



การสกัดสารออกฤทธิ์ชีวภาพจากรำข้าวโดยการให้ความร้อนแบบไฮโดรเทอร์มอล
ร่วมกับการใช้คลื่นอัลตราซาวด์ในการป้องกันเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง SH-SY5Y
จากภาวะเครียดออกซิเดชัน

EXTRACTION OF RICE BRAN BIOACTIVE COMPOUNDS USING
HYDROTHERMAL TREATMENT WITH ULTRASONIC-ASSISTED EXTRACTION
TO PROTECT SH-SY5Y CELL LINE FROM OXIDATIVE STRESS

อัศวเกียรติี พวงแสง

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

การสกัดสารออกฤทธิ์ชีวภาพจากรำข้าวโดยการให้ความร้อนแบบไฮโดรเทอร์มอล
ร่วมกับการใช้คลื่นอัลตราซาวด์ในการป้องกันเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง SH-SY5Y
จากภาวะเครียดออกซิเดชัน



ปริญญานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
การศึกษามหาบัณฑิต สาขาวิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ
ปีการศึกษา 2562
ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

EXTRACTION OF RICE BRAN BIOACTIVE COMPOUNDS USING
HYDROTHERMAL TREATMENT WITH ULTRASONIC-ASSISTED EXTRACTION
TO PROTECT SH-SY5Y CELL LINE FROM OXIDATIVE STRESS



A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of MASTER OF EDUCATION
(Chemistry)

Faculty of Science, Srinakharinwirot University

2019

Copyright of Srinakharinwirot University

ปริญญานิพนธ์

เรื่อง

การสกัดสารออกฤทธิ์ชีวภาพจากรำข้าวโดยการให้ความร้อนแบบไฮโดรเทอร์มอล
ร่วมกับการใช้คลื่นอัลตราซาวด์ในการป้องกันเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง SH-SY5Y
จากภาวะเครียดออกซิเดชัน

ของ

อัครเกียรติ พวงแสง

ได้รับอนุมัติจากบัณฑิตวิทยาลัยให้นับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาการศึกษามหาบัณฑิต สาขาวิชาเคมี

ของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

(รองศาสตราจารย์ นายแพทย์ฉัตรชัย เอกปัญญาสกุล)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

คณะกรรมการสอบปากเปล่าปริญญานิพนธ์

..... ที่ปรึกษาหลัก
(อาจารย์ ดร.ศุภกาญจน์ รัตนกร)

..... ประธาน
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วิกิตต์ ศิริศักดิ์
สุนทร)

..... กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปิยะดา จิตรตั้ง
ประเสริฐ)

ชื่อเรื่อง	การสกัดสารออกฤทธิ์ชีวภาพจากรำข้าวโดยการให้ความร้อนแบบไฮโดรเทอร์มอล ร่วมกับการใช้คลื่นอัลตราซาวด์ในการป้องกันเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง SH-SY5Y จากภาวะเครียดออกซิเดชัน
ผู้วิจัย	อัศรเกียรติ พวงแสง
ปริญญา	การศึกษามหาบัณฑิต
ปีการศึกษา	2562
อาจารย์ที่ปรึกษา	อาจารย์ ดร. ศุภกาญจน์ รัตนกร

สารออกฤทธิ์ชีวภาพในรำข้าวมีคุณประโยชน์หลากหลาย เช่น เป็นสารต้านออกซิเดชัน ด้านการเกิดมะเร็ง และโดยเฉพาะอย่างยิ่งมีสารที่ป้องกันโรคความเสื่อมของระบบประสาท งานวิจัยนี้จึงสนใจเพิ่มมูลค่าให้รำข้าวด้วยการสกัดสารออกฤทธิ์ชีวภาพโดยใช้วิธีการให้ความร้อนแบบไฮโดรเทอร์มอลร่วมกับการใช้คลื่นอัลตราซาวด์ และเปรียบเทียบประสิทธิภาพของตัวทำละลายเอทานอลและเอทิลอะซิเตต จากนั้นสารสกัดจะถูกประเมินคุณสมบัติทางเคมี โดยการทดสอบ Folin-Ciocalteu ทดสอบการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH วิเคราะห์ปริมาณของแกมมาออริซานอล และทดสอบการต้านภาวะเครียดออกซิเดชันในเซลล์ประสาท SH-SY5Y จากการศึกษพบว่าสารสกัดที่ใช้เอทานอลเป็นตัวทำละลายในการสกัด โดยสกัดผ่านการใช้ความร้อนแบบไฮโดรเทอร์มอลร่วมกับการใช้คลื่นอัลตราซาวด์ มีปริมาณของสารประกอบฟีนอลิกสูงที่สุด 3.21 mg GAE/g มีค่า EC_{50} ต่ำสุดอยู่ที่ 0.53 mg/mL มีปริมาณของแกมมาออริซานอลสูงที่สุด 12.98 mg/g และมีค่าร้อยละการรอดชีวิตของเซลล์ประสาทอยู่ที่ 79.13% ดังนั้นจึงสามารถสรุปได้ว่าการให้ความร้อนแบบไฮโดรเทอร์มอลร่วมกับการใช้คลื่นอัลตราซาวด์เป็นวิธีการสกัดที่มีประสิทธิภาพในการสกัดสารออกฤทธิ์ชีวภาพ ซึ่งสารออกฤทธิ์ชีวภาพมีประสิทธิภาพในการต้านภาวะเครียดออกซิเดชันในเซลล์ประสาท SH-SY5Y

คำสำคัญ : รำข้าว, สารออกฤทธิ์ชีวภาพ, ไฮโดรเทอร์มอล, อัลตราซาวด์, เซลล์ประสาท, เครียดออกซิเดชัน

Title	EXTRACTION OF RICE BRAN BIOACTIVE COMPOUNDS USING HYDROTHERMAL TREATMENT WITH ULTRASONIC-ASSISTED EXTRACTION TO PROTECT SH-SY5Y CELL LINE FROM OXIDATIVE STRESS
Author	AKHARAGAIT PHAUNGSEANG
Degree	MASTER OF EDUCATION
Academic Year	2019
Thesis Advisor	Dr. Supakan Ratanakon

Rice bran bioactive compounds have nutritional-rich value, such as antioxidant properties, anti-carcinogenic properties and in particular, to protect against neurodegenerative diseases. Therefore, this study aims to increase the added value of rice bran using hydrothermal treatment with ultrasonic-assisted extraction. Moreover, the efficiency of the extraction using two different organic solvents was studied. Subsequently, the chemical properties of extracts were evaluated by Folin-Ciocaltue assay, DPPH radical scavenging activities, gamma-oryzanol quantitative analysis and %viability of the SH-SY5Y cell line was also determined by MTT assay. The results showed that ultrasonic-assisted extraction using hydrothermal treatment with and ethanol as a solvent had the highest concentration of bioactive compounds. The phenolic content was 3.21 mg GAE/g. The efficiency to inhibit DPPH radical EC_{50} was 0.53 mg/mL, gamma-oryzanol content was 12.98 mg/g of extract and % viability of SH-SY5Y cell line was 79.13%. Thus, the extraction method using ultrasonic-assisted hydrothermal treatment is one of the most effective techniques for extracting rice bran bioactive compounds. The extracts also provided the ability to reduce oxidative stress in the SH-SY5Y cell line.

Keyword : Rice Bran, Bioactive Compounds, Hydrothermal Treatment, Ultrasoni-assisted Extraction, SH-SY5Y Cell Line, Oxidative Stress

กิตติกรรมประกาศ

ปริญญานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดีไม่ได้เลย ถ้าขาดอาจารย์ ดร.ศุภกาญจน์รัตน์กร อาจารย์ที่ปรึกษาปริญญานิพนธ์ผู้ให้คำปรึกษา ข้อเสนอแนะต่าง ๆ แนวคิดแนวทางการดำเนินการวิจัย แก่ไขตรวจทานปริญญานิพนธ์และความช่วยเหลือที่เป็นประโยชน์ตลอดการทำวิจัยในครั้งนี้

ขอขอบพระคุณกรรมการผู้ให้เกียรติมาเป็นกรรมการในการสอบปากเปล่าปริญญานิพนธ์ ได้แก่ ผศ.ดร.ปิยรัตน์ ตรีบัณฑิต ผศ.ดร.ปิยะดา จิตรตั้งประเสริฐ ผศ.ดร.สุเชาว์ ดอนพุดชา และดร.ชัชฎาภรณ์ พิณทอง ที่แนะนำแนวทางที่เป็นประโยชน์อย่างมากในการทำให้ปริญญานิพนธ์

ขอขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์กิตติ ศิริศักดิ์สุนทร อาจารย์ประจำวิชาเคมีอินทรีย์ แห่งภาควิชาเคมี มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ที่ให้ความกรุณาเป็นกรรมการสอบปากเปล่าปริญญานิพนธ์ และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปิยะดา จิตรตั้งประเสริฐ ที่ให้ความกรุณาเป็นกรรมการสอบปากเปล่าปริญญานิพนธ์ ตลอดจนให้คำแนะนำต่าง ๆ เพื่อให้ปริญญานิพนธ์ฉบับนี้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบคุณคณาจารย์ และฝ่ายสนับสนุน ภาควิชาเคมี แห่งมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒทุกท่านที่ทำให้การทำวิจัยราบรื่น นอกจากนี้ที่ลืมไม่ได้เลยก็คือห้องวิจัย คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ และสถาบันวิจัยจุฬาภรณ์ที่ช่วยเหลือที่ช่วยเหลือด้านการทดลองและอุปกรณ์การวิจัย

ขอขอบคุณสถาบัน สสวท.ที่สนับสนุนทุนการศึกษา และสำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติสำหรับเงินทุนสนับสนุนนักวิจัย ใหม่ วท.ประจำปี 2560 (FDA-CO-2561-6440-TH) เป็นอย่างสูง

และท้ายที่สุดขอขอบพระคุณ นายศรีศักดิ์ พวงแสง นางเกศินี พวงแสง บุพการีที่สนับสนุนผู้วิจัยในทุกๆด้าน ทั้งทุนทรัพย์ และกำลังใจในตลอดชีวิตของผู้วิจัย รวมถึงกัลยาณมิตรทุกคนที่คอยให้กำลังใจตลอดมา

อัศรเกียรติ พวงแสง

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ	ช
สารบัญตาราง.....	ณ
สารบัญรูปภาพ	ญ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
ภูมิหลัง	1
ความมุ่งหมายของงานวิจัย.....	3
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	4
ขอบเขตของการวิจัย	4
บทที่ 2 ทบทวนวรรณกรรม.....	5
ข้าว กข 105	6
สารออกฤทธิ์ชีวภาพ.....	9
วิธีการสกัดสารออกฤทธิ์ชีวภาพจากรำข้าว	14
การวิเคราะห์สารออกฤทธิ์ชีวภาพในรำข้าว	20
การทดสอบการต้านภาวะเครียดออกซิเดชันในเซลล์ประสาท	24
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย.....	27
อุปกรณ์การทดลอง	27
สารเคมี.....	27
วิธีการทดลอง	28

การสกัดสารออกฤทธิ์ชีวภาพจากรำข้าวด้วยการให้ความร้อนแบบ hydrothermal ร่วมกับการใช้คลื่น ultrasound	28
การวิเคราะห์สารออกฤทธิ์ชีวภาพในรำข้าวด้วยวิธีการทดสอบ Folin-Ciocalteu และการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH	30
การวิเคราะห์ปริมาณ γ -oryzanol ด้วยเทคนิค HPLC	31
การทดสอบการออกฤทธิ์ของน้ำมันรำข้าวต่อการต้านภาวะเครียดออกซิเดชันของเซลล์ประสาทด้วยวิธีการ MTT assay	32
บทที่ 4 ผลการศึกษา	35
การสกัดสารออกฤทธิ์ชีวภาพจากรำข้าวด้วยการให้ความร้อนแบบ hydrothermal ร่วมกับการใช้คลื่น ultrasound ในตัวทำละลายที่ต่างกัน	35
การทดสอบการออกฤทธิ์ของสารสกัดจากรำข้าวต่อการต้านภาวะเครียดออกซิเดชันของเซลล์ประสาทด้วยวิธีการ MTT assay.....	43
บทที่ 5 สรุป อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ.....	47
สรุปผลการวิจัย.....	47
อภิปรายผลการวิจัย	48
ข้อเสนอแนะ	50
บรรณานุกรม	51
ประวัติผู้เขียน.....	61

สารบัญตาราง

หน้า

ตาราง 1 องค์ประกอบทางเคมีของรำข้าว.....	8
ตาราง 2 ปริมาณ phenolic acid ในรำข้าวโดยใช้การทดสอบ Folin-Ciocalteu.....	10
ตาราง 3 ชนิดของ phenolic acid และปริมาณของ phenolic acid	11
ตาราง 4 ปริมาณ γ -oryzanol จากการตรวจสอบด้วยเทคนิค HPLC (Imsanguan et al., 2008).....	14
ตาราง 5 การให้ความร้อนแบบ hydrothermal	18
ตาราง 6 ประเภทของตัวทำละลายในการสกัดสารออกฤทธิ์ชีวภาพ.....	19
ตาราง 7 การใช้ HPLC ในการตรวจสอบสารออกฤทธิ์ชีวภาพในรำข้าว	23
ตาราง 8 ปริมาณของ phenolic acid (mgGAE/g)) จากวิธีการสกัดโดยการให้ความร้อน และการใช้ตัวทำละลายที่แตกต่างกัน.....	36
ตาราง 9 ค่า EC_{50} ของสารสกัดจากรำข้าวที่ผ่านการสกัดโดยตัวทำละลาย ethanol และ ethylacetate โดยวิธีการให้ความร้อนที่ต่างกัน.....	38
ตาราง 10 ปริมาณของ (1) ไสโคลาทีนิลเฟอรูเลท (2) 24-เมทิลไนไสโคลาทีนิลเฟอรูเลท (3) แคมฟิสเตอริลเฟอรูเลท (4) β -ไฮโดรสเตอริลเฟอรูเลท และปริมาณของ γ -oryzanol (mg/g) ในสารสกัดจากรำข้าวที่สกัดโดยการให้ความร้อน และการใช้ตัวทำละลายที่ต่างกัน.....	40
ตาราง 11 ร้อยละการรอดชีวิตของเซลล์ประสาท SH-SY5Y จากการเลี้ยงเซลล์ด้วย H_2O_2 และสารสกัดจากรำข้าวที่มีความเข้มข้น 2, 20 และ 200 μ g/mL ที่ผ่านการสกัดด้วยตัวทำละลาย ethanol และ ethylacetate โดยใช้วิธีการสกัดแบบให้ความร้อนแบบควบคุม และ hydrothermal ร่วมกับ ultrasound.....	44

สารบัญรูปภาพ

หน้า

ภาพประกอบ 1 แสดงส่วนประกอบต้นข้าว(ก) และส่วนประกอบของเมล็ดข้าว(ข)	6
ภาพประกอบ 2 โครงสร้างเมล็ดข้าว และรำข้าว	7
ภาพประกอบ 3 ปริมาณของสารต้านออกซิเดชันที่ละลายในไขมัน	9
ภาพประกอบ 4 ตัวอย่าง phenolic acid	10
ภาพประกอบ 5 โครงสร้าง γ -oryzanol	12
ภาพประกอบ 6 chromatogram ของ γ -oryzanol ที่ประกอบไปด้วยสาร 4 ชนิดได้แก่ (1)ไซโคล อาทีนิลเฟอรูเลท, (2)24-เมทิลีนไซโคลอาทีนิลเฟอรูเลท, (3)แคมฟีสเตอริลเฟอรูเลท และ (4) β -ไซ โตสเตอริลเฟอรูเลท	13
ภาพประกอบ 7 กลไกการเปลี่ยนสีของสารผสม Folin-Ciocalteu	20
ภาพประกอบ 8 โครงสร้างและการเปลี่ยนสีของอนุมูลอิสระ DPPH	22
ภาพประกอบ 9 โครงสร้างของเอ็มทีทีและฟอร์มาซาน	26
ภาพประกอบ 10 chromatogram ของสารมาตรฐาน γ -oryzanol	39
ภาพประกอบ 11 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างพื้นที่พีคและความเข้มข้น γ -oryzanol	39
ภาพประกอบ 12 (ก)ปริมาณของ phenolic acid (mg GAE/g) และ (ข)ปริมาณของ γ -oryzanol (mg/g) ในสารสกัดจากรำข้าวที่สกัดโดยการให้ความร้อน และการใช้ตัวทำละลายที่ต่างกัน	42
ภาพประกอบ 13 ร้อยละการรอดชีวิตของเซลล์ประสาท SH-SY5Y จากการเลี้ยงเซลล์ด้วย H_2O_2 และสารสกัดที่ใช้วิธีการสกัดโดยให้ความร้อนแบบควบคุม และไฮโครเทอร์มอลร่วมกับ ultrasound โดยที่สารสกัดมีความเข้มข้น 2, 20 และ 200 μ g/mL	45
ภาพประกอบ 14 ร้อยละการรอดชีวิตของเซลล์ประสาท SH-SY5Y จากการเลี้ยงเซลล์ด้วยสาร สกัดจากรำข้าวที่ผ่านการสกัดด้วยตัวทำละลายEthanolและ ethylacetate โดยใช้วิธีการสกัด แบบให้ความร้อนแบบควบคุม และ hydrothermal ร่วมกับ ultrasound ที่มีความเข้มข้น 2,20 และ 200 μ g/mL	46



บทที่ 1

บทนำ

ภูมิหลัง

รำข้าวเป็นผลพลอยได้จากการขัดสีที่มักนำไปผลิตเป็นอาหารสัตว์และนำไปผลิตเป็นน้ำมันบริโภค ในรำข้าวประกอบไปด้วยสารอาหารที่มีคุณประโยชน์ต่อร่างกาย ได้แก่ ไขมัน 12% โปรตีน 11% คาร์โบไฮเดรต 45% และ ไฟเบอร์ 14% นอกจากนี้ในรำข้าวยังพบสารออกฤทธิ์ชีวภาพ (bioactive compound) ได้แก่ phenolic acid และ γ -oryzanol ในปริมาณมากกว่าพืชผักผลไม้ ถั่ว และผลไม้แห้งชนิดอื่นๆ (Wu et al., 2004) ดังนั้นการสกัดสารออกฤทธิ์ชีวภาพจากรำข้าวเพื่อนำไปใช้ประโยชน์เป็นอาหารเสริมหรือทางด้านการแพทย์จึงเป็นการช่วยเพิ่มมูลค่าแก่รำข้าว

สารออกฤทธิ์ชีวภาพที่กล่าวข้างต้นเป็นสารเมตาบอไลต์ทุติยภูมิ (secondary metabolites) ที่พืชสร้างขึ้นมาเพื่อใช้ในการเจริญเติบโต ปกป้องเนื้อเยื่อพืชจากรังสีอัลตราไวโอเลต ป้องกันแมลงศัตรูพืช (Galanakis, 2017) ซึ่งจากการศึกษาพบว่าสารออกฤทธิ์ชีวภาพที่สกัดจากรำข้าว ได้แก่ phenolic acid และ γ -oryzanol มีส่วนช่วยในการ ลดความเสี่ยงต่อการเป็นโรคหัวใจ ด้านการอักเสบ ด้านโรคมะเร็ง ด้านโรคความดันโลหิต และช่วยป้องกันโรคสมองเสื่อมและโรคอัลไซเมอร์ เป็นต้น (Ausman, Rong, & Nicolosi, 2005; Berger et al., 2005; Ismail et al., 2014; นิภาพร ชนะคช, 2560; ปภาวดี คล่องพิทยาพงษ์, รุ่งตะวัน สถาปณผล, วรอนงค์ พุกษากิจ, & พรพรรณวี ชัยวิชาติ, 2011) และนอกจากนี้ยังมีการศึกษาเกี่ยวกับการใช้สารสกัดจากรำข้าวในการทดลองกับเซลล์ประสาท SH-SY5Y ซึ่งได้จากการผ่าตัดเนื้อเยื่อบริเวณไขกระดูกที่ได้รับการยอมรับว่ามีคุณลักษณะที่คล้ายคลึงกับเซลล์ประสาทของมนุษย์และได้รับการยอมรับในการใช้เป็นแบบจำลองในการทดสอบกับเซลล์ประสาทของมนุษย์ (Frota Junior et al., 2011) โดยในงานวิจัยได้มีการใช้สารสกัดจากรำข้าวที่เรียกว่า oryzanol-rich fraction ในการทดลองกับเซลล์ประสาท SH-SY5Y พบว่าสามารถเพิ่มการแสดงออกของยีนที่ใช้ต้านอนุมูลอิสระ และลดการแสดงออกของยีนที่เหนี่ยวนำให้เซลล์เกิดการตายแบบอะพอพโตซิส ซึ่งการเปลี่ยนแปลงของยีนกลุ่มชนิดนี้ช่วยเพิ่มอัตราการรอดชีวิตให้กับเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง SH-SY5Y ที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดการตายด้วย

H₂O₂ (Ismail et al., 2014) รวมถึงมีการศึกษาที่ได้ใช้สารสกัดจากรำข้าวที่มีสารรงควัตถุสูง เช่น ข้าวหอมนิล ซึ่งมีสารจำพวก anthocyanin, flavonoid, phenolic acid และ γ -oryzanol โดยสารดังกล่าวเป็นสารที่มีฤทธิ์สูงในการยับยั้งอนุมูลอิสระจำพวกอนุพันธ์ของออกซิเจนที่ว่องไว (Reactive Oxygen Species; ROS) ทำให้สามารถลดการตายของเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง SH-SY5Y (Vargas et al., 2018) ดังนั้นจะเห็นได้ว่าสารออกฤทธิ์ชีวภาพในรำข้าว มีคุณสมบัติทาง การแพทย์ในการป้องกันโรคความเสื่อมถอยของเซลล์ประสาท

โดยทั่วไปกระบวนการสกัดเพื่อให้ได้มาซึ่งสารออกฤทธิ์ชีวภาพในรำข้าวมีด้วยกันหลายวิธี เช่น การสกัดโดยใช้ตัวทำละลาย (conventional solvent extraction) การสกัดแบบซอกเลท (soxhlet extraction) และการสกัดโดยใช้ของไหลยิ่งยวด (supercritical fluid extraction) เป็นต้น (Dunford & King, 2000; Imsanguan et al., 2008; Wongwaiwech, Weerawatanakorn, Tharatha, & Ho, 2019) ซึ่งวิธีที่ใช้ในการสกัดสารออกฤทธิ์ชีวภาพจากรำข้าวอย่างแพร่หลายคือ การใช้ตัวทำละลาย เนื่องจากเป็นวิธีการที่ง่าย ไม่ยุ่งยาก แต่ข้อจำกัดของวิธีดังกล่าวคือร้อยละ ผลได้ของการสกัดน้อย นอกจากนี้การใช้การสกัดด้วยตัวทำละลาย พบว่าปริมาณของสารออกฤทธิ์ชีวภาพที่สกัดออกมาขึ้นอยู่กับชนิดของตัวทำละลาย โดยในการศึกษาเกี่ยวกับการใช้ตัวทำละลายต่างชนิดกันในการสกัดสารออกฤทธิ์ชีวภาพพบว่า phenolic acid สามารถสกัดออกมาได้ดี ด้วยการใช้ตัวทำละลายขั้วสูง เช่น methanol เป็นต้น ส่วน γ -oryzanol สามารถสกัดออกมาได้ดี ในตัวทำละลายขั้วต่ำ เช่น Hexane และ D-limonene เป็นต้น (Peanparkdee, Yamauchi, & Iwamoto, 2018) ดังนั้นจึงมีการศึกษาเกี่ยวกับการใช้ความร้อนในการช่วยสกัด (thermal treatment) เพื่อช่วยลดข้อจำกัดที่ได้กล่าวมาข้างต้น โดยการให้ความร้อนแก่รำข้าว เช่น การอบด้วยลมร้อน การนึ่ง การอบด้วยหม้อนึ่งแรงดัน การให้ความร้อนแบบไอมมิ่ง และการให้ความร้อนด้วยคลื่นไมโครเวฟ พบว่าสามารถเพิ่มร้อยละผลได้จากการสกัด และเพิ่มปริมาณของสารออกฤทธิ์ชีวภาพ (Min, McClung, & Chen, 2014; Nair et al., 2014; Özkaya, Turksoy, Özkaya, & Duman, 2017; Ruen-ngam, Thawai, & Sukonthamut, 2016; Tabaraki & Nateghi, 2011) นอกจากนี้การให้ความร้อนแบบ hydrothermal ด้วยการใช้หม้อนึ่งความดัน (autoclave) เป็นการใช้น้ำร้อนอุณหภูมิสูงเป็นตัวพาสารออกฤทธิ์ชีวภาพออกรำข้าว และน้ำที่มีความดันสูงยัง

ช่วยทำให้เซลล์ของรำข้าวแตกออกก่อนนำไปสกัดด้วยตัวทำละลายผสมระหว่าง Acetone:Water:Acetic acid ในอัตราส่วน 70:29.5:0.5 พบว่าปริมาณของสารต้านออกซิเดชันชนิดละลายได้ในไขมันมีปริมาณมากกว่าการสกัดด้วยการตัวทำละลายแบบดั้งเดิม (Min et al., 2014) และยังมีรายงานว่าการใช้คลื่น ultrasound ร่วมกับการสกัดด้วยตัวทำละลายแบบดั้งเดิมสามารถเพิ่มปริมาณของสารออกฤทธิ์ชีวภาพจากรำข้าวเมื่อเทียบกับการสกัดด้วยการใช้ตัวทำละลายเพียงอย่างเดียว (Tabaraki & Nateghi, 2011)

จากการศึกษาข้างต้นจึงเป็นเหตุผลให้ผู้วิจัยสนใจทำการพัฒนาการสกัดสารออกฤทธิ์ชีวภาพจากรำข้าวโดยใช้หม้อแรงดันในการให้ความร้อนแก่รำข้าวแบบ hydrothermal ร่วมกับการใช้คลื่น ultrasound ก่อนการนำไปสกัดด้วย ethanol และ ethylacetate เพื่อศึกษาการเพิ่มปริมาณของสารออกฤทธิ์ชีวภาพ โดยทำการวิเคราะห์เชิงปริมาณของสารต้านออกซิเดชันในกลุ่ม phenolic acid ด้วยการทดสอบ Folin-Ciocalteu เปรียบเทียบฤทธิ์การยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH และศึกษาฤทธิ์การยับยั้งการตายของเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง SH-SY5Y โดยวิธีการทดสอบเอ็มทีที (MTT assay) จากสารออกฤทธิ์ชีวภาพที่สกัดจากรำข้าวพันธุ์ กข 105 เนื่องจากเป็นข้าวที่คนไทยนิยมบริโภคและส่งออก ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงเป็นการนำรำข้าวมาเพิ่มมูลค่าทางเศรษฐกิจ รวมถึงได้สารสกัดที่สามารถนำไปใช้ประโยชน์ทางด้านการแพทย์ และเป็นอาหารเสริมที่มีฤทธิ์ในการต้านออกซิเดชันและสามารถป้องกันโรคความเสื่อมถอยของระบบประสาท

ความมุ่งหมายของงานวิจัย

1. เพื่อพัฒนารวมวิธีสกัดสารออกฤทธิ์ชีวภาพจากรำข้าวด้วยการให้ความร้อนแบบ hydrothermal ร่วมกับการใช้คลื่น ultrasound ในตัวทำละลายที่ต่างกัน
2. เพื่อเปรียบเทียบผลจากการใช้สารสกัดจากรำข้าวที่สกัดด้วยการให้ความร้อนและตัวทำละลายที่แตกต่างกันในการต้านภาวะเครียดออกซิเดชันในเซลล์ประสาท SH-SY5Y

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. เทคนิคการสกัดที่สามารถเพิ่มปริมาณของสารออกฤทธิ์ชีวภาพ
2. สารออกฤทธิ์ชีวภาพที่สกัดจากรำข้าวมีส่วนช่วยในการป้องกันโรคความเสื่อมถอยของระบบประสาท

ขอบเขตของการวิจัย

งานวิจัยนี้ศึกษาวิธีสกัดทางเคมี วิเคราะห์เชิงปริมาณของสารออกฤทธิ์ชีวภาพในสารสกัดจากรำข้าว และศึกษาฤทธิ์การต้านภาวะเครียดออกซิเดชันในเซลล์ประสาท SH-SY5Y โดยมีขอบเขตการศึกษาดังนี้

1. การสกัดสารออกฤทธิ์ชีวภาพจากรำข้าวด้วยการให้ความร้อนแบบ hydrothermal ร่วมกับการใช้คลื่น ultrasound

ตัวแปรต้น: วิธีการสกัดสารออกฤทธิ์ชีวภาพจากรำข้าว และการใช้ชนิดของตัวทำละลายที่ต่างกัน

ตัวแปรตาม: ได้แก่ ปริมาณ phenolic acid, ฤทธิ์การยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH และปริมาณ γ -oryzanol

2. การต้านภาวะเครียดออกซิเดชันในเซลล์ประสาท SH-SY5Y

ตัวแปรต้น: รูปแบบการให้ความร้อนในการสกัดสารออกฤทธิ์ชีวภาพ ตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัด และความเข้มข้นของสารออกฤทธิ์ชีวภาพที่สกัดจากรำข้าว

ตัวแปรตาม: ร้อยละการรอดชีวิตของเซลล์ประสาท SH-SY5Y

บทที่ 2

บททวนวรรณกรรม

ในการศึกษาการสกัดสารออกฤทธิ์ชีวภาพจากรำข้าวด้วยการให้ความร้อนแบบ hydrothermal ร่วมกับการใช้คลื่น ultrasound ในการป้องกันภาวะเครียดออกซิเดชันในเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง SH-SY5Y ผู้วิจัยได้ศึกษาเอกสารดังนี้

ข้าว กข 105

- ส่วนประกอบของข้าว
- รำข้าว
- องค์ประกอบทางเคมีของรำข้าว

สารออกฤทธิ์ชีวภาพในรำข้าว

- Phenolic acid
- γ -oryzanol

การสกัดสารออกฤทธิ์ชีวภาพในรำข้าว

- การสกัดด้วยวิธีดั้งเดิม
- การสกัดโดยการให้ความร้อน
- ตัวทำละลายในการสกัดสารออกฤทธิ์ชีวภาพในรำข้าว

การวิเคราะห์สารออกฤทธิ์ชีวภาพในรำข้าว

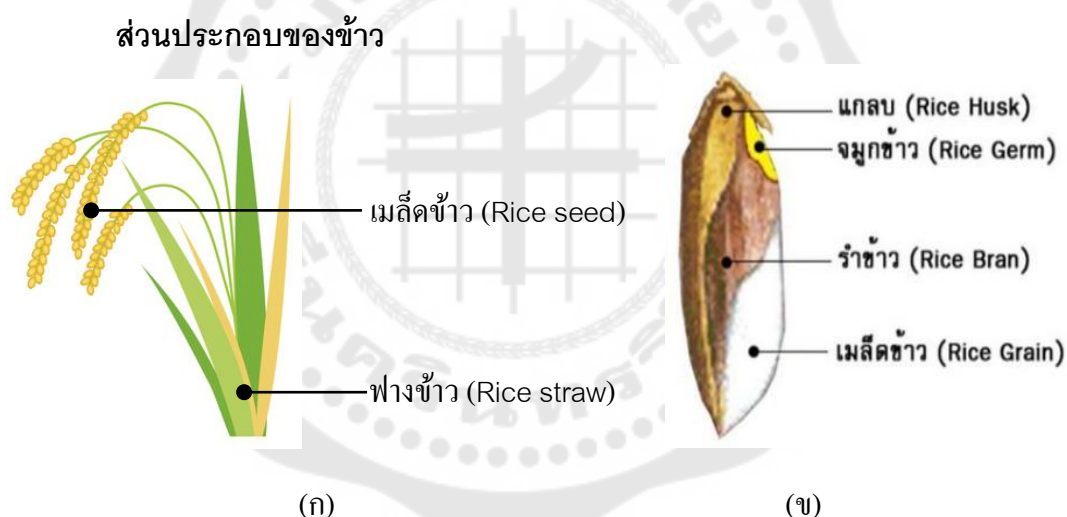
- การทดสอบ Folin-Ciocalteu
- การทดสอบฤทธิ์การยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH
- การวิเคราะห์ปริมาณแกมมาอริซานอลด้วยเทคนิค HPLC

การทดสอบการต้านภาวะเครียดออกซิเดชันในเซลล์ประสาท

- เซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง SH-SY5Y
- การทดสอบเอ็มทีที

ข้าว กข 105

ข้าว เป็นพืชที่ทำรายได้ให้กับประเทศไทยปีละหลายพันล้านบาท ซึ่งปี พ.ศ. 2561 นั้น ประเทศไทยได้ทำการส่งออกข้าวถึง 11.1 ล้านตัน คิดเป็นมูลค่ากว่า 9.4 พันล้านบาท (กรมการค้าต่างประเทศ, 2018; สำนักคณะกรรมการตรวจข้าวสภาคการการค้าแห่งประเทศไทย, 2018) โดย ข้าว กข 105 จัดเป็นข้าวที่มีราคาเฉลี่ยต่อตันสูงที่สุดอยู่ที่ 1,133 เหรียญสหรัฐต่อตัน ข้าว กข 105 มีลักษณะพิเศษที่แตกต่างจากข้าวในสายพันธุ์อื่นคือเมื่อนำมาหุงจะมีกลิ่นหอม และเมล็ดข้าวเหนียวนุ่ม ข้าว กข 105 จึงได้รับความนิยมในหมู่ของผู้บริโภค และรัฐบาลจึงสนับสนุนให้ชาวนาปลูกข้าว กข 105 เพื่อการส่งออกและบริโภคภายในประเทศ (วิไลภรณ์ ชนกล้าชัย, 2559, 6 มิถุนายน)



ภาพประกอบ 1 แสดงส่วนประกอบต้นข้าว(ก) และส่วนประกอบของเมล็ดข้าว(ข)

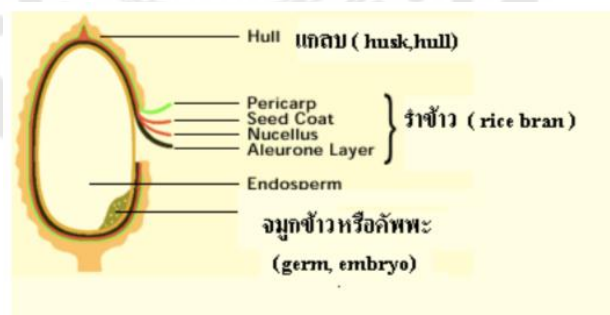
ที่มา: <http://www.chiangraifocus.com>

ต้นข้าว (ภาพประกอบ 1ก) ประกอบด้วย 2 ส่วนสำคัญได้แก่ เมล็ดข้าว (rice seed) และ ฟางข้าว (rice straw) โดยส่วนของเมล็ดข้าวจะเป็นส่วนที่ถูกเก็บผ่านการเก็บหรือเกี่ยวข้าวของ ชาวนา เพื่อนำไปสู่กระบวนการกะเทาะเปลือกข้าวและขัดสีเพื่อให้ได้ข้าวขาว เมื่อเก็บเกี่ยวข้าวแล้วจะได้เมล็ดข้าว (rice seed) (ภาพประกอบ 1ข) ที่มีส่วนประกอบได้แก่ แกลบ (rice husk)

จมูกข้าว (rice germ) รำข้าว (rice bran) และเมล็ดข้าว (rice grain) โดยก่อนจะได้เมล็ดข้าวที่นำไปใช้รับประทานเมล็ดข้าวจะถูกนำผ่านกระบวนการกะเทาะเพื่อนำเปลือกข้าวออก ข้าวที่ได้จะถูกเรียกว่าข้าวกล้อง (brown rice) ซึ่งจะประกอบไปด้วยจมูกข้าว รำข้าว และเมล็ดข้าว จากนั้นส่วนที่เหลือซึ่งจะถูกนำไปขัดสีส่วนที่เป็น จมูกข้าว และรำข้าว เพื่อให้ได้ข้าวสารสำหรับการบริโภค (Peanparkdee & Iwamoto, 2019)

รำข้าว

รำข้าว คือหนึ่งในเยื่อหุ้มผิวของเมล็ดข้าวกล้องที่ถูกขัดสีออกเมล็ดข้าว โดยส่วนของรำข้าวประกอบด้วยชั้นแอลิวโรน (aleurone layer) ชั้นในเยื่อโปร่งใส (nucellus) เปลือกเมล็ด (seed coat) และผนังผล (pericarp) ดังภาพประกอบ 2 โดยทั่วไปรำข้าวมีประมาณ 10% ของน้ำหนักข้าวเปลือกทั้งหมด (Zullaikah, Lai, Vali, & Ju, 2005) ถูกแบ่งออกเป็น 2 ส่วน ได้แก่ (1)รำหยาบหรือรำข้าวกล้อง เป็นรำข้าวที่ได้จากการสีข้าวเปลือกให้เป็นข้าวกล้อง รำหยาบเป็นส่วนผสมของแกลบ (husk) กับเนื้อเยื่อชั้นนอกของข้าวกล้อง เป็นส่วนที่มีเส้นใยสูงแต่ปริมาณน้ำตาลต่ำ และ (2)รำละเอียดหรือรำข้าวขาว ได้จากการขัดสีหรือขัดมันข้าวกล้องให้เป็นข้าวสารขาว โดยส่วนที่ถูกขัดออกมาในระหว่างขัดข้าวขาวมักเป็นส่วนผสมระหว่างส่วนห่อหุ้มเมล็ดข้าวหรือรำข้าว เป็นส่วนที่มีปริมาณน้ำมันมาก (Moongngarm, Daomukda, & Khumpika, 2012)



ภาพประกอบ 2 โครงสร้างเมล็ดข้าว และรำข้าว

ที่มา: www.foodnetworksolution.com

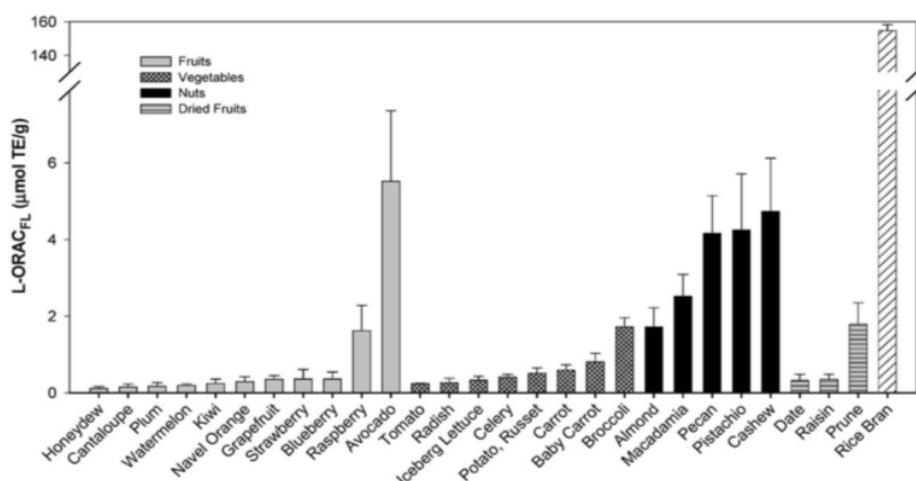
องค์ประกอบทางเคมีของรำข้าว

ลักษณะทางกายภาพโดยทั่วไปของรำข้าว ตัวอย่างเช่น สีของรำข้าวขึ้นอยู่กับชนิดของข้าว เช่น รำข้าว กข 105 มีสีน้ำตาลอ่อน รำข้าวหอมนิลมีสีม่วงเข้ม รำข้าวสังข์หยดมีสีแดง จากการศึกษาค้นคว้าองค์ประกอบทางเคมีของรำข้าว กข 105 ในงานวิจัยที่เกี่ยวข้องพบว่า มีองค์ประกอบดังตาราง 1 (Moongngarm et al., 2012)

ตาราง 1 องค์ประกอบทางเคมีของรำข้าว

องค์ประกอบ	ปริมาณเมื่อเทียบจากน้ำหนักแห้ง (%)
ไขมัน	12.45
โปรตีน	10.90
คาร์โบไฮเดรต	45.31
ไฟเบอร์	13.51
ซีลีเนียม	12.18
Phenolic acid	1.64 (mg GAE/g)
γ -oryzanol	5.5 (mg/g)
α -tocopherol	32.77 (μ g/g)
γ -tocopherol	46.63 (mg/g)

เนื่องจากการศึกษาพบว่าปริมาณ γ -oryzanol พบได้สูงที่สุดในรำข้าวเมื่อเทียบกับพืชผักชนิดอื่น ๆ ดังภาพประกอบ 3 (Wu et al., 2004) จึงทำให้รำข้าวเป็นแหล่งของสารออกฤทธิ์ชีวภาพจำพวก γ -oryzanol ที่น่าสนใจเมื่อเทียบกับผัก ผลไม้ ถั่ว และผลไม้แห้งชนิดอื่น อีกทั้งยังมีราคาถูกเนื่องจากเป็นของเหลือจากกระบวนการขัดสีของข้าว



ภาพประกอบ 3 ปริมาณของสารต้านออกซิเดชันที่ละลายในไขมัน

ที่มา: Wu et al. (2004)

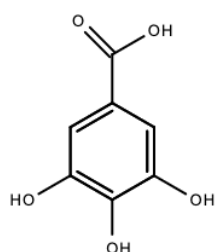
สารออกฤทธิ์ชีวภาพ

สารออกฤทธิ์ชีวภาพเป็นสารเมตาบอไลต์ทุติยภูมิที่ผลิตขึ้นในระบบร่างกายของสิ่งมีชีวิตเพื่อใช้ในกิจกรรมต่างๆ เช่น ยับยั้งอนุมูลอิสระ ยับยั้งและกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ กระตุ้นการทำงานของอวัยวะต่างๆ และควบคุมการแสดงออกของยีน เป็นต้น (Correia, Borges, Medeiros, & Genovese, 2012) โดยสิ่งมีชีวิตมีความต้องการสารออกฤทธิ์ชีวภาพแต่ละชนิดต่างกันออกไปจากการบริโภคอาหารโดยทั่วไป โดยร่างกายมีความจำเป็นในการบริโภคเพียงเล็กน้อย แต่หากร่างกายขาดสารออกฤทธิ์ชีวภาพก็จะส่งผลทำให้ระบบการทำงานในร่างกายผิดปกติ เช่นเดียวกับการที่ร่างกายได้รับวิตามินและเกลือแร่ต่าง ๆ จากการศึกษาสารออกฤทธิ์ชีวภาพในข้าวสาลีพันธุ์ กข 105 สามารถจำแนกชนิดของสารออกฤทธิ์ชีวภาพได้เป็น 2 ประเภท ได้แก่ phenolic acid และ γ -oryzanol (Imsanguan et al., 2008; Rao, Reddy, Babu, & Reddy, 2010)

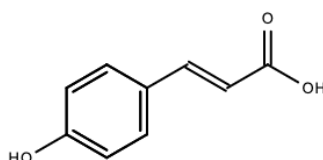
Phenolic acid

Phenolic acid พบได้ทั่วไปในพืชเพื่อใช้เป็นสารสำคัญในการดำรงชีวิต และตอบสนองต่อสิ่งเร้าที่ส่งผลต่อความเป็นอยู่ของพืช เช่น รังสีอัลตราไวโอเลต การติดเชื้อโรคในพืช การติดโรคระบาดในพืช และการถูกทำลายเนื้อเยื่อของพืช เป็นต้น (Beckman, 2000; Malenčić et al., 2013) โดยโครงสร้างของ phenolic acid โดยทั่วไปจะประกอบไปด้วย aromatic ring

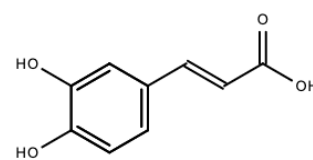
อย่างน้อย 1 วง ซึ่ง aromatic ring ดังกล่าวต่อกับ hydroxyl group อย่างน้อย 1 หมู่ เช่น กรดแกลลิก กรดคูมาริก และกรดคาเฟอิกดังภาพประกอบ 4



กรดแกลลิก



กรดคูมาริก



กรดคาเฟอิก

ภาพประกอบ 4 ตัวอย่าง phenolic acid

ที่มา: Shahidi, Vamadevan, Oh, and Peng (2019)

จากการศึกษา phenolic acid ในรำข้าว กข 105 พบว่าปริมาณของ phenolic acid จากในรำข้าวโดยใช้ทดสอบ Folin-Ciocalteu เป็นไปดังตาราง 2

ตาราง 2 ปริมาณ phenolic acid ในรำข้าวโดยใช้การทดสอบ Folin-Ciocalteu

วิธีการสกัด	ตัวทำละลาย	TPC (mg GAE/g)	ที่มา
สกัดด้วยตัวทำละลาย	80% Methanol	2.5±0.3	Butsat and Siriamornpun (2010)
สกัดด้วยตัวทำละลาย	Petroleum Ether	1.57±0.07	Moongnarm et al. (2012)

จากเอกสารงานวิจัยดังตาราง 2 จะพบว่าการใช้ตัวทำละลายเข้มข้น เช่น 60% (v/v) ethanol ร่วมกับการใช้คลื่น ultrasound สามารถช่วยเพิ่มปริมาณ phenolic acid ให้สูงขึ้นได้เมื่อเทียบกับการใช้ตัวทำละลายเข้มข้นต่ำ ในการสกัดเพียงอย่างเดียว แต่จากการศึกษาพบว่า การทดสอบ Folin-Ciocalteu นั้นสามารถบอกปริมาณ phenolic acid ซึ่งเป็นสารต้านออกซิเดชัน

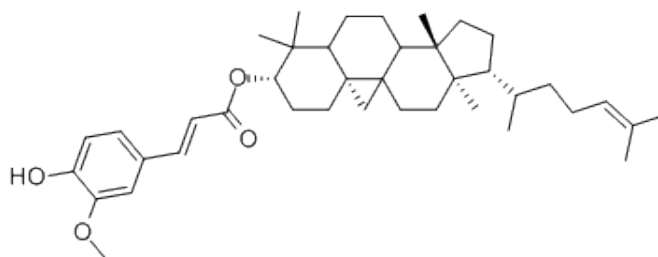
ได้เพียงคร่าวๆ ไม่สามารถระบุได้อย่างแม่นยำ รวมถึงไม่สามารถระบุชนิดและปริมาณที่แน่นอนได้ ดังนั้นวิธีที่นิยมใช้ในการตรวจสอบเชิงคุณภาพและปริมาณได้แก่ เทคนิค HPLC โดยในการศึกษาการใช้ HPLC ในการตรวจสอบ phenolic acid พบข้อมูลปริมาณและ phenolic acid ชนิดต่างๆ ดังตาราง 3 (Onofre & Hettiarachchy, 2007)

ตาราง 3 ชนิดของ phenolic acid และปริมาณของ phenolic acid

phenolic acid	ปริมาณ (mg/100 g น้ำหนักข้าว)
Vanillic acid	4.47 ± 0.23
<i>p</i> -Coumaric acid	34.73 ± 4.97
<i>trans</i> -Ferulic acid	25.59 ± 0.86
Benzoic acid	76.99 ± 4.50
Sinapic acid	13.84 ± 3.62
<i>o</i> -Coumaric acid	7.52 ± 0.56
Benzoic acid	76.99 ± 4.50

γ -oryzanol

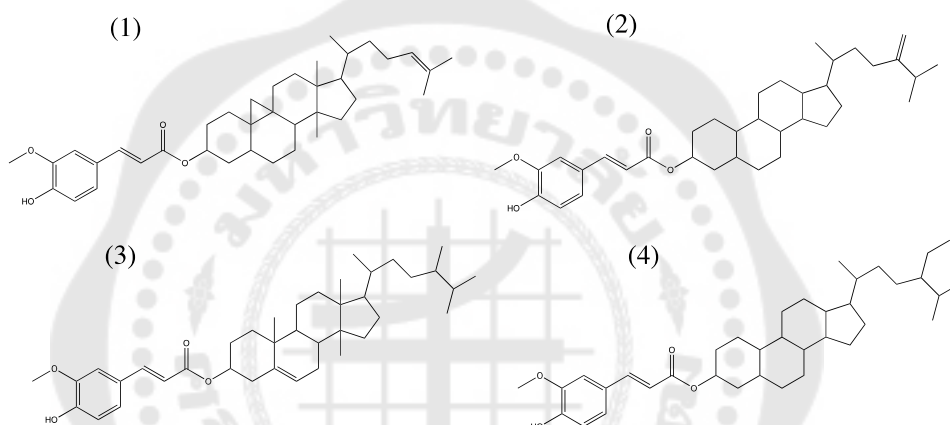
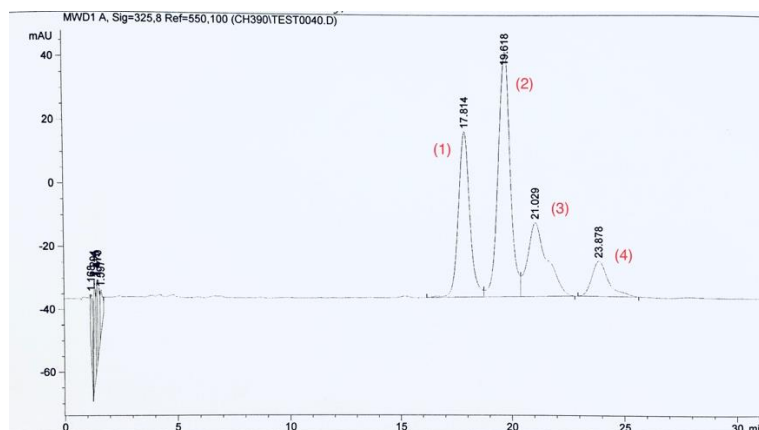
γ -oryzanol มีมากในรำข้าว และสามารถพบ γ -oryzanol ในรำข้าวเทียบเท่ากับโทโรลิก (trolox) 154.70 μ mole/g (Wu et al., 2004) โดย γ -oryzanol มีโครงสร้างของดังภาพประกอบ 5 มี hydroxyl group ที่สามารถจ่ายอิเล็กตรอนเพื่อยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารจำพวกอนุมูลอิสระ อีกทั้งยังมีสรรพคุณทางการแพทย์ที่สามารถช่วยป้องกันและรักษาโรคได้หลากหลายเช่น ป้องกันโรคที่เกิดจากความเสื่อมถอยของระบบประสาท ลดความเสี่ยงในการเกิดโรคมะเร็ง ลดความการดูดซึมคอเลสเตอรอล ลดความเสี่ยงจากการอุดตันของเกล็ดเลือดในกระแสโลหิต ลดการอักเสบของข้อต่อบริเวณกระดูก และลดความเสี่ยงในการเกิดภาวะโรคเบาหวาน (Ausman et al., 2005; Fujii, Butler, & Sasaki, 2018; Ismail et al., 2014; Jung et al., 2015)



ภาพประกอบ 5 โครงสร้าง γ -oryzanol

ที่มา : Minatel, Francisqueti, Corrêa, and Lima (2016)

ในการตรวจสอบปริมาณ γ -oryzanol มักใช้การตรวจสอบด้วยเทคนิค HPLC เนื่องจากเป็นเทคนิคที่ให้ผลแม่นยำ แม้มีสารในตัวอย่างเพียงเล็กน้อย จากการศึกษาการใช้เทคนิค HPLC พบว่า chromatogram ของสารมาตรฐาน γ -oryzanol มีลักษณะเป็น 4 พีคดังภาพประกอบ 6 โดยทั้ง 4 พีคประกอบด้วยสารประกอบในกลุ่มของ γ -oryzanol 4 ชนิดได้แก่ (1)ไฮโคลาทีนิลเฟอรูเลท, (2)24-เมทิลไฮโคลาทีนิลเฟอรูเลท, (3)แคมฟิสเตอร์ลเฟอรูเลท และ (4) β -ไฮโตสเตอร์ลเฟอรูเลท โดยปริมาณของ γ -oryzanol ในสารสกัดที่สกัดด้วยวิธีการต่างๆเป็นไปตามตาราง 4



ภาพประกอบ 6 chromatogram ของ γ -oryzanol ที่ประกอบไปด้วยสาร 4 ชนิดได้แก่
 (1)ไฮโคลาทีนิลเฟอรูลิท, (2)24-เมทิลินไฮโคลาทีนิลเฟอรูลิท, (3)แคมฟิสเตอร์ลิลเฟอรูลิท และ
 (4) β -ไฮโดสเตอร์ลิลเฟอรูลิท

ที่มา : Sakunpak, Suksaeree, Pathompak, Charoonratana, and Sermkaew (2014)

ตาราง 4 ปริมาณ γ -oryzanol จากการตรวจสอบด้วยเทคนิค HPLC (Imsanguan et al., 2008)

วิธีการสกัด	ตัวทำละลาย	ปริมาณของ γ -oryzanol (mg/g)	ที่มา
Supercritical Fluid Extractin	supercritical Fluid CO ₂	11.37	(Imsanguan et al., 2008)
Soxhlet Extraction	ethanol	9.81	
Conventional Solvent Extraction	ethanol	7.35	

วิธีการสกัดสารออกฤทธิ์ชีวภาพจากรำข้าว

จากการศึกษาการสกัดสารออกฤทธิ์ชีวภาพ อันได้แก่ phenolic acid และ γ -oryzanol พบว่ามีวิธีในการสกัดสารออกฤทธิ์ชีวภาพหลากหลาย ซึ่งแต่ละวิธีนั้นให้ปริมาณของสารออกฤทธิ์ชีวภาพต่างกัน อีกทั้งชนิดของตัวทำละลายก็มีผลต่อชนิดของสารออกฤทธิ์ชีวภาพที่ถูกสกัดออกมาจากรำข้าวเช่นกัน ดังนั้นวิธีในการสกัดสารออกฤทธิ์ชีวภาพจากรำข้าวสามารถแบ่งออกเป็นการใช้วิธีดั้งเดิมในการสกัด และการให้ความร้อน

การสกัดด้วยวิธีดั้งเดิม

การใช้ตัวทำละลายในการสกัด

การใช้ตัวทำละลายในการสกัดเป็นการนำพืชวัตถุดิบผสมกับตัวทำละลายอินทรีย์หรือน้ำแล้วนำไปเขย่าด้วยเครื่องเขย่าอัตโนมัติ เครื่องกวนอัตโนมัติ หรือแม้แต่การใช้ชอกเลทในการสกัดนั้นถือเป็นการสกัดด้วยวิธีการใช้ตัวทำละลายแบบดั้งเดิม (Goli, Barzegar, & Sahari, 2005; Jadhav, B.N, Gogate, & Rathod, 2009) การสกัดสารออกฤทธิ์ชีวภาพด้วยวิธีการใช้ตัวทำละลายแบบดั้งเดิมนี้อาจมีปริมาณของสารสกัดที่ได้ขึ้นอยู่กับแรงระหว่างโมเลกุลของสารออกฤทธิ์ชีวภาพและตัวทำละลาย (Goli et al., 2005) แต่ปัจจุบันงานวิจัยส่วนมากมักจะมียุทธศาสตร์ที่ทดแทนการสกัดด้วยตัวทำละลายแบบดั้งเดิมนี้นี้ เนื่องจากการสกัดด้วยการใช้ตัวทำละลายแบบ

ดั้งเดิมนี้ใช้ตัวทำละลายสิ้นเปลือง รวมถึงตัวทำละลายบางชนิดที่เป็นสารอินทรีย์ก็มักส่งผลเสียต่อสุขภาพของผู้ทดลอง นอกจากนี้ยังใช้เวลาในการสกัดค่อนข้างนานอีกด้วย (Lee et al., 2013) เช่นในการศึกษาของ Butsat and Siriamornpun (2010) ที่สกัด phenolic acid ในรำข้าวพันธ์ กข 105 ซึ่งเป็นสารประกอบข้าวสูง โดยในขั้นตอนของการสกัดได้ใช้ตัวทำละลาย methanol 80% ซึ่งเป็นตัวทำละลายข้าวสูง แต่ข้อเสียของตัวทำละลายนี้คือเป็นพิษสูง และใช้เวลานาน

การสกัดแบบชอกเลท (soxhlet extraction)

การสกัดด้วยวิธีการแบบชอกเลทเป็นวิธีการใช้สกัดสารจำพวกสารออกฤทธิ์ชีวภาพในพืช นิยมใช้ในการสกัดสารจำพวกน้ำมันจากพืช โดยข้อดีของการสกัดแบบชอกเลทได้แก่การที่ใช้ปริมาณของตัวทำละลายในการสกัดไม่มากเทียบเท่าการสกัดด้วยการใช้ตัวทำละลายแบบดั้งเดิมเพราะวิธีการชอกเลทจะใช้อุปกรณ์ที่เรียกว่าตัวควบแน่น (condenser) ในการควบแน่นตัวทำละลายแล้วพาแยกสารสกัดที่ต้องขึ้นไปด้านบน และวิธีการแบบชอกเลทใช้อุปกรณ์พื้นฐานและราคาไม่แพง แต่เทคนิคการสกัดนี้ยังคงใช้เวลาในการสกัดที่ยาวนาน (Castro, Silva, & Costa, 1998; Wang & Weller, 2006) เช่นในการศึกษาของ Imsanguan et al. (2008) การใช้การสกัดแบบชอกเลทในการสกัดสารออกฤทธิ์ชีวภาพในรำข้าวโดยในการสกัดแบบชอกเลทใช้เวลาในการสกัดทั้งหมด 24 ชั่วโมง จึงใช้เวลานานในการสกัดมากกว่าวิธีอื่น ๆ

การสกัดโดยการใช้ความร้อน

จากการศึกษาการใช้ความร้อนในการสกัดน้ำมันและสารออกฤทธิ์ชีวภาพในรำข้าวโดยการใช้ความร้อน เช่น การใช้คลื่น ultrasound การใช้คลื่นไมโครเวฟ การใช้ความร้อนแบบโอมมิง และการใช้การกลั่นไอน้ำ เป็นต้น พบว่าการใช้ความร้อนในรูปแบบต่างๆ สามารถช่วยลดระยะเวลา ลดปริมาณของตัวทำละลาย และสามารถเพิ่มปริมาณของสารออกฤทธิ์ชีวภาพ ร้อยละผลได้จากการสกัด รวมถึงสารสกัดที่ได้มีปริมาณของ phenolic acid สูงอีกด้วย

การใช้ความร้อนเป็นตัวช่วยในการสกัด (thermal treatment)

ในการสกัดสารออกฤทธิ์ชีวภาพจากรำข้าวพบว่าสามารถใช้การสกัดแบบชอกเลทในการสกัดได้ ซึ่งวิธีดังกล่าวให้ปริมาณ γ -oryzanol ซึ่งเป็นสารสำคัญในรำข้าวเมื่อเทียบกับการสกัดด้วยวิธีการใช้ตัวทำละลายแบบดั้งเดิม (Imsanguan et al., 2008) ซึ่งแม้ว่าวิธีการสกัดแบบชอกเลทจะได้รับความนิยมในการสกัดสารจำพวกน้ำมันและสารออกฤทธิ์ชีวภาพ

แต่วิธีการดังกล่าวมีข้อเสีย คือการใช้ระยะเวลาในการสกัดที่นาน แต่จุดเด่นของการวิธีสกัดแบบชอกเลทที่ให้ปริมาณของร้อยละผลได้และปริมาณของสารออกฤทธิ์ชีวภาพมากกว่าการสกัดด้วยตัวทำละลายคือการให้ความร้อน Ruen-ngam et al. (2016) ได้รายงานเกี่ยวกับการให้ความร้อนกับรำข้าวก่อนการสกัดด้วยการให้ความร้อน 6 รูปแบบ ได้แก่ การใช้ลมร้อน การใช้ไมโครเวฟ การต้ม การคั่ว และการอบโอโตเคลฟ พบว่าการใช้ลมร้อน การใช้ไมโครเวฟ และการใช้หม้อ สามารถช่วยเพิ่มปริมาณของสารต้านออกซิเดชัน ปริมาณของ γ -oryzanol ปริมาณร้อยละผลได้ รวมถึงเพิ่มความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH ได้อีกด้วย ซึ่งข้อดีนี้สามารถนำมาช่วยในการลดระยะเวลาที่ใช้สกัดแทนการสกัดแบบชอกเลทได้

การใช้คลื่น ultrasound ในการช่วยสกัด

คลื่น ultrasound เป็นคลื่นเชิงกลที่สามารถสร้างฟองอากาศขนาดเล็กระดับจุลภาคในตัวทำละลาย เมื่อฟองอากาศสัมผัสหรือกระทบกับผิวของพืชที่ถูกสกัด พลังงานจากฟองอากาศขนาดเล็กจะปลดปล่อยออกทำให้ผนังเซลล์ของพืชวัตถุแตกออก จึงทำให้สกัดสารได้มากกว่าการใช้เครื่องเขย่าเชิงกล (Peanparkdee et al., 2018) แต่อย่างไรก็ตามการใช้คลื่น ultrasound ในการช่วยสกัดสาร พบว่าประสิทธิภาพในการสกัดขึ้นอยู่กับอัตราส่วนระหว่างพืชที่ถูกนำมาสกัดต่อปริมาตรของตัวทำละลาย อุณหภูมิของอ่างน้ำขณะทำการสกัด และเวลาที่ใช้สกัด (Şahin & Şamli, 2013; Tabaraki & Nateghi, 2011)

จากการศึกษางานวิจัยพบว่ามีการใช้คลื่น ultrasound ในการช่วยสกัดอย่างแพร่หลาย แทนการใช้เครื่องเขย่าเชิงกล (mechanical shaker) ในการสกัด เช่น ในการสกัด phenolic acid จากเปลือกส้ม น้ำมันรำข้าว และน้ำมันหอมระเหยจากพืช (Allaf, Tomao, Ruiz, & Chemat, 2013; Khan, Abert- Vian, Fabiano- Tixier, Dangles, & Chemat, 2010; Peanparkdee, Patrawart, & Iwamoto, 2019) ซึ่งเทคนิคในการสกัดด้วยการนำพืชวัตถุแช่ในตัวทำละลาย แล้วนำไปใส่ในอ่าง ultrasound โดยสารสกัดที่ได้จะมีข้อเสียคือมีค่าความเบี่ยงเบนมาตรฐานมากกว่าการสกัดด้วยวิธีการใช้เครื่องเขย่าเชิงกล เนื่องจากตำแหน่งของตัวสร้างคลื่น ultrasound ในอ่าง ultrasound อาจส่งผลในการสร้างคลื่นได้ไม่สม่ำเสมอ แต่ร้อยละผลได้ที่ได้

จากการใช้คลื่น ultrasound ช่วยสกัดมีปริมาณมากกว่าการสกัดด้วยการใช้ตัวทำละลายแบบดั้งเดิม และใช้ระยะเวลาในการสกัดน้อยลง (Peanparkdee et al., 2018)

การให้ความร้อนแบบ hydrothermal

การให้ความร้อนแบบ hydrothermal เป็นกระบวนการให้ความร้อนผ่านน้ำหรือไอน้ำอุณหภูมิสูง เช่น การต้ม (wet-cooking) การนึ่ง (parboiling) การใช้เทคนิคไอซีพีดี (Instant Controlled Pressure Drop; ICPD) และการใช้หม้อแรงดัน โดยที่น้ำหรือไอน้ำที่มีอุณหภูมิสูงจะช่วยให้เซลล์ของรำข้าวถูกทำลาย และอุณหภูมิที่สูงสามารถเพิ่มอัตราการละลายของสารต้านออกซิเดชันได้ด้วย ซึ่งการใช้หม้อแรงดันนี้เป็นหลักการที่คล้ายคลึงกับการกลั่นด้วยไอน้ำ โดยที่ใช้น้ำเป็นตัวพาสารสำคัญออกมาจากพืชวัตถุดิบและใช้อุณหภูมิสูงในการช่วยสกัด (Allaf et al., 2013; Min et al., 2014; Özkaya et al., 2017)

จากการศึกษาเกี่ยวกับการให้ความร้อนโดยใช้เทคนิค hydrothermal ในการสกัดสารสำคัญจากรำข้าว พบว่าการต้มให้ผลการสกัดที่ไม่แตกต่างกับวิธีการสกัดด้วยตัวทำละลายแบบดั้งเดิม (Min et al., 2014) แต่วิธีการนึ่ง การใช้เทคนิคไอซีพีดี และการใช้หม้อแรงดัน ให้ปริมาณสารออกฤทธิ์ชีวภาพในกลุ่มของสารต้านออกซิเดชันที่ละลายในไขมันในปริมาณที่มากกว่า การใช้การต้มเพียงอย่างเดียว เนื่องจากการต้มเป็นการใช้น้ำที่มีอุณหภูมิสูงแก่พืชที่ถูกสกัด แต่การนึ่ง การใช้หม้อแรงดัน และการใช้เทคนิคไอซีพีดี เป็นการใช้น้ำร้อนในการพาสารออกฤทธิ์ชีวภาพออกมาจากรำข้าว และความดันยังมีผลทำให้เซลล์ของพืชวัตถุดิบถูกทำลายจากการใช้แรงดันไอน้ำที่มีอุณหภูมิสูง จากการศึกษาคุณสมบัติการให้ความร้อนแบบ hydrothermal แก่พืชทั้ง 4 แบบ พบข้อแตกต่างดังตาราง 5

ตาราง 5 การให้ความร้อนแบบ hydrothermal

วิธีการให้ความร้อน	ตัวพาสาร	ความดัน	ที่มา
การต้ม	น้ำ	ไม่มีความดัน	Min et al. (2014)
การนึ่ง	ไอน้ำ	ไม่มีความดัน	Ruen-ngam et al. (2016)
หม้อแรงดัน	ไอน้ำ	มีความดันและไม่สามารถลดความดันไอน้ำได้อย่างรวดเร็ว	Min et al. (2014), Özkaya et al. (2017)
เตาปฏิกรณ์ไอซีพีดี	ไอน้ำ	มีความดันสูงและสามารถลดความดันไอน้ำได้อย่างรวดเร็ว	(Allaf et al., 2014; Allaf et al., 2013; Besombes, Berka-Zougali, & Allaf, 2010)

ตัวทำละลายในการสกัดสารออกฤทธิ์ชีวภาพจากรำข้าว

การเลือกใช้ตัวทำละลายที่มีขั้วแตกต่างกันมีผลโดยตรงต่อชนิดของสารออกฤทธิ์ชีวภาพ เนื่องจากสมบัติในการละลายที่แตกต่างกัน จากการศึกษาการสกัดสารออกฤทธิ์ชีวภาพในรำข้าวพบว่าสารออกฤทธิ์ชีวภาพในรำข้าวมีขั้วต่ำ โดยทั่วไปจึงใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ในการสกัด ซึ่งการใช้ตัวทำละลายแต่ละชนิดมักให้สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ต่างกันดังตาราง 6

ตาราง 6 ประเภทของตัวทำละลายในการสกัดสารออกฤทธิ์ชีวภาพ

ตัวทำละลาย	สารออกฤทธิ์ชีวภาพ	ที่มา
Methanol	Phenolic acid และ Flavonoid	Rao et al. (2010)
Acetone, Methanol และ Ethanol	Phenolic acid และ Flavonoid	Jun, Song, Yang, Youn, and Kim (2012)
Ethanol และ D-limonene	Phenolic acid, Flavonoid, Anthocyanin, Vitamin E และ γ -oryzanol	Peanparkdee et al. (2018)
Methanol ผสม HCl	Anthocyanin, Vitamin E และ γ -oryzanol	Loypimai, Moongngarm, Chottanom, and Moontree (2015)
Hexane	Vitamin E และ γ -oryzanol	Bhatnagar, Prabhakar, Prasanth Kumar, Raja Rajan, and Gopala Krishna (2014)
Supercritical fluid CO ₂	Vitamin E และ γ -oryzanol	Imsanguan et al. (2008)
Supercritical fluid CO ₂	γ -oryzanol	Ismail et al. (2014)

จากการศึกษาดังตาราง 6 พบว่าการใช้ตัวทำละลายแต่ละชนิดสามารถสกัดสารออกฤทธิ์ชีวภาพจากรำข้าวได้เกือบทุกชนิดแต่ปริมาณของสารออกฤทธิ์ชีวภาพจะขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของตัวทำละลายโดยแบ่งออกได้เป็น 2 ประเภทได้แก่ (1) ตัวทำละลายอินทรีย์ซึ่งตัวทำละลายสามารถใช้น้ำมันรำข้าว รวมถึงสารออกฤทธิ์ชีวภาพที่มีขั้วต่ำ (2) ตัวทำละลายอินทรีย์ที่มีขั้วสูงสามารถใช้ในการสกัดสารออกฤทธิ์ชีวภาพที่มีขั้วสูง

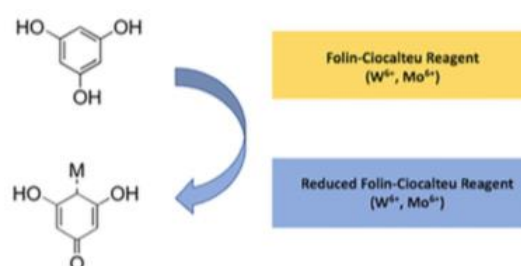
ดังนั้นผู้วิจัยนี้จึงสนใจเกี่ยวกับการให้ความร้อนแก่รำข้าวด้วยเทคนิคการให้ความร้อนแบบ hydrothermal โดยใช้หม้อแรงดัน ที่อุณหภูมิ 121°C ความดัน 15 psi เป็นเวลา 20 นาที ในการช่วยทำลายเซลล์รำข้าวด้วยความดันและจากไอน้ำร้อน รวมถึงใช้ไอน้ำร้อนพาสารออกฤทธิ์ชีวภาพออกจากรำข้าว แล้วจากนั้นจึงใช้คลื่น ultrasound ที่ความถี่ 40 kHz 1 ชั่วโมง ในการช่วยสกัดด้วยตัวทำละลาย

การวิเคราะห์สารออกฤทธิ์ชีวภาพในรำข้าว

เนื่องจากองค์ประกอบทางเคมีในรำข้าวที่สำคัญเป็นสารออกฤทธิ์ชีวภาพ ได้แก่ phenolic acid และ γ -oryzanol วิธีการที่ใช้ตรวจสอบสารออกฤทธิ์ชีวภาพโดยทั่วไปประกอบด้วย การทดสอบ Folin-Ciocalteu เพื่อใช้หาปริมาณของ phenolic acid การทดสอบฤทธิ์การยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH เพื่อทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งอนุมูลอิสระ และการใช้เทคนิค HPLC

การทดสอบ Folin-Ciocalteu

การทดสอบ Folin-Ciocalteu เป็นเทคนิคการวิเคราะห์เชิงสี (colorimetric analysis) ที่ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณของสารประกอบจำพวก phenolic acid โดยใช้สารประกอบจำพวกทังสเตน และโมลิบดีนัม ซึ่งเป็นสารผสมที่มีสีเหลือง แล้วใช้สารละลาย Na_2CO_3 ในการเปลี่ยน phenolic acid ให้อยู่ในรูปของฟีนอลไอออน โดยสารผสม Folin-Ciocalteu จะออกซิไดซ์ฟีนอลไอออนให้เปลี่ยนสารประกอบเชิงซ้อนของทังสเตนและโมลิบดีนัมให้เปลี่ยนเป็นสีน้ำเงิน โดยมีกลไกการเปลี่ยนสีดังภาพประกอบ 7 (Ciulu, Cádiz-Gurrea, & Segura-Carretero, 2018)



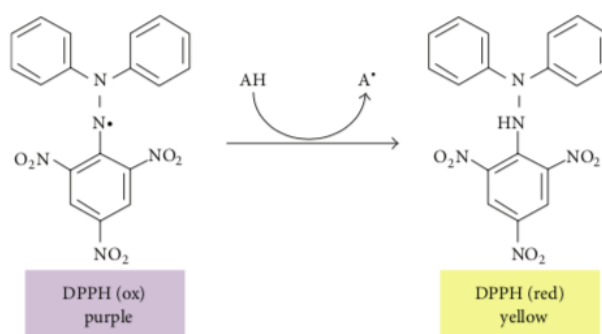
ภาพประกอบ 7 กลไกการเปลี่ยนสีของสารผสม Folin-Ciocalteu

ที่มา: Ford, Theodoridou, Sheldrake, and Walsh (2019)

ขั้นตอนและวิธีในการทดสอบทำได้โดยการเตรียมตัวอย่างของสารสกัด ซึ่งในกรณีที่สารตัวอย่างมีปริมาณน้อยอาจเตรียมตัวอย่างโดยการสกัดด้วยตัวทำละลายแล้วใช้เครื่องเซนติฟิวจ์โดยใช้ความเร็ว 3,000-13,000 RPM เป็นเวลา 5 – 10 นาที ในการตกตะกอนรำข้าวที่เป็นของแข็ง จากนั้นจึงทำการเก็บส่วนที่เป็นสารละลายใสในการนำไปวิเคราะห์ (Ainsworth & Gillespie, 2007; Min et al., 2014; Walter et al., 2013) โดยการเตรียมสารละลายตัวอย่างประมาณ 80-200 μL ในหลอดไมโครเซนติฟิวจ์ แล้วเติมสารละลายผสม Folin-Ciocalteu 0.25 N ลงในสารตัวอย่างโดยเติมมากกว่าสารละลายตัวอย่างประมาณ 2 เท่า แล้วเขย่าเป็นเวลาประมาณ 3 นาที จากนั้นจึงเติม 7.0 – 10.5% (โดย m/v) Na_2CO_3 ประมาณ 0.7 – 2.0 mL เพื่อเปลี่ยนกรดฟีนอลิกให้อยู่รูปของเกลือฟีนอเลท แล้วเพื่อปรับปริมาตรรวมของสารละลายผสมให้อยู่ในช่วง 1-3 mL แล้วในที่มืด 30 นาที แล้วนำไปเซนติฟิวจ์เพื่อให้สารละลายมีความใส แล้วนำไปวัดสเปคโตร 765 nm (Ainsworth & Gillespie, 2007; Blainski, Lopes, & de Mello, 2013; Sánchez-Rangel, Benavides, Heredia, Cisneros-Zevallos, & Jacobo-Velázquez, 2013; Walter et al., 2013) โดยปริมาณ phenolic acid จะใช้ความเข้มข้น gallic acid สร้างกราฟมาตรฐาน ซึ่งค่าที่ได้จะใช้หน่วย mg GAE/g (Walter et al., 2013)

การทดสอบฤทธิ์การยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH

อนุมูลอิสระเป็นสารที่มีขาคีเลกตรอนวงนอก 1 อิเล็กตรอน จึงมีความว่องไวในการออกซิไดซ์สารอื่น ๆ เพื่อลดความไม่เสถียรของตัวมันเอง ดังนั้นในการทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดรำข้าวจึงต้องทำการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งอนุมูลอิสระ ซึ่งโดยทั่วไปแล้วใช้การทดสอบการต้าน ABTS radical และ DPPH radical แต่โดยทั่วไปใช้การทดสอบ DPPH radical มากกว่า เนื่องจากมีความเฉื่อยในการสลายตัวเมื่อถูกแสงและความร้อนมากกว่าโดยโครงสร้างของ DPPH radical มีโครงสร้างดังภาพประกอบ 8 ซึ่งมีสีม่วง เมื่อทำปฏิกิริยากับสารต้านออกซิเดชันจะเกิดการชิงอิเล็กตรอนจากสารต้านออกซิเดชันแล้วอยู่ในรูปสารละลายที่มีสีเหลือง (Ciulu et al., 2018)



ภาพประกอบ 8 โครงสร้างและการเปลี่ยนสีของอนุมูลอิสระ DPPH

ที่มา: Teixeira, Gaspar, Garrido, Garrido, and Borges (2013)

ขั้นตอนและวิธีในการวัดประสิทธิภาพในการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH โดยทั่วไปทำได้โดยใช้สารเคมีระดับ 2-3 mL และสามารถเตรียมสารเคมีสำหรับการตรวจวัดระดับ 200 μ L ในไมโครเวลเพลทได้เช่นกัน ซึ่งการวิเคราะห์เชิงสีในเพลททำได้โดยการเตรียมสารละลาย DPPH ในตัวทำละลายอินทรีย์ เช่น Methanol และ DMSO เป็นต้น (Chen, Bertin, & Frolidi, 2013) โดยเตรียมความเข้มข้นประมาณ 0.004% (โดย m/v) หรือใช้ประมาณ 0.2 mM 100 μ L เติมลงในตัวอย่างที่ความเข้มข้นต่างกันปริมาตร 100 μ L แล้วเก็บในที่มืด 30 นาที ก่อนนำไปวัดด้วยเครื่องอ่านไมโครเพลท (microplate reader) โดยใช้ความยาวคลื่น 515-520 nm (Beta, Nam, Dexter, & Sapirstein, 2005; Chen et al., 2013; Chotimarkorn, Benjakul, & Silalai, 2008; Dasgupta & De, 2004; Shao, Xu, Sun, Bao, & Beta, 2014) โดยคำนวณร้อยละในการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH โดยใช้สมการ 1 (Chen et al., 2013)

$$\text{ร้อยละการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH} = [1 - ((A_{\text{sample}} - A_{\text{blank}}) / A_{\text{blank}})] \times 100$$

ซึ่ง A_{sample} คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารตัวอย่าง

A_{Blank} คือ ค่าการดูดกลืนแสงของชุดควบคุม

สมการ 1 การคำนวณร้อยละการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH

แล้วรายงานค่า EC_{50} เพื่อใช้ในการเปรียบเทียบฤทธิ์ในการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH ของสารตัวอย่าง โดยใช้ฟังก์ชันการวิเคราะห์แบบการถดถอยที่ไม่เป็นเชิงเส้น (Non-linear regression) แบบอสมมาตร 5 พารามิเตอร์ (Chen et al., 2013; Chotimarkorn et al., 2008)

การวิเคราะห์ปริมาณ γ -oryzanol ด้วยเทคนิค HPLC

ในการวิเคราะห์เชิงปริมาณ γ -oryzanol นิยมใช้การวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC เนื่องจากเป็นวิธีที่ใช้ปริมาณสารตัวอย่างน้อยและให้ผลที่แม่นยำ จากการศึกษากการใช้เทคนิค HPLC ในการวิเคราะห์ปริมาณของ γ -oryzanol ด้วยเทคนิค HPLC มีการใช้ชนิดของคอลัมน์ ชนิดของเฟสเคลื่อนที่ ในการวิเคราะห์องค์ประกอบในรำข้าวของชาวสายพันธุ์ต่าง ๆ ดังตาราง 7

ตาราง 7 การใช้ HPLC ในการตรวจสอบสารออกฤทธิ์ชีวภาพในรำข้าว

เฟสคงที่	เฟสเคลื่อนที่	ชนิด ข้าว	สารออกฤทธิ์ ชีวภาพ	ที่มา
aPoroshell120 EC-C18, 3.0×150 mm, 2.7 μ m	A: Methanol B: Acetonitrile	กข105	γ -oryzanol	Sakunpak et al. (2014)
C18 column (150 mm x 4.60, 4 μ m)	A: Methanol B: Water C: Butanol	กข105	Vitamin E; γ -oryzanol	Moongngarm et al. (2012)
chromolith®flash RP-18 column (25×4.6 mm, 5 μ m)	A: Mathanol B: Water	ข้าวหอม นิล	γ -oryzanol	Thongchai and Liawruangrath (2016)

การทดสอบการต้านภาวะเครียดออกซิเดชันในเซลล์ประสาท

โดยทั่วไปในระบบเซลล์ของสิ่งมีชีวิตนั้นจะมีระบบป้องกันการอนุมูลอิสระในกลุ่มอนุพันธ์ออกซิเจนที่ว่องไว (Reactive Oxygen Species; ROS) โดยการกำจัดสารดังกล่าวเพื่อป้องกันอันตรายต่อเซลล์ แต่ในการป้องกันเซลล์จากสารในกลุ่มอนุพันธ์ออกซิเจนที่ว่องไว พบว่าเซลล์สามารถป้องกันได้อย่างจำกัด หากอนุพันธ์ออกซิเจนที่ว่องไวมีปริมาณที่มากเกินไปจนยอมทำให้เซลล์เกิดกระบวนการเสื่อมของเซลล์ซึ่งก่อให้เกิดการตายของเซลล์ในที่สุด โดยเฉพาะโรคความเสื่อมถอยของระบบประสาท (Martindale & Holbrook, 2002; Mattson & Camandola, 2001) โดยปัจจัยสำคัญที่สามารถเหนี่ยวนำให้เซลล์ประสาทเกิดภาวะการตาย ได้แก่ H_2O_2 ซึ่งเป็นสารจำพวกอนุพันธ์ออกซิเจนที่ว่องไว โดย H_2O_2 ที่มากเกินไปจะส่งผลให้เอนไซม์ในกลุ่ม antioxidants ได้แก่ Superoxide dismutase(SOD), Catalase และ Glutathione peroxidase ไม่สามารถสลาย H_2O_2 เป็นน้ำได้ทั้งหมด จึงทำให้เกิดอนุมูลอิสระ hydroxyl radical ซึ่งเป็นสารที่สามารถทำลายเซลล์และทำลายสารพันธุกรรมซึ่งก่อให้เกิดโรคมะเร็งและก่อให้เกิดกระบวนการทำลายตัวเองของเซลล์ที่เรียกว่าอะพอพโทซิส (Melo et al., 2011)

ในการทดสอบสารยับยั้งการตายของเซลล์ประสาทใช้ในกรณีที่ต้องการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ เช่น ใช้น้ำมันรำข้าว กรดปาล์มมิติก และสารสกัดจากขมิ้นชัน ในการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ประสาทแล้วใช้สารจำพวก H_2O_2 ในการเหนี่ยวนำเซลล์ SH-SY5Y ให้ผลิตอนุพันธ์ออกซิเจนที่ว่องไวและเกิดการตายของเซลล์แบบอะพอพโทซิส จากนั้นจึงทำการวัดอัตราการรอดชีวิตของเซลล์ประสาทโดยใช้สารละลายเอ็มทีที โดยทั่วไปแล้วจะเตรียมสารละลายเอ็มทีทีโดยฟอสเฟสบัฟเฟอร์ซาลิน (Phosphate buffer saline; PBS) เป็นตัวทำละลาย โดยเตรียมความเข้มข้นอยู่ที่ 0.2-0.5 mg/mL แล้วเติมลงในไมโครเวลเพลทที่มีเซลล์ถูกเลี้ยง แล้วบ่มไว้ 4 ชั่วโมง ก่อนนำไปวัดสเปกโตรที่ 570 nm แล้วคำนวณร้อยละของเซลล์ที่รอดชีวิต โดยใช้ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายแล้วคำนวณโดยใช้สมการ 2 (Ismail et al., 2014; Ng & Say, 2018; Ramkumar et al., 2017)

$$\text{ร้อยละการรอดชีวิตของเซลล์ประสาท} = [(A_{\text{sample}} - A_{\text{blank}})/(A_{\text{control}} - A_{\text{blank}})] \times 100$$

ซึ่ง A_{sample} คือค่าการดูดกลืนแสงของเซลล์ที่เลี้ยงด้วยสารตัวอย่างและ H_2O_2

A_{control} คือค่าการดูดกลืนแสงของเซลล์ที่เลี้ยงด้วย H_2O_2 เท่านั้น

A_{blank} คือค่าการดูดกลืนแสงของเซลล์ที่เลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์เท่านั้น

สมการ 2 การคำนวณร้อยละการรอดชีวิตของเซลล์ประสาท

เซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง SH-SY5Y

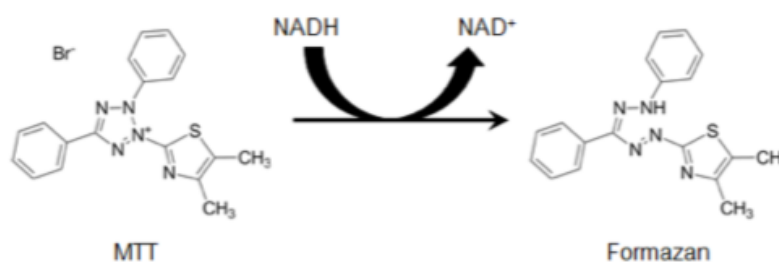
เซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง SH-SY5Y เป็นเซลล์ประสาทมนุษย์ที่ได้รับการยอมรับว่ามีคุณลักษณะที่คล้ายคลึงกับเซลล์ประสาทของมนุษย์และได้รับการยอมรับในการใช้เป็นแบบจำลองในการทดสอบกับเซลล์ประสาทของมนุษย์ เนื่องจากมีคุณลักษณะต่างๆ ได้แก่ องค์ประกอบทางชีวเคมี อัตราการเจริญและการแบ่งเซลล์ รวมถึงการเปลี่ยนแปลงคุณลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่คล้ายคลึงกัน ดังนั้นในการทดลองที่เกี่ยวข้องกับระบบประสาท เช่น ทดลองเกี่ยวกับสารพิษในเซลล์ประสาท สารเคมีที่เกี่ยวข้องกับเซลล์ประสาท การเปลี่ยนแปลงทางการแสดงออกของยีนในระบบประสาท จะใช้เซลล์ SH-SY5Y เป็นต้นแบบในการศึกษา (Frota Junior et al., 2011; Yu, Ye, Liu, Han, & Wang, 2011)

จากการศึกษาเกี่ยวกับเซลล์ประสาท SH-SY5Y โดยทั่วไปในการทำให้เซลล์ประสาทเกิดการแบ่งตัว ในงานวิจัยทั่วไปที่ทดลองเกี่ยวกับเซลล์ประสาท SH-SY5Y จะใช้สารละลายกรดเรตินอิกในการเหนี่ยวนำเซลล์ประสาทให้เกิดการแบ่งตัว โดยใช้ความเข้มข้นของเซลล์ประมาณ 5-100 μM ซึ่งเตรียมในสารละลาย Fetal bovine serum โดยใช้เวลาประมาณ 1-21 วัน (Xicoy, Wieringa, & Martens, 2017) หลังจากนั้นจึงใช้สารสกัดจากพืช เช่น ข้าวดำ ข้าวแดง เป็นต้น ในการทดสอบความเป็นพิษในเซลล์ประสาท และฤทธิ์ในการลดการเกิดภาวะเครียดออกซิเดชัน (Vargas et al., 2018)

การทดสอบเอ็มทีที (MTT)

การทดสอบเอ็มทีทีเป็นวิธีการวิเคราะห์เชิงสีในการตรวจวัดการรอดชีวิตของเซลล์ที่ถูกพัฒนาขึ้นเพื่อให้ง่ายต่อการตรวจวัดบนไมโครเวลเพลท เทคนิคนี้จึงถูกนำไปใช้อย่างแพร่หลายสำหรับการตรวจวัดการรอดชีวิตของเซลล์ โดยปริมาณของฟอร์มazan (formazan) จะเป็นตัวบ่งบอกถึงปริมาณของเซลล์ที่มีชีวิต ซึ่งเซลล์ที่ไม่ตายนั้นจะสามารถใช้ NADH ภายในเซลล์ออกซิไดซ์

สารละลายเอ็มที่ที่ดั่งภาพประกอบ 9 โดยที่เอ็มที่ที่มีสีเหลือง แต่เมื่อถูกรีดิวซ์ไปเป็นฟอร์มazan จะมีสีม่วง



ภาพประกอบ 9 โครงสร้างของเอ็มที่และฟอร์มazan

ที่มา: Patpan et al. (2019)

จากการศึกษาเกี่ยวกับการใช้สารออกฤทธิ์ชีวภาพที่สกัดจากรำข้าว เช่น ข้าวเหนียวแดง (red pericarp glutinous rice) ข้าวแดง (*Oryza glaberrima*) ข้าวดำ (*Oryza sativa*-cultivar IAC 600) ในการทดสอบการยับยั้งการตายของเซลล์เพาะเลี้ยงบางชนิด ได้แก่ เซลล์ตับ (H4IIE) และเซลล์ประสาท (SH-SY5Y) พบว่าสารออกฤทธิ์ชีวภาพที่สกัดจากรำข้าวเหล่านี้ มีปริมาณของ γ -oryzanol สูง อีกทั้งสารสกัดจากรำข้าวยังสามารถช่วยลดการตายของเซลล์ตับ และเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยงได้อีกด้วย (Chi, Lee, Kim, Kim, & Chung, 2007; Vargas et al., 2018)

ดังนั้นในการศึกษาเกี่ยวกับการใช้สารออกฤทธิ์ชีวภาพในการทดสอบการยับยั้งการตายของเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง SH-SY5Y จึงให้ความสนใจกับการใช้สารออกฤทธิ์ชีวภาพจากรำข้าวที่มีสารออกฤทธิ์ชีวภาพสูง ได้แก่ พันธุ์ กข 105 เพื่อนำของเหลือจากกระบวนการขัดสี มาก่อให้เกิดประโยชน์ทางการแพทย์ เภสัชกรรม และอาหารเสริม อีกทั้งยังเป็นการเพิ่มมูลค่าให้แก่วัสดุข้าวอีกด้วย

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

อุปกรณ์การทดลอง

1. เครื่อง Spectrophotometer ยี่ห้อ MAPADA รุ่น UV-1200 Spectrophotometer
2. เครื่องอ่านไมโครเพลท ยี่ห้อ Thermo รุ่น 355 Multiskan EX
3. หม้อน้ำแช่แข็งด้วยไอน้ำ ยี่ห้อ ZEALWAY รุ่น GI54TW
4. เครื่องทำความสะอาดด้วยคลื่น ultrasound ยี่ห้อ GT SONIC รุ่น D13
5. ตู้บ่มฆ่าเชื้อแบบเขย่า ยี่ห้อ ZHICHENG รุ่น ZHWY-100H
6. เครื่องเซนติฟิวจ์ ยี่ห้อ HETTICH รุ่น HET-1 1406
7. เครื่องเซนติฟิวจ์ ยี่ห้อ Wisc. รุ่น PC-200
8. คอลัมน์ HPLC ยี่ห้อ KNAUER ขนาด 150 x 4.6 mm Eurospher II 100-5 C18
9. เครื่อง HPLC ยี่ห้อ Agilent รุ่น 1100 series
10. เครื่องวอร์เท็กซ์

สารเคมี

1. Ethanol (CARLO ERBA)
2. ethylacetate (CARLO ERBA)
3. Acetonitrile HPLC grade (CARLO ERBA)
4. Methanol HPLC grade (CARLO ERBA)
5. Isopropanol HPLC grade (CARLO ERBA)
6. Na_2CO_3 (CARLO ERBA)
7. Folin-Ciocalteu Reagent (CARLO ERBA)
8. Gallic acid standard (ACROS ORGANIC)
9. DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl; DPPH) (ALORICH)
10. γ -oryzanol standard (ALORICH)
11. Minimum essential Eagle's medium

12. Ham's nutrient mixture F-12
13. Fetal bovine serum
14. non-essential amino acid
15. Gentamicin
16. MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide)

วิธีการทดลอง

การสกัดสารออกฤทธิ์ชีวภาพจากรำข้าวด้วยการให้ความร้อนแบบ hydrothermal ร่วมกับการใช้คลื่น ultrasound

การแยกรำข้าวออกจากสิ่งเจือปนอื่นๆ

นำรำข้าวที่ได้จากกระบวนการขัดสี ซึ่งเป็นรำข้าวพันธุ์ กข 105 กรองด้วยตะแกรง เพื่อนำรำข้าวและเมล็ดข้าวออก จากนั้นนำผงรำข้าวเก็บในถุงป้องกันความชื้น แล้วเก็บในตู้ทำความเย็นที่มีอุณหภูมิ -20°C ก่อนนำไปสกัดสารออกฤทธิ์ชีวภาพจากรำข้าวเพื่อลดการทำงานของเอนไซม์ไลเปส

การสกัดด้วยการให้ความร้อนแก่รำข้าวแบบ hydrothermal และการใช้คลื่น ultrasound

ในการศึกษาเกี่ยวกับการสกัดสารออกฤทธิ์ชีวภาพจากรำข้าวด้วยการให้ความร้อนแบบ hydrothermal ร่วมกับการใช้คลื่น ultrasound ผู้วิจัยได้ทำการศึกษาวิธีการสกัดที่แตกต่างกัน 4 รูปแบบได้แก่ การสกัดด้วยการให้ความร้อนแบบ hydrothermal ร่วมกับการใช้คลื่น ultrasound การสกัดด้วยการให้ความร้อนแบบ hydrothermal การสกัดด้วยการใช้คลื่น ultrasound และการสกัดด้วยการใช้ตัวทำละลายเพื่อใช้เป็นชุดการทดลองควบคุม รวมถึงใช้ตัวทำละลายที่แตกต่างกันสองชนิดได้แก่ ethanol และ ethylacetate

- การสกัดด้วยการให้ความร้อนแบบ hydrothermal ร่วมกับการใช้คลื่น ultrasound

ชั่งรำข้าวน้ำหนัก 10 g ใส่ขวดรูปชมพู่ แล้วเติมน้ำกลั่น 20 mL แล้วปิดฝาขวดด้วยแผ่นพาราฟิล์มและแผ่นอลูมิเนียมฟรอยด์ จากนั้นให้ความร้อนแก่รำข้าวแบบ hydrothermal ด้วยหม้อหนึ่งความดัน โดยใช้อุณหภูมิ 121°C ความดัน 15 psi โดยคงสภาวะดังกล่าว 20 นาที แล้วจึงนำรำข้าวที่ขึ้นอบที่อุณหภูมิ 60°C ด้วยตู้อบลมร้อน 4 ชั่วโมง เพื่อกำจัด

ความชื้นในรำข้าวก่อนเติมเต็มด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ 50 mL ก่อนนำไปสกัดด้วยการใช้คลื่น ultrasound 60 นาที โดยตั้งอุณหภูมิของอ่างที่ 51°C เมื่อสกัดโดยการใช้น้ำคลื่น ultrasound เสร็จจึงกรองสารสกัดออกจากรำข้าวด้วยกระดาษกรองแล้วนำสารสกัดไปกำจัดตัวทำละลายอินทรีย์แล้วเก็บสารสกัดที่เหลือไว้ที่ความเย็นประมาณ 4°C ก่อนนำไปทำการวิเคราะห์

- การสกัดด้วยการให้ความร้อนแบบ hydrothermal

ซึ่งรำข้าวน้ำหนัก 10 g ใส่ขวดรูปชมพู่ แล้วเติมน้ำกลั่น 20 mL แล้วปิดฝาขวดด้วยแผ่นพาราฟิล์มและแผ่นอลูมิเนียมฟรอยด์ จากนั้นให้ความร้อนแก่รำข้าวแบบ hydrothermal ด้วยหม้อน้ำความดัน โดยใช้อุณหภูมิ 121°C ความดัน 15 psi โดยคงสภาวะดังกล่าว 20 นาที แล้วจึงนำรำข้าวที่ขึ้นอบที่อุณหภูมิ 60°C ด้วยตู้อบลมร้อน 4 ชั่วโมงเพื่อกำจัดความชื้นในรำข้าวแล้วเติมด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ 50 mL ก่อนนำไปสกัดด้วยการใช้เครื่องเขย่า 60 นาที เมื่อสกัดโดยการใช้น้ำคลื่น ultrasound เสร็จจึงกรองสารสกัดออกจากรำข้าวด้วยกระดาษกรองแล้วนำสารสกัดไปกำจัดตัวทำละลายอินทรีย์ แล้วเก็บสารสกัดที่เหลือไว้ที่ความเย็นประมาณ 4°C ก่อนนำไปทำการวิเคราะห์

- การสกัดด้วยการใช้คลื่น ultrasound

ซึ่งรำข้าวน้ำหนัก 10 g ใส่ขวดรูปชมพู่ แล้วเติมน้ำกลั่น 20 mL แล้วนำรำข้าวที่เปียกอบที่อุณหภูมิ 60°C ด้วยตู้อบลมร้อน 4 ชั่วโมง เพื่อกำจัดความชื้นในรำข้าว จากนั้นเติมด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ 50 mL แล้วปิดฝาขวดด้วยแผ่นพาราฟิล์มและแผ่นอลูมิเนียมฟรอยด์ ก่อนนำไปสกัดด้วยการใช้คลื่น ultrasound 60 นาที โดยตั้งอุณหภูมิของอ่างที่ 51°C เมื่อสกัดโดยการใช้น้ำคลื่น ultrasound เสร็จจึงกรองสารสกัดออกจากรำข้าวด้วยกระดาษกรองแล้วนำสารสกัดไปกำจัดตัวทำละลายอินทรีย์ แล้วเก็บสารสกัดที่เหลือไว้ที่ความเย็นประมาณ 4°C ก่อนนำไปทำการวิเคราะห์

- การสกัดด้วยตัวทำละลายเพื่อใช้เป็นชุดการทดลองควบคุม

ซึ่งรำข้าวน้ำหนัก 10 g ใส่ขวดรูปชมพู่ แล้วเติมน้ำกลั่น 20 mL แล้วนำรำข้าวที่เปียกอบที่อุณหภูมิ 60°C ด้วยตู้อบลมร้อน 4 ชั่วโมง เพื่อกำจัดความชื้นในรำข้าว จากนั้นเติมด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ 50 mL แล้วปิดฝาขวดด้วยแผ่นพาราฟิล์มและแผ่นอลูมิเนียมฟรอยด์ ก่อนนำไปสกัดด้วยการใช้เครื่องเขย่า 60 นาที เมื่อสกัดเสร็จจึงกรองสารสกัดออกจากรำข้าวด้วยกระดาษกรองแล้วนำสารสกัดไปกำจัดตัวทำละลายอินทรีย์ แล้วเก็บสารสกัดที่เหลือไว้ที่ความเย็นประมาณ 4°C ก่อนนำไปทำการวิเคราะห์

การวิเคราะห์สารออกฤทธิ์ชีวภาพในรำข้าวด้วยวิธีการทดสอบ Folin-Ciocalteu และการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH

การทดสอบ Folin-Ciocalteu

การหาปริมาณของ phenolic acid ใช้วิธีของ Ainsworth et al. (2007) ซึ่งทำการปรับเปลี่ยนวิธีการทดลองตามความเหมาะสม โดยเตรียมสารสกัดจากรำข้าวละลายใน ethanol เข้มข้น 20 mg/mL ปริมาตร 100 μ L จากนั้นเติมสารละลาย Folin-Ciocalteu จำนวน 200 μ L แล้วนำไปออร์เทิกประมาณ 3 นาที ก่อนเติมสารละลาย 7.5% (โดย m/v) Na_2CO_3 800 μ L แล้วบ่มไว้ 30 นาที เมื่อครบแล้วจึงวัดสเปกโตรที่ 765 nm โดยใช้ Blank เป็น ethanol และเปรียบเทียบปริมาณของ phenolic acid ในสารตัวอย่างโดยเปรียบเทียบกับสารละลายมาตรฐาน gallic acid โดยการสร้างกราฟมาตรฐานความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงและความเข้มข้นของสารมาตรฐาน gallic acid โดยใช้ความเข้มข้น 1.000, 0.500, 0.250, 0.125, 0.063, 0.031 และ 0.016 mg/mL แล้วรายงานปริมาณของ phenolic acid ของสารสกัดในหน่วย mg GAE/g

การหาฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH

การหาฤทธิ์การยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH ใช้วิธีการของ Chen et al. (2013) ซึ่งทำการปรับเปลี่ยนวิธีการทดลองตามความเหมาะสม โดยเตรียมสารสกัดจากรำข้าวตัวอย่างที่มีความเข้มข้นต่างกัน 5 ความเข้มข้นได้แก่ 20, 10, 5, 2.5 และ 1.25 mg/mL ในไมโครเวลเพลท หลุมละ 100 μ L แล้วเติมสารละลาย DPPH ที่มีความเข้มข้น 0.2 mM ปริมาตร 100 μ L แล้วบ่มไว้ในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที ก่อนนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายที่ 515 nm แล้วบันทึกผล โดยทำการเตรียมสารละลายไทรอล็อกซ์ที่มีความเข้มข้นแตกต่างกัน 5 ความเข้มข้น เพื่อใช้เปรียบเทียบและสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสกัดตัวอย่างและคำนวณร้อยละการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH ด้วยสมการ (1)

เมื่อคำนวณร้อยละการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH แล้ว จะใช้โปรแกรมปริซึมกราฟแพดในการคำนวณค่า EC_{50} เพื่อใช้ในการเปรียบเทียบฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของสารสกัดจากรำข้าว โดยใช้ฟังก์ชันการวิเคราะห์แบบการถดถอยที่ไม่เป็นเชิงเส้น (Non-linear regression) แบบอสมมาตร 5 พารามิเตอร์

การวิเคราะห์ปริมาณ γ -oryzanol ด้วยเทคนิค HPLC

การเตรียมสารมาตรฐานและการทำกราฟมาตรฐานของแกมมาออร์ิซานอล

การวิเคราะห์ปริมาณของ γ -oryzanol ใช้วิธีการของ Sakunpak et al. (2014) ซึ่งทำการปรับเปลี่ยนวิธีการทดลองตามความเหมาะสม โดยเตรียมสารละลายมาตรฐาน γ -oryzanol ความเข้มข้น 1 mg/mL โดยชั่งสารมาตรฐาน 25 mg แล้วปรับปริมาตรด้วย isopropanol (HPLC grade) แล้วเจือจางสารละลายตัวอย่างอีก 5 ความเข้มข้นได้แก่ 0.500, 0.250, 0.125, 0.063 และ 0.031 mg/mL แล้วกรองผ่านละอองในสารละลายมาตรฐาน γ -oryzanol ด้วยไซริงค์ฟิลเตอร์สำหรับงาน HPLC ก่อนนำไปวิเคราะห์

ปริมาณของ γ -oryzanol ในแต่ละความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานจะถูกวิเคราะห์โดยใช้พื้นที่พีคของโครมาโตแกรมในการเทียบกับปริมาณของ γ -oryzanol โดยในการวิเคราะห์จะใช้คอลัมน์ชนิด C-18 (ขนาดคอลัมน์ 4.6x150 mm, ขนาดอนุภาค 5 μ m) โดยใช้เฟสเคลื่อนที่ 2 ชนิดได้แก่ methanol และ acetonitrile โดยใช้โหมดการชะแบบอัตราส่วนเฟสเคลื่อนที่คงที่ (isocratic elution) ความเร็วของโมบายล์เฟสอยู่ที่ 1.4 mL/min และตรวจวัดปริมาณของ γ -oryzanol ด้วยตัวตรวจจับสัญญาณแบบ DAD-detector ที่ 325 nm

การเตรียมสารตัวอย่างและการวิเคราะห์ปริมาณ γ -oryzanol

เตรียมสารละลายตัวอย่างความเข้มข้นประมาณ 12.5 mg/mL โดยละลายใน isopropanol จากนั้นจึงกรองผ่านละอองในสารละลายตัวอย่างด้วยไซริงค์ฟิลเตอร์สำหรับงาน HPLC ก่อนนำไปวิเคราะห์

ปริมาณ γ -oryzanol ในสารละลายตัวอย่างจะถูกวิเคราะห์โดยใช้พื้นที่พีคของโครมาโตแกรมในการเทียบกับปริมาณ γ -oryzanol ของกราฟมาตรฐาน γ -oryzanol โดยในการวิเคราะห์สารตัวอย่างจะใช้คอลัมน์ชนิด C-18 (ขนาดคอลัมน์ 4.6x150 mm, ขนาดอนุภาค 5 μ m) โดยใช้เฟสเคลื่อนที่ 2 ชนิดได้แก่ methanol และ acetonitrile โดยใช้โหมดการชะแบบอัตราส่วนเฟสเคลื่อนที่คงที่ (isocratic elution) ความเร็วของโมบายล์เฟสอยู่ที่ 1.4 mL/min อุณหภูมิของคอลัมน์ 30 °C และตรวจวัดปริมาณของ γ -oryzanol ด้วยตัวตรวจจับสัญญาณแบบ DAD-detector ที่ 325 nm

การทดสอบการออกฤทธิ์ของน้ำมันรำข้าวต่อการต้านภาวะเครียดออกซิเดชันของเซลล์ประสาทด้วยวิธีการ MTT assay

การทดสอบการต้านภาวะเครียดออกซิเดชันในเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง SH-SY5Y ทำได้โดยการวัดร้อยละการรอดชีวิตของเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง SH-SY5Y โดยใช้วิธีของ Ismail et al. (2014) ซึ่งแบ่งขั้นตอนการทำและปรับเปลี่ยนการทดลองตามความเหมาะสมดังนี้

การเตรียมสารละลาย MTT

เตรียมสารละลาย MTT เข้มข้น 5 mg/mL เพื่อใช้เป็น stock solution โดยการเตรียม MTT 150 mg ใน 0.1 M PBS pH 7.4 ที่ปลอดเชื้อแล้ว ปริมาตร 30 mL แล้วกรองสารละลาย MTT ผ่านแผ่นกรองที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของรู 0.2 μm ในหลอดทดลองที่ปลอดเชื้อ จากนั้นจึงเก็บสารละลายโดยการห่อแผ่นอลูมิเนียมฟลอยด์ในตู้เย็น

การเตรียมสารละลาย 0.4 N HCl

เตรียมสารละลาย โดยปิเปต HCl 1 N ปริมาตร 4 mL เจือจางในตัวทำละลายไอโซโพรพานอล 96 mL จะได้ปริมาณทั้งหมด 100 mL และความเข้มข้น 0.1 N HCl ใน isopropanol (โดย v/v)

การเลี้ยงเซลล์ประสาท SH-SY5Y

เซลล์ประสาทมนุษย์ชนิด SH-SY5Y จะถูกเพาะเลี้ยงโดยนำเซลล์ SH-SY5Y มาเพาะเลี้ยงใน T-75 flask ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ (complete media) ปริมาตร 10 mL สูตร Minimum Essential Medium (MEM) ที่มีส่วนผสมของ Ham's f-12 45%, fetal bovine serum 10% และยาปฏิชีวนะ penicillin/streptomycin 100 unit/mL แล้วนำไปเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 °C ภายใต้สภาวะควบคุมก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ (CO₂) 5% และความชื้นสัมพัทธ์ในบรรยากาศ 95% ในตู้เลี้ยงเซลล์ โดยอาหารจะถูกเปลี่ยนทุก ๆ 2-3 วัน เมื่อเซลล์เจริญจนมีความหนาแน่นประมาณ 80-90% ของ flask จึงทำการสับแบ่งเซลล์ (subculture) เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

การสับแบ่งเซลล์โดยวิธีการ Trypsinization เพื่อใช้ในการทดสอบการออกฤทธิ์ของน้ำมันรำข้าวต่ออัตราการอยู่รอดของเซลล์ด้วยวิธีการ MTT assay

นำอาหารเลี้ยงเซลล์เก่าออกด้วยปิเปตที่ปลอดเชื้อแล้วเติม 0.1 M PBS pH 7.4 ที่ปลอดเชื้อแล้วลงไปเพื่อล้าง FBS ในอาหารเลี้ยงเชื้อเก่า แล้วจึงเติม trypsin-EDTA 0.25% ปริมาตร 1.5 mL ลงไปใน flask แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C ภายใต้สภาวะควบคุมก๊าซ

คาร์บอนไดออกไซด์ (CO₂) 5% และความชื้นสัมพัทธ์ในบรรยากาศ 95% ในตู้เลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 1-5 นาที จากนั้นเมื่อเซลล์เริ่มหดและหลุดออกมาจากพื้นผิวของ flask แล้ว เติมหอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีส่วนผสมของ FBS เข้าไปเพื่อหยุดปฏิกิริยาของทริปซิน ใช้ปิเปตสารละลายเข้าออกเพื่อชะล้างเซลล์ที่ผิวของ flask จากนั้นจึงนำเซลล์ที่แขวนลอยลงใน conical tube ขนาด 15 mL แล้วนำไปเซนตริฟิวจ์ที่ 1500 RPM 5 นาที แล้วจึงนำส่วนใสทิ้งเพื่อแยกเซลล์ออกจากอาหารที่มีเอนไซม์ trypsin จากนั้นจึงเติมหอาหารเลี้ยงเซลล์ลงไป 1 mL

นำเซลล์แขวนลอยมา 5 μ L ผสมกับทริปเฟน บลู 45 μ L จะได้ dilution factor เท่ากับ 10 แล้วใช้ปิเปตผสมสารละลายให้ทั่วกันดีใน microcentrifuge tube แล้วนำไปนับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตด้วย Hematocytometer จากนั้นจึงคำนวณหาความเข้มข้นของเซลล์ทั้งหมดต่อปริมาตร 1 mL โดยใช้สมการ (3)

$$\text{ความเข้มข้นของเซลล์ (cells/mL)} = \bar{X} \times 10 \times 10^4$$

ซึ่ง $\bar{X}$ คือ จำนวนเซลล์เฉลี่ยต่อจำนวนช่องที่นับของ hematocytometer

สมการ 3 การคำนวณความเข้มข้นของเซลล์เมื่อนับด้วย hematocytometer

10 คือ dilution factor ของ ปริมาณเซลล์ต่อปริมาตรทั้งหมดที่ผสมกับ trypan blue หาได้จาก

$$\text{Dilution factor} = (\text{Cells} + \text{trypan blue}) / \text{Cells}$$

$$\text{Dilution factor} = (5 + 45) / 5$$

$$\text{Dilution factor} = 10$$

10⁴ คือ factor ของ hematocytometer ที่ใช้เพื่อแปลงมาเป็น ปริมาณของเซลล์ ต่อ 1 mL (cells/mL)

เมื่อได้ค่าความเข้มข้นของเซลล์ (cells/mL) แล้วนำค่าที่ได้มาคำนวณเพื่อใช้ในการเพาะเลี้ยง (seed cells) ในไมโครเวลเพลท ปริมาตร 200 μL ต่อหลุม โดยมีปริมาณเซลล์เริ่มต้น 40,000 เซลล์ต่อหลุม เพาะเลี้ยงเซลล์เริ่มต้นลงใน 96 wells เพลท แล้วนำไปเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37°C ภายใต้สภาวะควบคุมก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2) 5% และความชื้นสัมพัทธ์ในบรรยากาศ 95% ในตู้เลี้ยงเซลล์ต่ออีก 1 วัน เพื่อใช้ในการทดสอบการออกฤทธิ์ของน้ำมันรำข้าว ต่ออัตราการอยู่รอดของเซลล์ด้วยวิธีการ MTT assay

การประเมินภาวะเครียดออกซิเดชันในประสาทเพาะเลี้ยง SH-SY5Y ด้วยการทดสอบเอ็มทีที

ดูด medium ที่ใช้เลี้ยงเซลล์ออกจากไมโครเวลเพลท เดิมทิ้งแล้วเติมสารละลายตัวอย่างจากสารสกัดรำข้าว 3 ความเข้มข้นได้แก่ 2, 20 และ 200 $\mu\text{g/mL}$ ใน complete media ที่มีส่วนผสมของ H_2O_2 250 μM ปริมาตร 200 μL ต่อหลุม จากความเข้มข้นมากไปน้อย ซึ่ง complete media และ H_2O_2 250 μM จะถูกใช้เป็นกลุ่มควบคุมเพื่อเปรียบเทียบกับผลการทดสอบการออกฤทธิ์ของสารสกัดจากรำข้าว

จากนั้นเซลล์จะถูกบ่มสภาวะเดิม ในตู้เลี้ยงเซลล์อีก 1 วัน เมื่อเวลาครบแล้ว จากนั้นจึงดูดอาหารเลี้ยงเชื้อเก่าทิ้ง แล้วเติม 0.1 M PBS ที่ปลอดเชื้อแล้วลงไป 200 μL ต่อหลุม เพื่อล้าง ก่อนเติมสารละลาย MTT เข้มข้น 0.5 mg/mL ใน 0.1 M PBS ปริมาตร 100 μL ต่อหลุม แล้วนำไปบ่มที่ในตู้เลี้ยงเซลล์อีก 4 ชั่วโมง จากนั้นดูดสารละลาย MTT ทิ้งแล้วเติม 0.04 N HCl ใน isopropanol ปริมาตร 100 μL ต่อหลุม แล้วนำไปบ่มต่อไปตู้เลี้ยงเซลล์ 15 นาที แล้วนำไปวัดสเปกโตรด้วย microplate reader ที่ 590 nm แล้วใช้สมการ 2 หน้า 27 ในการคำนวณร้อยละการรอดชีวิตของเซลล์ประสาท

บทที่ 4

ผลการศึกษา

การสกัดสารออกฤทธิ์ชีวภาพจากรำข้าวด้วยการให้ความร้อนแบบ hydrothermal ร่วมกับการใช้คลื่น ultrasound ในตัวทำละลายที่ต่างกัน

ปริมาณ phenolic acid ทั้งหมดจากสารสกัดรำข้าว

จากผลการทดลองพบว่าปริมาณของ phenolic acid เป็นไปตามตาราง 8 โดยสารสกัดที่ใช้ ethanol เป็นตัวทำละลาย โดยผ่านการสกัดแบบ hydrothermal ร่วมกับการใช้คลื่น ultrasound สามารถสกัด phenolic acid ได้ในปริมาณที่สูงที่สุด ($p < 0.05$) 3.21 mg GAE/g โดยเมื่อเปรียบเทียบปริมาณของ phenolic acid ที่ให้ความร้อนในกลุ่มควบคุม กลุ่มที่ให้ความร้อนแบบ ultrasound กลุ่มที่ให้ความร้อนแบบ hydrothermal และในทางเดียวกันกลุ่มที่ใช้ ethylacetate เป็นตัวทำละลาย ปริมาณ phenolic acid จากการสกัดโดยใช้คลื่น ultrasound การให้ความร้อนแบบ hydrothermal และการให้ความร้อนแบบ hydrothermal ร่วมกับการใช้คลื่น ultrasound การให้ความร้อนทั้ง 3 รูปแบบสามารถสกัดปริมาณ phenolic acid สูงกว่า ($p < 0.05$) ชุดควบคุมที่ใช้ ethylacetate เป็นตัวทำละลายเช่นกัน

นอกจากผลการทดลองเมื่อเปรียบเทียบตัวทำละลาย พบว่าการใช้ ethanol ในการสกัดสารจะได้ปริมาณของ phenolic acid ที่มากกว่า ($p < 0.05$) การใช้ ethylacetate เป็นตัวทำละลาย

ตาราง 8 ปริมาณของ phenolic acid (mgGAE/g)) จากวิธีการสกัดโดยการให้ความร้อน และการใช้ตัวทำละลายที่แตกต่างกัน

วิธีการให้ความร้อน	ปริมาณ phenolic acid (mgGAE/g) ($\bar{X} \pm SE$)	
	ชนิดของตัวทำละลาย	
	Ethanol	Ethylacetate
ควบคุม	1.83 ± 0.15^b	0.94 ± 0.02^b
ใช้คลื่น ultrasound	2.17 ± 0.21	1.83 ± 0.10^a
ให้ความร้อนแบบ hydrothermal	2.40 ± 0.44^b	1.26 ± 0.07^{ab}
hydrothermal และคลื่น ultrasound	3.21 ± 0.42^{ab}	1.95 ± 0.33^{ab}

ตัวอักษร a แทนความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05) โดยวิธี t-test ในการเปรียบเทียบวิธีการให้ความร้อนแบบต่างๆกับแบบควบคุม

ตัวอักษร b แทนความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05) โดยวิธี t-test ในการเปรียบเทียบชนิดของตัวทำละลาย

ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH จากสารสกัดรำข้าว

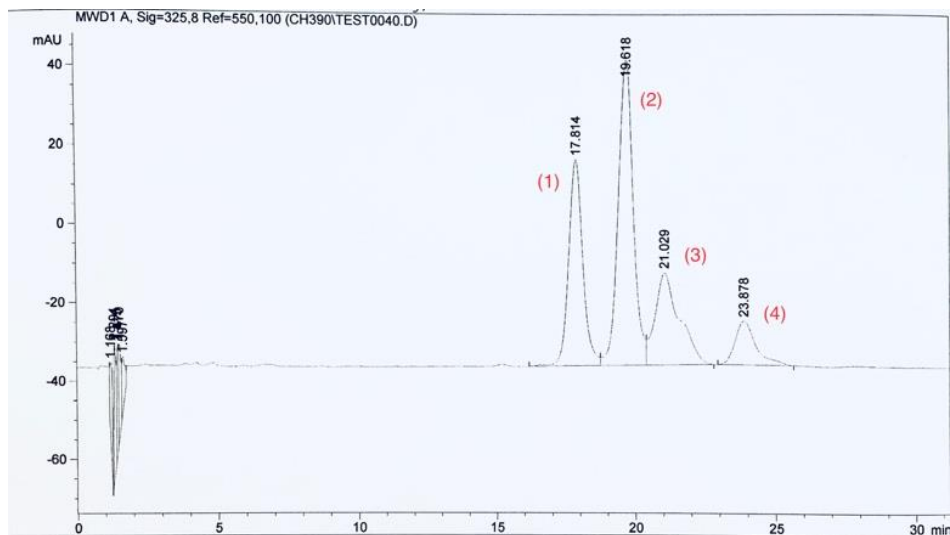
จากการทดลองนำสารสกัดจากรำข้าวที่ถูกสกัดด้วยตัวทำละลายต่างชนิด และวิธีการให้ความร้อนที่ต่างกันมาทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ DPPH โดยเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมดังตาราง 9 พบว่าความเข้มข้นของสารสกัดที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH ร้อยละ 50 (EC_{50}) ของสารสกัดจากรำข้าวที่ใช้ ethanol เป็นตัวทำละลาย และให้ความร้อนแบบ hydrothermal ร่วมกับคลื่น ultrasound มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ดีที่สุด โดยมีค่า EC_{50} ต่ำสุดที่ 0.53 mg/mL ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่ส่งผลยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH ที่มีความเข้มข้น 0.2 mM ได้ร้อยละ 50 โดยเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มตัวทำละลายเดียวกันที่ให้ความร้อนในรูปแบบที่ต่างกัน กลุ่มควบคุม กลุ่มที่ให้ความร้อนแบบ ultrasound และกลุ่มที่ให้ความร้อนแบบ hydrothermal มีค่า EC_{50} 1.01, 0.84 และ 0.71 mg/mL ตามลำดับ ซึ่งจะเห็นได้ว่าการให้ความร้อนแบบ hydrothermal ร่วมกับการใช้คลื่น ultrasound มีประสิทธิภาพสูงที่สุดเมื่อเทียบกับกลุ่มตัวทำละลาย ethanol เช่นเดียวกับในกลุ่มที่ใช้ตัวทำละลาย ethylacetate โดยการให้ความร้อนแบบ hydrothermal ร่วมกับการใช้คลื่น ultrasound มีค่า EC_{50} 0.87 ในขณะที่กลุ่มควบคุม กลุ่มที่ให้ความร้อนแบบ ultrasound และกลุ่มที่ให้ความร้อนแบบ hydrothermal มีค่า EC_{50} 1.25, 0.99 และ 1.05 mg/mL ตามลำดับ ซึ่งมีแนวโน้มเช่นเดียวกับกลุ่มตัวทำละลาย ethanol ในทางเดียวกัน หากเปรียบเทียบตัวทำละลายที่ต่างชนิดกันโดยที่ใช้รูปแบบการให้ความร้อนเดียวกันพบว่าสารสกัดที่สกัดโดยใช้ ethanol เป็นตัวทำละลายมีค่า EC_{50} ต่ำกว่าสารสกัดที่ใช้ ethylacetate เป็นตัวทำละลาย ซึ่งแสดงให้เห็นว่าการใช้ ethanol โดยให้ความร้อนแบบ hydrothermal ร่วมกับการใช้คลื่น ultrasound มีประสิทธิภาพสูงที่สุดในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH นอกจากนี้แนวโน้มในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ยังมีความสัมพันธ์กับปริมาณของ phenolic acid ตามตาราง 8 กล่าวคือ ปริมาณของ phenolic acid มากขึ้นจะส่งผลให้สารสกัดมีประสิทธิภาพในการยับยั้งอนุมูลอิสระที่มากขึ้นด้วยเช่นกัน

ตาราง 9 ค่า EC_{50} ของสารสกัดจากรำข้าวที่ผ่านการการสกัดโดยตัวทำละลาย ethanol และ ethylacetate โดยวิธีการให้ความร้อนที่ต่างกัน

วิธีการให้ความร้อน	EC_{50} (mg/mL)	
	ชนิดของตัวทำละลาย	
	Ethanol	Ethylacetate
ควบคุม	1.01	1.25
คลื่น ultrasound	0.84	0.99
ให้ความร้อนแบบ hydrothermal	0.71	1.05
hydrothermal และคลื่น ultrasound	0.53	0.87

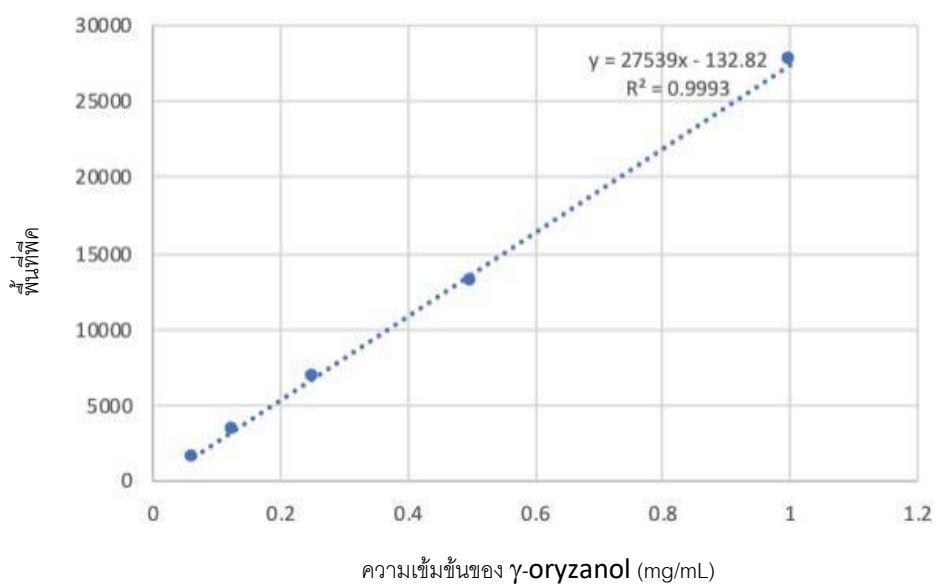
ปริมาณ γ -oryzanol ด้วยเทคนิคโครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง

จากการวิเคราะห์เพื่อหาปริมาณของ γ -oryzanol ในสารสกัดจากรำข้าวที่ผ่านการสกัดโดยใช้ตัวทำละลายต่างชนิดกัน และให้ความร้อนในรูปแบบต่างๆ โดยใช้เทคนิคโครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง ลักษณะของโครมาโตแกรมที่ได้จากการวิเคราะห์ปริมาณของสารมาตรฐาน γ -oryzanol มีลักษณะดังภาพประกอบ 10 โดยโครมาโตแกรมจะประกอบไปด้วยพีคของสาร 4 ชนิดได้แก่ (1) ไชโคลฮาทีนิลเฟอรูเลท (2) 24-เมทิลไนไชโคลฮาทีนิลเฟอรูเลท (3) แคมพีสเตอริลเฟอรูเลท และ (4) β -ไฮโดรสเตอริลเฟอรูเลท ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองในการวิเคราะห์ปริมาณ γ -oryzanol ในข้าวไทย 5 สายพันธุ์ของ Sakunpak et al. (2014) และปริมาณ γ -oryzanol ในสารตัวอย่างจะถูกเทียบจากกราฟมาตรฐานของ γ -oryzanol ดังภาพประกอบ 11 โดยปริมาณ γ -oryzanol จะคำนวณจากผลรวมค่าเฉลี่ยของปริมาณของสารทั้ง 4 ชนิด ซึ่งปริมาณของ γ -oryzanol เป็นไปดังตาราง 10



ภาพประกอบ 10 chromatogram ของสารมาตรฐาน γ -oryzanol

ความสัมพันธ์ระหว่างพื้นที่ที่ฟิคและความเข้มข้น γ -oryzanol



ภาพประกอบ 11 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างพื้นที่ที่ฟิคและความเข้มข้น γ -oryzanol

ตาราง 10 ปริมาณของ (1) ไฮโดรอลิกทีนิลเฟอรูเลท (2) 24-เมทิลไฮโดรอลิกทีนิลเฟอรูเลท (3) แคมพีลสเตริลเฟอรูเลท (4) *D*-ไฮโดรเตอริลเฟอรูเลท และ ปริมาณของ γ -oryzanol (mg/g) ในสารสกัดจากรำข้าวที่สกัดโดยการให้ความร้อน และการใช้ตัวทำละลายที่ต่างกัน

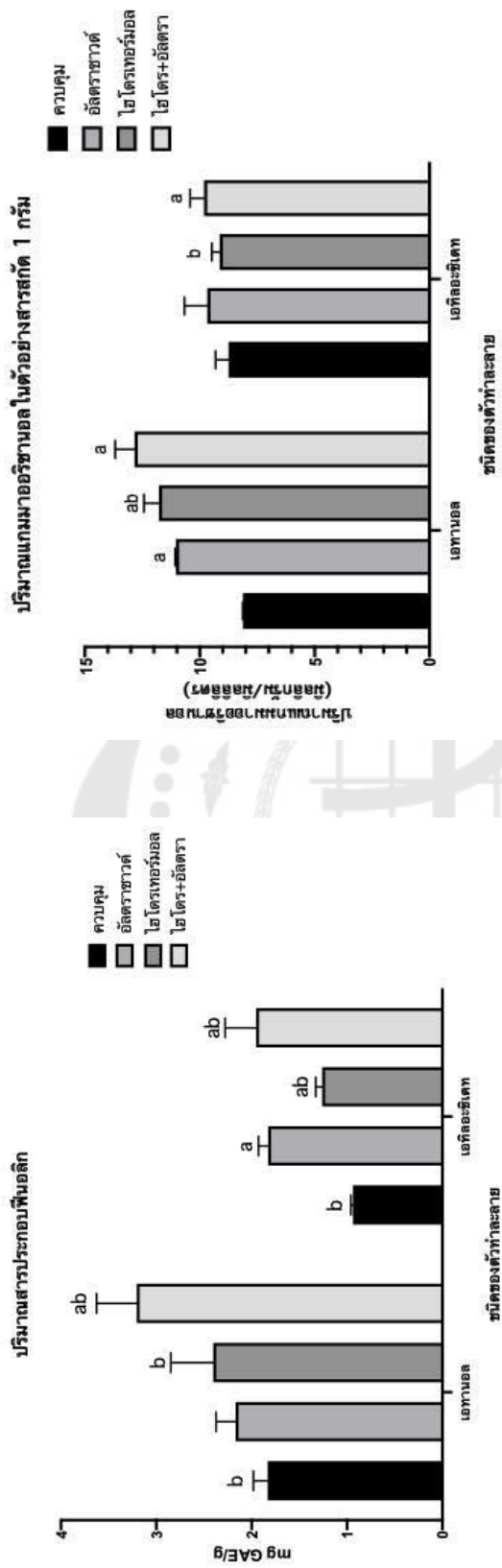
ตัวทำละลาย	รูปแบบการให้ความร้อน	ปริมาณของสาร(mg/g)				ปริมาณรวม (mg/g) ($\bar{x} \pm SE$)
		(1)	(2)	(3)	(4)	
Ethanol	ควบคุม	0.716 $\pm$ 0.202	4.057 $\pm$ 0.876	2.191 $\pm$ 0.362	1.161 $\pm$ 0.275	8.125 $\pm$ 0.505
	คลื่น ultrasound	0.800 $\pm$ 0.003	5.534 $\pm$ 0.136	2.940 $\pm$ 0.209	1.750 $\pm$ 0.064	11.024 $\pm$ 0.035 ^a
	hydrothermal	0.720 $\pm$ 0.022	5.387 $\pm$ 0.040	3.569 $\pm$ 0.157	2.126 $\pm$ 0.427	11.802 $\pm$ 0.651 ^{ab}
	hydrothermal และคลื่น ultrasound	0.732 $\pm$ 0.042	6.339 $\pm$ 0.321	3.724 $\pm$ 0.272	2.165 $\pm$ 0.043	12.960 $\pm$ 0.834 ^a
Ethylacetate	ควบคุม	0.179 $\pm$ 0.058	4.538 $\pm$ 0.360	2.990 $\pm$ 0.210	0.961 $\pm$ 0.469	8.668 $\pm$ 0.559
	คลื่น ultrasound	0.329 $\pm$ 0.103	5.169 $\pm$ 0.710	2.884 $\pm$ 0.347	1.532 $\pm$ 0.162	9.914 $\pm$ 0.990
	hydrothermal	0.461 $\pm$ 0.110	5.268 $\pm$ 0.941	3.226 $\pm$ 0.420	1.644 $\pm$ 0.209	10.599 $\pm$ 0.339 ^b
	hydrothermal และคลื่น ultrasound	0.259 $\pm$ 0.078	4.964 $\pm$ 0.544	3.355 $\pm$ 0.373	1.572 $\pm$ 0.091	10.150 $\pm$ 0.0601 ^a

ตัวอักษร a แทนความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05) โดยวิธี t-test ในการเปรียบเทียบวิธีการให้ความร้อนแบบต่างๆกับแบบควบคุม

ตัวอักษร b แทนความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05) โดยวิธี t-test ในการเปรียบเทียบชนิดของตัวทำละลาย

จากปริมาณ γ -oryzanol (ตาราง 10) ในสารสกัดจากรำข้าวที่ผ่านการให้ความร้อนรูปแบบที่ต่าง ๆ โดยที่ใช้ ethanol เป็นตัวทำละลาย พบว่าปริมาณ γ -oryzanol ในสารสกัดในชุดควบคุม, ชุด ultrasound, ชุด hydrothermal และชุด hydrothermal ร่วมกับ ultrasound มีปริมาณ γ -oryzanol 8.125 11.024 11.802 และ 12.960 mg/g ตามลำดับ ในขณะที่ชุดสารสกัดจากรำข้าวที่ผ่านการให้ความร้อนรูปแบบเดียวกัน แต่ใช้ ethylacetate เป็นตัวทำละลายมีค่าเฉลี่ยปริมาณ γ -oryzanol ในสารสกัดในชุดควบคุม, ชุด ultrasound, ชุด hydrothermal และชุด hydrothermal ร่วมกับ ultrasound 8.668 9.914 10.599 และ 10.105 mg/g ตามลำดับ จากผลการทดลองเมื่อเปรียบเทียบปริมาณของ γ -oryzanol ภายในกลุ่มตัวทำละลาย ethanol โดยให้ความร้อนในรูปแบบที่แตกต่างกัน พบว่าปริมาณ γ -oryzanol ในสารสกัดที่ผ่านการสกัดโดยใช้คลื่น ultrasound การให้ความร้อนแบบ hydrothermal และการให้ความร้อนแบบ hydrothermal ร่วมกับการใช้คลื่น ultrasound สูงกว่า ($p < 0.05$) กลุ่มควบคุม และจากการทดสอบค่าเฉลี่ยของปริมาณ γ -oryzanol ในสารสกัดที่สกัดโดยการให้ความร้อนแบบเดียวกันแต่ตัวทำละลายต่างกัน พบว่าชุดที่ใช้ตัวทำละลาย ethanol มีปริมาณ γ -oryzanol ไม่แตกต่าง ($p > 0.05$) กับการใช้ ethylacetate มีเพียงการให้ความร้อนแบบ hydrothermal เพียงอย่างเดียวเท่านั้นที่ปริมาณของ γ -oryzanol จากตัวทำละลายที่แตกต่างกัน ($p < 0.05$)

แต่อย่างไรก็ตามจากผลการศึกษาปริมาณของ phenolic acid และปริมาณของ γ -oryzanol ในสารสกัดมีความสอดคล้องไปในทิศทางเดียวกัน (ภาพประกอบ 12ก และ 12ข) กล่าวคือการใช้ ethanol เป็นตัวทำละลาย โดยใช้การให้ความร้อนแบบ hydrothermal ร่วมกับการใช้คลื่น ultrasound ทำให้ปริมาณ phenolic acid และ γ -oryzanol มีปริมาณสูงเช่นเดียวกัน อีกทั้งเมื่อพิจารณาร่วมกับประสิทธิภาพในการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH (ตาราง 9) พบว่าสารสกัดที่สกัดโดยใช้ตัวทำละลาย ethanol โดยใช้การให้ความร้อนแบบ hydrothermal ร่วมกับการใช้คลื่น ultrasound มีประสิทธิภาพสูงที่สุดในการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH



(ก)

(ข)

ภาพประกอบ 12 (ก) ปริมาณของ phenolic acid (mg GAE/g) และ (ข) ปริมาณของ γ -oryzanol (mg/g) ในสารสกัดจากข้าวที่สกัดโดยการให้ความร้อน และการใช้ตัวทำละลายที่ต่างกัน

ตัวอักษร a แทนความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) โดยวิธี t-test ในการเปรียบเทียบวิธีการให้ความร้อนแบบต่างๆกับแบบควบคุม
ตัวอักษร b แทนความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) โดยวิธี t-test ในการเปรียบเทียบชนิดของตัวทำละลาย

การทดสอบการออกฤทธิ์ของสารสกัดจากรำข้าวต่อการต้านภาวะเครียดออกซิเดชันของเซลล์ประสาทด้วยวิธีการ MTT assay

จากการศึกษาการใช้สารสกัดจากรำข้าวต่อการต้านภาวะเครียดออกซิเดชันของเซลล์ประสาทมนุษย์ SH-SY5Y โดยวิธีการทดสอบ MTT พบว่าร้อยละการรอดชีวิตของเซลล์ประสาทที่ถูกเลี้ยงด้วยสารสกัดจากรำข้าวที่ผ่านการสกัดโดยตัวทำละลายต่างชนิดกัน การให้ความร้อนที่แตกต่างกัน และการเลี้ยงเซลล์ประสาทด้วยสารสกัดจากรำข้าวที่มีความเข้มข้นแตกต่างกันเป็นไปดังตาราง 11 ซึ่งจากการเปรียบเทียบผลของการให้ความร้อนในการสกัดที่แตกต่างกันดังภาพประกอบ 13 ซึ่งพบว่าสารสกัดที่สกัดโดยวิธีการให้ความร้อนแบบ hydrothermal ร่วมกับการใช้คลื่น ultrasound ช่วยให้เซลล์ประสาท SH-SY5Y มีร้อยละการรอดชีวิตสูงกว่า ($p < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับชุดทดลองที่เลี้ยงด้วย $250 \mu\text{M H}_2\text{O}_2$ ในขณะที่การเลี้ยงเซลล์ประสาทด้วยสารสกัดที่ผ่านการให้ความร้อนชุดควบคุมไม่ส่งผลแตกต่าง ($p > 0.05$) กับชุดทดลองที่เลี้ยงด้วย $250 \mu\text{M H}_2\text{O}_2$ ในแง่ผลของใช้ตัวทำละลาย ethanol และ ethylacetate ในการสกัดสารออกฤทธิ์ชีวภาพจากรำข้าว จากการเปรียบเทียบร้อยละการรอดชีวิตของเซลล์ประสาทพบว่าการเลี้ยง เซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง SH-SY5Y ด้วยสารสกัดที่ใช้ตัวทำละลาย ethanol และ ethylacetate ไม่แตกต่างกัน ($p > 0.05$)

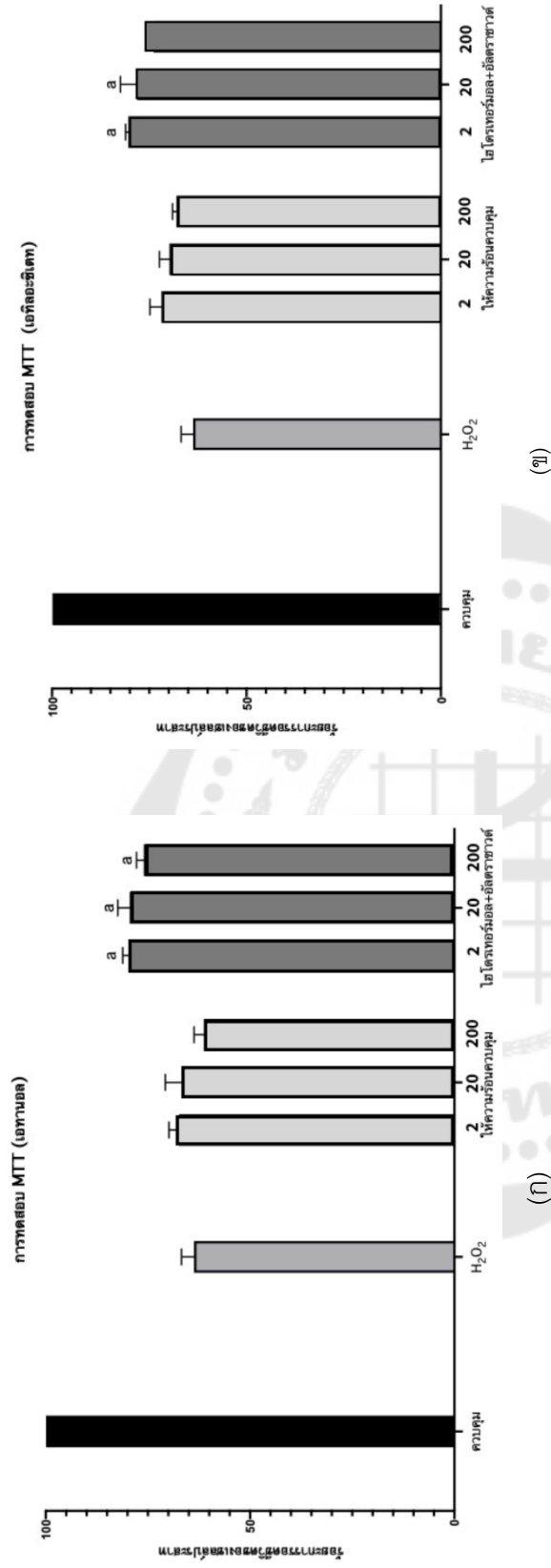
นอกจากผลของตัวทำละลายและการให้ความร้อนแบบ hydrothermal ร่วมกับการใช้คลื่น ultrasound ผู้วิจัยยังได้ศึกษาผลของความเข้มข้นของสารสกัดที่ใช้เลี้ยงกับเซลล์ประสาท (ตาราง 11 และภาพประกอบ 13) โดยความเข้มข้นที่ใช้เลี้ยงสารสกัด 2, 20 และ $200 \mu\text{g/mL}$ จากการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยในการต้านภาวะเครียดออกซิเดชันของสารที่สกัดผ่านการให้ความร้อนในรูปแบบต่างๆ และตัวทำละลายต่างชนิด พบว่า สารสกัดที่มีความเข้มข้น $2 \mu\text{g/mL}$ มีประสิทธิภาพในการต้านภาวะเครียดออกซิเดชันสูงที่สุด ($p < 0.05$)) เมื่อเปรียบกับการเลี้ยงเซลล์ประสาทด้วย $250 \mu\text{M H}_2\text{O}_2$ เพียงอย่างเดียว

ตาราง 11 ร้อยละการรอดชีวิตของเซลล์ประสาท SH-SY5Y จากการเลี้ยงเซลล์ด้วย H₂O₂ และสารสกัดจากรำข้าวที่มีความเข้มข้น 2, 20 และ 200 µg/mL ที่ผ่านการสกัดด้วยตัวทำละลาย ethanol และ ethylacetate โดยใช้วิธีการสกัดแบบให้ความร้อนแบบควบคุม และ hydrothermal ร่วมกับ ultrasound

วิธีการเลี้ยงเซลล์ประสาท	ร้อยละการรอดชีวิตของเซลล์ประสาท ($\bar{X} \pm SE$)	
	Ethanol	ethylacetate
ชุดการทดลองควบคุม	100.00 $\pm$ 0.00	
ชุดการทดลองที่เลี้ยงด้วย H ₂ O ₂	63.74 $\pm$ 3.07	
ควบคุม 2 µg/mL	67.38 $\pm$ 2.48	71.86 $\pm$ 2.97
ควบคุม 20 µg/mL	66.44 $\pm$ 4.32	69.84 $\pm$ 2.58
ควบคุม 200 µg/mL	61.36 $\pm$ 2.37 ^b	68.06 $\pm$ 0.99 ^b
hydrothermal และคลื่น ultrasound 2 µg /mL	79.13 $\pm$ 2.04 ^a	80.40 $\pm$ 0.68 ^a
hydrothermal และคลื่น ultrasound 20 µg /mL	79.47 $\pm$ 2.92 ^a	78.14 $\pm$ 4.30 ^a
hydrothermal และคลื่น ultrasound 200 µg/mL	76.02 $\pm$ 1.78 ^a	73.90 $\pm$ 1.98

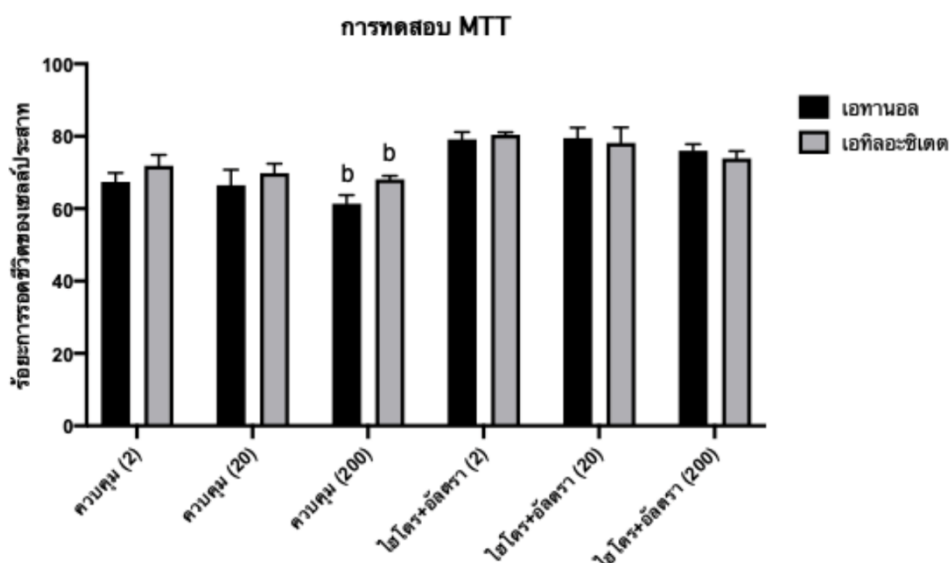
ตัวอักษร a แทนความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05) โดยวิธี t-test ในการเปรียบเทียบรูปแบบการให้ความร้อนแบบควบคุม และการให้ความร้อนแบบ hydrothermal ร่วมกับการใช้คลื่น ultrasound กับชุดทดลองที่เลี้ยงด้วย H₂O₂

ตัวอักษร b แทนความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05) โดยวิธี t-test ในการเปรียบเทียบชนิดของตัวทำละลาย



ภาพประกอบ 13 ร้อยละการรอดชีวิตของเซลล์ประสาท SH-SY5Y จากการเลี้ยงเซลล์ด้วย H₂O₂ และสารสกัดที่ใช้วิธีการสกัดด้วยความร้อนแบบควบคุม และไฮโดรเทอร์มอลร่วมกับ ultrasound โดยที่สารสกัดมีความเข้มข้น 2, 20 และ 200 $\mu\text{g/mL}$

ตัวอักษร a แทนความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) โดยวิธี t-test ในการเปรียบเทียบรูปแบบการให้ความร้อนแบบควบคุม และการให้ความร้อนแบบ hydrothermal ร่วมกับการใช้คลื่น ultrasound กับชุดทดลองที่เลี้ยงด้วย H₂O₂



ภาพประกอบ 14 ร้อยละการรอดชีวิตของเซลล์ประสาท SH-SY5Y จากการเลี้ยงเซลล์ด้วยสารสกัดจากรำข้าวที่ผ่านการสกัดด้วยตัวทำละลาย Ethanol และ ethylacetate โดยใช้วิธีการสกัดแบบให้ความร้อนแบบควบคุม และ hydrothermal ร่วมกับ ultrasound ที่มีความเข้มข้น 2, 20 และ 200 $\mu\text{g/mL}$

ตัวอักษร b แทนความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) โดยวิธี t-test ในการเปรียบเทียบชนิดของตัวทำละลาย

บทที่ 5

สรุป อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

สรุปผลการวิจัย

จากการทดลองในการใช้ตัวทำละลายที่แตกต่างกันอันได้แก่ ethanol และ ethylacetate รวมทั้งการใช้ความร้อนแบบ hydrothermal แก่รำข้าวร่วมกับการสกัดโดยใช้คลื่น ultrasound แล้วทำการประเมินคุณสมบัติของสารสกัดจากรำข้าวโดยใช้การทดสอบ Folin-Ciocalteu การหาฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH การวิเคราะห์หาปริมาณของ γ -oryzanol โดยเทคนิคโครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง และการประเมินภาวะเครียดออกซิเดชันในเซลล์ประสาท SH-SY5Y พบว่า

1. การให้ความร้อนในรูปแบบที่แตกต่างกันอันได้แก่ การใช้คลื่น ultrasound การให้ความร้อนแบบ hydrothermal และการให้ความร้อนแบบ hydrothermal ร่วมกับการใช้คลื่น ultrasound พบว่าการให้ความร้อนแบบ hydrothermal แก่รำข้าวร่วมกับการใช้คลื่น ultrasound ส่งผลได้ปริมาณของ phenolic acid สูงที่สุด โดยปริมาณของ phenolic acid จะสูงสุดเมื่อใช้ ethanol เป็นตัวทำละลาย นอกจากนี้ยังพบว่าปริมาณของ γ -oryzanol ในสารสกัดที่ผ่านการให้ความร้อนแบบไฮโดรร่วมกับการใช้คลื่น ultrasound มีปริมาณสูงที่สุดเมื่อเทียบกับการให้ความร้อนในรูปแบบอื่น ซึ่งปริมาณของ phenolic acid และ γ -oryzanol ที่สูงที่สุดส่งผลให้สารสกัดที่สกัดโดยใช้ ethanol เป็นตัวทำละลาย และผ่านการให้ความร้อนแบบ hydrothermal ร่วมกับการใช้คลื่น ultrasound เป็นสารสกัดที่มีประสิทธิภาพสูงที่สุดในการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH

2. การให้ความร้อนแบบ hydrothermal ร่วมกับการใช้คลื่น ultrasound จะได้สารสกัดที่มีประสิทธิภาพในการต้านภาวะเครียดออกซิเดชันในเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง SH-SY5Y ทำให้เซลล์ประสาทที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดการตายแบบอะพอพโตซิสมีอัตราการตายน้อยลง ในขณะที่ผลจากตัวทำละลายไม่ได้ส่งผลให้สารสกัดออกฤทธิ์แตกต่างกัน

ดังนั้นผลจากการทดลองจึงสามารถสรุปได้ว่าการให้ความร้อนแบบ hydrothermal ร่วมกับการใช้คลื่น ultrasound เป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพในการสกัดสารออกฤทธิ์ชีวภาพจากรำข้าว

ทั้ง phenolic acid และ γ -oryzanol ซึ่งเป็นสารประกอบที่มีคุณสมบัติทางชีวภาพในการป้องกันเซลล์ประสาทมนุษย์ SH-SY5Y จากภาวะเครียดออกซิเดชัน

อภิปรายผลการวิจัย

การศึกษาสารออกฤทธิ์ชีวภาพจากรำข้าวที่สกัดด้วยการให้ความร้อนแบบ hydrothermal ร่วมกับการใช้คลื่น ultrasound ในตัวทำละลายที่ต่างกัน

จากการศึกษาเกี่ยวกับการให้ความร้อนแบบ hydrothermal ร่วมกับการใช้ ultrasound และศึกษาผลจากการใช้ ethanol และ ethylacetate เป็นตัวทำละลาย จากผลการทดลองสามารถอภิปรายผลได้ดังนี้

ปริมาณ phenolic acid ทั้งหมดที่สกัดจากรำข้าว

ปริมาณสารออกฤทธิ์ชีวภาพในสารสกัดจากรำข้าวมีปริมาณของ phenolic acid เมื่อพิจารณาจากการให้ความร้อนในรูปแบบเดียวกันแต่ใช้ตัวทำละลายในการสกัดต่างชนิดกัน พบว่าตัวทำละลาย ethanol สามารถสกัด phenolic acid ได้ในปริมาณที่สูงกว่าการใช้ตัวทำละลาย ethylacetate ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Su et al. (2014) ที่ศึกษาการสกัด phenolic acid จากพืชโดยใช้เนื้อล้นจี๋โดยการใช้ตัวทำละลายชนิดต่างๆ พบว่าการใช้ตัวทำละลาย ethanol ร้อยละ 80 สามารถสกัด phenolic acid ได้ในปริมาณที่สูงกว่าเมื่อเทียบกับการใช้ตัวทำละลาย ethylacetate ร้อยละ 80 และการศึกษาของ Nawaz, Shad, and Muzaffar (2018) ที่ศึกษาคุณสมบัติทางเคมีของสารต้านออกซิเดชันประเภท phenolic acid ในผักกะหล่ำปลี โดยได้ศึกษาการใช้ตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ ในการสกัด phenolic acid จากกะหล่ำปลี พบว่าการใช้ตัวทำละลาย ethanol สามารถสกัด phenolic acid จากกะหล่ำปลีได้ในปริมาณที่สูงกว่าการใช้ ethylacetate เป็นตัวทำละลายด้วยเช่นเดียวกัน ทั้งนี้เป็นเพราะ phenolic acid เป็นสารขั้วสูง จึงเกิดอันตรกิริยากับตัวทำละลาย ethanol ที่มีขั้วได้มากกว่าการใช้ตัวทำละลาย ethylacetate จึงทำให้ ethanol เป็นตัวทำละลายที่มีความเหมาะสมในการนำมาสกัด phenolic acid มากกว่า รวมถึงจากการเปรียบเทียบปริมาณของ phenolic acid จากการใช้วิธีการสกัดแบบ hydrothermal ร่วมกับการใช้คลื่น ultrasound ในครั้งนี้พบว่า การให้ความร้อนแบบ hydrothermal ร่วมกับการใช้คลื่น ultrasound สามารถสกัดสารปริมาณของ phenolic acid ได้ 3.21 mg GAE/g ซึ่งมากกว่าการใช้สกัดโดยการใช้ตัวทำละลายเพียงอย่างเดียว จากผลการศึกษาของ Butsat and Siriamornpun (2010) ที่สามารถสกัดปริมาณ phenolic acid จากการใช้ตัวทำละลายเพียงอย่างเดียวได้ 2.5 mg

GAE/g และในการศึกษาของ Moongngarm et al. (2012) ที่ได้ปริมาณ phenolic acid เพียง 1.57 mg GAE/g จากการสกัดโดยวิธีการใช้ตัวทำละลายเพียงอย่างเดียว

ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH จากสารสกัดรำข้าว

จากการศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ DPPH พบว่าสารสกัดที่สกัดโดยการให้ความร้อนแบบ hydrothermal ร่วมกับการใช้คลื่น ultrasound โดยการใช้ ethanol เป็นตัวทำละลายจะได้สารสกัดที่มีค่า EC_{50} ต่ำที่สุดที่ 0.53 mg/mL เมื่อเปรียบเทียบกับการให้ความร้อนในรูปแบบอื่นๆ ในขณะที่การใช้ ethylacetate เป็นตัวทำละลายจะได้สารสกัดที่มีค่า EC_{50} ต่ำที่สุดที่ 0.87 mg/mL เมื่อเปรียบเทียบกับการให้ความร้อนในรูปแบบอื่นๆ เช่นกัน โดยค่า EC_{50} จากการทดลองแสดงให้เห็นถึงความสอดคล้องจากการวัดปริมาณ phenolic acid ในสารสกัดที่ผ่านการสกัดโดยการให้ความร้อนแบบ hydrothermal ร่วมกับการใช้คลื่น ultrasound ซึ่งมีปริมาณ phenolic acid สูงที่สุดเมื่อเทียบกับการให้ความร้อนในรูปแบบอื่นๆ โดยการใช้ตัวทำละลายเดียวกัน

ปริมาณ γ -oryzanol ด้วยเทคนิคโครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง

จากผลการวิเคราะห์ปริมาณ γ -oryzanol โดยการใช้เทคนิค HPLC พบว่ามีแนวโน้มสอดคล้องกับปริมาณของ phenolic และฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ DPPH ซึ่งปริมาณ γ -oryzanol พบได้สูงสุดในสารสกัดที่สกัดโดยการให้ความร้อนแบบ hydrothermal ร่วมกับการใช้คลื่น ultrasound โดยการใช้ ethanol เป็นในการสกัด แต่อย่างไรก็ตามปริมาณ γ -oryzanol จากการสกัดโดย ethylacetate นั้นมีปริมาณที่ต่ำกว่าการใช้ ethanol ซึ่งปกติ γ -oryzanol เป็นสารขั้วต่ำเมื่อสกัดด้วยตัวทำละลายควรได้ปริมาณที่สูงเมื่อใช้ตัวทำละลายขั้วต่ำเช่น ethylacetate ซึ่งขัดกับผลการทดลอง ทั้งนี้เป็นเพราะในขั้นตอนของการสกัด มีการให้ความร้อนในขณะที่ทำการสกัดซึ่งเป็นผลทำให้ ethylacetate ที่มีจุดเดือดต่ำระเหยจึงส่งผลให้ปริมาณของสารสกัดมีน้อยกว่าจึงเป็นผลอาจทำให้ปริมาณของ γ -oryzanol ลดน้อยลงอีกด้วย แต่อย่างไรก็ดีจากการศึกษาของ Imsanguan et al. (2008) ปริมาณของ γ -oryzanol พบว่าปริมาณของ γ -oryzanol จากการสกัดด้วยการใช้ supercritical fluid extraction, soxhlet extraction และ conventional solvent extraction ทำให้ได้ปริมาณ γ -oryzanol ในสารสกัด 11.37, 9.81 และ 7.35 mg/g ตามลำดับ ในขณะที่ผลจากการสกัดโดยการให้ความร้อนแบบ hydrothermal ร่วมกับการใช้คลื่น ultrasound ทำให้ได้สารสกัดที่มีปริมาณ γ -oryzanol สูงถึง 12.96 mg/g

การทดสอบการออกฤทธิ์ของสารสกัดจากรำข้าวต่อการต้านภาวะเครียดออกซิเดชันของเซลล์ประสาทด้วยวิธีการ MTT assay

จากการใช้สารสกัดที่จากรำข้าวในการทดสอบฤทธิ์การต้านภาวะเครียดออกซิเดชันในเซลล์ SH-SY5Y โดยทดสอบเปรียบเทียบระหว่างสารสกัดที่ผ่านการให้ความร้อนแบบ hydrothermal ร่วมกับการใช้คลื่น ultrasound และการใช้ตัวทำละลาย ethanol และ ethylacetate พบว่าการให้ความร้อนแบบ hydrothermal ร่วมกับการใช้คลื่น ultrasound โดยใช้ ethanol เป็นตัวทำละลาย ได้ทำให้ได้สารสกัดที่มีประสิทธิภาพสูงที่สุดในการต้านภาวะเครียดออกซิเดชันในเซลล์ SH-SY5Y ซึ่งในสารสกัดที่ใช้วิธีดังกล่าวมีปริมาณของสารออกฤทธิ์ชีวภาพในกลุ่มของ phenolic acid และ γ -oryzanol สูงที่สุด เมื่อเทียบกับการให้ความร้อนและใช้ตัวทำละลายชนิดอื่นๆ

ข้อเสนอแนะ

จากการศึกษาปริมาณของสารออกฤทธิ์ชีวภาพในสารสกัดจากรำข้าวในขั้นของการวิเคราะห์ปริมาณสารออกฤทธิ์ชีวภาพอาจใช้รำข้าวที่ได้รับการรับรองมาตรฐานและปริมาณสารออกฤทธิ์ชีวภาพจากแหล่งเพาะปลูกที่น่าเชื่อถือในการนำมาวิเคราะห์หาปริมาณเพื่อใช้ในการอ้างอิงถึงเพื่อเพิ่มความน่าเชื่อถือของประสิทธิภาพในการสกัดจากการใช้วิธีการให้ความร้อนแบบ hydrothermal นอกจากนี้ยังสามารถศึกษาการใช้สารสกัดจากรำข้าวสายพันธุ์อื่นๆในการสกัดสารออกฤทธิ์ชีวภาพด้วยวิธีการให้ความร้อนแบบ hydrothermal ร่วมกับการใช้คลื่น ultrasound ได้อีกด้วย

และจากการทดลองใช้หม้อนึ่งฆ่าเชื้อในการให้ความร้อนแบบ hydrothermal พบว่าปริมาณของสารออกฤทธิ์ชีวภาพในกลุ่มของ phenolic acid และ γ -oryzanol มีปริมาณที่สูงเมื่อทำการสกัดร่วมกับกรใช้คลื่น ultrasound หากเปลี่ยนเทคนิคการให้ความร้อนแบบ hydrothermal โดยการให้ความร้อนแบบ Instant Control Pressure Drop (ICPD) ซึ่งเป็นเตาปฏิกรณ์ที่สามารถใช้แรงดันได้มากกว่า 15 psi อาจจะทำให้ได้สารสกัดที่มีประสิทธิภาพมากกว่าการใช้หม้อนึ่งฆ่าเชื้อ

บรรณานุกรม

- Ainsworth, E. A., & Gillespie, K. M. (2007). Estimation of total phenolic content and other oxidation substrates in plant tissues using Folin–Ciocalteu reagent. *Nature Protocols*, 2, 875. doi:10.1038/nprot.2007.102
- Allaf, T., Fine, F., Tomao, V., Nguyen, C., Ginies, C., & Chemat, F. (2014). Impact of instant controlled pressure drop pre-treatment on solvent extraction of edible oil from rapeseed seeds. *OCL*, 21(3).
- Allaf, T., Tomao, V., Ruiz, K., & Chemat, F. (2013). Instant controlled pressure drop technology and ultrasound assisted extraction for sequential extraction of essential oil and antioxidants. *Ultrasonics Sonochemistry*, 20(1), 239-246.
- Ausman, L. M., Rong, N., & Nicolosi, R. J. (2005). Hypocholesterolemic effect of physically refined rice bran oil: Studies of cholesterol metabolism and early atherosclerosis in hypercholesterolemic hamsters. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 16(9), 521-529.
- Beckman, C. H. (2000). Phenolic-storing cells: keys to programmed cell death and periderm formation in wilt disease resistance and in general defence responses in plants? *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 57(3), 101-110.
- Berger, A., Rein, D., Schäfer, A., Monnard, I., Gremaud, G., Lambelet, P., & Bertoli, C. (2005). Similar cholesterol-lowering properties of rice bran oil, with varied γ -oryzanol, in mildly hypercholesterolemic men*. *European Journal of Nutrition*, 44(3), 163-173.
- Besombes, C., Berka-Zougali, B., & Allaf, K. (2010). Instant controlled pressure drop extraction of lavender essential oils: Fundamentals and experimental studies. *Journal of Chromatography A*, 1217(44), 6807-6815.
- Beta, T., Nam, S., Dexter, J. E., & Sapiststein, H. D. (2005). Phenolic Content and Antioxidant Activity of Pearled Wheat and Roller-Milled Fractions. *Cereal Chemistry*, 82(4), 390-393.

- Bhatnagar, A. S., Prabhakar, D. S., Prasanth Kumar, P. K., Raja Rajan, R. G., & Gopala Krishna, A. G. (2014). Processing of commercial rice bran for the production of fat and nutraceutical rich rice brokens, rice germ and pure bran. *LWT - Food Science and Technology*, 58(1), 306-311.
- Blainski, A., Lopes, G. C., & de Mello, J. C. P. (2013). Application and analysis of the folin ciocalteu method for the determination of the total phenolic content from *Limonium brasiliense* L. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 18(6), 6852-6865.
- Butsat, S., & Siriamornpun, S. (2010). Antioxidant capacities and phenolic compounds of the husk, bran and endosperm of Thai rice. *Food Chemistry*, 119(2), 606-613.
- Carbonell-Capella, J. M., Barba, F. J., Esteve, M. J., & Frigola, A. (2013). Quality parameters, bioactive compounds and their correlation with antioxidant capacity of commercial fruit-based baby foods. *Food Science and Technology International*, 20(7), 479-487. doi:10.1177/1082013213492523
- Castro, P. H. C. V. d., Silva, A. E. F. e., & Costa, L. P. N. d. (1998, 28-31 Oct. 1998). *Globo TV's HDTV Experimental Transmission*. Paper presented at the 140th SMPTE Technical Conference and Exhibit.
- Chen, Z., Bertin, R., & Foldi, G. (2013). EC50 estimation of antioxidant activity in DPPH assay using several statistical programs. *Food Chemistry*, 138(1), 414-420.
- Chi, H.-Y., Lee, C.-H., Kim, K.-H., Kim, S.-L., & Chung, I.-M. (2007). Analysis of phenolic compounds and antioxidant activity with H4IIE cells of three different rice grain varieties. *European Food Research and Technology*, 225(5), 887-893.
- Chotimarkorn, C., Benjakul, S., & Silalai, N. (2008). Antioxidant components and properties of five long-grained rice bran extracts from commercial available cultivars in Thailand. *Food Chemistry*, 111(3), 636-641.
- Ciulu, M., Cádiz-Gurrea, M. d. I. L., & Segura-Carretero, A. (2018). Extraction and Analysis of Phenolic Compounds in Rice: A Review. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 23(11), 2890.

- Correia, R. T. P., Borges, K. C., Medeiros, M. F., & Genovese, M. I. (2012). Bioactive compounds and phenolic-linked functionality of powdered tropical fruit residues. *Food Science and Technology International*, 18(6), 539-547.
- Dasgupta, N., & De, B. (2004). Antioxidant activity of Piper betle L. leaf extract in vitro. *Food Chemistry*, 88(2), 219-224.
- Dunford, N. T., & King, J. W. (2000). Phytosterol Enrichment of Rice Bran Oil by a Supercritical Carbon Dioxide Fractionation Technique. *Journal of Food Science*, 65(8), 1395-1399.
- Ford, L., Theodoridou, K., Sheldrake, G., & Walsh, P. (2019). A critical review of analytical methods used for the chemical characterisation and quantification of phlorotannin compounds in brown seaweeds. *Phytochemical Analysis*, 30, 1-13.
- Frota Junior, M. L. C. d., Pires, A. S., Zeidán-Chuliá, F., Bristot, I. J., Lopes, F. M., de Bittencourt Pasquali, M. A., . . . Moreira, J. C. F. (2011). In vitro optimization of retinoic acid-induced neuritogenesis and TH endogenous expression in human SH-SY5Y neuroblastoma cells by the antioxidant Trolox. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 358(1), 325-334.
- Fujii, M., Butler, J. P., & Sasaki, H. (2018). Gamma-oryzanol for behavioural and psychological symptoms of dementia. *Psychogeriatrics*, 18(2), 151-152.
- Galanakis, C. M. (2017). Chapter 1 - Introduction. In C. M. Galanakis (Ed.), *Nutraceutical and Functional Food Components* (pp. 1-14): Academic Press.
- Goli, A. H., Barzegar, M., & Sahari, M. A. (2005). Antioxidant activity and total phenolic compounds of pistachio (*Pistachia vera*) hull extracts. *Food Chemistry*, 92(3), 521-525.
- Imsanguan, P., Roaysubtawee, A., Borirak, R., Pongamphai, S., Douglas, S., & Douglas, P. L. (2008). Extraction of α -tocopherol and γ -oryzanol from rice bran. *LWT - Food Science and Technology*, 41(8), 1417-1424.
- Ismail, N., Ismail, M., Imam, M. U., Azmi, N. H., Fathy, S. F., Foo, J. B., & Abu Bakar, M. F. (2014). Mechanistic basis for protection of differentiated SH-SY5Y cells by

- oryzanol-rich fraction against hydrogen peroxide-induced neurotoxicity. *BMC complementary and alternative medicine*, 14, 467-467.
- Jadhav, D., B.N. R., Gogate, P. R., & Rathod, V. K. (2009). Extraction of vanillin from vanilla pods: A comparison study of conventional soxhlet and ultrasound assisted extraction. *Journal of Food Engineering*, 93(4), 421-426.
- Jun, H.-I., Song, G.-S., Yang, E.-I., Youn, Y., & Kim, Y.-S. (2012). Antioxidant Activities and Phenolic Compounds of Pigmented Rice Bran Extracts. *Journal of Food Science*, 77(7), C759-C764.
- Jung, C. H., Lee, D.-H., Ahn, J., Lee, H., Choi, W. H., Jang, Y. J., & Ha, T.-Y. (2015). γ -Oryzanol Enhances Adipocyte Differentiation and Glucose Uptake. *Nutrients*, 7(6), 4851-4861.
- Khan, M. K., Abert-Vian, M., Fabiano-Tixier, A.-S., Dangles, O., & Chemat, F. (2010). Ultrasound-assisted extraction of polyphenols (flavanone glycosides) from orange (*Citrus sinensis* L.) peel. *Food Chemistry*, 119(2), 851-858.
- Lee, L.-S., Lee, N., Kim, H. Y., Lee, C.-H., Hong, P. S., Jeon, Y.-W., & Kim, Y.-E. (2013). Optimization of Ultrasonic Extraction of Phenolic Antioxidants from Green Tea Using Response Surface Methodology. *Molecules*, 18(11), 1420-3049.
- Loypimai, P., Moongngarm, A., Chottanom, P., & Moontree, T. (2015). Ohmic heating-assisted extraction of anthocyanins from black rice bran to prepare a natural food colourant. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 27, 102-110.
- Malenčić, D., Cvejić, J., Tepavčević, V., Bursać, M., Kiproviski, B., & Rajković, M. (2013). Changes in L-phenylalanine ammonia-lyase activity and isoflavone phytoalexins accumulation in soybean seedlings infected with *Sclerotinia sclerotiorum*. *Central European Journal of Biology*, 8(9), 921-929.
- Martindale, J. L., & Holbrook, N. J. (2002). Cellular response to oxidative stress: Signaling for suicide and survival*. *Journal of Cellular Physiology*, 192(1), 1-15.
- Mattson, M. P., & Camandola, S. (2001). NF-kappaB in neuronal plasticity and neurodegenerative disorders. *The Journal of clinical investigation*, 107(3), 247-254.

- Melo, A., Monteiro, L., Lima, R. M. F., Oliveira, D. M. d., Cerqueira, M. D. d., & El-Bachá, R. S. (2011). Oxidative stress in neurodegenerative diseases: mechanisms and therapeutic perspectives. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2011, 467180-467180.
- Min, B., McClung, A., & Chen, M.-H. (2014). Effects of hydrothermal processes on antioxidants in brown, purple and red bran whole grain rice (*Oryza sativa* L.). *Food Chemistry*, 159, 106-115.
- Minatel, O. I., Francisqueti, V. F., Corrêa, R. C., & Lima, P. G. (2016). Antioxidant Activity of **Y**-Oryzanol: A Complex Network of Interactions. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(8).
- Moongngarm, A., Daomukda, N., & Khumpika, S. (2012). Chemical Compositions, Phytochemicals, and Antioxidant Capacity of Rice Bran, Rice Bran Layer, and Rice Germ. *APCBEE Procedia*, 2, 73-79.
- Nair, G. R., Divya, V. R., Prasannan, L., Habeeba, V., Prince, M. V., & Raghavan, G. S. V. (2014). Ohmic heating as a pre-treatment in solvent extraction of rice bran. *Journal of Food Science and Technology*, 51(10), 2692-2698.
- Nawaz, H., Shad, M., & Muzaffar, S. (2018). Phytochemical Composition and Antioxidant Potential of Brassica.
- Ng, Y.-W., & Say, Y.-H. (2018). Palmitic acid induces neurotoxicity and gliotoxicity in SH-SY5Y human neuroblastoma and T98G human glioblastoma cells. *PeerJ*, 6, e4696.
- Onofre, F. O., & Hettiarachchy, N. S. (2007). Extraction, Quantification, and Characterization of Phenolics Extracted with the Aid of Sonication from Rice Bran. *Cereal Chemistry*, 84(4), 337-342.
- Özkaya, B., Turksoy, S., Özkaya, H., & Duman, B. (2017). Dephytinization of wheat and rice brans by hydrothermal autoclaving process and the evaluation of consequences for dietary fiber content, antioxidant activity and phenolics. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 39, 209-215.
- Patpan, N., Banjerdpongchai, R., Tantiworawit, A., Poofery, J., Komonrit, P., Fanhchaksai, K., . . . Charoenkwan, P. (2019). The Effect of Transfusion-Dependent Thalassemia

- Patient's Serum on Peripheral Blood Mononuclear Cell Viability. *Journal of Cell Death*, 12, 117906601882353.
- Peanparkdee, M., & Iwamoto, S. (2019). Bioactive compounds from by-products of rice cultivation and rice processing: Extraction and application in the food and pharmaceutical industries. *Trends in Food Science & Technology*, 86, 109-117.
- Peanparkdee, M., Patrawart, J., & Iwamoto, S. (2019). Effect of extraction conditions on phenolic content, anthocyanin content and antioxidant activity of bran extracts from Thai rice cultivars. *Journal of Cereal Science*, 86, 86-91.
- Peanparkdee, M., Yamauchi, R., & Iwamoto, S. (2018). Characterization of Antioxidants Extracted from Thai Riceberry Bran Using Ultrasonic-Assisted and Conventional Solvent Extraction Methods. *Food and Bioprocess Technology*, 11(4), 713-722.
- Ramkumar, M., Rajasankar, S., Gobi, V. V., Dhanalakshmi, C., Manivasagam, T., Justin Thenmozhi, A., . . . Chidambaram, R. (2017). Neuroprotective effect of Demethoxycurcumin, a natural derivative of Curcumin on rotenone induced neurotoxicity in SH-SY 5Y Neuroblastoma cells. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 17(1), 217.
- Rao, A. S. V. C., Reddy, S. G., Babu, P. P., & Reddy, A. R. (2010). The antioxidant and antiproliferative activities of methanolic extracts from Njavara rice bran. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 10(1), 4.
- Ruen-ngam, D., Thawai, C., & Sukonthamut, S. (2016). Pretreatment to increase yield and antioxidant activity of γ -oryzanol in rice bran oil. *ScienceAsia*, 42, 75-82.
- Şahin, S., & Şamlı, R. (2013). Optimization of olive leaf extract obtained by ultrasound-assisted extraction with response surface methodology. *Ultrasonics Sonochemistry*, 20(1), 595-602.
- Sakunpak, A., Suksaeree, J., Pathompak, P., Charoonratana, T., & Sermkaew, N. (2014). Antioxidant individual γ – oryzanol screening in cold pressed rice bran oil of different Thai rice varieties by HPLC-DPPH method. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 6, 592-597.

- Sánchez-Rangel, J. C., Benavides, J., Heredia, J. B., Cisneros-Zevallos, L., & Jacobo-Velázquez, D. A. (2013). The Folin–Ciocalteu assay revisited: improvement of its specificity for total phenolic content determination. *Analytical Methods*, 5(21), 5990-5999.
- Shahidi, F., Vamadevan, V., Oh, W., & Peng, H. (2019). Phenolic compounds in agri-food by-products, their bioavailability and health effects.
- Shao, Y., Xu, F., Sun, X., Bao, J., & Beta, T. (2014). Identification and quantification of phenolic acids and anthocyanins as antioxidants in bran, embryo and endosperm of white, red and black rice kernels (*Oryza sativa* L.). *Journal of Cereal Science*, 59(2), 211-218.
- Su, D., Zhang, R., Hou, F., Zhang, M., Guo, J., Huang, F., . . . Wei, Z. (2014). Comparison of the free and bound phenolic profiles and cellular antioxidant activities of litchi pulp extracts from different solvents. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 14(1), 9.
- Tabaraki, R., & Nateghi, A. (2011). Optimization of ultrasonic-assisted extraction of natural antioxidants from rice bran using response surface methodology. *Ultrasonics Sonochemistry*, 18(6), 1279-1286.
- Teixeira, J., Gaspar, A., Garrido, E., Garrido, J., & Borges, F. (2013). Hydroxycinnamic Acid Antioxidants: An Electrochemical Overview. *BioMed research international*, 2013, 251754.
- Thongchai, W., & Liawruangrath, B. (2016). Determination of gamma oryzanol in rice bran oil by HPLC with molecularly imprinted solid-phase extraction. *International Food Research Journal*, 23, 1389-1395.
- Vargas, C. G., da Silva Junior, J. D., Rabelo, T. K., Moreira, J. C. F., Gelain, D. P., Rodrigues, E., . . . Flôres, S. H. (2018). Bioactive compounds and protective effect of red and black rice brans extracts in human neuron-like cells (SH-SY5Y). *Food Research International*, 113, 57-64.
- Walter, M., Marchesan, E., Massoni, P. F. S., da Silva, L. P., Sartori, G. M. S., & Ferreira, R. B. (2013). Antioxidant properties of rice grains with light brown, red and black

- pericarp colors and the effect of processing. *Food Research International*, 50(2), 698-703.
- Wang, L., & Weller, C. L. (2006). Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants. *Trends in Food Science & Technology*, 17(6), 300-312.
- Wongwaiwech, D., Weerawatanakorn, M., Tharatha, S., & Ho, C.-T. (2019). Comparative study on amount of nutraceuticals in by-products from solvent and cold pressing methods of rice bran oil processing. *Journal of Food and Drug Analysis*, 27(1), 71-82.
- Wu, X., Gu, L., Holden, J., Haytowitz, D. B., Gebhardt, S. E., Beecher, G., & Prior, R. L. (2004). Development of a database for total antioxidant capacity in foods: a preliminary study. *Journal of Food Composition and Analysis*, 17(3), 407-422.
- Xicoy, H., Wieringa, B., & Martens, G. J. M. (2017). The SH-SY5Y cell line in Parkinson's disease research: a systematic review. *Molecular Neurodegeneration*, 12(1), 10.
- Yu, J., Ye, J., Liu, X., Han, Y., & Wang, C. (2011). Protective effect of L-carnitine against H₂O₂-induced neurotoxicity in neuroblastoma (SH-SY5Y) cells. *Neurological Research*, 33(7), 708-716.
- Zullaikah, S., Lai, C.-C., Vali, S. R., & Ju, Y.-H. (2005). A two-step acid-catalyzed process for the production of biodiesel from rice bran oil. *Bioresource Technology*, 96(17), 1889-1896.
- กรมการค้าต่างประเทศ. (2018). การส่งออกข้าวของไทยแยกตามชนิดข้าว. Retrieved from <http://www.thairiceinfo.go.th/?page=DataL3.ShowData&codeData=A1003>
- นิภาพร ชนะคช. (2560). γ -oryzanol สารสำคัญในข้าว. วารสารกรมวิทยาศาสตร์บริการ, 65(205), 26-27.
- ปภาวดี คล่องพิทยาพงษ์, รุ่งตะวัน สถาพผล, วรอนงค์ พุกษากิจ, & พรรณนารี ชัยวิชาติ. (2011). ฤทธิ์การต้านการเจริญเติบโตของน้ำมันรำข้าวต่อเซลล์มะเร็งตับ. *EAR heritage journal science and technology*, 5, 56-67.
- วิไลภรณ์ ชนกันำชัย. (2559, 6 มิถุนายน). การปลูกข้าวขาวดอกมะลิ 105. Retrieved from สำนักคณะกรรมการตรวจข้าวสภาก่อการค้าแห่งประเทศไทย. (2018). สถิติข้าวส่งออกรายปี.





ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล อัศวเกียรติ พวงแสง
วัน เดือน ปี เกิด 21 มิถุนายน 2537
สถานที่เกิด จ.สุรินทร์
วุฒิการศึกษา ปริญญาตรี : เคมี (กศ.บ.) มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ
 มัธยมศึกษา : ม.1-ม.6 โรงเรียนศรัทธาสมุทร จ.สมุทรสงคราม
ที่อยู่ปัจจุบัน บ้านเลขที่ 196 หมู่ที่ 5 ต.ปลายโพรงพาง อ.อัมพวา จ.สมุทรสงคราม
 75110

