ผลของสารผสมจากสารสกัดสาหร่ายน้ำจืด *Rhizoclonium hieroglyphicum* และ *Spirogyra neglecta* ต่อการลดระดับน้ำตาลและไขมันในเลือดหนูเบาหวาน

Effect of mixed freshwater algae extracts, *Rhizoclonium hieroglyphicum* and *Spirogyra neglecta*, on hyperglycemia and hyperlipidemia in diabetic rats

รัตนาภรณ์ จันทร์ทิพย์[1] นริศรา ไล้เลิศ[2] เกรียงศักดิ์ เม่งอำพัน[3,4] วิวัฒน์ หวังเจริญ[5] และ ดวงพร อมรเลิศพิศาล[3,4*]

Janthip R.[1], Lailerd N. [2], Mangumphan K.[3,4], Wangchareon W.[5] and Amornlerdpison D.[3,4*]

[1]สาขาสหวิทยาการเกษตร คณะวิศวกรรมและอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้ เชียงใหม่ 50290

[1]Agricultural Interdisciplinary Program, Faculty of Engineering and Agro-Industry, Maejo University, Chiang Mai, Thailand 50290

[2]ภาควิชาสรีรวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ เชียงใหม่ 50200

[2]Department of Physiology, Faculty of Medicine, Chiang Mai University, Chiang Mai, Thailand 50200

[3]คณะเทคโนโลยีการประมงและทรัพยากรทางน้ำ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ เชียงใหม่ 50290

[3]Faculty of Fisheries Technology and Aquatic Resources, Maejo University, Chiang Mai, Thailand 50290

[4]ศูนย์ความเป็นเลิศด้านนวัตกรรมทางการเกษตรสำหรับบัณฑิตผู้ประกอบการ

[4]Center of Excellence in Agricultural Innovation for Graduate Entrepreneur, Maejo University, Chiang Mai, Thailand 50290

[5]คณะวิศวกรรมและอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้ เชียงใหม่ 50290

[5]Faculty of Engineering and Agro-Industry, Maejo University, Chiang Mai, Thailand 50290

*Corresponding author: doungpornfishtech@gmail.com

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์หลักในการศึกษาครั้งนี้คือ การประเมินฤทธิ์ชีวภาพสารสกัดผสมของสาหร่ายไก (*Rhizoclonium hieroglyphicum*) และสาหร่ายเตา (*Spirogyra neglecta*) เพื่อการเพิ่มประสิทธิภาพการออกฤทธิ์ของสารสกัดผสม (RSE) และช่วยลดต้นทุนของวัตถุดิบ โดยนำไปวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม ทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในหลอดทดลอง และทดสอบประสิทธิภาพของ RSE ในการลดระดับน้ำตาล ไตรกลีเซอไรด์ และคลอเลสเตอรอลในเลือดของหนูขาวเพศผู้ที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะเบาหวานด้วยสเตรปโทโซโทซิน ผลการศึกษาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม พบว่า RSE 1 กรัมมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม 42.31 มิลลิกรัมสมมูลของแกลลิก (mgGAE/ g extract) และมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเอบีทีเอส เท่ากับ 1115.28 มิลลิโมลาร์สมมูลของโทรลอกซ์ (mM TEAC/ g extract) ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระดีพีพีเอช และอนุมูลอิสระซุปเปอร์ออกไซด์ เท่ากับ 33.17 และ 139.44 mgGAE/ g extract ตามลำดับ ผลการทดสอบในกลุ่มหนูขาวที่มีภาวะเบาหวานและได้รับการป้อน RSE ขนาด 500 มก./กก. เป็นเวลา 8 สัปดาห์ พบว่าระดับน้ำตาลและคอเลสเตอรอลรวมในเลือดลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (36.82% และ 29.38% ตามลำดับ) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มหนูขาวควบคุมที่มีภาวะเบาหวาน ผลจากการศึกษาเป็นแนวทางในการพัฒนาสารสกัดสาหร่ายน้ำจืดเป็นผลิตภัณฑ์อาหารสุขภาพ เพื่อช่วยบรรเทาภาวะระดับน้ำตาลและไขมันในเลือดสูงในผู้ที่มีภาวะการเป็นโรคเบาหวานได้

คำสำคัญ: สาหร่ายไก สาหร่ายเตา ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ลดน้ำตาลในเลือด ฤทธิ์ลดไขมันในเลือด

Abstract

The main purpose of this study was to evaluate the bioactivity of the mixed algae extracts (RSE) which consisted of alga extracts of *Rhizoclonium hieroglyphicum* and *Spirogyra neglecta* in order to increase biological efficiency of RSE and reduce the cost of alga materials. The RSE was determined the total phenolic content and *in vitro* antioxidant activities. The effects of RSE on lowering blood glucose, triglycerides and cholesterol were studied in streptozotocin-induced diabetic rats. The results showed that the total phenolic content of RSE contained 42.31 mg GAE/ g extract and also presented the antioxidant activities were 1115.28 mM TEAC/ g extract, 33.17 and 139.44 mg GAE/ g extract in ABTS, DPPH and Superoxide radical scavenging assays, respectively. In animal study, the RSE at the concentration of 500 mg/kg was fed to the streptozotocin-induced diabetic rats for 8 weeks and showed the significant decrease of blood glucose and total cholesterol levels (36.82% and 29.38%, respectively) when compared with control group of diabetic rats. From the result of this study is a guideline for the development of freshwater algae extract as a supplement for hyperglycemia and hyperlipidemia in diabetic people.

Keywords: *R. hieroglyphicum*, *S. neglecta*, antioxidant, anti-hyperglycemia, anti-hyperlipidemia

บทนำ

โรคเบาหวานชนิดที่ 2 เป็นโรคที่เกิดจากตับอ่อนผลิตออร์โมนอินซูลินได้ลดลงหรือผลิตได้แต่มีประสิทธิภาพการลดน้ำตาลในเลือดลดลง ส่งผลให้มีระดับน้ำตาลในเลือดสูง และมีอาการกระหายน้ำบ่อย ปัสสาวะบ่อย อ่อนเพลีย และเหนื่อยง่าย จากสถิติผู้ป่วยด้วยโรคไม่ติดต่อเรื้อรัง (Non-Communicable Diseases, NCDs) พบว่าโรคเบาหวานเป็นโรคอันดับต้นๆ ที่คนไทยเป็นกันมากที่สุด โดยเฉพาะโรคเบาหวานชนิดที่ 2 ซึ่งพบว่าเป็นชนิดที่คนไทยเป็นกันมากกว่า 90% (Aekplakorn *et al*., 2018) สาเหตุของการเกิดโรคเบาหวานชนิดที่ 2 มักมาจากพฤติกรรมการบริโภคอาหารที่มีแคลอรี่สูง เกิดภาวะอ้วน และขาดการออกกำลังกาย ซึ่งในการรักษาโรคเบาหวานชนิดที่ 2 โดยยาลดระดับน้ำตาลชนิดรับประทานจำแนกตามกลไกการออกฤทธิ์มี 4 กลุ่ม ได้แก่ 1) ยาที่กระตุ้นการหลั่งอินซูลินจากเบต้าเซลล์ของตับอ่อน 2) ยาที่ลดภาวะดื้อต่ออินซูลิน 3) ยาที่ออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ alpha-glucosidase ที่ผนังลำไส้ ทำให้การดูดซึมกลูโคสจากทางเดินอาหารเกิดขึ้นช้าลง 4) ยาที่ยับยั้งเอนไซม์ที่ใช้ในการทำลายฮอร์โมนที่หลั่งจากลำไส้ ผู้ป่วยเบาหวานของไทยส่วนใหญ่ใช้ยาเมทฟอร์มิน (metformin) ซึ่งอยู่ในกลุ่มยาที่ลดภาวะดื้อต่ออินซูลิน ในการควบคุมระดับน้ำตาลในเลือดของผู้ป่วย (Aroda *et al*., 2015) โดยมีกลไกกระตุ้นความไวต่ออินซูลินในร่างกาย ทำให้มีการนำกลูโคสกลับเข้าไปในเซลล์และนำกลูโคสไปใช้เพิ่มขึ้น ลดการดูดซึมกลูโคสภายในลำไส้ และลดภาวะไขมันในเลือดหรือภาวะน้ำหนักตัวเกิน (Schofield *et al*., 2016)ได้อีกด้วย

สาหร่ายไก [*Rhizoclonium hieroglyphicum* (C. Agardh) Kützing] และสาหร่ายเตา [*Spirogyra neglecta* (Hassall) Kützing] ถูกนำมาใช้ในการศึกษาครั้งนี้ สาหร่ายไกเป็นสาหร่ายน้ำจืดที่มีการนำมาแปรรูปเป็นอาหารหลายรูปแบบ เช่น ไกทอด ไกยี ห่อนึ่งไก มีการเก็บเกี่ยวสาหร่ายไกจากแหล่งน้ำธรรมชาติ และนำมาทำให้แห้งเพื่อจำหน่ายราคา 500-600 บาทขึ้นกับฤดูกาล โดยเฉพาะกลุ่มวิสาหกิจชุมชนบ้านหนองบัวที่มีการนำเอาสาหร่ายไกมาทำเป็นผลิตภัณฑ์ดังกล่าวจนกลายเป็นสินค้าเด่นของชุมชน นอกจากนี้ยังมีรายงานการวิจัยถึงฤทธิ์ทางชีวภาพของสาหร่ายไก เช่น ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ป้องกันการอักเสบ และการเกิดแผลในกระเพาะอาหาร (Amornlerdpison *et al*., 2011) สารสกัดน้ำของสาหร่ายไกขนาด 1,000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ช่วยลดน้ำตาลและไตรกลีเซอไรด์ในสัตว์ทดลองที่มีภาวะเบาหวานได้ (Srimaroeng *et al*., 2015) นอกจากนี้เมื่อทดสอบในมนุษย์ที่ได้รับสารสกัดสาหร่ายไกขนาด 1,000 มิลลิกรัมต่อวัน พบว่า ไม่เป็นอันตรายและไม่มีผลต่ออัตราการเต้นของหัวใจสูงสุด (Sawangpak *et al*., 2016) ส่วนสาหร่ายเตา เป็นสาหร่ายน้ำจืดอีกชนิดหนึ่งที่มีคุณค่าทางโภชนาการ นิยมนำมาทำเป็นอาการพื้นบ้านและแปรรูปเป็นอาหาร สาหร่ายเตาต้องเพาะเลี้ยงในบ่อดินและมีการควบคุมคุณภาพน้ำเพื่อการเจริญเติบโต และเมื่อนำมาทำให้แห้งจะได้ผลผลิตสาหร่ายแห้งเหลือเพียงร้อยละ 10 ทำให้สาหร่ายเตามีราคาสูงถึง 3,000-3,500 บาทต่อกิโลกรัมแห้ง มีรายงานการวิจัยของสาหร่ายเตา พบว่ามีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา และมีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ(Peerapornpisal *et al*., 2012) โดยมีสารประกอบฟีนอลิกเป็นสารออกฤทธิ์ที่สำคัญ (Janthip *et al*., 2013) มีคุณสมบัติช่วยเพิ่มความไวในการตอบสนองต่ออินซูลิน และลดการเกิดภาวะเครียดออกซิเดชัน (oxidative stress) สาหร่ายเตาขนาด 1,000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ช่วยเพิ่มระดับเอนไซม์ที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและลดระดับน้ำตาลในสัตว์ทดลองได้ (Ontawong *et al*., 2013;) และยังมีฤทธิ์ควบคุมภาวะความดันโลหิตสูงในหนูขาวได้ด้วย (Kamkaew *et al*., 2016)

จากการวิจัยก่อนหน้านี้ได้ศึกษาปริมาณของสารประกอบฟีนอลิกและคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระของสาหร่ายไกและสาหร่ายเตาแต่ละชนิดพบว่า สารสกัดด้วยน้ำของสาหร่ายทั้ง 2 ชนิดมีสารประกอบฟีนอลิกชนิดไอโซเควอซิทินเป็นองค์ประกอบที่สำคัญ และสามารถขจัดอนุมูลอิสระได้ (Janthip *et al*., 2017) จากรายงานการวิจัยดังกล่าว ทีมวิจัยมีแนวคิดในการพัฒนาผลิตภัณฑ์ใหม่เพื่อนำมาใช้ในการป้องกันโรค NCDs โดยเฉพาะโรคเบาหวาน โดยการพัฒนาสูตรสารสกัดใหม่ที่มีการผสมสารสกัดสาหร่ายทั้ง 2 ชนิดอาศัยคุณสมบัติการก่อเจลที่ดีจากสาหร่ายไกและฤทธิ์ทางชีวภาพในการลดระดับน้ำตาลจากสาหร่ายเตาและสาหร่ายไก เพื่อให้ได้ประสิทธิภาพการออกฤทธิ์ของสารสกัดที่ดีขึ้นกว่าการใช้สาหร่ายเพียงชนิดเดียว และมีต้นทุนของวัตถุดิบเหมาะสม จากนั้นศึกษาสารสำคัญและฤทธิ์ทางชีวภาพทั้งในหลอดทดลองและสัตว์ทดลองที่ช่วยสนับสนุนการใช้ประโยชน์ในการเป็นผลิตภัณฑ์เสริมอาหารสำหรับป้องกันภาวะเบาหวานต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

1.การเตรียมสารสกัดสาหร่ายไกและสาหร่ายเตาด้วยน้ำ

นำสาหร่ายไกมาจากกลุ่มวิสาหกิจชุมชนบ้านหนองบัว ที่เก็บจากแม่น้ำน่าน ตำบลท่าวังผา จังหวัดน่าน ในช่วงเดือนพฤศจิกายนถึงมีนาคม ปี 2560 ส่วนสาหร่ายเตา นำมาจากกลุ่มวิสาหกิจชุมชนผู้เพาะเลี้ยงสาหร่ายเตา บ้านนาคูหา อำเภอเมือง จังหวัดแพร่ ที่เก็บในช่วงเดือนมิถุนายนถึงตุลาคม ปี 2559 นำสาหร่ายแห้ง (Figure 1) แต่ละชนิดมาสกัดด้วยน้ำ ในอัตราส่วนสาหร่ายแห้ง 100 กรัม ต้มในน้ำกลั่นปริมาตร 2 ลิตร เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นกรองแยกกากสาหร่ายออก นำส่วนสารละลายไประเหยเอานำออกด้วยเครื่องกลั่นระเหยแบบหมุนสุญญากาศ จนได้สารละลายเข้มข้น จากนั้นนำไปทำให้แห้งด้วยเครื่องระเหิดแห้งแบบแช่แข็ง (freeze dryer) จนได้สารสกัดน้ำสาหร่าย โดยการสกัดสาหร่ายไกและเตาทำวิธีสกัดเดียวกัน นำสารสกัดสาหร่ายไกและสาหร่ายเตามาผสมกันในอัตราส่วน 1:1 (สารสกัดสาหร่ายไก 100 กรัมผสมกับสารสกัดสาหร่ายเตา 100 กรัม) ผสมสารสกัดให้เข้ากันก่อนนำไปทดสอบต่อไป

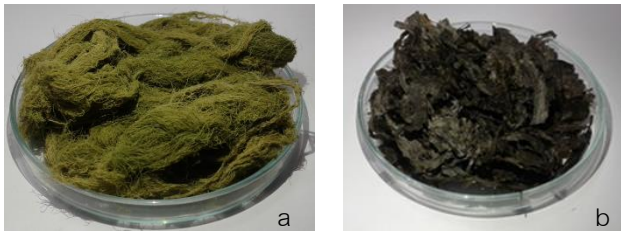


Figure 1 Dried *R. hieroglyphicum* (a) and *S. neglecta* (b)

2.การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม

การวิเคราะห์ปริมาณของสารประกอบฟีนอลิกรวม ตามวิธีการของ Sachindra และคณะ (2010) ซึ่งดัดแปลงจาก Folin-Ciocalteu method โดยการผสมสารสกัดสาหร่ายที่ความเข้มข้น 1-5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (มก./มล.) ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร (มล.)กับ 10% Folin-Ciocalteu solution 1 มล. และ 7.5% sodium carbonate solution 0.8 มล. ทิ้งไว้นาน 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง วัดค่าดูดกลืนแสงที่ 765 นาโนเมตร คำนวณปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดโดยเทียบกับสารมาตรฐานกรดแกลลิก (gallic acid) ในหน่วยมิลลิกรัมต่อกรัมของสารสกัดตัวอย่าง หรือสมมูลของกรดแกลลิก (mg GAE/g extract)

3.การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

3.1 ฤทธิ์ขจัดอนุมูลอิสระเอบีทีเอส

ฤทธิ์ขจัดอนุมูลอิสระเอบีทีเอส ($ABTS^{\bullet+}$ radical scavenging activity) ใช้วิธีทดสอบตามวิธีการของ Re *et al*. (1999) มีขั้นตอนดังนี้ เตรียมน้ำยา 2, 2'-azino-bis 3-ethylbenzthiazoline -6-sulfonic acid (ABTS) โดยการผสม 7 ไมโครโมลาร์ของ ABTS 5 มล.กับ 140 ไมโครโมลาร์ของโพแทสเซียมเปอร์ซัลเฟต ($K_2S_2O_8$) 88 ไมโครลิตร เก็บในที่มืด 16 ชั่วโมง นำมาเจือจางด้วยน้ำที่ปราศจากไอออน (deionized water) ในการทดสอบฤทธิ์ขจัดอนุมูล $ABTS^{\bullet+}$ หยดน้ำยา 1.8 มล. ลงในหลอดที่มีสารทดสอบหรือน้ำที่ปราศจากไอออน ผสม

ให้เข้ากัน ทิ้งไว้ 6 นาที วัดค่าดูดกลืนแสงที่ 734 นาโนเมตร คำนวณฤทธิ์ขจัดอนุมูล $ABTS^{\bullet+}$ เป็นร้อยละจากสมการดังนี้

ฤทธิ์ขจัดอนุมูล $ABTS^{\bullet+}$ (%) = [1- (A734 sample / A734 control] x 100

เมื่อ A734 sample และ A734 control เป็นค่าดูดกลืนแสงที่ 734 นาโนเมตร ของสารทดสอบและน้ำที่ปราศจากไอออน ตามลำดับ เปรียบเทียบความเข้มข้นของสารทดสอบกับความเข้มข้นของโทรลอกซ์ ซึ่งเป็นอนุพันธ์ของวิตามินอี ที่แสดงฤทธิ์เท่ากัน (Trolox equivalent antioxidant capacity, TEAC) หรือสมมูลของโทรลอกซ์

3.2 ฤทธิ์ขจัดอนุมูลอิสระดีพีพีเอช

ฤทธิ์ขจัดอนุมูลอิสระดีพีพีเอช (DPPH radical scavenging assay) ตามวิธีของ Zhang *et al*. (2007) โดยผสมสารสกัดสาหร่าย 0.4 มล. กับสารละลายอนุมูลอิสระดีพีพีเอช (diphenyl-picryhydrazyl radical, $DPPH^{\bullet}$) 1.6 มล. ตั้งทิ้งไว้ที่มืดเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร คำนวณการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH สูตรคำนวณได้จากการนำค่าการดูดกลืนแสงที่ลดลงจากการเติมตัวอย่างเทียบกับค่าการดูดกลืนแสงตั้งต้น ดังนี้

DPPH radical scavenging (%) = ((Ao – As) /Ao) x100

โดย Ao และ As คือ ค่าการดูดกลืนแสงเริ่มต้น และค่าการดูดกลืนแสงภายหลังจากเติมสารตัวอย่าง

สารมาตรฐานที่ใช้ในการเทียบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระดีพีพีเอช คือ กรดแกลลิก มีหน่วยเป็นมิลลิกรัมต่อกรัมของสารสกัดตัวอย่าง (mg GAE/g extract)

3.3การศึกษาฤทธิ์ขจัดอนุมูลอิสระซุเปอร์ออกไซด์

ฤทธิ์การขจัดอนุมูลซุปเปอร์ออกไซด์ ตามวิธีการของ Nishikimi *et al*. (1972) โดยนำ 156 ไมโครโมลาร์ของสารละลาย nitroblue tetrazolium (NBT) ปริมาตร 1 มล. และ 468 ไมโครโมลาร์ของสารละลาย nicotinamide adeninedinucleotide (NADH) ปริมาตร 1 มล. ผสมกับสารสกัดสาหร่ายปริมาตร 0.1 มล. แล้วเติม 60 ไมโครโมลาร์ของสารละลาย phenazine methosulphate (PMS) ปริมาตร 0.1 มล. ผสมให้เข้ากัน ทิ้งไว้ 5 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 560 นาโนเมตร โดยใช้กรดแกลลิกเป็นสารมาตรฐาน

4.การเตรียมสัตว์ทดลอง

การทดลองได้รับการอนุมัติการใช้สัตว์จากคณะกรรมการกำกับดูแลการเลี้ยงสัตว์และการใช้สัตว์ทดลอง คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ หมายเลขโครงการ 30/2561 โดยใช้หนูขาวเพศผู้ สายพันธุ์ Wistar สั่งซื้อจากศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล นำมาปรับตัวในห้องสัตว์ทดลองที่มีการควบคุมอุณหภูมิ 25±1 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน มีการให้อาหารและน้ำตลอดเวลา แบ่งหนูขาวน้ำหนักในช่วง 180-220 กรัม ออกเป็น 4 กลุ่มๆ ละ 6 ตัว ดังนี้

กลุ่มที่ 1: กลุ่มหนูได้รับอาหารปกติควบคุมและป้อนน้ำกลั่น (normal dietary control; NDC)

กลุ่มที่ 2: กลุ่มหนูน้ำตาลในเลือดสูงควบคุมและป้อนน้ำกลั่น (diabetes mellitus control rat; DMC)

กลุ่มที่ 3: กลุ่มหนูน้ำตาลในเลือดสูงและป้อนสารสกัดสูตรสาหร่ายผสม (RSE) ขนาด 500 มก./กก. (diabetes mellitus extract rat; DME)

กลุ่มที่ 4: กลุ่มหนูน้ำตาลในเลือดสูงและป้อนยาลดภาวะเบาหวาน (metformin) ขนาด 50 มก./กก. (diabetes mellitus metformin rat; DMM)

โดยกลุ่มที่ 2-4 จะถูกเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะน้ำตาลในเลือดสูง (hyperglycemia) ด้วยการฉีด streptozotocin เข้าทางช่องท้อง ในขนาด 40 มก./กก. (Srinivasan *et al*., 2005) หลังจากนั้น 10 วัน วัดระดับน้ำตาลในเลือดหนู หากมีค่าสูงกว่า 200 มก./ดล. (mg/dl) แสดงถึงการมีภาวะเบาหวาน เมื่อเริ่มป้อนสารทดสอบกลุ่มที่ได้รับการป้อน RSE และเมทฟอร์มิน จะถูกนำมาละลายด้วยน้ำกลั่นก่อนป้อน โดยจะป้อนในสารเวลา 8.00 น.ของทุกวัน ตลอด 8 สัปดาห์ สัตว์ทดลองทุกกลุ่มจะได้รับอาหารและน้ำอย่างเพียงพอ ทำการบันทึกน้ำหนัก และมีการเก็บตัวอย่างเลือดที่บริเวณปลายหางหนูปริมาตร 0.5 มล. เพื่อวิเคราะห์ค่าชีวเคมีในพลาสมาต่อไป

5.การตรวจวัดค่าชีวเคมีในพลาสมา

การตรวจวัดค่าชีวเคมีในพลาสมา ได้แก่ ระดับน้ำตาลกลูโคส ไตรกลีเซอไรด์ และคอเลสเตอรอล โดยน้ำยาทดสอบสำเร็จรูป (Biotech, Bangkok, Thailand)

สถิติที่ใช้ในการวิเคราะห์

ข้อมูลการวิจัยฤทธิ์ขจัดอนุมูลอิสระจะถูกแสดงในรูปค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Mean±S.D.) ข้อมูลการวิจัยในสัตว์ทดลองจะถูกแสดงในรูปค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Mean±S.E.) การวิเคราะห์ความแตกต่างของกลุ่มทดลอง ใช้ One-Way ANOVA ตามด้วย Post Hoc Test ของ Duncan

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

สารสกัดน้ำและปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม

จากการสกัดสาหร่ายทั้ง 2 ชนิด ด้วยน้ำ พบปริมาณสารสกัดสาหร่ายไกและสาหร่ายเตา คิดเป็นเปอร์เซ็นต์สารสกัดที่ได้ (%yield) เท่ากับ 44.36% และ 36.20% ของน้ำหนักสาหร่ายแห้ง ตามลำดับ สารสกัดสาหร่ายไกมีลักษณะเป็นผงแห้งสีน้ำตาลเข้ม ส่วนสารสกัดสาหร่ายเตาเป็นผงแห้งสีเขียวเข้ม เมื่อนำสารสกัดทั้งสองชนิดมาพัฒนาสูตรใหม่ในอัตราส่วน 1:1 เรียกว่า RSE แล้วนำไปวัดปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม พบว่า RSE มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิก 42.31±0.30 มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อสารสกัด 1 กรัม (mg GAE/ g extract) เมื่อเปรียบเทียบปริมารสารประกอบฟีนอลิกที่พบในสาหร่ายเตา 107.02 mg GAE/ g extract และสาหร่ายไกมีค่า 8.58 mg GAE/ g extract (Janthip *et al*., 2017) แสดงให้เห็นว่า RSE ที่มาจากการผสมสารสกัดสาหร่าย 2 ชนิด ทำให้มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกที่เพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับสาหร่ายไกเพียง

ชนิดเดียว และในการศึกษาครั้งนี้ RSE ยังแสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเอบีทีเอส ดีพีพีเอชและซุปเปอร์ออกไซด์ได้อีกด้วย (Table 1)

การศึกษาฤทธิ์ขจัดอนุมูลอิสระของสารสกัดสาหร่ายน้ำจืด

การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดสาหร่ายน้ำจืด โดยใช้วิธีทดสอบการขจัดอนุมูลอิสระ 3 ชนิด คือ อนุมูลเอบีทีเอส ดีพีพีเอช และอนุมูลอิสระซุปเปอร์ออกไซด์ แสดงใน Table 1 พบว่า RSE ปริมาณ 1 กรัมมีฤทธิ์ขจัดอนุมูลอิสระเอบีทีเอส 1,115.28 mM TEAC/ g extract ซึ่งสูงกว่าฤทธิ์ขจัดอนุมูลอิสระของสารสกัดสาหร่ายเตา 3 เท่า และสาหร่ายไกประมาณ 223 เท่า ตามรายงานการวิจัยของ Janthip *et al*. (2017) ที่รายงานไว้ก่อนหน้านี้ โดยสาหร่ายเตาและสาหร่ายไกแต่ละชนิดสามารถขจัดอนุมูลอิสระเอบีทีเอสได้ 379.01 และ 4.95 mM TEAC/ g extract ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบว่า RSE มีฤทธิ์ขจัดอนุมูลอิสระดีพีพีเอช และฤทธิ์ขจัดอนุมูลอิสระซุปเปอร์ออกไซด์ 33.17 และ 139.44 mg GAE/ g extract ตามลำดับ เมื่อนำไปเปรียบเทียบกับรายงานวิจัยของ Janthip *et al*. (2013) ที่พบว่าสารสกัดน้ำของสาหร่ายเตาสามารถขจัดอนุมูลอิสระดีพีพีเอช 3,446 mg GAE/ g extract ทำให้เห็นว่า RSE มีฤทธิ์ขจัดอนุมูลดีพีพีเอชได้น้อยกว่าสารสกัดสาหร่ายเตาเพียงชนิดเดียวอยู่มาก

ผลจากการทดลองดังกล่าวพอสรุปได้ว่า RSE สูตรสารสกัดนี้ให้ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกและมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระทั้ง 3 ชนิด สูงกว่าสารสกัดน้ำสาหร่ายไก แต่ต่ำกว่าสารสกัดน้ำสาหร่ายเตา อย่างไรก็ตาม หากพิจารณาต้นทุนของสาหร่าย พบว่า สาหร่ายเตา (3,500 บาทต่อกิโลกรัมน้ำหนักแห้ง) มีราคาสูงกว่าสาหร่ายไก (600 บาทต่อกิโลกรัมน้ำหนักแห้ง) ถึง 6 เท่า ดังนั้นสูตร RSE จะสามารถลดต้นทุนของวัตถุดิบได้สูงถึง 50% (ต้นทุนลดลง 2,050 บาทต่อกิโลกรัมน้ำหนักแห้ง) จึงน่าจะเป็นทางเลือกในการนำไปพัฒนาต่อในเชิงพาณิชย์ได้ นอกจากมีฤทธิ์ขจัดอนุมูลเอบีทีเอสและดีพีพีเอชแล้ว ยังสามารถขจัดอนุมูลซุปเปอร์ออกไซด์ ซึ่งเป็นอนุมูลอิสระที่พบได้ในร่างกายที่เป็นสาเหตุของการเกิดภาวะ oxidative stress เข้าไปทำลายเซลล์ในร่างกายจนนำไปสู่การเกิดโรคได้ (Rahman *et al*., 2012) จึงเป็นไปได้ว่าสูตร RSE จะช่วยลดระดับอนุมูลอิสระในร่างกายได้ด้วยเช่นกัน

Table1 The antioxidant activities of RSE (*S. neglecta* and *R. hieroglyphicum*)

Assays for antioxidant activity	Values
ABTS radical scavenging activity (mM TEAC/ g extract)	1,115.28 ± 23.11
DPPH radical scavenging activity (mg GAE/ g extract)	33.17 ± 0.62
Superoxide anion radical scavenging activity (mg GAE/ g extract)	139.44 ± 3.39

Data are expressed as Mean ± S.D. (n=3)

ผลวิเคราะห์ค่าชีวเคมีในพลาสมา

การทดสอบประสิทธิภาพของ RSE ในหนูขาวที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะเบาหวาน โดยทำให้มีระดับน้ำตาลในเลือดก่อนการทดสอบมากกว่า 200 mg/dl หรือมีภาวะ hyperglycemia ด้วย streptozotocin ซึ่งจะเข้าไปทำลายเบต้าเซลล์ในตับอ่อนซึ่งทำหน้าที่สังเคราะห์และผลิตฮอร์โมนอินซูลิน จึงทำให้เกิดภาวะเบาหวาน

ขึ้น ผลการทดสอบพบว่า กลุ่มหนูปกติ (NDC) และกลุ่มหนูที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะเบาหวานกลุ่มควบคุม (DMC) กลุ่มที่ได้รับการป้อนสารสกัด RSE (DME) และกลุ่มที่ได้รับการป้อนยาเมทฟอร์มิน (DMM) มีการเพิ่มขึ้นของน้ำหนักตัวไม่ต่างกันทางสถิติ (p>0.05) เนื่องจากในการทดลองเป็นการเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะน้ำตาลในเลือดสูงเพียงอย่างเดียว แต่ไม่เหนี่ยวนำให้เกิดภาวะอ้วน ดังนั้นการเพิ่มขึ้นของน้ำหนักจึงไม่แตกต่างกันมาก ซึ่งให้ผลเช่นเดียวกับระดับไตรกลีเซอไรด์ (Table 2) ผลการป้อนสารสกัด RSE และยาเมทฟอร์มินในกลุ่มหนูเบาหวาน ติดต่อกันเป็นเวลา 8 สัปดาห์ พบว่า หนูเบาหวานกลุ่ม DME มีระดับน้ำตาลในเลือดลดลง 36.82% และคอเลสเตอรอลรวมในเลือดลดลง 29.38% เมื่อเทียบกับหนูเบาหวาน DMC เช่นเดียวกับกลุ่มหนูที่ได้รับยาเมทฟอร์มิน (DMM) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05) โดยกลไกการออกฤทธิ์ของ RSE ในการลดน้ำตาลในเลือดน่าจะเกี่ยวข้องกับฮอร์โมนอินซูลิน เพราะมีรายงานการวิจัยพบว่า สารสกัดน้ำสาหร่ายเตาขนาด 1,000 มก./กก. มีผลต่อการเพิ่มความไวในการตอบสนองฮอร์โมนอินซูลิน และช่วยเพิ่มระดับเอนไซม์ที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (Ontawong *et al*., 2013) ในขณะที่สารสกัดสาหร่ายไกด้วยน้ำขนาด 1,000 มก./กก.สามารถลดระดับน้ำตาลและไตรกลีเซอไรด์ได้ด้วยเช่นกัน (Srimaroeng *et al*., 2015) แสดงให้เห็นว่าสาร RSE ขนาด 500 มก./กก. สามารถลดระดับน้ำตาลได้เช่นเดียวกับสาหร่ายเตาและสาหร่ายไก นอกจากนี้ทั้งสาหร่ายไกและสาหร่ายเตามีสารต้านอนุมูลอิสระ โดยเฉพาะสารฟีนอลิก ชนิดไอโซเควอซิทินที่พบในสาหร่ายทั้ง 2 ชนิด (Janthip *et al*., 2017) จะช่วยลดการเกิดภาวะเครียดออกซิเดชัน และส่งผลทำให้ลดระดับน้ำตาล ไตรกลีเซอไรด์ และคอเลสเตอรอลในผู้ที่มีภาวะเบาหวานได้

Table 2 Effect of RSE on body weight, glucose, triglyceride and cholesterol levels in diabetic rats at 8th week

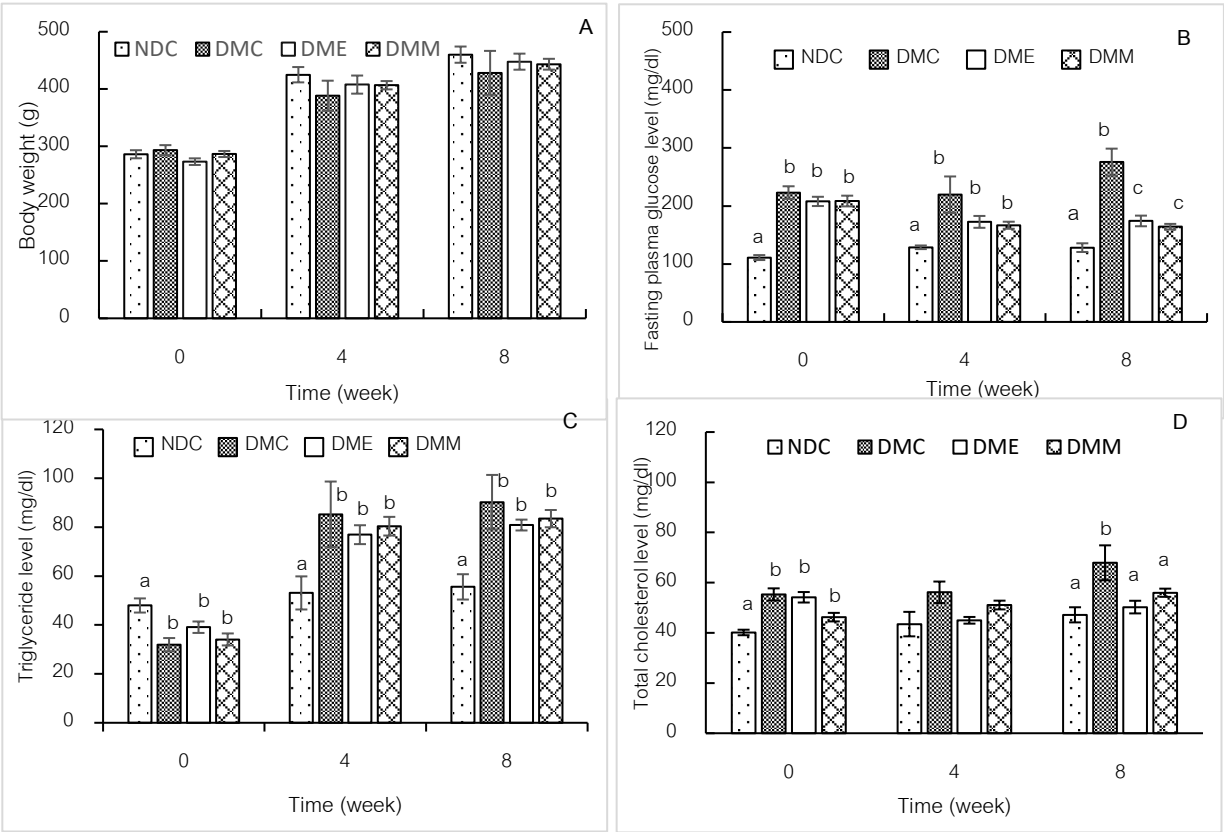
Group	NDC	DMC	DME	DMM
Body weight (g)	460.00 ± 14.14	428.33 ± 38.25	447.78 ± 14.02	443.33 ± 9.43
Plasma glucose level (mg/dl)	128.14 ± 7.50^{a}	275.72 ± 23.21^{b}	174.19 ± 9.16^{c}	164.30 ± 4.78^{c}
Triglyceride level (mg/dl)	55.59 ± 5.18^{a}	90.23 ± 11.15^{b}	80.88 ± 2.22^{b}	83.50 ± 3.53^{b}
Total cholesterol level (mg/dl)	47.18 ± 3.01^{a}	67.90 ± 6.96^{b}	47.95 ± 2.52^{a}	55.98 ± 1.63^{a}

Data are expressed as Mean ± S.E. (n=6)

a, b, c Means with different superscript in same row are significantly different (p < 0.05)

จาก Figure 2 แสดงน้ำหนักตัวและค่าชีวเคมีในเลือดของหนูกลุ่มปกติและกลุ่มเบาหวานทุกกลุ่ม ในสัปดาห์ที่ 0, 4 และ 8 พบว่า มีการเพิ่มขึ้นของน้ำหนักตัวไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (A) ส่วนค่าระดับน้ำตาลในเลือดของกลุ่มหนูเบาหวานควบคุมมีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นกว่าเดิมทุก 4 สัปดาห์ ในขณะที่กลุ่มที่ได้รับ

การป้อนสารสกัด RSE (DME)) เริ่มมีแนวโน้มของระดับน้ำตาลที่ลดลงในสัปดาห์ที่ 4 (ลดลง 21.38%) และลดลงอย่างชัดเจนในสัปดาห์ที่ 8 (ลดลง 36.82%) อย่างมีความแตกต่างกันทางสถิติ (B) ซึ่งให้ผลการทดสอบเช่นเดียวกับกลุ่มที่ได้รับยาเมทฟอร์มิน (DMM) ส่วนค่าไตรกลีเซอไรด์ของหนูเบาหวานทุกกลุ่ม พบว่าเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญจากกลุ่มหนูปกติ อาจเนื่องมาจากการเกิดภาวะเบาหวานทำให้ระดับของไตรกลีเซอไรด์เพิ่มขึ้น แม้ในกลุ่มที่ได้รับยาเมทฟอร์มิน ในขณะที่ระดับคอเลสเตอรอลในหนูเบาหวานลดลงอย่างต่อเนื่องตั้งแต่สัปดาห์ที่ 4 และ 8 ซึ่งสอดคล้องกับรายงานก่อนหน้านี้ที่พบว่า สารสกัดน้ำของสาหร่ายไกและสาหร่ายเตาที่ขนาด 1,000 มก./กก. มีคุณสมบัติลดน้ำตาลในเลือด ช่วยเพิ่มความไวในการตอบสนองต่ออินซูลิน และลดการเกิดภาวะเครียดออกซิเดชัน (Ontawong *et al*., 2013; Srimaroeng *et al*., 2015) และสารสกัดสาหร่ายเตายังมีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ HMG-CoA reductase ทำให้การสังเคราะห์คอเลสเตอรอลในตับลดลง และลดการดูดซึมคอเลสเตอรอลในลำไส้อีกด้วย (Doungjai *et al*., 2016) โดยกลไกการออกฤทธิ์ลดน้ำตาลในเลือดเหมือนกับยาเมทฟอร์มินที่ใช้ในการรักษาโรคเบาหวาน ดังนั้นจึงพบว่าในกลุ่มที่ได้รับ RSE จึงลดระดับคอเลสเตอรอลในหนูเบาหวานลงได้



Data are expressed as Mean ± S.E. (n=6)

a, b, c Means with different superscript in same row are significantly different ($p < 0.05$)

NDC= normal dietary control, DMC= diabetes mellitus control, DME= diabetes mellitus extract 500 mg/kg, DMM= diabetes mellitus metformin 50 mg/kg

Figure 2 Effect of RSE on body weight and blood chemistry in diabetic rats during 8 weeks

สรุปผลการทดลอง

สารสกัดสาหร่ายไกและสาหร่ายเตาถูกนำมาพัฒนาสูตรใหม่เรียกว่า RSE พบว่า มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกเป็นองค์ประกอบสำคัญ มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเอบีทีเอส ดีพีพีเอช และอนุมูลซุปเปอร์ออกไซด์ เมื่อนำ RSE ไปทดสอบในหนูเบาหวาน สามารถแสดงฤทธิ์ลดระดับน้ำตาล (anti-hyperglycemia) และฤทธิ์ลดระดับคอเลสเตอรอล (anti-hypercholesterolemia) ในเลือดสูงในหนูที่มีภาวะเบาหวานชนิดที่ 2 ได้ ถึงแม้ว่าการนำสารสกัดสาหร่ายทั้ง 2 ชนิดมาพัฒนาสูตรใหม่เป็น RSE จะมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่น้อยกว่าสาหร่ายเตาชนิดเดียว แต่สูตร RSE สามารถลดต้นทุนวัตถุดิบและแสดงฤทธิ์ชีวภาพได้ดี นอกจากนี้สาหร่ายไกยังแสดงคุณสมบัติในการก่อเจลให้กับผลิตภัณฑ์อีกด้วย โดยสูตรดังกล่าวมีความเป็นไปได้ในการพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์เสริมอาหารเชิงพาณิชย์ เพื่อป้องกันภาวะเบาหวานซึ่งเป็นหนึ่งในโรคไม่ติดต่อเรื้อรังที่มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องต่อประชากรในประเทศไทย

กิตติกรรมประกาศ

ทีมผู้วิจัยขอขอบคุณสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) สำหรับทุนสนับสนุนการวิจัยระดับปริญญาเอกภายใต้โครงการพัฒนานักวิจัยและงานวิจัยเพื่ออุตสาหกรรม (พวอ.) รหัสโครงการ PHD59I0010 ร่วมกับบริษัทอำพลฟูดส์ โพรเซสซิ่ง จำกัด และขอขอบคุณภาควิชาสรีรวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ และคณะเทคโนโลยีการประมงและทรัพยากรทางน้ำ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ สำหรับการสนับสนุนด้านสถานที่และอุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย

เอกสารอ้างอิง

Aekplakorn, W., Chariyalertsak, S., Kessomboon, P., Assanangkornchai, S., Taneepanickskul, S. and Putwatana, P. 2018. Prevalence of Diabetes and Relationship with Socioeconomic Status in the Thai Population: National Health Examination Survey. 2004-2014. 1-9. (in Thai)

Amornlerdpison, D., Mengumphan, K., Thumvijit, S. and Peerapornpisal, Y. 2011. Antioxidant and anti-inflammatory activities of freshwater macroalga, *Cladophora glomerata* Kutzing. Thai Journal of Agricultural Science. 44(5): 283-290. [in Thai]

Amornlerdpison, D., Ngernjan, M., Mengumphan, K. Janthip, R. and Srimaroeng, C. 2015. Active Compounds and Oxidative Defense of *Cladophora* spp. in Hybrid Catfish. KMUTT Research and Development Journal. 38(4): 393-405. [in Thai]

Aroda V.R, Christophi C.A, Edelstein S.L, Zhang P, Herman W.H, Barrett-Connor E, Delahanty L.M., Montez M.G., Ackermann R.T., Zhuo X., Knowler W.C. and Ratner R.E. 2015. The effect of lifestyle intervention and metformin on preventing or delaying diabetes among women with and without gestational diabetes: the Diabetes Prevention Program outcomes study 10-year follow-up. Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism. 100:1646–1653.

Doungjal, A., Limpeanchobb, N., Trisatb, K. and Amornlerdpison, D. 2016. *Spirogyra neglecta* inhibits the absorption and synthesis of cholesterol in vitro. Integrative Medicine Research. 5(4):301-308.

Janthip, R., Amornlerdpison, D. and Chimsook, T. 2013. Phytochemical Screening, Antioxidant Activity and Total Phenolic Content of *Spirogyra* spp. Advance Material Research. 699: 693-697.

Janthip, R., Lailerd, N., Wangchareon, W., Mangumphan, K. and Amornlerdpison, D. 2017. Chemical Compound and Biological Properties of Freshwater Macroalgae Extracts from *Spirogyra neglecta* and *Rhizoclonium hieroglyphicum*. In 2nd National Graduate Research Conference and Creative Innovation Competition. 189-195. Maejo University. Chiang Mai, Thailand.

Kamkaew, N., Amornlerdpison, D., Chootip, K. and Doungjai, A. 2016. Acute effect of *Spirogyra neglecta* extract on arterial blood pressure in rats. The 12th National Naresuan Conference: Research and Innovation to Develop the Country.21-22 July 2016. Naresuan University. Phitsanulok, Thailand. [in Thai]

Nishikimi, M., Rao, N.A. and Yagi, K. 1972. The Occurrence of Superoxide Anion in the Reaction of Reduced Phenazine Methosulfate and Molecular Oxygen. Biochemical and Biophysical Research Communications. 46: 849-854.

Ontawong, A., Saowakon, N. Vivithanaporn, P., Pongchaidecha, A., Lailerd, N. Amornlerdpison, D. Lungkaphin, A. and Srimaroeng, C. 2013. Antioxidant and Renoprotective Effects of *Spirogyra neglecta* (Hassall) Kutzing Extract in Experimental Type 2 Diabetic Rats. BioMed Research International. 1-15.

Peerapornpisal, Y. Panyoyai, T. and Amornlerdpison, D. 2012. Antioxidant and anti-inflammatory activities of *Spirogyra neglecta* (Hassall) Kützing" KKU Science Journal. 40(1); 228-235.

Rahman, T., Hosen, I., Islam, M. and Shekhar H. 2012. Oxidative stress and human health. Advances in Bioscience and Biotechnology. 3: 997-1019.

Rattanapot, T. Mengumphan, K. Srimaroeng, C. Janthip R. and Amornlerdpison, D. 2012. Antioxidant activity of *Spirogyra* sp. and effect of its supplementation on growth performance of tilapia in cage culture. Journal of Fisheries Technology Research. 6(2): 23-34. [in Thai]

Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A. Pannala, A., Yang, M. and Rice-Evans, C. 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. Free Radical Biology and Medicine. 26(9): 1231-1237.

Sachindra, N.M., Airanthi, M.K.W.A., Hosokawa, M. and Miyashita, K. 2010. Radical Scavenging and Singlet Oxygen Quenching Activity of Extracts from Indian Seaweeds. Journal of Food Science and Technology. 47(1): 94-99.

Sawangpak, A., Thongsri, T. and Chidnok, W. 2016. Acute Effects of *Cladophora glomerata* Extract on Time to Exhaustion during Severe Intensity Exercise. The 39th National Graduate Research Conference. Assumption University. Samuthprakarn, Thailand. [in Thai]

Srimaroeng, C., Ontawong, A., Saowakon, N., Vivithanaporn, P., Pongchaidecha, A., Amornlerdpison, D., Soodvilai, S. and Chatsudthipong, V. 2015. Antidiabetic and Renoprotective Effects of *Cladophora glomerata* Kützing Extract in Experimental Type 2 Diabetic Rats: A Potential Nutraceutical Product for Diabetic Nephropathy. Journal of Diabetes Research. 1-15.

Srinivasan, K., Viswanad, B., Asrat, L., Kaul, C.L. and Ramarao, P. 2005. Combination of high-fat diet-fed and low-dose streptozotocin-treated rat: A model for type 2 diabetes and pharmacological screening. Pharmacological Research. 52: 313–320.

Schofield J.D., Liu, Y., Rao-Balakrishna, P., Malik, R.A. and Soran H. 2016. Diabetes Dyslipidemia. Diabetes Therapy. 7: 203-219.

Zhang, W., Duan X., Huang H., Zhang, Y. and Wang, B. 2007. Evaluation of 28 marine algae from the Qingdao coast for antioxidative capacity and determination of antioxidant efficiency and total phenolic content of fractions and subfractions derived from *Symphyocladia latiuscula* (Rhodomelaceae) Journal of Applied Physiology. 19:97–108.