ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบจากสัตว์ทะเลกลุ่มเอคไคโนเดิร์ม

Antioxidant Activity of Crude Extracts from Echinoderms

ธีรวุฒิ เลิศสุทธิชวาล[12*] ราโชว์ ขาวชำนาญ[1] อุไรวรรณ วัฒนกุล[3]

Theerawoot Lerssutthichawal[12*] Rachow Kaochamnan[1] Uraiwan Wattanakul[3]

[1] สาขาประมง คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย วิทยาเขตนครศรีธรรมราช อ.ทุ่งสง จ.นครศรีธรรมราช 80110

[2] หน่วยวิจัยการจัดการสุขภาพสัตว์น้ำ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย วิทยาเขตนครศรีธรรมราช

[3] สาขาอุตสาหกรรมอาหารและผลิตภัณฑ์ประมง คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการประมง มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย วิทยาเขตตรัง อ.สิเกา จ.ตรัง

[*] Correspondence email: theerawootl@yahoo.com

บทคัดย่อ

ทำการรวบรวมตัวอย่างดาวทราย (*Asteropecten* sp.), เหรียญทะเล (*Echinarachnius* sp.) และปลิงทะเล (*Holothuria* sp.) จากชายหาดราชมงคล และอ่าวมะขาม อำเภอสิเกา จังหวัดตรัง ทำการสกัดสดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ 2 ชนิด เริ่มด้วย 95% เอธานอล แล้วแบ่งส่วนเพื่อแยกชั้นด้วยเฮกเซน นำสารสกัดที่ได้จากตัวทำละลายทั้ง 2 ชนิด ไประเหยด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศ นำไปทดสอบการศึกษาประสิทธิภาพของสารทุติยภูมิในรูปของสารสกัดหยาบในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH Scavenging Assay ผลปรากฏว่าสารสกัดหยาบจากปลิงทะเลในชั้นของเฮกเซนให้ผลต่อปฏิกิริยากับ DPPH สูงกว่าสารสกัดหยาบในชั้นของ 95% เอธานอล ($p<0.05$) ขณะที่สารสกัดหยาบจากเหรียญทะเลในชั้นของ 95% เอธานอล ให้ค่าการทำปฏิกิริยาต่อ DPPH สูงกว่าในชั้นของเฮกเซน ($p<0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับ BHA ซึ่งเป็นสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน พบว่าให้ผลที่ดีกว่าเช่นกัน อย่างไรก็ดีสารสกัดหยาบจากดาวทราย ทั้งในชั้น 95% เอธานอล และเฮกเซน ให้ค่าการขจัดอนุมูล DPPH ไม่แตกต่างกัน ($p>0.05$) จากการเปรียบเทียบของประสิทธิภาพของสารทุติยภูมิในรูปสารสกัดจากสัตว์ทั้ง 3 ชนิด จะเห็นได้ว่า ปลิงทะเล และเหรียญทะเล มีความเป็นไปได้ที่จะใช้เป็นสารต้านอนุมูลอิสระ ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับตัวทำละลายอินทรีย์ที่เหมาะสม

คำสำคัญ: สารต้านอนุมูลอิสระ สารทุติยภูมิ ดาวทราย เหรียญทะเล ปลิงทะเล เอคไคโนเดิร์ม

Abstract

Three species of echinoderms, sand sea star (*Asteropecten* sp.), sand dollar (*echinarachnius* sp.) and sea cucumber (*Holothuria* sp.) were collected from Rajamangala Beach and Ma-Kham Bay, Si-Kao District, Trang Province. The samples were freshly extracted using two organic solvents, starting with 95% ethanol within 72 hrs. and followed by hexane. Soluble extracts were then evaporated by vacuum rotary evaporator. DPPH Scavenging Assay was assigned to

evaluate the capacity of the secondary metabolites in forms of dried ethanol and hexane extracts. The results indicated that hexane extract from sea cucumber provided higher reaction to DPPH than that of ethanol one ($p<0.05$), while ethanol extract of sand dollar gave more activity than that of hexane extract ($p<0.05$). Comparatively, these two extracts gave higher antioxidant activity than that of BHA ($p<0.05$) which was regarded as standard antioxidant. However, No significant difference between the two extracts was observed in case of sand sea star ($p>0.05$). In conclusion, sea cucumber and sand dollar could probably be used as the antioxidants depending on the appropriate organic solvents.

Key words: Antioxidant, secondary metabolite, sand sea star, sand dollar, sea cucumber, echinoderm

คำนำ

อนุมูลอิสระ (free radicals) เป็นสารที่มีอิเลคตรอนอิสระ (unpaired electron) อยู่ในวงนอกของอะตอมหรือโมเลกุล มีที่มาทั้งแหล่งภายนอกร่างกาย ได้แก่ มลพิษในอากาศ โอโซน ไนตรัสออกไซด์ ไนโตรเจนไดออกไซด์ ฝุ่น ควันบุหรี่ อาหารที่มีกรดไขมันไม่อิ่มตัว แสงแดด ความร้อน รังสีแกมม่า ยาบางชนิด เช่น doxorubicin, penicillamine, paracetamol เป็นต้น และถูกสร้างขึ้นในร่างกายของสิ่งมีชีวิตเนื่องจากกระบวนการออกซิเดชั่น- รีดักชั่น (oxidation-reduction หรือ redox) นอกจากนี้ยังรวมถึงกลุ่ม reactive oxygen species (ROS) ที่มีออกซิเจนเป็นแกนกลางด้วย เช่น superoxide radical (O_2^-), hydrogen peroxide (H_2O_2), hypochlorous acid (HClO), hydroxyl radical (OH), singlet oxygen (O_2), ozone (O_3) อย่างไรก็ดีร่างกายสิ่งมีชีวิตมีกลไกที่จะกำจัดอนุมูลอิสระเหล่านี้ 2 วิธี คือ การใช้เอนไซม์ต่าง ๆ ในร่างกาย เช่น superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx) และการไม่ใช้เอนไซม์ ได้แก่ สารประกอบหรือโปรตีนบางชนิด เช่น albumin, bilirubin, ceruloplasmin, transferrin เป็นต้น หรืออาศัยวิตามินชนิดต่างๆ ได้แก่ วิตามินอี เบตา-คาโรทีน และ วิตามินซี ซึ่งสารเหล่านี้ทำหน้าที่ในการต่อต้านอนุมูลอิสระ (antioxidants) ในกรณีการเปลี่ยนแปลงของสิ่งแวดล้อม จะมีผลทำให้ ROS เพิ่มปริมาณสูงขึ้น และหากมีอนุมูลอิสระเกิดขึ้นในปริมาณที่มากเกินกว่าที่ระบบป้องกันจะยับยั้งได้หมด จะทำให้เกิดสภาวะที่เรียกว่า oxidative stress ซึ่งทำให้อนุมูลอิสระทำอันตรายต่ออวัยวะและเนื้อเยื่อต่าง ๆ ของร่างกาย (Ames *et al*.,1993; Wang, *et al*., 2010)

มีรายงานมากมายที่กล่าวถึงสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidants) จากพืช เช่น กลุ่มพืชผักและพืชสมุนไพร ได้แก่ กระดุมทอง (*Sonchus oleraceus*), กระเพรา (*Ocimum sanctum*), กำมะหยี่ (*Amarnathus caudatus*), มะแว้ง (*solanum nigrum*), ดีปลี (*Piper longum*), ขมิ้นเครือ (*Coscinium blumeanum*) (Keawpradub *et al*., 2004; Khalaf *et.al*., 2008; Veeru *et al*., 2009; De Ghosh & Ramakrishna, 2011; Xia *et al*, 2011) ไม้ผล ได้แก่ ฝรั่ง (*Guava* sp.), มะไฟ (*Baccurea tetrandra*), สับปะรด (*Ananas*

cosmosus) (Thaipong *et al*, 2006; Haripyaree, *et al*., 2010; Jacinto *et. al*., 2011) พืชป่าชายเลน ได้แก่ โกงกางใบเล็ก (*Rhizophora apiculata*), ชะคราม (*Suaeda maritima*), ตะบูนขาว (*Xylocarpus granatus*), ตะบัน (*Xylocarpus rumphii*), โปรงขาว (Ceriops decandra), พังกาหัวสุม (*Bruguiera gymnorrhiza*), แสมขาว (*Avicenia alba*), แสมแดง (*Aegiceras corniculatum*), เหงือกปลาหมอ (*Acanthus illicifolius*) (Bunyapraphatsara *et al*., 2002; Banerjee *et al*., 2008; Gatewongsa & Phaechamud, 2012) ซึ่งอุดมไปด้วยวิตามินชนิดต่าง ๆ และสารประกอบกลุ่ม polyphenols เช่น xanthones และ flavonoids (Asha *et al*., 2012) ทั้งนี้สัตว์ชั้นต่ำโดยเฉพาะสิ่งมีชีวิตในทะเล ก็มีรายงานว่าสารทุติยภูมิที่สร้างขึ้นนั้นมีประสิทธิภาพในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระได้เช่นกัน ได้แก่ ฟองน้ำ (*Subergagoria suberosa*) (Reddy *et al*., 2011), ปลิงทะเล (*Apostichopus japonicas*, *Cucumeria frondosa*, *Holothuria* spp. และ (Althuibat *et al*., 2009; Mamelona & Pelletier, 2010; Wang *et al*., 2010), เม่นทะเล (*Salmacis virgulata* และ *Strongylocentrotus droebachinensis*) (Mamelona & Pelletier, 2010; Shankarlal *et al*., 2011)

สัตว์ในกลุ่มเอคไคโนเดิร์มมีประโยชน์ในแง่นิเวศวิทยา คือเป็นกลุ่มที่ช่วยกำจัดอินทรียสารบริเวณชายฝั่ง, กรองกินตะกอนแขวนลอย เป็นตัวกลางของวัฏจักรแคลเซียม และคาร์บอน รวมถึงการเป็นตัวชี้วัดถึงคุณภาพน้ำ และสิ่งแวดล้อม (http://chm-thai.onep. go.th/chm/Meeting/2012/june28/doc/0628B003.pdf) แต่การรายงานการใช้ประโยชน์จากสัตว์กลุ่มดังกล่าวเชิงวิทยาศาสตร์ในประเทศไทยมีน้อยมาก เมื่อเปรียบเทียบกับต่างประเทศ ทั้งๆ ที่สัตว์กลุ่มนี้พบแพร่กระจายทั่วไปในภาคใต้ทั้ง 2 ฝั่ง และชายฝั่งตะวันออกของอ่าวไทย จากรายงานล่าสุดสัตว์ทะเลกลุ่มดังกล่าวในประเทศไทยมีถึง 400 ชนิด (http://chm-thai.onep.go.th/chm/biobrief /doc/Y4/BioBrief Y4_21.pdf) ได้แก่ Asteroidea 71 ชนิด, Echinoidea (67 ชนิด), Holothuroidea 96 ชนิด, Ophiuroiea (122 ชนิด) และ Crinoidea (46 ชนิด) แต่การใช้ประโยชน์มีเพียงกลุ่มปลิงทะเลเป็นส่วนใหญ่ (Ridzwan, 2007) ดังนั้นการใช้ประโยชน์ในด้านอื่น ๆ โดยเฉพาะเพื่อเป็นแหล่งสารอาหารเสริมบำรุงสุขภาพ ต้านอนุมูลอิสระ หรือยาต้านจุลชีพ อาจเป็นอีกแนวทางที่จะใช้ทรัพยากรทางทะเลได้อย่างมีคุณค่าสูงสุด

วิธีการศึกษาการออกฤทธิ์ทางชีวภาพในการต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant activity) มีหลายวิธี ได้แก่ DPPH assay, ABTS assay, FRAP assay และ ORAC assay แต่ที่ให้ผลชัดเจนและเป็นที่นิยมมากในปัจจุบันเป็นวิธี DPPH assay หรือ DPPH radical scavenging assay (Keawpradub *et al*., 2004; Banerjee *et al*., 2008; Althuibat *et al*., 2009; Veeru *et al*., 2009; Arulmozhi *et al*., 2010; Haripyaree *et al*., 2010; Shankarlal, *et al*., 2011; Reddy *et al*., 2011)

อุปกรณ์และวิธีการ

1. การเก็บตัวอย่างสัตว์ทะเลกลุ่มเอคไคโนเดิร์ม

ทำการรวบรวมตัวอย่างสัตว์ทะเลกลุ่มเอคไคโนเดิร์มจำนวน 3 ชนิด ที่พบแพร่กระจายอยู่ในบริเวณชายหาดราชมงคล และอ่าวมะขาม อำเภอสิเกา จังหวัดตรัง ได้แก่ ดาวทราย หรือ sand sea star

(*Astropecten* sp.), เหรียญทะเล หรือ sand dollar (*Echinarachnius* sp.) ปลิงทะเลดำ (*Holothuria* sp.) (Figures 1– 3) ให้ได้จำนวนตัวอย่างที่มากพอในการนำไปเตรียมสารสกัดหยาบ เก็บรักษาในสภาพสดโดยการแช่เย็น (chilling)

Figure 1 sand sea star

Figure 2 sand dollar

Figure 3 sea cucumber

ทำความสะอาดดาวทราย และเหรียญทะเล โดยใช้แปรง และล้างด้วยน้ำจืด ทำการชั่ง-วัดขนาด ก่อนเข้าสู่กระบวนการสกัด ส่วนปลิงทะเลจะทำการล้างเมือกที่ผิวตัวและชั่งน้ำหนักจากนั้นผ่าเอาอวัยวะภายในออกทั้งหมดแล้วล้างให้สะอาดและชั่งน้ำหนักอีกครั้ง

2. การสกัดแยก

ตัวอย่างสัตว์ทั้ง 3 ชนิด จะถูกสกัดโดย 95% เอธานอล อัตราส่วน ตัวอย่างสัตว์ต่อตัวทำละลาย เป็น 1 กิโลกรัม : 2 ลิตร เป็นเวลา 72 ชั่วโมง จะได้สารสกัดเป็นของเหลว 3 ชุด แยกสารสกัดเหลวแต่ละชุดเป็น 2 ส่วน ส่วนที่ 1 นำไปผ่านกระบวนการระเหยด้วยเครื่องระเหยแบบสุญญากาศ (vacuum rotatory evaporator) โดยตรง ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส จนได้สารสกัดหยาบแบบแห้ง อีกส่วนหนึ่งนำไปแยกชั้น (partition) ด้วยทำละลายเฮกเซน นำสารละลายไประเหยที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส จนเป็นสารสกัดสภาพแห้งเช่นกัน จะได้สารสกัดหยาบ 6 ชุด คือ สารสกัดหยาบดาวทราย, เหรียญทะเล และปลิงทะเลในชั้นเอธานอล และชั้นเฮกเซนตามลำดับ เก็บสารสกัดที่ได้ทั้งหมดในโถดูดความชื้น (desiccator)

3. การทดสอบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัด

3.1 การทดสอบด้วยวิธี DPPH Radical Scavenging Assay

การออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบ ทำโดยการทดสอบความสามารถขจัดอนุมูล DPPH ของสารสกัดตามวิธีของ Cotelle และ คณะ (1996) และดัดแปลงตามวิธีของ Fenglin (2004) ดังนี้

1. การเตรียมสารละลาย DPPH

ในการศึกษาครั้งนี้ใช้ 1,1–diphenyl-2 picryl–hydrazyl (DPPH) เป็นสารแทนอนุมูลอิสระ โดยชั่ง DPPH 0.0158 กรัม ละลายใน 95 % เอธานอล ปริมาตร 50 มิลลิลิตร จะได้สารลาย 0.8 มิลลิโมลาร์

2. การเตรียมตัวอย่างสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน BHA และสารสกัดหยาบ

2.1 เตรียมสารละลาย Butylated hydroxyanisole (BHA) ซึ่งเป็นสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน โดยชั่ง BHA 0.05 กรัม ละลายใน 95% เอธานอล ปริมาตร 5 มิลลิลิตร

2.2 ชั่งสารสกัดหยาบที่ได้จากขั้นตอนที่ 2 ปริมาณ 0.05 กรัม ละลายใน 95% เอธานอล ปริมาตร 5 มิลลิลิตร เตรียมความเข้มข้นของสารสกัดหยาบจำนวน 10 ความเข้มข้น เติม DPPH ปริมาตร 0.6 มิลลิลิตร ทั้งนี้จะปรับปริมาตรรวมให้ได้ 6 มิลลิลิตร ด้วย 70% เอธานอล จะได้ความเข้มข้น 0, 0.33, 0.67, 1.0, 0.33, 0.67, 2.0, 2.33, 2.67 และ 3.0 มิลลิกรัมต่อมิลิลิตร ตามลำดับ

3. ผสมสารละลายทั้ง 3 ชนิด ให้เข้ากันบ่มที่อุณหภูมิห้องในที่มืดนาน 30 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร

4. ทำการทดสอบการออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดรวม 6 ชุด ได้แก่ สารสกัดหยาบดาวทราย เหรียญทะเล และปลิงทะเล ที่ผ่านการสกัดด้วยตัวทำละลาย 2 ชนิดๆ ละ 2 ซ้ำ รวมถึงสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน BHA นำค่าที่วัดได้มาคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การขจัดอนุมูล DPPH จากสมการ

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

เมื่อ A_{sample} คือค่าการดูดกลืนแสงของชุดทดสอบ, $A_{control}$ คือค่าการดูดกลืนแสงของชุดควบคุม

5.เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การขจัดอนุมูล DPPH ด้วยวิธี DMRT (Steel & Torrie, 1981)

ผลการศึกษาและวิจารณ์

จากการทดสอบความสามารถในการออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ โดยใช้วิธีการจัดจับอนุมูล DPPH ของสารสกัดหยาบจากสัตว์ทะเลกลุ่มเอคไคโนเดิร์มทั้ง 3 ชนิด ผลปรากฏว่าสารสกัดหยาบจากปลิงทะเลในชั้นของเฮกเซนให้ผลต่อปฏิกิริยากับ DPPH สูงกว่าสารสกัดหยาบในชั้นของ 95% เอธานอล ($p<0.05$) อาทิ ในความเข้มข้นที่ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรเท่ากัน สารสกัดในชั้นเฮกเซนสามารถขจัดอนุมูล DPPH ได้ถึง 63% ขณะที่สารสกัดในชั้นเอธานอลมีความสามารถเพียง 19% เท่านั้น แต่สารสกัดหยาบจากเหรียญทะเลในชั้นของ 95% เอธานอล กลับให้ค่าการทำปฏิกิริยาต่อ DPPH สูงกว่าในชั้นของเฮกเซน ($p<0.05$) เช่น สารสกัดที่ระดับความเข้มข้น 1.33 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรเท่ากัน สารสกัดในชั้นเอธานอลให้ค่าการขจัดถึง 60% แต่ในชั้นเฮกเซนให้ค่าเพียง 40% เท่านั้น และเมื่อเทียบความสามารถในการออกฤทธิ์กับ BHA ซึ่งจัดเป็นสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน พบว่าสารสกัดที่ได้จากทั้ง 2 ชุดที่กล่าวมา ให้ผลดีกว่า BHA (Table 1)

อย่างไรก็ดีสารสกัดหยาบจากดาวทรายทั้งในชั้น 95% เอธานอล และเฮกเซน ให้ค่าการขจัดอนุมูล DPPH ไม่แตกต่างกัน ($p>0.05$) เช่นในระดับความเข้มข้นที่ 1.33 และ 1.67 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร แต่เมื่อเปรียบเทียบกับ BHA สารสกัดจากดาวทรายยังคงให้ผลที่ดีกว่า BHA ($p>0.05$) (Table 1)

เมื่อเปรียบเทียบจากกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารสกัดหยาบจากสัตว์ทั้ง 3 ชนิด ภายใต้ตัวทำละลาย 2 ชนิด โดยเปรียบเทียบกับ BHA (Fig. 4) จะเห็นว่า สารสกัดของปลิงทะเลในชั้นเฮกเซน (SCH) และสารสกัดของเหรียญทะเลในชั้นเอธานอล (SDA) จะมีการออกฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระสูงมาก

โดยจะเพิ่มขึ้นในอัตราที่สูงกว่าสารสกัดชุดอื่นๆ แต่ที่ต่างกันคือ เมื่อเพิ่มความเข้มข้นมากขึ้นเรื่อยๆ เปอร์เซ็นต์การดักจับ DPPH ของ SCH จะเริ่มคงที่ แต่สำหรับ SDA ยังคงสูงขึ้นเป็นลำดับ แสดงว่าสารทุติยภูมิบางชนิดที่ถูกสร้างขึ้นในสัตว์กลุ่มนี้อาจจะมีประสิทธิภาพจำกัด หากใช้ปริมาณมากเกินไปกลับไม่ให้ผลแต่อย่างใด

ในทางกลับกัน ผลจากการทดสอบการต้านอนุมูลอิสระในครั้งนี้ สารสกัดหยาบหลายชุดให้ผลดีกว่า BHA ทั้งๆ ที่อยู่ในรูปของสารสกัดหยาบ ซึ่งทำให้เชื่อมั่นว่าสารทุติยภูมิที่สร้างขึ้น และละลายอยู่ในสารสกัดหยาบนั้น ต้องมีประสิทธิภาพสูงมากในการดักจับอนุมูลอิสระ หากทำการแยกสารสกัดเหล่านี้ให้อยู่ในรูปสารกึ่งบริสุทธิ์ จะสามารถให้ประสิทธิภาพในการออกฤทธิ์ได้ดีกว่า ในขณะที่ใช้ในปริมาณที่น้อยกว่า ดังนั้นกระบวนการสกัด ตัวทำลาย สภาวะทางกายภาพที่เหมาะสม กระบวนการทดสอบ กระบวนการประยุกต์ใช้ จึงเป็นเรื่องที่ต้องคำนึงถึงอย่างยิ่ง ทั้งนี้ต้องสอดคล้องกับสารทุติยภูมิที่สร้างขึ้นในตัวสัตว์ด้วย เนื่องจากสารทุติยภูมิที่สร้างขึ้น อาจจะมีทั้งแบบละลายในน้ำ (hydrophilic) หรือแบบละลายในตัวทำละลายอินทรีย์ เนื่องจากเป็นกลุ่มที่มีขั้วต่ำหรือไม่มีขั้ว (non-polar chemicals) (Althunibat *et al*., 2009; Shankarlal *et al*., 2011)

Table 1 Scavenging activities of various extracts from three echinoderm species to DPPH (%) compared with BHA

Extract concentrations (mg/ml)	*Holothuria* sp.		*Echinarachnius* sp.		*Astropecten* sp.		BHA
	Ethanol (SCA)	Hexane (SCH)	Ethanol (SDA)	Hexane (SDH)	Ethanol (SSA)	Hexane (SSH)	
0	0	0	0	0	0	0	0
0.33	9.386^{d}	26.777^{a}	20.111^{b}	15.344^{c}	12.042c^{d}	10.160^{d}	3.864^{e}
0.67	14.774^{e}	45.215^{a}	34.221^{b}	23.282^{d}	25.797^{c}	21.182^{d}	4.945^{f}
1.0	19.062^{d}	63.038^{a}	48.762^{b}	33.526^{c}	34.770^{c}	33.621^{c}	14.505^{d}
1.33	20.510^{d}	73.804^{a}	60.149^{b}	40.107^{c}	36.423^{c}	39.409^{c}	21.110^{d}
1.67	22.711^{f}	82.357^{a}	73.144^{b}	50.948^{c}	42.031^{d}	45.936^{d}	33.108^{e}
2.0	30.127^{d}	83.794^{a}	81.127^{a}	55.154^{b}	46.813^{c}	49.816^{c}	42.209^{c}
2.33	31.170^{f}	83.493^{b}	88.243^{a}	60.427^{c}	49.823^{e}	56.158^{d}	54.626^{d}
2.67	33.836^{f}	83.493^{c}	90.285^{a}	69.076^{c}	51.180^{e}	58.313^{d}	67.593^{c}
3.0	35.399^{f}	83.493^{b}	92.141^{a}	71.149^{c}	54.427^{e}	65.271^{d}	79.571^{b}

Remark: Different superscript alphabets in each row mean significantly different; α = 0.05

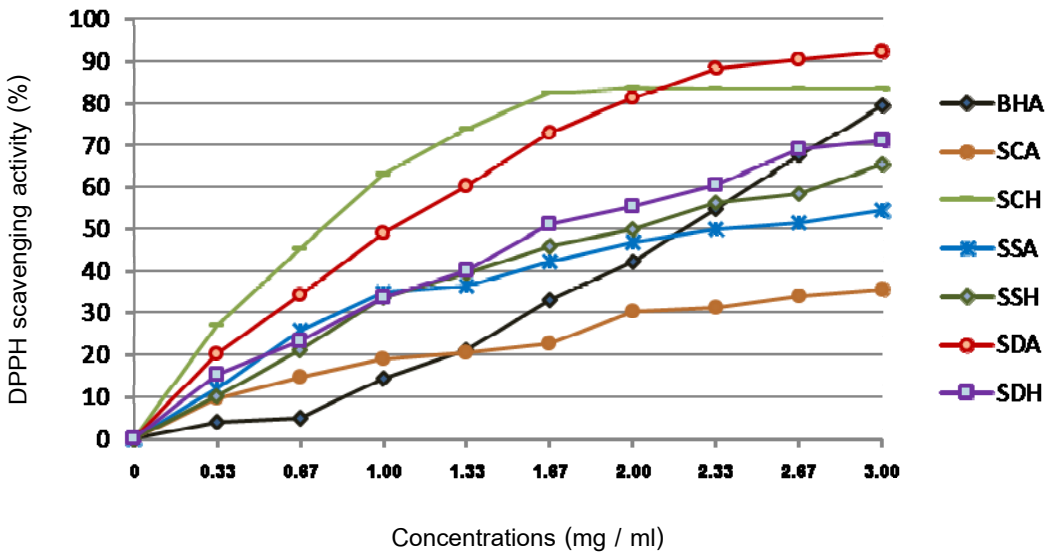

Fig. 4 DPPH scavenging activities of various echinoderm's extracts compared with BHA

จากผลการศึกษา (Table1&Fig.4) แสดงให้เห็นว่าสารทุติยภูมิที่สร้างขึ้นโดยสัตว์กลุ่มนี้มีความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) เช่นเดียวกับในสัตว์และพืชหลายชนิดที่มีรายงานมาก่อนแล้ว โดยเฉพาะในปลิงทะเล และเม่นทะเล ซึ่งพบว่าสารทุติยภูมิที่สร้างขึ้นมีองค์ประกอบที่เป็น phenolic compounds และ flavonoids ในปริมาณสูง (Mamelona *et al*., 2007) ซึ่งเป็นกลุ่มที่ยอมรับว่าสามารถดักจับอนุมูลอิสระในร่างกายของสิ่งมีชีวิตได้ดี ซึ่งสอดคล้องกับความเชื่อ และความนิยมในการบริโภคสัตว์กลุ่มนี้ โดยเฉพาะปลิงทะเล ที่มีมาเป็นเวลานานว่าเป็นหนึ่งในอาหารบำรุงสุขภาพ และเป็นยาอายุวัฒนะ และที่น่าสนใจคือกลุ่มเหรียญทะเล ซึ่งให้ประสิทธิภาพในการขจัดอนุมูลอิสระที่สูงมาก แต่ยังไม่มีรายงานถึงการใช้ประโยชน์จากกลุ่มนี้มาก่อน การศึกษาครั้งนี้จึงถือเป็นข้อมูลเบื้องต้นที่น่าติดตาม เนื่องจากเป็นสิ่งมีชีวิตที่ลักษณะการแพร่กระจายที่ชัดเจน และมีปริมาณมาก มีความเป็นไปได้ ที่จะเป็นทางเลือกใหม่ในการเป็นแหล่งผลิตสารต้านอนุมูลอิสระ เช่นเดียวกันกับกลุ่มดาวทะเล (Asteroidea) ซึ่งประกอบด้วยชนิดที่มีความหลากหลาย โดยเฉพาะในน่านน้ำไทย ยังไม่เคยมีรายงานมาก่อนเช่นกัน ดังนั้นการศึกษาในครั้งนี้ซึ่งเป็นครั้งแรกในภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ จะสามารถใช้เป็นแนวทางในการใช้ประโยชน์จากผลิตภัณฑ์ธรรมชาติเพื่อการจัดการด้านสุขภาพของผู้บริโภคในอนาคต

สรุป

สารสกัดหยาบจากปลิงทะเลในชั้นเฮกเซน และสารสกัดหยาบจากเหรียญทะเลในชั้นของเอธานอล จะให้ผลดีที่สุดในการต้านอนุมูลอิสระ จากการทดสอบค่าการดักจับ DPPH ส่วนสารสกัดหยาบจากดาวทะเลในชั้นของตัวทำลายเอธานอลและเฮกเซน ให้ผลใกล้เคียงกัน และเมื่อเทียบประสิทธิภาพกับสารต้านอนุมูลอิสระ

มาตรฐาน BHA พบว่า สารสกัดหยาบจากเอคไคโนเดิร์มเกือบทุกประเภทมีประสิทธิภาพสูงกว่า และมีความเป็นไปได้สูงที่จะใช้สัตว์กลุ่มนี้เป็นแหล่งผลิตสารต้านอนุมูลอิสระในอนาคต

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยเรื่องนี้เป็นส่วนหนึ่งของโครงการวิจัยเรื่อง "การใช้ประโยชน์ของสารทุติยภูมิจากสัตว์กลุ่มเอคไคโนเดิร์มในการจัดการสุขภาพสัตว์น้ำ" ซึ่งได้รับเงินอุดหนุนการวิจัยงบประมาณ ปี 2554 - 2555 จากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย" ขอขอบคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.พชร เพ็ชรประดับ จากคณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการประมง มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย วิทยาเขตตรัง ที่เอื้อเฟื้อในการดำเนินการเก็บตัวอย่างสัตว์ทดลอง ขอบคุณสาขาวิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย วิทยาเขตนครศรีธรรมราช ที่เอื้อเฟื้ออุปกรณ์ที่จำเป็นในการศึกษา

เอกสารอ้างอิง

Althuibat, O., Hashim, R., Taher, M., Daud, J. M., Ikeda, M. and Zali, B.I. 2009. In vitro antioxidant and antiproliferative activities of three Malasian sea cucumber species. European Journal of Scientific Research 37(3): 376-387.

Asha, K.K., Mathew, S. and Lakshmanan, P.T. 2012. Flavonoids and phenollic compounds in two mangrove species and their antioxidant property. Indian Journal of Geo-Marine Sciences 42(3): 259-264.

Ames, B. N., Shigenaga, M. K. and Hagen, T. M. 1993. Oxidants antioxidants, and the degenerative disease of aging. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United State of America 90: 7915-7922.

Banerjee, D., Chakrabarti, S., Hazra, A.K., Banerjee, S., Ray, J. and Mukherjee, B. 2008. Antioxidant activity and total phenolics of some mangroves in Sundarbans. African Journal of Biotechnology 7(6): 805-810.

Bunyapraphatsara, N. Jutiviboonsuk, A., Sornlek, P., Therathanathorn, W., Aksornkaew, S., Fong, H.H.S., Pezzuto, J. M. and Kosmeder, J. 2002. Pharmacological studies of plants in the mangrove forest. Thai Journal of Phytopharmacy 10(2): 1-12.

Cotelle, J. A., Bernier, J. L., Catteau, J. B., Pommery, J., Wallet, J. C. and Gaydou, E. M. 1996. Free radical. Biological Medicine 20: 35.

De Ghosh, M and Ramakrishna, T.M. 2011. Antioxidant survey in certain food plants. International Journal of Pharmacy and Biological Sciences 1(2): 1-7.

Fenglin, H., Ruili, L., Bao, H., and Liang, M. 2004. Free radical scavenging activity of extracts prepared from fresh leaves of selected Chinese medicinal plants. Fitoterapia. 75: 14-23.

Gatewongsa, P. and Phaechamud, T. 2012. Development of liquid soap containing methanolic extract of cork tree stamen. Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences 3(1): 384-389.

Haripyaree, A., Guneshwor, K and Damayanti, M. 2010. Evaluation of antioxidant properties of phenolics extracted from *Ananas comosus* L. Notulae Scientia Biologicae 2(2): 68-71.

Jacinto, S. D., Ramos, E. F., Siguan, A. P. T. and Canoy, R. J. C. 2011. Determining the antioxidant property of plant extracts: a laboratory exercise. Asian Journal of Biology Education 5(2011): 22-25.

Keawpradub, N., Dej-adisai and Yuenyongsawad. 2004. Antioxidant and cytotoxic activities of Thai medicinal plants named Khaminkhruea: *Arcangelisia flava*, *Coscinium blumeanum* and *Fibraurea tinctoria*. Songklanakarin Journal of Sciences and Technology 27(suppl.2), 2005: 455-467.

Khalaf, N. A., Shakya, A. K., Al-Othman, A., El-Agbar, Z. and Farah, H. 2008. Turkish Journal of Bilogy 32(2008): 51-55.

Mamelona, J., Pellitier, E. M., Lalancette, K.G., Legault, J., Karboune, S. and Kermasha, S. 2007. Quantification of phenolic contents and antioxidant capacity of Atlantic sea cucumber, *Cucumaria frondosa*. Food Chemistry 104: 1040-1047.

Mamelona, J and Pelltier, E. 2010. Producing high antioxidant activity extracts from echinoderm by products by using pressured liquid extraction. Biochemology 9(4): 523-528.

Ridzwan, B.H. 2007. Sea cucumber: The Malayan heritage, Research Center. IIUM, Kuala Lumpur.

Reddy, R. S., Audipudi, A. V., Reddy, G, D, and Bhaskar, C.V.S. 2011. Antioxidant, anti-inflammatory and antifungal activity of marine sponge *Subergargoria suberosa* – derived natural products. International Journal of PhamTech Resarch 3(1): 342-548.

Shankarlal, S., Prabu, K and Natarajan, E. 2011. Antimicrobial and antioxidant activity of purple sea urchin shell (*Salmacis virgulata* L Agassiz and Desor, 1846). American-Eurasian Journal of Scientific Research 6(3): 178 – 181.

Steel, R. G. D. and Torrie. J.H. 1981. Principles and Procedure of Statistics. McGraw-Hill Book.

Thaipong, K., Boonprakob, U, Crosby, K, Cisneros-Zevallos, L. and Byrne, D, H. 2006. Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. Journal of Composition and Analysis 19(2006): 669 – 675.

Veeru, P., Kishor, M., P. and Meenakshi. M. 2009. Screening of medicinal plant extracts for antioxidant activity. Journal of medicinal plants Research 3(8): 608-612.

Wang, F., Yang, H., Wang, X., Xing, K. and Gao, F. 2010. Antioxidant enzyme in sea cucumber *Apostichopus japonicus* (Selenka) during aeseivation. Journal of Medicinal Plants Research. 5(17); 4112-4118,

Xia, D.Z., Yu, X. F., Zhu, Z. Y. and Zou, Z. D. 2011. Antibiotic and antibacterial activity of six wild plants (*Sonchus* spp.) in China. Natural Product Research 25(20): 1893-1901.