การประเมินฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและสารพฤกษเคมีของสาหร่ายก้ามกุ้ง (*Chara corallina* Klein ex C.L.Willnenow)

Evaluation of Antioxidant Activity and Phytochemical from Kamkung (*Chara corallina* Klein ex C.L.Willnenow)

วรรณิณี จันทร์แก้ว[1*], มนต์สรวง ยางทอง[2], จันทนา แสงแก้ว[3]

Wanninee Chankaew[1*], Monsuang Yangthong[2], Jantana Sangkaew[3]

(Received: February 2, 2020; Revised: April 20, 2020; Accepted: May 19, 2020)

บทคัดย่อ

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อเปรียบเทียบปริมาณสารพฤกษเคมี (ฟีนอลิกรวม ฟลาโวนอยด์รวม และแทนนินรวม) และความสามารถต้านอนุมูลอิสระ 3 วิธี ได้แก่ การยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH ABTS และการจับโลหะไอออนของสารสกัดสาหร่ายก้ามกุ้ง (*Chara corallina*) จากตัวทำละลาย 3 ชนิด ได้แก่ เอทิลอะซิเตท เอทานอล และเมทานอล ผลการศึกษาพบว่าทั้งสามสารสกัดหยาบของสาหร่ายมีปริมาณสารพฤกษเคมีและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระแตกต่างกันทางสถิติ ($p<0.05$) โดยสารสกัดเอทิลอะซิเตทมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม และสารแทนนินรวม สูงที่สุดเท่ากับ 36.09±0.55 และ 31.91±0.67 mg GAE/g extract ตามลำดับ และมีความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH และความสามารถในจับโลหะไอออนได้ดีที่สุด มีค่า IC_{50} = 0.169±0.01 และ 0.098±0.00 mg/mL ตามลำดับ ในขณะที่สารสกัดเอทานอล สามารถสกัดสารฟลาโวนอยด์รวม ออกมาได้ปริมาณสูงที่สุด (23.113±0.04 mg QE/g extract) และมีความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระ ABTS ดีที่สุด (IC_{50} = 1.160±0.07 mg/mL) จากการวิเคราะห์ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ระหว่างค่า IC_{50} ของฤทธิ์กำจัดอนุมูลอิสระและสารพฤกษเคมี พบว่าสารประกอบฟีนอลิกรวม และสารแทนนินรวม มีส่วนสำคัญในการยับยั้งอนุมูลอิสระทั้งสามวิธี จากผลการศึกษาข้างต้นสรุปได้อย่างชัดเจนว่าสาหร่ายก้ามกุ้งมีศักยภาพที่

[1]สาขาประมง คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย

[1]Department of Fisheries, Faculty of Agriculture, Rajamangala University of Technology Srivijaya

[2]สาขาเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง วิทยาเขตชุมพร

[2]Disciplines of Technology Agriculture, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang Prince of Chumphon Campus

[3]คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏภูเก็ต

[3]Faculty of Science and Technology, Phuket Rajabhat University

*Corresponding author: wanninee.c@rmutsv.ac.th, wanninee81749@gmail.com

จะพัฒนาเป็นสารต้านอนุมูลอิสระธรรมชาติและพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์เพื่อสุขภาพได้

คำสำคัญ: สาหร่ายก้ามกุ้ง อนุมูลอิสระ แทนนิน ฟลาโวนอยด์ ฟีนอลิก

Abstract

The objective of this research was to compare the phytochemical contents (total phenolic content, total flavonoid content, tannin content) and the potential of antioxidant activities, DPPH scavenging activity, ABTS radical scavenging activity and metal chelating activity of *Chara corallina* extract using 3 different extraction solvent (ethyl acetate, ethanol and methanol). The results showed all group of phytochemical and all method of antioxidant activities were significantly different among different solvent extract ($p < 0.05$). The ethyl acetate extract showed the highest of total phenolic compound and tannin content were 36.09±0.55 and 31.91±0.67 mgGAE/g extract, respectively and the highest activity of scavenging DPPH and metal chelation (IC_{50} = 0.169±0.01 and 0.098±0.00 mg/ml). The ethanolic extract showed the highest of total flavonoid contents was 23.11±0.04 mgQE/g extract and the best activity of scavenging ABTS with IC_{50} was 1.116±0.07 mg/mL. According to Pearson's coefficient correlation between the extract with IC_{50} of antioxidant activities and the phytochemical contents, the results revealed that the total phenolic content and tannin content were major factors to stop antioxidant activities in all 3 study above. These findings clearly indicated that *C. corallina* had a significant potential to be used as natural antioxidants and to be develop into health products.

Keywords: *Chara corallina*, Free radical, Tannin, Flavonoid, Phenolic

บทนำ

ผลกระทบของอนุมูลอิสระต่อปัญหาสุขภาพกำลังเป็นที่กังวลของคนทั่วไป นำมาสู่กระแสการรับประทานอาหารที่มีสารต้านอนุมูลอิสระกันมากขึ้น ซึ่งสารพฤกษเคมี วิตามินต่าง ๆ รวมทั้งรงควัตถุต่าง ๆ ทั้งในพืช ผักผลไม้ต่าง ๆ ก็เป็นส่วนหนึ่งที่ร่างกายใช้ในการกำจัดอนุมูลอิสระได้เป็นอย่างดี ปัจจุบันจึงมีการศึกษาเกี่ยวกับสารต้านอนุมูลอิสระอย่างกว้างขวางทั้งในส่วนของการค้นหาชนิดและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระต่าง ๆ เนื่องจากอนุมูลอิสระเป็นโมเลกุลเล็ก ๆ ที่สามารถเข้าทำปฏิกิริยากับโมเลกุลต่าง ๆ ที่อยู่รอบได้ส่งผลให้เกิดความเสียหายแก่เซลล์ของร่างกายได้ตลอดเวลา จากรายงานวิจัยที่ผ่านมาพบว่าในธรรมชาติมีแหล่งสำคัญของสารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ เช่นพืชที่รับประทานใน

ชีวิตประจำวัน พืชสมุนไพร (Krishnaiah, Sarbatly, & Nithyanandam, 2011) รวมทั้งสาหร่าย (Peerapornpisal, Punyoyai, & Amornlerdpison, 2012)

ปัจจุบันได้มีการนำสาหร่ายน้ำจืดพื้นถิ่นกินได้มาใช้ประโยชน์ในด้านต่าง ๆ มากยิ่งขึ้น ซึ่งในส่วนของสาหร่ายน้ำจืดในท้องถิ่นของประเทศไทยนั้นมีรายงานมีสองกลุ่ม (division) คือ สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน และสาหร่ายสีเขียว ยกตัวอย่างเช่น สาหร่ายเตา (*Spirogyra*) สาหร่ายเห็ดลาบ (*Nostochopsis*) และสาหร่ายไก (*Cladophora*) ซึ่งนิยมบริโภคกันในพื้นที่ภาคเหนือและภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ส่วนในพื้นที่ภาคใต้มีรายงานการบริโภคสาหร่ายน้ำจืดชนิดที่มีชื่อท้องถิ่นว่าสาหร่ายก้ามกุ้ง (*Chara corallina*) (Chankaew, Amornlerdpison, Mahae, Na Nakorn & Amornwiriyachai, 2018) ซึ่งเป็นสาหร่ายที่อยู่ในกลุ่มของสาหร่ายไฟ (Charophytes) (Peerapornpisal, 2013) สำหรับการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพในสาหร่ายไฟสกุล *Chara* นั้นมีรายงานมีไม่มากนัก ดังเช่นการศึกษาในประเทศปากีสถานพบว่าสารสกัดด้วยเมทานอลของ *C. contraria* สามารถต้านการเจริญเชื้อราได้ 6 ชนิด (Ghazala & Shameel, 2005) และ Ghazala, Naila, Mustafa, Shahzad, & Leghari (2004) ได้รายงานว่าสารสกัดด้วยเมทานอล ของ *C. contraria* และ *Nitella flexilis* มีฤทธิ์ต้านการเจริญของแบคทีเรียได้ 3 ชนิด ต้านการเจริญของเชื้อรา 6 ชนิดจากเชื้อราทั้งหมด 10 ชนิด นอกจากนี้ยังพบว่า *C. contraria* มีฤทธิ์ต่อต้านการเจริญของเนื้องอก (antitumor activity)ได้ร้อยละ 30 นอกจากนี้ Zaman, Shameell, Shameel, & Leghari (1998) พบว่าสารสกัดเมทานอลและเอทานอลของสาหร่าย *C. corallina* var. *wallichii* มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียหลายชนิดเช่น *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhiae* และ *Streptococcus pyrogenes* และยับยั้งเชื้อรา *Aspergillus niger*, *Curvularia lunata* และ *Trichophyton mentagrophytes* ได้ จากการรายงานข้อมูลข้างต้นจะเห็นได้ว่าสาหร่ายไฟในสกุล *Chara* มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่น่าสนใจ อย่างไรก็ตามในสาหร่ายก้ามกุ้งยังไม่มีรายงานด้านฤทธิ์ชีวภาพโดยเฉพาะฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ จึงเป็นที่มาของการศึกษาครั้งนี้เพื่อให้ได้ข้อมูลในการใช้ประโยชน์เพื่อต่อยอดภูมิปัญญาท้องถิ่นของสาหร่ายน้ำจืดกินได้พื้นถิ่น ของชุมชนภาคใต้ การศึกษาในครั้งนี้จึงได้ประเมินสารสำคัญและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสาหร่ายก้ามกุ้งเพื่อเป็นแนวทางในใช้ประโยชน์จากสาหร่ายชนิดนี้ต่อไป

วัตถุประสงค์

เพื่อศึกษาปริมาณสารพฤกษเคมี 3 กลุ่ม ได้แก่ สารประกอบฟีนอลิกรวม สารฟลาโวนอยด์รวม และสารแทนนินรวม และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ 3 วิธี ได้แก่ การยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH การยับยั้งอนุมูลอิสระ ABTS และการจับโลหะไอออนของสารสกัดหยาบจากสาหร่ายก้ามกุ้ง (*Chara corallina*) 3 ชนิด ได้แก่ เอทิลอะซิเตท เอทานอล และเมทานอล

วิธีการวิจัย

1. การเตรียมตัวอย่าง

เก็บตัวอย่างสาหร่ายก้ามกุ้ง จากจังหวัดกระบี่ แล้วนำมาจำแนกชนิดตาม John, Whitton, & Brook (2002); www algaebase.com; Schubert & Blindow (2003); Sitwipusiri (2015); Borges & Necchi (2017) มาล้างทำความสะอาด และผึ่งลม จากนั้นนำไปอบที่อุณหภูมิ 50 ºC จนแห้ง แล้วนำมาบดจนละเอียด

2. การเตรียมสารสกัดหยาบ

นำผงสาหร่าย 20 กรัม สกัดด้วยตัวทำละลาย 3 ชนิด ได้แก่ เอทิลอะซิเตท เอทานอล และเมทานอล ในอัตราส่วน 1:10 (W:V) เขย่าด้วยเครื่องเขย่าเป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วกรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 ทำการสกัดซ้ำจากตัวอย่างเดิมจำนวน 3 ซ้ำ หลังจากนั้นทำการระเหยตัวทำละลายโดยใช้วิธีการระเหยด้วยเครื่องกลั่นแยกสาร (rotary evaporator) ชั่งและบันทึกน้ำหนักสารสกัดที่ได้

3. การหาปริมาณสารพฤกษเคมี

สารพฤกษเคมีเป็นสารสำคัญที่มีคุณสมบัติในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ ซึ่งในสาหร่ายนั้นมีอยู่หลายชนิด ในการศึกษาครั้งนี้ได้นำสารสกัดหยาบจากตัวทำละลายทั้งสามชนิดมาวิเคราะห์หาปริมาณสารพฤกษเคมี ดังนี้

3.1 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม (total phenolic contents)

โดยใช้วิธี Folin-Ciocalteu colorimetric ซึ่งใช้ Folin-ciocalteu reagent ซึ่งเป็นสารละลายที่มีสีเหลือง เมื่อเติมสารต้านอนุมูลอิสระลงไปจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำเงิน วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 nm โดยใช้สาร Gallic acid เป็นสารมาตรฐาน ที่ความเข้มข้น 0.05, 0.10, 0.20, 0.40, 0.60, 0.80 และ 1.0 mg/mL จากนั้นเติมสารสกัดตัวอย่างลงในหลอดทดลอง 0.1 mL เติมสารละลาย Follin-ciocalteu reagent 0.5 mL สารละลาย 20% Na_2CO_3 1 mL และน้ำกลั่น 8.4 mL ผสมให้เข้ากันบ่มทิ้งไว้ในที่มืด 1 ชั่วโมง วัดค่าการดูดกลืนแสงได้ที่ความยาวคลื่น 765 nm ด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Biodrop) โดยดัดแปลงตามวิธีการของ Julkunen-Tiitto, (1985) ทำการทดสอบตัวอย่างละ 3 ซ้ำ ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมจะอยู่ในหน่วย mg GAE/g extract ซึ่งคำนวณจาก Linear regression equation ของ Standard curve ของกราฟ Gallic acid

3.2 การวิเคราะห์ปริมาณสารฟลาโวนอยด์รวม (total flavonoid contents)

โดยใช้วิธี Aluminum chloride colorimetric ซึ่งการตรวจหาปริมาณสารฟลาโวนอยด์รวม ขึ้นอยู่กับการก่อตัวของสารประกอบเชิงซ้อน Aluminium-flavonoid สามารถวัดค่าการดูดกลืนแสงได้ที่ความยาวคลื่น 415 nm โดยใช้ Quercetin เป็นสารมาตรฐาน ที่ความเข้มข้น 12.50, 25.00, 50.00, 75.00,

100.00, 150.00 และ 250.00 mg/L จากนั้นเติมสารสกัดตัวอย่างและสารมาตรฐานลงใน 96 well plate 0.02 mL เติมสารละลาย 10%$AlCl_3$ 0.02 mL สารละลาย 1 M CH_3COOK 0.02 mL และน้ำกลั่น 0.180 mL จากนั้นผสมให้เข้ากันบ่มทิ้งไว้ 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 415 nm ด้วยเครื่องอ่านปฏิกิริยาบนไมโครเพลต (Biochrom รุ่น EZ Read 2000) ซึ่งดัดแปลงตามวิธีการของ Chang, Yang,Wen, & Chern (2002) ทำการทดสอบตัวอย่างละ 3 ซ้ำ ปริมาณสารฟลาโวนอยด์รวมจะอยู่ในหน่วย mg QE/g extract ซึ่งคำนวณจาก Linear regression equation ของ Standard curve ของกราฟ Quercetin

3.3 การวิเคราะห์ปริมาณสารแทนนินรวม (tannin content)

การวิเคราะห์หาปริมาณสารแทนนินรวมโดยใช้วิธีการของ Tembe & Bhamba (2014) ซึ่งใช้สาร Gallic acid เป็นสารมาตรฐาน ที่ความเข้มข้น 0.05, 0.10, 0.20, 0.40, 0.60, 0.80, และ 1.0 mg/mL โดยการปิเปตสารสกัดมา 0.1 mL ใส่ในขวดปริมาตร ขนาด 10 mL ผสมกับน้ำกลั่น 7.5 mL เติมสารละลาย Follin - ciocalteau 0.5 mL และสารละลาย 35% Na_2CO_3 1 mL หลังจากนั้นนำไปปรับปริมาตรให้ได้ 10 mL ด้วยน้ำกลั่น ผสมให้เข้ากันบ่มทิ้งไว้ 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 725 nm ทำการทดสอบตัวอย่างละ 3 ซ้ำ ปริมาณสารแทนนินรวมจะอยู่ในหน่วย mg GAE/g extract ซึ่งคำนวณจาก Linear regression equation ของ Standard curve ของกราฟ Gallic acid

4. การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระนั้นมีการศึกษาได้หลายวิธีการ แต่ในการศึกษาครั้งนี้ได้ทำการศึกษาทั้งหมด 3 วิธี ดังนี้

4.1 วิธี DPPH radical scavenging

การวัดความสามารถในการยับยั้งอนุมูล $DPPH^{\cdot}$ ดัดแปลงตามวิธีการของ Shimada, Fujikawa, Yahara, & Nakamura (1992) ทำการปิเปตสารสกัดที่ความเข้มข้นต่าง ๆ (0.005-3.200 mg/mL) 0.2 mL และ 0.1 mM DPPH 0.2 mL ผสมให้เข้ากันและทิ้งไว้ในที่มืด 30 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 nm ด้วยเครื่องอ่านปฏิกิริยาบนไมโครเพลต (EZ Read 2000) ใช้ BHT และ ascorbic acid เป็นสารมาตรฐาน ทำการทดสอบตัวอย่างละ 3 ซ้ำ หลังนั้นทำการคำนวณหาร้อยละของความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระ ดังสมการที่ (1) จากนั้นนำค่าที่ได้มาสร้างกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างร้อยละความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระ $DPPH^{\cdot}$ กับสารตัวอย่างในแต่ละความเข้มข้น แล้วคำนวณหาค่า Half maximal inhibitory concentration (IC_{50}) โดยใช้สมการเส้นตรง $y = ax + b$ ซึ่งหมายถึงค่าความเข้มข้นของสารตัวอย่างที่มีผลต่อการลดลงไปครึ่งหนึ่งของจำนวนอนุมูลอิสระจากจำนวนของอนุมูลอิสระเริ่มต้น

$$\% \text{ inhibition } = \left[\frac{(\text{Acontrol} - \text{Asample})}{\text{Acontrol}}\right] x100 \qquad (1)$$

4.2 วิธี Scavenging activity of ABTS radical

เป็นวิธีการวัดความสามารถในการฟอกสีอนุมูล $ABTS^{\bullet+}$ ดัดแปลงตามวิธีการของ Re et al. (1999) โดยการผสม 7 mM $ABTS^{\bullet+}$ 2 mL กับ 140 mM $K_2S_2O_8$ 35.5 µL ในขวดสีชา ทิ้งไว้ 16 ชั่วโมง จะได้ Stock ABTS radical cation ที่มีสีน้ำเงินอมเขียว ก่อนนำมาทำการทดลอง จะต้องเจือจาง Stock ABTS radical cation ด้วยน้ำกลั่นให้ได้ค่าดูดกลืนแสง เท่ากับ 0.700±0.010 (ต้องเตรียมใหม่ทุกครั้งก่อนการใช้งาน) ปิเปตสารสกัดที่ความเข้มข้นต่าง ๆ (1.0-10.0 mg/mL) 0.1 mL และ $ABTS^{\bullet+}$ 0.9 mL ผสมให้เข้ากัน ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 6 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 nm ด้วยเครื่องอ่านปฏิกิริยาบนไมโครเพลต (EZ Read 2000) โดยใช้น้ำกลั่นเป็นชุดควบคุม และใช้ Trolox เป็นสารมาตรฐาน ทำการทดสอบตัวอย่างละ 3 ซ้ำ หลังจากนั้นคำนวณร้อยละของความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระ ดังสมการที่ (1) จากนั้นนำค่า %inhibition ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ของสารสกัดแต่ละสภาวะที่ได้จากการคำนวณไปสร้างกราฟเส้นตรงเพื่อคำนวณหาค่า IC_{50}

3. วิธี Metal chelating activity

เป็นวิธีการวัดความสามารถในการดักจับโลหะไอออน ตามวิธีของ Dinis, Madeira, & Almeda (1994) ปิเปตสารสกัดที่เข้มข้นต่าง ๆ (0.025-9.500 mg/mL) 0.800 mL ผสมสารละลาย 2 mM $FeCl_2$ 0.01 mL และ 5 mM Ferrozine 0.02 mL เขย่าอย่างรวดเร็ว บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที วัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 562 nm ด้วยเครื่องอ่านปฏิกิริยาบนไมโครเพลต (EZ Read 2000) โดยใช้น้ำกลั่นปราศจากไอออนเป็นชุดควบคุม และใช้ EDTA เป็นสารมาตรฐาน นำค่าที่ได้ไปคำนวณหาความสามารถในการจับโลหะ (%chelating ability) ดังสมการที่ (2) จากนั้นนำค่า %chelating ability ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ของสารสกัดที่ได้จากการคำนวณจากสมการที่ (2) จะนำไปสร้างกราฟเส้นตรงเพื่อคำนวณหาค่า IC_{50}

$$\% \text{ chelation ability } = \left[\frac{(\text{Acontrol} - \text{Asample})}{\text{Acontrol}}\right] x100 \qquad (2)$$

การวิเคราะห์ทางสถิติ

นำข้อมูลที่ได้จากการทดลองมาวิเคราะห์ความแปรปรวนด้วยวิธี One-way ANOVA จากนั้นเปรียบเทียบหาค่าความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี DMRT (Duncan's Multiple Range Test) ที่ระดับความ

เชื่อมั่น 95% ($p<0.05$) และวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างสารพฤกษเคมีกับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ด้วยการหาค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (Pearson's correlation coefficients, r) โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูปทางสถิติ

ผลการวิจัย

ปริมาณสารพฤกษเคมี

1. ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม

การหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมเกิดขึ้นจากสารฟีนอลในสารสกัดสาหร่ายก้ามกุ้งมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงจึงเข้าทำปฏิกิริยากับสารละลาย Folin–ciocalteau reagent เกิดสีน้ำเงินของ Molybdate ในการศึกษาครั้งนี้ใช้ Gallic acid เป็นสารมาตรฐานและคำนวณหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมในหน่วยของมิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อกรัมของสารสกัด (mg gallic acid equivalent (GAE)/g extract) จากสมการเส้นตรงของกราฟมาตรฐาน Gallic acid ($y = 0.8636x$; $R^2 = 0.9996$) พบว่าปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมของสารสกัดจากสาหร่ายก้ามกุ้งด้วยตัวทำละลาย 3 ชนิด มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) โดยพบว่าสารสกัดเอทิลอะซิเตทมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมสูงสุด เท่ากับ 36.089±0.55 mg GAE/g extract รองลงมาคือ สารสกัดเอทานอล และเมทานอลมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมน้อยที่สุด เท่ากับ 22.503±0.52 และ 13.316±0.12 mg GAE/g extract ตามลำดับ (ตารางที่ 1)

2. ปริมาณสารฟลาโวนอยด์รวม

จากการวิเคราะห์ปริมาณสารฟลาโวนอยด์รวมในรูปของมิลลิกรัมสมมูลของสารเควอซิทินต่อสารสกัด 1 กรัม (mg QE/ g extract) เมื่อนำค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 415 nm มาสร้างกราฟเทียบกับความเข้มข้นของ Quercetin ที่มีระดับความเข้มข้นต่าง ๆ (12.50, 25.00, 50.00, 75.00, 100.00, 150.00 และ 250.00 mg/L) จะได้กราฟมาตรฐานเป็นเส้นตรงที่มีสมการ $y = 0.0044x$; $R^2 = 0.995$ ผลการศึกษาปริมาณสารฟลาโวนอยด์รวมของสารสกัดจากสาหร่ายในตัวทำละลายแต่ละชนิดมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) โดยพบว่าสารสกัดจากสาหร่ายก้ามกุ้งด้วยตัวทำละลายเมทานอล มีปริมาณสารฟลาโวนอยด์รวมสูงสุด รองลงมาคือสารสกัดด้วยตัวทำลายเอทานอล และเอทิลอะซิเตท ซึ่งมีค่าเท่ากับ 30.363±0.08, 23.113±0.04, 14.409±0.22 mg QE/g extract ตามลำดับ (ตารางที่ 1)

3. ปริมาณสารแทนนินรวม

จากการวิเคราะห์ปริมาณสารแทนนินรวมของสารสกัดหยาบจากสาหร่ายก้ามกุ้ง โดยวิธี Folin–ciocalteau reagent และคำนวณหาปริมาณสารแทนนินรวม ในหน่วยมิลลิกรัมของกรดแกลลิกต่อสาร

สกัด 1 กรัม (mg GAE/ g extract) เมื่อนำค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 nm มาสร้างกราฟเทียบกับความเข้มข้นของ Gallic acid ที่มีระดับความเข้มข้นต่าง ๆ (0.005, 0.010, 0.020, 0.040, 0.060, 0.080, 0.100 และ 0.200 mg/mL) จะได้กราฟมาตรฐานเป็นเส้นตรงที่มีสมการ คือ $y = 1.1616x$, $R^2 = 0.9916$ ผลการศึกษาปริมาณสารแทนนินรวมของสารสกัดสาหร่ายในตัวทำละลายแต่ละชนิดมีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p<0.05$) โดยพบว่าสารสกัดสาหร่ายก้ามกุ้งด้วยตัวทำละลายเอทิลอะซิเตทมีปริมาณสารแทนนินรวมสูงที่สุด รองลงมาคือสารสกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอล และเมทานอล มีค่าเท่ากับ 31.908±0.67, 28.976±0.39 และ 16.648±0.19 mg GAE/g extract ตามลำดับ (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 ปริมาณสารฟีนอลิกรวม ฟลาโวนอยด์รวม และแทนนินรวมของสารสกัดหยาบจากสาหร่ายก้ามกุ้ง

สารสกัด	ปริมาณสารพฤกษเคมี		
	ฟีนอลิกรวม (mg GAE/g extract)	ฟลาโวนอยด์รวม (mg QE/g extract)	แทนนินรวม (mg GAE/g extract)
เอทธิลอะซิเตท	36.089±0.55^{c}	14.409±0.22^{a}	31.908±0.67^{c}
เอทานอล	22.503±0.52^{b}	23.113±0.04^{b}	28.976±0.39^{b}
เมทานอล	13.316±0.12^{a}	30.363±0.08^{c}	16.648±0.19^{a}

หมายเหตุ: ตัวอักษรที่ต่างกันในแนวตั้งมีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p<0.05$)

ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

1. การยับยั้งอนุมูลอิสระDPPH

ผลจากการทดสอบความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระDPPH ของสารสกัดด้วยตัวทำละลายสามชนิดของสาหร่ายก้ามกุ้ง จากค่า IC_{50} ของสารสกัดหยาบจากสาหร่ายก้ามกุ้ง ด้วยตัวทำละลาย 3 ชนิด พบว่าสารสกัดหยาบของสาหร่ายก้ามกุ้ง มีความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระได้ 50% โดยสารสกัดที่มีค่า IC_{50} ดีที่สุด คือ เอทิลอะซิเตท รองลงมาคือสารสกัดเอทานอล และเมทานอล โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.159±0.01, 0.466±0.02 และ 0.774±0.03 mg/ml ตามลำดับ และเมื่อนำมาเทียบกับสารมาตรฐานทั้งสองชนิดคือ Ascorbic acid และ BHT พบว่าฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ $DPPH^{\cdot}$ ของสาหร่ายก้ามกุ้งน้อยกว่าสารมาตรฐานทั้งสองชนิด (ตารางที่ 2)

2. การยับยั้งอนุมูลอิสระ ABTS

ผลจากการทดสอบความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระ ABTS จากค่า IC_{50} ของสารสกัดด้วยตัวทำละลาย 3 ชนิดของสาหร่ายก้ามกุ้ง พบว่า สารสกัดเอทานอลมีความสามารถในการยับยั้งอนุมูล

อิสระ ABTS ดีที่สุด รองลงมาคือ สารสกัดเอทิลอะซิเตท และเมทานอล มีค่าเท่ากับ 1.160±0.07, 1.816±0.02 และ 4.074±0.15 mg/ml ตามลำดับ แต่ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมีค่าน้อยกว่าสารมาตรฐาน (Trolox) (ตารางที่ 2)

3. การจับโลหะไอออน

การศึกษาความสามารถในการแย่งจับโลหะไอออนของสารสกัดหยาบสาหร่ายก้ามกุ้ง พบว่า สารสกัดเอทธิลอะซิเตท มีค่า IC_{50} ดีที่สุด รองลงมาคือสารสกัดเอทานอล และเมทานอล มีค่าเท่ากับ 0.098±0.00, 0.135±0.00, 0.358±0.03 mg/ml ตามลำดับ และเมื่อนำมาเทียบกับสารมาตรฐาน EDTA พบว่ามีความสามารถในการแย่งจับกับโลหะ Fe^{2+} ได้น้อยกว่าสารมาตรฐานทุกตัวทำละลาย (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 ค่า IC_{50} ในการยับยั้งอนุมูลอิสระทั้งสามวิธีของสารสกัดหยาบจากตัวทำละลายทั้งสามชนิดของสาหร่ายก้ามกุ้ง

สารสกัด	IC_{50} (mg/mL)		
	การยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH	การยับยั้งอนุมูลอิสระ ABTS	การจับโลหะไอออน
เอทธิลอะซิเตท	0.159±0.01[b]	1.816±0.02[c]	0.098±0.00[b]
เอทานอล	0.466±0.02[c]	1.160±0.07[b]	0.135±0.00[c]
เมทานอล	0.774±0.03[d]	4.074±0.15[d]	0.358±0.03[d]
Ascorbic acid	0.009±0.00[a]	-	-
BHT	0.006±0.00[a]	-	-
EDTA	-	-	0.011±0.00[a]
Trolox	-	0.216±0.01[a]	-

หมายเหตุ: อักษรที่ต่างกันในแนวตั้งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05)

การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณสารพฤกษเคมีและความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ

ความสามารถในการออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระนั้นมีความสัมพันธ์กับปริมาณสารพฤกษเคมีในสารสกัด ดังนั้นในการศึกษานี้จึงได้วิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างสารพฤกษเคมีและความสามารถในการออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระต่าง ๆ โดยแปรค่าความสัมพันธ์ (r) สามารถอธิบายได้ดังรายละเอียดต่อไปนี้คือ ค่า r = $\geq$ 0.90 มีความสัมพันธ์ระดับสูงมาก ค่า r = 0.70–0.90 มีความสัมพันธ์ระดับสูง

ค่า r = 0.30–0.70 มีความสัมพันธ์ในระดับปานกลาง ค่า r = $\leq$ 0.30 มีความสัมพันธ์ในระดับต่ำ และค่า r = 0.00 ไม่มีความสัมพันธ์กันเชิงเส้นตรง ซึ่งเมื่อพิจารณาค่าที่ได้จากการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ปริมาณสารพฤกษเคมีกับค่า IC_{50} ของฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH, ABTS และการจับโลหะหนัก โดยวิธี Pearson's correlation coefficients พบว่าปริมาณสารพฤกษเคมีของสารสกัดสาหร่ายก้ามกุ้งที่สกัดด้วยตัวทำละลายต่างกันมีความสัมพันธ์เชิงลบกับความฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระทั้งสามวิธี หมายความว่าหากมีปริมาณสารพฤกษเคมีสูงจะมีประสิทธิภาพในการออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงหรือ ค่า IC_{50} จะน้อยลง ซึ่งจากการทดสอบพบว่าปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมมีความสัมพันธ์เชิงลบกับความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH ในระดับสูงมาก (r = -0.994) และมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ และปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมมีความสัมพันธ์กับประสิทธิภาพการจับโลหะ Fe^{2+} อยู่ในระดับสูงและมีความสัมพันธ์กับความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระ ABTS โดยมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ = -0.798 และ -0.432 ตามลำดับ (ตารางที่ 3)

จากผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณสารฟลาโวนอยด์รวมและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระทั้งสามวิธี พบว่าสารฟลาโวนอยด์รวม มีความสัมพันธ์เชิงลบกับความสามารถในการจับโลหะ Fe^{2+} ในระดับปานกลาง (r = -0.411) แต่ไม่มีความสัมพันธ์กับความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH และ ABTS (ตารางที่ 3) สำหรับปริมาณสารแทนนินรวม มีความสัมพันธ์กับประสิทธิภาพการแย่งจับโลหะหนักในระดับสูงมาก (r = -0.995) และมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ และมีความสัมพันธ์กับความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH ในระดับสูงและมีความสัมพันธ์กับความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระABTS ในระดับปานกลางโดยมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์เท่ากับ -895 และ -0.321 ตามลำดับ (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 3 ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (r) ระหว่างปริมาณสารพฤกษเคมีและความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ

ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ	**ปริมาณสารพฤกษเคมี**		
	ฟีนอลิกรวม	**ฟลาโวนอยด์รวม**	**แทนนินรวม**
การยับยั้งอนุมูลอิสระDPPH	-0.994**	0.085	-0.895
การยับยั้งอนุมูลอิสระABTS	-0.432	0.632	-0.321
การจับโลหะไอออน	-0.798	-0.411	-0.995**

หมายเหตุ : **ความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ (p<0.01)

อภิปรายผล

ปริมาณสารพฤกษเคมี

1. ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม

สารสกัดหยาบสาหร่ายก้ามกุ้งทุกตัวทำละลายมีสารประกอบฟีนอลิกที่ประกอบด้วยโมเลกุลที่มีขั้วและไม่มีขั้วเป็นองค์ประกอบจึงสกัดได้ในปริมาณที่แตกต่างกัน ซึ่งพบว่าสารสกัดเอทิลอะซิเตทมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมสูงสุด เท่ากับ 36.089±0.55 mg GAE/ g extract ซึ่งเมื่อนำปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมของสาหร่ายก้ามกุ้งมาเปรียบเทียบกับสาหร่ายชนิดอื่นที่ถูกเก็บมาจากธรรมชาติ พบว่าสาหร่ายก้ามกุ้งมีปริมาณสูงกว่าสารสกัดเอทานอลและน้ำของสาหร่ายเห็ดลาบ (*Nostoc commune*) ซึ่งมีค่าเท่ากับ 0.482±0.09 และ 0.064±0.002 mg GAE/ g of extract ตามลำดับ (Youcharoen, Srisuksomwong, & Tragoolpua, 2015) รวมทั้งสารสกัดน้ำของสาหร่ายไก (*Cladophora* spp.) (16.33±0.17 mg GAE/ g extract) (Amornlerdpison, Ngernjan, Mengumphan, & Junthip, 2015) แต่สารสกัดในสาหร่ายก้ามกุ้งมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมน้อยกว่าสารสกัดเอทิลอะซิเตทของสาหร่ายทะเลสีแดง *Laurencia mariannensis* ซึ่งมีค่าเท่ากับ 79.00±2.96 mgGAE/g extract (Praiboon & Chirapart, 2012)

2. ปริมาณสารฟลาโวนอยด์รวม

สารสกัดหยาบของสาหร่ายก้ามกุ้งทุกตัวทำละลายสามารถสกัดสารฟลาโวนอยด์ออกมาได้แตกต่างกัน โดยสารสกัดหยาบด้วยตัวทำละลายเมทานอลมีปริมาณสารฟลาโวนอยด์รวมสูงสุด เท่ากับ 30.363±0.08 QE/ g of extract ซึ่งชี้ว่าสารฟลาโวนอยด์ในสาหร่ายก้ามกุ้งมีสภาพขั้วใกล้เคียงกับตัวทำละลายเมทานอลมากที่สุดส่งผลให้สามารถสกัดออกมาได้มากที่สุดตามกฎ Like dissolve like rule (Reichardt, 2005) เมื่อเปรียบเทียบปริมาณสารฟลาโวนอยด์รวมของสาหร่ายก้ามกุ้งกับสาหร่ายอื่นที่เก็บมาจากธรรมชาติ พบว่าในสารสกัดด้วยเอทานอลมีปริมาณสูงกว่าสารสกัดเอทานอลของสาหร่ายเตา (*Spirogyra*) สาหร่ายไก (*Cladophora*) และสาหร่ายเห็ดลาบ (*N. commune*) ซึ่งค่าเท่ากับ 2.64±0.36, 3.83±0.90 และ 0.52±0.15 mg QE/g extract ตามลำดับ (Moonsin&Wongklom,2013) รวมถึงสารสกัดเอทานอลของสาหร่ายเห็ดลาบ (1.1±0.14 mg QE/g extract) (Youcharoen, Srisuksomwong, & Tragoolpua, 2015) แต่มีปริมาณต่ำกว่าสารสกัดด้วยน้ำที่อุณหภูมิ 20 ºC และ 40 ºC ของสาหร่ายสีแดง (*Gracilaria bursa-pastoris*) ซึ่งมีค่าเท่ากับ 49.12±0.17 และ 64.87±0.05 mg QE/ g extract ตามลำดับ (Ramdani et al., 2017)

3. ปริมาณสารแทนนินรวม

สารสกัดเอทิลอะซิเตทของสาหร่ายก้ามกุ้งมีปริมาณสารแทนนินรวมสูงที่สุด (31.908±0.67 mg GAE/ g extract) รองลงมาคือเอทานอลและเมทานอล ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับปริมาณฟีนอลิกรวม กล่าวคือตัวทำละลายที่มีขั้วค่อนข้างต่ำ สามารถสกัดสารแทนนินออกมาได้มากกว่าตัวทำละลายที่มีขั้วสูงกว่าสารแทนนิน ในสาหร่ายก้ามกุ้งมีสภาพขั้วใกล้เคียงกับเอทธิลอะซีเตทมากที่สุด ส่งผลให้สามารถสกัดออกมาได้มากที่สุด ซึ่งสอดคล้องกับปริมาณสารแทนนินรวมในสาหร่ายสีน้ำตาล *Dictyota dichotoma* ที่พบปริมาณมากในตัวทำละลายที่มีขั้วต่ำมากกว่าขั้วสูงซึ่งมีค่าเท่ากับ 1.85±0.24 และ 1.68±0.49 mg CAE/ g dry wt ในสารสกัดเอทิลอะซิเตทและเมทานอล ตามลำดับ (Deyab, Elkatony, & Ward, 2016) แต่ในสาหร่ายสีเขียวนั้นพบว่า ตัวทำละลายที่มีขั้วต่ำสามารถสกัดปริมาณแทนนินได้ปริมาณน้อยกว่าตัวทำละลายที่มีขั้วสูง เช่นการศึกษาในสาหร่ายขนนก (*Caulerpa recemosa*) พบว่าสารสกัดหยาบด้วยเฮกเซน คลอโรฟอร์มและเอทานอล มีปริมาณแทนนินรวมเท่ากับ 37.71±0.48, 136.44±2.22 และ 169.99±1.27 mg TAE/ g extract ตามลำดับ (Shibu & Dhanam, 2015)

ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

1. การยับยั้งอนุมูลอิสระDPPH

สารสกัดเอทิลอะซิเตทของสาหร่ายก้ามกุ้งด้วยมีความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระได้ดีที่สุด (ตารางที่ 2) ผลที่เกิดขึ้นนี้เกิดจากสารประกอบฟีนอลิกและสารแทนนินที่สามารถละลายได้ดีในตัวทำละลายเอทิลอะซิเตทมากที่สุด และความสามารถในการยับยั้ง $DPPH^{\cdot}$ ที่เกิดขึ้นแปรผันตามปริมาณสารพฤกษเคมีข้างต้น เมื่อพิจารณาผลจากความสัมพันธ์ด้วยวิธี Pearson's correlation coefficients พบว่าปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมและสารแทนนินรวมของสารสกัดเอทิลอะซิเตทของสาหร่ายก้ามกุ้งมีความสัมพันธ์เชิงลบกับปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมในระดับสูงมาก และสารแทนนินรวมในระดับสูงมีค่า r = -0.994 และ -0.943 ตามลำดับ หมายความว่าหากมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมและสารแทนนินรวมมากขึ้น ความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH ก็จะสูงด้วย (ค่า IC_{50} น้อยลง) ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานในสาหร่ายทะเลสีน้ำตาลหลายชนิดได้แก่ *Sargassum aquifolium*, *S. oligocystum*, *S. polycystum*, *S. ilicifolium*, *S. plagiophyllum*, *Tubinaria conoides*, *Padina australis*, *P. tetrastromatica* และ *Lobophora australis* (Praiboon & Chirapart, 2012) นอกจากนี้ยังสอดคล้องกับการรายงานของ Piluzza & Bullitta (2011) ซึ่งรายงานว่าความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระมีความสัมพันธ์ไปในทิศทางเดียวกันกับปริมาณของสารประกอบฟีนอลิกรวม กล่าวคือ ถ้ามีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมสูง ความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระก็จะสูงด้วย

เมื่อเปรียบเทียบกับการรายงานเกี่ยวกับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสาหร่ายทะเล พบว่าสารสกัดเอทิลอะซิเตทของสาหร่ายก้ามกุ้งมีความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระDPPH ได้ดีกว่าสารสกัดน้ำสาหร่ายสีน้ำตาล *T. conoides*, *S. polycystum* และ *S. binderi* มีค่า IC_{50} เท่ากับ 2.64± 0.01, 3.25± 0.03 และ 2.95± 0.02 mg/ml ตามลำดับ (Yangthong, Towatana, & Thawonsuwan, 2015) แต่มีความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระDPPH ได้ต่ำกว่าสารสกัดน้ำของสาหร่ายเตา(*S. neglecta*) มีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.044±0.002 mg/ml) (Punyoyai, 2008) และสารสกัดเมทานอลของสาหร่ายทุ่น (*Sargassum asperum*) มีค่า IC_{50} เท่ากับ 67.0 µg/ml (Pandithurai & Murugesa, 2014)

2. การยับยั้งอนุมูลอิสระABTS

ผลการศึกษาความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระABTS จากค่า IC_{50} ของสารสกัดหยาบของสาหร่ายก้ามกุ้ง พบว่าสารสกัดเอทานอลมีความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระABTS ดีที่สุด (ตารางที่ 2) มีแนวโน้มว่าสารประกอบฟีนอลิกและสารแทนนินรวมจะเป็นสารออกฤทธิ์ในการยับยั้งอนุมูลอิสระABTS ซึ่งเมื่อพิจารณาค่าที่ได้จากการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ค่า IC_{50} ของความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระABTS กับสารพฤกษเคมี พบว่าความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระ ABTS มีความสัมพันธ์กับปริมาณสารแทนนินรวมในระดับสูง(มีค่า r = -0.922) เมื่อนำค่า IC_{50} ของสารสกัดเอทานอลของสาหร่ายก้ามกุ้ง ที่มีความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระABTS ดีที่สุดมาเปรียบเทียบกับสาหร่ายธรรมชาติชนิดอื่นพบว่าสารสกัดด้วยเอทานอลของสาหร่ายก้ามกุ้งมีความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระABTS ได้ดีกว่าสารสกัดน้ำของสาหร่ายเตา *S. neglecta* (1.584±0.183 mg/ml) (Punyoyai, 2008) สารสกัดน้ำของสาหร่ายทุ่น (*S. polycystum*) (8.40 mg/ml) (Amornlerdpison et al., 2008) และสารสกัดน้ำของสาหร่ายเตา (*Spirogyra* sp.) ที่เก็บตัวอย่างในฤดูร้อนแต่มีฤทธิ์ต่ำกว่าสาหร่ายเตาที่เจริญในฤดูฝนและฤดูหนาว (Rattanapot, Menhumphan, Srimaroeng, Junthip, & Amornlrrdpisan, 2012) รวมถึงสารสกัดเมทานอลของสาหร่ายสีน้ำตาล *S. asperum* (Pandithurai & Murugesa, 2014)

3. การจับโลหะไอออน

ความสามารถในการแย่งจับกับโลหะไอออน (Fe^{2+}) โดยสารสกัดเอทธิลอะซิเตท มีค่า IC_{50} ดีที่สุด (ตารางที่ 2) ซึ่งมีแนวโน้มว่าสารออกฤทธิ์ในการแย่งจับกับโลหะหนัก คือสารประกอบฟีนอลิกและสารแทนนิน สอดคล้องกับค่าที่ได้จากการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ค่า IC_{50} ของความสามารถในการแย่งจับกับโลหะหนักคือกับปริมาณสารพฤกษเคมี พบว่าความสามารถในการแย่งจับกับโลหะหนักมีความสัมพันธ์กับสารแทนนินรวมในระดับสูงมาก (r =-0.999) สารประกอบฟีนอลิกรวมในระดับสูง (r = -0.876) ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานของ Sanchez-Moreno, Larrauri, & Saura-Calixto (1998) ที่พบว่าสารพอลีฟีนอลและสารประกอบฟีนอลิกเป็นตัวแย่งจับกับโลหะหนัก เมื่อพิจารณาค่า IC_{50} ของ

สารสกัดเอทิลอะซิเตทของสาหร่ายก้ามกุ้งที่สามารถแย่งจับกับโลหะหนักดีที่สุดมาเปรียบเทียบกับสาหร่ายจากธรรมชาติชนิดอื่นพบว่า มีความสามารถในการแย่งจับกับโลหะหนักได้ดีกว่าสารสกัดน้ำของสาหร่าย *S. neglecta* (Punyoyai, 2008) สารสกัดอะซิโตนและคลอโรฟอร์มของสาหร่ายสีแดง *Gracilaria verrucosa* (Gouda, Moharana, Das, & Patra, 2013) สารสกัดเมทานอล ปิโตรเลียมอีเทอร์ เอทิลอะซิเตท ไดคลอโรมีเทน บิวทานอล และน้ำของสาหร่ายไส้ไก่ (*Enteromorpha intesinalis*) แต่มีความสามารถแย่งจับกับโลหะหนักได้น้อยกว่าสารสกัด ปิโตรเลียมอีเทอร์ เอทิลอะซิเตท ไดคลอโรมีเทน บิวทานอล และน้ำของสาหร่ายไส้ไก่ (*Ulva rigida*) และสารสกัดด้วยปิโตรเลียมอีเทอร์ เอทิลอะซิเตท ไดคลอโรมีเทน บิวทานอล และน้ำของสาหร่ายสีน้ำตาล *Fucus spiralis* (Chernane, 2014)

จากข้อมูลฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระทั้งสามวิธีและสารพฤกษเคมีทั้งสามกลุ่มของสารสกัดทั้งสามตัวทำละลายของสาหร่ายก้ามกุ้ง สามารถบ่งชี้ได้ว่าสาหร่ายชนิดนี้มีศักยภาพในการนำมาเป็นสารต้านอนุมูลอิสระธรรมชาติได้เป็นอย่างดี อย่างไรก็ดีในเบื้องต้นนี้ตัวทำละลายที่มีความสามารถต้านอนุมูลอิสระได้ดีที่สุดในการศึกษาครั้งนี้คือเอทธิลอะซิเตท ซึ่งในการทดสอบประสิทธิภาพการต้านอนุมูลอิสระแต่ละวิธีมีข้อแตกต่างกันทางกลไกการทดสอบ และกลุ่มของสารต้านอนุมูลอิสระที่มีสมบัติแตกต่างกัน ดังนั้นการใช้วิธีการทดสอบประสิทธิภาพในการกำจัดอนุมูลอิสระมีหลายวิธีเพื่อเปรียบเทียบผลที่ได้ ยกตัวอย่างเช่น วิธี DPPH เป็นการทดสอบความสามารถในการให้ไฮโดรเจนอะตอมแก่อนุมูล DPPH ของสารต้านอนุมูลอิสระ ส่วนวิธี ABTS เป็นการทดสอบความสามารถของสารต้านอนุมูลอิสระด้วยการให้อิเลกตรอนกับอนุมูล ABTS (Phansuwan, 2013)

ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณสารพฤกษเคมีและความสามารถในการออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณสารพฤกษเคมีทั้งสามกลุ่มและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระทั้งสามวิธี พบว่าปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมมีความสัมพันธ์กันกับความสามารถต้านอนุมูลอิสระทั้งสามวิธี (ตารางที่ 3) มีความสอดคล้องกับการศึกษาของ Praiboon & Chirapart, (2012); Farasat, Khavari-Nejad, Nabvi, & Namjooyan (2012) และ Yangthong & Towatana (2014) ที่พบว่าปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมในสารสกัดมีความสัมพันธ์ในเชิงลบกับประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH หมายความว่าหากมีปริมาณฟีนอลิกในสารสกัดมากขึ้น ประสิทธิภาพในฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH หรือ ค่า IC_{50} จะน้อยลง ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาในพืชชั้นสูงพบว่า ส่วนใหญ่ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกกับประสิทธิภาพในการยับยั้งอนุมูลอิสระมีความสัมพันธ์กันเป็นลักษณะเส้นตรง หมายความว่าในสารสกัดจากสาหร่ายที่มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกสูงจะมีประสิทธิภาพในการยับยั้งอนุมูลอิสระสูงตามไปด้วย อย่างไรก็ตามเนื่องจากความซับซ้อนขององค์ประกอบทางเคมีที่พบในสารสกัดหยาบของสาหร่ายจะใช้หลักการทำนายความสามารถในการออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเช่นเดียวกับพืชชั้นสูง

ไม่ได้ในลักษณะเดียวกัน (Balboa, Conde, Moure, Falqué, & Domínguez, 2013) นอกจากนี้ ความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระของสารประกอบฟีนอลิกยังขึ้นอยู่กับลักษณะทางโครงสร้างที่แตกต่างกัน จำนวนและตำแหน่งของหมู่ไฮดรอกซิลที่อยู่ในโครงสร้างโมเลกุลของสารประกอบฟีนอลิกจะมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระที่ต่างกันออกไป (Farvin & Jacobsen, 2013)

สรุป

สารสกัดด้วยเอทิลอะซิเตทของสาหร่ายก้ามกุ้ง สามารถสกัดสารประกอบฟีนอลิกรวม และสารแทนนินรวมออกมาได้ปริมาณมากที่สุด และมีความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH และจับโลหะไอออนได้ดีที่สุด ส่วนสารสกัดด้วยเมทานอลสามารถสกัดสารฟลาโวนอยด์รวมออกมาได้ปริมาณสูงที่สุดและมีความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระ ABTS ดีที่สุด จากผลการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระทั้งสามวิธี และสารพฤกษเคมีทั้งสามกลุ่มของสารสกัดสาหร่ายก้ามกุ้งในครั้งนี้ สามารถชี้ได้ว่าสาหร่ายชนิดนี้มีศักยภาพในการนำมาเป็นสารต้านอนุมูลอิสระธรรมชาติได้เป็นอย่างดี และมีแนวโน้มว่าสารสกัดที่เป็นขั้วต่ำจะมีฤทธิ์ทางชีวภาพดีกว่าขั้วสูง

ข้อเสนอแนะ

เนื่องจากการศึกษาทางด้านฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและสารพฤกษเคมีของสาหร่ายก้ามกุ้งในครั้งนี้ได้ใช้สามตัวทำละลายในการสกัด ดังนั้นเพื่อให้ได้ข้อมูลที่ละเอียดมากขึ้นการศึกษาครั้งต่อไปจำเป็นต้องศึกษาตัวทำละลายที่ขั้วต่ำกว่าการศึกษาครั้งนี้ เช่น เฮกเซน และตัวทำละลายที่ขั้วสูงขึ้น เช่น น้ำ ซึ่งสารสกัดด้วยน้ำเป็นสารสกัดที่ปลอดภัย จากผลการศึกษาในครั้งนี้พบว่าสาหร่ายก้ามกุ้งมีศักยภาพที่สารต้านอนุมูลอิสระธรรมชาติจึงควรส่งเสริมให้มีการบริโภคสาหร่ายชนิดให้แพร่หลายมากขึ้นแต่อย่างไรก็ตามต้องเฝ้าระวังเรื่องการปนเปื้อนโลหะหนักด้วย

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติที่ได้สนับสนุนทุนการวิจัย ซึ่งงานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนงบประมาณจากโครงการวิจัยงบประมาณแผ่นดินประจำปี 2562 ของมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัยและ ดร.ณัฐฐา เสนีวาส สำหรับการยืนยันชนิดของสาหร่ายก้ามกุ้งที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้

รายการอ้างอิง (References)

Amornlerdpison, D., Peerapornpisal, Y., Taesotikul, T., Utan J., Nualchareon, M. & Kanjanapothi, D. (2008). Antioxidant activity of *Sargassum polycystum* C. Agardh. *Journal of Fisheries Technology Research*, 2(2), 96-103.

Amornlerdpison, D., Ngernjan, M., Mengumphan, K. & Junthip, R. (2015). Active Compounds and Oxidative Defense of *Cladophora* spp. in Hybrid Catfish. *KMUTT Research and Development Journal*, 33(4), 393-405.

Balboa, E.M., Conde, E., Moure, A., Falqué, E. & Domínguez, H. (2013). In vitro antioxidant properties of crude extracts and compounds from brown algae. *Food Chemistry*, 138, 1764-1785.

Borges, F.R. & Necchi, Jr. O. (2017). Taxonomy and phylogeny of *Chara* (Charophyceae, Characeae) from Brazil with emphasis on the midwest and southeast regions. *Phytotaxa*. 302(2): 101-121.

Chankaew, W., Amornlerdpison, D., Mahae N., Na Nakorn, W. & Amornwiriyachai, V. (2018). *Chara corallina* Klein ex Willdenow (Charales), A new report of edible freshwater alga in Southern Thailand. The 7 th International Conference on Integration of Science and Technology for Sustainable Development. Bali, Indonesia, November 26-29, 2018.

Chang, C., Yang, M., Wen, H. & Chern, J. (2002). Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. *Journal of Food and Drug Analysis*, 10, 178-182.

Chernane, H. (2014). Evaluation of antioxidant capacity of methanol extract and solvent fractions obtained from four Moroccan macroalgae species. *European Scientific Journal*, 10, 35-48.

Deyab, M., Elkatony, T. & Ward, F. (2016). Qualitative and quantitative analysis of phytochemical studies on brown seaweed, *Dictyota dichotoma*. *International Journal of Ecology and Development Research*, 4, 674-678.

Dinis, T.C.P., Madeira, V.M.C. & Almeda, L.M. (1994). Action of phenolic derivatives (acetaminophen, salicylate, and 5-amiosalicylate) as inhibitors of membrane lipid peroxidation and as peroxyl radical scavengers. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 315: 161-169.

Farasat, M., Khavari-Nejad, R. Nabvi, S.M.B. & Namjooyan, F. (2012). Antioxidant properties of two edible green seaweed from Northen coasts of the Persian Gulf. *Jundishapur Journal of Natural Pharmaceutical Products*, 8, 47 - 52.

Favin, K.H.S. & Jacobsen, C. (2013). Phenolic compounds and antioxidant activities of selected species of seaweed from Danish coast. *Food Chemistry*, 138, 1670-1681.

Ghazala B., Naila B., Mustafa S., Shahzad S. & Leghari, S.M. (2004). Phytochemistry and bioactivity of two stonewort algae (Charophyta) of Sindh. *Pakistan Journal of Botany*, 36(4), 733-743.

Ghazala, B. & Shameel, M. (2005). Phytochemistry and bioactivity of some freshwater green algae from Pakistan. *Pharmaceutical Biology*, 43(4), 358-369.

Gouda, S., Moharana, R.R., Das, G. & Patra, J.K. (2013). Free radical scavenging potential of extracts of *Gracilaria verrucosa* (L) (Harvey): An economically important seaweed from Chilika lake, India. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 6, 707-710.

John, D.M., Whitton, B.A. & Brook, A.J. (2002). *The freshwater algae flora of Britishiles*. Cambridge: England.

Julkunen-Tiitto, R. (1985). Phenolic constituents on the leaves of northern willows: Methods for the analysis of certain phenolics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 33(2), 213-217.

Krishnaiah, D., Sarbatly R. and Nithyanandam, R. (2011). A review of the antioxidant potential of medicinal plant species). *Food and Bioproducts Processing*. 89(1): 217-233.

Moonsin, P. & Wongklom, A. (2013). *The use of algal extract for cosmetics add value*. UBRU research report.

Pandithurai, M. & Murugesa, S. (2014). Free radical scavenging activity of methanolic extract of brown alga *Spatoglossum asperum*. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, 6(7), 128-132.

Phansuwan, B. (2013). Free radicals, Antioxidants and antioxidant activity determination. *Journal of Science and Technology*. 21(3), 275-286.

Peerapornpisal, Y., Punyoyai, T. and Amornlerdpison, D. (2012). Antioxidant and anti-inflammatory activities of *Spirogyra neglecta* (Hassall) Kützing. *KKU Science Journal*. 40. (1), 228-235.

Peerapornpisal, Y. (2013). *Freshwater algae in Thailand: Applied algae research laboratory, Microbiology Section*. Department of Biology. Faculty of Science, Chiang Mai University.

Piluzza, G. & Bullitta, S. (2011). Correlations between phenolic content and antioxidant properties in twenty-four plant species of traditional ethnoveterinary use in the Mediterranean area. *Pharmaceutical Biology*, 49(3), 240-247.

Punyoyai, T. (2008). *Antioxidant activity of Tao, Spirogyra neglecta* (Hassall) Kützing. Master's Thesis, Chiang Mai University.

Praiboon, J. & Chirapart, A. (2012). *Anti-oxidation activities of some seaweed extracts in Thailand.* Full research report, Kasetsart University.

Ramdani, M., Elasri, O., Saidi, N., Elkhiati, N., Taybi, F.A., Mostareh, M., Zaraali, O., Haloui, B. & Ramdani, M. (2017). Evaluation of antioxidant activity and total phenol content of *Gracilaria bursa-pastoris* harvested in Nador lagoon for an enhanced economic valorization. *Chemical and Biological Technologies in Agriculture*, 4(28), 1-7.

Rattanapot, T., Menhumphan, K., Srimaroeng, C., Junthip, R. & Amornlrrdpison, D. (2012). Antioxidant activity of *Spirogyra* sp. and effect of its supplementation on growth performance of Tilapia in cage culture. *Journal of Fisheries Technology Research*, 6(2), 23-43.

Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M. & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cationdecolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26, 1231–1237.

Reichardt, C.W.T. (2005). *Solvents and solvent effects in organic chemistry*. Edition T, editor. Germany.

Sanchez-Moreno, C., Larrauri, J.A. & Saura-Calixto, F. (1998). A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 76, 270-276.

Schubert, H. & Blindow, I. (2003). *Charophytes of the Baltic Sea. A.R.G.* Gantner Verlag Kommanditgesellschaft. Germany.

Sitwipusiri, A. (2015). *Diversity of stonewort (Family Characeae) in the central region of Thailand.* Thesis of Master of Science, Kasetsart University.

Shibu, A. & Dhanam, S. (2015). Phytochemical screening of *Caulerpa recemosa* collected from gulf of nanar, Tamil nadu. *Asian Journal of Biochemical and Pharmaceutical Research*, 3, 40-45.

Shimada, K., Fujikawa, K., Yahara, K. & Nakamura, T. (1992). Anti-oxidative properties of xanthome on the auto oxidation of soybean in cylcodextrin emulsion. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 40, 945-948.

Tembe, V.D. & Bhamba, R.S. (2014). Estimation of total phenol, tannin, alkaloid and flavonoid in *Hibiscus tilloaceus* Linn. wood extracts. Research and Review: *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 2, 41-47.

Yangthong, M. & Towatana, N. (2014). Total phenolic contents, DPPH radical-scavenging activities of six seaweeds from the southern coast of Thailand. *Journal of Fisheries Technology* 8, 93-104.

Yangthong, M., Towatana, N. & Thawonsuwan, J. (2015). Phenolic content and antioxidant properties of aqueous and ethanol extracts of seaweeds**.** *King Mongkut's agricultural journal*, 33(2), 73-81.

Youcharoen, R., Srisuksomwong, P. & Tragoolpua, Y. (2015). Antibacterial and antioxidant activities of *Nostoc commune* Vaucher ex Bornet & Flahault. *Science and Technology RMUTT Journal*, 5(2), 35-48.

Zaman, K.U., Shameell, S. Shameel, M. & Leghari, S.M. (1998). Bioactive compounds in *Chara corallina* var. *wallichii* (A.BR.) R.D. Wood (Charophyta). *Pakistan Journal of Botany*, 30, 19-31.