

การเพิ่มมูลค่าสาหร่ายน้ำจืดเป็นอาหารสุภาพชนิดเจล



รัตนภรณ์ จันทร์ทิพย์

ปริญญาปรัชญาดุษฎีบัณฑิต  
สาขาวิชาสหวิทยาการเกษตร  
มหาวิทยาลัยแม่โจ้  
พ.ศ. 2562

การเพิ่มมูลค่าสาหร่ายน้ำจืดเป็นอาหารสุขภาพชนิดเจล



คุณฉวีนิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของความสมบูรณ์ของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาปรัชญาดุษฎีบัณฑิต

สาขาวิชาสหวิทยาการเกษตร

สำนักบริหารและพัฒนามหาวิทยาลัยแม่โจ้

พ.ศ. 2562

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยแม่โจ้

## การเพิ่มมูลค่าสำหรับน้ำจืดเป็นอาหารสุขภาพชนิดเจล

รัตนาภรณ์ จันทร์ทิพย์

ดุษฎีนิพนธ์นี้ได้รับการพิจารณาอนุมัติให้เป็นส่วนหนึ่งของความสมบูรณ์ของการศึกษา

ตามหลักสูตรปริญญาปรัชญาดุษฎีบัณฑิต

สาขาวิชาสหวิทยาการเกษตร

พิจารณาเห็นชอบโดย

อาจารย์ที่ปรึกษา

อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ดวงพร อมรเลิศพิศาล)

วันที่.....เดือน.....พ.ศ. ....

อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

(รองศาสตราจารย์ ดร.เกรียงศักดิ์ เม่งอำพัน)

วันที่.....เดือน.....พ.ศ. ....

อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

(รองศาสตราจารย์ ดร.วิวัฒน์ หวังเจริญ)

วันที่.....เดือน.....พ.ศ. ....

อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.นริศรา ไล่เลิศ)

วันที่.....เดือน.....พ.ศ. ....

ประธานอาจารย์ผู้รับผิดชอบหลักสูตร

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชลินดา อริยเดช)

วันที่.....เดือน.....พ.ศ. ....

สำนักบริหารและพัฒนาวิชาการรับรองแล้ว

(รองศาสตราจารย์ ดร.ญาณิน โอภาสพัฒนกิจ)

รักษาการแทนรองอธิการบดี ปฏิบัติการแทน

อธิการบดีมหาวิทยาลัยแม่โจ้

วันที่.....เดือน.....พ.ศ. ....

ชื่อเรื่อง	การเพิ่มมูลค่าสาหร่ายน้ำจืดเป็นอาหารสุขภาพชนิดเจล
ชื่อผู้เขียน	นางสาวรัตนารัตน์ จันทร์ทิพย์
ชื่อปริญญา	ปรัชญาดุษฎีบัณฑิต สาขาวิชาสหวิทยาการเกษตร
อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ดวงพร อมรเลิศพิศาล

### บทคัดย่อ

สาหร่ายไถ (*Rhizoclonium hieroglyphicum* (C. Agardh) Kützing) และสาหร่ายเตา (*Spirogyra neglecta* (Hassall) Kützing) เป็นสาหร่ายน้ำจืดสีเขียวที่นิยมนำมาบริโภคเป็นอาหารพื้นบ้านทางภาคเหนือและภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย ถูกนำมาสกัดด้วยน้ำได้เป็นสารสกัดสาหร่ายไถ (RE) และสารสกัดสาหร่ายเตา (SE) จากนั้นนำมาวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลิก และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ก่อนนำมาพัฒนาสูตรสารสกัดผสมสาหร่ายทั้ง 2 ชนิด (RSE) เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการออกฤทธิ์ทางชีวภาพ โดยนำ RSE ไปวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิก และทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระก่อนนำไปพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์อาหารสุขภาพชนิดเจล (RSP) 4 สูตร ผลิตภัณฑ์นำไปทดสอบการยอมรับในอาสาสมัครเพื่อให้ได้สูตรที่ดีที่สุด และทดสอบประสิทธิภาพของ RSE และ RSP ต่อการลดระดับน้ำตาลในเลือด ไตรกลีเซอไรด์ และคอเลสเตอรอลในหนูขาว รวมถึงการวัดระดับเอนไซม์ต้านออกซิเดชัน ผลการสกัด RE และ SE ให้ปริมาณสารสกัด 46.97% และ 35.51% ตามลำดับ พบสารประกอบฟีนอลิกใน SE (107.02 mgGAE/g extract) ปริมาณสูงกว่า RE (8.58 mgGAE/g extract) และเมื่อวิเคราะห์ปริมาณไอโซควเวอซิทินในสารสกัด RE และ SE ด้วยเทคนิคลิควิดโครมาโทกราฟี-แมสสเปกโทเมตรี (LC-MS) พบว่า มีปริมาณ 264 และ 288 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ ฤทธิ์ขจัดอนุมูลอิสระเอบีทีเอสของ RE และ SE มีค่า 4.95 และ 379.01 mM TEAC/g extract ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าสารสกัดทั้ง 2 ชนิดมีสารไอโซควเวอซิทินเป็นสารฟีนอลิกที่ทำให้สารสกัดมีคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระได้ ผลการทดสอบเพื่อพัฒนาผลิตภัณฑ์ RSP พบว่า ระดับความเข้มข้น 0.5% ของ RSE ได้รับการยอมรับของสี กลิ่น เนื้อสัมผัส มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม 42.31 mgGAE/ g extract มีฤทธิ์ขจัดอนุมูลอิสระเอบีทีเอส ดีพีพีเอช และอนุมูลซูเปอร์ออกไซด์ เท่ากับ 1115.28 mM TEAC/g extract , 33.17 และ 139.44 mgGAE/ g extract ตามลำดับ และผลการทดสอบความชอบโดยรวมในอาสาสมัครที่มีอายุตั้งแต่ 35 ปีขึ้นไป พบว่ามีความพึงพอใจในระดับชอบมากถึงชอบมากอย่างยิ่ง ส่วนผลการทดสอบในกลุ่มหนูขาวที่มีภาวะเบาหวานและได้รับการป้อน RSE และ RSP ขนาด 500 มก./กก. เป็นเวลา 8 สัปดาห์ พบว่า RSE และ RSP สามารถลดระดับน้ำตาล (38.53% และ 41.28%) ลดระดับไตรกลีเซอไรด์ (2.96%

และ 36.84%) และคอเลสเทอรอลรวมลดลง (25.98% และ 21.07%) นอกจากนี้ทั้ง RSE และ RSP ยังสามารถลดระดับมาลอนไดอัลดีไฮด์ และเพิ่มระดับเอนไซม์ซูเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเทสได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เนื่องจาก RSE และ RSP มีสารประกอบฟีนอลิก ซึ่งมีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ มีฤทธิ์ช่วยเพิ่มความไวในการตอบสนองฮอร์โมนอินซูลิน ช่วยลดคอเลสเทอรอล และเพิ่มระดับของเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระในร่างกาย ดังนั้นทั้ง RSE และผลิตภัณฑ์ RSP ที่พัฒนาขึ้นจากการผสมสารสกัดสาหร่ายทั้ง 2 ชนิด เป็นผลิตภัณฑ์ที่มีศักยภาพในการควบคุมระดับน้ำตาล ลดคอเลสเทอรอล และลดภาวะเครียดออกซิเดชันในผู้ป่วยที่มีภาวะเบาหวานได้

คำสำคัญ : สาหร่ายไก่อ, สาหร่ายเตา, ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ, ลดน้ำตาล, ลดคอเลสเทอรอล



<b>Title</b>	VALUE ADDED OF THE FRESHWATER ALGAE AS JELLY FUNCTIONAL FOOD
<b>Author</b>	Miss Rattanaorn Janthip
<b>Degree</b>	Doctor of Philosophy in Agricultural Interdisciplinary
<b>Advisory Committee Chairperson</b>	Assistant Professor Dr. Doungporn Amornlerdpison

### ABSTRACT

*Rhizoclonium hieroglyphicum* (C. Agardh) Kützing and *Spirogyra neglecta* (Hassall) Kützing are freshwater green macroalgae in the north and northeast of Thailand. They were extracted with distilled water as algae aqueous extract (*R. hieroglyphicum* extract; RE and *S. neglecta* SE). The total phenolic content of RE and SE were determined using Folin-Ciocalteu reagent method and abundance of important component were analyzed using liquid chromatography-mass spectrometer (LC-MS). The antioxidant activities of RE and SE were evaluated before the algae product was formulated. The RE and SE were mixed to obtain the united algae extracts (RSE). RSE is a functional ingredient in new algae product or RSP. The RSP was formulated into four formulas and evaluated with the sensory test for colour, flavour, texture and overall satisfaction for the developed product. The RSE and RSP were estimated based on pharmacological effects on blood glucose, triglyceride, cholesterol and oxidative stress enzyme levels in rats. The results established that the yield of RE and SE were 46.97% and 35.51%, respectively. The total phenolic content of SE (107.02 mgGAE/g extract) was higher than RE (8.58 mg GAE/g extract). The isoquercetin were found in RE and SE which are possessed out of the phenolic compound known as antioxidant agent. The isoquercetin contents of RE and SE were 264 and 288 mg/kg extract, respectively. In ABTS radical scavenging model, the antioxidant capacity found in RE and SE were 4.95 and 379.01mM TEAC/g extract, respectively. RSE presented the antioxidant activities as ABTS, DPPH and

superoxide radical scavenging activities (1,115.28 mM TEAC/g extract, 33.17 and 139.44 mg GAE/ g extract, respectively). The results of sensory evaluation found that the 0.5% RSE recipe accepted high to very high levels on participants aged over 35 years. Moreover, the results of the blood chemistry parameters at the end of the experiments established that RSE and RSP at the dose of 500 mg/kg for 8 weeks decreased glucose (38.53% and 41.28%), triglycerides (2.96% and 36.84%) and total cholesterol levels (25.98% and 21.07%). Compared to the diabetic control group, the biomarkers of oxidative stress, such as malondialdehyde and antioxidant enzyme, including superoxide dismutase, displayed a significant increase in RSE and RSP. Moreover, RSE and RSP contain phenolics as active compound as well as antioxidant which restored insulin sensitivity, reduced cholesterol absorption and increased antioxidant enzymes. These findings indicate that RSE and RSP can be considered as potential dietary supplement to attenuate hyperglycemia, dyslipidemia and oxidative stress in diabetic patients.

Keywords : Rhizoclonium hieroglyphicum, Spirogyra neglecta, antioxidant, anti-hyperglycemia, anti-hypercholesterolemia

## กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ดวงพร อมรเลิศพิศาล อาจารย์ที่ปรึกษาหลักที่เป็นแรงบันดาลใจ คอยดูแลใส่ใจ สนับสนุนทุกเรื่อง จนทำให้การทำวิจัยครั้งนี้จนสำเร็จลุล่วงด้วยดี รองศาสตราจารย์ ดร. เกรียงศักดิ์ เม่งอำพัน รองศาสตราจารย์ ดร. วิวัฒน์ หวังเจริญ และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.นริศรา ไส้เลิศ อาจารย์ที่ปรึกษาร่วมที่เสียสละเวลา ค่อยให้คำแนะนำ และชี้แนะการทำวิจัยครั้งนี้จนสำเร็จ

ขอขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชุตินา ศรีมะเร็ง จากภาควิชาสรีรวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ที่ให้เกียรติเป็นประธานสอบดุษฎีนิพนธ์ และอาจารย์ ดร.สุดาพร ตงศิริ กรรมการสอบดุษฎีนิพนธ์ ที่ให้เกียรติเข้าร่วมเป็นกรรมการสอบดุษฎีนิพนธ์ในครั้งนี้ ขอขอบพระคุณสำหรับคำแนะนำที่เป็นประโยชน์ต่อการเขียนดุษฎีนิพนธ์นี้

ขอขอบคุณสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) สำหรับเงินทุนสนับสนุนการวิจัยระดับปริญญาเอกภายใต้โครงการพัฒนานักวิจัยและงานวิจัยเพื่ออุตสาหกรรม (พวอ.) รหัสโครงการ PHD59I0010 ร่วมกับบริษัทอำพลฟูดส์ โพรเซสซิง จำกัด

ขอขอบคุณคณะเทคโนโลยีการประมงและทรัพยากรทางน้ำ ศูนย์ความเป็นเลิศด้านนวัตกรรมทางการเกษตรสำหรับบัณฑิตผู้ประกอบการ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ ภาควิชาสรีรวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ สำหรับสนับสนุนด้านสถานที่และอุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย

ขอขอบคุณครอบครัว เพื่อน พี่น้องทุกคนที่คอยเป็นกำลังใจที่ดีให้กันเสมอมา

รัตนภรณ์ จันทร์ทิพย์

## สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ค
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ช
สารบัญ.....	ซ
สารบัญตาราง.....	ญ
สารบัญภาพ.....	ฎ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
ที่มาและความสำคัญของปัญหา.....	1
บทที่ 2 ทฤษฎีและการตรวจเอกสาร.....	5
กลุ่มโรคไม่ติดต่อเรื้อรัง.....	8
โรคเบาหวาน.....	10
เมทฟอร์มิน.....	13
ภาวะไขมันในเลือดสูง.....	14
โภชนาการสำหรับวัยผู้ใหญ่.....	16
อนุมูลอิสระ.....	17
สารต้านอนุมูลอิสระ.....	19
สารประกอบฟีนอลิก.....	24
สำหรับ่ายเตา.....	26
สำหรับ่ายไถ.....	27
มาตรฐานความปลอดภัยของอาหาร.....	29
การเจริญของจุลินทรีย์ในอาหาร.....	35

การศึกษาอายุการเก็บของผลิตภัณฑ์อาหาร.....	39
การประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัส.....	40
บทที่ 3 วิธีการดำเนินการทดลอง .....	45
3.1 การเตรียมสาหร่ายน้ำจืด.....	46
3.2 การเตรียมสารสกัดสาหร่ายน้ำจืด.....	47
3.3 การวิเคราะห์การปนเปื้อนของโลหะหนัก .....	48
3.4 การศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสาหร่ายน้ำจืด.....	48
3.5 การพัฒนาสูตรผลิตภัณฑ์อาหารสุขภาพชนิดเจลจากสาหร่ายน้ำจืด .....	53
3.6 การศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพในการต้านอนุมูลอิสระและการตรวจวัดชีวเคมีในเลือดของหนูขาว .....	55
บทที่ 4 ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง .....	60
4.1 การเตรียมวัตถุดิบและการเตรียมสารสกัด.....	60
4.2 การวิเคราะห์การปนเปื้อนของโลหะหนักในสาหร่ายไถและสาหร่ายเตา .....	63
4.3 การศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสาหร่ายน้ำจืด.....	65
4.4 การพัฒนาสูตรผลิตภัณฑ์อาหารสุขภาพชนิดเจล .....	70
4.5 การศึกษาอายุการเก็บของผลิตภัณฑ์.....	79
4.6 การศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของผลิตภัณฑ์อาหารสุขภาพชนิดเจลในหนูขาว .....	81
บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง.....	88
บรรณานุกรม.....	91
ประวัติผู้วิจัย.....	152

## สารบัญตาราง

หน้า

ตาราง 1 ร้อยละของผู้สูงอายุที่มีปัญหาด้านสุขภาพด้วยโรคเบาหวาน ปี 2545-2560 .....	7
ตาราง 2 ร้อยละของผู้สูงอายุที่มีปัญหาสุขภาพด้วยโรคความดันโลหิตสูง ปี 2545-2560 .....	8
ตาราง 3 ปัจจัยเสี่ยงของการเกิดโรคกลุ่ม NCDs ในประเทศไทย .....	14
ตาราง 4 ชนิดของโลหะหนัก การปนเปื้อนในอาหาร ความเป็นพิษและเกณฑ์มาตรฐานการปนเปื้อน .....	30
ตาราง 5 กลุ่มของวัตถุเจือปนอาหารที่แบ่งตามหน้าที่ด้านเทคโนโลยี .....	31
ตาราง 6 อุณหภูมิที่ใช้ในการทดสอบการเสื่อมคุณภาพของผลิตภัณฑ์ .....	40
ตาราง 7 สูตรผลิตภัณฑ์อาหารสุขภาพชนิดเจล 4 สูตรที่ใช้ทดสอบในอาสาสมัครโดยใช้สเกลพอดี้ ..	53
ตาราง 8 ปริมาณสารสกัด (%yield) ฤทธิ์ขจัดอนุมูลอิสระเอบีทีเอส และปริมาณสารประกอบฟีนอลิกของสารสกัดสาหร่ายไถ ( <i>R. hieroglyphicum</i> ).....	62
ตาราง 9 การวิเคราะห์การปนเปื้อนของโลหะหนักในสารสกัดสาหร่ายไถ (RE) และสาหร่ายเตา (SE) .....	63
ตาราง 10 เปรียบเทียบปริมาณสารประกอบฟีนอลิกของสารสกัดสาหร่ายไถ (RE) และสาหร่ายเตา (SE) ที่เก็บไว้นาน 12 เดือน .....	65
ตาราง 11 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกแต่ละชนิดที่พบในสารสกัด SE และ RE ด้วยเทคนิค HPLC	66
ตาราง 12 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิก ปริมาณ isoquercetin ฤทธิ์ขจัดอนุมูลอิสระเอบีทีเอส และค่า Water activity ของสารสกัดสาหร่ายเตา (SE) และสารสกัดสาหร่ายไถ (RE).....	68
ตาราง 13 ฤทธิ์ขจัดอนุมูลอิสระของสารสกัดผสม RSE .....	69
ตาราง 14 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิก และฤทธิ์ขจัดอนุมูลอิสระเอบีทีเอส ของสารสกัดสาหร่ายเตา (SE) สารสกัดสาหร่ายไถ (RE) และสารสกัดผสม RSE.....	69
ตาราง 15 สูตรผลิตภัณฑ์อาหารสุขภาพชนิดเจล และค่าสี ( $L^*a^*b^*$ ) ของผลิตภัณฑ์ .....	74
ตาราง 16 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิก และฤทธิ์ขจัดอนุมูลอิสระเอบีทีเอสของ RSP .....	81

ตาราง 17 น้ำหนักตัว ร้อยละของน้ำหนักตัวที่เพิ่มขึ้น และสัดส่วนของไขมันในช่องท้องกับน้ำหนักตัว  
 ของหนูปกติและหนูเบาหวานตลอดระยะเวลาทดสอบ 8 สัปดาห์..... 82

ตาราง 18 ระดับคอเลสเตอรอลรวม คอเลสเตอรอลชนิดเอชดีแอล (HDL) และคอเลสเตอรอลชนิด  
 แอลดีแอล (LDL) ในหนูขาวปกติและหนูเบาหวานหลังจากได้รับ RSE และ RSP เป็นเวลา 8 สัปดาห์  
 ..... 84



## สารบัญภาพ

	หน้า
ภาพ 1 สัดส่วนของประชากรไทยที่มีอายุต่ำกว่า 15 ปีกับประชากรที่มีอายุตั้งแต่ 60 ปีขึ้นไป .....	5
ภาพ 2 พีรามิดประชากรไทยในช่วงปี ค.ศ. 1980-2020 .....	7
ภาพ 3 สาเหตุและผลลัพธ์จากการเกิดโรคกลุ่มไม่ติดต่อเรื้อรัง .....	9
ภาพ 4 สาเหตุการเสียชีวิตของประชากรในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ปี ค.ศ. 2008 .....	9
ภาพ 5 การหลังของอินซูลินจากเบต้าเซลล์ของตับอ่อน .....	11
ภาพ 6 กลไกการออกฤทธิ์ของยากลุ่ม statin .....	16
ภาพ 7 การเกิดอนุมูลอิสระและการกำจัดโดยเอนไซม์ซูเปอร์ออกไซด์ คอะตาเลส และกลูต้าไทโอน เปอร์ออกซิเดส .....	20
ภาพ 8 ลำดับความสามารถของสารและเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระในร่างกาย .....	22
ภาพ 9 โครงสร้างหลักทางเคมีของสารฟีนอล .....	25
ภาพ 10 ตัวอย่างสารในกลุ่มสารประกอบฟีนอลิก .....	25
ภาพ 11 สาหร่ายเตาสด บ้านนาคูหา จังหวัดแพร่ (A) และสาหร่ายเตาแห้ง (B) .....	26
ภาพ 12 ลักษณะสาหร่ายไกสด (A) และสาหร่ายไกแห้ง (B) .....	28
ภาพ 13 การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิก .....	48
ภาพ 14 การทดสอบฤทธิ์จัดอนุมูลอิสระเอบีทีเอส .....	49
ภาพ 15 การทดสอบฤทธิ์จัดอนุมูลอิสระดีพีพีเอส .....	50
ภาพ 16 การทดสอบฤทธิ์จัดอนุมูลอิสระซูเปอร์ออกไซด์ .....	51
ภาพ 17 แบบสอบถามการยอมรับผลิตภัณฑ์อาหารสุขภาพชนิดเจลจากสาหร่ายน้ำจืดด้วยสเกลพอดิ .....	53
ภาพ 18 แบบสอบถามการยอมรับผลิตภัณฑ์อาหารสุขภาพชนิดเจลจากสาหร่ายน้ำจืดต้นแบบ .....	54
ภาพ 19 แผนการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพสัตว์ทดลอง .....	56

ภาพ 20 ลักษณะเซลล์ของสาหร่ายไก่อ (A) และสาหร่ายเตา (B) ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 400 เท่า.....	60
ภาพ 21 สารสกัดสาหร่ายไก่อด้วยเฮกเซน (A) อะซิโตน (B) เอทานอล (C) และน้ำ (D).....	61
ภาพ 22 ลักษณะสาหร่ายไก่อแห้งและสารสกัดน้ำสาหร่ายไก่อ (A) และสาหร่ายเตาแห้งและสารสกัดน้ำสาหร่ายเตา (B).....	63
ภาพ 23 ลักษณะสาหร่ายไก่อแห้งปี 2559 (K0) สาหร่ายไก่อแห้งปี 2559 ที่ไว้นาน 12 เดือน (K12) สารสกัดสาหร่ายไก่อปี 2559 (KA0) และสารสกัดสาหร่ายไก่อแห้งปี 2559 ที่ไว้นาน 12 เดือน (KA12).....	64
ภาพ 24 ลักษณะสาหร่ายเตาแห้งปี 2559 (A) สาหร่ายเตาแห้งปี 2559 ที่ไว้นาน 12 เดือน (B).....	65
ภาพ 25 โครมาโทแกรมของสารมาตรฐาน isoquercetin (A) และ isoquercetin ของ SE (B) และ RE (C) ด้วยเทคนิค LC-MS .....	67
ภาพ 26 โครงสร้างเคมีของ isoquercetin.....	68
ภาพ 27 การวัดเนื้อสัมผัสของสารสกัดสาหร่ายไก่อ (RE) ด้วยเครื่อง Texture analyzer .....	70
ภาพ 28 ลักษณะการก่อเจลของสารสกัดสาหร่ายไก่อที่ความเข้มข้นระดับต่างๆ.....	70
ภาพ 29 ลักษณะการก่อเจลของคาราจีแนนที่ความเข้มข้นระดับต่างๆ.....	71
ภาพ 30 ลักษณะผลิตภัณฑ์อาหารสุขภาพชนิดเจล 4 สูตร ที่ใช้ทดสอบการยอมรับในอาสาสมัคร... 71	71
ภาพ 31 ผลการยอมรับผลิตภัณฑ์อาหารสุขภาพชนิดเจล Recipe 1 ด้วย JAR scale.....	72
ภาพ 32 ผลการยอมรับผลิตภัณฑ์อาหารสุขภาพชนิดเจล Recipe 2 ด้วย JAR scale.....	72
ภาพ 33 ผลการยอมรับผลิตภัณฑ์อาหารสุขภาพชนิดเจล Recipe 3 ด้วย JAR scale.....	73
ภาพ 34 ผลการยอมรับผลิตภัณฑ์อาหารสุขภาพชนิดเจล Recipe 4 ด้วย JAR scale.....	74
ภาพ 35 การยอมรับผลิตภัณฑ์ต้นแบบ RSP ในอาสาสมัครช่วงอายุ 35-44 ปี.....	75
ภาพ 36 การยอมรับผลิตภัณฑ์ต้นแบบ RSP ในอาสาสมัครช่วงอายุ 45-54 ปี.....	75
ภาพ 37 การยอมรับผลิตภัณฑ์ต้นแบบ RSP ในอาสาสมัครอายุ 55 ปีขึ้นไป.....	76
ภาพ 38 การเปรียบเทียบผลการยอมรับผลิตภัณฑ์ RSP ในกลุ่มอาสาสมัคร 3 กลุ่มอายุ .....	77
ภาพ 39 ผลิตภัณฑ์ RSP ขนาดบรรจุ 200 มิลลิลิตร.....	77
ภาพ 40 ปริมาณจุลินทรีย์ใน RSP หลังการเก็บรักษาวันที่ 1, 5 และ 15 วัน ที่อุณหภูมิห้อง .....	79

ภาพ 41 ปริมาณจุลินทรีย์ใน RSP หลังการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 °C วันที่ 1, 15 และ 30 วัน.....	79
ภาพ 42 ลักษณะผลิตภัณฑ์ RSP ที่ผ่านการฆ่าเชื้อด้วยวิธีสเตอริไลส์ และเก็บนาน 3 เดือนที่อุณหภูมิห้อง.....	80
ภาพ 43 ระดับน้ำตาลกลูโคส คอเลสเทอรอล และไตรกลีเซอไรด์ในหนูขาวที่ได้รับ RSE และ RSP ในสัปดาห์ที่ 0, 4 และ 8.....	83
ภาพ 44 ระดับเอนไซม์ SOD และ CAT ในหนูขาวที่ได้รับ RSE และ RSP เป็นเวลา 8 สัปดาห์.....	85
ภาพ 45 ระดับเอนไซม์ GPx ในหนูขาวที่ได้รับ RSE และ RSP เป็นเวลา 8 สัปดาห์.....	86
ภาพ 46 ระดับมาลอนไดอัลดีไฮด์ในหนูปกติและหนูเบาหวาน.....	87



## บทที่ 1

### บทนำ

#### ที่มาและความสำคัญของปัญหา

จำนวนประชากรไทยในพ.ศ. 2560 มีประมาณ 66 ล้านคน ประชากรส่วนใหญ่ของไทย คือ วัยแรงงาน ซึ่งอยู่ในช่วงอายุ 15-59 ปี มีจำนวน 43 ล้านคน ที่เหลือเป็นประชากรวัยเด็กและสูงอายุ ซึ่งใน 10 ปีข้างหน้า ประชากรไทยส่วนใหญ่จะเป็นวัยสูงอายุมากกว่าวัยอื่นๆ เนื่องจากปัจจุบัน ประชากรไทยมีอัตราการเกิดลดลงมาก (Institute for Population and Social Research, 2017) มีรายงานสาเหตุการเสียชีวิตของประชากรผู้สูงอายุส่วนใหญ่ของไทยในปี 2552 พบว่า เสียชีวิตด้วย กลุ่มโรคติดต่อไม่เรื้อรัง (Non-Communicable Diseases; NCDs) และผลกระทบจากกลุ่มโรค NCDs มากกว่า 300,000 รายต่อปี และยังมีแนวโน้มสูงขึ้นอีก ทำให้กระทรวงสาธารณสุขของไทยมี นโยบาย เสริมสุขภาพและเน้นให้ประชากรไทยมีสุขภาพดี เพื่อลดอัตราการเสียชีวิตให้ได้ 1 ใน 3 ภายในปี 2573 (ThaiHealth, 2017) โรค NCDs เป็นโรคที่มีสาเหตุมาจากความเสื่อมของเซลล์และความผิดปกติของระบบเมตาบอลิก ทำให้เกิดภาวะเมตาบอลิกซินโดรม ซึ่งเกี่ยวข้องกับระบบการเผา ผลาญอาหารของร่างกาย กลุ่มโรคของ NCDs ได้แก่ โรคระบบหลอดเลือดและหัวใจ เบาหวาน ความดัน มะเร็ง รวมถึงโรคอ้วน เป็นต้น เหตุผลหนึ่งของการเกิดโรคในกลุ่ม NCDs คือ การรับประทานอาหารที่ไม่ถูกหลักโภชนาการ การบริโภคอาหารรสจัด จึงจำเป็นต้องมีการจัดการเรื่องโภชนาการที่ เหมาะสมตามวัย เพื่อป้องกันการเกิดปัญหาสุขภาพที่จะตามมา ทำให้ปัจจุบันอาหารสุขภาพ (functional food) หรืออาหารฟังก์ชัน จึงเป็นทางเลือกให้คนที่รักสุขภาพ เพราะอาหาร ฟังก์ชันนอกจากเป็นอาหารที่มีสารอาหารที่เป็นองค์ประกอบตามธรรมชาติแล้ว ยังมีสารอาหารที่มีผล ทางสรีรวิทยา ช่วยส่งเสริมสุขภาพที่ดี เช่น มีสารช่วยต้านอนุมูลอิสระ ลดคอเลสเตอรอล ลดระดับ น้ำตาล เป็นต้น (Hasler and Brown, 2009)

สาหร่ายน้ำจืดสีเขียวขนาดใหญ่ที่ชาวบ้านนิยมนำมาบริโภคและพบได้มากในเขตภาคเหนือ ของไทย ทั้งในจังหวัดแพร่ และจังหวัดน่าน ได้แก่ สาหร่ายไถ (*Rhizoclonium hieroglyphicum* (C. Agardh) Kützing) และสาหร่ายเตา (*Spirogyra neglecta* (Hassall) Kützing) สาหร่ายทั้ง 2 ชนิด นี้ได้รับความนิยมในการนำมารับประทานเป็นอาหารพื้นบ้านมาเป็นเวลานาน เช่น ยำเตา หรือตำเตา ไถยี้ และไถแผ่นทอดกรอบ สาหร่ายไถและสาหร่ายเตามีคุณค่าทางโภชนาการสูง มีโปรตีนประมาณ 20-25% ของน้ำหนักแห้ง ในสาหร่ายไถพบสารสำคัญที่มีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ ได้แก่ สารประกอบฟีนอลิก สารกลุ่มโพลีแซคคาไรด์ และซีลีเนียม (Peerapornpisal, 2013) จากรายงาน

การทดสอบฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา พบว่า สารสกัดน้ำของสาหร่ายเตาและสาหร่ายไก่ออกจากมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระทั้งในหลอดทดลองและในสัตว์ทดลองแล้ว ยังมีฤทธิ์ป้องกันการเกิดแผลในกระเพาะอาหาร ฤทธิ์ต้านการอักเสบ และมีความปลอดภัยในการรับประทาน โดยไม่พบอาการผิดปกติของหนูขาวเมื่อทดสอบความเป็นพิษเฉียบพลัน (Peerapornpisal et al., 2006) โดยเฉพาะสารสกัดสาหร่ายเตาด้วยน้ำขนาด 1,000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม สามารถลดระดับน้ำตาลและไขมันในเลือด มีผลเพิ่มความไวในการตอบสนองต่ออินซูลิน และลดการเกิดภาวะเครียดออกซิเดชัน (oxidative stress) ช่วยเพิ่มระดับเอนไซม์ที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ สามารถป้องกันภาวะแทรกซ้อนระยะเริ่มแรกทางหัวใจ หลอดเลือด และไตในหนูขาวที่ถูกกระตุ้นให้เป็นเบาหวานเมื่อได้รับสารสกัดสาหร่ายเตาเป็นเวลา 12 สัปดาห์ (Ontawong et al., 2013) และมีฤทธิ์ในการป้องกันการกลายพันธุ์และการเกิดมะเร็งที่ตับในหนูขาว (Thumvijit et al., 2013a; Thumvijit et al., 2014) ส่วนสาหร่ายไก่อมีสารต้านอนุมูลอิสระ (Amornlerdpison et al., 2011) และป้องกันการเกิดภาวะแทรกซ้อนที่ไตที่เกิดจากภาวะเบาหวานในหนู (Srimaroeng et al., 2015) ส่วนการทดสอบในมนุษย์ที่ได้รับสารสกัดสาหร่ายไก่อขนาด 1,000 มิลลิกรัม ไม่พบความผิดปกติของอัตราการเต้นของหัวใจ (Sawangpak et al., 2016)

การศึกษาสถานะที่เหมาะสมในการการอบแห้งสาหร่ายเตา พบว่า การอบด้วยคลื่นไมโครเวฟระบบสุญญากาศที่ระดับความเข้ม 2 วัตต์ต่อกรัมเป็นสถานะที่เหมาะสมที่สุดที่ทำให้สาหร่ายเตามีสารประกอบฟีนอลิกที่สูง (Assawarachan, 2013) ขณะที่สาหร่ายไก่อยังมีคุณสมบัติในการก่อกเจลได้ดี โดยสารสกัดสาหร่ายไก่อด้วยน้ำในขนาด 10% มีความสามารถในการก่อกเจลได้ดีใกล้เคียงกับ carrageenan ในขนาด 1% ซึ่งเป็นสารก่อกเจลที่สกัดมาจากสาหร่ายทะเลสีแดง ดังนั้นสารสกัดสาหร่ายไก่อจึงนำมาใช้เป็นสารก่อกเจลหรือให้ความหนืดในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง ยา และอาหาร (Leelapornpisid et al., 2014; Moongmai, 2013)

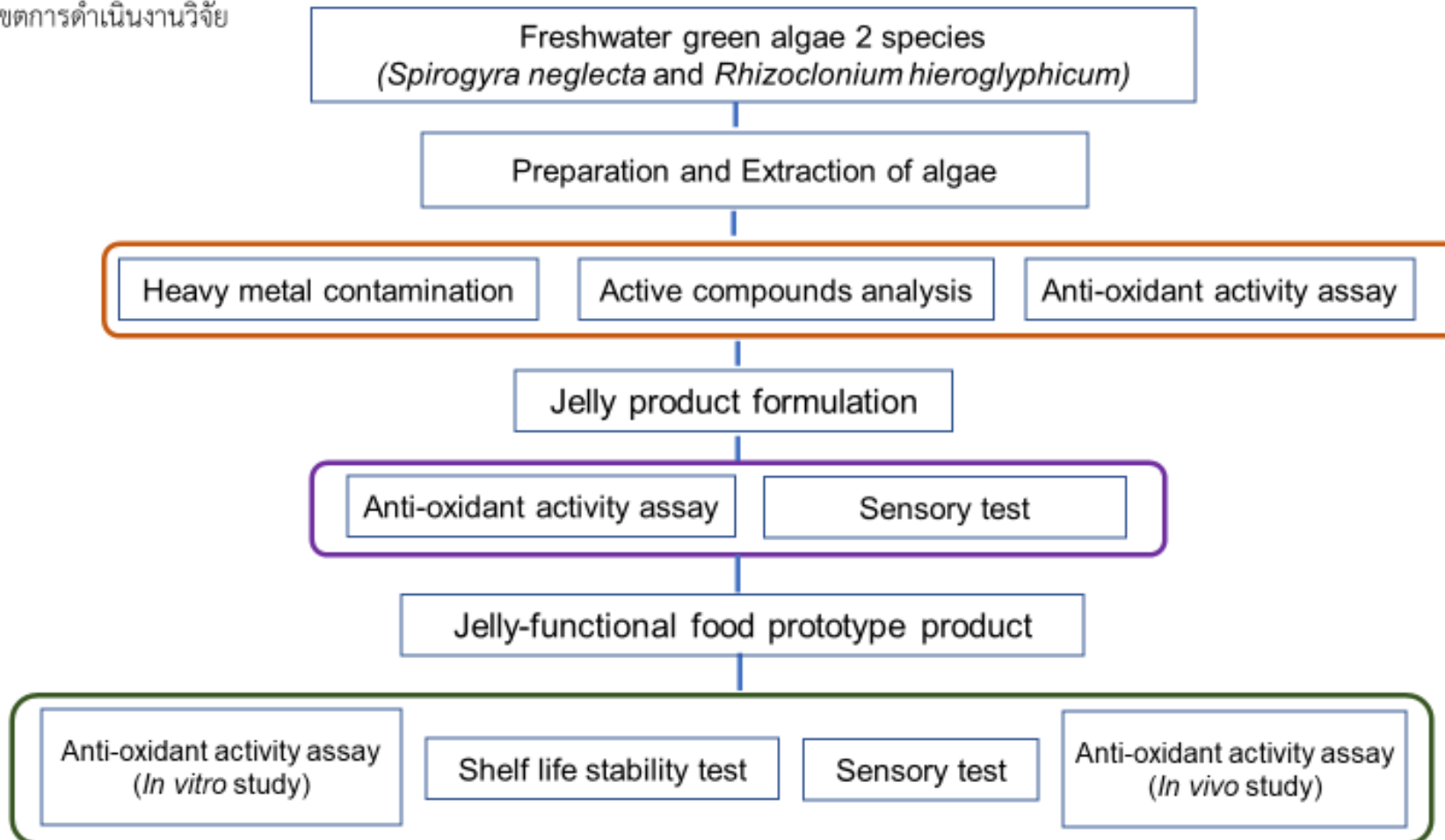
จากผลการวิจัยดังกล่าวจึงมีแนวคิดในการนำสาหร่ายเตาและสาหร่ายไก่อที่มีฤทธิ์ชีวภาพที่เป็นประโยชน์ต่อร่างกายมาพัฒนาเป็นอาหารสุขภาพชนิดเจล ทำให้สามารถรับประทานได้ง่าย โดยเน้นฤทธิ์ชีวภาพในการต้านอนุมูลอิสระช่วยป้องกันการเกิดโรคเรื้อรังหลายชนิดได้ โดยเฉพาะกลุ่มโรค NCDs ทดสอบความพึงพอใจและการยอมรับของผู้บริโภคต่อผลิตภัณฑ์ที่พัฒนามาจากส่วนผสมของสารสกัดสาหร่ายทั้ง 2 ชนิด นอกจากจะได้ผลิตภัณฑ์อาหารสุขภาพที่เป็นประโยชน์ต่อผู้บริโภค ยังเป็นการสร้างมูลค่าเพิ่มให้กับวัตถุดิบพื้นบ้าน ช่วยสร้างรายได้ให้กับชาวบ้านและชุมชนที่มีการเก็บหรือเพาะเลี้ยงสาหร่าย และยังเป็นการสร้างอาชีพที่มั่นคงให้กับเกษตรกรอย่างยั่งยืนต่อไป

### วัตถุประสงค์ของการวิจัย (Objectives)

1. เพื่อวิเคราะห์สารสำคัญและฤทธิ์ชีวภาพของสารสกัดสาหร่ายน้ำจืด 2 ชนิด คือ สาหร่ายเตาและสาหร่ายไถ และนำมาใช้กำหนดมาตรฐานผลิตภัณฑ์
2. เพื่อพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหารสุขภาพชนิดเจลจากสารสกัดสาหร่ายน้ำจืดทั้ง 2 ชนิด
3. เพื่อศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของผลิตภัณฑ์อาหารสุขภาพชนิดเจลจากสารสกัดสาหร่ายในหลอดทดลองและในสัตว์ทดลอง
4. เพื่อประเมินการยอมรับผลิตภัณฑ์อาหารสุขภาพชนิดเจลจากสารสกัดสาหร่ายน้ำจืดในอาสาสมัคร



ขอบเขตการดำเนินงานวิจัย

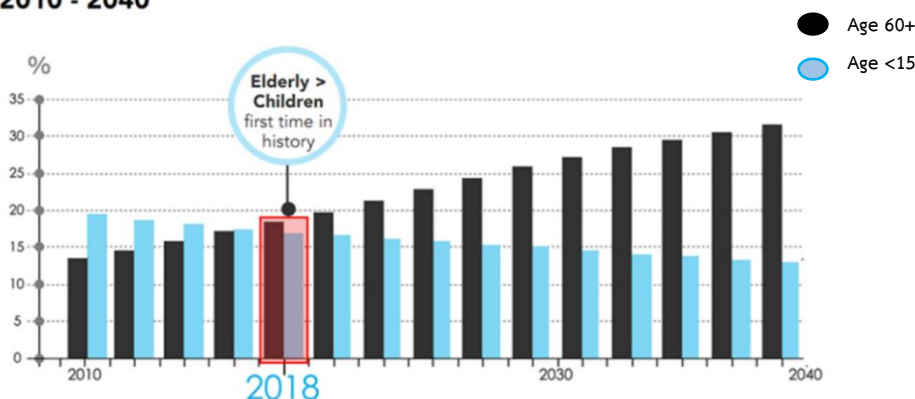


## บทที่ 2

### ทฤษฎีและการตรวจเอกสาร

ประเทศไทยกำลังอยู่ในช่วงการเปลี่ยนผ่านเข้าสู่สังคมผู้สูงอายุโดยสมบูรณ์ (aged society) โดยจากข้อมูลของ United Nations World Population Ageing พบว่า หลังจากปี 2552 ประชากรที่อยู่ในวัยพึ่งพิงได้แก่ เด็กและผู้สูงอายุ จะมีจำนวนมากกว่าประชากรในวัยแรงงาน และในปี 2560 จะเป็นครั้งแรกในประวัติศาสตร์ที่ประชากรเด็กน้อยกว่าผู้สูงอายุ สถานการณ์นี้เป็นผลมาจากการลดภาวะเจริญพันธุ์อย่างรวดเร็ว และการลดลงอย่างต่อเนื่องของระดับการตายของประชากร ทำให้จำนวนและสัดส่วนประชากรสูงอายุของประเทศไทย เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว จากข้อมูลประชากรของประเทศไทยปี 2556 ประชากรไทยมีจำนวน 64.6 ล้านคน เป็นผู้สูงอายุมากถึง 9.6 ล้านคน คาดว่าในปี 2573 จะมีจำนวนผู้สูงอายุ 17.6 ล้านคน (ร้อยละ 26.3) และปี 2583 จะมีจำนวนถึง 20.5 ล้านคน (ร้อยละ 32.1) ซึ่งหน่วยงานทั้งภาครัฐ และเอกชน ได้ร่วมกันดำเนินงานเพื่อคุ้มครอง ส่งเสริม และสนับสนุนสถานภาพ บทบาท และกิจกรรมของผู้สูงอายุ และเมื่อนำข้อมูลประชากรไทยที่มีอายุต่ำกว่า 15 ปีกับประชากรที่มีอายุตั้งแต่ 60 ปีขึ้นไปมาเทียบสัดส่วนเริ่มตั้งแต่ พ.ศ. 2553-2583 (ภาพ 1) ในปี พ.ศ. 2561 ประชากรทั้ง 2 ช่วงอายุจะมีสัดส่วนที่เท่ากัน และมีแนวโน้มที่กลุ่มประชากรที่มีอายุตั้งแต่ 60 ปีขึ้นไปจะมีสัดส่วนที่สูงขึ้นอย่างต่อเนื่อง (Foundation of Thai Gerontology Research and Development Institute, 2017)

**Proportion of the Population under Age 15 and 60 Years or Over:  
2010 - 2040**



**ภาพ 1** สัดส่วนของประชากรไทยที่มีอายุต่ำกว่า 15 ปีกับประชากรที่มีอายุตั้งแต่ 60 ปีขึ้นไป  
ที่มา : มูลนิธิสถาบันวิจัยและพัฒนาผู้สูงอายุไทย, 2560

ผลการลดลงของอัตราการเกิดของประชากร และอัตราการเสียชีวิตที่ลดลง ทำให้ประเทศไทยกำลังก้าวเข้าสู่สังคมผู้สูงอายุและสังคมผู้สูงอายุโดยสมบูรณ์ภายใน 10 ปี โดยองค์การสหประชาชาติ (United Nations: UN) ได้ให้นิยามไว้ ดังนี้

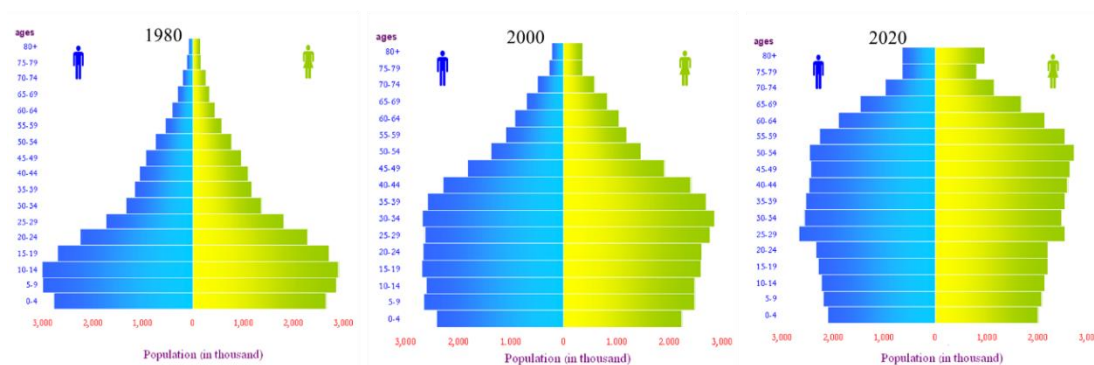
ผู้สูงอายุ (older person) หมายถึง ประชากรทั้งเพศชายและหญิงที่มีอายุมากกว่า 60 ปีขึ้นไป

สังคมผู้สูงอายุ (aging society) หมายถึง สังคมที่มีประชากรอายุ 60 ปีขึ้นไปที่อยู่จริงในพื้นที่ต่อประชากรทุกช่วงอายุในพื้นที่เดียวกัน ในอัตราเท่ากับหรือมากกว่าร้อยละ 10 ขึ้นไป หรือมีประชากรอายุ 65 ปีขึ้นไปที่อยู่จริงในพื้นที่ต่อประชากรทุกช่วงอายุในพื้นที่เดียวกัน ในอัตราเท่ากับหรือมากกว่าร้อยละ 7 ขึ้นไป

สังคมผู้สูงอายุโดยสมบูรณ์ (aged society) หมายถึง สังคมที่มีประชากรอายุ 60 ปีขึ้นไปที่อยู่จริงในพื้นที่ต่อประชากรทุกช่วงอายุในพื้นที่เดียวกัน ในอัตราเท่ากับหรือมากกว่าร้อยละ 20 ขึ้นไป หรือมีประชากรอายุ 65 ปีขึ้นไป ที่อยู่จริงในพื้นที่ต่อประชากรทุกช่วงอายุในพื้นที่เดียวกัน ในอัตราเท่ากับหรือมากกว่าร้อยละ 14 ขึ้นไป

### การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของประชากรไทย

ภาวะเศรษฐกิจและสังคมที่เปลี่ยนแปลงไป แนวคิดการมีจำนวนบุตรก็เปลี่ยนแปลง โดยเฉพาะอย่างยิ่งครอบครัวยุคใหม่ที่มีการศึกษาสูงมักมีบุตรเพียง 1-2 คนต่อครอบครัวเท่านั้น ประกอบสภาพสังคมเปลี่ยนแปลง แนวคิดการครองคู่แบบไม่มีบุตรเพิ่มมากขึ้น ทำให้อัตราการเกิดของประชากรรุ่นใหม่จึงมีแนวโน้มลดลง ส่งผลประชากรวัยแรงงานในอนาคตมีแนวโน้มลดลง ขณะที่ประชากรวัยสูงอายุเพิ่มมากขึ้น และอายุไขเฉลี่ยที่ยืนยาวขึ้นของคนไทย โดยแสดงการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของประชากรเป็นภาพปีระมิตประชากร ค.ศ. 1980-2020 (พ.ศ. 2523-2563) จะทำให้เห็นแนวโน้มการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างได้อย่างชัดเจนมากขึ้น (ภาพ 2) ซึ่งการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของประชากรนอกจากจะมีผลต่อจำนวนแรงงานแล้ว ยังส่งผลถึงเศรษฐกิจและสังคมในอนาคต



ภาพ 2 ปีรามิดประชากรไทยในช่วงปี ค.ศ. 1980-2020

ที่มา : สถาบันวิจัยประชากรและสังคม, 2560

ในปี พ.ศ. 2561 จำนวนผู้สูงอายุมีมากกว่าร้อยละ 10 ของจำนวนประชากร ส่งผลถึงจำนวนผู้ดูแลในอนาคตอันใกล้นี้ว่า จะมีผู้สูงอายุมากกว่าผู้ดูแล จึงจำเป็นต้องมีการวางแผนสุขภาพตั้งแต่วัยผู้ใหญ่ก่อนเข้าสู่สูงวัย เพื่อเตรียมความพร้อมให้ประชากรวัยผู้ใหญ่ที่จะเข้าสู่วัยผู้สูงอายุ ให้เป็นผู้สูงอายุที่มีสุขภาพดี จากรายงานของมูลนิธิสถาบันวิจัยและพัฒนาผู้สูงอายุไทย รายงานว่าปัจจุบัน (พ.ศ. 2562) ประเทศไทยได้เข้าสู่ภาวะสังคมผู้สูงอายุแล้ว และยังคงพบว่ามีปัญหาสุขภาพเกี่ยวกับการเป็นโรคไม่ติดต่อ เช่น โรคเบาหวาน ความดันโลหิตสูง เพิ่มขึ้นขึ้นทุก 5 ปี (ตาราง 1 และ 2) อาจเป็นผลมาจากพฤติกรรมตั้งแต่ก่อนวัยสูงอายุ เช่น การรับประทานอาหาร การออกกำลังกาย การสูบบุหรี่ และการดื่มแอลกอฮอล์ เป็นต้น ซึ่งโรคและพฤติกรรมดังกล่าว จะส่งผลทำให้ผู้สูงอายุอาจเกิดภาวะทุพพลภาพ ไม่สามารถดูแลตัวเอง และปฏิบัติกิจวัตรประจำวันได้ ทำให้ต้องการความช่วยเหลือจากผู้อื่น

ตาราง 1 ร้อยละของผู้สูงอายุที่มีปัญหาด้านสุขภาพด้วยโรคเบาหวาน ปี 2545-2560

พ.ศ.	ช่วงอายุ (ปี)			
	60-69	70-79	80 ขึ้นไป	รวมทุกอายุ
2545	8.8	8.0	6.0	8.3
2550	13.5	13.9	10.5	13.3
2554	14.7	16.0	13.8	15.0
2560	15.2	19.3	16.3	16.5

ที่มา : มูลนิธิสถาบันวิจัยและพัฒนาผู้สูงอายุไทย, 2562

ตาราง 2 ร้อยละของผู้สูงอายุที่มีปัญหาสุขภาพด้วยโรคความดันโลหิตสูง ปี 2545-2560

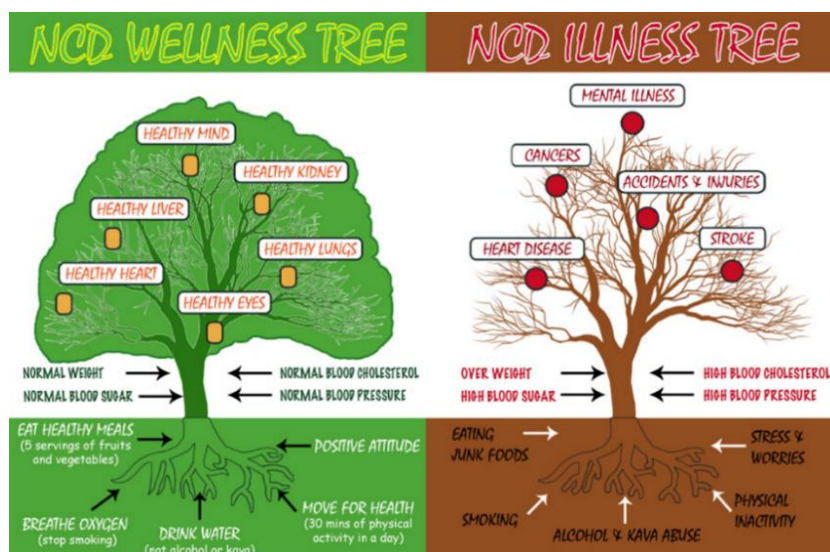
พ.ศ.	ช่วงอายุ (ปี)			รวมทุกอายุ
	60-69	70-79	80 ขึ้นไป	
2545	18.9	22.0	21.1	20.0
2550	28.9	36.0	34.6	31.7
2554	30.0	39.3	36.7	33.7
2560	29.1	39.6	40.2	33.6

ที่มา : มูลนิธิสถาบันวิจัยและพัฒนาผู้สูงอายุไทย, 2562

สำนักงานกองทุนสนับสนุนการสร้างเสริมสุขภาพ (สสส.) รายงานสาเหตุการเสียชีวิตของประชากรผู้สูงอายุส่วนใหญ่ของไทยในปี 2552 ว่า ผู้สูงอายุเสียชีวิตด้วยกลุ่มโรคไม่ติดต่อเรื้อรัง หรือ Non-Communicable Diseases (NCDs) และผลกระทบจากกลุ่มโรค NCDs มากกว่า 300,000 รายต่อปี หรือ คิดเป็น 73% ของการเสียชีวิตของประชากรไทยทั้งหมดและมีแนวโน้มสูงขึ้นอีก

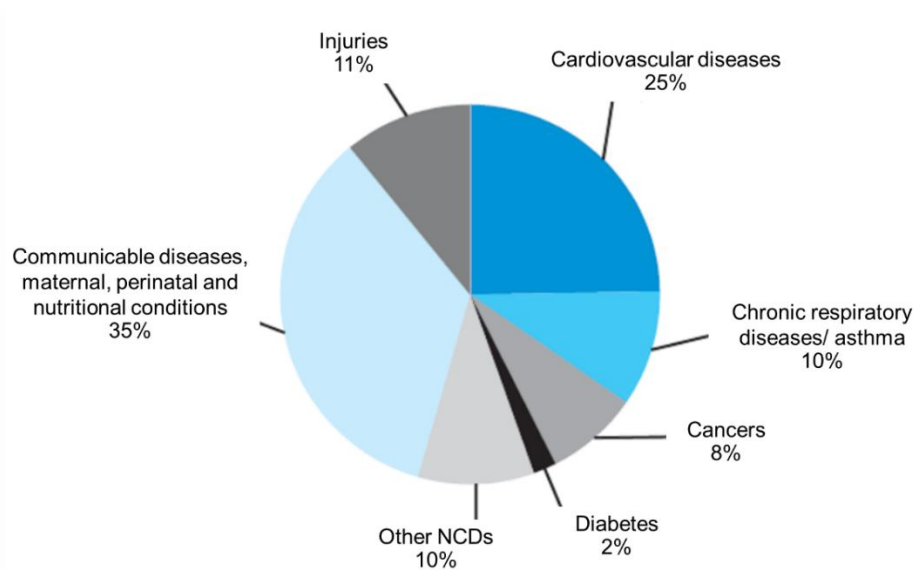
### กลุ่มโรคไม่ติดต่อเรื้อรัง

กลุ่มโรคไม่ติดต่อเรื้อรัง หรือกลุ่มโรค NCDs (Non-Communicable diseases) เป็นชื่อเรียกกลุ่มโรคที่ไม่ได้มีสาเหตุมาจากการติดเชื้อหรือเชื้อโรค ไม่สามารถติดต่อผ่านการสัมผัส คลุกคลี หรือติดต่อ ผ่านตัวนำโรค (พาหะ) หรือสารคัดหลั่งต่างๆ หากแต่เกิดจากปัจจัยต่างๆ ภายในร่างกาย ซึ่งส่วนใหญ่เป็นผลจากวิถีการใช้ชีวิตที่มีพฤติกรรมที่ทำลายสุขภาพ เช่น การดื่มแอลกอฮอล์ การสูบบุหรี่ ขาดการออกกำลังกาย การรับประทานอาหารรสหวานมันเค็มจัด และความเครียดวิตกกังวล ซึ่งจะส่งผลต่อสุขภาพกายและจิตในระยะยาว โดยเป็นสาเหตุของการนำมาสู่การเกิดกลุ่มโรค NCDs เช่น โรคมะเร็ง โรคเบาหวาน และโรคอ้วน เป็นต้น อาจเปรียบเทียบกับคนที่มีสุขภาพดีตั้งต้นไม้ที่สมบูรณ์ และต้นไม้ที่แห้งเฉาเปรียบเหมือนคนที่มีสุขภาพกายและจิตที่ไม่สมบูรณ์ ย่อมส่งผลให้เกิดโรคเรื้อรังต่างๆ ตามมาได้ (ภาพ 3) ดังนั้นการดูแลและรักษาสุขภาพตั้งแต่วัยทำงานย่อมจะส่งผลถึงการมีสุขภาพที่ดีในอนาคตได้



ภาพ 3 สาเหตุและผลลัพธ์จากการเกิดโรคกลุ่มไม่ติดต่อเรื้อรัง  
ที่มา : Ministry of Health and Medical Services, 2017

จากการรายงานขององค์การอนามัยโลกถึงสถานการณ์ของกลุ่มโรคไม่ติดต่อเรื้อรัง หรือกลุ่มโรค NCDs ในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ เมื่อปี 2008 พบว่า สาเหตุของการเสียชีวิต 65% มีเสียชีวิตจากกลุ่มโรค NCDs ซึ่งประเทศอินเดียเป็นประเทศที่พบว่า มีอัตราการเพิ่มขึ้นของผู้เสียชีวิตด้วยกลุ่มโรคนี้มากที่สุด โดยเพิ่มขึ้นจาก 32% ในปี 1995 เป็น 47% ในปี 2004 (World Health Organization, 2011)



ภาพ 4 สาเหตุการเสียชีวิตของประชากรในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ปี ค.ศ. 2008  
ที่มา : World Health Organization, 2011

ประเทศไทยเป็นประเทศหนึ่งที่มีการเสียชีวิตของประชากรด้วยสาเหตุจากกลุ่มโรค NCDs โดยโรค NCDs ที่มีอัตราผู้ป่วยและผู้เสียชีวิตสูงสุด 6 โรค ได้แก่

- โรคเบาหวาน (Diabetes Mellitus)
- โรคหลอดเลือดสมองและหัวใจ (Cardiovascular and Cerebrovascular Diseases)
- โรคถุงลมโป่งพอง (Emphysema)
- โรคมะเร็ง (Cancer)
- โรคความดันโลหิตสูง (Hypertension)
- โรคอ้วนลงพุง (Obesity)

## โรคเบาหวาน

โรคเบาหวาน (diabetes mellitus) เป็นโรคต่อมไร้ท่อและเป็นโรคที่มีความผิดปกติทางเมตาบอลิซึม มีลักษณะสำคัญของโรคคือ มีระดับกลูโคสในเลือดสูงกว่าปกติ (hyperglycemia) ปัสสาวะบ่อย (polyuria) ตื่นน้ำบ่อย (polydipsia) รับประทานอาหารจุ แต่น้ำหนักลดลง โดยมีสาเหตุเกิดจากการมีอินซูลิน (insulin) น้อยกว่าปกติหรือการตอบสนองต่ออินซูลินลดลงกว่าปกติ แบ่งเป็น 4 กลุ่ม (American Diabetes Association, 2015) ดังนี้

1. เบาหวานชนิดที่ 1 (type 1 diabetes mellitus) มักพบในคนที่มีอายุน้อย เกิดจากมีการทำลาย beta cell ของตับอ่อนโดย cellular mediated autoimmune ทำให้การสร้างอินซูลินลดน้อยลง คนที่เป็นเบาหวานชนิดนี้มีโอกาสเกิดภาวะกรดคั่งในกระแสเลือด (ketoacidosis) สูงกว่าเบาหวานชนิดที่ 2

2. เบาหวานชนิดที่ 2 (type 2 diabetes mellitus) มักเกิดกับคนที่มีอายุมากกว่า 40 ปี มีรูปร่างอ้วนหรือปกติ มีอาการเกิดขึ้นแบบค่อยเป็นค่อยไปหรือไม่มีอาการชัดเจน มักมีประวัติโรคเบาหวานในครอบครัว มักพบว่ามีระดับอินซูลินในเลือดปกติแต่ออกฤทธิ์ได้น้อยลงกว่าเดิมเพราะมีภาวะการดื้ออินซูลิน (insulin resistance)

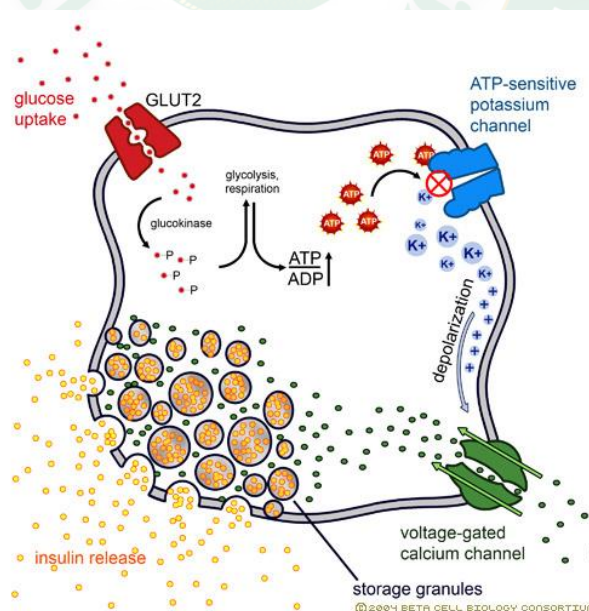
3. เบาหวานขณะตั้งครรภ์ (gestational diabetes mellitus) ขณะสตรีตั้งครรภ์ บางรายเกิดภาวะเบาหวานขึ้น เกิดจากผลของฮอร์โมนแลคโทเจน (lactogen) จากรกและโพรแลคติน (prolactin) ที่สูงขึ้นในขณะตั้งครรภ์ ซึ่งมีฤทธิ์ต้านฤทธิ์ของอินซูลิน อาการมักหายหลังคลอดแต่ในบางรายอาจมีการพัฒนาไปเป็นเบาหวานชนิดที่ 2 ได้ในภายหลัง

4. เบาหวานชนิดอื่นๆ เป็นกลุ่มอาการเบาหวานที่เป็นผลมาจากโรคหรือความผิดปกติอื่นๆ เช่น เบาหวานจากโรคตับอ่อนอักเสบเรื้อรัง (chronic pancreatitis) เบาหวานจากโรคต่อมไร้ท่ออื่นๆ

เช่น Cushing's syndrome ภาวะไทรอยด์เป็นพิษ (thyrotoxicosis) เบาหวานจากยาหรือสารพิษ เป็นต้น

### การหลั่งของอินซูลิน

โรคเบาหวานชนิดที่ 2 (type 2 diabetes mellitus) เกี่ยวข้องกับการหลั่งอินซูลิน (insulin) ซึ่งเป็นฮอร์โมนที่สร้างและหลั่งจากเบต้าเซลล์ของตับอ่อน มีหน้าที่นำน้ำตาลกลูโคสเข้าสู่เนื้อเยื่อต่างๆ ของร่างกาย หากร่างกายขาดอินซูลิน หรือ การออกฤทธิ์ของอินซูลินไม่ดี ร่างกายก็จะไม่สามารถเอาน้ำตาลไปใช้ได้ ทำให้ระดับน้ำตาลในเลือดสูงได้ ระดับของกลูโคสในกระแสเลือดเป็นตัวควบคุมการหลั่งอินซูลินจาก เบต้าเซลล์ โดยเมื่อระดับกลูโคสในเลือดสูงกว่า 70 mg/dL จะกระตุ้นการสังเคราะห์อินซูลินโดยเพิ่มกระบวนการ translation จากนั้นเมื่อกลูโคสเข้าสู่เบต้าเซลล์ของตับอ่อนทาง GLUT2 glucose จะถูก phosphorylated โดย hexokinase ได้ Glucose-6-phosphate จากนั้นผ่านกระบวนการ metabolite ต่างๆ จนเข้าสู่ไมโทคอนเดรียได้ ATP เมื่อ ATP ในเบต้าเซลล์เพิ่มมากขึ้นจะไปปิด ATP-sensitive K<sup>+</sup> channel ทำให้เกิด membrane depolarization และ voltage-gated calcium channel เปิด ทำให้ calcium ไหลเข้าสู่เซลล์ ซึ่งทำให้เกิด exocytosis หลั่งเบต้าเซลล์ออกมา (ภาพ 5) เมื่ออินซูลินจับกับ receptor จะกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ tyrosine kinase ซึ่งจะกระตุ้น signal transduction ต่างๆ ทำให้เกิดการนำ Glucose transporter 4 (GLUT4) ไปไว้ในเยื่อหุ้มเซลล์ ทำให้เพิ่มการดูดซึมกลูโคส เข้าสู่เซลล์



ภาพ 5 การหลั่งของอินซูลินจากเบต้าเซลล์ของตับอ่อน

ที่มา : <https://numob.wordpress.com/2009/07/25/insulin>

การวินิจฉัยโรคเบาหวานโดยการตรวจวัดระดับกลูโคสในเลือด (American Diabetes Association, 2015) ตามเกณฑ์ข้อใดข้อหนึ่ง ดังนี้

1. การตรวจระดับน้ำตาลในเลือดหลังจากงดอาหาร (fasting plasma glucose; FPG) โดยตรวจวัดตอนเช้าหลังงดอาหาร 8 ชั่วโมงหรือหลังเที่ยงคืน มีค่า FPG สูงกว่า 125 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร ตั้งแต่ 2 ครั้งขึ้นไป

2. การตรวจระดับน้ำตาลในเลือดเวลาใด ๆ (random plasma glucose) มีค่าสูงกว่า 200 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร ร่วมกับมีอาการของโรคเบาหวาน

3. การตรวจ oral glucose tolerance test (OGTT) โดยการตรวจระดับน้ำตาลหลังจากดื่มสารละลายกลูโคส 75 กรัมในน้ำ 300 มิลลิลิตร และเจาะเลือดตรวจหลังจากนั้น 2 ชั่วโมง มีระดับกลูโคส สูงกว่า 200 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร

เนื่องจากโรคเบาหวานเป็นโรคไม่ติดต่อเรื้อรัง การรักษาโรคเบาหวานจึงเป็นการควบคุมระดับน้ำตาลในเลือดให้อยู่ในเกณฑ์ปกติ เพื่อป้องกันหรือชะลอการเกิดภาวะแทรกซ้อนของโรค มี 2 แนวทาง (Wongyai et al., 2017) ดังนี้

1. การรักษาแบบไม่ใช้ยา โดยปรับเปลี่ยนรูปแบบการดำเนินชีวิต ได้แก่ การควบคุมอาหาร การออกกำลังกาย และการจัดการความเครียด

2. การรักษาแบบใช้ยา เพื่อลดระดับน้ำตาลชนิดรับประทานอาจจำแนกตามกลไกการออกฤทธิ์ได้เป็น 4 ประเภท คือ

2.1 ยาที่กระตุ้นการหลั่งอินซูลินจากเบต้าเซลล์ของตับอ่อน (Insulin secretagogues) ยาในกลุ่มนี้ยังแบ่งย่อยได้เป็น 2 ประเภท คือ

- Sulfonylureas ออกฤทธิ์โดยการจับกับ sulfonylurea receptor ที่เบต้าเซลล์ของตับอ่อน ยากลุ่มนี้ได้แก่ chlorpropamide, glibenclamide, glipizide, gliclazide, gliquidone และ glimepiride

- Non-sulfonylurea insulin secretagogues ออกฤทธิ์กระตุ้นการหลั่งอินซูลินของตับอ่อนเช่นเดียวกับ sulfonylurea แต่ที่ตำแหน่งต่างกัน ยาในกลุ่มนี้ได้แก่ repaglinide และ nateglinide

2.2 ยาที่ลดภาวะดื้อต่ออินซูลิน (insulin sensitizer) ได้แก่

- Metformin ออกฤทธิ์โดยการยับยั้งการสร้างกลูโคสจากตับเป็นหลัก นอกจากนี้ยังช่วยให้การออกฤทธิ์ของอินซูลินที่กล้ามเนื้อดีขึ้นด้วย

- Thiazolidinediones ออกฤทธิ์โดยการกระตุ้น peroxisome proliferator activated receptor gamma ซึ่งอยู่ที่เซลล์ไขมันเป็นหลัก และมีผลทำให้การออกฤทธิ์ของอินซูลินดีขึ้นทั้งที่เซลล์กล้ามเนื้อและเซลล์ไขมัน ยาในกลุ่มนี้ได้แก่ rosiglitazone และ pioglitazone

2.3 ยาที่ออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ alpha-glucosidase ที่ผนังลำไส้ (alpha-glucosidase inhibitors) ทำให้การดูดซึมกลูโคสจากทางเดินอาหารเกิดขึ้นช้าลง ยาในกลุ่มนี้ได้แก่ acarbose และ voglibose

2.4 Dipeptidyl Peptidase (DPP) IV inhibitors เป็นยาที่ยับยั้งเอนไซม์ที่ใช้ในการทำลายฮอร์โมนที่หลั่งจากลำไส้คือ glucagon-like peptide-1 (GLP-1) และ glucose-dependent insulinotropic polypeptide (GIP) ยาในกลุ่มนี้ได้แก่ sitagliptin และ vildagliptin

## เมทฟอร์มิน

เมทฟอร์มิน (metformin) เป็นยารักษาโรคเบาหวานในกลุ่ม Biguanide จะถูกดูดซึมอย่างรวดเร็วที่ลำไส้เล็ก ระดับยาในเลือดจะขึ้นสูงสุดที่ 2 ชั่วโมงหลังรับประทาน ยานี้สามารถลดระดับน้ำตาลในเลือดได้ประมาณ 60-70 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร เหมาะสำหรับผู้ป่วยที่ควบคุมอาหารไม่ได้ เหมาะสำหรับผู้ที่เบาหวานไม่ค่อยรุนแรง ยาจะมีผลเฉพาะผู้ที่มีระดับน้ำตาลในเลือดสูงกว่าปกติ และจะไม่ค่อยมีผลเมื่อน้ำตาลในเลือดเข้าสู่ปกติ ยานี้จึงไม่ทำให้เกิดภาวะน้ำตาลในเลือดต่ำ และระดับน้ำตาลในเลือดที่ลดลงมักจะมีความสัมพันธ์กับระดับน้ำตาลในเลือดก่อนใช้ยา ถ้ายิ่งสูงมากการลดลงจะยิ่งมาก ผู้ป่วยเบาหวานชนิดที่ 2 ที่ได้รับการรักษาด้วยเมทฟอร์มินแต่เพียงอย่างเดียว จะสามารถควบคุมให้ระดับน้ำตาลในเลือดให้ต่ำกว่า 140 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร เมทฟอร์มินจึงเหมาะกับผู้ป่วยเบาหวานชนิดที่ 2 ซึ่งมีภาวะดื้ออินซูลิน (Dumitrescu et al., 2014) และมีระดับน้ำตาลในเลือดไม่สูงมากนัก (น้อยกว่า 180 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร) จะตอบสนองต่อยาชนิดนี้ได้ดีที่สุด ผู้ป่วยที่มีระดับน้ำตาลในเลือดสูงมากๆ มักจะมีการขาดอินซูลินร่วมด้วย การใช้เมทฟอร์มินจะได้ผลระดับหนึ่งเท่านั้น ห้ามใช้ในผู้ป่วยที่มีระดับ creatinine ในเลือดสูงมากกว่า 1.5 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร และไม่ควรใช้กับผู้ที่ตับพิการ

แพทย์ใช้ยากกลุ่มนี้เป็นยาตัวแรกในผู้ป่วยเบาหวานที่มีภาวะไขมันในเลือดสูง (ช่วยลดระดับไขมันในเลือด) หรือมีภาวะน้ำหนักตัวเกิน (ช่วยลดน้ำหนัก) และสามารถใช้ควบกับยารักษาเบาหวานกลุ่มอื่นๆ ได้ทุกกลุ่ม หรือใช้ร่วมกับอินซูลินได้ในผู้ป่วยเบาหวานชนิดที่ 2

สมาคมโรคเบาหวานแห่งประเทศไทย รายงานถึงสถิติจำนวนผู้ป่วยที่เป็นโรคเบาหวานในประเทศไทยในปี 2557 มีจำนวนประมาณ 5 ล้านคนจากประชากรทั้งหมด 64 ล้านคนหรือ คิดเป็น

8% และปัจจุบันพบว่า โรคเบาหวานชนิดที่ 2 เป็นชนิดที่พบมากที่สุด (ประมาณ 90%) ในผู้ป่วยเบาหวานทั้งหมด (Diabetes Association of Thailand, 2016) ซึ่งสาเหตุมาจากพฤติกรรมการบริโภคอาหารที่ไม่ถูกต้องตามหลักโภชนาการเกิดเป็นภาวะโรคอ้วน อันเป็นสาเหตุหลักของการนำมาสู่การเกิดโรคเบาหวาน และกลุ่มโรค NCDs ต่างๆ ตามมา จากการรายงานของ Kaufman และคณะ (Kaufman et al., 2011) ถึงปัจจัยเสี่ยงของการเกิดโรคกลุ่ม NCDs ของประชากรไทยวัยทำงาน (อายุตั้ง 35 ปีขึ้นไป) พบว่าการมีภาวะอ้วนหรือน้ำหนักเกิน เป็นปัจจัยเสี่ยงหลักของการเกิดโรค NCDs ซึ่งนอกจากโรคเบาหวานแล้ว ยังมีโรคเรื้อรังอื่นๆ ที่มีแนวโน้มสูงขึ้นในประเทศไทย ได้แก่ โรคระบบหลอดเลือดและหัวใจ โรคมะเร็ง และโรคเกี่ยวกับระบบหายใจ

**ตาราง 3** ปัจจัยเสี่ยงของการเกิดโรคกลุ่ม NCDs ในประเทศไทย

ปัจจัยเสี่ยง	จำนวนประชากรไทย อายุตั้งแต่ 35 ปีขึ้นไป (%)		
	ชาย	หญิง	รวม
ภาวะความดันโลหิตสูง	21	20	21
ภาวะคอเลสเตอรอลสูง	14	21	18
เบาหวาน	9	10	9.6
ภาวะอ้วน/น้ำหนักเกิน	28	43	36
การสูบบุหรี่	48	3	25

ที่มา : Kaufman et al., 2011

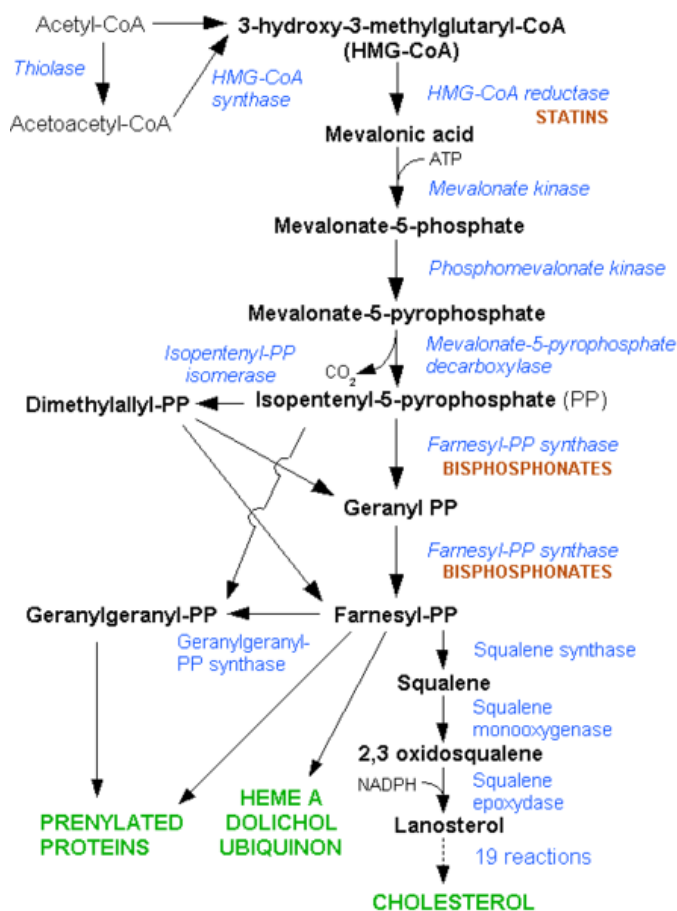
### ภาวะไขมันในเลือดสูง

ภาวะไขมันในเลือดสูง (dyslipidemia) เป็นภาวะที่ร่างกายมีระดับไขมันในเลือดสูงกว่าปกติ อาจเป็นระดับคอเลสเตอรอล (cholesterol) หรือระดับไตรกลีเซอไรด์ (triglyceride) สูงอย่างใดอย่างหนึ่ง หรือสูงทั้ง 2 ชนิด เป็นปัจจัยเสี่ยงที่สำคัญทำให้เกิดโรคหัวใจและหลอดเลือด ซึ่งอาจเป็นอันตรายถึงแก่ชีวิต หากมีคอเลสเตอรอลในเลือดสูงเกาะที่ผนังหลอดเลือด จะทำให้เกิดการอักเสบและภาวะหลอดเลือดแดงแข็ง (Miller et al., 2011) เมื่อการสะสมเพิ่มมากขึ้นหลอดเลือดแดงในร่างกายส่วนต่าง ๆ จะมีการตีบหรืออุดตัน เช่น หลอดเลือดหัวใจ หลอดเลือดสมอง ทำให้เกิดกล้ามเนื้อหัวใจขาดเลือด กล้ามเนื้อหัวใจตายทำให้เสียชีวิต รวมทั้งอัมพฤกษ์อัมพาต โดยค่าปกติของคอเลสเตอรอลในเลือดไม่ควรเกิน 200 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร และระดับไตรกลีเซอไรด์ในเลือดที่เหมาะสมไม่ควรเกิน 150 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร (Lee and Siddiqui, 2019) ทั้งนี้ภาวะไขมันในเลือดสูงมีสาเหตุมาจากการบริโภคอาหารที่มีคอเลสเตอรอลสูง หรือรับประทานอาหารมากเกินไปจนทำให้ร่างกายเกิดภาวะอ้วนหรือน้ำหนักเกิน และพฤติกรรมการดำเนินชีวิตแบบผิดๆ ขาดการออก

กำลังกาย การดื่มสุราหรือสูบบุหรี่เป็นประจำ เหตุดังกล่าวทำให้เกิดการสะสมไขมันในเส้นเลือดและนำไปสู่โรคหัวใจและหลอดเลือดในที่สุด คอเลสเตอรอลในร่างกายสามารถสร้างขึ้นเองและส่วนหนึ่งได้รับจากอาหาร แบ่งเป็น 2 ชนิด คือ คอเลสเตอรอลชนิดแอลดีแอล (Low Density Lipoprotein; LDL) หากมีระดับสูงเกินไปจะไปสะสมที่เยื่อหุ้มด้านในของหลอดเลือดแดง ทำให้เกิดภาวะหลอดเลือดแข็ง(atherosclerosis) ตีบหรืออุดตัน อีกชนิดคือ คอเลสเตอรอลชนิดเอชดีแอล (High Density Lipoprotein; HDL) เป็นชนิดที่มีประโยชน์ ทำหน้าที่นำคอเลสเตอรอลที่เหลือไปทำลายที่ตับ และป้องกันการเกิดภาวะหลอดเลือดแดงแข็ง ยาที่ใช้รักษาภาวะไขมันในเลือดสูงเพื่อลดระดับไขมันในเลือด แบ่งออกเป็น 4 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่ม Statins, Bile acid-binding resins, fibrate และยายับยั้งการดูดซึม sterol จากลำไส้เล็ก (Catapano et al., 2016)

ยากลุ่ม Statin หรือเรียกอีกชื่อว่า HMG-CoA (3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA) reductase inhibitors ยากลุ่มนี้เช่น lovastatin, atorvastatin และ simvastatin มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ HMG-CoA reductase ทำให้การสังเคราะห์คอเลสเตอรอลในตับลดลง (ภาพ 6) ทำให้ลดการสังเคราะห์วีแอลดีแอล คอเลสเตอรอล (Very low-density lipoprotein cholesterol; VLDL) และกรดน้ำดี (bile acid) เกิดการเพิ่มจำนวน LDL receptor ลดระดับ LDL ในเลือด ดังนั้นจึงป้องกัน atherosclerosis นอกจากนี้ยังมีฤทธิ์เป็นสารต้านอนุมูลอิสระ ทำให้ลดการอักเสบที่ผนังหลอดเลือด และเพิ่มการทำงานของเซลล์บุผนังหลอดเลือดให้กลับคืนสู่ปกติ เช่น การสังเคราะห์ Nitric oxide ทำให้หลอดเลือดขยายตัวและยับยั้งการทำงานของเกล็ดเลือด Statin ใช้ในการรักษา type IIa hypercholesterolemia สำหรับผลข้างเคียง คือทำให้เอนไซม์ในตับเพิ่มขึ้น กล้ามเนื้ออักเสบ (myolysis) และภาวะ rhabdomyolysis คือการสลายกล้ามเนื้ออย่างรวดเร็ว ทำให้มีสารต่างๆ หลั่งสู่เลือดจนไตกรองออกไม่ทัน ทำให้เกิดภาวะไตวายเฉียบพลัน และยังมีผลต่อทารกในครรภ์ (Bonetti et al., 2003)

ผลของการเกิดโรคในกลุ่ม NCDs มักเป็นสาเหตุของการเกิดโรคไม่เรื้อรังอื่นๆ เช่น โรคหัวใจและหลอดเลือด โรคไตและโรคเบาหวานได้ ดังนั้นการดูแลสุขภาพใส่ใจโภชนาการให้เหมาะสมกับวัยและความต้องการของร่างกายก็จะสามารถช่วยป้องกันการเกิดโรคดังกล่าวได้



ภาพ 6 กลไกการออกฤทธิ์ของยากลุ่ม statin

ที่มา : <https://numob.wordpress.com/category/antihyperlipidemia-drugs>

### โภชนาการสำหรับวัยผู้ใหญ่

ในแต่ละช่วงอายุของคน มีความต้องการสารอาหารที่แตกต่างกัน กรมอนามัยได้แบ่งกลุ่มคนไทยเป็นกลุ่มใหญ่ 4 กลุ่มตามอายุ ได้แก่ วัยทารก (5-11 เดือน) วัยเด็ก (1-8 ปี) วัยรุ่น (9-18 ปี) วัยผู้ใหญ่ (อายุตั้งแต่ 19 ปีขึ้นไป) โดยปริมาณสารอาหารแนะนำให้บริโภคประจำวันสำหรับคนไทย (กระทรวงสาธารณสุข, 2559) เป็นค่าอ้างอิงที่สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยาจัดทำขึ้น เพื่อใช้คำนวณและแสดงในฉลากโภชนาการ โดยคิดจากความต้องการพลังงานวันละ 2,000 กิโลแคลอรี คิดเป็นสัดส่วนของ โปรตีน 10% คาร์โบไฮเดรต 60% และไขมัน 30% ของอาหารที่รับประทานเข้าไป ปริมาณอาหารที่รับประทานในแต่ละวันเป็นปัจจัยหลักของการภาวะอ้วน หรือพอม โดยภาวะอ้วน (obesity) เป็นภาวะที่ร่างกายได้รับพลังงานมากกว่า 3,000 กิโลแคลอรีต่อวัน เกิดการสะสมของ

ไขมันในร่างกาย (วรรณิ และคณะ, 2559) นอกจากการใส่ใจเรื่องโภชนาการแล้วยังจำเป็นต้องมีการออกกำลังกายอย่างเหมาะสมควบคู่ไปด้วยเพื่อให้มีสุขภาพที่แข็งแรง

สังคมไทยปัจจุบันต้องรีบเร่งกับการทำงาน และการใช้ชีวิต ทำให้คนไทยที่ใส่ใจสุขภาพ แต่ไม่มีเวลา และมีความพร้อมทางเศรษฐกิจนิยมบริโภคผลิตภัณฑ์เสริมเพื่อสุขภาพ หรืออาหารฟังก์ชัน เพื่อบำรุงสุขภาพ โดยอาหารฟังก์ชัน (functional food) หมายถึง ผลิตภัณฑ์อาหารที่เมื่อบริโภคเข้าสู่ร่างกายแล้วสามารถทำหน้าที่อย่างอื่นให้กับร่างกาย นอกเหนือจาการสัมผัส (sensory function) การให้คุณค่าทางโภชนาการ (nutritive function) และหน้าที่อื่นๆ เช่น เพิ่มภูมิคุ้มกันให้ร่างกาย เพิ่มประสิทธิภาพการทำงานให้ร่างกาย ป้องกันโรค ลดอาการของโรคที่เกิดจากความผิดปกติของร่างกาย และชะลอความเสื่อมของร่างกาย เป็นต้น (Luangpituksa, 2009) ตัวอย่างของผลิตภัณฑ์อาหารฟังก์ชัน เช่น ผลิตภัณฑ์จากนม เช่น นมเปรี้ยว โยเกิร์ต น้ำมันปลา เครื่องดื่มน้ำผักผลไม้ เป็นต้น ปัจจุบันอาหารฟังก์ชัน ยังได้รับความนิยมมากขึ้นในทุกปี โดยจากผลการศึกษาศึกษาคุณภาพและโอกาสทางการตลาดของอุตสาหกรรมอนาคตปี 2560 ของสถาบันอาหาร กระทรวงอุตสาหกรรม รายงานว่า จากการศึกษากลุ่มตัวอย่างจำนวน 1,036 คน พบว่า มากกว่าร้อยละ 56 เคยบริโภคอาหารฟังก์ชัน มากที่สุดเมื่อเทียบกับอาหารนวัตกรรมอื่น ตัวอย่างผลิตภัณฑ์อาหารประเภทฟังก์ชัน เช่น ผลิตภัณฑ์เสริมสร้างระบบภูมิคุ้มกัน อาหารเสริมเรงน้ำหนักจากปลีกกล้วย นมต้านอนุมูลอิสระ เป็นต้น (National Food Institute, 2019)

โดยทั่วไปการเกิดโรคหรือความเสื่อมของร่างกายจะเพิ่มขึ้น เมื่อมีอายุที่สูงขึ้น ความช้าหรือเร็วของความเสื่อมขึ้นกับปัจจัยหลายอย่าง ทั้งภายในและภายนอกร่างกาย เช่น แสงแดด รังสี และกระบวนการเมทาบอลิซึม เป็นต้น ทำให้เกิดอนุมูลอิสระ ส่งผลต่อการเสื่อมของร่างกายและนำมาสู่การเกิดโรคในที่สุด

### อนุมูลอิสระ

อนุมูลอิสระ คือ อะตอม โมเลกุลหรือสารประกอบที่มีอิเล็กตรอนเดี่ยวอยู่ในออร์บิทัลวงนอกสุดที่มีระดับพลังงานสูง (Vajraguta et al., 2007) อนุมูลอิสระจะมีทั้งที่อยู่ในสภาวะเป็นกลางทางไฟฟ้า และอนุมูลในสภาวะที่มีประจุบวกหรือประจุลบ โดยอนุมูลที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำจะไวต่อการเกิดปฏิกิริยามากกว่าโมเลกุลที่มีน้ำหนักสูง เนื่องจากอิเล็กตรอนเดี่ยวจะไม่เสถียร และพยายามจับคู่กับอิเล็กตรอนเดี่ยวอื่น ชนิดของอนุมูลอิสระและสารที่เกี่ยวข้องกับอนุมูลที่มีบทบาทในทางชีววิทยา แบ่งเป็น 3 กลุ่มใหญ่ คือ

1. กลุ่มที่มีออกซิเจนเป็นองค์ประกอบสำคัญ (Reactive Oxygen Species, ROS) เช่น Superoxide, Superoxide anion, Hydroxyl และ Peroxyl
2. กลุ่มที่มีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบที่สำคัญ (Reactive Nitrogen Species, RNS) เช่น Nitric oxide และ Nitrogen dioxide
3. กลุ่มที่มีคลอรีนเป็นองค์ประกอบที่สำคัญ (Reactive Chlorine Species, RCS)

### การเกิดอนุมูลอิสระ

อนุมูลอิสระในร่างกายมนุษย์เกิดจากการเผาผลาญของเซลล์โดยการใช้ออกซิเจน อนุมูลซูเปอร์ออกไซด์แอนไอออน ( $O_2^-$ ) และอนุมูลไฮดรอกซี ( $\cdot OH$ ) เป็นอนุมูลที่พบในเซลล์มากกว่าอนุมูลอื่นๆ อนุมูลอิสระเป็นโมเลกุลที่ไม่เสถียรและพร้อมที่จะทำปฏิกิริยากับโมเลกุลตัวอื่น ทำให้มีการทำลายเนื้อเยื่อส่งผลให้เซลล์ได้รับความเสียหาย ทำให้เป็นต้นเหตุของการเกิดโรค (Halliwell et al., 1992; Vajraguta et al., 2007) สารชีวโมเลกุลในร่างกายที่ไวต่อการถูกออกซิไดส์ ได้แก่ ลิพิด โปรตีน และดีเอ็นเอ เมื่อเซลล์เกิดความเสียหายจะทำให้โรคมักมีการพัฒนาการอย่างรวดเร็วและมีความรุนแรงยิ่งขึ้น โดยเฉพาะโรคที่เกี่ยวข้องกับความเสื่อมและความบกพร่องของเซลล์ประสาท ระบบสื่อประสาทในสมอง และภาวะขาดเลือดของอวัยวะที่สำคัญต่อการดำรงชีวิต เช่น หัวใจและสมอง

### ค่าบ่งชี้หรือดัชนีชี้วัดภาวะถูกออกซิไดส์โดยอนุมูลอิสระ (Vajraguta et al., 2007)

อนุมูลอิสระมีความไวสูงต่อการเกิดปฏิกิริยา เป็นผลให้เกิดภาวะที่เซลล์และร่างกายถูกออกซิไดส์จนเกินสมดุล (oxidative stress) เกิดเป็นโรคต่าง ๆ ดังนั้นการรู้ระดับภาวะถูกออกซิไดส์ว่ามากน้อยเพียงใด ทำให้การป้องกัน และรักษาโรคมักมีประสิทธิภาพ การวัดระดับภาวะถูกออกซิไดส์วัดได้จากความสามารถในการป้องกันหรือต้านทานอันตรายจากอนุมูลอิสระหรือวัดได้จากปริมาณชีวโมเลกุลที่สำคัญในเซลล์ หรือร่างกายที่มีสภาพบกพร่องเสียหายหรือถูกทำลายโดยอนุมูลอิสระ ดังนั้นระดับการออกซิไดส์เกินสมดุลจึงใช้เป็นค่าบ่งชี้หรือดัชนีทางชีวภาพ (biomarker) ที่สำคัญสำหรับใช้ชี้วัดการเกิดโรคและความรุนแรงของโรค

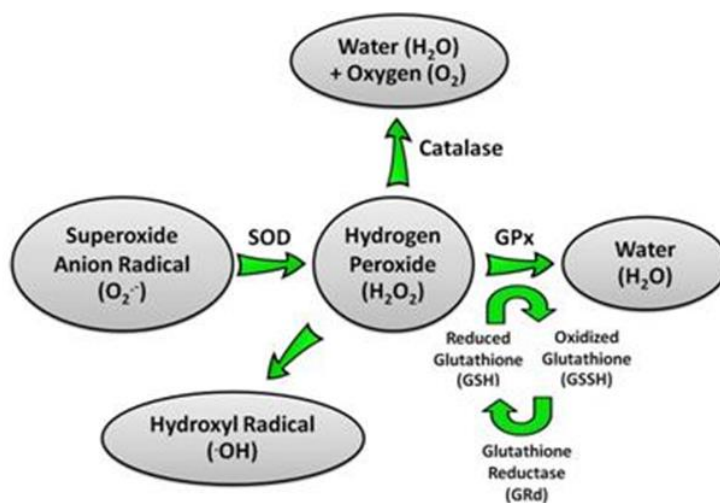
วิธีการวัดดัชนีชีวภาพที่ใช้บ่งชี้ภาวะถูกออกซิไดส์มากเกินสมดุลสามารถทำได้หลายวิธี คือ

1. วัดปริมาณอนุมูลอิสระและสารเกี่ยวข้องที่มีความไวสูงโดยตรง โดยใช้เครื่องมืออีพีอาร์ หรืออีเอสอาร์
2. วัดปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระหรือสารต้านออกซิเดชันที่อยู่ในร่างกายตามธรรมชาติ เช่น วิตามินซี วิตามินอี กลูตาไทโอน เป็นต้น

3. วัดปริมาณเอนไซม์ที่ทำหน้าที่กำจัดอนุมูลอิสระและสารที่เกี่ยวข้อง หรือทำหน้าที่กำจัดอนุมูลหรือต้านออกซิเดชัน เช่น เอนไซม์superoxide dismutase (SOD) เอนไซม์เปอร์ออกซิเดส
4. วัดปริมาณความเสียหายที่เกิดกับชีวโมเลกุลที่สำคัญในร่างกาย ได้แก่ การวัดสารที่เป็นผลิตภัณฑ์จากการที่ลิพิด โปรตีน และดีเอ็นเอถูกออกซิไดซ์โดยอนุมูลอิสระ หรือผลิตภัณฑ์จากอนุมูลอิสระ
5. วัดประสิทธิภาพหรือความสามารถโดยรวมในการต้านอนุมูล หรือต้านออกซิเดชัน (total antioxidant capacity, TAC) โดยการนำเลือด พลาสมาหรือสารต้านออกซิเดชันมาหาความสามารถโดยรวมในการต้านอนุมูลอิสระโดยวิธีการต่าง ๆ ได้แก่ วิธี FRAP (Ferric reducing antioxidant power), ORAC (Oxygen radical absorbance capacity) และ TEAC (Trolox equivalent antioxidant capacity) ด้วยการทำให้เกิดอนุมูลอิสระขึ้นและนำเลือด หรือพลาสมาเติมลงไปหลังจากนั้นวัดความสามารถในการยับยั้งอนุมูล โดยวัดปริมาณอนุมูลที่ลดลงหรือที่เหลือ

### สารต้านอนุมูลอิสระ

สารต้านอนุมูลอิสระ หรือสารแอนติออกซิแดนซ์ เป็นสารขจัดหรือกำจัดอนุมูล (radical scavenger) และเป็นสารที่สามารถทำปฏิกิริยากับอนุมูลอิสระโดยตรง เพื่อกำจัดให้หมดไป หรือหยุดปฏิกิริยาลูกโซ่ไม่ให้ดำเนินต่อ สารขจัดอนุมูลที่มีอยู่ตามธรรมชาติ เช่น กรดยูริก บิลิรูบิน จะกำจัดอนุมูล ส่วนวิตามินซี วิตามินอี กลูตาไทโอน เบตาแคโรทีน และยูบิควิโนน จะหยุดปฏิกิริยาลูกโซ่ของการเกิดอนุมูล สารต้านอนุมูลกลุ่มหลังมีบทบาทสำคัญในการทำให้ลิพิดเปอร์ออกซิเดชันสิ้นสุดลง โดยปกติในร่างกายมีสารต้านอนุมูลอิสระอยู่ในเซลล์ ได้แก่ เอนไซม์ซูเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเตส (Superoxide dismutase; SOD) เอนไซม์คะตาเลส (Catalase) และเอนไซม์กลูตาไทโอนเปอร์ออกซิเดส (Glutathione peroxidase; GPx) ทำหน้าที่ในการกำจัดอนุมูลซูเปอร์ออกไซด์ซึ่งเป็นอนุมูลเริ่มต้น และอนุมูลเปอร์ออกไซด์ก่อนที่จะทำปฏิกิริยาต่อ โดยมีโลหะเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ทำให้เกิดอนุมูลหรือสารที่มีฤทธิ์รุนแรงขึ้นกว่าเดิม (ภาพ 7)



ภาพ 7 การเกิดอนุมูลอิสระและการกำจัดโดยเอนไซม์ซูเปอร์ออกไซด์ คตะเลส และกลูต้าไทโอนเปอร์ออกซิเดส

ที่มา : (Kadsanit et al., 2011)

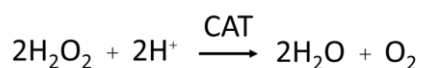
#### เอนไซม์ superoxide dismutase (Rahman et al., 2012)

เอนไซม์ superoxide dismutase (SOD) ทำหน้าที่ขจัดอนุมูลอิสระเริ่มต้นที่เกิดขึ้นในร่างกาย คือ ซูเปอร์ออกไซด์แอนไอออน ( $O_2^{\bullet-}$ ) โดยเร่งปฏิกิริยาดิสมิวเตสในการเปลี่ยนอนุมูลซูเปอร์ออกไซด์แอนไอออน ให้เป็นไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์



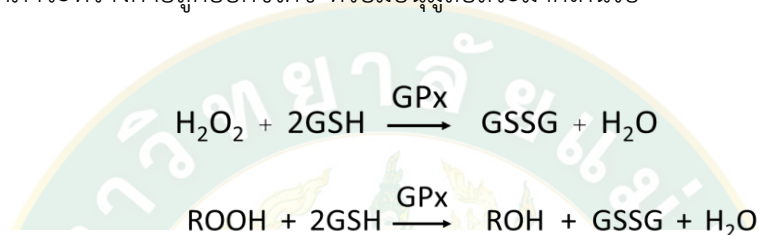
#### เอนไซม์คตะเลส (Rahman et al., 2012)

เอนไซม์คตะเลส (Catalase, CAT) เป็นเอนไซม์ที่อยู่ในรูปเปอร์ร็อกซิโซม มีฮีม คือ ferriprotoporphyrin เป็นองค์ประกอบ โครงสร้างเอนไซม์คตะเลสประกอบด้วยหน่วยย่อยของโปรตีนฮีม 4 หน่วยย่อยที่เหมือนกัน เอนไซม์คตะเลสทำหน้าที่เปลี่ยนไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ไปเป็นโมเลกุลของน้ำและออกซิเจน

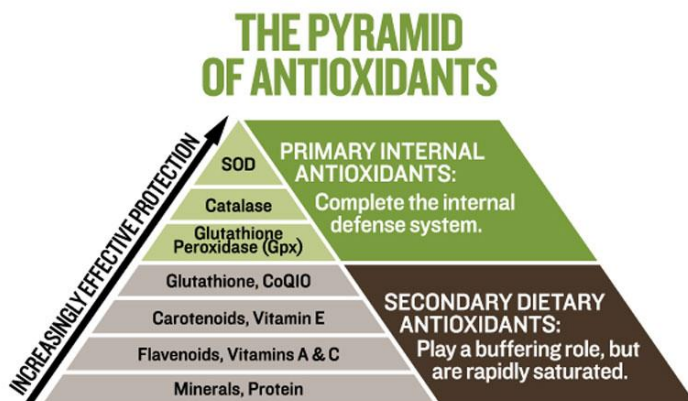


### เอนไซม์กลูตาไทโอนเปอร์ออกซิเดส (Rahman et al., 2012)

เอนไซม์เปอร์ออกซิเดสจะมีธาตุซีลีเนียมเป็นองค์ประกอบสำคัญอยู่ในโครงสร้างของเอนไซม์ เอนไซม์กลูตาไทโอนเปอร์ออกซิเดส (Glutathione peroxidase, GPx) จะทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยารีดักชันของสารประกอบไฮโดรเปอร์ออกไซด์ ได้แก่ ลิพิดเปอร์ออกไซด์ (ROOH) และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ โดยมีกลูตาไทโอน (Glutathione; GSH) ร่วมในปฏิกิริยา เป็นการสลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ไม่ให้เกิดปฏิกิริยาลูกโซ่ เอนไซม์นี้จะปกป้องเซลล์ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมไม่ให้ถูกทำลายหรือเสียหายจากภาวะที่ร่างกายถูกออกซิไดซ์ หรือมีอนุมูลอิสระมากเกินไป



สารต้านอนุมูลอิสระดังที่กล่าวมา สามารถจัดจำแนกได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่ คือ สารต้านอนุมูลอิสระปฐมภูมิ (primary internal antioxidants) ได้แก่ เอนไซม์ superoxide dismutase เอนไซม์ คอะตาเลส และเอนไซม์กลูตาไทโอนเปอร์ออกซิเดส เป็นเอนไซม์ที่ร่างกายสร้างขึ้นและเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ โดยมีความแรงของการขจัดอนุมูลอิสระได้มากที่สุด คือ เอนไซม์ superoxide dismutase รองลงมา คือ เอนไซม์คอะตาเลส และเอนไซม์กลูตาไทโอนเปอร์ออกซิเดส ตามลำดับ อีกกลุ่มคือ สารต้านอนุมูลอิสระที่ร่างกายได้รับเข้ามาจากภายนอก (secondary dietary antioxidants) เช่น กลูตาไทโอน วิตามินอี วิตามินซี ฟลาโวนอยด์ และแร่ธาตุต่างๆ เมื่อเปรียบเทียบความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระจะพบว่า เอนไซม์ที่ร่างกายสร้างขึ้นจะสามารถกำจัดอนุมูลอิสระได้มากกว่าอีกกลุ่ม (ภาพ 8) แต่เนื่องจากเมื่อร่างกายมีอายุที่เพิ่มขึ้นเอนไซม์ดังกล่าว จะถูกสร้างได้น้อยลง ทำให้อนุมูลอิสระในร่างกายไม่สามารถกำจัดได้หมด ซึ่งผลของภาวะที่ร่างกายถูกออกซิไดซ์ หรือมีอนุมูลอิสระเกินสมดุล เรียกว่า ภาวะ oxidative stress ทำให้เกิดความเสียหายต่อชีวโมเลกุล เกิดการตายของเซลล์และเนื้อเยื่อ อาจไปเร่งหรือก่อให้เกิดโรคต่างๆ ได้ เช่น โรคเกี่ยวกับหัวใจ สมอง และระบบประสาท



ภาพ 8 ลำดับความสามารถของสารและเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระในร่างกาย  
ที่มา : สิทธิวีร์, 2560

### วิธีการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเชิงปริมาณ

วิธีวิเคราะห์ที่นิยมได้แก่ การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธีการทำลายอนุมูลอิสระดีฟิพีเอช (DPPH<sup>•</sup>) วิธีการฟอกสีอนุมูลอิสระเอบีทีเอส (ABTS<sup>•+</sup>) และการวิเคราะห์ความสามารถในการรีดิวซ์เฟอร์ริกของสารต้านอนุมูลอิสระ (FRAP assay) ซึ่งเป็นวิธีการที่มีการสร้างอนุมูลอิสระที่ทราบความเข้มข้นที่แน่นอนและวิเคราะห์ความสามารถในการยับยั้งหรือกำจัดอนุมูลอิสระของสารตัวอย่าง โดยวัดปริมาณอนุมูลอิสระที่ลดลงหรือที่เหลือจากค่าการดูดกลืนแสง สารอนุมูลอิสระที่นิยมใช้ เช่น ABTS<sup>•+</sup> และ DPPH<sup>•</sup> การคำนวณหาปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระหาได้จากอัตราส่วนของการลดลงของค่าการดูดกลืนแสงของสารตัวอย่างกับสารมาตรฐาน เช่น โทรลอกซ์ วิตามินซี และ ferrous sulfate หน่วยของการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเชิงปริมาณแสดงได้ 2 แบบ คือ แบบปริมาณความเข้มข้นของสารต้านอนุมูลอิสระที่มีในตัวอย่าง ซึ่งค่าตัวเลขสูงแสดงว่ามีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูง และแบบปริมาณความเข้มข้นของสารตัวอย่างที่ทำให้สารอนุมูลอิสระลดลง 50% (IC<sub>50</sub>, 50% of inhibitory concentration) โดยค่าตัวเลขต่ำแสดงว่ามีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูง (Jadid et al., 2017)

#### 1. การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธีทำลายอนุมูลอิสระดีฟิพีเอช (DPPH)

การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธีการทำลายอนุมูลอิสระดีฟิพีเอช (diphenyl-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging assay) เป็นการทดสอบด้วยวิธีทางเคมีโดยใช้สารที่มีคุณสมบัติเป็นอนุมูลอิสระในที่นี้ คือ อนุมูลอิสระดีฟิพีเอช (DPPH<sup>•</sup>, diphenyl-picrylhydrazyl radical) ซึ่งเป็นสารสังเคราะห์ที่อยู่ในรูปอนุมูลอิสระที่คงตัวและมีสีม่วงสามารถดูดกลืนแสงได้สูงสุดโดยใช้เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (spectrophotometer) ที่ความยาวคลื่น 515 นาโนเมตร เมื่อ

DPPH• ทำปฏิกิริยากับสารต้านอนุมูลอิสระ (สารที่ให้อิเล็กตรอน) จะทำให้สีม่วงจางลงๆ ตั้งทิ้งไว้ที่มีดเป็นเวลา 30 นาทีเพื่อให้เกิดปฏิกิริยาก่อนนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสง ทำให้สามารถหาการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของสารตัวอย่างได้จากการคำนวณสีที่จางลงของการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH สูตรคำนวณได้จากการนำค่าการดูดกลืนแสงที่ลดลงจากการใส่ตัวอย่างเทียบกับค่าการดูดกลืนแสงตั้งต้นดังนี้

$$\text{DPPH radical scavenging (\%)} = ((A_o - A_s) / A_o) \times 100$$

โดย  $A_o$  = ค่าการดูดกลืนแสงเริ่มต้น

$A_s$  = ค่าการดูดกลืนแสงภายหลังจากเติมสารตัวอย่าง

สารมาตรฐานที่ใช้ในการเทียบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ คือ โทรลอกซ์ (trolox, 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid) แสดงค่าเป็น TEAC (trolox equivalent antioxidant capacity) มีหน่วยเป็น mM/mg หรือ  $\mu\text{M}/\text{mg}$  ข้อดีของวิธีนี้ คือ ง่าย สะดวก และรวดเร็ว ข้อเสีย คือ DPPH• ค่อนข้างเสถียรไม่ไวต่อปฏิกิริยาเหมือนอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นในร่างกายจริง จึงทำให้เกิดปฏิกิริยาได้ช้า ทำให้ค่าการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่วัดได้น้อยกว่าความเป็นจริง และต้องวัดในปฏิกิริยาที่เป็นแอลกอฮอล์ ซึ่งจะทำให้โปรตีนตกตะกอนจึงไม่สามารถวิเคราะห์ในตัวอย่างเป็นเลือดได้ รวมถึงสารที่มีการปนเปื้อนและโลหะจะรบกวน (interfere) ซึ่งสามารถเป็นตัวรบกวนแล้วทำให้สีของ DPPH• จางลงได้เช่นกัน

## 2. การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยการฟอกสีอนุมูลอิสระเอบีทีเอส (ABTS)

การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยการฟอกสีอนุมูลอิสระเอบีทีเอส (ABTS radical cation decolorization assay) เป็นวิธีการวัดความสามารถในการฟอกสีอนุมูลอิสระเอบีทีเอส ( $\text{ABTS}^{\bullet+}$ , 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) radical) เป็นสารสังเคราะห์ มีสีเขียวปนน้ำเงินสามารถดูดกลืนแสงได้สูงสุดที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร เนื่องจากสีของ  $\text{ABTS}^{\bullet+}$  ปกติจะมีค่าการดูดกลืนแสงสูง จึงต้องทำการเจือจาง  $\text{ABTS}^{\bullet+}$  ด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ จากนั้นนำ  $\text{ABTS}^{\bullet+}$  ทำปฏิกิริยากับสารตัวอย่างที่ละลายด้วยน้ำซึ่งจะทำให้สีจางลง และตั้งทิ้งไว้เพื่อให้เกิดปฏิกิริยา สามารถหาความเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของสารตัวอย่างได้จากการคำนวณสีที่จางลงของการยับยั้งอนุมูลอิสระ  $\text{ABTS}^{\bullet+}$  ซึ่งวิธีการคำนวณและการเทียบกับสารมาตรฐานโทรลอกซ์ (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid)

ข้อดีของวิธีการนี้ คือ  $\text{ABTS}^{\bullet+}$  ละลายได้ดีในน้ำ และตัวทำละลายอินทรีย์ จึงทำปฏิกิริยาได้อย่างรวดเร็ว และทำปฏิกิริยาได้ดีในช่วง pH กว้าง ส่วนข้อเสีย คือ  $\text{ABTS}^{\bullet+}$  ไม่เป็นสารธรรมชาติที่

พบในร่างกายหรือในเซลล์ของสิ่งมีชีวิต และต้องมีการทำปฏิกิริยากับสารอื่นก่อนถึงจะเกิดเป็นอนุมูลอิสระ

### 3. การวิเคราะห์ความสามารถในการรีดิวซ์เฟอร์ริกของสารต้านอนุมูลอิสระ

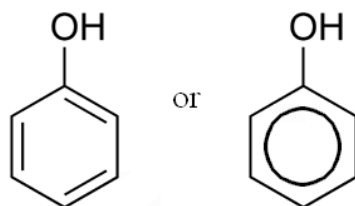
การวิเคราะห์ความสามารถในการรีดิวซ์เฟอร์ริกของสารต้านอนุมูลอิสระ (ferric ion reducing antioxidant power (FRAP) assay) วิธีการนี้อาศัยหลักการของสารต้านอนุมูลอิสระสามารถถ่ายเทอิเล็กตรอนให้กับสารประกอบเชิงซ้อน  $[\text{Fe(III)}(\text{TPTZ})_2]^{3+}$  ทำให้เกิดการเปลี่ยนรูปเป็น  $[\text{Fe(II)}(\text{TPTZ})_2]^{2+}$  ซึ่ง  $[\text{Fe(II)}(\text{TPTZ})_2]^{2+}$  มีความสามารถในการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 593 นาโนเมตร ปริมาณของ  $[\text{Fe(II)}(\text{TPTZ})_2]^{2+}$  ที่เกิดขึ้นสามารถประมาณความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระได้ในรูป FRAP value เทียบกับกราฟมาตรฐานของเฟอร์รัสซัลเฟต ( $\text{FeSO}_4$ )

ขั้นตอนของวิธีการนี้ ได้แก่ การทำให้เกิดสารประกอบเชิงซ้อน  $[\text{Fe(III)}(\text{TPTZ})_2]^{3+}$  ประกอบด้วย นำสารละลาย TPTZ (2,4,6-tri (2-pyridyl)-striaizine) ที่ละลายด้วยกรดไฮโดรคลอริกเจือจางมาทำปฏิกิริยากับสารละลายอะซิเตตบัฟเฟอร์ และสารละลายเฟอร์ริกไตรคลอไรด์เฮกซะไฮเดรต จากนั้นทำการรีดิวซ์เฟอร์ริก โดยการเติมสารละลายมาตรฐานเฟอร์รัสซัลเฟต หรือสารตัวอย่าง (สารต้านอนุมูลอิสระ) และตั้งทิ้งไว้ในที่มืด

วิธีการนี้เป็นวิธีที่ง่าย ใช้เวลาน้อย ไม่แพง และสามารถทำซ้ำแล้วให้ผลเหมือนเดิมแต่ข้อเสียคือ ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นเป็นปฏิกิริยาเคมีที่ไม่เกี่ยวข้องกับสภาวะร่างกาย และสารละลายที่ใช้อ้างอิงต้องใช้น้ำปราศจากไอออน (deionized water)

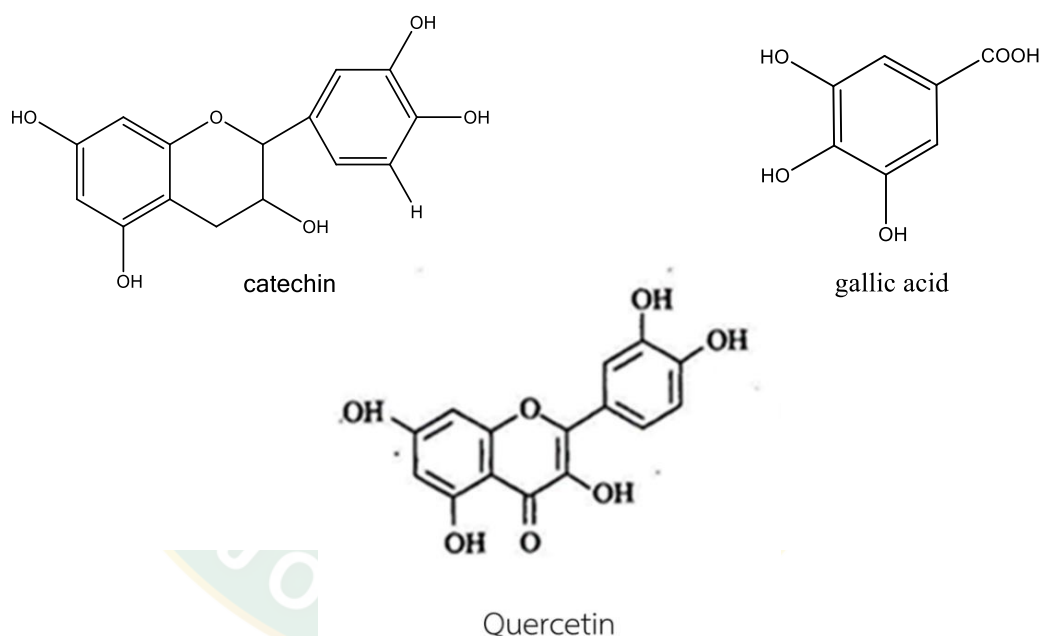
### สารประกอบฟีนอลิก

สารประกอบฟีนอลิก (phenolic compounds) มีโครงสร้างหลักทางเคมีประกอบด้วยโครงสร้างที่เป็นวงอะโรมาติกและมีหมู่แทนที่เป็นหมู่ไฮดรอกซี อย่างน้อย 1 หมู่ เป็น secondary metabolites เป็นสารที่สามารถพบได้ตามธรรมชาติในพืชหลายชนิด เช่น ผัก ผลไม้ เครื่องเทศ สมุนไพร ถั่วเมล็ดแห้ง เมล็ดธัญพืช สารประกอบฟีนอลิกมีสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (Pourmorad et al., 2006) มีฤทธิ์ทางชีวภาพหลายอย่าง เช่น ต้านแบคทีเรีย ต้านไวรัส ต้านการอักเสบและเพิ่มภูมิคุ้มกันให้กับร่างกาย (Ghasemzadeh and Jaafar, 2011) ต้านการแพ้ ช่วยสลายลิ่มเลือด ต้านการก่อมะเร็ง และลดความดันโลหิต เป็นต้น



ภาพ 9 โครงสร้างหลักทางเคมีของสารฟีนอล

ตัวอย่างสารในกลุ่มสารประกอบฟีนอลิก เช่น แคเทชิน กรดแกลลิก กรดแทนนิก เคอซิทิน และแคมเฟอร์อล เป็นต้น



ภาพ 10 ตัวอย่างสารในกลุ่มสารประกอบฟีนอลิก

สารประกอบฟีนอลิก เป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่สามารถพบได้ในพืชหลายชนิด เช่น ผลไม้ ตระกูลเบอร์รี่ ผลไม้ เครื่องเทศและพืชสมุนไพรหลายชนิด เป็นต้น นอกจากนี้มีรายงานการวิจัยเกี่ยวกับสารร่ายน้ำจืดสีเขียวที่กินได้ เช่น สาหร่ายเตา และสาหร่ายไถ ที่มีสารฟีนอลิกเป็นองค์ประกอบที่สำคัญอีกด้วย

## สาหร่ายเตา

สาหร่ายเตา (*Spirogyra neglecta* (Hassall) Kützing) เป็นสาหร่ายน้ำจืดสีเขียวพบมากในภาคเหนือ มีการเพาะปลูกเพื่อบริโภค มีการเก็บผลผลิตสาหร่ายเตาสด (ภาพ 11A) และทำแห้ง (ภาพ 11B) เพื่อจำหน่าย มีคุณค่าทางโภชนาการซึ่งประกอบไปด้วยโปรตีน 23-25% คาร์โบไฮเดรต 45-55% ไขมัน 5-7% เส้นใย 7-11% (Peerapornpisal, 2013) สารสกัดน้ำของสาหร่ายเตามีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ มีฤทธิ์ป้องกันการเกิดแผลกระเพาะอาหาร ฤทธิ์ต้านการอักเสบ และยังมีความปลอดภัยในการรับประทานโดยไม่พบอาการผิดปกติของหนูขาวเมื่อทดสอบความเป็นพิษเฉียบพลัน (Amornlerdpison et al., 2011; Peerapornpisal et al., 2006; Peerapornpisal et al., 2012) สาหร่ายเตามีสารโพลีแซคคาไรด์ที่สามารถนำมาใช้เป็นพรีไบโอติกส์ได้ โดยสามารถยับยั้งเชื้อก่อโรคนิชนิด *Salmonella enteritidis* และ *Escherichia coli* ได้ สารสกัดเมทานอลของสาหร่ายเตาสามารถยับยั้งเชื้อไวรัส HSV-1 และ HSV-2 ที่เป็นสาเหตุของการเกิดโรคเริ่มได้อีกด้วย (Phinyo, 2012) นอกจากนี้ยังได้มีการนำสารสกัดน้ำจากสาหร่ายเตาไปพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ต้นแบบอาหารสุขภาพเป็นเครื่องดื่มชนิดเจลและโยเกิร์ต พบว่าได้รับความพึงพอใจจากผู้บริโภค และจากการศึกษาความต้องการของผู้บริโภคที่มีต่อผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มชนิดเจลผสมสารสกัดจากสาหร่ายเตาพบว่า กลิ่นใบเตยได้รับความนิยมมากที่สุด (Kulsirimathanon, 2015) รวมถึงมีการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการการอบแห้งสาหร่ายเตาด้วยคลื่นไมโครเวฟ เพื่อใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตอาหารและเวชสำอางร่วมด้วย (Assawarachan, 2013)



A



B

ภาพ 11 สาหร่ายเตาสด บ้านนาคูหา จังหวัดแพร่ (A) และสาหร่ายเตาแห้ง (B)

มีรายงานการวิจัยในสัตว์ทดลองพบว่า สารสกัดน้ำของสาหร่ายเตาในขนาด 1 กรัม/กก./วัน ถูกป้อนในหนูที่ถูกกระตุ้นให้เป็นเบาหวานเป็นเวลา 12 สัปดาห์ สามารถลดระดับน้ำตาลและไขมันในเลือดที่สูงให้ลดลงอยู่ในระดับปกติ โดยมีผลเพิ่มความไวในการตอบสนองต่ออินซูลินและลดการเกิดภาวะเครียดออกซิเดชัน (oxidative stress) ช่วยป้องกันภาวะแทรกซ้อนระยะเริ่มแรกทางหัวใจ หลอดเลือดและไตในหนูขาวที่ถูกกระตุ้นให้เป็นเบาหวาน (Lailerd et al., 2009; Ontawong et al., 2013) นอกจากนี้ยังพบว่าสารสกัดน้ำสาหร่ายเตาช่วยเพิ่มระดับเอนไซม์ที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ได้แก่ catalase, glutathione reductase และ glutathione peroxidase และยังพบฤทธิ์ในการป้องกันการกลายพันธุ์และการเกิดมะเร็งที่ตับ (Thumvijit et al., 2013a; Thumvijit et al., 2014; Thumvijit et al., 2013b) รวมถึงสารสกัดสาหร่ายเตายังสามารถช่วยลดการดูดซึมคอเลสเตอรอลในลำไส้ได้อีกด้วย (Duangjai et al., 2016) นอกจากนี้การศึกษาในสัตว์ทดลองและในเซลล์แล้วยังมีรายงานจากการศึกษาของธีระวัฒน์ และคณะ (2555) พบว่าการเสริมสาหร่ายเตาในอาหารปลาช่วยให้มีการลดลงของระดับลิพิดเปอร์ออกซิเดชัน ร่วมกับมีการเพิ่มขึ้นของระดับกลูตาไทโอนรวม (total glutathione) และเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระชนิด superoxide dismutase ในปลานิล จึงช่วยป้องกันภาวะออกซิเดชันได้ ส่งผลให้ปลาไม่มีอัตราการรอดสูง และเจริญเติบโตได้ดี

ผลการศึกษาสาร polyphenolic compounds จากสารสกัดน้ำสาหร่ายเตาที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วย High Performance Liquid Chromatography (HPLC) สามารถระบุชนิดสารสำคัญในสาหร่ายเตาประกอบด้วย isoquercetin, catechin, hydroquinin, rutin, kaempferol, gallic acid, tannic acid, quercetin และ eriodictyol (Janthip, 2013) และยังมีพบสารสำคัญกลุ่ม sulfated polysaccharides อีกด้วย (Thumvijit et al., 2013a)

## สาหร่ายไถ

สาหร่ายไถ (*Rhizoclonium hieroglyphicum* (C. Agardh) Kützinger) เป็นสาหร่ายน้ำจืดสีเขียว อยู่ใน Division Chlorophyta มีลักษณะเป็นเส้นสาย ไม่แตกแขนง สาหร่ายชนิดนี้ในประเทศไทยจะพบมากใน 2 แหล่ง คือ แม่น้ำน่าน จังหวัดน่าน และแม่น้ำโขง บริเวณอำเภอเชียงของ จังหวัดเชียงราย ในการวิจัยครั้งนี้สาหร่ายไถมาจากแม่น้ำน่าน บ้านหนองบัว ตำบลปากคา อำเภอท่าวังผา จังหวัดน่าน สาหร่ายไถนิยมนำมารับประทานได้โดยเฉพาะแถบในภาคเหนือนิยมมาปรุงเป็นอาหาร เช่น ห่อหนึ่งไถ ไถยี จากรายงานการศึกษาของ Peerapornpisal และคณะ (Peerapornpisal et al., 2009) พบว่า สาหร่ายไถมีคุณค่าทางโภชนาการสูง โดย มีโปรตีนค่อนข้างสูงถึง 20% เส้นใย 21% และยังมีวิตามินและแร่ธาตุอีกหลายชนิด เช่น วิตามินเอ ซีและบี แคลเซียม แมกนีเซียม และเหล็ก (Utmaungkam, 2009) และยังมีซีลีเนียมซึ่งเป็นเกลือแร่ที่มีความสามารถด้านการเกิดอนุมูลอิสระใน

ปริมาณที่สูง (Peerapornpisal, 2013) มีสารสำคัญที่มีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ ได้แก่ สารประกอบฟีนอลิก และสารสำคัญกลุ่มโพลีแซคคาไรด์ จากการที่ได้ทดสอบฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา พบว่า สารสกัดสาหร่ายไกมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระทั้งในหลอดทดลอง และในสัตว์ทดลอง มีฤทธิ์ป้องกันการเกิดแผลกระเพาะอาหาร ฤทธิ์ต้านการอักเสบ และยังมีความปลอดภัยในการรับประทาน โดยไม่พบอาการผิดปกติของหนูขาวเมื่อทดสอบความเป็นพิษเฉียบพลัน



ภาพ 12 ลักษณะสาหร่ายไกสด (A) และสาหร่ายไกแห้ง (B)

ผลจากการศึกษาอาหารเสริมสาหร่ายไกต่อการเจริญเติบโตและการป้องกันภาวะออกซิเดชันในปลาหนังลูกผสม นำสาหร่ายไกมาเสริมในอาหารปลาเพื่อช่วยส่งเสริมสุขภาพของปลาให้ดีขึ้น เนื่องจากการเพิ่มระบบต้านอนุมูลอิสระจากคุณสมบัติของสาหร่ายไกจะช่วยทำให้ปลามีภูมิคุ้มกันที่ดี ทนต่อสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมได้ ทำให้ไม่เป็นโรคร้าย โตเร็ว อัตราการรอดสูง ทำให้ได้ผลผลิตปลาที่มีคุณภาพ (Amornlerdpison et al., 2015)

สารสกัดน้ำสาหร่ายไกพบสารประกอบฟีนอลิกที่ประกอบด้วย catechin, gallic acid, quercetin ซึ่งปริมาณของสารประกอบฟีนอลิกมีความสัมพันธ์กับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ โดยปริมาณสารประกอบฟีนอลิกของสาหร่ายไกที่เก็บจากแหล่งธรรมชาติ (แม่น้ำน่าน จังหวัดน่าน) และจากการเพาะเลี้ยง (มหาวิทยาลัยแม่โจ้ จังหวัดเชียงใหม่) ไม่มีความแตกต่างกัน (Amornlerdpison et al., 2015) นอกจากนี้ในสารสกัดน้ำสาหร่ายไกยังพบสารสำคัญกลุ่ม sulfated polysaccharides ที่ประกอบไปด้วยน้ำตาล rhamnose, xylose, arabinose และ galactose โดยมีคุณสมบัติในการกักเก็บน้ำและช่วยบำรุงผิวได้ดีเมื่อเทียบกับสาร hyaluronic acid ที่มีราคาแพง (Mungmai et al., 2014)

จากสถิติจำนวนผู้ป่วยด้วยโรคมะเร็งชนิดต่างๆ พบว่า มะเร็งหลอดอาหารเป็นที่พบบ่อย 1 ใน 10 อันดับของมะเร็งในประเทศไทย (National Cancer Institute, 2016) ผู้ป่วยจะมีปัญหาในการกลืน โดย

อาหารหรือผลิตภัณฑ์ที่เหมาะสมจึงควรมีลักษณะเป็นเจลกึ่งแข็งกึ่งเหลว มีเนื้อสัมผัสที่พอดี ง่ายต่อการเคี้ยวและการกลืน ผู้ป่วยสามารถรับประทานได้ง่ายจึงช่วยให้มีภาวะโภชนาการและมีคุณภาพชีวิตที่ดีขึ้น (สถาบันโภชนาการ มหาวิทยาลัยมหิดล, 2555) จากคุณสมบัติที่ดีของการก่อก้อนของสาหร่ายไคเจ็งเหมาะที่จะนำมาพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์อาหารที่มีลักษณะกึ่งแข็งกึ่งเหลวและมีประโยชน์ต่อสุขภาพ โดยการสร้างหรือพัฒนาผลิตภัณฑ์ จำเป็นต้องมีการประเมินการยอมรับของผลิตภัณฑ์ เพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่เป็นที่ต้องการต่อผู้บริโภคอย่างแท้จริง

### มาตรฐานความปลอดภัยของอาหาร

ประเทศไทยเริ่มมีการจัดระบบความปลอดภัยด้านอาหารแห่งชาติตั้งแต่ปี 2542 โดยมีการบังคับใช้กฎหมาย GMP (Good Manufacturing Practice) เพื่อให้ผู้ผลิตอาหารต้องปฏิบัติตามเพื่อให้เกิดความปลอดภัยและมั่นใจต่อการบริโภค ซึ่งครอบคลุมตั้งแต่สถานที่ตั้งของสถานประกอบการ อาคาร ระบบการผลิตและการขนส่ง โดยภายใต้การควบคุมของกระทรวงสาธารณสุข ประกอบด้วยหน่วยงานย่อยที่สำคัญ ได้แก่ สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กรมอนามัย กรมควบคุมโรค และจากการพิจารณาข้อกำหนดเพื่อความปลอดภัยในอาหารมีข้อที่ต้องใส่ใจและคำนึงถึงสิ่งเป็นพิษที่ปนเปื้อนในอาหาร อาจประกอบด้วยสิ่งเป็นพิษทั้งที่เป็นสิ่งมีชีวิต เช่น จุลินทรีย์ ไวรัส ยีสต์และรา เป็นต้น สารเคมี เช่น สารพิษจากเชื้อรา สารกำจัดศัตรูพืช โลหะหนัก และสารกัมมันตรังสี เป็นต้น ดังนั้นจึงต้องมีการควบคุมระดับความเข้มข้นของการปนเปื้อนของสารดังกล่าว เพื่อความปลอดภัยของผู้บริโภค

### การปนเปื้อนของโลหะหนัก

สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา กระทรวงสาธารณสุขได้มีประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 98 (พ.ศ. 2529) เรื่องมาตรฐานอาหารที่มีสารปนเปื้อน และฉบับที่ 273 (พ.ศ. 2546) เรื่องมาตรฐานอาหารที่มีสารปนเปื้อน (ฉบับที่ 2) กำหนดปริมาณโลหะหนักมากที่สุดที่สามารถตรวจพบได้ในอาหาร การปนเปื้อนในอาหาร ความเป็นพิษ และเกณฑ์มาตรฐานที่อนุญาตให้พบในอาหาร (ตาราง 4)

ตาราง 4 ชนิดของโลหะหนัก การปนเปื้อนในอาหาร ความเป็นพิษและเกณฑ์มาตรฐานการปนเปื้อน

โลหะหนัก	การปนเปื้อนในอาหาร	ความเป็นพิษ	เกณฑ์มาตรฐาน
ดีบุก (Tin; Sn)	อาหารบรรจุกระป๋องที่เคลือบด้วยดีบุก เกิดปฏิกิริยากัดกร่อนทำให้ปนลงในอาหาร	ปวดศีรษะ คลื่นไส้ อาเจียน ตาพร่า เบื่ออาหาร	ไม่เกิน 250 มก./กก.
สังกะสี (Zinc; Zn)	อาหารบรรจุกระป๋อง และการใช้ภาชนะเคลือบสังกะสีใส่อาหารที่เป็นกรด หรือการตากอาหารบนแผ่นสังกะสี	อ่อนเพลีย วิงเวียนศีรษะ และอาการท้องร่วง	ไม่เกิน 100 มก./กก.
ทองแดง (Copper; Cu)	พบปริมาณมากในอาหารทะเล	คลื่นไส้ อาเจียน เกิดการอักเสบในช่องท้องและกล้ามเนื้อ อาจทำให้เป็นโรคโลหิตจาง	ไม่เกิน 20 มก./กก.
ตะกั่ว (Lead; Pb)	การเพาะปลูกหรือเลี้ยงสัตว์ในบริเวณที่มีการปนเปื้อนของตะกั่ว การใช้ภาชนะในการผลิตอาหารและภาชนะบรรจุที่ไม่ได้มาตรฐาน	ปวดท้อง น้ำหนักลด เบื่ออาหาร คลื่นไส้ อาเจียน ประสาทหลอน ซึม ไม่รู้สึกตัว ชัก อัมพาต สลบและอาจเสียชีวิตได้	ไม่เกิน 1 มก./กก.
สารหนู (Arsenic; As)	เกิดจากการใช้ปุ๋ยและยาฆ่าแมลงในการเกษตร อาหารสัตว์ และอาหารทะเล	ทำลายระบบสมอง และตับ ตับอักเสบ	ไม่เกิน 2 มก./กก.
ปรอท (Mercury; Hg)	มักพบในสัตว์น้ำ ที่เลี้ยงในแหล่งน้ำที่มีการปนเปื้อนของปรอท	มือ และใบ หน้าเกิดอาการบวมและเจ็บ เป็นอัมพาต ท้องร่วง ระบบกล้ามเนื้อถูกทำลาย ประสาทตา และหูเสื่อม	ไม่เกิน 0.5 มก./กก.

## วัตถุเจือปนในอาหาร

วัตถุเจือปนในอาหาร หมายถึง วัตถุที่ตามปกติไม่ได้ใช้เป็นอาหารหรือส่วนประกอบที่สำคัญของอาหาร แต่ใช้เจือปนในอาหารเพื่อประโยชน์ทางเทคโนโลยีการผลิต การแต่งสี การปรุงแต่งกลิ่นรสอาหาร การบรรจุ การเก็บรักษา หรือการขนส่ง ซึ่งมีผลต่อคุณภาพอาหารหรือมาตรฐานหรือลักษณะของอาหาร รวมถึงวัตถุที่ไม่ได้เจือปนในอาหาร แต่มีภาชนะบรรจุไว้เฉพาะใส่รวมกับอาหารเพื่อประโยชน์ดังกล่าว เช่น วัตถุกันชื้น วัตถุดูดออกซิเจน เป็นต้น แต่ไม่รวมสารอาหารที่เติมเพื่อเพิ่มหรือปรับให้คงคุณค่าทางโภชนาการของอาหาร (Food and Drug Administration, 2016) แบ่งกลุ่มตามหน้าที่ทางด้านเทคโนโลยีการผลิตของวัตถุเจือปนอาหารออกเป็น 27 กลุ่ม ดังตาราง 5

ตาราง 5 กลุ่มของวัตถุเจือปนอาหารที่แบ่งตามหน้าที่ด้านเทคโนโลยี

กลุ่มตามหน้าที่	นิยาม	หน้าที่ด้านเทคโนโลยี
1. สารควบคุมความเป็นกรด (Acidity regulator)	เปลี่ยนหรือควบคุมความเป็นกรดหรือต่างของอาหาร	acidity regulator, acid, acidifier, alkali, base, buffer, buffering agent, pH adjusting agent
2. สารป้องกันการจับเป็นก้อน (Anticaking agent)	ลดการจับตัวเป็นก้อนของส่วนผสมของอาหาร	anticaking agent, anti-stick agent, drying agent, dusting agent
3. สารป้องกันการเกิดฟอง (Antifoaming agent)	ป้องกันหรือลดการเกิดฟอง	antifoaming agent, defoaming agent
4. สารป้องกันการเกิดออกซิเดชัน (Antioxidant)	ยืดอายุของอาหาร โดยป้องกันการเสื่อมเสียจากการออกซิเดชัน เช่น การหืนของไขมันและการเปลี่ยนสีของอาหาร	antioxidant, antioxidant synergist, antibrowning agent
5. สารฟอกสี (Bleaching agent)	วัตถุเจือปนอาหารที่ใช้สำหรับฟอกสีอาหารชนิดอื่นๆ ยกเว้นแป้ง	bleaching agent

ตาราง 5 (ต่อ) กลุ่มของวัตถุเจือปนอาหารที่แบ่งตามหน้าที่ด้านเทคโนโลยี

กลุ่มตามหน้าที่	นิยาม	หน้าที่ด้านเทคโนโลยี
6. สารเพิ่มปริมาณ (Bulking agent)	สารซึ่งนอกเหนือจากอากาศหรือน้ำ ซึ่งช่วยเพิ่มปริมาณของอาหารโดยไม่มีผลต่อค่าพลังงานของอาหาร	bulking agent, filler
7. สารให้ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ (Carbonating agent)	วัตถุเจือปนอาหารที่เติมลงไป เพื่อให้ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์	carbonating agent
8. สี (Colour)	เพิ่มหรือรักษาสีของอาหาร	colour, decorative pigment, surface colourant
9. สารคงสภาพของสี (Colour retention agent)	คงสภาพหรือรักษาหรือเพิ่มสีของอาหาร	colour retention agent, colour fixative, colour stabilizer, colour adjunct
10. สารช่วยทำละลาย หรือ ช่วยพา (Carrier)	วัตถุเจือปนอาหารใช้สำหรับช่วยในการทำละลาย หรือทำให้เกิดการกระจายตัว มีผลต่อการปรับสภาพทางกายภาพของวัตถุเจือปนอาหาร หรือสารอาหารอื่นโดยไม่ก่อให้เกิดผลทางเทคโนโลยีแต่ใช้เพื่อช่วยในการเก็บรักษาหรือเสริมการใช้วัตถุเจือปนอาหารหรือสารอาหารอื่นๆ	carrier, carrier solvent, nutrient carrier, diluent for other food additives, encapsulating agent
11. อิมัลซิไฟเออร์ (Emulsifier)	รักษาส่วนผสมของสารที่รวมตัวกัน เช่น น้ำและน้ำมันในอาหาร ให้มีความสม่ำเสมอ	emulsifier, plasticizer, dispersing agent, surface active agent, crystallization inhibitor, density adjustment, suspension agent, clouding agent

ตาราง 5 (ต่อ) กลุ่มของวัตถุเจือปนอาหารที่แบ่งตามหน้าที่ด้านเทคโนโลยี

กลุ่มตามหน้าที่	นิยาม	หน้าที่ด้านเทคโนโลยี
12.เกลืออิมัลซิไฟอิงค์ (Emulsifying salt)	เพื่อป้องกันการแยกตัวของไขมัน โดยจัดโปรตีนในเนยแข็งในการ ผลิตเนยแข็งเสียใหม่	emulsifying salt, melding salt
13.สารทำให้แน่น (Firming agent)	รักษาหรือทำให้เนื้อเยื่อแน่นและ กรอบ หรือทำปฏิกิริยากับสารให้ เจลเพื่อทำให้เกิดเจล หรือให้เจล แข็ง	firming agent
14.สารเพิ่มรสชาติ (Flavour enhancer)	เพิ่มรสชาติหรือกลิ่นของอาหาร	flavour enhancer, flavor synergist
15. สารปรับปรุงคุณภาพแป้ง (Flour treatment agent)	สารที่เติมไปในแป้งเพื่อเพิ่ม คุณสมบัติในการอบและการเกิดสี	flour treatment agent, flour bleaching agent, flour improver, dough conditioner, dough strengthening agent
16. สารทำให้เกิดฟอง (Foaming agent)	ทำให้เกิดฟองหรือคงการกระจาย ตัวของอากาศในอาหารที่เป็น ของเหลวหรือของแข็ง	foaming agent, whipping agent, aerating agent
17. สารทำให้เกิดเจล (Gelling agent)	ให้เนื้อสัมผัสของอาหารโดยการ สร้างเจล	gelling agent
18. สารเคลือบผิว (Glazing agent)	สารซึ่งเมื่อใช้กับผิวภายนอกของ อาหารแล้ว จะมีลักษณะปรากฏ ที่เป็นผิวมัน หรือช่วยเคลือบผิว เพื่อป้องกัน	glazing agent, sealing agent, coating agent, surface-finishing agent, polishing agent, film forming agent
19. สารทำให้เกิดความชุ่มชื้น (Humectant)	ป้องกันการแห้งของอาหาร เนื่องจากบรรยากาศที่มีความชื้น ต่ำ	humectant, moisture- retention agent, wetting agent

ตาราง 5 (ต่อ) กลุ่มของวัตถุเจือปนอาหารที่แบ่งตามหน้าที่ด้านเทคโนโลยี

กลุ่มตามหน้าที่	นิยาม	หน้าที่ด้านเทคโนโลยี
20. ก๊าซที่ช่วยในการเก็บรักษาอาหาร (Packaging gas)	วัตถุเจือปนอาหารที่เป็นก๊าซใช้เติมลงไปในภาชนะบรรจุทั้งก่อนระหว่างการบรรจุ และหลังการบรรจุเพื่อยืดอายุการเก็บรักษาอาหาร	packaging gas
21. สารกันเสีย (Preservative)	ยืดอายุของอาหารโดยการป้องกันการเสื่อมเสียจากจุลินทรีย์	preservative, antimicrobial preservative, antimycotic agent, bacteriophage control agent
22. ก๊าซที่ใช้ขับเคลื่อน (Propellant)	ก๊าซที่นอกเหนือจากอากาศ ซึ่งช่วยขับเคลื่อนอาหารออกจากภาชนะบรรจุ	propellant
23. สารช่วยให้ฟู (Raising agent)	สารหรือของผสมของอาหารที่ทำให้อากาศแยกตัวเป็นอิสระและเพิ่มปริมาณของแป้งทำขนมปัง	raising agent
24. สารช่วยจับอนุภาคโลหะ (Sequestrant)	วัตถุเจือปนอาหารที่ใช้จับกับสารที่มีประจุบวก เพื่อป้องกันการเกิดปฏิกิริยาของโลหะหนัก	sequestrant
25. สารทำให้คงตัว (Stabilizer)	ทำให้การแขวนลอยของสารตั้งแต่ 2 ชนิด ที่ไม่รวมกันในอาหารมีความสม่ำเสมอ	stabilizer, foam stabilizer, colloidal stabilizer, emulsion stabilizer
26. สารให้ความหวาน (Sweetener)	สารที่ไม่ใช่น้ำตาลแต่ให้รสหวานแก่อาหาร	sweetener, intense sweetener, bulk sweetener
27. สารให้ความข้นเหนียว (Thickener)	ให้ความหนืดแก่อาหาร	thickener, bodying agent, binder, texturizing agent

ที่มา : Food and Drug Administration, 2016

## การเจริญของจุลินทรีย์ในอาหาร

การเจริญของแบคทีเรียและยีสต์ชนิดเซลล์เดียวในอาหาร จะคล้ายคลึงกับที่เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อ เช่น การเจริญของสแตรทเทอร์ที่ใช้ในการผลิตอาหารบางชนิด เช่น โยเกิร์ต หรือการเจริญของแบคทีเรีย ที่ทำให้อาหารเสื่อมเสียหรือทำให้อาหารเป็นพิษ ซึ่งจะมีความแตกต่างกันไปตามชนิดของจุลินทรีย์และอาหารประเภทต่างๆ ในสภาวะการเจริญที่เฉพาะ จุลินทรีย์ต้องการสิ่งที่จำเป็นต่อการดำรงชีวิต 2 ประเภท ได้แก่ แหล่งพลังงานและแหล่งของสารเคมีที่จำเป็นต่อการสร้างองค์ประกอบที่สำคัญต่างๆ ของเซลล์ โดยเรียกรวมกันว่าสารอาหาร (nutrients) ซึ่งจุลินทรีย์นำมาใช้ในการเจริญและการสืบพันธุ์ โดยจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนในอาหารจะสามารถเจริญได้จะต้องมีองค์ประกอบอื่น ๆ ที่เหมาะสมหลายอย่าง เช่น ปริมาณสารอาหาร ปริมาณน้ำ pH อุณหภูมิ ปริมาณออกซิเจน จุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ และสารยับยั้ง (Kongbangkerd, 2003)

เซลล์จุลินทรีย์มีองค์ประกอบทางเคมีของธาตุและสารเคมีชนิดต่างๆ ที่สำคัญและจำเป็นต่อโครงสร้างและการทำงานของเซลล์ โดยพบว่าธาตุคาร์บอนเป็นธาตุที่มีมากที่สุด และธาตุออกซิเจน ไนโตรเจน ไฮโดรเจนและธาตุอื่นๆ มีปริมาณรองลงมาตามลำดับ ในการแบ่งประเภทจุลินทรีย์ตามความต้องการสารอาหาร มี 2 ประเภท คือ จุลินทรีย์ประเภทโฟโตออโตโทรฟ (photoautotroph) คือจุลินทรีย์ที่สามารถสังเคราะห์แสงได้ (photosynthetic) และจุลินทรีย์พวกคีโมเฮเทอโรโทรฟ (chemoheterotroph) นั้นมีบทบาทมากเกี่ยวกับจุลชีววิทยาทางอาหาร เป็นพวกที่ทำให้อาหารเสื่อมเสีย ก่อโรค อาหารเป็นพิษ และพวกที่เกี่ยวข้องกับการหมักต่างๆ จุลินทรีย์พวกคีโมเฮเทอโรโทรฟมีการใช้สารอาหารจากธาตุคาร์บอนในสารอินทรีย์มาใช้แตกต่างกันออกไป แบคทีเรีย ยีสต์และเชื้อราส่วนใหญ่มักใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนหลักและกลูโคสจะถูกนำมาใช้ก่อนในกรณีที่มีแหล่งคาร์บอนอื่นๆ อยู่ด้วย เช่น น้ำตาลที่ไม่ใช่กลูโคส น้ำตาลแอลกอฮอล์ แป้ง และโปรตีน เป็นต้น (Kongbangkerd, 2003)

## การควบคุมจุลินทรีย์ในอาหาร

การยับยั้งหรือทำลายจุลินทรีย์สามารถกระทำได้หลายวิธี เช่น การใช้ความร้อนชื้น (wet heat) ความร้อนแห้ง (dry heat) การใช้สารเคมีต่างๆ เช่น สารฆ่าเชื้อ (disinfectants) สารกันเสีย (preservatives) และสารปฏิชีวนะ (antibiotics) การปรับค่า pH การฉายรังสี (เช่น รังสีอัลตราไวโอเล็ต รังสีอออนไนส์หรือไมโครเวฟ) การลดค่าปริมาณน้ำในอาหารหรือค่าวอเตอร์แอกติวิตี ( $a_w$ ) การแช่เยือกแข็ง การแช่เย็น (ทำให้เกิด cold shock) การใช้อัลตราซาวด์ รวมทั้งการใช้ความดันสูง เป็นต้น

การทำลายจุลินทรีย์เนื่องจากความร้อน (thermal death) การใช้ความร้อนในการถนอมรักษาอาหาร ในบางครั้งไม่จำเป็นต้องฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมด เช่น การทำให้สุก (cooking) หรือการลวก (blanching) เพื่อทำลายเอนไซม์ แต่ก็มีผลทำให้จุลินทรีย์ลดจำนวนลง หรือให้ความร้อนแก่อาหาร เพื่อให้อาหารมีความปลอดภัยจากเชื้อโรค รวมทั้งทำลายจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดการเสื่อมเสีย

### วิธีการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ในอาหาร

กรรมวิธีฆ่าเชื้อด้วยความร้อนที่ใช้ในการผลิตอาหาร เพื่อให้อาหารปราศจากเชื้อโรคที่เป็นอันตรายต่อผู้บริโภค แต่ละวิธีผู้ผลิตสามารถเลือกใช้ตามความเหมาะสมของผลิตภัณฑ์ โดยมีกรรมวิธีดังนี้

#### การพาสเจอร์ไรส์ (Food and Drug Administration, 2016)

การพาสเจอร์ไรส์ (pasteurization) หมายถึง กรรมวิธีฆ่าเชื้อด้วยความร้อนเพื่อลดปริมาณจุลินทรีย์ให้อยู่ในระดับที่ปลอดภัยต่อผู้บริโภค และยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ที่ทำให้อาหารเสื่อมเสีย ผลิตภัณฑ์ที่ผ่านการพาสเจอร์ไรส์ ต้องเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิไม่เกิน 8 องศาเซลเซียส (°C) ตลอดระยะเวลาหลังบรรจุจนถึงผู้บริโภค และระยะเวลาการบริโภคจะสั้นเนื่องจากยังมีจุลินทรีย์อื่นที่ไม่อันตรายแต่อาจทำให้น้ำเสียหลงเหลืออยู่ โดยมีลักษณะการใช้อุณหภูมิและเวลาอย่างใดอย่างหนึ่งดังนี้

อุณหภูมิไม่ต่ำกว่า 63 และคงอยู่ที่อุณหภูมินี้ไม่น้อยกว่า 30 นาที แล้วทำให้เย็นลงทันทีที่อุณหภูมิ 5 °C หรือต่ำกว่า หรือ

อุณหภูมิไม่ต่ำกว่า 72 และคงอยู่ที่อุณหภูมินี้ไม่น้อยกว่า 15 วินาที แล้วทำให้เย็นลงทันทีที่อุณหภูมิ 5 °C หรือต่ำกว่า หรือ

อุณหภูมิและเวลาที่ให้ผลในการฆ่าเชื้อได้ แล้วทำให้เย็นลงทันทีที่อุณหภูมิ 5 °C หรือต่ำกว่า

#### การสเตอริไลส์ (Food and Drug Administration, 2016)

การสเตอริไลส์ (sterilization) หมายถึง กรรมวิธีฆ่าเชื้อด้วยความร้อนเพื่อทำให้อาหารปราศจากเชื้อโรคที่เป็นอันตรายต่อผู้บริโภค และไม่มีจุลินทรีย์ที่เป็นสาเหตุของการเน่าเสียซึ่งสามารถเจริญในอาหารภายใต้สภาวะอุณหภูมิปกติของการเก็บรักษา โดยไม่ต้องแช่เย็น มีอายุการเก็บรักษานานกว่าผลิตภัณฑ์ที่ผ่านการพาสเจอร์ไรส์ โดยมีลักษณะดังนี้

1. ผลิตภัณฑ์มีค่าวอเตอร์แอกติวิตี้ (water activity;  $a_w$ ) มากกว่า 0.85 และบรรจุในภาชนะที่ปิดสนิท กันอากาศเข้าออกได้ ดังนี้

ภาชนะโลหะ ที่ปิดผนึกด้วยตะเข็บสองชั้น (double seam) เช่น กระจง ปีบ เป็นต้น

ภาชนะแก้ว ที่ปิดผนึกด้วยฝาที่ออกแบบพอดีกับปากขวด ภายในฝาจะมีวัสดุยึดหยุ่น ทาหน้าที่ยกั้นรั่ว (sealing compound) ทั้งที่เป็นแผ่น (gasket หรือ liner) และที่เคลือบหรือหล่อติดกับฝาโดยตรง (plastisol) หรือที่ปิดผนึกแน่นสนิทด้วยการใช้ฟิล์มพลาสติกหรืออลูมิเนียมฟลอยด์ลามิเนต โดยใช้ความร้อนหลอมให้ละลายยึดติดกับปากขวด (heat sealing)

ภาชนะพลาสติก ที่ทนต่อสภาวะการฆ่าเชื้อ เช่น อุณหภูมิและความดันในเครื่องฆ่าเชื้อ (retortable plastic packaging) ปิดผนึกแน่นกันอากาศเข้าออกได้ด้วยความร้อน (heat seal) เช่น ถุงแพช (pouch) ถาดหรือถ้วยพลาสติก (semi-rigid tray and bowls) หรือ ปิดผนึกด้วยตะเข็บสองชั้น (double seam) เช่น ถ้วยพลาสติกกับฝาโลหะ หรือปิดผนึกด้วยฝาที่ออกแบบมาให้สามารถป้องกันการรั่วซึมของอากาศได้ ทั้งชนิดที่มีวัสดุบุผนึก และฝาชนิดไม่มีวัสดุบุผนึกชั้นใน ที่ผนึกแน่นด้วยแรงเชิงกล (plug seal cap)

2. ใช้ความร้อนในการฆ่าเชื้อ โดยใช้อุณหภูมิและเวลาที่เหมาะสมกับค่าความเป็นกรดต่างของผลิตภัณฑ์อาหาร

อาหารที่มีความเป็นกรดต่ำ การสเตอริไลส์ผลิตภัณฑ์อาหารมีค่าความเป็นกรดต่างมากกว่า 4.6 ใช้อุณหภูมิการฆ่าเชื้อไม่ต่ำกว่า 100 °C โดยใช้เวลาที่เหมาะสม

อาหารที่ปรับสภาพกรด การสเตอริไลส์ผลิตภัณฑ์อาหารที่มีความเป็นกรดต่ำที่ผ่านการปรับสภาพให้มีค่าความเป็นกรดต่างน้อยกว่าหรือเท่ากับ 4.6 โดยการเติมกรดหรือเติมส่วนผสมที่มีความเป็นกรดโดยธรรมชาติ ซึ่งจะช่วยยับยั้งการงอกของสปอร์ของจุลินทรีย์ก่อโรค ทำให้สามารถใช้อุณหภูมิไม่สูงมากนักในการฆ่าเชื้อที่เป็นเซลล์ของจุลินทรีย์ได้ โดยอุณหภูมิฆ่าเชื้อที่ใช้มักจะไม่ต่ำกว่า 100 °C

อาหารที่มีความเป็นกรด การสเตอริไลส์ผลิตภัณฑ์อาหารที่โดยธรรมชาติมีค่าความเป็นกรดต่างน้อยกว่าหรือเท่ากับ 4.6 ซึ่งจะช่วยยับยั้งการงอกของสปอร์ของจุลินทรีย์ก่อโรค ทำให้สามารถใช้อุณหภูมิไม่สูงมากนัก (น้อยกว่า 100 °C) ในการฆ่าเชื้อที่เป็นเซลล์ของจุลินทรีย์

**ยูเอชที** (Food and Drug Administration, 2016)

ยูเอชที (Ultra High Temperature ; UHT) หมายความว่า กรรมวิธีฆ่าเชื้อด้วยความร้อนที่อุณหภูมิไม่ต่ำกว่า 133 °C ไม่น้อยกว่า 1 วินาที แล้วบรรจุในภาชนะในสภาวะที่ปราศจากเชื้อ

### การทำให้แห้ง/ผสมแห้ง/อัดเม็ด/บรรจุแคปซูล (Food and Drug Administration, 2016)

การทำให้แห้ง คือ วิธีการถนอมอาหารที่โดยลดความชื้น (moisture content) ของอาหาร ด้วยการระเหยน้ำ การอบแห้ง (dehydration) การทอด (frying) หรือการระเหิดน้ำส่วนใหญ่ในอาหารออก ทำให้อาหารปลอดภัย เนื่องจากการลดปริมาณน้ำในอาหาร ทำให้อาหารมีค่าวอเตอร์แอกทิวิตี (water activity;  $a_w$ ) น้อยกว่า 0.6 มีความชื้นต่ำกว่า 15% ซึ่งเป็นระดับที่ปลอดภัยจากจุลินทรีย์ก่อโรค (pathogen) ยับยั้งการสร้างสารพิษของเชื้อรา (mycotoxin) เช่น Aflatoxin สามารถเก็บไว้ได้นานที่อุณหภูมิห้อง โดยไม่เน่าเสีย ไม่ต้องแช่เย็น แต่ทั้งนี้ควรเก็บในที่แห้งและเย็น เพื่อรักษาคุณภาพและต้องเก็บรักษาในบรรจุภัณฑ์ที่เหมาะสม และควบคุมความชื้นสัมพัทธ์ (relative humidity) ให้ต่ำเพื่อป้องกันการดูดน้ำกลับ

ผสมแห้ง คือ การนำส่วนประกอบของอาหารที่มีลักษณะแห้งมาผสมกัน โดยยังคงลักษณะแห้ง

การอัดเม็ด (pelleting) เป็นการนำเอาวัตถุดิบอาหารที่บดแล้วหรือผสมตามต้องการ มาคลุกรวมกันแล้วอัดผ่านเครื่องตอกเม็ด หรือรูตะแกรง ขนาดของเม็ดอาหารมีขนาดเล็กหรือขนาดใหญ่ ขึ้นกับ ความสัมพันธ์ของรูตะแกรง ความร้อน และแรงอัดให้มีความแน่น รวมถึงวิธีการผลิตอาหารอัดเม็ดหรือขึ้นรูปพร้อมสุก (อาหารเอ็กซ์ทรูด) โดยใช้เครื่องเอกซ์ทรูเดอร์ (extruder) ที่ทำให้อาหารมีลักษณะแห้ง

บรรจุแคปซูล นิยมใช้กับผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร คือ การนำส่วนประกอบที่มีลักษณะแห้งหรือของเหลวที่เป็นน้ำมัน (น้ำหรือแอลกอฮอล์ ละลายเปลือกแคปซูลได้ จึงไม่สามารถนำมาบรรจุได้) มีแคปซูล 2 ชนิด คือ แคปซูลแข็ง (hard capsules) หรือแคปซูลนิ่ม (soft capsules)

### การทำให้เข้มข้น (Food and Drug Administration, 2016)

การทำให้เข้มข้น (concentration) หมายถึง การทำให้เข้มข้นด้วยการแยกน้ำบางส่วนออกจากอาหารเหลวที่มีปริมาณน้ำมาก ออกจากอาหาร ทำให้มีส่วนที่เป็นของแข็งมากขึ้น อาหารมีความเข้มข้นเพิ่มขึ้น ส่งผลให้อาหารมีค่า water activity ลดลง ซึ่งจะควบคุมการเจริญของจุลินทรีย์ที่ทำให้เสื่อมเสีย (microbial spoilage) และจุลินทรีย์ก่อโรค (pathogen) วิธีการทำอาหารเข้มข้น เช่น การระเหย (evaporation) การทำให้เข้มข้นด้วยการแช่เยือกแข็ง (freeze concentration) การกรองด้วยเยื่อ (membrane filtration) แบบ reverse osmosis

### การแช่เยือกแข็ง (Food and Drug Administration, 2016)

การแช่เยือกแข็ง คือ กรรมวิธีการถนอมอาหาร ด้วยการลดอุณหภูมิของอาหาร ให้ต่ำกว่า  $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$  ทำให้น้ำในอาหารจะเปลี่ยนสถานะเป็นน้ำแข็ง

## การหมัก (Food and Drug Administration, 2016)

การหมัก (fermentation) เป็นการถนอมอาหารที่ใช้จุลินทรีย์ต่างๆ เช่น แบคทีเรีย ยีสต์ หรือรา เป็นเชื้อเริ่มต้น (starter) อาจเป็นเชื้อบริสุทธิ์ เชื้อผสม เช่น ลูกแป้งโคจิ หรือเชื้อที่ปนเปื้อนจากธรรมชาติเปลี่ยนแปลงสารอินทรีย์ในอาหารเกิดเป็นสารต่างๆ เช่น กลิ่นแอลกอฮอล์ กรดอินทรีย์ การหมักสามารถเกิดได้ทั้งในสภาวะที่มีอากาศ (aerobic fermentation) หรือไม่มีอากาศ (anaerobic fermentation) ซึ่งผลของการหมักนี้สามารถยับยั้งหรือชะลอการเจริญของจุลินทรีย์ที่ทำให้อาหารเสื่อมเสีย (microbial spoilage) และจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรค (pathogen) ทำให้อาหารปลอดภัย ยืดอายุการเก็บรักษา สามารถเก็บรักษาอาหารเพื่อบริโภคนอกฤดูกาล กระจายสินค้าได้กว้างขวางมากขึ้น

การวิเคราะห์ปริมาณจุลินทรีย์ต่างๆ ในอาหารที่ผ่านกระบวนการผลิต วัตถุประสงค์หรือในสภาวะการผลิตนั้นเป็นวิธีที่ใช้ควบคุมคุณภาพในโรงงานอุตสาหกรรมอาหารต่างๆ รวมทั้งห้องปฏิบัติการเกี่ยวกับสุขอนามัยและสุขลักษณะของอาหาร โดยสามารถวิเคราะห์ปริมาณและชนิดของจุลินทรีย์ทั้งในวัตถุดิบและผลิตภัณฑ์ เพื่อใช้เป็นมาตรฐานความปลอดภัยของผลิตภัณฑ์

## การศึกษาอายุการเก็บของผลิตภัณฑ์อาหาร

อายุการเก็บของผลิตภัณฑ์อาหาร หมายถึง ช่วงเวลาที่ผลิตภัณฑ์อาหารยังคงมีความปลอดภัยต่อการนำมาบริโภค และมีคุณภาพด้านต่างๆ เช่น คุณภาพทางประสาทสัมผัส ภายนอกและเคมีตามที่ผู้บริโภคต้องการ โดยการเลือกใช้ส่วนผสม กระบวนการแปรรูป การบรรจุ และการเก็บรักษาที่เหมาะสม (Wangcharoen, 2006) นับเป็นปัจจัยที่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงคุณภาพของผลิตภัณฑ์อาหาร การเก็บรักษาในสภาวะที่สามารถหลีกเลี่ยงหรือลดความเสี่ยงจากปัจจัยภายนอกที่มีผลต่อคุณภาพของผลิตภัณฑ์ ได้แก่ แสง ออกซิเจน ความชื้น และอุณหภูมิ เป็นต้น จึงมีความสำคัญอย่างมากต่ออายุการเก็บของผลิตภัณฑ์

การศึกษาอายุการเก็บของผลิตภัณฑ์อาหาร มีขั้นตอนดังต่อไปนี้

1. เลือกปฏิกิริยาหรือการเปลี่ยนแปลงที่จะใช้เป็นตัวบ่งชี้การเสื่อมคุณภาพของผลิตภัณฑ์
2. ศึกษาอัตราเร็วของปฏิกิริยาหรือการเปลี่ยนแปลงที่เลือกไว้
3. กำหนดคุณภาพต่ำสุดของผลิตภัณฑ์ที่ยังสามารถยอมรับได้
4. ทหาระยะเวลาที่ใช้สำหรับการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้น ตั้งแต่เริ่มต้นจนถึงจุดที่กำหนดไว้

การเลือกปฏิกิริยาหรือการเปลี่ยนแปลงที่จะใช้เป็นตัวบ่งชี้การเสื่อมคุณภาพของ ผลิตภัณฑ์สามารถทำได้โดยการพิจารณาการเสื่อมเสียของผลิตภัณฑ์ว่า มีลักษณะอย่างไร และลักษณะใดเป็น

ลักษณะที่มีผลต่อการยอมรับของผู้บริโภคมากที่สุด โดยทั่วไปเราสามารถใช้ข้อมูลทางวิชาการที่เกี่ยวข้องประกอบการตัดสินใจได้ หากเป็นผลิตภัณฑ์ที่ไม่สามารถหาข้อมูลดังกล่าวได้ อาจใช้วิธีการทดลองเพื่อเก็บข้อมูลเอง ซึ่งอาจต้องใช้เวลาอย่างมากในการเก็บข้อมูล ห้องปฏิบัติการส่วนใหญ่จึงนิยมใช้สภาวะเร่ง (accelerated shelf life test) ร่วมกับการทดลองที่สภาวะปกติเพื่อศึกษาข้อมูลดังกล่าวด้วย (ตาราง 6)

**ตาราง 6** อุณหภูมิที่ใช้ในการทดสอบการเสื่อมคุณภาพของผลิตภัณฑ์

ผลิตภัณฑ์แช่แข็ง	ผลิตภัณฑ์ของแห้ง/ กึ่งแห้ง	ผลิตภัณฑ์กระป๋อง
-40 °C (control)	0 °C (control)	5 °C (control)
-15 °C	23 °C (room temp.)	23 °C (room temp.)
-10 °C	30 °C	30 °C
-5 °C	35 °C	35 °C
	40 °C	40 °C
	45 °C	

ที่มา : Wangcharoen, 2006

### การประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัส

การประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัส (sensory evaluation) คือ การตรวจวิเคราะห์คุณภาพของอาหาร โดยใช้ประสาทสัมผัสทั้ง 5 ของผู้ชิม ได้แก่ การมอง การฟัง การดม การชิม และการสัมผัส ใช้จำนวนผู้ชิมที่มากพอสมควร ประมวลผลด้วยวิธีทางสถิติ และแปลผลอย่างมีหลักเกณฑ์ (Pornchaloempong, 2017) เมื่อผู้ชิมทำการทดสอบ จะประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัสโดยการให้คะแนน เป็นวิธีการทดสอบเพื่อให้ทราบระดับความเข้มของคุณลักษณะทางประสาทสัมผัสต่างๆ ของตัวอย่าง ซึ่งวิธีใช้สเกลนี้จะสามารถบอกขนาดของความแตกต่างได้ สามารถใช้สเกลในการทดสอบ เช่น แบบตัวเลข (numerical scale) โดยตัวเลขหรือคะแนนที่จะระบุลงไปในแต่ละระดับนั้น จะเรียงลำดับจากน้อยไปหามาก หรือจากมากไปหาน้อยก็ได้ ผู้ทดสอบสามารถให้คำนิยามเพื่อบ่งบอกคุณลักษณะทางประสาทสัมผัสที่รับรู้ นั้น ๆ ได้ คะแนนที่ใช้กำหนดระดับความเข้มที่ต้องการทดสอบควรมีเพียงพอที่ผู้ทดสอบจะตัดสินใจได้ง่าย โดยคะแนนควรมีอย่างน้อย 5-7 คะแนนขึ้นไป

วิธีการทดสอบที่ใช้ในการประเมินค่าทางประสาทสัมผัส (methods of sensory testing) แบ่งเป็น 3 ประเภท (Attabhanyo, 2001) คือ

1. ประเภททดสอบความพอใจ/การยอมรับ (preference/ acceptance test) เป็นการทดสอบเพื่อหาความพอใจของผู้ทดสอบชิมที่มีตัวอย่าง โดยใช้ความรู้สึกของผู้ทดสอบชิมโดยตรง

2. ประเภททดสอบความแตกต่าง (discriminatory test) เป็นการทดสอบเพื่อวัดความแตกต่างระหว่างตัวอย่าง ผู้ทดสอบชิมจะไม่นำความรู้สึกส่วนตัวในด้านความชอบหรือไม่ชอบที่มีต่อตัวอย่างมาใช้ในการวัดความแตกต่างระหว่างตัวอย่าง

3. ประเภททดสอบเชิงพรรณนาโวหาร (descriptive test) เป็นการทดสอบเพื่อวัดลักษณะและความเข้มข้นของความแตกต่าง

#### การทดสอบการยอมรับ (รัตนนา, 2544)

การทดสอบการยอมรับ เป็นการทดสอบเพื่อหาความพอใจของผู้ทดสอบชิมที่มีตัวอย่าง อยู่ด้วยกัน 4 แบบ

1) แบบ Paired comparison test เป็นการทดสอบที่ผู้ทดสอบได้รับตัวอย่าง 2 ตัวอย่างพร้อมกันในลักษณะปกปิด และให้บอกว่าชอบตัวอย่างใดมากกว่า โอกาสที่ผู้ทดสอบเลือกได้ถูกต้องโดยบังเอิญมี 50% การวิเคราะห์ผลทางสถิติใช้ Chi square

2) แบบ Hedonic scale เป็นการทดสอบเพื่อวัดการยอมรับและความพอใจที่มีต่อตัวอย่างด้วยการให้คะแนน โดยแบ่งสเกลคะแนนออกไปตามความพอใจจากมากที่สุดไปจนถึงน้อยที่สุด การวิเคราะห์ผลทางสถิติใช้ Analysis of variance และการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของตัวอย่างใช้ Tukey's test หรือ Duncan's New Multiple Rang test หลังการทดสอบแบบ Hedonic scale หากต้องการทราบทิศทางของลักษณะผลิตภัณฑ์ที่ควรจะเป็นหรือปรับปรุง อาจใช้การทดสอบแบบ just-right scale

ตัวอย่างสเกลวัดความพอดี (Just right scale)

ตัวอย่างสเกลวัดความพอดี (Just-right scale)			
สเกล 3 ระดับ (3 point scale)	<input type="checkbox"/> อ่อนไป (Too weak)	<input type="checkbox"/> พอดี (Just-right)	<input type="checkbox"/> เข้มไป (Too strong)
สเกล 5 ระดับ (5 point scale)	<input type="checkbox"/> สว่างไป (Too light)	<input type="checkbox"/> พอดี (Just-right)	<input type="checkbox"/> มืดไป (Too dark)
สเกล 7 ระดับ (7 point scale)	<input type="checkbox"/> อ่อนเกินไปมาก (Much too weak)	<input type="checkbox"/> พอดี (Just-right)	<input type="checkbox"/> เข้มเกินไปมาก (Much too strong)
สเกล 9 ระดับ (9 point scale)	<input type="checkbox"/> ไม่หวานเลย (Not at all sweet enough)	<input type="checkbox"/> พอดี (Just-right)	<input type="checkbox"/> หวานเกินไปมาก (Much too sweet)

สเกลวัดความพอดี (just-right scale) เป็นสเกลที่ใช้วัดความต้องการของผู้บริโภคที่มีต่อความเข้มของลักษณะทางประสาทสัมผัสที่สนใจของผลิตภัณฑ์ ทำให้สามารถหาความเข้มที่เหมาะสมของลักษณะนั้นๆ เพื่อให้ได้ข้อมูลสำหรับการพัฒนาผลิตภัณฑ์ นำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์ผลโดยการทดสอบค่า t-test หรือการวิเคราะห์ความแปรปรวน แต่สำหรับการวิเคราะห์ผลสเกลวัดความพอดี 3 ระดับ ควรเลือกรีวิววิเคราะห์ข้อมูลโดยกำหนดเกณฑ์ที่จะยอมรับว่าผลิตภัณฑ์มีความเข้มของลักษณะที่สนใจอยู่ในระดับพอดี โดยทั่วไปควรมีค่าประมาณร้อยละ 70 หากผลทดสอบได้มากกว่าจะถือว่าพอดี และมีเหตุผลที่จะไม่สนใจข้อมูลส่วนที่เหลือ (Wangcharoen, 2006)

3) แบบ Facial hedonic เป็นการทดสอบที่ใช้การแสดงออกของหน้าเป็นสเกลการยอมรับ โดยใช้จำนวนสเกลหน้า 5-7 หน้า หน้าที่ใช้ต้องไม่แสดงเพศ แสดงแต่ลักษณะความพอใจหรือไม่พอใจเล็กน้อย โดยใส่เครื่องหมายลงในช่องตรงหน้า การประเมินจะให้คะแนนหน้าทางซ้ายสุดเป็นคะแนนลบ หน้าทางขวาเป็นคะแนนบวกหน้าตรงกลางคะแนนเป็นศูนย์ วิเคราะห์ผลทางสถิติใช้ ANOVA

4) แบบ Ranking เป็นการทดสอบที่ใช้หาความพอใจของผู้ทดสอบที่มีต่อตัวอย่าง ด้วยการนำเสนอตัวอย่างหลายๆ ตัวอย่างพร้อมกันในลักษณะปกปิด แล้วให้ผู้ทดสอบชิมตัวอย่างตามลำดับของการนำเสนอ จากนั้นเรียงตัวอย่างตามลำดับความพอใจจากพอใจมาก

วิธีการทดสอบการยอมรับที่ได้รับความนิยมมากที่สุด คือ 9-point hedonic scale หรือ degree of liking scale การใช้ hedonic scale อาศัยบนหลักการที่ว่า ความชอบของผู้บริโภคนั้นสามารถถูกจัดจำแนกได้โดยค่าของการตอบสนอง (ความชอบและไม่ชอบ) ที่เกิดขึ้น (Lawless and Heymann, 2010) ข้อดีของการใช้ 9-point hedonic scale คือ ง่ายและการแปลผลได้ง่าย ได้รับการยอมรับในการประเมินอาหาร เครื่องดื่มและผลิตภัณฑ์อื่น ๆ ที่ไม่ใช่อาหารอย่างแพร่หลาย การให้คะแนนการยอมรับ (hedonic score) เป็นการให้คะแนนตามลำดับความชอบในตัวอย่างนั้น ลำดับความชอบแบบ 9-point hedonic scale จะมีลักษณะดังนี้

ชอบมากที่สุด	9	Like extremely
ชอบมาก	8	Like very much
ชอบปานกลาง	7	Like moderately
ชอบเล็กน้อย	6	Like slightly
เฉย ๆ	5	Neither like nor dislike
ไม่ชอบเล็กน้อย	4	Dislike slightly
ไม่ชอบปานกลาง	3	Dislike moderately
ไม่ชอบมาก	2	Dislike very much
ไม่ชอบมากที่สุด	1	Dislike extremely

การวิเคราะห์การยอมรับ เป็นวิธีการที่ผู้บริโภคเท่านั้นบอกได้ และวัดโดยวิธีทางวิทยาศาสตร์ ไม่ได้ หรืออาจวัดได้แต่ไม่เหมาะสมในการประยุกต์ใช้ เนื่องจากข้อมูลการยอมรับมาจากระดับการตอบสนองของมนุษย์ เริ่มจากการรับรู้ ทักษะคิด ความคิดเห็น ความชอบ/ไม่ชอบ จนได้ข้อมูลการยอมรับ/ปฏิเสธ ดังนั้นจึงต้องให้ผู้บริโภค (consumer) ทำหน้าที่เป็นผู้ทดสอบ (assessor) เพื่อให้ผลิตภัณฑ์ออกสู่ตลาดได้ตรงกับความต้องการของผู้บริโภค (Anprung, 2008)

#### ลักษณะของผู้ทดสอบการยอมรับ (Anprung, 2008)

ควรพิจารณาจากข้อมูลด้านต่าง ๆ ด้วย ได้แก่

- 1) ผู้บริโภค/ผู้ใช้ (user group) โดยพิจารณาจากอัตราการบริโภค เช่น ใช้ไม่บ่อย (light user) ใช้บ่อยปานกลาง (moderate user) หรือใช้บ่อยมาก (heavy user) มีการสำรวจก่อนจากนั้นนำมาจัดระดับความถี่ แล้วจัดกลุ่มแบ่งกลุ่มผู้ใช้
- 2) เพศ (sex) ผลลัพธ์บางประเภทเป็นผลลัพธ์เฉพาะสำหรับกลุ่มเพศ เช่น เครื่องสำอาง เสื้อผ้า ส่วนอาหารค่อนข้างไม่ชัดเจน ยกเว้นอาหารสุขภาพบางชนิด เช่น อาหารควบคุมน้ำหนัก อาหารควบคุมสมรรถภาพทางเพศ อาหารบำรุงครรภ์ เป็นต้น
- 3) รายได้ (income) ข้อมูลรายได้จะแสดงความสัมพันธ์เชื่อมโยงไปสู่กลุ่มผู้บริโภคที่มีกำลังซื้อ (purchasing power) สามารถรวบรวมได้จากการทำแบบสอบถามข้อมูลรายได้ต่อเดือนหรือต่อปี
- 4) วัย (age) ข้อมูลด้านวัยบ่งบอกถึงความสนใจต่อผลิตภัณฑ์ในรูปแบบต่าง ๆ กัน เช่น วัยเด็ก (4-12 ปี) ต้องการความสดชื่น มีสีสัน วัยผู้ใหญ่ มีความสนใจหลายเรื่อง ผลิตภัณฑ์ที่ต้องการมักจะมีลักษณะที่สำเร็จรูป สะดวก หรือมีผลต่อสุขภาพ เป็นต้น

5) เชื้อชาติ พื้นที่อาศัย ศาสนา การศึกษา การจ้างงาน (nationality, region, religion, education, employment) เป็นปัจจัยทางสังคมและสิ่งแวดล้อมทั้งภายในและภายนอกของผู้บริโภคที่มีส่วนเกี่ยวข้องกับการตัดสินใจยอมรับผลิตภัณฑ์ เช่น อาหารฮาลาล (halal food)

ข้อมูลเบื้องต้นของผู้ทดสอบจะเป็นแนวทางในการคัดกรองผู้ทดสอบตัวอย่างหรือผลิตภัณฑ์ เพื่อให้ได้ข้อมูลที่แท้จริงและเหมาะสมต่อการนำไปพัฒนาผลิตภัณฑ์ต่อไป

จากข้อมูลข้างต้นจึงมีความเป็นไปได้ในการนำสาหร่ายน้ำจืดทั้งสองชนิด คือ สาหร่ายไถและสาหร่ายเตามาพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์อาหารสุขภาพชนิดเจล ที่มีคุณค่าทางโภชนาการและมีฤทธิ์ทางชีวภาพหลายประการ เช่น คุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระ ป้องกันการเกิดภาวะเครียดออกซิเดชัน (oxidative stress) ซึ่งเป็นสาเหตุของการเกิดโรคต่างๆ โดยเฉพาะโรคที่เกิดในกลุ่มวัยทำงานและผู้สูงอายุ ได้แก่ โรคเบาหวาน อันเป็นที่มาของโรคไม่ติดต่อเรื้อรังอื่นๆ นอกจากนี้ผลิตภัณฑ์อาหารสุขภาพชนิดเจลจากสาหร่าย ยังเป็นผลิตภัณฑ์ที่สามารถกลืนได้ง่าย ทำให้ผู้ที่มีปัญหาในการกลืนสามารถรับประทานได้ง่ายอีกด้วย



### บทที่ 3

#### วิธีการดำเนินการทดลอง

##### วัตถุดิบ (Raw Materials)

สาหร่ายเตา (*Spirogyra neglecta* (Hassall) Kützing)

สาหร่ายไถ (*Rhizoclonium hieroglyphicum* (C. Agardh) Kützing)

##### สารเคมี (Chemicals)

###### *ABTS radical scavenging assay*

2,2'-Azino-bis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid (Sigma-Aldrich, USA)

Potassium persulphate (Sigma-Aldrich, USA)

Deionized water (RCL Labscan, Singapore)

Trolox (Sigma-Aldrich, USA)

###### *DPPH radical scavenging assay*

2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl (Sigma-Aldrich, USA)

Methanol (RCL Labscan, Singapore)

Gallic acid (Sigma-Aldrich, USA)

###### *Superoxide anion scavenging assay*

Nitroblue tetrazolium (Sigma-Aldrich, USA)

Nicotinamide adeninedinucleotide (Sigma-Aldrich, USA)

Phenazine methosulfate (Sigma-Aldrich, USA)

###### *Determination of total polyphenolic content*

Folin-Ciocalteu reagent (Merck, Germany)

Sodium carbonate (Sigma-Aldrich, USA)

Gallic acid (Sigma-Aldrich, USA)

Deionized water (RCL Labscan, Singapore)

###### *Total plate count*

Nutrient broth (HiMedia, India)

Agar (HiMedia, India)

*Enzymatic assay kit*

- Glucose (Biotech, Bangkok, Thailand)
- Triglyceride (Biotech, Bangkok, Thailand)
- Cholesterol reagent (Biotech, Bangkok, Thailand)
- TBARs assay kit (Cayman, USA)
- Superoxide dismutase assay kit (Cayman, USA)
- Catalase assay kit (Cayman, USA)
- Glutathione peroxidase assay kit (Cayman, USA)

**เครื่องมือวิทยาศาสตร์ (Apparatus)**

- Hot air oven (UF55, Memmert, Germany)
- Rotary evaporator (R-124, Buchi, Switzerland)
- Freeze dryer (FreeZone 4.5Liter Benchtop Freeze Dry System, Labconco, Missouri, USA)
- UV-Visible Spectrophotometer (Evolution 200 Series, Thermo Scientific, Finland)
- Microplate Spectrophotometer (Multiskan GO, Thermo Scientific, Finland)
- Inductive coupled plasma-mass spectrometer (7700 Series ICP-MS, Agilent, USA)
- Liquid chromatography-mass spectroscopy (1100 Series, Agilent, USA)
- Texture analyzer (TA.XT.plus, Stable Micro System, United Kingdom)

**วิธีการดำเนินการทดลอง****3.1 การเตรียมสาหร่ายน้ำจืด****3.1.1 สาหร่ายเตา**

สาหร่ายเตา (*Spirogyra neglecta* (Hassall) Kützing) ที่ใช้ในการวิจัยนำมาจาก บ้านนาคูหา ตำบลสวนเขื่อน อำเภอเมือง จังหวัดแพร่ โดยก่อนนำมาใช้ในการเตรียมเป็นวัตถุดิบ จะถูกนำมาพิสูจน์เอกลักษณ์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ เพื่อความถูกต้องของสายพันธุ์ จากนั้นนำมาทำให้

แห้งด้วยตู้อบลมร้อน (hot air oven) ที่อุณหภูมิ 55-60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เก็บบรรจุใส่ซองอลูมิเนียมฟลอยด์ เพื่อนำไปใช้ในการสกัดต่อไป

### 3.1.2 สาหร่ายไถ

สาหร่ายไถ (*Rhizoclonium hieroglyphicum* (C. Agardh) Kützing) ที่ใช้ในการวิจัยนำมาจากแม่น้ำน่าน บ้านหนองบัว อำเภอท่าวังผา จังหวัดน่าน จะถูกนำมาพิสูจน์เอกลักษณ์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ เพื่อความถูกต้องของสายพันธุ์ นำสาหร่ายไถมาทำให้แห้งด้วยตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 55-60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เก็บบรรจุใส่ซองอลูมิเนียมฟลอยด์ เพื่อนำไปใช้ในการสกัดต่อไป

## 3.2 การเตรียมสารสกัดสาหร่ายน้ำจืด

### 3.2.1 การศึกษาตัวทำละลายที่เหมาะสม

การศึกษาตัวทำละลายที่เหมาะสมโดยใช้ตัวทำละลาย 4 ชนิด ได้แก่ เฮกเซน อะซิโตน เอทานอล และน้ำ (90 องศาเซลเซียส) ตามวิธีการของ Janthip (Janthip, 2013) ในการสกัดสารสำคัญในสาหร่ายน้ำจืด เพื่อหาตัวทำละลายที่เหมาะสมในการสกัด และให้ปริมาณสารฟีนอลิกที่สูง

### 3.2.2 การสกัดสาหร่ายน้ำจืดด้วยน้ำ

สาหร่ายเตาและสาหร่ายไถ นำสาหร่ายแต่ละชนิดมาสกัดโดยวิธีการต้มด้วยน้ำที่อุณหภูมิ 90-100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นกรองแยกกากสาหร่ายออก นำกากสาหร่ายมาสกัดซ้ำอีก 2 รอบ นำสารละลายที่ได้ทั้งหมดมารวมกัน จากนั้นนำมากรองด้วยกระดาษกรอง ยี่ห้อ Whatman เบอร์ 1 ก่อนนำไปประเหยเอาน้ำออก ภายใต้สภาวะสุญญากาศด้วยเครื่อง Rotary evaporator จนได้สารละลายเข้มข้น นำไปทำให้แห้งด้วยเครื่อง Freeze dryer จนได้สารสกัดสาหร่ายแห้ง แล้วจึงนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อรักษาคุณภาพของสารสกัดก่อนนำไปทดสอบต่อไป

### 3.2.3 การศึกษาการเก็บรักษาสาหร่าย

สารสกัดของสาหร่ายน้ำจืดถูกนำมาเก็บไว้นาน 12 เดือน (ธันวาคม พ.ศ. 2559 – มกราคม 2561) ในสภาวะที่บดแสง และไม่มีความชื้น ที่อุณหภูมิห้อง (25-33 องศาเซลเซียส) วิเคราะห์ปริมาณสารฟีนอลิก เพื่อศึกษาความคงตัวของสารสำคัญ

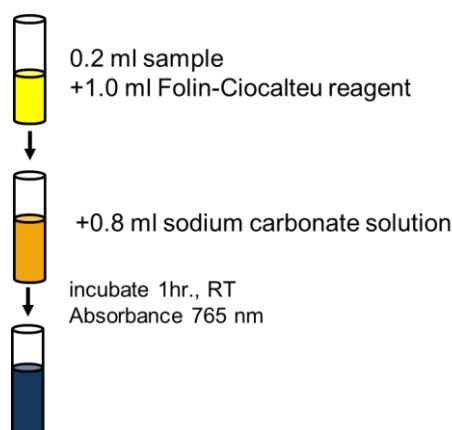
### 3.3 การวิเคราะห์การปนเปื้อนของโลหะหนัก

การวิเคราะห์การปนเปื้อนของโลหะหนัก (determination of the heavy metal contamination) ได้แก่ arsenic (As), lead (Pb), mercury (Hg), cadmium (Cd) และ chromium (Cr) ในสารสกัดสาหร่ายเตาและสาหร่ายไถด้วยเครื่อง Inductive Coupled Plasma Mass Spectrometer (ICP-MS) ยี่ห้อ Agilent รุ่น 7700 Series ICP-MS (Agilent technologies, Germany) โดยมีขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างตามวิธีมาตรฐาน AOAC (2000) ดังนี้ ซึ่งตัวอย่าง 0.2 กรัม แล้วนำไปเผาที่ 500 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง จนได้เถ้าตัวอย่าง จากนั้นละลายเถ้าตัวอย่างด้วย 1 โมลาร์ของกรดไฮโดรคลอริก ปริมาตร 10 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรเป็น 25 มิลลิลิตร ด้วยขวดปรับปริมาตร จากนั้นจึงนำตัวอย่างไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง ICP-MS เปรียบเทียบกับสารมาตรฐานแล้วคำนวณปริมาณโลหะหนักที่ปนเปื้อนในตัวอย่าง

### 3.4 การศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสาหร่ายน้ำจืด

#### 3.4.1 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิก (determination of total phenolic content)

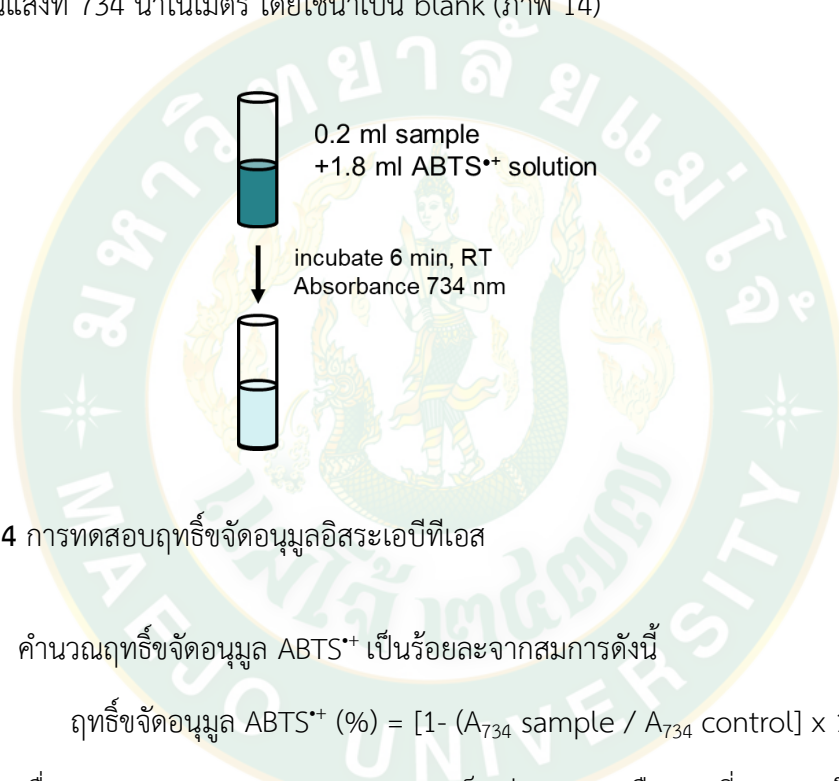
การตรวจวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกในสารสกัดของสาหร่ายเตาและสาหร่ายไถ ด้วยวิธีการของ Hammerschmidt และ Pratt (Hammerschmidt and Pratt, 1978) ดัดแปลงจากวิธี Folin-Ciocalteu method ดังนี้ ผสมสารสกัด 0.2 มิลลิลิตร กับสารละลาย 10% Folin-Ciocalteu 1 มิลลิลิตร และสารละลาย 7.5% โซเดียมคาร์บอเนต 0.8 มิลลิลิตร ที่ส่วนผสมที่ได้ไว้ 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง วัดค่าดูดกลืนแสงที่ 765 นาโนเมตร (ภาพ 13) คำนวณปริมาณสารประกอบฟีนอลิกโดยเทียบกับสารมาตรฐาน คือ กรดแกลลิก (gallic acid) ในหน่วย mg GAE/g extract ซึ่งหมายถึงปริมาณสารประกอบฟีนอลิกในสารสกัด 1 กรัม เมื่อเทียบกับปริมาณ gallic acid เป็นมิลลิกรัม



ภาพ 13 การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิก

### 3.4.2 ฤทธิ์ขจัดอนุมูลอิสระเอบีทีเอส (ABTS<sup>•+</sup> radical scavenging activity assay)

การทดสอบฤทธิ์ขจัดอนุมูลอิสระเอบีทีเอส อ้างอิงตามวิธีการของ Re และคณะ (Re et al., 1999) โดยมีขั้นตอนดังนี้ เตรียมตัวยาคือ 2, 2'-azino-bis 3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid (ABTS) โดยการผสม 7 ไมโครโมลาร์ของ ABTS 5 มิลลิลิตร กับ 140 ไมโครโมลาร์ของ โพแทสเซียมเปอร์ซัลเฟต (K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub>) 88 ไมโครลิตร เก็บในที่มืด 16 ชั่วโมง นำมาเจือจางด้วยน้ำที่ปราศจากไอออน (deionized water) ในการทดสอบฤทธิ์ขจัดอนุมูล ABTS<sup>•+</sup> หยดตัวยาคือ 1.8 มิลลิลิตร ลงในหลอดที่มีสารทดสอบหรือน้ำที่ปราศจากไอออน ผสมให้เข้ากัน ทิ้งไว้ 6 นาที วัดค่าดูดกลืนแสงที่ 734 นาโนเมตร โดยใช้น้ำเป็น blank (ภาพ 14)



ภาพ 14 การทดสอบฤทธิ์ขจัดอนุมูลอิสระเอบีทีเอส

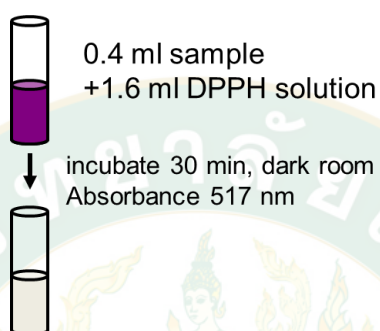
คำนวณฤทธิ์ขจัดอนุมูล ABTS<sup>•+</sup> เป็นร้อยละจากสมการดังนี้

$$\text{ฤทธิ์ขจัดอนุมูล ABTS}^{\bullet+} (\%) = [1 - (A_{734} \text{ sample} / A_{734} \text{ control})] \times 100$$

เมื่อ  $A_{734} \text{ sample}$  และ  $A_{734} \text{ control}$  เป็นค่าการดูดกลืนแสงที่ 734 นาโนเมตร ของสารทดสอบและน้ำที่ปราศจากไอออน ตามลำดับ เปรียบเทียบความเข้มข้นของสารทดสอบในขนาด 1 กรัม กับความเข้มข้นของ Trolox ซึ่งเป็นอนุพันธ์ของวิตามินอี ที่แสดงฤทธิ์เท่ากัน (Trolox equivalent antioxidant capacity, TEAC)

### 3.4.3 ฤทธิ์ขจัดอนุมูลอิสระดีพีพีเอช (DPPH radical scavenging assay)

ฤทธิ์ขจัดอนุมูลอิสระดีพีพีเอช ตามการทดสอบของ Zhang และคณะ (Zhang et al., 2007) โดยผสมสารสกัดสาหร่าย 0.4 มิลลิลิตร กับสารละลายอนุมูลอิสระดีพีพีเอช (DPPH<sup>•</sup>, diphenyl-picrylhydrazyl radical) 1.6 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่มีดเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร (ภาพ 15)



ภาพ 15 การทดสอบฤทธิ์ขจัดอนุมูลอิสระดีพีพีเอช

คำนวณการขจัดอนุมูลอิสระ DPPH สูตรคำนวณได้จากการนำค่าการดูดกลืนแสงที่ลดลงจากการเติมตัวอย่าง เทียบกับค่าการดูดกลืนแสงตั้งต้น ดังนี้

$$\text{DPPH radical scavenging (\%)} = ((A_o - A_s) / A_o) \times 100$$

โดย  $A_o$  และ  $A_s$  คือ ค่าการดูดกลืนแสงเริ่มต้น และค่าการดูดกลืนแสงภายหลังจากเติมสารตัวอย่าง สารมาตรฐานที่ใช้ในการเทียบฤทธิ์ขจัดอนุมูลอิสระดีพีพีเอช คือ กรดแกลลิก

### 3.4.4 ฤทธิ์ขจัดอนุมูลอิสระซูเปอร์ออกไซด์ (superoxide anion scavenging assay)

ฤทธิ์การขจัดอนุมูลซูเปอร์ออกไซด์ ตามวิธีการของ Nishikimi และคณะ (Nishikimi et al., 1972) โดยนำ 156 ไมโครโมลาร์ของสารละลาย nitroblue tetrazolium (NBT) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร และ 468 ไมโครโมลาร์ของสารละลาย nicotinamide adeninedinucleotide (NADH) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมกับสารสกัดสำหรับปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร แล้วเติม 60 ไมโครโมลาร์ของสารละลาย phenazine methosulphate (PMS) ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ทิ้งไว้ 5 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 560 นาโนเมตร (ภาพ 16) โดยใช้กรดแกลลิกเป็นสารมาตรฐาน



ภาพ 16 การทดสอบฤทธิ์ขจัดอนุมูลอิสระซูเปอร์ออกไซด์

### 3.4.5 การวิเคราะห์สารออกฤทธิ์ที่สำคัญด้วยเทคนิค Liquid chromatography-Mass spectroscopy (LC-MS)

การวิเคราะห์องค์ประกอบของสารประกอบฟีนอลิกด้วยเทคนิค LC-MS โดยอ้างอิงวิธีวิเคราะห์ของ Penarrieta และคณะ (Peñarrieta et al., 2007) โดยมีสภาวะที่ใช้ในการวิเคราะห์ดังต่อไปนี้

<b>Column</b>	Zorbax SB C18 150x4.6 mm 5 micron, Agilent technologies USA Column oven: 40 °C Flow: 1.0 mL/min.
<b>Mobile phase</b>	A = Acetonitrile B = 10 mM ammonium formate buffer pH 4 with formic acid 0 – 5 min 100% B 5 – 10 min 0-20% A 10 – 20 min 20% A 20 – 60 min 20-40% A
<b>Detector</b>	Diode array monitor at 270, 330, 350, 370 nm
<b>Mass detector system</b>	
Nebulizer pressure:	60 psi
Gas Nitrogen flow:	13 L/min
Gas temperature:	320 °C
Capillary voltage:	4000 V (positive) 3500 V (negative)
Mass scan:	100-700 m/z
Step size:	0.20
Interface:	API-ES mode

### 3.5 การพัฒนาสูตรผลิตภัณฑ์อาหารสุขภาพชนิดเจลจากสาหร่ายน้ำจืด

#### 3.5.1 การตั้งตำรับพัฒนาผลิตภัณฑ์ (formulation of jelly-functional product)

3.5.1.1 การศึกษาปริมาณสารสกัดสาหร่ายไคที่เหมาะสมต่อการเกิดเจลของผลิตภัณฑ์ต้นแบบ โดยแปรปริมาณสารสกัดสาหร่ายไค 4 ระดับ (1%, 2%, 3% และ 4%) ติดตามผลโดยศึกษาคุณสมบัติทางเนื้อสัมผัสด้วยเครื่อง Texture analyzer เพื่อให้ได้ลักษณะเจลที่เหมาะสม โดยเปรียบเทียบกับผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มชนิดเจลที่มีขายตามท้องตลาด

3.5.1.2 การปรับปรุงสูตรผลิตภัณฑ์ต้นแบบ โดยใช้สารสกัดสาหร่ายไค (RE) และสาหร่ายเตา (SE) เป็นส่วนผสมในผลิตภัณฑ์อาหารสุขภาพชนิดเจล 4 สูตรที่มีการผสมสารสกัดสาหร่ายทั้ง 2 ชนิด (RSE) ในอัตราส่วน 1:1 ที่ระดับความเข้มข้น 4%, 2%, 1% และ 0.5% (ตาราง 7) เพื่อให้ได้รับการยอมรับจากตัวแทนผู้บริโภคชายและหญิงอายุตั้งแต่ 35 ปีขึ้นไป (จำนวน 40 คน ต่อสูตร) โดยใช้สเกลพอดิ (Just About Right scale) รายละเอียดดังภาพ 17 เพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์ต้นแบบ (RSP) สำหรับการทดลองในขั้นต่อไป

ตาราง 7 สูตรผลิตภัณฑ์อาหารสุขภาพชนิดเจล 4 สูตรที่ใช้ทดสอบในอาสาสมัครโดยใช้สเกลพอดิ

สูตรผลิตภัณฑ์	RSE (%)	สารก่อเจล (%)	สารให้ความหวาน (%)
1	4	1	5
2	2	1.2	5
3	1	1.5	5
4	0.5	1.5	7

แบบสอบถามการยอมรับผลิตภัณฑ์อาหารสุขภาพชนิดเจลจากสาหร่ายน้ำจืด			
คำชี้แจง: ให้ทำเครื่องหมายลงในช่องว่าง ก่อนชิมตัวอย่างให้จิบน้ำก่อนชิม			
เพศ..... อายุ.....	การยอมรับ		
รหัสตัวอย่าง.....	อ่อนไป	พอดิ	เข้มไป
ลักษณะปรากฏ (สีของผลิตภัณฑ์)			
กลิ่น (คาว/ฉุน)			
เนื้อสัมผัส (ความนิ่ม/ แข็ง)			
ข้อเสนอแนะ (ถ้ามี) .....ขอขอบคุณค่ะ			

ภาพ 17 แบบสอบถามการยอมรับผลิตภัณฑ์อาหารสุขภาพชนิดเจลจากสาหร่ายน้ำจืดด้วยสเกลพอดิ

### 3.5.2 การทดสอบการยอมรับทางประสาทสัมผัสของผู้บริโภค (Sensory evaluation)

นำผลิตภัณฑ์ต้นแบบ (RSP) ที่ได้รับการยอมรับมาทดสอบการยอมรับทางประสาทสัมผัส ได้แก่ ลักษณะที่ปรากฏ สี กลิ่น รสชาติ เนื้อสัมผัส และการยอมรับโดยรวม ด้วยสเกลความชอบ 9 ระดับ (9-point hedonic scale) ในผู้บริโภคอายุตั้งแต่ 35 ปีขึ้นไป แบ่งเป็นช่วงอายุ ดังนี้ ช่วงอายุ 35-44, 45-54 และ 55 ปีขึ้นไป จำนวนช่วงอายุละ 100-135 คน รวมอาสาสมัครทั้งหมด 390 คน เพื่อทดสอบการยอมรับของผู้บริโภคกลุ่มใหญ่ โดยใช้แบบสอบถามมีรายละเอียดดังภาพ 18

รหัสแบบสอบถาม.....									
อายุ.....เพศ.....									
<b>แบบสอบถามการทดสอบการยอมรับผลิตภัณฑ์อาหารสุขภาพชนิดเจลจากสาหร่ายน้ำจืด</b>									
คำแนะนำ : กรุณาจิบน้ำก่อนการทดสอบตัวอย่าง และประเมินความชอบของท่านในด้านต่างๆ โดยทำเครื่องหมาย ✓ ลงในช่อง									
<b>ลักษณะปรากฏ</b>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	ไม่ชอบมาก อย่างยิ่ง	ไม่ชอบมาก	ไม่ชอบ ปานกลาง	ไม่ชอบ เล็กน้อย	บอกไม่ได้ว่า ชอบหรือไม่	ชอบ เล็กน้อย	ชอบ ปานกลาง	ชอบมาก	ชอบมาก อย่างยิ่ง
<b>กลิ่นรส</b>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	ไม่ชอบมาก อย่างยิ่ง	ไม่ชอบมาก	ไม่ชอบ ปานกลาง	ไม่ชอบ เล็กน้อย	บอกไม่ได้ว่า ชอบหรือไม่	ชอบ เล็กน้อย	ชอบ ปานกลาง	ชอบมาก	ชอบมาก อย่างยิ่ง
<b>เนื้อสัมผัส</b>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	ไม่ชอบมาก อย่างยิ่ง	ไม่ชอบมาก	ไม่ชอบ ปานกลาง	ไม่ชอบ เล็กน้อย	บอกไม่ได้ว่า ชอบหรือไม่	ชอบ เล็กน้อย	ชอบ ปานกลาง	ชอบมาก	ชอบมาก อย่างยิ่ง
<b>ความชอบรวม</b>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	ไม่ชอบมาก อย่างยิ่ง	ไม่ชอบมาก	ไม่ชอบ ปานกลาง	ไม่ชอบ เล็กน้อย	บอกไม่ได้ว่า ชอบหรือไม่	ชอบ เล็กน้อย	ชอบ ปานกลาง	ชอบมาก	ชอบมาก อย่างยิ่ง
ข้อเสนอแนะ (ถ้ามี)									

ภาพ 18 แบบสอบถามการยอมรับผลิตภัณฑ์อาหารสุขภาพชนิดเจลจากสาหร่ายน้ำจืดต้นแบบ

การประเมินความพึงพอใจทางประสาทสัมผัสด้วย 9-point hedonic scale มีเกณฑ์ในการให้คะแนนคือ ชอบมากอย่างยิ่ง = 9 คะแนน ชอบมาก = 8 คะแนน ชอบปานกลาง = 7 คะแนน ชอบเล็กน้อย = 6 คะแนน บอกไม่ได้ว่าชอบหรือไม่ = 5 คะแนน ไม่ชอบเล็กน้อย = 4 คะแนน ไม่ชอบปานกลาง = 3 คะแนน ไม่ชอบมาก = 2 คะแนน ไม่ชอบมากอย่างยิ่ง = 1 คะแนน

### 3.5.3 การศึกษาอายุการเก็บผลิตภัณฑ์ (shelf life)

ศึกษาอายุการเก็บของผลิตภัณฑ์ต้นแบบ โดยทดลองเก็บผลิตภัณฑ์ไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิห้อง ติดตามผลโดยพิจารณาการเปลี่ยนแปลงของลักษณะทางกายภาพ (สี และความคงตัวของผลิตภัณฑ์) จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด (total plate count) ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ และปริมาณสารประกอบฟีนอลิกของผลิตภัณฑ์ จากนั้นนำข้อมูลที่ได้มาใช้ในการประมาณอายุการเก็บของผลิตภัณฑ์

## 3.6 การศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพในการต้านอนุมูลอิสระและการตรวจวัดชีวเคมีในเลือดของหนูขาว

### 3.6.1 สัตว์ทดลอง (Animals)

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

กลุ่มที่ 1 : กลุ่มหนูได้รับอาหารปกติควบคุมและน้ำกลั่น (normal control; NC)

กลุ่มที่ 2 : กลุ่มหนูได้รับอาหารปกติควบคุมและผลิตภัณฑ์ (normal control + product; NP)

กลุ่มที่ 3 : กลุ่มหนูน้ำตาลในเลือดสูงควบคุมและป้อนน้ำกลั่น (diabetes mellitus control; DC)

กลุ่มที่ 4 : กลุ่มหนูน้ำตาลในเลือดสูงและได้รับ RSE ขนาด 500 มก./กก. (diabetes mellitus + RSE; DE)

กลุ่มที่ 5 : กลุ่มหนูน้ำตาลในเลือดสูงและได้รับ RSP ขนาด 500 มก./กก. (diabetes mellitus + algae product; DP)

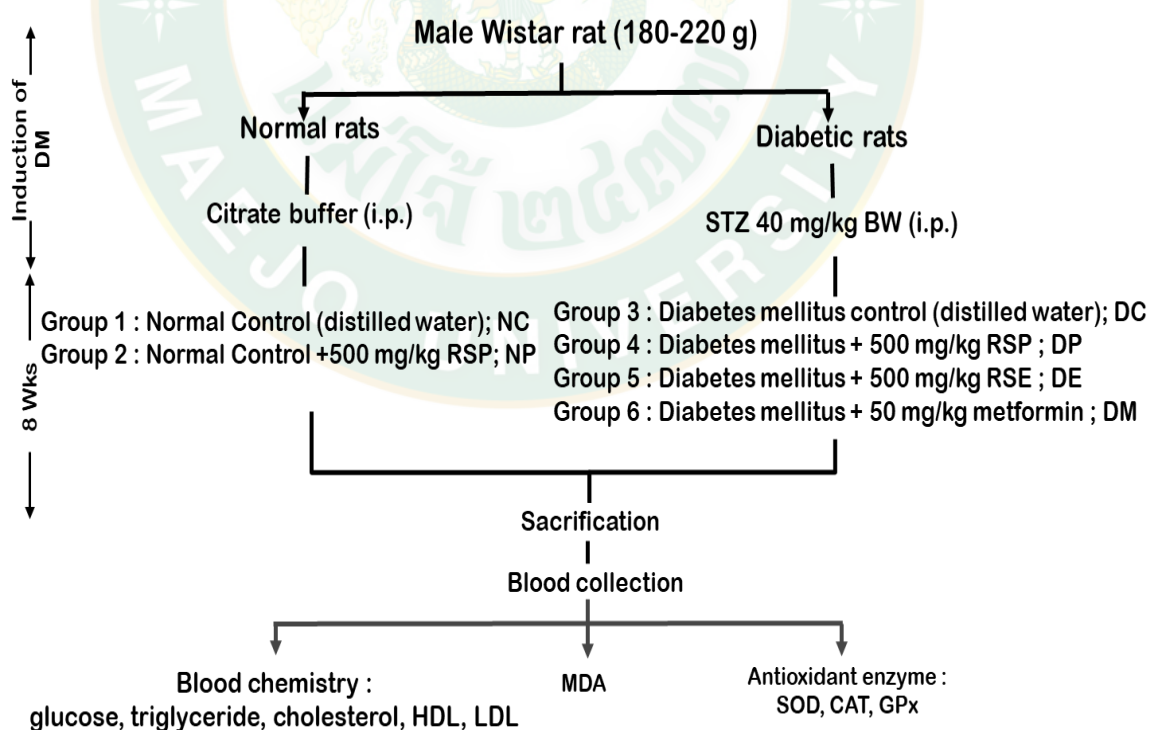
กลุ่มที่ 6 : กลุ่มหนูน้ำตาลในเลือดสูงและได้รับยาลดภาวะเบาหวาน (metformin) ขนาด 50 มก./กก. (diabetes mellitus + metformin; DM)

### 3.6.2 การเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะเบาหวาน (Diabetes induction)

หนูกลุ่มที่ 3-6 จะถูกเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะน้ำตาลในเลือดสูง (hyperglycemia) ด้วยการฉีด streptozotocin เข้าทางช่องท้อง ในขนาด 40 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (Srinivasan et al., 2005) หลังจากนั้น 10 วัน วัดระดับน้ำตาลในเลือดหนู หากมีค่าสูงกว่า 200 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร แสดงถึงการมีภาวะเบาหวาน เมื่อเริ่มป้อนสารทดสอบกลุ่มที่ได้รับการป้อน RSE และเมทฟอร์มิน จะถูกนำมาละลายด้วยน้ำกลั่น โดยจะป้อนในสารเวลา 8.00 น.ของทุกวัน ตลอด 8 สัปดาห์ สัตว์ทดลองทุกกลุ่มจะได้รับอาหารและน้ำอย่างเพียงพอ ทำการบันทึกน้ำหนัก และมีการเก็บตัวอย่างเลือดที่บริเวณปลายหางหนูปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร เพื่อวิเคราะห์ค่าชีวเคมีในพลาสมา ระดับมาลอนไดอัลดีไฮด์ และเอนไซม์ต้านออกซิเดชันต่อไป (ภาพ 19)

### 3.6.3 การวิเคราะห์ทางชีวเคมีในเลือด

การตรวจวัดระดับพลาสมา กลูโคส ไตรกลีเซอไรด์ คอเลสเตอรอลรวม คอเลสเตอรอลชนิด low-density lipoprotein (LDL) และคอเลสเตอรอลชนิด high-density lipoprotein (HDL) โดยใช้เทคนิค enzymatic test โดยใช้ชุดทดสอบ commercial kit



ภาพ 19 แผนการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพสัตว์ทดลอง

### การตรวจวัดระดับน้ำตาล

การตรวจวัดระดับน้ำตาลในพลาสมาโดยนำพลาสมา 3 ไมโครลิตร เติมลงในน้ำยาทดสอบกลูโคส (glucose reagent) ปริมาตร 300 ไมโครลิตร จากนั้นผสมให้เข้ากัน ทิ้งไว้ 5 นาที ก่อนนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 505 นาโนเมตร เทียบกับสารมาตรฐานกลูโคส จากนั้นนำค่าการดูดกลืนแสงมาคำนวณหาปริมาณกลูโคสดังนี้

$$\text{Glucose (mg/dl)} = (\text{Abs. of test/Abs. of calibrator}) \times \text{concentration of calibrator(mg/dl)}$$

### การตรวจวัดไตรกลีเซอไรด์

การตรวจวัดไตรกลีเซอไรด์ (TG) โดยใช้ซีรัมจากเลือดหนูปริมาตร 3 ไมโครลิตร ผสมกับน้ำยาทดสอบปริมาตร 300 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน ทิ้งไว้ 10 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 500 นาโนเมตร นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาคำนวณไตรกลีเซอไรด์ ดังนี้

$$\text{Serum triglyceride (mg/dl)} = (\text{Abs. of test} / \text{Abs. of standard}) \times 200$$

โดย Abs. of test และ Abs. of standard คือ ค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างและสารมาตรฐาน 200 คือ ค่าความเข้มข้นของสารมาตรฐาน (mg/dl)

### การตรวจวัดคอเลสเตอรอล

การตรวจวัดคอเลสเตอรอล (CHOL) มีวิธีการดังนี้ใช้ซีรัมจากเลือดหนูปริมาตร 3 ไมโครลิตร ผสมกับน้ำยาทดสอบปริมาตร 300 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน ทิ้งไว้ 15 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 505 นาโนเมตร นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาคำนวณ ดังนี้

$$\text{Cholesterol (mg/dl)} = (\text{Abs. of test} / \text{Abs. of standard}) \times C_s$$

โดย Abs. of test และ Abs. of standard คือ ค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างและสารมาตรฐาน  $C_s$  คือ ค่าความเข้มข้นของสารมาตรฐาน (mg/dl)

### การตรวจวัดคอเลสเตอรอลชนิดเอชดีแอลและแอลดีแอล

การตรวจวัดคอเลสเตอรอลชนิดเอชดีแอล (HDL) และแอลดีแอล (LDL) ใช้ซีรัมจากเลือดหนู วิเคราะห์โดยใช้เครื่อง Mindray BS-380 (Shenzhen, China)

3.6.4 การตรวจวัดระดับมาลอนไดอัลดีไฮด์ในพลาสมาด้วยปฏิกิริยาของกรดไทโอบาร์บิทูริก (Thiobarbituric acid reaction substance assay หรือ TBARS assay)

การวัดปริมาณมาลอนไดอัลดีไฮด์ (Malondialdehyde; MDA) ในพลาสมา เพื่อประเมินภาวะ oxidative stress จากปฏิกิริยาลิพิดเปอร์ออกซิเดชัน (lipid peroxidation) โดยนำ

เลือดตัวอย่างมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000g เก็บพลาสมา มาทำปฏิกิริยากับน้ำยาทดสอบสำเร็จรูป (TBARS assay kit, Cayman chemical, USA) ดังนี้ ผสมตัวอย่างทดสอบ 100 ไมโครลิตร และ สารละลาย sodium dodecyl sulfate (SDS) 100 ไมโครลิตร ให้เข้ากัน เติม color reagent 4 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปต้มที่ 100 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง นำตัวอย่างมาวางบนน้ำแข็งนาน 10 นาที ก่อนนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 1,600g อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที แล้วนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร และวัดเทียบหาความเข้มข้นจากกราฟมาตรฐาน

### 3.6.5 การวิเคราะห์เอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระ

#### 3.6.5.1 การวิเคราะห์เอนไซม์ superoxide dismutase (SOD) activity

การวัดระดับการทำงานของเอนไซม์ SOD ในเม็ดเลือดแดงตามวิธีการของ Concetti et al. (1976) วัดผลการยับยั้งการสร้างอนุมูลซูเปอร์ออกไซด์แอนไอออน ( $O_2^{\bullet-}$ ) โดยนำตัวอย่างทดสอบ 10 ไมโครลิตร ผสมกับ radical detector ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ให้เข้ากัน จากนั้นนำมาทำปฏิกิริยากับ xanthine oxidase 20 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 30 นาที แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 460 นาโนเมตร

#### 3.6.5.2 การวิเคราะห์เอนไซม์ catalase (CAT) activity

การวัดเอนไซม์ catalase ตามวิธีการของ Johnson et al. (1972) โดยใช้ตัวอย่างทดสอบ 20 ไมโครลิตร มาทำปฏิกิริยากับไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 20 ไมโครลิตร บ่มและเขย่านาน 20 นาทีที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นเติมโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ 30 ไมโครลิตร และ catalase purpald (Chromogen) 30 ไมโครลิตร บ่มและเขย่านาน 10 นาที แล้วเติม catalase potassium periodate 10 ไมโครลิตร บ่มและเขย่าต่ออีก 5 นาที แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร

#### 3.6.5.3 การวัดเอนไซม์กลูต้าไทโอนเปอร์ออกซิเดส (glutathione peroxidase, GPx)

นำตัวอย่างทดสอบ 20 ไมโครลิตร ทำปฏิกิริยากับ co-substrate mixture 20 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน เติม cumene hydroperoxide 20 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 340 นาโนเมตร เพื่อคำนวณหาค่า GPx activity

### สถิติที่ใช้ในการวิเคราะห์

ข้อมูลการวิจัยฤทธิ์ขจัดอนุโมลอิสระและปริมาณสารประกอบฟีนอลิก จะถูกแสดงในรูปค่าเฉลี่ย  $\pm$  ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (mean  $\pm$  S.D.) ข้อมูลการวิจัยในสัตว์ทดลองจะถูกแสดงในรูปค่าเฉลี่ย  $\pm$  ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานการวัด (mean  $\pm$  S.E.) การวิเคราะห์ความแตกต่างของกลุ่มทดลอง ใช้ One-Way ANOVA ตามด้วย Post Hoc Test ของ Duncan

### สถานที่ทดลองและเก็บข้อมูล

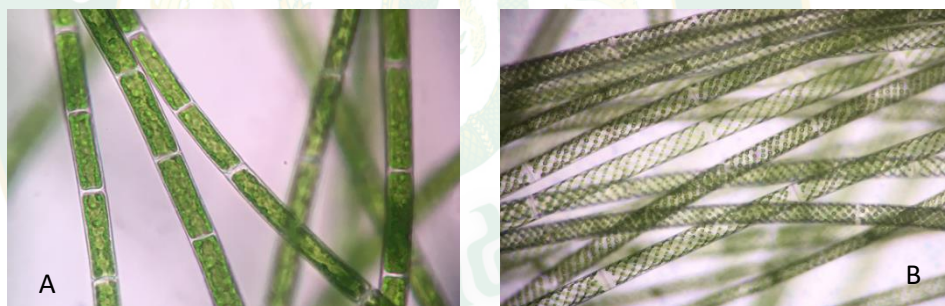
- 1) ห้องปฏิบัติการกลาง คณะเทคโนโลยีการประมงและทรัพยากรทางน้ำ มหาวิทยาลัยแม่โจ้
- 2) ห้องปฏิบัติการกลาง คณะวิศวกรรมและอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้
- 3) ภาควิชาสรีรวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
- 4) กาดแม่โจ้ 2477 ตลาดสินค้าเกษตรปลอดภัย มหาวิทยาลัยแม่โจ้
- 5) งานเกษตรแม่โจ้ 85ปี มหาวิทยาลัยแม่โจ้

## บทที่ 4

### ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง

#### 4.1 การเตรียมวัตถุดิบและการเตรียมสารสกัด

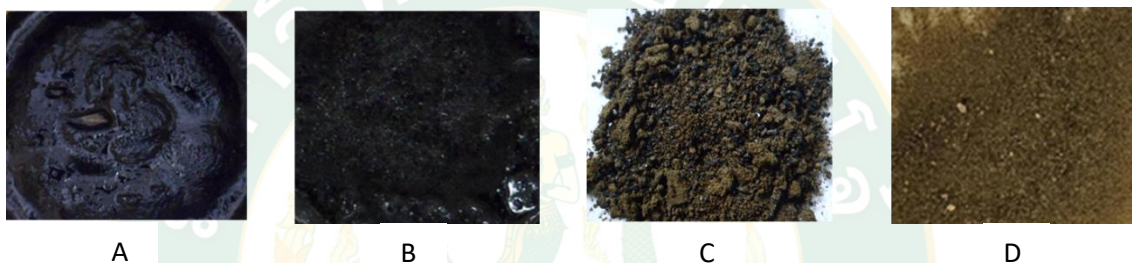
สาหร่ายไถ (*Rhizoclonium hieroglyphicum* (C. Agardh) Kützing) จากแม่น้ำน่าน ตำบลท่าวังผา จังหวัดน่าน และสาหร่ายเตา (*Spirogyra neglecta* (Hassall) Kützing) จากบ้านนาคูหา อำเภอเมือง จังหวัดแพร่ สาหร่ายแต่ละชนิดนำมาพิสูจน์เอกลักษณ์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (ภาพ 20) โดยสาหร่ายไถ (A) มีลักษณะเป็นเส้นสายไม่แตกแขนง เซลล์สีเขียวรูปทรงกระบอก ผันเซลล์หนา แบ่งเป็นชั้นๆ และผนังตามยาวมีลักษณะเป็นตัว “H” ส่วนสาหร่ายเตา (B) จะมีลักษณะเป็นเส้นสายยาว ไม่แตกแขนง เซลล์สีเขียวรูปทรงกระบอก ผันเซลล์มีเมือกหุ้ม คลอโรพลาสต์บิดเป็นเกลียว คล้ายริบบิ้นอยู่ทั่วเซลล์ (Peerapornpisal, 2013)



ภาพ 20 ลักษณะเซลล์ของสาหร่ายไถ (A) และสาหร่ายเตา (B) ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 400 เท่า

จากรายงานผลการศึกษาชนิดของตัวทำละลายที่เหมาะสมในการสกัดสารสำคัญกลุ่มฟีนอลิกจากสาหร่ายเตา โดยใช้เมทานอลและน้ำ จะให้ปริมาณสารสกัดและสารฟีนอลิกที่สูงกว่าตัวทำละลายอื่น (Janthip, 2013) ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้จึงได้ใช้ตัวทำละลาย 4 ชนิด ได้แก่ เฮกเซน อะซิโตน เอทานอล และน้ำ (90 °C) สกัดสารสำคัญในสาหร่ายไถ เพื่อหาตัวทำละลายที่เหมาะสม และทำให้แห้งด้วยวิธีแบบเยือกแข็ง (freeze dry) ได้สารสกัดหยาบปริมาณร้อยละผลผลิตสารสกัด (%yield) เท่ากับ 1.34, 2.17, 6.71 และ 46.97% ตามลำดับ โดยลักษณะสารสกัดสาหร่ายไถด้วยเฮกเซน (ภาพ 21A) และอะซิโตน (ภาพ 21B) มีลักษณะเหนียวข้นหนืด มีสีเขียวเข้ม ส่วนสารสกัดด้วยเอทานอลมีลักษณะเป็นผงแห้งสีเขียวเข้ม (ภาพ 21C) และสารสกัดด้วยน้ำมีลักษณะเป็นผงแห้งสีน้ำตาล

เข้ม (ภาพ 21D) ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดทั้ง 4 ชนิด ด้วยวิธีการขจัดอนุมูลอิสระเอบีทีเอส (ABTS radical scavenging activity) พบว่า สารสกัดสาหร่ายไคด้วยน้ำ มีความสามารถในการขจัดอนุมูลอิสระสูง ส่วนสารสกัดสาหร่ายไคด้วยเอทานอลมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกสูงกว่าตัวทำละลายชนิดอื่น (ตาราง 8) จากผลการศึกษานี้พบว่า การสกัดสาหร่ายไคด้วยน้ำและเอทานอล ซึ่งเป็นตัวทำละลายที่มีขั้วสูง ให้ผลเช่นเดียวกับการสกัดสาหร่ายเตา แต่เมื่อนำสารสกัดมาละลายด้วยน้ำพบว่า สารสกัดด้วยน้ำสามารถละลายน้ำได้ดีมากกว่าและให้ร้อยละสารสกัดสูง รวมถึงมีความปลอดภัยหากนำมาใช้เป็นส่วนประกอบในอาหาร ดังนั้นการศึกษาคั้งนี้ จึงใช้น้ำเป็นตัวทำละลายในการสกัดสาหร่ายไคและสาหร่ายเตา



ภาพ 21 สารสกัดสาหร่ายไคด้วยเฮกเซน (A) อะซิโตน (B) เอทานอล (C) และน้ำ (D)

ตาราง 8 ปริมาณสารสกัด (%yield) ฤทธิ์ขจัดอนุมูลอิสระเอปทีเอส และปริมาณสารประกอบฟีนอลิกของสารสกัดสาหร่ายไถ (*R. hieroglyphicum*)

สารสกัด	ปริมาณสารสกัด (%)	ฤทธิ์การขจัดอนุมูลอิสระเอปทีเอส (mM TEAC/ g extract)	ปริมาณสารประกอบฟีนอลิก (mg GAE/ g extract)
<i>S. neglecta</i> *			
เมทานอล	35.77	10,456.68 ± 203.76	346.58 ± 1.16
น้ำ	49.40	1,916.58 ± 46.32	589.77 ± 1.18
<i>R. hieroglyphicum</i>			
เฮกเซน	1.34	0.00 ± 0.00 <sup>a</sup>	1.30 ± 0.00 <sup>a</sup>
อะซีโตน	2.17	119.14 ± 4.99 <sup>b</sup>	3.85 ± 0.06 <sup>b</sup>
เอทานอล	6.71	141.40 ± 8.44 <sup>c</sup>	7.37 ± 0.40 <sup>c</sup>
น้ำ	46.97	600.16 ± 12.66 <sup>d</sup>	4.16 ± 0.15 <sup>b</sup>

หมายเหตุ \* Janthip (2013)

ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (mean ± S.D), n=3

อักษรที่ต่างกันในคอลัมน์เดียวกัน มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ )

จากการสกัดด้วยตัวทำละลายที่เรียงตามความสามารถในการละลายน้ำ (polarity) สรุปได้ว่า น้ำเป็นตัวทำละลายที่เหมาะสมโดยให้ปริมาณสารสกัดสูง มีค่าใช้จ่ายต่ำ ให้ปริมาณสารออกฤทธิ์และมีฤทธิ์ทางชีวภาพในการต้านอนุมูลอิสระได้ดี ได้ปริมาณสารสกัดน้ำสาหร่ายไถ (RE) และสาหร่ายเตา (SE) คิดเป็นเปอร์เซ็นต์สารสกัดที่ได้ (%yield) เท่ากับ 46.97% และ 35.51% ของน้ำหนักสาหร่ายแห้ง ตามลำดับ โดยสารสกัดสาหร่ายไถมีลักษณะเป็นผงแห้งสีน้ำตาลเข้ม (ภาพ 22A) ส่วนสารสกัดสาหร่ายเตาเป็นผงแห้งสีเขียวเข้ม (ภาพ 22B)



ภาพ 22 ลักษณะสาหร่ายไถแห้งและสารสกัดน้ำสาหร่ายไถ (A) และสาหร่ายเตาแห้งและสารสกัดน้ำสาหร่ายเตา (B)

#### 4.2 การวิเคราะห์การปนเปื้อนของโลหะหนักในสาหร่ายไถและสาหร่ายเตา

สารสกัดสาหร่ายด้วยน้ำ RE และ SE ถูกนำมาวิเคราะห์การปนเปื้อนโลหะหนัก ได้แก่ สารหนู (arsenic; As) ตะกั่ว (lead; Pb)ปรอท (mercury; Hg) แคดเมียม (cadmium; Cd) และโครเมียม (chromium; Cr) ด้วยเทคนิค ICP-MS พบว่า สารสกัดสาหร่ายทั้ง 2 ชนิด ไม่พบการปนเปื้อนของโลหะหนักดังกล่าว (ตาราง 9) และตามเกณฑ์การยอมรับของสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา (อย.) อ้างอิงประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 98 (พ.ศ.2529) ฉบับที่ 273 พ.ศ. 2546 และฉบับปรับปรุง พ.ศ. 2562 เรื่องมาตรฐานอาหารที่มีสารปนเปื้อน จึงเป็นการยืนยันได้ว่าสารสกัดสาหร่ายทั้ง 2 ชนิดที่สกัดด้วยน้ำมีความปลอดภัย สามารถนำมาใช้เป็นส่วนผสมของผลิตภัณฑ์ได้

ตาราง 9 การวิเคราะห์การปนเปื้อนของโลหะหนักในสารสกัดสาหร่ายไถ (RE) และสาหร่ายเตา (SE)

โลหะหนัก	ปริมาณ (มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม)		
	เกณฑ์ยอมรับของ อย.	RE	SE
สารหนู (arsenic; As),	<2	ไม่พบ	ไม่พบ
ตะกั่ว (lead; Pb),	<1	ไม่พบ	ไม่พบ
ปรอท (mercury; Hg),	<0.5	ไม่พบ	ไม่พบ
แคดเมียม (cadmium; Cd)	<2	ไม่พบ	ไม่พบ
โครเมียม (chromium; Cr)	<2	ไม่พบ	ไม่พบ

หมายเหตุ n=3

สาหร่ายไถในธรรมชาติ โดยทั่วไปจะพบมากในช่วงฤดูหนาว และต้นฤดูร้อน หรือจะพบมากประมาณ 4-5 เดือนเท่านั้นในหนึ่งปี อย่างไรก็ตามปริมาณผลผลิตของสาหร่ายไถช่วงเวลาที่พบในแต่ละปีจะขึ้นอยู่กับสภาพของสิ่งแวดล้อมโดยเฉพาะความชุ่มชื้น และอุณหภูมิของลำน้ำ ซึ่งมีผลสำหรับการสังเคราะห์แสง การเจริญเติบโตของสาหร่ายไถจะอาศัยกระบวนการสังเคราะห์แสงเป็นหลัก ดังนั้นการเก็บผลผลิตจากสาหร่ายไถจึงไม่สามารถทำได้อย่างสม่ำเสมอ จึงต้องมีการเก็บสาหร่ายไถในช่วงฤดูกาลที่มีสาหร่ายไถ เพื่อใช้ทดแทนช่วงฤดูที่มีสาหร่ายไถจำนวนน้อยลง ดังนั้นจึงได้ศึกษาคุณภาพของสาหร่ายไถที่เก็บไว้นาน 12 เดือนเพื่อให้มีวัตถุดิบเพียงพอสำหรับการผลิตผลิตภัณฑ์ต่างๆ ได้ทั้งปี ซึ่งพบว่าสาหร่ายไถ (K0) และสาหร่ายไถที่เก็บไว้นาน 12 เดือน (K12) ยังมีคุณค่าทางโภชนาการ และปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด แตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ (ตาราง 10) แม้จะมีการเปลี่ยนแปลงของสีสาหร่ายแห้ง (K0, K12) และสีของสารสกัด (KA0, KA12) ก็ตาม (ภาพ 23)

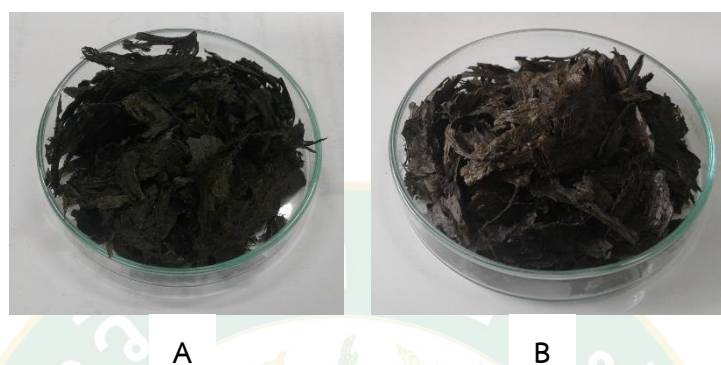


ภาพ 23 ลักษณะสาหร่ายไถแห้งปี 2559 (K0) สาหร่ายไถแห้งปี 2559 ที่ไว้นาน 12 เดือน (K12) สารสกัดสาหร่ายไถปี 2559 (KA0) และสารสกัดสาหร่ายไถแห้งปี 2559 ที่ไว้นาน 12 เดือน (KA12)

ดังนั้นในการเก็บรักษาสาหร่ายไถแห้งในระยะเวลา 12 เดือน มีการเปลี่ยนแปลงสีของสาหร่าย แต่ไม่ส่งผลต่อปริมาณคุณค่าทางโภชนาการ ปริมาณสารประกอบฟีนอลิก และฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ การนำสาหร่ายไถแห้งไปพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์อาหารสุขภาพได้ก่อนถึงฤดูกาลเก็บเกี่ยวถัดไป

ส่วนการเก็บรักษาสาหร่ายเตา ในสภาวะที่บดแสง ปิดสนิท ไม่มีความชื้น เก็บที่อุณหภูมิห้อง เช่นเดียวกับการเก็บรักษาสาหร่ายไถ พบว่า สาหร่ายเตาแห้ง (ภาพ 23A) และสาหร่ายเตาแห้งที่เก็บไว้นาน 12 เดือน (ภาพ 23B) ไม่มีการเปลี่ยนแปลงของสีเมื่อดูด้วยตาเปล่า และเมื่อนำสาหร่ายเตาแห้งไปสกัดด้วยน้ำ แล้ววิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกในสารสกัด พบว่า มีความแตกต่างอย่าง

ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p > 0.05$ ) ดังตาราง 10 แสดงให้เห็นว่า การเก็บสาหร่ายไคและสาหร่ายเตาในสภาวะดังกล่าว จะทำให้เก็บวัตถุดิบได้นาน 12 เดือน โดยไม่มีการเปลี่ยนแปลงของสารสำคัญทางสถิติ ซึ่งจะเป็นประโยชน์ต่อการจัดเก็บวัตถุดิบให้เพียงพอต่อการผลิตผลิตภัณฑ์ได้ทั้งปี



ภาพ 24 ลักษณะสาหร่ายเตาแห้งปี 2559 (A) สาหร่ายเตาแห้งปี 2559 ที่ไว้นาน 12 เดือน (B)

ตาราง 10 เปรียบเทียบปริมาณสารประกอบฟีนอลิกของสารสกัดสาหร่ายไค (RE) และสาหร่ายเตา (SE) ที่เก็บไว้นาน 12 เดือน

ระยะเวลาเก็บรักษา <sup>ns</sup>	ปริมาณสารประกอบฟีนอลิก (mg GAE/g extract)	
	RE	SE
เดือนที่ 0	6.16 ± 0.11	107.02 ± 1.03
เดือนที่ 12	5.97 ± 0.11	105.03 ± 1.81

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบน (mean ± S.D), n=3

<sup>ns</sup> ระยะเวลา (เดือนที่ 0, 12) มีผลให้เกิดความแตกต่างอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p > 0.05$ )

### 4.3 การศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสาหร่ายน้ำจืด

#### 4.3.1 การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกและปริมาณ isoquercetin

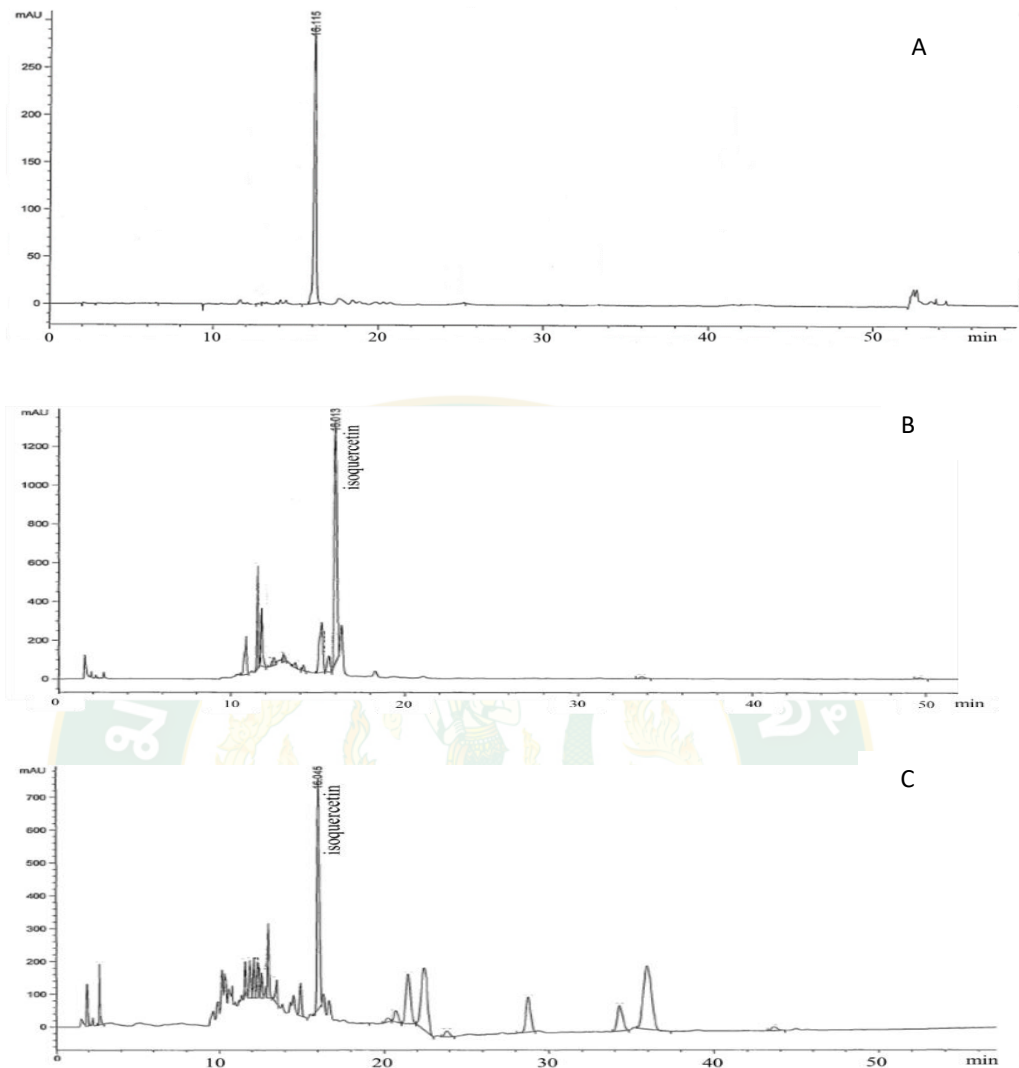
สารประกอบฟีนอลิกสามารถพบได้ในพืชหลายชนิด เช่น ผัก ผลไม้ มีสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (Pourmorad et al., 2006) มีฤทธิ์ทางชีวภาพหลายอย่าง เช่น ต้านแบคทีเรีย ต้านไวรัส ต้านการอักเสบและเพิ่มภูมิคุ้มกันให้กับร่างกาย (Ghasemzadeh and Jaafar, 2011) และจากรายงานการวิจัยสารสกัดสาหร่ายเตาและสาหร่ายไคด้วยน้ำ พบว่ามีสารประกอบฟีนอลิกที่มีฤทธิ์ต้าน

อนุมูลอิสระเป็นองค์ประกอบ โดยมีสาร gallic acid, eriodictyol, kaempferol, quercetin, hydroquinin, rutin, catechin, tannic acid และ isoquercetin ซึ่งพบในปริมาณมากที่สุดในการสกัดทั้ง 2 ชนิด (ตาราง 11) ในการศึกษาครั้งนี้ได้วิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมของ RE และ SE พบว่ามีสารประกอบฟีนอลิกรวมในปริมาณ 8.58 และ 107.02 mg GAE/g extract ตามลำดับ และเมื่อวิเคราะห์ปริมาณ isoquercetin ในสารสกัด RE และ SE ด้วยเทคนิค LC-MS (liquid chromatography mass spectrometer) พบว่ามีปริมาณ 264 และ 288 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมสารสกัด (ภาพ 25) จะเห็นได้ว่า SE มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมที่สูงกว่า RE ถึง 12 เท่า ส่งผลให้มีปริมาณ isoquercetin ที่สูงกว่าด้วย

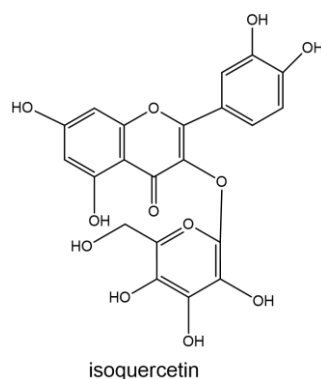
**ตาราง 11** ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกแต่ละชนิดที่พบในสารสกัด SE และ RE ด้วยเทคนิค HPLC

Polyphenolic compounds	ปริมาณ (มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม)	
	SE	RE
gallic acid	565.29	578.25
eriodictyol	347.68	Not detected
isoquercetin	5500.44	7875.57
kaempferol	621.40	138.55
quercetin	386.73	1014.58
hydroquinin	1118.32	1086.89
rutin	700.40	629.85
catechin	3531.08	2196.34
tannic acid	548.91	1278.03

จากการวิเคราะห์ SE และ RE ด้วยเทคนิค LC-MS พบสารประกอบฟีนอลิกชนิด isoquercetin (quercetin-3-glucoside) แสดงผลโครมาโทแกรมดังภาพ 25 นอกจากนี้คุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระแล้ว ยังสามารถช่วยลดระดับคอเลสเตอรอลและไตรกลีเซอไรด์ได้อีกด้วย (Huang et al., 2017; Zhang et al., 2007) โครงสร้างพื้นฐานของ isoquercetin (ภาพ 26) จะมีโครงสร้างของวงอะโรมาติกเชื่อมต่อกัน จากตาราง 11 จะเห็นได้ว่า isoquercetin เป็นสารฟีนอลิกที่พบในปริมาณสูงกว่าสารชนิดอื่น ดังนั้นสาร isoquercetin สามารถใช้เป็นสารมาตรฐานของสารสกัดสำหรับยาและอาหารยา เพื่อใช้กำหนดคุณภาพของสารสกัดก่อนจะนำไปพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์อื่นๆ ต่อไป



ภาพ 25 โครมาโทแกรมของสารมาตรฐาน isoquercetin (A) และ isoquercetin ของ SE (B) และ RE (C) ด้วยเทคนิค LC-MS



ภาพ 26 โครงสร้างเคมีของ isoquercetin

ตาราง 12 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิก ปริมาณ isoquercetin ฤทธิ์ขจัดอนุมูลอิสระเอบีทีเอส และค่า Water activity ของสารสกัดสาหร่ายเตา (SE) และสารสกัดสาหร่ายไถ (RE)

การทดสอบ	สารสกัด	
	SE	RE
ปริมาณสารประกอบฟีนอลิก (mg GAE/ g extract)	107.02 ± 1.03	8.58 ± 0.10
ปริมาณ isoquercetin (mg/ kg extract)	288	264
ฤทธิ์ขจัดอนุมูลอิสระเอบีทีเอส (mM TEAC/ g extract)	379.01 ± 3.08	4.95 ± 0.08
ค่า Water activity ( $a_w$ )	0.106 ± 0.002	0.103 ± 0.001

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (mean ± S.D), n=3

จากรายงานการวิจัยของสาหร่ายเตาและสาหร่ายไถที่มีมาก่อนหน้านี้ พบว่า สาหร่ายเตาและสาหร่ายไถที่ระดับความเข้มข้น 1,000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม สามารถลดระดับน้ำตาลในหนูขาวที่มีภาวะเบาหวานได้ (Lailerd et al., 2009; Srimaroeng et al., 2015) ดังนั้นในการพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหารสุขภาพจากสาหร่ายทั้ง 2 ชนิด จึงได้นำเอาสารสกัดไถ 1,000 มิลลิกรัมและสาหร่ายเตา 1,000 มิลลิกรัมมาผสมกัน โดยอาศัยคุณสมบัติการก่อเจลที่ดีจากสาหร่ายไถ และฤทธิ์ทางชีวภาพในการลดระดับน้ำตาลจากสาหร่ายเตาและสาหร่ายไถ เพื่อให้ได้ประสิทธิภาพการออกฤทธิ์ของสารสกัดที่ดีขึ้นกว่าการใช้สาหร่ายเพียงชนิดเดียว แล้วนำไปวิเคราะห์ฤทธิ์ทางชีวภาพก่อนนำไปพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์

#### 4.3.2 การศึกษาฤทธิ์ชีวภาพของสารสกัดผสม

การศึกษาฤทธิ์ชีวภาพของสารสกัดผสม RSE โดยการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิก พบว่า มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิก 42.31 mg GAE/ g extract เมื่อเปรียบเทียบกับ RE พบว่า RSE จะให้ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกที่สูงกว่า 6 เท่า จากการทดสอบความสามารถในการขจัดอนุมูลอิสระเอบีทีเอส ดีพีพีเอช และซูเปอร์ออกไซด์ ดังแสดงในตาราง 13 และ 14 แสดงให้เห็นว่า RSE มีฤทธิ์ขจัดอนุมูลอิสระเอบีทีเอสที่เพิ่มสูงขึ้นมากกว่า RE และ SE เพียงชนิดเดียว

**ตาราง 13** ฤทธิ์ขจัดอนุมูลอิสระของสารสกัดผสม RSE

การทดสอบ	ค่าการขจัดอนุมูลอิสระ
ฤทธิ์ขจัดอนุมูลอิสระเอบีทีเอส (mM TEAC/ g extract)	1,115.28 ± 23.11
ฤทธิ์ขจัดอนุมูลอิสระดีพีพีเอช (mg GAE/ g extract)	33.17 ± 0.62
ฤทธิ์ขจัดอนุมูลอิสระซูเปอร์ออกไซด์ (mg GAE/ g extract)	139.44 ± 3.39

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (mean ± S.D), n=3

**ตาราง 14** ปริมาณสารประกอบฟีนอลิก และฤทธิ์ขจัดอนุมูลอิสระเอบีทีเอส ของสารสกัดสาหร่ายเตา (SE) สารสกัดสาหร่ายไก่อ (RE) และสารสกัดผสม RSE

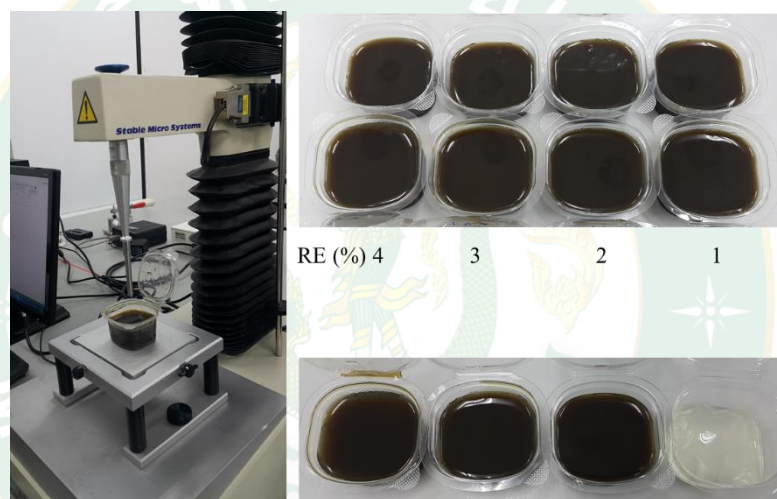
ฤทธิ์ทางชีวภาพ	SE	RE	RSE
ปริมาณสารประกอบฟีนอลิก (mg GAE/ g extract)	107.02 ± 1.03	8.58 ± 0.10	42.31 ± 0.30
ฤทธิ์ขจัดอนุมูลอิสระเอบีทีเอส (mM TEAC/ g extract)	379.01 ± 3.08	4.95 ± 0.08	1,115.28 ± 23.11

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (mean ± S.D), n=3

จากรายงานการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสาหร่ายเตายังพบว่า สามารถต้านการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมัน และอนุมูลอิสระไฮดรอกซิล และอนุมูลซูเปอร์ออกไซด์ (Peerapornpisal et al., 2012) อนุมูลซูเปอร์ออกไซด์ เป็นอนุมูลอิสระที่พบได้ในร่างกายที่เป็นสาเหตุของการเกิดภาวะ oxidative stress เข้าไปทำลายเซลล์ในร่างกายจนนำไปสู่การเกิดโรคได้ (Rahman et al., 2012) ดังนั้นการผสมสารสกัดสาหร่ายเป็นสูตร RSE ได้เป็นสารสกัดที่มีคุณสมบัติการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่มีประโยชน์ต่อร่างกาย และสามารถนำไปพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์อาหารสุขภาพได้

#### 4.4 การพัฒนาสูตรผลิตภัณฑ์อาหารสุขภาพชนิดเจล

การพัฒนาสูตรผลิตภัณฑ์เริ่มจากการหาปริมาณสารสกัดสาหร่ายไวกที่สามารถก่อเจลได้ โดยใช้ลักษณะเจลของผลิตภัณฑ์ตามท้องตลาด (ยี่ห้อเจเล่) เป็นต้นแบบ เนื่องจากเป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้รับ ความนิยมในตลาดทั่วไป โดยนำมาวัดค่าความแข็งของผลิตภัณฑ์ด้วยเครื่อง Texture analyzer (ภาพ 26) พบว่า มีค่า  $45.41 \pm 6.11\text{g}$  จากนั้นนำสารสกัดสาหร่ายไวก (RE) ที่ระดับความเข้มข้น 1-4% (ภาพ 27) โดยสารสกัดที่สามารถก่อเจลได้ คือ ที่ความเข้มข้น 4% RE แต่เมื่อนำไปวัดความแข็งของ เจล พบว่า ไม่สามารถวัดค่าได้ ดังนั้นจำเป็นต้องใช้สารก่อเจลเป็นส่วนผสม เพื่อให้ได้ลักษณะเจลที่ดี ขึ้น

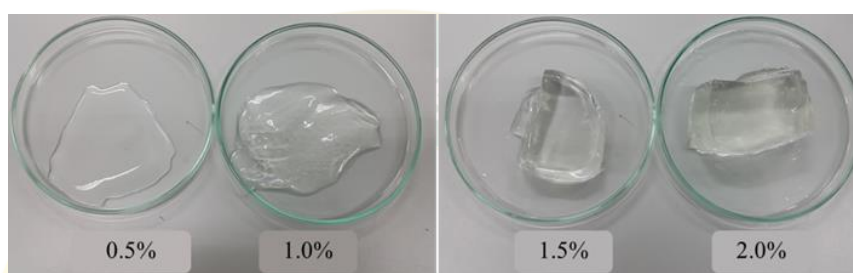


ภาพ 27 การวัดเนื้อสัมผัสของสารสกัดสาหร่ายไวก (RE) ด้วยเครื่อง Texture analyzer



ภาพ 28 ลักษณะการก่อเจลของสารสกัดสาหร่ายไวกที่ความเข้มข้นระดับต่างๆ

ในการพัฒนาสูตรผลิตภัณฑ์อาหารสุขภาพชนิดเจล ใช้คาราจีแนนเป็นวัตถุเจือปนอาหาร ที่ทำให้เกิดเจล ทำให้อาหารมีเนื้อสัมผัสเพิ่มขึ้น คาราจีแนนเป็นสารก่อเจลที่นิยมนำมาใช้เป็นส่วนผสม ในอาหารหลายชนิด (Hotchkiss et al., 2016) ผลการศึกษาลักษณะการก่อเจลของคาราจีแนนใน ระดับความเข้มข้นต่างๆ มีลักษณะดังภาพ 29 แต่เนื่องจากในสารสกัดสาหร่ายไก่อมีลักษณะเป็นเจล ดังนั้นในการพัฒนาสูตรจึงเลือกปรับความเข้มข้นของคาราจีแนน ที่ใช้เป็นส่วนผสมจากน้อยไปมาก (0.5-2.0%) เติมลงในสูตรผลิตภัณฑ์จนได้ความเข้มข้นที่เหมาะสม



ภาพ 29 ลักษณะการก่อเจลของคาราจีแนนที่ความเข้มข้นระดับต่างๆ

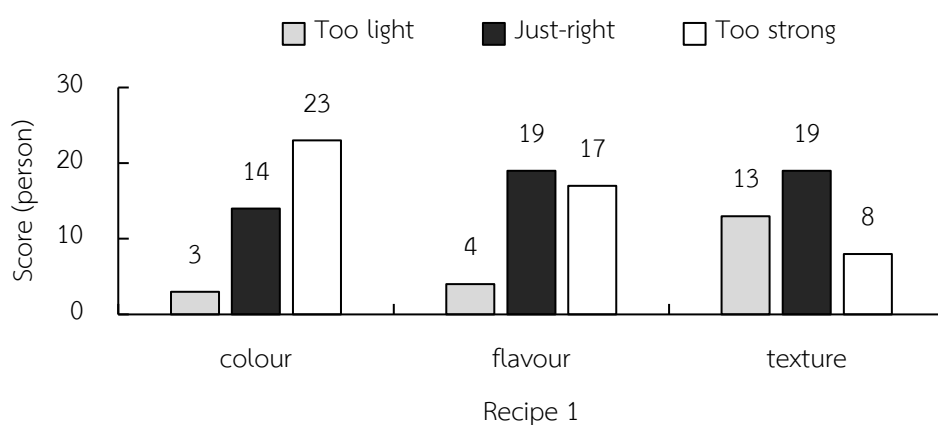
#### 4.4.1 การทดสอบการยอมรับผลิตภัณฑ์ด้วย Just About Right scale (JAR scale)

การทดสอบระดับความเข้มข้นของสารสกัดสาหร่ายไก่อและสาหร่ายเตาสูตรผสมอัตราส่วน 1:1 (RSE) ที่ 4% (Recipe 1), 2% (Recipe2), 1% (Recipe3) และ 0.5% (Recipe 4) ในผลิตภัณฑ์ อาหารสุขภาพชนิดเจลจากสาหร่าย (ภาพ 30) โดยใช้ JAR scale เพื่อพัฒนาสูตรผลิตภัณฑ์ให้เป็นที่ ยอมรับของผู้บริโภค โดยนำแต่ละสูตรไปทดสอบในอาสาสมัครเพศชายและหญิงที่มีอายุตั้งแต่ 35-50 ปี จำนวน 40 คนต่อสูตร

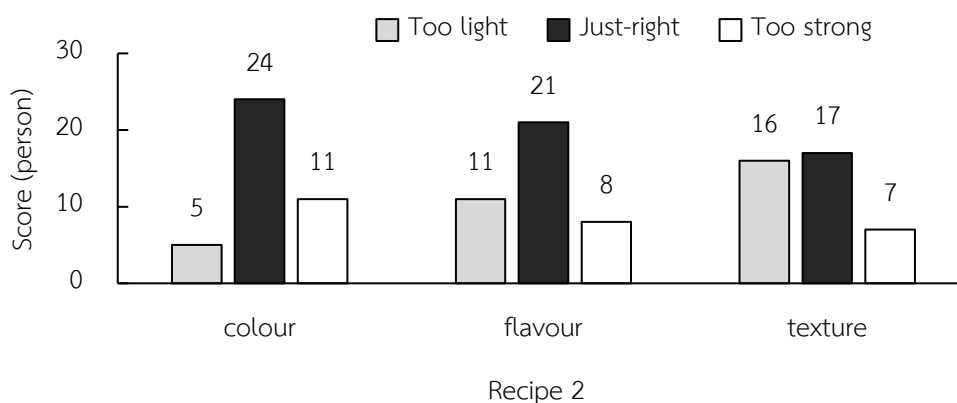


ภาพ 30 ลักษณะผลิตภัณฑ์อาหารสุขภาพชนิดเจล 4 สูตร ที่ใช้ทดสอบการยอมรับในอาสาสมัคร

ผลการทดสอบ Recipe 1 (RSE 4%) การยอมรับของผลิตภัณฑ์ในลักษณะของสี รสชาติ เนื้อสัมผัส และความชอบโดยรวม จากจำนวนอาสาสมัคร 40 คน เป็นเพศชาย 11 คน เพศหญิง 29 คน ควรมีการยอมรับ ไม่น้อยกว่า 27 คน (ค่าวิกฤตที่  $\alpha = 0.05$ ) หลังจากอาสาสมัครทดสอบชิมผลิตภัณฑ์ Recipe 1 พบว่า ผลิตภัณฑ์ยังไม่ได้รับการยอมรับ ผลิตภัณฑ์มีสี รสชาติ และเนื้อสัมผัสที่มากเกินไป (ภาพ 31) นอกจากนี้อาสาสมัครให้ความเห็นเพิ่มเติมว่าผลิตภัณฑ์มีรสขมเกินไป ดังนั้นจึงมีการพัฒนาสูตรที่ 2 โดยลด RSE ลงเหลือ 2% (Recipe2) แล้วทดสอบการยอมรับในอาสาสมัคร 40 คน เป็นเพศชาย 5 คน เพศหญิง 35 คน พบว่า ผลิตภัณฑ์ได้รับการยอมรับมากขึ้นกว่า Recipe 1 แต่ยังไม่ได้อยู่ในเกณฑ์รับการยอมรับ (ภาพ 32)

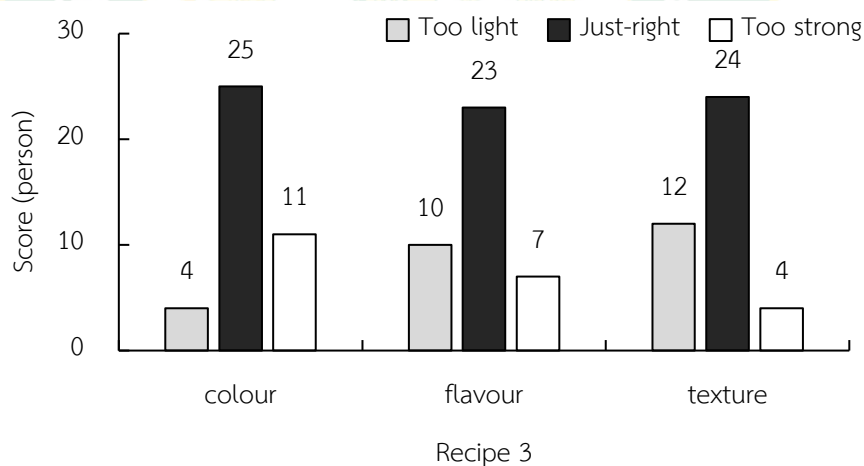


ภาพ 31 ผลการยอมรับผลิตภัณฑ์อาหารสุขภาพชนิดเจล Recipe 1 ด้วย JAR scale



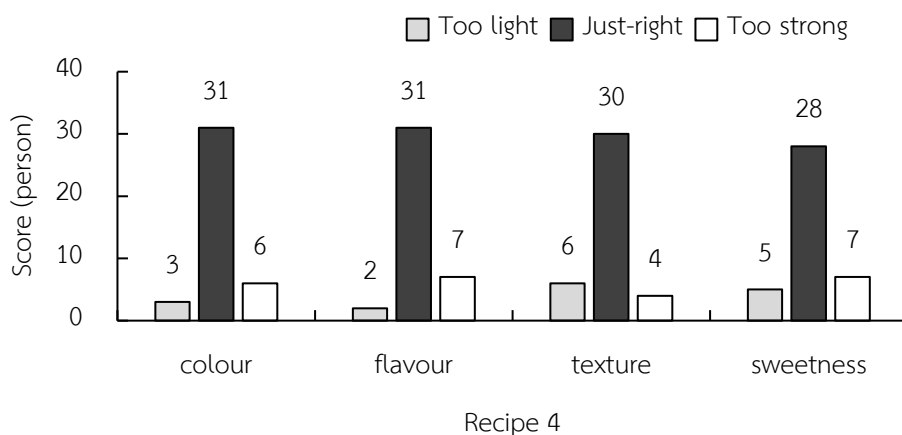
ภาพ 32 ผลการยอมรับผลิตภัณฑ์อาหารสุขภาพชนิดเจล Recipe 2 ด้วย JAR scale

หลังจากพัฒนาสูตร Recipe 1 และ 2 โดยปรับลด RSE ลง พบว่า การยอมรับผลิตภัณฑ์เพิ่มสูงขึ้น แต่ยังไม่ได้อยู่ในเกณฑ์รับการยอมรับ นอกจากนี้อาสาสมัครยังคงให้ข้อเสนอแนะเพิ่มเติมว่า ลักษณะของเนื้อสัมผัสเหลว ควรทำให้มีเนื้อของผลิตภัณฑ์มากขึ้น และรสชาติยังคงมีความขมอยู่ ดังนั้นจึงต้องปรับความเข้มข้นของ RSE ลงอีกครั้งเป็น 1% (Recipe 3) เมื่อผลิตผลิตภัณฑ์กลับพบว่า ผลิตภัณฑ์มีลักษณะของเนื้อสัมผัสที่เหลว การก่อก้อนลดลง จึงทำให้ต้องมีการเพิ่มสารก่อก้อนในผลิตภัณฑ์เพิ่มขึ้นจากเดิม 1.2% เป็น 1.5% ผลการทดสอบในอาสาสมัคร 40 คน เพศชาย 11 คน เพศหญิง 29 คน พบว่า ได้รับการยอมรับที่เพิ่มขึ้น โดยเฉพาะเนื้อสัมผัส (ภาพ 33) แต่มีข้อเสนอแนะว่า ผลิตภัณฑ์ยังคงมีรสชาติขมเล็กน้อย ดังนั้นเพื่อให้ผลิตภัณฑ์ได้รับการยอมรับ จึงพัฒนาสูตรอีกครั้งเป็น RSE 0.5% (Recipe 4) และเพิ่มสารให้ความหวานโดยใช้น้ำตาลแอลกอฮอล์ (sorbital) จาก 5% เป็น 7%



ภาพ 33 ผลการยอมรับผลิตภัณฑ์อาหารสุขภาพชนิดเจล Recipe 3 ด้วย JAR scale

ในการทดสอบผลิตภัณฑ์ Recipe 4 ได้มีการเพิ่มความหวานเป็น 7% ดังนั้นในการเก็บข้อมูลจากอาสาสมัครเพศชาย 8 คน เพศหญิง 32 คน จึงได้เพิ่มการยอมรับเรื่องความหวานของผลิตภัณฑ์ พบว่า Recipe 4 เป็นสูตรที่ได้รับการยอมรับที่อยู่ในเกณฑ์ (ภาพ 34) ทั้งการยอมรับด้านสี รสชาติ เนื้อสัมผัส และความหวาน ในการพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหารสุขภาพโดยทดสอบลักษณะทางประสาทสัมผัสในแต่ละลักษณะ จะมีผลต่อคุณภาพของผลิตภัณฑ์และการยอมรับของผู้บริโภค ซึ่งอาจไม่สามารถวัดได้ด้วยเครื่องมือหรืออุปกรณ์ทางวิทยาศาสตร์ (Watts et al., 1989) สูตรที่ได้รับการยอมรับจึงเป็นสูตรที่มีโอกาสทางการตลาดด้วย



ภาพ 34 ผลการยอมรับผลิตภัณฑ์อาหารสุขภาพชนิดเจล Recipe 4 ด้วย JAR scale

การทดสอบการยอมรับในอาสาสมัครอายุตั้งแต่ 35 ปีขึ้นไป ด้วย JAR scale พบว่า Recipe 4 มีสารสกัด RSE ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.5 และเติมสารให้ความหวานจาก 7% ได้รับการยอมรับในอาสาสมัคร โดยผลิตภัณฑ์มีสีเขียวเข้มถึงดำ ซึ่งเป็นสีธรรมชาติของสารสกัดสาหร่าย แม้จะมีการปรับลดความเข้มข้นของสารสกัดลง ผลิตภัณฑ์ยังมีสีเขียวเข้มคงเดิมทำให้ดูด้วยสายตาแล้วอาจไม่น่ารับประทาน แต่ขณะทดสอบได้ชี้แจงเหตุผลในเรื่องลักษณะของสีที่เป็นสีธรรมชาติ อาสาสมัครมีความเข้าใจและยอมรับได้มากขึ้น เมื่อนำผลิตภัณฑ์ทั้ง 4 สูตรมาวัดค่าสี  $L^*$  (ค่าความสว่างของสีขาวถึงดำ)  $a^*$  (ค่าความเข้มของสีเขียวถึงแดง)  $b^*$  (ค่าความเข้มของสีน้ำเงินถึงเหลือง) พบว่า มีค่าสี  $L^*$   $a^*$   $b^*$  ของผลิตภัณฑ์ทั้ง 4 สูตรมีความแตกต่างกันไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p > 0.05$ ) ดังแสดงตาราง 15

ตาราง 15 สูตรผลิตภัณฑ์อาหารสุขภาพชนิดเจล และค่าสี ( $L^*a^*b^*$ ) ของผลิตภัณฑ์

Recipe	RSE (%)	สารก่อเจล (%)	สารให้ความหวาน (%)	ค่าสี		
				$L^*$	$a^{*ns}$	$b^{*ns}$
1	4.0	1.0	5	0.00 ± 0.00	0.48 ± 0.05	4.28 ± 0.09
2	2.0	1.2	5	0.00 ± 0.00	0.48 ± 0.06	4.20 ± 0.09
3	1.0	1.5	5	0.00 ± 0.00	0.48 ± 0.07	4.35 ± 0.08
4	0.5	1.5	7	0.00 ± 0.00	0.48 ± 0.08	4.39 ± 0.09

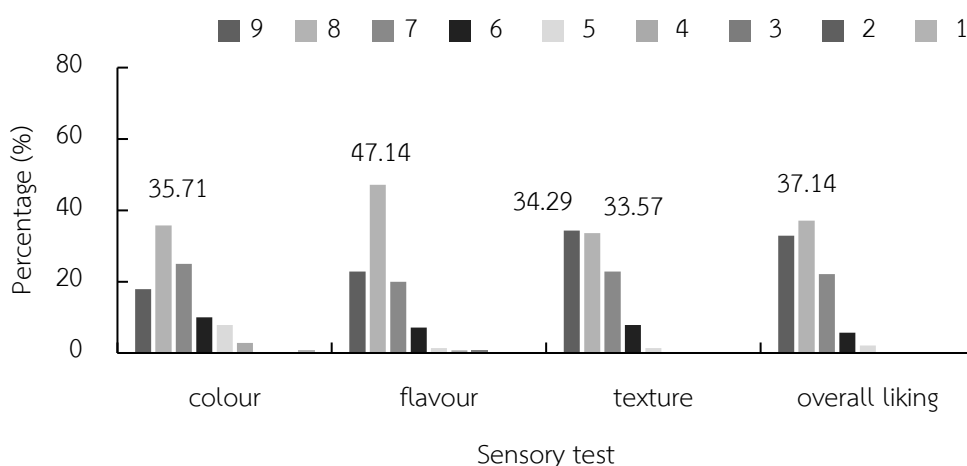
หมายเหตุ ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (mean ± S.D), n=10

<sup>ns</sup> ค่าเฉลี่ยในแต่ละคอลัมน์ แตกต่างอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p > 0.05$ )

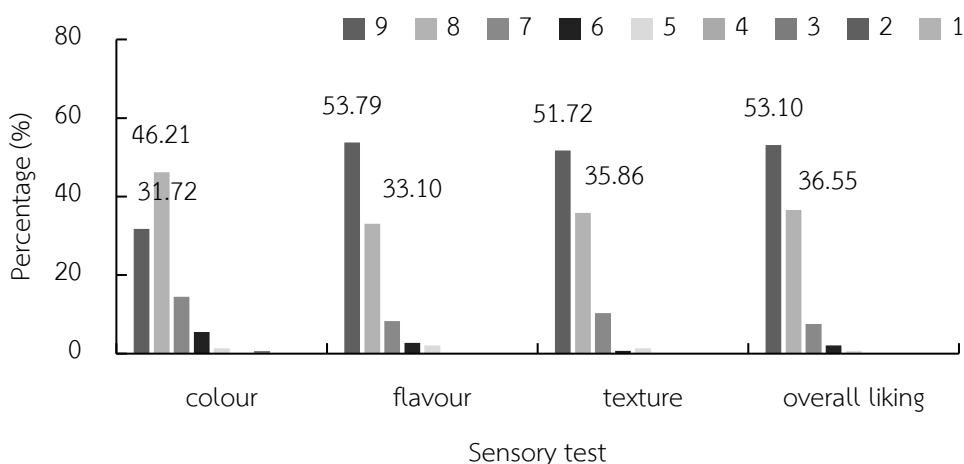
#### 4.4.2 การทดสอบการยอมรับผลิตภัณฑ์ต้นแบบในอาสาสมัครด้วย 9-point hedonic scale

ผลิตภัณฑ์อาหารสุขภาพชนิดเจลต้นแบบ (RSP) ที่ได้รับการยอมรับจากการทดสอบ JAR scale ถูกนำมาทดสอบการยอมรับทางประสาทสัมผัส ได้แก่ ลักษณะที่ปรากฏ สี กลิ่น รสชาติ เนื้อสัมผัส และการยอมรับโดยรวมด้วย 9-point hedonic scale ในผู้บริโภคน้อยกว่า 35 ปีขึ้นไป แบ่งเป็นช่วงอายุ 35-44, 45-54 และ 55 ปีขึ้นไป จำนวน 390 คน

ผลการทดสอบผลิตภัณฑ์ RSP ในกลุ่มอาสาสมัครทั้งเพศชายและหญิง ช่วงอายุ 35-44 ปี จำนวน 140 คน (ภาพ 35) และช่วงอายุ 45-54 ปี จำนวน 145 คน พบว่า อาสาสมัครทั้ง 2 กลุ่มนี้ยอมรับผลิตภัณฑ์ในเกณฑ์ระดับชอบมากถึงชอบมากยิ่งขึ้น (คะแนน 8-9)

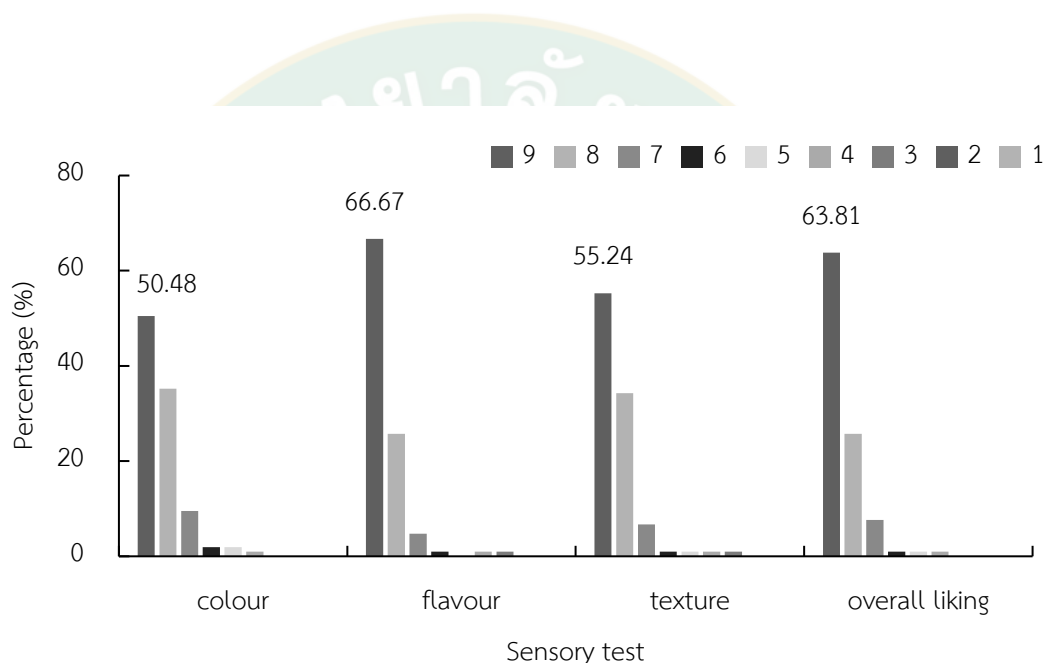


ภาพ 35 การยอมรับผลิตภัณฑ์ต้นแบบ RSP ในอาสาสมัครช่วงอายุ 35-44 ปี



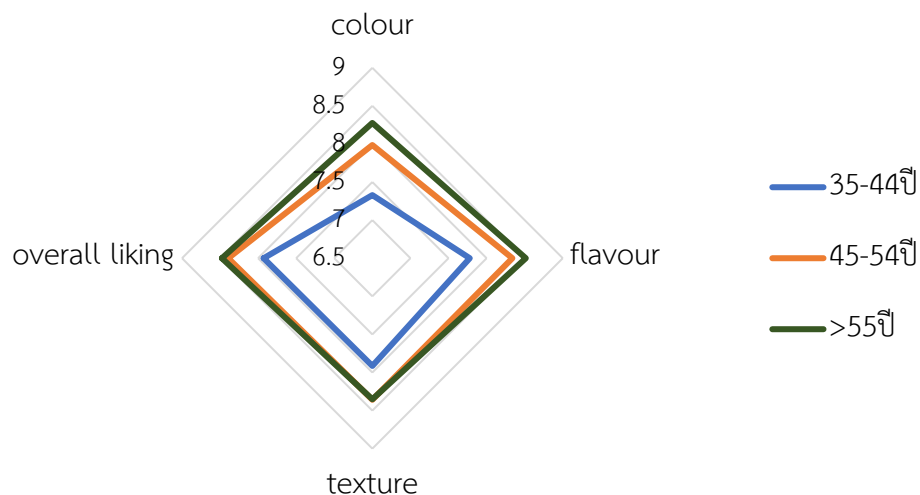
ภาพ 36 การยอมรับผลิตภัณฑ์ต้นแบบ RSP ในอาสาสมัครช่วงอายุ 45-54 ปี

ผู้สูงอายุมักจะมีปัญหาสุขภาพ นับตั้งแต่ปากซึ่งจะมีฟันที่โยกคลอน หักง่าย หรือใส่ฟันปลอม จึงมีปัญหาต่อการเคี้ยวมากและการรับรสจะไม่ดีเท่าที่ควร ผู้สูงอายุมักเลือกอาหารเฉพาะอาหารที่เคี้ยวง่าย ทำให้ขาดสารอาหารที่จำเป็น เช่น โปรตีน วิตามิน เกลือแร่ นอกจากนี้การหลั่งน้ำย่อยของกระเพาะอาหารลดลง ทำให้การย่อยและการดูดซึมอาหารลดลงไปด้วย เกิดภาวะการขาดอาหาร การเคลื่อนไหวของกระเพาะอาหาร และลำไส้ลดลง ทำให้รู้สึกหิวน้อยลง และมีปัญหาท้องผูก ซึ่งในการทดสอบผลิตภัณฑ์ RSP ในอาสาสมัครกลุ่มผู้ใหญ่ที่มีอายุตั้งแต่ 55 ปีขึ้นไป จึงได้รับการยอมรับในเกณฑ์ดีมากที่สุด (มากกว่า 50%) ส่วนใหญ่ให้ความเห็นเพิ่มเติมว่าทานง่าย ไม่หวาน และมีรสชาติดี



ภาพ 37 การยอมรับผลิตภัณฑ์ต้นแบบ RSP ในอาสาสมัครอายุ 55 ปีขึ้นไป

เมื่อเปรียบเทียบผลการทดสอบการยอมรับผลิตภัณฑ์ RSP ของอาสาสมัครทั้ง 3 กลุ่ม จำนวน 390 คน พบว่า ค่าเฉลี่ยคะแนนที่ได้จากอาสาสมัครที่มีอายุมากกว่า 55 ปี มีการยอมรับต่อผลิตภัณฑ์ RSP มากกว่ากลุ่มอายุ 35-44 ปีและ 45-54 ปี (ภาพ 37) แสดงให้เห็นว่าผลิตภัณฑ์ได้รับความสนใจจากกลุ่มผู้ใหญ่และผู้สูงอายุ ซึ่งเป็นกลุ่มผู้บริโภคเป้าหมายและเป็นกลุ่มที่มีความเสี่ยงต่อการเกิดโรค NCDs โดยเฉพาะโรคเบาหวาน ดังนั้นผลิตภัณฑ์ RSP จึงเป็นผลิตภัณฑ์ที่ตรงกับความต้องการของผู้บริโภคที่มีอายุตั้งแต่ 35 ปีขึ้นไป



ภาพ 38 การเปรียบเทียบผลการยอมรับผลิตภัณฑ์ RSP ในกลุ่มอาสาสมัคร 3 กลุ่มอายุ

#### 4.4.3 การวิเคราะห์ข้อมูลโภชนาการของผลิตภัณฑ์

ตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 182 พ.ศ. 2541 ได้กำหนดให้มีการแสดงฉลากโภชนาการ เพื่อให้ข้อมูลคุณค่าทางโภชนาการของอาหารแก่ผู้บริโภค เพื่อเป็นการคุ้มครองผู้บริโภคด้านอาหารและโภชนาการ (กระทรวงสาธารณสุข, 2562) ดังนั้นผลิตภัณฑ์ RSP ที่แสดงในภาพ 39 ขนาดบรรจุ 200 มิลลิลิตร และเป็นสูตรที่ได้รับการยอมรับในอาสาสมัครจึงถูกนำมาวิเคราะห์เพื่อให้ถูกต้องตามระเบียบของกระทรวง ผลการวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์โดยสถาบันบริการตรวจสอบคุณภาพและมาตรฐานผลิตภัณฑ์ ศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ แสดงคุณค่าทางโภชนาการและสารอาหารที่จะได้รับการรับประทานผลิตภัณฑ์ 1 ซอง (200 มิลลิลิตร) ดังนี้



ภาพ 39 ผลิตภัณฑ์ RSP ขนาดบรรจุ 200 มิลลิลิตร

ข้อมูลโภชนาการ		
ปริมาณสุทธิ 200 มิลลิลิตร		
หนึ่งหน่วยบริโภค : 1 : 1 ซอง (200 มิลลิลิตร)		
จำนวนหน่วยบริโภคต่อซอง : 1		
คุณค่าทางโภชนาการต่อหนึ่งหน่วยบริโภค		
พลังงานทั้งหมด 70 กิโลแคลอรี		
ร้อยละของปริมาณที่แนะนำต่อวัน*		
ไขมันทั้งหมด	0 ก.	0 %
โปรตีน	4 ก.	
คาร์โบไฮเดรตทั้งหมด	14 ก.	5 %
น้ำตาล	15 ก.	
โซเดียม	20 มก.	1 %
*ร้อยละของปริมาณสารอาหารที่แนะนำให้บริโภคต่อวันสำหรับคนไทยอายุตั้งแต่ 6 ปีขึ้นไป (Thai RDI) โดยคิดจากความต้องการพลังงานวันละ 2,000 กิโลแคลอรี		

คุณค่าทางโภชนาการต่อ 1 ซอง

ควรแบ่งทาน 1 ครั้ง

พลังงาน	น้ำตาล	ไขมัน	โซเดียม
70	15	0	20
* 4 %	* 25 %	*0 %	*1 %

\* คิดเป็นร้อยละของปริมาณสูงสุดที่บริโภคได้ต่อวัน

## 4.5 การศึกษาอายุการเก็บของผลิตภัณฑ์

### 4.5.1 การทดสอบปริมาณจุลินทรีย์ในผลิตภัณฑ์ (Total plate count)

การหาปริมาณจุลินทรีย์ในผลิตภัณฑ์ RSP บนอาหารเลี้ยงเชื้อ ทำการทดสอบในช่วงเดือนธันวาคม 2561-มีนาคม 2562 เพื่อใช้ประเมินอายุการเก็บผลิตภัณฑ์ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และที่อุณหภูมิห้อง พบว่า การเก็บผลิตภัณฑ์ไว้ในอุณหภูมิห้องสามารถเก็บได้นาน 14 วัน (ภาพ 40) ในขณะที่การเก็บผลิตภัณฑ์ไว้ในตู้เย็น สามารถเก็บได้นานถึง 1 เดือน โดยไม่มีการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ (ภาพ 41) แต่ผลิตภัณฑ์ที่เก็บไว้อุณหภูมิห้อง เริ่มมีการเปลี่ยนแปลงในลักษณะของเจล โดยพบว่า เกิดหยดน้ำบนเนื้อเจลเพิ่มมากขึ้นในวันที่ 5 ดังนั้นเพื่อให้ผลิตภัณฑ์คงสภาพเดิม ควรเก็บรักษาในสภาวะอุณหภูมิที่ต่ำกว่าอุณหภูมิห้อง



ภาพ 40 ปริมาณจุลินทรีย์ใน RSP หลังการเก็บรักษาวันที่ 1, 5 และ 15 วัน ที่อุณหภูมิห้อง

ในขณะที่การเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ในตู้เย็น สามารถช่วยยืดอายุการเก็บรักษา และคงสภาพลักษณะของผลิตภัณฑ์ได้ดีกว่า เมื่อวิเคราะห์ปริมาณจุลินทรีย์ในผลิตภัณฑ์ RSP หลังการเก็บ 15 วัน พบว่าเริ่มมีหยดน้ำบนเนื้อเจลเพิ่มขึ้น รสชาติของผลิตภัณฑ์คงเดิม ดังนั้นอายุการเก็บ (shelf life) ของผลิตภัณฑ์ RSP เท่ากับ 14 วัน โดยเก็บไว้ในตู้เย็น



ภาพ 41 ปริมาณจุลินทรีย์ใน RSP หลังการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 °C วันที่ 1, 15 และ 30 วัน

เนื่องจากการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ RSP ยังไม่สามารถเก็บรักษาได้นานพอ สำหรับการค้าเชิงพาณิชย์ ดังนั้นได้ทำการศึกษาหาวิธีการทำลายจุลินทรีย์ที่เหมาะสมกับผลิตภัณฑ์เพื่อให้สามารถยืดเวลาการเก็บรักษา จึงได้ใช้วิธีการฆ่าเชื้อด้วยความร้อน โดยใช้เครื่อง Autoclave (อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที) พบว่าสามารถเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ได้นาน 3 เดือน ที่อุณหภูมิห้องโดยไม่มีอาการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์และผลิตภัณฑ์คงสภาพ (ภาพ 41) และสามารถเก็บผลิตภัณฑ์ได้นาน 5 เดือน โดยไม่พบการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ แต่ผลิตภัณฑ์ไม่คงสภาพเดิม โดยลักษณะของเนื้อสัมผัสจะเหลวและมีน้ำบนผิวหน้ามากขึ้น ดังนั้นวิธีการใช้ความร้อนสูง สามารถฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ในผลิตภัณฑ์ ทำให้ผลิตภัณฑ์สามารถเก็บได้นานขึ้น อย่างไรก็ตามจะต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมเพื่อยืดอายุผลิตภัณฑ์และสามารถเก็บได้ที่อุณหภูมิห้องได้นาน 1 ปี จึงจะมีความเป็นไปได้ในเชิงพาณิชย์ เช่น การฆ่าเชื้อด้วยวิธีสเตอริไลซ์ (sterilization) อาหารด้วยเครื่องรีทอร์ต (retort) หลังจากบรรจุลงในบรรจุภัณฑ์ที่ปิดผนึกสนิท หรือถุงรีทอร์ตแพช (retort pouch)



ภาพ 42 ลักษณะผลิตภัณฑ์ RSP ที่ผ่านการฆ่าเชื้อด้วยวิธีสเตอริไลซ์ และเก็บนาน 3 เดือนที่อุณหภูมิห้อง

4.5.2 การทดสอบปริมาณสารประกอบฟีนอลิก และความสามารถในการขจัดอนุมูลอิสระของผลิตภัณฑ์ RSP

ผลการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิก และความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของผลิตภัณฑ์ RSP เมื่อผลิต (วันที่ 0) และภายหลังการเก็บรักษาที่ 4 องศาเซลเซียส นาน 14 วัน พบว่า มีการเปลี่ยนแปลงของปริมาณสารประกอบฟีนอลิกลดลงเล็กน้อย ในขณะที่ความสามารถในการขจัดอนุมูลอิสระเอปิตีเอสมีค่าเพิ่มขึ้นกว่าเดิมเล็กน้อย มีความแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p > 0.05$ ) ดังตาราง 16 ผลทดสอบดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าผลิตภัณฑ์ RSP ที่เก็บรักษาไว้นาน 14 วัน ยังคงสารสำคัญและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้

**ตาราง 16** ปริมาณสารประกอบฟีนอลิก และฤทธิ์ขจัดอนุมูลอิสระเอปทีเอสของ RSP

การทดสอบ	RSP	
	วันที่ 0	วันที่ 14
ปริมาณสารประกอบฟีนอลิก (mg GAE/200ml of product) <sup>ns</sup>	42.75 ± 0.93	41.51 ± 1.41
ฤทธิ์ขจัดอนุมูลอิสระเอปทีเอส (mM TEAC/200ml of product) <sup>ns</sup>	122.95 ± 4.16	127.33 ± 2.66

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (mean ± S.D), n=10

<sup>ns</sup> ระยะเวลาการเก็บรักษา (วันที่ 0 และ 14) ส่งผลให้มีความแตกต่างอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p > 0.05$ )

#### 4.6 การศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของผลิตภัณฑ์อาหารสุขภาพชนิดเจลในหนูขาว

##### 4.6.1 การวิเคราะห์ทางชีวเคมีในเลือด

การทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดผสมระหว่างสาหร่ายไคและสาหร่ายเตา (RSE) และผลิตภัณฑ์อาหารสุขภาพชนิดเจลจากสาหร่าย (RSP) ขนาด 500 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม นาน 8 สัปดาห์ ในหนูขาวที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะเบาหวาน โดยทำให้มีระดับน้ำตาลในเลือดก่อนการทดสอบมากกว่า 200 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร หรือมีภาวะ hyperglycemia ด้วย streptozotocin ซึ่งจะเข้าไปทำลายเบต้าเซลล์ในตับอ่อนซึ่งทำหน้าที่สังเคราะห์และผลิตฮอร์โมนอินซูลิน จึงทำให้เกิดภาวะเบาหวานขึ้น ผลการทดสอบพบว่า กลุ่มหนูปกติ (NC) กลุ่มหนูปกติที่ได้รับ RSP (NP) และกลุ่มหนูเบาหวานควบคุม (DC) กลุ่มหนูเบาหวานที่ได้รับ RSP (DP) กลุ่มหนูเบาหวานที่ได้รับ RSE (DE) และกลุ่มที่ได้รับการป้อนยาเมทฟอร์มิน (DM) มีการเพิ่มขึ้นของน้ำหนักตัวอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p > 0.05$ ) เนื่องจากในการทดลองเป็นการเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะน้ำตาลในเลือดสูงเพียงอย่างเดียวและไม่เหนี่ยวนำให้เกิดภาวะอ้วน ดังนั้นร้อยละของการเพิ่มขึ้นของน้ำหนักตัวหนูทุกกลุ่มจึงไม่แตกต่างกัน (ตาราง 17)

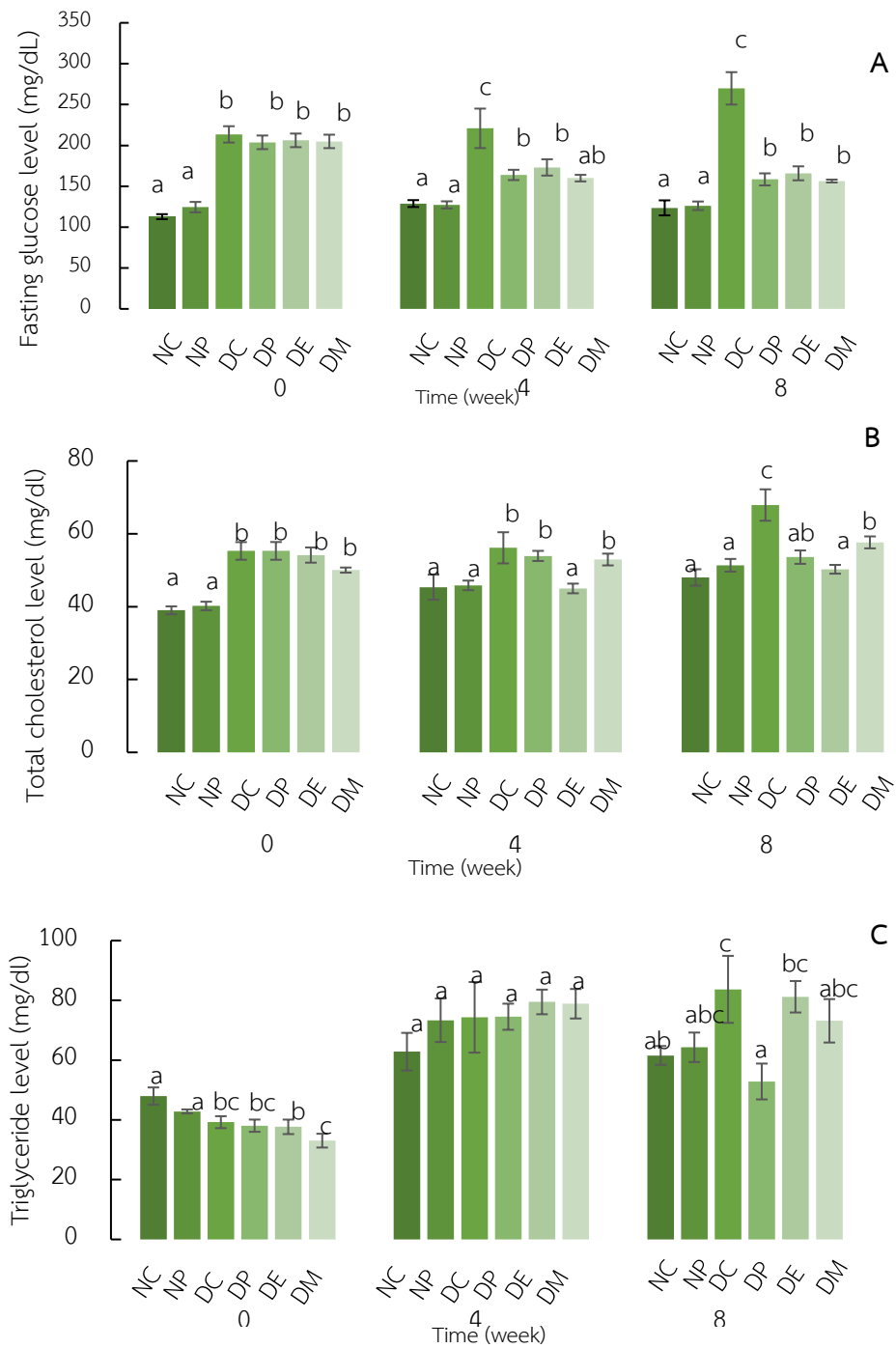
**ตาราง 17** น้ำหนักตัว ร้อยละของน้ำหนักตัวที่เพิ่มขึ้น และสัดส่วนของไขมันในช่องท้องกับน้ำหนักตัวของหนูปกติและหนูเบาหวานตลอดระยะเวลาทดสอบ 8 สัปดาห์

Group	Body weight (g)	%Weight gain	Visceral fat/ body weight
NC	460.00 ± 14.14	60.89 ± 4.35	0.0608 ± 0.0035
NP	463.75 ± 20.35	58.58 ± 5.97	0.0598 ± 0.0055
DC	428.33 ± 38.25	45.30 ± 10.75	0.0447 ± 0.0162
DP	445.56 ± 17.49	55.28 ± 4.04	0.0569 ± 0.0043
DE	447.78 ± 14.02	64.10 ± 5.06	0.0579 ± 0.0073
DM	443.33 ± 9.43	55.21 ± 5.02	0.0590 ± 0.0024

หมายเหตุ mean ± S.E.M. (n=6),  $p>0.05$ , NC = กลุ่มหนูปกติ, NP = กลุ่มหนูปกติและได้รับ RSP 500 มก./กก, DC = กลุ่มหนูเบาหวานควบคุม, DP = กลุ่มหนูเบาหวานและได้รับ RSP 500 มก./กก, DE = กลุ่มหนูเบาหวานและได้รับ RSE 500 มก./กก, DM = กลุ่มหนูเบาหวานและได้รับยา metformin 50 มก./กก.

ผลการป้อน RSE และ RSP ในหนูปกติและหนูเบาหวาน พบว่า กลุ่มหนูปกติที่ได้รับ RSP ไม่มีการเปลี่ยนแปลงของระดับน้ำตาลกลูโคส หลังจากได้รับ RSE และ RSP เป็นเวลา 8 สัปดาห์ (ภาพ 42A) ในขณะที่หนูเบาหวานกลุ่ม DE และ DP มีระดับน้ำตาลในเลือดลดลง 38.53% และ 41.28% ตามลำดับ และหนูเบาหวาน DM มีระดับน้ำตาลในเลือดลดลง 42.03% เมื่อเทียบกับหนูเบาหวาน DC หลังการทดสอบ 8 สัปดาห์

หนูปกติที่ได้รับ RSP นาน 8 สัปดาห์ ไม่พบการเปลี่ยนแปลงของระดับคอเลสเตอรอลรวม ส่วนผลการป้อน RSE และ RSP ในหนูเบาหวาน พบว่า DE และ DP มีระดับคอเลสเตอรอลรวมลดลง 25.98% และ 21.07% ตามลำดับ เมื่อเทียบกับหนูเบาหวาน DC อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p<0.05$ ) ในกลุ่มหนูเบาหวานที่ได้รับยาเมทฟอร์มิน (DM) ไม่สามารถลดระดับคอเลสเตอรอลได้ (ภาพ 42B) โดยกลไกการออกฤทธิ์ของ RSE ในการลดน้ำตาลในเลือดน่าจะเกี่ยวข้องกับฮอร์โมนอินซูลิน เพราะมีรายงานการวิจัยพบว่า หนูเบาหวานที่ได้รับสารสกัดน้ำสำหรับยาขนาด 1,000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ติดต่อกัน 12 สัปดาห์ มีผลต่อการเพิ่มความไวในการตอบสนองของฮอร์โมนอินซูลิน และช่วยเพิ่มระดับเอนไซม์ที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (Ontawong et al., 2013) นอกจากนี้มีงานวิจัยที่พบว่าสารสกัดสำหรับยาสามารถช่วยลดการดูดซึมคอเลสเตอรอลได้ (Doungjai et al. 2016) ในขณะที่สารสกัดสำหรับยาขนาด 1,000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม สามารถลดระดับน้ำตาลและไตรกลีเซอไรด์ได้ด้วยเช่นกัน (Srimaroeng et al., 2015) แสดงให้เห็นว่าสาร RSE ขนาด 500 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม สามารถลดระดับน้ำตาลได้เช่นเดียวกับสำหรับยาและสำหรับยาไค



หมายเหตุ อักษรที่ต่างกัน มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ( $p < 0.05$ ), NC= กลุ่มหนูปกติ, NP=กลุ่มหนูปกติและได้รับ RSP 500มก./กก, DC= กลุ่มหนูเบาหวานควบคุม, DP=กลุ่มหนูเบาหวานและได้รับ RSP 500 มก./กก, DE=กลุ่มหนูเบาหวานและได้รับ RSE 500 มก./กก, DM= กลุ่มหนูเบาหวานและได้รับยา metformin 50 มก./กก.

**ภาพ 43** ระดับน้ำตาลกลูโคส คอเลสเตอรอล และไตรกลีเซอไรด์ในหนูขาวที่ได้รับ RSE และ RSP ในสัปดาห์ที่ 0, 4 และ 8

**ตาราง 18** ระดับคอเลสเตอรอลรวม คอเลสเตอรอลชนิดเอชดีแอล (HDL) และคอเลสเตอรอลชนิดแอลดีแอล (LDL) ในหนูขาวปกติและหนูเบาหวานหลังจากได้รับ RSE และ RSP เป็นเวลา 8 สัปดาห์

Group	Total cholesterol (mg/dL)	HDL (mg/dL)	LDL (mg/dL)
NC	48.03 ± 2.25 <sup>a</sup>	60.80 ± 4.47 <sup>a</sup>	13.00 ± 0.71 <sup>ab</sup>
NP	51.36 ± 1.74 <sup>a</sup>	50.80 ± 4.32 <sup>a</sup>	15.40 ± 0.93 <sup>a</sup>
DC	67.90 ± 4.31 <sup>c</sup>	55.40 ± 3.17 <sup>a</sup>	10.00 ± 0.84 <sup>c</sup>
DP	53.59 ± 1.84 <sup>ab</sup>	56.20 ± 3.92 <sup>a</sup>	11.60 ± 0.87 <sup>bc</sup>
DE	50.26 ± 1.20 <sup>a</sup>	49.40 ± 3.70 <sup>a</sup>	11.40 ± 0.98 <sup>bc</sup>
DM	57.64 ± 1.64 <sup>b</sup>	59.60 ± 3.61 <sup>a</sup>	11.80 ± 0.92 <sup>bc</sup>

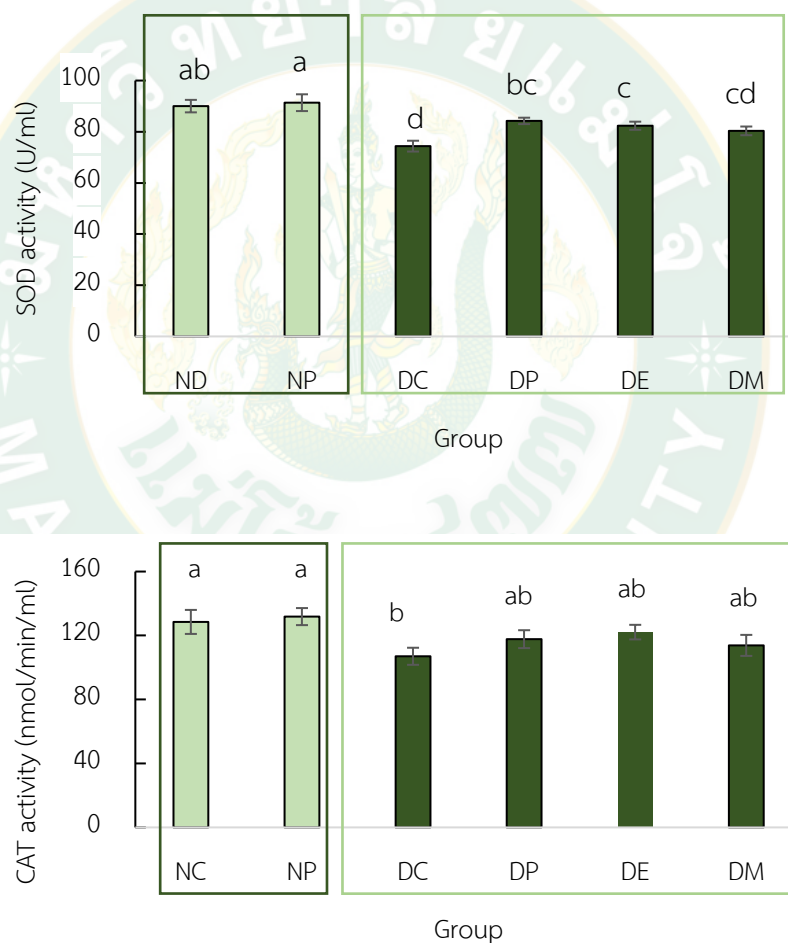
หมายเหตุ mean ± S.E.M. (n=6), อักษรที่ต่างกันในคอลัมน์เดียวกัน มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ( $p < 0.05$ ), NC= กลุ่มหนูปกติ, NP=กลุ่มหนูปกติและได้รับ RSP 500มก./กก, DC= กลุ่มหนูเบาหวานควบคุม, DP=กลุ่มหนูเบาหวานและได้รับ RSP 500 มก./กก, DE=กลุ่มหนูเบาหวานและได้รับ RSE 500 มก./กก, DM= กลุ่มหนูเบาหวานและได้รับยา metformin 50 มก./กก.

หลังจากหนูเบาหวานได้รับ RSE และ RSP นาน 8 สัปดาห์ พบว่ามีการลดลงของระดับคอเลสเตอรอลรวม แต่ปริมาณคอเลสเตอรอลชนิดเอชดีแอล (HDL) และคอเลสเตอรอลชนิดแอลดีแอล (LDL) ไม่มีความแตกต่างกัน (ตาราง 18) แสดงว่า RSE และ RSP มีผลลดคอเลสเตอรอลรวม แต่ไม่มีผลต่อระดับ HDL และ LDL ซึ่งระดับคอเลสเตอรอลทั้ง 2 ชนิดเกี่ยวข้องกับการเกิดโรกระบบหลอดเลือดและหัวใจ (Miller et al., 2011) หากมีระดับ HDL ต่ำและ LDL สูงจะทำให้มีความเสี่ยงการเกิดโรคดังกล่าวสูงขึ้นด้วย

ในการศึกษาครั้งนี้ พบว่า มีการลดลงของไตรกลีเซอไรด์ในหนูเบาหวานที่ได้รับ RSE และ RSP ที่มีส่วนผสมของสารสกัดสาหร่ายทั้ง 2 ชนิด โดยสาหร่ายไคและสาหร่ายเตาพบสารฟีนอลิกชนิด isoquercetin ในสาหร่ายทั้ง 2 ชนิด ซึ่งสารต้านอนุมูลอิสระ (Janthip et al., 2017) และยังมีรายงานการวิจัยที่พบว่า isoquercetin มีคุณสมบัติช่วยลดระดับน้ำตาล (Zhang et al., 2007) ไตรกลีเซอไรด์ และคอเลสเตอรอล (Huang et al., 2017) จึงเป็นการยืนยันได้ว่าผลิตภัณฑ์ที่พัฒนาขึ้นจากสาหร่ายดังกล่าวมีคุณสมบัติลดน้ำตาล ไตรกลีเซอไรด์ และคอเลสเตอรอลได้

#### 4.6.2 การวิเคราะห์เอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระ

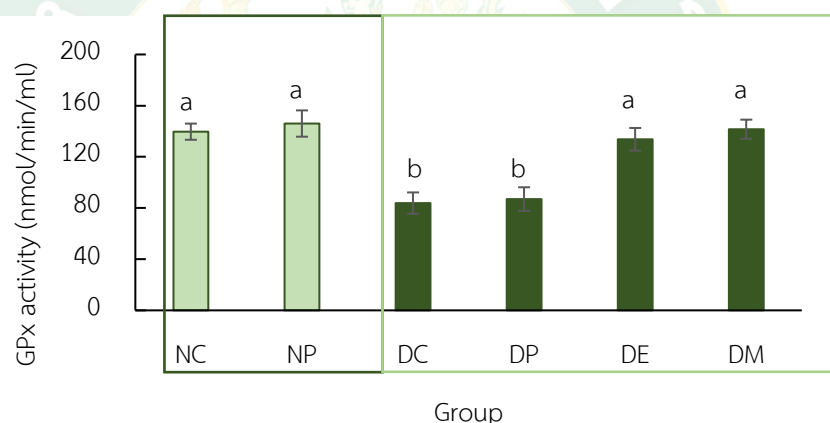
ผลการวิเคราะห์ปริมาณเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระ 3 ชนิด ได้แก่ ซูเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเตส (superoxide dismutase; SOD) คตาเลส (catalase; CAT) และกลูต้าไธโอนเปอร์ออกซิเดส (glutathione peroxidase; GPx) ในหนูขาวปกติและหนูเบาหวาน พบว่า หนูปกติที่ได้รับ RSP ขนาด 500 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ไม่มีผลต่อระดับเอนไซม์ SOD, CAT (ภาพ 43) และ GPx (ภาพ 44) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ในขณะที่หนูเบาหวาน DC จะมีระดับเอนไซม์ทั้ง 3 ชนิดน้อยกว่าหนูเบาหวานกลุ่มอื่นๆ โดยหนูเบาหวานที่ได้รับ RSE และ RSP มีระดับ SOD ที่เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ



หมายเหตุ อักษรที่ต่างกัน มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ( $p < 0.05$ ), NC= กลุ่มหนูปกติ, NP=กลุ่มหนูปกติและได้รับ RSP 500มก./กก, DC= กลุ่มหนูเบาหวานควบคุม, DP=กลุ่มหนูเบาหวานและได้รับ RSP 500 มก./กก, DE=กลุ่มหนูเบาหวานและได้รับ RSE 500 มก./กก, DM= กลุ่มหนูเบาหวานและได้รับยา metformin 50 มก./กก.

ภาพ 44 ระดับเอนไซม์ SOD และ CAT ในหนูขาวที่ได้รับ RSE และ RSP เป็นเวลา 8 สัปดาห์

อนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นในร่างกายจะถูกกำจัดได้โดยเอนไซม์ Superoxide dismutase (SOD), Catalase (CAT) และ Glutathione peroxidase (GPx) ทำหน้าที่ในการกำจัดอนุมูลที่เกิดขึ้นเป็นกลุ่มแรก (Vajraguta et al., 2007) วัดระดับเอนไซม์ GPx ในหนูเบาหวานที่ได้รับ RSP และ RSE พบว่า ปริมาณเอนไซม์ GPx ในหนูเบาหวานที่ได้รับ RSP ขนาด (DP) ไม่มีผลต่อระดับเอนไซม์ GPx ในขณะที่หนูเบาหวานที่ได้รับ RSE 500 mg/kg มีการเพิ่มขึ้นของระดับ GPx ที่เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยเอนไซม์ GPx จะทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยารีดักชันของสารประกอบไฮโดรเปอร์ออกไซด์ เพื่อไม่ให้เกิดปฏิกิริยาลูกโซ่ ทำให้ยับยั้งการเกิดสารอนุมูลอิสระเพิ่มขึ้น จนเกิดภาวะเครียดออกซิเดชัน (Oxidative stress) และเป็นที่มาของการเกิดโรคได้ (Sies, 1997) ดังนั้นการเพิ่มขึ้นของระดับ GPx จึงเป็นผลดีต่อร่างกายที่จะช่วยต้านภาวะ oxidative stress และป้องกันการเกิดโรคเรื้อรังต่างๆ ได้

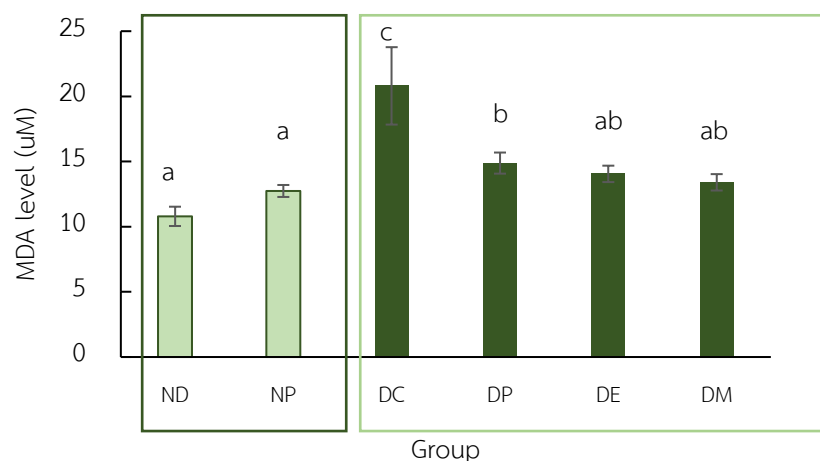


หมายเหตุ อักษรที่ต่างกัน มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ( $p < 0.05$ ), NC= กลุ่มหนูปกติ, NP=กลุ่มหนูปกติและได้รับ RSP 500มก./กก, DC= กลุ่มหนูเบาหวานควบคุม, DP=กลุ่มหนูเบาหวานและได้รับ RSP 500 มก./กก, DE=กลุ่มหนูเบาหวานและได้รับ RSE 500 มก./กก, DM= กลุ่มหนูเบาหวานและได้รับยา metformin 50 มก./กก.

**ภาพ 45** ระดับเอนไซม์ GPx ในหนูเบาหวานที่ได้รับ RSE และ RSP เป็นเวลา 8 สัปดาห์

#### 4.6.3 การตรวจวัดระดับมาลอนไดอัลดีไฮด์

มาลอนไดอัลดีไฮด์ (Malondialdehyde; MDA) เป็นผลผลิตของปฏิกิริยา lipid peroxidation เป็นสารบ่งชี้ถึงระดับของอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้น หากมีอนุมูลอิสระสูง MDA สูงก็จะสูงตามไปด้วย (Wirasorn et al., 2014) ในการศึกษาวัดระดับของ MDA ในหนูปกติที่ได้รับผลิตภัณฑ์ RSP และ RSE ไม่มีผลต่อระดับ MDA ในขณะที่กลุ่มหนูเบาหวานที่ได้รับผลิตภัณฑ์ DP และ DE พบว่ามีระดับ MDA ที่ลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มหนูเบาหวาน อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ภาพ 45) มีรายงานการวิจัยพบว่า สารสกัดสาหร่ายเตาช่วยเพิ่มระดับเอนไซม์ที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และลดระดับ MDA ในหนูเบาหวานได้ (Ontawong et al., 2013)



หมายเหตุ อักษรที่ต่างกัน มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ( $p < 0.05$ ), NC= กลุ่มหนูปกติ, NP=กลุ่มหนูปกติและได้รับ RSP 500มก./กก, DC= กลุ่มหนูเบาหวานควบคุม, DP=กลุ่มหนูเบาหวานและได้รับ RSP 500 มก./กก, DE=กลุ่มหนูเบาหวานและได้รับ RSE 500 มก./กก, DM= กลุ่มหนูเบาหวานและได้รับยา metformin 50 มก./กก.

#### ภาพ 46 ระดับมาลอนไดอัลดีไฮด์ในหนูปกติและหนูเบาหวาน

ผลการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของผลิตภัณฑ์อาหารสุขภาพชนิดเจลจากสาหร่ายในหนูขาปกติและหนูเบาหวาน พบว่า ผลิตภัณฑ์สามารถลดระดับน้ำตาลกลูโคส คอเลสเตอรอล และระดับมาลอนไดอัลดีไฮด์ นอกจากนี้ยังช่วยเพิ่มระดับเอนไซม์ Superoxide dismutase (SOD) และ Glutathione peroxidase (GPx) ซึ่งเป็นเอนไซม์ต้านออกซิเดชันในร่างกายได้อีกด้วย

จากผลการทดสอบฤทธิ์ชีวภาพของผลิตภัณฑ์อาหารสุขภาพชนิดเจลจากสาหร่ายในหนูขาขนาด 500 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม พบว่าสามารถแสดงฤทธิ์ชีวภาพได้ เมื่อคำนวณเทียบขนาดรับประทานสำหรับคน (Reagan-Shaw et al., 2007) พบว่า ปริมาณสารสกัดที่ควรได้รับต่อวันในคนน้ำหนัก 50 กิโลกรัมต้องได้รับสารสกัด 4 กรัม ดังนั้นเมื่อเทียบกับผลิตภัณฑ์ขนาดบรรจุ 200 มิลลิลิตร ควรรับประทาน 4 ถ้วยจึงจะได้รับสารสกัดครบตามขนาดที่ออกฤทธิ์ได้

## บทที่ 5

### สรุปผลการทดลอง

สำหรับรายโกและสำหรับรายเตาที่นำใช้ในการศึกษาจากจากแม่น้ำน่าน ตำบลท่าวังผา จังหวัดน่าน และบ้านนาคูหา อำเภอเมือง จังหวัดแพร่ เมื่อนำมาสำหรับทั้ง 2 ชนิดมาสกัดด้วยน้ำ แล้ววิเคราะห์การปนเปื้อนของโลหะหนัก ไม่พบว่ามีสารปนเปื้อนของสารหนู ตะกั่ว ปรอท แคดเมียม และโครเมียม นอกจากนี้สารสกัดที่ได้ยังมีคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระและมีฟีนอลิกชนิด isoquercetin เป็นองค์ประกอบ ซึ่งสามารถใช้เป็นตัวกำหนดมาตรฐานของสารสกัดสำหรับรายโกและสำหรับรายเตาได้ ทีมวิจัยมีแนวคิดในการพัฒนาผลิตภัณฑ์ใหม่เพื่อนำมาใช้ในการป้องกันโรค NCDs โดยเฉพาะโรคเบาหวาน โดยการพัฒนาสูตรสารสกัดใหม่ที่มีการผสมสารสกัดสำหรับรายทั้ง 2 ชนิดอาศัยคุณสมบัติการก่อเจลที่ดีจากสำหรับรายโก ฤทธิ์ทางชีวภาพในการลดระดับน้ำตาลจากสำหรับรายเตาและสำหรับรายโก เพื่อให้ได้ประสิทธิภาพการออกฤทธิ์ของสารสกัดที่ดีขึ้นกว่าการใช้สำหรับรายเพียงชนิดเดียว และมีต้นทุนของวัตถุดิบเหมาะสม เมื่อนำสารสกัดสำหรับรายโกและสำหรับรายเตามาผสมกัน และพัฒนาสูตรใหม่ หรือ RSE เป็นสารสกัดผสมสำหรับรายที่มีสารประกอบฟีนอลิกเพิ่มสูงขึ้นกว่าการใช้สารสกัดสำหรับรายโกเพียงชนิดเดียว และยังมีคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระในการทดสอบฤทธิ์ขจัดอนุมูลอิสระเอปียีเอส ดีพีพีเอช และอนุมูลซูเปอร์ออกไซด์ได้ดีอีกด้วย โดยสูตรที่พัฒนาขึ้นยังเป็นสูตรที่สามารถลดต้นทุนวัตถุดิบได้สูงถึง 50% จากการนำ RSE ไปพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์อาหารสุขภาพชนิดเจล RSP จนได้รับการยอมรับในอาสาสมัครที่มีอายุตั้งแต่ 35 ปีขึ้นไป จำนวน 390 คน อยู่ในระดับชอบมากถึงชอบมากยิ่งขึ้น และเป็นผลิตภัณฑ์ที่บริโภคได้ง่าย ปลอดภัย ไม่เจือวัตถุดิบเสีย สามารถเก็บได้นาน 14 วันในตู้เย็น ซึ่งจะต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมในการฆ่าเชื้อด้วยวิธีสเตอริไลซ์อาหารด้วยเครื่องรีเทอร์ต และเปลี่ยนบรรจุภัณฑ์เป็นถุงรีเทอร์ตเพื่อต่อไปเพื่อยืดอายุให้ได้อย่างน้อย 1 ปี

จากการทดสอบประสิทธิภาพของสารผสม RSE และผลิตภัณฑ์ RSP ด้วยการทดสอบฤทธิ์ชีวภาพในหนูเบาหวาน ซึ่งพบว่า RSE และ RSP สามารถแสดงฤทธิ์ลดระดับน้ำตาล (anti-hyperglycemia) และฤทธิ์ลดระดับคอเลสเตอรอล (anti-hypercholesterolemia) ในหนูที่มีภาวะเบาหวานชนิดที่ 2 ได้ นอกจากนี้ยังพบว่าทั้ง RSE และ RSP ยังแสดงคุณสมบัติในการเพิ่มระดับเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระ และลดระดับมาลอนไดอัลดีไฮด์ที่บ่งชี้ถึงภาวะเครียดออกซิเดชัน เมื่อเปรียบเทียบขนาดรับประทานของผลิตภัณฑ์ RSP ในคนที่มีน้ำหนัก 50 กิโลกรัม ควรรับประทานของผลิตภัณฑ์ RSP ขนาด 200ml จำนวน 4 ถ้วยต่อวัน จะแสดงฤทธิ์ลดระดับน้ำตาลและคอเลสเตอรอล

ดังนั้นผลิตภัณฑ์ที่พัฒนาขึ้นจากการนำเอาสารผสมของสารสกัดน้ำสาหร่ายไถและสาหร่ายเตามีความเป็นไปได้ในการพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์เสริมอาหารเชิงพาณิชย์ เพื่อป้องกันภาวะเบาหวานซึ่งเป็นหนึ่งในโรคไม่ติดต่อเรื้อรังที่มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องต่อประชากรในประเทศไทย นอกจากนี้ยังเป็นการเพิ่มรายได้ให้กับผู้เพาะเลี้ยงสาหร่ายทั้ง 2 ชนิด และเป็นการเพิ่มมูลค่าสาหร่ายน้ำจืดในด้านอาหารสุขภาพได้อีกด้วย



### ข้อเสนอแนะ

1. ควรใช้สารให้ความหวานชนิดอื่น เช่น หญ้าหวาน แทนการใช้น้ำตาลแอลกอฮอล์ เนื่องจากให้ความหวานแต่ไม่ให้พลังงาน
2. ควรพัฒนาสูตรเพิ่มเติม โดยทำให้เข้มข้นมากขึ้น เพื่อลดปริมาณที่ต้องรับประทานให้น้อยลง
3. หากพัฒนาสูตรผลิตภัณฑ์ให้เข้มข้นมากขึ้น ควรทดสอบในอาสาสมัครเพิ่มเติมโดยเจาะจงเฉพาะกลุ่มเป้าหมายที่ต้องการ



## บรรณานุกรม

- American Diabetes Association. 2015. Classification and diagnosis of diabetes. **Diabetes Care**, 38(Supplement 1), S8-S16.
- Amornlerdpison, D., Mengumphan, K., Thumvijit, S. & Peerapornpisal, Y. 2011. Antioxidant and anti-inflammatory activities of freshwater macroalga, *Cladophora glomerata* Kützing. **Thai Journal of Agricultural Science**, 44(5), 283-291.
- Amornlerdpison, D., Ngernjan, M., Mengumphan, K., Janthip, R. & Srimaroeng, C. 2015. Active Compounds and Oxidative Defense of *Cladophora* spp. in Hybrid Catfish. **KMUTT Research and Development Journal**, 38(4), 393-405.
- Anprung, P. 2008. **The principles of sensory simulation for food analysis**. Bangkok: Chulalongkorn University printing house, 341 p. [in Thai].
- Assawarachan, R. 2013. Microwave vacuum drying kinetics of dried *Spirogyra* sp. **Thai Society of Agricultural Engineering Journal**, 19(1), 14-24.
- Attabhanyo, R. 2001. **Principles of quality control and quality assurance**. Chiang Mai: Agro-Industry, Chiang Mai University.
- Bonetti, P. O., Lerman, L. O., Napoli, C. & Lerman, A. 2003. Statin effects beyond lipid lowering--are they clinically relevant? **European Heart Journal**, 24(3), 225-248.
- Catapano, A. L., Graham, I., De Backer, G., Wiklund, O., Chapman, M. J., Drexel, H., Hoes, A. W., Jennings, C. S., Landmesser, U., Pedersen, T. R., Reiner, Z., Riccardi, G., Taskinen, M. R., Tokgozoglul, L., Verschuren, W. M. M., Vlachopoulos, C., Wood, D. A., Zamorano, J. L. & Cooney, M. T. 2016. 2016 ESC/EAS Guidelines for the management of dyslipidaemias. **European Heart Journal**, 37(39), 2999-3058.
- Diabetes Association of Thailand. 2016. **Global status report on NCDs 2014 "Kick off to the goals"**. Nonthaburi: International Health Policy Program, 22 p. [in Thai].
- Duangjai, A., Limpeanchob, N., Trisat, K. & Amornlerdpison, D. 2016. *Spirogyra neglecta* inhibits the absorption and synthesis of cholesterol in vitro. **Integrative Medicine Research**, 5(4), 301-308.
- Dumitrescu, A., Bojariu, R., Birsan, M.-V., Marin, L. & Manea, A. 2014. Recent climatic

- changes in Romania from observational data (1961-2013). **Theoretical and Applied Climatology**, 122(1), 9 pages.
- Food and Drug Administration. 2016. **Criteria for selecting food production processes**. [Online]. Available [http://food.fda.moph.go.th/data/news/2559/590621\\_auto\\_e/600224.pdf](http://food.fda.moph.go.th/data/news/2559/590621_auto_e/600224.pdf) (9 May 2018).
- Foundation of Thai Gerontology Research and Development Institute. 2017. **Report of situation of the Thai elderly 2015**. Bangkok: Foundation of Thai Gerontology Research and Development Institute.
- Ghasemzadeh, A. & Jaafar, H. Z. 2011. Effects of solvent type on phenolics and flavonoids content and antioxidant activities in two varieties of young ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) extracts. **Journal of Medicinal Plants Research**, 5(7), 1147-1154.
- Halliwell, B., Gutteridge, J. M. & Cross, C. E. 1992. Free radicals, antioxidants, and human disease: where are we now? **Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, 119(6), 598-620.
- Hammerschmidt, P. A. & Pratt, D. E. 1978. Phenolic antioxidants of dried soybeans. **Journal of Food Science**, 43(2), 556-559.
- Hasler, C. M. & Brown, A. C. 2009. Position of the American Dietetic Association: functional foods. **Journal of the American Dietetic Association**, 109(4), 735-746.
- Huang, X. L., He, Y., Ji, L. L., Wang, K. Y., Wang, Y. L., Chen, D. F., Geng, Y., OuYang, P. & Lai, W. M. 2017. Hepatoprotective potential of isoquercitrin against type 2 diabetes-induced hepatic injury in rats. **Oncotarget**, 8(60), 101545-101559.
- Institute for Population and Social Research. 2017. [Online]. Available <http://www.ipsr.mahidol.ac.th/ipsrbeta/th/Gazette.aspx> (3 september 2017).
- Jadid, N., Hidayati, D., Rosyda Hartanti, S., Arraniry, B., Yuanita Rachman, R. & Wikanta, W. 2017. **Antioxidant activities of different solvent extracts of *Piper retrofractum* Vahl. using DPPH assay**.
- Janthip, R. 2013. **Phytochemical screening and antioxidant activity of *Spirogyra neglecta* (Hassall) Kutzing**. Master's Thesis. Maejo University.
- Janthip, R., Lailerd, N., Wangchareon, W., Mangumphan, K. & Amornlerdpison, D. 2017.

- Chemical compound and biological properties of freshwater macroalgae extracts from *Spirogyra neglecta* and *Rhizoclonium hieroglyphicum*.** The 2<sup>nd</sup> National Graduate Research Conference and Creative Innovation Competition, Maejo University, Chiang Mai, 189-195.
- Kadsanit, S., Pinitsoontorn, C., Loilome, W. & Yongvanit, P. 2011. Adverse effects caused by adaptive imbalance to genotoxic stress after infection and inflammation. **Srinagarind Medicine Journal**, 26(2), 127-135.
- Kaufman, N. D., Chasombat, S., Tanomsingh, S., Rajataramya, B. & Potempa, K. 2011. Public health in Thailand: emerging focus on non-communicable diseases. **The International Journal of Health Planning and Management**, 26(3), e197-212.
- Kongbangkerd, T. 2003. **Food microbiology.** Phitsanulok: Faculty of agriculture natural resources and environment, Naresuan University, 198 p. [in Thai].
- Kulsirimathanon, T. 2015. **Development of Spirogyra extract jelly drink.** Master's Thesis. Maejo University.
- Lailerd, N., Pongchaidecha, A., Amornlerdpison, D. & Peerapornpisal, Y. 2009. Beneficial effects of *Spirogyra neglecta* extract on glycemic and lipidemic status in streptozotocin-induced diabetic rats fed a diet enriched in fat. **Annals of Nutrition and Metabolism Journal**, 55, 709.
- Lawless, H. T. & Heymann, H. 2010. **Sensory evaluation of food: principles and practices.** 2<sup>nd</sup> ed. New York: Springer.
- Leelapornpisid, P., Mungmai, L., Sirithunyalug, B., Jiranusornkul, S. & Peerapornpisal, Y. 2014. A novel moisturizer extracted from freshwater macroalga [*Rhizoclonium hieroglyphicum* (C.Agardh) Kützing] for skin care cosmetic. **Chiang Mai Journal of Science**, 41(5.2), 1195-1207.
- Luangpituksa, P. 2009. **Functional Foods.** [Online]. Available [www.sc.mahidol.ac.th/scbt/articles/functional%20food-PL-12%20Oct%2009 .pdf](http://www.sc.mahidol.ac.th/scbt/articles/functional%20food-PL-12%20Oct%2009.pdf) (15 September 2017).
- Miller, M., Stone, N. J., Ballantyne, C., Bittner, V., Criqui, M. H., Ginsberg, H. N., Goldberg, A. C., Howard, W. J., Jacobson, M. S., Kris-Etherton, P. M., Lennie, T. A., Levi, M., Mazzone, T. & Pennathur, S. 2011. Triglycerides and cardiovascular disease: a scientific statement from the American Heart Association. **Circulation**, 123(20),

2292-2333.

- Moongmai, L. 2013. **Characterization of freshwater green macroalgae (*Rhizoclonium hieroglyphicum* Kutzing) extracts and cosmetic applications.** Doctoral Dissertation. Chiang Mai University.
- Mungmai, L., Jiranusornkul, S., Peerapornpisal, Y. & Leelapornpisid, P. 2014. Extraction, characterization and biological activities of extracts from freshwater macroalga [*Rhizoclonium hieroglyphicum* (C.Agardh) Kutzing] cultivated in Northern Thailand. **Chiang Mai Journal of Science**, 41(1), 14-26.
- National Cancer Institute. 2016. **Hospital based cancer registry 2014.** Bangkok: National Cancer Institute, 84 p. [in Thai].
- National Food Institute. 2019. **Upgrade the food processing industry.** [Online]. Available <http://www.nfi.or.th/news-detail.php?id=1772> (2 June 2019).
- Nishikimi, M., Appaji Rao, N. & Yagi, K. 1972. The occurrence of superoxide anion in the reaction of reduced phenazine methosulfate and molecular oxygen. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 46(2), 849-854.
- Ontawong, A., Saowakon, N., Vivithanaporn, P., Pongchaidecha, A., Lailerd, N., Amornlerdpison, D., Lungkaphin, A. & Srimaroeng, C. 2013. Antioxidant and renoprotective effects of *Spirogyra neglecta* (Hassall) Kützing extract in experimental type 2 diabetic rats. **BioMed Research International**, 2013(ID820786), 1-15.
- Peerapornpisal, Y. 2013. **Freshwater algae in Thailand.** Chiang Mai: Faculty of Science, Chiang Mai University, 361 p. [in Thai].
- Peerapornpisal, Y., Amornlerdpison, D., Rujjanawate, C., Ruangrit, K. & Kanjanapothi, D. 2006. Two endemic species of macroalgae in Nan river, Northern Thailand, as therapeutic agents. **Science Asia** 32 (1), 71-76.
- Peerapornpisal, Y., Panyoyai, T. & Amornlerdpison, D. 2012. Antioxidant and anti-inflammatory activities of *Spirogyra neglecta* (Hassall) Kützing. **KKU Science Journal**, 40(1), 228-235.
- Peerapornpisal, Y., Pongpaibul, Y., Kanjanapothi, D., Amornlerdpison, D., Taesotikul, T. & Tongsir, S. 2009. **Potential of freshwater algae as nutraceutical and cosmeceutical products.** Bangkok: National Research Council of Thailand, 77

p. [in Thai].

- Peñarrieta, M., Antonio Alvarado, J., Akesson, B. & Bergenståhl, B. 2007. Separation of phenolic compounds from foods by reversed-phase high performance liquid chromatography. **Revista Boliviana De. Quimica**, 24(1), 1-4.
- Phinyo, K. 2012. **Potentials of polysaccharides from Tao Tao [*Spirogyra neglecta* (Hassall) Kützing] for use as prebiotic**. Master's Thesis. Chiang Mai University.
- Pornchaloempong, P. 2017. **Sensory evaluation**. [Online]. Available <http://www.foodnetworksolution.com/wiki/word/0486/sensory-evaluation> (20 October 2017).
- Pourmorad, F., Hosseinimehr, S. J. & Shahabimajd, N. 2006. Antioxidant activity, phenol and flavonoid contents of some selected Iranian medicinal plants. **African Journal of Biotechnology**, 5(11), 1142-1145.
- Rahman, T., Hosen, I., Islam, T. & Shekhar, H. 2012. Oxidative stress and human health. **Advances in Bioscience and Biotechnology**, 03, 997-1019.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M. & Rice-Evans, C. 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology and Medicine**, 26(9), 1231-1237.
- Sawangpak, A., Thongsri, T. & Chidnok, W. 2016. **Acute effects of *Cladophora glomerata* extract on time to exhaustion during severe intensity exercise**. The 39<sup>th</sup> National Graduate Research Conference, Assumption University, Samuthprakarn.
- Sies, H. 1997. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. **Experimental Physiology**, 82, 291-295.
- Srimaroeng, C., Ontawong, A., Saowakon, N., Vivithanaporn, P., Pongchaidecha, A., Amornlerdpison, D., Soodvilai, S. & Chatsudthipong, V. 2015. Antidiabetic and renoprotective effects of *Cladophora glomerata* Kutzing extract in experimental type 2 diabetic rats: a potential nutraceutical product for diabetic nephropathy. **Journal of Diabetes Research**, 2015(320167), 15 pages.
- Srinivasan, K., Viswanad, B., Asrat, L., Kaul, C. L. & 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(4),

313-320.

- ThaiHealth. 2017. **Annual report 2017**. [Online]. Available <https://www.thaihealth.or.th/Books/540.html>. (10 september 2018).
- Thumvijit, T., Inboot, W., Peerapornpisal, Y., Amornlerdpison, D. & Wongpoomchai, R. 2013a. The antimutagenic and antioxidant properties of *Spirogyra neglecta* (Hassall) Kützing. **Journal of Medicinal Plants Research**, 7(34), 2494-2500.
- Thumvijit, T., Taya, S., Punvittayagul, C., Peerapornpisal, Y. & Wongpoomchai, R. 2014. Cancer chemopreventive effect of *Spirogyra neglecta* (Hassall) Kützing on diethylnitrosamine-induced hepatocarcinogenesis in rats. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, 15(4), 1611-1616.
- Thumvijit, T., Thuschana, W., Amornlerdpison, D., Peerapornpisal, Y. & Wongpoomchai, R. 2013b. Evaluation of hepatic antioxidant capacities of *Spirogyra neglecta* (Hassall) Kützing in rats. **Interdisciplinary Toxicology**, 6(3), 152-156.
- Utmaungkam, C. 2009. **Development of kai algae jelly product**. Master's Thesis. Srinakharinwirot University.
- Vajraguta, O., Boonchoong, P., Boonyarut, J. & Utsintong, M. 2007. **Radical scavenging agents**. Bangkok: Newthaimit press, 280 p. [in Thai].
- Wangcharoen, W. 2006. **Sensory evaluation of food**. Chiang Mai: Faculty of Engineering and Agro-industry, Maejo University, 321 p.
- Watts, B. M., Ylimaki, G. L., Jeffery, L. E. & Elias, L. G. 1989. **Basic sensory methods for food evaluation**. Canada: International Development Research Centre, 130 p.
- Wirasorn, K., Klarod, K., Hongsrabha, P. & Boonsiri, B. 2014. Oxidative Stress, Antioxidant and Cancer. **Srinagarind Medical Journal**, 29(2), 207-219.
- Wongyai, S., Kridid, A. & Nasae, J. 2017. The rational drug use in Diabetes mellitus. **Journal of Boromarajonani College of Nursing**, 33(3), 158-165.
- World Health Organization. 2011. **Noncommunicable diseases country profiles**. France: World Health Organization.
- Zhang, W. W., Duan, X. J., Huang, H. L., Zhang, Y. & Wang, B. G. 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 Phycology*, 19(2), 97-108.





ภาคผนวก



หนังสืออนุมัติการใช้สัตว์  
คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

หมายเลขโครงการ: ๓๐/๒๕๖๑  
ชื่อโครงการวิจัย: การเพิ่มมูลค่าสาหร่ายน้ำจืดเป็นอาหารสุขภาพชนิดเจล  
ชื่อหัวหน้าโครงการวิจัย: ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นริศรา ไส้เลิศ  
สังกัด: ภาควิชาสรีรวิทยา คณะแพทยศาสตร์

คณะแพทยศาสตร์ โดยความเห็นชอบของคณะกรรมการกำกับดูแลการเลี้ยงและการใช้สัตว์ทดลอง ได้พิจารณาโครงการวิจัยแล้ว เห็นว่าไม่ขัดต่อแนวทางสากลและประเทศในการปฏิบัติเกี่ยวกับการดูแลและใช้สัตว์

จึงอนุมัติให้ดำเนินการภายในขอบเขตของโครงการวิจัยที่เสนอมานี้ได้ ทั้งนี้มีผลตั้งแต่วันที่ ๑ พฤศจิกายน ๒๕๖๑

(ศาสตราจารย์ นายแพทย์มานิต ศรีสุวานนท์)

ประธานคณะกรรมการ

กำกับดูแลการเลี้ยงและการใช้สัตว์ทดลอง

วันที่ 16 พค. 61

(ศาสตราจารย์ นายแพทย์บรรณกิจ โฉมนากิวัดน์)

คณบดี

วันที่ 20 พย 61

## การนำเสนอผลงานวิจัย

1. การประชุมวิชาการ 2<sup>nd</sup> GCIC, 46<sup>th</sup> National and 9<sup>th</sup> International Graduate Research Conference วันที่ 17-18 สิงหาคม 2560 ณ ศูนย์ประชุมนานาชาติดิเอ็มเพรส โรงแรมดิเอ็มเพรส จังหวัดเชียงใหม่



## Proceedings

2<sup>nd</sup> National Graduate Research Conference and Creative  
Innovation Competition

“Graduate Research and Innovation for Economic and Social  
Sustainability”

May 17–18, 2018

The Empress Hotel, Chiang Mai, Thailand

Copyright © 2018  
Published by:  
Graduate School, Maejo University



มหาวิทยาลัยแม่โจ้ มหาวิทยาลัยบูรพาและบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเชียงใหม่  
ระหว่างวันที่ 17-18 พฤษภาคม 2561  
ณ ศูนย์ประชุมและแสดงสินค้านานาชาติเฉลิมพระเกียรติ 7 รอบพระชนมพรรษา เชียงใหม่



IGRCD2010092

### Chemical Compound and Biological Properties of Freshwater Macroalgae Extracts from *Spirogyra neglecta* and *Rhizoclonium hieroglyphicum*

Rattanaporn Janthip<sup>1\*</sup>, Narissara Lailerd<sup>2</sup>, Wiwat Wangchareon<sup>3</sup>, Kriangsak Mangumphan<sup>4</sup>  
and Doungporn Amornlerdpison<sup>4</sup>

<sup>1</sup> Agricultural Interdisciplinary Program, Graduate School, Maejo University, Chiang Mai, Thailand

<sup>2</sup> Department of Physiology, Faculty of Medicine, Chiang Mai University, Chiang Mai Thailand

<sup>3</sup> Faculty of Engineering and Agro-industry, Maejo University, Chiang Mai, Thailand

<sup>4</sup> Faculty of Fisheries Technology and Aquatic Resources, Maejo University, Chiang Mai, Thailand

\*Corresponding author, e-mail: [noiplant@yahoo.com](mailto:noiplant@yahoo.com)

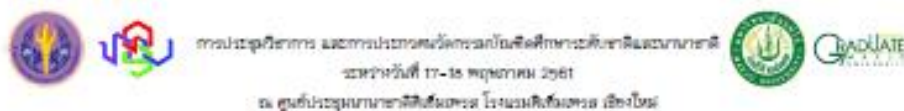
#### Abstract

*Spirogyra neglecta* and *Rhizoclonium hieroglyphicum* are freshwater green macroalgae in Northern of Thailand and have been used for the traditional foods according to their nutrients. These algae extracts displayed the biological activities, including anti-inflammatory, anti-oxidant and anti-diabetic activities as well as reduced blood glucose and triglyceride. The previous research reported the phenolic compounds are the active components in the freshwater green algae. This research aimed to determine the heavy metal contamination using ICP-MS (inductive coupled plasma mass spectrometer) and biochemical properties of aqueous extracts of both algae. The results showed the percentage yield of aqueous extracts of *S. neglecta* and *R. hieroglyphicum* were 35.51% and 38.41%, respectively. The contents of heavy metals which are arsenic, lead, mercury, cadmium and chromium were not detected in both of the algae extracts. The appearance of *S. neglecta* extract was dried dark green powder and *R. hieroglyphicum* extract was dried brown powder. The total phenolic contents were determined using Folin-Ciocalteu reagent method and analyzed abundance of important component using LC-MS (liquid chromatography mass spectrometer). The results showed that the *S. neglecta* aqueous extract (SA) and *R. hieroglyphicum* aqueous extract (RA) contained 107.02±1.03 and 8.58±0.10 mgGAE/ g extract, respectively. The isoquercetin contents of SA and RA were 288 and 264 mg/kg extract, respectively. The antioxidant capacity found in SA and RA were 379.01±3.08 and 4.95±0.08 TEAC/g extract, respectively in ABTS radical scavenging model. It can be concluded that both of the algae extracts were safe for consumption and have antioxidant potential which have been used as functional ingredients in food.

**Keywords:** *Rhizoclonium hieroglyphicum*, *Spirogyra neglecta*, phenolic contents, isoquercetin, antioxidant capacity

#### INTRODUCTION

*Spirogyra neglecta* is a genus of filamentous green algae of the Chlorophyta division. It is commonly found in freshwater areas and there are more than 400 species of *Spirogyra* in the world. *Spirogyra* sp. is an edible freshwater macroalga, consumed as traditional food in the north and northeast of Thailand due to its high nutrient content including vitamins, minerals and phenolic content [1]. *Rhizoclonium hieroglyphicum* has been naturally grown in the north of Thailand. It is commonly known in Thai as "Kai." Local people have traditionally used this alga as an ingredient in several northern Thai dishes. The alga exhibits maximum growth during the dry season (November-March), when the temperature and velocity of water are low [2]. The nutritional value of dried algae consists of protein 16.7%, carbohydrate 55.7%, lipid 18.1%, fiber, vitamin (A, B, C and E) and minerals [3,4]. These algae extracts display the biological activities, including anti-inflammatory, anti-gastric ulcer, anti-bacterial, anti-oxidant, anti-cancer, anti-mutagenic and anti-diabetic activities [5-13] as well as reduced blood glucose and triglyceride. [14] Besides, the freshwater algae extracts are loaded with bioactive compounds such as polysaccharide and



polyphenolic components (gallic acid, isoquercetin, quercetin, catechin and tannic acid etc.) [13]. Phenolics which are the secondary metabolite and the anti-oxidant substance displayed the biological properties. The chemical structure of phenolic consists of a hydroxyl group bounded directly to an aromatic hydrocarbon group [15]. They were found in plant, fruits, vegetables and beverages [16]. Isoquercetin and catechin displayed the main phenolic components in *S. neglecta* extract [13], [17]. This study was to determine the heavy metal contamination and biochemical properties of aqueous extracts of freshwater green macroalgae for safety of consumption and antioxidant potential which have been used as functional ingredients in food.

## MATERIALS AND METHODS

### Chemicals

Folin-Ciocalteu reagent (Merck, Germany), Sodium carbonate, Gallic acid, 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid); ABTS (Sigma-Aldrich, USA), Potassium persulphate (Sigma-Aldrich, USA), Trolox (Sigma-Aldrich, USA), isoquercetin (Sigma-Aldrich, Germany). All other chemical reagent used in this study were of analytical grade.

### Preparation of algae extracts

*S. neglecta* was collected from Nakuha village, Muang district, Phrae province, Thailand. *R. hieroglyphicum* was collected from Nongbuea village, Thawangpha district, Nan province, Thailand. The macroalgae were dried in the oven at 55 to 60°C for 48 hours. Each of dried algae was boiled with distilled water at 95 to 100°C for 1 hour. The algae extract solution was concentrated using a rotary evaporator and was lyophilized with a freeze dryer to obtain the dried extract. They were kept at -20°C until use.



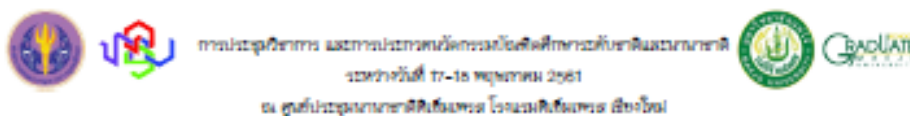
Fig.1 (a) Characteristic of fresh *S. neglecta* (a) and (b) cell under the microscope (10x)



Fig.2 (a) Characteristic of fresh *R. hieroglyphicum* and (b) cell under the microscope (40x)

### Determination of the heavy metal contamination

The determination of heavy metals (arsenic (As), lead (Pb), mercury (Hg), cadmium (Cd) and chromium (Cr)) contents in algae extracts were analyzed using inductive coupled plasma mass spectrometer (ICP-MS) on an Agilent 7700 Series ICP-MS (Agilent technologies, Germany). The



dry ashing method was used for sample preparation according to the AOAC method (2000). The sample test (0.2g) weigh into crucible and dry at 500 °C (temperature-controlled furnace and slowly raise temperature to 500 °C) for 16 hours. Remove the sample ash, let cool to room temperature and added 10ml 1M hydrochloric acid to dissolve ash by heating on hot plate. Transfer to 25ml volumetric flask and added 1M hydrochloric acid to volume 25ml and mixed. The standard curves of mixed standard solution were used to evaluate the heavy metal contents.

#### Determination of the total phenolic contents

The total phenolic contents of algae extracts were determined using the Folin-Ciocalteu method. [18] Sample solution (0.2 ml) was mixed with 1.0 ml of 10% Folin-Ciocalteu reagent and 0.8 ml of 7.5% sodium carbonate. The absorbance of the reaction mixture was measured spectrophotometer at 765 nm after 1 hour of incubation at room temperature. Results were expressed as gallic acid equivalents (GAE) per gram of extract.

#### Determination of Isoquercetin

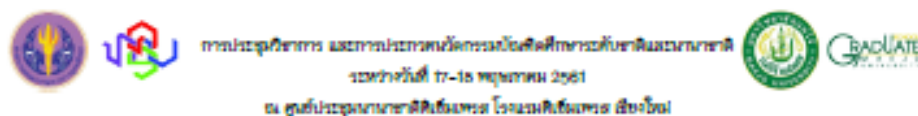
The determination of isoquercetin content was analyzed using liquid chromatography and mass spectrometry techniques on an Agilent Technologies 1100 series, equipped with a LiChroCART RP-18e column (4.6mm x 150 mm x 5mm) and diode array detector recording at 270, 330, 350 and 370nm. The mobile phases were a binary solvent system consisting of acetonitrile (A) and 10mM Ammonium formate, pH 4 (B). The gradient used was 5min 100%B, 5min 20%A, 10min 20%A, 40min 40%A. The isoquercetin contents were generated and calculated from the peak area of chromatogram.

#### ABTS radical scavenging activity

The ABTS radical cation (ABTS<sup>•+</sup>) scavenging method was modified. [19] The ABTS<sup>•+</sup> was produced by reacting 7 mM ABTS stock solution with 2.45 mM potassium persulphate and allowing the mixture to stand in the dark at room temperature for 12-16 hours before use. The ABTS<sup>•+</sup> solution was diluted with deionized water to an absorbance of 0.70 (±0.05) at 734 nm. Each of extracts (200 µl) was mixed with 1.8 ml of diluted ABTS<sup>•+</sup> solution. The decrease of absorbance was recorded after mixing. Trolox was used as standards. The results were expressed in mM Trolox equivalents (TEAC) per gram of extract. The assay was performed in triplicate.

## RESULTS AND DISCUSSIONS

The results showed the percentage yield of aqueous extracts of *S. neglecta* and *R. hieroglyphicum* were 35.51% and 38.41%, respectively. The appearance of *S. neglecta* extract was dried dark green powder and *R. hieroglyphicum* extract was dried brown powder. (Table1) The both algae extracts have been dissolved in water. The contents of heavy metals as arsenic, lead, mercury, cadmium and chromium were analyzed using ICP-MS were not detected in the both of algae extracts. *S. neglecta* and *R. hieroglyphicum* have been consumed as traditional food in the north of Thailand. They could be contaminated with a number of heavy metals. The arsenic, lead, mercury, cadmium and chromium are well known that an overdose of trace elements is harmful to health. It was reported in Japan that consuming cadmium contaminated rice could cause Itai-Itai disease [20].



**Table 1** Percentage yield (%) and the appearance of macroalgae (*S. neglecta* and *R. hieroglyphicum*) extracts.

Sample	Percentage of yield (%)	Appearance
<i>S. neglecta</i>	35.51	dark green powder
<i>R. hieroglyphicum</i>	38.41	brown powder

Algae, a group of marine or freshwater organisms provided the total phenolic contents and antioxidant capacity that they have been associated the quality of extract including color, flavor, properties, and nutrition [21]. The total phenolic contents were determined using Folin-Ciocalteu reagent method found that the *S. neglecta* aqueous extract (SA) and *R. hieroglyphicum* aqueous extract (RA) contained 107.02±1.03 and 8.58±0.10 mgGAE/ g extract, respectively. The phenolic substances are known to possess the ability to reduce oxidative damage [22], probably by trapping free radicals directly or scavenging them through a series of coupled reactions with antioxidant enzymes [23]. Phenolic compounds were reported to have many pharmacological properties (e.g. anti-inflammatory, anti-gastric, anti-mutagenic and anti-cancer activities [5-12]. The antioxidant capacity found that SA and RA were 379.01±3.08 and 4.95±0.08 mM TEAC/g extract, respectively in ABTS radical scavenging model (Table 2). The ABTS radical scavenging method has been widely used to evaluate the antioxidant capacity of compounds due to the simple, rapid, sensitive, and reproducible procedure [24]. Thus, SA and RA displayed the antioxidant capacity of phenolics were extracted by hot water and the phenolic hydroxyl groups are good hydrogen donors. They are also attributed to their ability to chelate metal ions involved in the production of free radicals [25].

**Table 2** Total phenolic contents, Isoquercetin contents and ABTS radical scavenging capacity of *S. neglecta* and *R. hieroglyphicum*) extracts.

Extracts	Total phenolic contents (mgGAE/ g extract)	Isoquercetin contents (mg/ kg extract)	ABTS radical scavenging capacity (mM TEAC/ g extract)
<i>S. neglecta</i>	107.02 ±1.03	288	379.01±3.08
<i>R. hieroglyphicum</i>	8.58±0.10	264	4.95±0.08

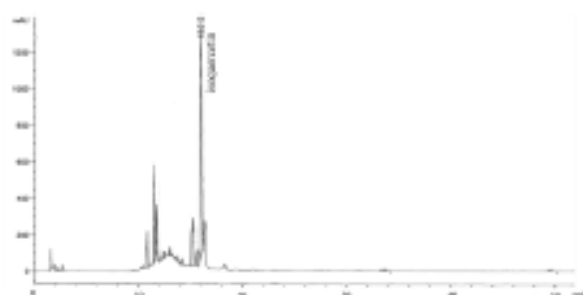
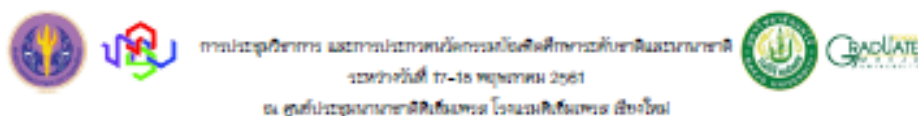


Fig.4 Isoquercetin chromatogram of *S. neglecta* aqueous extract using LC-MS

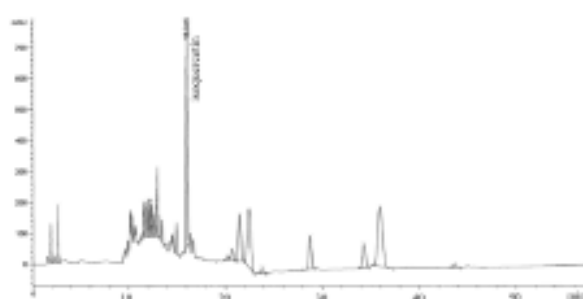


Fig.5 Isoquercetin chromatogram of *R. Hieroglyphicum* aqueous extract using LC-MS

The LC-MS (liquid chromatography mass spectrometer) analysis of SA and RA showed in Fig 3-5. They found that the isoquercetin content of SA and RA were 288 (at retention time (RT) 16.013) and 264 (at RT 16.045) mg/kg extract, respectively. Isoquercetin (quercetin -3-O-glucopyranoside) is one of the most common glycosides of quercetin occurring in various fruits and vegetables, and currently one of the most popular flavonoids used in various food supplements with a large number of potential health benefits [26,27]. However, SA and RA were indicated the biomarker of extract for functional ingredients in food.

#### CONCLUSIONS

This study indicated that macroalgae extracts from *S. neglecta* and *R. Hieroglyphicum* are safe for consumption without the heavy metal contamination including arsenic, lead, mercury, cadmium and chromium. The LC-MS analyses of phenolic compounds indicated the presence of isoquercetin as bioactive compounds. The extracts of *S. neglecta* and *R. Hieroglyphicum* demonstrated antioxidant activity. It can be concluded that both of the algae extracts were safe for consumption and have antioxidant potential which have been used as functional ingredients in food.

#### ACKNOWLEDGEMENTS

The authors gratefully acknowledge use of the services and facilities of the Graduate Central Laboratory, Faculty of Fisheries Technology and Aquatic Resources and Institute of Product Quality and Standardization (IQS), Maejo University, Chiang Mai, Thailand. This research was



มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม

ระหว่างวันที่ 17-18 พฤษภาคม 2561

ณ ศูนย์ปฏิบัติการวิจัยและพัฒนา เลี้ยงสัตว์น้ำ กำแพงแสน จังหวัดนครปฐม



supported by Research and Researcher for Industry (RRi) grant: PHD59I0010 and Ampol Food Processing Co., Ltd.

#### REFERENCES

1. T. Rattanapot, K. Mengumphan, C. Srimaroeng, R. Junthip and D. Amornlerdpison, "Antioxidant activity of *Spirogyra* sp. and effect of its supplementation on growth performance of tilapia in cage culture". *J. Fish. Tech. Res.*, 2012, 6(2), 23-34.
2. Y. Peerapornpisal, D. Kanjanapothi, T. Taesotikul and D. Amornlerdpison, "Potential of some freshwater algae in Northern Thailand as nutraceutical". *Phycologia*, 2009, 48(4), 104.
3. S. Tipnee, R. Ramaraj and Y. Unpaprom, "Nutritional Evaluation of Edible Freshwater Green Macroalga *Spirogyra varians*". *Emer. Life. Sci. Res.*, 2015, 1(2), 1-7.
4. T. Khuantairong and S. Traichaiyaporn, "The nutritional value of edible freshwater alga *Cladophora* sp. (Chlorophyta) grown under different phosphorus concentrations. *Int. J. Agric. Biol.*, 2011, 13, 297-300.
5. Y. Peerapornpisal, T. Panyoyai, and D. Amornlerdpison, "Antioxidant and anti-inflammatory activities of *Spirogyra neglecta* (Hassall) Kützing". *KKU Sci. J.*, 2012, 40(1), 228-235.
6. Y. Peerapornpisal, D. Amornlerdpison, C. Rujjanawate, K. Ruangrit and D. Kanjanapothi, "Two Endemic Species of Macroalgae in Nan River, Northern Thailand, as Therapeutic Agents". *Sci. Asia*, 2006, 32, 71-76.
7. D. Amornlerdpison, K. Mengumphan, S. Thumvijit and Y. Peerapornpisal, "Antioxidant and Anti-inflammatory Activities of Freshwater Macroalga, *Cladophora glomerata* Kützing". *Thai J. Agric. Sci.*, 2011, 44(5), 283-290.
8. S. Soltani, S. Saadatmand, R. Khavarinejad and T. Nejadstari, "Antioxidant and antibacterial activities of *Cladophora glomerata* (L.) Kütz. In Caspian sea coast, Iran". *Afr. J. Biotechnol.*, 2011, 10(39), 7684-7689.
9. R. Laungsuwon, and W. Chulalaksananukul, "Chemical composition and antibacterial activity of extracts from freshwater green algae, *Cladophora glomerata* Kützing and *Microspora floccosa* (Vaucher) Thuret". *J. Bio. Sci. Biotech.*, 2014, 3(3), 211-218.
10. R. Janthip, D. Amornlerdpison and T. Chimsook, "Phytochemical Screening, Antioxidant Activity and Total Phenolic Content of *Spirogyra* spp.". *Adv. Mat. Res.*, 2013, 699, 693-697.
11. T. Thumvijit, W. Inboot, Y. Peerapornpisal, D. Amornlerdpison and R. Wongpoomchai, "The antinutagenic and antioxidant properties of *Spirogyra neglecta* (Hassall) Kützing". *J. Med. Plants Res.*, 2013, 7(34), 2494-2500.
12. R. Laungsuwon, and W. Chulalaksananukul, "Antioxidant and anticancer activities of freshwater green algae, *Cladophora glomerata* and *Microspora floccosa*, from Nan River in northern Thailand". *Majyo Int. J. Sci. Technol.*, 2013, 7(20), 181-188.
13. A. Ontawong, N. Saowakon, P. Vivithanaporn, A. Pongchaidecha, N. Lailerd, D. Amornlerdpison, A. Lungkaphin and C. Srimaroeng, "Antioxidant and Renoprotective Effects of *Spirogyra neglecta* (Hassall) Kützing Extract in Experimental Type 2 Diabetic Rats". *Bio. Med. Res. Int* 2013, 1-15.
14. N. Lailerd, A. Pongchaidecha, D. Amornlerdpison and Y. Peerapornpisal, "Beneficial effects of *Spirogyra neglecta* extract on glycemic and lipidemic status in streptozotocin-induced Diabetic rats fed a diet enriched in fat". *Ann. Nutr. Metab.*, 2009, 55(S1), 609.
15. R. Randhir, Y. T. Lin, and K. Shetty, "Phenolics, their antioxidant and antimicrobial activity in dark germinated fenugreek sprouts in response to peptide and phytochemical elicitors". *Asia Pac. J. Clin. Nutr.*, 2004, 13, 295-307.
16. N. Balasundram, K. Sundram, and S. Samman, "Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses". *Food Chem.*, 2006, 99, 191-203.



กรมส่งเสริมการค้าระหว่างประเทศ กระทรวงพาณิชย์  
 ระหว่างวันที่ 17-18 กุมภาพันธ์ 2561  
 ณ ศูนย์ประชุมอเนกประสงค์กาญจนาภิเษก กรุงเทพมหานคร



17. A. Duangjai, N. Limpeanchop, K. Trisat and D. Amornlerdpison, "Spirogyra neglecta inhibits the absorption and synthesis of cholesterol" *Integr. Med. Res.*, 2016, 5(4), 301-308.
18. P.A. Hammerschmidt, and D.E. Pratt, Phenolic antioxidants of dried soybeans. *J. Food Sci.*, 1978, 43(2), 556-559.
19. R. Re, N. Pellegrini, A. Proteggente, A. Pannala, M. Yang and C. Rice-Evans, "Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay", *Free Radic. Biol. Med.*, 1999, 26(9-10), 1231-1237.
20. M. Kaneta, H. Hikichi, S. Endo and N. Sugiyama, "Chemical form of cadmium (and other heavy metals) in rice and wheat plants". *Environ. Health Perspect.* 1986, 65, 33-37.
21. L. Machu, L. Misurcova, J. V. Ambrozova, J. Orsavova, J. Míček, J. Sochor and T. Jurikova, "Phenolic Content and Antioxidant Capacity in Algal Food Products", *Molecules*, 2015, 20, 1118-1133.
22. B. Halliwell, "Oxidative damage, lipid peroxidation and antioxidant protection in chloroplasts". *Chem. Phys. Lipids*, 1987, 44, 327-340.
23. N.G. Lewis, Plant phenolics. In: Alscher, R.G. and Hess, J.L. (Eds). "Antioxidants in higher plants". Boca Raton, FL: CRC Press, 1993, 135-169.
24. L.P. Leong, and G. Shui, "An onvestigation of antioxidant capacity of fruits in Singapore markets". *Food Chem.*, 2002, 76, 69-75.
25. D.M. Pereira, P.A. Valentão, J.A. Pereira and P.B. Andrade, "Phenolics: From Chemistry to Biology", *Molecules*, 2009, 14, 2202-2211.
26. K. Valentova, J. Vrba, M. Bancirova, J. Ulrichova, and V. Kren, "Isoquercitrin: Pharmacology, toxicology, and metabolism". *Food Chem. Toxicol.* 2014, 68, 267-282.
27. W.Y. Wang, C.X. Sun, L.K. Mao, P.H. Ma, F.G. Liu, J. Yang, and Y.X. Gao, "The biological activities, chemical stability, metabolism and delivery systems of quercetin: A review". *Trends Food Sci. Technol.* 2016, 56, 21-38.

2. การประชุมวิชาการระดับชาติ ประจำปี 2561 ณ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ เชียงใหม่ วันที่ 11-13 ธันวาคม 2561 เรื่องผลของตัวทำละลายต่อปริมาณสารประกอบฟีนอลิกและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดสาหร่ายไก่อ (Effect of Solvents Extraction on Polyphenolic Content and Antioxidant Activity of *Rhizoctonium hieroglyphicum* extract)





### Abstract

*Rhizoclonium hieroglyphicum* is an edible freshwater macroalga, consumed as traditional food in north and northeast of Thailand. It was collected from Nan river, Nan province. Four extracts (hexane, acetone, ethanol and aqueous (90°C)) were used in quantity the phenolic contents and antioxidant capacity using ABTS radical scavenging activity assay. The results of extraction were 1.34, 2.17, 6.71 and 46.97%, respectively. The results of antioxidant activity found that the aqueous extract had the highest antioxidant activity was  $600.16 \pm 12.66$  mM TEAC/ g extract ( $P < 0.05$ ). The ethanol extract contained the highest polyphenolic content was  $7.37 \pm 0.40$  mg GAE/g extract ( $P < 0.05$ ). It can be concluded that the ethanol and aqueous extracts have high antioxidant potential and polyphenolic content which have been used as functional ingredients in nutraceutical and cosmeceutical products.

**Keywords:** *Rhizoclonium hieroglyphicum*, solvents, antioxidant, ABTS, polyphenolic

### คำนำ

สาหร่ายไค ( *Rhizoclonium hieroglyphicum* ) เป็นสาหร่ายที่ได้รับความนิยมในการนำมารับประทานเป็นอาหารพื้นบ้านมาเป็นเวลานาน เช่น ไคถี และไคแผ่นทอดกรอบ มีคุณค่าทางโภชนาการสูง ซึ่งมีโปรตีนประมาณ 20-25% ของน้ำหนักแห้ง สาหร่ายไคยังมีซีโอเนียมซึ่งเป็นเกลือแร่ที่มีความสามารถด้านการเกิดอนุมูลอิสระในปริมาณที่สูง (ยูวดี, 2555) พบสารสำคัญที่มีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ ได้แก่ สารประกอบฟีนอลิก และสารสำคัญกลุ่มโพลีแซ็กคาไรด์ จากรายงานการทดสอบฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา พบว่า สารสกัดสาหร่ายไคนอกจากมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระทั้งในหลอดทดลองและในสัตว์ทดลอง มีฤทธิ์ป้องกันการเกิดแผลในกระเพาะอาหาร ฤทธิ์ด้านการอักเสบ และมีความปลอดภัยในการรับประทาน โดยไม่พบอาการผิดปกติของหนูขาวเมื่อทดสอบความเป็นพิษเฉียบพลัน สาหร่ายไคยังสามารถป้องกันการเกิดภาวะแทรกซ้อนที่ไตที่เกิดจากภาวะเบาหวาน (Amornleerdpison *et al.*, 2011; Seimaroeng *et al.*, 2014) จากรายงานการวิจัยสาหร่ายไคยังมีคุณสมบัติในการก่อกวนเซลล์ โดยสารสกัดสาหร่ายไคด้วยน้ำในขนาด 10% มีความสามารถในการก่อกวนเซลล์ใกล้เคียงกับสารจันเนนในขนาด 1% ซึ่งเป็นสารก่อกวนที่สกัดมาจากสาหร่ายทะเลสีแดงและนิยมนำมาใช้ในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง ยา และอาหาร (Mungmai, 2013; Leelapompisid *et al.*, 2014)

การเผาผลาญของเซลล์ในร่างกายมนุษย์โดยการใช้ออกซิเจน จะทำให้เกิดอนุมูลอิสระขึ้น ซึ่งจะมีผลต่อต่อการเกิดปฏิกิริยา เป็นผลให้เกิดภาวะที่เซลล์และร่างกายถูกออกซิไดส์จนเกินสมดุล (oxidative stress) เกิดเป็นโรคต่าง ๆ การวัดระดับภาวะถูกออกซิไดส์ซึ่งว่ามากน้อยเพียงใด ทำให้สามารถป้องกัน และรักษาโรคได้อย่างมีประสิทธิภาพ ดังนั้นระดับการออกซิไดส์เกินสมดุลจึงใช้เป็นค่าบ่งชี้หรือดัชนีทางชีวภาพที่สำคัญสำหรับใช้ชี้วัดการเกิดโรคและความรุนแรงของโรค (โศภา, 2550) สารประกอบฟีนอลิก จัดเป็นสารต้านอนุมูลอิสระชนิดหนึ่งที่สามารถพบได้ตามธรรมชาติในพืชหลายชนิด เช่น ผัก ผลไม้ เครื่องเทศ สมุนไพร ถั่วเมล็ดแห้ง เมล็ดธัญพืช (Pourmorad *et al.*, 2006)

มีฤทธิ์ทางชีวภาพหลายอย่าง เช่น ค้านแบคทีเรีย ค้านไวรัส ค้านการอักเสบและเพิ่มภูมิคุ้มกันให้กับร่างกาย เป็นต้น (Ghasemzadeh et al., 2010)

จากรายงานการวิจัยดังกล่าวจึงมีแนวคิดในการคัดเลือกหาตัวทำละลายที่เหมาะสมสำหรับการสกัดสาหร่ายไค เพื่อให้ได้สารสกัดที่มีความปลอดภัยและมีฤทธิ์ชีวภาพที่เป็นประโยชน์ต่อร่างกาย เพื่อนำมาพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์อาหารสุขภาพและเวชสำอาง โดยเน้นฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ซึ่งช่วยป้องกันการเกิดโรคเรื้อรังหลายชนิดได้ นอกจากนี้ยังได้ผลิตภัณฑ์อาหารสุขภาพและเวชสำอางที่เป็นประโยชน์ต่อผู้บริโภค แล้วจึงเป็นการสร้างมูลค่าเพิ่มให้กับวัตถุดิบพื้นบ้าน ช่วยสร้างรายได้ให้กับชาวบ้านและชุมชนที่มีการเก็บหรือเพาะเลี้ยงสาหร่าย และสร้างอาชีพที่มั่นคงให้กับเกษตรกรอย่างยั่งยืนต่อไปได้

### อุปกรณ์และวิธีการ

#### การเตรียมสารสกัดสาหร่ายไค

นำสาหร่ายไคแห้งที่ผ่านการอบลมร้อนอุณหภูมิ 55-60°C. เป็นเวลา 48 ชั่วโมง บดเป็นผงละเอียด นำผงสาหร่ายไคแห้ง 100 กรัม มาแช่ในน้ำทำละลายแต่ละชนิด (เฮกเซน อะซิโตน และเอทานอล) ปริมาตร 2,000 มล. นาน 48 ชั่วโมง จากนั้นกรองแยกกากสาหร่ายออก นำกากสาหร่ายมาสกัดซ้ำอีก 2 รอบ นำสารละลายที่ได้ทั้งหมดมารวมกัน จากนั้นนำมากรองด้วยกระดาษกรอง เบอร์ 1 ี่ห้อ Whatman ก่อนนำไประเหยเอาน้ำออก ภายใต้สภาวะสูญญากาศด้วยเครื่อง rotary evaporator จนได้สารละลายเข้มข้น นำไปทำให้แห้งด้วยเครื่อง freeze dryer จนได้สารสกัดสาหร่ายแห้ง ส่วนการเตรียมสารสกัดสาหร่ายไคด้วยน้ำ นำมาสกัดโดยวิธีการคั้นด้วยน้ำที่อุณหภูมิ 90-100°C. เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นกรองแยกกากสาหร่ายออก นำกากสาหร่ายมาสกัดซ้ำอีก 2 รอบ นำสารละลายที่ได้ทั้งหมดมารวมกัน กรองด้วยกระดาษกรอง เบอร์ 1 ี่ห้อ Whatman นำไประเหยเอาน้ำออกด้วยเครื่อง rotary evaporator และทำให้แห้งด้วยเครื่อง freeze dryer จนได้สารสกัดแห้ง (Figure 1) จะได้สารสกัดสาหร่ายไคทั้งหมด 4 ชนิด จึงนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20°C. ก่อนนำไปทดสอบต่อไป

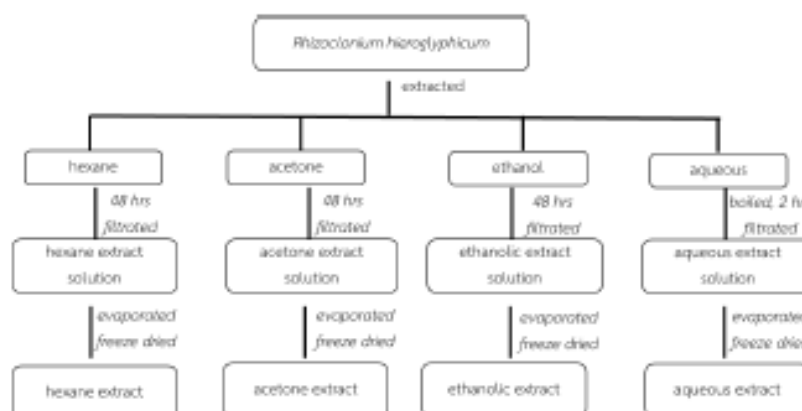


Figure 1 Flow diagram of extraction procedure for *R. hieroglyphicum*

#### การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

ทำมาการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในสารสกัดสาหร่ายโกลด์ด้วยวิธี ABTS radical scavenging activity ตามวิธีการของ 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 ไมโครโมลาร์ เก็บในที่มืด 16 ชั่วโมง นำมาเจือจางด้วยน้ำที่ปราศจากไอออน (deionized water) ในการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ABTS<sup>•+</sup> หนึ่งหน่วย 1.8 มล. ลงในหลอดที่มีสารทดสอบหรือน้ำที่ปราศจากไอออน ผสมให้เข้ากันทิ้งไว้ 6 นาที วัดค่าดูดกลืนแสงที่ 734 นาโนเมตรโดยใช้น้ำเป็น blank ค่าหน่วยฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ABTS<sup>•+</sup> เป็นร้อยละจากผลการดังนี้

$$\text{ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ABTS}^{\bullet+} (\%) = [1 - (A_{734} \text{ sample} / A_{734} \text{ control})] \times 100$$

เมื่อ  $A_{734} \text{ sample}$  และ  $A_{734} \text{ control}$  เป็นค่าดูดกลืนแสงที่ 734 นาโนเมตรของสารทดสอบและน้ำที่ปราศจากไอออน ตามลำดับ เปรียบเทียบความเข้มข้นของสารทดสอบกับความเข้มข้นของ Trolox ซึ่งเป็นอนุพันธ์ของวิตามินอี ที่แสดงฤทธิ์เท่ากัน (Trolox equivalent antioxidant capacity; TEAC)

#### การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิก

การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิก (Polyphenolic content) โดยใช้ Folin Ciocalteu reagent ตามวิธีการ Hammerschmidt and Pratt (1978) คัดแปลงจากวิธี Folin-Ciocalteu method ดังนี้ ผสมสารทดสอบ 0.2 มล. กับสารละลาย 10% Folin-Ciocalteu 1 มล. และสารละลาย 7.5% โซเดียมคาร์บอเนต 0.8 มล. ทิ้งส่วนผสมไว้ 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง วัดค่าดูดกลืนแสงที่ 765 นาโนเมตร คำนวณปริมาณสารประกอบฟีนอลิกโดยเทียบกับสารมาตรฐาน คือ กรดแกลลิก (3,4,5-trihydroxybenzoic acid) ในหน่วย mg GAE/g extract ซึ่งหมายถึงสารสกัดสาหร่าย 1 กรัม มีปริมาณฟีนอลิกเมื่อเทียบกับปริมาณกรดแกลลิกเป็นมิลลิกรัม

#### ผลการวิจัย

สาหร่ายโกลด์ (*Rhizoclonium hieroglyphicum*) ถูกนำมาสกัดด้วยตัวทำละลาย 4 ชนิด คือ เฮกเซน อะซีโตน เมทานอล และน้ำ และใช้การทำแห้งด้วยวิธีแบบเยือกแข็ง (freeze dry) ได้สารสกัดหยาบปริมาณร้อยละผลผลิตสารสกัด (%yield) เท่ากับ 1.34, 2.17, 6.71 และ 46.97% ตามลำดับ โดยลักษณะสารสกัดสาหร่ายโกลด์เฮกเซนและอะซีโตน มีลักษณะเหนียวข้นหนืด มีสีเขียวเข้ม ส่วนสารสกัดด้วยเมทานอลมีลักษณะเป็นผงแห้งสีเขียวเข้ม และสารสกัดด้วยน้ำมีลักษณะเป็นผงแห้งสีน้ำตาลเข้ม (Table 1 และ Figure 2)

Table 1 Percentage yield and appearance of *R. hieroglyphicum* extracts

<i>R. hieroglyphicum</i> extract	Percentage yield (%)	Appearance
Hexane	1.34	viscous, dark green
Acetone	2.17	viscous, dark green
Ethanol	6.71	dark green powder
Aqueous	46.97	dark brown powder

Figure 2 Characteristic appearance of *R. hieroglyphicum* extracts with 4 various solvents (hexane, acetone, ethanol and aqueous)

ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดทั้ง 4 ชนิด ด้วยวิธีการวัดอนุมูลอิสระอะบิทิเนส (ABTS radical scavenging activity) พบว่า สารสกัดสำหรับไก่ตัวเมีย มีความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระสูงที่สุด รองลงมาคือ เกล็ดปลา และอะซีโตน ตามลำดับ โดยมีค่าเทียบกับสารมาตรฐานโทรลอกซี เท่ากับ 600, 141 และ 119 มิลลิโมลาร์ (mM TEAC/ g extract) ตามลำดับ ซึ่งพบว่ามีค่าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P < 0.05$ ) ส่วนสารสกัดสำหรับไก่ตัวผู้กลับพบว่า ไม่มีความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระอะบิทิเนส เนื่องจากไม่สามารถวัดค่าการดูดกลืนแสงได้ (Table 2, Figure 3)

Table 2 ABTS radical scavenging activity and Polyphenolic content of *R. hieroglyphicum* extracts

<i>R. hieroglyphicum</i> extract	ABTS radical scavenging activity (mM TEAC/ g extract)	Polyphenolic content (mg GAE/ g extract)
Hexane	0.00±0.00 <sup>a</sup>	1.30±0.00 <sup>a</sup>
Acetone	119.14±8.99 <sup>b</sup>	3.85±0.06 <sup>b</sup>
Ethanol	141.40±8.44 <sup>c</sup>	7.37±0.40 <sup>c</sup>
Aqueous	600.16±12.66 <sup>d</sup>	4.16±0.15 <sup>b</sup>

Data expressed as mean ± SD, (n=5). The same letters within each column indicate statistically significant different ( $P < 0.05$ ) according to Duncan's Multiple Range Tests.

การวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกสารสกัดสาหร่ายโกล พบว่า สารสกัดสาหร่ายโกลด้วยเอทานอลมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกสูงที่สุด รองลงมา คือ สารสกัดด้วยน้ำ อะซิโตน และเฮกเซน มีค่าเท่ากับ 7.37, 4.16, 3.85 และ 1.30 มิลลิกรัมสมมูลแกลลิกต่อกรัมสารสกัด (mg GAE/ g extract) ตามลำดับ (Table 2) เมื่อนำมาวิเคราะห์ค่าทางสถิติพบว่า สารสกัดด้วยอะซิโตนและน้ำให้ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกไม่ต่างกันทางสถิติ จากผลการศึกษาครั้งนี้พบว่า ได้ปริมาณสารสกัดสาหร่ายโกลด้วยน้ำมากที่สุด และมีฤทธิ์ขจัดอนุมูลอิสระเหนือที่แสดงสูงกว่าสารสกัดที่ใช้ตัวทำละลายอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P \leq 0.05$ ) ส่วนสารสกัดสาหร่ายโกลด้วยเอทานอลมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกสูงที่สุดเมื่อเทียบกับการสกัดด้วยตัวทำละลายทั้ง 3 ชนิด

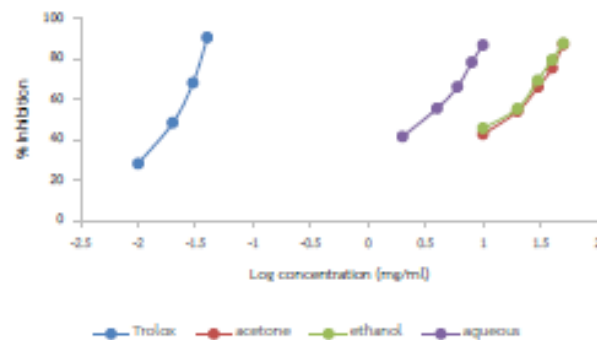


Figure 3 ABTS radical scavenging activity of *R. hieroglyphicum* extracts

### วิจารณ์ผลการวิจัย

การสกัดสารสำคัญในพืชแต่ละชนิดจะต้องเลือกใช้ตัวทำละลายให้เหมาะสม เพื่อให้ได้สารสำคัญที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ เนื่องจากตัวทำละลายแต่ละชนิด สามารถสกัดสารสำคัญได้แตกต่างกัน การเลือกใช้ตัวทำละลายอื่นวิธีในการสกัดสาหร่ายโกล โดยเรียงลำดับจากความเข้มข้นต่ำไปสูง คือ เฮกเซน อะซิโตน เอทานอล และน้ำ พบว่า การสกัดสารประกอบฟีนอลิกในสารสกัดสาหร่ายโกลด้วยเอทานอล (7.37 mg GAE/ g extract) จะได้สารสำคัญมากกว่าการใช้ตัวทำละลายอื่น เช่นเดียวกับการสกัดสาหร่ายพวงอุทุ (*Caulerpa lentillifera*) ด้วยเอทานอลให้ปริมาณสารฟีนอลิกที่สูงกว่าการสกัดด้วยน้ำ (Sumintillo *et al.*, 2014) และในการสกัดสาหร่าย *Ulva cloathrata* ใช้เอทานอลซึ่งเป็นตัวทำละลายที่มีขั้วใกล้เคียงกับเอทานอล พบว่า นอกจากจะให้สารประกอบฟีนอลิก (5.08 mg GAE/ g extract) ยังสกัดสารฟลาโวนอยด์ได้อีกด้วย (Farasat *et al.*, 2014) ส่วนการสกัดสาหร่ายโกลด้วยน้ำจะได้สารออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงกว่าเอทานอล ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดสาหร่ายโกลด้วยน้ำของ Amornleedpison *et al.* (2015) พบว่ามีฤทธิ์ขจัดอนุมูลอิสระเหนือที่แสดงเท่ากับ 123 mM TEAC/ g extract ในขณะที่การวิจัยครั้งนี้มีค่าการขจัดอนุมูลอิสระเท่ากับ 600 mM TEAC/ g extract ผลที่ได้ต่างกันเนื่องจากแหล่งที่มาสถานที่เพาะเลี้ยงและช่วงเวลาที่แตกต่างกัน อย่างไรก็ตามผลการวิจัยดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าสาหร่ายโกลมีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระได้ จากรายงานการวิจัยก่อนหน้านี้พบสารออกฤทธิ์ที่สำคัญในสาหร่ายโกล คือ กลุ่มสารประกอบ

พีนอลิกและโทอีแซคคาไรด์ (Amornlerdpison *et al.*, 2011; Srimarong *et al.*, 2014) คำนึงถึงในกระบวนการสกัดสามารถใช้น้ำและเอทานอลเป็นตัวทำละลายที่เหมาะสมเพื่อให้ได้สารสำคัญสกัดง่าออกมาได้ นอกจากนี้ยังพบว่า สารละลายที่นำมาจากแม่น้ำน่าน อำเภอท่าวังผา จังหวัดน่าน เมื่อนำมาสกัดด้วยน้ำ มีความสามารถในการละลายน้ำได้ง่าย และมีคุณสมบัติของโคโคโธซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Mungmai (2013) จึงสามารถนำมาใช้เป็นส่วนผสมในผลิตภัณฑ์อาหารสุขภาพและเวชสำอางได้ นอกจากนี้สารสกัดยังมีโปรตีนสูง (ฤวิศ, 2556) เมื่อนำมาใช้เป็นส่วนผสมในอาหารปลาพบว่าช่วยให้ปลามีการเจริญเติบโตที่ดี และลดการเกิดภาวะเครียดของปลาคือขึ้นได้อีกด้วย (Amornlerdpison *et al.*, 2015) ซึ่งผลวิจัยนี้ชี้ให้เห็นว่าสามารถนำสารสกัดง่าไปมาใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมอาหารเสริมสุขภาพหรือเวชสำอาง ที่มีสารประกอบพีนอลิกเป็นค้ำอนุบลูอิสรในผลิตภัณฑ์ต่างๆ ได้

### สรุปผลการวิจัย

การสกัดสารสกัดง่าด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ 4 ชนิด คือ เฮกเซน อะซิโตน เอทานอล และน้ำ พบว่าการสกัดด้วยน้ำให้ปริมาณสารสกัดสูงมากกว่าร้อยละ 40 และมีความสามารถละลายน้ำได้ดีมากกว่าสารสกัดอีก 3 ชนิด เมื่อนำสารสกัดมาวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบพีนอลิกรวมและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธีการหาคอนจูมเอบีทีเอส โดยเทียบกับสารมาตรฐานโทรอกซ์ พบว่า สารสกัดสารสกัดง่าด้วยเอทานอลมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระและมีปริมาณสารประกอบพีนอลิกสูงกว่าตัวทำละลายชนิดอื่น จากการศึกษาครั้งนี้สามารถนำสารสกัดสารสกัดง่าไปพัฒนาต่อออกเป็นส่วนผสมของผลิตภัณฑ์ด้านอาหารสุขภาพหรือเวชสำอางที่มีคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระได้ โดยเฉพาะสารสกัดสารสกัดง่าที่สกัดด้วยน้ำและเอทานอลเหมาะสมที่จะนำมาใช้เป็นส่วนผสม เนื่องจากมีความปลอดภัยสูงกว่าเมื่อเทียบกับตัวทำละลายชนิดอื่น

### กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณแก่นักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) สำหรับทุนสนับสนุนการวิจัยระดับปริญญาเอก ภายใต้โครงการพัฒนานักวิจัยและงานวิจัยเพื่ออุตสาหกรรม (พวอ.) รหัสโครงการ PHD590010 ร่วมกับบริษัทอ่าพลูคอส โพรเซสซิ่ง จำกัด และขอขอบคุณคณะเทคโนโลยีการประมงและทรัพยากรทางน้ำ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ สำหรับสนับสนุนค้ำสถานที่และอุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย

### เอกสารอ้างอิง

ฤวิศ พิศพิศา. 2556. สารสกัดง่าในประเทศไทย. พิมพ์ครั้งที่ 3 เชียงใหม่: ภาควิชาชีววิทยา

คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

โสภา วิษระคุปต์ ปรีชา บุญจูง จันทนา บุญระจันต์ และนาสิริรักษ์ อัดดีสินทอง. 2550. สารต้านอนุมูลอิสระ.

พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพฯ: นิวไทม์การพิมพ์.

- Amornlerdpison, D., K. Mengumphan, S. Thumvijit and Y. Peerapompisal. 2011. Antioxidant and anti-inflammatory activities of freshwater macroalga, *Cladophora glomerata* Kützinger. **Thai Journal of Agricultural Science** 44(5): 283-291.
- Amornlerdpison, D., M. Ngernjan, K. Mengumphan, R. Janthip and C. Srimaroeng. 2015. \ Active Compounds and Oxidative Defense of *Cladophora* spp. in Hybrid Catfish **KMUTT Research and Development Journal** 38(4): 393-405.
- Farasat, M., R. Khavari-Nejad, S. Nabawi and F. Namjooyanc. 2014. Antioxidant Activity, Total Phenolics and Flavonoid Contents of some Edible Green Seaweeds from Northern Coasts of the Persian Gulf. **Iranian Journal of Pharmaceutical Research** 13(1): 163-170.
- Ghasemzadeh, A., H.Z.E. Jaafar and A. Rahmat. 2011. Effects of solvent type on young ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) extract. **Journal of Medicinal Plants Research**. 5(7): 1147-1154.
- Hammerschmidt, P.A. and D.E. Pratt. 1978. Phenolic antioxidants of dried soybeans. **Journal of Food Science** 43(2): 556-559.
- Leelapompisid, P., L. Mungmai, B. Srithunyalug, S. Jiranusomkul and Y. Peerapompisal. 2014. A novel moisturizer extracted from freshwater macroalga [*Rhizoclonium hieroglyphicum* (C.Agardh) Kützinger] for skin care cosmetic. **Chiang Mai Journal of Science** 41(5.2): 1195-1207.
- Mungmai, L. 2013. **Characterization of freshwater green macroalgae (*Rhizoclonium hieroglyphicum* (C. Agardh) Kützinger) Extraction and Cosmetic Applications.** Doctoral dissertation. Graduate School. Chiang Mai University. 146p.
- Pourmorad, F., S.J. Hosseinimehr and N. Shahabimajd. 2006. Antioxidant activity, phenol and flavonoid contents of some selected Iranian medicinal plants. **African Journal of Biotechnology** 5(11): 1142-1145.
- Re, R., N. Pellegrini, A. Proteggente, A. Pannala, M. Yang and C. Rice-Evans. 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology and Medicine** 26(9-10): 1231-1237.
- Srimaroeng, C., A. Ontawong, C. Jaiyen, A. Pongchidecha and D. Amornlerdpison. 2014. Protective effects of *Cladophora glomerata* Kützinger extract against the impairment of renal transport function in experimental type 2 diabetic rats: A potential nutraceutical product for diabetic nephropathy. **Nephrology** 19(4): 15p.
- Sumintlee, W., P. Banjongsintri, J. Praiboon and W. Klaypradit. 2014. Antioxidant Activities of Crude Extracts from *Caulerpa intillifera*, *Sargassum oligocystum* and *Gracilaria changii*. **Journal of Food Technology, Siam university** 9(1) :63-75.

3. การประชุมวิชาการระดับชาติ มศว วิจัย ครั้งที่ 12 วันที่ 20-21 ธันวาคม 2562 ณ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ กรุงเทพมหานคร เรื่อง ผลของการเก็บรักษาสำหรับอายุเก็บต่อคุณค่าทางโภชนาการ ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (Postharvest affecting of *Rhizoglyphicum* on nutritional value, phenolic contents and antioxidant activities)



การประชุมวิชาการระดับชาติ "นศว 70ปี" ครั้งที่ 12  
วันที่ 20-21 สิงหาคม 2562 มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

**SWURES12-021 ผลของการเก็บรักษาสาหร่ายใต้อุณหภูมิต่ำทางโภชนาการ  
ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ  
POSTHARVEST AFFECTING OF *Rhizoclonium hieroglyphicum* ON NUTRITIONAL  
VALUE, PHENOLIC CONTENTS AND ANTIOXIDANT ACTIVITIES**

ภัททภรณ์ อัมพวิทย์<sup>1\*</sup>, ณัฐวุฒิ ทวีงสมนึก<sup>1</sup>, ศิราณี ดอนชัย<sup>2</sup>, ดวงพร อมรฉัตรพิลาส<sup>3</sup>  
*Rattapanorn Janthip<sup>1\*</sup>, Nattawut Whangsomnuek<sup>1</sup>, Siranee Donchai<sup>2</sup>, Doungporn Amornlerpison<sup>3</sup>*

<sup>1</sup>สาขาสหวิทยาการเกษตร คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้  
*<sup>1</sup>Agricultural Interdisciplinary Program, Faculty of Engineering and Agro-Industry, Maejo University.*

<sup>2</sup>คณะเทคโนโลยีการประมงและทรัพยากรทางน้ำ มหาวิทยาลัยแม่โจ้

*<sup>2</sup>Faculty of Fisheries Technology and Aquatic Resources, Maejo University.*

\*Corresponding author, E-mail: nojplant@yahoo.com

**บทคัดย่อ**

สาหร่ายใต้อุณหภูมิเย็น (*Rhizoclonium hieroglyphicum*) เป็นสาหร่ายน้ำจืดสีเขียวที่นิยมนำมาบริโภคเป็นอาหารพื้นบ้านในภาคเหนือของไทย มีสารประกอบฟีนอลิกและโพลีแซคคาไรด์เป็นสารออกฤทธิ์ที่สำคัญ ที่ทำให้สาหร่ายมีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาและฤทธิ์ทางชีวภาพ สาหร่ายใต้อุณหภูมิเย็นถูกเก็บมาจากแม่น้ำล้านนาเมื่อ 2559 จากถิ่นแบ่งเป็น 2 ส่วน สาหร่ายใต้อุณหภูมิเย็น 2559 (K0) และสาหร่ายใต้อุณหภูมิเย็นที่เก็บนาน 12 เดือน (K12) แล้วนำไปทดสอบคุณค่าทางโภชนาการในการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสาหร่ายใต้อุณหภูมิเย็น K0 และ K12 มาสกัดด้วยน้ำร้อน ได้เป็นสารสกัด KAO และ KA12 จากนั้นนำสารสกัดไปวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกโดยใช้โพลีเอทิลีน ไดออกไซด์ และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยใช้วิธีทดสอบการจับอนุมูลอิสระชนิดบีเอส ผลการศึกษาคุณค่าทางโภชนาการของสาหร่ายใต้อุณหภูมิเย็นทั้ง 2 ส่วน (K0 และ K12) พบว่า มีปริมาณโปรตีน ไขมัน และใยอาหารที่ไม่แตกต่างกัน การสกัดสาหร่ายใต้อุณหภูมิเย็นพบว่า ได้ร้อยละของสารสกัด (%yield) ของสาหร่ายใต้อุณหภูมิเย็น 2559 (KAO) และสารสกัดสาหร่ายใต้อุณหภูมิเย็นที่เก็บนาน 12 เดือน (KA12) เท่ากับ 28.46% และ 26.63% ตามลำดับ สารสกัด KAO และ KA12 มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดและฤทธิ์จับอนุมูลอิสระชนิดบีเอสที่ไม่แตกต่างกัน ดังนั้นสาหร่ายใต้อุณหภูมิเย็นที่เก็บไว้เวลานาน 12 เดือน ไม่มีผลเปลี่ยนแปลงคุณค่าทางโภชนาการ ปริมาณสารประกอบฟีนอลิก และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ จึงสามารถนำมาใช้แปรรูปเป็นอาหารสุขภาพและเวชสำอางได้อย่างมีคุณภาพ

**คำสำคัญ:** สาหร่ายใต้อุณหภูมิเย็น, คุณค่าทางโภชนาการ, สารประกอบฟีนอลิก, ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

**Abstract**

*Rhizoclonium hieroglyphicum*, freshwater green algae that are commonly found in the northern part of Thailand and has been consumed by locals as traditional foods for years. The polyphenolic compounds and polysaccharide were the main active components of *R. hieroglyphicum* which has the potential for pharmacological and biological activities. The algae was collected from Nan river, Nan province

การประมงจากทะเลสาบในเขต "เขต 10" ครั้งที่ 12  
วันที่ 20-21 สิงหาคม 2562 มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

in 2017, then the dried alga was divided into 2 parts which are dried alga (K0) and 12-month-old dried alga (K12). The dried alga K0 and K12 were determined for the nutritional value. In addition, the K0 and K12 were extracted with hot distilled water to obtained the crude extract of K0 (KA0) and K12 (KA12) for biological evaluations. The total phenolic contents were determined by using Folin-Ciocalteu reagent method and antioxidant activity was analyzed with ABT8 radical scavenging activity assay. The results of the nutritional value showed that the content of protein, fat and fiber has no difference between K0 and K12. The yield of aqueous extraction of KA0 and KA12 were 28.46% and 26.63%, respectively. The total phenolic contents and antioxidant activity of KA0 and KA12 displayed no different results. Therefore, it can be concluded that the dried alga was kept for 12 months can be used effectively as an ingredient in nutraceutical and cosmeceutical products.

**Keywords:** *Rhizodionium hieroglyphicum*, Nutritional Value, Phenolic Contents, Antioxidant Activity

## บทนำ

สาหร่ายไถ (*Rhizodionium hieroglyphicum*) เป็นสาหร่ายน้ำจืดชนิดหนึ่ง สามารถพบได้ทั่วไปในแหล่งน้ำจืด ทั้งแหล่งน้ำนิ่ง และแหล่งน้ำไหล ที่มีสภาพน้ำใสสะอาด และไถมีความเป็นกรดเล็กน้อย มักพบในแหล่งน้ำที่มีความลึกไม่เกิน 1 เมตร สอดตัวในบริเวณที่มองเห็นถึงผิวน้ำ พบมากทางภาคเหนือและอีสาน โดยภาคเหนือสามารถพบได้มากในแม่น้ำโขงและลำน้ำสาขา ในจังหวัดน่าน รวมถึงแม่น้ำโขงบริเวณจังหวัดเชียงราย ในแม่น้ำน่าน สาหร่ายไถในธรรมชาติมีพบมากประมาณ 4-5 เดือนเท่านั้นในหนึ่งปี [1] มีรายงานการวิจัยของสาหร่ายไถพบว่า มีสารสำคัญที่มีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ ได้แก่ สารประกอบฟีนอลิก และสารสำคัญกลุ่มโพลีแซคคาไรด์ จากการที่ได้ทดสอบฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาพบว่า สารสกัดสาหร่ายไถมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระทั้งในหลอดทดลองและในสัตว์ตัวทดลอง มีฤทธิ์ป้องกันการเกิดแผลกดทับในอาหาร ฤทธิ์ต้านการอักเสบ [2-3] และยังมีผลต่อการยับยั้งการเติบโตของไมโครออร์แกนิซึมของหนูขาวเมื่อทดสอบความเป็นพิษเฉียบพลัน [4] สารสกัดสาหร่ายไถพบสารประกอบฟีนอลิกที่ประกอบด้วย ไฮโดรควิโนน แคทชิน กรดแกอลิก กรดแทนนิก ไฮโดรควิโนน เคอซิกัน รูทีน และแคมเฟอรอล ซึ่งปริมาณของสารประกอบฟีนอลิกมีความสัมพันธ์กับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ [5] นอกจากนี้ในสารสกัดสาหร่ายไถยังพบสารสำคัญกลุ่มซัลเฟตโพลีแซคคาไรด์ (sulfated polysaccharides) ที่ประกอบด้วยน้ำตาลแรมโนส ไฮโลส อีรามีนโนส และกาแลคโตส โดยมีคุณสมบัติในการกักเก็บน้ำและช่วยนำรูปร่างที่ดีเมื่อเทียบกับสารไฮยาโลรอนิกที่มีราคาแพง [6]

สาหร่ายไถสามารถเพิ่มจำนวนมากขึ้นเรื่อย ๆ จนกว่าระดับน้ำในแม่น้ำจะแห้ง แต่โดยทั่วไปจะพบมากในช่วงฤดูหนาว และต้นฤดูร้อน อย่างไรก็ตามปริมาณผลผลิตของสาหร่ายไถช่วงเวลาที่พบในแหล่งน้ำขึ้นอยู่กับสภาพของสิ่งแวดล้อม โดยเฉพาะความขุ่น และอุณหภูมิของน้ำ ซึ่งมีผลต่อการสังเคราะห์แสง การเจริญเติบโตของสาหร่ายไถจะอาศัยกระบวนการสังเคราะห์แสงเป็นหลัก โดยจะสังเคราะห์อาหารที่มีอยู่ในแม่น้ำ ใช้สำหรับการเติบโต ดังนั้นการเก็บผลผลิตจากสาหร่ายจึงไม่สามารถทำได้อย่างสม่ำเสมอ จึงต้องมีการเก็บสาหร่ายไถในช่วงฤดูกาลที่มีสาหร่ายไถ เพื่อใช้ทดแทนช่วงฤดูที่มีสาหร่ายไถจำนวนน้อยลง ดังนั้นงานวิจัยนี้ได้ศึกษาคุณสมบัติของสาหร่ายไถแห้งที่เก็บในปี พ.ศ. 2559 และสาหร่ายไถแห้งที่เก็บนาน 12 เดือน ในสภาพแห้ง และหีบแห้ง ที่อุณหภูมิห้อง (27-30 องศาเซลเซียส) มาวิเคราะห์ปริมาณคุณค่าทางโภชนาการ ได้แก่ โปรตีน ไขมัน คาร์โบไฮเดรต เม็ลไอ และเถ้า รวมไปถึงทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ ได้แก่ ปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระ และสารฟีนอลิก เพื่อเป็นแนวทางในการจัดการทรัพยากรสัตว์น้ำที่อุดมสาหร่ายไถให้เพียงพอต่อความต้องการและการ

การประอบูรจากพระคัมภีร์ "บท 19" คดีที่ 12  
วันที่ 20-21 มีนาคม 2562 มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

นำไปใช้ประโยชน์ในด้านอาหารและเวชสำอางได้อย่างมีประสิทธิภาพ

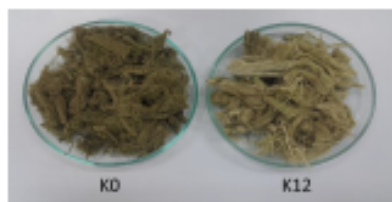
### วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เพื่อประเมินคุณภาพ คุณค่าทางโภชนาการ วิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิก และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดแห้งปี พ.ศ. 2559 และสารสกัดแห้งปี พ.ศ. 2559 ที่ถูกเก็บไว้นาน 12 เดือน ในสภาพแห้งและที่บ่มแสง ที่อุณหภูมิต้อง (27-30 องศาเซลเซียส)

### วิธีดำเนินการวิจัย

#### การวิเคราะห์คุณค่าทางโภชนาการ

สารสกัดแห้งปีจากแม่ไม้บ้าน ตำบลท่าวังผา จังหวัดน่าน นำมาผ่านเครื่องอบลมร้อนอุณหภูมิ 55-60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง คัดเป็นชิ้นเล็กๆ แบ่งเป็น 2 ส่วน ส่วนแรกคือสารสกัดแห้ง ส่วนที่สองคือสารสกัดแห้งที่เก็บในของหีบแสงและไม่มีความชื้นนาน 12 เดือนที่อุณหภูมิต้อง (27-30 องศาเซลเซียส) นำมาตรวจวัดสีและปริมาณคุณค่าทางโภชนาการ ได้แก่ โปรตีน ไขมัน คาร์โบไฮเดรต เนื้อใย และเถ้า



ภาพที่ 1 สักของสารสกัดแห้งปี 2559 (KD) และสารสกัดแห้งปี 2559 ที่ไว้นาน 12 เดือน (K12)

#### การเตรียมสารสกัด

นำสารสกัดแห้งปีล้างด้วยน้ำสะอาด 2-3 ครั้ง นำสารสกัดไปต้มด้วยน้ำกลั่น เป็นเวลา 60 นาที จากนั้นนำไปกรองด้วยผ้าขาวบางเพื่อแยกเอากากสารสกัดออก แล้วนำกากต้มซ้ำให้ครบ 3 ครั้ง นำสารสกัดโดยวิธีการต้มด้วยน้ำที่อุณหภูมิ 90-100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นกรองแยกกากสารสกัดออก นำกากสารสกัดมาสกัดซ้ำอีก 2 รอบ นำสารสกัดที่ได้ทั้งหมดมารวมกัน กรองด้วยกระดาษกรอง เบอร์ 1 ยี่ห้อ Whatman นำไปรีไซเคิลเอาเอาออกด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศ (rotary evaporator) จากนั้นนำไปทำให้แห้งด้วยเครื่องทำแห้งแบบแช่แข็ง (freeze dryer) จนได้สารสกัดแห้ง จะได้สารสกัดสารสกัดแห้งปี 2559 (KA0) และสารสกัดสารสกัดแห้งปี ที่เก็บไว้นาน 12 เดือน (KA12) จึงนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิต้อง -20 องศาเซลเซียส ก่อนนำสารสกัดไปทดสอบต่อไป

#### การวิเคราะห์ปริมาณของสารประกอบฟีนอลิก

การตรวจวิเคราะห์ปริมาณของสารประกอบฟีนอลิก ตามวิธีการของ ochandri และคณะ (2010) [7] ซึ่งดัดแปลงจาก Folin-Ciocalteu method ดังนี้ ผสมสารสกัดที่ความเข้มข้น 10-50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตรกับ 10% Folin-Ciocalteu solution 1 มิลลิลิตรและ 7.5% sodium carbonate solution 0.8 มิลลิลิตร ทั้งส่วนผสมที่ได้ไว้นาน 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิต้อง วัดค่าดูดกลืนแสงที่ 765 นาโนเมตร คำนวณปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดโดยเทียบกับสารมาตรฐานกรดแกลลิก (gallic acid) โดยหาค่ามิลลิกรัมต่อมิลลิกรัมของสารสกัดตัวอย่าง

**การศึกษากิจกรรมขจัดอนุมูลอิสระด้วยวิธี**

การศึกษากิจกรรมขจัดอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS radical scavenging activity ตามวิธีการของ Re et al. (1999) [8] มีขั้นตอนดังนี้ เตรียมสารละลาย 2, 2'-azino-bis 3-ethylbenzothiazoline -6-sulfonic acid (ABTS) โดยการผสม 7 โมโครโมลาร์ของ ABTS 5 มิลลิลิตรกับ 140 โมโครโมลาร์ของโพแทสเซียมเปอร์ซัลเฟต (K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub>) 88 โมโครลิตร เก็บในที่มืด 16 ชั่วโมง นำมาเจือจางด้วยน้ำที่ปราศจากไอออน (deionized water) จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร จนได้ค่าการดูดกลืนแสงของอนุมูลอิสระ (ABTS<sup>•+</sup>) อยู่ในช่วง 0.7± 0.05 ก่อนนำมาใช้ทดสอบ ในการทดสอบฤทธิ์ขจัดอนุมูล ABTS<sup>•+</sup> ของตัวอย่าง 1.8 มิลลิลิตร ลงในหลอดที่มีสารทดสอบหรือน้ำที่ปราศจากไอออน ผสมให้เข้ากัน ทิ้งไว้ 6 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 734 นาโนเมตร โดยใช้น้ำปราศจากไอออนเป็น blank ค่าแนวฤทธิ์ขจัดอนุมูล ABTS<sup>•+</sup> เป็นร้อยละจากสมการดังนี้

$$\text{ฤทธิ์ขจัดอนุมูล ABTS}^{\bullet+} (\%) = [1 - (A_{734 \text{ sample}} / A_{734 \text{ control}})] \times 100$$

เมื่อ A<sub>734 sample</sub> และ A<sub>734 control</sub> เป็นค่าการดูดกลืนแสงที่ 734 นาโนเมตร ของสารทดสอบและน้ำที่ปราศจากไอออน ตามลำดับ เปรียบเทียบความเข้มข้นของสารทดสอบกับความเข้มข้นของ Trolox ซึ่งเป็นอนุพันธ์ของวิตามิน อี ที่แสดงฤทธิ์เท่ากัน (Trolox equivalent antioxidant capacity, TEAC)



ภาพที่ 2 ขั้นตอนการดำเนินการวิจัย

**สถิติที่ใช้ในการวิเคราะห์**

ข้อมูลจะถูกแสดงในรูปค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Mean ± S.D) การวิเคราะห์ทางสถิติใช้ Paired Samples T-Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 0.05 เพื่อมองหาค่าความแตกต่างทางสถิติ ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป SPSS ค่า p<0.05 ถือว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

**ผลการวิจัย**

**คุณค่าทางโภชนาการ**

เมื่อวิเคราะห์ปริมาณคุณค่าทางโภชนาการของสารสกัดโสมแห้ง คุณค่าทางโภชนาการของสารสกัดโสมแห้ง (K0) และสารสกัดโสมแห้งที่เก็บไว้ 12 เดือน (K12) พบว่า มีโปรตีน 19.83 และ 22.54% ไขมัน 0.45

การประมงวิชาเกษตรศาสตร์ ปีที่ 101 คณิต 12  
วันที่ 20-21 มีนาคม 2562 มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

และ 0.38% เยื่อใย 1.90 และ 0.61% ความชื้น 4.12 และ 4.45% ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบทางสถิติพบว่า ปริมาณโปรตีน ไขมัน เยื่อใย และความชื้นของสาหร่ายไก่อหึ่ง 2 ชนิด ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ( $p > 0.05$ ) ส่วนคาร์โบไฮเดรตมีปริมาณ 5.35 และ 3.99% และเถ้า 64.14 และ 71.32% ตามลำดับ มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) ดังแสดงในตารางที่ 1 และเมื่อวัดค่าสีด้วยเครื่องวัดสี (colorimeter) แสดงค่าสี L\* a\* b\* ของสาหร่ายไก่อหึ่งทั้ง 2 ชนิด (K0 และ K12) คือ 34.78, 4.10, 23.03 และ 57.05, 3.47, 21.55 ตามลำดับ

ตารางที่ 1 ปริมาณคุณค่าทางโภชนาการของสารสกัดสาหร่ายไก่อหึ่ง 2559 (K0) และสาหร่ายไก่อหึ่งที่เก็บไว้นาน 12 เดือน (K12)

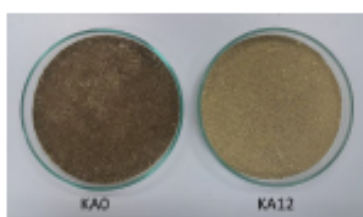
ปริมาณสารอาหารพื้นฐาน (%)	สาหร่ายไก่อหึ่ง	
	K0	K12
ความชื้น	4.12 ± 0.22 <sup>a</sup>	4.45 ± 0.62 <sup>a</sup>
โปรตีน	22.54 ± 2.38 <sup>a</sup>	19.83 ± 4.98 <sup>a</sup>
ไขมัน	0.45 ± 0.20 <sup>a</sup>	0.38 ± 0.23 <sup>a</sup>
เยื่อใย	1.90 ± 0.67 <sup>a</sup>	0.61 ± 0.39 <sup>a</sup>
คาร์โบไฮเดรต	4.54 ± 2.02 <sup>a</sup>	6.81 ± 1.25 <sup>b</sup>
เถ้า	64.14 ± 2.52 <sup>a</sup>	71.32 ± 0.19 <sup>b</sup>

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Mean ± S.D.), n=3

อักษรที่ต่างกันในแถวเดียวกันมีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ( $p < 0.05$ )

#### การวิเคราะห์คุณค่าทางโภชนาการ

เมื่อสกัดสาหร่ายไก่อหึ่งที่ทำการเก็บไฉ่ 2559 (K0) และสาหร่ายไก่อหึ่งที่เก็บไว้นาน 12 เดือน (K12) โดยใช้การต้มในน้ำร้อนที่อุณหภูมิ 90-95 องศาเซลเซียส และทำให้แห้งด้วยวิธี freeze dry พบว่า ปริมาณสารสกัดสาหร่ายไก่อหึ่งที่เก็บไฉ่ 2559 (KA0) น้ำหนัก 28.46 กรัม หรือคิดเป็นเปอร์เซ็นต์สารสกัดที่ได้ (%yield) เท่ากับ 28.46% ลักษณะผงไก่อหึ่งสีเข้มเข้ม มีค่าสี L\* a\* b\* เท่ากับ 48.09, 3.19, 4.68 และปริมาณสารสกัดสาหร่ายไก่อหึ่งที่เก็บไว้นาน 12 เดือน (KA12) ใต้น้ำหนัก 26.63 กรัม หรือคิดเป็น %yield เท่ากับ 26.63% มีลักษณะเป็นผงแห้งสีน้ำตาล แสดงค่าสี L\* a\* b\* เท่ากับ 62.81, 4.55, 11.50 (ภาพที่ 3)



ภาพที่ 3 ลักษณะของสารสกัดสาหร่ายไก่อหึ่ง 2559 (KA0) และสารสกัดสาหร่ายไก่อหึ่งเก็บนาน 12 เดือน (KA12)

การประมงจากทะเลในชาติ "แนว 30" ครั้งที่ 12  
วันที่ 20-21 สิงหาคม 2562 มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

#### การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิก

ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดในสารสกัดสาหร่ายไก่อปี 2559 (KA0) และสารสกัดสาหร่ายไก่อปี 2559 ที่เก็บไว้นาน 12 เดือน (KA12) พบว่า สารสกัดสาหร่ายไก่อทั้ง 2 ชนิด ที่ความเข้มข้นระหว่าง 10-50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (mg/ml) เมื่อนำมาเทียบกับสารมาตรฐานกรดแกลลิก พบว่าสารสกัดสาหร่ายไก่อ KA0 และ KA12 มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิก 6.16 และ 5.97 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรของกรดแกลลิกต่อสารสกัด 1 กรัม (mg GAE /g extract) ตามลำดับ และวิเคราะห์ค่าทางสถิติ พบว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ )

#### การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี

การศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของสาหร่ายไก่อที่สกัดด้วยน้ำโดยวิธี AHT® radical scavenging activity ที่ระดับความเข้มข้น 1-15 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (mg/ml) เมื่อนำมาคำนวณฤทธิ์ในการขจัดอนุมูลอิสระด้วยวิธี โดยเทียบกับสารมาตรฐานโพรทอกซี พบว่า สารสกัดสาหร่ายไก่อปี 2559 (KA0) มีปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระ 2.98 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรของโพรทอกซีต่อสารสกัด 1 กรัม หรือ 2.98 mg TEAC/g extract และสารสกัดสาหร่ายไก่อปี 2559 ที่เก็บไว้นาน 12 เดือน (KA12) มีปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระ 2.76 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรของโพรทอกซีต่อสารสกัด 1 กรัม หรือ 2.76 mg TEAC/g extract ซึ่งสารสกัดทั้ง 2 ชนิดไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ( $p > 0.05$ )

ตารางที่ 2 ฤทธิ์ขจัดอนุมูลอิสระด้วยวิธี และปริมาณสารประกอบฟีนอลิกของสารสกัดสาหร่ายไก่อปี 2559 (KA0) และสารสกัดสาหร่ายไก่อเก็บไว้นาน 12 เดือน (KA12)

การทดสอบ	สารสกัดสาหร่ายไก่อ	
	KA0	KA12
ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม (mg GAE/g extract)	6.16 ± 0.11*	5.97 ± 0.11*
ฤทธิ์การขจัดอนุมูลอิสระด้วยวิธี (mM TEAC/g extract)	2.98 ± 0.60*	2.76 ± 0.29*

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบน (Mean ± S.D), n=3

\*ลักษณะที่ต่างกันไม่แถวเดียวกัน มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ( $p < 0.05$ )

#### อภิปรายผลการวิจัย

สาหร่ายไก่อแห้งที่เก็บจากแม่น้ำผ่าน ตำบลท่าวังผา จังหวัดน่าน ที่เก็บเกี่ยวในปี พ.ศ. 2559 (K0) มีสีเขียวเข้ม และเมื่อเก็บไว้ 12 เดือน (K12) โคนาจะเปลี่ยนแสง เข้ม ที่อุณหภูมิห้อง (27-30 องศาเซลเซียส) พบว่าสาหร่ายไก่อมีการเปลี่ยนแปลงลักษณะของสีที่เปลี่ยนไปจากเดิม โดยจะมีสีที่จางลง และเมื่อนำสาหร่ายมาสกัดโดยใช้น้ำร้อนและทำให้แห้งด้วยวิธี freeze dry พบว่า ปริมาณสารสกัดในปี 2559 (KA0) ได้เปอร์เซ็นต์สารสกัด (%yield) เท่ากับ 28.46% สกัดผลผงไก่อเป็นผงสีเขียวเข้ม และปริมาณสารสกัดสาหร่ายไก่อ KA12 ได้ %yield เท่ากับ 26.63% มีลักษณะเป็นผงแห้งสีน้ำตาล แสดงว่าการเปลี่ยนแปลงสีของสาหร่ายไก่อแห้ง มีผลต่อสีของสารสกัดด้วยวิธีนี้เนื่องจากกระบวนการเก็บสาหร่ายไก่อแห้ง แสงแดด และสภาพแวดล้อมอาจส่งผลต่อการเปลี่ยนสีของสาหร่ายไก่อแห้ง [9] มีรายงานการวิจัยคุณค่าทางโภชนาการอาหารในสาหร่ายไก่อแห้งก่อนหน้านี้พบว่า มีปริมาณไขมัน 4.63 % โปรตีน 19.90 % คาร์โบไฮเดรต 30.80 % เยื่อใย 21.50 % เถ้า 16.90 % และความชื้น

การประจุไฟฟ้าการประจุไฟฟ้า "บด" 100" คิวท์ 12  
วันที่ 20-21 สิงหาคม 2562 มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

6.61 % [10] เมื่อเปรียบเทียบปริมาณคุณค่าทางโภชนาการของสารสกัดสาหร่ายไคโนในการวิจัยนี้พบว่า คุณค่าทางโภชนาการของสารสกัดสาหร่ายไคโนปี 2559 และสาหร่ายไคโนที่เก็บไว้เวลา 12 เดือน มีโปรตีน (20-23%) ไขมัน เยื่อใย และคาร์โบไฮเดรต ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p > 0.05$ ) ทั้งนี้คุณค่าทางโภชนาการที่มีปริมาณต่างกันอาจเนื่องมาจากปัจจัยทางสภาพแวดล้อม ได้แก่ ความเข้มแสง อุณหภูมิน้ำ ความเป็นกรดด่าง ความเร็วของกระแสน้ำ ปริมาณของแข็งที่แขวนลอยในน้ำ และปริมาณสารอาหาร โดยเฉพาะฟอสฟอรัสที่เป็นปัจจัยสำคัญที่ควบคุมการเจริญเติบโต และผลผลิตเบื้องต้นของสาหร่ายไคโน [11]

ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดในสารสกัดสาหร่ายไคโนปี 2559 และสาหร่ายไคโนที่เก็บไว้เวลา 12 เดือน เมื่อนำมาเทียบกับสารมาตรฐานแกลลิก พบว่า สารสกัดสาหร่ายไคโนมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกที่ไม่มีความแตกต่างกัน ( $p > 0.05$ ) การเจริญเติบโตของสาหร่ายไคโน จะส่งผลต่อปริมาณสารสำคัญในสาหร่ายไคโน [11] สารประกอบฟีนอลิกเป็นสารที่พบได้ในพืช ซึ่งปริมาณของสารประกอบฟีนอลิกที่มาจากพืชผักและผลไม้ชนิดต่างกันออกไปตามชนิดของพืช วิธีการปลูก ระดับความสูงแก่ กระบวนการแปรรูป และการเก็บ การให้ความร้อนในกระบวนการแปรรูปมีส่วนทำให้ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกลดลง ทำให้ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกในสารสกัดสาหร่ายไคโนแตกต่างกัน มีรายงานการวิจัยก่อนหน้าซึ่งสารออกฤทธิ์ที่สำคัญในสาหร่ายไคโน คือ กลุ่มสารประกอบฟีนอลิก และโพลีแซคคาไรด์ [5, 12] โดยเฉพาะสารไอโซเคอร์จิทัน เป็นสารประกอบฟีนอลิกชนิดหนึ่งที่มีมากในสาหร่ายไคโน และเป็นสารที่มีสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระด้วย [12, 13]

จากการศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของสาหร่ายไคโนที่สกัดด้วยน้ำ ด้วยวิธี ABTS radical scavenging activity พบว่า สารสกัดสาหร่ายไคโนปี 2559 ด้วยน้ำและสารสกัดจากสาหร่ายไคโนที่เก็บไว้เวลา 12 เดือน มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระที่ไม่แตกต่างกันทางสถิติ ( $p > 0.05$ ) นอกจากการจัดอนุมูลอิสระที่มีอิสระแล้วสารสกัดสาหร่ายไคโนยังสามารถกำจัดอนุมูลอิสระที่เกาะ และอนุมูลซูเปอร์ออกไซด์ได้อีกด้วย [5] มีรายงานการศึกษาของฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสาหร่ายไคโนในหลอดทดลอง 3 ชนิด พบว่า สาหร่ายไคโนเป็นสาหร่ายน้ำจืดสีเขียวเช่นเดียวกับสาหร่ายไคโน จะให้ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ( $p > 0.05$ ) แม้จะเก็บเกี่ยวจากแหล่งเดียวกัน [14] ดังนั้นสาหร่ายไคโนปี 2559 ที่เก็บไว้เวลา 12 เดือนที่อุณหภูมิห้อง ในภาชนะที่แห้งและมืด พบว่ามีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ( $p > 0.05$ )

### สรุปผลการวิจัย

สาหร่ายไคโนแห้ง (*Rhizoclonium heteroglychicum*) จากบ้านหนองบัว อำเภอท่าวังผา จังหวัดน่าน ปี 2559 นำไปทดสอบปริมาณคุณค่าทางโภชนาการ ได้แก่ โปรตีน ไขมัน คาร์โบไฮเดรต เยื่อใย ใยแก้ว ความชื้น พบว่า สาหร่ายไคโน มีคุณค่าทางโภชนาการที่สำคัญไม่แตกต่างกัน เมื่อนำสาหร่ายไคโนมาสกัดด้วยวิธีการต้มด้วยน้ำ แล้วนำไปทำให้แห้งด้วยวิธี freeze dry จากนี้สารสกัดสาหร่ายไคโนถูกนำไปทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ ได้แก่ ปริมาณสารประกอบฟีนอลิก และสารต้านอนุมูลอิสระ พบว่า ปริมาณสารสกัดสาหร่ายไคโนปี 2559 โดยปริมาณสารสกัด (% yield) ใกล้เคียงกัน (26-28%) แต่ลักษณะสีของสารสกัดต่างกันคือ ผงสีน้ำตาลกับผงสีเขียวเข้ม ส่วนปริมาณสารประกอบฟีนอลิกและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระพบว่า ไม่มีความแตกต่างกัน ในการเก็บรักษาสาหร่ายไคโนแห้งในระยะเวลา 12 เดือน ไม่ส่งผลต่อปริมาณคุณค่าทางโภชนาการ ปริมาณสารประกอบฟีนอลิก และฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ จึงสามารถนำสาหร่ายไคโนแห้งไปพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์เสริมอาหารหรือพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางได้ก่อนถึงฤดูกาลเก็บเกี่ยวต่อไป

### กิตติกรรมประกาศ

ทีมผู้วิจัยขอขอบคุณสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) สำนักงานสนับสนุนการวิจัยระดับปริญญาเอกภายใต้โครงการพัฒนาภาควิชาและงานวิจัยเพื่ออุตสาหกรรม (พอ.) รหัสโครงการ PHD5910010 ร่วมกับบริษัท อ่าฟลุคส์ โพรเซสซิ่ง จำกัด และขอขอบคุณคณะเทคโนโลยีการประมงและทรัพยากรทางน้ำ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ สำนักงานสนับสนุนด้านสถานที่และอุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย

### เอกสารอ้างอิง

- [1] ทวีศักดิ์ ชวีญูไทรรงค์; และ ศิริเพ็ญ ศรีไชยาพร. (2553). ประสิทธิภาพการสกัดคาโรทีนอยด์และคุณค่าทางโภชนาการของสาหร่ายโข (Cladophora sp.) เพื่อประโยชน์ทางเศรษฐกิจ (I). วารสารวิจัยเทคโนโลยีการประมง. 4(1): 54-64.
- [2] บวดี พิทรพิศาธ; ญาณิ พงษ์ใหญ่; ดวงดา กาญจนโพธิ์; ดวงพร อมรเลิศพิศาธ; ธวัช แต้โสคติภูง; และ สุศาทร์ คงศิริ. (2552). คุณภาพของสาหร่ายน้ำจืดขนาดใหญ่ในการเป็นผลิตภัณฑ์เสริมอาหารและเวชสำอาง. กรุงเทพฯ: สำนักงานส่งเสริมกรรมการวิจัยแห่งชาติ.
- [3] Anomlerdipison, Doungpom; Mengumphan, Kiangsak., Thumvijit, Tanika. and Peerapompisal, Yuwadee. (2011). Antioxidant and anti-inflammatory activities of freshwater macroalga, *Cladophora glomerata* Kützting. *Thai Journal of Agricultural Science*. 44(5): 283-291.
- [4] Fahrothanchai, Prannapus; Saenphet, Kanokpom; Peerapompisal, Yuwadee and Arizjat, Salika . (2005). Toxicological evaluation of *Cladophora glomerata* Kützting and *Microspora flocosa* Thuret in albino rats. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*. 37(3): 206-209.
- [5] ดวงพร อมรเลิศพิศาธ; เมธิ์ เวินท์เลอร์; เกว็องคักค็ เม็งอ่าพัม; รัตนภรณ์ ช่างวิฑิตย์; และ สุคิมา ศรีฉวีรัง. (2558, ตุลาคม-ธันวาคม). สารสำคัญและการป้องกันการก่อการก่อมะเร็งของสาหร่ายโขในปลาพ่นลูกผสม. วารสารวิจัยและพัฒนา มจร. 38(4): 393-405.
- [6] Leelapompisal, Pimpom; Mungmai, Lapetada; Sirithunyulug, Husebun; Jiranusomikul, Supat and Peerapompisal, Yuwadee. (2014, October). A Novel Moisturizer Extracted from Freshwater Macroalga [*Rhizoclonium hieroglyphicum* (C.Agardh) Kützting] for Skin Care Cosmetic. *Chiang Mai Journal of Science*. 41(5.2): 1195-1207.
- [7] Sachindra, Nm.; Airenthi, M.K. Wijajaja-Adhr; Hosokawa, Masashi. and Miyashita, Kazuo. (2010, January-February). Radical Scavenging and Singlet Oxygen Quenching Activity of Extracts from Indian Seaweeds. *Journal of Food Science and Technology*. 47(1): 94-99.
- [8] Re, Roberta; Pellegrini, Nicoletta; Proteggente, Anna; Pannala, Ananth; Yang, Min; and Rice-Evans, Catherine. (1999, May). Antioxidant activity applying an improved AHT8 radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*. 26(9): 1231-1237.
- [9] ปริญญา มูอฮัม; และ อมรวิทย์ วงษ์ภัก. (2556). การศึกษาของการใช้สารสกัดจากสาหร่ายเพื่อเพิ่มมูลค่าผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง. สาขาวิชาชีววิทยาและสาขาวิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์. อุบลราชธานี: มหาวิทยาลัยราชภัฏอุบลราชธานี.
- [10] บวดี พิทรพิศาธ. (2548). สาหร่ายน้ำจืดในภาคเหนือของประเทศไทย. เชียงใหม่: โรงพิมพ์พิงค์.
- [11] ศิริเพ็ญ ศรีไชยาพร. (2555). สาหร่ายโข. ภาควิชาชีววิทยา มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. เชียงใหม่.

- [12] Srimaeng, Chutima; Ontawong, Atcharaporn; Saowakon, Narawan; Vivithanaporn, Pompan; Pongchaidecha, Anchalee; Amornleedipon, Doungpom; Soodvilai, Sunhapan and Chabudthipong, Varanuj. (2015, February). Antidiabetic and Renoprotective Effects of *Cladophora glomerata* Kützinger Extract in Experimental Type 2 Diabetic Rats: A Potential Nutraceutical Product for Diabetic Nephropathy. *Journal of Diabetes Research*. 1-15.
- [13] Jantip, Rattanaorn; Lailerd, Narissara; Wangchareon, Wiwat; Mangumphan, Kriangsak and Amornleedipon, Doungpom. (2018, May 17-18). Chemical Compound and Biological Properties of Freshwater Macroalgae Extracts from *Spirogyra neglecta* and *Rhizoclonium hieroglyphicum*. In *2<sup>nd</sup> National Graduate Research Conference and Creative Innovation Competition*. pp.189-195. Chiang Mai: Maejo University.
- [14] ชีวะวัฒน์ รัตนพรณ์; เกียรติศักดิ์ เมืองอำพัน; ชูติลา ศรีนังใจ; ชัยนาภรณ์ ชัยภักดิ์; และ ดวงพร สมรมเลิศพิศม. (2555, กรกฎาคม-ธันวาคม).ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและผลต่อการเสริมสภาพร่างกายจากการเจริญเติบโตของปลาหมอสีในกระชัง. *วารสารวิจัยเทคโนโลยีการเกษตร*. 6(2): 23-34.

## ผลงานตีพิมพ์

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

จิตนาภณ์ จันททรัพย์<sup>1</sup> นิตยา ไลน์สี<sup>2</sup> เกียงศักดิ์ เม่งจำพัน<sup>3,4</sup> ววัฒน์ ทวีระเจริญ<sup>5</sup>  
และ ดวงพร ฉมรมเลิศพิสา<sup>3,6\*</sup>

Janthip R.<sup>1</sup>, Lailerd N.<sup>2</sup>, Mangumphan K.<sup>3,4</sup>, Wangcharoon W.<sup>5</sup> and Amornlerdpleon D.<sup>3,6\*</sup>

<sup>1</sup>สาขาวิชาเกษตร คณะวิศวกรรมและเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ เชียงใหม่ 50200

<sup>1</sup>Agricultural Interdisciplinary Program, Faculty of Engineering and Agro-Industry, Maejo University, Chiang Mai, Thailand 50200

<sup>2</sup>ภาควิชาสัตวศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ เชียงใหม่ 50200

<sup>3</sup>Department of Physiology, Faculty of Medicine, Chiang Mai University, Chiang Mai, Thailand 50200

<sup>4</sup>คณะเทคโนโลยีการประมงและทรัพยากรทางน้ำ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ เชียงใหม่ 50200

<sup>5</sup>Faculty of Fisheries Technology and Aquatic Resources, Maejo University, Chiang Mai, Thailand 50200

<sup>6</sup>ศูนย์ความเป็นเลิศด้านนวัตกรรมเกษตรศาสตร์ยั่งยืนบัณฑิตยสถาน

<sup>7</sup>Center of Excellence in Agricultural Innovation for Graduate Entrepreneur, Maejo University, Chiang Mai, Thailand 50200

<sup>8</sup>คณะวิศวกรรมและเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ เชียงใหม่ 50200

<sup>9</sup>Faculty of Engineering and Agro-Industry, Maejo University, Chiang Mai, Thailand 50200

\*Corresponding author: doungpomfahtech@gmail.com

## บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์หลักในการศึกษาครั้งนี้คือ การประเมินฤทธิ์เชิงเภสัชศาสตร์ของสาหร่ายโกล (*Rhizoclonium hieroglyphicum*) และสาหร่ายเตา (*Spirogyra neglecta*) เพื่อการเพิ่มประสิทธิภาพการลดฤทธิ์ของสารสกัดผสม (RSE) และช่วยลดต้นทุนของวัตถุดิบ โดยนำไปวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิก รวม ทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในหลอดทดลอง และทดสอบประสิทธิภาพของ RSE ในการลดระดับน้ำตาล ไตรกลีเซอไรด์ และคอเลสเตอรอลในเลือดของหนูขาวเพศผู้ที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะเบาหวานด้วย streptozotocin โดยการศึกษานี้ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม พบว่า RSE 1 กรัมมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม 42.31 มิลลิกรัมของแกลกติก (mgGAE/ g extract) และมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระชนิดบีซีเอส เท่ากับ 1115.28 มิลลิโมลาร์ลิสมูลของโทรดองก์ (mM TEAC/ g extract) ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระชนิดทีพีไอเอส และอนุมูลอิสระซูเปอร์ออกไซด์ 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 ผลจากการศึกษาเป็นแนวทางในการพัฒนาสารสกัด

สาหร่ายน้ำจืดเป็นยาลดน้ำตาลในเลือดและไขมันในเลือดสูงในผู้ป่วยที่มีภาวะการเป็นโรคเบาหวานได้

คำสำคัญ: สาหร่ายโกล สาหร่ายเตา กุหลาบสีน้ำเงิน, สารสกัดสาหร่ายน้ำจืด, สารสกัดไขมันในเลือด

#### Abstract

The main purpose of this study was to evaluate the bioactivity of the mixed algae extracts (RSE) which consisted of algae extracts of *Rhizoclonium hieroglyphicum* and *Spirogyra neglecta* in order to increase biological efficiency of RSE and reduce the cost of algae 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 เป็นโรคที่เกิดจากคั่งของน้ำตาลในเลือดสูงหรืออินซูลินได้ลดลงหรือมีประสิทธิภาพการลดน้ำตาลในเลือดลดลง ส่งผลให้มีระดับน้ำตาลในเลือดสูง และมีภาวะแทรกซ้อนน้ำมูก บิดสายตาสั้น อ่อนเพลีย และเหน็ดเหนื่อย จากสถิติผู้ป่วยด้วยโรคไม่ติดต่อเรื้อรัง (Non-Communicable Diseases, NCDs) พบว่าโรคเบาหวานเป็นโรคอันดับต้นๆ ที่คนไทยเป็นกันมากที่สุด โดยเฉพาะโรคเบาหวานชนิดที่ 2 ซึ่งพบว่าเป็นชนิดที่คนไทยเป็นกันมากกว่า 90% (Ackplakom et al., 2018) สาเหตุของการเกิดโรคเบาหวานชนิดที่ 2 มีกมาจากพฤติกรรมการบริโภคอาหารที่มีแคลอรีสูง เกิดภาวะอ้วน และขาดการออกกำลังกาย ซึ่งในการรักษาโรคเบาหวานชนิดที่ 2 โดยขาดระดับน้ำตาลชนิดรับประทานผ่านกลไกการออกฤทธิ์ 4 กลุ่ม ได้แก่ 1) ยาที่กระตุ้นการหลั่งอินซูลินจากเบต้าเซลล์ของตับอ่อน 2) ยาที่ลดภาวะดื้อต่ออินซูลิน 3) ยาที่ลดการดูดซึมของน้ำตาล alpha-glucosidase ที่ผนังลำไส้ ทำให้การดูดซึมกลูโคสจากทางเดินอาหารเกิดขึ้นช้าลง 4) ยาที่ยับยั้งเอนไซม์ที่ใช้ในการทำลายฮอโมนที่หลั่งจากลำไส้ ผู้ป่วยเบาหวานของไทยส่วนใหญ่ใช้ยาเมตฟอร์มิน (metformin) ซึ่งอยู่ในกลุ่มยาที่ลดภาวะดื้อต่ออินซูลิน ในการควบคุมระดับน้ำตาล

ในเลือดของผู้ป่วย (Arods et al., 2015) โดยมีกลไกกระตุ้นความไวต่ออินซูลินในร่างกาย ทำให้มีการนำกลูโคสกลับเข้าไปในเรสท์และนำกลูโคสไปใช้เพิ่มขึ้น ลดการดูดซึมกลูโคสภายในลำไส้ และลดภาวะไขมันในเลือดหรือภาวะน้ำตาลค้ำเกิน (Scheefeld et al., 2016) ได้ดีกว่า

สาหร่ายไค [Rhizoclonium hieroglyphicum (C. Agardh) Kützinger] และสาหร่ายเตา [Spirogyra neglecta (Haeussli) Kützinger] ถูกนำมาใช้ในการศึกษาครั้งนี้ สาหร่ายไคเป็นสาหร่ายน้ำจืดที่มีการนำมาแปรรูปเป็นอาหารหลายรูปแบบ เช่น โทฟุสด ไคชิ ทงนี่โร มีการเก็บเกี่ยวสาหร่ายไคจากแหล่งน้ำธรรมชาติ และนำมาทำให้แห้งเพื่อจำหน่ายราคา 500-600 บาทขึ้นกับฤดูกาล โดยเฉพาะกลุ่มวิสาหกิจชุมชนบ้านหนองบัวที่มีการนำสาหร่ายไคมาทำเป็นผลิตภัณฑ์ดังกล่าวกลายเป็นสินค้าเด่นของชุมชน นอกจากนี้ยังมีรายงานการวิจัยถึงฤทธิ์ทางชีวภาพของสาหร่ายไค เช่น ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ บังคับการอักเสบ และการศึกษาในกระเพาะอาหาร (Amomlerdaison et al., 2011) สารสกัดน้ำของสาหร่ายไคขนาด 1,000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ช่วยลดน้ำตาลและไตรกลีเซอไรด์ในสัตว์ทดลองที่มีการเบาหวานได้ (Srinarong et al., 2015) นอกจากนี้เมื่อทดสอบในมนุษย์ที่ได้รับสารสกัดสาหร่ายไคขนาด 1,000 มิลลิกรัมต่อวัน พบว่า ไม่เป็นอันตรายและไม่มีผลต่ออัตราการเต้นของหัวใจสูงสุด (Sawangsook et al., 2016) ส่วนสาหร่ายเตา เป็นสาหร่ายน้ำจืดอีกชนิดหนึ่งที่มีคุณค่าทางโภชนาการ นิยมนำมาทำเป็นอาหารพื้นบ้านและแปรรูปเป็นอาหาร สาหร่ายเตาดีจะมีฤทธิ์ยับยั้งไขมันและมีการควบคุมคุณภาพน้ำเพื่อการเจริญเติบโต และเมื่อนำมาทำให้แห้งจะได้ผลผลิตสาหร่ายแห้งแห้งเพียงร้อยละ 10 ทำให้สาหร่ายเตามีราคาสูงถึง 3,000-3,500 บาทต่อกิโลกรัมแห้ง มีรายงานการวิจัยของสาหร่ายเตา พบว่ามีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา และมีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (Pecarpompai et al., 2012) โดยมีสารประกอบฟีนอลิกเป็นสารออกฤทธิ์ที่สำคัญ (Janthip et al., 2013) มีคุณสมบัติช่วยเพิ่มความไวในการตอบสนองต่ออินซูลิน และลดการเกิดภาวะเครียดออกซิเดชัน (oxidative stress) สาหร่ายเตาขนาด 1,000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ช่วยเพิ่มระดับเอนไซม์ที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและลดระดับน้ำตาลในสัตว์ทดลองได้ (Ontawong et al., 2013) และยังมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระตามความเข้มข้นที่สูงในหนูขาวได้ด้วย (Kamkiew et al., 2016)

จากการวิจัยก่อนหน้านี้ได้ศึกษาปริมาณของสารประกอบฟีนอลิกและคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระของสาหร่ายไคและสาหร่ายเตาแต่ละชนิดพบว่า สารสกัดน้ำของสาหร่ายทั้ง 2 ชนิดมีสารประกอบฟีนอลิกชนิดโพลีฟีนอลสูงเป็นองค์ประกอบที่สำคัญ และสามารถสกัดอนุมูลอิสระได้ (Janthip et al., 2017) จากรายงานการวิจัยดังกล่าว ทีมวิจัยมีแนวคิดในการพัฒนาผลิตภัณฑ์ใหม่เพื่อนำมาใช้ในการป้องกันโรค NCDs โดยเฉพาะโรคเบาหวาน โดยการพัฒนาสูตรสารสกัดใหม่ที่มีการผสมสารสกัดสาหร่ายทั้ง 2 ชนิดจากผลิตภัณฑ์การถั่วเหลืองที่ดีจากสาหร่ายไคและฤทธิ์ทางชีวภาพในการลดระดับน้ำตาลจากสาหร่ายเตาและสาหร่ายไค เพื่อให้ได้ประสิทธิภาพการออกฤทธิ์ของสารสกัดที่ดียิ่งกว่าการใช้สาหร่ายเพียงชนิดเดียว และมีต้นทุนวัตถุดิบเหมาะสม จากนั้นศึกษาสารสำคัญและฤทธิ์ทางชีวภาพทั้งในหลอดทดลองและสัตว์ทดลองที่ช่วยสนับสนุนการวิจัยประโยชน์ในการเป็นผลิตภัณฑ์เสริมอาหารสำหรับป้องกันภาวะเบาหวานต่อไป

### อุปกรณ์และวิธีการ

#### 1. การเตรียมสารสกัดสาหร่ายโกลและสาหร่ายเตาด้วยน้ำ

นำสาหร่ายโกลมาจากกลุ่มวิสาหกิจชุมชนบ้านหนองบัว ที่เก็บจากแม่น้ำน่าน ตำบลท่าวังยา จังหวัดน่าน ในช่วงเดือนพฤศจิกายนถึงมีนาคม ปี 2560 ส่วนสาหร่ายเตา นำมาจากกลุ่มวิสาหกิจชุมชนผู้เพาะเลี้ยงสาหร่ายเตา บ้านนาอุทา อำเภอเมือง จังหวัดแพร่ ที่เก็บในช่วงเดือนมิถุนายนถึงตุลาคม ปี 2559 นำสาหร่ายแห้ง (Figure 1) แลยชงนึ่งจนสุกด้วยน้ำ ในอัตราส่วนสาหร่ายแห้ง 100 กรัม ต้มในน้ำกลั่นปริมาณ 2 ลิตร เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นกรองแยกกากสาหร่ายออก นำส่วนสารละลายไประเหยจนน้ำออกด้วยเครื่องกลั่นระเหยแบบหมุนสุญญากาศ จนได้สารละลายเข้มข้น จากนั้นนำไปทำให้แห้งด้วยเครื่องแห้งแบบแช่แข็ง (freeze dryer) จนได้สารสกัดน้ำสาหร่าย โดยการสกัดสาหร่ายโกลและเตาทำวิธีสกัดเดียวกัน นำสารสกัดสาหร่ายโกลและสาหร่ายเตามาผสมกันในอัตราส่วน 1:1 (สารสกัดสาหร่ายโกล 100 กรัมผสมกับสารสกัดสาหร่ายเตา 100 กรัม) ผสมสารสกัดให้เข้ากันก่อนนำไปทดสอบต่อไป

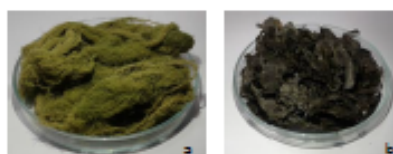


Figure 1 Dried *R. hieroglyphicum* (a) and *S. neglecta* (b)

#### 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. ที่ทิ้งไว้นาน 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง วัดค่าดูดกลืนแสงที่ 765 นาโนเมตร คำนวณปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดโดยเทียบกับสารมาตรฐานกรดแกลลิก (gallic acid) ในหน่วยมิลลิกรัมต่อกรัมของสารสกัดตัวอย่าง หรือสมมูลของกรดแกลลิก (mg GAE/g extract)

#### 3. การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

##### 3.1 ฤทธิ์กำจัดอนุมูลอิสระชนิดอะบตีเอส

ฤทธิ์กำจัดอนุมูลอิสระชนิดอะบตีเอส (ABTS<sup>•+</sup> radical scavenging activity) ใช้วิธีทดสอบตามวิธีการของ Re et al. (1999) มีขั้นตอนดังนี้ เตรียมน้ำยา 2, 2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) โดยการผสม 7 ไมโครโมลาร์ของ ABTS 5 มล. กับ 140 ไมโครโมลาร์ของโพแทสเซียมเปอร์ซัลเฟต (K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub>) 88 ไมโครลิตร เก็บในที่มืด 16 ชั่วโมง นำมาเจือจางด้วยน้ำที่ปราศจากไอออน (deionized water) ในการทดสอบฤทธิ์กำจัดอนุมูล ABTS<sup>•+</sup> หยดน้ำยา 1.8 มล. ลงในหลอดที่มีสารทดสอบหรือน้ำที่ปราศจากไอออน ผสมให้เข้า

กัน ที่ไว้ 6 นาที วัดค่าดูดกลืนแสงที่ 734 นาโนเมตร ค่ามาตรฐานฤทธิ์กำจัดอนุมูล ABTS<sup>•+</sup> เป็นร้อยละจากสมการดังนี้

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

เมื่อ A734 sample และ A734 control เป็นค่าดูดกลืนแสงที่ 734 นาโนเมตร ของสารทดสอบและน้ำที่ปราศจากใจจวน ตามลำดับ เปรียบเทียบความเข้มข้นของสารทดสอบกับความเข้มข้นของโทรลออกซ์ ซึ่งเป็นอนุพันธ์ของวิตามินอี ที่แสดงฤทธิ์เท่ากัน (Trolox equivalent antioxidant capacity, TEAC) หรือสมมูลของโทรลออกซ์

### 3.2 ฤทธิ์กำจัดอนุมูลดิสมัลทิฟิเคชัน

ฤทธิ์กำจัดอนุมูลดิสมัลทิฟิเคชัน (DPPH radical scavenging assay) ตามวิธีของ Zhang et al. (2007) โดยผสมสารสกัดเวลาถ่าย 0.4 มล. กับสารละลายอนุมูลดิสมัลทิฟิเคชัน (diphenylpicrylhydrazyl radical, DPPH<sup>•</sup>) 1.6 มล. ตั้งทิ้งไว้ที่มืดเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร ค่ามาตรฐานของอนุมูลดิสมัลทิฟิเคชัน DPPH อนุกรมคำนวณได้จากค่าการนำค่าการดูดกลืนแสงที่ลดลงจากการเติมตัวอย่างเทียบกับค่าการดูดกลืนแสงตั้งต้น ดังนี้

$$\text{DPPH radical scavenging} (\%) = ((A_0 - A_x) / A_0) \times 100$$

โดย A<sub>0</sub> และ A<sub>x</sub> คือ ค่าการดูดกลืนแสงเริ่มต้น และค่าการดูดกลืนแสงภายหลังการเติมสารตัวอย่าง สารมาตรฐานที่ใช้ในการเทียบฤทธิ์ต้านอนุมูลดิสมัลทิฟิเคชัน คือ กรดแอสคอร์บิก มีหน่วยเป็นมิลลิกรัมต่อกรัมของสารสกัดตัวอย่าง (mg GAE/g extract)

### 3.3 การศึกษาฤทธิ์กำจัดอนุมูลดิสมัลทิฟิเคชันเปอร์ออกไซด์

ฤทธิ์กำจัดอนุมูลดิสมัลทิฟิเคชันเปอร์ออกไซด์ ตามวิธีการของ Nishikimi et al. (1972) โดยนำ 156 ไมโครโมลาร์ของสารละลาย nitroblue tetrazolium (NBT) ปริมาตร 1 มล. และ 468 ไมโครโมลาร์ของสารละลาย nicotinamide adenine dinucleotide (NADH) ปริมาตร 1 มล. ผสมกับสารสกัดเวลาถ่ายปริมาตร 0.1 มล. แล้วเติม 60 ไมโครโมลาร์ของสารละลาย phenazine methosulphate (PMS) ปริมาตร 0.1 มล. ผสมให้เข้ากัน ตั้งไว้ 5 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 560 นาโนเมตร โดยให้กรดแอสคอร์บิกเป็นสารมาตรฐาน

## 4. การเตรียมสัตว์ทดลอง

การทดลองได้รับการอนุมัติการใช้สัตว์จากคณะกรรมการกำกับดูแลการเลี้ยงสัตว์และการใช้สัตว์ทดลอง คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ หมายเลขโครงการ 30/2561 โดยให้หนูขาวเพศผู้ สายพันธุ์ Wistar สังกัดจากศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล นำมาปรับตั้งน้ำหนักตัวสัตว์ทดลองที่มีการควบคุมจุดหนูกี้ 25 ± 1 กรัมเพศเมีย เป็นเวลา 7 วัน มีการให้อาหารและน้ำตลอดเวลา หนูขาวน้ำหนักหนักรหว่าง 180-220 กรัม ควบคุมเป็น 4 กลุ่มๆ ละ 6 ตัว ดังนี้

กลุ่มที่ 1: กลุ่มหนูได้รับอาหารปกติตามสุขและป้อนน้ำกลั่น (normal dietary control; NDC)

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

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

กลุ่มที่ 4: กลุ่มหนูน้ำตาสในเลือดสูงและบ้วนยาลดภาวะเบาหวาน (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) ตั้งจากวัน 10 วันวัดระดับน้ำตาลในเลือดหนู หากมีค่าสูงกว่า 200 มก./เดส. (mg/dl) แสดงถึงการมีภาวะเบาหวาน เมื่อเริ่มบ้วนสารทดสอบกลุ่มที่ได้รับบ้วน RSE และเมทฟอร์มิน จะถูกนำมาบ้วนด้วยน้ำกลั่นก่อนบ้วน โดยจะบ้วนในสารเวลา 8.00 น. ของทุกวัน ตลอด 8 สัปดาห์ สัตว์ทดลองทุกกลุ่มจะได้รับอาหารและน้ำอย่างเพียงพอ ทำการบันทึกน้ำหนัก และมีการเก็บตัวอย่างเลือดที่มีบริเวณปลายหางหนูปริมาตร 0.5 มล. เพื่อวิเคราะห์ค่าชีวเคมีในพลาสมาต่อไป

#### 5. การตรวจวัดค่าชีวเคมีในพลาสมา

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

#### สถิติที่ใช้ในการวิเคราะห์

ข้อมูลการวิจัยฤทธิ์จะจัดข้อมูลอิสระจะถูกแสดงในรูปค่าเฉลี่ย  $\pm$  ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Mean  $\pm$  S.D.) ข้อมูลการวิจัยในสัตว์ทดลองจะถูกแสดงในรูปค่าเฉลี่ย  $\pm$  ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Mean  $\pm$  S.E.) การวิเคราะห์ความแตกต่างของกลุ่มทดลอง ใช้ One-Way ANOVA ตามด้วย Post Hoc Test ของ Duncan

#### ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

##### สารสกัดน้ำและปริมาณสารประกอบฟีนอลิกขอม

จากการสกัดสารห่ายทั้ง 2 ชนิด ด้วยน้ำ พบปริมาณสารสกัดสารห่ายโกและสารห่ายเตา คิดเป็นเปอร์เซ็นต์สารสกัดที่ได้ (% yield) เท่ากับ 44.36% และ 36.20% ของน้ำหนักสารห่ายแห้ง ตามลำดับ สารสกัดสารห่ายโกมีลักษณะเป็นผงแห้งสีน้ำตาลเข้ม ส่วนสารสกัดสารห่ายเตาเป็นผงแห้งสีเทาเข้ม เมื่อนำสารสกัดทั้งสองชนิดมาพัฒนาสูตรใหม่ในอัตราส่วน 1 : 1 เรียกว่า RSE แล้วนำไปจัดปริมาณสารประกอบฟีนอลิกขอมพบว่า RSE มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิก 42.31  $\pm$  0.30 มิลลิกรัมต่อมิลลิกรัมของกรดแกลลิกต่อสารสกัด 1 กรัม (mg GAE/ g extract) เมื่อเปรียบเทียบกับปริมาณสารประกอบฟีนอลิกที่พบในสารห่ายเตา 107.02 mg GAE/ g extract และสารห่ายโกมีค่า 8.58 mg GAE/ g extract (Janthip et al., 2017) แสดงให้เห็นว่า RSE ที่มาจากการผสมสารสกัดสารห่าย 2 ชนิด ทำให้มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกที่เพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับสารห่ายโกเพียงชนิดเดียว และในการศึกษาครั้งนี้ RSE ยังแสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระชนิดบีเวต ดีพีพีแวลและซูเปอร์ออกไซด์อีกด้วย (Table 1)

#### การศึกษาฤทธิ์ขจัดอนุมูลอิสระของสารสกัดสาหร่ายน้ำจืด

การศึกษาฤทธิ์ขจัดอนุมูลอิสระของสารสกัดสาหร่ายน้ำจืด โดยใช้วิธีทดสอบการขจัดอนุมูลอิสระ 3 ชนิด คือ อนุมูลแอมิทิเวส ดีพีพีเอช และอนุมูลอิสระซูเปอร์ออกไซด์ แสดงใน Table 1 พบว่า RSE ปริมาณ 1 กรัมมีฤทธิ์ขจัดอนุมูลอิสระแอมิทิเวส 1,115.28 mM TEAC/ g extract ซึ่งสูงกว่าฤทธิ์ขจัดอนุมูลอิสระของสารสกัดสาหร่ายเลา 3 เท่า และสาหร่ายโกประมาณ 223 เท่า ตามรายงานการวิจัยของ Janship et al.(2017) ที่รายงานไว้ก่อนหน้านี โดยสาหร่ายเลาและสาหร่ายโกแต่ละชนิดสามารถขจัดอนุมูลอิสระแอมิทิเวสได้ 379.01 และ 4.95 mM TEAC/ g extract ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบว่า RSE มีฤทธิ์ขจัดอนุมูลอิสระดีพีพีเอช และฤทธิ์ขจัดอนุมูลอิสระซูเปอร์ออกไซด์ 33.17 และ 139.44 mg GAE/ g extract ตามลำดับ เมื่อนำไปเปรียบเทียบกับรายงานการวิจัยของ Janship et al. (2013) ที่พบว่าสารสกัดน้ำของสาหร่ายเลาสามารถขจัดอนุมูลอิสระดีพีพีเอช 3,446 mg GAE/ g extract ทำให้เห็นว่า RSE มีฤทธิ์ขจัดอนุมูลอิสระดีพีพีเอชได้น้อยกว่าสารสกัดสาหร่ายเลาเพียงชนิดเดียวอย่างมาก

นอกจากการทดสอบดังกล่าวแล้วพบว่า RSE สารสกัดนี้ให้ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกและมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระทั้ง 3 ชนิด สูงกว่าสารสกัดน้ำสาหร่ายโก แต่ต่ำกว่าสารสกัดน้ำสาหร่ายเลา อย่างไรก็ตามหากพิจารณาต้นทุนของสาหร่ายพบว่า สาหร่ายเลา (3,500 บาทต่อกิโลกรัมน้ำหนักแห้ง) มีราคาสูงกว่าสาหร่ายโก (600 บาทต่อกิโลกรัมน้ำหนักแห้ง) ถึง 6 เท่า ดังนั้นแล้ว RSE จะสามารถลดต้นทุนของวัตถุดิบได้สูงถึง 50% (ต้นทุนลดลง 2,050 บาทต่อกิโลกรัมน้ำหนักแห้ง) จึงน่าจะเห็นความคุ้มค่าในการนำไปพัฒนาต่อในเชิงพาณิชย์ได้ นอกจากนี้ฤทธิ์ขจัดอนุมูลอิสระแอมิทิเวสและดีพีพีเอชแล้ว ยังสามารถขจัดอนุมูลซูเปอร์ออกไซด์ 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	Value
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)

#### ยลวิเคาะชีพคำชีวเคมีในพลาสมา

การทดสอบประสิทธิภาพของ RSE ในหนูขาวที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะเบาหวาน โดยทำให้มีระดับน้ำตาลในเลือดก่อนการทดสอบมากกว่า 200 mg/dl หรือมีภาวะ hyperglycemia ด้วย streptozotocin ซึ่งจะเข้าไปทำลายเบต้าเซลล์ในตับอ่อนซึ่งทำหน้าที่สังเคราะห์และปล่อยอินซูลิน จึงทำให้เกิดภาวะเบาหวานขึ้น ผลการทดสอบพบว่า กลุ่มหนูปกติ (NDC) และกลุ่มหนูที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะเบาหวานกลุ่มควบคุม

(DMC) กลุ่มที่ได้รับการป้องกันสารสกัด RSE (DME) และกลุ่มที่ได้รับการป้องกันยาเพอร์นิน (DMM) มีการเพิ่มขึ้นของน้ำหนักตัวไม่ต่างกันทางสถิติ ( $p > 0.05$ ) เนื่องจากในการทดลองเป็นการให้น้ำทำให้เกิดภาวะน้ำตาลในเลือดสูงเพียงชั่วคราวเฉีว แต่ไม่เหนี่ยวนำให้เกิดภาวะฉับ ดังนั้นการเพิ่มขึ้นของน้ำหนักจึงไม่แตกต่างกันมาก ซึ่งใกล้เคียงกับระดับไตรกลีเซอไรด์ (Table 2) ผลการป้องกันสารสกัด RSE และยาเพอร์นินในกลุ่มหนูเบาหวาน สืบต่อกันเป็นเวลา 8 สัปดาห์ พบว่า หนูเบาหวานกลุ่ม DME มีระดับน้ำตาลในเลือดลดลง 36.82% และคอเลสเตอรอลรวมในเลือดลดลง 29.38% เมื่อเทียบกับหนูเบาหวาน DMC เช่นเดียวกับกลุ่มหนูที่ได้รับยาเพอร์นิน (DMM) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) โดยกลไกการออกฤทธิ์ของ RSE ในการลดน้ำตาลในเลือดน่าจะเกี่ยวข้องกับส่วโบนินซินูติน เพราะมีรายงานการวิจัยพบว่า สารสกัดน้ำสาหร่ายเคลารขนาด 1,000 มก./กก. มีผลต่อการเพิ่มความไวในการตอบสนองต่อส่วโบนินซินูติน และช่วยเพิ่มระดับเรนินที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (Ontawong et al., 2013) ในขณะที่สารสกัดสาหร่ายไคโดรเม้น้ำขนาด 1,000 มก./กก. สามารถลดระดับน้ำตาลและไตรกลีเซอไรด์ได้ด้วยเช่นกัน (Srimarong et al., 2015) แสดงให้เห็นว่าสาร RSE ขนาด 500 มก./กก. สามารถลดระดับน้ำตาลได้เช่นเดียวกับสาหร่ายเคลารและสาหร่ายไคโด นอกจากนี้ทั้งสาหร่ายไคโดและสาหร่ายเคลามีสารต้านอนุมูลอิสระ โดยเฉพาะสารฟีนอลิก ชนิดโพลีฟีนอลชนิดที่พบในสาหร่ายทั้ง 2 ชนิด (Janthip et al., 2017) จะช่วยลดการเกิดภาวะเครียดออกซิเดชัน และส่งผลทำให้ลดระดับน้ำตาล ไตรกลีเซอไรด์ และคอเลสเตอรอลในผู้ที่มีการเบาหวานได้

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

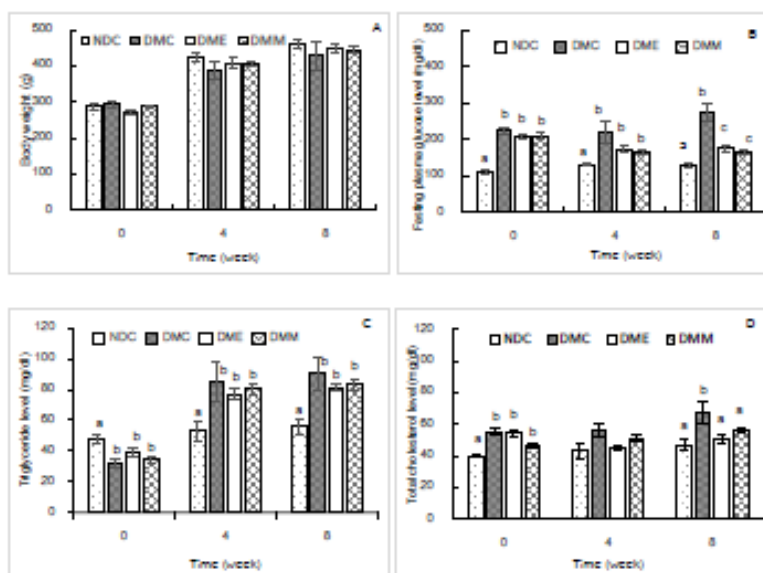
Group	NDC	DMC	DME	DMM
Body weight (g)	460.00 ± 14.14	428.33 ± 38.25	447.78 ± 14.02	443.33 ± 9.43
Plasma glucose level (mg/dl)	128.14 ± 7.50 <sup>a</sup>	275.72 ± 23.21 <sup>b</sup>	174.19 ± 9.16 <sup>b</sup>	164.30 ± 4.78 <sup>b</sup>
Triglyceride level (mg/dl)	55.59 ± 5.18 <sup>a</sup>	90.23 ± 11.15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

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 แสดงน้ำหนักตัวและค่าไขมันในเลือดของหนูกลุ่มปกติและกลุ่มเบาหวานทุกกลุ่ม ในสัปดาห์ที่ 0, 4 และ 8 พบว่า มีการเพิ่มขึ้นของน้ำหนักตัวไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (A) ส่วนค่าระดับน้ำตาลในเลือดของหนูเบาหวานควบคุมมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นกว่าเดิมทุก 4 สัปดาห์ ในขณะที่กลุ่มที่ได้รับการป้องกันสารสกัด RSE (DME) เริ่มมีแนวโน้มของระดับน้ำตาลที่ลดลงในสัปดาห์ที่ 4 (ลดลง 21.38%) และ

ผลของยารักษาเบาหวานในสัปดาห์ที่ 8 (ลดลง 36.82%) อย่างมีความแตกต่างกับทาบสถิติ (B) ซึ่งให้ผลการทดสอบเช่นเดียวกับกลุ่มที่ได้รับยาเมตฟอร์มิน (DMM) ส่วนค่าไตรกลีเซอไรด์ของหนูเบาหวานทุกกลุ่ม พบว่าเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญจากกลุ่มหนูปกติ อาจเนื่องมาจากการเกิดภาวะเบาหวานทำให้ระดับของไตรกลีเซอไรด์เพิ่มขึ้น แม้ในกลุ่มที่ได้รับยาเมตฟอร์มิน ในขณะที่ระดับคอเลสเตอรอลในหนูเบาหวานลดลงอย่างมีนัยสำคัญตั้งแต่สัปดาห์ที่ 4 และ 8 ซึ่งสอดคล้องกับรายงานก่อนหน้าที่พบว่า สารสกัดน้ำของสาหร่ายโกลและสาหร่ายเตาที่ขนาด 1,000 มก./กก. มีคุณสมบัติลดน้ำตาลในเลือด ช่วยเพิ่มความไวในการตอบสนองต่ออินซูลิน และลดการเกิดภาวะเครียดออกซิเดชัน (Ontawong *et al.*, 2013; Srimarong *et al.*, 2015) และสารสกัดสาหร่ายเตายังมีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ HMG-CoA reductase ทำให้การสังเคราะห์คอเลสเตอรอลในตับลดลง และลดการดูดซึมคอเลสเตอรอลในลำไส้เล็กด้วย (Dongjai *et al.*, 2016) โดยกลไกการออกฤทธิ์ลดน้ำตาลในเลือดเหมือนกับยาเมตฟอร์มินที่ใช้ในการรักษาโรคเบาหวาน ดังนั้นจึงพบว่าในกลุ่มที่ได้รับ RSE ซึ่งลดระดับคอเลสเตอรอลในหนูเบาหวานลงได้



Data are expressed as Mean  $\pm$  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: diabetic mellitus control, DME: diabetic mellitus extract 500 mg/kg, DMM: diabetic mellitus metformin 50 mg/kg

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

#### สรุปผลการทดลอง

สารสกัดสาหร่ายโกลและสาหร่ายเตาถูกนำมาพัฒนาสูตรใหม่เรียกว่า RSE พบว่า มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกเป็นองค์ประกอบสำคัญ และมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเหนือที่เอส ดีพีพีเอช และอนุมูลซูเปอร์ออกไซด์ เมื่อนำ RSE ไปทดสอบในหนูเบาหวาน สามารถลดระดับน้ำตาล (anti-hyperglycemia) และฤทธิ์ลดระดับคอเลสเตอรอล (anti-hypercholesterolemia) ในเลือดสูงในหนูที่มีการเบาหวานชนิดที่ 2 ได้ ถึงแม้ว่าการนำสารสกัดสาหร่ายทั้ง 2 ชนิดมาพัฒนาสูตรใหม่เป็น RSE จะมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่น้อยกว่าสาหร่ายเตาชนิดเดียว แต่สูตร RSE สามารถลดต้นทุนวัตถุดิบและแสดงฤทธิ์ชีวภาพได้ดี นอกจากนี้สาหร่ายโกลยังแสดงคุณสมบัติในการก่อเจลให้กับยาลิดอกซ์ที่จับด้วย โดยสูตรดังกล่าวมีควาเป็นไปได้ในการพัฒนาเป็นยาลิดอกซ์เสริมอาหารเชิงพาณิชย์ เพื่อป้องกันภาวะเบาหวานซึ่งเป็นหนึ่งในโรคไม่ติดต่อเรื้อรังที่มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วของประชากรในประเทศไทย

#### กิตติกรรมประกาศ

ทีมผู้วิจัยขอขอบคุณสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) สำหรับทุนสนับสนุนการวิจัยระดับปริญญาเอกภายใต้โครงการพัฒนานักวิจัยและงานวิจัยเพื่อจุดสายกรรม (พรอ.) รหัสโครงการ PHD5910010 ร่วมกับบริษัทจำปาฟลูอิดส์ โพรเซสซิ่ง จำกัด และขอขอบคุณภาคีชาวสรีรวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ และคณะเทคโนโลยีการประมงและทรัพยากรทางน้ำ มหาวิทยาลัยแม่โจ้สำหรับการสนับสนุนด้านสถานที่และอุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย

#### เอกสารอ้างอิง

- Aekplakorn, W., Chariyalertsak, S., Keasomboon, P., Assanangkornchai, S., Taneeponnitchakul, 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)
- Amomlerdpison, D., Mengumphan, K., Thumvijit, S. and Pechapompisal, Y. 2011. Antioxidant and anti-inflammatory activities of freshwater macroalga, *Cladophora glomerata* Kutzing. Thai Journal of Agricultural Science. 44(5): 283-290. (in Thai)
- Amomlerdpison, D., Ngomjan, M., Mengumphan, K., Janthip, R. and Srimarong, 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., Mantz 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.
- Doungjai, A., Limpanchob, N., Triasat, 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 Chimsaok, T. 2013. Phytochemical Screening, Antioxidant Activity and Total Phenolic Content of *Spirogyra* spp. *Advance Material Research*. 699: 693-697.
- Janthip, R., Lailerd, N., Wangcharoen, 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., Pongchaisdech, A., Lailerd, N., Amornlerdpison, D., Lungkaphin, A. and Srimarong, C. 2013. Antioxidant and Renoprotective Effects of *Spirogyra neglecta* (Hassall) Kützinger Extract in Experimental Type 2 Diabetic Rats. *Biomed Research International*. 1-15.
- Peerapompisal, Y., Panyoyai, T. and Amornlerdpison, D. 2012. Antioxidant and anti-inflammatory activities of *Spirogyra neglecta* (Hassall) Kützinger. *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.
- Rattanaput, T., Mangumphan, K., Srimarong, 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)
- Ric, 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., Airanthy, 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., Thongari, T. and Chidnok, W. 2016. Acute Effects of *Cladophora glomerata* Extract on Time to Exhaustion during Severe Intensity Exercise. The 39<sup>th</sup> National Graduate Research Conference. Assumption University, Samutprakarn, Thailand. (in Thai)
- Srimarong, C., Ontawong, A., Saowakon, N., Vivithanapom, P., Pongchaidecha, A., Amornleedipaisan, 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., Aaral, L., Kaul, G.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 *Symphycodia latiscula* (Rhodamelaecae) *Journal of Applied Physiology*. 19:97-108.

*Full Paper*

## Potential of freshwater algae extracts and their effect on blood glucose, lipids and oxidative markers in diabetic rats

Rattanaporn Janthip<sup>1</sup>, Narissara Lailerd<sup>2</sup>, Wiwat Wangchareon<sup>3</sup>, Kriangsak Mangumphan<sup>4</sup>  
and Doungporn Amornlerdpison<sup>4,5\*</sup>

<sup>1</sup> Interdisciplinary Agriculture Program, Faculty of Engineering and Agro-Industry, Maejo University, Chiang Mai, Thailand

<sup>2</sup> Department of Physiology, Faculty of Medicine, Chiang Mai University, Chiang Mai Thailand

<sup>3</sup> Faculty of Engineering and Agro-industry, Maejo University, Chiang Mai, Thailand

<sup>4</sup> Faculty of Fisheries Technology and Aquatic Resources, Maejo University, Chiang Mai, Thailand

<sup>5</sup> Center of Excellence in Agricultural Innovation for Graduate Entrepreneur, Maejo University, Chiang Mai, Thailand

\* Corresponding author, e-mail: [doungpornfishtech@gmail.com](mailto:doungpornfishtech@gmail.com)

*Received / Accepted / Published:*

---

**Abstract.** *Rhizoclonium hieroglyphicum* and *Spirogyra neglecta* are freshwater green macroalgae that have exhibited biological functions, such as antioxidant, anti-inflammatory and anti-diabetic properties, in our previous studies. The objectives of this work were to evaluate the total phenolic content of *R. hieroglyphicum* extract (RE) and *S. neglecta* extract (SE) using a Folin-Ciocalteu colorimetric assay with additional analysis through the liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS) technique. Afterwards, the RE and SE were mixed to obtain the united algae extracts (RSE). RSE is functional ingredient in algae products or RSP. The RSP was formulated into four formulas and evaluated with the sensory test by the Just-About-Right (JAR) scale in 160 participants for the developed product. The RSE and RSP were estimated based on pharmacological effects on blood chemistry in rats. The results established that the yield of RE and SE were 38.41% and 35.51%, respectively. The total phenolic content of RE and SE were 8.58 and 107.02 mgGAE/g extract, respectively. The isoquercetin were found in RE and SE which are possessed of the phenolic compound and antioxidant agent. The results of the blood chemistry at the end of the experiments established that RSE and RSP decreased glucose (38.53% and 41.28%), triglycerides (2.96% and 36.84%) and total cholesterol levels (25.98% and 21.07%). The biomarkers of oxidative stress, such as malondialdehyde and antioxidant enzymes, including superoxide dismutase, displayed a significant increase in RSE and RSP groups when compared to that of the diabetic control group. Moreover, glutathione peroxidase in the RSE group was found to significantly rise in terms of concentration when compared with the diabetic group. These finding indicated that the RSE and RSP possess anti-hyperglycemic, anti-lipidemic and antioxidative stress effects. They can be used beneficially and effectively as an ingredient in nutraceutical products.

**Keywords:** *Rhizoclonium hieroglyphicum*, *Spirogyra neglecta*, hyperglycemic, oxidative stress

---

## INTRODUCTION

Type 2 diabetes mellitus (T2DM) is a metabolic disorder defined by high blood glucose levels over 200 mg/dl. A person of Asian origin aged over 35 years suffering from being overweight, obesity and dyslipidemia is expected to be at risk for T2DM [1]. The main cause of dyslipidemia is food habits (salty, sweet, high fat), lifestyle, and physical activity. The prevalence and trends of T2DM in the Thai population are continuing to rise. In 2016, the percentage of Thai deaths from diabetes was 10% [2], which is therefore evidence of a major public health problem in Thailand. However, public health interventions have focused on reducing the number of diabetes patients with regular exercise, weight loss, and a healthy diet.

Diabetes mellitus is associated with an increase in free radicals and oxidative stress that is a cellular condition as a result of a physiological imbalance between antioxidants and free radicals [3]. The main antioxidant cellular enzymes are superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPx). They are the body's natural antioxidant defences that scavenge active free radicals to balance molecules. While the production of free radicals exceeds the relevant levels, it has been suggested that elevated intake of antioxidant-rich foods or antioxidant supplements will enhance the body's potential to minimize the risk of free radical-related health problems [4]. Interestingly, freshwater green macroalgae, like *R. hieroglyphicum* and *S. neglecta*, have nutritional and antioxidative properties.

*R. hieroglyphicum* and *S. neglecta* are part of the Chlorophyta division. They are commonly used for local food in North and Northeast Thailand. Previous research has reported that these algae exhibit antioxidant, anti-inflammatory, anti-cancer, anti-bacterial, anti-gastric ulcer and anti-diabetic activities [5, 6, 7]. In addition, they feature certain bioactive components, such as polyphenolic compounds and polysaccharides. Outawong et al. [8] and Srimaroeng et al. [9] described *S. neglecta* and *R. hieroglyphicum* at dosages of 1,000 mg/kg should enhance their antioxidant and anti-diabetic properties. The water extract of *R. hieroglyphicum* presents gelling as carrageenan [10]. Therefore, the combination of algae extracts was developed to yield a new algae product in order to estimate the potential effects on the levels of blood chemistry and antioxidant enzymes.

## MATERIALS AND METHODS

### Extract preparation

Dried *R. hieroglyphicum* and *S. neglecta* were collected from Nan province and Phrae province, Thailand. The macroalgae were dried in a hot air oven at 55 to 60°C for 48 hours. Each of the dried algae was boiled with distilled water at 95 to 100°C for one hour [11]. The algae extract solution was concentrated by a rotary evaporator and lyophilized with a freeze dryer to produce the dried extract. They were then stored at 4°C prior to subsequent experiments.

### Determination of total phenolic content

The total phenolic contents of algae extracts (*R. hieroglyphicum* extract; RE and *S. neglecta* extract; SE) were determined using the Folin-Ciocalteu method [12]. The sample solution at 0.2 ml was mixed with 1.0 ml of 10% Folin-Ciocalteu reagent and 0.8 ml of 7.5% sodium carbonate. The absorbance of the reaction mixture was measured spectrophotometrically at 765nm after one hour

of incubation at room temperature. Results were expressed as gallic acid equivalents (GAE) per gram of extract.

#### **Determination of isoquercetin content**

The isoquercetin content of RE and SE was assessed using liquid chromatography and mass spectrometry techniques on an Agilent Technologies 1100 series, equipped with a LiChroCART RP-18e column (4.6mm x 150mm x 5mm, 5 $\mu$ m) and diode array detector (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) recording at 270, 330, 350 and 370 nm. The mobile phases were a binary solvent system consisting of acetonitrile (A) and 10 mM Ammonium formate at pH 4 (B). The gradient used was 5 min 100%B, 5 min 20%A, 10 min 20%A and 40 min 40%A. [13]. The isoquercetin contents were generated and calculated from the peak area of the chromatogram.

#### **Formulation and preparation of algae products**

The combination extract of RE and SE at the ratio 1:1 or RSE was used as the ingredient for algae product (RSP) that varied four concentrations of RSE (4, 2, 1 or 0.5%) for sensory evaluation. The RSP consisted of RSE (4, 2, 1 or 0.5%), sweetener 7%, stabilizing agent 1.5% and water.

One hundred and sixty participants from Chiang Mai, Thailand participated as a consumer group. They were both male and female aged over 35 years. They were instructed to evaluate based on physical appearance (colour, flavour, texture) and overall liking using Just-About-Right (JAR) scaling [14]. Numerical scores of the ideal intensity level was used for the calculation of "Too Little", "Just Right" and "Too Much". The results should be presented in terms of a percentage. Scores of at least 70% meant sensory acceptance [15].

#### **Animals**

Male Wistar albino rats (120-150g) were purchased from the National Laboratory Animal Center, Mahidol University, Salaya, Thailand. The experimental procedure and protocols were approved by the Laboratory Animal Care and Use Committees at Faculty of Medicine, Chiang Mai University, Chiang Mai, Thailand. (Certificate of Ethics no. 30/2561, dated 7 November 2018). Animals were housed in a room and maintained at 25  $\pm$  1  $^{\circ}$ C on a 12-hour light/dark cycle. Further, the animals had free access to water and food.

Animals were randomized and divided into six groups:

- Group 1: normal control and received distilled water, NC
- Group 2: normal control and received 500 mg/kg RSP, NP
- Group 3: diabetic control and received distilled water, DC
- Group 4: diabetic and received 500 mg/kg RSP, DP
- Group 5: diabetic and received 500 mg/kg RSE, DE
- Group 6: diabetic and received 50 mg/kg metformin, DM

Groups 3-6 were induced into diabetes by intraperitoneal injection of 40 mg/kg streptozotocin (STZ) [16], and after 10 days, rats with fasting plasma glucose levels of  $\geq$ 200 mg/dL were classified as diabetic and used in this study. The duration of the experiment was eight weeks, after which the animals were sacrificed and blood samples were collected for assessment of fasting plasma glucose, triglycerides, cholesterol and antioxidant enzymes (SOD, CAT and GPx).

#### **Determination of glucose, triglycerides, and cholesterol level**

The blood samples were collected from the tail vein (under light ether anaesthesia) in the microcentrifuge tube containing sodium fluoride as an anticoagulant agent for determination of glucose levels and another non-anticoagulant microcentrifuge tube for determination of triglyceride and cholesterol concentrations. They were measured using the commercial enzymatic colorimetric

assay kit. The high density lipoprotein (HDL) and low density lipoprotein (LDL) levels in serum were established by automatic analysers (Mindray BS-380, Shenzhen, China)

#### **Determination of malondialdehyde levels**

Malondialdehyde (MDA) is a product of lipid peroxidation. The determination of malondialdehyde concentration using thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) assay kit (Cayman, USA) was according to the manufacturer's protocol. The blood sample was collected using an anticoagulant (EDTA) and centrifuged at 1,000g for 10 min. Pipetting off the yellow plasma samples was intended for testing. The sample vial was mixed with sodium dodecyl sulphate (SDS) solution and colour reagent. Next, they were incubated for one hour at 100°C and placed in an ice bath to stop the reaction. They were centrifuged at 1,600g for 10 min. The supernatant of the sample was measured using a spectrophotometer at 540 nm.

#### **Determination of antioxidant enzymes**

The SOD, CAT and GPx activities were determined in serum samples using a SOD assay kit, CAT assay kit and GPx assay kit (Cayman, USA).

##### *Determination of SOD activity*

Blood samples were collected without using an anticoagulant. Centrifugation of the blood was at 2,000 g for 15 min. Next, the yellow serum layer was pipetted off the top and stored on ice. Thereafter, the serum sample was added to the radical detector and vanthine oxidase to initiate the reaction with careful shaking to mix and incubated for 30 min. In what followed, the sample absorbance was read at 460 nm. The results of the SOD activity were expressed as U/ml.

##### *Determination of CAT activity*

The serum of the sample was used to determine CAT activity. The sample was mixed with phosphate buffer (pH 7.0) and formaldehyde reagent, and the reaction was initiated by adding diluted potassium hydroxide. Then, incubation and shaking for 20 min took place at room temperature. Purpald reagent and potassium periodate were added to each sample and incubated for five min before reading absorbance at 540 nm. The results were expressed as nmol/min/ml.

##### *Determination of GPx activity*

The blood sample was collected using an anticoagulant (EDTA), which was then centrifuged at 1,000 g for 10 min at 4°C. The yellow plasma layer was then pipetted off the top and added to the Tris-HCl buffer (pH 7.6) and co-substrate mixture, which consisted of nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) oxidase, glutathione and glutathione reductase. The reaction was initiated by adding cumene hydroperoxide. The activity of the reaction was read at an absorbance of 340 nm. The results are expressed as nmol/min/ml.

#### **Data analysis**

All data from the animal experiments are expressed as mean  $\pm$  standard error of the mean (S.E.M.). Statistical comparisons were performed by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Duncan's multiple range tests. Differences were considered to be significant when  $p < 0.05$ .

#### **RESULTS AND DISCUSSION**

The yield of RE and SE in hot water were 38.41% and 35.51%, respectively. The total phenolic content found in RE and SE contained 8.58 and 107.02 mgGAE/g extract, respectively (Table 1). The total phenolic content of SE was higher than RE in 12 instances. The results indicated that SE had higher antioxidant activity than RE. The water extraction of freshwater algae had a high yield value,

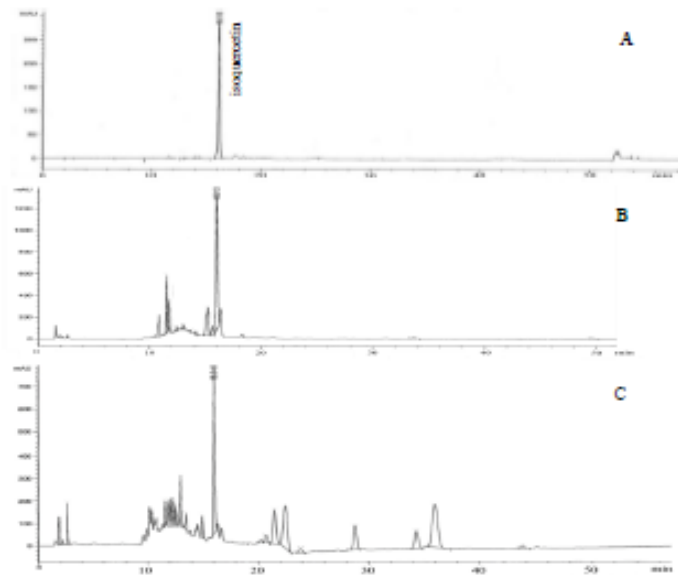
low cost and reliable safety according to our assessment. The algae extracts were employed for nutraceutical and pharmaceutical products. In addition, the standardization of extraction was important for quality control of the new product. The previous study reported that the phenolic compounds of RE and SE consisted of gallic acid, eriodictyol, isoquercetin, kaempferol, quercetin, hydroquinin, rutin, catechin and tannic acid. In particular, isoquercetin and catechin featured the main phenolic components in *R. hieroglyphicum* and *S. neglecta* [6, 8, 17, 18].

**Table 1** Percentage of yield, total phenolic contents and isoquercetin content of RE and SE

Sample	Yield (%)	Total phenolic contents (mgGAE/ g extract)	Isoquercetin content (mg/ kg extract)
<i>R. hieroglyphicum</i>	38.41	8.58 ± 0.10	264
<i>S. neglecta</i>	35.51	107.02 ± 1.03	288

Data expressed as mean ± S.D., n=3

Phenolic components have been reported for their effective antioxidant, anti-cancer, anti-bacterial, cardioprotective, antiinflammation, immune system-promoting and skin protection activities and are interesting candidates for pharmaceutical and medical applications [19]. The functional group arrangement, configuration and number of hydroxyl groups were also influenced by antioxidant activity of phenolic compounds, for example, radical-scavenging and metal ion chelation abilities [20]. In this study, the LC-MS technique was applied to the analysis of SE and RE as per Table 1 and Figure 1. The results established that the isoquercetin content of SE and RE were 288 and 264 mg/kg extract at retention times of 16.013 and 16.045, respectively. Isoquercetin is a type of phenolic compound known as an antioxidant agent, preventing or slowing down the oxidation process in foods. Moreover, isoquercetin or quercetin-3- glycoside decrease cholesterol and triglycerides while also promoting glucose consumption in diabetic rats and rabbits [21, 22, 23]. Therefore, the isoquercetin content of both extracts indicated the active compounds were present - they have been used as functional ingredients in nutraceutical products.



**Figure 1** LC-MS chromatogram of standard isoquercetin (A), isoquercetin of SE (B) and isoquercetin of RE (C)

The algae product (RSP) formulas consisted of RSE (ratio RE:SE = 1:1) at 4, 2, 1 and 0.5%, and were evaluated in terms of the product's colour, and it was found that all formulas had a dark green colour as well as the algae extract's colour. The participants aged over 35 years disliked the product's colour that presented the scored "JAR scaling" that was 60% for all RSP formulas. The colour, flavour, texture and overall liking at 0.5% of RSE were accepted for participants at a rate of more than 70%. Thus, RSP formulas (0.5% RSE) were utilised for ingredients of the algae product (RSP) and used in the animal testing, which investigated the blood chemistry and oxidative stress enzyme levels.

**Table 2** The sensory evaluation of four RSP formulas in the participants by JAR scaling

RSP formula	Acceptance test (%)			
	colour	flavour	texture	overall liking
4%	35.00	47.50	47.50	30.00
2%	60.00	52.50	42.50	50.00
1%	62.50	57.50	60.00	55.00
0.5%	60.00	75.00	77.50	77.50

n=160

The percentage of weight gain and ratio of visceral fat weight/body weight in all experimental groups (normal and diabetic rats) are shown in Table 3. Diabetic rats were not obese in this study. Additionally, increases in weight and visceral fat in normal and diabetic groups were not significantly different at the end of the trial period.

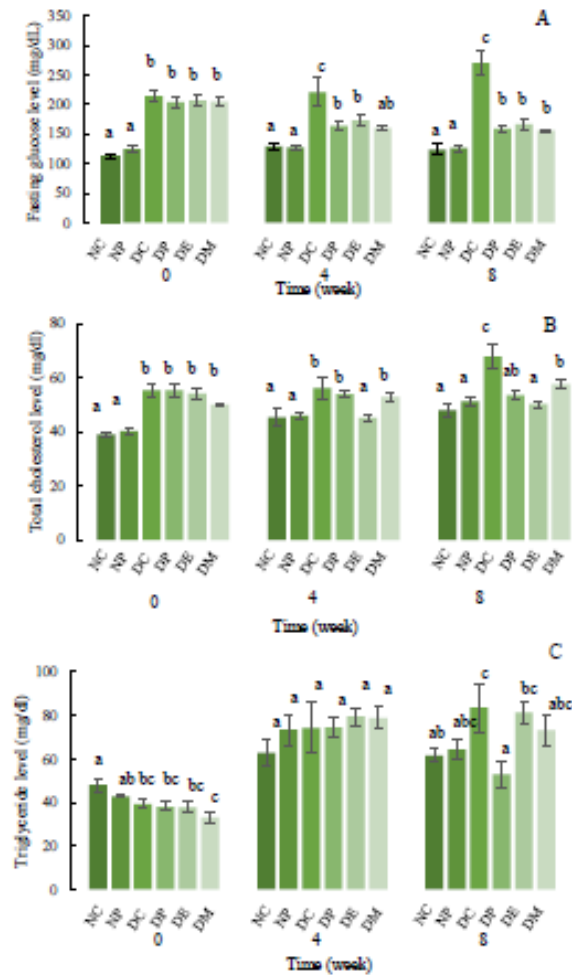
Table 3 Percentage of weight gain and visceral fat in the normal and diabetic rat at the 8<sup>th</sup> week

Group	%Weight gain	Visceral fat/body weight
NC	60.89 ± 4.35	0.0608 ± 0.0035
NP	58.58 ± 5.97	0.0598 ± 0.0055
DC	45.30 ± 10.75	0.0447 ± 0.0162
DP	55.28 ± 4.04	0.0569 ± 0.0043
DE	64.10 ± 5.06	0.0579 ± 0.0073
DM	55.21 ± 5.02	0.0590 ± 0.0024

Data expressed as mean ± S.E.M (n=6),  $p > 0.05$ , NC-normal control rats, NP-normal control rats and received 500mg/kg RSP, DC-diabetic control rats, DP-diabetic rats and received 500mg/kg RSP, DE-diabetic rats and received 500mg/kg RSE, DM-diabetic rats and received 50mg/kg metformin

Blood samples were collected and evaluated for glucose, triglyceride and cholesterol levels at 0, 4 and 8 weeks. The normal rats that received RSP exhibited no significant increase in fasting glucose levels when compared to the NC group at 8 weeks. The diabetic rat groups that received RSP and RSE had significant decreases in fasting glucose levels in terms of DP and DE when compared to the DC. Actually, T2DM is represented by fasting glucose level  $>200$  mg/dl (hyperglycaemia), insulin resistance and dyslipidemia. Metformin is a medicine that modulates the lowering of glucose concentrations. In Figure 2A, the diminution of fasting glucose levels was 41.28 and 38.53% in DP and DE, respectively, and DM was found to be 42.03% when compared with DC at the end of the experiment. The fasting glucose levels of DP and DE indicated that the RSP and RSE at a dosage of 500 mg/kg decreased the glucose level as well as those in the DM group.

In Figure 2B, the results for total cholesterol levels showed that the NP and NC groups did not have significant differences ( $p > 0.05$ ), though in diabetic groups, it was found that the total cholesterol of DE and DP were decreased (25.98 and 21.07%, respectively) when compared to the DC group. Moreover, triglycerides decreased in the DP at a greater rate than DE (36.84%, and 2.96%, respectively) by the 8<sup>th</sup> week (Figure 2B and 2C). Previous studies have found that *S. neglecta* at a dose of 1.0 g/kg BW/day did not have any effect on glucose or lipid levels in normal rats [8]. The *Cladophora glomerata* (*R. hieroglyphicum*) was able to reduce blood glucose and triglycerides while restoring insulin resistance under diabetic conditions [9]. Moreover, marine algae, such as *Sargassum hystrix*, at a dose of 300 mg/kg decreased the concentrations of triglycerides and cholesterol in diabetic rats [24]. *Sargassum oligocystum* experienced decreased fasting blood glucose and triglyceride levels [25]. Hence, RSE and RSP at a dose of 500 mg/kg can be diminish glucose and lipids in cases of diabetic mellitus.



**Figure 2** The levels of glucose, total cholesterol and triglycerides of algae extract and algae product in normal and diabetic rats at 0, 4 and 8 weeks. Different letters indicate statistically significant differences between groups ( $p < 0.05$ ) according to Duncan's Multiple Range Tests; NC-normal control rats, NP-normal control rats and received 500mg/kg RSP, DC-diabetic control rats, DP-diabetic rats and received 500mg/kg RSP, DE-diabetic rats and received 500mg/kg RSE, DM- diabetic rats and received 50mg/kg metformin

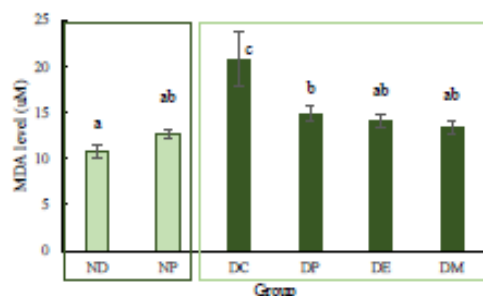
Interestingly, the total cholesterol of the DP and DE groups were significantly decreased to normal levels by the 8<sup>th</sup> week. However, the level of HDL across all groups was not significantly different. In addition, LDL in all diabetic groups was lower than normal groups (Table 3). High triglyceride levels combined with high LDL cholesterol or low HDL cholesterol are linked with fatty buildup within the artery walls, which increases the risk of heart attack and stroke, including cardiovascular and heart diseases [26]. From these results, it was shown that RSE and RSP can elicit anti-hypercholesterol activity.

**Table 3** Effect of RSE and RSP on total cholesterol, specifically HDL and LDL levels, at the 8<sup>th</sup> week

Group	Total cholesterol (mg/dL)	HDL (mg/dL)	LDL (mg/dL)
NC	48.03 ± 2.25 <sup>a</sup>	60.80 ± 4.47 <sup>a</sup>	13.00 ± 0.71 <sup>ab</sup>
NP	51.36 ± 1.74 <sup>a</sup>	50.80 ± 4.32 <sup>a</sup>	15.40 ± 0.93 <sup>a</sup>
DC	67.90 ± 4.31 <sup>c</sup>	55.40 ± 3.17 <sup>a</sup>	10.00 ± 0.84 <sup>c</sup>
DP	53.59 ± 1.84 <sup>ab</sup>	56.20 ± 3.92 <sup>a</sup>	11.60 ± 0.87 <sup>bc</sup>
DE	50.26 ± 1.20 <sup>a</sup>	49.40 ± 3.70 <sup>a</sup>	11.40 ± 0.98 <sup>bc</sup>
DM	57.64 ± 1.64 <sup>b</sup>	59.60 ± 3.61 <sup>a</sup>	11.80 ± 0.92 <sup>bc</sup>

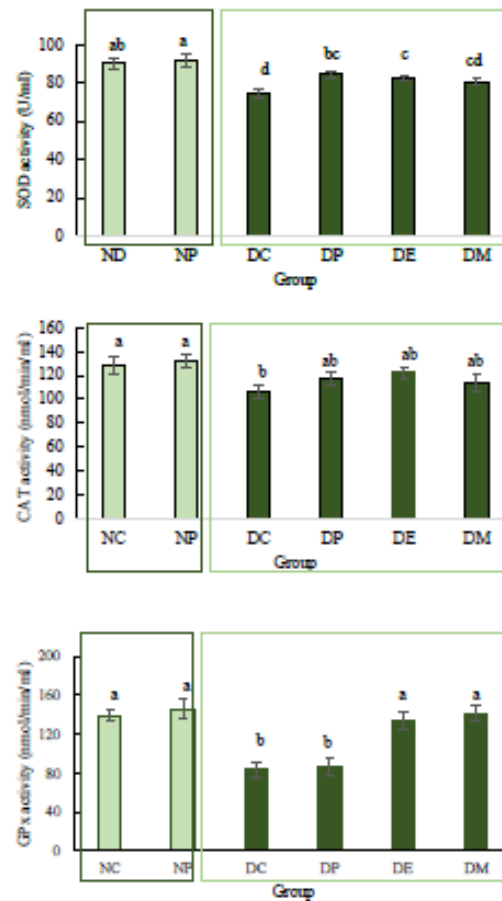
Data expressed as mean ± S.E.M. (n=6). The same letters within each column indicate statistically significant differences ( $p < 0.05$ ) according to Duncan's Multiple Range Tests; NC=normal control rats, NP=normal control rats and received 500mg/kg RSP, DC=diabetic control rats, DP=diabetic rats and received 500mg/kg RSP, DE=diabetic rats and received 500mg/kg RSE, DM= diabetic rats and received 50mg/kg metformin

MDA is the end-product of lipid peroxidation, and is the most frequently used biomarker of oxidative stress in various diseases despite its wide variations even in healthy people [27]. Furthermore, high levels of MDA lead to high oxidative stress, and oxidative damages are involved in both physiological and major pathological processes [28]. The present study found that the MDA levels of the DC group were greater than the treated groups (DP, DE and DM). The MDA levels of DP, DE and DM were significantly reduced when compared to the DC group. Therefore, RSE, RSP and metformin can defend against oxidative stress in diabetic rats.



**Figure 3** MDA levels of normal and diabetic rat groups. The various letters indicate statistically significant differences between groups ( $p < 0.05$ ) according to Duncan's Multiple Range Tests; NC-normal control rats, NP-normal control rats and received 500mg/kg RSP, DC-diabetic control rats, DP-diabetic rats and received 500mg/kg RSP, DE-diabetic rats and received 500mg/kg RSE, DM-diabetic rats and received 50mg/kg metformin

Free radicals are formed disproportionately in diabetes by glucose oxidation, non-enzymatic glycation of proteins and the subsequent oxidative degradation of glycosylated proteins. The high level of free radicals and simultaneous decline of antioxidant defence mechanisms lead to damage of cellular organelles and enzymes, increased lipid peroxidation and development of insulin resistance [29]. The antioxidant enzymes, SOD and CAT, featured significantly lower activities, and the same was the case for GPx activity in DC rats (Figure 4). The primary product in the course of oxygen metabolism is superoxide radical ( $O_2^{\cdot-}$ ), which is highly reactive. Superoxide is converted to a far less reactive product, hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ), by a family of metalloenzymes known as superoxide dismutase [25]. In addition, the SOD and GPx activity of the DP and DE groups rose significantly when compared to the DC group. It was reported that the phenolic compounds of *S. neglecta* and *R. hirsutoglyphicum* have antioxidant, anti-inflammatory and anti-diabetic properties [8, 9, 17]. According to these findings, RSP and RSE may have antioxidant agents that can reduce the amount of superoxide radicals or free radicals while restoring insulin resistance.



**Figure 4.** The levels of antioxidant enzyme (SOD, CAT, and GPx) activity. The same letters indicate statistically significant differences ( $p < 0.05$ ) according to Duncan's Multiple Range Tests; NC=normal control rats, NP=normal control rats and received 500mg/kg RSP, DC=diabetic control rats, DP=diabetic rats and received 500mg/kg RSP, DE=diabetic rats and received 500mg/kg RSE, DM=diabetic rats and received 50mg/kg metformin

#### CONCLUSIONS

Freshwater green macroalgae, *R. hieroglyphicum* and *S. neglecta*, were extracted with hot water and were found to contain isoquercetin, a bioactive compound. Both algae extracts, RE and SE, were mixed as RSE and developed into a new algae product (RSP) for determination of the effects

on anti-diabetic activity in rats. RSE and RSP exhibited a decrease in glucose, triglyceride and total cholesterol levels in diabetic rats. Moreover, RSE and RSP can defend against oxidative stress in the diabetic rats owing to lowering MDA concentrations and elevating antioxidant enzyme activity, especially superoxide dismutase, and glutathione peroxidase. These findings indicated that RSE and RSP have been found to possess anti-hyperglycemic, anti-lipidemic and anti-oxidative stress. It can be used beneficially and effectively as functional ingredients in nutraceutical products for diabetic mellitus.

#### ACKNOWLEDGEMENTS

The authors gratefully acknowledge use of the services and facilities of the Graduate Central Laboratory, Faculty of Fisheries Technology and Aquatic Resources Maejo University, Chiang Mai, and Faculty of Medicine, Chiang Mai University, Chiang Mai, Thailand. This research was supported by the Research and Researcher for Industry (RRI) grant (PHD59I0010) and Ampol Food Processing Co., Ltd.

#### REFERENCES

1. A. Ramachandran, "Know the signs and symptoms of diabetes", *Indian J. Med. Res.*, 2014, 140(5):579-581.
2. World Health Organization- Noncommunicable Diseases (NCD) Country Profiles, 2018, [http://www.who.int/nmh/countries/tha\\_en.pdf](http://www.who.int/nmh/countries/tha_en.pdf) (Accessed: June 2019).
3. A.R. Collins, "Assays for oxidative stress and antioxidant status: applications to research into the biological effectiveness of polyphenols", *Am. J. Clin. Nutr.*, 2005, 261S-7S.
4. O.M. Ighodaro and O.A. Akinloye, "First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPx): Their fundamental role in the entire antioxidant defence grid", *Alex. J. Med.*, 2017,1-7.
5. T. Rattanapot, K. Mangumphan, C. Srimaroeng, R. Jantip and D. Amornlerdpison, "Antioxidant activity of *Spirogyra* sp. and effect of its supplementation on growth performance of Tilapia in cage culture" *J. Fish. Tech. Res.*, 2012, 6(2), 23-34.
6. D. Amornlerdpison, M. Ngermjan, K. Mengumphan, R. Jantip and C. Srimaroeng, "Active compounds and oxidative defense of *Cladophora* spp. in hybrid catfish", *KMUTT Research and Development J.*, 2015, 38(4), 393-405.
7. T. Thumvijit, S. Taya, C. Punvittayagul, Y. Peerapornpisal and R. Wongpoomchai, "Cancer Chemopreventive Effect of *Spirogyra neglecta* (Hassall) Kützing on Diethylnitrosamine-Induced Hepatocarcinogenesis in Rats" *Asian Pac. J. Cancer Prev.*, 2014, 15 (4), 1611-1616.
8. A. Ontawong, N. Saowakon, P. Vivithanaporn, A. Pongchaidecha, N. Lailerd, D. Amornlerdpison, A. Lungkaphin and C. Srimaroeng, "Antidiabetic and renoprotective effect of *Spirogyra neglecta* Kützing extract in experimental type2 diabetic rats", *BioMed Res. Int.*, 2013, 1-15.
9. C. Srimaroeng, A. Ontawong, N. Saowakon, P. Vivithanaporn, A. Pongchaidecha, D. Amornlerdpison, S. Soodvilai and V. Chatusudthipong, "Antidiabetic and renoprotective effects of *Cladophora glomerata* Kützing extract in experimental type 2 diabetic rats: A Potential nutraceutical product for diabetic nephropathy", *J. Diabetes Res.*, 2015, 1-15.
10. L. Mungmai, S. Jiramasornkul, Y. Peerapornpisal, B. Sirithunyulug and P. Leelapornpisid "Extraction, Characterization and Biological Activities of Extracts from Freshwater Macroalga [*Rhizoclonium hieroglyphicum* (C. Agardh) Kützing] Cultivated in Northern Thailand". *Chiang Mai J. Sci.*, 2014, 41(1): 14-26.
11. R. Jantip, "Phytochemical screening and antioxidant activity of *Spirogyra neglecta* (Hassall) Kützing", *Master Thesis*, 2013, Maejo University, Thailand.
12. P. A. Hammerschmidt, and D. E. Pratt, Phenolic antioxidants of dried soybeans. *J. Food Sci.*, 1978, 43(2), 556-559.

13. J.M. Penarrieta, J.A. Alvarado, B. Akesson and B. Bergenstahl, "Separation of phenolic compounds from foods by reversed-phase high performance liquid chromatography", *Rev. Biol. Quim.*, 2007, 24(1), 1-4.
14. H.T. Lawless and H. Heymann, "Sensory Evaluation of Food: Principles and Practices", Springer, 2010, pp. 328-340
15. W. Wangcharoen, "Sensory evaluation", Faculty of Engineering and Agro-Industry, Maejo University, Thailand, 2006, Ch.6.
16. K. Srinivasan, B. Viswanad, L. Asrat, C.L. Kaul and P. Ramarao, "Combination of high-fat diet-fed and low-dose streptozotocin-treated rat: a model for type 2 diabetes and pharmacological screening", *Pharmacological Research*, 2005, 52(4), 313-320.
17. R. Janthip, D. Amornlerdpison and T. Chimsook, "Phytochemical Screening, Antioxidant Activity and Total Phenolic Content of *Spirogyra* spp.", *Adv. Mat. Res.*, 2013, 699, 693-697.
18. A. Duangjai, N. Limpeanchop, K. Trisat and D. Amornlerdpison, "*Spirogyra neglecta* inhibits the absorption and synthesis of cholesterol in vitro", *Interg. Med. Res.*, 2016, 5(4), 301-308.
19. D. Tungmunthum, A. Thongboonyou, A. Pholboon and A. Yangsabai, "Flavonoids and other phenolic compounds from medicinal plants for pharmaceutical and medical aspects: An Overview", *Medicine*, 2018, 5(93), 1-16.
20. K.E. Heim, A.R. Tagliaferro and D.J. Bobilya, "Flavonoid antioxidant: chemistry, metabolism and structure-activity relationships", *J. Nutr. Biochem.* 2002, 13, 572-584.
21. H.S. Omar, H.A. El-Beshbishy, Z. Moussa, K.F. Taha and A.N.B. Singab, "Antioxidant activity of *Artocarpus heterophyllus* Lam. (Jack Fruit) leaf extracts: remarkable attenuations of hyperglycemia and hyperlipidemia in streptozotocin-diabetic rats", *Sci. World J.*, 2011, 11, 788-800.
22. R. Zhang, Y. Yao, Y. Wang and G. Ren, "Antidiabetic activity of isoquercetin in diabetic KK-A<sup>y</sup> mice", *J. Nutr. Metab.*, 2011, 8(85), 1-6.
23. X. Huang, Y. He, L. Ji, K. Wang, D. Chen, Y. Geng, P. Yang, and W. Lai, "Hepatoprotective potential of isoquercitrin against type 2 diabetes-induced hepatic injury in rats", *Oncotarget*, 2017, 8(60), 101545-559.
24. T.L. Gotama, A. Husni and U. Ustadi, "Antidiabetic activity of *Sargassum hystrix* extracts in streptozotocin-induced diabetic rats", *Prev. Nutr. Food Sci.*, 2018, 23(3), 189-195.
25. S. Akbarzadeh, H. Gholampour, P. Farzadinia, A. Daneshi, B. Ramavandi, A. Moazzeni, M. Keshavarz and A. Bargahi, "Anti-diabetic effects of *Sargassum oligocystum* on Streptozotocin induced diabetic rat", *Iran J. Basic Med. Sci.*, 2018, 21(3), 342-346.
26. M. Miller, N.J. Stone, C. Ballantyne, V. Bittner, M.H. Criqui, H.N. Ginsberg, A.C. Goldberg, W.J. Howard, M.S. Jacobson, P.M. Kris-Etherton, T.A. Lennie, M. Levi, T. Mazzone, and S. Pennathur, "Triglycerides and Cardiovascular Disease", *Circulation*, 2011, 123(20), 2292-2333.
27. M. Khoubnasabjafari, K. Ansarin and A. Jouyban, "Reliability of malondialdehyde as a biomarker of oxidative stress in psychological disorders", *BioImpacts*, 2015, 123-127.
28. A. Ayala, M.F. Munoz and S. Arguelles, "Lipid Peroxidation: Production, Metabolism, and Signaling Mechanisms of Malondialdehyde and 4-Hydroxy-2-Nonenal", *Oxid. Med. Cell. Longev.*, 2014, 1-31.
29. P. Thakur, A. Kumar, P.K. Patra and A. Kumar, "A demographic study on relation between uric acid and diabetes parameters in the Chhattisgarh state of India", *Adv. Hum. Biol.*, 2017, 7, 124-9.

## ประวัติผู้วิจัย

ชื่อ-สกุล	นางสาว รัตนาภรณ์ จันทร์ทิพย์
เกิดเมื่อ	8 ตุลาคม 2523
ประวัติการศึกษา	ปริญญาตรี สาขาพืชสวน คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ จังหวัดเชียงใหม่ ปริญญาโท สาขาเคมีประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ จังหวัดเชียงใหม่
ประวัติการทำงาน	<ul style="list-style-type: none"><li>- เข้าร่วมการประชุมวิชาการ “โครงการพัฒนานักวิจัยและงานวิจัยเพื่ออุตสาหกรรม ครั้งที่ 3” วันที่ 24 กรกฎาคม 2560</li><li>- เข้าร่วมการประกวดผลงานในงานการประกวดนวัตกรรมบัณฑิตศึกษาแห่งชาติ ครั้งที่ 1 (1st National Graduate Research Conference and Creative Innovation Competition; 1st GCIC) และนำเสนอผลงานแบบ Oral presentation ในการประชุมวิชาการ 2nd GCIC, 46th National and 9th International Graduate Research Conference วันที่ 17-18 สิงหาคม 2560 ณ ศูนย์ประชุมนานาชาติดิเอ็มเพรส โรงแรมดิเอ็มเพรส จังหวัดเชียงใหม่</li><li>- นำเสนอผลงานในกิจกรรม RRI CMU Forum 2018 ณ ห้องประชุมพระยาศรีวิสารวาท ชั้น 1 สำนักงานมหาวิทยาลัยเชียงใหม่ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ จังหวัดเชียงใหม่ วันที่ 13 กุมภาพันธ์ 2561</li><li>- นำเสนอผลงานและเข้าร่วมการประชุมวิชาการ “โครงการพัฒนานักวิจัยและงานวิจัยเพื่ออุตสาหกรรม ครั้งที่ 4” ณ ศูนย์ประชุมแห่งชาติสิริกิติ์ กรุงเทพมหานคร วันที่ 23 กรกฎาคม 2561</li><li>- นำเสนอผลงานแบบ Oral presentation ในประชุมวิชาการระดับชาติ ประจำปี 2561 ณ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ เชียงใหม่ วันที่ 11-13 ธันวาคม 2561</li><li>- นำเสนอผลงานแบบ Poster ในประชุมวิชาการระดับชาติ มศว.วิจัย ครั้งที่ 12 ประจำปี ณ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ กรุงเทพฯ วันที่ 20-21 มีนาคม 2562</li></ul>