

บทที่ 2

ทบทวนวรรณกรรม

2.1 ข้าว

ข้าวเป็นพืชอาหารที่สำคัญชนิดหนึ่งของโลก โดยเฉพาะประเทศในภูมิภาคเอเชียที่นิยมรับประทานข้าวเป็นอาหารประจำวันมากกว่าในภูมิภาคอื่นๆ ของโลก การผลิต บริโภคและการค้าข้าวส่วนใหญ่จึงกระจุกตัวอยู่ในทวีปเอเชีย ข้าวเป็นพืชในเขตร้อนซึ่งต้องการอุณหภูมิและความชื้นสูงในการเจริญเติบโต ประเทศไทยจึงเป็นประเทศหนึ่งที่เหมาะสมกับการปลูกข้าว พันธุ์ข้าวของไทยเป็นที่นิยมของประชากรที่บริโภคข้าวทั่วโลก อีกทั้งภูมิอากาศและภูมิประเทศของประเทศไทยเหมาะกับการเจริญเติบโต ประเทศที่มีบทบาทมากในการส่งออกข้าว คือประเทศไทย รองลงมาคืออินเดีย เวียดนาม จีนและพม่า ตามลำดับ โดยประเทศไทยส่งออกข้าวปีละประมาณ 7 ล้านตัน เป็นสัดส่วนประมาณร้อยละ 36 ของการส่งออกข้าวทั้งหมดทั่วโลก จึงนับได้ว่าข้าวเป็นพืชเศรษฐกิจหลักที่สำคัญของประเทศ ซึ่งสมควรอย่างยิ่งที่จะได้รับการส่งเสริมในด้านการเพาะปลูก นอกจากนั้นข้าวไทยยังมีศักยภาพในการนำมาพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์สุขภาพเพื่อเพิ่มมูลค่าให้แก่ข้าวไทย เนื่องจากตลาดการค้าข้าวระหว่างประเทศมีการแข่งขันกันค่อนข้างสูง

ข้าวที่นำมาปลูกเป็นอาหารนั้นแบ่งออกได้เป็น 2 ชนิด คือ ข้าว *Oryza sativa* L. ปลูกในทวีปเอเชียและ *Oryza glaberrima* Steud ปลูกในทวีปแอฟริกา แต่ข้าวที่ค้าขายกันในตลาดโลกเกือบทั้งหมดเป็นข้าวที่ปลูกจากแถบเอเชีย แต่จากสภาพความผันแปรทางภูมิศาสตร์และภูมิอากาศ ประกอบกับการคัดเลือกของมนุษย์ ทำให้มีพันธุ์ข้าวทั่วโลกประมาณ 120,000 สายพันธุ์ สำหรับข้าวที่ปลูกในไทยเป็นพันธุ์ข้าวเมล็ดยาว คือ ข้าวอินดิกา แต่ประกอบด้วยหลายสายพันธุ์ทั้งที่มีการพัฒนาขึ้นใหม่และข้าวพันธุ์พื้นเมืองซึ่งมีอยู่ประมาณ 3,500 สายพันธุ์ ซึ่งมีข้าวป่า ข้าวพื้นเมือง และข้าวที่ผสมโดยมนุษย์ขึ้นมาใหม่ แต่ข้าวพันธุ์ที่สร้างชื่อเสียงให้กับไทยมากที่สุด คือ ข้าวหอมมะลิ ข้าวมีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Oryza sativa* L. จัดเป็นธัญพืชในวงศ์ Gramineae เป็นแหล่งอาหารหลักที่ให้คาร์โบไฮเดรตเพื่อเพิ่มพลังงาน นอกจากการเป็นอาหารในชีวิตประจำวันของประชากรส่วนใหญ่ของโลกแล้ว ยังมีการนำข้าวมาแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์อื่น เช่น ข้าวหมก ขนมไทยที่ใช้แป้งข้าวเหนียวและ/หรือแป้งข้าวเจ้า เครื่องดื่มประเภทแอลกอฮอล์และอื่นๆ ข้าวที่ปลูกในประเทศไทยมีทั้งข้าวเจ้าและข้าวเหนียว ซึ่งต่างประกอบด้วยแป้งในปริมาณร้อยละ 80 – 90 สำหรับสารอาหารในข้าวที่รองจากคาร์โบไฮเดรตคือ โปรตีนในปริมาณร้อยละ 5 – 10 ส่วนที่เหลือเป็นไขมัน วิตามิน และเกลือแร่ รวมทั้งสารประกอบอื่น นอกจากนั้นในประเทศยังมีความหลากหลายของสายพันธุ์ข้าวและสีของเมล็ดข้าวซึ่งพบทั้งข้าวสีแดง ข้าวสีดำและข้าวสีม่วง โดยเฉพาะข้าวสีม่วงที่พบมากในเขตพื้นที่ภาคเหนือ ซึ่งมีชื่อเรียกว่า “ข้าวเก่าหรือข้าวเหนียวดำ” ตัวอย่างเช่น ข้าวเก่าพันธุ์ดอยสะเก็ด ข้าวเก่าพันธุ์อมก๋อย ข้าวเก่าสีมัว เป็นต้น (Boonsit et al.,

2010) นอกจากนั้นยังมีข้าวกล้องสีพื้นเมืองที่มีการปลูกเฉพาะบนพื้นที่สูงอีกด้วยโดยเฉพาะในเขตจังหวัดตาก แม่ฮ่องสอน พะเยาและน่าน

2.2 รำข้าว

รำข้าวเป็นส่วนที่มีสารอาหารมากที่สุดที่อยู่ในส่วนของ caryopsis และอุดมไปด้วยวิตามินและแร่ธาตุ ซึ่งกระบวนการสีข้าวมีผลต่อองค์ประกอบต่างๆ ในรำข้าว รำข้าวอุดมไปด้วยสารอาหารซึ่งมีองค์ประกอบของโปรตีนร้อยละ 14 – 16 และยังพบมีกรดอะมิโนไลซีน (lysine) ในปริมาณสูง คาร์โบไฮเดรตส่วนใหญ่มาจากเฮมิเซลลูโลสร้อยละ 8.7-11.4 เซลลูโลสร้อยละ 9-12.8 แป้งและบีต้า-กลูแคน (β -glucan) ร้อยละ 1 และไขมันอีกประมาณร้อยละ 3 – 4 รำข้าวเป็นแหล่งที่พบวิตามินอีสูง คือ ประมาณ 300 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม นอกจากนี้ในรำข้าวยังเป็นแหล่งสำคัญของโทโคโทรอินอล โพลีฟีนอลและฟลาโวนอยด์ นอกจากนั้นยังพบแร่ธาตุบางชนิด เช่น เหล็ก อลูมิเนียม แคลเซียม คลอรีน โซเดียม โพแทสเซียม แมกนีเซียม แมงกานีส ฟอสฟอรัส ซีลีเนียม และสังกะสี เป็นต้น อย่างไรก็ตามองค์ประกอบของแร่ธาตุในรำข้าวจะขึ้นกับปริมาณสารอาหารในดินที่พืชเจริญเติบโต ภูมิอากาศและการให้ปุ๋ย สำหรับในน้ำมันจากรำข้าว (crude rice bran oil) ประกอบด้วย triacylglycerols ร้อยละ 68-71 diacylglycerols ร้อยละ 2-3 monoacylglycerols ร้อยละ 5-6 กรดไขมันอิสระร้อยละ 2-3 glycolipids (ส่วนใหญ่เป็น phosphatidylcholine, phosphatidylethanolamine และ phosphatidylinositol) ร้อยละ 5-7 และ waxes อีกร้อยละ 2-3 (McCaskill & Zhang, 1999; Sayre & Saunders, 1990)

ตารางที่ 2.1 สารอาหารที่พบในรำข้าวที่มีความชื้นร้อยละ 9.62 ของน้ำหนักแห้ง (Oliveira *et al.*, 2012)

สารอาหารที่มีผลต่อสุขภาพ	ปริมาณ
Lipids content (ร้อยละ)	22.20 $\pm$ 0.43
Crude protein (ร้อยละ)	15.36 $\pm$ 0.06
แกมมา-โอโรซานอล (มิลลิกรัม/กิโลกรัมรำข้าวสด)	12,510 $\pm$ 51
โทโคโทรอินอลและโทโคเฟอรอล (มิลลิกรัม/กิโลกรัมรำข้าวสด)	334 $\pm$ 14

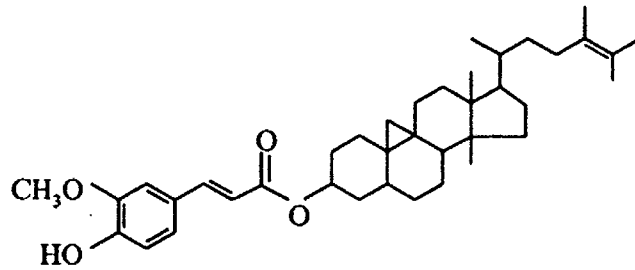
ปัจจุบันมีการนิยมนำรำข้าวมาสกัดเป็นน้ำมันรำข้าว (rice bran oil) เนื่องจากเป็นน้ำมันที่มีคุณภาพและได้รับความนิยม อันเนื่องมาจากอุดมไปด้วยกรดไขมันที่สมดุล ทั้งยังประกอบด้วยสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่หลากหลาย เช่น แกมมา-โอโรซานอล โทโคโทรอินอล โทโคเฟอรอลและไฟโตสเตอรอล (phytosterol)

2.3 โอไรซานอล (oryzanol)

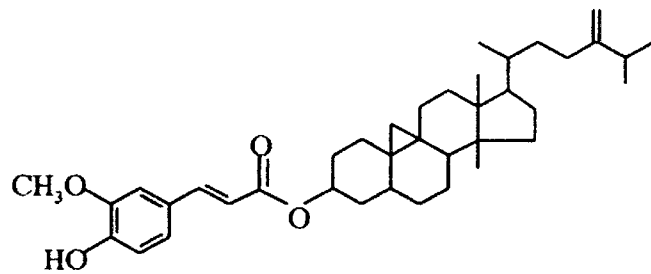
ในช่วงแรกเชื่อว่าโอไรซานอลเป็นสารเดี่ยว ต่อมาภายหลังจึงสามารถแสดงให้เห็นว่าเป็น สารผสมของกรดเฟอร์ูลิก (ferulic acid) ที่จับอยู่กับสเตอรอล (sterols) หรือไตรเทอร์พีน แอลกอฮอล์ (triterpene alcohols) ด้วยพันธะเอสเทอร์ ซึ่งมีอยู่ทั้งหมด 3 รูปแบบ คือ แอลฟา (α) บีตา (β) และ แกมมา-โอไรซานอล (γ -oryzanol) ซึ่งแกมมา-โอไรซานอลเป็นรูปแบบที่พบมากที่สุด โดยสเตอรอลที่พบในส่วนประกอบของแกมมา-โอไรซานอลคือ campesterol และ sitosterol และใน ส่วนของไตรเทอร์พีนแอลกอฮอล์ที่พบคือ cycloartenol และ 24-methylene cycloartanol ดังแสดง ในรูปที่ 2.1 มีนักวิทยาศาสตร์ได้ทำการศึกษาวิจัยพบว่าในน้ำมันรำข้าว (rice bran oil) มีปริมาณ แกมมา-โอไรซานอลอยู่ระหว่างร้อยละ 1-3 ซึ่งปริมาณที่แตกต่างกันนั้นจะขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของ ข้าว ฤดูกาลในการเพาะปลูกและวิธีวิเคราะห์ที่ใช้ (Seetharamaiah & Prabhakar, 1986) แหล่ง ธรรมชาติที่พบแกมมา-โอไรซานอลคือ ข้าวกล้องและรำข้าว แต่สารอื่นบางชนิดที่พบในแกมมา-โอไรซานอล เช่น sitostanyl ferulate, campestanyl ferulate ยังสามารถพบได้ในข้าวโพดและธัญพืช (Seitz, 1989) จากการศึกษาการสกัดน้ำมันรำข้าวด้วยเครื่องเกลียวอัดแบบบีบเย็นจะมีปริมาณ แกมมา-โอไรซานอลสูงถึงร้อยละ 1-2 หรือ 10,000 - 20,000 ppm ขณะที่น้ำมันรำข้าวแบบผ่าน กระบวนการสกัดโดยใช้สารเคมีและความร้อนจะมีปริมาณแกมมา-โอไรซานอลเหลืออยู่เพียงร้อยละ 0.0005 หรือ 500 ppm ปัจจุบันมีการพัฒนากระบวนการผลิตน้ำมันรำข้าวให้คงมีปริมาณ แกมมา-โอไรซานอลสูงถึงร้อยละ 0.0040 หรือ 4,000 ppm โดยปริมาณของแกมมา-โอไรซานอล จะเป็นตัวบ่งชี้ถึงคุณภาพของน้ำมันรำข้าวในการเป็นสารต้านออกซิเดชัน ซึ่งแสดงให้เห็นว่าการ สกัดน้ำมันรำข้าวด้วยเทคนิคที่ใช้ความร้อนจะทำให้ได้ปริมาณแกมมา-โอไรซานอลน้อยกว่าเทคนิค ที่ไม่ใช้ความร้อน (คมสัน, 2550; Krishna *et al.*, 2006) จากการศึกษาของ Khuwijitjaru และคณะ (2009) พบว่าปริมาณแกมมา-โอไรซานอลลดลงมากกว่าร้อยละ 50 เมื่อทดสอบที่อุณหภูมิ 120, 150, และ 200 องศาเซลเซียส นอกจากนั้นจากการศึกษาความคงตัวของแกมมา-โอไรซานอลที่ อุณหภูมิ 132, 160, 192, และ 222 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 480, 140, 60, และ 50 ชั่วโมง ตามลำดับ พบว่าทุกสภาวะที่ทดสอบทำให้ปริมาณแกมมา-โอไรซานอลลดลงอย่างมีนัยสำคัญ

การพัฒนาเทคนิคสำหรับวิเคราะห์ปริมาณแกมมา-โอไรซานอลนั้นเริ่มขึ้นโดย Diack และ Saska ในปี ค.ศ.1994 โดยการใช้เทคนิค normal phase high performance liquid chromatography (HPLC) ซึ่งสามารถแยกแกมมา-โอไรซานอลได้เป็น 2 ส่วนสกัด (fractions) และแต่ละส่วนสกัด ประกอบด้วยสารสำคัญอย่างน้อย 2 ชนิดหรือมากกว่านั้น การตรวจเอกลักษณ์และวิเคราะห์ ปริมาณของสารสำคัญแต่ละชนิดในแกมมา-โอไรซานอลนั้นจึงเป็นเรื่องที่ยากขึ้นเนื่องมาจากการ แยกสกัดสารสำคัญแต่ละชนิดได้ไม่สมบูรณ์ นอกจากนั้นยังมีการใช้เทคนิค reversed-phase HPLC สามารถแยกสารสำคัญได้ 5 ชนิด (Norton, 1995) หรือ 6 ชนิด (Evershed *et al.*, 1988; Rogers *et al.*, 1993) หลังจากนั้นจึงสามารถแยกแกมมา-โอไรซานอลได้สำเร็จจากน้ำมันรำข้าวโดยใช้เทคนิค

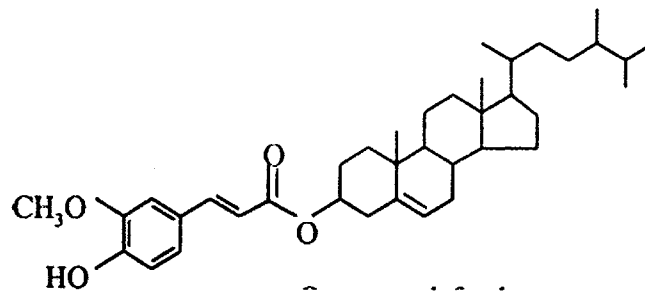
preparative normal-phase HPLC ได้เป็นแกมมา-โอไรซานอลเข้มข้น (concentrated γ -oryzanol) จากนั้นจึงทำการแยกและลดการรบกวนจากสารอื่นด้วยเทคนิค reverse-phase HPLC ซึ่งสามารถแยกสารสำคัญได้ถึง 10 ชนิด คือ Δ^7 -stigmasteryl ferulate, stigmasteryl ferulate, cycloartenyl ferulate, 24-methylenecycloartanyl ferulate, Δ^7 -campestenyl ferulate, campestenyl ferulate, Δ^7 -sitostenyl ferulate, sitostenyl ferulate, campestanyl ferulate และ sitostanyl ferulate ซึ่งสารสำคัญหลัก 3 ชนิดที่พบในแกมมา-โอไรซานอลคือ cycloartenyl ferulate, 24-methylenecycloartanyl ferulate และ campestenyl ferulate (Zullaikah *et al.*, 2009) จากการที่แกมมา-โอไรซานอลมีองค์ประกอบเป็นเอสเทอร์ของกรดเฟอรูลิกซึ่งเป็นอนุพันธ์ของกรดคาร์บอกซิลิก ดังนั้นเมื่ออยู่ในสภาวะสารละลายที่เป็นกรดและด่าง จะทำให้ H^+ และ OH^- เข้าไปทำปฏิกิริยากับหมู่คาร์บอนิลของหมู่เอสเทอร์ (อนุพันธ์ของกรดคาร์บอกซิลิก) ได้เป็นกรดคาร์บอกซิลิกและแอลกอฮอล์ ดังนั้นในสภาวะของระบบทางเดินอาหารโดยเฉพาะสภาวะกรดของกระเพาะอาหาร อาจทำให้เกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสด้วยกรด ทำให้สารสำคัญในแกมมา-โอไรซานอลเกิดการสลายตัวซึ่งอาจส่งผลต่อการดูดซึมเข้าสู่เซลล์ได้



Cycloartenyl ferulate



24-methylene cycloartanyl ferulate



Campesteryl ferulate

รูปที่ 2.1 สารสำคัญหลักที่พบในแอมมา-โอโรซานอล

2.4 โทโคไตรอีนอลและโทโคเฟอรอล (tocotrienol and tocopherol)

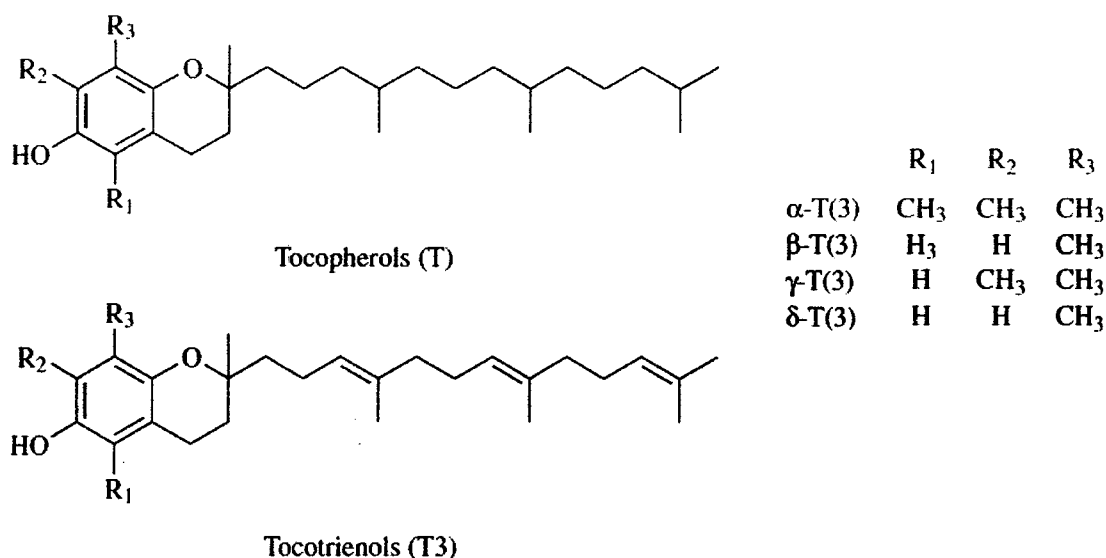
เมื่อพิจารณาจากโครงสร้างของโทโคไตรอีนอลและโทโคเฟอรอลนั้นจะประกอบด้วย โครงสร้าง 2 ส่วน (ดังรูปที่ 2.2) คือ วงแหวน chromanol และ hydrophobic side chain ที่เชื่อมต่อกันที่ตำแหน่ง C-2 โดยสามารถแบ่งเป็นโทโคไตรอีนอลและโทโคเฟอรอลตาม hydrophobic side chain ดังนี้คือ

1. โทโคเฟอรอล (tocopherol) มี hydrophobic side chain เป็น phytyl side chain ซึ่งประกอบด้วย chiral center ทั้งหมด 3 ตำแหน่ง คือ ที่ตำแหน่ง C-2 ในวงแหวน chromanol และที่

ตำแหน่ง C-4' และ C-8' ใน phytyl side chain โดยที่โทโคเฟอรอลแบ่งเป็น 4 รูปแบบ (แอลฟา, แกมมา, บีตา, และเดลต้า) ตามจำนวนและตำแหน่งของหมู่เมทิล (methyl group) ในวงแหวน chromanol เมื่อพิจารณาจากโครงสร้างแล้วสามารถเรียงลำดับความไม่มีชีวิตของโทโคเฟอรอลได้ดังนี้ แอลฟา > แกมมา > บีตา > เดลต้า โดยพบว่าแอลฟา-โทโคเฟอรอลเป็นรูปแบบที่พบมากที่สุด ใน endogenous lipid-soluble และมีฤทธิ์ยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาลูกโซ่ของไขมัน (ลิพิดเปอร์ออกซิเดชัน) ได้ดีที่สุดอีกด้วย

2. โทโคไตรเอนอล (tocotrienol) มี hydrophobic side chain เป็น isophytyl side chain ซึ่งประกอบด้วย chiral center เพียง 1 ตำแหน่งคือ ที่ตำแหน่ง C-2 ของวงแหวน chromanol โดยจะมีพันธะคู่ 3 ตำแหน่งใน hydrophobic side chain คือ ที่ตำแหน่ง C-3', C-7', และ C-11' โดยที่โทโคไตรเอนอลก็แบ่งเป็น 4 รูปแบบเช่นเดียวกับโทโคไตรเอนอล คือ แอลฟา, แกมมา, บีตา, และเดลต้า

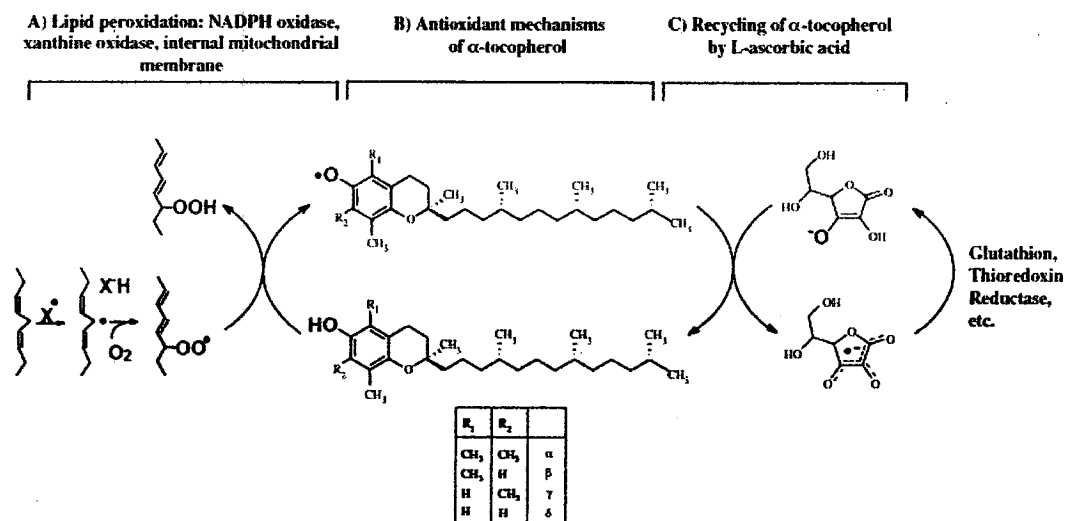
โทโคไตรเอนอลและโทโคเฟอรอลเป็นสารที่มีความว่องไวในการสลายตัวและเสื่อมสภาพจากการถูกออกซิไดซ์ โดยเฉพาะในสภาวะที่มีแสง ความร้อน สภาวะกรดและด่าง (Adam *et al.*, 2007)



รูปที่ 2.2 โครงสร้างของโทโคไตรเอนอลและโทโคเฟอรอล (Christie, 2014)

ในกระบวนการทางชีวเคมีของเซลล์ในร่างกายจะมีการถ่ายทอดอิเล็กตรอนอยู่ตลอดเวลา หากมีกระบวนการดังกล่าวเพิ่มมากขึ้นกว่าปกติอาจทำให้ระบบ antioxidant defense system กำจัดอนุมูลอิสระได้ไม่สมบูรณ์ จึงอาจมีอนุมูลอิสระที่หลุดออกมาและเข้าทำปฏิกิริยากับสารชีวโมเลกุลทั้งไขมัน ดีเอ็นเอและโปรตีนได้ โดยถ้าเป็นปฏิกิริยากับไขมันจะเรียกว่า ปฏิกิริยาลิพิดเปอร์ออกซิเดชัน (lipid peroxidation) ซึ่งเป็นปฏิกิริยาแบบลูกโซ่ของไขมันชนิดไม่อิ่มตัว (unsaturated

fatty acid) โดยที่อนุมูลอิสระเพียง 1 โมเลกุลสามารถทำให้เกิดลิพิดเปอร์ออกซิเดชันเป็นจำนวนหลายร้อยโมเลกุลก่อนที่จะสิ้นสุดปฏิกิริยา เนื่องจากปฏิกิริยาลิพิดเปอร์ออกซิเดชันสามารถเกิดได้ง่ายกับเยื่อหุ้มเซลล์ซึ่งเป็นฟอสโฟลิพิด ซึ่งประกอบด้วยไขมัน 2 ชั้น การเกิดลิพิดเปอร์ออกซิเดชันกับชั้นไขมันในเยื่อหุ้มเซลล์นั้นทำให้เยื่อหุ้มเซลล์มีคุณสมบัติเปลี่ยนไป ส่งผลต่อเอนไซม์และตัวรับ (receptor) ที่ฝังตัวอยู่ในเยื่อหุ้มเซลล์ ทำให้เกิดพยาธิสภาพต่างๆ ตามมา โดยที่โทโคเฟอรอลและวิตามินซีจะทำงานร่วมกันในการยับยั้งปฏิกิริยาลิพิดเปอร์ออกซิเดชัน เนื่องจากโทโคเฟอรอลจะถูกเก็บสะสมไว้ในชั้นไขมัน ดังนั้นอนุมูลลิพิดเปอร์ออกไซด์ที่เกิดขึ้นจากอนุมูลอิสระเข้าทำปฏิกิริยากับไขมันที่ไม่อิ่มตัวจะถูกกำจัดด้วยโทโคเฟอรอลเพื่อยุติปฏิกิริยาลูกโซ่ดังกล่าว ดังรูปที่ 2.3 เมื่อโทโคเฟอรอลให้ไฮโดรเจนแก่อนุมูลลิพิดเปอร์ออกไซด์แล้วจะเปลี่ยนแปลงเป็นอนุมูล tocopheroxyl จากนั้นวิตามินซีจะทำหน้าที่ในการเปลี่ยนอนุมูล tocopheroxyl กลับมาเป็นโทโคเฟอรอลเช่นเดิม ในขณะที่วิตามินซีจะถูกเปลี่ยนเป็นอนุมูล ascorbyl จากนั้นอนุมูล ascorbyl จะถูกเปลี่ยนรูปให้กลับมาเป็น ascorbic acid (active form) อีกครั้งด้วย glutathione หรือ thioredoxin reductase



รูปที่ 2.3 วงจรการทำงานของโทโคเฟอรอลร่วมกับวิตามินซีในการยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาลูกโซ่ของไขมัน (Niki et al., 2005)

หลังจากการวิจัยพบว่าแอลฟา-โทโคไตรอีนอลที่ได้จากข้าวบาร์เลย์ (*Hordeum vulgare* L.) มีฤทธิ์ยับยั้งการสร้างโคเลสเตอรอลนั้นทำให้ทราบถึงคุณประโยชน์ของโทโคไตรอีนอลต่อสุขภาพและการป้องกันโรค (Qureshi et al., 2000) ต่อจากนั้นมีการศึกษาวิจัยพบว่าน้ำมันปาล์มเป็นแหล่งของโทโคไตรอีนอล (Elson, 1992) ซึ่งพบว่าในน้ำมันปาล์มซึ่งสกัดมาจากผิวของผลปาล์มนั้นมีส่วนประกอบเป็นโทโคเฟอรอลร้อยละ 30 และโทโคไตรอีนอลร้อยละ 70 (Sundram et al., 2003) แต่น้ำมันปาล์มก็ไม่ได้ได้รับความนิยมเนื่องจากมีส่วนประกอบของ saturated fatty acid ร้อยละ 50

unsaturated fatty acid ร้อยละ 40 และ polyunsaturated fatty acid ร้อยละ 10 ซึ่งจากส่วนประกอบของน้ำมันปาล์มนี้มีส่วนประกอบของไขมันที่ไม่อิ่มตัวสูงจึงอาจส่งผลกระทบต่อสุขภาพได้ ทางสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยาของประเทศสหรัฐอเมริกาจึงกำหนดให้ระบุปริมาณ tran-fatty acid บนฉลากตั้งแต่ปี ค.ศ.2003 เป็นต้นมา ต่อจากนั้นมีการค้นพบว่าน้ำมันรำข้าวเป็นแหล่งที่สำคัญของแกมมา-โทโคไตรอีนอลแต่กลับพบว่าปริมาณแอลฟา-โทโคไตรอีนอลค่อนข้างต่ำ มีการศึกษาวิจัยพบว่าในน้ำมันรำข้าวมีส่วนประกอบของโทโคไตรอีนอลรูปแบบใหม่ 2 ชนิด คือ desmethyl tocotrienol [3,4-dihydro-2-methyl-2-(4,8,12-trimethyltrideca-3'(E), 7'(E), 11'-trienyl)-2H-1-benzopyran-6-ol] และ didesmethyl tocotrienol [3,4-dihydro-2-(4,8,12-trimethyltrideca-3'(E), 7'(E), 11'-trienyl)-2H-1-benzopyran-6-ol] (Qurechi *et al.*, 2000) จากการศึกษาวิจัยพบว่าเอนไซม์ 3-hydroxy-3-methylglutaryl (HMG-CoA) CoA reductase ซึ่งจะผลิตเมวาโลเนต (mevalonate) ซึ่งจะถูกเปลี่ยนแปลงต่อไปเป็นสเตอรอล (sterol) และผลิตภัณฑ์อื่นๆ ซึ่งโทโคไตรอีนอลสามารถลด total cholesterol และ LDL-cholesterol ได้จากการที่ไปยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ HMG-CoA reductase ผ่านกลไกทาง post-transcription แต่อย่างไรก็ตามกลับพบว่าแอลฟา-โทโคเฟอรอลกลับมีฤทธิ์ที่ตรงกันข้ามโดยไปกระตุ้นกิจกรรมของเอนไซม์ดังกล่าว (Qurechi *et al.*, 2000) ซึ่งผลการวิจัยดังกล่าวยังไม่ทราบกลไกที่แน่นอน ต้องมีการศึกษาวิจัยในเชิงลึกต่อไป นอกจากนี้ยังมีการศึกษาผลของส่วนสกัดที่มีปริมาณโทโคไตรอีนอลสูงจากน้ำมันปาล์มต่อการลดระดับโคเลสเตอรอลในเลือดหมูที่มีระดับโคเลสเตอรอลสูง พบว่ากลุ่มทดลองที่ได้รับส่วนสกัดที่มีปริมาณโทโคไตรอีนอลสูงลดระดับ total serum cholesterol ลงร้อยละ 44 ลดระดับ LDL-cholesterol ลงร้อยละ 60 ทั้งยังลดระดับ apolipoprotein B ลงอย่างมีนัยสำคัญ (ร้อยละ 26) ลดระดับ thromboxane-B2 ลงร้อยละ 41 และลดระดับ platelet factor 4 ลงร้อยละ 29 จากผลดังกล่าวสามารถสรุปได้ว่าส่วนสกัดที่มีโทโคไตรอีนอลสูงนั้นสามารถป้องกัน endothelium และ platelet aggregation ได้ (Qureshi *et al.*, 1991a) ไม่ใช่โทโคไตรอีนอลจากน้ำมันปาล์มเท่านั้นที่มีการศึกษาวิจัย แต่ยังมีการศึกษาวิจัยฤทธิ์ลดระดับโคเลสเตอรอลจากโทโคไตรอีนอลที่ได้จากน้ำมันรำข้าว (Chen & Cheng, 2006; Qureshi *et al.*, 2001a) สำหรับข้อมูลที่สนับสนุนกลไกการลดระดับโคเลสเตอรอลในเลือดของโทโคไตรอีนอลมาจากการยับยั้ง post-transcriptional ของเอนไซม์ HMG-CoA reductase ซึ่งจะไปยับยั้งการสร้างโคเลสเตอรอล (Pearce *et al.*, 1992) นอกจากนี้ยังพบว่าแกมมา-โทโคไตรอีนอลซึ่งพบมากในน้ำมันรำข้าวจะกระตุ้นกระบวนการสลายโคเลสเตอรอล (Chen & Cheng, 2006) ในการศึกษาในหลอดทดลองพบว่าแกมมา-โทโคไตรอีนอลมีฤทธิ์ยับยั้งกระบวนการชีวสังเคราะห์ของโคเลสเตอรอลสูงกว่าแอลฟา-โทโคไตรอีนอลถึง 30 เท่า สำหรับโทโคไตรอีนอลที่ได้จากการสังเคราะห์ (racemic) และโทโคไตรอีนอลที่ได้จากธรรมชาติ (chiral) แสดงฤทธิ์ยับยั้งกระบวนการชีวสังเคราะห์ของโคเลสเตอรอลและการยับยั้งการแสดงออก (expression) ของเอนไซม์ HMG-CoA reductase ที่ใกล้เคียงกัน (Pearce *et*

et al., 1992) จึงอาจสรุปได้ว่าโทโคไตรอีนอลไปรบกวน mevalonate pathway ในเซลล์สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมโดยไปยับยั้งการแสดงออกของยีนแบบ post-transcriptional ของเอนไซม์ HMG-CoA reductase และมีความจำเพาะเจาะจงในการควบคุมกลไกระดับในเซลล์ (intracellular mechanism) ในการสลาย reductase protein (Parker *et al.*, 1993) ซึ่งสามารถกล่าวได้ว่า farnesyl side chain และหมู่แทนที่ methyl/hydroxyl ของแกมมา-โทโคไตรอีนอลทำให้มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ HMG-CoA reductase ที่ดีมากกว่าโทโคไตรอีนอลที่ได้จากการสังเคราะห์ (Pearce *et al.*, 1994)

ไอโซพรีนอยด์ (isoprenoids) ทั้งบริสุทธิและชนิดสารผสมแสดงฤทธิ์ต้านมะเร็งที่ดี (Mo & Elson, 1999) โดยที่โทโคไตรอีนอลเป็นไอโซพรีนอยด์ ในขณะที่โทโคเฟอร์รอลไม่ใช่ ซึ่งแอลฟา-โทโคไตรอีนอลเป็นรูปแบบที่มีฤทธิ์ปกป้องระบบประสาท (neuroprotection) ดีที่สุด (Khanna *et al.*, 2006) และยังพบว่าแกมมาและเดลต้า-โทโคไตรอีนอลเป็นสารธรรมชาติที่มีฤทธิ์ต้านมะเร็งที่ดีกว่ารูปแบบอื่นๆ โดยพบว่าฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของโทโคไตรอีนอลไม่ได้มีความสัมพันธ์กับฤทธิ์ต้านมะเร็ง แม้ว่าหมู่ฟีนอลิกในโทโคไตรอีนอลไม่ได้มีส่วนสำคัญต่อฤทธิ์ต้านมะเร็ง แต่ก็ยังพบว่า side chain มีส่วนกับฤทธิ์ต้านออกซิเดชันอยู่บ้างซึ่งสามารถป้องกันการก่อมะเร็งได้ (Yu *et al.*, 2005) ส่วนสกัดที่มีโทโคไตรอีนอลสูงจากน้ำมันปาล์มถูกนำมาศึกษาในการต้านมะเร็งเต้านม ส่วนสกัดดังกล่าวไม่ได้มีเพียงโทโคไตรอีนอลเท่านั้น ยังประกอบด้วยแอลฟา-โทโคเฟอร์รอลด้วย การศึกษาวิจัยพบว่าส่วนสกัดที่มีโทโคไตรอีนอลสูงที่ความเข้มข้น 180 $\mu\text{g/mL}$ สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ MDA-MB-435 estrogen receptor-negative ได้ร้อยละ 50 ในขณะที่แอลฟา-โทโคเฟอร์รอลไม่แสดงฤทธิ์ดังกล่าวแม้จะเพิ่มความเข้มข้นสูงถึง 1,000 $\mu\text{g/mL}$ ซึ่งจากผลข้างต้นนักวิจัยได้ทำการศึกษาในระยะเวลาที่ยาวนานขึ้น โดยใช้ส่วนสกัดที่มีโทโคไตรอีนอลสูงที่ความเข้มข้น 180 $\mu\text{g/mL}$ และแอลฟา-โทโคเฟอร์รอลที่ความเข้มข้น 500 $\mu\text{g/mL}$ ซึ่งผลการทดสอบก็เป็นเช่นเดิม ซึ่งจากการวิจัยดังกล่าวได้ตอบสมมุติฐานที่ว่าแอลฟา-โทโคเฟอร์รอลที่พบในส่วนสกัดที่มีโทโคไตรอีนอลสูงนั้นไม่ได้มีส่วนในการออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งและโทโคไตรอีนอลมากกว่าที่เป็นตัวออกฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง (Nasaretnam *et al.*, 1995) นอกจากนั้นยังมีรายงานการวิจัยพบว่าส่วนสกัดที่มีโทโคไตรอีนอลสูง แอลฟา-แกมมา- และเดลต้า-โทโคไตรอีนอลยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ estrogen receptor-negative MDA-MB-435 ที่ความเข้มข้นในการยับยั้งการเจริญเติบโตร้อยละ 50 (IC_{50}) เท่ากับ 180, 30, และ 90 $\mu\text{g/mL}$ ตามลำดับ ในขณะที่แอลฟา-โทโคเฟอร์รอลไม่แสดงฤทธิ์ดังกล่าวแม้จะเพิ่มความเข้มข้นไปถึง 500 $\mu\text{g/mL}$ นอกจากนั้นสารสกัดที่มีโทโคไตรอีนอลสูง แอลฟา-แกมมา- และเดลต้า-โทโคไตรอีนอลยังยับยั้งการเจริญเติบโตของ estrogen receptor-positive MCF-7 ที่ความเข้มข้นในการยับยั้งการเจริญเติบโตร้อยละ 50 เท่ากับ 4, 6, และ 2 $\mu\text{g/mL}$ ตามลำดับ โดยที่แอลฟา-โทโคเฟอร์รอลมีฤทธิ์ต่ำกว่า 20-50 เท่า โดยมีค่าความเข้มข้นในการยับยั้งการเจริญเติบโตร้อยละ 50 เท่ากับ

125 $\mu\text{g/mL}$ ในขณะที่ tamoxifen ซึ่งเป็น synthetic anti-estrogen ยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ MCF-7 ที่ความเข้มข้นที่ยับยั้งการเจริญเติบโตร้อยละ 50 เท่ากับ 0.04 $\mu\text{g/mL}$ และยังพบว่ามีเฉพาะแกมมา-และเดลต้า-โทโคไตรอีนอลที่มี tamoxifen ผสมอยู่ด้วยแสดงฤทธิ์ synergistic inhibitory ในการยับยั้งอัตราการเจริญเติบโตและการเจริญเติบโตของเซลล์ MCF-7 โดยที่แอลฟา-โทโคเฟอรอลไม่แสดงฤทธิ์ synergistic inhibitory เมื่อให้ร่วมกับ tamoxifen (Guthrie *et al.*, 1997) นอกจากนี้ยังพบว่าเซลล์มะเร็งเต้านม MDA-MB-231 ถูกยับยั้งการเจริญเติบโตที่ความเข้มข้นของสารสกัดที่มีโทโคไตรอีนอลสูงเท่ากับ 20 $\mu\text{g/mL}$ นอกจากนั้นจากการทดลองพบว่าโทโคไตรอีนอลแต่ละรูปแบบที่พบในส่วนสกัดที่มีโทโคไตรอีนอลสูงและส่วนสกัดที่มีโทโคไตรอีนอลสูงสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตทั้งในเซลล์ estrogen-responsive เช่นเดียวกับเซลล์ estrogen-nonresponsive ทั้งในสภาวะที่มีและไม่มี estradiol (Nesaretnam *et al.*, 2000) การยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ MCF-7 อย่างสมบูรณ์เกิดขึ้นเมื่อได้รับแกมมา-โทโคไตรอีนอลหรือเดลต้า-โทโคไตรอีนอลที่ความเข้มข้น 6 $\mu\text{g/mL}$ ในสภาวะที่ไม่มี estradiol และเดลต้า-โทโคไตรอีนอลที่ความเข้มข้น 10 $\mu\text{g/mL}$ ในสภาวะที่มี estradiol ในทางกลับกันแกมมา-โทโคไตรอีนอลที่ความเข้มข้น 10 $\mu\text{g/mL}$ ไม่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ MDA-MB-231 ได้ในสภาวะที่มี estradiol ในขณะที่แอลฟา-โทโคเฟอรอลไม่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ MCF-7, MDA-MB-231, หรือ ZR-75-1 ได้ทั้งในสภาวะที่มีและไม่มี estradiol (Mo & Elson, 1999; Nerasetnam *et al.*, 2000) จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่ากลไกการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งเต้านมของโทโคไตรอีนอลไม่ได้ผ่านกลไก estrogen receptor-mediated pathway แต่อาจผ่านกลไก estrogen antagonists นอกเหนือจากนั้นยังพบว่าโทโคไตรอีนอลไม่สามารถเพิ่มระดับ growth-inhibitory insulin-like growth factor binding protein ในเซลล์ MCF-7 ได้ ซึ่งมีความแตกต่างจากกลไกของ retinolic acid ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งเต้านมชนิด estrogen-responsive (Nesaretnam *et al.*, 1998) กลไกในระดับโมเลกุลของโทโคไตรอีนอลในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งเต้านมนั้นพบว่า เดลต้า-โทโคไตรอีนอลกระตุ้นการแสดงออกของยีน TGF- β receptor II และกระตุ้นสัญญาณ TGF- β -, Fas-, และ JNK (Shun *et al.*, 2004) นอกจากนี้ส่วนสกัดที่มีโทโคไตรอีนอลสูงและแกมมา-โทโคไตรอีนอลกระตุ้นให้เซลล์ตายจากกระบวนการ apoptosis โดยที่ส่วนสกัดที่มีโทโคไตรอีนอลสูงและแกมมา-โทโคไตรอีนอลจะไปเพิ่มระดับของ caspase-8 และ caspase-3 ภายในเซลล์ โดยไม่มีผลต่อระดับ caspase-9 นอกจากนั้นพบว่าการทดสอบด้วยตัวยับยั้ง caspase-8 และ caspase-3 ที่จำเพาะเจาะจง จะไปยับยั้งการกระตุ้นให้เซลล์ +SA ตายด้วยโทโคไตรอีนอล จึงสามารถสรุปได้ว่าโทโคไตรอีนอลกระตุ้นให้เซลล์ +SA ตายโดยไปกระตุ้นสัญญาณ caspase-8 และ caspase-3 โดยที่ไม่มีผลต่อ caspase-9 (Shah *et al.*, 2003)

จะเห็นว่าโทโคไตรอินอลและโทโคเฟอร์รอลมีฤทธิ์ทางชีวภาพมากมาย แต่โทโคไตรอินอลและโทโคเฟอร์รอลก็มีปัญหาเรื่องความคงตัวด้วย มีรายงานวิจัยพบว่าความร้อนมีผลต่อความคงตัวของโทโคไตรอินอลและโทโคเฟอร์รอลในน้ำมันปาล์ม โดยพบว่าความร้อนส่งผลต่อความคงตัวของแกมมา-โทโคเฟอร์รอล แอลฟา-โทโคเฟอร์รอล แกมมา-โทโคไตรอินอลและแกมมา-โทโคเฟอร์รอล โดยส่งผลเล็กน้อยต่อแอลฟา-โทโคเฟอร์รอลและแอลฟา-โทโคไตรอินอล (Adam *et al.*, 2007) นอกจากนี้ยังพบว่าสภาวะที่มีออกซิเจนจะส่งผลต่อความคงตัวของโทโคไตรอินอลและโทโคเฟอร์รอลด้วยเช่นกัน (Leskova *et al.*, 2006)

2.5 เทคนิคการสกัดด้วยของไหลวิกฤตยิ่งยวด

ปัจจุบันผู้บริโภคให้ความสนใจในผลิตภัณฑ์สุขภาพจากธรรมชาติมากขึ้น เนื่องจากมีรายงานถึงอันตรายและความเป็นพิษน้อยกว่าการใช้ผลิตภัณฑ์ที่ผ่านการสังเคราะห์ทางเคมี แต่โดยทั่วไปการเตรียมสารสกัดจากสารธรรมชาติและสมุนไพรนั้นจะใช้เทคนิคการสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ (organic solvent) ซึ่งได้แก่ เฮกเซน (hexane) เมทานอล (methanol) เอทานอล (ethanol) อะซีโตน (acetone) เอทิลอะซิเตต (ethyl acetate) และเตตระไฮโดรฟิวแรน (tetrahydrofuran) เป็นต้น ซึ่งปัญหาและข้อเสียที่พบจากการสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์คือ ต้องใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ในปริมาณสูง ตัวทำละลายที่นำมาใช้มีราคาสูง ติดไฟง่าย ตัวทำละลายบางชนิดมีความเป็นพิษต่อร่างกายของผู้ใช้และผู้บริโภคหากมีการตกค้าง เมื่อมีการใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ในการสกัดปริมาณสูงส่งผลให้จำเป็นต้องมีกระบวนการกำจัดตัวทำละลายอินทรีย์ที่เหลือจากกระบวนการสกัดที่มีประสิทธิภาพและส่งผลต่อสิ่งแวดล้อมน้อยที่สุดอีกด้วย ปัจจุบันจึงมีการพัฒนาวิธีการกักตุนสารสำคัญจากสารธรรมชาติและสมุนไพรที่มีความเป็นมิตรกับสุขภาพและเป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อมขึ้น เทคนิคหนึ่งที่ถูกพัฒนาขึ้นคือ การสกัดด้วยของไหลวิกฤตยิ่งยวด (supercritical fluid extraction) โดยการอาศัยคุณสมบัติของตัวทำละลายที่สภาวะวิกฤต (critical point) ของไหลวิกฤตยิ่งยวด (supercritical fluid) จะมีคุณสมบัติทางเคมีฟิสิกส์อยู่ระหว่างของเหลวและก๊าซ คือ มีความหนาแน่นค่อนข้างสูงคล้ายกับของเหลวจึงสามารถละลายสารได้ดี แต่จะมีความหนืดต่ำและมีความสามารถในการแพร่หรือซึมผ่านเข้าไปในโครงสร้างของแข็งได้ดีเหมือนก๊าซ ด้วยคุณสมบัติดังกล่าวข้างต้นจึงนิยมนำของไหลวิกฤตยิ่งยวดมาใช้เป็นตัวทำละลายในการสกัดสารสำคัญจากสารธรรมชาติและสมุนไพร โดยเฉพาะการใช้คาร์บอนไดออกไซด์มาใช้เป็นตัวทำละลายในการสกัดที่เรียกว่า การสกัดด้วยคาร์บอนไดออกไซด์วิกฤตยิ่งยวด (supercritical carbon dioxide extraction)

สารที่อยู่ในสภาวะของไหลวิกฤตยิ่งยวด (supercritical fluid) คือสารที่อยู่เหนืออุณหภูมิ ณ จุดวิกฤต (critical temperature) และความดัน ณ จุดวิกฤต (critical pressure) เมื่อสารอยู่เหนือจุดวิกฤตจะไม่สามารถเพิ่มความดันให้แก่สารที่อยู่ในสถานะก๊าซให้กลายเป็นของเหลวได้ (York, 1999)

การสกัดด้วยของไหลวิกฤตยิ่งยวดจะมีคุณสมบัติร่วมกันระหว่างของเหลวและก๊าซ โดยมีความหนาแน่นคล้ายของเหลวจึงมีความสามารถในการละลายสารได้ดี มีสัมประสิทธิ์การแพร่ (diffusion coefficient) คล้ายก๊าซและความหนืดต่ำกว่าของเหลวจึงทำให้การถ่ายเทมวล (mass transfer) และความสามารถในการแทรกซึมผ่านสารต่างๆ ได้ดี นอกจากนั้นคุณสมบัติทางกายภาพ เช่น ความสามารถในการละลายสาร การถ่ายเทมวลสาร ความสามารถในการซึมผ่านสารจะเปลี่ยนแปลงไปหากมีการเปลี่ยนอุณหภูมิและความดันเพียงเล็กน้อยเท่านั้น (Yasuji *et al.*, 2008) ปัจจุบันตัวทำละลายที่นิยมนำมาใช้ในการสกัดด้วยเทคนิคการสกัดด้วยของไหลวิกฤตยิ่งยวดคือ ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ เนื่องจากก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์มีข้อดีที่เป็นก๊าซเฉื่อย ไม่ไวไฟ ราคาถูก ไม่มีกลิ่น ไม่มีรส ไม่เป็นพิษ เป็นมิตรต่อสุขภาพและสิ่งแวดล้อม นอกจากนี้ยังง่ายต่อการกำจัดออกจากสารสกัดที่ได้และไม่เหลือตัวทำละลายตกค้างในสารสกัดที่ได้ การใช้คาร์บอนไดออกไซด์เป็นตัวทำละลายในการสกัดด้วยคาร์บอนไดออกไซด์วิกฤตยิ่งยวดมีข้อดีคือ มีจุดวิกฤตต่ำ ที่สภาวะความดัน 72.8 บาร์รยาศและที่อุณหภูมิ 31.1 องศาเซลเซียส ในสภาวะวิกฤตยิ่งยวดนี้ คาร์บอนไดออกไซด์จะมีคุณสมบัติเป็นตัวทำละลายที่ดี การใช้อุณหภูมิต่ำจึงไม่มีปัญหาเกี่ยวกับการสลายตัวของสารสกัดที่ได้อันเนื่องมาจากความร้อน นอกจากนี้ยังสามารถแยกออกจากสารสกัดได้ง่ายหลังจากสิ้นสุดขั้นตอนการสกัดด้วยการลดความดัน จึงไม่เหลือตัวทำละลายตกค้างในสารสกัดที่ได้ จึงไม่มีผลเสียต่อสุขภาพ อีกทั้งคาร์บอนไดออกไซด์ที่ใช้เป็นตัวทำละลายก็ไม่มีผลเสียต่อสิ่งแวดล้อมอีกด้วย มีรายงานวิจัยหลายเรื่องที่มีการประยุกต์ใช้เทคนิคการสกัดด้วยของไหลวิกฤตยิ่งยวดมาใช้ในการสกัดสารสำคัญ ตัวอย่างเช่น การวิจัยของ Mastaroh และคณะ (2001) ได้ใช้การสกัดด้วยของไหลวิกฤตยิ่งยวดในการแยกส่วนต่างๆ ของน้ำมันปาล์มดิบในลักษณะกึ่งต่อเนื่อง พบว่าเบต้าแคโรทีนสามารถสกัดออกมาได้ยากเมื่อใช้ความดันสูงอันเนื่องมาจากมีความเข้มข้นของสาร Raffinate (สารประกอบอื่นๆ ที่มีลักษณะข้นหนืด) สูง ทำให้ส่งผลต่อประสิทธิภาพของการสกัด Rozzi และคณะ (2002) ได้ทำการพัฒนาและหาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้ด้วยเทคนิคของไหลวิกฤตยิ่งยวด จากการศึกษาพบว่าสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้คือ อุณหภูมิ 35–50 องศาเซลเซียส ความดัน 90–110 bar ขนาดอนุภาคของผงตะไคร้ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 4–8 มิลลิเมตรและเวลาที่ใช้ในกระบวนการสกัด 3 ชั่วโมง นอกจากนั้นยังมีรายงานวิจัยเปรียบเทียบการสกัดแกมมา-โอโรซานอลจากรำข้าวด้วยตัวทำละลายอินทรีย์กับการใช้คาร์บอนไดออกไซด์วิกฤตยิ่งยวด พบว่าการสกัดแกมมา-โอโรซานอลจากรำข้าวด้วยคาร์บอนไดออกไซด์วิกฤตยิ่งยวดให้ %Yield สูงกว่าเมื่อสกัดด้วยเฮกเซนและไอโซ-โพรพานอล ในอัตราส่วน 50:50 ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 45–60 นาที เป็นจำนวน 4 เท่า (Xu and Godber, 1999)

2.6 การสกัดด้วยการบีบเย็น (Cold-pressed extraction)

เป็นเทคนิคการเตรียมน้ำมันโดยการใช้น้ำมันที่เย็นและใช้ความร้อนต่ำ แม้ว่าการใช้ความร้อนในการผลิตน้ำมันจะลดคุณภาพด้านกลิ่น สีและคุณค่าทางโภชนาการ แต่ในความเป็นจริงความร้อนจะช่วยเพิ่มผลผลิตที่ได้ น้ำมันที่เตรียมด้วยการบีบเย็นต้องผลิตในสิ่งแวดล้อมที่อุณหภูมิไม่เกินระดับที่กำหนดไว้ ซึ่งอุณหภูมิที่กำหนดไว้จะขึ้นอยู่กับชนิดของน้ำมัน แต่โดยทั่วไปจะกำหนดไว้ที่ 80 องศาฟาเรนไฮต์ (ประมาณ 27 องศาเซลเซียส) โดยส่วนใหญ่การสกัดน้ำมันรำข้าวสำหรับกลุ่มเกษตรกร ผู้ประกอบธุรกิจขนาดกลางและขนาดย่อมจะนิยมใช้เครื่องบีบอัดชนิดเกลียว (screw press) ในการเตรียมน้ำมันรำข้าว เนื่องจากหาซื้อเครื่องมือได้ง่าย ในราคาไม่สูงมากนัก มีการใช้งานไม่ซับซ้อน รวมทั้งมีการค่าใช้จ่ายในการดำเนินงานและซ่อมบำรุงต่ำ

จากหลักฐานงานวิจัยและระดับเทคโนโลยีที่มีอยู่ในประเทศ การผลิตน้ำมันรำข้าวชนิดแคปซูลอ่อน (soft gelatin capsule) นั้นต้องใช้งบประมาณในการลงทุนสูง ซึ่งจากข้อมูลที่สามารถค้นคว้าได้มีโรงงานที่รับบรรจุแคปซูลอ่อนอยู่ทั้งหมด 3 โรงงาน ซึ่งเป็นข้อจำกัดของวิสาหกิจชุมชน ผู้ประกอบธุรกิจขนาดกลางและขนาดย่อมในการสร้างโอกาสทางธุรกิจ คณะผู้วิจัยจึงมีความสนใจที่จะพัฒนาผลิตภัณฑ์น้ำมันรำข้าวชนิดแคปซูลแข็ง (hard gelatin capsule) ซึ่งใช้งบประมาณในการลงทุนต่ำกว่ามาก อีกทั้งได้คัดเลือกน้ำมันรำข้าวเก่าที่มีปริมาณแอมมา-โอโรซานอล โทโคไตรอีนอล และโทโคเฟอรอลสูงมาพัฒนาเป็นผงเพื่อบรรจุในแคปซูลแข็งชนิดแตกตัวในลำไส้ (enteric coated capsule) เพื่อลดการสูญเสียสารสำคัญที่ไม่คงตัวในสภาวะกรดของกระเพาะอาหาร

2.7 ระบบนำส่งยา

ระบบนำส่งยา (drug delivery system) คือ การเตรียมยาในรูปแบบต่างๆ ที่สามารถควบคุมให้ปลดปล่อยยาในอัตราและปริมาณที่กำหนด และสามารถนำยาไปยังอวัยวะ หรือบริเวณเป้าหมายในร่างกายได้ตามต้องการ เพื่อทำให้เกิดผลสูงสุดในการรักษาและลดผลข้างเคียง พอลิเมอร์นับเป็นองค์ประกอบที่สำคัญอย่างหนึ่งในระบบนำส่งยา ที่ช่วยควบคุมให้การปลดปล่อยยาเป็นไปตามต้องการ โดยทำหน้าที่ใน 3 ลักษณะใหญ่ๆ คือ เป็นสารช่วยควบคุมการปลดปล่อยให้เกิดช้าๆ และคงที่ในปริมาณที่ต้องการ เป็นตัวช่วยป้องกัน และนำส่งยาไปยังบริเวณเป้าหมายในร่างกาย โดยไม่ทำให้ยาเกิดการปลดปล่อย หรือตัวยายถูกทำลายไปก่อน ทั้งนี้พอลิเมอร์ที่เลือกใช้ต้องมีสมบัติทางชีวภาพที่สำคัญคือ มีความเข้ากันได้กับเนื้อเยื่อในร่างกาย (biocompatible) สามารถย่อยสลายได้ในร่างกาย (biodegradable) และสามารถย่อยสลายในร่างกายได้เมตาบอไลต์ (metabolite) จากการย่อยสลายที่ไปเป็นองค์ประกอบของเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน จึงทำให้ไม่เป็นพิษ เอนแคปซูเลชัน (encapsulation) (Rosenberg & Sheu, 1996; Yasutaka *et al.*, 1990) เป็นเทคนิคหนึ่งที่ถูกนำมาพัฒนาระบบนำส่งยา เอนแคปซูเลชันเป็นกระบวนการที่สารหรือส่วนผสมของสารถูกเคลือบด้วยสารชนิดอื่น สารที่ถูกเคลือบ (coated) หรือถูกยัดจับไว้ (entrapped) ส่วนใหญ่จะเป็น

ของเหลว แต่บางครั้งอาจเป็นอนุภาคของแข็งหรือก๊าซซึ่งมีชื่อเรียกแตกต่างกัน เช่น core material หรือ internal phase สารที่นำมาเคลือบจะเรียกว่า wall material, carrier, membrane, shell หรือ coating หรือการทำในรูปแบบของยาเม็ดที่มีการเคลือบด้วยพอลิเมอร์ที่ทนต่อสภาพกรดและสภาพที่อยู่ในลำไส้เล็กและสามารถแตกตัวและปลดปล่อยตัวยาได้เมื่อถึงลำไส้ใหญ่

การนำส่งยาทางการรับประทานมีการพัฒนาขึ้นมาตลอดเช่นเดียวกันเนื่องจากเป็นที่นิยมและสะดวกในการใช้ ไม่จำเป็นต้องผ่านการทำปฏิกิริยาจากเชื้อ จึงมีต้นทุนการผลิตต่ำ ระบบนำส่งทางการรับประทานที่มีการพัฒนา (Sastry *et al.*, 2000) ได้แก่

1. รูปแบบที่มีการแตกตัวหรือปลดปล่อยตัวยาอย่างรวดเร็วในช่องปากจนเกิดเป็นสารละลายหรือสารแขวนตะกอนโดยไม่จำเป็นต้องใช้น้ำ ซึ่งสะดวกต่อผู้ที่กลืนยายาก ซึ่งอาจใช้วิธีการเตรียมยาเม็ดธรรมดาหรือเตรียมโดยผ่านกระบวนการ lyophilization
2. รูปแบบที่อาศัยการเคลือบด้วยแรงประจุทางไฟฟ้า
3. รูปแบบยาที่สามารถควบคุมการปลดปล่อยยาเตรียมด้วยเทคนิค three-dimensional printing
4. รูปแบบที่เตรียมด้วยเทคนิค floss formation

การพัฒนาระบบนำส่งทางลำไส้ใหญ่ได้รับความสนใจมากขึ้นเรื่อยๆ ซึ่งในช่วงแรกมุ่งหวังการรักษาโรคเฉพาะที่เป็นสำคัญ อันได้แก่ ulcerative colitis, irritable bowel syndrome และ Crohn's disease ซึ่งตัวยาที่นำมาใช้รักษาเป็นยากลุ่มด้านการอักเสบและสเตียรอยด์เป็นส่วนใหญ่ (Junginger, 1993) นอกจากนั้นยังมีการพัฒนาการนำส่งสารธรรมชาติ เช่น การเตรียมยาเม็ดเคลือบฟิล์มฟ้าทะลายโจรผสมมังคุดเพื่อนำส่งยังลำไส้ โดยเคลือบเม็ดยาด้วยพอลิเมอร์ชนิด Eudragit L100 (เจนจิราและคณะ, 2013) นอกจากนั้นคณะผู้วิจัยยังได้พัฒนาระบบนำส่งสารสกัดแกมมา-โอโรซานอลจากข้าวกล้องผัสดูแลลำไส้ใหญ่ โดยการเคลือบฟิล์มเม็ดยาสองชั้นด้วยพอลิเมอร์สังเคราะห์ 2 ชนิดคือ Eudragit NE 30D เคลือบชั้นในสุดเพื่อชะลอการปลดปล่อยสารสำคัญบริเวณลำไส้เล็กและเคลือบชั้นนอกสุดด้วย Eudragit L100 เพื่อยับยั้งการปลดปล่อยสารสำคัญจากยาเม็ดในกระเพาะอาหารโดยอาศัยกลไกการควบคุมการละลายของสารเคลือบใน pH ที่แตกต่างกัน เป็นต้น ในการเคลือบฟิล์มยาเม็ดด้วยพอลิเมอร์สังเคราะห์นั้นต้องใช้อุณหภูมิของหม้อเคลือบอยู่ที่ประมาณ 97 – 103 องศาเซลเซียส ระยะเวลาในการเคลือบประมาณ 1.5 – 6 ชั่วโมง ดังนั้นในการพัฒนาระบบนำส่งสู่ลำไส้เล็กโดยการเคลือบฟิล์มเม็ดยาด้วยพอลิเมอร์สังเคราะห์นั้นจะส่งผลกระทบต่อปริมาณของโทโคไตรอีนอลและโทโคเฟอรอล เนื่องจากมีรายงานวิจัยพบว่าอุณหภูมิที่เกินกว่า 100 องศาเซลเซียสนั้นจะทำให้โทโคไตรอีนอลและโทโคเฟอรอลเสียสภาพไป (Adam *et al.*, 2007) ดังนั้นในการศึกษาวิจัยครั้งนี้คณะผู้วิจัยจึงทำการวิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญทั้งโทโคไตรอีนอล โทโคเฟอรอลและแกมมา-โอโรซานอลในตัวอย่างน้ำมันรำข้าวเก่าและน้ำมันรำข้าวขาว จากนั้นจึงคัดเลือกน้ำมันรำข้าวที่มีปริมาณโทโคไตรอีนอล โทโคเฟอรอลและแกมมา-โอโรซา

นอลสูงสุดมาจัดทำมาตรฐานของสารสำคัญและพัฒนาเป็นผงแกรนูลที่สามารถบรรจุลงในแคปซูลชนิดเคลือบเอนเทอริกได้ จากนั้นจึงศึกษาการละลายและปลดปล่อยสารสำคัญจากแคปซูลน้ำมันรำข้าวถ่วงถ่วงกล่าว