การวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดและการต้านอนุมูลอิสระในสาหร่ายน้ำจืดของจังหวัดน่าน

อัจฉราภรณ์ ผลรินทร์

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเคมีศึกษา
คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา
มิถุนายน 2560
ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยบูรพา

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์และคณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ได้พิจารณาวิทยานิพนธ์ของ อัจฉราภรณ์ ผลรินทร์ ฉบับนี้แล้ว เห็นสมควรรับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเคมีศึกษา ของมหาวิทยาลัยบูรพาได้

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์

..... อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก
(ดร. ศิริรัตน์ ชาญไววิทย์)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุภาวดี ศรีแย้ม)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธาน
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุนันทา วังกานต์)

..... กรรมการ
(ดร. ศิริรัตน์ ชาญไววิทย์)

..... กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุภาวดี ศรีแย้ม)

..... กรรมการ
(ดร. นิตยา ไชยเนตร)

คณะวิทยาศาสตร์อนุมัติให้รับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเคมีศึกษา ของมหาวิทยาลัยบูรพา

..... คณบดีคณะวิทยาศาสตร์
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. เอกรัฐ ศรีสุข)
วันที่ 12 เดือน มิถุนายน พ.ศ. 2560

การวิจัยนี้ได้รับทุนการศึกษา
โครงการส่งเสริมการผลิตครูที่มีความสามารถพิเศษทางวิทยาศาสตร์และคณิตศาสตร์
จากสถาบันส่งเสริมการสอนวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี
ระดับปริญญาโท ภาคพิเศษ ปีการศึกษา (ฤดูร้อน) 2557

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลงได้ด้วยความกรุณาจาก ดร.ศิริรัตน์ ชาญไววิทย์ อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุภาวดี ศรีแย้ม อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ที่กรุณาให้คำปรึกษาแนะนำแนวทางที่ถูกต้อง ตลอดจนแก้ไขข้อบกพร่องต่าง ๆ ด้วยความละเอียดถี่ถ้วน และเอาใจใส่ด้วยดีเสมอมา ข้าพเจ้ารู้สึกซาบซึ้งเป็นอย่างยิ่ง จึงขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ โอกาสนี้

ขอขอบพระคุณคณาจารย์ประจำภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ทุกท่าน ที่ช่วยสอนวิชาเคมีในส่วนของเนื้อหา และปฏิบัติการเคมีอย่างเข้มข้น เพื่อปลูกฝังให้ข้าพเจ้าเป็นนักวิทยาศาสตร์ และเป็นครูวิทยาศาสตร์ที่มีความรู้ในภาคทฤษฎี และภาคปฏิบัติวิชาเคมีเป็นอย่างดี

ขอขอบพระคุณโครงการส่งเสริมการผลิตครูที่มีความสามารถพิเศษทางวิทยาศาสตร์และคณิตศาสตร์ (สควค.) สถาบันส่งเสริมการสอนวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี (สสวท.) ที่ให้การสนับสนุนทุนการศึกษา และทุนในการทำวิทยานิพนธ์

ขอขอบพระคุณห้องปฏิบัติการ ศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลล้านนา จังหวัดน่าน สนับสนุนเครื่องมือวิทยาศาสตร์ในการตรวจวิเคราะห์

ขอขอบพระคุณเพื่อนนิสิตปริญญาโท สาขาเคมีศึกษาทุกท่านที่มีส่วนช่วยในการแนะนำช่วยเหลือและให้กำลังใจในการทำวิทยานิพนธ์ครั้งนี้

ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อฉลอง คุณแม่ละอองดาว ผลรินทร์ และสมาชิกในครอบครัวทุกคนที่ให้กำลังใจ และสนับสนุนข้าพเจ้าเสมอมา

คุณค่าและประโยชน์ของวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ข้าพเจ้าขอมอบเป็นกตัญญูกตเวทิตาแด่บุพการี บูรพาจารย์ และผู้มีพระคุณทุกท่านทั้งในอดีตและปัจจุบัน ที่ทำให้ข้าพเจ้าเป็นผู้มีการศึกษาและประสบความสำเร็จมาจนตราบเท่าทุกวันนี้

อัจฉราภรณ์ ผลรินทร์

57920935: สาขาวิชา: เคมีศึกษา; วท.ม. (เคมีศึกษา)
คำสำคัญ: สาหร่ายน้ำจืด/ สารประกอบฟีนอลิก/ การต้านอนุมูลอิสระ/ คลอโรฟิลล์

อัจฉราภรณ์ ผลรินทร์: การวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดและการต้านอนุมูลอิสระในสาหร่ายน้ำจืดของจังหวัดน่าน (DETERMINATION OF TOTAL PHENOLIC AND ANTIOXIDANT ACTIVITY IN FRESH WATER MACRO ALGAE FROM NAN PROVINCE) คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์: ศิริรัตน์ ชาญไววิทย์, Ph.D., สุภาวดี ศรีแย้ม, วท.ด. 71 หน้า ปี พ.ศ. 2560.

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในสารสกัดสาหร่ายน้ำจืด และปริมาณคลอโรฟิลล์ในสาหร่ายน้ำจืดสด 4 ชนิด ได้แก่ สาหร่ายไกต๊ะ (M*icrospora* sp.) สาหร่ายไกไหม (C*ladophora* sp.) สาหร่ายเตา (S*pirogyra* sp.) และสาหร่ายลอน (N*ostochopsis* sp.) ในจังหวัดน่าน โดยสกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอลบริสุทธิ์ ด้วยวิธีการสกัดสาหร่ายน้ำจืด 2 วิธีคือ วิธีการสกัดแบบแช่ และวิธีการสกัดแบบใช้เครื่องเขย่าสาร

ผลการวิจัยพบว่า การวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดด้วยวิธี Folin-Ciocalteu phenol test สารสกัดจากสาหร่ายเตามีปริมาณมากที่สุดด้วยวิธีการสกัดทั้ง 2 วิธี มีค่าเท่ากับ 179.18 ± 0.13 mgGAE/g extract ด้วยวิธีการสกัดแบบแช่ และ 204.29 ± 0.25 mgGAE/g extract ด้วยวิธีการสกัดแบบใช้เครื่องเขย่าสาร สำหรับการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH วิธี ABTS และวิธี FRAP พบว่า สารสกัดจากสาหร่ายเตามีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระสูงสุดมีค่าเท่ากับ 323.71 ± 0.72, 574.19 ± 3.88 และ 386.72 ± 1.61 mgTE/g extract ตามลำดับ และจากการศึกษาปริมาณคลอโรฟิลล์ที่มีอยู่ในสาหร่ายน้ำจืดแต่ละชนิดด้วยวิธี Spectrophotometric ด้วยตัวทำละลายอะซิโตนบริสุทธิ์ พบว่า สาหร่ายไกต๊ะมีปริมาณคลอโรฟิลล์เอ และคลอโรฟิลล์บีสูงสุดมีค่าเท่ากับ 2.31 ± 0.17 และ 1.57 ± 0.13 mg/g extract ตามลำดับ ผลการวิจัยข้างต้น สามารถนำไปใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานทางวิทยาศาสตร์ที่เป็นประโยชน์ และสามารถถ่ายทอดองค์ความรู้สู่ชุมชนให้ช่วยกันอนุรักษ์สาหร่ายในท้องถิ่น อีกทั้งตระหนักถึงคุณค่า และนำไปสู่การเพิ่มมูลค่าของผลิตภัณฑ์อาหารได้

57920935: MAJOR: CHEMICAL EDUCATION; M.Sc. (CHEMICAL EDUCATION)
KEYWORDS: FRESH WATER MACRO ALGAE/ TOTAL PHENOLIC COMPOUND/ ANTIOXIDANT ACTIVITY/ CHOLROPHYLL

ATCHARAPORN PHONRIN: DETERMINATION OF TOTAL PHENOLIC AND ANTIOXIDANT ACTIVITY IN FRESH WATER MACRO ALGAE FROM NAN PROVINCE ADVISORY COMMITEE: SIRIRAT CHANVIVIT, Ph.D., SUPAWADEE SRIYAM, Ph.D. 71 P. 2017.

The aims of this research are evaluation of total phenolic contents, antioxidant activities from ethanolic extracts and chlorophyll contents from four types of fresh macro algae i.e. Khaitha (M*icrospora* sp.), Khaimai (C*ladophora* sp.), Tao (S*pirogyra* sp.) and Lon (N*ostochopsis* sp.) in Nan province by extraction with ethanol. Maceration and orbital shaker extraction methods were compared.

Total phenolic contents were determined by Folin–Ciocalteu phenol test. The highest amount of total phenolic compound was found in Tao extract, accounting for 179.18 ± 0.13 mg GAE/g extract from maceration extraction method and 204.29 ± 0.25 mg GAE/g extract from orbital shaker extraction method. The highest antioxidant capacity was also found in Tao extract. The antioxidant capacities analyzed by DPPH ABTS and FRAP assay were 323.71 ± 0.72, 574.19 ± 3.88 and 386.72 ± 1.61 mg TE/g extract, respectively. The chlorophyll of fresh water macro algae were determined by spectrophotometric method. All samples were extracted with absolute acetone. Khaitha showed the highest content of chlorophyll-a and chlorophyll-b as followed 2.31 ± 0.17 and 1.57 ± 0.13 mg/g. extract The results from this study gave benefit basic scientific data of fresh water macro algae and it can pass on the knowledge to people for conserving their local algae. Moreover, they can realize to the increase the value added of their food products

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ..... จ

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... ฉ

สารบัญ ..... ช

สารบัญตาราง ..... ฌ

สารบัญภาพ ..... ญ

บทที่

1 บทนำ 1

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา 1

วัตถุประสงค์ของการวิจัย 2

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย 2

ขอบเขตของการวิจัย 3

2 เอกสาร และงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 4

สาหร่ายน้ำจืด 4

อนุมูลอิสระ 7

สารต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant) 8

กลไกการต้านอนุมูลอิสระ 15

วิธีการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเชิงปริมาณ 16

งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 20

3 วิธีดำเนินการวิจัย 24

เครื่องมือและวัสดุอุปกรณ์ 24

สารเคมี 25

วิธีดำเนินการวิจัย 25

วิธีการสกัดสาหร่ายน้ำจืด 27

การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด

(Total Phenolic Content ; TPC) 27

การวิเคราะห์การต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดสาหร่ายน้ำจืดสด 29

การวิเคราะห์ปริมาณคลอโรฟิลล์ 31

สารบัญ (ต่อ)

บทที่	หน้า
การวิเคราะห์ผลทางสถิติ	31
4 ผลการวิจัย	32
ผลการศึกษาร้อยละผลผลิตที่ได้จากการสกัดสาหร่าย	32
ผลการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (Total phenolic compound)	32
ผลการวิเคราะห์การต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดสาหร่ายน้ำจืด	32
ผลการวิเคราะห์ปริมาณคลอโรฟิลล์ในสาหร่ายน้ำจืดทั้ง 4 ชนิด	35
5 อภิปรายและสรุปผลการทดลอง	36
อภิปรายผลการทดลอง	36
สรุปผลการทดลอง	41
บรรณานุกรม	43
ภาคผนวก	47
ภาคผนวก ก	48
ภาคผนวก ข	51
ภาคผนวก ค	53
ภาคผนวก ง	58
ภาคผนวก จ	60
ประวัติย่อของผู้วิจัย	71

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

2-1 คุณค่าทางโภชนาการของสาหร่ายไก 6

2-2 รงควัตถุที่ใช้ในการสังเคราะห์แสง 13

4-1 ร้อยละผลผลิตที่ได้จากการสกัดด้วยวิธีการสกัดแบบแช่ตัวอย่างในเอทานอลและ
วิธีการสกัดด้วยเครื่องเขย่าสาร 32

4-2 ผลการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (TPC) ของสารสกัดสาหร่ายน้ำจืด 33

4-3 ผลการวิเคราะห์การต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดสาหร่ายน้ำจืด 34

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
2-1	สูตรโครงสร้างของสารประกอบฟีนอลิก	10
2-2	ช่วงการดูดกลืนแสงของคลอโรฟิลล์	11
2-3	โครงสร้างของคลอโรฟิลล์	12
2-4	โครงสร้างสารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์	15
2-5	กลไกการต้านอนุมูลอิสระของสารประกอบฟีนอลิก	16
2-6	ปฏิกิริยาของ 2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical (DPPH radical)	17
2-7	ปฏิกิริยาของ 2, 2-Azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt (ABTS radical)	18
2-8	ปฏิกิริยาของ FRAP assay	19
3-1	ตัวอย่างสาหร่ายน้ำจืด กลุ่มสาหร่ายสีเขียว (Chlorophyta)	26
3-2	ตัวอย่างสาหร่ายน้ำจืด กลุ่มสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน (Cyanophyta) สาหร่ายลอน (Nostochopsis sp.)	26

บทที่ 1
บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

สาหร่ายเป็นผู้ผลิตของระบบนิเวศในน้ำ ความสามารถในการเจริญเติบโตของสาหร่ายแต่ละชนิดมีความแตกต่างกันและเกี่ยวข้องกับปัจจัยทางกายภาพหลายประการที่สำคัญคือ แสง ปริมาณสารประกอบของคาร์บอน และสารอาหารอื่น ๆ ในน้ำ ในธรรมชาติซึ่งมีสภาพแวดล้อมที่เปลี่ยนแปลงอยู่ตลอดเวลา สาหร่ายน้ำจืด (Fresh water macro algae) จึงเป็นดัชนีชี้วัดคุณภาพของน้ำ โดยสาหร่ายจะเป็นตัวเพิ่มปริมาณออกซิเจนให้แก่แม่น้ำน่าน สามารถพบสาหร่ายน้ำจืดในแม่น้ำน่าน ตั้งแต่ต้นน้ำน่านอำเภอทุ่งช้างไปจนถึงอำเภอเวียงสา สาหร่ายน้ำจืดที่พบเป็นกลุ่มสาหร่ายสีเขียวได้แก่ สาหร่ายไก และสาหร่ายเตา ส่วนสาหร่ายลอน จัดอยู่ในกลุ่มสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน สาหร่ายน้ำจืดเหล่านี้นิยมนำมารับประทานเป็นอาหารพื้นเมือง ปัจจุบันนิยมแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์ ขนม หรือของหวาน

สาหร่ายไก จะขึ้นตามธรรมชาติ อยู่บนก้อนหินในแม่น้ำน่านมีสีเขียวสด ลักษณะเป็นเส้นยาวความยาว 1-2 เมตร มักจะอยู่ลึกใต้ท้องน้ำลงไป 30-50 ซม.อยู่ในสภาพน้ำที่ใสสะอาด และมีน้ำไหลเอื่อย ๆ จะพบมากที่สุดที่อำเภอท่าวังผา ในช่วงฤดูหนาวตั้งแต่เดือนตุลาคมถึงเดือนเมษายน สาหร่ายไกอยู่ใน Division Chlorophyta สามารถแบ่งประเภทได้ 2 ชนิดคือ 1) สาหร่ายไกต๊ะมีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Microspora* sp. ลักษณะเป็นกระจุกอยู่ปนกับไกไหม ลักษณะเส้นจะสั้นและลื่นมากเป็นเส้นสายที่หยาบกว่าสาหร่ายไกไหม 2) สาหร่ายไกไหมหรือไกเปื้อย มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Cladophora* sp. ลักษณะจะเกาะอยู่กับหินเป็นกระจุกแล้วจึงกระจายแผ่ออกเป็นฝอยจำนวนมาก ลักษณะเส้นจะเหนียวและลื่น มีสีเขียวซีด มีความยาวประมาณ 80 เซนติเมตร เส้นสายยาวและอ่อนนุ่มคล้ายเส้นไหม ชาวบ้านนิยมนำสาหร่ายไกทั้ง 2 ชนิดมาปรุงอาหาร เช่น แกงไกห่อนึ่งไก ไกยี รวมถึงแปรรูปเป็นขนมหวาน หรือของคบเคี้ยวที่ขายเป็นผลิตภัณฑ์ชุมชนหรือ OTOP เช่น ทองม้วนไก ข้าวเกรียบไก และสาหร่ายไกอบกรอบปรุงรส เป็นต้น

สาหร่ายเตา จัดอยู่ใน Division Chlorophyta มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Spirogyra* sp. พบมากในฤดูฝน บริเวณน้ำนิ่งใสสะอาด ลักษณะของสาหร่ายชนิดนี้จะเป็นเส้นสายยาว ไม่แตกแขนง คล้ายเส้นผมสีเขียวสด จับดูจะรู้สึกลื่นมือ เนื่องจากมีเมือกหุ้มอยู่ภายนอก เซลล์จะมีรูปร่างเป็นรูปทรงกระบอก มักเกิดรวมกันเป็นกลุ่ม อาจอยู่ที่ก้นบ่อ หรืออาจจะลอยอยู่บริเวณผิวน้ำ ชาวบ้านนิยมนำสาหร่ายเตามาปรุงเป็นอาหารพื้นเมืองที่รับประทานแบบสดคือ ตำเตา นอกจากนั้นยังมี

การแปรรูปเป็นข้าวเกรียบเตา นอกจากนี้เตาสามารถนำไปใช้เพื่อรักษาแผลจากโรคมะเร็งไข่ปลา ไม่ให้ปวดแสบปวดร้อน มีสรรพคุณลดน้ำตาลในเลือดได้ (พรรณพิมล สุริยะพรหมชัย, 2556)

สาหร่ายลอนมีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Nostochopsis* sp. อยู่ใน Division Cyanophyta เป็นสาหร่ายน้ำจืดสีเขียวแกมน้ำเงินขนาดใหญ่ มีลักษณะเป็นก้อนเมือกลื่นมือคล้ายวุ้น รูปร่างไม่แน่นอน มีสีเขียวอ่อนถึงสีเขียวเข้ม หรือมีสีเหลืองถึงน้ำตาลพบในแหล่งน้ำไหลโดยเกาะบนก้อนหิน ชาวจังหวัดน่านนิยมนำมาทำเป็นขนมลอน หรือนำมาทำเป็นของหวานที่มีสรรพคุณแก้ร้อนใน (ยุวดี พีรพรพิศาล และคณะ, 2552) ในปัจจุบันสาหร่ายน้ำจืดที่ทรงคุณค่าที่อยู่กับชาวจังหวัดน่านมานานนับร้อยปี เป็นที่รู้จักน้อยลง เนื่องด้วยสภาพแวดล้อมที่เปลี่ยนแปลงไปทำให้สาหร่ายน้ำจืดมีปริมาณน้อยและหาได้ยากกว่าในอดีต จากข้อมูลข้างต้น สาหร่ายน้ำจืดมีคุณสมบัติทางยาต่าง ๆ มากมาย

ดังนั้นผู้วิจัยจึงมีความสนใจที่จะทำการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสาหร่ายน้ำจืดแบบสดในจังหวัดน่าน ซึ่งยังไม่พบการรายงานผลการวิเคราะห์สาหร่ายน้ำจืดแบบสดของจังหวัดน่าน เพื่อให้ได้เป็นข้อมูลทางวิทยาศาสตร์ในด้านฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเพื่อที่จะนำไปเป็นแนวทางให้ความรู้ และสร้างความตระหนักถึงคุณค่า และเป็นข้อมูลถ่ายทอดองค์ความรู้สู่ชุมชนให้บริโภคสาหร่ายน้ำจืดในท้องถิ่นมากยิ่งขึ้น

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อศึกษาวิธีการสกัดสารออกฤทธิ์ในสาหร่ายน้ำจืดที่เหมาะสม
2. เพื่อวิเคราะห์หาปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดในสารสกัดสาหร่ายน้ำจืดในจังหวัดน่าน
3. เพื่อศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในสารสกัดสาหร่ายน้ำจืดแต่ละชนิด
4. เพื่อวิเคราะห์หาปริมาณคลอโรฟิลล์ที่มีอยู่ในสาหร่ายน้ำจืดแต่ละชนิด

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย

1. ทำให้ทราบถึงวิธีการสกัดสารออกฤทธิ์ในสาหร่ายน้ำจืดที่เหมาะสม
2. ทำให้ทราบถึงปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดที่มีอยู่ในสารสกัดสาหร่ายน้ำจืดสด
3. ทำให้ทราบถึงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH, ABTS และ FRAP ของสารสกัดสาหร่ายน้ำจืดสดแต่ละชนิด
4. ทำให้ทราบถึงปริมาณคลอโรฟิลล์ที่มีอยู่ในสาหร่ายน้ำจืดสด

5. เป็นข้อมูลพื้นฐานทางวิทยาศาสตร์ เพื่อให้ทราบถึงประโยชน์ในการนำสาหร่ายสดมาบริโภค

6. ให้ความรู้แก่ประชาชน ถ่ายทอดองค์ความรู้สู่ชุมชนให้ช่วยกันอนุรักษ์สาหร่ายในท้องถิ่น ตระหนักถึงคุณค่าและนำไปสู่การเพิ่มมูลค่าของผลิตภัณฑ์อาหาร

ขอบเขตของการวิจัย

1. สาหร่ายน้ำจืด 4 ชนิด (ยุวดี พีรพรพิศาล และคณะ, 2552) ที่ได้จากแม่น้ำน่านของจังหวัดน่าน ได้แก่

สาหร่ายไกต๊ะ (M*icrospora* sp.) เก็บในเดือนธันวาคม 2558

สาหร่ายไกไหม (C*ladophora* sp.) เก็บในเดือนกุมภาพันธ์ 2559

สาหร่ายเตา (S*pirogyra* sp.) เก็บในเดือนธันวาคม 2558

สาหร่ายลอน (N*ostochopsis* sp.) เก็บในเดือนมีนาคม 2559

2. สกัดสาหร่ายสดแต่ละชนิดตามวิธีการสกัดสารด้วยวิธีการแช่ และวิธีการใช้เครื่องเขย่าสารในตัวทำละลายเอทานอลบริสุทธิ์

3. นำสารสกัดสาหร่ายแต่ละชนิดวิเคราะห์หาปริมาณสารดังต่อไปนี้

3.1 วิเคราะห์หาปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดในสารสกัดสาหร่ายน้ำจืดแต่ละชนิดด้วยวิธี Folin-Ciocalteu phenol test

3.2 วิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH ABTS และ FRAP ในสารสกัดสาหร่ายน้ำจืดแต่ละชนิด

3.3 วิเคราะห์หาปริมาณคลอโรฟิลล์ที่มีอยู่ในสาหร่ายน้ำจืดแต่ละชนิดด้วยวิธี Spectrophotometric

บทที่ 2
เอกสาร และงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

สาหร่ายน้ำจืด

สาหร่ายน้ำจืดขนาดใหญ่เป็นทรัพยากรในน้ำที่สำคัญอีกประเภทหนึ่งทั้งเป็นผู้ผลิตออกซิเจนให้กับแหล่งน้ำและเป็นผู้ผลิตให้แก่สิ่งมีชีวิตในน้ำ มนุษย์นำสาหร่ายน้ำจืดมาใช้ประโยชน์ในแง่การเป็นอาหารและยารักษาโรคต่าง ๆ มากมาย โดยนำมาประกอบอาหารทั้งสดและแห้งขึ้นอยู่กับชนิดของสาหร่าย สาหร่ายที่ชาวบ้านนิยมนำมารับประทานได้แก่ สาหร่ายเตา สาหร่ายไก และสาหร่ายลอน จากภูมิปัญญาท้องถิ่นเชื่อกันว่าสาหร่ายไกและสาหร่ายลอนซึ่งเป็นสาหร่ายประจำถิ่นในแม่น้ำน่าน จังหวัดน่าน และแม่น้ำโขง อำเภอเชียงของ จังหวัดเชียงราย สามารถนำมาใช้เพื่อบรรเทาโรคบางชนิดได้ เช่น โรคเกี่ยวกับระบบทางเดินอาหาร โรคผิวหนัง และทำให้สุขภาพแข็งแรง เป็นต้น ส่วนสาหร่ายเตาชาวบ้านเชื่อว่าช่วยป้องกันการเกิดแผลในกระเพาะอาหารได้

สาหร่ายเตาหรือเทาน้ำ มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Spirogyra* sp. อยู่ใน Division Chlorophyta เป็นสาหร่ายน้ำจืดที่คนทั่วไปรู้จักกันมากที่สุด มักเกิดรวมกันเป็นกลุ่ม ในน้ำที่นิ่งและสะอาด อาจอยู่ก้นบ่อกับก้อนดิน ก้อนหิน หรืออาจจะลอยอยู่บริเวณผิวน้ำ ลักษณะของสาหร่ายชนิดนี้จะเป็นเส้นสายคล้ายเส้นผมไม่แตกแขนง เมื่อจับรู้สึกลื่นมือเนื่องจากมีเมือกหุ้ม มีสีเขียว เซลล์รูปทรงกระบอกยาวซึ่งมีขนาดตั้งแต่ความยาวเท่าความกว้างจนกระทั่งความยาวมากกว่าความกว้างหลายเท่า จีนัสนี้มีประมาณ 290 ชนิด แต่ละชนิดมีความแตกต่างกันตามขนาด (ยุวดี พีรพรพิศาล, 2552; พิพัฒน์ ชนาเทพาพร และณัฐรินทร์ ศิริรัตนนันท์, 2557)

สาหร่ายไกมีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Cladophora* sp. และ *Microspora* sp. เป็นสาหร่ายน้ำจืดสีเขียวขนาดใหญ่ อยู่ใน Division Chlorophyta ชื่อพื้นเมืองมีหลายชื่อได้แก่ ไกเหนียว ไกค้าง ไกเปื้อย ไกไหม ไกต๊ะ สาหร่ายไคร ไกค่าว เป็นต้น ลักษณะเป็นเส้นสายขนาดใหญ่บางชนิดแตกแขนงบางชนิดไม่แตกแขนงมองเห็นด้วยตาเปล่าสีเขียวสดใส พบว่ากระจายทั่วไป โดยเฉพาะบริเวณพื้นท้องน้ำที่แสงส่องถึงมีและมีกระแสน้ำไหลไม่แรงนัก จัดเป็นพืชชั้นต่ำที่มีคลอโรฟิลล์จึงสามารถสังเคราะห์แสงสร้างอาหารได้เอง โดยน้ำจะต้องใสสะอาดมีคุณภาพดี สาหร่ายไกจึงจะเจริญเติบโตโดยสาหร่ายไกจะยึดเกาะบนก้อนหินหรือสิ่งยึดเกาะอื่น ๆ จะไม่พบสาหร่ายไกในน้ำที่สกปรก ชาวบ้านนิยมนำสาหร่ายไกมาเป็นอาหารในครัวเรือน โดยนำมาทำไกยี และไกแผ่นปรุงรส (ยุวดี พีรพรพิศาล และคณะ, 2552)

สาหร่ายไกเมื่อเปียกน้ำจะมีลักษณะนุ่มมือและเมื่อบีบน้ำออกหรือทำให้สะเด็ดน้ำจะรู้สึกสากมือนิด ๆ มีลักษณะเป็นเส้นใยสายยาวที่แตกแขนงได้มองดูคล้ายเส้นผมคนเราหรือรากฝอยของพืช ในประเทศไทยจะพบสาหร่ายชนิดนี้ใน 2 แหล่งคือแม่น้ำน่าน จังหวัดน่าน และแม่น้ำโขง บริเวณอำเภอเชียงของ จังหวัดเชียงราย สำหรับจังหวัดน่านจะพบสาหร่ายชนิดนี้ขึ้นเจริญเติบโตเป็นแผงเต็มพื้นที่ในลำน้ำน่าน แต่จะมีมากน้อยขึ้นอยู่กับสิ่งยึดเกาะที่สาหร่ายจะเจริญได้ คือก้อนหินขนาดใหญ่เล็ก มีน้ำใสไหลตลอด โดยมีความลึกประมาณ 30-50 เซนติเมตร ในน้ำขุ่นหรือพื้นท้องน้ำเป็นดินทรายจะไม่พบสาหร่ายไก ซึ่งสาหร่ายไกไม่ได้เจริญทั้งปีแต่จะเจริญในช่วงฤดูแล้ง คือ ฤดูหนาวต่อกับต้นฤดูร้อนในช่วงเดือนพฤศจิกายน ถึง เมษายน เมื่อมีฝนตกลงมาน้ำในลำน้ำจะขุ่น สาหร่ายเหล่านี้ไม่สามารถสังเคราะห์แสงได้จะทยอยตายไปจนหมด ชาวบ้านจะรอให้สาหร่ายเจริญเต็มที่ ซึ่งจะมีขนาดยาวมากตั้งแต่ครึ่งเมตรไปจนถึง 4-5 เมตร เรียกการเก็บสาหร่ายไกว่า “จกไก” ซึ่งคือ การดึงสาหร่ายที่มีขนาดยาวพอเหมาะออกจากก้อนหินแล้วส่ายไปมา ในน้ำให้ดินหรือสิ่งที่เกาะมาหลุดออกไปพาดไว้บนท่อนแขนสะสมไปเรื่อย ๆ จนมากพอก็จะม้วนให้ เป็นกลุ่มก้อนนำไปตากหรือแปรรูปเป็นอาหารชนิดต่าง ๆ ต่อไป (ชรินรัตน์ อุดเมืองคำ, 2552) ชาวจังหวัดน่านเชื่อว่าสาหร่ายไกมีคุณสมบัติทั้งด้านโภชนาการและเป็นยาอายุวัฒนะ สามารถรักษาโรคต่าง ๆ เช่น โรคมะเร็ง ระบายความร้อน ดับกระหาย รักษาแผลสด อีกทั้งทำให้ร่างกายกระชุ่มกระชวย ชะลอความแก่ ผมดกดำ ด้วยคุณประโยชน์มากมายของสาหร่ายไกทำให้เกิดภูมิปัญญาชาวน่านนำมาทำเป็นอาหารพื้นเมืองจากสาหร่ายชนิดนี้ คือ “ไกยี” ที่เป็นการแปรรูปสาหร่ายให้เก็บไว้รับประมานได้นานหลายเดือนและ “ห่อนึ่งไก” ที่มีลักษณะคล้ายกับห่อหมก ในปัจจุบันได้แปรรูปสาหร่ายไกให้เป็นสาหร่ายแผ่นกรอบปรุงรส ข้าวเกรียบไก ขนมปังไก เส้นบะหมี่ไก หมูยอสาหร่ายไก ลูกชิ้นหมู สาหร่ายไก น้ำพริกสาหร่ายไก เยลลี่ไก เป็นต้น ซึ่งผลิตภัณฑ์ทุกอย่างของสาหร่ายไกได้จำหน่ายภายในชุมชน ตัวเมือง ภายในจังหวัดน่าน (ปริญญา มูลสิน และอมรรัตน์ วงษ์กลม, 2556)

ชรินรัตน์ อุดเมืองคำ (2552) ได้รายงานผลการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับสาหร่ายไก เพื่อนำมาประกอบอาหารในประเทศไทย เช่น ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ได้รับทุนการวิจัยจากสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัยให้ทำการศึกษาศักยภาพของสาหร่ายขนาดใหญ่ในการนำมาเป็นอาหารและยาโดยทำการศึกษาสาหร่ายไกในแม่น้ำน่านเป็นระยะเวลา 3 ปีตั้งแต่ปี พ.ศ. 2545-2548 และที่สำคัญยิ่งคือการแปรรูปเพื่อเป็นอาหารได้มากกว่าในปัจจุบัน สามารถเก็บไว้ได้นานโดยคุณภาพไม่เปลี่ยนแปลงและสามารถจำหน่ายได้กว้างขวางทั้งในประเทศและต่างประเทศโดยมี จุดประสงค์ให้เป็นผลิตภัณฑ์ที่สามารถจำหน่ายได้อย่างยั่งยืนและมั่นคง รวมทั้งพัฒนาไกยี ซึ่งเป็นภูมิปัญญาดั้งเดิมของชุมชนอยู่แล้วให้มีคุณภาพดียิ่งขึ้นโดยเฉพาะความเหม็นหืนซึ่งไม่ควรจะมีอยู่ในผลิตภัณฑ์ ด้านคุณค่าทางโภชนาการของสาหร่ายไก พบว่า

สาหร่ายไกมีโปรตีน กากใยอาหาร ไขมัน วิตามิน และเกลือแร่ นอกจากนี้สาหร่ายไกยังมีซีลีเนียม ซึ่งเป็นเกลือแร่ที่สามารถต้านการเกิดอนุมูลอิสระในปริมาณที่สูงมากอีกด้วย คุณค่าทางโภชนาการของสาหร่ายไกจากแม่น้ำน่านได้แสดงไว้ในตารางดังนี้

ตารางที่ 2-1 คุณค่าทางโภชนาการของสาหร่ายไก

สารอาหารพื้นฐาน	**ปริมาณ (กรัม/ 100 กรัม น้ำหนักแห้ง)**
ความชื้น	6.61
ไขมัน	3.12
โปรตีน (Nx6.25)	19.30
กาก (ใยอาหาร)	21.90
คาร์โบไฮเดรต (โดยการคำนวณ)	30.34
วิตามิน (ไมโครกรัม/ 100 กรัม น้ำหนักแห้ง)	
วิตามินเอ	ไม่พบ
วิตามินซี (มิลลิกรัม/ 100 กรัม น้ำหนักแห้ง)	6.78
วิตามินบี 1	169.5
วิตามินบี 2	541.1
เกลือแร่ (มิลลิกรัม/ 100 กรัม น้ำหนักแห้ง)	
แคลเซียม	943.9
โซเดียม	716.9
แมกนีเซียม	170.5
เหล็ก	162.0
ซีลีเนียม (ไมโครกรัม/ 100 กรัม น้ำหนักแห้ง)	460.4

สาหร่ายลอน มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Nostochopsis* sp. อยู่ใน Division Cyanophyta จัดอยู่ในกลุ่มสาหร่ายน้ำจืดสีเขียวแกมน้ำเงินขนาดใหญ่ มีลักษณะกลุ่มเซลล์เป็นก้อนเมือก ลื่นมือคล้ายวุ้น มีรูปร่างไม่แน่นอน สีเขียวอ่อน สีเขียวเข้ม หรือสีน้ำตาล ภายในมีเส้นสายจำนวนมากฝังอยู่เส้นสายตรงหรือโค้งงอ แตกแขนง ไม่เป็นระเบียบ บางแขนงสั้น บางแขนงยาว เมื่อยังอ่อนอยู่จะเป็นก้อนตัน เมื่อโตขึ้นตรงกลางจะกลวง สามารถพบในแหล่งน้ำไหลโดยเกาะบนก้อนหิน จากผลการวิเคราะห์คุณค่าทางอาหารของสาหร่ายลอนจากแหล่งน้ำต่าง ๆ ในประเทศไทยพบว่า

สาหร่ายลอนปริมาณ 100 กรัมประกอบด้วยโปรตีน 20.26-43.53 เปอร์เซ็นต์ ไขมัน 0.00-1.56 เปอร์เซ็นต์ ใยอาหาร 2.70-43.00 เปอร์เซ็นต์ วิตามินต่าง ๆ ได้แก่ วิตามินเอ บีหนึ่ง บีสอง และแร่ธาตุ เช่น แคลเซียม ซึ่งมีปริมาณสูงมากในสาหร่ายลอน ยังประกอบด้วยกรดอะมิโนที่จำเป็นต่อร่างกาย เช่น เมไทโอนีน ไลซีน โพรลีน ซีรีน ไทโรซีน และอะลานีน และไม่พบจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรค ไม่มีการปนเปื้อนของโลหะหนักที่เป็นอันตรายต่อสุขภาพ (ยุวดี พีรพรพิศาล และคณะ, 2552) เมื่อนำสาหร่ายลอนมาล้างน้ำให้สะอาดแล้วใส่น้ำหวานและน้ำแข็งลงไป เพื่อเป็นอาหารหวาน และยังเป็นยาแก้ร้อนในอีกด้วย (พิพัฒน์ ชนาเทพาพร และณัฐรินทร์ ศิริรัตนนันท์, 2557)

อนุมูลอิสระ

อนุมูลอิสระ (Free radical) คือ โมเลกุล หรือไอออนที่มีอิเล็กตรอนโดดเดี่ยวอยู่รอบนอก และมีอายุสั้นมาก เป็นโมเลกุลที่ไม่เสถียร และว่องไวต่อการเกิดปฏิกิริยาเคมี มีบทบาทสำคัญทางชีวเคมี คือทำให้เกิดกระบวนการทางเคมีหลายอย่างในสิ่งมีชีวิต โมเลกุลหรือไอออนชนิดนี้เป็นตัวก่อให้เกิดปฏิกิริยาลูกโซ่ พบได้ในสิ่งมีชีวิตและในเซลล์ ยกตัวอย่างเช่น superoxide anion radical ($O_2^{\bullet}$) hydroxyl radical ($HO^{\bullet}$) และ peroxide radical ($ROO^{\bullet}$) เป็นต้น อนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นแบ่งได้เป็น 2 ประเภท ดังนี้

1. อนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นภายในร่างกาย ซึ่งเกิดจากกระบวนการเมตาบอลิซึมโดยมีการเคลื่อนย้ายอิเล็กตรอนออกจากโมเลกุลของออกซิเจนทำให้อิเล็กตรอนในโมเลกุลออกซิเจนไม่สมดุลกลายเป็นอนุมูลอิสระและว่องไวในการเข้าทำปฏิกิริยามาก และสามารถดึงอิเล็กตรอนจากโมเลกุลอื่นมาแทนที่อิเล็กตรอนที่ขาดหายไปเพื่อให้ตัวเองเกิดความสมดุลหรือเสถียร นอกจากนี้อนุมูลอิสระสามารถทำลายสารชีวโมเลกุลเช่น ลิพิด โปรตีน เอนไซม์ คาร์โบไฮเดรต ฯลฯ จึงทำให้เกิดโรคต่าง ๆ มากมาย (บุหรัน พันธุ์สวรรค์, 2556)

2. อนุมูลอิสระที่มาจากสิ่งแวดล้อมภายนอก ได้แก่ สารเคมีและสิ่งปนเปื้อนที่มากับอากาศที่เราหายใจเข้าไป สารเติมแต่งอาหาร สีผสมอาหาร สารเคมีปนเปื้อนในอาหาร สารกันบูดหรือสารเคมีต่าง ๆ ที่ใช้ ในการเกษตร ส่วนใหญ่ในร่างกายจะมีอนุมูลอิสระอยู่แล้ว และร่างกายสามารถกำจัดออกได้ แต่หากร่างกายได้รับสารอนุมูลอิสระจากภายนอก (กันยารัตน์ สาคร, 2556) อนุมูลอิสระถูกสร้างขึ้นมาจากกระบวนการเมตาบอลิซึมของร่างกายและในภาวะที่ผิดปกติ เช่น ภาวะของโรคหรือภาวะที่ร่างกายแวดล้อมด้วยมลพิษจะส่งผลให้ร่างกายเกิดการสะสมของอนุมูลอิสระเพิ่มมากขึ้น ดังนั้นจำเป็นที่ร่างกายต้องหาทางป้องกัน สิ่งที่ร่างกายสร้างขึ้นเพื่อปกป้องตัวเองคือระบบต้านอนุมูลอิสระ ซึ่งประกอบไปด้วยสารหรือเอนไซม์ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ สามารถ

ชะลอหรือป้องกันปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารที่ไวต่อการเกิดปฏิกิริยา แต่ในบางภาวะที่มีปริมาณอนุมูลอิสระมากเกินกว่าที่ระบบต้านอนุมูลอิสระจะรับได้จะเกิดภาวะที่เรียกว่า oxidative stress ซึ่งจะส่งผลกระทบต่อเซลล์สิ่งมีชีวิตทำให้เกิดโรค

ด้วยเหตุนี้มนุษย์จึงจำเป็นต้องรับประทานอาหารที่เป็นแหล่งของสารต้านออกซิเดชันจากธรรมชาติสามารถพบได้ในพืชและสัตว์ ได้แก่ วิตามิน เอ วิตามิน ซี วิตามิน อี เอนไซม์ สารสกัดจากพืชที่มีสารประกอบฟีนอลิกที่ทำหน้าที่เป็นตัวกำจัดอนุมูลอิสระโดยอาศัยหลักพื้นฐานคือ

1. ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ สารตั้งต้นก็จะสามารถถูกชะลอ หรือสามารถป้องกันการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารที่ไวต่อการเกิดปฏิกิริยาได้

2. อนุมูลอิสระที่ถูกกำจัดออกไปแล้วจะต้องมีความเสถียร (Stable) (รัชฎาพร อุ่นศิวิไลย์, จิราวรรณ อุ่นเมตตาอาร และจิตรา สิงห์ทอง, 2554)

สารต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant)

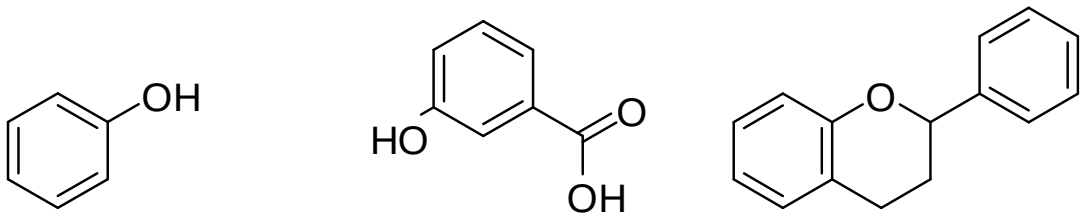
สารต้านอนุมูลอิสระ คือโมเลกุลของสารที่สามารถจับกับตัวรับและสามารถยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชันของโมเลกุลสารอื่น ๆ ได้ (กันยารัตน์ สาคร, 2556) โดยทั่วไปสารต้านอนุมูลอิสระสามารถพบได้ในธรรมชาติจากสารหลายชนิด เช่น สารประกอบฟีนอลิก (Phenolic compounds) สารประกอบไนโตรเจน (Nitrogen compounds) และแคโรทีนอยด์ (Carotenoid) กลูตาไธโอนเอนไซม์ วิตามินซี และวิตามินอี ฯลฯ ซึ่งบทบาทสำคัญของสารต้านอนุมูลอิสระคือป้องกันการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันในร่างกาย สารเหล่านี้มีกลไกในการต้านอนุมูลอิสระหลายแบบ เช่นดักจับ (Scavenge) อนุมูลอิสระโดยตรง ยับยั้งการสร้างอนุมูลอิสระหรือเข้าจับ (Chelate) กับโลหะเพื่อป้องกันการสร้างอนุมูลอิสระ ซึ่งเป็นสาเหตุของการเกิดโรคต่าง ๆ ของมนุษย์ ป้องกันการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมันที่เป็นสาเหตุหลักของการเสื่อมคุณภาพในอาหาร ทำให้อาหารมีกลิ่น สี และรสชาติเปลี่ยนแปลงไป (บุหรัน พันธุ์สวรรค์, 2556) ปัจจุบันองค์กรที่เกี่ยวข้องในอุตสาหกรรมอาหารและยาได้พัฒนาสารต้านอนุมูลอิสระที่มาจากธรรมชาติ เช่นสาหร่ายทะเล แบคทีเรีย เชื้อราและพืชชั้นสูง (เจนจิรา จิรัมย์ และประสงค์ สีหานาม, 2554) ในร่างกายของคนเราสามารถรับสารต้านอนุมูลอิสระได้จาก 2 แหล่งคือเกิดจากร่างกายสร้างเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระขึ้นมาควบคุมปริมาณอนุมูลอิสระให้อยู่ในภาวะที่สมดุลและแหล่งที่สองคือ การรับประทานสารต้านอนุมูลอิสระเข้าไปจำพวกวิตามิน เบต้าแคโรทีน แคโรทีนอยด์ และมีแร่ธาตุบางชนิด เช่น เซเลเนียม และสังกะสีเป็นสารที่ช่วยปฏิกิริยาของเอนไซม์ซึ่งทำหน้าที่กำจัดอนุมูลอิสระด้วย รวมทั้งสารประกอบฟีนอลิกซึ่งเป็นพฤษเคมีที่สามารถพบได้ในพืช ผักและผลไม้เพื่อช่วยเสริมสร้างระบบการต่อต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันในร่างกายให้มีประสิทธิภาพในการทำลาย

อนุมูลอิสระได้ดียิ่งขึ้น ตัวอย่างสารต้านอนุมูลอิสระที่พบในร่างกาย เช่น glutathione peroxidase (GPX), glutathione reductase และ glutathione transferase ซึ่งทำหน้าที่ทำให้โมเลกุลของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) เป็นออกซิเจน และน้ำ ส่วนเอนไซม์ superoxide dismutase (SOD) สามารถเปลี่ยน O_2 เป็น H_2O_2 หรือสารประกอบโปรตีนบางอย่างเช่น อัลบูมิน (Albumin) บิลิรูบิน (Bilirubin) เซอรูโลพลาสมิน (Ceruloplasmin) กลูตาไธโอน (Glutathione) ทรานสเฟอริน (Transferrin) ยูบิควินอล (Ubiquinol) และยูเรต (Urate) เป็นต้น สารเหล่านี้มีหน้าที่คอยควบคุมอนุมูลอิสระต่าง ๆ ให้อยู่ในระดับพอเหมาะ แต่ถ้าเมื่อใดที่มีอนุมูลอิสระเกิดขึ้นในปริมาณมากเกินกว่าที่ระบบป้องกันจะยับยั้งได้หมด อนุมูลอิสระจะทำอันตรายต่ออวัยวะและเนื้อเยื่อต่าง ๆ ของร่างกาย ซึ่งถ้าสะสมมาก ๆ อาจนำไปสู่ความผิดปกติหรือพยาธิสภาพหลายอย่าง (เจนจิรา จิรัมย์ และประสงค์ สีหานาม, 2554)

1. สารต้านอนุมูลอิสระที่มีอยู่ในธรรมชาติ

1.1 สารประกอบฟีนอกลิก

สารประกอบฟีนอลิกจัดเป็นสารต้านอนุมูลที่ได้รับจากภายนอกและพบได้มากในธรรมชาติจัดเป็นส่วนประกอบหลักของเมตาบอไลท์ทุติยภูมิ (Secondary metabolites) ในพืช ได้แก่ พืชผัก ผลไม้ ชาเขียว ชาดำ ช็อกโกแลต และไวน์แดง ฯลฯ เป็นต้น ในปัจจุบันพบสารประกอบฟีนอลิกมากกว่า 8,000 ชนิด ตั้งแต่โมเลกุลอย่างง่ายเช่น กรดฟีนอลิก ฟีนิลโปรพานอยด์ และฟลาโวนอยด์ไปจนถึงโครงสร้างพอลิเมอร์ที่ซับซ้อนเช่น ลิกนิน เมลานิน และแทนนิน เป็นต้น แม้ว่าปริมาณสารกลุ่มฟีนอลิกในธรรมชาติจะมีปริมาณที่แตกต่างกัน แต่พบว่า ปริมาณโดยเฉลี่ยที่คนได้รับต่อวันจะอยู่ในช่วงตั้งแต่ 20 มิลลิกรัมถึง 1,000 มิลลิกรัม สารประกอบฟีนอลิกมีบทบาทสำคัญเนื่องจากมีฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย ต้านไวรัส ต้านการอักเสบ ต้านการแพ้ มีคุณสมบัติในการสลายลิ่มเลือด ต้านสารก่อมะเร็ง ปกป้องหรือการชะลอความชรา และสามารถลดความดันโลหิตในการสลายลิ่มเลือด เป็นต้น (กันยารัตน์ สาคร, 2556) ซึ่งคุณสมบัติดังกล่าวนี้มีความสัมพันธ์กับคุณสมบัติการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ โครงสร้างทั่วไปของสารประกอบฟีนอลิกประกอบด้วยโครงสร้างที่เป็นวงอะโรมาติกและมีหมู่แทนที่เป็นหมู่ไฮดรอกซิลตั้งแต่ 2 หมู่ขึ้นไป ดังภาพที่ 2-1 โดยหมู่ไฮดรอกซิลมีบทบาทสำคัญในการดักจับอนุมูลอิสระต่าง ๆ ไม่ให้ไปกระตุ้นหรือก่อให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันได้ โดยการให้ไฮโดรเจนอะตอมแก่อนุมูลอิสระเหล่านั้น (ปิยศิริ สุนทรนนท์, 2551)



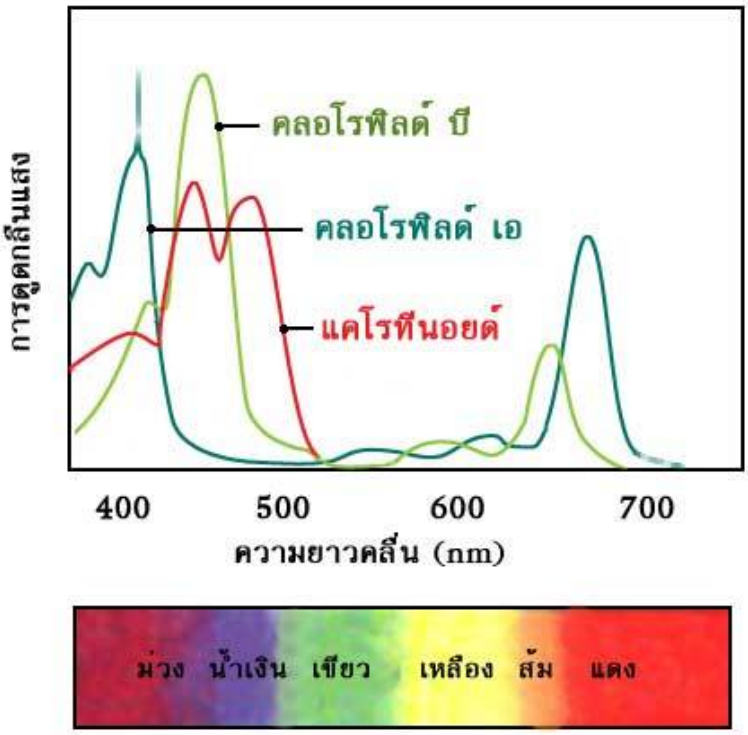
Phenols Phenolic acids Flavonoids

ภาพที่ 2-1 สูตรโครงสร้างของสารประกอบฟีนอลิก
(ที่มา: http://www.foodnetworksolution.com/wiki/word/2585/phenolic-compound)

1.2 คลอโรฟิลล์ (Chlorophyll)

พืชทุกชนิดสามารถสร้างอาหารเพื่อการเจริญเติบโตได้ โดยมีรงควัตถุสีเขียว เรียกว่า คลอโรฟิลล์ (Chlorophyll) พบอยู่ในคลอโรพลาสต์ (Chloroplast) ทำหน้าที่เปลี่ยนพลังงานแสงเป็นสารอาหารจำพวกแป้งและน้ำตาล ผ่านกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสง (Photosynthesis) คลอโรฟิลล์พบทั้งในพืชชั้นต่ำ และชั้นสูง โดยเฉพาะในพืชตระกูลผักที่มีสีเขียวเกือบทุกส่วน นอกจากนั้นยังพบได้ในสาหร่ายทุกชนิดและแบคทีเรียบางชนิด โดยคลอโรฟิลล์เอมีสีเขียวแกมน้ำเงิน (Blue-green) และคลอโรฟิลล์บีมีสีเขียวแกมเหลือง (Yellow-green) นำไปใช้เพื่อการดำรงชีวิต คลอโรฟิลล์เป็นสารที่ดูดกลืนแสงในช่วงแสงสีฟ้าและสีแดง แต่สามารถดูดกลืนแสงสีเหลืองและสีเขียวได้น้อย คลอโรฟิลล์จะดูดกลืนแสงสีฟ้าและสีแดงไว้ ทำให้มองเห็นใบพืชมีสีเขียวได้ เนื่องจากส่วนแสงสีเขียวไม่ถูกดูดกลืนจึงสะท้อนออกมาทำให้ตามองเห็นเป็นสีเขียว ดังภาพที่ 2-2 จะพบคลอโรฟิลล์เอ (Chlorophyll a) และคลอโรฟิลล์บี (Chlorophyll b) ในอัตราส่วน 3: 1 (ภาคภูมิ พระประเสริฐ, 2550) โมเลกุลของคลอโรฟิลล์ประกอบด้วยส่วนหัวของวงแหวนพอร์ไฟริน (Porphyrin ring) ซึ่งเป็นโมเลกุลใหญ่ประกอบด้วยวงแหวนไพโรล (Pyrrole) ยึดติดกันโดยมีเทนคาร์บอน (Methane carbon, $-CH_3$) เกิดเป็นโมเลกุลใหญ่ที่แบนราบในคลอโรฟิลล์มีแมกนีซีเซียม (Mg) อยู่ตรงกลางโดยแมกนีเซียมอะตอมยึดติดกับไนโตรเจนอะตอม 2 ตัวด้วยพันธะโควาเลนต์ (Covalent bond) ส่วนไนโตรเจนอีก 2 ตัวต่างแบ่งอิเล็กตรอน 2 ตัวเพื่อใช้ร่วมกับแมกนีเซียมเกิดเป็นพันธะโคออร์ดิเนตโควาเลนต์ (Coordinate covalent) และส่วนหางซึ่งเป็นไฮโดรคาร์บอนสายยาว เรียกว่าไฟทอล (Phytol) ดังนั้นโครงสร้างโมเลกุลของคลอโรฟิลล์เอ ($C_{55}H_{72}O_5N_4Mg$) และคลอโรฟิลล์บี ($C_{55}H_{70}O_6N_4Mg$) (เยาวดี รุ่งเรือง และสุพิชญา จันทะชุม, 2552) คลอโรฟิลล์ทั้งสองชนิดมีโครงสร้างเหมือนกัน แต่แตกต่างกันที่ตำแหน่งที่ 3 โดยคลอโรฟิลล์เอ

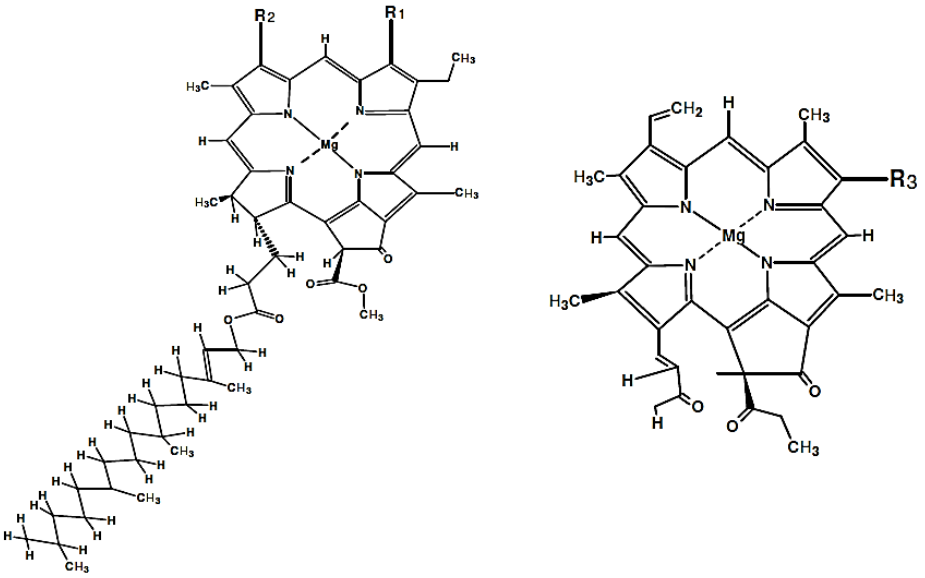
มีโซ่ข้างเป็นหมู่เมทิล ($-CH_3$) ส่วนของคลอโรฟิลล์บีเป็นหมู่อัลดีไฮด์ ดังภาพที่ 2-3 โครงสร้างที่ต่างกันของคลอโรฟิลล์ทั้งสองชนิดก็จะทำให้มีคุณสมบัติที่แตกต่างกันโดยเฉพาะด้านการละลาย โดยที่หมู่เมทิลของคลอโรฟิลล์เอทำให้โมเลกุลไม่มีขั้ว จึงละลายได้ดีในสารละลายที่ไม่มีขั้ว ส่วนหมู่อัลดีไฮด์ของคลอโรฟิลล์บีจะเป็นโมเลกุลที่มีขั้วจึงทำให้คลอโรฟิลล์บีละลายได้ดีในตัวทำละลายที่มีขั้วจึงทำให้คลอโรฟิลล์บางส่วนละลายน้ำได้

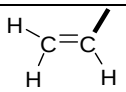
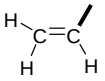


ภาพที่ 2-2 ช่วงการดูดกลืนแสงของคลอโรฟิลล์
(ที่มา: https://sanookpuppui.wordpress.com)

การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างทางเคมีของคลอโรฟิลล์อาจเกิดได้จากหลายสาเหตุ แต่ในการประกอบอาหารส่วนใหญ่จะเกิดจากปฏิกิริยาฟีโอไฟทิไนเซชัน (Pheophytinization) ซึ่งเป็นการแทนที่แมกนีเซียมในคลอโรฟิลล์ด้วยไฮโดรเจน เกิดได้ดีในสภาวะที่เป็นกรดและทำให้เกิดสีเขียวมะกอกของฟีโอไฟทิน (Pheophytin) นอกจากนี้ยังมีการแตกออกของหมู่ไฟทอล ซึ่งจะเกิดคลอโร-ฟิลไลด์ (Chlorophylides) เนื่องจากเอนไซม์คลอโรฟิลเลส (Chlorophyllase) คลอโรฟิลไลด์จะให้สีเขียวเช่นเดียวกับคลอโรฟิลล์แต่จะสามารถละลายในน้ำได้ดีกว่าคลอโรฟิลล์ ปฏิกิริยา

ฟีโอไฟทิไน-เซซัน (Pheophytinization) เป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้เกิดการสูญเสียความคงตัวของสีเขียวในระหว่างกระบวนการแปรรูปอาหารด้วยความร้อนจึงได้มีการพยายามหาวิธีในการรักษาความคงตัวของสีเขียวโดยวิธีต่าง ๆ



คลอโรฟิลล์	R_1	R_2
เอ		
บี		

ภาพที่ 2-3 โครงสร้างของคลอโรฟิลล์ (Leven, 2011)

รงควัตถุที่ใช้ในการสังเคราะห์แสง

ในกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสง คลอโรพลาสต์เป็นออแกเนลล์ที่ทำหน้าที่นี้จะต้องมีรงควัตถุที่ใช้ในการสังเคราะห์ด้วยแสง ได้แก่ คลอโรฟิลล์ แคโรทีนอยด์ และไฟโคบิลิน ดังตารางที่ 2-2

ตารางที่ 2-2 รงควัตถุที่ใช้ในการสังเคราะห์แสง

ชนิดของรงควัตถุ	ช่วงแสงที่ดูดกลืนแสง (Nm)	ชนิดของพืช
คลอโรฟิลล์ ได้แก่		
คลอโรฟิลล์ เอ	420, 660	พืชชั้นสูงทุกชนิดและสาหร่ายพืช
คลอโรฟิลล์ บี	435, 643	ชั้นสูงทุกชนิดและสาหร่ายบางชนิด
คลอโรฟิลล์ ซี	445, 625	ไดอะตอม สาหร่ายสีน้ำตาลและ
คลอโรฟิลล์ ดี	450, 690	สาหร่ายสีแดง
คาร์โรทีนอยด์ ได้แก่		
เบตาคาร์โรทีน	425, 450, 480	พืชชั้นสูงและสาหร่ายส่วนใหญ่พืช
แอลฟาคาร์โรทีน	420, 440, 470	ส่วนใหญ่และสาหร่ายบางชนิด
ลูตีออล (Luteol)	425, 445, 475	สาหร่ายสีเขียว สีแดงและพืชชั้นสูง
ไวโอลาแซนธอล (Violaxanthol)	425, 450, 475	พืชชั้นสูง
แกมมาคาร์โรทีน	–	แบคทีเรีย
ฟูโคแซนธอล (Fucoxanthol)	425, 450, 475	ไดอะตอมและสาหร่ายสีน้ำตาล
ไฟโคบิลินส์ ได้แก่		
ไฟโคอีรีธรินส์ (Phycoerythrins)	490, 546, 576	สาหร่ายสีแดง
ไฟโคไซยานินส์ (Phycocyanins)	618	สาหร่ายสีน้ำเงิน สาหร่ายสีน้ำเงิน แกมเขียว และสาหร่ายสีแดงบาง ชนิด

ที่มา: https://sanookpuppui.wordpress.com

การวิเคราะห์หาคลอโรฟิลล์มี 3 วิธี คือ Spectrophotometric method, Fluorimetric method และ HPLC method วิธี Fluorimetric นั้นค่อนข้างไว (Sensitive) และใช้ตัวอย่างน้ำน้อยกว่าวิธี Spectrophotometric

การวิเคราะห์ปริมาณคลอโรฟิลล์ด้วยวิธี Spectrophotometric โดยนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 663 และ 645 นาโนเมตร (Nm) แล้วคำนวณหาปริมาณคลอโรฟิลล์ จากสูตร

Chlorophyll A (G/ L) $= 0.0127 (A_{663}) - 0.00269 (A_{645})$

Chlorophyll B (G/ L) $= 0.0029 (A_{663}) - 0.00468 (A_{645})$

Total Chlorophyll (G/ L) $= 0.0202 (A_{663}) + 0.00802 (A_{645})$

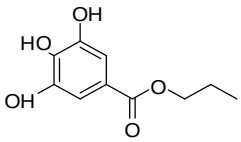
เมื่อ A_{663} และ A_{645} คือ ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 663 และ 645 นาโนเมตร ตามลำดับ

ประโยชน์ของคลอโรฟิลล์

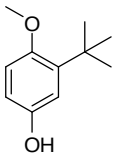
ปัจจุบันคลอโรฟิลล์ที่สกัดได้จากส่วนสีเขียวของพืชกำลังเป็นที่นิยมนำมารับประทานเพื่อเป็นอาหารเสริมสำหรับสุขภาพเป็นอย่างมาก ซึ่งมีประโยชน์ต่อร่างกาย เป็นสารอาหารประเภทให้พลังงานแก่ร่างกาย ประกอบด้วยโปรตีน ไขมัน และคาร์โบไฮเดรต ช่วยเพิ่มปริมาณเม็ดเลือดแดง ป้องกันโรคโลหิตจาง เสริมสร้างภูมิต้านทาน ป้องกันตับอักเสบ และเสริมการทำงานของตับ ป้องกันแผลอักเสบ และระงับเชื้อ ป้องกันโรคมะเร็งต่าง ๆ เช่น มะเร็งกระเพาะอาหาร มะเร็งลำไส้ เป็นต้น ช่วยให้มีระบบขับถ่ายที่ดี ควบคุมความเป็นกรดในกระเพาะอาหาร และส่งเสริมการย่อยอาหาร รักษาสมดุลจุลินทรีย์ที่เป็นประโยชน์ในระบบทางเดินอาหาร ป้องกันโรคท้องร่วง โรคติดเชื้อในระบบทางเดินอาหาร ช่วยในการดูดซึมน้ำ และแร่ธาตุในลำไส้ ป้องกันโรคริดสีดวงทวารหนัก ลดกลิ่นตัวเหม็น และที่สำคัญเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ ทำให้ดูอ่อนกว่าวัย (ภาคภูมิ พระประเสริฐ, 2550)

2. สารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์ (Synthetic antioxidants)

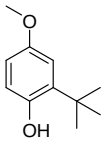
สารประกอบฟีนอลิกสังเคราะห์ 5 ชนิดคือ propylgallate, 2-butylated hydroxyanisole, 3-butylate hydroxyanisole, BHT (Butylated hydroxytoluene) และ tertiary butylhydroquinone ซึ่งมีสูตรโครงสร้างดังภาพที่ 2-4 เป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่นิยมใช้ในอุตสาหกรรมอาหารเพื่อยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน (เจนจิรา จิรัมย์ และประสงค์ สีหานาม, 2554)



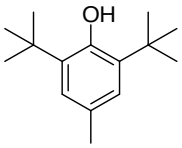
propyl gallate



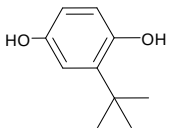
2- butylated hydroxyanisole



3-butylate hydroxyanisole



butylated hydroxytoluene

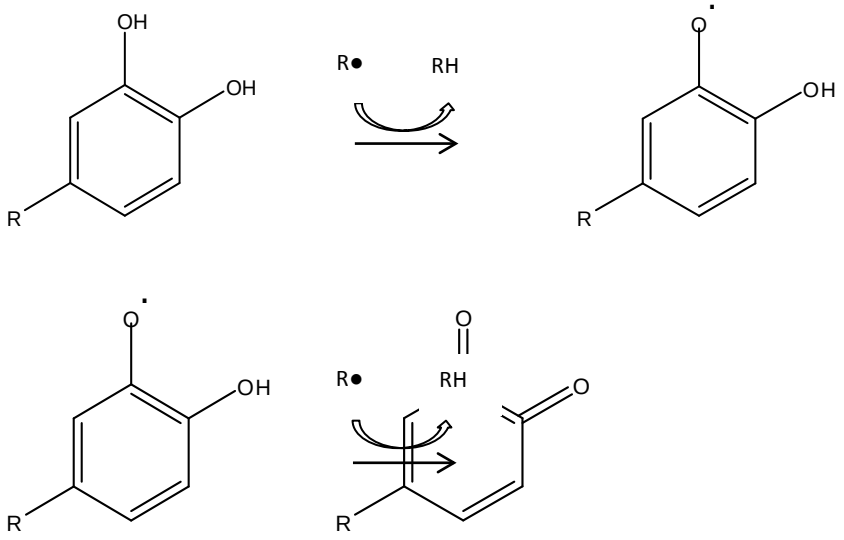


tertiary butylhydroquinone

ภาพที่ 2-4 โครงสร้างสารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์
(ที่มา: en.wikipedia.org/ wiki)

กลไกการต้านอนุมูลอิสระ

สารประกอบฟีนอลิก (Phenolic compounds) เป็นสารกลุ่มใหญ่ที่พบมากในพืชตัวอย่าง สารกลุ่มนี้ได้แก่สารจำพวก flavonoids ที่มี catechol เป็นองค์ประกอบของแทนนิน (กันยารัตน์ สาคร, 2556) ซึ่งโครงสร้างหลักประกอบด้วย aromatic ring แทนที่ด้วย hydroxy group โดยมากเป็นสารที่มีขั้ว ละลายในตัวทำละลายจำพวกแอลกอฮอล์ได้ดี กลไกของสารประกอบฟีนอลิกที่แสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ดังภาพที่ 2-5 คือเมื่อมีอนุมูลอิสระมาดึงโปรตอนไปแต่ในโครงสร้างมีอิเล็กตรอนหนาแน่นจึงสามารถเกิดการเคลื่อนย้ายอิเล็กตรอนไปทั่วโครงสร้าง (Delocalization) ทำให้โครงสร้างเสถียรไม่เกิดเป็นอนุมูลอิสระต่อไป (ระวิวรรณ แก้วอมตวงศ์ และทรงพร จึงมั่นคง, 2549)



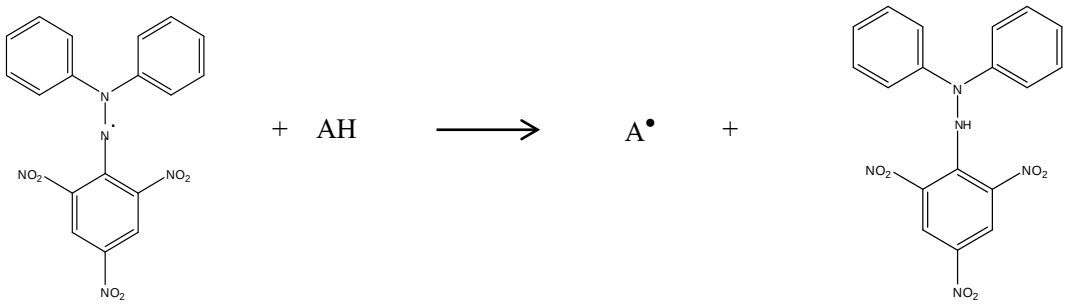
ภาพที่ 2-5 กลไกการต้านอนุมูลอิสระของสารประกอบฟีนอลิก (ระวิวรรณ แก้วอมตวงศ์ และทรงพร จึงมั่นคง, 2549)

วิธีการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเชิงปริมาณ

วิธีการวิเคราะห์ปริมาณของอนุมูลอิสระเป็นความสามารถในการเป็นตัวต้านออกซิเดชันของโมเลกุลหรือไอออนที่มีอิเล็กตรอนโดดเดี่ยว วิธีที่นิยมใช้ได้แก่ 2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), 2, 2-azobis (3-ethyl-benzothialzoline-6-sulfonic acid) (ABTS), ferric reducing antioxidant power (FRAP) และอื่น ๆ ซึ่งมักนำมาใช้ในการวิเคราะห์ความสามารถในการเป็นตัวต้านออกซิเดชันในผักและผลไม้ชนิดต่าง ๆ (บุหรัน พันธุ์สวรรค์, 2556)

1. วิธี 2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical scavenging capacity assay (DPPH assay) เป็นวิธีการวิเคราะห์ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระซึ่งใช้ reagent คือ 2, 2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl เป็น stable radical ในตัวทำละลายแอลกอฮอล์ ซึ่งสารละลายนี้มีสีม่วง ดังภาพที่ภาพที่ 2-6 เมื่อเติมสารต้านอนุมูลอิสระลงไปทำให้สีม่วงนั้นจางลง เนื่องมาจากสารต้านอนุมูลอิสระไปให้โปรตอนกับอนุมูล DPPH ซึ่งจะติดตามการเกิดปฏิกิริยาที่ค่าความยาวคลื่น 517 nm (รัชฎาพร อุ่นศิวิไลย์, จิราวรรณ อุ่นเมตตาอารี และจิตรา สิงห์ทอง, 2554)

DPPH (Purple) Antioxidation DPPH: H (Colorless)



ภาพที่ 2-6 ปฏิกิริยาของ 2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical (DPPH radical)
(กันยารัตน์ สาคร, 2556)

สารประกอบฟีนอลิกจะทำหน้าที่กำจัดอนุมูลอิสระและไอออนของโลหะที่สามารถเร่งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมันและโมเลกุลอื่น ๆ ด้วยการให้อะตอมไฮโดรเจนแก่อนุมูลอิสระอย่างรวดเร็วดังปฏิกิริยาต่อไปนี้ (ระวิวรรณ แก้วอมตวงศ์ และทรงพร จึงมั่นคง, 2549)

$ROO^{\bullet} + PPH \longrightarrow ROOH + PP^{\bullet}$ ---------- (1.1)

$RO^{\bullet} + PPH \longrightarrow ROH + PP^{\bullet}$ ---------- (1.2)

เมื่อ $ROO^{\bullet}$, $RO^{\bullet}$ คือ free radicals, PPH คือ polyphenolic compound

เมื่อสารประกอบฟีนอลิกให้อะตอมไฮโดรเจนแก่อนุมูลอิสระไปแล้วอนุมูลอิสระของสารประกอบฟีนอลิกจะค่อนข้างมีเสถียรภาพ ดังนั้นจึงไม่ทำปฏิกิริยาอื่นต่อไป อีกทั้งอนุมูลอิสระของสารประกอบฟีนอลิกบางชนิดสามารถรวมตัวกับอนุมูลอิสระอื่นได้อีกด้วย จึงทำให้สารประกอบฟีนอลิกเหล่านั้นลดจำนวนอนุมูลอิสระลงได้ถึง 2 เท่า ดังปฏิกิริยาต่อไปนี้ 3 (ปิยศิริ สุนทรนนท์, 2551)

$ROO^{\bullet} + PP^{\bullet} \longrightarrow ROOPP$ ----------(1.3)

$RO^{\bullet} + PP^{\bullet} \longrightarrow ROPP$ ----------(1.4)

โดย $DPPH^{\bullet}$ จะเกิดปฏิกิริยากับ antioxidant (AH) หรือกับ radical species ($R^{\bullet}$) ได้ดังสมการที่ (1.5) และ (1.6)

$DPPH^{\bullet} + AH \longrightarrow DPPH\text{-}H + A^{\bullet}$ ----------(1.5)

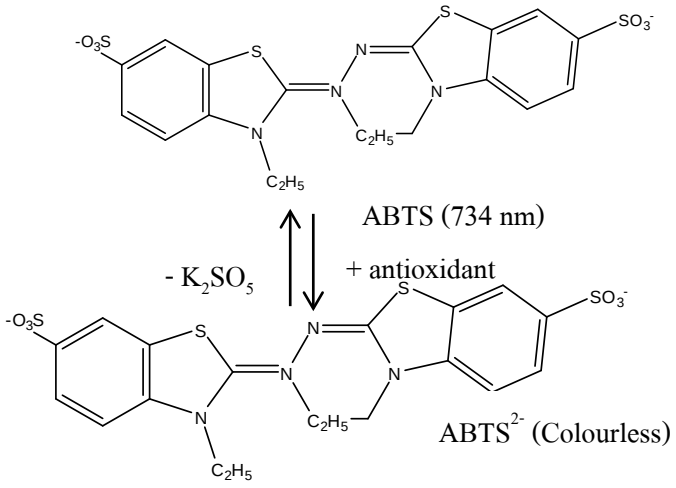
$DPPH^{\bullet} + R^{\bullet} \longrightarrow DPPH\text{-}R$ ----------(1.6)

ถ้าตัวอย่างมีความสามารถในการต้านออกซิเดชันได้สูง ความเข้มของสารละลายสีม่วงก็จะลดลง

สารมาตรฐานที่ใช้ในการเทียบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ คือ trolox (6-hydroxyl-2, 5, 7, 8-tetramethylchlorman-2-carboxylic acid) แสดงค่าเป็น TEAC (Trolox equivalent antioxidant capacity) มีหน่วยเป็นมิลลิโมลาร์ต่อมิลลิกรัม (MM/ mg) หรือ ไมโครโมลาร์ต่อมิลลิกรัม μM/ mg) ข้อดีของวิธีนี้คือ ง่าย สะดวก และรวดเร็ว ข้อเสียคือ $DPPH^{\bullet}$ ค่อนข้างเสถียรไม่ไวต่อปฏิกิริยาเหมือนอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นในร่างกายจริง จึงทำให้เกิดปฏิกิริยาได้ช้า ทำให้ค่าการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่วัดได้น้อยกว่าความเป็นจริง และต้องวัดในปฏิกิริยาที่เป็นแอลกอฮอล์ (บุหรัน พันธุ์สวรรค์, 2556)

2. วิธี 2, 2–Azino–bis (3–ethylbenzothiazoline–6–sulfonic acid) cation radical-scavenging assay: (ABTS assay)

ABTS assay เป็นวิธีการวิเคราะห์ความสามารถในการต้านออกซิเดชัน (Antioxidant capacity) ซึ่งใช้ reagent คือ 2, 2-Azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt เป็น stable radical ใน aqueous solution ดังภาพที่ 2-7 ซึ่ง ABTS radical มีสีเขียว เมื่อเติมสารต้านอนุมูลอิสระลงไปทำให้สีเขียวนั้นจางลง เนื่องมาจากสารต้านอนุมูลอิสระไปให้อิเล็กตรอนกับอนุมูล ABTS ซึ่งจะติดตามการเกิดปฏิกิริยาที่ค่าความยาวคลื่น 734 nm (กันยารัตน์ สาคร, 2556)



ภาพที่ 2-7 ปฏิกิริยาของ 2, 2-Azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt (ABTS radical)

(ที่มา: www.scitechnol.com/ 2324-9099/ 2324-9099-2-107.php)

การทำให้ เกิด ABTS radical ทำได้หลายวิธีดังนี้

1. ใช้ enzyme reaction คือใช้เอนไซม์ เร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันให้เกิด ABTS radical เช่น peroxidase, myoglobin เป็นต้น

2. ใช้ chemical reaction โดยใช้สารเคมี เช่น manganese dioxide, potassium persulfate, 2, 2-azo-bis-(2-amidinopropane) (ABAP) เป็นต้น

$$OH^- + ABTS \longrightarrow ABTS^{\bullet+} + H_2O \qquad \text{---------- (1.7)}$$

antioxidant (AH) จะทำปฏิกิริยากับ $ABTS^{\bullet+}$ ดังนี้

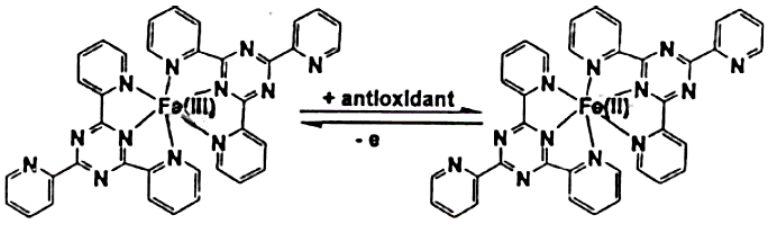
$$ABTS^{\bullet+} + AH \longrightarrow ABTS + A \qquad \text{---------- (1.8)}$$

มีผลให้ความเข้มของสารละลายสีเขียวลดลงด้วย

วิธีการคำนวณและการเทียบกับสารมาตรฐาน trolox กระทำเช่นเดียวกับวิธี DPPH ข้อดีของวิธีการนี้ คือ $ABTS^{\bullet+}$ ละลายได้ดีในน้ำและตัวทำละลายอินทรีย์จึงทำปฏิกิริยาได้อย่างรวดเร็วและทำปฏิกิริยาได้ดีในช่วง pH กว้างส่วนข้อเสีย คือ $ABTS^{\bullet+}$ ไม่เป็นสารธรรมชาติที่พบในร่างกายหรือในเซลล์ของสิ่งมีชีวิตและต้องมีการทำปฏิกิริยากับสารอื่นก่อนถึงจะเกิดเป็นอนุมูลอิสระ (บุหรัน พันธุ์สวรรค์, 2556)

3. วิธี Ferric reducing antioxidant power (FRAP assay)

FRAP assay เป็นวิธีที่ใช้ในการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยอาศัยปฏิกิริยารีดอกซ์และติดตามการเปลี่ยนแปลงสีของสารประกอบเชิงซ้อนคือเมื่อสารประกอบเชิงซ้อน ferric tripyridyltriazine (Fe^{3+}-TPTZ) ได้รับอิเล็กตรอนจากสารต้านออกซิเดชันแล้วจะเปลี่ยนไปอยู่ในรูปสารประกอบเชิงซ้อน ferrous tripyridyltriazine (Fe^{2+}-TPTZ) ที่มีสีม่วงน้ำเงิน ดังภาพที่ 2-8 โดยติดตามปฏิกิริยารีดอกซ์ที่เกิดขึ้นโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 595 nm ดังสมการ (รัชฎาพร อุ่นศิวิไลย์ และคณะ, 2554)



ภาพที่ 2-8 ปฏิกิริยาของ FRAP assay (รัชฎาพร อุ่นศิวิไลย์ และคณะ, 2554)

วิธี FRAP สามารถ เปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน ferrous sulfate หรือสารมาตรฐาน trolox แล้วรายงานเป็นค่า FRAP value ข้อดีของวิธีนี้ก็ คือ เสียค่าใช้จ่ายน้อย สะดวก รวดเร็วมีขั้นตอนในการทดลองไม่ยุ่งยาก ซับซ้อนและมี reproducibility ดี (บุหรัน พันธุ์สวรรค์, 2556)

งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Laungsuwon and Chulalaksananukul (2014) ได้ศึกษาสาหร่ายน้ำจืด 2 ชนิดคือ *Cladophora glomerata* Kützing และ *Microspora floccosa* (Vaucher) Thuret จากแม่น้ำน่าน โดยใช้ตัวทำละลายได้แก่ เฮกเซน เอทิลอะซิเตต เมทานอล และน้ำร้อน ในการสกัด พบว่าสารสกัดเฮกเซนและเอทิลอะซิเตตของสาหร่ายทั้งสองชนิดแสดงฤทธิ์ต้านเชื้อ Bacillus cereus และ Vibrio parahaemolyticus สารสกัดถูกแยกโดยใช้คอลัมน์โครมาโตกราฟีและมีลักษณะทางเคมีโดย GC-MS เพื่อที่จะได้ทราบรายละเอียดของสารประกอบ องค์ประกอบหลักคือกรดไขมันและสารประกอบอินทรีย์อื่น ๆ ผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าสารสกัดจาก *C. glomerata* และ *M. floccosa* มีฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์ได้ดีและอาจเป็นแหล่งที่มีคุณค่าทางชีวภาพสำหรับผลิตภัณฑ์เพื่อสุขภาพ

สรณัตร เทียมดาว และยุวดี พีรพรพิศาล (2552) ศึกษาความหลากหลายของสาหร่ายน้ำจืด ได้แก่ สาหร่ายไก และสาหร่ายเตา โดยสาหร่ายไกประกอบด้วย 2 สกุล คือ *Claophora* sp. และ *Microspora* sp. สาหร่ายเตาประกอบด้วย 1 สกุล คือ *Spirogyra* sp.ในแม่น้ำโขงและแม่น้ำน่าน โดยเก็บตัวอย่างจาก 7 จุดเก็บตัวอย่าง ซึ่ง 3 จุดเก็บตัวอย่างอยู่ในแม่น้ำแม่โขง จังหวัดเชียงราย และ 4 จุดเก็บตัวอย่างอยู่ในแม่น้ำน่าน จังหวัดน่าน พบสาหร่ายน้ำจืดกินได้ทั้งหมด 9 ชนิด 3 สกุล 2 วงศ์ และ 2 อันดับ พบว่า แต่ละจุดที่ทำการเก็บตัวอย่างคุณภาพน้ำอยู่ในระดับปานกลาง ลักษณะที่เหมาะสมต่อการเจริญของสาหร่ายไก และ เตา มีความแตกต่างกัน โดยงานวิจัยนี้ศึกษาลักษณะทางกายภาพของพื้นท้องน้ำที่มักพบการเจริญของสาหร่ายไกจะเป็นบริเวณที่มีลักษณะพื้นท้องน้ำเป็นก้อนหินซึ่งเป็นที่ยึดเกาะของเส้นสาย พบได้ทั้งในกระแสน้ำที่แรงและไม่แรง และได้รับแสงในปริมาณมาก ส่วนเตามักพบในน้ำนิ่งไม่จำเป็นต้องยึดเกาะกับก้อนหินหรือกิ่งไม้ แต่สาหร่ายทั้งสองชนิดมีลักษณะที่เหมือนกันประเภทหนึ่งก็คือ เจริญในน้ำที่มีคุณภาพปานกลาง มีสารอาหารไม่มากไม่น้อยเกินไป จากคุณสมบัตินี้ทำให้ไม่สามารถพบการเจริญของสาหร่ายชนิดนี้ในบริเวณที่เป็นต้นน้ำซึ่งมีคุณภาพดีมากแต่จะพบได้ในบริเวณที่มีชุมชนอาศัยอยู่ หรือมีการทำเกษตรกรรม ซึ่งน้ำมักจะมีสารอาหารจากแหล่งเกษตรกรรม ทำให้น้ำมีคุณภาพปานกลาง แต่ถ้าน้ำมีสารอาหารมากจนทำให้น้ำมีคุณภาพไม่ดีก็จะไม่พบสาหร่ายดังกล่าว

Kosasu, Wongklom, and Moonsin (2015) ศึกษาการต้านอนุมูลอิสระในสาหร่ายน้ำจืดของจังหวัดอุบลราชธานีโดยใช้ เอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ในการสกัดสาหร่าย 3 ชนิดคือชนิดที่ 1 *Spirogyra* sp. ชนิดที่ 2 *Cladophora* sp., *Microspora* sp. และชนิดที่ 3 *Nostoc commune* sp.จากการทดลองพบว่าชนิดของสาหร่ายมีผลต่อปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดและฟลาโวนอยด์ สาหร่ายทั้ง 3 ชนิดมีปริมาณรวมของฟีนอลิก 155.82, 12.12, 18.22 มิลลิกรัมสมมูลกับกรดแกลลิกต่อกรัมของสารสกัด (Mg GAE / g extract) และมีปริมาณรวมของ ฟลาโวนอยด์ 2.64, 3.83, 0.52 มิลลิกรัมสมมูลกับเคอซิทินต่อกรัมของสารสกัด (Mg QE/ g extract)ตามลำดับ นอกจากจากนี้การทดสอบการต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี phosphomolybdenum พบว่าชนิดที่ 1 ชนิดที่ 2 และชนิดที่ 3 มีปริมาณ 178.89, 150.67 และ 173.28 มิลลิกรัมสมมูลกับกรดแอสคอบิกต่อกรัมของสารสกัด (Mg AE/ g extract) ตามลำดับ ส่วนวิธี radical scavenging activity โดยใช้ DPPH พบว่า ชนิดที่1 มีเปอร์เซ็นต์การต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุด ชนิดที่ 2 และชนิดที่ 3 มีเปอร์เซ็นต์การต้านอนุมูลอิสระต่ำ ดังนั้นสาหร่ายชนิด *Spirogyra* sp. ซึ่งมีปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด ฟลาโวนอยด์ และการต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุด จึงเหมาะแก่การนำไปผลิตเป็นครีมลดรอยเหี่ยวย่นในเครื่องสำอาง

พันธุ์ทิพย์ วิเศษพงษ์พันธ์, พลชา จิตรมิตรสัมพันธ์, ชัชรี แก้วสุรลิขิต และอรรถวุฒิ กันทะวงศ์ (ม.ป.ป.) ได้ศึกษาสารสกัดจากสาหร่าย 16 ชนิด ได้แก่ สาหร่ายสีเขียว 6 ชนิด สาหร่ายสีน้ำตาล 5 ชนิด และสาหร่ายสีแดง 5 ชนิด พบว่า มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH และ ABTS ได้แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) โดยมีค่าการออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH และ ABTS ระหว่างร้อยละ 5.89 ± 0.46-73.13 ± 1.26 และ 41.19 ± 1.65 – 85.85 ± 0.43 mg/ ml และปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดมีค่าระหว่าง 0.03 ± 0.02-104.35 ± 1.94 mg GAE/ g extract โดยสารสกัดที่มีประสิทธิภาพในการออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงสุด คือ สารสกัดจากสาหร่ายสีน้ำตาล *Lobophora variegata* ซึ่งออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH และ ABTS โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 35.33 ± 5.03 และ 61.33 ± 8.32 mg/ ml และยังมีปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดสูงสุดคือ 104.35 ± 1.94 mg GAE/ g extract และยังพบว่า สารสกัดจากกลุ่มสาหร่ายสีน้ำตาลมีการออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ได้สูงกว่าสาหร่ายอีกสองกลุ่ม ในขณะที่การออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ABTS สูงพบได้ในสารสกัดจากสาหร่ายทั้งสามกลุ่ม และพบว่าปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดมีความสัมพันธ์กับการออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH และ ABTS อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($R = 0.776$ และ 0.687)

Farasat, Nejad, Nabavi, and Namjooyan (2014) ศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดและปริมาณฟลาโวนอยด์โดยใช้เมทานอลในการสกัดสาหร่ายทะเล 4 สปีชีส์ (U*lva clathrata* (Roth) C.Agardh, *Ulva linza* Linnaeus, *Ulva flexuosa* Wulfen และ *Ulva intestinalis* Linnaeus) ที่เจริญบริเวณภาคใต้ของอิหร่านทางชายฝั่งทางตอนเหนือของอ่าวเปอร์เซีย

สาหร่ายทะเลเก็บจากเดย์เยอร์ ทาเฮอริ และชายฝั่งทางเหนือของโอลิ ในเดือนเมษายน ปี ค.ศ. 2011 สาหร่ายทะเลสกัดด้วยเมทานอลนำมาศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยใช้วิธี DPPH และตรวจวัดโดยใช้เครื่องไมโครเพลท สาหร่ายทะเลทุกชนิดสามารถยับยั้งการต้านอนุมูลอิสระของ DPPH ชนิด *Ulva clathrata* มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระดีที่สุดด้วยค่า IC_{50} ที่ต่ำ (0.881 mg/ ml) เมื่อเปรียบเทียบกับชนิดอื่น ๆ และมีปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดสูงสุดเท่ากับ 5.080 mg GAE / g extract และปริมาณฟลาโวนอยด์เท่ากับ 33.094 mg rutin (RE) / g extract) แสดงให้เห็นความสัมพันธ์เชิงบวกกับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของ DPPH ($P < 0.01$) และมีความสัมพันธ์เชิงลบกับ IC_{50} ($P < 0.01$) สรุปงานวิจัยได้ว่า สาหร่ายทะเลสีเขียวมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในยา อาหารเสริม เครื่องสำอาง และอุตสาหกรรมอาหาร

น้ำฝน เบ้าทองคำ และถนอมนวล พรหมบุญ (2556) ศึกษาการวิเคราะห์สารสกัดจากเห็ดป่ากินได้ 5 ชนิดในจังหวัดเพชรบูรณ์ (เห็ดน้ำผึ้ง เห็ดระโงกขาว เห็ดถ่านใหญ่ เห็ดน้ำหมาก และเห็ดตะไคล) สกัดในตัวทำละลาย 3 ชนิด คือ เอทิลอะซิเตท เมทานอล และน้ำ เมื่อทดสอบคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี 2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging capacity และหาปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดด้วยวิธี Folin-Ciocalteu และวิเคราะห์เชิงปริมาณด้วยสถิติและค่าความแปรปรวนด้วย ANOVA พบว่า สารสกัดหยาบจากเห็ดในชั้นตัวทำละลายเอทิลอะซิเตทมีสมบัติต้านอนุมูลอิสระสูงสุด ยกเว้นเห็ดตะไคลจะเป็นชั้นน้ำพิจารณาจากค่า IC_{50} เปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน trolox มีค่าเป็น 0.0213, 0.0073, 0.0224, 0.02391, และ 0.0339 mg./ mL ตามลำดับ แต่ทุกตัวมีค่า IC_{50} สูงกว่า trolox ซึ่งมีค่าคือ 2.2430 mg/ ml และค่า IC_{50} มีความสัมพันธ์กับปริมาณฟีนอลิกรวมทั้งหมด ยกเว้นสารสกัดจากเห็ดตะไคลในชั้นตัวทำละลายเอทิลอะซิเตท จากผลการวิจัยนี้เป็นประโยชน์ต่อการศึกษาประโยชน์จากเห็ดในระดับต่อไปและเป็นประโยชน์ต่อการเลือกบริโภคเห็ดป่าของชาวบ้าน

ชลดา จัดประกอบม พรพรรณ เหล่าวชิระสุวรรณ และเมธิน ผดุงกิจ (2556) ศึกษาเห็ดเกือกม้า (P*hellinus rimosus*) พบว่า มีฤทธิ์ทางยาและมักพบในเขตภาคอีสานตามภูมิปัญญาดั้งเดิมทางการแพทย์แผนไทยได้มีการนำมาใช้เป็นส่วนผสมในตำรับยารักษามะเร็ง รักษาโรคเริม อาการปวดหู และอาการผื่นคันปวดแสบปวดร้อนการศึกษานี้เป็นการศึกษาเพื่อเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ต้านการกลายพันธุ์ของสารสกัดเห็ดหิ้งเกือกม้าที่สกัดด้วยเอทานอล น้ำ และการสกัดอัลคาลอยด์ทำการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี 2, 2-Diphenyl-picrylhydrazyl radical assay (DPPH assay) และ Ferric reducing antioxidant power assay (FRAP assay) รวมถึงการศึกษาฤทธิ์ต้านการก่อกลายพันธุ์โดยวิธี Ames test ซึ่งทดสอบกับ เชื้อแบคทีเรียคือ *Salmonella typhimurium* strain TA 98 และ TA 100 สารสกัดที่ออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ต้าน

การก่อกลายพันธุ์ที่ดีที่สุดคือ สารสกัด *P. rimosus* โดยวิธีการสกัดด้วยเอทานอล ซึ่งเป็นที่น่าสนใจในการนำมาพัฒนาเป็นอาหารเสริมต่อไป

สัณห์ ละอองศรี (2551) ได้ศึกษาปริมาณคลอโรฟิลล์เอ และคลอโรฟิลล์บี ในใบชาสด 4 ชนิด ได้แก่ ใบชาจีน ใบชาญี่ปุ่น ใบชาน้ำมันดอกแดง และใบชาน้ำมันดอกขาว ที่สกัดด้วยอะซิโตน เข้มข้น 99.5 เปอร์เซ็นต์พบว่า มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยพบปริมาณคลอโรฟิลล์เอ และคลอโรฟิลล์บี ในใบชาญี่ปุ่นสูงที่สุดมีค่าเท่ากับ 27.93 และ 24.75 mg/ L และพบปริมาณคลอโรฟิลล์เอ และคลอโรฟิลล์บีในใบชาน้ำมันพันธุ์ดอกแดงต่ำที่สุดเท่ากับ 22.32 และ 9.67 mg/ L ซึ่งอาจเป็นสาเหตุสำคัญ ที่ทำให้ชาน้ำมันพันธุ์ดอกแดง อ่อนแอ ไม่สามารถปรับตัวเข้ากับสภาพแวดล้อมของประเทศไทยได้

วริพัสย์ อารีกุล, ธัญวรัตม์ แซ่กู้, ปิยะนุช เชื้อวงศ์งาม และธนกร เหล่าโรจน์ภิญโญ (ม.ป.ป) ได้ศึกษาต้นอ่อนข้าว 2 สายพันธุ์คือ หอมนิล และข้าวก่ำสีนิล นำมาเพาะจนมีอายุ 2 สัปดาห์ ตัวอย่างแบ่งออกเป็น 2 ส่วน คือตัวอย่างสด และตัวอย่างแห้งที ผ่านการท่าแห้งแบบแช่เยือกแข็ง ซึ่งตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดมี 2 ชนิด คือ เอธานอล และน้ำ จากนั้นวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิก ปริมาณคลอโรฟิลล์ทั้งหมด และทดสอบความสามารถในการต้านออกซิเดชันด้วยวิธี free radical scavenging activity (DPPH), Ferric reducing/ antioxidant power (FRAP) และ Thiobarbuturic acid reactive substances (TBARS) พบว่าสารสกัดต้นข้าวอ่อนที่ผ่านการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งมีปริมาณฟีนอลิก ปริมาณคลอโรฟิลล์ และความสามารถการต้านออกซิเดชันมีค่าสูงกว่าตัวอย่างสด ($P \leq 0.05$) ในขณะที่การสกัดด้วยเอธานอลมีประสิทธิภาพดีกว่าการสกัดด้วยน้ำเป็นส่วนใหญ่ นอกจากนี้ต้นข้าวอ่อนทั้ง 2 สายพันธุ์มีปริมาณฟีนอลิก ปริมาณคลอโรฟิลล์ และความสามารถการต้านออกซิเดชันใกล้เคียงกัน ($P>0.05$)

บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

เครื่องมือและวัสดุอุปกรณ์

1. เครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ (Spectrophotometer) ยี่ห้อ Thermo รุ่น Spectronic BioMate 3 ประเทศอังกฤษ
2. เครื่องระเหยสุญญากาศ (Rotary evaporator) ยี่ห้อ Buchi Rotavapor รุ่น R-II ประเทศสหรัฐอเมริกา
3. เครื่องเขย่าสารแนวนอน (Orbital shaker) ยี่ห้อ DAIGGER รุ่น SH30t ประเทศสหรัฐอเมริกา
4. เครื่องเขย่าผสมสารละลาย (Vortex) ยี่ห้อ Scientific Industries รุ่น Vortex-Genie II ประเทศสหรัฐอเมริกา
5. ตู้แช่เยือกแข็ง -80 องศาเซลเซียส ยี่ห้อ ANGELTANTONI รุ่น PLATINUM 370 H ประเทศอิตาลี
6. เครื่องวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (PH meter) ยี่ห้อ Metrohm รุ่น PH 827 ประเทศสหรัฐอเมริกา
7. เครื่องทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (Freeze dryer) ยี่ห้อ Labonco รุ่น FreeZone 6 Lt. ประเทศสหรัฐอเมริกา
8. เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง (Analytical balance) ยี่ห้อ Sartorius รุ่น BSA6202S ประเทศเยอรมัน
9. เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง (Analytical balance) ยี่ห้อ Sartorius รุ่น BSA224S-CW ประเทศเยอรมัน
10. ปิเปตขนาด 1, 10 มิลลิลิตร
11. บีกเกอร์ขนาด 10, 25, 50, 100 และ 250 มิลลิลิตร
12. ขวดวัดปริมาตรขนาด 10, 25, 50, 100, 250 และ 500 มิลลิลิตร
13. ขวดบรรจุสารตัวอย่างขนาด 15 มิลลิลิตร
14. หลอดทดลองขนาด 30 มิลลิลิตร
15. อลูมิเนียมฟลอยด์
16. ไมโครปิเปตขนาด 10, 100, 1000 และ 5000 ไมโครลิตร

17. กระดาษกรอง Whatman No.1

สารเคมี

1. Folin-Ciocalteu reagent บริษัท Merck KGaA, Inc. ประเทศเยอรมัน
2. 2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) บริษัท SIGMA-ALDRICH, Inc. ประเทศเยอรมัน
3. Gallic acid บริษัท SIGMA-ALDRICH, Inc. ประเทศเยอรมัน
4. Sodium carbonate (LR grade) บริษัท Ajax Finechem, Inc. ประเทศออสเตรเรีย
5. 99.9 % Ethanol (AR grade) บริษัท QRec, Inc. ประเทศนิวซีแลนด์
6. 6-hydroxyl-2,5,7,8-tetramethylchlorman-2-carboxylic acid (Trolox) บริษัท SIGMA-ALDRICH, Inc. ประเทศเยอรมัน
7. Glacial acetic acid (LR grade) บริษัท Merck KGaA, Inc. ประเทศเยอรมัน
8. Sodium acetate (LR grade) บริษัท Ajax Finechem, Inc. ประเทศออสเตรเรีย
9. 2, 4, 6-tripyridyl-3-triazine (TPTZ) บริษัท SIGMA-ALDRICH, Inc. ประเทศเยอรมัน
10. Iron (II) chloride (LR grade) บริษัท Ajax Finechem, Inc. ประเทศออสเตรเรีย
11. 2, 2-Azino-bis-(3-ethylbenzothia zoline-6-sulfonic acid diammonium salt (ABTS) บริษัท SIGMA-ALDRICH, Inc. ประเทศเยอรมัน
12. Potassium persulfate (LR grade) บริษัท Ajax Finechem, Inc. ประเทศออสเตรเรีย
13. Acetone (AR grade) บริษัท SIGMA-ALDRICH, Inc. ประเทศเยอรมัน

วิธีดำเนินการวิจัย

1. ตัวอย่างสาหร่าย

สาหร่ายที่ใช้ในการวิจัยมีทั้งหมด 4 ชนิด จากแม่น้ำน่าน อำเภอท่าวังผา จังหวัดน่าน (ยุวดี พีรพรพิศาล และคณะ, 2552) สามารถจัดกลุ่มสาหร่ายสีเขียว (Chlorophyta) ได้แก่ สาหร่ายไกต๊ะ (M*icrospora* sp.) (ภาพที่ 3-1(ก)) เก็บในเดือนธันวาคม สาหร่ายไกไหม (C*ladophora* sp.) (ภาพที่ 3-1(ข)) เก็บในเดือนกุมภาพันธ์ สาหร่ายเตา (S*pirogyra* sp.) (ภาพที่ 3-1(ค)) เก็บในเดือนธันวาคม กลุ่มสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน (Cyanophyta) คือสาหร่ายลอน (N*ostochopsis* sp.) (ภาพที่ 3-2) เก็บในเดือนมีนาคม

ภาพที่ 3-1(ก)

ภาพที่ 3-1(ข)

ภาพที่ 3-1(ค)

ภาพที่ 3-2

ภาพที่ 3-1 ตัวอย่างสาหร่ายน้ำจืด กลุ่มสาหร่ายสีเขียว (Chlorophyta)
(ก) สาหร่ายไกต๊ะ (M*icrospora* sp.), (ข) สาหร่ายไกไหม (C*ladophora* sp.)
(ค) สาหร่ายเตา (S*pirogyra* sp.)

ภาพที่ 3-2 ตัวอย่างสาหร่ายน้ำจืด กลุ่มสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน (Cyanophyta)
สาหร่ายลอน (N*ostochopsis* sp.)

2. การเตรียมตัวอย่างก่อนวิเคราะห์

นำสาหร่ายน้ำจืดสดมาล้างสิ่งสกปรกออกให้ความสะอาดด้วยน้ำเปล่า 4-5 รอบ ผึ่งในที่ร่มให้สะเด็ดน้ำ เก็บตัวอย่างที่ตู้แช่แข็ง -20 องศาเซลเซียสจนกว่าจะนำไปวิเคราะห์

วิธีการสกัดสาหร่ายน้ำจืด

วิธีที่ 1 สกัดสาหร่ายน้ำจืดแต่ละชนิดด้วยเอทานอลได้ดัดแปลงจากวิธีของ Kosasu et al. (2015) โดยใช้ตัวอย่างสาหร่ายสด 100 กรัมสกัดด้วยเอทานอลบริสุทธิ์ 100 มิลลิลิตรในขวดสีชาและเก็บให้พ้นแสงแดด เป็นเวลา 3 วัน จากนั้นนำสารละลายที่ได้มากรองด้วยกระดาษกรอง Whatman No. 1 ทำการทดลอง 3 ครั้ง นำสารสกัดที่ได้มาระเหยเพื่อแยกตัวทำละลายออกให้หมดด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศ (Buchi Rotavapor รุ่น R-II) และทำแห้งต่อด้วยเครื่องทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (Labonco รุ่น FreeZone 6) โดยสารสกัดหยาบจากสาหร่ายน้ำจืดที่ได้ใส่ลงในขวดเก็บตัวอย่างสีชาปิดสนิท เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส และบันทึกผลคิดเป็นร้อยละผลผลิตที่ได้ดังสมการที่ (1)

วิธีที่ 2 ดัดแปลงจากวิธีของรัชฎาพร อุ่นศิวิไลย์, จิราวรรณ อุ่นเมตตาอาร และจิตรา สิงห์ทอง (2554) โดยใช้ตัวอย่างสาหร่ายสด 10 กรัมสกัดด้วยเอทานอลบริสุทธิ์ 10 มิลลิลิตร และทำการเขย่าตัวอย่างอย่างต่อเนื่องเป็นเวลา 2 ชั่วโมงด้วยเครื่องเขย่าสารแนวนอน (Orbital shaker) (DAIGGER รุ่น SH30t) แล้วจึงนำไปกรองด้วยกระดาษกรอง Whatman No. 1 ทำการสกัดซ้ำจากตัวอย่างเดิมจำนวน 3 ครั้ง จากนั้นนำไประเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศ (Buchi Rotavapor รุ่น R-II) จากนั้นนำสารสกัดสาหร่ายไปทำให้แห้งด้วยวิธีการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (Labonco รุ่น FreeZone 6 Lt.) เก็บรักษาในภาชนะบรรจุปิดสนิทสีชา เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อรอวิเคราะห์ในขั้นตอนต่อไป และบันทึกผลคิดเป็นร้อยละผลผลิตที่ได้ดังสมการที่ (1)

ร้อยละผลผลิตที่ได้ (% yield) = (น้ำหนักสารสกัด/ น้ำหนักตัวอย่าง) x 100 .....(1)

การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (Total Phenolic Content ; TPC)

การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดใช้วิธี Folin-Ciocalteu phenol test ที่ดัดแปลงจากวิธีของ Kosasu et al. (2015)

1. การเตรียมสารละลายมาตรฐาน

การเตรียมสารละลายมาตรฐานของกรดแกลลิกเข้มข้น 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร ทำโดยละลายกรดแกลลิก (Gallic acid) หนัก 0.10 กรัม ละลายในเอทานอล 10 มิลลิลิตรเทลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร และปรับปริมาตรสารละลายด้วยเอทานอลจนครบ 100 มิลลิลิตร

การเตรียมสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิกที่ระดับความเข้มข้น 10, 25, 50, 75, 100, 150, 200 และ 250 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยปิเปตสารละลายมาตรฐานของกรดแกลลิกเข้มข้น 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตรมา 0.10, 0.25, 0.50, 0.75, 1.00, 1.50, 2.00 และ 2.50 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 10 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 10 มิลลิลิตร

2. การเตรียมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3) เข้มข้น 10% w/ v

ชั่งโซเดียมคาร์บอเนต 10 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 100 มิลลิลิตร

3. การสร้างกราฟมาตรฐานของกรดแกลลิก

โดยปิเปตน้ำกลั่น 9.5 มิลลิลิตรในหลอดทดลองตามด้วยสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิกที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร จากนั้นเติมสารละลาย Folin-Ciocalteu Reagent 0.5 มิลลิลิตร เขย่า 5 นาที จากนั้นเติมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต 10 % w/ v ปริมาตร 2.0 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ในที่มืด ที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 730 นาโนเมตร (Nm) โดยใช้เครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ (Thermo รุ่น BioMate 3) และใช้สารละลายเอทานอลแทนสารละลายตัวอย่างเป็นสารละลายแบลงค์

4. การเตรียมสารละลายตัวอย่าง

ชั่งสารสกัดสาหร่ายสดมาอย่างละ 0.01 กรัมละลายในเอทานอลบริสุทธิ์ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ผสมจนสารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน จากนั้นนำสารสกัดหยาบจากสาหร่ายสดปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร มาทำปฏิกิริยากับ Folin-Ciocalteu reagent ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร และน้ำกลั่นปริมาตร 9.5 มิลลิลิตร ใส่สารละลาย Sodium carbonate ความเข้มข้น 10% w/ v ปริมาตร 2.0 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ในที่มืด ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที เมื่อครบเวลาแล้วจึงนำสารละลายที่เตรียมไปวัดค่าการดูดกลืนคลื่นแสงที่ความยาวคลื่น 730 นาโนเมตรด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ (Thermo รุ่น BioMate 3) สำหรับสารละลายแบลงค์ใช้สารละลายเอทานอลแทนสารละลายตัวอย่าง ทำการวิเคราะห์เช่นเดียวกัน 3 ซ้ำ จากนั้นจึงนำค่าการดูดกลืนแสงมาวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดโดยอาศัยการคำนวณจากสมการมาตรฐานของกรดแกลลิก และคำนวณปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมดในหน่วยมิลลิกรัมสมมูลกรดแกลลิกต่อน้ำหนักสารสกัด 1กรัม (Mg GAE/ g extract)

การวิเคราะห์การต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดสาหร่ายน้ำจืดสด

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

วิธี DPPH radical scavenging ดัดแปลงมาจากปริญญา มูลสิน และอมรรัตน์ วงษ์กลม (2556)

1.1 การเตรียมสารละลาย DPPH เข้มข้น 0.1 มิลลิโมลต่อลิตร

ชั่ง DPPH มา 0.0039 กรัม ละลายด้วยเอทานอลบริสุทธิ์ เทลงในขวดวัดปริมาตร ขนาด 100 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยเอทานอลจนครบปริมาตร 100 มิลลิลิตร

1.2 การเตรียมสารละลายสกัดสาหร่ายและการวิเคราะห์ผล

ชั่งสารสกัดสาหร่าย 0.10 กรัมละลายในเอทานอลบริสุทธิ์ 20 มิลลิลิตร ปิเปตสารละลายสารสกัดตัวอย่างละ 1.0 มิลลิลิตรลงในหลอดทดลองที่มีสารละลาย DPPH 0.1 มิลลิโมลาร์ (MM) ปริมาตร 2.0 มิลลิลิตร เขย่าเป็นเวลา 3 นาที จากนั้นเก็บในที่มืดที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาทีแล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร โดยเครื่องสเปคโตรโฟโตรมิเตอร์ (Thermo scientific รุ่น BioMate 3) ใช้เอทานอลบริสุทธิ์แทนสารละลายตัวอย่างเป็นสารละลายแบลงค์ จากนั้นนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาคำนวณหาค่าการต้านอนุมูลอิสระ DPPH โดยเทียบกับสารมาตรฐาน trolox

1.3 การเตรียมสารละลายมาตรฐาน trolox

ปิเปต trolox เข้มข้น 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร และใช้เอทานอลเป็นตัวทำละลายให้ได้ความเข้มข้น 1, 3, 5, 10, 20, 30 และ 40 มิลลิกรัมต่อลิตรและทำการวิเคราะห์เหมือนกับสารสกัดสาหร่ายแต่ใช้สารละลาย trolox แทนสารสกัดสาหร่าย แล้วนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาสร้างกราฟมาตรฐานของ trolox โดยให้แกน x เป็นค่าความเข้มข้นของ trolox และแกน y เป็นค่าการดูดกลืนแสงที่ 517 นาโนเมตร นำค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดตัวอย่างมาเทียบกับกราฟมาตรฐาน ซึ่งค่าที่ได้แสดงเป็นหน่วยมิลลิกรัมสมมูล trolox ต่อน้ำหนักสารสกัด 1 กรัม (Mg trolox equivalent (TE)/ g extract)

2. วิธี 2, 2-Azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) cation radical-scavenging assay: (ABTS assay)

วิธี ABTS free radical scavenging activity ดัดแปลงมาจาก ศิริพร โอโกโนกิ และคณะ (2550)

2.1 เตรียม ABTS stock solution

ใช้สารละลาย ABTS เข้มข้น 7 มิลลิโมลต่อลิตร ผสมกับสารละลายโพแทสเซียมเปอร์ซัลเฟตความเข้มข้น 2.45 มิลลิโมลต่อลิตร ในอัตราส่วน 1:1 ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องในที่มืด 12-16 ชั่วโมง

2.2 ทดสอบ ABTS radical solution

นำ ABTS stock solution มาเจือจางด้วยเอทานอลบริสุทธิ์ และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร ให้อยู่ในช่วง 0.7 ± 0.2

2.3 การเตรียมสารสกัดสาหร่าย

ผสมสารละลายสกัดสาหร่ายปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร และสารละลาย ABTS radical ที่เจือจางแล้ว ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องในที่มืดนาน 6 นาที แล้วจึงนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร และนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาคำนวณหาค่าการต้านอนุมูลอิสระ ABTS โดยเทียบกับสารมาตรฐาน trolox

2.4 การเตรียมสารละลายมาตรฐาน trolox

ปิเปต trolox เข้มข้น1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร และใช้เอทานอลบริสุทธิ์เป็นตัวทำละลายให้ได้ความเข้มข้น 1, 10, 20, 30, 40, 50, 60 และ 70 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ และทำการวิเคราะห์เหมือนกับสารสกัดสาหร่าย แต่ใช้สารละลาย trolox แทนสารสกัดสกัดสาหร่ายนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง จากนั้นนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาสร้างกราฟมาตรฐานของ trolox โดยให้แกน x เป็นค่าความเข้มข้นของ trolox และแกน y เป็นค่าการดูดกลืนแสงนำค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดตัวอย่างมาเทียบกับกราฟมาตรฐาน ซึ่งค่าที่ได้แสดงเป็นหน่วยมิลลิกรัมสมมูล trolox ต่อน้ำหนักสารสกัด 1 กรัม (Mg trolox equivalent (TE)/ g extract)

3. วิธี Ferric reducing ability power (FRAP) assay

วิธี FRAP ตามวิธีของสถาพร สัตย์ซื่อ, สุธาสินี ทัพพสารพงศ์ และธีระศักดิ์ ดำรงรุ่งเรือง (2557)

3.1 การตรียมสาระละลาย FRAP reagent

ผสม 300 มิลลิโมลต่อลิตร Acetate buffer (PH 3.6) สารละลาย Ferric chloride 20 มิลลิโมลต่อลิตร และ 10 มิลลิโมลต่อลิตร 2, 4, 6-tripyridyl-3-triazine (TPTZ) ให้เข้ากันในอัตราส่วน 10: 1: 1 (V/ v/ v) แล้วนำไปอุ่นที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที

3.2 การเตรียมสารละลายสาหร่ายสกัด

ละลายสาหร่ายสกัดให้มีความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรด้วยเอทานอลบริสุทธิ์ ปิเปตสารละลายสาหร่ายสกัดปริมาตร 0.3 มิลลิลิตร โดยเติมลงในสารละลาย FRAP reagent ปริมาตร 3.7 มิลลิลิตรและนำไปบ่มที่อุณหภูมิห้องในที่มืดเป็นเวลา 4 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 593 นาโนเมตร จากนั้นไปคำนวณเป็นประสิทธิภาพในการรีดิวซ์ (Reducing ability) โดยอาศัยสมการเส้นตรงจากกราฟมาตรฐานของ trolox

3.3 การเตรียมสารละลายมาตรฐาน trolox

ปิเปต trolox เข้มข้น1,000 มิลลิกรัมกรัมต่อลิตร และใช้เอทานอลบริสุทธิ์เป็นตัวทำละลายให้ได้ความเข้มข้น 10, 20, 30, 40, 50, 60 และ 70 มิลลิกรัมต่อลิตรตามลำดับ และทำการวิเคราะห์เหมือนกับสารสกัดสาหร่ายแต่ใช้สารละลาย trolox แทนสารสกัดสกัดสาหร่ายนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงจากนั้นนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาสร้างกราฟมาตรฐานของ trolox โดยให้แกน x เป็นค่าความเข้มข้นของ trolox และแกน y เป็นค่าการดูดกลืนแสงนำค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดตัวอย่างมาเทียบกับกราฟมาตรฐาน ซึ่งค่าที่ได้แสดงเป็นหน่วยมิลลิกรัมสมมูล trolox ต่อน้ำหนักสารสกัด 1 กรัม (Mg trolox equivalent (TE)/ g extract)

การวิเคราะห์ปริมาณคลอโรฟิลล์ ดัดแปลงจากสัณห์ ละอองศรี (2551)

หั่นสาหร่ายน้ำจืดสดให้ละเอียดปริมาณ 100 มิลลิกรัม สกัดด้วยอะซิโตนปริมาตร 20 มิลลิลิตร จนสาหร่ายเปลี่ยนเป็นสีใส โดยหุ้มภาชนะบรรจุสารละลายคลอโรฟิลล์ด้วยอะลูมิเนียมฟลอยด์เพื่อป้องกันการสูญเสียคลอโรฟิลล์จากการโดนแสง จากนั้นกรองเอากากสาหร่ายออก ปรับปริมาตรของสารละลายด้วยอะซิโตนให้เท่ากับ 30 มิลลิลิตร นำสารละลายคลอโรฟิลล์ที่สกัดด้วยอะซิโตนไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวช่วงคลื่น 645 และ 663 นาโนเมตรด้วยสเปคโตโฟโตรมิเตอร์ (Thermo รุ่น BioMate3) และนำค่าที่ได้ไปคำนวณหาปริมาณคลอโรฟิลล์เอ คลอโรฟิลล์บี และปริมาณคลอโรฟิลล์รวม ดังสมการที่ (5)-(7)

ปริมาณคลอโรฟิลล์เอ (Mg/ g) $= [12.7\ (A_{663})-2.69\ (A_{645})] \times (V) / (1000 \times m)$… (5)

ปริมาณคลอโรฟิลล์บี (Mg/ g) $= [22.9\ (A_{645})-4.68\ (A_{663})] \times (V) / (1000 \times m)$… (6)

ปริมาณคลอโรฟิลล์รวม (Mg/ g) $= [20.21(A_{645}) + 8.02(A_{663})] \times (V) / (1000 \times m)$… (7)

เมื่อ $A_{645,663}$ = ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 645 และ 663 nm ตามลำดับ

V = ปริมาตรของสารละลายที่ตรวจวัดคลอโรฟิลล์ (มิลลิลิตร)

m = น้ำหนักสาหร่ายน้ำจืดสด (กรัม)

การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

การศึกษาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด การต้านอนุมูลอิสระวิธี DPPH, ABTS และ FRAP และการหาปริมาณคลอโรฟิลล์ของสาหร่ายน้ำจืด 4 ชนิด วิเคราะห์ผลทางสถิติโดยใช้การวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of variance, ANOVA) และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยใช้วิธี Duncan’s multiple range test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ด้วยโปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ SPSS เวอร์ชั่น 22

บทที่ 4
ผลการวิจัย

ผลการศึกษาร้อยละผลผลิตที่ได้จากการสกัดสาหร่าย

จากการนำสาหร่ายน้ำจืดแบบสด 4 ชนิดของจังหวัดน่าน ได้แก่ สาหร่ายไกต๊ะ สาหร่ายไกไหม สาหร่ายเตา และสาหร่ายลอน ที่สกัดด้วยวิธีการแช่ และวิธีการสกัดใช้เครื่องเขย่าสาร โดยทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง และคำนวณร้อยละผลผลิตที่ได้ (% yield) ได้ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 4-1

ตารางที่ 4-1 ร้อยละผลผลิตที่ได้จากการสกัดด้วยวิธีการสกัดแบบแช่ตัวอย่างในเอทานอลและวิธีการสกัดด้วยเครื่องเขย่าสาร

ตัวอย่าง	ร้อยละผลผลิตที่ได้ (% yield)	
	วิธีสกัดแบบแช่	วิธีสกัดด้วยเครื่องเขย่าสาร
สาหร่ายไกต๊ะ	1.41 ± 0.11	1.53 ± 0.80
สาหร่ายไกไหม	1.02 ± 0.03	1.33 ± 0.94
สาหร่ายเตา	2.19 ± 0.06	2.08 ± 0.11
สาหร่ายลอน	0.21 ± 0.04	0.98 ± 0.27

จากตารางที่ 4-1 เมื่อเปรียบเทียบร้อยละผลผลิตที่ได้ (% yield) จากสารสกัดสาหร่าย 4 ชนิด ด้วยวิธีการสกัดที่แตกต่างกัน พบว่าสาหร่ายเตาให้ร้อยละผลผลิตมากที่สุด รองลงมาคือ สาหร่ายไกต๊ะ สาหร่ายไกไหม และสาหร่ายลอน ตามลำดับ

ผลการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (Total phenolic compound)

การวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (TPC) โดยใช้วิธี Folin-Ciocalteu phenol test และคำนวณหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดในหน่วยของมิลลิกรัมแกลลิกสมมูลต่อสารสกัด 1 กรัม (Mg GAE/ g extract) ของสารสกัดจากสาหร่ายไกต๊ะ สาหร่ายไกไหม สาหร่ายเตา และสาหร่ายลอน ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 4-2 จะเห็นได้ว่า ในสาหร่ายเตามีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดมากที่สุดมีค่าเท่ากับ 179.18 ± 0.13 mg GAE/ g extract

ด้วยวิธีการแช่ และ 204.29 ± 0.25 mg GAE/ g extract ด้วยวิธีใช้เครื่องเขย่าสาร รองลงมาคือ สาหร่ายไกตั๊ะ สาหร่ายลอน และสาหร่ายไกไหม ตามลำดับ

ตารางที่ 4-2 ผลการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (TPC) ของสารสกัดสาหร่ายน้ำจืด

ตัวอย่าง	TPC (Mg GAE/ g extract)	
	วิธีสกัดแบบแช่	วิธีสกัดด้วยเครื่องเขย่าสาร
สาหร่ายไกตั๊ะ	37.31 ± 0.38^{d}	54.54 ± 0.84^{c}
สาหร่ายไกไหม	10.09 ± 1.08^{f}	21.11 ± 0.68^{e}
สาหร่ายเตา	179.18 ± 0.13^{b}	204.29 ± 0.25^{a}
สาหร่ายลอน	35.70 ± 0.64^{d}	26.56 ± 0.57^{e}

หมายเหตุ ตัวอักษร a-f ที่แตกต่างกันตามคอลัมน์ และตามแถว แตกต่างกันทางสถิติ ($P \leq 0.05$)

จากตารางที่ 4-2 พบว่า ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดในสาหร่ายทุกชนิดด้วยวิธีการสกัดทั้ง 2 วิธีแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) แสดงให้เห็นว่า ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดในสาหร่ายไกตั๊ะ สาหร่ายไกไหม และสาหร่ายเตา ด้วยวิธีสกัดแบบใช้เครื่องเขย่าสารให้ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดมากกว่าการสกัดแบบแช่ สำหรับสาหร่ายลอนปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดที่สกัดแบบแช่ให้ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดมากกว่าการใช้เครื่องเขย่าสาร

ผลการวิเคราะห์การต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดสาหร่ายน้ำจืด

การทดสอบการต้านอนุมูลอิสระของสาหร่ายน้ำจืดที่สกัดด้วยวิธีที่แตกต่างกันคือ วิธีสกัดแบบแช่ และวิธีสกัดแบบเครื่องเขย่าสาร ซึ่งทดสอบการต้านอนุมูลอิสระทั้งหมด 3 วิธีคือ วิธี DPPH วิธี ABTS และวิธี FRAP โดยเทียบกับกราฟมาตรฐาน trolox ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ในหน่วย mg TE/ g extract แสดงผลดังตารางที่ 4-3

ตารางที่ 4-3 ผลการวิเคราะห์การต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดสาหร่ายน้ำจืด

วิธีการสกัดตัวอย่าง	ตัวอย่าง	DPPH (Mg TE/ g extract)	ABTS (Mg TE/ g extract)	FRAP (Mg TE/ g extract)
แบบแช่	สาหร่ายไกต๊ะ	0.74 ± 0.28^{d}	29.66 ± 1.64^{d}	23.49 ± 1.18^{b}
	สาหร่ายไกไหม	0.70 ± 0.42^{d}	28.35 ± 1.76^{d}	15.91 ± 1.68^{b}
	สาหร่ายเตา	315.00 ± 0.60^{b}	565.25 ± 2.08^{a}	386.72 ± 1.61^{a}
	สาหร่ายลอน	1.01 ± 0.48^{d}	$53.79 \pm 0.47^{c,d}$	22.57 ± 3.12^{b}
แบบใช้เครื่องเขย่าสาร	สาหร่ายไกต๊ะ	$2.33 \pm 1.26^{c,d}$	81.84 ± 3.33^{c}	45.72 ± 0.97^{b}
	สาหร่ายไกไหม	$1.82 \pm 1.74^{c,d}$	37.06 ± 1.60^{d}	34.30 ± 3.38^{b}
	สาหร่ายเตา	323.71 ± 0.72^{a}	574.19 ± 3.88^{a}	286.51 ± 3.00^{a}
	สาหร่ายลอน	2.72 ± 0.16^{c}	158.78 ± 3.84^{b}	35.91 ± 0.40^{b}

หมายเหตุ ตัวอักษร a-d ที่แตกต่างกันตามคอลัมน์เดียวกัน แตกต่างกันทางสถิติ ($P \leq 0.05$)

การศึกษาการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH ของสารสกัดสาหร่ายทั้ง 4 ชนิดพบว่า สาหร่ายเตามีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระมากที่สุดเท่ากับ 315.00 ± 0.60 mg TE/ g extract ด้วยวิธีสกัดแบบแช่ และ 323.71 ± 0.72 mg TE/ g extract ด้วยวิธีสกัดแบบใช้เครื่องเขย่าสาร รองลงมาคือ สาหร่ายลอน สาหร่ายไกต๊ะ และสาหร่ายไกไหม ตามลำดับ และพบว่าค่าการต้านอนุมูลอิสระในสาหร่ายเตา และสาหร่ายลอน ด้วยวิธีการสกัดสาหร่ายทั้ง 2 วิธี แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) ดังแสดงในตารางที่ 4-3

เมื่อทำการศึกษาการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS ให้ผลการวิเคราะห์มีแนวโน้มเช่นเดียวกับการวิเคราะห์ด้วยวิธี DPPH พบว่า สาหร่ายเตามีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระมากที่สุดเท่ากับ 565.25 ± 2.08 mg TE/ g extract ด้วยวิธีการสกัดแบบแช่ และมีค่าเท่ากับ 574.19 ± 3.88 mg TE/ g extract ด้วยวิธีสกัดแบบใช้เครื่องเขย่าสาร รองลงมาคือ สาหร่ายลอน สาหร่ายไกต๊ะ และสาหร่ายไกไหม ค่าการต้านอนุมูลอิสระในสาหร่ายไกต๊ะ และสาหร่ายลอน ด้วยวิธีการสกัดสาหร่ายทั้ง 2 วิธี แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) ดังแสดงในตารางที่ 4-3

การศึกษาการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP พบว่า สาหร่ายเตามีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระมากที่สุดเช่นกัน มีค่าเท่ากับ 386.72 ± 1.61 mg TE/ g extract ด้วยวิธีการสกัดแบบแช่ และมีค่าเท่ากับ 286.51 ± 3.00 mg TE/ g extract ด้วยวิธีสกัดแบบใช้เครื่องเขย่าสาร รองลงมาคือ สาหร่ายไกต๊ะ สาหร่ายลอน และสาหร่ายไกไหม และพบว่าค่าการต้านอนุมูลอิสระในสาหร่ายทั้ง 4 ชนิด

ด้วยวิธีการสกัดสาหร่ายทั้ง 2 วิธีไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$) ดังแสดงในตารางที่ 4-3

ผลการวิเคราะห์ปริมาณคลอโรฟิลล์ในสาหร่ายน้ำจืดทั้ง 4 ชนิด

การวิเคราะห์หาปริมาณคลอโรฟิลล์เอ และคลอโรฟิลล์บี ซึ่งสกัดด้วยอะซิโตนบริสุทธิ์ พบว่า สาหร่ายไกต๊ะมีปริมาณคลอโรฟิลล์เอสูงสุดคือ 2.31 ± 0.17 มิลลิกรัมต่อกรัม (Mg/ g) รองลงมาคือ สาหร่ายเตา สาหร่ายไกไหม และสาหร่ายลอนตามลำดับ ขณะที่สาหร่ายไกต๊ะมีปริมาณคลอโรฟิลล์บี สูงสุดเช่นเดียวกันมีค่าเท่ากับ 1.57 ± 0.13 mg/ g รองลงมาคือสาหร่ายไกไหม สาหร่ายเตา และสาหร่ายลอน ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 4-5

ตารางที่ 4-5 ผลการวิเคราะห์การหาปริมาณคลอโรฟิลล์ในสาหร่ายน้ำจืด

ตัวอย่าง	คลอโรฟิลล์เอ (Mg/ g)	คลอโรฟิลล์บี (Mg/ g)	คลอโรฟิลล์รวม (Mg/ g)
สาหร่ายไกต๊ะ	2.31 ± 0.17^{a}	1.57 ± 0.13^{a}	3.88 ± 0.31^{a}
สาหร่ายไกไหม	0.35 ± 0.02^{b}	0.22 ± 0.01^{b}	0.57 ± 0.04^{b}
สาหร่ายเตา	0.59 ± 0.01^{c}	0.18 ± 0.00^{b}	0.77 ± 0.01^{b}
สาหร่ายลอน	0.09 ± 0.01^{d}	0.05 ± 0.00^{c}	0.14 ± 0.01^{c}

หมายเหตุ ตัวอักษร a- d ที่แตกต่างกันตามคอลัมน์เดียวกัน แตกต่างกันทางสถิติ ($P \leq 0.05$)

ปริมาณคลอโรฟิลล์รวมของสาหร่ายน้ำจืด 4 ชนิดพบว่า สาหร่ายไกต๊ะมีปริมาณคลอโรฟิลล์รวมมากที่สุดเท่ากับ 3.88 ± 0.31 mg/ g รองลงมาคือ สาหร่ายเตา สาหร่ายไกไหม และสาหร่ายลอน ตามลำดับ และพบว่าปริมาณคลอโรฟิลล์เอ คลอโรฟิลล์บี และคลอโรฟิลล์รวมในสาหร่ายทั้ง 4 ชนิด แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$)

บทที่ 5
อภิปรายและสรุปผลการทดลอง

อภิปรายผลการทดลอง

ในการทดลองทำการสกัดสารจากสาหร่ายน้ำจืดแบบสดจำนวน 4 ชนิดด้วยเอทานอลบริสุทธิ์ โดยทำการสกัดสารจากสาหร่ายน้ำจืด 2 วิธีคือวิธีการสกัดแบบแช่ด้วยเอทานอลบริสุทธิ์เป็นเวลา 3 วัน และวิธีสกัดแบบใช้เครื่องเขย่าสารเป็นเวลา 2 ชั่วโมง แล้วนำสารสกัดสาหร่ายน้ำจืดทั้ง 4 ชนิดมาคำนวณร้อยละผลผลิตได้ (% yield) พบว่าสารสกัดสาหร่ายเตามีร้อยละผลผลิตได้มากที่สุดเท่ากับร้อยละ 2.19 ± 0.06 และร้อยละ 2.08 ± 0.11 ตามลำดับ รองลงมาคือ สาหร่ายไกต๊ะ สาหร่ายไกไหม และสาหร่ายลอน ซึ่งผลของ Kosasu et al. (2015) ศึกษาโดยใช้เอทานอลบริสุทธิ์สกัดสาหร่ายน้ำจืดแบบแห้ง และสกัดโดยวิธีการแช่พบว่า ร้อยละผลผลิตที่ได้ของสาหร่ายเตามากที่สุดมีค่าเท่ากับร้อยละ 4.53 สาหร่ายไกมีค่าเท่ากับร้อยละ 3.86 และสาหร่ายลอนมีค่าเท่ากับร้อยละ 0.70 เนื่องจากตัวอย่างสาหร่ายน้ำจืดที่นำมาวิเคราะห์เป็นตัวอย่างแบบสด จึงมีน้ำเป็นองค์ประกอบจึงทำให้ได้ร้อยละผลผลิตที่ได้มีปริมาณที่น้อย และการศึกษาของ ยุวดี พีรพรพิศาล และคณะ (2552) ได้รายงานร้อยละผลผลิตที่ได้โดยใช้น้ำในการสกัดสาหร่าย 4 ชนิด พบว่า ปริมาณส่วนสกัดที่ได้จากสาหร่ายเตามีค่าเท่ากับ ร้อยละ 18 สาหร่ายไกไหมมีค่าเท่ากับร้อยละ 15 สาหร่ายไกต๊ะมีค่าเท่ากับร้อยละ 13 และสาหร่ายลอนมีค่าเท่ากับร้อยละ 9

การวิเคราะห์หาปริมาณกลุ่มสารประกอบฟีนอลิก ซึ่งเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่สำคัญชนิดหนึ่ง ที่พบในสาหร่ายน้ำจืดทั้ง 4 ชนิด พบว่าสารสกัดสาหร่ายเตามีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดมากที่สุดเท่ากับ 179.18 ± 0.13 mg GAE/ g extract ด้วยวิธีการแช่ และมีค่าเท่ากับ 204.29 ± 0.25 mg GAE/ g extract ด้วยวิธีสกัดแบบใช้เครื่องเขย่าสาร รองลงมาคือ สาหร่ายไกต๊ะ สาหร่ายลอน และสาหร่ายไกไหม ตามลำดับ จากการรายงานผลการวิเคราะห์ของปริญญา มูลสิน และอมรรัตน์ วงษ์กลม (2556) ที่สกัดสาหร่ายแบบแห้งด้วยวิธีการแช่ในเอทานอล พบว่า สารสกัดสาหร่ายเตาให้ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกมากที่สุดเท่ากับ 155.82 mg GAE/ g extract รองลงมาคือ สาหร่ายลอน และสาหร่ายไกที่ให้ค่าเท่ากับ 18.22 และ 12.12 mg GAE/ g extract ตามลำดับ จากผลการวิเคราะห์แสดงให้เห็นว่า สารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดที่พบในสาหร่ายน้ำจืดทั้ง 4 ชนิด สามารถแสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้ และพบว่าปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดในสาหร่ายไกต๊ะ สาหร่ายไกไหม และสาหร่ายเตา ด้วยวิธีสกัดแบบใช้เครื่องเขย่าสารจะให้ปริมาณสูงกว่าวิธีการสกัดแบบแช่ และมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) อาจเป็นเพราะ

การใช้เครื่องเขย่าสารส่งผลให้สาหร่ายทั้ง 3 ชนิดกระจายตัวอย่างสม่ำเสมอในเอทานอล สาหร่ายจึงสัมผัสกับเอทานอลได้ดี และการใช้เครื่องเขย่ามีความเร็วรอบคงที่ สม่ำสมอ จึงให้ค่าปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดสูงกว่าวิธีการสกัดแบบแช่ ส่วนสาหร่ายลอนที่วิธีการสกัดแบบแช่ให้ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดสูงกว่าวิธีสกัดแบบใช้เครื่องเขย่าสาร เนื่องจากสาหร่ายลอน มีลักษณะเป็นกลุ่มเซลล์ เป็นก้อนเมือก คล้ายวุ้น ตรงกลางจะกลวง ซึ่งมีลักษณะต่างจากสาหร่ายไกตั๊ะ สาหร่ายไกไหม และสาหร่ายเตา ที่มีลักษณะเป็นเส้นยาว (ยุวดี พีรพรพิศาล และคณะ, 2552) สาหร่ายลอนจึงเหมาะกับการสกัดแบบแช่ในเอทานอลที่ใช้เวลาในการสกัดนานกว่า เอทานอลสามารถแทรกซึมเข้าไปในเซลล์ได้ดีกว่าจึงให้ค่าสูงกว่าการใช้เครื่องเขย่าสาร (ดวงกมล เรือนงาม, 2557)

การวิเคราะห์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH เป็นการศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดในการยับยั้งกับอนุมูลอิสระ DPPH ที่อยู่ในรูปที่เสถียร โดย DPPH คืออนุมูลอิสระที่เสถียรและสามารถรับอิเล็กตรอนได้ เมื่อได้รับอิเล็กตรอนจากโมเลกุลอื่นจะทำให้เปลี่ยนเป็นโมเลกุลที่ไม่เป็นอนุมูลอิสระ (รัชฎาพร อุ่นศิวิไลย์ และคณะ, 2554) จากผลการวิเคราะห์ในงานวิจัยนี้พบว่าสาหร่ายเตามีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระมากที่สุด ซึ่งผลการวิเคราะห์สัมพันธ์กับปริมาณสารประกอบฟี-นอลิกทั้งหมดคือ สาหร่ายเตามีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดสูงที่สุด จึงสามารถต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH ได้สูงที่สุด จากการรายงานผลการทดลองของ Kosasu et al. (2015) ที่ศึกษาการต้านอนุมูลอิสระ DPPH พบว่าสาหร่ายเตามีค่าการต้านอนุมูลอิสระเท่ากับ 52.33 ± 1.84 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีค่ามากกว่าสาหร่ายลอน และสาหร่ายไก ตามลำดับ การศึกษาของ ยุวดี พีรพรพิศาล และคณะ (2552) ได้ทำการศึกษาสาหร่ายน้ำจืด 4 ชนิดที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยสามารถยับยั้งอนุมูล DPPH ได้ความเข้มข้นที่สามารถกำจัดอนุมูลอิสระได้ 50 เปอร์เซ็นต์ (IC_{50}) ดังนี้ สาหร่ายเตามีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.04 mg/ ml รองลงมาคือสาหร่ายไกไหมมีค่า IC_{50} เท่ากับ 10.97 mg/ ml สาหร่ายไกตั๊ะมีค่า IC_{50} เท่ากับ 12.49 mg/ ml และสาหร่ายลอนมีค่า IC_{50} เท่ากับ 29.78 mg/ ml ตามลำดับ แสดงว่าสาหร่ายเตามีค่ามีค่า IC_{50} ต่ำที่สุด นั่นคือสาหร่ายเตาจึงมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระได้มากกว่าสาหร่ายชนิดอื่น ๆ การศึกษาของ Farasat et al. (2014) พบว่าสาหร่ายทะเลสีเขียว *Ulva clathrata* มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดสูงที่สุด จึงแสดงค่าการต้านอนุมูลอิสระ IC_{50} ที่ต่ำที่สุด การรายงานผลการทดลองของ พันธุ์ทิพย์ วิเศษพงษ์พันธ์ และคณะ (2555) ที่พบว่า สารสกัดสาหร่ายทะเลสีน้ำตาล *Lobophora variegata* ออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ได้ดีที่สุดและมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดสูงที่สุดเช่นกัน ค่าการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ในหน่วย mg TE/ g extract พบว่า ในสารสกัดสาหร่ายเตา และสาหร่ายลอน วิธีการสกัดสาหร่ายทั้ง 2 วิธี แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$)

การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS เป็นการศึกษาการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของสาร ABTS โดยโพแทสเซียมเปอร์ซัลฟตจะไปออกซิไดซ์ ABTS ให้เป็น $ABTS^{\bullet+}$ ทำให้เกิดเป็นสีเขียว จากนั้นสารสกัดสาหร่ายจะรีดิวซ์ $ABTS^{\bullet+}$ ให้กลับมาเป็น ABTS ทำให้สีเขียวจางลง ผลการวิเคราะห์ในงานวิจัยนี้พบว่า สาหร่ายเตามีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระมากที่สุดเช่นเดียวกับวิธี DPPH แสดงว่าสาหร่ายเตาสามารถรีดิวซ์ $ABTS^{\bullet+}$ ได้ดีกว่าสาหร่ายชนิดอื่น ๆ และค่าการต้านอนุมูลอิสระ ABTS ในหน่วย mg TE/ g extract พบว่า สาหร่ายไกต๊ะ และสาหร่ายลอนด้วยวิธีการสกัดสาหร่ายทั้ง 2 วิธี แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) จากการศึกษาของ ธีระวัฒน์ รัตนพจน์, เกรียงศักดิ์ เม่งอำพัน, ชุติมา ศรีมะเริง, รัตนาภรณ์ จันทร์ทิพย์ และดวงพร อมรเลิศพิศาล (2555) ได้รายงานผลการทดลองความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระ ABTS ของสารสกัดสาหร่ายเตาด้วยน้ำ ในฤดูร้อน หนาว และฝน เมื่อเทียบกับสารละลายมาตรฐาน trolox พบว่าสารสกัดของสาหร่ายเตาฤดูหนาวและฤดูฝนที่ความเข้มข้นน้อยกว่ามีความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระ ABTS ได้ดีกว่าสารละลายมาตรฐาน trolox ส่วนสารสกัดสาหร่ายเตาฤดูร้อนต้องใช้ความเข้มข้นสูงจึงจะมีค่าการยับยั้งอนุมูลอิสระได้ดีเท่าสารละลายมาตรฐาน trolox และสารสกัดสาหร่ายเตาฤดูฝนและหนาว หากเพิ่มความเข้มข้นของสารสกัดสาหร่ายเตาให้มากขึ้นจะสามารถให้ผลการยับยั้งอนุมูลอิสระมากขึ้นได้ใกล้เคียงกับ trolox (97-99 เปอร์เซ็นต์) และการรายงานผลของ Mungmai, Jiranusornkul, Peerapornpisal, Sirithunyalug and Leelapornpisid (2014) ได้ทดสอบความสามารถในการจับอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS ของสาหร่ายไกชนิด *Rhizoclonium hieroglyphicum* (C.Agardh) จากแม่น้ำน่านพบว่า สารสกัดสาหร่ายไกด้วยน้ำสามารถต้านอนุมูลอิสระ ABTS ที่แสดงค่า IC_{50} เท่ากับ 13.94 ± 0.02 mg/ ml และแสดงค่า Trolox Equivalent Antioxidative Capacity (TEAC) เท่ากับ 2.07 ± 0.03 mg TE/ g extract ซึ่งแสดงค่าการต้านอนุมูลอิสระได้ดีกว่าสารละลายมาตรฐาน trolox ถึง 2 เท่า และพบว่าความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ ABTS ของสาหร่ายน้ำจืดทั้ง 4 ชนิดสามารถต้านอนุมูลอิสระในทิศทางเดียวกับวิธี DPPH

การวิเคราะห์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP เป็นการศึกษาสารต้านอนุมูลอิสระสามารถถ่ายเทอิเล็กตรอนให้กับสารประกอบเชิงซ้อน $[Fe\text{-}(TPTZ)]^{3+}$ ทำให้เกิดการเปลี่ยนรูปเป็น $[Fe\text{-}(TPTZ)]^{2+}$ (บุหรัน พันธุ์สวรรค์, 2556) ซึ่งผลการวิเคราะห์พบว่า ค่าการต้านอนุมูลอิสระ FRAP ในหน่วย mg TE/ g extract ด้วยวิธีการสกัดสาหร่ายทั้ง 2 วิธีไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$) และสาหร่ายเตามีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระมากที่สุดเช่นเดียวกับ 2 วิธี ข้างต้น แสดงว่าสาหร่ายเตามีความสามารถในการถ่ายทอดอิเล็กตรอนให้ Fe^{3+} เปลี่ยนเป็น Fe^{2+} ได้มากที่สุดจึงมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระได้ดีกว่าสาหร่ายชนิดอื่น ๆ จากผลการศึกษาของ วสันต์ สุมินทิลี่, ปนิดา บรรจงสินศิริ, จันทนา ไพรบูรณ์ และวรรณวิมล คล้ายประดิษฐ์ (2556) ได้ศึกษา

ประสิทธิภาพในการรีดิวซ์ของสารสกัดจากสาหร่าย 3 ชนิดคือ สาหร่ายพวงองุ่น สาหร่ายทุ่น และสาหร่ายเขากวาง พบว่าการเพิ่มความเข้มข้นของสารสกัดสาหร่ายมีผลทำให้ความสามารถในการรีดิวซ์ของสารสกัดสาหร่ายทั้ง 3 ชนิดสูงขึ้น และสารสกัดเอทานอลจากสาหร่ายทั้ง 3 ชนิด มีประสิทธิภาพในการรีดิวซ์ที่สูงกว่าสารสกัดน้ำร้อนอย่างมีนัยสำคัญ ($P \leq 0.05$) ในทุกระดับความเข้มข้น ที่ระดับความเข้มข้น 500 μg/ ml สารสกัดเอทานอลจากสาหร่ายพวงองุ่นมีความสามารถในการรีดิวซ์สูงที่สุดมีค่าเท่ากับ 171.69 ± 2.13 μM ascorbic acid equivalent (AE)/ g extract รองลงมาคือสารสกัดเอทานอลจากสาหร่ายทุ่น และสารสกัดเอทานอลจากสาหร่ายเขากวางซึ่งมีค่าเท่ากับ 52.50 ± 0.66 และ 17.15 ± 0.06 μM AE/ g extract ตามลำดับ ซึ่งมีค่าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) จากการรายงานผลการทดลองของ Kosasu et al. (2015) ที่ศึกษาประสิทธิภาพในการรีดิวซ์ Mo^{6+} ด้วยวิธี phosphomolybdenum method ในหน่วยของ mg AE/ g extract พบว่าสาหร่ายเตามีประสิทธิภาพในการรีดิวซ์ Mo^{6+} ให้เป็น Mo^{5+} มากที่สุดเท่ากับ 178.89 mg AE/ g extract จึงกล่าวได้ว่าความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดสอดคล้องกับปริมาณของสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดที่มีในตัวอย่าง หากสารสกัดใดมีปริมาณของสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดมากจะมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระมากเช่นกัน (รัชฎาพร อุ่นศิวิไลย์ และคณะ, 2554)

ในงานวิจัยนี้ได้วิเคราะห์การต้านอนุมูลอิสระเชิงปริมาณ 3 วิธี ซึ่งวิธีเป็นที่นิยม และแต่ละวิธีมีความจำเพาะแตกต่างกัน จึงใช้หลายวิธีร่วมกันในการตรวจสอบและสรุปผล ทั้งนี้เพื่อให้ผลการทดสอบมีความถูกต้องและแม่นยำ โดยวิธีการทำลายอนุมูลอิสระ DPPH มีข้อดี คือ ง่าย สะดวก และรวดเร็ว ส่วนข้อเสีย คือ อนุมูลอิสระ DPPH ค่อนข้างเสถียรไม่ไวต่อปฏิกิริยาเหมือนอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นในร่างกายจริงจึงทำให้เกิดปฏิกิริยาได้ช้า ทำให้ค่าการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่วัดได้น้อยกว่าความเป็นจริง และต้องวัดในปฏิกิริยาที่เป็นแอลกอฮอล์การฟอกสีอนุมูลอิสระ ข้อดีของวิธี ABTS คืออนุมูลอิสระ $ABTS^{\bullet+}$ละลายได้ดีในน้ำ และตัวทำละลายอินทรีย์จึงทำปฏิกิริยาได้อย่างรวดเร็ว และทำปฏิกิริยาได้ดีในช่วง pH กว้าง มีข้อเสีย คือ $ABTS^{\bullet+}$ เป็นสารสังเคราะห์ที่ไม่พบในร่างกายหรือเซลล์สิ่งมีชีวิต และต้องมีการทำปฏิกิริยากับสารอื่นก่อนถึงจะเกิดเป็นอนุมูลอิสระได้ และวิธี FRAP เป็นวิธีที่ง่าย ใช้เวลาน้อย ไม่แพง และสามารถทำซ้ำแล้วให้ผลเหมือนเดิม มีข้อเสีย คือปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นเป็นปฏิกิริยาเคมีที่ไม่เกี่ยวข้องกับสภาวะร่างกาย และสารละลายที่ใช้อ้างอิงต้องใช้น้ำปราศจากไอออนในการวิเคราะห์ (บุหรัน พันธุ์สวรรค์, 2556) จะเห็นว่าในแต่ละวิธีข้างต้นมีความจำเพาะแตกต่างกันจึงต้องเลือกใช้วิธีให้เหมาะสมกับคุณลักษณะของตัวอย่างที่นำมาวิเคราะห์ ทั้งนี้เพื่อให้ผลการทดสอบมีความว่องไว ถูกต้อง เที่ยงตรง และแม่นยำ

การวิเคราะห์หาปริมาณคลอโรฟิลล์เอ และคลอโรฟิลล์บี สกัดด้วยอะซิโตนบริสุทธิ์ พบว่า สาหร่ายไกต๊ะมีปริมาณคลอโรฟิลล์เอสูงสุดคือ 2.31 ± 0.17 mg/ g รองลงมาคือ สาหร่ายเตา สาหร่ายไกไหม และสาหร่ายลอนตามลำดับ ขณะที่สาหร่ายไกต๊ะมีปริมาณคลอโรฟิลล์บีสูงสุด เช่นเดียวกันมีค่าเท่ากับ 1.57 ± 0.13 mg/ g รองลงมาคือสาหร่ายไกไหม สาหร่ายเตา และสาหร่ายลอน ตามลำดับ โดยปริมาณคลอโรฟิลล์เอ คลอโรฟิลล์บี และคลอโรฟิลล์รวมในสาหร่ายทั้ง 4 ชนิด แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) และพบว่า ปริมาณคลอโรฟิลล์เอของสาหร่ายน้ำจืดสดทุกชนิดมีปริมาณมากกว่าคลอโรฟิลล์บี เนื่องจากคลอโรฟิลล์ทั้งสองชนิดมีโครงสร้างแตกต่างกันที่ตำแหน่งที่ 3 โดยคลอโรฟิลล์เอมีโซ่ข้างเป็นหมู่เมทิล ($-CH_3$) ส่วนของคลอโรฟิลล์บีเป็นหมู่อัลดีไฮด์ โครงสร้างที่ต่างกันของคลอโรฟิลล์ทั้งสองชนิดก็จะทำให้มีคุณสมบัติที่แตกต่างกัน โดยเฉพาะด้านการละลายโดยที่หมู่เมทิลของคลอโรฟิลล์เอทำให้โมเลกุลไม่มีขั้วจึงละลายได้ดีในสารละลายที่ไม่มีขั้วเช่น อะซิโตน ไดเอทิลอีเทอร์ เป็นต้น ส่วนหมู่อัลดีไฮด์ของคลอโรฟิลล์บีเป็นโมเลกุลที่มีขั้วจึงทำให้คลอโรฟิลล์บีละลายได้ดีในตัวทำละลายที่มีขั้วเช่น น้ำ และแอลกอฮอล์ จึงทำให้คลอโรฟิลล์เอละลายได้ในแอซิโตนดีกว่าคลอโรฟิลล์บี (Sumanta, Haqu, Nishika, & Suprakash, 2014) จึงส่งผลต่อปริมาณคลอโรฟิลล์เอที่มีปริมาณมากกว่าคลอโรฟิลล์บี ดังงานวิจัยของ Devmalkar et al. (2014) ที่ศึกษาปริมาณคลอโรฟิลล์และสมบัติทางชีวเคมีของไบรโอไฟตา พบว่า ปริมาณความเข้มข้นของคลอโรฟิลล์เอมีมากกว่าคลอโรฟิลล์บี โดยชนิดของ Hepatacea, *Plagiochasma articulatum* มีปริมาณคลอโรฟิลล์เอมากที่สุดคือ 0.359 mg/ g จากผลการศึกษาปริมาณคลอโรฟิลล์เอ คลอโรฟิลล์บี และคลอโรฟิลล์รวมของสาหร่ายไกต๊ะ สาหร่ายไกไหม และสาหร่ายเตามีปริมาณคลอโรฟิลล์มากกว่าสาหร่ายลอน เนื่องจากสาหร่ายลอน *Nostochopsis sp.* อยู่ใน Division Cyanophyta จัดอยู่ในกลุ่มสาหร่ายน้ำจืดสีเขียวแกมน้ำเงินขนาดใหญ่ ที่มีลักษณะเป็นกลุ่มเซลล์ก้อนเมือกสีเขียว หรือสีน้ำตาล ซึ่งสาหร่ายน้ำจืดสีเขียวแกมน้ำเงินไม่มีคลอโรพลาสต์ แต่มีคลอโรฟิลล์ และมีไฟโคบิลิน (Phycobilin) เป็นรงควัตถุที่กระจายอยู่ในไซโตพลาสซึม จึงทำให้สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินสามารถสังเคราะห์แสงได้ ซึ่งไฟโคบิลินเป็นรงควัตถุที่ละลายน้ำได้ ซึ่งประกอบด้วยไฟโคอิริธริน (Phycoerythrin) เป็นรงควัตุสีแดง พบในสาหร่ายสีแดง และไฟโคไซยานิน (Phycocyanin) เป็นรงควัตถุสีน้ำเงินที่พบในสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินโดยไฟโคไซยานินจะรับแสงที่มีความยาวคลื่น 550-615 nm ได้มากที่สุด (ดนัย บุณยเกียรติ, 2547) จึงทำให้วิเคราะห์ปริมาณคลอโรฟิลล์ในสาหร่ายลอนได้น้อยกว่าสาหร่ายไกต๊ะ สาหร่ายไกไหม และสาหร่ายเตา เพราะสาหร่ายทั้ง 3 ชนิดจัดอยู่ในกลุ่มสาหร่ายสีเขียวใน Division Chlorophyta ซึ่งเป็นกลุ่มสาหร่ายที่มีคลอโรพลาสต์เป็นรงควัตถุซึ่งสามารถดูดกลืนแสงในช่วงแถบสีม่วงน้ำเงินและแดงที่ความยาวคลื่น 435, 663 และ 645 nm

การต้านอนุมูลอิสระและปริมาณคลอโรฟิลล์ของสาหร่ายทั้ง 4 ชนิด อาจขึ้นกับปัจจัยหลายชนิดเช่น ระดับความลึกของแม่น้ำ การทับถมของตะกอนในแม่น้ำ อัตราการไหลของน้ำ ซึ่งส่งผลต่อกระบวนการสังเคราะห์แสง โดยสาหร่ายจะดึงสารอาหาร และน้ำจากแม่น้ำใช้สำหรับการเติบโต (ยุวดี พีรพรพิศาล และคณะ, 2552) ดังนั้นสภาพแวดล้อมที่นำสาหร่ายมาวิเคราะห์อาจส่งผลต่อสารออกฤทธิ์ได้

ในงานวิจัยนี้ไม่ได้ทำการศึกษาว่าสารตัวใดที่เป็นตัวออกฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน และวิเคราะห์ปัจจัยที่ส่งผลต่อปริมาณคลอโรฟิลล์ ดังนั้นควรมีการแยกสารบริสุทธิ์ที่เป็นตัวออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และวิเคราะห์ปัจจัยที่ส่งผลต่อปริมาณคลอโรฟิลล์ ในสารสกัดสาหร่ายน้ำจืดแต่ละชนิด

สรุปผลการทดลอง

การนำสาหร่ายน้ำจืด 4 ชนิดมาสกัดด้วยวิธีการแช่ในตัวทำละลายเอทานอลบริสุทธิ์และวิธีการสกัดด้วยเครื่องเขย่าสารพบว่า ร้อยละผลผลิตที่ได้ (% yield) จากสารสกัดสาหร่ายเตามากที่สุด รองลงมาคือ สาหร่ายไกต๊ะ สาหร่ายไกไหม และสาหร่ายลอน

การวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดในตัวทำละลายเอทานอลบริสุทธิ์พบว่า สารสกัดสาหร่ายเตามีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดมากที่สุด ด้วยวิธีการสกัด 2 วิธี รองลงมาคือ สาหร่ายไกต๊ะ สาหร่ายลอน และสาหร่ายไกไหม ตามลำดับ

จากการศึกษาการต้านอนุมูลอิสระทั้ง 3 วิธีพบว่าวิธี DPPH และวิธี ABTS ให้ผลการวิเคราะห์มีแนวโน้มการต้านอนุมูลอิสระเช่นเดียวกันด้วยวิธีการสกัด 2 วิธีคือ สาหร่ายเตามีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระมากที่สุด รองลงมาคือ รองลงมาคือ สาหร่ายลอน สาหร่ายไกต๊ะ และสาหร่ายไกไหม วิธี FRAP พบว่า สาหร่ายเตามีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระมากที่สุดเช่นกันด้วยวิธีการสกัด 2 วิธี รองลงมาคือ สาหร่ายไกต๊ะ สาหร่ายลอน และสาหร่ายไกไหม ตามลำดับ

การวิเคราะห์หาปริมาณคลอโรฟิลล์เอ และคลอโรฟิลล์บี พบว่าสาหร่ายน้ำจืดทั้ง 4 ชนิดมีปริมาณคลอโรฟิลล์เอมากกว่าคลอโรฟิลล์บี และผลการศึกษาพบว่าสาหร่ายไกต๊ะมีปริมาณคลอโรฟิลล์เอสูงสุดคือ 2.31 mg/ g รองลงมาคือ สาหร่ายเตา สาหร่ายไกไหม และสาหร่ายลอน ตามลำดับ ขณะที่สาหร่ายไกต๊ะมีปริมาณคลอโรฟิลล์บีสูงสุดเช่นเดียวกันมีค่าเท่ากับ 1.57 mg/ g รองลงมาคือสาหร่ายไกไหม สาหร่ายเตา และสาหร่ายลอน ตามลำดับ และพบว่าสาหร่ายไกต๊ะมีปริมาณคลอโรฟิลล์รวมมากที่สุดเท่ากับ 3.88 ± 0.31 mg/ g รองลงมาคือ สาหร่ายเตา สาหร่ายไกไหม และสาหร่ายลอน ตามลำดับ

จากผลการศึกษาปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด การต้านอนุมูลอิสระ และการวิเคราะห์หาปริมาณคลอโรฟิลล์ในสาหร่ายน้ำจืดของจังหวัดน่าน ข้อมูลที่ได้จากการศึกษานี้สามารถนำไปใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานทางวิทยาศาสตร์ที่เป็นประโยชน์ และสามารถถ่ายทอดองค์ความรู้สู่ชุมชนให้ช่วยกันอนุรักษ์สาหร่ายในท้องถิ่น อีกทั้งตระหนักถึงคุณค่า และนำไปสู่การเพิ่มมูลค่าของผลิตภัณฑ์อาหารได้

บรรณานุกรม

กันยารัตน์ สาคร. (2556). *การหาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด ฟลาโวนอยด์ทั้งหมดและแอนโทไซยานินทั้งหมดจากเปลือกมังคุดและความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระโดยใช้วิธีพื้นที่ผิวผลตอบสนอง*. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร-มหาบัณฑิต, สาขาวิชาชีวเคมี, คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

สถาบันนวัตกรรมการเรียนรู้. (ม.ป.ป.). *การวัดการดูดกลืนแสงและสเปคตรัมของสารสีจากพืชโดยใช้เครื่อง Spectrophotometer*. เข้าถึงได้จาก http://www.il.mahidol.ac.th/emedia/photosynthesis/ spectrophotometer/spectrophotometer.htm

วิกิพีเดีย. (ม.ป.ป.). *คลอโรฟิลล์*. เข้าถึงได้จาก https://th.wikipedia.org/wiki/คลอโรฟิลล์

เจนจิรา จิรัมย์ และประสงค์ สีหานาม. (2554). อนุมูลอิสระและสารต้านอนุมูลอิสระ: แหล่งที่มาและกลไกการเกิดปฏิกิริยา. *วารสารวิชาการมหาวิทยาลัยราชภัฏกาฬสินธุ์, 1,* 59-70.

ชรินรัตน์ อุดเมืองคำ. (2552). *การพัฒนาผลิตภัณฑ์เยลลี่จากสาหร่ายไก*. สารนิพนธ์วิทยาศาสตรศึกษา, สาขาวิชาวิทยาศาสตรศึกษา, บัณฑิตวิทยาลัย, มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ.

ชลดา จัดประกอบ, พรพรรณ เหล่าวชิระสุวรรณ และเมธิน ผดุงกิจ. (2556). ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ต้านการก่อกลายพันธุ์ของสารสกัดเห็ดหิ้งเกือกม้า. ใน *การประชุมวิชาการและนำเสนอผลงานระดับชาติ The 5th Annual Northeast Pharmacy Research Conference of 2013 16-17 กุมภาพันธ์ 2556 "Pharmacy Profession: Moving Forward to ASEAN Harmonization"* (หน้า 175-179). มหาสารคาม: คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม.

ดนัย บุณยเกียรติ. (2547). *การสังเคราะห์แสง*. เข้าถึงได้จาก http://web.agri.cmu.ac.th/hort/course/359311/PPHY4_photosyn.htm

ดวงกมล เรือนงาม. (2557). การสกัดสารต้านอนุมูลอิสระ. *วารสารวิทยาศาสตร์ลาดกระบัง, 23*(2), 120-139.

ธีระวัฒน์ รัตนพจน์, เกรียงศักดิ์ เม่งอำพัน, ชุติมา ศรีมะเริง, รัตนาภรณ์ จันทร์ทิพย์ และดวงพร อมรเลิศพิศาล. (2555). ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและผลการเสริมสาหร่ายเตาต่อการเจริญเติบโตของปลานิลในกระชัง. *วารสารวิจัยเทคโนโลยีการประมง, 6*(2), 23-34.

นพวัฒน์ เพ็งคำศรี, จัตุพล กันทะมูล, ภัทราภรณ์ โตวัฒนกิจ, วชิรวิทย์ วงศ์ษารัฐ, วนิดา ใจหมั่น, นิภาพร เมืองจันทร์ และสุภารัตน์ จันทร์เหลือง. (2554). ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดเหง้าข่าลิง. *วารสารไทยเภสัชศาสตร์และวิทยาการสุขภาพ, 6*(3), 195-201.

น้ำฝน เบ้าทองคำ และถนอมนวล พรหมบุญ. (2556). *ศึกษาสารต้านอนุมูลอิสระและปริมาณสารฟีนอลลิกทั้งหมดของเห็ดป่ากิน ได้ 5 ชนิดจากป่าชุมชนบ้านน้ำจางในเขตพื้นที่จังหวัดเพชรบูรณ์*. กรุงเทพฯ: สำนักบริหารโครงการส่งเสริมการวิจัยในอุดมศึกษาและพัฒนามหาวิทยาลัยวิจัยแห่งชาติ.

บุหรัน พันธุ์สวรรค์. (2556). อนุมูลอิสระ สารต้านอนุมูลอิสระ และการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ. *วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี, 21*(3), 274-286.

ปริญญา มูลสิน และอมรรัตน์ วงษ์กลม. (2556). *การศึกษาผลของการใช้สารสกัดจากสาหร่ายเพื่อเพิ่มมูลค่าผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง*. อุบลราชธานี: มหาวิทยาลัยราชภัฏอุบลราชธานี.

ปิยศิริ สุนทรนนท์. (2551). *การต้านอนุมูลอิสระในดอกดาหลา*. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร-มหาบัณฑิต, สาขาวิชาชีวเคมี, คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

พรรณพิมล สุริยะพรหมชัย. (2557). *เกษตรน่ารู้*. กรุงเทพฯ: กรมวิชาการเกษตร.

พันธุ์ทิพย์ วิเศษพงษ์พันธ์, พลชา จิตรมิตรสัมพันธ์, ชัชรี แก้วสุรลิขิต และอรรถวุฒิ กันทะวงศ์. (2555). *ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากสาหร่ายทะเล*. กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

พิพัฒน์ ชนาเทพาพร และณัฐรินทร์ ศิริรัตนนันท์. (2557). *ความแปรปรวนของปัจจัยทางสิ่งแวดล้อมที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของสาหร่ายเตา และสาหร่ายลอนในแหล่งน้ำธรรมชาติของจังหวัดเพชรบูรณ์*. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต, สาขาวิชาเกษตรศาสตร์และวิทยาศาสตร์การประมง, คณะเทคโนโลยีการเกษตร, มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบูรณ์.

ภาคภูมิ พระประเสริฐ. (2550). *สรีรวิทยาของพืช*. เข้าถึงได้จาก http://www.siamchemi.com/คลอโรฟิลล์.

ยุวดี พีรพรพิศาล, ดวงพร อมรเลิศพิศาล, ดวงตา กาญจนโพธิ์, ธวัช แต้โสตถิกุล, ญาณี พงษ์ไพบูลย์ และสุดาพร ตงศิริ. (2552). *ศักยภาพของสาหร่ายน้ำจืดขนาดใหญ่ในการเป็นผลิตภัณฑ์เสริมอาหารและเวชสำอาง*. เชียงใหม่: สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

เยาวดี รุ่งเรือง และสุพิชญา จันทะชุม. (2552). *กิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดคลอโรฟิลล์ด้วยเอทานอลจากผักเหมียง*. สงขลา: ภาควิชาเทคโนโลยีอาหาร, คณะอุตสาหกรรมเกษตร, มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

ระวิวรรณ แก้วอมตวงศ์ และทรงพร จึงมั่นคง. (2549). ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH และปริมาณสารฟีนอล รวมของสารสกัดพืชสมุนไพรบางชนิด. *วารสารวิชาการมหาวิทยาลัยอุบลราชธานี, 82,* 76-88.

รัชฎาพร อุ่นศิวิไลย์, จิราวรรณ อุ่นเมตตาอารี และจิตรา สิงห์ทอง. (2554). *ฤทธิ์ทางชีวภาพและคุณสมบัติเชิงหน้าที่ของสารสกัดย่านาง เครือหมาน้อย และรางจืด*. นครราชสีมา: มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี.

วริพัสย์ อารีกุล, ธัญวรัตม์ แซ่กู้, ปิยะนุช เชื้อวงศ์งาม และธนกร เหล่าโรจน์ภิญโญ. (ม.ป.ป) *ปริมาณฟีนอลิก คลอโรฟิลล์ และความสามารถในการต้านออกซิเดชันของต้นอ่อนข้าวดำ*. กรุงเทพฯ: คณะอุตสาหกรรมเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

วสันต์ สุมินทิลี่, ปนิดา บรรจงสินศิริ, จันทนา ไพรบูรณ์ และวรรณวิมล คล้ายประดิษฐ์. (2556). กิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบจากสาหร่ายพวงองุ่น (C*aulerpa lintillifera*) สาหร่ายทุ่น (S*argassum oligocystum*) และสาหร่ายเขากวาง (G*racilaria changii*). *วารสารเทคโนโลยีการอาหาร มหาวิทยาลัยสยาม, 9*(1), 63-75.

ศิริพร โอโกโนกิ, ชฎารัตน์ ดวงรัตน์, สมบัติ เชาวนพูนผล และทรงยศ อนุชปรีดา. (2550). *การวิจัยสารต้านอนุมูลอิสระจากสมุนไพรไทย.* กรุงเทพฯ: สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย.

สัณห์ ละอองศรี. (2551). การศึกษาปริมาณคลอโรฟิลล์ในใบชาสด. *วารสารวิทยาศาสตร-การเกษตร, 39*(3), 178-181.

สถาพร สัตย์ซื่อ**,** สุธาสินี ทัพพสารพงศ์ และธีระศักดิ์ ดำรงรุ่งเรือง. (2557). การตรวจคัดกรองฤทธิ์ต้านออกซิเดชันและฤทธิ์กระตุ้นการสร้างคอลลาเจนในเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากช่องปากของสารสกัดจากพืช. ใน *The 6th Annual Northeast Pharmacy Research Conference of 2014 "A Celebration of 100 years of Thai Pharmacy and 20 Years of UBU Pharmacy"* (หน้า 1-5). อุบลราชธานี: มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี.

สรฉัตร เทียมดาว และยุวดี พีรพรพิศาล. (2552). ความหลากหลายของสาหร่ายน้ำจืดกินได้ในแม่น้ำโขงและแม่น้ำน่าน. *วารสารวิจัยเทคโนโลยีการประมง, 3*(1), 115-124.

Farasata, M., Nejada, R. K., Bagher Nabavib, S. M., & Namjooyanc, F. (2014). Antioxidant Activity, Total Phenolics and Flavonoid Contents of some Edible Green Seaweeds from Northern Coasts of the Persian Gulf. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research, 13*(1), 163-170.

Kosasu, T., Wongklom, A., & Moonsin, P. (2015). Total phenolics, flavonoids and antioxidant activity of fresh water macroalgae from Ubon Ratchathani, Thailand. *Journal of Food Science and Agricultural Technology, 1*(1), 207-210.

Laungsuwon, R., & Chulalaksananukul, W. (2014). Chemical composition and antibacterial activity of extracts from freshwater green algae, *Cladophora glomerata* Kützing and *Microspora floccosa* (Vaucher) Thuret . *J. BioSci. Biotech, 3*(3), 211-218.

Mungmai, L., Jiranusornkul, S., Peerapornpisa, Y., Sirithunyalug, B., & Leelapornpisid, P. Characterization and Biological Activities of Extracts from Freshwater Macroalga [*Rhizoclonium hieroglyphicum* (C.Agardh) K tzing] Cultivated in Northern Thailand. *Chiang Mai J. Sci., 41*(1), 14-26.

Sumanta, N., Haque, C. I., Nishika, J., & Suprakash, R. (2014). Spectrophotometric Analysis of Chlorophylls and Carotenoids from Commonly Grown Fern Species by Using Various Extracting Solvents. *Research Journal of Chemical Sciences, 4*(9), 63-69.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

การเตรียมสารเคมี

การเตรียมสารเคมี

1. การเตรียมสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิก

การเตรียม stock แกลลิก 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยการชั่งกรดแกลลิก 0.1000 g ละลายในเอทานอล และปรับปริมาตรด้วยขวดวัดปริมาตรจนครบ 100 มิลลิลิตร

การเตรียมสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิกที่ระดับความเข้มข้น 10, 25, 50, 75, 100, 150, 200 และ 250 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยปิเปตสารละลายมาตรฐานของกรดแกลลิก 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร มา 0.10, 0.25, 0.50, 0.75, 1.00, 1.50, 2.00 และ 2.50 มิลลิลิตร ตามลำดับใส่ในขวดวัดปริมาตรขนาด 10.00 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 10 มิลลิลิตร

2. การเตรียมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3) เข้มข้น 10 % w/ v

โดยชั่ง Na_2CO_3 10 กรัมด้วยเครื่องชั่ง 4 ตำแหน่งละลายด้วยน้ำกลั่น เทลงในขวดวัดปริมาตร ขนาด 100 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบปริมาตร 100 มิลลิลิตร

3. การเตรียมสารละลาย DPPH เข้มข้น 0.1 มิลลิโมลต่อลิตร

ชั่ง DPPH มา 0.0039 กรัม ละลายด้วยเอทานอลเทใส่ขวดวัดปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยเอทานอลจนครบปริมาตร 100 มิลลิลิตร

4. การเตรียมสารละลายมาตรฐาน trolox เข้มข้น 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ชั่ง trolox 0.0100 กรัม ละลายด้วยเอทานอล เทใส่ขวดวัดปริมาตรขนาด 10 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยเอทานอลจนครบปริมาตร 10 มิลลิลิตร

5. การเตรียมสารมาตรฐาน trolox ในการวิเคราะห์การต้านอนุมูลอิสระ DPPH

การเตรียมสารละลายมาตรฐาน trolox ที่ระดับความเข้มข้น 1, 3, 5, 10, 20, และ 30 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยปิเปตสารละลายมาตรฐาน trolox เข้มข้น 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตรมา 0.01, 0.02, 0.03, 0.05, 0.10, 0.20 และ 0.30 มิลลิลิตร ตามลำดับ ใส่ในขวดวัดปริมาตรขนาด 10 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรด้วยเอทานอลจนครบ 10 มิลลิลิตร

6. การเตรียมสารมาตรฐาน trolox ในการวิเคราะห์การต้านอนุมูลอิสระ ABTS

การเตรียมสารละลายมาตรฐาน trolox ที่ระดับความเข้มข้น 1, 10, 20, 30, 40, และ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยปิเปตสารละลายมาตรฐาน trolox 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรมา 10, 20, 30, 50, 100, 200 และ 300 ไมโครลิตร ตามลำดับใส่ในขวดวัดปริมาตร ขนาด 10 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรด้วยเอทานอลจนครบ 10 มิลลิลิตร

7. การเตรียมสารละลายสำหรับการวิเคราะห์ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี ABTS

ชั่ง ABTS มา 0.0180 กรัม ละลายและปรับปริมาตรด้วยน้ำปราศจากไอออนให้ได้ 5 มิลลิลิตร จะได้ ABTS solution เข้มข้น 7 มิลลิโมลาร์ ชั่ง $K_2S_2O_2$มา 0.0033 กรัม ละลายและปรับปริมาตรด้วยน้ำน้ำปราศจากไอออนให้ได้ 5 มิลลิลิตร จะได้สารละลาย $K_2S_2O_2$ เข้มข้น 2.45 มิลลิโมลาร์ นำสารละลายทั้งสองที่เตรียมได้มาผสมกัน จะได้เป็น ABTS stock solution เก็บในขวดสีชาที่ 4.0 °C

8. การเตรียมสารมาตรฐาน trolox ในการวิเคราะห์การต้านอนุมูลอิสระ FRAP

การเตรียมสารละลายมาตรฐาน trolox ที่ระดับความเข้มข้น 10, 20, 30, 40, 50, 60 และ 70 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยปิเปตสารละลายมาตรฐานของกรด trolox เข้มข้น 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตรมา 0.10, 0.20, 0.30, 0.40, 0.50, 0.60 และ 0.70 มิลลิลิตร ตามลำดับ ใส่ในขวดวัดปริมาตรขนาด 10 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรด้วยเอทานอลจนครบ 10 มิลลิลิตร

9. การเตรียมสารละลายสำหรับการวิเคราะห์ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี FRAP

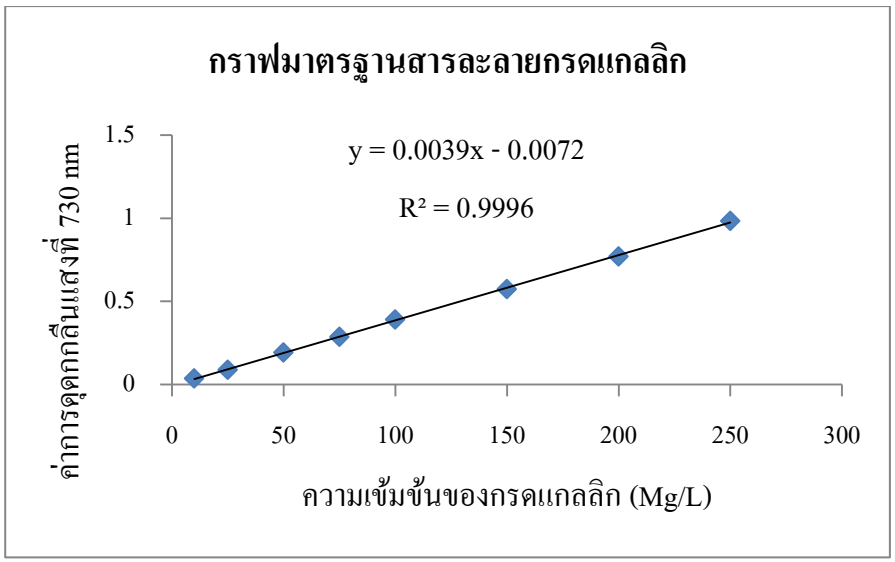
ชั่ง $FeCl_3 6H_2O$ มา 0.2703 กรัม มาละลายและปรับปริมาตรด้วยน้ำปราศจากไอออนในขวดวัดปริมาตรขนาด 50 มิลลิลิตร จะได้สารละลาย $FeCl_3 6H_2O$ เข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์

ชั่ง TPTZ 0.1561 กรัม ละลายและปรับปริมาตรด้วย 40 มิลลิโมลาร์ HCl ในขวดวัดปริมาตรขนาด 50 มิลลิลิตร จะได้สารละลาย TPTZ เข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์

ชั่ง CH_3COONa 1.3608 กรัม ละลายในน้ำปราศจากไอออน จากนั้นเติม CH_3COOH 8 มิลลิโมลาร์ ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปวัด pH ให้ได้ค่าเท่ากับ 3.6 และนำมาปรับปริมาตรให้ครบ 500 มิลลิลิตร

ภาคผนวก ข

การคำนวณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของสาหร่ายน้ำจืด



จากกราฟมาตรฐานกรดแกลลิกได้สมการเส้นตรงคือ y = 0.0039 x - 0.0072, R^2 = 0.9996 ในการคำนวณจะนำค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 730 นาโนเมตรของสารสกัดสาหร่ายมาเทียบกับสารมาตรฐานกรดแกลลิกโดยสามารถคำนวณได้ดังตัวอย่างต่อไปนี้

ตัวอย่าง สารสกัดจากสาหร่ายไกต๊ะ 0.0047 g เมื่อทำการวิเคราะห์แล้วพบว่ามีค่าการดูดกลืนแสงที่ 730 นาโนเมตรเท่ากับ 0.128 โดยมีปริมาตรสารละลายตัวอย่างเท่ากับ 5 ml

จากกราฟมาตรฐาน จะได้ x = (Y + 0.0072) / 0.0039

นำค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดตัวอย่างไปแทนค่า y ในสมการ

จะได้ x = 34.67 mg/ L

นั่นคือ สารสกัดสาหร่าย 1000 ml มีปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด เท่ากับ 34.67 mg

ถ้า สารสกัดสาหร่าย 5 ml มีปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด เท่ากับ (34.67 × 5)/ 1000 = 0.173 mg

ในการทดลองได้ใช้สารสกัดสาหร่ายไกต๊ะ 0.0047 g มีปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด เท่ากับ 0.173 mg

ถ้า สารสกัดสาหร่ายไกต๊ะ 1 g มีปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด เท่ากับ 0.173/ 0.0047 = 36.81 mg

ดังนั้นในสารสกัดสาหร่ายไกต๊ะมี total phenolic content เมื่อเทียบกับสารมาตรฐานกรดแกลลิกเท่ากับ 36.81 mg Gallic acid equivalent (GAE)/ g extract

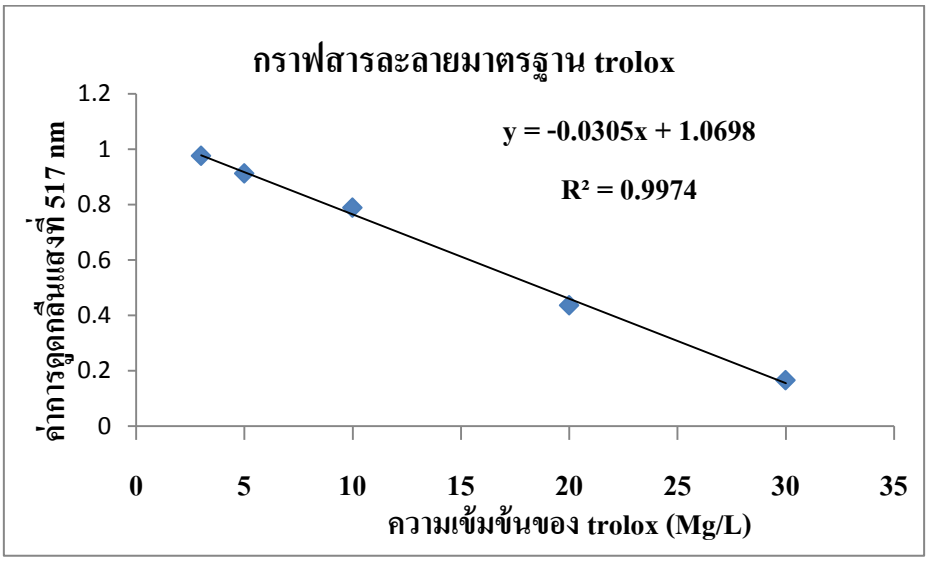
ภาคผนวก ค

การหาค่าการต้านอนุมูลอิสระของสาหร่ายน้ำจืด

1. การคำนวณความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH

1.1 การคำนวณความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระเทียบกับสารมาตรฐาน Trolox

กราฟมาตรฐานสารละลาย trolox ในการวิเคราะห์การต้านอนุมูลอิสระ DPPH



จากกราฟมาตรฐานสารละลาย trolox ได้สมการเส้นตรงคือ y = -0.0305x + 1.0698 R^2 = 0.9974 ในการคำนวณจะนำค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตรของสารสกัดสาหร่ายมาเทียบกับสารมาตรฐานสารละลาย trolox โดยสามารถคำนวณได้ดังตัวอย่างต่อไปนี้

<u>ตัวอย่าง</u> สารสกัดจากสาหร่ายไกต๊ะ 0.0102 g เมื่อทำการวิเคราะห์แล้วพบว่ามีค่าการดูดกลืนแสงที่ 517 นาโนเมตรเท่ากับ 0.835 โดยมีปริมาตรสารละลายตัวอย่างเท่ากับ 10 ml

จากกราฟมาตรฐาน จะได้ x = (Y – 1.0698) / - 0.0305

นำค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดตัวอย่างไปแทนค่า y ในสมการ

จะได้ x = 0.265 mg/ L

นั่นคือ สารสกัดสาหร่าย 1000 ml มี trolox equivalent เท่ากับ 0.265 mg

ถ้า สารสกัดสาหร่าย 10 ml มี trolox equivalent เท่ากับ (0.265 × 10)/ 1000 = 0.0026 mg ในการทดลองได้ใช้สารสกัดสาหร่ายไกต๊ะ 0.0102 g มี trolox equivalent เท่ากับ 0.0026 mg ถ้าสารสกัดสาหร่ายไกต๊ะ 1 g มี trolox equivalent เท่ากับ 0.0026 / 0.0102 = 0.25 mg ดังนั้นในสารสกัดสาหร่ายไกต๊ะมี trolox equivalent เมื่อเทียบกับสารมาตรฐานมี trolox เท่ากับ 0.25 mg trolox equivalent (TE)/ g extract

1.2 การคำนวณเปอร์เซ็นต์การต้านฤทธิ์อนุมูล DPPH

นำค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 nm ของสารสกัดตัวอย่างมาคำนวณตามสมการ % DPPH radical scavenging activity = ((Ac – As) / Ac) × 100

เมื่อ Ac = ค่าการดูดกลืนแสงของสารควบคุม

As = ค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดตัวอย่าง

คำนวณได้ดังตัวอย่างต่อไปนี้

ตัวอย่าง สารสกัดสารสกัดสาหร่ายไกตัะ เมื่อทำการวิเคราะห์แล้วพบว่า มีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 nm เท่ากับ 0.835 และค่าการดูดกลืนแสงของสารควบคุมที่ความยาวคลื่น 517 nm เท่ากับ 0.948

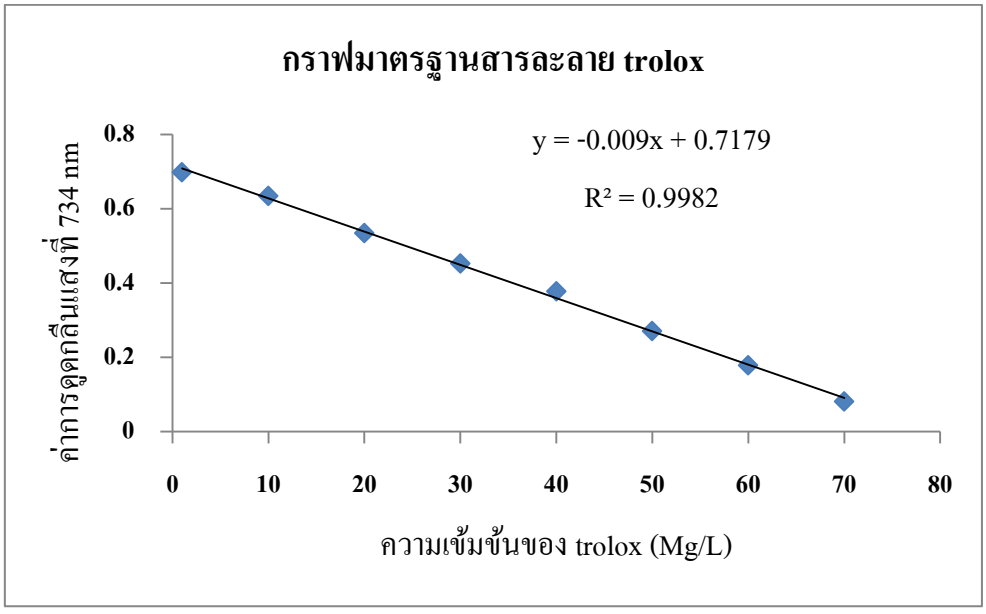
จะได้ % DPPH radical scavenging activity = ((0.948 – 0.835)/ 0.948) × 100

= 11.92

2. การคำนวณความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี ABTS

2.1 การคำนวณความสามารถในการต้านอนุมุลอิสระเทียบกับสารมาตรฐาน Trolox

กราฟมาตรฐานสารละลาย trolox ในการวิเคราะห์การต้านอนุมูลอิสระ ABTS



จากกราฟมาตรฐานสารละลาย trolox ได้สมการเส้นตรงคือ y = -0.009x + 0.7179 R^2 = 0.9982 ในการคำนวณจะนำค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตรของสารสกัดสาหร่ายมาเทียบกับสารมาตรฐานสารละลาย trolox โดยสามารถคำนวณได้ดังตัวอย่างต่อไปนี้

ตัวอย่าง สารสกัดจากสาหร่ายไกต๊ะ 0.0108 g เมื่อทำการวิเคราะห์แล้วพบว่า มีค่าการดูดกลืนแสงที่ 734 นาโนเมตรเท่ากับ 0.424 โดยมีปริมาตรสารละลายตัวอย่างเท่ากับ 10 ml

จากกราฟมาตรฐาน จะได้ x = (Y – 0.7179) / -0.009

นำค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดตัวอย่างไปแทนค่า y ในสมการ

จะได้ x = 32.656 mg/ L

นั่นคือ สารสกัดสาหร่าย 1000 ml มี trolox equivalent เท่ากับ 32.656 mg

ถ้าสารสกัดสาหร่าย 10 ml มี trolox equivalent เท่ากับ (32.656 × 10)/ 1000 = 0.327 mg

ในการทดลองได้ใช้สารสกัดสาหร่ายไกต๊ะ 0.0108 g มี trolox equivalent เท่ากับ 0.327 mg

ถ้า สารสกัดสาหร่ายไกต๊ะ 1 g มี trolox equivalent เท่ากับ 0.327 / 0.0108 = 30.52 mg

ดังนั้นในสารสกัดสาหร่ายไกต๊ะมี trolox equivalent เมื่อเทียบกับสารมาตรฐานมี trolox เท่ากับ 30.52 mg trolox equivalent (TE)/ g extract

2.2 การคำนวณแปอร์เซ็นต์การต้านฤทธิ์อนุมูล ABTS

นำค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 nm ของสารสกัดตัวอย่างมาคำนวณตามสมการ

% ABTS radical scavenging activity = ((Ac – As) / Ac) × 100

เมื่อ Ac = ค่าการดูดกลืนแสงของสารควบคุม

As = ค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดตัวอย่าง

คำนวณได้ดังตัวอย่างต่อไปนี้

ตัวอย่าง สารสกัดสารสกัดสาหร่ายไกต๊ะ เมื่อทำการวิเคราะห์แล้วพบว่ามีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 nm เท่ากับ 0.424 และค่าการดูดกลืนแสงของสารควบคุมที่ความยาวคลื่น 734 nm เท่ากับ 0.700

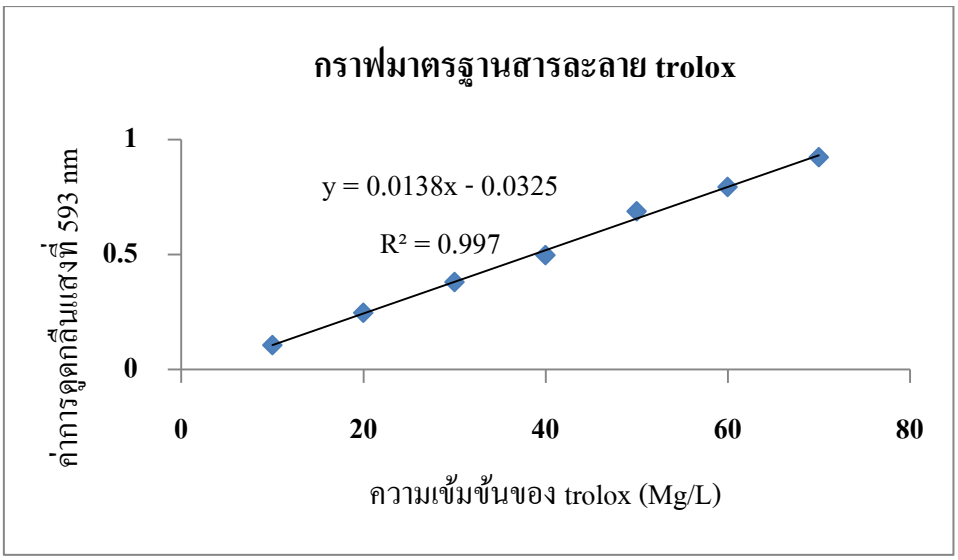
จะได้ % ABTS radical-scavenging activity = ((0.700 – 0.424)/ 0.700) × 100

= 39.43

3. การคำนวณความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี FRAP

3.1 การคำนวณความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระเทียบกับสารมาตรฐาน Trolox

กราฟมาตรฐานสารละลาย trolox ในการวิเคราะห์การต้านอนุมูลอิสระ FRAP



จากกราฟมาตรฐานสารละลาย trolox ได้สมการเส้นตรงคือ y = 0.0138x-0.0325 R^2 = 0.997 ในการคำนวณจะนำค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 539 นาโนเมตรของสารสกัดสาหร่ายมาเทียบกับสารมาตรฐานสารละลาย trolox โดยสามารถคำนวณได้ดังตัวอย่างต่อไปนี้

ตัวอย่าง สารสกัดจากสาหร่ายไกต๊ะ 0.0107 g เมื่อทำการวิเคราะห์แล้วพบว่ามีค่าการดูดกลืนแสงที่ 539 นาโนเมตรเท่ากับ 0.483 โดยมีปริมาตรสารละลายตัวอย่างเท่ากับ 10 ml

จากกราฟมาตรฐาน จะได้ x = (Y + 0.0325) / 0.0138

นำค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดตัวอย่างไปแทนค่า y ในสมการ

จะได้ x = 37.355 mg/ L

นั่นคือ สารสกัดสาหร่าย 1000 ml มี trolox equivalent เท่ากับ 37.355 mg

ถ้าสารสกัดสาหร่าย 10 ml มี trolox equivalent เท่ากับ (37.355 × 10)/ 1000 = 0.374 mg

ในการทดลองได้ใช้สารสกัดสาหร่ายไกต๊ะ 0.0107 g มี trolox equivalent เท่ากับ 0.374 mg

ถ้า สารสกัดสาหร่ายไกต๊ะ 1 g มี trolox equivalent เท่ากับ 0.374 / 0.0107 = 34.91 mg

ดังนั้นในสารสกัดสาหร่ายไกต๊ะมี trolox equivalent เมื่อเทียบกับสารมาตรฐานมี trolox เท่ากับ 34.91 mg trolox equivalent (TE)/ g extract

ภาคผนวก ง

การหาปริมาณคลอโรฟิลล์ในสาหร่ายน้ำจืด

การหาปริมาณคลอโรฟิลล์ในสาหร่ายน้ำจืด

จากสูตร

ปริมาณคลอโรฟิลล์เอ (A) = [12.7 (A_{663}) -2.69 (A_{645})] x (V)/ (1000 x m)

ปริมาณคลอโรฟิลล์บี (B) = [22.9 (A_{645}) -4.68 (A_{663})] x (V)/ (1000 x m)

โดยที่

A_{645} = ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 645

A_{663} = ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 663

ยกตัวอย่างการคำนวณปริมาณคลอโรฟิลล์ในสาหร่ายไกตั๊ะ

A_{645} = 0. 337

A_{663} = 0.627

แทนค่า ปริมาณคลอโรฟิลล์เอ = [12.7 (0.627) -2.69 (0.337)] x (30)/ (1000 x 0.1001)

= 2.115 mg/ g

ปริมาณคลอโรฟิลล์บี = [22.9 (0. 337) -4.68 (0.627)] x (30)/ (1000 x 0.1001)

= 1..433 mg/ g

จากสูตร

ปริมาณคลอโรฟิลล์รวม (Mg/ g) = [20.21(A_{645})+ 8.02(A_{663})] x (V)/ (1000 x m)

= 20.21(0.337)+8.02(0.627) x (30)/ (1000 x 0.1001)

= 3.548 mg/ g

ดังนั้นในสาหร่ายไกตั๊ะปริมาณคลอโรฟิลล์รวม 3.55 มิลลิกรัมต่อกรัม

ภาคผนวก จ

การวิเคราะห์ค่าทางสถิติ

การวิเคราะห์ค่าทางสถิติ

1. การวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of variance, ANOVA) และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยใช้วิธี Duncan's multiple range test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

จากการวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดในสารสกัดสาหร่ายน้ำจืด 4 ชนิดด้วยวิธีการสกัดสาหร่าย 2 วิธีคือ วิธีแช่ด้วยเอทานอลบริสุทธิ์ และวิธีการใช้เครื่องเขย่าสาร

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: TPC

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	120850.446[a]	7	17264.349	1408.865	.000
Intercept	121464.721	1	121464.721	9912.184	.000
วิธี	744.553	1	744.553	60.760	.000
สาหร่าย	119133.961	3	39711.320	3240.660	.000
วิธี * สาหร่าย	971.931	3	323.977	26.438	.000
Error	196.065	16	12.254		
Total	242511.232	24			
Corrected Total	121046.511	23			

a. R Squared = .998 (Adjusted R Squared = .998)

TPC

Duncan[a,b]

วิธีxสาหร่าย	N	Subset					
		1	2	3	4	5	6
2.00	3	10.0910					
6.00	3		21.1080				
8.00	3		26.5543				
4.00	3			35.6983			
1.00	3			37.3130			
5.00	3				54.8940		
3.00	3					179.1820	
7.00	3						204.2867
Sig.		1.000	.075	.580	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on observed means.

The error term is Mean Square(Error) = 12.254.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

b. Alpha = 0.05.

2. การวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of variance, ANOVA) และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยใช้วิธี Duncan's multiple range test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

จากการวิเคราะห์การต้านอนุมูลอิสระของสาหร่ายน้ำจืดสด 4 ชนิด

- DPPH

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: DPPH

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	454620.437[a]	7	64945.777	80727.443	.000
Intercept	157499.512	1	157499.512	195771.513	.000
วิธี	64.824	1	64.824	80.576	.000
สาหร่าย	454496.448	3	151498.816	188312.662	.000
วิธี * สาหร่าย	59.165	3	19.722	24.514	.000
Error	12.872	16	.805		
Total	612132.820	24			
Corrected Total	454633.309	23			

a. R Squared = 1.000 (Adjusted R Squared = 1.000)

DPPH

Duncan[a,b]

วิธีxสาหร่าย	N	Subset			
		1	2	3	4
2.00	3	.7010			
1.00	3	.7440			
4.00	3	1.0123			
6.00	3	1.8286	1.8286		
5.00	3	2.3351	2.3351		
8.00	3		2.7288		
3.00	3			315.0053	
7.00	3				323.7179
Sig.		.060	.261	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on observed means.

The error term is Mean Square (Error) = .805.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

b. Alpha = 0.05.

- ABTS

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: ABTS

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	1184577.581[a]	7	169225.369	354.775	.000
Intercept	876618.705	1	876618.705	1837.799	.000
วิธี	11459.910	1	11459.910	24.025	.000
สาหร่าย	1163725.631	3	387908.544	813.236	.000
วิธี * สาหร่าย	9392.040	3	3130.680	6.563	.004
Error	7631.899	16	476.994		
Total	2068828.184	24			
Corrected Total	1192209.479	23			

a. R Squared = .994 (Adjusted R Squared = .991)

ABTS

Duncan[a,b]

วิธีxสาหร่าย	N	Subset			
		1	2	3	4
2.00	3	28.3520			
1.00	3	29.6647			
6.00	3	37.0633			
4.00	3	53.7887	53.7887		
5.00	3		81.8488		
8.00	3			158.7767	
3.00	3				565.2567
7.00	3				574.1867
Sig.		.207	.135	1.000	.623

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on observed means.

The error term is Mean Square(Error) = 476.994.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

b. Alpha = 0.05.

- FRAP

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: FRAP

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	267681.300[a]	7	38240.186	6.009	.001
Intercept	195613.287	1	195613.287	30.738	.000
วิธี	2562.212	1	2562.212	.403	.535
สาหร่าย	264930.405	3	88310.135	13.877	.000
วิธี * สาหร่าย	188.682	3	62.894	.010	.999
Error	101823.080	16	6363.943		
Total	565117.667	24			
Corrected Total	369504.380	23			

a. R Squared = .724 (Adjusted R Squared = .604)

FRAP

Duncan[a,b]

วิธีxสาหร่าย	N	Subset 1	Subset 2
2.00	3	15.9100	
4.00	3	22.5720	
1.00	3	23.4913	
6.00	3	34.3020	
8.00	3	35.9097	
5.00	3	45.7270	
3.00	3		257.8187
7.00	3		286.5127
Sig.		.687	.665

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on observed means.

The error term is Mean Square(Error) = 6363.943.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

b. Alpha = 0.05.

จากการวิเคราะห์ปริมาณคลอโรฟิลล์ของสาหร่ายน้ำจืดสด 4 ชนิด

- คลอโรฟิลล์เอ

ANOVA

Chl_A

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	9.055	3	3.018	389.373	.000
Within Groups	.062	8	.008		
Total	9.117	11			

Chl_A

Duncan[a]

สาหร่าย	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
ลอน	3	.0867			
ไหม	3		.3540		
เตา	3			.5940	
ตั๊ะ	3				2.3077
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

- คลอโรฟิลล์บี

ANOVA

Chl_B

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	4.592	3	1.531	327.188	.000
Within Groups	.037	8	.005		
Total	4.629	11			

Chl_B

Duncan[a]

สาหร่าย	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
ลอน	3	.0483		
เตา	3		.1843	
ไหม	3		.2183	
ตั๊ะ	3			1.5713
Sig.		1.000	.560	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

- ปริมาณคลอโรฟิลล์รวม

ANOVA

Chl A+ChlB

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	26.398	3	8.799	352.956	.000
Within Groups	.199	8	.025		
Total	26.597	11			

Chl A+ChlB

Duncan[a]

สาหร่าย	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
ลอน	3	.1333		
ไหม	3		.5700	
เตา	3		.7767	
ตี๊ะ	3			3.8763
Sig.		1.000	.148	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.