



รายงานผลการวิจัยฉบับสมบูรณ์  
ทุนอุดหนุนวิจัย มก. ปีงบประมาณ 2555

โครงการวิจัยรหัส ร-ม 14.53

ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากสาหร่ายทะเลบางชนิดในประเทศไทย

Anti-oxidation activities of some seaweed extracts in Thailand

คณะผู้วิจัย

ดร. จันทนา ไพโรบูรณ์

รศ.ดร.อนงค์ จีระภัทร์

การศึกษากิจกรรมในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดเอทานอลและสารสกัดส่วนที่มีไขมันน้อย (lipophilic) จากสาหร่ายทะเลสีน้ำตาล 9 ชนิด ที่เก็บรวบรวมจากบริเวณชายฝั่งทะเลของประเทศไทย โดยใช้วิธีการในการทดสอบกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระ 4 วิธี (การขจัดอนุมูล DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl), การขจัดอนุมูล hydroxyl, ความสามารถในการรีดิวซ์ และความสามารถในการจับโลหะ) ผลจากการศึกษาพบว่า สารสกัดจากสาหร่ายแต่ละชนิดจะมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกและมีกิจกรรมในการต้านอนุมูลอิสระแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยพบว่าสารสกัดเอทานอลจาก *Lobophora australis* จะมีปริมาณสารสกัดมากที่สุดเท่ากับ  $21.29 \pm 3.24\%$  และสารสกัดส่วน lipophilic จาก *Sargassum ilicifolium* จะมีปริมาณสารสกัดน้อยที่สุดเท่ากับ  $2.68 \pm 0.03\%$  นอกจากนี้ยังพบว่าเอทานอลมีประสิทธิภาพในการสกัดสารประกอบฟีนอลิกได้ดีกว่าสารผสมของคลอโรฟอร์มและเมทานอล และจากสารสกัดทั้งหมดที่ได้จากสาหร่ายต่างชนิดกันพบว่า สารสกัดเอทานอลจาก *L. australis* จะมีประสิทธิภาพในการขจัดอนุมูล DPPH ได้ดีที่สุด ( $EC_{50} = 12.18 \pm 0.26 \mu\text{g/mL}$ ) และมีปริมาณฟีนอลิกสูงที่สุด ( $137.01 \pm 3.92 \text{ mg PGE/g extract}$ ) ขณะที่สารสกัดเอทานอลจาก *Padina australis* จะมีประสิทธิภาพในการขจัดอนุมูล Hydroxyl ได้ดีที่สุด เท่ากับ  $84.84 \pm 0.09\%$  ที่ความเข้มข้น  $1 \text{ mg/mL}$  และพบว่าสารสกัดเอทานอลจาก *P. stromatica* จะมีความสามารถในการรีดิวซ์ดีที่สุด ( $2,130.08 \pm 49.23 \mu\text{M AAE/g extract}$ ) ขณะที่ความสามารถในการจับโลหะของสารสกัดทั้งสองชนิด (สารสกัดเอทานอล และสารสกัดส่วนที่มีไขมันน้อย) จะเพิ่มขึ้นตามการเพิ่มความเข้มข้นของสารสกัด โดยทั่วไปจะเห็นได้ว่า กิจกรรมในการต้านอนุมูลอิสระจะมีความสัมพันธ์กับปริมาณฟีนอลิกในสารสกัด ซึ่งให้เห็นว่าสารโพลีฟีนอลที่พบในสารสกัดของสาหร่ายเหล่านี้เป็นสารที่มีส่วนในการออกฤทธิ์ อย่างไรก็ตาม พบว่าสารสกัดจากสาหร่ายบางชนิดที่มีปริมาณฟีนอลิกต่ำแต่สามารถแสดงฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระในบางวิธีการทดสอบได้ดี แสดงให้เห็นว่าอาจมีสารประกอบอื่นๆ ถูกสกัดออกมาด้วยกัน เช่น fucosterol และสารในกลุ่ม terpene อื่นๆ โดยที่สารเหล่านี้ อาจเป็นสารที่ผลต่อคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระในภาพรวม ดังนั้นจึงจำเป็นจะต้องมีการศึกษาในเรื่องนี้ต่อไป

**คำสำคัญ:** สาหร่ายสีน้ำตาล DPPH อนุมูลไฮดรอกซิล ความสามารถในการรีดิวซ์ ความสามารถในการจับโลหะ โพลีฟีนอล

## Abstract

Ethanol and lipophilic extracts of 9 species of seaweeds collected along Thailand coast were screened for antioxidant activities using four *in vitro* antioxidant assay (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging activity, hydroxyl radical scavenging activity, reducing power and ferrous ion-chelating). Significant differences were observed in total and individual phenolic content and the antioxidant activities of seaweed species evaluated. Maximum yield was observed in ethanolic extracts of *Lobophora australis* with  $21.29 \pm 3.24\%$  and lowest yield was observed in lipophilic extracts of *Sargassum ilicifolium* with  $2.68 \pm 0.03\%$ . Moreover, ethanol was more efficient for polyphenol extraction than chloroform-methanol mixture. Among the extracts obtained from different seaweeds, the ethanolic extracts of *L. australis* showed the highest DPPH scavenging activity ( $EC_{50} = 12.18 \pm 0.26 \mu\text{g/mL}$ ) and highest phenolic contents ( $137.01 \pm 3.92 \text{ mg PGE/g extract}$ ). Hydroxyl scavenging activity was highest in ethanolic extracts of *Padina australis* with  $84.84 \pm 0.09\%$  at concentration of  $1 \text{ mg/mL}$ . Reducing power was highest in ethanolic extracts of *P. stromatica* ( $2,130.08 \pm 49.23 \mu\text{M AAE/g extract}$ ). Metal chelating activities of both extracts (ethanolic and lipophilic) increased with increasing concentration. In general, the various antioxidative assays correlated well with the total phenolic content, indicating that algal polyphenols are active components in these extracts. However, some of the antioxidative assays some species with low phenolic content also showed good antioxidative effects indicating that some other co-extracted active compounds such as fucosterol and others terpene may also contribute to the overall antioxidant properties and this need further investigation.

**Keywords:** Brown seaweed, DPPH, hydroxyl radical, reducing power, metal chelating activity, polyphenol

## กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณสถาบันวิจัยและพัฒนามหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ที่ให้การสนับสนุนงบประมาณในการศึกษาวิจัยในครั้งนี้ ขอขอบพระคุณ รศ.ดร.อนงค์ จีรภัทร์ ที่ให้คำปรึกษาและแนะนำตลอดการวิจัยทำให้งานวิจัย และขอขอบพระคุณ ศ.ดร. กาญจน์ภาชน์ ถ้วมโนมนต์ สำหรับคำปรึกษาในการเก็บและจำแนกชนิดของตัวอย่างสาหร่ายในงานวิจัย

จันทนา ไพบูรณ์

มิถุนายน 2558

## สารบัญ

|                                                       | หน้าที่ |
|-------------------------------------------------------|---------|
| สารบัญ                                                | i       |
| สารบัญภาพ                                             | ii      |
| สารบัญตาราง                                           | iii     |
| บทนำ                                                  | 1       |
| เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง                        | 4       |
| วิธีการดำเนินการวิจัย และสถานที่ทำการทดลอง/เก็บข้อมูล | 15      |
| ผลและวิจารณ์ผลการศึกษา                                | 21      |
| สรุปผลการทดลอง                                        | 40      |
| ข้อเสนอแนะ                                            | 41      |
| เอกสารอ้างอิง                                         | 42      |
| ภาคผนวก                                               | 48      |

## สารบัญภาพ

| ภาพที่            |                                                                            | หน้าที่ |
|-------------------|----------------------------------------------------------------------------|---------|
| 1                 | กระบวนการดูดซึมและเมตาบอลิซึมของฟูโคแซนทินในร่างกาย                        | 13      |
| 2                 | โครงสร้างทางเคมีของฟูโคแซนทิน                                              | 14      |
| 3                 | ปริมาณสารสกัดจากสาหร่ายทะเลสีน้ำตาล 9 ชนิด                                 | 22      |
| 4                 | ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดที่พบในสารสกัดจากสาหร่ายทะเลสีน้ำตาล 9 ชนิด            | 25      |
| 5                 | ประสิทธิภาพในการขจัดอนุมูล DPPH ของสารสกัดจากสาหร่ายสีน้ำตาล 9 ชนิด        | 27      |
| 6                 | ประสิทธิภาพในการยับยั้งอนุมูล hydroxyl ของสารสกัดจากสาหร่ายสีน้ำตาล 9 ชนิด | 29      |
| 7                 | ประสิทธิภาพในการรีดิวซ์ของสารสกัดจากสาหร่ายสีน้ำตาล 9 ชนิด                 | 32      |
| <b>ภาคผนวกที่</b> |                                                                            |         |
| 1                 | กราฟมาตรฐานของ ascorbic acid ที่ใช้ในการคำนวณประสิทธิภาพในการรีดิวซ์       | 49      |
| 2                 | ลักษณะ chromatogram ของสารฟูโคแซนทินที่พบในสารสกัดจากสาหร่ายสีน้ำตาล       | 50      |

## สารบัญตาราง

| ตารางที่ |                                                                                               | หน้าที่ |
|----------|-----------------------------------------------------------------------------------------------|---------|
| 1        | รายชื่อของสารห่วยสีน้ำตาลที่ใช้ในการศึกษา                                                     | 15      |
| 2        | ปริมาณสารสกัดเอทานอลและสารสกัดส่วน lipophilic ของสารห่วยสีน้ำตาลในการศึกษา (% ของน้ำหนักแห้ง) | 23      |
| 3        | ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดในสารสกัดจากสารห่วยสีน้ำตาล 9 ชนิด                                        | 24      |
| 4        | ประสิทธิภาพในการจับอนุมูล DPPH ของสารสกัดจากสารห่วยสีน้ำตาล 9 ชนิด                            | 25      |
| 5        | ประสิทธิภาพในการยับยั้งอนุมูล hydroxyl ของสารสกัดจากสารห่วยสีน้ำตาล 9 ชนิด                    | 30      |
| 6        | ประสิทธิภาพในการรีดิวซ์ของสารสกัดจากสารห่วยสีน้ำตาล 9 ชนิด                                    | 31      |
| 7        | ประสิทธิภาพในการจับโลหะของสารสกัดจากสารห่วยสีน้ำตาล 9 ชนิด                                    | 33      |
| 8        | ปริมาณฟลูโคแซนทินที่พบในสารสกัดส่วน lipophilic ของสารห่วยสีน้ำตาล 9 ชนิด                      | 35      |
| 9        | ปริมาณวิตามินอี ( $\alpha$ -tocopherol) ของสารสกัดส่วน lipophilic จากสารห่วยสีน้ำตาล 9 ชนิด   | 37      |
| 10       | ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (r) ขององค์ประกอบทางเคมีและประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระ          | 38      |

## บทที่ 1

### บทนำ

ในปัจจุบันมนุษย์เรารู้จักนำมาสาหร่ายทะเลมาใช้ประโยชน์ในหลายๆ ด้านด้วยกัน เช่น การเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ การกำจัดน้ำเสีย เป็นอาหารคน อาหารสัตว์ ใช้เป็นแหล่งพลังงาน ทำปุ๋ย ซึ่งประโยชน์ต่างๆ ดังที่กล่าวมานี้ เป็นที่ทราบกันดีอยู่แล้ว แต่สาหร่ายทะเลยังมีประโยชน์อีกด้านหนึ่ง ซึ่งกำลังเป็นที่สนใจของนักวิจัย และนักลงทุนอย่างมาก นั่นคือการใช้สาหร่ายทะเลเป็นแหล่งในการสกัดเอาสารเคมีที่เป็นประโยชน์ในด้านต่างๆ ซึ่งเป็นที่ต้องการในหลายๆ วงการ ไม่ว่าจะเป็นในอุตสาหกรรมอาหารและเครื่องดื่ม เครื่องสำอางค์ หรือแม้แต่ในด้านเภสัชกรรม หรือการแพทย์ก็เริ่มหันมาสนใจศึกษาสารสกัดที่ได้จากสาหร่ายทะเลเช่นกัน และเริ่มมีการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากสาหร่ายทะเลกันอย่างกว้างขวาง เช่น สารต้านไวรัส (antivirus) (Damonte *et al.*, 1994; Witvrouw *et al.*, 1994 และ Kolender *et al.*, 1995) สารต้านการแข็งตัวของเลือด (anticoagulant) (Kakita *et al.*, 1997; Pereira *et al.*, 2002; Kakita และ Kitamura, 2003; และ Melo *et al.*, 2004) สารต้านมะเร็ง (anticancer) (Hamann และ Scheuer, 1993; Hamann *et al.*, 1996 Horgen *et al.*, 2000; Nuijen *et al.*, 2000 และ Sparidans *et al.*, 2001) สารต้านการแก่ (anti-aging) และโดยเฉพาะอย่างยิ่งคุณสมบัติในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) เนื่องจากอนุมูลอิสระอาจจะถือได้ว่าเป็นต้นตอของปัญหาที่เลวร้ายทั้งหลายภายในร่างกายคนเรา และก่อให้เกิดโรคต่างๆ ไม่ว่าจะเป็นโรคหัวใจ โรคมะเร็ง ความแก่ ความเสื่อมของอวัยวะต่างๆ ซึ่งจะสังเกตเห็นได้ว่ายาบำรุง อาหารเสริม และเครื่องสำอางต่างๆ ในปัจจุบันมักจะกล่าวว่ามีส่วนผสมของสารต้านอนุมูลอิสระซึ่งเป็นสารสกัดจากสาหร่ายทะเล

ตัวอย่างของอนุมูลอิสระ ได้แก่ superoxide anion ( $O_2^-$ ), hydroxyl radical ( $OH^\bullet$ ) และ lipid peroxide radical ( $ROO^\bullet$ ) เป็นต้น ในปฏิกิริยาออกซิเดชัน superoxide anion จะเป็นอนุมูลอิสระตัวแรกและเป็นสารตั้งต้นให้เกิดอนุมูลอิสระตัวอื่นตามมา และส่งผลให้เซลล์ถูกทำลายโดยอนุมูลอิสระต่างๆ เหล่านั้น ในระหว่างอนุมูลอิสระทั้งสามชนิดนี้ hydroxyl radical จัดเป็นอนุมูลอิสระที่มีความสามารถในการทำลายเซลล์มากที่สุด สำหรับในปฏิกิริยา lipid peroxidation ซึ่งเป็นการออกซิไดซ์กรดไขมันไม่อิ่มตัวที่เป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์ทำให้ผนังเซลล์เกิดความเสียหายและจะก่อให้เกิดโรคต่างๆ ตามมา (Wang *et al.*, 2004) ในภาวะปกติร่างกายคนเราจะมีกลไกในการกำจัดอนุมูลอิสระเหล่านี้ 2 วิธีคือ ใช้เอนไซม์ต่างๆ ในร่างกาย เช่น superoxide dismutase (SOD) และไมเอนไซม์ ได้แก่ วิตามินอี เบต้าแคโรทีน และวิตามินซี แต่เนื่องจากเอนไซม์ SOD ในร่างกายนั้นมีอย่างจำกัด ขณะที่เราสามารถทานสารอาหารเสริมได้ ได้แก่พวกวิตามินต่างๆ ซึ่งเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ หรือมีอีกชื่อว่า antioxidant ซึ่งสารพวกนี้พบมากในผักและผลไม้บางชนิด จึงมีการสนับสนุนให้ทานสิ่งเหล่านี้เพิ่มมากขึ้นโดยมีความเชื่อ

ว่าอาจลดการเกิดโรคต่างๆ ลงได้ ซึ่งนอกจากผักและผลไม้แล้ว สาหร่ายทะเลก็เป็นอีกแหล่งหนึ่งที่มีวิตามินและเกลือแร่ต่างๆ เช่น วิตามินอี วิตามินซี เบต้าแคโรทีน โซเดียม แคลเซียม ไอโอดีน ฯลฯ นอกจากนี้ยังมีสารต้านอนุมูลอิสระที่ไม่พบในพืชชั้นสูงอีกหลายชนิดด้วยกัน (Yuan *et al.* 2005)

ผลจากการศึกษาของโครงการวิจัยนี้ในปีแรก ได้สกัดสารจากสาหร่ายทะเลในประเทศไทย 11 ชนิด ได้แก่ การวิจัยในครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาถึงวิธีการและชนิดของสาหร่ายที่เหมาะสมสำหรับการสกัดสารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจากสาหร่ายทะเลทั้งหมด 11 ชนิดในประเทศไทย ประกอบด้วยสาหร่ายสีเขียว 3 ชนิด ได้แก่ *Caulerpa lentillifera*, *Caulerpa racemosa* var. *corynephora* และ *Chlorodesmis hildebrandtii* สาหร่ายสีน้ำตาล 5 ชนิด ได้แก่ *Sargassum polycystum* (SP), *Turbinaria conoides*, *Padina australis* จากเกาะสมุย (PAS), *Padina australis* จากประจวบคีรีขันธ์ (PAP) และ *Colpomenia sinuosa* และสาหร่ายสีแดง 3 ชนิด ได้แก่ *Laurencia mariannensis*, *Gracilaria tenuistipitata* และ *Solieria robusta* ผลจากการศึกษาพบว่าการสกัดตัวอย่างสาหร่ายด้วยตัวทำละลายที่มีขั้ว เช่น เมทานอล หรือสารผสมระหว่างคลอโรฟอร์มและเมทานอล (อัตราส่วน 2:1) จะให้สารสกัดที่มีปริมาณสารสกัด (yield) และฟีนอลิกทั้งหมดมากกว่าตัวทำละลายอื่นๆ ซึ่งสารสกัดที่ได้จะมีฤทธิ์ในการยับยั้งอนุมูลอิสระต่างๆ เช่น DPPH, superoxide anion, hydroxyl radical, lipid peroxidation และ metal-chelating ได้ดี นอกจากนี้เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มของสาหร่าย (Division) แล้ว พบว่าสาหร่ายในกลุ่มสีน้ำตาลจะให้สารสกัดที่มีปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด และมีฤทธิ์ในการยับยั้งอนุมูลอิสระได้ดีกว่าสาหร่ายในกลุ่มอื่นๆ ดังนั้นสาหร่ายในกลุ่มสีน้ำตาลนี้จึงเหมาะสมสำหรับการนำไปศึกษาในเชิงลึกต่อไป

ดังนั้นโครงการวิจัยที่นำเสนอในครั้งนี้ จึงเป็นการต่อยอดงานวิจัยในปีแรก โดยมีเป้าหมายในการศึกษาศักยภาพการออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารบริสุทธิ์ หรือกึ่งบริสุทธิ์จากสาหร่ายทะเลสีน้ำตาล ตลอดจนตรวจสอบองค์ประกอบและโครงสร้างทางเคมีของสารสกัดที่ได้จากการศึกษา เพื่อเป็นองค์ความรู้สำหรับการนำสารสกัดเหล่านี้ไปประยุกต์ใช้ประโยชน์ในด้านอื่นๆ ที่เหมาะสมต่อไป และเป็นการเพิ่มมูลค่าให้แก่สาหร่ายทะเลในประเทศไทย

### วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

- 1) เพื่อสกัดสารแยกสารที่มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระจากสาหร่ายทะเลสีน้ำตาล
- 2) เพื่อศึกษาถึงศักยภาพในการออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากสาหร่ายทะเลสีน้ำตาล
- 3) เพื่อศึกษาถึงปริมาณ องค์ประกอบทางเคมี สารสกัดที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจากสาหร่ายสีน้ำตาลบางชนิดในประเทศไทย เพื่อนำข้อมูลพื้นฐานที่ได้ไปใช้ประโยชน์ในด้านอื่นๆ ต่อไป

### ขอบเขตของโครงการวิจัย

ขอบเขตการวิจัยของโครงการ “ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากสาหร่ายทะเลบางชนิดในประเทศไทย” เป็นการต่อยอดงานวิจัยจากผลการศึกษาที่ได้ในปีแรก โดยจะทำการสกัดตัวอย่างจากสาหร่ายสีน้ำตาลอย่างน้อย 5 ชนิด ด้วยตัวทำละลายเมทานอล จากนั้นจะนำสารสกัดที่ได้มาทำการแยกส่วนด้วยเทคนิค (liquid-liquid partition) โดยใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ต่างๆ จากนั้นจะนำสารที่ได้ไปทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งอนุมูลอิสระ เปรียบเทียบกับสารสกัดหยาบ และคัดเลือกสารสกัดที่ออกฤทธิ์ในการยับยั้งอนุมูลอิสระได้ดีที่สุด โดยดูจากค่า  $EC_{50}$  (half maximal effective concentration) หรือการเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน

### ทฤษฎี สมมุติฐาน (ถ้ามี) และกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย

การศึกษาในครั้งนี้จะเป็นการศึกษาเปรียบเทียบระหว่างสารสกัดหยาบเอทานอลและสารสกัดที่ผ่านการแยกส่วนโดยอาศัยเทคนิคทางเคมี เช่น การแยกส่วน (partition) โดยใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ เพื่อแยกสารมีขั้วและไม่มีขั้วออกจากกัน จากนั้นนำสารที่ได้ไปทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งอนุมูลอิสระต่างๆ และเปรียบเทียบข้อมูลที่ได้กับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบเอทานอล โดยมีสมมุติฐานว่า สารที่ได้จากการแยกส่วนอาจจะมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระดีกว่าสารสกัดหยาบ โดยพิจารณาจากค่า  $EC_{50}$  ของสารสกัดที่ใช้ในการทดสอบ

## บทที่ 2

### เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

#### 2.1 อนุมูลอิสระ

อนุมูลอิสระ (free radical) หมายถึง สารซึ่งมีอิเล็กตรอนซึ่งไม่มีคู่อยู่ในวงรอบของอะตอม หรือ โมเลกุล อนุมูลอิสระที่สำคัญ ได้แก่ hydroxyl radical, superoxide, peroxy, alkoxyl และ oxides ของ nitrogen โดยปกติสารเหล่านี้เกิดขึ้นโดยปฏิกิริยาในร่างกายอยู่แล้ว โดยเฉพาะเมื่อมีธาตุเหล็ก ทองแดง แมงกานีส โคบอลต์ โครเมียม นิเกิล อยู่ด้วย อนุมูลอิสระเหล่านี้มักเกิดเป็นปฏิกิริยาลูกโซ่และ ร่างกายของมนุษย์จะมีระบบในการกำจัดอนุมูลอิสระเหล่านี้ออกไป แต่ถ้าร่างกายได้รับสารอนุมูลอิสระจาก ภายนอกมากเกินไป เช่น การรับประทานเนื้อสัตว์ที่มีส่วนประกอบของไขมันสูง การสูบบุหรี่ การใช้น้ำมันที่ใช้ทอด อาหารที่อุณหภูมิสูงๆ มาใช้อีก หรือจากสิ่งแวดล้อม เช่น แสงอาทิตย์ซึ่งมีรังสี ultraviolet รังสี x-ray หรือจากมลพิษต่างๆ เช่น คาร์บอนหรือ ก๊าซจากท่อไอเสียรถยนต์ ถ้าสารเหล่านี้มีมากกว่าความสามารถของ ระบบต่อต้านอนุมูลอิสระในร่างกาย หรือในภาวะที่ร่างกายมีระบบต่อต้านอนุมูลอิสระลดลง เช่น ผู้สูงอายุ ก็จะทำให้มีสารอนุมูลอิสระเหล่านี้ซึ่งรวมเรียกว่า reactive oxygen species (ROS) มากเกินไปและอาจ ก่อให้เกิดอันตรายแก่ร่างกายได้ อนุมูลอิสระที่มากเกินไปจะเป็นอันตรายต่อไขมัน (โดยเฉพาะ low density lipoprotein) โปรตีน สารพันธุกรรม DNA และคาร์โบไฮเดรต ทำให้เพิ่มอัตราการเสี่ยงต่อการ เป็นโรคหลายชนิด โรคที่สำคัญและมีการศึกษากันมาก ได้แก่ โรคหลอดเลือดตีบและแข็งตัว โรคมะเร็ง บางชนิด Alzheimer's disease หรือโรคความจำเสื่อม โรคไขข้ออักเสบ ความแก่ เป็นต้น (Peter, 1989).

#### 2.2 ปฏิกิริยาออกซิเดชัน

ปฏิกิริยาออกซิเดชัน (oxidation) หมายถึง ปฏิกิริยาที่อะตอมหรือโมเลกุลมีการสูญเสีย อิเล็กตรอนให้กับอะตอมหรือโมเลกุลอื่นๆ ซึ่งปฏิกิริยาออกซิเดชันจัดเป็นครึ่งปฏิกิริยาของปฏิกิริยา ออกซิเดชัน-รีดักชัน (oxidation-reduction reaction) ซึ่งหมายถึงปฏิกิริยาที่เกี่ยวข้องกับการรับ/ส่ง อิเล็กตรอนของอะตอมหรือโมเลกุลหนึ่งไปสู่อะตอมหรือโมเลกุลหนึ่ง (Raymond, 2005) ซึ่งผลของ ปฏิกิริยาออกซิเดชันจะทำให้มีอนุมูลอิสระเกิดขึ้น

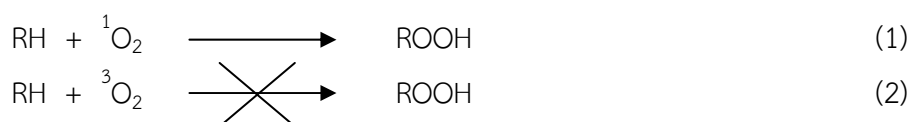
##### 2.2.1) กลไกการเกิดออกซิเดชัน (Mechanism of oxidation)

ปฏิกิริยาออกซิเดชันที่เกิดขึ้นส่วนใหญ่มักเกิดขึ้นจากปฏิกิริยาออกซิเดชันของกรดไขมัน โดยมีกรดไขมันไม่อิ่มตัวเป็นสารตั้งต้น ซึ่งทำให้เกิดอนุมูลอิสระขึ้น โดยกลไกการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันมีด้วยกัน 3 ขั้นตอน ดังนี้ (Gordon, 1990)

- |                |                                                                                             |
|----------------|---------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1. Initiation  | เป็นขั้นเริ่มต้นการเกิดอนุมูลอิสระ (free radical)                                           |
| 2. Propagation | เป็นปฏิกิริยาต่อเนื่องของปฏิกิริยาออกซิเดชัน                                                |
| 3. Termination | เป็นปฏิกิริยาสุดท้ายที่ทำให้ผลผลิตที่เกิดขึ้นไม่ได้เป็นอนุมูลอิสระ (non – radical products) |

1) ขั้นเริ่มต้นการเกิดอนุมูลอิสระ (Initiation)

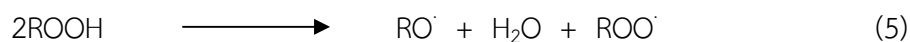
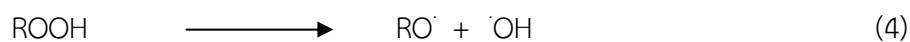
ขั้นเริ่มต้นการเกิดอนุมูลอิสระ เริ่มต้นจากปฏิกิริยารวมตัวกันระหว่างกรดไขมันไม่อิ่มตัว (unsaturated fatty acid; RH) กับโมเลกุลของออกซิเจนในสภาวะกระตุ้นหรือ ซิงเกิ้ลทอออกซิเจน (Singlet oxygen;  $^1\text{O}_2$ ) ซึ่งมีความไวต่อการเกิดปฏิกิริยามากกว่าโมเลกุลของ ออกซิเจนในสภาวะพื้นฐานหรือทริปเปรีทอออกซิเจน (Triplet oxygen;  $^3\text{O}_2$ ) โดยทั่วไปโมเลกุลของออกซิเจนจะอยู่ในรูปของทริปเปรีทอออกซิเจนซึ่งมีความเสถียรสูง แต่ถ้าทริปเปรีทอออกซิเจนเหล่านั้นได้รับพลังงาน เช่น การได้รับพลังงานจากแสงเป็นตัวกระตุ้น เป็นต้น จึงทำให้เกิดเป็นซิงเกิ้ลทอออกซิเจนขึ้น โดยซิงเกิ้ลทอออกซิเจนจะทำปฏิกิริยากับ RH ทำให้เกิดโมเลกุลไฮโดรเปอร์ออกไซด์ (hydroperoxide; ROOH) ซึ่งเป็นโมเลกุลเริ่มต้นของการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน ดังสมการที่ (1) แต่ปฏิกิริยารวมตัวระหว่างกรดไขมันกับทริปเปรีทอออกซิเจนไม่สามารถเกิดขึ้นได้ดังสมการที่ (2)



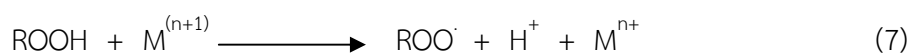
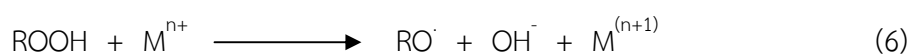
อย่างไรก็ตาม ROOH สามารถเกิดขึ้นได้จากปฏิกิริยาของกรดไขมันที่ไม่อิ่มตัวกับ  $^3\text{O}_2$  ที่มีเอนไซม์ lipoxygenase เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ดังสมการที่ (3)



พันธะระหว่าง O-O ในโมเลกุล ROOH จัดเป็นพันธะอ่อน ดังนั้นโมเลกุลของ ROOH จึงแตกตัวออกทำให้เกิดอนุมูล alkoxyl ( $\text{RO}^\cdot$ ) และอนุมูลไฮดรอกซี (hydroxyl radical;  $^\cdot\text{OH}$ ) ดังสมการที่ (4) และทำให้เกิดอนุมูล  $\text{RO}^\cdot$  และอนุมูล alkylperoxyl ( $\text{ROO}^\cdot$ ) ดังสมการที่ (5)

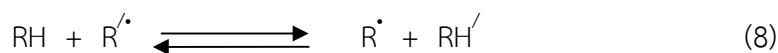


ในกรณีที่มีโลหะ (Metal ion; M) อยู่ในระบบ โลหะเหล่านี้นจะมีบทบาทในการเร่งการแตกตัวของ ROOH ซึ่งจะทำให้เกิดอนุมูล  $\text{RO}^\cdot$  และ hydroxyl anion ( $\text{OH}^-$ ) ดังสมการที่ (6) และ  $\text{ROO}^\cdot$  และไฮโดรเจนอะตอม ( $\text{H}^\cdot$ ) ดังสมการที่ (7)



## 2) ขั้นปฏิกิริยาต่อเนื่องของปฏิกิริยาออกซิเดชัน (Propagation)

อนุมูลของกรดไขมันไม่อิ่มตัว (unsaturated fatty acid radical;  $\text{R}^\cdot$ ) จัดเป็นอนุมูลที่มีความว่องไวสูงและสามารถทำให้เกิดปฏิกิริยาต่อเนื่องได้ ปฏิกิริยาต่อเนื่องของปฏิกิริยาออกซิเดชัน จะทำให้เกิดอนุมูลอิสระเป็นจำนวนมาก โดยปฏิกิริยาต่อเนื่องเกิดขึ้นจากการสูญเสียไฮโดรเจนอะตอม ดังสมการที่ (8) และ (10) และการเกิดปฏิกิริยาระหว่าง  $\text{R}^\cdot$  กับ  $^3\text{O}_2$  ได้ ดังสมการที่ (9)



## 3) ขั้นสุดท้ายการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน (Termination)

ขั้นตอนสุดท้ายการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน เป็นปฏิกิริยาการรวมตัวกันของอนุมูลอิสระ 2 อนุมูล ที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาลูกโซ่ ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่ไม่ได้เป็นอนุมูลอิสระ (non – radical product) ได้แก่ ปฏิกิริยาการรวมตัวกันของอนุมูล  $\text{ROO}^\cdot$  และอนุมูล  $\text{R}^\cdot$  ทำให้เกิดผลผลิตเป็น alkyl peroxide ( $\text{ROOR}$ ) ดังสมการที่ (11) และปฏิกิริยาการรวมตัวกันของอนุมูล  $\text{ROO}^\cdot$  2 อนุมูล ทำให้เกิดผลผลิตเป็น  $\text{ROOR}$  และออกซิเจน ( $\text{O}_2$ ) ดังสมการที่ (12)



### 2.2.2 อันตรายของอนุมูลอิสระต่อระบบของสิ่งมีชีวิต

อนุมูลอิสระที่เกิดในระบบของสิ่งมีชีวิตที่เป็นผลผลิตจากการเผาผลาญพลังงาน จะทำให้เกิดอนุมูลซูเปอร์ออกไซด์แอนไอออน (superoxide anion radical;  $O_2^{\cdot-}$ ) และ  $\cdot OH$  ซึ่ง  $O_2^{\cdot-}$  และ  $\cdot OH$  เป็นอนุมูลที่พบในเซลล์มากกว่าอนุมูลอื่นๆ และมีความว่องไวสูง ในขณะที่ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์แอนไอออน (hydrogen peroxide anion;  $OOH^-$ ) และเปอร์ออกซีไนเตรตแอนไอออน (peroxy nitrate anion;  $ONOO^-$ ) แม้ไม่เป็นอนุมูลอิสระแต่จัดเป็นสารเกี่ยวข้องที่มีความว่องไวสูง (reactive species, RS) มีบทบาทในปฏิกิริยารีดอกซ์ที่เกิดขึ้นในเซลล์เป็นอย่างมาก นอกจากนี้  $O_2^{\cdot-}$  ยังเป็นอนุมูลเริ่มแรกที่เกิดในเซลล์ซึ่งสามารถทำให้เกิดอันตรายต่อร่างกายได้โดยตรงหรือเป็นสารตั้งต้นในการเกิดปฏิกิริยาลูกโซ่ ซึ่งหากเกิดปฏิกิริยาลูกโซ่ขึ้นจะทำให้เกิดอนุมูลอิสระชนิดอื่นๆรวมทั้งสารเกี่ยวข้องที่มีความไวสูงเพิ่มมากขึ้น นอกจากนี้ฤทธิ์ความแรงของอนุมูลอิสระและสารเกี่ยวข้องที่เกิดจากปฏิกิริยาลูกโซ่จะมีอันตรายสูงขึ้นด้วยเช่นกัน (โอภา, 2550)

ถึงแม้ว่าภายในร่างกายมนุษย์มีการสร้างสารแอนติออกซิแดนท์ในรูปของเอนไซม์ (enzymatic antioxidants) ได้แก่ superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx) และ catalase ขึ้นมาเพื่อกำจัดอนุมูลอิสระภายในร่างกาย แต่ถ้าอนุมูลอิสระในร่างกายมีจำนวนมากเกินกว่าสารแอนติออกซิแดนท์ที่ร่างกายสร้างขึ้น อนุมูลอิสระเหล่านั้นที่หลงเหลืออยู่จะมีผลในการทำลายเซลล์ต่างๆ ภายในร่างกายมนุษย์ได้ หรือเรียกว่าภาวะจากความเครียดจากการออกซิเดชัน (oxidative stress) ดังนั้นการบริโภคสารแอนติออกซิแดนท์จากแหล่งอาหารต่างๆ อาจมีผลช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการกำจัดอนุมูลอิสระได้อีกทางหนึ่ง

## 2.3 สารต้านอนุมูลอิสระ

สารต้านอนุมูลอิสระ เป็นคำศัพท์ที่แปลมาจากคำว่า antiradical ปัจจุบันศัพท์คำนี้ได้ถูกบัญญัติใหม่เป็นสารขจัดหรือกำจัดอนุมูล (radical scavenger) เพื่อให้ถูกต้องตรงกับการทำงาน และอาจใช้คำว่า สารแอนติออกซิแดนท์แทน อย่างไรก็ตามในภาษาไทยยังคงใช้คำว่าอนุมูลอิสระอยู่ สารต้านอนุมูลอิสระเป็นสารที่สามารถทำปฏิกิริยากับอนุมูลโดยตรง เพื่อกำจัดอนุมูลให้หมดไป หรือหยุดปฏิกิริยาลูกโซ่ไม่ให้ดำเนินต่อ สารขจัดอนุมูลอิสระที่มีอยู่ตามธรรมชาติ เช่น กรดยูริก บิลิรูบิน จะกำจัดอนุมูล ส่วนวิตามินซี วิตามินอี กลูตาไทโอน เบตาแคโรทีน และยูบิควินอน จะหยุดปฏิกิริยาลูกโซ่ของการเกิดอนุมูล สารต้านอนุมูลอิสระประเภทหลังมีบทบาทสำคัญในการทำให้ลิวปีดเปอร์ออกซิเดชันสิ้นสุดลง สารต้านอนุมูลอิสระที่กล่าวมามีโครงสร้างเคมีและฤทธิ์ต้านออกซิเดชันที่แตกต่างกัน เช่น วิตามินอีมีโครงสร้างที่ละลายในไขมันได้ดี ดังนั้นจึงสามารถเข้าไปออกฤทธิ์ที่เมมเบรนได้ วิตามินอีจัดเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่มีฤทธิ์แรงสามารถหยุดปฏิกิริยาลูกโซ่ได้ วิตามินอีจะทำปฏิกิริยาขจัดอนุมูลลิวปีดเปอร์ออกซิ และได้เป็นอนุมูลของวิตามินอี ( $T-O^{\cdot}$ ) อนุมูล  $T-O^{\cdot}$  เป็นอนุมูลที่มีความไวต่ำ ทำให้ไม่สามารถเกิดลิวปีดเปอร์ออกซิเดชันต่อไปได้

วิตามินซีละลายน้ำได้ดี มีหน้าที่เปลี่ยนอนุมูล  $T-O^{\cdot}$  ทำให้ได้วิตามินอีกลับคืนโดยการรับอิเล็กตรอนจากอนุมูล  $T-O^{\cdot}$  อนุมูลวิตามินซีจะถูกขับออกทางปัสสาวะ (โอภา, 2550)

สารต้านอนุมูลอิสระที่ได้จากสารสกัดธรรมชาติหรือที่เป็นที่รู้จักโดยทั่วไป ได้แก่ วิตามินอีจากธรรมชาติอยู่ในรูป D-tocopherol หรือ D-alpha-tocopherol , green tea extract สารสกัดจากชาเขียวเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่สำคัญในชาเขียวมีชื่อว่า ECGG (Epigallocatechin Gallate) ซึ่งเป็นสารประกอบพอลิฟลาโวนอยด์ lycopene เป็นสารในกลุ่มแคโรทีนอยด์ พบมากในมะเขือเทศและผลิตภัณฑ์จากมะเขือเทศ rosemary extract เพื่อให้กลิ่นและรสชาติในอาหารอเมริกันและอาหารยุโรป โรสแมรี (Rosmarinum officinalis L.) มีสารต้านอนุมูลอิสระ เช่น rosmarinic acid, carnosol และ carnosic acid เป็นต้น นอกจากนี้ยังมีกลุ่มวิตามินซี วิตามินอี ซีลีเนียม เบต้าแคโรทีน วิตามินเอ และฟลาโวนอยด์ต่าง ๆ (phytochemical) เช่น สารประกอบฟีนอลิก (polyphenol) จากชาและสมุนไพรบางชนิด ไอโซฟลาโวน (isoflavones) จากถั่วเหลือง เป็นต้น

สารแอนติออกซิแดนซ์ที่สามารถพบได้ใน ผัก ผลไม้ ใบไม้ น้ำมันจากเมล็ดพืช ธัญพืช รากไม้ สมุนไพรและเครื่องเทศ โดยพบว่าองค์ประกอบสำคัญที่มีบทบาทในการทำหน้าที่เป็นสารแอนติออกซิแดนซ์ ได้แก่ ฟลาโวนอยด์และสารประกอบฟีนอลิก โดยสารแอนติออกซิแดนซ์ในกลุ่มของสารประกอบฟีนอลิกจัดเป็นกลุ่ม redox properties มีบทบาทในการเป็นสารให้/ส่งผ่านอิเล็กตรอน(reducing agents) สารให้โปรตอน (hydrogen donators) และสารกำจัดซิงเกิ้ลท็อกซิเจน (singlet oxygen quenchers) รวมถึงสารจับโลหะ (metal chelation) (Kahkonen *et al.*, 1999)

### 2.3.1 กลไกในการต้านอนุมูลอิสระของสารแอนติออกซิแดนซ์

สารแอนติออกซิแดนซ์แบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่ม ได้แก่ สารแอนติออกซิแดนซ์ปฐมภูมิ (primary antioxidant) ทำหน้าที่ยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันโดยทำหน้าที่ให้โปรตอน (hydrogen transfer) หรืออิเล็กตรอน (electron transfer) แก่อนุมูลอิสระ ส่งผลให้อนุมูลอิสระมีความเสถียรภาพและไม่ก่อให้เกิดปฏิกิริยา โดยอาศัยกลไกการยับยั้งปฏิกิริยาดังกล่าวด้วยหลักการ Hydrogen atom transter (HAT-based) และ Single-electron transfer (SET-based) และสารแอนติออกซิแดนซ์ทุติยภูมิ (secondary antioxidant) มีหน้าที่ยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชันนอกเหนือจากการทำหน้าที่ของสารแอนติออกซิแดนซ์ปฐมภูมิดังที่กล่าว เช่น บทบาทในการเป็นสารจับโลหะ (chelatan) รวมทั้งการกำจัดซิงเกิ้ลท็อกซิเจน (singlet oxygen scavenging) เป็นต้น

## 1) Hydrogen atom transter (HAT-based)

HAT-based คือกลไกการต้านอนุมูลอิสระโดยสารแอนติออกซิแดนท์ (AH) จะให้ไฮโดรเจนอะตอม (H) แก่อนุมูลอิสระ ( $\text{ROO}^\bullet$ ) ซึ่งจะทำให้อนุมูลอิสระเหล่านั้นมีความเสถียรเพิ่มมากขึ้น กลายเป็น  $\text{ROOH}$  และสารแอนติออกซิแดนท์จะกลายเป็นอนุมูลของสารแอนติออกซิแดนท์ (phenoxyl radical;  $\text{A}^\bullet$ ) ดังสมการที่ (13) โดยปฏิกิริยา HAT-based จะไม่ขึ้นกับตัวทำละลายและค่าพีเอช แต่หากมีสารรีดิวซ์หรือโลหะอยู่ด้วยจะทำให้การวิเคราะห์ซับซ้อนและส่งผลให้ค่าที่วิเคราะห์ได้สูงกว่าความเป็นจริง (โอภา, 2550)



## 2) Single-electron transfer (SET-based)

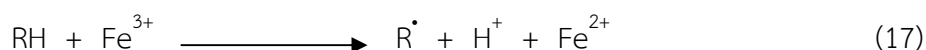
SET-based คือกลไกการต้านอนุมูลอิสระโดยสารแอนติออกซิแดนท์จะให้/ส่งผ่านอิเล็กตรอนแก่อนุมูลอิสระ ดังสมการที่ (14) – (16)



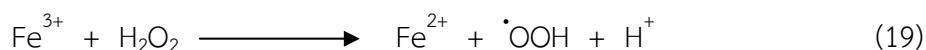
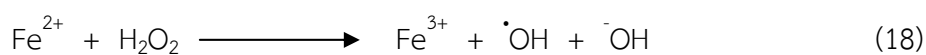
จากสมการที่ (13) และ (14) – (16) สังเกตได้ว่าสารแอนติออกซิแดนท์ที่ทำหน้าที่ขจัดอนุมูลอิสระ โดยอาศัยกลไก HAT-based และ SET-based ให้ผลผลิตที่เหมือนกันในขั้นสุดท้าย แม้ว่าทั้ง 2 กลไกมีกลไกทางจลนศาสตร์และมีสารที่เกิดขึ้นแตกต่างกัน แต่เมื่อรวมสมการที่ (14) – (16) ของกลไก SET-based จะได้ผลลัพธ์เช่นเดียวกับสมการของกลไก HAT-based ซึ่งแสดงดังสมการที่ (13) ดังนั้นในการวิเคราะห์ประสิทธิภาพในบทบาทการเป็น primary antioxidant ของสารแอนติออกซิแดนท์ควรจะทำการวิเคราะห์ทั้งสองกลไกนี้ควบคู่กันไปเสมอ (โอภา, 2550)

## 3) ความสามารถในการจับโลหะ (chelating ability)

โลหะมีบทบาทเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา (catalyst) และสามารถเป็นสารตั้งต้นการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน (pro-oxidant) โดยทำหน้าที่ส่งผ่านอิเล็กตรอนให้แก่ กรดไขมันไม่อิ่มตัว (RH) ส่งผลให้เกิดการแตกตัวของกรดไขมัน ดังสมการที่ (17)



นอกจากนี้โลหะจะทำให้เกิดการแตกตัวของโมเลกุลไฮโดรเปอร์ออกไซด์ (ROOH) ทำให้เกิดอนุมูลอิสระขึ้น ดังสมการที่ (6) – (7) และโลหะยังทำให้เกิด  $\cdot\text{OH}$  ได้โดยปฏิกิริยา Fenton ดังสมการที่ (18) – (19) (Craft *et al.*, 2012) ซึ่งจัดเป็นอนุมูลอิสระที่มีอันตรายต่อร่างกาย โดยภายในร่างกายมนุษย์  $\cdot\text{OH}$  จะไปทำลายเซลล์ในร่างกายโดยการทำให้เกิด lipid oxidation ที่บริเวณผนังเซลล์ และทำให้โครงสร้างโปรตีนเสียสภาพ



สารแอนติออกซิแดนท์ที่มีสมบัติในการจับโลหะจัดอยู่ในกลุ่ม secondary antioxidant มีบทบาทในการยับยั้งกิจกรรมของโลหะโดยการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนกับโลหะ (Complexation) ทำให้โลหะไม่สามารถทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันได้ (Mira *et al.*, 2002) การเกิดสารประกอบเชิงซ้อนของโลหะหนักที่เกิดจากผลของสารจับโลหะนั้น เกิดขึ้นจากผลของลิแกนด์ (ligand) โดยลิแกนด์คืออะตอมหรือหมู่ฟังก์ชัน ที่อยู่ล้อมรอบไอออนโลหะ โดยลิแกนด์มีบทบาทในการให้คู่อิเล็กตรอนกับไอออนโลหะหรืออะตอมตัวกลาง ซึ่งอะตอมตัวกลางมีหน้าที่รับคู่อิเล็กตรอนจากลิแกนด์เข้าไปยังออร์บิทัลว่าง มีการซ้อนกันระหว่างออร์บิทัลของลิแกนด์ที่มีคู่อิเล็กตรอนกับออร์บิทัลว่างของไอออนโลหะ โดยเกิดพันธะโคเวเลนต์แบบโคออร์ดิเนต (กฤษณา, 2532)

## 2.4 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจากสาหร่ายสีน้ำตาล

ในปัจจุบันผู้คนให้ความสนใจอย่างมากในเรื่องของสารต้านทานอนุมูลอิสระจากธรรมชาติ โดยเฉพาะในอุตสาหกรรมอาหารและเครื่องดื่ม เครื่องสำอางค์ และยารักษาโรค ซึ่งสารต้านอนุมูลอิสระเหล่านี้ส่วนใหญ่สกัดได้จากสมุนไพร เครื่องเทศ ชาเขียว ผลไม้ตระกูลส้ม และองุ่น เป็นต้น โดยเฉพาะผลไม้และผักนั้นมีการศึกษากันอย่างกว้างขวางและเป็นที่รู้กันว่าเป็นแหล่งสำคัญของวิตามิน แร่ธาตุ โยอาหาร ตลอดจนสารประกอบฟีนอลิกซึ่งประกอบได้ด้วย กรดฟีนอลิก ฟลาโวนอยด์ ไอโซฟลาโวนอยด์ และลิกนิน (Yuan *et al.*, 2005) นอกจากนี้สาหร่ายทะเลก็นับเป็นแหล่งหนึ่งของโยอาหาร และสารต้านอนุมูลอิสระที่สำคัญ ซึ่งในประเทศแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้มีการบริโภคสาหร่ายทะเลมาเป็นเวลานานแล้ว โดยเฉพาะในประเทศจีน ญี่ปุ่น เกาหลี และอินโดนีเซีย และเริ่มขยายตัวไปสู่ประเทศกลุ่มยุโรป เช่น ฝรั่งเศส นอร์เวย์ ไอร์แลนด์ และไอริแลนด์ โดยสาหร่ายทะเลที่นิยมนำมาบริโภคนั้นจะประกอบได้ด้วยสาหร่ายทะเลสีน้ำตาล (Phaeophyta) สีเขียว (Chlorophyta) และสาหร่ายสีแดง (Rhodophyta) สาหร่ายที่นำมาบริโภคเหล่านี้เป็นจะประกอบได้ด้วยโมเลกุลของสารที่มีคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระ

เช่น กรดแอสคอร์บิก (ascorbic acid) กลูตาไธโอน (glutathione) สารประกอบกลุ่มแคโรทีนอยด์ (เช่น แอลฟา และเบต้า-แคโรทีน และ ฟิวโคแซนทิน) สารประกอบกลุ่ม catechins (เช่น catechin, epigallocatechin, epigallocatechin gallate) สารประกอบกลุ่มโพลีฟีนอล (เช่น แอลฟา-, แกมมา-, และเดลต้า-โพลีฟีนอล) และสารประกอบในกลุ่มโพลีฟีนอลซึ่งในปัจจุบันมีการวิจัยอย่างกว้าง (Yuan *et al.* 2005) โดยที่สารประกอบในกลุ่มของโพลีฟีนอลและโพลีฟีนอลจะทำหน้าที่เป็นตัวรับอนุมูลอิสระและหยุดปฏิกิริยาลูกโซ่ (chain-breaking) ของปฏิกิริยาออกซิเดชัน ขณะที่สารในกลุ่มของแคโรทีนอยด์จะทำหน้าที่เป็นสารต้านอนุมูลอิสระโดยการจับอนุมูลอิสระ (trapping free radical) และ/หรือระงับการเกิดซิงเกิลออกซิเจน (quenching singlet oxygen) (Miyashita *et al.*, 2012) นอกจากนี้ยังมีรายงานอีกว่า ในสาหร่ายทั้ง 3 กลุ่ม สาหร่ายในกลุ่มสีน้ำตาลจะเป็นกลุ่มที่มีสารที่ออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมากกว่าและมีฤทธิ์สูงกว่าสาหร่ายในกลุ่มสีเขียว และสีแดง (Balboa *et al.*, 2013)

จากการค้นคว้ารายงานการวิจัยเกี่ยวกับสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากสาหร่ายสีน้ำตาลในต่างประเทศ พบว่า สารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพในสาหร่ายกลุ่มนี้โดยมากจะเป็นสารในกลุ่มของโพลีฟีนอล (เช่น phlorotannin, catechin) เทอร์ปีน (เช่น sesquiterpene และ diterpene) และแคโรทีนอยด์ (เช่น ฟิวโคแซนทิน) เป็นต้น ตัวอย่างการศึกษาวิจัยเช่น จากการรายงานของ Lim *et al.* (2009) พบว่า สารสกัดด้วยตัวทำละลายจาก *Sargassum siliquastrum* มีฤทธิ์ในการยับยั้งการถูกทำลายของเม็ดเลือดแดงโดยอนุมูลอิสระ 2,2-azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride (AAPH) และยับยั้ง lipid peroxidation และอนุมูล superoxide ได้ นอกจากนี้ในสาหร่ายสีน้ำตาลยังพบสาร phlorotannin ซึ่งเป็นสารโพลีฟีนอลในกลุ่มแทนนิน ซึ่งแตกต่างจากแทนนินที่พบในพืชชั้นสูง สาร phlorotannin นี้พบเฉพาะในสาหร่ายสีน้ำตาลเท่านั้น (Wang *et al.*, 2008) โดยสารชนิดนี้มีรายงานว่า มีฤทธิ์ในการยับยั้งจุลินทรีย์ และยับยั้งการเกิดอนุมูลอิสระได้ เช่น จากรายงานของ Nakai *et al.* (2006) ซึ่งได้ตรวจหาสารที่มีความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ ด้วยการสกัดสาหร่ายในประเทศญี่ปุ่น 25 ชนิด โดยใช้เอทานอลความเข้มข้น 50% ผลจากการศึกษาพบว่าสารสกัดจากสาหร่าย *Sargassum ringgoldianum* ซึ่งเป็นสารผสมที่มี phlorotannin เป็นองค์ประกอบหลักมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเกิด superoxide radical ได้ดีที่สุด โดยมีค่า IC<sub>50</sub> เท่ากับ 1.0 µg/ml ซึ่งมีความสามารถสูงกว่าสาร catechin ที่เป็นสารมาตรฐานถึง 5 เท่า

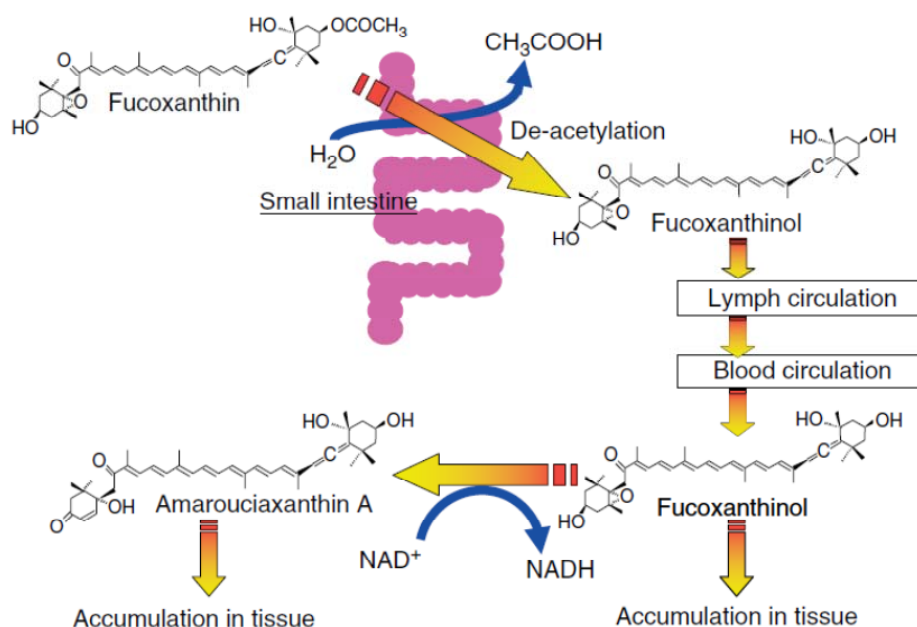
สารสกัดหยาบโพลีฟีนอลที่ได้จากการสกัดสาหร่ายสีน้ำตาล *Ecklonia cava* ด้วยเอนไซม์สามารถยับยั้งการเกิด DPPH radical ได้สูงสุด 70% ที่ความเข้มข้น 5 µg/ml และมีความสามารถในการยับยั้ง superoxide anion, hydrogen peroxide และ hydroxyl radical ได้สูงกว่า BHT ซึ่งเป็นสาร positive control ที่ความเข้มข้นเท่ากัน (Athukorala *et al.*, 2006) และจากรายงานของ Chew *et al.* (2008) ซึ่งสกัด *Padina antillarum*, *Caulerpa racemosa* และ *Kappaphycus alvarezii* ด้วย

สารละลายเมทานอล 50% พบว่า *P. antillarum* สามารถยับยั้งการเกิด DPPH radical ได้ดีที่สุดโดยมีค่า IC<sub>50</sub> เท่ากับ 0.34 mg/ml ซึ่งสัมพันธ์โดยตรงกับปริมาณโพลีฟีนอลในสารสกัดเช่นกัน และ Kumar Chandini *et al.* (2008) รายงานว่าสารสกัดโพลีฟีนอลจากสาหร่ายน้ำตาล *Sargassum marginatum*, *Padina tetrastomatica* และ *Turbinaria conoides* มีความสามารถยับยั้ง DPPH radical ได้สูงสุด 23.16, 17.79 และ 19.55 % ตามลำดับ และสามารถยับยั้ง hydroxyl radical ได้สูงสุด 96.87, 98.20 และ 99.01 % ตามลำดับ Lekameera *et al.* (2008) รายงานว่าสารสกัด DMSO และเมทานอลจาก *Colpomenai sinuosa* มีฤทธิ์ในการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH (96.56% และ 88.57%) nitric oxide radical (81.2% และ 76.69%) hydrogen peroxide (70.7% และ 56.6%) และ ABTS (76.8% และ 74.9%) ได้ อย่างไรก็ตามการศึกษากฎที่ต้านอนุมูลอิสระจากสารกลุ่มโพลีฟีนอลในสาหร่ายส่วนใหญ่ยังเป็นการทดสอบในระดับหลอดทดลอง (*in vitro*) แต่เมื่อนำไปศึกษาในสิ่งมีชีวิต (*in vivo*) หรือร่างกายมนุษย์ จะมีปัญหาหลายประการ อันเนื่องมาจากความซับซ้อนของกลไกในการดูดซึม ดังนั้นจึงจำเป็นต้องมีการศึกษาในเชิงลึกต่อไป เกี่ยวกับการดูดซึมสารในกลุ่มโพลีฟีนอลและความสามารถในการออกฤทธิ์ทางชีวภาพ

นอกจากสารในกลุ่มโพลีฟีนอลแล้ว ในสาหร่ายสีน้ำตาลยังพบสารฟูโคแซนทิน ซึ่งเป็นสารในกลุ่มแคโรทีนอยด์ ที่พบได้มากในสาหร่ายสีน้ำตาล เช่น *Undaria* (wakame) และ *Laminaria* (combu) สาหร่ายทั้งสองชนิดนี้เป็นสาหร่ายที่นิยมรับประทานเป็นอาหารในประเทศญี่ปุ่น เกาหลี และจีน จึงทำให้มีผู้สนใจศึกษาคุณค่าทางโภชนาการมาเป็นเวลานาน และมีรายงานพบว่าสารฟูโคแซนทินที่พบในสาหร่ายสีน้ำตาลนั้นสามารถดูดซึมเข้าสู่ร่างกายได้ โดยจะเป็นจากฟูโคแซนทินไปเป็นฟูโคแซนทินอล (fucoxanthinol) ได้ในลำไส้เล็ก และจากนั้นจะเปลี่ยนไปเป็น amarouciaxanthin A และถูกดูดซึมไปยังระบบต่างๆ ของร่างกาย (Miyashita *et al.*, 2012)

สารฟูโคแซนทินนี้มีผลในการยับยั้งทางชีวภาพหลายประการ เช่น ยับยั้งการเกิดภาวะโรคอ้วน (Maeda *et al.*, 2005; Hosokawa *et al.*, 2010) ยับยั้งการเกิดภาวะโรคเบาหวาน (Maeda *et al.*, 2009) และยับยั้งมะเร็งได้ (เช่น มะเร็งลำไส้, มะเร็งปอด และมะเร็งเต้านม) เป็นต้น นอกจากนี้ผลในการยับยั้งเซลล์มะเร็งแล้วยังพบว่าฟูโคแซนทินยังมีส่วนช่วยเพิ่มจำนวนของ docosahexaenoic acid (DHA) และ arachidonic acid (AA) ในตับของหนูทดลองได้ ซึ่งกรดไขมันทั้งสองชนิดนี้มีคุณสมบัติที่เป็นประโยชน์ต่อสุขภาพ เช่น ลดระดับไตรกลีเซอไรด์ และโคเลสเตอรอลในเลือด ด้านการอักเสบ และมีผลในการต้านเซลล์มะเร็งเช่นกัน (Tsukui *et al.*, 2009) และจากรายงานของ Heo และ Jeon (2009) พบว่าฟูโคแซนทินที่สกัดได้จาก *Sargassum siliquastrum* นั้นมีความสามารถป้องกันเซลล์จากการถูกทำลายด้วย UV-B ได้ถึง 81.47% ซึ่งแสดงให้เห็นว่าฟูโคแซนทินนั้นสามารถใช้เพื่อเป็นสารป้องกันการเกิด

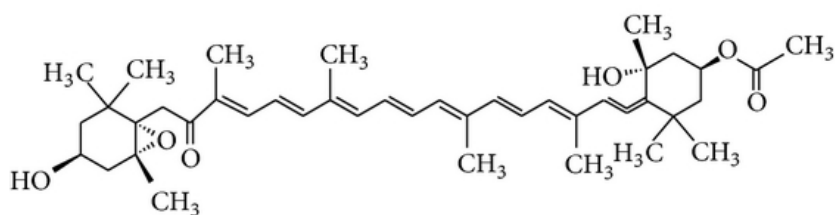
oxidative stress ที่ถูกกระตุ้นด้วยรังสี UV-B และสามารถนำมาประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมเครื่องสำอางได้ต่อไปในอนาคต



ภาพที่ 1 กระบวนการดูดซึมและเมตาบอลิซึมของฟูโคแซนทินในร่างกาย

ที่มา: Miyashita et al. (2010)

นอกจากนี้ยังมีรายงานว่า สารฟูโคแซนทินที่พบในสาหร่ายสีน้ำตาลมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระได้สูงกว่าวิตามินอีถึง 13.5 เท่า และผลจากการวิเคราะห์ความสามารถในการต้านอนุมูล superoxide ด้วยการใช้อิเล็กตรอนสปินเรโซแนนซ์ (ESR) พบว่าสารฟูโคแซนทินมีความสัมพันธ์กับความสามารถในการออกฤทธิ์เช่นเดียวกับสารโพลีฟีนอล (Miyashita et al., 2012) การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูล DPPH, peroxy และ ABTS ของสารสกัดเมทานอลจากสาหร่าย 5 ชนิด ผลการศึกษาพบว่า *Sargassum honeri* และ *Cystoseira hakodatensis* มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระได้ดีที่สุด โดยมีความสัมพันธ์ในเชิงบวกกับปริมาณโพลีฟีนอล และฟูโคแซนทินที่พบได้สูงในสารสกัดของสาหร่ายทั้งสองชนิดนี้ (Widjaja-Adhi et al., 2011a) Yan et al. (1999) ได้รายงานว่าฟูโคแซนทินนั้นมีความสามารถในการยับยั้งอนุมูล DPPH ได้สูง โดยโครงสร้างของฟูโคแซนทินนั้นมีผลต่อความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ เนื่องจากในโครงสร้างของฟูโคแซนทินจะมีหมู่ functional อยู่ที่ terminal ring (ภาพที่ 2)



ภาพที่ 2 โครงสร้างทางเคมีของฟูโคแซนทิน

ดังนั้นผลที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้จะมีประโยชน์อย่างยิ่งในการจะค้นพบสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สำคัญๆ จากสาหร่ายสีน้ำตาลในประเทศไทย และข้อมูลที่ได้จะสามารถนำไปเผยแพร่ให้แก่ผู้สนใจ และนำไปใช้ประโยชน์ในการประยุกต์ใช้สาหร่ายสีน้ำตาลในด้านต่างๆ ได้ ซึ่งจะเป็นการเพิ่มมูลค่าให้แก่ทรัพยากรสาหร่ายของประเทศไทยซึ่งยังมีผู้ศึกษาอยู่น้อย และยังขาดข้อมูลพื้นฐานที่สำคัญอีกหลายประการ

### บทที่ 3

#### วิธีการดำเนินการวิจัย และสถานที่ทำการทดลอง/เก็บข้อมูล

##### 3.1 สถานที่ทำการทดลอง

ห้องปฏิบัติการของศูนย์วิจัยทรัพยากรสาหร่าย คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

##### 3.2 วิธีการดำเนินการวิจัย

###### 1) การเก็บรวบรวมและการเตรียมตัวอย่างสาหร่าย

เก็บรวบรวมตัวอย่างสาหร่ายสีน้ำตาล 9 ชนิด ที่เก็บรวบรวมทั้งจากฝั่งชายทะเลอ่าวไทย และ ชายฝั่งทะเลอันดามัน สาหร่ายที่เก็บรวบรวมได้จัดอยู่ใน 2 ครอบครัว คือ Sargassaceae และ Dictyotaceae และเป็นชนิดที่พบมากในธรรมชาติ (ตารางที่ 1) นำตัวอย่างที่เก็บได้ใส่ถุงพลาสติกสุญญากาศ พร้อมติดป้ายระบุข้อมูล เก็บรักษาในตู้เย็นที่ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำไปใช้ในการทดลอง

ตารางที่ 1 รายชื่อของสาหร่ายสีน้ำตาลที่ใช้ในการศึกษา

| ครอบครัว<br>(Family) | ลำดับ<br>ที่ | ชนิด                           | ตัวย่อ | สถานที่             | วันที่เก็บ   |
|----------------------|--------------|--------------------------------|--------|---------------------|--------------|
| Sargassaceae         | 1            | <i>Sargassum aquifolium</i>    | (SA)   | หาดนางรอง จ. ชลบุรี | พฤษภาคม 2555 |
|                      | 2            | <i>Sargassum oligocystum</i>   | (SO)   | หาดนางรอง จ. ชลบุรี | พฤษภาคม 2555 |
|                      | 3            | <i>Sargassum polycystum</i>    | (SPO)  | แสมสาร จ.ชลบุรี     | สิงหาคม 2555 |
|                      | 4            | <i>Sargassum ilicifolium</i>   | (SI)   | จ. พังงา            | เมษายน 2555  |
|                      | 5            | <i>Sargassum plagiophyllum</i> | (SPL)  | จ. กระบี่           | เมษายน 2555  |
|                      | 6            | <i>Tubinaria conoides</i>      | (TC)   | หาดนางรอง จ. ชลบุรี | สิงหาคม 2555 |
| Dictyotaceae         | 7            | <i>Padina australis</i>        | (PA)   | แสมสาร จ.ชลบุรี     | พฤษภาคม 2555 |
|                      | 8            | <i>Padina tetrastrum</i>       | (PT)   | แสมสาร จ.ชลบุรี     | พฤษภาคม 2555 |
|                      | 9            | <i>Lobophora australis</i>     | (LA)   | หาดนางรอง จ. ชลบุรี | พฤษภาคม 2555 |

## 2) การสกัดสารสกัดหยาบ

การสกัดสารสกัดหยาบจากสาหร่ายสีน้ำตาลดำเนินการตามวิธีการของ Sachindra *et al.* (2010) โดยนำสาหร่ายมาสกัดด้วยเอทานอล ในอัตราส่วน 1:20 (w/v) แล้วทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง จากนั้นนำมากรองด้วยกระดาษกรอง Whatman No.2 และสกัดกากที่เหลืออยู่ซ้ำอีก 2 ครั้ง นำสารที่กรองได้ในแต่ละครั้งมารวมกันและนำไปทำให้เข้มข้นขึ้นด้วยเครื่อง rotary evaporator สารสกัดหยาบที่ได้นำไปละลายใน methanol กรองด้วยกระดาษกรอง PTFE ใส่ใน vial สีชา จากนั้นเป่าด้วยก๊าซไนโตรเจน และเก็บไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำไปใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดและฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ

## 3) การแยกส่วนของสารสกัดด้วยเทคนิค liquid-liquid partition

นำสาหร่ายมาสกัดด้วยเอทานอลตามวิธีการในข้อ (2) จากนั้นระเหยเอาส่วนของเอทานอลออกโดยใช้ rotary evaporator จนแห้ง และละลายสารที่สกัดได้ด้วยเมทานอล นำสารสกัดที่ได้มาแยกเป็นส่วนสกัด (Fraction) โดยวิธี liquid-liquid partition ในกรวยแยกโดยใช้คลอโรฟอร์ม: สารสกัด : น้ำ ในอัตราส่วน 10 : 5 : 3 จากนั้นตั้งทิ้งให้แยกชั้น เก็บส่วนล่างที่เป็นส่วนของคลอโรฟอร์มซึ่งสารสกัดที่มีความมีขั้วต่ำ (low polarity) หรือเป็นสารสกัดส่วนไขมัน (lipophilic) จะละลายอยู่ในส่วนนี้ นำสารที่ได้ไปทำให้แห้งขึ้นด้วยเครื่อง rotary evaporator ซึ่งน้ำหนักที่ได้ และนำสารสกัดที่ได้ไปละลายในเมทานอล และกรองด้วยกระดาษกรอง 0.45 µm PTFE ใส่ใน vial สีชา จากนั้นเป่าด้วยก๊าซไนโตรเจน และนำไปแช่ใน -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำไปวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด และทดสอบฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ

## 4) การตรวจวิเคราะห์ปริมาณและองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัด

### 4.1) การวิเคราะห์ปริมาณสารสกัด

นำตัวอย่างที่ได้จากการสกัดมาทำให้แห้งและชั่งน้ำหนัก และเทียบกับน้ำหนักเริ่มต้นของตัวอย่างสาหร่ายที่นำมาสกัด ตามสกัด

$$\text{Yield (\% w/w)} = \frac{\text{น้ำหนักของสารสกัดหยาบ}}{\text{น้ำหนักแห้งเริ่มของตัวอย่างสาหร่ายที่นำมาสกัด}} \times 100$$

### 4.2) การวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด (Polyphenol analysis)

ตรวจวิเคราะห์ปริมาณของโพลีฟีนอลทั้งหมดในสารสกัดของสาหร่ายสามารถวิเคราะห์ได้โดยใช้สารละลาย Folin-Ciocalteu ตามวิธีการของ Sachindra *et al.* (2010) โดยใช้ตัวอย่างที่ละลาย

ในเมทานอล 0.1 ml ผสมกับ สารละลาย Folin-Ciocalteu ความเข้มข้น 10% ปริมาตร 0.75 ml และนำไปบ่มที่ 37 °C เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นเติมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนตความเข้มข้น 6% ลงไป 0.75 ml ผสมให้เข้ากันและทิ้งไว้ที่ 37°C เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำไปวัดความยาวคลื่นที่ 750 นาโนเมตร โดยใช้ Phloroglucinol (1,3,5-trihydroxybenzene, Sigma) เป็นสารมาตรฐาน และปริมาณของสารฟีนอลิกทั้งหมดจะรายงานผลเป็น Phloroglucinol equivalents (PGE)

#### 4.3) การวิเคราะห์ปริมาณฟูโคแซนทิน

การเตรียมสารละลายมาตรฐานฟูโคแซนทิน ซึ่งสกัดจากสาหร่าย *S. oligocystum* โดยปรับปรุงจากวิธีการของ Jaswir et al. (2013) ใช้เมทานอลและทิ้งไว้เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำสารที่สกัดได้มาทำให้เข้มข้น และนำไปแยกส่วนโดยใช้กรวยแยกและสกัดด้วยเฮกเซน 3 ครั้ง จากนั้นนำมาสกัดต่อด้วย diethyl ether เพื่อแยกสารฟูโคแซนทิน นำส่วนของ diethyl ether มาให้แห้งด้วยเครื่อง rotary evaporator ที่อุณหภูมิ 30 °C จากนั้นละลายด้วยเบนซีน และนำสารที่ได้นำไปผ่านคอลัมน์ซิลิกาเจล (Kieselgel 60, 0.063-0.200 mm, Merck) โดยใช้เฮกเซนเป็น mobile phase เพื่อกำจัดส่วนที่เป็นคลอโรฟิลล์ออกไป จากนั้นชะต่อด้วยสารละลายผสมระหว่างเฮกเซน:อะซิโตน (อัตราส่วน 6:4 v/v) และสุดท้ายชะด้วยอะซิโตน จากนั้นรวมสารที่ถูกแยกในส่วนของสารผสมเฮกเซน:อะซิโตน และ อะซิโตน เข้าด้วยกัน และนำไปทำแห้งด้วย rotary evaporator จากนั้นละลายด้วยเมทานอลปริมาณเล็กน้อย และนำไปทำให้บริสุทธิ์อีกครั้งโดยการฉีดเข้าเครื่อง HPLC (Agilen Technology, Germany) โดยใช้ column ZORBAX Eclipse Plus C18, 5.0  $\mu$ m, 4.6 x 150 mm, Agilen Technology) โดยใช้ mobile phase คือสารผสมระหว่างเมทานอลและอะซิโตนในอัตราส่วน 70:30 (v/v) ที่อัตราเร็ว 1 mL/min โดยเปรียบเทียบค่า retention time กับสารมาตรฐานฟูโคแซนทินที่ได้รับความอนุเคราะห์มาจาก Laboratory of Biofunctional Material Chemistry, Department of Bioresources Chemistry, Faculty of Fisheries Sciences, Hokkaido University ประเทศญี่ปุ่น โดยเลือกเก็บสารละลายใน peak ที่มี retention time ตรงกับสารมาตรฐานฟูโคแซนทินที่ได้รับมาจากประเทศญี่ปุ่น จนมีปริมาณมากพอ จากนั้นนำไปทำให้เข้มข้นโดย rotary evaporator และนำไปทดสอบความบริสุทธิ์โดยใช้เครื่อง RP-HPLC (Agilent technology, Germany) ที่ต่อกับคอลัมน์ TSK-gel E3038-06CR C18, 5.0  $\mu$ m, 4.6 x 250 mm, TOSOH BIOSEP, U.S.A.) และเป็น Photodiode array detector (PDA) ซึ่งความบริสุทธิ์ของฟูโคแซนทินที่ได้มีค่ามากกว่า >97%

ปริมาณของฟูโคแซนทินที่ได้จากสารสกัดสามารถนำมาวิเคราะห์โดยใช้เครื่อง HPLC และใช้สารผสมระหว่างเมทานอลและอะซิโตนในอัตราส่วน 70:30 (v/v) เป็น mobile phase ที่อัตราเร็ว 1 mL/min อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร และคำนวณปริมาณสารฟูโคแซนทินในตัวอย่างจากกราฟมาตรฐาน

#### 4.4) การวิเคราะห์ปริมาณวิตามินอี ( $\alpha$ -tecopherol)

ปริมาณของวิตามินอีที่ได้จากสารสกัดสามารถนำมาวิเคราะห์โดยใช้เครื่อง HPLC และใช้สารผสมระหว่างเฮกเซนและ 2-โพรพานอล (propanol) อัตราส่วน 99.2:0.8 (v/v) เป็น mobile phase ที่อัตราเร็ว 1 mL/min อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ที่ความยาวคลื่น Ex. 298 นาโนเมตร และ Em. 325 นาโนเมตร และวิเคราะห์ปริมาณวิตามินอี โดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของ *dl*- $\alpha$ -tecopherol (Widijaja-Adhi Airanthi, 2011)

#### 5) การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัด

วิธีการที่นำมาใช้ในการทดสอบฤทธิ์ต้านทานอนุมูลอิสระ ได้แก่ วิธี DPPH• radical scavenging activity, วิธี hydroxyl radical scavenging activity, วิธี metal chelating activity และ วิธี Reducing activity โดยมีรายละเอียดดังต่อไปนี้

##### 5.1) วิธี 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging

การตรวจวิเคราะห์การยับยั้งอนุมูล DPPH ตามวิธีการของ Yuan *et al.* (2005) โดยมี BHT เป็น positive control และทดสอบความสามารถในการยับยั้งโดยการเติมสารตัวสกัดที่ความเข้มข้นต่างๆ ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ลงในสารละลาย DPPH ความเข้มข้น  $4 \times 10^4$  M ในเมทานอล ปริมาตร 2.9 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน และทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร ค่าที่วัดได้จะแสดงความสามารถในการสารต้านออกซิเดชันออกมาในค่า % inhibition ตามสมการดังนี้

$$\% \text{ Inhibition} = [1 - (A_s - A_{so}) / A_c] \times 100$$

เมื่อ  $A_s$  คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายตัวอย่างที่ใส่สารละลาย DPPH

$A_{so}$  คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายตัวอย่าง

$A_c$  คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย DPPH

##### 5.2) วิธี Hydroxyl radical scavenging activity

การตรวจวิเคราะห์ทำได้โดยเตรียมสารผสมของเฟอร์รัสซัลเฟต ( $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ สารละลาย EDTA ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ และสารละลาย 2-deoxyribose ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร นำมาผสมกับสารสกัดที่ต้องการทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้ง ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร และเติมสารละลาย phosphate buffer (pH 7.4) ความเข้มข้น 0.1

โมลลาร์ ลงในสารละลายตัวอย่างจนได้ปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 1.8 มิลลิลิตร จากนั้นเติมสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ( $H_2O_2$ ) ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลลาร์ ลงไป 0.2 มิลลิลิตร และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง ภายหลังจากการบ่มเติมสารละลาย Trichloroacetic acid (TCA) ความเข้มข้น 2.8% และสารละลาย Thiobarbituric acid (TBA) ความเข้มข้น 1.0% อย่างละ 1 มิลลิลิตร ลงในสารละลายตัวอย่าง จากนั้นนำไปต้มจนเดือดเป็นเวลา 10 นาที และนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 532 นาโนเมตร และนำไปคำนวณเป็น % inhibition ได้ตามสมการ

$$\% \text{ Inhibition} = [1 - (A_s - A_{so}) / A_c] \times 100$$

เมื่อ  $A_s$  คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายตัวอย่างที่ใส่สารละลาย 2-deoxyribose และ  $H_2O_2$

$A_{so}$  คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายตัวอย่าง

$A_c$  คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย 2-deoxyribose และ  $H_2O_2$

### 5.3) วิธี Reducing activity

การตรวจวิเคราะห์ reducing activity ของสารสกัดตามวิธีการของ Yuan *et al.* (2005) โดยใช้ ascorbic acid เป็นสารมาตรฐาน วิธีการทดสอบโดยเติมสารสกัด 0.5 มิลลิลิตร ลงในสารผสมของ phosphate buffer (pH 6.6) ความเข้มข้น 0.2 โมลลาร์ ปริมาตร 1.25 มิลลิลิตร และสาร  $K_3Fe(CN)_6$  ความเข้มข้น 1% ปริมาตร 1.25 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปบ่มที่ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที นำตัวอย่างไปแช่ในถังน้ำแข็ง และเติมสาร Trichloroacetic acid (TCA) ความเข้มข้น 10% ลงไป 1.25 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ดูดสารผสมนี้ออกมา 1.25 มิลลิลิตร นำไปผสมกับสารผสมของน้ำ ปริมาตร 1.25 มิลลิลิตร และสารเฟอร์ริกคลอไรด์ ( $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ ) ความเข้มข้น 0.1% ปริมาตร 0.25 มิลลิลิตร ทั้งไว้ให้เกิดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำตัวอย่างไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 700 นาโนเมตร จากนั้นคำนวณเป็นประสิทธิภาพในการรีดิวซ์ (reducing ability) โดยอาศัยสมการเส้นตรงจากกราฟมาตรฐานของ L-ascorbic acid และรายงานเป็น ascorbic acid equivalent (AAE)

### 5.4) วิธี Ferrous iron chelating activity

วิธีการ Ferrous iron chelating (FIC) นี้เป็นการตรวจวิเคราะห์คุณสมบัติในการเป็น iron chelating ของสารสกัดจากสาหร่ายจะใช้วิธีการตาม Lopes *et al.* (1999) โดยเตรียมตัวอย่างสารสกัดที่ความเข้มข้นต่างๆ ปริมาตร 0.80 มิลลิลิตรในหลอดทดลอง และใช้น้ำกลั่นเป็นชุดควบคุม เติมสารละลาย  $FeCl_2$  ความเข้มข้น 2 มิลลิโมลลาร์ ลงไป 0.01 มิลลิลิตร และเติมสารละลาย ferrozine ความเข้มข้น 5 มิลลิโมลลาร์ ลงไป 0.02 มิลลิลิตร เขย่าอย่างรวดเร็ว และบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที

วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นที่ 562 นาโนเมตร จากนั้นนำค่าที่ได้ไปคำนวณหา % inhibition ได้ตามสมการ

$$\% \text{ Inhibition} = [1 - (A_s - A_{s_0}) / A_c] \times 100$$

เมื่อ  $A_s$  คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายตัวอย่างที่ใส่สารละลาย  $\text{FeCl}_2$  และ ferrozine

$A_{s_0}$  คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายตัวอย่าง

$A_c$  คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย  $\text{FeCl}_2$  และ ferrozine

#### 6) การวิเคราะห์ทางสถิติ

วิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of Variance, ANOVA) ของข้อมูลเกี่ยวกับปริมาณขององค์ประกอบทางเคมี และฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดต่างๆ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's Multiple Range Test

## บทที่ 4

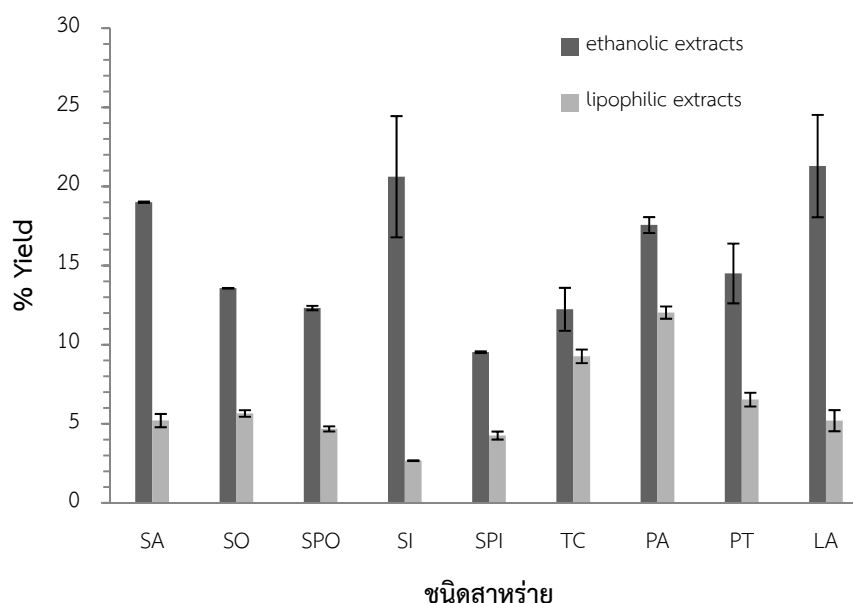
### ผลและวิจารณ์ผลการศึกษา

จากผลการศึกษาในปีที่ 1 ที่ได้สกัดและทดสอบฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระจากสาหร่ายทะเล 11 ชนิด ประกอบไปด้วยสาหร่ายกลุ่มต่างๆ ได้แก่ สาหร่ายสีเขียว 3 ชนิด สาหร่ายสีน้ำตาล 5 ชนิด และสาหร่ายสีแดง 3 ชนิด ผลจากการศึกษาพบว่าสารสกัดจากสาหร่ายกลุ่มสีน้ำตาลให้ผลในการยับยั้งอนุมูลอิสระในภาพรวมดีกว่าสาหร่ายกลุ่มๆ อื่นๆ ดังนั้นในการศึกษาปีที่ 2 นี้ จึงได้มุ่งเน้นศึกษาในสาหร่ายกลุ่มสีน้ำตาล และได้เก็บรวบรวมสาหร่ายทะเลสีน้ำตาลทั้งหมด 9 ชนิด ดังแสดงในตารางที่ 1 โดยเก็บรวบรวมทั้งจากฝั่งชายทะเลอ่าวไทย และชายฝั่งทะเลอันดามัน สาหร่ายที่เก็บรวบรวมได้นี้จะจัดอยู่ใน 2 ครอบครัว (Family) คือ Sargassaceae และ Dictyotaceae ซึ่งมีรายงานการวิจัยในต่างประเทศหลายฉบับที่ศึกษาเกี่ยวกับฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระจากสารสกัดของสาหร่ายเหล่านี้ แต่การศึกษาในประเทศไทยนั้นยังมีการศึกษาอยู่น้อย

การศึกษานี้ได้สกัดสารจากสาหร่าย โดยเปรียบเทียบระหว่าง “สารสกัดหยาบเอทานอล” (ใช้เอทานอลในการสกัด) หรือเรียกว่า “ethanolic extracts” และสารที่สกัดโดยใช้วิธีการ Liquid-liquid extraction ด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ ได้แก่ สารละลายคลอโรฟอร์ม:เมทานอล:น้ำ ในอัตราส่วน 1:1:0.9 โดยเลือกเก็บตัวอย่างในส่วนของคลอโรฟอร์มซึ่งอยู่ด้านล่าง (lower phase) สารสกัดที่ได้จากวิธีการนี้จะ เป็นสารสกัดส่วนที่ไม่ชอบน้ำ หรือมีขั้วน้อยถึงไม่มีขั้ว โดยจากนี้ไปจะขอเรียกว่าสารสกัดส่วนนี้ว่า “lipophilic extracts” หรือ “สารสกัดส่วนไขมัน” เนื่องจากมีหลายงานว่าสารสกัดส่วนใหญ่ที่พบในสาหร่ายสีน้ำตาลและมีคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระ ได้แก่ ฟุโคแซนทิน วิตามินอี และ phlorotannin นั้น เป็นสารที่ละลายในส่วนมีขั้วน้อยถึงไม่มีขั้ว (lipid soluble) อย่างไรก็ตามการสกัดด้วยวิธีการหลังนี้ต้องใช้สารเคมีที่มีความเป็นพิษ เช่น เมทานอล และคลอโรฟอร์ม ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกันเอทานอลจะเป็นสารเคมีที่มีความปลอดภัยมากกว่าและหาได้ง่าย อย่างไรก็ตาม ต้องพิจารณาถึงความสามารถในการออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดที่ได้ด้วยเช่นกัน ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อทดสอบฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระเพื่อเปรียบเทียบระหว่างสารสกัดหยาบเอทานอล (ethanolic extracts) และส่วน lipophilic extract ตลอดจนการวิเคราะห์เพื่อหาความสัมพันธ์ระหว่างการออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและองค์ประกอบทางเคมีที่พบในสาหร่ายสกัด โดยผลการศึกษาที่ได้มีรายละเอียดดังต่อไปนี้

#### 4.1 ปริมาณสารสกัดจากสาหร่ายทะเลสีน้ำตาล

จากการศึกษาปริมาณสารสกัดจากสาหร่ายทะเล 9 ชนิด ที่สกัดด้วย 2 วิธีการที่ต่างกันดังแสดงดังภาพที่ 3 ซึ่งสาหร่ายแต่ละชนิดจะให้ปริมาณสารสกัดที่ต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P \leq 0.05$ ) และพบว่าการใช้เอทานอลในการสกัดจะให้ปริมาณสารสกัดมากกว่าสารสกัดส่วน lipophilic โดยปริมาณของสารสกัดเอทานอลจะอยู่ในช่วง 9.53-21.29% ขณะที่สารสกัดส่วน lipophilic จะมีปริมาณสารสกัดอยู่ในช่วง 2.68-12.03% ซึ่งให้เห็นว่าการใช้ตัวทำละลายต่างกันในการสกัดส่งผลต่อปริมาณสารสกัดของสาหร่ายที่ต่างกัน เนื่องจากความมีขั้ว (polarity) ของตัวทำละลาย และองค์ประกอบทางเคมีที่มีอยู่ในสาหร่ายแต่ละชนิดที่ไม่เหมือนกัน เอทานอลจัดเป็นตัวทำละลายที่มีขั้วปานกลาง (ดัชนีความมีขั้วเท่ากับ 5.1) ขณะที่คลอโรฟอร์มจัดเป็นตัวทำละลายที่มีขั้นน้อยกว่าเอทานอล (ดัชนีความมีขั้วเท่ากับ 4.1) และสารที่สกัดได้จะเป็นกลุ่มที่ไม่ชอบน้ำ ผลการศึกษานี้สอดคล้องกับรายงานหลายฉบับที่กล่าวว่า การใช้ตัวทำละลายที่ต่างกันในการสกัดจะมีผลต่อปริมาณและชนิดขององค์ประกอบทางเคมีในสารสกัดจากสาหร่าย ซึ่งอาจจะส่งผลให้สารสกัดมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระต่างกันออกไป (Yuan et al., 2005; López et al., 2011)



ภาพที่ 3 ปริมาณสารสกัดจากสาหร่ายทะเลสีน้ำตาล 9 ชนิด

ตารางที่ 2 ปริมาณสารสกัดเอทานอลและสารสกัดส่วน lipophilic ของสาหร่ายสีน้ำตาลในการศึกษานี้ (% ของน้ำหนักแห้ง)

| ชนิด                        | ตัวย่อ | ปริมาณสารสกัด (% w/w)     |                          |
|-----------------------------|--------|---------------------------|--------------------------|
|                             |        | Ethanolic extracts        | Lipophilic extracts      |
| <i>Sargassum aquifolium</i> | (SA)   | 19.01±0.04 <sup>d,e</sup> | 5.21±0.42 <sup>c,d</sup> |
| <i>S. oligocystum</i>       | (SO)   | 13.57±0.02 <sup>b</sup>   | 5.66±0.21 <sup>d</sup>   |
| <i>S. polycystum</i>        | (SPO)  | 12.32±0.14 <sup>a,b</sup> | 4.68±0.16 <sup>b,c</sup> |
| <i>S. ilicifolium</i>       | (SI)   | 20.62±3.83 <sup>d,e</sup> | 2.68±0.03 <sup>a</sup>   |
| <i>S. plagiophyllum</i>     | (SPL)  | 9.53±0.05 <sup>a</sup>    | 4.26±0.25 <sup>b</sup>   |
| <i>Tubinaria conoides</i>   | (TC)   | 12.24±1.36 <sup>a,b</sup> | 9.27±0.43 <sup>f</sup>   |
| <i>Padina australis</i>     | (PA)   | 17.57±0.50 <sup>c,d</sup> | 12.03±0.39 <sup>g</sup>  |
| <i>P. tetrastromptica</i>   | (PT)   | 14.51±1.89 <sup>b,c</sup> | 6.53±0.44 <sup>e</sup>   |
| <i>Lobophora australis</i>  | (LA)   | 21.29±3.24 <sup>e</sup>   | 5.20±0.67 <sup>c,d</sup> |

ค่าที่แสดงในตารางหมายถึง ค่าเฉลี่ย±SD (n=3)

ตัวอักษรตามแนวตั้ง (a-g) ที่ต่างกันแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ P<0.05

นอกจากนี้ยังพบว่า ในสารสกัดเอทานอลจาก *L. australis* จะมีปริมาณสารสกัดมากที่สุดเท่ากับ 21.29±3.24 % ซึ่งไม่ต่างจาก *S. ilicifolium* (20.62±3.83%) และ *S. aquifolium* (19.01±0.04%) (ตารางที่ 2) โดยที่สาหร่ายที่ให้ปริมาณสารสกัดเอทานอลล้น้อยที่สุดคือ *S. plagiophyllum* (9.53±0.05%) สำหรับสารสกัดส่วน lipophilic สารสกัดของ *P. australis* จะมีปริมาณสูงที่สุด เท่ากับ 12.03±0.39% รองลงมาได้แก่ *T. conoides* (9.27±0.43%) และ *P. tetrastomatica* (6.53±0.44%) ตามลำดับ ขณะที่สารสกัดของสาหร่าย *S. ilicifolium* จะมีปริมาณสารสกัดน้อยที่สุดเท่ากับ 2.68 ±0.03 %

เมื่อเปรียบเทียบกับผลการศึกษาก่อนหน้านี้พบว่าปริมาณสารสกัดที่ได้จาก *T. conoides* ใน การศึกษานี้มีปริมาณมากกว่าสารสกัดเมทานอลของ *T. conoides* ที่ศึกษาโดย Chakraborty et al. (2013) เช่นเดียวกับ *S. polycystum* ที่มีปริมาณมากกว่าที่เคยมีรายงานโดย Matanjun et al. (2008) ขณะที่ปริมาณสารสกัดจาก *P. tetrastomatica* มีปริมาณน้อยกว่าสารสกัดเมทานอลของสาหร่ายชนิดนี้ ที่ศึกษาโดย Kumar et al. (2011) ซึ่งมีปริมาณสารสกัดเท่ากับ 19.45±1.69% ผลจากการศึกษานี้ ชี้ให้เห็นว่า ชนิดของตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดจะส่งผลให้ได้ปริมาณสารสกัดต่างกันออกไป (López et al., 2011, Sabeena Farvin and Jacobsen, 2013) นอกจากนี้ปริมาณสารสกัดในสาหร่ายยังขึ้นอยู่กับ หลายๆ ปัจจัย ทั้งปัจจัยจากสิ่งแวดล้อมภายนอก เช่น แสง อุณหภูมิ ความเค็ม ธาตุอาหาร และปัจจัย

ภายในตัวสาหร่ายเอง เช่น อายุ ความยาวของลำต้น ชนิดของเนื้อเนื้อ และองค์ประกอบของผนังเซลล์ เป็นต้น

#### 4.2 ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดในสารสกัด

สาร phlorotannins เป็นสารในกลุ่มโพลีฟีนอล ที่เป็นโอลิโกเมอร์หรือโพลิเมอร์ของ phloroglucinol ซึ่งสารชนิดนี้พบได้มากในสาหร่ายกลุ่มสีน้ำตาล และจะมีโครงสร้างที่แตกต่างไปจากสารแทนนินที่พบในพืชชั้นสูง อีกทั้งมีความสามารถในการป้องกันสาหร่ายจากการถูกกัดกิน และการเกิด epiphyte หรือการเกิดโรคในสาหร่ายได้ เช่นเดียวกับมีความสามารถในการป้องกันเซลล์จากการถูกทำลายด้วยแสง และป้องกันเซลล์จากการถูกทำลายด้วยอนุมูลอิสระ โดยที่ phlorotannin ที่พบในสาหร่ายสีน้ำตาลนี้จะมีขนาดโมเลกุลอยู่ในช่วง 400-400,000 Da และพบได้ประมาณ 0.5-20% ของน้ำหนักแห้ง (Balboa et al., 2013) นอกจากนี้ยังรายงานหลายฉบับกล่าวว่าฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระนั้นมีความสัมพันธ์โดยตรงกับสารฟีนอลิกที่พบในสารสกัด (Iwai, 2008; Kuda and Ikemori, 2009; Zubia et al. 2009; López et al., 2011)

ตารางที่ 3 ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดในสารสกัดจากสาหร่ายสีน้ำตาล 9 ชนิด

| ชนิด                        | ตัวย่อ | ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด<br>(mg PGE*/g สารสกัด) |                          | ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด<br>(mg PGE/g สาหร่ายแห้ง) |                          |
|-----------------------------|--------|---------------------------------------------|--------------------------|------------------------------------------------|--------------------------|
|                             |        | Ethanolic                                   | Lipophilic               | Ethanolic                                      | Lipophilic               |
|                             |        | extracts                                    | extracts                 | extracts                                       | extracts                 |
| <i>Sargassum aquifolium</i> | (SA)   | 78.69±0.71 <sup>c</sup>                     | 37.71±2.65 <sup>b</sup>  | 5.61±0.05 <sup>b</sup>                         | 1.96±0.14 <sup>b</sup>   |
| <i>S. oligocystum</i>       | (SO)   | 84.61±0.44 <sup>d</sup>                     | 25.47±2.91 <sup>a</sup>  | 6.50±0.03 <sup>c</sup>                         | 1.50±0.16 <sup>a</sup>   |
| <i>S. polycystum</i>        | (SPO)  | 72.59±0.15 <sup>b</sup>                     | 40.82±2.77 <sup>b</sup>  | 5.46±0.01 <sup>ab</sup>                        | 1.91±0.13 <sup>b</sup>   |
| <i>S. ilicifolium</i>       | (SI)   | 59.86±0.13 <sup>a</sup>                     | 78.86±2.76 <sup>d</sup>  | 4.93±0.01 <sup>a</sup>                         | 2.11±0.07 <sup>b</sup>   |
| <i>S. plagiophyllum</i>     | (SPL)  | 98.18±0.37 <sup>e</sup>                     | 117.57±2.96 <sup>f</sup> | 8.11±0.03 <sup>e</sup>                         | 5.01±0.13 <sup>d</sup>   |
| <i>Tubinaria conoides</i>   | (TC)   | 60.08±3.87 <sup>a</sup>                     | 58.35±4.13 <sup>c</sup>  | 7.35±0.47 <sup>d</sup>                         | 5.41±0.38 <sup>d,e</sup> |
| <i>Padina australis</i>     | (PA)   | 70.03±0.78 <sup>b</sup>                     | 80.89±4.31 <sup>d</sup>  | 12.35±0.14 <sup>f</sup>                        | 9.73±0.52 <sup>f</sup>   |
| <i>P. tetrastrum</i>        | (PT)   | 103.62±0.86 <sup>f</sup>                    | 87.99±1.54 <sup>e</sup>  | 15.07±0.12 <sup>g</sup>                        | 5.57±0.10 <sup>e</sup>   |
| <i>Lobophora australis</i>  | (LA)   | 137.01±3.92 <sup>g</sup>                    | 77.47±1.70 <sup>d</sup>  | 29.18±0.83 <sup>h</sup>                        | 4.03±0.09 <sup>c</sup>   |

\* PGE = Phloroglucinol equivalent

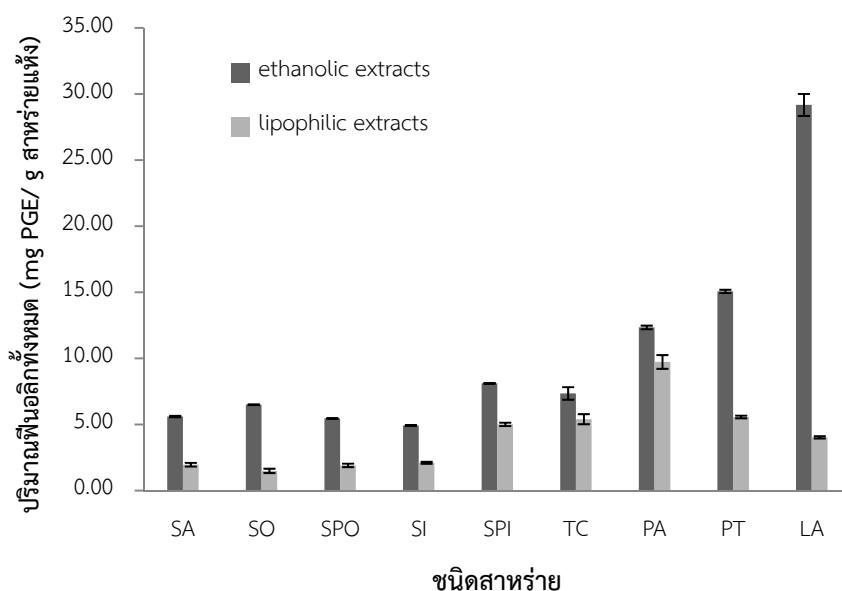
ค่าที่แสดงในตารางหมายถึง ค่าเฉลี่ย±SD (n=3)

ตัวอักษรตามแนวตั้ง (a-e) ที่ต่างกันแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ P<0.05

จากผลการศึกษาจะพบว่าปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดในสาหร่ายแต่ละชนิดที่ใช้ในการศึกษาจะมีความแตกต่างกันขึ้นอยู่กับตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัด ซึ่งค่าปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดได้จากการ

คำนวณจากสมการเส้นตรงจากกราฟมาตรฐาน phloroglucinol และรายงานเป็น phloroglucinol equivalent (PGE) โดยภาพรวมพบว่า สารสกัดเอทานอลจะมีปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดมากกว่าสารสกัดส่วน lipophilic เมื่อคำนวณเป็นปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดต่อน้ำหนักแห้งของสาหร่าย (ตารางที่ 3) อย่างไรก็ตาม หากคำนวณเป็นต่อน้ำหนักของสารสกัด สารสกัดส่วน lipophilic ของสาหร่าย *Sargassum ilicifolium*, *S. plagiophyllum* และ *Padina australis* จะมีปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดมากกว่าสารสกัดเอทานอล

ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดที่พบในสารสกัดเอทานอลจะอยู่ในช่วง 4.93-29.18 mg PGE/g สาหร่ายแห้ง ขณะที่สารสกัดส่วน lipophilic จะมีปริมาณโพลีฟีนอลทั้งหมดอยู่ในช่วง 1.50-9.73 mg PGE/g สาหร่ายแห้ง (ตารางที่ 3) โดยสารสกัดเอทานอลจากสาหร่าย *L. australis* จะมีปริมาณโพลีฟีนอลทั้งหมดมากที่สุด โดยมีปริมาณเท่ากับ  $29.18 \pm 0.83$  mg PGE/g สาหร่ายแห้ง (ภาพที่ 4) รองลงมาได้แก่ สารสกัดเอทานอลของ *P. australis* และ *P. tetrastrumtica* ตามลำดับ สำหรับสารสกัดส่วน lipophilic สาหร่าย *P. australis* จะมีปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดสูงสุดโดยมีค่าเท่ากับ  $9.73 \pm 0.52$  mg PGE/g สาหร่ายแห้ง รองลงมาได้แก่ *P. tetrastrumtica* และ *T. conoides* หากพิจารณาจากกลุ่มของสาหร่ายจะเห็นได้ว่าสาหร่ายในวงศ์ (Family) Dictyotaceae จะมีปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดมากกว่าสาหร่ายในวงศ์ Sargassaceae



ภาพที่ 4 ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดที่พบในสารสกัดจากสาหร่ายทะเลสีน้ำตาล 9 ชนิด

จากการศึกษาอิทธิพลของตัวทำละลายต่อประสิทธิภาพในการสกัดสารประกอบฟีนอลิกจากตัวอย่างสาหร่ายทั้ง 9 ชนิดนี้ สามารถสังเกตได้ว่าปริมาณฟีนอลิกที่แตกต่างกัน อาจเกิดขึ้นจากสมบัติทางกายภาพของตัวทำละลาย ดังที่กล่าวข้างต้น ซึ่งจากระดับความมีขี้ที่แตกต่างกันของตัวทำละลายจะส่งผลต่อการละลายหรือการสกัดสารที่มีองค์ประกอบทางเคมีประเภทต่างๆ รวมถึงสารประกอบฟีนอลิกออกมาจากตัวอย่างสาหร่าย ดังนั้นในการสกัดตัวอย่างสาหร่ายด้วยตัวทำละลายที่มีขี้ปานกลางเช่นเอทานอล จะมีผลต่อองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดที่ได้ก็จะมีขี้ปานกลางเช่นกัน รวมถึงได้สารประกอบฟีนอลิกในกลุ่มที่มีขี้ปานกลาง ในขณะที่การใช้ตัวทำละลายที่มีขี้ต่ำในการสกัดก็จะส่งผลให้ได้สารสกัดในกลุ่มที่มีขี้ต่ำด้วย ดังนั้นผลการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าสาหร่ายสีน้ำตาลทั้ง 9 ชนิดนี้มีปริมาณสารประกอบในกลุ่มที่มีขี้ปานกลางมากกว่าสารประกอบในกลุ่มที่มีขี้ต่ำ นอกจากนี้การเลือกใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ที่ระดับความมีขี้ที่แตกต่างกัน ยังมีผลให้สารประกอบฟีนอลิกที่สกัดได้มีปริมาณและลักษณะโครงสร้างที่แตกต่างกันไป ซึ่งอาจจะส่งผลต่อฤทธิ์ในการยับยั้งอนุมูลอิสระที่แตกต่างกันออกไป (Lopez et al., 2011)

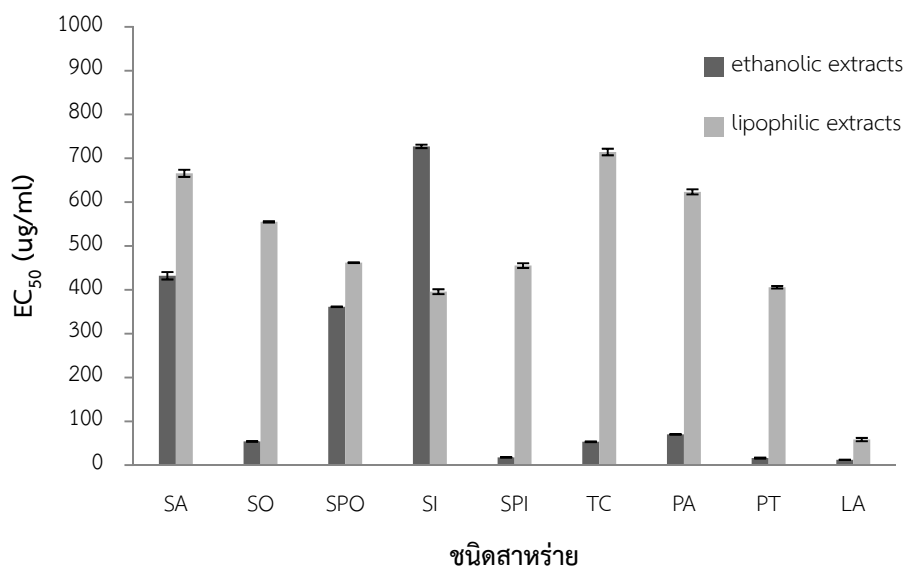
นอกจากนี้ยังมีรายงานกล่าวว่าปริมาณของฟีนอลิกที่แตกต่างกันในสาหร่ายแต่ละชนิดอาจเกิดจากปัจจัยทางสิ่งแวดล้อม เช่น สัตว์ที่มากัดกินสาหร่าย ความลึก ความเค็ม ปริมาณธาตุอาหารในน้ำทะเล และการเปลี่ยนแปลงของฤดูกาล เช่นเดียวกับปัจจัยในตัวของสาหร่ายเอง เช่น อายุ ความยาวของลำต้น และลักษณะของเนื้อเยื่อสาหร่าย (Conan et al., 2004; Sabeena Favin and Jacobsen, 2013)

#### 4.3 ความสามารถในการออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

##### 4.3.1) ประสิทธิภาพในการขจัดอนุมูล DPPH

การทดสอบด้วยวิธี DPPH radical scavenging เป็นการทดสอบประสิทธิภาพในการขจัดอนุมูลอิสระโดยสารต้านอนุมูลอิสระ ซึ่งอนุมูล DPPH เป็นอนุมูลอิสระสังเคราะห์ที่นิยมใช้ในการทดสอบเนื่องจากมีความคงตัวสูง และสารต้านอนุมูลอิสระในการศึกษานี้ ได้แก่ สารสกัดจากสาหร่ายสีน้ำตาล 9 ชนิด ทั้งนี้สารต้านอนุมูลอิสระจะทำหน้าที่ให้อิเล็กตรอนแก่อนุมูล DPPH ส่งผลให้โครงสร้างของอนุมูล DPPH เปลี่ยนไปเป็นโครงสร้างที่ไม่ใช่อนุมูลอิสระ โดยในการวิเคราะห์ประสิทธิภาพในการขจัดอนุมูล DPPH ของสารสกัดจากสาหร่ายจะรายงานผลการทดลองในค่า Half maximal effective concentration ( $EC_{50}$ ) ซึ่งหมายถึงค่าความเข้มข้นของสารตัวอย่างที่มีผลต่อการลดจำนวนของอนุมูลอิสระลงครึ่งหนึ่งจากจำนวนของอนุมูลอิสระเริ่มต้น โดยหากค่า  $EC_{50}$  มาก บ่งบอกถึงประสิทธิภาพของตัวอย่งนั้นต่ำ แต่ในทางกลับกันหากค่า  $EC_{50}$  น้อย บ่งบอกถึงประสิทธิภาพที่ดีของตัวอย่าง

ผลการศึกษาประสิทธิภาพในการขจัดอนุมูลอิสระ DPPH ของสารสกัดจากสาหร่ายทั้ง 9 ชนิด แสดงดังในภาพที่ 5 ในภาพรวมจะเห็นได้ว่าสารสกัดเอทานอลมีประสิทธิภาพในการขจัดอนุมูล DPPH ได้ดีกว่าสารสกัด lipophilic ยกเว้นในสาหร่าย *S. ilicifolium* ที่สารสกัดในส่วน lipophilic จะมีประสิทธิภาพดีกว่าสารสกัดเอทานอล



ภาพที่ 5 ประสิทธิภาพในการขจัดอนุมูล DPPH ของสารสกัดจากสาหร่ายสีน้ำตาล 9 ชนิด

ตารางที่ 4 ประสิทธิภาพในการขจัดอนุมูล DPPH ของสารสกัดจากสาหร่ายสีน้ำตาล 9 ชนิด

| ชนิด                           | ตัวย่อ | ค่า EC <sub>50</sub> (µg/mL) |                          |
|--------------------------------|--------|------------------------------|--------------------------|
|                                |        | Ethanolic extracts           | Lipophilic extracts      |
| <i>Sargassum aquifolium</i>    | (SA)   | 435.77±2.30 <sup>e</sup>     | 665±8.17 <sup>s</sup>    |
| <i>S. oligocystum</i>          | (SO)   | 54.14±0.54 <sup>b</sup>      | 525.05±1.45 <sup>e</sup> |
| <i>S. polycystum</i>           | (SPO)  | 361.45±0.65 <sup>d</sup>     | 462.06±0.89 <sup>d</sup> |
| <i>S. ilicifolium</i>          | (SI)   | 727.31±3.90 <sup>f</sup>     | 395.81±5.54 <sup>b</sup> |
| <i>S. plagiophyllum</i>        | (SPI)  | 17.81±0.03 <sup>a</sup>      | 455.31±5.34 <sup>d</sup> |
| <i>Tubinaria conoides</i>      | (TC)   | 53.87±0.74 <sup>b</sup>      | 714.45±7.49 <sup>h</sup> |
| <i>Padina australis</i>        | (PA)   | 70.30±0.47 <sup>c</sup>      | 623.57±4.73 <sup>f</sup> |
| <i>P. tetrastrumptica</i>      | (PT)   | 16.12±1.06 <sup>a</sup>      | 435.83±2.89 <sup>c</sup> |
| <i>Lobophora australis</i>     | (LA)   | 12.18±0.26 <sup>a</sup>      | 58.43±3.83 <sup>a</sup>  |
| BHT (Bytylated Hydroxytoluene) |        | 14.23±0.21                   |                          |

ค่าที่แสดงในตารางหมายถึง ค่าเฉลี่ย±SD (n=3)

ตัวอักษรตามแนวตั้ง (a-h) ที่ต่างกันแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ P<0.05

นอกจากนี้จากผลการศึกษายังพบว่า สารสกัดเอทานอลจาก *L. australis*, *P. tetrastrumtica* และ *S. plagiophyllum* จะมีประสิทธิภาพในการขจัดอนุมูล DPPH ได้ดีที่สุด (ตารางที่ 4) โดยมีค่า  $EC_{50}$  เท่ากับ  $12.18 \pm 0.26$ ,  $16.12 \pm 1.06$  และ  $17.81 \pm 0.03$   $\mu\text{g/mL}$  โดยไม่มีความแตกต่างกัน ( $P \leq 0.05$ ) และค่าที่ได้นี้มีค่าใกล้เคียงกับ BHT ( $EC_{50} = 14.23 \pm 0.21$   $\mu\text{g/mL}$ ) ที่เป็นสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน (positive control) สำหรับสารสกัดส่วน lipophilic พบว่าสารสกัดจาก *L. australis* จะมีประสิทธิภาพดีที่สุด มีค่า  $EC_{50}$  เท่ากับ  $58.43 \pm 3.83$   $\mu\text{g/mL}$  รองลงมาได้แก่ *S. ilicifolium* ( $395.81 \pm 5.54$   $\mu\text{g/mL}$ ) และ *P. tetrastrumtica* ( $435.83 \pm 2.89$   $\mu\text{g/mL}$ ) ตามลำดับ จากผลการศึกษานี้จะเห็นได้ว่า สารสกัดจากสาหร่าย *L. australis* มีความประสิทธิภาพในการขจัดอนุมูล DPPH ได้ดีทั้งสารสกัดเอทานอลและสารสกัด lipophilic โดยสารสกัด lipophilic จากสาหร่ายชนิดนี้ยังมีประสิทธิภาพดีกว่าสารสกัดเอทานอลของ *S. aquifolium*, *S. polycystum* และ *S. ilicifolium*

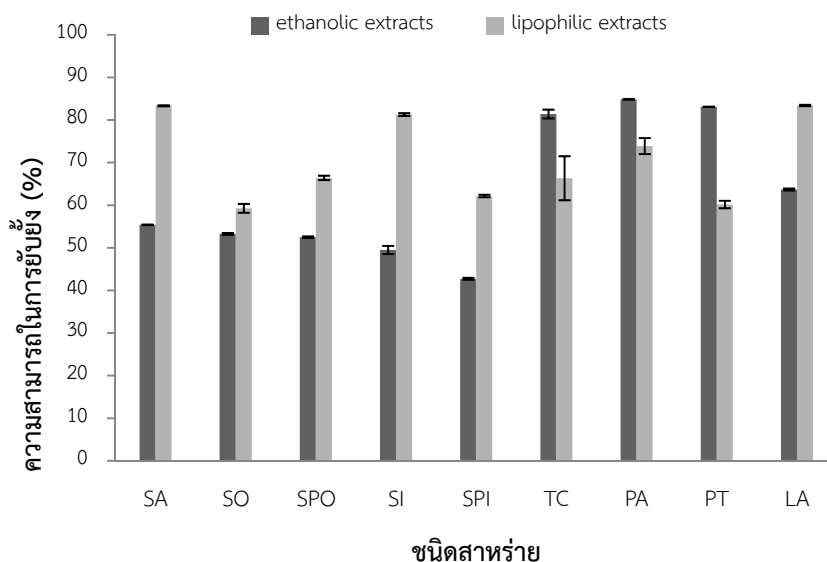
นอกจากนี้เมื่อเปรียบเทียบกับผลการศึกษาก่อนหน้า ประสิทธิภาพในการขจัดอนุมูล DPPH ของ *S. aquifolium* (syn. *S. binderi*) และ *T. conoides* ในการศึกษาที่มีผลน้อยกว่าที่เคยมีรายงานไว้โดย Boonchum et al. (2011) ซึ่งศึกษาสาหร่ายทั้ง 2 ชนิด นี้ในประเทศไทย โดยมีค่า  $EC_{50}$  เท่ากับ 0.13  $\mu\text{g/mL}$  และ 0.84  $\mu\text{g/mL}$  ตามลำดับ ขณะที่ประสิทธิภาพในการขจัดอนุมูล DPPH ของ *S. plagiophyllum* ในการศึกษาครั้งนี้ มีประสิทธิภาพดีกว่าสารสกัดอะซิโตนจากสาหร่ายชนิดเดียวกันนี้ที่รายงานโดย Suresh et al. (2012) ซึ่งมีค่า  $EC_{50}$  เท่ากับ 910  $\mu\text{g/mL}$

จากผลการศึกษาข้างต้นจะเห็นได้ว่า ถึงแม้จะเป็นสาหร่ายชนิดเดียวกัน แต่หากเก็บจากต่างสถานที่ ในเวลาที่ต่างกันก็จะส่งผลให้ประสิทธิภาพในการออกฤทธิ์ต่างกันได้ เนื่องจากองค์ประกอบทางเคมีต่างๆ ในสาหร่ายนั้นสามารถแปรผันได้ตามปัจจัยทั้งภายนอกและภายใน เช่น ปริมาณแสง ความเค็ม ธาตุอาหารในบริเวณที่เจริญ ฤดูกาล สถานที่เก็บ สัตว์หน้าดินกลุ่มที่กินสาหร่ายเป็นอาหาร อายุของสาหร่าย ความยาว ชนิดของเนื้อเยื่อ รวมถึงวิธีการในการสกัด (Balboa et al., 2013) ซึ่งอาจจะทำให้สารออกฤทธิ์และฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระที่อยู่ในสาหร่ายต่างกัน

#### 4.3.2) ประสิทธิภาพในการยับยั้งอนุมูล Hydroxyl

การศึกษาประสิทธิภาพในการยับยั้งอนุมูล hydroxyl ของสารตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษานี้ เป็นการสังเคราะห์อนุมูล hydroxyl โดยผ่านปฏิกิริยา Fenton reaction ( $\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{Fe}^{3+} + \text{OH}^- + \bullet\text{OH}$ ) จากนั้นอนุมูล hydroxyl ที่เกิดขึ้นจะไปออกซิไดซ์ deoxyribose และเมื่อเติม สาร Thiobarbituric acid (TBA) และ Trichloroacetic acid (TCA) จะเกิดเป็นสารเชิงซ้อนของ 2-thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) ถ้าสารที่ใช้ทดสอบมีความสามารถในการยับยั้งอนุมูล hydroxyl ที่

เกิดขึ้นได้ ก็จะทำให้ deoxyribose ไม่ถูกออกซิไดซ์ โดยผลการยับยั้งอนุมูล hydroxyl ของสารสกัดจากสาหร่ายสีน้ำตาล 9 ชนิด แสดงผลดังภาพที่ 7 และตารางที่ 5



ภาพที่ 6 ประสิทธิภาพในการยับยั้งอนุมูล hydroxyl ของสารสกัดจากสาหร่ายสีน้ำตาล 9 ชนิด

จากการทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งอนุมูล hydroxyl ของสารสกัดจากสาหร่าย 9 ชนิดในภาพรวมพบว่า ในกลุ่มของสาหร่ายสกุล *Sargassum* และ *Lobophora* สารสกัดเอทานอลจะมีประสิทธิภาพน้อยกว่าสารสกัด lipophilic (ภาพที่ 6) แสดงให้เห็นว่าสารที่มีความสามารถในการยับยั้งอนุมูล hydroxyl ของสาหร่ายกลุ่มนี้เป็นสารที่อยู่ในกลุ่มมีขั้วน้อย หรือ lipid soluble ขณะที่ในสาหร่าย *T. conoides*, *P. australis* และ *P. tetrastrumatica* สารสกัดเอทานอลจะมีประสิทธิภาพมากกว่าสารสกัดส่วน lipophilic

นอกจากนี้ยังพบว่าในส่วนของสารสกัดเอทานอล สารสกัดจากสาหร่าย *P. australis* จะมีประสิทธิภาพในการยับยั้งอนุมูล hydroxyl ดีที่สุด ( $84.84 \pm 0.09\%$ ) รองลงมาได้แก่สาหร่าย *P. tetrastrumatica* ( $83.10 \pm 0.01\%$ ) และ *T. conoides* ( $81.40 \pm 1.03\%$ ) ตามลำดับ (ตารางที่ 5) ขณะที่ในสารสกัดส่วน lipophilic สารสกัดจาก *S. aquifolium*, *S. ilicifolium* และ *L. australis* จะมีประสิทธิภาพในการยับยั้งอนุมูล hydroxyl ได้ดีที่สุด เท่ากับ  $83.33 \pm 0.12\%$ ,  $81.28 \pm 0.32\%$  และ  $83.41 \pm 0.17\%$  ตามลำดับ โดยประสิทธิภาพของสารสกัด lipophilic จากสาหร่ายทั้ง 3 ชนิดนี้ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ( $P < 0.05$ ) นอกจากนี้ยังพบว่าในสารสกัดจากสาหร่าย *S. plagiophyllum* จะมีประสิทธิภาพต่ำที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับสาหร่ายชนิดอื่นที่ใช้ตัวทำละลายในการสกัดเหมือนกัน อย่างไรก็ตาม

ตาม เมื่อเปรียบเทียบกับสารยับยั้งอนุมูลอิสระมาตรฐาน Ascorbic acid (positive control) จะเห็นได้ว่าสารสกัดจากสาหร่ายทั้งหมดมีประสิทธิภาพในการยับยั้งอนุมูล hydroxyl ได้น้อยกว่าสารมาตรฐาน

ตารางที่ 5 ประสิทธิภาพในการยับยั้งอนุมูล hydroxyl ของสารสกัดจากสาหร่ายสีน้ำตาล 9 ชนิด

| ชนิด                        | ตัวย่อ | ความสามารถในการยับยั้ง (%)* |                         |
|-----------------------------|--------|-----------------------------|-------------------------|
|                             |        | Ethanollic extracts         | Lipophilic extracts     |
| <i>Sargassum aquifolium</i> | (SA)   | 55.40±0.06 <sup>d</sup>     | 83.33±0.12 <sup>d</sup> |
| <i>S. oligocystum</i>       | (SO)   | 53.26±0.21 <sup>c</sup>     | 59.26±1.04 <sup>a</sup> |
| <i>S. polycystum</i>        | (SPO)  | 52.50±0.20 <sup>c</sup>     | 66.41±0.51 <sup>b</sup> |
| <i>S. ilicifolium</i>       | (SI)   | 49.49±0.96 <sup>b</sup>     | 81.28±0.32 <sup>d</sup> |
| <i>S. plagiophyllum</i>     | (SPL)  | 42.72±0.22 <sup>a</sup>     | 62.15±0.28 <sup>a</sup> |
| <i>Tubinaria conoides</i>   | (TC)   | 81.40±1.03 <sup>f</sup>     | 66.33±5.17 <sup>b</sup> |
| <i>Padina australis</i>     | (PA)   | 84.84±0.09 <sup>h</sup>     | 73.88±1.87 <sup>c</sup> |
| <i>P. tetrastromptica</i>   | (PT)   | 83.10±0.01 <sup>g</sup>     | 60.16±0.87 <sup>a</sup> |
| <i>Lobophora australis</i>  | (LA)   | 63.69±0.24 <sup>e</sup>     | 83.41±0.17 <sup>d</sup> |
| Ascorbic acid               |        | 97.34±0.12                  |                         |

\*ที่ความเข้มข้น 1 mg/mL

ค่าที่แสดงในตารางหมายถึง ค่าเฉลี่ย±SD (n=3)

ตัวอักษรตามแนวตั้ง (a-h) ที่ต่างกันแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ P<0.05

เมื่อเปรียบเทียบกับผลการศึกษาก่อนหน้าพบว่า ประสิทธิภาพในการยับยั้งอนุมูลอิสระของสาหร่าย *T. conoides* และ *P. tetrastomatica* ในการศึกษาครั้งนี้ยังมีค่าใกล้เคียงกับการศึกษาของ Chandini et al. (2008) ที่สารสกัดเมทานอลจากสาหร่ายทั้ง 2 ชนิดนี้ มีค่าเท่ากับ 82.09±9.40% สำหรับ *T. conoides* และ 87.38±5.73% สำหรับ *P. tetrastomatica*

#### 4.3.3) ประสิทธิภาพในการรีดิวซ์ของสารสกัดจากสาหร่าย

วิธีนี้เป็นการศึกษาความสามารถในการรีดิวซ์ หรือให้อิเล็กตรอนของสารตัวอย่างที่ต้องการทดสอบแก่สารอนุมูลอิสระที่สังเคราะห์ขึ้นภายในระบบ โดยสารที่ต้องการทดสอบจะเป็นตัวให้อิเล็กตรอนแก่อนุมูลอิสระแล้วทำให้เปลี่ยนเป็นสารที่คงตัว อีกทั้งยังสามารถหยุดปฏิกิริยาลูกโซ่ของอนุมูลอิสระอีกด้วย โดยอาศัยจากการวัดปฏิกิริยา reduction ของ  $\text{Fe}^{3+}(\text{CN})_6$  ไปเป็น  $\text{Fe}^{2+}(\text{CN})_6$  ซึ่งจะทำให้มีสีน้ำเงิน

ที่เข้มข้น ซึ่งค่าประสิทธิภาพในการรีดิวซ์ของสารสกัดจากสาหร่าย 9 ชนิด ที่วิเคราะห์ได้แสดงดังตารางที่ โดยรายงานผลการทดลองในค่าของ  $\mu\text{M}$  ascorbic acid equivalent (AAE)/g ของสารสกัด โดยอาศัย กราฟมาตรฐานของ L-ascorbic acid ( $R^2 = 0.9927$ ) (ภาพผนวกที่ 1)

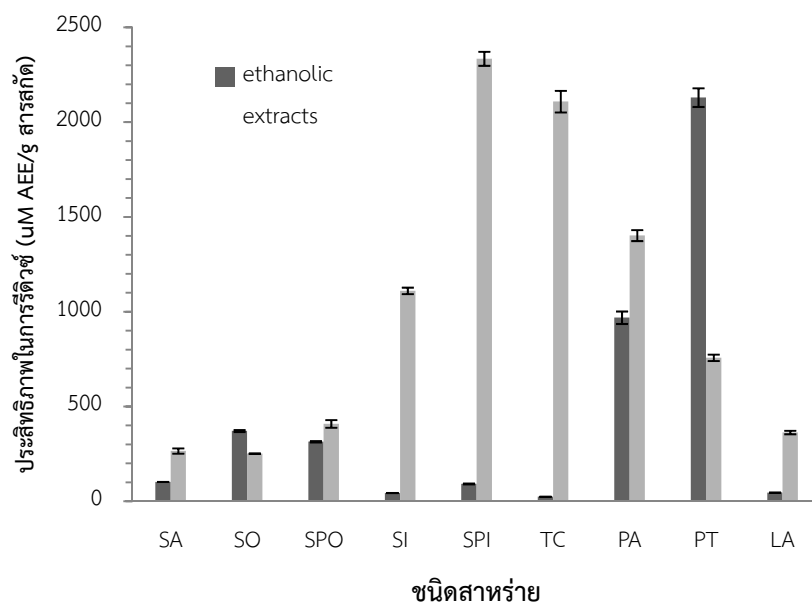
ผลการศึกษาประสิทธิภาพในการรีดิวซ์ของสารสกัดจากสาหร่าย (ตารางที่ 6) พบว่าสารสกัดส่วน lipophilic จะมีความสามารถในการรีดิวซ์มากกว่าสารสกัดเอทานอล ซึ่งให้เห็นว่าสารประกอบที่มีความสามารถในการรีดิวซ์ในสาหร่ายส่วนใหญ่เป็นสารในกลุ่มที่มีขั้วน้อย ยกเว้นใน *S. oligocystum* และ *P. tetrastromatica* ที่สารสกัดเอทานอลจะมีความสามารถในการรีดิวซ์มากกว่าสารสกัดส่วน lipophilic แสดงให้เห็นว่าในสาหร่ายทั้งสองชนิดนี้ สารประกอบที่มีความสามารถในการรีดิวซ์จะเป็นสารที่อยู่ในกลุ่มที่มีขั้วปานกลาง

ตารางที่ 6 ประสิทธิภาพในการรีดิวซ์ของสารสกัดจากสาหร่ายสีน้ำตาล 9 ชนิด

| ชนิด                        | ตัวย่อ | Reducing ability ( $\mu\text{M}$ AAE/g สารสกัด) |                                   |
|-----------------------------|--------|-------------------------------------------------|-----------------------------------|
|                             |        | Ethanollic extracts                             | Lipophilic extracts               |
| <i>Sargassum aquifolium</i> | (SA)   | 102.70 $\pm$ 0.31 <sup>b</sup>                  | 265.79 $\pm$ 13.87 <sup>a</sup>   |
| <i>S. oligocystum</i>       | (SO)   | 371.31 $\pm$ 5.10 <sup>d</sup>                  | 251.89 $\pm$ 1.52 <sup>a</sup>    |
| <i>S. polycystum</i>        | (SPO)  | 314.77 $\pm$ 3.58 <sup>c</sup>                  | 408.60 $\pm$ 20.29 <sup>b</sup>   |
| <i>S. ilicifolium</i>       | (SI)   | 44.36 $\pm$ 0.19 <sup>a</sup>                   | 1,110.57 $\pm$ 17.05 <sup>d</sup> |
| <i>S. plagiophyllum</i>     | (SPL)  | 92.02 $\pm$ 2.21 <sup>b</sup>                   | 2,334.70 $\pm$ 36.94 <sup>g</sup> |
| <i>Tubinaria conoides</i>   | (TC)   | 24.28 $\pm$ 1.30 <sup>a</sup>                   | 2,108.90 $\pm$ 56.92 <sup>f</sup> |
| <i>Padina australis</i>     | (PA)   | 969.03 $\pm$ 32.84 <sup>e</sup>                 | 1,402.34 $\pm$ 29.00 <sup>e</sup> |
| <i>P. tetrastromatica</i>   | (PT)   | 2,130.08 $\pm$ 49.23 <sup>f</sup>               | 757.50 $\pm$ 16.92 <sup>c</sup>   |
| <i>Lobophora australis</i>  | (LA)   | 46.12 $\pm$ 0.43 <sup>a</sup>                   | 363.32 $\pm$ 9.21 <sup>b</sup>    |

ค่าที่แสดงในตารางหมายถึง ค่าเฉลี่ย $\pm$ SD (n=3)

ตัวอักษรตามแนวตั้ง (a-g) ที่ต่างกันแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่  $P < 0.05$



ภาพที่ 7 ประสิทธิภาพในการรีดิวซ์ของสารสกัดจากสาหร่ายสีน้ำตาล 9 ชนิด

นอกจากนี้ยังพบว่า สารสกัด lipophilic จาก *S. plagiophyllum* จะมีความสามารถในการรีดิวซ์มากที่สุด โดยมีค่าเท่ากับ  $2,334.70 \pm 36.94$   $\mu\text{M AEE/g}$  สารสกัด รองลงมาได้แก่ สารสกัดเอทานอลจาก *P. tetrastrum* ( $2,130.08 \pm 49.23$   $\mu\text{M AEE/g}$  สารสกัด) และสารสกัด lipophilic ของ *T. conoides* ( $2,108.90 \pm 56.92$   $\mu\text{M AEE/g}$  สารสกัด) ตามลำดับ (ภาพที่ 7)

#### 4.3.4) ประสิทธิภาพในการจับโลหะของสารสกัดจากสาหร่าย

การวิเคราะห์ประสิทธิภาพในการจับโลหะของสารสกัดด้วยวิธี FIC นี้เป็นวิธีการที่นิยมใช้ในการหาความสามารถในการต้านออกซิเดชันของสารที่ต้องการทดสอบโดยอาศัยความสามารถในการแย่งจับกับโลหะ  $\text{Fe}^{2+}$  เมื่อเติมสาร Ferrozine ลงไป สารนี้จะไปจับกับ  $\text{Fe}^{2+}$  แล้วอยู่ในรูป Ferrozine -  $\text{Fe}^{2+}$  complex ซึ่งจะให้สีแดง และถ้าสารที่ต้องการทดสอบมีความสามารถในการแย่งจับกับ  $\text{Fe}^{2+}$  จะอยู่ในรูป Antioxidant -  $\text{Fe}^{2+}$  complex แล้วจะทำให้สีแดงของ Ferrozine -  $\text{Fe}^{2+}$  complex จางลงได้ วิธีการนี้จัดเป็นการวิเคราะห์ประสิทธิภาพในการต้านออกซิเดชันในบทบาทการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระแบบทุติยภูมิ (secondary antioxidant) โดยสารที่ต้องการทดสอบจะทำหน้าที่จับโลหะ ( $\text{Fe}^{2+}$ ) ที่มีบทบาทในการเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันได้ ทำให้เกิดสารประกอบเชิงซ้อนระหว่างโลหะกับสารต้านอนุมูลอิสระ ส่งผลให้โลหะไม่สามารถทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันได้ โดยผลการศึกษาประสิทธิภาพในการจับโลหะของสารสกัดจากสาหร่ายทั้ง 9 ชนิด แสดงดังตารางที่ 7 การทดสอบประสิทธิภาพในการจับโลหะจะแสดงผลเป็น % และค่า  $\text{EC}_{50}$  (บางตัวอย่างเท่านั้นที่สามารถคำนวณได้จากช่วงความเข้มข้นที่ทดสอบ) โดย ND หมายถึงตัวอย่างที่ไม่มีความสามารถในการเป็นสารจับโลหะ

ตารางที่ 7 ประสิทธิภาพในการจับโลหะของสารสกัดจากสาหร่ายสีน้ำตาล 9 ชนิด

| ชนิด                        | ตัวย่อ | ความเข้มข้น<br>( $\mu\text{g/mL}$ ) | Chelating ability   |                                       |                     |                                       |
|-----------------------------|--------|-------------------------------------|---------------------|---------------------------------------|---------------------|---------------------------------------|
|                             |        |                                     | Ethanollic extracts |                                       | Lipophilic extracts |                                       |
|                             |        |                                     | %                   | EC <sub>50</sub> ( $\mu\text{g/mL}$ ) | %                   | EC <sub>50</sub> ( $\mu\text{g/mL}$ ) |
| <i>Sargassum aquifolium</i> | (SA)   | 100                                 | 9.58 $\pm$ 0.54     |                                       |                     |                                       |
|                             |        | 200                                 | 15.38 $\pm$ 1.39    |                                       |                     |                                       |
|                             |        | 300                                 | 22.90 $\pm$ 1.35    |                                       |                     |                                       |
|                             |        | 400                                 | 35.84 $\pm$ 0.49    | 689.46                                | ND                  | ND                                    |
|                             |        | 500                                 | 42.91 $\pm$ 0.66    |                                       |                     |                                       |
|                             |        | 1000                                | 65.53 $\pm$ 1.73    |                                       |                     |                                       |
| <i>S. oligocystum</i>       | (SO)   | 100                                 | 5.81 $\pm$ 0.63     |                                       | 0.43 $\pm$ 0.28     |                                       |
|                             |        | 200                                 | 25.06 $\pm$ 1.91    |                                       | 2.33 $\pm$ 1.21     |                                       |
|                             |        | 300                                 | 39.99 $\pm$ 0.13    | 406.48                                | 7.92 $\pm$ 0.76     | ND                                    |
|                             |        | 400                                 | 50.24 $\pm$ 0.99    |                                       | 15.61 $\pm$ 0.41    |                                       |
|                             |        | 500                                 | 57.80 $\pm$ 0.92    |                                       | 19.08 $\pm$ 1.21    |                                       |
| <i>S. polycystum</i>        | (SPO)  | 100                                 | 15.98 $\pm$ 1.36    |                                       | 0.65 $\pm$ 0.26     |                                       |
|                             |        | 200                                 | 30.68 $\pm$ 4.00    |                                       | 2.65 $\pm$ 0.37     |                                       |
|                             |        | 300                                 | 31.69 $\pm$ 1.06    |                                       | 4.27 $\pm$ 0.33     |                                       |
|                             |        | 400                                 | 40.83 $\pm$ 1.07    | 526.27                                | 10.32 $\pm$ 0.13    | ND                                    |
|                             |        | 500                                 | 47.34 $\pm$ 0.51    |                                       | 16.22 $\pm$ 0.45    |                                       |
|                             |        | 1000                                | 73.21 $\pm$ 2.23    |                                       | 23.43 $\pm$ 1.56    |                                       |
| <i>S. ilicifolium</i>       | (SI)   | 100-500                             | ND                  | ND                                    | ND                  | ND                                    |
| <i>S. plagiophyllum</i>     | (SPL)  | 100-500                             | ND                  | ND                                    | ND                  | ND                                    |
| <i>Tubinaria conoides</i>   | (TC)   | 100                                 | 1.30 $\pm$ 0.42     |                                       | 12.11 $\pm$ 1.99    |                                       |
|                             |        | 200                                 | 24.18 $\pm$ 0.71    |                                       | 22.78 $\pm$ 2.95    |                                       |
|                             |        | 300                                 | 40.70 $\pm$ 0.80    |                                       | 34.18 $\pm$ 0.40    |                                       |
|                             |        | 400                                 | 52.14 $\pm$ 1.53    | 384.71                                | 47.41 $\pm$ 0.85    | 564.54                                |
|                             |        | 500                                 | 59.97 $\pm$ 0.79    |                                       | 49.22 $\pm$ 1.04    |                                       |
|                             |        | 1000                                | 64.32 $\pm$ 0.46    |                                       | 63.78 $\pm$ 0.56    |                                       |
| <i>Padina australis</i>     | (PA)   | 100                                 | ND                  |                                       | 0.73 $\pm$ 0.35     |                                       |
|                             |        | 200                                 | 0.39 $\pm$ 0.03     |                                       | 3.71 $\pm$ 1.27     |                                       |
|                             |        | 300                                 | 21.55 $\pm$ 0.86    |                                       | 17.62 $\pm$ 1.01    |                                       |
|                             |        | 400                                 | 37.82 $\pm$ 2.71    | 639.33                                | 21.56 $\pm$ 0.88    | ND                                    |
|                             |        | 500                                 | 49.05 $\pm$ 2.55    |                                       | 22.19 $\pm$ 0.26    |                                       |
|                             |        | 1000                                | 61.13 $\pm$ 1.24    |                                       | 23.34 $\pm$ 0.89    |                                       |

ตารางที่ 7 (ต่อ)

| ชนิด                                   | ตัวย่อ | ความเข้มข้น<br>(µg/mL) | Chelating ability              |                          |                     |                          |
|----------------------------------------|--------|------------------------|--------------------------------|--------------------------|---------------------|--------------------------|
|                                        |        |                        | Ethanolic extracts             |                          | Lipophilic extracts |                          |
|                                        |        |                        | %                              | EC <sub>50</sub> (µg/mL) | %                   | EC <sub>50</sub> (µg/mL) |
| <i>Padina tetrastromptica</i>          | (PT)   | 100                    | 1.84±1.31                      |                          |                     |                          |
|                                        |        | 200                    | 5.37±1.09                      |                          |                     |                          |
|                                        |        | 300                    | 5.62±0.22                      | ND                       | ND                  | ND                       |
|                                        |        | 400                    | 6.77±1.41                      |                          |                     |                          |
|                                        |        | 500                    | 6.47±0.18                      |                          |                     |                          |
| <i>Lobophora australis</i>             | (LA)   | 50                     | -                              |                          | 10.84±1.50          |                          |
|                                        |        | 100                    | 5.92±1.19                      |                          | 53.96±0.43          |                          |
|                                        |        | 200                    | 10.94±0.84                     | ND                       | 68.07±2.29          | 87.55                    |
|                                        |        | 300                    | 14.15±0.71                     |                          | 71.74±0.60          |                          |
|                                        |        | 400                    | 17.21±0.47                     |                          | 73.62±1.39          |                          |
|                                        |        | 500                    | 20.28±0.25                     |                          | 74.38±2.29          |                          |
| Ethelenediaminetetraacetic acid (EDTA) |        |                        | EC <sub>50</sub> = 28.39 µg/mL |                          |                     |                          |

ค่าที่แสดงในตารางหมายถึง ค่าเฉลี่ย $\pm$ SD (n=3)

ND = not detected (no activity)

จากผลการศึกษาพบว่า ประสิทธิภาพในการจับโลหะของสารสกัดจะเพิ่มมากขึ้นเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารสกัด สอดคล้องกับการศึกษาของ Chew et al. (2008) และ Chakraborty et al. (2013) และในภาพรวมสารสกัดเอทานอลจะมีความสามารถในการจับโลหะมากกว่าสารสกัดส่วนไขมัน (ตารางที่ 7) ยกเว้นใน *L. australis* ซึ่งสารสกัดในส่วน lipophilic จะมีความสามารถมากกว่าสารสกัดเอทานอล นอกจากนี้ยังเห็นได้ว่า สารสกัดจากสาหร่ายบางชนิดไม่มีความสามารถในการจับโลหะ เช่น *S. ilicifolium* และ *S. plagiophyllum* และสารสกัดส่วน lipophilic ของ *S. aquifolium* และ *P. tetrastrum* จากผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่าสารที่มีความสามารถในการจับโลหะในสาหร่ายสีน้ำตาลจะเป็นกลุ่มของสารประกอบที่มีขั้วปานกลาง มากกว่ากลุ่มที่มีขั้วน้อยหรือไม่มีขั้ว และเมื่อพิจารณาจากค่า  $\text{EC}_{50}$  พบว่า สารสกัดส่วน lipophilic จาก *L. australis* จะมีประสิทธิภาพในการดักจับโลหะได้ดีที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับสารสกัดของสาหร่ายทุกชนิด โดยมีค่า  $\text{EC}_{50}$  เท่ากับ 87.55  $\mu\text{g/mL}$  รองลงมาได้แก่ สารสกัดเอทานอลจาก *T. conoides* ( $\text{EC}_{50}$  เท่ากับ 384.71  $\mu\text{g/mL}$ ) และสารสกัดเอทานอลจาก *S. polycystum* ( $\text{EC}_{50}$  เท่ากับ 406.48  $\mu\text{g/mL}$ ) ตามลำดับ อย่างไรก็ตามค่าที่ได้นี้ก็ยิ่งน้อยกว่า EDTA ซึ่งเป็นสารมาตรฐานที่ใช้ในการทดสอบประสิทธิภาพในการดักจับโลหะ ( $\text{EC}_{50} = 28.39 \mu\text{g/mL}$ ) นอกจากนี้ยังพบว่า

ประสิทธิภาพในการจับโลหะของสารสกัดเอทานอลจาก *T. conoides* ในการศึกษาครั้งนี้มีค่าใกล้เคียงกับสารสกัดไดคลอโรมีเทนของสาหร่ายชนิดเดียวกันนี้ที่ศึกษาโดย Chakraborty et al. (2013)

#### 4.5 องค์ประกอบทางเคมีในสารสกัดส่วน lipophilic

##### 4.5.1) ปริมาณฟูโคแซนทิน

ฟูโคแซนทิน เป็นสารกลุ่มแคโรทีนอยด์ที่พบมากในสาหร่ายสีน้ำตาล และมีสัดส่วนคิดเป็นประมาณ 10% ของแคโรทีนอยด์ที่พบในธรรมชาติ และมีรายงานว่ามีความดีต่อสุขภาพในหลายประการ เช่น ป้องกันการเกิดโรคมะเร็ง โรคอ้วน เบาหวาน ยับยั้งการเกิดออกซิเดชัน และต้านการอักเสบ เป็นต้น (Nomura et al., 2013) นอกจากนี้ยังมีรายงานว่า สารฟูโคแซนทินที่สกัดได้จากสาหร่าย *Laminaria japonica* มีคุณสมบัติในการกีดการทำงานของเอนไซม์ Tyrosinase ได้และมีความสามารถในการยับยั้งกระบวนการเกิดสีได้ซึ่งอาจจะนำมาพัฒนาเป็นเครื่องสำอางบำรุงผิว (skin whitening agent) ได้ (Kim and Pangestuti, 2011) และการบริโภคฟูโคแซนทินมีส่วนช่วยให้ร่างกายสามารถสังเคราะห์ DHA ได้มากขึ้น (Tsukui et al., 2009)

จากการตรวจวิเคราะห์ปริมาณฟูโคแซนทินในสารสกัดส่วน lipophilic ของสาหร่าย 9 ชนิด ให้ผลแสดงดังตารางที่ 8

ตารางที่ 8 ปริมาณฟูโคแซนทินที่พบในสารสกัดส่วน lipophilic ของสาหร่ายสีน้ำตาล 9 ชนิด

| ชนิด                        | ตัวย่อ | ปริมาณฟูโคแซนทิน            |                            |
|-----------------------------|--------|-----------------------------|----------------------------|
|                             |        | mg/ g สารสกัด               | mg/g สาหร่ายแห้ง           |
| <i>Sargassum aquifolium</i> | (SA)   | 31.39 ± 0.88 <sup>b</sup>   | 1.64 ± 0.05 <sup>b</sup>   |
| <i>S. oligocystum</i>       | (SO)   | 44.31 ± 4.21 <sup>c,d</sup> | 2.51 ± 0.24 <sup>c</sup>   |
| <i>S. polycystum</i>        | (SPO)  | 60.59 ± 3.73 <sup>e</sup>   | 2.84 ± 0.17 <sup>d</sup>   |
| <i>S. ilicifolium</i>       | (SI)   | 42.24 ± 3.33 <sup>c,d</sup> | 1.13 ± 0.09 <sup>a</sup>   |
| <i>S. plagiophyllum</i>     | (SPL)  | 60.59 ± 3.73 <sup>e</sup>   | 2.58 ± 0.16 <sup>c,d</sup> |
| <i>Tubinaria conoides</i>   | (TC)   | 46.58 ± 0.00 <sup>d</sup>   | 4.32 ± 0.00 <sup>f</sup>   |
| <i>Padina australis</i>     | (PA)   | 38.81 ± 0.60 <sup>c</sup>   | 4.67 ± 0.07 <sup>g</sup>   |
| <i>P. tetrastrum</i>        | (PT)   | 60.73 ± 5.23 <sup>e</sup>   | 3.97 ± 0.34 <sup>e</sup>   |
| <i>Lobophora australis</i>  | (LA)   | 18.96 ± 1.64 <sup>a</sup>   | 0.99 ± 0.09 <sup>a</sup>   |

ค่าที่แสดงในตารางหมายถึง ค่าเฉลี่ย±SD (n=3)

ตัวอักษรตามแนวตั้ง (a-g) ที่ต่างกันแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ P<0.05

จากตารางที่ 8 พบว่าสารสกัดส่วน lipophilic ของสาหร่าย *P. australis* จะมีปริมาณฟิวโคแซนทินสูงที่สุด เท่ากับ  $4.67 \pm 0.07$  mg/ g สาหร่ายแห้ง) รองลงมาได้แก่ *T. conoides* ( $4.32 \pm 0.00$  mg/ g สาหร่ายแห้ง) และ *S. polycystum* ( $2.84 \pm 0.17$  mg/ g สาหร่ายแห้ง) ตามลำดับ โดยสาหร่ายที่มีปริมาณฟิวโคแซนทินน้อยที่สุดคือ *L. australis* ( $0.99 \pm 0.09$  mg/ g สาหร่ายแห้ง) และ *S. ilicifolium* ( $1.13 \pm 0.09$  mg/ g สาหร่ายแห้ง)

ปริมาณของฟิวโคแซนทินในสาหร่ายสกุล *Sargassum* ที่ใช้ในการศึกษานี้มีปริมาณอยู่ในช่วง 1.13-2.84 mg/g สาหร่ายแห้ง สอดคล้องกับรายงานของ Terasaki et al. (2009) ที่กล่าวว่าสาหร่ายในสกุล *Sargassum* จะมีปริมาณฟิวโคแซนทินอยู่ในช่วง 1-8 mg/g ของน้ำหนักแห้ง นอกจากนี้ปริมาณของฟิวโคแซนทินจะสามารถแปรผันได้ตามฤดูกาลได้เช่นกัน

#### 4.5.2) ปริมาณวิตามินอี

วิตามินอี เป็นสารต้านการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันและอนุมูลอิสระที่มีประสิทธิภาพ (potent antioxidant) ซึ่งมีผลในการป้องกันการทำลายเซลล์ หรือลดความเสี่ยงของอวัยวะต่างๆ ที่มีสาเหตุมาจากอนุมูลอิสระได้ นอกจากนี้ยังมีผลช่วยปกป้องการเสื่อมสลายของเยื่อหุ้มเซลล์ (stabilize) ที่ขึ้นอยู่กับอวัยวะต่างๆ เช่น ผิวหนัง ตา ตับ เต้านม หลอดเลือด และเม็ดเลือดแดง ทำให้อวัยวะดังกล่าวทำงานอย่างมีประสิทธิภาพและมีความคงทนมากขึ้นด้วย คุณสมบัติที่เป็นสารต้านอนุมูลอิสระของวิตามินอี นอกจากจะช่วยป้องกันเซลล์จากการทำลายของปฏิกิริยาออกซิเดชันและการเกิดอนุมูลอิสระแล้ว วิตามินอียังช่วยป้องกันการเกิดสารไนโตรซามีน (nitrosamines) ตัวการหนึ่งที่เกิดโรคมะเร็ง โดยเกิดจากการทำปฏิกิริยาของสารจำพวกไนไตรท์ที่มีในอาหารที่รับประทานเข้าไปภายในกระเพาะอาหาร และยังช่วยเสริมสร้างภูมิคุ้มกันให้กับร่างกายอีกด้วย โดยวิตามินอีนั้นมีความสำคัญต่อร่างกายเนื่องจากมีส่วนสำคัญในการป้องกันไขมันที่ผนังเซลล์จากการเกิด peroxidation โดยทั่วไปแล้ววิตามินอีที่พบจะมีทั้งหมด 8 รูปแบบ ได้แก่  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -,  $\delta$ -tocopherol และ  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -,  $\delta$ -tocotrienols ซึ่งแบบ  $\alpha$  จะมีผลเป็นสาร antioxidant สูงสุด และในสาหร่ายกลุ่มสีน้ำตาลจะมีปริมาณวิตามินอีสูงกว่าที่พบในสาหร่ายสีเขียวและสีแดง (Mišcová, 2012)

จากการตรวจสอบปริมาณวิตามินอี ( $\alpha$ -tocopherol) ที่พบในสารสกัดส่วน lipophilic ในสาหร่ายสีน้ำตาลทั้ง 9 ชนิด แสดงผลดังตารางที่ 9

ตารางที่ 9 ปริมาณวิตามินอี ( $\alpha$ -tocopherol) ของสารสกัดส่วน lipophilic จากสาหร่ายสีน้ำตาล 9 ชนิด

| ชนิด                        | ตัวย่อ | ปริมาณวิตามินอี       |                       |
|-----------------------------|--------|-----------------------|-----------------------|
|                             |        | mg/ g สารสกัด         | mg/100g สาหร่ายแห้ง   |
| <i>Sargassum aquifolium</i> | (SA)   | $3.06 \pm 0.67^e$     | $15.91 \pm 3.46^e$    |
| <i>S. oligocystum</i>       | (SO)   | $2.28 \pm 0.18^d$     | $12.92 \pm 1.04^d$    |
| <i>S. polycystum</i>        | (SPO)  | $1.01 \pm 0.29^{b,c}$ | $4.74 \pm 1.36^b$     |
| <i>S. ilicifolium</i>       | (SI)   | $3.26 \pm 0.03^e$     | $8.72 \pm 0.09^c$     |
| <i>S. plagiophyllum</i>     | (SPL)  | $6.19 \pm 0.21^f$     | $26.40 \pm 0.36^f$    |
| <i>Tubinaria conoides</i>   | (TC)   | $0.68 \pm 0.00^{a,b}$ | $6.30 \pm 0.00^{b,c}$ |
| <i>Padina australis</i>     | (PA)   | $0.59 \pm 0.11^{a,b}$ | $7.14 \pm 1.36^{b,c}$ |
| <i>P. tetrastrumptica</i>   | (PT)   | $1.17 \pm 0.20^c$     | $7.62 \pm 1.30^c$     |
| <i>Lobophora australis</i>  | (LA)   | $0.32 \pm 0.02^a$     | $1.68 \pm 0.11^a$     |

ค่าที่แสดงในตารางหมายถึง ค่าเฉลี่ย $\pm$ SD (n=3)

ตัวอักษรตามแนวตั้ง (a-f) ที่ต่างกันแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่  $P < 0.05$

จากตารางที่ 9 พบว่าสารสกัดส่วน lipophilic ของสาหร่าย *S. plagiophyllum* จะมีปริมาณวิตามินอีสูงที่สุด เท่ากับ  $26.40 \pm 0.36$  mg/100g น้ำหนักสาหร่ายแห้ง รองลงมาได้แก่ *S. aquifolium* ( $15.91 \pm 3.46$  mg/100g น้ำหนักสาหร่ายแห้ง) และ *S. oligocystum* ( $12.92 \pm 1.04$  mg/100g น้ำหนักสาหร่ายแห้ง) ตามลำดับ โดยสาหร่ายที่มีปริมาณวิตามินเอน้อยที่สุดคือ *L. australis* ( $1.68 \pm 0.11$  mg/100g น้ำหนักสาหร่ายแห้ง)

#### 4.6 ความสัมพันธ์ระหว่างองค์ประกอบทางเคมีและความสามารถในการออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

จากการรวบรวมเอกสารพบว่ามีรายงานหลายฉบับกล่าวว่าประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระนั้นมีความสัมพันธ์กับปริมาณองค์ประกอบทางเคมีในสารสกัดของสาหร่ายสีน้ำตาล (Iwai, 2008; López et al, 2011 and Balboa et al., 2013) ดังนั้นในการศึกษานี้จึงได้วิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีที่เคยมีรายงานว่ามีความสัมพันธ์กับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ได้แก่ โพลีฟีนอลทั้งหมด ฟลูโคแซนทิน และวิตามินอี เพื่อนำมาหาความสัมพันธ์กับประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระต่างๆ โดยการแปรค่าความสัมพันธ์ (r) สามารถอธิบายได้ดังรายละเอียดต่อไปนี้

| ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (r) | ความหมาย                        |
|-------------------------------|---------------------------------|
| $\geq 0.90$                   | มีความสัมพันธ์สูงมาก            |
| $0.70 - 0.90$                 | มีความสัมพันธ์สูง               |
| $0.30 - 0.70$                 | มีความสัมพันธ์ในระดับปานกลาง    |
| $\leq 0.30$                   | มีความสัมพันธ์ในระดับต่ำ        |
| 0.00                          | ไม่มีความสัมพันธ์กันเชิงเส้นตรง |

สำหรับความสัมพันธ์ขององค์ประกอบทางเคมีกับประสิทธิภาพในการจับโลหะนั้นไม่นำมาทดสอบด้วย เนื่องจากสารสกัดสาหร่ายบางชนิดไม่ออกฤทธิ์ในการต้านโลหะ หรือออกฤทธิ์เฉพาะส่วนของสารสกัดเอทานอลเท่านั้นจึงไม่นำมาทดสอบความสัมพันธ์ในการศึกษา

การวิเคราะห์ปริมาณฟลูโคแซนทินและวิตามินอี ได้ทำการวิเคราะห์เฉพาะในตัวอย่างสารสกัดส่วน lipophilic เท่านั้น เนื่องจากมีข้อจำกัดในเรื่องของอุปกรณ์ และงบประมาณในการวิจัยจึงไม่ได้วิเคราะห์ในส่วนของสารสกัดเอทานอล และการหาความสัมพันธ์นั้นเป็นหาค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์นี้วิเคราะห์เฉพาะเพียงในกลุ่มของสารสกัดกลุ่ม lipophilic เท่านั้น

**ตารางที่ 10** ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (r) ขององค์ประกอบทางเคมีและประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระ

|                                  | ฟีนอลิกทั้งหมด | ฟลูโคแซนทิน | วิตามินอี |
|----------------------------------|----------------|-------------|-----------|
| การขจัดอนุมูล DPPH ( $EC_{50}$ ) | -0.608**       | 0.275       | -0.041    |
| การยับยั้งอนุมูลไฮดรอกซิล        | 0.128          | -0.755**    | 0.204     |
| การรีดิวซ์                       | 0.271*         | 0.363       | 0.070     |

\* ความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

\*\* ความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99%

จากการทดสอบความสัมพันธ์ของประสิทธิภาพในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (ตารางที่ 10) พบว่าปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดในสารสกัดมีความสัมพันธ์เชิงลบกับประสิทธิภาพในการขจัดอนุมูล DPPH ในระดับปานกลาง ( $R = -0.608$ ) และมีนัยสำคัญทางสถิติ หมายความว่าหากมีปริมาณฟีนอลิกในสารสกัดมากขึ้นประสิทธิภาพในการขจัดอนุมูล DPPH หรือค่า  $EC_{50}$  จะน้อยลง (ค่าน้อยมีประสิทธิภาพดี) ผลการศึกษานี้สอดคล้องกับงานวิจัยของ Iwai (2008) ที่รายงานว่าความสามารถในการขจัดอนุมูล DPPH จากสารสกัดของสาหร่ายสีน้ำตาล *Ecklonia stolonifera* มีความสัมพันธ์กับปริมาณฟีนอลิกที่พบในสาร

สกัด และรายงานของ López et al. (2011) ซึ่งได้ทำการศึกษาในสาหร่ายสีน้ำตาล *Stypocaulon scoparium* และพบว่าปริมาณของฟีนอลิกในสารสกัดมีความสัมพันธ์กับประสิทธิภาพในการรีดิวซ์อยู่ในระดับต่ำ ( $R=0.271$ ) สอดคล้องกับงานวิจัยของ Kuda and Ikemori (2009) และ Zubia et al. (2009)

อย่างไรก็ตาม ไม่พบความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณฟีนอลิกและประสิทธิภาพในการยับยั้งอนุมูล hydroxyl ซึ่งสอดคล้องกับรายงานการวิจัยหลายฉบับกล่าวว่า ไม่พบความสัมพันธ์ของปริมาณฟีนอลิกของสารสกัดจากสาหร่ายและประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระบางชนิด เช่น สารสกัดในส่วน dichloromethane ของ *S. siliquastrum* กับการทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้ง lipid peroxidation (Lim et al, 2009) การทดสอบสารสกัดจากสีน้ำตาลกับ DPPH (Widjaja-Adhi et al., 2011 (a)) ปริมาณฟีนอลิกจากสารสกัดของ *Fucus vesiculosus*, *F. serratus* และ *Ascophyllum nodosum* ซึ่งไม่สัมพันธ์กับประสิทธิภาพในการรีดิวซ์ (Wang et al., 2009) และปริมาณฟีนอลิกในสารสกัดจาก *Sargassum* sp. ที่ไม่สัมพันธ์กับความสามารถในการยับยั้ง lipoxygenase และความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ (Matsukawa et al., 1997)

ทั้งนี้ต่างที่พบในพืชชั้นสูงที่โดยมากปริมาณฟีนอลิกกับประสิทธิภาพในการยับยั้งอนุมูลอิสระมีความสัมพันธ์กันเป็นลักษณะเส้นตรง เป็นเหตุผลว่าในสารสกัดจากสาหร่ายที่มีปริมาณฟีนอลิกสูงๆ จึงควรจะมีประสิทธิภาพสูงตามไปด้วย อย่างไรก็ตาม เนื่องจากความซับซ้อนขององค์ประกอบทางเคมีที่พบในสารสกัดหยาบของสาหร่าย (Balboa et al., 2013) การใช้ลักษณะความสัมพันธ์เช่นเดียวกับพืชชั้นสูงมาทำนายความสามารถในการออกฤทธิ์อาจจะได้ข้อมูลในลักษณะเดียวกัน นอกจากนี้ ความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระของสารประกอบฟีนอลิกยังขึ้นอยู่กับลักษณะทางโครงสร้างที่แตกต่างกัน จำนวนและตำแหน่งของหมู่ไฮดรอกซิลที่อยู่ในโครงสร้างโมเลกุล สารประกอบฟีนอลิกที่มีหมู่ไฮดรอกซิลในตำแหน่ง ortho และ para จะมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระสูงกว่าสารประกอบฟีนอลิกที่มีหมู่ไฮดรอกซิลอยู่ในตำแหน่ง meta (Sabeena Farvin and Jacobsen, 2013) ดังนั้นการสกัดโดยใช้ตัวทำละลายที่ต่างกันก็จะส่งผลทำให้ได้สารสกัดที่มีองค์ประกอบของฟีนอลิก (phenolic profile) ที่แตกต่างกัน ทำให้มีความสามารถในการประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระต่างกันออกไป ขึ้นอยู่กับชนิดของสารประกอบฟีนอลิกที่สกัดออกมาได้ โดยจะต้องมีการศึกษาในรายละเอียดต่อไป

นอกจากนี้ ยังพบว่าปริมาณฟลูโคแซนทินในสารสกัดส่วน lipophilic มีความสัมพันธ์ในเชิงลบกับประสิทธิภาพในการยับยั้งอนุมูล hydroxyl ขณะที่ปริมาณวิตามินอีในสารสกัด lipophilic ไม่มีความสัมพันธ์กับประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระ และพบว่าประสิทธิภาพในการยับยั้งอนุมูล hydroxyl มีความสัมพันธ์กับความสามารถในการรีดิวซ์ ( $r=0.369$ ) และปริมาณของสารสกัดมีความสัมพันธ์ยิ่งยวดกับปริมาณฟีนอลิกที่พบในสาหร่าย ( $r=0.694$ )

จากผลการศึกษาทั้งหมดจะเห็นได้ว่า การที่สารสกัดของสาหร่ายแต่ละชนิดมีประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระต่างกัน เป็นผลมาจากตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดต่างกัน ส่งผลให้องค์ประกอบทางเคมีที่อยู่ในสารสกัดแต่ละชนิดหรือในสาหร่ายแต่ละชนิดต่างกันออกไป และมีสารสกัดบางส่วนถึงแม้จะมีปริมาณฟีนอลิก ฟลูโคแซนทิน หรือวิตามินอี ซึ่งมีรายงานว่า เป็นสารที่มีประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระอยู่มาก แต่ก็ไม่สามารถแสดงฤทธิ์บางอย่างได้ แสดงให้เห็นว่าในสารสกัดของสาหร่ายสีน้ำตาลนั้น อาจยังมีสารประกอบชนิดอื่นๆ นอกเหนือไปจากสารดังกล่าวข้างต้น และเป็นสารที่มีความสามารถในการออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้ เช่น fucosterol หรือสารในกลุ่มของ terpene อื่นๆ (Balboa et al., 2013) ซึ่งเป็นสารที่ไม่ได้ทดสอบในการศึกษานี้ หรือความสามารถในการออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระอาจไม่ได้เป็นผลมาจากสารประกอบชนิดใดชนิดหนึ่งเท่านั้น อาจจะเป็นทำหน้าที่ร่วมกัน (synergistic) จึงจะมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ (López et al., 2011) ดังนั้นในการศึกษาต่อไปอาจต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมในสารกลุ่มอื่นๆ ด้วยเช่นกัน

### สรุปผลการทดลอง

จากผลการสกัดสาหร่ายสีน้ำตาลทั้ง 9 ชนิดโดยใช้ตัวทำละลายที่ต่างกัน เมื่อเปรียบเทียบระหว่างสารสกัดเอทานอลและสารสกัดสกัดส่วน lipophilic จะพบว่าการใช้เอทานอลในการสกัดจะทำให้ได้ปริมาณสารสกัด (yield) และปริมาณฟีนอลิกในสารสกัดมากกว่าสารสกัดส่วน lipophilic ซึ่งประสิทธิภาพในการออกฤทธิ์ต้านอนุมูล DPPH และความสามารถในการรีดิวซ์มีความสัมพันธ์โดยตรงกับปริมาณฟีนอลิกที่พบในสารสกัด เมื่อเปรียบเทียบกลุ่มของสาหร่ายจะพบว่าสาหร่ายในวงศ์ Dictyotaceae จะมีปริมาณฟีนอลิกมากกว่าสาหร่ายในวงศ์ Sargassaceae นอกจากนี้ยังพบว่าสารสกัดเอทานอลจากสาหร่าย *L. australis* และ *S. plagiophyllum* จะมีประสิทธิภาพในการขจัดอนุมูล DPPH ได้ดีพอๆ กับสาร BHT ซึ่งเป็นสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน (positive control) ขณะที่ในภาพรวมสารสกัดในส่วน lipophilic จะมีประสิทธิภาพในการยับยั้งอนุมูล hydroxyl ได้ดีกว่าสารสกัดเอทานอล เช่นเดียวกับความสามารถในการรีดิวซ์ โดยสารสกัดจากสาหร่าย *S. plagiophyllum* จะมีประสิทธิภาพในการรีดิวซ์ดีที่สุด สำหรับประสิทธิภาพในการดักจับกับโลหะจะพบว่าความสามารถในการจับโลหะจะเพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารสกัด และในภาพรวมสารสกัดเอทานอลจะมีประสิทธิภาพในการจับโลหะได้ดีกว่าสารสกัดส่วน lipophilic ซึ่งสารสกัด lipophilic ในสาหร่ายบางชนิดไม่มีประสิทธิภาพในการจับโลหะ นอกจากนี้ยังพบว่าสารสกัดทั้งเอทานอล และส่วน lipophilic ของสาหร่าย 2 ชนิด ได้แก่ *S. ilicifolium* และ *S. plagiophyllum* ไม่มีประสิทธิภาพในการดักจับโลหะเช่นกัน อย่างไรก็ตาม ผลจากการศึกษาพบว่าสารสกัดส่วน lipophilic ของสาหร่าย *L. australis* จะมีประสิทธิภาพในการจับโลหะดีที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับสารสกัดจากสาหร่ายชนิดอื่นๆ แต่ยังมีประสิทธิภาพน้อยกว่าสารมาตรฐาน EDTA (positive control) เมื่อวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีในสารสกัดส่วน lipophilic ที่เคยรายงานว่ามีผล

ต่อประสิทธิภาพในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ เช่น ฟุโคแซนทิน และวิตามินอี แล้วนำมาวิเคราะห์ความสัมพันธ์กับประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระในการศึกษานี้ ไม่พบว่ามีความสัมพันธ์กันแต่อย่างใด จึงอาจเป็นไปได้ว่าในสารสกัดของสาหร่ายสีน้ำตาลอาจมีสารเคมีในกลุ่มอื่นๆ ที่มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระที่ยังไม่ได้ทดสอบในการศึกษานี้ เช่น สารในกลุ่ม fucosterol หรือ terpene อยู่ด้วย จึงจำเป็นต้องมีการศึกษาต่อไป และถึงแม้จะไม่พบความสัมพันธ์ของฟุโคแซนทิน และวิตามินอี ต่อประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระ แต่สารทั้ง 2 ชนิดนี้ ยังมีรายงานว่ามีความสามารถในการออกฤทธิ์ทางชีวภาพอื่นๆ อีกหลายประการ เช่น ด้านมะเร็ง ด้านการอักเสบ ลดภาวะโรคอ้วน และเบาหวาน เป็นต้น ซึ่งข้อมูลที่ได้นี้สามารถสามารถนำไปต่อยอดงานวิจัยเพื่อพัฒนาการค้นหายาออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากสาหร่ายซึ่งเป็นทรัพยากรภายในประเทศที่มีมากและยังไม่มีมีการนำไปใช้ประโยชน์ และนำไปประยุกต์ใช้ได้ในด้านต่างๆ ที่เหมาะสมต่อไป

### ข้อเสนอแนะ

จากผลการศึกษาในครั้งนี้ ผู้วิจัยมีข้อเสนอแนะดังรายละเอียดต่อไปนี้

1. เนื่องจากในการศึกษาครั้งนี้ใช้สาหร่ายสีน้ำตาลเพียง 9 ชนิด ดังนั้นหากต้องการศึกษาต่อไป ควรมีการศึกษาในสาหร่ายสีน้ำตาลสายพันธุ์อื่นๆ เพิ่มเติม เนื่องจากประเทศไทยยังขาดการศึกษาวิจัยในด้านสาหร่ายทะเลอีกมาก และยังมีสาหร่ายสีน้ำตาลอีกหลายชนิดที่ยังไม่เคยมีผู้ศึกษามาก่อน
2. ควรมีการศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับการทำสารให้บริสุทธิ์และนำสารบริสุทธิ์ที่ได้นั้นมาทดสอบประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระ หรือตรวจหาองค์ประกอบทางเคมีที่มีความสัมพันธ์กับการออกฤทธิ์เพิ่มมากขึ้น โดยเฉพาะในสาหร่าย *L. australis*
3. ควรมีพัฒนาศึกษาวิธีการสกัดอื่นๆ ที่ไม่ใช่ตัวทำละลายที่มีความเป็นพิษ และได้สารสกัดที่มีประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระที่ดี
4. ควรมีการศึกษาประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระของสารในกลุ่มที่ละลายน้ำได้ (hydrophilic) เช่น โพลีแซคคาไรด์จากสาหร่ายสีน้ำตาลในกลุ่ม fucoidan ซึ่งมีรายงานว่ามีประสิทธิภาพในการออกฤทธิ์ทางชีวภาพหลายชนิด รวมถึงมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระด้วยเช่นกัน อีกทั้งยังเป็นสารที่พบเป็นปริมาณมากในสาหร่ายสีน้ำตาล ซึ่งในการวิจัยครั้งนี้ไม่ได้ศึกษาในสารกลุ่มนี้เนื่องจากจะต้องใช้งบประมาณสูง รวมถึงอุปกรณ์และเทคนิคในการสกัด เช่น ต้องใช้ anion-exchange chromatography ในการทำให้บริสุทธิ์ รวมถึงต้องมีการใช้เอนไซม์ตัดโมเลกุลของโพลีแซคคาไรด์ให้มีขนาดเล็กเพื่อให้อยู่ในรูปที่เป็น low molecular weight หรือ oligosaccharide เพื่อให้เหมาะสมต่อการนำมาทดสอบฤทธิ์ และต้องมีการตรวจสอบน้ำหนักโมเลกุล รวมถึงองค์ประกอบของน้ำตาล ตลอดจนโครงสร้างทางเคมี ซึ่ง

จะต้องใช้เทคนิคทางโครมาโตกราฟีหลายชนิดทั้ง gel filtration chromatography GC, HPLC, FT-IR และ NMR ซึ่งเครื่องมือบางชนิดไม่มีอยู่ในหน่วยงานทำให้จะต้องเสียค่าใช้จ่ายในการเช่าใช้ค่อนข้างสูง

### เอกสารอ้างอิง

- กฤษณา ชุตินา. 2532. **หลักเคมีทั่วไป เล่ม 2**. พิมพ์ครั้งที่ 9 บริษัทประชาชน จำกัด, กรุงเทพฯ ฯ.
- โอภา วัชรคุปต์, ปรีชา บุญจง, จันทนา บุญยะรัตน์ และ มาลีรักษ์ อัดต์สินทอง. 2550. **สารต้านอนุมูลอิสระ**. พิมพ์ครั้งที่ 2. นิวไทยมิตรการพิมพ์, กรุงเทพฯ.
- Athukorala, Y., Kim, K.N. and Y.J. Jeon. 2006. Antiproliferative and antioxidant properties of an enzymatic hydrolysate from brown alga, *Ecklonia cava*. **Food. Chem. Toxicol.** 44: 1065-1074.
- Balboa, E.M., Conde, E., Moure, A., Falqu , E. and H. Domínguez. 2013. In vitro antioxidant properties of crude extracts and compounds from brown algae. **Food Chem.** 138:1764-1785.
- Boonchum, W., Peerapornpisal, Y., Kanjanapothi, D., Pekkoh, J., Pumas, C., Jamjai, U., et al. 2011. Antioxidant activity of some seaweed from the gulf of Thailand. **Inter. J. Agri.Bio.** 13: 95–99.
- Chakraborty, K. Praveen, N. K., Vijayan, K. K. and G.S. Rao. 2013. Evaluation of phenolic contents and antioxidant activities of brown seaweeds belonging to *Turbinaria* spp. (Phaeophyta, Sargassaceae) collected from Gulf of Mannar. **Asian Pac. J. Trop. Biomed.** 3(1): 8-16.
- Chandini, S.K., Ganesan, P. and N. Bhaskar. 2008. *In vitro* antioxidant activities of three selected brown seaweeds of India. **Food Chem.** 107:707-713.
- Chew, Y.L., Lim, Y.Y., Omar, M. and K.S. Khoo. 2008. Antioxidant activity of their edible seaweeds from two area in South East Asia. **LWT.** 41: 1067-1072.
- Connan, S. Goulard, F., Stiger, V., Deslandes, E. and E.A. Gall. 2004. Interspecific and temporal variation in phlorotannin levels in assemblages of brown algae. **Bot. Mar.** 47: 410-416.

- Damonte, E.B., J. Neyts, C.A. Pujol, R. Snoech, G. Andrei, S. Ikeda, M. Witvrouw, D. Reymen, H. Haines, M.C. Matulewicz, A. Cerezo, C.E. Coto and E. De Vlercq. 1994. Antiviral activity of a sulfate polysaccharide from the red seaweed *Nothogenia fastigiata*. **Biochem. Pharmacol.** 47: 2187-2192.
- Gordon, M.H. 1990. The mechanism of antioxidant action in vitro. *In*: B.J.F. Hudson (Ed.), **Food antioxidants**. Elsevier Applied Science, England.
- Hamann, M.T., C.S. Otto, P.J. Scheuer and D.V. Dunbar. 1996. Kahalalides: Bioactive depsiopeptide from a marine mollusk, *Elysia rufescens* and the Green Alga *Bryopsis* sp. **J. Org. Chem.** 61: 6594-6600.
- Hamann, M.T. and P.J. Scheuer. 1993. Kahalalide F: A bioactive depsiopeptide from the sacoglossan mollusk, *Elysia rufescens* and the Green Alga *Bryopsis* sp. **J. Am. Chem. Soc.** 115: 5825-5826.
- Heo, S.J. and Y.J. Jeon. 2009. Protective effect of fucoxanthin isolated from *Sargassum siliquastrum* on UV-B induced cell damage. **J. Photochem. Photobio. B: Biology.** 95: 101-107.
- Horgen, F.D., D.B. Santos delos, G. Goetz, B. Sakamoto, Y. Kan, H. Nagai and P.J. Scheuer. 2000. A new depsipeptide from the sacoglossan mollusk *Elysia ornata* and the green alga *Bryopsis* species. **J. Nat. Prod.** 63: 152-154.
- Hosokawa, M., Miyashita, T., Nishikawa, S., Tsukui, T., Beppu, F., Okada, T. and K. Miyashita. 2010. Fucoxanthin regulates adipocytokine mRNA expression in white adipose tissue of diabetic/obese KK-A<sup>y</sup> mice. **Arch. Biochem. Biophys.** 504(1):17-25.
- Iwai, K. 2008. Antidiabetic and antioxidant effects of polyphenols in brown alga *Ecklonia stolonifera* in genetically diabetic KK-Ay mice. **Plant Foods for Human Nutrition.** 63: 163-169.
- Jaswir, I., Noviendri, D., Salleh, H.M., Taher, M., Miyashita, K. and N. Ramli. 2013. Analysis of fucoxanthin content and purification of all-trans-fucoxanthin from *Turbinaria turbinata* and *Sargassum plagiophyllum* by SiO<sub>2</sub> open column chromatography and reversed phase-HPLC. **J. Liquid Chromatography and Related Technol.** 36 (10)1340-1354.
- Kahkonen, M.P., Hopia, A.I., Vuorela, H.J., Rauha, J.P., Pihlaja, K., Kujala T.S. and M. Heinonen. 1999. Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. **J. Agric. Food Chem.** 47: 3954-3962.

- Kakita, H., S. Fukuoka, H. Obika, Z.F. Li and H. Kamishima. 1997. Purification and properties of a high molecular weight hemagglutinin from the red alga, *Gracilaria verrucosa*. **Bot. Mar.** 40: 241-247.
- Kakita, H. and T. Kitamura. 2003. Hemagglutinating activity in the cultivated red alga *Gracilaria chorda* Holmes, from Japan, pp. 175-182. In A.R.O. Chapman, R.J. Anderson, V.J. Vreeland, and I.R. Davison, eds. **Proceeding of the 17<sup>th</sup> International Seaweed Symposium**. Oxford University Press, Oxford.
- Kim, M.K., Dubacq, J. P., Thomas, J. C. and G. Giraud. 1996. Seasonglyal variations of triacylglycerols and fatty acids in *Fucus serratus*. **Phytochemistry**. 43 (1): 49-55.
- Kolender, A.A., M.C. Matulewicz and A.S. Cerezo. 1995. Structural analysis of antiviral sulfated  $\alpha$ -D-(1,3)-linked mannans. **Carbohydr. Res.** 273: 179-185.
- Kuda, T., and T. Ikemori. 2009. Minerals, polysaccharides and antioxidant properties of aqueous solutions obtained from macroalgal beach-casts in the Noto Peninsula, Ishikawa, Japan. **Food Chem.** 112 575–581.
- Kumar Chandini, S., Ganesan, P. and N. Bhaskar. 2008. *In vitro* antioxidant activities of three selected brown seaweeds of India. **Food Chem.** 107: 707-713.
- Kumar, M., Kumari, P., Trivedi, N., Shukla M.K., Gupta, V., Reddy, C.R.K. and B. Jha. 2011. Minerals, PUFAs and antioxidant properties of some tropical seaweeds from Saurashtra coast of India. **J. Appl. Phycol.** 23:797-810.
- Lekameera, R., Vijayabaskar, P. and S.T.Somasundaram. 2008. Evaluating antioxidant property of brown algae *Colpomenia sinuosa* (DERB. ET SOL). **Afr Food Sci.** 2: 126-130.
- Lim, S. N., Cheung, P. C. K., Ooi, V. E. C., and P. O. Ang. 2009. Evaluation of antioxidative activity of extracts from a brown seaweed, *Sargassum siliquastrum*. **J. Agri. Food Chem.** 50: 3862–3866.
- Lópes, G.K.B., Schulman, H.M. and M. Hermes-Lima. 1999. Polyphenol tannic acid inhibits hydroxyl radical formation form Fenton reaction by complexing ferrous ions. **BBA.** 1472: 142-152.
- López, A., Rico, M., Rivero, A., & Suárez de Tangil, M. 2011. The effects of solvents on the phenolic contents and antioxidant activity of *Stypocaulon scoparium* algae extracts. **Food Chem.**125: 1104–1109.

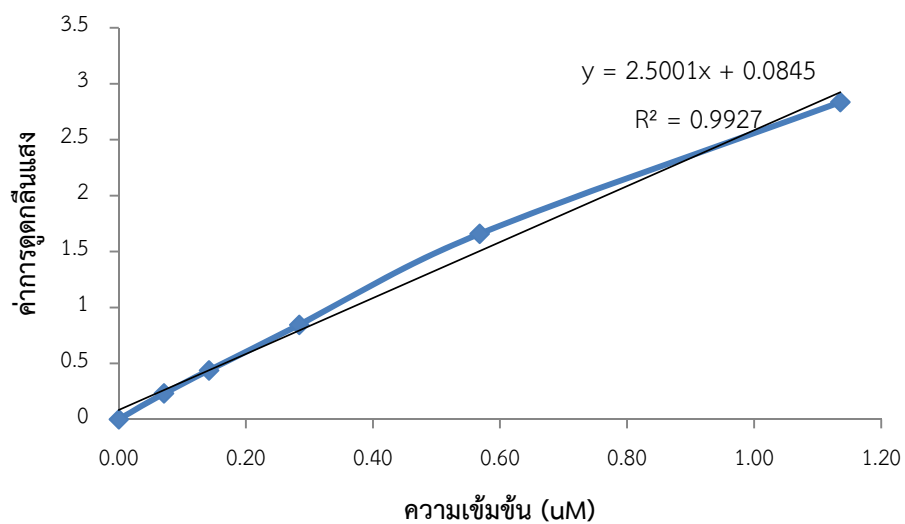
- Maeda, H., Hosokawa, M., Sashima, T., Funayama, K. and K. Miyashita. 2005. Fucoxanthin from edible brown seaweed, *Undaria pinnatifida* shows antiobesity effect through UCP1 expression in white adipose tissues. **BRRC**. 332:392-397.
- Maeda, H., Hosokawa, M., Sashima, T., Funayama-Murakami, K. and K. Miyashita. 2009. Antiobesity and anti-diabetic effects of fucoxanthin on diet-induced obesity conditions in murine model. **Molecular Medicine Report**. 2: 897-902.
- Matanjun, P., Mohamed, S., Mustapha, N.M., Mohammad, K. and C.H. Ming. 2008. Antioxidant activities and phenolic content of eight species of seaweeds from north Borneo. **J. Appl. Phycol**. 20:367-373.
- Matsukawa, R., Dubinsky, E., Kishimoto, K., Masaki, P., Masuda, K., Takeuchi, T., et al. 1997. A comparison of screening methods for antioxidant activity in seaweeds. **J. Appl. Phycol**. 9: 29–35.
- Melo, F. R., M. S. Pereira, D. Foguel and P. A. S. Mourao. 2004. Antithrombin-mediated anticoagulant activity of sulfated polysaccharides. **J. Biol. Chem.** 279: 20824-20835.
- Mira, L., Fernandez, M.T., Santos, M., Rocha, R., Florancio M.H. and K.R. Jennings. 2002. Interactions of flavonoids with iron and copper ion: A mechanism for their antioxidant activity. **Free Rad. Res.** 36: 1199-1208.
- Mišcová, L. 2012. Chemical Composition of Seaweed. pp.173-192 *In*. Se-Kwon Kim (eds) **Handbook of Marine Macroalgae Biotechnology and Applied Phycology**. Wiley-Blackwell. A John Wiley & Son, Ltd, Publication.
- Miyashita, K., Nishikawa, S. Beppu, F., Tsukui, T., Abea, M. and M. Hosokawa. 2010. The allenic carotenoid fucoxanthin, a novel marine nutraceutical from brown seaweeds. **J. Sci. Food Agric**. 91: 1166–1174.
- Miyashita, K., Widjaja-Adhi, M.K.A., Abe, M. and M. Hosokawa. 2012. Algal Carotenoids as Potent Antioxidants. pp. 403-414. *In*. Se-Kwon Kim (eds.), **Handbook of Marine Macroalgae: Biotechnology and Applied Phycology**. Wiley-Blackwell. 567 p.
- Nakai, M., Kageyama, N., Nakahara, K. and W. Miki. 2006. Phlorotannins as Radical Scavengers from the Extract of *Sargassum ringgoldianum* **Mar. Biotech**. 8: 409–414

- Nomura, M., Kamogawa, H, Susanto, E., Kawagoe, C. Yasui, H., Saga, N, Hosokawa, M. and K. Miyashita. 2013. Seasonal variation of total lipids, fatty acid composition, and fucoxanthin contents of *Sargassum horneri* (Turner) and *Cystoseira hakodatensis* (Yendo) from the northern seashore of Japan. **J. Appl. Phycol.** 25:1159-1169.
- Nuijen, B., M. Bouma M, H. Talsma, C. Manada, J.M. Jimeno, L. Lopez-Lazaro, A. Bult and J.H. Beijnen. 2000. Development of a lyophilized parenteral pharmaceutical formulation of the investigational polypeptide marine anticancer agent kahalalide F. **Drug Dev. Ind. Pharm.** 27: 767-780.
- Pereira, M. S., E. S. A. Vilela-Silva, A. Valente and P. A. S. Mourao. 2002. A 2-sulfated, 3-linked  $\alpha$ -L-galactan is an anticoagulant polysaccharide. **Carbohydr. Res.** 337: 2231-2238.
- Peter, H. 1989. **Free Radical and Human Disease: CRC Handbook of Free Radical and Antioxidant Vol 1.** New York Press, New York.
- Qi, H., T. Zhao, Q. Zhang, Z. Li and Z. Zhao. 2005. Antioxidant activity of different molecular weight sulfated polysaccharides from *Ulva pertusa* Kjellm (Chlorophyta). **J. Appl. Phycol.** 17: 527-534.
- Raymond, C. 2005. **Chemistry.** 8<sup>th</sup> edit. McGraw-Hill Companies, New York.
- Sabeena Farvin, K.H. and C. Jacobsen. 2013. Phenolic compounds and antioxidant activities of selected species of seaweeds from Danish coast. **Food Chem.** 138: 1670-1681.
- Sachindra, N. M. , Airanthi, M. K. W. A. , Hosokawa, M. and K. Miyashita (2010) Radical scavenging and singlet oxygen quenching activity of extracts from Indian seaweeds. **J. Food Sci. Technol.** 47:94–99.
- Sparidans, R.W., E. Stokvis, J.M. Jimeno, L. Lopez-Lazaro, J.H. Schellens and J.H. Beijnen. 2001. Chemical and enzymatic stability of a cyclic depsipeptide, thenovel, marine-derived, anti-cancer agent kahalalide F. **Anticancer Drugs.** 12: 575-582.
- Suresh, V., Kumar, N. S., Murugan, P., Palani, P., Rengasamy R. and C. Anbazhagan. 2012. Antioxidant properties of sequential extracts from brown seaweed, *Sargassum plagiophyllum*, C. Agardh. **Asian Pacific Journal of Tropical Disease.** S937-S939.

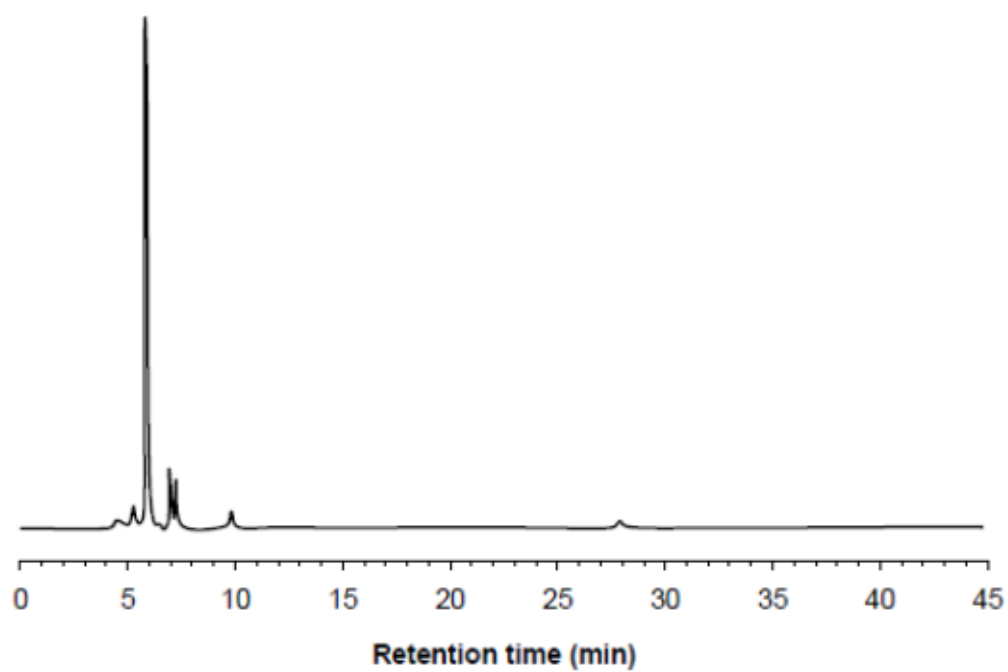
- Tsukui, T., Baba, N., Hosokawa, M., Sashima, T. and K. Miyashita. 2009. Enhancement of hepatic docosahexaenoic acid and arachidonic acid content in C57BL/6J mice by dietary fucoxanthin. **Fish Sci.** 75: 261-263.
- Wang, J., X. Jiang, M. Mou and H. Guan. 2004. Anti-oxidation of agar oligosaccharides produced by agarase from a marine bacterium. **J. Appl. Phycol.** 16: 333-340.
- Wang, T., Jónsdóttir, R., and G. Ólafsdóttir. (2009). Total phenolic compounds, radical scavenging and metal chelation of extracts from Icelandic seaweeds. **Food Chem.** 116: 240–248.
- Wang, Y., Xu, Z., Bach, S.J. and T.A. McAllister. 2008. Effect of phlorotannins from *Ascophyllum nodosum* (brown seaweed) on in vitro ruminal digestion of mixed forage or barley grain. **Animal Feed Science and Technology.** 145:375-395.
- Widjaja-Adhi, M.K.A., Hosokawa, M. and K. Miyashita. 2011 (a) Comparative study of antioxidant activity of edible Japanese brown seaweeds. *J. Food Sci.* 76:104-111.
- Widijaja-Adhi, M.K.A, Sasaki, N., Iwasaki, S., Baba, N., Abe, M., Hosokawa, M. and K. Miyashita. 2011(b). Effect of Brown Seaweed Lipids on Fatty Acid Composition and Lipid Hydroperoxide Levels of Mouse Liver. **J. Agri. Food Chem.** 59: 4156-4163.
- Witvrouw, M., J.A. Este, M.Q. Mateu, D. Reyman, G. Anderi, R. Snoech, S. Ikeda, R. Pauwels, N.V. Bianchini, J. Desmyter and E. De Clercq. 1994. Activity of a sulfated polysaccharide extracted from the red seaweed *Aghardhiella tenera* against human immunodeficiency virus and other enveloped viruses. **Antiviral Chem. Chemo.** 5: 297-303.
- Yuan, Y.V., Carrington, M.F. and N.A. Walsh. 2005. Extracts from dulse (*Palmaria palmata*) are effective antioxidants and inhibitor of cell proliferation in vitro. **Food. Chem. Toxic.** 43: 1073-1081.
- Zubia, M., Fabre, M. S., Kerjean, V., Lann, K. L., Stiger-Pouvreau, V., Fauchon, M., et al. 2009. Antioxidant and antitumoural activities of some Phaeophyta from Brittany coasts. **Food Chem.** 116, 693–701.

ภาคผนวก

## กราฟมาตรฐานของ ascorbic acid



ภาพผนวกที่ 1 กราฟมาตรฐานของ ascorbic acid ที่ใช้ในการคำนวณประสิทธิภาพในการรีดิวซ์



ภาพผนวกที่ 2 ลักษณะ chromatogram ของสารฟูโคแซนทินที่พบในสารสกัดจากสาหร่ายสีน้ำตาล