

Thesis Title Chemopreventive Potential of Gamma-Oryzanol Extract
from Thai Purple Rice Bran

Author Mr. Chalermpong Saenjum

Degree Doctor of Philosophy (Pharmacy)

Thesis Advisory Committee Assoc. Prof. Dr. Busaban Sirithunyalug Advisor

Asst. Prof. Dr. Chaiyavat Chaiyasut Co-advisor

Asst. Prof. Dr. Sunee Chansakaow Co-advisor

ABSTRACT

This study aimed to investigate the chemopreventive potential of γ -oryzanol extract from Thai purple rice bran, assessed by antioxidant and anti-inflammatory activities and the induction effect on phase II detoxifying enzymes. Ten purple rice bran samples were collected in Northern Thailand. The crude rice bran oil was prepared by Soxhlet's extraction in a hexane-ethyl acetate mixture and further purified by column chromatography to obtain the γ -oryzanol extracts. The γ -oryzanol content was analyzed using reversed-phase high performance liquid chromatography (HPLC). The extracts contained γ -oryzanol in the range of 1.17 – 9.14% w/w. Subsequently, the extract from 5 cultivars of Thai purple rice bran namely *PAH E-KAW*, *GAM THOR*, *GAM SUKHOTHAI-2*, *GAM BOUNG*, and *GAM DOI MUSUR*, which contained more than 5% w/w of γ -oryzanol, were selected for chemopreventive potential

evaluation; each extract was first standardized by adding the equivalent amount of each extract to give 10% w/v γ -oryzanol. All of the extracts exhibited moderate antioxidant activity as assessed by an ABTS assay, superoxide anion scavenging activity and ferric reducing ability power (FRAP). Additionally, *GAM BOUNG* exhibited a strong inhibition effect on linoleic acid peroxidation ($IC_{50} = 36.79 \pm 2.97$ $\mu\text{g/mL}$) and an inhibition effect on nitric oxide production in RAW 264.7 cells, with an IC_{50} value of 29.32 ± 2.21 $\mu\text{g/mL}$. Furthermore, all of the extracts (10 $\mu\text{g/mL}$) exhibited the protective effect on oxidative DNA damage induced by Fenton reaction as compared with the positive control quercetin (lower than 5 $\mu\text{g/mL}$). Moreover, all of the extracts showed a potent anti-inflammatory activity through an inhibitory effect on cyclooxygenase-2 (COX-2) and tumor necrosis factor- α (TNF- α) production in combined LPS-IFN- γ -activated HT-29 colorectal adenocarcinoma cells. *GAM BOUNG* exhibited the highest inhibitory effect on COX-2 and TNF- α production, without exerting cytotoxicity, followed by *GAM SUKHOTHAI-2*, *GAM THOR* and control γ -oryzanol. Furthermore, all of the extracts showed the induction effect on glutathione S-transferase and UDP-glucuronosyl transferase activity. Interestingly, only *GAM BOUNG* exhibited the induction effect on sulfotransferase activity. These results indicate that the γ -oryzanol extract from Thai purple rice bran is more likely to be acting as a lipophilic radical scavenger rather than a hydrophilic radical scavenger. Moreover, these extracts exert a potent anti-inflammatory activity and induction effects on Phase II detoxifying enzymes. These findings suggest there is a potential use of γ -oryzanol extract from Thai purple rice bran as chemopreventive supplements or in nutraceuticals.

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์	ศักยภาพในการป้องกันการก่อมะเร็งของสารสกัดแกมมา-โอโรซานอลจากรำข้าวเก่าไทย	
ผู้เขียน	นายเฉลิมพงษ์ แสนจุ่ม	
ปริญญา	วิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต (เภสัชศาสตร์)	
คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์	รศ.ดร.บุษบัน ศิริธัญญาลักษณ์	อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก
	ผศ.ดร.ไชยวัฒน์ ไชยสุด	อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
	ผศ.ดร.สุนีย์ จันทร์สกว	อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

บทคัดย่อ

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อประเมินศักยภาพในการป้องกันการก่อมะเร็งของสารสกัดแกมมา-โอโรซานอลจากรำข้าวเก่าไทยซึ่งประเมินด้วยฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน ฤทธิ์ต้านการอักเสบและการกระตุ้นเอนไซม์กำจัดสารพิษและสารก่อมะเร็ง โดยคัดเลือกรำข้าวเก่าสายพันธุ์พื้นเมืองจำนวน 10 ตัวอย่างในเขตพื้นที่ภาคเหนือของประเทศไทย นำตัวอย่างรำข้าวมาสกัดเป็นน้ำมันรำข้าวด้วยวิธีการสกัดแบบต่อเนื่องด้วยตัวทำละลายผสมระหว่างเฮกเซนและเอทิลอะซิเตต จากนั้นนำน้ำมันรำข้าวที่ได้มาทำให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์จะได้สารสกัดแกมมา-โอโรซานอล วิเคราะห์หาปริมาณแกมมา-โอโรซานอลด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงพบว่าสารสกัดแกมมา-โอโรซานอลจากรำข้าวเก่าไทยมีปริมาณแกมมาโอโรซานอลอยู่ในช่วงระหว่างร้อยละ 1.17 - 9.14 โดยน้ำหนัก คัดเลือกสารสกัดที่มีปริมาณแกมมา-โอโรซานอลมากกว่าร้อยละ 5 โดยน้ำหนัก ซึ่งได้แก่สายพันธุ์ป่าอึกอ ก่าต่อ ก่าสุโขทัย-2 ก่าบึงและก่าคอยมูเซอเพื่อนำมาประเมินศักยภาพในการป้องกันการก่อมะเร็ง โดยนำสารสกัดดังกล่าวมาปรับมาตรฐานให้มีส่วนประกอบหลักของแกมมา-โอโรซานอลเท่ากับร้อยละ 10 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร สารสกัดแกมมา-โอโรซานอลจากรำข้าวเก่าไทยทั้งหมดแสดงฤทธิ์ต้านออกซิเดชันในระดับปานกลางเมื่อประเมินด้วยวิธีวิเคราะห์เอบีทีเอส (ABTS) ความสามารถในการให้อิเล็กตรอน (FRAP) และการขจัดอนุมูลอิสระซูเปอร์ออกไซด์ สารสกัดแกมมา-โอโรซานอลจากรำข้าวเก่าบึงแสดงฤทธิ์ยับยั้งการเกิดลิปิดเปอร์ออกซิเดชันสูงสุด ความเข้มข้นที่สามารถยับยั้งการเกิดลิปิดเปอร์ออกซิเดชันได้ร้อยละ 50 (IC_{50}) เท่ากับ 36.79 ± 2.97 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรและฤทธิ์ยับยั้งการสร้างไนตริกออกไซด์ในเซลล์แมคโครฟลาจ RAW 264.7 ความเข้มข้นที่สามารถยับยั้งการสร้างไนตริกออกไซด์ได้ร้อยละ 50 เท่ากับ 29.32 ± 2.21 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นอกจากนี้สารสกัดแกมมา-โอโรซานอลทั้งหมดที่ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรยังสามารถยับยั้งการทำลายดีเอ็นเอจากปฏิกิริยา

เฟนตันเมื่อเปรียบเทียบกับสารมาตรฐานเคอซิทินที่สามารถยับยั้งการทำลายดีเอ็นเอจากปฏิกิริยาเฟนตันที่ความเข้มข้นน้อยกว่า 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรสารสกัดทั้งหมดแสดงฤทธิ์ด้านการอักเสบที่ดีผ่านการยับยั้งการสร้างเอนไซม์ไซโคลออกซิจิเนส-2 (COX-2) และทูเมอร์ เนโครซิส แฟกเตอร์-อัลฟา (TNF- α) ในเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่และไส้ตรง (HT-29) ที่ถูกกระตุ้นด้วยไลโปพอลิแซคคาไรด์ไรต์และอินเทอร์เฟอรอน-แกมมา สารสกัดแกมมา-โอโรซานอลจากรำข้าวกำบั้งแสดงฤทธิ์ยับยั้งการสร้างเอนไซม์ไซโคลออกซิจิเนส-2 และทูเมอร์ เนโครซิส แฟกเตอร์-อัลฟาสูงสุดโดยที่ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ที่ใช้ทดสอบ ตามมาด้วยสารสกัดแกมมา-โอโรซานอลจากรำข้าวกำสุโขทัย-2 รำข้าวกำต่อและแกมมา-โอโรซานอลเปรียบเทียบ ตามลำดับ นอกจากนี้สารสกัดแกมมา-โอโรซานอลจากรำข้าวกำบั้ง รำข้าวกำสุโขทัย-2 และรำข้าวกำต่อยังสามารถกระตุ้นเอนไซม์กลูตาไธโอน เอสทรานสเฟอเรสและยูดีพี-กลูคูโรนิซิด ทรานสเฟอเรส เป็นที่น่าสนใจว่ามีเพียงสารสกัดแกมมา-โอโรซานอลจากรำข้าวกำบั้งเท่านั้นมีผลกระตุ้นเอนไซม์ซัลโฟทรานสเฟอเรส ผลการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่า สารสกัดแกมมา-โอโรซานอลจากรำข้าวกำไทยแสดงฤทธิ์ขจัดอนุมูลอิสระในกลุ่มที่ชอบไขมันมากกว่ากลุ่มที่ชอบน้ำ นอกจากนี้สารสกัดแกมมา-โอโรซานอลจากรำข้าวกำไทยยังมีฤทธิ์ด้านการอักเสบที่ดีและสามารถกระตุ้นเอนไซม์กำจัดสารพิษและสารก่อมะเร็งได้อีกด้วย จากการศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าสารสกัดแกมมา-โอโรซานอลจากรำข้าวกำไทยมีศักยภาพในการพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์เสริมสุขภาพเพื่อป้องกันการก่อมะเร็งได้