ปริมาณฟีนอลิกและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดด้วยตัวทำละลายจากสาหร่ายทะเล

Phenolic Content and Antioxidative Activity of Solvent Extracts from Seaweeds

จันทนา ไพรบูรณ์ และ อนงค์ จีรภัทร์

Jantana Praiboon and Anong Chirapart

บทคัดย่อ

การวิเคราะห์ปริมาณโพลีฟีนอลและทดสอบฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ เช่น ฤทธิ์ในการยับยั้งอนุมูล DPPH, superoxide anion, hydroxyl, lipid peroxidation และการแย่งจับกับไอออนของโลหะของสารสกัดด้วยตัวทำละลายจากสาหร่ายทะเล 11 ชนิด พบว่า สารสกัดเอทิลอะซิเตทจาก *Laurencia mariannensis* มีปริมาณฟีนอลิกมากที่สุดเท่ากับ 79.00±2.96 mg GAE (gallic acid equivalent)/g สารสกัด และเมื่อเปรียบเทียบสารสกัดทั้งหมดพบว่าสารสกัดเอทิลอะซิเตทของ *Padina australis* (PAS) สามารถยับยั้งอนุมูล DPPH ได้สูงสุด (92.82±0.44%) สารสกัดเมทานอลของ *Padina australis* (PAP) สามารถยับยั้งอนุมูล superoxide anion ได้สูงสุด (58.75±0.94%) และสารที่สกัดด้วยสารผสมระหว่างคลอโรฟอร์มและเมทานอลจาก *Sargassum polycystum* สามารถยับยั้งอนุมูล hydroxyl ได้สูงสุด (79.26±2.52%) ขณะที่สารสกัดเอทิลอะซิเตทจาก *Caulerpa lentillifera* สามารถยับยั้งเปอร์ออกซิเดชั่นของลิปิด ได้สูงสุด (90.31±0.23%) และสารสกัดเอทิลอะซิเตทจาก *L. mariannensis* สามารถจับกับไอออนของโลหะได้สูงสุด (96.19±0.06%) จากผลจากทดลองแสดงให้เห็นว่าสาหร่ายเหล่านี้มีศักยภาพในการใช้เป็นแหล่งของสารต้านอนุมูลอิสระตามธรรมชาติ

Abstract

Phenolic content and antioxidant activity such as DPPH radical scavenging, superoxide radical scavenging, hydroxyl radical scavenging, lipid peroxidation inhibitory and ferrous ion chelating activity of seaweed extract from 11 species were investigated. The total phenolic content was highest in ethyl acetate (EA) extract of *Laurencia mariannensis* (79.00±2.96 mg GAE (gallic acid equivalent)/ g extract). Among them, EA extract of *Padiana australis* (PAS) showed the highest DPPH scavenging activity (92.82±0.44%), methanolic extract of *Padina australis* (PAP) showed the highest superoxide anion scavenging activity (58.75±0.94%), Chloroform-Methanol extract of *Sargassum polycystym* showed the highest hydroxyl radical scavenging activity of 79.26±2.52%, EA extract of *Caulerpa lentillifera* showed the highest lipid peroxidation inhibitory activity (90.31±0.23%) EA extract of *L. mariannensis* showed the highest ion chelating activity (96.19±0.06%). This result indicated these seaweeds could be used as a source of natural antioxidants.

Key Words: phenolic, antioxidant activity, solvent extract and solvent extract

e-mail address: ffisjtn@ku.ac.th

ศูนย์วิจัยทรัพยากรชีวภาพสาหร่าย ภาควิชาชีววิทยาประมง คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ 10900

Algal Bioresources Research Center, Department of Fishery Biology, Fisheries Faculty, Kasetsart University, Bangkok, 10900

คำนำ

ปัจจุบันมนุษย์เรารู้จักนำมาสาหร่ายทะเลมาใช้ประโยชน์ในหลายๆ ด้านด้วยกัน เช่น การเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ การกำจัดน้ำเสีย เป็นอาหารคน อาหารสัตว์ และใช้เป็นแหล่งพลังงาน เป็นต้น ซึ่งประโยชน์ต่างๆ ดังที่กล่าวมานี้ เป็นที่ทราบกันดีอยู่แล้ว แต่สาหร่ายทะเลยังมีประโยชน์อีกด้านหนึ่ง ซึ่งกำลังเป็นที่สนใจของนักวิจัย และนักลงทุนอย่างมาก นั่นคือการใช้สาหร่ายทะเลเป็นแหล่งวัตถุดิบในการสกัดสารสำคัญที่เป็นประโยชน์ในด้านต่างๆ ไม่ว่าจะเป็นในอุตสาหกรรมอาหารและเครื่องดื่ม เครื่องสำอางค์ หรือแม้แต่ในด้านเภสัชกรรมหรือการแพทย์ก็เริ่มหันมาสนใจศึกษาสารสำคัญที่ได้จากสาหร่ายทะเลเช่นกัน และเริ่มมีการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากสาหร่ายทะเลกันอย่างกว้างขวาง เช่น สารต้านไวรัส (antivirus) (Damonte *et al*., 1994; Witvrouw *et al*., 1994 and Kolender *et al*., 1995) สารต้านการแข็งตัวของเลือด (anticoagulant) (Pereira *et al.,* 2002; Kakita and Kitamura, 2003 and Melo *et al*., 2004) สารต้านมะเร็ง (anticancer) (Hamann *et al*., 1996 Horgen *et al*., 2000; Nuijen *et al*., 2000 and Sparidans *et al*., 2001) สารต้านการแก่ (antiaging) และโดยเฉพาะอย่างยิ่งคุณสมบัติในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) เนื่องจากอนุมูลอิสระอาจจะถือได้ว่าเป็นต้นตอของปัญหาที่เลวร้ายทั้งหลายภายในร่างกายคนเรา และก่อให้เกิดโรคต่างๆ ไม่ว่าจะเป็นโรคหัวใจ โรคมะเร็ง ความแก่ ความเสื่อมของอวัยวะต่างๆ ซึ่งจะสังเกตุเห็นได้ว่ายาบำรุง อาหารเสริม และเครื่องสำอางต่างๆ มักจะกล่าวว่ามีส่วนผสมของสารต้านอนุมูลอิสระซึ่งเป็นสารสกัดจากสาหร่ายทะเล

นอกจากนี้ยังพบว่า มีงานวิจัยในต่างประเทศจำนวนมากที่ศึกษาถึงการสกัดสารต้านอนุมูลอิสระจากสาหร่ายทะเลโดยใช้ตัวทำละลายชนิดต่างๆ เช่น เมทานอล เอทานอล เอทิลอะซิเตท เฮกเซน และคลอโรฟอร์ม เป็นต้น (Chandini *et al*., 2008; Genesan *et al*., 2008; Matanjun *et al*., 2008; López *et al.,* 2011) โดยตัวทำละลายแต่ละชนิดจะให้กลุ่มสารที่แตกต่างกันออกไปตามความมีขั้ว และมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่แตกต่างกัน

ดังนั้นงานวิจัยในครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาถึงตัวทำละลายที่เหมาะสม สำหรับการสกัดสารต้านอนุมูลอิสระจากสาหร่ายทะเลบางชนิดในประเทศไทย เพื่อเป็นองค์ความรู้สำหรับการนำสารสกัดเหล่านี้ไปประยุกต์ใช้ประโยชน์ในด้านอื่นๆ ที่เหมาะสม และเป็นการเพิ่มมูลค่าให้แก่ทรัพยาการสาหร่ายทะเลในประเทศไทย

อุปกรณ์และวิธีการ

การเตรียมตัวอย่าง

ตัวอย่างสาหร่ายที่นำมาศึกษา ประกอบด้วยสาหร่ายสีเขียว 3 ชนิด (*Caulerpa lentillifera*, *Caulerpa racemosa* var. *corynephora* และ *Chlorodesmis hildebrandtii*) สาหร่ายสีน้ำตาล 5 ชนิด (*Colpomenia sinuosa*, *Padina australis* (PAP), *Padina australis* (PAS), *Sargassum polycystum* และ *Turbinaria conoides*) และสาหร่ายสีแดง 3 ชนิด (*Gracilaria tenuistipitata, Laurencia mariannensis* และ *Solieria robusta*) ที่เก็บรวบรวมจากชายฝั่งทะเลของประเทศไทย จากนั้นนำตัวอย่างสาหร่ายทะเลที่เก็บรวบรวมได้นำมาทำความสะอาดและนำไปเก็บรักษาไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาใช้ในการสกัดและการวิเคราะห์ทางเคมีต่อไป

การสกัดด้วยตัวทำละลาย (Solvent extraction)

สกัดตัวอย่างสาหร่ายทะเลด้วยตัวทำละลายต่างๆ ได้แก่ เฮกเซน (n-hexane) เอทิลอะซิเตท (ethyl acetate) คลอโรฟอร์มต่อเมทานอล (chloroform:methanol) ในอัตราส่วน 2:1 และ เมทานอล (methanol) โดย

นำตัวอย่างสาหร่ายสด 5 กรัม มาสกัดด้วยตัวทำละลายต่างๆ ในอัตราส่วนสาหร่าย:ตัวทำละลาย 1:20 (w/v) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำกากมาสกัดซ้ำอย่างน้อย 2 ครั้ง นำสารละลายที่ได้ในแต่ละครั้งมารวมกันและนำไปทำให้เข้มข้นขึ้นด้วยเครื่อง rotary evaporator ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส จนแห้ง ชั่งน้ำหนัก และละลายตัวอย่างในเมทานอล เก็บในขวดสีชา เป่าด้วยก๊าซไนโตรเจน และเก็บไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำตัวอย่างสารสกัดที่ได้ไปทดสอบปริมาณโพลีฟีนอลและฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ

การวิเคราะห์ปริมาณโพลีฟีนอลทั้งหมด (total polyphenol analysis)

ตรวจวิเคราะห์ปริมาณโพลีฟีนอลของสารสกัดโดยวิธีการของ Yuan *et al*. (2005) โดยใช้ gallic acid เป็นสารมาตรฐาน ปริมาณของโพลีฟีนอลจะแสดงผลเป็น gallic acid equivalent (GAE)/ กรัมสารสกัด

การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัด

1) วิธี DPPH radical scavenging activity

วิเคราะห์การยับยั้งอนุมูล DPPH ตามวิธีการของ Yuan *et al*. (2005) และทดสอบโดยการเติมสารสกัดที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ลงในสารละลาย DPPH ความเข้มข้น 4×10^{4} M ในเมทานอล ปริมาตร 2.9 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน และทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร โดยชุดควบคุมจะเติมเมทานอลแทนสารสกัด และ blank จะเติมเมทานอลแทนสารละลาย DPPH จากนั้นนำค่าที่ได้ไปคำนวณหา % inhibition ตามสมการที่ 1

2) วิธี Superoxide radical scavenging activity

วิเคราะห์การยับยั้ง superoxide anion radical ตามวิธีการของ Qi *et al*. (2005) โดยเตรียมตัวอย่างสารสกัดที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลองที่มีสารละลายบัฟเฟอร์ Tris-HCl (pH 8) ความเข้มข้น 16 มิลลิโมลลาร์, สารละลาย Nitroblue tetrazolium (NBT) ความเข้มข้น 72 ไมโครโมลลาร์, สารละลาย β-Nicotinamide adenine dinucleotide (NADH) ความเข้มข้น 338 ไมโครโมลลาร์ และสารละลาย Phenazine metrosulphate (PMS) ความเข้มข้น 30 ไมโครโมลลาร์ นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นที่ 560 นาโนเมตร โดยชุดควบคุมจะเติมน้ำแทนสารสกัด และ blank จะเติม Tris-HCl แทนสารละลาย NADH จากนั้นนำค่าที่ได้ไปคำนวณหา % inhibition ตามสมการที่ 1

3) วิธี Hydroxyl radical scavenging activity

การวิเคราะห์การยับยั้งอนุมูล hydroxyl โดยเตรียมสารผสมของเฟอร์รัสซัลเฟต ($FeSO_4.7H_2O$) สารละลาย EDTA และสารละลาย 2-deoxyribose ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ อย่างละ 0.2 มิลลิลิตร นำมาผสมกับสารสกัดจากสาหร่าย (ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) 0.2 มิลลิลิตร และเติมสารละลาย phosphate buffer (pH 7.4) ความเข้มข้น 0.1 โมลลาร์ ลงในสารละลายตัวอย่าง จากนั้นเติมสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ ลงไป 0.2 มิลลิลิตร และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง หลังจากการบ่มเติมสารละลาย Trichloroacetic acid (TCA) ความเข้มข้น 2.8% และสารละลาย Thiobarbituric acid (TBA) ความเข้มข้น 1.0% อย่างละ 1 มิลลิลิตร ลงในสารละลายตัวอย่าง จากนั้นนำไปต้มจนเดือดเป็นเวลา 10 นาที และนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 532 นาโนเมตร โดยชุดควบคุมจะเติมน้ำแทนสารสกัด และ blank จะเติม phosphate buffer แทนสารละลาย 2-deoxyribose และนำไปคำนวณเป็น % inhibition ได้ตามสมการที่ 1

4) วิธี Lipid peroxidation inhibitory activity

วิเคราะห์ความสามารถในการยับยั้ง Lipid peroxidation ตามวิธีการของ Wang *et al.* (2004) โดยการเติมสารสกัดจากสาหร่าย (ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองที่มีสารละลายไข่แดงความเข้มข้น 1/25 อยู่0.2 มิลลิลิตร เติมสารละลายเฟอร์รัสซัลเฟต ($FeSO_4.7H_2O$) ความเข้มข้น 25 มิลลิโมลาร์ 0.2 มิลลิลิตร และ phosphate buffer saline (PBS, pH 7.45) 1.5 มิลลิลิตร ในชุดควบคุมใช้ PBS แทนสารตัวอย่าง จากนั้นวัดปฏิกิริยา lipid peroxidation โดยการเติมสารละลาย Thiobarbituric acid (TBA) ความเข้มข้น 0.5 %(ละลายใน 20% Trichloroacetic acid) ในปริมาณที่เท่ากันลงในหลอดทดลอง และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที และหยุดปฏิกิริยาโดยการนำหลอดทดลองไปแช่ในถังน้ำแข็ง และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 g เป็นเวลา 30 นาที นำส่วนใสที่ได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 532 นาโนเมตร โดยชุดควบคุมจะเติมน้ำแทนสารสกัด และ blank จะเติม PBS แทนสารละลายไข่แดง จากนั้นนำไปคำนวณเป็น % inhibition ได้ตามสมการที่ 1

5) วิธี Metal chelating activity

วิเคราะห์คุณสมบัติในการเป็น iron chelating ของสารสกัดจากสาหร่ายจะใช้วิธีการตาม Lopes *et al.* (1999) โดยเตรียมตัวอย่างสารสกัดที่ความเข้มข้น1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 0.80 มิลลิลิตรในหลอดทดลอง และใช้น้ำกลั่นเป็นชุดควบคุม เติมสารละลาย $FeCl_2$ ความเข้มข้น 2 มิลลิโมลาร์ ลงไป 0.01 มิลลิลิตร และเติมสารละลาย ferrozine ความเข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ ลงไป 0.02 มิลลิลิตร เขย่าอย่างรวดเร็ว และบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นที่ 562 นาโนเมตร โดย blank จะเติมน้ำแทนสารละลาย ferrozine จากนั้นนำค่าที่ได้จากการวัดค่าการดูดกลืนแสงไปคำนวณหา % inhibition ได้ตามสมการที่ 1

$$\% \text{ Inhibition} = [1-(Abs_{sample} - Abs_{blank}) / Abs_{control}] \times 100 \quad [1]$$

การวิเคราะห์ทางสถิติ

การทดลองทั้งหมดทำ 3 ซ้ำ และวิเคราะห์ความแตกต่างของปริมาณโพลีฟีนอล และความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดต่างๆ และเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างวิธีการสกัด โดยใช้วิธี ANOVA มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ณ ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($P<0.05$)

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

ปริมาณของสารสกัดจากสาหร่าย

การสกัดสารจากสาหร่ายทะเลทั้งหมด 11 ชนิด ด้วยตัวทำละลายชนิดต่างๆ โดยภาพรวมพบว่าสารสกัดเมทานอลจะมีปริมาณ yield มากกว่าสารสกัดอื่นๆ (Table 1) รองลงมาได้แก่ สารสกัดที่สกัดด้วยสารผสมระหว่างคลอโรฟอร์มและเมทานอล และสารสกัดเอทิลอะซิเตท ตามลำดับ จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าสารที่พบในสาหร่ายโดยส่วนใหญ่เป็นสารที่มีขั้ว สารสกัดที่มีปริมาณสูงที่สุด ได้แก่ สารสกัดเมทานอลจากสาหร่ายสีน้ำตาล *P. australis* (PAS) มีปริมาณ yield สูงสุด 32.20 ± 2.91 % ของน้ำหนักแห้ง เมื่อเปรียบเทียบกับรายงานที่มีก่อนหน้า พบว่าปริมาณสารที่สกัดได้จาก *P. australis* (PAS) มีค่าสูงกว่าสารสกัดเมทานอลได้จากสาหร่ายสกุล *Padina* sp. (8.55% ของน้ำหนักแห้ง) ที่รายงานไว้โดย Matanjun *et al*. (2008)

นอกจากนี้ยังพบว่า สารสกัดเมทานอลจากสาหร่ายสีน้ำตาล *S. polycystum* และ *T. conoides* ในการศึกษาครั้งนี้มีปริมาณ yield เท่ากับ 8.12 ± 0.66 และ10.11 ± 0.66% ตามลำดับ ซึ่งมากกว่าที่เคยมีรายงานไว้ในสาหร่ายชนิดเดียวกันซึ่งมีปริมาณเท่ากับ 4.05% (Matanjun *et al.,* 2008) และ 5.76 ± 0.66% (Chandini *et al*., 2008) ตามลำดับ ขณะที่สารสกัดเมทานอลของ *C. lentillifera* มีปริมาณ yield (14.15 ± 1.64 %) น้อยกว่าสารสกัดเมทธานอลของสาหร่ายชนิดเดียวกันที่มีเคยรายงานไว้ซึ่งมีปริมาณ yield เท่ากับ 30.86% (Matanjun *et al*., 2008)

Table 1 Yield (%, w/w of dry weight) of seaweed extracts with different solvents

Species*	Yield (%)			
	Hexane	Eethyl acetate	Chloroform:Methanol	Methanol
Caulerpa lentillifera	4.43 ± 0.74^{bc}	3.98 ± 0.65^{bc}	2.51 ± 0.32^{c}	14.15 ± 2.84^{a}
Caulerpa racemosa var. *corynephora*	3.55 ± 1.20^{b}	2.77 ± 1.86^{b}	16.79 ± 0.17^{a}	17.18 ± 2.70^{a}
Chlorodesmis hildebrandtii	4.07 ± 1.46^{c}	3.33 ± 0.26^{c}	6.51 ± 0.57^{b}	8.22 ± 0.98^{a}
Colpomenia sinuosa	2.40 ± 0.62^{b}	2.08 ± 0.92^{b}	1.39 ± 0.02^{b}	8.46 ± 1.47^{a}
Padina australis (PAP)	3.31 ± 0.09^{c}	5.18 ± 1.43^{b,c}	8.24 ± 1.76^{a}	8.86 ± 0.81^{a}
Padina australis (PAS)	1.49 ± 0.42^{b}	3.74 ± 1.44^{b}	30.24 ± 1.51^{a}	32.20 ± 2.91^{a}
Sargassum polycystum	1.07 ± 0.63^{d}	2.38 ± 0.36^{c,d}	4.15 ± 0.82^{b}	8.12 ± 1.14^{a}
Turbinaria conoides	1.20 ± 0.19^{c}	3.66 ± 1.48^{b}	8.37 ± 1.71^{a}	10.11 ± 1.14^{a}
Gracilaria tenuistipitata	4.62 ± 1.02^{b}	11.24 ± 2.48^{a}	8.33 ± 3.07^{a}	3.05 ± 0.50^{b}
Laurencia mariannensis	2.19 ± 0.37^{b}	4.84 ± 0.94^{a}	3.93 ± 0.47^{a,b}	5.04 ± 1.42^{a}
Solieria robusta	8.62 ± 0.44^{b}	6.68 ± 1.76^{b}	17.27 ± 0.58^{a}	18.15 ± 2.12^{a}

Note: Mean values (mean ± SD, n = 3) with different superscripts in the same row (a,b,c,d) are significantly different (P<0.05)

ปริมาณโพลีฟีนอลของสารสกัด

สารประกอบโพลีฟีนอลพบได้โดยทั่วไปในพืช และมีผลการศึกษามากมายที่รายงานถึงฤทธิ์ทางชีวภาพของสารประกอบนี้รวมถึงฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ ซึ่งจากรายงานก่อนหน้านี้แสดงให้เห็นว่าสารสกัดจากสาหร่ายทะเล โดยเฉพาะสารในกลุ่มโพลีฟีนอลมีคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระได้ (Lim *et al*., 2002; Chew *et al*., 2008; Ganesan *et al.,* 2008 และ Chandini *et al.,* 2008) โดยปริมาณโพลีฟีนอลของสารสกัดในการศึกษาครั้งนี้แสดงใน Table 2 จากผลการศึกษาพบว่า สารสกัดเอทิลอะซิเตทมีปริมาณโพลีฟีนอลมากกว่าสารสกัดอื่นๆ รองลงมาได้แก่ สารสกัดเมทานอล ขณะที่สารสกัดด้วยเฮกเซนจะมีปริมาณโพลีฟีนอลน้อยที่สุด ในจำนวนสารสกัดทั้งหมด พบว่าสารสกัดเอทิลอะซิเตทจากสาหร่ายสีแดง *L. mariannensis* มีปริมาณโพลีฟีนอลมากที่สุด 79.00 ± 2.96 มิลลิกรัม GAE/กรัมสารสกัด นอกจากนี้เมื่อเปรียบเทียบตามกลุ่ม (Division) ของสาหร่าย จะพบว่าสาหร่ายในกลุ่มสีน้ำตาลจะมีปริมาณโพลีฟีนอลมากกว่าสาหร่ายกลุ่มอื่นๆ เนื่องจากสารโพลีฟีนอลในกลุ่ม phlorotannins ที่พบได้มากในสาหร่ายสีน้ำตาลนั้นมีคุณสมบัติเป็น bi-polar (Targett and Arnold, 1998) ทำให้สาหร่ายกลุ่มนี้มีปริมาณโฟลีฟีนอลมากกว่ากลุ่มอื่นเมื่อสกัดด้วยตัวทำละลายทั้งที่ไม่มีขั้วและมีขั้ว

ฤทธิ์ในการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH ของสารสกัดจากสาหร่าย

จากผลการศึกษาพบว่า ในภาพรวมสารสกัดที่สกัดด้วยสารผสมระหว่างคลอโรฟอร์มและเมทานอลจะมีความสามารถในการยับยั้งอนุมูล DPPH ได้มากกว่าสารสกัดอื่นๆ รองลงมาได้แก่สารสกัดเอทิลอะซิเตท และสาร

สกัดเฮกเซนจะมีความสามารถในการยับยั้งอนุมูล DPPH น้อยที่สุด หากเปรียบเทียบกับการสกัดด้วยตัวทำละลายอื่นๆ นอกจากนี้หากเปรียบเทียบระหว่างกลุ่ม (Division) ของสาหร่าย พบว่าสาหร่ายในกลุ่มสีน้ำตาลจะมีความสามารถในการยับยั้งอนุมูล DPPH ได้มากกว่าสาหร่ายกลุ่มสีเขียวและสีแดง และสารสกัดที่มีความสามารถในการยับยั้งมากที่สุดคือ สารสกัดเอทิลอะซิเตทจากสาหร่ายสีน้ำตาล *P. australis* (PAS) ยับยั้งได้ 92.82 ± 0.77% และสารสกัดคลอโรฟอร์ม:เมทานอล และสารสกัดเมทานอลจาก *Colpomenia sinuosa* ตามลำดับ (Table 3)

Table 2 Total polyphenol content (mg GAE/g extract) of seaweed extracts with different solvents

Species*	Total polyphenol content			
	Hexane	Eethyl acetate	Chloroform:Methanol	Methanol
Caulerpa lentillifera	5.19 ± 1.44^{d}	50.14 ± 3.32^{a}	25.34 ± 1.15^{c}	43.48 ± 3.12^{b}
Caulerpa racemosa var. *corynephora*	2.43 ± 0.67^{c}	52.66 ± 4.45^{a,b}	50.67 ± 2.86^{b}	57.79 ± 2.18^{a}
Chlorodesmis hildebrandtii	6.85 ± 0.20^{c}	34.91 ± 0.99^{a}	27.82 ± 0.95^{b}	27.28 ± 3.26^{b}
Colpomenia sinuosa	67.64 ± 0.00^{a}	42.43 ± 3.75^{c}	24.21 ± 0.00^{d}	59.66 ± 2.27^{b}
Padina australis (PAP)	48.35 ± 2.26^{c}	60.79 ± 1.95^{b}	37.83 ± 2.54^{d}	72.35 ± 7.21^{a}
Padina australis (PAS)	4.69 ± 0.51^{c}	63.15 ± 6.30^{a}	14.90 ± 1.83^{b}	16.60 ± 0.05^{b}
Sargassum polycystum	19.82 ± 0.58^{d}	73.94 ± 1.21^{a}	64.71 ± 5.53^{b}	32.28 ± 2.06^{c}
Turbinaria conoides	7.85 ± 1.14^{c}	63.42 ± 1.95^{b}	75.13 ± 3.52^{a}	74.49 ± 1.68^{a}
Gracilaria tenuistipitata	4.17 ± 0.00^{d}	13.67 ± 0.37^{c}	28.96 ± 2.18^{b}	47.80 ± 3.04^{a}
Laurencia mariannensis	46.10 ± 6.20^{c}	79.00 ± 5.12^{a}	53.85 ± 2.99^{b}	36.43 ± 0.85^{d}
Solieria robusta	7.61 ± 0.50^{c}	15.62 ± 1.75^{a}	7.57 ± 0.63^{c}	11.25 ± 0.87^{b}

Note: Mean values (mean ± SD, n = 3) with different superscripts in the same row (a,b,c,d) are significantly different (P<0.05)

GAE = Gallic acid equivalent

Table 3 DPPH scavenging activity (%) of seaweed extracts (1mg/ml) with different solvents

Species*	DPPH scavenging activity (%)			
	Hexane	Eethyl acetate	Chloroform:Methanol	Methanol
Caulerpa lentillifera	2.74 ± 2.49^{d}	67.64 ± 1.00^{a}	36.93 ± 1.23^{b}	32.69 ± 1.03^{c}
Caulerpa racemosa var. *corynephora*	7.34 ± 1.97^{d}	23.38 ± 2.05^{c}	36.62 ± 1.32^{a}	27.50 ± 1.77^{b}
Chlorodesmis hildebrandtii	9.45 ± 2.56^{d}	80.90 ± 1.70^{b}	85.56 ± 1.64^{a}	60.43 ± 1.54^{c}
Colpomenia sinuosa	32.11 ± 2.35^{b}	15.57 ± 5.77^{c}	91.18 ± 0.93^{a}	90.80 ± 0.19^{a}
Padina australis (PAP)	69.74 ± 0.00^{b}	34.07 ± 1.15^{c}	79.08 ± 0.75^{a}	80.51 ± 1.61^{a}
Padina australis (PAS)	27.27 ± 2.90^{d}	92.82 ± 0.77^{a}	37.59 ± 2.08^{c}	48.93 ± 2.12^{b}
Sargassum polycystum	4.14 ± 0.53^{d}	86.61 ± 0.33^{b}	91.81 ± 1.21^{a}	64.91 ± 2.47^{c}
Turbinaria conoides	29.38 ± 2.43^{d}	52.03 ± 2.84^{c}	66.75 ± 1.44^{a}	63.85 ± 2.73^{b}
Gracilaria tenuistipitata	52.94± 0.00^{b}	37.79 ± 3.34^{c,d}	34.53 ± 2.64^{d}	62.55 ± 2.11^{a}
Laurencia mariannensis	3.74 ± 3.18^{c}	64.41 ± 1.91^{a}	18.11 ± 1.05^{b}	17.15 ± 4.22^{b}
Solieria robusta	0.67 ± 0.56^{c}	56.99 ± 4.20^{a}	15.48 ± 2.18^{b}	18.47 ± 3.78^{b}

Note: Mean values (mean ± SD, n = 3) with different superscripts in the same row (a,b,c,d) are significantly different (P<0.05)

ฤทธิ์ในการยับยั้งอนุมูลอิสระ superoxide ของสารสกัดจากสาหร่าย

ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ superoxide ของสารสกัดจากสาหร่ายทะเลในการศึกษานี้แสดงใน Table 4 ผลจากการศึกษาในภาพรวมพบว่า สารสกัดเมทานอลมีความสามารถในการยับยั้งมากกว่าสารสกัดอื่นๆ และรองลงมาได้แก่ และสารสกัดของผสมคลอโรฟอร์ม:เมทานอล และจากสารสกัดทั้งหมด สารสกัดของสารผสมคลอโรฟอร์ม:เมทานอล และสารสกัดเมทานอลจากสาหร่าย *C. cinuosa* มีฤทธิ์ในการยับยั้งมากที่สุด โดยมีค่าเท่ากับ 76.19 ± 1.58% และ 72.63 ± 5.57% ตามลำดับ และฤทธิ์ในการยับยั้งของสารสกัดทั้ง 2 นี้ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

Table 4 Superoxide anion scavenging activity (%) of seaweed extracts (1 mg/ml) with different solvents

Species*	Superoxide anion scavenging activity (%)			
	Hexane	Eethyl acetate	Chloroform:Methanol	Methanol
Caulerpa lentillifera	15.58 ± 2.35^{c}	8.38 ± 2.20^{d}	23.43 ± 1.94^{b}	30.64 ± 4.27^{a}
Caulerpa racemosa var. *corynephora*	22.06 ± 1.20^{a}	10.08 ± 1.91^{b}	25.43 ± 6.57^{a}	27.30 ± 2.79^{a}
Chlorodesmis hildebrandtii	30.42 ± 2.23^{a}	4.41 ± 0.60^{b}	29.72 ± 4.28^{a}	26.87 ± 1.67^{a}
Colpomenia sinuosa	51.10 ± 0.00^{b}	50.26 ± 6.62^{b}	76.19 ± 1.58^{a}	72.63 ± 5.57^{a}
Padina australis (PAP)	ND	16.84 ± 8.27^{c}	45.32 ± 1.72^{b}	58.75 ± 1.62^{a}
Padina australis (PAS)	29.36 ± 2.60^{a}	3.77 ± 0.95^{d}	23.66 ± 0.94^{b}	19.48 ± 2.20^{c}
Sargassum polycystum	0.67 ± 0.00^{c}	10.24 ± 5.06^{b}	56.61 ± 4.34^{a}	50.84 ± 7.15^{a}
Turbinaria conoides	1.14 ± 0.25^{c}	1.62 ± 1.39^{c}	7.78 ± 2.65^{b}	15.32 ± 2.48^{a}
Gracilaria tenuistipitata	1.69 ± 0.11^{c}	16.91 ± 1.18^{b}	27.27 ± 0.70^{a}	16.30 ± 1.06^{b}
Laurencia mariannensis	13.48 ± 4.45^{c}	4.70 ± 1.35^{d}	40.33 ± 2.42^{a}	28.54 ± 7.16^{b}
Solieria robusta	28.91 ± 0.00^{a}	11.93 ± 0.00^{d}	23.48 ± 0.10^{b}	22.23 ± 0.56^{c}

Note: Mean values (mean ± SD, n = 3) with different superscripts in the same row (a,b,c,d) are significantly different (P<0.05)

ND = not determine

ฤทธิ์ในการยับยั้งอนุมูลอิสระ hydroxyl ของสารสกัดจากสาหร่าย

ความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระ hydroxyl ของสารสกัดจากสาหร่าย (Table 5) ผลจากการศึกษาในภาพรวมพบว่า สารสกัดเมทานอล มีฤทธิ์ในการยับยั้งมากกว่าสารสกัดอื่นๆ นอกจากนี้ยังพบว่าการสกัดสารจากสาหร่าย *C. lentillifera* ด้วยตัวทำละลายทั้ง 4 ชนิด สารสกัดที่ได้จะมีฤทธิ์ในการยับยั้งอนุมูลอิสระ hydroxyl ไม่แตกต่างกันทางสถิติ โดยมีค่าการยับยั้งอยู่ในช่วง เช่นเดียวกับที่พบใน C. *racemosa* var. *corynephora* และ *S. robusta* ตามลำดับ สารสกัดที่แสดงฤทธิ์ในการยับยั้งได้มากที่สุด ได้แก่ สารสกัดเฮกเซนจากสาหร่ายสีน้ำตาล *C. sinuosa* มีค่าเท่ากับ 90.05 ± 0.77% สำหรับในกลุ่มของสาหร่ายสีแดง สารสกัดที่ได้จากการสกัด *G. tenuistipitata* ด้วยสารผสมระหว่างคลอโรฟอร์มและเมทานอลจะแสดงผลในการยับยั้งมากที่สุด (66.99 ± 2.88%)

ฤทธิ์ในการยับยั้งการเกิด lipid peroxidation ของสารสกัดจากสาหร่าย

ความสามารถในการยับยั้งการเกิด lipid peroxidation แสดงดัง Table 6 ผลจากการศึกษาพบว่า สารสกัดเอทิลอะซิเตทจาก *C. lentillifera* แสดงความสามารถในการยับยั้งได้มากที่สุด เท่ากับ 90.31±0.40%

รองลงมาได้แก่สารที่สกัดจาก *C. helderandtii* ด้วยสารผสมระหว่างคลอโรฟอร์มและเมทธานอล และ สารสกัดเฮกเซนจาก *G. tenuistipitata* ซึ่งมีความสามารถในการยับยั้ง เท่ากับ 87.08 ± 1.91 และ 77.92 ± 2.95% ตามลำดับ สำหรับในสาหร่ายกลุ่มสีน้ำตาล สารสกัดเมทานอลจาก *P. australis* (PAP) แสดงฤทธิ์ในการยับยั้งได้มากที่สุดเท่ากับ 77.19 ± 0.60% ในกลุ่มของสาหร่ายสีแดงสารสกัดจาก *S. robusta* แสดงความสามารถในการยับยั้งได้น้อยที่สุด

Table 5 Hydroxyl radical scavenging activity (%) of seaweed extracts (1 mg/ml) with different solvents

Species*	Hydroxyl radical scavenging activity (%)			
	Hexane	Eethyl acetate	Chloroform:Methanol	Methanol
Caulerpa lentillifera	53.82 ± 2.77^{a}	59.08 ± 5.87^{a}	56.81 ± 2.33^{a}	58.61 ± 1.67^{a}
Caulerpa racemosa var. *corynephora*	71.66 ± 5.36^{a}	75.19 ± 6.46^{a}	71.13 ± 0.97^{a}	71.19 ± 5.18^{a}
Chlorodesmis hildebrandtii	71.82 ± 3.05^{a}	57.35 ± 2.35^{c}	65.32 ± 2.96^{b}	66.93 ± 3.33^{b}
Colpomenia sinuosa	90.05 ± 0.77^{a}	86.67 ± 0.96^{c}	88.12 ± 1.04^{b}	86.25 ± 0.29^{c}
Padina australis (PAP)	ND	49.78 ± 6.61^{b}	52.52 ± 5.43^{b}	62.70 ± 4.06^{a}
Padina australis (PAS)	50.90 ± 3.00^{b}	61.09 ± 3.20^{a}	61.07 ± 1.09^{a}	61.70 ± 2.57^{a}
Sargassum polycystum	63.87 ± 0.00^{c}	71.84 ± 4.64^{b}	79.26 ± 4.37^{a}	69.53 ± 1.16^{b}
Turbinaria conoides	49.57 ± 1.46^{c}	53.49 ± 2.91^{b}	56.02 ± 3.03^{b}	63.25 ± 1.74^{a}
Gracilaria tenuistipitata	49.93 ± 0.00^{c}	58.10 ± 4.75^{b}	66.99 ± 2.88^{a}	62.87 ± 1.45^{a}
Laurencia mariannensis	58.59 ± 1.29^{a}	53.70 ± 3.83^{b}	57.56 ± 1.34^{a}	60.23 ± 0.93^{a}
Solieria robusta	58.29 ± 2.15^{a}	58.96 ± 0.00^{a}	56.43 ± 1.85^{a}	56.95 ± 1.88^{a}

Note: Mean values (mean ± SD, n = 3) with different superscripts in the same row (a,b,c,d) are significantly different (P<0.05)

ND = not determine

Table 6 Inhibition of lipid peroxidation (%) of seaweed extracts (1 mg/ml) with different solvents

Species	Inhibition of lipid peroxidation (%)			
	Hexane	Eethyl acetate	Chloroform:Methanol	Methanol
Caulerpa lentillifera	23.61 ± 1.16^{c}	90.31 ± 0.40^{a}	1.68 ± 0.20^{d}	27.38 ± 0.45^{b}
Caulerpa racemosa var. *corynephora*	2.94 ± 0.28^{d}	13.19 ± 2.69^{c}	62.42 ± 3.40^{a}	37.31 ± 2.36^{b}
Chlorodesmis hildebrandtii	3.75 ± 1.74^{d}	56.63 ± 1.28^{b}	87.08 ± 1.91^{a}	37.17 ± 0.82^{c}
Colpomenia sinuosa	ND	4.92 ± 2.75^{b}	52.91 ± 5.58^{a}	53.93 ± 2.55^{a}
Padina australis (PAP)	ND	53.09 ± 1.22^{b}	30.06 ± 0.06^{c}	77.19 ± 0.60^{a}
Padina australis (PAS)	6.04 ± 2.10^{d}	66.81 ± 3.45^{a}	54.79 ± 1.07^{b}	15.72 ± 0.55^{c}
Sargassum polycystum	0.82 ± 0.09^{d}	38.64 ± 1.60^{b}	18.42 ± 4.10^{c}	56.80 ± 1.84^{a}
Turbinaria conoides	53.41 ± 2.10^{a}	0.17 ± 0.10^{d}	30.16 ± 0.90^{b}	5.06 ± 0.40^{c}
Gracilaria tenuistipitata	77.92 ± 2.95^{a}	46.98 ± 0.64^{b}	17.63 ± 0.59^{c}	21.82 ± 2.76^{c}
Laurencia mariannensis	40.66 ± 0.57^{b}	49.34 ± 0.54^{a}	17.03 ± 2.20^{d}	27.19 ± 3.08^{c}
Solieria robusta	26.76 ± 0.61^{a}	6.20 ± 0.85^{c}	26.96 ± 1.10^{a}	16.26 ± 1.98^{b}

Note: Mean values (mean ± SD, n = 3) with different superscripts in the same row (a,b,c,d) are significantly different (P<0.05)

ND = not determine

ฤทธิ์ในการจับโลหะของสารสกัดจากสาหร่าย

ความสามารถในการจับกับไอออนของโลหะของสารสกัดจากสาหร่ายในการศึกษาครั้งนี้แสดงดัง Table 7 ผลจากการศึกษาพบว่า สารสกัดเอทิลอะซิเตทของสาหร่ายหลายชนิดจะแสดงความสามารถในการจับไอออนของโลหะได้มากกว่าสารสกัดอื่นๆ โดยที่สารสกัดเอทิลอะซิเตทของสาหร่าย *L. mariannensis* จะมีความสามารถในการแย่งจับโลหะมากที่สุดมีค่าเท่ากับ 96.19±0.10% และเมื่อเปรียบเทียบตามชนิดของสารสกัดจะพบว่าสารสกัดเอกเซนของสาหร่ายส่วนใหญ่จะมีความสามารถในการจับกับโลหะน้อยที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับสารสกัดอื่นๆ

Table 7 Metal chelating activity (%) of seaweed extracts (1 mg/ml) with different solvents

Species	Metal chaelationg activity (%)			
	Hexane	Eethyl acetate	Chloroform:Methanol	Methanol
Caulerpa lentillifera	1.17 ± 0.16^{d}	60.51 ± 4.17^{a}	9.07 ± 2.29^{c}	42.08 ± 0.01^{b}
Caulerpa racemosa var. *corynephora*	1.30 ± 0.07^{d}	36.67± 4.18^{c}	62.73 ± 3.22^{b}	69.62 ± 0.03^{a}
Chlorodesmis hildebrandtii	35.90 ± 0.03^{c}	55.83 ± 1.09^{a}	50.96 ± 0.01^{b}	22.53 ± 2.96^{d}
Colpomenia sinuosa	ND	4.12 ± 0.34^{b}	9.37 ± 0.58^{a}	3.31 ± 0.17^{c}
Padina australis (PAP)	ND	39.32 ± 4.15^{a}	35.66 ± 2.96^{a}	11.49 ± 0.04^{b}
Padina australis (PAS)	2.00 ± 0.40^{c}	35.38 ± 4.17^{a}	12.61 ± 2.29^{b}	0.17 ± 0.03^{c}
Sargassum polycystum	ND	68.06 ± 0.04^{a}	72.03 ± 4.07^{a}	15.99 ± 4.17^{b}
Turbinaria conoides	23.25 ± 0.02^{d}	31.42 ± 2.96^{c}	38.23 ± 0.02^{b}	43.45 ± 0.00^{a}
Gracilaria tenuistipitata	12.21 ± 0.00^{c}	3.24 ± 1.89^{d}	3.50 ± 0.08^{d}	23.84 ± 3.20^{b}
Laurencia mariannensis	3.60 ± 0.01^{c}	96.19 ± 0.10^{a}	1.46 ± 0.01^{d}	5.58 ± 1.36^{b}
Solieria robusta	5.49 ± 0.00^{b,c}	6.06 ± 0.00^{b}	12.33 ± 1.88^{a}	9.45 ± 4.66^{a,b}

Note: Mean values (mean ± SD, n = 3) with different superscripts in the same row (a,b,c,d) are significantly different (P<0.05)

ND = not determine

สรุป

จากผลการศึกษาทั้งหมดในภาพรวม พบว่าการสกัดตัวอย่างสาหร่ายด้วยตัวทำละลายที่มีขั้วปานกลาง เช่น เมทานอล หรือสารผสมระหว่างคลอโรฟอร์มและเมทานอล (อัตราส่วน 2:1) จะให้สารสกัดที่มีปริมาณสารสกัด (yield) และโพลีฟีนอลมากกว่าตัวทำละลายอื่นๆ ซึ่งสารสกัดที่ได้จะมีฤทธิ์ในการยับยั้งอนุมูลอิสระต่างๆ เช่น DPPH, superoxide anion, hydroxyl radical, lipid peroxidation และ metal-chelating ได้ดี นอกจากนี้เมื่อเปรียบเทียบในกลุ่มของสาหร่าย (Division) แล้ว พบว่าสาหร่ายในกลุ่มสีน้ำตาลจะให้สารสกัดที่มีปริมาณโพลีฟีนอล และมีฤทธิ์ในการยับยั้งอนุมูลอิสระได้ดีกว่าสาหร่ายในกลุ่มอื่นๆ ดังนั้นสาหร่ายในกลุ่มสีน้ำตาลนี้จึงเหมาะสมสำหรับการนำไปศึกษาในเชิงลึกต่อไป โดยอาจนำไปสกัดและแยกให้ได้สารบริสุทธิ์ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งอนุมูลอิสระที่ดีขึ้น

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้เป็นส่วนหนึ่งของโครงการวิจัยเรื่องฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากสาหร่ายทะเลบางชนิดในประเทศไทย ซึ่งได้รับการสนับสนุนทุนวิจัยจากสถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ปีงบประมาณ 2553-2555

เอกสารอ้างอิง

Chandini, S.K., Ganesan, P. and N. Bhaskar. 2008. *In vitro* antioxidant activities of three selected brown seaweeds of India. **Food Chem.**107:707-713.

Chew, Y.L., Lim, Y.Y., Omar, M. and K.S. Khoo. 2008. Antioxidant activity of three edible seaweeds from tow areas in South East Asia. **LWT.** 41:1067-1072.

Damonte, E.B., J. Neyts, C.A. Pujol, R. Snoech, G. Andrei, S. Ikeda, M. Witvrouw, D. Reymen, H. Haines, M.C. Matulewicz, A. Cerezo, C.E. Coto and E. De Vlercq. 1994. Antiviral activity of a sulfate polysaccharide from the red seaweed *Nothogenia fastigiata.* **Biochem. Pharmacol.** 47: 2187-2192.

Genesan, P., Kumar, Chandini S. and N. Bhaskar. 2008. Antioxidant properties of methanol extract and its solvent fractions obtained from selected Indian red seaweeds. **Bioresource Technology**. 99:2717-2723.

Kakita, H. and T. Kitamura. 2003. Hemagglutinating activity in the cultivated red alga *Gracilaria chorda* Holmes, from Japan, pp. 175-182. In A.R.O. Chapman, R.J. Anderson, V.J. Vreeland, and I.R. Davison, eds. **Proceeding of the 17th International Seaweed Symposium**. Oxford University Press, Oxford.

Kolender, A.A., M.C. Matulewicz and A.S. Cerezo. 1995. Structural analysis of antiviral sulfated ∝-D-(1,3)-linked mannans. **Carbohydr. Res.** 273: 179-185.

Hamann, M.T., C.S. Otto, P.J. Scheuer and D.V. Dunbar. 1996. Kahalalides: Bioactive depsioeptide from a marine molluk, *Elysia rufescens* and the Green Alga *Bryosis* sp. **J. Org. Chem.** 61: 6594-6600.

Horgen, F.D., D.B. Santos dels, G. Goetz, B. Sakamoto, Y. Kan, H. Nagai and P.J. Scheuer. 2000. A new depsipeptide from the sacoglossan mollusk *Elysia ornate* and the green alga *Bryopsis* species. **J. Nat. Prod.** 63: 152-154.

Lim, S.N., Cheung, P.C.K, Ooi, V.E.C. and P.O. Ang. 2002. Evaluation of Antioxidant Activity of Extracts from a Brown Seaweed, *Sargassum siliquastrum*. **J. Agric. Food. Chem.** 50:3862-3866.

López, A., Rico, M., Rivero, A. and M.S.Tangil. 2011. The effects of solvents on the phenolic contents and antioxidant activity of *Stypocaulon scoparium* algae extracts. **Food Chem.** 125: 1104–1109.

Lopes, G.K.B., Schulman, H.M. and M. Hermes-Lima. 1999. Polyphenol tannic acid inhibits hydroxyl radical formation form Fenton reaction by complexing ferrous ions. **BBA.** 1472: 142-152.

Matanjun,P., Mohamed, S., Mustapha, N.M., Mohammad, K. and C.H. Ming. 2008. Antioxidant activities and phenolic content of eight species of seaweeds from north Borneo. **J.Appl.Phycol**. 20:367-373.

Melo, F. R., M. S. Pereira, D. Foguel and P. A. S. Mourao. 2004. Antithrombin-mediated anticoagulant activity of sulfated polysaccharides. **J. Biol. Chem.** 279: 20824-20835.

Nuijen, B., M. Bouma M, H. Talsma, C. Manada, J.M. Jimeno, L. Lopez-Lazoro, A. Bult and J.H. Beijnen. 2000. Development of a lyophilized parenteral pharmaceutical formulation of the investigational polypeptide marine anticancer agent kahalalide F. **Drug Dev. Ind. Pharm.** 27: 767-780.

Pereira, M. S., E. S. A. Vilela-Silva, A. Valente and P. A. S. Mourao. 2002. A 2-sulfated, 3-linked α-L-galactan is an anticoagulant polysaccharide. **Carbohydr. Res.** 337: 2231-2238.

Qi, H., T. Zhao, Q. Zhang, Z. Li and Z. Zhao. 2005. Antioxidant activity of different molecular weight sulfated polysaccharides from *Ulva pertusa* Kjellm (Chlorophyta). **J. Appl. Phycol.** 17: 527-534.

Sparidans, R.W., E. Stokvis, J.M. Jimeno, L. Lopez-Lazaro, J.H. Schellens and J.H. Beignen. 2001. Chemical and enzymatic stability of a cyclic depsipeptide, thenovel, marine-derived, anti-cancer agent kahalalide F. **Anticacer Drugs.** 12: 575-582.

Targett, G. and T.M. Arnold. 1998. Predicting the effect of brown algae phlorotannins on marine herbivores in tropical and temperate oceans. J. Phycol. 34(2):195-205.

Wang, J., X. Jiang, M. Mou and H. Guan. 2004. Anti-oxidation of agar oligosaccharides produced by agarase from a marine bacterium. **J. Appl. Phycol.** 16: 333-340.

Witvrouw, M., J.A. Este, M.Q. Mateu, D. Reymen, G. Anderi, R. Snoech, S. Ikeda, R. Pauwels, N.V. Bianchini, J. Desmyter and E. De Clercq. 1994. Activity of a sulfated polysaccharide extracted from the red seaweed *Aghardhiella tenera* against human immunodeficiency virus and other enveloped viruses. **Antiviral Chem. Chemo.** 5: 297-303.

Yuan, Y.V., Bone, D.E. and M.F Carrington. 2005. Antioxidant activity of dulse (*Palmaria palmate*) extract evaluated in vitro. **Food. Chem.** 91: 485-494.