

การพัฒนาเภสัชภัณฑ์จากน้ำมันรำข้าวเพื่อสุขภาพ

Development of Pharmaceutical Preparation from Rice Bran Oil for Health Promotion

ปภาวดี คล่องพิทยาพงษ์ และจันทรรัตน์ จาริกสกุลชัย

Papavadee Klongpityapong and Juntarat Jaricksakulchai

คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยอีสเทิร์นเอเซีย

Faculty of Pharmacy, Eastern Asia University

Received: March 21, 2019

Revised: June 5, 2019

Accepted: June 13, 2019

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาการออกฤทธิ์ในการยับยั้งการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งผิวหนัง (A 375) ของน้ำมันรำข้าวที่มีสารแกมมาโอไรซานอลในความเข้มข้นต่าง ๆ กัน จากการทดลองพบว่าน้ำมันรำข้าวที่มีสารแกมมาโอไรซานอล 18,000 พีพีเอ็ม ให้ผลที่เป็นพิษต่อเซลล์ ต่อต้านการแพร่กระจายของเซลล์ ต้านการบุกรุกของเซลล์ ต้านการเกาะติดของเซลล์ และทำลายหลอดเลือดที่ไปเลี้ยงเซลล์ ดังนั้นจึงใช้น้ำมันรำข้าวที่มีสารแกมมาโอไรซานอล 18,000 พีพีเอ็ม ความเข้มข้น 10% 15% และ 20% โดยน้ำหนักในการตั้งสูตรตำรับโลชั่น แล้วนำมาศึกษาความคงตัว สี กลิ่น ความหนืด และ ค่าพีเอชที่อุณหภูมิห้อง (27-30 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 4 สัปดาห์ และตรวจสอบที่สภาวะเร่งระหว่างอุณหภูมิความร้อน และความเย็น -5 องศาเซลเซียส ถึง 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จำนวน 6 ครั้ง ผลการศึกษาความ คงตัวทางกายภาพพบว่า โลชั่นที่ได้ มีความคงตัวดี สามารถป้องกันผิวหนังแห้ง ป้องกันมะเร็งผิวหนัง และป้องกันการ เกิดออกซิเดชันจากแสงยูวีได้

คำสำคัญ: น้ำมันรำข้าว, สารแกมมาโอไรซานอล, เซลล์มะเร็งผิวหนัง, ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ, ฤทธิ์ยับยั้งการแพร่กระจาย, การทดสอบความคงตัว

Abstract

The aim of this study was to test anti-tumor activity against human melanoma cell (A375). Cultured cells were exposed to various rice bran oils containing gamma oryzanol in different concentrations. It was found that rice bran oil containing gamma oryzanol 18,000 ppm give good result for cytotoxicity, antimigration, anti-invasion, antiadhesion and finally inhibited tube formation. Therefore rice bran oil containing gamma oryzanol 18,000 ppm, 10%, 15% and 20% w/w, were used to formulate lotion and evaluate physical stability of texture, color, smell, viscosity and pH at room temperature (27-30 °C) for 4 weeks with heating and cooling between the refrigerated temperatures of -5°C and incubator temperature 50°C for 48 hours for six cycles. The results of physical

stability test showed that lotions are stable. It can protect skin dryness, prevent skin cancer and prevent oxidation from UV exposure.

Keywords: rice bran oil, gamma oryzanol, skin cancer, antioxidant, antimigration, stability test



บทนำ

น้ำมันรำข้าวหรือที่เรียกว่าน้ำมันจมูกข้าว เป็นน้ำมันที่มีสัดส่วนของกรดไขมันอิ่มตัวเชิงเดี่ยวสูง ส่วนประกอบที่สำคัญคือ แกมมาออไรซานอลแกมมาอะมิโนบิวตาริกแอซิด (GABA) ไฟโตสเตอรอล และโทโคไตรอีนอล เป็นแหล่งของธาตุเหล็ก วิตามินบี วิตามินอี โปแทสเซียม โทเอมีน ไนอาซิน แมงกานีส และฟอสฟอรัส ซึ่งมีคุณค่าทางโภชนาการสูง มีคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระ เป็นสารจากธรรมชาติที่ดี สามารถเพิ่มความชุ่มชื้นให้แก่ผิวหนัง และยังเป็นองค์ประกอบสำคัญในสูตรตำรับผลิตภัณฑ์ (Srikaeo & Pradit, 2011; Angelis et al., 2011; Jennings & Akoh, 2009) ช่วยในการป้องกันการเกิดออกซิเดชันโดยการเกิดออกซิเดชัน เป็นสาเหตุของการเกิดความผิดปกติของร่างกาย เช่น โรคมะเร็ง และโรคเกี่ยวกับหลอดเลือด จากผลงานวิจัยด้านการต้านอนุมูลอิสระพบว่า สารสำคัญที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพ คือแกมมาออไรซานอล (Cheng et al., 2010; Szczesniak, Ostaszewski, Ciecierska, and Sadkowski, 2016; Klongpityapong, Supabphol, and Supabphol 2013) โดยน้ำมันรำข้าวหรือน้ำมันจมูกข้าว ได้ถูกนำมาใช้ในกลุ่มผลิตภัณฑ์เสริมอาหารเพื่อเป็นการส่งเสริม และป้องกันสุขภาพ น้ำมันรำข้าว หรือน้ำมันจมูกข้าว เป็นน้ำมันที่ได้จากธรรมชาติสามารถนำมาเป็นส่วนประกอบของการตั้งตำรับผลิตภัณฑ์ในกลุ่มเครื่องสำอาง หรือผลิตภัณฑ์ในกลุ่มบำรุงผิว (Sohail et al., 2017)

ด้านผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร ได้เริ่มนำน้ำมันรำข้าวมาช่วยส่งเสริมสุขภาพ สารสำคัญที่เป็นองค์ประกอบที่ออกฤทธิ์การมีฤทธิ์ลดระดับ cholesterol ในเลือด (Cheng et al., 2010; Ha et al., 2005; Utarwuthipong et al., 2009)

หรือนำมาใช้เป็นองค์ประกอบในการปรุงอาหารช่วยลดระดับของ low density lipoprotein-cholesterol (Eady et al., 2011) และยังสามารถช่วยต้านอนุมูลอิสระ (Juliano, Cossu, Alamanni, and Piu, 2005; Servinova, Kagan, Han, D, and Packer, 1991; Iqbal, Minhajuddin, and Beg, 2004) สามารถช่วยรักษาโรคมะเร็งอีกด้วย (Kim, Kang, Nam, and Friedman 2012) มีรายงานว่าให้ผลดีในการต้านการเจริญของเซลล์มะเร็งต่อมลูกหมาก (Klongpityapong, 2013) และเนื่องจากน้ำมันรำข้าวเป็นน้ำมันที่มาจากธรรมชาติ และยังคงประกอบไปด้วยสารสำคัญ ที่ออกฤทธิ์ให้ประโยชน์ที่ดีต่อผิวหนัง จึงนำไปสู่การทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งผิวหนัง และนำมาพัฒนาเป็นสูตรตำรับต่อไป

วัตถุประสงค์

เพื่อทดสอบความเป็นพิษ ฤทธิ์การยับยั้งการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งผิวหนัง ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ และพัฒนาสูตรตำรับโลชั่น พร้อมทั้งประเมินความคงสภาพภายใต้สภาวะต่าง ๆ ของสูตรตำรับที่ได้

แนวคิดทฤษฎีที่เกี่ยวข้อง

น้ำมันรำข้าว เป็นน้ำมันที่ได้จากจมูกข้าว โดยอุดมไปด้วยสารสำคัญทางธรรมชาติ ซึ่งได้มีการศึกษาเบื้องต้นว่า สารสำคัญต่าง ๆ เหล่านี้ มีความสามารถในการต้านสารอนุมูลอิสระและต้านปฏิกิริยาออกซิเดชัน น้ำมันรำข้าวอุดมไปด้วยคุณค่าทางโภชนาการที่สูง ปัจจุบันได้มีการนำน้ำมันรำข้าวมาเป็นผลิตภัณฑ์เสริมอาหารโดยสามารถพบมากตามท้องตลาด หรือตามแหล่งผลิตภัณฑ์เสริมอาหารเพื่อสุขภาพ จากฤทธิ์ของสารสำคัญในน้ำมันรำข้าวที่ได้

มีการศึกษานั้น สารสำคัญที่ออกฤทธิ์ได้ถูกดึงออกมาเพื่อนำมาใช้ และเพิ่มปริมาณสารสำคัญให้มีความเข้มข้นที่สูงขึ้น เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการออกฤทธิ์ให้เพิ่มสูงขึ้น จากฤทธิ์การต้านสารอนุมูลอิสระในน้ำมันรำข้าวได้ถูกนำมาศึกษาเพิ่มในเซลล์มะเร็ง เนื่องจากสารอนุมูลอิสระเป็นอีกหนึ่งสาเหตุที่ทำให้เกิดมะเร็ง โดยสาเหตุดังกล่าวก็เป็นที่ยอมรับกัน โดยจากการศึกษาฤทธิ์ด้านการต้านมะเร็งจากน้ำมันรำข้าวที่ถูกตีพิมพ์เผยแพร่ในวารสารระดับนานาชาติ คือ เรื่อง Antioxidant effect of gamma-oryzanol on human prostate cancer cells ประกอบกับน้ำมันรำข้าวมีส่วนประกอบสำคัญที่ให้ประโยชน์ในการสร้างความแข็งแรงแก่ผิว และเป็นสารสำคัญที่อยู่ในวิตามินอี ซึ่งเป็นส่วนประกอบหลักที่สามารถใส่ในสูตรตำรับที่เป็นเภสัชภัณฑ์

หรือผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง ทางผู้วิจัยจึงได้

- ศึกษาประสิทธิภาพของน้ำมันรำข้าวที่มีความเข้มข้นของสาร gamma oryzanol ต่าง ๆ ว่ามีประสิทธิภาพต่อเซลล์มะเร็งผิวหนังหรือไม่ อย่างไร

- ศึกษาประสิทธิภาพของน้ำมันรำข้าวที่มีความเข้มข้นของสาร gamma oryzanol ต่าง ๆ ในการต้านการสร้างหลอดเลือดใหม่

- พัฒนาเภสัชภัณฑ์ชนิดโลชั่น โดยนำผลการศึกษาของน้ำมันรำข้าวในการต้านมะเร็งผิวหนัง มาเป็นสารออกฤทธิ์ใส่ลงในโลชั่น และทดสอบด้านความคงตัวที่อุณหภูมิห้อง และความคงตัวภายใต้สภาวะเร่ง

กรอบแนวคิดการวิจัย

ทดสอบประสิทธิภาพการต้านเซลล์มะเร็งผิวหนัง

- Proliferation assay (ทดสอบฤทธิ์ด้านการเจริญเติบโต)
- Migration assay (ทดสอบฤทธิ์เคลื่อนย้ายที่ผ่าน collagen)
- Invasion assay (ทดสอบฤทธิ์บุกรุกผ่าน extracellular matrix)
- Adhesion assay (ทดสอบฤทธิ์เกาะตัวในที่ใหม่)

ทดสอบการต้านการสร้างหลอดเลือดใหม่

- VEGFR (ทดสอบการแสดงออกยีน VEGFR ในเซลล์บุผิวหลอดเลือด)
- VEGF (ทดสอบปริมาณ VEGF และการแสดงออกยีน VEGF ในเซลล์มะเร็ง)

ทดสอบการออกฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระเบื้องต้น โดยวิธี DPPH scavenging assay

- การตรวจสอบคุณภาพวิเคราะห์ด้วย เทคนิค Thin layer chromatography (TLC)
- การตรวจสอบปริมาณวิเคราะห์ โดยวิธี Spectrometric assay

พัฒนาตำรับโลชั่นน้ำมันรำข้าว

- พัฒนาสูตรตำรับต่าง ๆ ของน้ำมันรำข้าว
- ทดสอบความคงตัวของผลิตภัณฑ์

ศึกษาภายใต้สภาวะอุณหภูมิห้อง

ศึกษาความคงตัวของตำรับภายใต้สภาวะเร่ง

สมมติฐานการวิจัย

1. น้ำมันรำข้าวที่มีปริมาณสาร gamma oryzanol ขนาดต่าง ๆ มีฤทธิ์การต้านเซลล์มะเร็งผิวหนัง
2. น้ำมันรำข้าวที่มีปริมาณสาร gamma oryzanol ขนาดต่าง ๆ มีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ
3. การพัฒนาสูตรตำรับที่ดีสามารถรองรับปริมาณสารสำคัญที่อยู่ในรูปน้ำมันในปริมาณสูงได้ และมีความคงตัวดี ณ สภาวะอุณหภูมิต่าง ๆ

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

1. การทดสอบการประสิทธิผลการต้านเซลล์มะเร็งผิวหนัง

อุปกรณ์การเลี้ยงเซลล์, อาหารเลี้ยงเซลล์, เซลล์ move ; membrane , ECM ; Matrigel®, collagen I, collagen IV, fibronectin, vitronectin , chamber , RT-PCR ; primer , RNA extract kit , RT-PCR ; cDNA kit

2. การพัฒนาสูตรตำรับ

Rice bran oil containing gamma oryzanol 18,000 ppm, Vitamin E acetate, Cyclomethicone , Glycerin , Propylene glycol , Triethanolamine, Phenoxyethanol, Sodium lauryl sulfate, Carbopol® 940, Tetrasodium EDTA , Glyceryl monostearate , Butylated hydroxytoluene

วิธีการทดสอบ

1. เพื่อทดสอบความสามารถของน้ำมันรำข้าวที่มีแกมมาออไรซานอล 5,000 - 18,000 พีพีเอ็ม ในการยับยั้งการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งผิวหนัง ผ่านกลไกการควบคุมภาวะ oxidative stress หรือ matrix metalloproteinases (MMPs)

1.1 การเพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็งผิวหนังเซลล์มะเร็งจากธนาคารเซลล์หรือเรียกว่า cell line มิใช่จากผู้ป่วยโดยตรง จึงไม่ต้องผ่านคณะกรรมการจริยธรรมในมนุษย์ โดยทำการเลี้ยงเซลล์มะเร็งผิวหนัง ให้มีสุขภาพ

ดีในอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM เพื่อให้เซลล์เติบโตได้เต็มที่และมีสุขภาพดี เหมาะต่อการทำวิจัยในขั้นต่อ ๆ ไป

1.2 การศึกษาผลต่อการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งชนิดผิวหนัง โดยศึกษาการยับยั้งการเจริญเติบโต การเคลื่อนย้ายที่ การบุกรุก และการเกาะตัวในใหม่ของเซลล์มะเร็งดังต่อไปนี้

- การศึกษาผลต่อการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งชนิดผิวหนัง ทำการเลี้ยงเซลล์มะเร็งผิวหนังใน (1) อาหารเลี้ยงเซลล์ปกติเป็นกลุ่มควบคุม (control group) และ (2) อาหารเลี้ยงเซลล์ปกติที่มีน้ำมันรำข้าว (ที่มีสาร gamma oryzanol ขนาดความเข้มข้นต่าง ๆ กัน คือ 5,000, 8,000, 15,000 และ 18,000 พีพีเอ็ม) ขนาดความเข้มข้นต่าง ๆ ในระยะเวลา คือ 1- 7 วัน เติม MTT reagent ซึ่งจะเปลี่ยนสีเฉพาะเซลล์ที่ยังมีชีวิตอยู่ให้เกิดผลึกสีน้ำเงินเข้ม ต่อจากนั้นละลายสีน้ำเงินเข้มออกจากเซลล์ นำน้ำสีที่ได้ไปวัดความเข้มข้นของสีที่จะแปรตามจำนวนเซลล์ที่ยังมีชีวิตอยู่ เปรียบเทียบความเข้มข้นที่เซลล์รอดชีวิตอยู่ได้ 50 % หรือ IC_{50}

- การศึกษาผลต่อการเคลื่อนย้ายที่ (migration) ของเซลล์มะเร็งชนิดผิวหนัง เก็บเซลล์มะเร็งผิวหนัง มาเติมน้ำมันรำข้าว (ที่มีสาร gamma oryzanol ขนาดความเข้มข้นต่าง ๆ กัน คือ 5,000, 8,000, 15,000 และ 18,000 พีพีเอ็ม) ขนาดความเข้มข้นต่าง ๆ บรรจุ DMEM ปล่องให้เซลล์เคลื่อนย้ายที่ข้าม membrane ไปยัง compartment ล่างในเวลา 4-6 ชั่วโมง นำ membrane ที่คั่นระหว่างสอง chamber มาย้อมสีเพื่อประเมินความเข้มข้นของน้ำมันรำข้าวขนาดใดที่มีผลต่อการเคลื่อนย้ายที่ของเซลล์มะเร็งผิวหนัง ด้วยการนำไปคำนวณเป็น % การเคลื่อนย้ายที่ของเซลล์ โดยเปรียบเทียบกับกลุ่ม negative control well จะมีค่าการเคลื่อนย้ายที่ของเซลล์เป็น 100 % และ % inhibition มีค่าเป็นศูนย์ ค่า IC_{50}

- การศึกษาผลต่อการบุกรุก (invasion) ของเซลล์มะเร็งชนิดผิวหนัง ทดสอบการบุกรุกของเซลล์ผ่าน basement membrane โดยทำเช่นเดียวกับการศึกษาผลต่อการเคลื่อนย้ายที่ของเซลล์ ต่างกันที่จะ precoated membrane ด้วย basement membrane extract ที่ใกล้เคียงเนื้อเยื่อ basement membrane จริง

คือ Matrigel® เพื่อให้เซลล์เลียนแบบการแทรกตัวผ่าน basement membrane จริง ๆ และทำ pretreatment เซลล์ด้วยน้ำมันรำข้าวเป็นเวลา 0 และ 48 ชั่วโมง เพื่อดูประสิทธิภาพในการ pretreatment ด้วย

- การศึกษา (adhesion) ของเซลล์มะเร็ง ชนิดผิวหนัง มาเติมน้ำมันรำข้าว (ที่มีสาร gamma oryzanol ที่มีปริมาณต่าง ๆ กัน คือ 5,000, 8,000, 15,000 และ 18,000 พีพีเอ็ม) ขนาดความเข้มข้นต่าง ๆ เติมหาลงใน 96-well plate นำไปใส่ตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ที่ 37 °C ประมาณ 2-4 ชั่วโมง ล้างส่วนที่ไม่เกาะติดพื้นออก แล้วย้อมสีเฉพาะเซลล์ที่เกาะติดพื้น well นำไปคำนวณ เป็น % การเกาะติดพื้น well ของเซลล์ โดยเปรียบเทียบ well ที่เป็น (negative control well) % inhibition มีค่าเป็นศูนย์ คำนวณค่า IC₅₀

2. ทดสอบความสามารถของน้ำมันรำข้าว 5,000 - 18,000 พีพีเอ็ม ด้านการออกฤทธิ์ในการต้าน การสร้างหลอดเลือดใหม่ระดับเซลล์ ผ่านกลไกการ ควบคุมภาวะ oxidative stress และ/หรือ matrix metalloproteinases (MMPs)

2.1 การศึกษาการต้านการสร้างหลอดเลือดใหม่ เก็บเซลล์ผิวหนังหลอดเลือดที่มีสุขภาพดีในลักษณะ cell suspension มาเติมน้ำมันรำข้าว (ที่มีสาร gamma oryzanol ขนาดความเข้มข้นต่าง ๆ กัน คือ 5,000, 8,000, 15,000 และ 18,000 พีพีเอ็ม) ขนาดความเข้มข้นต่าง ๆ จากนั้นศึกษาการต้านกระบวนการสร้างหลอดเลือดใหม่ ด้วยกระบวนการดังต่อไปนี้

- การศึกษาผลต่อการแสดงออกของยีน VEGFR ในเซลล์ผิวหนังหลอดเลือด นำเซลล์ผิวหนังหลอดเลือดที่มีสุขภาพดีที่แบ่งเป็น 2 กลุ่ม คือ (1) กลุ่มเซลล์ที่ใช้ อาหารเลี้ยงเซลล์ปกติเป็นกลุ่มควบคุม (negative control group) และ (2) กลุ่มเซลล์ที่ใช้อาหารเลี้ยงเซลล์ปกติที่มี น้ำมันรำข้าว (ที่มีสาร gamma oryzanol ขนาดความเข้มข้นต่าง ๆ กัน คือ 5,000, 8,000, 15,000 และ 18,000 พีพีเอ็ม) เป็นเวลา 1 - 7 วัน เก็บเซลล์ผิวหนังหลอดเลือดแต่ละ แล้วทำ RT-PCR โดยใช้ primer ของยีน VEGFR เพื่อ ดูการแสดงออกของยีน VEGFR ในเซลล์ผิวหนังหลอดเลือด

- การศึกษาผลต่อการแสดงออกของยีน VEGF ในเซลล์มะเร็งผิวหนัง กระตุ้นเซลล์ผิวหนัง

หลอดเลือด นำเซลล์มะเร็งผิวหนัง ที่มีสุขภาพดี ที่มาแบ่ง เลี้ยงเป็น 2 กลุ่ม คือ (1) กลุ่มเซลล์ที่ใช้อาหาร เลี้ยงเซลล์ปกติเป็นกลุ่มควบคุม (negative control group) และ (2) กลุ่มเซลล์ที่ใช้อาหารเลี้ยงเซลล์ปกติที่มีน้ำมัน รำข้าว (ที่มีสาร gamma oryzanol ขนาดความเข้มข้น ต่าง ๆ กัน คือ 5,000, 8,000, 15,000 และ 18,000 พีพี เอ็ม) ขนาดความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นเวลา 1 - 7 วัน เก็บ เซลล์ชนิดต่าง ๆ ทำ RT-PCR เพื่อดูการแสดงออกของยีน VEGF ในเซลล์มะเร็ง

- การศึกษาปริมาณ VEGF ในเซลล์มะเร็ง โดย นำเซลล์มะเร็งผิวหนัง แบ่งเลี้ยงเป็น 2 กลุ่ม คือ (1) กลุ่ม เซลล์ที่ใช้อาหารเลี้ยงเซลล์ปกติเป็นกลุ่มควบคุม (negative control group) และ (2) กลุ่มเซลล์ที่ใช้อาหารเลี้ยงเซลล์ ปกติที่มีน้ำมันรำข้าว (ที่มีสาร gamma oryzanol ขนาด ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน คือ 5,000, 8,000, 15,000 และ 18,000 พีพีเอ็ม) ขนาดความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นเวลา 1 - 7 วัน เก็บเซลล์ชนิดต่าง ๆ แต่ละกลุ่มมาวิเคราะห์ปริมาณ VEGF โดยใช้ VEGF assay kit

3. ทดสอบความสามารถของน้ำมันรำข้าวที่มี สารแกมมาออไรซานอล 5,000 - 18,000 พีพีเอ็ม ด้าน การออกฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระเบื้องต้น โดยวิธี DPPH scavenging assay แบ่งออกเป็น 2 ขั้นตอน คือ

3.1 การตรวจสอบคุณภาพวิเคราะห์ด้วย เทคนิค Thin layer chromatography (TLC)

วิธีวิเคราะห์ (1) นำน้ำมันรำข้าว มา spot บนแผ่น TLC (2) Developed โดยใช้ตัวทำละลายดังนี้ CHCl₃ : CH₃ OH : H₂ O อัตราส่วน 62 : 35 : 8 (3) ปล่อยให้แห้งบนแผ่น TLC แห้ง (4) นำมาสเปรย์ด้วย 0.2 mM DPPH ใน เมธานอล ให้ทั่วแผ่น TLC ทิ้งไว้ให้แห้งบริเวณที่มีสาร ต้านอนุมูลอิสระอยู่จะปรากฏเป็นจุดสีเหลืองบนพื้น สีม่วง

3.2 การตรวจสอบปริมาณวิเคราะห์ โดย วิธี Spectrometric assay

ทดสอบความสามารถกักจับอนุมูล DPPH ของน้ำมันรำข้าว ตามวิธีของ Yen & Hen, (1995) โดยนำ

น้ำมันรำข้าว มาเตรียมเป็นสารละลายที่มีความเข้มข้นต่าง ๆ กัน ใน Absolute Ethanol ปริมาณ 100 ไมโครลิตร และเติมสารละลาย DPPH ความเข้มข้น 0.05 มิลลิโมล/ลิตร ใน Absolute Ethanol ปริมาตร 1 มิลลิลิตรลงไปผสมให้เข้ากัน หลังจากทิ้งไว้ในที่มืด ณ อุณหภูมิห้องนาน 30

นาที ตามลำดับ นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 515 นาโนเมตร เปรียบเทียบกับชุดควบคุม ซึ่งใส่ Absolute Ethanol แทนน้ำมันรำข้าว นำค่าที่ได้มาคำนวณหาร้อยละ การดักจับอนุมูลอิสระ DPPH จากสูตร

$$\text{ร้อยละการดักจับอนุมูลอิสระ DPPH} = \left[\frac{(A_{\text{control}} - A_{\text{sample}})}{A_{\text{control}}} \right] \times 100$$

A_{control} = ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายควบคุม

A_{sample} = ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายตัวอย่าง

จากนั้นคำนวณหา IC_{50} จากกราฟระหว่าง ร้อยละการยับยั้งกับความเข้มข้นของสารสกัด ณ เวลาต่าง ๆ IC_{50} = ค่าความเข้มข้นของสารสกัดที่สามารถดักจับอนุมูลอิสระ DPPH ได้ ร้อยละ 50

4. การศึกษาพัฒนาตำรับสูตรผลิตภัณฑ์ที่มีส่วนประกอบของน้ำมันรำข้าวที่มีสาร gamma oryzanol 18,000 ppm

4.1 การพัฒนาตำรับ นำข้อมูลประสิทธิภาพในการต้านการเจริญของเซลล์มะเร็งผิวหนังมากำหนดปริมาณของน้ำมันรำข้าวชนิดที่มีสาร gamma oryzanol 18,000 ppm โดยเตรียมตำรับสูตรผลิตภัณฑ์ในรูปแบบโลชั่นพื้น (สูตรที่ 1) ซึ่งมีส่วนประกอบหลักที่สำคัญ 3 ส่วนคือ (1) วัฏภาคน้ำ (water phase) ได้แก่ น้ำ และสารต่าง ๆ ซึ่งอาจเป็นของแข็ง หรือของเหลวที่ละลายได้ในน้ำ อาจเป็นสารเพิ่มความหนืด, สารฮิวแมคแตนท์, สารกันเสีย, สารลด-แรงตึงผิว (เช่น Tween) สีที่ละลายน้ำ, สารต้านออกซิเดชัน และสารออกฤทธิ์ที่ละลายในน้ำได้ (2) วัฏภาคน้ำมัน (oil phase) ได้แก่ น้ำมันต่าง ๆ (เช่น olive oil, mineral oil, castor oil), ไขมัน, สีที่ละลายน้ำมัน, น้ำหอม, สารกันหืน (เช่น butylatedhydroxyanisole, butylatedhydroxytoluene) และสารออกฤทธิ์อื่นที่ละลายน้ำมันได้ (3) ตัวทำอิมัลชัน (emulsifier) ได้แก่ สารลดแรงตึงผิว (เช่น Tween, Span, sodium lauryl ether sulfate) ตัวทำอิมัลชันเป็นตัวสำคัญในการผสมผสานให้วัฏภาคน้ำและน้ำมันเข้า กันเป็นเนื้อเดียวกัน

4.2 การพัฒนาสูตรตำรับผลิตภัณฑ์โลชั่น (product preparation) โดยเตรียมสูตรตำรับ ผลิตภัณฑ์

ทั้งหมด 4 ตำรับ ดังนี้ (1) ตำรับที่ 1 เป็นตำรับพื้น (2) ตำรับที่ 2 เป็นตำรับพื้นที่ใส่น้ำมันรำข้าวที่มีสาร gamma oryzanol 18,000 ppm ที่ความเข้มข้น 10% w/w (3) ตำรับที่ 3 เป็นตำรับพื้นที่ใส่น้ำมันรำข้าวที่มีสาร gamma oryzanol 18,000 ppm ที่ความเข้มข้น 15 % w/w (4) ตำรับที่ 4 เป็นตำรับพื้นที่ใส่น้ำมันรำข้าวที่มีสาร gamma oryzanol 18,000 ppm ที่ความเข้มข้น 20 % w/w

4.3 การประเมินลักษณะทางกายภาพของสูตรตำรับผลิตภัณฑ์ โดยหลังจากได้พัฒนาสูตรตำรับผลิตภัณฑ์แล้วให้ตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สังเกตลักษณะที่ปรากฏของสูตรตำรับผลิตภัณฑ์ ดูการแยกชั้น ประเมินลักษณะการเปลี่ยนแปลงของสี แล้ววัดค่าความเป็นกรด - ด่างของตำรับ ด้วยเครื่อง pHmeter วัดค่าความหนืดของสูตรตำรับผลิตภัณฑ์ด้วยเครื่อง Brookfield

4.4 การทดสอบความคงตัว (stability test) นำสูตรตำรับผลิตภัณฑ์โลชั่นที่ได้ในข้อ 3.2 มาทดสอบทางด้านความคงตัว โดยศึกษาที่ 2 สภาวะ คือ

- ศึกษาภายใต้สภาวะอุณหภูมิห้อง โดยแบ่งการศึกษากออกเป็น 2 กลุ่มการศึกษา คือ (1) กลุ่มผลิตภัณฑ์ที่อยู่ภายใต้อุณหภูมิห้องที่สัมผัสแสงแดด (2) กลุ่มผลิตภัณฑ์ที่อยู่ภายใต้อุณหภูมิห้องที่ไม่สัมผัสแสงแดดสังเกตลักษณะที่ปรากฏ ได้แก่ สี กลิ่น และการแยกชั้น ตามมาตรฐาน มอก.152 (2539) ด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงโดยใช้ความเร็ว

รอบ 6,000 rpm, 20 นาที, 25 °ซ. บันทึกลักษณะของผลิตภัณฑ์ดูการแยกชั้น สังเกตลักษณะที่ปรากฏของสูตรตำรับผลิตภัณฑ์ ดูการแยกชั้น ประเมินลักษณะการเปลี่ยนแปลงของสี แล้ววัดค่าความเป็นกรด - ด่างของตำรับ ด้วยเครื่อง pHmeter ทำการวัดค่าความข้นหนืดของสูตรตำรับผลิตภัณฑ์ด้วยเครื่อง Brookfield

- **ศึกษาความคงตัวของตำรับภายใต้สภาวะเร่ง** ประเมินความคงตัวของตำรับด้วยวิธี freeze-thaw cycle โดยนำไปเก็บในตู้เย็น อุณหภูมิ -5 °ซ. เป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้วนำไปเก็บในตู้อบที่อุณหภูมิ 50 °ซ. เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ทำเช่นนี้เป็น 1 cycle ทำการทดสอบทั้งหมด 6 Cycles และหลังจากครบ 6 Cycles แล้วประเมินต่อด้วยเกณฑ์และขั้นตอนเดียวกับการศึกษาภายใต้สภาวะอุณหภูมิห้อง

การวิเคราะห์และสรุปผลข้อมูล

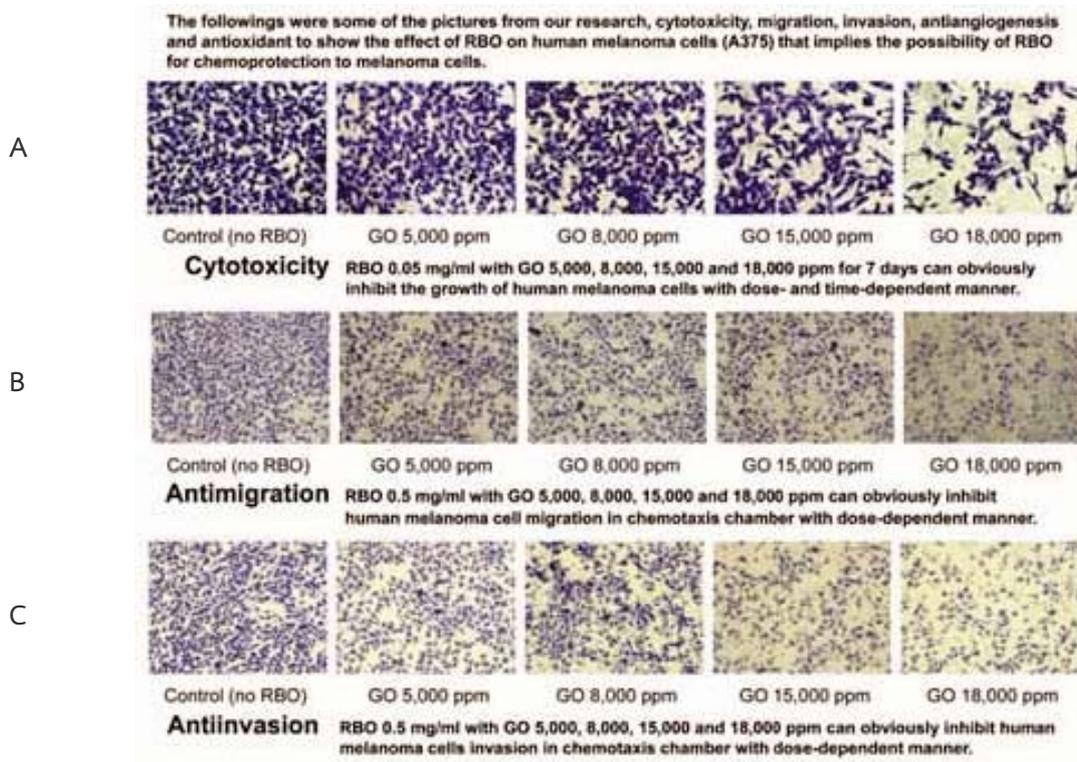
การวิจัยใช้การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติจากโปรแกรมสำเร็จ SPSS ในการวิเคราะห์ข้อมูล โดยการวิเคราะห์แบ่งเป็นสถิติเชิงพรรณนา (descriptive analytical statistic) เช่น ค่าเฉลี่ย (mean) และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation) เป็นการประเมินความเชื่อมั่นด้านความแตกต่างของชุดข้อมูล การวิเคราะห์ paired t- test ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 %

ผลการทดลอง

1. ผลการศึกษาการออกฤทธิ์ในการยับยั้งการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งผิวหนัง ผ่านกลไกการควบคุมภาวะ oxidative stress หรือ matrix metalloproteinases (MMPs)

การทดสอบฤทธิ์การต้านเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งผิวหนัง A375 ของน้ำมันรำข้าวที่มีปริมาณสารแกมมาออลโรซานอลความเข้มข้นต่างๆ คือ 5,000, 8,000, 15,000 และ 18,000 พีพีเอ็ม เป็นเวลา 1 - 7 วัน เปรียบเทียบกับตัวควบคุม (negative cell) แสดงในรูปที่ 1 พบว่า น้ำมันรำข้าวที่มีปริมาณสารแกมมาออลโรซานอล ปริมาณ 5,000, 8,000, 15,000 และ 18,000 พีพีเอ็ม ความเข้มข้น 0.05 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร จะทำให้ฤทธิ์การต้านเซลล์มะเร็ง A375 มีค่าเพิ่มมากขึ้นตามปริมาณสารแกมมาออลโรซานอล ในน้ำมันรำข้าวที่เพิ่มขึ้น และมีประสิทธิภาพดีที่สุดที่ ปริมาณสารแกมมาออลโรซานอล 18,000 พีพีเอ็ม ระดับความเข้มข้น 0.05 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง A375 ลดปริมาณของเซลล์มีชีวิตได้ 50% ได้ดีที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับตัวควบคุม (negative cell)

การทดสอบผลต่อการเคลื่อนย้ายที่ ผลต่อการบุกรุกการเกาะตัวในใหม่ของเซลล์มะเร็งผิวหนัง ของน้ำมันรำข้าวที่มีปริมาณสารแกมมาออลโรซานอลความเข้มข้นต่างๆ คือ 5,000, 8,000, 15,000 และ 18,000 พีพีเอ็ม เป็นเวลา 1 - 7 วัน เปรียบเทียบกับตัวควบคุม (negative cell) แสดงในรูปที่ 1 พบว่า น้ำมันรำข้าวที่มีปริมาณสารแกมมาออลโรซานอล ปริมาณ 5,000, 8,000, 15,000 และ 18,000 พีพีเอ็ม ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ช่วยให้การเคลื่อนย้ายที่และผลต่อการบุกรุกการเกาะตัวในใหม่ของเซลล์มะเร็งผิวหนัง A375 มีค่าเพิ่มมากขึ้นตามปริมาณสารแกมมาออลโรซานอล ของในน้ำมันรำข้าว และมีประสิทธิภาพดีที่สุดที่ ปริมาณสารแกมมาออลโรซานอล ปริมาณ 18,000 พีพีเอ็ม ระดับความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง A375 ลดปริมาณของเซลล์มีชีวิตได้ 50% ได้ดีที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับตัวควบคุม (negative cell)



ภาพ 1 A แสดงลักษณะผล Cytotoxicity ของน้ำมันรำข้าว 0.05 mg/ml ที่มีสาร gamma oryzanol (GO) 5,000, 8,000, 15,000 และ 18,000 พีพีเอ็ม

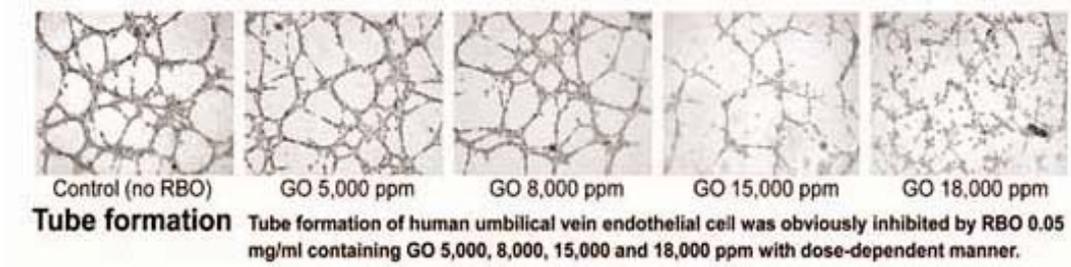
B แสดงลักษณะผล Antimigration ของน้ำมันรำข้าว 0.5 mg/ml ที่มีสาร gamma oryzanol (GO) 5,000, 8,000, 15,000 และ 18,000 พีพีเอ็ม

C แสดงลักษณะผล Antiinvasion ของน้ำมันรำข้าว 0.5 mg/ml ที่มีสาร gamma oryzanol (GO) 5,000, 8,000, 15,000 และ 18,000 พีพีเอ็ม

2. ทดสอบความสามารถของน้ำมันรำข้าวที่มีสารแกมมาออร์ซานอล 5,000 - 18,000 พีพีเอ็ม ด้านการออกฤทธิ์ในการต้านการสร้างหลอดเลือดใหม่ระดับเซลล์ ผ่านกลไกการควบคุมภาวะ oxidative stress และ/หรือ matrix metalloproteinases (MMPs)

การทดสอบการต้านการสร้างหลอดเลือดใหม่ระดับเซลล์ของเซลล์มะเร็งผิวหนัง A375 ของน้ำมันรำข้าวที่มีปริมาณสารแกมมาออร์ซานอลความเข้มข้นต่างๆ คือ 5,000, 8,000, 15,000 และ 18,000 พีพีเอ็ม เป็นเวลา 1 - 7 วัน เปรียบเทียบกับตัวควบคุม (negative cell)

แสดงในรูปที่ 2 พบว่า น้ำมันรำข้าวที่มีปริมาณสารแกมมาออร์ซานอล ปริมาณ 5,000, 8,000, 15,000 และ 18,000 พีพีเอ็ม ความเข้มข้น 0.05 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ช่วยให้การสร้างหลอดเลือดใหม่ระดับเซลล์ของเซลล์มะเร็งผิวหนัง A375 ได้เพิ่มมากขึ้นตามปริมาณสารแกมมาออร์ซานอลในน้ำมันรำข้าว และมีประสิทธิภาพดีที่สุดที่ ปริมาณสารแกมมาออร์ซานอล 18,000 พีพีเอ็ม ระดับความเข้มข้น 0.05 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง A375 ลดปริมาณของเซลล์มีชีวิตได้ 50% ได้ดีที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับตัวควบคุม (negative cell)

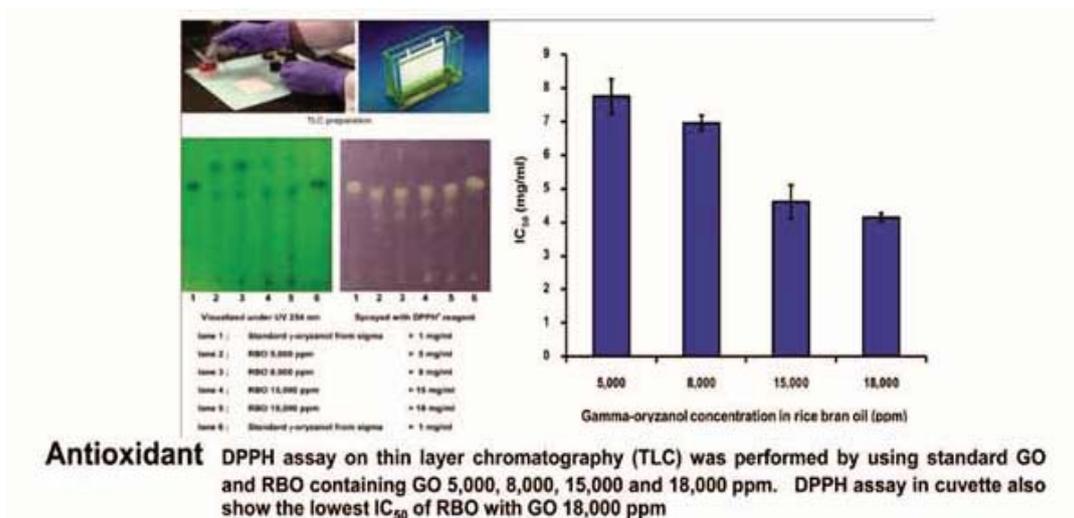


ภาพ 2 แสดงลักษณะผล Tube formation ของน้ำมันรำข้าว 0.05 mg/ml ที่มีสาร gamma oryzanol (GO) 5,000, 8,000, 15,000 และ 18,000 พีพีเอ็ม

3. ทดสอบความสามารถของน้ำมันรำข้าวที่มีสารแกมมาออไรซานอล 5,000 - 18,000 พีพีเอ็ม ด้านการออกฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระเบื้องต้น โดยวิธี DPPH scavenging assay

ค่าการยับยั้งสารออกซิเดชัน (DPPH) ที่ 50% (IC_{50}) ซึ่งเราสามารถคำนวณจากสมการจากการสร้างกราฟที่ได้

จากผลการทดสอบ จากรูปที่ 3 ค่า IC_{50} มีค่าดังนี้ RBO:GO 5,000 ppm = 7.9 mg/ml, RBO:GO 8,000 ppm = 7 mg/ml, RBO:GO 15,000 ppm = 4.8 mg/ml และ RBO:GO 18,000 ppm = 4.0 mg/ml เนื่องจากค่า IC_{50} ต่ำจะทำให้ค่าการยับยั้งสารออกซิเดชันที่สูง แสดงว่าค่าการยับยั้งสารออกซิเดชันที่ดีที่สุด คือ RBO:GO 18,000 ppm



ภาพ 3 แสดงลักษณะผล Antioxidant ของน้ำมันรำข้าว 0.05 mg/ml ที่มีสาร gamma oryzanol (GO) 5,000, 8,000, 15,000 และ 18,000 พีพีเอ็ม

4. ผลการพัฒนาตำรับ

จากสูตรตั้งต้นเป็นสูตรมาตรฐานที่มีระบบความคงตัวโดยใช้ Gelling agent ไม่สามารถเป็นสูตรตำรับที่เหมาะสมสำหรับปริมาณสารสำคัญที่อยู่ในวัตถุดิบน้ำมันปริมาณ 10 - 20 % w/w เนื่องจากเป็นส่วนที่มีปริมาณสูง ดังนั้นเพื่อให้สูตรตำรับมีความคงตัว และมีความเหมาะสม

สามารถกักเก็บสารสำคัญ จึงมีการปรับส่วนประกอบโดยเพิ่ม Glycerol monostearate ที่ทำหน้าที่เสริมฤทธิ์เป็น Emulsifier ในระดับความเข้มข้น 3% w/w, 3.5% w/w และ 4% w/w และ ที่ระดับความเข้มข้นของ Glycerol monostearate 3.5% w/w เป็นระดับที่เหมาะสมจึงนำไปพัฒนาสูตรตำรับอิมัลชันเจลที่มีส่วนประกอบของน้ำมันรำข้าวต่อไป

5. ผลการประเมินลักษณะทางกายภาพและทดสอบความคงตัวของสูตรตำรับอิมัลชันเจลที่มีส่วนประกอบของน้ำมันรำข้าว

5.1 จากการประเมินลักษณะทางกายภาพของสูตรตำรับและนำไปศึกษาความคงตัว ในสภาวะอุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 4 สัปดาห์ (อุณหภูมิ 27-30 องศาเซลเซียส) โดยแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม คือ อยู่ในสภาวะโดนแสง และไม่โดนแสง ประเมินผลทางกายภาพ โดยทดสอบลักษณะภายนอกที่เห็นลักษณะเนื้อผลิตภัณฑ์ สี กลิ่น การไหลของผลิตภัณฑ์ ความเป็นกรด-ด่าง (pH) และความหนืด พบว่า ทั้ง 8 สูตรตำรับ มีลักษณะเป็นครีมเจลข้นเล็กน้อย สีเหลืองอ่อน ขุ่นทึบแสง มีกลิ่นจำเพาะซึ่งมาจากน้ำมันรำข้าว และค่าความเป็นกรด-ด่าง อยู่ในช่วงกลาง และหลังการทดสอบ พบว่า ทั้ง 8 สูตรตำรับ

ด้านลักษณะภายนอกที่เห็นมีความคงตัวดี สี ไม่มีการเปลี่ยนแปลงจากเดิม

ความหนืด หลังศึกษาความคงตัว ในสภาวะอุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 4 สัปดาห์ ของสูตรตำรับอิมัลชันเจลที่มีส่วนประกอบของน้ำมันรำข้าวทั้ง 10% w/w, 15% w/w และ 20% w/w ค่าความหนืดเพิ่มขึ้นไม่แตกต่างจากก่อนศึกษาความคงตัว และค่าความหนืดอยู่ในช่วง 3258-4300 cP (ตาราง 1)

ความเป็นกรด-ด่าง หลังศึกษาความคงตัว ในสภาวะอุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 4 สัปดาห์ ของสูตรตำรับอิมัลชันเจลที่มีส่วนประกอบของน้ำมันรำข้าวทั้ง 10% w/w, 15% w/w และ 20% w/w ค่าความเป็นกรด-ด่างเพิ่มขึ้นไม่แตกต่างจากก่อนศึกษาความคงตัว และค่าความเป็นกรด-ด่าง อยู่ในช่วงกลาง (ตาราง 1)



ภาพ 4 แสดงลักษณะทางกายภาพที่สังเกตจากการมองเห็นของสูตรตำรับผลิตภัณฑ์ ที่ประกอบด้วยน้ำมันรำข้าว ที่มีสาร gamma oryzanol (GO) 18,000 พีพีเอ็ม (สูตรที่ 1 : สูตรพื้นฐาน, สูตรที่ 2 : RBO 10% w/w, สูตรที่ 3 : RBO 15% w/w และ สูตรที่ 4 : RBO 20% w/w)

ตาราง 1

แสดงการประเมินลักษณะทางกายภาพของสูตรคาร์บิลด์ที่มีส่วนผสมของน้ำมันรำข้าว สูตรพื้นฐาน, 10% w/w, 15% w/w และ 20% w/w ในสภาวะอุณหภูมิห้อง 27-30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 สัปดาห์, n=3 (Mean±SD)

วันที่	F1		F2		F3		F4	
	สูตรพื้นฐาน	RBO 10% w/w	RBO 10% w/w	RBO 15% w/w	RBO 15% w/w	RBO 20% w/w	RBO 20% w/w	
t=0	t=28	t=0	t=28	t=0	t=28	t=0	t=28	
ลักษณะเนื้อ	ขาว							
สี	ไม่มีกลิ่น							
กลิ่น	ไม่มีกลิ่น							
การแยกชั้น	ไม่พบ							
การไหลของผลิตภัณฑ์	+	+	+	++	++	+++	+++	
ความข้นหนืด	4179 ±195	4212 ±115	4266 ±65	4066 ±65	4146 ±51	4068 ±412	4008 ±411	
ความเป็นกรด - ต่าง	6.84± 0.046	6.96± 0.025	6.82± 0.042	6.94± 0.021	6.94± 0.021	7.01± 0.031	7.04± 0.036	
ความชื้น	3258 ±336	3451 ±47	3565 ±254	3964 ±147	3995 ±245	40788 ±405	3988 ±251	
ความชื้น	7.02± 0.035	7.00± 0.026	7.04± 0.051	7.04± 0.051	7.04± 0.051	7.04± 0.051	7.04± 0.051	

หมายเหตุ : 1. วัดค่าความหนืดของตัวรับด้วยเครื่อง BROOKFIELD viscometer ใช้เข็มเบอร์ CPE-52, ความเร็วรอบ 20 rpm ที่อุณหภูมิ 24-26 องศาเซลเซียส
 2. วัดค่า pH ด้วยเครื่อง pH meter ยี่ห้อ Sartorius รุ่น Docu-pH⁺ Meter
 3. ใช้สถิติ paired t-test วิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างค่า before และ after ภายใต้อุณหภูมิและความชื้นที่ระบับนัยสำคัญ 0.05
 4. * p < 0.05 t=0 vs t=28

5.2 จากการทดสอบความคงตัวของกายภาพของสูตรตำรับนำไปศึกษาความคงตัวของสภาวะเร่งด้วยวิธีร้อนสลับเย็น : Heating/Cooling (อุณหภูมิ -5 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้วนำไปเก็บในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง) นาน 6 รอบ แล้วประเมินผลทางกายภาพ โดยแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม คือ อยู่ในสภาวะโดนแสง และไม่โดนแสง แล้วประเมินผลทางกายภาพ โดยทดสอบลักษณะภายนอกที่เห็นลักษณะเนื้อผลิตภัณฑ์ สี กลิ่น การไหลของผลิตภัณฑ์ ความเป็นกรด-ด่าง (pH) และความหนืด พบว่า ทั้ง 8 สูตรตำรับ มีลักษณะเป็นครีมเจลชั้นเล็กน้อย สีเหลืองอ่อน ขุ่นทึบแสง มีกลิ่นจำเพาะซึ่งมาจากน้ำมันรำข้าว และค่าความเป็นกรด-ด่าง อยู่ในช่วงกลาง และหลังการทดสอบ พบว่า ทั้ง 8 สูตรตำรับ

ด้านลักษณะภายนอกที่เห็นมีความคงตัวดี สี ไม่มีการเปลี่ยนแปลงจากเดิม (ตาราง 2)

ความหนืด หลังศึกษาความคงตัวของสภาวะเร่ง จำนวน 6 รอบ ของสูตรตำรับโลชั่นที่มีส่วนประกอบของน้ำมันรำข้าว 10% w/w ค่าความหนืดลดลงไม่แตกต่างจากก่อนศึกษาความคงตัว และค่าความหนืดอยู่ในช่วง 3600-3900 cP และสูตรตำรับอิมัลชันเจลที่มีส่วนประกอบของน้ำมันรำข้าว 15% w/w ค่าความหนืดไม่แตกต่างจากก่อนศึกษา ความคงตัว และค่าความหนืดอยู่ในช่วง 3600-3900 cP และ และสูตรตำรับอิมัลชันเจลที่มีส่วนประกอบของน้ำมันรำข้าว 20% w/w ค่าความหนืดไม่แตกต่างจากก่อนศึกษา ความคงตัว และค่าความหนืดอยู่ในช่วง 3500-3700 cP (ตาราง 2)

ความเป็นกรด-ด่าง หลังศึกษาความคงตัวของสภาวะเร่ง จำนวน 6 รอบ ของสูตรตำรับโลชั่นที่มีส่วนประกอบของน้ำมันรำข้าวทั้ง 10% w/w, 15% w/w และ 20% w/w ค่าความเป็นกรด-ด่างไม่แตกต่างจากก่อนศึกษาความคงตัว และค่าความเป็นกรด-ด่าง ณ เวลา before และ after ที่เวลาต่าง ๆ ไม่มีการเปลี่ยนแปลงทั้งหมด 6 รอบอยู่ในช่วงกลาง (ตาราง 2)

ตาราง 2

แสดงการประเมินลักษณะทางกายภาพของสูตรตำรับผลิตภัณฑ์อิมัลชันเจลที่มีส่วนประกอบของน้ำมันรำข้าว สูตรพื้นฐาน, 10% w/w, 15% w/w และ 20% w/w ภายใต้สภาวะแรงด้วยวิธีร่อนลึบเป็น นาน 6 รอบ, n=3 (Mean±SD)

วันที่	F1		F2		F3		F4	
	t=0	t=6 cycles	t=0	t=6 cycles	t=0	t=6 cycles	t=0	t=6 cycles
ลักษณะเนื้อ	โดน	ไม่โดน	โดน	ไม่โดน	โดน	ไม่โดน	โดน	ไม่โดน
	แสง	แสง	แสง	แสง	แสง	แสง	แสง	แสง
กลิ่น	ครีม	ครีม	ครีม	ครีม	ครีม	ครีม	ครีม	ครีม
	เจล	เจล	เจล	เจล	เจล	เจล	เจล	เจล
การแยกชั้น	ขาว	ขาว	ขาว	ขาว	ขาว	ขาว	ขาว	ขาว
	ไม่มี	ไม่มี	ไม่มี	ไม่มี	ไม่มี	ไม่มี	ไม่มี	ไม่มี
การไหลของผลิตภัณฑ์	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ
	+	+	+	+	+	+	+	+
ค่าเฉลี่ย	4251 ±147	4345 ±41	4369 ±54	3749 ±132	3641 ±147	3778 ±40	3859 ±65	3977 ±143
ความแปรปรวน	6.84±	6.88±	6.93±	7.03±	7.00±	7.03±	7.06±	6.93±
การทดสอบ t-test	0.046	0.050	0.067	0.042	0.057	0.020	0.031	0.046
ค่าเฉลี่ย	3554 ±111	3645 ±147	3748 ±53	3859 ±65	3977 ±143	3554 ±111	3645 ±147	3748 ±98
ความแปรปรวน	7.02±	7.06±	7.06±	7.06±	7.06±	7.06±	7.06±	7.02±
การทดสอบ t-test	0.015	0.048	0.059	0.048	0.048	0.059	0.048	0.015

- หมายเหตุ : 1. วัดค่าความหนืดของตำรับด้วยเครื่อง BROOKFIELD viscometer ใช้เข็มเบอร์ CPE-52, ความเร็วรอบ 20 rpm ที่อุณหภูมิ 24-26 องศาเซลเซียส
 2. วัดค่า pH ด้วยเครื่อง pH meter ยี่ห้อ Sartorius รุ่น Docu-pH⁺ Meter
 3. ใช้สถิติ paired t-test วิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างค่า before และ after ภายใต้ความเชื่อมั่นร้อยละ 95 หรือที่ระดับนัยสำคัญ 0.05
 4. * p < 0.05 t=0 vs t=28

สรุปและอภิปรายผลการทดลอง

น้ำมันรำข้าวมีความหลากหลายในคุณสมบัติหลายด้าน ปัจจุบันได้นำน้ำมันรำข้าวเข้ามาใช้ในด้านการรักษาและบำบัดโรค เนื่องจากน้ำมันรำข้าวมีสารสำคัญที่เป็นองค์ประกอบสำคัญหลายองค์ประกอบ ซึ่งองค์ประกอบเหล่านั้นล้วนแต่มีฤทธิ์ในการป้องกันความเสื่อม และบำบัดโรคได้อย่างมากมาย สำหรับโรคมะเร็ง ได้มีการนำมาศึกษาและทดลองในระดับเซลล์ ซึ่งผลการทดลองที่ได้ต่างสนับสนุนถึงผลด้านการยับยั้งการแพร่กระจายของมะเร็ง งานวิจัยฉบับนี้ศึกษาฤทธิ์การยับยั้งการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งผิวหนัง A375 พบว่า ฤทธิ์การยับยั้งการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งผิวหนัง A375 จะเพิ่มขึ้นตามสัดส่วนของปริมาณสารแกมมาออโรซานอลที่เพิ่มขึ้น ค่าความเข้มข้นของปริมาณสารแกมมาออโรซานอลที่ยับยั้งการแพร่กระจายของเซลล์ได้สูงที่สุดที่ระดับปริมาณสารแกมมาออโรซานอลใน 18,000 ppm ปริมาณ 0.05 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในการทดสอบด้านความเป็นพิษของสารแกมมาออโรซานอล และด้านการทดสอบ ผลต่อการเคลื่อนย้ายที่ ผลต่อการบุกรุก ผลต่อการเกาะตัวในใหม่ และด้านการสร้างหลอดเลือดใหม่ของเซลล์มะเร็งผิวหนัง สารแกมมา ออโรซานอล ปริมาณ 18,000 พีพีเอ็ม ระดับความเข้มข้น 0.05 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง A375 ลดปริมาณของเซลล์มีชีวิตได้ 50% ได้ดีที่สุดในเมื่อเปรียบเทียบกับตัวควบคุม (negative cell) ตามสัดส่วนของปริมาณสารแกมมาออโรซานอล เช่นเดียวกับผลการศึกษาด้านฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ เนื่องจากค่า IC50 ต่ำจะให้ค่าการยับยั้งสารออกซิเดชันที่สูง แสดงว่าค่าการยับยั้งสารออกซิเดชันที่ดีที่สุด คือ RBO:GO 18,000 ppm ที่มีค่า = 4.0 mg/ml

จากการพัฒนาสูตรตำรับโลชั่นที่มีส่วนประกอบของน้ำมันรำข้าวมีการปรับระบบ Emulsifier ที่ใช้ในสูตรตำรับโลชั่น คือ Glycerol monostearate เกิดปฏิกิริยา

Saponification กับต่างอ่อน (Triethanolamine) ทำหน้าที่ลดแรงตึงผิวระหว่างผิวของน้ำและน้ำมัน จึงสามารถทำให้สูตรตำรับคงตัวได้ดี โดยปริมาณที่เหมาะสมและสามารถทำให้สารสำคัญที่อยู่ในวัตถุดิบน้ำมันคงตัว และจากสูตรพื้นฐานได้นำมาพัฒนาต่อโดยใส่สารสำคัญ คือ น้ำมันรำข้าวที่มีปริมาณสารแกมมาออโรซานอล 18,000 ppm 10% w/w, 15% w/w และ 20% w/w มีลักษณะภายนอก ด้านลักษณะเนื้อผลิตภัณฑ์ สี กลิ่น การไหลของผลิตภัณฑ์ ความเป็นกรด-ด่าง (pH) และความหนืดที่เหมาะสม และเมื่อทดสอบด้านความคงตัว ทั้ง 2 สภาวะที่อุณหภูมิห้อง และภายใต้สภาวะเร่งซึ่ง แต่ละสภาวะ มีทั้งโดนแสง และไม่โดนแสง พบว่า ทั้ง 4 สภาวะมีความคงตัวดี แต่สูตรตำรับ โลชั่นที่มีน้ำมันรำข้าวมีปริมาณสารแกมมาออโรซานอล 18,000 ppm ปริมาณ 20% w/w เมื่อเปรียบเทียบกับสูตรตำรับที่มีปริมาณน้ำมันรำข้าวมีปริมาณสารแกมมาออโรซานอล 18,000 ppm ปริมาณ 10% w/w และ 15% w/w ด้านลักษณะความหนืด พบว่าสูตรตำรับที่มีปริมาณ น้ำมันรำข้าวมีปริมาณสารแกมมาออโรซานอล 18,000 ppm 20% w/w มีความข้นหนืดที่ต่ำ อาจมีแนวโน้มที่จะเสียสภาพความคงตัวได้สูง เมื่อระยะเวลาผ่านไป อาจต้องมีการพัฒนาระบบโลชั่นให้มีความข้นหนืดเพิ่มขึ้น เพื่อเพิ่มอัตราการคงตัวของสูตรตำรับให้สูงขึ้น และจากการทดสอบสูตรตำรับโลชั่นที่มีน้ำมันรำข้าวปริมาณสารแกมมาออโรซานอล 18,000 ppm เป็นสารสำคัญมีฤทธิ์ด้านการยับยั้งการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งผิวหนังได้ และมีฤทธิ์การ

ต้านอนุมูลอิสระได้ดี อยู่ในสูตรตำรับที่ผ่านการทดสอบความคงตัวแล้ว จึงเป็นที่น่าให้ความสำคัญด้านการทดสอบประสิทธิภาพของสูตรตำรับโลชั่นที่มีน้ำมันรำข้าวมีปริมาณสารแกมมาออโรซานอล 18,000 ppm ในระดับอาสาสมัครเพื่อดูประสิทธิภาพด้านอื่น ๆ ต่อไป



References

- Angelis, A., & et al. (2011). One-step isolation of gamma-oryzanol from rice bran oil by non-aqueous hydrostatic countercurrent chromatography. *Journal of Separation Science*, 34(18), 2528-2537.
- Cheng, H.H., & et al. (2010). Gamma-oryzanol ameliorates insulin resistance and hyperlipidemia in rats with streptozotocin/nicotinamide-induced type 2 diabetes. *International Journal for Vitamin and Nutrition Research*, 80(1), 45-53.
- Eady S., & et al. (2011). Consumption of a plant sterol-based spread derived from rice bran oil is effective at reducing plasma lipid levels in mildly hypercholesterolaemic individuals. *British Journal of Nutrition*, 105(12), 1808-1818.
- Ha, T.Y., & et al. (2005). Bioactive components in rice bran oil improve lipid profiles in rats fed a high-cholesterol diet. *Nutrition Research*, 25(6), 597-606.
- Iqbal, J., Minhajuddin, M., & Beg, Z.H. (2004). Suppression of diethylnitrosamine and 2-acetylaminofluorene-induced hepatocarcinogenesis in rats by tocotrienol-rich fraction isolated from rice bran oil. *European Journal of Cancer Prevention*, 13(6), 515-20.
- Jennings, B.H., & Akoh, C.C. (2009). Characterization of a rice bran oil structured lipid. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(8), 3346-3350.
- Juliano, C., Cossu, M.I., Alamanni, M.C., & Piu, L. (2005). Antioxidant activity of gamma-oryzanol: mechanism of action and its effect on oxidation stability of pharmaceutical oils. *International Journal of Pharmaceutics*, 299(1-2), 146-154.
- Kim, S.P., Kang, M.Y., Nam, S.H., & Friedman, M. (2012). Dietary rice bran component gamma-oryzanol inhibits tumor growth in tumor-bearing mice. *Molecular Nutrition & Food Research*, 56(1), 935-944.
- Klongpityapong, P., Supabphol, R., & Supabphol, A. (2013). Antioxidant effect of gamma-oryzanol on human prostate cancer cells. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 14(9), 5421-5425.
- Servinova, E., Kagan, V., Han, D., & Packer, L. (1991). Free radical recycling and intramembrane mobility in the antioxidant properties of alpha-tocopherol and alpha-tocotrienol. *Free Radical Biology and Medicine*, 10(5), 263-275.
- Sohail, M., & et al. (2017). Rice bran nutraceuticals: A comprehensive review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 57(17), 3771-3780.
- Srikaeo, K., & Pradit, M. (2011). Simple techniques to increase the production yield and enhance the quality of organic rice bran oils. *Journal of Oleo Science*, 60(1), 1-5.

Szczesniak, K.A., Ostaszewski, P., Ciecierska, A., & Sadkowski, T. (2016). Investigation of nutraceutical phytochemical – gamma-oryzanol in experimental animal models. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition (Berl)*, 100(4), 601-617.

Utarwuthipong, T., & et al. (2009). Small dense low-density lipoprotein concentration and oxidative susceptibility changes after consumption of soybean oil, rice bran oil, palm oil and mixed rice bran/palm oil in hypercholesterolaemic women. *Journal of International Medical Research*, 37(1), 96-104.

