**รหัสโครงการ** SUT 3-305-50-24-15

**รายงานการวิจัย**

# อาหารเสริมโปรตีนไหม Sericin-Chromium ต่อผลการดูดซึม Chromium ในลำไส้หนู และการลด LDL

# Silk protien, sericin-chromium supplement elevates intestinal absorption of chromium and reduces LDL level in rat

**คณะผู้วิจัย**

**หัวหน้าโครงการ**

**ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. มาโนชญ์ สุธีรวัฒนานนท์**

สาขาวิชาเทคโนโลยีอาหาร สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

**ผู้ร่วมวิจัย**

**ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ชัยณรงค์ โตจรัส**

ภาควิชากายวิภาคศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

**ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ พ.ศ. 2551**

**ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว**

กันยายน 2553

# บทคัดย่อ

ซิริซินที่ได้จากการสกัดรังไหมดิบจากหนอนไหม *Bombyx mori* ด้วยกรรมวิธีการใช้ความร้อนและความดันสูง เมื่อนำมาทดสอบประสิทธิภาพการช่วยการดูดซึมโครเมียมในลำไส้หนูทดลองและการลดระดับคลอเรสเตอรอลชนิด Low density lipoprotein (LDL) พบว่าซิริซินช่วยทำให้โครเมียมดูดซึมเข้าสู่ร่างกายอย่างรวดเร็ว โดยไม่มีผลต่อระดับการกินอาหารของหนูทดลองและอัตราการเจริญเติบโตของหนู แต่น้ำหนักเฉลี่ยของหนูกลุ่มทดลองที่ได้รับโครเมียมร่วมกับซิริซินมีแนวโน้มลดลง อาจเป็นผลจากการที่ร่างกายของหนูดูดซึมโครเมียมได้ดีมากขึ้น ซึ่งจะช่วยเร่งการเผาผลาญคาร์โบไฮเดรตและไขมัน ส่งผลให้มีน้ำหนักลดลงมากกว่าในกลุ่มควบคุม สอดคล้องกับน้ำหนักไขมันบริเวณหน้าท้อง (Omentum) ที่ลดลง เมื่อนำเซลล์ไขมันบริเวณหน้าท้อง (Adipose cell) ไปตรวจเปรียบเทียบกันพบว่ามีขนาดเล็กกว่าในกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ นอกจากนี้ปริมาณของ Cholesterol และ Triglycerides ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติโดยที่ระดับ HDL ของหนูที่ได้รับอาหารเสริมซิริซินโครเมียมสูงกว่าหนูที่ได้รับสารอาหารเพียงอย่างใดอย่างหนึ่ง ระดับ LDL และ Triglycerides ลดต่ำลงมากกว่า 50% เมื่อเทียบกับหนูทดลองในกลุ่มควบคุม ระดับการเสริมอาหารที่เหมาะสมที่พบคือ ซิริซินเข้มข้น 10 mg/kg ร่วมกับโครเมียม 300 μg/kg สำหรับการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์เพาะเลี้ยง Caco-2 ของโครเมียมและซิริซินพบว่าไม่มีผลต่อการเจริญเติบของเซลล์เมื่อใช้ความเข้มข้นของโครเมียมสูงถึง 8 ppm และซิริซินที่ความเข้มข้น 100 μg/ml และที่ความเข้มข้น 1600 μg/ml จำนวนเซลล์เพาะเลี้ยงลดลง 20% จะเห็นได้ว่าซิริซินมีศักยภาพในการนำมาใช้เป็นอาหารเสริมร่วมกับโครเมียม เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการดูดซึมและเสริมฤทธิ์ของโครเมียม

## Abstract

Sericin extracted from silk cocoons of *Bombyx mori* under high pressure and temperature was used as a feed supplement to enhance the absorption efficiency of chromium in small intestines of rats and to lower the level of serum low density lipoprotein (LDL). Results show that sericin increased the rate of chromium adsorption without affecting the amount of feed consumption and the growth rate. However, rats fed sericin-chromium had lower body weight at the end of the study. This indicates that rats in these groups absorbed higher amount of chromium than the control group and had higher metabolism rates of carbohydrates and lipids resulting in lower body weight. The results correlate well with the weight of adipose tissue and the size of adipose cells that rats fed sericin-chromium had significant lower weight omentum and smaller size of adipose cells than the rats in control group. Moreover, HDL levels of rats fed sericin-chromium were significantly higher than those of the control. Whereas, LDL and triglyceride levels were 50% lower than the control group. The appropriate ratio of sericin and chromium found in this study was 10 mg/kg and 300 μ/kg, respectively. Cell toxicity was conducted in Caco-2 cells. The concentration of chromium up to 8 ppm did not affect the viability of Caco-2 cells. Sericin at the concentration of 100 μg/ml was not toxic to Caco-2 cells. However, at the concentration of 1600 μg/ml, cell viability was reduced 20%. From this study, it suggests that sericin have potential to be use as a food supplement to enhance the adsorption efficiency of chromium.

# สารบัญ


| | หน้า |
|---|---|
| บทคัดย่อ (ภาษาไทย) | ก |
| บทคัดย่อ (ภาษาอังกฤษ) | ข |
| สารบัญ | ค |
| สารบัญตาราง | ง |
| สารบัญภาพ | ฉ |
| ประวัติคณะผู้วิจัย | ช |
| **1. บทนำ** | 1 |
| 1.1 ที่มาและความสำคัญ | 1 |
| 1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการ | 2 |
| 1.3 ขอบเขตของโครงการวิจัย | 2 |
| 1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ | 2 |
| **2. ปริทัศน์วรรณกรรมและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง** | 3 |
| 2.1 โครเมียม (Chromium) | 3 |
| 2.2 ซิริซิน (Sericin) | 16 |
| **3. วิธีการดำเนินการวิจัย** | 21 |
| 3.1 การผลิตซิริซิน | 21 |
| 3.2 การศึกษาผลของซิริซินต่อการดูดซึม โครเมียมพิโคลิเนตในเซลล์ลำไส้เพาะเลี้ยง | 21 |
| 3.3 การศึกษาผลของซิริซินต่อการดูดซึมโครเมียมพิโคลิเนตในลำไส้หนู | 23 |
| 3.4 การวิเคราะห์ข้อมูล | 24 |
| **4. ผลการทดลองและอภิปราย** | 25 |
| 4.1 ผลของซิริซินต่อการดูดซึม โครเมียมพิโคลิเนตในเซลล์ลำไส้เพาะเลี้ยง | 25 |
| 4.2 การศึกษาผลของซิริซินต่อการดูดซึม โครเมียมพิโคลิเนตในลำไส้หนู | 33 |
| **5. วิจารณ์ผลการทดลอง** | 42 |
| **6. สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ** | 45 |
| 6.1 สรุปผลการทดลอง | 45 |
| 6.2 ข้อเสนอแนะ | 45 |
| **บรรณานุกรม** | 46 |
| **ภาคผนวก** | 52 |

# สารบัญตาราง


| ตารางที่ | | หน้า |
|---|---|---|
| 1 | แหล่งอาหารที่พบโครเมียม | 10 |
| 2 | ปริมาณโครเมียมที่ร่างกายต้องการในแต่ละช่วงอายุ | 11 |
| 3 | ชนิดและปริมาณกรดอะมิโนที่มีในโปรตีนซิริซิน | 16 |
| 4 | คุณสมบัติและหน้าที่ที่สำคัญของกรดอะมิโนในซิริซินที่มีประโยชน์ต่อร่างกาย | 18 |
| 5 | ผลของโครเมียมพิโคลิเนตต่อ cell viability ของ Caco-2 cells | 26 |
| 6 | การดูดซึมของ chromium picolinate ผ่าน Caco-2 cells | 30 |
| 7 | ผลของซิริซิน บี ต่อการดูดซึมของ chromium picolinate | 31 |
| 8 | เปรียบเทียบปริมาณโครเมียมในเลือดของหนูกลุ่มควบคุมและหนูกลุ่มที่ได้รับ CrPic และ CrPic ร่วมกับ Sericin ที่ความเข้มข้นต่างๆ หลังจากป้อนสารละลายไปแล้วภายในระยะเวลา 24 ชั่วโมง | 33 |
| 9 | เปรียบเทียบอัตราการเจริญเติบโต และการใช้อาหารของหนูกลุ่มควบคุม หนูกลุ่มที่ได้รับ Sericin CrPic และ CrPic ร่วมกับ Sericin ที่มีความเข้มข้นแตกต่างกันเป็นเวลานาน 8 สัปดาห์ | 34 |
| 10 | เปรียบเทียบน้ำหนักอวัยวะภายในของหนูกลุ่มควบคุม หนูกลุ่มที่ได้รับ Sericin CrPic และ CrPic ร่วมกับ Sericin ที่ความเข้มข้นแตกต่างกันเป็น เวลานาน 8 สัปดาห์ | 35 |
| 11 | เปรียบเทียบผลการวิเคราะห์เลือดทางเคมีคลินิกของหนูกลุ่มควบคุม หนูกลุ่มที่ได้รับ Sericin CrPic และ CrPic ร่วมกับ Sericin ที่ความเข้มข้นแตกต่างกันเป็นเวลานาน 8 สัปดาห์ | 36 |
| 12 | เปรียบเทียบปริมาณของโครเมียมที่สะสมในตับและไตของหนูกลุ่มควบคุม หนูกลุ่มที่ได้รับ Sericin CrPic และ CrPic ร่วมกับ Sericin ที่ความเข้มข้นแตกต่างกันเป็นเวลานาน 8 สัปดาห์ | 37 |
| 13 | เปรียบเทียบขนาดของเซลล์ไขมันที่บริเวณส่วนของหน้าท้องของหนูกลุ่มควบคุม หนูกลุ่มที่ได้รับ Sericin CrPic และ CrPic ร่วมกับ Sericin ที่ความเข้มข้นแตกต่างกันเป็นเวลานาน 8 สัปดาห์ | 38 |
| 14 | ผลของ Chromium picolinate ต่อ cell viability ของเซลล์ Caco-2 (การทดลองครั้งที่ 1) | 53 |

# สารบัญตาราง (ต่อ)


| ตารางที่ | | หน้า |
|---|---|---|
| 15 | ผลของ Chromium picolinate ต่อ cell viability ของเซลล์ Caco-2 (การทดลองครั้งที่ 1) | 53 |
| 16 | ผลของซิริซิน บี 100 μg/ml ต่อการดูดซึมของ chromium picolinate | 54 |
| 17 | ผลของซิริซิน บี 1000 μg/ml ต่อการดูดซึมของ chromium picolinate | 54 |
| 18 | ผลของซิริซิน บี 2000 μg/ml ต่อการดูดซึมของ chromium picolinate | 54 |

# สารบัญภาพ


| ภาพที่ | | หน้า |
|---|---|---|
| 1 | Hypothetical models of low-molecular weight Cr peptide complexes. | 7 |
| 2 | The structure of Cr(III) picolinate. | 13 |
| 3 | ผลของซิริซิน บี ต่อ cell viability ของ Caco-2 cells เลี้ยง Caco-2 cells ใน 96 well plate ในอาหารที่มีซิริซินบี ความเข้มข้น 100 และ 1600 μg/ml ในระยะเวลา 24 ชั่วโมง, 48 ชั่วโมง, และ 72 ชั่วโมง | 27 |
| 4 | การวิเคราะห์ปริมาณของ chromium picolinate ที่สกัดได้จากผลิตภัณฑ์เสริมอาหารชนิดเม็ด เมื่อเปรียบเทียบกับความเข้มข้นที่ได้จากการคำนวณ | 28 |
| 5 | Diagram แสดงการทดสอบการดูดซึมของ chromium picolinate เลี้ยง Caco-2 cell บน membrane | 29 |
| 6 | การดูดซึมของ chromium picolinate ผ่าน Caco-2 cell เมื่อเลี้ยงเซลล์ด้วย chromium picolinate 10 ppm บนด้าน apical side | 30 |
| 7 | ผลของซิริซิน บี ต่อการดูดซึมของ chromium picolinate ผ่าน Caco-2 cell เมื่อเลี้ยงเซลล์ด้วย chromium picolinate 10 ppm บนด้าน apical side ร่วมกับซิริซินบี ความเข้มข้น 100, 1000 และ 2000 μg/ml | 32 |
| 8 | ภาพเปรียบเทียบความแตกต่างของเซลล์ไขมันที่บริเวณส่วนของหน้าท้องของหนูกลุ่มควบคุมหนูกลุ่มที่ได้รับ Sericin, CrPic และ CrPic ร่วมกับ Sericin ที่ความเข้มข้นแตกต่างกันเป็น เวลานาน 8 สัปดาห์ | 39 |
| 9 | ภาพเปรียบเทียบความแตกต่างของรูปร่าง ลักษณะของหนูกลุ่มควบคุม หนูกลุ่มที่ได้รับ Sericin, CrPic และ CrPic ร่วมกับ Sericin ที่ความเข้มข้นแตกต่างกันเป็นเวลานาน 8 สัปดาห์ | 40 |

**ประวัติคณะผู้วิจัย**

<u>หัวหน้าโครงการ</u>

1. ชื่อ (ภาษาไทย) นายมาโนชญ์ สุธีรวัฒนานนท์

(ภาษาอังกฤษ) Mr. Manote Sutheerawattananonda

2. ตำแหน่งปัจจุบัน ผู้ช่วยศาสตราจารย์

3. หน่วยงานที่อยู่ที่ติดต่อได้พร้อมโทรศัพท์ โทรสาร และ E-mail

สาขาวิชาเทคโนโลยีอาหาร

สำนักเทคโนโลยีการเกษตร

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

อ. เมือง จ. นครราชสีมา 30000

โทรศัพท์/โทรสาร 044-224-230/044-224-150

E-mail : msutheera@yahoo.com

**4. ประวัติการศึกษา**

| ปริญญา | สาขาวิชา | มหาวิทยาลัย | ปี | หัวข้อวิทยานิพนธ์ |
|---|---|---|---|---|
| Post-doc | Food Science | University of | 254 | UF Cheddar cheese |
| Ph.D. | Food Science | Minnesota | 2 | Physicochemical properties of |
| | | University of | 254 | process cheese: Influence on |
| MS | Food Science | Minnesota | 1 | meltability |
| | | | | Physical properties and |
| BS | Food | University of | 253 | microstructure of extruded wheat |
| | Technology | Minnesota | 7 | - |
| | | Oregon State | 253 | |
| | | University | 4 | |

**5. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ ระบุสาขาวิชาการ**

Physicochemical properties of food, Food Microstructure, Food Processing, Foods for health and beauty, Biopolymers

## 6. งานวิจัย

### 6.1 งานวิจัยที่กำลังทำ

6.1.1 การพัฒนาผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางจากโปรตีนไหมซิริซินและไฟโบรอินที่ผ่านการแปรรูปแล้ว (Development of cosmetic products from reprocessed-silk sericin and fibroin (ระยะเวลาดำเนินการ 3 ปี) แหล่งทุน มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี (ดำเนินการปีที่ 3)

6.1.2 การเพิ่มปริมาณแป้งต้านทานการย่อยในผลิตภัณฑ์พาสต้าข้าวเจ้า (Increase of resistant starch in rice pasta products) (ระยะเวลาดำเนินการ 2 ปี) แหล่งทุน มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

6.1.3 การพัฒนากรรมวิธีการผลิตฟิล์มจากไฟโบรอินเพื่อใช้เป็นเวชภัณฑ์ทางการแพทย์ (Method development of fibroin films for medical products) (ระยะเวลาดำเนินการ 2 ปี) แหล่งทุน มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

6.1.4 การพัฒนาระบบการผลิต CLA ต้นแบบด้วยแบคทีเรียกรดแล็กติกเพื่อใช้ในอุตสาหกรรม (development of conjugated linoleic acid (CLA) production model using lactic acid bacteria (LAB) for industrial application) (ระยะเวลาดำเนินการ 3 ปี) แหล่งทุน มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี (ช่วง 6 เดือนสุดท้าย)

6.1.5 การพัฒนาอาหารที่เป็นยาและผลิตภัณฑ์ยาจากลูทีนที่สกัดได้จากรังไหมเหลือง และอนุพันธ์ ขนาดเล็กของโปรตีนซิริซิน (Development of nutraceutical and pharmaceutical products from lutein extracted from *Bombyx mori* cocoons and sericin derivatives) (ระยะเวลาดำเนินการ 4 ปี) แหล่งทุนสำนักงานวิจัยการเกษตร (ดำเนินการช่วง 6 เดือนที่ 2)

### 6.2 งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว

<u>หัวหน้าโครงการ</u>

6.2.1 คุณลักษณะทางกายภาพและโครงสร้างภายในของพาสต้าข้าวเจ้าที่ได้จากการอัดพอง (Physical characteristics and microstructure of extruded rice pasta) (ระยะเวลาดำเนินการ 2 ปี) แหล่งทุน มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

6.2.2 ผลกระทบของสภาวะการทำเอ็กทรูชั่นต่อคุณสมบัติของเนื้อสัมผัสและโครงสร้างภายในของผลิตภัณฑ์ข้าวเจ้าที่พองตัวและไม่พองตัว (Influences of extrusion parameters on textural properties and microstructure of expanded and non-expanded products) (ระยะเวลาดำเนินการ 1 ปี) แหล่งทุน มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

6.2.3 การพัฒนากรรมวิธีการเคลือบเส้นใยสังเคราะห์ด้วยซิริซิน (Surface modification of synthetic and natural fibers for protein coating) (ระยะเวลาดำเนินการ 1 ปี) แหล่งทุน มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

6.2.4 การพัฒนาเกมแอนนิเมชั่นด้านความปลอดภัยของอาหาร (Food Safety 3-D animation game) (ระยะเวลาดำเนินการ 6 เดือน) แหล่งทุน กองทุนนวัตกรรม สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดา สยามบรมราชกุมารี

6.2.5 คุณภาพและปริมาณของ CLA (conjugated linoleic acid) ในน้ำนมหลังผ่านขบวนการให้ความร้อนแบบพาสเจอไรเซชั่นและแบบ UHT (Qualities and contents of CLA (conjugated linoleic acids) in cow milk after pasteurization and UHT process) (ระยะเวลาดำเนินการ 3 ปี) แหล่งทุน มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

6.2.6 คุณสมบัติทางเคมีกายภาพของผง fibroin และ sericin ที่ผลิตได้จากรังไหมและน้ำต้มไหม (Physicochemical properties of fibroin and sericin powders produced from silk cocoons and silk water) (ระยะเวลาดำเนินการ 2 ปี) แหล่งทุน มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

6.2.7 การศึกษาความเป็นไปได้ในการสกัดสาร phytoestrogens จากมันมือเสือในประเทศไทยเพื่อทดแทนการใช้ premarin (Possibility of using phytoestrogens extracted from native yams in Thailand to substitute Premarin) (ระยะเวลาดำเนินการ 2 ปี) แหล่งทุน มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

6.2.8 ปลาส้มสำเร็จรูป (Ready-to-eat Pla-Som) (ระยะเวลาดำเนินการ 2 ปี) แหล่งทุน สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

6.2.9 การศึกษากรรมวิธีการสกัดและคุณสมบัติเชิงหน้าที่ของ Lutein จากรังไหมเหลือง *Bombyx mori* เพื่อใช้เป็นเครื่องสำอางและยา (ระยะเวลาดำเนินการ 2 ปี) แหล่งทุน สภาอุตสาหกรรมแห่งประเทศไทย

6.2.10 ความเป็นไปได้ในการใช้สมุนไพรไทยเป็นยาแก้ไขอาการไร้สมรรถภาพในชาย (Possibility of using Thai herbal medicine to correct male incompetence) (ระยะเวลาดำเนินการ 1 ปี 6 เดือน) แหล่งทุน มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

6.2.11 การศึกษาการทำเข้มข้นโปรตีนซิริซินด้วยวิธีการ Ultrafiltration และ Falling-film evaporation (ระยะเวลาดำเนินการ 3 เดือน) แหล่งทุน Industrial Technology Assistance Program (ITAP) สวทช

6.2.12 ความคงตัวของโปรตีนซิริซินบนผ้า polyester และ cotton ต่อการซักตามมาตรฐานของกลุ่มประเทศยุโรป (ระยะเวลาดำเนินการ 9 เดือน) แหล่งทุน Industrial Technology Assistance Program (ITAP) สวทช

6.2.13 การศึกษาวิธีการสกัดและความคงตัวของสารป้องกันอนุมูลอิสระ DNJ และคลอโรฟิลล์จากชาหม่อน (ระยะเวลาดำเนินการ 12 เดือน) แหล่งทุน Industrial Technology Assistance Program (ITAP) สวทช

6.2.14 อาหารเสริมโปรตีนไหม sericin-chromium ต่อการดูดซึม chromium ในลำไส้หนูและการลดระดับ LDL (Silk Protein, Sericin-Chromium Supplement elevates intestinal absorption of chromium and reduces LDL level in rats) (ระยะเวลาดำเนินการ 2 ปี) แหล่งทุน มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

6.2.15 การศึกษาฤทธิ์ป้องกันมะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักและโรคหลอดเลือดหัวใจของซิริซินเมื่อเป็นอาหารเสริม (Study of sericin as dietary supplement for colorectal cancer and coronary artery disease (CAD) prevention) ระยะเวลาดำเนินการ 2 ปี แหล่งทุน สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

<u>ผู้ร่วมวิจัย</u>

6.2.16 การวิเคราะห์คุณภาพซาก องค์ประกอบทางเคมีและกายภาพของไก่กระทง ไก่พื้นเมืองและไก่เพศผู้ (A comparative study of characteristics, chemical composition and sensory qualities of hybrid native chicken, commercial broilers and laying male chicks) (ระยะเวลาดำเนินการ 1 ปี) แหล่งทุน สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

6.2.17 เรื่อง โปรแกรมฐานข้อมูลอุตสาหกรรมอาหารของไทย (ระยะเวลาดำเนินการ 2 ปี) แหล่งทุนศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ

6.2.18 การพัฒนาน้ำทิ้งจากโรงงานผลิตแป้งมันสำปะหลังภายหลังการบำบัดให้มีคุณภาพเทียบเท่าน้ำประปา (Development of wastewater from cassava starch plant to obtain tap water quality) (ระยะเวลาดำเนินการ 1 ปี) แหล่งทุน กองทุนนวัตกรรมสมเด็จพระเทพรัตนราชสุดา สยามบรมราชกุมารี

6.2.19 การคัดแยกสายพันธุ์จุลินทรีย์ที่ผลิต PHAs การสกัดและการแยกให้บริสุทธิ์สำหรับการผลิตพลาสติกย่อยสลายได้ทางชีวภาพ (ระยะเวลาดำเนินการ 2 ปี) แหล่งทุน สภาวิจัยแห่งชาติ

6.2.20 การผลิตกรดแล็กติกเพื่อใช้ผลิตพลาสติกชีวภาพชนิดพอลิแล็กติกในประเทศไทย (ระยะเวลาดำเนินการ 10 เดือน) แหล่งทุน สำนักงานนวัตกรรมแห่งชาติ

**6.3. สิทธิบัตร**

6.3.1. กรรมวิธีการผลิตพาสต้าข้าวเจ้า

6.3.2. กรรมวิธีการผลิตผงซิริซินจากใยไหมพันธุ์ไทยด้วยน้ำร้อนและน้ำธรรมดา

6.3.3. กรรมวิธีการเคลือบผืนเส้นใยด้วยโปรตีนซิริซิน

6.3.4. กรรมวิธีการเคลือบโปรตีนซิริซินบนผืนเส้นใย

6.3.5. สูตรน้ำยาโปรตีนซิริซิน เคลือบผืนเส้นใย

6.3.6. การผลิตสารละลายไฟโบรอินเพื่อใช้เป็นวัตถุดิบอุตสาหกรรม

6.3.7. กรรมวิธีการเพิ่ม CLA ในผลิตภัณฑ์โยเกิร์ตด้วยแบคทีเรียกรดแล็คติก

6.3.8. กรรมวิธีการผลิตปลาส้มด้วยกล้าเชื้อแบคทีเรียกรดแล็กติก

6.3.9. กรรมวิธีการผลิตน้ำส้มและน้ำมะนาวผงด้วยวิธีการพ่นฝอยแบบแช่เยือกแข็ง

6.3.10. กรรมวิธีการผลิต Sericin – Lutien Complex และ Lutein จากไหม

6.3.11. Method for extracting silk extract containing lutein

**6.3. รางวัลที่ได้รับจากการปฏิบัติงาน**

6.4.1.พนักงานดีเด่น สาขาสิ่งประดิษฐ์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปี 2549 เข็มกลัดทองคำ

6.4.2. พนักงานดีเด่น สาขาสิ่งประดิษฐ์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปี 2547 เข็มกลัดทองคำ

<u>ผู้ร่วมวิจัย</u>

1. ชื่อ (ภาษาไทย) นายชัยณรงค์ นามสกุล โตจรัส

(ภาษาอังกฤษ) Mr. Chainarong Tocharus

2. ตำแหน่งปัจจุบัน ผู้ช่วยศาสตราจารย์

3. หน่วยงานที่อยู่ที่ติดต่อได้พร้อมโทรศัพท์ โทรสาร และ E-mail

ภาควิชากายวิภาคศาสตร์ คณะแพทย์ศาสตร์

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ อ. เมือง จ. เชียงใหม 52000

โทรศัพท์/โทรสาร 053-945312/ 053-945304

E-mail : chainarongt@hotmail.com

1. ประวัติการศึกษา

| ปริญญา | สาขาวิชา | มหาวิทยาลัย | ปี | หัวข้อวิทยานิพนธ์ |
|---|---|---|---|---|
| เอก | วท.ด. (เภสัชศาสตร์) | ม.นเรศวร | 2548 | การศึกษาผลต่อการแข็งตัวของ องคชาต สเปิร์ม และพิษวิทยาของ กวาวเครือแดง |
| โท | วท.ม.(กายวิภาคศาสตร์) | ม.มหิดล | 2535 | The viability testing of frozen-thawed bovine embryo produced in vitro |
| ตรี | วท.บ. (ชีววิทยา) | มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ | 2530 | - |

5. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ ระบุสาขาวิชาการ

Assisted reproductive technology (ART), Pharmacology, Toxicology, Molecular biology

6. งานวิจัย

6.1 งานวิจัยที่กำลังทำ

1. การศึกษาผลของ TGF-$\beta$1 ต่อเซลล์สมอง microglia ที่ได้รับการกระตุ้นจากสาร แอมเฟตามีน (ทุนสภาวิจัยแห่งชาติปี 50)

2. ฤทธิ์ยับยั้งการเกิด Alzheimer's disease ของ curcuminoids analogs ต่อเซลล์เพาะเลี้ยง microglia

(ทุนสภาวิจัยแห่งชาติปี 51)

6.2 งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว

1. การศึกษาผลของสารเสพติดกลุ่มแอมเฟตามีนต่อการทำงานของเอนไซม์ nitric oxide synthase และ กระบวนการ signaling ภายในเซลล์ (ทุนสกว. ปี 2548)

7. ผลงานตีพิมพ์


1. Kitiyanant Y, Thonabulsombat C, **Tocharus C**, Saniwongse B and Pavasuthipaisit K. Culture of bovine embryos from oocytes matured and fertilized in vitro to the blastocyst stage with oviductal tissue. J Sci Thailand. 15 : 251 – 260, 1989.

2. Kitiyanant Y, Sricharoen P, Thonabulsombat C, **Tocharus C** and Pavasuthipaisit K. Pregnancy resulting from bovine oocytes matured, fertilized and cultured with oviductal cell in vitro. J Physio Sci. 3(1) : 63 – 67, 1990.

3. Thonabulsombat C, Pavasuthipaisit K, Chongthammakun S, Kitiyanant Y, Saniwongse B and **Tocharus C**. Successful culture of bovine embryos from oocytes matured and fertilized in vitro to the blastocyst stage. Thai J Vet. 20(1) : 275 – 290, 1990.

4. Pavasuthipaisit K, Kitiyanant Y, **Tocharus C**. Biotechnogy in farm animals II : Freezing of embryos produced in vitro. In Microbial Utilization of Renewable Resources P Matangkasombat and Y Oshima. 8 : 411 – 417, 1992.

5. Pavasuthipaisit K, Kitiyanant Y, Thonabulsombat C, **Tocharus C**, Sriurairatana S and White KL. In vitro maturation, fertilization and embryo development in Thai swamp buffalo (Bubalus bubalis). Theriogenology. 38 : 545 – 555, 1992.

6. Pavasuthipaisit K, Kitiyanant Y and **Tocharus C**. Sex determination of in vitro produced bovine embryos by embryo developmental stage and immunoflour. Thai J Physiol Sci 6(1) : 63 – 74, 1993.

7. **Tocharus C**, Prempree P, Kitiyanant Y, Areekijseree M, Jaruansuwan M and Pavasuthipaisit K. Viability testing frozen- thawed bovine embryo produced from oocytes matured, fertilized and cultured with oviductal cells in vitro. Thai J Physiol Sci. Vol 7(1) : 23 – 31, 1994.

8. Pavasuthipaisit K, Kitiyanant Y, Lhumahamongkol S, **Tocharus C** and Prempree P. Porcine oviductal cells support in vitro bovine embryo development. Theriogenology. 41 : 1127 – 1138, 1994.

9. Pavasuthipaisit K, Kitiyanant Y, Saniwongse B, **Tocharus C**. Co-culture of bovine embryos matured and fertilized in vitro to the blastocyst stage with oviductal tissue. In : Symposium on Fertilization in Mammals. Boston U.S.A. p.87, 1989.

10. Kitiyanant Y, Songthavesin C, Youngprapakorn P, Junprasert S, Arekijseree M, **Tocharus C** and Pavasuthipaisit K. Seasonal changes of male reproductive tract and testosterone level of Crocodilus siamensis. Proceedings in Second Inter – Congress Sympsium of The Asia and Oceania Society for Comparative Endocronology. 232 – 233, 1993.

11. Pavasuthipaisit K, Kitiyanant Y, **Tocharus C**, Thonabulsombat C, Lhumahamongkol S, Areekijseree M and Nakaompop N. Biotechnology in farm animal III : Ovum pick up, embryo production and hormonal influence. Proceeding in Second Inter – Congress Symposium of The Asia and Oceania Society for Comparative Endocrinology. 160 – 161, 1993.

12. Pavasuthipaisit K, **Tocharus C**, Thonabulsombat C and Kitiyanant Y. The viability testing of frozen- thawed bovine embryos produced in vitro. Theriogenology. 39(1) : 280, 1993.

13. Pavasuthipaisit K, Kitiyanant Y, **Tocharus C**, Thonabulsombat C, Areekijseree M, Lhumahamongkol S, Nakaompop N and Prempree P. Biotechnology in farm animals I. Embryo production in vitro and sexing : Proceeding in The 31st Kasetsart University Annual conference, 93 – 106, 1993.

14. Kitiyanant Y, Lhumahamongkol S, Areekijseree M, **Tocharus C**, Thonabulsombat C and Pavasuthipaisit K. Porcine oviductal cells support in vitro bovine embryo development. Theriogenology. 39(1) : 246, 1993.

15. Kitiyanant Y, **Tocharus C**, Areekijseree M, Jaruansuwan M, Vasavanandh T, Rathprasert K and Pavasuthipaisit K. Biotechnology IV : Sexing in cattle. Proceedings in the International Congress (Techno Indochina) on Science and Technology for good Relationship with Neighbour Countries. P. 41 : 18 – 24 ; August 1994, Bangkok, Thailand.

16. Kitiyanant Y, Schmidth MJ, **Tocharus C**, Areekijseree M and Pavasuthipaisit K. Acrosome evaluation of semen collection by AV in asiatic elephant (Elephas maximus) and treated with caffeine, PHE, c-AMP and Heparin. Seventh International Symposium on Spermatology, p.95 – 96 ; Carin, North Queensland, Australia 9 –14 October ; 1994.

17. Kitiyanant Y, Youngprapakorn P, Songthavesin C, **Tocharus C**, Jumprasert S and Pavasuthipaisit K. Seasonal changes of sperm morphology and reproductive tracts of

Crocodylus siamensis. Proceedings of the 12th Working Meeting of the Crocodile Specialist Group of the Species Survival Commission of IUCN – The World Conservation Union. Vol. V2 : 268 – 278, 1994.

18. Kitiyanant Y, Youngprapakorn P, Songthavesin C, **Tocharus C**, Jumprasert S and Pavasuthipaisit K. Seasonal changes of sperm morphology and reproductive tracts of Crocodylus siamensis. Proceedings of the 12th Working Meeting of the Crocodile Specialist Group of the Species Survival Commission of IUCN – The World Conservation Union. Vol. V2 : 268 – 278, 1994.

19. Kitiyanant Y, Youngprapakorn P, Songthavesin C, **Tocharus C**, Jumprasert S and Pavasuthipaisit K. Seasonal changes of sperm morphology and reproductive tract of Crocodylus siamensis. Thai Association for Trade in Reptiles and Amphibians. 1 : 40 – 41, 1994.

20. Pavasuthipaisit K, Kitiyanant Y and **Tocharus C**. Embryonic development of bovine oocytes fertilized by sperm microinjection ; Comparison between subzonal and ooplasmic injection. Theriogenology. 41 : 270, 1994.

21. Kitiyanant Y, **Tocharus C**, Areekijseree M and Pavasuthipaisit K. Swamp buffalo oocytes from transvaginal ultrasound- guided aspiration fertilized and co-cultured in vitro with bovine oviductal epithelial cells. Theriogenology. 43(1) : 250, 1995.

22. Pavasuthipaisit K, Holyoak RG, **Tocharus C**, Kitiyanant Y. Repeated transvaginal follicular aspiration in swamp buffalo. Theriogenology. 43(1) : 295,1995.

23. **Tocharus C**, Kitiyanant Y and Pavasuthipaisit K. Fertilization and subsequent development of bovine embryos after intracytoplasmic sperm injection (ICSI) using different injection pipettes. Theriogenology. 45(1) : 302, 1996.

24. **Tocharus C**, Kitiyanant Y, Thaiying S and Pavasuthipaisit K. Viability of in vitro produced bovine blastocysts after biopsy and vitrification. Proceedings of Third Asia Pacific Conference on Agricultural biotechnology, November 1996, Thailand.

25. Kitiyanant Y, **Tocharus C**, Jaruansuwan M, Chuangsoongneon U and Pavasuthipaisit K. Survival rates of in vitro produced bovine embryos at different developmental stages cryopreserved by vitrification. The 13th International Congress on Animal Reproduction Sydney Australia. Vol. 3 p. 15 – 5, 1996.

26. **Tocharus C**, Sukbunteung J, Charoensuwan M, Chuangsoongneon U, Kitiyanant Y and Pavasuthipaisit K. Different developmental stages of bovine embryos produced in vitro : their sex ratio and survival rates. Theriogenology. 47(10 : 330, 1997.

27. Guocheng J, Yanxiang S, Zhonghua Y, **Tocharus C**, Kitiyanant Y and Pavasuthipaisit K. The differences of osmotic behaviors of bovine embryos from in vitro and in vivo and their quality evaluation. Theriogenology. 47(1) : 307, 1997.

28. Chinsomboon S, **Tocharus C**, Wongkularb A, Chatasingh S, Srisombut C, Rojanasakul A. The influence of injection site and with or without performing cytoplasmic aspiration on fertilization. Proceedings of the 11th world congress on in vitro fertilization and human reproductive. Genetics, P-100, Sydney, Australia. 9 –14 May ; 1999.

29. **Tocharus C**, Smitasiri Y, Ingkaninan K, Pisutthanan S & Jeenapongsa R. Effects of *Butea superba* Roxb. on intracavernous pressure in rats. The 1st Graduate Research Symposium, the Pharmaceutical Education Development Consortium (oral presentation), Naresuan University, Phitsanulok, Thailand, 19 August 2002, Text and General Publication, p 8., 2002.

30. Matsuda E, Shigeoka T, Iida R, **Tocharus C**, Kawaichi M and Ishida Y. Expression profiling with arrays of randomly disrupted genes in mouse embryonic stem cells leads to *in vivo* functional analysis. The 28th Annual Meeting of the Society of Anatomy of Thailand, 27-29 April 2005.

31. **Tocharus C**, Jeenapongsa R, Teakthong T & Smitasiri Y. Effects of long-term treatment of *Butea superba* on sperm motility and concentration. Naresuan University Journal, 13: 11-17, 2005.

32. **Tocharus C** and Tocharus J. Effect of various culture media on mouse 2-cell development and their viability *in vitro*. Naresuan University journal, 13: 19-26, 2005.

33. Posri R, Tocharus J, Jeenapongsa R and **Tocharus C**. Long term effect of *Butea superba* on sperm fertility ability. The 29th Annual Meeting of the Society of Anatomy of Thailand, 3-5 May 2006.

34. **Tocharus C**, Smitasiri Y, Jeenapongsa R. *Butea superba* Roxb. enhances penile erection in rats. Phytotherapy Research, 20(6): 484-489, 2006.

35. **Tocharus C**, Smitasiri Y and Jeenapongsa R. Acute and chronic toxicity studies of *Butea superba* (in press).

36. **Tocharus C**, Posri R, Jeenapongsa R and Tocharus J. Long – term effect of *Butea superba* on hamster sperm fertility ability (in press).

# บทที่ 1

# บทนำ

## 1.1 ที่มาและความสำคัญ

ปัจจุบันอาหารเสริมหลายประเภทกำลังได้รับความนิยมเป็นอย่างมาก เนื่องจากผู้คนหันมาใส่ใจกับสุขภาพมากขึ้น chromium supplementation นับเป็นผลิตภัณฑ์อาหารเสริมชนิดหนึ่งที่ได้รับความสนใจจากผู้รักสุขภาพ โดยเฉพาะผู้ป่วยโรคเบาหวาน นักกีฬา และผู้ควบคุมน้ำหนัก

Chromium (Cr) เป็นเกลือแร่ชนิดหนึ่งที่มีความจำเป็นต่อกระบวนการชีวเคมีในร่างกาย และถ้าหากร่างกายขาดเมื่อใดอาจทำให้เกิดภาวะผิดปกติต่อระบบการเผาผลาญอาหารในร่างกายได้ โครเมียมในรูป trivalent หรือ Chromium (III) เป็นรูปที่มีผลต่อการทำงานของ Insulin ในกระบวนการเผาผลาญพลังงาน คาร์โบไฮเดรทและไขมันในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม(Vincent, 2001) โดยโครเมียมช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการทำงานของ Insulin ให้มีการนำ glucose และ amino acid เข้าสู่ muscle cells เพื่อนำไปเผาผลาญเป็นพลังงานได้มากขึ้นและช่วยกระตุ้นการทำงานของ ribosome (Hill & Milner, 1985)

ปริมาณโครเมียมที่ร่างกายควรได้รับอย่างน้อยโดยเฉลี่ยประมาณ 35 ไมโครกรัมต่อวัน และ 25 ไมโครกรัมต่อวัน สำหรับเพศชายและหญิงตามลำดับ (Trumbo, Yates, Schlickek, & Poos, 2001) แม้ว่าโครเมียมจะมีความจำเป็นต่อร่างกาย แต่โครเมียมจะถูกดูดซึมได้ในปริมาณที่น้อยมาก คืออยู่ในช่วง 0.4 - 2.5 เปอร์เซ็นต์ของโครเมียมทั้งหมดที่เข้าสู่ร่างกาย (Anderson & Kozlovsky, 1985) โครเมียมที่ไม่ถูกดูดซึมส่วนใหญ่จะถูกขับออกไปกับอุจจาระ (Mertz, 1969) ส่วนโครเมียมที่ถูกดูดซึมส่วนใหญ่จะถูกขับออกอย่างรวดเร็วไปกับปัสสาวะ (Anderson et al., 1983) และโครเมียมยังสามารถสะสมอยู่ในอวัยวะต่างๆ ของมนุษย์ได้แก่ ตับ ม้าม เนื้อเยื่ออ่อน (soft tissue) และกระดูก (Lim, Sargent, & Kusubov, 1983) ซึ่งเป็นอวัยวะที่มีการสะสมที่คล้ายกับหนู อวัยวะที่สามารถสะสมโครเมียมในหนู ได้แก่ ไต ม้าม กระดูก ตับ และ testes (Hopkins, 1965; Kamath et al., 1997) นอกจากนี้ปริมาณของโครเมียมที่สะสมในเส้นผม เหงื่อและปัสสาวะจะแปรผันผกผันกับอายุของมนุษย์อีกด้วย (Davies, Howard, Hunnisett, & Howard, 1997)

Sericin เป็นโปรตีนทรงกลมละลายน้ำได้ น้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วง 10-300 kDa (Tao, Li, & Xie, 2005) ห่ อหุ้มชั้น fibroin fiber และเป็นส่วนประกอบประมาณ 20 - 30% ของน้ำหนักรังไหมทั้งหมด (Sasaki, Yamada, & Kato, 2000) sericin ประกอบด้วยกรดอะมิโน 18 ชนิด ซึ่งมีหมู่ข้าง (side group) ที่มีความเป็นขั้วสูง ได้แก่หมู่ hydroxyl, carboxyl, และ amino group (Tao et al., 2005) โดยจะมี aspartic acid และ serine ปริมาณสูงถึง 19% และ 32% ตามลำดับ (Cho et al., 2003) ทำให้ sericin มี

คุณสมบัติในการดึงดูดหรือจับกับแร่ธาตุต่างๆ ได้ดี โดยหมู่ hydroxyl และ carboxyl ของ sericin จะเกิดปฏิกิริยา chelation กับแร่ธาตุ (Zhaorigetu, Sasaki, Watanabe, & Kato, 2001) และมีการศึกษาวิจัยพบว่า การให้อาหารที่มี sericin เป็นองค์ประกอบช่วยเพิ่มการดูดซึมเหล็ก, สังกะสี, แมกนีเซียม และแคลเซียม ได้มากถึง 41%, 41%, 21% และ 17% ตามลำดับ โดยไม่มีผลกระทบต่อการขับแร่ธาตุออกทางปัสสาวะ (Sasaki et al., 2000) ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงเป็นการศึกษาผลของการใช้ sericin ต่อการดูดซึมโครเมียมในลำไส้หนู โดยดูจากอัตราการเจริญเติบโต ปริมาณไขมันในร่างกาย ผลทางเคมีคลินิก และปริมาณของโครเมียมที่สะสมในอวัยวะภายใน

## 1.2 วัตถุประสงค์ของการศึกษา

1. ศึกษาผลของ Sericin ต่อการดูดซึมโครเมียมที่เป็นแร่ธาตุอาหารจำเป็นในลำไส้หนู
2. เพื่อศึกษาผลการส่งเสริมกันระหว่างโปรตีน Sericin และ chromium ต่อการลดลงของปริมาณ Low- density lipoprotein (LDL) รวมถึงสภาวะไขมันในเลือดของหนูทดลอง โดยใช้ปริมาณ High -density lipoprotein (HDL) เป็นดัชนีและกลไกในเซลล์เพาะเลี้ยง

## 1.3 ขอบเขตของโครงการวิจัย

งานวิจัยนี้เป็นการประยุกต์ใช้ประโยชน์จากคุณสมบัติเชิงหน้าที่ของซิริซิน เพื่อส่งเสริมการดูดซึมโครเมียม ซึ่งเป็นแร่ธาตุอาหารจำเป็น มีผลส่งเสริมการลดลงของไขมันและระดับ LDL ในเลือดและเนื้อเยื่อต่างๆ ในสิ่งมีชีวิตโดยใช้หนูเป็นสัตว์ทดลอง การศึกษาเริ่มจากการเตรียมผงโปรตีนซิริซิน (silk sericin powders) นำมาตรวจวัดลักษณะทางกายภาพและคุณสมบัติทางเคมีกายภาพต่างๆ ที่จำเป็น จากนั้นใช้ผงโปรตีนที่ได้ในการเตรียมอาหารเสริม sericin-chromium หรือ sericin-chromium supplement พร้อมทั้งตรวจสอบคุณสมบัติทางเคมีกายภาพและวิเคราะห์ปริมาณ chromium ที่เป็นองค์ประกอบ

ศึกษาผลของ sericin ต่อการดูดซึมโครเมียมในลำไส้หนูทดลอง สำหรับการศึกษาคุณสมบัติเชิงหน้าที่ของ sericin-chromium supplement ใช้ปัจจัยส่งเสริมการลดลงของระดับ LDL ในเส้นเลือดและกล้ามเนื้อของหนูทดลองและติดตามการเปลี่ยนแปลงระดับ HDL-cholesterol ในเลือด เพื่อใช้เป็นดัชนีบ่งชี้ภาวการณ์เปลี่ยนแปลงระดับไขมันในเลือดตลอดระยะเวลาการให้อาหารที่มีการเติม sericin-chromium supplement เทียบกับกลุ่มที่เติมผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร โครเมียม ในท้องตลาดและกลุ่มควบคุมที่ไม่มีการเติมอาหารเสริมโครเมียม

## 1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

การเผยแพร่ในวารสาร จดสิทธิบัตร และหน่วยงานที่นำผลการวิจัยไปใช้ประโยชน์ บริษัทผู้ผลิตยา และผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร

# บทที่ 2
# ปริทัศน์วรรณกรรมและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

## 2.1 โครเมียม (Chromium)

ปัจจุบันแนวโน้มผู้ป่วยและเสียชีวิตด้วยโรคหัวใจมีสัดส่วนที่สูงขึ้นและมากกว่าโรคมะเร็งซึ่งเคยเป็นสถิติโรคที่มีผู้เสียชีวิตสูงสุดในอดีต จัดเป็นสาเหตุการเสียชีวิตสูงสุด 2 อันดับแรกในประเทศสหรัฐอเมริกาและแคนาดา รองลงมาคืออุบัติเหตุ โรคเบาหวาน และโรคหลอดเลือด ตามลำดับ (Cao, 2005) จากรายงานมูลเหตุของปัจจัยเสี่ยงต่อโรคที่สำคัญและเป็นสาเหตุหลักเกิดจากพฤติกรรมการบริโภคอาหาร รวมถึงวิธีการดำรงชีวิตหรือ lifestyle โดย 20-35% เสียชีวิตจากโรคหลอดเลือดและหัวใจ (Atherosclerosis & cardiovascular diseases), 20-60% จากโรคมะเร็งและ 30% เสียชีวิตจากโรคเบาหวานชนิดที่ 2 ในขณะที่ประมาณ 50-80% เป็นผู้ป่วยและผู้ที่มีความสัมพันธ์กับโรคเบาหวาน นอกจากผลกระทบดังกล่าว Agriculture & Agri-Food Canada ยังระบุโรคที่สัมพันธ์กับการบริโภคอาหารซึ่งรวมถึงภาวะความดันโลหิตสูง (hypertension), โรคหลอดเลือดหัวใจ (coronary heart diseases) และภาวะที่เกี่ยวกับระบบลำไส้ ส่งผลให้ค่ารักษาพยาบาลของหลายประเทศเพิ่มขึ้นปีละหลายพันล้าน ด้วยเหตุนี้ปัจจุบันผู้บริโภคจึงมีความตื่นตัวและตระหนักถึงความสำคัญของสุขภาพมากขึ้นจะเห็นได้จากการแสวงหาวิธีการป้องกันด้านต่างๆ เพื่อลดความเสี่ยงต่อการเกิดโรคโดยเฉพาะอย่างยิ่งความต้องการผลิตภัณฑ์ เสริมอาหารที่ชดเชยให้ผู้บริโภคได้รับสารอาหารที่จำเป็นเพิ่มขึ้น รวมทั้งส่งเสริมกิจกรรมทางชีวภาพต่างๆในร่างกายให้เกิดขึ้นอย่างสมบูรณ์

ปัจจุบันการผลิตและจำหน่ายผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร (nutritional supplements) trivalent chromium สูตรต่างๆกลายเป็นอุตสาหกรรมที่มีมูลค่าสูงหลายล้านดอลลาร์สหรัฐ (Mozaffari et al.,2005) โดยเฉพาะตลาดอเมริกา เนื่องจากมีการสำรวจพบว่ามากกว่า 90% ของประชากรวัยผู้ใหญ่อยู่ในภาวะขาดแคลนโครเมียม (Sterns, Belbrino, & Witerhahn, 1995; Wilson & Gondy, 1995) สาเหตุแรกเกิดจากการบริโภคอาหารที่มีโครเมียมเป็นองค์ประกอบในระดับที่ไม่เพียงพอกับความต้องการโครเมียมในธรรมชาติพบในหน่วยไมโครกรัมในอาหารชนิดต่างๆ ได้แก่ เครื่องเทศ,พืชสมุนไพรที่มีกลิ่นฉุน (aromatic herbs) (Garcia, Cabrera, Lorenzo, & Lopez, 2000) นมวัว (Hathcock, 2004) เนื้อไม่ติดมัน (lean meat) โดยเฉพาะ process meat (Schechter, 2005) ข้าวกล้อง ถั่วลันเตา และ Broccoli ที่จัดว่ามีปริมาณโครเมียมอยู่ประมาณ 1-11 มิลลิกรัม และพบอยู่เล็กน้อยในมันฝรั่ง น้ำองุ่น น้ำส้ม ไข่ เนื้อวัว ยีสต์หมักเบียร์ (brewer's yeast) และ molesses (Hathcock, 2004) อย่างไรก็ตามอาหารที่มีน้ำตาล Sucrose และ Fructose ให้เกิดการสูญเสียโครเมียม แต่ยังไม่มีรายงานถึงสาเหตุและกลไกอีกสาเหตุหนึ่งขึ้นอยู่กับธรรมชาติร่างกายของมนุษย์จะไม่เก็บสะสมหรือดูดซึมโครเมียม ในรูป trivalent หรือ chromium (III) ที่เป็น essential trace elements ได้ไม่ดีนัก โดย

ธรรมชาติมนุษย์ต้องการโครเมียมประมาณ 1 ไมโครกรัมต่อวัน แต่ส่วนใหญ่สามารถดูดซึมได้เพียงร้อยละ 1-2 ของปริมาณโครเมียมในอาหารที่รับประทานทั้งหมด (Dietary Research Institute, 2005) นอกจากนี้ chromium (III) ผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ได้ยากและจับกับเซลล์ได้เมื่อร่างกายต้องการใช้เท่านั้น ด้วยเหตุนี้จึงมีการสังเคราะห์ chromium (III) ในรูปของโครงสร้างและองค์ประกอบต่างๆ โดยมีวัตถุประสงค์ในการเพิ่มความสารถการดูดซึมในระบบลำไส้และทำให้ร่างกายสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้มากขึ้นโดยไม่ก่อให้เกิดพิษหรือผลกระทบต่อร่างกาย

Evanas กล่าวว่า โครเมียมเป็นอาหารสำหรับคนชรา เพราะทุกคนจะต้องมีความต้องการเมื่อเริ่มมีอายุตั้งแต่ 35 ปีขึ้นไป (Dietary Research Institute, 2005) สำหรับปริมาณการบริโภคโครเมียมที่เหมาะสมขึ้นอยู่กับเพศ อายุ และสภาวะร่างกายยังไม่สามารถกำหนดได้แน่นอนเนื่องจากมีหลายปัจจัยที่เกี่ยวข้อง การศึกษาของ Scheehter ระบุว่าปริมาณที่เหมาะสมในการบริโภคต่อวัน (Adequate Daily intake: AI) มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นตามอายุที่เพิ่มขึ้น เด็กแรกเกิดถึง 12 เดือนหรือเมื่อหย่านมแม่จะต้องการน้อยประมาณ 0.2-5.5 ไมโครกรัม เนื่องจากมีในน้ำนมแม่โดยเฉพาะน้ำนมน้ำเหลืองและร่างกายจะมีการสะสมโครเมียมซึ่งจะเริ่มลดลงและสะสมน้อยมากหรือไม่สะสมเลยเมื่ออายุมากขึ้น (Hathcock, 2004) อีกทั้งการบริโภคพร้อมกับนมยังมีผลยับยั้งการดูดซึมโครเมียม เนื่องจากปริมาณฟอสฟอรัสที่มีอยู่สูงในนมด้วย ในประเทศสหรัฐอเมริกามีการบริโภคโครเมียมต่อวันอยู่ในช่วง 20-50 ไมโครกรัม พบหมุนเวียนในกระแสโลหิตอยู่ในช่วง 0.05-0.5 ไมโครกรัมต่อลิตรหรือ 1.0-9.6 nmol/L Food and Nutrition Board of the NAS/NRC ระบุว่าควรบริโภคโครเมียมไม่เกิน 50-200 ไมโครกรัมต่อวัน

Chromium (III) เป็นธาตุอาหารที่จำเป็นต่อการทำงานของอินซูลินและกระบวนการเผาผลาญของ คาร์โบไฮเดรต ไขมัน (Anderson et al., 1997; Anderson, Polansky, Bryden, & Canary, 1991; Anderson et al., 1983; Vincent, 2001)และโปรตีนในมนุษย์และสัตว์ (Berner, Murphy, & Slesinski, 2004) นอกจากนี้ยังสามารถทำหน้าที่คล้ายสารต้านอาการกดประสาท (Antidepressant-like action) จากการศึกษาหนูที่ให้อาหารเสริมในรูป โครเมียมพิโคลิเนต สามารถลดระดับ tryptophan (TRP) ในเลือด กรดไขมันที่ไม่ถูก esterified และ corticonsterone รวมถึง brain TRP, serotonin (5-hydroxytryptamine) , noradrenaline และ pineal melatonin อย่างมีนัย (Franklin & Odontiadls, 2003) แสดงให้เห็นว่าโครเมียมสามารถเพิ่มการขนส่งกรดอะมิโนไปยังสมองได้ ถ้าอยู่ในสภาวะขาดโครเมียมเป็นเวลานานทำให้เกิด glucose tolerance หรือไม่สามารถใช้กลูโคสให้พลังงานได้ ระบบประสาทที่เกี่ยวข้องกับการทำงานอินซูลินผิดปกติ ระดับกรดไขมันอิสระสูง การสันดาปอาหารต่ำ nitrogen metabolism ของโปรตีนผิดปกติ (Morris et al., 2000; Nutrition Basics Home, 1999; Jeejeebhoy et al., 1997; Morris Wells and Macneil, 1995;Mertz, 1993) มีความเสี่ยงต่อโรคเบาหวานชนิดที่ 2 , โรคหลอดเลือด (Cardiovascular diseases ) และระบบประสาทผิดปกติ (EPA,1998; IOM, 2001; quoted in Benner, Murphy and Slesinski, 2004) โครเมียมที่พบทั่วไปอยู่ในรูป valence state

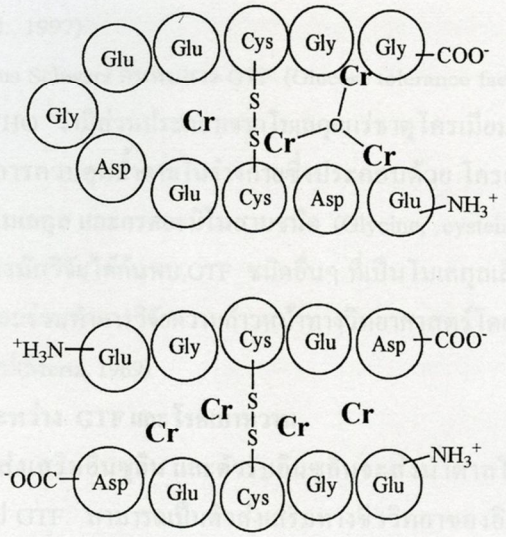
2 รูปได้แก่ hexavalent ($Cr^{6+}$) และ trivalent ($Cr^{3+}$) เกลือของสารประกอบ trivatent chromium หรือ chromium (III) ถูกใช้เป็น micronutrients และอาหารเสริมที่อยู่ในรูปสารประกอบเชิงซ้อนต่างๆ ได้แก่ chromium chloride, niacin-bound chromium (III) หรือ chromium polynicotinate และ chromium picolinate ธรรมชาติของ chromium (III) จะถูกดูดซึมได้ยากร่างกายสามารถขับโครเมียมออกทางปัสสาวะได้ ดังนั้นจึงไม่มีปัญหาเรื่องความเป็นพิษ (Bagchi, Stohs, Downs, Bagchi, & Preuss, 2002) อย่างไรก็ตามสารประกอบเชิงซ้อน chromium (III)ไม่ทุกชนิดที่สามารถใช้เป็นอาหารเสริมได้อย่างปลอดภัย (Shrivastava, Ravikumar, Shanmugasundaram, Babu, & Nair, 2005) นักวิจัยหลายประเทศได้มีการศึกษาผลกระทบผลิตภัณฑ์เสริมอาหารที่อยู่ในรูปสารประกอบเชิงซ้อนโครเมียมหลายรูป ยืนยันถึงความปลอดภัยและความจำเป็นต่อร่างกาย ยกเว้นอยู่ในรูปของ chromium picolinate ซึ่งเป็นสารประกอบเชิงซ้อนที่สามารถดูดซึมได้มากที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับรูปอื่นๆ และมีมูลค่าทางการตลาดสูง (Berner et al., 2004) เนื่องจากการสะสมของโครเมียมกรณีรับประทานเกินขนาดที่แนะนำติดต่อกันเป็นเวลานาน อาจมีผลทำให้ DNA บางส่วนเสียหายในหนู Chinese hamster (Sterns et al., 1995) ซึ่งใช้ pharmacokinetic models ในการทำนายสำหรับผลกระทบ (biological effects) ของการสะสมโครเมียมในมนุษย์ยังไม่แน่ชัด (Sterns et al., 1995) Hepburn และ Vincent ได้ศึกษาการกระจายตัวของโครเมียมในเนื้อเยื่อและส่วนประกอบของเซลล์ของหนูทดลอง ในปี ค.ศ. 2003 ด้วยวิธีการ radioactive labeling โดยใช้ผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร chromium picolinate พบว่าโครเมียมกระจายเข้าสู่เซลล์เร็วมากและมีความเข้มข้นของโครเมียมสูงในอวัยวะได้แก่ ไต, กล้ามเนื้อและตับ และระดับเซลล์ได้แก่ nucleus และ mitochondria ดังนั้นการบริโภคเกินขนาดที่แนะนำติดต่อกันเป็นเวลานานอาจทำให้เกิดแผลในลำไส้และทำลายตับและไตได้ อย่างไรก็ตามจากผลการศึกษาของ Mozaffari และคณะ (2005) ในหนูที่มีภาวะไตเสื่อมลงตามอายุพบว่า chromium picolinate ไม่มีผลกระทบกับการทำงานของไต แต่ chromium picolinate มีผลทำให้สาย DNA เปิดออก (Speetjeans et al., 1999) หรือเกิด nicking (Chaudhary et al.,2005; Tasapakos and Wetterhahn, 1983; Vaigyanathan and Nair, 2003) อย่างไรก็ตามส่วนประกอบที่มีบทบาทเข้าจับกับ DNA ทำให้เกิดความเสียหายคือส่วนของ picolinic acid ไม่ใช่ โครเมียม (Hathcock, 2004) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาผลกระทบของ chromium picolinate เทียบกับรูปอื่น ๆ การศึกษาในอดีตพบปัญหาการดูดซึมโครเมียม เมื่อบริโภคไม่เกินขนาดที่แนะนำ 50 ไมโครกรัม การดูดซึมจะลดลงจาก 2% เป็น 0.5 % เมื่อบริโภคมากขึ้นจาก 10 ไมโครกรัม เป็น 50 ไมโครกรัมตามลำดับ (Anderson & Kozlovsky, 1985) ปัจจุบันมีการศึกษาพบปัจจัยเสริมอื่นๆ ที่สำคัญและพบว่าการบริโภคอาหารที่มีโครเมียมพร้อมวิตามินบี 3, glycine, cycteine และ glutamic acid ช่วยส่งเสริมการดูดซึม (Hathcock, 2004; Calafat et al., 1990) ดังนั้นแนวโน้มการผลิตจึงมีการสังเคราะโครเมียมรวมกับวิตามินและกรดอะมิโนบางชนิดที่ส่งเสริมการดูดซึมและคุณสมบัติเชิงหน้าที่ การสังเคราะห์สารประกอบเชิงซ้อนโดยการ chelating chromium (III)ด้วย D-phenylalanine ligand ในaqueous solution เกิดเป็น chromium $(phenylalanine)_3$

เป็นอีกรูปที่ไม่จับกับ DNA ภายใต้สภาวะ physiological reducing สามารถกระตุ้นกระบวนการ Insulin-signaling และ glucose tolerance โดยเฉพาะในผู้ป่วยเบาหวานชนิดที่ 2 ได้ (Yang et al., 2005) Anderson และคณะ (2004) พบว่า chromium histidinate complexes เป็นรูปที่ร่างกายมนุษย์สามารถดูดซึมได้ดีและมีความคงตัวมากกว่ารูป chromium picolinate และ chromium chloride นอกจากนี้ยังพบว่าการผสม starch ในสูตรจะยับยั้งการดูดซึมของโครเมียม ผลิตภัณฑ์เสริมอาหารส่วนใหญ่ในสหรัฐอเมริกาจะเป็นรูป chromium (III) ที่อยู่ในวิตามินและเกลือแร่รวม (US DHHS, 1998, quoted in Berner, Murphy and Slesinski, 2004 ) Niacin-bound chromium เป็นอีกรูปที่ได้รับความสนใจเนื่องจากไม่มีรายงานการเกิดผลข้างเคียงและควบคุม glucose toleranceในผู้ใหญ่ถึงวัยสูงอายุ (Urberg & Zemel, 1987) การบริโภคในปริมาณ 200 ไมโครกรัมต่อวัน ควบคู่กับการควบคุมอาหารและออกกำลังกายจะทำให้ไขมันและ non- fat body ลดลงอย่างมีนัยโดยไม่เปลี่ยนแปลงองค์ประกอบทางเคมีในเลือดในระยะเวลา 2 เดือน (Crawford, Scheckenbach, & Preuss, 1999) จะเห็นได้ว่าผลิตภัณฑ์เสริมอาหารโครเมียมเป็นอุตสาหกรรมที่มีการพัฒนาอยู่ตลอดเวลา ทั้งนี้เพื่อให้ได้รูปสารประกอบเชิงซ้อนที่มีประสิทธิภาพสูงสุด

โครเมียม เป็นแร่ธาตุที่จำเป็นต่อร่างกาย เพื่อการเจริญเติบโตที่มีสุขภาพที่ดี โครเมียมมีความจำเป็นต่อขบวนการแตกตัวของโมเลกุลโปรตีน ไขมัน และ คาร์โบไฮเดรต ร่างกายต้องการโครเมียมในปริมาณ 50–200 ไมโครกรัมต่อวัน โครเมียมมีส่วนในการช่วยรักษาปริมาณน้ำตาล ในร่างกายให้คงที่สำหรับกระบวนการย่อยสลายคาร์โบไฮเดรต ในงานวิจัยพบว่า โครเมียม เป็นส่วนประกอบของสารที่เรียกว่า GTF (Glucose tolerance factor) โดยทำงานร่วมกับ ไนอาซิน และ กรดอะมิโนอีกหลายชนิด นอกจากนั้นโครเมียมยังมีบทบาทในการเพิ่ม HDL หรือ คอเลสเตอรอลชนิดดีและลดระดับคอเลสเตอรอลทั้งหมด (Ding, Olson, & Caruso, 1996; Lukaski, 1999)โครเมียมจะกระตุ้นการทำงานของเอ็นไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนน้ำตาลกลูโคสให้เป็นพลังงาน และขบวนการสังเคราะห์กรดไขมันและคอเลสเตอรอลจึงดูเหมือนว่า โครเมียมเพิ่มประสิทธิภาพของอินซูลิน และการจัดการกับน้ำตาลกลูโคส ป้องกันการเกิดน้ำตาลในเลือดต่ำเพราะว่ามีอินซูลินมากเกินไป หรือโรคเบาหวานเนื่องจากว่ามีอินซูลินน้อยเกินไป

โครเมียมมีบทบาทในการส่งเสริมการออกฤทธิ์ของอินซูลิน และมีส่วนสำคัญอย่างยิ่ง ในขบวนการเผาผลาญน้ำตาลกลูโคส หรือคาร์โบไฮเดรตของเซลล์เพื่อควบคุมระดับน้ำตาลในเลือด กลไกการงานของโครเมียมต่อกิจกรรมอินซูลิน โครเมียมจะกระตุ้นการทำงานของอินซูลินโดยทำให้โครเมียมเคลื่อนที่เข้าไปในเซลล์ โดยภายในเซลล์จะจับกับเพปไทด์กลายเป็น LMWCr (low-molecular weight chromium-binding peptide) ดังรูปที่ 1 LMWCr ทำให้การขยายตัวของอินซูลินเป็นไปโดยอัตโนมัติ หลังจากตัวรับอินซูลินทำหน้าที่หลัก LMWCr อาจจะมีปฏิกิริยากับอินไซด์ที่กระตุ้นกรดอะมิโนกับอินซูลินแล้วตัวรับอินซูลินจะเปลี่ยนรูปแบบการทำงาน ซึ่งจะกระตุ้นให้เกิดการเคลื่อนที่ของโครเมียมจากเลือดไปยังเซลล์อื่น ๆ ส่งผลให้ LMWCr ปล่อยสารจากเซลล์ผ่าน

กระแสเลือด และขับถ่ายออกมาทางปัสสาวะ และไม่สามารถนำมาใช้ได้อีก (Vincent, 2001; Vincent, 2004)




**รูปที่ 1** Hypothetical models of low-molecular weight Cr peptide complexes.
ที่มา : (Dinakarpandian et al., 2004)

**2.1.1 Glucose tolerance factor (GTF)**

GTF หรือ Glucose Tolerance Factor ซึ่งมีอยู่ทั่วไปตามธรรมชาติในเนื้อเยื่อของร่างกายมนุษย์ โดยเฉพาะในตับและไต มีส่วนผสมจากแร่ธาตุโครเมียม วิตามิน และกรดอะมิโนต่างๆ ทำหน้าที่ในการเผาผลาญน้ำตาลในร่างกายให้เป็นปกติ (Mertz, 1955) เพราะการลำเลียงน้ำตาลเข้าสู่เซลล์ในร่างกายจะต้องประสานกับอินซูลิน และตัวรับอินซูลิน GTF จะมีส่วนประกอบของแร่ธาตุโครเมียม วิตามิน และกรดอะมิโน ตามปกติร่างกายคนเราจำเป็นต้องใช้พลังงานในการดำรงชีวิต พลังงานเหล่านี้ได้จากอาหารที่รับประทานเข้าไป โดยเฉพาะอาหารประเภทแป้งที่ถูกย่อยสลายกลายเป็นน้ำตาลกลูโคสในกระเพาะอาหาร และถูกดูดซึมเข้าไปในกระแสเลือดเพื่อส่งผ่านไปเลี้ยงเนื้อเยื่อต่าง ๆ ของร่างกาย แต่การที่ร่างกายจะนำน้ำตาลไปใช้เป็นพลังงานได้นั้นจำเป็นต้องอาศัยองค์ประกอบสองอย่างคือ ฮอร์โมนจากตับอ่อนที่ชื่ออินซูลินซึ่งมีหน้าที่เป็นตัวพาน้ำตาลกลูโคสเข้าสู่เซลล์ของเนื้อเยื่อต่างๆ และสาร GTF (Glucose tolerance factor) ซึ่งสารนี้ทำหน้าที่กระตุ้นการทำงานของฮอร์โมนอินซูลิน หากในร่างกายของเรามีปริมาณสาร GTF น้อยกว่าปกติจะทำให้ประสิทธิภาพการทำงานของอินซูลินลดน้อยลงไปด้วย ดังนั้นหากกลไกทั้งสองอย่างหรืออย่างใดอย่างหนึ่งทำงาน

บกพร่อง จะทำให้น้ำตาลไม่สามารถเข้าสู่เซลล์ได้ตามปกติ และทำให้น้ำตาลเหลือตกค้างอยู่ในกระแสเลือดมากกว่าปกติ เมื่อในเลือดมีระดับน้ำตาลในเลือดสูงมาก ไตจะกรองน้ำตาลออกมากับปัสสาวะและกระบวนการกรองน้ำตาลในเลือดที่สูงมากออกมาทางปัสสาวะนั้นไตจำเป็นจะต้องดึงน้ำออกมาด้วย (Davies et al., 1997)

ในปี 1957 Klaus Schwarz ค้นพบสาร GTF (Glucose tolerance factor) ในไตของสัตว์ GTF ได้รับการรับรองจาก WHO ว่ามีส่วนประกอบจากโมเลกุลแร่ธาตุโครเมียมที่เป็นอนุมูลอิสระ GTF เป็นส่วนหนึ่งในปัจจัยการควบคุมน้ำตาลในร่างกายซึ่งประกอบด้วย โครเมียมไตรวาเลนส์ ($Cr^{3+}$) 1 โมเลกุล ไนอะซิน 2 โมเลกุล และกรดอะมิโนสามชนิด (Glycine, cysteine และ glutamic acid) อย่างละ 1 โมเลกุล ต่อมานักวิจัยได้ค้นพบ GTF ชนิดอื่นๆ ที่เป็นโมเลกุลเล็กๆ หลายปีหลังจากนั้น Mao Chia-Hung และคณะร่วมทำการวิจัยความก้าวหน้าทางวิทยาศาสตร์โดยใช้เทคโนโลยีในการมาทำเป็นผลิตภัณฑ์สำเร็จรูป(Mertz, 1969)

**ความสัมพันธ์ระหว่าง GTF และ โรคเบาหวาน**

GTF เป็นตัวส่งเสริมอินซูลิน และตัวรับอินซูลินจะส่งน้ำตาลในเลือดเข้าสู่เซลล์ และกลายเป็นพลังงานต่อไป GTF สามารถเป็นตัวส่งเสริมทางชีววิทยาของอินซูลิน และทำให้ตัวรับอินซูลินมีความไวในการทำงานเพิ่มมากขึ้น โดยการบีบรัดตัวที่ตัวรับอินซูลินและเพิ่มการซึมผ่านไปยังเซลล์เยื่อบุผิว GTF ทำให้น้ำตาลในเลือดเข้าสู่เซลล์ได้ GTF ช่วยให้อินซูลินทำหน้าที่ได้ดี และลดระดับน้ำตาลในเลือด และตัวรับอินซูลินทำหน้าที่ได้ดีขึ้น แต่หากขาด จะทำให้เกิดภาวะน้ำตาลในเลือดต่ำ (Vincent, 2001)

**2.1.2 บทบาทหน้าที่ของโครเมียม**

1. ระดับโครเมียมในซีรั่มจะสูงเมื่อแรกเกิดและจะลดลงเมื่อโตเป็นผู้ใหญ่ (Schroeder et al., 1962) อีกทั้งอายุที่เพิ่มขึ้นยังมีผลต่อความเข้มข้นของโครเมียมในเส้นผม เหงื่อ และปัสสาวะลดลงอย่างมีนัยสำคัญ (Davies et al., 1997)

2. การได้รับโครเมียมในปริมาณที่ไม่เพียงพอต่อความต้องการในผู้หญิง ซึ่งอาจเกิดจากการได้รับสารอาหารทางหลอดเลือด (Parenteral Nutrition) (Brown, Forloines-Lynn, & Gross, 1986) แก้ไขได้ด้วยการให้ผลิตภัณฑ์อาหารเสริมโครเมียมทางสารละลายที่ให้ทางหลอดเลือด เพื่อให้การหลั่งอินซูลินเพียงพอที่จะลดน้ำตาลในเลือดจนเป็นปกติ

3. การให้อาหารหนูที่มีโครเมียมในปริมาณต่ำจะทำให้การตอบสนองของฮอร์โมนอินซูลินต่อระดับน้ำตาลในเลือดผิดปกติ (Striffler, Law, & Polansky, 1995)

4. การดูดซึมโครเมียมผกผันโดยตรงกับสัดส่วนที่รับเข้าไปในร่างกาย ซึ่งความเป็นจริงแล้วการดูดซึมโครเมียมก็เป็นสิ่งที่สำคัญ

5. การที่มีปริมาณโครเมียมมากขึ้นในปัสสาวะส่งผลให้เกิดภาวะน้ำตาลในเลือดสูง (Hyperglycemia) (BW Morris, MacNeil, & Stanley, 1993) ในภาวะปกติ อินซูลินเป็นฮอร์โมนตัวหนึ่งในร่างกาย สร้างและหลั่งจากตับอ่อน มีหน้าที่พาน้ำตาลกลูโคสในเลือดเข้าสู่เนื้อเยื่อ เพื่อให้เซลล์ใช้เป็นพลังงาน ดังนั้นถ้ามีความผิดปกติ คือปริมาณอินซูลินลดลง หรือประสิทธิภาพการทำงานของอินซูลินลดลง ก็จะส่งผลให้น้ำตาลไม่ถูกนำเข้าสู่เนื้อเยื่อ จึงมีระดับน้ำตาลคั่งอยู่ในเลือดสูงกว่าปกติ ระดับน้ำตาลในเลือดที่สูงกว่าปกตินี้ จะถูกไตขับออกมาทางปัสสาวะ ทำให้ตรวจพบน้ำตาลในปัสสาวะ

ในการศึกษาจำนวน 37 เป็นชาย 19 คนและหญิง 18 คน ทำการให้บริโภคอาหารอ้างอิงเป็นเวลา 2 สัปดาห์ โดยนักโภชนาการจะให้สูตรอาหารที่มีปริมาณโปรตีน ไขมัน คาร์โบไฮเดรต และสารอาหารอื่นๆในระดับที่เหมาะสม และอีกกลุ่มหนึ่งเป็นอาหารที่มีปริมาณน้ำตาลสูง ในอาหารอ้างอิงมีคาร์โบไฮเดรตเชิงซ้อน 35% และ น้ำตาลเชิงเดี่ยว 15% ในขณะที่อาหารที่มีปริมาณน้ำตาลสูงมีคาร์โบไฮเดรตเชิงซ้อน 15% และ น้ำตาลเชิงเดี่ยว 35% ปริมาณโครเมียมของทั้งอาหารอ้างอิงและอาหารน้ำตาลสูงมีประมาณ 16 ไมโครกรัมต่อ 1000 แคลลอรี่ เมื่อเปรียบเทียบกับอาหารอ้างอิงแล้วพบว่าอาหารที่มีน้ำตาลสูงจะสูญเสียโครเมียมออกทางปัสสาวะเพิ่มขึ้นจาก 10% เป็น 300% ใน 27 คน จาก 37 คน การขับโครเมียมทางปัสสาวะระหว่างเพศชายและเพศหญิงไม่มีความแตกต่างกัน จากผลการทดลองดังกล่าวแสดงถึง การบริโภคอาหารที่มีน้ำตาลสูงจะกระตุ้นให้เกิดการสูญเสียโครเมียมได้ง่าย และอาจนำไปสู่การขาดโครเมียมซึ่งจะเกี่ยวกับการดื้อต่ออินซูลินและการเผาผลาญไขมัน (Kozlovsky, Moser, Reiser, & Anderson, 1986)

6. โครเมียมเป็นส่วนประกอบของเมทัลโลเอนไซม์ ทำหน้าที่เป็นคะตะลิสต์ของปฏิกิริยาเมตาบอลิซึมต่าง ๆ (Mertz, 1992) ยิ่งไปกว่านั้นโมเลกุลที่ชื่อ Chromodulin และ LMWCr ยังอธิบายผลกระทบต่อระดับโมเลกุลของโครเมียม

### 2.1.3 แหล่งที่พบโครเมียม

แหล่งที่พบโครเมียมที่ดีที่สุด คือ ยีสต์ (Brewer's yeast) นอกจากนั้นก็ยังพบในเมล็ดธัญพืช และ ซีเรียล ซึ่งปกติจะถูกทำลายไปในระหว่างกระบวนการผลิต เบียร์บางยี่ห้อมีโครเมียมในปริมาณมากของอาหารตามธรรมชาติที่พบว่ามีโครเมียม ดังแสดงในตารางที่ 1 การขาดโครเมียมหรือได้รับโครเมียมในปริมาณที่ต่ำกว่าที่ USDA ได้แนะนำไว้ ปริมาณโครเมียมที่ร่างกายต้องการต่อวัน Recommended Dietary Allowance (RDA) ได้ แนะนำไว้ดังตารางที่ 2 และประมาณ 3 % ของโครเมียมในอาหารที่จะถูกดูดซึมเข้าสู่ร่างกาย คนทั่วไปควรได้รับโครเมียม เป็นอาหารเสริม การรับประทานอาหารประเภทน้ำตาล และอาหารในกลุ่มคาร์โบไฮเดรตในปริมาณสูง ก็อาจจะทำให้เกิดการขาดโครเมียม และเร่งให้เกิดโรค เบาหวานได้ พบคนในกลุ่มผู้สูงอายุ นักกีฬา และหญิงมีครรภ์เป็นกลุ่มที่เสี่ยงต่อการขาดโครเมียมมากที่สุด ขนาดที่แนะนำโดยทั่วไป คือ 200 ไมโครกรัมต่อวัน

ในปริมาณที่โครเมียมวางขายทั่วไป (50 – 300 ไมโครกรัมต่อวัน) ไม่พบว่าก่อให้เกิดอาการเป็นพิษต่อร่างกาย (toxicity) อาหารเสริมโครเมียมอาจจะเพิ่มหรือเข้าไปช่วยการทำงานของยารักษาโรคเบาหวาน (เช่น อินซูลิน หรือยาลดน้ำตาลอื่น ๆ) และอาจทำให้เกิดอาการระดับน้ำตาลต่ำได้ ดังนั้น ผู้ป่วยโรคเบาหวานจึงควรปรึกษาแพทย์ผู้เชี่ยวชาญก่อนที่จะทานอาหารเสริมโครเมียม และจากการศึกษาพบว่า วิตามินซีเพิ่มการดูดซึมของโครเมียม จึงได้มีการแนะนำให้รับประทานร่วมกันระหว่าง วิตามินซีและโครเมียม หรือทานร่วมกับอาหารที่มี วิตามินซี สูงๆ(Vincent, 2001)

**ตารางที่ 1** แหล่งอาหารที่พบโครเมียม

| **Food** | **Chromium (ไมโครกรัม)** |
|---|---|
| Broccoli, 1/2 cup | 11 |
| Grape juice, 1 cup | 8 |
| English muffin, whole wheat, 1cup | 4 |
| Potatoes, mashed, 1 cup | 3 |
| Garlic, dried, 1 teaspoon | 3 |
| Basil, dried, 1 tablespoon | 2 |
| Beef cubes, 3 ounces | 2 |
| Orange juice, 1 cup | 2 |
| Turkey breast, 3 ounces | 2 |
| Whole wheat bread, 2 slices | 2 |

**ที่มา:** (Anderson, Bryden, & Polansky, 1992; Cabrera-Vique, Teissedre, Cabanis, & Cabinis, 1997)

**ตารางที่ 2** ปริมาณโครเมียมที่ร่างกายต้องการในแต่ละช่วงอายุ

| อายุ | ปริมาณโครเมียมที่ร่างกายต้องการในแต่ละวัน (ไมโครกรัม) | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | เด็กและเด็กทารก | ผู้ชาย | ผู้หญิง | สตรีมีครรภ์ | สตรีให้นมบุตร |
| เด็กทารก อายุไม่เกิน 6 เดือน | 0.2 | | | | |
| 7 – 12 เดือน | 5.5 | | | | |
| 1 – 3 ปี | 11 | | | | |
| 4 – 8 ปี | 15 | | | | |
| 9 to 13 ปี | | 25 | 21 | | |
| 14 to 18 ปี | | 35 | 24 | 29 | 44 |
| 19 to 50 ปี | | 35 | 25 | 30 | 45 |
| >50 years | | 30 | 20 | | |

**ที่มา:** http://ods.od.nih.gov/factsheets/chromium.asp#en14

**2.1.4 ประโยชน์ของโครเมียม**

**1) ควบคุมระดับน้ำตาลในเลือดและโรคเบาหวาน**

ในผู้ป่วยโรคเบาหวานแบบที่ 2 โครเมียมมีส่วนในการช่วยรักษาปริมาณน้ำตาลในร่างกายให้คงที่ (ในขบวนการย่อยสลายคาร์โบไฮเดรต) งานวิจัยพบว่าอินซูลินที่หลั่งจากตับอ่อนจะมีความสัมพันธ์กับระดับน้ำตาลในเลือด แต่ปัญหาคือเซลล์ร่างกายผู้ป่วยไม่ตอบสนองต่ออินซูลิน โครเมียมเป็นส่วนประกอบของสารที่เรียกว่า GTF (Glucose tolerance factor) ทำงานร่วมกับไนอะซินและกรดอะมิโน อีกหลายชนิดช่วยกระตุ้นให้เซลล์ร่างกายตอบสนองต่ออินซูลินได้ดียิ่งขึ้น ช่วยให้ระดับน้ำตาลเข้าสู่ระดับปกติ มีการทดลองซึ่งเป็นการทดลองแบบที่ทั้งผู้ทดสอบและผู้ถูกทดสอบไม่มีใครทราบเลยว่าได้ยาที่มีส่วนผสมของโครเมียมหรือไม่มีเพื่อตัดตัวแปรด้านความรู้สึกของผู้เข้าการทดลองที่อาจจะมีผลต่อการวัดผลในประสิทธิภาพของโครเมียม ซึ่งผลการทดลองสนับสนุนสรรพคุณด้านการลดน้ำตาลในเลือดของ โครเมียม เนื่องจากโครเมียมช่วยในการควบคุมระดับน้ำตาลในเลือดและช่วยในการทำให้ glucose tolerance ดีขึ้น ดังนั้นการได้รับโครเมียมจึงมีประโยชน์ต่อผู้ป่วยโรคเบาหวานชนิดที่ 2 คนที่มีอาการระดับน้ำตาลในเลือดต่ำมีอาการดีขึ้นเมื่อได้รับโครเมียม 200 ไมโครกรัมต่อวัน (Lim et al., 1983; Lukaski, 1999)

**2) ลดระดับคอเลสเตอรอลในร่างกาย**

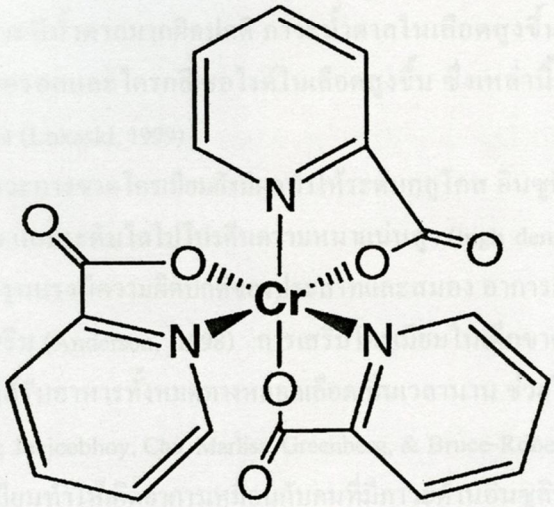
การศึกษาวิจัยพบว่าโครเมียม (ทั้งในรูปแบบพิกโคลิเนตและอื่นๆ) มีผลในการลดระดับคอเลสเตอรอลในร่างกาย โดยการมีบทบาทไปเพิ่ม HDL หรือ คอเลสเตอรอล ชนิดดีและลดระดับคอเลสเตอรอลทั้งหมด ในการศึกษาประสิทธิภาพของโครเมียมในมนุษย์ โดยให้อาสาสมัคร 28 คน รับโครเมียม 200 ไมโครกรัม เป็นเวลา 42 วัน ทำการตรวจ Levels of total cholesterol, low-density lipoprotein (LDL) cholesterol, and Apo lipoprotein B พบว่ามีการลดลงอย่างมีนัยสำคัญในขณะที่ Apo lipoprotein A-I และ the high-density lipoprotein (HDL) เพิ่มขึ้น ดังนั้นโครเมียมมีประสิทธิภาพในการลดไขมันในเลือดในคนได้ (Press, Geller, & Evans, 1990) มีการศึกษาที่สอดคล้องกัน เมื่อให้โครเมียมพิโคลิเนต 200 ไมโครกรัมต่อวันในระยะเวลาสองเดือน พบว่าคอเลสเตอรอลรวมและ LDL ลดลงมากกว่า 10% (Anderson, 2003)

**2.1.5 โคเมียมพิโคลิเนต (Chromium picolinate)**

ในปี 1959 Schwartzc และ Mertz ได้ค้นพบสารที่คล้ายกับระบบการทำงานของ GTF ซึ่งสามารถแยกจากยีสต์ ซึ่งคือ สารไตรวาเลนโครเมียม และยังมีความสัมพันธ์ของแร่ธาตุบางชนิด เช่น กรดอะมิโน และวิตามิน และยังค้นพบว่า GTF ยังเป็นส่วนประกอบของ GTF ชนิดอื่นในตับของสัตว์ชนิดอื่นๆ ในการหมักข้าวมอลต์ และ น้ำนมของวัว ควาย แต่ GTF ที่ดีที่สุดมีอยู่ในน้ำนมของมนุษย์ ซึ่งเป็นการเกิดขึ้นตามธรรมชาติ เพื่อที่เด็กทารกแรกเกิดจะได้เจริญเติบโตอย่างสมบูรณ์ โรงงานหลายแห่งได้พยายามที่จะทำการผลิต GTF แต่ส่วนมากกระบวนการผลิต GTF ไม่เป็นที่ยอมรับ จึงไม่สามารถผลิตในปริมาณมากเพื่อการค้า

โครเมียม พิโคลิเนตเป็นสารประกอบระหว่าง โมเลกุลของโครเมียม 1 โมเลกุลจับกับกรดพิโลลินิค 3 โมเลกุล ดังรูปที่ 2 ซึ่งมาจากกระบวนการเผาผลาญตามธรรมชาติ พบในน้ำนม โครเมียมพิโคลิเนต เป็นรูปแบบของโครเมียมที่ดูดซึมเข้าสู่ร่างกายได้ง่ายและมีประสิทธิภาพช่วยลดน้ำหนักโดยเพิ่มการเผาผลาญไขมัน จากการศึกษาพบว่า โครเมียมพิโคลิเนตช่วนลดปริมาณไขมันและกระตุ้นการสร้างมวลกล้ามเนื้อ โดยมีงานวิจัยที่ทดลองให้โครเมียมพิโคลิเนต ขนาด 400 ไมโครกรัมต่อวันกับอาสาสมัครเป็นระยะเวลา 3 เดือน พบว่ามีการลดลงของปริมาณไขมันในร่างกายและ น้ำหนักร่างกาย โครเมียมพิโคลิเนตเป็นผลิตภัณฑ์อาหารเสริมที่เป็นที่ยอมรับว่าเป็นเกลือแร่ที่สามารถเพิ่มประสิทธิภาพของเซลล์ในการนำเอากรดอะมิโนเข้าสู่เซลล์ได้มากขึ้น โดยกรดอะมิโนเหล่านี้จะมีผลต่อมวลกล้ามเนื้อและการเจริญเติบโตของร่างกาย(Milner & Hill, 1985) โครเมียมพิโคลิเนตมีผลช่วยเร่งการเผาผลาญไขมันในร่างกาย และเพิ่มมวลกล้ามเนื้อ มีการศึกษาเมื่อปี 1998 โดยมีอาสาสมัครสุขภาพดีจำนวน 122 คนที่เป็นสมาชิกของเฮลท์คลับในเทกซัสได้รับ โครเมียมจำนวน 400 ไมโครกรัมต่อวันของโครเมียมพิโคลิเนต หรือยาหลอกเป็นระยะเวลาติดต่อกัน 3 เดือน คนที่ได้รับ

โครเมียมมีไขมันในร่างกายลดลง 6 ปอนด์ (2.7 กิโลกรัม) ขณะที่คนที่ได้รับยาหลอกลดลงเพียง 3 ปอนด์ (1.3 กิโลกรัม)(Kareus, Kelley, Walton, & Sinclair, 2001)




**รูปที่ 2** โครงสร้างของ Cr(III) picolinate. (Kareus et al., 2001)

**2.1.6 การดูดซึมโครเมียม**

โครเมียมมีการดูดซึมได้น้อยมาก ส่วนใหญ่จะดูดซึมที่ลำไส้เล็กเพียง 0.5 – 3% ของอาหารทั้งหมดที่รับประทานเข้าไป ส่วนที่เหลือจะถูกขับออกทางอุจจาระ วิตามินซีและวิตามินบีสาม(ไนอะซิน) มีส่วนช่วยในการดูดซึมโครเมียมเข้าสู่ร่างกาย โครเมียมส่วนใหญ่จะถูกสะสมไว้ที่ตับ ม้าม เนื้อเยื่ออ่อนและกระดูก การรับประทานอาหารที่หวานจัด และมีน้ำตาลสูง (มีน้ำตาลเป็นส่วนประกอบมากกว่า 35% ของแคลอรี่ที่ได้รับ) จะลดการดูดซึมโครเมียมในร่างกาย และเร่งการขับโครเมียมออกมาทางปัสสาวะ ภาวะที่มีการติดเชื้อ ออกกำลังกายอย่างหนัก มีความเครียดสูง ทำให้ร่างกายสูญเสียโครเมียมมากขึ้น เกิดอาการขาดโครเมียมได้หากรับประทานโครเมียมน้อยอยู่แล้ว

จากการทดลองเพื่อเปรียบเทียบการดูดซึมโครเมียมในเลือดของหนูทดลองจากกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ให้โครเมียมซึ่งสกัดจากอาหารหนูที่เสริมโครเมียมแล้วทำการฉีดเข้าไปใต้ผิวหนัง เมื่อเวลาผ่านไป 18 ชั่วโมง ตรวจหาการตอบสนองต่อน้ำตาลในเลือด พบว่าไม่แตกต่างกัน แต่เมื่อทำการตรวจที่ 1 และ 2 ชั่วโมง พบว่า มีการดูดซึม 14.9 และ 11.8 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรในหนูกลุ่มควบคุม 26.5 และ 27.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในหนูกลุ่มที่ให้โครเมียม (Mertz, 1969)

**2.1.7 การขาดโครเมียม**

ปกติมักไม่ค่อยพบอาการขาดโครเมียมในคนและสัตว์ แต่หากขาดอาหารที่มีโครเมียมนาน ๆ จะทำให้ระดับน้ำตาลในเลือดผิดปกติ และเมื่อร่างกายขาดโครเมียมจะมีอาการต่อไปนี้คือ มีการเปลี่ยนแปลงระบบการเผาผลาญคาร์โบไฮเดรต เช่น การสะสมไกลโคเจนที่ตับลดลง ระดับอินซูลินในเลือดสูงขึ้น ปัสสาวะมีน้ำตาลมากผิดปกติ ภาวะน้ำตาลในเลือดสูงขึ้นเมื่อออดอาหาร ลดการเจริญเติบโต คอเรสเตอรอลและไตรกลีเซอไรด์ในเลือดสูงขึ้น ซึ่งเหล่านี้ล้วนอาการเริ่มต้นของโรคเบาหวานชนิดที่สอง (Lukaski, 1999)

นอกจากนี้ ภาวะการขาดโครเมียมยังมีผลทำให้ระดับกลูโคส อินซูลิน คอเลสเตอรอล และไตรกลีเซอร์ไรด์ สูงขึ้น และระดับไลโปโปรตีนความหนาแน่นสูง (high density lipoproteins) ลดลง การขาดโครเมียมอย่างรุนแรงมีความผิดปกติของประสาทและสมอง อาการผิดปกตินี้กลับสู่ปกติได้โดยการให้โครเมียมเสริม (Anderson, 1998) การเสริมโครเมียมในเด็กขาดอาหาร ผู้สูงอายุ ผู้ป่วยเบาหวาน และผู้ป่วยที่ได้รับอาหารทั้งหมดทางหลอดเลือดเป็นเวลานาน ช่วยให้ความทนต่อกลูโคสดีขึ้น (Carter et al., 1968; Jeejeebhoy, Chu, Marliss, Greenberg, & Bruce-Robertson, 1977)

การขาดโครเมียมทำให้เกิดอาการเหมือนกับคนที่มีภาวะต้านอินซูลินและเบาหวานชนิดที่ 2 ระดับโครเมียมในเลือดที่ต่ำสัมพันธ์กับการเพิ่มความเสี่ยงต่อการเป็นโรคเบาหวานชนิดที่ 2 (Anderson, 1998) ผู้ป่วยเบาหวานจะมีระดับโครเมียมในพลาสมาลดลง ในคนและสัตว์ทดลองพบว่าระดับโครเมียมในร่างกายต่ำมีความสัมพันธ์กับความผิดปกติในเมแทบอลิซึมของอินซูลิน กลูโคส และไขมัน ซึ่งจะเพิ่มความเสี่ยงต่อการเป็นโรคหัวใจและหลอดเลือด การเสริมโครเมียมทำให้อินซูลินทำงานได้ดีขึ้น ทำให้เนื้อเยื่อต่าง ๆ ในร่างกายมีประสิทธิภาพในการนำกลูโคสไปใช้ได้เพิ่มขึ้น (Anderson, 2003; Jeejeebhoy et al., 1977)

**2.1.8 การแก้ไขอาการขาดโครเมียม**

ในผู้ป่วยที่มีการขาดโครเมียมรุนแรง แพทย์มักจะใช้ยาที่มีส่วนประกอบของโครเมียมพิโคลิเนต ซึ่งเป็นโครเมียม (3+) ที่อยู่ในรูปของเกลือ ทานเป็นเวลาหนึ่งสัปดาห์ (Kareus et al., 2001)

**2.1.9 ผลที่เกิดจากการได้รับโครเมียมมากเกินความจำเป็น**

โครเมียมมีการดูดซึมได้น้อยและสามารถขับออกไปได้ทางปัสสาวะ จึงไม่พบปัญหาที่เกิดจากการรับประทานโครเมียมเป็นจำนวนมาก ๆ แต่อย่างไรก็ตามมักมีการกล่าวอ้างสรรพคุณของโครเมียมเกินความเป็นจริง โดยเฉพาะในยาลดความอ้วน ดังนั้นการรับประทานโครเมียมปริมาณมากเกินความจำเป็น อาจก่ออันตรายได้ (Moukarzel, 2009)

**2.1.10 พิษวิทยาของโครเมียม**

โครเมียมถูกนำมาใช้ในเรื่องของการลดน้ำหนัก โดยกลไกในการลดน้ำหนักยังไม่ทราบแน่ชัดในปัจจุบัน อาจเนื่องจากมีการพบว่าโครเมียมเป็นโคแฟกเตอร์กับอินซูลิน ซึ่งช่วยควบคุมระดับน้ำตาลกลูโคสในร่างกาย การขาดโครเมียมจึงอาจทำให้เกิดภาวะดื้อต่ออินซูลินและระบบการเผาผลาญอาหารของสารจำพวก คาร์โบไฮเดรต โปรตีน และไขมันผิดปกติไปได้ การศึกษากลไกทางพิษวิทยาของโครเมียม โดย hexavalent chromium สามารถผ่านเข้าสู่เซลล์ได้ดี และ oxygen intermediates form ของ hexavalent chromium ซึ่งเกิดระหว่างปฏิกิริยา reduction เป็น trivalent form ในร่างกาย อาจทำปฏิกิริยากับ DNA เกิด genotoxic effect ส่วน trivalent form สามารถผ่านเข้าสู่ cell ได้น้อย ถูกรีดิวซ์เป็น divalent chromium โดย L– cysteine และ NADH ในร่างกาย ทำให้เกิด hydroxy radicals ขึ้น และจากการศึกษาใน cell culture พบว่าเกิดการเพิ่ม oxidative stress , reduction ของ cytochrome – c และ DNA breaks เมื่อระดับความเข้มข้นของ chromium เกิน 20 ไมโครกรัมต่อวัน (Stout et al., 2009) ในการศึกษาจำนวน 209 ทำศึกษาเกี่ยวกับประสิทธิภาพของ trivalent chromium ในการเหนี่ยวนำให้เกิดความผิดปกติในเซลล์สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม พบความผิดปกติ 48 การศึกษา ส่วนอีก 161 การศึกษาที่เหลือไม่พบความผิดปกติ โดยการศึกษาที่พบความผิดปกตินั้นมีระดับ trivalent chromium ที่สัมผัสเซลล์มากกว่าหรือเท่ากับ 100 ไมโครกรัมต่อวันมีรายงานในหญิงผิวขาว อายุ 33 ปี ได้รับโครเมียมพิกโคลิเนต 1200 – 2400 ไมโครกรัมต่อวัน เป็นเวลา 4 – 5 เดือนก่อนเพื่อลดน้ำหนัก พบว่ามีอาการน้ำหนักลด, anemia , hemolysis , thrombocytopenia , liver dysfunction และ renal failure ซึ่งค่าของผลการตรวจทางห้องปฏิบัติการกลับเป็นปกติหลังจากหยุด โครเมียมพิกโคลิเนตและเข้ารับการรักษาเป็นเวลา 1 ปี (Carter et al., 1968)

การศึกษาพิษวิทยาของโครเมียมแบบ randomized clinical trials จำนวน 19 การทดลอง แต่ละการทดลองได้รับโครเมียมโดยการรับประทาน ขนาด 175 และ 1000 ไมโครกรัมต่อวันเป็นระยะเวลา 6 และ 64 สัปดาห์ ปรากฏว่าไม่พบ toxic effect นอกจากนี้ยังไม่พบการเกิด carcinogenicity จากการทำ autopsy ในผู้ป่วยหญิงรายหนึ่งซึ่งได้รับโครเมียมในสารอาหารทางหลอดเลือด (parenteral nutrition ) เป็นเวลา 21 ปี และในผู้ป่วยหญิงอีกรายซึ่งได้รับโครเมียมจากสารอาหารทางหลอดเลือด (parenteral nutrition) เป็นเวลา 27 ปี โดยผู้ป่วยทั้ง 2 ราย ได้รับ $CrCl_3$ 20 ไมโครกรัมต่อวัน (Mertz, 1992)

ในปัจจุบันยังไม่มีการสรุปแน่ชัดเกี่ยวกับผลกระทบที่อาจเกิดขึ้นจากการใช้ยาลดความอ้วน ดังนั้นการใช้ chromium หรือ chromium picolinate จึงควรใช้ภายใต้การดูแลของแพทย์ และใช้เมื่อจำเป็น ในขนาดไม่เกิน 50 – 200 ไมโครกรัมต่อวันเนื่องจากหากใช้ในขนาดสูงอาจทำให้เกิดพิษจากโครเมียมได้ ซึ่งอาการแสดงได้แก่ dizziness, intense thirs, abdominal pain, hemorrhagic gastroenteritis, yellow – green emesis, methemoglobinemia, anemia, hemolysis, thrombocytopenia,

liver dysfunction, renal failure, shock, oliguria หรือ anuria และอาจเสียชีวิตจาก uremia นอกจากนี้ โครเมียมยังอาจเป็นสารก่อมะเร็งได้อีกด้วย (Trumbo et al, 2001; Vincent, 2004)

## 2.2 ซิริซิน (sericin)

### 2.2.1 แหล่งที่พบซิริซิน

ซิริซินสกัดได้จากรังไหมที่ได้จากหนอนไหม *Bombyx mori* โดยโปรตีนซิริซินเป็นโปรตีนที่ถูกสร้างมาจากต่อมบริเวณส่วนกลางของลำตัวหนอนไหม มีคุณสมบัติเหนียวคล้ายกาวเคลือบอยู่บริเวณรอบ เส้นไหม ทำหน้าที่เคลือบ/ห่อหุ้มและเป็นกาวยึดเกาะเส้นใยไฟโบรอินให้คงสภาพเป็นรังไหมไว้ได้ (Zhang, 2002)

### 2.2.2 โครงสร้างและองค์ประกอบทางเคมีของซิริซิน

ซิริซินเป็นโปรตีนที่มีโมเลกุลขนาดใหญ่ มีน้ำหนักโมเลกุลระหว่าง 10 - 300 kDa ประกอบด้วยกลุ่มเคมีจำพวกกลุ่มไฮดรอกซิล (Hydroxyl group) กลุ่มคาร์บอนิล (Carbonyl group) และกลุ่มอะมิโน (Amino group) ซึ่งสามารถสร้างพันธะไฮโดรเจนที่แข็งแรงซึ่งส่งผลให้มีแรงยึดเหนี่ยวระหว่างโมเลกุลสูง โปรตีนซิริซินประกอบไปด้วยกรดอะมิโนถึง 18 ชนิด (ดังแสดงในตารางที่ 3) ที่พบมากได้แก่ เซอรีน (Serine) และกรดแอสปาติก (Aspartic acid) ซึ่งมีประมาณ 33.4 และ 16.7 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (Zhang, 2002)

**ตารางที่ 3** แสดงชนิดและปริมาณกรดอะมิโนที่มีในโปรตีนซิริซิน

| Amino acid | Assay (g/100g) | Amino acid | Assay (g/100g) |
|---|---|---|---|
| Serine | 33.40 | Valine | 2.80 |
| Aspartate | 16.70 | Histidine | 1.30 |
| Glutamate | 4.40 | Luecine | 1.10 |
| Glycine | 13.50 | Isoluecine | 0.70 |
| Threonine | 9.70 | Phenylalanine | 0.50 |
| Lysine | 3.30 | Trytophan | 0.20 |
| Tyrosine | 2.60 | Proline | 0.70 |
| Arginine | 3.10 | Cystine | 0.20 |
| Alanine | 6.00 | Methionine | 0.04 |

ที่มา : Nantong Dongchang Chemical Industrial (2002).

**2.2.3 การผลิตซิริซิน**

ซิริซินเป็นวัสดุเหลือทิ้ง (byproduct) จากอุตสาหกรรมผ้าไหม เนื่องมีการผลิตเส้นไหมจำเป็นต้องมีกระบวนการลอกกาวไหมหรือซิริซินจากรายงานการวิจัยพบว่าซิริซินและเส้นไหมมีประโยชน์และคุณสมบัติต่างๆ มากมาย จึงได้มีการคิดค้นวิธีการแปรรูปและพัฒนาการใช้ประโยชน์จากซิริซินและ เส้นไหมเพื่อเพิ่มมูลค่าโดยการนำมาใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมต่าง ๆ เช่น เครื่องสำอาง อาหาร การแพทย์ และอาหารเสริม

สกัดโปรตีนซิริซินเริ่มต้นจากน้ำทิ้งโรงงานอุตสาหกรรมไหม โดยน้ำทิ้งได้จากกระบวนการลอกกาวไหม ซึ่งส่วนประกอบของน้ำทิ้งประกอบด้วยเกลือและกรดไขมัน (soap) ปนอยู่ ในการศึกษาเป็นการศึกษาการแยกกรดไขมันด้วยวิธี Centrifugation (CFG) การตกผลึกที่อุณหภูมิต่ำ (LTC) Ultrafiltration (UF) (Ayguna & Gecita, 2009; Capar, Aygun, & Gecit, 2008) ที่แยกส่วนที่ไม่บริสุทธิ์โดยการนำไป centrifuge จากนั้นนำไปกรองโดยใช้ membrane ที่มีรูพรุนขนาดเล็ก เช่น Microfiltration (MF), Ultrafiltration (UF), และ Nanofiltration (NF) (Capar, Aygun, & Gecit, 2008)

การแยกซิริซินออกจากน้ำเสียโดยน้ำเสียได้จากอุตสาหกรรมไหม มีค่า BOD (4840 ml/L), COD (8870 mg/L) โดยใช้ Membrane filtration และ Enzymatic hydrolysis โดยโปรตีนที่ผ่านการสกัด จะมีมวลโมเลกุล 2427-9863 Da ซิริซินที่ได้สามารถนำไปใช้ในอุตสาหกรรมเครื่องสำอางได้ (Vaithanomsat & Kitpreechavanich, 2008) สกัดน้ำเสียจากโรงงานอุตสาหกรรมไหมโดยใช้ 75% (v/v) ethanol (Wu, Wang, & Xu, 2007)

**2.2.4 การใช้ประโยชน์จากโปรตีนซิริซิน**

2.2.4.1 ประโยชน์ด้านอุตสาหกรรมอาหาร

เนื่องจากโปรตีนซิริซินเป็นโปรตีนที่ใกล้เคียงกับโปรตีนในร่างกายมนุษย์ที่มีกรดอะมิโนที่จำเป็นต่อร่างกาย เช่น เซอรีน เป็นแหล่งสะสมน้ำตาล glucose ในตับและกล้ามเนื้อช่วยลดระดับน้ำตาลในเลือดในกรณีเป็นโรคเบาหวาน ส่วนทรีโอนีนช่วยป้องกันการเกิดไขมันในตับและควบคุมระบบการทำงานของร่างกายให้เป็นปกติ จึงมีการนำโปรตีนซิริซินมาเป็นสารปรุงแต่งอาหาร (Food Additive) ในอุตสาหกรรมอาหารเสริมและเครื่องดื่ม นอกจากนี้โปรตีนซิริซินยังใช้เป็นสารต้าน อนุมูลอิสระยับยั้งการเกิดออกซิเดชันของไขมันและยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์ไทโรซิเนส (Tyrosinase; polyphenol oxidase) ในอุตสาหกรรมการผลิตยา เครื่องสำอาง อาหาร สารเติมแต่งอาหารอีกด้วย (U.S.Patent No.6,165,982, 2000) (Kato et al., 1998)

**ตารางที่ 4** คุณสมบัติและหน้าที่ที่สำคัญของกรดอะมิโนในซิริซินที่มีประโยชน์ต่อร่างกาย

| ชนิดกรดอะมิโนในผงไหม | หน้าที่และคุณสมบัติ |
|---|---|
| Glycine | • ควบคุมระดับคอเลสเตอรอล<br>• ป้องกันและรักษาความดันโลหิตสูง<br>• ช่วยเสริมสร้างการทำงานของตับ |
| Alanine | • เป็นแหล่งพลังงานสำคัญต่อเนื้อเยื่อกล้ามเนื้อ,สมองและระบบประสาทส่วนกลาง<br>• ผลิต antibodies ที่ช่วยให้ระบบภูมิคุ้มกันดีขึ้น<br>• ช่วยในกระบวนการทำงานของน้ำตาลและกรดอินทรีย์ |
| Serine | • เป็นแหล่งในการสะสมน้ำตาล glucose ในตับและในกล้ามเนื้อ ช่วยส่งเสริมระบบการทำงานของ Insulin เป็นการลดน้ำตาลในเลือดซึ่งช่วยในการเผาผลาญไขมันที่สะสมในร่างกาย<br>• ช่วยในระบบภูมิคุ้มกันแข็งแรงขึ้น<br>• สังเคราะห์กรดไขมันล้อมรอบ nerve fibers |

ที่มา : (Kato et al., 1998)

นอกจากนี้ยังพบว่า ซิริซินและ hydrolyzed sericin ทนต่อการย่อยโดยเอนไซม์และสามารถป้องกันโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่ ใช้เป็นสารเติมแต่งในอาหารและเครื่องดื่ม รวมถึงผลิตภัณฑ์เสริมสุขภาพ ซึ่งไม่เพียงแต่มีประสิทธิภาพในการควบคุมน้ำหนักและป้องกัน/รักษาอาการท้องผูกเท่านั้น แต่ยังช่วย เร่งการดูดซึมแร่ธาตุของลำไส้และช่วยขับของเสียออกจากร่างกายอย่างรวดเร็ว โดยผงซิริซินที่ใช้ในการทดลองสกัดโดยน้ำร้อนเป็นเวลา 2 ชั่วโมง และ hydrolyze บางส่วนด้วยกรด ด่างหรือเอนไซม์ แยกซิริซินโดยการนำน้ำที่ได้จากการสกัดเติม methanol, ethanol หรือ dioxane เพื่อให้ตกตะกอนนำไปกรองโดยใช้ Ultrafiltration และแยกซิริซินโดยวิธี reverse osmosis และนำไปทำแห้ง (WIPO Patent No.20070275875, 2007)

**2.2.4.2 ประโยชน์ด้านอุตสาหกรรมเครื่องสำอาง**

เนื่องจากโปรตีนซิริซินมีคุณสมบัติในการดูดซึมน้ำได้ดี ติดกับเส้นผมและผิวหนังได้แน่น เป็นฟิล์มเคลือบผิวหนังและเส้นผมจึงช่วยป้องกันแสงอัลตร้าไวโอเลตได้ดี และเป็นสารแอนตี้ออกซิแดนซ์ (Antioxidant agent) โปรตีนซิริซินจึงถูกนำไปใช้เป็นส่วนผสมในเครื่องสำอาง (Une & Kusaki, 2003)

**2.2.4.3 ประโยชน์ด้านอุตสาหกรรมเส้นใยผ้า**

มีงานวิจัยการเคลือบผ้าด้วยโปรตีนซิริซินสามารถป้องกันการเกิดผื่นคันและอาการแพ้ได้ เหมาะสมกับผิวที่ไวต่อการสัมผัสโดยการนำเส้นใยสังเคราะห์จุ่มลงในสารละลายโปรตีนซิริซินที่มีความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ นำไปทำแห้งที่ 100 องศาเซลเซียส นาน 3 นาที แล้วจึงนำเส้นใยนั้นไปทอเพื่อตัดเย็บเป็นชุดสำหรับสวมใส่ต่อไป มีการนำไปใช้ในอุตสาหกรรมชุดชั้นในสตรีที่มีราคาแพง ผ้าอ้อมสำหรับเด็กทารกและผ้าพันแผล (Yamada & Fuwa, 1998)

**2.2.4.4 ประโยชน์ด้านวัสดุย่อยสลายทางชีวภาพ**

โปรตีนซิริซินสามารถย่อยสลายได้และไม่เป็นพิษต่อสิ่งแวดล้อม (Annamaria, Maria, Tollia, Silvio, & Orio, 1998) ได้ผสมโปรซิริซินลงในโพลิยูริเทนโฟม (Polyurethane foam) ซึ่งทำให้โฟมมีความสามารถในการดูดซับน้ำและความชื้นได้ดี การนำผงโปรตีนซิริซินไปละลายไปละลายในตัวทำละลายอินทรีย์ (Organic solvent) เช่นเตตระไฮโดรฟูแรน (Tetrahydrofuran)และไดออกเซน (Dioxane) ที่มีโพลีเอสเทอร์ โพลีออล (Polyesther polyol) เป็นส่วนประกอบ โปรตีนซิริซินจะทำปฏิกิริยากับโพลีไทโอไซยาเนท (Polysocyanate) ส่งผลให้ฟิล์มดังกล่าวสามารถย่อยสลายได้เองตามธรรมชาติ

**2.2.4.5 เยื่อเลือกผ่าน ( Membrane Materials )**

จากการทดลองที่ผ่านมาสามารถใช้โปรตีนซิริซินในการผลิตเยื่อเลือกผ่านเพื่อใช้ในกระบวนการสารประกอบที่ผสมกันอยู่ได้(Hirotsu & Nakajima, 1994) นำโปรตีนซิริซินชนิดที่ไม่ละลายน้ำไปผลิตเยื่อเลือกผ่าน พบว่า เยื่อเลือกผ่านที่ได้มีคุณสมบัติในการแยกของผสมระหว่างน้ำและแอลกอฮอล์ได้ แต่อย่างไรก็ดีเป็นการยากที่จะผลิตเยื่อเลือกผ่านจากโปรตีนซิริซินบริสุทธิ์ เนื่องจากกรดอะมิโนที่ประกอบในโครงสร้างของโปรตีนซิริซินมีน้ำหนักโมเลกุลและมีหมู่ function เป็น neutral polar จึงมีการนำ crosslink agent มาผสมหรือทำให้โปรตีนซิริซินเกิดการ copolymerized กับสารประกอบอื่นๆ ซึ่งส่งผลให้เยื่อเลือกผ่านที่มีโปรตีนซิริซินเป็นองค์ประกอบมีสมบัติในการชอบน้ำ (Hydrophilic) เยื่อเลือกผ่านที่ผลิตได้จึงมีความสามารถในการแยกน้ำออกจากสารละลายอินทรีย์ได้

**2.2.4.6 วัสดุชีวภาพเชิงหน้าที่ ( Functional biomaterials)**

พบว่าการนำโปรตีนซิริซินที่มีน้ำหนักโมเลกุลขนาดใหญ่ (เตรียมได้จากการนำรังไหมต้มในน้ำนาน 30 นาที) ผสมกับโพลีเมอร์ที่สามารถละลายในน้ำได้โดยเฉพาะอย่างยิ่ง โพลีไวนิลแอลกอฮอล์ (Polyvinyl alcohol: PVA) จากนั้นเกลี่ยลงแผ่นพลาสติก รอให้แห้งที่อุณหภูมิห้องใช้เวลาราว 24 ชั่วโมง เมื่อนำแผ่นฟิล์มที่ผลิตได้ไปวิเคราะห์คุณสมบัติด้วย x-ray diffraction และกล้องจุลทรรศน์อิเล็คตรอนชนิดส่องกราด พบว่าฟิล์มดังกล่าวมีโครงสร้างเป็นแบบ microphase-separated ที่มีความแข็งแรงและทนความร้อนได้ดี โดยฟิล์มที่ผลิตได้มีโปรตีนซิริซินเป็นส่วนผสมประมาณ 10-30 เปอร์เซ็นต์ (Ishikawa et al., 1987)

มีงานวิจัยที่ศึกษาการทำฟิล์มเคลือบจากโปรตีนซิริซินเพื่อใช้เคลือบผิวหน้าของเครื่องทำความเย็นเพื่อป้องกันการเกาะของน้ำแข็ง ซึ่งสามารถประยุกต์ใช้ได้อย่างกว้างขวางในระบบทำความเย็นต่างๆ เช่น ตู้เย็น ตู้แช่แข็ง อีกทั้งยังสามารถใช้เคลือบบนถนนและหลังคาเพื่อป้องกันอุบัติเหตุและยังง่ายต่อการกวาดหิมะด้วย (Tanaka et al., 1999)

**2.2.4.7 วัสดุชีวภาพทางการแพทย์ ( Medical biomaterial )**

Tsubouchi (1999) ได้พัฒนาวัสดุปิดรักษาผิวหนัง (wound dressing) ซึ่งมีทั้งโปรตีนซิริซินและไฟโบรอินเป็นส่วนประกอบในการรักษาบาดแผล พบว่า ช่วยให้แผลหายสนิทโดยไม่ก่อให้เกิดการหลุดลอกของผิวหนังเมื่อเปิดวัสดุปิดปากแผลออก ซึ่งเริ่มจากการศึกษาวัสดุปิดปากแผลที่เป็น non-crystalline fibroin film มีน้ำเป็นส่วนประกอบประมาณ 3-16 เปอร์เซ็นต์ และมีความหนาประมาณ 10-100 ไมโครเมตร

# บทที่ 3
# วิธีการดำเนินการวิจัย

## 3.1 การผลิตซิริซิน

### 3.1.1 การเตรียมรังไหมดิบ

รังไหมดิบสีขาวจากหนอนไหม *Bombyx mori* มาทำการตัดเพื่อนำดักแด้ออกจากรังไหมดิบ จากนั้นทำความสะอาดด้วยการกำจัดเศษสิ่งสกปรกต่างๆ ที่ไม่ต้องการออกจากรังไหมดิบ ลดขนาดรังไหมดิบด้วยการตัดย่อยรังไหมดิบให้มีขนาดประมาณ 1x1 cm

### 3.1.2 การเตรียมตัวอย่างผงโปรตีนซิริซิน

- การสกัดแยกโปรตีนซิริซิน

นำรังไหมดิบที่ผ่านกระบวนการลดขนาดและทำความสะอาดมาทำการสกัดโปรตีนซิริซินออกด้วยน้ำกลั่น ตามกระบวนการที่ได้ยื่นจดสิทธิบัตรไว้ (กรรมวิธีการสกัดโปรตีนซิริซิน เลขที่คำขอ 080595) โดยทำการสกัดภายใต้ความดันและความร้อนสูงภายในหม้อนึ่งความดัน ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นำตัวอย่างที่ผ่านการสกัดมาแยกระหว่างส่วนของรังไหมและน้ำต้มรังไหมออกจากกัน นำน้ำต้มรังไหมที่ได้มาวิเคราะห์หาปริมาณของแข็งทั้งหมดและทำแห้ง

- การทำแห้งโปรตีนซิริซิน

นำน้ำต้มรังไหมที่ได้จากการสกัดไปทำแห้งด้วยเครื่องทำแห้งทรงกระบอก (Drum dryer) โดยให้พื้นผิวของลูกกลิ้งมีอุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส และมีความเร็วรอบ 85-95 รอบต่อนาที จากนั้นนำตัวอย่างซิริซินที่ผ่านการทำแห้งมาทำการบดด้วยเครื่องปั่น เพื่อลดขนาดของตัวอย่างให้มีอนุภาคเล็กลงแล้วจึงนำโปรตีนซิริซินมาคัดขนาดด้วยการใช้ตะแกรงร่อน

## 3.2 การศึกษาผลของซิริซินต่อการดูดซึม โครเมียมพิโคลิเนตในเซลล์ลำไส้เพาะเลี้ยง

### 3.2.1วิธีการทดลอง

**3.2.1.1 การเพาะเลี้ยงเซลล์ลำไส้ Caco-2** เลี้ยง Caco-2 cells ใน culture flask ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM/F12 ที่มี 10% fetal bovine serum (FBS) และ 1% penicillin-streptomycin ใน incubator 37 $^{\circ}$C และ 5%$CO_2$ หลังจากเซลล์โตทั่วจานเลี้ยง ทำการ subculture ทุกๆ 3-4 วัน โดย detach เซลล์ด้วย 0.25% trypsin ใน $Ca^{2+}$-, $Mg^{2+}$-free phosphate buffer (PBS) ที่มี 0.2 g/L EDTA

**3.2.1.2 การตรียมสารละลายโปรตีนซิริซิน** ละลายซิริซิน ใน phosphate buffer saline pH 7.4 ความเข้มข้น 20 mg/ml จากนั้นผ่านกระบวนการฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอ อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 15 นาที ทิ้งไว้ให้เย็นแล้วนำไปทดสอบกับเซลล์

**3.2.1.3 การเตรียมสารละลายโครเมียมพิโคลิเนต (Chromium picolinate)** สกัดโครเมียมพิโคลิเนต จากรูปแบบเม็ดซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์เสริมอาหารโครเมียมพิโคลิเนต GNC (Nutra manufacturing Inc., USA)ขนาด 200 μg/เม็ด โดยนำผลิตภัณฑ์เสริมอาหารโครเมียม 5 เม็ด บดและละลายในน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรในขวดปรับปริมาตร 25 ml จนได้ความเข้มข้น 40 mg/l (40 ppm) แล้วนำไปกรองด้วย 0.45 μm membrane

**3.2.1.4 การทดสอบ cell viability** เลี้ยงเซลล์ใน 96 well plate 10,000 cells/well เลี้ยงไว้ใน $CO_2$ incubator 1 วัน จากนั้นเปลี่ยนเป็นอาหารที่ไม่มี FBS ร่วมกับ chromium picolinate หรือซิริซินที่ความเข้มข้นที่ต้องการทดสอบ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ก่อนครบกำหนด 2 ชั่วโมง เติมสารละลาย 0.5% MTT 10 μl ใน medium ทำใน laminar air flow เก็บเซลล์ใน $CO_2$ incubator เมื่อครบ 24 ชั่วโมง ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ออกให้หมด เติมสารละลาย DMSO-EtOH (1:1 v/v) 200 μl/well บ่มไว้ที่ $37^0$ C ประมาณ 5-10 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วย Spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 595 nm

**3.2.1.5 การดูดซึมโครเมียมพิโคลิเนตในเซลล์ลำไส้เพาะเลี้ยง** เลี้ยง Caco-2 cells ใน insert well ขนาด 6 well plate โดยเปลี่ยนอาหารทุก ๆ 3-4 วันเป็นเวลานาน 2-3 สัปดาห์ เพื่อให้เซลล์มีการพัฒนาเลียนแบบเซลล์ผนังลำไส้เล็ก 1 วันก่อนทำการทดลองการดูดซึม เปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์เป็นอาหารที่ไม่มี FBS ที่มีโครเมียมพิโคลิเนตความเข้มข้น 10 ppm ในอาหารเลี้ยงเซลล์ส่วนบน (apical side) แล้วเลี้ยงต่อใน $CO_2$ incubator จากนั้นทำการเก็บอาหารส่วนข้างล่าง (basal side) ที่เวลา 1, 3, 24, 48, 72 ชั่วโมง เพื่อนำไปวัดปริมาณโครเมียมพิโคลิเนต ที่ถูกดูดซึมผ่านเซลล์มาจาก apical side การทดสอบผลของซิริซินต่อการดูดซึมโครเมียมพิโคลิเนต ให้เติมซิริซินที่ความเข้มข้นต่างๆ ร่วมกับโครเมียมพิโคลิเนต

**3.2.1.6 การวิเคราะห์ปริมาณโครเมียมด้วยเครื่อง Atomic absorption ทำการวัดความเข้มข้นของโครเมียมด้วยเครื่อง** Atomic absorption (Variant 220) โดยทำการเปรียบเทียบกับสารละลายโครเมียมมาตรฐาน (AOAC Official Method 947.27)

## 3.3 การศึกษาผลของซิริซินต่อการดูดซึม โครเมียมพิโคลิเนตในลำไส้หนู

### 3.3.1 ระเบียบวิธีวิจัย

#### 3.3.1.1 สัตว์ทดลอง

หนูสายพันธุ์ Sprague-Dawley เพศผู้ อายุ 9 สัปดาห์ จำนวน 61 ตัว จากสำนักสัตว์ทดลองแห่งชาติศาลายา มหาวิทยาลัยมหิดล นำมาเลี้ยงที่ห้องควบคุมแสง light-dark cycle เท่ากับ 12:12 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 25 ± 1 องศาเซลเซียส และควบคุมไฟให้เปิดในช่วงเวลา 6.00 – 18.00 น. หนูทดลองได้รับอาหารและน้ำอย่างเพียงพอตลอดการทดลองขั้นตอนการใช้สัตว์ทดลองจะดำเนินการตามข้อกำหนดจรรยาบรรณการใช้สัตว์เพื่องานทางวิทยาศาสตร์ (สภาวิจัยแห่งชาติ สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ)

#### 3.3.1.2 การศึกษาการดูดซึมของโครเมียมในหนูแรท

การทดลองนี้ใช้ Chromium Picolinate (CrPic) แบ่งหนูแรทเพศผู้ออกเป็น 6 กลุ่ม จำนวนกลุ่มละ 6 ตัวดังนี้ กลุ่มที่ 1 เป็นกลุ่มควบคุม ได้รับน้ำกลั่นในปริมาตร 1 มิลลิลิตรต่อตัว กลุ่มที่ 2 ได้รับสารละลายโครเมียมที่มีความเข้มข้น 300 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัมของน้ำหนักตัว ในปริมาตร 1 มิลลิลิตร กลุ่มที่ 3, 4 และ 5 ได้รับสารละลายโครเมียมที่มีความเข้มข้น 300 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัมของน้ำหนักตัวเท่ากัน และผสมสารละลาย sericin ที่มีความเข้มข้น 1, 10 และ100 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมของน้ำหนักตัว ในปริมาตร 1 มิลลิลิตรตามลำดับ โดยสัตว์ทดลองจะได้สารด้วยวิธีป้อนทางปากเพียงครั้งเดียว จากนั้นจะเก็บตัวอย่างเลือดจำนวน 5 ครั้ง หลังจากสัตว์ทดลองได้รับสารละลายต่างๆ ไปแล้วภายในระยะเวลา 24 ชั่วโมงทุกกลุ่ม จากนั้นนำเลือดไปวิเคราะห์หาปริมาณธาตุโครเมียม

#### 3.3.1.3 การทดสอบผลของ sericin ในการดูดซึมโครเมียม

แบ่งหนูทดลองออกเป็น 6 กลุ่มๆ ละ 6 ตัว ดังนี้

กลุ่มที่ 1 เป็นกลุ่มควบคุม ได้รับน้ำกลั่นในปริมาตร 1 มิลลิลิตรต่อตัว

กลุ่มที่ 2, 3, 4, 5, 6 เป็นกลุ่มทดลองโดยได้รับสารสูตรต่างๆ กันแล้วผสมด้วยน้ำกลั่นในปริมาตร 1 มิลลิลิตรต่อตัว

กลุ่มที่ 2 Sericin 100 mg/kg BW/day

กลุ่มที่ 3 CrPic 300 µg/kg BW/day

กลุ่มที่ 4 CrPic 300 µg/kg BW + Sericin 1 mg/kg BW/day

กลุ่มที่ 5 CrPic 300 µg/kg BW + Sericin 10 mg/kg BW/day

กลุ่มที่ 6 CrPic 300 µg/kg BW + Sericin 100 mg/kg BW/day

โดยสัตว์ทดลองจะได้สารด้วยวิธีป้อนทางปากติดต่อกันทุกวัน วันละครั้ง ช่วงเวลาเช้านาน เป็นเวลา 8 สัปดาห์

- **ศึกษาอัตราการเจริญเติบโต**

โดยการชั่งน้ำหนักหนูก่อนการทดลองและเมื่อสิ้นสุดการทดลอง และชั่งน้ำหนักอาหารที่สัตว์ทดลองกินอาหารเข้าไปต่อวัน ตามวิธีของ (Zha, Wang, Xu, & Gu, 2007)

- **การทดสอบผลทางเคมีคลินิก**

เมื่อสิ้นสุดการทดลองทำการเก็บเลือดจากสัตว์ทดลองไปส่งตรวจหาปริมาณของ Glucose, Blood Urea Nitrogen (BUN), Cholesterol, Triglyceride (TG), High Density Lipoprotein (HDL), Low Density Lipoprotein(LDL), Total Protein (TP) โดยการส่งตรวจที่ห้องปฏิบัติการเมดสตาร์ (MED STAR Lab) ที่ผ่านการรับรองความสามารถตามมาตรฐาน ISO 15189 : 2007) ตามวิธีของ (Zha, Wang, Xu, & Gu, 2007)

- **การทดสอบปริมาณของโครเมียมที่สะสมอยู่ในอวัยวะภายใน**

ตัดอวัยวะภายในได้แก่ ตับและไตจากสัตว์ทดลองนำไปวิเคราะห์หาปริมาณของโครเมียมที่สะสมในตับและไต จากนั้นทำการวิเคราะห์หาปริมาณของโครเมียมด้วยเครื่อง Inductively coupled plasma-Mass spectrometry (ICP-MS) และส่งตัวอย่างตรวจที่ห้องปฏิบัติการกลาง (ประเทศไทย) ที่ผ่านการรับรองความสามารถตามมาตรฐาน ISO/IEC 17025 ตามวิธีของ (Anderson et al., 1996)

- **การตรวจพยาธิสภาพของอวัยวะภายในและเนื้อเยื่อไขมันบริเวณหน้าท้อง**

ตัดอวัยวะภายในของสัตว์ทดลองเพื่อดูความผิดปกติของอวัยวะและชั่งน้ำหนักเพื่อเปรียบเทียบความแตกต่างของแต่ละกลุ่ม และนำเนื้อเยื่อไขมันบริเวณหน้าท้องชั่งน้ำหนักเพื่อทำการเปรียบเทียบจากนั้นนำมาแช่ใน 10 เปอร์เซ็นต์ฟอร์มาลิน ทำการตัดชิ้นเนื้อให้เป็นชิ้นเล็กๆ ด้วยใบมีดผ่าตัดให้หนาไม่เกิน 3 มม. และผ่านขั้นตอนการเตรียมชิ้นเนื้อ นำไปย้อมด้วย Hematoxylin และ Eosin (H&E) เพื่อศึกษาพยาธิสภาพ ตามวิธีของ (ปราณี ชวลิตธำรง, ทรงพล ชีวะพัฒน์, & สมเกียรติ ปัญญามัง, 2001)

## 3.4 การวิเคราะห์ข้อมูล

ข้อมูลที่ได้จากทุกการทดลอง จะแสดงค่า mean ± SD และนำมาทดสอบความแตกต่างทางสถิติด้วย one way analysis of variance (ANOVA) และวัดค่าความแตกต่างระหว่างกลุ่มโดยใช้ LSD test ทดสอบค่าความแตกต่างทางสถิติและค่าระดับความเชื่อมั่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ $p<0.05$

# บทที่ 4
# ผลการทดลอง

## 4.1 ผลของซิริซินต่อการดูดซึม โครเมียมพิโคลิเนตในเซลล์ลำไส้เพาะเลี้ยง

### 4.1.1 ผลของโครเมียมพิโคลิเนตต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ Caco-2

ในเบื้องต้นได้ทดสอบผลของ chromium picolinate ที่ความเข้มข้นต่างๆ ต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ เพื่อช่วยในการเลือกความเข้มข้นที่ปลอดภัยในการศึกษาการดูดซึมของ chromium picolinate ต่อไป ซึ่งผลการทดลองเป็นไปตามคาดหมายว่า chromium picolinate ไม่มีอันตรายต่อเซลล์ ในทุกความเข้มข้นที่ทำการทดสอบดังที่แสดงในตารางที่ 5 โดยค่า cell viability จะประมาณ 100% ใกล้เคียงกับกลุ่มควบคุม ซึ่งเป็นเซลล์ที่มีการเติมอาหารเลี้ยงเซลล์แทนสารละลาย chromium picolinate

ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า chromium picolinate เป็นสารที่มีความปลอดภัยต่อเซลล์ Caco-2 เนื่องจากการทดลองส่วนนี้ เป็นการ screen เบื้องต้นเพื่อเลือกความเข้มข้นของ chromium picolinate ที่จะนำไปใช้ต่อไปเท่านั้น ผู้วิจัยจึงทำการทดลองซ้ำเพียง 2 ครั้งซึ่งยังคงสามารถให้ความมั่นใจต่อความปลอดภัยต่อเซลล์ Caco-2 ได้ เนื่องจากในการทดลองแต่ละครั้งมีการทำซ้ำหลาย wells เพื่อยืนยันผลการทดลอง

**ตารางที่ 5** ผลของโครเมียมพิโคลิเนตต่อ cell viability ของ Caco-2 cells

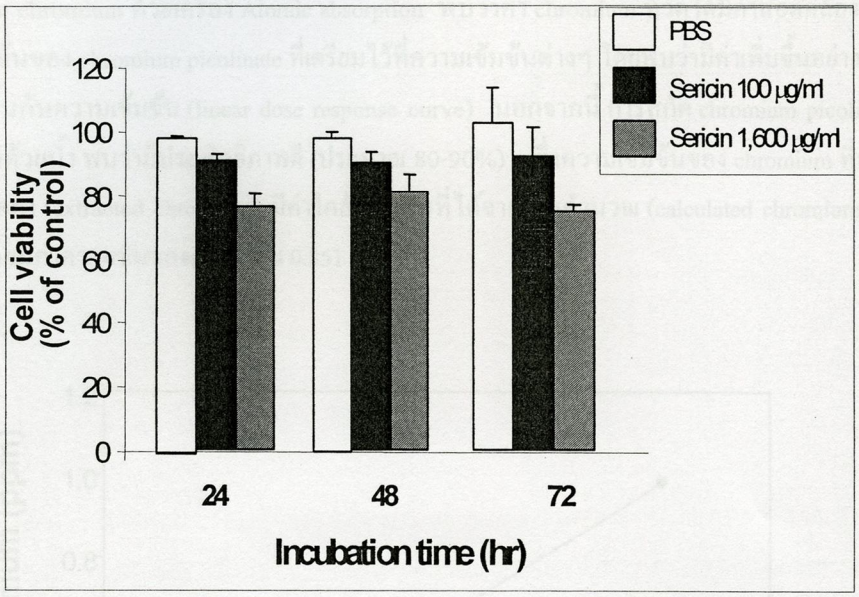
| ความเข้มข้น chromium picolinate (ppm) | Cell viability (% of control) | |
|---|---|---|
| | ครั้งที่ 1 | ครั้งที่ 2 |
| 0 | 107.89 | 102.76 |
| 0.5 | 108.86 | - |
| 1 | 109.9 | 105.1 |
| 1.5 | 110.5 | - |
| 2 | 104.7 | 105.06 |
| 4 | 105.04 | 114.11 |
| 8 | - | 103.6 |

**หมายเหตุ** - การทดลองครั้งที่ 1 ทำซ้ำ 4 wells, การทดลองครั้งที่ 2 ทำซ้ำ 2 wells

- Chromium picolinate ที่ 0 ppm คือ น้ำ ซึ่งใช้เป็นตัวทำละลาย
- กลุ่มควบคุม (100% cell viability) คือ เติมอาหารเลี้ยงเซลล์แทนสารละลาย chromium picolinate

**4.1.2 ผลของซิริซินต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ Caco-2**

ผลการทดลองนี้เป็นการทดสอบผลของซิริซินต่อการเจริญเติบโตของ Caco-2 cells โดยทำการทดลองด้วยการเลี้ยงเซลล์ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีซิริซินที่ความเข้มข้นต่างๆ ตั้งแต่ 0-1600 μg/ml เป็นเวลานาน 24, 48 และ 72 ชม. โดยผลการทดลองนี้ แสดงผลของซิริซิน บี (sericin B) ที่ความเข้มข้น 100 และ 1600 μg/ml และวิเคราะห์จำนวนเซลล์ที่ยังมีชีวิตอยู่ (cell viability) หลังจากการเลี้ยงด้วยซิริซินด้วยวิธี MTT assay และคำนวณเปรียบเทียบกับเซลล์กลุ่มควบคุมที่ไม่มีซิริซิน ผลการทดลองดังรูปที่ 3 พบว่าซิริซิน บี ที่ความเข้มข้นต่ำ (100 μg/ml) ไม่มีผลต่อ cell viability ของ Caco-2 cells ส่วนซิริซินที่ความเข้มข้นสูง 1600 μg/ml มีผลลด cell viability เล็กน้อยประมาณ 20%



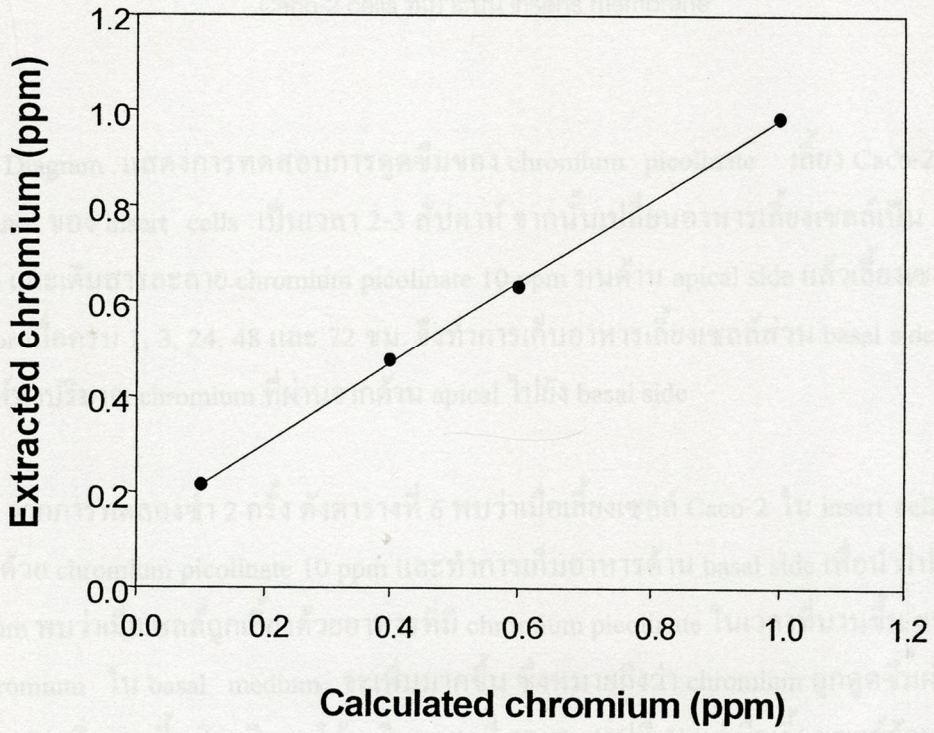

**รูปที่ 3** ผลของซิริซิน บี ต่อ cell viability ของ Caco-2 cells เลี้ยง Caco-2 cells ใน 96 well plate ในอาหารที่มีซิริซิน บี ความเข้มข้น 100 และ 1600 µg/ml ในระยะเวลา 24 ชั่วโมง, 48 ชั่วโมง และ 72 ชั่วโมง

แม้ว่าซิริซิน บี ที่ความเข้มข้นสูงจะมีผลต่อเซลล์เล็กน้อย แต่ในการทดสอบ cell viability นี้ใช้ Caco-2 อายุ 24 ชม. ซึ่งเป็น non-differentiated cells แตกต่างจาก การทดสอบการดูดซึมของสาร ซึ่งใช้ differentiated Caco-2 cell อายุ 2-3 สัปดาห์ ที่เจริญอย่างหนาแน่นจนพัฒนาเป็น monolayer ที่เลียนแบบ epithelial cells ที่ brush border ของผนังลำไส้เล็ก ซึ่ง differentiated Caco-2 cell นี้มีความทนต่อสารต่างๆได้ดีกว่า แต่การทดสอบ cell viability ใน differentiated cells มีความจำกัด เนื่องจากเซลล์หนาแน่นมาก ค่าที่วัดได้จาก MTT จึงจะไม่เห็นความแตกต่างกันระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่ม treatment อย่างไรก็ตาม จากการสังเกตพบว่า ซิริซิน บี ที่ความเข้มข้นสูงไม่มีผลต่อการเจริญเติบโตของเซลล์

**4.1.3 การวิเคราะห์ปริมาณ chromium**

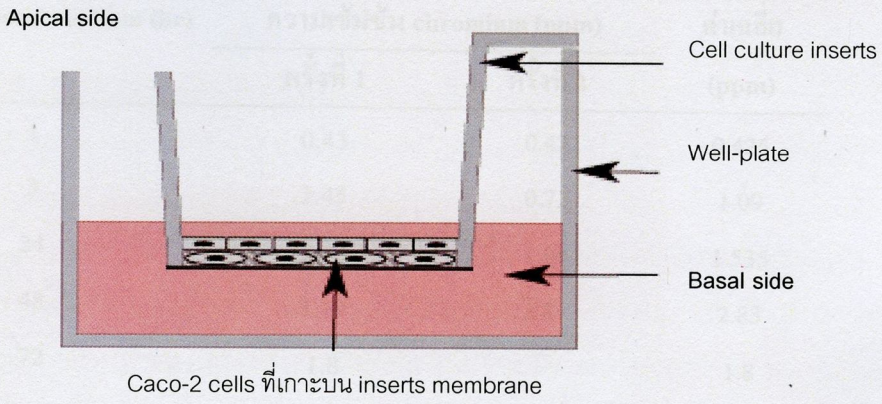
เนื่องจาก chromium picolinate ที่ใช้ในการทดลองนี้ เป็นการเตรียมโดยการสกัดออกจาก *ผลิตภัณฑ์เสริมอาหารชนิดเม็ดด้วยการละลายในน้ำ เพื่อให้แน่ใจว่าสามารถละลาย chromium* picolinate ออกจากเม็ดผลิตภัณฑ์ได้ และเพื่อให้ทราบความเข้มข้นของ chromium picolinate ที่แน่นอนเพื่อจะนำไปใช้ต่อไป ผู้วิจัยได้เตรียมเป็นสารละลาย chromium picolinate ที่สกัดได้ที่ความ

เข้มข้นต่างๆ เพื่อนำไปวิเคราะห์หาปริมาณ chromium จากผลการทดลอง (รูปที่ 4) โดยการวิเคราะห์หาปริมาณ chromium ด้วยเครื่อง Atomic absorption พบว่าค่า chromium ที่วัดได้มีค่าสอดคล้องตามความเข้มข้นของ chromium picolinate ที่เตรียมไว้ที่ความเข้มข้นต่างๆ โดยพบว่ามีค่าเพิ่มขึ้นอย่างเป็นเส้นตรงขึ้นกับความเข้มข้น (linear dose response curve) นอกจากนี้ การสกัด chromium picolinate จากเม็ดยาด้วยน้ำ พบว่ามีประสิทธิภาพดี (ประมาณ 80-90%) ซึ่งความเข้มข้นของ chromium ที่สกัดได้จากเม็ดยา (extracted chromium) มีค่าใกล้เคียงกับที่ได้จากการคำนวณ (calculated chromium) ดังรูปที่ 4 โดยมีค่าความชันของกราฟเป็น 0.851




**รูปที่ 4** การวิเคราะห์ปริมาณของ chromium picolinate ที่สกัดได้จากผลิตภัณฑ์เสริมอาหารชนิดเม็ด เมื่อเปรียบเทียบกับความเข้มข้นที่ได้จากการคำนวณ

**การดูดซึมของ Chromium picolinate ผ่านชั้นของ differentiated Caco-2 cells**



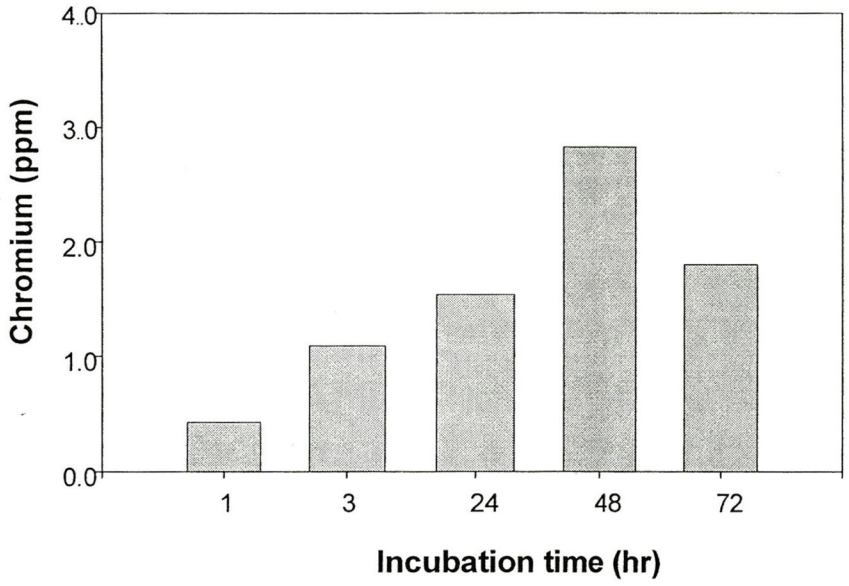

**รูปที่ 5** Diagram แสดงการทดสอบการดูดซึมของ chromium picolinate เลี้ยง Caco-2 cell บน membrane ของ insert cells เป็นเวลา 2-3 สัปดาห์ จากนั้นเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์เป็น serum-free medium และเติมสารละลาย chromium picolinate 10 ppm บนด้าน apical side แล้วเลี้ยงเซลล์ใน $CO_2$ incubator เมื่อครบ 1, 3, 24, 48 และ 72 ชม. จึงทำการเก็บอาหารเลี้ยงเซลล์ส่วน basal side เพื่อนำไปวิเคราะห์หาปริมาณ chromium ที่ผ่านจากด้าน apical ไปยัง basal side

จากการทดลองซ้ำ 2 ครั้ง ดังตารางที่ 6 พบว่าเมื่อเลี้ยงเซลล์ Caco-2 ใน insert cells ดังแสดงข้างต้น ด้วย chromium picolinate 10 ppm และทำการเก็บอาหารด้าน basal side เพื่อนำไปวัดปริมาณ chromium พบว่าเมื่อเซลล์ถูกเลี้ยงด้วยอาหารที่มี chromium picolinate ในเวลาที่นานขึ้น ความเข้มข้นของ chromium ใน basal medium จะเพิ่มมากขึ้น ซึ่งหมายถึงว่า chromium ถูกดูดซึมผ่านชั้นของ Caco-2 cells เพิ่มมากขึ้น โดยมีแนวโน้มเพิ่มสูงสุดที่ 48 ชม. (รูปที่ 5) แต่เมื่อเลี้ยงเซลล์ด้วย chromium picolinate นาน 72 ชม. ความเข้มข้นของ chromium ใน basal medium มีค่าลดลง ซึ่งอาจหมายถึงการอิ่มตัวในการดูดซึมของ chromium อย่างไรก็ตาม การทดลองที่ 72 ชม. นี้ เป็นผลมาจากการทดลองเพียงครั้งเดียว

นอกจากการวัดปริมาณ chromium จากส่วนของ basal medium แล้ว ได้ทำการเก็บเซลล์และเตรียมเป็น cell lysate และนำไปวัดปริมาณของ chromium ที่อาจถูกเก็บไว้ภายในเซลล์ จากผลการทดลอง เป็นที่น่าแปลกใจที่พบระดับของ chromium ภายในเซลล์ต่ำมาก ซึ่งอาจเป็นเพราะ chromium ion จับอยู่กับโปรตีนภายในเซลล์อย่างแน่นหนาในรูปของ protein-bound complexes จึงทำให้ไม่สามารถวัดปริมาณได้ด้วยวิธีการวิเคราะห์นี้

**ตารางที่ 6** การดูดซึมของ chromium picolinate ผ่าน Caco-2 cells

| เวลาที่เก็บ basal medium (hr) | ความเข้มข้น chromium (ppm) | | ค่าเฉลี่ย |
|---|---|---|---|
| | ครั้งที่ 1 | ครั้งที่ 2 | (ppm) |
| 1 | 0.43 | 0.42 | 0.425 |
| 3 | 1.45 | 0.73 | 1.09 |
| 24 | 2.03 | 1.04 | 1.535 |
| 48 | 1.79 | 3.87 | 2.83 |
| 72 | 1.8 | - | 1.8 |
| Cell lysate | -0.84 | 0.54 | -0.15 |




**รูปที่ 6** การดูดซึมของ chromium picolinate ผ่าน Caco-2 cell เมื่อเลี้ยงเซลล์ด้วย chromium picolinate 10 ppm บนด้าน apical side และเมื่อครบ 1, 3, 24, 48 และ 72 ชม. จึงทำการเก็บอาหารเลี้ยงเซลล์ส่วน basal side เพื่อนำไปวิเคราะห์หาปริมาณ chromium (ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ยจาก 2 การทดลอง ยกเว้นที่ 72 ชม. ที่เป็นค่าจากการทดลองเพียงครั้งเดียว)

**ผลของซิริซิน บี ต่อการดูดซึมของ Chromium picolinate**

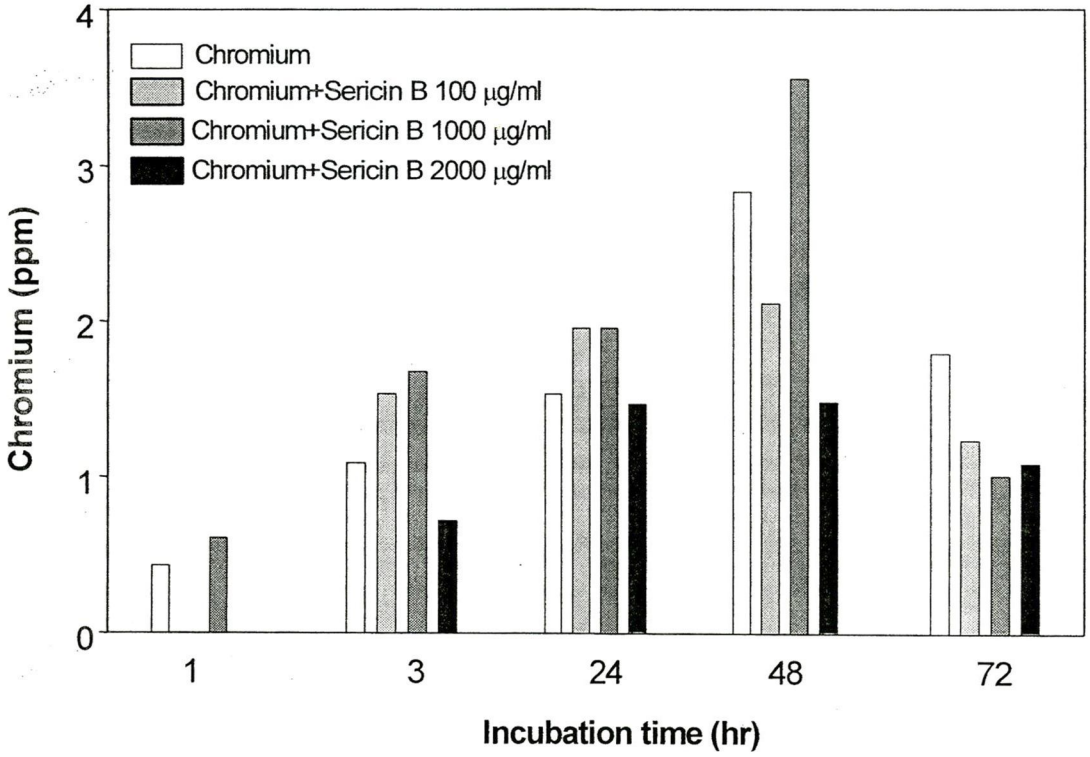
ในการทดสอบผลของซิริซินต่อการดูดซึม chromium picolinate ซิริซินที่ใช้ในการทดลองนี้คือ ซิริซิน บี (MW 76-132 kDa) โดยเลี้ยงเซลล์ Caco-2 ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มี chromium picolinate 10 ppm ร่วมกับซิริซิน บี ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ดังผลการทดลองในตารางที่ 7 และรูปที่ 6

จากผลการทดลอง พบว่าซิริซิน บี ที่ความเข้มข้น 100 และ 1000 μg/ml มีแนวโน้มที่จะเพิ่มการดูดซึมของ chromium picolinate ได้ ในช่วงระยะเวลาที่เซลล์ถูกเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มี chromium picolinate และซิริซิน บี ไม่เกิน 24 ชม. (รูปที่ 6) แต่เมื่อระยะเวลานานขึ้น จะพบว่าซิริซินอาจมีผลทำให้การดูดซึมของ chromium picolinate ลดลง ส่วนซิริซิน บี ที่ความเข้มข้นสูง 2000 μg/ml พบว่าไม่มีผลเพิ่มการดูดซึม แต่ผลเป็นไปในทางตรงกันข้าม คือ ลดการดูดซึมของ chromium picolinate ในทุกช่วงเวลาที่ทำการทดสอบ

**ตารางที่ 7** ผลของซิริซิน บี ต่อการดูดซึมของ chromium picolinate

| เวลาที่เก็บ basal medium (hr) | ความเข้มข้น chromium (ppm) | | | |
|---|---|---|---|---|
| | ซิริซิน 0 mg/ml | ซิริซิน 100 mg/ml | ซิริซิน 1000 mg/ml | ซิริซิน 2000 mg/ml |
| 1 | 0.425 | -0.205 | 0.600 | -0.130 |
| 3 | 1.090 | 1.535 | 1.680 | 0.720 |
| 24 | 1.535 | 1.955 | 1.955 | *1.470* |
| 48 | 2.830 | 2.115 | 3.555 | 1.485 |
| 72 | *1.800* | *1.240* | *1.010* | *1.090* |

**หมายเหตุ** ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ยจาก 2 การทดลอง ยกเว้นค่าที่พิมพ์เป็นตัวเอียง มาจาก 1 การทดลอง




**รูปที่ 7** ผลของซิริซิน บี ต่อการดูดซึมของ chromium picolinate ผ่าน Caco-2 cell เมื่อเลี้ยงเซลล์ด้วย chromium picolinate 10 ppm บนด้าน apical side ร่วมกับซิริซิน บี ความเข้มข้น 100, 1000 และ 2000 µg/ml และเมื่อครบ 1, 3, 24, 48 และ 72 ชม. จึงทำการเก็บอาหารเลี้ยงเซลล์ส่วน basal side เพื่อนำไปวิเคราะห์หาปริมาณ chromium (ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ยจาก 2 การทดลอง ยกเว้นที่ 72 ชม. ที่เป็นค่าจาก 1 การทดลอง)

## 4.2 การศึกษาผลของซิริซินต่อการดูดซึม โครเมียมพิโคลิเนตในลำไส้หนู

**ตารางที่ 8** เปรียบเทียบปริมาณโครเมียมในเลือดของหนูกลุ่มควบคุม และหนูกลุ่มที่ได้รับ CrPic และ CrPic ร่วมกับ Sericin ที่ความเข้มข้นต่างๆ หลังจากป้อนสารละลายไปแล้วภายในระยะเวลา 25 ชั่วโมง

| Treatment | ความเข้มข้นของโครเมียม (µg/ml) | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | 5 hr | 10 hr | 15 hr | 20 hr | 25 hr |
| Control | 0.61 | 0.53 | 0.51 | 0.49 | 0.49 |
| CrPic 300 µg/kg | 0.72 | 0.59 | 0.46 | 0.37 | 0.003 |
| CrPic 300 µg/kg + Sericin 1 mg/kg | 0.78 | 0.59 | 0.58 | 0.49 | 0.004 |
| CrPic 300 µg/kg + Sericin 10 mg/kg | 0.25 | 0.02 | 0.005 | 0.004 | 0.003 |
| CrPic 300 µg/kg + Sericin 100 mg/kg | 0.15 | 0.12 | 0.03 | 0.01 | 0.007 |

หมายเหตุ ค่าการทดลองที่ได้มาจากเลือดของหนูหนึ่งตัวที่ทำการเก็บในแต่ละช่วงเวลา

ตารางที่ 8 แสดงปริมาณของโครเมียมในกระแสเลือดของกลุ่มควบคุมเมื่อเวลาผ่านไป 24 ชั่วโมง มีมากกว่ากลุ่มที่ได้รับ CrPic และ CrPic ร่วมกับ Sericin ส่วนกลุ่มที่ได้รับ CrPic และ CrPic ร่วมกับ Sericin 1 mg/kg มีลักษณะการกระจายตัวของโครเมียมเหมือนกันคือเมื่อเวลาผ่านไป 24 ชั่วโมง ปริมาณของโครเมียมจะเหลือน้อยมากเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม กลุ่มที่มีการกระจายตัวของโครเมียมเข้าสู่ร่างกายได้เร็ว คือเมื่อเวลาผ่านไป 15 ชั่วโมง จะเหลือปริมาณของโครเมียมในกระแสเลือดน้อยมากคือกลุ่มที่ได้รับ CrPic ร่วมกับ Sericin ที่ความเข้มข้น 10 และ 100 mg/kg และกลุ่มที่มีการกระจายตัวของโครเมียมได้มากที่สุด คือกลุ่มที่ได้รับ CrPic ร่วมกับ Sericin ที่มีความเข้มข้น 10 mg/kg เนื่องจากเมื่อเวลาผ่านไป 15 ชั่วโมง พบปริมาณของโครเมียมในกระแสเลือดน้อยที่สุดเมื่อเทียบกับกลุ่มอื่นที่ทำการทดลองในช่วงเวลาเดียวกัน

**ตารางที่ 9** เปรียบเทียบอัตราการเจริญเติบโต และการใช้อาหารของหนูกลุ่มควบคุม หนูกลุ่มที่ได้รับ Sericin CrPic และ CrPic ร่วมกับ Sericin ที่มีความเข้มข้นแตกต่างกันเป็นเวลานาน 8 สัปดาห์

| Item | Control | Sericin 100 mg/kg | CrPic 300 µg/kg | CrPic 300 µg/kg Sericin 1 mg/kg | CrPic 300 µg/kg Sericin 10 mg/kg | CrPic 300 µg/kg Sericin 100 mg/kg |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Initial body weight (g) | 330.00 ± 15.49 | 325.00 ± 20.74 | 341.67 ± 16.02 | 325.00 ± 30.82 | 355.00 ± 22.58 | 336.67 ± 18.62 |
| Final body weight (g) | 451.67 ± 18.35 | 431.67 ± 21.37 | 445.00 ± 24.29 | 423.33 ± 42.27 | 430.00 ± 55.14 | 430.00 ± 33.47 |
| Daily food intake (g/d) | 19.76 ± 1.42 | 18.57 ± 0.93 | 19.52 ± 1.73 | 18.93 ± 1.42 | 18.81 ± 0.81 | 18.45 ± 0.75 |

Values are expressed as mean ± SD $*p < 0.05$; Six rats per group.

การกินอาหารของแต่ละกลุ่มไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ และเมื่อสิ้นสุดการทดลอง น้ำหนักของแต่ละกลุ่มก็ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ แต่มีแนวโน้มที่จะเริ่มลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (ตารางที่ 9)

**ตารางที่ 10** เปรียบเทียบน้ำหนักอวัยวะภายในของหนูกลุ่มควบคุม หนูกลุ่มที่ได้รับ Sericin CrPic และ CrPic ร่วมกับ Sericin ที่ความเข้มข้นแตกต่างกันเป็นเวลานาน 8 สัปดาห์

| Parameter | Control | Sericin 100 mg/kg | CrPic 300 µg/kg | CrPic 300 µg/kg Sericin 1 mg/kg | CrPic 300 µg/kg Sericin 10 mg/kg | CrPic 300 µg/kg Sericin 100 mg/kg |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Omentum (g) | 0.81 ± 0.09 | 0.75 ± 0.12 | 0.74 ± 0.06 | 0.71 ± 0.08* | 0.70 ± 0.02* | 0.63 ± 0.04* |
| Heart (g) | 1.39 ± 0.06 | 1.46 ± 0.19 | 1.51 ± 0.07 | 1.54 ± 0.09 | 1.45 ± 0.21 | 1.39 ± 0.18 |
| Lung (g) | 2.10 ± 0.61 | 1.69 ± 0.34 | 2.50 ± 0.76 | 2.05 ± 0.62 | 2.49 ± 0.70 | 1.92 ± 0.58 |
| Liver (g) | 13.30 ± 0.36 | 12.89 ± 1.11 | 13.00 ± 1.00 | 11.87 ± 1.28 | 12.85 ± 2.06 | 11.39 ± 0.96* |
| Kidney (g) | 2.51 ± 0.18 | 2.40 ± 0.24 | 2.53 ± 0.19 | 2.36 ± 0.37 | 2.56 ± 0.26 | 2.42 ± 0.20 |
| Adrenal gland (g) | 0.07 ± 0.02 | 0.06 ± 0.03 | 0.08 ± 0.01 | 0.06 ± 0.02 | 0.06 ± 0.02 | 0.05 ± 0.01 |
| Pancreas (g) | 0.86 ± 0.17 | 1.08 ± 0.15* | 1.09 ± 0.26* | 1.10 ± 0.12* | 1.09 ± 0.14* | 1.26 ± 0.19* |
| Spleen (g) | 0.95 ± 0.06 | 0.90 ± 0.04 | 0.96 ± 0.10 | 0.91 ± 0.09 | 0.97 ± 0.07 | 0.94 ± 0.05 |
| Prostate gland (g) | 0.46 ± 0.07 | 0.49 ± 0.10 | 0.41 ± 0.11 | 0.44 ± 0.08 | 0.45 ± 0.07 | 0.40 ± 0.10 |
| Seminal vesicle (g) | 1.61 ± 0.15 | 1.57 ± 0.33 | 1.53 ± 0.37 | 1.43 ± 0.31 | 1.40 ± 0.27 | 1.42 ± 0.07 |
| Epididymis (g) | 1.02 ± 0.28 | 1.12 ± 0.09 | 1.17 ± 0.09 | 1.18 ± 0.28 | 1.20 ± 0.17 | 1.06 ± 0.23 |
| Testis (g) | 2.21 ± 0.74 | 2.57 ± 0.60 | 2.62 ± 0.18 | 2.63 ± 0.26 | 2.74 ± 0.26 | 2.75 ± 0.89 |

Values are expressed as mean ± SD *$p < 0.05$; Six rats per group.

น้ำหนักของไขมันบริเวณหน้าท้อง (Omentum) พบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติคือ กลุ่มที่ได้รับ CrPic ร่วมกับ Sericin ที่ความเข้มข้น 1 10 และ 100 mg/kg เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ในกลุ่มที่ได้รับ CrPic ร่วมกับ Sericin ที่ความเข้มข้น 100 mg/kg พบว่าน้ำหนักของตับ (Liver) จะเล็กลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ พบว่าน้ำหนักของตับอ่อน (Pancreas) เพิ่มมากขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติทุกกลุ่มการทดลองเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (ตารางที่ 10)

**ตารางที่ 11** เปรียบเทียบผลการวิเคราะห์เลือดทางเคมีคลินิกของหนูกลุ่มควบคุม หนูกลุ่มที่ได้รับ Sericin CrPic และ CrPic ร่วมกับ Sericin ที่ความเข้มข้นแตกต่างกันเป็นเวลานาน 8 สัปดาห์

| Parameter | Control | Sericin 100 mg/kg | CrPic 300 µg/kg | CrPic 300 µg/kg Sericin 1 mg/kg | CrPic 300 µg/kg Sericin 10 mg/kg | CrPic 300 µg/kg Sericin 100 mg/kg |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Glucose (mg/dl) | 158.33 ± 17.06 | 155.33 ± 12.19 | 152.00 ± 8.00 | 152.50 ± 6.95 | 143.33 ± 6.00* | 139.83 ± 15.88* |
| BUN (mg/dl) | 23.33 ± 1.03 | 23.83 ± 1.17 | 21.83 ± 1.47 | 23.00 ± 1.55 | 23.33 ± 3.14 | 21.33 ± 3.67 |
| Cholesterol (mg/dl) | 91.17 ± 3.92 | 85.17 ± 4.17 | 80.00 ± 8.37* | 81.67 ± 9.33* | 75.33 ± 3.88* | 67.83 ± 8.16* |
| HDL (mg/dl) | 38.00 ± 7.07 | 42.17 ± 3.66 | 42.83 ± 2.71 | 45.83 ± 5.81* | 46.00 ± 2.83* | 46.33 ± 6.62* |
| LDL (mg/dl) | 35.17 ± 2.14 | 33.00 ± 2.28 | 18.17 ± 2.32* | 19.00 ± 8.44* | 15.00 ± 5.97* | 13.17 ± 1.72* |
| Triglyceride (mg/dl) | 98.33 ± 38.52 | 82.67 ± 16.82 | 88.83 ± 53.92 | 70.83 ± 10.98 | 49.00 ± 7.56* | 48.67 ± 12.39* |
| Total protein (g/dl) | 5.63 ± 0.30 | 6.27 ± 0.16* | 6.27 ± 0.22* | 6.15 ± 0.29* | 6.50 ± 0.30* | 6.15 ± 0.39* |

Values are expressed as mean ± SD *$p < 0.05$, Six rats per group.

ตารางที่ 11 แสดงระดับของ glucose ในกระแสเลือดลดลงในกลุ่มที่ได้รับ CrPic ร่วมกับ Sericin ที่ความเข้มข้น 10 และ 100 mg/kg อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในกลุ่มที่ได้รับ CrPic และ กลุ่ม CrPic ร่วมกับ Sericin ที่ความเข้มข้น 1 10 และ 100 mg/kg มีระดับของ Cholesterol ลดลง อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เช่นเดียวกับระดับของ Triglyceride ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในกลุ่มที่ได้รับ CrPic ร่วมกับ Sericin ที่ความเข้มข้น 10 และ 100 mg/kg ปริมาณของ Total protein เพิ่มสูงมากขึ้นทุกกลุ่มการทดลองเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม โดยมีแนวโน้มสูงขึ้นเมื่อเพิ่มปริมาณความเข้มข้นของ Sericin แต่ในขณะที่ระดับของ BUN ไม่มีความแตกต่างกัน ระดับของ HDL เพิ่มขึ้นซึ่งตรงกันข้ามกับระดับของ LDL ซึ่งลดลง ในกลุ่มที่ได้รับ CrPic ร่วมกับ Sericin ที่ความเข้มข้น 1, 10 และ 100 mg/kg ตามลำดับ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยเฉพาะ LDL มีแนวโน้มลดลงเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ Sericin

**ตารางที่ 12** เปรียบเทียบปริมาณของโครเมียมที่สะสมในตับและไตของหนูกลุ่มควบคุม หนูกลุ่มที่ได้รับ Sericin CrPic และ CrPic ร่วมกับ Sericin ที่ความเข้มข้นแตกต่างกันเป็นเวลานาน 8 สัปดาห์

| **Treatment** | **Kidney (ng/g)** | **Liver (ng/g)** |
|---|---|---|
| Control | 95.75 ± 3.87 | 98.18 ± 6.33 |
| Sericin 100 mg/kg | 103.72 ± 24.35 | 99.67 ± 12.34 |
| CrPic 300 µg/kg | 104.93 ± 13.73 | 110.61 ± 16.23 |
| CrPic 300 µg/kg + Sericin 1 mg/kg | 112.09 ± 21.65 | 107.88 ± 10.06 |
| CrPic 300 µg/kg + Sericin 10 mg/kg | 132.18 ± 20.77* | 114.93 ± 7.74* |
| CrPic 300 µg/kg + Sericin 100 mg/kg | 123.47 ± 13.06* | 116.30 ± 8.56* |

Values are expressed as mean ± SD *$p < 0.05$, Six rats per gr

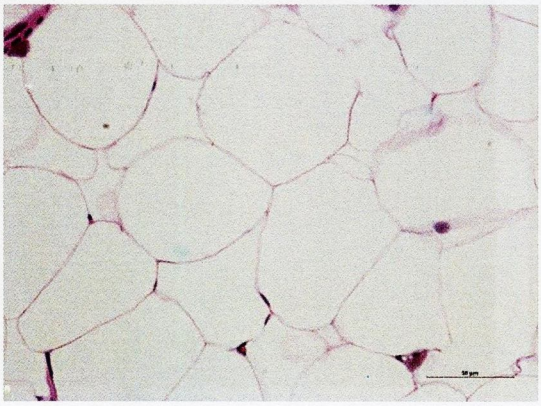
เมื่อเปรียบเทียบปริมาณของโครเมียมที่พบในไตและตับมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (ตารางที่ 12) ในกลุ่มที่ได้รับ CrPic ร่วมกับ Sericin ที่ความเข้มข้น 10 และ 100 mg/kg มีปริมาณความเข้มข้น 132.18 และ 123.47 ng/g ตามลำดับ และปริมาณของโครเมียมที่พบในตับ มีปริมาณ 114.93 และ 116.30 ng/g ในกลุ่มที่ได้รับ CrPic ร่วมกับ Sericin ที่ความเข้มข้น 10 และ 100 mg/kg ตามลำดับ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 12)

**ตารางที่ 13** เปรียบเทียบขนาดของเซลล์ไขมันที่บริเวณส่วนของหน้าท้องของหนูกลุ่มควบคุม หนูกลุ่มที่ได้รับ Sericin CrPic และ CrPic ร่วมกับ Sericin ที่ความเข้มข้นแตกต่างกันเป็นเวลานาน 8 สัปดาห์

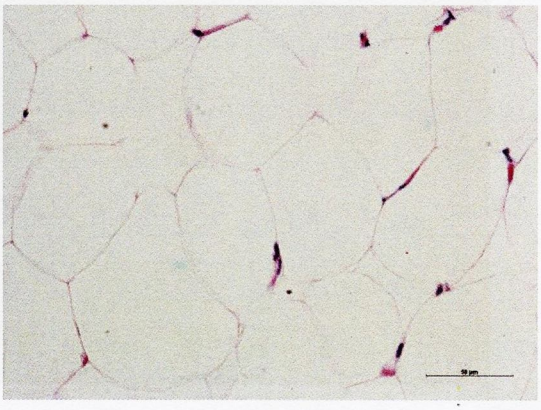
| **Treatment** | **Size of adipose cell** | |
|---|---|---|
| | **< 50 µm (%)** | **> 50 µm (%)** |
| Control | 0 | 6/6 (100) |
| Sericin 100 mg/kg | 1/6 (17) | 5/6 (83) |
| CrPic 300 µg/kg | 3/6 (50) * | 3/6 (50) * |
| CrPic 300 µg/kg + Sericin 1 mg/kg | 5/6 (83) * | 1/6 (17) * |
| CrPic 300 µg/kg + Sericin 10 mg/kg | 6/6 (100) * | 0 * |
| CrPic 300 µg/kg + Sericin 100 mg/kg | 6/6 (100) * | 0 * |

Values are expressed as mean $\pm$ SD $^{*}p < 0.05$, Six rats per group.

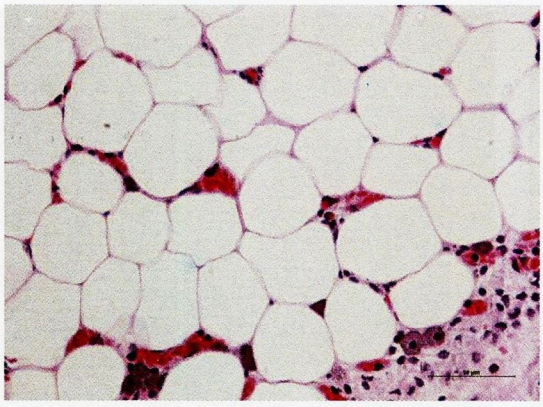
ตารางที่ 13 แสดงขนาดของเซลล์ไขมัน (Adipose cell) มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางน้อยกว่า 50 ไมครอน (µm) พบในกลุ่มที่ได้รับ Sericin CrPic และ CrPic ร่วมกับ Sericin ทุกความเข้มข้น ส่วนกลุ่มที่ได้รับ CrPic และ CrPic ร่วมกับ Sericin ทุกความเข้มข้นจะแตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยเฉพาะในกลุ่มที่ได้รับ CrPic ร่วมกับ Sericin ที่มีความเข้มข้น 10 และ 100 mg/kg พบมากถึง 100 เปอร์เซ็นต์



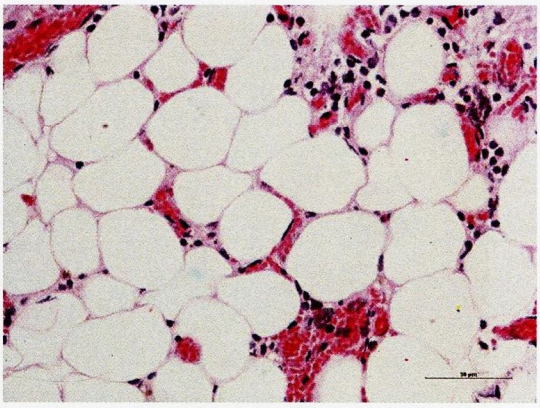
(A) Control



(B) Sericin 100 mg (40X)

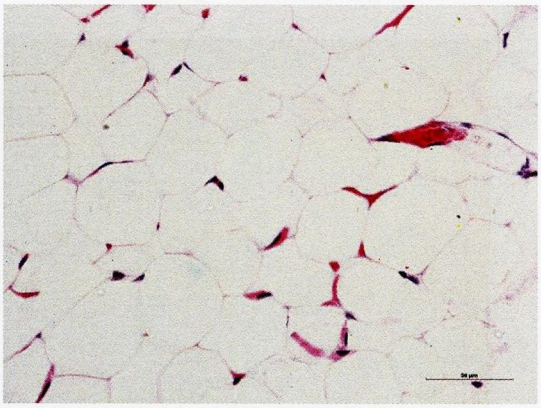


(C) CrPic 300 µg/kg (40X)



(D) CrPic 300 µg/kg + Sericin 1 mg/kg (40X)

( E ) CrPic 300 µg/kg + Sericin 10 mg/kg (40X)

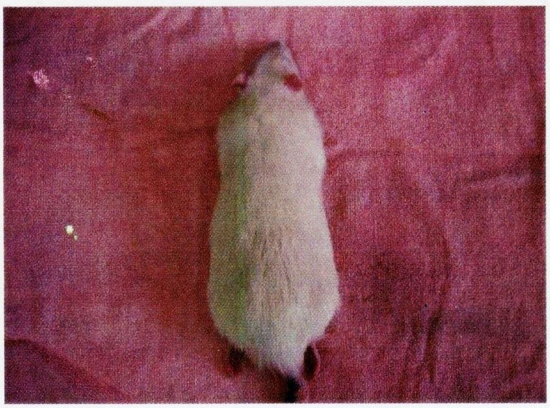


( F) CrPic 300 µg/kg + Sericin 100 mg/kg (40X)

**รูปที่ 8** ภาพเปรียบเทียบความแตกต่างของเซลล์ไขมันทีบริเวณส่วนของหน้าท้องของหนูกลุ่มควบคุม หนูกลุ่มที่ได้รับ Sericin CrPic และ CrPic ร่วมกับ Sericin ที่ความเข้มข้นแตกต่างกันเป็น เวลานาน 8 สัปดาห์

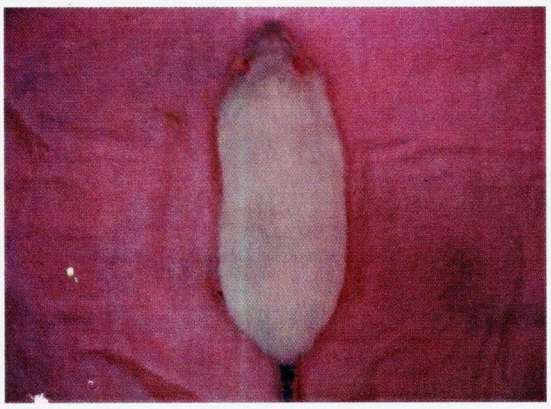
**Control**

**Sericin 100 mg/kg**



**CrPic 300 µg/kg**

**CrPic 300 µg/kg + Sericin 1 mg/kg**



**CrPic 300 µg/kg + Sericin 10 mg/kg**

**CrPic 300 µg/kg + Sericin 100 mg/kg**

**รูปที่ 9 ภาพเปรียบเทียบความแตกต่างของรูปร่าง** ลักษณะของหนูกลุ่มควบคุม หนูกลุ่มที่ได้รับ Sericin CrPic และ CrPic ร่วมกับ Sericin ที่ความเข้มข้นแตกต่างกันเป็นเวลานาน 8 สัปดาห์

รูปที่ 8-(A) เป็นรูปของเซลล์ไขมัน แต่ละเซลล์จะมีขนาดเท่าๆ กัน มีเส้นผ่าศูนย์กลางมากกว่า 50 μm ซึ่งมีขนาดใกล้เคียงกับรูปที่ 8-(B) เป็นกลุ่มที่ได้รับ Sericin 100 mg/kg เซลล์ไขมันมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางน้อยกว่า 50 μm ซึ่งลดขนาดลงกว่าครึ่งหนึ่งเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม พบในกลุ่มที่ได้รับ CrPic และ CrPic ร่วมกับ Sericin ที่ความเข้มข้น 1 , 10 และ 100 mg/kg ตามลำดับ ในรูปที่ 8 (C)-(F) คือกลุ่มที่มีขนาดของเซลล์ไขมันลดลง และเซลล์ไขมันแต่ละเซลล์จะมีการเรียงตัวแบบอัดแน่นเป็นระเบียบ โดยเฉพาะรูปที่ 8-(E )และ (F) เป็นกลุ่มที่ได้รับ CrPic ร่วมกับ Sericin ที่ความเข้มข้น 10 และ 100 mg/kg จะมีหลอดเลือดขนาดเล็ก (capillary) หนาแน่นมากกว่ากลุ่มอื่นอย่างชัดเจน เมื่อเปรียบเทียบกับ รูปที่ 9 จะเห็นความแตกต่างของรูปร่างหนู ลักษณะของหนูกลุ่มควบคุม หนูกลุ่มที่ได้รับ Sericin CrPic และ CrPic ร่วมกับ Sericin แตกต่างกัน โดยหนูในกลุ่มควบคุมจะมีลักษณะที่อ้วนกว่าหนูในกลุ่มที่ได้รับSericin CrPic และ CrPic ร่วมกับ Sericin

# บทที่ 5
# วิจารณ์ผลการทดลอง

Sericin มีผลต่อการดูดซึมโครเมียมเข้าสู่ร่างกายได้รวดเร็ว (ตารางที่ 8) ซึ่งอาจจะเนื่องมาจากการที่ตัวของ Sericin เองมีคุณสมบัติที่มีความเป็นขั้วสูง ได้แก่หมู่ hydroxyl, carboxyl, และ amino group (Tao et al., 2005) ซึ่งตัวคุณสมบัตินี้เองทำให้หลังได้รับโครเมียมแล้วผ่านไปนาน 25 ชั่วโมงในกลุ่มที่ให้ sericin ร่วมกับ CrPic จึงพบปริมาณโครเมียมน้อยมากในกระแสเลือด (ตารางที่ 8) ดังนั้น Sericin น่าจะไปมีผลเกี่ยวกับกลไกที่ช่วยในการดูดซึมโครเมียมเข้าสู่ร่างกายได้ดี แต่กลไกอย่างไรนั้นยังไม่มีรายงานในขณะนี้คงต้องทำการศึกษาวิจัยต่อไป จากตารางที่ 9 Sericin น่าจะไม่มีผลต่อการกินอาหารของหนูทดลอง เนื่องจากการกินอาหารในทุกกลุ่มไม่แตกต่างกัน แสดงว่าการกินอาหารปกตินั่นคือโครเมียมไม่มีผลต่อประสิทธิภาพการกินอาหารซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Mooney และ Cromwell (1995) แต่ดูที่น้ำหนักเมื่อสิ้นสุดการทดลองมีแนวโน้มไปในทางที่ลดลงเมื่อให้หนูทดลองได้รับ CrPic ร่วมกับ Sericin ถึงแม้ว่าจะไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติก็ตามซึ่งอาจเป็นได้ว่าช่วงระยะเวลาในการได้รับสารน้อยเกินไป เหตุที่น้ำหนักหนูทดลองลดลงอาจเนื่องมาจากการที่ระบบการดูดซึมโครเมียมของหนูดีขึ้น ทำให้ CrPic มีผลต่อการลดน้ำหนักและช่วยเพิ่มขนาดและจำนวนของกล้ามเนื้อทั้งในคนและในสัตว์เลี้ยง (Lukashi et al. (1999), Anderson et al. (1998), Vincent et al. (2004)) และเมื่อดูน้ำหนักเมื่อสิ้นสุดการทดลองกับอัตราการกินอาหารที่ไม่แตกต่างกันแสดงว่าอัตราการเจริญของกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับสารไม่มีความแตกต่างกันเช่นเดียวกับรายงานผลของ Hasten และคณะ (1996) กล่าวว่าโครเมียมไม่มีผลต่ออัตราการเจริญเติบโตที่ทดลองในหนูแรท แต่ผลก็แตกต่างกันกับกลุ่มของ Page และคณะ (1993) รายงานครั้งแรกว่าสามารถเพิ่มอัตราการเจริญเติบโตได้ในหนู และความเข้มข้นของโครเมียมที่ใช้คือ 50 และ 200 µg Cr/kg และงานวิจัยนี้ก็ตรงกันกับ Amoikon และคณะ (1995) และ Boleman และคณะ (1995) รายงานว่า CrPic ไม่มีผลต่ออัตราเจริญเติบโตและประสิทธิภาพในการกินอาหารในหมู ส่วนทางคณะวิจัยของ Mooney (1995) รายงานว่า CrPic ช่วยเพิ่มน้ำหนักแต่ไม่มีผลต่อการกินอาหารในหมู อาจจะยังไม่มีข้อสรุปที่ชัดเจนที่เกี่ยวกับ CrPic ว่ามีผลต่ออัตราการเจริญเติบโตและประสิทธิภาพในการกินอาหารได้หรือไม่ แต่จากการทดลองนี้พบว่า Sericin ช่วยในการดูดซึม CrPic และไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของอัตราการเจริญเติบโตและประสิทธิภาพในการกินอาหาร แต่มีแนวโน้มที่จะทำให้น้ำหนักลดลง และการที่หนูทดลองมีน้ำหนักลดลงเนื่องมาจากการที่ Sericin ช่วยในการดูดซึม CrPic เข้าร่างกายได้มากเลยมีผลต่อเมตาบอลิซึมของคาร์โบไฮเดรทและไขมัน (Vincent et al., 2001) ซึ่งสอดคล้องกับน้ำหนักของไขมันหน้า

ท้อง (Omentum) ที่ลดลง (ตารางที่ 10) และปริมาณของ Cholesterol และ Triglyceride ที่ลดลง (ตารางที่ 11) และทำให้ขนาดของเซลล์ไขมัน (Adipose cell) มีขนาดเล็กลง (รูปที่ 14 C-F)

ผลทางเคมีคลินิกจะเห็นว่ากลุ่มที่ได้รับ CrPic ร่วมกับ Sericin ที่ความเข้มข้น 10 และ 100 mg/kg ทำให้ระดับน้ำตาลในกระแสเลือดลดลงซึ่งตรงกับการทดลองของ Zha และคณะ (2007) ซึ่ง CrPic มีผลต่อการทำงานของ Insulin ในกระบวนการเผาผลาญพลังงานคาร์โบไฮเดรทและไขมันในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (Vincent et al., 2001) โดยโครเมียมช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการทำงานของ Insulin ให้มีการนำ glucose และ amino acid เข้าสู่ muscle cells เพื่อนำไปเผาผลาญเป็นพลังงานได้มากขึ้นและช่วยกระตุ้นการทำงานของ ribosome (Hill et al., 1985) ค่าของ BUN ปกติแสดงให้เห็นว่าการทำงานของไตปกติดียังไม่ก่อให้เกิดพยาธิสภาพ ส่วน Total protein เพิ่มมากขึ้นทุกกลุ่มแสดงให้เห็นว่าเกิดการดูดซึมโครเมียมมากขึ้นนั่นเอง เนื่องมาจากมีการเปลี่ยนแปลงพวกคาร์โบไฮเดรทและไขมันทำให้ค่าของ Total protein ที่อยู่ในกระแสเลือดสูง ซึ่งแตกต่างจากการทดลองของ Zha และคณะ (2007) ซึ่งค่า Total protein ไม่มีความแตกต่างกัน แต่การทดลองนั้นไม่ได้ใช้ Sericin เข้าไปผสมกับโครเมียมที่ใช้ในการทดลองด้วย ทำให้พอสรุปได้ว่า Sericin น่าจะเป็นตัวการสำคัญในการนำโครเมียมเข้าสู่ระบบดูดซึมของร่างกายได้ดีกว่าการได้รับโครเมียมเพียงอย่างเดียว และน่าจะมีกลไกที่สำคัญบางอย่างซึ่งยังไม่ทราบในงานวิจัยนี้ว่า sericin เพียงชนิดเดียว หรือ sericin ร่วมกับ CrPic ที่มีผลต่อการสร้างกล้ามเนื้อ เมื่อนำ CrPic และ Sericin มาใช้ร่วมกันน่าจะมีผลต่อการลดระดับไขมันทั้งในเนื้อเยื่อเกี่ยวพันของร่างกายและในระบบหลอดเลือดซึ่งดูได้จากระดับ Cholesterol และ Triglyceride ที่ลดลง โดยเฉพาะที่หลอดเลือดและกล้ามเนื้อหัวใจพบว่าระดับของ HDL เพิ่มขึ้น และระดับ LDL ลดต่ำลงในทุกความเข้มข้นของ Sericin และไม่พบลักษณะทางพยาธิสภาพเมื่อเปิดอวัยวะภายในออกดูแต่พบว่าน้ำหนักของตับอ่อน (ตารางที่ 10) จะเพิ่มขึ้นทุกกลุ่มเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมซึ่งน่าจะมาจากสาเหตุที่มีการเพิ่มเมตาบอลิซึ่มของไขมัน เนื่องจาก CrPic หรือ CrPic ร่วมกับ Sericin ทำให้ตับอ่อนซึ่งเป็นทั้ง exocrine และ endocrine gland ทำหน้าที่ในการสร้าง insulin และน้ำย่อยออกมาในปริมาณที่มากเพื่อย่อยไขมันเนื่องจากขนาดของ pancreatic cells จะถูกกระตุ้นให้มีการทำงานมากทำให้ขนาดของเซลล์ใหญ่ขึ้นร่วมกับการที่มี pancreatic enzyme ที่สร้างออกมามากจาก pancreatic cells ซึ่งเป็นเหตุผลที่ทำให้น้ำหนักของตับอ่อนเพิ่มมากขึ้น แต่ถ้าให้ระยะยาวผลจะเป็นอย่างไรในแง่ของ ระดับของ insulin และการเกิดพยาธิสภาพของตับอ่อนในส่วนนี้จะต้องทำการทดลองต่อไปเนื่องจากมีผลต่อตับอ่อนโดยตรง และพบว่าน้ำหนักของตับลดลง (ตารางที่ 10) เมื่อให้ CrPic ร่วมกับ Sericin ที่ความเข้มข้น 100 mg/kg น่าจะมีการดึงเอาไขมันออกมาจากตับมากเลยทำให้น้ำหนักลดลง ซึ่งในส่วนนี้จะต้องทำการศึกษาในระยะยาวของการได้รับสาร CrPic ร่วมกับ Sericin ว่ามีผลต่อการทำงานของตับ และการเกิดพยาธิสภาพอย่างไร จากการทดลองจะเห็นว่า Sericin มีผลต่อการดูดซึมของโครเมียมเข้าสู่ร่างกาย ซึ่งโครเมียมมีผลต่อสุขภาพหลายด้านแต่จะทำอย่างไรถึงจะให้มีการดูด

ซึมโครเมียมได้มากที่สุด จากการทดลองนี้พบว่าความเข้มข้นที่เหมาะสมที่สุดของ Sericin คือที่ความเข้มข้น 10 และ 100 mg/kg เมื่อใช้ร่วมกับ CrPic ปริมาณ 300 µg/kg และโครเมียมจะถูกเก็บสะสมไว้ที่ ไต และตับ ในปริมาณที่สูงโดยเฉพาะที่ ไตจะมีปริมาณมากที่สุด ซึ่งก็สอดคล้องกับการทดลองของ Zha และคณะ (2007) เพราะว่าร่างกายมีการขับโครเมียมที่ร่างกายสามารถดูดซึมได้ออกจากร่างกายไปกับปัสสาวะเป็นส่วนใหญ่ (Anderson et al., 1983)

# บทที่ 6
# สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

## 6.1 สรุปผลการทดลอง

1. Sericin ช่วยเพิ่มการดูดซึมโครเมียมของร่างกาย ทั้งในด้านประสิทธิภาพและปริมาณ ซึ่งช่วยลดการสูญเสียปริมาณโครเมียมที่ได้รับเข้าไป
2. Sericin และ CrPic มีฤทธิ์เสริมกันเมื่อนำมาใช้ร่วมกันมี ทำให้ลดระดับของไขมันในกระแสเลือด ลดขนาดของเซลล์ไขมันบริเวณหน้าท้อง และมีผลดีต่อระบบหลอดเลือดและหัวใจ
3. ความเข้มข้นของ Sericin ที่เหมาะสมที่จะนำมาผสมร่วมกับ CrPic เพื่อเป็นอาหารเสริมสุขภาพคือ ที่ความเข้มข้นของ Sericin 10 mg/kg BW/day ร่วมกับ CrPic 300 μg/kg Bw/day

## 6.2 ข้อเสนอแนะ

1. ควรมีการพัฒนาซิริซินให้อยู่ในรูปแบบที่เหมาะสมเพื่อนำมาใช้เป็นอาหารเสริมต่อไปในอนาคต
2. ควรทำการทดลองศึกษาถึงผลกระทบการใช้อาหารเสริมนี้เป็นเวลานาน สำหรับการควบคุมน้ำหนัก โดยศึกษาทั้งในกลุ่มที่รับประทานอาหารปกติ อาหารที่มีแคลลอรี่สูง และในกลุ่มที่มีการออกกำลังกายร่วมด้วย
3. ควรมีการศึกษาถึงรูปแบบของการนำ Sericin มาผสมกับโครเมียม ว่าแบบใดจะมีประสิทธิภาพสูงสุดทั้งขนาดโมเลกุลของซิริซิน หรือควรพัฒนา sericin nano ควบคู่ไปกับกับการพัฒนา Chromium nanocomposite (CrNano) ซึ่งเริ่มมีการศึกษากันแล้วในประเทศจีนและพบว่ามีการดูดซึมดีกว่า CrPic ที่ใช้ในการทดลองนี้ ถ้าสามารถพัฒนาสารทั้งสองชนิดนี้ให้จับกันได้ดี และสามารถเร่งการดูดซึมได้ภายใน 5 ชั่วโมงแรก หลังจากได้รับสารหรือเร็วกว่านั้นจะทำให้ไม่สูญเสียโครเมียมไปกับปัสสาวะเลย ผลคือ ร่างกายไม่ได้รับปริมาณของโครเมียมมากเกินไป ใช้โครเมียมในปริมาณที่น้อยและกำหนดความพอดีของโครเมียมต่อความจำเป็นของร่างกายได้ อันนี้ถือว่าเป็นข้อที่ดีที่สุดในการนำ Sericin มาใช้ประโยชน์

# บรรณานุกรม

Anderson, R. A. (1998). Chromium, Glucose Intolerance and Diabetes. *Journal of the American College of Nutrition,* 17(6), 548-555.

Anderson, R. A. (2003). Chromium and insulin resistance. *Nutrition Research Review,* 16(2), 267-275.

Anderson, R. A., Bryden, N. A., & Polansky, M. M. (1992). Dietary chromium intake: freely chosen diets, institutional diets and individual foods. *Biological Trace Element Research,* 32, 117-121.

Anderson, R. A., Bryden, N. A., Polansky, M. M., & Gautschi, K. (1996). Dietary chromium effects on tissue chromium concentrations and chromium absorption in rats. *Journal of Trace Elements in Experimental Medicine,* 9(1), 11-19.

Anderson, R. A., Cheng, N., Polansky, M. M., Bryden, N. A., Chi, J., & Feng, J. (1997). Elevated intakes of supplemental chromium improve glucose and insulin variables in individuals with type 2 diabetes. *Diabetes,* 46, 1786-1791.

Anderson, R. A., & Kozlovsky, A. S. (1985). Chromium intake, absorption and excretion of subjects consuming self-selected diets. *American Journal of Clinical Nutrition,* 41, 1177-1183.

Anderson, R. A., Polansky, M. M., Bryden, N. A., & Canary, J. J. (1991). Supplemental-chromium effects on glucose, insulin, glucagons and urinary chromium losses in subjects consuming controlled low-chromium diets. *American Journal of Clinical Nutrition,* 54, 909-916.

Anderson, R. A., Polansky, M. M., Bryden, N. A., Patterson, K. Y., Veillon, C., & Glinsmann, W. H. (1983). Effects of chromium supplementation on urinary Cr excretion of human subjects and correlation of Cr excretion with selected clinical parameters. *Journal of Nutrition,* 113(2), 276-281.

Annamaria, S., Maria, R., Tollia, M., Silvio, S., & Orio, C. (1998). The microbial degradation of silk: a laboratory investigation. *International Biodeterioration and Biodegredation,* 42, 203-211.

Ayguna, S. S., & Gecita, M. R. (2009). Separation of sericin from fatty acids towards its recovery from silk degumming wastewaters. *Journal of Membrane Science,* 342(1-2), 179-189

Bagchi, D., Stohs, S. J., Downs, B. W., Bagchi, M., & Preuss, H. G. (2002). Cytotoxicity and oxidative mechanisms of different forms of chromium. *Toxicology,* 180, 5-22.

Berner, T. O., Murphy, M. M., & Slesinski, R. (2004). Determination the safety of chromium tripicolinate for addition to foods as a nutrition supplement. *Food and Chemical Toxicoiogy,* 42, 1029-1042.

Brown, R. O., Forloines-Lynn, S., & Gross, R. E. (1986). Chromium deficiency after long term total parenteral nutrition. *Digestive Diseases Sciences,* 31, 661-664.

Cabrera-Vique, C., Teissedre, P.-L., Cabanis, M.-T., & Cabinis, J.-C. (1997). Determination and levels of chromium in French wine and grapes by graphite furnace atomic absorption spectrometry. *Journal Agricultural Food Chemistry,* 45, 1808-1811.

Calafat, A. M., Fiol, J. J., Terron, A., Moreno, V., Goodgame, D. M. L., & Hussain, I. (1990). Ternary chromium(III)-nucleotide-amino acid complexes III. -Glutamic acid derivatives. *International Inorganic Chemistry Journal,* 169, 133-139.

Capar, G., Aygun, S. S., & Gecit, M. R. (2008). Treatment of silk production wastewaters by membrane processes for sericin recovery. *Journal of Membrane Science,* 325, 920-931.

Carter, J. P., Katfab, A., Abd-El-hadi, K., Davis, J. T., Gholmy, A. E., & Parwardhan, V. N. (1968). Chromium (III) in hypoglycemic and in impaired glucose utilization in Kwashiorkor. *American Journal of Clinical Nutrition,* 21(3), 195-202.

Cho, K. Y., Moon, J. Y., Lee, Y. W., Lee, K. G., Yeo, J. H., Kweon, H. Y., et al. (2003). Preparation of self-assembled silk sericin nanoparticles. *International Journal of Biological Macromolecules,* 32, 36-42.

Crawford, V., Scheckenbach, R., & Preuss, H. G. (1999). Effect of niacin-bound chromium supplementation on body composition in overweight African-American women. *Diabetes, Obesity and Metabolism,* 1, 331-337.

Davies, S., Howard, J. M., Hunnisett, A., & Howard, M. (1997). Age-related decreases in chromium levels in 51,665 hair, sweat, and serum samples from 40,872 patients-Implications for the prevention of cardiovascular disease and type II diabetes mellitus. *Metabolism,* 46(5), 469-473.

Dietary Research Institute. (2005). Chromium Report: The Anti-Aging mineral that controls cravings for sugar and sweets,manades key hormonees, facilitate weight loss and muscle gain, prevents heart diease and strengthens the immune system: [On-line]. Available: http://www.primev.com/Chromium.html.

Dinakarpandian, D., Morrissette, V., Chaudhary, S., Amini, K., Bennett, B., & Horn, J. D. V. (2004). An informatics search for the low-molecular weight chromium-binding peptide. *BMC Chemical Biology,* 4(2).

Ding, H., Olson, L. K., & Caruso, J. A. (1996). Elemental speciation for chromium in chromium picolinate products. *Spectrochimica Acta Part B,* 51, 1801-1812.

Franklin, M., & Odontiadls, J. (2003). Effect of treatment with Chromium Picolinate don Peripheral Amino Acid Availability and Brain Monoamine Function in the rat. *Pharmacopsychiatry,* 36, 176-180.

Garcia, E., Cabrera, C., Lorenzo, M. L., & Lopez, M. C. (2000). Chromium levels in spices and aromatic herbs. *Science of the Total Environment,* 247, 51-56.

Hathcock, J. N. (2004). Vitamin and mineral safety In 2 (Ed.): [On-line]. Available: http://www.cmusa.org/scfety_PRINT.html.

Hill, D. J., & Milner, R. D. G. (1985). Insulin as a growth factor. *Pediatric Research,* 19, 879-886.

Hopkins, L. J. (1965). Distribution in the rat of physiological amounts of injected Cr51(III) with time. *American Journal of Physiology,* 209(4), 731-735.

Jeejeebhoy, K. N., Chu, R. C., Marliss, E. B., Greenberg, G. R., & Bruce-Robertson, A. (1977). Chromium deficiency, glucose intolerance, and neuropathy reversed by chromium supplementation, in a patient receiving long-term total parenteral nutrition. *American Journal of Clinical Nutrition,* 30(4), 531-538.

Kamath, S. M., Stoecker, B. J., Davis-Whitenack, M. L., Smith, M. M., Adeleye, B. O., & Sangiah, S. (1997). Absorption, retention and urinary excretion of chromium-51 in rats pretreated with indomethacin and dosed with dimethylprostaglandin E2, misoprostol or prostacyclin. *Journal Nutrition,* 127, 478-482.

Kareus, S. A., Kelley, C., Walton, H. S., & Sinclair, P. R. (2001). Release of Cr(III) from Cr(III) picolinate upon metabolic activation. *Journal of Hazardous Materials,* 84, 163-174.

Kato, N., Sato, S., Yamanaka, A., Yamada, H., Fuwa, N., & Nomura, M. (1998). Silk protein sericin inhibits lipid peroxidation and tyrosinase activity. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry,* 62, 145-147.

Kozlovsky, A. S., Moser, P. B., Reiser, S., & Anderson, R. A. (1986). Effects of diets high in simple sugars on urinary chromium losses. *Metabolism,* 35(6), 515-518.

Lim, T. H., Sargent, R. T., & Kusubov, N. (1983). Kinetics of trace element chromium (III) in the human body. *American Journal of Physiology,* 244, R445-R454.

Lukaski, H. C. (1999). Chromium as a supplement. *Annual Review of Nutrition,* 19, 279-302.

Mertz, W. (1969). Chromium occurrence and function in biological systems. .*Physiology Review,* 49, 163-239.

Mertz, W. (1992). Chromium in Human Nutrition: A Review. *Journal of nutrition*, 123(4),626.

Milner, R. D. G., & Hill, D. J. (1985). Insulin as a Growth Factor. *Pediatric Research,* 19(9), 879-886.

Morris, B., MacNeil, S., & Stanley, K. (1993). The inter-relationship between insulin and chromium in hyperinsulinaemic euglycaemic clamps in healthy volunteers. *Journal of Endocrinology,* 139, 339-345.

Moukarzel, A. (2009). Chromium in Parenteral Nutrition: Too Little or Too Much? *Gastroenterology,* 137, 18-28.

Nutrition Basics Home. (1999). Dificiency diseases and good nutrition-chromium: [On-line]. Avialable: http://waltonfeed.com/self/health/vit-min/chromium.html.

Press, R. I., Geller, J., & Evans, G. W. (1990). The effect of chromium picolinate on serum cholesterol and apolipoprotein fractions in human subjects. *Western Journal of Medicine,* 152(1), 41-45.

Sasaki, M., Yamada, H., & Kato, N. (2000). Consumption of silk protein, sericin elevates intestinal absorption of Zinc, Iron, Magnesium and Calcium in rats. *Nutrition Research,* 20, 1505-1511.

Schechter, S. (2005). Chromium: An essential mineral we need: [On-line]. Available: http://www.immunesupport.com/news/95sum005.html.

Shrivastava, H. Y., Ravikumar, T., Shanmugasundaram, N., Babu, M., & Nair, B. U. (2005). Cytotoxicity studies of chromium (III) complexes on human dermal fibroblasts. *Free Radical Biology and Medicine,* 38, 58-69.

Sterns, D. M., Belbrino, J. J., & Witerhahn, K. E. (1995). A prediction of chromium(III) accumulation in humans from chromium dietary supplements:Review. *FBSEB Journal,* 9, 1643-1648.

Stout, M. D., Nyska, A., Collins, B. J., Witt, K. L., Kissling, G. E., Malarkey, D. E., et al. (2009). Chronic toxicity and carcinogenicity studies of chromium picolinate monohydrate administered in feed to F344/N rats and B6C3F1 mice for 2 years. *Food and Chemical Toxicology,* 47, 729-733.

Striffler, J., Law, J., & Polansky, M. (1995). Chromium improves insulin response to glucose in rats. *Metabolism,* 44, 1314-1320.

Tanaka, K., Kajiyama, N., Ishikura, K., Waga, S., Kikuchi, A., Ohtomo, K., et al. (1999). Determination of the site of disulfide linkage between heavy and light chains of silk fibroin produced by *Bombyx mori. Biochemica et Biophysica Acta,* 1432, 92-103.

Tao, W., Li, M., & Xie, R. (2005). Preparation and structure of porous silk sericin materials. *Macromolecular Materials and Engineering,* 290, 188-194.

Trumbo, P., Yates, A. A., Schlickek, S., & Poos, M. (2001). Dietary Reference Intakes : vitamin A, vitamin K, arsenic, boron, chromium, copper, iodine, iron, manganese, molybdenum, nickel, silicon, vanadium, and zinc. *Journal of the American Dietetic Association,* 101, 294-301.

Une, T., & Kusaki, K. (2003). Japan Patent no. 2003113072.

Urberg, M., & Zemel, M. B. (1987). Evidence for synergism between chromium and nicotinic acid in the control of glucose tolerance in elderly huamans. *Metabolism,* 19, 896-899.

Vaithanomsat, P., & Kitpreechavanich, V. (2008). Sericin separation from silk degumming wastewater. *Separation and Purification Technology,* 59, 129-133.

Vincent, J. B. (2001). The bioinorganic chemistry of chromium (III). *Polyhedron,* 20, 1-26.

Vincent, J. B. (2004). Recent advances in the nutritional biochemistry of trivalent chromium. *Proceedings of the Nutrition Society,* 63, 41-47.

Wilson, B. E., & Gondy, A. (1995). Effects of chromium supplementation on fasting insulin levels and lipid parameters in healthy, non-obese young subjects. *Diabetes Research and Clinical Practice,* 28, 179-184.

Wu, J.-H., Wang, Z., & Xu, S.-Y. (2007). Preparation and characterization of sericin powder extracted from silk industry wastewater. *Food Chemistry,* 103, 1255-1262.

Yamada, H., & Fuwa, Y. (1998). Fibrous article for contact with skin. *Japan Patent* 10001872*A*.

Yang, X., Palanichamy, K., Ontko, A. C., Rao, M. N. A., Fang, C. X., Ren, J., et al. (2005). A newly synthetic chromium complex-chromium (phenyalamine) improves insulin responsiveness and reduces whole body glucose tolerance. *FEBS Letters,* 579, 1458-1464.

Zha, L. Y., Wang, M. Q., Xu, Z. R., & Gu, L. Y. (2007). Efficacy of Chromium (III) Supplementation on Growth, Body composition, Serum parameters, and Tissue Chromium in Rats. *Biological Trace Element Research,* 119, 42-50.

Zhang, Y. (2002). Applications of silk natural silk protein sericin in biomaterials. *Biotechnology Advance*, 20, 91-100.

Zhaorigetu, S., Sasaki, M., Watanabe, H., & Kato, N. (2001). Supplement silk protein, sericin Suppresses Colon Tumorigenesis in 1,2-Dimethylhydrazine-Treated Mice by Reducting Oxidative Stress and Cell Proliferation. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry,* 65, 2181-2186.

ปราณี ชวลิตธำรง, ทรงพล ชีวะพัฒน์, & สมเกียรติ ปัญญามัง. (2001). Chronic toxicity of Butea superba Roxb. วารสารกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์, 3, 182-195.

# ภาคผนวก

**ตารางที่ 14** ผลของ Chromium picolinate ต่อ cell viability ของเซลล์ Caco-2 (การทดลองครั้งที่ 1)

| **Chromium** | **OD 595 nm** | | | | | **Cell viability** |
|---|---|---|---|---|---|---|
| **picolinate (ppm)** | Well 1 | Well 2 | Well 3 | Well 4 | Mean | **(% of control)** |
| Control | 0.5848 | 0.6026 | 0.6578 | 0.5953 | 0.6101 | 100.00 |
| 0.0 | 0.5524 | 0.6981 | 0.6974 | 0.6851 | 0.6582 | 107.89 |
| 0.5 | 0.6202 | 0.6691 | 0.7101 | 0.6574 | 0.6642 | 108.86 |
| 1.0 | 0.7452 | 0.6380 | 0.6424 | 0.6563 | 0.6705 | 109.90 |
| 1.5 | 0.7288 | 0.6089 | 0.6622 | 0.6969 | 0.6742 | 110.50 |
| 2.0 | 0.5673 | 0.6670 | 0.5719 | 0.7491 | 0.6388 | 104.70 |
| 4.0 | 0.7700 | 0.6378 | 0.5180 | 0.6376 | 0.6409 | 105.04 |

**หมายเหตุ** : เลี้ยงเซลล์ Caco-2 อายุ 24 ชม.ใน 96 well plate ด้วยอาหารที่มี Chromium picolinate เป็นเวลา 24 ชม. ก่อนวัด cell viability ด้วย MTT assay Control คือ เติมอาหารเลี้ยงเซลล์แทนสารละลาย Chromium picolinate

**ตารางที่ 15** ผลของ Chromium picolinate ต่อ cell viability ของเซลล์ Caco-2 (การทดลองครั้งที่ 1)

| **Chromium** | **OD 595 nm** | | | **Cell viability** |
|---|---|---|---|---|
| **picolinate (ppm)** | Well 1 | Well 2 | Mean | **(% of control)** |
| Control | 0.4888 | 0.3119 | 0.4003 | 100 |
| 0 | 0.4762 | 0.3466 | 0.4114 | 102.76 |
| 1 | 0.4511 | 0.3904 | 0.4208 | 105.1 |
| 2 | 0.4639 | 0.3773 | 0.4206 | 105.06 |
| 4 | 0.5104 | 0.4033 | 0.4569 | 114.11 |
| 8 | 0.4871 | 0.3424 | 0.4148 | 103.6 |

**หมายเหตุ** : เลี้ยงเซลล์ Caco-2 อายุ 24 ชม.ใน 96 well plate ด้วยอาหารที่มี Chromium picolinate เป็นเวลา 24 ชม. ก่อนวัด cell viability ด้วย MTT assayControl คือ เติมอาหารเลี้ยงเซลล์แทนสารละลาย Chromium picolinate

**ตารางที่ 16** ผลของซิริซิน บี 100 μg/ml ต่อการดูดซึมของ chromium picolinate

| เวลาที่เก็บ basal medium (hr) | ความเข้มข้น chromium (ppm) | | ค่าเฉลี่ย (ppm) |
|---|---|---|---|
| | ครั้งที่ 1 | ครั้งที่ 2 | |
| 1 | 0.52 | -0.93 | **-0.205** |
| 3 | 1.75 | 1.32 | **1.535** |
| 24 | 1.81 | 2.1 | **1.955** |
| 48 | 1.52 | 2.71 | **2.115** |
| 72 | 1.24 | - | **1.24** |

**ตารางที่ 17** ผลของซิริซิน บี 1000 μg/ml ต่อการดูดซึมของ chromium picolinate

| เวลาที่เก็บ basal medium (hr) | ความเข้มข้น chromium (ppm) | | ค่าเฉลี่ย (ppm) |
|---|---|---|---|
| | ครั้งที่ 1 | ครั้งที่ 2 | |
| 1 | 0.12 | 1.08 | **0.6** |
| 3 | 1.37 | 1.99 | **1.68** |
| 24 | 2.05 | 1.86 | **1.955** |
| 48 | 1.62 | 5.49 | **3.555** |
| 72 | 1.01 | - | **1.01** |

**ตารางที่ 18** ผลของซิริซิน บี 2000 μg/ml ต่อการดูดซึมของ chromium picolinate

| เวลาที่เก็บ basal medium (hr) | ความเข้มข้น chromium (ppm) | | ค่าเฉลี่ย (ppm) |
|---|---|---|---|
| | ครั้งที่ 1 | ครั้งที่ 2 | |
| 1 | -0.34 | 0.08 | **-0.13** |
| 3 | 0.27 | 1.17 | **0.72** |
| 24 | 1.47 | - | **1.47** |
| 48 | 0.72 | 2.25 | **1.485** |
| 72 | 1.09 | - | **1.09** |