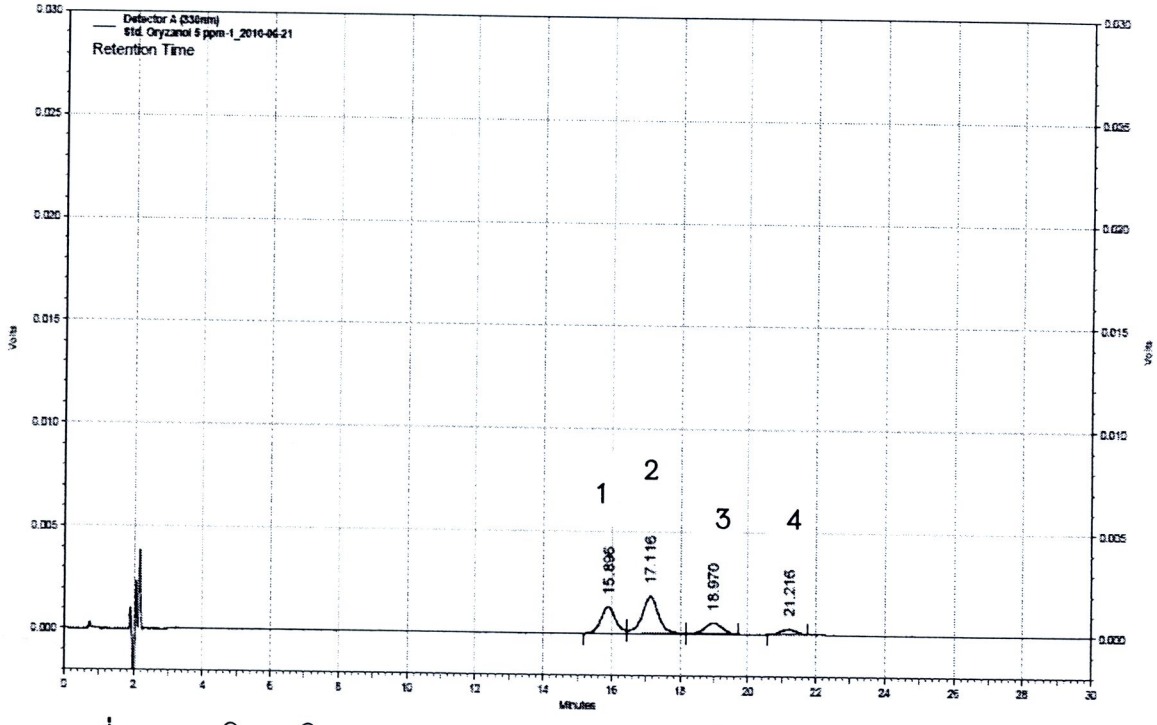
บทที่ 4
ผลการทดลองและอภิปรายผลการทดลอง

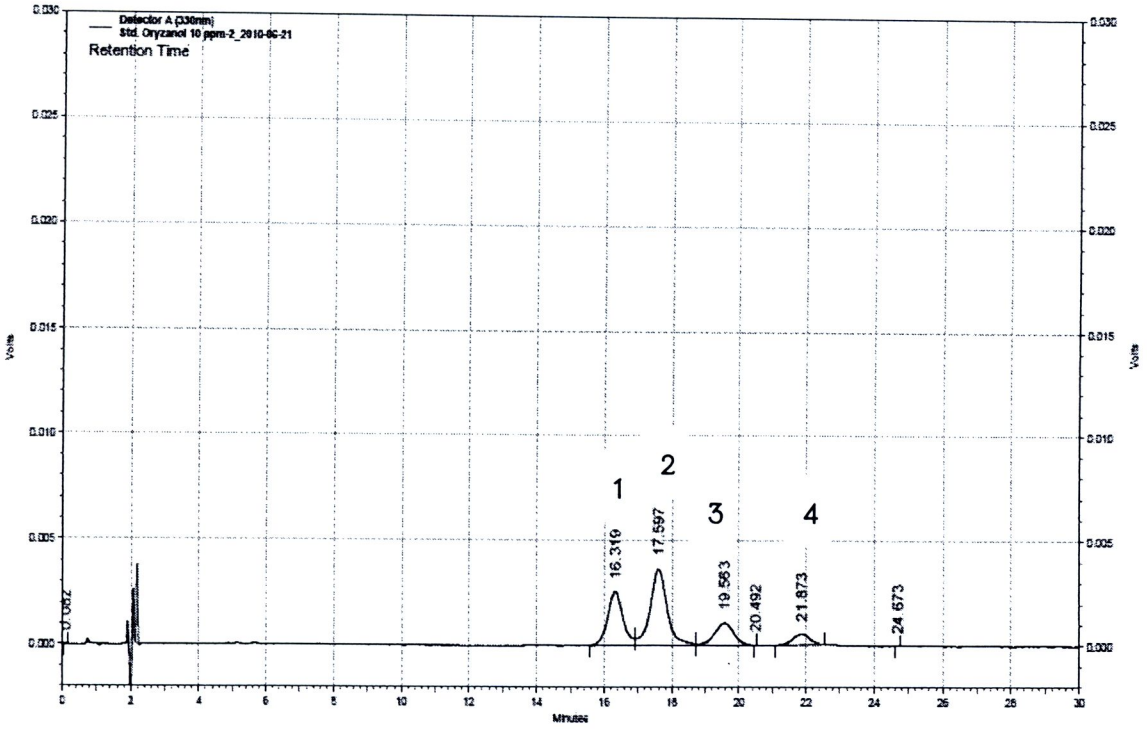
4.1 การวิเคราะห์ปริมาณแกมม่า-โอไรซานอล

เมื่อศึกษา HPLC โครมาโทแกรมเทียบกับสารมาตรฐานแกมม่า-โอไรซานอลที่ความเข้มข้นต่างๆ ดังรูปที่ 4 - 7 พบว่าสารมาตรฐานแกมม่า-โอไรซานอลประกอบด้วยสารสำคัญหลักทั้งหมด 4 ชนิดดังนี้ cycloartenyl ferulate (1), 24-methylenecycloartanyl ferulate (2), campesteryl ferulate (3) และ sitosteryl ferulate (4) ตามลำดับ โดยในปี ค.ศ.1999 Xu และ Godber สามารถแยกสารสำคัญจากน้ำมันรำข้าวได้ถึง 10 ชนิด ซึ่งประกอบด้วย Δ^7-stigmastenyl ferulate, stigmasteryl ferulate, cycloartenyl ferulate, 24-methylenecycloartanyl ferulate, Δ^7-campestenyl ferulate, campesteryl ferulate, Δ^7-sitotenyl ferulate, sitosteryl ferulate, campestanyl ferulate และ sitostanyl ferulate และพบว่า cycloartenyl ferulate, 24-methylenecycloartanyl ferulate และ campesteryl ferulate เป็นสารสำคัญหลักที่พบในสารมาตรฐานแกมม่า-โอไรซานอล เมื่อนำข้อมูล Peak area และน้ำหนักของสารมาตรฐานแกมม่า-โอไรซานอลมาสร้างกราฟมาตรฐานพบว่าได้กราฟเส้นตรง โดยมีสมการ $y = 1386.3X - 70.661$ และมีค่า $R^2 = 0.999$ (ดังรูปที่ 8)

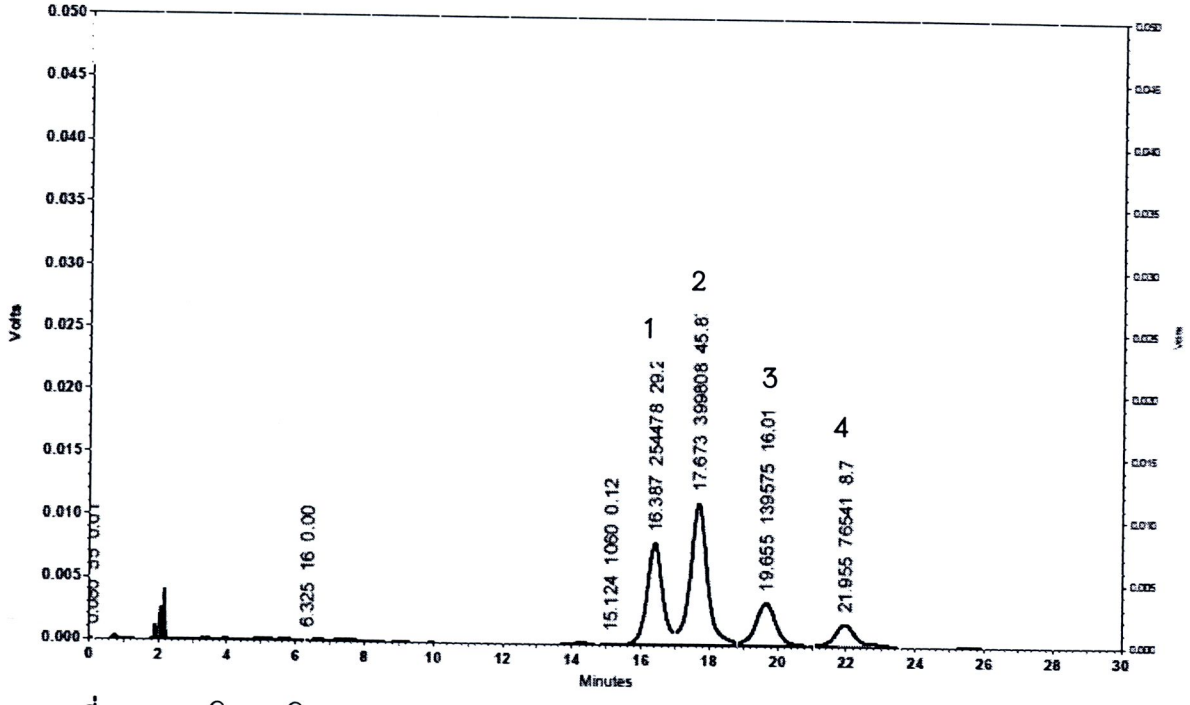
ในการศึกษาวิจัยครั้งนี้ได้ทดสอบวัฏภาคเคลื่อนที่ที่เหมาะสมในการแยกสกัดสารสกัดแกมม่า-โอไรซานอลด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ โดยดัดแปลงวิธีของ Xu and Godber (1999) พบว่าเมื่อเปรียบเทียบกับ HPLC โครมาโทแกรมของสารมาตรฐานแกมม่า-โอไรซานอลที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ดังรูปที่ 4-7 แล้ว สารสกัดแกมม่า-โอไรซานอลจากข้าวก่ำบิ้งที่ได้จากการเก็บสารละลายวัฏภาคเคลื่อนที่ผสมระหว่างเฮกเซนและเอธิล อะซีเตตในอัตราส่วน 7:3 (รูปที่ 9) มีปริมาณแกมม่า-โอไรซานอลและสามารถแยกสารอื่นออกได้สูงที่สุด สำหรับสารสกัดแกมม่า-โอไรซานอลที่ได้จากการเก็บสารละลายวัฏภาคเคลื่อนที่ 1:1 (รูปที่ 10) มีปริมาณแกมม่า-โอไรซานอลน้อยกว่าและไม่สามารถแยกสารอื่นได้ดีเท่าสารสกัดที่ได้จากการเก็บสารละลายวัฏภาคเคลื่อนที่ในอัตราส่วน 7:3 ในขณะที่สารสกัดแกมม่า-โอไรซานอลที่ได้จากการเก็บสารละลายวัฏภาคเคลื่อนที่ 9:1 (รูปที่ 11) ตรวจวิเคราะห์พบแกมม่า-โอไรซานอลน้อยที่สุด ดังนั้นจึงเลือกสารสกัดแกมม่า-โอไรซานอลที่ได้จากการเก็บสารละลายจากวัฏภาคเคลื่อนที่เฮกเซนและเอธิล อะซีเตตในอัตราส่วน 7:3 เพื่อนำมาวิเคราะห์หาปริมาณแกมม่า-โอไรซานอลต่อไป



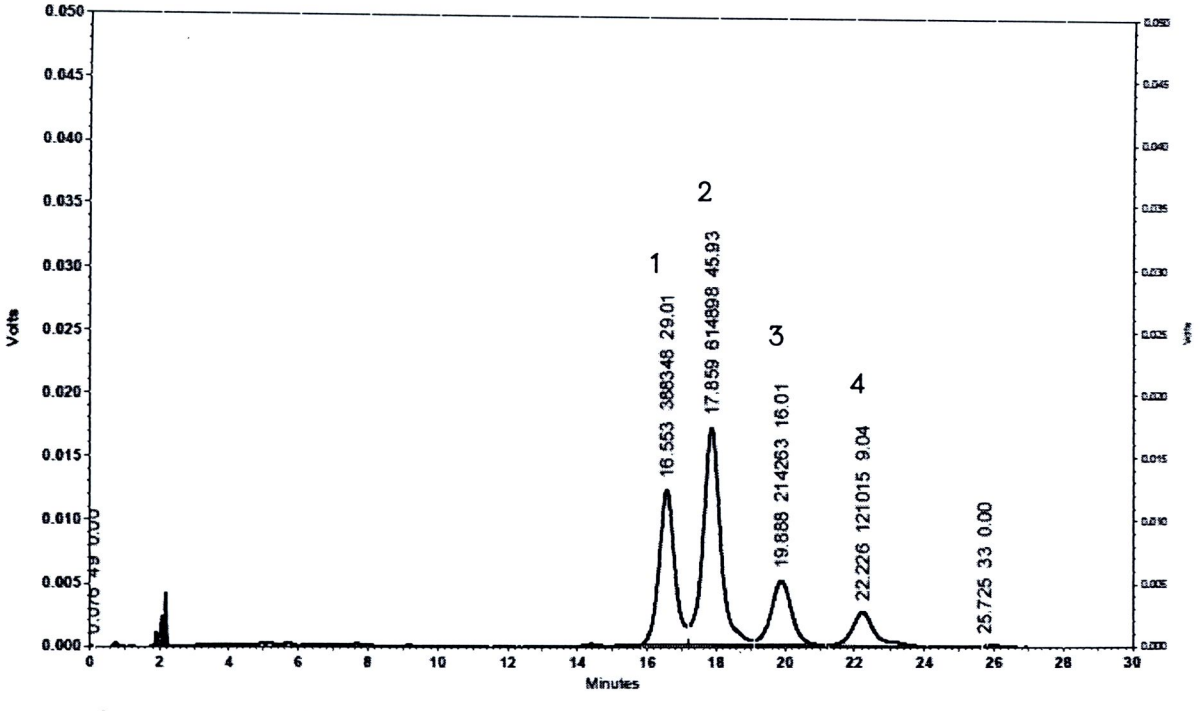
รูปที่ 4 HPLC โครมาโทแกรมของสารมาตรฐานแกมม่า-โอไรซานอลความเข้มข้น 5 ppm



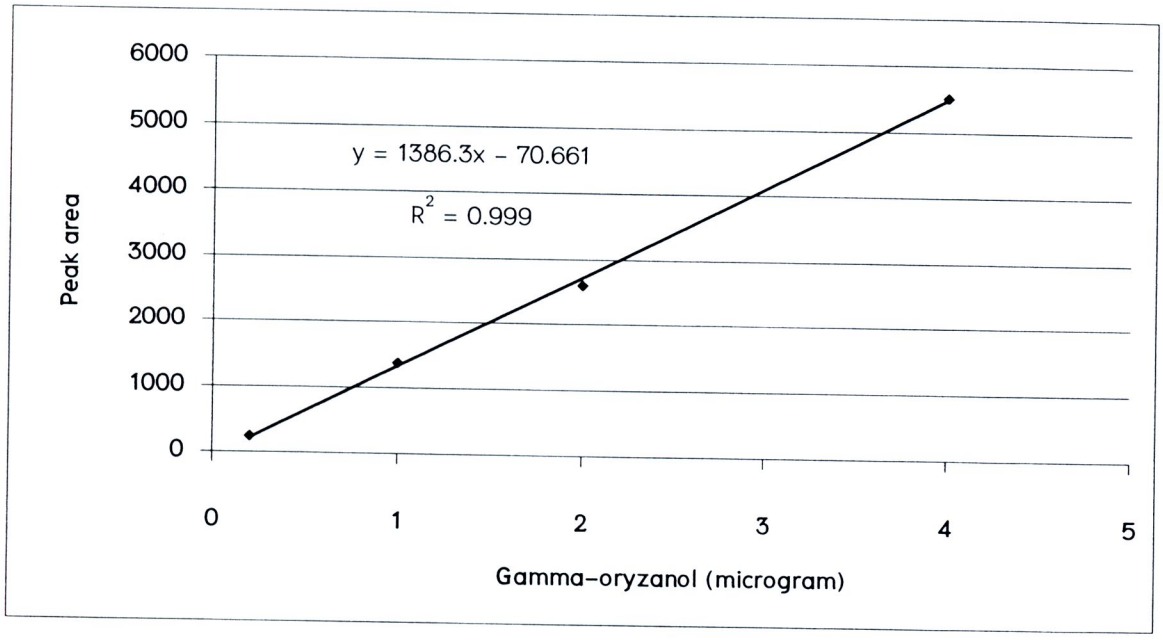
รูปที่ 5 HPLC โครมาโทแกรมของสารมาตรฐานแกมม่า-โอไรซานอลความเข้มข้น 10 ppm



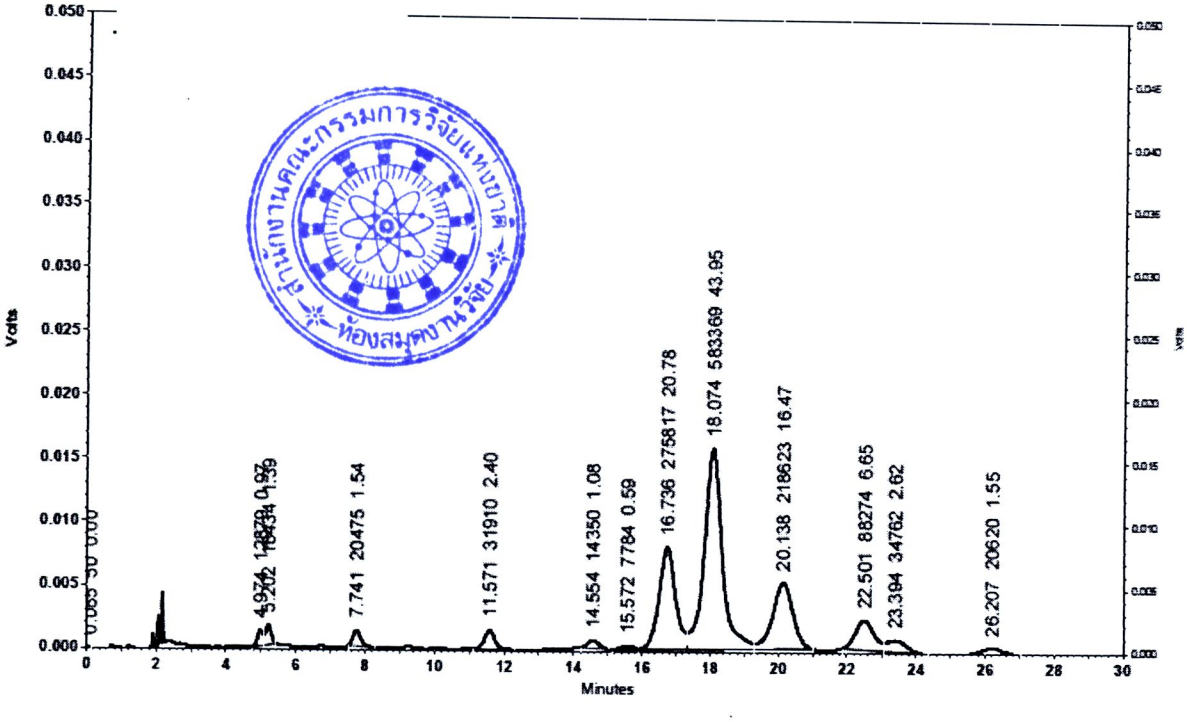
รูปที่ 6 HPLC โครมาโทแกรมของสารมาตรฐานแกมม่า-โอไรซานอลความเข้มข้น 25 ppm



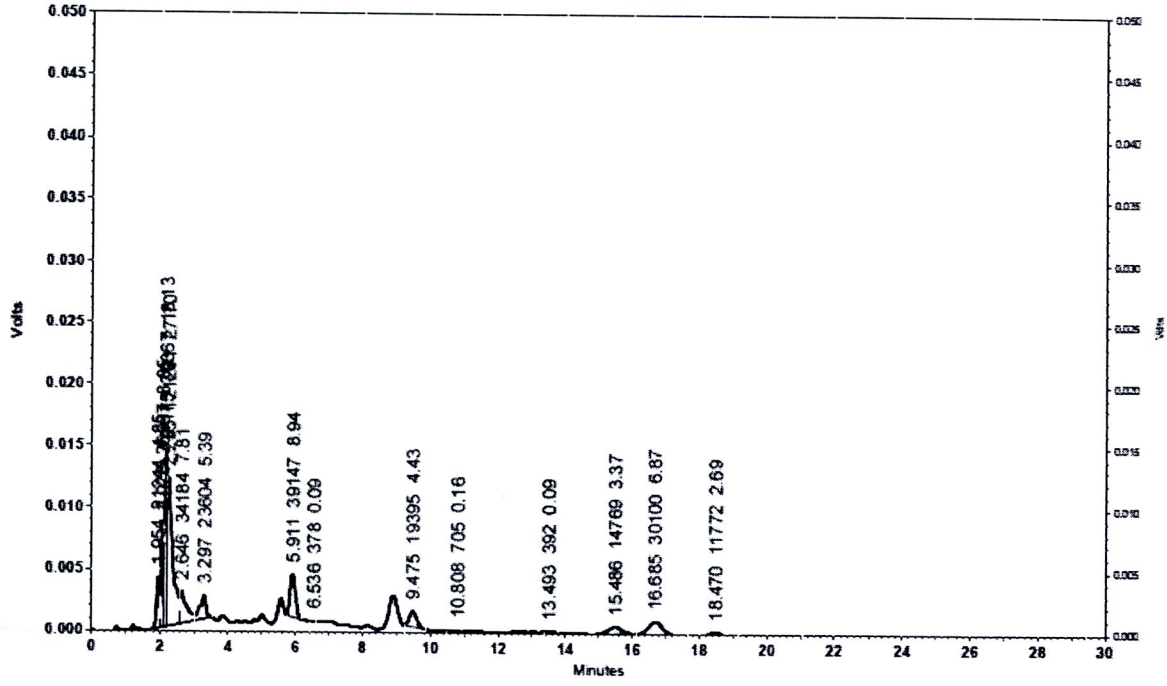
รูปที่ 7 HPLC โครมาโทแกรมของสารมาตรฐานแกมม่า-โอไรซานอลความเข้มข้น 50 ppm



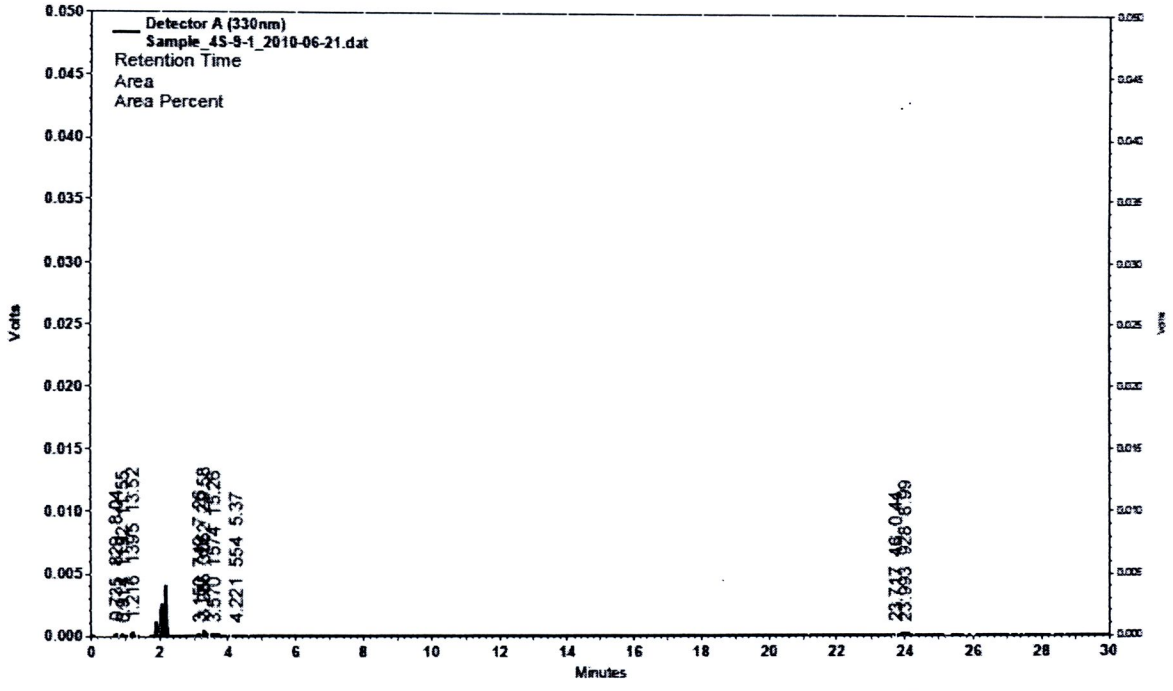
รูปที่ 8 กราฟมาตรฐานของสารมาตรฐานแกมม่า-โอไรซานอล



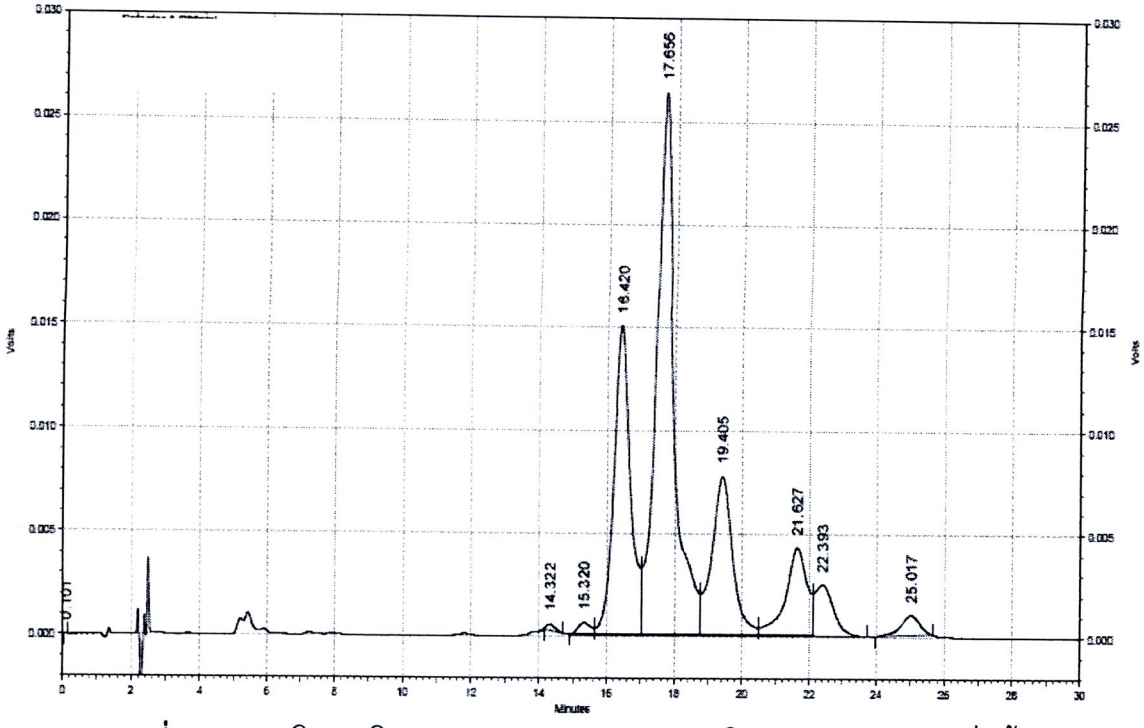
รูปที่ 9 HLPC โครมาโทแกรมของสารสกัดแกมม่า-โอไรซานอลจากข้าวก่ำบิ้งที่ได้จากวัฏภาคเคลื่อนที่ผสมระหว่างเฮกเซนและเอธิล อะซีเตต ในอัตราส่วน 7:3



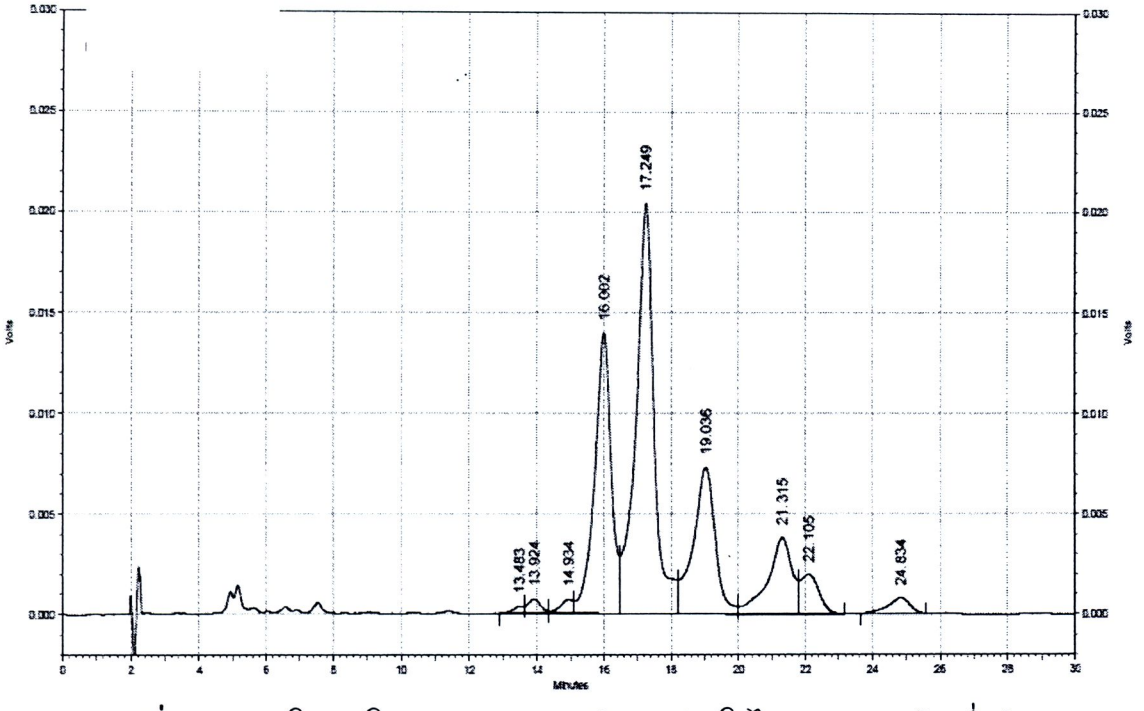
รูปที่ 10 HLPC โครมาโทแกรมของสารสกัดแกมม่า-โอไรซานอลจากข้าวก่ำบิ้งที่ได้จากวัฏภาคเคลื่อนที่ผสมระหว่างเฮกเซนและเอธิล อะซีเตต ในอัตราส่วน 1:1



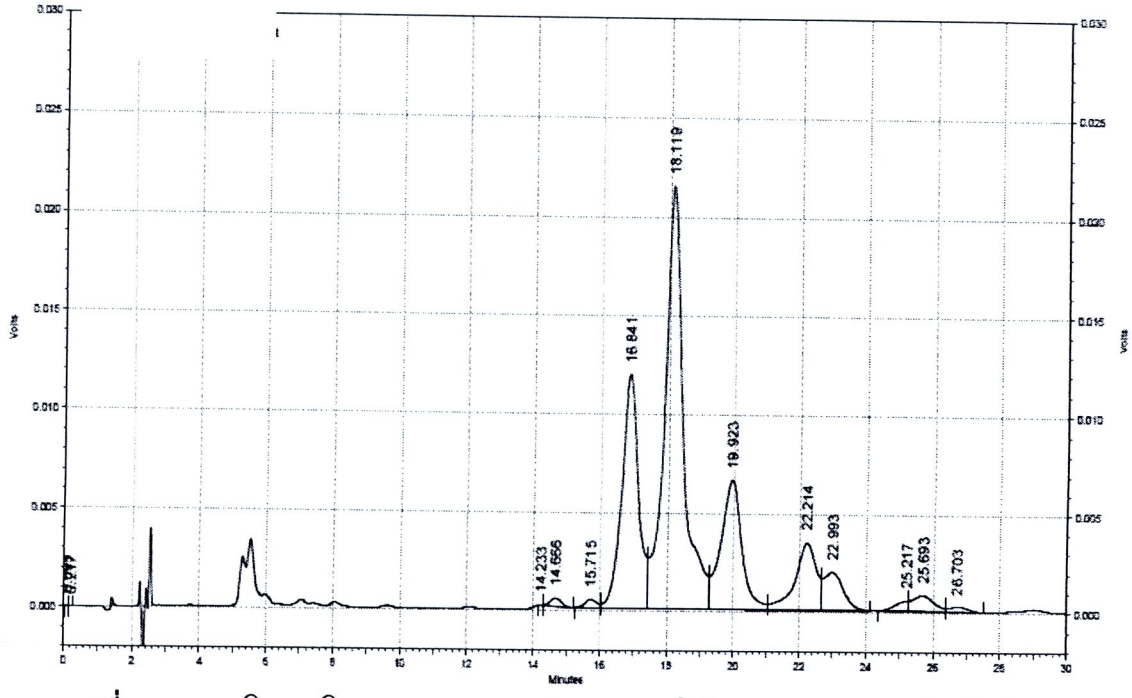
รูปที่ 11 HLPC โครมาโทแกรมของสารสกัดแกมม่า-โอไรซานอลจากข้าวก่ำบิ้งที่ได้จากวัฏภาคเคลื่อนที่ผสมระหว่างเฮกเซนและเอธิล อะซีเตต ในอัตราส่วน 9:1



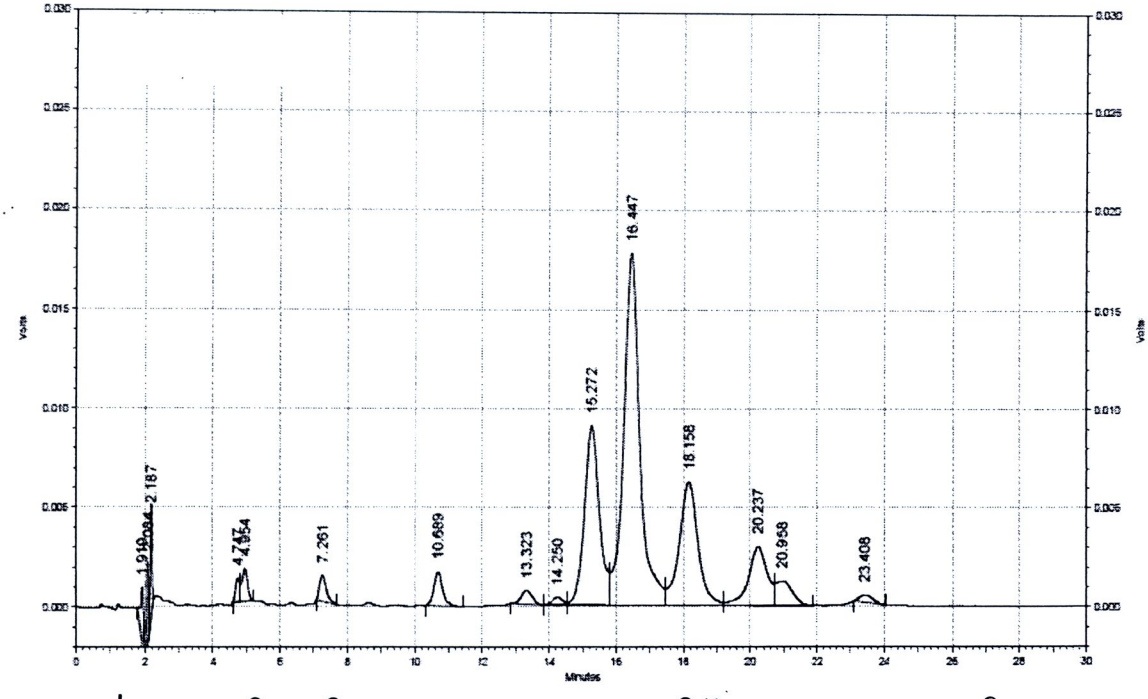
รูปที่ 12 HLPC โครมาโทแกรมของสารสกัดแกมม่า-โอไรซานอลจากข้าวก่ำปิ้ง



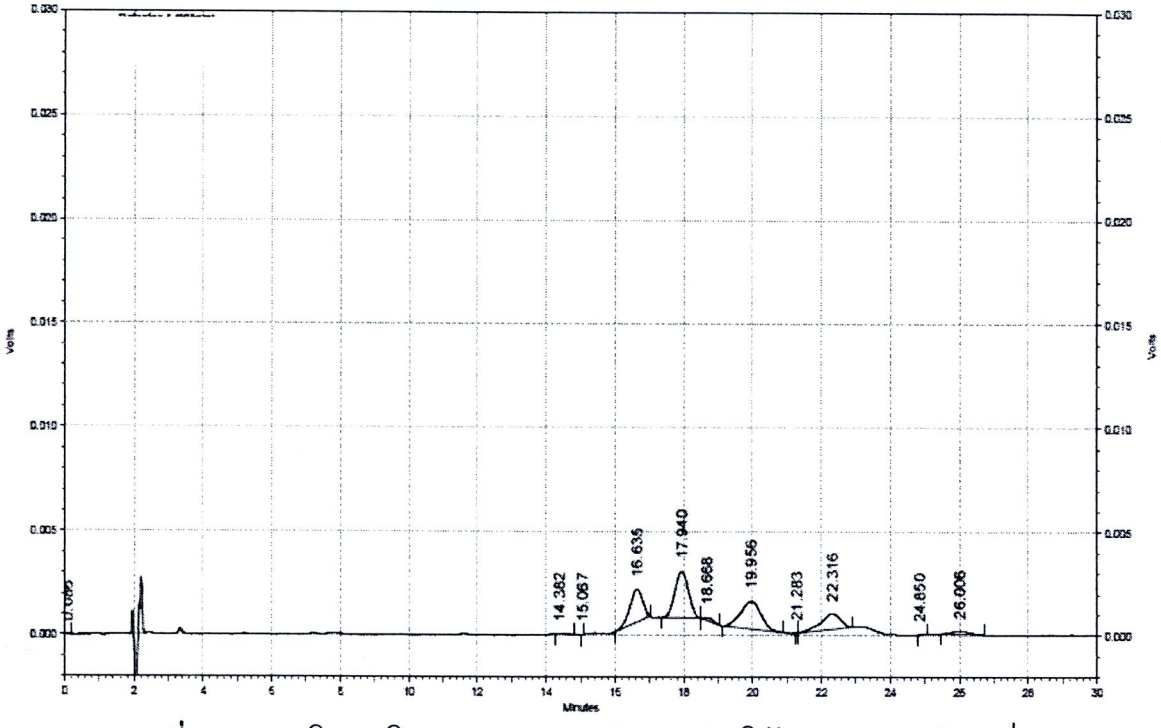
รูปที่ 13 HLPC โครมาโทแกรมของสารสกัดแกมม่า-โอไรซานอลจากข้าวก่ำต่อ



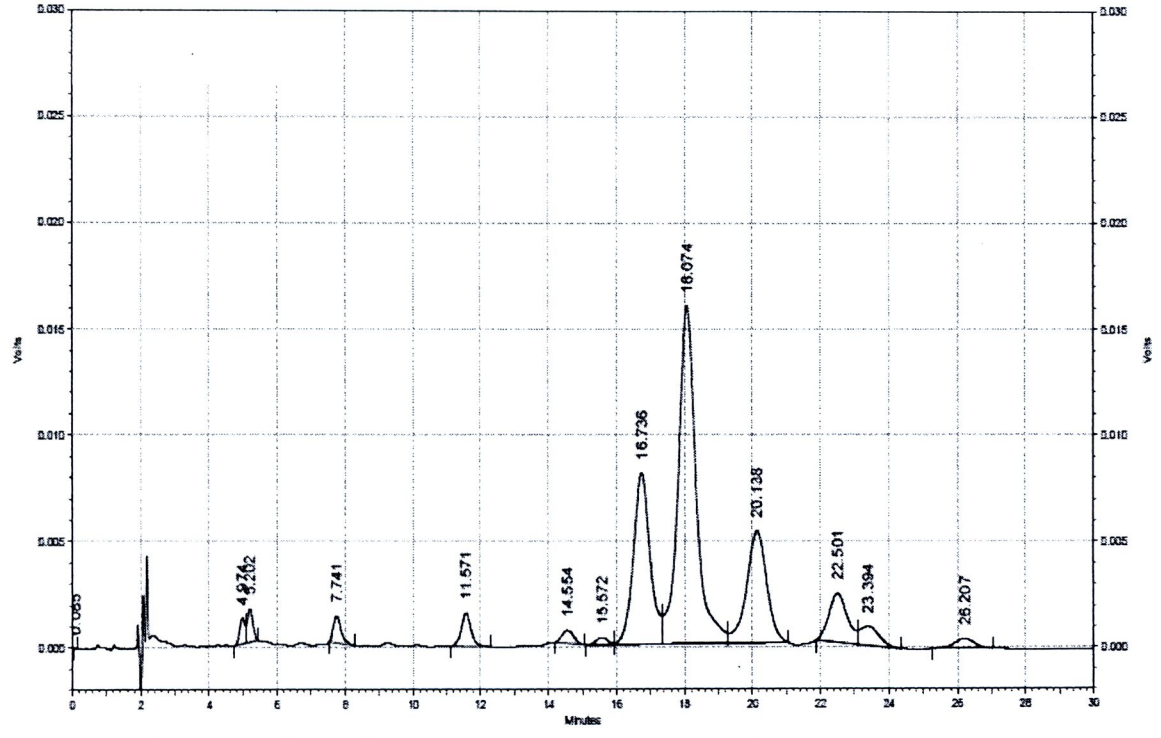
รูปที่ 14 HLPC โครมาโทแกรมของสารสกัดแกมม่า-โอไรซานอลจากข้าวดำสุโขทัย 1



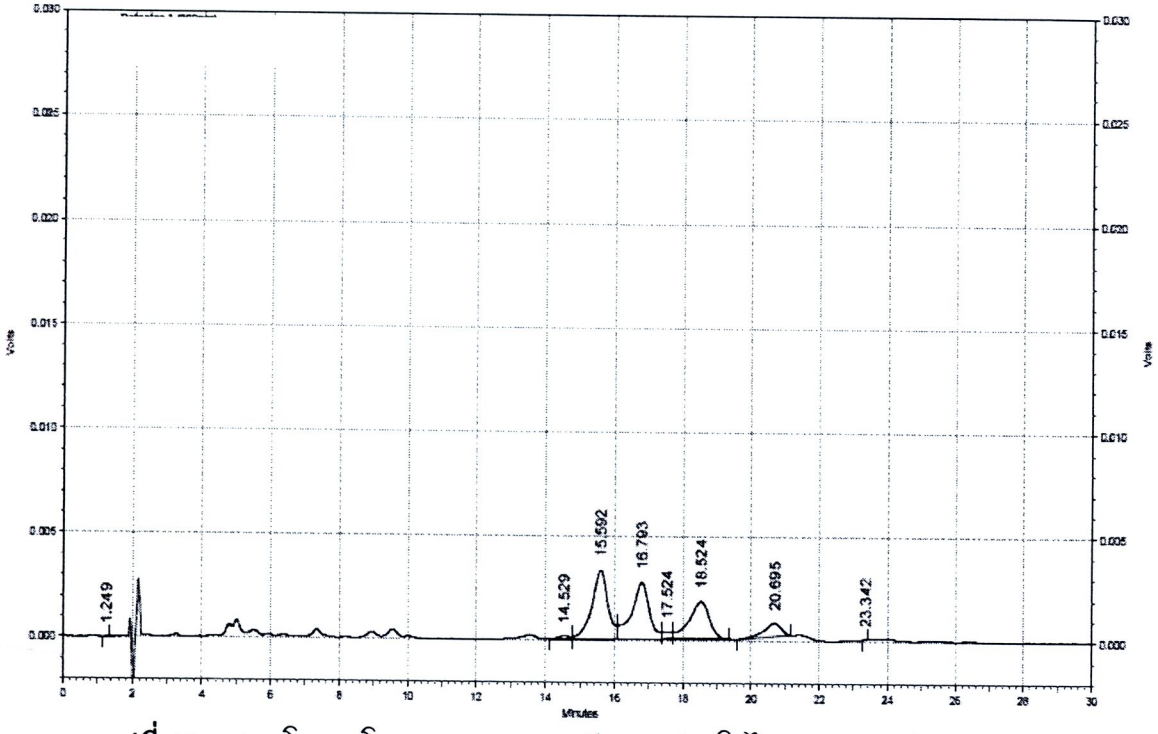
รูปที่ 15 HLPC โครมาโทแกรมของสารสกัดแกมม่า-โอไรซานอลจากข้าวแดงสุโขทัย 1



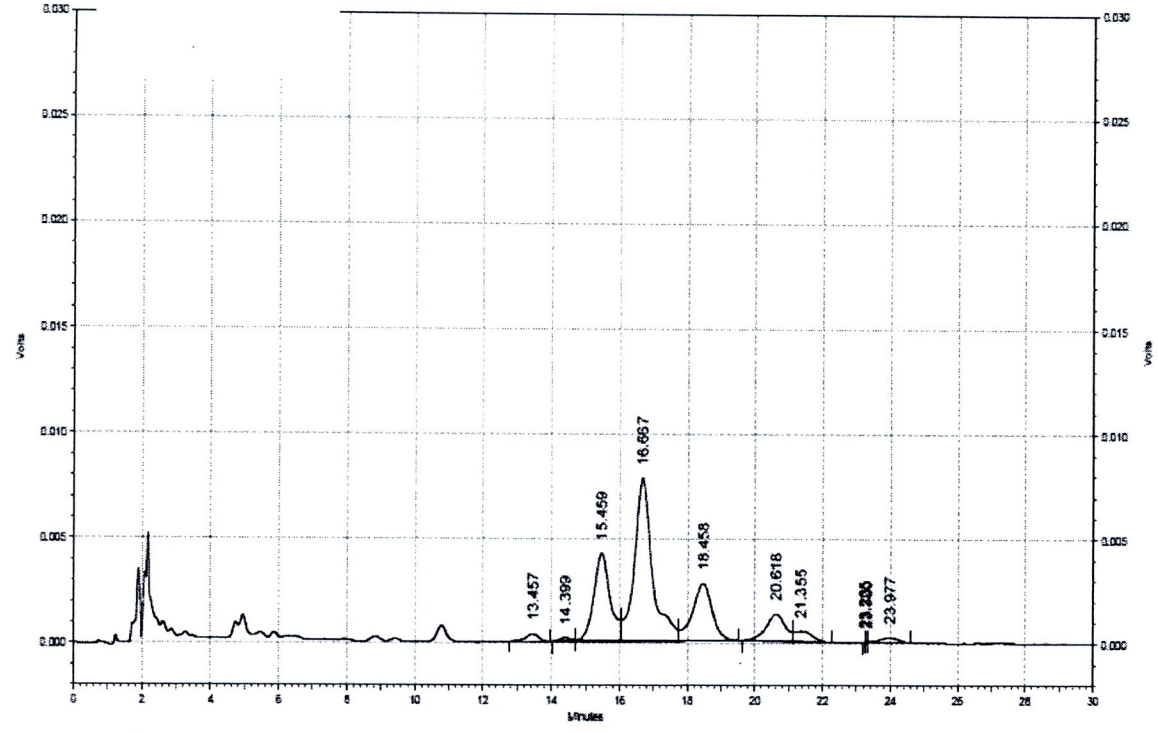
รูปที่ 16 HLPC โครมาโทแกรมของสารสกัดแกมม่า-โอไรซานอลจากข้าวกล่ำ



รูปที่ 17 HLPC โครมาโทแกรมของสารสกัดแกมม่า-โอไรซานอลจากข้าวซิวแม่จัน



รูปที่ 18 HLPC โครมาโทแกรมของสารสกัดแกมม่า-โอไรซานอลจากข้าวชัยนาท 1



รูปที่ 19 HLPC โครมาโทแกรมของสารสกัดแกมม่า-โอไรซานอลจากข้าวสันป่าตอง 1

จากการวิเคราะห์หาปริมาณแกมม่า-โอไรซานอลจากสารสกัดจากข้าวก่ำจำนวน 5 ตัวอย่าง (รูปที่ 12-14, ข้าวก่ำบิ้ง, ข้าวก่ำต่อ, และข้าวดำสุโขทัย 1 ตามลำดับ) ข้าวแดงจำนวน 3 ตัวอย่าง (รูปที่ 15 และ 16, ข้าวแดงสุโขทัยและข้าวกล่ำ) และข้าวขาวจำนวน 5 ตัวอย่าง (รูปที่ 17-19, ข้าวเจ้าฮ่อ, ข้าวชัยนาท 1, และข้าวสันป่าตอง 1 ตามลำดับ) พบว่าสารสกัดแกมม่า-โอไรซานอลทั้งหมดประกอบด้วยสารสำคัญหลักทั้ง 3 ชนิดดังที่พบในสารมาตรฐานแกมม่า-โอไรซานอล และยังประกอบด้วยองค์ประกอบอื่นๆ อีกอย่างน้อย 5 ชนิด เมื่อคำนวณหาปริมาณแกมม่า-โอไรซานอลจากพื้นที่ของสารสำคัญหลัก 3 ชนิดคือ cycloartenyl ferulate, 24-methylenecycloartanyl ferulate และ campesteryl ferulate พบว่าสารสกัดแกมม่า-โอไรซานอลจากข้าวก่ำมีปริมาณแกมม่า-โอไรซานอลอยู่ในช่วงระหว่างร้อยละ 0.97 - 14.05 โดยน้ำหนัก ข้าวแดงมีปริมาณแกมม่า-โอไรซานอลอยู่ในช่วงระหว่างร้อยละ 0.77 - 6.72 โดยน้ำหนักและข้าวขาวมีปริมาณแกมม่า-โอไรซานอลอยู่ในช่วงระหว่างร้อยละ 1.49 - 6.87 โดยน้ำหนัก โดยส่วนใหญ่พบว่าสารสกัดแกมม่า-โอไรซานอลจากข้าวก่ำมีปริมาณแกมม่า-โอไรซานอลสูง โดยเฉพาะข้าวก่ำบิ้ง ข้าวก่ำต่อและข้าวก่ำปาอีคอที่มีการปลูกแบบข้าวไร่ มีเพียงข้าวดำสุโขทัย 1 ที่มีการปลูกแบบข้าวนาสวน แต่เป็นการปลูกแบบเกษตรอินทรีย์ ตัวอย่างข้าวแดงทั้งหมดซึ่งเป็นข้าวจ้าวทั้งหมดมีการปลูกแบบนาสวนมีเพียงข้าวแดงสุโขทัย 1 ที่มีการปลูกแบบเกษตรอินทรีย์มีปริมาณแกมม่า-โอไรซานอลสูงที่สุดในกลุ่มข้าวแดง ส่วนข้าวขาวนั้นพบว่าข้าวชิวจันมีปริมาณแกมม่า-โอไรซานอลสูงสุด

ตารางที่ 4 ร้อยละของแกมม่า-โอไรซานอลในสารสกัดแกมม่า-โอไรซานอล

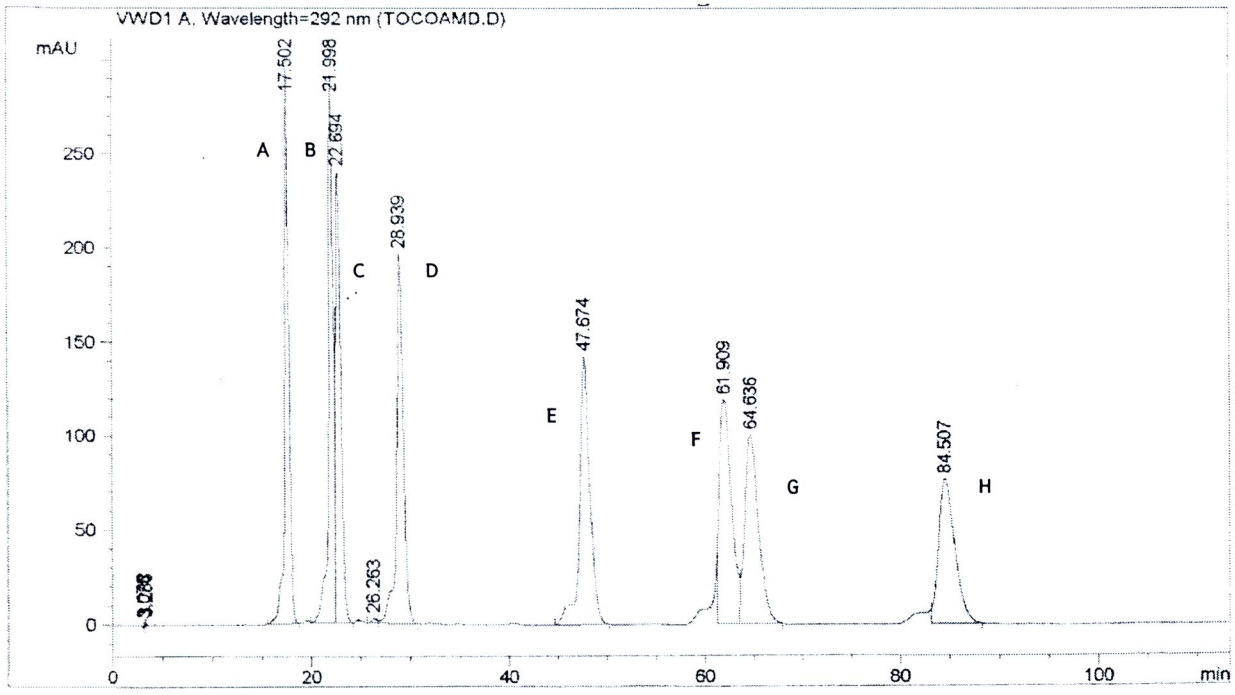
ชนิด	สายพันธุ์	ร้อยละของแกมม่า-โอไรซานอลในสารสกัดแกมม่า-โอไรซานอล
ข้าวขาว	ข้าวสันป่าตอง 1	4.56 ± 0.55 ^{gh}
	ข้าวชัยนาท 2	2.15 ± 0.28 ^{j}
	ข้าวชัยนาท 1	1.49 ± 0.29 ^{k}
	ข้าวดอกมะลิ 105	5.62 ± 0.43 ^{g}
	ข้าวชิวแม่จัน	6.87 ± 0.53 ^{f}
ข้าวแดง	ข้าวเหนียวแดง	0.77 ± 0.22 ^{l}
	ข้าวกล่ำ	2.87 ± 0.34 ^{i}
	ข้าวแดงสุโขทัย 1	6.72 ± 0.42 ^{e}
ข้าวก่ำ	ข้าวเหนียวดำ	0.97 ± 0.25 ^{jk}
	ข้าวก่ำบิ้ง	14.05 ± 0.58 ^{a}
	ข้าวก่ำต่อ	11.20 ± 0.38 ^{c}
	ข้าวดำสุโขทัย 1	12.38 ± 0.42 ^{b}
	ข้าวก่ำปาอีคอ	8.19 ± 0.41 ^{d}

ข้อมูลแสดงในรูปแบบ ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน, n = 3

$^{a, b, c,...}$ หมายถึงปริมาณแกมมม่า-โอไรซานอลมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 โดยเรียงลำดับจากปริมาณแกมม่า-โอไรซานอลสูงไปต่ำ

ในการศึกษาวิจัยครั้งนี้ จะศึกษาเปรียบเทียบปริมาณและกลไกการป้องกันการก่อมะเร็งของสารสัดแกมม่า-โอไรซานอลเท่านั้น แต่โดยปกติแล้วในเมล็ดข้าวจะมีสารสำคัญอื่นๆ อยู่ด้วย ตัวอย่างเช่น สารกลุ่มโทโคไตรอีนอลและโทโคเฟอรอล สารกลุ่มฟีนอลลิค นอกจากนั้นในเมล็ดข้าวก่ำยังพบสารกลุ่มแอนโธไซยานิน เป็นต้น เพื่อเป็นการยืนยันว่าสารสกัดที่นำมาศึกษาวิจัยนั้นมีเฉพาะสารกลุ่มแกมม่า-โอไรซานอล โดยไม่มีสารกลุ่มโทโคไตรอีนอล โทโคเฟอรอล สารกลุ่มฟีนอลลิคและแอนโธไซยานิน จึงได้ทำการตรวจวิเคราะห์ปริมาณสารกลุ่มดังกล่าวด้วย โดยพบว่าตรวจวิเคราะห์ไม่พบสารกลุ่มแอนโธไซยานินในสารสกัดแกมม่า-โอไรซานอลจากข้าวก่ำเมื่อ

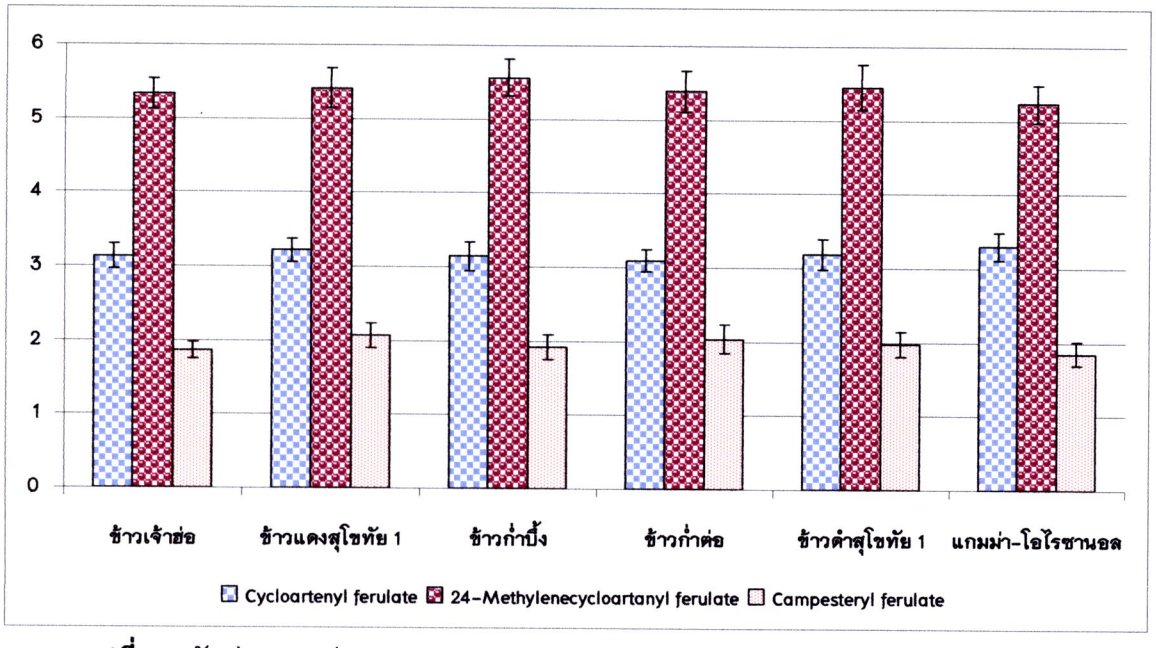
วิเคราะห์ปริมาณแอนโธไซยานินโดยรวมด้วยเทคนิค pH different spectrophotometry และตรวจวิเคราะห์ไม่พบสารกลุ่มฟีนอลลิคในสารสกัดแกมม่า-โอไรซานอลทั้งหมดเมื่อวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลลิคโดยรวมด้วยวิธี Folin-Ciocalteu การตรวจวิเคราะห์ไม่พบแอนโธไซยานินและสารกลุ่มฟีนอลลิคอาจเนื่องมาจากสารกลุ่มแอนโธไซยานินและกลุ่มฟีนอลลิคเป็นสารที่มีขั้ว จากกระบวนการแยกสกัดแกมม่า-โอไรซานอลจากเมล็ดข้าวนั้นใช้ตัวทำละลายอินทรีย์และยังนำมาทำให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ ดังนั้นสารกลุ่มแอนโธไซยานินและกลุ่มฟีนอลลิคจึงไม่สามารถแยกสกัดออกมาด้วยกระบวนการดังกล่าวได้ นอกจากนี้ยังมีสารกลุ่มโทโคไตรอีนอลและโทโคเฟอรอลที่อาจปนเปื้อนมาในสารสกัดแกมม่า-โอไรซานอล เนื่องจากสารกลุ่มโทโคไตรอีนอลและโทโคเฟอรอลเป็นสารที่ไม่มีขั้วและมีรายงานว่าพบในเมล็ดข้าวเช่นกัน ดังนั้นจึงได้วิเคราะห์หาปริมาณสารกลุ่มโทโคไตรอีนอลและโทโคเฟอรอลด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC) โดยวิเคราะห์หาทั้งเดลต้า-, เบต้า-, แกมม่า-, และแอลฟ่า-โทโคไตรอีนอลและโทโคเฟอรอล



รูปที่ 20 HLPC โครมาโทแกรมของสารมาตรฐานโทโคไตรอีนอลและโทโคเฟอรอล

จากรูปที่ 20 แสดงโครมาโทแกรมของสารมาตรฐานโทโคไตรอีนอลและโทโคเฟอรอลทั้งหมดอย่างละ 4 รูปแบบคือ เดลต้า-โทโคไตรอีนอล (A), เบต้า-โทโคไตรอีนอล (B), แกมม่า-โท

โคไตรอีนอล (C), แอลฟ่า-โทโคไตรอีนอล (D), เดลต้า-โทโคเฟอรอล (E), เบต้า-โทโคเฟอรอล (F), แกมม่า-โทโคเฟอรอล (G), และแอลฟ่า-โทโคเฟอรอล (H) ตามลำดับ ที่วิเคราะห์ด้วยเทคนิค Reversed-phase HPLC with gradient elution จากการตรวจวิเคราะห์ ไม่พบสารกลุ่มโทโคไตรอีนอลและโทโคเฟอรอลในสารสกัดแกมม่า-โอไรซานอลทั้งหมด ดังนั้นสารสกัดแกมม่า-โอไรซานอลจากข้าวก่ำ ข้าวแดงและข้าวขาวจึงไม่มีสารสำคัญกลุ่มโทโคไตรอีนอล โทโคเฟอรอล แอนโธไซยานินและสารกลุ่มฟีนอลลิคอยู่ จากการวิเคราะห์ปริมาณแกมม่า-โอไรซานอลในสารสกัด ได้คัดเลือกสารสกัดแกมม่า-โอไรซานอลที่มีปริมาณแกมม่า-โอไรซานอลสูงกว่าร้อยละ 5 โดยน้ำหนักจากแต่ละกลุ่มข้าวซึ่งประกอบด้วยสารสกัดแกมม่า-โอไรซานอลจากข้าวเจ้าฮ่อ (ข้าวขาว) ข้าวแดงสุโขทัย 1 (ข้าวแดง) ข้าวก่ำบิ้ง ข้าวก่ำต่อและข้าวดำสุโขทัย 1 (ข้าวก่ำ) มาศึกษากลไกการป้องกันการก่อมะเร็งต่อไป โดยจัดทำมาตรฐานโดยการปรับให้มีปริมาณสารสำคัญหลักในแกมม่า-โอไรซานอลให้มีปริมาณเท่ากันทั้งหมดซึ่งได้แก่ Cycloartenyl ferulate, 24-Mehtylcycloartanyl ferulate, และ Campesteryl ferulate เท่ากับร้อยละ 10 โดยน้ำหนักต่อปริมาตรก่อนนำมาศึกษากลไกการป้องกันการก่อมะเร็งเปรียบเทียบกับสารมาตรฐานแกมม่า-โอไรซานอล



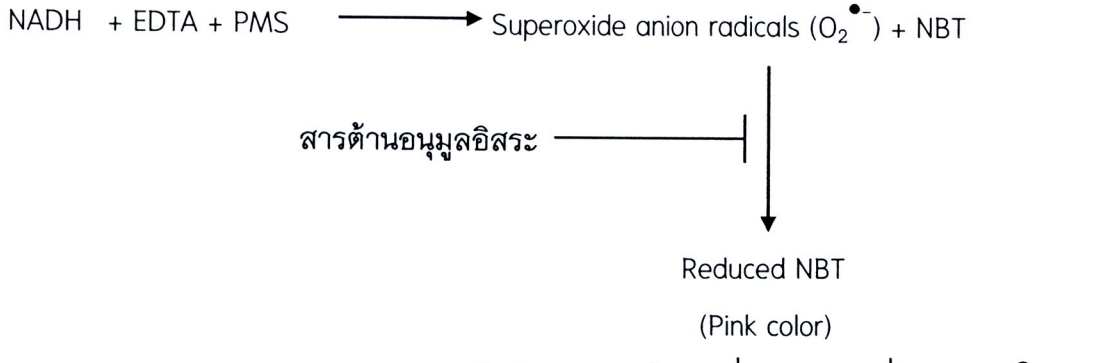
รูปที่ 21 สัดส่วนระหว่าง Cycloartenyl ferulate, 24-Methylenecycloartanyl ferulate, และ Campesteryl ferulate

จากการวิเคราะห์สัดส่วนของสารสำคัญหลักทั้ง 3 ชนิดในแกมม่า-โอไรซานอลซึ่งประกอบด้วย Cycloartenyl ferulate, 24-Methylenecycloartanyl ferulate, และ Campesteryl ferulate ในสารสกัดแกมม่า-โอไรซานอลจากข้าวไทยที่ได้คัดเลือกมาจำนวน 5 ตัวอย่างซึ่งได้แก่ ข้าวก่ำบิ้ง ข้าวก่ำต่อ ข้าวดำสุโขทัย 1 ข้าวแดงสุโขทัย 1 และข้าวเจ้าฮ่อ ดังรูปที่ 21 พบว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของสัดส่วนของสารสำคัญหลักทั้ง 3 ชนิดเมื่อประเมินที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

4.2 การศึกษาฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน

4.2.1 ฤทธิ์การขจัดอนุมูลอิสระซุปเปอร์ออกไซด์

อนุมูลอิสระซุปเปอร์ออกไซด์ถูกสร้างขึ้นจากการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของ Reduced β-nicotinamide adenine dinucleotide (NADH) โดยการกระตุ้นจาก Phenazine methosulphate (PMS) จากนั้นวิเคราะห์อนุมูลอิสระซุปเปอร์ออกไซด์ที่เกิดขึ้นด้วยการเกิดปฏิกิริยารีดักชันของ Nitroblue tetrazolium (NBT) โดยทำการวิเคราะห์ Reduced NBT ที่เกิดขึ้นที่ความยาวคลื่น 560 นาโนเมตร (ดังแสดงในรูปที่ 22) โดยเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน L-Ascorbic acid และสารมาตรฐานแกมม่า-โอไรซานอล



รูปที่ 22 ขั้นตอนการศึกษาฤทธิ์ขจัดอนุมูลอิสระซุปเปอร์ออกไซด์

ตารางที่ 5 ค่าความเข้มข้นที่สามารถขจัดอนุมูลอิสระซุปเปอร์ออกไซด์ได้ร้อยละ 50 (IC_{50}) ของสารสกัดแกมม่า-โอไรซานอล

สายพันธุ์	IC_{50} (μg/ml)
ข้าวซิวแม่จัน	20.72 ± 0.88 [f]
ข้าวแดงสุโขทัย 1	19.31 ± 0.60 [ef]
ข้าวก่ำบิ้ง	12.74 ± 0.81 [b]
ข้าวก่ำต่อ	16.32 ± 0.98 [cd]
ข้าวดำสุโขทัย 1	14.95 ± 0.66 [c]
สารมาตรฐานแกมม่า-โอไรซานอล	22.92 ± 0.75 [fg]
L-Ascorbic acid	7.68 ± 0.37 [a]

ค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน, n = 3

[a, b, c,...] หมายถึงค่าความเข้มข้นที่สามารถขจัดอนุมูลอิสระซุปเปอร์ออกไซด์ได้ร้อยละ 50 มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

จากผลการประเมินฤทธิ์ต้านออกซิเดชันผ่านการขจัดอนุมูลอิสระซุปเปอร์ออกไซด์พบว่าสารสกัดแกมม่า-โอไรซานอลที่สกัดจากตัวอย่างข้าวขาว ข้าวแดงและข้าวก่ำทั้ง 5 ตัวอย่างที่ผ่านการทำจัดทำมาตรฐานโดยการปรับให้มีส่วนประกอบหลักของแกมม่า-โอไรซานอลเท่ากันก่อนที่จะนำมาศึกษาฤทธิ์ต้านออกซิเดชันมีค่าความเข้มข้นที่สามารถขจัดอนุมูลอิสระซุปเปอร์ออกไซด์ได้ร้อยละ 50 อยู่ในช่วงระหว่าง 12.74 – 20.72 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ดังแสดงในตารางที่ 5) โดยพบว่าสารสกัดแกมม่า-โอไรซานอลที่สกัดจากข้าวก่ำบิ้งมีฤทธิ์ขจัดอนุมูลอิสระซุปเปอร์ออกไซด์สูงที่สุด โดยมีค่าความเข้มข้นที่สามารถขจัดอนุมูลอิสระซุปเปอร์ออกไซด์ได้ร้อยละ 50 เท่ากับ 12.74 ± 0.81 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยมีฤทธิ์ขจัดอนุมูลอิสระที่ต่ำกว่าสารมาตรฐาน L-Ascorbic acid ที่มีค่าความเข้มข้นที่สามารถขจัดอนุมูลอิสระซุปเปอร์ออกไซด์ได้ร้อยละ 50 เท่ากับ 7.68 ± 0.37 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แต่มีฤทธิ์ขจัดอนุมูลอิสระซุปเปอร์ออกไซด์ที่สูงกว่าสารมาตรฐานแกมม่า-โอไรซานอลที่มีค่าความเข้มข้นที่สามารถขจัดอนุมูลอิสระซุปเปอร์ออกไซด์ได้ร้อยละ 50 เท่ากับ 22.92 ± 0.75 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามมาด้วยสารสกัดแกมม่า-โอไรซานอลที่สกัดจากข้าวดำสุโขทัย 1 ข้าวก่ำต่อ ข้าวแดงสุโขทัย 1 และข้าวซิวแม่จัน ที่มีค่าความเข้มข้นที่สามารถขจัดอนุมูลอิสระซุปเปอร์ออกไซด์ได้ร้อยละ 50 เท่ากับ 14.95 ± 0.66, 16.32 ± 0.98, 19.31 ± 0.60, และ 20.72 ± 0.88 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ จากข้อมูลดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าสารสกัดแกมม่า-โอไรซานอลที่สกัดจากข้าวก่ำแสดงฤทธิ์ขจัดอนุมูลอิสระซุปเปอร์ออกไซด์ที่สูงกว่าสาร

สกัดแกมม่า-โอไรซานอลที่สกัดจากข้าวแดงและข้าวขาว ทั้งนี้สารสกัดแกมม่า-โอไรซานอลทั้งหมดมีฤทธิ์ขจัดอนุมูลอิสระซุปเปอร์ออกไซด์สูงกว่าสารมาตรฐานแกมม่า-โอไรซานอล

4.2.2 ฤทธิ์การขจัดอนุมูลอิสระไนตริกออกไซด์

ไนตริกออกไซด์ (Nitric oxide, NO) เป็นอนุมูลที่ถูกสร้างขึ้นในร่างกายจาก L-arginine โดยเอนไซม์ไนตริกออกไซด์ ซินเทส (Nitric oxide synthase, NOS) มีการศึกษาวิจัยพบว่ามีการหลั่งไนตริกออกไซด์จากแมคโครฟลาจในการตอบสนองต่อกระบวนการอักเสบ (Stuehr and Nathan, 1989) สำหรับการประเมินฤทธิ์ขจัดอนุมูลอิสระไนตริกออกไซด์ในครั้งนี้ ไนตริกออกไซด์ถูกสร้างขึ้นมาจากโซเดียม ไนโตรพลัสไซด์ หลังจากที่ทำปฏิกิริยากับสารที่ต้องการทดสอบแล้วจึงวัดปริมาณไนไตรท์ที่เหลืออยู่โดยใช้ Griess reagent ซึ่งประกอบด้วย 1% Sulfanilamide และ 0.1% Naphthylethylenediamine dihydrochloride แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร โดยเปรียบเทียบกับสารมาตรฐานเคอร์คูมินและสารมาตรฐานแกมม่า-โอไรซานอล

ตารางที่ 6 ค่าความเข้มข้นที่สามารถขจัดอนุมูลอิสระไนตริกออกไซด์ได้ร้อยละ 50 (IC_{50}) ของสารสกัดแกมม่า-โอไรซานอล

สายพันธุ์	IC_{50} (μg/ml)
ข้าวชิวแม่จัน	11.63 ± 1.03 ^{d}
ข้าวแดงสุโขทัย 1	8.54 ± 0.48 ^{bc}
ข้าวก่ำบิ้ง	7.09 ± 0.44 ^{ab}
ข้าวก่ำต่อ	6.95 ± 0.39 ^{a}
ข้าวดำสุโขทัย 1	7.88 ± 0.86 ^{b}
สารมาตรฐานแกมม่า-โอไรซานอล	13.95 ± 0.53 ^{e}
สารมาตรฐานเคอร์คูมิน	6.35 ± 0.26 ^{a}

ค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน, n = 3

$^{a, b, c,...}$ หมายถึงค่าความเข้มข้นที่สามารถขจัดอนุมูลอิสระไนตริกออกไซด์ได้ร้อยละ 50 มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

จากผลการประเมินฤทธิ์ต้านออกซิเดชันผ่านการขจัดอนุมูลอิสระไนตริกออกไซด์พบว่าสารสกัดแกมม่า-โอไรซานอลที่สกัดจากตัวอย่างข้าวทั้ง 5 ตัวอย่างที่ผ่านการจัดทำมาตรฐานให้มี

ปริมาณสารสำคัญหลักในแกมม่า-โอไรซานอลเท่ากันมีค่าความเข้มข้นที่สามารถขจัดอนุมูลอิสระไนตริกออกไซด์ได้ร้อยละ 50 อยู่ในช่วงระหว่าง 6.95 – 13.95 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ดังแสดงในตารางที่ 6) โดยพบว่าสารสกัดแกมม่า-โอไรซานอลที่สกัดจากข้าวก่ำต่อมีฤทธิ์ขจัดอนุมูลอิสระไนตริกออกไซด์สูงที่สุด โดยมีค่าความเข้มข้นที่สามารถขจัดอนุมูลอิสระไนตริกออกไซด์ได้ร้อยละ 50 เท่ากับ 6.95 ± 0.39 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยมีฤทธิ์ขจัดอนุมูลอิสระที่ต่ำกว่าสารมาตรฐานเคอร์คูมินที่มีค่าความเข้มข้นที่สามารถขจัดอนุมูลอิสระไนตริกออกไซด์ได้ร้อยละ 50 เท่ากับ 6.35 ± 0.26 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แต่มีฤทธิ์ขจัดอนุมูลอิสระไนตริกออกไซด์ที่สูงกว่าสารมาตรฐานแกมม่า-โอไรซานอลที่มีค่าความเข้มข้นที่สามารถขจัดอนุมูลอิสระไนตริกออกไซด์ได้ร้อยละ 50 เท่ากับ 13.95 ± 0.53 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามมาด้วยสารสกัดแกมม่า-โอไรซานอลที่สกัดจากข้าวก่ำบิ้ง ข้าวดำสุโขทัย 1 ข้าวแดงสุโขทัย 1 และข้าวชิวแม่จัน ที่มีค่าความเข้มข้นที่สามารถขจัดอนุมูลอิสระไนตริกออกไซด์ได้ร้อยละ 50 เท่ากับ 7.09 ± 0.44, 7.78 ± 0.86, 8.84 ± 0.48, และ 11.63 ± 1.03 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ จากข้อมูลดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าสารสกัดแกมม่า-โอไรซานอลที่สกัดจากข้าวก่ำแสดงฤทธิ์ขจัดอนุมูลอิสระไนตริกออกไซด์ที่สูงกว่าสารสกัดแกมม่า-โอไรซานอลที่สกัดจากข้าวแดงและข้าวขาวเช่นเดียวกับฤทธิ์ต้านออกซิเดชันโดยการขจัดอนุมูลอิสระซุปเปอร์ออกไซด์

4.2.3 ฤทธิ์ยับยั้งการเกิดลิปิดเปอร์ออกซิเดชัน

การตรวจวัดการเกิดลิปิดเปอร์ออกซิเดชันจัดเป็นวิธีการประเมินสภาพความเสียหายที่เกิดขึ้นหลังจากอนมูลอิสระเข้าทำลายโครงสร้างไขมันของเซลล์ ในการศึกษาวิจัยครั้งนี้ใช้วิธี Linoleic acid peroxidation assay โดยดัดแปลงวิธีวิเคราะห์มาจาก Choi et al., 2002 โดยทำการวิเคราะห์ปริมาณ Thiobarbituric acid-reacting substances (TBARS) ในสารละลายที่เกิดขึ้นที่ความยาวคลื่น 532 นาโนเมตร ค่าการยับยั้งการเกิดลิปิดเปอร์ออกซิเดชันได้ร้อยละ 50 ของสารสกัดแกมม่า-โอไรซานอลที่สกัดจากตัวอย่างข้าวทั้ง 5 สายพันธุ์เปรียบเทียบกับสารมาตรฐานแกมม่า-โอไรซานอล คาร์เทชิน (Catechin) และรูทีน (Rutin)

จากตารางที่ 7 แสดงผลการประเมินฤทธิ์ต้านออกซิเดชันผ่านการยับยั้งการเกิดลิปิดเปอร์ออกซิเดชันพบว่าสารสกัดแกมม่า-โอไรซานอลที่สกัดจากตัวอย่างข้าวทั้ง 5 ตัวอย่างที่ผ่านการจัดทำมาตรฐานโดยการปรับให้มีส่วนประกอบหลักของแกมม่า-โอไรซานอลเท่ากันก่อนที่จะนำมาศึกษาฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน มีค่าความเข้มข้นที่สามารถยับยั้งการเกิดลิปิดเปอร์ออกซิเดชันได้ร้อยละ 50 อยู่ในช่วงระหว่าง 32.32 – 38.04 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยสารสกัดแกมม่า-โอไรซานอลจากข้าวไทยแสดงฤทธิ์ยับยั้งการเกิดลิปิดเปอร์ออกซิเดชันที่ได้ดีกว่าสารมาตรฐานแกมม่า-โอ

ไรซานอล โดยที่สารสกัดแกมม่า-โอไรซานอลจากข้าวก่ำบิ้งแสดงฤทธิ์ยับยั้งการเกิดลิปิดเปอร์ออกซิเดชันสูงสุด โดยมีค่าความเข้มข้นที่สามารถยับยั้งการเกิดลิปิดเปอร์ออกซิเดชันได้ร้อยละ 50 เท่ากับ 32.32 ± 0.78 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามมาด้วยสารสกัดแกมม่า-โอไรซานอลจากข้าวก่ำต่อ ข้าวดำสุโขทัย 1 ข้าวแดงสุโขทัย 1 และข้าวชิวแม่จัน ตามลำดับ

ตารางที่ 7 ค่าความเข้มข้นที่สามารถยับยั้งการเกิดลิปิดเปอร์ออกซิเดชันได้ร้อยละ 50 ของสารสกัดแกมม่า-โอไรซานอล

สายพันธุ์	IC_{50} (μg/ml)
ข้าวชิวแม่จัน	38.04 ± 1.13 ^{d}
ข้าวแดงสุโขทัย 1	36.34 ± 1.08 ^{c}
ข้าวก่ำบิ้ง	32.32 ± 0.78 ^{a}
ข้าวก่ำต่อ	33.67 ± 0.66 ^{ab}
ข้าวดำสุโขทัย 1	34.42 ± 0.72 ^{bc}
สารมาตรฐานแกมม่า-โอไรซานอล	39.84 ± 0.43 ^{d}
สารมาตรฐานรูทีน	62.33 ± 0.89 ^{f}
สารมาตรฐานคาร์เทชิน	65.59 ± 0.76 ^{g}

ค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน, n = 3

$^{a, b, c,...}$ หมายถึงค่าความเข้มข้นที่ยับยั้งการเกิดลิปิดเปอร์ออกซิเดชันได้ร้อยละ 50 มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

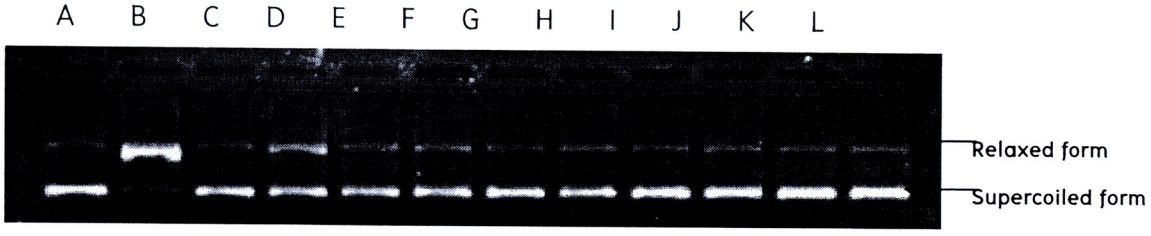
จากการศึกษาฤทธิ์ต้านออกซิเดชันโดยประเมินจากฤทธิ์ขจัดอนุมูลอิสระซุปเปอร์ออกไซด์ ไนตริกออกไซด์และฤทธิ์ยับยั้งการเกิดลิปิดเปอร์ออกซิเดชันของสารสกัดแกมม่า-โอไรซานอลจากข้าวไทย แสดงให้เห็นว่าสารสกัดแกมม่า-โอไรซานอลจากข้าวไทยแสดงฤทธิ์ต้านออกซิเดชันที่ดีผ่านกลไกในลักษณะเดียวกันกับสารต้านออกซิเดชันกลุ่มที่ชอบไขมัน (Lipophilic antioxidant) มากกว่ากลุ่มที่ชอบน้ำ (Hydrophilic antioxidant) นอกจากนั้นการแสดงฤทธิ์ขจัดอนุมูลอิสระไนตริกออกไซด์ที่ดียังแสดงถึงศักยภาพของสารสกัดแกมม่า-โอไรซานอลจากข้าวไทยในการออกฤทธิ์ต้านการอักเสบ เนื่องจากอนุมูลอิสระไนตริกออกไซด์มีความสัมพันธ์กับกระบวนการอักเสบ (Surh, 2003)

4.3 ความสามารถในการป้องกันการทำลายดีเอ็นเอจากอนุมูลอิสระ

ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (Hydrogen peroxide) สามารถแพร่ผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ เข้าไปในนิวเคลียสและทำปฏิกิริยากับเหล็ก แล้วเกิดอนุมูลอิสระไฮดรอกซิลจากปฏิกิริยาเฟนตอน (Fenton reaction) อนุมูลอิสระที่เกิดจากปฏิกิริยาเฟนตอนนี้สามารถทำความเสียหายให้กับดีเอ็นเอได้ อย่างไรก็ตาม หากเป็นไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์อย่างเดียวไม่สามารถทำให้ดีเอ็นเอแตกได้ แต่เมื่อมีเหล็กภายในเซลล์ร่วมด้วยจึงมีบทบาทสำคัญในการกระตุ้นปฏิกิริยาเฟนตอน โดยทำปฏิกิริยากับไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ แล้วทำให้เกิดอนุมูลอิสระที่ทำความเสียหายกับดีเอ็นเอ การเติมเหล็กและไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์จะเป็นตัวเร่งปฏิกริยาและสร้างอนุมูลอิสระไฮดรอกซิลซึ่งสามารถเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของเบส ทำให้สายดีเอ็นเอขาด และเกิดการเปลี่ยนแปลงลักษณะ (Conformation change) ของดีเอ็นเอได้ ซึ่งการที่เหล็กสามารถกระตุ้นปฏิกิริยาเฟนตันทำให้เกิดอนุมูลอิสระแล้วทำให้เกิดความเสียหายต่อดีเอ็นเอนี้ ในการศึกษาฤทธิ์ป้องกันการทำลายดีเอ็นเอโดยอนุมูลอิสระ จะใช้ Plasmid DNA pUC18 โดยอาศัยการสร้างอนุมูลอิสระไฮดรอกซิล (Hydroxyl, $OH^{\bullet}$) จากไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) และเฟอร์รัสซัลเฟต ($FeSO_4$) โดยการเกิดปฏิกิริยาเฟนตันดังแสดง

$$H_2O_2 + Fe^{2+} \rightarrow Fe^{3+} + OH^{\bullet} + OH^{-}$$

การศึกษาครั้งนี้ทำได้โดยบ่มสารตัวอย่างในความเข้มข้นต่างๆ กับ Plasmid DNA pUC18 พร้อมกับสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์และสารละลายเฟอร์รัสซัลเฟต ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง จากนั้นจึงนำสารละลายที่ได้จากการบ่มมาทำอิเล็กโทรโฟรีซิส โดยเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน Epigallocatechin gallate (EGCG) และเควอเซทิน โดยปกติ Plasmid DNA pUC18 จะอยู่ในรูป Supercoiled form มากกว่า Relaxed form เมื่อ Supercoiled form ถูกทำลายด้วยอนุมูลไฮดรอกซิลจะทำให้ปริมาณของ Supercoiled form ลดลง แต่กลับทำให้ Relaxed form มีปริมาณมากขึ้น จึงสามารถวิเคราะห์ได้จากอัตราส่วนของ Intensity ที่วิเคราะห์ได้จากเครื่อง Gel documentation ระหว่าง Supercoiled form กับ Relaxed form (Saenjum et al., 2010) ดังแสดงในตารางที่ 8



รูปที่ 23 อิเล็กโทรโฟรีซิสของ Plasmid pUC18 DNA เมื่อ A: ชุดควบคุมเฉพาะ Plasmid DNA, B: Plasmid DNA + Fenton reaction, C: ชุดควบคุมเฉพาะ Plasmid DNA, D: Plasmid DNA + สารสกัดแกมม่า-โอไรซานอลจากข้าวก่ำบิ้งความเข้มข้น 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร, E: Plasmid DNA + สารสกัดแกมม่า-โอไรซานอลจากข้าวก่ำบิ้งความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร, F: Plasmid DNA + สารสกัดแกมม่า-โอไรซานอลจากข้าวก่ำบิ้งความเข้มข้น 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร, G: Plasmid DNA + สารสกัดแกมม่า-โอไรซานอลจากข้าวก่ำบิ้งความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร, H: ชุดควบคุมเฉพาะ Plasmid DNA, I: Plasmid DNA + สารมาตรฐานเควอเซทินความเข้มข้น 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร, J: Plasmid DNA + สารมาตรฐานเควอเซทินความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร, K: Plasmid DNA + สารมาตรฐานเควอเซทินความเข้มข้น 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร, L: Plasmid DNA + สารมาตรฐานเควอเซทินความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

จากรูปที่ 23 แสดงให้เห็นว่าโดยปกติแล้ว Plasmid pUC18 DNA จะประกอบด้วย Supercoiled form ปริมาณสูง โดยจะพบ Relaxed form ในปริมาณเล็กน้อย (Lane A) เมื่อนำ Plasmid pUC18 DNA มาบ่มร่วมกับสารตั้งต้นสำหรับปฏิกิริยาเฟนตันที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 60 นาที พบว่า Supercoiled form ของ Plasmid pUC18 DNA จะถูกทำลายด้วยอนุมูลอิสระไฮดรอกซิลที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาเฟนตันแล้วเปลี่ยนเป็น Relexed form จึงทำให้ปริมาณของ Supercoiled form ลดลงและ Relexed form เพิ่มขึ้น (Lane B) ดังนั้นถ้าสารตัวอย่างสามารถป้องกันการทำลายดีเอ็นเอได้ ปริมาณ Supercoiled form และ Relaxed form ไม่ควรจะแตกต่างจากชุดควบคุม (Lane A)

ตารางที่ 8 อัตราส่วนระหว่าง Supercoiled form และ Relaxed form เมื่อทดสอบด้วยสารสกัดแกมม่า-โอไรซานอล

ความเข้มข้น (µg/ml)	อัตราส่วนระหว่าง Supercoiled และ Relaxed form			
	EGCG	แกมม่า-โอไรซานอล	ข้าวชิวแม่จัน	ข้าวแดงสุโขทัย 1
ชุดควบคุม	3.80 ± 0.13	3.75 ± 0.18	3.84 ± 0.32	3.87 ± 0.32
5	3.86 ± 0.27	1.82 ± 0.46*	1.56 ± 0.29 *	1.59 ± 0.36*
10	3.74 ± 0.18	2.19 ± 0.35*	1.83 ± 0.28*	3.95 ± 0.46
25	3.83 ± 0.29	2.42 ± 0.46*	3.66 ± 0.40	3.79 ± 0.34
50	3.87 ± 0.23	3.69 ± 0.29	3.72 ± 0.33	3.69 ± 0.18

ความเข้มข้น (µg/ml)	อัตราส่วนระหว่าง Supercoiled และ Relaxed form			
	ข้าวก่ำบิ้ง	ข้าวก่ำต่อ	ข้าวดำสุโขทัย 1	เควอเซทิน
ชุดควบคุม	3.76 ± 0.15	3.85 ± 0.25	3.79 ± 0.25	3.87 ± 0.34
5	1.89 ± 0.19*	1.91 ± 0.24*	1.57 ± 0.43*	3.67 ± 0.31
10	3.67 ± 0.31	3.66 ± 0.32	3.68 ± 0.39	3.96 ± 0.23
25	3.73 ± 0.28	3.79 ± 0.26	3.65 ± 0.25	3.79 ± 0.26
50	3.83 ± 0.22	3.87 ± 0.31	3.69 ± 0.29	3.75 ± 0.23

ค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน, n = 3,

ชุดควบคุมคือ Plasmid DNA + ตัวทำละลายสารสกัดแกมม่า-โอไรซานอล

* หมายถึงอัตราส่วนระหว่าง Supercoiled form และ Relexed form มีความแตกต่างจากชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95%,

จากตารางที่ 8 แสดงให้เห็นว่าสารมาตรฐานเควอเซทินและ EGCG แสดงฤทธิ์ป้องกันการทำลายดีเอ็นเอจากอนุมูลอิสระได้ดีที่สุดที่ความเข้มข้นต่ำกว่า 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สารสกัดแกมม่า-โอไรซานอลที่สกัดจากข้าวก่ำบิ้ง ข้าวก่ำต่อ ข้าวดำสุโขทัย 1 และข้าวแดงสุโขทัย 1 แสดงฤทธิ์ป้องกันการทำลายดีเอ็นเอจากอนุมูลอิสระได้ที่ความเข้มข้นเดียวกันที่ความเข้มข้น 10

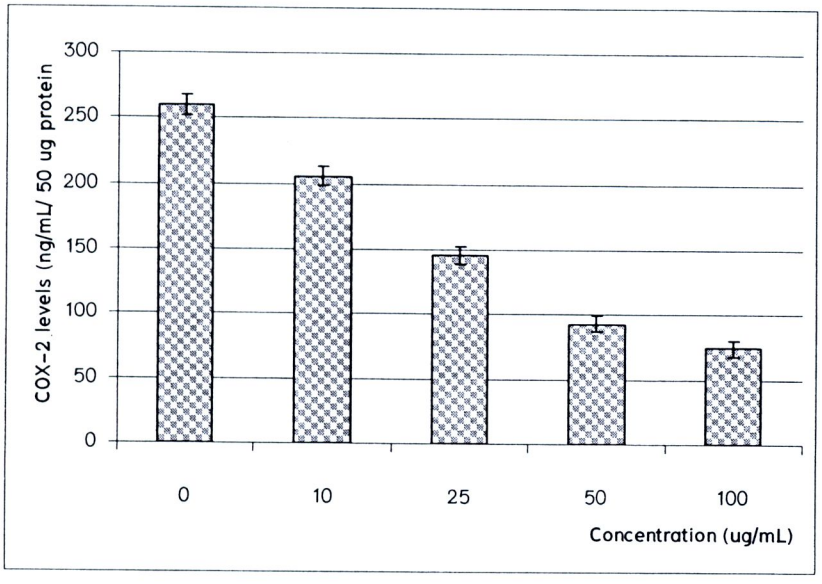
ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สำหรับสารสกัดแกมม่า-โอไรซานอลจากข้าวซิวแม่จันแสดงฤทธิ์ป้องกันการทำลายดีเอ็นเอจากอนุมูลอิสระได้ที่ความเข้มข้นเดียวกันที่ความเข้มข้น 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในขณะที่สารมาตรฐานแกมม่า-โอไรซานอลแสดงฤทธิ์ป้องกันการทำลายดีเอ็นเอที่ความเข้มข้นเท่ากับ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จะเห็นว่าสารสกัดแกมม่า-โอไรซานอลที่สกัดจากข้าวก่ำและข้าวแดงแสดงฤทธิ์ป้องกันการทำลายดีเอ็นเอได้ดีกว่าสารสกัดแกมม่า-โอไรซานอลที่สกัดจากข้าวขาว ในการทดสอบด้วยวิธีการป้องกันการทำลายดีเอ็นเอจากอนุมูลอิสระมีความเป็นไปได้ว่าอาจเกิดจาก 2 กลไก คือ สารสกัดแกมม่า-โอไรซานอลสามารถขจัดอนุมูลอิสระไฮดรอกซิลที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาเฟนตันก่อนที่อนุมูลอิสระไฮดรอกซิลจะเข้าทำลายดีเอ็นเอหรืออาจเกิดจากการที่สารสกัดแกมม่า-โอไรซานอลสามารถจับกับเหล็กไอออน (Iron chelating effect) ทำให้ไม่มีเหล็กเข้าไปทำปฏิกิริยากับไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เพื่อสร้างอนุมุลอิสระไฮดรอกซิล ส่วนการที่สารสกัดแกมม่า-โอไรซานอลจากข้าวก่ำและข้าวแดงแสดงฤทธิ์ป้องกันการทำลายดีเอ็นเอจากอนุมูลอิสระได้สูงกว่าข้าวขาวและสารมาตรฐานแกมม่า-โอไรซานอลนั้นอาจเกิดจากการที่สารสกัดแกมม่า-โอไรซานอลจากข้าวก่ำและข้าวแดงมีองค์ประกอบของสารสำคัญรองอื่นๆ ที่วิเคราะห์ได้จากเทคนิค Reversed-phase HLPC ที่เป็นส่วนประกอบของแกมม่า-โอไรซานอลมากกว่าข้าวขาวและสารมาตรฐานแกมม่า-โอไรซานอล จึงมีโอกาสเสริมฤทธิ์กัน (Synergistic effect) ทำให้ความสามารถในการขจัดอนุมูลอิสระไฮดรอกซิลและ/หรือการจับกับเหล็กไอออนของสารสกัดแกมม่า-โอไรซานอลจากข้าวก่ำและข้าวแดงสูงกว่าข้าวขาวและสารมาตรฐานแกมม่า-โอไรซานอล

4.4 ฤทธิ์ต้านการอักเสบ

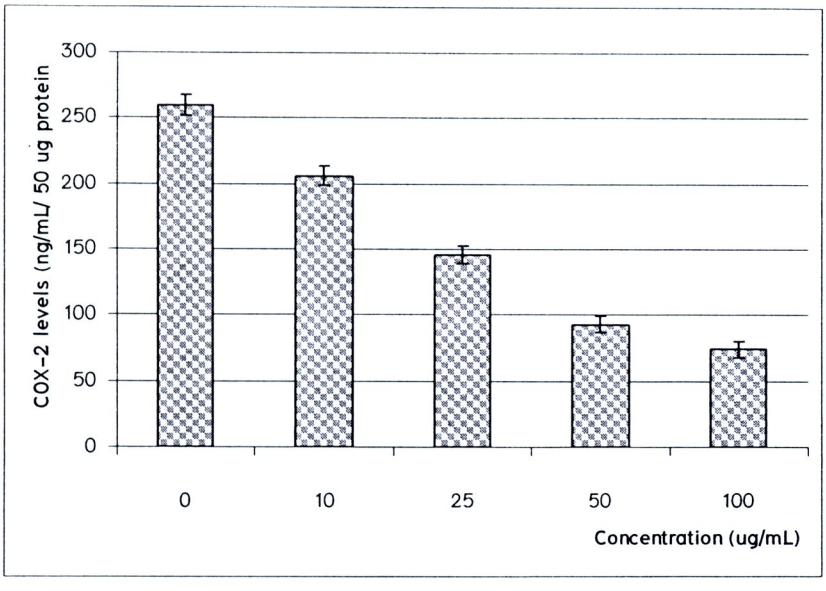
การประเมินฤทธิ์ต้านการอักเสบของสารสกัดแกมม่า-โอไรซานอลจากข้าวไทยผ่านการยับยั้งการสร้างเอนไซม์ไซโคลออกซิจีเนส-2 (COX-2) และทูเมอร์ เนโครซิส แฟคเตอร์-แอลฟ่า (TNF-α) ในเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่และไส้ตรง (HT-29 adenocarcinoma cells) ที่ถูกกระตุ้นด้วยไลโปพอลิแซคคาไรด์และอินเทอร์เฟอรอน-แกมม่า

4.4.1 การยับยั้งการสร้างเอนไซม์ไซโคลออกซิจีเนส-2

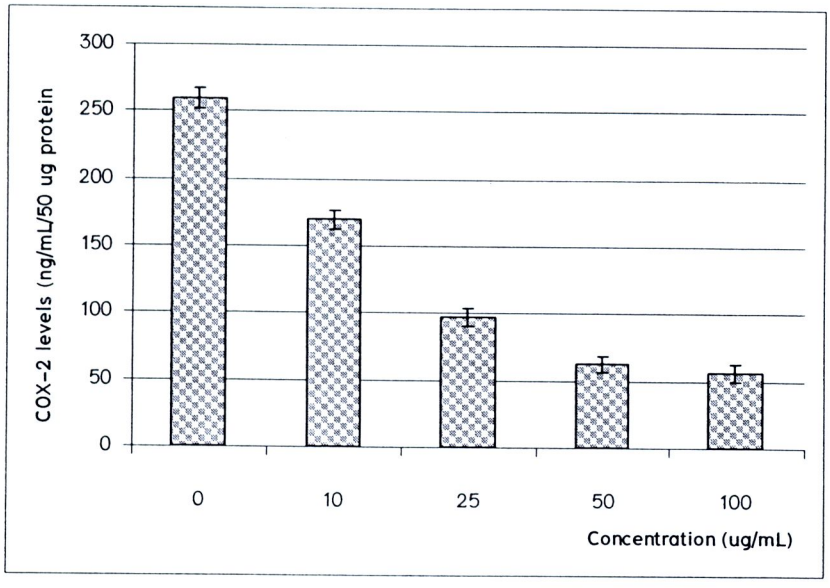
ฤทธิ์ยับยั้งการสร้างเอนไซม์ไซโคลออกซิจีเนส-2 (COX-2) ของสารสกัดแกมม่า-โอไรซานอลในเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่และไส้ตรง HT-29 มีความสัมพันธ์กับความเข้มข้น (Concentration-dependent manner) ดังแสดงในรูปที่ 24-28 เปรียบเทียบกับสารมาตรฐานแกมม่า-โอไรซานอล เคอร์คูมินและแอสไพริน ดังแสดงในรูปที่ 29-31



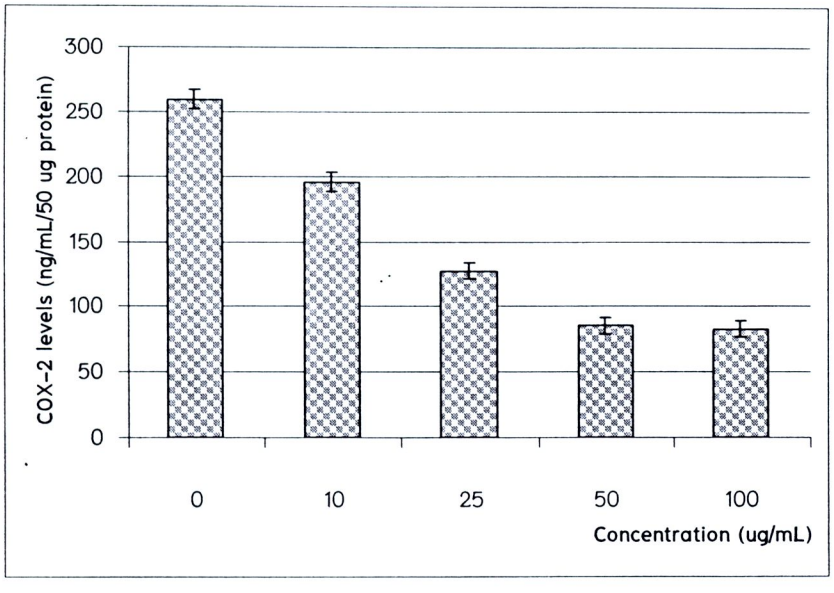
รูปที่ 24 การยับยั้งการสร้างเอนไซม์ COX-2 ของสารสกัดแกมม่า-โอไรซานอลจากข้าวซิวแม่จัน



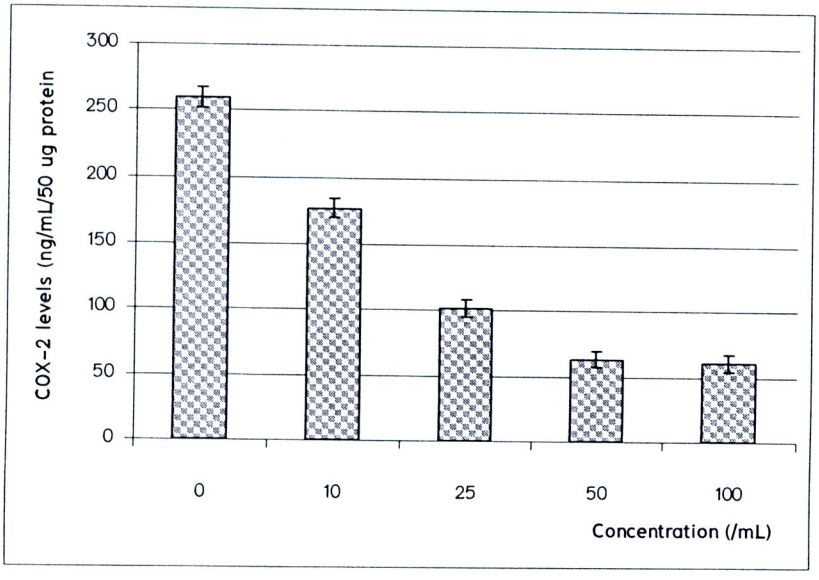
รูปที่ 25 การยับยั้งการสร้างเอนไซม์ COX-2 ของสารสกัดแกมม่า-โอไรซานอลจากข้าวแดงสุโขทัย1



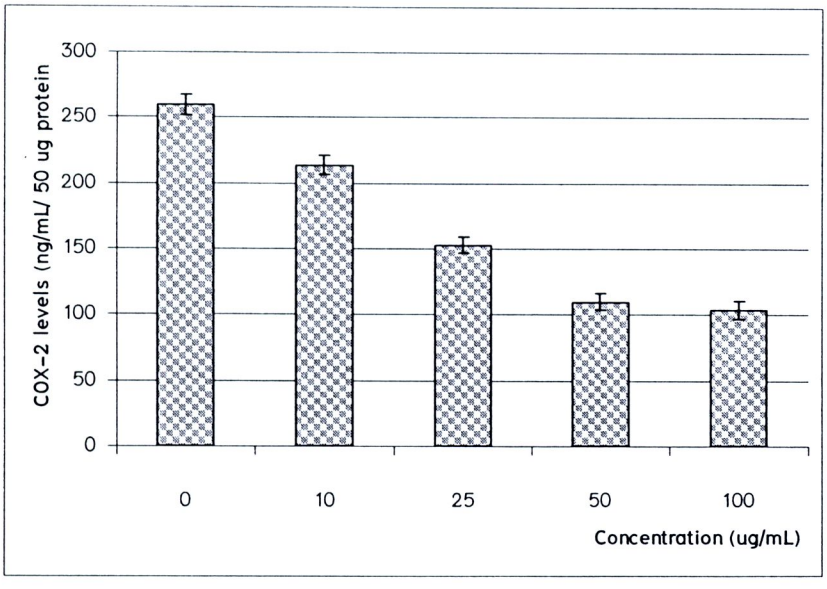
รูปที่ 26 การยับยั้งการสร้างเอนไซม์ COX-2 ของสารสกัดแกมม่า-โอไรซานอลจากข้าวก่ำบิ้ง



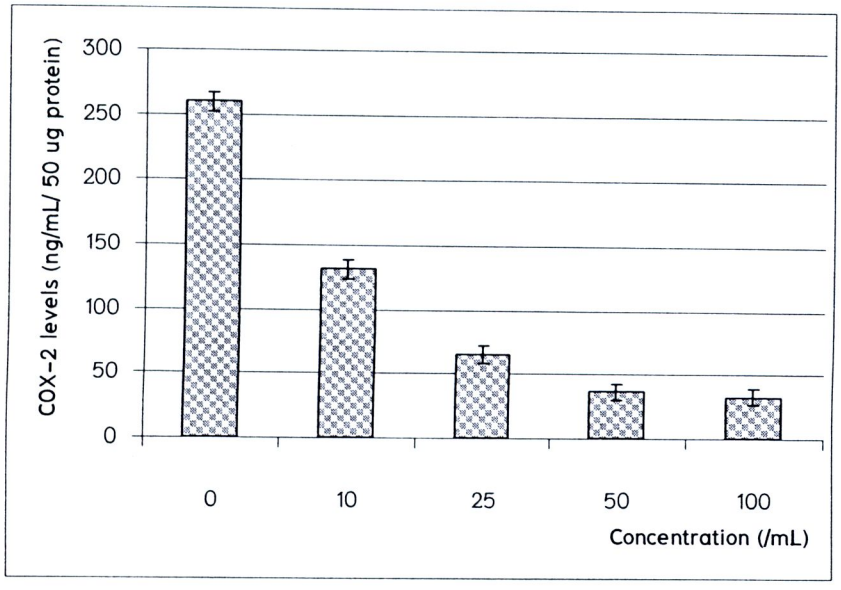
รูปที่ 27 การยับยั้งการสร้างเอนไซม์ COX-2 ของสารสกัดแกมม่า-โอไรซานอลจากข้าวก่ำต่อ



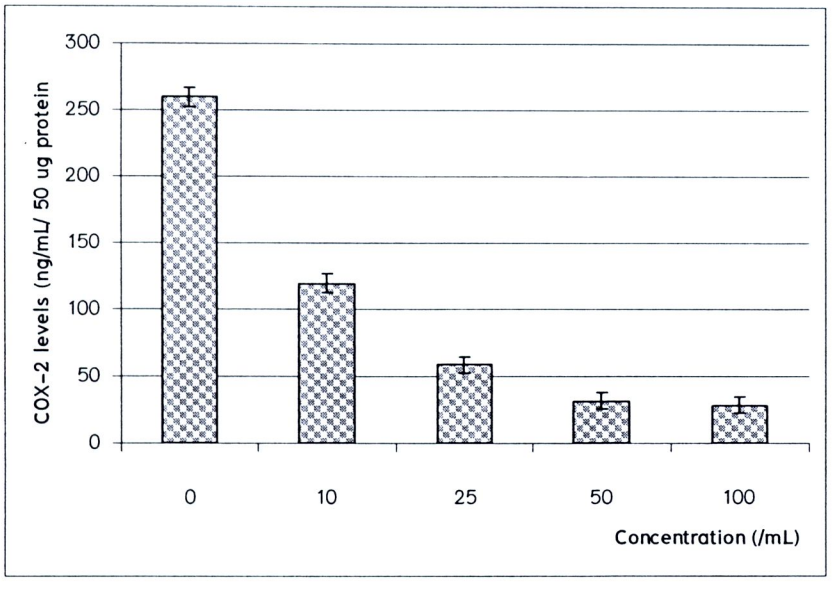
รูปที่ 28 การยับยั้งการสร้างเอนไซม์ COX-2 ของสารสกัดแกมม่า-โอไรซานอลจากข้าวดำสุโขทัย1



รูปที่ 29 การยับยั้งการสร้างเอนไซม์ COX-2 ของสารมาตรฐานแกมม่า-โอไรซานอล



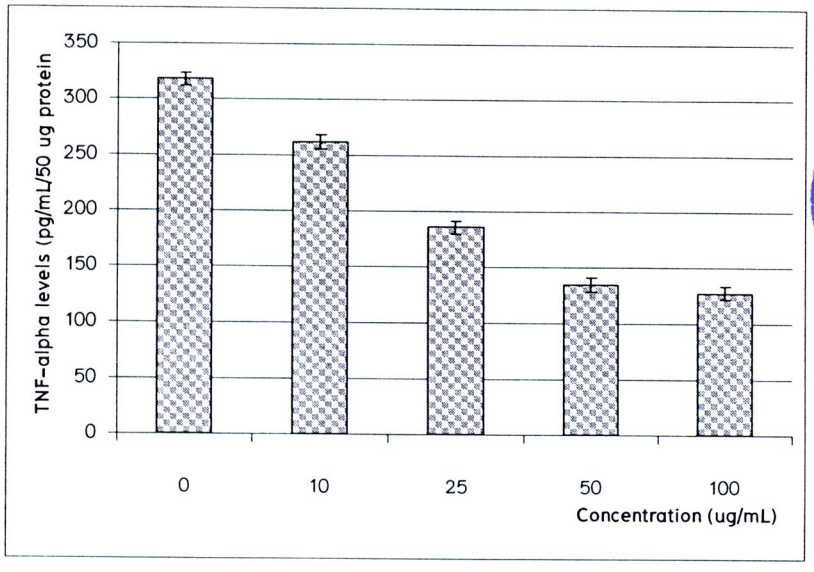
รูปที่ 30 การยับยั้งการสร้างเอนไซม์ COX-2 ของสารมาตรฐานเคอร์คูมิน



รูปที่ 31 การยับยั้งการสร้างเอนไซม์ COX-2 ของสารมาตรฐานแอสไพริน

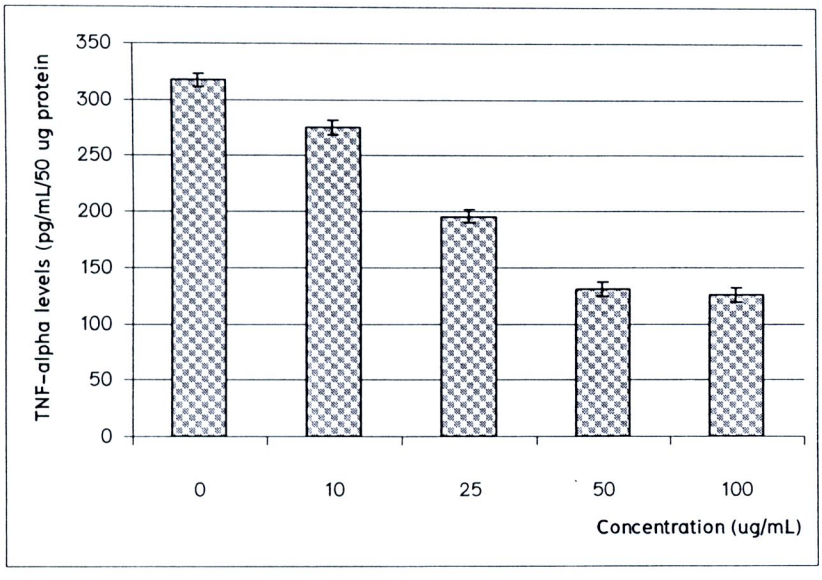
4.4.2 การยับยั้งการสร้างทูเมอร์ เนโครซิส แฟคเตอร์-แอลฟ่า

ฤทธิ์ยับยั้งการสร้างทูเมอร์ เนโครซิสแฟคเตอร์-α (TNF-α) ของสารสกัดแกมม่า-โอไรซานอลในเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่และไส้ตรง HT-29 มีความสัมพันธ์กับความเข้มข้น (Concentration-dependent manner) ดังแสดงในรูปที่ 32-36

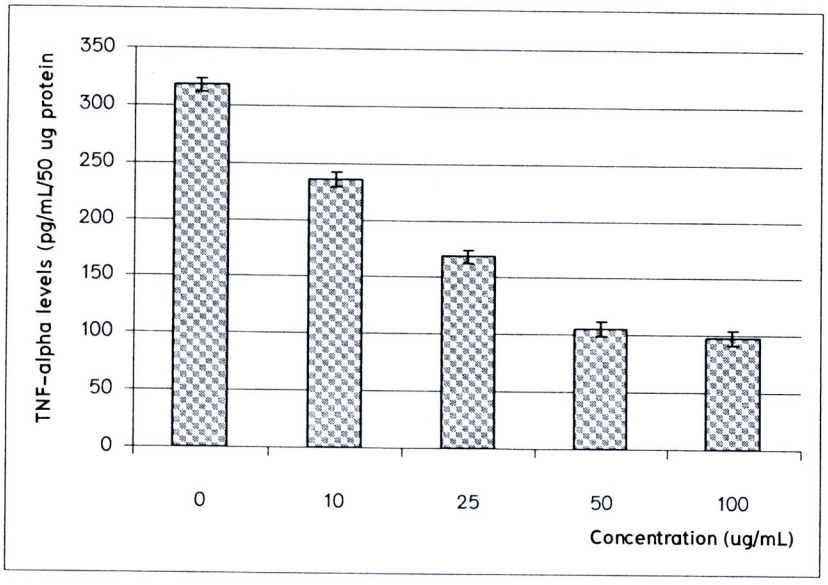


สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ห้องสมุดงานวิจัย

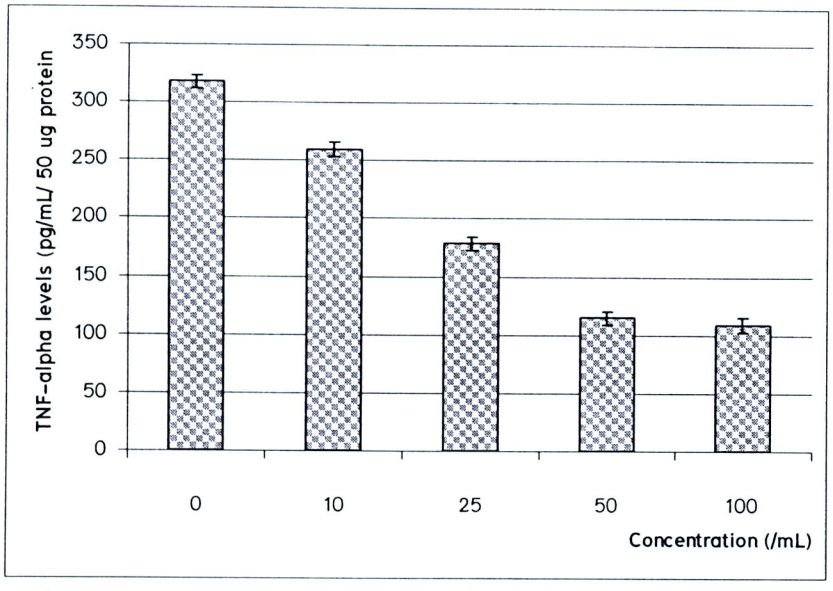
รูปที่ 32 การยับยั้งการสร้าง TNF-α ของสารสกัดแกมม่า-โอไรซานอลจากข้าวซิวแม่จัน



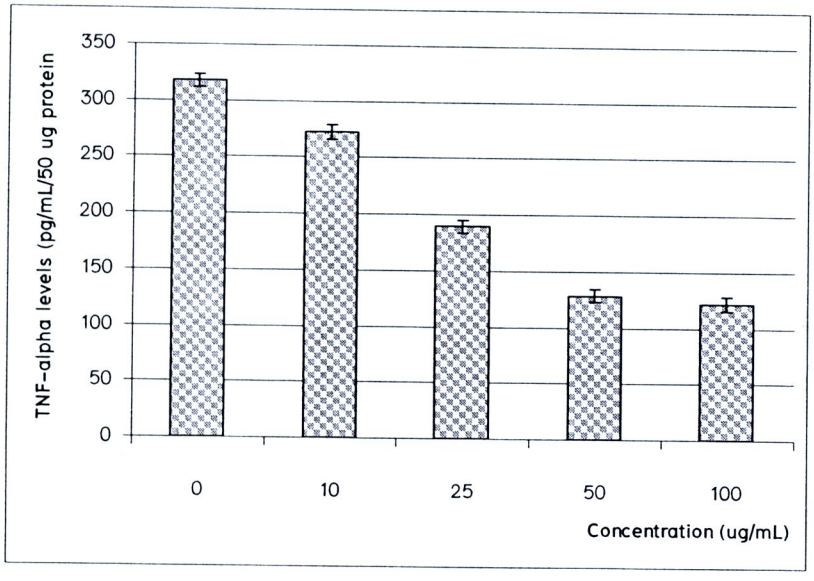
รูปที่ 33 การยับยั้งการสร้าง TNF-α ของสารสกัดแกมม่า-โอไรซานอลจากข้าวแดงสุโขทัย 1



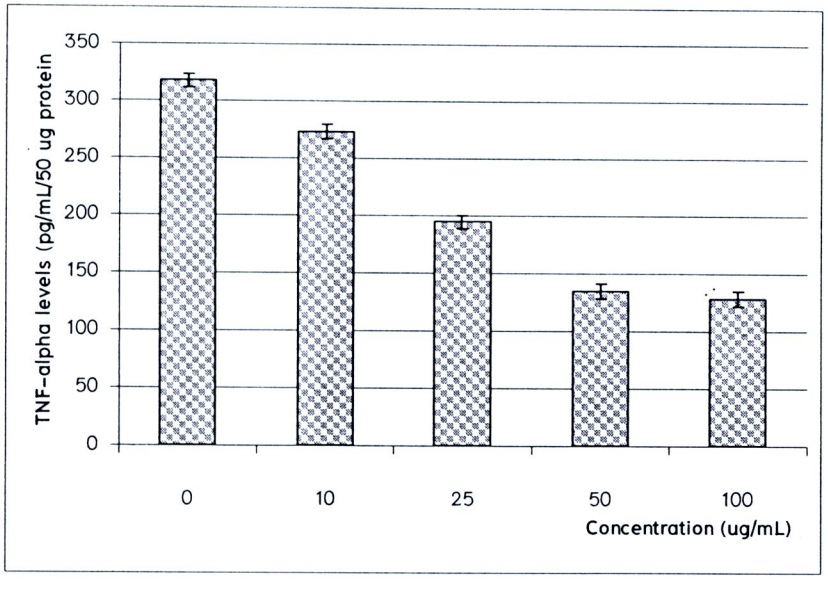
รูปที่ 34 การยับยั้งการสร้าง TNF-α ของสารสกัดแกมม่า-โอไรซานอลจากข้าวก่ำบิ้ง



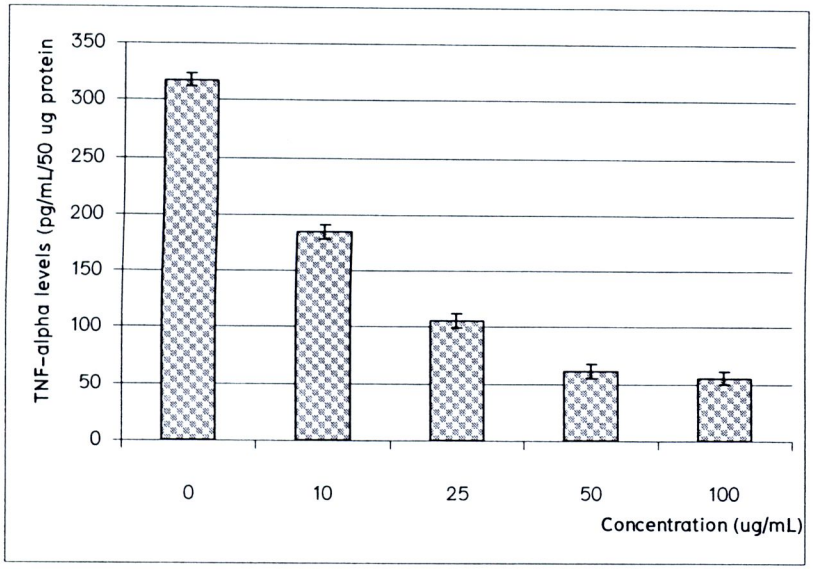
รูปที่ 35 การยับยั้งการสร้าง TNF-α ของสารสกัดแกมม่า-โอไรซานอลจากข้าวดำสุโขทัย 1



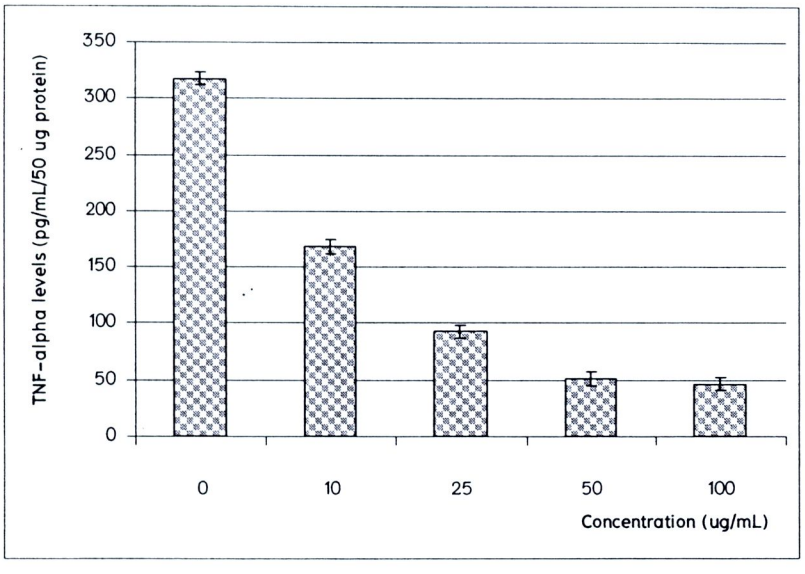
รูปที่ 36 การยับยั้งการสร้าง TNF-α ของสารสกัดแกมม่า-โอไรซานอลจากข้าวก่ำต่อ



รูปที่ 37 การยับยั้งการสร้าง TNF-α ของสารมาตรฐานแกมม่า-โอไรซานอล



รูปที่ 38 การยับยั้งการสร้าง TNF-α ของสารมาตรฐานเคอร์คิวมิน



รูปที่ 39 การยับยั้งการสร้าง TNF-α ของสารมาตรฐานแอสไพริน

ตารางที่ 9 ค่าความเข้มข้นที่สามารถยับยั้งการสร้างไซโคลออกซิจีเนส-2 และทูเมอร์ เนโครซิสแฟคเตอร์-แอลฟ่าได้ร้อยละ 50 (IC_{50}) ของสารสกัดแกมม่า-โอไรซานอล

สายพันธุ์	IC_{50} (μg/ml)	
	COX-2	TNF-α
ข้าวเจ้าฮ่อ	28.31 ± 1.54^{e}	32.32 ± 0.76^{DE}
ข้าวแดงสุโขทัย 1	25.72 ± 0.80^{d}	30.15 ± 0.88^{D}
ข้าวก่ำบิ้ง	22.24 ± 1.22^{c}	28.29 ± 0.74^{C}
ข้าวก่ำต่อ	23.27 ± 0.64^{cd}	28.39 ± 0.88^{C}
ข้าวดำสุโขทัย 1	22.39 ± 0.78^{c}	28.89 ± 0.72^{CD}
สารมาตรฐานแกมม่า-โอไรซานอล	35.75 ± 1.28^{f}	36.73 ± 2.05^{F}
สารมาตรฐานเคอร์คูมิน	16.14 ± 0.65^{b}	18.43 ± 1.09^{B}
สารมาตรฐานแอสไพริน	13.79 ± 0.46^{a}	15.34 ± 0.43^{A}

ค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน, วิเคราะห์ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

$^{a, b, c,...}$ หมายถึงค่าความเข้มข้นที่ยับยั้งการสร้างเอนไซม์ COX-2 ได้ร้อยละ 50 มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

$^{A, B, C,...}$ หมายถึงค่าความเข้มข้นที่ยับยั้งการสร้าง TNF-α ได้ร้อยละ 50 มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

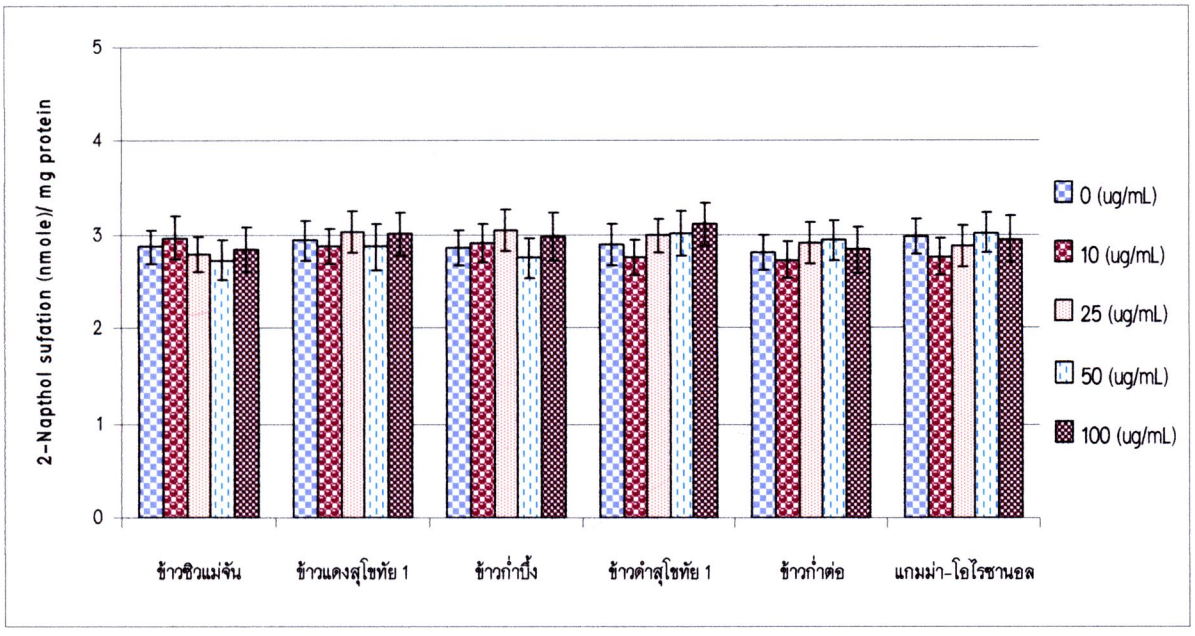
จากตารางที่ 9 สารสกัดแกมม่า-โอไรซานอลจากข้าวไทยแสดงฤทธิ์ยับยั้งการสร้างเอนไซม์ไซโคลออกซิจีเนส-2 และทูเมอร์ เนโครซิสแฟคเตอร์-แอลฟ่าที่ดี ถึงแม้จะมีฤทธิ์ยับยั้งการสร้างเอนไซม์ไซโคลออกซิจีเนส-2 และทูเมอร์ เนโครซิสแฟคเตอร์-แอลฟ่าจะต่ำกว่าสารมาตรฐานเคอร์คูมินและแอสไพริน แต่มีฤทธิ์ที่ดีกว่าสารมาตรฐานแกมม่า-โอไรซานอล สารสกัดแกมม่า-โอไรซานอลจากข้าวก่ำบิ้งแสดงฤทธิ์ยับยั้งการสร้างเอนไซม์ไซโคลออกซิจีเนส-2 สูงสุด ตามมาด้วยสารสกัดแกมม่า-โอไรซานอลจากข้าวดำสุโขทัย 1 ข้าวก่ำต่อ ข้าวแดงสุโขทัย 1 และข้าวชิวแม่จัน ตามลำดับ นอกจากนั้นสารสกัดแกมม่า-โอไรซานอลจากข้าวก่ำบิ้งยังแสดงฤทธิ์ยับยั้งการสร้างทูเมอร์ เนโครซิสแฟคเตอร์-แอลฟ่าสูงสุด ตามมาด้วยสารสกัดแกมม่า-โอไรซานอลจากข้าวก่ำต่อ ข้าวก่ำสุโขทัย 1 ข้าวแดงสุโขทัย 1 และข้าวชิวแม่จัน ตามลำดับ สารสกัดแกมม่า-โอไรซานอลจากข้าวไทยมีฤทธิ์ต้านการอักเสบที่ดีนั้นอาจเกิดจากสารสกัดแกมม่า-โอไรซานอลเป็นสารกลุ่มที่ไม่มีขั้ว (Non-polar) จึงสามารถเคลื่นที่ผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ซึ่งเป็นสารกลุ่มฟอสโฟลิปิดได้ดีหรืออาจเกิด

จากสารสกัดแกมม่า-โอไรซานอลถูกไฮไดรไลซ์ภายในเซลล์เกิดเป็นกรดเฟอร์รูลิค (Ferulic acid) และไฟโตสเตอรอล (Phytosterol) แล้วออกฤทธิ์ยับยั้งการสร้างเอนไซม์ไซโคลออกซิจีเนส-2 (COX-2) และทูเมอร์ เนโครซิสแฟคเตอร์-แอลฟ่า (TNF-α) โดยผลการทดสอบที่ได้มีความสอดคล้องกับผลการทดสอบของ Akihisa และคณะ (2000) ที่พบว่าสารกลุ่ม Sterol ferulate มีฤทธิ์ต้านการอักเสบ เมื่อทดสอบด้วยการยับยั้งการอักเสบบริเวณหูหนูที่ถูกกระตุ้นด้วย 12-O-tetradecanoylphorbal-13-acetate (TPA) นอกจากนั้นยังสอดคล้องกับรายงานของ Choi และคณะ (2010) ที่พบว่าสารสกัดจากรำข้าวสามารถยับยั้งการสร้างทูเมอร์ เนโครซิสแฟคเตอร์-แอลฟ่า (TNF-α) อินเทอร์ลิวคิน-1β (IL-1β) อินเทอร์ลิวคิน-6 (IL-1) และลิวโคไตรอิน-B4 (LTB-4) ได้

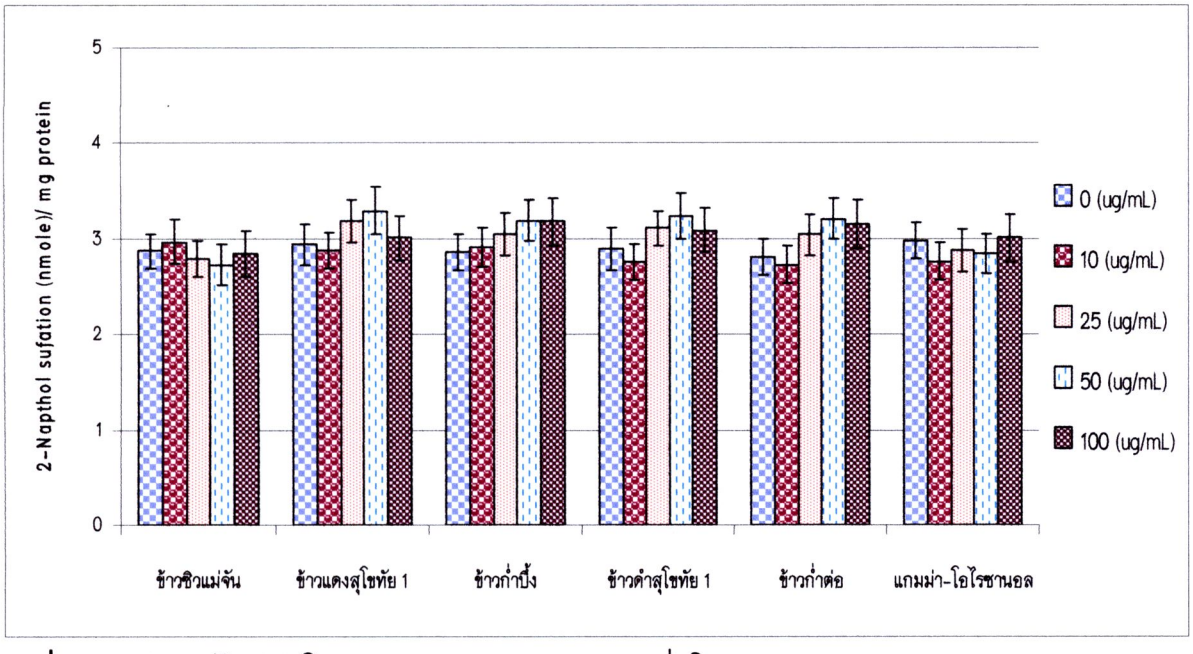
4.5 การกระตุ้นเอนไซม์ซัลโฟทรานสเฟอเรส (SULT)

การกระตุ้นเอนไซม์กำจัดสารพิษและสารก่อมะเร็ง (Phase II detoxifying enzymes) จะช่วยเพิ่มความสามารถในการกำจัดและ/หรือขจัดสารพิษ สารว่องไวปฏิกิริยาที่ผ่านการเปลี่ยนแปลงด้วยเอนไซม์เปลี่ยนแปลงยา (Phase I metabolizing enzymes) และสารก่อมะเร็ง เป็นต้น ให้ขับออกจากร่างกายก่อนที่สารเหล่านั้นจะเข้าทำลายสารชีวโมเลกุลต่างๆ ในร่างกาย แล้วนำไปสู่การก่อโรคเรื้อรังต่างๆ โดยเฉพาะโรคมะเร็ง ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้ที่การกระตุ้นเอนไซม์กำจัดสารพิษและสารก่อมะเร็งจะช่วยลดโอกาสของการก่อมะเร็งได้ ในการศึกษาความสามารถของสารสกัดแกมม่า-โอไรซานอลจากข้าวไทยในการกระตุ้นเอนไซม์ซัลโฟทรานสเฟอเรสจะทดสอบในเซลล์มะเร็งตับ (Hep G2 hepatoma cells)

จากรูปที่ 40 แสดงให้เห็นว่าระดับของเอนไซม์ซัลโฟทรานสเฟอเรส ณ เวลาเริ่มต้นของการทดสอบมีค่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95



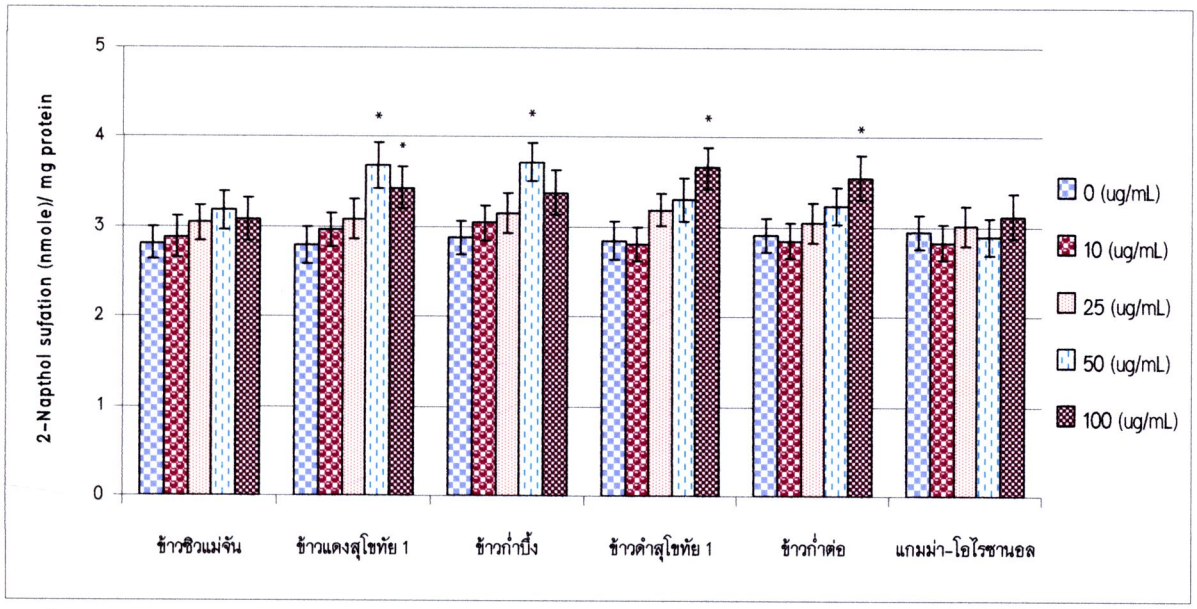
รูปที่ 40 ระดับเอนไซม์ซัลโฟทรานสเฟอเรส ณ เวลา 0 ชั่วโมง



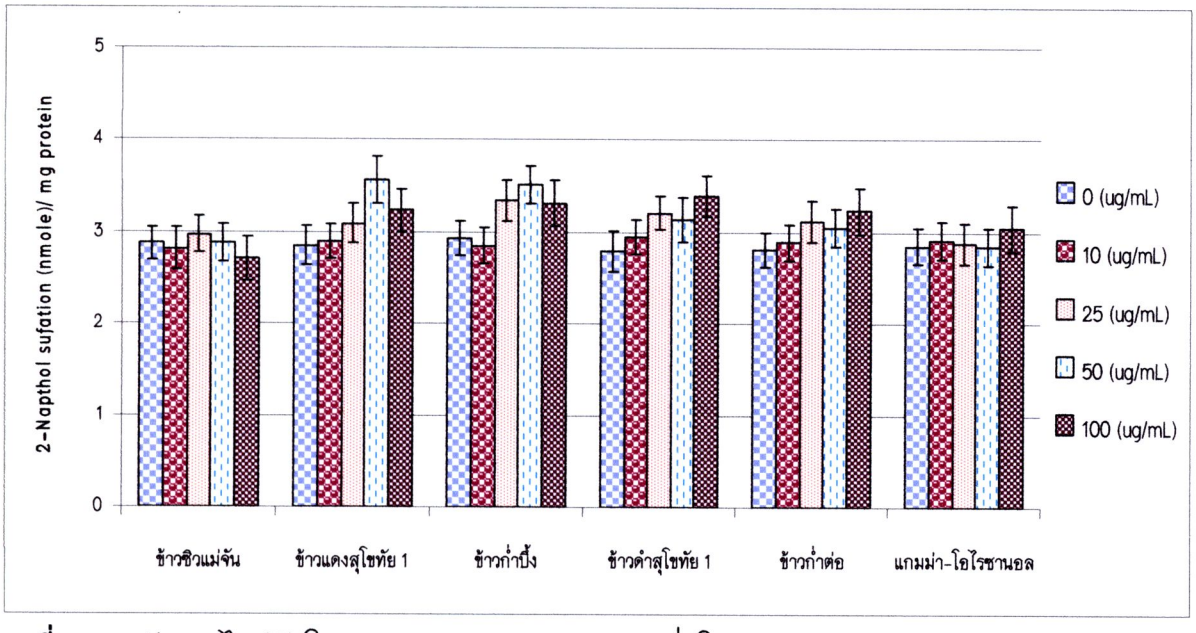
รูปที่ 41 ระดับเอนไซม์ซัลโฟทรานสเฟอเรส ณ เวลา 12 ชั่วโมง

จากรูปที่ 41 เมื่อบ่มสารสกัดแกมม่า-โอไรซานอลที่ความเข้มข้นต่างๆ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 12 ชั่วโมง พบว่าระดับของเอนไซม์ซัลโฟทรานสเฟอเรสมีระดับเพิ่มขึ้นเล็กน้อย สำหรับสารสกัดแกมม่า-โอไรซานอลจากข้าวแดงสุโขทัย 1 ข้าวก่ำปิ้ง ข้าวดำสุโขทัย 1 และข่าวก่ำ

ต่อ ที่ระดับความเข้มข้นเท่ากับ 25, 50, และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แต่ยังไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม



รูปที่ 42 ระดับเอนไซม์ซัลโฟทรานสเฟอเรส ณ เวลา 24 ชั่วโมง



รูปที่ 43 ระดับเอนไซม์ซัลโฟทรานสเฟอเรส ณ เวลา 48 ชั่วโมง

จากรูปที่ 42 เมื่อบ่มสารสกัดแกมม่า-โอไรซานอลที่ความเข้มข้นต่างๆ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าระดับของเอนไซม์ซัลโฟทรานสเฟอเรสมีระดับเพิ่มขึ้นสำหรับ

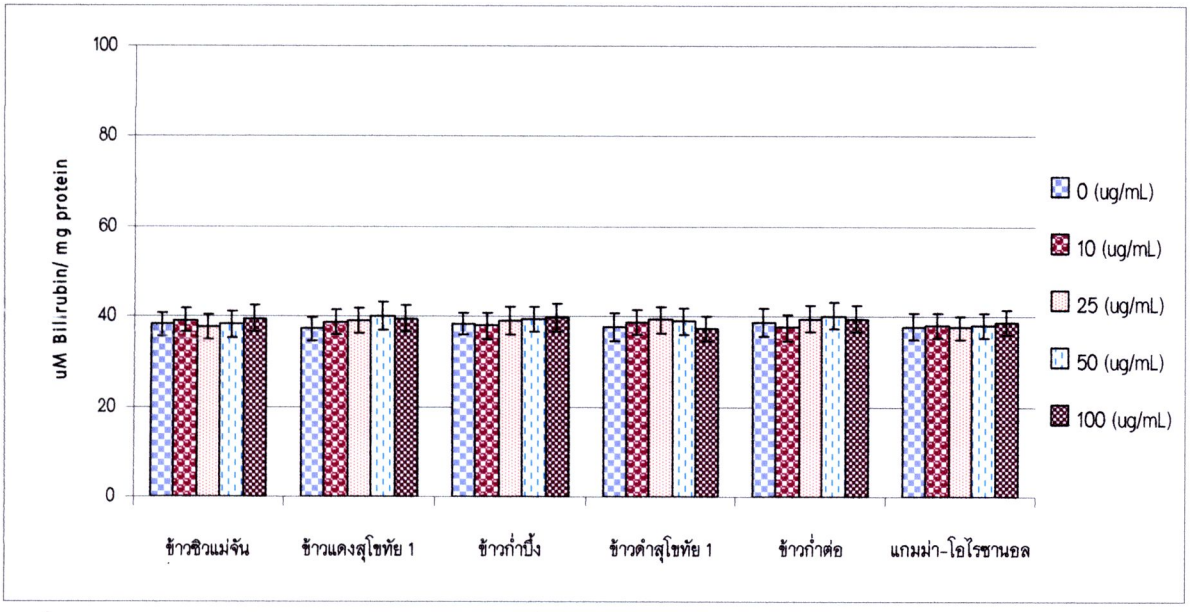
สารสกัดแกมม่า-โอไรซานอลจากข้าวแดงสุโขทัย 1 แสดงความสามารถในการกระตุ้นเอนไซม์ซัลโฟทรานสเฟอเรสที่ระดับความเข้มข้นเท่ากับ 50 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สารสกัดแกมม่า-โอไรซานอลจากข้าวก่ำบิ้ง แสดงความสามารถในการกระตุ้นเอนไซม์ซัลโฟทรานสเฟอเรสที่ระดับความเข้มข้นเท่ากับ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แต่ที่ระดับความเข้มข้นเท่ากับ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ระดับเอนไซม์ซัลโฟทรานสเฟอเรสจะต่ำกว่าที่ระดับความเข้มข้นเท่ากับ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในขณะที่สารสกัดแกมม่า-โอไรซานอลจากข้าวดำสุโขทัย 1 และข้าวก่ำต่อสามารถกระตุ้นเอนไซม์ซัลโฟทรานสเฟอเรสที่ระดับความเข้มข้นเท่ากับ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วนสารสกัดแกมม่า-โอไรซานอลจากข้าวชิวแม่จันและสารมาตรฐานแกมม่า-โอไรซานอลไม่มีผลต่อระดับเอนไซม์ซัลโฟทรานสเฟอเรส

จากรูปที่ 43 เมื่อบ่มสารสกัดแกมม่า-โอไรซานอลที่ความเข้มข้นต่างๆ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบว่าระดับของเอนไซม์ซัลโฟทรานสเฟอเรสมีระดับเพิ่มขึ้นสำหรับสารสกัดแกมม่า-โอไรซานอลจากข้าวแดงสุโขทัย 1 ข้าวก่ำบิ้ง ข้าวดำสุโขทัย 1 และข่าวก่ำต่อ ที่ระดับความเข้มข้นเท่ากับ 25, 50, และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แต่ยังไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 เมื่อเปรียบเทียบกับเวลา 24 ชั่วโมง และเมื่อพิจารณาปริมาณการเพิ่มขึ้นของเอนไซม์ซัลโฟทรานสเฟอเรสแล้วพบว่ามีสัดส่วนที่ลดลง ดังนั้นระยะเวลาที่ใช้ในการบ่มเป็นปัจจัยที่สำคัญและจากผลการทดลองนี้จึงคาดว่าเวลาที่เหมาะสมในการกระตุ้นเอนไซม์ซัลโฟทรานสเฟอเรสของสารสกัดแกมม่า-โอไรซานอลจากข้าวไทยเท่ากับ 24 ชั่วโมง

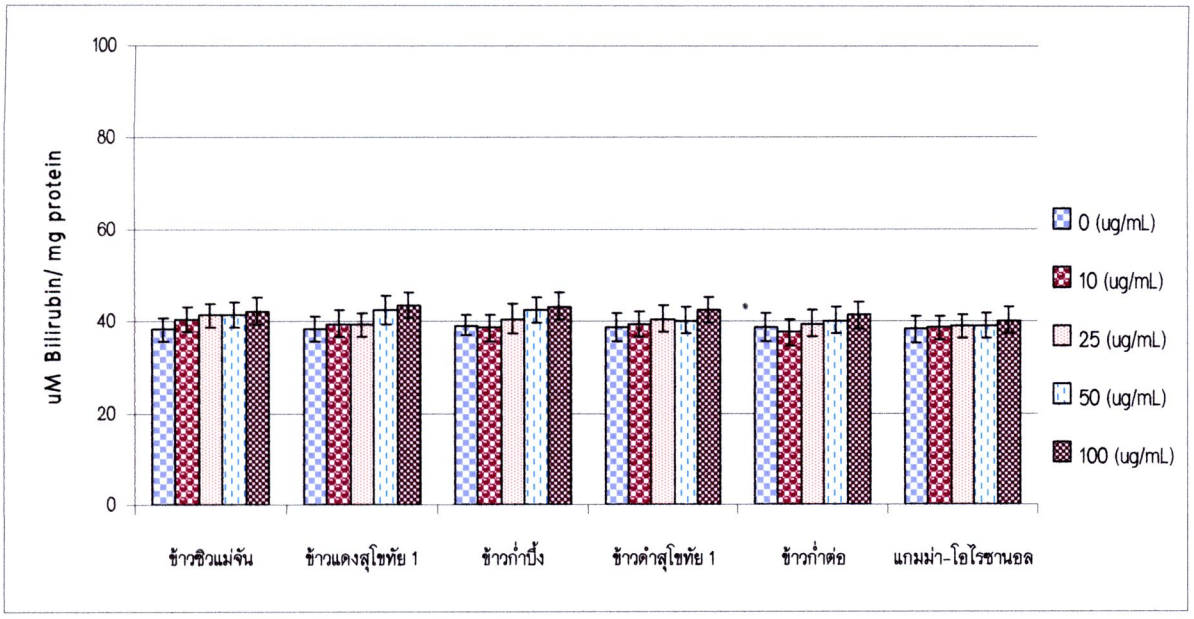
6. การกระตุ้นเอนไซม์ฮีมออกซิจีเนส-1 (HO-1)

เอนไซม์ฮีมออกซิจีเนส-1 เป็นเอนไซม์ที่มีหน้าที่สลายฮีมได้ผลผลิตเป็นเหล็ก คาร์บอนไดออกไซด์และบิลริเวอดินดังรูปที่ 44 นอกจากนั้นยังมีฤทธิ์ป้องกันเซลล์บาดเจ็บจากสารก่อออกซิเดชันต่างๆ ซึ่งอาจเกี่ยวข้องกับเซลล์มะเร็งในการป้องกันตัวจากยาเคมีบำบัด ในการวิจัยครั้งนี้จะศึกษาการกระตุ้นเอนไซม์ฮีมออกซิจีเนสในเซลล์มะเร็งตับ Hep G2 แล้ววัดปริมาณของบิลริรูบินที่เกิดขึ้นจากการสลายตัวของ Biliverdin เปรียบเทียบกับชุดควบคุม

รูปที่ 44 การเปลี่ยนแปลงฮีมโดยเอนไซม์ฮีมออกซิจีเนส-1

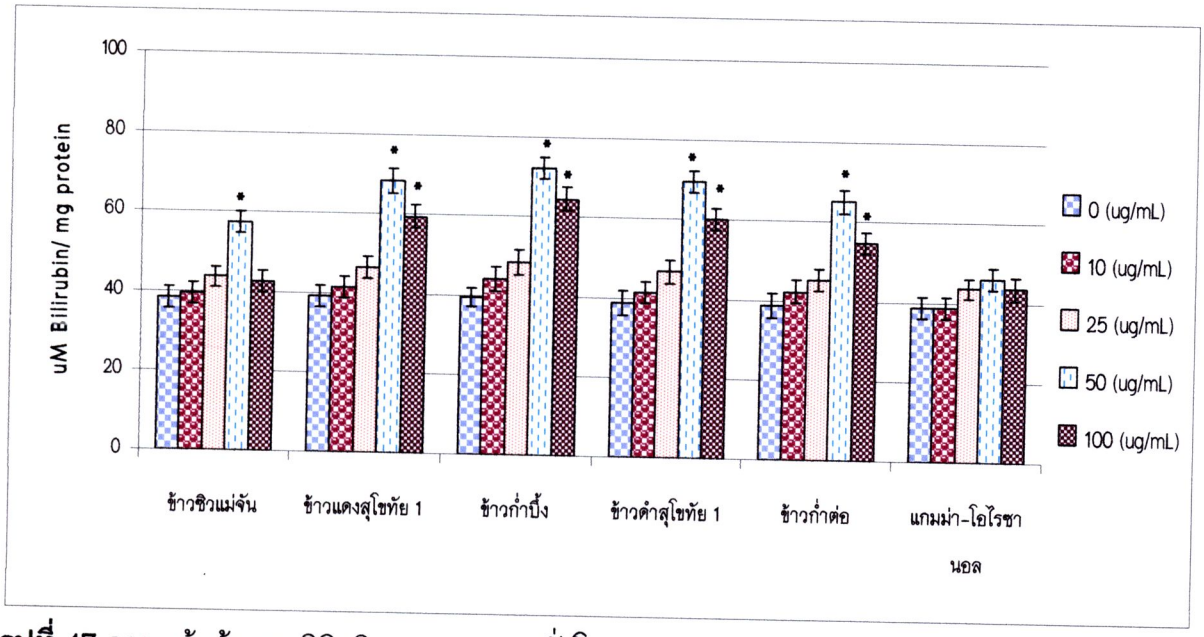


รูปที่ 45 ความเข้มข้นของบิลิรูบิน ณ เวลา 0 ชั่วโมง

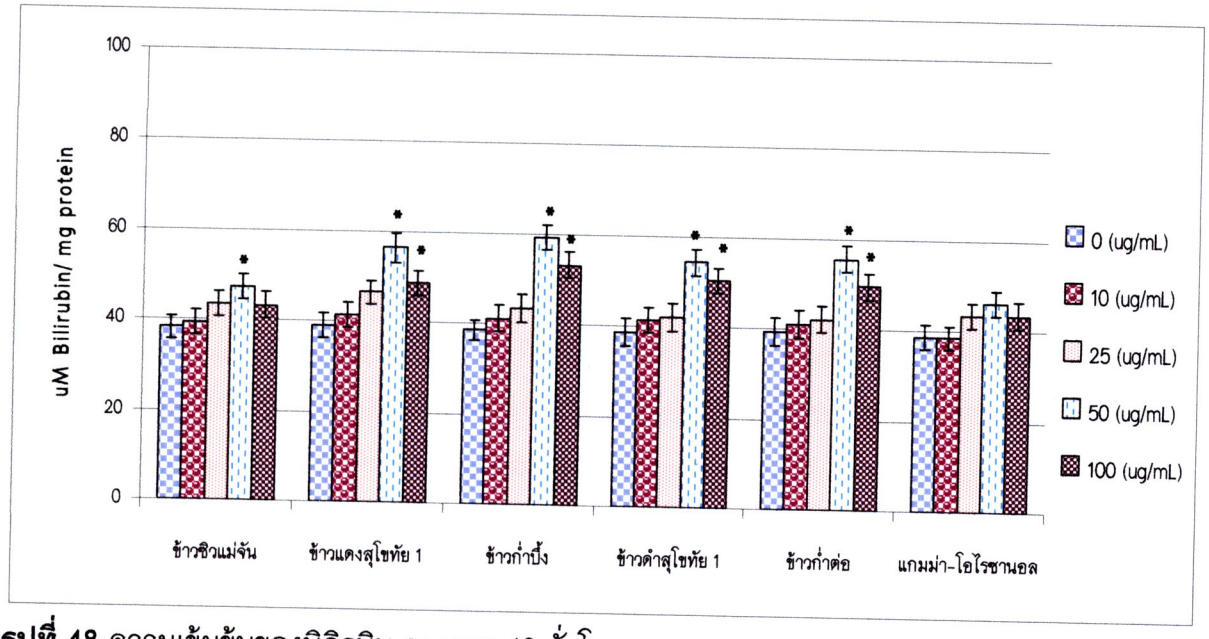


รูปที่ 46 ความเข้มข้นของบิลิรูบิน ณ เวลา 12 ชั่วโมง

จากรูปที่ 45 และ 46 สารสกัดแกมม่า-โอไรซานอลจากข้าวไทยและสารมาตรฐานแกมม่า-โอไรซานอลไม่สามารถกระตุ้นเอนไซม์ฮีมออกซิจีเนส-1 ได้ เมื่อบ่มสารสกัดแกมม่า-โอไรซานอลกับมะเร็งตับ Hep G2 โดยที่ระดับความเข้มข้น 10, 25, 50, และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ณ เวลา 0 และ 12 ชั่วโมงไม่ได้ทำให้ระดับบิลิรูบินซึ่งเป็นผลลัพธ์ที่ได้จากการสลายฮีมด้วยเอนไซม์ฮีม ออกซิจีเนส-1 แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95



รูปที่ 47 ความเข้มข้นของบิลิรูบิน ณ เวลา 24 ชั่วโมง



รูปที่ 48 ความเข้มข้นของบิลิรูบิน ณ เวลา 48 ชั่วโมง

จากรูปที่ 47 สารสกัดแกมม่า-โอไรซานอลจากข้าวก่ำบิ้งแสดงฤทธิ์กระตุ้นเอนไซม์ฮีมออกซิจีเนส-1 สูงสุดที่ความเข้มข้นเท่ากับ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรเมื่อบ่มสารสกัดกับเซลล์มะเร็งตับ Hep G2 เป็นเวลานาน 24 ชั่วโมง นอกจากนั้นยังพบว่าสารสกัดแกมม่า-โอไรซานอลจากข้าวดำสุโขทัย 1 ข้าวก่ำต่อและข้าวแดงสุโขทัย 1 แสดงฤทธิ์กระตุ้นเอนไซม์ฮีมออกซิจีเนสในระดับสูงด้วยเช่นกัน ในขณะที่สารสกัดแกมม่า-โอไรซานอลจากข้าวซิวแม่จันแสดงฤทธิ์กระตุ้นเอนไซม์ฮีมออกซิจีเนสในระดับต่ำ โดยพบว่าระดับความเข้มข้นของสารสกัดแกมม่า-โอไรซานอลที่สามารถกระตุ้นเอนไซม์ฮีมออกซิจีเนสได้สูงสุดเท่ากับ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยที่สารมาตรฐานแกมม่า-โอไรซานอลไม่สามารถกระตุ้นเอนไซม์ฮีมออกซิจีเนสได้เมื่อวิเคราะห์ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

จากรูปที่ 48 สารสกัดแกมม่า-โอไรซานอลจากข้าวก่ำบิ้ง ข้าวดำสุโขทัย 1 ข้าวก่ำต่อ ข้าวแดงสุโขทัย 1 และข้าวซิวแม่จันสามารถกระตุ้นเอนไซม์ฮีมออกซิจีเนส-1 ได้เมื่อบ่มสารสกัดแกมม่า-โอไรซานอลกับมะเร็งตับ Hep G2 เป็นเวลานาน 48 ชั่วโมง แต่ความสามารถในการกระตุ้นเอนไซม์ฮีมออกซิจีเนส-1 จะต่ำกว่าการบ่มเป็นเวลานาน 24 ชั่วโมง

จากการศึกษาเปรียบเทียบปริมาณแกมม่า-โอไรซานอลในสารสกัดข้าวก่ำ ข้าวแดงและข้าวขาวพบว่าสารสกัดแกมม่า-โอไรซานอลจากข้าวก่ำมีปริมาณแกมม่า-โอไรซานอลสูงสุด ข้าวก่ำที่ปลูกบนที่สูงเหนือระดับน้ำทะเลปานกลาง 500 เมตรขึ้นไป ซึ่งได้แก่ ข้าวก่ำบิ้ง ข้าวก่ำต่อและข้าวก่ำปาอีคอจะมีปริมาณแกมม่า-โอไรซานอลสูงกว่าข้าวก่ำที่ปลูกแบบนาสวนซึ่งได้แก่ ข้าวเหนียวดำ ซึ่งสัมพันธ์กับรายงานวิจัยที่พบว่าปริมาณแกมม่า-โอไรซานอลขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของข้าวและสิ่งแวดล้อมในพื้นที่เพาะปลูก (Boonsit et al., 2010) เมื่อนำสารสกัดแกมม่า-โอไรซานอลจากข้าวไทยที่ผ่านการจัดทำมาตรฐานโดยการปรับให้มีปริมาณสารสำคัญหลัก 3 ชนิดคือ Cycloartenyl ferulate, 24-Mehtylenecycloartanyl ferulate, และ Campesteryl ferulate เท่ากันมาศึกษากลไกการป้องกันการก่อมะเร็งพบว่าสารสกัดแกมม่า-โอไรซานอลจากข้าวไทยแสดงฤทธิ์ต้านออกซิเดชันในลักษณะที่คล้ายกับสารต้านออกซิเดชันในกลุ่มที่ชอบไขมันมากกว่าในกลุ่มที่ชอบน้ำ นอกจากนั้นยังแสดงฤทธิ์กระตุ้นเอนไซม์ซัลโฟทรานสเฟอเรสซึ่งเป็นเอนไซม์ที่มีความสำคัญในการช่วยกำจัดสารพิษและสารก่อมะเร็งที่เกิดขึ้นในร่างกายและเอนไซม์ฮีมออกซิจีเนส-1 ซึ่งเป็นเอนไซม์ในระบบต้านอนุมูลอิสระที่ช่วยขจัดอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นในร่างกาย นอกจากนั้นสารสกัดแกมม่า-โอไรซานอลจากข้าวไทยยังแสดงฤทธิ์ต้านการอักเสบที่ดีผ่านการยับยั้งการสร้างเอนไซม์ไซโคลออกซิจิเนส-2 และทูเมอร์ เนโครซิส แฟคเตอร์-แอลฟา มีความเป็นไปได้ที่สารสกัดแกมม่า-โอไรซานอลจากข้าวไทยสามารถผ่านเข้าไปในเซลล์ได้ดีจากคุณสมบัติที่ชอบไขมันหรืออาจเกิดจากเมื่อสารสกัดแกมม่า-โอไรซานอลผ่านเข้าไปในเซลล์แล้วเกิดไฮโดรไลซิสแล้วได้ผล

ลัพธ์เป็นกรดเฟอร์ลูริคและไฟโตสเตอรอลแล้วจึงออกฤทธิ์ทางชีวภาพดังกล่าว จากการศึกษาพบว่าสารสกัดแกมม่า-โอไรซานอลจากข้าวไทยแสดงฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน ฤทธิ์ป้องกันการทำลายดีเอ็นเอจากอนุมูลอิสระ ฤทธิ์กระตุ้นเอนไซม์ซัลโฟทรานสเฟอเรสและเอนไซม์ฮีมออกซิจีเนส-1 นอกจากนั้นยังแสดงฤทธิ์ต้านการอักเสบที่ดีกว่าสารมาตรฐานแกมม่า-โอไรซานอล อาจเนื่องมาจากการจัดทำมาตรฐานของสารสกัดแกมม่า-โอไรซานอลนั้นคำนวณจากปริมาณสารสำคัญหลัก 3 ชนิดดังที่ได้กล่าวมาแล้วข้างต้น แต่ในสารสกัดแกมม่า-โอไรซานอลยังพบสารสำคัญรองอีก 4-5 ชนิด ซึ่งเป็นสารกลุ่มเอสเทอร์ของกรดเฟอร์รูลิคและไฟโตสเตอรอลเช่นเดียวกัน และจากรายงานวิจัยพบว่าแกมม่า-โอไรซานอลประกอบด้วยสารสำคัญกลุ่มเอสเทอร์ของกรดเฟอร์รูลิคและไฟโตเสตอรอลถึง 10 ชนิด (Xu and Godber, 1999) จึงมีความเป็นไปได้ที่สารสำคัญรองเหล่านั้นในสารสกัดแกมม่า-โอไรซานอลจะช่วยเสริมฤทธิ์และ/หรือเพิ่มฤทธิ์ทางชีวภาพที่ได้ทำการศึกษาในครั้งนี้ จึงทำให้สารสกัดแกมม่า-โอไรซานอลมีฤทธิ์ทางชีวภาพที่สูงกว่าสารมาตรฐานแกมม่า-โอไรซานอล