การศึกษาศักยภาพของผลิตผลพลอยได้จากการผลิตน้ำมันรำข้าว ในด้านการเป็นแหล่งของสารโภชนเภสัชและ การประยุกต์ใช้ในน้ำมันรำข้าว

ดลพร ว่องไวเวช

วิทยานิพนธ์เสนอบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยนเรศวร เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
หลักสูตรปริญญาปรัชญาดุษฎีบัณฑิต
สาขาวิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร
กรกฎาคม 2563
ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยนเรศวร

วิทยานิพนธ์ เรื่อง "การศึกษาศักยภาพของผลิตผลพลอยได้จากการผลิตน้ำมันรำข้าวในด้านการเป็นแหล่งของสารโภชนเภสัชและการประยุกต์ใช้ในน้ำมันรำข้าว"
ของนางสาวดลพร ว่องไวเวช
ได้รับการพิจารณาให้นับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาปรัชญาดุษฎีบัณฑิต สาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์
(ดร. พัทธนันท์ เกษมวีรศานต์)

.....ประธานที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. มณฑนา วีระวัฒนากร)

.....กรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์
(ดร. สุกีวรรณ เดชโยธิน)

.....กรรมการผู้ทรงคุณวุฒิ
(รองศาสตราจารย์ ดร. ธีรพร กงบังเกิด)

อนุมัติ

.....
(ศาสตราจารย์ ดร.ไพศาล มุณีสว่าง)
คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

ประกาศคุณูปการ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้ได้รับเงินทุนสนับสนุนจากโครงการการทำกิจกรรมส่งเสริมและสนับสนุนการวิจัย ประเภทบัณฑิตศึกษา ประจำปีงบประมาณ 2561 ระดับปริญญาเอก จากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.) และมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลล้านนาที่มอบโอกาสและทุนการศึกษาแก่ข้าพเจ้า วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงอย่างสมบูรณ์เพราะได้รับความร่วมมือช่วยเหลือและคำแนะนำที่มีประโยชน์ต่อการศึกษาค้นคว้าอย่างยิ่งจากผู้มีพระคุณหลายท่าน อาทิ

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.มณฑนา วีระวัฒนากร ประธานที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่ให้ความกรุณาแก่ศิษย์คนนี้ตั้งแต่วันแรกจนกระทั่งถึงวันสุดท้ายของการศึกษา รวมทั้ง ยังคอยผลักดันและมอบประสบการณ์ที่ดีทั้งในและต่างประเทศให้แก่ข้าพเจ้า

อาจารย์ ดร.สุกีวรรณ เดชโยธิน กรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่ได้กรุณาให้คำปรึกษาแนะนำให้ความรู้และข้อคิดที่เป็นประโยชน์ เพื่อการปรับปรุงทำให้การดำเนินการวิจัยสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี รวมทั้งให้กำลังใจในการเรียนตลอดมา

คณะกรรมการวิทยานิพนธ์ อันประกอบไปด้วย ดร.พัทธนันท์ เกษมวีรศานต์ ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ และรองศาสตราจารย์ ดร.ธีรพร กงบังเกิด กรรมการผู้ทรงคุณวุฒิที่ได้กรุณาให้คำแนะนำ ตลอดจนแก้ไขข้อบกพร่องของวิทยานิพนธ์ด้วยความเอาใจใส่ จนทำให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงได้อย่างสมบูรณ์และทรงคุณค่า

คุณวรรณภา สระพินครบุรี ผู้ที่เป็นทั้งเพื่อนและพี่ของข้าพเจ้า ผู้ที่ให้ความรู้ความช่วยเหลือและคำแนะนำแก่ข้าพเจ้ามาโดยตลอด ทำให้ข้าพเจ้ารู้สึกโชคดีที่ได้มาเรียนที่มหาวิทยาลัยแห่งนี้

คุณสมศักดิ์ ทะระถา ผู้ที่ถือว่าเป็นอาจารย์ของข้าพเจ้าอีกท่านหนึ่ง ผู้ที่ไม่เคยรังเกียจหรือรำคาญ เมื่อข้าพเจ้าถามคำถามที่ไม่ค่อยฉลาดนัก พร้อมทั้งยังมีความเต็มใจมอบความรู้แก่คนโง่อย่างข้าพเจ้า

คุณปรีชาพร เกตุแก้ว ผู้ที่คอยให้กำลังใจและให้คำปรึกษาแก่ข้าพเจ้าตลอดมา

คุณกัลยกร ลี้หิรัญสกุล เพื่อนผู้เป็นที่รักของข้าพเจ้าที่ได้จากโลกนี้ไปแล้ว

กัลยาณมิตรทุกท่าน สำหรับกำลังใจ คำชี้แนะและความช่วยเหลือต่างๆ ตลอดระยะเวลาในการทำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้

สุดท้ายนี้ ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ **คุณแม่อารี และคุณพ่อถาวร ว่องไวเวช** ผู้ซึ่งคอยดูแลให้กำลังใจ คำแนะนำและทุนทรัพย์ในการศึกษาเล่าเรียน รวมทั้งมอบทุนทรัพย์ในการหาประสบการณ์ทั้งในและต่างประเทศแก่ข้าพเจ้ามาโดยตลอด อนึ่ง ประโยชน์และคุณค่าอันใดที่ได้รับจากวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ขอมอบเป็นกตัญญุตาบูชาแด่บิดา มารดา ครู อาจารย์ ตลอดจน ผู้มีพระคุณที่มิอาจระบุนามได้หมดในที่นี้

ดลพร ว่องไวเวช

ชื่อเรื่อง	การศึกษาศักยภาพของผลิตผลพลอยได้จากการผลิตน้ำมันรำข้าวในด้านการเป็นแหล่งของสารโภชนเภสัชและการประยุกต์ใช้ในน้ำมันรำข้าว
ผู้วิจัย	ดลพร ว่องไวเวช
ประธานที่ปรึกษา	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.มณฑนา วีระวัฒนากร
กรรมการที่ปรึกษา	ดร.สุกีวรรณ เดชโยธิน
ประเภทสารนิพนธ์	วิทยานิพนธ์ ปร.ด. สาขาวิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร, มหาวิทยาลัยนเรศวร, 2562
คำสำคัญ	โพลิโคซานอล แกมมา-โอริซานอล วิตามินอี ไฟโตสเตอรอล น้ำมันรำข้าว ผลพลอยได้จากกระบวนการผลิตน้ำมันรำข้าว ไดเมทิลอีเทอร์ การสกัดสารด้วยไดเมทิลอีเทอร์ภายใต้สภาวะกึ่งวิกฤติ เทคนิคทรานเอสเทอริฟิเคชัน ความเป็นพิษ การลดระดับคอเลสเตอรอล

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้ศึกษาสารโภชนเภสัชที่เหลืออยู่ในผลพลอยได้จากกระบวนการผลิตน้ำมันรำข้าวแบบบีบเย็น (ได้แก่ รำสกัด กากกรอง) และแบบใช้ตัวทำละลาย (รำสกัด น้ำมันรำกรดไขมันอิสระไขรำข้าว ไขรำข้าวจุดหลอมเหลวสูง) โดยสารโภชนเภสัชที่พบมากที่สุด คือ แกมมา-โอริซานอล (γ-oryzanol) รองลงมา คือ ไฟโตสเตอรอล (Phytosterol) โพลิโคซานอล (Policosanol; PCs) วิตามินอี (Vitamin E) และแกมมา-อะมิโนบิวทิเรต (GABA) โดยการทดสอบความแม่นของการวิเคราะห์ปริมาณโพลิโคซานอล พบว่า ค่าร้อยละการคืนกลับของแต่ละความเข้มข้นผ่านตามเกณฑ์การยอมรับของ AOAC (2002) การศึกษาความคงตัวอนุพันธ์โพลิโคซานอล พบว่า ไม่มีความคงทนต่อการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ อุณหภูมิ 25°ซ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง แต่สารละลายมาตรฐานโพลิโคซานอลที่ความเข้มข้น 100 ppm สามารถเก็บรักษาในอุณหภูมิ 4°C ได้เป็นเวลา 1 สัปดาห์ และการตรวจสอบความแข็งหรือความคงทนของวิธีวิเคราะห์โพลิโคซานอล ทำได้โดยการเปลี่ยนแปลงพารามิเตอร์ในการทดสอบโพลิโคซานอลบางประการ พบว่า วิธีการวิเคราะห์ปริมาณโพลิโคซานอลด้วยวิธีดังกล่าวมีความคงทนปัจจัยที่อาจจะเกิดขึ้นได้

ศึกษาการสกัดโพลิโคซานอลโดยเทคนิคทรานเอสเทอริฟิเคชัน (Transesterification; TE) สามารถเพิ่มปริมาณ PCs ได้ถึง 80.08-91.37 เท่าเมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างตั้งต้น โดยตัวอย่างที่มีปริมาณ PCs สูงที่สุด คือ TE-RBW (30,787.89 mg/100g) รองลงมา คือ TE-FC (6,100.12 mg/100g) ต่อมานำตัวอย่าง RBW และ FC ที่ผ่านกระบวนการ TE มาเพิ่มปริมาณโพลิโคซานอลโดยการสกัดสาร

ด้วยไดเมเทิลอีเทอร์ภายใต้สภาวะกึ่งวิกฤติ พบว่า ตัวอย่าง RBW และ FC มีปริมาณ PCs เพิ่มขึ้นถึง 84 และ 85% จากนั้น นำสารโพลิโคซานอลที่สกัดได้ (PPC) มาศึกษาความเป็นพิษกึ่งเฉียบพลันในหนูไมส์เพศผู้และเพศเมียที่ขนาด 50 100 และ 200 มก./กก./วัน เป็นเวลา 28 วัน พบว่า สัตว์ทดลองรอดชีวิตทั้งหมด และไม่พบอาการความเป็นพิษในหนูไมส์เพศผู้และเพศเมีย ส่วนผลทางจุลพยาธิวิทยาแสดงให้เห็นว่าตับและไตไม่มีความแตกต่างจากกลุ่มควบคุม การศึกษาประสิทธิภาพของ PPC ในการลดระดับไขมันในเลือดในแฮมสเตอร์เพศผู้ พบว่า การให้สาร PCs ที่ระดับ 50 mg/kg/วัน สามารถลดระดับ T-CHO และ TG ในกระแสเลือดได้ รวมทั้งมีฤทธิ์ในการเพิ่มระดับ HDL ที่เป็นไขมันชนิดดีได้เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ได้รับอาหารไขมันสูง

การศึกษาคุณสมบัติทางกายภาพของน้ำมันรำข้าวเสริมโพลิโคซานอลที่ 300 และ 600 ppm พบว่า การเสริมโพลิโคซานอลในปริมาณที่มากขึ้นทำให้น้ำมันรำข้าวมีความสว่าง ความเป็นสีแดงและความเป็นสีเหลืองมากขึ้นรวมทั้งยังทำให้มีความเป็นกรดมากขึ้น รวมทั้งการเสริม PPC ลงในน้ำมันรำข้าวทำให้น้ำมันรำข้าวมีความหนืดเพิ่มมากขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างควบคุม ($P \leq 0.05$) น้ำมันรำข้าวเสริม PPC มีความคงทนต่อความร้อนที่อุณหภูมิ 150 และ 180°ซ เป็นเวลา 20 นาที และเมื่อเก็บที่อุณหภูมิ 27°ซ เป็นเวลา 6 เดือน พบว่า มีแนวโน้มของค่าความเป็นกรด (Acid value; A.V.) และค่าเพอร์ออกไซด์ (Peroxide value; P.V.) ที่สูงขึ้นเมื่อเก็บรักษาไว้เป็นระยะเวลานานขึ้น แต่ค่าที่ได้ยังอยู่ในเกณฑ์การยอมรับตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข (ฉบับที่ 205) พ.ศ. 2543 เรื่องน้ำมันและไขมัน ส่วนการศึกษาการเปลี่ยนแปลงปริมาณโพลิโคซานอลในน้ำมันรำข้าวเสริมโพลิโคซานอลสกัดระหว่างการเก็บรักษาน้ำมันรำข้าวเสริม PPC มีความคงตัวดีตลอดอายุการเก็บรักษาเป็นเวลา 6 เดือน

Title	INVESTIGATING THE ABILITY OF BY-PRODUCTS FROM RICE BRAN OIL PROCESS AS THE SOURCE OF FUNCTIONAL INGREDIENTS AND THEIR APPLICATION IN RICE BRAN OIL
Author	Donporn Wongwaiwech
Advisor	Assistant Professor Monthana Weerawatanakorn, Ph.D.
Co - Advisor	Sukeewan Detyothin, Ph.D.
Academic Paper	Thesis Ph.D. in Food Science and Technology, Naresuan University, 2019
Keywords	Policosanol, γ-oryzanol, Vitamin E, Phytosterol, Rice bran oil, Rice bran oil by-products, Dimethyl ether, Sub-critical fluid dimethyl ether extraction, Transesterification, Toxicity study, Cholesterol lowering test

ABSTRACT

This research aimed to investigate the remaining nutraceutical in the by-products from cold pressed rice bran oil extraction process (defatted rice bran, filter cake) and solvent extraction process (defatted rice bran, rice acid oil, rice bran wax and high melting point wax). The nutraceutical found the most was γ-oryzanol, phytosterol, policosanol (PCs), vitamin E and GABA, respectively. The accuracy of policosanol content analysis found that the %recovery of each concentration passed AOAC (2002) criteria. The study on stabilization of policosanol derivatives found that there was no resistance for 48 hours storing at 25°C but the policosanol standard solution (100 ppm) was able to be stored at 4°C temperature for 1 week. The robustness test of policosanol content analysis was done by changing some parameter in experimental conditions. The results showed that the analysis of the policosanol content was robust to these operational changes.

The study of policosanol extraction by using sub-critical fluid dimethyl ether extraction compared with transesterification (TE). The results showed that the amount of policosanol by TE were increased 80.08-91.37-fold higher than their origin content. The highest amount of PCs was found in TE-RBW (30,787.89 mg/100) follow by TE-FC

(6,100.12 mg/100g). Then TE-RBW and TE-FC were increasing policosanol content by sub-critical fluid dimethyl ether extraction (SUBDME). It was found that SUBDME can increased PCs purity up to 84-85%. The sub-acute toxicity study of purified policosanol (PPC) in male and female mice at 50, 100 and 200 mg/kg/day for 28 days. It was found that the experimental mice were all survived without the toxicity symptoms. The result from histopathology showed that there was no difference in liver and kidney tissues from the controlled group. The study of cholesterol lowering effect test of PPC in male Syrain hamster found that PCs at 50 mg/kg/day was able to reduce T-CHO and TG level. It was able to increase HDL level when compare with high fat diet group.

The study on physical and chemical property of rice bran oil enrich with policosanol at 300 and 600 ppm indicates that samples with more PPC are darker, redder and more blue. It also increased acidity and viscosity when compared to the controlled sample ($P \leq 0.05$). Rice bran oil enrich with policosanol had a good heat resistance at 150 and 180°C for 20 minutes and when stored at 27°C for 6 months, it tended to have higher acid value (A.V.) and peroxide value (P.V.) due to the storing duration. However, The A.V. and P.V. contents of rice bran oil and rice bran oil enrich with policosanol were lower than the Notification of Thailand Public Health Ministry (vol.205) B.E. 2543 on oil and fat.

สารบัญ

บทที่		หน้า
1	บทนำ	1
	ความเป็นมาของปัญหา	1
	จุดมุ่งหมายของการวิจัย	4
	ขอบเขตของการวิจัย	4
	สมมติฐานของการวิจัย	5
2	เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	6
	ข้าว (Oryza sativa Linn.)	6
	แกมมา-อะมิโนบิวทิเรต (γ-aminobutyrate)	11
	วิตามินอี (Vitamin E)	13
	แกมมา-โอริซานอล (γ-oryzanol)	15
	ไฟโตสเตอรอล (Phytosterols)	16
	โพลิโคซานอล (Policosanol)	18
	การสกัดด้วยของไหลภายใต้สภาวะกึ่งวิกฤต (Sub-critical fluid extraction, SUBFE)	21
	ไดเมทิลอีเทอร์ (Dimethyl Ether, DME)	24
	การตรวจสอบการใช้ได้ของวิธี (Method validation)	27
	การศึกษาความเป็นพิษ	31
	ไขมัน (Lipid)	38
3	วิธีดำเนินการวิจัย	46
	ประชากรและกลุ่มตัวอย่าง	46
	สารเคมีและอุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย	47
	การวิเคราะห์ข้อมูล	50
	วิธีการดำเนินการวิจัย	51

สารบัญ (ต่อ)

บทที่		หน้า
4	**ผลการวิจัย**	68
	การศึกษาที่ 1 การศึกษาปริมาณสารโภชนเภสัช (Nutraceuticals) ในผลิตผลพลอยได้จากโรงงานผลิตน้ำมันรำข้าวทั้งแบบบีบเย็นและแบบสกัดด้วยตัวทำละลาย ในด้านศักยภาพการเป็นแหล่งของสารโภชนเภสัช	68
	การศึกษาที่ 2 การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ตลอดจนทำการศึกษาการสกัดและเพิ่มปริมาณโพลิโคซานอลในผลิตผลพลอยได้จากผลิตโรงงานน้ำมันรำข้าวโดยการสกัดสารด้วยไดเมทิลอีเทอร์เหลวภายใต้สภาวะกึ่งวิกฤติ (SUBDME) แบ่งเป็น 2 ส่วน	78
	การศึกษาที่ 3 การทดสอบความเป็นพิษและประสิทธิภาพในการลดระดับคอเลสเตอรอลในสัตว์ทดลองของสารโพลิโคซานอลสกัดรวมทั้งพัฒนาน้ำมันรำข้าวเสริมโพลิโคซานอลเพื่อเป็นต้นแบบผลิตภัณฑ์อาหารฟังก์ชั่น	92
5	บทสรุป	123
	สรุปผลการวิจัย	123
	ข้อเสนอแนะ	126
บรรณานุกรม		127
ภาคผนวก		153
ประวัติผู้วิจัย		174

สารบัญตาราง

ตาราง หน้า

1 แสดงขั้นตอนในการทำบริสุทธิ์น้ำมันรำข้าวและผลิตผลพลอยได้..... 10
2 แสดงการจัดลำดับความเป็นพิษของสารเคมีในระยะความเป็นพิษแบบเฉียบพลัน..... 33
3 แสดงปัจจัยที่มีผลกระทบต่อความคงทนของวิธีวิเคราะห์ปริมาณสารโพลิโคซานอล..... 55
4 แสดงการวางแผนการตรวจสอบความคงทนของวิธีวิเคราะห์โพลิโคซานอล..... 55
5 แสดงปริมาณพลังงานและสารอาหารของอาหารสำหรับหนูไมส์และแฮมสเตอร์ (Normal Diet)..... 60
6 แสดงปริมาณพลังงานและสารอาหารของอาหารไขมันสูงสำหรับแฮมสเตอร์ (High fat diet; HFD)..... 63
7 แสดงปริมาณและส่วนผสมของอาหารปกติและอาหารไขมันสูงสำหรับแฮมสเตอร์..... 64
8 แสดงปริมาณการเสริมโพลิโคซานอลสกัดในน้ำมันรำข้าว..... 65
9 แสดงปริมาณความชื้นและสารแกมมา-อะมิโนบิวทิเรต (γ -aminobutyrate) ในผลิตผลพลอยได้จากโรงงานผลิตน้ำมันรำข้าวแบบบีบเย็นและแบบสกัดด้วยตัวทำละลาย..... 69
10 แสดงการวิเคราะห์ปริมาณแกมมา-โอริซานอล โทโคไตรอีนอล โทโคฟีรอล และไฟโตสเตอรอลในตัวอย่างจากโรงงานผลิตน้ำมันรำข้าวแบบบีบเย็นและแบบใช้ตัวทำละลาย..... 72
11 แสดงรูปแบบ Mass fragmentation ของไฟโตสเตอรอลที่ทำอนุพันธ์ Trimethylsilylation..... 74
12 แสดงปริมาณโพลิโคซานอลในผลิตผลพลอยได้จากกระบวนการผลิตน้ำมันรำข้าวทั้ง 2 วิธี..... 77
13 แสดงผลรวมของปริมาณสารโภชนเภสัชที่พบในผลิตผลพลอยได้จากโรงงานสกัดน้ำมันรำข้าวแบบบีบเย็นเปรียบเทียบกับแบบสกัดด้วยตัวทำละลาย..... 77
14 แสดงค่าความแม่นและความเที่ยงของสารสกัดโพลิโคซานอลด้วยเครื่อง GC-MS..... 80
15 แสดงสมการเส้นตรงของกราฟมาตรฐานและค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ของสารมาตรฐานโพลิโคซานอล..... 80

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตาราง หน้า

16 แสดงผลการศึกษาความคงทนของวิธีวิเคราะห์ปริมาณโพลิโคซานอล..... 83

17 แสดงปริมาณผลผลิตที่สกัดได้จากผลิตผลพลอยได้จากกระบวนการสกัดน้ำมันรำข้าวด้วยเทคนิคการสกัดสารด้วยไดเมทิลอีเทอร์เหลวภายใต้สภาวะกึ่งวิกฤติและปฏิกิริยา ทรานเอสเทอริฟิเคชัน..... 85

18 แสดงปริมาณสารโภชนเภสัชจากผลิตผลพลอยได้จากกระบวนการสกัดน้ำมันรำข้าวทั้ง 2 วิธี โดยเทคนิคการสกัดสารด้วยไดเมทิลอีเทอร์เหลวภายใต้สภาวะกึ่งวิกฤติและปฏิกิริยาทรานเอสเทอริฟิเคชัน..... 87

19 แสดงปริมาณผลผลิตที่สกัดโดยเทคนิคการสกัดสารด้วยไดเมทิลอีเทอร์เหลวภายใต้สภาวะกึ่งวิกฤติและการสกัดสารด้วยตัวทำละลายจากผลิตผลพลอยได้ RBW และ FC ที่ผ่านการปรับสภาพ (TE-RBW และ TE-FC)..... 89

20 แสดงปริมาณสารโภชนเภสัชในตัวอย่าง TE-FC และ TE-RBW จากการเพิ่มปริมาณโพลิโคซานอลโดยเทคนิคการสกัดสารด้วยไดเมทิลอีเทอร์เหลวภายใต้สภาวะกึ่งวิกฤติและการสกัดสารด้วยตัวทำละลาย..... 90

21 แสดงชนิดและปริมาณของสารเคมีตกค้างในสารโพลิโคซานอลสกัดจากไขรำข้าวที่ผ่านกระบวนการทรานเอสเทอริฟิเคชันและผ่านการเพิ่มปริมาณโพลิโคซานอลโดยเทคนิคการสกัดสารด้วยไดเมทิลอีเทอร์เหลวภายใต้สภาวะกึ่งวิกฤติ..... 92

22 แสดงอัตราส่วนของน้ำหนักตัวหนูไมส์กับน้ำหนักสัมพัทธ์ของตับ หัวใจ ไต ม้าม และอัณฑะของหนูไมส์เพศผู้ เมื่อได้รับสารโพลิโคซานอลสกัดเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม..... 94

23 แสดงผลของสารโพลิโคซานอลสกัดต่อค่าชีวเคมีในเลือดของหนูไมส์เพศผู้เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม..... 95

24 แสดงอัตราส่วนของน้ำหนักตัวหนูไมส์กับน้ำหนักสัมพัทธ์ของตับ หัวใจ ไต ม้าม และรังไข่ของหนูไมส์เพศเมียเมื่อได้รับสารโพลิโคซานอลสกัดเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม..... 99

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตาราง หน้า

25 แสดงผลของสารโพลิโคซานอลสกัดต่อค่าชีวเคมีในเลือดของหนูไมส์เพศเมีย เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม..... 100

26 แสดงน้ำหนักตัวแฮมสเตอร์เพศผู้เมื่อเริ่มทำการทดลองและเมื่อสิ้นสุดการทดลอง รวมทั้งน้ำหนักของตับ ไต ม้าม อัณฑะและเนื้อเยื่อไขมันของแฮมสเตอร์ เมื่อได้รับ สารโพลิโคซานอลสกัดเปรียบเทียบในแต่ละกลุ่ม..... 106

27 แสดงผลของสารโพลิโคซานอลสกัดต่อค่าชีวเคมีในเลือดของแฮมสเตอร์เพศผู้ เปรียบเทียบกับกลุ่มอื่น..... 109

28 แสดงคุณสมบัติทางเคมีและกายภาพของน้ำมันรำข้าวเสริมสารโพลิโคซานอลสกัด..... 114

29 แสดงปริมาณโพลิโคซานอลในน้ำมันรำข้าวเสริมสารโพลิโคซานอลสกัดที่อุณหภูมิ 150°ซ และ 180°ซ ที่เวลา 0 10 15 และ 20 นาที..... 115

30 แสดงค่าความเป็นกรด (A.V.) ของน้ำมันรำข้าวสูตรควบคุมและน้ำมันรำข้าว เสริมโพลิโคซานอลที่ระดับ 300 และ 600 ppm ในระหว่างการเก็บ..... 119

31 แสดงค่าเพอร์ออกไซด์ (P.V.) ของน้ำมันรำข้าวสูตรควบคุมและน้ำมันรำข้าว เสริมโพลิโคซานอลที่ระดับ 300 และ 600 ppm ในระหว่างการเก็บ..... 120

32 แสดงปริมาณโพลิโคซานอลในน้ำมันรำข้าวสูตรควบคุมและน้ำมันรำข้าว เสริมสารโพลิโคซานอลสกัดระหว่างการเก็บ..... 122

สารบัญภาพ

ภาพ		หน้า
1	แสดงองค์ประกอบของเมล็ดข้าว	7
2	แสดงแผนภูมิแสดงกระบวนการผลิตน้ำมันรำข้าว (a) น้ำมันรำข้าวจากกระบวนการสกัดด้วยตัวทำละลาย (b) น้ำมันรำข้าวจากกระบวนการบีบเย็น	9
3	แสดงการสังเคราะห์สารกาบาจากกรดอะมิโนกลูตาเมต	12
4	แสดงการสังเคราะห์สารกาบาจากน้ำตาลกลูโคสผ่านสารตัวกลางจากวัฏจักรเครปส์ โดยการทำงานของเอนไซม์ GABA α-oxoglutarate transaminase (GABA-T)	13
5	แสดงโครงสร้างทางเคมีของโทโคฟีรอลและโทโคไตรอีนอล	14
6	แสดงโครงสร้างทางเคมีของไซโคอะทีนิล เฟอรูเรต (Cycloartenyl ferulate) 24-เมทิลลีนไซโคอะทีนิล เฟอรูเรต (24-Methylenecycloartanyl ferulate) และแคมเพสเตอริว เฟอรูเรต (Campesteryl ferulate)	16
7	แสดงโครงสร้างทางเคมีของคอเลสเตอรอลและสเตอรอลจากพืช	17
8	แสดงโครงสร้างทางเคมีของโพลิโคซานอล	18
9	แสดงกระบวนการผลิตไดเมทิลอีเทอร์แบบทางอ้อม (Indirect DME Synthesis)	25
10	แสดงกระบวนการผลิตไดเมทิลอีเทอร์แบบทางตรง (Direct DME Synthesis)	26
11	แสดงความแม่นและความเที่ยง	29
12	แสดงเส้นทางการได้รับสารพิษเข้าสู่ร่างกายจนถึงการกำจัดออกจากร่างกาย	31
13	แสดงโครงสร้างทางเคมีของคอเลสเตอรอล	39
14	แสดงกระบวนการสังเคราะห์คอเลสเตอรอล	41
15	แสดงโครงสร้างทางเคมีของไตรกลีเซอไรด์	42
16	แสดงกระบวนการสังเคราะห์ไตรกลีเซอไรด์ในตับ	43
17	แสดงผลิตผลพลอยได้จากกระบวนการผลิตน้ำมันรำข้าวแบบบีบเย็นและใช้ตัวทำละลาย	46
18	แสดงสัตว์ทดลอง (a) หนูไมส์ สายพันธุ์ ICR (b) แฮมสเตอร์ สายพันธุ์ Syrian	47

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพ		หน้า
19	แสดงการศึกษาปริมาณสารโภชนเภสัชในผลิตผลพลอยได้จากโรงงานผลิตน้ำมันรำข้าวทั้งแบบบีบเย็นและแบบสกัดด้วยตัวทำละลายในด้านศักยภาพการเป็นแหล่งของสารโภชนเภสัช	52
20	แสดงเครื่องสกัดสารด้วยไดเมทิลอีเทอร์เหลวภายใต้สภาวะกึ่งวิกฤต	57
21	แสดงการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์โพลิโคซานอล และการศึกษาการสกัดและเพิ่มปริมาณโพลิโคซานอลในผลิตผลพลอยได้จากโรงงานน้ำมันรำข้าว	58
22	แสดงสถานที่และอาหารสำหรับหนูไมส์ (a) ห้องเลี้ยงสัตว์ทดลอง; (b) อาหารสำหรับหนูไมส์	60
23	แสดงการศึกษาความเป็นพิษกึ่งเฉียบพลันของโพลิโคซานอลสกัดในหนูไมส์	61
24	แสดงอาหารสำหรับแฮมสเตอร์ (a) Normal diet; (b) High fat diet	63
25	แสดงการศึกษาประสิทธิภาพการลดระดับคอเลสเตรอลในเลือดของโพลิโคซานอลสกัด ในแฮมสเตอร์เพศผู้	64
26	แสดงการพัฒนาน้ำมันรำข้าวเสริมโพลิโคซานอลเพื่อเป็นผลิตภัณฑ์อาหารฟังชั่น	67
27	แสดง LC-MS โครมาโตแกรมแกมมา-โอริซานอล (a) สารมาตรฐานแกมมา-โอริซานอล (b) สารสกัดแกมมา-โอริซานอลจากผลิตผลพลอยได้ RAO; พีคที่ (1) Cycloartenyl ferulate; (2) 24-methylene cycloartenyl ferulate; (3) campesteryl ferulate; (4) β-sitosteryl ferulate	71
28	แสดงโครงสร้างทางเคมีของแกมมา-โอริซานอลในรำข้าวและน้ำมันรำข้าว	73
29	แสดงโครมาโตแกรมจาก GC-MS ของไฟโตสเตอรอล (a) สารมาตรฐานไฟโตสเตอรอล (b) สารสกัดไฟโตสเตอรอลจากตัวอย่าง FC; พีคที่ (1) Cholestane (Internal standard); (2) Campesterol; (3) Stigmasterol; (4) β-sitosterol และ (5) β-sitostanol	74

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพ		หน้า
30	แสดงโครมาโตแกรมของโพลิโคซานอลจาก GC-MS (a) สารมาตรฐานโพลิโคซานอล (b) สารสกัดโพลิโคซานอลจากตัวอย่าง HPW; พีคที่ (1) Docosanol (C_{22}-OH); (2) Tetracosanol (C_{24}-OH); (3) Hexacosanol (C_{26}-OH); (4) Octacosanol (C_{28}-OH); (5) Triacontanol (C_{30}-OH).....	76
31	แสดงปริมาณสารโพลิโคซานอลหลังทำอนุพันธ์ 48 ชั่วโมง ก่อนการวิเคราะห์.....	82
32	แสดงการลดลงของปริมาณสารมาตรฐานโพลิโคซานอลในแต่ละสัปดาห์ (เก็บที่อุณหภูมิ 4°ซ).....	82
33	แสดงผลิตผลพลอยได้จากกระบวนการผลิตน้ำมันรำข้าวทั้ง 2 ระบบและสารสกัดที่ได้จากกระบวนการสกัดสารด้วยไดเมทิลอีเทอร์เหลวภายใต้สภาวะกึ่งวิกฤติ ปฏิกิริยาทรานเอสเทอริฟิเคชัน และการสกัดด้วยตัวทำละลาย.....	84
34	แสดงกลไกของปฏิกิริยาทรานเอสเทอริฟิเคชันในตัวอย่างไขรำข้าว.....	87
35	แสดงปริมาณและสัดส่วนของสารโภชนเภสัชในสารโพลิโคซานอลสกัดจากไขรำข้าว ที่ผ่านกระบวนการทรานเอสเทอริฟิเคชันและผ่านการเพิ่มปริมาณโพลิโคซานอลโดยเทคนิคการสกัดสารด้วยไดเมทิลอีเทอร์เหลวภายใต้สภาวะกึ่งวิกฤติ.....	91
36	แสดงลักษณะภายนอกของหนูไมส์เพศผู้ในวันที่ 28 กลุ่มควบคุมเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ได้สารโพลิโคซานอลสกัดที่ระดับ 50 100 และ 200 มก.....	93
37	แสดงปริมาณการบริโภคอาหารและน้ำเฉลี่ยต่อตัวหนูไมส์เพศผู้กลุ่มควบคุมเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ได้สารโพลิโคซานอลสกัดที่ 50 100 และ 200 มก/กก./วัน.....	93
38	แสดงการเปลี่ยนแปลงระดับจุลกายวิภาคของเนื้อเยื่อตับหนูไมส์เพศผู้ย้อมสีด้วยวิธี H&E (กำลังขยาย 200 เท่า).....	96
39	แสดงการเปลี่ยนแปลงระดับจุลกายวิภาคของเนื้อเยื่อไตหนูไมส์เพศผู้ย้อมสีด้วยวิธี H&E (กำลังขยาย 200 เท่า).....	97

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพ		หน้า
40	แสดงลักษณะภายนอกของหนูไมส์เพศเมียในวันที่ 28 กลุ่มควบคุมเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ได้สารโพลิโคซานอลสกัดระดับ 50 100 และ 200 มก.....	98
41	แสดงปริมาณการบริโภคอาหารและน้ำเฉลี่ยต่อตัวหนูไมส์เพศเมียกลุ่มควบคุมเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ได้สารโพลิโคซานอลสกัดระดับ 50 100 และ 200 มก./กก./วัน.....	99
42	แสดงการเปลี่ยนแปลงระดับจุลกายวิภาคของเนื้อเยื่อตับหนูไมส์เพศเมียย้อมสีด้วยวิธี H&E (กำลังขยาย 200 เท่า).....	101
43	แสดงการเปลี่ยนแปลงระดับจุลกายวิภาคของเนื้อเยื่อไตหนูไมส์เพศเมียย้อมสีด้วยวิธี H&E (กำลังขยาย 200 เท่า).....	102
44	แสดงผลของสารโพลิโคซานอลสกัดที่ระดับ 50 มก./กก./วัน และยาโลวาสแตติน 20 มก./กก./วัน ต่อลักษณะภายนอกของแฮมสเตอร์เพศผู้ในวันที่ 70.....	104
45	แสดงผลของสารโพลิโคซานอลสกัดและยาโลวาสแตตินต่อการบริโภคอาหารและน้ำ เฉลี่ยต่อตัวแฮมสเตอร์เพศผู้เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม.....	105
46	แสดงการเปลี่ยนแปลงระดับจุลกายวิภาคของเนื้อเยื่อตับแฮมสเตอร์เพศผู้ย้อมสีด้วยวิธี H&E (กำลังขยาย 200 เท่า).....	111
47	แสดงการเปลี่ยนแปลงระดับจุลกายวิภาคของเนื้อเยื่อไขมันแฮมสเตอร์เพศผู้ย้อมสีด้วยวิธี H&E (กำลังขยาย 200 เท่า) (a) White adipose tissues (b) Adipose tissue histological stained with hematoxylin & eosin (H&E).....	112
48	แสดงน้ำมันรำข้าวเสริมสารโพลิโคซานอลสกัดและน้ำมันรำข้าวสูตรควบคุมในวันที่ 0.....	114
49	แสดงความคงตัวต่อความร้อนของน้ำมันรำข้าวเสริมสารโพลิโคซานอลสกัดที่อุณหภูมิ 150°ซ และ 180°ซ ที่เวลา 0 10 15 และ 20 นาที.....	116

อักษรย่อ

กก.	=	กิโลกรัม
มก.	=	มิลลิกรัม
มม.	=	มิลลิเมตร
มล.	=	มิลลิลิตร
γ	=	Gamma
°ซ	=	องศาเซลเซียส
µL	=	ไมโครลิตร
µm	=	ไมโครเมตร
A.V.	=	ค่าความเป็นกรด; Acid value
ALT	=	Alanine aminotransferase
AST	=	Aspartate aminotransferase
BUN	=	Blood Urea Nitrogen
C_{22}	=	Docosanol
C_{24}	=	Tetracosanol
C_{26}	=	Hexacosanol
C_{28}	=	Octacosanol
C_{30}	=	Triacontanol
DFRB-C	=	รำข้าวสกัดน้ำมันจากโรงงานผลิตน้ำมันรำข้าวแบบบีบเย็น
DFRB-S	=	รำข้าวสกัดน้ำมันจากโรงงานผลิตน้ำมันรำข้าวด้วยตัวทำละลาย
DME	=	Liquidized dimethyl Ether
FC	=	กากจากการกรองน้ำมันรำข้าวบีบเย็น
GABA	=	แกมมา-อะมิโนบิวทิแรต
GC-MS	=	Gas chromatography–mass spectrometry
GTC	=	กลีเซอรอล; Glyceryl Tricaprylate-Caprate
HDL	=	ลิโพโปรตีนความหนาแน่นสูง; High-density lipoprotein cholesterol
HFD	=	อาหารไขมันสูง; High fat diet

อักษรย่อ (ต่อ)

HMW	=	ไขรำข้าวจุดหลอมเหลวสูง
HPLC	=	High Performance Liquid Chromatography
Hz	=	Hertz
i.d.	=	เส้นผ่านศูนย์กลางภายใน; Inside diameter
KOH	=	โพแทสเซียมไฮดรอกไซด์
LC-MS	=	Liquid chromatography–mass spectrometry
LDL	=	ลิโพโปรตีนความหนาแน่นต่ำ; Low-density lipoprotein cholesterol
LOD	=	ขีดจำกัดการตรวจพบ; Limit of Detection
LOQ	=	ขีดจำกัดการวัดเชิงปริมาณ; Limit of Quantitation
LV	=	ยาโลวาสแตติน; Lovastatin
M	=	โมลล่า; Molar
mEq	=	ค่ามิลลิอิควิวาเลนต์; Milliequivalent
P.V.	=	ค่าเพอร์ออกไซด์; Peroxide Value
PCs	=	Policosanol; สารโพลิซานอล
pH	=	Power of hydrogen ion concentration
PPC	=	สารโพลิโคซานอลสกัด; Purified policosanol
ppm	=	หนึ่งในล้านส่วน; Parts-per-million
QC	=	Quality Control
R	=	ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์
RAO	=	น้ำมันรำกรดไขมันอิสระ
RBO	=	น้ำมันรำข้าว
RBW	=	ไขรำข้าว
RP-HPLC	=	Reverse-phase High-performance liquid chromatography
RSD	=	ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์; Relative standard deviations
sd	=	ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน; Standard Deviation
SE	=	การสกัดแบบใช้ตัวทำละลาย; Solvent extraction

อักษรย่อ (ต่อ)

SFDME	=	การสกัดสารด้วยไดเมเทิลอีเทอร์ภายใต้สภาวะกึ่งวิกฤติ; Sub-critical liquefied dimethyl ether
SFE	=	การสกัดสารด้วยของไหลภายใต้สภาวะกึ่งวิกฤติ; Sub-critical fluid extraction
T3s	=	โทโคไตรอีนอล; Tocotrienol
T-CHO	=	คอเลสเตอรอลทั้งหมด; Total cholesterol
TE	=	ทรานเอสเทอริฟิเคชั่น; Transesterification
TG	=	ไตรกลีเซอไรด์; Triglyceride
TMS	=	Trimethyl silyl ether
Ts	=	โทโคฟีรอล; Tocopherol
UV/VIS	=	Ultraviolet and Visible
VAT	=	Visceral adipose tissue
W	=	Watt

บทที่ 1

บทนำ

ความเป็นมาของปัญหา

ข้าว (Oryza sativa Linn.) เป็นหนึ่งในพืชที่เป็นอาหารหลักของโลกและจัดเป็นพืชเศรษฐกิจของไทย โดยเฉลี่ยผลผลิตข้าวเปลือกต่อปีคือประมาณ 27.42 ล้านตันต่อปี เมื่อผ่านกระบวนการสีข้าวจะได้เป็นข้าวสารประมาณ 19 ล้านตัน ซึ่งมีผลิตผลพลอยได้ที่เป็นรำข้าวประมาณปีละ 2.88 ล้านตัน (Thai rice exporters Association, 2016) เดิมรำข้าวใช้เป็นส่วนผสมของอาหารสัตว์ต่อมาได้มีการนำรำข้าวที่ได้ไปสกัดเป็นน้ำมันเพื่อใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร ผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร และผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง ปี 2019 ประเทศไทยสามารถผลิตน้ำมันรำข้าวดิบได้ถึง 130,691 ตัน (The Office of Industrial Economics, 2019) น้ำมันรำข้าวเป็นน้ำมันที่มีคุณค่าทางโภชนาการสูงเนื่องจากมีองค์ประกอบของกรดไขมันในสัดส่วนที่เหมาะสมตามที่องค์การอนามัยโลก (World Health Organization; WHO) แนะนำให้บริโภคและยังประกอบด้วยสารโภชนเภสัชหลายชนิด เช่น แกมมา-โอริซานอล (γ-Oryzanol) โทโคฟีรอล (Tocopherols) โทโคไตรอีนอล (Tocotrienols) ไฟโตสเตอรอล (Phytosterols) และโพลิโคซานอล (Policosanol) ซึ่งสารดังกล่าวจะถูกกำจัดออกไประหว่างกระบวนการทำให้บริสุทธิ์ (Refining Process) เพื่อให้ได้น้ำมันรำข้าวที่มีคุณภาพด้านสมบัติทางเคมีกายภาพเหมาะสำหรับการบริโภคตามข้อกำหนดของสำนักงานมาตรฐานอุตสาหกรรม (มอก.)

โดยทั่วไปการผลิตน้ำมันรำข้าวที่นิยมใช้ในระดับอุตสาหกรรม มี 2 วิธี คือ การสกัดด้วยตัวทำละลายและการสกัดด้วยวิธีบีบเย็น การสกัดด้วยตัวทำละลายจะให้ผลผลิต (%yield) สูงถึง 98% ของปริมาณน้ำมันที่มีในรำข้าว ตัวทำละลาย (Solvent) ที่นิยมใช้ คือ เฮกเซน โดยน้ำมันจะผ่านกระบวนการทำให้บริสุทธิ์หลายขั้นตอนซึ่งแต่ละขั้นตอนจะได้ผลิตผลพลอยได้ (By-products) เป็นจำนวนมาก เช่น รำข้าวที่ถูกสกัดไขมันออกแล้ว (Defatted rice bran) ไขรำข้าว (Rice wax) น้ำมันรำกรดไขมันอิสระ (Rice acid oil) โดยกระบวนการผลิตน้ำมันรำข้าวด้วยวิธีนี้จะได้น้ำมันรำข้าวเพื่อการบริโภค (Cooking oil) การสกัดน้ำมันรำข้าวด้วยวิธีบีบเย็นมีกระบวนการผลิตไม่ซับซ้อน โดยอาศัยหลักการการบีบอัดด้วยแรงดันและไม่ใช้ความร้อนจึงสามารถรักษาปริมาณสารอาหารและสารโภชนเภสัชสำคัญที่มีอยู่ในรำข้าวและจมูกข้าวได้อย่างครบถ้วน น้ำมันที่ได้จึงเหมาะสำหรับใช้เพื่อเป็นผลิตภัณฑ์เสริมอาหารซึ่งบรรจุในรูปแคปซูล กระบวนการผลิตน้ำมันรำข้าวแบบบีบเย็น

ทำให้เกิดผลิตผลพลอยได้ที่สำคัญ คือ รำข้าวที่ถูกสกัดไขมันออกแล้ว (Defatted rice bran) และกากจากกระบวนการกรอง (Filter cake) โดยกระบวนการผลิตน้ำมันรำข้าวทั้ง 2 วิธีดังกล่าวข้างต้นก่อให้เกิดผลิตผลพลอยได้จากกระบวนการผลิตมากถึง 80-88% ซึ่งผลิตผลพลอยได้ดังกล่าวน่าจะประกอบด้วย สารอาหารที่มีคุณค่าทางโภชนาการ เช่น วิตามินอี (Vitamin E) และสารโภชนเภสัช (Nutraceuticals) ที่มีฤทธิ์ในการป้องการเกิดโรคไม่ติดต่อเรื้อรัง เช่น กาบา (GABA) แกมมา-โอริซานอล (γ-oryzanol) ไฟโตสเตรอล (Phytosterol) และโพลิโคซานอล (Policosanol) และสามารถนำมาพัฒนาให้เป็นแหล่งสารโภชนเภสัชได้เพื่อใช้ในอุตสาหกรรมต่างๆ

โพลิโคซานอล (Policosanol) คือ กลุ่มของแอลกอฮอล์สายตรงยาว (Long chain fatty alcohol) ที่มีความยาวสายคาร์บอนตั้งแต่ 20-36 อะตอม (C_{20}-C_{36}) พบได้ในไขจากสัตว์และพืชบางชนิด เช่น ไขจากผึ้ง รำข้าว อ้อย ข้าวโอ๊ตและข้าวสาลี มีคุณสมบัติลดอัตราเสี่ยงในการเกิดโรคหัวใจ ลดการรวมตัวของเกล็ดเลือด (Platelet aggregation) ลดอันตรายของเยื่อบุหลอดเลือด (Endothelial damage) และลดการสร้างโฟมเซลล์ (Foam cell formation) (Affuso et al., 2012; Harrabi et al., 2009; Ohta et al., 2008; Ravelo et al., 2011) จากประโยชน์ดังกล่าวจึงมีการนำโพลิโคซานอลไปใช้เป็นยาและองค์ประกอบในผลิตภัณฑ์เสริมอาหารหลายชนิด โดยโพลิโคซานอลส่วนใหญ่จะสกัดมาจากไขอ้อย จากการค้นคว้าพบว่าในชานอ้อยมีปริมาณโพลิโคซานอล 270 มก./กก. ในไขผึ้งมีปริมาณโพลิโคซานอลสูงกว่าในชานอ้อยถึง 45 เท่า (Irmak et al., 2006) ปัจจุบันยังไม่มีวิธีมาตรฐานสำหรับวิเคราะห์โพลิโคซานอลแต่มีรายงานการพัฒนาวิธีการวิเคราะห์เพื่อหาปริมาณโพลิโคซานอลด้วยเทคนิคต่างๆ เช่น GC-FID GC-TOFMS GC-MS/MS HPLC HT-GC-MS (Asikin et al., 2012; Attard et al., 2015; Choi, S.J. et al., 2016; Keum et al., 2005; Kim, J.K. et al., 2012; Seo et al., 2013) และวิธีที่ได้รับความนิยมมากที่สุด คือ GC-MS หรือ เทคนิคแก๊สโครมาโตกราฟี-แมสสเปกโตรมิเตอร์ (Gas Chromatography - Mass Spectrometer) ซึ่งเป็นเทคนิคที่มีความไวและความจำเพาะเจาะจงในการวิเคราะห์สูง แต่เนื่องจากโพลิโคซานอลมีความสามารถในการระเหยกลายเป็นไอต่ำ (Low volatility) จึงจำเป็นต้องทำให้เป็นอนุพันธ์ (Derivative) ที่สามารถระเหยและทำให้ทนความร้อนสูง นอกจากนี้การทำให้เกิดอนุพันธ์ยังเป็นการเพิ่มประสิทธิภาพในการวิเคราะห์ปริมาณสาร อย่างไรก็ตามหากต้องการให้ได้ผลการวิเคราะห์ที่แม่นยำแล้ว การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ (Method validation) จึงเป็นสิ่งจำเป็นที่ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการตรวจวัดให้เกิดความแม่นยำและเที่ยงตรงมากขึ้น

ปัจจุบันประเทศไทยยังนำเข้าสารโภชนเภสัชจากต่างประเทศเพื่อใช้เป็นส่วนประกอบ (Functional ingredients) ในการผลิตอาหารฟังก์ชัน (Functional food) ผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร (Dietary supplement) ตลอดจนเครื่องสำอาง ทั้งที่ประเทศไทยเป็นประเทศเกษตรกรรมซึ่งเป็นแหล่งผลิตวัตถุดิบที่อุดมไปด้วยสารโภชนเภสัช ไขรำข้าวประกอบด้วยปริมาณโพลิโคซานอลมากถึง 10.82 กรัม/100 กรัม และมีการศึกษาพัฒนากระบวนการสกัดให้มีความบริสุทธิ์และมีประสิทธิภาพมากขึ้น เพื่อให้เพียงพอต่อความต้องการในปัจจุบัน สำหรับการทำบริสุทธิ์สารโพลิโคซานอลเพื่อให้ได้โพลิโคซานอลสกัด (Purified policosanol; PPC) นั้น สามารถทำได้หลายวิธี เช่น การสกัดด้วยตัวทำละลาย การใช้ตัวทำละลายร่วมกับการกลั่นแยกสารในระดับโมเลกุล(Molecular distillation) และการใช้ตัวทำละลายร่วมกับการตกผลึก แต่วิธีดังกล่าวต้องใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ปริมาณมาก ซึ่งอาจตกค้างในผลิตภัณฑ์และก่อให้เกิดความเป็นพิษต่อร่างกาย เป็นสารก่อมะเร็งและไม่เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม จึงได้มีการพัฒนาค้นคว้าหาวิธีอื่นเพื่อลดการใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ รวมทั้งนำเทคโนโลยีอื่นมาประยุกต์ใช้ในการสกัดสาร การสกัดสารด้วยของไหลกึ่งวิกฤติ (Sub-critical fluid extraction; SUBFE) เป็นเทคนิคที่กำลังได้รับความสนใจเนื่องจากเป็นการสกัดด้วยความดันและอุณหภูมิต่ำ ใช้พลังงานน้อยเป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม เทคนิค SUBFE ยังนิยมใช้ในการสกัดสารโภชนเภสัช เช่น แคโรทีนอยด์ (Carotenoids) แกมมา-โอริซานอล (γ-oryzanol) ไฟโตสเตรอล (Phytosterol) จากพืชหลากหลายชนิด เช่น เมล็ดแตงโมคาลาฮารี (Kalahari melon seeds) (Kar Lin, Nyam et al., 2011) เมล็ดกระเจี๊ยบ (Roselle seeds) (Nyam, K.L. et al., 2010) รำข้าว (Rice bran) (Hung et al., 2019) เมล็ดบักธอร์น (Buckthorn seeds) (Sajfrtova et al., 2010) ถั่วเหลือง(Soybeans) (Snyder et al., 1999) และเมล็ดเมล่อน (Melon seeds) (Ekinci, & Guru, 2019) ตัวทำละลายที่ใช้ในสภาวะกึ่งวิกฤติมีหลายชนิดซึ่งไดเมทิลอีเทอร์เหลว (Liquidized dimethyl ether; DME) เป็นหนึ่งในตัวทำละลายที่กำลังได้รับความสนใจนำมาใช้สกัดสารสำคัญจากวัตถุดิบธรรมชาติ เนื่องจากมีจุดเดือดต่ำ คือ -24.8°ซ และมีความดันไออิ่มตัว (Saturated vapor pressure) ที่ 20°ซ นอกจากนี้ DME มีสมบัติละลายน้ำในระดับต่ำ (7-8 wt% ในอุณหภูมิปกติ) ทำให้แยกออกจากน้ำได้ง่าย จึงช่วยลดการใช้พลังงานในการทำแห้ง (Dewatering) และการระเหยตัวทำละลาย รวมทั้งมีความเป็นพิษต่ำและไม่ก่อให้เกิดสารเปอร์ออกไซด์ มีงานวิจัยที่นำ DME มาใช้ในการสกัดสารโภชนเภสัชกลิ่นรส จากสมุนไพรและเครื่องเทศ เช่น ขิง พริกไทยดำ และพริก ซึ่งผลการสกัดที่ได้มีประสิทธิภาพใกล้เคียงกับการใช้คาร์บอนไดออกไซด์ภายใต้สภาวะวิกฤตยิ่งยวด (Supercritical carbon dioxide) (Furukawa et al., 2016)

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อเปรียบเทียบปริมาณสารโภชนเภสัชในผลิตผลพลอยได้จากกระบวนการผลิตน้ำมันรำข้าวทั้ง 2 วิธี คือ วิธีการสกัดด้วยตัวทำละลายและการสกัดด้วยวิธีบีบเย็น รวมทั้งตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์เพื่อยืนยันว่ามีความถูกต้องมีประสิทธิภาพและความแม่นยำ ตลอดจนศึกษาวิธีการสกัดและการเพิ่มปริมาณโพลิโคซานอลโดยการสกัดด้วยไดเมทิลอีเทอร์เหลวภายใต้สภาวะกึ่งวิกฤติ รวมทั้งศึกษาความเป็นพิษและประสิทธิภาพในการลดระดับคอเลสเตอรอลในเลือดของโพลิโคซานอลสกัดและนำมาประยุกต์ใช้ในน้ำมันรำข้าว

จุดมุ่งหมายของการวิจัย

1. ศึกษาปริมาณสารโภชนเภสัชในผลิตผลพลอยได้จากโรงงานผลิตน้ำมันรำข้าวทั้งแบบบีบเย็นและแบบสกัดด้วยตัวทำละลายในด้านศักยภาพการเป็นแหล่งของสารโภชนเภสัช
2. ตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์โพลิโคซานอล (Policosanol method validation) ตลอดจนทำการศึกษาการสกัดและการเพิ่มปริมาณโพลิโคซานอลในผลิตผลพลอยได้จากโรงงานน้ำมันรำข้าวด้วยไดเมทิลอีเทอร์เหลวภายใต้สภาวะกึ่งวิกฤต
3. ศึกษาความเป็นพิษและประสิทธิภาพในการลดระดับคอเลสเตอรอลในสัตว์ทดลองของโพลิโคซานอลที่สกัดได้ (Purified policosanol; PPC) รวมทั้งนำไปใช้ในน้ำมันรำข้าว

ขอบเขตของการวิจัย

การศึกษาวิจัยนี้เพื่อเปรียบเทียบปริมาณสารโภชนเภสัชในผลิตผลพลอยได้จากกระบวนการผลิตน้ำมันรำข้าวแบบบีบเย็นและแบบสกัดด้วยตัวทำละลาย รวมทั้งศึกษาวิธีการสกัดเพิ่มปริมาณโพลิโคซานอลโดยการใช้เทคนิคการสกัดสารด้วยไดเมทิลอีเทอร์เหลวภายใต้สภาวะกึ่งวิกฤติ (Sub-critical fluid dimethyl ether extraction; SUBDME) โดยแบ่งการทดลองออกเป็น 3 การทดลอง ดังนี้

การทดลองที่ 1 วิเคราะห์ปริมาณสารโภชนเภสัช ได้แก่ กาบา (GABA) แกมมา-โอริซานอล (γ-oryzanol) ไฟโตสเตอรอล (Phytosterol) วิตามินอี (Vitamin E) และโพลิโคซานอล (Policosanol) ในผลิตผลพลอยได้จากโรงงานผลิตน้ำมันรำข้าวแบบบีบเย็นและแบบสกัดด้วยตัวทำละลาย

การทดลองที่ 2 ตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ ได้แก่ ความแม่น ความเที่ยงตรง ขีดจำกัดในการตรวจพบ ขีดจำกัดในการวัดเชิงปริมาณ ความแข็งของวิธีวิเคราะห์ ความคงตัวของสารละลายมาตรฐานและสารสกัดโพลิโคซานอล ตลอดจนทำการศึกษาการสกัดและเพิ่มปริมาณโพลิโคซานอลจากผลิตผลพลอยได้จากโรงงานน้ำมันรำข้าวทั้ง 2 วิธี ด้วยเทคนิคการสกัดด้วยไดเมทิลอีเทอร์เหลวภายใต้สภาวะกึ่งวิกฤติ (SUBDME)

การทดลองที่ 3 ทดสอบความเป็นพิษในหนูไมส์เพศผู้และเพศเมีย รวมทั้งศึกษาประสิทธิภาพในการลดระดับคอเลสเตอรอลของโพลิโคซานอลสกัดในแฮมสเตอร์เพศผู้ รวมทั้งการประยุกต์ใช้สารโพลิโคซานอลสกัดในน้ำมันรำข้าวโดยศึกษาผลการเติมสารโพลิโคซานอลต่อคุณภาพน้ำมันรำข้าว

สมมติฐานของการวิจัย

รำข้าวเป็นแหล่งของสารอาหารและสารโภชนเภสัชซึ่งมีคุณสมบัติออกฤทธิ์ทางชีวภาพ (Bioactive) ในด้านการส่งเสริมสุขภาพ ได้แก่ วิตามินอี (Vitamin E) ไฟโตสเตอรอล (Phytosterols) แกมมา-โอริซานอล (γ-oryzanol) แกมมา-อะมิโนบิวทิเรท (γ-aminobutyrate; GABA) และโพลิโคซานอล (Policosanol) โดยสารดังกล่าวจะถูกกำจัดออกไปในระหว่างกระบวนการทำบริสุทธิ์เพื่อให้ได้น้ำมันที่มีความเหมาะสมสำหรับการบริโภค โรงงานผลิตน้ำมันรำข้าวจึงมีผลิตผลพลอยได้เป็นจำนวนมาก ซึ่งผลิตผลพลอยได้จากกระบวนการผลิตน้ำมันรำข้าวน่าจะยังมีสารอาหารที่มีคุณค่าทางโภชนาการและสารโภชนเภสัชที่มีฤทธิ์ส่งเสริมสุขภาพเหลืออยู่ และมีศักยภาพในการพัฒนาให้เป็นแหล่งสารโภชนเภสัชด้วยเทคนิคการสกัดด้วยไดเมทิลอีเทอร์เหลวภายใต้สภาวะกึ่งวิกฤติ (SUBDME) เพื่อนำมาประยุกต์ใช้ในน้ำมันรำข้าว ซึ่งน่าจะเป็นประโยชน์ต่อทั้งอุตสาหกรรมน้ำมันรำข้าว และอุตสาหกรรมอาหารเพื่อสุขภาพรวมทั้งยังเป็นการเพิ่มมูลค่าให้กับผลิตผลพลอยได้จากอุตสาหกรรมผลิตน้ำมันรำข้าว

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

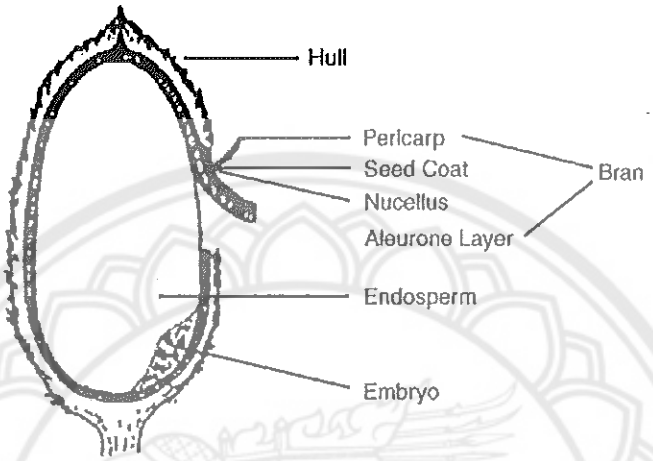
ข้าว (Oryza sativa Linn.)

ข้าวเป็นพืชในสกุล (Genus) Oryza ซึ่งอยู่ในวงศ์ (Family) เดียวกับหญ้า โดยพืชสกุลข้าวมีชนิดปลูก (Cultivated species) 2 ชนิด และชนิดป่า (Wild species) 21 ชนิด โดยทั่วโลกมีข้าวอยู่ประมาณ 120,000 สายพันธุ์ โดยข้าวชนิดที่คนไทยบริโภค คือ Oryza sativa L. ข้าวในแถบเอเชียมีการแบ่งย่อยออกเป็น 1) ข้าวจาปอนิกา (Japonica) หรือข้าวเมล็ดสั้น (Oryza sativa var. japonica) เป็นข้าวที่นิยมปลูกในประเทศแถบเอเชียตะวันออก เช่น จีน ญี่ปุ่น และเกาหลี 2) ข้าวอินดิกา (Indica) หรือข้าวเมล็ดยาว (Oryza sativa var. indica) นิยมปลูกในแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้และอินโดนีเซีย และ 3) ข้าวจาวานิกา (Javanica) หรือข้าวชวา (Oryza sativa var. javanica) นิยมปลูกในประเทศอินโดนีเซีย (Rodkum, 2011) ผลผลิตข้าวของไทยมีปริมาณเฉลี่ยปีละ 31-33 ล้านตัน ข้าวเปลือกนำไปสีเป็นข้าวสารได้ปริมาณ 20-22 ล้านตัน และใช้ในการบริโภคภายในประเทศเป็นสัดส่วนปริมาณประมาณ 53% และส่งออกประมาณ 47% โดยในปี 2562/2563 ประเทศไทยเป็นผู้ส่งออกข้าวอันดับ 2 ของโลก (Krungsri Research, 2562) ซึ่งสร้างรายได้ประมาณ 4,408 ถึง 5,619 ล้านเหรียญสหรัฐอเมริกาต่อปี ประเทศหลักที่นำเข้าข้าวจากประเทศไทย คือ เบนิน ฟิลิปปินส์ จีน อินโดนีเซีย แอฟริกาใต้ สหรัฐอเมริกา และมาเลเซีย (สมาคมผู้ส่งออกข้าวไทย, 2562)

1. องค์ประกอบของข้าว

ข้าวประกอบไปด้วยหลายส่วน โดยส่วนที่อยู่นอกสุด คือ เปลือกหุ้มเมล็ดหรือแกลบ (Hull หรือ Husk) ซึ่งจะหุ้มอยู่บริเวณเปลือกนอกของเมล็ดข้าว ถัดมา คือ ส่วนเมล็ดข้าว ซึ่งประกอบด้วยจมูกข้าวหรือคัพภะ (Embryo หรือ Germ) รำข้าวและเมล็ดข้าว (Endosperm) ดังแสดงในภาพ 1 รำข้าว หมายถึง ส่วนเยื่อหุ้มผล (Pericarp) เยื่อหุ้มเมล็ด (Seed coat) นิวเซลลัส (Nucellus) ชั้นแอลิวโรน (Aleurone) และจมูกข้าวหรือคัพภะของเมล็ดข้าว (Grem, Embryo) (Orthoefer, 2005) รำข้าว ประกอบด้วย โปรตีน 11-15% คาร์โบไฮเดรต 34-62% เส้นใย 7-11% เถ้า 7-11% และไขมัน 15-22% รำข้าวได้จากการสีข้าว ซึ่งจะได้ประมาณ 8% ของน้ำหนักข้าวเปลือกทั้งหมด (Prasad et al., 2011) องค์ประกอบของรำข้าวขึ้นอยู่กับแหล่งที่มาของข้าว เทคนิคการสีข้าวและวิธีการทำให้เกิดความเสถียร (Stabilization) ของข้าว รำข้าวเป็นแหล่งของสารต้านอนุมูลอิสระธรรมชาติ (Natural Antioxidant) ที่สำคัญ ได้แก่ โทโคฟีรอล (Tocopherol) โทโคไตรอีนอล (Tocotrienol) และแกมมา-

โอริซานอล (γ-oryzanol) ที่มีรายงานว่า รำข้าวสามารถลดระดับคอเลสเตอรอลในเลือดได้ โดยเฉพาะในส่วนของลิโพโปรตีนความหนาแน่นต่ำหรือไขมันเลว (Low-density lipoprotein; LDL) ซึ่งลดความเสี่ยงของการเกิดโรคหัวใจได้ (Prasad et al., 2011)



ภาพ 1 แสดงองค์ประกอบของเมล็ดข้าว

ที่มา: Orthoefer, 2005

ข้าว (Oryza sativa Linn.) เป็นผลผลิตทางการเกษตรที่สำคัญของเอเชียและของประเทศไทย ข้าวจัดเป็นอาหารที่สำคัญของคนในเอเชีย ผลิตภัณฑ์หลักจากการสีข้าว คือ เมล็ดข้าว (Endosperm) ซึ่งมีประมาณ 70% และผลพลอยได้จากการสีข้าวประกอบด้วยแกลบข้าว (Rice Husk) 20% รำข้าว (Rice Bran) 8% และจมูกข้าว (Rice Germ) 2% รำข้าวเป็นแหล่งที่ดีของน้ำมัน โดยในรำข้าวมีปริมาณน้ำมันประมาณ 20% (Hoed et al., 2006) องค์ประกอบทางเคมีส่วนใหญ่ของน้ำมันรำข้าว คือ ลิพิดคิดเป็นปริมาณ 15-22% ในรำข้าว โดยน้ำมันรำข้าว ประกอบด้วย ลิพิดที่ให้สบู่ (Saponifiable Lipids) 95.6% ได้แก่ ไกลโคลิพิด (Glycolipid) และฟอสโฟลิพิด (Phospholipids) และส่วนที่เหลือ คือ ลิพิดที่ไม่ให้สบู่ (Unsaponifiable Lipid) 4.2% ได้แก่ สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ เช่น โทโคฟีรอล/โทโคไตรอีนอล (Tocopherols/tocotrienols) (tocols: 1500-2000 ppm) แกมมา-โอริซานอล (10,000-20,000 ppm) ไฟโตสเตอรอล (15,000-20,000 ppm) และแคโรทีนอยด์ (Carotenoids) (Balachandran et al., 2008)

2. กระบวนการสกัดน้ำมันรำข้าว

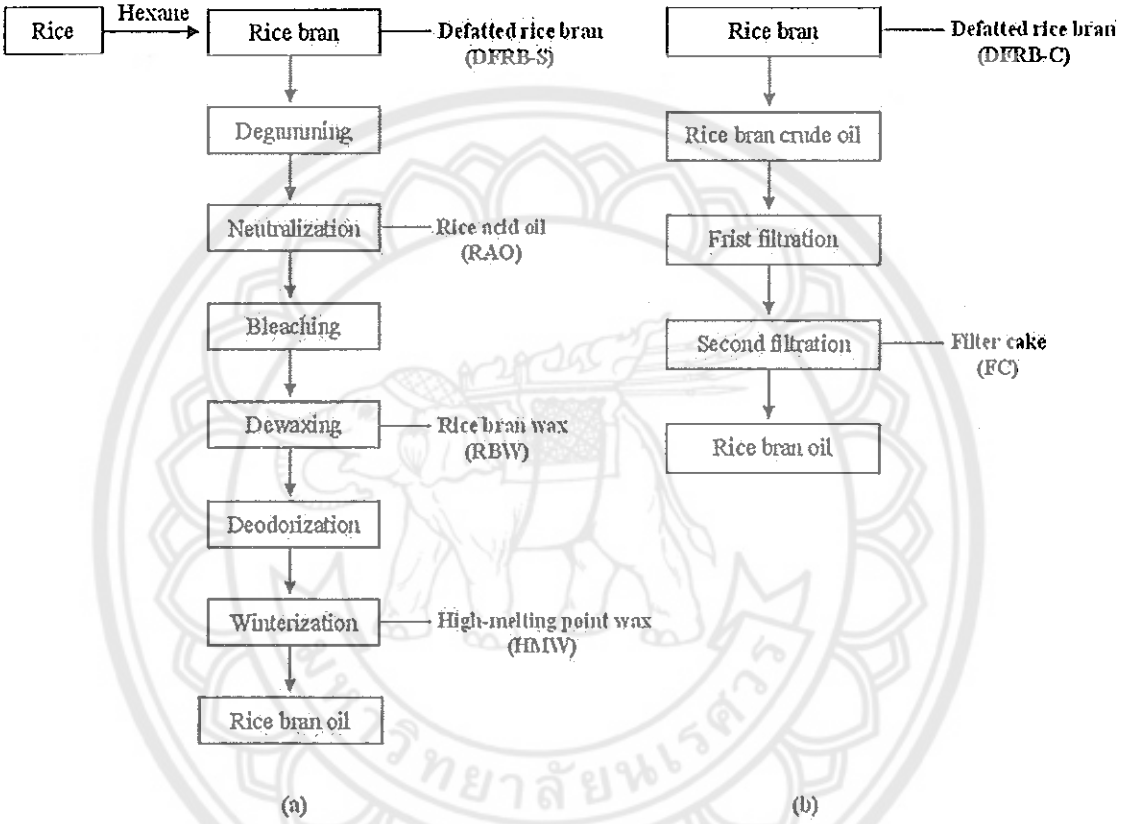
กระบวนการสกัดน้ำมันรำข้าวประกอบด้วย 2 ขั้นตอนสำคัญ คือ การทำเสถียรรำข้าว มีจุดประสงค์เพื่อหยุดปฏิกิริยาไฮโดรไลซีทของไตรกลีเซอไรด์ (Triglycerides) เพื่อไม่ให้เกิดกรดไขมันอิสระ วิธีการที่ใช้โดยทั่วไป คือ การอบแห้งและการใช้ไอน้ำ (Amarasinghe, & Gangodavilage, 2004) อีกขั้นตอนหนึ่ง คือ การสกัดแยกน้ำมันรำข้าว เพื่อให้ได้ผลผลิตสูงมีกรดไขมันอิสระต่ำ การเปลี่ยนแปลงทางเคมีต่ำ มีการเจือปนของไข ยางเหนียวและโลหะหนักต่ำ ซึ่งทำได้ 2 วิธี ได้แก่ การสกัดด้วยตัวทำละลาย (Solvent extraction process) และการบีบเย็นหรือการกดอัด (Cold pressed extraction process)

2.1 กระบวนการสกัดน้ำมันรำข้าวโดยใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ (Solvent extraction process)

การใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ในการสกัดน้ำมันรำข้าวนิยมใช้เฮกเซนเป็นตัวสกัด การสกัดด้วยวิธีนี้จะให้ผลผลิตสูง (98%) และปฏิบัติการได้ง่าย (Amarasinghe et al., 2009) แต่ข้อเสีย คือ น้ำมันที่สกัดได้จะมีปริมาณกรดไขมัน (3-5%) ไข (2-4%) และยางเหนียว (Gum) สูง (1-2%) จึงทำให้การสกัดน้ำมันรำข้าวด้วยวิธีนี้จำเป็นต้องผ่านกระบวนการทำให้บริสุทธิ์ (Refining process) อื่นร่วมด้วย กระบวนการสกัดน้ำมันรำข้าวเริ่มจากรำข้าวจะถูกสกัดน้ำมันด้วยตัวทำละลายเพื่อสกัดน้ำมันในรำข้าวออกมากับกับเฮกเซน (Hexane) ได้เป็นน้ำมันดิบที่ปนอยู่กับ ตัวทำละลายเรียกว่า ไมเซลลา (Miscella) จากนั้นทำการระเหยตัวทำละลายเฮกเซนออกจากน้ำมันดิบโดยการให้ความร้อนกับ Miscella ด้วยเครื่องระเหย (Evaporator) และ Striping Column เพื่อให้ได้น้ำมันดิบ

ต่อมา คือ กระบวนการทำให้บริสุทธิ์ (Refining process) โดยเริ่มจากกระบวนการแยกยางเหนียว (Degumming) ทำได้โดยเติมน้ำร้อนและกรดซิตริกหรือกรดฟอสฟอริกแล้วใช้เครื่องเหวี่ยง (Centrifuge) เพื่อทำให้ยางเหนียว (Gum) ตกตะกอนจะได้น้ำมันดิบและตะกอนยางเหนียว (Gum) การทำให้เป็นกลาง (Neutralization) เพื่อกำจัดกรดไขมันอิสระ (Free fatty acid) ด้วยการเติมโซดาเดียมไฮดรอกไซด์ (Sodium hydroxide) เพื่อทำปฏิกิริยากับกรดไขมันอิสระ (Free fatty acid) ด้วยปฏิกิริยาซาปอนนิฟิเคชัน (Saponification) จนได้สบู่ และทำการแยกสบู่ (Soapstock) ออก (Bhosle, & Subramanian, 2005) ต่อมา คือ กระบวนการฟอกสี (Bleaching) โดยเติมดินฟอกสี (Activated Carbon หรือ Bleaching Earth) เพื่อแยกรงควัตถุ (Pigments) เช่น คลอโรฟิลล์ (Chlorophylls) และแคโรทีนอยด์ (Carotenoids) (Orthoefer, 2005) จากนั้น ทำการกำจัดไข (Dewaxing) ด้วยการเก็บน้ำมันไว้ที่อุณหภูมิ 15 °ซ เพื่อแยกไขมันที่มีจุดหลอมเหลวสูงออก ทำให้น้ำมันที่ได้มีจุดหลอมเหลวต่ำช่วยป้องกันการขุ่นของน้ำมันหรือการตกผลึกไขมันในระหว่างการเก็บ

ในอุณหภูมิต่ำได้ (Pestana et al., 2009) ต่อมา คือ การกำจัดกลิ่น (Deodorization) โดยการกลั่นที่อุณหภูมิสูง (Distillation) ด้วยหอกลั่น เพื่อกำจัดกลิ่นและกรดไขมันอิสระ (Yang et al., 2010) และขั้นตอนสุดท้าย คือ วินเทอร์ไรเซชัน (Winterization) เพื่อแยกไขเป็นเก็บน้ำมันไว้ที่อุณหภูมิ 5°ซ เพื่อกำจัดไขที่มีจุดหลอมเหลวสูงออก ดังแสดงในภาพ 2a



ภาพ 2 แสดงแผนภูมิแสดงกระบวนการผลิตน้ำมันรำข้าว
(a) น้ำมันรำข้าวจากกระบวนการสกัดด้วยตัวทำละลาย
(b) น้ำมันรำข้าวจากกระบวนการบีบเย็น

2.2 กระบวนการสกัดน้ำมันรำข้าวโดยการบีบเย็น (Cold pressed extraction process)

วิธีการสกัดน้ำมันรำข้าวแบบบีบเย็นจะช่วยรักษาคุณภาพของสารสำคัญในรำข้าวและจมูกข้าวได้อย่างครบถ้วนเป็นวิธีที่ให้น้ำมันที่มีคุณภาพดีที่สุด จึงเป็นวิธีที่เหมาะสำหรับการผลิตน้ำมันรำข้าวและจมูกข้าวเพื่อใช้เป็นผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร และเนื่องจากการผลิตน้ำมันรำข้าวและจมูกข้าวด้วยกระบวนการบีบเย็นใช้เวลานานและให้ผลผลิตต่ำจึงไม่เป็นที่นิยมในระดับอุตสาหกรรมอาหาร กระบวนการสกัดน้ำมันรำข้าวแบบบีบเย็นเริ่มจากทำการร่อนรำข้าวด้วยตะแกรงร่อน

เพื่อนำส่วนที่ไม่ต้องการออก จากนั้นนำรำข้าวที่ได้มาบีบอัดด้วยแรงดันผ่านเครื่องสกรูเพลส (Screw Press) โดยมีความร้อนระหว่างการบีบอัดที่ประมาณ 40-70°ซ น้ำมันรำข้าวที่ผ่านการบีบแล้ว จะผ่านกระบวนการกรองโดยการกรองแบบแรงดัน (Filter Press) โดยการกรองด้วยวิธีนี้สามารถกรองได้อย่างรวดเร็ว แต่อาจจะทำให้มีกากรำข้าวติดมาพร้อมกับน้ำมันรำข้าวทำให้น้ำมันไม่บริสุทธิ์และทำให้มีกลิ่นหืนได้ง่าย ดังนั้น น้ำมันรำข้าวจึงต้องทำการกรองอีกครั้งผ่านกระดาษกรอง (Filter Paper) ขนาด 2.5 ไมครอน และขั้นตอนสุดท้าย คือ การนำน้ำมันรำข้าวที่ได้มาทำการฆ่าเชื้อโดยการหมุนเหวี่ยงผ่าน UV sterilizer (Moreau, & Kamal-Eldin, 2009) ดังแสดงในภาพ 2b โดยกระบวนการทำน้ำมันรำข้าวบริสุทธิ์เป็นกระบวนการเพื่อกำจัดสารที่ไม่ต้องการออกไป แต่ในขณะเดียวกันก็ได้สารที่เป็นผลิตผลพลอยได้ที่มีคุณค่าซึ่งสามารถนำมาทำให้บริสุทธิ์และเพิ่มมูลค่าได้อีกทั้งนำไปใช้ประโยชน์ต่อได้ ดังแสดงในตาราง 1

ตาราง 1 แสดงขั้นตอนในการทำบริสุทธิ์น้ำมันรำข้าวและผลิตผลพลอยได้

Step	Removable substance	By-product
Degumming	Phospholipids	Lecithin
Neutralization	Free fatty acids	γ-Oryzanol
Bleaching	Pigments	×
Dewaxing	Wax	Rice bran wax and policosanol
Deodorization	Flavor	Phytosterols and γ-oryzanol

ที่มา: Lilitchan, & Aryusuk, 2008

3. ประโยชน์ของน้ำมันรำข้าว

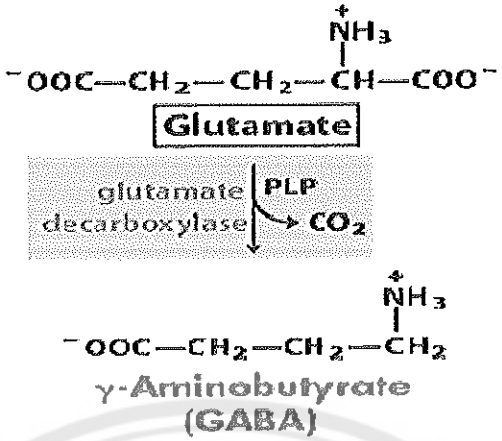
น้ำมันรำข้าว ประกอบด้วย สารโภชนเภสัชหลายชนิด ได้แก่ แกมมา-โอริซานอลและวิตามินอี ซึ่งกลุ่มโทโคไรอีนอลและไฟโตสเตรอลมีฤทธิ์ในการลดระดับลิโพโปรตีนความหนาแน่นต่ำหรือไขมันเลว (Low density lipoprotein; LDL) และไตรกลีเซอไรด์ (Triglycerides) นอกจากนี้ แกมมา-โอริซานอลยังช่วยคงระดับ หรือเพิ่มระดับลิโพโปรตีนความหนาแน่นสูงหรือไขมันดี (High density lipoprotein; HDL) จึงส่งผลให้ลดความเสี่ยงของการเกิดโรคหัวใจและโรคที่เกิดจากหลอดเลือดตีบตัน (Nagao et al., 2001) เช่น โรคหัวใจขาดเลือด หัวใจวาย หลอดเลือดตีบ อัมพฤกษ์ อัมพาต (Mellen et al., 2008) นอกจากนี้ สารต้านอนุมูลอิสระในน้ำมันรำข้าวยังมีฤทธิ์ช่วยป้องกันและยับยั้งการเกิด

โรคมะเร็ง (Kannappan et al., 2010; Sun et al., 2009) ลดการเจริญเติบโตของเนื้องอก (Evans et al., 2010) และมีคุณสมบัติช่วยรักษาสมดุลของระบบประสาท บำรุงสมอง เสริมความจำ ป้องกันโรคสมองเสื่อม และโรคอัลไซเมอร์ และคุณสมบัติทางเครื่องสำอางช่วยบำรุงผิวพรรณให้ความชุ่มชื้น เพิ่มความยืดหยุ่นแก่ผิวหนัง ลดเลือนริ้วรอย (Noboru, & Yusho, 1970; Shugo, 1979) และมีส่วนช่วยปรับสมดุลของระบบสตรีวัยทองและช่วยลดอาการร้อนวูบวาบ (Hot flashes) (Murase, & Iishima, 1963)

แกมมา-อะมิโนบิวทิเรต (γ-aminobutyrate)

แกมมา-อะมิโนบิวทิเรต (γ -aminobutyrate) หรือกาบา (GABA) เป็นกรดอะมิโนที่เกิดจากกระบวนการดีคาร์บอกซิเลชั่น (Decarboxylation) ของกรดอะมิโนกลูตามิก (Glutamic Acid) โดยการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์กลูตาเมตดีคาร์บอกซิเลส (Glutamate decarboxylase) และใช้วิตามินบีหกในรูปไพริดอกซอลฟอสเฟต (Pyridoxal phosphate) เป็นโคแฟคเตอร์ (ภาพ 3) (Lehninger et al., 1993) กาบามีสูตรโมเลกุล คือ $C_4H_9NO_2$ น้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 103.12 กรัม/โมล มีจุดหลอมเหลวที่ 195°ซ สารกาบาบริสุทธิ์มีลักษณะเป็นผงผลึกสีขาว ละลายในน้ำได้ดีและละลายได้ในแอลกอฮอล์บางชนิด อาทิ เมทานอล (Methanol) กับเอทานอล (Ethanol) แต่จะไม่ละลายในสารจำพวกตัวทำละลายที่มีขั้วต่ำ (Rodkum, 2011)

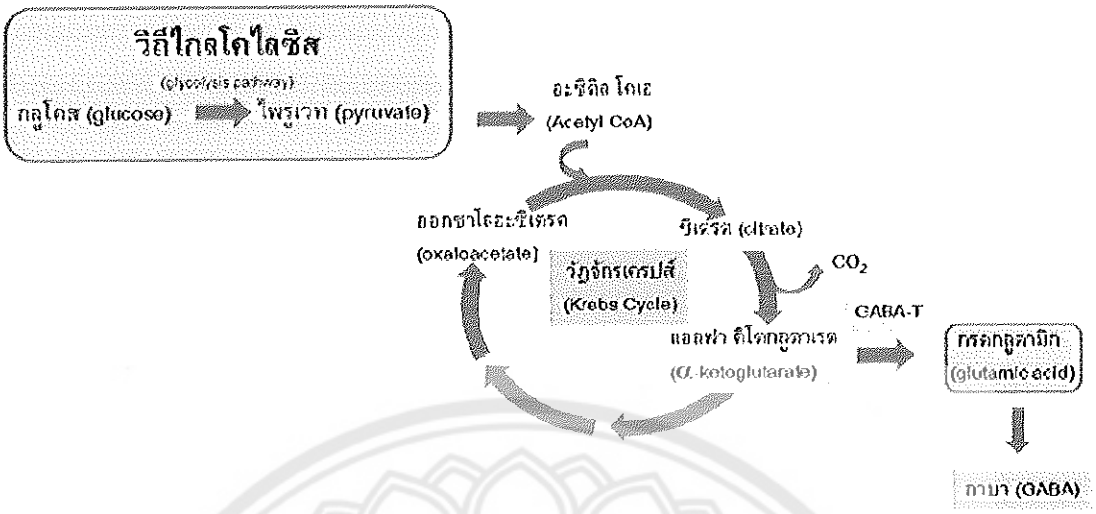
กาบามีบทบาทสำคัญในการทำหน้าที่เป็นสารสื่อประสาทชนิดยับยั้ง (Inhibitory neurotransmitter) ในระบบประสาทส่วนกลาง เป็นสารสื่อประสาทชนิดที่ผ่านบริเวณเชื่อมต่อระหว่างเซลล์ประสาทจึงทำให้กระแสประสาทผ่านได้น้อยลง ทำให้สมองที่ได้รับการกระตุ้นเกิดการผ่อนคลายและส่งผลให้นอนหลับสบาย (Petroff, 2002; Schousboe, & Waagepetersen, 2007) อีกทั้ง ยังช่วยกระตุ้นต่อมใต้สมองส่วนหน้า (Anterior pituitary gland) ซึ่งทำหน้าที่ผลิตฮอร์โมนช่วยในการเจริญเติบโต (Human growth hormone; HGH) ทำให้เกิดการสร้างเนื้อเยื่อกล้ามเนื้อทำให้กล้ามเนื้อเกิดความกระชับและเกิดสารป้องกันไขมันที่ชื่อ ลิโปโทรปิก (Lipotropic) ส่งผลในการช่วยป้องกันการสะสมไขมันในร่างกาย (Powers et al., 2008) และป้องกันโรคสูญเสียความทรงจำ (อัลไซด์เมอร์) (Ito, & Ishikawa, 2004) สุดท้ายช่วยรักษาโรคที่เกี่ยวกับระบบประสาทหรือจิตเภท (Schizophrenia) หลายโรค เช่น โรควิตกกังวล โรคนอนไม่หลับ (Abdou et al., 2006; Yoto et al., 2012)



ภาพ 3 แสดงการสังเคราะห์สารกาบาจากกรดอะมิโนกลูตาเมต

ที่มา: Lehninger et al., 1993

ปกติร่างกายมนุษย์จะได้รับสารกาบา จาก 2 ทาง คือ 1) จากอาหารที่มีปริมาณสารกาบาสูง เช่น ใบชาแห้ง แตงเมลอน มะเขือเทศ กิมจิ (Kimchi) ข้าวกล้องงอก ฟักทองและเต้าหู้ เป็นต้น และจากการวิเคราะห์สารกาบาในข้าวที่มีปริมาณอะไมโลสแตกต่างกัน โดยใช้เครื่อง High performance liquid chromatography (HPLC) พบว่า ปริมาณสารกาบาในข้าวเจ้าชนิดที่มีอะไมโลสต่ำ (Low amylose) อยู่ระหว่าง 31.0-37.2 มก./100 กรัม และในข้าวเจ้าชนิดอะไมโลสสูง (High amylose) มีอยู่ 21.4-28.8 มก./100 กรัม ส่วนข้าวเหนียวมีปริมาณสารกาบาอยู่ในช่วงระหว่าง 29.6-72.8 มก./100 กรัม (Tungtrakul, 2007) 2) จากการสังเคราะห์ขึ้นเองในร่างกาย โดยการย่อยสลายน้ำตาลกลูโคสผ่านกระบวนการไกลโคไลซิสเพื่อให้ได้ผลผลิตเป็นสารไพรูเวท จากนั้น สารไพรูเวทจะเข้าสู่วัฏจักรเครปส์ ทำให้ได้สารตัวกลาง คือ แอลฟา-คีโตกลูตาเรต (α-ketoglutarate) ที่สามารถนำไปใช้สำหรับการสังเคราะห์กรดกลูตามิกที่เป็นสารตั้งต้นสำหรับสารกาบา โดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์ GABA α-oxoglutarate transaminase (GABA-T) (Olsen, & DeLorey, 1999) (ภาพ 4) โดยสารกาบาที่ร่างกายสังเคราะห์ขึ้นจะพบที่บริเวณสมองในปริมาณสูง ดังนั้นหากร่างกายได้รับกลูโคสก็จะส่งผลให้สมองมีการสร้างสารกาบาซึ่งทำให้สมองเกิดการผ่อนคลายได้นอกเหนือจากการได้รับจากอาหาร

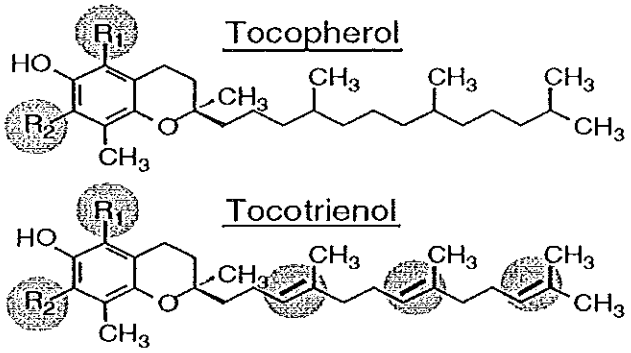


ภาพ 4 แสดงการสังเคราะห์สารกาบาจากน้ำตาลกลูโคสผ่านสารตัวกลางจากวัฏจักรเครปส์ โดยการทำงานของเอนไซม์ GABA α-oxoglutarate transaminase (GABA-T)

ที่มา: Thongekkaew, 2015

วิตามินอี (Vitamin E)

วิตามินอี คือ จุลธาตุอาหาร (Micronutrient) หรือสารอาหารที่มีความจำเป็นต่อร่างกาย มีคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระ วิตามินอี ประกอบด้วย อนุพันธ์ของแอลฟา-เบตา-แกมมา-และเดลตา-โทโคฟีรอล (α-, β-, γ-. และ δ-Tocopherol) และอนุพันธ์ของ แอลฟา-เบตา-แกมมา-และเดลตา-โทโคไตรอีนอล (α-, β-, γ-. และ δ -Tocotrienol) ดังภาพ 5 ซึ่งในโครงสร้างของวงแหวน 6-chromanol ของกลุ่มโทโคฟีรอลจะถูกแทนที่ด้วยหมู่เมทิล (Methyl group) ที่ตำแหน่ง 5, 7 และโดยที่ตำแหน่งที่ 2 เป็น C_{16} Saturated side chain ส่วนกลุ่มโทโคไตรอีนอลนั้นจะมีพันธะคู่ที่ตำแหน่ง 3', 7' และ 11' ของแขนงข้าง (Side chain) ซึ่งโทโคฟีรอลและโทโคไตรอีนอลในรูปแบบเฉพาะต่างๆ นั้นจะแตกต่างกันที่จำนวนและตำแหน่งของหมู่เมทิลบนวงแหวน 6-Chromanol โดยแอลฟา-โทโคฟีรอล และแอลฟา-โทโคไตรอีนอลนั้น จะถูกแทนที่ด้วยหมู่เมทิล 3 หมู่ เบตา-โทโคฟีรอล เบตา-โทโคไตรอีนอล แกมมา-โทโคฟีรอล และแกมมา-โทโคไตรอีนอลจะถูกแทนที่ด้วยหมู่เมทิล 2 หมู่ เดลตา-โทโคฟีรอล และเดลตา-โทโคไตรอีนอลจะถูกแทนที่ด้วยหมู่เมทิล 1 หมู่ (Eitenmiller, & Lee, 2004; Yoshida et al., 2007)



Tocochromanol	R_1	R_2	Vitamin E activity(%) Tocopherol	Tocotrienol
alpha	CH_3	CH_3	100	21–50
beta	CH_3	H	25–50	5
gamma	H	CH_3	8–19	nm
delta	H	H	<3	nm

ภาพ 5 แสดงโครงสร้างทางเคมีของโทโคฟีรอลและโทโคไตรอีนอล

หมายเหตุ: nm = not measurable

ที่มา: DellaPenna, & Last, 2006

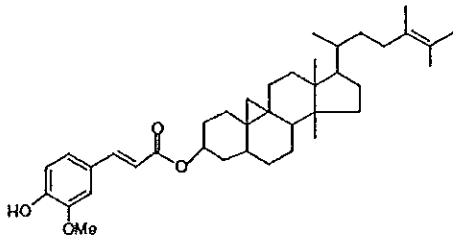
วิตามินอีบริสุทธิ์มีลักษณะข้นหนืด สีเหลือง ละลายได้ดีในน้ำมัน มีสูตรโมเลกุล $C_{29}H_{50}O_2$ มวลโมเลกุล 430 กรัม/โมล (Eitenmiller, & Lee, 2004) วิตามินอีเป็นสารต้านอนุมูลอิสระในธรรมชาติที่มีบทบาทสำคัญในอุตสาหกรรมอาหาร ยา และเครื่องสำอาง โดยแอลฟา-โทโคฟีรอล เป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพมากกว่า เบตา-โทโคฟีรอล แอลฟา-โทโคไตรอีนอล แกมมา-โทโคฟีรอล เบตา-โทโคไตรอีนอล และเดลตา-โทโคฟีรอล ตามลำดับ (Cheong et al., 2008) โทโคฟีรอลและโทโคไตรอีนอลเป็นสารต้านอนุมูลอิสระธรรมชาติที่มีบทบาทสำคัญในการรักษาคุณภาพอาหารและการป้องกันโรค โดยโทโคฟีรอลและโทโคไตรอีนอลสามารถยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาเพอร์ออกซิเดชันของเอซิลกลีเซอรอล (Acylglycerol peroxidation) โดยการจับกับอนุมูลอิสระ สามารถยับยั้งการสังเคราะห์คอเลสเตอรอลในตับ มีฤทธิ์เป็นสารต้านมะเร็ง เพิ่มระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายและลดการเสื่อมสภาพของเซลล์ โทโคฟีรอลและโทโคไตรอีนอลยังทำหน้าที่เป็นสารต่อต้านการแข็งตัวของเลือด มีประสิทธิภาพในการฟื้นฟูสภาพผิวหนังและสามารถป้องกันการเกิดโรคอัลไซเมอร์ในผู้สูงอายุ (Chu et al., 2002) นอกจากนี้ ยังสามารถสามารถลดการอักเสบอันเนื่องมาจากกระบวนการสร้างหลอดเลือดใหม่ของก้อนมะเร็ง (Inflammatory angiogenesis) ในเซลล์เยื่อบุหลอดเลือดฝอย (Microvascular endothelial cells) ของมนุษย์ (Wells et al., 2010) และยังมีคุณสมบัติในการยับยั้ง

การเกิดเพอร์ออกไซด์ของกรดไขมันไม่อิ่มตัว (Polyunsaturated fatty acid) ในเยื่อหุ้มของสิ่งมีชีวิต (Biological membrane) (Choi, Y., & Lee, 2009)

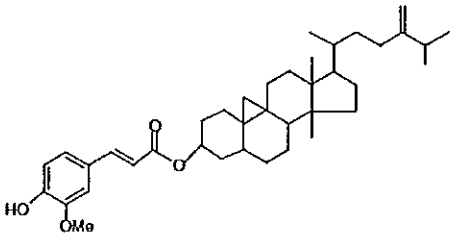
แกมมา-โอริซานอล (γ-oryzanol)

โอริซานอลค้นพบครั้งแรกในน้ำมันรำข้าวในปี ค.ศ. 1954 โดยนักวิทยาศาสตร์ชาวญี่ปุ่นชื่อ Tsuchiya, T. และ Kaneko, R. (Azrina et al., 2008) มีสูตรโมเลกุล คือ $C_{40}H_{58}O_4$ มวลโมเลกุล 602.9 กรัม/โมล โอริซานอลบริสุทธิ์จะมีลักษณะเป็นผงสีขาวหรือสีขาวปนเหลืองอ่อน โปร่งคล้ายแป้ง ไม่มีกลิ่น ละลายได้ดีในคลอโรฟอร์ม รองลงมา คือ อีเทอร์ ละลายได้เล็กน้อยในเฮปเทนและไม่ละลายในน้ำ มีจุดหลอมเหลวสูงประมาณ 161.2°ซ แต่ไม่ทนต่อแสงแดด (Park et al., 2013) โอริซานอลมีทั้งหมด 10 อนุพันธ์ ซึ่งล้วนเป็นอนุพันธ์ของกรดเฟอรูลิก (Ferulic acid) ในจำนวนนี้มี 3 อนุพันธ์ที่มีความสำคัญในแง่ของการออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ คือ Cycloartenyl ferulate, 24-Methylene cycloartenyl ferulate, Campesteryl ferulate (Azrina et al., 2008) ดังแสดงในภาพ 6 โอริซานอลเป็นกลุ่มของสารประกอบเอสเทอร์ระหว่างกรดเฟอรูลิก (Ferulic Acid) และสเตอรอล (Sterols) หรือไตรเทอร์ปีนแอลกอฮอล์ (Triterpene alcohols) ชนิดต่างๆ โดยโอริซานอลเป็นสารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระตามธรรมชาติ เช่นเดียวกับ โทโคฟีรอลและโทโคไตรอีนอล แต่มีประสิทธิภาพสูงกว่าวิตามินอี-แอลฟาโทโคฟีรอล (α-Tocopherol) ถึง 6 เท่า (Huang et al., 2002) สามารถพบได้ในข้าวและพืชผักบางชนิด โดยพบมากในส่วนของเยื่อหุ้มเมล็ดและจมูกข้าว

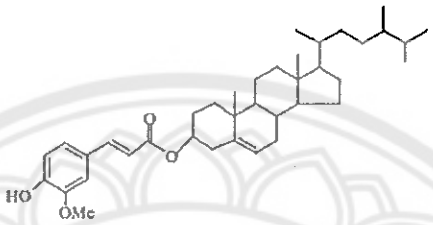
จากการรวบรวมผลงานวิจัยทางด้านโภชนาการ พบว่า การบริโภคแกมมา-โอริซานอลสามารถลดระดับคอเลสเตอรอลในเลือด (Gerhardt, & Gallo, 1998) ลดการจับตัวของเกล็ดเลือด (Seetharamaiah et al., 1990) ช่วยปรับสมดุลของสตรีวัยทอง (Murase, & Iishima, 1963) และช่วยเพิ่มปริมาณกล้ามเนื้อ ในปัจจุบันแกมมา-โอริซานอลยังมีความสำคัญมากขึ้นในการใช้เป็นยา ผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร และเครื่องสำอางเพราะมีคุณสมบัติที่สำคัญ คือ มีประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระได้สูง ป้องกันแสงยูวี ทำให้ผิวหนังชุ่มชื้นและต้านการอักเสบ (Brigitte, 1995; Pizzorno et al., 2002)



Cycloartenyl ferulate



24 methylene Cycloartanyl ferulate



Campesteryl ferulate

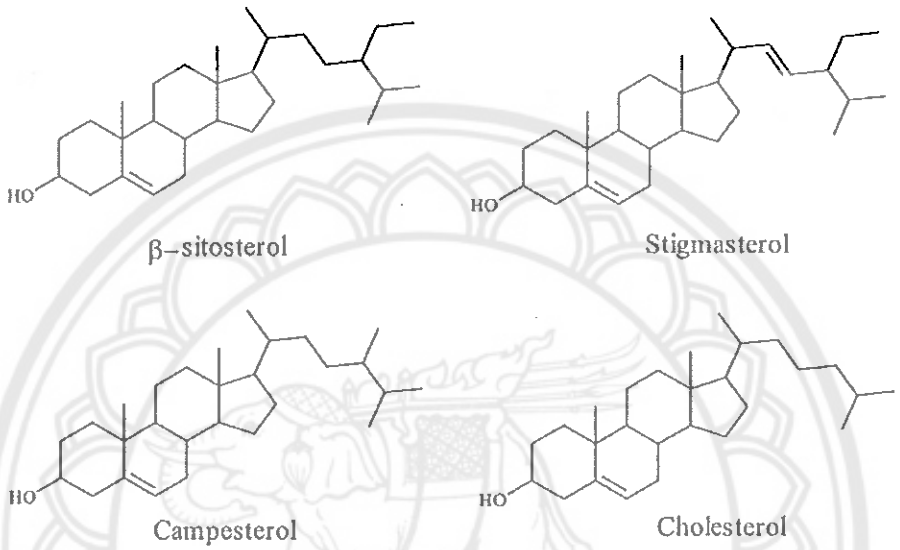
ภาพ 6 แสดงโครงสร้างทางเคมีของไซโคอะทีนิล เฟอรูเรต (Cycloartenyl ferulate) 24-เมทิลลีนไซโคอะทีนิล เฟอรูเรต (24-Methylenecycloartanyl ferulate) และแคมเพสเตอริว เฟอรูเรต (Campesteryl ferulate)

ที่มา: Patel, & Naik, 2004

ไฟโตสเตอรอล (Phytosterols)

ไฟโตสเตอรอลเป็นสารพบได้เฉพาะในพืช มีสมบัติไม่ละลายน้ำ ละลายได้ในน้ำมันและแอลกอฮอล์ มีโครงสร้างคล้ายกับคอเลสเตรอลในมนุษย์แต่มีโซ่กิ่งที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 17 ต่างจากคอเลสเตอรอล ส่วนสตานอล (Stanol) เป็นสเตอรอลอิ่มตัวที่มีไม่มีพันธะคู่ในโครงสร้างวงแหวน สเตอรอลในธรรมชาติอาจพบทั้งในรูปที่เกิดปฏิกิริยาเอสเทอริฟิเคชัน (Esterification) กับกรดไขมันหรืออยู่ในรูปแบบอิสระ ดังภาพ 7 ซึ่งแสดงโครงสร้างของสเตอรอลในพืชเปรียบเทียบได้กับคอเลสเตอรอล กลไกการออกฤทธิ์ของสารไฟโตสเตอรอล คือ สารนี้จะเข้าแข่งขันกับคอเลสเตอรอลในการดูดซึมจากลำไส้เล็ก ส่งผลให้คอเลสเตอรอลจากอาหารไม่สามารถเข้าสู่ร่างกายได้จึงทำให้ปริมาณคอเลสเตอรอลในกระแสเลือดลดลงตามลำดับ โดยสเตอรอลจะถูกดูดซึมพร้อมกับคอเลสเตอรอล โดยเซลล์ลำไส้เล็กซึ่งมีโปรตีน Niemann-Pick C1 like 1 (NPCL1) ซึ่ง สเตอรอลเพียงจำนวนน้อยเท่านั้นที่จะถูกดูดซึม แต่ส่วนใหญ่จะถูกขับออกจากเซลล์ลำไส้เล็กโดย Adenosine-binding cassette G5/8 (ABCG5/8) พร้อมกับคอเลสเตอรอล ดังนั้น เมื่อร่างกายได้รับสเตอรอลมากขึ้น ร่างกายก็จะขับคอเลสเตอรอลออกมาจากร่างกายมากขึ้นเช่นกัน (Somseemee et al., 2014)

ไฟโตสตอรอล แบ่งออกเป็น 2 ประเภทหลัก คือ 1) สเตอรอลจากพืช (Plant sterols) เช่น เบต้า-ซิโตสเตอรอล (β-sitosterol) แคมเพสเตอรอล (Campesterol) และสติกมาสเตอรอล (Stigmasterol) และ 2) สตานอลรอลจากพืช (Plant stanols) เช่น เบต้า- ซิโตสตานอล (β-Sitostanol) และแคมเพสสตานอล (Campestanol) (Gupta et al., 2011) ซึ่งสารทั้งสองมีความแตกต่างกันที่โครงสร้าง



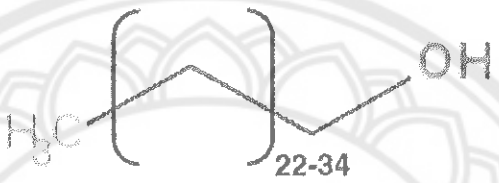
ภาพ 7 แสดงโครงสร้างทางเคมีของคอเลสเตอรอลและสเตอรอลจากพืช

ที่มา: Clement et al., 2013

ไฟโตสเตอรอลพบได้ในธัญพืช เช่น ถั่ว น้ำมันพืช (น้ำมันรำข้าว น้ำมันข้าวโพด น้ำมันเมล็ดดอกทานตะวัน น้ำมันถั่วเหลือง น้ำมันมะกอก น้ำมันงา) งา จมูกข้าว รำข้าว ไข่แดง ตับ กุ้ง ปู เหล่านี้คือ กลุ่มของอาหารที่พบว่า มีไฟโตสเตอรอลมากโดยเฉพาะในรำข้าวมีไฟโตสเตอรอลในปริมาณ 2,230-4,450 ppm (Qureshi et al., 2002) และเมื่อผ่านกระบวนการสกัดเป็นน้ำมันรำข้าวจะมีความเข้มข้นของไฟโตสเตอรอลสูงถึง 11,900 ppm (Abidi, 2001) ไฟโตสเตอรอลมีผลต่อร่างกายหลายประการ ได้แก่ มีผลต่อไขมันและคอเลสเตอรอล ใช้ป้องกันโรคหลอดเลือดอุดตันที่เกิดจากไขมันสะสมทำให้หลอดเลือดตีบตัน (Shaghaghi et al., 2013; Talati et al., 2010)

โพลิโคซานอล (Policosanol)

โพลิโคซานอล (Policosanol) คือ กลุ่มของแอลกอฮอล์สายตรงยาว (Long chain aliphatic alcohols) ที่มีความยาวคาร์บอน 20-34 อะตอม (C_{20}-C_{34}) (Irmak et al., 2006) โดยมีสารโดโคซานอล (Docosanol; C_{22}) เตตระโคซานอล (Tetracosanol; C_{24}) เฮกซะโคซานอล (Hexacosanol; C_{26}) ออกตะโคซานอล (Octacosanol; C_{28}) และไตรอะคอนทานอล (Triacontanol; C_{30}) เป็นองค์ประกอบหลัก (Lilitchan, & Aryusuk, 2008) โดยโครงสร้างทางเคมีของโพลิโคซานอล แสดงในภาพ 8



ภาพ 8 แสดงโครงสร้างทางเคมีของโพลิโคซานอล

ที่มา: Weerawatanakorn et al., 2019

โพลิโคซานอลพบได้ในไขจากสัตว์และพืชบางชนิด เช่น ไขจากผึ้ง (Bees wax) ไขรำข้าว (Rice bran wax) ไขอ้อย (Sugar cane wax) และไขคาร์นูบา (Carnuba wax) โดยปริมาณและองค์ประกอบของโพลิโคซานอลในไขแต่ละชนิดขึ้นอยู่กับวัตถุดิบที่นำมาสกัด เช่น ไขอ้อยมีโพลิโคซานอลที่มีความยาวคาร์บอน 24-34 อะตอม โดยมีออกตะโคซานอล (Octacosanol ; C_{28}) มากที่สุดถึง 66% (Stuchlik, & Zak, 2002) ในไขผึ้งพบโพลิโคซานอลที่มีความยาวคาร์บอน 18-34 อะตอม โดยมีไตรอะคอนทานอล (Triacontanol ; C_{30}) มากที่สุดคิดเป็น 30.2% (Bogdanov, 2009) ส่วนโพลิโคซานอลที่พบในไขรำข้าวมีความยาวสายคาร์บอน 22-36 อะตอม (C_{22}-C_{38}) โดยมีไตรอะคอนทานอล (Triacontanol ; C_{30}) มากที่สุด คิดเป็น 33.1% (Puengtham et al., 2008)

ปัจจุบันนักวิจัยเริ่มให้ความสนใจในการศึกษาถึงประโยชน์ของโพลิโคซานอล ซึ่งพบว่าการบริโภคโพลิโคซานอลสามารถลดลิโพโปรตีนความหนาแน่นต่ำหรือไขมันเลว (Low-density lipoprotein; LDL) ในขณะที่ลิโพโปรตีนความหนาแน่นสูงหรือไขมันดีเพิ่มขึ้น (High-density lipoprotein; HDL) (Hargrove et al., 2004) นอกจากนี้ ยังมีรายงานว่า โพลิโคซานอลสามารถป้องกันและรักษาโรคเกี่ยวกับหลอดเลือดหัวใจ (Cardiovascular disease) (Varady et al., 2003) ช่วยยับยั้งการสังเคราะห์คอเลสเตอรอล (Cholesterol biosynthesis) และเพิ่มการย่อยสลาย LDL

(LDL decatabolism) (Menendez et al., 1994) ลดการรวมตัวของเกล็ดเลือด (Platelet aggregation) ลดอันตรายของเยื่อบุหลอดเลือด (Endothelial damage) และลดการเกิดโฟมเซลล์ (Foam cell formation) (Arruzazabala, M., 1996; Carbajal et al., 1998) อีกทั้งสามารถยั้งยั้งการเกิดเปอร์ออกซิเดชั่นของไขมัน ป้องกันการเกิดเปอร์ออกซิเดชั่นของลิโพโปรตีนทั้งในส่วนของไขมันและโปรตีน (Menendez et al., 1994) และสามารถลดการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชั่นในไขมันเลว (LDL oxidation) (Menendez et al., 1999, 2000) ซึ่งเป็นสาเหตุนำไปสู่การเกิดภาวะหลอดเลือดแดงแข็ง (Atherosclerosis) เป็นต้น สำหรับทางด้านความปลอดภัยของโพลิโคซานอล พบว่า โพลิโคซานอลไม่ก่อให้เกิดความผิดปกติของยีน (Mutagen) และไม่เป็นสารก่อมะเร็ง (Carcinogen) นอกจากนี้ยังพบว่า โพลิโคซานอลไม่มีพิษต่อยีนทั้งในเซลล์ร่างกายและเซลล์ที่กำลังเจริญเติบโต (Rendon et al., 1992)

1. งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับสารโพลิโคซานอล

โพลิโคซานอลมีคุณสมบัติในการต่อต้านการเกิดมะเร็ง มีฤทธิ์ในการชะลอวัย ลดการจับตัวของเกล็ดเลือด เป็นสารต้านอนุมูลอิสระ ลดการอักเสบ และคุณประโยชน์ของโพลิโคซานอลที่ได้รับความสนใจมากที่สุด คือ การลดระดับคลอเลสเตอรอลในเลือดซึ่งเป็นสาเหตุของโรคหลอดเลือดแดงแข็ง (Atherosclerosis) (Affuso et al., 2012; Arruzazabala, M. et al., 1996; Carbajal et al., 1998; Castano et al., 2003; Harrabi et al., 2018; Lee et al., 2016; Noa et al., 2003; Sharma et al., 2019) นอกจากนี้ ยังมีรายงานว่าโพลิโคซานอลไม่ก่อให้เกิดความผิดปกติของยีน (Mutagen) ไม่เป็นสารก่อมะเร็ง (Carcinogen) และไม่มีพิษต่อยีนทั้งในเซลล์ร่างกายและเซลล์ที่กำลังเจริญเติบโต โดยมีงานวิจัยที่เกี่ยวข้องดังต่อไปนี้

1.1 การศึกษาคุณสมบัติในด้านการลดระดับคอเลสเตอรอลในเลือด

Arruzazabala et al. (1994) ทำการศึกษาการใช้โพลิโคซานอลปริมาณ 5-50 มก./กก./วัน เป็นเวลา 4 สัปดาห์ ในการลดระดับคอเลสเตอรอลในเลือดของกระต่ายนิวซีแลนด์ (New Zealand rabbits) ที่ถูกเหนี่ยวนำให้มีคอเลสเตอรอลสูง พบว่า โพลิโคซานอลสามารถลดระดับไตรกลีเซอไรด์ คอเลสเตอรอลทั้งหมด รวมทั้งลิโพโปรตีนความหนาแน่นต่ำ (LDL) ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) แต่ไม่มีผลเปลี่ยนแปลงระดับลิโพโปรตีนความหนาแน่นสูง (HDL) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$) Menendez et al. (1997) ทำการทดสอบโพลิโคซานอลที่สกัดจากไขจากอ้อยปริมาณ 50 มก./กก./วัน เป็นเวลา 30 วัน ในกระต่ายนิวซีแลนด์ที่ถูกเหนี่ยวนำให้มีคอเลสเตอรอลสูง พบว่า โพลิโคซานอลสามารถลดการสังเคราะห์คอเลสเตอรอลที่ตับได้ และ Arruzazabala et al. (2000) พบว่า การบริโภคโพลิโคซานอลในปริมาณ 25 หรือ 200 มก./กก./วัน

เป็นเวลา 60 วัน ในกระต่ายที่มีภาวะไขมันในเลือดสูง สามารถลดการเกิดโรคหลอดเลือดแดงแข็งได้ (Atherosclerotic lesions) โดยโพลิโคซานอลสามารถลดการหลั่งของเอนไซม์ Thromboxane A2 (TXA2) และเพิ่มระดับ Prostacyclin (PGI2) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ทำให้หลอดเลือดขยายตัว และห้ามการจับกันของเกล็ดเลือด (Platelet aggregation inhibitor) ต่อมา Wang et al. (2005) ทำการศึกษาประสิทธิภาพของโพลิโคซานอลสายยาว ในการลดระดับคอเลสเตอรอลในโกลเด้น ไซเรียน แฮมสเตอร์ (Golden Syrian hamsters) ที่ระดับ 50 มก./กก./วัน เป็นเวลา 28 วัน พบว่าการบริโภคโพลิโคซานอล 50 มก./กก./วัน สามารถเพิ่มระดับลิโพโปรตีนความหนาแน่นสูง (HDL) ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) แต่ไม่มีผลต่อการลดลงของไตรกลีเซอไรด์และคอเลสเตอรอลทั้งหมด

นอกจากการศึกษาประสิทธิภาพการลดระดับคอเลสเตอรอลในสัตว์ทดลองแล้ว มีหลายงานวิจัยที่ทำการศึกษาผลดังกล่าวในมนุษย์ โดย Hernandez et al. (1992) ทำการศึกษาการบริโภคโพลิโคซานอลในปริมาณ 10 และ 20 มก./วัน ในคนไข้ที่มีสุขภาพดี พบว่า สามารถลดระดับไตรกลีเซอไรด์ได้ 10.7% และ 11.3% ตามลำดับ รวมทั้งการบริโภคโพลิโคซานอลในปริมาณ 20 มก./วัน ยังสามารถลดระดับ LDL ได้ถึง 20% อีกทั้งยังเพิ่มระดับ HDL ในเลือดได้ถึง 29.93% Kim et al. (2018) ทำการศึกษาประสิทธิภาพการลดระดับคอเลสเตอรอลในคนไข้ชาวเกาหลีที่มีความเสี่ยงต่อการเกิดโรคความดันโลหิตสูงทั้งเพศหญิงและชาย อายุระหว่าง 18-65 ปี เป็นเวลา 24 สัปดาห์ พบว่าการบริโภคโพลิโคซานอลจากไขอ้อยในปริมาณ 20 มก./วัน สามารถลดค่าความดันเลือดในหลอดเลือดส่วนปลายและส่วนกลาง รวมทั้งเพิ่มระดับ HDL ได้ นอกจากนี้ Chen et al. (2005) ยังพบว่า การบริโภคโพลิโคซานอลมีประสิทธิภาพมากกว่าไฟโตสเตรอล (สเตอรอลและสตานอล) ด้านการลดระดับคอเลสเตอรอล โดยการบริโภคโพลิโคซานอลในปริมาณ 12 มก./วัน สามารถลดระดับไขมันเลว (LDL cholesterol) และคอเลสเตอรอลทั้งหมดได้ อีกทั้งยังเพิ่มระดับไขมันดี (HDL cholesterol) ในคนไข้จำนวน 1,528 คน

1.2 ความเป็นพิษของโพลิโคซานอล

Alemán et al. (1994) ศึกษาความเป็นพิษของโพลิโคซานอลในหนูแรท (Rats) สายพันธุ์ Sprague Dawley ทั้งเพศผู้และเพศเมีย ในปริมาณ 0.5 - 500 มก./กก./วัน เป็นเวลา 12 เดือน พบว่า สัตว์ทดลองไม่แสดงอาการของความเป็นพิษ รวมทั้งไม่ส่งผลกระทบต่อน้ำหนักตัว การบริโภคอาหาร น้ำหนักอวัยวะ ค่าทางชีวเคมีในเลือด หรือจุลพยาธิวิทยาของเนื้อเยื่อเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม Gámez et al. (2001) ศึกษาความเป็นพิษระยะยาวของโพลิโคซานอล ที่ระดับ 50 500 2,500 และ 5,000 มก./กก./วัน เป็นเวลา 6 เดือน ในหนูแรทสายพันธุ์ Sprague Dawley ทั้งเพศผู้และเพศเมีย พบว่า สัตว์ทดลองไม่แสดงอาการของความเป็นพิษอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ซึ่งผลการทดลองมีความสอดคล้องกับการศึกษาของ Aleman et al. (1995) ที่พบว่า โพลิโคซานอลไม่ก่อให้เกิดมะเร็ง (Carcinogenicity) รวมทั้ง Rodríguez et al. (1998) ยังพบว่า โพลิโคซานอลไม่มีผลต่อการสืบพันธุ์และไม่ส่งผลต่อการพัฒนาการร่างกายของทารกในครรภ์

การสกัดด้วยของไหลภายใต้สภาวะกึ่งวิกฤต (Sub-critical fluid extraction, SUBFE)

SUBFE เป็นเทคนิคการสกัดที่ใช้ตัวทำละลายเป็นเฟสของเหลวโดยสกัดที่อุณหภูมิและความดันสูง (Mustafa, & Turner, 2011; Ramos, 2012) การสกัดที่อุณหภูมิสูงกว่าจุดเดือดของตัวทำละลายที่ความดันบรรยากาศจะมีผลเพิ่มทั้งการละลายของสารที่ต้องการสกัดและคุณสมบัติการถ่ายเทมวล (Mass tran SUBFEr property) ในปี ค.ศ. 1995 บริษัท Dionex ได้เสนอเทคโนโลยีการสกัดด้วย Accelerated solvent extraction technology (ASE®) ซึ่งในปัจจุบันเทคโนโลยีนี้ได้ครอบคลุมถึง Pressurized liquid extraction, Pressurized solvent extraction, Accelerated solvent extraction และ Sub-critical fluid extraction โดยปัจจัยหลักที่มีอิทธิพลต่อการสกัดมีดังต่อไปนี้

1. ปัจจัยหลักที่มีอิทธิพลต่อการสกัด

1.1 ตัวทำละลายอินทรีย์

หลักการใช้ตัวทำละลายสำหรับการสกัด คือ Like dissolves like ซึ่งหมายถึงตัวถูกละลายที่มีขั้วจะละลายในตัวทำละลายที่มีขั้ว ในขณะที่ตัวถูกละลายที่ไม่มีขั้วจะละลายในตัวทำละลายที่ไม่มีขั้ว ทั้งนี้สารที่ต้องการสกัดจึงต้องมีขั้วใกล้เคียงกับขั้วของตัวทำละลาย (Pronyk, & Mazza, 2009; Turner, & Waldeback, 2010) และตัวทำละลายที่ใช้จะต้องละลายสารอื่นที่ไม่ต้องการออกมาได้น้อยหรือไม่ละลายออกมาเลย ในกรณีการสกัดสารที่มีความเข้มข้นต่ำตัวทำละลายที่เลือกใช้ไม่ควรมีผลต่อความเร็วในการสกัด (Rate of extraction) แต่ควรมีผลต่ออัตราการถ่ายเทมวลของสารที่ต้องการสกัด (Rate of mass transfer) (Mustafa, & Turner, 2011) ดังนั้น การเลือกใช้ตัวทำละลายที่มีสมบัติเหมาะสมในการละลายและการปลดปล่อยสารที่ต้องการสกัดจึงเป็นสิ่งสำคัญ หลักการละลายของสารในตัวทำละลายจะเกี่ยวข้องกับ Hansen solubility parameter โดยเป็นปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับแรงดึงดูดระหว่างโมเลกุล (Intermolecular force) แรงแผ่กระจาย (Dispersion force) และพันธะไฮโดรเจน (Hydrogen bond) ซึ่งมีความสัมพันธ์กับหลักการละลายของสารตามกฎ Like dissolves like (Srinivas et al., 2009) อย่างไรก็ตาม เนื่องจากมีปัจจัยหลายอย่างที่ส่งผลต่อการละลายในระหว่างกระบวนการสกัด ดังนั้น จึงควรพิจารณาถึงความสามารถในการละลายของสารในตัวทำละลายร่วมไปกับการพิจารณาถึงค่าใช้จ่ายและความปลอดภัยในการเลือกใช้ตัวทำละลาย

ในปัจจุบันนักวิจัยมีแนวโน้มเลือกใช้ตัวทำละลายที่เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม (Green solvents) มาใช้ในกระบวนการสกัดมากยิ่งขึ้น เช่น เอทานอล (Ethanol) เมทานอล (Methanol) เฮปเทน (Heptane) เฮกเซน (Hexane) คาร์บอนไดออกไซด์ (Carbondioxide) โพรเพน (Propane) และไดเมทธิลอีเทอร์ (Dimethyl ether) นอกจากนี้ เมื่อนำตัวทำละลายมาผสมกันเอธานอล โพรพานอล (Propanol) หรือผสมกับน้ำ จะเพิ่มความสามารถในการสกัดอีกทั้งยังมีความปลอดภัยสูงกว่าการสกัดแบบไม่ผสมกับน้ำ

1.2 อุณหภูมิ

อุณภูมิระหว่างการสกัดเป็นหนึ่งในปัจจัยหลักที่มีความสำคัญต่อประสิทธิภาพและความจำเพาะเจาะจง (Selectivity) ของตัวทำละลายในกระบวนการ SUBFE การใช้อุณหภูมิสูงสามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการสกัดและขัดขวางการจับกันระหว่างสารที่ต้องการสกัดกับเมตริกซ์ของตัวอย่าง จากการจับกันด้วยแรงหรือพันธะ เช่น แรงแวนเดอร์วาลส์ (Van Der Waals force) แรงดึงดูดระหว่างขั้ว (Dipole-dipole interaction) และพันธะไฮโดรเจน (Mustafa, & Turner, 2011) โดยพลังงานความร้อน (Thermal energy) จะไปทำลายการจับกันระหว่างโมเลกุลชนิดเดียวกัน (Cohesive interactions) และการจับกันระหว่างโมเลกุลที่ต่างกัน (Adhesive interactions) โดยกรณีหลังนี้หมายถึงการจับกันระหว่างสารที่ต้องการสกัดกับเมตริกซ์ของตัวอย่าง ซึ่งความร้อนจะไปลดพลังงานกระตุ้น (Activation energy) จึงทำให้สารถูกปลดปล่อย (Desorption process) ออกจากเมตริกซ์ได้ง่ายยิ่งขึ้น นอกจากนี้ อุณหภูมิที่สูงขึ้นยังช่วยลดแรงตึงผิวของตัวทำละลายตัวถูกละลาย (Solute) และเมตริกซ์ ทำให้เมตริกซ์ของตัวอย่างเปียกด้วยตัวทำละลาย (Solvent wetting) เพิ่มมากขึ้น (Mockel et al., 1987) อีกทั้งการเพิ่มอุณหภูมิยังไปลดความหนืดของตัวทำละลาย เพิ่มประสิทธิภาพในการซึมผ่าน (Penetration) ของตัวทำละลายเข้าสู่อนุภาคของเมตริกซ์ส่งผลให้การสกัดมีประสิทธิภาพดียิ่งขึ้น (Perry et al., 2000) ข้อดีอีกประการของการสกัดด้วยตัวทำละลายที่มีอุณหภูมิสูง คือ การเพิ่มขึ้นของอัตราการแพร่ (Diffusion rate) ซึ่งจะมีผลเพิ่มการถ่ายเทมวลของสารที่ต้องการสกัดไปสู่ตัวทำละลายทำให้การสกัดมีความรวดเร็วมากขึ้น แต่การเพิ่มอุณหภูมิก็อาจส่งผลให้ความจำเพาะเจาะจงในการสกัดลดลงและอาจไปทำลายสารประกอบที่ไม่ทนความร้อน โดยทำให้เกิดการแตกตัวหรือถูกทำลายด้วยปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส (Hydrolysis) (Fernandez-Gonzalez et al., 2008; Santivanez-Veliz et al., 2017) จุดประสงค์ของการใช้เทคนิค SUBFE ในการสกัดสารเพื่อต้องการเพิ่มการแพร่ของสารที่ต้องการสกัดในตัวทำละลาย และลดปริมาณการใช้ตัวทำละลายซึ่งการเพิ่มอุณหภูมิในการสกัดสามารถเพิ่มประสิทธิภาพการสกัดได้

1.3 ความดัน

ประโยชน์หลักของการเพิ่มความดันในกระบวนการสกัด คือ เมื่ออุณหภูมิในระหว่างการสกัดมีค่าสูงกว่าจุดเดือดของตัวทำละลายจะทำให้ตัวทำละลายยังคงอยู่ในสถานะของเหลว อีกทั้งการเพิ่มความดันที่อุณหภูมิสูงและการลดแรงตึงผิวของตัวทำละลายจะช่วยผลักดันให้ตัวทำละลายเข้าสู่รูพรุนของเมตริกซ์ของตัวอย่างได้มากขึ้น ส่งผลให้ตัวทำละลายสัมผัสกับสารที่ต้องการสกัดได้ดีขึ้น (Mustafa, & Turner, 2011; Zaibunnisa et al., 2009) นอกจากนี้ การเพิ่มความดันในระหว่างกระบวนการสกัดจะทำให้เมตริกซ์ของตัวอย่างแตกออก และเพิ่มการถ่ายเทมวลของสารที่ต้องการสกัดออกจากเมตริกซ์ไปสู่ตัวทำละลาย การใช้ความดันระหว่างการสกัดยังเพิ่มการถ่ายเทมวลสาร (Mass transfer) ทำให้สารที่ต้องการสกัดเข้าสู่ตัวทำละลายได้ง่ายขึ้น และยังไปทำลายฟองอากาศ (Air bubble) ที่อยู่ในเมตริกซ์ของตัวอย่าง ซึ่งมีผลขัดขวางการสัมผัสระหว่างสารที่ต้องการสกัดกับตัวทำละลาย (Mustafa, & Turner, 2011; Zaibunnisa et al., 2009)

1.4 สารเพิ่มประสิทธิภาพ

สารเพิ่มประสิทธิภาพ คือ สารที่เติมเข้าไปในระบบของไหลกึ่งวิกฤติเพื่อให้สามารถสกัดสารได้อย่างจำเพาะมากขึ้น สารเพิ่มประสิทธิภาพได้แก่ สารลดแรงตึงผิว สารต้านออกซิเดชั่น หรือการเติมแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ลงไปเพื่อทำให้น้ำมีความเป็นกรดเพิ่มขึ้นเล็กน้อยซึ่งจะเพิ่มประสิทธิภาพในการสกัดสารบางชนิดได้ (Mustafa, & Turner, 2011) ทั้งนี้ มีสิ่งที่พึงระวัง คือ การเติมสารเพิ่มประสิทธิภาพมากเกินไป จะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงพารามิเตอร์ของระบบได้

2. การประยุกต์ใช้การสกัดสารด้วยของไหลภายใต้สภาวะกึ่งวิกฤต

การสกัดของเหลวกึ่งวิกฤตเป็นเทคโนโลยีที่ค่อนข้างง่าย รวดเร็ว ใช้ตัวทำละลายในปริมาณต่ำ สามารถปรับสภาวะ (Condition) ของการสกัดให้มีความเหมาะสมกับสารที่มีความไวต่อการถูกทำลายด้วยออกซิเจนและแสงได้ อีกทั้งยังเป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม นอกจากนี้ การเตรียมตัวอย่างก่อนการสกัดทำได้ง่ายโดยเฉพาะตัวอย่างที่ไม่มีไขมัน จากการค้นคว้า พบว่า เทคนิค SUBFE ได้รับความนิยมในการสกัดสารหลายชนิด เช่น

Khuwijitjaru et al. (2012) ศึกษาการสกัดกลิ่นรสและสารประกอบฟีนอลิก (Phenolic compounds) จากอบเชยด้วยการสกัดด้วยน้ำกึ่งวิกฤติ (Subcritical water extraction) เปรียบเทียบกับการสกัดด้วยเมทนอล พบว่า การสกัดด้วยน้ำกึ่งวิกฤติมีประสิทธิภาพในการสกัด Caffeic Ferulic P-coumaric Protocatechuic และ Vanillic acids มากกว่าการสกัดด้วยเมทานอล รวมทั้งสารที่สกัดด้วยน้ำกึ่งวิกฤติ มีค่าการวิเคราะห์ความสามารถในการเป็นสารต้านออกซิเดชันด้วยวิธี DPPH สูงกว่าสารที่สกัดด้วยเมทานอล

Santos et al. (2015) ทำการศึกษาการสกัดน้ำมันจากเมล็ดแครมบี (Crambe seed; Crambe abyssinica H.) โดยการสกัดด้วยโพรเพน (Propane) ภายใต้สภาวะกึ่งวิกฤตเปรียบเทียบกับการสกัดด้วยซอกเลต (Soxhlet) โดยใช้ตัวทำละลายผสมเอ็น-เฮกเซน (n-hexane) และไดคลอโรมีเทน (Dichloromethane) จากการทดลอง พบว่า การสกัดด้วยโพรเพนภายใต้สภาวะกึ่งวิกฤต (51.0 wt%) ให้ผลผลิตสูงกว่าการสกัดด้วยซอกเลต (47.5 wt%)

Adil et al. (2008) ได้ทำการศึกษาเปรียบเทียบการสกัดสารประกอบฟีนอลิก (Phenolic compounds) จากกากเชอร์รี่เปรี้ยว (Sour cherry) ระหว่างการสกัดด้วยเอทานอลความดันสูง (High pressure ethanol extraction) กับสารสกัดด้วยคาร์บอนไดออกไซด์ร่วมกับเอทานอลภายใต้สภาวะกึ่งวิกฤต พบว่า การสกัดด้วยเอทานอลความดันสูงมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกอยู่ 3.80 gae มก./100 กรัม และมีประสิทธิภาพในการอนุมูลอิสระ (Antiradical efficiency) อยู่ 22 มก. DPPH/100 กรัม ส่วนสารสกัดด้วยคาร์บอนไดออกไซด์ร่วมกับเอทานอลภายใต้สภาวะกึ่งวิกฤตปริมาณสารประกอบฟีนอลิกอยู่ 0.6 gae มก./100 กรัม และมีประสิทธิภาพในการอนุมูลอิสระอยู่ 2.30 DPPH/100 กรัม

นอกจากนี้ เทคนิค SUBFE ยังได้รับความนิยมในการสกัดสีจากธรรมชาติ สารประกอบฟีนอลิก น้ำมันจากพืชน้ำมัน น้ำมันหอมระเหย สารต้านอนุมูลอิสระ แคโรทีนอย กลิ่นรส หรือสารโภชนเภสัชจากพืชหลากหลายชนิด (Bai et al., 2019; Ko et al., 2017; Munir et al., 2018; Nastic et al., 2018; Rout et al., 2008; Rutkowska, & Stolyhwo, 2009; Soto, & Luque de Castro, 2001; Tan et al., 2018; Teixeira et al., 2018) และเมื่อเปรียบเทียบกับเทคนิคอื่นๆ การสกัดด้วย SUBFE มีข้อได้เปรียบในเรื่องการใช้อุณหภูมิและแรงดันต่ำ ใช้เวลาในการสกัดสั้น และมีกระบวนการสกัดง่ายไม่ยุ่งยาก รวมทั้งเป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม (Herrero et al., 2006; Soto Ayala, & Luque de Castro, 2001)

ไดเมทิลอีเทอร์ (Dimethyl Ether, DME)

ไดเมทิลอีเทอร์ (Dimethyl Ether, DME) หรือรู้จักกันในนาม Methoxymethane, Wood ether, Dimethyl oxide หรือ Methyl ether เป็นสารประกอบอีเทอร์ที่มีขนาดเล็กที่สุด มีสูตรเคมีคือ CH_3OCH_3 มีสถานะเป็นก๊าซที่อุณหภูมิห้อง ไม่มีสีไม่มีกลิ่น ไม่มีพิษ (European Technology and Innovation Platform, 2020) สามารถทำให้เป็นของเหลวได้เมื่อถูกอัดภายใต้ความดัน ปกติถูกใช้เป็นสารขับเคลื่อนในกระป๋องสเปรย์หรือใช้เป็นสารทดแทนสารฟรีออนซึ่งสามารถลุกติดไฟได้ DME มีจุดเดือดที่ -25°ซ (ที่ 101.3 kPa) และมีความดันไออิ่มตัว (Saturated vapor pressure) ที่ 20°ซ (0.51 MPa) (European Food Safety Authority, 2009) DME จึงได้รับความนิยมนำมาใช้ทดแทนก๊าซปิโตรเลียมเหลว เช่น ใช้บรรจุใส่ถังก๊าซ ก๊าซกระป๋อง และเมื่อเกิดการเผาไหม้จะถูกเผาไหม้

ได้อย่างสมบูรณ์ ไม่เกิดเขม่า ไม่ปลดปล่อยก๊าซคาร์บอนมอนอกไซด์และมีออกไซด์ของไนโตรเจนต่ำกว่าเชื้อเพลิงทั่วไป และไม่มีส่วนประกอบของกำมะถันจึงไม่ก่อให้เกิดก๊าซซัลเฟอร์ไดออกไซด์ จึงไม่ส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม (Department of Energy Business, 2011)

1. กระบวนการผลิตไดเมทิลอีเทอร์

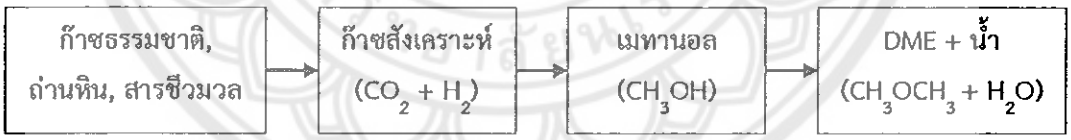
DME ส่วนใหญ่ถูกสังเคราะห์ขึ้นจากก๊าซธรรมชาติ ขยะอินทรีย์ หรือชีวมวล (Biomass) โดยกระบวนการผลิตสามารถแบ่งออกได้เป็น 2 วิธี คือ

1.1 การผลิตแบบทางอ้อมโดยผ่านกระบวนการดีไฮเดรชั่นของเมทานอล

การผลิตวิธีนี้เป็นวิธีที่ใช้กันโดยทั่วไปโดยก๊าซคาร์บอนมอนอกไซด์และก๊าซไฮโดรเจน (ก๊าซสังเคราะห์) ที่ได้จากกระบวนการก๊าซซิฟิเคชั่น (Gasification) ของถ่านหินหรือชีวมวล หรือจากกระบวนการรีฟอร์มมิ่ง (Reforming process) ของก๊าซธรรมชาติจะถูกนำมาทำปฏิกิริยากันเพื่อผลิตเมทานอล จากนั้นเมทานอลจะถูกเร่งด้วยตัวเร่งปฏิกิริยา (Catalyst) ซึ่งส่วนใหญ่จะเป็น Copper-based ($Cu/ZnO/Al_2O_3$) จากนั้น เมทานอลจะเข้าสู่กระบวนการคายน้ำโดยมีตัวเร่งปฏิกิริยาอีกประเภทหนึ่ง เช่น สารจำพวก Silica-alumina (γ-Al_2O_3) เมทานอลจะเกิดปฏิกิริยาควบแน่นเกิดเป็นดีเอ็มอีและน้ำ (Speight, 2015) ดังแสดงในภาพ 9

$$2CO + 4H_2 \longleftrightarrow 2CH_3OH \qquad \Delta H = -90.8\ kJ/mol\ CH_3OH \qquad 1$$

$$2CH_3OH \longleftrightarrow CH_3OCH_3 + H_2O \qquad \Delta H = -23.4\ kJ/mol\ CH_3OH \qquad 2$$



ภาพ 9 แสดงกระบวนการผลิตไดเมทิลอีเทอร์แบบทางอ้อม (Indirect DME Synthesis)

ที่มา: Reubroycharoen, 2008

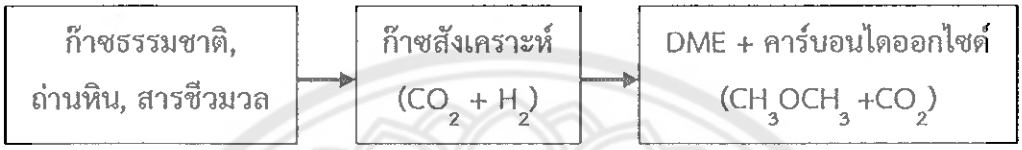
1.2 กระบวนการผลิตดีเอ็มอีแบบทางตรง

การผลิตดีเอ็มอีวิธีนี้เป็นเทคโนโลยีที่คิดค้นขึ้นใหม่ ซึ่งมีข้อดีกว่าวิธีการทางอ้อม คือ ไม่จำเป็นต้องมีขั้นตอนของการสังเคราะห์เมทานอลทำให้สามารถลดต้นทุนการผลิตลงได้ โดยใช้ระบบ Dual-catalyst ซึ่งสามารถผลิตเมทานอลสังเคราะห์ (Methanol synthesis) พร้อมกับการคายน้ำ (Dehydration) ทำให้ก๊าซสังเคราะห์สามารถเกิดปฏิกิริยาเคมีเกิดเป็นดีเอ็มอีได้โดยตรง

ในกระบวนการเดียว ซึ่งสามารถลดความยุ่งยากในขั้นตอนการผลิตเมทานอลรวมทั้งสามารถลดต้นทุนได้อีกด้วย (ภาพ 10) (European Technology and Innovation Platform, 2020)

$$3CO + 3H_2 \longleftrightarrow CH_3OCH_3 + CO_2 \quad 3$$

$$2CO + 4H_2 \longleftrightarrow CH_3OCH_3 + H_2O \quad 4$$



ภาพ 10 แสดงกระบวนการผลิตไดเมทิลอีเทอร์แบบทางตรง (Direct DME Synthesis)

ที่มา: Reubroycharoen, 2008

ปัจจุบันประเทศที่เป็นผู้ผลิตดีเอ็มอีรายใหญ่ ได้แก่ จีน ญี่ปุ่น เกาหลี และบราซิล นอกจากนี้ ยังมีอีกหลายประเทศที่กำลังอยู่ระหว่างการสร้างโรงงานผลิตดีเอ็มอี เช่น อียิปต์ อินโดนีเซีย อินเดีย และอิหร่าน โดยการกำหนดราคาของดีเอ็มอีที่ผลิตจากเมทานอล จะขึ้นกับราคาของเมทานอล และก๊าซปิโตรเลียมเหลว (ก๊าซ LPG) โดยทั่วไปแล้วเนื่องจากค่าความร้อนของดีเอ็มอีจะอยู่ที่ประมาณร้อยละ 62 ของค่าความร้อนของก๊าซ LPG ดังนั้น ราคาขายดีเอ็มอีจึงอยู่ที่ประมาณร้อยละ 75-90 ของราคาก๊าซ LPG

2. การประยุกต์ใช้ไดเมทิลอีเทอร์เหลวภายใต้สภาวะกึ่งวิกฤตเพื่อสกัดสารโภชนเภสัช

ไดเมทิลอีเทอร์เหลวเป็นตัวทำละลายที่ได้รับความนิยมใช้ร่วมกับเทคนิค SUBFE ในการสกัดสารโภชนเภสัช เนื่องจาก DME มีความดันต่ำและจุดเดือดต่ำรวมทั้งมีราคาถูก และมีความสามารถในการทำละลายที่ดี อีกทั้งไม่ทิ้งสิ่งตกค้างในผลิตภัณฑ์จึงทำให้ไดเมทิลอีเทอร์เหลวได้รับความสนใจและใช้เป็นตัวทำละลายในการสกัดสารโภชนเภสัชเพื่อใช้ในอาหาร (European Food Safety Authority (EFSA), 2015; Varlet et al., 2014)

Kanda et al. (2013) ศึกษาการสกัดคาเฟอีนจากชาเขียวด้วยเทคนิคไดเมทิลอีเทอร์เหลวภายใต้สภาวะกึ่งวิกฤต (Sub-critical fluid dimethyl ether; SUBDME) พบว่า เทคนิค SUBDME สามารถลดปริมาณคาเฟอีนเกือบทั้งหมดที่มีอยู่ในชาเขียว รวมทั้งยังคงปริมาณของคาเทชิน (Catechin) ในตัวอย่างได้ถึง 25.2-56.0% และยังมีเอพิกัลโลคาเทชิน กัลเลต (Epigallocatechin

gallate; EGCG) ซึ่งเป็นคาเทชินที่มีความสำคัญในการออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในตัวอย่างมากถึง 56.0% Hoshino et al. (2014) ศึกษาเปรียบเทียบการสกัดน้ำมันหอมระเหยจากเปลือกส้มยูซุ (Yuzu) และส้มพงกาน (Ponkan) ระหว่างการสกัดด้วย SUBDME กับการกลั่นด้วยไอน้ำ (Steam distillation method; SD) พบว่า การสกัดน้ำมันหอมระเหยจากส้มยูซุและส้มพงกานด้วยเทคนิค SD ให้ปริมาณผลผลิตอยู่ที่ 2.1% และ 4.7% ตามลำดับ โดยการสกัดด้วยเทคนิค SUBDME ให้ผลผลิตในปริมาณเกือบเท่ากับการสกัดด้วยเทคนิค SD

Kanda et al., (2014) ได้ศึกษาเปรียบเทียบการสกัดฟูโคแซนทีน (Fucoxanthin) จากสาหร่ายสีน้ำตาล (Brown seaweed) Undaria pinnatifida ด้วยเอทานอล ซอกเลต (Ethanol-Soxhlet) คาร์บอนไดออกไซด์วิกฤตยิ่งยวด (Supercritical carbon dioxide; $SCCO_2$) และ SUBDME ผลการทดลอง พบว่า การสกัดด้วย SUBDME ให้ปริมาณผลผลิตสูงที่สุดที่ 390 ไมโครกรัม/มก. โดยให้ผลผลิตมากกว่าการสกัดด้วย $SCCO_2$ ถึง 6.48 เท่า ต่อมา Hoshino et al. (2016) ทำการศึกษาเปรียบเทียบการสกัดลิพิดจากจุลินทรีย์ Labyrinthula Aurantiochytrium limacinum ระหว่างการสกัดด้วย $SCCO_2$ SUBDME เฮกเซน-ซอกเลต (Hexane-Soxhlet) และBligh-Dyer (BD) พบว่า การสกัดด้วย SUBDME (46.1 wt%) ให้ปริมาณผลผลิตมากกว่าการสกัดด้วย $SCCO_2$ (21.3 wt%) และ Hexane-Soxhlet (43.6 wt%) แต่น้อยกว่าการสกัดแบบ BD (50.7 wt%) อย่างไรก็ตาม การสกัดด้วย SUBDME สามารถลดขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างได้ เช่น การทำแห้งและการทำลายผนังเซลล์ (Cell-disruption)

นอกจากนี้ ยังมีการใช้เทคนิค SUBDME ในการสกัดสารแคโรทีนอย (Carotenoids) สกัดโปรตีนจากแครอทและฟักทองญี่ปุ่น (Japanese squash) สกัดไฮโดรคาร์บอน (Hydrocarbons) และลิพิด (Lipids) จากสาหร่าย Botryococcus braunii สกัดสารแอสตาแซนทิน (Astaxanthin) จากสาหร่าย Haematococcus pluvialis รวมทั้งนำไปสกัดน้ำมันจากเมล็ดยางพารา เมล็ดกัญชง (Hemp; Cannabis sativa L.) และน้ำมันตับปลาทูน่า (Boonnoun et al., 2018; Boonnoun, & Kurita, 2014; Fang et al., 2018; Furukawa et al., 2016; Goto et al., 2015; Subratti et al., 2019)

การตรวจสอบการใช้ได้ของวิธี (Method validation)

การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธี คือ กระบวนการที่พิสูจน์ว่าวิธีทดสอบมีความเหมาะสมที่จะนำไปใช้ทดสอบตามวัตถุประสงค์ที่ต้องการใช้โดยมีหลักฐานยืนยัน (Eurachem, 2014) หลักฐานที่ใช้ในการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบ เพื่อยืนยันของห้องปฏิบัติการ คือ ผลการตรวจสอบคุณลักษณะเฉพาะของวิธี (Method performance characteristic) ซึ่งเป็นข้อมูลที่แสดงถึงคุณภาพระดับความน่าเชื่อถือของการทดสอบภายใต้เงื่อนไข ความจำเพาะของวิธีทดสอบ โดยใช้หลักการทาง

สถิติมาแสดง (AOAC, 2002) ได้แก่ ความเที่ยงตรง (Precision) ความแม่น (Accuracy) ขีดจำกัดในการตรวจพบ (Limit of Detection; LOD) ขีดจำกัดในการวัดเชิงปริมาณ (Limit of Quantitation; LOQ) ความสัมพันธ์เชิงเส้นตรง (Linearity) ความคงทนของวิธี (Ruggedness & Robustness)

1. คุณลักษณะเฉพาะของวิธีทดสอบ

คุณลักษณะเฉพาะของวิธีทดสอบ ตามแนวทางของ Eurachem (2014) และ NATA Technical Note 17 (2009) มีดังนี้

1.1 ความแม่น (Accuracy) ความแม่นเป็นคุณลักษณะที่ชี้ผลการทดสอบมีค่าเข้าใกล้ค่าจริงหรือค่าอ้างอิงหรือค่าที่ยอมรับ เนื่องจากในทางปฏิบัติยากที่จะทราบค่าจริงจึงใช้วิธีเปรียบเทียบกับค่าที่ยอมรับแทน โดยทำได้ 2 วิธี ดังนี้

1.1.1 การเปรียบเทียบกับค่าอ้างอิงหรือค่าที่ยอมรับ (Reference value) ทำได้ 2 วิธี คือ ทดสอบเปรียบเทียบกับวัสดุอ้างอิง (Reference Material; RM) และอีกวิธี คือ การทดสอบตัวอย่างกับวิธีอื่นที่อ้างอิงได้ เช่น Reference method หรือ Standard method จากนั้นจึงเปรียบเทียบผลโดยใช้หลักทางสถิติ

1.1.2 การตรวจสอบค่าคืนกลับ (Recovery test) กรณีไม่มีวัสดุอ้างอิงการตรวจสอบความแม่นให้ทำโดยการเติมธาตุที่ทดสอบ ซึ่งเป็นสารมาตรฐานและรู้ค่าที่แน่นอนในปริมาณเล็กน้อยลงในตัวอย่าง (Spike/fortified sample) แล้วทดสอบและคำนวณหา % Recovery แทน โดยการตรวจสอบค่าคืนกลับจะทำที่ 3 ระดับความเข้มข้น (NATA Technical Note 17, 2009) เกณฑ์การยอมรับของ % Recovery ขึ้นอยู่กับวิธีการทดสอบตามมาตรฐานที่ระบุไว้

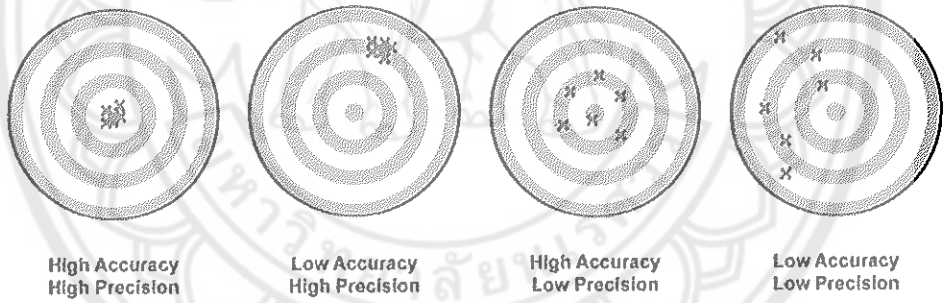
1.2 ความเที่ยงตรง (Precision) ความเที่ยงตรงเป็นคุณลักษณะที่แสดงความสามารถในการทดสอบซ้ำตัวอย่างแล้วให้ผลการทดสอบที่ใกล้เคียงกัน หรือหมายถึงการทดสอบนั้นให้ผลที่ใกล้เคียงเมื่อทำด้วยวิธีเดียวกันภายใต้สภาวะที่ใกล้เคียงกัน มักแสดงในรูปของค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Standard Deviation; s) หรือค่าความแปรปรวน (Variance; s2) หรือสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน (Coefficient of Variation; CV) หรือค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (Relative Standard Deviation; RSD) คำที่แสดงค่าความเที่ยงตรงในวิธีทดสอบต่างๆ มักใช้คำว่า Repeatability หรือ Reproducibility อย่างไรก็ตาม ความเที่ยงตรงไม่ได้บอกถึงความถูกต้องของผลการทดสอบ แต่ชี้ว่าการทดสอบนั้นมีความสม่ำเสมอเที่ยงตรงในระดับใดเมื่อมีการทดสอบซ้ำ โดยทั่วไปการตรวจสอบความเที่ยงตรงถูกแบ่งออกเป็น 3 สภาวะ ได้แก่

1.2.1 Repeatability condition เป็นสภาวะการทดสอบที่ทำในสภาวะเดิมทั้งหมด ได้แก่ ตัวอย่าง เครื่องมือ สารเคมีวิธีทดสอบ ผู้ทดสอบและห้องปฏิบัติการเดียวกัน ทดสอบซ้ำ

ในช่วงเวลาที่สั้นที่สุด เช่น 2 ถึง 3 วัน ข้อมูลที่ได้จากการตรวจสอบสภาวะแบบนี้สามารถใช้ชี้คุณลักษณะของวิธีได้แต่ไม่สามารถใช้แสดงความเที่ยงตรงของการทดสอบในระยะยาวได้

1.2.2 Intermediate precision condition เป็นสภาวะการทดสอบที่ทำในสถานที่เดิม แต่มีการเปลี่ยนแปลงสภาวะบางประการ เช่น เปลี่ยนผู้ทดสอบ เพื่อให้ครอบคลุมการเปลี่ยนแปลงที่อาจเกิดขึ้นได้ในสภาวะการทำงานจริง ข้อมูลที่ได้สามารถนำไปใช้ควบคุมคุณภาพการทดสอบในระยะยาวของห้องปฏิบัติการได้

1.2.3 Reproducibility condition เป็นการวัดตัวอย่างเดิม แต่มีการเปลี่ยนแปลงสภาวะบางอย่าง เช่น เปลี่ยนผู้ทดสอบ เครื่องมือและห้องปฏิบัติการ การตรวจสอบด้วยสภาวะเช่นนี้ใช้ในกรณีที่ต้องการให้วิธีทดสอบเป็นวิธีมาตรฐานสามารถใช้กับห้องปฏิบัติการทั่วไป ความแตกต่างของความเที่ยงตรงและความแม่น แสดงให้เห็นได้อย่างชัดเจนดังภาพ 11 ซึ่งมีผลการทดสอบ 4 แบบ ห้องปฏิบัติการบางแห่งอาจให้ผลการทดสอบที่มีค่าความเที่ยงตรงสูงแต่มีความแม่นต่ำ ในทางกลับกันบางแห่งอาจให้ค่าความแม่นสูงแต่ความเที่ยงตรงต่ำ แต่ที่สำคัญที่สุดคือทุกห้องปฏิบัติการต้องมีทั้งความเที่ยงตรงและความแม่นสูง



ภาพ 11 แสดงความแม่นและความเที่ยง

ที่มา: Keller, 2015

1.3 ขีดจำกัดในการตรวจพบ (Limit of Detection; LOD) หมายถึง ปริมาณความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถตรวจวัดได้ แต่ไม่สามารถแสดงปริมาณได้อย่างมีความถูกต้องหรือค่าความแม่น เป็นค่าที่ต่างจากค่าศูนย์และมีค่ามากกว่าค่าความไม่แน่นอนของวิธี ค่า LOD ของวิธีทดสอบต่างกับค่าสัญญาณต่ำสุดของเครื่องมือทดสอบที่ใช้อัตราส่วนระหว่างสัญญาณกับสัญญาณรบกวน (Signal to the noise ratio) โดยทั่วไป LOD มีค่าประมาณ 3 เท่าของส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของสารละลายแบลงค์ (Blank) ของตัวอย่าง

1.4 ขีดจำกัดในการวัดเชิงปริมาณ (Limit of Quantitation, LOQ) คือ ปริมาณความเข้มข้นต่ำสุดของสารที่ทดสอบ ซึ่งสามารถหาปริมาณได้โดยมีความแม่นและความเที่ยงตรงเป็นที่ยอมรับ โดยทั่วไป LOQ จะมีค่าเป็น 3 เท่าของ LOD หรือประมาณ 10 เท่าของส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน แต่บางกรณี LOQ อาจมากกว่าหรือน้อยกว่า 10 เท่าของส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานก็ได้ ขึ้นอยู่กับแต่ละเทคนิคของการทดสอบ และการนำผลการตรวจสอบความแม่นมาพิจารณาปรับตามความเหมาะสม

1.5 ความสัมพันธ์เชิงเส้นตรง (Linearity) หรือช่วงความเป็นเส้นตรง เป็นคุณลักษณะเฉพาะของวิธีทดสอบที่แสดงความสัมพันธ์อย่างเป็นสัดส่วนโดยตรงระหว่างปริมาณที่ทราบค่ากับปริมาณจากการทดสอบ จำเป็นต้องตรวจสอบสำหรับวิธีที่มีช่วงการทดสอบหรือมีช่วงการใช้งานที่กว้าง การตรวจสอบความความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงทำได้ 2 กรณี คือ

1.5.1 ความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงของเครื่องมือ เป็นคุณลักษณะที่แสดงความสัมพันธ์อย่างเป็นสัดส่วนโดยตรงระหว่างสัญญาณจากเครื่องมือวัด (Response) และความเข้มข้นของสารในช่วงของการใช้งาน โดยใช้กราฟมาตรฐาน (Calibration curve)

1.5.2 ความสัมพันธ์เชิงเส้นของวิธีทดสอบ เป็นความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณของสารมาตรฐานที่วัดกับปริมาณที่วัดได้ ทดสอบโดยใช้วัสดุอ้างอิงรับรองหรือวัสดุอ้างอิงที่มีเนื้อสารเดียวกันหรือใกล้เคียงกับตัวอย่าง

1.6 การทดสอบความคงตัว (Stability) (NATA Technical Note 17, 2009)

1.6.1 การทดสอบความคงตัวของอนุพันธ์ (Post-preparative stability) ทดสอบความคงตัวของอนุพันธ์เมื่อตั้งทิ้งไว้ในเครื่องฉีดสารอัตโนมัติตามอุณหภูมิที่กำหนดเพื่อรอการวิเคราะห์ เกณฑ์การยอมรับ ค่าความเข้มข้นที่ตรวจวัดได้ต้องเปลี่ยนแปลงไม่เกิน 15%

1.6.2 การทดสอบความคงตัวของสารละลายมาตรฐาน (Stock-solution stability) ตามสภาวะที่จัดเก็บและวิเคราะห์เปรียบเทียบพื้นที่ใต้กราฟของ Stock solution ที่เก็บไว้ตามระยะเวลาที่กำหนดกับพื้นที่ใต้กราฟของ Stock solution ที่เตรียมขึ้นใหม่ เกณฑ์การยอมรับค่าพื้นที่ใต้กราฟของ Stock solution ที่เก็บไว้ต้องเปลี่ยนแปลงไม่เกิน 5%

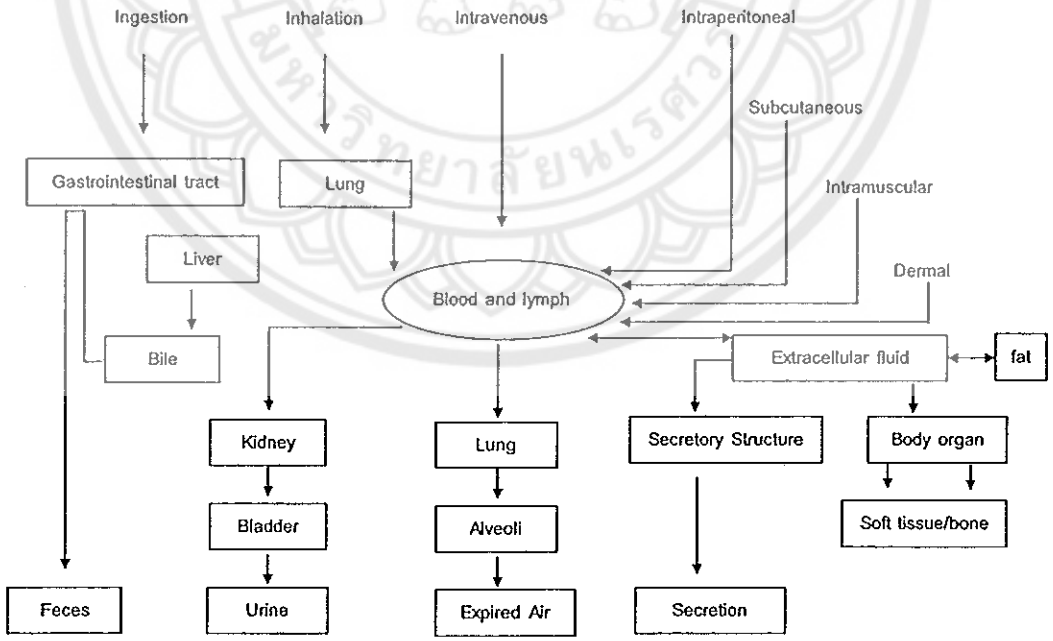
1.7 ความแข็งหรือความคงทนของวิธี (Ruggedness and Robustness) ความแข็งหรือความคงทนของวิธีเป็นคุณลักษณะที่แสดงความสามารถของวิธีที่ผลการทดสอบจะไม่เปลี่ยนแปลงเมื่อมีการเปลี่ยนแปลงสภาวะเพียงเล็กน้อยจากสภาวะปกติ อาทิ ความแตกต่างของอุณหภูมิ ความเป็นกรด ด่าง ระยะเวลาดำเนินการบางขั้นตอน โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อตรวจสอบความแข็งแรงของวิธีทดสอบภายใต้สภาวะการทำงานปกติที่มีตัวแปรตัวใดหรือหลายตัวเปลี่ยนแปลง

การศึกษาความเป็นพิษ

สารพิษ (Toxicant) หมายถึง สารที่เป็นอันตรายต่อมนุษย์ โดยอาจเป็นอันตรายเฉพาะกรณีที่สัมผัสสารพิษ เช่น เมื่อกรดหกรดหรือเปื้อนผิวหนังจะกัดผิวหนังเป็นแผลหรือเป็นอันตรายต่อระบบต่างๆ ของร่างกาย หรือกรณีที่รับสารนั้นเข้าสู่ร่างกาย เช่น การกิน หรือหายใจเอาสารพิษเข้าไป เป็นต้น สารพิษบางชนิดทำอันตรายต่อปอด บางชนิดทำอันตรายต่อตับ บางชนิดทำอันตรายต่อสมอง

1. การได้รับสารพิษเข้าสู่ร่างกายทางการกิน

การได้รับสารพิษเข้าสู่ร่างกายทางการกิน (Ingestion) สารพิษจะผ่านปากและลิ้นสู่ลำคอ ผ่านหลอดอาหารลงสู่กระเพาะอาหาร ตลอดเส้นทางเดินอาหาร (Gastrointestinal tract) ที่ประกอบด้วยเยื่อบุซึ่งไวต่อการสัมผัสทำให้เกิดการระคายเคืองและเกิดการอาเจียนออก ซึ่งเป็นลักษณะของการป้องกันตนเองของร่างกายอย่างหนึ่ง สารพิษที่มีฤทธิ์ระคายเคืองและกัดกร่อนจะทำอันตรายต่อเยื่อบุทางเดินอาหารทำให้เกิดแผลที่ทางเดินอาหารได้ สารพิษเมื่อลงสู่กระเพาะจะปะปนกับน้ำย่อย (Gastric juice) ซึ่งมีฤทธิ์เป็นกรดและช่วยในการแตกตัวของสารพิษ กระเพาะอาหารเป็นทางที่สารพิษเข้าสู่ร่างกายได้ดีทางหนึ่ง เนื่องจากสารพิษจะถูกกักเก็บเป็นเวลานานที่กระเพาะอาหาร จากกระเพาะอาหารสารพิษจะผ่านสู่ลำไส้เล็กซึ่งเป็นส่วนที่สารพิษจะซึมผ่านเข้าสู่กระแสเลือดได้มาก เนื่องจากลำไส้เล็กมีความยาวและพื้นที่มากจึงทำให้เกิดการดูดซึมได้มากขึ้น ดังแสดงในภาพ 12



ภาพ 12 แสดงเส้นทางการได้รับสารพิษเข้าสู่ร่างกายจนถึงการกำจัดออกจากร่างกาย

ที่มา: คคนางค์ โพศรีดี, 2555

2. การทดสอบความเป็นพิษ

การทดสอบความเป็นพิษนิยมทำในสัตว์ทดลองแล้วนำมาทำนายผลที่อาจเกิดขึ้นกับมนุษย์ โดยถือว่าอันตรายจากสารพิษที่เกิดกับสัตว์ทดลองควรจะเป็นแบบเดียวกับอันตรายที่จะเกิดขึ้นกับมนุษย์ ในการทดสอบสารพิษจะทำให้ทราบถึงการตอบสนองของร่างกายต่อปริมาณหรือขนาดของสารพิษ โดยส่วนใหญ่แล้วจะเป็นการทดสอบสารพิษกับสารชนิดใหม่ที่ยังไม่มีข้อมูลมาก่อน โดยวิธีการทดสอบความเป็นพิษของสารนั้นสามารถทดสอบได้ทั้งการทดสอบพิษแบบเฉียบพลัน การทดสอบพิษแบบกึ่งเฉียบพลัน การทดสอบพิษแบบกึ่งเรื้อรัง และการทดสอบพิษแบบเรื้อรัง การทดสอบความเป็นพิษสามารถแบ่งการทดสอบ ได้ดังนี้ (รภัทร เอกนิธิเศรษฐ์, 2557)

2.1 การทดสอบการเกิดพิษแบบเฉียบพลัน (Acute toxicity test)

เป็นวิธีการทดสอบอาการพิษที่เกิดขึ้นในเวลาสั้นๆ หลังจากได้รับสารที่ทดสอบเพียงครั้งเดียว นิยมทดสอบกับสารเคมีที่ผลิตใหม่และพัฒนาขึ้นใหม่เพื่อนำมาเป็นข้อมูลจำแนกความเป็นอันตรายของสาร กลไกการออกฤทธิ์ ความเป็นพิษต่ออวัยวะเฉพาะ เป็นข้อมูลที่ประกอบการพิจารณาประเมินความเป็นพิษและปฏิกิริยาต่อมนุษย์ รวมทั้งให้ข้อมูลเปรียบเทียบความสัมพันธ์ของสารที่ได้รับและอาการพิษที่แสดงออกของสารแต่ละชนิด

การทดสอบความเป็นพิษแบบเฉียบพลันโดยการกิน เป็นการทดสอบสารที่ต้องการทดสอบแล้วทำให้สัตว์ทดลองตาย เช่น LD_{50} หมายถึง ปริมาณสารที่สัตว์ทดลองได้รับโดยตรงเพียงครั้ง 1 ครั้ง และทำให้สัตว์ทดลองตายครึ่งหนึ่งของจำนวนสัตว์ที่ใช้ ส่วนมากจะทำการทดสอบในสัตว์กัดแทะโดยแบ่งกลุ่มสัตว์ทดลองอย่างน้อย 3 กลุ่มให้ปริมาณสาร คือ ขนาดที่ไม่แสดงอาการ ขนาดที่แสดงอาการหรือตายบ้าง และขนาดที่แสดงอาการอย่างมาก สังเกตอาการที่แสดงอย่างละเอียด เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และติดตามอาการจนถึง 14 วัน อาการที่สังเกตตั้งแต่ระคายเคือง การหายใจ ท้องเสีย ชัก และตาย การทดสอบต้องควบคุมปัจจัยหลายอย่าง เช่น ชนิด อายุ น้ำหนัก เพศ สุขภาพของสัตว์ทดลอง อาหาร วิธีที่สัตว์ได้รับสาร อุณหภูมิ เวลา ฤดูกาล และความผิดพลาดของผู้ทดลอง นำผลการทดลองมาเขียนกราฟระหว่างปริมาณสารที่ได้รับกับความถี่ที่สัตว์ตาย การจัดลำดับความเป็นพิษเฉียบพลันของสาร (Acute toxicity) ดังแสดงในตาราง 2

ตาราง 2 แสดงการจัดลำดับความเป็นพิษของสารเคมีในระยะความเป็นพิษแบบเฉียบพลัน

ระดับความเป็นพิษ	LD_{50} โดยการกิน (มก./กก.)	LD_{50} โดยการสัมผัส (มก./กก.)	LD_{50} โดยการหายใจ (ppm/V)
พิษมากที่สุด (Super toxic)	≤ 5	≤ 50	≤ 100
พิษมากอย่างยิ่ง (Extremely toxic)	5-50	50-200	100-500
พิษมาก (Very toxic)	50-300	200-1,000	500-2,500
พิษปานกลาง (Moderate toxic)	300-2,000	1,000-2,000	10,000-30,000
พิษน้อย (Slightly Toxic)	2,000-5,000	2,000-5,000	2,500-5,000

แหล่งที่มา: Globally Harmonized of Classification and Labelling of Chemical (GHS), 2011

2.2 การทดสอบการเกิดพิษแบบกึ่งเฉียบพลัน (Sub-acute toxicity test)

เป็นการทดสอบความเป็นพิษที่สัตว์ทดลองได้รับสารหลายครั้งในช่วงเวลาหนึ่ง แต่ไม่นานจนเป็นรุ่นอายุของสัตว์ อาจทดสอบโดยการกินในสัตว์กัดแทะเป็นเวลา 28 ถึง 90 วัน หรือทางผิวหนังเป็นเวลา 21 ถึง 28 วัน หรือทางหายใจเป็นเวลา 28 ถึง 90 วัน ข้อมูลที่ได้มีความจำเป็นต่อการทดสอบแบบเรื้อรังและเป็นข้อมูลสำหรับการประเมินปริมาณของสารพิษขนาดสูงสุดที่ได้รับทุกวันแล้วไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงใดๆ ต่อร่างกายหรือไม่แสดงอาการผิดปกติจนสามารถสังเกตได้ (No observed effect level, NOEL) และยังให้ข้อมูลเกี่ยวกับอวัยวะเป้าหมายของสารพิษรวมทั้งข้อมูลการสะสมของสารพิษ

การทดสอบแบบ 28 ถึง 90 วัน เป็นการทดสอบโดยผสมสารที่ต้องการทดสอบกับอาหาร หรือ ละลายในน้ำดื่ม และทำการควบคุมปัจจัยทางกายภาพ เช่น กรง อุณหภูมิ ความชื้น อากาศที่ถ่ายเท ความสะอาด การเตรียมสาร ปริมาณของสาร ปัจจัยทางชีวภาพต้องตระหนัก เช่น ชนิดของสัตว์ควรทดสอบควรมีอย่างน้อย 2 ชนิด โดยเป็นสัตว์กัดแทะและสัตว์ชนิดอื่น และต้องระบุถึงสายพันธุ์ของสัตว์ อายุ เพศ สุขภาพ และความเครียดซึ่งนับเป็นปัจจัยที่มีผลต่อการทดสอบ ข้อมูลที่ควรตรวจสอบขณะที่ดำเนินการทดสอบ (Interim data) คือ ลักษณะภายนอกที่สังเกตได้ ได้แก่ น้ำหนักตัว อัตราการกินอาหาร พฤติกรรม อัตราการหายใจ ผิวหนัง ลักษณะของแก้วตาและเรตินา การตาย อาการป่วย ผลการตรวจเลือดทางชีวเคมี ตรวจปัสสาวะและอุจจาระ และ

ข้อมูลที่ควรตรวจสอบเมื่อสิ้นสุดการทดลองเพิ่มเติม เช่น การผ่าชากดูอวัยวะภายใน เช่น ตับ ไต ต่อมน้ำเหลืองและตรวจพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อ

2.3 การทดสอบการเกิดพิษแบบกึ่งเรื้อรัง (Sub-chronic toxicity test)

การทดสอบพิษกึ่งเรื้อรังจะทำได้โดยใช้ความเข้มข้นของสารพิษในปริมาณต่ำให้แก่สัตว์ทดลองเป็นเวลานาน การทดสอบการเกิดพิษแบบกึ่งเรื้อรังใช้เวลาประมาณ 1-3 เดือน หลักการของการศึกษาการเกิดพิษแบบกึ่งเรื้อรัง คือ การหาระดับของสารพิษที่ไม่เกิดอันตราย (No-observed effect level) และอวัยวะเป้าหมายของสารพิษ หลังจากให้สัตว์ทดลองได้รับสารหลายครั้งติดต่อกันเป็นเวลา 90 วัน การทดลองนิยมใช้สัตว์ทดลอง 2 ชนิด คือ หนูและสุนัข โดยให้สัตว์ทดลองได้รับสารพิษทางปากและใช้ขนาดของสารที่แตกต่างกัน โดยที่ขนาดของสารที่ใช้สูงสุดไม่ควรทำให้สัตว์ทดลองตายมากกว่าร้อยละ10 ของสัตว์ทดลองทั้งหมด จำนวนสัตว์ทดลองที่ใช้ในการทดลอง ถ้าเป็นหนูควรใช้ประมาณ 10-20 ตัว/เพศ/ขนาดของสารและเมื่อสัตว์ทดลองได้รับสารพิษแล้วให้สังเกตดูสัตว์ทดลอง 1-2 ครั้งต่อวันจนครบเวลา 90 วัน สิ่งที่สังเกต เช่น น้ำหนัก การกินอาหาร การหายใจ เป็นต้น เมื่อครบเวลา 90 วัน นำสัตว์ทดลองไปตรวจเลือดเนื้อเยื่อและอวัยวะต่างๆ ต่อไป

2.4 การทดสอบการเกิดพิษแบบเรื้อรัง (Chronic toxicity test)

การทดสอบการเกิดพิษแบบเรื้อรังเป็นการทดสอบที่ใช้สารในปริมาณน้อย หลายครั้งและเป็นเวลานานอาจถึงหนึ่งหรือมากกว่าหนึ่งชั่วอายุของสัตว์ทดลอง การทดสอบความเป็นพิษแบบเรื้อรังเพื่อเก็บข้อมูลผลหรืออาการพิษหลายด้าน และเพื่อกำหนดค่าขอบเขตความปลอดภัยในการควบคุมการใช้สารเคมี การทดสอบส่วนมากจะใช้สัตว์ทดลอง 2 ชนิด ชนิดแรกควรเป็นหนูทดลองที่ทำการทดลองอย่างน้อย 1.5-2 ปี ข้อมูลที่เก็บหลังจาก 1 ปี เพื่อแสดงความเป็นพิษแบบเรื้อรังโดยที่ไม่ได้เป็นผลจากการมีอายุมาก ข้อมูลที่เก็บหลังจาก 1.5 ปีในหนูไมส์ (Mice) หรือ 2 ปีในหนูแรท (Rats) เพื่อทดสอบการเป็นมะเร็ง สัตว์ทดลองอีกชนิดหนึ่งไม่ควรเป็นสัตว์กัดแทะซึ่งอาจเป็นสุนัขหรือลิง ทำการทดสอบความเป็นพิษแบบเรื้อรังโดยการให้สารที่ทดสอบทางอาหาร น้ำดื่ม ผสมในแคปซูลหรือทางหายใจ ขนาดที่ให้เป็นขนาดสูงสุดที่สัตว์ทนได้และไม่แสดงอาการพิษ (Maximum tolerated dose, MTD) และอีก 2 ขนาด น้อยกว่า MTD อาจเป็น 0.25 MTD และ 0.125 MTD โดยขนาดต่ำสุดไม่ควรแสดงอาการพิษหรืออาจประมาณขนาดของสารจากผลการทดสอบแบบกึ่งเรื้อรัง MTD คือ ขนาดของสารสูงสุดที่ทำให้น้ำหนักของสัตว์ทดลองลดลงน้อยกว่า 10% เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมและไม่ทำให้สัตว์ตาย เกิดอาการพิษหรือเกิดพยาธิสภาพอาจทำให้ตายเร็วกว่าปกติ ในการดูแลสัตว์ทดลองต้องคำนึงปัจจัยหลายอย่าง เช่น กรง และสภาพแวดล้อมเหมือนกับการทดสอบแบบกึ่งเรื้อรัง ข้อมูลที่ทำการศึกษาเหมือนกับการทดสอบแบบกึ่งเรื้อรัง

3. การตรวจสอบการเกิดพิษและตัวชี้วัด

ตัวชี้วัดความเป็นพิษ ได้แก่ อัตราการตาย สังเกตพฤติกรรมและอาการของสัตว์ ค่าทางโลหิตวิทยา ค่าเคมีของเลือด ตรวจดูลักษณะของอวัยวะต่างๆ การตรวจทางพยาธิวิทยา และการประเมินการทำงานของระบบร่างกาย รายละเอียดต่างๆ มีดังต่อไปนี้ (สำนักอาหาร สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา, 2012)

3.1 อัตราการตาย (Mortality)

จำนวนสัตว์ทดลองที่ตายมากกว่าร้อยละ 10 ไม่ว่าจะพบในกลุ่มทดลองหรือกลุ่มควบคุมเป็นสิ่งที่ควรคำนึงถึง ยกเว้นในการศึกษาแบบตลอดช่วงชีวิตสัตว์ทดลอง (Life time) ซึ่งอัตราการตายในกลุ่มที่ได้รับสารในขนาดสูงอาจเป็นการบ่งบอกว่ามีการเลือกใช้ขนาดทดสอบที่ไม่เหมาะสม อัตราการตายที่สูงจะเปลี่ยนแปลงค่าของการทำลายเซลล์ (Autolysis) ของเนื้อเยื่อและอวัยวะต่างๆ ให้เพิ่มขึ้นเป็นผลทำให้ได้ข้อมูลที่ไม่มีความสมบูรณ์ นอกจากนี้ ปัจจัยที่ต้องคำนึงถึงในการอภิปรายผล เช่น อัตราการตายสูงอาจเป็นผลมาจากภาวะการณ์ติดเชื้อหรือปัญหาอื่นๆ ที่ไม่ได้เกี่ยวข้องกับสารที่ทดสอบจะต้องนำมาพิจารณาร่วมด้วย

3.2 การสังเกตพฤติกรรมและอาการของสัตว์ (Cage-side observations)

การสังเกตพฤติกรรมและอาการของสัตว์ควรทำเป็นประจำอย่างน้อยวันละ 1-2 ครั้ง ในสัตว์ทดลองทุกตัวตลอดการศึกษา เพื่อประเมินลักษณะอาการทั่วไปของสารเคมีที่ทดสอบต่อผลทางเภสัชวิทยา หรือผลกระทบทางด้านพิษวิทยา เพื่อประเมินภาวะการเจ็บป่วยและการเสียชีวิตที่เกิดขึ้น เช่น การประเมินสุขภาพโดยรวมของสัตว์ทดลองซึ่งอาจส่งผลให้มีการปรับเปลี่ยนแบบแผนการทดลองหรือวิธีการทดลอง เช่น กรณีที่สัตว์มีอาการชักอาจแสดงถึงความเป็นพิษต่อระบบประสาทส่วนกลาง ดังนั้นควรมีการทดสอบพิษต่อระบบประสาทของสารนั้นเพิ่มเติม

3.3 ข้อมูลน้ำหนักตัวและปริมาณการบริโภค (Body weight and feed intake data)

โดยหลักพื้นฐานทั่วไปกลุ่มสัตว์ทดลองและกลุ่มควบคุมจะถูกชั่งน้ำหนักสัปดาห์ละ 1 ครั้ง และทำการบันทึกปริมาณการบริโภคของสัตว์ตลอดการศึกษา การลดลงของน้ำหนักหรืออัตราการเพิ่มน้ำหนักของสัตว์ทดลองเป็นภาวะที่ไวในการบ่งบอกความเป็นพิษ

3.4 ด้านจักษุวิทยา (Ophthalmology)

การตรวจสอบตาในสัตว์ทดลองทุกตัวจะถูกตรวจสอบเมื่อเริ่มต้นและสิ้นสุดการศึกษา ถึงแม้ว่าการเปลี่ยนแปลงทางด้านจักษุวิทยาจะไม่แสดงให้เห็นบ่อยแต่เป็นสิ่งสำคัญของการประเมินความเป็นพิษของอาหารและสิ่งทดลอง

3.5 ด้านโลหิตวิทยา (Haematology)

การตรวจสามารถเก็บตัวอย่างในสภาวะที่สัตว์ทดลองอดหรือไม่อดอาหารที่ช่วงเวลาแตกต่างกันในระหว่างการศึกษา โดยทั่วไปสำหรับการศึกษาทางด้านการเกิดพิษเรื้อรังจะตรวจวัดตอนเริ่มต้น ระหว่างช่วงใดช่วงหนึ่งของการศึกษาและเมื่อสิ้นสุดการศึกษา โดยสามารถวัดค่าปริมาตรเม็ดเลือดแดงอัดแน่น (Haematocrit) ความเข้มข้นของเลือด (Haemoglobin concentration) จำนวนเม็ดเลือด แดง (Erythrocyte count) จำนวนของเม็ดเลือดขาวทั้งหมดและจำนวนต่อชนิดของเม็ดเลือดขาว (Total and differential leukocyte counts) ปริมาณเฉลี่ยของฮีโมโกลบินในเม็ดเลือดแดง (Mean corpuscular haemoglobin) รวมทั้งประเมินศักยภาพในการ แข็งตัวของเลือด (Clotting time, prothrombin time, thromboplastin time) และการเปลี่ยนแปลงในเซลล์ไขกระดูกเป็นการประเมินว่าระบบการสร้างเม็ดเลือดได้รับความเสียหายหรือไม่

3.6 ด้านเคมีคลินิก (Clinical chemistry) (ประสาร เปรมะสกุล, 2554)

โดยก่อนทดสอบควรให้สัตว์อดอาหารก่อนอย่างน้อย 8 ชั่วโมง สิ่งที่ทดสอบ คือ

3.6.1 Blood urea nitrogen (BUN) คือ ค่าไนโตรเจนจากยูเรียที่อยู่ในเลือด เนื่องจากสารยูเรียเป็นผลิตผลสุดท้ายจากการเผาผลาญโปรตีนที่ตับและขับออกทางไต และปัสสาวะจะมากหรือน้อยขึ้นกับสภาวะของร่างกาย ใช้วิเคราะห์ประสิทธิภาพการทำงานของไต การกรองของกรวยไต

3.6.2 ครีเอตินิน (Creatinine; CREA) เป็นของเสียที่เกิดจากการทำงานหรือการสลายของกล้ามเนื้อซึ่งจะถูกกำจัดโดยไตใช้ตรวจสมรรถภาพการทำงานของไต ในภาวะปกติครีเอตินินจะถูกกรองผ่านไต และขับออกมากับปัสสาวะ ในการตรวจระดับครีเอตินินจึงต้องทำการตรวจในกระแสเลือด หรือในปัสสาวะร่วมด้วยในบางครั้ง

3.6.3 การตรวจวัดเอนไซม์อะมิโนทรานเฟอเรส (Aminotransferase) เป็นเอนไซม์ที่ช่วยสร้างกรดอะมิโน เร่งปฏิกิริยาอะมิโนทรานเฟอเรส (Aminotransferase) ใช้บ่งชี้ความผิดปกติของตับที่เกิดจากเซลล์ตับอักเสบ หรือถูกทำลาย โดยจะเกิดการรั่วออกมาของเอนไซม์ แอสพาเตตอะมิโนทรานเฟอเรส (Aspartate aminotransferase; AST) และเอนไซม์อะลานีน อะมิโนทรานเฟอเรส (Alanine aminotransferase; ALT) ในปริมาณสูง

$$\text{L- Aspartate + 2- oxoglutarate} \xrightarrow{\text{AST}} \text{Oxaloacetate + L- Glutamate}$$

$$\text{L- Alanine + 2- oxoglutarate} \xrightarrow{\text{ALT}} \text{Pyruvate + L- Glutamate}$$

โดย AST เป็นเอนไซม์ที่พบในกระแสเลือดซึ่งเกี่ยวข้องกับความเสียหายต่อตับ เม็ดเลือดแดง หัวใจ กล้ามเนื้อ ตับอ่อน ไต ส่วน ALT เป็นเอนไซม์ในตับที่ได้รับผลกระทบ

จากสารพิษ หรือฟกช้ำ ได้รับบาดเจ็บ เสียหาย จึงสามารถใช้เอนไซม์เหล่านี้เป็นข้อบ่งชี้ของโรคตับ หากอัตราส่วนของ AST: ALT มากกว่า หรือน้อยกว่า 1:1 อาจสันนิษฐานได้ว่าเป็นโรคไขมันพอกตับ แม้ไม่ได้ดื่มแอลกอฮอล์ หรือเป็นโรคตับอักเสบจากไวรัส หรือเกิดจากการใช้ยา (เฉียบพลันหรือเรื้อรัง)

การเปลี่ยนแปลงระดับเอนไซม์ในซีรัมจะมีส่วนเกี่ยวข้องกับการเกิดพิษต่ออวัยวะเป้าหมายเพราะเอนไซม์จะถูกปล่อยจากเซลล์ที่ได้รับความเสียหาย ดังนั้นการเปลี่ยนแปลงค่าต่างๆ ทางเคมีคลินิกอาจจะเป็นสัญญาณที่บ่งบอกความเป็นพิษที่เกิดขึ้นต่อไต หัวใจ หรือตับ มีผลทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงน้ำหนักของอวัยวะเช่น ตับและไต โดยที่อาจไม่พบความเปลี่ยนแปลงทางพยาธิวิทยา การเปลี่ยนแปลงของเอนไซม์จำนวนหนึ่งที่มีส่วนเกี่ยวข้องในการเกิดความเป็นพิษต่อหัวใจ เช่น การเพิ่มขึ้นของเอนไซม์ AST, แลคเตตดีไฮโดรจีเนส (Lactate dehydrogenase; LDH) และครีเอทีน ไคเนส (Creatine Kinase) การเปลี่ยนแปลงลิพิดในพลาสมาอาจจะบ่งบอกความเป็นพิษต่อตับ ในขณะที่ระดับน้ำตาลในเลือดบ่งบอกถึงความเป็นพิษต่อไต การวัดระดับของสารที่ถูกทดสอบในตัวอย่างเลือดสามารถเป็นข้อมูลที่บ่งบอกการได้รับสัมผัสของร่างกาย การดูดซึมและระบบการเผาผลาญเป็นปัจจัยสำคัญในการประเมินว่าสารที่ทดสอบในปริมาณเท่าไรที่จะเข้าสู่ระบบการไหลเวียนของร่างกาย พิษจลนศาสตร์เป็นการเปลี่ยนแปลงเมื่อสารเข้าสู่ร่างกายจะบ่งบอกการเคลื่อนที่ของสารไปทั่วร่างกายและบริเวณที่สารนั้นออกฤทธิ์

3.7 การวิเคราะห์ผลปัสสาวะ (Urinalyses)

การวิเคราะห์ผลปัสสาวะ ประกอบไปด้วย การประเมินปริมาณของปัสสาวะที่ผลิตขึ้นมา ความถ่วงจำเพาะ ค่ากรด-ด่าง กลูโคสและโปรตีน การตรวจประเมินตะกอนและการตรวจเลือดหรือเซลล์เม็ดเลือดที่ปรากฏในปัสสาวะโดยใช้กล้องจุลทรรศน์ การวิเคราะห์นี้จะทำในช่วงสัปดาห์สุดท้ายของการศึกษา การวิเคราะห์ปัสสาวะและอุจจาระทำให้ได้ข้อมูลสำคัญที่เกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงการทำงานระบบขับถ่ายเนื่องมาจากสารเคมี

3.8 การชันสูตรซาก (Necropsy)

การชันสูตรซากจะเป็นการตรวจผิวภายนอก ช่องอกและช่องท้อง ซากและอวัยวะทั้งหมดควรจะทำทันทีหลังจากสัตว์ถูกฆ่าหรือพบว่ามีการตาย การอธิบายผลจะไม่สามารถยอมรับได้หากเกิดการขาดหายไปของเนื้อเยื่อที่มีสาเหตุมาจากการสลายตัวของเนื้อเยื่อ (Autolysis) เนื้อเยื่อที่นำมาทดสอบทางพยาธิวิทยาจะต้องถูกทำให้คงสภาพความสมบูรณ์โดยใช้น้ำยาที่ทำให้เนื้อเยื่อสามารถคงสภาพอยู่ได้

3.9 การชั่งน้ำหนักอวัยวะ (Organ weight)

อวัยวะ เช่น ท่อพักอสุจิ (Epidiymides) หัวใจ ไต ตับ ปอด ม้าม ถุงอัณฑะ รังไข่และมดลูก จะถูกชั่งน้ำหนักข้อมูลที่แสดงจะเป็นน้ำหนักของแต่ละอวัยวะ หรือน้ำหนักของแต่ละอวัยวะเทียบกับน้ำหนักตัวของสัตว์ทดลอง

3.10 การตรวจสอบลักษณะทางจุลพยาธิวิทยา (Histological examination)

เมื่อพบว่ามีผลกระทบจากพิษต่อระบบร่างกายเกิดขึ้นจะต้องมีการตรวจสอบลักษณะทางจุลพยาธิวิทยาในกลุ่มที่ทำการศึกษา หากพบว่าสัตว์ทดลองมีการตายหรือมีการยุติในช่วงต้นของการศึกษาจะต้องมีการตรวจสอบลักษณะทางจุลพยาธิวิทยาด้วย ในกรณีที่จำนวนสัตว์ที่ใช้ทำการศึกษาน้อย เช่น สุนัข จะต้องมีการตรวจสอบทั้งในกลุ่มควบคุมและทุกกลุ่มที่ได้รับสารที่ทดสอบ

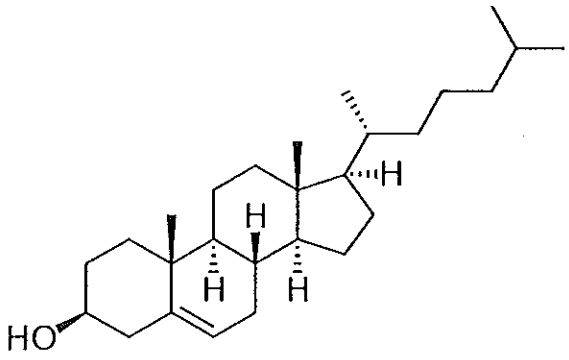
ไขมัน (Lipid)

ไขมัน คือ สารที่ละลายได้ในตัวทำละลายอินทรีย์ (Organic solvents) เช่น อีเทอร์ ไฮโดรคาร์บอน แต่ไม่ละลายในน้ำ โดยทั่วไปประกอบด้วยคาร์บอน ไฮโดรเจนและออกซิเจน ไขมันบางชนิดอาจมีไนโตรเจน ฟอสฟอรัสหรือกำมะถันอยู่ในโครงสร้าง เนื่องจากไขมันเป็นสารไม่ละลายน้ำ ดังนั้น การที่จะถูกพาไปในกระแสเลือดได้จะต้องรวมตัวกับโปรตีนรวมเรียกว่า ลิโพโปรตีน (Lipoprotein) คนปกติจะมีไขมันประมาณ 450-1,000 มก./ดล. ร่างกายจะได้รับไขมันจากอาหารและจากการสร้างที่ตับ โดยหลังจากรับประทานอาหารที่มีไขมันแล้ว 2 ชั่วโมง ระดับไขมันจะสูงขึ้นและสูงที่สุดที่ 6-8 ชั่วโมง และจะลดลงเป็นปรกติภายใน 10 ชั่วโมง โดยร่างกายจะใช้ไขมันเป็นพลังงาน สร้างฮอร์โมน ช่วยในการย่อยอาหาร และสร้างเนื้อเยื่อของเซลล์ (ณรงค์ศักดิ์ วัชโรทน, 2542)

1. ชนิดของไขมัน (เรณุกา วิญญูเจริญกุล, 2556)

1.1 คอเลสเตอรอล

คอเลสเตอรอลเป็นสารประเภทไขมันอย่างหนึ่งที่มีอยู่ในร่างกายและจะสะสมมากในตับ ไขสันหลัง (Spinal cord) สมอง และผนังหลอดเลือดแดง (Atheroma) การเคลื่อนย้ายหรือขนส่งคอเลสเตอรอลในร่างกายจะใช้โปรตีนที่ชื่อว่า ลิโพโปรตีน (Lipoprotein) ซึ่งมีแกนกลางเป็นไขมันชนิดไม่มีขั้ว (Non-polar lipid) เช่น ไตรกลีเซอไรด์ คอเลสเตอรอลเอสเตอร์ ล้อมรอบด้วยไขมันชนิดที่ละลายน้ำได้บางส่วน (Amphipatic lipid) เช่น ฟอสโฟลิพิด คอเลสเตอรอล และมีโปรตีนบางชนิดที่เรียกว่า อะโพลิโพโปรตีน (Apolipoprotein) หรือ อะโพโปรตีน (Apoprotein) แทรกอยู่ในชั้นของไขมันเหล่านี้โดยทำหน้าที่เป็นตัวรับ-ส่งสัญญาน (Recepter)



ภาพ 13 แสดงโครงสร้างทางเคมีของคอเลสเตอรอล

ที่มา: Engelking, 2015

ลิโพโปรตีน (Lipoproteins) เป็นสารที่ประกอบไปด้วย ไขมันชนิดคอเลสเตอรอล เอสเทอร์ (Cholesterol ester) และไตรกลีเซอไรด์เป็นแกน ผิวของโมเลกุลประกอบด้วยสารที่ละลายน้ำ เช่น Phospholipids free cholesterol และ Apolipoprotein โดยมีลิโพโปรตีนที่สำคัญ ได้แก่

1. ไคโลไมครอน (Chylomicron) พบในพลาสมาหลังจากที่รับประทานอาหารที่มีไขมันมาก โดยจะพบพลาสมาขุ่นเหมือนสีน้ำนม ไคโลไมครอนถูกสร้างจากเยื่อบุผิวในลำไส้ (Intestinal epithelial cells) ประกอบด้วย ไตรกลีเซอไรด์เป็นส่วนใหญ่ นอกนั้นเป็นคอเลสเตอรอล ฟอสโฟลิปิด และโปรตีน ไคโลไมครอนทำหน้าที่หลักในการขนส่งไตรกลีเซอร์ไรด์จากลำไส้เล็กไปยังตับ เพื่อไปเผาผลาญ

2. วีแอลดีแอล (Very Low-Density Lipoprotein, VLDL) ประกอบด้วย ไตรกลีเซอไรด์เป็นส่วนใหญ่มีคอเลสเตอรอลและฟอสโลลิพิดเป็นส่วนน้อย ทำหน้าที่ขนส่งไตรกลีเซอไรด์ที่ร่างกายสร้างขึ้นจากตับไปยังผนังหลอดเลือด เนื้อเยื่อไขมันและกล้ามเนื้อ

3. แอลดีแอล (Low Density Lipoprotein, LDL) เป็นคอเลสเตอรอลส่วนใหญ่ในร่างกายของมนุษย์ มีส่วนประกอบของคอเลสเตอรอลในปริมาณสูงถึงร้อยละ 45 ร่างกายสร้าง LDL จากการเผาผลาญ VLDL ทำหน้าที่ขนส่งคอเลสเตอรอลจากตับไปยังผนังหลอดเลือด เนื้อเยื่อไขมัน และกล้ามเนื้อ ทำให้ระดับคอเลสเตอรอลในเลือดสูงขึ้นถ้าสูงเป็นระยะเวลานาน จะเกิดการคั่งและเกาะตามหลอดเลือดทำให้เกิดการอุดตันได้จึงจัดเป็นไขมันชนิดเลว

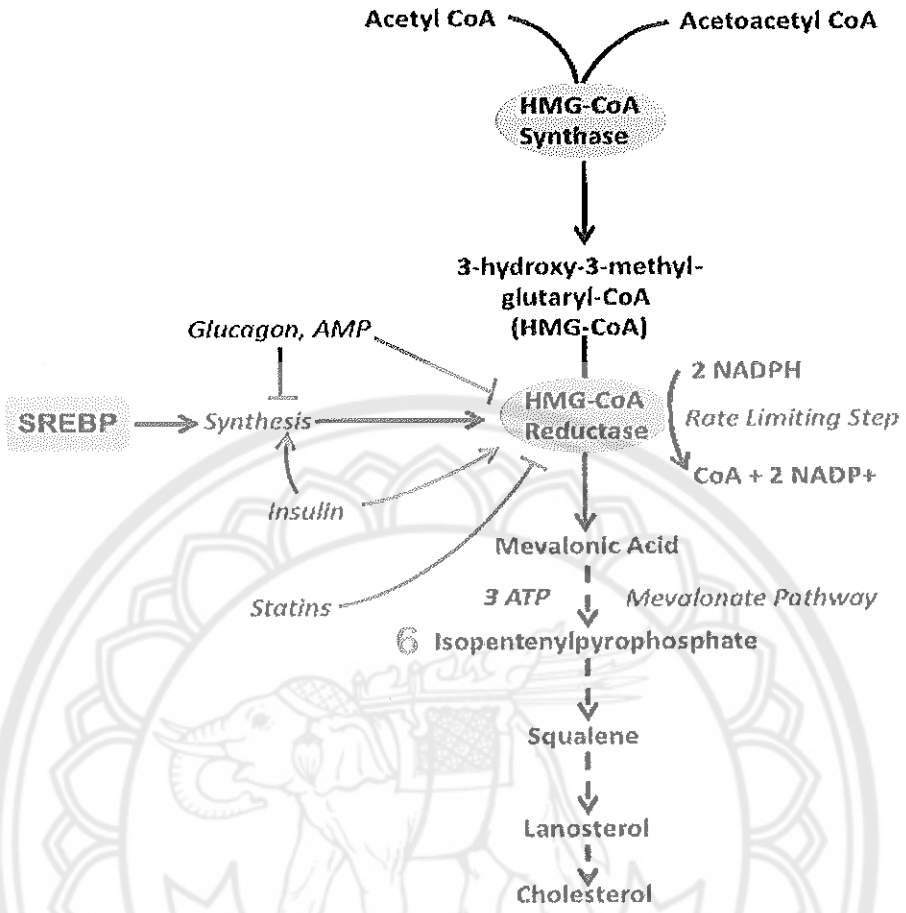
4. เอชดีแอล (High Density Lipoprotein, HDL) ถูกสร้างขึ้นที่ตับและลำไส้เล็ก ประกอบด้วยโปรตีนเป็นส่วนใหญ่ มีคอเลสเตอรอลและไขมันเพียงเล็กน้อย Fammingham study แสดงให้เห็นว่า HDL เป็นปัจจัยเสี่ยงผกผันต่อโรคหัวใจขาดเลือด (Coronary heart disease) และ

การลดลงของ HDL จะเพิ่มความเสี่ยงในการเกิดโรคหัวใจขาดเลือดโดยเฉพาะเมื่อ HDL <35 มก./ดล. จะป้องกันการเกิดภาวะหลอดเลือดแข็ง (Atherosclerosis) จากการนำคอเลสเตอรอลส่วนเกินกลับไปที่ตับเพื่อกำจัดออกจากร่างกาย (Reverse cholesterol transport) โดย HDL จะเป็นตัวนำคอเลสเตอรอลจากเนื้อเยื่อส่วนปลาย (Peripheral tissue) มายังตับ ทำให้มีคอเลสเตรอลที่เนื้อเยื่อส่วนปลายน้อยลง (Gordon et al., 1977)

คอเลสเตอรอลสามารถสังเคราะห์ได้ในร่างกายและถูกนำไปใช้สร้างเป็นองค์ประกอบของโครงสร้างผนังเซลล์และลิโพโปรตีน หรือนำไปเปลี่ยนให้เป็นกรดน้ำดี วิตามินดี และสเตียรอยด์ฮอร์โมน คอเลสเตอรอลในร่างกายมีแหล่งมาจากอาหารและจากการสังเคราะห์จากสารตั้งต้น Acetyl CoA ซึ่งมาจากกระบวนการเมแทบอลิซึมของคาร์โบไฮเดรต กรดอะมิโน และกรดไขมัน อวัยวะหลักที่สร้างคอเลสเตอรอล คือ ตับ ซึ่งสร้างและส่งออกมาในกระแสเลือดในรูปของ Very low density lipoprotein (VLDL) ที่ลำไส้เล็กมีการสังเคราะห์คอเลสเตอรอลได้เช่นกัน และส่งออกสู่กระแสเลือดในรูปของไคโลไมครอน นอกจากนี้ ต่อมที่มีการสร้างสเตียรอยด์ฮอร์โมนสามารถสร้างคอเลสเตอรอลได้เพราะต้องนำคอเลสเตอรอลที่สร้างได้ไปสร้างฮอร์โมนต่างๆ ต่อไป โดยกระบวนการสังเคราะห์คอเลสเตอรอลแสดงในภาพ 14

การสังเคราะห์คอเลสเตอรอล สามารถแบ่งออกได้เป็น 3 ขั้นตอนใหญ่ๆ ดังนี้

1. การสังเคราะห์เมลาโลเนท (Mevalonate) จาก Acetyl-CoA สารตั้งต้นในการสังเคราะห์คอเลสเตอรอล คือ Acetyl-CoA โดยปฏิกิริยาแรกเป็นการรวมตัวกันของ Acetyl-CoA 2 โมเลกุล ได้เป็น Acetoacetyl-CoA ซึ่งจะรวมกับอีกหนึ่งโมเลกุลของ Acetyl-CoA ได้เป็น 3-hydroxy-3- methylglutaryl-CoA (HMG-CoA) จากนั้น HMG-CoA จะเปลี่ยนไปเป็นเมลาโลเนทโดยอาศัยเอนไซม์ HMG-CoA reductase เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา โดยปฏิกิริยาของเอนไซม์นี้ถือเป็นจุดที่ควบคุมการสังเคราะห์คอเลสเตอรอล



ภาพ 14 แสดงกระบวนการสังเคราะห์คอเลสเตอรอล

ที่มา: Christie, 2020

2. การสังเคราะห์สควาลีน (Squalene) จากเมลาโลเนท (Mevalonate) ซึ่งเมลาโลเนทที่ได้ในขั้นตอนแรกจะถูกเติมหมู่ฟอสเฟต 3 หมู่ ได้สารตัวกลางชื่อ 3-phospho-5-pyrophospho-mevalonate จากนั้น เปลี่ยนไปเป็นสารตัวกลางอีกตัวหนึ่ง คือ Isopentenyl pyrophosphate ที่มีคาร์บอน 5 อะตอม ซึ่งสารตัวกลางนี้สามารถเปลี่ยนไปอยู่ในรูปของ Dimethylallyl pyrophosphate เมื่อ Isopentenyl pyrophosphate และ Dimethylallyl pyrophosphate มารวมกัน โดยเสียหมู่ไพโรฟอสเฟตออกไป จะได้เป็นสารตัวกลางที่มีคาร์บอน 10 อะตอม คือ Geranyl pyrophosphate สารตัวกลางนี้สามารถรวมตัวกับ Isopentenyl pyrophosphate ได้ผลิตภัณฑ์เป็น Farnesyl pyrophosphate ซึ่งมีคาร์บอน 15 อะตอม Farnesyl pyrophosphate คาร์บอน 15 อะตอม จะรวมตัวกันเองได้เป็น Squalene ซึ่งมีคาร์บอน 30 อะตอม

3. การสังเคราะห์คอเลสเตอรอลจากสควาลีน จะเกิดการเปลี่ยนแปลงหลายขั้นตอนได้เป็นลาโนสเตรอล (Lanosterol) ซึ่งมีโครงสร้างเป็นวงแหวนแบบสเตอรอยด์ (Steroid) และมีการเปลี่ยนแปลงอีกหลายขั้นตอนจนได้คอเลสเตอรอลที่มีจำนวนคาร์บอน 27 อะตอม คอเลสเตอรอลที่ได้จะถูกนำใช้เป็นโครงสร้างของเยื่อหุ้มเซลล์และเซลล์ประสาทในคนและสัตว์ นอกจากนี้ คอเลสเตอรอลยังเป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์สารสเตอรอยด์ชนิดอื่นๆ เช่น น้ำดี วิตามินดี และสเตอรอยด์ฮอร์โมน

1.2 ไตรกลีเซอไรด์

เป็นไขมันชนิดหนึ่งซึ่งร่างกายได้มาจากอาหารไขมันที่มาจากสัตว์เช่น เนื้อ หมู ไก่ ที่รับประทานเข้าไปโดยตรง อีกทางหนึ่งได้จากการที่ตับสังเคราะห์ขึ้นเองในร่างกายจากน้ำตาล แป้ง และแอลกอฮอล์ (สันต์ ใจยอดศิลป์, 2010) โดยโครงสร้างทางเคมีของไตรกลีเซอไรด์ ดังแสดงในภาพ 15

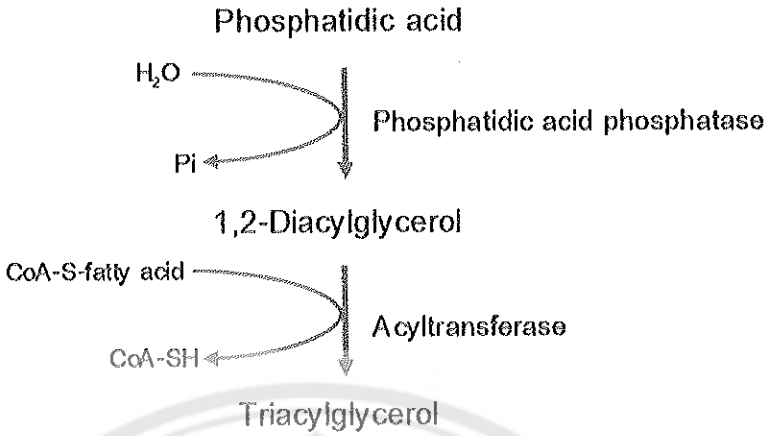
ภาพ 15 แสดงโครงสร้างทางเคมีของไตรกลีเซอไรด์

ที่มา: Christie, 2020

การสังเคราะห์ไตรกลีเซอไรด์ในร่างกายเกิดได้ 2 วิธี คือ (ภาพ 16)

1.2.1 เกิดขึ้นที่เซลล์ลำไส้เล็ก โดยอาศัย 2-monoacylglycerol เป็นสารตัวกลาง เกิดจากการย่อยอาหารไขมันที่ลำไส้เล็กทำปฏิกิริยาเอสเทอริฟาย (Esterified) กับกรดไขมันที่ตำแหน่ง 1 และ 3 ของกลีเซอไรด์เรียกว่าสร้างโดยวิถี 2-monoglyceride pathway

1.2.2 การสร้างไตรกลีเซอไรด์โดยอาศัย L-glycerol-3-phosphate ทำให้เกิดสารตัวกลาง คือ Phosphatidic acid และ 1, 2-diacylglycerol จากนั้นมีการเติมกรดไขมันตัวที่ 3 เข้าไปให้กับ 1, 2-diacylglycerol ได้เป็นไตรกลีเซอไรด์ ปฏิกิริยานี้พบได้ในเนื้อเยื่อของตับและเนื้อเยื่อไขมัน



ภาพ 16 แสดงกระบวนการสังเคราะห์ไตรกลีเซอไรด์ในตับ

ที่มา: Abbas, 2002

1.3 ฟอสโฟลิพิด

ประกอบด้วยหมู่ฟอสเฟตเอสเทอร์ พบเป็นส่วนประกอบของเยื่อหุ้มเซลล์ (Cell membrane) ทำหน้าที่เลือกให้สารบางชนิดผ่านเข้าไปภายในเซลล์ พบมากในสมองและเส้นประสาท ฟอสโฟลิพิด 1 โมเลกุล เกิดจากการรวมตัวของกลีเซอรอล 1 โมเลกุล กรดไขมัน 2 โมเลกุล และหมู่ฟอสเฟตอีก 1 หมู่ ฟอสโฟลิพิดแบ่งเป็น 2 ประเภท คือ ฟอสโฟกลีเซอไรด์และสฟิงโกลิพิด

ฟอสโฟลิพิดถูกสังเคราะห์ขึ้นเพื่อเป็นโครงสร้างของเยื่อหุ้มต่างๆ ซึ่งจะไม่มีการสะสมในร่างกาย โดยเซลล์ยูคาริโอตจะสังเคราะห์ฟอสโฟลิพิดที่ร่างแหเอนโดพลาซึมแบบเรียบ (Smooth endoplasmic reticulum) ยกเว้นฟอสโฟลิพิดบางชนิดของไมโทคอนเดรียจะมีการสังเคราะห์ในไมโทคอนเดรีย การสังเคราะห์ฟอสโฟลิพิดจะคล้ายกับการสังเคราะห์ไตรเอซิล กลีเซอรอล โดยมีกรดฟอสฟาติดิก (Phosphatidic acid) เป็นสารตั้งต้น แล้วเปลี่ยนให้อยู่ในรูปของ Cytidine diphosphate diacylglycerol (CDP-diacylglycerol) จากนั้น จึงมีการรวมกับหมู่ต่างๆ เช่น โคลีน (Choline) เอทานอลเอมีน (Ethanolamine) เซอรีน (Serine) และอินโนซิทอล (Inositol) การนำหมู่โคลีนและเอทานอลเอมีนมารวมกับ CDP-diacylglycerol นั้น โคลีนและเอทานอลเอมีนจะต้องอยู่ในรูป CDP-choline และ CDP-ethanolamine

1.4 กรดไขมัน

เป็นกรดอินทรีย์ที่มีคาร์บอนอะตอมต่อกันเป็นโซ่ยาวตั้งแต่ 12 อะตอมขึ้นไป โดยทั่วไปจะมีจำนวนคาร์บอนอะตอมเป็นเลขคู่ กรดไขมันแบ่งออกเป็น 2 ประเภท คือ

1.4.1 กรดไขมันอิ่มตัว (Saturated fatty acids) เป็นกรดไขมันที่ในโมเลกุลไม่มีพันธะคู่ระหว่างอะตอมของคาร์บอน มีสูตรทั่วไป คือ C_nH_{2N}+1COOH พบมากในไขมันจากสมองสัตว์ หรือเครื่องในสัตว์ เนย และไข่แดง ตัวอย่างเช่น กรดลอลิก กรดปาล์มิติก และกรดสเตียริก

1.4.2 กรดไขมันไม่อิ่มตัว (Unsaturated fatty acids) เป็นกรดไขมันที่ในโมเลกุลมีพันธะคู่หรือพันธะสามทำให้สามารถรับไฮโดรเจนเข้าไปในโมเลกุลได้ พบมากในน้ำมันพืช เช่น กรดปาล์มิโตเลอิก กรดโอเลอิก กรดไลโนเลอิก เป็นต้น

2. การย่อยไขมัน

2.1 การย่อยทางปากและกระเพาะอาหาร

ในปากและกระเพาะอาหารมีเอนไซม์ลิงกัวไลเปส (Lingual lipase) และแกสตริกไลเปส (Gastric lipase) เป็นเอนไซม์ที่ทำงานได้แม้ในสภาวะที่เป็นกรด (Acid lipase) โดยโมเลกุลไตรกลีเซอไรด์ที่มีกรดไขมันประเภทสายสั้น (Short chain) และสายยาวปานกลาง (Medium chain) (พบในนม) เป็นองค์ประกอบจะถูกย่อยโดยไลเปส (Lipase) ได้เป็นกรดไขมัน (Fatty acid) และ 2-monoacylglycerol แต่อัตราการย่อยจะเกิดขึ้นอย่างช้าๆ เนื่องจากไขมันไม่อยู่ในรูปอิมัลซิฟาย (Emulsified) และเอนไซม์จะสามารถย่อยได้เฉพาะไขมันที่อยู่ผิวนอกสุด ดังนั้นจึงพบว่า ไลเปสที่ปากและกระเพาะอาหารจะทำงานได้ดีในเด็กทารกที่รับประทานน้ำนมแม่ หรือนมวัว เพราะไตรกลีเซอไรด์ในน้ำนมอยู่ในรูปที่อิมัลซิฟายแล้ว และเป็นไขมันที่มีกรดไขมันประเภทสายสั้นและสายยาวปานกลางอยู่มากเอ็นไซม์จึงสามารถย่อยได้ ดังนั้นในผู้ใหญ่อาหารประเภทไขมันจะไม่ถูกย่อยในปากและกระเพาะอาหาร

2.2 การย่อยที่ลำไส้เล็ก

ลำไส้เล็กเป็นบริเวณที่ไขมันจากอาหารจะถูกย่อยได้อย่างสมบูรณ์เนื่องจากไขมันเป็นสารที่ไม่ละลายน้ำ ดังนั้น ในกระบวนการดูดซึมและการย่อยต้องทำให้อาหารไขมันละลายเข้ากับน้ำก่อนโดยกระบวนการอิมัลชัน (Emulsification) โดยอาศัยกรดน้ำดีและเกลือน้ำดี (Bile acid and bile salt) กระจายโมเลกุลของไขมันให้อยู่ในรูปไมเซลล์ผสม (Mixed micelle) ทำให้ไขมันละลายน้ำได้ดีขึ้น เอนไซม์จึงทำการย่อยไขมันได้เนื่องจากเกลือน้ำดีเป็นสารประกอบจำพวกแอมฟิพาธิค (Amphipathic) ที่มีทั้งส่วนที่ไม่ชอบ (Hydrophobic) และส่วนที่ชอบน้ำ (Hydrophilic) ในโมเลกุล ซึ่งถูกสังเคราะห์ขึ้นที่ตับแล้วเก็บไว้ในถุงน้ำดี โดยจะหลั่งเข้าสู่ลำไส้เล็กเมื่อมีฮอร์โมน Cholecystokinin มากระตุ้นการย่อยอาหารไขมันในลำไส้เล็กอาศัยเอนไซม์ที่สร้างมาจากตับอ่อน ฮอร์โมนที่ควบคุมการย่อยไขมันในชั้นเยื่อบุผนังลำไส้เล็ก คือ ฮอร์โมนคอเลซิสโทโคนิน (Cholecystokinin; CCK) โดยฮอร์โมนจะออกฤทธิ์ไปกระตุ้นการบีบตัวของถุงน้ำดีทำให้มีการปล่อยน้ำดีออกสู่ลำไส้เล็กและ

มีผลทำให้ลำไส้บีบตัวช้าลง และเพื่อให้เกิดการย่อยไขมันที่สมบูรณ์เอนไซม์ในตับอ่อน (Pancreatic lipase) และฮอร์โมนซิครีติน (Secretin) จะกระตุ้นให้ตับอ่อนหลั่งไบคาร์บอเนต (Bicarbonate) เพื่อช่วยปรับ pH ของไคม์ (Chyme) ให้เหมาะสม (pH ~ 6) กับการถูกย่อยโดยเอนไซม์ในลำไส้เล็ก

2.3 เอนไซม์ที่ใช้ในการย่อยไขมัน แบ่งได้เป็น 3 กลุ่มใหญ่ คือ

2.3.1 เอนไซม์แพนครีเอติกไลเปส (Pancreatic lipase; triacylglycerol lipase) เป็นเอนไซม์ที่หลั่งจากตับอ่อน ทำหน้าที่ย่อยสลายไตรเอซิลกลีเซอรอลโดยสลายพันธะเอสเทอร์ที่เชื่อมกรดไขมันกับกลีเซอรอลตรงตำแหน่งที่ 1 และตำแหน่งที่ 3 ของอะตอมคาร์บอนของ กลีเซอรอล โดยจะย่อยตำแหน่งที่ 3 และตำแหน่งที่ 1 ตามลำดับ ได้เป็นกรดไขมันอิสระ (Free fatty acids), 1,2-diacylglycerols และ 2-acylglycerols ประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ในตับอ่อน (Pancreatic lipase) จะเพิ่มขึ้นเมื่อทำงานร่วมกับโปรตีน Pancreatic colipase โดยโปรตีนนี้มีส่วนช่วยทำให้เอนไซม์ในตับอ่อนมาจับที่บริเวณผิวสัมผัสของน้ำมันและน้ำ (Lipid-water interface) ได้ดีขึ้น รวมทั้งช่วยให้เอนไซม์มีความเสถียรมากขึ้น ทำให้มีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างบริเวณตำแหน่งกัมมันต์ (Active site) ของเอนไซม์ ทำให้เอนไซม์สามารถทำงานได้อย่างมีประสิทธิภาพ เรียกปรากฏการณ์ที่เกิดขึ้นบริเวณผิวสัมผัสของน้ำมันและน้ำ (Lipid-water interface) นี้ว่า "Interfacial activation"

2.3.2 เอนไซม์ฟอสโฟไลเปส (Phospholipase) เป็นเอนไซม์ที่หลั่งจากตับอ่อน ทำหน้าที่ย่อยสลายฟอสโฟลิพิด ซึ่งเอนไซม์ฟอสโฟไลเปสมีหลายชนิดด้วยกัน ได้แก่ ฟอสโฟไลเปสเอวัน (Phospholipase A_1) ฟอสโฟไลเปสเอทู (Phospholipase A_2) ฟอสโฟไลเปสซี (Phospholipase C) และฟอสโฟไลเปสดี (Phospholipase D) เป็นต้น ซึ่งแต่ละชนิดจะย่อยสลายพันธะเอสเทอร์ที่ตำแหน่งจำเพาะแตกต่างกันไป

ในการย่อยสลายฟอสโฟลิพิดด้วยเอนไซม์ฟอสโฟไลเปสเอทูจะได้ผลิตภัณฑ์เป็นไลโซฟอสโฟลิพิด (Lysophospholipid) ซึ่งมีคุณสมบัติเป็น Detergent เช่นเดียวกับฟอสโฟลิพิดชนิดเลซิติน (Lecithin) (Phosphatidylcholine) ที่เป็นองค์ประกอบในน้ำดี มีส่วนช่วยทำให้ไขมันละลายน้ำได้ดีขึ้น ดังนั้นไลโซฟอสโฟลิพิดที่ได้จากการย่อยฟอสโฟลิพิดด้วยเอนไซม์ฟอสโฟไลเปสเอทูมีส่วนช่วยเพิ่มประสิทธิภาพของการย่อยสลายไขมันที่ลำไส้เล็กเช่นเดียวกับเลซิตินซึ่งเป็นองค์ประกอบของน้ำดี

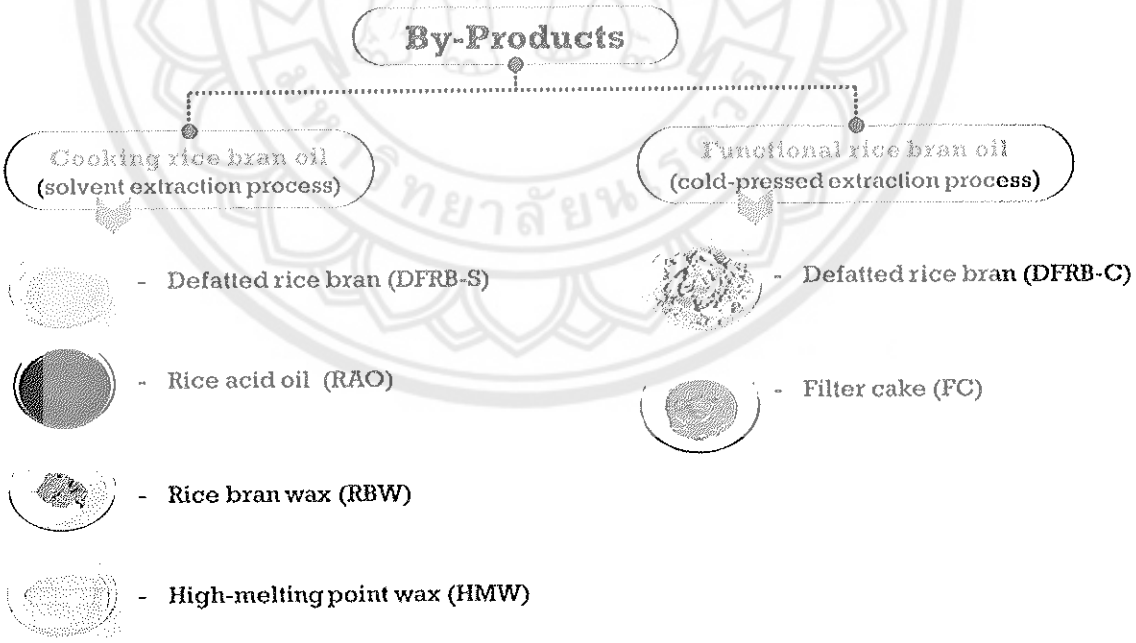
2.3.3 เอนไซม์คอเลสเตอริลเอสเทอร์ไฮโดรเลส (Cholesteryl ester hydrolase) ทำหน้าที่ย่อยสลายพันธะเอสเทอร์ที่เชื่อมระหว่างคอเลสเตอรอลกับกรดไขมันในคอเลสเตอริลเอสเทอร์ (Cholesteryl ester) ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์เป็นคอเลสเตอรอลกับกรดไขมันอิสระ

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

ประชากรและกลุ่มตัวอย่าง

สุ่มตัวอย่างผลิตผลพลอยได้จากกระบวนการผลิตน้ำมันรำข้าวทั้งแบบบีบเย็นและแบบใช้ตัวทำละลาย ผลิตผลพลอยได้จากกระบวนการผลิตน้ำมันรำข้าวได้แก่ รำสกัด (Defatted rice bran) และกากกรองน้ำมันรำข้าว (Filter cake) จากบริษัทลพบุรีน้ำมันพืชบีบเย็น ตำบลท่าหิน อำเภอเมือง จังหวัดลพบุรี และผลิตผลพลอยได้จากกระบวนการผลิตน้ำมันรำข้าวแบบตัวทำละลาย ได้แก่ รำสกัด (Defatted rice bran) น้ำมันรำกรดไขมันอิสระ (Acid oil) ไขรำข้าว (Rice bran wax) ไขรำข้าวจุดหลอมเหลวสูง (High-melting point rice bran wax) และน้ำมันรำข้าวสำหรับบริโภค (Refine oil) จากบริษัทน้ำมันรำข้าวสุรินทร์จำกัด ตำบลหนองเต็ง อำเภอกระสัง จังหวัดบุรีรัมย์ โดยเก็บตัวอย่างทันทีในแต่ละขั้นตอนของกระบวนการผลิต บรรจุใส่ถุงสุญญากาศ (Vacuum bag) และเก็บที่อุณหภูมิ -20°ซ จนกระทั่งใช้งาน ตัวอย่างที่ใช้ในการทดสอบแสดงในภาพ 17



ภาพ 17 แสดงผลิตผลพลอยได้จากกระบวนการผลิตน้ำมันรำข้าวแบบบีบเย็นและใช้ตัวทำละลาย

สัตว์ทดลองสำหรับการศึกษาความเป็นพิษของโพลิโคซานอลสกัดดำเนินการโดยใช้หนูไมส์ (Mus musculus) สายพันธุ์ MLAC:ICR เพศผู้และเพศเมีย อายุ 4 สัปดาห์ น้ำหนัก 19-20 กรัม จากบริษัท BioLASCO Taiwan Co., Ltd การศึกษาประสิทธิภาพการลดระดับคอเลสเตอรอลของโพลิโคซานอลสกัดดำเนินการทดลองโดยใช้แฮมสเตอร์ (Mesocricetus auratus) สายพันธุ์ Golden หรือ Syrian เพศผู้ อายุ 70-90 กรัม อายุ 3 สัปดาห์ จากบริษัท NARlabs, Taiwan ดังแสดงในภาพ 18

(a) (b)

ภาพ 18 แสดงสัตว์ทดลอง (a) หนูไมส์ สายพันธุ์ ICR (b) แฮมสเตอร์ สายพันธุ์ Syrian

สารเคมีและอุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย

1. สารเคมี

1.1 2,2,4-ไตรเมทิลเพนเทน หรือไอโซออกเทน (RCI Labscan, Bangkok, Thailand)

1.2 กลีเซอรอล (First Chemical works, Taiwan)

1.3 คลอโรฟอร์ม (RCI Labscan, Bangkok, Thailand)

1.4 คอเลสเตอรอล (Acros Organics, New Jersey, USA)

1.5 โซเดียมคลอไรด์ ชนิดเม็ด (RCI Labscan, Bangkok, Thailand)

1.6 โซเดียมไฮดรอกไซด์ (RCI Labscan, Bangkok, Thailand)

1.7 ไซลีน (Surgipath, Peterborough, UK)

1.8 ไดเมทิลอีเทอร์ (Siam Tamiya Co, Ltd, Bangkok, Thailand)

1.9 โทลูอีน (RCI Labscan, Bangkok, Thailand)

1.10 นอร์วาลีน (Phenomenex, Torrance, CA, USA)

1.11 น้ำมันถั่วเหลือง (Taitang, Taiwan)

1.12 น้ำมันรำข้าวสำหรับบริโภค (Refine oil) (บริษัท น้ำมันรำข้าวสุรินทร์ จำกัด, ประเทศไทย)

1.13 น้ำมันหมู (Xiang zhu you wang chun, Taiwan)

1.14 น้ำยาเปอร์เมาต์ Permount® (FisherChemical, USA)

1.15 โพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ ชนิดเม็ด (Merck Millipore, Darmstadt, Germany)

1.16 ไพริดีน (Merck Millipore, Darmstadt, Germany)

1.17 ไพโรแกลลอน (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)

1.18 ฟอร์มาลิน

1.19 เมทานอล (RCI Labscan, Bangkok, Thailand)

1.20 โลวาสเตติน (Chem scene, Taiwan)

1.21 สารป้องกันการแข็งตัวของเลือด (Anticoagulant) ชนิด Lithium heparin

1.22 สารละลายมาตรฐาน 5 แอลฟา-คอเลสเทน (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)

1.23 สารละลายมาตรฐานกรดแกมมา-อะมิโนบิวทีริค (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)

1.24 สารละลายมาตรฐานแกมมา-โอรีซานอล (98.5%) (Tsuno Rice Fine Chemical Co., Ltd, Wakayama, Japan)

1.25 สารละลายมาตรฐานโทโคฟีรอลและโทโคไตรอีนอล (ChromaDex, Irvine, CA, USA)

1.26 สารละลายมาตรฐานโพลิโคซานอล (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)

1.27 สารละลายมาตรฐานไฟโตสเตอรอล (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)

1.28 สารสำหรับทำอนุพันธ์ N, O-bis (trimethylsilyl) -trifluoroacetamide (BSTFA) with 1% trimethylchlorosilane (TMCS) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)

1.29 อะซิโตไนไทร (RCI Labscan, Bangkok, Thailand)

1.30 อาหารสำหรับสัตว์ทดลอง 5001 Rodent Diet (Purina Lab Diet, MO, USA)

1.31 อีโอซิน (Surgipath, Peterborough, UK)

1.32 เอทานอล (RCI Labscan, Bangkok, Thailand)

1.33 เอทิล อะซิเตท (RCI Labscan, Bangkok, Thailand)

1.34 ไอโซโพรพานอล (Merck Millipore, Darmstadt, Germany)

1.35 เฮกเซน (RCI Labscan, Bangkok, Thailand)

1.36 เฮมาโทไซลิน (Surgipath, Peterborough, UK)

2. อุปกรณ์

2.1 กรรไกรผ่าตัด

2.2 กรวยรองบุชเนอร์

2.3 กระดาษกรอง whatman เบอร์ 42

2.4 กระบอกฉีดยาขนาด 1 มิลลิลิตร

2.5 ขวดน้ำสำหรับเลี้ยงสัตว์ทดลอง

2.6 เข็มฉีดยาขนาด 27 หรือ 28

2.7 คีมคีบ

2.8 เครื่องกลั่นระเหยสารแบบหมุน Rotary Evaporator (Heidolph, Germany)

2.9 เครื่องกวนสารชนิดแม่เหล็กให้ความร้อน Hotplate magnetic stirrer (Ika, Germary)

2.10 เครื่องกวนสารแบบแกนหมุน Overhead stirrer (Ika, Germary)

2.11 เครื่องแก๊สโครมาโตกราฟฟี-แมสสเปกโตรมิเตอร์ Gas Chromatography-Mass Spectrometry; GC-MS (Agilent technologies, USA)

2.12 เครื่องเขย่าสาร Vortex mixer (Scientific Industries, USA)

2.13 เครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงแบบผันกลับ Reverse-phase High-performance liquid chromatography; RP-HPLC (Agilent technologies, USA)

2.14 เครื่องจ่ายพาราฟิน Electric paraffin dispenser (Roundfin, China)

2.15 เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง Analytical Balance (Shimadzu, Japan)

2.16 เครื่องเตรียมชิ้นเนื้ออัตโนมัติ Automatic tissue processor (Leica Biosystems, USA)

2.17 เครื่องปั่นเหวี่ยง Laboratory Centrifuge (TheromoFisher Scientific, USA)

2.18 เครื่องปิดผนึกแบบสุญญากาศ (Fresh world, China)

2.19 เครื่องระเหยสารด้วยก๊าซไนโตรเจน Nitrogen Blowing Sample Concentration (Caliper LifeSciences, UK)

2.20 เครื่องลิควิดโครมาโตกราฟฟี-แมสสเปกโตรมิเตอร์ Liquid chromatography-mass spectrometry; LC-MS (Agilent technologies, USA)

2.21 เครื่องวัดความเป็นกรดด่าง Ionix pH100 pH meter (Ionix, Singapore)

2.22 เครื่องวัดความหนืด BROOKFIELD - DV-II Viscometer (Brookfield, MA, USA)

2.23 เครื่องวัดสี Chroma meter CR-400 (Konica Minolta, Japan)

2.24 เครื่องสกัดสารด้วยไดเมทิลอีเทอร์ภายใต้สภาวะกึ่งวิกฤตระดับห้องปฏิบัติการ (Sub-critical liquefied dimethyl ether laboratory scale; SUBDME)

2.25 เครื่องอัลตราโซนิกส์ คลีนเซอร์ Ultrasonic cleaner (Branson, Danbury, USA)

2.26 ชุดวิเคราะห์ปริมาณกรดแกมมา-อะมิโนบิวทีริค EZ: faast® amino sample test kit for GC/MS profiling of protein hydrolysates (Phenomenex, Torrance, CA, USA)

2.27 ตลับใส่ชิ้นเนื้อที่ได้รับการตกแต่ง (Cassettes)

2.28 ตู้แช่แข็ง -20 °ซ (Haier, Thailand)

2.29 ตู้อบลมร้อน Hot-air oven (Memmert, Germary)

2.30 ถาดแบบกรงลิ้นชักขนาด 18 ×28×12 เซนติเมตร/กรง

2.31 ถาดแบบกรงลิ้นชักขนาด 31 ×55×20 เซนติเมตร/กรง

2.32 โถดูดความชื้น Desiccator

2.33 ปั๊มสุญญากาศ รุ่น AS29 (JEDTO, Thailand)

2.34 แผ่นสไลด์กล้องจุลทรรศน์

2.35 พาราฟิล์ม Parafilm (Parafilm®, USA)

2.36 ภาชนะอะลูมิเนียมสำหรับหาความชื้น Moisture can

2.37 มีดผ่าตัด

2.38 วัสดุรองพื้น (P.J. Murphy forest products corps, New Jersey, USA)

2.39 หลอดไมโครเซ็นตริฟิวส์ (Microcentrifuge tube)

2.40 อุปกรณ์ป้อนอาหารทางปาก ชนิดเหล็กกล้าไร้สนิม ขนาด 20-gauge x 38 มม. (Thermo Fisher Scientific, USA)

การวิเคราะห์ข้อมูล

ข้อมูลทั้งหมดที่ได้จากการศึกษานำมาวิเคราะห์ทางสถิติโดยแสดงผลการวิจัยเป็นค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) วิเคราะห์ความแปรปรวนของข้อมูลโดยวิธี One-way analysis of variance (ANOVA) และทดสอบความแตกต่างระหว่างตัวอย่างด้วยวิธี Duncan's Multiple Range Test ที่ระดับความเชื่อมั่น $P \leq 0.05$ โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SPSS 19 (SPSS Inc. , Chicago, IL, USA)

วิธีการดำเนินการวิจัย

การศึกษางานวิจัยครั้งนี้แบ่งออกเป็น 3 ส่วน โดยมีวิธีการดำเนินการวิจัยดังนี้

การศึกษาที่ 1 การศึกษาปริมาณสารโภชนเภสัชในผลิตผลพลอยได้จากโรงงานผลิตน้ำมันรำข้าวทั้งแบบบีบเย็นและแบบสกัดด้วยตัวทำละลายในด้านศักยภาพการเป็นแหล่งของสารโภชนเภสัช

1. ศึกษาและเปรียบเทียบปริมาณแกมมา-อะมิโนบิวทิแรท (GABA) วิตามินอี (Tocopherol และ Tocotrienol) แกมมา-โอริซานอล (γ-oryzanol) ไฟโตสเตอรอล (Phytosterols) และโพลิโคซานอล (Policosanol) ในผลิตผลพลอยได้จากโรงงานผลิตน้ำมันรำข้าวทั้งแบบบีบเย็นและแบบสกัดด้วยตัวทำละลายในด้านศักยภาพการเป็นแหล่งของสารเภสัชกรรม

1.1 วิเคราะห์ปริมาณความชื้นของรำข้าวสกัดและผลิตผลพลอยได้จากโรงงานผลิตน้ำมันรำข้าวตามวิธี AOAC, 1995 No. 925.10 Moisture in flour

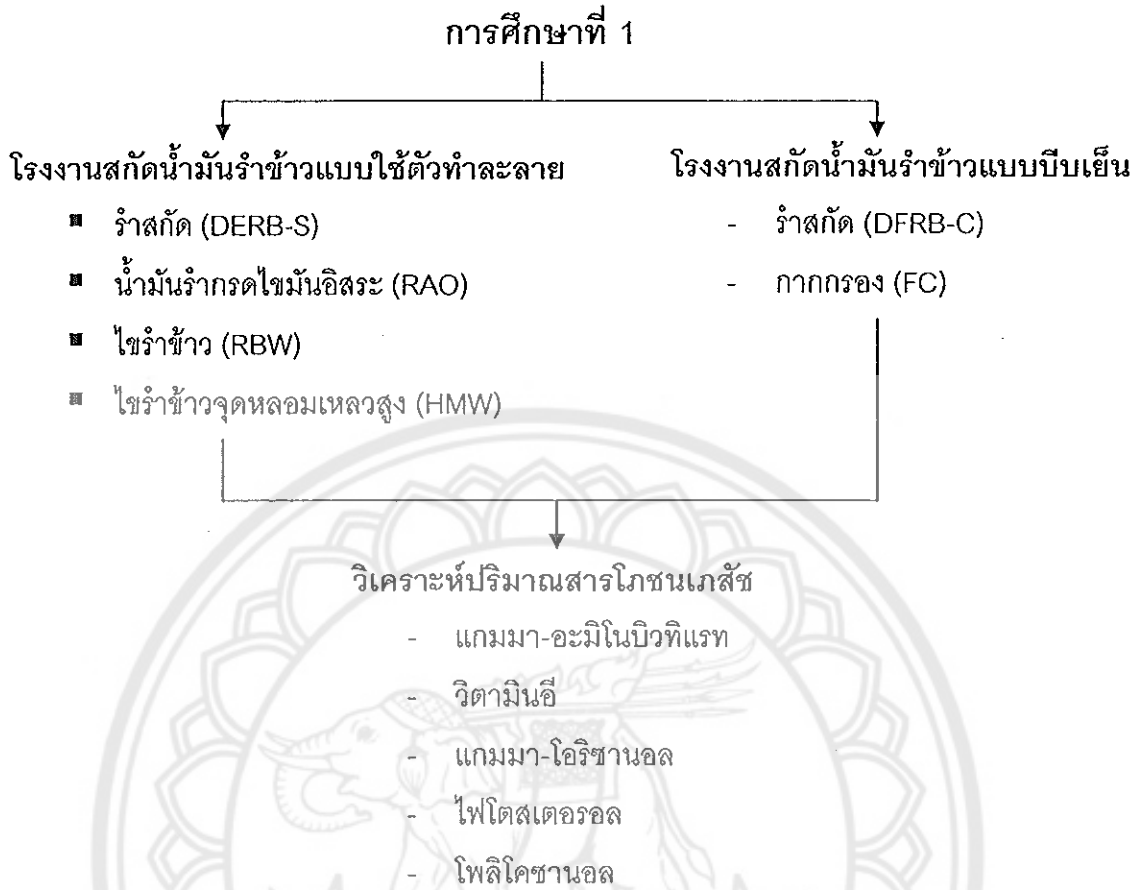
1.2 วิเคราะห์ปริมาณแกมมา-อะมิโนบิวทิแรท (GABA) ด้วยเครื่อง Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS) ปรับปรุงวิธีของ Iwaki, Kitada (2007)

1.3 วิเคราะห์ชนิดปริมาณวิตามินอีประกอบด้วยอนุพันธ์ของแอลฟา-เบตา-แกมมา-และเดลตา-โทโคฟีรอล (α-, β-, γ-, และ δ- Tocopherol) และอนุพันธ์ของแอลฟา- เบตา- แกมมา- และเดลตา-โทโคไตรอีนอล (α-, β-, γ-, และ δ -Tocotrienol) ด้วย Reverse-phase High-performance liquid chromatography (RP-HPLC) โดยปรับปรุงวิธีของ Gornas et al. (2014; Huang, & Ng, 2011)

1.4 วิเคราะห์แกมมา-โอริซานอล (γ-oryzanol) โดยใช้เครื่อง Liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS) ปรับปรุงตามวิธีของ Gornas et al. (2014; Huang, & Ng, 2011)

1.5 วิเคราะห์ชนิดและปริมาณไฟโตสเตอรอล (Phytosterol) ด้วยการปรับปรุงวิธีของ Lagarda et al. (2006)

1.6 วิเคราะห์ปริมาณสารโพลิโคซานอล (Policosanol) ด้วยเครื่อง Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS) โดยการปรับปรุงวิธีของ Ishaka et al. (2014; Asikin et al., 2008)



ภาพ 19 แสดงการศึกษาปริมาณสารโภชนเภสัชในผลิตผลพลอยได้จากโรงงานผลิตน้ำมันรำข้าวทั้งแบบบีบเย็นและแบบสกัดด้วยตัวทำละลายในด้านศักยภาพการเป็นแหล่งของสารโภชนเภสัช

การศึกษาที่ 2 การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์โพลิโคซานอล ศึกษาการสกัด และการเพิ่มปริมาณโพลิโคซานอลในผลิตผลพลอยได้จากโรงงานน้ำมันรำข้าวโดยการสกัดด้วยไดเมทิลอีเทอร์เหลวภายใต้สภาวะกึ่งวิกฤต

1. ทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ปริมาณสารโพลิโคซานอล โดยทำการตรวจสอบคุณลักษณะเฉพาะของวิธีการทดสอบตามมาตรฐานของ EURACHEM (1998; AOAC, 2002) ดังนี้

1.1 การตรวจสอบความแม่น (Accuracy) โดยเตรียมสารละลายมาตรฐาน โพลิโคซานอล ที่ความเข้มข้น 50, 100 และ 150 ลงในสารละลายโทลูอีน (สารละลายแบลงค์) จากนั้น ทำการทดสอบทั้ง Un-spiked และ Spiked samples ความเข้มข้นละ 7 ซ้ำ จากนั้นทดสอบซ้ำจำนวน 7 ครั้ง แล้วจึงคำนวณหาค่า %Recovery ของการทดสอบแต่ละครั้ง จากสูตร ดังนี้

$$\% \text{ Recovery} = \frac{(C_1 - C_2)}{C_3} \times 100$$

โดยที่ C_1 = ความเข้มข้นของ Spiked sample

C_2 = ความเข้มข้นของตัวอย่าง Unspiked sample

C_3 = ความเข้มข้นของสารมาตรฐานที่เติมลงในตัวอย่าง

จากนั้นนำผลที่ได้ไปเปรียบเทียบผลกับเกณฑ์ที่ยอมรับ เกณฑ์การยอมรับแนะนำให้อยู่ที่ 80%-120% หากค่าที่ได้ไม่อยู่ในช่วงนี้ควรปรับปรุงวิธีใหม่ (EURACHEM, 1998)

1.2 การตรวจสอบความเที่ยง (Precision) ความเที่ยงจะแสดงในรูปของ Repeatability ทำได้โดยการเติมสารละลายมาตรฐานโพลิโคซานอลความเข้มข้น 50 ppm ลงใน QC Sample นำค่าการคำนวณ Relative standard deviations (RSD) จากการทดสอบซ้ำมาเปรียบเทียบกับ RSD จากการคำนวณตามสมการ Horwitz equation (AOAC, 2002) ดังนี้

Relative standard deviations (RSD) = $\pm C^{-0.15}$

ในขณะที่ C = Concentration ratio

โดยเกณฑ์การยอมรับของ HORRAT ต้องมีค่า RSD อยู่ระหว่าง 0.5-1.5 ส่วน และ AOAC จะยอมรับค่า HORRAT น้อยกว่าหรือเท่ากับ 2

1.3 การตรวจสอบขีดจำกัดในการตรวจพบ (Limit of detection, LOD) ทำได้โดยการเติมสารละลายมาตรฐานในความเข้มข้นที่ 0.25 0.5 และ 1 ppm ลงในสารละลายโทลูอีน (สารละลายแบลงค์) ทำการทดสอบ 10 ซ้ำ จากนั้นคำนวณค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานต่อความเฉลี่ยของแต่ละความเข้มข้น จากนั้นนำผลที่ได้มาคำนวณค่า LOD ดังนี้

LOD = 3 S_0 / ความชันของกราฟมาตรฐาน

โดยเส้นตัดแกน y จุดตัดคือ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของสารละลายแบลงค์ (S_0)

1.4 การตรวจสอบขีดจำกัดในการวัดเชิงปริมาณ (Limit of quantitation, LOQ) การตรวจสอบ LOQ ทำไปพร้อมๆ กับ LOD โดย LOQ จะมีค่าประมาณ 3 เท่าของ LOD หรือ 10 SD ซึ่งสามารถใช้ข้อมูลการตรวจสอบเดียวกันได้ โดยนำผลที่ได้มาคำนวณค่า LOQ ดังนี้

LOQ = 10 S_0 / ความชันของกราฟมาตรฐาน

โดยเส้นตัดแกน y จุดตัดคือ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของสารละลายแบลงค์ (S_0)

1.5 การตรวจสอบความสัมพันธ์เชิงเส้นตรง (Linearity) ทำตามแนวทางของ (EURACHEM, 1998) โดยเตรียมสารละลายมาตรฐานที่ความเข้มข้นที่ 10 50 100 200 และ 300 ppm โดยแต่ละระดับต้องเตรียมให้มีอิสระต่อกัน วัด 1 ซ้ำ สร้างกราฟระหว่างสัญญาณที่วัดได้บนแกน y กับความเข้มข้นบนแกน x และตรวจสอบความเป็นเส้นตรง โดยค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (r) ค่า r ควรเข้าใกล้ 1

1.6 การทดสอบความคงตัว (Stability)

1.6.1 การทดสอบความคงตัวของสารสกัดโพลิซานอล (Post-preparative stability) ทำได้โดยทำอนุพันธ์แบบ Silylation ระหว่างตัวอย่างกับสาร N,O-bis (trimethylsilyl)-trifluoroacetamide (BSTFA) เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง (25°ซ) เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ดำเนินการทดสอบนำผลที่ได้มาคำนวณค่าตามสมการ โดยเกณฑ์การยอมรับของการเปลี่ยนแปลงไม่ควรเกิน ±15% ของความเข้มข้นปกติ (European medicines agency, 2012)

$$\%\ \text{Change} = 100 - \left[\frac{\text{Amount of policosanol after 48 h}}{\text{Amount of policosanol at 0 h}}\right] \times 100$$

1.6.2 การทดสอบความคงตัวของสารละลายมาตรฐานโพลิโคซานอล (Policosanol stock solution stability) ทำโดยเตรียมสารละลายมาตรฐานที่ความเข้มข้น 100 ppm โดยจะถูกวิเคราะห์หลังจากเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4°ซ) เป็นเวลา 1, 2, 3 และ 4 สัปดาห์ โดยค่าความคงตัวของสารละลายมาตรฐานโพลิโคซานอลคำนวณตามสมการ โดยมีเกณฑ์การยอมรับของการเปลี่ยนแปลงไม่เกิน ±5% (Nowatzke, & Woolf, 2007)

$$\%\ \text{Change} - 100 - \left[\frac{\text{Area peak of policosanol after storage}}{\text{Area peak of policosanol at beginning}}\right] \times 100$$

1.7 การตรวจสอบความแข็งหรือความคงทนของวิธี (Ruggedness & Robustness) ทำการตรวจสอบตาม Youden Ruggedness Trial (AOAC, 2002) โดยการกำหนดปัจจัยที่มีโอกาสทำให้ผลการทดสอบเปลี่ยนแปลงทั้งหมด 7 ปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับวิธีวิเคราะห์ โดยกำหนดให้มีสภาวะปกติ (ใช้อักษร ตัวพิมพ์ใหญ่) และสภาวะที่เปลี่ยนแปลง (ใช้อักษรตัวพิมพ์เล็ก) ดังตาราง 3

ตาราง 3 แสดงปัจจัยที่มีผลกระทบต่อความคงทนของวิธีวิเคราะห์ปริมาณสารโพลิโคซานอล

ปัจจัย	เงื่อนไขของการทดสอบ	
	สภาวะปกติ	สภาวะที่เปลี่ยนแปลง
อุณหภูมิสำหรับการทำอนุพันธ์ (Temperature for derivatization)	A = 50 °ซ	a = 60 °ซ
การสัมผัสกับแสง (Light exposure)	B = ขวดสีชา	b = ขวดสีใส
อุณหภูมิในการเก็บ (Storage temperature)	C = 4°ซ	c = 25°ซ
ตัวทำละลาย (Solvent)	D = โทลูอีน	d = คลอโรฟอร์ม
ช่วงเวลาในการวิเคราะห์ (Periods of derivatized reaction)	E = วิเคราะห์ทันทีที่หลังจากทำอนุพันธ์	e = วิเคราะห์หลังจากทำอนุพันธ์แล้ว 15 ชั่วโมง
เวลาในการทำปฏิกิริยา (Reaction time)	F = 30 นาที	f = นาที
การสัมผัสกับคลื่นอัลตร้าโซนิค (Ultrasonic exposure time)	G= ไม่มีการสัมผัส	g = สัมผัสเป็นเวลา 5 นาที

โดยทำการทดสอบทั้งหมด 8 ครั้ง ครั้งที่ 1 เป็นสภาวะปกติ และอีก 7 ครั้งมีการเปลี่ยนแปลงปัจจัยต่างๆ กัน จากนั้นคำนวณผลการทดสอบในแต่ละการทดลอง ดังตาราง 4

ตาราง 4 แสดงการวางแผนการตรวจสอบความคงทนของวิธีวิเคราะห์โพลิโคซานอล

Run No.	Factor Combinations	Measurement obtained
1	A B C D E F G	X_1
2	A B c D e f g	X_2
3	A b C d E f g	X_3
4	A b c d e F G	X_4
5	a B C d e F g	X_5
6	a B c d E f G	X_6
7	a b C D e f G	X_7
8	a b c D E F g	X_8

ที่มา: AOAC, 2002

คำนวณผลการทดสอบในแต่ละปัจจัย โดยแบ่งเป็น 2 สภาวะ คือ สภาวะปกติ (ตัวพิมพ์ใหญ่) และสภาวะที่มีการเปลี่ยนแปลง (ตัวพิมพ์เล็ก) ดังนี้

Effect of A and a $= \frac{4\square}{4} - \frac{4\square}{4} = \frac{\square_1+\square_2+\square_3+\square_4}{4} - \frac{\square_5+\square_6+\square_7+\square_8}{4} = \square$

Effect of B and b $= \frac{4\square}{4} - \frac{4\square}{4} = \frac{\square_1+\square_2+\square_5+\square_6}{4} - \frac{\square_3+\square_4+\square_7+\square_8}{4} = \square$

Effect of C and c $= \frac{4\square}{4} - \frac{4\square}{4} = \frac{\square_1+\square_3+\square_5+\square_7}{4} - \frac{\square_2+\square_4+\square_6+\square_8}{4} = \square$

Effect of D and d $= \frac{4\square}{4} - \frac{4\square}{4} = \frac{\square_1+\square_2+\square_7+\square_8}{4} - \frac{\square_3+\square_4+\square_5+\square_6}{4} = \square$

Effect of E and e $= \frac{4\square}{4} - \frac{4\square}{4} = \frac{\square_1+\square_3+\square_6+\square_8}{4} - \frac{\square_2+\square_4+\square_5+\square_7}{4} = \square$

Effect of F and f $= \frac{4\square}{4} - \frac{4\square}{4} = \frac{\square_1+\square_4+\square_5+\square_8}{4} - \frac{\square_2+\square_3+\square_6+\square_7}{4} = \square$

Effect of G and g $= \frac{4\square}{4} - \frac{4\square}{4} = \frac{\square_1+\square_4+\square_6+\square_7}{4} - \frac{\square_2+\square_3+\square_5+\square_8}{4} = \square$

ทำการคำนวณจนครบทุกปัจจัย ผลที่ได้ คือ ปริมาณของโพลิโคซานอล ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน และค่าความอ่อนไหว (Significant sensitive for change) ของทั้ง 8 ผลลัพธ์ ซึ่งใช้เกณฑ์การยอมรับความแข็งหรือความคงทนของวิธี (Bedregal et al., 2008) ดังนี้

IF [A-a]..... [G-g] $\square \pm \sqrt{2}$*SD = significant sensitive for changes

หากค่า $\sqrt{2}$*SD ของปัจจัยใดมีมากกว่าผลลัพธ์ที่ได้ แสดงให้เห็นว่าวิธีการนี้มีความไวต่อตัวแปรดังกล่าว รวมทั้งมีผลต่อเปลี่ยนแปลงปริมาณสารโพลิโคซานอล

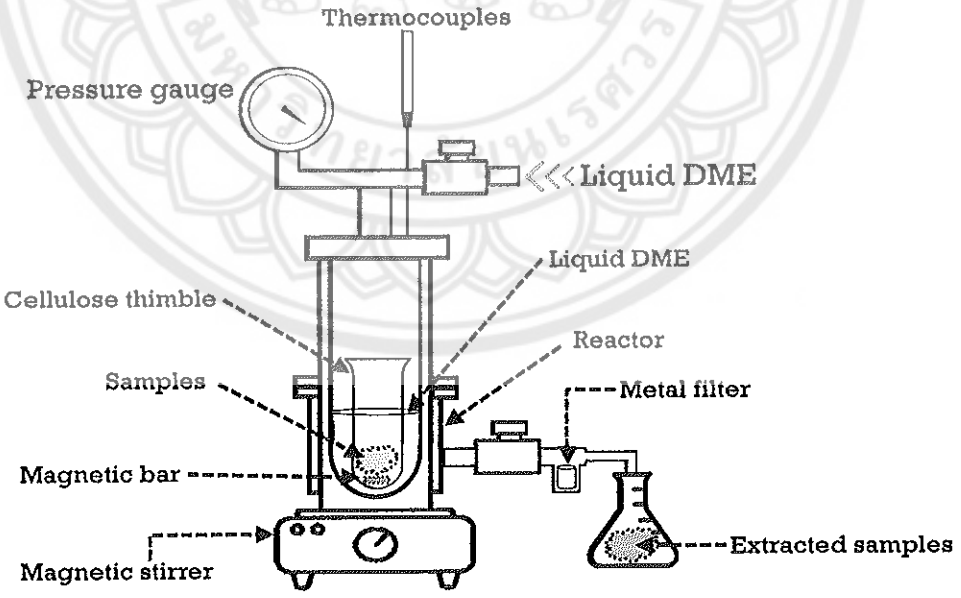
2. ศึกษาการสกัดสารโภชนเภสัช และเพิ่มปริมาณสารโพลิโคซานอลจากผลิตผลพลอยได้จากกระบวนการผลิตน้ำมันรำข้าวบีบเย็นและแบบสกัดด้วยตัวทำละลายโดยการสกัดสารด้วยไดเมทิลอีเทอร์เหลวภายใต้สภาวะกึ่งวิกฤต

ศึกษาวิธีการสกัดสารโภชนเภสัชจากผลิตผลพลอยได้ ได้แก่ รำสกัด (DERB-S) และไขรำข้าว (RBW) จากโรงงานผลิตน้ำมันรำข้าวด้วยตัวทำละลาย รำสกัด (DERB-C) และกากกรอง (FC) จากโรงงานผลิตน้ำมันรำข้าวแบบบีบเย็นด้วยไดเมทิลอีเทอร์เหลวภายใต้สภาวะกึ่งวิกฤตเปรียบเทียบกับวิธีทางเคมีทรานเอสเทริฟิเคชัน (Transesterification; TE) และการศึกษาการเพิ่มความบริสุทธิ์สารโพลิโคซานอลทำด้วยไดเมทิลอีเทอร์เหลวภายใต้สภาวะกึ่งวิกฤตเทียบกับวิธีสกัดด้วยตัวทำละลาย (Solvent extraction) ด้วยตัวอย่างที่ผ่านการปรับสภาพ

2.1 การสกัดสารโภชนเภสัชด้วยไดเมทิลอีเทอร์เหลวภายใต้สภาวะกึ่งวิกฤต (ภาพ 20) ชั่งตัวอย่าง 10 กรัม ใส่ลงใน Cellulose thimble (Whatman 30 mm× 100 mm) จากนั้นนำไปใส่ในเครื่อง Sub-critical liquefied dimethyl ether (SUBDME) ใส่ Liquefied dimethyl ether (DME) ปริมาณ 60 กรัม โดยตั้งอุณหภูมิที่ 35°ซ ความดัน 8 bar อัตราในการกวนที่ 500 รอบ/นาที เป็นเวลา 30 นาที สารที่ได้จะถูกกรองด้วย Metal filter ขนาด 7 Microns และเก็บที่อุณหภูมิ -20°ซ เพื่อรอการวิเคราะห์ในขั้นต่อไป

2.2 กระบวนการสกัดโพลิโคซานอลด้วยเทคนิคทรานเอสเทริฟิเคชัน (Transesterification; TE) โดยปรับปรุงวิธีของ Aryusuk (2018) ละลายตัวอย่างไขรำข้าวและกากกรองปริมาณ 40 กรัม ใส่ส่วนผสมของ 2% โซเดียมไฮดรอกไซด์ในเอทานอลปริมาณ 240 มล. จากนั้นปั่นกวนที่ความเร็ว 500 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 80°ซ เป็นเวลา 15 นาที ปล่อยให้ส่วนผสมที่ได้ทำปฏิกิริยาเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 60°ซ จากนั้นเทส่วนผสมของไอโซออกเทน : เอทานอล (70: 30) ในปริมาณ 200 มล. ทำการแยกสารด้วยกรวยแยกสาร และเก็บส่วนใสในตู้เย็นอุณหภูมิ 4°ซ เป็นเวลา 18 ชั่วโมง จากนั้นนำ Crystallized wax ที่ได้มากรองด้วยกรวยกรองบุชเนอร์ และล้างด้วยเอทานอลปริมาณ 10 มิลลิตร จำนวน 2 รอบ นำตัวอย่างที่เหลือบนกระดาษกรองไปอบในตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 60°ซ เป็นเวลา 5 ชั่วโมง แล้วจึงนำไปบดให้ละเอียดและเก็บที่อุณหภูมิ -20°ซ

2.3 การเพิ่มความบริสุทธิ์หรือปริมาณสารโพลิโคซานอลด้วยไดเมทิลอีเทอร์เหลวภายใต้สภาวะกึ่งวิกฤต (ภาพ 20) ชั่งตัวอย่างที่ผ่านการปรับสภาพด้วยเทคนิค ทรานเอสเทอริฟิเคชัน ปริมาณ 10 กรัมลงใน Cellulose thimble (Whatman 30 mm× 100 mm) จากนั้นนำไปใส่ในเครื่อง Sub-critical liquefied dimethyl ether (SUBDME) ใส่ Liquefied dimethyl ether (DME) ปริมาณ 60 กรัม โดยตั้งอุณหภูมิที่ 35°ซ ความดัน 8 bar อัตราในการกวนที่ 500 รอบ/นาที เป็นเวลา 30 นาที สารที่ได้จะถูกกรองด้วย Metal filter ขนาด 60 Microns และเก็บที่อุณหภูมิ -20°ซ



ภาพ 20 แสดงเครื่องสกัดสารด้วยไดเมทิลอีเทอร์เหลวภายใต้สภาวะกึ่งวิกฤต

ที่มา: ปรับปรุงจาก Horikoshi, Hamamura, Kajitani, Yoshizawa-Fujita, & Serpone, 2008

2.4 การทำบริสุทธิ์โพลิโคซานอลด้วยตัวทำละลายโทลูอีน (Solvent extraction) ปรับปรุงวิธีของ Asikin et al. (2012) ชั่งตัวอย่างที่ผ่านการปรับสภาพด้วยเทคนิค ทรานเอสเทอริฟิเคชัน ปริมาณ 2 กรัม จากนั้นใส่โทลูอีน 40 มล. เขย่าเป็นเวลา 30 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 6,000 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 10°ซ เป็นเวลา 15 นาที ดูดส่วนใสแล้วนำไปทำระเหยจนแห้งด้วยเครื่องกลั่นระเหยสาร นำไปบดให้ละเอียดและเก็บที่อุณหภูมิ -20°ซ

2.5 วิเคราะห์ปริมาณสารเคมีตกค้าง (Multi-solvent residue screen) ใน โพลิโคซานอลสกัดโดยใช้เครื่อง Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS) จากการปรับปรุงวิธีของ Seo, & Shin (2010)

2.5.1 วิเคราะห์ปริมาณแกมมา-โอริซานอล ตามหัวข้อ 1.4

2.5.2 วิเคราะห์ชนิดและปริมาณไฟโตสเตอรอล ตามหัวข้อ 1.5

2.5.3 วิเคราะห์ปริมาณโพลิโคซานอล ตามหัวข้อ 1.6

ภาพ 21 แสดงการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์โพลิโคซานอล และการศึกษาการสกัดและเพิ่มปริมาณโพลิโคซานอลในผลิตผลพลอยได้จากโรงงานน้ำมันรำข้าว

การศึกษาที่ 3 ศึกษาความเป็นพิษและประสิทธิภาพในการลดระดับคอเลสเตอรอลในสัตว์ทดลองของสารโพลิโคซานอลสกัด รวมทั้งพัฒนาน้ำมันรำข้าวเสริม สารโพลิโคซานอล

1. ศึกษาความเป็นพิษ (Toxicity test) และประสิทธิภาพในการลดระดับ คอเลสเตอรอล (Cholesterol-lowering effects test) ในเลือดของสารโพลิโคซานอลสกัด (PPC) ในสัตว์ทดลอง

1.1 การทดสอบความเป็นพิษของโพลิโคซานอลสกัด (Purified policosanol; PPC) กึ่งเฉียบพลัน (Sub-acute toxicity test) ในหนูไมส์ โดยปรับปรุงวิธีของ Alemán et al. (1995) โดยใช้หนูไมส์พันธุ์ ICR น้ำหนัก 19-21 กรัม อายุ 4 สัปดาห์ จากบริษัท BioLASCO Taiwan Co., Ltd. โดยปล่อยหนูให้คุ้นเคยกับสภาพแวดล้อมก่อนการทดลอง 1 สัปดาห์ โดยเลี้ยงในห้องเลี้ยงสัตว์ทดลอง ณ Institute of Food Science and Technology, National Taiwan University สาธารณรัฐจีน (ไต้หวัน) ห้องมีการควบคุมอุณหภูมิที่ 25 ±1°ซ และความชื้นที่ 50 % ได้รับแสงสว่างวันละ 12 ชั่วโมง (ภาพ 22a) หนูสามารถเข้าถึงอาหาร 5001 Rodent Diet ชนิดเม็ด (ภาพ 22b) (พลังงานและสารอาหารแสดงในตาราง 5) และน้ำได้ตลอดเวลา

แบ่งหนูออกเป็น 4 กลุ่ม กลุ่มละ 10 ตัว แต่ละกลุ่ม ประกอบด้วย เพศผู้ 5 ตัว เพศเมีย 5 ตัว และป้อนสารละลายโพลิโคซานอลสกัดในกลีเซอรอลทางปาก (Oral gavage) เป็นเวลา 28 วัน

กลุ่มที่ 1 ให้สารละลายกลีเซอรอลในปริมาณ 100 มก./กก./น้ำหนักตัว/วัน

กลุ่มที่ 2 ให้สารละลายกลีเซอรอลผสมกับ PPC ความเข้มข้น 40 มก./มล. ในปริมาณ 50 มก./น้ำหนักตัว กก./วัน

กลุ่มที่ 3 ให้สารละลายกลีเซอรอลผสมกับ PPC ความเข้มข้น 40 มก./มล. ในปริมาณ 100 มก./น้ำหนักตัว กก./วัน

กลุ่มที่ 4 ให้สารละลายกลีเซอรอลผสมกับ PPC ความเข้มข้น 40 มก./มล. ในปริมาณ 200 มก./น้ำหนักตัว กก./วัน

การเตรียมละลายโพลิโคซานอลทำได้โดยนำ PPC ผสมกับสารละลายกลีเซอรอลที่ระดับความเข้มข้นที่ 40 มก./มล. จากนั้น นำไปแช่ในน้ำร้อนอุณหภูมิ 60°ซ จนละลายทั้งหมด และเก็บที่อุณหภูมิ 4°ซ โดยสารละลายผสมที่ใช้จะมีการเตรียมใหม่ทุก 3 วัน

ตาราง 5 แสดงปริมาณพลังงานและสารอาหารของอาหารสำหรับหนูไมส์และแฮมสเตอร์ (Normal Diet)

สารอาหาร	ปริมาณ (กรัม/100กรัม)	พลังงาน (kcal/100 กรัม)	พลังงาน (%)
โปรตีน	23.90	95.60	28.50
ไขมัน	5.00	45.00	13.40
คาร์โบไฮเดรต	48.70	194.80	58.10
อื่นๆ	22.40	-	-
รวม	100.00	335.40	100.00

(a) (b)

ภาพ 22 แสดงสถานที่และอาหารสำหรับหนูไมส์ (a) ห้องเลี้ยงสัตว์ทดลอง; (b) อาหารสำหรับหนูไมส์

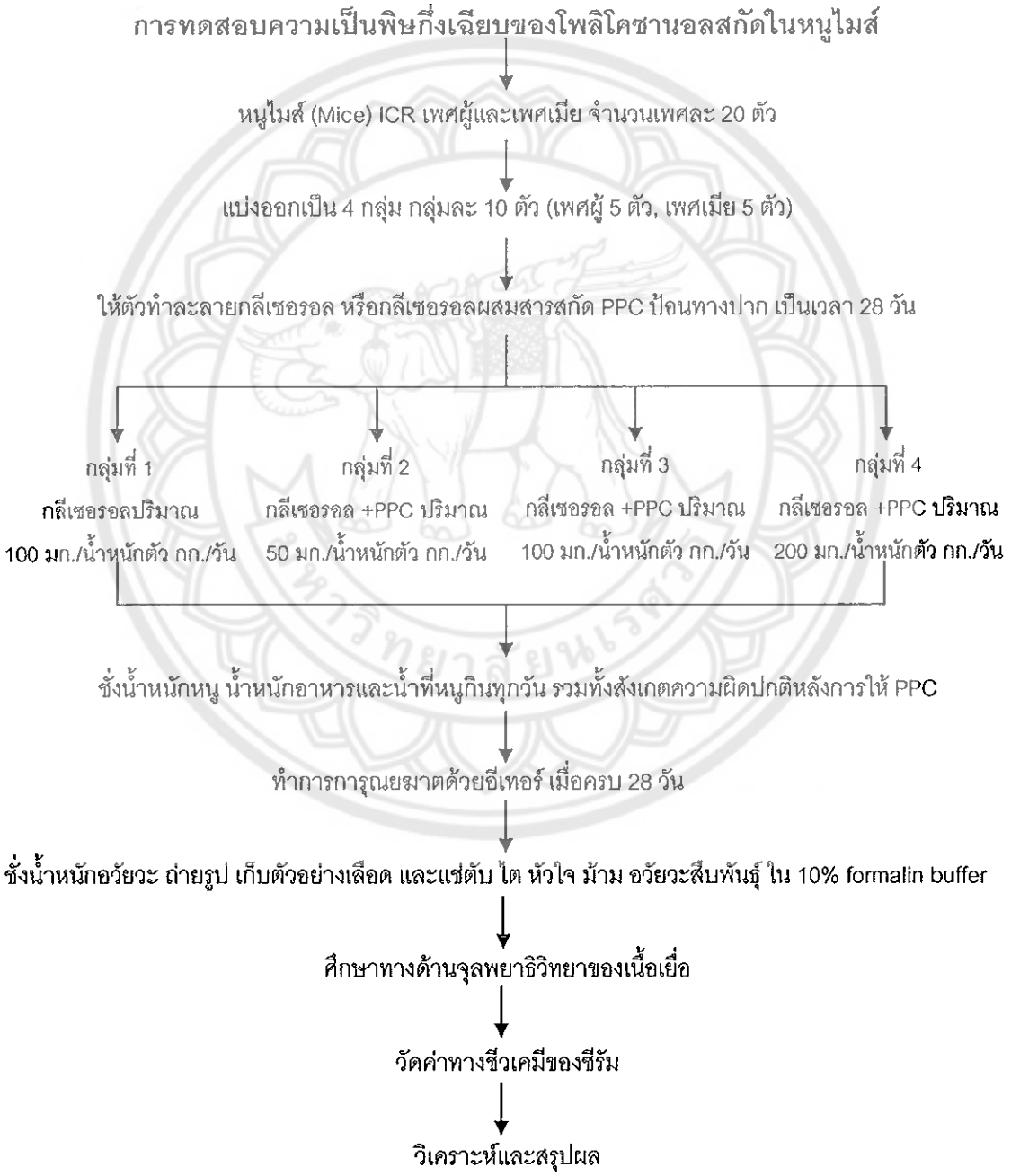
ขั้นตอนการทดลอง

1. ป้อนสารละลายกลีเซอรอล หรือสารละลายกลีเซอรอล ผสม PPC ทุกวัน ในช่วงเวลา 8.30-12.00 เป็นเวลา 28 วัน

2. ชั่งน้ำหนักหนู รวมทั้งน้ำหนักอาหารและน้ำที่หนูกินทุกวัน และสังเกตลักษณะภายนอก หรืออาการผิดปกติ หรือการเปลี่ยนแปลงที่อาจจะเกิดขึ้นได้ หลังการป้อน PPC

3. หลังจากป้อนสารละลายกลีเซอรอล หรือสารละลายกลีเซอรอลผสม PPC ครบ 28 วัน ทำการการุณยฆาตด้วยอีเทอร์ จากนั้นจึงทำการเก็บตัวอย่างเลือดและผ่าซาก (ภาคผนวก ข)

และทำการวิเคราะห์ค่าทางชีวเคมีของเซรัม เช่น Blood Urea Nitrogen (BUN), Creatinine (CREA), Aspartate aminotransferase (AST) และ Alanine aminotransferase (ALT) โดยการตรวจวัดค่าดังกล่าว ทำโดยส่งตัวอย่างไปที่ Institute of Information Science, Academia Sinica สาธารณรัฐจีน (ไต้หวัน) รวมทั้งชั่งน้ำหนักอวัยวะต่างๆ เช่น ตับ ไต หัวใจ ม้าม และอวัยวะสืบพันธุ์ จากนั้นนำอวัยวะทั้งหมดแช่ใน 10 % formalin buffer เพื่อนำไปศึกษาทางด้านจุลพยาธิวิทยาของเนื้อเยื่อ (ภาคผนวก ข)



ภาพ 23 แสดงการศึกษาความเป็นพิษกึ่งเฉียบพลันของโพลิโคซานอลสกัดในหนูไมส์

1.2 การศึกษาประสิทธิภาพการลดระดับคอเลสเตรอลในเลือดของ โพลิโคซานอลสกัดในแฮมสเตอร์ โดยปรับปรุงวิธีของ Varady et al. (2003) โดยใช้แฮมสเตอร์เพศผู้ พันธุ์ Syrian น้ำหนัก 70-90 กรัม อายุ 3 สัปดาห์ จากบริษัท NARlabs, Taiwan จากนั้นปล่อยให้ แฮมสเตอร์คุ้นเคยกับสภาพแวดล้อมก่อนการทดลอง 1 สัปดาห์ โดยเลี้ยงในห้องเลี้ยงสัตว์ทดลอง ณ Institute of Food Science and Technology, National Taiwan University สาธารณรัฐจีน (ไต้หวัน) โดยห้องจะมีการควบคุมอุณหภูมิที่ 25 ±1°ซ และความชื้นที่ 50 % ให้แสงสว่างวันละ 12 ชั่วโมง แฮมสเตอร์สามารถเข้าถึงอาหาร 5001 Rodent Diet ชนิดผง และน้ำได้ตลอดเวลา

แบ่งแฮมเตอร์เป็น 4 กลุ่ม กลุ่มละ 10 ตัว และให้สารทางปาก เป็นเวลา 70 วัน

กลุ่มที่ 1 ให้อาหารปกติ (Normal food) (ภาพ 24a) (พลังงานและสารอาหารแสดงในตาราง 5) และป้อนสารละลายกลีเซอรอลในปริมาณ 50 มก./น้ำหนักตัว กก./วัน

กลุ่มที่ 2 ให้อาหารที่มีไขมันสูง (High fat diet food; HFD) (ภาพ 24b) (พลังงานและสารอาหารแสดงในตาราง 6) และป้อนสารละลายกลีเซอรอลในปริมาณ 50 มก./น้ำหนักตัว กก./วัน

กลุ่มที่ 3 ให้อาหารที่มีไขมันสูง และป้อนสารละลายกลีเซอรอลผสมกับยาโลวาสแตติน (Lovastatin) ซึ่งเป็นยาลดคอเลสเตอรอลในมนุษย์ ในปริมาณ 20 มก./น้ำหนักตัว กก./วัน

กลุ่มที่ 4 ให้อาหารที่มีไขมันสูง และป้อนสารละลายกลีเซอรอลผสมกับสารโพลิโคซานอลสกัด (PPC) ในปริมาณ 50 มก./น้ำหนักตัว กก./วัน

การเตรียมสารละลายผสมโพลิโคซานอล ทำเช่นเดียวกับ การทดลองที่ 1.1 ส่วนการเตรียมสารละลายผสมยาโลวาสแตติน ทำได้โดยผสมยาโลวาสแตตินกับสารละลายกลีเซอรอลที่ระดับความเข้มข้นที่ 20 มก./มล. จากนั้น นำไปแช่ในน้ำร้อนจนละลายทั้งหมดเก็บในอุณหภูมิ 4°ซ โดยสารละลายผสมที่ใช้จะมีการเตรียมใหม่ทุก 3 วัน

ขั้นตอนการทดลอง

1. ป้อนสารละลายกลีเซอรอล หรือสารละลายกลีเซอรอล ผสม PPC หรือสารละลาย กลีเซอรอลผสมกับยาโลวาสแตตินทุกวัน ในช่วงเวลา 8.30-12.00 เป็นเวลา 70 วัน

2. ชั่งน้ำหนักแฮมสเตอร์ รวมทั้งน้ำหนักอาหารและน้ำที่แฮมสเตอร์กินทุกวัน และสังเกตลักษณะภายนอก หรืออาการผิดปกติ หรือการเปลี่ยนแปลงที่อาจจะเกิดขึ้นได้ หลังการป้อน PPC หรือ Lovastatin

3. หลังจากป้อนสารละลายกลีเซอรอล หรือสารละลายกลีเซอรอลผสม PPC หรือสารละลายกลีเซอรอลผสมกับยาโลวาสแตติน เมื่อครบ 70 วัน งดให้อาหารก่อนทำการการุณยฆาตด้วยอีเทอร์เป็นเวลา 8 ชั่วโมง จากนั้นจึงทำการผ่าซากเพื่อเก็บตัวอย่างเลือดจากหัวใจ (ภาคผนวก ข) มาวิเคราะห์ค่าทางชีวเคมีของซีรัมได้แก่ค่า คอเลสเตอรอลทั้งหมด (Total cholesterol; T-CHO),

แอชดีแอลคอเลสเตอรอล หรือไขมันดี (High-density lipoprotein cholesterol; HDL) ลิโพโปรตีนความหนาแน่นต่ำ หรือไขมันเลว (Low-density lipoprotein cholesterol; LDL) และค่า ไตรกลีเซอไรด์ (Triglyceride; TG) โดยการตรวจวัดค่าดังกล่าวทำโดยส่งตัวอย่างไปที่ Institute of Information Science, Academia Sinica สาธารณรัฐจีน (ไต้หวัน) รวมทั้งชั่งน้ำหนักอวัยวะต่างๆ เช่น ตับ ไต ม้าม อัณฑะ ไขมัน Perigonadal Retroperitoneal และ Mesenteric จากนั้น นำอวัยวะทั้งหมดดังกล่าวมาแช่ใน 10 % formalin buffer เพื่อนำไปศึกษาทางด้านจุลพยาธิวิทยาของเนื้อเยื่อ (ภาคผนวก ข)

(a) (b)

ภาพ 24 แสดงอาหารสำหรับแฮมสเตอร์ (a) Normal diet; (b) High fat diet

ตาราง 6 แสดงปริมาณพลังงานและสารอาหารของอาหารไขมันสูงสำหรับแฮมสเตอร์ (High fat diet; HFD)

สารอาหาร	ปริมาณ (กรัม/100 กรัม)	พลังงาน (kcal/100 กรัม)	พลังงาน (%)
โปรตีน	20.29	81.16	25.08
ไขมัน	19.35	174.15	23.92
คาร์โบไฮเดรต	41.35	165.40	51.10
อื่นๆ	19.01	-	-
รวม	100.00	420.71	100.00

ตาราง 7 แสดงปริมาณและส่วนผสมของอาหารปกติและอาหารไขมันสูงสำหรับแฮมสเตอร์

ส่วนผสม	Normal Diet		HFD	
5001 Laboratory rodent diet	1,000 กรัม	100%	849 กรัม	84.90%
น้ำมันหมู	-	0%	50 กรัม	5%
น้ำมันถั่วเหลือง	-	0%	100 กรัม	10%
คอเลสเตอรอล	-	0%	1 กรัม	0.1%

ภาพ 25 แสดงการศึกษาประสิทธิภาพการลดระดับคอเลสเตรอลในเลือด ของโพลิโคซานอลสกัด ในแฮมสเตอร์เพศผู้

2. การพัฒนาน้ำมันรำข้าวเสริมโพลิโคซานอลโดยศึกษาผลการเสริมสารโพลิโคซานอลสกัดต่อคุณภาพน้ำมันด้านสมบัติทางเคมี กายภาพและวิเคราะห์ปริมาณโพลิโคซานอล เพื่อเป็นต้นแบบอาหารฟังชั่น (Functional food)

2.1 การพัฒนาน้ำมันรำข้าวเพิ่มสารโพลิโคซานอลสกัดที่ระดับ 300 และ 600 ppm คำนวณจากการแนะนำให้บริโภคสารโพลิโคซานอล (PC) ในปริมาณ 20 มก. ต่อวัน หรือเท่ากับ 6.6 มก. ต่อมื้อ (20/3) จากอาหารที่รับประทาน และสำหรับประเทศไทยกระทรวงสาธารณสุขได้ให้คำแนะนำการบริโภคไขมันต่อวัน คือ ไม่ควรบริโภคไขมันเกิน 65 กรัม หรือ 21 กรัมต่อมื้อ อย่างไรก็ตามในมื้ออาหารควรได้รับปริมาณไขมันจากอาหารที่หลากหลาย เช่น ไขมันจากสัตว์ จากพืช หรือขนม ดังนั้น การวิจัยนี้เลือกปริมาณไขมันที่ควรได้รับจากน้ำมันที่ 50% ของปริมาณไขมันที่ควรได้รับต่อมื้อหรือในมื้อนั้น คือที่ 10.5 กรัมต่อมื้อ (21/2) ซึ่งการคำนวณปริมาณการเสริมโพลิโคซานอลสกัดที่ 300 และ 600 ppm แสดงดังต่อไปนี้

ปริมาณการเสริมโพลิโคซานอลสกัดที่ระดับ 300 ppm

น้ำมันรำข้าวมื้อละ 21 กรัม มี PC 6.6 มก.

ถ้าน้ำมัน 1,000 กรัม มี PC $\frac{1,000 \times 6.6}{21} = 314.29 \approx 300$ ppm

ปริมาณการเสริมโพลิโคซานอลสกัดที่ระดับ 600 ppm

น้ำมันรำข้าวมื้อละ 10.5 กรัม มี PC 6.6 มก.

ถ้าน้ำมันรำข้าว 1,000 กรัม มี PC $\frac{1,000 \times 6.6}{10.5} = 628.57 \approx 600$ ppm

โดยการเสริมน้ำมันรำข้าวด้วยโพลิโคซานอลสกัดทำได้โดยแบ่งน้ำมันรำข้าวสำหรับบริโภค (Refine oil) มาบางส่วนแล้วนำไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 60°ซ กวนผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องกวนสารแบบแกนหมุนที่ความเร็วรอบ 1,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที โดยใช้วิธีที่ปรับปรุงจาก Tian, & Acevedo (2018) ซึ่งปริมาณการเสริมโพลิโคซานอลสกัดแสดงในตาราง 8

ตาราง 8 แสดงปริมาณการเสริมโพลิโคซานอลสกัดในน้ำมันรำข้าว

กลุ่มทดลอง	น้ำมันรำข้าว (มิลลิลิตร)	โพลิโคซานอลสกัด (มิลลิกรัม)
น้ำมันรำข้าวสูตรควบคุม	1,000	0
น้ำรำข้าวเสริมโพลิโคซานอลสกัด 300 ppm	1,000	300
น้ำรำข้าวเสริมโพลิโคซานอลสกัด 600 ppm	1,000	600

2.2 การศึกษาความคงตัวต่อความร้อนของน้ำมันรำข้าวเสริมสาร โพลิโคซานอลสกัดโดยปรับปรุงวิธีจาก Lira et al. (2017) ชั่งน้ำมันรำข้าวเสริมสารโพลิโคซานอลสกัดในปริมาณ 30 มล. ให้ความร้อนในกระทะแบบเปิด (เส้นผ่าศูนย์กลาง 19 cm สูง 4 cm) เป็นเวลา 10, 15 และ 20 นาที ที่อุณหภูมิ 150 และ 180°ซ จากนั้นบรรจุตัวอย่างใส่ขวดสีชาและตั้งทิ้งไว้ให้เย็น และนำไปวิเคราะห์หาปริมาณโพลิโคซานอลด้วยเครื่อง GC/MS

2.3 การศึกษาผลการเก็บน้ำมันรำข้าวเสริมโพลิโคซานอลสกัดต่อสมบัติทางเคมีและกายภาพ โดยทำแบ่งตัวอย่างออกเป็น 3 กลุ่ม ได้แก่ น้ำมันรำข้าวสูตรควบคุม น้ำมันรำข้าวเสริม PPC ที่ระดับ 300 และ 600 ppm จากนั้นบรรจุตัวอย่างน้ำมันในขวดสีชาปริมาตร 70 มล. ปิดฝาให้สนิท พันด้วยพาราฟิล์มเก็บในอุณหภูมิห้อง (27±5°ซ) เป็นเวลา 6 เดือน สุ่มตัวอย่างน้ำมันที่ได้เพื่อวิเคราะห์ค่าสีและความเข้มของสี รวมทั้งความหนืดเริ่มต้น วิเคราะห์ค่าความเป็นกรดและค่าเปอร์ออกไซด์ทุก 15 วัน และวิเคราะห์ปริมาณโพลิโคซานอลทุก 1 เดือน

2.4 วิเคราะห์ปริมาณสารโพลิโคซานอล (Policosanol) ตามหัวข้อ 1.6

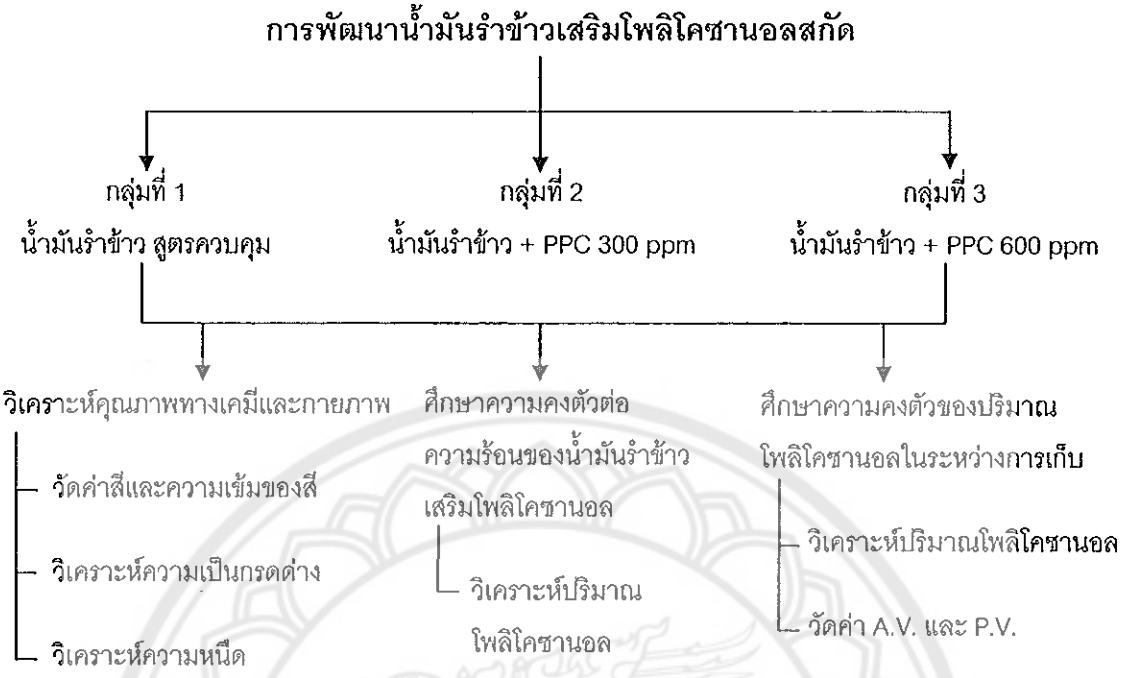
2.5 วิเคราะห์ปริมาณค่าความเป็นกรด (Acid value; A.V.) ตามวิธี AOAC (1995)

2.6 วัดค่าเพอร์ออกไซด์ (Peroxide Value; P.V.) ตามวิธี AOAC (1995)

2.7 การวัดสีและความเข้มสีของตัวอย่างน้ำมันรำข้าวสูตรควบคุมและสูตรเสริม PPC ในระดับ 300 ppm และ 600 ppm ด้วยเครื่อง Chroma meter CR-400 (Konica Minolta, Japan)

2.8 วัดค่าความเป็นกรด-ด่างของตัวอย่างน้ำมันรำข้าวสูตรควบคุมและสูตรเสริม PPC ในระดับ 300 ppm และ 600 ppm ด้วยเครื่อง Ionix pH 100 pH meter (Ionix, Singapore)

2.9 วัดความหนืด ด้วยเครื่อง BROOKFIELD - DV-II Viscometer (Brookfield, MA, USA) โดยใช้หัววัด RV spindle 501 ตั้งโปรแกรมให้ความเร็วรอบในการหมุนหัววัดที่ 100 รอบ/นาที โดยให้ค่าทอร์ก (Torque) อยู่ในช่วง 85-100% อุณหภูมิของตัวอย่างอยู่ที่ 27-28°ซ จากนั้นทำการบันทึกค่า Torque (%) และค่า Centipoise (cP) โดยแต่ละตัวอย่างจะวัดค่าทั้งหมด 3 ซ้ำ



ภาพ 26 แสดงการพัฒนาน้ำมันรำข้าวเสริมโพลิโคซานอลเพื่อเป็นผลิตภัณฑ์อาหาร**ฟังชั่น**

บทที่ 4

ผลการวิจัย

การศึกษาที่ 1 การศึกษาปริมาณสารโภชนเภสัช (Nutraceuticals) ในผลิตผลพลอยได้จากโรงงานผลิตน้ำมันรำข้าวทั้งแบบบีบเย็นและแบบสกัดด้วยตัวทำละลายในด้านศักยภาพการเป็นแหล่งของสารโภชนเภสัช

1. วิเคราะห์ปริมาณแกมมา-อะมิโนบิวทิเรต (γ -aminobutyrate) ในผลิตผลพลอยได้จากโรงงานผลิตน้ำมันรำข้าวแบบบีบเย็นและแบบสกัดด้วยตัวทำละลาย

ผลจากการวิเคราะห์ปริมาณสาร GABA (ตาราง 9) ในผลิตผลพลอยได้จากโรงงานผลิตน้ำมันรำข้าวแบบบีบเย็นและแบบสกัดด้วยตัวทำละลาย พบว่า ตัวอย่างรำสกัดจากกระบวนการสกัดน้ำมันรำข้าวแบบที่ใช้ตัวทำละลาย (DFRB-S) เป็นตัวอย่างที่มีปริมาณ GABA สูงที่สุด (97.36±1.22 มก./100 กรัม) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) รองลงมา ได้แก่ กากกรองจากกระบวนการสกัดแบบบีบเย็น (FC) (17.18±0.23 มก./100 กรัม) และรำสกัดจากกระบวนการบีบเย็น (DFRB-C) (12.04±0.11 มก./100 กรัม) ผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นสารกาบาตกค้างในตัวอย่างรำข้าวที่เหลือจากการใช้ตัวทำละลายสกัดเป็นปริมาณมากกเมื่อเทียบกับรำสกัดที่ได้จากกระบวนการบีบเย็น ซึ่งบ่งชี้ว่าการสกัดน้ำมันด้วยตัวทำละลายไม่สามารถสกัดสาร GABA ได้อย่างมีประสิทธิภาพ เนื่องจาก GABA เป็นสารจำพวก Polar non-protein amino acid (Pramai et al., 2018) จึงไม่สามารถละลายในสารละลายที่มีขั้วต่ำ เช่น เฮกเซนซึ่งเป็นตัวทำละลายที่ใช้สกัดน้ำมันรำข้าวในระดับอุตสาหกรรมได้ จึงทำให้สาร GABA เหลืออยู่เป็นจำนวนมากในตัวอย่าง DFRB-S นอกจากนี้ ทฤษฎีดังกล่าวสามารถอธิบายผลการวิเคราะห์ปริมาณ GABA ในตัวอย่างน้ำมันรำกรดไขมันอิสระ (RAO) ไขรำข้าว (RBW) และไขรำข้าวจุดหลอมเหลวสูง (HMW) จากกระบวนการผลิตน้ำมันรำข้าวด้วยตัวทำละลาย ซึ่งไม่พบสาร GABA ในตัวอย่าง อย่างไรก็ตาม ปริมาณสารกาบาที่พบในตัวอย่าง FC และ DFRB-C เนื่องมาจากเป็นตัวอย่างที่ผ่านกระบวนการบีบน้ำมันด้วยแรงทางกลเท่านั้นจึงเป็นเหตุให้ยังคงมีปริมาณ GABA ตกค้างเหลือในผลิตผลพลอยได้ดังกล่าว

ตาราง 9 แสดงปริมาณความชื้นและสารแกมมา-อะมิโนบิวทิเรต (γ -aminobutyrate) ในผลิตผลพลอยได้จากโรงงานผลิตน้ำมันรำข้าวแบบบีบเย็นและแบบสกัดด้วยตัวทำละลาย

ตัวอย่าง	ปริมาณความชื้น (%)	γ -aminobutyrate (GABA) (มก.100 กรัม)	
		ฐานเปียก	ฐานแห้ง
DFRB-C	6.35±0.13^{b}	11.22±0.10^{c}	12.04±0.11^{c}
FC	2.87±0.10^{c}	16.60±0.22^{b}	17.18±0.23^{b}
DFRB-S	8.95±0.09^{a}	88.65±1.11^{a}	97.37±1.22^{a}
RAO	1.84±0.09^{d}	ND	ND
RBW	0.50±1.09^{e}	ND	ND
HMW	0.69±0.07^{e}	ND	ND

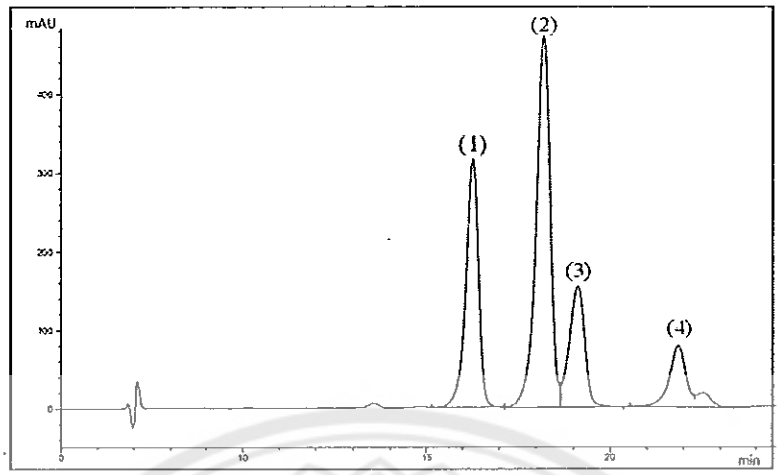
ตัวเลขในตารางแสดงค่าเฉลี่ยบนความชื้นฐานเปียก/แห้งและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (n=3); ND หมายถึง ปริมาณที่ตรวจพบได้มีค่า < LOD (ค่า LOD และ LOQ แสดงในภาคผนวก ค); ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยตัวอักษรที่แตกต่างกันในคอลัมน์เดียวกัน แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$)

2. ปริมาณแกมมา-โอริซานอล (γ-oryzanol) วิตามินอี (Tocotrienol; T3s, Tocopherol; Ts) และไฟโตสเตอรอล (Phytosterol) ในผลิตผลพลอยได้จากโรงงานผลิตน้ำมันรำข้าวแบบบีบเย็นและแบบสกัดด้วยตัวทำละลาย

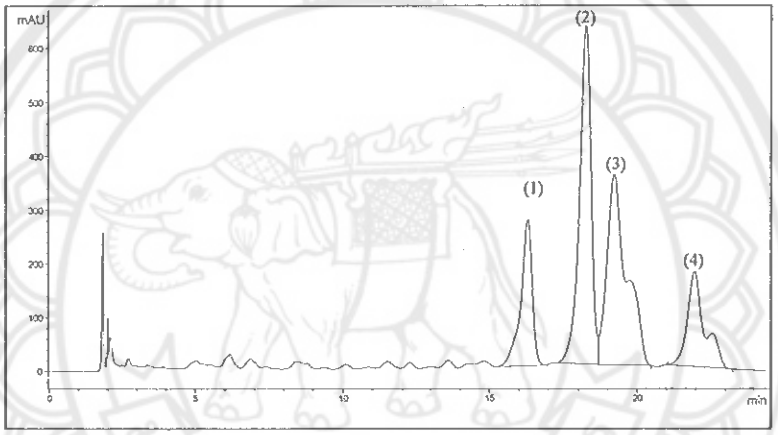
การวิเคราะห์แกมมา-โอริซานอลด้วยเครื่อง LC-MS สามารถแยกแกมมา-โอริซานอลได้ทั้งหมด 4 ชนิด คือ Cycloartenyl ferulate (m/z 601.3), 24-Methylene cycloartenyl ferulate (m/z 615.3), Campesteryl ferulate (m/z 575.3) และ β-sitosteryl ferulate (m/z 589.3) ดังแสดงในโครมาโตแกรมของแกมมา-โอริซานอล ภาพ 27 ผลดังกล่าวสอดคล้องกับงานวิจัยของ Pestana et al. (2009) ที่ระบุว่าโครงสร้างของแกมมา-โอริซานอล จะประกอบด้วย เอสเทอร์ (Esters) ของ Trans-ferulic acid (Hydroxycinnamic acid) กับไฟโตสเตอรอลจำพวก Cycloartenol, β-sitosterol, 24-Methylenecycloartenol และ Campesterol ที่มีโครงสร้างทางเคมีแสดงในภาพ 28 (Lerma-García et al., 2009) โดย RAO เป็นผลิตผลพลอยได้ที่มีปริมาณแกมมา-โอริซานอลสูงที่สุด (3,901.59 ± 4.08 มก./100 กรัม) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) รองลงมา คือ FC (1,058.28±24.86 มก./100 กรัม) และ RBW (862.80±5.52 มก./ 100 กรัม) ดังแสดงในตาราง 10

แกมมา-โอริซานอลหลักที่พบใน RAO คือ Cycloartenyl ferulate และ 24-Methylene cycloartenyl ferulate จากข้อมูลสามารถระบุได้ว่าขั้นตอน Neutralization ในกระบวนการผลิตน้ำมันรำข้าวด้วยตัวทำละลายเป็นปัจจัยที่ทำให้เกิดการสูญเสียแกมมา-โอริซานอลไปกับผลิตผลพลอยได้ RAO โดยสอดคล้องกับงานวิจัยของ Pestana et al. (2009) ซึ่งกล่าวว่า แกมมา-โอริซานอลเกือบทั้งหมดจะสูญเสียไปในกระบวนการทำให้เป็นกลาง เนื่องจากความรุนแรงของด่างที่ใช้ในกระบวนการ รวมทั้งการใช้ตัวทำละลายและไอน้ำในขั้นตอนการกำจัดกรดไขมันอิสระก็สามารถทำให้เกิดการสูญเสียแกมมา-โอริซานอลได้เช่นกัน จากรายงานของ Yoon, & Kim (1994) ระบุว่า ประมาณ 12-59% ของแกมมา-โอริซานอลจะสูญเสียไปในกระบวนการทำบริสุทธิ์น้ำมันด้วยด่างรุนแรง โดยการศึกษาดังกล่าว พบว่า แกมมา-โอริซานอลในน้ำมันรำข้าวเกิดการสูญเสียไปกับ RAO มากถึง 3.9% ของปริมาณแกมมา-โอริซานอลที่อยู่น้ำมันรำข้าวดิบ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าตัวอย่าง RAO อาจเป็นแหล่งที่ดีสำหรับการสกัดแกมมา-โอริซานอลออกมาเพื่อนำมาใช้ในอุตสาหกรรมยาและอาหารเพื่อสุขภาพ

วิตามินอีชนิดที่พบเป็นส่วนใหญ่ในผลิตผลพลอยได้ คือ วิตามินอีในรูป Tocotrienol (T3s) โดยผลิตผลพลอยได้ที่มีปริมาณวิตามินอีรวม (ผลรวมของ Tocotrienol; T3s และ Tocopherol; Ts) สูงที่สุด คือ RAO (120.59±1.72 มก./100 กรัม) อย่างไรก็ตาม พบว่า รำสกัดน้ำมัน (DFRB-S) (6.47±0.27 มก./100 กรัม) และน้ำมันรำกรดไขมันอิสระ RAO (106.93±1.25 มก./100 กรัม) เป็นตัวอย่างที่มี T3s สูงที่สุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) รองลงมา คือ FC (97.38±1.33 มก./100 กรัม) และพบว่า RAO เป็นผลิตผลพลอยได้ที่มีปริมาณ Ts สูงสุดที่ 14.59±0.20 รองลงมา คือ FC (13.56±0.47 มก./100 กรัม) (ตาราง 10) เมื่อวิเคราะห์รูปแบบ (Isoform) ของ T3s และ Ts พบว่าตัวอย่างผลพลอยได้จากกระบวนการผลิตน้ำมันรำข้าวมีปริมาณ γ-T3s สูงที่สุด โดยพบใน FC (86.74±0.99 มก./100 กรัม) และRAO (86.01±0.79 มก./100 กรัม) รองลงมา คือ α -T3s ซึ่งพบ RBW (18.45±0.30 มก./100 กรัม) และพบ T3s และ Ts รูปแบบ β ในปริมาณต่ำที่สุด ซึ่งผลดังกล่าวสอดคล้องกับงานวิจัยของ Vanessa Ribeiro Pestana et al. (2008) และผู้คณะวิจัยท่านอื่นที่กล่าวว่า β-Tocopherol เป็นรูปแบบวิตามินอีที่พบได้ปริมาณน้อยที่สุดน้ำมันรำข้าว (Cho, & Lim, 2016; Wen, 2015)



(a)



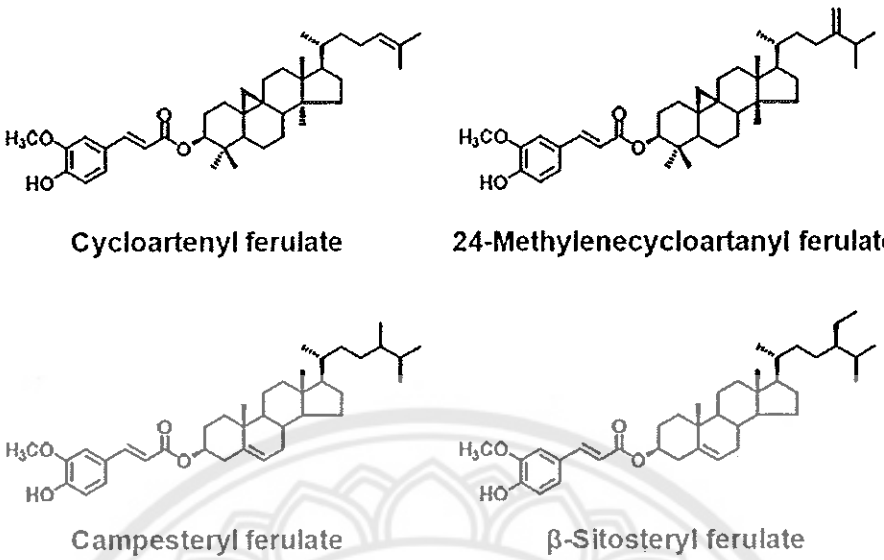
(b)

ภาพ 27 แสดง LC-MS โครมาโตแกรมแกมมา-โอริซานอล (a) สารมาตรฐานแกมมา-โอริซานอล (b) สารสกัดแกมมา-โอริซานอลจากผลิตผลพลอยได้ RAO; พีคที่ (1) Cycloartenyl ferulate; (2) 24-methylene cycloartenyl ferulate; (3) campesteryl ferulate; (4) β-sitosteryl ferulate

ตาราง 10 แสดงการวิเคราะห์ปริมาณแกมมา-โอริซานอล โทโคไตรอีนอล โทโคฟีรอล และไฟโตสเตอรอลในตัวอย่างจากโรงงานผลิตน้ำมันรำข้าวแบบบีบเย็นและแบบใช้ตัวทำละลาย

สารโภชนเภสัช	ชนิดผลิตผลพลอยได้จากการผลิตน้ำมันรำข้าว					
(มก./100 กรัม)	DFRB-C	FC	DFRB-S	RAO	RBW	HMW
γ -oryzanol	229.76±1.52^{d}	1,058.28±24.86^{b}	39.39±0.16^{e}	3,901.59±4.08^{a}	862.80±5.52^{c}	35.38±0.03^{e}
Tocotrienol (T3s)						
α –T3s	2.77±0.10^{e}	8.51±0.33^{c}	0.72±0.01^{f}	14.73±0.46^{b}	18.45±0.30^{a}	5.38±0.24^{d}
β –T3s	ND	ND	ND	ND	ND	ND
γ –T3s	19.45±0.03^{b}	86.74±0.99^{a}	2.85±0.02^{d}	86.01±0.79^{a}	17.38±0.09^{c}	17.07±0.04^{c}
δ –T3s	0.91 ±0.07^{d}	2.12±0.01^{b}	0.62±0.05^{e}	6.19±0.01^{a}	1.48±0.07^{c}	0.92±0.01^{d}
รวม T3s	23.14±0.01^{d}	97.38±1.33^{b}	4.20±0.08^{e}	106.93±1.25^{a}	37.33±0.46^{c}	23.38±0.18^{d}
Tocopherol (Ts)						
α - Ts	3.02±0.18^{c}	8.27±0.04^{a,b}	3.60±2.81^{c}	9.33±0.34^{a}	5.47±0.17^{b,c}	ND
β -Ts	ND	ND	ND	ND	1.35±0.10^{b}	0.96±0.05^{a}
γ -Ts	1.57±0.07^{e}	6.32±0.27^{a}	0.76±0.04^{f}	3.28±0.11^{d}	3.89±0.13^{b}	3.64±0.08^{c}
δ - Ts	ND	ND	ND	1.03±0.02^{a}	0.95±0.01^{b}	0.67±0.01^{c}
รวม Ts	4.60±0.19^{c}	14.59±0.20^{a}	4.37±2.77^{c}	13.65±0.47^{a,b}	11.67±0.13^{b}	5.29±0.13^{c}
รวม (T3s+Ts)	28.25±0.20^{d}	112.42±1.35^{b}	6.47±0.27^{e}	120.59±1.72^{a}	49.00±0.33^{c}	28.67±0.31^{d}
Phytosterol (มก./100 กรัม)						
Campesterol	0.47 ±0.14^{c}	52.38 ±2.69^{b}	0.34 ±0.01^{c}	151.23±3.27^{a}	0.73 ±0.04^{c}	0.50 ±0.12^{c}
Stigmasterol	2.61±0.03^{d}	60.41 ±2.80^{b}	0.74 ±0.01^{d}	97.53±2.41^{a}	21.77 ±0.86^{c}	19.17±0.89^{c}
β -sitosterol	1.64±0.54^{d}	118.02±6.38^{b}	0.38 ±0.01^{d}	317.95±4.76^{a}	66.83 ±1.43^{c}	68.88±1.49^{c}
β-sitostanol	0.69± 0.20^{d}	13.15 ±1.36^{b}	0.27 ±0.01^{d}	32.68 ±1.17^{a}	3.86 ±0.77^{c}	4.21 ±0.17^{c}
รวม Phytosterol	5.43 ±0.86^{d}	243.98±13.24^{b}	1.75 ±0.01^{d}	599.40±11.62^{a}	93.20±1.38^{c}	92.77±2.08^{c}

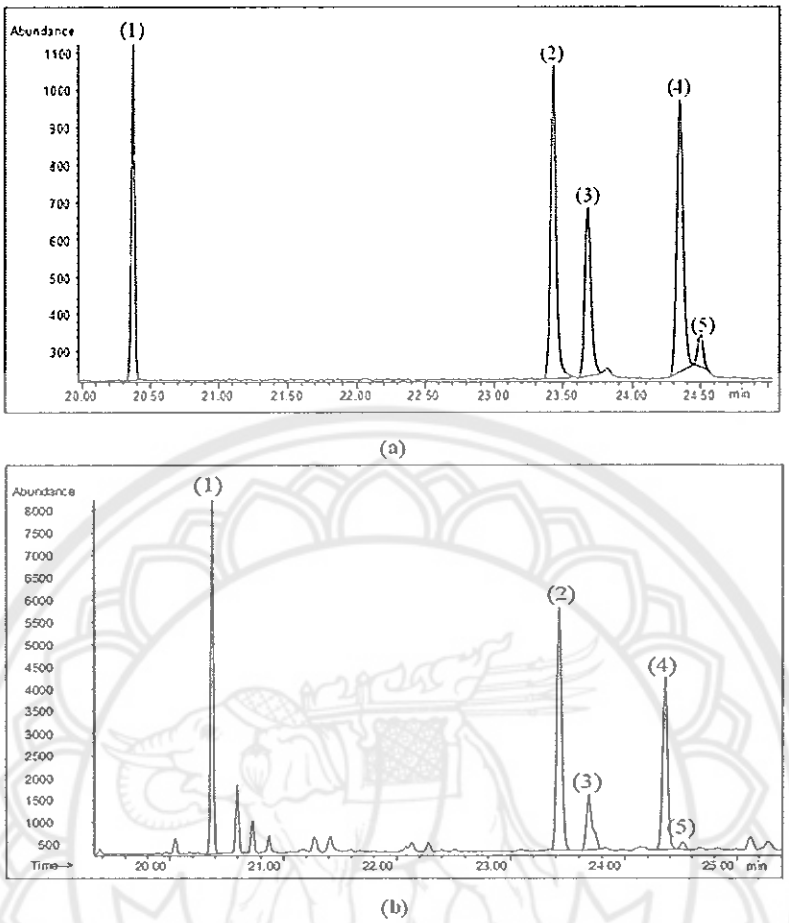
ตัวเลขในตารางแสดงค่าเฉลี่ยบนความชื้นฐานแห้งและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (n=3) ND หมายถึง ปริมาณที่ตรวจพบได้มีค่า < LOD (ค่า LOD และ LOQ แสดงในภาคผนวก ค) ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยตัวอักษรที่แตกต่างกันในแถวเดียวกัน แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$)



ภาพ 28 แสดงโครงสร้างทางเคมีของแกมมา-โอริซานอลในรำข้าวและน้ำมันรำข้าว

ที่มา: Kobayashi et al., 2019

ผลการวิเคราะห์จากกราฟโครมาโตแกรม (Chromatograms) ของสารมาตรฐานไฟโตสเตอรอลและผลิตผลพลอยได้ FC เปรียบเทียบกับรูปแบบของ Mass fragmentation (ภาพ 29) พบโครมาโตแกรม (Chromatograms) ทั้งหมด 5 พีค ซึ่งประกอบด้วย ไฟโตสเตอรอลทั้ง 4 รูปแบบ และสารมาตรฐานภายใน (Internal standard) ได้แก่ Cholestane (Internal standard) (พีคที่ 1 tR 20.38 นาที), Campesterol (พีคที่ 2 tR 23.43 นาที), Stigmasterol (พีคที่ 3 tR 23.68 นาที), β-sitosterol (พีคที่ 4 tR 24.35 นาที) และ β-sitostanol (พีคที่ 5 tR 24.51 นาที) ซึ่งรูปแบบ Mass fragmentation ของไฟโตสเตอรอลแต่ละชนิดแสดงในตาราง 11 จากผลการทดลอง พบว่า ผลิตผลพลอยได้ RAO มีปริมาณไฟโตสเตอรอลสูงที่สุด (599.40±11.62 มก./100 กรัม) ดังแสดงในตาราง 10 รองลงมา คือ FC (243.98±13.24 มก./100 กรัม) ไฟโตสเตอรอลชนิดที่พบมากที่สุด คือ β-sitosterol รองลงมา คือ Stigmasterol และ Campesterol โดยผลการทดลองนี้สอดคล้องกับหลายงานวิจัย (Derakhshan-Honarparvar et al., 2010; Normen et al., 2007; Sawadikiat, & Hongsprabhas, 2014) ผลการทดลองของ Sawadikiat, & Hongsprabhas (2014) พบว่า ผลิตผลพลอยได้ RAO ปริมาณไฟโตสเตอรอล (457-567 มก./100 กรัม) ใกล้เคียงกับผลที่ได้จากงานวิจัยนี้ และจากการวิเคราะห์ปริมาณไฟโตสเตอรอล สามารถสรุปได้ว่า RAO จากโรงงานผลิต น้ำมันรำข้าวแบบใช้ตัวทำละลาย และ FC จากโรงงานผลิตน้ำมันรำข้าวบีบเย็นมีศักยภาพด้านการเป็นแหล่งของไฟโตสเตอรอลได้



ภาพ 29 แสดงโครมาโตแกรมจาก GC-MS ของไฟโตสเตอรอล (a) สารมาตรฐานไฟโตสเตอรอล (b) สารสกัดไฟโตสเตอรอลจากตัวอย่าง FC; พีคที่ (1) Cholestane (Internal standard); (2) Campesterol; (3) Stigmasterol; (4) β-sitosterol และ (5) β-sitostanol

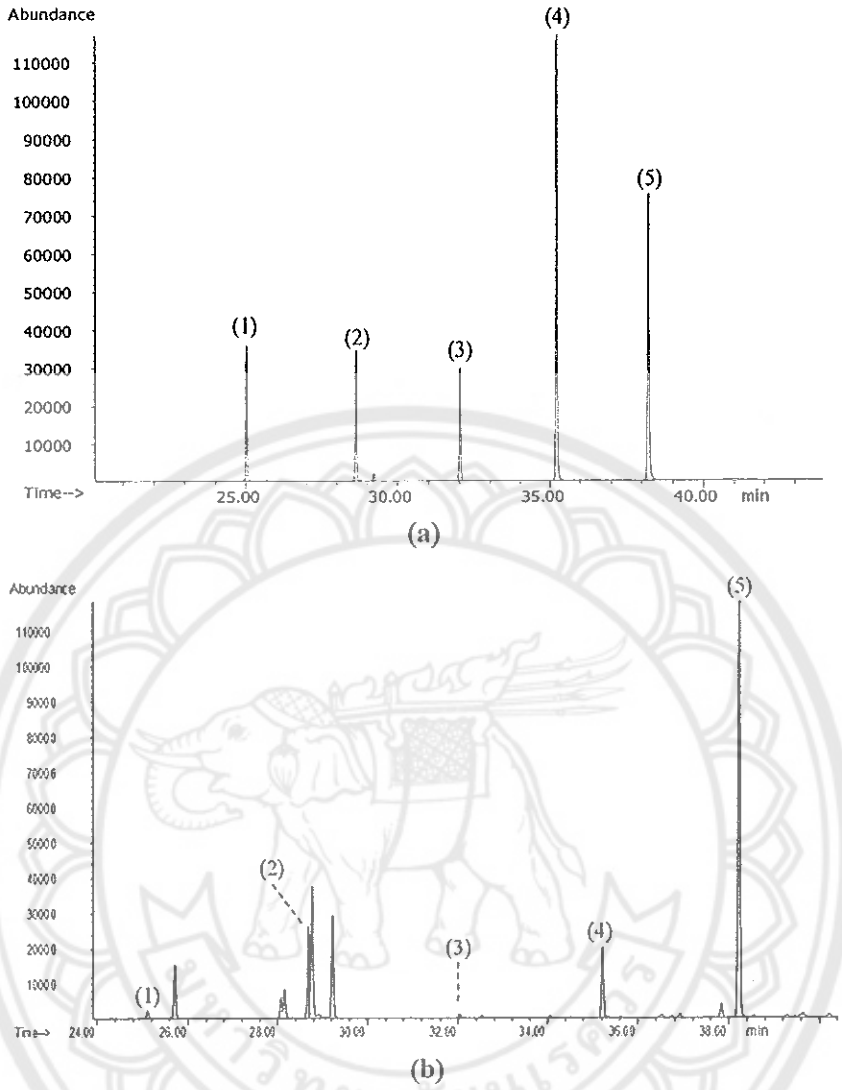
ตาราง 11 แสดงรูปแบบ Mass fragmentation ของไฟโตสเตอรอลที่ทำอนุพันธ์ Trimethylsilylation

Compound	Molecular target Ion, m/z	Qualifier ions, m/z
Cholestane	374	147, 217, 357
Campesterol	382	129, 343, 367
Stigmasterol	484	129, 255, 394
β-sitosterol	486	129, 357, 396
β-sitostanol	488	215, 383, 398

3. ปริมาณสารโพลิชานอลของผลิตผลพลอยได้จากโรงงานผลิตน้ำมันรำข้าวแบบบีบเย็นและแบบสกัดด้วยตัวทำละลาย

รำข้าวเป็นแหล่งที่ดีของไขรำข้าว (Wax) ซึ่งประกอบไปด้วย เอสเทอร์ของกรดลิกโนซีริก (Lignoceric acid/ $C_{23}H_{47}COOH$) ประมาณ 43 wt % กรดโดโคโซนิก (Docosoic acid) ประมาณ 16 wt% และแอลกอฮอล์สายตรงยาว (C_{22-36}) ประมาณ 28 wt% (Muicic et al., 2015) เช่น Docosanol (C_{22}) Tetracosanol (C_{24}) Hexacosanol (C_{26}) Octacosanol (C_{28}) และ Triacontanol (C_{30}) ที่เรียกว่าสารโพลิโคซานอล (Policosanol; PCs) (Cravotto et al., 2004; Irmak et al., 2006) หลายงานวิจัยรายงานถึงฤทธิ์ช่วยลดระดับคอเลสเตอรอลในเลือดได้ของสารโพลิโคซานอล (Chen et al., 2008; Francini-Pesenti et al., 2008) ตาราง 12 แสดงชนิดและปริมาณ PCs ที่พบในผลิตผลพลอยได้ที่วิเคราะห์สามารถแยกได้โดยอาศัยรูปแบบของ Mass fragmentation และ Target ion เช่น Docosanol (C_{22}-OH) m/z 383 (qualifier ions, m/z 103, 384, 385), Tetracosanol (C_{24}-OH) m/z 411 (qualifier ions, m/z 103, 412, 413), Hexacosanol (C_{26}-OH) m/z 439 (qualifier ions, m/z 103, 440, 441), Octacosanol (C_{28}-OH) m/z 467 (qualifier ions, m/z 103, 468, 469) และ Triacontanol (C_{30}-OH) m/z 495 (Qualifier ions, m/z 103, 496, 497) (Asikin et al., 2008) กราฟโครมาโตแกรม (Chromatogram) ของสารมาตรฐานโพลิโคซานอลและของผลิตผลพลอยได้ แสดงในภาพ 30

เมื่อเปรียบเทียบปริมาณ PCs ในแต่ละผลิตผลพลอยได้ที่ศึกษา พบว่า RBW มีปริมาณ PCs สูงที่สุด (332.79±7.27 มก./100 กรัม) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) รองลงมา คือ HMW (169.44±0.91 มก./100 กรัม) และ RAO (99.33±3.24 มก./100 กรัม) (ตาราง 12) และพบว่าโพลิโคซานอลหลักที่พบในผลิตผลพลอยได้ คือ Octacosanol (C_{28}-OH) และ Triacontanol (C_{30}-OH) ซึ่งผลการทดลองที่ได้นี้สอดคล้องกับผลการศึกษาของ Kim et al. (2012) และ Ishaka et al. (2014) ที่พบว่า ส่วนประกอบหลักของ PCs ในข้าว คือ Octacosanol (C_{28}-OH) และ Triacontanol (C_{30}-OH) ดังนั้น ผลิตผลพลอยได้ RBW และ HMW จากโรงงานน้ำมันรำข้าวแบบใช้ตัวทำละลายเป็นแหล่งที่ดีของสารโพลิโคซานอล



ภาพ 30 แสดงโครมาโตแกรมของโพลิโคซานอลจาก GC-MS (a) สารมาตรฐานโพลิโคซานอล (b) สารสกัดโพลิโคซานอลจากตัวอย่าง HPW; พีคที่ (1) Docosanol (C_{22}-OH); (2) Tetracosanol (C_{24}-OH); (3) Hexacosanol (C_{26}-OH); (4) Octacosanol (C_{28}-OH); (5) Triacontanol (C_{30}-OH)

ตาราง 12 แสดงปริมาณโพลิโคซานอลในผลิตผลพลอยได้จากกระบวนการผลิตน้ำมันรำข้าวทั้ง 2 วิธี

PCs (มก./100 กรัม)	ชนิดของผลิตผลพลอยได้					
	DFRB-C	FC	DFRB-S	RAO	RBW	HMW
Docosanol (C_{22})	5.08±0.02^{c}	3.75±0.11^{d}	3.35 ±0.01^{d}	7.20±0.42^{b}	7.99±0.21^{a}	7.50±0.03^{ab}
Tetracosanol (C_{24})	21.56±0.55^{c}	24.24±2.02^{c}	13.94±0.94^{d}	52.36±2.38^{a}	53.80±0.10^{a}	45.06±1.50^{b}
Hexacosanol (C_{26})	1.83±0.03^{d}	11.56±0.16^{c}	1.72±0.50^{d}	10.63±0.11^{c}	42.75±1.94^{a}	13.82±0.77^{b}
Octacosanol (C_{28})	10.15±0.45^{c}	12.13±0.27^{c}	11.12±0.31^{c}	10.16±0.01^{c}	71.83±2.65^{a}	26.10±0.08^{b}
Triacontanol (C_{30})	6.91±0.17^{e}	24.30±0.70^{c}	6.66±0.13^{e}	18.96±0.32^{d}	156.41±2.99^{a}	76.92±3.08^{b}
รวม	45.55±0.14^{e}	76.00±3.29^{d}	36.79±0.48^{f}	99.33±3.24^{c}	332.79±7.27^{a}	169.44±0.91^{b}

ตัวเลขในตารางแสดงค่าเฉลี่ยบนความชื้นฐานแห้งและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (n=3) ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยตัวอักษรที่แตกต่างกันในแถวเดียวกัน แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$)

ตาราง 13 แสดงผลรวมของปริมาณสารโภชนเภสัชที่พบในผลิตผลพลอยได้จากโรงงานสกัดน้ำมันรำข้าวแบบบีบเย็นเปรียบเทียบกับแบบสกัดด้วยตัวทำละลาย

สารโภชนเภสัช	การสกัดน้ำมันรำข้าวแบบบีบเย็น	การสกัดน้ำมันรำข้าวแบบใช้ตัวทำละลาย
γ -aminobutyrate (GABA) (มก./100 กรัม)	29.22	97.37
γ- Oryzanol (มก./100 กรัม)	1,288.04	4,839.16
Vitamin E (มก./100 กรัม)	140.67	204.73
Phytosterol (มก./100 กรัม)	249.41	787.12
Policosanol (มก./100 กรัม)	121.55	647.11
รวม (กก./100 กก.)	1.7	6.6

ตัวเลขในตารางแสดงค่าเฉลี่ยบนความชื้นฐานแห้งและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (n=3)

4. การเปรียบเทียบสารโภชนเภสัช (Nutraceuticals) ในผลิตผลพลอยได้จากโรงงานผลิตน้ำมันรำข้าวแบบบีบเย็นและแบบสกัดด้วยตัวทำละลาย

การเปรียบเทียบปริมาณสารโภชนเภสัชที่คงเหลืออยู่ในผลพลอยได้ทั้งหมดจากกระบวนการผลิตน้ำมันรำข้าวแต่ละระบบแสดงในตาราง 13 การสกัดน้ำมันรำข้าวแบบใช้ ตัวทำละลายมีการทำบริสุทธิ์ในหลายขั้นตอน โดยแต่ละขั้นตอนจะมีผลิตผลพลอยได้หลากหลายซึ่งแต่ละผลิตผลพลอยได้ยังคงอุดมไปด้วยสารโภชนเภสัชที่สำคัญเป็นจำนวนมาก เช่น กาบา (GABA) แกมมา-โอริซานอล (γ-oryzanol) ไฟโตสเตอรอล (Phytosterol) วิตามินอี (Vitamin E) และโพลิโคซานอล (Policosanol) โดยปริมาณรวมของสารโภชนเภสัชในผลิตผลพลอยได้จากกระบวนการสกัดน้ำมันด้วยตัวทำละลายมีประมาณ 6.6 kg/100 kg โดยสารที่พบมากที่สุดในผลิตผลพลอยจากโรงงานผลิตน้ำมันรำข้าวทั้ง 2 วิธี คือ แกมมา-โอริซานอล ซึ่งผลิตผลพลอยได้จากโรงงานผลิตน้ำมันรำข้าวแบบใช้ตัวทำละลายมีแกมมา-โอริซานอลในปริมาณมากถึง 4,839.16 มก./100 กรัม และพบในปริมาณ 1,288.04 มก./100 กรัม ในผลิตผลพลอยได้จากโรงงานผลิตน้ำมันรำข้าวบีบเย็น นอกจากนี้ ผลิตผลพลอยได้จากโรงงานผลิตน้ำมันรำข้าวแบบใช้ตัวทำละลายมีปริมาณกาบา วิตามินอี ไฟโตสเตอรอล และโพลิโคซานอลมากกว่าผลิตผลพลอยได้จากโรงงานผลิตน้ำมันรำข้าวบีบเย็น

จากการวิจัยแสดงให้เห็นว่าผลิตผลพลอยได้จากกระบวนการผลิตน้ำมันรำข้าว ยังมีสารโภชนเภสัชที่มีฤทธิ์ส่งเสริมสุขภาพเหลืออยู่เป็นจำนวนมาก และมีศักยภาพจะใช้เป็นแหล่งเพื่อพัฒนาการสกัดสารโภชนเภสัชดังกล่าวเพื่อเป็นการเพิ่มมูลค่าให้กับผลิตผลพลอยได้ที่มีราคาถูกให้กลายเป็นสารโภชนเภสัชที่มีราคาแพง นอกจากจะมีประโยชน์ต่ออุตสาหกรรมน้ำมันรำข้าวไทยแล้วยังก่อให้เกิดประโยชน์อุตสาหกรรมอื่นๆ ที่เกี่ยวข้อง เช่น อุตสาหกรรมผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร อุตสาหกรรมอาหารฟังชั่น อุตสาหกรรมยา

การศึกษาที่ 2 การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ตลอดจนทำการศึกษาการสกัดและเพิ่มปริมาณโพลิโคซานอลในผลิตผลพลอยได้จากผลิตโรงงานน้ำมันรำข้าวโดยการสกัดสารด้วยไดเมทิลอีเทอร์เหลวภายใต้สภาวะกึ่งวิกฤติ (SUBDME) แบ่งเป็น 2 ส่วน

1. ตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ปริมาณโพลิโคซานอล

1.1 ความแม่นและความเที่ยงตรงของการวิเคราะห์

ความแม่นของการวิเคราะห์ปริมาณโพลิโคซานอลแสดงด้วยค่าร้อยละการคืนกลับ (%Recovery) ผลทดลอง พบว่า ร้อยละการคืนกลับของวิธีวิเคราะห์ที่ความเข้มข้นของโพลิโคซานอลเท่ากับ 50 100 และ 150 ppm ของแต่ละความเข้มข้นมีค่าอยู่ในช่วง 98.90-102.02% 99.28-101.37%

และ 99.67-101.37% ตามลำดับ ซึ่งแสดงผลในตาราง 14 โดยค่าที่ได้ดังกล่าวอยู่ภายใต้ตามเกณฑ์การยอมรับของ AOAC (2002) ซึ่งกำหนดเกณฑ์การยอมรับไว้ที่ 80%-120%

ความเที่ยงตรงของวิธีวิเคราะห์ปริมาณโพลิโคซานอลแสดงด้วยค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (Relative standard deviations; RSD) ซึ่งแบ่งการวิเคราะห์เป็น 2 แบบ คือ การวิเคราะห์ความเที่ยงในวันเดียวกัน (Intra-day precision) และการวิเคราะห์ความเที่ยงระหว่างวัน (Inter-day precision) โดยแต่ละแบบทำการทดสอบแบบละ 7 ซ้ำ จากการทดสอบวิเคราะห์ความเที่ยงในวันเดียวกัน พบว่า %RSD ของปริมาณโพลิโคซานอลที่ความเข้มข้น 50, 100 และ 150 ppm อยู่ในช่วง 0.88-0.98% 0.93-0.92% และ 0.94-1.00% ตามลำดับ (ตาราง 13) และผลการวิเคราะห์ความเที่ยงตรงระหว่างวันที่ความเข้มข้นของโพลิโคซานอลเท่ากับ 50 100 และ 150 ppm มี %RSD อยู่ในช่วง 0.83-0.98% 0.89-0.99 และ 0.92-1.00% (ตาราง 14) โดยเกณฑ์การยอมรับของ %RSD อยู่ต้องมีค่า RSD น้อยกว่าหรือเท่ากับ 2 ดังนั้น การวิเคราะห์ความเที่ยงในวันเดียวกันและการวิเคราะห์ความเที่ยงระหว่างวันอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้

1.2 การตรวจสอบขีดจำกัดในการตรวจพบและการตรวจสอบขีดจำกัดในการวัดเชิงปริมาณ

ผลการตรวจสอบขีดจำกัดในการตรวจพบและการตรวจสอบขีดจำกัดในการวัดเชิงปริมาณ ศึกษาได้จากนิยามอัตราส่วนของสัญญาณระหว่างสัญญาณที่ต้องการตรวจวัดกับสัญญาณรบกวน (S/N) เท่ากับ 3 ในการวิเคราะห์ LOD และมากกว่าหรือเท่ากับ 10 ในการวิเคราะห์ LOQ แต่เนื่องจากไม่สามารถตรวจพบสัญญาณของ Blank ได้ ดังนั้น จึงใช้วิธีการหาค่า LOD และ LOQ โดยการเติมสารละลายมาตรฐานในความเข้มข้นที่ 0.25 0.5 และ 1 ppm ลงในตัวทำละลายโทลูอีน (สารละลายแบลงค์) จากนั้น นำมาคำนวณส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานต่อค่าเฉลี่ยของแต่ละความเข้มข้น จากการทดลองสรุปได้ว่า LOD และ LOQ ของสารโพลิโคซานอล มีค่าดังนี้ 0.73, 2.44 ppm (C_{22}); 0.84 2.82 ppm (C_{24}); 0.68 2.27 ppm (C_{26}); 0.63, 2.09 ppm (C_{28}) และ 0.63, 2.09 ppm (C_{30})

1.3 ความเป็นเส้นตรง

ความเป็นเส้นตรงจะแสดงด้วยกราฟความสัมพันธ์เชิงเส้นระหว่างพื้นที่ใต้กราฟ (Peak area) ต่อความเข้มข้นของโพลิโคซานอล ซึ่งแสดงโดยค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (Correlation Coefficient; R) และสามารถหาความเข้มข้นของตัวอย่างโดยการคำนวณจากสมการ $Y = mX+c$ ที่ได้จากกราฟมาตรฐาน ผลการศึกษากราฟมาตรฐานสำหรับวิเคราะห์ปริมาณสาร โพลิโคซานอล พบว่า ความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐานในช่วงความเข้มข้น 10-300 ppm ของโพลิโคซานอล

มีค่า R = 0.9978-0.9987 ซึ่งค่าดังกล่าว (ตาราง 15) อยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้โดยค่าความเป็นเส้นตรงควรมีค่ามากกว่า 0.995

ตาราง 14 แสดงค่าความแม่นและความเที่ยงของสารสกัดโพลิโคซานอลด้วยเครื่อง GC-MS

Analytes	Original (ppm.)	Spiked (ppm.)	Found (ppm.)	% Recovery	Intra-day RSD (%)	Inter-day RSD (%)
Docosanol (C_{22})	65.11	50	115.58 ±0.74	100.94±1.47	0.8815	0.9524
		100	166.16±1.22	101.05 ±1.22	0.9264	0.9837
		150	216.47 ±1.40	100.91±0.93	0.9463	1.0002
Tetracosanol (C_{24})	60.76	50	110.87±0.83	100.22 ±1.83	0.8871	0.8308
		100	161.01 ±1.43	100.24 ±1.42	0.9308	0.8865
		150	211.30 ±1.10	100.36 ±0.73	0.9500	0.9200
Hexacosanol (C_{26})	4.78	50	55.79 ±0.17	102.02 ±0.37	0.9836	0.9795
		100	105.99 ±0.38	101.21 ±0.38	0.9913	0.9890
		150	155.10 ±0.26	100.22 ±0.17	0.9950	0.9969
Octacosanol (C_{28})	46.81	50	97.21 ±1.15	100.79 ±2.31	0.9048	0.8868
		100	148.17 ±1.97	101.37 ±1.82	0.9425	0.9290
		150	198.83 ±1.85	101.35 ±1.14	0.9585	0.9514
Triacontanol (C_{30})	45.82	50	95.27 ±0.50	98.90 ±1.09	0.9075	0.9242
		100	145.10 ±2.11	99.28 ±2.11	0.9455	0.9567
		150	195.32 ±1.23	99.67 ±0.82	0.9610	0.9758

ตัวเลขในตารางแสดงค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (n=3)

ตาราง 15 แสดงสมการเส้นตรงของกราฟมาตรฐานและค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ของสารมาตรฐานโพลิโคซานอล

Analytes	Linear regression equation	Correlation coefficient (R)
Docosanol (C_{22})	y = 15734x - 113201	0.9981
Tetracosanol (C_{24})	y = 16732x + 42122	0.9982
Hexacosanol (C_{26})	y = 12057x + 28653	0.9978
Octacosanol (C_{28})	y = 12715x - 16652	0.9987
Triacontanol (C_{30})	y = 11575x - 93224	0.9980

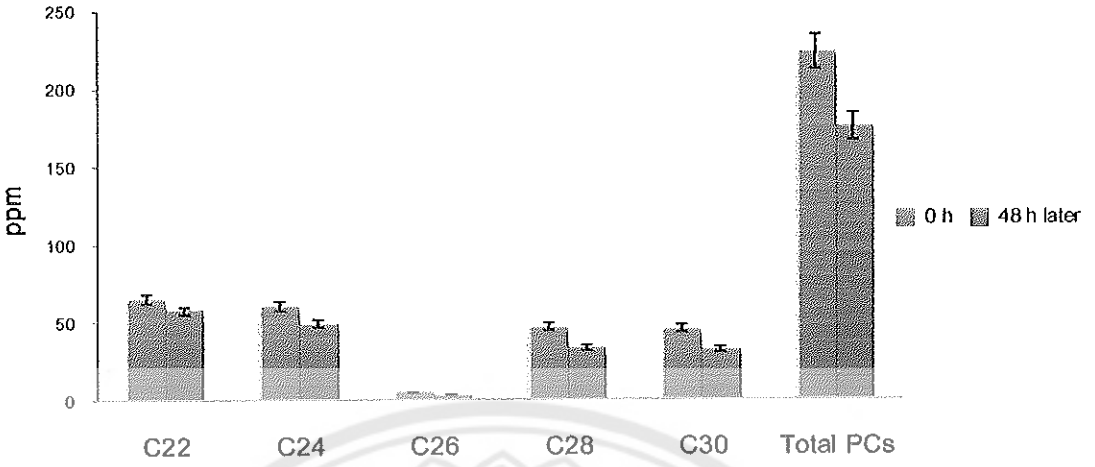
1.4 การศึกษาความคงตัวของสารโพลิซานอล

1.4.1 การศึกษาความคงตัวของอนุพันธ์

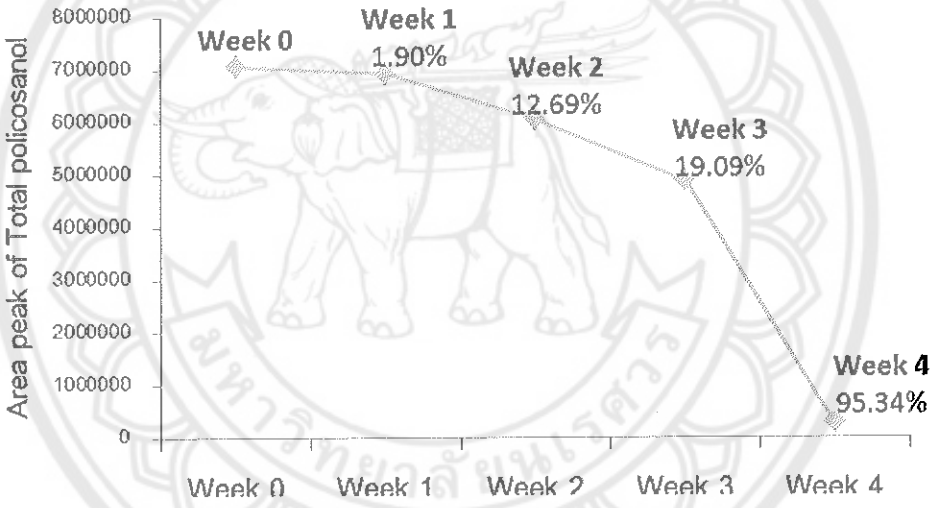
การศึกษาความคงตัวของอนุพันธ์สามารถวิเคราะห์ได้จากการเปรียบเทียบระหว่างความเข้มข้นของสารโพลิโคซานอลที่ทำอนุพันธ์ไตรเมทิลไซริล (Trimethylsilyl) กับ N,O-bis (trimethylsilyl) -trifluoroacetamide (BSTFA) แล้วทำการทดสอบทันทีกับสารเดิมที่ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 25°ซ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง และนำมาคำนวณค่าร้อยละการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้น ผลการทดลองบ่งชี้ว่าปริมาณสารโพลิโคซานอล C_{22}-C_{30} ที่ตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 48 ชั่วโมงมีร้อยละการเปลี่ยนแปลงในช่วง 11.46 ถึง 29.31% ส่วนปริมาณโพลิโคซานอลทั้งหมดมีการเปลี่ยนแปลงที่ 21.11% (ภาพ 31) จากผลการทดลองแสดงว่าโพลิโคซานอลที่ทำอนุพันธ์แล้ว ไม่มีความคงตัวต่อการเก็บรักษาเนื่องจากมีค่าการเปลี่ยนแปลงเกิน ±15% (European medicines agency, 2012) ดังนั้น เมื่อโพลิโคซานอลทำอนุพันธ์กับ N,O-bis (trimethylsilyl) -trifluoroacetamide (BSTFA) แล้วควรทำการวิเคราะห์ทันที

1.4.2 การศึกษาความคงตัวของสารละลายมาตรฐานโพลิโคซานอล

การศึกษาความคงตัวของสารละลายมาตรฐานโพลิโคซานอล โดยการเก็บสารละลายมาตรฐานโพลิโคซานอลความเข้มข้น 100 ppm ที่อุณหภูมิ 4°ซ และนำมาวิเคราะห์เพื่อศึกษาความคงตัวทุก 1 สัปดาห์ รวมทั้งหมด 1 เดือน ผลการทดสอบแสดงโดยเปรียบเทียบพื้นที่ใต้พีคของ Stock solution ที่เก็บไว้กับพื้นที่ใต้พีคของ Stock solution ที่วิเคราะห์ในเวลาเริ่มต้นของการเตรียมสารละลาย ผลการทดลอง (ภาพ 32) พบว่า เมื่อเก็บสารมาตรฐานในอุณหภูมิและระยะเวลาดังกล่าว พื้นที่ใต้พีคของปริมาณโพลิโคซานอลทั้งหมดในสัปดาห์ที่ 1, 2, 3 และ 4 มีค่าการเปลี่ยนแปลง เท่ากับ 1.90, 12.69, 19.09 และ 95.34% ตามลำดับ จากการทดสอบแสดงให้เห็นได้ว่า สารละลายมาตรฐานโพลิโคซานอลสามารถเก็บรักษาในอุณหภูมิ 4°ซ ได้เป็นเวลา 1 สัปดาห์เท่านั้น และไม่ควรนำมาใช้ทดสอบเมื่อเก็บรักษาเกินระยะเวลา 1 สัปดาห์ เนื่องจากเกิดการเปลี่ยนแปลงของพื้นที่ใต้พีคเกินมาตรฐานที่ ±5% (Nowatzke, & Woolf, 2007)



ภาพ 31 แสดงปริมาณสารโพลิโคซานอลหลังทำอนุพันธ์ 48 ชั่วโมง ก่อนการวิเคราะห์



ภาพ 32 แสดงการลดลงของปริมาณสารมาตรฐานโพลิโคซานอลในแต่ละสัปดาห์ (เก็บที่อุณหภูมิ 4°ซ)

1.5 การตรวจสอบความแข็งหรือความคงทนของวิธีวิเคราะห์โพลิโคซานอล

การตรวจสอบความแข็งหรือความคงทนของวิธีวิเคราะห์โพลิโคซานอลทำได้โดยเปลี่ยนแปลงพารามิเตอร์ในการทดสอบการวิเคราะห์ปริมาณโพลิโคซานอลบางประการ เช่น อุณหภูมิในการทำอนุพันธ์ การสัมผัสกับแสง อุณหภูมิการเก็บรักษา ชนิดของตัวทำละลาย ช่วงเวลาในการวิเคราะห์ ระยะเวลาในการปฏิกิริยา และการสัมผัสกับคลื่นอัลตราโซนิค ผลการทดลองแสดงในตาราง 16 ซึ่งพบว่า ปัจจัยที่มีผลกระทบต่อปริมาณโพลิโคซานอลสูงที่สุด คือ ชนิดของสารละลาย (ปัจจัย D) รองลงมา คือ เวลาในการทำปฏิกิริยา (ปัจจัย F) การสัมผัสกับแสงแดด (ปัจจัย B) และ

อุณหภูมิการเก็บรักษา (ปัจจัย C) ตามลำดับ ถึงแม้ว่าปัจจัยทั้ง 7 จะส่งผลกระทบต่อปริมาณโพลิโคซานอล อย่างไรก็ตาม ปัจจัยทั้งหมดที่ทำการทดลองส่งผลกระทบอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) ต่อการเปลี่ยนแปลงของปริมาณ PCs เนื่องจากร้อยละความแตกต่างของปัจจัยมีค่าไม่เกินกว่าเกณฑ์การยอมรับ (ค่า $\pm\sqrt{2}$*S) ที่ ±6.31 ดังนั้น จึงสามารถสรุปได้ว่าวิธีการวิเคราะห์ปริมาณโพลิโคซานอลดังกล่าวมีความคงทนปัจจัยที่เปลี่ยนแปลง

ตาราง 16 แสดงผลการศึกษาความคงทนของวิธีวิเคราะห์ปริมาณโพลิโคซานอล

Conditions	Factors	% Difference	Significant sensitive for change
อุณหภูมิสำหรับการทำอนุพันธ์	A,a	2.65	×
การสัมผัสกับแสง	B,b	-5.11	×
อุณหภูมิในการเก็บ	C,c	4.51	×
ตัวทำละลาย	D,d	6.08	×
ช่วงเวลาในการวิเคราะห์	E,e	-2.45	×
เวลาในการทำปฏิกิริยา	F,f	5.27	×
การสัมผัสกับคลื่นอัลตร้าโซนิค	G,g	-2.41	×
SD		4.47	
$\pm\sqrt{2}$*S		6.31	

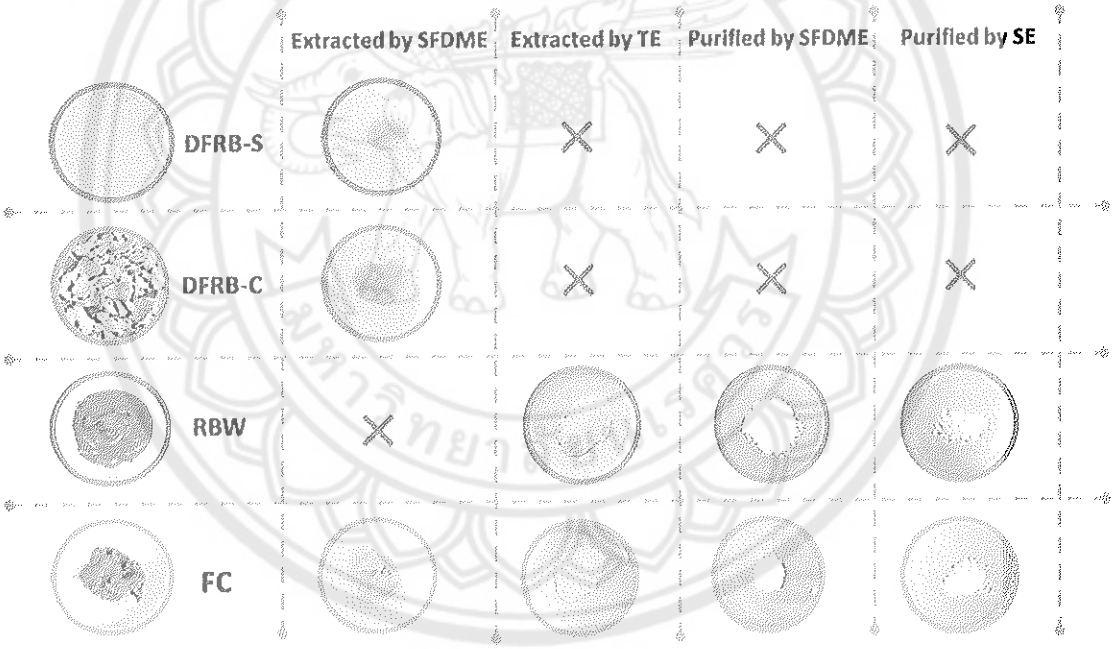
สารสกัด PCs ทำอนุพันธ์ไตรเมทิลไซริล (Trimethylsilyl) กับ N,O-bis (trimethylsilyl)-trifluoroacetamide (BSTFA)

2. ศึกษาการสกัดสารโภชนเภสัช และการเพิ่มปริมาณโพลิโคซานอลในผลิตผลพลอยได้จากกระบวนการสกัดน้ำมันรำข้าวบีบเย็นและแบบสกัดด้วยตัวทำละลายโดยเทคนิคการสกัดด้วยไดเมทิลอีเทอร์เหลวภายใต้สภาวะกึ่งวิกฤติ (SUBDME)

2.1 การสกัดสารโภชนเภสัชจากผลิตผลพลอยได้จากกระบวนการสกัดน้ำมันรำข้าวโดยเทคนิคการสกัดด้วยไดเมทิลอีเทอร์เหลวภายใต้สภาวะกึ่งวิกฤติ (SUBDME)

การทดลองนี้มีข้อจำกัดที่ไม่สามารถใช้เทคนิคการสกัดด้วยไดเมทิลอีเทอร์เหลวภายใต้สภาวะกึ่งวิกฤติ (SUBDME) สกัดทุกผลิตผลพลอยได้โดยตรง เนื่องจากสมบัติของ DME เมื่อปล่อยสู่ภายนอกอุณหภูมิจะต่ำลงประมาณ -11°ซ (ค่าจากการทดสอบ) เช่น ตัวอย่างไขรำข้าวจะจับตัวแข็งและติดอยู่ภายในเครื่องจึงจำเป็นต้องใช้ปฏิกิริยาเคมีทรานเอสเทอริฟิเคชัน

(Transesterification; TE) แทนการสกัดด้วย SUBDME โดยในการสกัดโพลิโคซานอลจะทำการเปรียบเทียบระหว่างการสกัดสารด้วย SUBDME กับการใช้เทคนิค TE ตลอดจนทำการเปรียบเทียบปริมาณสารโภชนเภสัชอื่น ได้แก่ แกมมา-โอริซานอล (γ-oryzanol) ไฟโตสเตอรอล (Phytosterol) และโพลิโคซานอล (PCs) จากการทดลอง พบว่า ตัวอย่างที่สกัดด้วยเทคนิค SUBDME มีลักษณะเป็นน้ำมันสีน้ำตาลอมเหลือง ส่วนตัวอย่างที่สกัดด้วยวิธี TE มีลักษณะเป็นผงแห้งมีสีคล้ายกับตัวอย่างตั้งต้น (ภาพ 33) ปริมาณผลผลิตที่สกัดได้จากผลิตผลพลอยได้จากกระบวนการผลิตน้ำมันรำข้าวด้วยเทคนิค SUBDME และ TE แสดงในตาราง 17 โดยการสกัดผลิตผลพลอยได้ DFRB-C (9.71 ±3.03%) ให้ปริมาณผลผลิตสูงกว่า DFRB-S (3.60 ±1.34%) สำหรับผลิตผลพลอยได้ FC พบว่า การสกัดด้วย SUBDME ให้ผลผลิตในปริมาณที่สูงกว่า (52.14 ±3.62%) เมื่อเทียบกับการสกัดด้วยวิธี TE (18.82 ±5.10%)



ภาพ 33 แสดงผลิตผลพลอยได้จากกระบวนการผลิตน้ำมันรำข้าวทั้ง 2 ระบบและสารสกัดที่ได้จากกระบวนการสกัดสารด้วยไดเมทิลอีเทอร์เหลวภายใต้สภาวะกึ่งวิกฤติ ปฏิกิริยา ทรานเอสเทอริฟิเคชัน และการสกัดด้วยตัวทำละลาย

ตาราง 17 แสดงปริมาณผลผลิตที่สกัดได้จากผลิตผลพลอยได้จากกระบวนการสกัดน้ำมันรำข้าวด้วยเทคนิคการสกัดสารด้วยไดเมทิลอีเทอร์เหลวภายใต้สภาวะกึ่งวิกฤติและปฏิกิริยา ทรานเอสเทอริฟิเคชัน

Samples	Method	Solvent	Extraction Times	Extraction yields
DFRB-S	SUBDME	Dimethyl ether	30 นาที	3.60 ±1.34 %
DFRB-C	SUBDME	Dimethyl ether	30 นาที	9.71 ±3.03 %
FC	SUBDME	Dimethyl ether	30 นาที	52.14 ±3.62 %
FC	TE	Ethanol + Isooctane	90 นาที	18.82 ±5.10%
RBW	TE	Ethanol + Isooctane	90 นาที	43.71 ±8.64%

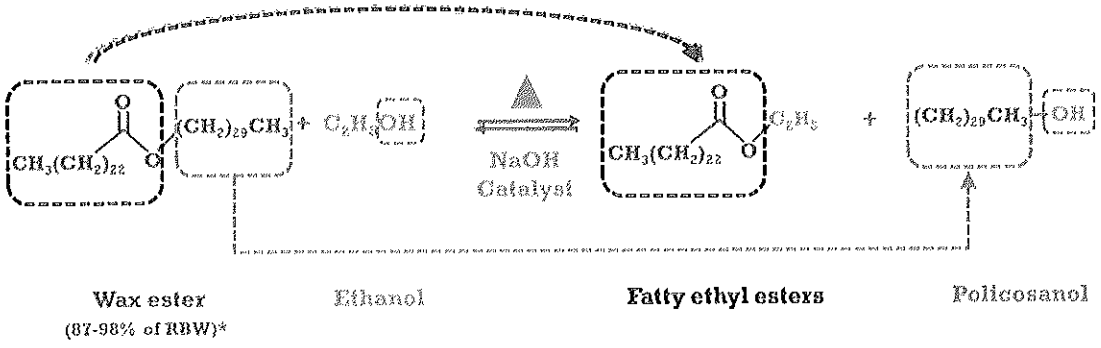
ตัวเลขในตารางแสดงค่าเฉลี่ย ร้อยละและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (n=3)

ปริมาณแกมมา-โอริซานอล ไฟโตสเตอรอล และโพลิโคซานอลในผลิตผลพลอยได้จากกระบวนการสกัดน้ำมันรำข้าวแบบบีบเย็นและแบบสกัดด้วยตัวทำละลายที่สกัดด้วยเทคนิค SUBDME และ TE แสดงในตาราง 18 จากการทดลอง พบว่า แต่ละผลิตผลพลอยได้มีปริมาณสารโภชนเภสัชที่สกัดได้แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) โดยผลิตผลพลอยได้ที่สกัดด้วยเทคนิค SUBDME เช่น DFRB-S (924.51±3.80 มก./100 กรัม) มีปริมาณแกมมา-โอริซานอลสูงที่สุด รองลงมา คือ FC (829.88±18.66 มก./100 กรัม) และพบว่า การสกัด DFRB-S และ DFRB-C ด้วยเทคนิค SUBDME สามารถเพิ่มปริมาณของแกมมา-โอริซานอลได้มากขึ้นถึง 3.21-23.47 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับปริมาณสารดังกล่าวในตัวอย่างตั้งต้น (ตาราง 10) อย่างไรก็ตาม การใช้เทคนิค TE สกัดผลิตผลพลอยได้ FC ทำให้ปริมาณแกมมา-โอริซานอลลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) ถึง 21% เมื่อเปรียบเทียบกับ FC ที่สกัดด้วยวิธี SUBDME นอกจากนี้ การสกัดด้วยวิธี TE ทำให้ปริมาณแกมมา-โอริซานอลลดลงในตัวอย่าง RBW อีกด้วย โดยลดลงจาก 862.80±5.52 มก./100 กรัม (RBW ตั้งต้น; ตาราง 10) เหลือเพียง 43.16±1.42 มก./100 กรัม ทั้งนี้อาจเป็นผลมาจากกลไกของปฏิกิริยาทรานเอสเทอริฟิเคชัน (Transesterification; TE) โดยทรานเอสเทอริฟิเคชันเป็นปฏิกิริยาเคมีระหว่างไขมันหรือน้ำมันกับแอลกอฮอล์ โดยทำการเปลี่ยนหมู่อัลคิลที่ติดกับออกซิเจนของเอสเทอร์กับหมู่อัลคิลของแอลกอฮอล์ไปเป็นสารเอสเทอร์ชนิดอื่น ซึ่งมีด่างหรือกรดเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา (Schuchardt et al., 1998) กล่าวคือ แกมมา-โอริซานอลที่เป็นสารประกอบระหว่างเฟอรูเลต (Ferulate; 4-hydroxo-3-methoxycinnamic acid) กับเอสเทอร์ของสเตอรอล (Campesterol Stigmasterol และ β-stigmasterol) หรือไตรเทอร์พีนแอลกอฮอล์ (Cycloartenol 24-methylene cycloartanol

Cyclobranol) (Srikaeo, 2014) ถูกทำลายพันธะ เอสเทอร์ด้วยปฏิกิริยาทรานเอสเทอริฟิเคชัน จึงทำให้ปริมาณแกมมา-โอริซานอลที่วิเคราะห์ได้มีปริมาณน้อยลง

เมื่อสกัดตัวอย่างผลิตผลพลอยได้ด้วยเทคนิค SUBDME พบว่า ไฟโตสเตอรอลมีปริมาณเพิ่มขึ้นตั้งแต่ 1.28-146.93 เท่า แต่การใช้วิธีการสกัด TE ทำให้ปริมาณไฟโตสเตอรอลลดลง 35.94-61.77% เมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างตั้งต้น (ตาราง 10) โดยตัวอย่างที่มีปริมาณ ไฟโตสเตอรอลสูงที่สุด คือ DFRB-C (367.54±11.79 มก./100 กรัม) รองลงมา คือ FC (312.34±9.66 มก./100 กรัม) และ DFRB-S (257.12±0.30 มก./100 กรัม) ตามลำดับ ซึ่งผลการทดลองดังกล่าวชี้ให้เห็นว่า เทคนิคการสกัด SUBDME มีศักยภาพในการสกัดไฟโตสเตอรอล เนื่องจาก DME สามารถละลายสารที่ไม่มีขั้วได้หลากหลาย (Goto et al., 2015) และสามารถเพิ่มการถ่ายโอนมวล (Mass transfer) โดยการสร้างพันธะไฮโดรเจนกับสารสกัดได้ (Poojary et al., 2016) แต่การใช้เทคนิค TE สกัดตัวอย่างทำให้มีปริมาณไฟโตสเตอรอลลดลง 35.94-38.23% ทั้งนี้ อาจเนื่องมาจากกระบวนการทรานเอสเทอริฟิเคชันทำให้ไฟโตสเตอรอลบางส่วนเกิดพันธะเอสเทอร์กับสารอื่น เช่น กรดไขมัน ซึ่งทำให้ผลการวิเคราะห์ปริมาณไฟโตสเตอรอลลดลง โดยในธรรมชาติไฟโตสเตอรอล นอกจากจะเป็นไฟโตสเตอรอลอิสระ (Free phytosterol) และยังมีบางส่วนที่ทำปฏิกิริยา เอสเทอร์ริฟิเคชัน (Esterification) กับกรดไขมันหรือกลูโคไซด์ (Glucosides) (Povey, 2016)

สำหรับปริมาณสารโพลิโคซานอล พบว่า ได้ผลตรงข้ามกับปริมาณแกมมา-โอริซานอลและไฟโตสเตอรอล โดยผลิตผลพลอยได้ที่นำมาสกัดด้วยวิธี TE พบว่า RBW (30,787.89±130.35 มก./100 กรัม) ให้ปริมาณ PCs สูงที่สุด รองลงมา คือ ตัวอย่าง FC (6,100.12±77.57 มก./100 กรัม) ซึ่งการสกัดตัวอย่างด้วยวิธี TE สามารถเพิ่มปริมาณ PCs ได้ถึง 80.08-91.37 เท่าเมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างตั้งต้น (ตาราง 10) การเพิ่มขึ้นของปริมาณสาร PCs นี้สามารถอธิบายได้จากปฏิกิริยาเคมี TE ซึ่งเปลี่ยนแวกซ์เอสเทอร์ (Wax ester) ให้เป็น Fatty acid ethyl ester และโพลิโคซานอลได้อย่างมีประสิทธิภาพ (ภาพ 34) จากผลการทดลอง พบว่า เทคนิค SUBDME มีความสามารถในการปลดปล่อยสารโภชนเภสัชที่ละลายในไขมันได้ดี ได้แก่ แกมมา- โอริซานอล ไฟโตสเตอรอล ในขณะที่วิธี TE มีประสิทธิภาพในการสกัดโพลิโคซานอล (PCs) ได้ดี และเมื่อเปรียบเทียบปริมาณ PCs แล้วพบว่า ตัวอย่างที่สกัดด้วยวิธี TE เหล่านี้ (RBW และ FC) มีศักยภาพจะนำไปพัฒนาการสกัดโพลิโคซานอลและการทำบริสุทธิ์ต่อไปได้



ภาพ 34 แสดงกลไกของปฏิกิริยาทรานเอสเทอริฟิเคชันในตัวอย่างไขรำข้าว

ตาราง 18 แสดงปริมาณสารโภชนเภสัชจากผลิตผลพลอยได้จากกระบวนการสกัด**น้ำมัน**รำข้าวทั้ง 2 วิธี โดยเทคนิคการสกัดสารด้วยไดเมทิลอีเทอร์เหลวภายใต้**สภาวะ**กึ่งวิกฤติและปฏิกิริยาทรานเอสเทอริฟิเคชัน

Nutraceuticals (มก./100 กรัม)	Extraction by SUBDME			Extraction by TE	
	Samples			Samples	
	DFRB-S	DFRB-C	FC	FC	RBW
γ –oryzanol	924.51±3.80^{a}	737.46±9.14^{c}	829.88±18.66^{b}	85.54±3.14^{d}	43.16±1.42^{e}
Phytosterol					
- Campesterol	63.33±1.12^{a}	47.37±0.45^{b}	41.28±0.86^{c}	12.73±0.23^{d}	7.69±0.28^{e}
- Stigmasterol	105.25±1.32^{a}	68.85±0.99^{b}	53.19±2.70^{c}	11.40±0.18^{d}	4.62±0.12^{e}
- β -Sitosterol	67.56±4.37^{c}	220.64±11.48^{a}	204.06±5.47^{b}	62.30±3.26^{c}	43.48±2.04^{d}
- β-Sitostanol	20.97±2.23^{b}	30.68±1.13^{a}	13.81±0.64^{c}	6.85±0.78^{d}	3.92±0.24^{d}
Total phytosterol	257.12±0.30^{c}	367.54±11.79^{a}	312.34±9.66^{b}	93.28±2.53^{d}	59.71±2.11^{e}
Policosanol					
- C22	4.93±0.04^{c}	4.02±0.06^{c}	3.53±0.05^{c}	35.28±0.25^{b}	108.35±2.04^{a}
- C24	19.72±0.87^{c}	18.33±1.54^{c}	20.40±0.86^{c}	506.10±13.39^{b}	4,392.24±61.81^{a}
- C26	7.73±0.12^{c}	7.93±0.13^{c}	7.33±0.04^{c}	730.28±16.45^{b}	4,103.22±24.74^{a}
- C28	9.38±0.29^{c}	10.02±0.38^{c}	13.39±0.28^{c}	2,088.31±26.15^{b}	10,404.91±56.85^{a}
- C30	10.13±0.50^{c}	9.67±0.47^{c}	13.84±0.26^{c}	2,740.14±21.33^{b}	11,779.16±15.09^{a}
Total policosanol	51.88±1.82^{c}	49.96±2.59^{c}	58.48±0.35^{c}	6,100.12±77.57^{b}	30,787.89±130.35^{a}

ตัวเลขในตารางแสดงค่าเฉลี่ยบนความซื้นฐานแห้งและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (n=3)

ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยตัวอักษรที่แตกต่างกันในแถวเดียวกัน แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$)

2.2 การเพิ่มปริมาณโพลิโคซานอลในผลิตผลพลอยได้ FC และ RBW ที่ผ่านการปรับสภาพ (Pretreatment) แล้ว ด้วยเทคนิคการสกัดสารด้วยไดเมทิลอีเทอร์เหลวภายใต้สภาวะกึ่งวิกฤต (SUBDME) เปรียบเทียบกับการใช้ตัวทำละลาย (Solvent extraction; SE) การเพิ่มปริมาณโพลิโคซานอลด้วยเทคนิค SUBDME ดำเนินการโดยนำผลิตผลพลอยได้ FC (TE-FC) และ RBW (TE-RBW) ที่ผ่านการปรับสภาพด้วยเทคนิค TE แล้ว มาสกัดต่อด้วยเทคนิค SUBDME และเปรียบเทียบกับการใช้วิธีสกัดด้วยตัวทำละลาย (SE) จากการทดลอง พบว่า ปริมาณผลผลิตของตัวอย่างที่ผ่านกระบวนการเพิ่มปริมาณโพลิโคซานอลด้วยเทคนิค SE (10.84-18.24%) มีปริมาณผลผลิตมากกว่าตัวอย่างที่ผ่านกระบวนการเพิ่มปริมาณ PCs ด้วยเทคนิค SUBDME (1.32-2.49%) (ตาราง 19) นอกจากนี้ ยังพบว่าลักษณะสารสกัดที่ได้หลังจากกระบวนการเพิ่มปริมาณ PCs แล้ว จะเปลี่ยนจากผงสีเหลืองอมน้ำตาลไปเป็นผงสีขาวและผงสีขาวอมเหลือง (ภาพ 33) ตาราง 20 แสดงการเปรียบเทียบปริมาณแกมมา-โอริซานอล ไฟโตสเตอรอล และโพลิโคซานอล (PCs) ในตัวอย่างที่ปรับสภาพ TE-FC และ TE-RBW และผ่านกระบวนการสกัดซ้ำด้วยเทคนิค SUBDME และ SE เพื่อเพิ่มปริมาณ PCs ผลการทดลอง พบว่าตัวอย่าง TE-FC ที่ผ่านกระบวนการ SE มีปริมาณแกมมา-โอริซานอลสูงที่สุด (258.02 ± มก./100 กรัม) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) ในขณะที่ตัวอย่างเดียวกันที่ผ่านกระบวนการ SUBDME ไม่พบ (Non-detected) ปริมาณแกมมา-โอริซานอล สำหรับปริมาณไฟโตสเตอรอลพบว่า ตัวอย่างที่ผ่านการปรับสภาพและผ่านกระบวนการเพิ่มปริมาณ PCs ด้วยวิธี SE ให้ปริมาณไฟโตสเตอรอลสูงที่สุด คือ ตัวอย่าง TE-FC (563.47±28.36 มก./100 กรัม) รองลงมา คือ ตัวอย่าง TE- RBW (460.16±2.23 มก./100 กรัม) กระบวนการสกัด SUBDME ทำให้ปริมาณไฟโตสเตอรอลในตัวอย่างที่ผ่านการปรับสภาพสูงขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างตั้งต้น (ตาราง 18)

ปริมาณ PCs มีค่าเพิ่มขึ้นเมื่อผ่านขั้นตอนการเพิ่มปริมาณ PCs ด้วยเทคนิค SUBDME ซึ่งจะพบว่า แต่ละตัวอย่างมีปริมาณ PCs เพิ่มขึ้นถึง 2.76-13.84 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างตั้งต้น (ตาราง 18) โดยตัวอย่าง TE- RBW และ TE-FC ที่ผ่านกระบวนการเพิ่มปริมาณ PCs ด้วยเทคนิค SUBDME มีปริมาณ PCs สูงที่สุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) ที่ 84,4,913.14± 1,409.00 และ 84,398.86±1,362.92 มก./100 กรัม ตามลำดับ(ตาราง 20) หรือมีความบริสุทธิ์ของสารโพลิโคซานอลมากถึง 85% และ 84% ตามลำดับ (ภาพ 33) รองลงมา คือ TE-FC ที่ผ่านกระบวนการเพิ่มปริมาณ PCs ด้วยเทคนิค SE (72,318.21±725.02 มก./100 กรัม) (ตาราง 20) จากการทดลองสามารถสรุปว่า การใช้เทคนิคการสกัดด้วย TE ร่วมกับเทคนิค SUBDME มีประสิทธิภาพดีในการเพิ่มปริมาณโพลิโคซานอล ซึ่งจะเห็นได้จากผลิตผลพลอยได้ RBW ที่เดิมมีปริมาณ PCs เป็นองค์ประกอบอยู่ 332.79±7.27 มก./100 กรัม แต่เมื่อผ่านกระบวนการทั้งสองแล้วทำให้ปริมาณโพลิโคซานอลเพิ่มขึ้นถึง 225.15 เท่า (84,913.14±1,409.00 mg/100gm)

ไดเมทิลอีเทอร์มีความสามารถในการละลายสารอินทรีย์ได้หลากหลาย โดยเฉพาะสารที่ไม่มีขั้ว (Non polar) นอกจากนี้ ยังเป็นตัวทำละลายที่ดีโดยเฉพาะกับสารที่มีพันธะไฮโดรเจน และเพื่อละลายสารที่มีพันธะไฮโดรเจนได้นั้น จำเป็นต้องใช้พลังงานในทำการละลายสูง (High solvation energy) ในกรณีนี้ DME จะทำหน้าที่เหมือนตัวรับพันธะไฮโดรเจน (Hydrogen bond acceptors) และจะสร้างพันธะไฮโดรเจนกับตัวถูกละลาย (Hydrogen-bonding solutes) จึงทำให้ไดเมทิลอีเทอร์มีความสามารถในการแทรกซึมเข้าสู่เซลล์ของตัวอย่างและสกัดสารโภชนเภสัชต่างๆ ออกมาได้ดี (Hoshino et al., 2016; Kanda et al., 2014; Li et al., 2014; Poojary et al., 2016) และเมื่อใช้ในเทคนิค SUBFE ทำให้ไดเมทิลอีเทอร์มีอุณหภูมิอยู่เหนือจุดเดือดรวมทั้งการรักษาความดันที่เหมาะสมทำให้ไดเมทิลอีเทอร์อยู่ในสภาวะของไหลที่มีคุณสมบัติเฉพาะตัว คือ มีสัมประสิทธิ์การแพร่ (Diffusion coefficient) คล้ายแก๊สและความหนืดต่ำกว่าของเหลวจึงทำให้การถ่ายเทมวลสาร และมีความสามารถในการซึมผ่าน (Diffusion coefficients) ดีขึ้น อีกทั้งความดันยังช่วยให้ไดเมทิลอีเทอร์เข้าสู่เซลล์ของตัวอย่างได้ง่ายขึ้น (Alvarez-Rivera et al., 2020; Mandal et al., 2015; Sanchez-Camargo et al., 2017)

ตาราง 19 แสดงปริมาณผลผลิตที่สกัดโดยเทคนิคการสกัดสารด้วยไดเมทิลอีเทอร์เหลวภายใต้สภาวะกึ่งวิกฤติและการสกัดสารด้วยตัวทำละลายจากผลิตผลพลอยได้ RBW และ FC ที่ผ่านการปรับสภาพ (TE-RBW และ TE-FC)

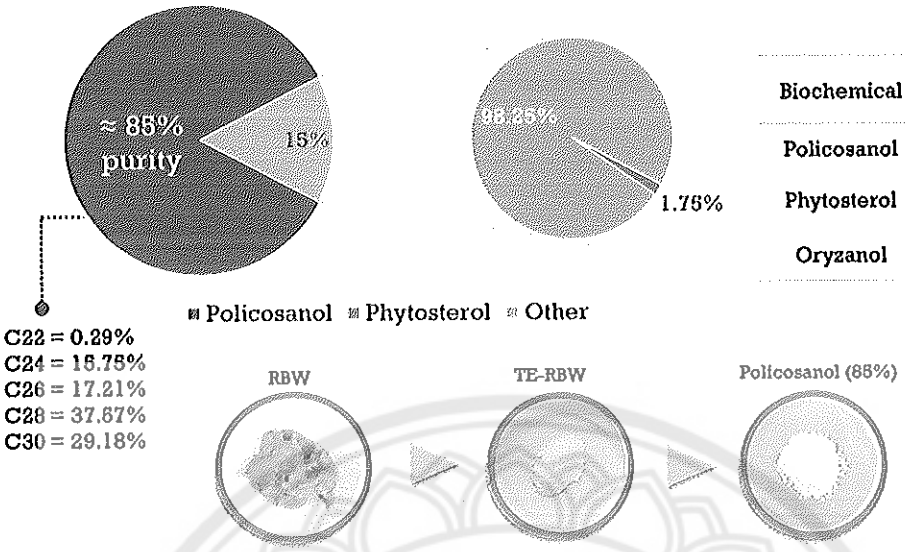
Samples	Methods	Solvent	Extraction times	Extraction yield (%)
TE-RBW	SUBDME	Dimethyl ether	30 นาที	2.49 ±0.49
TE-FC	SUBDME	Dimethyl ether	30 นาที	1.32 ±0.27
TE-FC	SE	Toluene	180 นาที	10.84 ±0.23
TE-RBW	SE	Toluene	180 นาที	18.24 ±0.56

TE-RBW = ไขรำข้าวที่ผ่านกระบวนการทรานเอสเทอริฟิเคชัน; TE-FC = กากกรองผ่านกระบวนการทรานเอสเทอริฟิเคชัน; SE= การสกัดด้วยตัวทำละลายโทลูอีน ตัวเลขแสดงในรูปของค่าเฉลี่ย ร้อยละและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (n=3)

ตาราง 20 แสดงปริมาณสารโภชนเภสัชในตัวอย่าง TE-FC และ TE-RBW จากการเพิ่มปริมาณโพลิโคซานอลโดยเทคนิคการสกัดสารด้วยไดเมทิลอีเทอร์เหลวภายใต้สภาวะกึ่งวิกฤติและการสกัดสารด้วยตัวทำละลาย

Nutraceutical (มก./100 กรัม)	Extraction by SUBDME		Extraction by SE	
	Samples		Samples	
	TE-FC	TE-RBW	TE-FC	TE-RBW
γ - oryzanol	ND	ND	258.02±0.01^{a}	114.37±1.18^{b}
Phytosterol				
- Campesterol	ND	ND	201.81±8.59^{a}	165.16±1.11^{b}
- Stigmasterol	ND	19.19±0.24^{c}	194.99±6.03^{a}	134.22±2.46^{b}
- β -sitosterol	32.12±7.92^{c}	18.23±2.06^{d}	47.78±1.23^{b}	90.65±3.47^{a}
- β-sitostanol	161.04±2.02^{b}	251.72±7.75^{a}	120.13±15.04^{c}	71.97±0.11^{d}
Total phytosterol	193.17±5.90^{d}	289.14±9.87^{c}	563.47±28.36^{a}	460.16±2.23^{b}
Policosanol				
- C22	203.92±0.73^{d}	250.08±1.53^{c}	293.04±3.06^{b}	374.82±2.62^{a}
- C24	10,318.48±511.04^{c}	13,374.37±9.35^{a}	12,231.18±63.84^{b}	12,483.98±302.26^{b}
- C26	14,153.56±406.18^{a}	14,613.22±291.18^{a}	12,556.02±139.01^{b}	10,711.60±527.84^{c}
- C28	32,560.01±389.59^{a}	31,898.52±742.87^{a}	24,164.37±266.73^{b}	21,056.39±208.28^{c}
- C30	27,162.89±135.30^{a}	24,776.45±160.15^{b}	23,073.60±252.44^{c}	18,090.92±109.98^{d}
Total PC	84,398.86±1,362.92^{a}	84,913.14±1,409.00^{a}	72,318.21±725.02^{b}	62,717.72±546.46^{c}

TE-RBW = ไขรำข้าวที่ผ่านกระบวนการทรานเอสเทอริฟิเคชัน; TE-FC = กากกรองผ่านกระบวนการทรานเอสเทอริฟิเคชัน; SE= การสกัดด้วยตัวทำละลายโทลูอีน ตัวเลขในตารางแสดงค่าเฉลี่ยบนความชื้นฐานแห้งและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (n=3) ND หมายถึง ปริมาณที่ตรวจพบได้มีค่า < LOD (ค่า LOD และ LOQ แสดงในภาคผนวก ค) ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยตัวอักษรที่แตกต่างกันในแถวเดียวกัน แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$)



Biochemical	Content (mg/100g)
Policosanol	84,912.64
Phytosterol	289.14
Oryzanol	Non detected

ภาพ 35 แสดงปริมาณและสัดส่วนของสารโภชนเภสัชในสารโพลิโคซานอลสกัดจากไขรำข้าวที่ผ่านกระบวนการทรานเอสเทอริฟิเคชันและผ่านการเพิ่มปริมาณโพลิโคซานอลโดยเทคนิคการสกัดสารด้วยไดเมทิลอีเทอร์เหลวภายใต้สภาวะกึ่งวิกฤติ

2.3 วิเคราะห์ปริมาณสารเคมีตกค้างในสารโพลิโคซานอลสกัด

ผลการวิเคราะห์ปริมาณสารเคมีตกค้างในสารโพลิโคซานอลสกัดจากไขรำข้าว (RBW) ที่ผ่านกระบวนการปรับสภาพด้วยวิธี TE และผ่านการสกัดเพื่อเพิ่มปริมาณโพลิโคซานอลด้วยเทคนิค SFDME แสดงในตาราง 20 ผลการทดลอง พบว่า สารโพลิโคซานอลสกัด (PPC) มีสารเคมีตกค้างต่ำกว่า 1.50 ppm โดยโทลูอีน (Toluene) เป็นสารเคมีตกค้างที่พบมากที่สุดที่ระดับ 1.44±0.06 ppm รองลงมา คือ อะซิโตน (Acetone) (1.11±0.15 ppm) และเอทานอล (Ethanol) (1.06±0.07 ppm) ในขณะที่พบเฮกเซน (Hexane) อะซิตัลดีไฮด์ (Acetaldehyde) และ 2,2,4- ไตรเมทิลเพนเทน (Isooctane) ต่ำกว่า 1 ppm ตามแนวปฏิบัติของ International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use (ICH) กำหนดปริมาณสารเคมีตกค้างที่ถือว่าปลอดภัยในผลิตภัณฑ์ยาไว้ดังนี้ เฮกเซนและโทลูอีนไม่เกิน 290 ppm และ 890 ppm ตามลำดับ เอทานอลและอะซิโตนแต่ละชนิดไม่ควรเกิน 5,000 ppm อย่างไรก็ตาม 2,2,4-ไตรเมทิลเพนเทนยังไม่มีข้อมูลทางพิษวิทยาเกี่ยวกับปริมาณสูงสุดที่ได้รับในแต่ละวัน (Permitted daily exposure) (International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use (ICH), 2017) แต่ความเป็นพิษเฉียบพลันของ 2,2,4-ไตรเมทิลเพนเทนต่ำมากและ

คล้ายคลึงกับเอ็น-ออกเทน (n-octane) (Patnaik, 2006) ส่วนปริมาณที่ยอมรับได้สำหรับอะซิตัลดีไฮด์ Food Safety Commission of Japan ได้กำหนดปริมาณที่บริโภคได้ต่อวัน (Acceptable daily intake) ไม่เกิน 1.8 มก./คน/วัน (Food Safety Commission of Japan, 2005) จากผลการทดลองจึงสามารถสรุปได้ว่า สารเคมีตกค้างใน โพลิโคซานอลสกัด (PPC) มีค่าไม่เกินมาตรฐานและถือว่ามีความปลอดภัยต่อการบริโภค

ตาราง 21 แสดงชนิดและปริมาณของสารเคมีตกค้างในสารโพลิโคซานอลสกัดจาก**ไขรำข้าว**ที่ผ่านกระบวนการทรานเอสเทอริฟิเคชันและผ่านการเพิ่มปริมาณโพลิโค**ซานอล**โดยเทคนิคการสกัดสารด้วยไดเมทิลอีเทอร์เหลวภายใต้สภาวะกึ่งวิกฤติ

สารเคมี	ความเข้มข้น (ppm)
เอทานอล	1.06 ±0.07
อะซิโตน	1.11 ±0.15
เฮกเซน	0.81 ±0.15
อะซิตัลดีไฮด์	0.93 ±0.09
2,2,4-ไตรเมทิลเพนเทน (ไอโซออกเทน)	0.17 ±0.01
โทลูอีน	1.44 ±0.06

ตัวเลขในตารางแสดงค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (n=3)

การศึกษาที่ 3 การทดสอบความเป็นพิษและประสิทธิภาพในการลดระดับคอเลส**เตอรอล**ในสัตว์ทดลองของสารโพลิโคซานอลสกัด รวมทั้งพัฒนาน้ำมันรำข้าวเสริมโพลิโค**ซานอล**เพื่อเป็นต้นแบบผลิตภัณฑ์อาหารฟังก์ชั่น

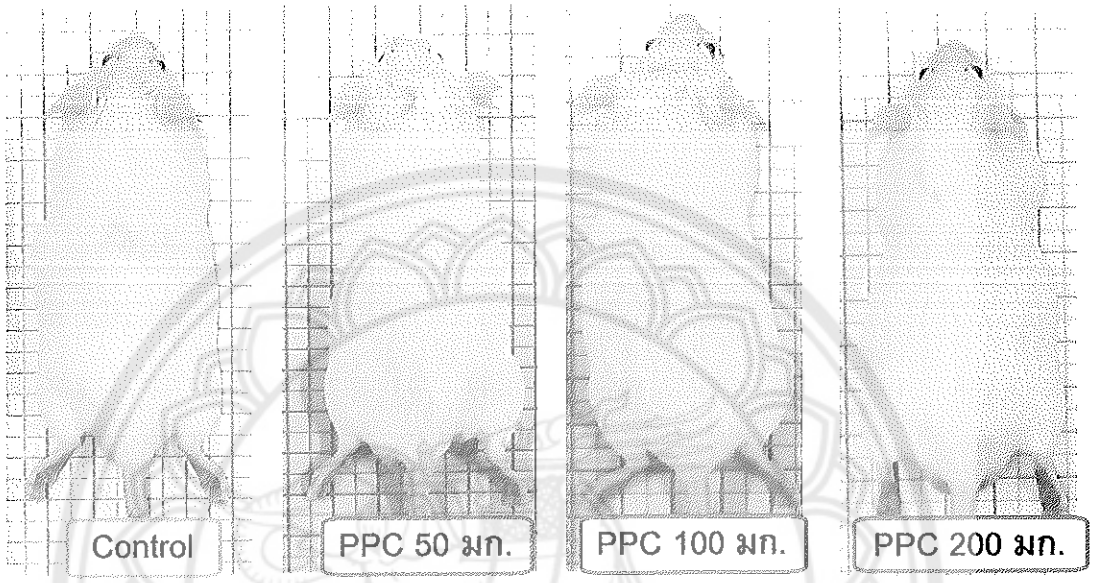
1. การศึกษาความเป็นพิษกึ่งเฉียบพลันของสารโพลิโคซานอลสกัด (PPC) ในหนูไมส์ (Mice) เพศผู้และเพศเมีย

1.1 ผลของโพลิโคซานอลสกัดต่อหนูไมส์เพศผู้

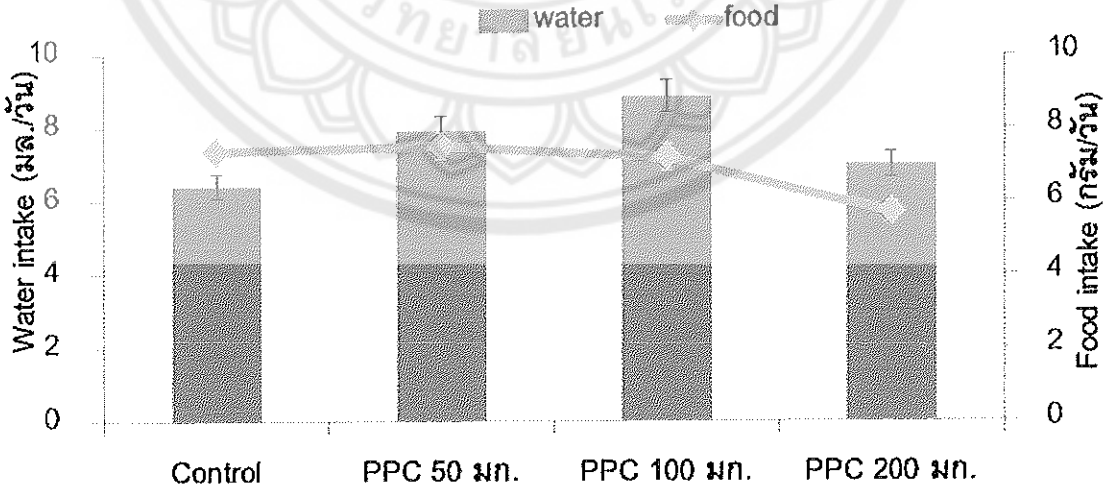
1.1.1 ผลต่อน้ำหนักตัวและลักษณะภายนอกที่ปรากฏ

จากการสังเกตความเป็นพิษของหนูทดลอง ไม่พบอาการขนร่วง ก้าวร้าว เซื่องซึม อุจจาระร่วง อาเจียน หรือลักษณะร่างกายอ่อนแอ และไม่พบว่าหนูทดลองตายภายใน 24 ชั่วโมง (ภาพ 36) น้ำหนักตัวเมื่อเริ่มการทดลอง (W_1) ของหนูไมส์เพศผู้ทั้ง 4 กลุ่ม ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \geq 0.05$) หนูมีการเติบโตที่เป็นปกติตลอดการทดลอง กินอาหาร

(5.68-7.17 มก./ตัว/วัน) และน้ำ (6.40-8.85 มก./ตัว/วัน) (ภาพ 37) ได้ตามปกติ ภายหลังสิ้นสุดการทดลองในวันที่ 28 (W_{28}) พบว่า หนูทุกกลุ่มมีน้ำหนักตัวเพิ่มขึ้น และมีค่าสูงกว่าค่าที่ W_1 แต่ไม่มีความแตกต่างกันระหว่างกลุ่ม (ตาราง 22) และไม่พบการตายของหนูทดลอง



ภาพ 36 แสดงลักษณะภายนอกของหนูไมส์เพศผู้ในวันที่ 28 กลุ่มควบคุมเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ได้สารโพลิโคซานอลสกัดที่ระดับ 50 100 และ 200 มก.



ภาพ 37 แสดงปริมาณการบริโภคอาหารและน้ำเฉลี่ยต่อตัวหนูไมส์เพศผู้กลุ่มควบคุมเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ได้สารโพลิโคซานอลสกัดที่ 50 100 และ 200 มก/กก./วัน

ตาราง 22 แสดงอัตราส่วนของน้ำหนักตัวหนูไมส์กับน้ำหนักสัมพัทธ์ของตับ หัวใจ ไต ม้าม และอัณฑะของหนูไมส์เพศผู้ เมื่อได้รับสารโพลิโคซานอลสกัด เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม

Ratio of organ: body weight	กลุ่มควบคุม	สารโพลิโคซานอลสกัด (มก./กก./วัน)		
		50	100	200
Liver (10^{-3})	63.06±4.35	64.44±4.54	58.55±16.11	64.12±3.04
Heart (10^{-3})	4.54±0.52	4.26±0.13	4.21±1.05	4.02±0.40
Kidney (10^{-3})	18.45±0.87	18.76±2.18	18.30±6.49	18.58±1.56
Spleen (10^{-3})	2.79±0.43	2.86±0.52	2.92±0.86	2.59±0.32
Testes (10^{-3})	5.70±0.53	5.40±0.51	5.06±1.12	6.03±0.66

ตัวเลขในตารางแสดงค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (n=5) ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยตัวอักษรที่แตกต่างกันในแถวเดียวกัน แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$)

1.1.2 ผลต่ออวัยวะที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการเมทาบอลิซึมและอวัยวะสืบพันธุ์

ผลต่ออวัยวะที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการเมทาบอลิซึมและอวัยวะสืบพันธุ์ เมื่อให้ PPC ที่ระดับ 50, 100 และ 200 มก./กก./วัน แก่หนูไมส์เพศผู้เป็นเวลา 28 วัน พบว่า ไม่มีผลต่ออัตราส่วนของน้ำหนักตัวหนูไมส์กับน้ำหนักสัมพัทธ์ของตับ หัวใจ ไต ม้าม และอัณฑะของหนูไมส์เพศผู้ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \geq 0.05$) เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ดังนั้น PPC ที่ระดับ 50, 100 และ 200 มก./กก./วัน ไม่ก่อให้เกิดความผิดปกติของตับ หัวใจ ไต ม้าม และอัณฑะของหนูไมส์

1.1.3 ผลต่อค่าทางชีวเคมีในเลือด

ค่าทางชีวเคมีในเลือดที่บ่งบอกการทำงานของตับ ได้แก่ ค่า AST (Aspartate aminotransferase) และค่า ALT (Alanine aminotransferase) ในขณะที่ค่า BUN (Blood Urea Nitrogen) และ CREA (Creatinine) เป็นค่าที่บ่งบอกการทำงานของไต จากการทดลอง พบว่า ปริมาณการให้สารสกัด PPC ที่แตกต่างกันไม่มีผลต่อระดับ AST ALT BUN และ CREA อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ($P \geq 0.05$) แสดงถึง PPC ที่ระดับ 50, 100 และ 200 มก./กก./วัน ไม่ก่อให้เกิดความผิดปกของตับและไต ของหนูไมส์เพศผู้

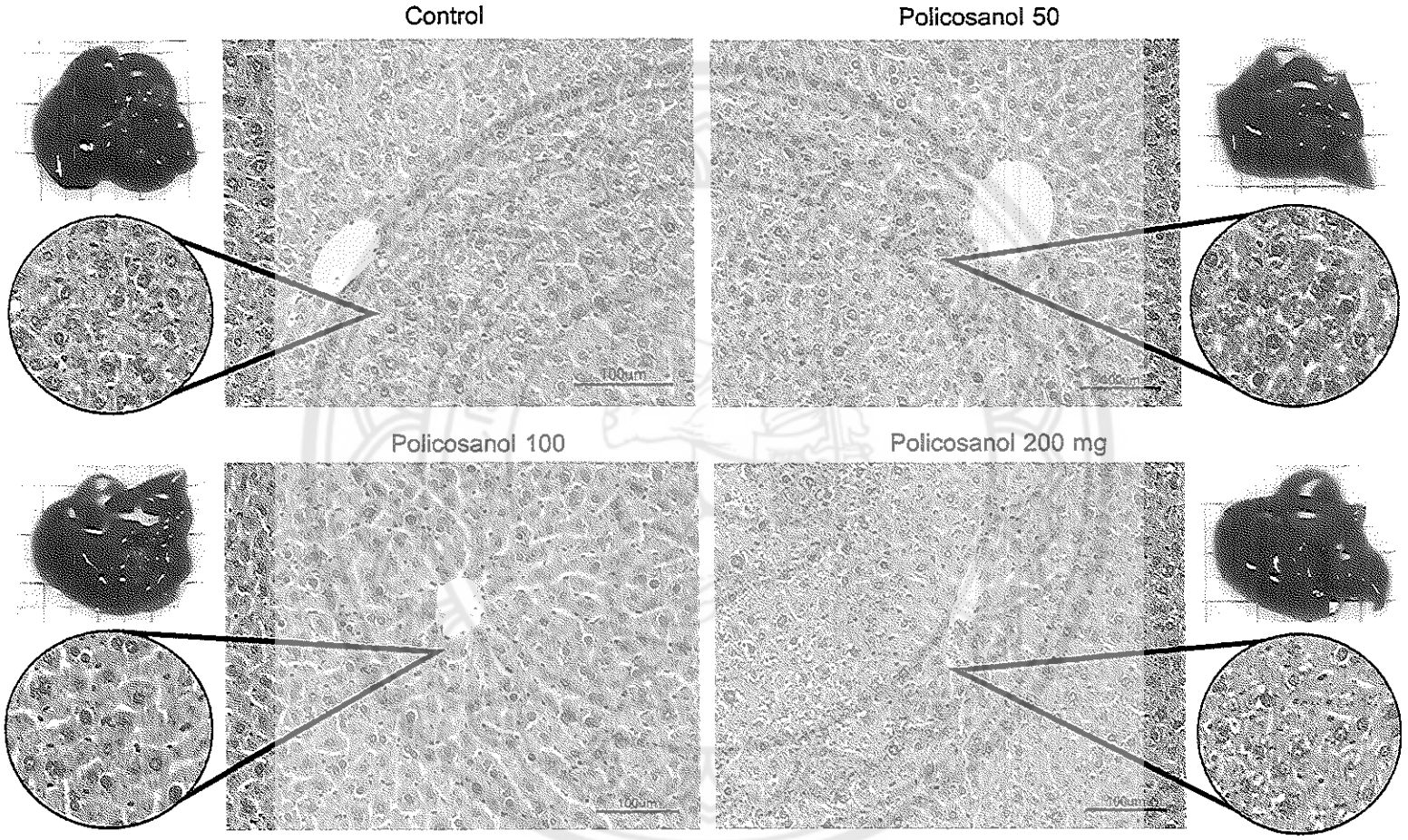
ตาราง 23 แสดงผลของสารโพลิโคซานอลสกัดต่อค่าชีวเคมีในเลือดของหนูไมส์เพศผู้เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม

ค่าชีวเคมี	กลุ่มควบคุม	สารโพลิโคซานอลสกัด (มก./กก.)		
		50	100	200
AST (ยูนิต/ลิตร)	103.43±54.13	113.83±80.55	124.80±77.31	126.63±65.48
ALT (ยูนิต/ลิตร)	27.02±6.08	34.68±35	33.80±6.42	25.85±4.84
BUN (มก./dL)	30.74±2.94	28.08±1.94	24.65±5.66	26.10±5.94
CREA (มก./dL)	0.17±0.04	0.14±0.02	0.13±0.05	0.12±0.08

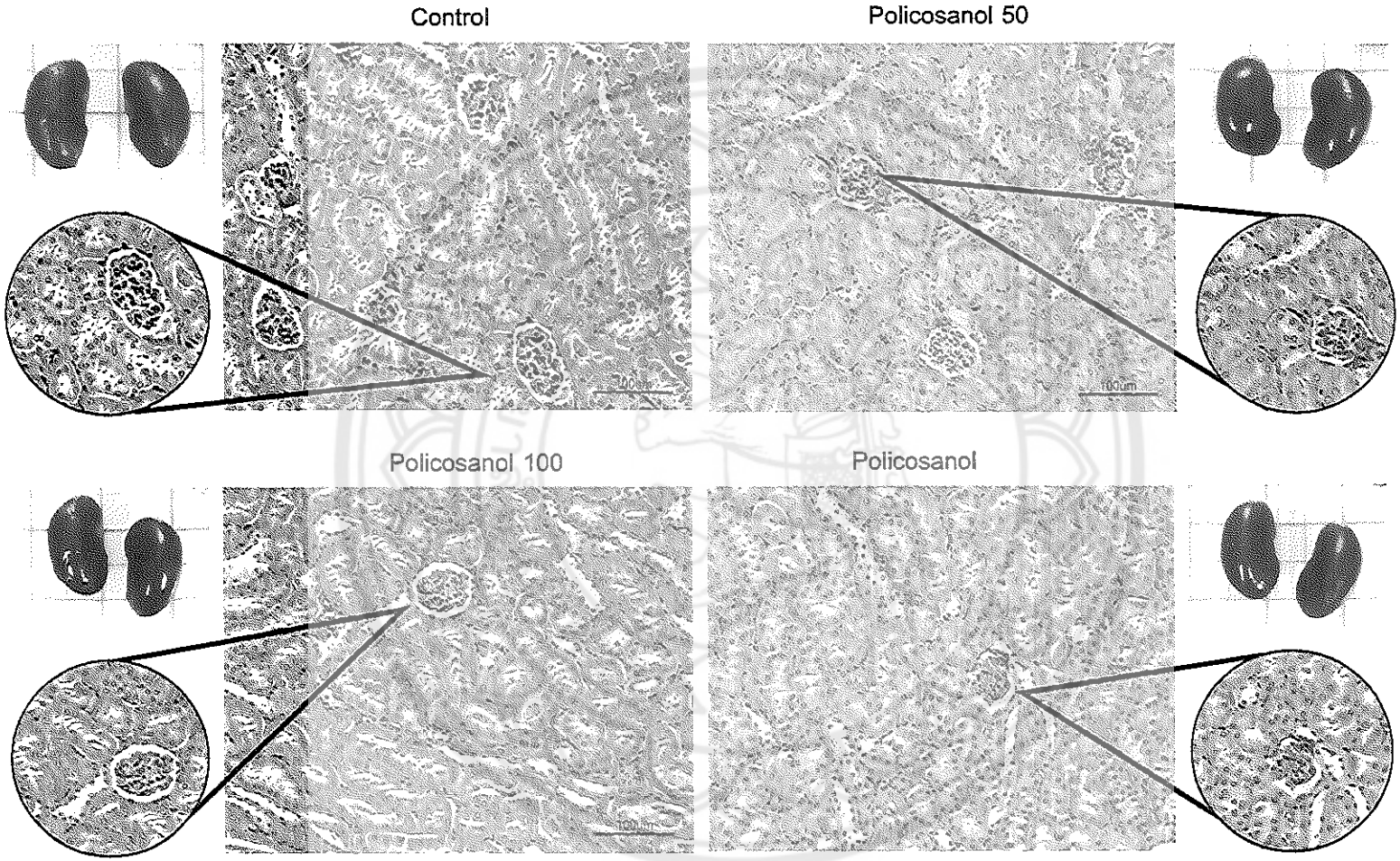
AST= Aspartate aminotransferase, ALT = Alanine aminotransferase, BUN = Blood Urea Nitrogen, CREA = Creatinine ตัวเลขในตารางแสดงค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (n=5) ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยตัวอักษรที่แตกต่างกันในแถวเดียวกัน แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$)

1.1.4 ผลต่อการเปลี่ยนแปลงระดับจุลกายวิภาคของเนื้อเยื่อ (Histological) ตับและไต

ผลการตรวจทางจุลพยาธิวิทยาในหนูไมส์เพศผู้กลุ่มที่ได้รับ PPC ทั้ง 3 ระดับเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (ภาพ 38 และ 39) พบว่า ไม่มีความผิดปกติของเนื้อเยื่อตับทั้งในด้านลักษณะขนาดของเซลล์ และสีของตับ รวมทั้งไม่ส่งผลต่อลักษณะทางกายวิภาคศาสตร์ของไตทั้งในด้านลักษณะของเส้นเลือดฝอยในโกลเมอรูลัส ขนาดของโกลเมอรูลัสและขนาดของช่องว่างภายในโบว์แมนแคปซูล (Bowman's capsule space)



ภาพ 38 แสดงการเปลี่ยนแปลงระดับจุลกายวิภาคของเนื้อเยื่อตับหนูไมส์เพศผู้ย้อมสีด้วยวิธี H&E (กำลังขยาย 200 เท่า)



ภาพ 39 แสดงการเปลี่ยนแปลงระดับจุลกายวิภาคของเนื้อเยื่อไตหนูไมส์เพศผู้ย้อมสีด้วยวิธี H&E (กำลังขยาย 200 เท่า)

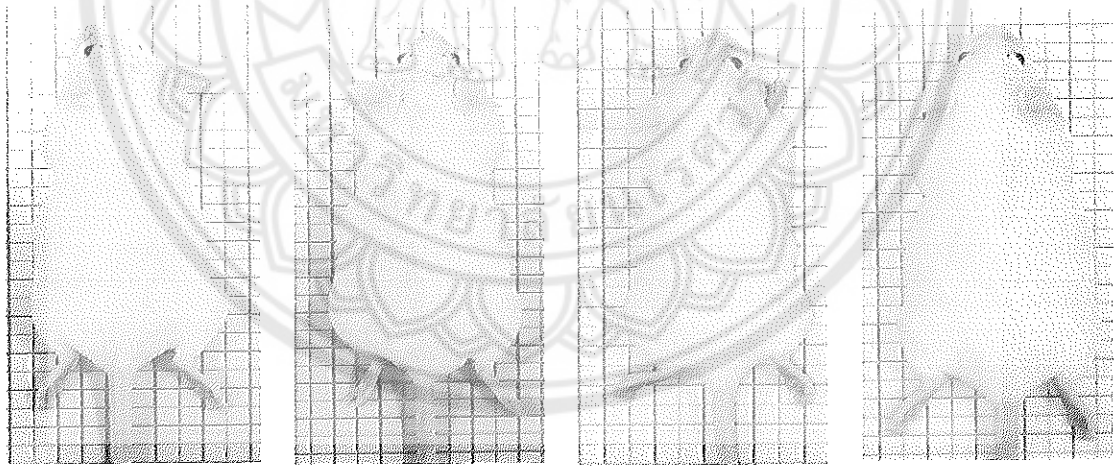
1.2 ผลของโพลิโคซานอลสกัดต่อหนูไมส์เพศเมีย

1.2.1 ผลต่อน้ำหนักตัวและลักษณะปรากฏภายนอก

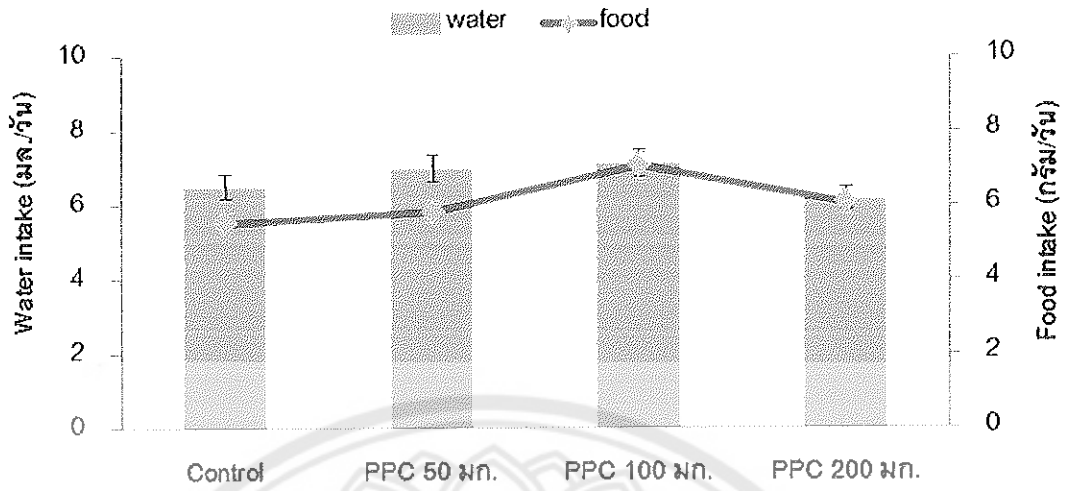
จากการสังเกตความเป็นพิษ ไม่พบอาการขนร่วง ก้าวร้าว เซื่องซึม อุจจาระร่วง อาเจียน หรือลักษณะร่างกายอ่อนแอ (ภาพ 40) และไม่พบว่า หนูทดลองตายภายใน 24 ชั่วโมง น้ำหนักตัวเมื่อเริ่มการทดลอง (W_1) ของหนูไมส์เพศเมียทั้ง 4 กลุ่มไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ หนูมีการเติบโตที่เป็นปกติตลอดการทดลอง กินอาหาร (5.51-7.06 มก./ตัว/วัน) และน้ำ (6.17-7.12 gm/ตัว/วัน) (ภาพ 41) ได้ตามปกติ ภายหลังสิ้นสุดการทดลองในวันที่ 28 (W_{28}) พบว่า หนูทุกกลุ่มมีน้ำหนักตัวเพิ่มขึ้น และมีค่าสูงกว่าค่าที่ W_1 แต่ไม่มีความแตกต่างกันระหว่างกลุ่ม (ตาราง 22) และไม่พบการตายของหนูทดลอง

1.2.2 ผลต่ออวัยวะที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการเมทาบอลิซึมและอวัยวะสืบพันธุ์

ผลต่ออวัยวะที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการเมทาบอลิซึมและอวัยวะสืบพันธุ์ เมื่อให้ PPC ในระดับ 50, 100 และ 200 มก./กก./วัน แก่หนูไมส์เพศเมีย เป็นเวลา 28 วัน พบว่า ไม่มีผลต่ออัตราส่วนของน้ำหนักตัวหนูไมส์เพศเมียกับน้ำหนักสัมพัทธ์ของตับ หัวใจ ไต ม้าม และรังไข่ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \geq 0.05$) เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (ตาราง 24)



ภาพ 40 แสดงลักษณะภายนอกของหนูไมส์เพศเมียในวันที่ 28 กลุ่มควบคุมเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ได้สารโพลิโคซานอลสกัดระดับ 50 100 และ 200 มก.



ภาพ 41 แสดงปริมาณการบริโภคอาหารและน้ำเฉลี่ยต่อตัวหนูไมส์เพศเมีย กลุ่มควบคุมเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ได้สารโพลิโคซานอลสกัดระดับ 50 100 และ 200 มก./กก./วัน

ตาราง 24 แสดงอัตราส่วนของน้ำหนักตัวหนูไมส์กับน้ำหนักสัมพัทธ์ของตับ หัวใจ ไต ม้าม และรังไข่ของหนูไมส์เพศเมียเมื่อได้รับสารโพลิโคซานอลสกัดเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม

Ratio of organ: body weight	กลุ่มควบคุม	สารโพลิโคซานอลสกัด (มก./กก./วัน)		
		50	100	200
Liver (10^{-3})	61.95±3.77^{a,b}	58.42±4.44^{a,b}	56.60±4.43^{b}	64.34±4.61^{a}
Heart (10^{-3})	4.26±0.30	3.95±0.20	4.36±0.54	4.39±0.32
Kidney (10^{-3})	16.09±1.34^{a,b}	14.25±0.46^{b}	14.56±0.41^{a,b}	16.45±2.08^{a}
Spleen (10^{-3})	3.57±0.57	4.09±1.05	2.97±1.09	4.05±1.04
Ovary (10^{-3})	0.72±0.19	0.69±0.15	0.62±0.26	0.75±0.10

ตัวเลขในตารางแสดงค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (n=5) ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยตัวอักษรที่แตกต่างกันในแถวเดียวกัน แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$)

1.2.3 ผลต่อค่าทางชีวเคมีในเลือด

พบว่า ปริมาณการให้ PPC ที่แตกต่างกัน ไม่มีผลต่อระดับ AST, ALT, BUN และ CREA อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ($P \geq 0.05$) (ตาราง 25)

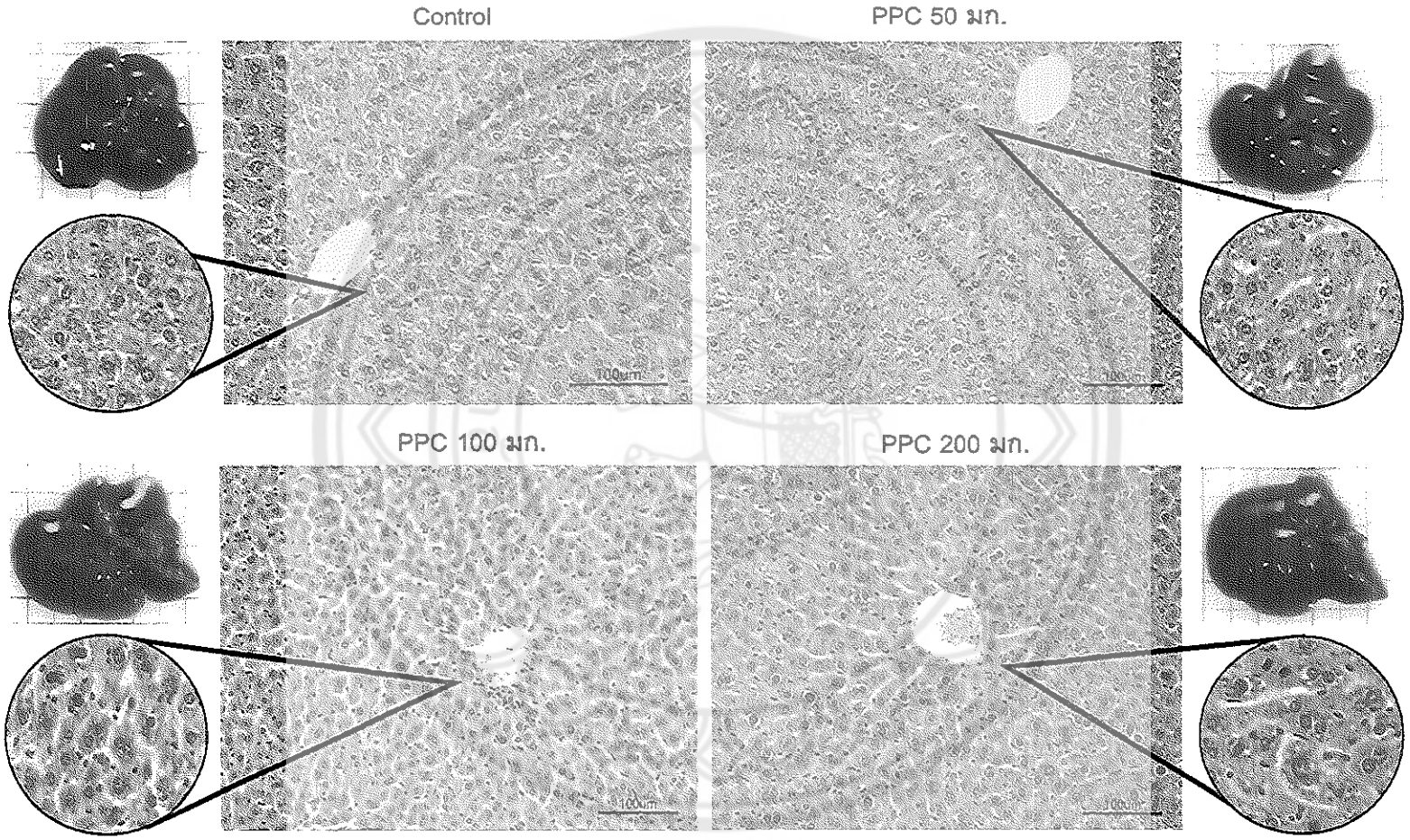
ตาราง 25 แสดงผลของสารโพลิโคซานอลสกัดต่อค่าชีวเคมีในเลือดของหนูไมส์เพศเมีย เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม

ค่าชีวเคมี	ค่าชีวเคมี	สารโพลิโคซานอลสกัด (มก./กก./วัน)		
		50	100	200
AST (ยูนิต/ลิตร)	147.25±77.74	156.63±18.19	192.10±74.75	234.70±64.36
ALT (ยูนิต/ลิตร)	32.84±12.57	28.48±2.75	41.47±8.39	31.43±5.55
BUN (มก./dL)	23.60±4.66	25.85±3.51	22.40±2.82	22.45±4.24
CREA (มก./dL)	0.13±0.04	0.17±0.07	0.12±0.08	0.18±0.03

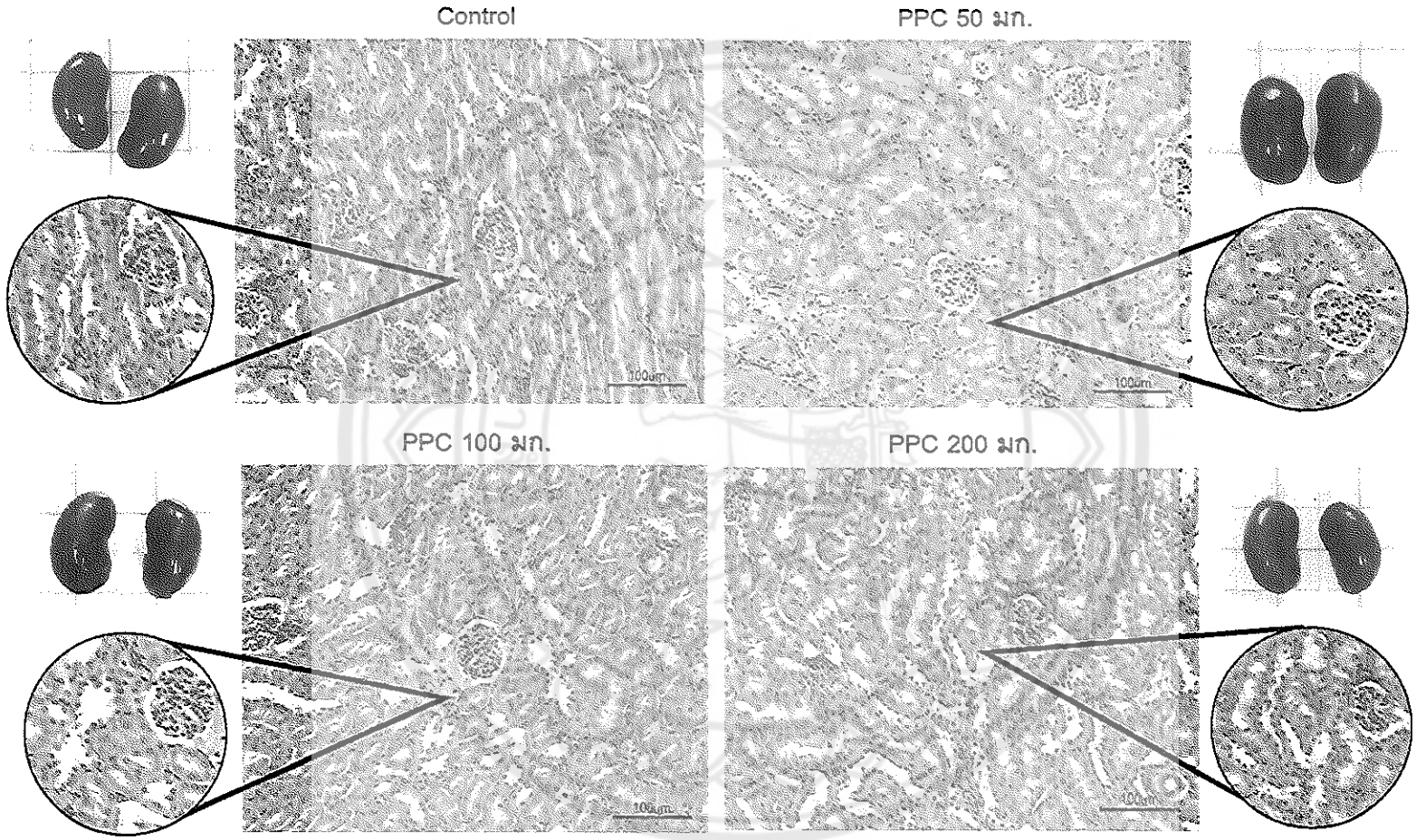
AST= Aspartate aminotransferase, ALT = Alanine aminotransferase, BUN = Blood Urea Nitrogen, CREA = Creatinine ตัวเลขในตารางแสดงค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (n=5) ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยตัวอักษรที่แตกต่างกันในแถวเดียวกัน แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$)

1.2.4 ผลต่อการเปลี่ยนแปลงระดับจุลกายวิภาคของเนื้อเยื่อตับและไต

ผลการตรวจทางจุลพยาธิวิทยาในหนูไมส์เพศเมียกลุ่มที่ได้รับ PPC ทั้ง 3 ขนาด เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (ภาพที่ 42 และ 43) พบว่า ไม่มีความผิดปกติของเนื้อเยื่อตับทั้งในด้านลักษณะ ขนาดของเซลล์ และสีของตับ รวมทั้งไม่ส่งผลต่อลักษณะทางกายวิภาคศาสตร์ของไตทั้งในด้านลักษณะของเส้นเลือดฝอยในโกลเมอรูลัส ขนาดของโกลเมอรูลัสและขนาดของช่องว่างภายในโบว์แมนแคปซูล (Bowman's capsule space)



ภาพ 42 แสดงการเปลี่ยนแปลงระดับจุลกายวิภาคของเนื้อเยื่อตับหนูไมส์เพศเมียย้อมสีด้วยวิธี H&E (กำลังขยาย 200 เท่า)



ภาพ 43 แสดงการเปลี่ยนแปลงระดับจุลกายวิภาคของเนื้อเยื่อไตหนูไมส์เพศเมียย้อมสีด้วยวิธี H&E (กำลังขยาย 200 เท่า)

จากการทดสอบความแบบพิษแบบกึ่งเฉียบพลันของสารสกัดโพลิโคซานอลบริสุทธิ์ในหนูไมส์เพศผู้และเพศเมีย ในขนาด 50, 100 และ 200 มก./กก./วัน เป็นระยะเวลา 28 วัน พบว่าไม่พบอาการผิดปกติและความผิดปกติใด ของหนูไมส์ทั้งเพศผู้และเพศเมีย สัตว์ทดลองรอดชีวิตทั้งหมด ส่วนผลต่ออวัยวะที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการเมทาบอลิซึมและอวัยวะสืบพันธุ์ พบว่าอัตราส่วนระหว่างน้ำหนักของอวัยวะที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการเมทาบอลิซึมและอวัยวะสืบพันธุ์ต่อน้ำหนักตัวของหนูไมส์ทั้งเพศผู้และเพศเมียไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \geq 0.05$) ซึ่งแสดงให้เห็นว่า การให้ PPC ในที่ระดับ ตั้งแต่ 50-200 มก./กก./วัน ไม่มีผลต่อน้ำหนักอวัยวะที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการทาบอลิซึมและอวัยวะสืบพันธุ์

จากการวิเคราะห์ค่าชีวเคมีในเลือด พบว่า การให้สารโพลิซานอลสกัดแก่หนูไมส์เพศผู้และเพศเมียในขนาด 50, 100 และ 200 มก./กก./วัน ไม่ส่งผลต่อค่า ALT AST CREA และ BUN อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \geq 0.05$) แสดงให้เห็นว่าตับและไตสามารถทำงานได้อย่างปกติ ส่วนผลทางจุลพยาธิวิทยาในกลุ่มหนูทดสอบทั้งเพศผู้และเพศเมียที่ได้รับสาร PPC ทั้ง 3 ระดับ พบว่าพยาธิสภาพที่ตับและไตไม่มีความแตกต่างจากกลุ่มควบคุม ดังนั้น จึงสรุปว่าการให้สาร PCs ที่ระดับ 50-200 มก./กก./วัน ไม่แสดงความเป็นพิษกึ่งเฉียบพลันในสัตว์ทดลอง ซึ่งผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับการศึกษาของ Aleman et al. (1994; Aleman et al., 1995; Gamez et al., 2001) ที่ทำการทดลองกับหนูแรทและหนูไมส์ โดย Aleman et al. (1994) ทำการทดลองโดยให้สารโพลิโคซานอลจากการทดลองภายในห้องปฏิบัติการในระดับ 0.5-500 มก./กก./วัน เป็นเวลา 6 เดือน ต่อมา Aleman et al. (1995) ได้ทำการศึกษาการเป็นสารก่อมะเร็งของอาหารเสริมโพลิโคซานอล (Ateromixol) ในหนูไมส์เพศผู้และเพศเมีย (Swiss mice) ในปริมาณ 50-500 มก./กก. เป็นเวลา 18 เดือน นอกจากนี้ Gamez et al. (2001) ยังทำการทดลองโดยให้สารโพลิโคซานอลบริสุทธิ์จากบริษัท Plants for Natural Products Manufacturing (Havana City, Cuba) ในขนาด 50-5,000 มก./กก./วัน เป็นเวลา 12 เดือน โดยผลการทดลองดังกล่าวบ่งชี้ว่าหนูแรทและหนูไมส์ไม่แสดงความผิดปกติทางพิษวิทยา ค่าชีวเคมีในเลือด น้ำหนักของอวัยวะที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการเมทาบอลิซึม และค่าโลหิตวิทยา

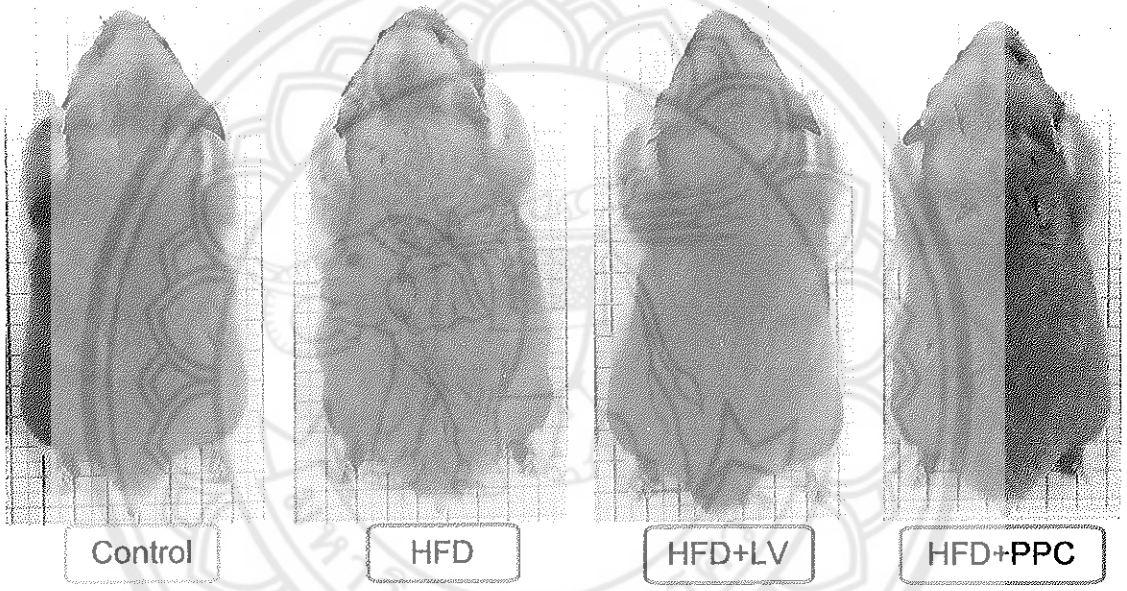
2. การศึกษาประสิทธิภาพการลดระดับไขมันในเลือดของสารโพลิโคซานอลสกัดในแฮมสเตอร์เพศผู้

2.1 ผลของโพลิโคซานอลสกัดต่อน้ำหนักตัวและลักษณะภายนอกที่ปรากฏ

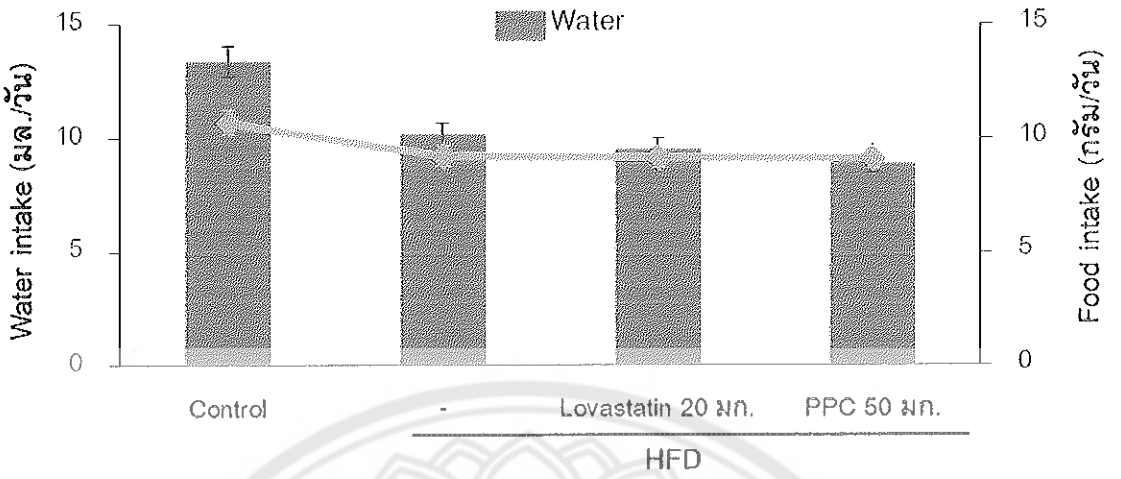
จากการสังเกตความเป็นพิษของหนูที่ได้รับสารโพลิโคซานอลสกัด (HFD+PPC 50 มก./กก./วัน) ไม่พบอาการขนร่วง ก้าวร้าว เซื่องซึม อุจจาระร่วง อาเจียน หรือลักษณะร่างกายอ่อนแอ แต่ในสัปดาห์ที่ 2, 3 และ 5 แฮมสเตอร์กลุ่มที่ได้รับยาโลวาสแตติน (HFD+LV 20 มก./กก./วัน) ตายรวมจำนวน 5 ตัว โดยหลังจากให้ยาโลวาสแตตินแฮมสเตอร์มีอาการเซื่องซึม ไม่อยากอาหาร และตาย

ในที่สุด ซึ่งภายหลังจากสัปดาห์ที่ 5 จึงทำการเปลี่ยนจากการป้อน (Oral gavage) ยาโลวาสแตติน ทางปากเป็นการผสมลงในอาหาร โดยลักษณะภายนอกของแฮมสเตอร์ในวันที่ 70 แสดงในภาพ 44

น้ำหนักตัวเมื่อเริ่มการทดลอง (W_1) ของแฮมสเตอร์เพศผู้ทั้ง 4 กลุ่มไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แฮมสเตอร์มีการเติบโตที่เป็นปกติตลอดการทดลอง กินอาหาร (9.11-10.70 กรัม/ตัว/วัน) และน้ำ (8.90-13.39 กรัม/ตัว/วัน) (ภาพ 45) ได้ตามปกติ โดยภายหลังสิ้นสุดการทดลองในวันที่ 70 (W_{70}) พบว่า แฮมสเตอร์ทุกกลุ่มมีน้ำหนักตัวเพิ่มขึ้น และมีค่าสูงกว่าค่าที่ W_1 แต่ไม่มีความแตกต่างกันระหว่างกลุ่ม (ตาราง 26)



ภาพ 44 แสดงผลของสารโพลิโคซานอลสกัดที่ระดับ 50 มก./กก./วัน และยาโลวาสแตติน 20 มก./กก./วัน ต่อลักษณะภายนอกของแฮมสเตอร์เพศผู้ในวันที่ 70



ภาพ 45 แสดงผลของสารโพลิโคซานอลสกัดและยาโลวาสแตตินต่อการบริโภคอาหารและน้ำเฉลี่ยต่อตัวแฮมสเตอร์เพศผู้เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม

2.2 ผลของโพลิโคซานอลสกัดต่ออวัยวะที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการเมทาบอลิซึม อวัยวะสืบพันธุ์ และเนื้อเยื่อไขมัน

การศึกษาผลต่ออวัยวะที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการเมทาบอลิซึม อวัยวะสืบพันธุ์และเนื้อเยื่อไขมันของแฮมสเตอร์เพศผู้กลุ่มที่ได้รับอาหารไขมันสูง (HFD) กลุ่มที่ได้รับยาโลวาสแตติน (HFD+LV 20 มก./กก./วัน) และกลุ่มที่ได้รับสารโพลิโคซานอลสกัด (HFD+PPC 50 มก./กก.วัน) เป็นเวลา 70 วัน พบว่า การได้รับยาโลวาสแตติน (LV) และสารโพลิโคซานอลสกัด (PPC) ในปริมาณดังกล่าวไม่มีผลต่อน้ำหนักตับ ไต และม้ามอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \geq 0.05$) เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม อย่างไรก็ตาม พบว่า แฮมสเตอร์กลุ่มที่ได้รับยาโลวาสแตติน (HFD+LV) มีน้ำหนักของอวัยวะสืบพันธุ์ Perigonadal fat และ Retroperitoneal fat ต่ำกว่ากลุ่มอื่น อีกทั้ง พบว่า แฮมสเตอร์กลุ่มที่ได้รับอาหารไขมันสูง (HFD) กลุ่มได้รับยาโลวาสแตติน (HFD+LV) และกลุ่มที่ได้รับสารโพลิโคซานอลสกัด (HFD+PPC) มีน้ำหนัก Mesenteric fat สูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) (ตาราง 26)

Perigonadal fat, Retroperitoneal fat และ Mesenteric fat (ภาพ 47 a) เป็นเนื้อเยื่อไขมันในช่องท้อง (Visceral adipose tissue; VAT) ที่ห่อหุ้มอวัยวะภายใน เช่น ตับ ตับอ่อน หัวใจ และลำไส้ โดย Perigonadal fat เรียกอีกชื่อ คือ Epididymal ในเพศผู้ และ Periovarian ในเพศเมีย ซึ่งจะอยู่บริเวณไต เช่นเดียวกับ Retroperitoneal fat ส่วน Mesenteric fat เป็นไขมันที่ห่อหุ้มลำไส้เล็ก ซึ่งมีความคล้ายคลึงกับ Intra-abdominal adipose tissue ในคนทั้งตำแหน่งและทางชีววิทยา เนื่องจาก

เป็นทางเข้าสู่เส้นเลือดดำได้ (Chusyd et al., 2016) จากผลการทดลองดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าการบริโภคอาหารที่มีไขมันสูงจะทำให้มีปริมาณเนื้อเยื่อไขมันโดยเฉพาะไขมันประเภท VAT เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) โดยในมนุษย์พบความสัมพันธ์ของการเพิ่มขึ้นของ VAT จะเพิ่มความเสี่ยงของภาวะดื้อต่ออินซูลิน (Insulin resistance) และโรคไขมันในเลือดสูง (Dyslipidemia) (Wajchenberg et al., 2002) อีกทั้ง ยังเพิ่มปัจจัยเสี่ยงในการเป็นโรคเบาหวานชนิดที่ 2 (Type 2 diabetes) (Boyko et al., 2000) โรคความดันโลหิตสูง (Hypertension) (Hayashi et al., 2003) และเป็นสาเหตุที่ทำให้เสียชีวิตได้ (Kuk et al., 2006) ซึ่งจากการทดลอง พบว่า การให้ยา Lovastatin และสาร PPC ไม่มีผลต่อการการลดลงของน้ำหนักไขมันในช่องท้องของแฮมสเตอร์

ตาราง 26 แสดงน้ำหนักตัวแฮมสเตอร์เพศผู้เมื่อเริ่มทำการทดลองและเมื่อสิ้นสุดการทดลอง รวมทั้งน้ำหนักของตับ ไต ม้าม อัณฑะและเนื้อเยื่อไขมันของแฮมสเตอร์เมื่อได้รับ สารโพลิโคซานอลสกัดเปรียบเทียบในแต่ละกลุ่ม

Organ weight (กรัม)	Control	HFD	HFD+LV*	HFD+PPC
Initial body wt	76.62±4.11	76.91±1.28	74.87±0.24	75.36±1.17
Final body wt	142.91±0.05	143.02±11.97	121.83±8.80	150.23±16.70
Liver	6.35 ±0.91	6.29 ±1.58	5.71±0.89	6.93 ±1.85
Kidney	1.24 ±0.13	1.10 ±0.16	1.11 ±0.12	1.19 ±0.13
Spleen	0.10 ±0.02	0.10 ±0.02	0.09 ±0.01	0.11 ±0.03
Testes	3.41 ±0.33^{a}	3.41 ±0.67^{a}	2.81±0.95^{b}	3.59 ±0.34^{a}
Perigonadal fat	3.61 ±0.82^{a}	3.61 ±1.37^{a}	2.84 ±0.86^{b}	4.30 ±1.24^{a}
Retroperitoneal fat	2.77 ±0.59^{a}	2.61 ±0.98^{a}	1.88 ±0.62^{b}	3.37 ±1.02^{a}
Mesenteric fat	1.75 ±0.69^{b}	2.36 ±1.34^{a}	2.10 ±1.06^{a}	3.42 ±1.73^{a}

ตัวเลขในตารางแสดงค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (n=10 n=5*) ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยตัวอักษรที่แตกต่างกันในแถวเดียวกัน แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$)

2.3 ผลของโพลิโคซานอลสกัดต่อค่าทางชีวเคมีในเลือด

ค่าชีวเคมีในเลือดที่ศึกษาประกอบด้วย 4 ค่า ได้แก่ ปริมาณคอเลสเตอรอลทั้งหมด (Total cholesterol; T-CHO) ไตรกลีเซอไรด์ (Triglyceride; TG) ลิโพโปรตีนความหนาแน่นต่ำหรือ

ไขมันเลว (Low Density Lipoprotein; LDL) และลิโพโปรตีนความหนาแน่นสูงหรือไขมันดี (High-density lipoprotein cholesterol; HDL) ซึ่งเป็นการตรวจระดับไขมันในเลือด (Lipid profile) เพื่อดูความเปลี่ยนแปลงขององค์ประกอบของไขมันในกระแสเลือดซึ่งหากมีระดับไขมันต่างไปจากเกณฑ์ที่เหมาะสมจะส่งผลให้เกิดความเสี่ยงต่อการเกิดภาวะหลอดเลือดแดงแข็ง (Atherosclerosis) และก่อให้เกิดโรคหัวใจและหลอดเลือด (Cardiovascular diseases) ได้ (คณาจารย์ภาควิชาเวชศาสตร์ชุมชน คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์, 2004) จากการศึกษาประสิทธิภาพการลดระดับไขมันในเลือดของสารโพลิโคซานอลสกัดในแฮมสเตอร์เพศผู้ โดยแบ่งเป็นกลุ่มควบคุม (อาหารปกติ) กลุ่มที่ได้รับอาหารไขมันสูง (HFD) กลุ่มที่ได้รับยาโลวาสแตติน (HFD+LV) และกลุ่มที่ได้รับสารโพลิโคซานอลสกัด (HFD+PPC) เป็นระยะเวลา 70 วัน ซึ่งผลการทดลองแสดงในตาราง 27 พบว่า ปริมาณคอเลสเตอรอลในเลือดทั้งหมด (T-CHO) ของแฮมสเตอร์กลุ่มที่ได้รับอาหารไขมันสูง (HFD) มีค่าสูงที่สุด (218.56 มก./dL) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) และกลุ่มควบคุมมีค่าต่ำที่สุด (139.04 มก./dL) ผลการทดลอง พบว่า แฮมสเตอร์กลุ่มที่ได้รับยาโลวาสแตติน (HFD+LV) และกลุ่มที่ได้รับสารโพลิโคซานอลสกัด (HFD+PPC) มีปริมาณคอเลสเตอรอลในเลือดทั้งหมด (T-CHO) ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) ที่ 2.5% และ 10.5 % ซึ่งสารสกัดโพลิโคซานอลทำให้ค่าคอเลสเตอรอลทั้งหมดลดลง เนื่องมาจากแฮมสเตอร์ทั้ง 3 กลุ่มได้รับอาหารที่มีส่วนประกอบของไขมันสูง จึงทำให้คอเลสเตอรอลในเลือดมีปริมาณสูงกว่ากลุ่มควบคุม อย่างไรก็ตาม กลุ่มที่ได้รับยาโลวาสแตติน (HFD+LV) และกลุ่มที่ได้รับสารโพลิโคซานอลสกัด (HFD+PPC) มีปริมาณคอเลสเตอรอลในเลือดทั้งหมด (T-CHO) ต่ำกว่ากลุ่มที่ได้รับอาหารไขมันสูง (HFD)

สำหรับปริมาณไตรกลีเซอไรด์ (TG) ในเลือด พบว่า แฮมสเตอร์กลุ่มที่ได้รับอาหารไขมันสูง (HFD) กลุ่มที่ได้รับยาโลวาสแตติน (HFD+LV) และกลุ่มที่ได้รับสารโพลิโคซานอลสกัด (HFD+PPC) มีค่าเฉลี่ยปริมาณไตรกลีเซอไรด์ (TG) ในเลือด ไม่แตกต่างกันมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \geq 0.05$) อย่างไรก็ตาม ปริมาณไตรกลีเซอไรด์ (TG) ในเลือดมีแนวโน้มลดลงเมื่อได้รับสารโพลิโคซานอลสกัดจาก 218.24 มก./dL เป็น 186.43 มก./dL (ลดลง 14.5 %) นอกจากนี้ พบว่า แฮมสเตอร์กลุ่มที่ได้รับอาหารไขมันสูง (HFD) และกลุ่มที่ได้รับยาโลวาสแตติน (HFD+LV) มีค่าปริมาณของแอลดีแอลคอเลสเตอรอลหรือไขมันเลว (LDL) สูงที่สุด (62.23 มก./dL และ 59.15 มก./dL) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) รองลงมา คือ กลุ่มควบคุม (25.64 มก./dL) และกลุ่มที่ได้รับสารโพลิโคซานอลสกัด (HFD+PPC) (38.21 มก./dL) โดยกลุ่มที่ได้รับสารโพลิโคซานอลสกัดมีปริมาณของแอลดีแอลคอเลสเตอรอลลดลง 38.6% นอกจากนี้ ปริมาณลิโพโปรตีนความหนาแน่นสูงหรือไขมันดี (HDL) ในเลือดของกลุ่มที่ได้รับยาโลวาสแตติน (HFD+LV) มีค่าสูงที่สุด (124.14 มก./dL) รองลงมา คือ

กลุ่มที่ได้รับสารโพลิโคซานอลสกัด (HFD+PPC) (120.34 มก./dL) ซึ่งมีค่าดังกล่าวสูงกว่าควบคุม (95.79 มก./dL) และกลุ่มที่ได้รับอาหารไขมันสูง (HFD) (104.06 มก./dL) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) สารโพลิโคซานอลสกัดทำให้ค่าลิโพโปรตีนความหนาแน่นสูงหรือไขมันดี (HDL) ในเลือดสูงขึ้น 15.6% สารโพลิโคซานอลสกัดมีผลต่อการลดลงของลิโพโปรตีนความหนาแน่นต่ำหรือไขมันเลว และทำให้ผลรวมของคอเลสเตอรอลทั้งหมดลดลง (เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับอาหารไขมันสูง) นอกจากนี้ ผลการทดลองบ่งชี้ว่า สารโพลิโคซานอลสกัด (PPC) มีผลต่อการเพิ่มขึ้นของแอชดีแอลคอเลสเตอรอลหรือไขมันดี (HDL) ในแฮมเตอร์เพศผู้ โดยแอชดีแอลคอเลสเตอรอลหรือไขมันดี (HDL) เป็นลิโพโปรตีนความหนาแน่นสูงมีหน้าที่ขนส่งโมเลกุลไขมันออกจากผนังหลอดเลือดลดการสะสมแมคโครฟาจ (Macrophage) ดังนั้น จึงสามารถช่วยป้องกันหรือทุเลาโรคหลอดเลือดแดงแข็งได้

โลวาสแตติน (Lovastatin) เป็นยากลุ่มสแตตินที่ใช้เป็นยาลดไขมันในกระแสเลือดที่มีฤทธิ์ยับยั้งการทางานของเอนไซม์ HMG-CoA reductase ซึ่งเป็นเอนไซม์จำกัดอัตรา (Rate limiting enzyme) สำหรับการเปลี่ยน HMG CoA ไปเป็นสารประเภทคอเลสเตอรอลในกระแสเลือดจึงนิยมใช้เป็นยาลดระดับคอเลสเตอรอลในเลือดในปริมาณ 10-20 มก./คน/วัน ในกลุ่มคนที่มีความเสี่ยงต่อการเป็นโรคหัวใจและหลอดเลือด (Cardiovascular disease) จากภาวะไขมันสูงกว่าปกติ (Friesen, & Rodwell, 2004) หลายงานวิจัย พบว่า สารโพลิโคซานอลมีกลไกการออกฤทธิ์คล้ายยาโลวาสแตติน คือ สามารถยับยั้งการทางานของเอมไซม์ HMG-CoA reductase โดยจำกัดอัตราการสังเคราะห์คอเลสเตอรอลในกระแสเลือดได้ (Menendez et al., 1997; Weerawatanakorn et al., 2017) ซึ่งสามารถนำมาใช้อธิบายผลการทดลองที่ทำให้แฮมสเตอร์ในกลุ่มที่ได้รับสาร โพลิโคซานอลสกัด (HFD+PPC) มีปริมาณคอเลสเตอรอลในเลือดทั้งหมด (T-CHO) ต่ำกว่ากลุ่มที่อาหารไขมันสูง (HFD) ได้

ผลการทดลองดังกล่าวสอดคล้องกับหลายงานวิจัย เช่น การทดลองในหนูไมส์กระต่าย หรือแฮมสเตอร์ (Kassis, 2008; Roberto Menendez et al., 1996; Sharma et al., 2019; Varady et al., 2003; Wang et al., 2005) โดย Varady et al. (2003) ได้ทำการศึกษาประสิทธิภาพในการลดระดับคอเลสเตอรอลของโพลิซานอล จากบริษัท Degussa Bio Actives (Champaign, Ill, USA) ในแฮมสเตอร์ที่ระดับ 50 มก./กก./วัน เป็นเวลา 28 วัน พบว่า สามารถลดปริมาณคอเลสเตอรอลในเลือดทั้งหมด (T-CHO) และปริมาณแอลดีแอลคอเลสเตอรอลหรือไขมันเลว (LDL) ได้ตั้งแต่ 13-23% และ 19-31% ตามลำดับ ในขณะที่สามารถเพิ่มปริมาณของแอชดีแอลคอเลสเตอรอลหรือไขมันดี (HDL) ได้ตั้งแต่ 8-29% ต่อมา Wang et al. (2005) ได้ทำการทดลองประสิทธิภาพการลดระดับคอเลสเตอรอลของโพลิซานอล จากบริษัท Degussa BioActives (Champaign, Ill, USA) ในแฮมเสตอร์

ที่ระดับ 25 และ 50 มก./กก./วัน เป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่า ปริมาณคอเลสเตอรอลในเลือดทั้งหมด (T-CHO) ของแฮมสเตอร์กลุ่มที่ได้รับสารโพลิโคซานอลในปริมาณ 50 มก./กก./วัน ลดลง และปริมาณแอชดีแอลคอเลสเตอรอลหรือไขมันดี (HDL) เพิ่มขึ้น นอกจากนี้ มีการศึกษาประสิทธิภาพของโพลิซานอลในการลดระดับคอเลสเตอรอลในมนุษย์ (Castano et al., 2001; Gladys Castano et al., 2003; Chen, F. et al., 2005; Cho et al., 2018; Kim et al., 2018; Menendez et al., 1997; Menendez et al., 2000) Kim et al. (2018) ได้ทำการศึกษาโพลิโคซานอลในมนุษย์ที่ระดับ 20 มก./คน/วัน เป็นเวลา 24 สัปดาห์ พบว่า ระดับของแอชดีแอลคอเลสเตอรอลหรือไขมันดี (HDL) เพิ่มขึ้น 12-16% งานวิจัยของ Cho et al. (2018) พบว่า การบริโภคสารโพลิโคซานอลในปริมาณ 10 มก./คน/วัน เป็นเวลา 8 สัปดาห์ สามารถเพิ่มแอชดีแอลคอเลสเตอรอลหรือไขมันดี (HDL) ในกระแสเลือดได้มากถึง 1.3 เท่า

ตาราง 27 แสดงผลของสารโพลิโคซานอลสกัดต่อค่าชีวเคมีในเลือดของแฮมสเตอร์เพศผู้เปรียบเทียบกับกลุ่มอื่น

Biochemical parameters	Normal diet (Control)	High fat diet (HFD)		
		-	Lovastatin (LV)*	Purified policosanol (PPC)
T-CHO (มก./dL)	139.04±13.18^{c}	218.56±15.68^{a}	213.10±10.85^{b}	195.67±9.81^{b}
TG (มก./dL)	108.50±38.42^{b}	218.24±59.75^{a}	157.93±26.82^{ab}	186.43±46.62^{a}
LDL (มก./dL)	25.64±7.83^{b}	62.23±14.52^{a}	59.15±10.21^{a}	38.21±23.02^{b}
HDL (มก./dL)	95.79±13.60^{b}	104.06±11.39^{b}	124.14±15.88^{a}	120.34±10.88^{a}

T-CHO = Total cholesterol; TG = Triglyceride; LDL = Low Density Lipoprotein; HDL = High-density lipoprotein ตัวเลขในตารางแสดงค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (n=10 n=5*) ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยตัวอักษรที่แตกต่างกันในแถวเดียวกัน แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$)

2.4 ผลของโพลิโคซานอลสกัดต่อการเปลี่ยนแปลงระดับจุลกายวิภาคของเนื้อเยื่อ ผลต่อเนื้อเยื่อตับ

ลักษณะภายนอกของเนื้อเยื่อตับของแฮมสเตอร์กลุ่มควบคุมและแฮมสเตอร์กลุ่มที่ได้รับอาหารไขมันสูง (HFD) มีความแตกต่างกันอย่างเห็นได้ชัด สังเกตจากสีของตับที่เปลี่ยนจาก

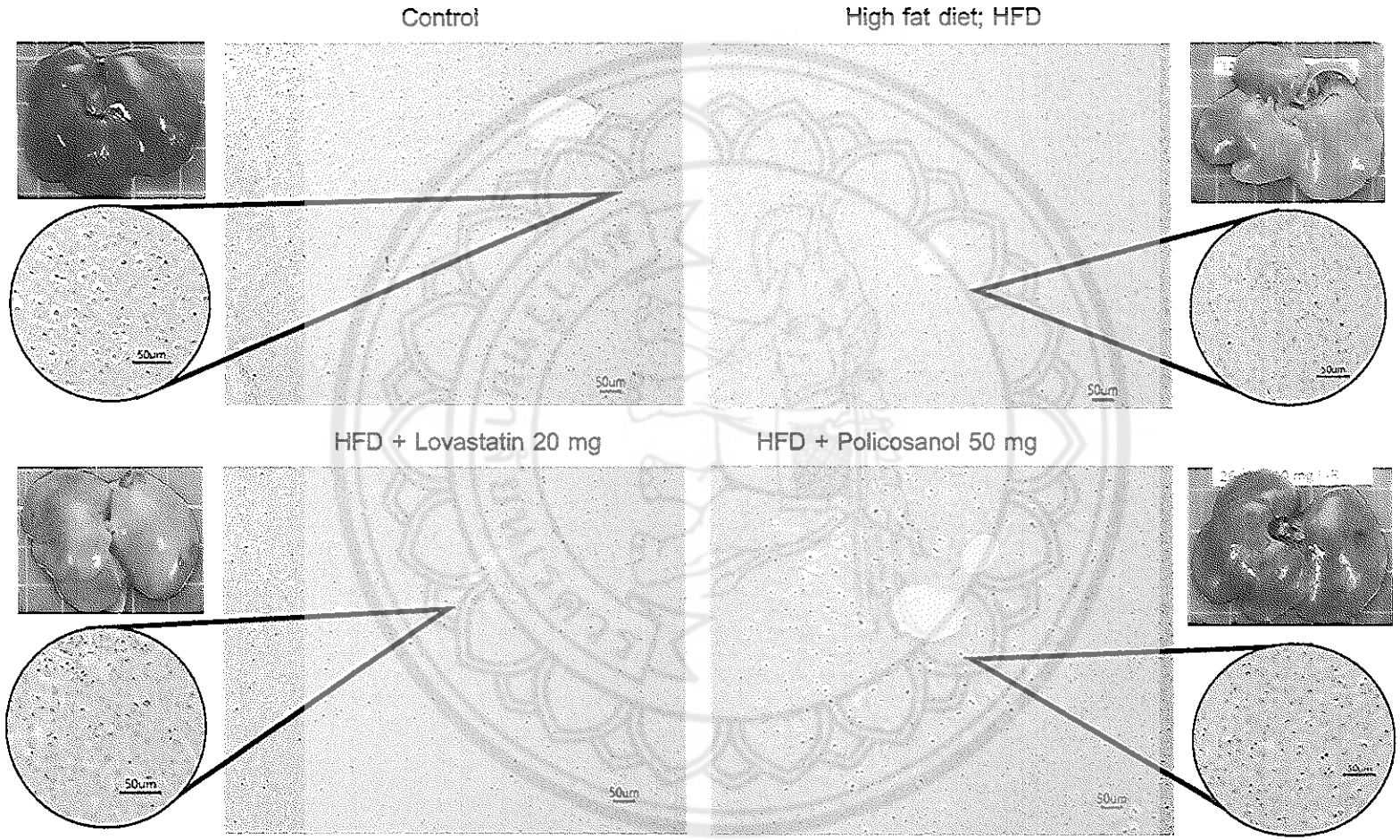
สีแดงไปเป็นสีขาวและมีจุดสีขาวของไขมันกระจายอยู่ทั่วเนื้อเยื่อตับ รวมทั้งตับของแฮมสเตอร์ที่ได้รับอาหารไขมันสูงจะมีความแข็งไม่อ่อนนุ่มเหมือนแฮมสเตอร์กลุ่มควบคุม (ภาพ 46) ซึ่งเป็นอาการของไขมันพอกตับ (Fatty liver) โดยในระยะแรกจะมีไขมันสะสมอยู่ในเนื้อตับแต่ยังไม่มีการอักเสบหรือพังผืดเกิดขึ้น ภาวะเหล่านี้เกิดจากความปกติในการใช้พลังงานของร่างกายส่งผลให้มีปริมาณไขมันในร่างกายสูง เช่น การบริโภคอาหารไขมันสูง จากร่างกายสร้างไขมันมากขึ้น หรือร่างกายนำไขมันไปใช้ได้น้อยลง จึงส่งผลให้มีไขมันสะสมในตับสูงขึ้น

ผลต่อเนื้อเยื่อไขมัน

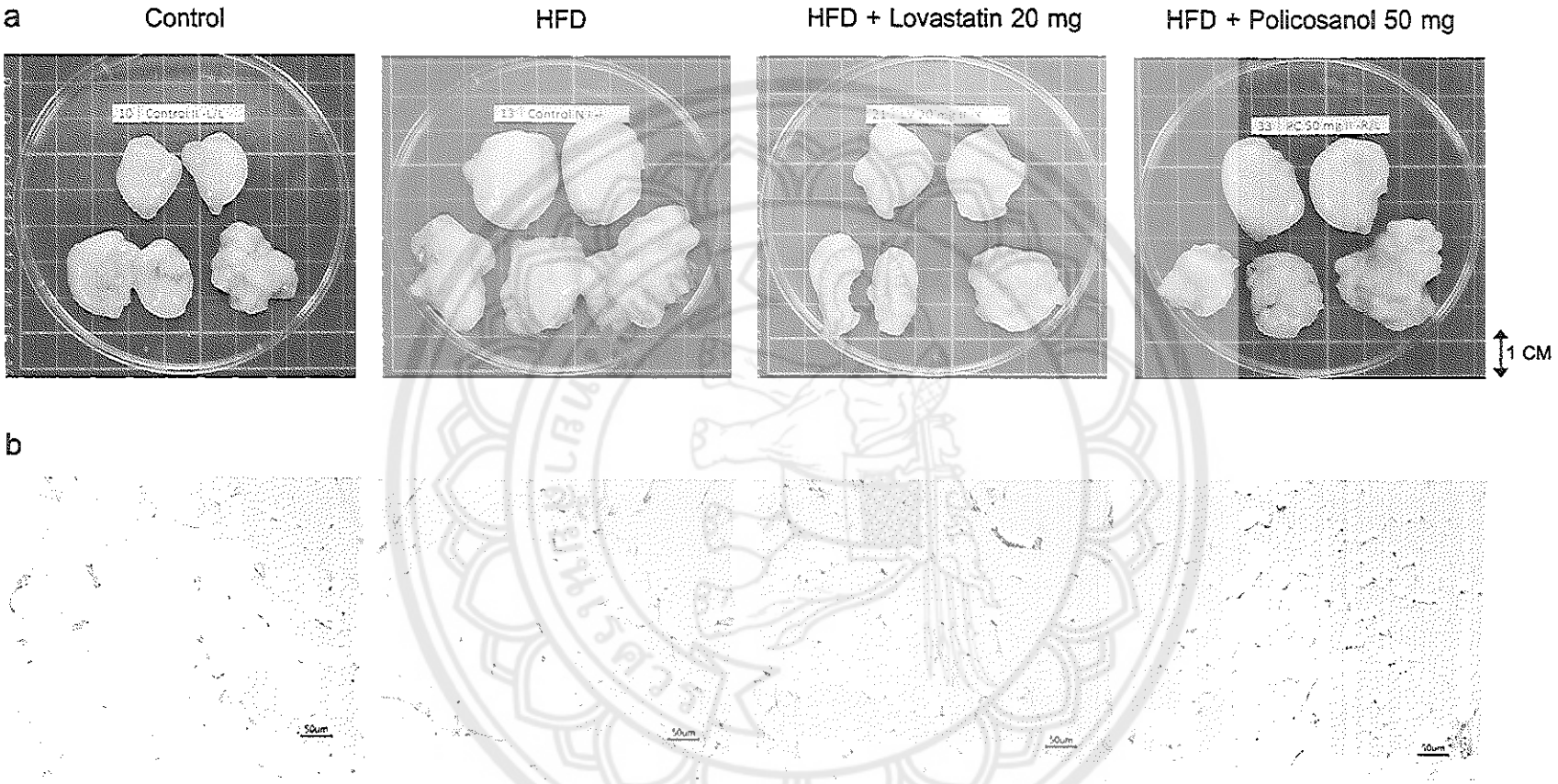
จากการศึกษาผลของสารโพลิโคซานอลสกัดต่อเนื้อเยื่อไขมัน (ภาพ 47b) พบว่าเซลล์ไขมันของแฮมสเตอร์กลุ่มควบคุมมีขนาดเล็กที่สุด และเนื้อเยื่อไขมันของแฮมสเตอร์กลุ่มที่ได้รับอาหารไขมันสูง (HFD) มีขนาดใหญ่กว่ากลุ่มควบคุม

การศึกษาประสิทธิภาพการลดระดับไขมันในเลือดของสารโพลิโคซานอลสกัดในแฮมสเตอร์เพศผู้ พบว่า น้ำหนักตับ ไต และม้ามของแฮมสเตอร์ในกลุ่มที่ได้รับอาหารไขมันสูง (HFD) กลุ่มที่ได้รับยาโลวาสแตติน (HFD+LV) และกลุ่มที่ได้รับสารโพลิโคซานอลสกัด (HFD+PPC) ไม่มีความแตกต่างกันมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \geq 0.05$) เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม อย่างไรก็ตาม แฮมสเตอร์กลุ่มที่ได้รับยาโลวาสแตติน (HFD+LV) มีน้ำหนักของอวัยวะสืบพันธุ์ Perigonadal fat และ Retroperitoneal fat ต่ำกว่ากลุ่มอื่น นอกจากนี้ แฮมสเตอร์กลุ่มที่ได้รับอาหารไขมันสูง (HFD) กลุ่มที่ได้รับยาโลวาสแตติน (HFD+LV)) และกลุ่มที่ได้รับสารโพลิโคซานอลสกัด (HFD+PPC) มีน้ำหนัก Mesenteric fat สูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) ทั้งนี้ อาจเนื่องมาจากการได้รับอาหารที่มีไขมันสูง

ผลต่อระดับคอเลสเตอรอลในเลือด พบว่า สารโพลิโคซานอลสกัดมีผลต่อการลดลงของลิโพโปรตีนความหนาแน่นต่ำ (ไขมันเลว) และทำให้ผลรวมของคอเลสเตอรอลทั้งหมดลดลงเมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับอาหารไขมันสูง (HFD) นอกจากนี้ ผลการทดลองยังบ่งชี้ว่าสารโพลิโคซานอลสกัดมีผลต่อการเพิ่มขึ้นของแอชดีแอลคอเลสเตอรอลหรือไขมันดี (HDL) ในแฮมเตอร์เพศผู้ ส่วนผลต่อการเปลี่ยนแปลงระดับจุลกายวิภาคของเนื้อเยื่อตับและเนื้อเยื่อไขมัน พบว่า เนื้อเยื่อตับของแฮมสเตอร์ที่ได้รับอาหารไขมันสูงมีจุดสีขาวของไขมันแทรกอยู่ เป็นผลเนื่องมาจากได้รับอาหารไขมันสูง แสดงให้เห็นภาวะการอักเสบของตับในระยะเริ่มต้น ส่วนการวิเคราะห์เนื้อเยื่อไขมัน พบว่าเซลล์ไขมันของแฮมสเตอร์กลุ่มที่ได้รับอาหารไขมันสูง (HFD) มีขนาดใหญ่กว่ากลุ่มควบคุม



ภาพ 46 แสดงการเปลี่ยนแปลงระดับจุลกายวิภาคของเนื้อเยื่อตับแฮมสเตอร์เพศผู้ย้อมสีด้วยวิธี H&E (กำลังขยาย 200 เท่า)



ภาพ 47 แสดงการเปลี่ยนแปลงระดับจุลกายวิภาคของเนื้อเยื่อไขมันแฮมสเตอร์เพศผู้ย้อมสีด้วยวิธี H&E (กำลังขยาย 200 เท่า)

(a) White adipose tissues (b) Adipose tissue histological stained with hematoxylin & eosin (H&E)

3. พัฒนาน้ำมันรำข้าวเสริมสารโพลิโคซานอลสกัดเพื่อเป็นต้นแบบผลิตภัณฑ์อาหารฟังชั่น

3.1 การศึกษาสมบัติทางกายภาพของน้ำมันรำข้าวเสริมสารโพลิโคซานอลสกัด

ปริมาณการเสริมโพลิโคซานอลในผลิตภัณฑ์น้ำมันรำข้าวทำที่ 2 ระดับ ได้แก่ ที่ 300 และ 600 ppm โดยคำนวณจากปริมาณโพลิโคซานอลที่แนะนำให้บริโภคต่อวัน คือ 20 มก. มีฤทธิ์ในการลดระดับคลอเรสเตอรอลในเลือด (Francini-Pesenti et al., 2008) ดังนั้น ร่างกายควรได้รับโพลิโคซานอลจากอาหารที่รับประทานอยู่ที่ 6.6 มก./มื้อ (3 มื้อต่อวัน) และสำหรับประเทศไทย กระทรวงสาธารณะสุขได้ให้คำแนะนำการบริโภคไขมันต่อวัน คือ ไม่ควรบริโภคไขมันเกิน 65 กรัม (กระทรวงสาธาณสุข, 2541) หรือ 21 กรัมต่อมื้อ อย่างไรก็ตาม ในมื้ออาหารควรได้รับไขมันจากอาหารที่หลากหลาย เช่น ไขมันจากสัตว์ จากพืช ขนม เป็นต้น ดังนั้นปริมาณไขมันที่ควรได้รับจากน้ำมันบริโภคควรอยู่ที่ 50% ของปริมาณไขมันที่ควรได้รับในมื้อนั้น ดังนั้น ผู้วิจัยจึงทำการเสริมสารโพลิโคซานอลสกัดลงในน้ำมันรำข้าวที่ 2 ระดับ คือ ที่ 6.6 มก. ต่อน้ำมันรำข้าว 21 กรัม (ประมาณ 300 ppm) และที่ 6.6 มก. ต่อน้ำมันรำข้าว 10.5 กรัม (ประมาณ 600 ppm) น้ำมัน รำข้าวทั้ง 3 สูตร แสดงในภาพ 48

จากการศึกษาสมบัติทางกายภาพของน้ำมันรำข้าวเสริมโพลิโคซานอล พบว่า การเสริมสารโพลิซานอลสกัดในระดับที่แตกต่างกันทำให้ค่า L* a* และ b* มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) (ตาราง 28) โดยน้ำมันรำข้าวที่เสริมสารโพลิโคซานอลสกัดที่ระดับ 600 ppm มีค่า L* ต่ำที่สุด (40.61±0.36) รองลงมา คือ น้ำมันรำข้าวที่มีการเสริมสารโพลิโคซานอลสกัดที่ระดับ 300 ppm (42.38±0.43) ($P \leq 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างควบคุม น้ำมันรำข้าวที่มีการเสริมสารโพลิโคซานอลสกัดที่ระดับ 600 ppm มีค่า a* มากที่สุด (-1.68±0.16) ($P \leq 0.05$) และน้ำมันรำข้าวเสริมสารโพลิโคซานอลสกัดที่ระดับ 600 ppm มีค่า b* ต่ำที่สุด (18.72±0.76) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) สำหรับค่าความเป็นกรดด่างของน้ำมันรำข้าว พบว่า น้ำมันที่มีการเสริมสารโพลิโคซานอลสกัดทำให้ตัวอย่างมีความเป็นด่างมากขึ้น (4.93±0.04) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกันตัวอย่างควบคุม (4.36±0.06)

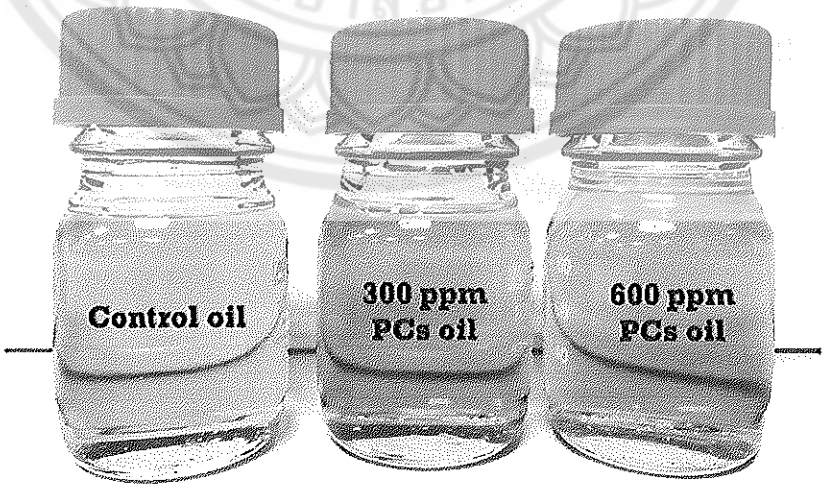
น้ำมันรำข้าวมีค่าความหนืดคงที่ไม่เปลี่ยนแปลงเมื่อเปลี่ยนอัตราความเร็วในการหมุน ซึ่งแสดงสมบัติของของไหลแบบ Newtonian (Steffe, 1992) โดยความหนืดของน้ำมันรำข้าวเสริมสารโพลิซานอลสกัดทั้งสองระดับมีค่ามากกว่าน้ำมันรำข้าวสูตรควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) แต่ความหนืดของน้ำมันรำข้าวเสริมสารโพลิซานอลสกัดทั้ง 2 ระดับไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P \geq 0.05$) จากผลการทดลอง พบว่า การเสริมสารโพลิซานอลสกัดที่ 300 ppm และ 600 ppm มีผลต่อค่าความสว่าง (L*) ความเป็นสีแดง (a*) และความเป็นสีเหลือง (b*)

โดยการเสริมสารโพลิซานอลสกัดในปริมาณที่มากขึ้นทำให้น้ำมันรำข้าวมีความสว่างลดลง แต่ทำให้ความเป็นสีแดงและความเป็นน้ำเงินเพิ่มมากขึ้น รวมทั้งยังทำให้มีความเป็นด่างมากขึ้น เนื่องจากสารโพลิโคซานอลสกัดมีความเป็นกรดที่ระดับ pH 5-6 และทำให้ความหนืดของน้ำมันเพิ่มขึ้น

ตาราง 28 แสดงคุณสมบัติทางเคมีและกายภาพของน้ำมันรำข้าวเสริมสารโพลิโคซานอลสกัด

สมบัติทางเคมี และกายภาพ	น้ำมันรำข้าว		
	ควบคุม	เสริม PPC 300 ppm	เสริม PPC 600 ppm
ค่าสีและความเข้มของสี			
- L*	42.99±0.16^{a}	42.38±0.43^{b}	40.61±0.36^{c}
- a*	-2.16±0.04^{c}	-2.01±0.05^{b}	-1.68±0.16^{a}
- b*	20.66±0.21^{a}	20.33±0.31^{a}	18.72±0.76^{b}
ค่าความเป็นกรด-ด่าง	4.36±0.06^{b}	4.93±0.04^{a}	4.93±0.12^{a}
ความหนืด (cP)	88.53±0.15^{b}	89.83±0.6^{a}	90.40±0.89^{a}

L* = ค่าความสว่าง; a* = ค่าความเป็นสีแดงและสีเขียว; b* = ค่าความเป็นสีเหลืองและน้ำเงิน ตัวเลขในตารางแสดงค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (n=3) ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยตัวอักษรที่แตกต่างกันในแถวเดียวกัน แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$)



ภาพ 48 แสดงน้ำมันรำข้าวเสริมสารโพลิโคซานอลสกัดและน้ำมันรำข้าวสูตรควบคุมในวันที่ 0

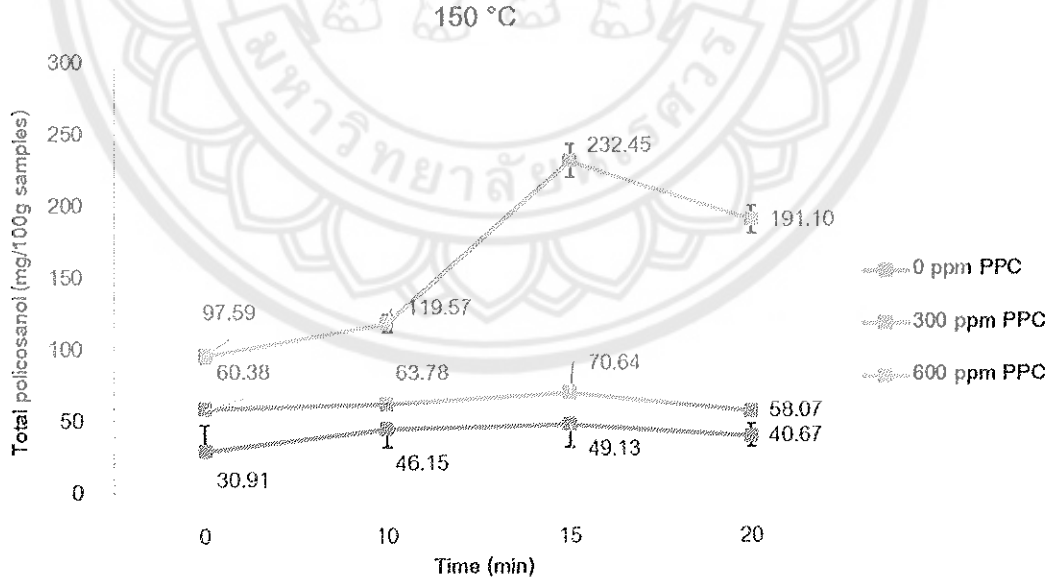
3.2 การศึกษาความคงตัวต่อความร้อนของน้ำมันรำข้าวเสริมสารโพลิโคซานอลสกัด

การศึกษาความคงตัวต่อความร้อนของน้ำมันรำข้าวเสริมสารโพลิโคซานอลสกัด ทำการศึกษาที่อุณหภูมิ 150°ซ ซึ่งเป็นตัวแทนของการประกอบอาหารแบบวิธีการผัดและที่ 180°ซ ตัวแทนของการประกอบอาหารด้วยวิธีการทอด (Majchrzak et al., 2017) โดยศึกษาเวลาในการประกอบอาหารที่ 10, 15 และ 20 นาที โดยปกติระยะเวลาในการประกอบอาหารแบบการผัดและการทอดจะอยู่ระหว่าง 3-20 นาที (United States Department of Agriculture, 2013) ปริมาณโพลิโคซานอลจากผลการทดลองแสดงในตาราง 29 และภาพ 49 จากการทดลอง พบว่า ปริมาณโพลิโคซานอลของน้ำมันรำข้าวสูตรควบคุมก่อนให้ความร้อน คือ 30.91±0.19 มก./100 กรัม ปริมาณโพลิโคซานอลของน้ำมันรำข้าวเสริมสารโพลิโคซานอลสกัดที่ระดับ 300 ppm คือ 60.38±0.31 มก./100 กรัม และปริมาณโพลิโคซานอลของน้ำมันรำข้าวเสริมสารโพลิโคซานอลสกัดที่ระดับ 600 ppm คือ 97.59±0.62 มก./100 กรัม และเมื่อให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 150°ซ ปริมาณโพลิโคซานอลมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างเริ่มต้น (นาทีที่ 0) อย่างไรก็ตาม เมื่อได้รับความร้อนเกิน 15 นาที ปริมาณโพลิโคซานอลมีแนวโน้มลดลง และการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 180°ซ ให้ผลการทดลองคล้ายกับที่ 150 °ซ คือ ปริมาณโพลิซานอลจะเพิ่มขึ้นอยู่ระยะเวลาหนึ่งจากนั้นเมื่อเกินระยะเวลา 10 นาที ปริมาณโพลิโคซานอลมีแนวโน้มลดลง (ภาพ 49) ซึ่งมีความสอดคล้องกับงานวิจัยของ Kim, Chung, & Lim (2014) ที่พบว่า เมื่อรำข้าวผ่านการนึ่งด้วยแรงดันไอน้ำ (Autoclave) ที่อุณหภูมิ 121°ซ เป็นเวลา 20 นาที ทำให้ปริมาณโพลิโคซานอลและวิตามินอีเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างควบคุม โดยการเพิ่มขึ้นของปริมาณโพลิโคซานอลอาจเนื่องมาจากเมื่อโพลิโคซานอลได้รับความร้อนพันธะที่จับกับไขมันจะถูกทำลายและถูกปลดปล่อยออกมาในรูปโพลิโคซานอลอิสระ (Free policosanols) ซึ่งมีความสอดคล้องกับงานวิจัยของ Bryngelsson et al. (2002) ที่พบว่า สารต้านอนุมูลอิสระที่ละลายในไขมัน (Lipophilic antioxidants) เช่น วิตามินอีและโพลิโคซานอลจะมีปริมาณสูงขึ้นเมื่อได้รับความร้อน ทั้งนี้หากสัมผัสความร้อนเป็นเวลานานขึ้นโพลิโคซานอลอาจเกิดการสลายตัวและเกิดการ ออกซิเดชั่นจากความร้อนได้ (Asikin et al., 2008) อย่างไรก็ตาม การให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 150°ซ และ 180°ซ เป็นเวลา 20 นาที ไม่มีผลทำให้ปริมาณของโพลิโคซานอลลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับปริมาณเริ่มต้น (นาทีที่ 0) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$)

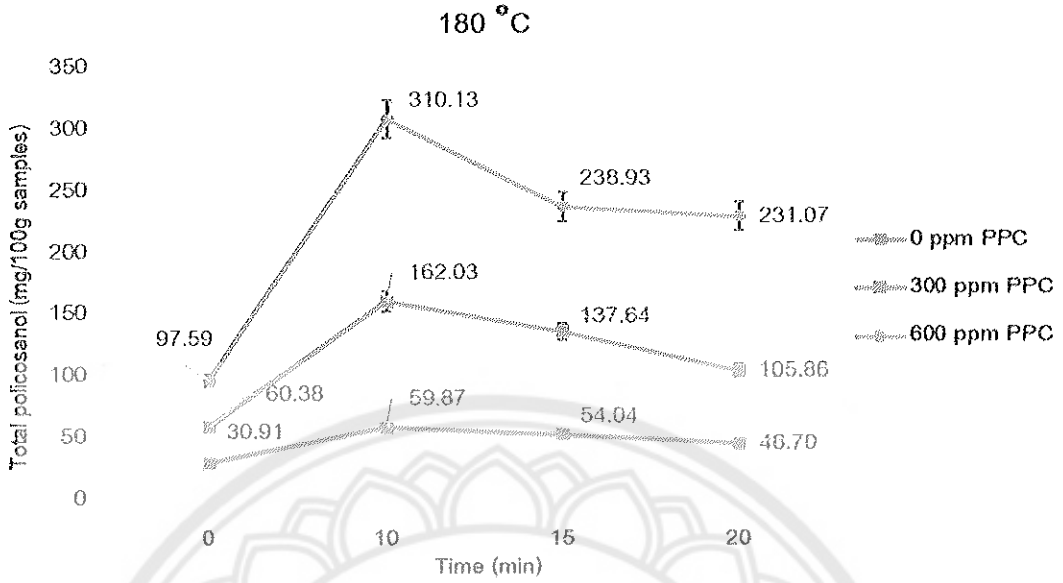
ตาราง 29 แสดงปริมาณโพลิโคซานอลในน้ำมันรำข้าวเสริมสารโพลิโคซานอลสกัดที่อุณหภูมิ 150°ซ และ 180°ซ ที่เวลา 0 10 15 และ 20 นาที

น้ำมันรำข้าว	ปริมาณโพลิโคซานอล (มก./100 กรัม)			
	0 นาที	10 นาที	15 นาที	20 นาที
อุณหภูมิ 150°ซ				
- ควบคุม	30.91±0.19^{d}	46.15±1.88^{b}	49.13±1.60^{a}	40.67±1.04^{c}
- เสริม PPC 300 ppm	60.38±0.31^{c}	63.78±1.47^{b}	70.64±2.14^{a}	58.07±0.21^{c}
- เสริม PPC 600 ppm	97.59±0.62^{d}	119.57±1.30^{c}	232.45±3.87^{a}	191.10±2.77^{b}
อุณหภูมิ 180°ซ				
- ควบคุม	30.91±0.19^{d}	59.87±2.70^{a}	54.04±0.15^{b}	46.42±0.80^{c}
- เสริม PPC 300 ppm	60.38±0.31^{d}	162.03±0.36^{a}	137.64±0.58^{b}	105.86±0.01^{c}
- เสริม PPC 600 ppm	97.59±0.62^{d}	310.13±1.02^{a}	238.93±0.76^{b}	231.07±1.54^{c}

ตัวเลขในตารางแสดงค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (n=3) ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยตัวอักษรที่แตกต่างกันในแถวเดียวกัน แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$)



ภาพ 49 แสดงความคงตัวต่อความร้อนของน้ำมันรำข้าวเสริมสารโพลิโคซานอลสกัดที่อุณหภูมิ 150°ซ และ 180°ซ ที่เวลา 0 10 15 และ 20 นาที



ภาพ 49 (ต่อ)

3.3 การศึกษาอายุการเก็บรักษาน้ำมันรำข้าวเสริมสารโพลิโคซานอลสกัด

3.3.1 การเปลี่ยนแปลงของดัชนีชี้การเกิดออกซิเดชันของน้ำมันรำข้าวเสริมสารโพลิโคซานอลสกัด

น้ำมันรำข้าวเสริมสารโพลิโคซานอลสกัดถูกเก็บไว้ในขวดแก้วสีชาภายใต้อุณหภูมิห้อง (27°ซ) เป็นเวลา 6 เดือน สุ่มตรวจสอบดัชนีการเกิดออกซิเดชันของน้ำมัน ได้แก่ ค่าความเป็นกรด (Acid value; A.V.) และค่าเพอร์ออกไซด์ (Peroxide value; P.V.) ทุก 15 วัน เป็นเวลา 180 วัน (ตาราง 30 และ 31) ค่า A.V. และ P.V. เป็นค่าที่ใช้บ่งชี้คุณภาพของน้ำมันและไขมันสำหรับบริโภค โดยบ่งบอกถึงการเสื่อมเสียของน้ำมันและไขมัน โดยค่า A.V. เป็นค่าที่ใช้บ่งชี้ถึงการถูกทำลายของไตรเอซีลกลีเซอรอล (Triacylglycerol) ที่มีอยู่ในน้ำมันกลายเป็นกรดไขมันอิสระ (Free fatty acid) โดยเอนไซม์ไลเปส (Lipase) ค่า A.V. สูง หมายถึง กรดไขมันอิสระมีปริมาณมากน้ำมันจะเกิดการเหม็นหืน (Rancidity) (นิธิยา รัตนาปนนท์, 2548) ค่า P.V. จะเป็นค่าที่บ่งชี้เมื่อเกิดปฏิกิริยากรดไขมันไม่อิ่มตัวในน้ำมันถูกออกซิไดซ์ (Oxidize) ไปเป็นสารประกอบเพอร์ออกไซด์ (Peroxide) ซึ่งเป็นสาเหตุทำให้เกิดการเหม็นหืน (Rancidity) (Bowers, 1992)

ผลการทดลอง พบว่า ดัชนีชี้ทั้งสองสูงขึ้นเมื่อเวลาการเก็บนานขึ้น (ตาราง 30 และ 31) โดยน้ำมันรำข้าวทั้ง 3 สูตร มีค่า A.V. เพิ่มขึ้นสูงสุดในวันที่ 180 (มีค่าตั้งแต่ 2.66-2.99 มก. KOH/กรัมน้ำมัน) การเพิ่มขึ้นของค่า A.V. เนื่องมาจากปฏิกิริยาออกซิเดชันของน้ำมันทำให้เกิดการสลายตัวของสารไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ (Hydrogen dioxide) เกิดเป็นสารประเภท

แอลดีไฮด์คีโตน และไฮโดรคาร์บอน อย่างไรก็ตามการเติมสารโพลิโคซานอลสกัดในความเข้มข้น 600 ppm มีผลทำให้ค่า A.V. ต่ำกว่าน้ำมันรำข้าวสูตรควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) การเปลี่ยนแปลงของค่า P.V. แสดงให้เห็นการเพิ่มขึ้นอย่างช้าๆ ของสารเพอร์ออกไซด์ในระหว่างการเก็บ โดยมีปัจจัยเร่งคือความชื้นและออกซิเจนโดยปฏิกิริยาจะเกิดได้เร็วขึ้นโดยเฉพาะน้ำมันที่มีกรดไขมันชนิดไม่อิ่มตัวเป็นองค์ประกอบหลัก เช่น น้ำมันรำข้าว (Choe & Min, 2007) อย่างไรก็ตาม น้ำมันรำข้าวเสริมสารโพลิโคซานอลสกัดในปริมาณ 600 ppm มีค่า P.V. ต่ำกว่าน้ำมันสูตรควบคุมและน้ำมันรำข้าวเสริมสารโพลิโคซานอลสกัดในปริมาณ 300 ppm (ตาราง 31) การเปลี่ยนแปลงทั้งค่า A.V. และ P.V. ของน้ำมันรำข้าวเสริมสารโพลิโคซานอลสกัดที่น้อยกว่าสูตรควบคุมอาจเนื่องมาจากสารโพลิโคซานอลสกัดไปยับยั้งหรือชะลอการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของน้ำมันรำข้าวได้ เนื่องจากสาร PPC มีคุณสมบัติต้านการเกิดออกซิเดชัน (Ham et al., 2015; Harrabi et al., 2018; Kim, J.Y. et al., 2017; Liao et al., 2018; Montserrat-De La Paz et al., 2014) Harrabi et al. (2018) ได้ทำการศึกษาคุณสมบัติการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของโพลิโคซานอลในน้ำมันเมล็ด มิลค์ทิสเซิล (Milk Thistle) พบว่า น้ำมันเมล็ดมิลค์ ทิสเซิล ระยะเมล็ดอ่อน (Immature seed) มีปริมาณโพลิโคซานอล 987.68 มก./กก. และมีฤทธิ์ในการต่อต้านการเกิดออกซิเดชั่น (Antioxidant) ที่ 96.42% โดยการทดสอบด้วยเทคนิค DPPH assay และ 90.35% เมื่อทดสอบด้วยวิธี ABTS assay นอกจากนี้ Kim et al. (2017) ได้ทำการศึกษาเปรียบเทียบฤทธิ์ในการต่อต้านการเกิดออกซิเดชั่น (Antioxidant) ของโพลิโคซานอลในเซรั่มของกลุ่มทดลอง 3 กลุ่มทดลอง (Young non-smoker, young smoker และ middle-aged non-smoker) หลังจากได้รับอาหารเสริม โพลิโคซานอล (10 มก./วัน) เป็นเวลา 8 สัปดาห์ ด้วยเทคนิค Ferric ion reduction ability (FRAP) พบว่า กลุ่มทดลองที่ได้รับอาหารเสริมโพลิโคซานอลทุกกลุ่ม มีค่า Ferric ion reduction ability เพิ่มขึ้น 10% เมื่อเปรียบเทียบกับสัปดาห์ที่ 0 ดังนั้น การเติมสารโพลิโคซานอลสกัด ในปริมาณที่เพียงพออาจสามารถชะลอกระบวนการออกซิเดชันในผลิตภัณฑ์ได้

การเสริมสารโพลิโคซานอลสกัดในน้ำมันรำข้าวไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงค่า A.V. อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \geq 0.05$) อย่างไรก็ตาม การเสริมสารโพลิโคซานอลสกัดในระดับ 600 ppm สามารถลดค่า P.V. ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) หลังจากการเก็บเป็นเวลา 6 เดือน อย่างไรก็ตาม ผลิตภัณฑ์น้ำมันรำข้าวเสริมสารโพลิโคซานอลสกัดที่เก็บเป็นเวลา 6 เดือน มีค่า A.V. และค่า P.V. อยู่ในเกณฑ์มาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม มอก.44-2516 เรื่อง น้ำมันรำสำหรับบริโภค มอก.47-2533 เรื่อง น้ำมันและไขมันบริโภค รวมทั้งยังอยู่ในเกณฑ์การยอมรับตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข (ฉบับที่ 205) พ.ศ. 2543 เรื่องน้ำมันและไขมัน ที่กำหนดให้ผลิตภัณฑ์

น้ำมันรำข้าวต้องมีค่า A.V. ไม่เกิน 0.6 มก. KOH/กรัม น้ำมัน และมีค่า P.V. ไม่เกิน 10 mEq/กก. น้ำมัน (ประกาศกระทรวงสาธารณสุข, 2543; สำนักงานมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม (สมอ.), 2558)

ตาราง 30 แสดงค่าความเป็นกรด (A.V.) ของน้ำมันรำข้าวสูตรควบคุมและน้ำมันรำข้าวเสริมโพลิโคซานอลที่ระดับ 300 และ 600 ppm ในระหว่างการเก็บ

ระยะเวลา (วัน)	น้ำมันรำข้าว		
	Control oil	300 ppm oil	600 ppm oil
0	0.14±0.00[a]	0.14±0.01[a]	0.13±0.00[b]
15	0.14±0.01[a]	0.14±0.00[b]	0.13±0.00[b]
30	0.15±0.01[a]	0.15±0.01[a,b]	0.14±0.01[b]
45	0.15±0.00[a]	0.15±0.00[a]	0.14±0.01[b]
60	0.16±0.01[a]	0.15±0.00[b]	0.14±0.00[c]
75	0.16±0.01	0.15±0.00	0.15±0.00
90	0.17±0.02[a]	0.16±0.01[a,b]	0.15±0.00[b]
105	0.17±0.03	0.16±0.01	0.16±0.00
120	0.17±0.02	0.16±0.00	0.16±0.01
135	0.18±0.02	0.17±0.01	0.17±0.00
150	0.18±0.02	0.17±0.01	0.17±0.00
165	0.19±0.01	0.18±0.01	0.18±0.00
180	0.19±0.01	0.18±0.00	0.18±0.00

ตัวเลขในตารางแสดงค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (n=3) ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยตัวอักษรที่แตกต่างกันในแถวเดียวกัน แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$)

ตาราง 31 แสดงค่าเพอร์ออกไซด์ (P.V.) ของน้ำมันรำข้าวสูตรควบคุมและน้ำมันรำข้าวเสริมโพลิโคซานอลที่ระดับ 300 และ 600 ppm ในระหว่างการเก็บ

ระยะเวลา (วัน)	ตัวอย่าง		
	Control oil	300 ppm oil	600 ppm oil
0	1.99±0.01^{a}	1.93±0.12^{a}	1.86±0.10^{a}
15	2.19±0.01^{a}	1.99±0.00^{b}	1.79±0.00^{c}
30	2.21±0.09^{a}	2.02±0.09^{a,b}	1.93±0.12^{b}
45	2.26±0.11^{a}	2.11±0.10^{a,b}	1.93±0.01^{b}
60	2.45±0.11^{a}	2.26±0.11^{a,b}	2.06±0.12^{b}
75	2.50±0.10^{a}	2.29±0.02^{b}	2.18±0.11^{b}
90	2.71±0.11^{a}	2.39±0.00^{b}	2.25±0.11^{b}
105	2.77±0.01^{a}	2.59±0.00^{b}	2.32±0.12^{c}
120	2.77±0.01^{a}	2.63±0.06^{b}	2.38±0.02^{c}
135	2.79±0.10^{a}	2.69±0.11^{a}	2.44±0.09^{b}
150	2.90±0.09^{a}	2.78±0.03^{a}	2.50±0.09^{b}
165	2.95±0.05^{a}	2.88±0.10^{a}	2.58±0.01^{b}
180	2.99±0.10^{a}	2.93±0.04^{a}	2.66±0.08^{b}

ตัวเลขแสดงออกมาในรูปของค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (n=3) ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยตัวอักษรที่แตกต่างกันในแถวเดียวกัน แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$)

3.3.2 การเปลี่ยนแปลงปริมาณ PCs ในน้ำมันรำข้าวเสริมโพลิโคซานอลสกัดระหว่างการเก็บเป็นเวลา 6 เดือน

ผลการศึกษาการเปลี่ยนแปลงปริมาณ PCs ในน้ำมันรำข้าวเสริมสารโพลิโคซานอลสกัดที่เก็บในขวดแก้วสีชาภายใต้อุณหภูมิห้อง (27±5°ซ) โดยวิเคราะห์ปริมาณ PCs ทุก 30 วัน เป็นเวลา 6 เดือน แสดงใน ตาราง 32 ผลการทดลอง พบว่า ระยะการเก็บมีผลต่อปริมาณ PCs โดยเดือนที่ 2 ของการเก็บปริมาณ PCs ทั้งหมดสูงขึ้น อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) ซึ่งปริมาณที่เพิ่มขึ้นของ PCs อาจเกิดขึ้นจากการสลายพันธะระหว่างโพลิโคซานอลกับกรดไขมัน (Fatty acid) หรือเอซีลกลีเซอรอล (Acylglycerols) โดย Caradec et al. (2004) ระบุว่าการเพิ่มขึ้นของแอลกอฮอล์แบบไขมัน (Fatty alcohols) อาจมีความสัมพันธ์กับปฏิกิริยาระหว่างกรดไขมันที่ทำ

ปฏิกิริยาเอสเทอริฟิเคชัน (Fatty acid esterified) กับไตรกลีเซอไรด์ (Triglyceride) อย่างไรก็ตาม หลังจากเดือนที่ 2 ปริมาณ PCs ค่อยๆ ลดลงเฉลี่ยเดือนละ 4.90-9.87% โดยตัวอย่างที่มีอัตราการลดลงของ PCs สูงที่สุด คือ น้ำมันรำข้าวเสริมสารโพลิโคซานอลสกัดที่ปริมาณ 300 ppm โดยมีอัตราการลดลงเฉลี่ยเดือนละ 9.87% โดยหลังจากการเก็บเป็นเวลา 6 เดือนพบว่า น้ำมันรำข้าวสูตรควบคุมมีปริมาณ PCs ที่ 31.62±0.21 มก./100 กรัม (316 ppm) โดยเพิ่มจากปริมาณเริ่มต้น 2.30% น้ำมันรำข้าวเสริมสารโพลิโคซานอลสกัดที่ระดับ 300 ppm มีปริมาณ PCs ที่ 60.89±0.61 มก./100 กรัม (608 ppm) เพิ่มขึ้น 0.85% จากปริมาณเริ่มต้น และน้ำมันรำข้าวเสริมสารโพลิโคซานอลสกัดในปริมาณ 600 ppm มีปริมาณ PCs ที่ 106.59±6.30 มก./100 กรัม (1,065 ppm) โดยเพิ่มจากปริมาณเริ่มต้นที่ 9.22%

เมื่อเปรียบเทียบปริมาณ PCs ในเดือนที่ 6 กับปริมาณเริ่มต้นของตัวอย่างน้ำมันรำข้าวสูตรควบคุม และน้ำมันรำข้าวเสริมสารโพลิโคซานอลสกัดที่ระดับ 300 ppm พบว่ามีปริมาณ PCs ไม่ต่ำกว่าปริมาณเริ่มต้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \geq 0.05$) แต่ปริมาณ PCs ในตัวอย่างน้ำมันรำข้าวเสริมสารโพลิโคซานอลสกัดที่ระดับ 600 ppm ในเดือนที่ 6 มีปริมาณมากกว่าปริมาณในเดือนที่ 0 (ตาราง 32) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) โดยสาเหตุของการเปลี่ยนแปลงปริมาณ PCs ในระหว่างการเก็บอาจเกิดจากการเปลี่ยนแปลงทางเคมี เช่น การลดลงโดยการออกซิเดชันเป็นอัลดีไฮด์ (Aldehyde) ของไขมันและกรดไขมัน (Lukic et al., 2015) หรือเกิดการเปลี่ยนโครงสร้างจากแอลกอฮอล์ (Alcohol form) ไปเป็นเอสเตอร์ของกรดไขมัน (Fatty acid esters) เช่น Octacosanol (C28-OH) ไปเป็น Octacosanoyl ester (Cabrera et al., 2002) จากผลการทดลองสามารถสรุปได้ว่า น้ำมันรำข้าวเสริมสารโพลิโคซานอลสกัดมีความคงตัวตลอดอายุการเก็บ 6 เดือน

ตาราง 32 แสดงปริมาณโพลิโคซานอลในน้ำมันรำข้าวสูตรควบคุมและน้ำมันรำข้าวเสริมสารโพลิโคซานอลสกัดระหว่างการเก็บ

เวลา (เดือน)	ปริมาณโพลิโคซานอลในน้ำมันรำข้าว (มก. /100 กรัม)		
	PPC 0 ppm	PPC 300 ppm	PPC 600 ppm
0	^{Cc}30.91±0.19	^{Bd}60.38±0.31	^{Ab}97.59±0.62
1	^{Ca}33.23±0.11	^{Ba}67.30±0.05	^{Aa}113.51±3.21
2	^{Bab}32.93±0.95	^{Bb}65.39±1.40	^{Aa}113.83±3.32
3	^{Cab}32.83±0.14	^{Bc}63.35±0.06	^{Aa}110.33±1.92
4	^{Cabc}32.15±0.22	^{Bc}63.27±1.23	^{Aa}108.29±3.44
5	^{Cbc}31.60±0.22	^{Bcd}61.99±0.21	^{Aa}106.78±3.52
6	^{Cbc}31.62±0.21	^{Bd}60.89±0.61	^{Aa}106.59±6.30

ตัวเลขแสดงออกมาในรูปของค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (n=3) ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยตัวอักษรตัวพิมพ์ใหญ่ที่แตกต่างกันในแถวเดียวกัน และอักษรตัวพิมพ์เล็กที่แตกต่างกันในคอลัมน์เดียวกัน แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$)

บทที่ 5

บทสรุป

สรุปผลการวิจัย

การศึกษาที่ 1 การศึกษาปริมาณสารโภชนเภสัชในผลิตผลพลอยได้จากโรงงานผลิตน้ำมันรำข้าวทั้งแบบบีบเย็นและแบบสกัดด้วยตัวทำละลายในด้านศักยภาพการเป็นแหล่งของสารโภชนเภสัช

สารโภชนเภสัช (Nutraceutical) ที่เหลืออยู่ในผลิตผลพลอยได้จากกระบวนการผลิตน้ำมันรำข้าวทั้งสองระบบเป็นสารโภชนเภสัชประเภทที่ละลายในไขมัน เช่น แกมมา-โอริซานอล (γ-oryzanol) ไฟโตสเตรอล (Phytosterol) และโพลิโคซานอล (Policosanol) นอกจากนี้ ยังเป็นแหล่งของวิตามินอีทั้ง 8 ไอโซเมอร์ ได้แก่อนุพันธ์ของ α-, β-, γ-, และ δ- โทโคฟีรอล (Ts) และอนุพันธ์ของแอลฟา-เบตา-แกมมา-และเดลตา-โทโคไตรอีนอล (α-, β-, γ-, และ δ -Tocotrienol) โดยสารโภชนเภสัชที่พบปริมาณสูงที่สุด คือ แกมมา-โอริซานอล (γ-oryzanol) รองลงมา คือ ไฟโตสเตอรอล (Phytosterol) โพลิโคซานอล (Policosanol) วิตามินอี (Vitamin E) และแกมมา-อะมิโนบิวทิเรต (γ-aminobutyrate) หรือ GABA ตามลำดับ โดยพบสารแกมมา-โอริซานอล ไฟโตสเตอรอล และวิตามินอีสูงที่สุดในตัวอย่างน้ำมันรำกรดไขมันอิสระ (RAO) (3,901.59, 599.40 และ 120.59 มก./100 กรัม ตามลำดับ) สำหรับปริมาณสารโพลิโคซานอลพบปริมาณสูงที่สุดในตัวอย่างไขรำข้าว (RBW) (332.79 มก./100 กรัม) โดยรูปแบบโพลิโคซานอลที่พบมากที่สุด คือ ในรูป Triacontanol (C_{30}-OH) รองลงมา คือ Octacosanol (C_{28}-OH) และปริมาณสารโภชนเภสัชทั้งหมด ได้แก่ แกมมา-โอริซานอล (γ-oryzanol) ไฟโตสเตอรอล (Phytosterol) โพลิโคซานอล (Policosanol) และวิตามินอีที่พบในผลิตผลพลอยได้จากกระบวนการสกัดน้ำมันรำข้าวแบบใช้ตัวทำละลายมีปริมาณมากถึง 6.6 กก./100 กก. หรือ 60.6 กก./ตัน ในขณะที่ผลิตผลพลอยได้จากกระบวนการผลิตน้ำมันรำข้าวแบบบีบเย็นพบปริมาณสารโภชนเภสัชดังกล่าวในปริมาณ 1.7 กก./100 กก. หรือ 17 กก./ตัน

การศึกษาที่ 2 การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ปริมาณโพลิโคซานอลตลอดจนศึกษาการสกัดสารโภชนเภสัช และการเพิ่มปริมาณโพลิโคซานอลในผลิตผลพลอยได้จากโรงงานผลิตน้ำมันรำข้าวโดยเทคนิคการสกัดด้วยไดเมทิลอีเทอร์เหลวภายใต้สภาวะกึ่งวิกฤต

จากการทดสอบความแม่นของการวิเคราะห์ปริมาณโพลิโคซานอล พบว่า ค่าร้อยละการคืนกลับของแต่ละความเข้มข้นผ่านตามเกณฑ์การยอมรับของ AOAC (2002) ซึ่งมาตรฐานเกณฑ์

การยอมรับ คือ 80%-120% และความเที่ยงของวิธีวิเคราะห์ปริมาณโพลิโคซานอลในวันเดียวกัน และการวิเคราะห์ความเที่ยงระหว่างวันอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ ผลจากการตรวจสอบขีดจำกัดในการตรวจพบ (LOD) และการตรวจสอบขีดจำกัดในการวัดเชิงปริมาณ (LOQ) ของโพลิโคซานอลเท่ากับ 0.73, 2.44 ppm สำหรับ Docosanol (C_{22}) 0.84, 2.82 ppm สำหรับTetracosanol (C_{24}) 0.68, 2.27 ppm สำหรับHexacosanol (C_{26}) 0.63, 2.09 ppm สำหรับ Octacosanol (C_{28}) และ 0.63, 2.09 ppm สำหรับ Triacontanol (C_{30}) ตามลำดับ

การศึกษาความคงตัวของอนุพันธ์ไตรเมทิลไซริล (Trimethylsilyl) กับ N,O-bis (trimethylsilyl) -trifluoroacetamide (BSTFA) เปรียบเทียบระหว่างทำการทดสอบทันทีและที่ตั้งทิ้งไว้ ที่อุณหภูมิ 25°ซ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง แสดงให้เห็นว่า อนุพันธ์โพลิโคซานอลไม่มีความคงทนต่อการเก็บ เนื่องจากมีค่าการเปลี่ยนแปลงเกิน ±15 % ดังนั้น เมื่อทำอนุพันธ์แล้วควรทำการวิเคราะห์ปริมาณสารโพลิโคซานอลทันที อย่างไรก็ตาม สารละลายมาตรฐานโพลิโคซานอลที่ความเข้มข้น 100 ppm มีความคงตัวที่อุณหภูมิ 4°ซ เป็นเวลา 1 สัปดาห์ และพบว่า วิธีการวิเคราะห์โพลิโคซานอลมีความคงตัวต่อการเปลี่ยนแปลงพารามิเตอร์ ได้แก่ อุณหภูมิสำหรับการทำอนุพันธ์ การสัมผัสกับแสง อุณหภูมิในการเก็บตัวทำละลาย ช่วงเวลาในการวิเคราะห์ เวลาในการทำปฏิกิริยา และการสัมผัสกับคลื่นอัลตร้าโซนิค

การศึกษาการสกัดสารโภชนเภสัชได้แก่แกมมา-โอริซานอล (γ-oryzanol) ไฟโตสเตรอล (Phytosterol) และโพลิโคซานอล (Policosanol) ตลอดจนศึกษาการเพิ่มปริมาณโพลิโคซานอลในผลิตผลพลอยได้จากกระบวนการสกัดน้ำมันรำข้าวบีบเย็นและแบบสกัดด้วยตัวทำละลาย พบว่าการสกัดสารด้วยไดเมทิลอีเทอร์เหลวภายใต้สภาวะกึ่งวิกฤตมีประสิทธิภาพในการสกัดสารแกมมา-โอริซานอล (γ-oryzanol) ไฟโตสเตรอล (Phytosterol) ในขณะที่การใช้เทคนิค ทรานเอสเทอริฟิเคชั่นร่วมกับการสกัดสารด้วยไดเมทิลอีเทอร์เหลวภายใต้สภาวะกึ่งวิกฤตมีประสิทธิภาพในการสกัดและเพิ่มความบริสุทธิ์ของ PCs โดยสามารถผลิตสารสกัดโพลิโคซานอลที่มีความบริสุทธิ์สูงถึง 84-85%

การศึกษาที่ 3 ศึกษาความเป็นพิษและประสิทธิภาพในการลดระดับคอเลสเตอรอลในสัตว์ทดลองของโพลิโคซานอลสกัดรวมทั้งพัฒนาอาหารต้นแบบน้ำมันรำข้าวเสริมโพลิโคซานอล

การศึกษาความเป็นพิษกึ่งเฉียบพลันของสารโพลิโคซานอลสกัดในหนูไมส์เพศผู้และเพศเมีย เป็นระยะเวลา 28 วัน ไม่พบความผิดของสัตว์ทดลองและสัตว์ทดลองทั้งหมดรอดชีวิต การให้สารโพลิโคซานอลสกัดแก่หนูไมส์เพศผู้และเพศเมีย ในระดับ 50, 100 และ 200 มก./กก./วัน ไม่มีผลต่อค่าทางชีวเคมีในเลือดที่สัมพันธ์กับสุขภาพตับและไต ได้แก่ ค่า AST (Aspartate aminotransferase) ค่า ALT (Alanine aminotransferase) BUN (Blood Urea Nitrogen) และ

CREA (Creatinine) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ($P \geq 0.05$) ผลทางจุลพยาธิวิทยาในหนูไมส์เพศผู้และเพศเมียกลุ่มที่ได้รับสารโพลิโคซานอลสกัดทั้ง 3 ระดับ พบว่า พยาธิสภาพที่ตับและไตไม่มีความแตกต่างจากกลุ่มควบคุม ดังนั้น การได้รับสารโพลิโคซานอลสกัดที่ระดับ 50-200 มก./กก./วัน มีความปลอดภัยและไม่มีความเป็นพิษเป็นพิษกึ่งเฉียบพลันต่อหนูไมส์ทั้งเพศผู้และเพศเมีย

การศึกษาประสิทธิภาพในการลดระดับคอเลสเตอรอลในเลือดของสารโพลิโคซานอลสกัดในแฮมสเตอร์เพศผู้ พบว่าการให้สารโพลิโคซานอลสกัดที่ระดับ 50 มก./กก./วัน ควบคู่กับการให้อาหารไขมันสูงไม่มีผลต่อน้ำหนักตับ ไต และม้ามของแฮมสเตอร์เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม แต่พบว่า แฮมสเตอร์กลุ่มที่ได้รับอาหารไขมันสูง (HFD) กลุ่มที่ได้รับยาโลวาสแตติน (HFD+LV) และกลุ่มที่ได้รับสารโพลิโคซานอลสกัด (HFD+PPC) มีน้ำหนักไขมันเมซันเทริก (Mesenteric fat) สูงกว่ากลุ่มควบคุม ($P \geq 0.05$) ผลต่อค่าชีวเคมีในเลือด พบว่า สารโพลิโคซานอลสกัดทำให้ระดับคอเลสเตอรอลทั้งหมด (T-CHO) ลดลง 10.5 % ลิโพโปรตีนความหนาแน่นต่ำหรือไขมันเลว (LDL) ลดลง 38.6% และทำให้ค่าลิโพโปรตีนความหนาแน่นสูงหรือไขมันดี (HDL) ในเลือดสูงขึ้น 15.6% เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ได้รับอาหารไขมันสูง นอกจากนี้ ผลการทดลองยังบ่งชี้ว่าสาร โพลิโคซานอลสกัดไม่มีผลต่อค่าไตรกลีเซอไรด์ (TG) ในเลือด

การเสริมโพลิโคซานอลในปริมาณมากขึ้นส่งผลต่อสีของน้ำมันโดยทำให้ค่าความสว่าง (L*) ลดลง ในขณะที่ทำให้ค่าความเป็นสีแดง (a*) และความเป็นสีน้ำเงิน (b*) เพิ่มมากขึ้น นอกจากนี้มีผลทำให้ค่าความเป็นกรดลดลง และความหนืดเพิ่มมากขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับน้ำมันรำข้าวสูตรควบคุม การเสริมโพลิโคซานอลสกัดที่ระดับ 300 ppm และ 600 ppm ไม่มีผลต่อความหนืด นอกจากนี้น้ำมันรำข้าวเสริมโพลิโคซานอลในปริมาณ 300 ppm และ600 ppm มีความคงตัวต่อความร้อนที่อุณหภูมิ 150°ซ และ 180°ซ เป็นเวลา 20 นาที

การเกิดออกซิเดชันได้แก่ ความเป็นกรด (Acid value) และค่าเพอร์ออกไซด์ (Peroxide value) ของน้ำมันรำข้าวเสริมสารโพลิโคซานอลสกัดทั้งสองระดับที่เก็บไว้ในขวดแก้วสีชาภายใต้อุณหภูมิห้อง (27±5°ซ) เป็นเวลา 6 เดือน มีแนวโน้มสูงขึ้นเมื่อเก็บเป็นเวลานานขึ้น และการเสริมสารโพลิโคซานอลสกัดในน้ำมันรำข้าวไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงค่า A.V. อย่างไรก็ตาม การเสริมสารโพลิโคซานอลสกัดในระดับ 600 ppm สามารถลดค่า P.V. ได้ หลังจากการเก็บเป็นเวลา 6 เดือน ซึ่งเนื่องจากสมบัติการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของโพลิโคซานอล นอกจากนี้ค่า A.V. และค่า P.V ของน้ำมันรำข้าวเสริมโพลิโคซานอลทั้ง 2 ระดับ ที่เก็บเป็นเวลา 6 เดือน อยู่ในเกณฑ์การยอมรับตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข (ฉบับที่ 205) พ.ศ. 2543 เรื่อง น้ำมันและไขมัน ที่กำหนดให้ผลิตภัณฑ์น้ำมันรำข้าวต้องมีค่า A.V. ไม่เกิน 0.6 mg KOH/กรัมน้ำมัน และมีค่า P.V. ได้ไม่เกิน 10 mEq/กก.

น้ำมัน และปริมาณโพลิโคซานอลในน้ำมันรำข้าวเสริมโพลิโคซานอลสกัดมีความคงตัวตลอดการเก็บเป็นเวลา 6 เดือน

ข้อเสนอแนะ

1. เทคนิคการสกัดสารด้วยไดเมทิลอีเทอร์เหลวภายใต้สภาวะกึ่งวิกฤตสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการสกัดพืชน้ำมันที่ต้องการคงคุณค่าด้านโภชนาการและสารโภชนเภสัช เช่น น้ำมันรำข้าว

2. ควรมีการพัฒนาการผลิตโพลิโคซานอลสกัดด้วยเทคนิคการสกัดสารด้วยไดเมทิลอีเทอร์เหลวภายใต้สภาวะกึ่งวิกฤตในระดับอุตสาหกรรม เนื่องจากเป็นเทคนิคที่ใช้สารเคมีน้อย ปลอดภัยและเป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม

3. ควรมีการศึกษาประสิทธิภาพของโพลิโคซานอลแต่ละรูปแบบ (Form) ในด้านการลดระดับคอเลสเตอรอลในเลือด

4. ควรเพิ่มระยะเวลาการศึกษาประสิทธิภาพการลดระดับคอเลสตอรอลในสัตว์ทดลองของโพลิโคซานอลสกัดเป็น 90-120 วัน

บรรณานุกรม

บรรณานุกรม

กระทรวงสาธารณสุข. (2541). *สารอาหารที่แนะนำให้บริโภคประจำวันสำหรับคนไทยอายุตั้งแต่ 6 ปีขึ้นไป*. กรุงเทพฯ: กระทรวงสาธารณสุข.

กระทรวงสาธารณสุข. (2543). *ประกาศกระทรวงสาธารณสุข (ฉบับที่ 205) พ.ศ. 2543 เรื่อง น้ำมัน และไขมัน*. กรุงเทพฯ: กระทรวงสาธารณสุข.

คคนางค์ โพศรีดี. (2555). *การศึกษาความเป็นพิษกึ่งระยะยาวของสารสกัดรางจืดในหนูขาว*. นครราชสีมา: มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี.

คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์. (2004). *แนวทางการดูแลรักษาความผิดปกติของระดับไขมันในเลือดในบริการปฐมภูมิ โรงพยาบาลสงขลานครินทร์*. สืบค้น 22 เมษายน 2563, จาก http://medinfo2.psu.ac.th/commed/web/pdf/5/dyslipidemia.pdf

ณรงค์ศักดิ์ วัชโรทน. (2542). *การศึกษาเปรียบเทียบผลของสารสกัดจากกระเทียมกับยาเฮชเอ็มจีโคเอรีดักเตสอินฮิบิเตอร์ในการลดลงของระดับพลาสมาแอลดีแอลคอเลสเตอรอลในผู้ป่วยหลังปลูกถ่ายไต*. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

นิธิยา รัตนาปนนท์. (2548). *วิทยาศาสตร์การอาหารของไขมันและน้ำมัน*. กรุงเทพฯ: โอเดียนสโตร์.

ประสาร เปรมะสกุล. (2554). *คู่มือแปลผลตรวจเลือด เล่มแรก* (พิมพ์ครั้งที่ 6). กรุงเทพฯ: อรุณการพิมพ์.

วิจัยกรุงศรี. (2562). *แนวโน้มธุรกิจ/อุตสาหกรรม ปี 2562-2564 อุตสาหกรรมข้าว*. สืบค้น 24 มิถุนายน 2563, จาก https://www.krungsri.com/bank/getmedia/e637a1b2-295a-4532-9f78-92832d673464/IO_Rice_190814_TH_EX.aspx).

รภัทร เอกนิธิเศรษฐ์. (2557). *การทดสอบความเป็นพิษ*. สืบค้น 4 มิถุนายน 2563, จาก http://www.elfit.ssru.ac.th/rapat_ek/pluginfile.php/65/mod_page/content/71/pdf

เรณุกา วิญญูเจริญกุล. (2556). *การศึกษาฤทธิ์ของลูกสำรองในการเป็นยาระบาย ลดน้ำตาลไขมันในเลือดและต้านออกซิเดชันในหนูขาวที่ได้รับอาหารไขมันสูงเปรียบเทียบกับผงบุก*. สงขลา: มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

สมาคมผู้ส่งออกข้าวไทย. (2562). *รายงานสถานการณ์ส่งออกข้าว แนวโน้มและทิศทางการส่งออกข้าวไทยปี 2562*. สืบค้น 24 มิถุนายน 2563, จาก http://www.thairiceexporters.or.th/Press release/2019/TREA Press Release Thai Rice Situation & Trend Year 2019-30012019.pdf

สันต์ ใจยอดศิลป์. (2553). ไขมันไตรกลีเซอไรด์. *Health.Co.Th.Journal, 2*, 7-8.

สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา. (2012). *หลักเกณฑ์การประเมินความปลอดภัยสำหรับวัตถุเจือปนอาหาร*. กรุงเทพฯ: สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา.

สำนักงานมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม. (2558). *มาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม*. สืบค้น 19 กุมภาพันธ์ 2563, จาก https://www.tisi.go.th/

Abbas, Javed. (2002). *Fatty acid synthesis*. Retrieved June 6, 2020, from http://javed-abbas.tripod.com/notesonline/biochemistry/lipid-synthesis.html

Abdou, Adham M., Higashiguchi, S., Horie, Mujo, K.K., Hatta, H., & Yokogoshi, H. (2006). Relaxation and immunity enhancement effects of gamma-aminobutyric acid (GABA) administration in humans. *BioFactors, 26*(3), 201-208.

Abidi, S.L. (2001). Chromatographic analysis of plant sterols in foods and vegetable oils. *Journal of Chromatography A, 935*(1-2), 173-201.

Adil, Incinur Hasbay, Esra, Y.M., & Alev Bayindirli. (2008). Extraction of total phenolics of sour cherry pomace by high pressure solvent and subcritical fluid and determination of the antioxidant activities of the extracts. *Separation Science and Technology, 43*(5), 1091-1110.

Affuso, Flora, Valentina Mercurio, Antonio Ruvolo, Concetta Pirozzi, Filomena Micillo, Guido Carlomagno, ... Serafino Fazio. (2012). A nutraceutical combination improves insulin sensitivity in patients with metabolic syndrome. *World Journal of Cardiology, 4*(3), 77.

Aleman, C.L., Mas, R., Caridad, M.H., Idania, R., Elizabeth, C., Miriam, N., ... Fraga, V. (1994). A 12-month study of policosanol oral toxicity in sprague dawley rats. *Toxicology Letters, 70*(1), 77-87.

Aleman, C.L., Puig, M.N., Elias, E.C., Ortega, C.H., Guerra, I.R., Ferreiro, R.M., & Brimis, F. (1995). Carcinogenicity of policosanol in mice: An 18-month study. *Food and Chemical Toxicology, 33*(7), 573-578.

Alvarez-Rivera, Gerardo, Monica Bueno, Diego Ballesteros-Vivas, Jose A. Mendiola, & Elena Ibanez. (2020). *Pressurized liquid extraction*. London, U.K.: Elsevier.

Amarasinghe, B.M.W.P.K., & Gangodavilage, N.C. (2004). Rice bran oil extraction in Sri Lanka: Data for process equipment design. *Food and Bioproducts Processing, 82*(1), 54-59.

Amarasinghe, B.M.W.P.K., Kumarasiri, M.P.M., Gangodavilage, N.C. (2009). Effect of method of stabilization on aqueous extraction of rice bran oil. *Food and Bioproducts Processing, 87*(2), 108-114.

AOAC. (2002). Guidelines for single laboratory validation of chemical methods for dietary supplements and botanicals. *AOAC International, 1*(1), 1-38.

Arruzazabala, M.L., Carbajal, D., Mas, R., Molina, V., Valdes, S., & Laguna, A. (1994). Cholesterol-lowering effects of policosanol in rabbits. *Biology Research, 27*(3-4), 205-208.

Arruzazabala, M.L., Noa, M., Menendez, R., Mas, R., Carbajal, D., Valdes, S., & Molina, V. (2000). Protective effect of policosanol on atherosclerotic lesions in rabbits with exogenous hypercholesterolemia. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research, 33*(7), 835-840.

Arruzazabala, M.L. (1996). Effect of policosanol successive dose increases on platelet aggregation in healthy volunteers. *Pharmacological Research, 34*(5-6), 181-185.

Arruzazabala, M.L, Valdes, S., Mas, R., Fernandez, L, & Carbajal, D. (1996). Effect of policosanol successive dose increases on platelet aggregation in healthy volunteers. *Pharmacological Research, 34*(5-6), 181-185.

Aryusuk, Kornkanok. (2018). *Wax: Co-product of rice bran oil refining.* Retrieved February 1, 2019, from http://ricebranoil.co.in/pdf/Dr AryusukWaxCoproduct of RBO refining.pdf

Asikin, Yonathan, Takeshi Chinen, Takara Kensaku, & Koji Wada. (2008). Determination of long-chain alcohol and aldehyde contents in the non-centrifuged cane sugar kokuto. *Food Science and Technology Research, 14*(6), 583-588.

Asikin, Yonathan, Makoto Takahashi, Naoto Hirose, De Xing Hou, Kensaku Takara, & Koji Wada. (2012). Wax, policosanol, and long-chain aldehydes of different sugarcane (Saccharum Officinarum L.) cultivars. *European Journal of Lipid Science and Technology, 114*(5), 583-591.

Association of Official Analytical Chemists (AOAC). (1995). *Official methods of analysis of the association of official analytical chemists* (16th ed.). Gaithersburg, Pa: AOAC International.

Attard, T.M., Rob McElroy, C., Camila, R.A., Igor, P., James, C.H., & Andrew, H.J. (2015). Sugarcane waste as a valuable source of lipophilic molecules. *Industrial Crops and Products, 76*, 95-103.

Azrina, A., Maznah, I., & Azizah, A.H. (2008). Extraction and determination of oryzanol in rice bran of mixed herbarium UKMB; AZ 6807: MR 185, AZ 6808: MR 211, AZ6809: MR 29. *ASEAN Food Journal, 15*(1), 89-96.

Bai, Liang, Xin Cheng, Jingzhi Xu, Xiangxing Wang, Hui Zhao, ... He Huang. (2019). Black sesame pigment extract from sesame dregs by subcritical CO 2: Extraction optimization, composition analysis, binding copper and antioxidant protection. *LWT Journal, 100*(7), 28-34.

Balachandran, C., Mayamol, P.N., Shiny, T., Divya, S., Sundaresan, A., & Arumughan, C. (2008). An ecofriendly approach to process rice bran for high quality rice bran oil using supercritical carbon dioxide for nutraceutical applications. *Bioresource Technology, 99*(8), 2905-2912.

Bedregal, P., Torres, B., Ubillus, M., Mendoza, P., & Montoya, E. (2008). Robustness in NAA evaluated by the youden and steiner test. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry, 278*(3), 801-806.

Berryman, Darlene, E., & Edward, L.O. (2017). Growth hormone's effect on adipose yissue: Quality versus quantity. *International Journal of Molecular Sciences, 18*(8), 1-28.

Bhosle, B.M., & Subramanian, R. (2005). New approaches in deacidification of edible oils - a review. *Journal of Food Engineering, 69*(4), 481-494.

Bogdanov, S. (2009). *Beeswax: Production, properties composition and control.* N.P.: Bee Product Science.

Boonnoun, Panatpong, & Yuko Kurita. (2014). Wet extraction of lipids and astaxanthin from haematococcus pluvialis by liquefied fimethyl ether. *Journal of Nutrition & Food Sciences, 4*(5), 56-62.

Boonnoun, Panatpong, Artiwan Shotipruk, Hideki Kanda, & Motonobu Goto. (2018). Optimization of rubber seed oil extraction using liquefied dimethyl ether. *Chemical Engineering Communications, 206*(6), 746-753.

Bowers, Jane. (1992). *Fat and pils in foods.* N.P.: Maxwell Macmillan International.

Boyko, E.J., Fujimoto, W.Y., Leonetti, D.L., & Newell-Morris, L. (2000). Visceral adiposity and risk of type 2 Diabetes: A prospective study among Japanese Americans. *Diabetes Care, 23*(4), 465-471.

Brigitte, K. (1995). *Cosmetic sunscreen composition containing ferulic acid and gamma-oryzanol.* N.P.: n.p.

Bryngelsson, S., Lena, D.H., & Kamal-Eldin, A. (2002). Effects of commercial processing on levels of antioxidants in oats (Avena Sativa L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 50*(7), 1890-1896.

Cabrera, L., Rivero, B., Magraner, J., Sierra, R., & Velazquez, C. (2002). Study of the stability of tablets containing 10 mg of policosanol as active principle. *Boll Chim Farm, 141*(3), 223-229.

Caradec, Sarah, Vincent Grossi, Franck Gilbert, Catherine Guigue, & Madeleine Goutx. (2004). Influence of various redox conditions on the degradation of microalgal triacylglycerols and fatty acids in marine sediments. *Organic Geochemistry, 35*(3), 277-87.

Carbajal, D., Arruzazabala, M.L., Valdes, S., & Mas, R. (1998). Effect of policosanol on platelet aggregation and serum levels of arachidonic acid metabolites in healthy volunteers. *Prostaglandins, Leukotrienes & Essential Fatty Acids, 58*(1), 61-64.

Castano, G., Mas, R., Fernandez, L., Illnait, J., Gamez, R., & Alvarez, E. (2001). Effects of policosanol 20 versus 40 mg/day in the treatment of patients with type II hypercholesterolemia: A 6-month double-blind study. *International Journal of Pharmacology Research, 21*(1), 43-57.

Castano, Gladys, Rosa Mas, Lilia Fernandez, Jose Illnait, Meylin Mesa, ... Magnolia Lezcay. (2003). Comparison of the efficacy and tolerability of policosanol with atorvastatin in elderly patients with type II Hypercholesterolaemia. *Drugs & Aging, 20*(2), 153-163.

Chen, Fang, Tongyi Cai, Guanghua Zhao, Xiaojun Liao, Linyu Guo, & Xiaosong Hu. (2005). Optimizing conditions for the purification of crude octacosanol extract from rice bran wax by molecular distillation analyzed using response surface methodology. *Journal of Food Engineering, 70*(1), 47-53.

Chen, J.T., Robert, W., Robert, D., Shamburek, F.P., & Gyorgy, C. (2005). Meta-analysis of natural therapies for hyperlipidemia: Plant sterols and stanols versus policosanol. *Pharmacotherapy, 25*(2), 171-183.

Chen, Zhen-yu, Rui Jiao, & Ka Ying Ma. (2008). Cholesterol-lowering nutraceuticals and functional foods cholesterol-lowering nutraceuticals and functional. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 56*(10), 8761-8773.

Cheong, Jean Ne, Chin Ping Tan, Yaakob, B., Che Man, & Misni Misran. (2008). Alpha-tocopherol nanodispersions: Preparation, characterization and stability evaluation. *Journal of Food Engineering, 89*(2), 204-209.

Cho, Dong Hwa, & Seung Taik Lim. (2016). Germinated brown rice and its bio-functional compounds. *Food Chemistry, 196*, 259-271.

Cho, Kyung Hyun, Suk Jeong Kim, Dhananjay Yadav, Jae Yong Kim, & Jae Ryong Kim. (2018). *Consumption of cuban policosanol improves blood pressure and lipid profile via enhancement of HDL functionality in healthy women subjects: Randomized, double-blinded, and placebo-controlled study.* N.P.: Oxidative Medicine and Cellular Longevity.

Choe, E., & Min, D.B. (2007). Chemistry of deep-fat frying oils. *Journal of Food Science, 72*(5), 101-120.

Choi, Sol Ji, Su Yeon Park, Ji Su Park, Sang Kyu Park, & Mun Yhung Jung. (2016). Contents and compositions of policosanols in green tea (Camellia Sinensis) leaves. *Food Chemistry, 204,* 94-101.

Choi, Youngmin, & Junsoo Lee. (2009). Antioxidant and antiproliferative properties of a tocotrienol-rich fraction from grape seeds. *Food Chemistry, 114*(4), 1386-1390.

Christie, W.W. (2020). *Sterols: 1. cholesterol and cholesterol esters.* Retrieved June 6, 2020, from https://lipidhome.co.uk/lipids/simple/cholest/index.htm

Chu, B.S., Baharin, B.S., & Quek, S.Y. (2002). Factors affecting pre-concentration of tocopherols and tocotrienols from palm fatty acid distillate by lipase-catalysed hydrolysis. *Food Chemistry, 79*(1), 55-59.

Chusyd, D.E., Donghai, W.D., Huffman, M., & Tim, N.R. (2016). *Relationships between rodent white adipose fat pads and human white adipose fat depots.* N.P.: Frontiers in Nutrition.

Clement, J., Okine, L.K.N., Achel, G., Gyampo, O., Adjei, S., Nyarko, A.K., … Edoh, D.A. (2013). *Prospects of croton membranaceus for prostate health.* Washington, DC: ACS Symposium Series.

Cravotto, Giancarlo, Arianna Binello, Gianfranco Merizzi, & Milvio Avogadro. (2004). Improving solvent-free extraction of policosanol from rice bran by high-intensity ultrasound treatment. *European Journal of Lipid Science and Technology, 106*(3), 147-151.

DellaPenna, D., & Robert, L.L. (2006). Progress in the dissection and manipulation of plant vitamin E biosynthesis. *Physiologia Plantarum, 126*(3), 356-368.

Department of Energy Business. (2011). *Dimethyl ether.* Retrieved July 6, 2020, from https://www.doeb.go.th/knowledge/data/1Dimethyl_Ether.pdf

Derakhshan-Honarparvar, M., Hamedi, M.M., & Kh Pirouzifard, M. (2010). Rice bran phytosterols of three widespread iranian cultivars. *Journal of Agricultural Science and Technology, 12*(2), 167-172.

Eitenmiller, Ronald, & Junsoo Lee. (2004). *Vitamin E food chemistry, composition, and analysis.* N.P.: n.p.

Ekinci, Mustafa Serhat, & Metin Guru. (2019). Extraction of phytosterols from melon (Cucumis Melo) seeds by supercritical CO2 as a clean technology. *Green Processing and Synthesis, 8*(1),677-682.

Engelking, L.R. (2015). *Chapter 61-cholesterol.* N.P.: Veterinary hysiological Chemistry.

Eurachem. (2014). *Eurachem guide: The fitness for purpose of snalytical Methods-A laboratory guide to method validation and related topics.* N.P.: n.p.

EURACHEM. (1998). *The fitness for purpose of analytical methods a laboratory guide to method validation and related topics.* N.P.: EURACHEM.

European Food Safety Authority. (2009). Scientific opinion of the panel on food contact materials, enzymes, flavourings and processing aids (CEF) on dimethyl ether as an extraction solvent. *The European Food Safety Authority Journal, 984*, 1-13.

European Food Safety Authority (EFSA). (2015). Scientific opinion on the safety of use of dimethyl ether as an extraction solvent under the intended conditions of use and the proposed maximum residual limits. *The European Food Safety Authority Journal, 13*(7), 4174.

European medicines agency. (2012). Guideline on bioanalytical method validation. *EMEA, Committee for Medicinal Products for Human Use, 44*(7), 1-23.

European Technology and Innovation Platform. (2020). *Dimethyl ether (DME) fact sheet.* Retrieved January 11, 2020, from http://www.etipbioenergy.eu/fact-sheets/dimethyl-ether-dme-fact-sheet

Evans, N.P., Sarah, M., Eva, S.M., Amir, G.J., Raquel, H., & Josep, B.R. (2010). Conjugated linoleic acid ameliorates inflammation-induced colorectal cancer in mice through activation of PPARg 1-3. *The Journal of Nutrition Nutritional Immunology, 140,* 515-521.

Fang, Yizhou, Saiqi Gu, Shulai Liu, Jianyou Zhang, Yuting Ding, & ianhua Liu. (2018). Extraction of oil from high-moisture tuna Liver by subcritical dimethyl ether: Feasibility and optimization by the response surface method. *RSC Advances, 8*(5), 2723-2732.

Fernández-Gonzalez, V., Concha-Grana, E., Muniategui-Lorenzo, S., Lopez-Mahia, P., & Prada-Rodriguez, D. (2008). Pressurized hot Water extraction coupled to solid-phase microextraction-gas chromatography-mass spectrometry for the analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in sediments. *Journal of Chromatography A, 1196-1197*(1-2), 65-72.

Food Safety Commission of Japan. (2005). *Evaluation report of food additives acetaldehyde*. N.P.: n.p.

Francini-Pesenti, F., Beltramolli, D., Acqua, D.S., & Brocadello, F. (2008). Effect of sugar cane policosanol on lipid profile in primary hypercholesterolemia. *Phytotherapy Research, 22*, 318-322.

Friesen, J.A., & Victor, W.R. (2004). The 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme-a (HMG-CoA) reductases. *Genome Biology, 5*(11), 56-78.

Furukawa, Hiroka, Asuka Kikuchi, Atsuko Noriyasu, Francois Bouteau, Syouhei Nishihama, ... Tomonori Kawano. (2016). Use of liquefied dimethyl ether for the extraction of proteins from vegetable tissues. *Solvent Extraction Research and Development, 23*(1), 127-135.

Gamez, R., Celia, L.A., Rosa, M., Miriam, N., Idania, R., Haydee, G., ... Caridad, A. (2001). A 6-month study on the toxicity of high doses of policosanol orally administered to sprague-dawley rats. *Journal of Medicinal Food, 4*(2), 57-65.

Gerhardt, A.L., & Gallo, N.B. (1998). Full-fat rice bran and oat bran similarly reduce hypercholesterolemia in humans. *The Journal of Nutrition, 128*(5), 865-869.

Globally Harmonized of Classification and Labelling of Chemical (GHS). (2011). *Globally harmonized system of classification and labelling of chemicals* (4th ed.). New York: n.p.

Gordon, T., Castelli, W.P., Hjortland, M.C., Kannel, W.B., & Dawber, T.R. (1977). High density lipoprotein as a protective factor against coronary heart disease. the framingham study. *The American Journal of Medicine, 62*(5), 707-714.

Gornas, Pawel, Aleksander Siger, Jaroslaw Czubinski, Krzysztof Dwiecki, Dalija Seglina, & Malgorzata Nogala-Kalucka. (2014). An alternative RP-HPLC method for the separation and determination of tocopherol and tocotrienol homologues as butter authenticity markers: A comparative study between two European countries. *European Journal of Lipid Science and Technology, 116*(7), 895-903.

Goto, Motonobu, Hideki Kanda, Wahyudiono, & Siti Machmudah. (2015). Extraction of carotenoids and lipids from algae by supercritical CO2 and subcritical dimethyl ether. *Journal of Supercritical Fluids, 96*, 245-251.

Gupta, A.K., Savopoulos, C.G., Ahuja, J., & Hatzitolios, A.I. (2011). Role of phytosterols in lipid-lowering: Current perspectives. *The Quarterly Journal of Medicine, 104*(4), 301-308.

Ham, Hyeonmi, Sung Won Yoon, In Hwan Kim, Jieun Kwak, Jeom Sig Lee, Heon sang Jeong,& Junsoo Lee. (2015). Protective effects of unsaponifiable matter from rice bran on oxidative damage by modulating antioxidant enzyme activities in HepG2 cells. *LWT - Food Science and Technology, 61*(2), 602-608.

Hargrove, J., Greenspan, P., & Hartle, D. (2004). Nutritional significance and metabolism of very long chain fatty alcohols and acids from dietary waxes. *Experimental Biology and Medicine (Maywood), 229*(3), 215-226.

Harrabi, Saoussem, Sadok Boukhchina, Paul M. Mayer, & Habib Kallel. (2009). Policosanol distribution and accumulation in developing corn kernels. *Food Chemistry, 115*(3), 918-923.

Harrabi, Saoussem, Azza Ferchichi, Asma Bacheli, & Hayet Fellah. (2018). Policosanol composition, antioxidant and anti-arthritic activities of milk thistle (Silybium Marianum L.) oil at different seed maturity stages. *Lipids in Health and Disease, 17*(1), 1-7.

Hayashi, Tomoshige, Edward, J.B., Donna, L.L., Marguerite, J.M., Laura Newell-Morris, Steven, E.K., & Wilfred, Y.F. (2003). Visceral adiposity and the risk of impaired glucose tolerance: A prospective study among Japanese Americans. *Diabetes Care, 26*(3), 650-655.

Hernandez, F., Illnait, J., & Mas, R. (1992). Effect of policosanol on serum lipids and lipoproteins in healthy volunteers. *Current Therapeutic Research, 51*(4), 568-575.

Herrero, Miguel, Alejandro Cifuentes, & Elena Ibanez. (2006). Sub-and supercritical fluid extraction of functional ingredients from different natural sources: Plants, food-by-products, algae and microalgae- a review. *Food Chemistry, 98*(1), 136-148.

Hoed, V.V., Depaemelaere, G., Vil. Vila, A.J., Santiwattana, P., Verhe, R., & De Greyt, W. (2006). Influence of chemical refining on the major and minor components of rice bran oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society, 83*(4), 315-321.

Horikoshi, Satoshi, Tomofumi Hamamura, Masatsugu Kajitani, Masahiro Yoshizawa-Fujita, & Nick Serpone. (2008). Green chemistry with a novel 5.8-GHz microwave apparatus. *Organic Process Research and Development, 12*(6), 1089-1093.

Hoshino, Rintaro, Kazuya Murakami, Wahyudiono, Siti Machmudah, Yuji Okita, ... Motonobu Goto. (2016). Economical wet extraction of lipid from labyrinthula aurantiochytrium limacinum by using liquefied dimethyl ether. *Engineering Journal, 20*(4), 145-153.

Hoshino, Rintaro, Wahyudiono, Siti Machmudah, Hideki Kanda, & and Motonobu Goto. (2014). Simultaneous extraction of water and essential oils from citrus leaves and peels using liquefied dimethyl ether. *Journal of Nutrition & Food Sciences, 4*(5), 1-5.

Huang, Dejian, Boxin Ou, Maureen Hampsch-woodill, Judith A. Flanagan, & Elizabeth K. Deemer. (2002). Development and validation of oxygen radical absorbance capacity assay for lipophilic antioxidants using randomly methylated β-cyclodextrin as the solubility enhancer. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 50*, 1815-1821.

Huang, Shao-Hua, & Lean-Teik Ng. (2011). An improved high-performance liquid chromatographic method for simultaneous determination of tocopherols, tocotrienols and γ-oryzanol in rice. *Journal of Chromatography A, 1218*(29), 4709-4713.

Hung, C.C., Weng, Y.M., Yu, Z.R., & Wang, B.J. (2019). Optimal selectivity of γ-oryzanol and total phenolic compounds from rice bran using supercritical carbon dioxide fractionation technique. *International Food Research Journal, 26*(2), 639-647.

International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use (ICH). (2017). *ICH Q3C Maintenance procedures for the guidance for industry Q3C impurities: Residual solvents.* N.P.: Administration Center for Drug Evaluation and Research (CDER), Center for Biologics Evaluation and Research (CBER).

Irmak, Sibel, Nurhan Turgut Dunford, & Jeff Milligan. (2006). Policosanol contents of beeswax, sugar cane and wheat extracts. *Food Chemistry, 95*(2), 312-318.

Ishaka, Aminu, Mustapha Umar Imam, Rozi Mahamud, Abu Bakar Zakaria Zuki, & Ismail Maznah. (2014). Characterization of rice bran wax policosanol and its nanoemulsion formulation. *International Journal of Nanomedicine, 9*(1), 2261-2269.

Ito, Shoichi, & Yukihiro Ishikawa. (2004). *Marketing of value-added rice products in Japan: Germinated brown rice and rice bread.* Rome, Italy: n.p.

Iwaki, K., & Kitada, Y. (2007). Availability of partially milled rice as a daily source of gamma-aminobutyric acid. *Food Science and Technology Research, 13,* 41-44.

Kanda, Hideki, Yuichi Kamo, Siti Machmudah, Wahyudiono, & Motonobu Goto. (2014). Extraction of fucoxanthin from raw macroalgae excluding drying and cell wall disruption by liquefied dimethyl ether. *Marine Drugs, 12*(5), 2383-2396.

Kanda, Hideki, Peng Li, & Hisao Makino. (2013). Production of decaffeinated green tea leaves using liquefied dimethyl ether. *Food and Bioproducts Processing, 91*(4), 376-380.

Kannappan, Ramaswamy, Jayaraj Ravindran, Sahdeo Prasad, Bokyung Sung, & Vivek R. Yadav. (2010). γ -tocotrienol promotes TRAIL-induced apoptosis through reactive oxygen species/extracellular signal-regulated dinase/P53-mediated upregulation of death receptors. *American Association for Cancer Research, 9*(8), 2196-2207.

Kassis, A.N. (2008). Evaluation of cholesterol-lowering and antioxidant properties of sugar cane policosanols in hamsters and humans. Applied Physiology, *Nutrition and Metabolism, 33*(3), 540-541.

Keller, A. (2015). *Precision vs.* Retrieved December 7, 2017, from http://kaffee.50webs.com/Science/labs/Lab-Precision.vs.Accuracy.html

Keum, Taek Hwang, Eun Kim Ji, & Curtis L. Weller. (2005). Policosanol contents and compositions in wax-like materials extracted from selected cereals of Korean origin. *Cereal Chemistry, 82*(3), 242-245.

Khuwijitjaru, Pramote, Nucha Sayputikasikorn, Suched Samuhasaneetoo, Parinda Penroj, Prasong Siriwongwilaichat, & Shuji Adachi. (2012). Subcritical water extraction of flavoring and phenolic compounds from cinnamon bark (Cinnamomum Zeylanicum). *Journal of Oleo Science, 61*(6), 349-355.

Kim, Jae Kwang, Soo-Yun Park, Ji Yun Jung, Sun-Hwa Ha, Sun-Hyung Lim, ... Seok-Cheol Suh. (2012). Policosanol content and composition of Korean rice (Oryza Sativa L.) cultivars. *Cereal Chemistry, 89*(3), 151-154.

Kim, Jae Yong, Seong Min Kim, Suk Jeong Kim, Eun Young Lee, Jae Ryong Kim, & Kyung Hyun Cho. (2017). Consumption of policosanol enhances HDL functionality via CETP inhibition and reduces blood pressure and visceral fat in young and middle-aged subjects. *International Journal of Molecular Medicine, 39*(4), 889-899.

Kim, Suk Jeong, Dhananjay Yadav, Hye Jeong Park, Jae Ryong Kim, & Kyung Hyun Cho. (2018). Long-term consumption of cuban policosanol lowers central and brachial blood pressure and improves lipid profile with enhancement of lipoprotein properties in healthy Korean participants. *Frontiers in Physiology, 9*(4), 1-11.

Kim, Sung Min, Hyun Jung Chung, & Seung Taik Lim. (2014). Effect of various heat treatments on rancidity and some bioactive compounds of rice bran. *Journal of Cereal Science, 60*(1), 243-248.

Ko, Min Jung, Jeong Hyun Lee, Hwa Hyun Nam, & Myong Soo Chung. (2017). Subcritical water extraction of phytochemicals from phlomis umbrosa turcz. *Innovative Food Science and Emerging Technologies, 42*(5), 1-7.

Kobayashi, Eri, Junya Ito, Naoki Shimizu, Takumi Kokumai, Shunji Kato, ... Kiyotaka Nakagawa. (2019). Evaluation of γ-oryzanol accumulation and lipid metabolism in the body of mice following long-term administration of γ-oryzanol. *Nutrients, 11*(1), 39-45.

Kuk, Jennifer, L., Peter, T.K., Milton, Z.N., Timothy, S.C., Steven, N.B., & Robert, R. (2006). Visceral fat Is an independent predictor of all-cause mortality in men. *Obesity, 14*(2), 336-341.

Lagarda, M.J., Garcia-Llatas, G., & Farre, R. (2006). Analysis of phytosterols in foods. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 41*(5), 1486-1496.

Lee, Eun-Young, Jeong-Ah Yoo, So-Mang Lim, & Kyung-Hyun Cho. (2016). Anti-aging and tissue regeneration ability of policosanol along with lipid-lowering effect in hyperlipidemic zebrafish via enhancement of high-density lipoprotein functionality. *Rejuvenation Research, 19*(2), 149-158.

Lehninger, A.L., Nelson, D.L., & Cox, M. (1993). *Principles of biochemistry* (2nd ed.). New York: Worth.

Lerma-Garcia, M.J., Herrero-Martínez, J.M., Simo-Alfonso, E.F., Mendonça, C.R.B., & Ramis-Ramos, G. (2009). Composition, industrial processing and applications of rice bran γ-oryzanol. *Food Chemistry, 115*(2), 389-404.

Li, Peng, Hideki Kanda, & Hisao Makino. (2014). Simultaneous production of bio-solid fuel and bio-crude from vegetal biomass using liquefied dimethyl ether. *Fuel, 116*, 370-376.

Liao, Po Lin, Ching Hao Li, Ling Shan Tse, Jaw Jou Kang, & Yu Wen Cheng. (2018). Safety assessment of the cistanche tubulosa gealth food froduct memoregain®: Genotoxicity and 28-day repeated dose toxicity test. *Food and Chemical Toxicology, 118*(5), 581-588.

Lilitchan, Supathra, & Kornkanok Aryusuk. (2008). Health benefits and production of policosanol from rice bran wax. *Journal of Public Health, 38*(3), 457-464.

Lira, G.M., Caterine, C.V.Q.C., Ítalo, B.A. de O., Bruno, C.F., Sarah, J.G.B.S., & Neura, B. (2017). Changes in the lipid fraction of king mackerel pan fried in coconut oil and cooked in coconut milk. *Food Research International, 101*(8), 198-202.

Lukic, Marina, Igor Lukic, Barbara Sladonja, & Vlasta Pilizota. (2015). Policosanol variation in olive oil as a result of variety, ripening, and storage. *European Journal of Lipid Science and Technology, 117*(8), 1248-1260.

Majchrzak, Tomasz, Martyna, L., Anna, R., Tomasz, D., Jacek, G., & Jacek, N. (2017). Thermal eegradation assessment of danola and olive oil using ultra-fast gas chromatography coupled with chemometrics. *Monatshefte Fur Chemie – Chemical Monthly, 148*(9), 1625-1630.

Mandal, S.C., Vivekananda, M., & Anup, K.D. (2015). *Classification of extraction methods.* London, U.K.: Elsevier.

Mellen, P.B., Thomas, F.W., & David, M.H. (2008). Whole grain intake and cardiovascular disease: A meta-analysis. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases, 18*(4), 283-290.

Menendez, R., Arruzazabala, L., Mas, R., Del Rio, A., Amor, A.M., Gonzalez, R.M., ... Illnait, J. (1997). Cholesterol-lowering effect of policosanol on rabbits with hypercholesterolaemia induced by a wheat starch-casein diet. *British Journal of Nutrition, 77*(6), 923-932.

Menendez, R., Fernandez, S.I., Del Rio, A., Gonzalez, R.F.V., Amor, A.M., & Mas, R.M. (1994). Policosanol inhibits cholesterol biosynthesis and enhances LDL processing in cultured human fibroblasts. *Biological Research, 27*(3-4), 199-203.

Menendez, Roberto, A.M.A., Rosa, M.G., Vivian, F., & Rosa, M. (1996). Effect of policosanol on the hepatic cholesterol biosynthesis of normocholesterolemic rats. *Biological Research, 29*(2), 253-257.

Menendez, Roberto, Vivian Fraga, Ana Ma Amor, Rosa Ma Gonzalez, & Rosa Mas. (1999). Oral administration of policosanol inhibits in vitro copper ion-induced rat lipoprotein peroxidation. *Physiology and Behavior, 67*(1), 1-7.

Menendez, Roberto, Rosa Mas, Ana Ma Amor, Rosa Ma Gonzalez, Julio C. Fernandez, ... Sonia Jimenez. (2000). Effects of policosanol treatment on the susceptibility of low density lipoprotein (LDL) isolated from healthy volunteers to oxidative modification in vitro. *British Journal of Clinical Pharmacology, 50*(3), 255-262.

Montserrat-De La Paz, S., Garcia-Gimenez, M.D., Angel-Martín, M., Perez-Camino, M.C., & Fernandez, A.A. (2014). Long-chain fatty alcohols from evening primrose oil inhibit the inflammatory response in murine peritoneal macrophages. *Journal of Ethnopharmacology, 151*(1), 131-136.

Mockel, H.J., Hofler, F., & Melzer, H. (1987). Correlation between reversed-phase retention and solute molecular surface type and area: IV. influence of eluent water content on the retention produced by different surface types. *Journal of Chromatography A, 338*, 285-293.

Moreau, R.A., & Afaf Kamal-Eldin. (2009). *Introduction. In gourmet and health-promoting specialty oils*. Urbana, Illinois: AOCS.

Muicic, Monika, Michael Tupi, Stephen, E.R., Scott Walters, Benjamin Bergman, ... Garrett Zoop. (2015). *Renewable fatty acid waxes and methods of Making*. N.P.: n.p.

Munir, M.T., Hamid Kheirkhah, Saeid Baroutian, Siew Young Quek, & Brent, R.Y. (2018). Subcritical water extraction of bioactive compounds from waste onion ckin. *Journal of Cleaner Production, 183*, 487-494.

Murase, Y., & Iishima, H. (1963). Clinical studies of oral administration of gamma-oryzanol on climacteric complaints and its dyndrome. *Obstetrics & Gynecology, 12*, 147-149.

Mustafa, Arwa, & Charlotta Turner. (2011). Pressurized liquid extraction as a green approach in food and herbal plants Extraction: A review. *Analytica Chimica Acta, 703*(1):8–18.

Nagao, Koji, Masao Sato, Miyuki Takenaka, Miyuki Ando, Masako Iwamoto, & Katsumi Imaizumi. (2001). Feeding unsaponifiable compounds from rice bran oil does not alter hepatic MRNA abundance for cholesterol metabolism-related proteins in hypercholesterolemic rats. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 65*(2), 371-377.

Nastic, Natasa, Jaroslava Svarc-Gajic, Cristina Delerue-Matos, Simone Morais, Fatima, M.B., & Manuela, M.M. (2018). Subcritical water extraction of antioxidants from mountain germander (Teucrium Montanum L.). *Journal of Supercritical Fluids, 138*(4), 200-206.

NATA Technical Note 17. (2009). *Guideline for the validation of chemical test methods.* Australia: National Association of Testing Authorities.

Noa, Miriam, Sarahi Mendoza, Rosa Mas, & Nilda Mendoza. (2003). Effect of policosanol on carbon tetrachloride-induced acute liver damage in sprague-dawley rats. *Drugs in R and D, 4*(1), 29-35.

Noboru, K., & Yusho, T. (1970). *Oryzanol containing cosmetics.* N.P.: n.p.

Normen, Lena, Lars Ellegard, Henny Brants, Paresh Dutta, & Henrik Andersson. (2007). A phytosterol database: Fatty foods consumed in sweden and the Netherlands. *Journal of Food Composition and Analysis, 20*(3-4), 193-201.

Nowatzke, William, & Eric Woolf. (2007). Best practices during bioanalytical method validation for the characterization of assay reagents and the evaluation of analyte stability in assay standards, quality controls, and study samples. *The AAPS Journal, 9*(2), E117-122.

Nyam, K.L., Tan, C.P., Lai, O.M., Long, K., & Che Man, Y.B. (2010). Optimization of supercritical fluid extraction of phytosterol from roselle seeds with a central composite design model. *Food and Bioproducts Processing, 88*(2-3), 239-246.

Nyam, Kar Lin, Chin Ping Tan, Oi Ming Lai, Kamariah Long, & Yaakob B.Ch.M. (2011). Optimization of supercritical CO2 extraction of phytosterol-enriched oil from kalahari melon seeds. *Food and Bioprocess Technology, 4*(8), 1432-1441.

Ohta, Yoshiji, Koji Ohashi, Tatsuya Matsura, Kenji Tokunaga, Akira Kitagawa, & Kazuo Yamada. (2008). Octacosanol attenuates disrupted hepatic reactive oxygen species metabolism associated with acute liver injury progression in rats intoxicated with carbon tetrachloride. *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition, 42*(2), 118-125.

Olsen, R.W., & Timothy, M.D. (1999). *GABA synthesis, uptake and release. In Basic neurochemistry: Molecular, cellular and medical aspects* (6th ed.). Rome, Italy: Lippincott-Raven.

Orthoefer, F.T. (2005). *Rice bran oil.* U.S.A.: John Wiley & Sons.

Park, JungWoo, Eun Yeong Jang, Ji Young Kim, BoRa Yi, Mi Ja Kim, ... JaeHwan Lee. (2013). Effects of visible light irradiation on the oxidative stability in rice bran. *Journal of Cereal Science, 58*(1), 178-181.

Patel, M., & Naik, S.N. (2004). Gamma-oryzanol from rice bran oil - a review. *Journal of Scientific and Industrial Research, 63*(7), 569-578.

Patnaik, P. (2006). *A comprehensive guide to the hazardous properties of chemical substances* (3rd ed.). U.S.A.: John Wiley & Sons.

Perry, S., Robert, H.P., Don, W.G., & James, O.M. (2000). *Perry's chemical engineers' handbook.* U.S.A.: The McGraw-Hill.

Pestana, V.R., Rui, C., Zambiazi, C., Mendonca, R.B., Mariangela, H.B., & Guillermo, R.R. (2009). The influence of industrial processing on the physico-chemical characteristics and lipid and antioxidant contents of rice bran. *Grasas y Aceites, 60*(2), 184-193.

Pestana, V.R., Rui, C.Z., Carla, R.B.M., Mariangela, H.B., Maria, J.L.G., & Guillermo, R.R. (2008). Quality changes and tocopherols and [Gamma]-orizanol concentrations in rice bran oil during the refining process. *Journal of the American Oil Chemists' Society, 1013*(1), 19.

Petroff, O.A.C. (2002). GABA and glutamate in the human brain. *Neuroscientist, 8*(6), 562-573.

Pizzorno, L., Pizzorno, J., & Murray, M. (2002). *Natural medicine instructions for patients.* New York: Churchill Livingstone.

Poojary, M.M., Francisco, J.B., Bahar, A., Francesco, D., Gianpiero, P., Daniel, A.D., & Pablo, J. (2016). Innovative alternative technologies to extract carotenoids from microalgae and seaweeds. *Marine Drugs, 14*(11), 1-34.

Povey, K. (2016). *Developing food products, which help consumers to lower their cholesterol level.* London, U.K.: Elsevier.

Powers, M.E., Joshua, F.Y., Sean, C.M., & Stephen, E.B. (2008). Growth hormone isoform responses to GABA ingestion at rest and after exercise. *Medicine and Science in Sports and Exercise, 40*(1), 104-110.

Pramai, Phaiwan, Nur Ashikin Abdul Hamid, Ahmed Mediani, Maulidiani Maulidiani, Faridah Abas, & Sudarat Jiamyangyuen. (2018). Metabolite profiling, antioxidant, and α-glucosidase inhibitory activities of germinated rice: Nuclear-magnetic-resonance-based metabolomics study. *Journal of Food and Drug Analysis, 26*(1), 47-57.

Prasad, M.N., Nagendra, K.R., Sanjay, M., Shravya, K., Vismaya, M.N., & Nanjunda, S.S. (2011). Health benefits of rice bran - a review. *Journal of Nutrition & Food Sciences, 1*(3), 1-7.

Pronyk, C., & Mazza, G. (2009). Design and scale-up of pressurized fluid extractors for food and bioproducts. *Journal of Food Engineering, 95*(2), 215-226.

Puengtham, Jiraporn, Kornkanok Aryusuk, Kanisa Kittiratanapiboon, Narumon Jeyashoke, & Kanit Krisnangkura. (2008). Extraction purification and characterization of policosanol from Thai rice bran wax. *KMUTT Research and Development Journal, 31*(2), 305-318.

Qureshi, A.A., Sami, S.A., & Khan, F.A. (2002). Effects of stabilized rice bran, its soluble and fiber fractions on blood glucose levels and serum lipid parameters in humans with diabetes mellitus types I and II. *Journal of Nutritional Biochemistry, 13*(3), 175-187.

Ramos, L. (2012). Critical overview of selected contemporary sample preparation techniques. *Journal of Chromatography A, 1221*, 84-98.

Ravelo, Y., Vivian, M., Daisy, C., Lilia, F., Julio, C., Fernandez, M., Arruzazabala, L., & Rosa, M. (2011). Evaluation of anti-inflammatory and antinociceptive effects of D-002 (Beeswax Alcohols). *Journal of Natural Medicines, 65*(2), 330-335.

Rendon, A., Rodriguez, M., Lopez, M., Garcia, H., Cajigas, A., Mas, R., & Fernandez, I. (1992). Policosanol: A study of its genotoxicity and teratogenicity in rodents. *Toxicology Letters, 63*(1). 249.

Reubroycharoen, P. (2008). GTL technology for green fuel production. *Technology Promotion Mag, 199*, 95-104.

Rodkum, W. (2011). *Determination of gamma-aminobutyric acid in GABA-rice by capillary electrophoresis.* Bangkok, Thailand: Thammasat University.

Rodríguez, M.D., Rafael, G., Maribel, S., & Haydee, G. (1998). Developmental toxicity of D-002 (a Mixture of Aliphatic Primary Alcohols) in rats and rabbits. *Journal of Applied Toxicology, 18*(5), 313-316.

Rout, P.K., Naik, S.N., & Rao, Y.R. (2008). Subcritical CO2 extraction of floral fragrance. from quisqualis indica. *Journal of Supercritical Fluids, 45*(2), 200-205.

Rutkowska, Jaroslawa, & Andrzej Stolyhwo. (2009). Application of carbon dioxide in subcritical state (LCO2) for extraction/fractionation of carotenoids from red paprika. *Food Chemistry, 115*(2), 745-752.

Sajfrtova, Marie, Ivana Lickova, Martina Wimmerova, Helena Sovova, & Zdenek Wimmer. (2010). β-Sitosterol: Supercritical carbon dioxide extraction from sea buckthorn (Hippophae Rhamnoides L.) seeds. *International Journal of Molecular Sciences, 11*(4), 1842-1850.

Sanchez-Camargo, Andrea del Pilar, Elena Ibanez, Alejandro Cifuentes, & Miguel Herrero. (2017). *Bioactives obtained from plants, seaweeds, microalgae and food by-products using pressurized liquid extraction and supercritical fluid extraction.* London, U.K.: Elsevier.

Santivanez-Veliz, Mery, Elsa Moreno-Viguri, Silvia Perez-Silanes, Javier Varela, Hugo Cerecetto, ... Elena Lizarraga. (2017). Development, validation and application of a GC–MS method for the simultaneous detection and quantification of neutral lipid species in trypanosoma cruzi. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences, 1061-1062*(1), 225-232.

Santos, Katia Andressa, Reinaldo Aparecido Bariccatti, Lucio Cardozo-Filho, Ricardo Schneider, Fernando Palu, ... Edson Antonio Da Silva. (2015). Extraction of crambe seed oil using subcritical propane: Kinetics, characterization and modeling. *Journal of Supercritical Fluids, 104*, 54-61.

Sawadikiat, Pattong, & Parichat Hongsprabhas. (2014). Phytosterols and γ-oryzanol in rice bran oils and distillates from physical refining process. *International Journal of Food Science and Technology, 49*(9), 2030-2036.

Schousboe, A., & Helle, S.W. (2007). GABA: Homeostatic and pharmacological aspects. *Progress in Brain Research, 160*(2), 9-19.

Schuchardt, Ulf, Ricardo Sercheli, & Rogerio Matheus. (1998). Transesterification of vegetable oils: A review general aspects of transesterification transesterification of vegetable oils acid-catalyzed processes base-catalyzed processes. *Journal of the Brazilian Chemical Society, 9*(1), 199-210.

Seetharamaiah, G.S., Krishnakantha, T.P., & Chandrasekhara, N. (1990). Influence of oryzanol on platelet aggregation in rats. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology, 36*, 291-297.

Seo, Ilwon, & Han Seung Shin. (2010). Determination of toluene and other residual solvents in various food packaging materials by gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS). *Food Science and Biotechnology, 19*(6), 1429-1434.

Seo, Woo Duck, Heung Joo Yuk, Marcus J. Curtis-Long, Ki Chang Jang, Jin Hwan Lee, ... Ki Hun Park. (2013). Effect of the growth stage and cultivar on policosanol profiles of barley sprouts and their adenosine 5-monophosphate-activated protein kinase activation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 61*(5), 1117-1123.

Shaghaghi, Mandana Amir, Suhad S. Abumweis, & Peter JH Jones. (2013). Cholesterol-lowering efficacy of plant sterols/stanols provided in capsule and tablet formats: Results of a systematic review and meta-analysis. *Journal of the Academy of Nutrition and Dietetics, 113*(11), 1494-1503.

Sharma, Rahul, Takashi Matsuzaka, Mahesh K. Kaushik, Takehito Sugasawa, Hiroshi Ohno, Yunong Wang, ... Hitoshi Shimano. (2019). Octacosanol and policosanol prevent high-fat diet-induced obesity and metabolic disorders by activating brown adipose tissue and improving liver metabolism. *Scientific Reports, 9*(1), 1-7.

Shugo, M. (1979). *Anti-dandruff and anti-itching shampoo.* N.P.: n.p.

Snyder, J.M., Jerry, W.K., Scott, L.T., & Angela, L.N. (1999). Concentration of phytosterols for analysis by supercritical fluid extraction. *Journal of the American Oil Chemists' Society, 76*(6), 717-721.

Somseemee, Oranuch, Nongnit Morakot, & Chaiyasit Sittiwet. (2014). *Analysis 1 of sterol content in jasmine rice (Oryza Sativa).* Mahasarakham, Thailand: Mahasarakham university.

Soto Ayala, Rogelio, & Luque de Castro, M.D. (2001). Continuous subcritical water extraction as a useful tool for isolation of edible essential oils. *Food Chemistry, 75*(1), 109-113.

Speight, J.G. (2015). Synthetic liquid fuel production from gasification. In *Gasification for synthetic fuel production: Fundamentals, processes and applications.* N.P.: Woodhead.

Srikaeo, Khongsak. (2014). Organic rice bran oils in health. In *Wheat and rice in disease prevention and health.* London, U.K.: Elsevier.

Srinivas, K., King, J.W., Monrad, J.K., Howard, L.R., Hansen, C.M. (2009). Optimization of subcritical fluid extraction of bioactive compounds using hansen solubility parameters. *Journal of Food Science, 74*(6), 342-354.

Steffe, J.F. (1992). *Rheological methods in food process engineering* (2nd ed.). N.P.: Freeman.

Stuchlík, Milan, & Stanislav Zak. (2002). Vegetable lipids as components of functional foods. *Biomedical Papers, 146*(2), 3-10.

Subratti, A., Lorale, J.L., & Nigel, K.J. (2019). Liquified dimethyl ether (DME): A green solvent for the extraction of hemp (Cannabis Sativa L.) seed oil. *Sustainable Chemistry and Pharmacy, 12*(1), 100-144.

Sun Wenguang, Weili Xu, Huikun Liu, Jiaren Liu, Qi Wang, Jin Zhou, ... Bingqing Chen. (2009). Gamma-tocotrienol induces mitochondria-mediated apoptosis in human gastric adenocarcinoma SGC-7901 cells. *Journal of Nutritional Biochemistry, 20*(4), 276-284.

Talati, R., Diana, M.S., Sagar, S.M., Olivia, J.P., & Craig, I.C. (2010). The comparative efficacy of plant sterols and stanols on serum lipids: A systematic review and meta-analysis. *Journal of the American Dietetic Association, 110*(5), 719-726.

Tan, Chin Xuan, Gun Hean Chong, Hazilawati Hamzah, & Hasanah Mohd Ghazali. (2018). Comparison of subcritical CO2 and ultrasound-assisted aqueous methods with the conventional solvent method in the extraction of avocado oil. *Journal of Supercritical Fluids, 135*(11), 45-51.

Teixeira, G.L., Saeed, M.G., Marcos, L.C., Alejandro, G.M., & Rosemary, H.R. (2018). Assessment of subcritical propane, supercritical CO2 and soxhlet extraction of oil from sapucaia (Lecythis Pisonis) nuts. *Journal of Supercritical Fluids, 133*(10), 122-132.

Thai rice exporters Association. (2016). *Thai rice production, consumption, and stocks.* Retrieved April 24, 2017, from http://www.thairiceexporters.or.th/production.htm

The Office of Industrial Economics. (2019). *Industry statistics.* Retrieved April 24, 2017, from http://www.oie.go.th/academic/statistics

Thongekkaew, Jantaporn. (2015). A greatly useful of GABA for health. *KKU Science Journal, 43*(2), 205-211.

Tian, Yixing, & Nuria C. Acevedo. (2018). Kinetic study on photostability of retinyl palmitate entrapped in policosanol oleogels. *Food Chemistry 55*(2), 252-259.

Tungtrakul, Patcharee. (2007). GABA in rice germ and germinated brown rice. *Food Journal, 37*(4), 291-296.

Turner, C., & Waldeback, M. (2010). *Principles of pressurized fluid extraction and environmental, food and agricultural applications. In Separation, extraction and concentration processes in the food, beverage and nutraceutical industries.* N.P.: Woodhead.

United States Department of Agriculture. (2013). *Deep fat frying and food safety.* Retrieved February 3, 2020, from https://www.fsis.usda.gov/wps/portal/fsis/topics/food-safety-education/get-answers/food-safety-fact-sheets/safe-food-handling/deep-fat-frying-and-food-safety/ct_index

Varady, K.A., Yanwen, W., & Peter, J.H.J. (2003). Role of policosanols in the prevention and treatment of cardiovascular disease. *Nutrition Reviews, 61*(11), 376-383.

Varlet, V., Smith, F., & Augsburger, M. (2014). New trends in the kitchen: Propellants assessment of edible food aerosol sprays used on food. *Food Chemistry, 142*, 311-317.

Wajchenberg, B.L., Giannella-Neto, D., da Silva, M.E., & Santos, R.F. (2002). Depot-specific hormonal characteristics of subcutaneous and visceral adipose tissue and their relation to the metabolic syndrome. *Hormone and Metabolic Research, 34*(11-12), 616-621.

Wang, Yanwen, Naoyuki Ebine, Xiaoming Jia, Peter J. H. Jones, Clint Fairow, & Ralf Jaeger. (2005). Very long chain fatty acids (Policosanols) and phytosterols affect plasma lipid levels and cholesterol biosynthesis in hamsters. *Metabolism: Clinical and Experimental, 54*(4), 508-514.

Weerawatanakorn, M., Tamaki, H., Asikin, Y., Wada, K., Takahashi, M., Ho, C.T., & Pan, M.H. (2017). Policosanol contents, volatile profile and toxicity test of granulated cane sugar enriched with rice bran materials. *International Food Research Journal, 24*(3), 1019-1028.

Weerawatanakorn, Monthana, Kanyaphat Meerod, Donporn Wongwaiwech, & Chi-tang Ho. (2019). Policosanols: Chemistry, occurrence, and health effects. *Current Pharmacology Reports, 5*(3), 131-149.

Wells, S.R., Merilyn, H.J., Courtney, R., Vicky, H., Konstantinos, A.P., & Jonathon, S.A. (2010). Alpha, gamma and delta-tocopherols reduce inflammatory angiogenesis in human microvascular endothelial cells. *The Journal of Nutritional Biochemistry, 21*(7), 589-597.

Wen, Tan Xian. (2015). *Extraction and analysis of antioxidant capacity in rice bran extracts from different sarawak local rice varieties.* Malaysia: Swinburne University of Technology Sarawak.

Yang, Haojun, Feng Yan, Daogeng Wua, Ming Huo, Jianxin Li, ... Yiming Jiang. (2010). Recovery of phytosterols from waste residue of soybean oil deodorizer distillate. *Bioresource Technology, 101*(5), 1471-1476.

Yoon, Suk Hoo, & Sun Ki Kim. (1994). Oxidative stability of high-fatty acid rice bran oil at different stages of refining. *Journal of the American Oil Chemists' Society, 71*(2), 227-229.

Yoshida, Yasukazu, Yoshiro Saito, Leslie Sargent Jones, & Yasushi Shigeri. (2007). Chemical reactivities and physical effects in comparison between tocopherols and tocotrienols: Physiological significance and prospects as antioxidants. *Journal of Bioscience and Bioengineering, 104*(6), 439-445.

Yoto, A., Murao, S., Motoki, M., Yokoyama, Y., Horie, N., Takeshima, K., ... Yokogoshi, H. (2012). Oral Intake of gamma-aminobutyric acid affects mood and activities of central nervous system during stressed condition induced by mental tasks. *Amino Acids, 43*(3), 1331-1337.

Zaibunnisa, A.H., Norashikin, S., Mamot, S., & Osman, H. (2009). An experimental design approach for the extraction of volatile compounds from turmeric leaves (Curcuma Domestica) using pressurised liquid extraction (PLE). *Food Science and Technology, 42*(1), 233-238.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก วิธีการวิเคราะห์คุณภาพทางเคมีและกายภาพ

1. **ปริมาณความชื้น** (Association of Official Analytical Chemists (AOAC), 1995)

อบภาชนะสำหรับหาความชื้นในตู้อบ ณ อุณหภูมิ 105°ซ เป็นเวลา 3 ชั่วโมง นำออกจากตู้อบ จากนั้นนำไปใส่ในโถดูดความชื้นจนกระทั่งภาชนะสำหรับหาความชื้นอยู่ที่อุณหภูมิชั่งน้ำหนักอีกครั้ง จากนั้นชั่งตัวอย่างที่ต้องการหาความชื้นประมาณ 1-2 กรัม ใส่ลงในภาชนะหาความชื้นที่ทราบน้ำหนักแน่นอน นำไปอบในตู้ที่อุณหภูมิ 105°ซ เป็นเวลา 5-6 ชั่วโมง นำออกจากตู้อบ จากนั้นนำไปใส่ในโถดูดความชื้นจนกระทั่งภาชนะสำหรับหาความชื้นอยู่ที่อุณหภูมิชั่งน้ำหนักอีกครั้ง อบซ้ำจนน้ำหนักที่ชั่งได้ทั้งสองครั้งมีค่าต่างกันไม่เกิน 1-3 มก.

การคำนวณ

$$\text{ปริมาณความชื้น} = \frac{\text{ผลต่างของน้ำหนักตัวอย่างก่อนอบและหลังอบ (กรัม)} \times 100 \text{ (เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก)}}{\text{น้ำหนักตัวอย่างเริ่มต้น (กรัม)}}$$

2. **ปริมาณกรดแกมมาอะมิโนบิวทาริค** (GABA) (Iwaki, & Kitada, 2007)

ชั่งตัวอย่างจำนวน 3 กรัม ด้วยเอทานอล 70% ปริมาณ 15 มล. นำไปเขย่าเป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 3,000 ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที การทำอนุพันธุ์และการทำบริสุทธิ์โดยใช้ EZ:faast amino sample test kit for GC/MS profiling of protein hydrolysates จากบริษัท Phenomenex (Torrance, CA) โดยดูดส่วนใสปริมาณ 100 µl ใส่ลงใน reaction tube เติมสารละลายมาตรฐานภายในนอวาลีน (Norvaline) ลงไปในปริมาณ 50 µl เขย่าสารละลายให้เข้ากันเป็นเวลา 30 วินาที จากนั้นชะด้วยReagent 3A+3B ปริมาณ 200 µl นำสารละลายที่ชะมาได้มา เขย่าสารละลายให้เข้ากันเป็นเวลา 10 วินาที ดูด Reagent (4) มา 50 µl จากนั้นเขย่าสารละลายให้เข้ากันเป็นเวลา 30 วินาที เติม Reagent (5) มา 100 µl และนำไปเขย่าสารละลายให้เข้ากันเป็นเวลา 30 วินาที จากนั้นทิ้งไว้เป็นเวลา 2 นาที แล้วจึงเติม Reagent (6) ลงไป 100 µl แล้วจึงเขย่าสารละลายให้เข้ากันเป็นเวลา 30 วินาที ตั้งทิ้งไว้จนแยกชั้นแล้วดูดสารละลายส่วนใสมา 150 µL ใส่ในหลอด Insert แล้วปิดฝา

แยกและหาปริมาณของ GABA ด้วยเครื่อง Gas Chromatograph-Mass Spectrometer (GC-MS) คอลัมน์ Phenomenex (Zebron ZB-AAA 0.25 mm × 10 m i.d., ฟิมล์หนา 0.25 µm) ตัวอย่าง (2.0 µl) ถูกฉีดเข้าเครื่องด้วย Agilent technologies 7683 auto sampler และ Split injector โดยตั้ง Split ratio ไว้ที่ 1:15 ตั้งอุณหภูมิไว้ที่ 110°ซ จากนั้นอุณหภูมิจะเพิ่มขึ้นทุก 30°ซ/นาที จนถึง 300°ซ และจะคงที่เป็นเวลา 2 นาที อุณหภูมิ Injector และ detector อยู่ที่ 320°ซ อัตราการไหลที่

1.1 มล./นาที ยีเลียมถูกใช้เป็นก๊าซนำพา ทำการวิเคราะห์ GABA โดยใช้ Retention time ของสารมาตรฐาน และ Literature data

3. ปริมาณวิตามินอี ในรูปด้วยอนุพันธ์ของ α-, β-, γ-, และ δ- โทโคฟีรอล (Ts) และอนุพันธ์ของแอลฟา- เบตา- แกมมา- และเดลตา-โทโคไตรอีนอล (α-, β-, γ-, และ δ -Tocotrienol) (Gornas et al., 2014; Huang, & Ng, 2011)

ชั่งตัวอย่างจำนวน 1 กรัม เติมคลอโรฟอร์มและเมททานอล (3:2 v/v) ปริมาณ 15 มล. จากนั้นนำไปเขย่าสารละลายให้เข้ากัน 10 นาที ตั้งทิ้งไว้จนตกตะกอน 30 นาที ถึง 1 ชั่วโมง กรองผ่านฟิลเตอร์ชนิดไนล่อนขนาด 0.45 ไมครอน ใส่ลงใน Micro centrifuged tube ให้มีปริมาณมากกว่า 500 µl เติมเฟสเคลื่อนที่ (อะซีโตไนไตรล์: เมททานอล : ไอโซโพรพานอล, 25 : 70 : 5 +0.1 กรดอะซิติก) ปริมาณ 500 µl ลงไปผสมให้เข้ากัน

แยกและหาปริมาณ Ts, T3s ด้วยเครื่อง Reversed phase High Performance Liquid Chromatography (HPLC) Diode Array Detector (DAD) ตัวอย่าง (20 µl) ถูกฉีดเข้าเครื่องด้วย Agilent technologies 1100 Auto injector ถูกแยกที่อุณหภูมิ 40°ซ ด้วยคอลัมน์ Luna CN 100A (4.6 × 250 mm i.d., ฟิลม์หนา 5 µm) โดยใช้เฟสเคลื่อนที่ คือ 94% เมททานอล, 6% น้ำปราศจากไอออน อัตราการไหลที่ 1 มล./นาที เป็นเวลา 12 นาที จากนั้นจะเปลี่ยนเฟสเคลื่อนที่เป็น อะซีโตไนไตรล์: เมททานอล : ไอโซโพรพานอล, 25 : 70 : 5 +0.1 กรดอะซิติก และคงที่เป็นเวลา 8 นาที โทโคฟีรอลและโทโคไตรอีนอล (รูปแบบ δ, β, γ และ α) ความยาวคลื่นที่ 298 และ328 nm

4. ปริมาณแกมมาออริซานอล (γ-oryzanol) (Gornas et al., 2014; Huang, & Ng, 2011)

ชั่งตัวอย่างจำนวน 1 กรัม เติมคลอโรฟอร์มและเมททานอล (3:2 v/v) ปริมาณ 15 มล. จากนั้นนำไปเขย่าสารละลายให้เข้ากันเป็นเวลา 10 นาที ตั้งทิ้งไว้จนตกตะกอนเป็นเวลา 30 นาที ถึง 1 ชั่วโมง กรองผ่านฟิลเตอร์ชนิดไนล่อน ขนาด 0.45 ไมครอน ใส่ลงใน Micro centrifuged tube ให้มีปริมาณมากกว่า 500 µl เติม เฟสเคลื่อนที่ (อะซีโตไนไตรล์: เมททานอล : ไอโซโพรพานอล, 25 : 70 : 5 +0.1 กรดอะซิติก) ปริมาณ 500 µl ลงไปผสมให้เข้ากัน

แยกและหาปริมาณของแกมมออริซานอลด้วยเครื่อง Liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS) Agilent technologies 1100 Diode Array Detector (DAD) ต่อเชื่อมกับ Agilent technologies 1100 auto injector และ Agilent technologies LC/MSD SL) ตัวอย่าง 20 µL จะถูกฉีดเข้าไปในเครื่องและจะถูกวิเคราะห์ที่อุณหภูมิ 40°ซ ด้วยคอลัมน์ Agilent Zorbax Eclipse XDB-C18 (4.6 × 150 mm i.d., ฟิมส์หนา 5 µm) โดยใช้เฟสเคลื่อนที่ คือ อะซีโตไนไตรล์ : เมททานอล : ไอโซโพรพานอล (25:70:5 v/v) อัตราการไหลที่ 1 มล./นาที ความยาวคลื่นที่ 325 nm

5. **ปริมาณไฟโตสเตอรอล** (Phytosterol) (Lagarda et al., 2006)

ชั่งตัวอย่าง 1 กรัมเติมสารมาตรฐานภายในคอเลสเทน 0.1% (Cholestane) 1 มล. จากนั้นเติมโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ (60%) 2 มล., เอทานอล (95%) 2 มล., สารละลายเกลือ (1%) 2 มล.และ Ethanolic pyrogallol (6%) 5 มล. ลงใน Screw tube จากนั้นทำการซาปอนนิฟิเคชัน (Saponification) ภายใต้ก๊าซไนโตรเจน โดยต้ม Screw tube ที่อุณหภูมิ 70°ซ ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิเขย่าสารละลายให้เข้ากันทุกๆ 5 นาที รวมทั้งหมด 45 นาที จากนั้นทำให้เย็นในอ่างน้ำแข็งและเติมสารละลายเกลือ (1%) 15 มล. ลงไป สกัดด้วยสารละลายผสมเฮกเซนและ เอทิลอะซิเตท (9:1 v/v) ปริมาณ 15 มล. โดยทำการสกัดทั้งหมด 2 ครั้ง เก็บส่วนใสมาระเหยด้วยก๊าซไนโตรเจนที่อุณหภูมิ 45°ซ จนแห้งสนิท นำตัวอย่างที่แห้งแล้วมาทำอนุพันธุ์โดยการเติมสารละลายผสม N,O-Bis trifluoro acetamide (BSTFA)-Trimethyi chlorosilane (TMCS) 99:1 ปริมาณ 200 µL และไพริดีน (Pyridine) 100 µL นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 60°ซ เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำไปทำแห้งด้วยก๊าซไนโตรเจนนำตัวอย่างที่ทำแห้งแล้วมาละลายด้วยเฮกเซนปริมาณ 1 มล. แล้วกรองด้วยฟิลเตอร์ชนิดไนล่อน

แยกและหาปริมาณสเตอรอลด้วย Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS) Agilent technologies 6890n ใส่คอลัมน์ DB-5ms (0.25 mm × 30 m i.d., ฟิมล์หนา 0.25 µm) ตัวอย่าง (1 µl) ถูกฉีดเข้าเครื่องด้วย Agilent technologies 7683 auto sampler และ Split injector (Split ratio 1:50) อุณหภูมิถูกโปรแกรมไว้ที่ 100°ซ เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นอุณหภูมิจะเพิ่มขึ้นทุก 10°ซ/นาที จนถึง 300°ซ และจะคงที่เป็นเวลา 14 นาที อุณหภูมิ Injector และ Detector อยู่ที่ 270°ซ อัตราการไหล อยู่ที่ 1.5 มล./นาที ฮีเลียมถูกใช้เป็นก๊าซนำพา ใช้สารละลายมาตรฐานภายในคอเลสเทน (Cholestane) ทำการวิเคราะห์สเตอรอลโดยใช้ Retention time ของสารมาตรฐานและ Literature data (AOCS American Oil Chemists Society, 1997)

6. **ปริมาณโพลิโคซานอล** (Policosanol) (Asikin et al., 2008; Ishaka et al., 2014)

ชั่งตัวอย่างที่มีไขมันมากปริมาณ 1 กรัม ใส่ในหลอด Polypropylene แล้วไฮโดรไลส์ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.2 โมล ปริมาณ 10 มล. (น้ำ: เมททานอล 3:1 v/v) จากนั้นนำไปสั่นสะเทือนด้วยคลื่นอัลตราโซนิค (Sonicate) ด้วยเครื่อง Branson 8510 (Branson Ultrasonics Co., Connecticut, USA) ที่ 44 Hz, 250 W, อุณหภูมิ 60°ซ เป็นเวลา 90 นาที นำสารที่ได้ไปสกัดด้วย toluene และทำให้เย็นที่อุณหภูมิ 2°ซ แล้วจึงนำไปปั่นเหวี่ยง (Centrifuged) ที่ 4,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที ดูดส่วนใสแล้วกรองด้วย 0.45 µm ฟิลเตอร์ชนิดไนล่อน

ชั่งตัวอย่างที่มีไขมันต่ำ 5 กรัม ลงใน Thimbles (Whatman 33 mm×100 mm) เทส่วนผสมของเฮกเซน: เมททานอล (20:1 v/v) 250 มล. ลงไป ทำการสกัดด้วย Soxhlet เป็นเวลา 12 ชั่วโมง จากนั้นระเหยด้วย Rotary evaporator ที่อุณหภูมิ 40°ซ ตัวอย่างที่แห้งแล้วจะถูกชะด้วยโทลูอีนประมาณ 5 มล. แล้วกรองด้วย 0.45 µm Filter การทำอนุพันธ์สำหรับการวิเคราะห์ โพลิโคซานอล ตัวอย่างปริมาณ 200 µL ถูกผสมรวมกับ N,O-bis(trimethylsilyl)-trifluoroacetamide (BSTFA) with 1% trimethylchlorosilane (TMCS) ปริมาณ 100 µL จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 50°ซ เป็นเวลา 30 นาที

ปริมาณของโพลิโคซานอลวิเคราะห์ด้วย Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS) โดยใช้ Agilent technologies 6890n คอลัมน์ DB-5ms (0.25 mm × 30 m i.d., ฟิมล์หนา 0.25 µm) โดย GC injector และ Flame ionized detector จะถูกตั้งที่อุณหภูมิ 350°ซ ตัวอย่าง (1 µl) ถูกฉีดเข้าเครื่องด้วย Agilent technologies 7683 auto sampler และ Split injector (split ratio 1:10) อุณหภูมิถูกโปรแกรมไว้ที่ 150°ซ จากนั้นอุณหภูมิจะเพิ่มขึ้นทุก 4°ซ/นาที จนถึง 320°ซ และจะคงที่เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นตัวอย่าง 0.3 µl จะถูกฉีดเข้า MS detection (split ratio 1:10) ส่วน Electron impact (EI) ion source และ Transfer line จะถูกตั้งอุณหภูมิไว้ที่ 200 และ 280°ซ Ionization energy ถูกตั้งที่ 70 eV. ฮีเลียมถูกใช้เป็นก๊าซนำพาและทำการอ้างอิงผลวิเคราะห์โพลิโคซานอล โดยใช้ Retention time ของสารมาตรฐานและ Literature data

7. วิเคราะห์หาสารเคมีตกค้าง (Multi-solvent residue screen) (Seo, & Shin, 2010)

ชั่งตัวอย่างในปริมาณ 0.5 มก. ใส่ใน Headspace vial ขนาด 20 มล. จากนั้นปิดฝาให้แน่น นำไปใส่ใน Automated headspace sampler และทำการบ่มที่อุณหภูมิ 70°ซ เป็นเวลา 30 นาที เครื่อง Headspace และ Transfer line จะถูกตั้งอุณหภูมิที่ 70°ซ และ 150°ซ ส่วน Loop equilibrium Loop fill และ GC cycle times จะถูกโปรแกรมที่ 0.05 0.10 และ 50 นาที การแยกและหาความเข้มข้นของสารเคมีตกค้างวิเคราะห์ด้วย Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS) โดยใช้ Agilent technologies 6890n คอลัมน์ DB-5ms (0.25 mm × 30 m i.d., ฟิมล์หนา 0.25 µm) ฮีเลียมถูกใช้เป็นก๊าซนำพาในอัตราการไหลที่ 1.0 มล./นาที ในขณะที่ sample inlet ถูกตั้งที่อุณหภูมิ 250°ซ อุณหภูมิเตาอบจะถูกโปรแกรมไว้ที่ 35°ซ และคงที่เป็นเวลา 5 นาที จากนั้น อุณหภูมิจะเพิ่มขึ้นทุก 10°ซ/นาที จนถึง 300°ซ และจะคงที่เป็นเวลา 1 นาที ส่วนอุณหภูมิของ injector, MS quad temperatures, Transfer line และ MS source จะถูกตั้งที่ 250 150 280 และ 230°ซ และทำการอ้างอิงผลวิเคราะห์สารเคมีตกค้าง โดยใช้ Retention time ของสารมาตรฐานและ Literature data

8. **ค่าความเป็นกรด** (Acid value) (Association of Official Analytical Chemists (AOAC), 1995)

ผสมไดเอทิลอีเทอร์และเอทิลแอลกอฮอล์ (1:1 v/v) 25 มล. กับสารละลายฟีนอฟทาลีน 1% ให้เข้ากัน 0.5 มล. ไตเตรตตัวทำละลายผสมให้เป็นกลางด้วยสารละลายโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 0.1 M ชั่งตัวอย่าง 2 กรัม ละลายน้ำมันตัวอย่างลงในตัวทำละลายผสมที่เป็นกลาง จากนั้น ไตเตรตด้วยสารละลายโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ 0.1 M จนกระทั่งสารละลายกลายเป็นสีชมพู

การคำนวณ

$$\text{Acid value} = \frac{\text{จำนวนมิลลิลิตรของสารละลายโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ที่ใช้ไตเตรต} \times 5.61}{\text{น้ำหนักตัวอย่าง (กรัม)}}$$

9. **ค่าเปอร์ออกไซด์** (Peroxide Value) (Association of Official Analytical Chemists (AOAC), 1995)

ชั่งตัวอย่างที่ต้องการทดสอบ 5.00 ±0.05 กรัม ใส่ลงในขวดรูปชมพู่ เติมสารละลายกรดอะซิติกและคลอโรฟอร์ม (3:1 v/v) 30 มล. หมุนขวดเบาๆ จนตัวอย่างละลายทั้งหมด เติมสารละลายโพแทสเซียมไอโอไดด์ (อิ่มตัว) 0.5 มล. และสารละลายแป้งผสมให้เข้ากับ นำสารละลายที่ได้มาไตเตรตกับ 0.1 M สารละลายโซเดียมไธโอซัลเฟตจนกระทั่งสารละลายไม่มีสี (ถ้าปริมาตรที่ใช้น้อยกว่า 0.5 มล. ให้ไตเตรตซ้ำโดยใช้สารละลายสารละลายโซเดียมไธโอซัลเฟต 0.01 M แทน)

การคำนวณ

$$\text{Peroxide Value} = \frac{(S-B) \times M \times 1{,}000}{\text{ปริมาณตัวอย่าง (กรัม)}}$$

S = ปริมาณที่ใช้ไตเตรตตัวอย่าง

B = ปริมาณที่ใช้ไตเตรต Blank

M = Molarity ของสารละลายโซเดียมไธโอซัลเฟต

ภาคผนวก ข วิธีวิจัยที่เกี่ยวข้องกับสัตว์ทดลอง

1. วิธีการป้อนสารให้แก่สัตว์ทดลอง

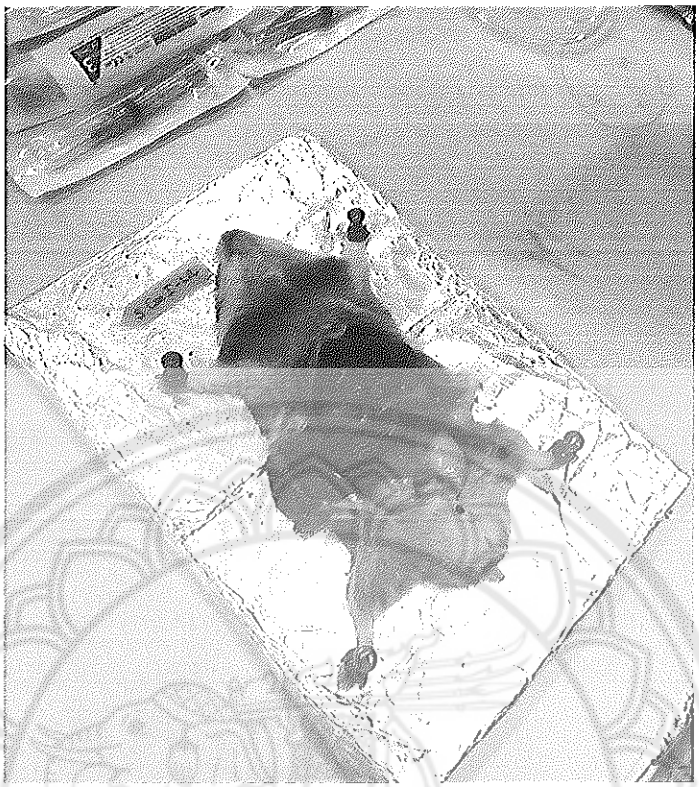
นำกระบอกฉีดยาขนาด 1 มล. มาต่อกับอุปกรณ์ป้อนอาหารทางปาก (Feeding tube) ชนิดเหล็กกล้าไร้สนิม ขนาด 20-gauge x 38 มม. จากนั้นดูดสารที่ใช้ป้อนตามปริมาณที่ต้องการต่อน้ำหนักตัวของสัตว์ทดลอง ใช้นิ้วชี้และนิ้วหัวแม่มือข้างซ้ายดึงส่วนหนังบริเวณด้านต้นคอด้านบนของสัตว์ทดลอง ใช้อุ้งมือและนิ้วทั้งสามที่เหลือจับหนังตรงบริเวณหลังของสัตว์ทดลองให้แน่น การจับโดยวิธีนี้ทำให้สัตว์ทดลองอยู่นิ่งและอ้าปากออกเล็กน้อย จากนั้นจึงสอด Feeding tube ผ่านลิ้นเข้าถึงลำคอลึกประมาณ 1.5 ซม. จึงป้อนสารลงไปอย่างระมัดระวังและรวดเร็ว เพื่อป้องกันไม่ให้เกิดแผลกับหลอดอาหารและการสำลัก

ภาพภาคผนวก 1 การป้อนสารให้แก่สัตว์ทดลอง

2. การเก็บตัวอย่างเลือดจากสัตว์ทดลอง (คคนางค์ โพศรีดี, 2555)

2.1 การสลบสัตว์ทดลองก่อนผ่าตัด

นำสัตว์ทดลองใส่ในกล่องเพื่อให้ดมอีเทอร์จนกระทั่งตาย นำมาวางไว้ที่ถาด และจัดท่าสัตว์ทดลองให้นอนหงาย ตรึงที่เท้าทั้งสี่ข้าง



ภาพภาคผนวก 2 การตรึงซากสัตว์ทดลอง

2.2 การผ่าตัดเจาะเลือดที่หัวใจ

ใช้กรรไกรตัดเปิดผ่านผิวหนังและเนื้อจากช่องอก ตัดกระดูกซี่โครงทั้งสองข้างแล้วพลิกขึ้นไปด้านหน้า ใช้คีมปากเล็กจับบริเวณหัวใจ ส่วน Apex โดยพยายามให้โดนกล้ามเนื้อหัวใจน้อยที่สุด ดึงขึ้นมาเล็กน้อย จากนั้นใช้เข็มขนาด 27 หรือ 28 ที่ชะด้วยสารป้องกันการแข็งตัวของเลือด (Anticoagulant) ชนิด Lithium heparin แทงลงไปที่หัวใจห้องล่างซ้าย พร้อมกับเริ่มดูดเลือดอย่างช้าๆ จนได้ประมาณ 1-2 มล. เพื่อนำไปวิเคราะห์ค่าทางชีวเคมี

2.3 การเตรียมซีรัมและวิเคราะห์ค่าทางชีวเคมี

นำตัวอย่างเลือดไปปั่นด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ 3,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 5 นาที ดูดส่วนใสใส่หลอดไมโครเซ็นตริฟิวส์ที่เตรียมไว้ จากนั้นเก็บในตู้แช่แข็ง -20°ซ เพื่อนำไปวิเคราะห์หาค่าทางชีวเคมี

3. การเก็บตัวอย่างอวัยวะ

การผ่าตัดเพื่อเก็บตัวอย่างอวัยวะและชั่งน้ำหนักด้วยเครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง ทำการบันทึกน้ำหนักหัวใจ ตับ ม้าม ไต อัณฑะหรือรังไข่ และเนื้อเยื่อไขมัน ด้วยวิธีการดังต่อไปนี้

3.1 หัวใจ

ใช้คีมคีบดึงหัวใจและลอกเยื่อหุ้มหัวใจ (Pericardium) ออก ใช้กรรไกรตัดเส้นเลือดแดงใหญ่เอออร์ตา (Aorta) เส้นเลือดแดงสู่ปอด (Pulmonary artery) หลอดเลือดดำจากปอด (Pulmonary vein) และหลอดเลือดเวนาคาวาด้านบน (Superior vena cava) ให้เหลือแต่ส่วนหัวใจ และล้างด้วยสารละลายน้ำเกลือนอร์มัลซาไลน์ (Normal saline solution) ใช้กระดาษทิชชูซับหัวใจให้แห้ง แล้วจึงนำไปชั่งน้ำหนัก

3.2 ตับ

ใช้กรรไกรเลาะเนื้อเยื่อที่ติดกับตับและส่วนต่างๆ ของทางเดินอาหารออกให้หมด ตัดส่วนตับออกมาเลาะเนื้อเยื่อไขมันให้หมดอีกครั้ง จากนั้นจึงนำตับไปชั่งน้ำหนัก

3.3 ม้าม

ใช้กรรไกรตัดส่วนพังผืดที่ติดกับตับอ่อนและไตซ้าย เลาะเนื้อเยื่อไขมันที่ติดกับม้ามออกให้หมด นำม้ามไปชั่งน้ำหนัก

3.4 ไต

ใช้คีมคีบไตขึ้นเล็กน้อย ใช้กรรไกรตัดส่วนเส้นเลือดออกเลาะเนื้อเยื่อไขมันที่ติดกับไตออกให้หมด นำไตไปชั่งน้ำหนัก

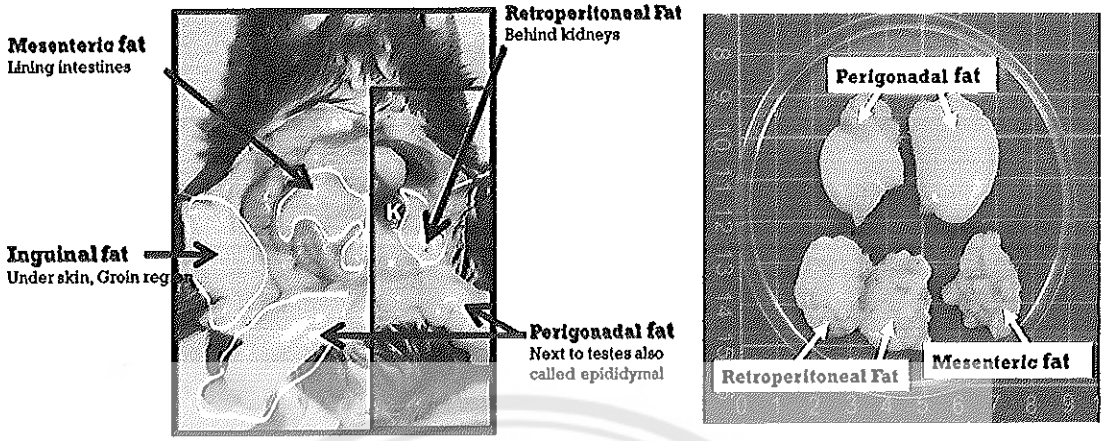
3.5 อัณฑะและรังไข่

อัณฑะ ใช้กรรไกรตัดอัณฑะออกจากส่วนหัวและท้ายของท่อพักอสุจิ ที่เชื่อมต่อกับสายรั้งลูกอัณฑะ นำอัณฑะไปชั่งน้ำหนัก

รังไข่ ใช้กรรไกรเลาะส่วนไขมันบริเวณปีกมดลูกออก รังไข่จะมีลักษณะคล้ายพวงองุ่น ใช้กรรไกรตัดส่วนของรังไข่ออกจากเอ็นยึดรังไข่และตัวมดลูก นำรังไข่ไปชั่ง น้ำหนัก

3.6 เนื้อเยื่อไขมัน

ใช้กรรไกรตัดเนื้อเยื่อไขมันบริเวณหน้าท้องของสัตว์ทดลอง โดยไขมันเพอริโกนาดาล (Perigonadal fat) จะเป็นไขมันที่ติดกับอวัยวะสืบพันธุ์ของสัตว์ทดลอง ส่วนไขมันเรโทเพอริโทเนียล (Retroperitoneal fat) เป็นไขมันที่ติดกับไต และไขมันแมสเซนเทอริก (Mesenteric fat) เป็นเนื้อเยื่อไขมันพยุงอวัยวะภายในช่องท้อง



ภาพภาคผนวก 3 ชนิดและตำแหน่งเนื้อเยื่อไขมันของสัตว์ทดลอง

ที่มา: Berryman, & List, 2017

4. การเตรียมชิ้นเนื้อ เพื่อนำไปวิเคราะห์จุลพยาธิวิทยา

หลังจากชั่งน้ำหนักและถ่ายรูปอวัยะแล้ว นำอวัยวะหัวใจ ตับ ม้าม ไต อัณฑะและรังไข่ รวมทั้งเนื้อเยื่อไขมัน มาตัดแต่งเพื่อเอาบริเวณที่ต้องการให้ติดบนสไลด์จัดใส่ตลับพลาสติก (Cassettes) แช่ในน้ำยาตรึงสภาพฟอร์มาดีไฮด์บัฟเฟอร์ (Formaldehyde neutral buffer; 10% ฟอร์มาลิน 238 มล., น้ำกลั่น 762 มล. pH 7.4) ทันที จากนั้นนำแช่ในตู้แช่แข็ง -20°ซ จนกระทั่งใช้งาน

4.1 **การล้าง** (Washing)

ล้างชิ้นเนื้อที่ตรึงสภาพมาแล้วด้วยน้ำไหลผ่าน (Running water) เป็นเวลา 20-30 นาที เพื่อให้น้ำยาตรึงสภาพถูกขับออกไปจากชิ้นเนื้อ

4.2 **การดูดน้ำออกจากเซลล์ชิ้นเนื้อ** (Dehydration)

เป็นการเอาน้ำออกจากตัวอย่าง หลังจากล้างเพื่อให้พร้อมต่อการยอมให้ Embedding media ซึมผ่านเข้าไปได้ โดยใช้เอทานอลเป็นตัวดูดน้ำออกจากเซลล์ (Dehydrant) นำชิ้นเนื้อแช่เอทานอลแต่ละความเข้มข้นที่ 80% (ครึ่งชั่วโมง), 85% (2 ชั่วโมง), 95% (1 ชั่วโมง), 100% (1 ชั่วโมง), 100% (1 ชั่วโมง) และ 100% (1 ชั่วโมง) ตามลำดับ โดยใช้เครื่องเตรียมชิ้นเนื้ออัตโนมัติ

4.3 **การทำให้ใส** (Clearing)

เป็นการนำสารเคมีตัวที่ยอมให้ Embedding media แทรกซึมเข้าสู่เซลล์เนื้อเยื่อได้ โดยแช่ชิ้นเนื้อในไซลีน (Xylene) จำนวน 3 อ่าง และแต่ละอ่างใช้เวลาในการแช่ชิ้นเนื้อที่ 1, 1 และ 2 ชั่วโมง ตามลำดับ โดยใช้เครื่องเตรียมชิ้นเนื้ออัตโนมัติ

4.4 การคงรูปโครงสร้าง (Impregnation)

เป็นการขจัดเอาไซลีนออกจากชิ้นเนื้อ แล้วแทนที่ด้วย Embedding media โดยใช้พาราฟิน (Paraffin) เป็น Embedding media (หลอมเหลวพาราฟินที่อุณหภูมิ 58°ซ) ซึ่งจะทำให้เซลล์และเนื้อเยื่อตลอดจนโครงสร้างภายในเนื้อเยื่อคงรูปและแข็งพอที่จะตัดเป็นสไลด์ชิ้นเนื้อได้ โดยแช่เนื้อในอ่างพาราฟิน จำนวน 2 อ่าง และแต่ละอ่างใช้เวลาในการแช่ชิ้นเนื้อที่ 2 และ 1.5 ชั่วโมง ด้วยเครื่องเตรียมชิ้นเนื้ออัตโนมัติ

4.5 การทำบล็อกตัวอย่าง (Embedding)

วางชิ้นเนื้อด้านที่ต้องการจะตัดให้อยู่ด้านล่างติดกับพื้นของแม่พิมพ์ (ถาดอลูมิเนียม) จากนั้นหล่อด้วยพาราฟินให้เต็มแม่พิมพ์ (ให้ความร้อนอยู่เสมอขณะจัดเรียง ชิ้นเนื้อ) ทาบตลับพลาสติก (Cassettes) ลงไปบนแม่พิมพ์ ปล่อยให้เย็นที่อุณหภูมิ -20°ซ

4.6 การตัดบล็อกชิ้นเนื้อ (Sectioning)

ตัดพาราฟินส่วนเกินทั้ง 4 ด้านออกไป (Trimming) จากนั้นนำบล็อกที่ตัดแต่งแล้วใส่ในช่องยึดตัวอย่าง (Block holder) จับยึดบล็อกตัวอย่างให้แน่นจึงตัดบล็อกตัวอย่างด้วย Microtome โดยให้ความหนาของชิ้นเนื้อที่ประมาณ 4-7 ไมโครเมตร จากนั้นนำชิ้นเนื้อที่ตัดแล้วแช่ในน้ำอุณหภูมิประมาณ 43-45°ซ นำกระจกสไลด์ไปแตะติดกับชิ้นเนื้อที่ลอยอยู่และทำมุม 45°ซ ขึ้นจากน้ำอุ่น (แผ่นชิ้นเนื้อจะเกาะติดกับสไลด์ขึ้นมา) จากนั้นนำไปอบในตู้อบลมร้อน

4.7 การย้อมสี (Staining)

การย้อมสีจะใช้สี 2 ชนิด คือ เฮมาโทไซลิน (Hematoxylin) ทำปฏิกิริยากับกรดนิวคลิอิคและเนื้อเยื่อที่เป็นกรดทำให้เกิดสีน้ำเงินหรือสีน้ำเงินแกมดำ และสีอีกชนิดหนึ่ง คือ อีโอซิน (Eosin) ซึ่งทำปฏิกิริยากับเนื้อเยื่อที่เป็นด่าง โดยเฉพาะอย่างยิ่งโปรตีนในไซโทพลาสซึมจะทำให้เกิดสีชมพูหรือสีชมพูแกมแดง ขั้นตอนการย้อมสี มีดังต่อไปนี้

4.7.1 ละลายพาราฟินในชิ้นเนื้อ โดยแช่น้ำยาไซลีน 2 ครั้งๆ ละ 2 นาที

4.7.2 จุ่มในน้ำกลั่นประมาณ 4 ครั้ง

4.7.3 ย้อมสีเฮมาโทไซลิน โดยแช่ไว้ในอ่างสีประมาณ 15 นาที

4.7.4 ล้างด้วยน้ำไหลผ่าน (Running water) ประมาณ 20 นาที

4.7.5 ย้อมสีทับด้วยอีโอซิน โดยแช่ประมาณ 15 วินาที ถึง 2 นาที

4.7.6 ดูดน้ำออกจากชิ้นเนื้อ โดยแช่ในเอทานอล 95% 2 ครั้งๆ ละ 2 นาที

4.7.7 ดูดน้ำออกจากชิ้นเนื้อ โดยแช่ในเอทานอล 100% 2 ครั้งๆ ละ 2 นาที

4.7.8 ทำชิ้นเนื้อให้ใส โดยแช่ในไซลีน 2 ครั้งๆ ละ 2 นาที

4.7.9 ปิดทับชิ้นเนื้อบนสไลด์ด้วย Cover glass และทำให้ปิดสนิทด้วยน้ำยาเปอร์เมาต์ (Permount)

ภาคผนวก ค ข้อมูลเสริม (Supplementary data)

ตารางภาคผนวก 1 ขีดจำกัดในการตรวจพบและขีดจำกัดในการวัดเชิงปริมาณของสารโภชนเภสัชในผลิตพลอยได้จากกระบวนการผลิตน้ำมันรำข้าว

Chemical constituents	LOD (ppm.)[a]	LOQ (ppm.)[b]
GABA	1.08	3.60
γ -oryzanol	0.05	0.17
Tocotrienol		
α –T3s	0.66	2.20
β –T3s	0.47	1.57
γ –T3s	0.52	1.73
δ –T3s	0.04	0.13
Tocopherol		
α - Ts	0.89	2.97
β -Ts	0.40	1.33
γ -Ts	0.49	1.63
δ - Ts	0.49	1.63
Phytosterol		
Campesterol	0.08	0.27
Stigmasterol	0.03	0.10
β -Sitosterol	0.20	0.67
Sitostanol	0.03	0.10
Policosanol		
Docosanol (C22)	1.88	6.27
Tetracosanol (C24)	1.44	4.80
Hexacosanol (C26)	1.31	4.37
Octacosanol (C28)	1.44	4.80
Triacontanol (C30)	1.75	5.83

GABA = γ –aminobuytyric acid; LOD = ขีดจำกัดในการตรวจพบ (Limit of detection); LOQ = ขีดจำกัดในวัดเชิงปริมาณ (Limit of quantitation)

[a]LOD คำนวณได้จาก $3S_0$ ของสารละลายแบลค์/slope (S_0 คือ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของสารละลาย Blank)

[b]LOQ คำนวณได้จาก $10S_0$ ของสารละลายแบลค์ (S_0 คือ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของสารละลาย Blank)

บัญชีหมายเลข 3

แนบท้ายประกาศกระทรวงสาธารณสุข (ฉบับที่ 182) พ.ศ. 2541

สารอาหารที่แนะนำให้บริโภคประจำวันสำหรับคนไทยอายุตั้งแต่ 6 ปีขึ้นไป (THAI RECOMMENDED DAILY INTAKES-THAI RDI)

ลำดับที่ (No.)	สารอาหาร (Nutrient)	ปริมาณที่แนะนำต่อวัน (Thai RDI)	หน่วย (Unit)
1	ไขมันทั้งหมด (Total Fat)	65*	กรัม (g)
2	ไขมันอิ่มตัว (Saturated Fat)	20*	กรัม (g)
3	โคเลสเตอรอล (Cholesterol)	300	มิลลิกรัม (มก.)
4	โปรตีน (Protein)	50*	กรัม (g)
5	คาร์โบไฮเดรตทั้งหมด (Total Carbohydrate)	300*	กรัม (g)
6	ใยอาหาร (Dietary Fiber)	25	กรัม (g)
7	วิตามินเอ (Vitamin A)	800	ไมโครกรัม อาร์ อี (µg RE)
8	วิตามินบี 1 (Thiamin)	1.5	มิลลิกรัม (มก.)
9	วิตามินบี 2 (Riboflavin)	1.7	มิลลิกรัม (มก.)
10	ไนอะซิน (Niacin)	20	ไมโครกรัม เอ็น อี (µg NE)
11	วิตามินบี 6 (Vitamin B6)	2	มิลลิกรัม (มก.)
12	โฟเลต (Folate)	200	ไมโครกรัม (µg)
13	ไบโอติน (Biotin)	150	ไมโครกรัม (µg)
14	กรดแพนโทธินิค (Pantothenic Acid)	6	มิลลิกรัม (มก.)
15	วิตามินบี 12 (Vitamin B12)	2	ไมโครกรัม (µg)
16	วิตามินซี (Vitamin C)	60	มิลลิกรัม (มก.)
17	วิตามินดี (Vitamin D)	5	ไมโครกรัม (µg)
18	วิตามินอี (Vitamin E)	10	มิลลิกรัม แอลฟา-ที อี (มก.α -TE)
19	วิตามินเค (Vitamin K)	80	ไมโครกรัม (µg)
20	แคลเซียม (Calcium)	800	มิลลิกรัม (มก.)
21	ฟอสฟอรัส (Phosphorus)	800	มิลลิกรัม (มก.)
22	เหล็ก (Iron)	15	มิลลิกรัม (มก.)
23	ไอโอดีน (Iodine)	150	ไมโครกรัม (µg)
24	แมกนีเซียม (Magnesium)	350	มิลลิกรัม (มก.)
25	สังกะสี (Zinc)	15	มิลลิกรัม (มก.)
26	ทองแดง (Copper)	2	มิลลิกรัม (มก.)
27	โพแทสเซียม (Potassium)	3,500	มิลลิกรัม (มก.)

ลำดับที่ (No.)	สารอาหาร (Nutrient)	ปริมาณที่แนะนำต่อวัน (Thai RDI)	หน่วย (Unit)
28	โซเดียม (Sodium)	2,400	มิลลิกรัม (มก.)
29	แมงกานีส (Manganese)	3.5	มิลลิกรัม (มก.)
30	ซีลีเนียม (Selenium)	70	ไมโครกรัม (µg)
31	ฟลูออไรด์ (Fluoride)	2	มิลลิกรัม (มก.)
32	โมลิบดินัม (Molybdenum)	160	ไมโครกรัม (µg)
33	โครเมียม (Chromium)	130	ไมโครกรัม (µg)
34	คลอไรด์ (Chloride)	3,400	มิลลิกรัม (มก.)
* ปริมาณของไขมันทั้งหมด ไขมันอิ่มตัว โปรตีน และคาร์โบไฮเดรต ที่แนะนำให้บริโภคต่อวันคิดจากการเปรียบเทียบพลังงานที่ควรได้จากสารอาหารดังกล่าวเป็นร้อยละ 30, 10, 10 และ 60 ตามลำดับของพลังงานทั้งหมด หากพลังงานทั้งหมดที่ควรได้รับต่อวันเป็น 2,000 กิโลแคลอรี (ไขมัน 1 กรัม ให้พลังงาน 9 กิโลแคลอรี, โปรตีน 1 กรัมให้พลังงาน 4 กิโลแคลอรี, คาร์โบไฮเดรต 1 กรัม ให้พลังงาน 4 กิโลแคลอรี)			

หมายเหตุ: 1. สำหรับน้ำตาลไม่ควรบริโภคเกินร้อยละ 10 ของพลังงานทั้งหมดที่ได้รับต่อวัน

2. คำอธิบายหน่วยของวิตามินเอ ไนอะซิน วิตามินอี และวิตามินดี

2.1 วิตามินเอ RE = Retinol equivalent

1 RE = 1 µg retinol = 6 µg β-carotene = 3.33 IU

2.2 ไนอะซิน NE = Niacin equivalent

1 NE = 1 มก. Niacin = 60 มก. Tryptophan

2.3 วิตามินอี α-TE = α-Tocopherol equivalent

1 α-TE = 1 มก. D-α-tocopherol = 1.5 IU

2.4 วิตามินดีมีหน่วยเป็น ไมโครกรัม โดยคำนวณเป็น cholecalciferol

1 µg = 40 IU

(สำเนา)

ประกาศกระทรวงสาธารณสุข

(ฉบับที่ 205) พ.ศ.2543

เรื่อง น้ำมันและไขมัน

โดยที่เป็นการสมควรปรับปรุงประกาศกระทรวงสาธารณสุขว่าด้วยเรื่อง น้ำมันและไขมัน อาศัยอำนาจตามความในมาตรา 5 และมาตรา 6(3)(4)(5)(6)(7) และ (10) แห่งพระราชบัญญัติอาหาร พ.ศ.2522 อันเป็นพระราชบัญญัติที่มีบทบัญญัติบางประการเกี่ยวกับการจำกัดสิทธิและเสรีภาพของบุคคล ซึ่งมาตรา 29 ประกอบกับมาตรา 35 มาตรา 48 และมาตรา 50 ของรัฐธรรมนูญแห่งราชอาณาจักรไทยบัญญัติให้กระทำได้โดยอาศัยอำนาจตามบทบัญญัติแห่งกฎหมาย รัฐมนตรีว่าการกระทรวงสาธารณสุขออกประกาศไว้ ดังต่อไปนี้

ข้อ 1 ให้ยกเลิก

(1) ประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 22 (พ.ศ. 2522) เรื่อง กำหนดน้ำมันและไขมันเป็นอาหารควบคุมเฉพาะและกำหนดคุณภาพหรือมาตรฐาน วิธีการผลิต และฉลากสำหรับน้ำมันและไขมัน ลงวันที่ 13 กันยายน พ.ศ. 2522

(2) ประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 72 (พ.ศ. 2525) เรื่อง แก้ไขเพิ่มเติมประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 22 (พ.ศ. 2522) ลงวันที่ 19 พฤศจิกายน พ.ศ. 2525

(3) ประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 134 (พ.ศ. 2534) เรื่อง น้ำมันและไขมันผสม (ฉบับแก้ไขเพิ่มเติม) ลงวันที่ 15 กุมภาพันธ์ พ.ศ. 2534

(4) ประกาศกระทรวงสาธารณสุข (ฉบับที่ 164) พ.ศ. 2538 เรื่อง แก้ไขเพิ่มเติม ประกาศกระทรวงสาธารณสุขว่าด้วย เรื่อง น้ำมันและไขมัน (ฉบับที่ 3) ลงวันที่ 19 กรกฎาคม พ.ศ. 2538

ข้อ 2 ให้น้ำมันและไขมันที่ใช้เป็นอาหารได้ ซึ่งได้แก่ กลีเซอร์ไรด์ของกรดไขมันต่างๆ ที่ได้จาก พืชหรือสัตว์ซึ่งใช้เป็นอาหารและบรรจุในภาชนะที่ปิดสนิท กล่อง ซอง หรือสิ่งห่อหุ้มที่ปิดผนึกเพื่อจำหน่ายเป็นอาหารที่กำหนดคุณภาพหรือมาตรฐาน ทั้งนี้ไม่รวมถึงเนยและเนยเทียม

ข้อ 3 น้ำมันและไขมันที่ใช้เป็นอาหาร แบ่งออกเป็นสามชนิด

(1) น้ำมันและไขมันที่ได้จากพืช

(2) น้ำมันและไขมันที่ได้จากสัตว์

(3) น้ำมันและไขมันผสม ได้แก่ น้ำมันและไขมันที่ได้จากพืชต่างชนิดผสมกันไม่เกินสองชนิด หรือน้ำมันและไขมันที่ได้จากพืชหรือสัตว์ตั้งแต่สองชนิดขึ้นไปที่ผสมกันโดยผ่านกรรมวิธี

ไฮโดรจีเนชั่น (Hydrogenation) หรือเอสเตอร์ริฟิเคชั่น (Esterification) หรือน้ำมันและไขมันผสมตามชนิดและกรรมวิธีอื่นที่ได้รับความเห็นชอบจากสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา

ข้อ 4 พืชหรือไขมันของสัตว?ที่จะนำมาผลิตเอาน้ำมันและไขมัน ต้องมีสภาพที่เหมาะสมจะใช้ผลิตอาหาร และอยู่ในสภาพที่ให้น้ำมันและไขมันซึ่งบริโภคได้โดยปราศจากอันตราย

ข้อ 5 วิธีการผลิตน้ำมันและไขมันให้ทำได้ ดังนี้

(1) วิธีธรรมชาติ ทำโดยการบีบอัดโดยใช้ความร้อนหรือวิธีธรรมชาติอื่นตามที่ ได้รับความเห็นชอบจากสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา และนำมาทำให้สะอาดโดยการล้าง การตั้งไว้ให้ตกตะกอน การกรอง หรือการหมุนเหวี่ยง

(2) วิธีผ่านกรรมวิธี ทำโดยนำน้ำมันและไขมันที่ได้จากวิธีธรรมชาติ หรือที่ได้จากการสกัดด้วยสารละลายตามที่ได้รับความเห็นชอบจากสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา และนำมาผ่านกรรมวิธีทำให้บริสุทธิ์อีกครั้งหนึ่ง

(3) วิธีอื่นตามที่ได้รับความเห็นชอบจากสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา

ข้อ 6 น้ำมันและไขมันต้องมีคุณภาพหรือมาตรฐาน ดังต่อไปนี้

(1) มีค่าของกรด (Acid Value) คิดเป็นมิลลิกรัมโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ต่อน้ำมัน หรือไขมัน 1 กรัม

(1.1) ได้ไม่เกิน 4.0 สำหรับน้ำมันและไขมันซึ่งทำโดยวิธีธรรมชาติ

(1.2) ได้ไม่เกิน 0.6 สำหรับน้ำมันและไขมันซึ่งทำโดยวิธีผ่านกรรมวิธี

(1.3) ได้ไม่เกิน 4.0 สำหรับน้ำมันและไขมันผสมซึ่งทำโดยวิธีธรรมชาติ

(1.4) ได้ไม่เกิน 0.6 สำหรับน้ำมันและไขมันผสมซึ่งทำโดยวิธีผ่านกรรมวิธี

(1.5) ได้ไม่เกิน 1.0 สำหรับน้ำมันและไขมันซึ่งทำโดยวิธีผ่านกรรมวิธีผสมกับน้ำมันและไขมันซึ่งทำโดยวิธีธรรมชาติ

(2) มีค่าเพอร์ออกไซด์ (Peroxide Value) คิดเป็นมิลลิกรัมสมมูลย์ต่อน้ำมันและไขมัน 1 กิโลกรัม ได้ไม่เกิน 10

(3) มีน้ำและสิ่งที่ระเหยได้ (Water and Volatile Matter) ที่อุณหภูมิ105 องศาเซลเซียส ได้ไม่เกินร้อยละ 0.2 ของน้ำหนัก

(4) มีปริมาณสบู่ (Soap Content) ได้ไม่เกินร้อยละ 0.005 ของน้ำหนัก

(5) มีสิ่งอื่นที่ไม่ละลาย (Insoluble Impurities) ได้ไม่เกินร้อยละ 0.05 ของน้ำหนัก

(6) มีกลิ่นและรสตามลักษณะเฉพาะของน้ำมันและไขมัน ยกเว้นน้ำมันและไขมัน ผสม

(7) ไม่มีกลิ่นหืน

(8) ตรวจพบสารปนเปื้อนได้ไม่เกินที่กำหนด ดังต่อไปนี้

(8.1) ไม่พบน้ำมันแร่ (Mineral oil)

(8.2) เหล็ก ในน้ำมันหรือไขมันธรรมชาติและในน้ำมันหรือไขมันผสมไม่เกิน 5.0 มิลลิกรัม ต่อน้ำมันหรือไขมัน 1 กิโลกรัม ในน้ำมันหรือไขมันผ่านกรรมวิธีไม่เกิน 1.5 มิลลิกรัม ต่อน้ำมันหรือไขมัน 1 กิโลกรัม

(8.3) ทองแดง ในน้ำมันหรือไขมันธรรมชาติและในน้ำมันหรือไขมันผสมไม่เกิน 0.4 มิลลิกรัม ต่อน้ำมันหรือไขมัน 1 กิโลกรัม ในน้ำมันหรือไขมันผ่านกรรมวิธีไม่เกิน 0.1 มิลลิกรัม ต่อน้ำมันหรือไขมัน 1 กิโลกรัม

(8.4) ตะกั่ว ไม่เกิน 0.1 มิลลิกรัม ต่อน้ำมันหรือไขมัน 1 กิโลกรัม

(8.5) สารหนู ไม่เกิน 0.1 มิลลิกรัม ต่อน้ำมันหรือไขมัน 1 กิโลกรัม

(8.6) อัฟลาทอกซิน (Aflatoxin) ไม่เกิน 20 ไมโครกรัม ต่อน้ำมันหรือไขมัน 1 กิโลกรัม (ไม่เกิน 20 ส่วนในพันล้านส่วน)

(8.7) ไซโคลโพรพีนอย แฟตตี้ แอซิด (Cyclopropenoid Fatty Acid) ไม่เกินร้อยละ 0.4 โดยน้ำหนัก น้ำมันและไขมันผสมนอกจากต้องมีคุณภาพหรือมาตรฐานตามวรรคหนึ่งแล้ว อาจมีคุณภาพหรือมาตรฐานอื่นตามที่ได้รับความเห็นชอบจากสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยาด้วยก็ได้ น้ำมันและไขมันที่ผลิตตามวิธีอื่นในข้อ 5(3) ให้มีคุณภาพหรือมาตรฐานตามที่ได้รับความเห็นชอบจากสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา

ข้อ 7 การใช้วัตถุเจือปนอาหารให้ใช้ได้ตามชนิดและปริมาณที่กำหนดไว้ในบัญชีท้ายประกาศนี้ การใช้วัตถุเจือปนอาหารชนิดอื่นนอกจากที่กำหนดให้ใช้ได้ตามวรรคแรก ต้องได้รับความเห็นชอบจากสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา

ข้อ 8 ผู้ผลิตหรือนำเข้าน้ำมันและไขมันเพื่อจำหน่ายต้องปฏิบัติตามประกาศกระทรวงสาธารณสุขว่าด้วยเรื่อง วิธีการผลิต เครื่องมือเครื่องใช้ในการผลิต และการเก็บรักษาอาหาร

ข้อ 9 การใช้ภาชนะบรรจุน้ำมันและไขมัน ให้ปฏิบัติตามประกาศกระทรวงสาธารณสุขว่าด้วยเรื่อง ภาชนะบรรจุ

ข้อ 10 การแสดงฉลากของน้ำมันและไขมัน ให้ปฏิบัติตามประกาศกระทรวงสาธารณสุขว่าด้วยเรื่อง ฉลาก

ข้อ 11 ให้ใบสำคัญการขึ้นทะเบียนตำรับอาหารหรือใบสำคัญการใช้ฉลากอาหารตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 22 (พ.ศ. 2522) เรื่อง กำหนดน้ำมันและไขมันเป็นอาหารควบคุมเฉพาะ และกำหนดคุณภาพหรือมาตรฐาน วิธีการผลิต และฉลาก สำหรับน้ำมันและไขมัน

ลงวันที่ 13 กันยายน พ.ศ. 2522 แก้ไขเพิ่มเติมโดยประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 72 (พ.ศ. 2525) เรื่อง แก้ไขเพิ่มเติมประกาศ กระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 22 (พ.ศ. 2522) ลงวันที่ 19 พฤศจิกายน พ.ศ. 2525 ประกาศกระทรวง สาธารณสุข ฉบับที่ 134 (พ.ศ. 2534) เรื่อง น้ำมันและไขมันผสม (ฉบับแก้ไขเพิ่มเติม) ลงวันที่ 15 กุมภาพันธ์ พ.ศ. 2534 และประกาศกระทรวงสาธารณสุข (ฉบับที่ 164) พ.ศ. 2538 เรื่อง แก้ไขเพิ่มเติม ประกาศกระทรวงสาธารณสุขว่าด้วยเรื่อง น้ำมันและไขมัน (ฉบับที่ 3) ลงวันที่ 19 กรกฎาคม พ.ศ. 2538 ซึ่งออกให้ก่อนวันที่ประกาศนี้ใช้บังคับยังคงใช้ต่อไปได้อีกสองปี นับแต่ประกาศนี้ใช้บังคับ

ข้อ 12 ให้ผู้ผลิต ผู้นำเข้าน้ำมันและไขมันที่ได้รับอนุญาตอยู่ก่อนวันที่ประกาศนี้ใช้บังคับยื่นคำขอรับเลขสารบบอาหารภายในหนึ่งปี นับแต่วันที่ประกาศนี้ใช้บังคับ เมื่อยื่นคำขอดังกล่าวแล้วให้ได้รับการผ่อนผันการปฏิบัติตามข้อ 8 ภายในสองปี นับแต่วันที่ประกาศนี้ใช้บังคับ และให้คงใช้ฉลากเดิมที่เหลืออยู่ต่อไปจนกว่าจะหมดแต่ต้องไม่เกินสองปี นับแต่วันที่ประกาศนี้ใช้บังคับ

ข้อ 13 ประกาศนี้ ให้ใช้บังคับเมื่อพ้นกำหนดหนึ่งร้อยแปดสิบวันนับแต่วันถัดจากวันประกาศในราชกิจจานุเบกษา เป็นต้นไป

ประกาศ ณ วันที่ 19 กันยายน พ.ศ. 2543

กร ทัพพะรังสี

รัฐมนตรีว่าการกระทรวงสาธารณสุข

(ราชกิจจานุเบกษาฉบับประกาศทั่วไป เล่ม 118 ตอนพิเศษ 6 ง. ลงวันที่ 24 มกราคม พ.ศ. 2544)

บัญชีแนบท้ายประกาศกระทรวงสาธารณสุข (ฉบับที่ 205) พ.ศ. 2543
เรื่อง น้ำมันและไขมัน

อันดับ	ประเภทวัตถุเจือปนอาหาร	ชื่อวัตถุเจือปนอาหาร	ปริมาณสูงสุดที่ให้ใช้ได้เป็นมิลลิกรัมต่อกิโลกรัม	หมายเหตุ
1	สี (Color): ให้ใช้ได้เพื่อความมุ่งหมายที่จะทำให้ผลิตภัณฑ์มีสีเหมือนธรรมชาติ	1.1 เบตา-คาโรทีน (Beta-carotene)	25	
		1.2 สีคำแสด (Annatto extract)	20	
		1.3 เคอร์คิวมิน หรือเทอร์เมอริค (Curcumin or turmeric)	5	คำนวณเป็น Bixin หรือ Norbixin ทั้งหมดคำนวณเป็น Total curcumin
		1.4 เบตา-อะโป-8'-คาโรทีนาล (Beta-apo-8'-carotenal)	25	
		1.5 เมทิลและเอทิลเอสเทอร์ของกรดเบตา-อะโป-8'-คาโรทีโนอิคแอซิด (Methyl and ethyl ester of beta-apo-8'-carotenoic acid)	25	
2	การแต่งกลิ่น (Flavours): ให้ใช้กลิ่น สังเคราะห์ได้ ทั้งนี้วัตถุประสงค์ดังกล่าวจะต้องไม่เป็นอันตรายแก่สุขภาพและ ไม่ทำให้ผู้บริโภคเข้าใจผิดว่าเป็นการปิดบังซ่อนเร้นความด้อยคุณภาพของน้ำมันหรือไขมัน หรือทำให้น้ำมันหรือไขมันนั้นมีคุณค่าสูงกว่าความเป็นจริงไขมันนั้นมีคุณค่าสูงกว่าความเป็นจริง			

อันดับ	ประเภทวัตถุเจือปนอาหาร	ชื่อวัตถุเจือปนอาหาร	ปริมาณสูงสุดที่ให้ใช้ได้เป็นมิลลิกรัมต่อกิโลกรัม	หมายเหตุ
3	วัตถุกันหืน (antioxidants)	3.1 โพรพิล แกลเลท (Propyl gallate)	100	
		3.2 บิวทิเลเตด ไฮดรอกซีโทลูอีน (Butylated hydroxytoluene, BHT)	75	
		3.3 บิวทิเลเตด ไฮดรอกซีอะนีโซล (Butylated hydroxyanisole, BHA)	175	
		3.4 เทอร์ไทอารี บิวทิล ไฮโดรควิโนน (Tertiary butyl hydroquinone, TBHQ)	120	
		3.5 โพรพิล แกลเลท (Propyl gallate) รวมกับ BHA หรือ BHT หรือ TBHQ หรือรวมทั้งสามอย่างใช้รวมกัน	200 แต่ปริมาณการใช้ของแต่ละตัวต้องไม่เกินปริมาณที่กำหนดใน 3.1, 3.2, 3.3 และ 3.4	วัตถุกันหืนตาม 3.6 และ 3.7 จะใช้อย่างใดอย่างหนึ่ง หรือรวมกันได้ไม่เกิน 500 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม
		3.6 แอสคอร์บิลพัลมิเตท (Ascorbyl palmitate)	500	
		3.7 แอสคอร์บิลสเตียเรท (Ascorbyl stearate)	500	
		3.8 โทโคเฟอรอลส์ชนิดธรรมชาติและชนิดสังเคราะห์ (Natural and synthetic tocopherols)	500	
		3.9 ไดลอริล ไธโอไดโพรพิโอเนท (Dilauryl thiodipropionate)	200	

อันดับ	ประเภทวัตถุเจือปนอาหาร	ชื่อวัตถุเจือปนอาหาร	ปริมาณสูงสุดที่ให้ใช้ได้เป็นมิลลิกรัมต่อกิโลกรัม	หมายเหตุ
4	สารเสริมฤทธิ์วัตถุกันหืน (Antioxidant synergists)	4.1 กรดซิตริคและโซเดียมซิเตรท (Citric acid and sodium citrate) 4.2 ไอโซโพรพิลซิเตรท (Isopropylcitrate) 4.3 กรดฟอสฟอริค (Phosphoric acid) 4.4 โมโนกลีเซอไรด์ซิเตรท (Monoglyceride citrate)	ตาม GMP 100 100 100	สารเสริมฤทธิ์วัตถุกันหืนตามข้อ 4.2 4.3 และ 4.4 จะใช้อย่างใดอย่างหนึ่ง หรือใช้รวมกันได้ไม่เกิน 100 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม
5	วัตถุกันฟอง (Antifoaming agents)	ไดเมทิลโพลีซิลอกเซน (Dimethyl polysiloxane หรือ Dimethy silicone) อย่างเดียวหรือผสมกับซิลิคอนไดออกไซด์ (Silicon dioxide)	10	
6	วัตถุกันตกผลึก (Crystallization inhibitor)	ออกซีสเตียริน (Oxystearin)	1,250	