

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญ

สิ่งมีชีวิตทุกชนิดที่ดำรงชีวิตโดยอาศัยออกซิเจนในกระบวนการเผาผลาญสารอาหาร ระหว่างการขนส่งอิเล็กตรอน ในระบบการหายใจจะเกิดออกซิเจนที่มีประจุลบ เป็นผลผลิตสุดท้าย เรียกว่า reactive oxygen species (ROS) ซึ่งอาจเปรียบเสมือนออกซิเจนที่เป็นของเสียจากกระบวนการเผาผลาญ สาร ROS หรือสารอนุมูลอิสระ (free radical) ได้แก่ ซูเปอร์ออกไซด์ เรดิคัล (superoxide radical; $O_2^{\cdot-}$), ไฮดรอกซิลเรดิคัล (hydroxyl radical; $HO^{\cdot}$), อัลคอกซิล เรดิคัล (alkoxyl radical; $RO^{\cdot}$) และไนตรัส เรดิคัล (nitrous radical; $NO^{\cdot}$) สารเหล่านี้เป็นสารประกอบที่มีอิเล็กตรอนที่พลังงานรอบนอกของอะตอมออกซิเจนเป็นเลขคี่จึงไม่คงตัวและไวต่อการเกิดปฏิกิริยากับสารอื่น ส่งผลให้เกิดการทำลายและการตายของเซลล์ ในสภาวะปกติร่างกายจะมีการกลไกในการปรับสมดุลโดยการสร้างสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) ขึ้นเอง เช่น การทำงานของเอนไซม์ซูเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเตส (superoxide dismutase, SOD), คาตาเลส (catalase), กลูตาไธโอนเปอร์ออกซิเดส (glutathione peroxidase), เปอร์ออกซิเดส (peroxidase) และไซโตโครมซี เปอร์ออกซิเดส (cytochrome C peroxidase) เป็นต้น แต่บางครั้งเอนไซม์ที่ร่างกายผลิตขึ้นอาจไม่เพียงพอต่อการกำจัดสารอนุมูลอิสระ ประกอบกับปัจจัยภายนอกที่มีผลต่อสภาวะผิดปกติของเซลล์ โดยเฉพาะความเครียด รังสี และสารพิษต่างๆ ส่งผลให้อนุมูลอิสระมีปริมาณมากกว่าสารต้านอนุมูลอิสระที่ร่างกายสร้างขึ้นมา สภาวะที่เกิดความไม่สมดุลเช่นนี้ เรียกว่า สภาวะเครียดออกซิเดชัน (oxidative stress) เมื่อสภาวะเครียดออกซิเดชันเกิดขึ้นภายในเซลล์และเนื้อเยื่อ ส่งผลให้เกิดการทำลายของอวัยวะเนื้อเยื่อต่างๆของร่างกาย เช่น เกิดริ้วรอยและถ้าสะสมมากๆ อาจนำไปสู่ ความผิดปกติ หรือพยาธิสภาพหลายอย่าง เช่น โรคเมเร็ง โรคหลอดเลือดหัวใจ โรคเสื่อม (Alzheimer) และโรคพาร์กินสัน (Parkinson) โรคไขข้ออักเสบ โรคเบาหวานและต้อกระจก (Valko et al., 2007) ดังนั้นการได้รับสารต้านอนุมูลอิสระจากภายนอก จึงเป็นหนทางหนึ่งที่จะช่วยเสริมการควบคุมและป้องกันอันตรายจากอนุมูลอิสระเหล่านี้ได้ เนื่องจากสารต้านอนุมูลอิสระที่ได้รับจากการสังเคราะห์แม้มีประสิทธิภาพสูง แต่มีข้อจำกัดของการใช้และมีปัญหาด้านความปลอดภัยในการบริโภค การหาสารออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจากธรรมชาติจึงได้รับความสนใจ สารประกอบจากสาหร่ายทะเลได้รับการยอมรับจากหลายการรายงานจากทั่วโลก ว่ามีคุณสมบัติที่ดีในการต้านอนุมูลอิสระ (Kuda et al., 2005; Yuan et al., 2005; Zubia et al., 2008; Iwai, 2008; Chew et al., 2008; Yangthong et al., 2009; Boonchum et al., 2011) แต่สำหรับการรายงานของสาหร่ายในประเทศไทยมีข้อมูลการศึกษาในด้านนี้น้อยมาก ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของสาหร่ายทะเลมีความเกี่ยวข้องกับหลายปัจจัย สาหร่ายต่างชนิดกันย่อมมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระที่แตกต่างกัน สาหร่ายชนิดเดียวกันแต่เก็บมาจากแหล่งต่างกันก็มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระที่ต่างกัน วิธีการสกัด และสารละลายที่ใช้ในการสกัดก็ส่งผลให้มีความต่างกันของการต้านอนุมูลอิสระ สำหรับสารละลายที่ใช้ในการสกัดหากเป็นสารในกลุ่มสารอนินทรีย์ อาจส่งผลให้เกิดความกังวลตามมาในกลุ่มผู้บริโภค และความกังวลด้านสิ่งแวดล้อม

ดังนั้นด้วยสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง วิทยาเขตชุมพร เป็นสถาบันการศึกษาในระดับอุดมศึกษา สังกัดทบวงมหาวิทยาลัย มีหน้าที่ในการจัดการเรียนการสอน การวิจัย

การบริการวิชาการสู่สังคม ซึ่งตั้งอยู่ ณ ต.ชุมโค อ.ปะทิว จ.ชุมพร จึงมีความสนใจศึกษาความสามารถด้านอนุมูลอิสระของสาหร่ายทะเลขนาดใหญ่ที่พบแพร่กระจายเฉพาะบริเวณชายฝั่งของจังหวัดชุมพร สำหรับวิธีการสกัดและสารที่ใช้ในการสกัด มุ่งใช้วิธีการและสารสกัดที่ปลอดภัยและไม่เป็นพิษต่อสภาพแวดล้อม เพื่อการใช้ประโยชน์และการต่อยอดในอนาคต

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1.2.1 เพื่อศึกษาหาปริมาณฟีนอลิกโดยรวมจากสารสกัดจากสาหร่ายทะเลที่สกัดด้วยน้ำและเอทิลแอลกอฮอล์

1.2.2 เพื่อศึกษาหาความสามารถในการดักจับอนุมูล DPPH[•] จากสาหร่ายทะเลที่สกัดด้วยน้ำและเอทิลแอลกอฮอล์

1.2.3 เพื่อศึกษาหาความสามารถในการดักจับอนุมูลซูเปอร์ออกไซด์ O₂⁻ จากสาหร่ายทะเลที่สกัดด้วยน้ำและเอทิลแอลกอฮอล์

1.2.4 เพื่อศึกษาหาความสามารถในการดักจับอนุมูลไฮดรอกซิล OH[•] จากสาหร่ายทะเลที่สกัดด้วยน้ำและเอทิลแอลกอฮอล์

1.3 ขอบเขตของโครงการวิจัย

การวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากสาหร่ายทะเลที่พบแพร่กระจายบริเวณพื้นที่ชายฝั่งของจังหวัดชุมพร โดยเปรียบเทียบการสกัดระหว่างน้ำและเอทิลแอลกอฮอล์

บทที่ 2

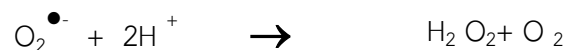
ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 อนุมูลอิสระ

อนุมูลอิสระ (Free radical) เป็นอนุพันธ์ของออกซิเจนที่มีพิษต่อเซลล์ของสิ่งมีชีวิต เมื่ออนุมูลอิสระเกิดขึ้นแล้วไม่ถูกทำลายหรือกำจัดออกไป อนุมูลอิสระจะเข้าทำลายสารชีวโมเลกุลที่เป็นองค์ประกอบของเซลล์ ได้แก่ โปรตีน ดีเอ็นเอ และไขมัน ความเสียหายที่เกิดขึ้นนี้ทำให้เกิดการตายของเซลล์ (Halliwell and Gutteridge, 1999) ถ้ามีอนุมูลอิสระมากจะทำให้เซลล์ตกอยู่ในภาวะเครียดออกซิเดชัน อนุมูลอิสระชนิดที่พบได้แก่

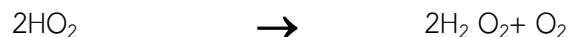
1. อนุมูลซูเปอร์ออกไซด์ ($O_2^{\bullet -}$)

เป็นอนุมูลอิสระที่ให้โทษรุนแรงและเกิดขึ้นเสมอ พบได้ภายในเซลล์ทั่วไป ส่วนใหญ่เกิดขึ้นระหว่างกระบวนการขนส่งอิเล็กตรอนจากโมเลกุลของออกซิเจนไปยังโมเลกุลของน้ำภายในไมโทคอนเดรีย อนุมูลนี้จะไม่เข้าทำปฏิกิริยาทำลายเซลล์โดยตรง แต่เมื่อทำปฏิกิริยากับไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) โดยมีเหล็กหรือทองแดงช่วยเร่งในปฏิกิริยา Fenton จะได้เป็นอนุมูลไฮดรอกซิล ($OH^{\bullet}$) ซึ่งเป็นสารออกซิไดซ์ที่มีความว่องไวสูง (Winston, 1991)



2. อนุมูลไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2)

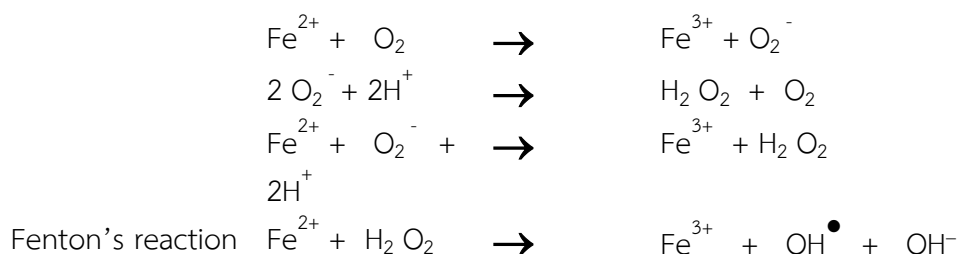
เป็นอนุมูลอิสระที่มีความเป็นพิษรุนแรง มาก เนื่องจากมีความไม่เสถียรมาก สิ่งมีชีวิตสามารถสร้างไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) จากซูเปอร์ออกไซด์ ($O_2^{\bullet -}$) ได้โดยตรงจากปฏิกิริยา Dismutation ของเอนไซม์ Superoxide dismutase (SOD) (Akoh and Min, 1998) ดังสมการ



ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่ได้ถึงแม้ว่าไม่เป็นอนุมูลอิสระ และจัดเป็นสารออกซิไดส์ที่ไม่ทำ ปฏิกิริยาทำลายเซลล์ แต่เป็นสารตั้งต้นที่ทำให้เกิดอนุมูลไฮดรอกซิล (Winston, 1991)

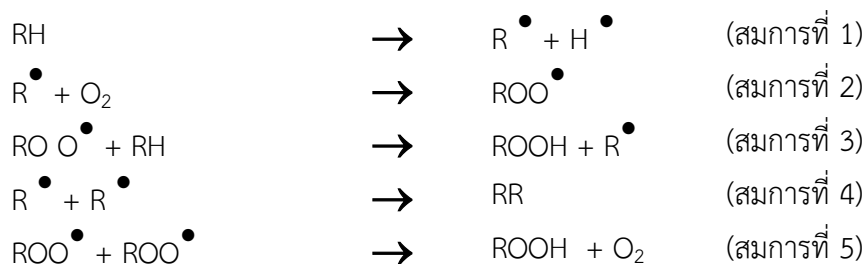
3. อนุมูลไฮดรอกซิล ($OH^{\bullet}$)

จัดเป็นสารออกซิไดส์แรงสูงที่มีความว่องไวสูงสุด สามารถเข้าทำปฏิกิริยากับสารต่างๆ ที่อยู่รอบข้างในทันทีที่ถูกสร้างขึ้น ดังนั้นอนุมูลอิสระนี้จึงเป็นอันตรายต่อสารชีวโมเลกุลในสิ่งมีชีวิตมากกว่าอนุมูลชนิดอื่นๆ (Halliwell, 1999) อนุมูลไฮดรอกซิลสร้างขึ้นจากไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) ที่มีโลหะทรานสิชันอยู่ในระบบโดยเหล็ก จะทำลายพันธะที่ยึดเหนี่ยวระหว่างออกซิเจนของสารเปอร์ออกไซด์ได้เป็นอนุมูลไฮดรอกซิล ($OH^{\bullet}$) และไฮดรอกไซด์ไอออน (hydroxide ion, OH^-) ในปฏิกิริยา Fenton ดังสมการข้างล่าง



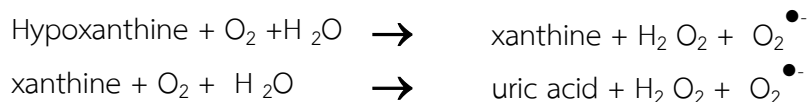
อนุมูลอิสระและสารเกี่ยวข้องที่เป็นผลผลิตของอนุมูลอิสระจะมีความไวในการเกิดปฏิกิริยาและมีปริมาณที่สูงมากเกินกว่าที่กระบวนการป้องกันจะต้านทานไว้ได้ (Betteridge, 2000; Tiahou *et al.*, 2004) สิ่งมีชีวิตที่ใช้ออกซิเจนในกระบวนการเผาผลาญอาหารเพื่อให้ได้พลังงาน จึงมีอนุมูลอิสระของออกซิเจนเกิดขึ้นตลอดเวลา โดยพบว่าประมาณ 1-3 เปอร์เซ็นต์ของออกซิเจนทั้งหมดที่ถูกนำเข้ามา จะเปลี่ยนมาอยู่ในรูปของอนุมูลอิสระ อนุมูลอิสระถูกสร้างขึ้นในไมโทคอนเดรียและเอนโดพลาสมิกเรติคูลัมโดยปฏิกิริยาที่ทำให้เกิดอนุมูลอิสระได้แก่

1. ปฏิกิริยาออกซิเดชันที่เกิดขึ้นเอง (autoxidation) เช่น การเกิดออกซิเดชันของไขมัน ในกระบวนการเผาผลาญไขมัน (Nawar, 1996) โดยกรดไขมันจะแตกตัวเป็นอนุมูลอิสระ โดยมีแสง อุณหภูมิเป็นตัวเร่ง (ดังสมการที่ 1) ต่อมาอนุมูลอิสระทำปฏิกิริยากับออกซิเจนเกิดเป็นอนุมูลเปอร์ออกซี (peroxy radical) และทำปฏิกิริยาต่อกับกรดไขมันเกิดเป็นไฮโดรเปอร์ออกไซด์ และอนุมูลอิสระ ซึ่งหากมีแสงและความร้อนเป็นตัวเร่ง ก็จะทำให้เกิดปฏิกิริยาต่อทำให้อนุมูลอิสระเพิ่มขึ้น และอนุมูลอิสระนี้สามารถทำปฏิกิริยาใหม่ต่อไปเรื่อยๆ (ดังสมการที่ 2 และ 3) และเกิดการรวมตัวกันเป็นอนุมูลอิสระในรูปแบบต่างๆ (ดังสมการที่ 4 และ 5)



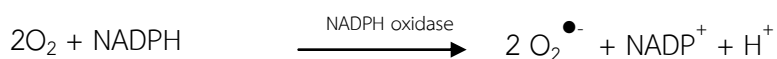
2. ปฏิกิริยาออกซิเดชันที่มีเอนไซม์เป็นตัวเร่ง (Halliwell *et al.*, 1995) การทำงานของเอนไซม์สำคัญ 2 ชนิด ที่มีผลกระตุ้นการสร้างอนุมูลอิสระภายในร่างกายได้แก่

2.1 เอนไซม์ xanthine oxidase (XO) ทำหน้าที่สำคัญในกระบวนการสลายเบสพิวรีน (purine) โดยการเปลี่ยน hypoxanthine เป็น xanthine และ xanthine เป็น uric acid พร้อมกับให้อิเลคตรอนแก่ออกซิเจนเกิดเป็นอนุมูลซูเปอร์ออกไซด์ ($O_2^{\bullet-}$)



2.2 เอนไซม์ lipoxygenase (LOX) ทำหน้าที่เร่งการออกซิเดชันของกรดไขมันไม่อิ่มตัวสูง (polyunsaturated fatty acid) โมเลกุลของเอนไซม์นี้มีเหล็กเป็นส่วนประกอบซึ่งทำหน้าที่ดึงอะตอมไฮโดรเจนจากกรดไขมันและเติมออกซิเจนให้กับกรดไขมันเกิดเป็น hydroperoxide ซึ่งจะสลายตัวเป็นอนุมูลของกรดไขมันต่อไป

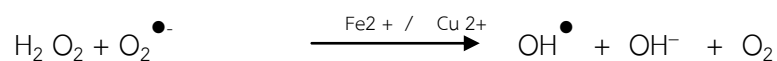
3. ปฏิกริยาออกซิเดชันที่เกิดจากขบวนการกลืนหรือทำลายสิ่งแปลกปลอม (phagocytosis) ของเซลล์เม็ดเลือดขาวเช่น นิวโทรฟิล โมโนไซต์ และมาโครฟาจ เมื่อเซลล์ได้รับการกระตุ้นจากสิ่งแปลกปลอมจะมีการดึงโมเลกุลออกซิเจน (O_2) มาใช้เป็นจำนวนมากเพื่อผลิตเป็นอนุมูลซูเปอร์ออกไซด์ จากปฏิกริยาของเอนไซม์ NADPH oxidase ที่อยู่บนเยื่อชั้นนอก (outer membrane) ของเม็ดเลือดขาว ดังสมการ



นอกจากนี้ในเม็ดสี (Granule) ของเม็ดเลือดขาวยังมีเอนไซม์ myeloperoxidase ทำให้เกิดอนุมูลไฮโปคลอรัส (hypochlorus, HOCL) ซึ่งเป็นสารที่ทำลายจุลชีพได้ดังสมการ



4. โลหะทรานสิชัน (Transition metals) 2 ชนิดคือ เหล็ก และทองแดง ที่มีอยู่ทั่วไปในร่างกาย สามารถเร่งการสร้างอนุมูลไฮดรอกซิล จากซูเปอร์ออกไซด์ และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ในปฏิกริยา Fenton (Fenton 's reaction) (Halliwell, 1999) ดังสมการ



2.2 สารต้านอนุมูลอิสระ

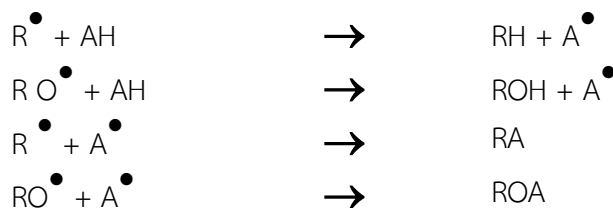
สารต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidants) คือ ตัวกลางที่ทำให้เกิดความสมดุลระหว่างปฏิกิริยาออกซิเดชันและรีดักชันในเซลล์หรือร่างกาย โดยหน้าที่เบื้องต้นคือ ป้องกันการเกิดอนุมูลอิสระ และเมื่ออนุมูลอิสระเกิดขึ้นก็จะทำปฏิกิริยากับอนุมูลอิสระ เพื่อเคลื่อนย้ายหรือยับยั้งอนุมูลอิสระ (Victor *et al.*, 2004) สารต้านอนุมูลอิสระแบ่งได้เป็น 2 กลุ่มคือ สารต้านอนุมูลอิสระในกลุ่มเอนไซม์ และสารต้านอนุมูลอิสระในกลุ่มที่ไม่ใช่เอนไซม์ (Seifried *et al.*, 2007)

1. สารต้านอนุมูลอิสระในกลุ่มเอนไซม์ เป็นกลไกที่สำคัญขั้นแรกที่ทำหน้าที่ควบคุมปริมาณอนุมูลอิสระให้อยู่ในภาวะสมดุล ได้แก่ เอนไซม์ซูเปอร์ออกไซด์ ดิสมูเตส, เอนไซม์คาตาเลส, เอนไซม์กลูตาไธโอน เปอร์ออกซิเดส, เอนไซม์กลูตาไธโอน เอส-ทรานสเฟอเรส

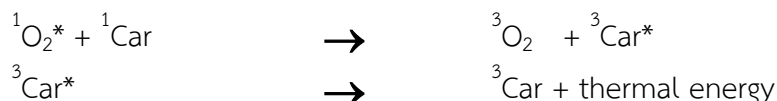
2. สารต้านอนุมูลอิสระในกลุ่มที่ไม่ใช่เอนไซม์ คือสารที่สามารถทำปฏิกิริยากับอนุมูลอิสระโดยตรงเพื่อกำจัดอนุมูลอิสระให้หมดไป หรือหยุดปฏิกิริยาลูกโซ่ไม่ให้ดำเนินต่อไป สารอนุมูลอิสระมีโครงสร้างทางเคมีและฤทธิ์ต้านออกซิเดชันแตกต่างกัน เช่น วิตามิน ฟลาโวนอยด์ พอลิฟีนอล และสารซีเลทโลหะ (Seifried *et al.*, 2007)

กลไกการทำงานของสารต้านอนุมูลอิสระ มีดังนี้

1. ดักจับอนุมูลอิสระ (radical scavenging) โดยการให้ไฮโดรเจน หรืออิเล็กตรอนแก่อนุมูลอิสระดังสมการ



2. สารในกลุ่มรงควัตถุของสาหร่าย เช่น แคโรทีนอยด์ สามารถยับยั้งการทำงานของซิงเลตออกซิเจน (singlet oxygen quenching) ($^1O_2^*$) โดยการเปลี่ยนซิงเลตออกซิเจนให้อยู่ในรูป triplet oxygen (3O_2) และปล่อยพลังงานที่ได้รับออกไปในรูปความร้อน โดยที่แคโรทีนอยด์ (Car) 1 โมเลกุลสามารถทำปฏิกิริยากับซิงเลตออกซิเจนได้ถึง 1,000 โมเลกุล (Sies *et al.*, 1992)



3. กลุ่มวิตามินจากสาหร่าย เช่น วิตามินอีสามารถหยุดปฏิกิริยาการสร้างอนุมูลอิสระ (chain-breaking) โดยป้องกันเยื่อหุ้มเซลล์ถูกทำลายจากปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมัน ซึ่งวิตามินอีจะทำหน้าที่เป็นตัวรับอิเล็กตรอนจากอนุมูลเปอร์ออกซิล (peroxyl, ROO) (Burton and Traber, 1990) นอกจากนี้วิตามิน

อี (tocopherol) และวิตามินซี (ascorbic acid) จะทำงานร่วมกัน โดยวิตามินซีจะให้ไฮโดรเจนอะตอมแก่อนุมูลโทโคเพอรอล เปอร์ออกซิล (tocopherol peroxy) ที่เกิดจากการทำปฏิกิริยาระหว่างวิตามินอี กับอนุมูลเปอร์ออกซิล (ROO) เปลี่ยนรูปกลับไปเป็น tocopherol ที่สามารถทำงานได้ (Frankel *et al.*, 1998)

4. สารประกอบฟีนอลิกบางชนิด สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาอนุมูลอิสระ (enzyme inhibition) เช่น ฟลาโวนอยด์ คีทีซิน โพลีโรแทนนิน โบรโมฟีนอล สามารถยับยั้งเอนไซม์ ลิพอกซิจีเนส (lipoxygenase) โดยสามารถเข้าจับกับไอออนของเหล็กซึ่งเป็นโคแฟกเตอร์ (cofactor) ลดประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ดังกล่าว (Puerta, 1999)

5. สารคีเลทโลหะ (Metal chelators) เช่น สารอัลแวนจากสาหร่ายผักกาด (*Ulva pertusa*) ฟุคอยแดน จากสาหร่ายสีน้ำตาล (*Laminaria japonicus*) (Wang *et al.*, 2008; Qi *et al.*, 2006) ทำหน้าที่เป็นสารคีเลทโลหะ ซึ่งจะทำหน้าที่จับและแยกโลหะที่เกี่ยวข้องในขั้นตอนการเกิด ($\bullet$ OH) เข้ามารวมไว้ในโครงสร้างให้อยู่ในรูปสารประกอบเชิงซ้อน โลหะจึงไม่สามารถทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาการเกิดอนุมูลอิสระได้

2.3 สาหร่ายทะเล

สาหร่ายทะเลขนาดใหญ่ (Macroalgae) สาหร่ายทะเลจัดเป็นพืชชั้นต่ำ ซึ่งไม่มีระบบราก ใบ และระบบการลำเลียงน้ำและสารอาหารที่แท้จริง อาศัยการดูดซึมโดยวิธีการแพร่ (osmosis) สาหร่ายทะเลขนาดใหญ่สามารถจำแนกได้ 3 กลุ่ม ได้แก่ สาหร่ายสีแดง (Red algae) สาหร่ายสีเขียว (Green algae) และสาหร่ายสีน้ำตาล (Brown algae) สาหร่ายแต่ละกลุ่มมีความแตกต่างกันตามชนิดของรงควัตถุ สาหร่ายแต่ละกลุ่มมีการนำมาใช้ประโยชน์ได้หลายรูปแบบ ทั้งการใช้เป็นอาหารโดยตรงโดยมนุษย์และสัตว์เนื่องจากสาหร่ายมีคุณค่าทางอาหารสูง ทั้งแหล่งของแร่ธาตุ วิตามิน กรดอะมิโน กรดไขมัน และอื่นๆ นอกจากนี้ยังนำมาใช้ประโยชน์และในรูปแบบของสารสกัดซึ่งมีคุณสมบัติต่างๆ มากมาย สารประกอบจากสาหร่ายทะเล (Bioactive compound) ได้รับการยอมรับว่ามีคุณสมบัติที่ดีในด้านต่างๆ ด้านเชื้อแบคทีเรีย เชื้อไวรัส ด้านการอักเสบ ลดความดันโลหิต ช่วยสลายลิ่มเลือด ด้านสารก่อมะเร็ง (Kim *et al.*, 2008; Chew *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2007; Nahas *et al.*, 2007; Yuan *et al.*, 2005) และเสริมสร้างภูมิคุ้มกัน (Chiu *et al.*, 2008) นอกจากนี้มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ (Biglari *et al.*, 2008; Yesilyurt *et al.*, 2008; Nagai and Yukimoto, 2003) สารประกอบจากสาหร่ายทะเล ได้แก่ แซนทีน แอสตาแซนทีน แคโรทีนอยด์ กรดฟีนอลิก ฟลาโวนอยด์ คีทีซิน โพลีโรแทนนิน โบรโมฟีนอล (bromophenols) อัลแวน (ulvan) สารประกอบพอลิฟีนอล ในสาหร่ายสีน้ำตาลจะถูกเรียกว่า โพลีโรแทนนิน โดยพบประมาณ 5-15 เปอร์เซ็นต์ของน้ำแห้งสาหร่าย ส่วนในสาหร่ายสีแดงจะถูกเรียกว่า โบรโมฟีนอล ซึ่งสารดังกล่าวมีบทบาทในการป้องกันโรค และลดภาวะเครียดออกซิเดชัน (Burtin, 2003) สารที่ได้จากสาหร่ายนอกจากมีความแตกต่างกันตามชนิดของสาหร่าย วิธีการสกัดและชนิดของสารที่ใช้ในการสกัดจะทำให้ได้สารสกัดที่มีคุณสมบัติแตกต่างกัน (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 รายงานการศึกษาวิจัยผลของสารสกัดจากสาหร่ายทะเลต่อการดักจับอนุมูลอิสระ

ชนิดของสาหร่าย	สารจากสาหร่าย	การสกัด	ผลของสารจากสาหร่าย	อ้างอิง
สาหร่ายสีน้ำตาล				
<i>Palmaria palmata</i>	-	Inorganic solvent	-ต้านอนุมูลไฮดรอกซิล (OH•) -ยับยั้งการเกิดลิพิดเปอร์ออกซิเดชัน	Yuan <i>et al.</i> , 2005
<i>Euchema kappaphycus</i> <i>Gracilaria edulis</i> <i>Acanthophora spicifera</i>	sulfate galactose	Inorganic solvent	-ต้านอนุมูลอิสระ (DPPH [•]), (OH•)	Ganesan <i>et al.</i> , 2007
<i>Polysiphonia urceolata</i>	bromophenols	Inorganic solvent	-ยับยั้งอนุมูล(DPPH [•]), anti-inflammatory	Li <i>et al.</i> , 2007
สาหร่ายสีน้ำเงิน				
<i>Hijikia fusiformis</i>	fucoxanthin	Inorganic solvent	ต้านการเกิดอนุมูล ซูเปอร์ออกไซด์ (O ^{•-} ₂)	Yan <i>et al.</i> , 1999
<i>Sargassum</i> sp. <i>S. kjellmanianum</i> <i>S. riggoldianum</i>	pholotannins	Inorganic solvent	-ต้านการเกิดอนุมูล ซูเปอร์ออกไซด์ (O ^{•-} ₂) -ยับยั้งการเกิดลิพิดเปอร์ออกซิเดชัน -กระตุ้นการทำงานของเอนไซม์เอส ทรานเฟอร์เรส - ต้านแบคทีเรีย	Nakai <i>et al.</i> , 2006
<i>Sargassum</i> sp. (Songkhla: Thailand)	-	Hot water extract	-ยับยั้งอนุมูล OH [•]	DPPH, Yangthong <i>et al.</i> , 2009
<i>Turbinaria conoides</i>	-	-	scavenging activity of O ^{•-} ₂ - anti-lipid peroxidation - reducing power	Boonchum <i>et al.</i> , 2011

ชนิดของสาหร่าย	สารจากสาหร่าย	การสกัด	ผลของสารจากสาหร่าย	อ้างอิง
สาหร่ายสีน้ำตาล(ต่อ)				
<i>Ecklonia stonifera</i> , <i>Ecklonia kurome</i>	phlorotannins	Inorganic solvent	-ต้านอนุมูลอิสระ DPPH, Kuda <i>et al.</i> , (O ^{•-2}), ferrous- 2007 reducing, และต้าน แบคทีเรีย antibacterial (<i>E. coli</i> , <i>Pseudomonas</i> <i>aeruginosa</i> , <i>Staphylococcus</i> <i>aureus</i>)	
<i>Laminaria japonica</i>	galactose fucoidan	Inorganic solvent	-ต้านอนุมูลซูเปอร์ออกไซด์ (O ^{•-2}) และ 2008 ต้านอนุมูลไฮดรอกซิล ([•] OH) -ทำหน้าที่เป็นสารคีเลทโลหะ	
สาหร่ายสีเขียว				
<i>Caulerpa racemosa</i>	sulfate polysaccharide	Hot water	-ต้านไวรัส (antiviral)	Ghosh <i>et al.</i> , 2004
<i>Ulva pertusa</i>	ulvan	Inorganic solvent	-ต้านอนุมูลซูเปอร์ออกไซด์(O ^{•-2}),อนุมูลไฮดรอกซิล(HO [•]),สารคีเลทโลหะ	Qi <i>et al.</i> , 2006

สำหรับประเทศไทย มีรายงานการศึกษาปริมาณฟีนอลิก และค่าความสามารถในการดักจับอนุมูลอิสระของสาหร่ายทะเลที่แพร่กระจายบริเวณชายฝั่งทะเลภาคใต้ตอนล่างของประเทศไทย ดังตารางที่ 2 (Yangthong *et al.*, 2009)

ตารางที่ 2 ปริมาณฟีนอลิกและความสามารถในการดักจับอนุมูลอิสระ

พื้นที่เก็บ ตัวอย่าง	ชนิดสาหร่าย	ปริมาณฟีนอลิก (mg tannic acid/100 g dried sample)	Antioxidant activity IC ₅₀ (mg/mL)		
			DPPH	OH ⁻	O ₂ ⁻
ปัตตานี	<i>Gracilaria tenuistipitata</i>	-	-	-	-
สตูล	<i>Caulerpa macrophysa</i>	1,874.51 ± 121.14	61.68 ± 0.51	39.39 ± 0.38	NA
ปัตตานี	<i>Ulva lactuca</i>	7,528.71 ± 354.70	12.63 ± 0.41	14.47 ± 0.72	NA
สงขลา	<i>Sargassum</i> sp.	25,984.75 ± 321.59	1.18 ± 0.04	6.36 ± 0.00	NA

DPPH = 1,1 – diphenyl-2-picryl-hydrazyl

IC₅₀ = concentrations that inhibit oxidation by 50%

OH⁻ = Hydroxyl ion

O₂⁻ = Superoxide

NA = NO activity

สาหร่ายที่นำมาศึกษา

Brachytrichia quoyi สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน พัลลัสเป็นก้อนกลม เกือบกลมหรือรูปร่างไม่แน่นอน คล้ายถุงขนาดต่าง ๆ กัน ผิวมีรอยย่น มักเกาะติดอยู่กับก้อนหินเขตน้ำขึ้นน้ำลง บริเวณชุมชนโขดหินหรือแนวปะการังส่วนใหญ่ (Lewmanomont and Ogawa, 1995)



Brachytrichia quoyi

Dictyota ciliolate สำหรับสีน้ำตาล ทลัสแพร่ขยายเป็นพุ่ม แขนงมีรูปร่างเป็นแถบคล้ายริบบิ้น ขอบมีหนาม และปลายสุดโค้งมนแตกแขนงแบบคู่ มักเกาะติดอยู่กับโขดหิน ก้อนหินเขตน้ำขึ้นน้ำลง



Dictyota ciliolate

Padina minor สาหร่ายสีน้ำตาล ทัลลัสแผลเป็นรูปพัด ขอบมีวนมีรากยึดเกาะลักษณะเป็นรูปถ้วย มีสไตป์สั้นๆ มีความหนา 2 ชั้นของเซลล์ ผิวด้านล่างมีคราบหินปูน ผิวด้านบนมีขนเป็นแนวโค้งขนานกับขอบของทัลลัส มีอวัยวะสืบพันธุ์เป็นแนวสีเข้ม เนื้อแนวขนทุกแนว ทัลลัสสีน้ำตาลอมเขียวหรือน้ำตาลอมเหลือง ขึ้นบนแนวหิน บริเวณน้ำขึ้นน้ำลง



Padina minor

Sargassum binderi สาหร่ายสีน้ำตาล ทัลลัสมีลักษณะเหมือนพืชชั้นสูง มีส่วนรากสำหรับยึดเกาะตั้งตรงเป็นรูปถ้วย สไตป์รูปทรงกระบอกผิวเรียบหรือขรุขระ มีเส้นผ่าศูนย์กลางสูงสุดประมาณ 3 มิลลิเมตร ยาวประมาณ 1 เซนติเมตร โดยมีแขนงแรก (primary brach) แตกออกจากสไตป์เป็นวงโดยรอบประมาณ 6-8 แขนง แขนงมีลักษณะแบนเรียบ ส่วนคล้ายใบมีขนาดใหญ่รูปหอกถึงเรียวไม่สมมาตร เห็นเส้นกลางใบไม่ชัดเจน มีคริปโตสโตมา (cryptostoma) ขนาดเล็กกระจายอยู่ทั่วทั้งใบ ถุงลม (vesicle) มีขนาดกลมหรือรูปไข่ มี 2 เพศในต้นเดียวกัน อวัยวะสืบพันธุ์ (receptacle) มีลักษณะแบน และมักบิดเป็นเกลียว บริเวณขอบมีลักษณะเป็นหยักและคมเกิดขึ้นเดี่ยวๆ หรือแตกเป็นกิ่งก้าน (Noiraksa and Ajisaka, 2008)



Sargassum binderi

S. polycystum สาหร่ายสีน้ำตาล ทัลลัสมีลักษณะเหมือนพีชชั้นสูง มีทัลลัสเป็นสีน้ำตาลค่อนข้างเหลือง มีส่วนรากสำหรับยึดเกาะตั้งตรงเป็นรูปถ้วย มีสไตป์เป็นทรงกระบอกสั้นๆ แขนงที่แตกจากสไตป์มีลักษณะขรุขระเป็นหนามเล็กๆ มากมาย เบลดของแขนงอันดับที่ 2 ของแต่ละต้นมีลักษณะที่แตกต่างกัน ขอบด้านบนของเบลดมีลักษณะคล้ายฟันเลื่อย มีเส้นกลางใบยาวจนถึงปลายสุดของเบลดและมีคริปโตสโตมากระจายบนเบลด ถุงลมมีรูปร่างลักษณะที่แตกต่างกันซึ่งภายในต้นหนึ่งจะมีรูปร่างหลายแบบคล้ายรูปไข่ บางครั้งบริเวณผิวด้านนอกแผ่ออกเป็นแผ่นคล้ายปีก มีคริปโตสโตมาจำนวนไม่มาก ถุงลมมีทั้งที่อยู่เดี่ยวๆ หรือเป็นข้อ สร้างบริเวณแขนงอันดับที่ 1 หรือแขนงอันดับที่ 2 อวัยวะสืบพันธุ์เพศผู้และเพศเมียแยกต้นกัน เพศผู้มีลักษณะเป็นแท่งกลม ยาวประมาณ 8 มิลลิเมตร เกิดเดี่ยวๆ หรือเป็นคู่ เพศเมียเป็นแท่งกลมบริเวณส่วนโคน และส่วนด้านบนค่อนข้างแบน ยาวประมาณ 4 มิลลิเมตร อยู่รวมกันเป็นข้อ ส่วนของแขนงอันดับที่ 1 สามารถสร้างสโตลอน (stolon) ออกไปได้หลายทิศทาง (สุเมธ และอนงค์, 2555)



S. polycystum

Turbinaria conoides (J. Agardh) Kützing สาหร่ายสีน้ำตาล ทัลลัสเป็นพุ่ม มีแขนงจำนวนมากแตกจากแกนหลัก ส่วนคล้ายใบเกิดอยู่บนแขนง ใบมีลักษณะคล้ายรูปไต ขอบใบมีรอยหยักคล้ายฟันเลื่อยขนาดใหญ่ มีถุงลมฝังอยู่ตรงกลาง ส่วนที่คล้ายรากเกาะยึดแข็งแรง พบเจริญเติบโตบนโขดหิน ในเขตนํ้าลงต่ำสุดบริเวณชายฝั่งที่มีคลื่นสงบ (Lewmanomont and Ogawa, 1995)



Turbinaria conoides

บทที่ 3
วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการทดลอง

3.1 สารเคมี

สารเคมีที่ใช้ในการทดลองเป็นชนิดคุณภาพวิเคราะห์ (analytical grade) หรือเทียบเท่า

สารเคมี	M.W.	บริษัทที่ผลิต
L-Ascorbic acid	176.13	May&Baker
Butylated hydroxytoluene (BHT)	220.13	Sigma
1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH)	394.30	Merck
Dipotassium hydrogen phosphate ($K_2 HPO_4$)	174.18	Fluka
Ethylene diamine tetraacetic acid disodium salt (EDTA)	372.24	Fluka
2-Deoxy-D-ribose	134.13	Fluka
Ferric chloride ($FeCl_3$)	162.21	Sigma
Folin	260.2	Sigma
Hydrogen peroxide	34.01	Merck
Methanol	32.04	BDH
L-Methionine	149.20	Sigma
Nitro blue tetrazolium dihydrochloride (NBT)	817.60	Sigma
Potassium hydroxide	56.11	J.T.Baker
Potassium dihydrogen phosphate ($KH_2 PO_4$)	134.09	Fluka
Riboflavin	376.40	Sigma
Sodium chloride (NaCl)	58.44	Merck
Sodium hydroxide	40.00	Merck
Tannic acid	1701.20	Sigma
Thiobarbituric acid (TBA)	144.10	Carlo Erba
Trichloroacetic acid (TCA)	163.39	Carlo Erba
Triton X-100	646.35	Sigma
Trolox (6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethyl chroman-2-carboxylic acid)	250.29	Aldrich

3.2 อุปกรณ์

หม้อนึ่งความดันสูง (Autoclave) รุ่น ES315
 เครื่องวัดการดูดกลืนแสงรุ่น Expert 96
 เครื่องทำแห้งภายใต้ความเย็นและสุญญากาศ (Freeze dryer) รุ่น Scanvac Coolsafe 110-4 Pro
 ตู้แช่ -80 องศาเซลเซียส (Ultra Low Temperature Freezer)
 เครื่องกลั่นระเหยแห้ง (Rotary evaporator รุ่น SM-Series ของ Buchi
 เครื่อง Vacuum Pump รุ่น V-700 ของ Buchi
 เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (UV-VIS recording spectrophotometer) รุ่น 8453 บริษัท Hewlett-Packard, USA
 เครื่องหมุนเหวี่ยงแบบตั้งโต๊ะ (refrigerated bench-top centrifuge) รุ่น 5804R ของ Eppendorf, Germany
 เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่งรุ่น 10 ของ Mettler, Switzerland
 เครื่องวัด pH (pH meter) รุ่น PHM61 ของ Radiometer, Denmark
 เครื่องกวนสารละลาย (magnetic stirrer) รุ่น PC-410 ของ Corning, USA
 เครื่องผสมสารละลาย (vortex mixer) รุ่น K-550-GE ของ Scientific Industries, USA
 อ่างควบคุมอุณหภูมิ (water-bath) รุ่น SS40-D ของ Grant, England

3.3 วิธีการทดลอง

3.3.1 การเก็บตัวอย่างสาหร่าย

เก็บตัวอย่างสาหร่ายทะเลขนาดใหญ่จากชายฝั่งทะเลของจังหวัดชุมพร อำเภอปะทิว บริเวณชายหาด บ่อเมา ตัวอย่างสาหร่ายทะเลที่เก็บรวบรวมได้จะถูกแบ่งเป็น 2 ส่วน ส่วนแรกเก็บเป็นตัวอย่างแห้ง (herbarium specimens) เพื่อนำไปจำแนกชนิดภายในห้องปฏิบัติการและส่วนที่สองจะถูกเก็บในอุณหภูมิ - 4 องศาเพื่อเตรียมไปสกัดต่อไป

3.3.2 การเตรียมสารสกัดจากสาหร่ายทะเล

ตัวอย่างสาหร่ายทะเลถูกล้างทำความสะอาดด้วยน้ำจืด กำจัดสิ่งต่างๆ ที่เกาะติด (epiphy) ผึ่งให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง และนำมาบดให้ละเอียด หลังจากนั้นนำสาหร่ายที่บดละเอียดแล้วมาสกัดสกัดด้วยสารละลาย 2 ชนิด คือ น้ำ และเอทิลแอลกอฮอล์ โดยใช้สาหร่าย 10 กรัมต่อน้ำหรือเอทิลแอลกอฮอล์ 500 มิลลิลิตร การสกัดด้วยน้ำตามวิธีการของ Yangthong et al. (2012) สารละลายที่ได้จากการสกัดด้วยน้ำจะถูกกรองผ่านผ้ากรองขนาด 200 ไมครอน ทำให้แห้งด้วยความเย็น (freeze drying) สำหรับการสกัดด้วยเอทิลแอลกอฮอล์ ใช้เอทิลแอลกอฮอล์ 35 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์พื้นบ้านจากจังหวัดชุมพร ใช้วิธี Maceration เป็นเวลา 30 วัน หลังจากนั้นนำมากรองด้วยผ้ากรองขนาด 200 ไมครอน และระเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่อง rotary evaporator

3.3.3 การหาปริมาณพอลิฟีนอล (polyphenol) ในสารสกัด

หาปริมาณพอลิฟีนอลด้วยวิธีการของ Velioğlu *et al.* (1998) ซึ่งดำเนินการดังนี้ นำสารสกัดสำหรับแต่ละชนิดที่ได้จากการสกัดที่แตกต่างกันข้างต้น มาเตรียมเป็นสารละลายความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นนำสารละลายของสารสกัดสำหรับปริมาณ 100 ไมโครลิตร มาเติมสารละลาย Folin-Ciocalteu reagent (ประกอบด้วย 1:9 ของ Folin-Ciocalteu reagent : น้ำกลั่น) ปริมาตร 0.75 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 5 นาที ก่อนจะเติมโซเดียมคาร์บอเนต (ประกอบด้วย 1:9 ของโซเดียมคาร์บอเนต:น้ำกลั่น) 0.75 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 90 นาที จากนั้นนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 725 นาโนเมตร เทียบกับ blank ซึ่งใช้น้ำแทนสารสกัด หาปริมาณ polyphenol ในสารสกัดโดยเปรียบเทียบค่าที่วัดได้กับกราฟมาตรฐานซึ่งเตรียมจากสารละลาย tannic acid ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ

3.3.4 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากสาหร่าย

3.3.4.1 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูล DPPH[•]

ทดสอบความสามารถในการดักจับอนุมูล DPPH[•] ของสารสกัด ตามวิธีการของ Hutadilok-Towatana *et al.* (2006) โดยนำสารสกัดปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร มาเติมสารละลาย 0.2 mM DPPH ในเมธานอล ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน หลังจากนั้นทิ้งไว้ในที่มืด ณ อุณหภูมิห้อง นาน 30 นาที และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 518 นาโนเมตร เปรียบเทียบกับชุดควบคุมซึ่งใส่น้ำกลั่นแทนสารสกัด โดยใช้น้ำเท่านั้นเป็น blank นำค่าที่วัดได้มาคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การดักจับอนุมูล DPPH[•] จากสูตร

$$\% \text{ scavenging} = [(A_{\text{control}} - A_{\text{sample}}) / A_{\text{control}}] \times 100$$

$$A_{\text{control}} = \text{ค่าการดูดกลืนแสงของชุดควบคุม}$$

$$A_{\text{sample}} = \text{ค่าการดูดกลืนแสงของชุดทดสอบ}$$

จากนั้นคำนวณหา IC_{50} (ค่าความเข้มข้นของสารสกัดที่สามารถดักจับอนุมูล DPPH[•] ได้ 50 %) จากกราฟระหว่าง % scavenging กับความเข้มข้นของสารสกัด

3.3.4.2 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลไฮดรอกซิล (OH[•])

ดัดแปลงจากวิธีการที่ระบุโดย Hutadilok-Towatana *et al.* (2006) โดยนำหลอดทดลองมาบรรจุสารละลายของสารสกัดที่มีความเข้มข้นต่างกัน ปริมาตร 67 ไมโครลิตร หลังจากนั้นเติมสารละลาย 30 mM KH_2PO_4 /KOH, pH 7.4 ปริมาตร 134 ไมโครลิตร, 17 mM deoxyribose ปริมาตร 67 ไมโครลิตร, 34 mM H_2O_2 ปริมาตร 33 ไมโครลิตร, 1.2 mM EDTA ปริมาตร 33 ไมโครลิตร, 300 μ M FeCl ปริมาตร 67 ไมโครลิตร และ 600 μ M ascorbic acid ปริมาตร 67 ไมโครลิตรลงไปตามลำดับ ผสมให้เข้ากัน จากนั้นนำมาบ่ม (incubate) ในอ่างควบคุมอุณหภูมิ (water bath) ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วเติม 1 % (w/v) TBA ใน 50 mM NaOH ปริมาตร 333 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันก่อนนำมาบ่มต่อที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที หลังจากนั้นให้เย็น นำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 532 นาโนเมตร เปรียบเทียบกับชุดควบคุมซึ่งมีแต่ reagent เท่านั้น และชุด sample blank ซึ่งประกอบด้วยสารสกัดกับ

reagent ต่างๆ ยกเว้น deoxyribose โดยใช้ชุดควบคุมที่ไม่มี deoxyribose อยู่ด้วยเป็น blank นำค่าที่วัดได้มาคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การดักจับอนุมูล $\text{OH}^\bullet$ จากสูตร

$$\% \text{ scavenging} = [A_{\text{control}} - (A_{\text{sample}} - A_{\text{sample blank}}) / A_{\text{control}}] \times 100$$

A_{control} = ค่าการดูดกลืนแสงของชุดควบคุม

A_{sample} = ค่าการดูดกลืนแสงของชุดทดสอบ

$A_{\text{sample blank}}$ = ค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัด

จากนั้นคำนวณหาค่า IC_{50} (ค่าความเข้มข้นของสารสกัดที่สามารถดักจับอนุมูล $\text{OH}^\bullet$ ได้ 50 %) จากกราฟระหว่าง % scavenging กับความเข้มข้นของสารสกัด

3.3.4.3 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลซูเปอร์ออกไซด์ ($\text{O}_2^{\bullet-}$)

อาศัยวิธีการของ Bayer and Fridovich (1987) ดัดแปลงโดย Hutadilok-Towatana *et al.* (2006) โดยนำสารสกัดแต่ละชนิดมาเตรียมเป็นสารละลายความเข้มข้นต่างๆ กันในเมทานอล ปริมาตร 20 ไมโครลิตร แล้วผสมกับสารละลายผสมของ 9.9 mM L-methionine, 1.72 mM NBT, 1% (W/V) Triton X-100 และ 17 μM riboflavin ใน 50 mM K_2HPO_4 pH 7.8 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร หลังจากส่องด้วยแสง (illuminate) จากหลอดฟลูออเรสเซนต์ (fluorescent lamp) ความเข้ม 40 วัตต์ นาน 7 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 560 นาโนเมตร เปรียบเทียบกับชุดควบคุมซึ่งใส่น้ำกลั่นแทนสารสกัด และชุด sample blank ที่มีสารสกัดกับ reagent ต่างๆ ยกเว้น riboflavin โดยใช้ควบคุมที่ไม่เติม riboflavin ลงไปเป็น blank นำค่าที่วัดได้มาคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การดักจับอนุมูล $\text{O}_2^{\bullet-}$ จากสูตร

$$\% \text{ scavenging} = [A_{\text{control}} - (A_{\text{sample}} - A_{\text{sample blank}}) / A_{\text{control}}] \times 100$$

A_{control} = ค่าการดูดกลืนแสงของชุดควบคุม

A_{sample} = ค่าการดูดกลืนแสงของชุดทดสอบ

$A_{\text{sample blank}}$ = ค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัด

จากนั้นคำนวณหาค่า IC_{50} (ค่าความเข้มข้นของสารสกัดที่สามารถดักจับอนุมูล $\text{O}_2^{\bullet-}$ ได้ 50 %) จากกราฟระหว่าง % scavenging กับความเข้มข้นของสารสกัด

3.4. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

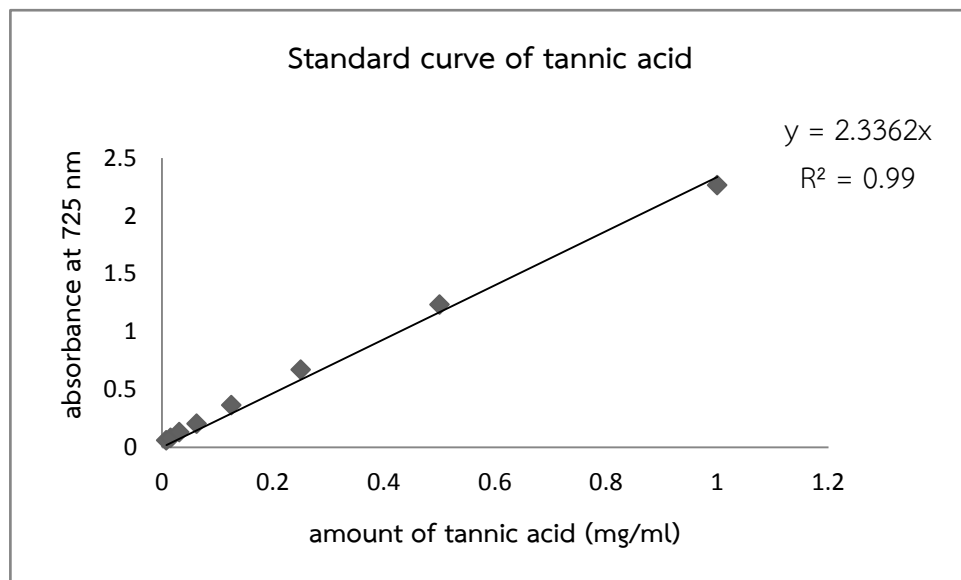
ทดสอบค่าความแตกต่างของการออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากสาหร่ายทะเล โดยวิธีการวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนด้วยวิธี ANOVA ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % จากนั้นนำไปวิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติโดยวิธี Duncan's New multiple range Test (Duncan, 1955)

บทที่ 4

ผลการทดลอง

4.1 ปริมาณฟีนอลิกโดยรวม

ผลจากการทดลองนี้พบว่า สารสกัดน้ำจากสาหร่ายทะเลทั้ง 6 ชนิดมีปริมาณฟีนอลิกโดยรวมมากกว่าสารสกัดเอทิลแอลกอฮอล์ สารสกัดน้ำจากสาหร่าย *Turbinaria conoides* มีปริมาณฟีนอลิกโดยรวมมากที่สุด รองลงมาเป็นสารสกัดน้ำจากสาหร่าย *Sargassum binderi*, *S. polycystum*, *Padina minor*, *Dictyota ciliolate* และ *Brachytrichia quoyi* สำหรับสารสกัดเอทิลแอลกอฮอล์พบว่าสาหร่าย *Turbinaria conoides* มีปริมาณฟีนอลิกโดยรวมมากที่สุดเช่นกัน รองลงมาเป็นสารสกัดจากสาหร่าย *S. polycystum*, *Dictyota ciliolate*, *Padina* sp. และ *Brachytrichia quoyi* (ดังตารางที่ 1)



ภาพที่ 1 กราฟมาตรฐานของ tannic acid ที่ใช้หาปริมาณฟีนอลิกโดยรวมจากสารสกัดสาหร่าย

ตารางที่ 1 ปริมาณฟีนอลิกโดยรวมจากสารสกัดจากสาหร่ายทะเลที่สกัดด้วยน้ำและเอทิลแอลกอฮอล์จากสาหร่ายทะเลขนาดใหญ่ของจังหวัดชุมพร

สาหร่าย	ปริมาณฟีนอลิกโดยรวม (mg TAE/g extract)	
	น้ำ	เอทิลแอลกอฮอล์
<i>Brachytrichia quoyi</i>	137.30 ± 2.33^a	51.55 ± 3.36^a
<i>Dictyota ciliolata</i>	280.59 ± 1.67^b	142.66 ± 11.44^b
<i>Turbinaria conoides</i>	732.36 ± 11.84^f	265.62 ± 0.81^d
<i>Padina minor</i>	366.63 ± 9.91^c	67.14 ± 2.39^a
<i>Sargassum polycystum</i>	512.67 ± 4.62^d	158.54 ± 0.74^c
<i>Sargassum binderi</i>	568.08 ± 15.83^e	ND

¹ ค่าเฉลี่ย + ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน จากข้อมูล 3 ซ้ำ

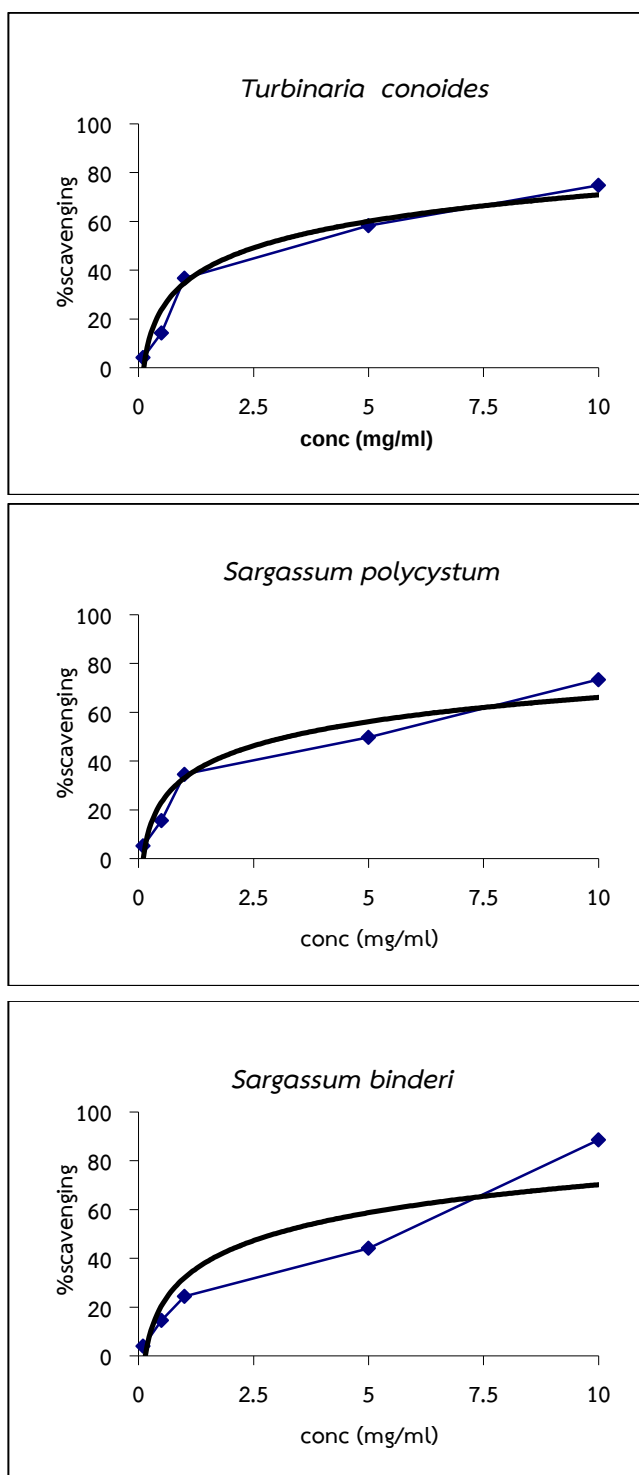
ค่าเฉลี่ยในสมมุติฐานที่มีตัวอักษรเหมือนกันกำกับ ไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์ ($p > 0.05$)

ND: Not determined

4.2ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

4.2.1 ฤทธิ์ต้านอนุมูล DPPH[•]

การทดสอบความสามารถในการดักจับอนุมูล DPPH[•] ในสารละลาย โดยอาศัยหลักการ คือ เมื่ออนุมูล DPPH[•] ในสารละลายสีม่วงได้รับอิเล็กตรอนจากสารสกัดสาหร่าย จะกลายเป็นสารประกอบ DPPH ที่เสถียรขึ้นและไม่มีสีม่วงเหมือนกับอนุมูล DPPH[•] ทำให้ตรวจวัดความสามารถในการดักจับอนุมูล DPPH[•] ของสารสกัดจากสาหร่ายได้ จากค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย DPPH[•] ที่ลดลง ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูล DPPH[•] ในสาหร่ายทะเลพบว่า สารสกัดน้ำจากสาหร่ายทะเล 3 ชนิดมีความสามารถในการดักจับอนุมูล DPPH[•] ได้แก่ สารสกัดจากสาหร่าย *Turbinaria conoides*, *S. binderi*, *S. polycystum* โดยมีค่า IC₅₀ คือ 2.64 ± 0.01 , 2.95 ± 0.02 และ 3.252 ± 0.03 ซึ่งมีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ในขณะที่สารสกัดเอทิลแอลกอฮอล์จากสาหร่ายทะเลทั้ง 6 ชนิด ไม่มีความสามารถในการดักจับอนุมูล DPPH[•] (ดังตารางที่ 2 และภาพที่ 2)



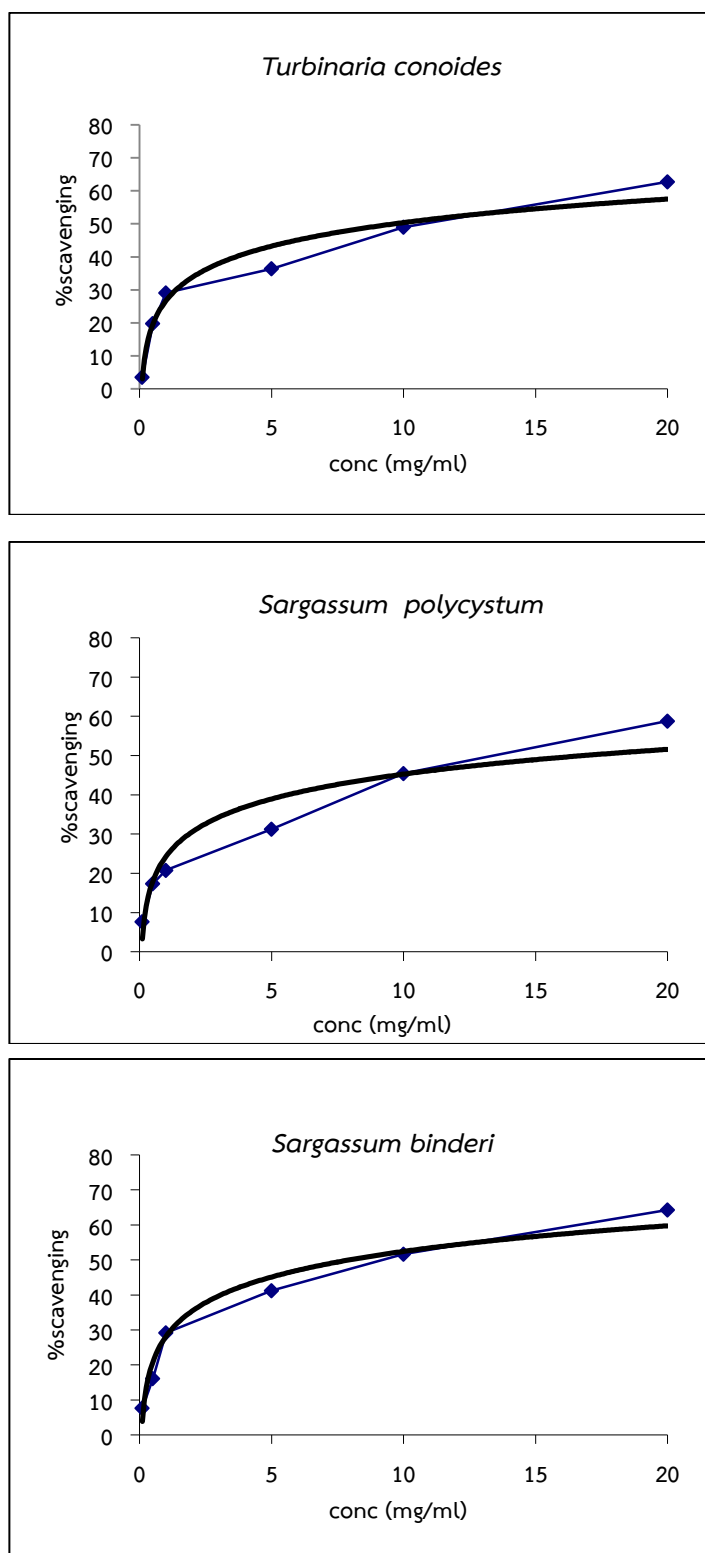
ภาพที่ 2 ความสามารถในการดักจับอนุมูล DPPH[•] ของสารสกัดน้ำจากสาหร่ายทะเล

4.2.2 ฤทธิ์ต้านอนุมูลซูเปอร์ออกไซด์ ($O_2^{\bullet-}$)

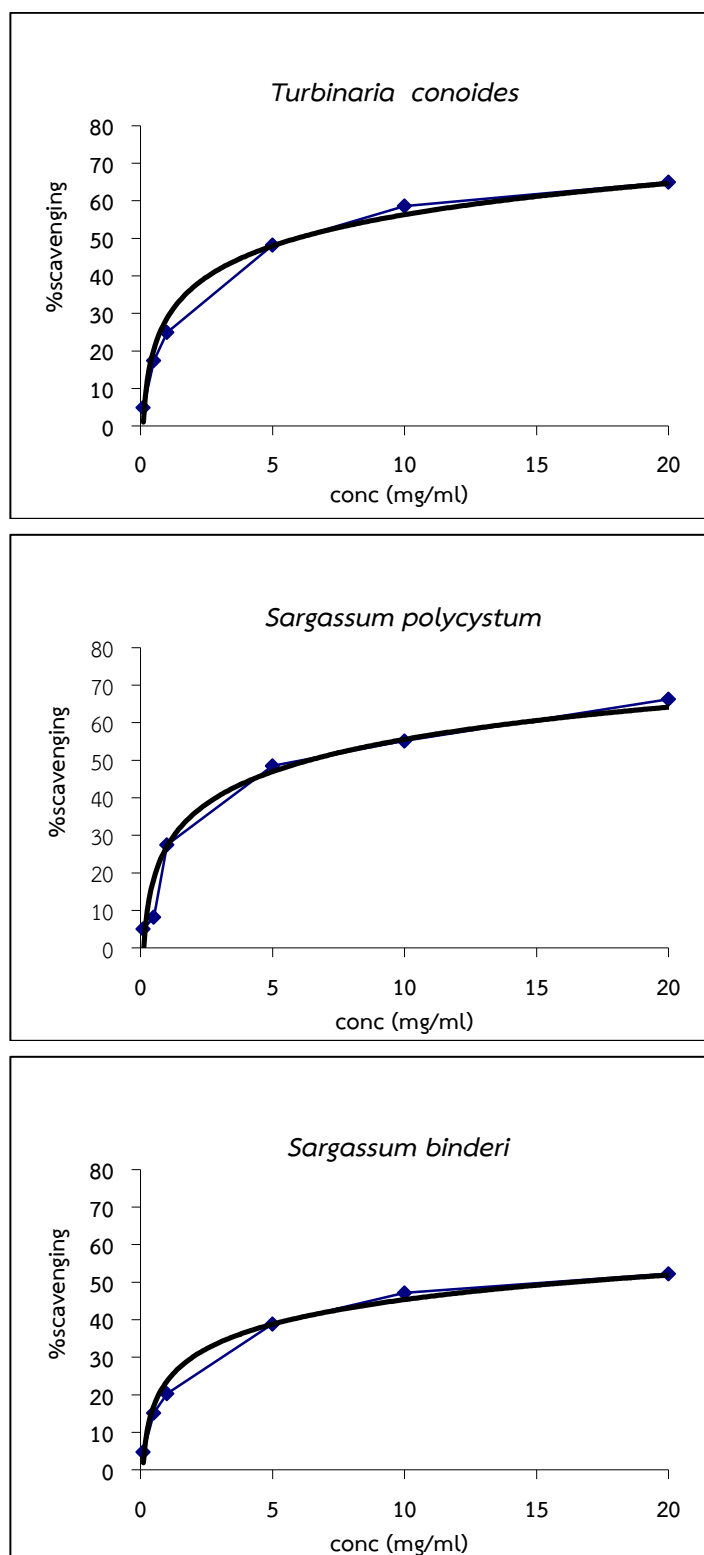
การทดสอบความสามารถในการดักจับอนุมูลซูเปอร์ออกไซด์ในสารละลาย อาศัยหลักการ คือ เมื่อ riboflavin ถูกกระตุ้นด้วยแสงจะสามารถรับอิเล็กตรอนจาก methionine แล้วเปลี่ยนโครงสร้างเป็น semiquinone ซึ่งจะให้อิเล็กตรอนต่อไปยังออกซิเจน (O_2) เปลี่ยนเป็นอนุมูลซูเปอร์ออกไซด์ แล้วไปรีดิวซ์ (reduce) NBT ที่มีสีเหลืองเปลี่ยนเป็นสาร formazan ที่มีสีม่วงในที่สุด วัดความสามารถของสารสกัดในการดักจับอนุมูลซูเปอร์ออกไซด์ ได้จากการยับยั้งการเปลี่ยนสีของ NBT จากผลการศึกษาพบว่า สารสกัดน้ำจากสาหร่ายทะเล 3 ชนิดมีความสามารถในการดักจับอนุมูล $O_2^{\bullet-}$ ได้แก่ *Turbinaria conoides*, *S. binderi*, *S. polycystum* โดยมีค่า IC_{50} คือ 9.64 ± 0.00 , 16.80 ± 0.01 และ 7.94 ± 0.00 ซึ่งมีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ในขณะที่สารสกัดเอทิลแอลกอฮอล์จากสาหร่ายทะเลทั้ง 6 ชนิด ไม่มีความสามารถในการดักจับอนุมูล $O_2^{\bullet-}$ (ดังตารางที่ 2 และภาพที่ 3)

4.2.3 ฤทธิ์ต้านอนุมูลไฮดรอกซิล ($OH^{\bullet}$)

การทดสอบความสามารถในการดักจับอนุมูลซูเปอร์ออกไซด์ในสารละลาย อาศัยหลักการ คือ เมื่อน้ำตาล deoxyribose ถูกทำลายโดยปฏิกิริยาออกซิเดชันของอนุมูล $OH^{\bullet}$ ที่เกิดจากปฏิกิริยา Fenton จะมีสารประกอบอัลดีไฮด์ (aldehydes) เกิดขึ้น ซึ่งตรวจวัดได้ในรูปสารประกอบเชิงซ้อนสีชมพูของ TBARS (thiobarbituric acid reactive substances) ดังนั้นจึงสามารถนำวิธีดังกล่าวมาใช้ตรวจสอบฤทธิ์ของสารสกัดได้โดยดูจากค่าการดูดกลืนแสงสีชมพูที่ลดลง จากผลการศึกษาพบว่า สารสกัดน้ำจากสาหร่ายทะเล 3 ชนิดมีความสามารถในการดักจับอนุมูล $OH^{\bullet}$ ได้แก่ *Turbinaria conoides*, *S. polycystum*, *S. binderi* โดยมีค่า IC_{50} คือ 5.91 ± 0.02 , 6.38 ± 0.03 และ 16.34 ± 0.02 ซึ่งมีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ในขณะที่สารสกัดเอทิลแอลกอฮอล์จากสาหร่ายทะเลทั้ง 6 ชนิด ไม่มีความสามารถในการดักจับอนุมูล $OH^{\bullet}$ (ดังตารางที่ 2 และภาพที่ 4)



ภาพที่ 3 ความสามารถในการดักจับอนุมูล $O_2^{\bullet-}$ ของสารสกัดน้ำจากสาหร่ายทะเล



ภาพที่ 4 ความสามารถในการดักจับอนุมูล $\text{OH}^\bullet$ ของสารสกัดน้ำจากสาหร่ายทะเล

ตารางที่ 2 การดักจับอนุมูลอิสระของสารสกัดน้ำและเอทิลแอลกอฮอล์จากสาหร่ายทะเลขนาดใหญ่ของจังหวัดชุมพร

สารสกัด	IC ₅₀		
	DPPH	Superoxide	Hydroxyl
BHA	0.02 ± 0.02		
Trolox		0.24 ± 0.04	
Tannin			0.44 ± 0.01
น้ำ			
<i>Brachytrichia quoyi</i>	NA	ND	ND
<i>Dictyota ciliolata</i>	NA	ND	ND
<i>Turbinaria conoides</i>	2.64 ± 0.01 ^a	9.64 ± 0.00 ^b	5.91 ± 0.02 ^a
<i>Padina minor</i>	NA	ND	ND
<i>Sargassum polycystum</i>	3.252 ± 0.03 ^c	16.80 ± 0.01 ^c	6.38 ± 0.03 ^b
<i>Sargassum binderi</i>	2.95 ± 0.02 ^b	7.94 ± 0.00 ^a	16.34 ± 0.02 ^c
เอทิลแอลกอฮอล์			
<i>Brachytrichia quoyi</i>	NA	ND	ND
<i>Dictyota ciliolata</i>	NA	ND	ND
<i>Turbinaria conoides</i>	NA	ND	ND
<i>Padina minor</i>	NA	ND	ND
<i>Sargassum polycystum</i>	NA	ND	ND
<i>Sargassum binderi</i>	NA	ND	ND

¹ ค่าเฉลี่ย + ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน จากข้อมูล 3 ซ้ำ

ค่าเฉลี่ยในสดมภ์ที่มีตัวอักษรเหมือนกันกำกับ ไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์ (p>0.05)

NA: No activity, ND: Not determined

บทที่ 5

วิจารณ์ผลการทดลอง

สารสกัดจากสาหร่ายทะเลได้รับการยอมรับจากทั่วโลก ว่ามีคุณสมบัติที่ดีในการต้านอนุมูลอิสระ (Kuda *et al.*, 2005; Yuan *et al.*, 2005; Zubia *et al.*, 2008; Iwai, 2008; Chew *et al.*, 2008; Yangthong *et al.*, 2009; Boonchum *et al.*, 2011) วิธีการสกัดที่แตกต่าง สารเคมีที่แตกต่างที่ใช้ในการสกัด ย่อมส่งผลต่อประสิทธิภาพหรือฤทธิ์ของสารสกัดที่แตกต่างกัน การใช้สารเคมีหรือตัวทำละลายอินทรีย์ในการสกัดย่อมส่งผลต่อตัวผู้สกัดโดยตรง ของเสียจากการสกัดส่งผลต่อสภาพแวดล้อม ผลิตภัณฑ์ที่ได้อาจมีการตกค้างของสารเคมี ดังนั้นการเลือกใช้ตัวสกัดที่ส่งผลกระทบต่อสภาพแวดล้อมน้อยที่สุด และปลอดภัยต่อทั้งตัวผู้สกัด สภาพแวดล้อมและผลิตภัณฑ์ จึงมีความน่าสนใจ จากการทดลองครั้งนี้จึงสนใจศึกษาการใช้ น้ำ และ เอทิลแอลกอฮอล์ ในการสกัดสาหร่าย เอทิลแอลกอฮอล์ที่ใช้เป็นผลิตภัณฑ์ที่สามารถบริโภคได้ ผลิตภัณฑ์จำหน่ายในท้องถิ่นจังหวัดชุมพร สารสกัดจากสาหร่ายทะเลซึ่งสกัดด้วยน้ำ และเอทิลแอลกอฮอล์เป็นสารสกัดที่มีกรรมวิธีการผลิตที่ปลอดภัยทั้งต่อสภาพแวดล้อมและการนำไปใช้ประโยชน์ ผลจากการศึกษาครั้งนี้พบว่าสารสกัดจากสาหร่ายทะเลทุกชนิดที่สารสกัดด้วยน้ำมีปริมาณฟีนอลิกโดยรวมสูงกว่าสารสกัดจากเอทิลแอลกอฮอล์ เนื่องจากสารประกอบฟีนอลิกสามารถละลายน้ำได้ สารประกอบฟีนอลิกมีความสัมพันธ์กับฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ (Yangthong *et al.*, 2014) เนื่องจากมีโครงสร้างที่ประกอบด้วยโครงสร้างที่เป็นวงอะโรมาติก และมีหมู่แทนที่เป็นหมู่ไฮดรอกซีอย่างน้อย 1 หมู่ ทำให้สามารถให้อิเล็กตรอนแก่อะตอมหรือโมเลกุลที่มีอิเล็กตรอนไม่เพียงพอ หรือที่เรียกว่าอนุมูลอิสระได้ ช่วยยับยั้งหรือต่อต้านปฏิกิริยาออกซิเดชัน สารประกอบฟีนอลิก มีโพลีฟีนอลเป็นส่วนประกอบหลักของเมแทบอไลต์ทุติยภูมิ (secondary metabolites) ในพืช จัดเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่พบมากในธรรมชาติ โดยพบตั้งแต่สารที่มีโมเลกุลอย่างง่ายไปจนถึงสารที่มีโครงสร้างโมเลกุลที่ซับซ้อนสำหรับในสาหร่ายทะเล สาหร่ายสีน้ำตาลมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกสูงกว่าสาหร่ายสีแดงและสีเขียว (Matajun *et al.*, 2008) จากการทดลองครั้งนี้สาหร่ายทั้ง 6 ชนิดที่ศึกษาเป็นสาหร่ายสีน้ำตาล 5 ชนิด และสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน 1 ชนิดคือ *B. quoyi* พบว่าสาหร่ายสีน้ำตาลทั้ง 5 ชนิด มีปริมาณฟีนอลิกรวมสูงกว่าสาหร่าย *B. quoyi* โดยสาหร่าย *T. conoides* มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกสูงที่สุด ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Kumar *et al.* (2008) รายงานว่าสารสกัดน้ำจากสาหร่าย *T. conoides* มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกสูงที่สุด คือ 49.16 mg GAE/g extract และการศึกษาของ Devi *et al.* (2011) รายงานว่าสารสกัดเมธานอลจากสาหร่าย *T. conoides* มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกสูงที่สุด คือ 1.23 ± 0.173 mg GAE/g extract จากการศึกษาครั้งนี้ สารสกัดด้วยน้ำและเอทิลแอลกอฮอล์ของสาหร่าย *T. conoides* มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกสูงที่สุด แต่ต่างจากการศึกษาของ Parthiban *et al.* (2013) รายงานว่าสารสกัดด้วยอะซิโตนและเอธานอลของสาหร่าย *Dictyota dichotoma* มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกสูงกว่าสารสกัด *T. ornata* สารสกัดหรือตัวทำละลายที่ต่างกัน ย่อมส่งผลต่อปริมาณสารประกอบฟีนอลิกที่ต่างกัน สารสกัดจากสาหร่ายสีน้ำตาลในรูปของสารสกัดร้อน Hot water extract จากสาหร่าย *S. hemiphyllum* มีปริมาณฟีนอลิกรวมคือ 0.240 mg/ml (Hwang *et al.*, 2010) ซึ่งต่ำกว่าสารสกัดจากสาหร่าย *S. binderi* และ *S. polycystum* จากการทดลองครั้งนี้ สาหร่ายแมสกูล (genus) เดียวกันแต่ต่างชนิด (species) ก็มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกต่างกัน

ความสามารถในการดักจับอนุมูล DPPH[•] เป็นวิธีการหนึ่งที่ใช้ในการตรวจสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของสารสกัด โดยฤทธิ์การต้านอนุมูล DPPH[•] มีความสัมพันธ์กับปริมาณสารประกอบฟีนอลิกในสารสกัดจากสาหร่ายสีน้ำตาล ขณะไม่มีความสัมพันธ์กันในสาหร่ายสีแดง *Gracilaria tenuistipitata* และสาหร่ายสีเขียว *Caulerpa microphysa* และ *Ulva lactuca* (Yangthong et al., 2014) ซึ่งกลุ่มสารที่ทำหน้าในการออกฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระไม่ได้มีสารประกอบฟีนอลิกเท่านั้น สารสกัดน้ำจากสาหร่ายสีน้ำตาลต้านอนุมูลอิสระได้ดีกว่าสารสกัดจากเอธานอล (Farvin et al., 2010) สารสกัดน้ำจากสาหร่ายสีน้ำตาล *Sargassum* sp. และสาหร่ายสีแดง *Porphyra vietnamensis* สามารถยับยั้งอนุมูล DPPH ได้ดีกว่าสารสกัดจากเมธานอลในสาหร่ายดังกล่าวทั้ง 2 ชนิด (Yangthong et al., 2014) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาครั้งนี้ สารสกัดน้ำจากสาหร่าย *T. conoides*, *S. polycystum* และ *S. binder* สามารถยับยั้งอนุมูล DPPH ได้ดีกว่าสารสกัดจากเอทิลแอลกอฮอล์ สารสกัดจากสาหร่ายสด เช่น สารสกัดน้ำจากสาหร่าย *S. plagiophyllum* มีประสิทธิภาพในการต้านอนุมูล DPPH ต่ำกว่าจากการทดลองครั้งนี้ โดยมีค่า IC₅₀ คือ 4.8 ± 0.3 ขณะที่ประสิทธิภาพในการต้านอนุมูล O₂^{•-} ใกล้เคียงกับสารสกัดจากสาหร่าย *S. binderi* แต่มีประสิทธิภาพสูงกว่าสารสกัดจากสาหร่าย *S. polycystum* จากการทดลองครั้งนี้ โดยมีค่า IC₅₀ คือ 7.0 ± 0.2 และสำหรับประสิทธิภาพในการต้านอนุมูล OH^{•-} สารสกัดน้ำจากสาหร่าย *S. plagiophyllum* มีประสิทธิภาพในการต้านอนุมูล OH^{•-} ดีกว่าสารสกัดจากสาหร่าย *S. binderi* และ *S. polycystum* การทดลองครั้งนี้ โดยมีค่า IC₅₀ คือ 4.6 ± 0.4 (Suresh et al., 2012) ชนิดของสาหร่าย ฤดูกาล สภาพพื้นที่ที่ต่างกัน ตัวทำละลายอินทรีย์ที่ใช้ในการสกัดและวิธีการสกัด ส่งผลต่อฤทธิ์ทางชีวภาพของสาหร่ายที่แตกต่างกัน ซึ่งการศึกษาฤทธิ์หรือประสิทธิภาพดังกล่าวนอกจากข้อมูลจากการทดสอบในหลอดแก้ว (*in vitro*) ภายในห้องปฏิบัติการแล้ว ควรมีการศึกษาทดลองจริงในสิ่งมีชีวิต (*in vivo*) เนื่องจากฤทธิ์บางอย่างอาจเพิ่มประสิทธิภาพเมื่ออยู่ในกลไกร่างกายของสิ่งมีชีวิต

บทที่ 6

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

จากการศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลของสาหร่ายทะเลที่สกัดด้วยน้ำและเอทิลแอลกอฮอล์ พบว่า

6.1 สารสกัดจากสาหร่ายทะเลทุกชนิดที่สกัดด้วยน้ำมีปริมาณฟีนอลิกโดยรวมสูงกว่าสารสกัดจากสาหร่ายทะเลที่สกัดด้วยเอทิลแอลกอฮอล์

6.2 สารสกัดจากสาหร่ายทะเล 3 ชนิดที่สกัดด้วยน้ำได้แก่ สาหร่าย *T. conoides*, *S. binderi*, *S. polycystum* มีความสามารถในการดักจับอนุมูล DPPH[•] ในขณะที่สารสกัดจากสาหร่ายทะเลที่สกัดด้วยเอทิลแอลกอฮอล์ทุกชนิดไม่มีมีความสามารถในการดักจับอนุมูล DPPH[•]

6.3 สารสกัดจากสาหร่ายทะเล 3 ชนิดที่สกัดด้วยน้ำได้แก่ สาหร่าย *T. conoides*, *S. binderi*, *S. polycystum* มีความสามารถในการดักจับอนุมูลซูเปอร์ออกไซด์ O₂^{•-} ในขณะที่สารสกัดจากสาหร่ายทะเลที่สกัดด้วยเอทิลแอลกอฮอล์ทุกชนิดไม่มีมีความสามารถในการดักจับอนุมูลซูเปอร์ออกไซด์ O₂^{•-}

6.4 สารสกัดจากสาหร่ายทะเล 3 ชนิดที่สกัดด้วยน้ำได้แก่ สาหร่าย *T. conoides*, *S. polycystum*, *S. binderi* มีความสามารถในการดักจับอนุมูลไฮดรอกซิล OH[•] ในขณะที่สารสกัดจากสาหร่ายทะเลที่สกัดด้วยเอทิลแอลกอฮอล์ทุกชนิดไม่มีมีความสามารถในการดักจับอนุมูลไฮดรอกซิล OH[•]

6.5 สารสกัดจากสาหร่าย *T. conoides* มีปริมาณฟีนอลิกโดยรวมสูงที่สุดและมีฤทธิ์การต้านอนุมูล DPPH[•], O₂^{•-} และ OH[•] ดีที่สุด

ข้อเสนอแนะ

จากผลการศึกษา สาหร่าย *T. conoides* เป็นสาหร่ายที่มีปริมาณฟีนอลิกโดยรวมสูงที่สุดและมีฤทธิ์การต้านอนุมูล DPPH[•], O₂^{•-} และ OH[•] ดีที่สุด แต่สาหร่ายชนิดดังกล่าวไม่นิยมบริโภค เหมือนเช่น สาหร่าย *S. polycystum* และ *S. binderi* ดังนั้น ด้วยประสิทธิภาพของฤทธิ์การต้านอนุมูลที่ดีกว่า จึงควรมีการศึกษาวิจัยเพิ่มเติมถึงรูปแบบการนำสาหร่ายชนิดดังกล่าวมาใช้ประโยชน์

เอกสารอ้างอิง

- โอภา วัชรคุปต์, ปรีชา บุญจุง, จันทนา บุญยรัตน์ และมาลีรักษ์ อัดต์สินทอง. 2549. สารต้านอนุมูลอิสระ. พิเสพรีนท์. นนทบุรี. 190.
- สุเมธ เริงสะอาด และ อนงค์ จีรภัทร์, 2555. ความผันแปรทางลักษณะสัณฐานวิทยาของสาหร่ายสีน้ำตาล *Sargassum polycystum* C. Agardh. ว.วิทย์. มข. 40(1): 155-166.
- Akoh, C.C. and Min, B. D. 1998. Antioxidants *In Food Lipids*. pp. 423-448. New York.
- Bayer, W. F. and Fridovich, I. 1987. Assaying for superoxide dismutase activity: some large consequences of minor changes in conditions. *Anal. Biochem.* 161: 599-566.
- Betteridge, D. J., 2000. What is oxidative stress. *Metabolism.* 49: 3-4.
- Boonchum, W., Y. Peerapornpisal, P. Vacharapiyasophon, J. Pekkoh, C. Pumas, U. Jamjai, D. Amornlerdpison, Noiraksar, T and Kanjanapothi, D. 2011. Antioxidant activity of some seaweed from the gulf of Thailand. *Int. J. Agric. Biol.* 13: 95-99.
- Burtin, P. 2003. Nutritional value of seaweeds. *EJEAFChe.* 2: 498-503.
- Burton, G.W. and Traber, M.G. 1990. Vitamin E antioxidant activity biokinetics and bioavailability. *Annu. Rev. Nutr.* 10: 357-382.
- Chew, Y.L., Lim., Y. Y., Omar, M. and Khoo, S. K. 2008. Antioxidant activity of three edible seaweeds from two areas in South East Asia. *Food Sci. Technol.* 41 (6): 1067-1072.
- Devi, G.K., Manivannan, K., Thirumaran, G., Rajathi, ,F.A.A. and Anantharaman, P. 2011. In vitro antioxidant activities of selected seaweeds from Southeast coast of India. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*: 205-211.
- Duncan, D.B. 1955. Multiple-rang and multiple F tests. *Biometrics* 11: 1-42.
- Farvin, K.H.S., Surendraraj, A. and Anandan, R. 2010. Protective effect of squalene on certain lysosomal hydrolases and free amino acids in isoprenaline induced myocardial infarction in rats. *Int. J. Pharmacol.* 6: 97-103.
- Frankel, E. N., Bosanek, C.A., Meyer, A.S., Siliman, K. and Kirk, L.L. 1998. Commercial grape juices inhibit the in vitro oxidation of human low-density lipoproteins. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 46: 834 – 838.
- Ganesan, P., Kumar, C. S and Bhaskar, N. 2007. Antioxidant properties of methanol extract and its solvent fractions obtained from selected Indian red seaweeds. *Bioresource Technol.* 99: 2717-2723.
- Ghosh, P., Adhikari, U., Ghosal, P. K., Pujol, C. A., Carlucci, M. J., Damonte, E. B. and Ray, B. 2004. *In vitro* anti-herpetic activity of sulfated polysaccharide fractions from *Caulerpa racemosa*. *Phytochemistry.* 65: 3151-3157.

- Halliwell, B. 1999. Antioxidant defense mechanism: from the beginning to the end (of the beginning). *Free Rad. Res.* 31: 261 – 272.
- Halliwell, B., Gutteridge, J.C.M. 1999. *Free Radicals in Biology and Medicine*, 3rd ed. Oxford University Press, New York.
- Halliwell, B., Aeschbach, R., Loliger, J. and Arouma, O.I. 1995. The characterization of antioxidants. *Food Chem. Toxic.* 33: 601-617.
- Hutadilok-Towatana, N., Chaiyamutti, P., Panthong, K., Mahabusarakam, W. and Rukachaisirikul, V. 2006. Antioxidative and free radical scavenging activities of some plants used in Thai folk medicine. *Pharm. Biol.* 44: 221-228.
- Hwang, A.P., Wu, C.H., Gau, S. Y., Chien, S.Y. and Hwang, D.F. 2010. Antioxidant and immune-stimulating activities of hot-water extract from seaweed *Sargassum Hemiphyllum*. *Journal of Marine Science and Technology.* 18(1): 41-46.
- Iwai, K., 2008. Antidiabetic and antioxidant effects of polyphenols in brown alga *Ecklonia stolonifera* in genetically diabetic KK-Ay mice. *Plant Foods Hum. Nutr.* 63: 163-169.
- Kim, S. K., Lee, D.Y., Jung, W. K., Kim, J. H, Choi, I., Park, S. G., Seo, S. K., Lee, S. W., Lee, C. M., Yea, S. S., Choi, Y. H. and Choi, W. 2008. Effects of *Ecklonia cava* ethanolic extracts on airway hyperresponsiveness and inflammation in a marine asthma model: Role of suppressor of cytokine signaling. *Biomed Pharmacother.* 62: 289-296.
- Kuda, T., Tsunekawa, M., Goto, H. and Araki, Y. 2005. Antioxidant properties of four edible algae harvested in the Noto Peninsula, Japan. *J. Food Comp. Anal.* 18: 625–633.
- Kuda, T., Goto, T. K. H., Suzuki, T. and Yano, T. 2007. Varieties of antioxidant and antibacterial properties of *Ecklonia stolonifera* and *Ecklonia kurome* products harvested and processed in the Noto peninsula, Japan. *Food Chem.* 103: 900-905.
- Kumar, C.S., Ganesan, P. and Bhaskar, N. 2008. In vitro antioxidant activities of three selected brown seaweeds of India. *Food Chemistry.* 107: 707-713.
- Li, K., Li, X. M., Ji, N. Y. and Wang, B. G. 2007. Natural bromophenols from the marine red algae polysiphonia urceolate (Rhodomelaceae) structural elucidation and DPPH radical-scavenging activity. *Bioorg. Med. Chem.* 15: 6627-6631.
- Lewmanomont, K. and Ogawa, H. 1995. *Common Seaweeds and Seagrasses of Thailand*. Integrated Promotion Technology Co.Ltd, Bangkok
- Matanjun, P., Mohamed, S., Mustapha, N.M., Muhammad, K.H. and Ming, C.H. 2008. Antioxidant activities and phenolics content of eight species of seaweeds from north Borneo. *J. Appl. Phycol.* 20: 367-37.
- Nagai, T and Yukimoto, T. 2003. Preparation and functional properties of beverages made from sea algae. *Food Chem.* 81: 327-332.

- Nahas, R., Abatis, D., Anagnostopoulou, M. A., Kefalas, P., Vasias, C. and Roussis, V. 2007. Radical- scavenging activity of Aegean Sea marine algae. *Food Chem.* 102: 577- 581.
- Nakai, M., Kageyama, N., Nakahara, K. and MiKi, W. 2006. Phlorotannins as radical scavengers from the extract of *Sargassum ringgoldiaum*. *Mar. Biotechnol.* 8: 409-414.
- Nawar, W.W. 1996. Lipid. *In Food Chem.* (ed. O. R. Fennema) Vol. III, pp. 210 - 243. New York : Marcel Dekker, Inc.
- Noiraksar, T. and Ajisaka, T. 2008. Taxonomy and distribution of *Sargassum* (Phaeophyceae) in the Gulf of Thailand. *J. Appl. Phycol.* 20: 963–977.
- Parthiban, C., Saranya, C., Girija, K., Hemalatha, A., Suresh, M and Anantharaman, P. 2013. Evaluation of *in vitro* antioxidant properties of some selected seaweeds from Tuticorin coast. *Int.J.Curr.Microbiol.App.Sci* (2013) 2(9): 64-73
- Puerta, T. 1999. Inhibition of leukocytes lipooxygenase by phenolics from virgin olive oil. *Biochem. Pharm. J.* 57(4): 445-449.
- Qi, H., Zhang, Q., Zhao, T., Hu, R., Zhang, K. and Li, Z. 2006. *In vitro* antioxidant activity of acetylated and benzoylated derivatives of polysaccharide extracted from *Ulva pertusa* (Chlorophyta). *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 16: 2441-2445.
- Seifried, H. E., Anderson, D. E. Fisher, E. I. and Milner, J. A. 2007. A review of the interaction among dietary antioxidants and reactive oxygen species. *J. Nutr. Biochem.* 18: 567-579.
- Sies, H., Stahl, W. and Sunduist, A. 1992. Antioxidant functions of vitamins. Vitamins E and C, beta- carotene, and other carotenoids. *Ann. NY Acad. Sci.* 368: 7–19.
- Suresh, V., Kumar, N.S., Murugan, P., Palani, P., Rengasamy, P. and Anbazhagan, C. 2012. Antioxidant properties of sequential extracts from brown seaweed, *Sargassum plagiophyllum*, C. Agardh. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*: S937-S939.
- Tiahou, G., Maire, B., Dupuy, A., Delage, M., Vernet, M.H., Mathieu-daude, J. C., Michel, F., Sess, E.D. and Cristol, J.P., 2004. Lack of oxidative stress in a selenium deficient area in Ivory coast potential nutritional antioxidant role of crude palm oil. *Eur J Nutr.* 43: 367-374.
- Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M.T.D., Mazur, M. and Telser, J. 2007. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 39: 44–84.
- Velioglu, Y. S., Mazza, G., Gao, L., and Oomah, B. D. 1998. Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetable and grain products. *J. Agric. Food Chem.* 46: 4113 - 4117.

- Victor, V. M., Rocha, M. and De la Fuente, M. 2004. Immune cells: free radicals and antioxidants in sepsis. *Int. Immunopharmacol.* 4: 327-347.
- Wang, J., Zhang, Q., Zhang, Z. and Li, Z. 2008. Antioxidant activity of sulfated polysaccharide fractions extracted from *Laminaria japonica*. *J. Biol. Macromol.* 42: 127-132.
- Winston, G. W. 1991. Oxidants and antioxidants in aquatic animals. *Comp. Biochem. Physiol.* 100: 173-176.
- Yan, X. J., Chuda, Y., Suzuki, M. and Nagata, T. 1999. Fucoxanthin as the major antioxidant in *Hijikia fusiformis*, common edible seaweed. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 63: 605-607.
- Yangthong, M., Hutadilok-Towatana, N. and Phromkunthong, W. 2009. Antioxidant activities of four edible seaweeds from the southern coast of Thailand. *Plant Foods Human Nutrient.* 64(3): 218-223.
- Yangthong, M., Thawonsuwan, J., Hutadilok-Towatana, N. and Phromkunthog, W. 2012. Effects of the hot-water extract from *Sargassum* sp. on antibacterial activity, non-specific immunity and TBARs production in Asian Sea Bass (*Lates calcarifer*, Bloch). *Kasetsart University Fisheries Research Bulletin.* 36 (3): 30-42.
- Yangthong, M. and Hutadilok-Towatana. 2014. Total phenolic contents, DPPH radical-scavenging activities of six seaweeds from the Southern Coast of Thailand. *Journal of Fisheries Technology Research.* 8(1): 93-104.
- Yesilyurt, V., Halfon, B., Ozturk, M and Topcu, G. 2008. Antioxidant potential and phenolic constituent of *Salvia cedronella*. *Food Chem.* 108: 31-39.
- Yuan, Y. V., Carrington, M. F. and Walsh, N. A. 2005. Extracts from dulse (*Palmaria palmate*) are effective antioxidants and inhibitors of cell proliferation in vitro. *Food Chem. Toxicol.* 43: 1073-1081.
- Zubia, M., Payri, C. and Deslandes, E. 2008. Alginate, mannitol, phenolic compounds and biological activities of two range-extending brown algae, *Sargassum mangarevense* and *Turbinaria ornata* (Phaeophyta: Fucales) from Tahiti (French Polynesia). *J. Appl. Phycol.* 20: 1033-1043.

สรุปค่าใช้จ่ายการดำเนินงานโครงการวิจัย



แบบรายงานการใช้จ่ายเงินโครงการวิจัย

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

รายงานความก้าวหน้า ครั้งที่ 4 รอบ 12 เดือน ประจำปีงบประมาณ 2557

หน่วยงาน วิทยาเขตชุมพรเขตรอุดมศักดิ์ จังหวัดชุมพร

☐ แหล่งงบประมาณแผ่นดิน (แบบปกติ)☒ แหล่งเงินรายได้

ชื่อโครงการ (ภาษาไทย) การต้านอนุมูลอิสระของสาหร่ายทะเลจากจังหวัดชุมพร

(ภาษาอังกฤษ) Antioxidant activity of seaweeds from Chumphon Province

ชื่อ-สกุลหัวหน้าโครงการวิจัยผู้รับทุน/ผู้วิจัย อาจารย์ ดร.มนต์สรวง ยางทอง

รายงานในช่วงตั้งแต่วันที่ 1 ตุลาคม 2556 ถึงวันที่ 30 กันยายน 2557

ระยะเวลาดำเนินการ 1 ปี เดือน ตั้งแต่วันที่ 1 ตุลาคม 2556 ถึงวันที่ 30 กันยายน 2557

ข้อมูลการรายงานค่าใช้จ่ายงบประมาณโครงการวิจัย

1. การเบิกจ่ายงบประมาณ (กรณีการจ่ายเงินถ้าจ่ายงวดเดียวให้ลบข้อที่ไม่เกี่ยวข้องออก)

งวดที่ 1 171,800 บาท 100 % วันที่ได้รับอนุมัติให้เบิกจ่ายเงิน (ป/ด/ว) พฤศจิกายน 2556

2. สรุปงบประมาณค่าใช้จ่ายที่ใช้นับตั้งแต่เริ่มทำการวิจัยถึงปัจจุบัน (จำแนกตามหมวดค่าใช้จ่าย)

หมวดค่าใช้จ่าย	งบประมาณรวม ทั้งโครงการ	ค่าใช้จ่าย (บาท)	คงเหลือ (หรือเกิน)
งบบุคลากร :ค่าจ้างชั่วคราว	-	-	-
งบดำเนินงาน			
ค่าตอบแทน	-	-	-
ค่าใช้สอย	114,241.20	114,241.20	-
ค่าวัสดุ	57,558.80	57,558.80	-
ค่าสาธารณูปโภค	-	-	-
งบลงทุน: ค่าครุภัณฑ์	-	-	-
รวม	171,800	171,800	

(ดร.มนต์สรวง ยางทอง)

ลงนามหัวหน้าโครงการวิจัยผู้รับทุน

...../...../.....

(.....)

ลงนามเจ้าหน้าที่การเงิน/เจ้าหน้าที่ที่เกี่ยวข้อง

...../...../.....

ข้อมูลประวัติคณะผู้วิจัย

ประวัติส่วนตัว

- ชื่อ-สกุล ดร. มนต์สรอง ยางทอง
ตำแหน่งปัจจุบัน อาจารย์ประจำหลักสูตรวิทยาศาสตรการประมงและทรัพยากรทางน้ำ

ประวัติการศึกษา

ชื่อย่อปริญญา	สาขา	สถาบันที่จบ	ปีที่จบ
วท.ด	วาริชศาสตร์	มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่ ประเทศไทย	2555
วท.ม.	วาริชศาสตร์	มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่ ประเทศไทย	2545
วท.บ.	การเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ	สถาบันเทคโนโลยีการเกษตรแม่โจ้ ประเทศไทย	2538

สาขาวิจัยที่มีความชำนาญพิเศษ (แตกต่างจากวุฒิการศึกษา) อาหารสัตว์น้ำ

ทุนการศึกษาและทุนวิจัยที่เคยได้รับ

ปี พ.ศ.	ทุนการศึกษาและทุนวิจัย	สถาบันที่ให้
2557	ทุนวิจัยเรื่องการต้านอนุมูลอิสระของสาหร่ายทะเลจากจังหวัดชุมพร	สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง เขตอุดมศักดิ์จังหวัดชุมพร (งบประมาณเงินรายได้ 2557)
2550	ทุนการศึกษาระดับปริญญาเอก	สำนักงานคณะกรรมการอุดมการศึกษาแห่งชาติ
2550	ทุนวิจัยเรื่อง การเจริญเติบโตของปลานิลแปลงเพศที่รับประทานอาหารเคลือบด้วยไคโตซานระดับต่างๆ	สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง เขตอุดมศักดิ์จังหวัดชุมพร (งบประมาณแผ่นดิน 2550)
2548	ทุนวิจัยเรื่อง ผลของไคโตซานระดับต่างๆ ต่อการเคลือบเมืออาหารปลานิลแปลงเพศที่เสริมด้วยเอนไซม์ไฟเตส	สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง เขตอุดมศักดิ์จังหวัดชุมพร (งบประมาณแผ่นดิน 2548)

ผลงานวิจัย/งานสร้างสรรค์

ผลงานวิจัย/งานสร้างสรรค์ที่ตีพิมพ์เผยแพร่ (ระดับชาติและนานาชาติ)

วุฒิพร พรหมขุนทอง. **มนต์สรวง ยางทอง**. กิจการ ศุภมาตย์ และดุสิต นาคะชาติ. 2547. ผลของเอนไซม์ไฟเตสและอนินทรีย์ฟอสเฟตต่อการใช้ฟอสฟอรัสในปลานิลแปลงเพศ. ว. สงขลานครินทร์. ปีที่ 26 (2)

มนต์สรวง ยางทอง และศิริญา งามระลึก. 2549. ผลของปุ๋ยชนิดต่างๆต่อการเจริญเติบโตของสาหร่ายผมนาง. การประชุมวิชาการนเรศวรวิจัย ครั้งที่ 2 ความสำเร็จของการพัฒนาชุดโครงการ 28-29 กรกฎาคม 2549. 262- 268.

มนต์สรวง ยางทอง. 2549. ผลของไคโตซานระดับต่างๆ ต่อการเคลือบเมล็ดอาหารปลานิลแปลงเพศที่เสริมด้วยเอนไซม์ไฟเตส. ว. พระจอมเกล้าลาดกระบัง. 14 (1): 34-43.

มนต์สรวง ยางทอง. แววลี วิบูลย์กิจ และ พิมาน เกาสมบัติ. 2550. ศึกษาการเจริญเติบโตของปลานิลแปลงเพศที่ได้รับอาหารเคลือบด้วยไคโตซานระดับต่างๆ. วารสารวิจัยเทคโนโลยีการประมง. 1(2): 223-234.

Yangthong, M., Hutadilok-Towatana, N. and Phromkunthong, W. 2009. Antioxidant activities of four edible seaweeds from the southern coast of Thailand. Plant Foods Human Nutrient. 64(3): 218-223.

Yangthong, M., Thawonsuwan, J., Hutadilok-Towatana, N. and Phromkunthog, W. 2012. Effects of the hot-water extract from *Sargassum* sp. on antibacterial activity, non-specific immunity and TBARs production in Asian Sea Bass (*Lates calcarifer*, Bloch). Kasetsart University Fisheries Research Bulletin. 36 (3): 30-42.

Yangthong, M., Oncharoen, S. and Sripanomyom, J. 2014. Effect of *Sargassum* meal supplementation on growth performance of sex-reversed tilapia (*Oreochromis niloticus* Linn.). p. 234-241. In proceedings of 52nd Kasetsart University Annual Conference, Fisheries, Agricultural Extension and Home Economics. Bangkok (Thailand)

Yangthong, M. and Hutadilok-Towatana. 2014. Total phenolic contents, DPPH radical-scavenging activities of six seaweeds from the Southern Coast of Thailand. Journal of Fisheries Technology Research. 8(1): 93-104.

บทความ

มนต์สรวง ยางทอง. 2546. ปะการังเทียมกับการฟื้นฟูทรัพยากรประมง. ว. ราชมงคลพันตรา ปีที่ 1 (2)

วุฒิพร พรหมขุนทอง และ**มนต์สรวง ยางทอง**. 2548. การประยุกต์ใช้เอนไซม์ไฟเตสในการเลี้ยงปลา. ผลงานวิจัยและบทความทางวิชาการในวาระครบรอบ 30 ปี คณะทรัพยากรธรรมชาติ. 28-32.

มนต์สรวง ยางทอง. 2549. บทบาทของไคติน-ไคโตซานต่อการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ. ว. พระจอมเกล้าลาดกระบัง. 14 (1): 44-48.

มนต์สรวง ยางทอง. 2557. การเกิดภาวะเครียดออกซิเดชันในปลา. วารสารเกษตรพระจอมเกล้า คณะเทคโนโลยีการเกษตร. 32(2): 66-75.

มนต์สรวง ยางทอง และ จิระยุทธ รื่นศิริกุล. 2557. การนำ cut-down tube มาประยุกต์ใช้แทน cannulation tube เพื่อตรวจสอบความสมบูรณ์เพศของปลาทะเล. วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี. 22(4): 545-552.

การเสนอผลงานวิชาการ

Yangthong, M., Ngamraluek, S. and Viboonkit, K. 2007. Effect of fertilizers on growth of *Gracilaria fisheri* (Xia & Abbott) Abbott, Zhang & Xia, XIXth International Seaweed Symposium March 26 -31, Kobe, Japan.

Nualcharoen, M. Nualcharoen, P. Seingkaew, J. Mayusoa, S.Johnduong, S. Chookaew, O. Jinpracha, J.Ruangchuay, R. **Yangthong, M.** Jankaew, W. Chankaew, S. Thersakul, M. and Ariyadet, C. 2008. Diversity and sustainable use development of the marine algae in Souther Coast of Thailand. Vth Asian Pacific Phycological Forum Algae in a changing world. November 10-14, Wellington, New Zealand.

Yangthong, M., Thawonsuwan, J., Hutadilok-Towatana, N. and Phromkunthong, W. 2009. Effects of hot water extracted from marine algae on scavenging activity and immunostimulatory of seabass. Phycologia. 48(4): 147.

Yangthong, M., Thawonsuwan, J., Hutadilok-Towatana, N. and Phromkunthog, W. 2011. Immunostimulatory effects of hot water extract from *Sargassum* sp. in seabass. 5th National Conference on Algae and Plankton. 16-18 March 2011, BP Samila Beach Hotel, Songkhla.

Yangthong, M. and Hutadilok-Towatana. 2013. Total phenolic contents, DPPH radical-scavenging activities of six seaweeds from the Southern Coast of Thailand. 6th National Conference on Algae and Plankton. 28-31 March 2013, the International Convention Centre, Empress Hotel, Chiang Mai.

Yangthong, M., Thawonsuwan, J., Hutadilok-Towatana, N. and Phromkunthog, W. 2013. An aqueous extract from *Sargassum* sp. enhances the immune response and resistance against *Streptococcus iniae* in the Asian sea bass (*Lates calcarifer* Bloch). 3rd Interaational Fisheries Symposium. 28-30 November 2013, Pattaya, Thailand.

ภาคผนวก

สรุปค่าใช้จ่ายการดำเนินงานโครงการวิจัย