและรำข้าวเหนียวดำ เพื่อเปรียบเทียบทั้งในเชิงปริมาณและคุณภาพ ซึ่งการศึกษานี้อาจจะพบออริซานอลชนิดใหม่ที่มีคุณสมบัติที่ดีกว่าทั้งในเชิงปริมาณและคุณภาพ ทำให้คุ้มค่าในการพัฒนาต่อไป

1.1 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

- 1.1.1 สามารถสกัดออริซานอลจากรำข้าวพันธุ์ทุ่งสงและรำข้าวเหนียวดำได้
- 1.1.2 จำแนกและวิเคราะห์สูตรโครงสร้างอนุพันธ์แต่ละชนิดของออริซานอลโดยใช้เทคนิคทางโครมาโทกราฟีและสเปกโทรสโกปีได้
- 1.1.3 ทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของออริซานอลที่แยกได้

1.2 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

จำแนกและระบุชนิดของอนุพันธ์ของออริซานอลที่พบในรำข้าวพันธุ์ทุ่งสงและรำข้าวเหนียวดำได้



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ข้าว

ข้าว หมายถึง เมล็ดของพืชพวกหญ้าในวงศ์ Gramineae ตระกูล *Oryza* ใช้เป็นอาหาร ลำต้นเป็นไม้เนื้ออ่อน เป็นพืชล้มลุกที่มีอายุเพียงหนึ่งปี (annual grass) มีใบเป็นชนิดใบเลี้ยงเดี่ยว (Monocotyledon) มีรากเป็นระบบรากฝอย (Fibrous root system) สามารถเจริญเติบโตได้ใน ลักษณะภูมิประเทศและภูมิอากาศที่แตกต่างกันทั้งในเขตร้อนและเขตอบอุ่น ตั้งแต่พื้นที่น้ำท่วมสูง ไปจนถึงพื้นที่สูงตามไหล่เขา ทำให้เกิดความหลากหลายของข้าวชนิดต่างๆ ที่แพร่กระจายไปทั่วโลกอย่างน้อย 23 ชนิด ซึ่งมีเพียง 2 ชนิดที่มนุษย์ปลูกเพื่อบริโภค คือ ข้าวเอเชีย (*Oryza sativa* Linn) และข้าวแอฟริกา (*Oryza glaberrima* Steud) นอกเหนือจากข้าวปลูก 2 ชนิดนี้แล้ว ที่เหลือ 21 ชนิด จัดอยู่ในข้าวป่า (wild rice)

ข้าวที่ปลูกเพื่อบริโภค สามารถแบ่งออกได้เป็นชนิดต่างๆ ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับสิ่งที่ใช้เป็น มาตรการสำหรับการแบ่งแยกข้าว

2.1.1 แบ่งตามสภาพภูมิอากาศและสายพันธุ์ข้าว

2.1.1.1 กลุ่มข้าวอินดิกา (*Indica*) ได้แก่ ข้าวเมล็ดยาวหรือยาวปานกลาง ปลูกทั่วไปบริเวณเขตร้อน เช่น ไทย อินเดีย ฟิลิปปินส์ เวียดนาม ลาว และมาเลเซีย เป็นต้น

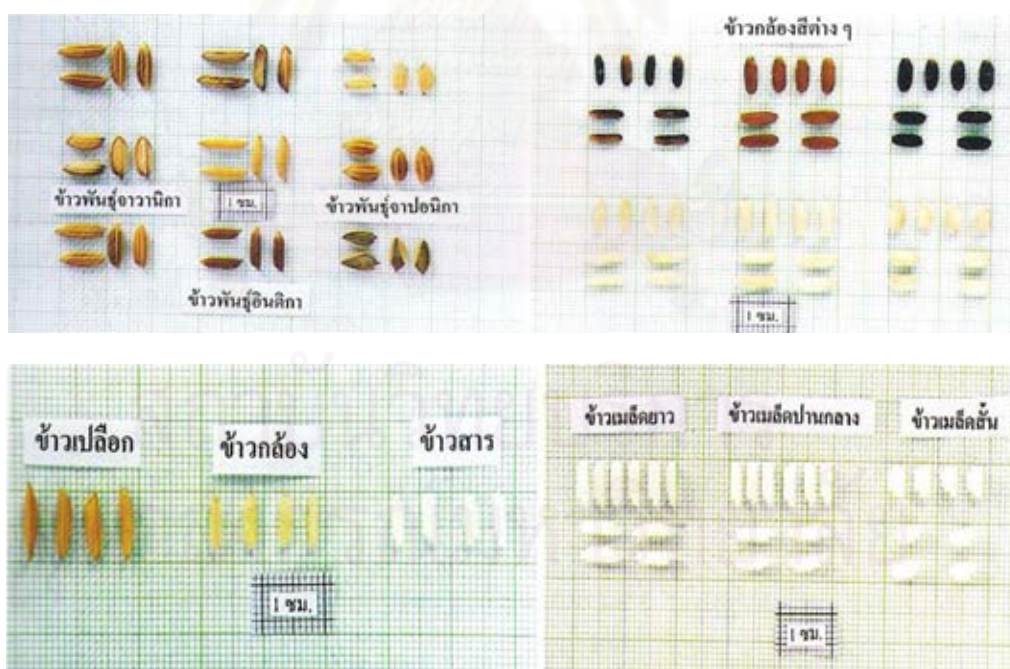
2.1.1.2 กลุ่มข้าวจาปอนิกา (*Japonica*) ได้แก่ ข้าวเมล็ดสั้น ปลูกทั่วไปบริเวณ เขตกึ่งร้อน เขตอบอุ่น และเขตที่มีอากาศเย็น เช่น ญี่ปุ่น เกาหลี และจีน เป็นต้น

2.1.1.3 กลุ่มข้าวจาวานิกา (*Javanica*) ได้แก่ ข้าวที่มีลักษณะอยู่ระหว่างข้าว อินดิกาและจาปอนิกา เมล็ดค่อนข้างสั้นป้อม ปลูกทั่วไปบริเวณเส้นศูนย์สูตร เช่น อินโดนีเซีย เป็นต้น

2.1.2 แบ่งตามลักษณะเนื้อสัมผัสของข้าวเมื่อหุงสุก

2.1.2.1 ข้าวเหนียว มีลักษณะเนื้อของเมล็ดข้าวสีขุ่น เมื่อนำมานึ่งให้สุก ข้าวสุกจะจับตัวกันติดแน่น เหนียวติดมือจึงเรียกว่า ข้าวเหนียว เนื่องจากองค์ประกอบทางเคมีของเนื้อเมล็ดข้าว ซึ่งส่วนใหญ่เป็นคาร์โบไฮเดรตประเภทสตาร์ช (starch) ประกอบด้วยแอมิโลเพกทิน (amylopectin) เกือบทั้งหมด (ร้อยละ 99-100) ที่ให้ลักษณะเหนียวแก่ข้าวเหนียว

2.1.2.2 ข้าวเจ้า มีลักษณะเนื้อของเมล็ดข้าวสีขาวใส เมื่อบึ่งหรือหุงจนสุก ข้าวสุกจะไม่เกาะติดกันจะร่วน สีขาวขุ่น เนื่องจากองค์ประกอบทางเคมีของเนื้อเมล็ดข้าวที่เป็นคาร์โบไฮเดรตประเภทสตาร์ช ซึ่งประกอบด้วยแอมิโลเพกทินและแอมิโลส (amylase) เมื่อรวมกันแล้วคิดเป็นร้อยละที่แตกต่างกัน จะให้ลักษณะเนื้อข้าวสุก มีความร่วน แข็งหรือนุ่มต่างกัน โดยถ้ามีปริมาณแอมิโลสต่ำ (เช่น ร้อยละ 7-10) ข้าวสุกจะนุ่ม มีความเหนียว แต่ถ้ามีปริมาณแอมิโลสสูง (เช่น ร้อยละ 30) ก็จะมีมีความร่วน และแข็งเพิ่มขึ้น (อรอนงค์ นัยวิกุล, 2547)

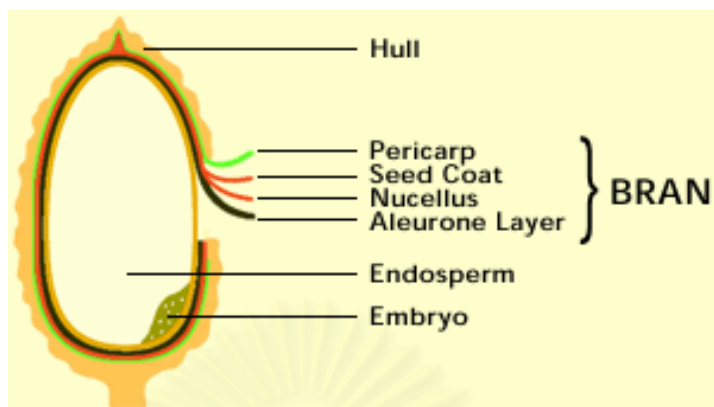


รูปที่ 2.1 ลักษณะข้าวชนิดต่างๆ (อรอนงค์ นัยวิกุล, 2547)

2.2 รำข้าวและน้ำมันรำข้าว

รำข้าว หมายถึง ผลพลอยได้จากการสีข้าว การผลิตน้ำมันรำข้าวเกิดขึ้นครั้งแรกเมื่อ 50 ปีก่อน และมีการใช้อยู่จนถึงปัจจุบันในประเทศแถบเอเชีย เช่น ญี่ปุ่น เกาหลี จีน ไต้หวัน ไทย และปากีสถาน (Kahlon และคณะ, 1992) ซึ่งในแต่ละปีโลกผลิตน้ำมันรำข้าวได้ประมาณน้อยกว่า 800,000 เมตริกตัน หรือเพียงร้อยละ 1 ของน้ำมันพืชทั้งหมด (McCaskill และ Zhang, 1999) ทั้งนี้ น้ำมันรำข้าวเป็นน้ำมันที่มีคุณภาพดีเทียบเท่ากับน้ำมันถั่วเหลือง

ข้าวเปลือก ประกอบด้วยโครงสร้างต่างๆ คือ เปลือกข้าว (hull) ร้อยละ 20 เนื้อเยื่อที่สะสมอาหาร (endosperm) ร้อยละ 72 รำ (bran) ร้อยละ 6 และเมล็ด (germ) ร้อยละ 2 (Juliano และ Bechtel, 1985; Lu และ Luh, 1991) (รูปที่ 2.2) ซึ่งรำข้าวประกอบด้วยส่วนเยื่อหุ้มผล (pericarp) เปลือกหุ้มเมล็ด (seed coat) นิวเซลลัส (nucellus) และชั้นแอลิวโรน (aleurone layer) ในรำข้าวมีน้ำมันอยู่ประมาณร้อยละ 15-20 โปรตีนร้อยละ 12-16 คาร์โบไฮเดรตร้อยละ 34-52 เส้นใยหยาบร้อยละ 7-11 และเถ้าร้อยละ 7-10 (McCaskill และ Zhang, 1999) ในแต่ละปีประเทศไทยมีผลพลอยได้เป็นรำข้าวประมาณร้อยละ 40 จะถูกนำไปสกัดน้ำมันเพื่อบริโภค โดยส่วนใหญ่แล้วจะถูกส่งออกในรูปของน้ำมันรำดิบ มีส่วนน้อยที่นำมาทำให้บริสุทธิ์ ซึ่งองค์ประกอบของน้ำมันรำดิบรำข้าว (ตารางที่ 2.1) แบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่ๆ คือ กลุ่มสารที่สะพอนนิไฟได้ (saponifiable) ประมาณร้อยละ 90-96 ประกอบด้วยกรดไขมันที่มีประโยชน์ต่อร่างกาย ประเภทกรดไขมันไม่อิ่มตัว และกรดไขมันที่จำเป็นในปริมาณมาก เช่น กรดโอเลอิกร้อยละ 42.5 ลิโนเลอิกร้อยละ 39.1 และปาล์มิติกร้อยละ 15 ส่วนกรดไขมันที่มีน้อย เช่น กรดสเตียริกร้อยละ 1.9 ลิโนเลนิกร้อยละ 1.1 ไมริสติกร้อยละ 0.2 และปีเฮนิกร้อยละ 0.2 อีกกลุ่มคือ กลุ่มสารที่สะพอนนิไฟไม่ได้ (unsaponifiable) ประมาณร้อยละ 4.2 และพบว่ากลุ่มสารที่สะพอนนิไฟไม่ได้นี้มีปริมาณสูงกว่าน้ำมันอื่นๆ อีกทั้งมีสารที่มีประโยชน์ต่อสุขภาพ (ตารางที่ 2.2) เช่น วิตามิน อี และออริซานอล (Sharma และ Rukmini, 1987; Orthofer, 1996; Kreuzer, 2000) ซึ่งสารทั้งสองนี้จะถูกสกัดออกมาพร้อมกับน้ำมัน แต่อาจถูกขจัดออกหรือสลายตัวไปในกระบวนการทำให้บริสุทธิ์ (refining) ซึ่งจะมากหรือน้อยขึ้นกับความรุนแรงในกระบวนการทำให้บริสุทธิ์ (Sharma และ Rukmini, 1987; Orthofer, 1996; Kreuzer, 2000; นฤมล จีโยชิต และ คณิต กฤษณังกูร, 2544) ดังนั้นรำข้าวจึงมีสมบัติเด่น คือ สามารถลดคอเลสเตอรอลที่ไม่ดี (Low Density Lipoprotein Cholesterol: LDL-C) โดยไม่ลดคอเลสเตอรอลที่ดี (High Density Lipoprotein Cholesterol: HDL-C) เพราะมีกรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงเดี่ยวสูง (Monounsaturated Fatty Acid) และมีสัดส่วนของกรดไขมันที่เหมาะสม คือ กรดไขมัน : กรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงเดี่ยว : กรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อน เท่ากับ 10:10-15:<10 ของพลังงานที่ได้รับต่อวัน (นัยนา บุญทวีวัฒน์ และ เวรดี จงสุวัฒน์, 2545)



รูปที่ 2.2 โครงสร้างของเมล็ดข้าว ปรับปรุงจาก Orthoefer, 1996

ตารางที่ 2.1 องค์ประกอบของน้ำมันดิบรำข้าว (Sayre, 1988)

Composition of Crude Rice Bran Oil	
Saponifiable Lipids	90-96%
Neutral Lipids	88-89%
Triglycerides	83-86%
Diglycerides	3-4%
Monoglycerides	6-7%
Free Fatty Acids	2-4%
Waxes	3-4%
Glycolipids	6-7%
Phospholipids	4-5%
Unsaponifiable Lipids	4.2%
Phytosterols, Sterolesters, Hydrocarbons, Triterpene Alcohols, Tocopherols	

ตารางที่ 2.2 องค์ประกอบของกลุ่มสารที่สะaponifiไฟไม่ได้ในน้ำมันดิบ

รำข้าว (Sayre, 1988)

Unsaponifiable Lipids in Crude Rice Bran Oil (% of Crude Oil)	
Total Unsaponifiable Lipids	4.2
Sterol	1.8
β -Sitosterol	0.88
Campesterol	0.51
Stigmasterol	0.27
4-Methyl Sterols	0.4
Citrostadienol	0.17
Gramisterol	0.16
Obtusifoliol	0.03
Triterpene Alcohols	1.2
24-Methylene-cycloartanol	0.49
Cycloartenol	0.48
Cycloartanol	0.11
Less Polar Compounds	0.8
Aliphatic Alcohols Hydrocarbons : Squalene	0.12
Tocotrienols	0.04
Tocopherols	0.07

2.3 ออริซานอล

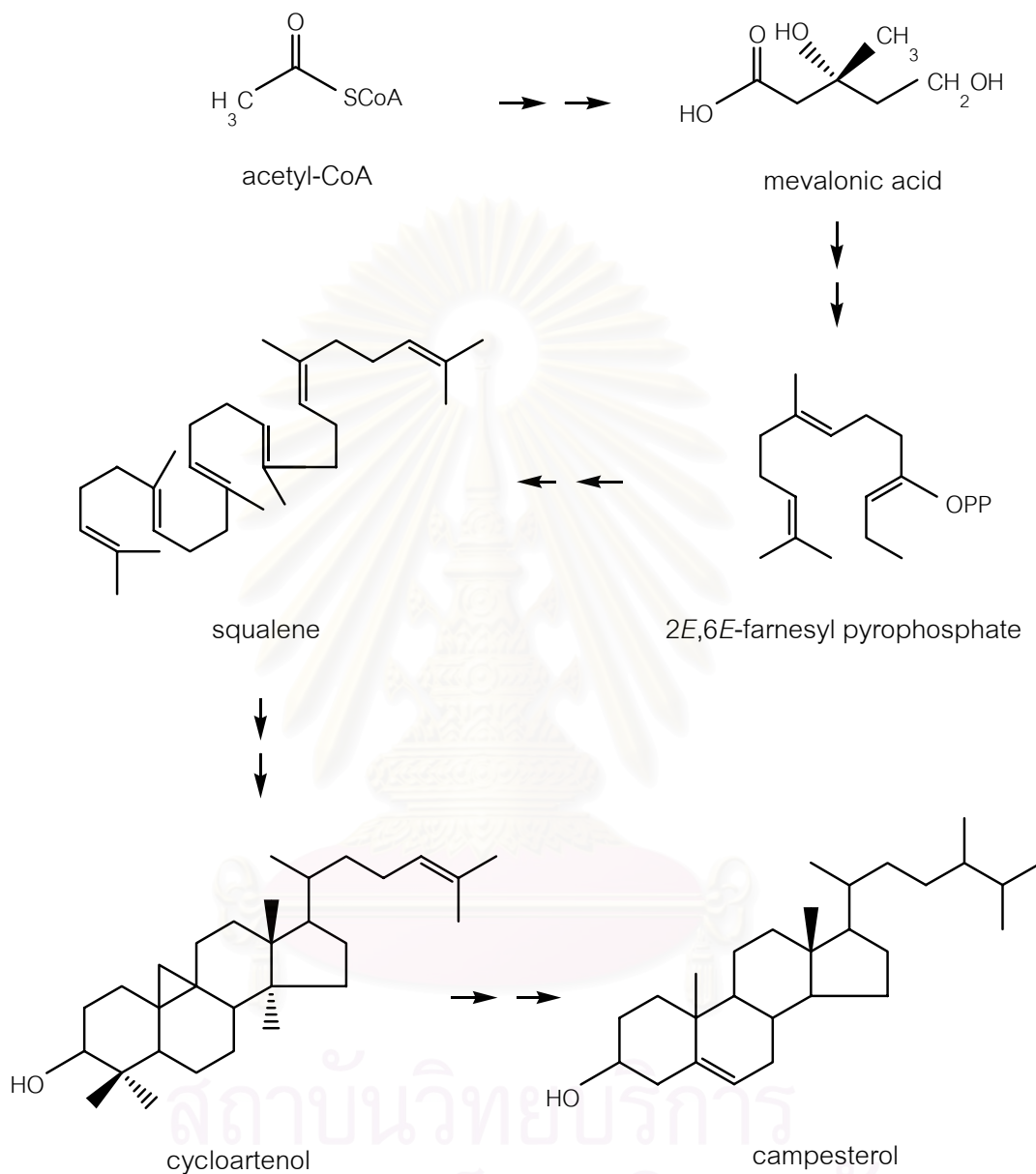
ออริซานอล คือ สารประกอบจำพวกเอสเทอร์ที่เกิดขึ้นเองตามธรรมชาติที่ประกอบด้วยโครงสร้างหลักสองส่วนคือ ส่วนของกรดเฟอร์ูลิก (Ferulic acid; 4-hydroxy-3-methoxycinnamic acid) และส่วนของสเตอรอลพืช (phytosterol หรือ plant sterol) หรือไตรเทอร์พีน แอลกอฮอล์ (triterpene alcohol) เชื่อมต่อกันด้วยพันธะเอสเทอร์ (Roger และคณะ, 1993; Diack และ Saska, 1994; Evershed และคณะ, 1998; Xu และ Godber, 1999) ออริซานอลถูกค้นพบครั้งแรกในน้ำมันรำข้าวเมื่อปี ค.ศ. 1954 โดยนักวิทยาศาสตร์ชาวญี่ปุ่น คือ Kaneko และ Tsuchiya ซึ่งในตอนแรกผู้ค้นพบคิดว่าออริซานอลเป็นสารประกอบชนิดเดียว (Kaneko และ Tsuchiya, 1954) แต่ต่อมาเมื่อมีการวิเคราะห์และตรวจสอบพบว่า ออริซานอลเป็นกลุ่มของสารจำพวก

เอสเทอร์ของกรดเฟอรูลิกที่มีหลายอนุพันธ์ เรียกว่า แอลฟา(α) เบตา(β) และแกมมา(γ) ซึ่งแกมมา-ออริซานอล (γ -oryzanol) จะให้ลักษณะชัดเจนและดีที่สุด และได้รับการถูกกล่าวถึงมากที่สุด (Graf, 1992; Xu และ Godber, 1999; Huang, 2003) อนุพันธ์หลักของออริซานอล ได้แก่ 24-methylenecycloartanyl ferulate cycloartenyl ferulate campesteryl ferulate, β -sitosteryl ferulate และ campestanil ferulate (Seitz, 1989; Rogers และคณะ, 1993; Diack และ Saska, 1994; Norton, 1995; Xu และ Godber, 1999)

ออริซานอล มีลักษณะเป็นผลึกสีขาวหรือสีขาวปนเหลือง ไม่ละลายน้ำ ละลายได้เล็กน้อยในไดเอทิล อีเทอร์ และเอ็น-เฮปเทน ละลายได้ดีในแอลกอฮอล์และคลอโรฟอร์ม (Bucci และคณะ, 2003) เสถียรที่อุณหภูมิห้อง (Tamagawa และคณะ, 1992a,b) มีจุดหลอมเหลวในช่วง 137.5-138.5 องศาเซลเซียส (Kaneko และ Tsuchiya, 1954) โดยที่ออริซานอลนั้นพบในน้ำมันรำข้าวเท่านั้นประมาณร้อยละ 1.1-2.6 หรือประมาณ 30,000 มก./กก. ซึ่งไม่พบน้ำมันพืชชนิดอื่น (Rong และคณะ, 1997; Seetharamaiah และ Prabhakar, 1986)

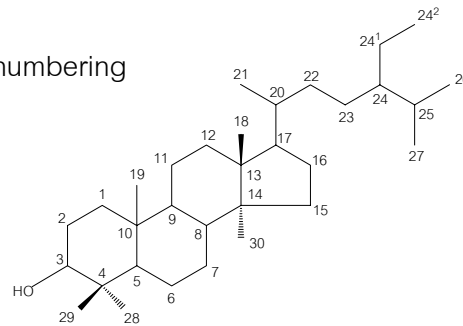
2.4 ลักษณะทางชีววิทยาของออริซานอล

บทบาทหน้าที่ของออริซานอลในพืชนั้นยังไม่ทราบแน่ชัด เนื่องจากเป็นสารประกอบเอสเทอร์ของกรดเฟอรูลิกกับสเตอรอลหรือไตรเทอร์พีน หรืออาจกล่าวได้ว่ามาจากสองส่วน คือ ส่วนของไตรเทอร์พีนหรือสเตอรอลและส่วนของกรดเฟอรูลิก ไตรเทอร์พีนอยด์จัดเป็นคำประเภทเดียวกันกับเทอร์พีนอยด์ เทอร์พีน หรือไอโซพรีนอยด์ ซึ่งเป็นความหลากหลายแพร่กระจายของผลิตภัณฑ์ธรรมชาติที่ได้จากวิถีชีวสังเคราะห์ (biosynthesis pathway) โดยอาศัย mevalonate เป็นสารตั้งต้นซึ่งเป็นคลาสย่อย (subclass) ของสเตอรอยด์ (Banthorpe, 1991) วิถีชีวสังเคราะห์ทั่วไปเป็นการควบคุมทางเอนไซม์ (รูปที่ 2.3) โดยเริ่มต้นจาก Acetyl-CoA เปลี่ยนไปเป็น mevalonate 2E,6E-farnesyl pyrophosphate squalene และ triterpenoids ที่มีรูปร่างเป็น chair-boat-chair-boat เป็นผลิตภัณฑ์สุดท้าย ตามลำดับ (Bramley, 1997) โดยที่ไฟโตสเตอรอลหรือสเตอรอลพืช (phytosterol) สร้างต่อจาก triterpenoids หรือ cycloartenol ซึ่งเห็นได้ชัดเจนในพืช (Connolly และ Hill, 1991) โดยการเอาหมู่เมทิล 3 หมู่ใน squalene ออก คือ คาร์บอนตำแหน่งที่ 4, 14 และ 4 (รูปที่ 2.4(ก)) ระบบตัวเลขตาม IUPAC-IUC, 1989; Bramley, 1997; Goad, 1991) ไฟโตสเตอรอล (phytosterol) มีบทบาทในโครงสร้างของเซลล์พืช โดยเป็นส่วนประกอบที่จำเป็นของเยื่อหุ้มเซลล์ เปรียบเสมือนคอเลสเตอรอลในเซลล์สัตว์ (Goad, 1991)

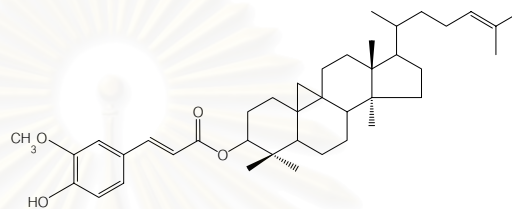


รูปที่ 2.3 วิธีสังเคราะห์อย่างย่อของเทอร์ปีนอยด์ในพืช (Bramley, 1997)

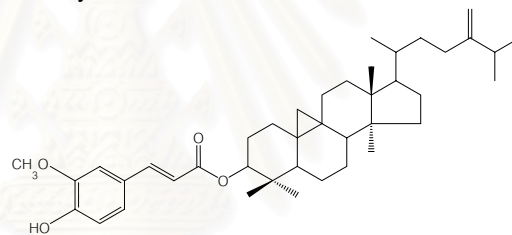
(ก) a sterol with carbon numbering



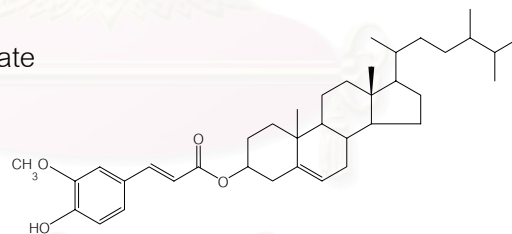
(ข1) cycloartenyl ferulate



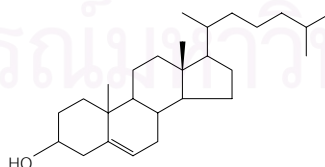
(ข2) 24-methylenecycloartanyl ferulate



(ข3) campesteryl ferulate



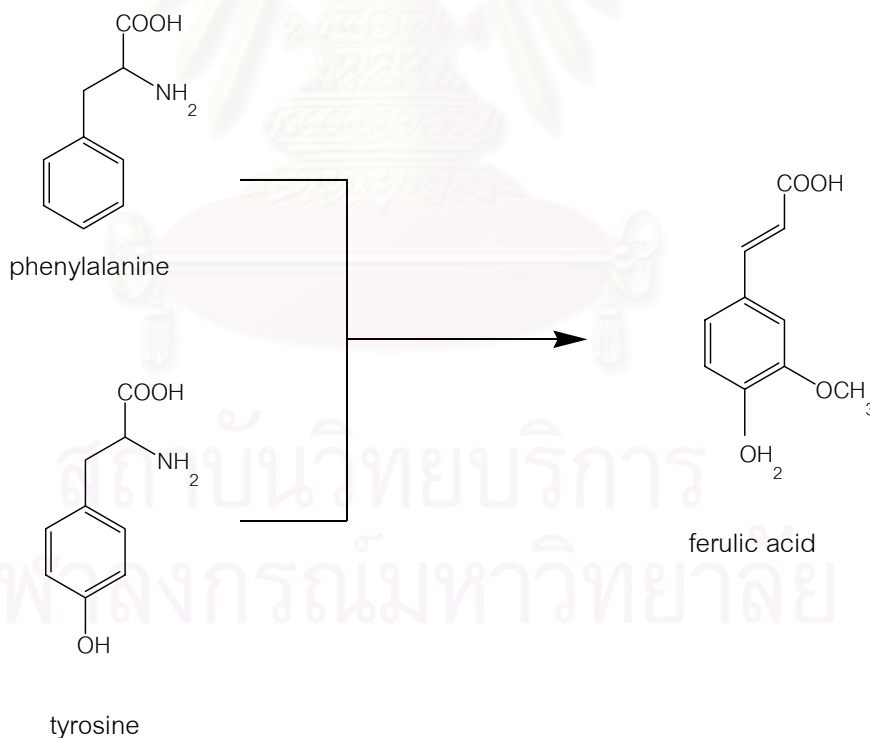
(ค) cholesterol



รูปที่ 2.4 โครงสร้างเคมีของ (ก) a sterol with carbon numbering, (ข1)-(ข3) อนุพันธ์ของ
ออร์ิซานอล และ (ค) คอเลสเตอรอล (Bramley, 1997; Goad, 1991)

ทำหน้าที่ควบคุมความเหลวหรือการเปลี่ยนรูปได้ของไขมันและเพิ่มความเสถียรของกลไกของเยื่อหุ้มเซลล์ โดยที่เยื่อหุ้มพลาสมาจะมีระดับสเตอรอลสูงสุด และมีอัตราส่วนระหว่างสเตอรอลและฟอสโฟลิพิดมากที่สุด ส่วนเอนโดพลาสมิก เรติคูลัม มีปริมาณต่ำกว่า ขณะที่ไมโทคอนเดรียและเยื่อหุ้มคลอโรพลาสต์มีสเตอรอลอิสระในปริมาณเล็กน้อย สเตอรอลมีส่วนสำคัญต่อการเจริญเติบโตของพืช 2 ประการด้วยกันคือ ประการแรกสำหรับการสร้างเยื่อหุ้มเซลล์ด้วยการแบ่งเซลล์ อีกประการหนึ่งคือ สำหรับ 24-ethylsterol เช่น stigmasterol มีหน้าที่พิเศษในการดำเนินการต่อไปของการแบ่งเซลล์ (Huang, 2003)

ส่วนกรดเฟอร์ูลิก เริ่มต้นจากการเปลี่ยนฟีนิลอะลานีนและไทโรซีน โดยเอนไซม์ (รูปที่ 2.5) ซึ่งส่วนใหญ่แล้วกรดเฟอร์ูลิกจะเกิดปฏิกิริยาเอสเทอร์ โดยรวมเข้ากับโมเลกุลอื่นๆ ในพืชจำนวนมาก ซึ่งบทบาทหน้าที่ทางชีววิทยาของกรดเฟอร์ูลิกนั้นคือ เชื่อมองค์ประกอบต่างๆ ของเซลล์และลด hydrolytic degradation โดย endosperm enzyme ระหว่างการพัฒนา ดังนั้นกรดเฟอร์ูลิกจึงมีส่วนเป็นตัวยับยั้งการพัฒนา (Graf, 1992)



รูปที่ 2.5 วิธีของกลไกการสร้างกรดเฟอร์ูลิกอย่างย่อในพืช (Graf, 1992)

2.5 การพัฒนาการวิเคราะห์ออร์ซิซานอล

การวิเคราะห์และหาปริมาณของอนุพันธ์แต่ละชนิดของออร์ซิซานอล ซึ่งเทคนิคที่นิยมใช้ในการวิเคราะห์ คือ เทคนิคการใช้ HPLC (High Performance Liquid Chromatography) และการใช้ยูวี สเปกโทรโฟโตมิเตอร์ เนื่องจากการใช้ยูวี สเปกโทรโฟโตมิเตอร์ มีความสะดวกรวดเร็วจึงนิยมใช้ในการหาปริมาณทั้งหมดของออร์ซิซานอล และการดูกลิ่นแสงยูวีของแต่ละอนุพันธ์ของออร์ซิซานอล นั้นใกล้เคียงกันมาก สำหรับเทคนิค HPLC นั้นนิยมใช้ในการแยกอนุพันธ์และหาปริมาณของออร์ซิซานอล

Diack และ Saska (1994) ใช้ normal-phase HPLC และคอลัมน์ซิลิกาในการแยกอนุพันธ์ของออร์ซิซานอลจากน้ำมันรำข้าว พบว่าสามารถแยกอนุพันธ์ของออร์ซิซานอลได้เพียง 2 ส่วน โดยแต่ละส่วนจะมีออร์ซิซานอลอยู่อย่างน้อย 2 ชนิด จึงทำให้ไม่สามารถระบุชนิดและหาปริมาณของสารดังกล่าวได้

Evershed และคณะ (1988) และ Roger และคณะ (1993) ใช้ reverse-phase HPLC สามารถแยก อนุพันธ์ของออร์ซิซานอลได้ 6 ชนิด แต่มีเพียง 2 ชนิดเท่านั้นที่แยกออกมาได้อย่างสมบูรณ์

Xu และ Godber (1999) ใช้เทคนิค normal-phase HPLC ร่วมกับ reverse-phase HPLC สามารถแยกอนุพันธ์ของออร์ซิซานอลได้ 10 ชนิดออกจากน้ำมันรำข้าว ได้แก่ Δ^7 -stigmasteryl 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

Akihisa และคณะ (2000) สามารถแยกอนุพันธ์ของออร์ซิซานอลจากน้ำมันรำข้าว ได้ ออร์ซิซานอลชนิดใหม่ 6 ชนิด คือ cycloeucalenol *trans*-ferulate 24-methylenecholesterol *trans*-ferulate cycloartenol *cis*-ferulate 24-methylenecycloartanol *cis*-ferulate 24-methylenecholesterol *cis*-ferulate และ sitosterol *cis*-ferulate

Fang และคณะ (2003) ใช้เทคนิค LC-MS/MS แยกออร์ซิซานอลจากน้ำมันรำข้าว พบ ออร์ซิซานอล 24 ชนิด โดยเป็นออร์ซิซานอลชนิดใหม่ 9 ชนิด คือ campesteryl *trans*-caffeate cycloartenyl *trans*-caffeate hydroxydehydrocycloartenol ferulate 24*R*-cycloart-25-ene-3 β ,24-diol-3 β *trans*-ferulate 24*S*-cycloart-25-ene-3 β ,24-diol-3 β *trans*-ferulate cycloart-23*Z*-ene-3 β ,25-diol-3 β *trans*-ferulate 24-hydroxy-24-methylcycloartanyl *trans*-ferulate (2 isomers) และ 25-hydroxy-24-methylcycloartanyl *trans*-ferulate

ส่วนงานวิจัยในประเทศไทยส่วนใหญ่เป็นการหาปริมาณออริซานอลในข้าวพันธุ์ต่างๆ และผลของออริซานอล เป็นต้น ทั้งนี้ยังไม่มีรายงานวิจัยในการวิเคราะห์หาสูตรโครงสร้างของอนุพันธ์แต่ละชนิดของออริซานอล เช่น

Kaladee และคณะ (2004) วิเคราะห์ความสามารถในการสะสมแกมมา-ออริซานอล จากความหลากหลายของพันธุ์กรรมข้าวเหนียวดำ ที่รวบรวมได้ในภาควิชาพืชไร่ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

พันทิพา พงษ์เพ็ญจันทร์และคณะ (2548) ศึกษาผลของแกมมา-ออริซานอลต่อการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันในหนูไม่ซี

ศลิษา โชคเหมาะและคณะ (2548) พัฒนารูปวิธีวิเคราะห์ปริมาณแกมมา-ออริซานอลในรำข้าว

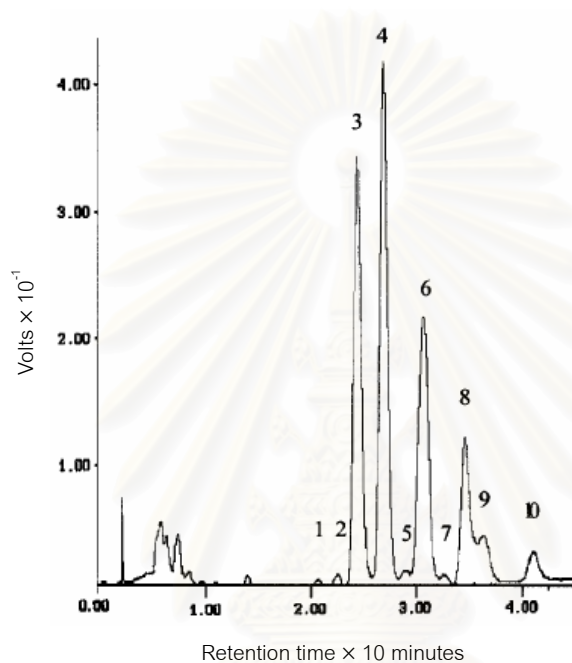
เด็ก เวชชานุกเคราะห์ (2548) ศึกษาอนุพันธ์ของออริซานอลในรำข้าวหอมมะลิที่ปลูกในประเทศไทย

2.6 อิทธิพลของกระบวนการผลิตน้ำมันรำข้าวต่อออริซานอล

หลังจากผ่านการสีข้าว รำข้าวจะเกิดกลิ่นเหม็นหืนอย่างรวดเร็วโดยเอนไซม์ที่มีอยู่ในรำข้าว ซึ่งวิธีการที่ทำให้รำข้าวมีความเสถียรคือ การใช้ความร้อนในการขับไล่หรือเตาอบไฟฟ้า การทำให้แห้งตัว และการใช้สารเคมี ดังนั้นหลังจากผ่านการสีข้าวแล้ว รำข้าวจะถูกทำให้เสถียรโดยการยับยั้งเอนไซม์ไลเปส (lipase) และป้องกันการเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสซึ่งให้ผลิตภัณฑ์เป็นกรดไขมันอิสระและกลีเซอรอล (Huang, 2003)

ความเสถียรและการเก็บรักษาไว้ได้ของออริซานอลในรำข้าวหลังจากที่ได้มา ศึกษาโดย Shin และคณะ (1997) ซึ่งการสูญเสียของออริซานอลและวิตามินอีทั้งหมดเพิ่มขึ้นเมื่ออุณหภูมิในการขับไล่เพิ่มขึ้น โดยขึ้นอยู่กับลักษณะของอุณหภูมิ แต่ดัชนีการสูญเสียวิตามินอีทั้งหมดมากกว่าการสูญเสียออริซานอล และหลังจากรำข้าวมีความเสถียรแล้วน้ำมันดิบรำข้าวก็จะถูกสกัดออกมาและทำให้บริสุทธิ์ก่อนที่จะนำมาบริโภค ซึ่งกระบวนการที่ทำให้น้ำมันรำข้าวบริสุทธิ์นั้นประกอบด้วยขั้นตอนการกำจัดกัม (degumming) การกำจัดกรดไขมันอิสระ (deacidification) การฟอกสี (bleaching) และการกำจัดกลิ่น (deodorization) โดยมีรายงานมาแล้วว่าสเตอรอลเกิดการสูญเสียทั้งหมดหลังจากการทำให้บริสุทธิ์ประมาณร้อยละ 10-70 โดยอาศัยชนิดของน้ำมันและสภาวะของกระบวนการที่ใช้ และปริมาณสเตอรอลจะลดลงทีละน้อยในทุกขั้นตอนของกระบวนการทำให้บริสุทธิ์ (Kochhar, 1983)

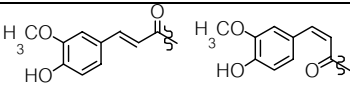
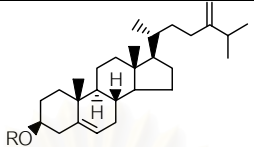
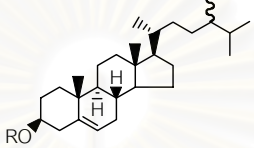
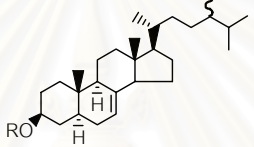
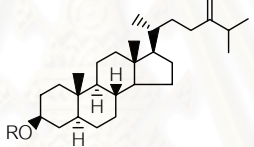
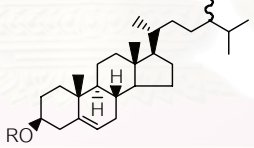
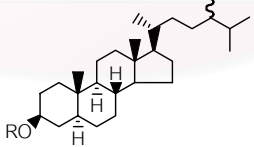
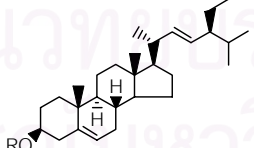
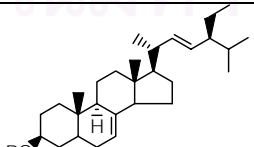
ในขั้นตอนการกำจัดกรดจะใช้ต่าง เช่น โซเดียมไฮดรอกไซด์หรือโซดาไฟ เพื่อเอากรดไขมันอิสระออกในรูปของโซสบู่ (soap stock) ซึ่งมีอริซานอลผสมอยู่ด้วย จากนั้นแยกโดยการตกตะกอนหรือปั่นเหวี่ยง โดยที่โซสบู่สามารถทำให้เป็นกรดได้อีกครั้งเพื่อให้เป็นน้ำมันกรดสีเข้มซึ่ง



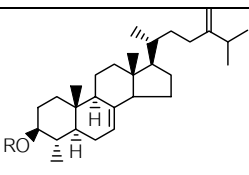
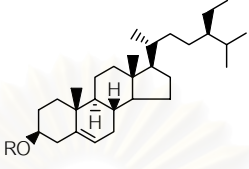
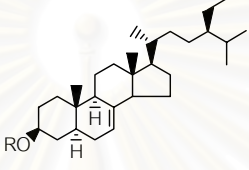
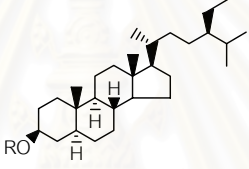
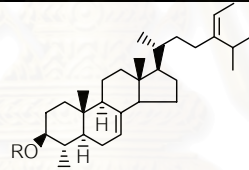
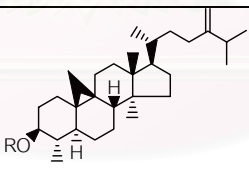
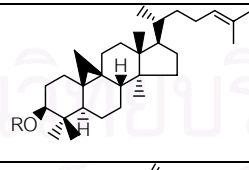
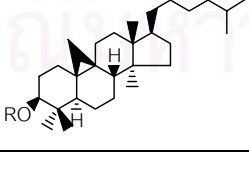
- | | |
|---------------------------------------|---------------------------------------|
| 1. Δ^7 -stigmasteryl ferulate, | 2. stigmasteryl ferulate, |
| 3. cycloartenyl ferulate, | 4. 24-methylenecycloartanyl ferulate, |
| 5. Δ^7 -campestenyl ferulate, | 6. campesteryl ferulate, |
| 7. Δ^7 -sitostenyl ferulate, | 8. sitosteryl ferulate, |
| 9. campestanyl ferulate, | 10. sitostanyl ferulate |

รูปที่ 2.6 โครมาโทแกรมของอริซานอลจากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค reverse-phase HPLC จาก Xu และ Godber, 1999 (คอลัมน์, C₁₈; ภูมิภาคเคลือบที่, เมธานอล/อะซิโตนไตรรล์/ไดคลอโรมีเทน/กรดอะซิติก=50:44:3:3; อัตราการไหล, 1.4 มล./นาที; ฆูวี ดีเทคเตอร์, 330 นาโนเมตร

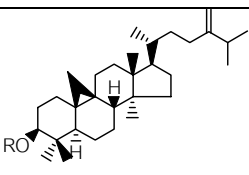
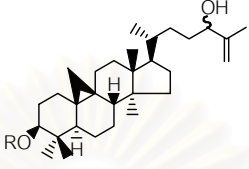
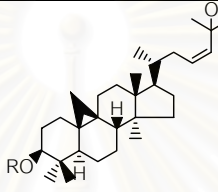
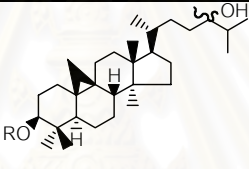
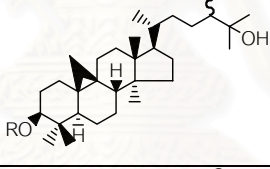
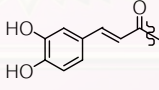
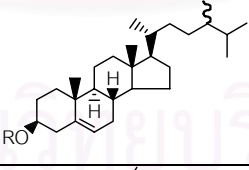
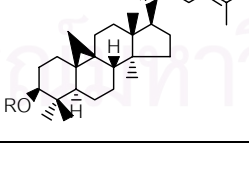
ตารางที่ 2.3 โครงสร้างทางเคมีของอนุพันธ์อริซานอลในรำข้าวที่มีการรายงานมาแล้ว

อนุพันธ์อริซานอล	โครงสร้างทางเคมี	เอกสารอ้างอิง
STEROL FERULATE	 <p>R = <i>trans</i>-ferulate <i>cis</i>-ferulate</p>	
24-methylenecholesteryl (<i>cis</i> -, <i>trans</i> -) ferulate	 <p>MW 574</p>	Akihisa และคณะ, 2000
campesteryl หรือ 22-dihydrobrassicasteryl <i>trans</i> -ferulate	 <p>MW 576</p>	Yasukawa และคณะ, 1998 Xu และ Godber, 1999
Δ^7 -campesteryl หรือ 24-methylathasteryl <i>trans</i> -ferulate	 <p>MW 576</p>	Fang และคณะ, 2003 Iwatsuki และคณะ, 2003 Xu และ Godber, 1999
24-methylenecholestanyl <i>trans</i> -ferulate	 <p>MW 576</p>	Iwatsuki และคณะ, 2003
24-methylcholesteryl <i>cis</i> -ferulate	 <p>MW 576</p>	Akihisa และคณะ, 2000
campestanlyl หรือ 24-methylcholestanyl <i>trans</i> -ferulate	 <p>MW 578</p>	Fang และคณะ, 2003 Iwatsuki และคณะ, 2003 Xu และ Godber, 1999
stigmasteryl (<i>cis</i> -, <i>trans</i> -) ferulate	 <p>MW 588</p>	Akihisa และคณะ, 2000
Δ^7 -stigmastenylyl <i>trans</i> -ferulate	 <p>MW 588</p>	Xu และ Godber, 1999

ตารางที่ 2.3 โครงสร้างทางเคมีของอนุพันธ์อริซานอลในรำข้าวที่มีการรายงานมาแล้ว

อนุพันธ์อริซานอล	โครงสร้างทางเคมี	เอกสารอ้างอิง
gramisteryl (<i>cis</i> -, <i>trans</i> -) ferulate	 MW 588	Akihisa และคณะ, 2000
sitosteryl (<i>cis</i> -, <i>trans</i> -) ferulate	 MW 590	Akihisa และคณะ, 2000 Roger และคณะ, 1993 Xu และ Godber, 1999
Δ^7 -sitosteryl หรือ schottenyl <i>trans</i> -ferulate	 MW 590	Fang และคณะ, 2003 Iwatsuki และคณะ, 2003 Xu และ Godber, 1999
stigmastanyl หรือ Sitostanyl (<i>cis</i> -, <i>trans</i> -) ferulate	 MW 592	Akihisa และคณะ, 2000 Xu และ Godber, 1999
citrostadienol (<i>cis</i> -, <i>trans</i> -) ferulate	 MW 602	Akihisa และคณะ, 2000
cycloeucaleny <i>trans</i> -ferulate	 MW 602	Akihisa และคณะ, 2000 Fang และคณะ, 2003
cycloartenyl (<i>cis</i> -, <i>trans</i> -) ferulate	 MW 602	Akihisa และคณะ, 2000 Roger และคณะ, 1993 Xu และ Godber, 1999
cycloartanyl <i>trans</i> -ferulate	 MW 604	Roger และคณะ, 1993

ตารางที่ 2.3 โครงสร้างทางเคมีของอนุพันธ์อริซานอลในรำข้าวที่มีการรายงานมาแล้ว

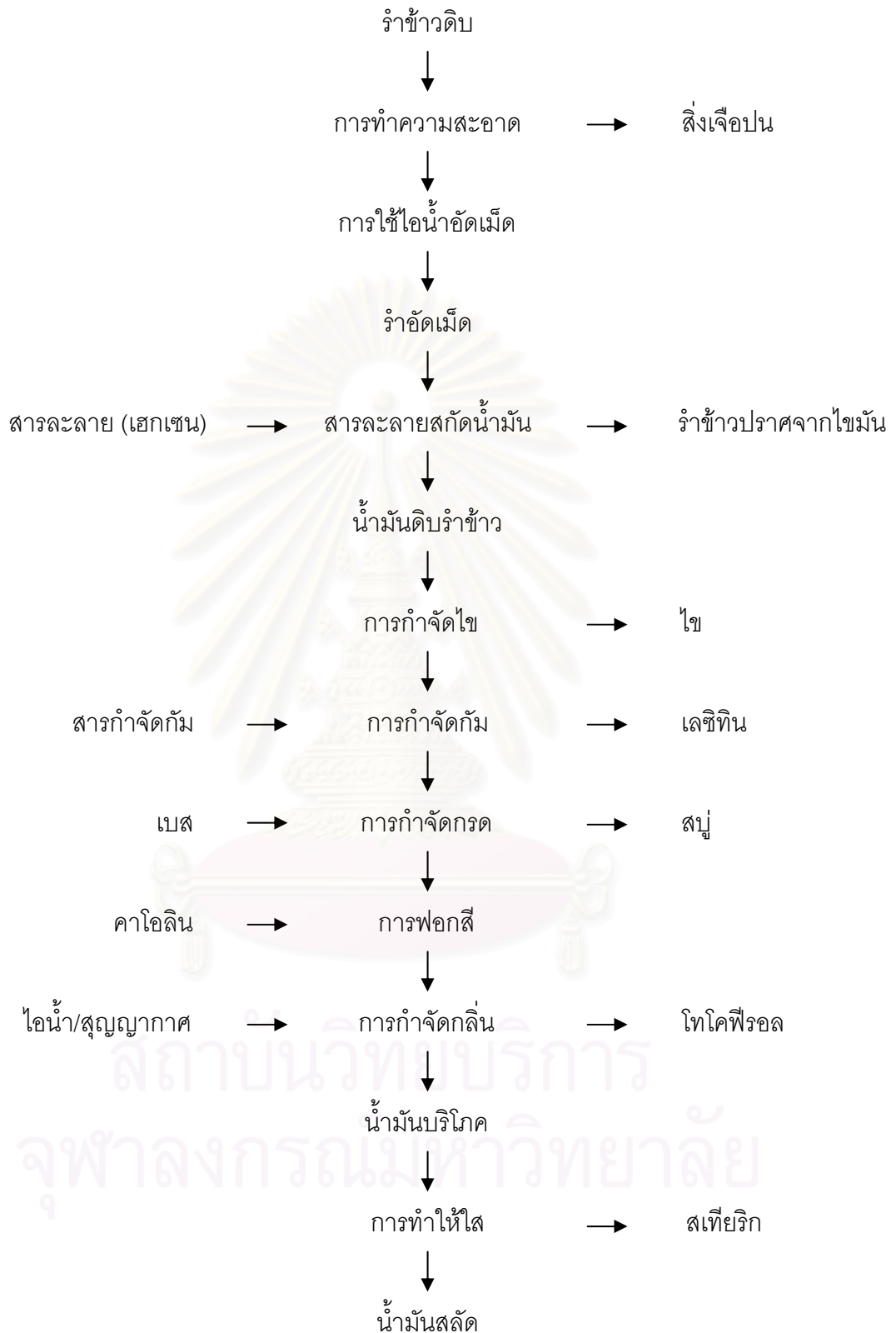
อนุพันธ์อริซานอล	โครงสร้างทางเคมี	เอกสารอ้างอิง
24-methylenecycloartanyl (<i>cis</i> -, <i>trans</i> -) ferulate	 MW 616	Akihisa และคณะ, 2000 Roger และคณะ, 1993 Xu และ Godber, 1999
(24 <i>R,S</i>)-cycloart-25-ene-3β,24-diol-3β- <i>trans</i> -ferulate	 MW 618	Fang และคณะ, 2003
cycloart-23 <i>Z</i> -ene-3β,25-diol-3β- <i>trans</i> -ferulate	 MW 618	Fang และคณะ, 2003
24-hydroxy-24-methylcycloartanyl <i>trans</i> -ferulate	 MW 634	Fang และคณะ, 2003
25-hydroxy-24-methylcycloartanyl <i>trans</i> -ferulate	 MW 634	Fang และคณะ, 2003
CAFFEATE ESTERS	 R = <i>trans</i> -caffeate	
campesteryl <i>trans</i> -caffeate	 MW 562	Fang และคณะ, 2003
cycloartenyl <i>trans</i> -caffeate	 MW 588	Fang และคณะ, 2003

ในส่วนของกรดไขมันอิสระสามารถกลั่นได้ภายใต้สูญญากาศ และออร์ซิซานอลก็จะเป็นส่วนที่เหลือ เรียกว่า pitch และเป็นการเอาออร์ซิซานอลกลับคืนจาก pitch ที่เป็นผลพลอยได้ที่มีราคาถูก (Das และคณะ, 1998) ส่วนในขั้นตอนการฟอกสี มีวัตถุประสงค์เพื่อเอาสีออกโดยใช้ความร้อนที่ อุณหภูมิ 85 องศาเซลเซียส และตัวดูดซับ เช่น ผงถ่านกัมมันต์ (activated carbon) และ activated bleaching earth ซึ่งมีรายงานว่ามีส่วนของสเตอรอลที่เปลี่ยนแปลงไป คือ ดีไฮโดรชันและออกซิเดชัน และดีไฮโดรชันของสเตอรอลเอสเทอร์นั้นอาจจะเกิดระหว่างการฟอกสี ต่อมาคือขั้นตอนการกำจัดกลิ่น เพื่อเอาสารประกอบที่ระเหยได้และรสชาติที่ไม่ต้องการออก โดยการกลั่นด้วยไอน้ำภายใต้การลดความดัน ปกติแล้วจะใช้กับสารที่ไม่ใช่สารระเหยที่สลายตัวที่เกิด จากความร้อนกลายเป็นสารระเหย แล้วกลั่นตัวออกมา

สุดท้ายเป็นขั้นตอนการเกิดปฏิกิริยาไฮโดรจีเนชัน (เติมไฮโดรเจน) ซึ่งเป็นขั้นตอนสำคัญ ในอุตสาหกรรมน้ำมัน โดยให้น้ำมันที่เป็นของเหลวเปลี่ยนเป็นไขมันที่มีลักษณะเป็นกึ่งของแข็ง หรือของแข็งสำหรับการใช้เป็นพิเศษ เช่น มาร์การีน เป็นต้น กระบวนการเติมไฮโดรเจนจะให้ตรง ตำแหน่งพันธะคู่ในสายโซ่กรดไขมันซึ่งจะไวต่อการเกิดออกซิเดชัน และด้วยเหตุนี้จึงสามารถแก้ไข ให้เกิดความเสถียรจากการเกิดออกซิเดชันของน้ำมันได้ และผลของการฟอกสีและการเติม ไฮโดรเจนต่อปริมาณออร์ซิซานอลในการทำให้น้ำมันรำข้าวบริสุทธิ์ไม่มีการศึกษาที่ชัดเจน ซึ่งอาจจะ สัมพันธ์กับข้อเท็จจริงที่ว่า ออร์ซิซานอลเกิดการสูญเสียหลังจากขั้นตอนการกำจัดกรด

2.7 การศึกษาทางพิษวิทยาและการก่อให้เกิดมะเร็งของออร์ซิซานอล

ความปลอดภัยของออร์ซิซานอลต่อการบริโภคของมนุษย์ ทดสอบโดยการศึกษากทาง พิษวิทยาต่อหนูที่เลี้ยงด้วยอาหารที่มีน้ำมันรำข้าวร้อยละ 10 เปรียบเทียบกับน้ำมันพืชประเภทถั่ว ลิสง 3 รุ่นด้วยกัน (Rukmini, 1988) โดยที่องค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันทั้งสองชนิดเหมือนกัน ยกเว้นกลุ่มของสารที่สะพอนนิไฟไม่ได้ของน้ำมันรำข้าว (ร้อยละ 4.1) มีปริมาณสูงกว่า ซึ่งน้ำมันรำ ข้าวมีผลต่อการเจริญเติบโตรวมถึงน้ำหนักที่เพิ่มขึ้นและประสิทธิภาพของอาหารที่เลี้ยงด้วยโดยที่ ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ และผลของการดูดซึมไขมันและการกักเก็บไนโตรเจน ฟอสฟอรัส และแคลเซียม ก็ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ นอกจากนี้ผลของความเป็นพิษ ของน้ำมันรำข้าวจากการจำลองการประเมินค่าจำนวน 2 คู่ 3 รุ่นด้วยกัน ซึ่งไม่พบความผิดปกติ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มของน้ำมันประเภทถั่วลิสง โดยคิดเป็นร้อยละของน้ำหนักแรกคลอด ขนาด ของครอก น้ำหนักทารก อัตราการตายก่อนหย่านมและจำนวนวันที่ให้กำเนิดลูกจากวันที่มีคู่ ซึ่ง



แผนผังที่ 2.1 กระบวนการผลิตน้ำมันรำข้าว (อรอนงค์ นัยวิกุล, 2547)

โอกาสที่สามารถก่อให้เกิดการกลายพันธุ์ของน้ำมันรำข้าว เมื่อใช้เป็นน้ำมันทอดและได้รับความร้อนซ้ำๆ พบว่าให้ผลเป็นลบ โดยเห็นได้จากความเสถียรหรือความคงทนจากการเกิดออกซิเดชัน

นอกจากนี้ความปลอดภัยของออริซานอลที่ประเมินโดยใช้เวลาสั้นโดยใช้ Rec assay (bacterial DNA repair test), Aim test (bacterial reverse mutation test), ทดสอบความผิดปกติของโครโมโซมเนื้อเยื่อไขกระดูกของหนู และทดสอบการยับยั้งเกี่ยวกับกระบวนการเผาผลาญโดยใช้ Chinese hamster V79 cells (Tsushimoto และคณะ, 1991) ซึ่งออริซานอลแสดงให้เห็นว่าไม่เป็นพิษต่อยีนและไม่ยับยั้งการติดต่อสื่อสารระหว่างเซลล์

ศักยภาพที่ก่อให้เกิดมะเร็งของออริซานอล ศึกษาโดยการเลี้ยงหนูด้วยอาหารที่มีออริซานอล 2 กรัม/กก. น้ำหนักร่างกาย/วัน นาน 78 สัปดาห์ (Tamagawa และคณะ, 1992b) และ 2 ปี (Tamagawa และคณะ, 1992a) พบว่าไม่มีการเปลี่ยนแปลงการปฏิบัติที่สัมพันธ์กันในเงื่อนไขทั่วไป เช่น การบริโภคอาหาร อัตราการตาย น้ำหนักอวัยวะ และระบบเลือด การตรวจสอบเนื้อเยื่อที่เกิดโรคทำได้โดยการเกิดเนื้องอก พบว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญระหว่างกลุ่มที่ปฏิบัติและกลุ่มควบคุม

การปรับปรุงแก้ไขผลของออริซานอล มีการศึกษาในอวัยวะต่างๆ ของหนูโดยใช้สารก่อมะเร็งเป็นต้นแบบ (Hirose และคณะ, 1991) โดยการรวมสารก่อมะเร็ง 3 ชนิดเข้าด้วยกัน คือ 2,2'-dihydroxy-di-n-propylnitrosamine (1 กรัม/กก. น้ำหนักร่างกาย × 2 i.p. injections) *N*-ethyl-*N*-hydroxyethylnitrosamine (1.5 กรัม/กก. น้ำหนักร่างกาย × 2 i.g. administration) และ 3,2'-dimethyl-4-aminobiphenyl (75 มก./กก. น้ำหนักร่างกาย × 3 subcutaneous injections) โดยเว้นระยะไว้ 3-4 วัน หลังจากนั้นหนึ่งสัปดาห์เลี้ยงด้วยอาหารที่มีออริซานอลร้อยละ 1 นาน 32 สัปดาห์ แล้วจึงฆ่าหนูเพื่อการชันสูตรวิเคราะห์ที่สมบูรณ์ ผลที่ได้ชี้ให้เห็นว่าการบำบัดด้วยออริซานอลมีความโน้มเอียงที่จะลดภาวะการเกิดมะเร็งตับและตับอ่อน อย่างไรก็ตามปริมาณออริซานอลร้อยละ 1 ที่ใช้ในการศึกษา 100-150 ครั้ง มีปริมาณสูงกว่าออริซานอลที่ให้ปกติในยาที่ใช้ (มากกว่า 300 มก./คน/วัน)

นอกจากนี้การศึกษาอื่นๆ ของการปรับปรุงแก้ไขผลของการก่อให้เกิดมะเร็ง แสดงให้เห็นโดยใช้สัตว์ต้นแบบที่มีลักษณะคล้ายกัน (Imaida และคณะ, 1990) แต่เป็นการรวมสารก่อมะเร็ง 2 ชนิดด้วยกัน คือ 1,2-dimethylhydrazine (40 มก./กก. น้ำหนักร่างกาย × 3 subcutaneous injections ภายในหนึ่งสัปดาห์) และ 1-methyl-1-nitrosourea (20 มก./กก. น้ำหนักร่างกาย × 2 i.p. administration 2 ครั้ง/สัปดาห์ นาน 2 สัปดาห์) หลังจากนั้นเลี้ยงด้วยอาหารที่มีกรดเฟอรูลิกร้อยละ 1 จนกระทั่งการวิเคราะห์เสร็จสิ้นสมบูรณ์นาน 52 สัปดาห์ ผลลัพธ์แสดงให้เห็นว่า

กรดเฟอร์ูลิกร้อยละ 1 มีผลให้เกิดการยับยั้งอ่อนๆ และไม่กระตุ้นให้เกิดเนื้องอกที่ไม่ร้ายแรงและมะเร็งที่ปอด ซึ่งเป็นผลจากออริซานอลที่ศึกษาโดย Hirose และคณะ (1991)

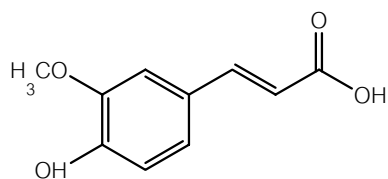
ออริซานอลได้รับการยอมรับและใช้ในทางการค้าในหลายประเทศ เช่น ญี่ปุ่น แต่รัฐบาลและอุตสาหกรรมในสหรัฐอเมริกานิยมมากกว่า จากการศึกษาจึงชี้ให้เห็นว่า ออริซานอลไม่เป็นที่สารถ่อมะเร็งในสัตว์และน้ำมันรำข้าวมีความปลอดภัยต่อการบริโภคของมนุษย์ ไม่มีรายงานการวิจัยที่ชัดเจนหรือผลข้างเคียงเรื้อรังของออริซานอล และมีหลักฐานที่แสดงให้เห็นประโยชน์ของมันต่อมนุษย์เพิ่มขึ้นและทางการค้าก็เจริญเติบโตขึ้น ดังนั้นการทดลองทางคลินิกจึงต้องมีการวางแผนอย่างดีและกว้างขวาง ก็ให้เห็นศักยภาพของออริซานอลและกรดเฟอร์ูลิกที่เป็นตัวขัดขวางทางเคมีหรือตัวกระตุ้นกลไกการก่อให้เกิดมะเร็งหรือยับยั้งการเกิดมะเร็ง

2.8 การศึกษาด้านเภสัชวิทยาของออริซานอล

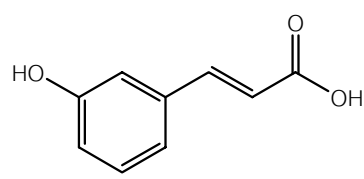
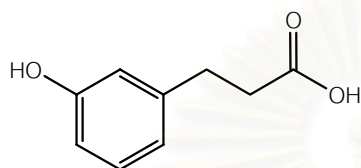
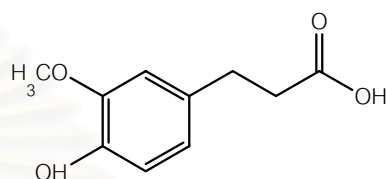
ขณะที่ออริซานอลถูกนำมาใช้ประโยชน์มากมายในหลายๆ ประเทศ โดยใช้เป็นสารเติมแต่งในอาหารและใช้ในทางเภสัชกรรม ซึ่งมีการศึกษาเพียงเล็กน้อยในประเทศอังกฤษที่ได้วินิจฉัยการย่อยของออริซานอลในทางเดินกระเพาะอาหารและลำไส้ของมนุษย์ โดยที่การศึกษาส่วนใหญ่ใช้สัตว์ต้นแบบเป็นกระต่ายและหนู โดยใช้เทคนิคอินเลเยอร์โครมาโทกราฟีในการวิเคราะห์เพื่อระบุออริซานอลและเมทาบอลไลท์ของมัน

การศึกษาเกี่ยวกับการดูดซึม การเผาผลาญและการลำเลียงน้ำเหลืองของออริซานอลที่ติดฉลากด้วยคาร์บอน-14 โดยให้ทางปากหนู (50 มก./กก.) ศึกษาโดย Fujiwara และคณะ (1983) หลังจากนั้น 72 ชั่วโมง พบว่ามีการปล่อยกัมมันตรังสีออกมาร้อยละ 9.8 ในน้ำปัสสาวะและในอุจจาระร้อยละ 84.5 โดยที่พบในอุจจาระนั้นไม่พบการเปลี่ยนแปลงของออริซานอล แต่พบผลผลิตของการสันดาปหลักๆ คือ ferulic acid, dihydroferulic acid, *m*-hydroxyphenylpropionic acid, *m*-coumaric acid, *m*-hydroxyhippuric acid, hippuric acid (รูปที่ 2.7) และการรวมกันเป็น glucuronide หรือ sulfate

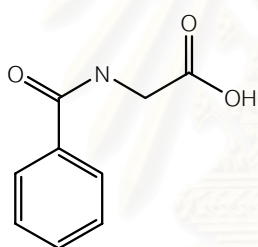
ต่อมาได้มีการใช้ออริซานอลอย่างเดี่ยวโดยให้ทางปาก 300 มก. ในมนุษย์ ซึ่งความเข้มข้นของพลาสมาที่มีออริซานอลและกรดเฟอร์ูลิกอยู่ 37.6 และ 36.6 มก./มล. ตามลำดับ กรดเฟอร์ูลิกถูกขับออกมาในน้ำปัสสาวะร้อยละ 2.4-2.8 ของปริมาณที่ได้รับต่อวัน แต่ไม่พบออริซานอล (Odomi และคณะ, 1983) การทดลองในลำไส้โดยใช้ออริซานอลที่ติดฉลากด้วย



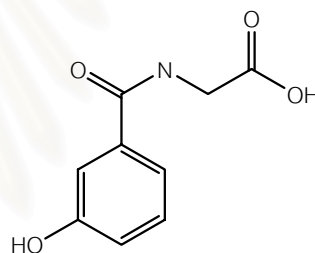
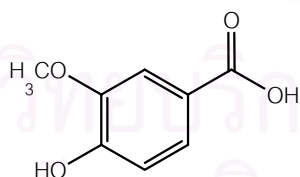
ferulic acid

*m*-coumaric acid*m*-hydroxyphenylpropionic acid
(*m*-HPPA)

dihydroferulic acid



hippuric acid

*m*-hydroxyhippuric acid
(*m*-HHA)

vanilic acid

รูปที่ 2.7 โครงสร้างทางเคมีของกรดเฟอรูลิกและ urinary metabolites ของมันที่มีรายงานไว้ใน Fujiwara และคณะ(1983) และ Booth และคณะ(1957)

คาร์บอน-14 แสดงให้เห็นว่าพันธะเอสเทอร์ของออริซานอลบางส่วนเกิดไฮโดรไลซ์ภายในลำไส้ระหว่างการดูดซึม (Fujiwara และคณะ, 1983)

เอนไซม์ที่ทำหน้าที่สำหรับการเกิดไฮโดรไลซิสของออริซานอลระหว่างการสันดาปนั้นไม่ได้มีการศึกษาอย่างสมบูรณ์ อย่างไรก็ตามก่อนหน้านี้มีการศึกษาในหลอดทดลอง ซึ่งแสดงให้เห็นว่าออริซานอลเกิดไฮโดรไลซ์เป็นกรดเฟอรูลิกในตับ ลำไส้ ตับอ่อน และไตของหนู (Kudo และ Akiyama, 1982) และเมื่อเร็วๆ นี้มีการศึกษาที่แสดงให้เห็นว่า steryl ferulate ถูกไฮโดรไลซ์โดยเอนไซม์ที่ใช้ในการย่อยของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม ซึ่ง Moreau และ Hicks (2004) แสดงให้เห็นว่าการสังเคราะห์ sitostanyl ferulate นั้นถูกไฮโดรไลซ์โดย cholesteryl esterase และ pancreaticin ขณะที่ steryl ferulates ของออริซานอลถูกไฮโดรไลซ์โดย cholesteryl esterase เพียงตัวเดียว นอกจากนี้ Miller และคณะ (2004) ได้แยกเอนไซม์ที่สามารถใช้ในทางการค้าสำหรับการไฮโดรไลซ์ออริซานอลที่เหมาะสมในหลอดทดลองและชี้ให้เห็นว่า pancreatic cholesteryl esterase มีบทบาทสำคัญในกระบวนการสันดาปของออริซานอลในสิ่งมีชีวิต

2.9 ศักยภาพในการทำหน้าที่ของออริซานอลต่อสุขภาพของมนุษย์

ออริซานอลมีศักยภาพในการทำหน้าที่หลายอย่าง เช่น ฤทธิ์ในการต่อต้านออกซิเดชัน (Xu และคณะ, 2001) ลดระดับคอเลสเตอรอลในกระแสเลือด (Sasaki และคณะ, 1990) ลดการดูดซึมคอเลสเตอรอลและการสะสมไขมันบนผนังหลอดเลือดแดงระยะเริ่มแรก (Rong และคณะ, 1997) ยับยั้งการรวมตัวของเกร็ดเลือด (Seetharamaiah และคณะ, 1990) ยับยั้งการเกิดเนื้องอก (Yasukawa และคณะ, 1998) เป็นต้น

2.9.1 ฤทธิ์ในการต่อต้านออกซิเดชัน

สำหรับความเข้าใจในการทำหน้าที่เป็นสารต้านออกซิเดชัน ประการแรกคือการเน้นออกซิเดชันที่เป็นสาเหตุให้เกิดโดยทั่วไปของ reactive oxygen species (ROS) ซึ่งเกี่ยวข้องกับ การเข้าร่วมของออกซิเจนภายใต้ภาวะทางกายภาพและระบบป้องกันออกซิเดชันในอวัยวะของมนุษย์ ซึ่ง ROS คืออนุมูล อะตอม หรือกลุ่มของอะตอมที่มีอิเล็กตรอนคู่โดดเดี่ยวน้อยที่สุด เช่น อนุมูลเพอรอกซิล (ROO^{\cdot}) อนุมูลไฮดรอกซิล (OH^{\cdot}) อนุมูลไนตริก (NO^{\cdot}) และอนุมูลซูเปอร์ออกไซด์ แอนไอออน ($\text{O}_2^{\cdot-}$) หรือสารประกอบที่ไม่เป็นอนุมูล เช่น ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) และซิงกลิตออกซิเจน ($^1\text{O}_2$) ซึ่งมีความสามารถในการออกซิไดซ์โมเลกุล ROS อาจจะเป็นประจุบวก ประจุลบ หรือไม่มีประจุและบางครั้งเรียกว่า ออกซิแดนท์ หรือ โปรออกซิแดนท์

ระบบป้องกันสารยับยั้งออกซิเดชันในร่างกายนั้น ประกอบด้วยสารยับยั้งออกซิเดชันที่เป็นเอนไซม์และไม่เป็นเอนไซม์ ซึ่งหมายความว่าสารนั้นค่อนข้างจะมีความเข้มข้นต่ำเมื่อเปรียบเทียบกับสารที่ทำให้ล่าช้าหรือยับยั้งการเกิดออกซิเดชันของสาร ซึ่งเอนไซม์หลักๆ ที่ยับยั้งการเกิดออกซิเดชัน เช่น เอนไซม์ซูเปอร์ออกไซด์ดิสมัทเทส ($O_2^{\cdot-} \rightarrow H_2O_2$) คตะเลส ($H_2O_2 \rightarrow H_2O$) กลูตาไธโอนเพอออกซิเดส (organic hydroperoxides $ROOH \rightarrow H_2O$) กับ กลูตาไธโอน ($GSH \rightarrow GSSH$) และเมททอล-ไบดิง โปรตีน (เพอริทินและทรานสเฟอร์ริน) วัตถุประสงค์เริ่มต้นของลิวพินเพอออกซิเดชันและการทำความเข้าใจเกี่ยวกับ (แอดิเอ็นเอ) ส่วนสารยับยั้งการเกิดออกซิเดชันที่ไม่เป็นเอนไซม์ เป็นสารที่มีความสำคัญทางโภชนาการ คือ กรดแอสคอร์บิก (วิตามินซี) โทโคฟีรอลและโทโคไตรอีนอล (วิตามินอี) แครทีนอยด์ และฟลาโวนอยด์

2.9.1.1 ฤทธิ์ต่อต้านออกซิเดชันของคอเลสเทอรอล

ผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากปฏิกิริยาออกซิเดชันของคอเลสเทอรอล เป็นสารประกอบที่สามารถก่อให้เกิดการกลายพันธุ์และก่อให้เกิดมะเร็งได้ (Ansari และคณะ, 1982; Watanabe และคณะ, 1988; Paniangvait และคณะ, 1995; Gerhardt และ Gallo, 1998; Woods และ O' Brien, 1998) ซึ่งผลิตภัณฑ์เหล่านี้สามารถก่อให้เกิดอันตรายต่อหลายๆ เซลล์ในหลอดเลือด เช่น เซลล์เม็ดเลือดขาวและ endothelial cell ทำให้เกิดเป็นแผ่นๆ ก่อให้เกิดโรคเกี่ยวกับหัวใจและปอดมากมาย (Kumar และ Singhal, 1991; Morel และ Lin, 1996; Wilson และคณะ, 1997; Lyon และ Brown, 1999) ปฏิกิริยาออกซิเดชันของคอเลสเทอรอลเริ่มต้นโดยอนุมูลอิสระผลิต hydroperoxides, peroxides และ degradation products อื่นๆ (Maerker, 1987; Smith, 1987; Yan และ White, 1990; Chien และคณะ, 1998)

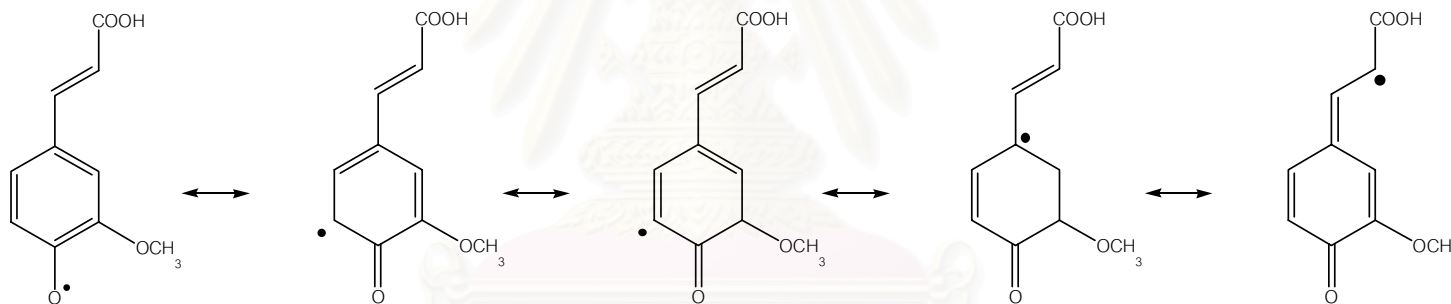
ฤทธิ์ในการต่อต้านออกซิเดชันของออร์ซีซานอลประมาณได้จากการใช้สารเคมีเหนี่ยวนำให้เกิดออกซิเดชันของลิวพิน และวัดรุ่นของผลิตภัณฑ์ที่ถูกออกซิไดซ์เป็นต้นแบบ โดยที่ปฏิกิริยาออกซิเดชันของคอเลสเทอรอลถูกเร่งโดย 2,2'-azobis(2-methylpropionamide) dihydrochloride (AAPH) เพื่อเปรียบเทียบความสามารถในการยับยั้งผลิตภัณฑ์ของคอเลสเทอรอลที่ถูกออกซิไดซ์โดยออร์ซีซานอลและวิตามินอี (Xu และคณะ, 2001) ซึ่งฤทธิ์ในการต่อต้านออกซิเดชันสรุปได้จากระยะเวลาของรุ่นผลิตภัณฑ์ของคอเลสเทอรอลที่ถูกออกซิไดซ์ 7 ตัวด้วยกัน (5,6 α -epoxycholesterol 5,6 β -epoxycholesterol 7-ketocholesterol 7 α -hydroperoxycholesterol 7 β -hydroperoxycholesterol 7 α -hydroxycholesterol และ 7 β -hydroxycholesterol) ในการเข้าร่วมของอนุพันธ์หลัก 3 ตัวของออร์ซีซานอล (cycloartenyl ferulate 24-methylenecycloartenyl ferulate และ campesteryl ferulate) หรืออนุพันธ์ของ

วิตามินอี (α -tocopherol γ -tocopherol α -tocotrienol และ γ -tocotrienol) ผลลัพธ์แสดงให้เห็นว่า 24-methylenecycloartanyl ferulate มีฤทธิ์ในการต่อต้านออกซิเดชันสูงสุดและอนุพันธ์หลักของ ออร์ซีซานอลทั้ง 3 ตัว มีฤทธิ์ในการต่อต้านออกซิเดชันสูงกว่าอนุพันธ์ของวิตามินอี เนื่องจาก โครงสร้างของพวกมันคล้ายกับคอเลสเตอรอลมาก จึงมีความสามารถมากกว่าคอเลสเตอรอลในการรวมเป็นอิมัลชันหยดเล็กๆ จึงมีประสิทธิภาพในการป้องกันคอเลสเตอรอลที่ต่อต้านการทำลาย อนุมูลอิสระ ซึ่งการต่อต้านออกซิเดชันของอนุพันธ์ออร์ซีซานอลนั้นอาศัยหมู่ phenolic hydroxy ใน ส่วนของกรดเฟอรูลิกของออร์ซีซานอล กรดเฟอรูลิกนั้นก็เป็นสารแอนติออกซิแดนท์ ชนิด phenolic acid เพราะว่ามีหมู่ hydroxy บน phenolic ring

2.9.1.2 ฤทธิ์ต่อต้านการก่อให้เกิดมะเร็ง

ไตรเทอร์พีน แอลกอฮอล์ และ สเตอรอล และ oxygenated derivatives ของพวกมันมีฤทธิ์ต่อการวิเคราะห์เบื้องต้นในสิ่งมีชีวิตสำหรับการกระตุ้นการต่อต้านเนื้องอก โดยการยับยั้งอาการบวมที่หูที่เป็นสาเหตุให้เกิดการอักเสบ ซึ่งเหนี่ยวนำโดย 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) ในหนู และกระตุ้นให้เกิดเนื้องอกในระยะที่สองของการก่อให้เกิดมะเร็งในผิวหนังหนู เริ่มต้นโดยใช้ 7,12-dimethylbenz[a]anthracene (DMBA) แล้ว กระตุ้นด้วย TPA (Akihisa และคณะ, 1997; Yasukawa และคณะ, 1991, 1997) และออร์ซีซานอล ที่สกัดได้จากรำข้าวก็สามารถยับยั้งการต่อต้านการเหนี่ยวนำให้เกิดการอักเสบโดย TPA ในหนูได้ (Yasukawa และคณะ, 1998; Akihisa และคณะ, 2000) นอกจากนี้ยังมีการใช้น้ำมันรำข้าวสาธิต ข้าวไรน์ และข้าวโพดเป็นส่วนประกอบในอาหารนั้นมีข้อดีเพราะว่ามีสเตอรอล และสเตอรอล เฟอรูเลท เป็นส่วนประกอบซึ่งเป็นสารที่มีสมบัติป้องกันมะเร็ง (Hakala และคณะ, 2002) นอกจากนี้สเตอรอลพืช โดยเฉพาะซีโตสเตอรอลยังมีประสิทธิภาพในการป้องกันมะเร็งธรรมชาติได้ (Awad และ Fink, 2000) รวมถึงในลำไส้ใหญ่ (Raicht และคณะ, 1980) ต่อมลูกหมาก (Awad และคณะ, 2000a) และเต้านม (Awad และคณะ, 2000b) ดังนั้นออร์ซีซานอลจึงเป็นสารที่มีคุณค่า สามารถต่อต้านการเกิดเนื้องอกได้

การต่อต้านออกซิเดชันของออร์ซีซานอลนั้น Graf (1992) อธิบายไว้ว่า การต่อต้าน ออกซิเดชันเกิดจากหมู่ phenolic hydroxyl ของกรดเฟอรูลิกของออร์ซีซานอลเป็นตัวให้ไฮโดรเจน อะตอมแก่อนุมูลอิสระ แล้วเปลี่ยนอยู่ในรูปของอนุมูล phenoxy (รูปที่ 2.8) ซึ่งเป็นอนุมูลที่มีความ เสถียรของเรโซแนนซ์สูงมากเนื่องจากอิเล็กตรอนคู่โดดเดี่ยวอาจจะไม่ได้อยู่บนอะตอมออกซิเจน เพียงอย่างเดียว แต่มันสามารถย้ายข้ามไปรวมกับโมเลกุลอื่นได้ และการเข้าร่วมของหมู่



รูปที่ 2.8 ความเสถียรของเรโซแนนซ์ของอนุมูลกรดเฟอร์ูลิก (Graf, 1992)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

phenolic hydroxyl อีกหมู่หนึ่งจะช่วยเพิ่มการทำลายอนุมูลเนื่องจากความเสถียรของเรโซแนนซ์ที่เพิ่มขึ้น และ *o*-quinone ที่ถูกสร้างขึ้น แต่ methoxylation ของ *p*-coumaric acid ที่อยู่ในรูปของกรดเฟอรูลิกก็มีส่วนทำลายอนุมูล phenoxy ทำให้ศักยภาพในการต่อต้านออกซิเดชันลดลง อย่างไรก็ตามหมู่ phenolic hydroxyl และ side chain ที่ขยายออกก็สามารถรวมเป็นกรดเฟอรูลิกที่ทำลายอนุมูลได้เป็นอย่างดี ดังนั้นปฏิกิริยาลูกโซ่ของอนุมูล (radical chain reaction) จึงสิ้นสุดลงด้วยไฮโดรเจนอะตอมจากหมู่ phenolic hydroxyl แล้วเปลี่ยนอยู่ในรูปของอนุมูล phenoxy ที่เรโซแนนซ์มีความเสถียร

2.9.2 ความสามารถในการลดคอเลสเตอรอลในเลือดที่มีมากผิดปกติ

ผลของการลดคอเลสเตอรอลในเลือดที่มีมากผิดปกติของน้ำมันพืชที่ผสมกับน้ำมันรำข้าว ในปริมาณที่แตกต่างกันในหญิงสาว ทำให้มีสุขภาพดีเมื่อให้อาหาร 7 วัน (Suzuki และ Osima, 1970) ซึ่งผลนี้ก็มีรายงานในการเลี้ยงหนูด้วยอาหารธรรมชาติที่มีน้ำมันรำข้าวร้อยละ 7 หรืออาหารที่มีคอเลสเตอรอลสูง คือมีคอเลสเตอรอลร้อยละ 1 และน้ำมันรำข้าวร้อยละ 7 นาน 4-7 สัปดาห์ และมีนัยสำคัญของการลดระดับคอเลสเตอรอลรวม และ LDL-C ในเลือดและระดับและลดระดับ HDL-C เล็กน้อยทั้งในอาหารธรรมชาติและอาหารที่มีคอเลสเตอรอลสูง (Sunitha และคณะ, 1997)

ในส่วนของสะพอนนิไฟไม่ได้ของน้ำมันรำข้าวที่มีศักยภาพในการลดคอเลสเตอรอล (Kiribuchi และคณะ, 1983; Ikeda และคณะ, 1985) โดยอาหารที่ใช้เลี้ยงหนูมีคอเลสเตอรอลร้อยละ 0.5 กับ cycloartenol 24-methylenecycloartanol และ/หรือ β -sitosterol ร้อยละ 0.05-1 สามารถลดคอเลสเตอรอลในพลาสมา และเพิ่มการขับถ่ายของเสียที่เกี่ยวข้องกับคอเลสเตอรอลได้ ต่อมาพบว่าออร์ซานอลมีผลในการลดคอเลสเตอรอลในเลือดได้ (Seetharamaiah และ Chandrasekhara, 1989) ในอาหารที่มีน้ำมันรำข้าวร้อยละ 10 แสดงให้เห็นว่าสามารถลดระดับคอเลสเตอรอลในซีรัมและตับของหนูได้อย่างชัดเจน และน้ำมันรำข้าวที่เติมออร์ซานอลลงไปร้อยละ 0.5 ลดได้มากกว่าอย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งสอดคล้องกับ Rong และคณะ (1997) พบว่าในอาหารที่เลี้ยงหนูที่มีคอเลสเตอรอลร้อยละ 0.1 กับ/หรือไม่ใช้ออร์ซานอลร้อยละ 1 นาน 7 สัปดาห์ ซึ่งอาหารที่เลี้ยงหนูที่มีออร์ซานอลสามารถลดคอเลสเตอรอลรวมในพลาสมาได้ร้อยละ 28 และลด LDL-C และ VLDL-C (Very Low Density Lipoprotein Cholesterol) ได้ร้อยละ 34 ขณะที่ลดการดูดซึมคอเลสเตอรอลได้ร้อยละ 25 นอกจากนี้ออร์ซานอลยังแสดงให้เห็นว่าไม่มีผลต่อการสังเคราะห์คอเลสเตอรอลที่ตรวจวัดโดยกิจกรรมของเอนไซม์ HMG-CoA reductase (3-hydroxy-

3-methylglutaryl coenzyme-A reductase) ในตับและลำไส้ ซึ่งเป็นตัวบ่งชี้ที่สำคัญในการลดระดับคอเลสเตอรอลในพลาสมา

มีการศึกษาเกี่ยวกับออร์นิทานอลต่อมนุษย์เพียงเล็กน้อย ซึ่ง Sasaki และคณะ (1990) ได้ศึกษาผลกระทบของออร์นิทานอลต่อ ซีรัม ลิพิด ของผู้ป่วยโรคจิตเรื้อรังและผู้ป่วยที่เป็นโรค dyslipidemia โดยที่ผู้ป่วยทุกคนจะได้รับออร์นิทานอล 100 มก. วันละ 3 ครั้ง นาน 16 สัปดาห์ ผลลัพธ์แสดงให้เห็นว่าระดับคอเลสเตอรอลรวมและ LDL-C ลดลงอย่างมีนัยสำคัญและไม่มีผลข้างเคียง เพราะฉะนั้นออร์นิทานอลจึงมีความปลอดภัยและมีประสิทธิภาพในการรักษาผู้ป่วยที่เป็นโรค dyslipidemia

มีข้อสันนิษฐานโดยทั่วไปว่า ไฟโตสเตอรอลยับยั้งการดูดซึมคอเลสเตอรอลจากอาหารและถุงน้ำดีในลำไส้ได้ เพราะความคล้ายคลึงกันระหว่างโครงสร้างของไฟโตสเตอรอลและคอเลสเตอรอล แต่ไฟโตสเตอรอลจะเพิ่มส่วน side chain เข้าไป ตัวอย่างของไฟโตสเตอรอล เช่น campesterol β -sitosterol และ stigmasterol เป็นต้น ซึ่งเป็นไฟโตสเตอรอลที่พบมากที่สุดใ้น้ำมันพืชที่รับประทานได้ โดยที่ β -sitosterol เป็นที่ยอมรับโดยทั่วไปว่าเป็นสารประกอบเด่นที่มีอิทธิพลต่อการลดคอเลสเตอรอล (Moreau และคณะ, 2002; Ostlund, 2002; Trautwein และคณะ, 2002) ไฟโตสเตอรอลแบ่งเป็น 2 กลุ่มด้วยกันคือ sterol หรือ Δ^5 -sterol (sterol กับพันธะคู่ที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 5) และ stanol (5α -reaction ของพันธะคู่ของ Δ^5 -sterol) (Katan และคณะ, 2003)

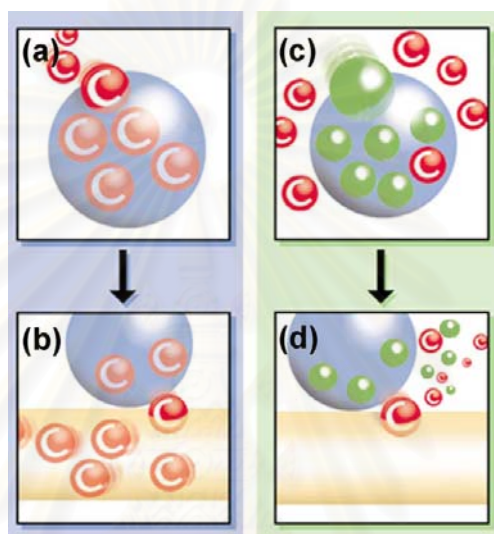
ถึงแม้ว่าคอเลสเตอรอลและไฟโตสเตอรอลจะมีโครงสร้างทางเคมีคล้ายคลึงกัน แต่ก็มีความแตกต่างกันอย่างมากในความสามารถของการดูดซึมเมื่อเปรียบเทียบกัน โดยที่ส่วนเล็กน้อยของคอเลสเตอรอลดูดซึมขณะที่ไฟโตสเตอรอลแสดงการดูดซึมน้อยมากหรือแทบจะไม่มีเลย ซึ่งความแตกต่างเล็กๆ นี้อาจมีผลต่อโครงสร้างทางเคมีของคอเลสเตอรอลและไฟโตสเตอรอลที่มีเหตุผลเพียงพอที่จะอธิบายได้สำหรับคุณภาพของการดูดซึมที่แตกต่างกัน (Trautwein และคณะ, 2003)

กลไกอื่นซึ่งไฟโตสเตอรอลหรือไฟโตสเตอรอลเอสเทอร์ไปรบกวนการดูดซึมคอเลสเตอรอลนั้นไม่ชัดเจนนัก แต่อาศัยขั้นตอนการดูดซึมคอเลสเตอรอล กล่าวคือการแข่งขันในการละลายระหว่างคอเลสเตอรอลและไฟโตสเตอรอลเป็น Dietary Mixed Micelles (DMM) ซึ่งประกอบด้วยเกลือของกรดน้ำดี โมโนเอซิลกลีเซอไรด์ กรดไขมันอิสระ โลซิฟอสฟอลิพิด ฟอสฟอลิพิด และคอเลสเตอรอลอิสระ ซึ่งการเพิ่มเติมของกรดไขมันอิสระ ฟอสฟอลิพิด และโมโนเอซิลกลีเซอไรด์เข้าไปยัง micelles ของเกลือของกรดน้ำดีนั้นเพื่อลดความเข้มข้นของ

micelles ในระยะวิกฤติของเกล็ดของกรดน้ำดีและเพิ่มการละลายเป็น micelles ของคอเลสเตอรอลอย่างมีนัยสำคัญ (Mel' nikov และคณะ, 2004) ซึ่งคอเลสเตอรอลอยู่ในรูปละลายน้ำได้อยู่ภายใน DMM เคลื่อนที่มาถึงตำแหน่งการดูดซึมก็จะถูกดูดซึมเข้าสู่ระบบหมุนเวียน DMM จึงมีบทบาทสำคัญในกลไกของการดูดซึม โดยเป็นตัวขนส่งสารประกอบ lipophilic และ amphiphilic ไปยังผนังลำไส้ (Trautwein และคณะ, 2003) ซึ่งการขนส่งของ DMM นั้นเชื่อว่าเป็นทฤษฎีใหม่ที่จะอธิบายว่าไฟโตสเตอรอลแสดงความสามารถในการลดคอเลสเตอรอลได้ (รูปที่ 2.9) ซึ่งการทดสอบความเชื่อนี้ได้ทดสอบในสิ่งมีชีวิตหลายชนิด [ในสัตว์ทดลองใช้หนูเป็นประจำ (Ikeda และคณะ, 1983, 1988a, 1988b, 1989; Trautwein และคณะ, 2003)] และในห้องปฏิบัติการ (Mel' nikov และคณะ, 2004) ผลสรุปจากการทดลองเหล่านี้ คือ การละลายของคอเลสเตอรอลถูกจำกัดด้วยไฟโตสเตอรอล หรือ ไฟโตสแตนอล (phytostanol) เนื่องจากทั้งคู่มีความสามารถจำกัดในการละลายโมเลกุลที่ไม่ชอบน้ำ และความใกล้ชิดที่มากกว่าของไฟโตสเตอรอลต่อ micelles ไฟโตสเตอรอลเป็นโมเลกุลที่ไม่ชอบน้ำจึงแสดงความใกล้ชิด DMM ได้สูงกว่า ดังนั้นจึงแทนที่คอเลสเตอรอลด้วยการเปลี่ยนแปลงพลังงานอิสระ นอกจากนี้ Trautwein และคณะ (2002) ได้กล่าวไว้ว่า เอสเทอร์ไฟด์ของสเตอรอลและสแตนอลให้ผลเท่าๆ กันในการลดคอเลสเตอรอลและ LDL-C ในพลาสมา ซึ่งสเตอรอลและสแตนอลมีประสิทธิภาพในการลดคอเลสเตอรอลโดยการกระตุ้นการขับถ่ายกากของเสียของคอเลสเตอรอลผ่านการยับยั้งการดูดซึมคอเลสเตอรอลภายในลำไส้ แต่ไม่มีผลกระทบต่อการขับถ่ายกรดน้ำดี

สรุปก็คือ ออร์นิทานอลแสดงความสามารถในการลดคอเลสเตอรอลในเลือดที่มีมากผิดปกติ โดยมีหลักฐานอ้างอิงถึงกลไกการลดคอเลสเตอรอลในเลือดที่มีมากผิดปกติของออร์นิทานอล การดูดซึมคอเลสเตอรอลและการขนส่งในมนุษย์ ซึ่งคอเลสเตอรอลในร่างกายมนุษย์มาจาก 2 แหล่งด้วยกันคือ แหล่งแรกมาจากคอเลสเตอรอลภายใน สังเคราะห์ภายในตับ บางส่วนไปยัง VLDL แล้วถูกขับเข้าสู่ระบบเลือด และบางส่วนเปลี่ยนไปเป็นเกล็ดน้ำดีแล้วเก็บในถุงน้ำดี และปล่อยเข้าสู่ลำไส้เล็กส่วนต้น (duodenum) ซึ่งเป็นสารชะล้างทางชีวภาพอยู่ในรูปของ micelles กับ dietary lipids แล้วจึงดูดซึมอีกครั้งที่ส่วนปลายสุดของลำไส้เล็ก (ileum) และกลับสู่ตับผ่านเส้นเลือดที่เกี่ยวข้องกับตับ ส่วนอีกแหล่งหนึ่งคือ คอเลสเตอรอลจากอาหารภายนอก อันซึ่งเข้าร่วมภายใน micelles แล้วจึงดูดซึมที่ลำไส้เล็กส่วนกลาง (jejunum) แล้วจึงเดินทางต่อไปยังตับผ่านระบบน้ำเหลืองและกระแสเลือด ซึ่งในระหว่างหนึ่งวันคอเลสเตอรอลภายในลำไส้ 2 ใน 3 ส่วนมาจากแหล่งภายใน และ 1 ใน 3 ส่วนมาจากแหล่งอาหาร โดยที่การดูดซึมคอเลสเตอรอลในมนุษย์มีความแตกต่างกันอย่างกว้างขวาง (ร้อยละ 15-75) (Grundy, 1983) ซึ่งแสดงให้เห็นได้จากการลด

คอเลสเตอรอลในซีรัม โดยเฉพาะ LDL-C ที่ เป็นผลจากการยับยั้งการดูดซึมคอเลสเตอรอล (Gylling และ Miettinen, 1985)



รูปที่ 2.9 กลไกการแข่งขันในการละลายระหว่างไฟโตสเตอรอลและคอเลสเตอรอล

- (a) คอเลสเตอรอล (biliary และ dietary)(C) เข้าสู่ micelles; (b)คอเลสเตอรอล เคลื่อนย้ายจาก micelles ไปยังผนังลำไส้ (gut wall) และเข้าสู่กระแสเลือด;
 (c) ไฟโตสเตอรอลป้องกันคอเลสเตอรอลส่วนใหญ่เข้าสู่ micelles;
 (d) คอเลสเตอรอลไม่สามารถดูดซึมได้และไฟโตสเตอรอลก็เป็นตัวกำจัดของเสียออกจากร่างกาย (Leveille, 2002)

2.9.3 สมบัติอื่นๆ ของออร์นิทานอลที่มีผลต่อสุขภาพของมนุษย์

จากรายงานการวิจัยต่างๆ กล่าวว่า ไขมันโอเลอมีผลต่อไฮโปทาลามัส (hypothalamus) และต่อมพิทูอิทารี (pituitary gland) ซึ่งฮอร์โมนที่มีผลกระทบบคือ โกรท ฮอว์โมน (Growth Hormone; GH) ไทรอยด์-สติมูเลทติง ฮอว์โมน (Thyroid-Stimulating Hormone; TSH) โพรแลกติน (Prolactin) และลูทิไนซิง ฮอว์โมน (Leutinizing Hormone; LH) (Murray, 1996)

เพิ่มระดับฮอร์โมนเทสโทสเตอโรน (testosterone) เนื่องจากออร์ชานอลมีผลต่อไฮโปทาลามัส โดยจะไปกระตุ้นการปลดปล่อยโกรทฮอร์โมน รีลีสซิงฮอร์โมน (Growth Hormone Releasing Hormone; GHRH) ให้ปลดปล่อยฮิวแมนโกรทฮอร์โมน (human Growth Hormone; hGH) ซึ่งทั้งเทสโทสเตอโรนและฮิวแมนโกรทฮอร์โมน จะช่วยเพิ่มความแข็งแรงและสร้างกล้ามเนื้อ (Lichenstein และคณะ, 1994; Murray, 1996; Karladee และคณะ, 2004) ทั้งนี้ นักกีฬาและ body builder ต่างเชื่อว่าสเตอรอยด์ที่มีอยู่ตามธรรมชาติที่เป็นส่วนประกอบของออร์ชานอลมีฤทธิ์ในร่างกายเหมือนสเตอรอยด์ที่ใช้สร้างเนื้อเยื่อ (anabolic steroid) (Wheeler และ Garleb, 1991) นอกจากนี้ยังมีการศึกษาโดยใช้ผู้เข้าร่วมที่ได้รับออร์ชานอล 30 มก./วัน นาน 8 สัปดาห์ ผลลัพธ์ที่ได้พบว่ามีน้ำหนักร่างกายและความแข็งแรงเพิ่มขึ้น (Bucci และคณะ, 1990)

กระตุ้นการปลดปล่อยเอนโดρφิน (endorphin) ระหว่างการออกกำลังกายซึ่งจะช่วยให้ลดความรู้สึกอ่อนเพลีย เหน็ดเหนื่อย เมื่อยล้า ทำให้ออกกำลังกายได้นานขึ้น (Rosenbloom และคณะ, 1992) ช่วยรักษาอาการของระบบประสาทที่ผิดปกติ และอาการผิดปกติของหญิงวัยหมดประจำเดือน เนื่องจากความสามารถของออร์ชานอลในการลดการหลั่งลูทีไนซิงฮอร์โมน โดยต่อมพิทูอิทารี ซึ่งในหลายๆ งานวิจัยพบว่าการบำบัดรักษาด้วยออร์ชานอลทำให้อาการของหญิงวัยหมดประจำเดือนดีขึ้น (Ishihara และคณะ, 1982; Ishihara, 1984; Murray, 1996) นอกจากนี้นักวิทยาศาสตร์ชาวญี่ปุ่นได้ทำการศึกษา โดยใช้ผู้หญิง 13 คน ผู้ซึ่งผ่านการตัดมดลูกออก ซึ่งมีลักษณะเหมือนกับหญิงวัยหมดประจำเดือน โดยให้ออร์ชานอล 100 มก. วันละ 3 ครั้ง ผลลัพธ์ที่ได้ผู้หญิงมากกว่าครึ่งมีอาการของหญิงวัยหมดประจำเดือนลดลงร้อยละ 50 เช่น อาการร้อนวูบวาบ เป็นต้น (Murase และ Ishima, 1963) นอกจากนี้ Ishihara และคณะ (1982) ทำการศึกษาโดยให้ผู้หญิง 40 คน รับออร์ชานอล 300 มก. ทุกวัน นาน 4-8 สัปดาห์ ผลสำรวจพบว่าผู้หญิงร้อยละ 80-85 รู้สึกว่าอาการของพวกเขาหายเป็นปกติ

ช่วยรักษาอาการผิดปกติที่เกี่ยวข้องกับการย่อยต่างๆ เช่น แผลในกระเพาะอาหาร กระเพาะอาหารอักเสบ และอาการของลำไส้ที่ไวต่อการกระตุ้น (Mizuta และ Itaya, 1978; Ichimaru และคณะ, 1984; Murray, 1996) เนื่องจากความสามารถของออร์ชานอลในการลดการหลั่งกรดในกระเพาะอาหาร และการควบคุมให้ระบบประสาทหลังสารที่เกี่ยวข้องกับการย่อยกลับสู่สภาพปกติ (Bucci และคณะ, 1990) นอกจากนี้ออร์ชานอลยังยับยั้งการรวมตัวของเกร็ดเลือดที่เหนียวนำโดยเอ็ดดีพีและคอลลาเจนอย่างมีนัยสำคัญ (Seetharamaiah และคณะ, 1990; Eitenmiller, 1997) และลดการสะสมของไขมันบนผนังหลอดเลือดแดงระยะแรกเริ่ม (Rong และคณะ, 1997) อย่างไรก็ตามก็ยังคงต้องมีการศึกษาถึงกลไกของออร์ชานอลต่อการเพิ่มการหลั่ง

ฮอริโมนที่ได้กล่าวถึงมาแล้ว นอกจากนี้จะต้องศึกษาถึงประสิทธิภาพทั้งหมดของฮอริซานอลต่อฮอริโมนที่เกี่ยวข้องกับไฮโปทาลามัสและต่อมพิทูอิทารี

2.10 การประยุกต์ใช้ฮอริซานอล

เนื่องจากบทบาทหน้าที่ของฮอริซานอลที่ค้นพบมานั้นมีความหวังว่า ฮอริซานอลอาจจะมี ความสำคัญในตลาดการค้าและประยุกต์ใช้ได้อย่างกว้างขวางในผลิตภัณฑ์ต่างๆ ฮอริซานอลสามารถเพิ่มคุณค่าในผลิตภัณฑ์อาหารต่างๆ เช่น ธัญพืชและมาร์การีนเพื่อลดระดับคอเลสเตอรอลและต่อต้านออกซิเดชัน เติมลงไปใต้น้ำมันสำหรับทอดเพื่อเพิ่มความเสถียร เติมลงไปในตัวดับที่ใช้เคลือบผิวหน้าอาหารหรือภาชนะบรรจุอาหาร เพื่อประสิทธิภาพการต่อต้านออกซิเดชันในการยืดระยะเวลาการเก็บอาหารหรือใช้เป็นวัตถุกันเสียธรรมชาติ และยังสามารถเสริมเข้าไปในผลิตภัณฑ์ที่ไม่ใช่อาหาร เช่น โลชั่นบำรุงผิวและครีมกันแดด เนื่องจากความสามารถของฮอริซานอลในการดูดกลืนรังสียูวี และผลิตภัณฑ์ดูแลผิวสำหรับซ่มแซมพื้นผิวแห้งและไวต่อการกระตุ้น นอกจากนี้ฮอริซานอลยังอาจจะสามารถพัฒนาต่อไปเป็นยาลดคอเลสเตอรอล ทำให้ลดความเสี่ยงต่อการเป็นโรคหัวใจ หรือใช้สร้างกล้ามเนื้อได้

บทที่ 3

วิธีการดำเนินการวิจัย

3.1 เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย

3.1.1 Fourier Transform Infrared Spectrophotometer (FT-IR)

เครื่อง Fourier Transform Infrared Spectrophotometer (FT-IR) ของบริษัท Nicolet Impact รุ่น 410 สำหรับวัดอินฟราเรดสเปกตรัมของสาร สารตัวอย่างที่เป็นของแข็งเตรียมโดยบดผสมกับโพแทสเซียมโบรไมด์ (KBr) ชัดเป็นแผ่น (pellet) ส่วนสารตัวอย่างที่เป็นของเหลวเตรียมโดยหยดของเหลวลงบนแผ่นวินิลไคลไรด์ที่ทำด้วยโซเดียมคลอไรด์ (NaCl)

3.1.2 Nuclear Magnetic Resonance Spectrometer (NMR)

เครื่อง Nuclear Magnetic Resonance Spectrometer (NMR) รุ่น Varian Mercury 400 NMR สำหรับการหาสเปกตรัมของ $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$, COSY, NOESY, HSQC และ HMBC โดยวิเคราะห์สเปกตรัมของ $^1\text{H-NMR}$ ที่ 400 MHz และ $^{13}\text{C-NMR}$ ที่ 100 MHz สารตัวอย่างที่ใช้ตรวจวัดเตรียมโดยละลายในสารละลายตัวที่เรีทเท็ด คลอโรฟอร์ม (CDCl_3) โดยวัดค่าเคมีคอลชิฟต์เป็นพีพีเอ็ม (ppm) สำหรับค่าเคมีคอลชิฟต์ (δ) อ้างอิงกับค่าเคมีคอลชิฟต์ของตัวทำละลายที่ตกค้างอยู่ในตัวทำละลายชนิดตัวที่เรีทเท็ด โดยที่ CDCl_3 อ้างอิงที่ 7.26 (δ) ppm สำหรับ ^1H nuclei และ 77.16 (t) ppm สำหรับ ^{13}C nuclei

3.1.3 Ultraviolet-Visible Spectrophotometer (UV-Vis)

เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) รุ่น Varian Cary 50 Probe เตรียมโดยนำสารตัวอย่างมาละลายด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ที่สารนั้นละลายได้ดี แล้วเจือจางให้ได้ความเข้มข้นที่เหมาะสมก่อนนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงและใช้ตัวทำละลายอินทรีย์นั้นเป็นตัวทำละลายอ้างอิง

3.1.4 Rotary Vacuum Evaporator

เครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุน (Rotary Vacuum Evaporator) ของบริษัท Buchi ประเทศสวิตเซอร์แลนด์

3.1.5 เครื่องเขย่า (Shaker)

เครื่องเขย่า (ชั้น 20) ของหน่วยวิจัยไบโออินทรีย์แก๊นิกเคมี (Research Centre of Bioorganic Chemistry Unit; RCBC) คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.1.6 High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

เครื่อง HPLC รุ่น ThermoFinnigan SpectraSystem ต่ออยู่กับ semi-preparative reverse-phase ODS-Hypersil column (25 ซม. × 10 มม. × 5 ไมโครเมตร) ของบริษัท Thermo Electron Corporation ประเทศสหรัฐอเมริกา ซึ่งตรวจวัดออร์แกนอลด้วย SpectraSystem UV6000 photodiode array detector ที่ความยาวคลื่น 330 นาโนเมตร โดยใช้วัฏภาคเคลื่อนที่เป็น เมธานอลต่ออะซิโตนในอัตราส่วน 40:60 (isocratic elution) ที่อัตราการไหล 1 มล./นาที ด้วย sample loop 500 ไมโครลิตร โดยที่ retention time ของตัวอย่าง ขึ้นันโดยโครมาโทแกรมของออร์แกนอลมาตรฐาน และบันทึกโครมาโทแกรมด้วย ChromQuest 4.1SP2 software

3.1.7 Microplate Reader Spectrophotometer

เครื่อง Microplate Reader Spectrophotometer วัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร ประมวลผลโดยใช้ software SUNRISE Magellan™ v.4.0 TECAN ประเทศออสเตรเลีย

3.1.8 Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometer (MALDI-TOF)

เครื่อง MALDI-TOF รุ่น BIFLEX ของบริษัท Bruker ประเทศเยอรมัน สำหรับวัดมวลโมเลกุลของสาร

3.2 สารเคมี

3.2.1 ตัวทำละลายอินทรีย์

3.2.1.1 ตัวทำละลายอินทรีย์ชนิด *commercial grade* ก่อนนำมาใช้ทำให้บริสุทธิ์ด้วยการกลั่น ได้แก่ เฮกเซน และเอทิลอะซิเตต

3.2.1.2 ตัวทำละลายอินทรีย์ชนิด *analytical grade* ได้แก่ เฮกเซน เอทิลอะซิเตต อะซิโตน เมทานอล คลอโรฟอร์ม และแอมโซลูทเอทานอล

3.2.1.3 ตัวทำละลายอินทรีย์ชนิด *HPLC grade* ได้แก่ เมทานอล อะซิโตน ไตรคลอโรเอทิลีน

3.2.1.4 ตัวทำละลายอินทรีย์ชนิด *deuterated* สำหรับ NMR ได้แก่ ดิวเทอเรียมคลอโรฟอร์ม (CDCl_3)

3.2.2 สารเคมีอื่นๆ

3.2.2.1 ซิลิกา เจล Merck' s silica gel 60 Art. 1.09385.1000 (230-400 mesh ASTM) สำหรับคอลัมน์โครมาโทกราฟี

3.2.2.2 แผ่นโครมาโทกราฟีแบบบาง (*Thin Layer Chromatography, TLC*) สำเร็จรูป ชนิด Art. 5554 TLC Aluminium Sheet Silica gel $^{60}\text{F}_{254}$ (1.05554.0001) ของบริษัท Merck, Damstadt ประเทศเยอรมัน ขนาด 20×20 ตร.ซม. หนา 0.2 มม.

3.2.2.3 2,2'-diphenyl-1-picrylhydrazyl (*DPPH'*) radical ซื้อจากบริษัท Sigma-Aldrich ประเทศเยอรมัน

3.2.2.4 แอลฟา-โทโคฟีรอล ซื้อจากบริษัท Sigma-Aldrich ประเทศเยอรมัน

3.3 ตัวอย่าง

รำข้าวที่ใช้ในการวิจัย คือ รำข้าวพันธุ์ทุ่งสง (Thungsong Rice Bran, TS) เป็นข้าวเจ้าพันธุ์พื้นเมืองทางภาคใต้ของประเทศไทย และรำข้าวเหนียวดำ (Purple Glutinous Rice Bran; PG) หรือข้าวก้านาน เป็นข้าวเหนียวสีคล้ำหรือสีม่วงเข้ม นิยมปลูกทางภาคเหนือของประเทศไทย รำข้าวที่ได้เก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ก่อนนำมาใช้ในการวิจัย

ออริซานอลมาตรฐาน (standard oryzanol) สำหรับใช้เป็นสารอ้างอิง (reference compound) ได้รับความกรุณาจากนายประวิทย์ สันติวัฒนา (บริษัท น้ำมันบริโภคไทย จำกัด)

3.4 การสกัดน้ำมันดิบรำข้าว

ซึ่งรำข้าว 500 กรัม แบ่งใส่พลาสติกขนาด 250 มล. เท่าๆ กัน สกัดด้วยเฮกเซน โดยเติมลงในพลาสติกๆ ละ 100 มล. ปิดด้วยอะลูมิเนียมฟอยล์ แล้วนำไปแช่อบบนเครื่องเขย่า นาน 3 วัน ที่อุณหภูมิห้อง (25-30 องศาเซลเซียส) จากนั้นนำมากรอง เก็บส่วนใสไว้ กากที่เหลือนำไปสกัดซ้ำอีก 3-5 ครั้ง ด้วยวิธีดังกล่าว ส่วนใสที่ได้นำมารวมกันแล้วนำไประเหยเอาตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ได้เป็นน้ำมันดิบรำข้าว (crude rice bran oil) (แผนผังที่ 3.1)

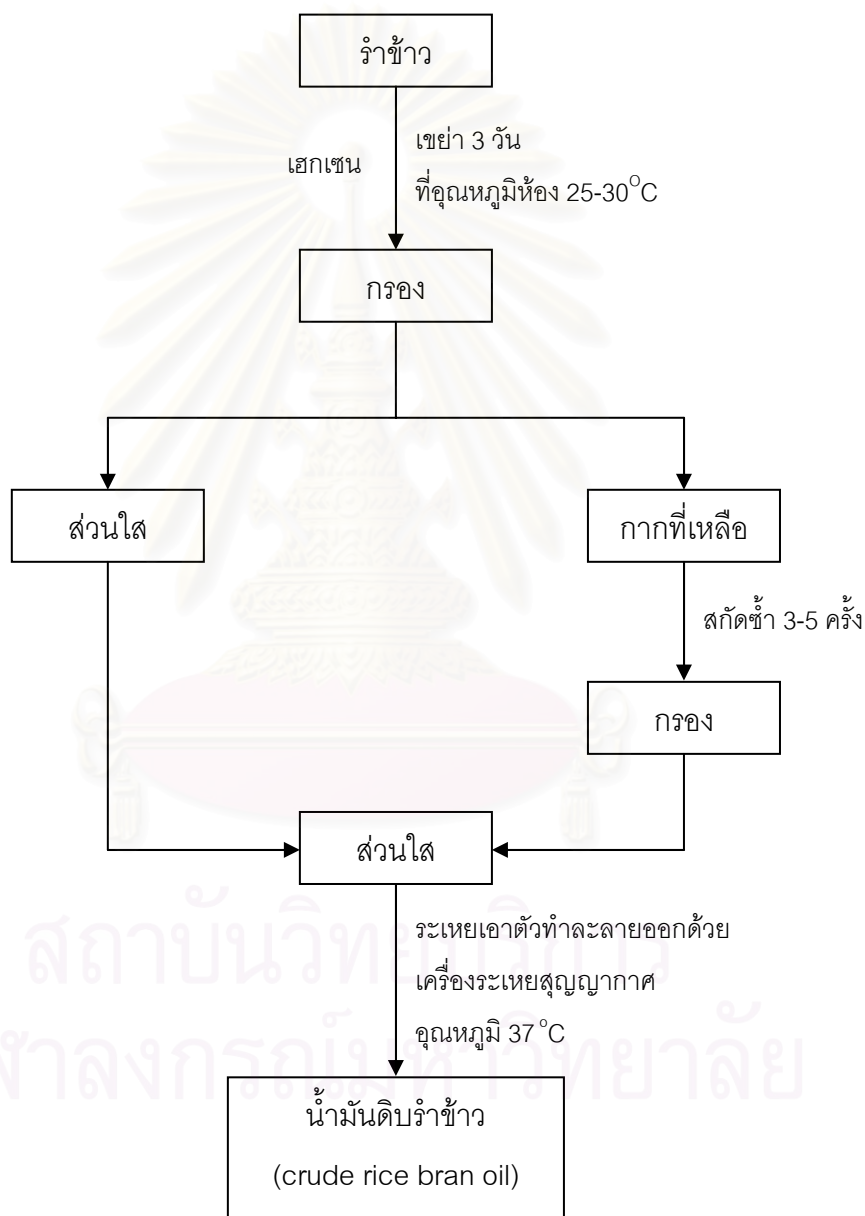
3.5 การประมาณปริมาณออริซานอล

การประมาณปริมาณออริซานอลทั้งหมดในน้ำมันดิบรำข้าว ใช้เทคนิค ยูวี สเปกโทรโฟโตเมตรี ด้วยการคำนวณค่า specific extinction coefficient ($\epsilon_{1\text{ cm}}$) ของออริซานอลมาตรฐานที่ให้ค่า optical density สูงสุดในเอธิลอะซิเตตที่ความยาวคลื่น (λ_{max}) 321 นาโนเมตร จากสมการของ Beer's Laws เพื่อใช้ในการคำนวณปริมาณออริซานอลทั้งหมดในน้ำมันดิบรำข้าวพันธุ์ทุ่งสงและน้ำมันดิบรำข้าวเหนียวดำ

3.6 การทำให้ออริซานอลบริสุทธิ์

นำน้ำมันดิบรำข้าวมาละลายด้วยเฮกเซนเล็กน้อย บรรจุลงซิลิกา เจล คอลัมน์โครมาโทกราฟี โดยใช้วัฏภาคเคลื่อนที่เป็น เฮกเซนต่อเอธิลอะซิเตตในอัตราส่วน 1:0-0:1 แล้วเก็บสารที่ถูกระบายออกมาเป็นลำดับส่วน จากนั้นนำไประเหยเอาตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศ ได้ออริซานอลผสม ซึ่งตรวจหาตำแหน่งของออริซานอลด้วยเทคนิค TLC โดยเปรียบเทียบกับออริซานอลมาตรฐาน ซึ่งใช้แผ่น TLC สำเร็จรูป ใช้ระยะทางให้วัฏภาคเคลื่อนที่ 4 ซม. โดยแต้มสารด้วยหลอดรูเล็ก (capillary tube) แล้วปล่อยให้เกิดการแยกในขวดแก้วโดยให้วัฏภาคเคลื่อนที่ขึ้นไปถึงแนวตัวทำละลาย จากนั้นทำให้แห้ง แล้วนำไปตรวจหาตำแหน่งของสาร

บนแผ่น TLC โดยส่องภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ตที่ความยาวคลื่น 254 และ 365 นาโนเมตร หรือ
 จุ่มลงในวานิลิน รีเอเจนต์ (ละลายวานิลิน 0.5 กรัมในเอทานอล 95 มล. และกรดซัลฟิวริกเข้มข้น
 4.5 มล.) แล้วนำไปเผาจนกระทั่งเกิดการเปลี่ยนสี จากนั้นนำออริซานอลผสมมาตกผลึกด้วย
 เมทานอลและอะซิโตน ในอัตราส่วน 1:1



แผนผังที่ 3.1 การสกัดน้ำมันดิบรำข้าว

3.6.1 การแยกอริซานอลในน้ำมันดิบรำข้าวพันธุ์ทุ่งสง

นำรำข้าวพันธุ์ทุ่งสง 500 กรัม มาสกัดด้วยเฮกเซนทิ้งไว้นาน 3 วัน บนเครื่องเขย่า ที่อุณหภูมิห้อง (25-30 องศาเซลเซียส) สกัดซ้ำ 3-5 ครั้ง ได้สารสกัดเฮกเซนหรือน้ำมันดิบรำข้าวพันธุ์ทุ่งสง (34.33 กรัม) หลังจากการระเหยเอาตัวทำละลายออก (แผนผังที่ 3.2)

น้ำมันดิบรำข้าวพันธุ์ทุ่งสง (33.01 กรัม) ละลายด้วยเฮกเซนเล็กน้อย บรรจุลง ซิลิกา เจล คอลัมน์ โครมาโทกราฟี (ซิลิกา เจล 300 กรัม) โดยใช้วัฏภาคเคลื่อนที่เป็น เฮกเซนต่อ เอธิลอะซิเตตในอัตราส่วน 1:0-0:1 เก็บสารที่ถูกชะออกมาลำดับส่วนละ 50 มล. แล้วนำไป ตรวจสอบตำแหน่งสารด้วยแผ่น TLC จากนั้นรวมลำดับส่วนต่างๆ ที่ให้ลักษณะตำแหน่งสารบน แผ่น TLC เหมือนกัน แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง UV-Vis สเปกโทรโฟโตมิเตอร์ โดยเลือกลำดับส่วนที่มีลักษณะการดูดกลืนแสงยูวีคล้ายคลึงกับอริซานอลมาตรฐาน (รูปที่ 21 ก ภาคผนวก ก) และทำให้แห้ง (ตารางที่ 3.1)

3.6.1.1 การแยกอริซานอลผสม TS1

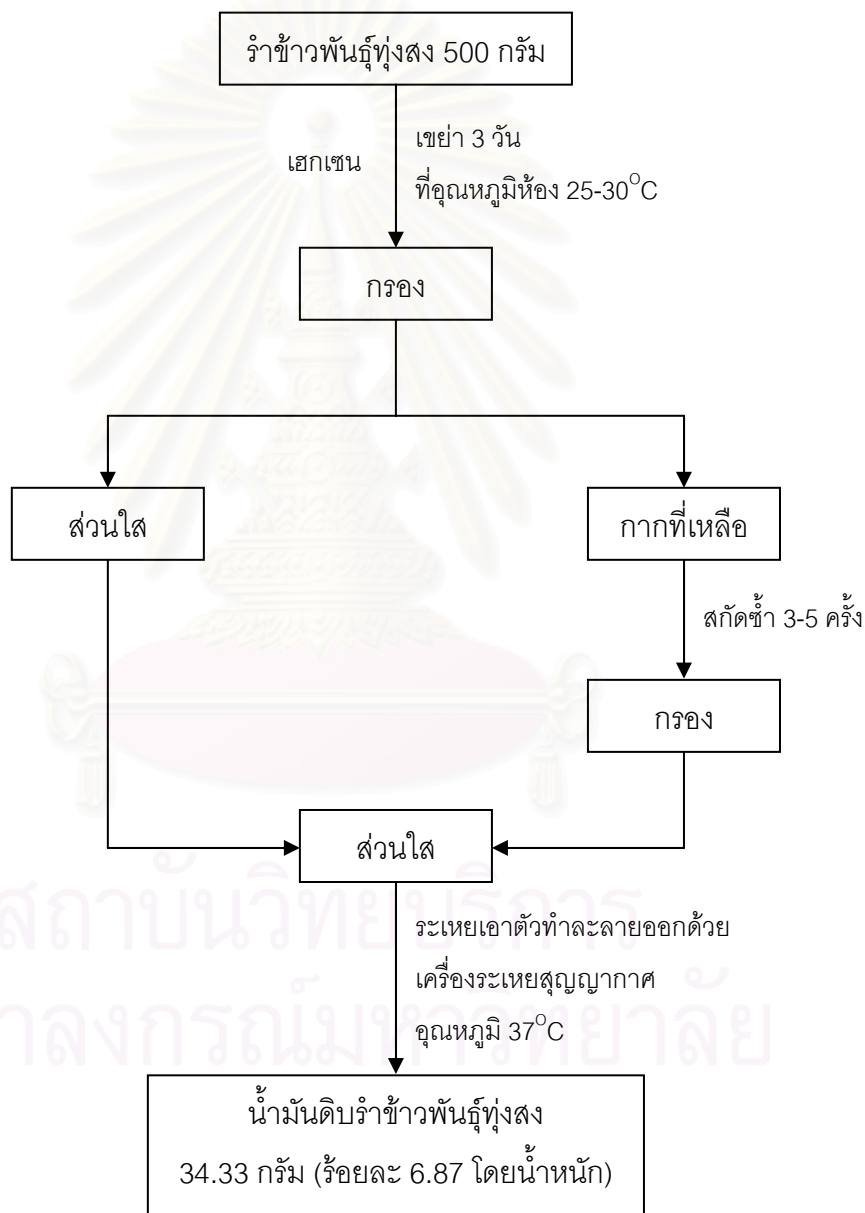
ลำดับส่วนรวมที่ T05 ได้จากการใช้เทคนิคซิลิกา เจล คอลัมน์ โครมาโทกราฟี ที่ชะด้วยวัฏภาคเคลื่อนที่เป็นเอธิลอะซิเตตร้อยละ 15 ในเฮกเซน จากนั้นทำให้บริสุทธิ์ด้วยการตกผลึก โดยใช้เมธานอลและอะซิโตนในอัตราส่วน 1:1 ได้เป็นอริซานอลผสม โดยยืนยันผลจาก TLC pattern (รูปที่ 1 ก ภาคผนวก ก) และการดูดกลืนแสงยูวี เมื่อเปรียบเทียบกับ อริซานอลมาตรฐาน (รูปที่ 3 ก และ 4 ก ภาคผนวก ก) ซึ่งมีลักษณะเป็นผงสีขาวปนเหลือง (77.83 มก.) (แผนผังที่ 3.3) แล้วทำการจำแนกและระบุชนิดอนุพันธ์ของอริซานอลผสม TS1 โดยใช้ เทคนิคทางสเปกโทรสโกปี

3.6.2 การแยกอริซานอลในน้ำมันดิบรำข้าวเหนียวดำ

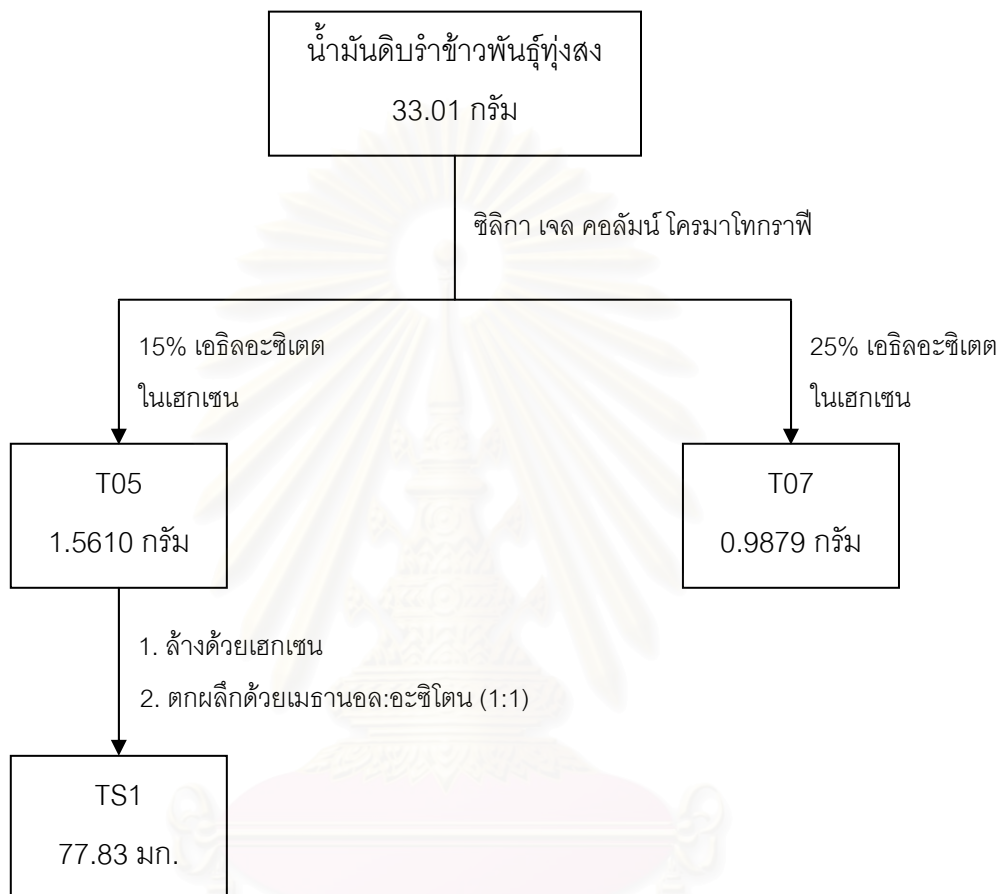
นำรำข้าวเหนียวดำ 500 กรัม มาสกัดด้วยเฮกเซนทิ้งไว้นาน 3 วัน บนเครื่องเขย่า ที่อุณหภูมิห้อง (25-30 องศาเซลเซียส) สกัดซ้ำ 3-5 ครั้ง ได้สารสกัดเฮกเซนหรือน้ำมันดิบรำข้าวเหนียวดำ (39.54 กรัม) หลังจากการระเหยเอาตัวทำละลายออก (แผนผังที่ 3.4)

น้ำมันดิบรำข้าวเหนียวดำ (35.12 กรัม) ละลายด้วยเฮกเซนเล็กน้อย บรรจุลง ซิลิกา เจล คอลัมน์ โครมาโทกราฟี (ซิลิกา เจล 350.19 กรัม) โดยใช้วัฏภาคเคลื่อนที่เป็น เฮกเซน ต่อเอธิลอะซิเตตในอัตราส่วน 1:0-0:1 เก็บสารที่ถูกชะออกมาลำดับส่วนละ 50 มล. แล้วนำไป ตรวจสอบตำแหน่งสารด้วยแผ่น TLC จากนั้นรวมลำดับส่วนต่างๆ ที่ให้ลักษณะตำแหน่งสารบน

แผ่น TLC เหมือนกัน แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง UV-Vis สเปกโทรโฟโตมิเตอร์ โดยเลือกลำดับส่วนที่มีลักษณะการดูดกลืนแสงยูวีคล้ายคลึงกับออริซานอลมาตรฐาน (รูปที่ 21 ก ภาคผนวก ก) และทำให้แห้ง (ตารางที่ 3.2)



แผนผังที่ 3.2 การสกัดน้ำมันดิบรำข้าวพันธุ์ทุ่งสง



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

แผนผังที่ 3.3 วิธีการแยกคอริชานอลในน้ำมันดิบรำข้าวพันธุ์ทุ่งสง

ตารางที่ 3.1 ลักษณะของลำดับส่วนต่างๆ ที่แยกได้จากน้ำมันดิบจำข้าวพันธุ์ทุ่งสง

รวม ลำดับส่วน	ลำดับส่วน	วิฎภาคเคลื่อนที่	ลักษณะ	น้ำหนัก (กรัม)	ร้อยละโดยน้ำหนัก ของน้ำมันดิบจำข้าว
T01	1-26	100% เฮกเซน	ของแข็งสีขาว คล้ายไข	0.1389	0.421
T02	27-52	5% เอลิอะซีเตตในเฮกเซน	ของแข็งสีขาว คล้ายไข	0.0098	0.030
T03	53	5% เอลิอะซีเตตในเฮกเซน	ของแข็งสีขาว คล้ายไข	0.3980	1.206
T04	54-96	10% เอลิอะซีเตตในเฮกเซน	ของเหลวใสสีส้มอ่อน มีของแข็งสีขาวแขวนลอยอยู่	28.4199	86.095
T05	97-108	15% เอลิอะซีเตตในเฮกเซน	ของเหลวใสสีส้มอมน้ำตาล มีของแข็งสีขาว ปนเหลือง ตกตะกอนอยู่ คล้ายผลึก	1.5610	4.729
T06	109-128	20% เอลิอะซีเตตในเฮกเซน	ของเหลวใสสีน้ำตาลอ่อน	0.9305	2.819
T07	129-200	25% เอลิอะซีเตตในเฮกเซน	ของเหลวใสสีน้ำตาล	0.9879	2.993
T08	201-265	30-45% เอลิอะซีเตตในเฮกเซน	ของเหลวใสสีน้ำตาล	0.3345	1.013
T09	266-281	50% เอลิอะซีเตตในเฮกเซน	ของเหลวหนืดสีน้ำตาลอ่อน	0.0109	0.033
T10	282-284	100% เอลิอะซีเตต	ของเหลวหนืดสีน้ำตาลอ่อน	0.0206	0.062
T11	285-292	100% เอลิอะซีเตต	ของเหลวหนืดสีน้ำตาลอ่อน	0.0185	0.056

3.6.2.1 การแยกออริซานอลผสม PG1

ลำดับส่วน P09 ได้จากการใช้เทคนิคซิลิกา เจล คอลัมน์ โครมาโทกราฟี ที่ชะด้วยวัฏภาคเคลื่อนที่เป็นเอธิลอะซิเตตร้อยละ 15 ในเฮกเซน จากนั้นตกผลึกโดยใช้เมทานอล และอะซิโตนในอัตราส่วน 1:1 แล้วนำไปแยกด้วยเทคนิคซิลิกา เจล คอลัมน์ โครมาโทกราฟีและตกผลึกซ้ำอีกครั้ง จากนั้นแยกด้วย HPLC และ preparative TLC ได้ออริซานอลผสม PG1 โดยยืนยันผลจาก TLC pattern (รูปที่ 2ก ภาคผนวก ก) และการดูกลิ่นแสงยูวีเมื่อเปรียบเทียบกับออริซานอลมาตรฐาน (รูปที่ 11ก และ 12ก ภาคผนวก ก) ซึ่งมีมีลักษณะกึ่งของเหลวของแข็งสีเหลือง (83.6 มก.) (แผนผังที่ 3.5) แล้วทำการจำแนกและระบุชนิดอนุพันธ์ของออริซานอลผสม PG1 โดยใช้เทคนิคทางสเปกโทรสโกปี

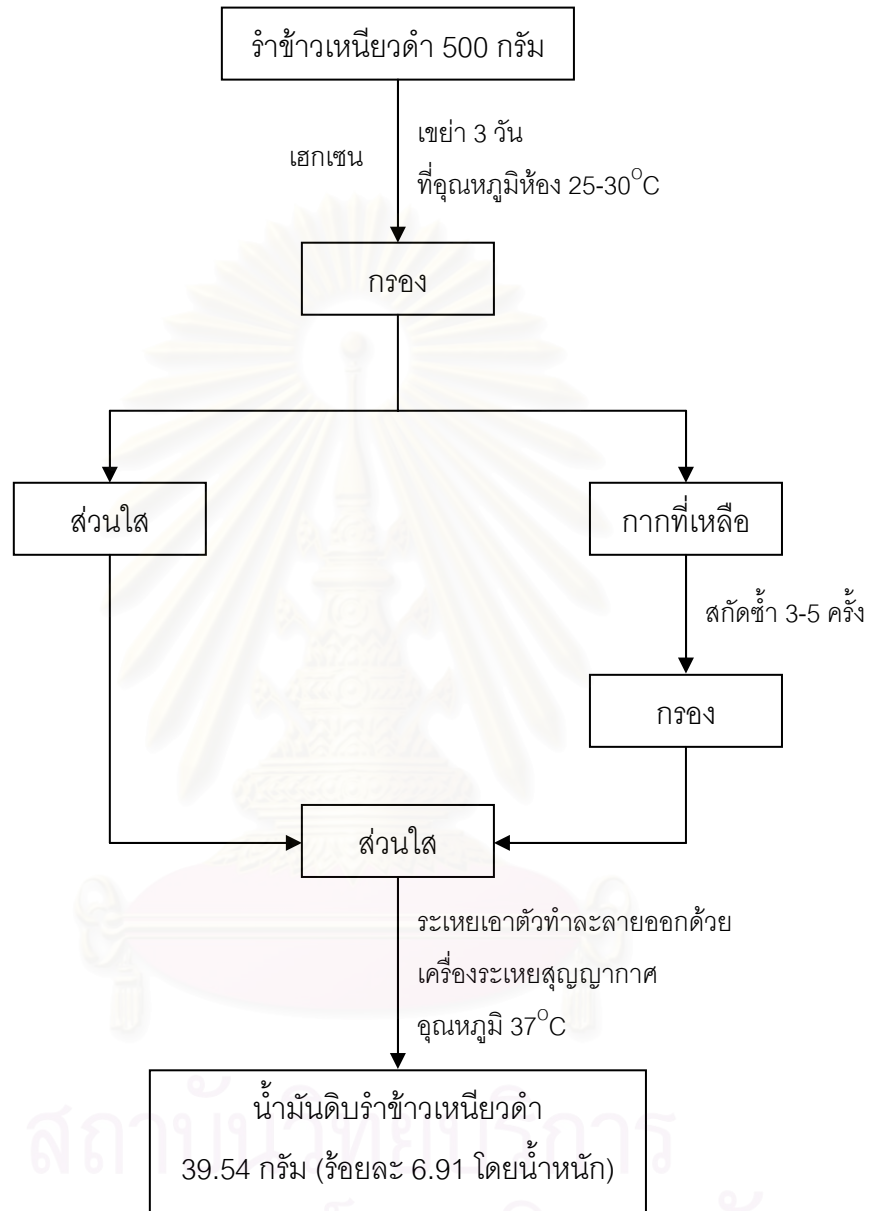
3.7 การจำแนกและระบุชนิดอนุพันธ์ของออริซานอล

การจำแนกและระบุชนิดอนุพันธ์ของออริซานอลโดยใช้เทคนิคทางสเปกโทรสโกปี (IR $^1\text{H-NMR}$ และ MS)

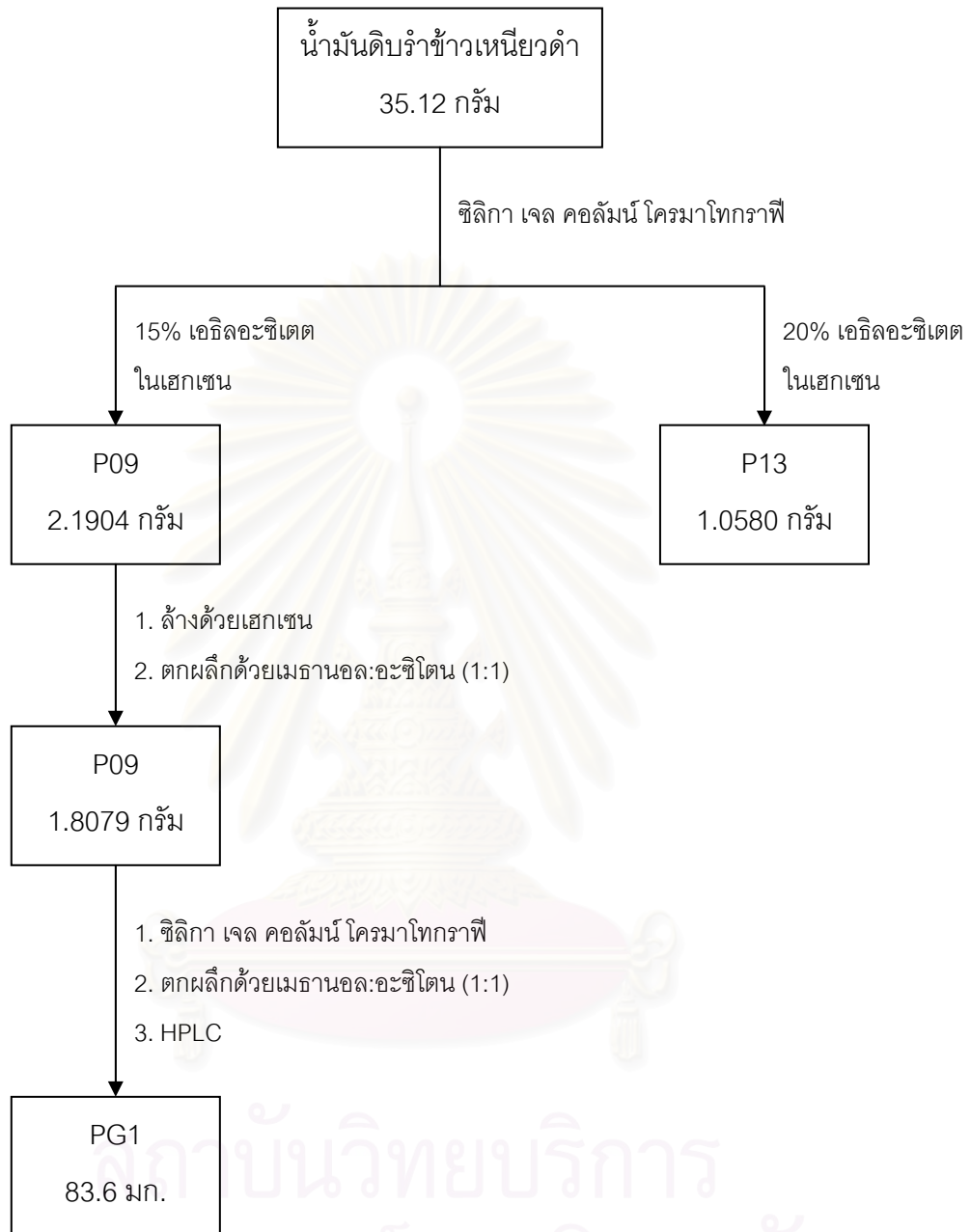
3.8 การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของออริซานอล

3.8.1 ฤทธิ์ในการต่อต้านออกซิเดชันของออริซานอลผสมต่อ DPPH $^{\cdot}$ radical

ฤทธิ์ในการทำลายอนุมูลอิสระของออริซานอลผสม ทดสอบโดยใช้ 2,2'-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH $^{\cdot}$) radical ออริซานอลผสมและแอลฟา-โทโคฟีรอล (ตัวควบคุม) เตรียมโดยละลายในแอบโซลูทเอธานอล ใช้เป็น stock solution (1 มก./มล.) จากนั้นปิเปตต์ออริซานอลและแอลฟา-โทโคฟีรอล 50 ไมโครลิตร ลงในทุกหลอดทดลอง (เก็บในที่มืดโดยหลอดทดลองด้วยอะลูมิเนียมฟอยล์) ซึ่งเตรียมตัวอย่างที่ความเข้มข้นต่างๆ คือ 200, 100, 80, 60, 40, 20, 0 ไมโครกรัม/มล. (แต่ละความเข้มข้นทำ 3 ซ้ำ) แล้วเติมสารละลาย DPPH $^{\cdot}$ (ความเข้มข้น 200 ไมโครโมลาร์ ในแอบโซลูทเอธานอล แล้วเก็บที่อุณหภูมิ - 20 องศาเซลเซียส โดยห่อด้วยอะลูมิเนียมฟอยล์ ก่อนนำมาใช้) 100 ไมโครลิตร เขย่าให้กันแล้วบ่มให้เกิดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้อง นาน 30 นาที ในที่มืด และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร (แผนผังที่ 3.6) แล้วคำนวณค่าการยับยั้งเป็นร้อยละ (%inhibition) (Juliano และคณะ, 2005) และค่า IC $_{50}$ ซึ่งหาได้จากกราฟมาตรฐาน



แผนผังที่ 3.4 การสกัดน้ำมันดิบรำข้าวเหนียวดำ



แผนผังที่ 3.5 วิธีการแยกคอริซานอลในน้ำมันดิบรำข้าวเหนียวดำ

ตารางที่ 3.2 ลักษณะของลำดับส่วนต่างๆ ที่แยกได้จากน้ำมันดิบรำข้าวเหนียวดำ

รวม ลำดับส่วน	ลำดับส่วน	วิฎภาคเคลื่อนที่	ลักษณะ	น้ำหนัก (กรัม)	ร้อยละโดยน้ำหนัก ของน้ำมันดิบรำข้าว
P01	1-8	100% เฮกเซน	ของแข็งสีขาว	0.0403	0.115
P02	9-15	100% เฮกเซน	ของแข็งสีขาว	0.1378	0.392
P03	16-23	100% เฮกเซน	ของแข็งสีเหลืองอ่อน	1.8962	5.399
P04	24-37	5% เอธิลอะซิเตตในเฮกเซน	ของเหลวใสสีเหลืองอ่อน	15.9649	45.458
P05	38-44	5% เอธิลอะซิเตตในเฮกเซน	ของแข็งสีชมพูอ่อน	5.4538	15.529
P06	45-47	10% เอธิลอะซิเตตในเฮกเซน	ของเหลวใสสีเหลืองอ่อน มีของแข็งสีขาวแขวนลอยอยู่	1.2780	3.639
P07	48-53	10% เอธิลอะซิเตตในเฮกเซน	ของเหลวใสสีเหลืองอมส้ม	2.2741	6.475
P08	54-60	10% เอธิลอะซิเตตในเฮกเซน	ของเหลวใสสีเหลือง	2.3817	6.782
P09	61-73	15% เอธิลอะซิเตตในเฮกเซน	ของเหลวใสสีเหลืองเข้ม มีผลึก	2.1904	6.237
P10	74-78	15% เอธิลอะซิเตตในเฮกเซน	ของเหลวสีน้ำตาลดำ	0.8335	2.373
P11	79-87	15% เอธิลอะซิเตตในเฮกเซน	ของเหลวสีดำ	0.8338	2.374
P12	88-109	15% เอธิลอะซิเตตในเฮกเซน	ของเหลวสีดำ	0.8411	2.395
P13	110-138	20% เอธิลอะซิเตตในเฮกเซน	ของเหลวสีน้ำตาลเข้ม	1.0580	3.013
P14	139-151	30% เอธิลอะซิเตตในเฮกเซน	ของเหลวใสสีน้ำตาลเข้ม	0.4629	1.318
P15	152-161	50% เอธิลอะซิเตตในเฮกเซน	ของเหลวใสสีน้ำตาล	0.2561	0.729
P16	162-173	50% เอธิลอะซิเตตในเฮกเซน	ของเหลวใสสีน้ำตาล	0.3687	1.050
P17	174-179	100% เอธิลอะซิเตต	ของเหลวใสสีน้ำตาล	0.3050	0.868

$$\text{การยับยั้งเป็นร้อยละ (\%inhibition)} = \left(1 - \frac{A_{\text{สารตัวอย่าง}}}{A_{\text{blank}}} \right) \times 100$$

3.8.2 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง

การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งของออร์แกนอลผสม ส่งทดสอบที่
ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพอุตสาหกรรม คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
วิทยาเขตหาดใหญ่ โดย ดร. อัครวิทย์ กาญจนโอภาส และนายธีรศักดิ์ อนันตพงศ์

เซลล์มะเร็งที่ใช้ในงานวิจัยมี 4 ชนิดคือ เซลล์มะเร็งเต้านม (breast cancer: MCF-7) เซลล์มะเร็งปากมดลูก (cervical cancer: Hela) เซลล์มะเร็งลำไส้ (colon cancer: HT-29) และเซลล์มะเร็งในช่องปาก (oral cavity cancer: KB) เลี้ยงในอาหาร Eagle 's Minimal Essential Medium (EMEM) นาน 3 วัน ทำการเตรียมสารแขวนลอยเซลล์เพื่อคำนวณหาจำนวนเซลล์ต่อมิลลิลิตร โดยการนับ viable cell ด้วย hemacytometer (trypan blue exclusion) จากนั้นทำการเลี้ยงเซลล์ในถาดหลุม 96 หลุมๆ ละ 100 ไมโครลิตร (2,500-3,000 เซลล์ต่อหลุม) แล้วบ่มใน CO₂ incubator นาน 24 ชั่วโมง เพื่อให้เซลล์เกาะเป็น monolayer จากนั้นเติมสารตัวอย่าง (ออร์แกนอลผสม) ที่ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัม/มล. หลุมละ 100 ไมโครลิตร โดยมี blank คือหลุมที่ไม่เติมสารตัวอย่าง และชุดควบคุมคือเซลล์มะเร็งที่เลี้ยงในอาหาร แล้วบ่มไว้ใน CO₂ incubator นาน 72 ชั่วโมง และวิเคราะห์ด้วยวิธี Sulphorhodamine B assay (SRB assay) เปรียบเทียบกับชุดควบคุม โดยเติม trichloroacetic acid (TCA) ร้อยละ 40 ที่ละลายด้วย acetic acid ร้อยละ 1 เพื่อตรึงเซลล์ แล้วบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 1 ชั่วโมง จากนั้นทำการล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่นและย้อมสีเซลล์ด้วย SRB stain นาน 30 นาที แล้วล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่นอีกครั้งและทิ้งไว้จนเซลล์แห้ง เติมสารละลาย Tris-Base 10 มิลลิโมล หลุมละ 200 ไมโครลิตร เขย่า 10 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 492 นาโนเมตร และคำนวณค่าการยับยั้งเซลล์มะเร็งเป็นร้อยละ (%inhibition)

$$\text{การยับยั้งเซลล์มะเร็งเป็นร้อยละ (\%inhibition)} = \left(\frac{A_{\text{ชุดควบคุม}} - A_{\text{สารตัวอย่าง}}}{A_{\text{ชุดควบคุม}}} \right) \times 100$$



แผนผังที่ 3.6 วิธีการทดสอบฤทธิ์ในการต่อต้านออกซิเดชันของออริซานอลผสมต่อ
DPPH[•] radical

บทที่ 4

ผลการวิเคราะห์ข้อมูลและอภิปรายผล

4.1 การสกัดน้ำมันดิบรำข้าว

ในงานวิจัยนี้ศึกษาการสกัดน้ำมันดิบรำข้าวโดยใช้เฮกเซน ได้น้ำมันดิบรำข้าว 34.33 และ 39.54 กรัม (ผลได้ร้อยละ 6.87 และ 7.11 ของน้ำหนักรำข้าว) จากรำข้าวพันธุ์ทุ่งสงและรำข้าวเหนียวดำตามลำดับ (ตารางที่ 4.1)

4.2 การประมาณปริมาณออริซานอล

การประมาณปริมาณออริซานอลในน้ำมันดิบรำข้าวในงานวิจัยนี้ใช้เทคนิคยูวี สเปกโทรโฟโตมิเตอร์ ตามวิธีของ Das และคณะ (1998)

ปริมาณออริซานอลทั้งหมดในน้ำมันดิบรำข้าวพันธุ์ทุ่งสงและรำข้าวเหนียวดำ ได้จากการวัดค่า optical density ในเอธิลอะซิเตตเปรียบเทียบกับออริซานอลมาตรฐาน ซึ่งให้ค่า optical density สูงสุดที่ความยาวคลื่น (λ_{max}) 321 นาโนเมตร เพื่อใช้ในการคำนวณค่า specific extinction coefficient ($\epsilon_{1\text{ cm}}$) มีค่าเท่ากับ $26,265\text{ cmPP}^{-1}\text{M}^{-1}$ และใช้ในการคำนวณปริมาณออริซานอลทั้งหมด (แสดงการคำนวณในภาคผนวก ก) ร้อยละของผลได้ของการประมาณออริซานอลทั้งหมดในน้ำมันดิบรำข้าว ดังแสดงในตารางที่ 4.2 ซึ่งพบว่าผลการประมาณปริมาณออริซานอลทั้งหมดในน้ำมันดิบรำข้าวพันธุ์ทุ่งสงและรำข้าวเหนียวดำมีค่าอยู่ระหว่างร้อยละ 0.6-0.8

ตารางที่ 4.1 ปริมาณน้ำมันดิบรำข้าว (ร้อยละของผลได้) ในรำข้าวพันธุ์ทุ่งสง และรำข้าวเหนียวดำ

พันธุ์รำข้าว	ปริมาณน้ำมันดิบรำข้าว (กรัม)	ร้อยละของผลได้
ทุ่งสง	34.33	6.87
ข้าวเหนียวดำ	39.54	7.91

ตารางที่ 4.2 การประมาณปริมาณออริซานอล (ร้อยละของผลได้) ในน้ำมันดิบ
รำข้าวพันธุ์ทุ่งสงและรำข้าวเหนียวดำ

พันธุ์รำข้าว	ปริมาณออริซานอล (มก.)	ร้อยละของผลได้
ทุ่งสง	279	0.81
ข้าวเหนียวดำ	257	0.65

4.3 การจำแนกและการระบุชนิดอนุพันธ์ของออริซานอล

การจำแนกและการระบุชนิดอนุพันธ์ของออริซานอลจากรำข้าวพันธุ์ทุ่งสงและรำข้าวเหนียวดำ ใช้เทคนิคทางสเปกโทรสโกปี (IR $^1\text{H-NMR}$ และ MS) โดยศึกษาเปรียบเทียบกับข้อมูลที่ได้มีการรายงานมาแล้ว (Bucci และคณะ, 2003; Yasukawa และคณะ, 1998)

4.3.1 การจำแนกและการระบุชนิดอนุพันธ์ของออริซานอลจากรำข้าวพันธุ์ทุ่งสง

4.3.1.1 การจำแนกและการระบุชนิดอนุพันธ์ของออริซานอลผสม TS1

ออริซานอลผสม TS1 ได้จากการตกผลึก ซึ่งมีลักษณะเป็นผงสีขาวปนเหลือง (77.83 มก., ผลได้ร้อยละ 0.24 ของน้ำมันดิบรำข้าว) โครงสร้างของอนุพันธ์ออริซานอลจากออริซานอลผสม TS1 วิเคราะห์โดยใช้เทคนิคทางสเปกโทรสโกปี

IR สเปกตรัมของออริซานอลผสม TS1 แสดงในรูปแบบที่ 5ก ภาคผนวก ก และ absorption band ที่แสดงชนิดของการสั่น ในตารางที่ 4.3 ซึ่ง IR สเปกตรัมแสดง absorption band ที่สำคัญของออริซานอล คือ 3421 cm^{-1} (O-H stretching), 1704 cm^{-1} (aliphatic ester C=O stretching), 1634 cm^{-1} (C=C in aromatic ring) และ 1595 cm^{-1} (C=C in unsaturated part) โดยให้ลักษณะเดียวกัน เมื่อเปรียบเทียบกับออริซานอลมาตรฐาน (รูปที่ 6ก ภาคผนวก ก)

$^1\text{H-NMR}$ สเปกตรัมของออริซานอลผสม TS1 แสดงในรูปแบบที่ 7ก ในภาคผนวก ก แสดง hydroxy proton ของส่วน ferulate ที่ 5.90 ppm methoxy proton ของส่วน ferulate ที่ 3.93 ppm และ 3 aromatic proton ของส่วน ferulate ที่ 6.91 7.05 และ 7.07 ppm และ proton ในส่วนของ sterol ที่ 0-2 ppm ดังแสดงในตารางที่ 4.4-4.7 โดยให้ลักษณะเดียวกัน เมื่อเปรียบเทียบกับออริซานอลมาตรฐาน (รูปที่ 8ก ภาคผนวก ก)

positive-mode mass สเปกตรัมของออริซานอลผสม TS1 แสดงในรูปแบบที่ 9ก ภาคผนวก ก โดยให้ลักษณะเดียวกัน เมื่อเปรียบเทียบกับออริซานอลมาตรฐาน (รูปที่ 10ก ภาคผนวก ก)

จากการศึกษาอนุพันธ์ของออริซานอลในรำข้าวพันธุ์ทุ่งสง ด้วยเทคนิค IR $^1\text{H-NMR}$ และ MS โดยเปรียบเทียบกับผลที่มีรายงานไว้ก่อนหน้านี้ (เล็ก เวชชานูเคราะห์, 2548; Akihisa และคณะ, 2000; Fang และคณะ, 2003; Roger และคณะ, 1993; Xu และ Godber, 1999; Yasukawa และคณะ, 1998) อนุพันธ์ของออริซานอลที่อาจระบุได้ 4 ชนิด คือ campesteryl ferulate (MW 576) sitosteryl ferulate (MW 590) cycloartenyl ferulate (MW 602) และ 24-methylenecycloartanyl ferulate (MW 616) ดังแสดงในรูปที่ 4.1

ตารางที่ 4.3 IR absorption band ที่แสดงชนิดของการสั่นของออริซานอลผสม TS1

เลขคลื่น (cm^{-1})	ชนิดของการสั่น
3421	O-H stretching
2930	aromatic C-H stretching
2860	hydrocarbon C-H stretching
1704	C=O stretching in ester
1634	C=C stretching in aromatic ring
1595	C=C stretching
1456	-CH ₂ bending
1378	-CH ₃ bending
1265, 1160	C-O bending
813	C-H bending out of plane

ตารางที่ 4.4 $^1\text{H-NMR}$ สเปกตรัมของ 24-methylenecycloartanyl ferulate ใน CDCl_3
จากอริซานอลผสม TS1 และงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ตำแหน่ง proton	$^1\text{H-NMR}$ chemical shifts (δ/ppm , 400 MHz, CDCl_3)	
	อริซานอลผสม TS1	24-methylenecycloartanyl ferulate
3	4.71 (1H, m)	4.71 (1H, m)
18	0.97 (3H, s)	0.98 (3H, s)
19	0.36 (d, $J = 4.0$ Hz, exo) 0.60 (d, $J = 4.0$ Hz, endo)	0.37 (d, $J = 4.0$ Hz, exo) 0.60 (d, $J = 4.0$ Hz, endo)
21	0.90 (3H, d, $J = 6.0$ Hz)	0.90 (3H, d, $J = 5.5$ Hz)
24	4.66 (br s) 4.72 (br s)	4.67 (br s) 4.72 (br s)
25	2.23 (1H, sept, $J = 7.0$ Hz)	2.24 (1H, sept, $J = 7.0$ Hz)
26	1.02 (3H, d, $J = 6.4$ Hz)	1.03 (3H, d, $J = 6.6$ Hz)
27	1.03 (3H, d, $J = 6.4$ Hz)	1.04 (3H, d, $J = 7.0$ Hz)
28	0.91 (3H, s)	0.90 (3H, s)
29	0.97 (3H, s)	0.98 (3H, s)
30	0.92 (3H, s)	0.92 (3H, s)
2'	6.30 (1H, d, $J = 16.0$ Hz)	6.30 (1H, d, $J = 16.1$ Hz)
3'	7.59 (1H, d, $J = 16.0$ Hz)	7.60 (1H, d, $J = 15.8$ Hz)
5'	7.05 (1H, d, $J = 1.6$ Hz)	7.04 (1H, d, $J = 1.8$ Hz)
8'	6.91 (1H, d, $J = 8.4$ Hz)	6.92 (1H, d, $J = 8.4$ Hz)
9'	7.07 (1H, dd, $J = 1.6, 8.4$ Hz)	7.08 (1H, dd, $J = 1.8, 8.4$ Hz)
6'-OCH ₃	3.93 (3H, s)	3.94 (3H, s)
7'-OH	5.90 (1H, br s)	5.85 (1H, br s)

ตารางที่ 4.5 $^1\text{H-NMR}$ สเปกตรัมของ cycloartenyl ferulate ใน CDCl_3 จากออริซานอลผสม TS1 และงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

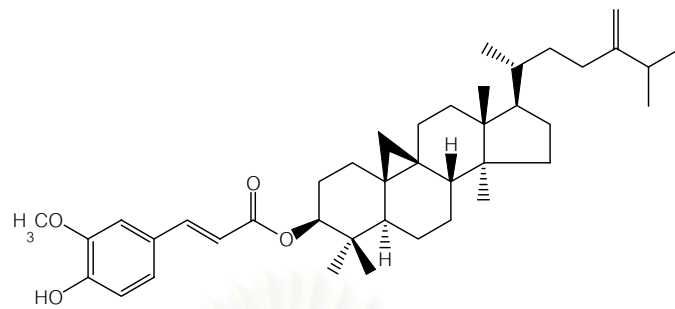
ตำแหน่ง proton	$^1\text{H-NMR}$ chemical shifts (δ/ppm , 400 MHz, CDCl_3)	
	ออริซานอลผสม TS1	cycloartenyl ferulate
3	4.71 (1H, m)	4.71 (1H, m)
18	0.97 (3H, s)	0.97 (3H, s)
19	0.36 (d, $J = 4.0$ Hz, exo) 0.60 (d, $J = 4.0$ Hz, endo)	0.37 (d, $J = 4.4$ Hz, exo) 0.60 (d, $J = 4.0$ Hz, endo)
21	0.90 (3H, d, $J = 6.0$ Hz)	0.89 (3H, d, $J = 6.2$ Hz)
24	5.10 (1H, br t, $J = 6.4$ Hz)	5.11 (1H, br t, $J = 7.0$ Hz)
26	1.68 (3H, s)	1.69 (3H, s)
27	1.61 (3H, s)	1.61 (3H, s)
28	0.91 (3H, s)	0.90 (3H, s)
29	0.97 (3H, s)	0.98 (3H, s)
30	0.92 (3H, s)	0.91 (3H, s)
2'	6.30 (1H, d, $J = 16.0$ Hz)	6.30 (1H, d, $J = 16.1$ Hz)
3'	7.59 (1H, d, $J = 16.0$ Hz)	7.60 (1H, d, $J = 15.8$ Hz)
5'	7.05 (1H, d, $J = 1.6$ Hz)	7.04 (1H, d, $J = 1.8$ Hz)
8'	6.91 (1H, d, $J = 8.4$ Hz)	6.92 (1H, d, $J = 8.1$ Hz)
9'	7.07 (1H, dd, $J = 1.6, 8.4$ Hz)	7.08 (1H, dd, $J = 1.8, 8.1$ Hz)
6'-OCH ₃	3.93 (3H, s)	3.94 (3H, s)
7'-OH	5.90 (1H, br s)	5.85 (1H, br s)

ตารางที่ 4.6 $^1\text{H-NMR}$ สเปกตรัมของ sitosteryl ferulate ใน CDCl_3 จากออริซานอลผสม TS1 และงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

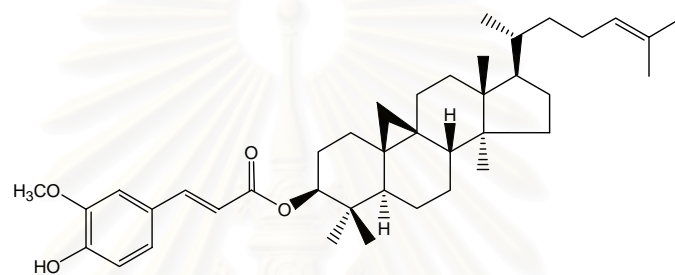
ตำแหน่ง proton	$^1\text{H-NMR}$ chemical shifts (δ/ppm , 400 MHz, CDCl_3)	
	ออริซานอลผสม TS1	sitosteryl ferulate
3	4.71 (1H, m)	4.75 (1H, m)
4	2.38 (br s) 2.40 (br s)	2.39 (br s) 2.41 (br s)
6	5.40 (1H, m)	5.41 (1H, m)
18	0.67 (3H, s)	0.69 (3H, s)
19	1.04 (3H, s)	1.05 (3H, s)
21	0.89 (3H, d, $J = 7.0$ Hz)	0.89 (3H, d, $J = 6.2$ Hz)
24	0.84 (3H, t, $J = 7.2$ Hz)	0.85 (3H, t, $J = 7.0$ Hz)
26	0.83 (3H, d, $J = 8.0$ Hz)	0.82 (3H, d, $J = 7.6$ Hz)
27	0.85 (3H, d, $J = 8.0$ Hz)	0.84 (3H, d, $J = 7.0$ Hz)
2'	6.30 (1H, d, $J = 16.0$ Hz)	6.30 (1H, d, $J = 16.1$ Hz)
3'	7.59 (1H, d, $J = 16.0$ Hz)	7.60 (1H, d, $J = 15.8$ Hz)
5'	7.05 (1H, d, $J = 1.6$ Hz)	7.04 (1H, d, $J = 1.8$ Hz)
8'	6.91 (1H, d, $J = 8.4$ Hz)	6.92 (1H, d, $J = 8.1$ Hz)
9'	7.07 (1H, dd, $J = 1.6, 8.4$ Hz)	7.08 (1H, dd, $J = 1.8, 8.1$ Hz)
6'-OCH ₃	3.93 (3H, s)	3.94 (3H, s)
7'-OH	5.90 (1H, br s)	5.85 (1H, br s)

ตารางที่ 4.7 $^1\text{H-NMR}$ สเปกตรัมของ campesteryl ferulate ใน CDCl_3 จากอริซานอลผสม TS1 และงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

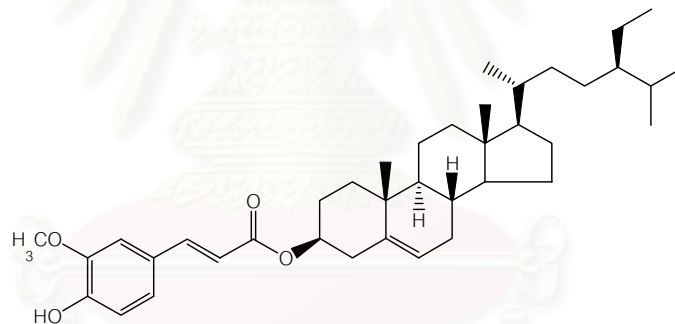
ตำแหน่ง proton	$^1\text{H-NMR}$ chemical shifts (δ/ppm , 400 MHz, CDCl_3)	
	อริซานอลผสม TS1	campesteryl ferulate
3	4.71 (1H, m)	4.71 (1H, m)
4	2.38 (br s)	2.39 (br s)
	2.40 (br s)	2.41 (br s)
6	5.40 (1H, m)	5.41 (1H, m)
18	0.67 (3H, s)	0.69 (3H, s)
19	1.04 (3H, s)	1.05 (3H, s)
21	0.89 (3H, d, $J = 6.0$ Hz)	0.89 (3H, d, $J = 6.2$ Hz)
24	0.77 (3H, d, $J = 6.4$ Hz)	0.78 (3H, d, $J = 6.6$ Hz)
26	0.85 (3H, d, $J = 7.2$ Hz)	0.85 (3H, d, $J = 6.2$ Hz)
27	0.82 (3H, d, $J = 7.6$ Hz)	0.81 (3H, d, $J = 6.8$ Hz)
2'	6.30 (1H, d, $J = 16.0$ Hz)	6.30 (1H, d, $J = 16.1$ Hz)
3'	7.59 (1H, d, $J = 16.0$ Hz)	7.60 (1H, d, $J = 15.8$ Hz)
5'	7.05 (1H, d, $J = 1.6$ Hz)	7.04 (1H, d, $J = 1.8$ Hz)
8'	6.91 (1H, d, $J = 8.4$ Hz)	6.92 (1H, d, $J = 8.1$ Hz)
9'	7.07 (1H, dd, $J = 1.6, 8.4$ Hz)	7.08 (1H, dd, $J = 1.8, 8.1$ Hz)
6'-OCH ₃	3.93 (3H, s)	3.94 (3H, s)
7'-OH	5.90 (1H, br s)	5.85 (1H, br s)



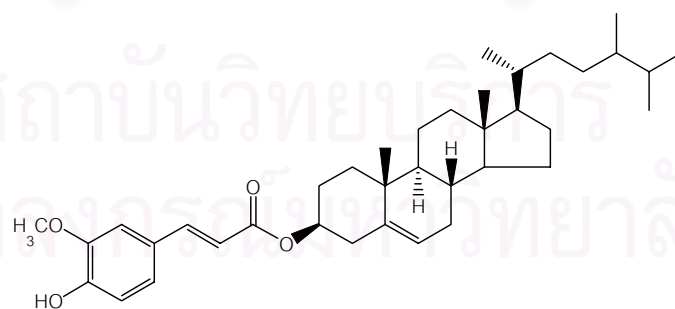
24-methylenecycloartanyl ferulate



cycloartanyl ferulate



sitosteryl ferulate



campesteryl ferulate

รูปที่ 4.1 โครงสร้างของอนุพันธ์อริซานอลจากรำข้าวพันธุ์ทุ่งสง

4.3.2 การจำแนกและการระบุชนิดอนุพันธ์ของอริซานอลจากรำข้าวเหนียวดำ

4.3.2.1 การจำแนกและการระบุชนิดอนุพันธ์ของอริซานอลผสม PG1

อริซานอลผสม PG1 ได้จากการทำการทำ preparative TLC มีลักษณะกึ่งของเหลวของแข็งสีเหลือง (83.6 มก., ผลได้ร้อยละ 0.24 ของน้ำมันดิบรำข้าว) โครงสร้างของอนุพันธ์อริซานอลจากอริซานอลผสม PG1 อธิบายโดยใช้เทคนิคทางสเปกโทรสโกปี

IR สเปกตรัมของอริซานอลผสม PG1 แสดงในรูปแบบที่ 15ก ภาคผนวก ก และ absorption band ที่แสดงชนิดของการสั่น ในตารางที่ 4.8 ซึ่ง IR สเปกตรัมแสดง absorption band ที่สำคัญของอริซานอล คือ 3421 cm^{-1} (O-H stretching), 1738 cm^{-1} (aliphatic ester C=O stretching), 1627 cm^{-1} (C=C in aromatic ring) และ 1582 cm^{-1} (C=C in unsaturated part) โดยให้ลักษณะเดียวกัน เมื่อเปรียบเทียบกับอริซานอลมาตรฐาน (รูปที่ 16ก ภาคผนวก ก)

$^1\text{H-NMR}$ สเปกตรัมของอริซานอลผสม PG1 แสดงในรูปแบบที่ 17ก ภาคผนวก ก แสดง hydroxy proton ของส่วน ferulate ที่ 5.93 ppm methoxy proton ของส่วน ferulate ที่ 3.94 ppm และ 3 aromatic proton ของส่วน ferulate ที่ 6.88 7.04 และ 7.06 ppm และ proton ในส่วนของ sterol ที่ 0-2 ppm ดังแสดงในตารางที่ 4.9-4.11 โดยให้ลักษณะเดียวกัน เมื่อเปรียบเทียบกับอริซานอลมาตรฐาน (รูปที่ 18ก ภาคผนวก ก) อย่างไรก็ตาม จาก $^1\text{H-NMR}$ สเปกตรัม พบว่าตำแหน่ง proton ในส่วนของ ferulate นั้นไม่ชัดเจนมากนัก ทั้งนี้อาจจะเป็นเนื่องจากปริมาณของกรดกรดเฟอรูลิกที่มีอยู่น้อย จึงไม่สามารถเปรียบเทียบกับ $^1\text{H-NMR}$ สเปกตรัม ที่มีรายงานไว้ก่อนหน้านี้ได้ชัดเจนและถูกต้องมากนัก แต่สามารถยืนยันได้ว่าเป็นอริซานอลผสม PG1 จากโครมาโทแกรมการดูดกลืนแสงยูวี (ภาคผนวก ก รูปที่ 11ก) และผลจากการทำให้อริซานอลบริสุทธิ์ด้วยเทคนิค HPLC (ภาคผนวก ก รูปที่ 13ก) เมื่อเปรียบเทียบกับอริซานอลมาตรฐาน (รูปที่ 12ก และ 14ก ภาคผนวก ก)

positive-mode mass สเปกตรัม แสดง $[\text{M}+\text{H}]^+$ ของอริซานอลผสม PG1 ที่ m/z 619 และ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ ที่ m/z 657 ในรูปที่ 19ก ภาคผนวก ก ซึ่งเป็นของ (24*R,S*)-cycloart-25-ene-3 β ,24-diol-3 β *trans*-ferulate และ/หรือ cycloart-23*Z*-ene-3 β ,25-diol-3 β *trans*-ferulate และ 24-hydroxy-24-methylcycloartanyl *trans*-ferulate และ/หรือ 25-hydroxy-24-methylcycloartanyl *trans*-ferulate ตามลำดับ โดยให้ลักษณะเดียวกัน เมื่อเปรียบเทียบกับอริซานอลมาตรฐาน (รูปที่ 20ก ภาคผนวก ก)

จากการศึกษาอนุพันธ์ของอริซานอลในรำข้าวเหนียวดำ ด้วยเทคนิค IR $^1\text{H-NMR}$ และ MS โดยเปรียบเทียบกับผลที่มีรายงานไว้ก่อนหน้านี้ (เล็ก เวชชานุกะระห์, 2548; Akihisa และคณะ, 2000; Fang และคณะ, 2003; Roger และคณะ, 1993; Xu และ Godber, 1999; Yasukawa และคณะ, 1998) อนุพันธ์ของอริซานอลที่อาจจะพบได้ 5 ชนิด คือ sitosteryl

ferulate (MW 590) cycloartenyl ferulate (MW 602) 24-methylenecycloartanyl ferulate (MW 616) (24*R,S*)-cycloart-25-ene-3 β ,24-diol-3 β *trans*-ferulate (MW 618) และ/หรือ cycloart-23*Z*-ene-3 β ,25-diol-3 β *trans*-ferulate (MW 618) และ 24-hydroxy-24-methylcycloartanyl *trans*-ferulate (MW 634) และ/หรือ 25-hydroxy-24-methylcycloartanyl *trans*-ferulate (MW 634) ดังแสดงในรูปที่ 4.2

ตารางที่ 4.8 IR absorption band ที่แสดงชนิดของการสั่นของอริซานอลผสม PG1

เลขคลื่น (cm ⁻¹)	ชนิดของการสั่น
3421	O-H stretching
2921	aromatic C-H stretching
2847	hydrocarbon C-H stretching
1738	C=O stretching in ester
1627	C=C stretching in aromatic ring
1582	C=C stretching
1456	-CH ₂ bending
1378	-CH ₃ bending
1247, 1165	C-O bending
717	C-H bending out of plane

ตารางที่ 4.9 $^1\text{H-NMR}$ สเปกตรัมของ 24-methylenecycloartanyl ferulate ใน CDCl_3
จากออริซานอลผสม PG1 และงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

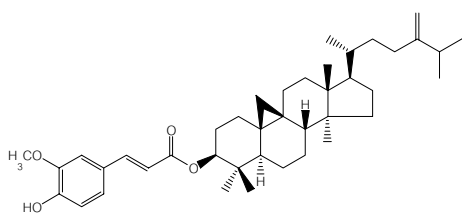
ตำแหน่ง proton	$^1\text{H-NMR}$ chemical shifts (δ/ppm , 400 MHz, CDCl_3)	
	ออริซานอลผสม PG1	24-methylenecycloartanyl ferulate
3	4.73 (1H, m)	4.71 (1H, m)
18	0.97 (3H, s)	0.98 (3H, s)
19	0.40 (d, $J = 4.0$ Hz, exo) 0.60 (d, $J = 4.0$ Hz, endo)	0.37 (d, $J = 4.0$ Hz, exo) 0.60 (d, $J = 4.0$ Hz, endo)
21	0.89 (3H, d, $J = 7.2$ Hz)	0.90 (3H, d, $J = 5.5$ Hz)
24	4.65 (br s) 4.73 (br s)	4.67 (br s) 4.72 (br s)
25	2.21 (1H, sept, $J = 4.8$ Hz)	2.24 (1H, sept, $J = 7.0$ Hz)
26	1.02 (3H, d, $J = 7.0$ Hz)	1.03 (3H, d, $J = 6.6$ Hz)
27	1.04 (3H, d, $J = 5.6$ Hz)	1.04 (3H, d, $J = 7.0$ Hz)
28	0.90 (3H, s)	0.90 (3H, s)
29	0.95 (3H, s)	0.98 (3H, s)
30	0.93 (3H, s)	0.92 (3H, s)
2'	6.15 (1H, d, $J = 15.6$ Hz)	6.30 (1H, d, $J = 16.1$ Hz)
3'	7.59 (1H, d, $J = 16.0$ Hz)	7.60 (1H, d, $J = 15.8$ Hz)
5'	7.04 (1H, d, $J = 1.2$ Hz)	7.04 (1H, d, $J = 1.8$ Hz)
8'	6.88 (1H, d, $J = 8.0$ Hz)	6.92 (1H, d, $J = 8.4$ Hz)
9'	7.06 (1H, dd, $J = 1.2, 8.4$ Hz)	7.08 (1H, dd, $J = 1.8, 8.4$ Hz)
6'-OCH ₃	3.94 (3H, s)	3.94 (3H, s)
7'-OH	5.93 (1H, br s)	5.85 (1H, br s)

ตารางที่ 4.10 $^1\text{H-NMR}$ สเปกตรัมของ cycloartenyl ferulate ใน CDCl_3 จากออริซานอลผสม PG1 และงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

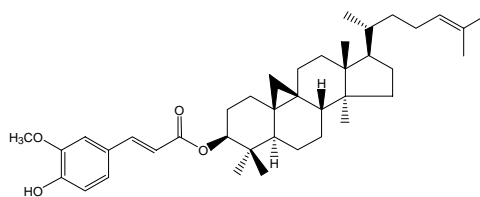
ตำแหน่ง proton	$^1\text{H-NMR}$ chemical shifts (δ/ppm , 400 MHz, CDCl_3)	
	ออริซานอลผสม PG1	cycloartenyl ferulate
3	4.71 (1H, m)	4.71 (1H, m)
18	0.97 (3H, s)	0.97 (3H, s)
19	0.40 (d, $J = 4.0$ Hz, exo)	0.37 (d, $J = 4.4$ Hz, exo)
	0.60 (d, $J = 4.0$ Hz, endo)	0.60 (d, $J = 4.0$ Hz, endo)
21	0.89 (3H, d, $J = 7.2$ Hz)	0.89 (3H, d, $J = 6.2$ Hz)
24	5.10 (1H, br t, $J = 6.8$ Hz)	5.11 (1H, br t, $J = 7.0$ Hz)
26	1.68 (3H, s)	1.69 (3H, s)
27	1.61 (3H, s)	1.61 (3H, s)
28	0.90 (3H, s)	0.90 (3H, s)
29	0.95 (3H, s)	0.98 (3H, s)
30	0.93 (3H, s)	0.91 (3H, s)
2'	6.15 (1H, d, $J = 15.6$ Hz)	6.30 (1H, d, $J = 16.1$ Hz)
3'	7.59 (1H, d, $J = 16.0$ Hz)	7.60 (1H, d, $J = 15.8$ Hz)
5'	7.04 (1H, d, $J = 1.2$ Hz)	7.04 (1H, d, $J = 1.8$ Hz)
8'	6.88 (1H, d, $J = 8.0$ Hz)	6.92 (1H, d, $J = 8.1$ Hz)
9'	7.06 (1H, dd, $J = 1.2, 8.4$ Hz)	7.08 (1H, dd, $J = 1.8, 8.1$ Hz)
6'-OCH ₃	3.94 (3H, s)	3.94 (3H, s)
7'-OH	5.93 (1H, br s)	5.85 (1H, br s)

ตารางที่ 4.11 $^1\text{H-NMR}$ สเปกตรัมของ sitosteryl ferulate ใน CDCl_3 จากอริซานอลผสม PG1 และงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

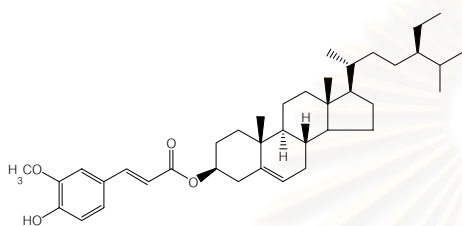
ตำแหน่ง proton	$^1\text{H-NMR}$ chemical shifts (δ/ppm , 400 MHz, CDCl_3)	
	อริซานอลผสม PG1	sitosteryl ferulate
3	4.73 (1H, m)	4.75 (1H, m)
4	2.38 (br s)	2.39 (br s)
	2.40 (br s)	2.41 (br s)
6	5.41 (1H, m)	5.41 (1H, m)
18	0.68 (3H, s)	0.69 (3H, s)
19	1.04 (3H, s)	1.05 (3H, s)
21	0.88 (3H, d, $J = 6.0$ Hz)	0.89 (3H, d, $J = 6.2$ Hz)
24	0.84 (3H, t, $J = 7.0$ Hz)	0.85 (3H, t, $J = 7.0$ Hz)
26	0.78 (3H, d, $J = 7.6$ Hz)	0.82 (3H, d, $J = 7.6$ Hz)
27	0.80 (3H, d, $J = 7.2$ Hz)	0.84 (3H, d, $J = 7.0$ Hz)
2'	6.15 (1H, d, $J = 15.6$ Hz)	6.30 (1H, d, $J = 16.1$ Hz)
3'	7.59 (1H, d, $J = 16.0$ Hz)	7.60 (1H, d, $J = 15.8$ Hz)
5'	7.04 (1H, d, $J = 1.2$ Hz)	7.04 (1H, d, $J = 1.8$ Hz)
8'	6.88 (1H, d, $J = 8.0$ Hz)	6.92 (1H, d, $J = 8.1$ Hz)
9'	7.06 (1H, dd, $J = 1.2, 8.4$ Hz)	7.08 (1H, dd, $J = 1.8, 8.1$ Hz)
6'-OCH ₃	3.94 (3H, s)	3.94 (3H, s)
7'-OH	5.93 (1H, br s)	5.85 (1H, br s)



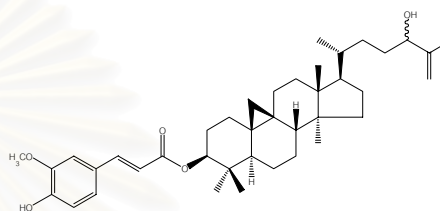
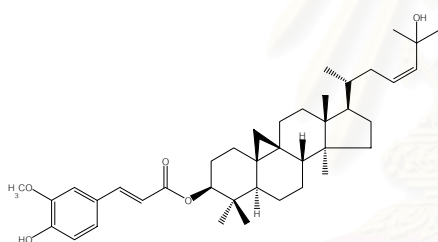
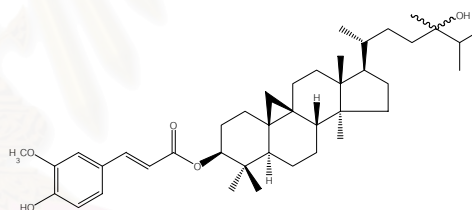
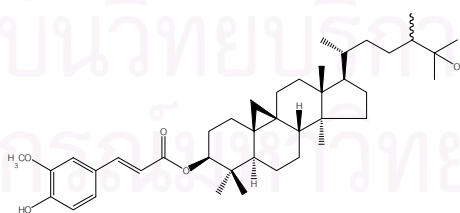
24-methylenecycloartanyl ferulate



cycloartanyl ferulate



sitosteryl ferulate

 $(24R,S)$ -cycloart-25-ene-3 β ,24-diol-3 β *trans*-ferulatecycloart-23 Z -ene-3 β ,25-diol-3 β *trans*-ferulate24-hydroxy-24-methylcycloartanyl *trans*-ferulate25-hydroxy-24-methylcycloartanyl *trans*-ferulate

รูปที่ 4.2 โครงสร้างของอนุพันธ์ออร์ิซานอลจากรำข้าวเหนียวดำ

4.3.3 การจำแนกและการระบุชนิดอนุพันธ์ของอริซานอลมาตรฐาน

อริซานอลมาตรฐาน มีลักษณะเป็นผงสีขาวปนเหลือง โครงสร้างของอริซานอลมาตรฐานวิเคราะห์โดยใช้เทคนิคทางสเปกโทรสโกปี

IR สเปกตรัมของอริซานอลผสมมาตรฐาน แสดงในรูปที่ 24ก ภาคผนวก ก และ absorption band ที่แสดงชนิดของการสั่น ในตารางที่ 4.12 ซึ่ง IR สเปกตรัมแสดง absorption band ที่สำคัญของอริซานอล คือ 3413 cm^{-1} (O-H stretching), 1700 cm^{-1} (aliphatic ester C=O stretching), 1634 cm^{-1} (C=C in aromatic ring) และ 1595 cm^{-1} (C=C in unsaturated part)

$^1\text{H-NMR}$ สเปกตรัมของอริซานอลมาตรฐาน แสดงในรูปที่ 25ก ในภาคผนวก ก แสดง hydroxy proton ของส่วน ferulate ที่ 5.93 ppm methoxy proton ของส่วน ferulate ที่ 3.93 ppm และ 3 aromatic proton ของส่วน ferulate ที่ 6.91 7.04 และ 7.07 ppm และ proton ในส่วนของ sterol ที่ 0-2 ppm ดังแสดงในตารางที่ 4.13-4.16

positive-mode mass สเปกตรัมของอริซานอลมาตรฐาน แสดงในรูปที่ 22ก ภาคผนวก ก

จากการศึกษาอนุพันธ์ของอริซานอลมาตรฐาน ด้วยเทคนิค IR $^1\text{H-NMR}$ และ MS โดยเปรียบเทียบกับผลที่มีรายงานไว้ก่อนหน้านี้ (เล็ก เวชชานูเคราะห์, 2548; Akihisa และคณะ, 2000; Fang และคณะ, 2003; Roger และคณะ, 1993; Xu และ Godber, 1999; Yasukawa และคณะ, 1998) อนุพันธ์ของอริซานอลที่อาจจะพบได้ 4 ชนิด คือ campesteryl ferulate (MW 576) sitosteryl ferulate (MW 590) cycloartenyl ferulate (MW 602) และ 24-methylenecycloartanyl ferulate (MW 616) ดังแสดงในรูปที่ 4.1

ตารางที่ 4.12 IR absorption band ที่แสดงชนิดของการสั่นของ
ออร์แกนอลมาทรูฐาน

เลขคลื่น (cm^{-1})	ชนิดของการสั่น
3413	O-H stretching
2939	aromatic C-H stretching
2865	hydrocarbon C-H stretching
1700	C=O stretching in ester
1634	C=C stretching in aromatic ring
1595	C=C stretching
1465	-CH ₂ bending
1382	-CH ₃ bending
1265, 1165	C-O bending
817	C-H bending out of plane

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4.13 $^1\text{H-NMR}$ สเปกตรัมของ 24-methylenecycloartanyl ferulate ใน CDCl_3
จากอริชานอลมาตรฐานและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ตำแหน่ง	$^1\text{H-NMR}$ chemical shifts (δ /ppm, 400 MHz, CDCl_3)	
proton	อริชานอลมาตรฐาน	24-methylenecycloartanyl ferulate
3	4.71 (1H, m)	4.71 (1H, m)
18	0.97 (3H, s)	0.98 (3H, s)
19	0.36 (d, $J = 4.4$ Hz, exo)	0.37 (d, $J = 4.0$ Hz, exo)
	0.59 (d, $J = 4.0$ Hz, endo)	0.60 (d, $J = 4.0$ Hz, endo)
21	0.88 (3H, d, $J = 6.0$ Hz)	0.90 (3H, d, $J = 5.5$ Hz)
24	4.66 (br s)	4.67 (br s)
	4.71 (br s)	4.72 (br s)
25	2.23 (1H, sept, $J = 6.8$ Hz)	2.24 (1H, sept, $J = 7.0$ Hz)
26	1.02 (3H, d, $J = 6.8$ Hz)	1.03 (3H, d, $J = 6.6$ Hz)
27	1.03 (3H, d, $J = 6.8$ Hz)	1.04 (3H, d, $J = 7.0$ Hz)
28	0.91 (3H, s)	0.90 (3H, s)
29	0.97 (3H, s)	0.98 (3H, s)
30	0.93 (3H, s)	0.92 (3H, s)
2'	6.30 (1H, d, $J = 16.0$ Hz)	6.30 (1H, d, $J = 16.1$ Hz)
3'	7.59 (1H, d, $J = 16.0$ Hz)	7.60 (1H, d, $J = 15.8$ Hz)
5'	7.04 (1H, d, $J = 1.6$ Hz)	7.04 (1H, d, $J = 1.8$ Hz)
8'	6.91 (1H, d, $J = 8.0$ Hz)	6.92 (1H, d, $J = 8.4$ Hz)
9'	7.07 (1H, dd, $J = 1.6, 8.0$ Hz)	7.08 (1H, dd, $J = 1.8, 8.4$ Hz)
6'-OCH ₃	3.93 (3H, s)	3.94 (3H, s)
7'-OH	5.93 (1H, br s)	5.85 (1H, br s)

ตารางที่ 4.14 $^1\text{H-NMR}$ สเปกตรัมของ cycloartenyl ferulate ใน CDCl_3 จากออริซานอล
มาตรฐานและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ตำแหน่ง	$^1\text{H-NMR}$ chemical shifts (δ /ppm, 400 MHz, CDCl_3)	
proton	ออริซานอลมาตรฐาน	cycloartenyl ferulate
3	4.71 (1H, m)	4.71 (1H, m)
18	0.97 (3H, s)	0.97 (3H, s)
19	0.36 (d, $J = 4.4$ Hz, exo) 0.59 (d, $J = 4.0$ Hz, endo)	0.37 (d, $J = 4.4$ Hz, exo) 0.60 (d, $J = 4.0$ Hz, endo)
21	0.88 (3H, d, $J = 6.0$ Hz)	0.89 (3H, d, $J = 6.2$ Hz)
24	5.10 (1H, br t, $J = 6.8$ Hz)	5.11 (1H, br t, $J = 7.0$ Hz)
26	1.70 (3H, s)	1.69 (3H, s)
27	1.60 (3H, s)	1.61 (3H, s)
28	0.91 (3H, s)	0.90 (3H, s)
29	0.97 (3H, s)	0.98 (3H, s)
30	0.93 (3H, s)	0.91 (3H, s)
2'	6.30 (1H, d, $J = 16.0$ Hz)	6.30 (1H, d, $J = 16.1$ Hz)
3'	7.59 (1H, d, $J = 16.0$ Hz)	7.60 (1H, d, $J = 15.8$ Hz)
5'	7.04 (1H, d, $J = 1.6$ Hz)	7.04 (1H, d, $J = 1.8$ Hz)
8'	6.91 (1H, d, $J = 8.0$ Hz)	6.92 (1H, d, $J = 8.1$ Hz)
9'	7.07 (1H, dd, $J = 1.6, 8.0$ Hz)	7.08 (1H, dd, $J = 1.8, 8.1$ Hz)
6'-OCH ₃	3.93 (3H, s)	3.94 (3H, s)
7'-OH	5.93 (1H, br s)	5.85 (1H, br s)

ตารางที่ 4.15 $^1\text{H-NMR}$ สเปกตรัมของ sitosteryl ferulate ใน CDCl_3 จากอริซานอล
มาตรฐานและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ตำแหน่ง	$^1\text{H-NMR}$ chemical shifts (δ/ppm , 400 MHz, CDCl_3)	
proton	อริซานอลมาตรฐาน	sitosteryl ferulate
3	4.71 (1H, m)	4.75 (1H, m)
4	2.38 (br s)	2.39 (br s)
	2.40 (br s)	2.41 (br s)
6	5.40 (1H, m)	5.41 (1H, m)
18	0.68 (3H, s)	0.69 (3H, s)
19	1.04 (3H, s)	1.05 (3H, s)
21	0.88 (3H, d, $J = 6.0$ Hz)	0.89 (3H, d, $J = 6.2$ Hz)
24	0.84 (3H, t, $J = 7.0$ Hz)	0.85 (3H, t, $J = 7.0$ Hz)
26	0.78 (3H, d, $J = 7.6$ Hz)	0.82 (3H, d, $J = 7.6$ Hz)
27	0.80 (3H, d, $J = 7.2$ Hz)	0.84 (3H, d, $J = 7.0$ Hz)
2'	6.30 (1H, d, $J = 16.0$ Hz)	6.30 (1H, d, $J = 16.1$ Hz)
3'	7.59 (1H, d, $J = 16.0$ Hz)	7.60 (1H, d, $J = 15.8$ Hz)
5'	7.04 (1H, d, $J = 1.6$ Hz)	7.04 (1H, d, $J = 1.8$ Hz)
8'	6.91 (1H, d, $J = 8.0$ Hz)	6.92 (1H, d, $J = 8.1$ Hz)
9'	7.07 (1H, dd, $J = 1.6, 8.0$ Hz)	7.08 (1H, dd, $J = 1.8, 8.1$ Hz)
6'-OCH ₃	3.93 (3H, s)	3.94 (3H, s)
7'-OH	5.93 (1H, br s)	5.85 (1H, br s)

ตารางที่ 4.16 $^1\text{H-NMR}$ สเปกตรัมของ campesteryl ferulate ใน CDCl_3 จากอริชานอลมาตรฐานและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ตำแหน่ง	$^1\text{H-NMR}$ chemical shifts (δ/ppm , 400 MHz, CDCl_3)	
	อริชานอลมาตรฐาน	campesteryl ferulate
3	4.71 (1H, m)	4.71 (1H, m)
4	2.38 (br s)	2.39 (br s)
	2.40 (br s)	2.41 (br s)
6	5.40 (1H, m)	5.41 (1H, m)
18	0.68 (3H, s)	0.69 (3H, s)
19	1.04 (3H, s)	1.05 (3H, s)
21	0.88 (3H, d, $J = 6.0$ Hz)	0.89 (3H, d, $J = 6.2$ Hz)
24	0.77 (3H, d, $J = 6.4$ Hz)	0.78 (3H, d, $J = 6.6$ Hz)
26	0.84 (3H, d, $J = 6.8$ Hz)	0.85 (3H, d, $J = 6.2$ Hz)
27	0.82 (3H, d, $J = 6.4$ Hz)	0.81 (3H, d, $J = 6.8$ Hz)
2'	6.30 (1H, d, $J = 16.0$ Hz)	6.30 (1H, d, $J = 16.1$ Hz)
3'	7.59 (1H, d, $J = 15.8$ Hz)	7.60 (1H, d, $J = 15.8$ Hz)
5'	7.04 (1H, d, $J = 1.6$ Hz)	7.04 (1H, d, $J = 1.8$ Hz)
8'	6.91 (1H, d, $J = 8.0$ Hz)	6.92 (1H, d, $J = 8.1$ Hz)
9'	7.07 (1H, dd, $J = 1.6, 8.0$ Hz)	7.08 (1H, dd, $J = 1.8, 8.1$ Hz)
6'-OCH ₃	3.93 (3H, s)	3.94 (3H, s)
7'-OH	5.93 (1H, br s)	5.85 (1H, br s)

4.4 การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของออร์ซิซานอล

ในงานวิจัยนี้ศึกษาการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของออร์ซิซานอลในการต่อต้านออกซิเดชัน ต่อการทำลาย DPPH[•] radical เนื่องจากเป็นวิธีการทดสอบเบื้องต้นที่ง่าย สะดวก และรวดเร็ว (Juliano และคณะ, 2005)

4.4.1 การทดสอบฤทธิ์ในการต่อต้านออกซิเดชันของออร์ซิซานอลผสมต่อ DPPH[•] radical

การทดสอบฤทธิ์ในการต่อต้านออกซิเดชันของออร์ซิซานอลผสม TS1 และ PG1 ต่อการทำลาย DPPH[•] radical โดยเปรียบเทียบกับแอลฟา-โทโคฟีรอลและออร์ซิซานอลมาตรฐาน (positive control) ด้วยวิธี DPPH assay (Juliano และคณะ, 2005) ซึ่งใช้ความเข้มข้น 0-200 ไมโครกรัม/มล. จากการศึกษาพบว่า ฤทธิ์ในการต่อต้านออกซิเดชันต่อการทำลาย DPPH[•] radical ของแอลฟา-โทโคฟีรอลมากที่สุด (ค่า IC₅₀ ต่ำสุด) รองลงมา คือ ออร์ซิซานอลมาตรฐาน ออร์ซิซานอลผสม TS1 และออร์ซิซานอลผสม PG1 ตามลำดับ (ตารางที่ 4.17) ซึ่งฤทธิ์ในการต่อต้านออกซิเดชัน ต่อการทำลาย DPPH[•] radical ของออร์ซิซานอลมาตรฐานและออร์ซิซานอลผสม TS1 และ PG1 เพิ่มขึ้นอย่างค่อยเป็นค่อยไปเมื่อความเข้มข้นเพิ่มขึ้น ขณะที่ฤทธิ์ในการต่อต้านออกซิเดชันของ แอลฟา-โทโคฟีรอล เพิ่มขึ้นอย่างเห็นได้ชัดเจนเมื่อความเข้มข้นเพิ่มขึ้น และคงที่เมื่อความเข้มข้น เพิ่มมากขึ้น (ภาคผนวก ข รูปที่ 1ข-4ข) อย่างไรก็ตาม ฤทธิ์ในการต่อต้านออกซิเดชันต่อ การทำลาย DPPH[•] radical ของออร์ซิซานอลผสม TS1 เมื่อเปรียบเทียบกับออร์ซิซานอลมาตรฐาน มีความแตกต่างกันไม่มากนัก ส่วนฤทธิ์ในการต่อต้านออกซิเดชันของออร์ซิซานอลผสม PG1 น้อย มากเมื่อเปรียบเทียบกับออร์ซิซานอลมาตรฐานและแอลฟา-โทโคฟีรอล ทั้งนี้เนื่องจากออร์ซิซานอล ผสม PG1 อาจจะมีปริมาณกรดเฟอรูลิกน้อยเกินไป สังเกตได้จากผล ¹H-NMR สเปกตรัม (รูปที่ 15ก ภาคผนวก ก) ดังที่ได้กล่าวมาแล้วในหัวข้อ 4.3.2.1 ทั้งนี้เนื่องจากการต่อต้านออกซิเดชันของ ออร์ซิซานอลนั้น Graf (1992) อธิบายไว้ว่า การต่อต้านออกซิเดชันเกิดจากหมู่ phenolic hydroxyl ของกรดเฟอรูลิกของออร์ซิซานอลเป็นตัวให้ proton แก่อนุมูลอิสระ แล้วเปลี่ยนอยู่ในรูปของอนุมูล phenoxy (รูปที่ 2.8) และการเข้าร่วมของหมู่ phenolic hydroxyl อีกหมู่หนึ่งจะช่วยเพิ่มการ ทำลายอนุมูลอิสระ เนื่องจากความเสถียรของเรโซแนนซ์ที่เพิ่มขึ้น

นอกจากนี้ Nyström และคณะ (2005) ศึกษาความสามารถของออร์ซิซานอลที่สกัดได้ จากรำข้าวสาลีหรือรำข้าวไรน์ในการยับยั้ง hydroperoxide formation ใน bulk methyl linoleate และ methyl linoleate emulsion และฤทธิ์ในการต่อต้านออกซิเดชันโดยการทำลาย DPPH[•] radical ทดสอบที่ 2 ความเข้มข้น กล่าวคือที่ความเข้มข้นต่ำๆ ฤทธิ์ในการทำลาย DPPH[•] radical ไม่มีความแตกต่างกันระหว่าง ออร์ซิซานอล กรดเฟอรูลิก และแอลฟา-โทโคฟีรอล แต่ที่ความเข้มข้น สูง แอลฟา-โทโคฟีรอล มีฤทธิ์ในการทำลาย DPPH[•] radical สูงที่สุด โดยที่ลำดับในการมีฤทธิ์

ลดลงดังนี้ แอลฟา-โทโคฟีรอล > กรดเฟอรูลิก > สารสกัดหยาบจากข้าวไรน์ > สารสกัดหยาบจากข้าวสาลี > cholesteryl ferulate = sitosteryl ferulate ซึ่งสอดคล้องกับรายงานการวิจัยที่มีมาก่อนหน้านี้ คือ กรดเฟอรูลิกมีฤทธิ์ในการทำลาย DPPH[•] radical มากกว่า sterol esters ของมันเล็กน้อย (Kikuzaki และคณะ, 2002) และจากงานวิจัยนี้ก็ให้ผลสอดคล้องกับ Kikuzaki และคณะ (2002) และ Nyström และคณะ (2005) คือ ออร์ิซานอลผสมที่สกัดได้จากรำข้าวพันธุ์ทุ่งสงและรำข้าวเหนียวดำ มีฤทธิ์ในการต่อต้านออกซิเดชันโดยการทำลาย DPPH[•] radical ต่ำกว่า แอลฟา-โทโคฟีรอล ซึ่งทดสอบด้วยวิธี DPPH assay แต่จากการศึกษาของ Kikuzaki และคณะ (2002) ทดสอบด้วยวิธี DPPH assay โดยใช้สารละลาย DPPH ในเอทานอลที่ความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์ ความเข้มข้นของสารตัวอย่างที่ 20 ไมโครโมลาร์ และบ่มให้เกิดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส แต่ในงานวิจัยนี้ทดสอบโดยใช้สารละลาย DPPH ในเอทานอลที่ความเข้มข้น 200 ไมโครโมลาร์ ความเข้มข้นของสารตัวอย่างที่ 0-250 ไมโครโมลาร์ และบ่มให้เกิดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

ตารางที่ 4.17 ประสิทธิภาพในการต่อต้านออกซิเดชันของออร์ิซานอลผสมต่อ DPPH[•] radical เปรียบเทียบกับแอลฟา-โทโคฟีรอล

ตัวอย่าง	IC ₅₀ (ไมโครกรัม/มล.)
ออร์ิซานอลผสม TS1	244.24
ออร์ิซานอลผสม PG1	632.63
ออร์ิซานอลมาตรฐาน	118.65
แอลฟา-โทโคฟีรอล	44.19

4.4.2 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง

การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งของออร์ิซานอลผสม TS1 ออร์ิซานอลผสม PG1 และออร์ิซานอลมาตรฐาน โดยทดสอบกับเซลล์มะเร็งเต้านม (MCF-7) มะเร็งปากมดลูก (Hela) มะเร็งลำไส้ (HT-29) และมะเร็งในช่องปาก (KB) ซึ่งทดสอบที่ความเข้มข้น 25 ไมโครกรัม/มล. (ตารางที่ 4.18) พบว่าผลที่ได้มีค่าติดลบ (ทดสอบที่ความเข้มข้น 25 ไมโครกรัม/มล.) แสดงว่าออร์ิซานอลผสมทั้ง 3 ชนิด ไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเซลล์มะเร็งทั้ง 4 ชนิด หรือไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ เพราะถ้ามีฤทธิ์ในการยับยั้งเซลล์มะเร็งจะต้องมีค่าการยับยั้งเซลล์มะเร็งมากกว่าร้อยละ 75 และสาเหตุที่ค่าการยับยั้งเซลล์มะเร็งเป็นลบ อาจจะมีผลจากปัจจัยอื่นๆ จาก

สภาวะแวดล้อมในการทดสอบ ที่ทำให้ผลการทดสอบผิดพลาดหรือคลาดเคลื่อน เพราะเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม ค่าการยับยั้งเซลล์มะเร็งจะมีค่าเท่ากับศูนย์ ถ้าสารที่ทดสอบนั้นไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเซลล์มะเร็ง

ทั้งนี้จากการศึกษาของ Tamagawa และคณะ (1992a และ 1992b) ในหนู F344 และ B6CF₃, พบว่าออริซานอลไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์

ตารางที่ 4.18 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งของออริซานอลผสม

ตัวอย่าง	ร้อยละของการยับยั้งเซลล์มะเร็ง			
	MCF-7 (มะเร็งเต้านม)	Hela (มะเร็งปากมดลูก)	HT-29 (มะเร็งลำไส้)	KB (มะเร็งในช่องปาก)
ออริซานอลผสม TS1	-2.80	-36.33	-45.61	-25.10
ออริซานอลผสม PG1	-15.26	-31.23	-39.60	-32.54
ออริซานอลมาตรฐาน	-10.02	-37.80	-79.92	-20.14

ในอนาคตจำเป็นต้องมีการพัฒนาการสกัด การจำแนก และระบุชนิดอนุพันธ์ของออริซานอลให้ดีขึ้น เพื่อเพิ่มมูลค่าทางการค้า เช่น ในอุตสาหกรรมอาหาร และเครื่องสำอาง โดยเฉพาะในทางเภสัชกรรม เนื่องจากความสามารถของออริซานอลในการลดการดูดซึมคอเลสเตอรอลในเลือด ดังที่ได้กล่าวมาแล้วในบทที่ 2 ซึ่งต่อไปในอนาคตอาจมีการพัฒนานำออริซานอลไปใช้เป็นยาลดคอเลสเตอรอลก็ได้

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

น้ำมันดิบรำข้าวจากรำข้าวพันธุ์ทุ่งสงและรำข้าวเหนียวดำ ได้จากการสกัดด้วยเฮกเซน (34.33 และ 39.54 กรัม ตามลำดับ) โดยที่การประมาณปริมาณออร์นิทานอลทั้งหมดนั้น ใช้เทคนิคยูวี สเปกโทรโฟโตเมตรี ซึ่งคำนวณได้จากค่า specific extinction coefficient ของออร์นิทานอลมาตรฐาน เท่ากับ (279 และ 257 มก. จากรำข้าวพันธุ์ทุ่งสงและรำข้าวเหนียวดำ ตามลำดับ)

การทำให้ออร์นิทานอลบริสุทธิ์ใช้เทคนิคซิลิกา คอลัมน์ โครมาโทกราฟี และ HPLC ได้ ออร์นิทานอลผสม (77.83 และ 83.6 มก. จากรำข้าวพันธุ์ทุ่งสงและรำข้าวเหนียวดำ ตามลำดับ) จากนั้นจำแนกและระบุชนิดอนุพันธ์ของออร์นิทานอล โดยใช้เทคนิค IR ¹H-NMR และ MS ซึ่ง 24-methylenecycloartanyl ferulate cycloartanyl ferulate และ sitosteryl ferulate เป็นอนุพันธ์ของออร์นิทานอลที่พบในทั้งรำข้าวพันธุ์ทุ่งสงและรำข้าวเหนียวดำ นอกจากนี้ยังพบ campesteryl ferulate ในรำข้าวพันธุ์ทุ่งสง และ (24*R,S*)-cycloart-25-ene-3 β ,24-diol-3 β *trans*-ferulate และ/หรือ cycloart-23*Z*-ene-3 β ,25-diol-3 β *trans*-ferulate และ 24-hydroxy-24-methylcycloartanyl *trans*-ferulate และ/หรือ 25-hydroxy-24-methylcycloartanyl *trans*-ferulate ในรำข้าวเหนียวดำ อีกด้วย

การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของออร์นิทานอลผสม TS1 และ PG1 ใช้ระบบของ 2,2'-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH[•]) radical เปรียบเทียบกับออร์นิทานอลมาตรฐานและ แอลฟา-โทโคฟีรอล (positive control) ใช้ความเข้มข้น 0-200 ไมโครกรัม/มล. พบว่าออร์นิทานอลที่สกัดได้จากรำข้าวทั้งสองพันธุ์ มีประสิทธิภาพในการต่อต้านออกซิเดชันโดยการทำลาย DPPH[•] radical ซึ่ง แอลฟา-โทโคฟีรอล มีประสิทธิภาพมากที่สุด รองลงมาคือ ออร์นิทานอลมาตรฐาน ออร์นิทานอลผสม TS1 และออร์นิทานอล PG1 ตามลำดับ และไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ เมื่อทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

นัยนา บุญทวีวัฒน์ และ เรวดี จงสุวัฒน์. 2545. น้ำมันรำข้าว ทางเลือกเพื่อสุขภาพของคนไทย.

กรุงเทพฯ : โอเดียนสโตร์,

เล็ก เวชชานูเคราะห์. 2548. องค์ประกอบของออริซานอลในรำข้าวหอมมะลิ. วิทยานิพนธ์ปริญญา

วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์
มหาวิทยาลัย.

อรอนงค์ นัยวิกุล. 2547. ข้าว : วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ :

มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์,

ภาษาอังกฤษ

Akihisa, T., Yasukawa, K. and Kasahara, Y. 1997. Triterpenoids from the flowers of
compositae and their anti-inflammatory effects. Curr. Topics Phytochem. 1 :
137-144.

Akihisa, T., Yasukawa, K., Yamaura, M., Ukiya, M., Kimura, Y., Shimizu, N. and Arai, K.
2000. Triterpene alcohol and sterol ferulates from rice bran and their anti-
inflammatory effects. J. Agric. Food Chem. 48 : 2313-2319.

Ansari, G.A.S., Walker, R.D., Smart, V.B. and Smith, L.L. 1982. Further investigations of
mutagenic cholesterol preparation. Food Chem. Toxicol 20 : 35-41.

Award, A.B., Down, A.C. and Fink, C.S. 2000b. Inhibition of growth and stimulation of
apoptosis by β -sitosterol treatment of MDA-MB-231 human breast cancer cells in
culture. Int. J. Mol. Med. 5 : 541-546.

Award, A.B. and Fink, C.S. 2000. Phytosterols as anticancer dietary components :
evidence and mechanism of action. J. Nutr. 130 : 2127-2130.

Award, A.B., Gan, Y. and Fink, C.S. 2000a. Effect of β -sitosterol, a plant sterol, on
growth, protein phosphatase 2A and phospholipids D in LNCaP cells. Nutr.
Cancer. 36 : 74-78.

Banthorpe, D.V. 1991. Classification of triterpenoids and general procedures for their
characterization. In : Methods in Plant Biochemistry. vol. 7. San Diego :
Academic Press Inc.,

- Booth, A.N., Emerson, O.H., Jones, F.T. and DeEds, F. 1957. Urinary metabolites of caffeic and chlorogenic acids. J. Biol. Chem. 229 : 51-59.
- Bramley, P.M. 1997. Isoprenoid metabolism. In : Plant Biochemistry. San Diego, CA : Academic Press Inc.,
- Bucci, L.R., Blackman, G., Defond, W., Kaufmann, R., Mandel-Tayes, C., Sparks, W.S., Stiles, J.C. and Hickson, J.F. 1990. Effect of ferulate on strength and body composition of weightlifters. J. Appl. Sports Sci. Res. 4 : 104-109.
- Bucci, R., Magri, A.D., Magri, A.L. and Marini, F. 2003. Comparison of three spectrophotometric methods for the determination of γ -oryzanol in rice bran oil. J. Anal. Bioanal. Chem. 375 : 1254-1259.
- Chien, J.T., Wang, H.C. and Chen, B.H. 1998. Kinetic model of the cholesterol oxidation during heating. J. Agric. Food Chem. 46 : 2572-2577.
- Cicero, A.F.G. and Gaddi, A. 2001. Rice bran oil and γ -oryzanol in the treatment of hyperlipoproteinaemias and other conditions. Phytother. Res. 15 : 277-289.
- Connolly, J.D. and Hill, R.A. 1991. Triterpenoids. In : Methods in Plant Biochemistry. vol. 7. San Diego, CA : Academic Press Inc.,
- Das, P.K., Chaudhuri, A., Kaimal, T.N.B. and Bhalerao, U.T. 1998. Isolation of γ -oryzanol through calcium ion induced precipitation of anionic micellar aggregates. J. Agric. Food Chem. 46 : 3073-3080.
- Diack, M. and Saska, M. 1994. Separation of vitamin E and γ -oryzanols from rice bran by normal-phase chromatography. J. Am. Oil Chem. Soc. 71 : 1211-1217.
- Eitenmiller, R.R. 1997. Vitamin E content of fats and oil-nutritional implications. Food Technol. 51 : 78-81.
- Evershed, R.P. Spooner, N., Prescott, M.C. and Good, L.J. 1988. Isolation and characterization of intact steryl ferulates from seeds. J. Chromatogr. 440 : 23-25.
- Fang, N., Yu, S. and Badger, T.M. 2003. Characterization of triterpene alcohol and sterol ferulates in rice bran using LC-MS/MS. J. Agric. Food Chem. 51 : 3260-3267.
- Fry, A.C., Bonner, E., Lewis, D.L., Johnson, R.L., Stone, M.H. and Kraemer, W.J. 1997. The effects of γ -oryzanol supplementation during resistance exercise training. Int. J. Sport Nutr. 7(4) : 318-329.

- Fujiwara, S., Sakurai, S., Sugimoto, I. and Awata, N. 1983. Absorption and metabolism of γ -oryzanol in rats. Chem. Pharm. Bull. 31(2) : 645-652.
- Gerhardt, A.L. and Gallo, N.B. 1998. Full-fat rice bran and oat bran similarly reduce hypercholesterolemia in humans. J. Nutr. 128 : 865-869.
- Goad, L.J. 1991. Phytosterols. In : Methods in Plant Biochemistry. vol. 7. San Diego, CA : Academic Press Inc.,
- Graf, E. 1992. Antioxidant potential of ferulic acid. Free Radic. Biol. Med. 13 : 435-448.
- Grundy, S.M. 1983. Absorption and metabolism of dietary cholesterol. Annu. Rev. Nutr. 3 : 71-96.
- Gylling, H. and Miettinen, T.A. 1995. The effect of cholesterol absorption inhibition on low-density lipoprotein cholesterol level. Atherosclerosis. 117 : 305-308.
- Hakala, P., Lampi, A.-M., Oillilainen, V., Werner, U., Murkovic, M., Wahala, K., Karkola, S. and Phronen, V. 2002. Steryl phenolic acid esters in cereals and their milling fractions. J. Agric. Food Chem. 50 : 5300-5307.
- Hirose, M., Ozaki, K., Takaba, K., Fukushima, S., Shirai, T. and Ito, N. 1991. Modifying effects of the naturally occurring antioxidants in γ -oryzanols, phytic acid, tannic acid and n-tritriacotane-16, 18-dione in a rat wide-spectrum organ carcinogenesis model. Carcinogenesis. 12(10) : 1917-1921.
- Huang, C.C.J. 2003. Potential functionality and digestibility of oryzanol as determined using *in vitro* cell culture models. The degree of Doctor of Philosophy in the Department of Food Science in Louisiana State University and Agricultural and Mechanical College.
- Huang, D.J., Chen, H.J., Lin, C.D. and Lin, Y.H. 2005. Antioxidant and antiproliferative activities of water spinach (*Ipomoea aquatica* Forsk) constituent. Bot. Bull. Acad. Sin. 46 : 99-106.
- Ichimaru, Y., Moriyama, M., Ichimaru, M. and Gomita, Y. 1984. Effects of γ -oryzanol on gastric lesions and small intestinal propulsive activity in mice. Nippon Yakurigaku Zasshi. 84(6) : 537-542.
- Ikeda, I., Nakashima-Yoshida, K. and Sugano, M. 1985. Effects of cycloartenol on absorption and serum levels of cholesterol in rats. J. Nutr. Sci. Vitaminol. 31(3) : 375-384.

- Ikeda, I. and Sugano, M. 1983. Some aspects of mechanism of inhibition of cholesterol absorption by β -sitosterol. Biochim. Biophys. Acta. 732 : 651-658.
- Ikeda, I., Tanabe, Y. and Sugano, M. 1989. Effects of sitosterol and sitostanols on micellar solubility of cholesterol. J. Nutr. Sci. Vitaminol. 35 : 361-369.
- Ikeda, I., Tanabe, Y., Sugano, M. Vahouny, G.V. and Gallo, L.L. 1988a. Inhibition of cholesterol absorption in rats by plant sterols. J. Lipid Res. 29 : 1573-1582.
- Ikeda, I., Tanabe, Y., Sugano, M. Vahouny, G.V. and Gallo, L.L. 1988b. Discrimination between cholesterol and sitosterol for absorption in rats. J. Lipid Res. 29 : 1583-1591.
- Imaida, K., Hirose, M., Yamaguchi, S., Takahashi, S. and Ito, N. 1990. Effects of naturally occurring antioxidants on combined 1,2-dimethylhydrazine-initiated and 1-methyl-1-nitrosourea-initiated carcinogenesis in F344 rats. Cancer Lett. 55 : 55-60.
- Ishihara, M. 1984. Effect of γ -oryzanol on serum lipid peroxide level and clinical symptoms of patients with climacteric disturbances. Asia Oceania J. Obstet. Gynaecol. 10 : 317-323.
- Ishihara, M., Ito, Y., Nakakita, T., Maehama, T., Hieda, S., Yamamoto, K. and Ueno, N. 1982. Clinical effect of γ -oryzanol on climacteric disturbance-on serum lipid peroxides. Nippon Sanka Fujinka Gakkai Zasshi. 34(2) : 243-251.
- Iwatsuki, K., Akihisa, T., Tokuda, H., Ukiya, M., Higashihara, H., Mukainaka, T., Iizuka, M., Hayashi, Y., Kimura, Y. and Nishino, H. 2003. Sterol ferulates, sterols and 5-alk(en)ylresorcinols from wheat, rye and corn bran oils and their inhibitory effects on epstein-barr virus activation. J. Agric. Food Chem. 51 : 6683-6688.
- Johnson, L.A. and Lusas, E.W. 1983. Comparison of alternative solvents for oils extraction. J. Am. Oil Chem. Soc. 60(2) : 229-242.
- Juliano, B.O. and Bechtel, D.B. 1985. The rice grain and its gross composition. In : Rice Chemistry and Technology. St. Paul, MN : American Association of Cereal Chemists Inc.,
- Juliano, C., Cossu, M., Alamanni, M.C. and Piu, L. 2005. Antioxidant activity of γ -oryzanol: mechanism of action and its effect on oxidative stability of pharmaceutical oils. Int. J. Pharm. 299 : 146-154.

- Kahlon, T., Saunders, R., Sayre, R., Chow, F., Chin, M. and Betschart, A. 1992. Cholesterol-lowering effects of rice bran oil fraction in hypercholesterolemic hamsters. Cereal Chem. 69(5) : 485-489.
- Kaneko, R. and Tsuchiya, T. 1954. New compound from rice bran oil. Kougyo Kagaku Zasshi. 57 : 526-529.
- Karladee, D., Pongpiachan, P., Taltachum, T. and Gavilo, A. 2004. Accumulation of γ -oryzanol in purple rice grain. Faculty of Agriculture, Chiangmai University, Chiangmai, Thailand.
- Katan, M.B., Grundy, S.M., Jones, P., Law, M., Miettinen, T. and Paoletti, R. 2003. Efficacy and safety of plant stanols and sterols in the management of blood cholesterol level. Mayo Clin. Proc. 78 : 965-978.
- Kikuzaki, H., Hisamoto, M., Hirose, K., Akiyama, K. and Taniguchi, H. 2002. Antioxidants properties of ferulic acid and it related compounds. J. Agric. Food Chem. 50 : 2161-2168.
- Kiribuchi, M., Miura, K., Tokuda, S. and Kaneda, T. 1983. Hypocholesterolemic effect of triterpene alcohols with soysterol on plasma cholesterol in rats. J. Nutr. Sci. Vitaminol. 29(1) : 35-43.
- Kochhar, S.P. 1983. Influence of processing on sterols of edible vegetable oils. Progress Lipid Res. 22 : 161-188.
- Kreuzer, H. 2000. Dividens from rice. Food Product Design. Texas, USA : Weeks Publishing Company,
- Kudo, S. and Akiyama, H. 1982. High-performance liquid chromatographic procedure for the determination of a new antithrombotic and vasodilating agent in human plasma. Otsuka Pharm. 27 : 419-422.
- Kumar, N. and Singhal, O.P. 1991. Cholesterol oxides and atherosclerosis : a review. J. Agric. Food Chem. 55 : 497-510.
- Leveille, G.Sr. 2002. Scientific and Regulatory Affaris CargillTM. Linking Biological Science with Food Technology.

- Lichtenstein, A.H., Ausman, L.M., Carrasco, W., Gualtieri, L.J., Jenner, J.L., Ordovas, J.M. Nicolosi, R.J., Goldin, B.R. and Schaefer, E.J. 1994. Rice bran oil consumption and plasma lipid levels in moderately hypercholesterolemic humans. Arterioscler. Thromb. 14 : 549-556.
- Lu, S. and Luh, B.S. 1991. Properties of the rice caryopsis. In : Rice Production. Vol. 1. New York : Van Nostrand Reinhold,
- Luo, H.-F., Li, Q., Yu, S., Badger, T.M. and Fang, N. 2005. Cytotoxic hydroxylated triterpene alcohol ferulates from rice bran. J. Nat. Prod. 68 : 94-97.
- Lyon, M.A. and Brown, A.J. 1999. 7-ketocholesterol. Int. J. Biochem. Cell Biol. 31 : 369-375.
- Maerker, G. 1987. Cholesterol autoxidation-current status. J. Am. Oil Chem. Soc. 64 : 388-392.
- McCaskill, D.R. and Zhang, F. 1999. Use of rice bran oil in foods. Food Technol. 53(2) : 50-53.
- Mel'nikov, S.M., Seijen ten Hoorn, J.W.M. and Eijkelenboom, A.P.A.M. 2004. Effect of phytosterols and phytostanols on the solubilization of cholesterol by dietary mixed micelles : an *in vitro* study. Chem. Phys. Lipids. 127 : 121-141.
- Miller, A., Frenzel, T., Schmarr, H.-G. and Engel, K.-H. 2003. Coupled liquid chromatography-gas chromatography for the rapid analysis of γ -oryzanol in rice lipids. J. Chromatogr. 985 : 403-410.
- Miller, A., Majauskaite, L. and Engel, K.H. 2004. Enzyme-catalyzed hydrolysis of γ -oryzanol. Eur. Food Res. Technol. 218 : 349-354.
- Mizuta, K. and Itaya, K. 1978. Effects of γ -oryzanol and atropine on gastric secretion stimulated by insulin or 2-deoxy-D-glucose. Nippon Yakurigaku Zasshi. 74(4) : 517-524.
- Mizuta, K., Kaneta, H. and Itaya, K. 1978. Effects of γ -oryzanol on gastric secretions in rats. Nippon Yakurigaku Zasshi. 74(2) : 285-295.
- Murase, Y. and Ishima, H. 1963. Clinical studies of oral administration of γ -oryzanol on climacteric complaints and its syndrome. Obstet. Gynecol. Prac. 12 : 147-149.

- Moreau, R.A., Whitaker, B.D. and Hicks, K.B. 2002. Phytosterols, phytostanols and their conjugates in foods : structural diversity, quantitative analysis and health-promoting uses. Prog. Lipid Res. 41 : 457-500.
- Moreau, R.A. and Hicks, K.B. 2004. The in vitro hydrolysis of phytosterol conjugates in food matrices by mammalian digestive enzymes. Lipids. 39(8) : 769-776.
- Morel, D.W. and Lin, C.Y. 1996. Cellular biochemistry of oxysterols derived from the diet or oxidation *in vivo*. J. Nutr. Biochem. 7 : 495-506.
- Murray, M.T. 1996. Encyclopedia of nutritional supplements. New York : Tree River Press,
- Norton, R.A. 1995. Quantitation of steryl ferulate and β -coumarate esters from corn and rice. Lipids. 30 : 269-274.
- Nyström, L., Mäkinen, M., Lampi, A.-M. and Piironen, V. 2005. Antioxidant activity of steryl ferulate from rye and wheat bran. J. Agric. Food Chem. 53 : 2503-2510.
- Odomi, M., Ishigami, M. and Shimizu, T. 1983. Probucol prevents the progression of atherosclerosis in Watanabe heritable hyperlipidemic rabbit, an animal model for familial hypercholesterolemia. Otsuka Pharm. 64 : 592-598.
- Orthoefer, F.T. 1996. Rice bran oil : healthy lipid source. Food Technol. 50(12) : 62-64.
- Ostlund, R.E.Jr. 2002. Phytosterols in human nutrition. Annu. Rev. Nutr. 22 : 533-549.
- Paniangvait, P., King, A.J., Jones, A.D. and German, B.G. 1995. Cholesterol oxides in foods of animal origin. J. Food Sci. 60 : 1159-1165.
- Qureshi, A.A., Sami, S.A. and Khan, F.A. 2002. Effects of stabilized rice bran, its soluble and fiber fractions on blood glucose levels and serum lipid parameters in humans with diabetes mellitus Types I and II. J. Nutr. Biochem. 13 : 175-187.
- Rao, K.V.S.A., Rao, B.V.S.K. and Kaimal, T.N.B. 2002. Process for the isolation of oryzanols from rice bran oil soap stock. US patent number 6,410,762.
- Raicht, R.F., Conhen, B.I., Fazzini, E., Sarwal, A. and Takahashi, M. 1980. Protective effect of plant sterols against chemically-induced colon tumor in rats. J. Cancer Res. 40 : 403-405.

- Roger, E.J., Rice, S.M., Nicolosi, R.J., Carpenter, D.R., McClelland, C.A. and Romanczyk, L.J. 1993. Identification and quantitation of γ -oryzanol components and simultaneous assessment of tocopherols in rice bran oil. J. Am. Oil Chem. Soc. 70 : 301-307.
- Rong, N., Ausman, L.M. and Nicolosi, R.J. 1997. Absorption and aortic fatty streaks in hamsters. Lipids. 32 : 303-309.
- Rosenbloom, C., Millard-Stafford, M. and Lathrop, J. 1992. Contemporary ergogenic aids used by strength/power athletes. J. Am. Diet Assoc. 92(10) : 1264-1265.
- Rukmini, C. 1988. Chemical, Nutritional and toxicological studies of rice bran oil. Food Chem. 30 : 257-268.
- Sasaki, J., Takada, K., Kusuda, M., Tanabe, Y., Matsunaga, A. and Arakawa, K. 1990. Effects of γ -oryzanol on serum lipids and apolipoproteins in dyslipidemic schizophrenics receiving major tranquilizers. Clin. Ther. 12(3) : 263-268.
- Sayre, R.N. 1988. Rice bran as a source of edible oil and higher value chemicals. Western Regional Research Center, ARS, USDA.
- Seetharamaiah, G.S. and Chandrasekhara, N. 1989. Studies on hypocholesterolemic activity of rice bran oil. Atherosclerosis. 78 : 219-223.
- Seetharamaiah, G.S., Krishnakantha, T.P. and Chandrasekhara, N. 1990. Influence of oryzanol on platelet aggregation in rats. J. Nutr. Sci. Vitaminol. (Tokyo) 36(3) : 291-297.
- Seetharamaiah, G.S. and Prabhakar, J.V. 1986. Oryzanol content of Indian rice bran oil and its extraction from soap stock. J Food Sci. Technol. 23 : 270-273.
- Seitz, M. 1989. Stanols and sterols esters of ferulic and β -coumaric acids in wheat, corn, rye and triticale. J. Agric. Food Chem. 37 : 662-667.
- Sharma, R.D. and Rukmini, C. 1987. Hypocholesterolemic activity of unsaponifiable matter of rice bran oil. J. Med. Res. 85 : 278-281.
- Shin, T., Godber, J.S., Martin, D. and Wells, J. 1997. Hydrolytic stability and changes in E vitamers and oryzanol of extruded rice bran during storage. J. Food Sci. 62(4) : 704-708.
- Smith, L.L. 1987. Cholesterol autoxidation. Chem. Phys. Lipids. 44 : 87-125.

- Sunitha, T., Manorama, R. and Rukmini, C. 1997. Lipid profile of rats fed blends of rice bran oil in combination with sunflower and safflower oil. Plants Foods Hum. Nutr. 51 : 219-230.
- Suzuki, S. and Osima, S. 1970. Influence of blending of edible fats and oils on human serum cholesterol level (Part 1 and 2). Jpn. J. Nutr. 28 : 3-6 and 194-198.
- Tamagawa, M., Otaki, Y., Takahashi, T., Otaka, T., Kimura, S. and Miwa, T. 1992a. Carcinogenicity study of γ -oryzanol in F344 rats. Foods Chem. Toxicol. 30(1) : 41-48.
- Tamagawa, M., Otaki, Y., Takahashi, T., Otaka, T., Kimura, S. and Miwa, T. 1992b. Carcinogenicity study of γ -oryzanol in B6C3F₁ mice. Foods Chem. Toxicol. 30 : 49-56.
- Trautwein, E.A., Schulz, C., Rieckhoff, D., Kunath-Rau, A., Erbersdobler, H.F., Groot, W.A. and Meijer, G.W. 2002. Effect of esterified 4-desmethylsterols and -stanols or 4,4'-dimethylsterols on cholesterol and bile acid metabolism in hamster. Br. J. Nutr. 87 : 227-237.
- Trautwein, E.A., Duchateau, G.S.M.J.E., Lin, Y., Mel'nikov, S.M., Molhuizen, H.O.F. and Ntanos, F.Y. 2003. Proposed mechanisms of cholesterol-lowering action of plant sterols. Eur. J. Lipid Sci. Technol. 105 : 179-185.
- Tsushimoto, G., Shibahara, T., Awogi, T., Kaneko, E., Sotou, S., Yamamoto, K. and Shirakawa, H. 1991. DNA-damaging, mutagenic, clastogenic and cell-cell communication inhibitory properties of γ -oryzanol. J. Toxicol. Sci. 16(4) : 191-202.
- Watanabe, K., Nakamura, R. and Hosono, A. 1988. Mutagenic activity of heat-induced cholesterol-degradation products. J. Food Sci. 38 : 119-123.
- Wheeler, K.B. and Garleb, K.A. 1991. γ -oryzanol-plant sterol supplementation : metabolic, endocrine and physiologic effects. Int. J. Sport Nutr. 1(2) : 170-177.
- Wilson, A.M., Sisk, R.M. and O'Brien, N.M. 1997. Modulation of cholestan-3 β , 5 α , 6 β -triol toxicity by butylated hydroxytoluene, α -tocopherol and β -carotene in newborn rat kidney cells *in vitro*. Br. J. Nutr. 78 : 497-492.

- Woods, J.A. and O' Brien, N.M. 1998. Investigation of the potential genotoxicity of cholesterol oxidation products in two mammalian fibroblast cell lines. Nutr. Cancer. 31 : 192-198.
- Xu, Z. and Godber, J.S. 1999. Purification and identification of components of γ -oryzanol in rice bran oil. J. Agric. Food Chem. 47 : 2724-2728.
- Xu, Z. and Godber, J.S. 2000. Comparison of supercritical fluid and solvent extraction methods in extracting γ -oryzanol from rice bran. J. Am. Oil Chem. Soc. 77 : 1127-1131.
- Xu, Z., Hua, N. and Godber, J.S. 2001. Antioxidation activity of tocopherols, tocotrienols and γ -oryzanol components from rice bran against cholesterol oxidation accelerated by 2,2'-azobis(2-methylpropionamide) dihydrochlorides. J. Agric. Food Chem. 49 : 2077-2081.
- Yagi, K. and Ohishi, N. 1979. Action of ferulic acid and its derivatives as antioxidants. J. Nutr. Sci. Vitaminol. 25 : 127-130.
- Yan, P.S. and White, P.J. 1990. Cholesterol oxidation in heated lard enriched with two levels of cholesterol. J. Am. Oil Chem. Soc. 67 : 927-931.
- Yasukawa, K. and Akihisa, T. 1997. Anti-inflammatory and antitumor-promoting activities of sterols, triterpene alcohols and their derivatives. Recent Res. Devel. Oil Chem. 1 : 115-125.
- Yasukawa, K., Akihisa, T., Kimura, Y., Tamura, T. and Takido, M. 1998. Inhibitory effect of cycloartenol ferulate, a component of rice bran, on tumor promotion in two-stage carcinogenesis in mouse skin. Biol. Pharm. Bull. 21 : 1072-1076.
- Yasukawa, K., Takido, M., Matsumoto, T., Takeuchi, M. and Nakagawa, S. 1991. Sterol and triterpene derivatives from plants inhibit the effects of a tumor promoter and sitosterol and betulinic acid inhibit tumor formation in mouse skin two-stage carcinogenesis. Oncology. 48 : 72-76.
- Yamauchi, J., Takahara, J., Uneki, T., Yakushiji, W., Nakashima, Y., Miyoshi, M. and Ofuji, T. 1980. The effect of γ -oryzanol on rat pituitary hormone secretion. Nippon Naibunpi Gakkai Zasshi. 56(8) : 1130-1139.



ภาคผนวก

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาคผนวก ก

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การประมาณปริมาณออร์ิซานอล

1. คำนวณค่า specific extinction coefficient ($\epsilon_{1\text{ cm}}$) ของออร์ิซานอลมาตรฐาน

จากสมการของ Beer's Laws

$$A = \epsilon bc \quad \text{เมื่อ } A = \text{ค่า optical density (absorbance)}$$

$$\epsilon = \text{molar absorptivity (L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1} \text{ หรือ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}\text{)}$$

$$b = \text{path length ของ cuvette ที่ใส่สารตัวอย่าง (cm)}$$

$$c = \text{ความเข้มข้นของสารตัวอย่าง (mol L}^{-1} \text{ หรือ M)}$$

ค่า optical density สูงสุดของออร์ิซานอลมาตรฐานในเอธิลอะซิเตต ที่ความยาวคลื่น 321 นาโนเมตร เท่ากับ 0.872 (A) ที่ความเข้มข้น 0.02 กรัม/ลิตร ซึ่งมวลโมเลกุลของออร์ิซานอลมาตรฐาน เท่ากับ 602 กรัม/โมล

$$\text{ออร์ิซานอลมาตรฐาน } 602 \text{ กรัม เท่ากับ } 1 \text{ โมล}$$

$$\text{ออร์ิซานอลมาตรฐาน } 0.02 \text{ กรัม เท่ากับ } \frac{0.02 \text{ กรัม} \times 1 \text{ โมล}}{602 \text{ กรัม}} = 3.32 \times 10^{-5} \text{ โมล}$$

$$\therefore \text{ความเข้มข้นของออร์ิซานอลมาตรฐาน (c) = } 3.32 \times 10^{-5} \text{ โมล/ลิตร (M)}$$

$$\text{จาก } A = \epsilon bc \quad \rightarrow \quad \epsilon = \frac{A}{bc} = \frac{0.872}{(1 \text{ cm})(3.32 \times 10^{-5} \text{ M})}$$

$$\therefore \epsilon = 26,265 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$$

2. คำนวณปริมาณออริซานอลทั้งหมดในรำข้าวพันธุ์ทุ่งสงและรำข้าวเหนียวดำ

ค่า optical density ที่ความยาวคลื่น 321 นาโนเมตร ในเอทิลอะซิเตต

$$\text{น้ำมันดิบรำข้าวพันธุ์ทุ่งสง} = 0.354$$

$$\text{น้ำมันดิบรำข้าวเหนียวดำ} = 0.284$$

$$\text{จาก } A = \epsilon bc \rightarrow c = \frac{A}{b\epsilon} = \frac{0.354}{(1 \text{ cm})(26,265 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1})}$$

$$\therefore c = 1.35 \times 10^{-5} \text{ M}$$

จาก ออริซานอล 1 โมล เท่ากับ 602 กรัม

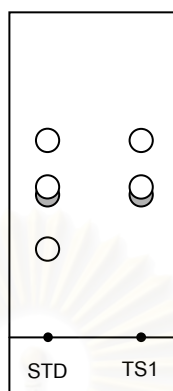
$$\text{ออริซานอล } 1.35 \times 10^{-5} \text{ โมล เท่ากับ } \frac{(1.35 \times 10^{-5} \text{ โมล})(602 \text{ กรัม})}{1 \text{ โมล}} = 8.13 \times 10^{-3} \text{ กรัม}$$

จาก น้ำมันดิบรำข้าวทุ่งสง 34.33 กรัม

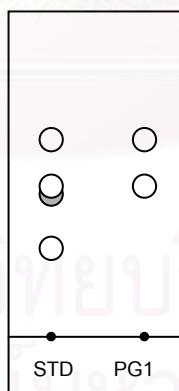
$$\begin{aligned} \therefore \text{ปริมาณออริซานอลในน้ำมันดิบรำข้าวพันธุ์ทุ่งสง} &= (8.13 \times 10^{-3} \text{ กรัม})(34.33 \text{ กรัม}) \\ &= 279 \text{ มก.} \end{aligned}$$

ปริมาณออริซานอลในน้ำมันดิบรำข้าวเหนียวดำ คำนวณเช่นเดียวกัน = 257 มก.

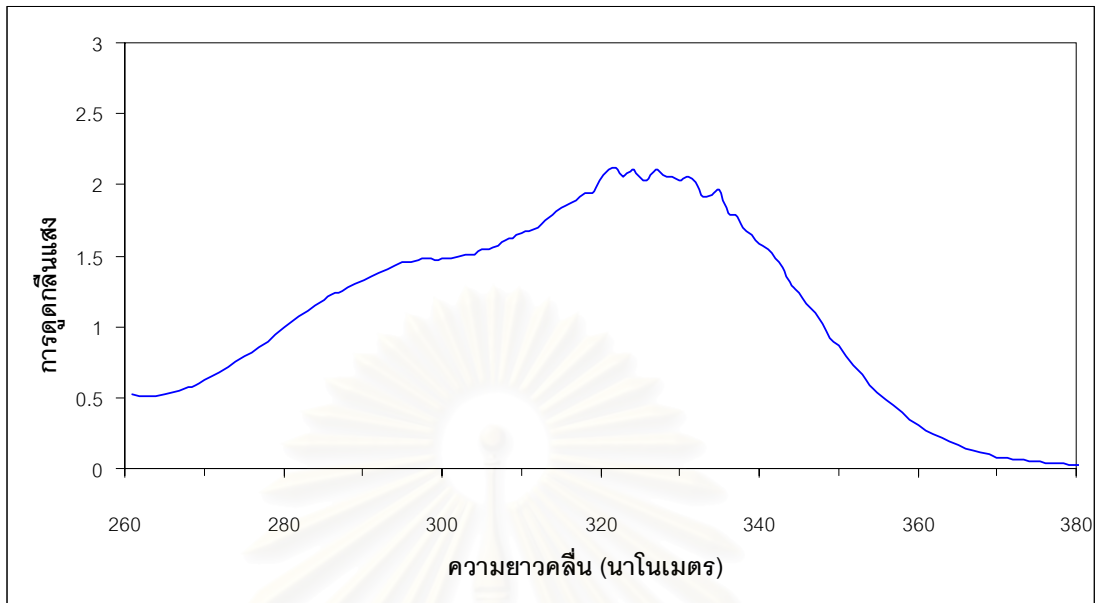
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



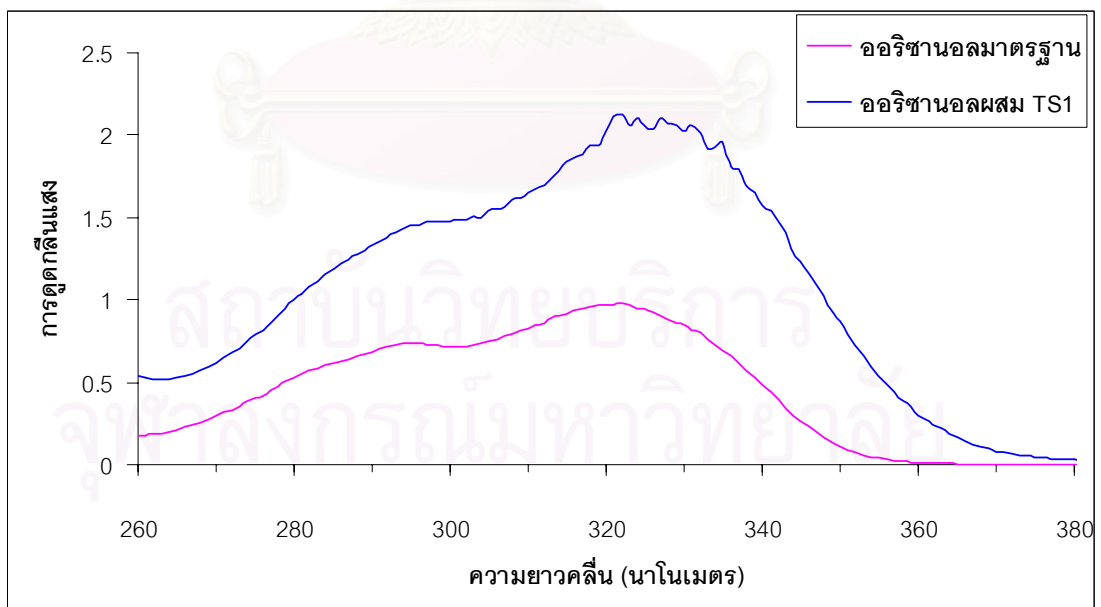
รูปที่ 1ก TLC pattern ของอริซานอลมาตรฐาน และอริซานอลผสม TS1



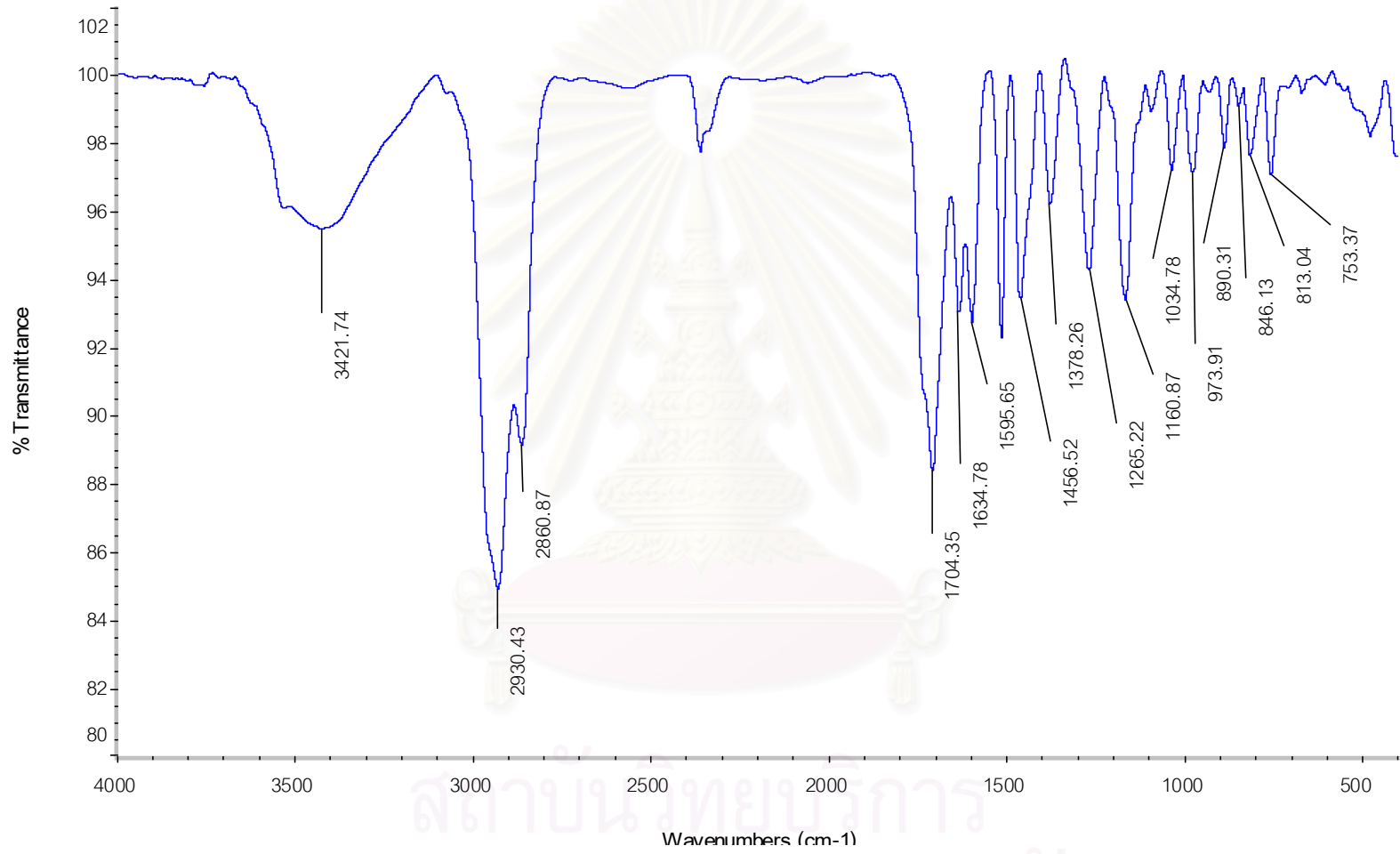
รูปที่ 2ก TLC pattern ของอริซานอลมาตรฐาน และอริซานอลผสม PG1



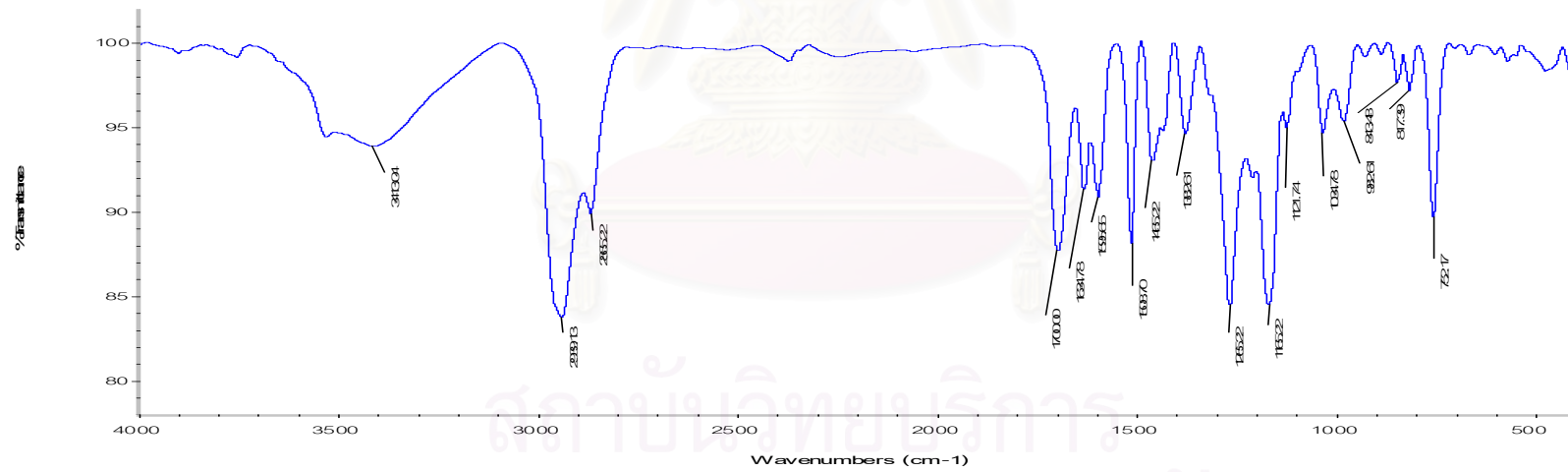
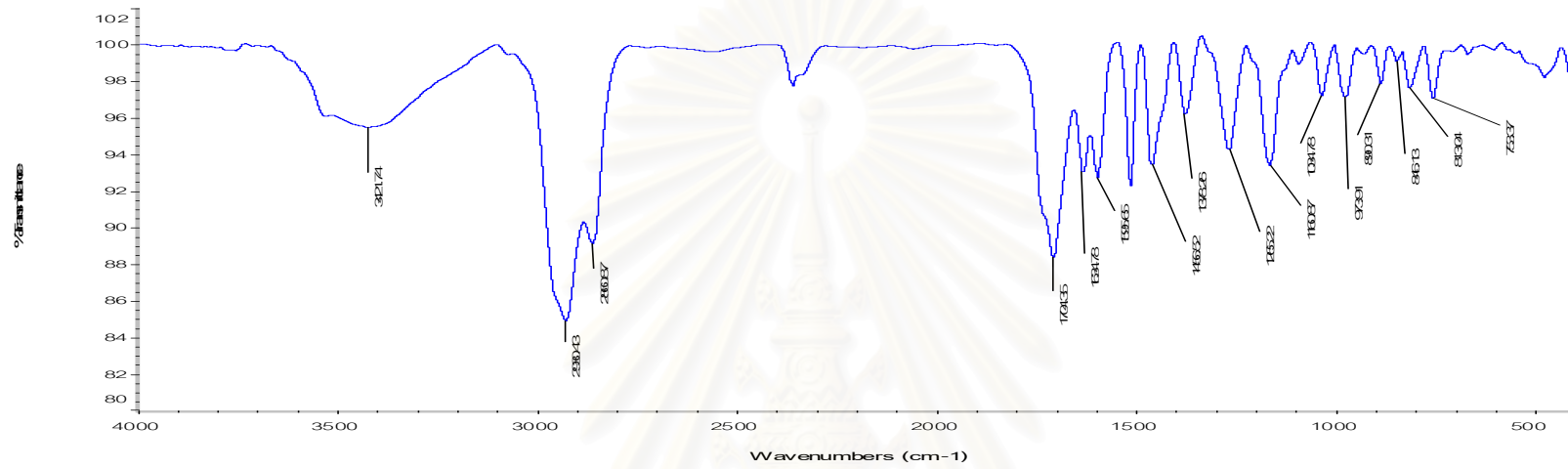
รูปที่ 3ก ยูวี โคโรมาโทแกรมของอริซานอลผสม TS1



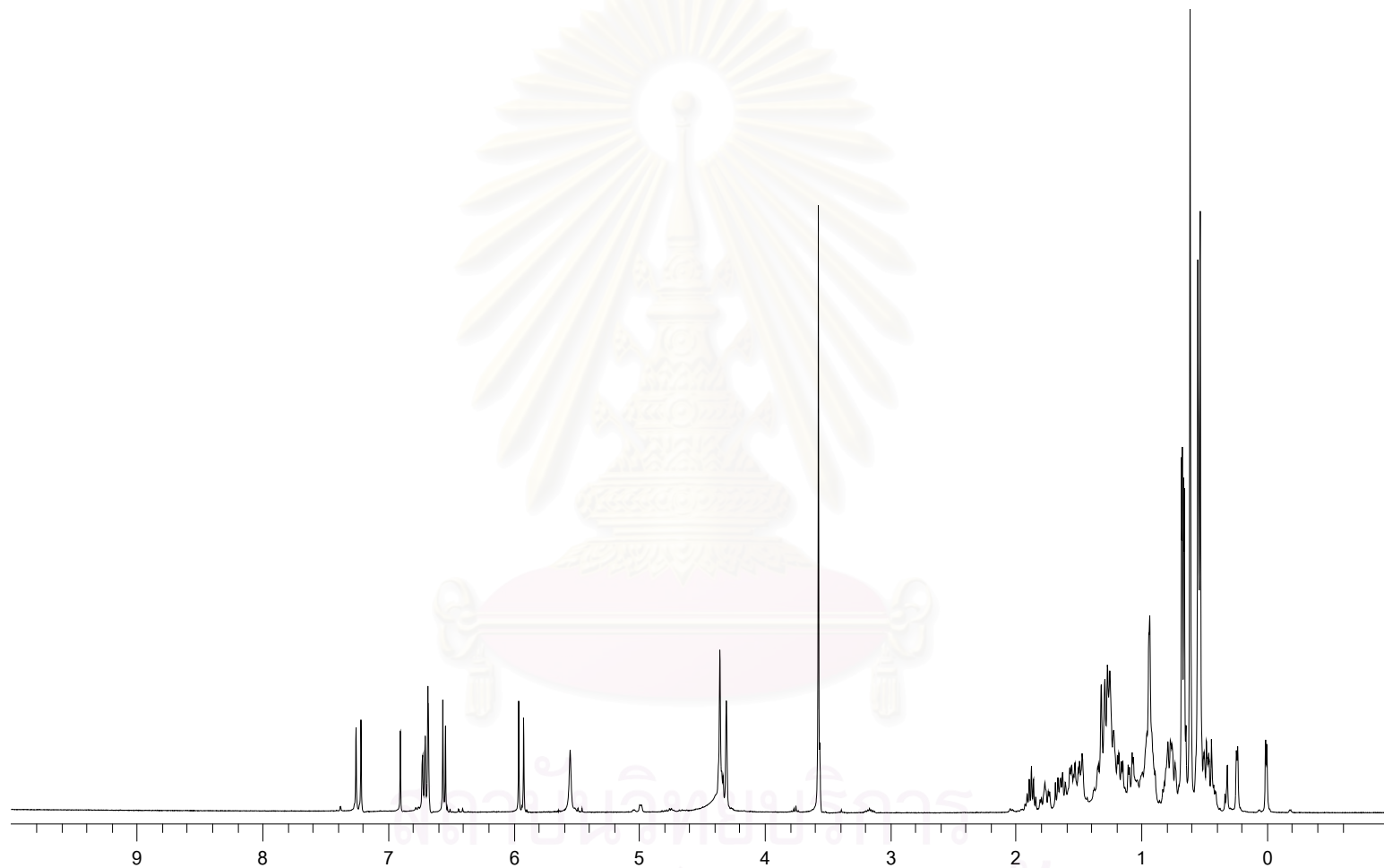
รูปที่ 4ก ยูวี โคโรมาโทแกรมของอริซานอลผสม TS1 และอริซานอลมาตรฐาน



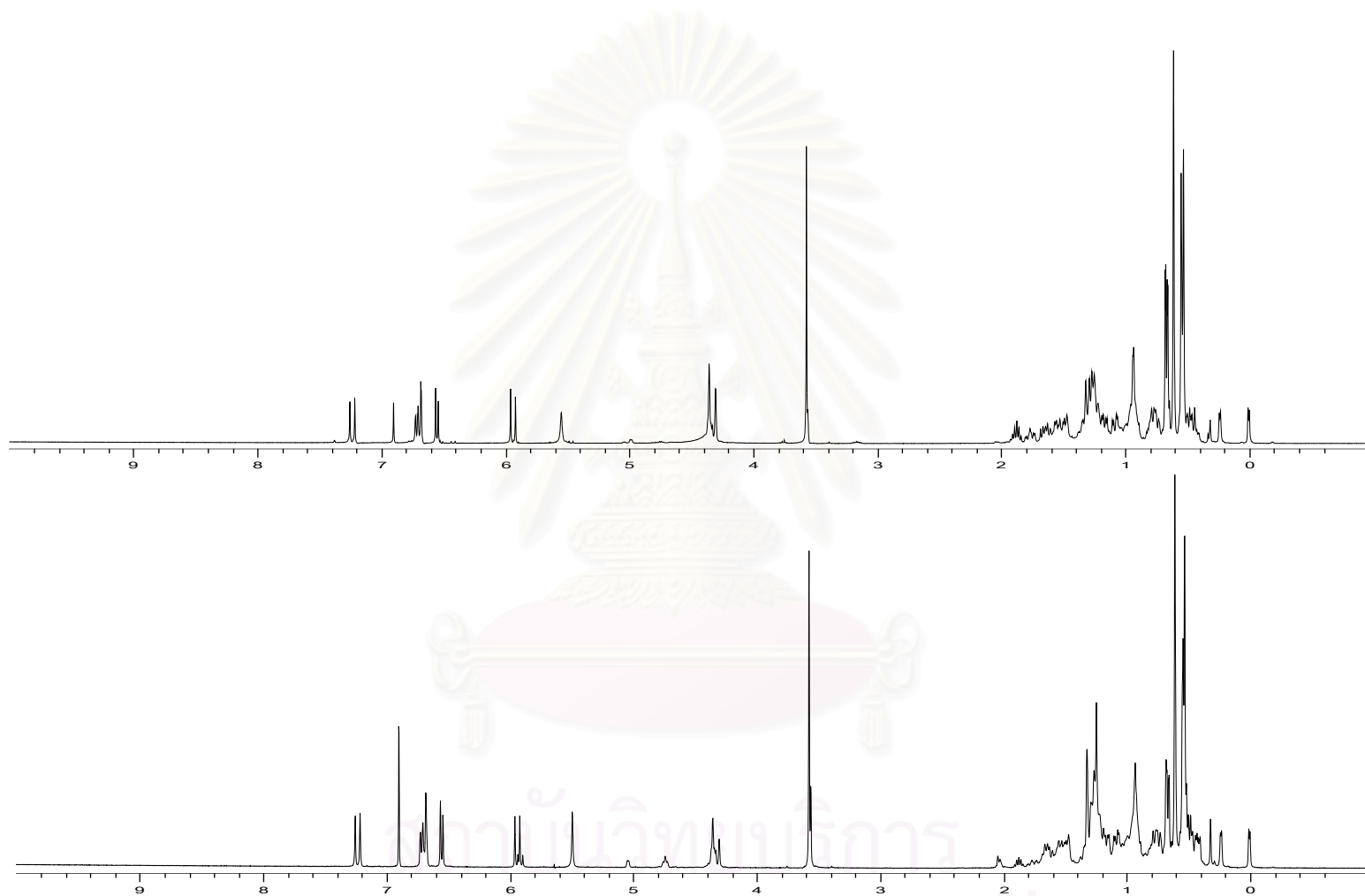
รูปที่ 5ก IR สเปกตรัมของออริซานอลผสม TS1



รูปที่ 6ก IR สเปกตรัมของออริซานอลผสม TS1 (บน) และออริซานอลมาตรฐาน (ล่าง)



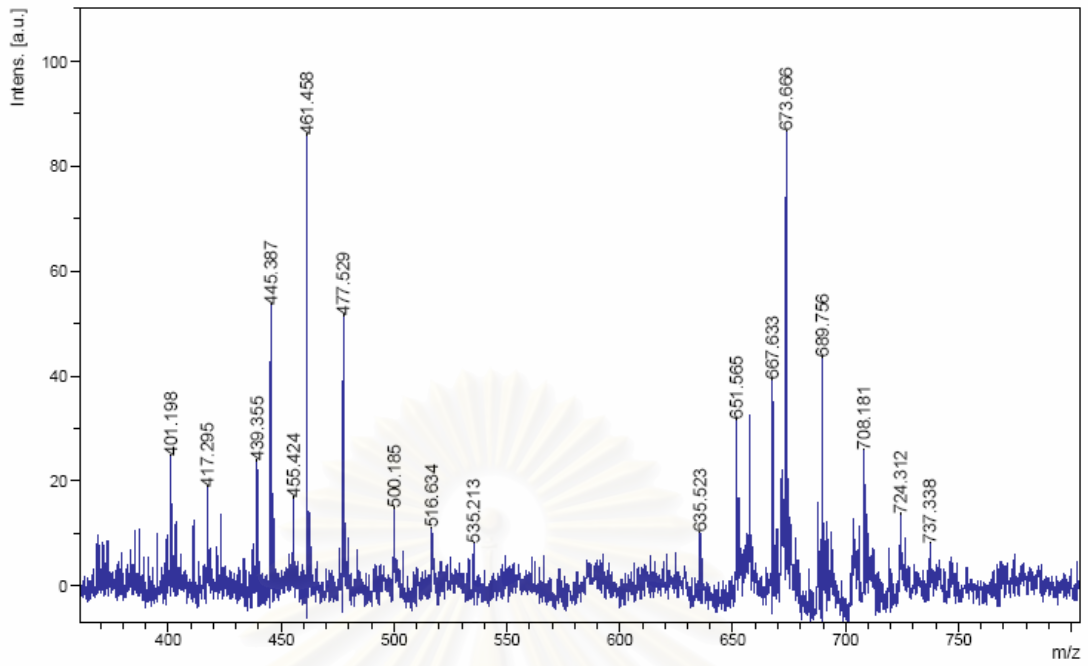
รูปที่ 7ก $^1\text{H-NMR}$ สเปกตรัมของออริซานอลผสม TS1



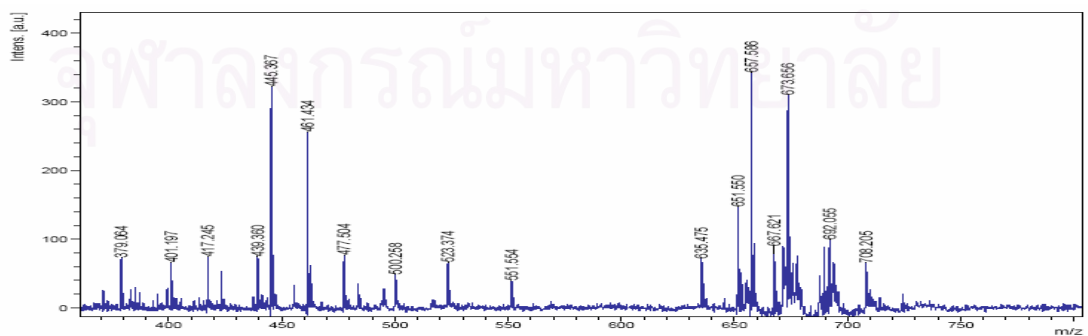
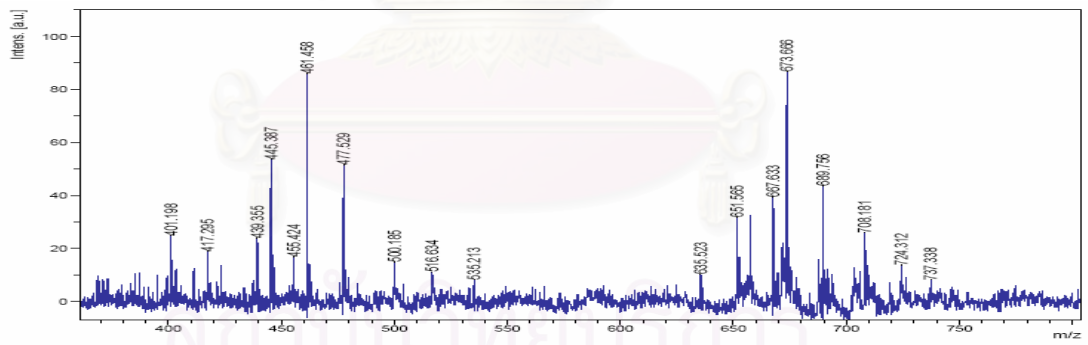
รูปที่ 8ก $^1\text{H-NMR}$ สเปกตรัมของอริชานอลผสม TS1 (บน) และอริชานอลมาตรฐาน (ล่าง)

ตารางที่ 1ก ตำแหน่ง proton ใน $^1\text{H-NMR}$ สเปกตรัมของ 24-methylenecycloartanyl ferulate cycloartenyl ferulate sitosteryl ferulate และ campesteryl ferulate ใน CDCl_3 จากอริซานอลผสม TS1 และงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

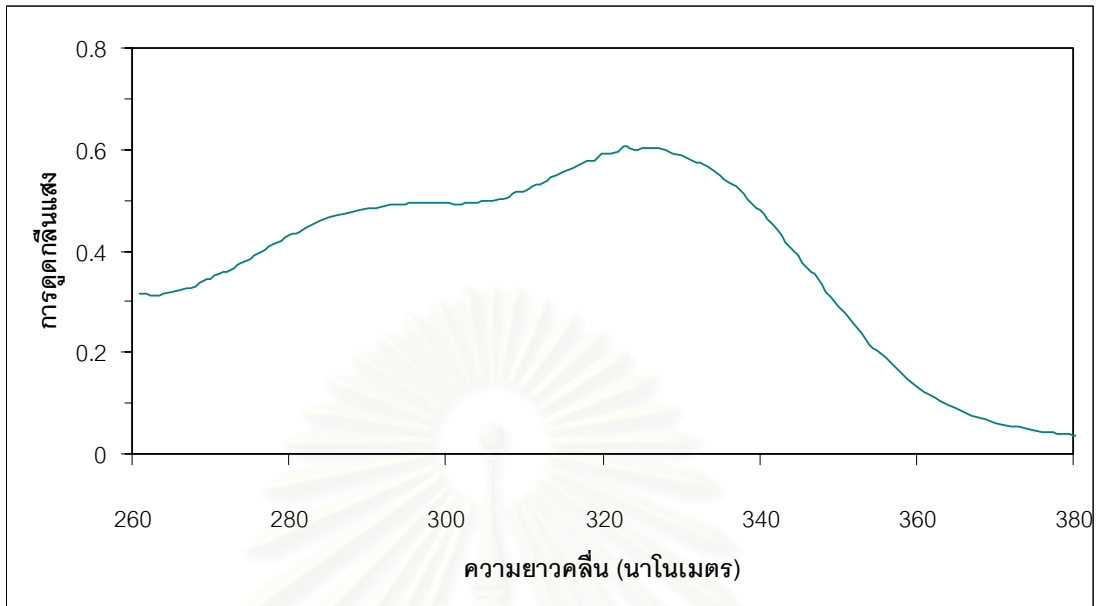
ตำแหน่ง proton	$^1\text{H-NMR}$ chemical shifts (δ /ppm, 400 MHz, CDCl_3)				
	อริซานอลผสม TS1	24-methylenecycloartanyl ferulate	cycloartenyl ferulate	sitosteryl ferulate	campesteryl ferulate
3	4.71	4.71	4.71	4.75	4.71
4	2.38			2.39	2.39
	2.40			2.41	2.41
6	5.40			5.41	5.41
18	0.97	0.98	0.97	0.69	0.69
19	0.36	0.37	0.37		
	0.60	0.60	0.60		
	1.04			1.05	1.05
21	0.90	0.90	0.89	0.89	0.89
24	0.84			0.85	
	0.77				0.78
	4.66	4.67			
	4.72	4.72			
	5.10		5.11		
25	2.23	2.24			
26	0.83			0.82	
	0.85				0.85
	1.02	1.03			
	1.68		1.69		
27	0.82				0.81
	0.85			0.84	
	1.03	1.04			
	1.61		1.61		
28	0.91	0.90	0.90		
29	0.97	0.98	0.98		
30	0.92	0.92	0.91		
2'	6.30	6.30	6.30	6.30	6.30
3'	7.59	7.60	7.60	7.60	7.60
5'	7.05	7.04	7.04	7.04	7.04
8'	6.91	6.92	6.92	6.92	6.92
9'	7.07	7.08	7.08	7.08	7.08
6'-OCH ₃	3.93	3.94	3.94	3.94	3.94
7'-OH	5.90	5.85	5.85	5.85	5.85



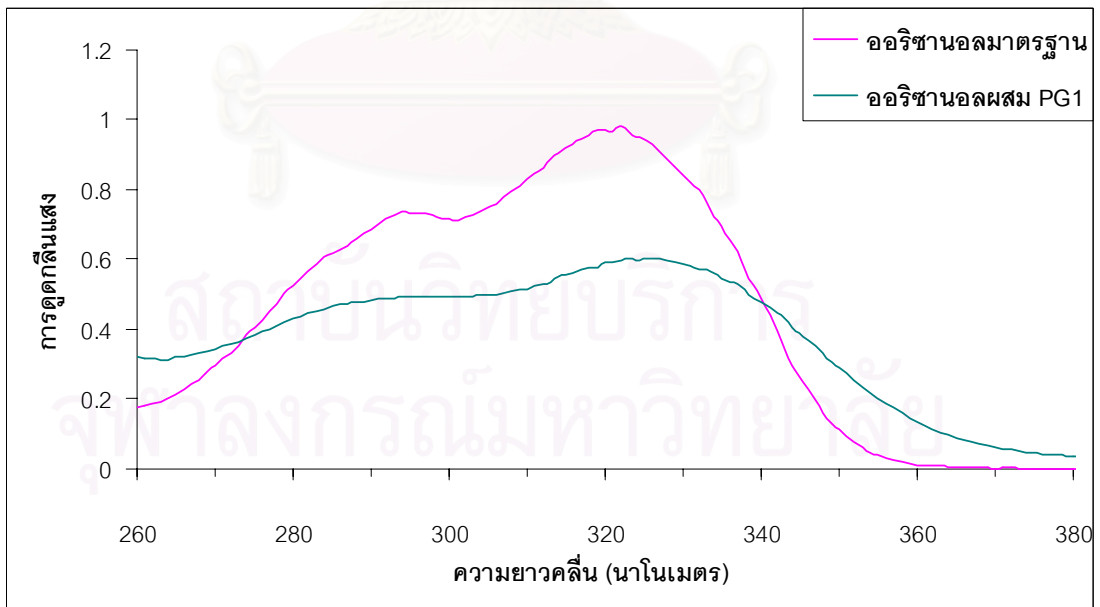
รูปที่ 9ก MS สเปกตรัมของออริซานอลผสม TS1



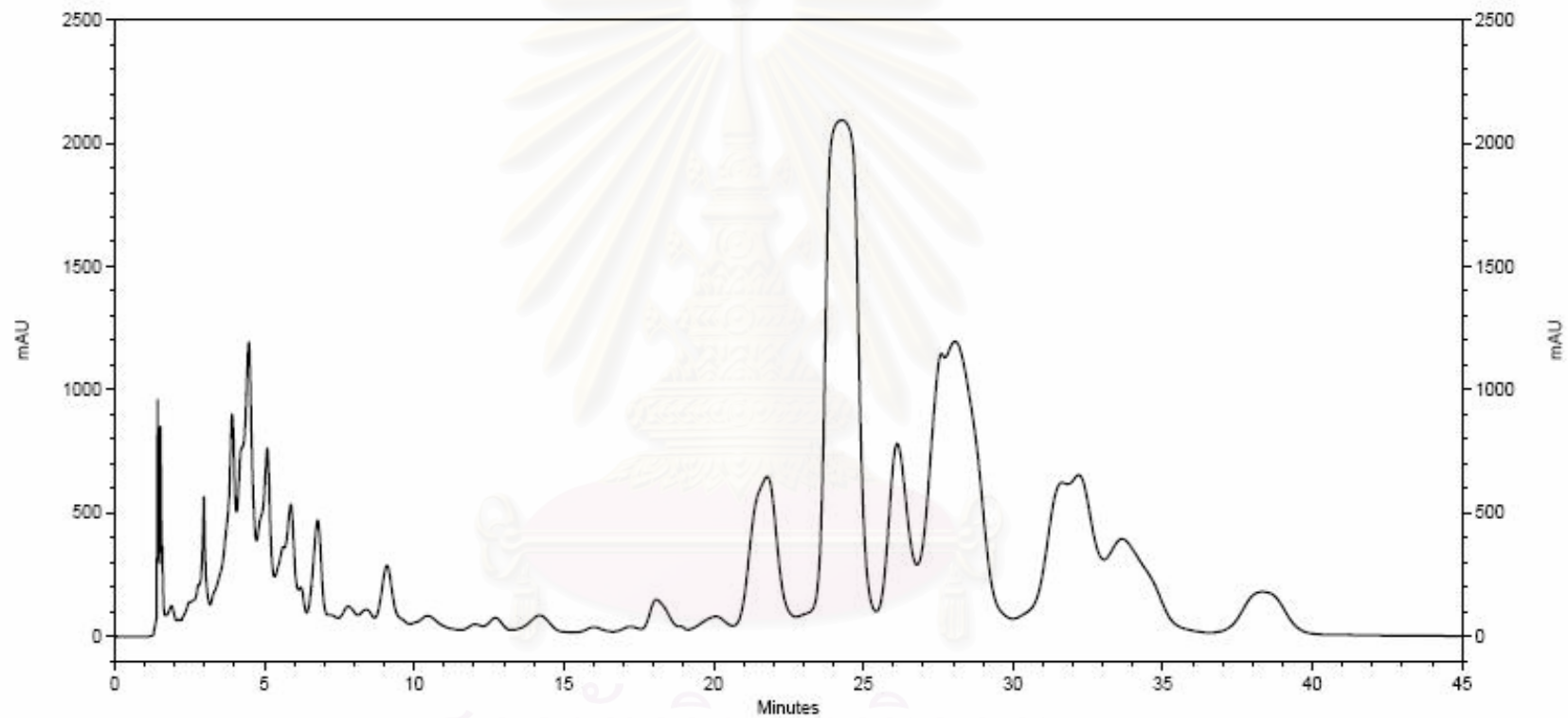
รูปที่ 10ก MS สเปกตรัมของออริซานอลผสม TS1 (บน) และออริซานอลมาตรฐาน (ล่าง)



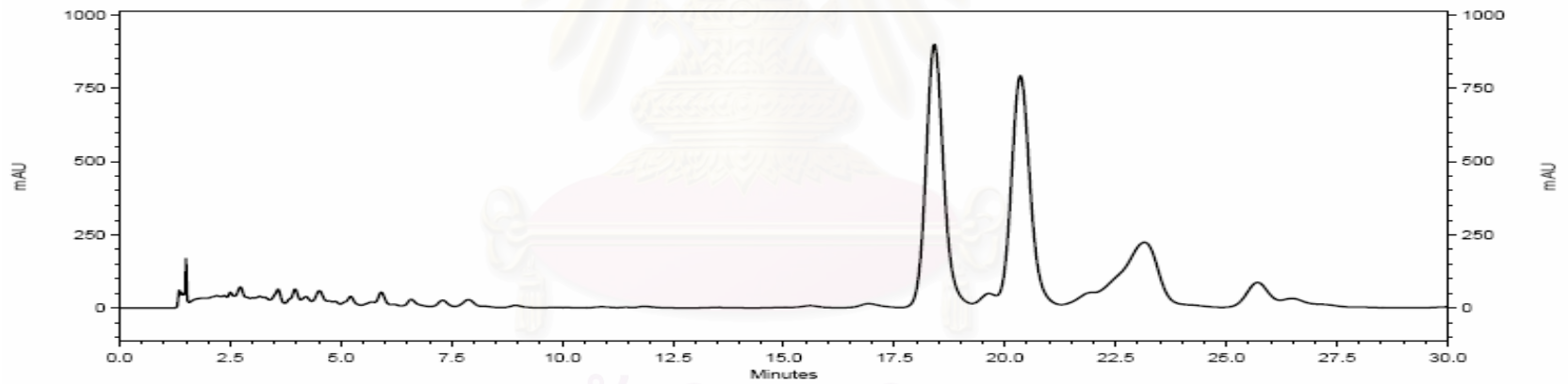
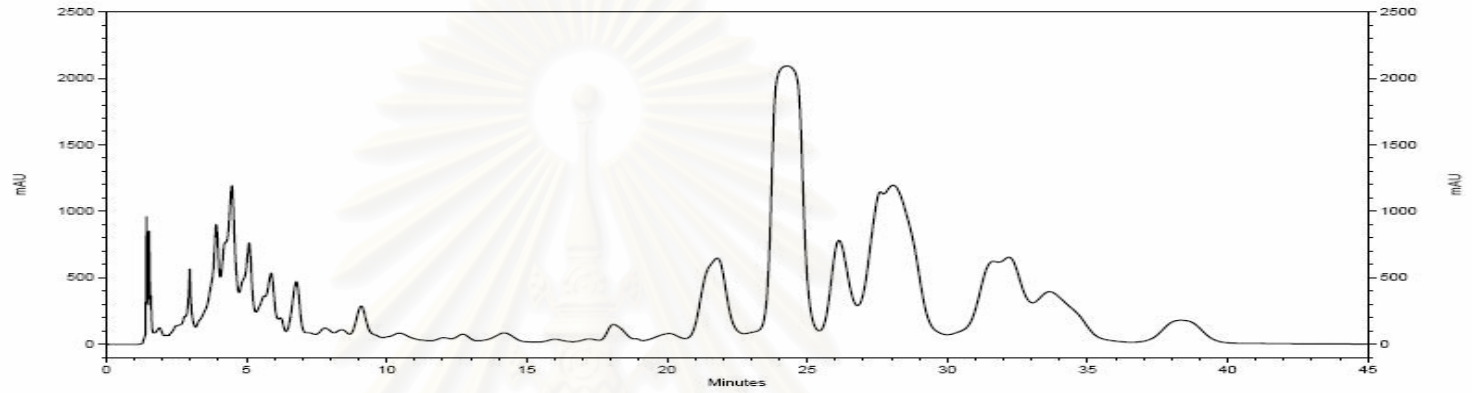
รูปที่ 11ก ยูวี โคโรมาโทแกรมของออริซานอลผสม PG1



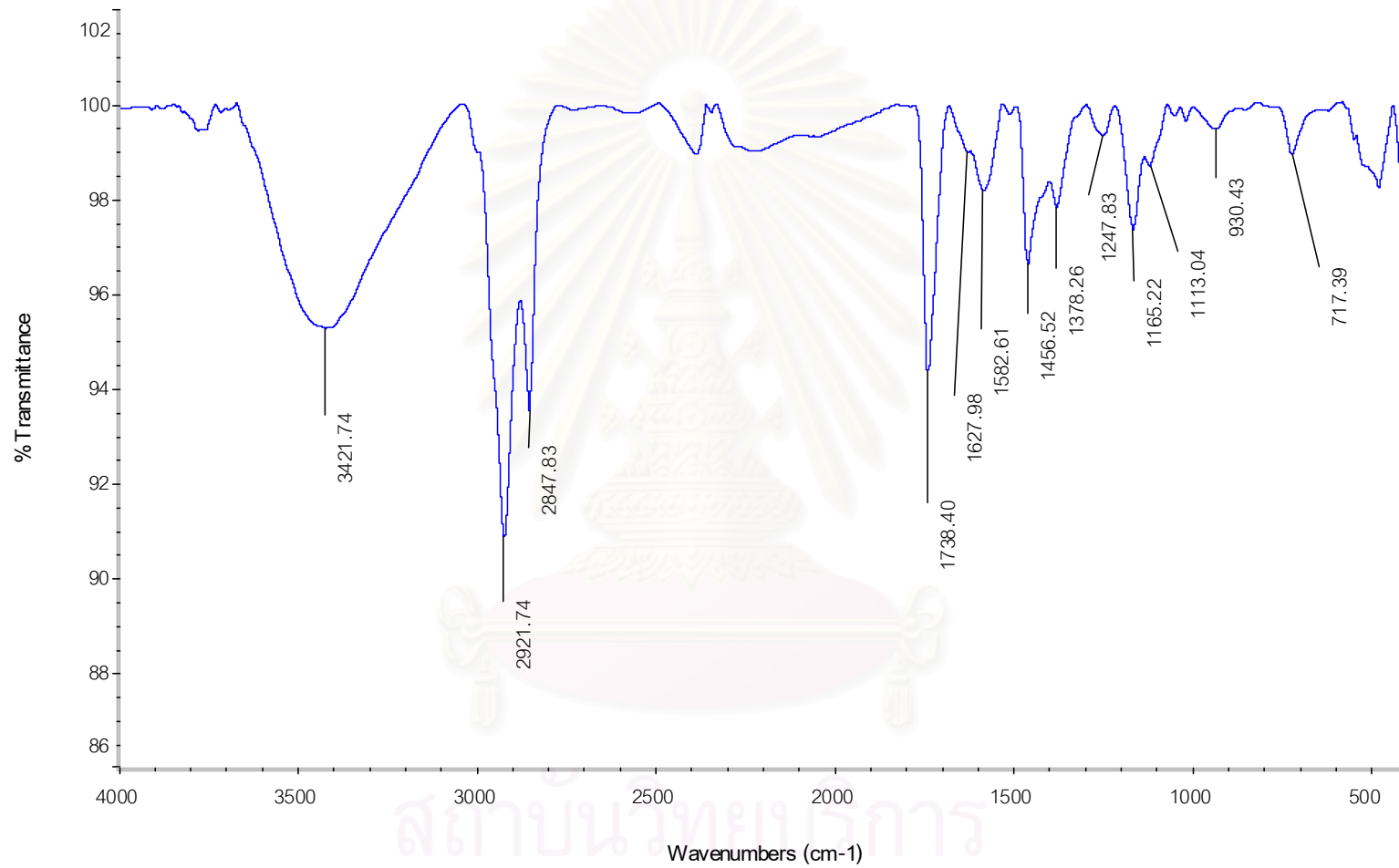
รูปที่ 12ก ยูวี โคโรมาโทแกรมของออริซานอลผสม PG1 และออริซานอลมาตรฐาน



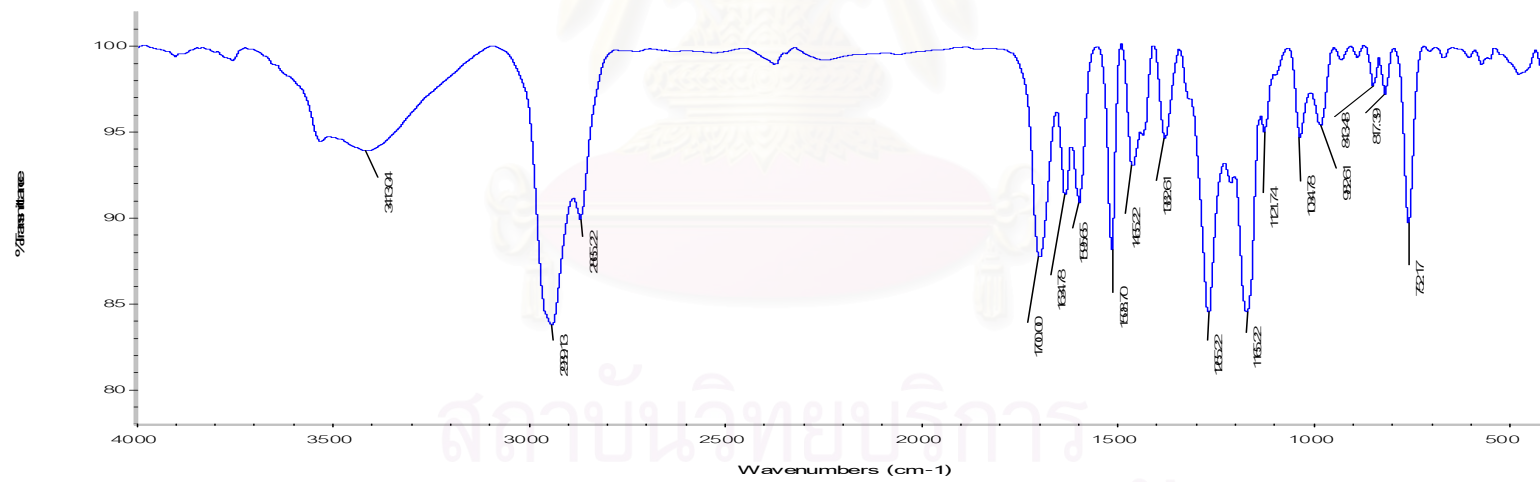
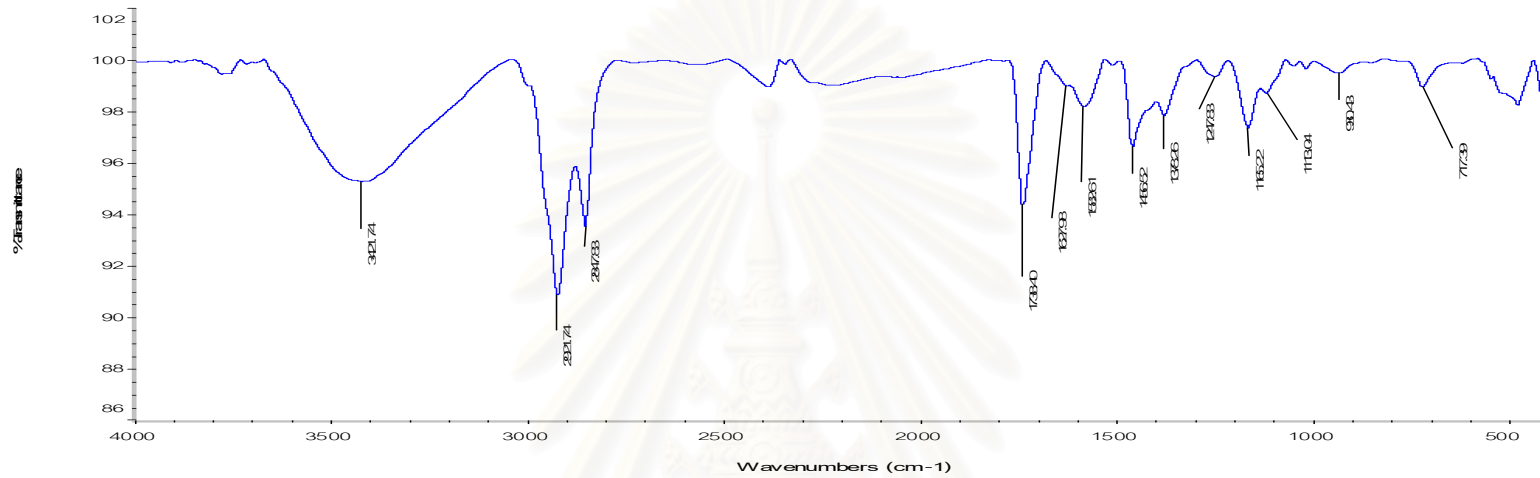
รูปที่ 13ก HPLC โครมาโทแกรมของอริซานอลผสม PG1 (คอลัมน์, C₁₈; ภูมิภาคเคลื่อนที่, เมธานอล:อะซิโตไนไตรล์ (40:60); อัตราการไหล 1 มล./นาที; ยูวี ดีเทคเตอร์, 330 นาโนเมตร)



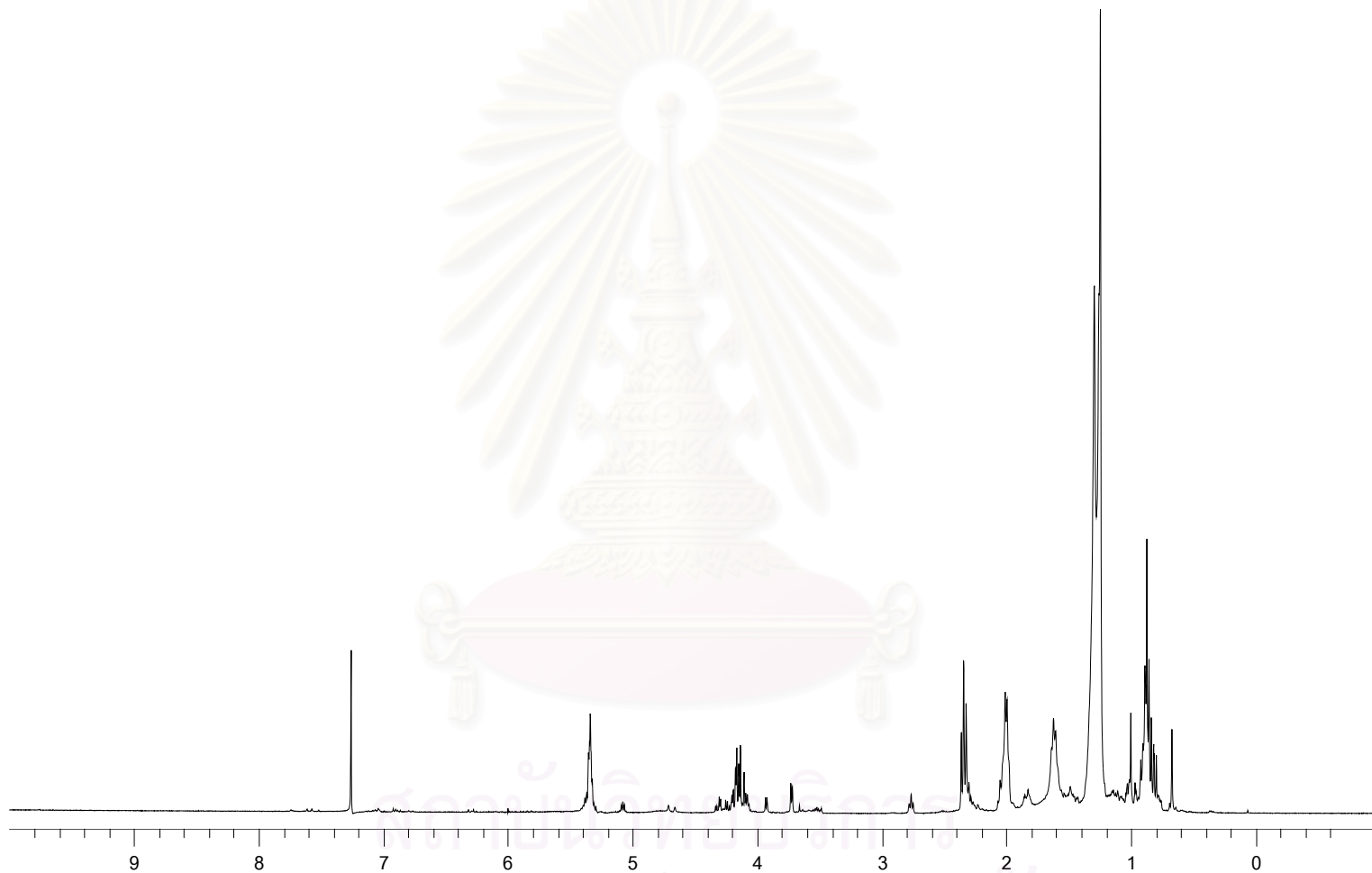
รูปที่ 14ก HPLC โครมาโทแกรมของอริซานอลผสม PG1 (บน) และอริซานอลมาตรฐาน (ล่าง) (คอลัมน์, C₁₈; ภูมิภาคเคลื่อนที่, เมธานอล:อะซิโตนไตรรล์ (40:60); อัตราการไหล 1 มล./นาที; ยูวี ดีเทคเตอร์, 330 นาโนเมตร)



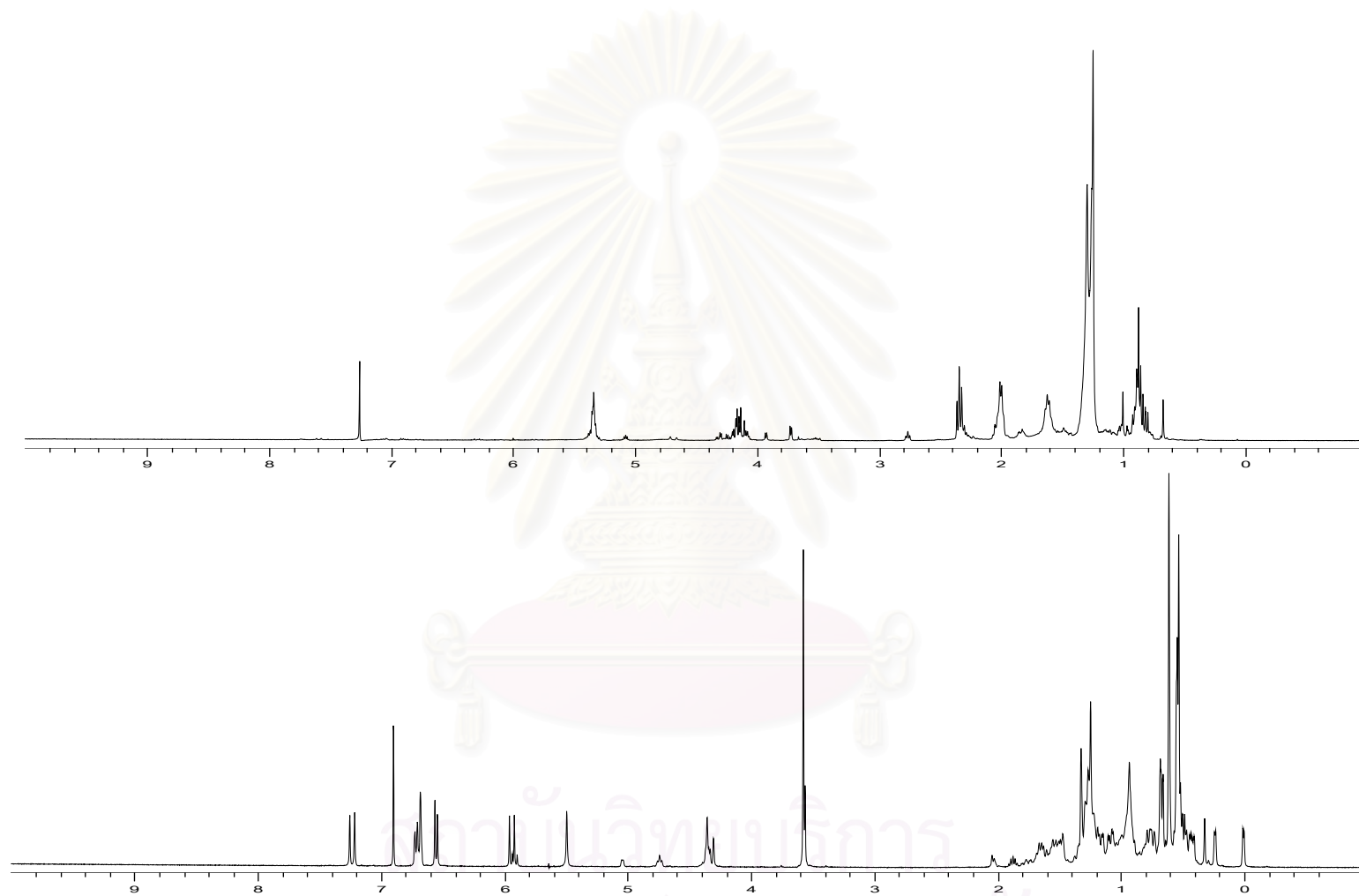
รูปที่ 15ก IR สเปกตรัมของออร์นิทานอลผสม PG1



รูปที่ 16 ก IR สเปกตรัมของออริซานอลผสม PG1 (บน) และออริซานอลมาตรฐาน (ล่าง)



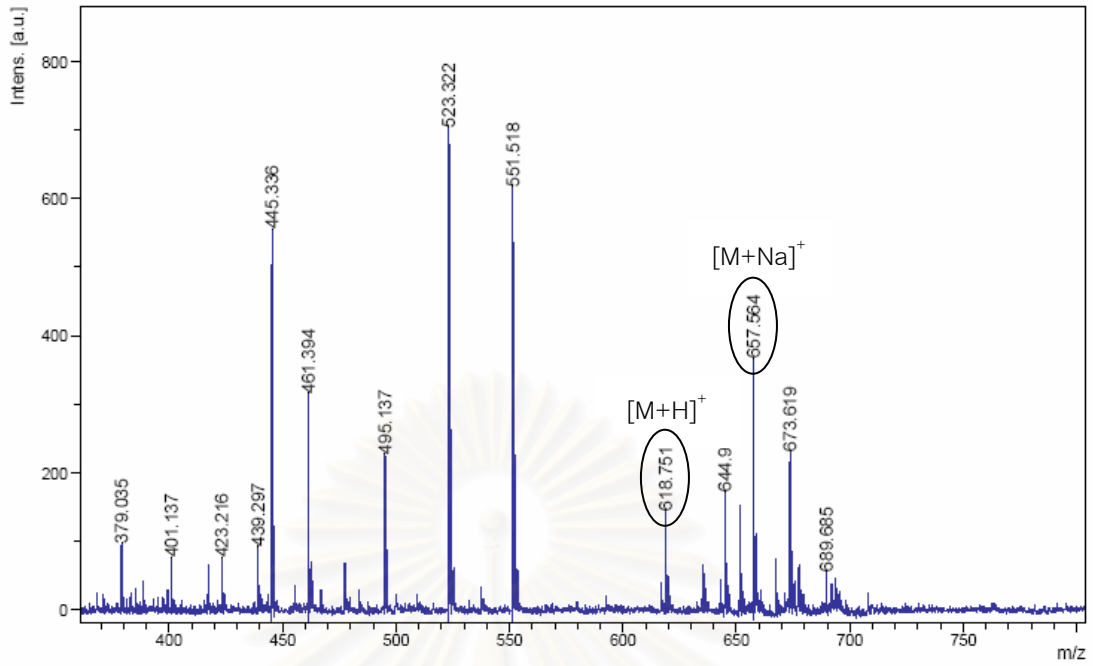
รูปที่ 17ก $^1\text{H-NMR}$ สเปกตรัมของอริซานอลผสม PG1



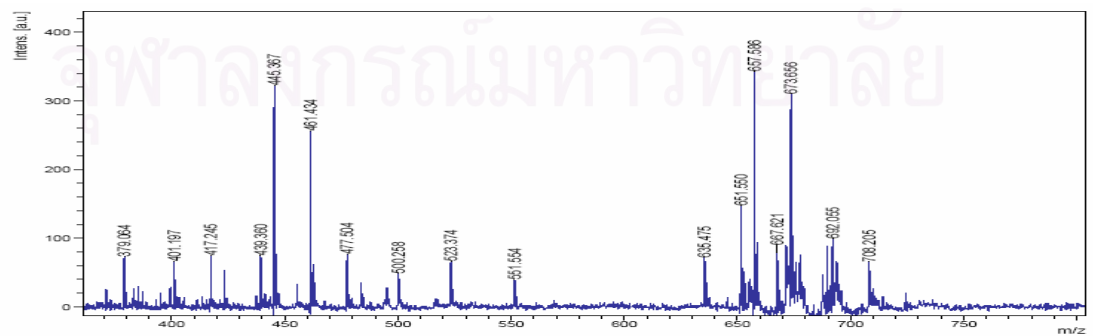
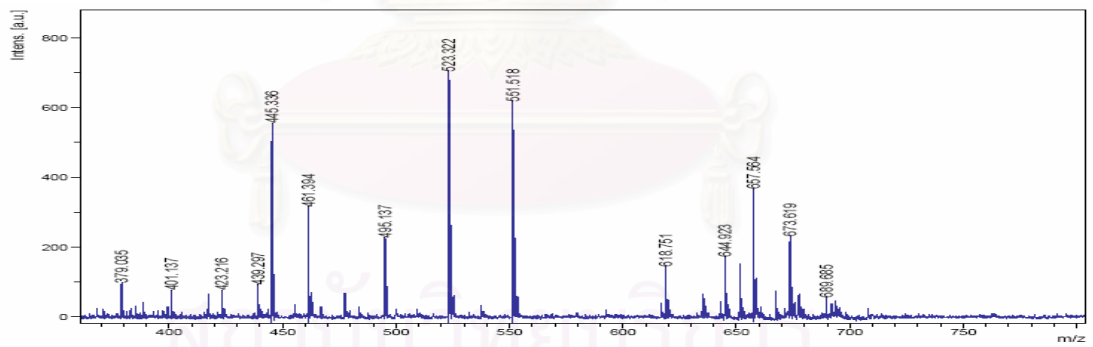
รูปที่ 18ก $^1\text{H-NMR}$ สเปกตรัมของอริชานอลผสม PG1 (บน) และอริชานอลมาตรฐาน (ล่าง)

ตารางที่ 2ก ตำแหน่ง proton ใน $^1\text{H-NMR}$ สเปกตรัมของ 24-methylenecycloartanyl ferulate cycloartenyl ferulate และ sitosteryl ferulate ใน CDCl_3 จาก ออร์ิซานอลผสม PG1 และงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

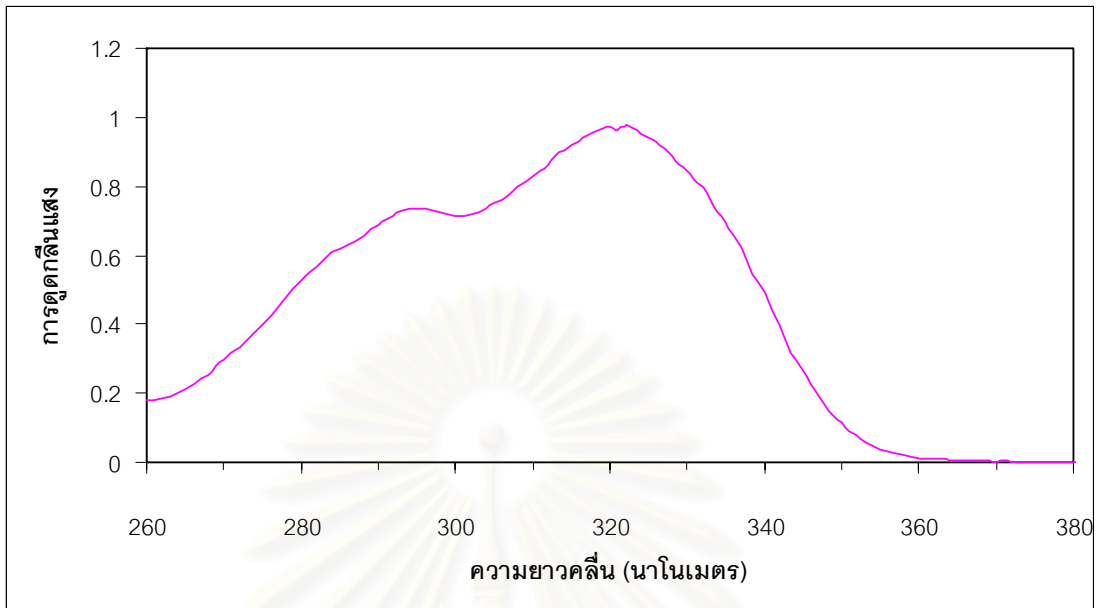
ตำแหน่ง proton	$^1\text{H-NMR}$ chemical shifts (δ/ppm , 400 MHz, CDCl_3)			
	ออร์ิซานอลผสม PG1	24-methylenecycloartanyl ferulate	cycloartenyl ferulate	sitosteryl ferulate
3	4.73	4.71	4.71	4.75
4	2.38			2.39
	2.40			2.41
6	5.41			5.41
18	0.97	0.98	0.97	0.69
19	0.40	0.37	0.37	
	0.60	0.60	0.60	
	1.04			1.05
21	0.89	0.90	0.89	0.89
24	0.84			0.85
	4.65	4.67		
	4.73	4.72		
	5.10		5.11	
25	2.21	2.24		
26	0.78			0.82
	1.02	1.03		
	1.68		1.69	
27	0.80			0.84
	1.04	1.04		
	1.61		1.61	
28	0.90	0.90	0.90	
29	0.95	0.98	0.98	
30	0.93	0.92	0.91	
2'	6.15	6.30	6.30	6.30
3'	7.59	7.60	7.60	7.60
5'	7.04	7.04	7.04	7.04
8'	6.88	6.92	6.92	6.92
9'	7.06	7.08	7.08	7.08
6'-OCH ₃	3.94	3.94	3.94	3.94
7'-OH	5.93	5.85	5.85	5.85



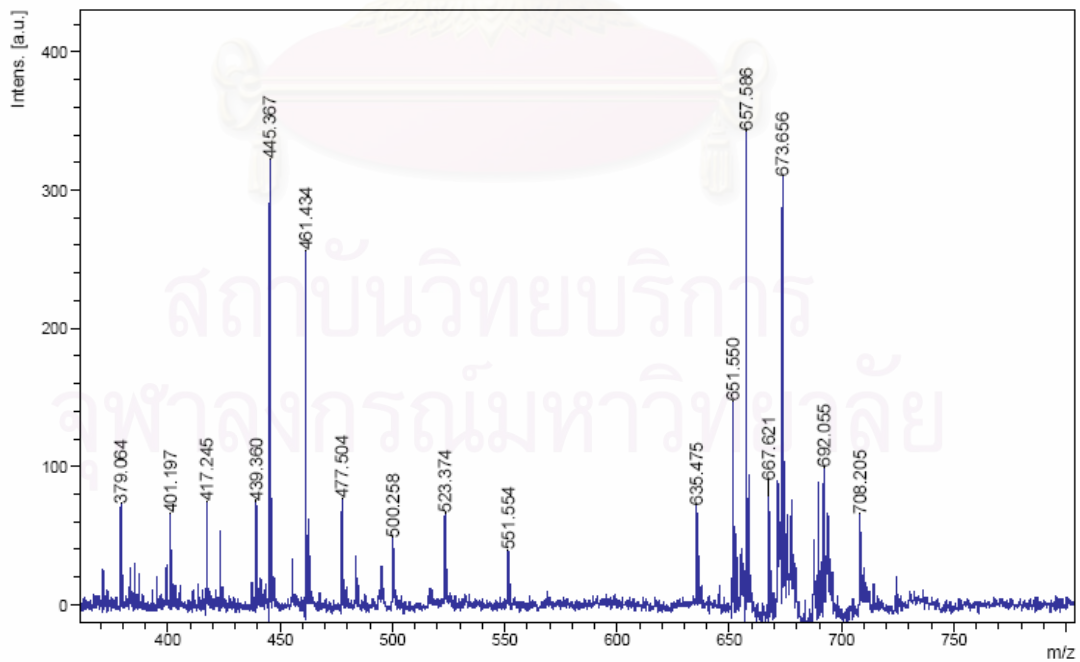
รูปที่ 19ก MS สเปกตรัมของออริซานอลผสม PG1



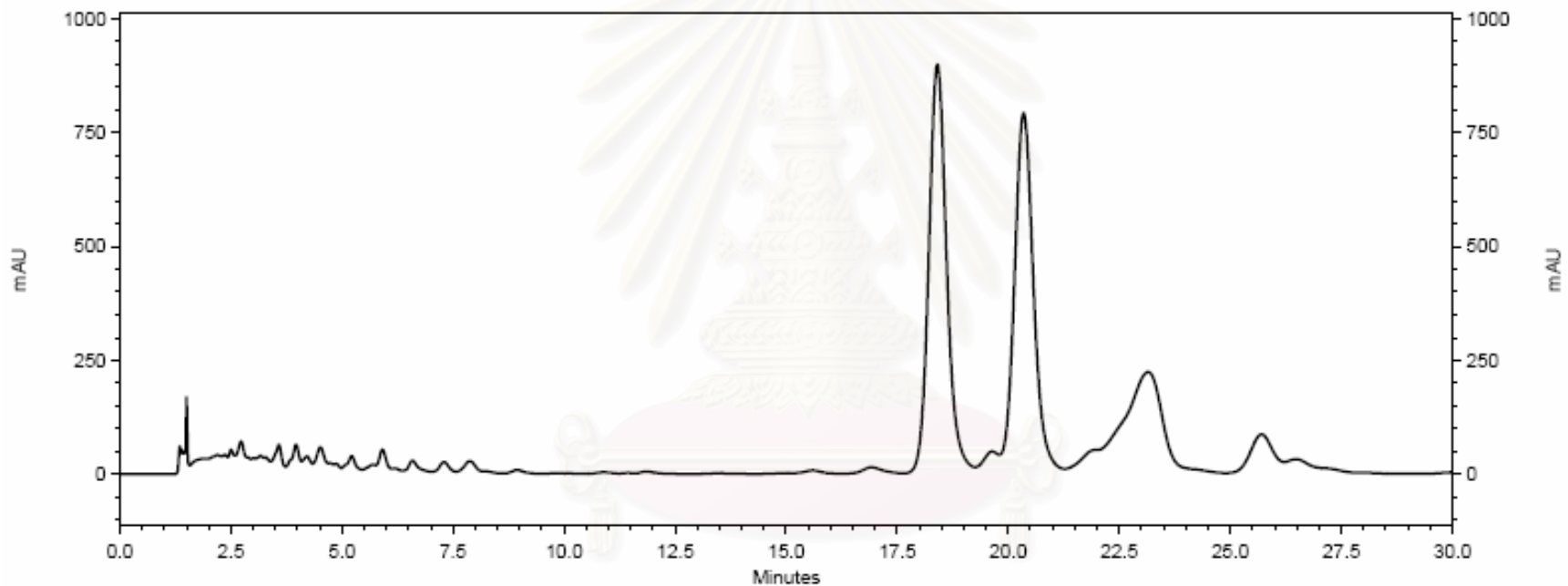
รูปที่ 20ก MS สเปกตรัมของออริซานอลผสม PG1 (บน) และออริซานอลมาตรฐาน (ล่าง)



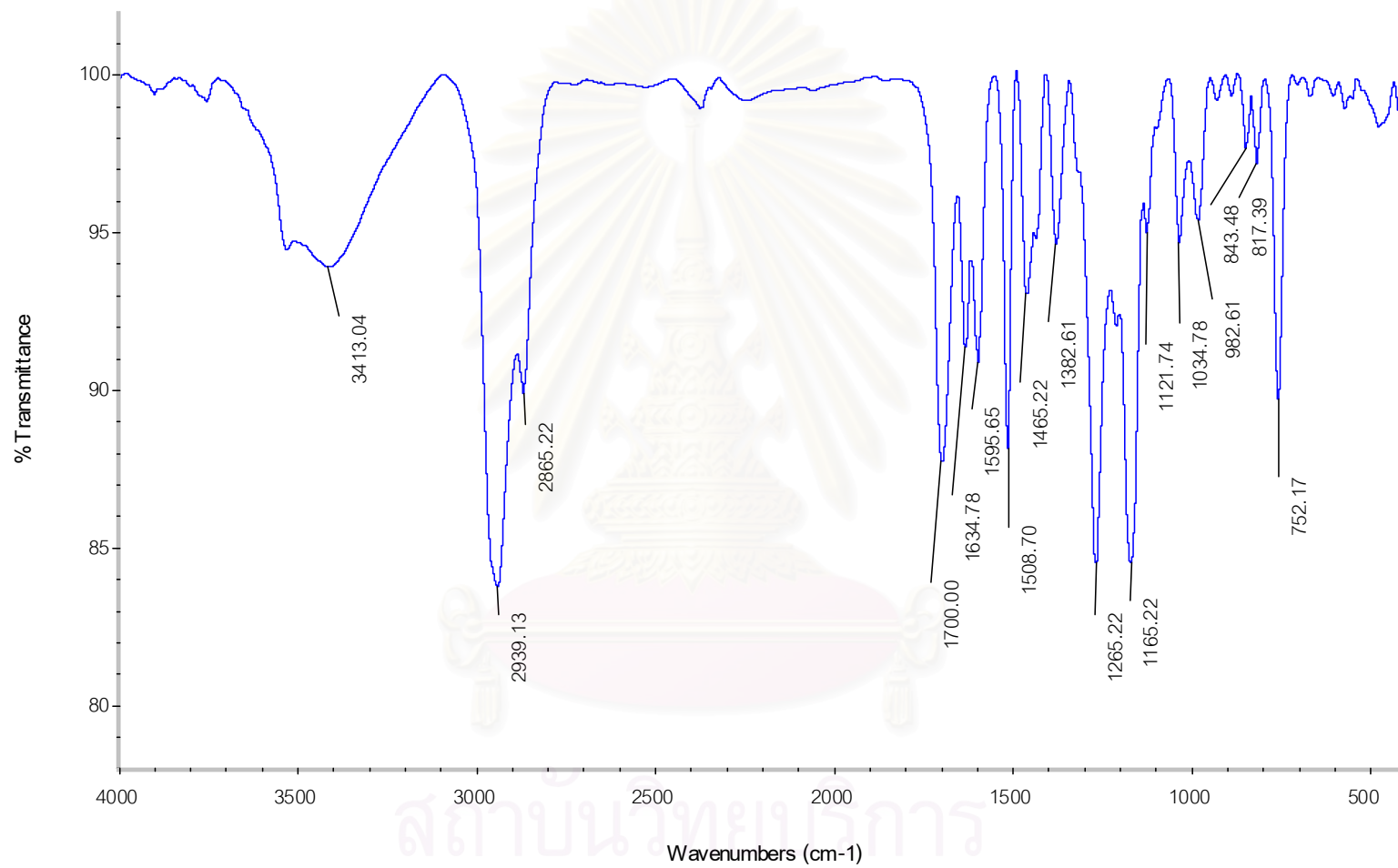
รูปที่ 21ก ยูวี โคโรมาโทแกรมของออริซานอลมาตรฐาน



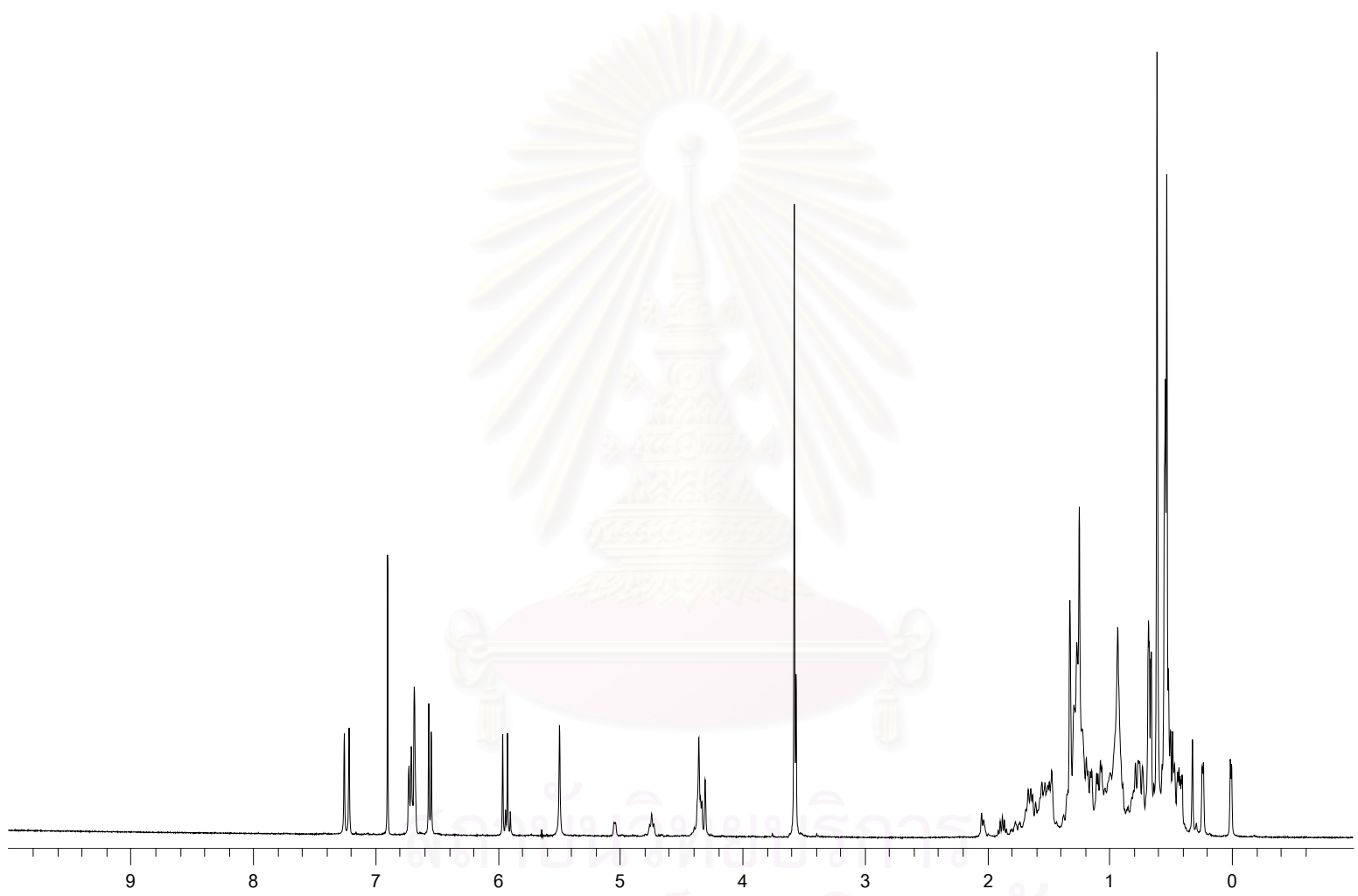
รูปที่ 22ก MS สเปกตรัมของออริซานอลมาตรฐาน



รูปที่ 23ก HPLC โครมาโทแกรมของออริซานอลมาตรฐาน (คอลัมน์, C₁₈; วัฏภาคเคลื่อนที่, เมธานอล:อะซิโตไนไตรล์ (40:60); อัตราการไหล 1 มล./นาที; ยูวี ดีเทคเตอร์, 330 นาโนเมตร)



รูปที่ 24ก IR สเปกตรัมของออริซานอลมาตรฐาน

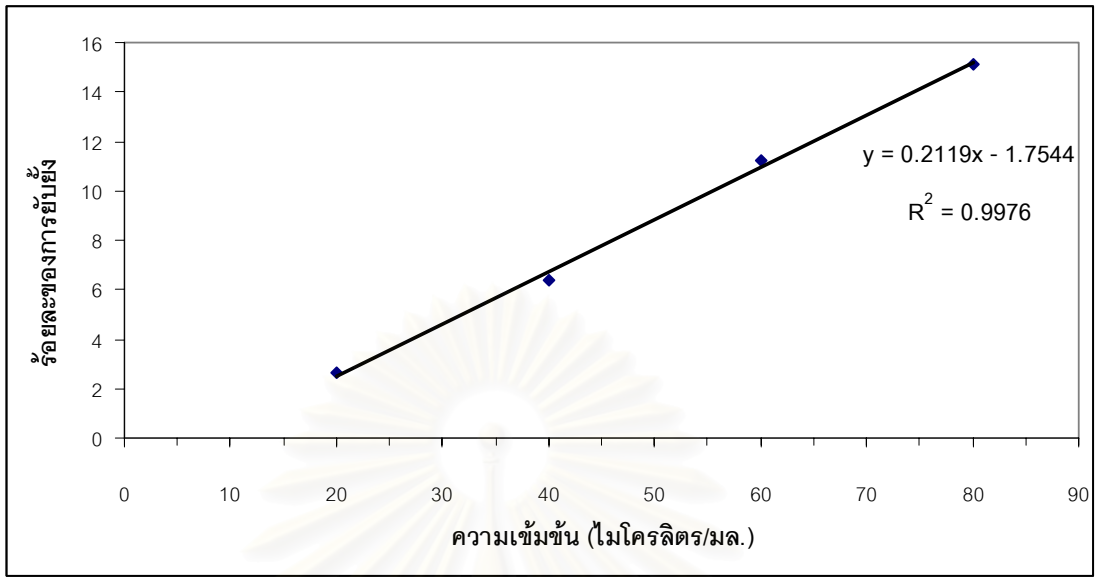


รูปที่ 25ก $^1\text{H-NMR}$ สเปกตรัมของออร์ซานอลมาตรฐาน

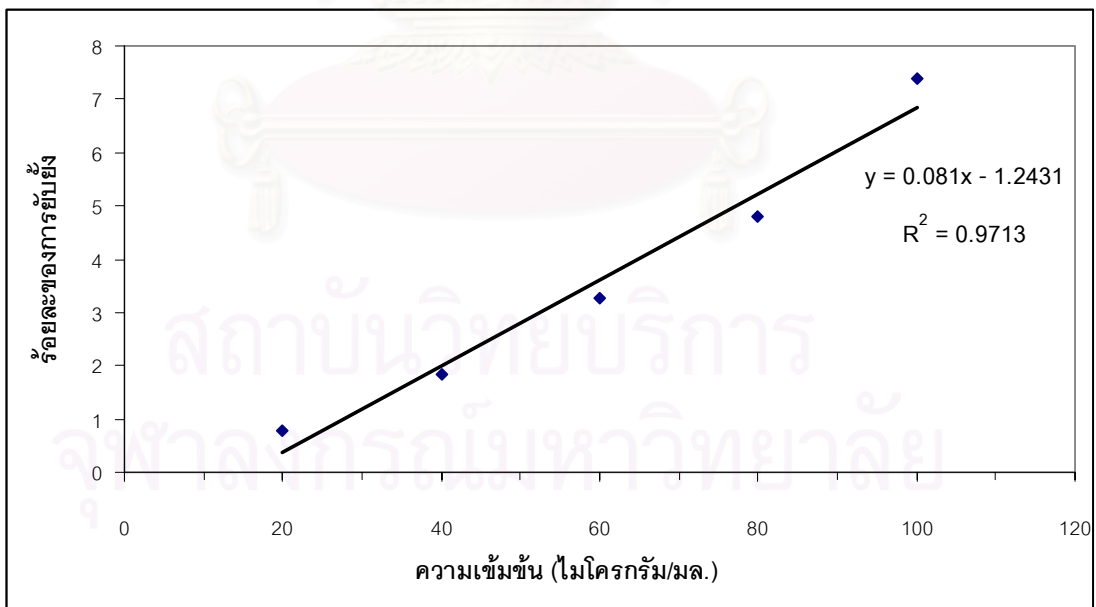


ภาคผนวก ข

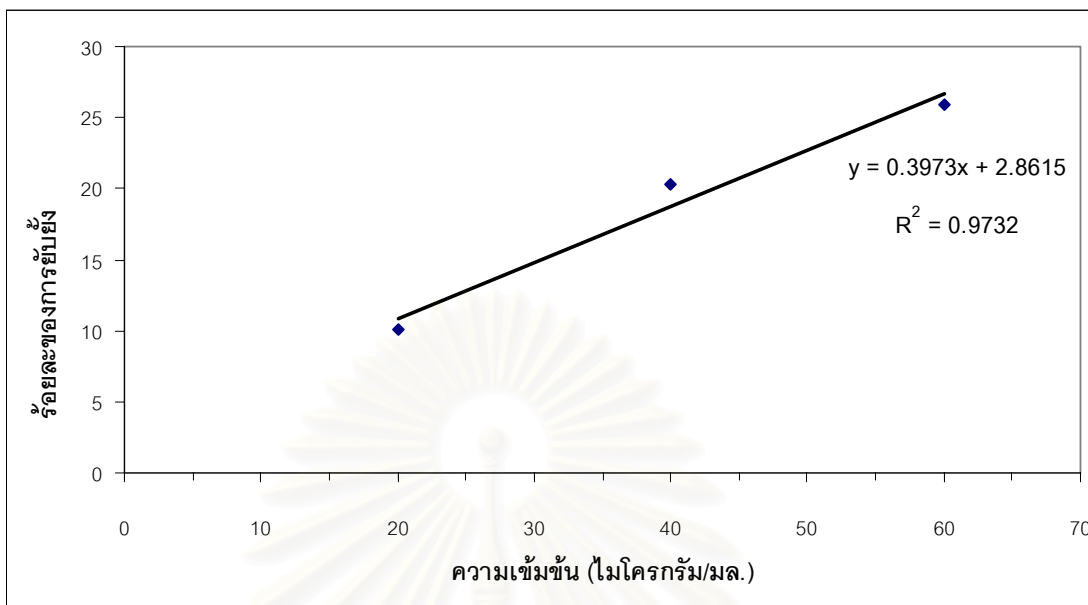
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



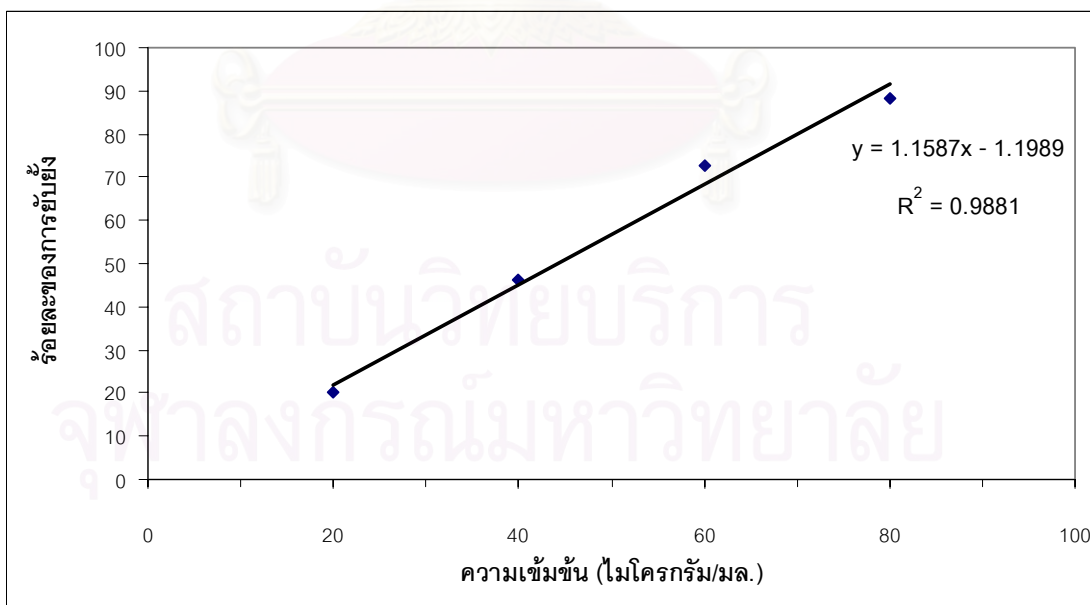
รูปที่ 1ข ฤทธิ์ในการต่อต้านออกซิเดชันของอริซานอลผสม TS1



รูปที่ 2ข ฤทธิ์ในการต่อต้านออกซิเดชันของอริซานอลผสม PG1



รูปที่ 3ข ฤทธิ์ในการต่อต้านออกซิเดชันของอริซานอลมาตรฐาน



รูปที่ 4ข ฤทธิ์ในการต่อต้านออกซิเดชันของแอลฟา-โทโคฟีรอล

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวรัชณี สมสวัสดิ์ เกิดเมื่อวันที่ 2 ตุลาคม พ.ศ.2524 ณ จังหวัดสุราษฎร์ธานี สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาตรี หลักสูตรวิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์ จังหวัดนครศรีธรรมราช เมื่อปี พ.ศ.2546 และเข้าศึกษาต่อระดับปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพมหานคร เมื่อปี พ.ศ.2547



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย