

ฤทธิ์การป้องกันภาวะเครียดจากออกซิเดชันในเซลล์ลำไส้มนุษย์
ของข้าวหมากจากข้าวเหนียวดำพันธุ์ลิ้มผัว
(*Oryza sativa* L. variety Leum Phua)

Preventive Effect of Oxidative Stress in Human Intestinal
Cell Line (Caco2-cell) of Kao Mak Made from Black
Glutinous Rice (*Oryza sativa* L. variety Leum Phua)

ยศพร พลายไธ*

หลักสูตรโภชนาการและการประกอบอาหาร โรงเรียนการเรือน มหาวิทยาลัยสวนดุสิต
ถนนสิรินธร แขวงบางพลัด เขตบางพลัด กรุงเทพมหานคร 10700

Yossaporn Plaitho*

Department of Nutrition and Culinary, School of Culinary Arts, Suan Dusit University,
Sirindhorn Road, Bangphlat, Bangkok 10700

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อหาปริมาณวิตามินอี โพลีฟีนอลทั้งหมด แอนโทไซยานินทั้งหมด แกมมาโอไรซานอล สมบัติในการต้านอนุมูลอิสระ และศักยภาพในการป้องกันภาวะเครียดจากออกซิเดชันในเซลล์ลำไส้มนุษย์ของข้าวหมาก ทั้งที่ไม่ผ่านและผ่านการจำลองการย่อยในระบบทางเดินอาหาร ข้าวหมากเตรียมจากข้าวเหนียวดำพันธุ์ลิ้มผัวหุงสุก หมักกับลูกแป้งนาน 3 วัน ผลการศึกษาพบว่าข้าวหมากที่ผ่านการจำลองการย่อยมีปริมาณวิตามินอีและโพลีฟีนอลทั้งหมดมากกว่าข้าวหมากที่ไม่ผ่านการจำลองการย่อย และข้าวเหนียวดำสุกตามลำดับ อย่างไรก็ตามพบว่าข้าวหมากที่ไม่ผ่านการจำลองการย่อยมีปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมดสูงสุด ขณะที่ข้าวเหนียวดำสุกมีปริมาณแกมมาโอไรซานอลมากที่สุด ผลการต้านอนุมูลอิสระของตัวอย่างที่ศึกษาด้วยวิธี DPPH และ FRAP แสดงให้เห็นว่าข้าวหมากที่ผ่านการจำลองการย่อยมีประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระสูงกว่าข้าวหมากที่ไม่ผ่านการจำลองการย่อย และข้าวเหนียวดำสุก ตามลำดับ สิ่งที่น่าสนใจในงานวิจัยนี้ คือ เซลล์ลำไส้ที่ได้รับสารสกัดตัวอย่างร่วมกับ H_2O_2 มีปริมาณการหลั่ง IL-8 ลดลง เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมผลบวก (ได้รับ H_2O_2 เพียงอย่างเดียว) นอกจากนี้ยังพบว่าข้าวหมากที่ผ่านการจำลองการย่อยมีฤทธิ์ยับยั้งการหลั่ง IL-8 ดีกว่าข้าวหมากไม่ผ่านการย่อย และข้าวเหนียวดำสุก ตามลำดับ

คำสำคัญ : ข้าวเหนียวดำ; ข้าวหมาก; การจำลองการย่อย; ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ; ภาวะเครียดจากออกซิเดชัน

*ผู้รับผิดชอบบทความ : yossaphorn@hotmail.com

Abstract

The aim of this study was to determine the contents of vitamin E, total polyphenols, total anthocyanins, gamma oryzanol, the antioxidant activity and the activity against oxidative stress in human intestinal cell line (Caco2-cell) of non-digested and *in vitro* digested Kao Mak. Kao Mak was prepared by fermenting cooked black glutinous rice (*Oryza sativa* L. variety Leum Phua) with Look Pang for 3 days. The results indicated that the *in vitro* digested Kao Mak contained higher vitamin E and total polyphenols than those of both non-digested one and cooked black glutinous rice, respectively. However, it was shown that non-digested Kao Mak had the highest amount of total anthocyanins while cooked black glutinous rice had the highest amount of gamma oryzanol. The antioxidant activities assayed using DPPH and FRAP methods showed that the *in vitro* digested Kao Mak exhibited higher antioxidant capacities than those of the non-digested one and the cooked black glutinous rice, respectively. The most interested of this study was shown that the extracts from all samples with H₂O₂ reduced the secretion of IL-8 by Caco2-cell when compared with positive control group (treated with H₂O₂ alone). In addition, it was found that *in vitro* digested Kao Mak had better inhibition on IL-8 secretion than that of both non-digested one and cooked black glutinous rice, respectively.

Keywords: black glutinous rice; Kao Mak; *in vitro* digestion; antioxidant activity; oxidative stress

1. บทนำ

ข้าวเหนียวดำพันธุ์ลิ้มผั่ว (*Oryza sativa* L. variety Leum Phua) มีสารสำคัญหลายชนิดที่เป็นประโยชน์ต่อร่างกาย เช่น กรดไขมันไม่อิ่มตัวในกลุ่มโอเมกา 3 โอเมกา 6 และโอเมกา 9 เหล็ก แคลเซียม แมงกานีส วิตามินอี แอนโทไซยานิน และแกมมาโอไรซานอล [1] Subasree [2] ได้ระบุว่าวิตามินอีสามารถยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชันที่เกิดกับแอลดีแอลคอเลสเตอรอล (LDL cholesterol) กรดไขมันไม่อิ่มตัวหลายตำแหน่ง และผนังเซลล์ ซึ่งช่วยให้เซลล์ในร่างกายไม่ถูกทำลายด้วยอนุมูลอิสระ อีกทั้งบทความวิจัยหลายบทความได้ระบุว่า วิตามินอีช่วยลดการอักเสบ ลดความเสี่ยงของการเกิดโรคหลอดเลือดหัวใจ (coronary heart disease) ป้องกันการเกิดมะเร็งในอวัยวะต่าง ๆ เช่น ลำไส้ใหญ่ ปอด เต้านม และต่อม

ลูกหมาก [3] แอนโทไซยานินเป็นรงควัตถุที่ให้สีแดง น้ำเงิน หรือม่วงที่พบในพืชนั้นจัดเป็นสารในกลุ่มโพลีฟีนอลที่มีสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระ จึงสามารถช่วยลดความเสี่ยงของการเกิดโรคหัวใจ มะเร็ง เบาหวาน และข้ออักเสบได้ [4-6] ส่วนแกมมาโอไรซานอลซึ่งพบในรำข้าว เมล็ดข้าว เปลือกข้าว และเอนโดสเปอร์ม [7] มีบทบาทสำคัญในการยับยั้งการเกิดอนุมูลอิสระและการเกาะตัวของเกล็ดเลือด รวมถึง ช่วยลดการอักเสบ ช่วยลดระดับคอเลสเตอรอล และช่วยเพิ่มระดับเอช ดีแอล คอเลสเตอรอล (HDL cholesterol) ในกระแสเลือด [8-10]

การหมักถูกนำมาใช้ถนอมอาหารบางชนิด อาหารหมักพื้นบ้านของไทยที่รู้จักกันดี คือ ข้าวหมาก ซึ่งได้จากการนำข้าวเหนียวที่หุงสุกแล้วไปหมักกับลูกแป้งข้าวหมากที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2-3 วัน ได้

ผลิตภัณฑ์มีลักษณะนุ่ม ชุ่มน้ำ ซึ่งอาจเปรี้ยวเล็กน้อย พร้อมรสชาติของแอลกอฮอล์และมีกลิ่นรสตามธรรมชาติจากการหมัก [11] กลิ่นและรสชาติที่พบในข้าวหมากเกิดจากราที่อยู่ในลูกแป้ง เช่น *Aspergillus* spp., *Mucor* spp., *Rhizopus oryzae* หรือ *Amylomyces rouxii* สร้างเอนไซม์อะไมเลสออกมาย่อยแป้งในข้าวเหนียวได้เป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว เช่น กลูโคส กาแลกโตส และฟรุคโตส เมื่อแป้งในข้าวถูกย่อยจึงไม่สามารถอุ้มน้ำไว้ได้ทำให้น้ำที่มีอยู่ซึมออกมาเป็นน้ำเชื่อมข้าว จากนั้นยีสต์ เช่น *Saccharomyces cerevisiae* ที่อยู่ในลูกแป้งจะเปลี่ยนน้ำตาลให้เป็นแอลกอฮอล์ รวมถึงมีแบคทีเรีย เช่น *Acetobacter* spp. และ *Gluconobacter* spp. ที่ผลิตกรดอะซิติก *Pediococcus* และ *Lactobacillus* ที่ผลิตกรดแลกติก นอกจากนี้ในลูกแป้งยังมีแป้งข้าวเจ้า และสมุนไพรต่าง ๆ เช่น กระเทียม พริกไทย และข่า ที่มีส่วนช่วยยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ก่อโรค [12-16] จากบทความของไชยวัฒน์ [17] ทำให้กล่าวได้ว่าข้าวหมากเป็นอาหารที่มีประโยชน์ต่อร่างกาย เนื่องจากมีจุลินทรีย์ในกลุ่มโพรไบโอติก (probiotic) ที่ช่วยปรับสมดุลของระบบทางเดินอาหารและระบบขับถ่าย ช่วยกระตุ้นการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย ลดอาการภูมิแพ้และการอักเสบ ลดระดับโคเลสเตอรอลในกระแสเลือด และอาจมีผลป้องกันการเกิดสารก่อมะเร็ง นักวิจัยหลายท่านพบว่าข้าว ข้าวสาลี ข้าวฟ่าง หรือข้าวโอ๊ตที่หมักด้วย *Agaricus blazei* Murrill หรือข้าวกล้องแดงที่หมักด้วยลูกแป้ง(ragi)หรือรำข้าวที่หมักด้วย *Rhizopus oryzae*, *Rhizopus oligosporus* หรือ *Monascus purpureus* มีปริมาณโพลีฟีนอลทั้งหมดและประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระเพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับอาหารที่ไม่ผ่านการหมัก [18-22] ที่น่าสนใจ คือ การศึกษาของ Plaitho และคณะ [23] ที่แสดงให้เห็นว่าข้าวหมากจากข้าวหอมมะลิแดง

ข้าวมันปู ข้าวสังข์หยด ข้าวหอมนิล ข้าวไรซ์เบอร์รี่ และข้าวเหนียวดำมีปริมาณสารโพลีฟีนอล แอนโทไซยานิน ศักยภาพในการต้านการเกิดอนุมูลอิสระ และฤทธิ์ต้านการก่อกลายพันธุ์ในแมลงหวี่สูงขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับข้าวพันธุ์เดียวกันที่ไม่ผ่านการหมัก โดยข้าวหมากจากข้าวเหนียวดำให้ผลจากการศึกษาที่ดีที่สุด

มีผู้สนใจว่าการย่อยอาหารในระบบทางเดินอาหารมนุษย์นั้นมีผลต่อสารสำคัญในอาหารหรือไม่ ผลการศึกษาของ Bhatt และ Patel [24] แสดงให้เห็นว่ากระเทียมที่ผ่านการจำลองการย่อยในระบบทางเดินอาหารมีปริมาณสารโพลีฟีนอลและศักยภาพในการต้านอนุมูลอิสระเพิ่มขึ้นซึ่งคล้ายกับการศึกษาของ Ti และคณะ [25] ที่พบว่าข้าวกล้องสุกและข้าวขาวสุกที่ผ่านการจำลองการย่อยมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิก สารฟลาโวนอยด์ และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างที่ไม่ผ่านการย่อย อย่างไรก็ตามแม้ว่าข้าวกล้องสุก น้อยหน่า ทุเรียน พลัม และองุ่นดำที่ผ่านการจำลองการย่อยจะมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกเพิ่มสูงขึ้นแต่ประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระเมื่อวัดด้วยวิธี DPPH กลับลดลง [26-27] ซึ่ง Correa-Betanzo และคณะ [28] พบว่าลูเบอร์รี่ที่ผ่านการจำลองการย่อยมีปริมาณโพลีฟีนอล แอนโทไซยานิน และศักยภาพในการต้านอนุมูลอิสระลดลงเช่นกัน ซึ่งไม่ต่างจากการศึกษาในองุ่นของ Granese และคณะ [29]

จากข้อมูลข้างต้น ผู้วิจัยจึงสนใจนำข้าวหมากจากข้าวเหนียวดำพันธุ์ลิ้มฟัวที่ไม่ผ่านและผ่านการจำลองการย่อยในร่างกายมนุษย์มาหาปริมาณวิตามินอี โพลีฟีนอลทั้งหมด แอนโทไซยานินทั้งหมด แกมมาโอไรซานอล สมบัติในการต้านอนุมูลอิสระ และศักยภาพในการป้องกันภาวะเครียดจากออกซิเดชันในเซลล์ลำไส้มนุษย์ (Caco-2 cell) Caco-2 cell มีต้นกำเนิดจากเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่มนุษย์ (human colon adeno-

carcinoma) ซึ่งเมื่อนำมาเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์จะมีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างและมีการทำงานคล้ายกับเซลล์เอนเทอโรไซต์ (enterocyte) ของลำไส้เล็ก จึงนิยมนำมาใช้ศึกษาการขนส่งสารหรือการดูดซึมสารในลำไส้เล็ก [30]

2. วิธีการวิจัย

2.1 การเตรียมตัวอย่าง

นำข้าวเหนียวดำพันธุ์ลิ้มผั่วที่หาซื้อได้จากท้องตลาด 3 ตราสินค้า มาผสมให้เข้ากันเป็นตัวอย่างแบบผสมรวม (composite sample) แล้วนำมาหุงในหม้อหุงข้าวไฟฟ้า (พานาโซนิค SRDF 101) ในอัตราส่วน ข้าว 1 ส่วน ต่อน้ำ 2 ส่วน เมื่อข้าวสุกนำมาผึ่งให้เย็นที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ตัวอย่างที่ได้เรียกว่า “ข้าวเหนียวดำสุก” นำข้าวเหนียวดำสุกที่พักให้เย็นมาหมักกับลูกแป้งข้าวหมากในอัตราส่วนร้อยละ 0.2 ต่อข้าวเหนียวดำดิบในตู้ควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส นาน 3 วัน ตัวอย่างที่ได้เรียกว่า “ข้าวหมาก” นำตัวอย่างข้าวที่ได้ไปอบในตู้อบลมร้อนที่ 60 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง แล้วเก็บไว้ในถุงสุญญากาศที่ 4 องศาเซลเซียส [23]

2.2 การเตรียมสารสกัดข้าวเหนียวดำสุกหรือข้าวหมาก

การเตรียมสารสกัดข้าวเหนียวดำสุกหรือข้าวหมากดัดแปลงมาจาก Muangnoi และคณะ [31] นำตัวอย่าง 1 กรัม ผสมกับ 90 % เอทานอล ปริมาตร 50 มิลลิลิตร แล้วสกัดด้วยความถี่สูงในเครื่อง ultrasonic bath (Mettler Electronics Corp, Anaheim, CA, USA) นาน 10 นาที จากนั้นจึงนำตัวอย่างไปแยกชั้นด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยง (centrifuge) (Becton Dickinson Dynac Centrifuge, Sparks, MD, USA) ที่ความเร็ว $5,600 \times g$ ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที กรองแยกส่วนใสด้วยกระดาษ

กรอง แล้วจึงนำกากที่เหลือไปสกัดซ้ำในวิธีเดิมอีก 1 ครั้ง นำส่วนที่เป็นของเหลวใสที่ได้ทั้ง 2 ครั้ง รวมกันทำให้แห้งด้วยเครื่องระเหยตัวทำละลายภายใต้สุญญากาศที่ความร้อน 45 องศาเซลเซียส เมื่อได้ตัวอย่างแห้งแล้วจึงเติมน้ำกลั่นปริมาตร 10 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันก่อนนำไปเก็บรักษาที่ -80 องศาเซลเซียส

2.3 การเตรียมตัวอย่างข้าวหมากที่ผ่านการจำลองการย่อยในร่างกายมนุษย์

นำตัวอย่าง 1 กรัม ผสมกับ 120 มิลลิโมลาร์ NaCl ปริมาตร 30 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปผ่านการจำลองสภาวะการย่อยในร่างกายมนุษย์ทั้งในกระเพาะอาหารและลำไส้เล็กตามวิธีของ Ferruzzi และคณะ [32] และ Dawilai และคณะ [33] โดยปรับความเป็นกรด-ด่าง (pH) ของสารละลายตัวอย่างให้ได้ 2.0 ด้วย 1 โมลาร์ HCl เติมน้ำเปปซิน 2 มิลลิลิตร นำไปย่อยในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิแบบเขย่าได้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 1 ชั่วโมง ปรับความเป็นกรด-ด่างให้ได้ 5.3 ด้วย 0.9 โมลาร์ NaHCO_3 เติมน้ำสกัดน้ำดี (bile extract) และแพนกรีเอติน (pancreatin) ปรับความเป็นกรด-ด่างให้ได้ 7.0 ด้วย 1 โมลาร์ NaOH จากนั้นนำไปย่อยในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิแบบเขย่าได้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 2 ชั่วโมง แล้วหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว $10,000 \times g$ ที่อุณหภูมิห้องนาน 60 นาที จากนั้นนำส่วนใสไปกรองด้วยแผ่นกรองขนาด 0.2 ไมครอน ของเหลวที่ผ่านการกรองจะเรียกว่า micellarized fraction และนำไปไล่อากาศด้วยก๊าซไนโตรเจน ปิดฝาให้แน่นด้วยแผ่นพาราฟิล์ม แล้วจึงนำไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส

2.4 การหาปริมาณวิตามินอีและแกมมาโอโรซานอล

การหาปริมาณวิตามินอีและแกมมาโอโรซานอลทำตามวิธีของ Moongngarm และ Saetung

[34] โดยนำตัวอย่าง 1 กรัม สกัดด้วยเมทานอล ปริมาตร 10 มิลลิลิตร นำสารสกัดที่ได้ไปวิเคราะห์หา วิตามินอีและแกมมาโอโรซานอลด้วยเครื่อง HPLC (Agilent 1100 series, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) โดยใช้คอลัมน์ Water Resolve C₁₈ column 90 Å (5 ไมโครเมตร 3.9×150 มิลลิเมตร) ใช้ น้ำ เมทานอล และอะซีโตนไนไตรล์ (acetonitrile) เป็นเฟสเคลื่อนที่แบบ gradient elution มีอัตราการไหลเท่ากับ 1 มิลลิลิตรต่อนาที ฉีด ตัวอย่างในปริมาณ 20 ไมโครลิตร ตรวจวัดวิตามินอี และอนุพันธ์ของวิตามินอีด้วย fluorescence detector ที่ความยาวคลื่นกระตุ้น 298 นาโนเมตร และความยาวคลื่นกระจาย 328 นาโนเมตร และ ตรวจวัดแกมมาโอโรซานอลด้วย photodiode array detector ที่ความยาวคลื่น 325 นาโนเมตร บ่งชี้ วิตามินอีและแกมมาโอโรซานอลด้วยการเปรียบเทียบ retention time ของตัวอย่างกับสารมาตรฐาน รายงานผลวิตามินอีเป็นไมโครกรัมต่อน้ำหนักตัวอย่างแห้ง 100 กรัม และแกมมาโอโรซานอลรายงานเป็น ไมโครกรัมต่อน้ำหนักตัวอย่างแห้ง 1 กรัม

2.5 การหาปริมาณโพลีฟีนอลทั้งหมด

หาปริมาณโพลีฟีนอลทั้งหมดโดยใช้ Folin-Ciocalteu reagent [35] วิเคราะห์ปริมาณโพลีฟีนอล ทั้งหมดด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 750 นาโน เมตร ด้วยเครื่อง UV-visible spectrophotometer (UV-1601, Shimadzu Corp, Kyoto, Japan) คำนวณหาปริมาณโพลีฟีนอลทั้งหมดในตัวอย่างเปรียบ เทียบกับกราฟมาตรฐานกรดแกลลิก รายงานผลเปรียบเทียบเป็นมิลลิกรัมของกรดแกลลิกในตัวอย่างน้ำหนักแห้ง 1 กรัม

2.6 การหาปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมด

นำตัวอย่างมาสกัดด้วยเอทานอลที่ถูกรับ ให้มีความเป็นกรด (95 % เอทานอล และ 1.0 นอร์มัล

HCl ในอัตราส่วน 85:15 v/v) ตามวิธีของ Abdel-Aal และ Hucl [36] การวิเคราะห์หาปริมาณแอนโทไซยา- นินทั้งหมดในตัวอย่างใช้วิธีพีเอช-ดิฟเฟอเรนเชียล (pH-differential) ตามวิธีของ Lee และคณะ [37] โดยนำสารสกัดตัวอย่างมาเจือจางด้วยสารละลาย บัฟเฟอร์ที่มีความเป็นกรดต่าง 1.0 หรือ 4.5 และ นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 510 และ 700 นาโน เมตร ด้วยเครื่อง microplate reader (Sunrise, Tecan Co., Austria) รายงานผลเปรียบเทียบกับมิลลิ กรัมของ cyanidin 3-glucoside ในตัวอย่างน้ำหนักแห้ง 1 กรัม เนื่องจาก cyanidin 3-glucoside เป็น แอนโทไซ-ยานินที่พบมากที่สุดในช่วงเหี่ยวดำ [38]

2.7 การทดสอบศักยภาพการต้านอนุมูลอิสระ

การทดสอบศักยภาพการต้านอนุมูลอิสระ ทำได้ด้วยการทดสอบ 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) และ ferric reducing antioxidant power (FRAP) ดังนี้

การทดสอบด้วยวิธี DPPH เป็นการวัด ความสามารถของตัวอย่างในการให้อิเล็กตรอนหรือ ไฮโดรเจนอะตอมกับ DPPH[•] ซึ่งเป็นอนุมูลอิสระที่ เสถียร โดยนำสารสกัดตัวอย่างผสมกับสารละลาย DPPH และนำไปเก็บในที่มืดนาน 30 นาที ตามวิธีของ Fukumoto และ Mazza [39] จากนั้นนำไปวัดค่าการ ดูดกลืนแสงที่ 517 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง microplate reader คำนวณหาศักยภาพในการต้านอนุมูลอิสระ ของตัวอย่างเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของสาร ละลาย Trolox ซึ่งเป็นสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน รายงานผลเป็นมิลลิโมลของ Trolox ในตัวอย่าง น้ำหนักแห้ง 100 กรัม

ศักยภาพการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP เป็นการวัดความสามารถของตัวอย่างในการรีดิวซ์ สารประกอบ Fe³⁺-TPTZ ให้อยู่ในรูปของ Fe²⁺-TPTZ

การทดสอบทำตามวิธีของ Griffin และ Bhagooli [40] โดยผสมสารสกัดตัวอย่างกับ FRAP reagent และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง microplate reader นำค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดตัวอย่างมาคำนวณหาค่า FRAP โดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของสารละลาย $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ รายงานผลเป็นมิลลิโมลของ Fe^{2+} ในตัวอย่างน้ำหนักแห้ง 100 กรัม

2.8 การป้องกันการเกิดภาวะเครียดจากออกซิเดชันในเซลล์ลำไส้มนุษย์ (Caco-2 cell)

เลี้ยงเซลล์มะเร็งลำไส้ (Caco2) (ATCC, Rockville, MD, USA) ใน 6-well plate โดยมีความเข้มข้นของเซลล์ 4×10^4 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ตามวิธีของ Han และคณะ [41] ซึ่งจะเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ทุก ๆ 2 วัน เมื่อเซลล์เจริญเต็มที่ (ประมาณ 4-5 วัน) จะลดความเข้มข้นของ heat inactivated fetal bovine serum ในอาหารเลี้ยงเซลล์จากร้อยละ 10 ให้เหลือร้อยละ 7.5 (v/v) และเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ทุก ๆ 2 วัน เซลล์ที่นำไปใช้ทดสอบมีอายุ 11-14 วัน หลังจากเจริญเต็มที่เนื่องจากเป็นช่วงที่เซลล์มีสมบัติทางชีวภาพใกล้เคียงกับเซลล์ลำไส้ คือ มีไมโครวิลไลและเอนไซม์ต่าง ๆ ที่ใช้ในการดูดซึมสารตามคำแนะนำของ Garrett และคณะ [42] จากนั้นนำเซลล์มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ผสมข้าวเหนียวดำสุกหรือข้าวหมากที่ไม่ผ่านการย่อยความเข้มข้น 5, 10 หรือ 20 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร หรือผสม micellarized fraction ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร (ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่ไม่เป็นพิษกับเซลล์) ในตู้บ่มเพาะเลี้ยงที่ 37 องศาเซลเซียส ภายใต้อากาศที่มีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 (v/v) นาน 4 ชั่วโมง แล้วเติม 2 มิลลิโมลลาร์ H_2O_2 ลงไป นำเซลล์ไปเลี้ยงต่ออีก 30 นาที แล้วกรองเซลล์ออก นำอาหารเลี้ยงเซลล์ไปหาปริมาณอินเตอร์ลิวคิน 8 (interleukin-8; IL-8) ซึ่งเป็นตัวบ่งชี้

ทางเคมีที่เซลล์จะหลั่งออกมาเมื่อเกิดภาวะเครียดจากออกซิเดชันด้วยวิธี ELISA [43] รายงานผลเป็นเปอร์เซ็นต์ยับยั้งการหลั่ง IL-8

2.9 การวิเคราะห์ทางสถิติ

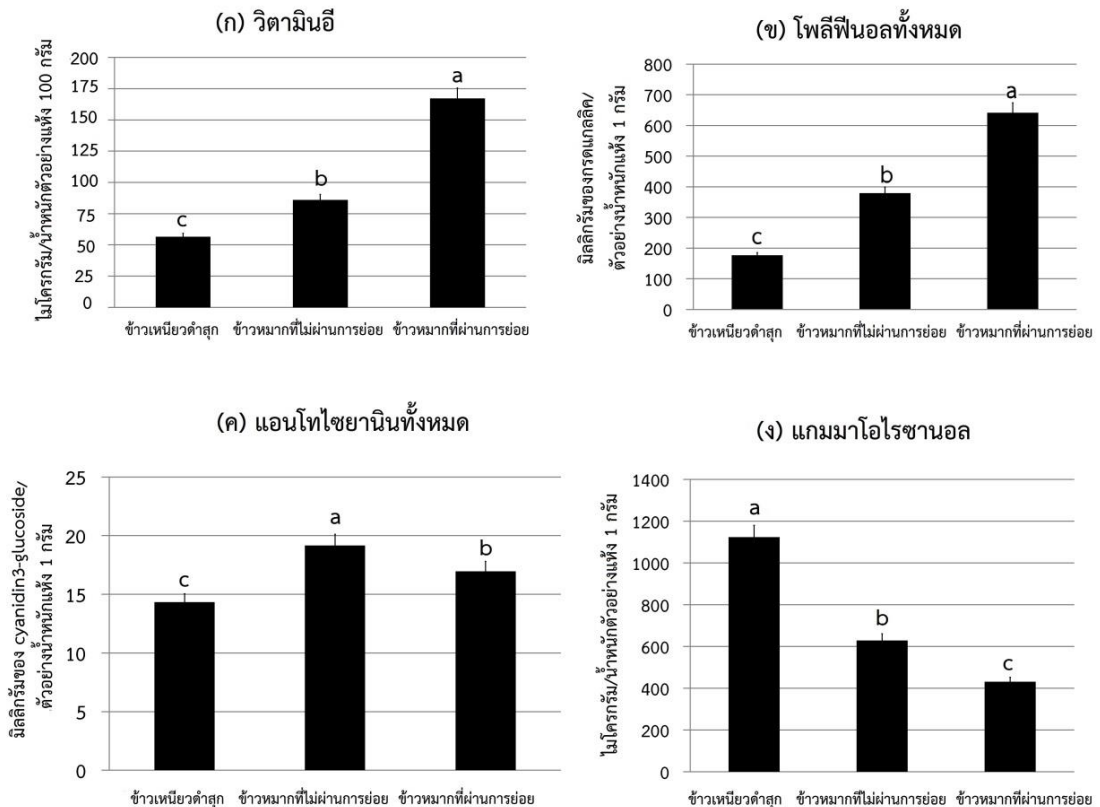
ผลการวิเคราะห์แสดงในรูปค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (mean $\pm$ SD) วิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี one-way ANOVA และ Duncan's new multiple range test ที่ระดับนัยสำคัญทางสถิติ $P < 0.05$ โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป ข้อมูลที่ได้ทั้งหมดมาจากการทดลอง 3 ซ้ำ

3. ผลการวิจัยและวิจารณ์

3.1 ปริมาณวิตามินอี โพลีฟีนอลทั้งหมด แอนโทไซยานินทั้งหมด และแกมมาโอโรซานอลในข้าวเหนียวดำสุก ข้าวหมากที่ไม่ผ่านและผ่านการจำลองการย่อยในร่างกายมนุษย์

ปริมาณวิตามินอี โพลีฟีนอลทั้งหมด แอนโทไซยานินทั้งหมด และแกมมาโอโรซานอลในข้าวเหนียวดำสุก ข้าวหมากที่ไม่ผ่านและผ่านการจำลองการย่อย แสดงในรูปที่ 1

ผลการหาปริมาณวิตามินอี โพลีฟีนอลทั้งหมด และแอนโทไซยานินทั้งหมด (รูปที่ 1ก, 1ข และ 1ค) พบว่าข้าวหมากมีสารดังกล่าวสูงกว่าข้าวเหนียวดำสุก โดยพบว่าข้าวหมากที่ผ่านการจำลองการย่อยมีปริมาณวิตามินอี (167.19 ไมโครกรัมต่อตัวอย่างน้ำหนักแห้ง 100 กรัม) และโพลีฟีนอลทั้งหมด (641.77 มิลลิกรัมของกรดแกลลิกในตัวอย่างน้ำหนักแห้ง 1 กรัม) มากกว่าข้าวหมากที่ไม่ผ่านการย่อย (85.98 ไมโครกรัมต่อตัวอย่างน้ำหนักแห้ง 100 กรัม และ 379.82 มิลลิกรัมของกรดแกลลิกในตัวอย่างน้ำหนักแห้ง 1 กรัม) และข้าวเหนียวดำสุก (56.53 ไมโครกรัมต่อตัวอย่างน้ำหนักแห้ง 100 กรัม และ 176.55 มิลลิกรัมของกรดแกลลิกในตัวอย่างน้ำหนัก



รูปที่ 1 ปริมาณวิตามินอี (ก) โพลีฟีนอลทั้งหมด (ข) แอนโทไซยานินทั้งหมด (ค) และแกมมาโอไรซานอล (ง) ในข้าวเหนียวดำสุก ข้าวหมากที่ไม่ผ่านการย่อยและผ่านการย่อย โดยตัวอักษร a-c แสดงความแตกต่างของค่าเฉลี่ยที่ได้จากตัวอย่างในการศึกษาเดียวกันที่ระดับนัยสำคัญทางสถิติ $P < 0.05$

แห้ง 1 กรัม) ตามลำดับ ส่วนปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมดในตัวอย่าง พบว่าข้าวหมากที่ไม่ผ่านการจำลองการย่อยมีปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมด (19.16 มิลลิกรัมของ cyanidin 3-glucoside ต่อตัวอย่างน้ำหนักแห้ง 1 กรัม) มากกว่าข้าวหมากที่ผ่านการจำลองการย่อย (16.96 มิลลิกรัมของ cyanidin 3-glucoside ต่อตัวอย่างน้ำหนักแห้ง 1 กรัม) และข้าวเหนียวดำสุก (14.34 มิลลิกรัมของ cyanidin 3-glucoside ต่อตัวอย่างน้ำหนักแห้ง 1 กรัม) ตามลำดับ (รูปที่ 1ค) ผลที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้สอดคล้องกับการศึกษาก่อนหน้านี้ของ Fernandez-Orozco และคณะ [44] ที่พบว่าถั่วเหลืองที่หมักด้วย *Aspergillus*

oryzae หรือ *Rhizopus oryzae* มีปริมาณวิตามินอีเพิ่มสูงขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับถั่วเหลืองดิบ ปริมาณโพลีฟีนอลทั้งหมด และแอนโทไซยานินทั้งหมดที่เพิ่มสูงขึ้นในข้าวหมากให้ผลเช่นเดียวกับผลการศึกษาในข้าวหมากที่ผลิตจากข้าวสีของ Plaitho และคณะ [23] และโคจิ (koji) ที่ได้จากการหมักถั่วดำกับ *Aspergillus awamori* ของ Lee และคณะ [45] นอกจากนี้ ยังพบว่ารำข้าว รำข้าวสาลี ข้าวสาลี ข้าวกล้อง ข้าวโพด และข้าวโอ๊ตที่หมักด้วยรา *Rhizopus* spp. หรือ *Aspergillus* spp. [46-48] ชาดำและโกจิเบอร์รี่ที่หมักด้วยยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* [49] มีปริมาณโพลีฟีนอลเพิ่มสูงขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับอาหาร

ที่ไม่ผ่านการหมัก ปริมาณวิตามินอี โพลีฟีนอลทั้งหมด และแอนโทไซยานินทั้งหมดที่เพิ่มขึ้นในข้าวหมากอาจเนื่องมาจากกระบวนการหมักที่อยู่ในลูกแป้ง ข้าวหมาก เช่น *Rhizopus oryzae*, *Mucor spp.*, หรือ *Aspergillus spp.* สร้างเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดส [50-53] สลายพันธะเบต้า 1,4 ไกลโคซิดิกในโมเลกุลของเซลลูโลสได้กลูโคส [54] เมื่อเซลลูโลสซึ่งเป็นส่วนประกอบของผนังเซลล์พืชถูกทำลายจึงส่งผลให้วิตามินอี โพลีฟีนอล และแอนโทไซยานินที่อยู่ภายในผนังเซลล์ [55-56] หลุดออกมาได้มากขึ้น รวมถึงร่าดังกล่าวสามารถสร้างเอนไซม์ไลเปส [57] โปรตีเอส [58] และอะไมเลส [59] ย่อยไขมัน โปรตีน และคาร์โบไฮเดรตในวัตถุดิบส่งผลให้วิตามินอี โพลีฟีนอล หรือแอนโทไซยานินที่อาจจับอยู่กับสารอาหารเหล่านั้นถูกปลดปล่อยเป็นอิสระมากขึ้น

ผลการหาปริมาณแกมมาโอโรซานอล พบว่าข้าวเหนียวดำสุกมีแกมมาโอโรซานอลมากที่สุด (1123.26 ไมโครกรัมต่อตัวอย่างน้ำหนักแห้ง 1 กรัม) รองลงมา คือ ข้าวหมากที่ไม่ผ่านการย่อย (629.21 ไมโครกรัมต่อตัวอย่างน้ำหนักแห้ง 1 กรัม) และข้าวหมากที่ผ่านการจำลองการย่อย (431.22 ไมโครกรัมต่อตัวอย่างน้ำหนักแห้ง 1 กรัม) ตามลำดับ (รูปที่ 1ง) แสดงให้เห็นว่าการหมักมีผลทำให้สารดังกล่าวมีปริมาณลดลงซึ่งให้ผลคล้ายกับการหมักรำข้าวด้วย *Lactococcus lactis*, *Pediococcus pentoseus* หรือ *Aspergillus oryzae* [60-61] ปริมาณแกมมาโอโรซานอลที่ลดลงอาจเนื่องมาจากกระบวนการหมักจุลินทรีย์สร้างเอนไซม์ที่สามารถสลายพันธะในโมเลกุลของแกมมาโอโรซานอลได้เป็นสารอื่น เช่น กรดเฟอร์ูลิก สเตอรอล หรือสารประกอบไตรเทอร์พีนแอลกอฮอล์ (triterpene alcohol) Sirilun และคณะ พบว่ารา *Aspergillus oryzae* ที่ใช้หมักรำข้าวสามารถสร้างเอนไซม์เฟอร์ูลิกแอซิดเอสเทอเรส (ferulic acid

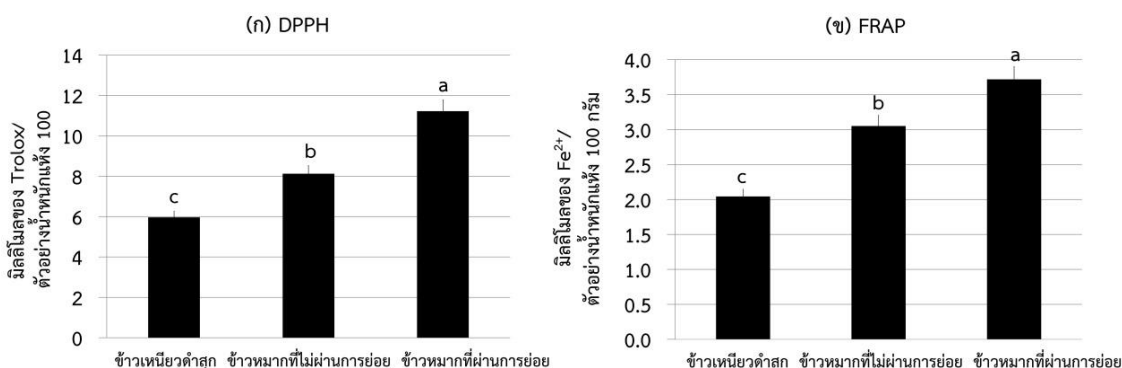
esterase) ออกมาสลายพันธะเอสเทอร์ในโมเลกุลของแกมมาโอโรซานอลได้กรดเฟอร์ูลิกอิสระส่งผลให้รำข้าวหมักมีแกมมาโอโรซานอลลดลง [61]

เมื่อพิจารณาผลที่ได้จากการจำลองการย่อยในระบบทางเดินอาหาร พบว่าข้าวหมากที่ผ่านการจำลองการย่อย มีปริมาณวิตามินอีและโพลีฟีนอลทั้งหมดเพิ่มขึ้นร้อยละ 94.45 และ 68.97 ตามลำดับ เปรียบเทียบกับข้าวหมากที่ไม่ผ่านการย่อย ซึ่งคล้ายกับการศึกษาในข้าวกล้องสุกและข้าวขาวสุก [25] กลไกสำคัญอาจเป็นผลจากเอนไซม์ ความเป็นกรด-ด่างในระบบทางเดินอาหารที่มีส่วนช่วยสลายพันธะที่จับกันระหว่างวิตามินอีหรือโพลีฟีนอลกับสารประกอบอื่นในอาหาร เช่น ไขมัน คาร์โบไฮเดรต โปรตีน เซลลูโลส หรือลิกนิน ส่งผลให้วิตามินอีหรือโพลีฟีนอลอยู่ในรูปอิสระมากขึ้น ในขณะเดียวกัน พบว่าข้าวหมากที่ผ่านการจำลองการย่อยมีปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมดและแกมมาโอโรซานอลลดลง คิดเป็นร้อยละ 11.48 และ 31.47 ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับข้าวหมากที่ไม่ผ่านการย่อย ปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมดที่ลดลงหลังผ่านการจำลองการย่อยคล้ายกับการศึกษาในน้ำทับทิม และน้ำแบล็คเคอร์แรนท์ [62-63] ซึ่งเป็นผลจากสภาวะกรด-ด่างในระบบทางเดินอาหารที่ส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของแอนโทไซยานิน เมื่อแอนโทไซยานินอยู่ในสภาพแวดล้อมที่เป็นกรดในกระเพาะอาหาร (pH 2) จะอยู่ในรูป flavylium cation ซึ่งมีสีแดง เมื่ออยู่ในสภาวะด่างในลำไส้เล็ก (pH 6-6.5) โครงสร้างของแอนโทไซยานินเปลี่ยนจาก flavylium cation เป็น chalcone ซึ่งไม่มีสี หรืออาจเนื่องมาจากแอนโทไซยานินถูกเมแทบอลิซึมได้เป็นสารไม่มีสี หรือถูกออกซิไดซ์ไปเป็นสารอื่น [62] ส่วนการลดลงของแกมมาโอโรซานอลอาจเป็นผลมาจากเอนไซม์เพปซิน กรดไฮโดรคลอริกในกระเพาะอาหาร และเอนไซม์แพน-ครีเอตินในลำไส้เล็ก [64]

3.2 ศักยภาพในการต้านอนุมูลอิสระของข้าวเหนียวดำสุก ข้าวหมากที่ไม่ผ่านการย่อย และการหมักข้าวหมากที่ย่อยในร่างกายนมนุษย์

ผลการทดสอบศักยภาพในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH (รูปที่ 2ก) พบว่าข้าวหมากที่ไม่ผ่านการหมักการย่อยมีประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระสูงสุด คือ มีค่าเท่ากับ 11.22 มิลลิโมลของ Trolox ต่อตัวอย่างน้ำหนักแห้ง 100 กรัม รองมา คือ ข้าวหมากที่ไม่ผ่านการย่อย (8.12 มิลลิโมลของ Trolox ต่อตัวอย่างน้ำหนักแห้ง 100 กรัม) และข้าว

เหนียวดำสุก (5.96 มิลลิโมลของ Trolox ต่อตัวอย่างน้ำหนักแห้ง 100 กรัม) ตามลำดับ การทดสอบด้วยวิธี FRAP ให้ผลในทำนองเดียวกับวิธี DPPH คือ ข้าวหมากที่ไม่ผ่านการหมักการย่อยมีศักยภาพในการต้านอนุมูลอิสระ (3.72 มิลลิโมลของ Fe^{2+} ต่อตัวอย่างน้ำหนักแห้ง 100 กรัม) สูงกว่าข้าวหมากที่ไม่ผ่านการย่อย (3.05 มิลลิโมลของ Fe^{2+} ต่อตัวอย่างน้ำหนักแห้ง 100 กรัม) และข้าวเหนียวดำสุก (2.04 มิลลิโมลของ Fe^{2+} ต่อตัวอย่างน้ำหนักแห้ง 100 กรัม) ตามลำดับ (รูปที่ 2ข)



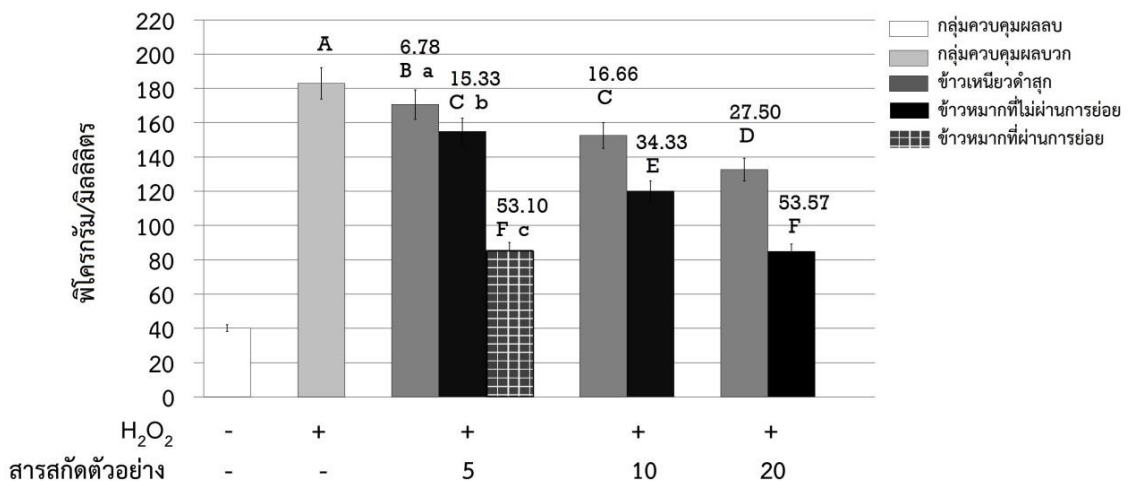
รูปที่ 2 ศักยภาพในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH (ก) และวิธี FRAP (ข) ของข้าวเหนียวดำสุก ข้าวหมากที่ไม่ผ่านการย่อยและผ่านการย่อย โดยตัวอักษร a-c แสดงความแตกต่างของค่าเฉลี่ยที่ได้จากตัวอย่างในการศึกษาเดียวกันที่ระดับนัยสำคัญทางสถิติ $P < 0.05$

ศักยภาพในการต้านอนุมูลอิสระเป็นผลมาจากวิตามินอี โพลีฟีนอล แอนโทไซยานิน และแกมมาโอโรซานอลที่พบในตัวอย่าง กลไกสำคัญในการต้านอนุมูลอิสระของสารดังกล่าวมาจากความสามารถในการดักจับอนุมูลอิสระ (radical scavenging) โดยการให้อิเล็กตรอนหรือไฮโดรเจนอะตอมกับอนุมูลอิสระ เช่น $ROO^\bullet$, $OH^\bullet$, $O_2^\bullet$, H_2O_2 และ $DPPH^\bullet$ [64-66] หรือความสามารถในการหยุดปฏิกิริยาการสร้างอนุมูลอิสระ (chain-breaking) โดยทำหน้าที่เป็นตัวรับอิเล็กตรอนจากอนุมูลอิสระ [67-68] ส่งผลให้อนุมูลอิสระมีความเสถียรขึ้น การศึกษาในครั้งนี้ให้ผลคล้ายกับที่พบใน

ธัญชาติหมัก (ข้าวสาลี ข้าว ข้าวโอ๊ต ข้าวฟ่าง ข้าวโพด) ถั่วหมัก (ถั่วดำและถั่วมะแฮะ) และ Haria (เครื่องดื่มที่ได้จากการหมักข้าวของอินเดีย) [18,45,69-70] รวมถึงพบว่าข้าวหมากที่ไม่ผ่านการหมักการย่อยในระบบทางเดินอาหารมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงกว่าข้าวหมากที่ไม่ผ่านการย่อยซึ่งให้ผลในทิศทางเดียวกับการศึกษาในข้าวขาว ข้าวกล้อง และข้าวสาลี [25,71] ผลที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าการหมักและการนำไปผ่านการหมักการย่อยในระบบทางเดินอาหารสามารถเพิ่มศักยภาพในการต้านอนุมูลอิสระได้ ซึ่งเป็นผลมาจากเอนไซม์จากการหมักหรือการย่อย รวมถึง

สภาวะกรด-ด่างที่ใช้ในการย่อยอาหารช่วยสกัดสารสำคัญ เช่น วิตามินอีและโพลีฟีนอลออกจากองค์ประกอบของอาหารได้มากขึ้น อีกทั้ง Chen และคณะ [27] พบว่า ศักยภาพในการต้านอนุมูลอิสระมีความ

สัมพันธ์เชิงบวกกับปริมาณวิตามินอีและโพลีฟีนอลในอาหาร ซึ่งแสดงให้เห็นว่าวิตามินอีและโพลีฟีนอลมีบทบาทสำคัญต่อความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของตัวอย่าง



รูปที่ 3 ปริมาณการหลั่ง IL-8 ของเซลล์ลำไส้ที่ได้รับสารสกัดตัวอย่างร่วมกับ H₂O₂ โดยตัวอักษร A-F แสดงความแตกต่างของค่าเฉลี่ยปริมาณการหลั่ง IL-8 ในเซลล์ลำไส้ที่ได้รับสารสกัดตัวอย่าง 5, 10 หรือ 20 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ร่วมกับ H₂O₂ กับกลุ่มควบคุมผลบวก (ได้รับ H₂O₂ เพียงอย่างเดียว) และตัวอักษร a-c แสดงความแตกต่างของค่าเฉลี่ยปริมาณการหลั่ง IL-8 ในเซลล์ลำไส้ที่ได้รับสารสกัดตัวอย่าง 5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ร่วมกับ H₂O₂ ที่ระดับนัยสำคัญทางสถิติ $P < 0.05$ ตัวเลขในกราฟแสดงเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการหลั่ง IL-8

3.3 การป้องกันการเกิดภาวะเครียดจากออกซิเดชันในเซลล์ลำไส้มนุษย์ (Caco-2 cell)

ภาวะเครียดจากออกซิเดชันมีสาเหตุมาจากการมีอนุมูลอิสระในปริมาณมากเกินไปความสามารถของร่างกายในการกำจัดอนุมูลอิสระ ส่งผลให้เซลล์ได้รับความเสียหายจนเกิดการอักเสบ เมื่อเกิดการอักเสบ เซลล์เม็ดเลือดขาวจะหลั่งสารในกลุ่มอินเตอร์ลิวคิน เช่น IL-8 ออกมาเพื่อเป็นการตอบสนองต่อภาวะการอักเสบ จากผลการศึกษารูปที่ 3 แสดงให้เห็นว่าเซลล์ลำไส้ที่ได้รับสารสกัดตัวอย่าง 5, 10 หรือ

20 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ร่วมกับ H₂O₂ มีปริมาณการหลั่ง IL-8 แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ $P < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมผลบวก (ได้รับ H₂O₂ เพียงอย่างเดียว) โดยพบว่าปริมาณการหลั่ง IL-8 ลดลงตามปริมาณสารสกัดตัวอย่างที่เพิ่มมากขึ้น ซึ่งอาจเป็นผลมาจากประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระของวิตามินอี โพลีฟีนอล แอนโทไซยานิน และแกมมาโอไรซานอลที่พบในตัวอย่างดังที่ได้กล่าวข้างต้น Chohan และคณะ [72] พบว่าศักยภาพในการต้านอนุมูลอิสระและปริมาณโพลีฟีนอลที่พบในโรสแมรี่

(rosemary) เสดจ (sage) และไทม์ (thyme) มีความสัมพันธ์กับการยับยั้งการหลั่ง IL-8 ในเซลล์ลำไส้ (Caco-2) และเซลล์เม็ดเลือดขาวที่ถูกกระตุ้นด้วย tumor necrosis factor (TNF- α) หรือ H₂O₂ จากการศึกษาพบว่าเซลล์ลำไส้ที่ได้รับสารสกัดข้าวหมากร่วมกับ H₂O₂ มีปริมาณการหลั่ง IL-8 น้อยกว่าเซลล์ลำไส้ที่ได้รับสารสกัดข้าวเหนียวดำสุกร่วมกับ H₂O₂ ในทุกความเข้มข้นที่ทดสอบ เมื่อพิจารณาปริมาณการหลั่ง IL-8 ของเซลล์ลำไส้ที่ได้รับสารสกัดตัวอย่าง 5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ร่วมกับ H₂O₂ พบว่าเซลล์ลำไส้ที่ได้รับสารสกัดข้าวหมากที่ผ่านการย่อยมีปริมาณการหลั่ง IL-8 (85.81 พิโคกรัม/มิลลิลิตร) น้อยกว่าเซลล์ลำไส้ที่ได้รับสารสกัดข้าวหมากที่ไม่ผ่านการย่อย (154.90 พิโคกรัม/มิลลิลิตร) และข้าวเหนียวดำสุก (170.55 พิโคกรัม/มิลลิลิตร) ตามลำดับ ซึ่งคิดเป็นเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการหลั่ง IL-8 คือ 53.10, 15.33 และ 6.78 ตามลำดับ ประสิทธิภาพในการยับยั้งการหลั่ง IL-8 ที่มากขึ้นในข้าวหมากเป็นผลมาจากวิตามินอีและโพลีฟีนอลที่เพิ่มขึ้นระหว่างการหมักและการย่อยในระบบทางเดินอาหาร H₂O₂ เป็นสารตั้งต้นของอนุมูลออกซิเจน (oxygen radical) ที่เหนี่ยวนำให้เซลล์หลั่ง IL-8 ผ่านกระบวนการส่งสัญญาณในวิถี mitogen-activated protein kinases (MAPK) โดยอาศัย extracellular signal-regulated kinases (ERKs), Jun N-terminal kinase (JNK) และ p38 [73] Matsuoka และคณะ [74] รายงานว่าสารสกัดโพลีฟีนอลจากชาเขียวสามารถยับยั้งการทำงานของ JNK และ p38 จึงส่งผลให้เซลล์เยื่อบุถุงลมปอด (A549 cell) ที่ได้รับ H₂O₂ หลั่ง IL-8 ลดลง นอกจากนี้ da Silveira Vargas และคณะ [75] พบว่าเซลล์โพรงประสาทฟัน (MDPC-23) ที่ได้รับวิตามินอีร่วมกับ H₂O₂ มีชีวิตรอดมากกว่ากลุ่มที่ได้รับ H₂O₂ เพียงอย่างเดียว ซึ่งให้ผลเช่นเดียวกับการศึกษาที่พบในเซลล์เยื่อบุ

ผนังหลอดเลือด [76] แสดงให้เห็นว่าวิตามินอีสามารถป้องกันเซลล์โพรงประสาทฟันและเซลล์เยื่อบุผนังหลอดเลือดไม่ให้ถูกทำลายด้วย H₂O₂ ได้

4. สรุป

การหมักและการย่อยในระบบทางเดินอาหารส่งผลต่อปริมาณสารสำคัญในข้าวเหนียวดำพันธุ์ลิ้มผัว โดยพบว่าวิตามินอีและโพลีฟีนอลมีปริมาณเพิ่มขึ้นหลังการหมักและการจำลองการย่อย ขณะที่แอนโทไซยานินมีปริมาณเพิ่มขึ้นหลังการหมักแต่มีปริมาณลดลงเมื่อผ่านการจำลองการย่อย ส่วนแกมมาโอไรซานอลมีปริมาณลดลงหลังการหมักและการจำลองการย่อย รวมถึงพบว่าข้าวหมากที่ผ่านการจำลองการย่อยมีศักยภาพในการต้านอนุมูลอิสระและสามารถยับยั้งการหลั่ง IL-8 ในเซลล์ลำไส้ได้ดีกว่าข้าวหมากที่ไม่ผ่านการจำลองการย่อยและข้าวเหนียวดำสุก ตามลำดับ ผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่าข้าวหมากมีฤทธิ์ลดภาวะเครียดจากออกซิเดชันซึ่งเป็นสาเหตุหนึ่งของการเกิดโรคเรื้อรัง เช่น โรคมะเร็ง โรคไขมันในเลือดสูง เพื่อเป็นการส่งเสริมการบริโภคข้าวหมากหรือนำข้าวหมากไปใช้ในอุตสาหกรรมอาหารเพื่อสุขภาพ จึงควรศึกษาถึงประสิทธิภาพของข้าวหมากในด้านการลดความเสี่ยงต่อการเกิดโรคต่าง ๆ เช่น การลดระดับน้ำตาล หรือระดับไขมันในเลือด โดยอาจศึกษาในเซลล์หรือในสัตว์ทดลองต่อไป

5. กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.แก้ว กังสดาลอำไพ ที่ปรึกษาสถาบันโภชนาการ มหาวิทยาลัยมหิดล เป็นอย่างสูงสำหรับคำแนะนำในวิเคราะห์ตัวอย่างพร้อมทั้งให้คำปรึกษาในการทำวิจัยครั้งนี้ รวมถึงสถาบันวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยสวนดุสิต ที่ให้ทุนสนับสนุนงานวิจัย

6. รายการอ้างอิง

- [1] อภิชาติ เนินพลับ, อัจฉรา ณ ลำปาง เนินพลับ, พจน์ วัจนะภูมิ และพงศา สุขเสริม, 2553, ข้าวเหนียวพันธุ์ “ลัมผั่ว” พันธุ์กรรมข้าวอนุรักษ์เพื่อคุณค่าทางโภชนาการ, น. 187-197, ใน การสัมมนาวิชาการ กลุ่มศูนย์วิจัยข้าวภาคเหนือตอนบนและภาคกลางตอนล่าง ประจำปี 2553, 9-10 มีนาคม 2553, โรงแรมอมรินทร์ลากูน, พิษณุโลก.
- [2] Subasree, S., 2014, Role of vitamin C and vitamin E in health and disease, J. Pharm. Sci. Res. 6: 52-55.
- [3] Rizvi, S., Raza, S.T., Ahmed, F., Ahmad, A., Abbas, S. and Mahdi, F., 2014, The role of vitamin E in human health and some diseases, Sultan Qaboos Univ. Med. J. 14: 157-165.
- [4] Rechner, A.R. and Kroner, C., 2005, Anthocyanins and colonic metabolites of dietary polyphenols inhibit platelet function, Thromb. Res. 116: 327-334.
- [5] Wang, L.S. and Stoner, G.D., 2008, Anthocyanins and their role in cancer prevention, Cancer Lett. 269: 281-290.
- [6] Cassidy, A., Mukamal, K.J., Liu, L., Franz, M., Eliassen, A.H. and Rimm, E.B., 2013, High anthocyanin intake is associated with a reduced risk of myocardial infarction in young and middle-aged women, Circulation 127: 188-196.
- [7] Goufo, P. and Trindade, H., 2014, Rice antioxidants: phenolic acids, flavonoids, anthocyanins, proanthocyanidins, tocopherols, tocotrienols, γ -oryzanol, and phytic acid, Food Sci. Nutr. 2: 75-104.
- [8] Cicero, A.F.G. and Gaddi, A., 2001, Rice bran oil and γ -oryzanol in the treatment of hyperlipoproteinemias and other conditions, Phytother. Res. 15: 277-289.
- [9] Juliano, C., Cossu, M., Alamanni, M.C. and Piu, L., 2005, Antioxidant activity of gamma-oryzanol: Mechanism of action and its effect on oxidative stability of pharmaceutical oils, Int. J. Pharm. 299: 146-54.
- [10] Saenjum, C., Chaiyasut, C., Chansakaow, S., Suttajit, M. and Sirithunyalug, B., 2001, Antioxidant and anti-inflammatory activities of gamma-oryzanol rich extracts from Thai purple rice bran, J. Med. Plant Res. 6: 1070-1077.
- [11] สำนักงานมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม, มาตรฐานผลิตภัณฑ์ชุมชน ข้าวหมาก, 2549, แหล่งที่มา : http://tcps.tisi.go.th/pub/tcps162_46.pdf, 22 มิถุนายน 2557.
- [12] ฉัตรชัย สังข์ผุด และจิราภรณ์ สังข์ผุด, เทคโนโลยีกล้าเชื้อลูกแป้งยีสต์และกระบวนการหมักน้ำตาลจากสำหรับผลิตสุราขาว, แหล่งที่มา : <http://mua.wu.ac.th/mua/pdf/file-181.pdf>, 2 กุมภาพันธ์ 2557.
- [13] เจริญ เจริญชัย, 2548, บทบาทของยีสต์และราจากลูกแป้งในการหมักข้าว, ปทุมธานี, มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี, 74 น.
- [14] Aidoo, K.E., Nout, M.J.R. and Sarkar, P.K., 2006, Occurrence and function of yeasts in Asian indigenous fermented foods, FEMS

- Yeast Res. 6: 30-39.
- [15] Buglass, A.J., 2011, Alcoholic Fermentation, pp. 73-74. In Buglass, A.J. (Ed.), Handbook of Alcoholic Beverages: Technical, Analytical and Nutritional Aspects, John Wiley and Sons, inc., New Jersey.
- [16] Manosroi, A., Ruksiriwanich, W., Kietthanakorn, B., Manosroi, W. and Manosroi, J., 2011, Relationship between biological activities and bioactive compounds in the fermented rice sap, Food Res. Int. 44: 2757-2765.
- [17] ไชยวัฒน์ ไชยสุต, 2556, โปรไบโอติก : จุลินทรีย์ทางเลือกเพื่อสุขภาพ, โรงพิมพ์สำนักงานพระพุทธศาสนาแห่งชาติ, กรุงเทพฯ, 136 น.
- [18] Zhai, F.H., Wang, Q. and Han, J.R., 2015, Nutritional components and antioxidant properties of seven kinds of cereals fermented by the basidiomycete *Agaricus blazei*, J. Cereal Sci. 65: 202-208.
- [19] Kong, E.L., Lee, B.K., Michelle, Ginjom, I. and Nissom, P.M., 2015, DNA damage inhibitory effect and phytochemicals of fermented red brown rice extract, Asian Pac. J. Trop. Dis. 5: 732-736.
- [20] Kupski, L., Cipolatti, E., Rocha, M., Oliveira, M.S., Souza-Soares, L.A. and Badiale-Furlong, E., 2012, Solid-state fermentation for the enrichment and extraction of proteins and antioxidant compounds in rice bran by *Rhizopus oryzae*, Braz. Arch. Biol. Technol. 55: 937-942.
- [21] Schmidt, C.G., Gonçalves, L.M., Prietto, L., Hackbart, H.S. and Furlong, E.B., 2014, Antioxidant activity and enzyme inhibition of phenolic acids from fermented rice bran with fungus *Rizhopus oryzae*, Food Chem. 146: 371-377.
- [22] Razak, D.L.A., Rashid, N.Y.A., Jamaluddin, A., Sharifudin, S.A. and Long, K., 2015, Enhancement of phenolic acid content and antioxidant activity of rice bran fermented with *Rhizopus oligosporus* and *Monascus purpureus*, Biocatal. Agric. Biotechnol. 4: 33-38.
- [23] Plaitho, Y., Kangsadalampai, K. and Sukprasansap, M., 2013, The protective effect of Thai fermented pigmented rice on urethane induced somatic mutation and recombination in *Drosophila melanogaster*, J. Med. Plant Res. 7: 91-98.
- [24] Bhatt, A. and Patel, V., 2013, Antioxidant activity of garlic using conventional extraction and *in vitro* gastrointestinal digestion, Free Radic. Res. 3: 30-34.
- [25] Ti, H., Zhang, R., Li, Q., Wei, Z. and Zhang, M., 2015, Effects of cooking and *in vitro* digestion of rice on phenolic profiles and antioxidant activity, Food Res. Int. 76: 813-820.
- [26] Chung, H., 2009, Characterization of antioxidant activities of soybeans and assessment of their bioaccessibility after

- in vitro* digestion, Available Source: http://scholar.lib.vt.edu/theses/available/etd-11172009-120942/unrestricted/chung_hyun_d_2009.pdf, February 1, 2016.
- [27] Chen, G.L., Chen, S.G., Chen, F., Xie, Y.Q., Han, M.D., Luo, C.X., Zhao, Y.Y. and Gao, Y.Q., 2016, Nutraceutical potential and antioxidant benefits of selected fruit seeds subjected to an *in vitro* digestion, *J. Funct. Foods* 20: 317-331.
- [28] Correa-Betanzo, J., Allen-Vercos, E., McDonald, J., Schroeter, K., Corredig, M. and Paliyath, G., 2014, Stability and biological activity of wild blueberry (*Vaccinium angustifolium*) polyphenols during simulated *in vitro* gastrointestinal digestion, *Food Chem.* 15: 522-531.
- [29] Granese, T., Cardinale, F., Cozzolino, A., Pepe, S., Ombra, M.N., Nazzaro, F., Coppola, F. and Fratianni, F., 2004, Variation of polyphenols, anthocyanins and antioxidant power in the strawberry grape (*Vitis labrusca*) after simulated gastro-intestinal transit and evaluation of *in vitro* antimicrobial activity, *Food Nutr. Sci.* 5: 60-65.
- [30] Sambuy, Y., de Angelis, I., Ranaldi, G., Scarino, M.L., Stamatii, A. and Zucco, F., 2005, The Caco-2 cell line as a model of the intestinal barrier: influence of cell and culture-related factors on Caco-2 cell functional characteristics, *Cell Biol. Toxicol.* 21: 1-26.
- [31] Muangnoi, C., Chingsuwanrote, P., Praengamthanachoti, P., Svasti, S., and Tuntipopipat, S., 2012, *Moringa oleifera* pod inhibits inflammatory mediator production by lipopolysaccharide-stimulated raw 264.7 murine macrophage cell lines, *Inflammation* 35: 445-455.
- [32] Ferruzzi, M.G., Lumpkin, J.L., Schwartz, S.J. and Failla, M., 2006, Digestive Stability, micellarization, and uptake of beta-carotene isomers by Caco-2 human intestinal cells, *J. Agr. Food Chem.* 54: 2780-2785.
- [33] Dawilai, S., Muangnoi, C., Praengamthanachoti, P. and Tuntipopipat S., 2013, Anti-inflammatory activity of bioaccessible fraction from *Eryngium foetidum* leaves, *Biomed. Res. Int.* 2013: 1-8.
- [34] Moongngarm, A. and Saetung, N., 2010, Comparison of chemical compositions and bioactive compounds of germinated rough rice and brown rice, *Food Chem.* 122: 782-788.
- [35] Amarowicz, R., Pegg, R.B., Rahimi-Moghadam, P., Barl, B. and Weil, J.A., 2004, Free-radical scavenging capacity and antioxidant activity of selected plant species from the Canadian prairies, *Food Chem.* 84: 551-562.
- [36] Abdel-Aal, E.S.M. and Hucl, P., 1999, A rapid method for quantifying total anthocyanins in blue aleurone and purple pericarp wheats, *Cereal Chem.* 76: 350-354.

- [37] Lee, J., Durst, R.W. and Wrolstad, R.E., 2005, Determination of total monomeric anthocyanin pigment content of fruit juices, beverages, natural colorants, and wines by the pH differential method: Collaborative study, J. AOAC Int. 88: 1269-1278.
- [38] Sompong, R., Siebenhandl-Ehn, S., Linsberger-Martin, G. and Berghofer, E., 2011, Physicochemical and antioxidative properties of red and black rice varieties from Thailand, China and Sri Lanka Food Chem. 124: 132-140.
- [39] Fukumoto, L.R. and Mazza, G., 2000, Assessing antioxidant and pro-oxidant activity of phenolic compounds, J Agr. Food Chem. 48: 3597-3604.
- [40] Griffin, S.P. and Bhagooli, R., 2004, Measuring antioxidant potential in corals using the FRAP assay, J. Exp. Mar. Biol. Eco. 302: 201-211.
- [41] Han, O., Failla, M.L., Hill, A.D., Morris, E.R. and Smith, J.C. Jr., 1994, Inositol phosphates inhibit uptake and transport of iron and zinc by a human intestinal cell line, J. Nutr. 124: 580-587.
- [42] Garrett, D.A., Failla, M.L., Sarama, R.J. and Craft, N., 1999, Development of an *in vitro* digestion method to assess carotenoid bioavailability from meals, J. Agr. Food Chem. 47: 4301-4309.
- [43] Katayama, S. and Mine, Y., 2007, Antioxidant activity of amino acids on tissue oxidative stress in human intestinal epithelial cell model, J. Agr. Food Chem. 55: 8458-8464.
- [44] Fernandez-Orozco, R., Frias, J., Muñoz, R., Zielinski, H., Piskula, M.K., Kozłowska, H. and Vidal-Valverde C., 2007, Fermentation as a bio-process to obtain functional soybean flours, J. Agr. Food Chem. 55: 8972-8979.
- [45] Lee, I.H., Hung, Y.H. and Chou, C.C., 2007, Total phenolic and anthocyanin contents, as well as antioxidant activity, of black bean koji fermented by *Aspergillus awamori* under different culture conditions, Food Chem. 104: 936-942.
- [46] Oliveira, M.S., Cipolatti, E.P., Furlong, E.B. and Soares, L.S., 2012, Phenolic compounds and antioxidant activity in fermented rice (*Oryza sativa*) bran, Ciênc Tecnol. Aliment. 32: 531-537.
- [47] Bhanja Dey, T. and Kuhad, R.C., 2014, Upgrading the antioxidant potential of cereals by their fungal fermentation under solid-state cultivation conditions, Lett. Appl. Microbiol. 59: 493-499.
- [48] Zhang, L., Gao, W., Chen, X. and Wang, H., 2014, The effect of bioprocessing on the phenolic acid composition and antioxidant activity of wheat bran, Cereal Chem. 91: 255-261.
- [49] dos Reis, B.A., Kosińska-Cagnazzo, A., Schmitt, R. and Andlauer, W., 2014, Fermentation of plant material-effect on

- sugar content and stability of bioactive compounds, Pol. J. Food Nutr. Sci. 64: 235-241.
- [50] Takii, Y., Ikeda, K., Sato, C., Yano, M., Sato, T. and Konno, H., 2005, Production and characterization of β -glucosidase from *Rhizopus oryzae* MIBA348, J Biol. Macromol. 5: 11-16.
- [51] Tako, M., Farkas, E., Lung, S.Z., Krisch, J., Vagvolgyi, C.S. and Papp, T., 2010, Identification of acid- and thermotolerant extracellular β -glucosidase activities in Zygomycetes fungi, Acta Biol. Hung. 61: 101-110.
- [52] Raza, F., Raza, N.A., Hameed, U., Haq, I.U. and Mariam, I., 2011, Solid state fermentation for the production of β -glucosidase by co-culture of *Aspergillus niger* and *A. oryzae*, Pak. J. Bot. 43: 75-83.
- [53] Lima, M.A., Oliveira-Neto, M., Kadowaki, M.A., Rosseto, F.R., Prates, E.T., Squina, F.M., Leme, A.F., Skaf, M.S., Polikarpov, I., Lima, M.A., Oliveira-Neto, M., Kadowaki, M.A., Rosseto, F.R., Prates, E.T., Squina, F.M., Leme, A.F., Skaf, M.S. and Polikarpov, I., 2013, *Aspergillus niger* β -glucosidase has a cellulase-like tadpole molecular shape: insights into glycoside hydrolase family 3 (GH3) β -glucosidase structure and function, J. Biol. Chem. 288: 32991-33005.
- [54] Singhania, R.R., Patel, A.K., Sukumaran, R.K., Larroche, C. and Pandey, A., 2013, Role and significance of beta-glucosidases in the hydrolysis of cellulose for bioethanol production, Bioresour. Technol. 127: 500-507.
- [55] DellaPenna, D., 2005, A decade of progress in understanding vitamin E synthesis in plants, J Plant Physiol. 162: 729-37.
- [56] Padayachee, A., Netzel, G., Netzel, M., Day, L., Mikkelsen, D. and Gidley, M.J., 2013, Lack of release of bound anthocyanins and phenolic acids from carrot plant cell walls and model composites during simulated gastric and small intestinal digestion, Food Funct. 4: 906-916.
- [57] Gopinath, S.C.B., Anbu, P. and Hilda, A., 2005, Extracellular enzymatic activity profiles in fungi isolated from oil-rich environments, Mycoscience 46: 119-126.
- [58] de Souza, P.M., 2005, A biotechnology perspective of fungal proteases. Braz. J. Microbiol. 46: 337-346.
- [59] Saleem, A. and Ebrahim, M.K.H., 2014, Production of amylase by fungi isolated from legume seeds collected in Almadinah Almunawwarah, Saudi Arabia, J. Taibah Univ. Sci. 8: 90-97.
- [60] Rashid, N.Y.A., Razak, D.L.A., Jamaluddin, A., Sharifuddin, S.A. and Long, K., 2015, Bioactive compounds and antioxidant activity of rice bran fermented with lactic acid bacteria, Malays J. Microbiol. 11: 156-162.

- [61] Sirilun, S., Chaiyasut, C., Pengkumsri, N., Pelyuntha, W., Peerajan, S. and Sundaram Sivamaruthi, B., 2015, Production of ferulic acid from oryzanol degradation during the fermentation of black rice bran by ferulic acid esterase producing *Aspergillus oryzae* HP, J. Pure Appl. Microbiol. 9: 513-520.
- [62] Pérez-Vicente, A., Gil-Izquierdo, A. and García-Viguera, C., 2002, *In vitro* gastrointestinal digestion study of pomegranate juice phenolic compounds, anthocyanins, and vitamin C, J. Agr. Food Chem. 50: 2308-2312.
- [63] Uzunović, A. and Vranić, E., 2008, Stability of anthocyanins from commercial black currant juice under simulated gastrointestinal digestion, Bosn. J. Basic Med. Sci. 8: 254-258.
- [64] Huang, C.C.J., 2003, Potential functionality and digestibility of oryzanol as determined using *in vitro* cell culture models, Ph.D. Thesis, Agricultural and Mechanical College, Louisiana State University, The United States of America, 159 p.
- [65] Farbstein, D., Kozak-Blickstein, A. and Levy, A., 2010, Antioxidant vitamins and their use in preventing cardiovascular disease, Molecules 15: 8098-8110.
- [66] Suganya Devi, P., Saravana Kumar, M. and Mohan Das, S., 2012, DNA damage protecting activity and free radical scavenging activity of anthocyanins from red sorghum (*Sorghum bicolor*) bran, Biotechnol. Res. Int. 2012: 1-9.
- [67] Burton, G.W. and Traber, M.G., 1990, Vitamin E antioxidant activity biokinetics and bioavailability, Annu. Rev. Nutr. 10: 357-382.
- [68] Rojano, B., Saez, J., Schinella, G., Quijano, J., Vélez, E., Gil, A. and Notario, R., 2008, Experimental and theoretical determination of the antioxidant properties of isoespintanol (2-isopropyl-3,6-dimethoxy-5-methylphenol), J. Mol. Struct. 877: 1-6.
- [69] Lee, B.H., Lai, Y.S. and Wu, S.C., 2015, Antioxidation, angiotensin converting enzyme inhibition activity, nattokinase, and antihypertension of *Bacillus subtilis* (natto) fermented pigeon pea, J. Food Drug Anal. 23: 750-757.
- [70] Ghosh, K., Ray, M., Adak, A., Dey, P., Halder, S.K., Das, A., Jana, A., Parua (Mondal), S., Mohapatra, P.K.D., Pati, B.R. and Mondal, K.C., 2015, Microbial, saccharifying and antioxidant properties of an Indian rice based fermented beverage, Food Chem. 168: 196-202.
- [71] Liyanapathirana, C. and Shahidi, F., 2004, Antioxidant activity of wheat extracts as affected by *in vitro* digestion, BioFactors 21: 325-328.
- [72] Chohan, M., Naughton, D.P., Jones, L. and Opara. E.I., 2012, An investigation of the relationship between the anti-inflammatory activity, polyphenolic content, and

- antioxidant activities of cooked and *in vitro* digested culinary herbs, *Oxid. Med. Cell Longev.* 2012: 1-9.
- [73] Lee, Y.S., Bak, E.J., Kim, M., Park, W., Seo, J.Y. and Yoo, Y.J., 2008, Induction of IL-8 in periodontal ligament cells by H₂O₂, *J. Microbiol.* 4: 579-584.
- [74] Matsuoka, K., Isowa, N., Yoshimura, T., Liu, M. and Wada, H., 2002, Green tea polyphenol blocks H₂O₂-induced interleukin-8 production from human alveolar epithelial cells, *Cytokine* 18: 266- 273.
- [75] da Silveira Vargas, F., Soares, D.G., Ribeiro, A.P., Hebling, J. and de Souza Costa, C.A., 2014, Protective effect of alpha-tocopherol isomer from vitamin E against the H₂O₂ induced toxicity on dental pulp cells, *Biomed. Res. Int.* 2014: 1-5.
- [76] Tong, F.Y. and Meydani, M., 2001, Green tea catechins and vitamin E inhibit angiogenesis of human microvascular endothelial cells through suppression of IL-8 production, *Nutr. Cancer* 41: 119-25.