

ปริมาณฟีนอลและคุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดด้วยน้ำ และเอทานอลสาหร่ายทะเล

Phenolic Content and Antioxidant Properties of Aqueous and Ethanol Extracts of Seaweeds

มนต์สรวง ยางทอง¹ จำเริญศรี กาวารสุวรรณ² และนางพร โต้วัฒน^{3,4}

บทคัดย่อ

เปรียบเทียบปริมาณฟีนอลและฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ DPPH, อนุมูลอิสระซูเปอร์ออกไซด์ และอนุมูลอิสระไฮดรอกซิล ระหว่างสารสกัดด้วยน้ำและเอทานอลของสาหร่ายทะเลจากชายฝั่งจังหวัดชุมพร 6 ชนิด ได้แก่ *Brachytrichia quoyi*, *Dictyota ciliolata*, *Padina minor*, *Sargassum binderi*, *Sargassum polycystum* และ *Turbinaria conoides* พบว่าสารสกัดด้วยน้ำจากสาหร่ายทะเลทั้ง 6 ชนิด มีปริมาณฟีนอลสูงกว่าสารสกัดด้วยเอทานอล โดยสารสกัดด้วยน้ำจากสาหร่าย *T. conoides* มีปริมาณ ฟีนอลสูงที่สุด คือ 732.36 ± 11.84 mg TAE/g extract รองลงมา ได้แก่สารสกัดด้วยน้ำจากสาหร่าย *S. binderi*, *S. polycystum*, *P. minor*, *D. ciliolata* และ *B. quoyi* ซึ่งมีปริมาณฟีนอล คือ 568.08 ± 15.83 , 512.67 ± 4.62 , 366.63 ± 9.91 , 280.59 ± 1.67 , 137.30 ± 2.33 mg TAE/g extract ตามลำดับ โดยมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) สำหรับฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระพบว่าสารสกัดด้วยเอทานอลจากสาหร่ายทะเลทั้ง 6 ชนิด ไม่มีประสิทธิภาพการต้านอนุมูลอิสระ ขณะที่สารสกัดด้วยน้ำจากสาหร่ายทะเล 3 ชนิด (*T. conoides*, *S. binderi* และ *S. polycystum*) มีประสิทธิภาพการต้านอนุมูลอิสระ โดยสารสกัดด้วยน้ำจากสาหร่าย *T. conoides* มีประสิทธิภาพการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ดีที่สุด โดยมีค่า IC_{50} คือ 2.64 ± 0.01 mg/ml ($p < 0.05$), สารสกัดด้วยน้ำจากสาหร่าย *S. binderi* มีประสิทธิภาพการต้านอนุมูลอิสระซูเปอร์ออกไซด์ดีที่สุด โดยมีค่า IC_{50} คือ 7.94 ± 0.00 mg/ml ($p < 0.05$) และสารสกัดด้วยน้ำจากสาหร่าย *T. conoides* มีประสิทธิภาพการต้านอนุมูลอิสระไฮดรอกซิลดีที่สุด โดยมีค่า IC_{50} คือ 5.91 ± 0.02 mg/ml ($p < 0.05$) ดังนั้นสารสกัดด้วยน้ำจากสาหร่าย *T. conoides* มีศักยภาพพัฒนาเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ

คำสำคัญ : ฟีนอล อนุมูล DPPH อนุมูลซูเปอร์ออกไซด์ อนุมูลไฮดรอกซิล สาหร่ายทะเล

Abstract

The experiment was conducted to compare total phenolic content (TPC) and the antioxidant activities such as 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH), superoxide radical and hydroxyl radical between aqueous and ethanol extracts from 6 different kind of seaweeds: *Brachytrichia quoyi*, *Dictyota ciliolata*, *Padina minor*, *Sargassum binderi*, *Sargassum polycystum* and *Turbinaria conoides* collected from coastal area of Chumphon province. The result showed that the phenolic compounds obtained from aqueous extracts were higher than those of ethanol extracts. The aqueous extracts of seaweeds were significantly different ($p < 0.05$). *T. conoides* had the highest TPC at 732.36 ± 11.84 mg TAE/g extract followed by *S.*

¹หลักสูตรวิทยาศาสตรจารย์ประมงและทรัพยากรทางน้ำ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง วิทยาเขตชุมพรเขตรอุดมศักดิ์ จ.ชุมพร 86160

²สถาบันวิจัยสุขภาพสัตว์น้ำชายฝั่ง อ. เมือง จ. สงขลา 90100

³ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่ จ. สงขลา 90110

⁴สถานวิจัยความเป็นเลิศด้านผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่ จ. สงขลา 90110

binderi, *S. polycystum*, *P. minor*, *D. ciliolata* and *B. quoyi* at 568.08 ± 15.83 , 512.67 ± 4.62 , 366.63 ± 9.91 , 280.59 ± 1.67 , 137.30 ± 2.33 mg TAE/g extract respectively. Ethanol extracts of the six species of seaweed did not show radical scavenging activities while the aqueous extracts from *T. conoides*, *S. binderi* and *S. polycystum* showed an antioxidant activities ($p < 0.05$). The aqueous extracts from *T. conoides* had the highest level of DPPH radical scavenging activity at 2.64 ± 0.01 mg/ml while the aqueous extracts from *S. binderi* had the highest level of superoxide radical scavenging activity at 7.94 ± 0.00 mg/ml. The aqueous extracts from *T. conoides* had the highest level of hydroxyl radical scavenging activity at 5.91 ± 0.02 mg/ml. Therefore, the aqueous extract from *T. conoides* has the potential to develop as an antioxidant.

Keywords : phenol, DPPH radical, superoxide radical, hydroxyl radical, seaweed

คำนำ

สิ่งมีชีวิตทุกชนิดที่ดำรงชีวิตโดยอาศัยออกซิเจนในระบบการเผาผลาญสารอาหาร ระหว่างการขนส่งอิเล็กตรอนในระบบการหายใจจะเกิดออกซิเจนที่มีประจุลบเป็นผลผลิตสุดท้าย เรียกว่า reactive oxygen species (ROS) ซึ่งอาจเปรียบเสมือนออกซิเจนที่เป็นของเสียจากกระบวนการเผาผลาญ สาร ROS หรือสารอนุมูลอิสระ (free radical) ได้แก่ อนุมูลอิสระซูเปอร์ออกไซด์ (superoxide radical; $O_2^{\bullet-}$), อนุมูลอิสระไฮดรอกซิล (hydroxyl radical; OH^{\bullet}), อนุมูลอิสระอัลคอกซิล (alkoxyl radical; RO^{\bullet}) และอนุมูลอิสระไนตรัส (nitrous radical; NO^{\bullet}) สารเหล่านี้เป็นสารประกอบที่มีอิเล็กตรอนที่วงพลังงานรอบนอกของอะตอมออกซิเจนเป็นเลขคี่จึงไม่คงตัวและไวต่อการเกิดปฏิกิริยากับสารอื่น ส่งผลให้เกิดการทำลายและการตายของเซลล์ ในสภาวะปกติร่างกายจะมีการกลไกในการปรับสมดุลโดยการสร้างสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) ขึ้นเอง เช่น การทำงานของเอนไซม์ซูเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเตส (superoxide dismutase), คาตาเลส (catalase), กลูตาไธโอนเปอร์ออกซิเดส (glutathione peroxidase), เปอร์ออกซิเดส (peroxidase) และไซโตโครมซี เปอร์ออกซิเดส (cytochrome C peroxidase) เป็นต้น แต่บางครั้งเอนไซม์ที่ร่างกายผลิตขึ้นอาจไม่เพียงพอต่อการกำจัดสารอนุมูลอิสระ ประกอบกับปัจจัยภายนอกที่มีผลต่อสภาวะผิดปกติของเซลล์โดยเฉพาะความเครียด รังสี และสารพิษต่างๆ ส่งผลให้สารอนุมูลอิสระมีปริมาณมากกว่าสารต้านอนุมูลอิสระที่ร่างกายสร้างขึ้น สภาวะที่เกิดความไม่สมดุลเช่นนี้ เรียกว่า สภาวะเครียดออกซิเดชัน (oxidative stress) เมื่อสภาวะเครียดออกซิเดชันเกิดขึ้นภายในเซลล์และเนื้อเยื่อ ส่งผลให้เกิดการทำลายของอวัยวะเนื้อเยื่อต่างๆ ของร่างกาย เช่น เกิดริ้วรอย และถ้าสะสมมาก ๆ อาจนำไปสู่ความผิดปกติ หรือพยาธิสภาพหลายอย่าง เช่น โรคมะเร็ง โรคหลอดเลือดหัวใจ โรคความจำเสื่อม (Alzheimer) และโรคพาร์กินสัน (Parkinson) โรคไขข้ออักเสบ โรคเบาหวานและต้อกระจก (Valko *et al.*, 2007) ดังนั้นการได้รับสารต้านอนุมูลอิสระจากภายนอก จึงเป็นหนทางหนึ่งที่จะช่วยเสริมการควบคุมและป้องกันอันตรายจากอนุมูลอิสระเหล่านี้ได้ เนื่องจากสารต้านอนุมูลอิสระที่ได้รับจากการสังเคราะห์ทางเคมี แม้มีประสิทธิภาพสูง แต่มีข้อจำกัดของการใช้และมีปัญหาด้านความปลอดภัยในการบริโภค (Bjelakovic *et al.*, 2013) การหาสารออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจากรวมชาติจึงได้รับความสนใจ สารประกอบจากสาหร่ายทะเลได้รับการยอมรับจากหลายการรายงานจากทั่วโลกว่ามีคุณสมบัติที่ดีในการต้านอนุมูลอิสระ (Boonchum *et al.*, 2011; Chew *et al.*, 2008; Iwai, 2008; Kuda *et al.*, 2005; Yangthong *et al.*, 2009; Yangthong and Hutadilok-Towatana. 2014; Yuan *et al.*, 2005; Zubia *et al.*, 2008) โดยฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของสาหร่ายทะเลมีความเกี่ยวข้องกับหลายปัจจัย สารทำลายที่ใช้ในการสกัดเป็นปัจจัยหนึ่งที่ส่งผลต่อประสิทธิภาพของสารสกัด (Manivannan *et al.*, 2012; Seenivasan and Indu. 2013) สารทำลายอินทรีย์ (organic solvent) เช่น อะซิโตน เฮกเซน เมทานอล อาจส่งผลให้เกิดความกังวล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตามมาในกลุ่มผู้บริโภคในแง่ของการสารตกค้าง และความกังวลด้านสิ่งแวดล้อมต่อการกำจัดสารดังกล่าว ดังนั้นการศึกษาค้นคว้าจึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากสาหร่ายทะเลที่แพร่กระจายบริเวณพื้นที่ชายฝั่งของจังหวัดชุมพร โดยเปรียบเทียบประสิทธิภาพของสารสกัดจากสาหร่ายทะเลชนิดต่าง ๆ ที่สกัดด้วยน้ำและเอทานอล 35 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเป็นเอทานอลชนิดที่สามารถบริโภคได้ เพื่อการใช้ประโยชน์และการต่อยอดในอนาคต

อุปกรณ์และวิธีการ

1. การเก็บตัวอย่างสาหร่าย

เก็บตัวอย่างสาหร่ายทะเลขนาดใหญ่บริเวณชายหาดบ่อเมา อำเภอปะทิว จังหวัดชุมพร จำนวน 6 ชนิด ได้แก่ *Brachytrichia quoyi*, *Dictyota ciliolata*, *Padina minor*, *Sargassum binderi*, *S. polycystum*, และ *Turbinaria conoides* ตัวอย่างสาหร่ายทะเลที่เก็บรวบรวมได้แบ่งเป็น 2 ส่วน ส่วนแรกเก็บเป็นตัวอย่างแห้ง (herbarium specimens) เพื่อใช้จำแนกชนิดและส่วนที่สองเก็บที่อุณหภูมิ -4 องศาเซลเซียส เพื่อใช้สกัดต่อไป

2. การเตรียมสารสกัด

นำตัวอย่างสาหร่ายทะเลล้างทำความสะอาดด้วยน้ำจืด กำจัดสิ่งต่าง ๆ ที่เกาะติด นำไปอบที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 8 ชั่วโมง และนำมาบดให้ละเอียด หลังจากนั้นนำสาหร่ายที่บดละเอียดแล้วมาสกัดด้วยสารละลาย 2 ชนิด คือ น้ำ และ เอทานอลชนิดบริโภคได้ เข้มข้น 35 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้สาหร่าย 10 กรัมต่อน้ำหรือเอทานอล 500 มิลลิลิตร การสกัดด้วยน้ำตามวิธีการของ Yangthong *et al.* (2012) สารละลายที่ได้จากการสกัดด้วยน้ำกรองผ่านผ้ากรองขนาดตา 200 ไมโครเมตร ทำให้แห้งด้วยการแช่เยือกแข็ง (freeze drying) สำหรับการสกัดด้วยเอทานอล ใช้วิธี maceration เป็นเวลา 30 วัน หลังจากนั้นนำมากรองด้วยผ้ากรองขนาด 200 ไมโครเมตร และระเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่อง rotary evaporator

3. การหาปริมาณฟีนอล (phenol)

หาปริมาณฟีนอลดัดแปลงจากวิธีการของ Veliloglu *et al.* (1998) โดยทำปฏิกิริยาใน microtiter 96-well plate ดำเนินการดังนี้ นำสารสกัดสาหร่ายแต่ละชนิดที่ได้จากการสกัดที่แตกต่างกันข้างต้น มาเตรียมเป็นสารละลายความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นนำสารละลายของสารสกัดสาหร่ายปริมาณ 10 ไมโครลิตร เติมสารละลาย Folin-Ciocalteu (อัตราส่วน 1:9 ของ Folin-Ciocalteu reagent : น้ำกลั่น) ปริมาตร 75 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที จากนั้นเติมโซเดียมไบคาร์บอเนต (ประกอบด้วย 60:1 ของโซเดียมไบคาร์บอเนต:น้ำกลั่น) 75 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 90 นาที จากนั้นนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 725 นาโนเมตร เทียบกับ blank ซึ่งใช้น้ำแทนสารสกัด หาปริมาณฟีนอลในสารสกัดโดยเปรียบเทียบค่าที่วัดได้กับกราฟมาตรฐานซึ่งเตรียมจากสารละลายกรดแทนนิก (tannic acid) ที่ระดับความเข้มข้นตั้งแต่ 0-1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

4. การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

4.1 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ตามวิธีการของ Hutadilok-Towatana *et al.* (2006) โดยนำสารสกัดที่ความเข้มข้น 0-10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร เติมสารละลายอนุมูลอิสระ DPPH เข้มข้น 0.2 มิลลิโมลาร์ ในเมทานอล ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ทิ้งไว้ในที่มืด ณ อุณหภูมิห้อง 30 นาที และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 518 นาโนเมตร เปรียบเทียบกับชุดควบคุมซึ่งใส่น้ำกลั่นแทนสารสกัด โดยใช้ น้ำเป็น blank นำค่าที่วัดได้มาคำนวณหาร้อยละของการต้านอนุมูลอิสระ DPPH จากสูตร

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

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

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากนั้นคำนวณหาค่า IC_{50} (ค่าความเข้มข้นของสารสกัดที่สามารถดักจับอนุมูลอิสระ DPPH ได้ร้อยละ 50) จากกราฟระหว่างร้อยละการดักจับอนุมูลอิสระกับความเข้มข้นของสารสกัด

4.2 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระไฮดรอกซิล ดัดแปลงจากวิธีการของ Hutadilok-Towatana *et al.* (2006) โดยใส่สารละลายของสารสกัดความเข้มข้นต่างกันในหลอดทดลอง (0-20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ปริมาตร 67 ไมโครลิตร หลังจากนั้นเติมสารละลาย 30 มิลลิโมลาร์ KH_2PO_4/KOH , pH 7.4 ปริมาตร 134 ไมโครลิตร, 17 มิลลิโมลาร์ deoxyribose ปริมาตร 67 ไมโครลิตร, 34 มิลลิโมลาร์ H_2O_2 ปริมาตร 33 ไมโครลิตร, 1.2 มิลลิโมลาร์ EDTA ปริมาตร 33 ไมโครลิตร, 300 ไมโครโมลาร์ FeCl ปริมาตร 67 ไมโครลิตร และ 600 ไมโครโมลาร์ ascorbic acid ปริมาตร 67 ไมโครลิตรลงไปตามลำดับ ผสมให้เข้ากัน จากนั้นนำมาบ่ม (incubate) ในอ่างควบคุมอุณหภูมิ (water bath) ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วเติม 1 % (w/v) TBA ใน 50 มิลลิโมลาร์ NaOH ปริมาตร 333 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันก่อนนำมาบ่มต่อที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส 20 นาที หลังจากทิ้งให้เย็น นำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 532 นาโนเมตร เปรียบเทียบกับชุดควบคุมซึ่งมีแต่ reagent เท่านั้น และชุด sample blank ซึ่งประกอบด้วยสารสกัดกับ reagent ต่างๆ ยกเว้น deoxyribose โดยใช้ชุดควบคุมที่ไม่มี deoxyribose อยู่ด้วยเป็น blank นำค่าที่วัดได้มาคำนวณหาร้อยละของการต้านอนุมูลอิสระไฮดรอกซิล 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} (ค่าความเข้มข้นของสารสกัดที่สามารถดักจับอนุมูลอิสระ DPPH ได้ร้อยละ 50) จากกราฟระหว่างร้อยละการดักจับอนุมูลอิสระกับความเข้มข้นของสารสกัด

4.3 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระซูเปอร์ออกไซด์ อาศัยวิธีการของ Hutadilok-Towatana *et al.* (2006) ซึ่งดัดแปลงมาจากวิธีของ Bayer and Fridovich (1987) โดยนำสารสกัดแต่ละชนิดมาเตรียมเป็นสารละลายความเข้มข้นต่างๆ กัน (0-20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ในเมธานอล ปริมาตร 20 ไมโครลิตร แล้วผสมกับสารละลายผสมของ 9.9 มิลลิโมลาร์ L-methionine, 1.72 มิลลิโมลาร์ NBT, 1% (W/V) Triton X-100 และ 17 ไมโครโมลาร์ riboflavin ใน 50 โมลาร์ 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 นำค่าที่วัดได้มาคำนวณหาร้อยละของการต้านอนุมูลอิสระซูเปอร์ออกไซด์ 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

จากนั้นคำนวณค่า IC₅₀ (ค่าความเข้มข้นของสารสกัดที่สามารถดักจับอนุมูลอิสระ DPPH ได้ร้อยละ 50) จากกราฟระหว่างร้อยละการดักจับอนุมูลอิสระกับความเข้มข้นของสารสกัด

5. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ทดสอบค่าความแตกต่างของการออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากสาหร่ายทะเล โดยวิธีการวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนด้วยวิธี ANOVA ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 จากนั้นนำไปทดสอบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยเป็นรายคู่โดยเปรียบเทียบเชิงพหุคูณด้วยวิธี Duncan's New multiple range Test (Duncan, 1955)

ผลการทดลองและวิจารณ์

ผลจากการศึกษาครั้งนี้พบว่าสารสกัดจากสาหร่ายทะเลทุกชนิดที่สกัดด้วยน้ำมีปริมาณฟีนอลโดยรวมสูงกว่าสกัดด้วย เอทานอล สารสกัดด้วยน้ำจากสาหร่าย *T. conoides* มีปริมาณฟีนอลิกโดยรวมมากที่สุด รองลงมาเป็นสารที่สกัดด้วยน้ำในสาหร่าย *S. binderi*, *S. polycystum*, *P. minor*, *D. ciliolata* และ *B. quoyi* สำหรับสารสกัดด้วยเอทานอลพบว่าสาหร่าย *T. conoides* มีปริมาณฟีนอลโดยรวมมากที่สุดเช่นกัน รองลงมาเป็นสารสกัดจากสาหร่าย *S. polycystum*, *D. ciliolata*, *P. minor* และ *B. quoyi* (Table 1)

สารประกอบฟีนอลมีความสัมพันธ์กับฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ (Yangthong and Hutadilok-Towatana, 2014) เนื่องจากมีโครงสร้างที่ประกอบด้วยโครงสร้างที่เป็นวงอะโรมาติก และมีหมู่แทนที่เป็นหมู่ไฮดรอกซิลอย่างน้อย 1 หมู่ ทำให้สามารถให้อิเล็กตรอนแก่อะตอมหรือโมเลกุลที่มีอิเล็กตรอนไม่เป็นคู่ หรือที่เรียกว่าอนุมูลอิสระได้ ช่วยยับยั้งหรือต่อต้านปฏิกิริยาออกซิเดชัน สารประกอบฟีนอล มีฟอสฟีนอลเป็นส่วนประกอบหลักของเมแทบอไลต์ทุติยภูมิ (secondary metabolites) ในพืช จัดเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่พบมากในธรรมชาติ โดยพบตั้งแต่สารที่มีโมเลกุลอย่างง่ายไปจนถึงสารที่มีโครงสร้างโมเลกุลที่ซับซ้อน สำหรับสาหร่ายทะเล สาหร่ายสีน้ำตาล *S. polycystum* มีปริมาณสารประกอบฟีนอลสูงกว่าสาหร่ายสีแดง ได้แก่ *Euचेuma cottonii*, *Euचेuma spinosum* และ *Halymenia durvillaei* และสีเขียว ได้แก่ *Caulerpa lentillifera*, *Caulerpa racemosa* (Matajun et al., 2008) จากการทดลองครั้งนี้สาหร่ายทั้ง 6 ชนิดที่ศึกษาเป็นสาหร่ายสีน้ำตาล 5 ชนิด และสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน 1 ชนิดคือ *B. quoyi* พบว่าสาหร่ายสีน้ำตาลทั้ง 5 ชนิด มีปริมาณฟีนอลรวมสูงกว่าสาหร่าย *B. quoyi* โดยสาหร่าย *T. conoides* ที่สกัดด้วยน้ำมีปริมาณสารประกอบฟีนอลสูงที่สุด คือ 732.36 ± 11.84 mg TAE/g extract ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Kumar et al. (2008) รายงานว่าสารสกัดน้ำจากสาหร่าย *T. conoides* มีปริมาณสารประกอบฟีนอลสูงที่สุด คือ 49.16 mg GAE/g extract และการศึกษาของ Devi et al. (2011) รายงานว่าสารสกัดเมทานอลจากสาหร่าย *T. conoides* มีปริมาณสารประกอบฟีนอลสูงที่สุด คือ 1.23 ± 0.173 mg GAE/g extract และจากการศึกษาของ Parthiban et al. (2013) รายงานว่าสารสกัดด้วยอะซิโตนและเอทานอลของสาหร่าย *D. dichotoma* มีปริมาณสารประกอบฟีนอลสูงกว่าสารสกัด *T. ornata* สารสกัดหรือตัวทำละลายที่ต่างกัน ย่อมส่งผลต่อปริมาณสารประกอบฟีนอลที่ต่างกัน สารสกัดจากสาหร่ายสีน้ำตาลในรูปของสารสกัดด้วยน้ำร้อน (hot water extract) จากสาหร่าย *S. hemiphyllum* มีปริมาณฟีนอลรวมคือ 0.240 mg GAE/g extract (Hwang et al., 2010) ซึ่งต่ำกว่าสารสกัดจากสาหร่าย *S. binderi* และ *S. polycystum* ของการทดลองครั้งนี้ สาหร่ายแม้สกุลเดียวกัน แต่ต่างชนิดก็มีปริมาณสารประกอบ ฟีนอลต่างกัน

Table 1 Total phenolic content of aqueous and ethanol extracts from various seaweeds.

| | TPC (mg TAE/g extract) ¹ | |
|-----------------------------|-------------------------------------|-----------------------------|
| | Aqueous | Ethanol |
| <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 |

¹Mean ± standard deviation of three replications.

Means within each column not sharing a common superscript are significantly different (p<0.05), ND: Not determined

ความสามารถในการดักจับอนุมูลอิสระ DPPH เป็นวิธีการหนึ่งที่ใช้ในการตรวจสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของสารสกัด การทดสอบความสามารถในการดักจับอนุมูลอิสระ DPPH ในสารละลาย โดยอาศัยหลักการ คือ เมื่ออนุมูลอิสระ DPPH ในสารละลายสีม่วงได้รับอิเล็กตรอนจากสารสกัดสาขาหว่าย จะกลายเป็นสารประกอบ DPPH ที่เสถียรขึ้นและไม่มีสีม่วงเหมือนกับอนุมูลอิสระ DPPH ทำให้ตรวจวัดความสามารถในการดักจับอนุมูลอิสระ DPPH ของสารสกัดจากสาขาหว่ายได้ จากค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายอนุมูลอิสระ DPPH ที่ลดลง (Singh and Rajini, 2004) ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ในสาขาหว่ายทะเล พบว่าสารสกัดน้ำจากสาขาหว่ายทะเล 3 ชนิด มีความสามารถในการดักจับอนุมูลอิสระ DPPH ได้แก่ สารสกัดจากสาขาหว่าย *T. conoides*, *S. binderi*, *S. polycystum* โดยมีค่า IC₅₀ คือ 2.64 ± 0.01, 2.95 ± 0.02 และ 3.25 ± 0.03 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งมีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ (p<0.05) ในขณะที่สารสกัดเอทานอลจากสาขาหว่ายทะเลทั้ง 6 ชนิด ไม่มีความสามารถในการดักจับอนุมูลอิสระ DPPH (Table 2) โดยฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ DPPH มีความสัมพันธ์กับปริมาณสารประกอบฟีนอลในสารสกัดจากสาขาหว่ายสีน้ำตาล ขณะไม่มีความสัมพันธ์กันในสาขาหว่ายสีแดง *Gracilaria tenuistipitata* และสาขาหว่ายสีเขียว *Caulerpa microphysa* และ *Ulva lactuca* (Yangthong and Hutadilok-Towatana, 2014) ซึ่งกลุ่มสารที่ทำหน้าในการออกฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระไม่ได้มีสารประกอบฟีนอลเท่านั้น สารสกัดด้วยน้ำจากสาขาหว่ายสีน้ำตาล ได้แก่ *S. binderi* และ *T. conoides* ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ได้ดีกว่าการสกัดด้วยเอทานอล (Boonchum et al., 2011) สารสกัดด้วยน้ำจากสาขาหว่ายสีน้ำตาล *Sargassum* sp. (SG-0044) และสาขาหว่ายสีแดง *Pyropia vietnamensis* สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH ได้ดีกว่าสารสกัดด้วยเมทานอล (Yangthong and Hutadilok-Towatana, 2014) สารสกัดจากสาขาหว่ายสด เช่น สารสกัดด้วยน้ำจากสาขาหว่าย *S. plagiophyllum* มีประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ต่ำกว่าจากการทดลองครั้งนี้ โดยมีค่า IC₅₀ คือ 4.8 ± 0.3 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (Suresh et al., 2012)

การทดสอบความสามารถในการดักจับอนุมูลอิสระซูเปอร์ออกไซด์ อาศัยหลักการ คือ เมื่อ riboflavin ถูกกระตุ้นด้วยแสงจะสามารถรับอิเล็กตรอนจาก methionine แล้วเปลี่ยนโครงสร้างเป็น semiquinone ซึ่งจะให้อิเล็กตรอนต่อไปยังออกซิเจน เปลี่ยนเป็นอนุมูลซูเปอร์ออกไซด์ แล้วไปรีดิวซ์ NBT ที่มีสีเหลืองเปลี่ยนเป็นสาร formazan สีม่วงในที่สุด วัดความสามารถของสาร สกัดในการดักจับอนุมูลซูเปอร์ออกไซด์ ได้จากการยับยั้งการเปลี่ยนสีของ NBT (Hutadilok-Towatana et al., 2006) จากผลการศึกษาพบว่า สารสกัดด้วยน้ำจากสาขาหว่ายทะเล 3 ชนิดมีความสามารถในการดักจับอนุมูลอิสระซูเปอร์ออกไซด์ ได้แก่ *T. conoides*, *S. binderi*, *S. polycystum* โดยมีค่า

IC₅₀ คือ 9.64 ± 0.00 , 16.80 ± 0.01 และ 7.94 ± 0.00 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งมีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ในขณะที่สารสกัดด้วยเอทานอลจากสาหร่ายทะเลทั้ง 6 ชนิด ไม่มีความสามารถในการดักจับอนุมูลอิสระซูเปอร์ออกไซด์ (Table 2) มีรายงานการศึกษาสารสกัดด้วยน้ำจากสาหร่าย *S. plagiophyllum* มีประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระซูเปอร์ออกไซด์ใกล้เคียงกับสารสกัดจากสาหร่าย *S. binderi* แต่มีประสิทธิภาพสูงกว่าสารสกัดจากสาหร่าย *S. polycystum* ของการทดลองครั้งนี้ โดยมีค่า IC₅₀ คือ 7.0 ± 0.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (Suresh *et al.*, 2012)

Table 2 The IC₅₀ (mg/ml) of antioxidant activities of aqueous and ethanol extracts from various seaweeds.

| | Radical scavenging activity | | |
|-----------------------------|-----------------------------|-------------------------|-----------------------|
| | DPPH ¹ | Superoxide ¹ | Hydroxyl ¹ |
| BHA | 0.02 ± 0.02 | ND | ND |
| Trolox | ND | 0.24 ± 0.04 | ND |
| Tannin | ND | ND | 0.44 ± 0.01 |
| Aqueous | | | |
| <i>Brachytrichia quoyi</i> | NA | NA | NA |
| <i>Dictyota ciliolata</i> | NA | NA | NA |
| <i>Turbinaria conoides</i> | 2.64 ± 0.01^a | 9.64 ± 0.00^b | 5.91 ± 0.02^a |
| <i>Padina minor</i> | NA | NA | NA |
| <i>Sargassum polycystum</i> | 3.25 ± 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 |
| Ethanol | | | |
| <i>Brachytrichia quoyi</i> | NA | NA | NA |
| <i>Dictyota ciliolata</i> | NA | NA | NA |
| <i>Turbinaria conoides</i> | NA | NA | NA |
| <i>Padina minor</i> | NA | NA | NA |
| <i>Sargassum polycystum</i> | NA | NA | NA |
| <i>Sargassum binderi</i> | NA | NA | NA |

¹Mean + standard deviation of three replications.

Means within each column not sharing a common superscript are significantly different ($p < 0.05$), NA: No activity, ND: Not determined.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การทดสอบความสามารถในการดักจับอนุมูลอิสระไฮดรอกซิล อากซ์หลักการ คือ เมื่อน้ำตาล deoxyribose ถูกทำลายโดยปฏิกิริยาออกซิเดชันของอนุมูลอิสระไฮดรอกซิล ที่เกิดจากปฏิกิริยา Fenton จะมีสารประกอบอัลดีไฮด์ (aldehydes) เกิดขึ้น ซึ่งตรวจวัดได้ในรูปสารประกอบเชิงซ้อนสีชมพูของ TBARS (thiobarbituric acid reactive substances) ดังนั้นจึงสามารถนำวิธีดังกล่าวมาใช้ตรวจสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดได้โดยดูจากค่าการดูดกลืนแสงสีชมพูที่ลดลง (Hutadilok-Towatana *et al.*, 2006) จากผลการศึกษาพบว่า สารสกัดด้วยน้ำจากสาหร่ายทะเล 3 ชนิดมีความสามารถในการดักจับอนุมูลอิสระไฮดรอกซิล ได้แก่ *T. conoides*, *S. polycystum*, *S. binderi* โดยมีค่า IC₅₀ คือ 5.91 ± 0.02 , 6.38 ± 0.03 และ 16.34 ± 0.02 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งมีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ในขณะที่สารสกัดด้วยเอทานอลจากสาหร่ายทะเลทั้ง 6 ชนิด ไม่มีความสามารถในการดักจับอนุมูลอิสระไฮดรอกซิล (Table 2) สำหรับประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระไฮดรอกซิล สารสกัดน้ำจากสาหร่าย *S. plagiophyllum* มีประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระไฮดรอกซิลดีกว่าสารสกัดจากสาหร่าย *S. binderi* และ *S. polycystum* ของการทดลองครั้งนี้ โดยมีค่า IC₅₀ คือ 4.6 ± 0.4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (Suresh *et al.*, 2012) ชนิดของสาหร่าย ฤดูกาล สภาพพื้นที่ที่ต่างกัน ตัวทำละลายอินทรีย์ที่ใช้ในการสกัดและวิธีการสกัด ส่งผลต่อฤทธิ์ทางชีวภาพของสาหร่ายที่แตกต่างกัน ซึ่งการศึกษาฤทธิ์หรือประสิทธิภาพดังกล่าวนอกจากข้อมูลจากการทดสอบในหลอดแก้ว (*in vitro*) ภายในห้องปฏิบัติการแล้ว ควรมีการศึกษาทดลองจริงในสิ่งมีชีวิต (*in vivo*) เนื่องจากฤทธิ์บางอย่างอาจเพิ่มประสิทธิภาพเมื่ออยู่ในกลไกร่างกายของสิ่งมีชีวิต

สรุปผลการทดลอง

จากผลการศึกษาสารสกัดสาหร่ายที่สกัดด้วยน้ำมีปริมาณฟีนอลโดยรวมและความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH อนุมูลอิสระซูเปอร์ออกไซด์และอนุมูลอิสระไฮดรอกซิลสูงกว่าสารสกัดด้วยเอทานอล โดยสารสกัดด้วยน้ำจากสาหร่าย *T. conoides* มีศักยภาพในการพัฒนาเป็นสารต้านอนุมูลอิสระเพื่อใช้ทดแทนสารสังเคราะห์

เอกสารอ้างอิง

- 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.
- Bjelakovic, G. Nikolova, D. and Gluud, C. 2013. Antioxidant supplements to prevent mortality. *JAMA Clinical Evidence Synopsis.* 310(11): 1178-1179.
- Boonchum, W., Peerapornpisal, Y. Vacharapiyasophon, P. Pekkoh, J. Pumas, C. Jamjai, U. Amornlerdpison, D. Noiraksar, T and Kanjanapothi, D. 2011. Antioxidant activity of some seaweed from the gulf of Thailand. *Int. J. Agric. Biol.* 13: 95-99.
- 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.
- 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*. *J Mar Sci Technol.* 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.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- 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.
- Kumar, C.S., Ganesan, P. and Bhaskar, N. 2008. *In vitro* antioxidant activities of three selected brown seaweeds of India. *Food Chem.* 107: 707-713.
- Manivannan, K. Anantharaman, P and Balasubramanian, T. 2012. Evaluation of antioxidant properties of marine microalga *Chlorella marina* (Butcher, 1952). *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine.* S342-S346.
- 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: 367-373.
- 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.* 2(9): 64-73.
- Seenivasan, R and Indu, H. 2013. In vitro antioxidant activity of selected from southeast coast of India. *Int J Pharm Pharm Sci.* 5(2): 474-484.
- Singh, N. and Rajini, P.S. 2004. Free radical scavenging activity of an aqueous extract of potato peel. *Food Chem.* 85: 611-616.
- 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.
- 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. *Int J Biochem Cell Biol.* 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.
- Yangthong, M., Hutadilok-Towatana, N. and Phromkunthong, W. 2009. Antioxidant activities of four edible seaweeds from the southern coast of Thailand. *Plant Foods Hum. Nutr.* 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, N. 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.
- Yuan, Y.V., Carrington, M.F. and Walsh, N.A. 2005. Extracts from dulse (*Palmaria palmata*) 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.