

ผลของสารสกัดด้วยน้ำต่อปริมาณสารพฤกษเคมีและกิจกรรมต้านอนุมูลอิสระ
ของสาหร่ายสีแดง (*Caloglossa beccarii* De Toni)

Effect of Water Extraction on Phytochemicals and Antioxidant Activities of Red Algae (*Caloglossa beccarii* De Toni)

วัลภา เหลือแหล่¹ เพ็ญศรี เพ็ญประไพ² และวรรณิณี จันทร์แก้ว^{1*}

Wanlapa Luealae¹ Pensri Penprapai² and Wanninee Chankaew^{1*}

Received: October 2, 2019; Revised: November 19, 2019; Accepted: November 20, 2019

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อเปรียบเทียบปริมาณสารพฤกษเคมี และกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระซึ่งวิเคราะห์ประสิทธิภาพในการกำจัดอนุมูล ABTS และการจับโลหะของสารสกัดหยาบจากสาหร่าย *Caloglossa beccarii* ซึ่งได้เก็บตัวอย่างจากจังหวัดนครศรีธรรมราชที่สกัดด้วยน้ำในสภาวะที่ต่างกัน (อุณหภูมิ/เวลา) 5 สภาวะ ได้แก่ 4 °C/24 h, 25 °C/12 h, 50 °C/6 h, 75 °C/3 h และ 100 °C/1.5 h ผลการศึกษาพบว่า สารสกัดทั้ง 5 สภาวะ มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด สารฟลาโวนอยด์รวม และกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) โดยสารสกัดด้วยน้ำที่สภาวะ 25 °C/12 h มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดสูงที่สุดซึ่งมีค่าเท่ากับ 32.95 ± 0.21 mg GAE/g extract และมีค่า IC_{50} ในการกำจัดอนุมูลอิสระเท่ากับ 0.24 ± 0.00 mg/mL ส่วนสารสกัดด้วยน้ำที่สภาวะ 4 °C/24 h มีปริมาณสารฟลาโวนอยด์รวมสูงที่สุดเท่ากับ 24.67 ± 0.04 mg QE/g extract และมีค่า IC_{50} ต่ำสุดในประสิทธิภาพในการจับโลหะเท่ากับ 0.27 ± 0.003 mg/mL ตามลำดับ จากผลการศึกษาชี้ให้เห็นว่า สภาวะในการสกัดด้วยน้ำที่ 4 °C/24 h และ 25 °C/12 h มีความเหมาะสมสำหรับการใช้ประโยชน์ด้านกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระของสาหร่าย *C. beccarii*

คำสำคัญ : สาหร่าย; ฟีนอลิก; ฟลาโวนอยด์; อนุมูลอิสระ

¹ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย นครศรีธรรมราช

² คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย นครศรีธรรมราช

¹ Faculty of Agriculture, Rajamangala University of Technology Srivijaya, Nakhon Si Thammarat

² Faculty of Science and Technology, Rajamangala University of Technology Srivijaya, Nakhon Si Thammarat

* Corresponding Author E - mail Address: wanninee.c@rmutsv.ac.th

Abstract

The objectives of this research were to compare the phytochemical contents and antioxidant activities analyzed by scavenging activity of ABTS radical and metal ablating activity of *Caloglossa beccarii* aqueous extract using 5 different extraction conditions (4 °C/24 h, 25 °C/12 h, 50 °C/6 h, 75 °C/3 h and 100 °C/1.5 h). *Caloglossa beccarii*, was collected from Nakhon Si Thammarat province. The results showed the total phenolic compound, total flavonoid content and antioxidant activities content were significantly different among extract condition ($p < 0.05$). The aqueous extract at 25 °C/12 h showed the highest of total phenolic compound was 32.95 ± 0.21 mgGAE/g extract and the best activity of scavenging ABTS with $IC_{50} = 0.24 \pm 0.00$ mg/mL, respectively. The extract at condition 4 °C/24 h showed the highest of total flavonoid was 24.67 ± 0.04 mgQE/g extract and the lowest IC_{50} with metal chelation = 0.27 ± 0.00 mg/mL, respectively. This findings indicated that the aqueous extracts at condition 4 °C/24 h and 25 °C/12 h were the most suitable for antioxidant extraction from *C. beccarii*.

Keywords: Algae; Phenolic; Flavonoid; Free Radical

บทนำ

ปัจจุบันมีการศึกษาเกี่ยวกับสารต้านอนุมูลอิสระอย่างกว้างขวางทั้งในส่วนของการค้นหาชนิดและฤทธิ์ของสารต้านอนุมูลอิสระต่าง ๆ เนื่องจากอนุมูลอิสระเป็นโมเลกุลเล็ก ๆ ที่สามารถเข้าทำปฏิกิริยากับโมเลกุลต่าง ๆ ที่อยู่รอบข้างได้ จะส่งผลให้เกิดความเสียหายแก่เซลล์ภายในร่างกายและสามารถเกิดขึ้นได้ตลอดเวลา เช่น จากกระบวนการเผาผลาญอาหารภายในร่างกาย การถูกกระตุ้นจากแสงแดด มลพิษ ควันบุหรี่ แอลกอฮอล์ ความเครียด ฯลฯ โดยปกติร่างกายของคนเราจะมีการกำจัดอนุมูลอิสระได้หลายทาง แต่ในสภาวะที่มีการสร้างอนุมูลอิสระจำนวนมากเกินไปที่จะกำจัดได้ทันอาจก่อให้เกิดการบาดเจ็บของเซลล์ซึ่งเป็นกลไกสำคัญที่ก่อให้เกิดโรคต่าง ๆ เช่น โรคชรา โรคหัวใจ โรคหลอดเลือด โรคความจำเสื่อม โรคข้ออักเสบ โรคภูมิแพ้ โรคความดันโลหิต และโรคต่อกระเพาะ เป็นต้น [1] จากงานวิจัยพบว่าในธรรมชาติมีแหล่งสำคัญของสารที่มีฤทธิ์กำจัดอนุมูลอิสระ ซึ่งสามารถนำมาใช้ป้องกันและรักษาโรคได้ เช่น พืชที่ใช้บริโภคในชีวิตประจำวัน พืชสมุนไพร [2] และสาหร่าย [3]

สาหร่ายสีแดงน้ำจืดจึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่ง เนื่องจากมีคุณสมบัติในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ โดยในเซลล์ของสาหร่ายที่ประกอบไปด้วยกลุ่มสารทุติยภูมิหลายชนิด เช่น คลอโรฟิลล์ แคโรทีนอยด์ ไฟโคบิลิโปรตีนและกลุ่มสารพฤษเคมีอื่น ๆ ซึ่งสารเหล่านี้มีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่สำคัญและสามารถสกัดได้โดยใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ชนิดต่าง ๆ ทั้งนี้ปริมาณของสารต้านอนุมูลอิสระที่สกัดมาขึ้นอยู่กับการสกัด ได้แก่ อุณหภูมิ ระยะเวลา และชนิดของตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัด [4] จากคุณสมบัติดังกล่าวของสาหร่ายจึงทำให้เป็นที่น่าสนใจ ซึ่งจากการสืบค้นข้อมูลการนำสาหร่ายสีแดงน้ำจืด

ไปใช้ประโยชน์ยังมีรายงานไม่มากนัก ทั้งนี้มีการศึกษากันมากในสาหร่ายทะเล สาหร่ายเกลียวทอง (*Spirulina plantensis*) สำหรับในน้ำจืดนั้นมีการศึกษาในสาหร่ายสีเขียว คือ สาหร่ายเตา (*Spirogyra neglecta*) [5] สาหร่ายไคตะ (*Microspora* sp.) สาหร่ายไคไหม (*Cladophora* sp.) สาหร่ายเตา (*Spirogyra* sp.) สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน คือ สาหร่ายลอน (*Nostochopsis* sp.) [6] มีรายงานในสาหร่ายสีแดงน้ำจืด เช่น *Compsopogon aeruginosus* Kützinger [7] *Caloglossa ogasawarensis* Okamura [8] *Compsopogon caeruleus* Montagne และ *Sirodotia suecica* Kylin [9] สำหรับในสาหร่ายสีแดง *Caloglossa beccarii* De Toni นั้นที่ผ่านมา Luealae, W., Penpapai, P., and Chankaew, W. [10] ได้ทำการศึกษาฤทธิ์กำจัดอนุมูลอิสระ DPPH ของสารสกัดด้วยน้ำที่อุณหภูมิต่างกัน สามสภาวะ พบว่าสารสกัดน้ำที่อุณหภูมิ 4 °C มีฤทธิ์กำจัดอนุมูลอิสระดีที่สุด อย่างไรก็ตามเพื่อให้ได้ข้อมูลครอบคลุมมากขึ้นสำหรับน้ำสาหร่ายสีแดงชนิดนี้ไปใช้ประโยชน์ต่อไป การศึกษารังนี้จึงได้ทำการศึกษาเปรียบเทียบปริมาณสารพฤษเคมี และกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธีการกำจัดอนุมูล ABTS และการจับโลหะของสารสกัดหยาบ *Caloglossa beccarii* ในสภาวะที่ต่างกันเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดสารสำคัญ รวมทั้งได้เลือกน้ำเป็นตัวทำละลายในการสกัดเพื่อความปลอดภัยต่อการนำไปใช้ประโยชน์ และเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม

วิธีดำเนินการวิจัย

1. ขั้นตอนวิธีการวิจัย

1.1 การเตรียมตัวอย่าง

นำตัวอย่างสาหร่าย *C. beccarii* จากลำธารในเขตอำเภอทุ่งสง (08°09.051 N, 099°44.786 E) และอำเภอชะอวด (07°57.13 N, 099°45.55 E) จังหวัดนครศรีธรรมราช มาล้างทำความสะอาดและฟุ้งลมให้มีความหมดพอสสมควร แล้วนำไปอบที่อุณหภูมิ 50 °C จนกว่าสาหร่ายจะแห้ง แล้วนำมาปั่นด้วยเครื่องปั่นไฟฟ้าให้ละเอียด

1.2 การเตรียมสารสกัดหยาบ

การเตรียมสารสกัดหยาบ โดยชั่งผงสาหร่ายมา 20 g เติมน้ำลงไปปริมาตร 200 mL และนำมาสกัดด้วยน้ำในสภาวะที่ต่างกันที่อุณหภูมิ/เวลา 5 สภาวะ ได้แก่ 4 °C/24 h (ทำการสกัดในตู้เย็น อุณหภูมิ 4 °C), 25 °C/12 h, 50 °C/ 6 h, 75 °C/3 h และ 100 °C/1.5 h ด้วยอ่างควบคุมอุณหภูมิ (Water Bath) ทำการสกัดซ้ำจากตัวอย่างเดิมจำนวน 3 ซ้ำ แล้วจึงนำไปกรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 โดยสารสกัดที่ได้จะนำไปทำให้แห้งด้วยวิธีการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง ซึ่งและบันทึกน้ำหนักสารสกัดที่ได้ และเทียบกับน้ำหนักเริ่มต้นของตัวอย่างสาหร่ายที่นำมาสกัด จากนั้นนำมาคำนวณหาปริมาณสารสกัดหยาบ (%yield) หลังจากนั้นนำสารสกัดหยาบที่ได้มาทำการเจือจางด้วยตัวทำละลายน้ำกลั่นปราศจากไอออนให้มีความเข้มข้น 0.005 – 3.200 mg/L เพื่อนำไปทำการทดสอบกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระต่อไป

2. การหาปริมาณสารพฤษเคมี

สารพฤษเคมีที่มีคุณสมบัติในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระในสาหร่ายนั้นมีอยู่หลายชนิด แต่ในงานวิจัยนี้จะทำการหาทั้งหมด 2 ชนิด ดังนี้

2.1 การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (Total Phenolic Contents)

ทำการศึกษาด้วยวิธี Folin-Ciocalteu Colorimetric Assay โดยปิเปตสารสกัดหยาบจากสาหร่ายปริมาณ 0.1 mL ผสมกับสาร Folin-Ciocalteu ปริมาตร 0.5 mL เติมน้ำละลาย Sodium Carbonate (Na_2CO_3) ความเข้มข้น 20 % ปริมาตร 1 mL และน้ำกลั่นปริมาณ 8.4 mL ผสมให้เข้ากัน บ่มทิ้งไว้ในที่มืด 1 h วัดค่าการดูดกลืนแสงได้ที่ความยาวคลื่น 765 nm ด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Biodrop) ใช้กรดแกลลิกเป็นสารมาตรฐาน โดยดัดแปลงตามวิธีการของ Julkunen-Tiitto, R. [11]

2.2 การวิเคราะห์ปริมาณสารฟลาโวนอยด์รวม (Total Flavonoid Contents)

ทำการศึกษาด้วยวิธี Aluminum Chloride Colorimetric Assay โดยการปิเปตสารสกัดหยาบจากสาหร่ายปริมาณ 0.02 mL ใส่ในภาชนะทดลองที่มีสารละลาย Aluminum Chloride ความเข้มข้น 10 % ปริมาตร 0.02 mL เติมน้ำละลาย Potassium Acetate ความเข้มข้น 1 M ปริมาตร 0.02 mL และน้ำกลั่นปริมาณ 0.180 mL จากนั้นเขย่าให้เข้ากันบ่มทิ้งไว้ 30 min ที่อุณหภูมิห้อง วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 415 nm ด้วยเครื่องอ่านปฏิกิริยาบนไมโครเพลต (Biochrom รุ่น EZ Read 2000) ใช้เคอเวซิดินเป็นสารมาตรฐาน โดยดัดแปลงตามวิธีการของ Chang, C., Yang, M., Wen, H., and Chern, J. [12]

3. การทดสอบกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระ

การทดสอบกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระนั้นมีอยู่ด้วยกันหลายวิธีแต่ในงานวิจัยนี้จะทำการทดสอบกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระทั้งหมด 2 วิธี ดังนี้

3.1 วิธี Scavenging Activity of ABTS radical

เป็นวิธีการวัดความสามารถในการฟอกสีอนุมูลอิสระเอบีทีเอส (ABTS^{•+}, 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzo-thiazoline-6-sulfonic acid) radical) ซึ่งเป็นสารสังเคราะห์ ดัดแปลงตามวิธีการของ Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., and Rice-Evans, C. [13] โดยการผสมสารละลาย ABTS^{•+} ความเข้มข้น 7 mM ปริมาตร 2 mL กับสารละลาย Potassium Persulfate ($\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$) ความเข้มข้น 140 mM ปริมาตร 35.5 μL ในขวดสีชา ตั้งทิ้งไว้ในที่มืด 16 h ที่อุณหภูมิห้อง จะได้ Stock ABTS radical cation ที่มีสีน้ำเงินอมเขียว ก่อนนำมาทำการทดลองจะต้องเจือจาง Stock ABTS radical cation ด้วยน้ำกลั่นให้ได้ค่าดูดกลืนแสงเท่ากับ 0.700 ± 0.010 (ต้องเตรียมใหม่ทุกครั้งก่อนการใช้งาน) เติมน้ำกลั่นที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ปริมาตร 0.1 mL ในหลอดทดลองผสมกับสารละลาย ABTS^{•+} ปริมาตร 0.9 mL เขย่าให้เข้ากัน ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 6 min วัดค่าการดูดกลืนแสงได้สูงสุดที่ความยาวคลื่น 734 nm ด้วยเครื่องอ่านปฏิกิริยาบนไมโครเพลต โดยใช้ น้ำกลั่นเป็นชุดควบคุม และใช้ไทโรลอสเป็นสารมาตรฐาน นำค่าดูดกลืนแสงที่ได้มาคำนวณร้อยละการกำจัดความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระดังสมการที่ (1) จากนั้นนำค่า % inhibition ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ของสารสกัดแต่ละสภาวะที่ได้จากการคำนวณไปสร้างกราฟเส้นตรงเพื่อคำนวณหาค่า Half maximal inhibitory concentration (IC_{50}) ซึ่งหมายถึงค่าความเข้มข้นของสารตัวอย่างที่มีผลต่อการลดจำนวนของอนุมูลอิสระลงไปครึ่งหนึ่งจากจำนวนของอนุมูลอิสระเริ่มต้น

$$\%inhibition = \left[\frac{A_{734\text{control}} - A_{734\text{sample}}}{A_{734\text{control}}} \right] \times 100 \quad (1)$$

เมื่อ

- A734 control* = ค่าการดูดกลืนแสงของสารควบคุม (ABTS^{•+} ที่เจือจางแล้ว)
A734 sample = ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายตัวอย่าง (สารสกัด + ABTS^{•+})

3.2 วิธี Metal Chelating Activity

เป็นการวัดความสามารถในการแย่งจับโลหะไอออน ตามวิธีของ Dinis, T. C. P., Madeira, V. M. C., and Almeda, L. M. [14] โดยเตรียมตัวอย่างสารสกัดที่เข้มข้นต่าง ๆ ปริมาตร 0.800 mL ในหลอดทดลอง และใช้น้ำกลั่นปราศจากไอออนเป็นชุดควบคุม เติมสารละลาย Iron (II) chloride (FeCl₂) ความเข้มข้น 2 mM ปริมาตร 0.01 mL และสารละลาย Ferrozine ความเข้มข้น 5 mM ปริมาตร 0.02 mL เขย่าอย่างรวดเร็วมั้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 min วัดค่าดูดกลืนแสงได้สูงสุดที่ความยาวคลื่น 562 nm ด้วยเครื่องอ่านปฏิกิริยาบนไมโครเพลต โดยใช้ดีทีเอเป็นสารมาตรฐาน นำค่าที่ได้ไปคำนวณหาความสามารถในการจับโลหะ (%*chelating ability*) ดังสมการที่ (2) จากนั้นนำค่า %*chelating ability* ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ของสารสกัดที่ได้จากการคำนวณจากสมการที่ (2) จะนำไปสร้างกราฟเส้นตรงเพื่อคำนวณหาค่า IC₅₀

$$\%chelating\ ability = \left[\frac{A562control - A562sample}{A562control} \right] \times 100 \quad (2)$$

เมื่อ

- A562control* = ค่าการดูดกลืนแสงของสารควบคุม (DI + FeCl₂ + Ferrozine)
A562sample = ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายตัวอย่าง (สารสกัด + FeCl₂ + Ferrozine)

4. การวิเคราะห์ทางสถิติ

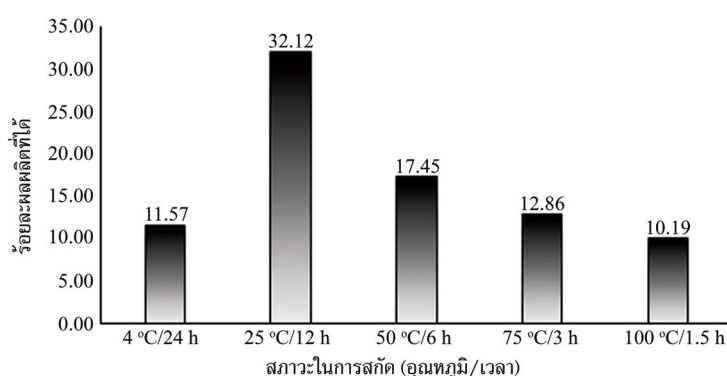
นำข้อมูลที่ได้จากการทดลองมาวิเคราะห์ความแปรปรวนด้วยวิธี One-way ANOVA จากนั้นเปรียบเทียบค่าความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี DMRT (Duncan's Multiple Range Test) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % ($p < 0.05$) และวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างสารฟลาโวนอยด์กับกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระด้วยการหาค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (Pearson's Correlation Coefficients, r) โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูปทางสถิติ

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. ปริมาณสารสกัดหยาบ

จากการนำสาหร่าย *C. beccarii* มาสกัดด้วยน้ำในสภาวะที่ต่างกัน 5 สภาวะ พบว่าสารสกัดด้วยน้ำที่สภาวะ 25 °C/12 h มีร้อยละผลผลิตมากที่สุด รองลงมาคือสารสกัดด้วยน้ำที่สภาวะ 50 °C/6 h และน้อยที่สุดคือสารสกัดด้วยน้ำที่สภาวะ 100 °C/1.5 h คิดเป็น 32.12 17.45 และ 10.19 ตามลำดับ (รูปที่ 1) ซึ่งสีของสารสกัดหยาบหลังจากการนำไปทำแท้งแบบแช่เยือกแข็งจะมีสีที่แตกต่างกันออกไป

ในแต่ละสภาวะที่ใช้ในการสกัด (รูปที่ 2) จากข้อมูลข้างต้นสอดคล้องกับการศึกษาของ Malaiwan, T. [15] และ Boonchum, W. [16] ที่ทำการสกัดสาหร่าย *Spirogyra* sp. พบว่าน้ำเป็นตัวทำละลายได้ดีที่สุด และได้ร้อยละผลผลิต มากกว่าตัวทำละลายเอทานอล โดยค่า % yield สารสกัดด้วยน้ำและเอทานอลของสาหร่ายดังกล่าวเท่ากับ 12.62 และ 4.44 ตามลำดับ ทั้งนี้เมื่อเปรียบเทียบสารสกัดด้วยน้ำที่สภาวะ 50 °C/6 h พบว่ามีร้อยละผลผลิตสูงกว่างานวิจัยของ Malaiwan, T. [15] นอกจากนี้ยังมีร้อยละผลผลิตสูงกว่าสารสกัดน้ำของสาหร่ายสีแฉ่งน้ำจืด *C. aeruginosus* และ *C. ogasawaraensis* [8] ผลการทดลองชี้ให้เห็นว่าสารประกอบที่มีชีวสูงอาจมีส่วนสำคัญในสาหร่ายและสามารถสกัดได้โดยใช้ตัวทำละลายมีชีว ทั้งนี้ปัจจัยที่ส่งผลต่อปริมาณผลผลิตสารสกัดขึ้นอยู่กับสภาวะในการสกัดถือว่าเป็นสิ่งสำคัญ สภาวะในที่นี้ได้แก่ ระยะเวลา และอุณหภูมิในการสกัดซึ่งมีผลต่อปริมาณสารสกัดที่ออกมา กล่าวคือ เมื่อใช้ระยะเวลาและอุณหภูมิที่เหมาะสมจะส่งผลให้ได้ปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระที่สกัดมาได้เพิ่มขึ้น [4] ในขณะเดียวกันการใช้น้ำร้อนในการสกัดสารสำคัญจากสาหร่ายจะทำให้ได้สารในกลุ่มโพลีแซคคาไรด์ [18] นอกจากนี้ยังมีอีกหนึ่งปัจจัยที่สำคัญ คือ อัตราส่วนระหว่างวัตถุดิบกับตัวทำละลายเนื่องจากเมื่อเราเลือกใช้อัตราส่วนของวัตถุดิบกับตัวทำละลายเหมาะสมจะส่งผลให้ได้ปริมาณสารที่เพิ่มขึ้น [19]



รูปที่ 1 ร้อยละผลผลิตของสาหร่าย *C. beccarii* ที่สกัดด้วยน้ำในสภาวะที่ต่างกัน 5 สภาวะ



(ก) 4 °C/24 h

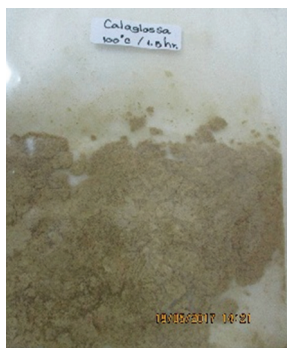
(ข) 25 °C/12 h

(ค) 50 °C/6 h

รูปที่ 2 สีของสารสกัดด้วยน้ำในสภาวะที่ต่างกัน 5 สภาวะของสาหร่าย *C. beccarii* หลังจากการนำไปทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง



(ง) 75 °C/3 h



(จ) 100 °C/1.5 h

รูปที่ 2 สีของสารสกัดด้วยน้ำในสภาวะที่ต่างกัน 5 สภาวะของสาหร่าย *C. beccarii* หลังจากการนำไปทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (ต่อ)

2. การหาปริมาณสารพฤกษเคมี

2.1 การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด

ผลการศึกษาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดซึ่งได้คำนวณจากสมการเส้นตรงจากกราฟมาตรฐานกรดแกลลิก ($y = 0.8503 + 0.0732x$; $R^2 = 0.9951$) จากการศึกษาพบว่าปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของสาหร่าย *C. beccarii* ที่สกัดด้วยน้ำในสภาวะที่ต่างกัน 5 สภาวะมีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) (ตารางที่ 1) โดยสารสกัดด้วยน้ำที่สภาวะ 25 °C/12 h มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดสูงที่สุด รองลงมาคือ สารสกัดด้วยน้ำที่สภาวะ 4 °C/24 h และน้อยที่สุดคือ สารสกัดด้วยน้ำที่สภาวะ 50 °C/6 h โดยมีค่า 32.95 ± 0.21 , 24.01 ± 0.48 และ 16.72 ± 0.25 mg GAE/g extract ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับการศึกษาของ Ramdani, M., Elasri, O., Saidi, N., Elkhiaati, N., Taybi, F. A., Mostareh, M., Zaraali, O., Haloui, B., and Ramdani, M. [20] พบว่าสารสกัดด้วยน้ำทุกสภาวะมีปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดน้อยกว่าสารสกัดด้วยน้ำที่อุณหภูมิ 20 °C และ 40 °C ของสาหร่ายสีแดงทะเล *Gracilaria bursa-pastoris* แต่สารสกัดด้วยน้ำที่สภาวะ 4 °C/24 h 25 °C/ 12 h และ 75 °C/3 h มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดสูงกว่าสารสกัดน้ำสาหร่ายสีแดงน้ำจืด *Caloglossa ogasawaraensis* และ *Compsopogon aeruginosus* แต่สารสกัดด้วยน้ำที่สภาวะ 50 °C/6 h และ 100 °C/1.5 h มีค่าต่ำกว่าสาหร่าย *C. ogasawaraensis* แต่มีค่าสูงกว่าสาหร่าย *C. aeruginosus* ซึ่งมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดเท่ากับ 20.89 ± 0.68 และ 6.14 ± 0.43 mg GAE/g extract [8] ซึ่งสอดคล้องกับรายงานหลายฉบับที่กล่าวว่าการใช้ความร้อนที่แตกต่างกันจะส่งผลต่อปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด เพราะอุณหภูมิเป็นปัจจัยที่ส่งผลกระทบต่อความคงตัวของสารประกอบฟีนอลิกและส่งผลทำให้ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกมีค่าลดลง [21] - [22]

2.2 การวิเคราะห์ปริมาณสารฟลาโวนอยด์รวม

ผลการศึกษาปริมาณสารฟลาโวนอยด์รวมซึ่งได้คำนวณจากสมการเส้นตรงจากกราฟมาตรฐานเคอวิชติน ($y = 0.0025 + 0.0593x$; $R^2 = 0.9997$) จากการศึกษาพบว่าสารสกัดหยาบของสาหร่าย *C. beccarii* ที่สกัดด้วยน้ำในสภาวะที่ต่างกัน 5 สภาวะ มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมี

นัยสำคัญ ($p < 0.05$) (ตารางที่ 1) โดยสารสกัดด้วยน้ำที่สภาวะ 4 °C/24 h มีปริมาณสารฟลาโวนอยด์รวมสูงที่สุด รองลงมาคือ สารสกัดด้วยน้ำที่สภาวะ 25 °C/12 h และน้อยที่สุดคือ สารสกัดด้วยน้ำที่สภาวะ 100 °C/1.5 h โดยมีค่า 24.67 ± 0.02 , 22.67 ± 0.02 และ 11.40 ± 0.08 mgQE/g extract ตามลำดับ และเมื่อเปรียบเทียบกับการศึกษาของ Chankaew, W., Penpapai, P., Pood-ngam, J., and Luealae, W. [9] พบว่าสารสกัดด้วยน้ำที่สภาวะ 4 °C/24 h มีปริมาณสารฟลาโวนอยด์รวมสูงกว่าสารสกัดเมทานอลของสาหร่ายสีแดงน้ำจืด 2 ชนิด คือ *Compsopogon caeruleus* และ *Sirodotia suecica* แต่มีปริมาณน้อยกว่าสารสกัดน้ำที่อุณหภูมิ 20 °C และ 40 °C ของสาหร่ายสีแดงทะเล *Gracilaria bursapastoris* ซึ่งมีปริมาณสารฟลาโวนอยด์รวมเท่ากับ 19.22 ± 0.12 และ 59.04 ± 0.09 mgQE/g extract [20] ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับ Zakaria, N. A., Ibrahim, D., Sulaiman, S. F., and Supardy, N. A. [23] ที่กล่าวว่าสารต้านอนุมูลอิสระที่สกัดได้จากพืชมีแนวโน้มที่จะละลายน้ำได้เนื่องจากมักเป็นสารจำพวกโกลโคไซด์ และมีความสัมพันธ์กับการศึกษาของ Isantea, O. and Wonggajang, K. [24] ที่พบว่าสารฟลาโวนอยด์จะถูกสกัดออกมาได้มากที่สุดในตัวทำละลายที่มีความเป็นขั้วสูง

ตารางที่ 1 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดและสารฟลาโวนอยด์รวมของสารสกัดสาหร่าย *C. beccarii* ที่สกัดด้วยน้ำในสภาวะที่ต่างกัน

สภาวะในการสกัด (อุณหภูมิ/เวลา)	สารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (mgGAE/g extract)	สารฟลาโวนอยด์รวม (mgGAE/g extract)
4 °C/24 h	$24.01 \pm 0.48^{d*}$	24.67 ± 0.02^c
25 °C/12 h	32.95 ± 0.21^c	22.67 ± 0.02^d
50 °C/6 h	$16.72 \pm 0.25^{a*}$	16.92 ± 0.06^c
75 °C/3 h	21.85 ± 0.31^c	11.87 ± 0.04^b
100 °C/1.5 h	$18.48 \pm 0.25^{b*}$	11.40 ± 0.08^a

หมายเหตุ: ตัวอักษรที่ต่างกันในแต่ละแถวมีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p < 0.05$); * Luealae, W., Penpapai, P., and Chankaew, W. [10]

3. การทดสอบกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระ

3.1 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี Scavenging Activity of ABTS Radical

สารสกัดจากสาหร่ายแต่ละสภาวะในการสกัดตอบสนองต่อฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระแต่ละวิธีได้แตกต่างกัน โดยสารสกัดด้วยน้ำทั้ง 5 สภาวะให้ค่า IC_{50} ได้แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) (ตารางที่ 2) โดยพบว่าสารสกัดด้วยน้ำที่สภาวะ 25 °C/12 h แสดงผลการต้านอนุมูลอิสระได้ดีที่สุด รองลงมาคือ สารสกัดด้วยน้ำที่สภาวะ 50 °C/6 h และมีฤทธิ์ต่ำสุดที่สภาวะ 4 °C/24 h โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.24 ± 0.00 , 0.33 ± 0.00 และ 0.55 ± 0.00 mg/mL ตามลำดับ แต่เมื่อนำมาเปรียบเทียบกับสารมาตรฐานไทโรลออกซ์พบว่า ทุกสภาวะในการสกัดมีฤทธิ์กำจัดอนุมูล ABTS ได้น้อยกว่า ซึ่งค่า IC_{50} ของสารมาตรฐานไทโรลออกซ์เท่ากับ 0.04 ± 0.00 mg/mL (ตารางที่ 2) จากผลการศึกษาในครั้งนี้ชี้ให้เห็นว่าสารสกัดสาหร่ายสีแดงน้ำจืด *C. beccarii* ทั้ง 5 สภาวะในการสกัด

มีความสามารถในการกำจัดอนุมูล ABTS ได้ดีกว่าสารสกัดน้ำสาหร่ายสีน้ำตาล *Amphiroa* sp., *Halimeda macroloba*, *Sargassum bimderi* และ *Turbinaria conoides* [16] และสารสกัดน้ำสาหร่าย *Spirulina platensis* [25] แต่ต่ำกว่าสารสกัดน้ำของสาหร่ายเตา (*Spirogyra* sp.) [26] ทั้งนี้เมื่อพิจารณาจากปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด พบว่ามีความสัมพันธ์กับความสามารถในการกำจัดอนุมูล ABTS ($R = -0.464$) กล่าวคือหากมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดมากขึ้นฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ABTS จะมีค่า IC_{50} ต่ำลง (IC_{50} น้อยจะมีประสิทธิภาพดี) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Piluzza, G. and Bullitta, S. [27] พบว่าปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดมีความสัมพันธ์ไปในทิศทางเดียวกันกับฤทธิ์กำจัดอนุมูลอิสระบางชนิด

3.2 การทดสอบประสิทธิภาพในการจับโลหะด้วยวิธี Metal Chelating Activity

การวิเคราะห์ประสิทธิภาพในการจับโลหะจัดเป็นอีกกลไกหนึ่งในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ เนื่องจากโลหะไอออน โดยเฉพาะธาตุเหล็กที่อยู่ในรูปเฟอร์รัส (Fe^{2+}) เป็นตัวการสำคัญที่มีบทบาทในการเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชัน โดยโลหะไอออน Fe^{2+} จะทำปฏิกิริยาออกซิเดชันกับออกซิเจนในอากาศเกิดเป็นสารอนุมูล Superoxide anion ซึ่งเป็นอนุมูลอิสระเริ่มต้นที่ทำให้เกิดอนุมูลอิสระตัวอื่น ๆ ตามมา [14] จากการศึกษาพบว่าสารสกัดด้วยน้ำทั้ง 5 สภาวะมีประสิทธิภาพในการจับโลหะได้แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) (ตารางที่ 2) โดยสารสกัดด้วยน้ำที่สภาวะ 4 °C/24 h มีประสิทธิภาพในการจับโลหะมากที่สุด โดยให้ค่า IC_{50} ต่ำสุด รองลงมาคือ สารสกัดด้วยน้ำที่สภาวะ 50 °C/6 h และมีประสิทธิภาพในการจับโลหะได้น้อยที่สุดที่สภาวะ 100 °C/1.5 h โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.27 ± 0.00 , 0.32 ± 0.00 และ 2.03 ± 0.02 mg/mL ตามลำดับ แต่เมื่อนำมาเปรียบเทียบกับสารมาตรฐานอัสกีทิกที่เอพบว่าทุกสภาวะในการสกัดมีประสิทธิภาพในการจับโลหะได้น้อยกว่า ซึ่งค่า IC_{50} ของสารมาตรฐานอัสกีทิกที่เอเท่ากับ 0.04 ± 0.00 mg/mL อย่างไรก็ตามสารสกัดด้วยน้ำที่สภาวะ 4 °C/24 h มีประสิทธิภาพในการจับโลหะได้ดีกว่าสารสกัดน้ำสาหร่ายทะเล *Caulerpa lentilifera*, *Sargassum oligocystum* และ *Gracilaria changii* [28] และสารสกัดเมทานอลความเข้มข้น 70 % ของสาหร่ายสีน้ำตาลทะเล *Ecklonia cava* [29] แต่มีประสิทธิภาพในการจับโลหะได้น้อยกว่าสารสกัดน้ำสาหร่ายเตา (*Spirogyra neglecta*) [30] ทั้งนี้เมื่อพิจารณาจากปริมาณสารฟลาโวนอยด์รวมพบว่า มีความสัมพันธ์กับประสิทธิภาพในการจับโลหะ ($R = -0.589$) กล่าวคือหากมีปริมาณสารฟลาโวนอยด์มากขึ้นประสิทธิภาพในการจับโลหะสูงขึ้นเช่นกัน จากการศึกษาครั้งนี้จะเห็นได้ว่าสารสกัดด้วยน้ำที่สภาวะ 4 °C/24 h มีประสิทธิภาพในการจับโลหะหนักได้ดีที่สุด เนื่องมาจากในขั้นตอนการสกัดในสภาวะนี้ไม่ต้องผ่านความร้อนใด ๆ จึงทำให้ปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระไม่ถูกทำลาย เพราะอุณหภูมิและระยะเวลาในการให้ความร้อนมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระ [31] และที่อุณหภูมิ 4 °C สามารถสกัดสารสีกลุ่มไฟโคบิลโปรตีนออกมาได้ในปริมาณมาก ซึ่งสารสีกลุ่มนี้มีคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระได้ [32] - [33]

ตารางที่ 2 ค่า IC_{50} ของกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดสาหร่าย *C. beccarii* ที่สกัดด้วยน้ำในสภาวะที่ต่างกัน 5 สภาวะ

สภาวะในการสกัด (อุณหภูมิ/เวลา)	IC_{50} (mg/ml)	
	ฤทธิ์กำจัดอนุมูล ABTS	ประสิทธิภาพในการจับโลหะ
4 °C/24 h	0.55±0.00 ^f	0.27±0.00 ^b
25 °C/12 h	0.24±0.00 ^b	0.33±0.00 ^d
50 °C/6 h	0.33±0.33 ^c	0.32±0.01 ^c
75 °C/3 h	0.50±0.00 ^d	0.66±0.02 ^e
100 °C/1.5 h	0.51±0.00 ^e	2.03±0.02 ^f
ไทรลอกซ์	0.04±0.00 ^a	-
อีดีทีเอ	-	0.04±0.00 ^a

หมายเหตุ: ตัวอักษรที่ต่างกันในแนวดิ่งมีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p < 0.05$)

สรุปผล

จากผลการทดลองข้างต้นพบว่าสารสกัดด้วยน้ำทั้ง 5 สภาวะ มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด และสารฟลาโวนอยด์รวมที่แตกต่างกัน ทำให้มีฤทธิ์กำจัดอนุมูลอิสระที่แตกต่างกันด้วย โดยสารสกัดด้วยน้ำที่สภาวะ 4 °C/24 h มีปริมาณสารฟลาโวนอยด์รวมสูงที่สุด และมีประสิทธิภาพในการจับโลหะดีที่สุด ส่วนสารสกัดด้วยน้ำที่สภาวะ 25 °C/12 h มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดสูงที่สุดและมีฤทธิ์กำจัดอนุมูล ABTS ดีที่สุด ดังนั้นสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดด้วยน้ำเพื่อการใช้ประโยชน์จากสาหร่ายสีแดงน้ำจืด *Caloglossa beccarii* ควรทำการสกัดที่อุณหภูมิค่าคือ 4 °C และ 25 °C ซึ่งมีศักยภาพในการต้านอนุมูลอิสระมากที่สุด และงานวิจัยนี้ยังเป็นข้อมูลพื้นฐานในการสกัดสารเพื่อนำไปใช้พัฒนาเป็นสารต้านอนุมูลอิสระจากธรรมชาติในอุตสาหกรรมเวชสำอางและเภสัชกรรมได้ในอนาคต

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติที่ได้สนับสนุนทุนการวิจัยประจำปี 2560 และ Prof. Ganesan Kandaswamy, Prof. John A. West และ Prof. Orlando Necchi JR. สำหรับการยืนยันชนิดของสาหร่ายสีแดงน้ำจืดที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้

References

- [1] Ames, B. N., Shigenaga, M. K., and Hagen, T. M. (1993). Oxidation, Antioxidants and the Degenerative Disease of Aging. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (PNAS)*. Vol. 90, No. 17, pp. 7915-7922. DOI: 10.1073/pnas.90.17.7915

- [2] Krishnaiah, D., Sarbatly, R., and Nithyanandam, R. (2011). A Review of the Antioxidant Potential of Medicinal Plant Species. **Food and Bioproducts Processing**. Vol. 89, No. 1, pp. 217-233. DOI: 10.1016/j.fbp.2010.04.008
- [3] Peerapornpisal, Y. (2013). **Freshwater Algae in Thailand: Applied Algae Research Laboratory, Microbiology Section**. Department of Biology. Faculty of Science, Chiang Mai University
- [4] Dai, J. and Mumper, R. (2010). Plant Phenolics: Extraction, Analysis and Their Antioxidant and Anticancer Properties. **Molecules**. Vol. 15, No. 10, pp. 7313-7352. DOI: 10.3390/molecules15107313
- [5] Peerapornpisal, Y., Punyoyai, T., and Amornlerdpison, D. (2012). Antioxidant and Anti-Inflammatory Activities of *Spirogyra neglecta* (Hassall) Kützing. **KKU Science Journal**. Vol. 40, Number 1, pp. 228-235
- [6] Phonrin, A. (2017). **Determination of Total Phenolic and Antioxidant Activity in Fresh Water Macroalgae from Nan Province**. M. Sc. Thesis, Burapha University, Chonburi
- [7] Chankaew, W. and Penpapi, P. (2015). Distribution and Antioxidant Activity of Freshwater Red Algae in Watershed Area, Nakhon Si Thammarat Province. **Khon Kaen Agriculture Journal**. Vol. 43, Suppl. 1, pp. 215-223
- [8] Chankaew, W., Luealae, W., and Phomhom, S. (2016). Diversity and Screening of Biological Activity of Red Macroalgae from Trang Watershed Area, Thailand. **International Journal of Agricultural Technology**. Vol. 12, No. 7.2, pp. 2113-2122
- [9] Chankaew, W., Penpapai, P., Pood-ngam, J., and Luealae, W. (2018). Phycobiliprotein, Polyphenol Contents and Antioxidant Activity of Two Red Algae, *Compsopogon coeruleus* Montagne and *Sirodotia suecica* Kylin. **Khon Kaen Agriculture Journal**. Vol. 46, Suppl. 1, pp. 279-285
- [10] Luealae, W., Penpapai, P., and Chankaew, W. (2018). Phenolic Content and Antioxidant Activity of Aqueous Extracts of Red Alga, *Caloglossa beccarii* De Toni. In **Proceedings of the 2nd Endemic Botanical Conference of Thailand**. Chiang Rai: Mae Fah Luang University. pp. 1-8
- [11] Julkunen-Tiitto, R. (1985). Phenolic Constituents on the Leaves of Northern Willows: Methods for the Analysis of Certain Phenolics. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. Vol. 33, Issue 2, pp. 213-217. DOI: 10.1021/jf00062a013
- [12] Chang, C., Yang, M., Wen, H., and Chern, J. (2002). Estimation of Total Flavonoid Content in Propolis by Two Complementary Colorimetric Methods. **Journal of Food and Drug Analysis**. Vol. 10, Issue 3, pp. 178-182. DOI: 10.38212/2224-6614.2748
- [13] Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., and Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant Activity Applying an Improved ABTS Radical Cation Decolorization Assay. **Free Radical Biology and Medicine**. Vol. 26, Issue 9/10, pp. 1231-1237. DOI: 10.1016/s0891-5849(98)00315-3
- [14] Dinis, T. C. P., Madeira, V. M. C., and Almeda, L. M. (1994). Action of Phenolic Derivatives (Acetaminophen, Salicylate, and 5-amiosalicylate) as Inhibitors of Membrane Lipid Peroxidation and as Peroxyl Radical Scavengers. **Archives of Biochemistry and Biophysics**. Vol. 315, Issue 1, pp. 161-169. DOI: 10.1006/abbi.1994.1485

- [15] Malaiwan, T. (2550). **Study on Antioxidant of *Cladophora* sp., *Nostochopsis* sp. and *Spirogyra* sp.** Independent Study, Chiang Mai University, Chiang Mai
- [16] Boonchum, W. (2011). **Antioxidant Activity of Some Marine Algae from the Gulf of Thailand and the Application in Cosmeceutical Product.** Ph.D. Philosophy in Applied Microbiology, Chiang Mai University, Chiang Mai
- [17] Yarnpakdee, S., Benjakul, S., and Senphan, T. (2018). Antioxidant Activity of the Extracts from Freshwater Macroalgae (*Cladophora glomerata*) Grown in Northern Thailand and its Preventive Effect Against Lipid Oxidation of Refrigerated Eastern Little Tuna Slice. **Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**. Vol. 19, Number 3, pp. 209-219. DOI: 10.4194/1303-2712-v19_03_04
- [18] Jiao, G., Yu, G., Zhang, J., and Ewart, H. S. (2011). Chemical Structures and Bioactivities of Sulfated Polysaccharides from Marine Algae. **Marine Drugs**. Vol. 9, Issue 2, pp. 196-223. DOI: 10.3390/md9020196
- [19] Palakajornsak, Y. (2004). **Extraction and Stability of Anthocyanins from Mangosteen Peel.** M.Sc. Thesis in Department of Food Technology, Silpakorn University, Bangkok
- [20] Ramdani, M., Elasmri, O., Saidi, N., Elkhiaati, N., Taybi, F. A., Mostareh, M., Zeraali, O., Haloui, B., and Ramdani, M. (2017). Evaluation of Antioxidant Activity and Total Phenol Content of *Gracilaria bursa-pastoris* Harvested in Nador Lagoon for an Enhanced Economic Valorization. **Chemical and Biological Technologies in Agriculture**. Vol. 4, No. 28, pp. 1-7. DOI: 10.1186/s40538-017-0110-z
- [21] Siritrakulsak, P. and Simla, S. (2015). Effects of Conventional Cooking Method on Antioxidant Content in Moonflower. **Khon Kaen Agriculture Journal**. Vol. 43, Suppl. 1, pp. 875-880
- [22] Lapnitiporn, S., Laihakunjit, N., and Kerdchoechuen, O. (2012). Physico-Chemical Composition and Antioxidant Activity of Cashew Apple Juice. **Thai Journal of Agricultural Science**. Vol. 43, Suppl. 2, pp. 409-412
- [23] Zakaria, N. A., Ibrahim, D., Sulaiman, S. F., and Supardy, N. A. (2011). Assessment of Antioxidant Activity, Total Phenolic Content and *in vitro* Toxicity of Malaysian Red Seaweed, *Acanthophora spicifera*. **Journal of Chemical and Pharmaceutical Research**. Vol. 3, No. 3, pp. 182-191
- [24] Isantea, O. and Wonggajang, K. (2015). The Investigation of the Extraction Solvent System of Phenolic and Flavonoids Rich Extracts and Antioxidant Activity from *Tagetes erecta* Flower. **Science and Technology Nakhon Sawan Rajabhat University Journal**. Vol. 7, No. 7, pp. 29-40
- [25] Kongyod, K. (2010). **Anti-Bacterial and Anti-Free Radical Effects of *Spirulina platensis* Extract.** M.Sc. Thesis in Biology, Chiang Mai University, Chiang Mai
- [26] Rattanapot, T., Menhumphan, K., Srimaroeng, C., Junthip, R., and Amornlerdpison, D. (2012). Antioxidant Activity of *Spirogyra* sp. and Effect of its Supplementation on Growth Performance of Tilapia in Cage Culture. **Journal of Fisheries Technology Research**. Vol. 6, No. 2, pp. 23-43
- [27] Piluzza, G. and Bullitta, S. (2011). Correlations Between Phenolic Content and Antioxidant Properties in Twenty-Four Plant Species of Traditional Ethnoveterinary use in the Mediterranean Area. **Pharmaceutical Biology**. Vol. 49, Issue 3, pp. 240-247. DOI: 10.3109/13880209.2010.501083

- [28] Sumintilee, W., Banjongsinsiri, P., Praiboon, J., and Klaypradit, W. (2014). Antioxidant Activities of Crude Extract from *Caulerpa lentillifera*, *Sargassum oligocystum* and *Gracilaria changii*. **Journal of Food Technology, Siam University**. Vol. 9, No. 1, pp. 63-75
- [29] Senevirathne, M., Kim, S., Siriwardhana, N., Ha, J., Lee, K., and Jeon, Y. (2006). Antioxidant Potential of *Ecklonia cava* on Reactive Oxygen Species Scavenging, Metal Chelating, Reducing Powder and Lipid Peroxidation Inhibition. **Food Science and Technology International**. Vol. 12, Issue 1, pp. 27-38. DOI: 10.1177/1082013206062422
- [30] Punyoyai, T. (2008). **Antioxidant Activity of Tao, *Spirogyra neglecta* (Hassall) Kützing**. M.Sc. Thesis in Biology, Chiang Mai University, Chiang Mai
- [31] Loannou, I., Hafsa, I., Hamdi, S., Charbonnel, C., and Ghoul, M. (2012). Review of the Effects of Food Processing and Formulation on Flavonol and Anthocyanin Behavior. **Journal of Food Engineering**. Vol. 111, Issue 1, pp. 208-217. DOI: 10.1016/j.jfoodeng.2012.02.006
- [32] Bhat, V. B. and Madyastha, K. M. (2000). C-Phycocyanin: A Potent Peroxyl Radical Scavenger *in Vivo* and *in Vitro*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. Vol. 275, Issue 1, pp. 20-25. DOI: 10.1006/bbrc.2000.3270
- [33] Estrada, J. E. P., Bescós, P. B., and del Fresno, A. M. V. (2001). Antioxidant Activity of Different Fractions of *Spirulina platensis* Protean Extract. **II Farmaco**. Vol. 56, Issue 5-7, pp. 497-500. DOI: 10.1016/s0014-827x(01)01084-9