



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การตรวจสอบสารไขมัน และกรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อนในสาหร่ายเศรษฐกิจ

Screening for lipids and polyunsaturated fatty acids

from the economic seaweed

ดร. ธนพรรณ เสียงแจ่ม

โครงการวิจัยประเภทงบประมาณเงินรายได้

(เงินอุดหนุนจากรัฐบาล) ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2561

มหาวิทยาลัยบูรพา

รหัสโครงการ 694239

สัญญาเลขที่ 174/2561

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การตรวจสอบสารไขมัน และกรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อนในสาหร่ายเศรษฐกิจ

Screening for lipids and polyunsaturated fatty acids

from the economic seaweed

ดร. ธนพรรณ เสียงแจ่ม

คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

## กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากงบประมาณเงินรายได้ (เงินอุดหนุนจากรัฐบาล) ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2561 มหาวิทยาลัยบูรพา ผ่านสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ เลขที่สัญญา 174/2561

## Acknowledgment

This work was financially supported by the Research Grant of Burapha University through National Research Council of Thailand (Grant no. 174/2561).

## บทคัดย่อ

สาหร่ายทะเล เป็นทรัพยากรธรรมชาติที่มีคุณค่าและมีองค์ประกอบของสารสำคัญที่สามารถนำมาใช้ประโยชน์ในด้านต่าง ๆ ซึ่งงานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาเปรียบเทียบ ชนิดและปริมาณของไขมันจากสารสกัดสาหร่ายพวงองุ่น สาหร่ายผักกาดทะเล สาหร่ายโพรง และสาหร่ายลื่นมังกรในตัวทำลาย 3 ชนิด ได้แก่ 95% ethanol, Ethyl acetate และ Chloroform:Methanol ทดสอบด้วยวิธี โครมาโทกราฟีแบบผิวนาง (TLC) และเปรียบเทียบชนิดของกรดไขมัน และอนุพันธ์อื่น ๆ ทดสอบด้วยวิธี การวิเคราะห์กรดไขมันโดยเทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟี-แมสสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ (GC-MS) ผลการศึกษา พบว่า มีไขมันชนิด Phosphatidylcholine (PC) และ Phosphatidylethanolamine (PE) อยู่มากในสาหร่ายพวงองุ่นและสาหร่ายผักกาดทะเลที่สกัดด้วย Chloroform:Methanol และจากการเปรียบเทียบชนิดของกรดไขมัน พบคุณลักษณะเด่นของกรดไขมันชนิดอิ่มตัว รองลงมาเป็นชนิดไม่อิ่มตัวเชิงซ้อนและไม่อิ่มตัวเชิงเดี่ยว กรดไขมันหลักที่พบ ได้แก่ C16:0, C18:0, C18:1n9, C22:0, C22:1n9 เป็นต้น ซึ่งไขมันและกรดไขมันเหล่านี้สามารถนำมาใช้ประโยชน์ในด้านต่าง ๆ ตลอดจนสามารถนำมาเป็นข้อมูลพื้นฐานในการทำงานวิจัยในครั้งต่อไปได้

**คำสำคัญ** สารสกัดสาหร่าย กรดไขมัน เทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟี-แมสสเปกโทรโฟโตมิเตอร์

## Abstract

Marine algae are an important sources of high beneficial compound, including sulfated polysaccharides, antioxidants, and bioactive secondary metabolites. Lipids also play a role in cellular function, inflammation, antitumor, antibacterial, and reproduction through fatty acid molecules especially PUFA and HUFAs. This study, we focus on two abundance algae near the west coast of the gulf of Thailand i.e. Sea lettuce (*Ulva rigida*) and Blubber weed (*Solieria robusta*) extracts by using Thin-layer chromatography (TLC) and Gas chromatography mass spectrometry (GC-MS). In this study we showed the composition of phospholipids, especially PCs and total fatty acids (FAs) in three fractions of *U. rigida* and *S. robusta* extracted by ethanol, chloroform-methanol, and ethylacetate. PCs is present in all fractions but reaching maximum in chloroform-methanol extract of *U. rigida*. Analysis by GC-MS indicated that the major FAs present in all fractions were composed of 14:0, 16:0, 17:0, 18:0, 16:1, 18:1, 18:2, 20:1, 20:2, 20:4, 20:5, and 22:6. The chloroform-methanol extract of *U. rigida* and *S. robusta* contained the largest amounts of these FAs. This knowledge will be useful in formulating supplementary food containing appropriate amounts of fatty acids, PUFA, and HUFA from marine algae.

Keywords: *Ulva rigida*, *Solieria robusta*, Marine algae, Lipids, Fatty acids, GC-MS

## สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ	ง
Abstract	จ
สารบัญ	ฉ
สารบัญตาราง	ช
สารบัญภาพ	ซ
สารบัญคำย่อ	ฌ
1. บทนำ	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา	3
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย	3
1.3 สมมติฐานของการทดลอง	3
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	3
1.5 ขอบเขตของการวิจัย	3
2. วัสดุอุปกรณ์ สารเคมีและวิธีการทดลอง	4
2.1 วัสดุอุปกรณ์	4
2.2 สารเคมี	5
2.3 วิธีการทดลอง	6
2.3.1 การเตรียมสารสกัดจากสาหร่าย 4 ชนิด	6
2.3.2 การแยกและการหาปริมาณของไขมันด้วยวิธีโครมาโทกราฟีแบบผิวบาง (TLC)	7
2.3.3 การวิเคราะห์กรดไขมันโดยเครื่องโครมาโทกราฟีแบบแก๊ส-แมสสเปกโตรเมทรี (GC-MS)	7
3. ผลการทดลอง	8
3.1 การแยกและการหาปริมาณของไขมันด้วยวิธีโครมาโทกราฟีแบบผิวบาง (TLC)	8
3.2 การวิเคราะห์กรดไขมันโดยเทคนิคโครมาโทกราฟีแบบแก๊ส-แมสสเปกโตรเมทรี (GC-MS)	10
3.3 ร้อยละของกรดไขมันและอนุพันธ์อื่น ๆ	22
4. อภิปราย สรุปผลการทดลอง และข้อเสนอแนะ	30
4.1 อภิปรายสรุปผลการวิจัย	30
4.2 สรุปผลการทดลอง	31
4.3 ข้อเสนอแนะ	31
5. เอกสารอ้างอิง	32
6. ภาคผนวก	34
ภาคผนวก ก	35

## สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
2-1 แสดงชนิดของสาหร่ายในแต่ละตัวทำละลาย	9
2-2 แสดงพื้นที่ได้กราฟของสาหร่ายผักกาดทะเลในตัวทำละลายที่แตกต่างกัน	23
2-3 แสดงพื้นที่ได้กราฟของสาหร่ายพวงองุ่นในตัวทำละลายที่แตกต่างกัน	25
2-4 แสดงพื้นที่ได้กราฟของสาหร่ายโพรงในตัวทำละลายที่แตกต่างกัน	27
2-5 แสดงพื้นที่ได้กราฟของสาหร่ายลิ้นมังกรในตัวทำละลายที่แตกต่างกัน	29



## สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
2-1 แผนผังแสดงการสกัดสารจากสาหร่าย 4 ชนิด	6
2-2 TLC chromatogram ชนิดของไขมันจากสารสกัดสาหร่ายแห้ง	8
2-3 TLC chromatogram ชนิดของไขมันจากสารสกัดสาหร่ายสด	9
2-4 แสดงชนิดของกรดไขมันจากสารสกัดสาหร่ายผักกาดทะเลด้วย Ethyl acetate	10
2-5 แสดงชนิดของกรดไขมันจากสารสกัดสาหร่ายโพรงด้วย Ethyl acetate	11
2-6 แสดงชนิดของกรดไขมันจากสารสกัดสาหร่ายพวงองุ่นด้วย Ethyl acetate	12
2-7 แสดงชนิดของกรดไขมันจากสารสกัดสาหร่ายลื่นมังกรด้วย Ethyl acetate	13
2-8 แสดงชนิดของกรดไขมันจากสารสกัดสาหร่ายลื่นมังกรด้วย 95% ethanol	14
2-9 แสดงชนิดของกรดไขมันจากสารสกัดสาหร่ายโพรงด้วย 95% ethanol	15
2-10 แสดงชนิดของกรดไขมันจากสารสกัดสาหร่ายพวงองุ่นด้วย 95% ethanol	16
2-11 แสดงชนิดของกรดไขมันจากสารสกัดสาหร่ายผักกาดทะเลด้วย 95% ethanol	17
2-12 แสดงชนิดของกรดไขมันจากสารสกัดสาหร่ายผักกาดทะเลด้วย Chloroform:Methanol	18
2-13 แสดงชนิดของกรดไขมันจากสารสกัดสาหร่ายโพรงด้วย Chloroform:Methanol	19
2-14 แสดงชนิดของกรดไขมันจากสารสกัดสาหร่ายลื่นมังกรด้วย Chloroform:Methanol	20
2-15 แสดงชนิดของกรดไขมันจากสารสกัดสาหร่ายพวงองุ่นด้วย Chloroform:Methanol	21
2-16 แสดงร้อยละของกรดไขมันสาหร่ายผักกาดทะเลในตัวทำละลายที่แตกต่างกัน	22
2-17 แสดงร้อยละของกรดไขมันสารสกัดสาหร่ายพวงองุ่นในตัวทำละลายที่แตกต่างกัน	24
2-18 แสดงร้อยละของกรดไขมันสาหร่ายโพรงในตัวทำละลายที่แตกต่างกัน	26
2-19 แสดงร้อยละของกรดไขมันสาหร่ายลื่นมังกรในตัวทำละลายที่แตกต่างกัน	28

## สารบัญย่อ

ARA	Arachidonic acid
DHA	Docosahexaenoic acid
EPA	Eicosapentaenoic acid
GC-MS	Gas chromatography-mass spectrometry
GLA	Gamma-linolenic acid
LA	Linoleic acid
PUFA	Polyunsaturated fatty acid
TLC	Thin Layer Chromatography

# บทที่ 1

## บทนำ

### 1.1 ที่มาและความสำคัญของงานวิจัย

สาหร่ายทะเลขนาดใหญ่ (macroalgae) เป็นทรัพยากรธรรมชาติที่ไม่มีระบบราก ใบ และระบบการลำเลียงน้ำ และสารอาหารที่แท้จริง อาศัยการดูดซึมโดยวิธีการแพร่ (osmosis) ซึ่งสาหร่ายทะเลขนาดใหญ่สามารถจำแนกได้ 4 กลุ่ม ได้แก่ สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน (blue green algae) สาหร่ายสีแดง (red algae) สาหร่ายสีเขียว (green algae) และสาหร่ายสีน้ำตาล (brown algae) สาหร่ายแต่ละกลุ่มมีความแตกต่างกันตามชนิดของรงควัตถุ สาหร่ายแต่ละกลุ่มมีการนำมาใช้ประโยชน์ได้หลายรูปแบบ ทั้งการใช้เป็นอาหารโดยตรงสำหรับมนุษย์และสัตว์ เนื่องจากสาหร่ายอุดมไปด้วยสารอาหารที่มีประโยชน์ต่อร่างกายหลายชนิด ได้แก่ คาร์โบไฮเดรต ไขมัน โปรตีน วิตามิน และใยอาหาร เป็นต้น นอกจากนี้ยังนำมาใช้ประโยชน์และในรูปแบบของสารสกัดซึ่งมีคุณสมบัติต่างๆ มากมาย สารประกอบจากสาหร่ายทะเล (bioactive compound) ได้รับการยอมรับว่ามีคุณสมบัติที่ดีในด้านต่างๆ เช่น ด้านเชื้อแบคทีเรีย (antibacterial) ด้านเชื้อไวรัส (antivirus) ด้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) ด้านการอักเสบ (anti-inflammatory) ด้านมะเร็ง (anticancer) ด้านการแข็งตัวของเลือด (anti-coagulant) ลดความดันโลหิต (Chew et al., 2008; Yangthong et al., 2009) และเสริมสร้างภูมิคุ้มกัน (Chiu et al., 2008; Yangthong et al., 2012) เป็นต้น ซึ่งสารประกอบจากสาหร่ายทะเล ได้แก่ xanthin, astaxanthin, carotenoid, phenolic acids, flavonoid, phlorotannin, bromophenol, ulvan, และ polyphenol ซึ่งในสาหร่ายสีน้ำตาลมักถูกเรียกว่า phlorotannin (Nakai et al., 2006) ส่วนในสาหร่ายสีแดงจะถูกเรียกว่า bromophenol (Li et al., 2007) สารในกลุ่มฟีนอล คือ สารประกอบที่มีวงแหวน (aromatic ring) และกลุ่มไฮดรอกซิลและรวมไปถึงอนุพันธ์ของสารประกอบฟีนอล ซึ่งมีการแทนที่ด้วยหมู่เคมีต่าง ๆ จำแนกตามโครงสร้าง (จำนวนของวงแหวนฟีนอลและองค์ประกอบอื่นของโครงสร้างที่เชื่อมวงแหวน) แบ่งออกเป็น 5 ประเภท ได้แก่ ไดเฟอรูโลอิลมีเทน (diferuloylmethane) สทิลบีน (stilbenes) ฟลาโวนอยด์ (flavonoids) กรดฟีนอลิก (phenolic acids) และแทนนิน (tannins) (Weerawatanakorn, 2013) โดยกรดฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์เป็นสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สำคัญ (Atanassova et al., 2011) ซึ่งสาหร่ายทะเลถือเป็นทรัพยากรธรรมชาติที่มีความสำคัญและมีคุณค่าและมีองค์ประกอบของสารสำคัญที่มีความสามารถเป็นสารต้านออกซิเดชันได้ดี นอกจากนี้กรดไขมันไม่อิ่มตัวที่เป็นองค์ประกอบในสาหร่ายหลายชนิดยังมีความสำคัญ โดยเฉพาะกรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อน เช่น กรดไขมันโอเมก้า 3 ที่ประกอบด้วยกรดไขมันสำคัญคือ EPA (eicosapentaenoic acid) และ DHA (docosahexaenoic acid) เป็นต้น โดยทั่วไปสาหร่ายที่ให้ไขมันได้สูงพบทั้งในกลุ่มไซยาโนแบคทีเรีย สาหร่ายสีเขียวและไดอะตอม เช่น *Chlorella* sp., *Scenedesmus* sp., *Isochrysis* sp., *Tetraselmis* sp. เป็นต้น นอกจากนี้ไขมันของสาหร่ายยังมีกรดไขมันไม่อิ่มตัวที่เป็นประโยชน์อยู่มากนอกเหนือจาก EPA และ DHA เช่น arachidonic acid (ARA), gamma-linolenic acid (GLA), linoleic acid (LA) เป็นต้น (Chisti, 2007) ซึ่งกรดไขมันเหล่านี้สามารถนำมาใช้เป็นส่วนหนึ่งของอุตสาหกรรมอาหาร และสามารถนำมาใช้ในอุตสาหกรรมเครื่องสำอางและ

อุตสาหกรรมยาได้อีกด้วย ในการศึกษาปริมาณไขมันและชนิดของกรดไขมันในสาหร่ายขนาดใหญ่ที่มีมากในธรรมชาติ มีการศึกษาในสาหร่ายหลายชนิด ได้แก่ สาหร่ายสีแดง (*Acanthophora* sp.) สาหร่ายสีเขียว (*Ulva rigida*, *U. intestinalis*, *Caulerpa racemosa*, *C. lentillifera*, *Cladophora* sp.) สาหร่ายสีน้ำตาล (*Sargassum* sp., *Padina* sp.) เป็นต้น ซึ่งสาหร่ายทะเลได้รับความสนใจเป็นพิเศษ เพราะในสาหร่ายทะเลมีสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพและสารต้านอนุมูลอิสระค่อนข้างสูง (Lohrmann, 2007) สำหรับสาหร่ายทะเลสีเขียวและสาหร่ายทะเลสีแดงซึ่งพบได้หลายชนิด พบว่ามีสารต้านอนุมูลอิสระจึงเป็นที่ยอมรับและน่าจะมีการนำมาใช้ประโยชน์อย่างสูงทั้งในปัจจุบันและอนาคต เนื่องจากเป็นสารธรรมชาติ ซึ่งแตกต่างจากสารที่สังเคราะห์ขึ้นจากสารเคมีที่ทำให้ผู้บริโภคไม่มั่นใจในผลที่จะได้รับจากสารเคมีเหล่านั้น (Yang, 2000) จากคุณสมบัติและองค์ประกอบทางเคมีของสาหร่ายทะเลดังกล่าวแล้วนั้น ในงานวิจัยนี้จึงสนใจศึกษาชนิดของไขมันและกรดไขมันสำคัญในสาหร่ายทะเล 4 ชนิด ได้แก่ สาหร่ายพวงองุ่น (*Caulerpa lentillifera*), สาหร่ายโพรง (*Solieria robusta*), สาหร่ายลิ้นมังกร (*Halymenia durvillei*) และสาหร่ายผักกาดทะเล (*Ulva rigida*) ดังนั้นข้อมูลพื้นฐานจากงานวิจัยนี้จะสามารถเป็นประโยชน์เพื่อต่อยอดงานวิจัยและเพิ่มมูลค่าผลิตภัณฑ์ได้มากขึ้น

## 1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1. ศึกษาเปรียบเทียบ ชนิดและปริมาณของไขมันจากสารสกัดสาหร่ายพวงองุ่น, สาหร่ายโพรง, สาหร่ายลีนมังกร และสาหร่ายผักกาดทะเลในตัวทำละลาย 3 ชนิด ได้แก่ 95% ethanol, Ethyl acetate และ Chloroform: Methanol ด้วยวิธี Thin-Layer Chromatography (TLC)

2. เปรียบเทียบชนิดของกรดไขมัน และอนุพันธ์อื่น ๆ จากสารสกัดสาหร่ายพวงองุ่น, สาหร่ายโพรง, สาหร่ายลีนมังกร และสาหร่ายผักกาดทะเลในตัวทำละลาย 3 ชนิด ได้แก่ 95% ethanol, Ethyl acetate และ Chloroform: Methanol ด้วยวิธี Gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS)

## 1.3 สมมติฐานของงานวิจัย

สารสกัดจากสาหร่ายพวงองุ่น, สาหร่ายโพรง, สาหร่ายลีนมังกร และสาหร่ายผักกาดทะเลมีชนิดและปริมาณของไขมันและกรดไขมันที่แตกต่างกัน

## 1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ทราบถึงปริมาณและชนิดของไขมันกับกรดไขมันในสาหร่ายพวงองุ่น, สาหร่ายโพรง, สาหร่ายลีนมังกร และสาหร่ายผักกาดทะเล

2. ทราบถึงความแตกต่างของตัวทำละลายทั้ง 3 ชนิดของสารสกัดสาหร่ายในการหาชนิดของไขมันและกรดไขมัน

3. ทราบถึงข้อมูลเกี่ยวกับไขมันและกรดไขมันในสาหร่าย 4 ชนิด ที่สามารถนำไปพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์และยาในการรักษาโรค เช่น โรคมะเร็ง และโรคเบาหวาน

## 1.5 ขอบเขตของงานวิจัย

ศึกษาโดยสกัดสาหร่ายพวงองุ่น, สาหร่ายโพรง, สาหร่ายลีนมังกร และสาหร่ายผักกาดทะเล ด้วย 95% ethanol, Ethyl acetate และ Chloroform: Methanol นำสารสกัดไปทำให้แห้ง หลังจากนั้นนำไปศึกษาการแยกและการหาปริมาณของไขมันด้วยวิธีโครมาโทกราฟีแบบผิวบาง (Thin Layer Chromatography, TLC) และ นำไปวิเคราะห์กรดไขมันโดยเครื่องโครมาโทกราฟีแบบแก๊ส-แมสสเปกโตรเมทรี (Gas chromatography-mass spectrometry, GC-MS)

## บทที่ 2

### วัสดุอุปกรณ์ สารเคมีและวิธีดำเนินการวิจัย

#### 2.1 วัสดุอุปกรณ์

1. สำลี
2. ตู้อบ
3. Rack
4. ถังก๊าซไนโตรเจน
5. กระดาษฟอยด์ (foil)
6. พาราฟิล์ม (parafilm)
7. ช้อนตักสาร (spatula)
8. ขวด vial ปริมาตร 2 ml
9. กระบอกตวง (cylinder)
10. กรวยกรอง (glass funnel)
11. เครื่อง Rotary evaporator
12. เครื่องชั่งทศนิยม 2 ตำแหน่ง
13. เข็มฉีดยาแก้ว ปริมาตร 25  $\mu$ l
14. หลอดทดลอง ปริมาตร 12 ml
15. ตู้ดูดควันสารเคมี (Fume hood)
16. ปีกเกอร์ ปริมาตร 50, 100, 1000 ml
17. เครื่อง BLook LED transilluminator
18. เครื่องปั่นเหวี่ยงสุญญากาศ (Speed vac)
19. ขวดแก้ว Duran ปริมาตร 100, 500, 1000 ml
20. เครื่อง Gas chromatography-mass spectrometry
21. High performance thin layer chromatography plate (HPTLC silica gel plate)

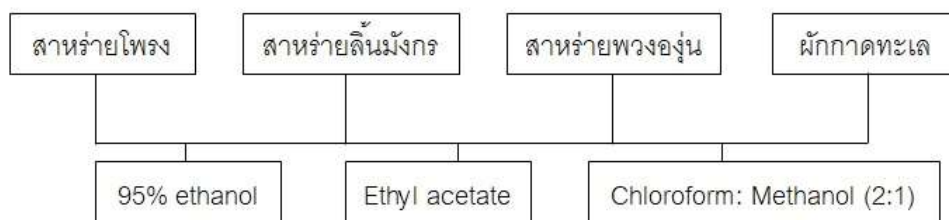
## 2.2 สารเคมี

1. PC standard
2. Hexane (C<sub>6</sub>H<sub>14</sub>)
3. Methanol (CH<sub>3</sub>OH)
4. Primuline reagents
5. Chloroform (CHCl<sub>3</sub>)
6. 1-Propanol (C<sub>3</sub>H<sub>8</sub>O)
7. 80% Acetone (C<sub>3</sub>H<sub>6</sub>O)
8. Ethyl acetate (C<sub>4</sub>H<sub>8</sub>O<sub>2</sub>)
9. น้ำกลั่น (Distilled water)
10. Diethyl ether ((C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>)<sub>2</sub>O)
11. Methyl acetate (C<sub>3</sub>H<sub>6</sub>O<sub>2</sub>)
12. 1% Sulfuric acid (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)
13. Toluene (C<sub>7</sub>H<sub>8</sub> (C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>CH<sub>3</sub>))
14. 95% Ethanol (CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>OH)
15. Absolute ethanol (C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH)
16. 0.25% Potassium chloride (KCl)
17. 2% Potassium bicarbonate (KHCO<sub>3</sub>)
18. 0.1% Butylated hydroxytoluene (BHT)

## 2.3 วิธีการทดลอง

### 2.3.1 การสกัดสารจากสาหร่ายโพรง, สาหร่ายลีนมังกกร, สาหร่ายพวงองุ่น และผักกาดทะเลโดยตัวทำละลาย 95% ethanol, Ethyl acetate และ Chloroform: Methanol (2:1)

นำตัวอย่างสดของสาหร่ายพวงองุ่น, สาหร่ายโพรง, สาหร่ายลีนมังกกร และผักกาดทะเล มาล้างทำความสะอาด ชั่งน้ำหนักสด และตากให้แห้ง จากนั้นนำสาหร่ายมาตัดให้ละเอียด และชั่งน้ำหนักแห้ง แล้วมาแช่ในตัวทำละลาย ที่อุณหภูมิห้อง ประมาณ 7 วันเพื่อให้สารละลายในตัวทำละลายแต่ละชนิดออกมา โดยใช้ตัวอย่างแต่ละชนิด (ตัวอย่างแห้ง:ตัวทำละลาย) ในตัวทำละลาย 95% ethanol จะมีอัตราส่วนที่ใช้ดังนี้ คือ สาหร่ายโพรง และ สาหร่ายลีนมังกกรใช้ 1:10, สาหร่ายพวงองุ่นใช้ 1:20 และผักกาดทะเลใช้ 1:30 ส่วนในตัวทำละลาย Ethyl acetate และ Chloroform: Methanol (2:1) จะมีอัตราส่วนที่ใช้ดังนี้ คือ สาหร่ายโพรง และ สาหร่ายลีนมังกกรใช้ 1:10, สาหร่ายพวงองุ่น และ ผักกาดทะเลใช้ 1:20 (ภาพ 3-1) เมื่อครบเวลา ได้ทำการกรองสารละลายของแต่ละตัวอย่างโดยการใช้นิรภัยแก้วและสำลี จากนั้นนำสารสกัดไประเหยแห้งเพื่อนำตัวทำละลายออกด้วยเครื่อง Rotary Evaporator (BUCHI, Switzerland) จะได้สารสกัดของตัวอย่างแต่ละชนิด และนำสารสกัดที่ได้ไปเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ  $-20^{\circ}\text{C}$  เพื่อป้องกันการเสื่อมสภาพของสาร



ภาพ 2-1 แผนผังแสดงการสกัดสารจากสาหร่ายโพรง, สาหร่ายลีนมังกกร, สาหร่ายพวงองุ่น และผักกาดทะเลโดยตัวทำละลาย 95% ethanol, Ethyl acetate และ Chloroform: Methanol (2:1)

- สาหร่ายโพรงในตัวทำละลาย 95% ethanol, Ethyl acetate และ Chloroform: Methanol (2:1) ใช้ในอัตราส่วน 1:10
- สาหร่ายลีนมังกกรในตัวทำละลาย 95% ethanol, Ethyl acetate และ Chloroform: Methanol (2:1) ใช้ในอัตราส่วน 1:10
- สาหร่ายพวงองุ่นในตัวทำละลาย 95% ethanol, Ethyl acetate และ Chloroform: Methanol (2:1) ใช้ในอัตราส่วน 1:20
- ผักกาดทะเลในตัวทำละลาย 95% ethanol ใช้ในอัตราส่วน 1:30 ส่วนในตัวทำละลาย Ethyl acetate และ Chloroform: Methanol (2:1) ใช้ในอัตราส่วน 1:20



### 2.3.2 การแยกและการหาปริมาณของไขมันด้วยวิธีโครมาโทกราฟีแบบผิบบาง (Thin-layer Chromatography, TLC)

สารสกัดจะถูกแยกและหาปริมาณของไขมันด้วย TLC โดยนำสารละลายที่มีไขมันที่สกัดได้ (ตัวอย่างละ 5  $\mu$ l) และ PC standard (*Sigma-Aldrich, USA*) มาหยดให้เป็นเส้นตรง ขนาด 5x1 mm. ลงบน High performance thin layer chromatography plate (HPTLC silica gel plate) และรอให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นนำแผ่น HPTLC แต่ละแผ่นแช่ในบีกเกอร์ที่มี separation buffer (methyl acetate, 1-propanol, chloroform และ 0.25% KCl ในอัตราส่วน 25:25:10:9 โดยปริมาตร) เมื่อสารแยกเสร็จแล้วนำแผ่น HPTLC มาเป่าให้แห้ง และฉีดพ่นด้วย primuline reagents (*Sigma-Aldrich, USA*) ที่ประกอบด้วย primuline 5 mg ใน 80% acetone (ในน้ำกลั่น) ปริมาณ 100 ml จากนั้นรอกจนแห้ง แบน PC ปรากฏและสามารถถ่ายภาพได้ภายใต้ Blue light โดยใช้เครื่อง BLook LED transilluminator (GeneDirex, Taiwan) และนำมาวิเคราะห์ความเข้มของแบนโดยใช้โปรแกรม ImageJ (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>)

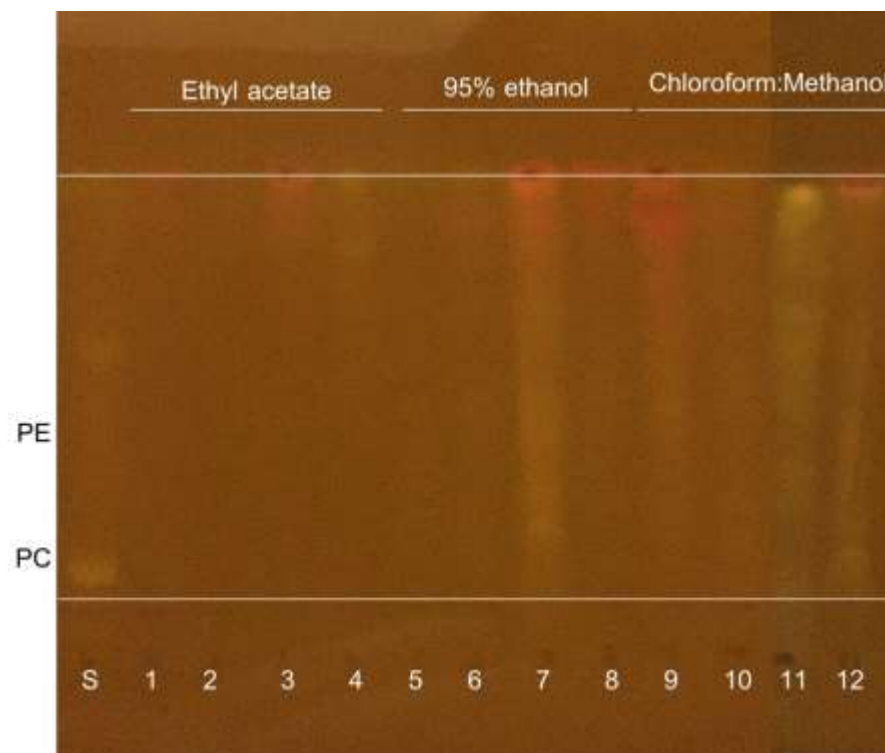
### 2.3.3 การวิเคราะห์กรดไขมันโดยเครื่องโครมาโทกราฟีแบบแก๊ส-แมสสเปกโทรเมตรี (Gas chromatography-mass spectrometry, GC-MS)

นำสารสกัดสำหรับแต่ละชนิดมาทำการสกัดไขมันโดยการทำให้แห้งด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงสุญญากาศ (Thermo scientific SC210A, USA) เมื่อสารสกัดแห้งได้นำมาทำการเติมหมู่เมทิล (Methylation) โดยการเติม toluene 1 ml, 1% sulfuric acid 2 ml และ arachidic acid (20:0) 2.5  $\mu$ l นำไปต้มในตู้อบ 80°C, 1 ชั่วโมง เมื่อครบเวลา นำมาเติมด้วย 2%KHCO<sub>3</sub> 2 ml, hexane: diethyl ether 5 ml และ 0.1% BHT เมื่อสารตัวอย่างแยกชั้นเลือกเฉพาะสารชั้นบน (ทำซ้ำ 3 ครั้ง) พอทำครบจำนวนนำมาทำให้แห้งด้วยก๊าซไนโตรเจน เมื่อสารตัวอย่างแห้งได้เติม Chloroform: Methanol (2:1) 0.5 ml ลงในแต่ละตัวอย่าง และนำตัวอย่างลงในขวด vial สำหรับทำ GC-MS จากนั้นนำตัวอย่างแต่ละชนิดมาวิเคราะห์ โดยใช้การฉีดปริมาตร 1 ไมโครลิตรต่อตัวอย่าง ด้วยเครื่อง GC-MS (Agilent Technology GC 6890N, USA) ใช้กับคอลัมน์ HP-5MS (30 m x 0.25 mm ID x 0.25 mm, Agilent Technology, USA) กรดไขมันบริสุทธิ์จะได้รับการวิเคราะห์ภายใต้อุณหภูมิคอลัมน์ 210 °C และความดันคอลัมน์ระหว่าง 110 kPa-380 kPa ที่ 7 kPa/min หลังจากการวิเคราะห์ กรดไขมันจะถูกประมวลผลด้วย Agilent Chem Station data system

## 2.4 ผลการทดลอง

### 2.4.1 การแยกและการหาปริมาณของไขมันด้วยวิธีโครมาโทกราฟีแบบผิวนาง (Thin-layer Chromatography, TLC)

จากผลการทดลองการหาชนิดของไขมันจากสารสกัดสาหร่ายแห้ง 4 ชนิด ในตัวทำละลายที่แตกต่างกัน (ภาพ 2-2) ผลที่ได้ คือ พบ Phosphatidylcholine (PC) และ Phosphatidylethanolamine (PE) ได้มากในสาหร่ายพวงองุ่นที่สกัดด้วย 95% ethanol สาหร่ายลิ้นมังกรและสาหร่ายผักกาดที่สกัดด้วย Chloroform:Methanol เมื่อเทียบกับสาหร่ายชนิดต่าง ๆ



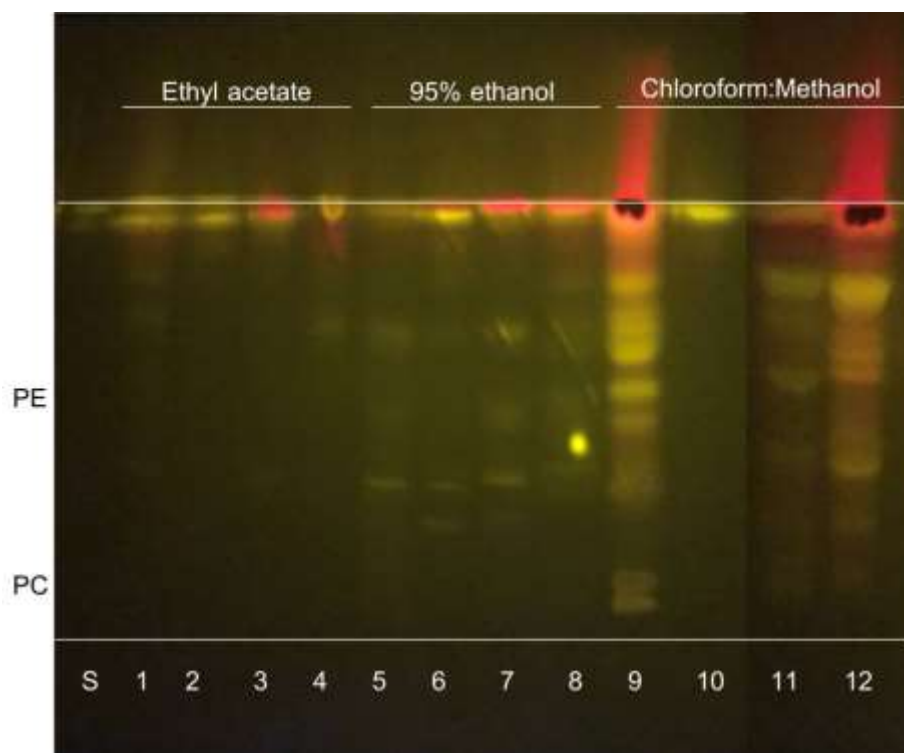
ภาพ 2-2 TLC chromatogram ชนิดของไขมันจากสารสกัดสาหร่ายแห้ง 4 ชนิด  
ในตัวทำละลายที่แตกต่างกัน

(PC = Phosphatidylcholine, PE = Phosphatidylethanolamine)

ตาราง 2-1 แสดงชนิดของสาหร่ายในแต่ละตัวทำละลาย

ที่	Ethyl acetate	ที่	95% ethanol	ที่	Chloroform:Methanol
1	สาหร่ายผักกาดทะเล	5	สาหร่ายลีนมังกกร	9	สาหร่ายผักกาดทะเล
2	สาหร่ายโพรง	6	สาหร่ายโพรง	10	สาหร่ายโพรง
3	สาหร่ายพวงองุ่น	7	สาหร่ายพวงองุ่น	11	สาหร่ายลีนมังกกร
4	สาหร่ายลีนมังกกร	8	สาหร่ายผักกาดทะเล	12	สาหร่ายพวงองุ่น

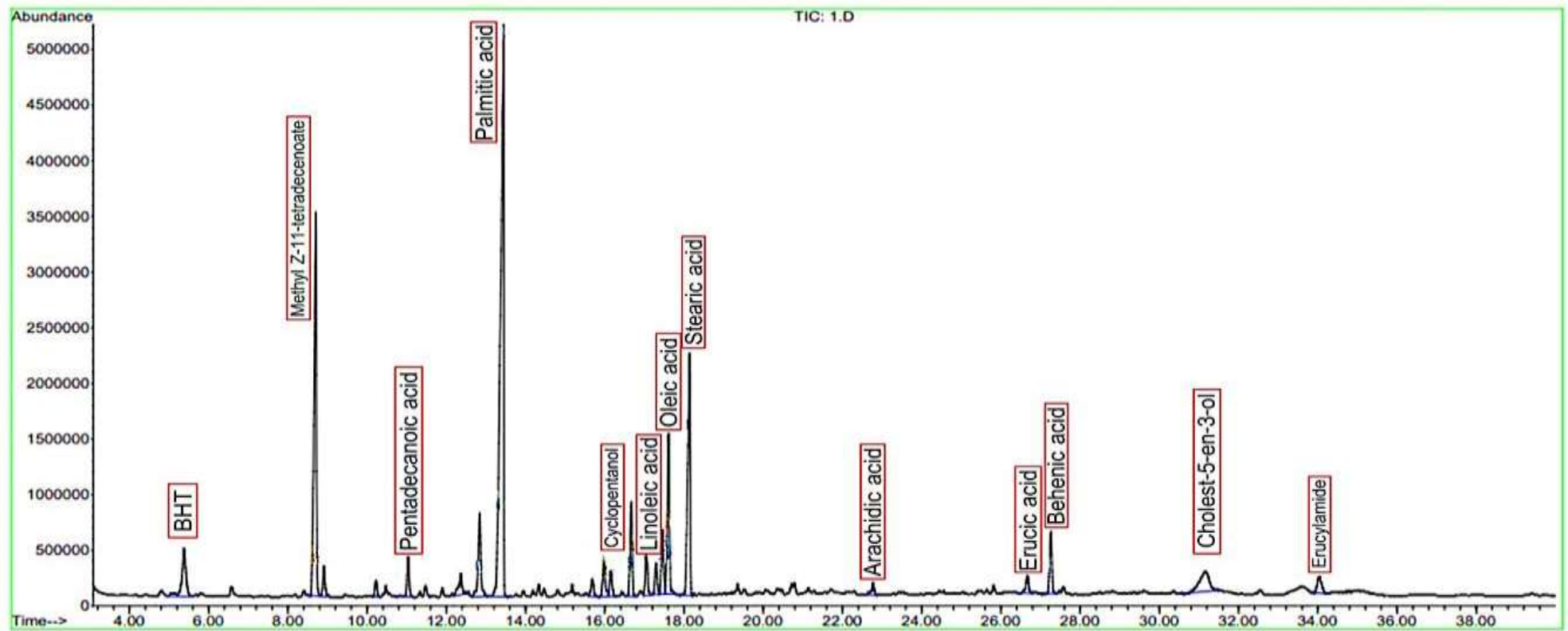
จากผลการทดลองการหาชนิดของไขมันจากสารสกัดสาหร่ายสด 4 ชนิด ในตัวทำละลายที่แตกต่างกัน (ภาพ 2-3) ผลที่ได้ คือ พบ Phosphatidylcholine (PC) และ Phosphatidylethanolamine (PE) ได้มากในสาหร่ายพวงองุ่นและสาหร่ายผักกาดที่สกัดด้วย Chloroform:Methanol เมื่อเทียบกับสาหร่ายชนิดต่าง ๆ



ภาพ 2-3 TLC chromatogram ชนิดของไขมันจากสารสกัดสาหร่ายสด 4 ชนิด ในตัวทำละลายที่แตกต่างกัน (PC = Phosphatidylcholine, PE = Phosphatidylethanolamine)

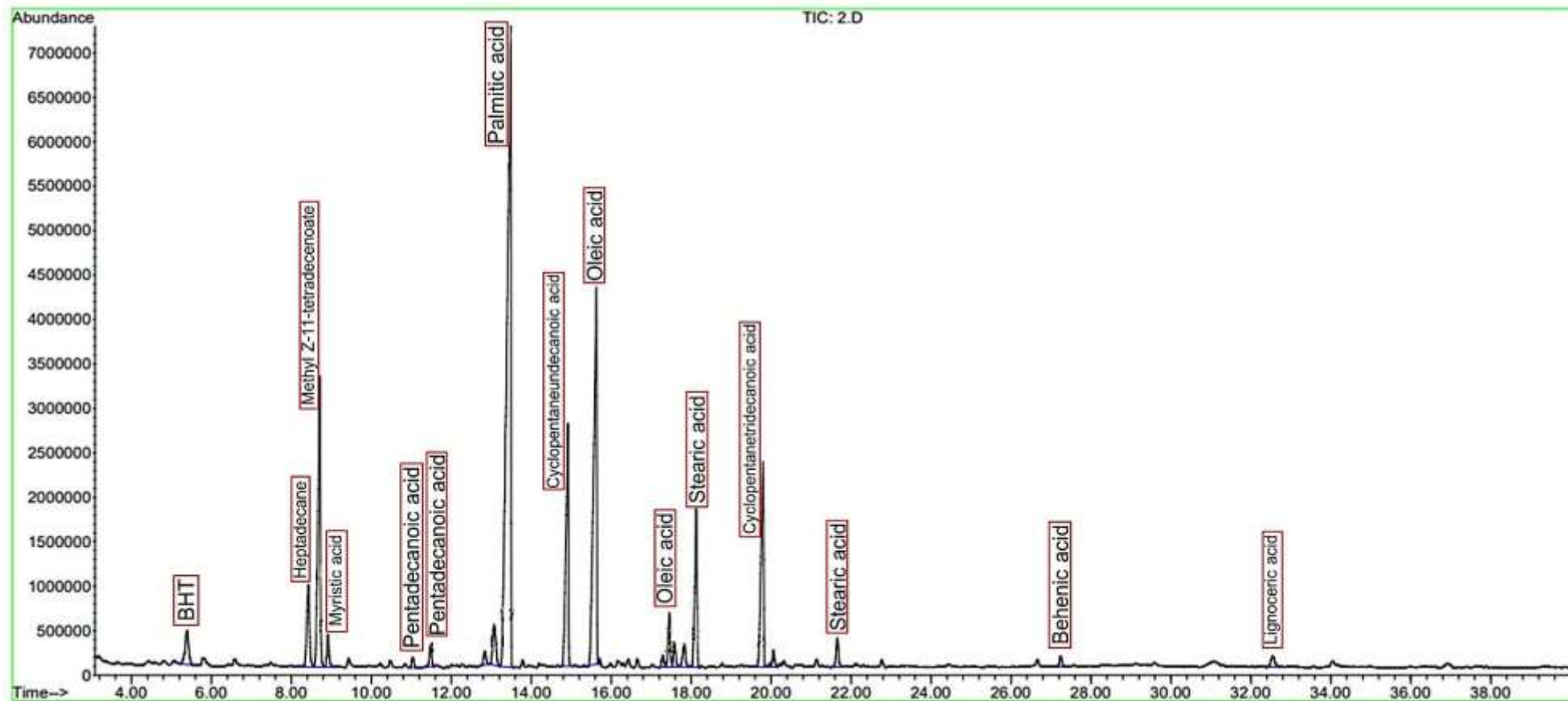
## 2.4.2 การวิเคราะห์กรดไขมันโดยเทคนิคโครมาโทกราฟีแบบแก๊ส-แมสสเปกโตรเมตรี (Gas chromatography-mass spectrometry, GC-MS)

จากการนำสารละลายสกัดหยาบที่สกัดด้วย Ethyl acetate ไปวิเคราะห์ด้วย GC-MS พบกรดไขมันและอนุพันธ์อื่น ๆ ได้แก่ BHT, Methyl Z-11-tetradecenoate, Pentadecanoic acid, Palmitic acid, Cyclopentanol, Linoleic acid, Oleic acid, Stearic acid, Arachidic acid, Erucic acid, Behenic acid, Cholest-5-en-3-ol และ Erucylamide เป็นต้น



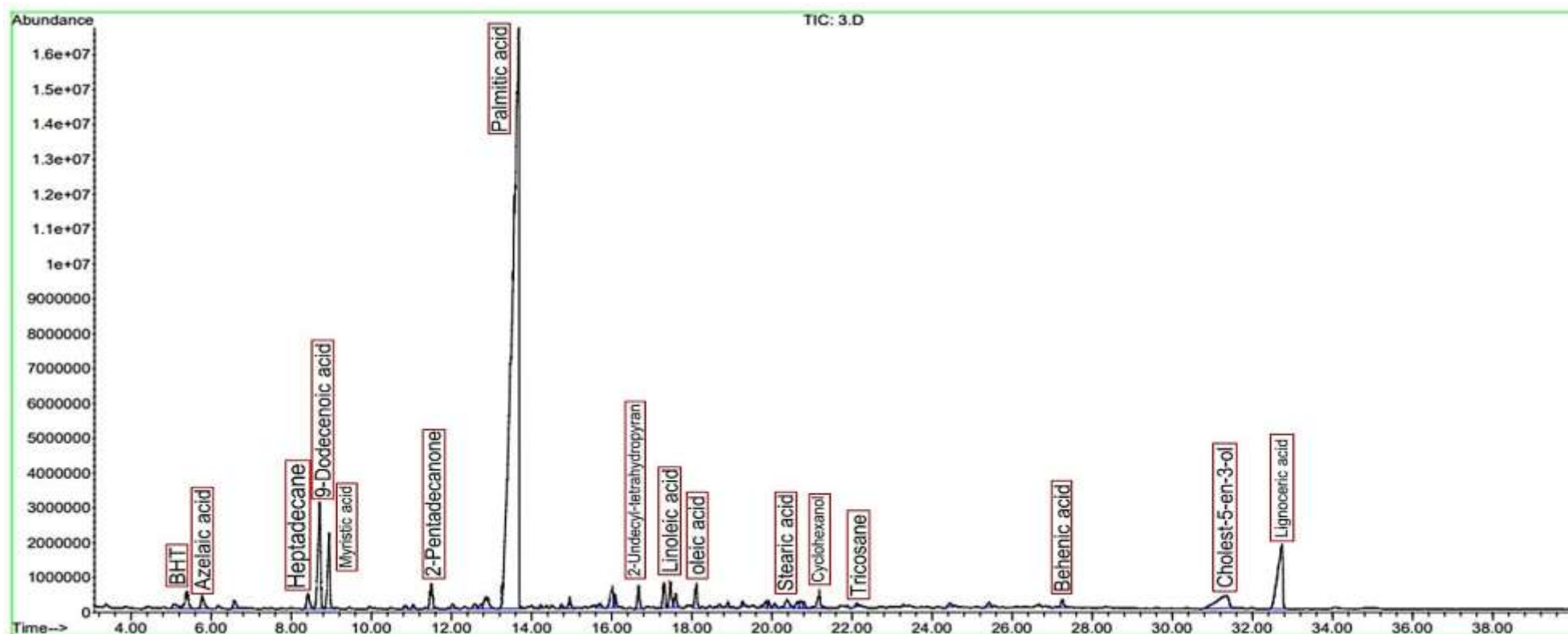
ภาพ 2-4 แสดงชนิดของกรดไขมันและอนุพันธ์อื่น ๆ ที่ได้จากสารสกัดสำหรับสกัดหยาบด้วย Ethyl acetate

จากการนำสารห่วยโพร่งที่สกัดด้วย Ethyl acetate ไปวิเคราะห์ด้วย GC-MS พบกรดไขมันและอนุพันธ์อื่น ๆ ได้แก่ BHT, Heptadecane, Methyl Z-11-tetradecenoate, Myristic acid, Pentadecanoic acid, Palmitic acid, Cyclopentaneundecanoic acid, Oleic acid, Stearic acid, Arachidic acid, Behenic acid และ Lignoceric acid เป็นต้น



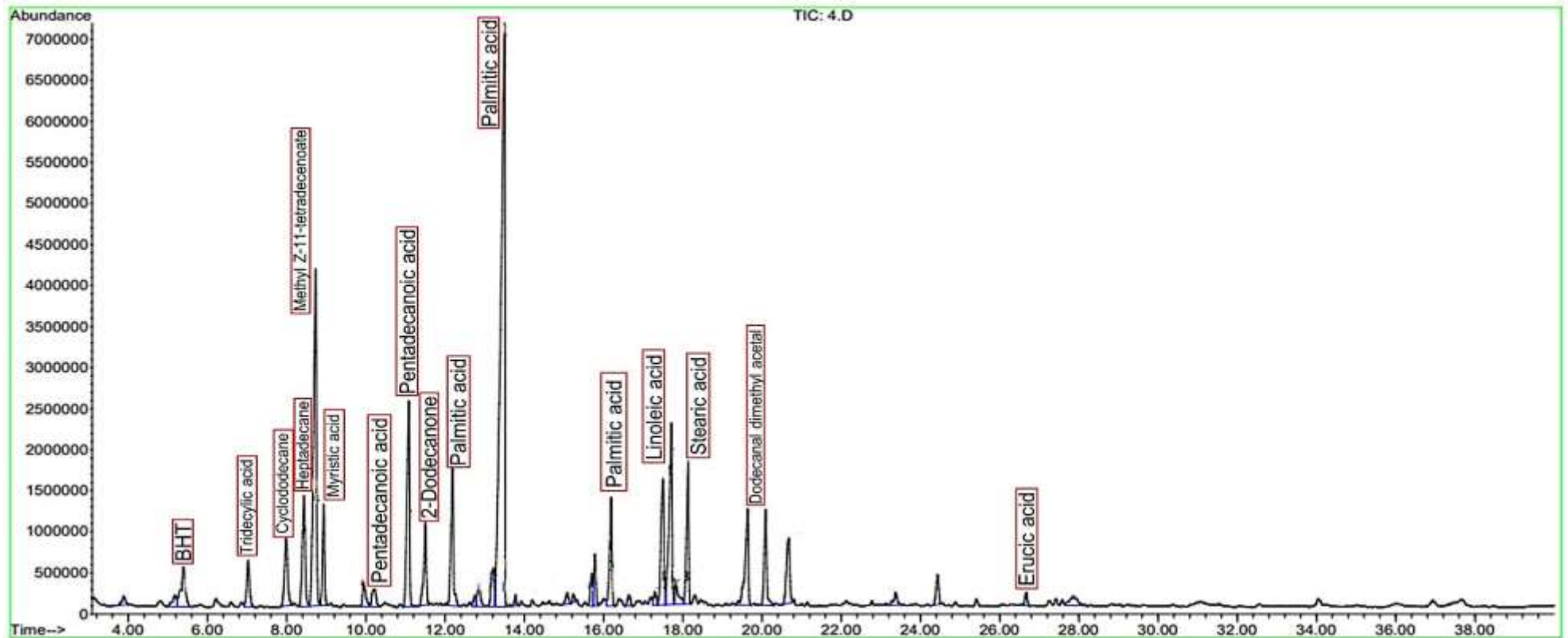
ภาพ 2-5 แสดงชนิดของกรดไขมันและอนุพันธ์อื่น ๆ ที่ได้จากการสกัดสารห่วยโพร่งด้วย Ethyl acetate

จากการนำสารห่วยางอูุ่่นที่สกัดด้วย Ethyl acetate ไปวิเคราะห์ด้วย GC-MS พบกรดไขมันและอนุพันธ์อื่น ๆ ได้แก่ BHT, Azelaic acid, Heptadecane, 9-Dodecenoic acid, Myristic acid, 2-Pentadecanone, Palmitic acid, 2-Undecyl-tetrahydropyran, Linoleic acid, Oleic acid, Stearic acid, Cyclohexanol, Tricosane, Behenic acid, Cholest-5-en-3-ol และ Lignoceric acid เป็นต้น



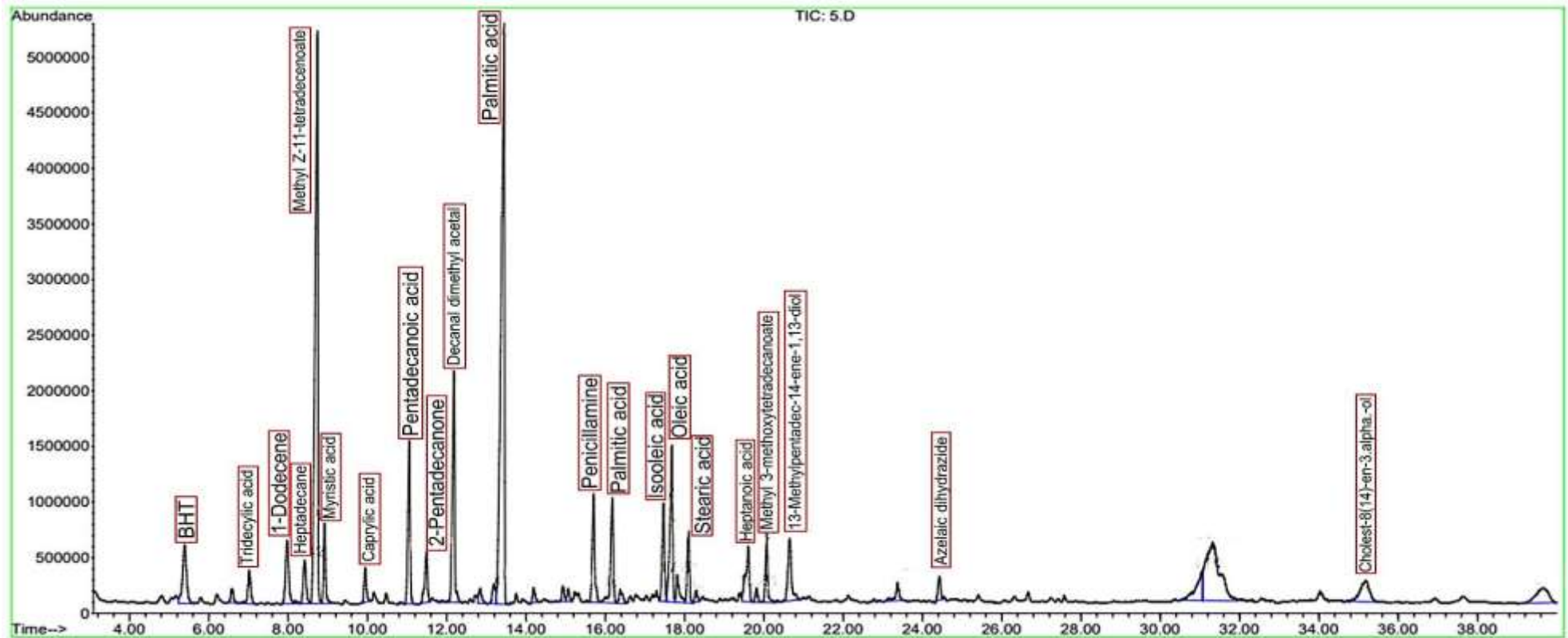
ภาพ 2-6 แสดงชนิดของกรดไขมันและอนุพันธ์อื่น ๆ ที่ได้จากสารสกัดสาหร่ายพวงอูุ่่นด้วย Ethyl acetate

จากการนำสารห่วยล้นมังกรที่สกัดด้วย Ethyl acetate ไปวิเคราะห์ด้วย GC-MS พบกรดไขมันและอนุพันธ์อื่น ๆ ได้แก่ BHT, Tridecylic acid, Cyclododecane, Heptadecane, Methyl Z-11-tetradecenoate, Myristic acid, Pentadecanoic acid, Palmitic acid, Linoleic acid, Stearic acid, Dodecanal dimethyl acetal และ Erucic acid เป็นต้น



ภาพ 2-7 แสดงชนิดของกรดไขมันและอนุพันธ์อื่น ๆ ที่ได้จากการสกัดสารห่วยล้นมังกรด้วย Ethyl acetate

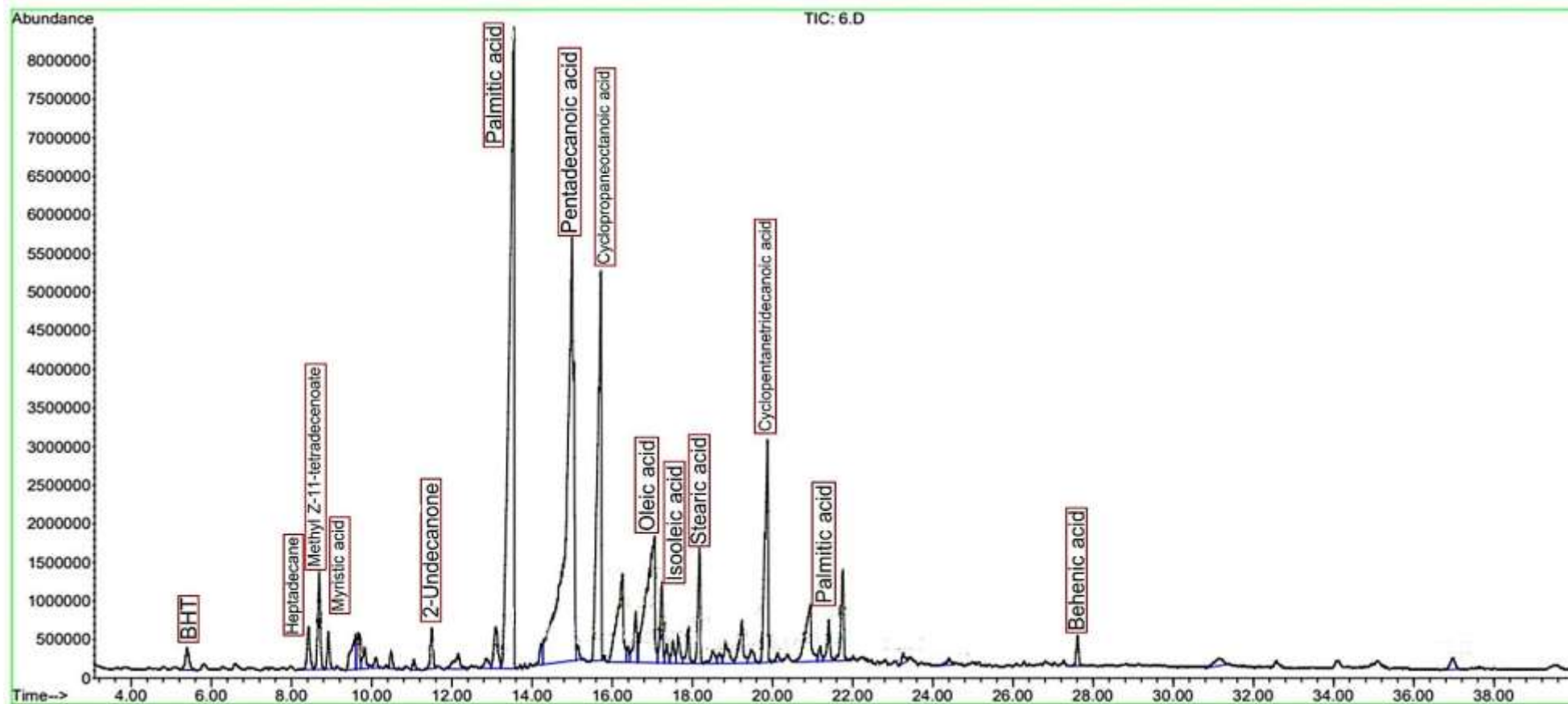
จากการนำสารห่วยล้นมังกรที่สกัดด้วย 95% ethanol ไปวิเคราะห์ด้วย GC-MS พบกรดไขมันและอนุพันธ์อื่น ๆ ได้แก่ BHT, Tridecylic acid, 1-Dodecene, Heptadecane, Methyl Z-11-tetradecenoate, Myristic acid, Caprylic acid, Pentadecanoic acid, 2-Pentadecanone, Decanal dimethyl acetal, Palmitic acid, Penicillamine, Isoleic acid, Oleic acid, Stearic acid, Heptanoic acid, Methyl 3-methoxytetradecanoate, 13-Methylpentadec-14-ene-1,13-diol, Azelaic acid และ Cholest-8(14)-en-3.alpha.-ol เป็นต้น



ภาพ 2-8 แสดงชนิดของกรดไขมันและอนุพันธ์อื่น ๆ ที่ได้จากการสกัดสารห่วยล้นมังกรด้วย 95% ethanol

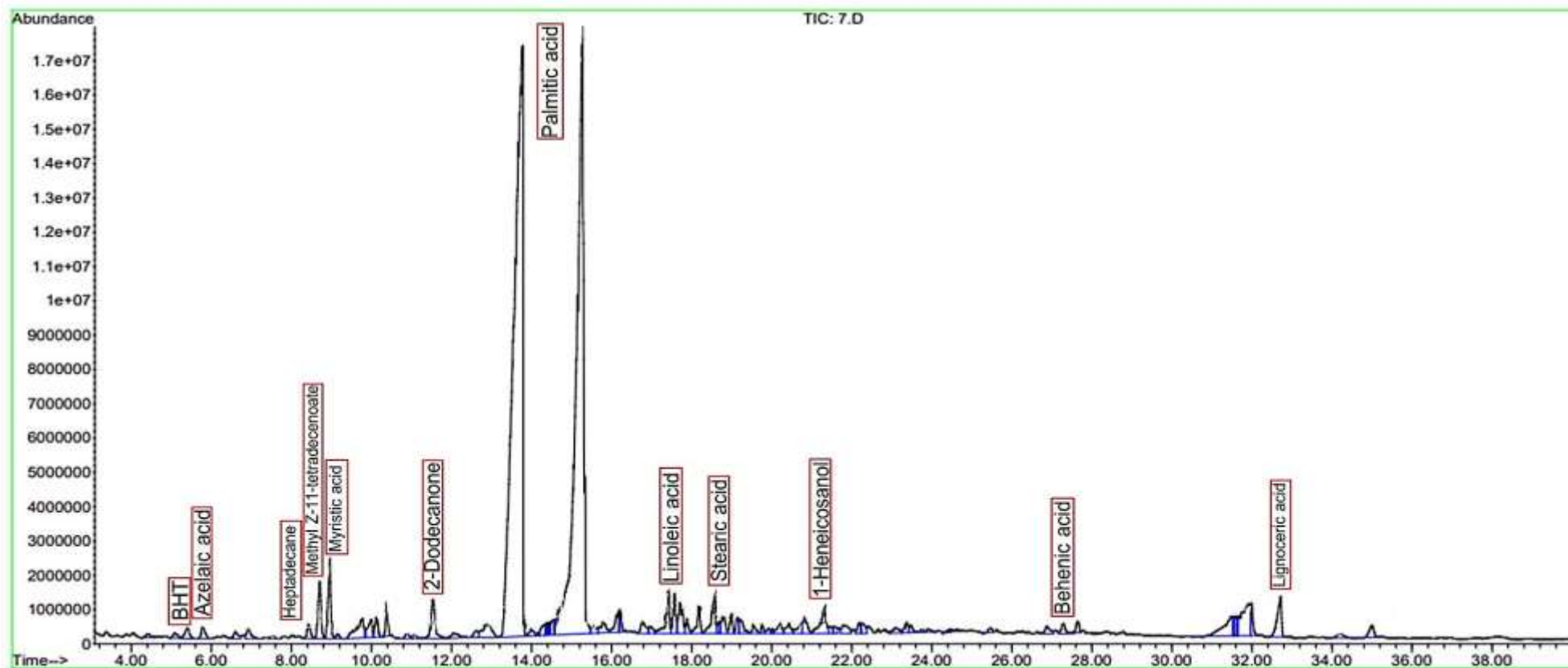


จากการนำสารห่วยโปรงที่สกัดด้วย 95% ethanol ไปวิเคราะห์ด้วย GC-MS พบกรดไขมันและอนุพันธ์อื่น ๆ ได้แก่ BHT, Heptadecane, Methyl Z-11-tetradecenoate, Myristic acid, Pentadecanoic acid, 2-Undecanone, Palmitic acid, Cyclopropaneoclanoic acid, Oleic acid, Isoleic acid, Stearic acid, Cyclopentanetridecanoic acid และ Behenic acid เป็นต้น



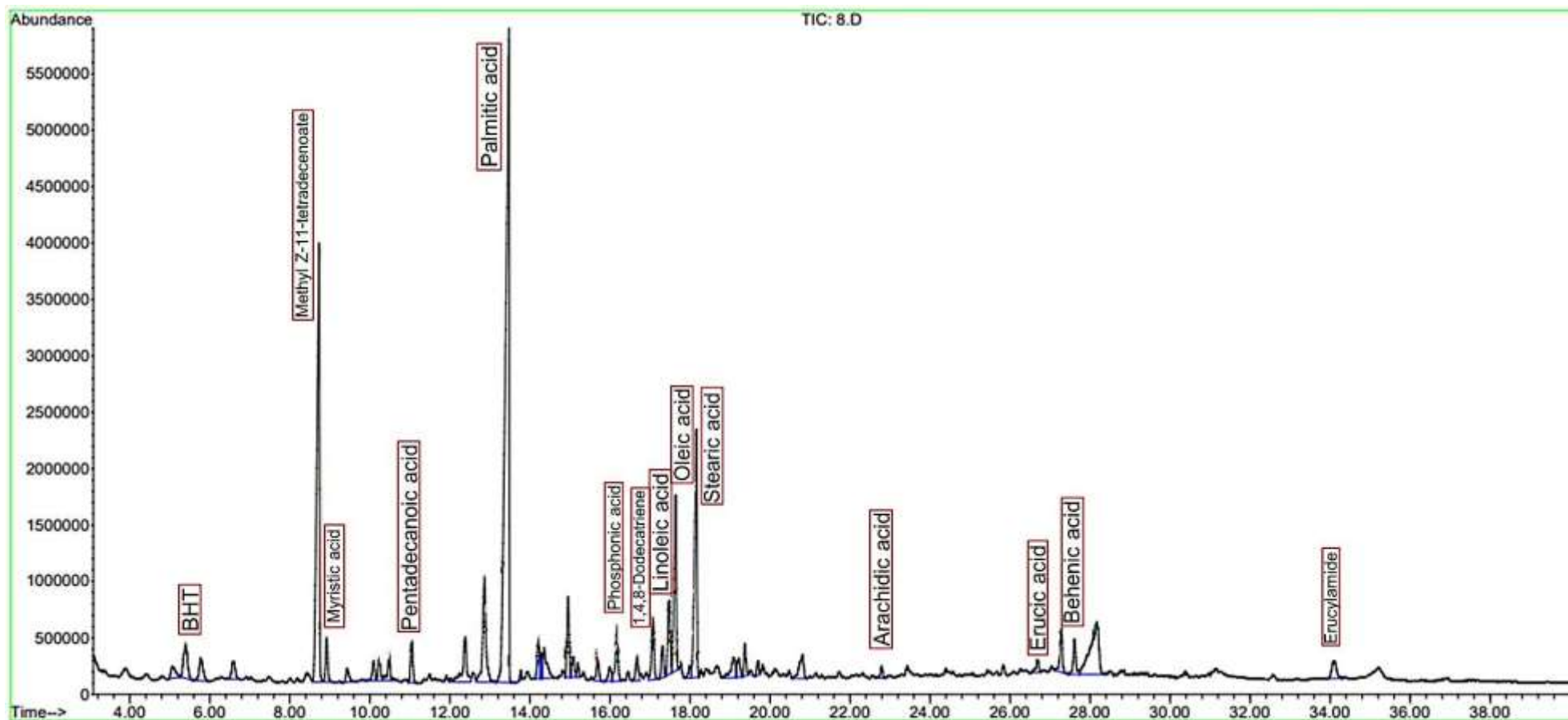
ภาพ 2-9 แสดงชนิดของกรดไขมันและอนุพันธ์อื่น ๆ ที่ได้จากสารสกัดสาหร่ายโปรงด้วย 95% ethanol

จากการนำสารห่วยพวงงุ่นที่สกัดด้วย 95% ethanol ไปวิเคราะห์ด้วย GC-MS พบกรดไขมันและอนุพันธ์อื่น ๆ ได้แก่ BHT, Azelaic acid, Heptadecane, Methyl Z-11-tetradecenoate, Myristic acid, 2-Dodecanone, Palmitic acid, Linoleic acid, Stearic acid, 1-Heneicosanol, Behenic acid และ Lignoceric acid เป็นต้น



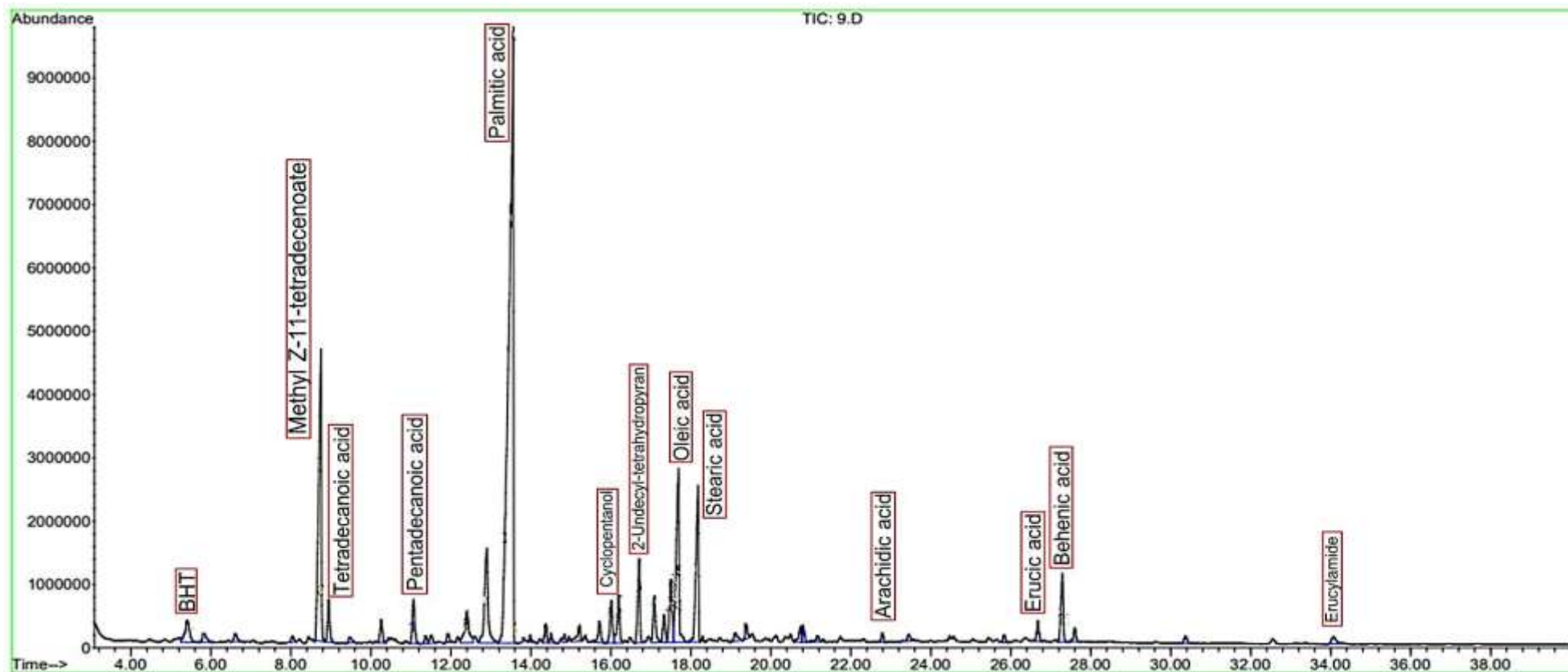
ภาพ 2-10 แสดงชนิดของกรดไขมันและอนุพันธ์อื่น ๆ ที่ได้จากสารสกัดสาหร่ายพวงงุ่นด้วย 95% ethanol

จากการนำสารห่วยผักกาดทะเลที่สกัดด้วย 95% ethanol ไปวิเคราะห์ด้วย GC-MS พบกรดไขมันและอนุพันธ์อื่น ๆ ได้แก่ BHT, Methyl Z-11-tetradecenoate, Myristic acid, Pentadecanoic acid, Palmitic acid, Phosphonic acid, 1,4,8-Dodecatriene, Linoleic acid, Oleic acid, Stearic acid, Arachidic acid, Erucic acid, Behenic acid และ Erucylamide เป็นต้น



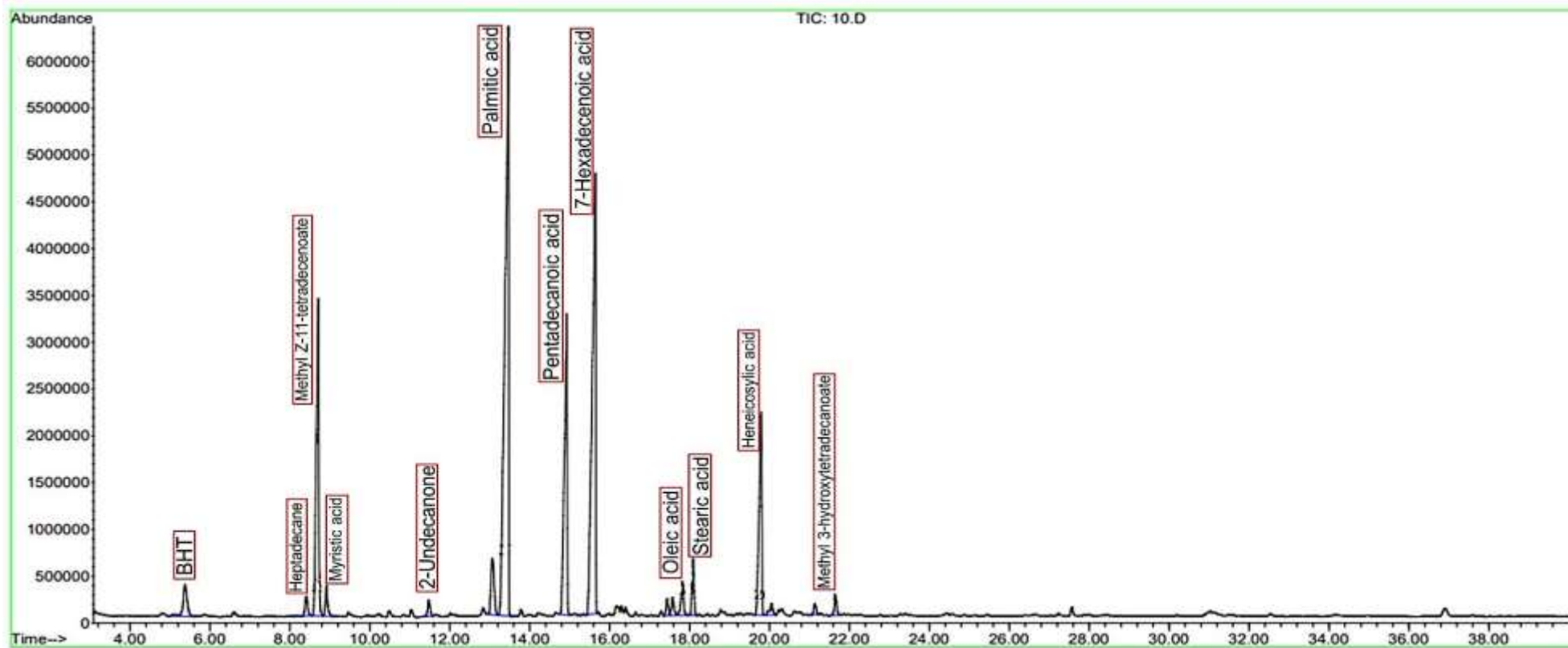
ภาพ 2-11 แสดงชนิดของกรดไขมันและอนุพันธ์อื่น ๆ ที่ได้จากการสกัดสารห่วยผักกาดทะเลด้วย 95% ethanol

จากการนำสารห่วยผักกาดทะเลที่สกัดด้วย Chloroform:Methanol ไปวิเคราะห์ด้วย GC-MS พบกรดไขมันและอนุพันธ์อื่น ๆ ได้แก่ BHT, Methyl Z-11-tetradecenoate, Tetradecanoic acid, Pentadecanoic acid, Palmitic acid, Cyclopentanol, 2-Undecyl-tetrahydropyran, Oleic acid, Stearic acid, Arachidic acid, Erucic acid, Behenic acid และ Erucylamide เป็นต้น



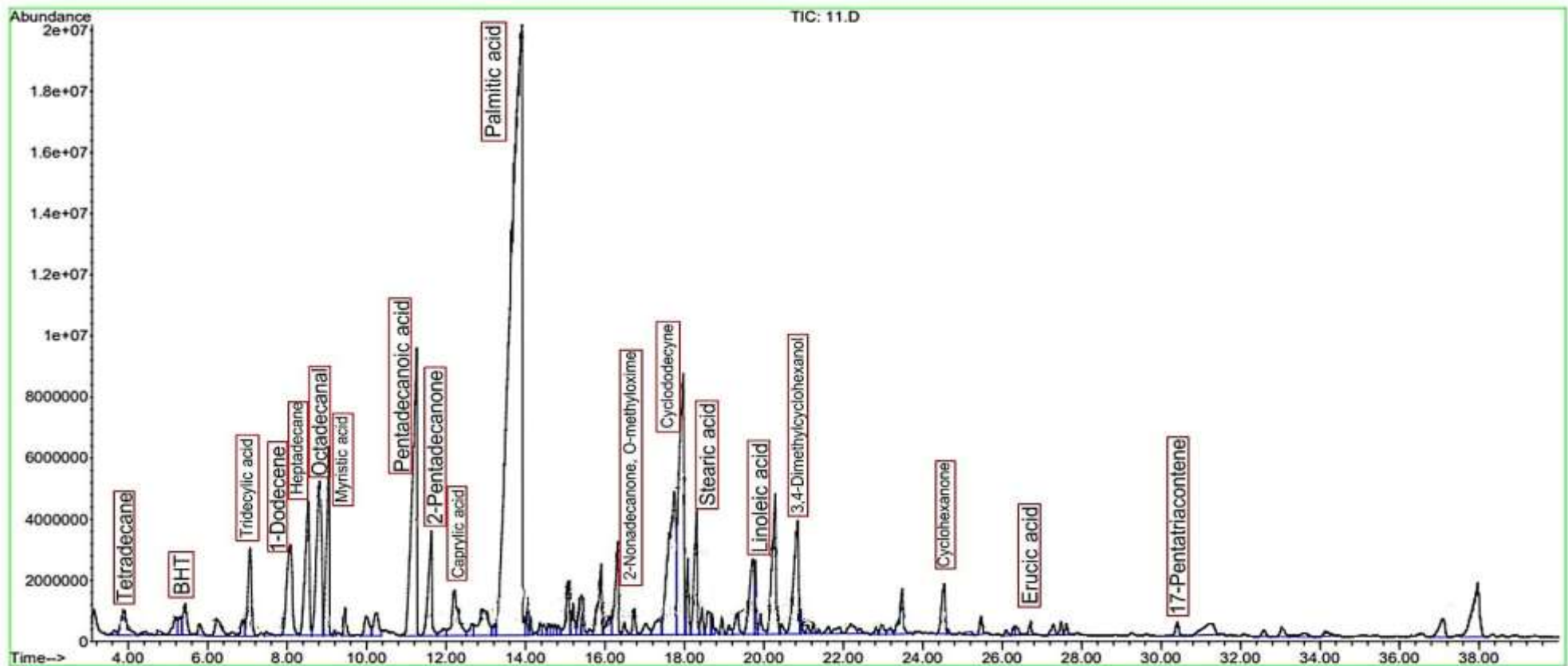
ภาพ 2-12 แสดงชนิดของกรดไขมันและอนุพันธ์อื่น ๆ ที่ได้จากการสกัดสารห่วยผักกาดทะเลด้วย Chloroform:Methanol

จากการนำสารห่วยโพรงที่สกัดด้วย Chloroform:Methanol ไปวิเคราะห์ด้วย GC-MS พบกรดไขมันและอนุพันธ์อื่น ๆ ได้แก่ BHT, Heptadecane, Methyl Z-11-tetradecenoate, Myristic acid, 2-Undecanone, Palmitic acid, Pentadecanoic acid, 7-Hexadecnoic acid, Oleic acid, Stearic acid, Heneicosylic acid และ Methyl 3-hydroxytetradecanoate เป็นต้น



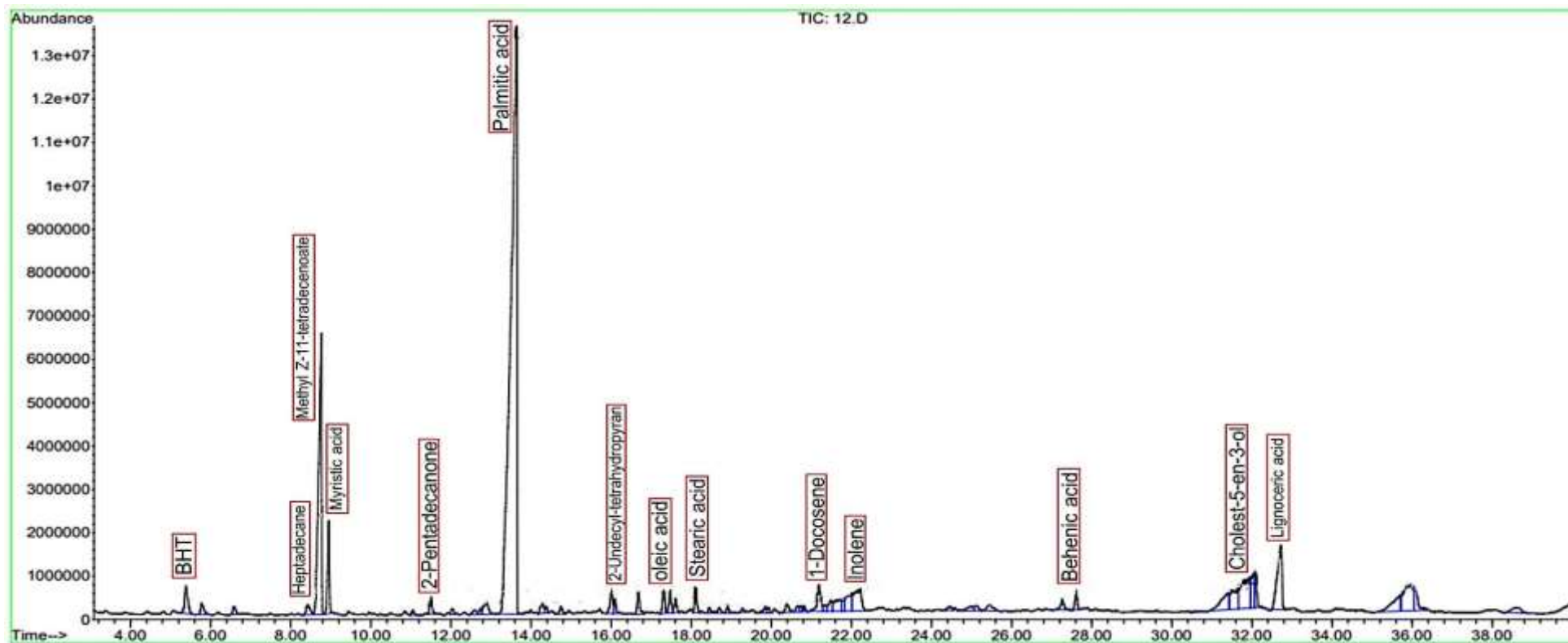
ภาพ 2-13 แสดงชนิดของกรดไขมันและอนุพันธ์อื่น ๆ ที่ได้จากสารสกัดสาหร่ายโพรงด้วย Chloroform:Methanol

จากการนำสารห่วยล้นมังกรที่สกัดด้วย Chloroform:Methanol ไปวิเคราะห์ด้วย GC-MS พบกรดไขมันและอนุพันธ์อื่น ๆ ได้แก่ Tetradecane, BHT, Tridecyllic acid, 1-Dodecene, Heptadecane, Octadecanal, Myristic acid, Pentadecanoic acid, 2-Pentadecanone, Caprylic acid, Palmitic acid, 2-Nonadecanone, O-methyloxime, Cyclododecyne, Stearic acid, Linoleic acid, 3,4-Dimethylcyclohexanol, Cyclohexanone, Erucic acid และ 17-Pentatriacontene เป็นต้น



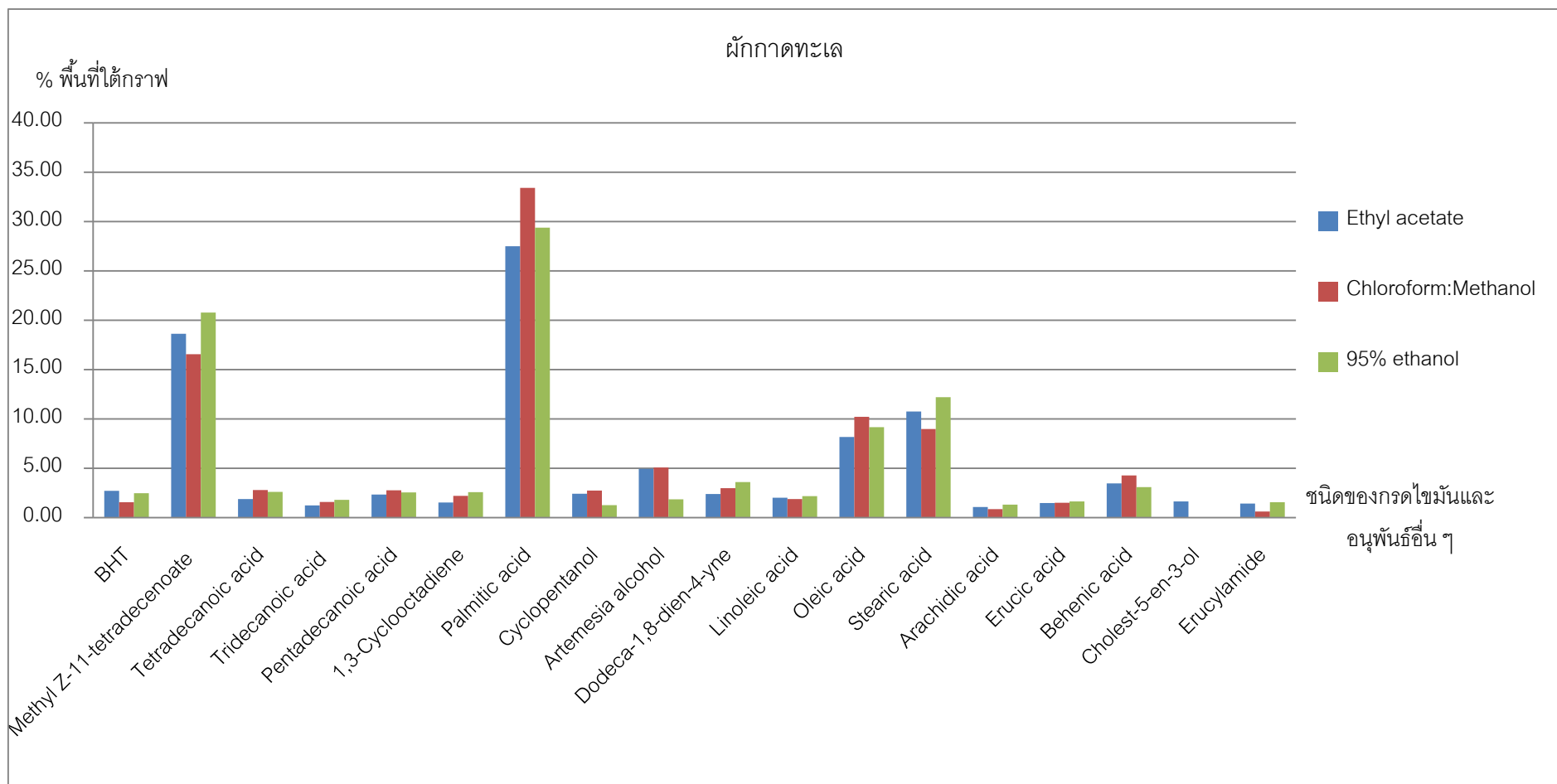
ภาพ 2-14 แสดงชนิดของกรดไขมันและอนุพันธ์อื่น ๆ ที่ได้จากการสกัดสำหรับห่วยล้นมังกรด้วย Chloroform:Methanol

จากการนำสารห่วยพวงอุ้งนที่สกัดด้วย Chloroform:Methanol ไปวิเคราะห์ด้วย GC-MS พบกรดไขมันและอนุพันธ์อื่น ๆ ได้แก่ BHT, Heptadecane, Methyl Z-11-tetradecenoate, Myristic acid, 2-Pentadecanone, Palmitic acid, 2-Undecyl-tetrahydropyran, Oleic acid, Stearic acid, 1-Docosene, Inolene, Behenic acid, Cholest-5-en-3-ol และ Lignoceric acid เป็นต้น



ภาพ 2-15 แสดงชนิดของกรดไขมันและอนุพันธ์อื่น ๆ ที่ได้จากสารสกัดสำหรับพวงอุ้งนด้วย Chloroform:Methanol

### 2.4.3 ร้อยละของกรดไขมันและอนุพันธ์อื่น ๆ

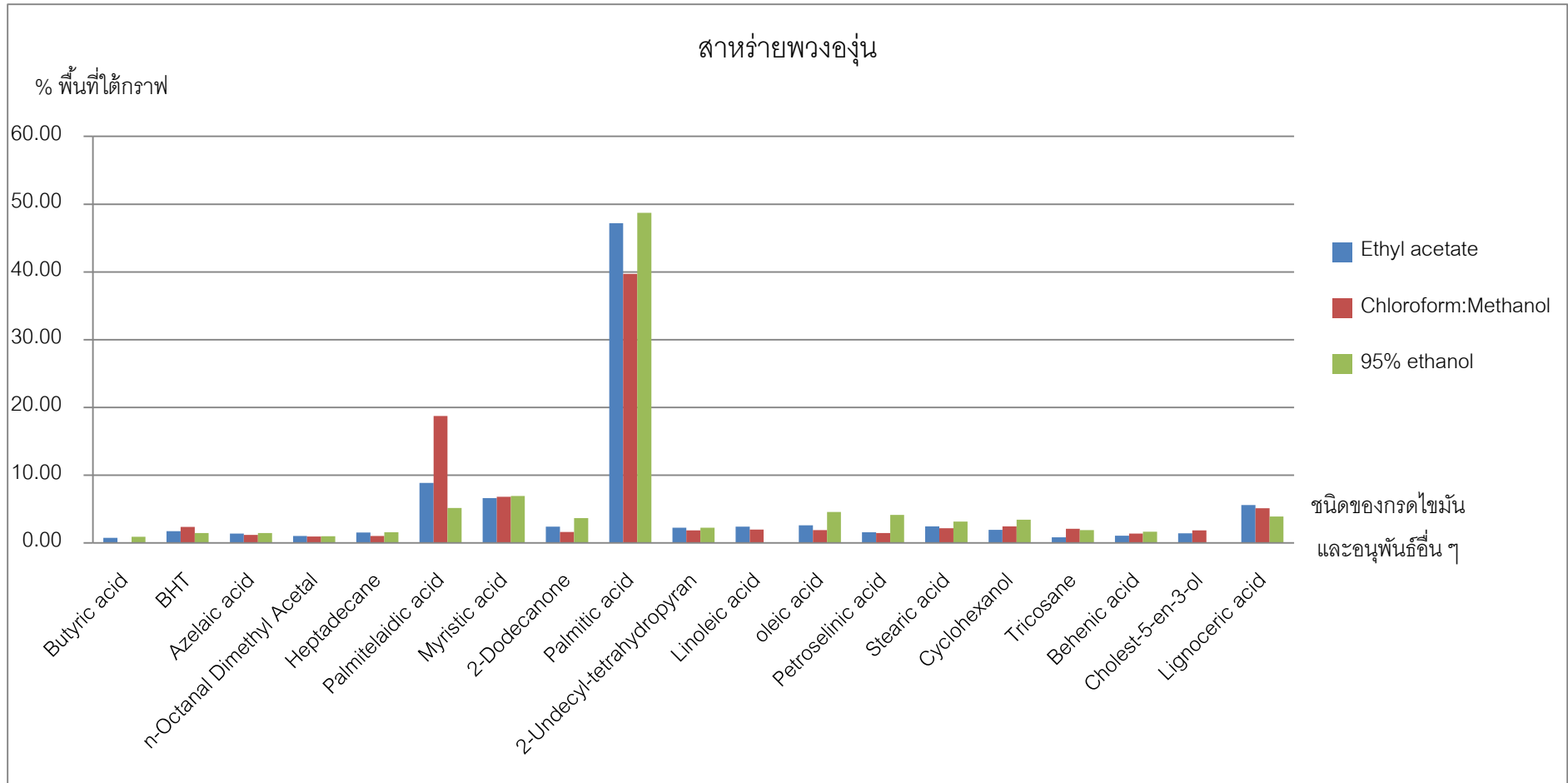


ภาพ 2-16 แสดงร้อยละของกรดไขมันและอนุพันธ์อื่น ๆ ต่อปริมาณของกรดไขมันทั้งหมดที่ได้จากสารสกัดสาหร่ายผักกาดทะเลในตัวทำละลายที่แตกต่างกัน



ตาราง 2-2 แสดงพื้นที่ใต้กราฟแต่ละเวลาของกรดไขมันแต่ละชนิดและอนุพันธ์อื่น ๆ ของสาหร่ายฝักกาดทะเลในตัวอย่างที่ละลายที่แตกต่างกัน

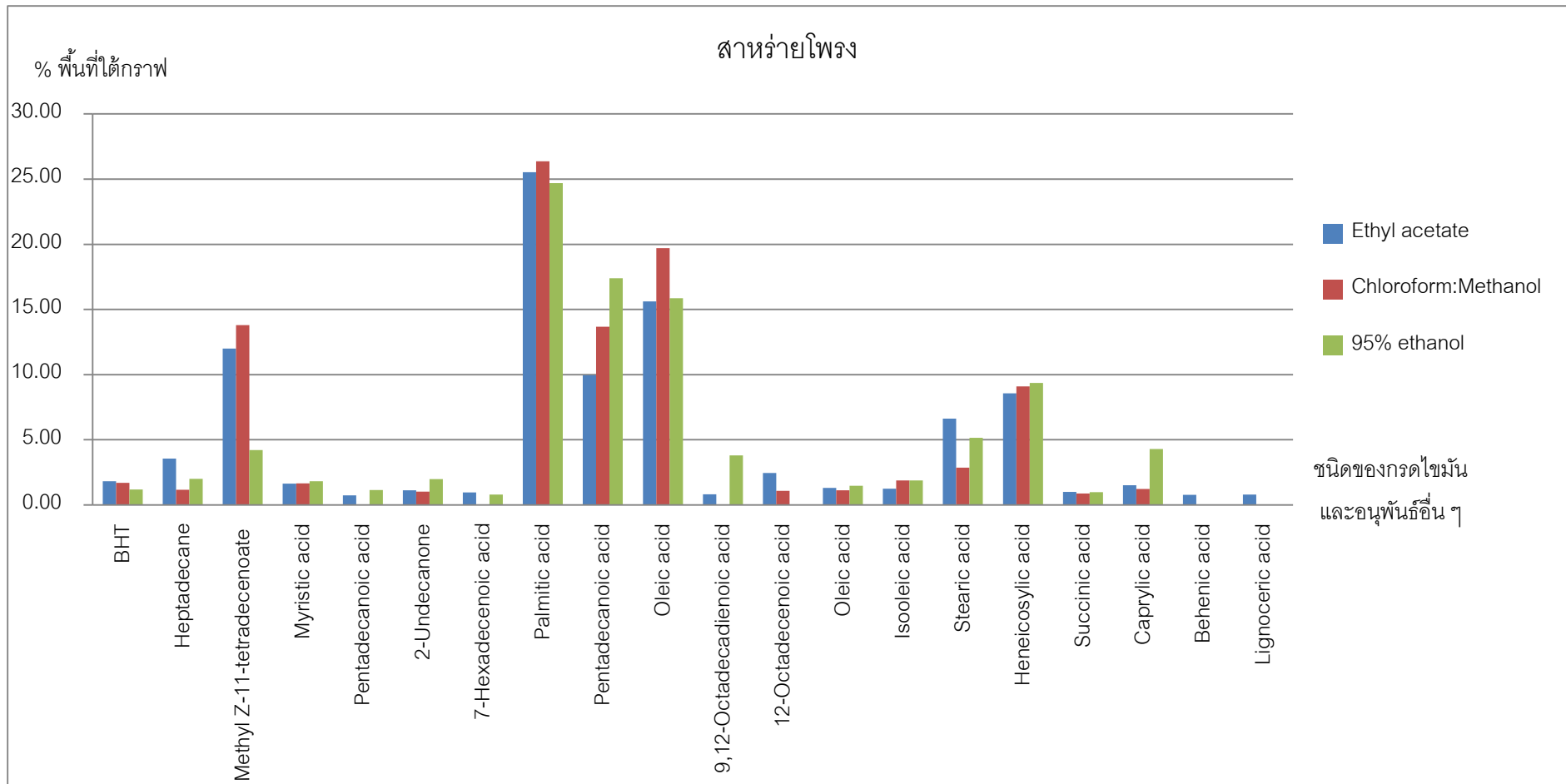
ชนิดของกรดไขมัน และอนุพันธ์อื่น ๆ	เวลา	Ethyl acetate	Chloroform:Methanol	95% ethanol
BHT	5.38	516976	433681	477534
Methyl Z-11-tetradecenoate	8.706	3540905	4584070	4005650
Tetradecanoic acid	8.91	358467	773189	503965
Tridecanoic acid	10.228	232982	439863	344691
Pentadecanoic acid	11.035	444418	767813	489262
1,3-Cyclooctadiene	12.362	291304	610067	495644
Palmitic acid	13.442	5226021	9259715	5660860
Cyclopentanol	15.985	456714	758075	240856
Artemesia alcohol	16.67	941190	1408426	355957
Dodeca-1,8-dien-4-yne	17.054	451887	826638	694056
Linoleic acid	17.297	384478	519635	421319
Oleic acid	17.613	1554228	2827049	1768613
Stearic acid	18.138	2043771	2490216	2351024
Arachidic acid	22.772	203315	237974	250956
Erucic acid	26.667	281999	417522	315148
Behenic acid	27.265	658468	1181415	594205
Cholest-5-en-3-ol	31.15	313420	0	0
Erucylamide	34.043	270897	173602	302329



ภาพ 2-17 แสดงร้อยละของกรดไขมันและอนุพันธ์อื่น ๆ ต่อปริมาณของกรดไขมันทั้งหมดที่ได้จากสารสกัดสาหร่ายพวงองุ่นในตัวทำละลายที่แตกต่างกัน

ตาราง 2-3 แสดงพื้นที่ใต้กราฟแต่ละเวลาของกรดไขมันแต่ละชนิดและอนุพันธ์อื่น ๆ ของสาหร่ายพวงองุ่น  
ในตัวทำละลายที่แตกต่างกัน

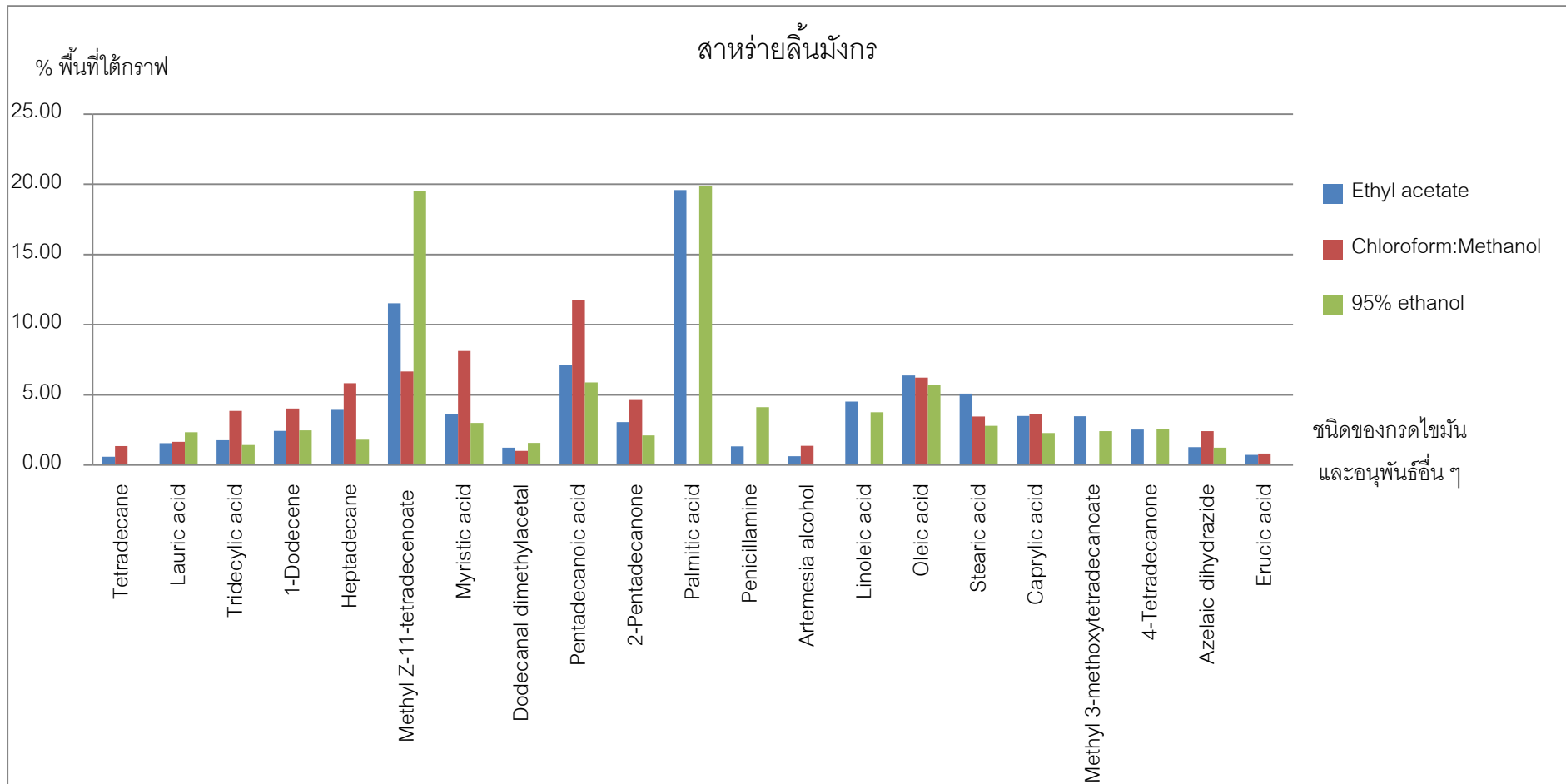
ชนิดของกรดไขมัน และอนุพันธ์อื่น ๆ	เวลา	Ethyl acetate	Chloroform:Methanol	95% ethanol
Butyric acid	5.083	256724	0	315920
BHT	5.39	601559	797786	518791
Azelaic acid	5.774	481467	392998	517292
<i>n</i> -Octanal Dimethyl Acetal	6.581	350434	316306	356722
Heptadecane	8.419	526646	348075	557182
Palmitelaidic acid	8.716	3062526	6303906	1833121
Myristic acid	8.944	2283635	2286800	2464263
2-Dodecanone	11.497	833040	549770	1299127
Palmitic acid	13.675	16322428	13370562	17323678
2-Undecyl-tetrahydropyran	16.675	773702	623696	803946
Linoleic acid	17.317	825180	657188	0
oleic acid	17.468	896075	641978	1617250
Petroselinic acid	17.599	538052	491875	1471330
Stearic acid	18.109	849130	730152	1114640
Cyclohexanol	21.173	672609	816055	1218152
Tricosane	22.13	284221	707609	678051
Behenic acid	27.255	374025	467259	586783
Cholest-5-en-3-ol	31.34	485552	619590	0
Lignoceric acid	32.735	1929647	1716537	1387078



ภาพ 2-18 แสดงร้อยละของกรดไขมันและอนุพันธ์อื่น ๆ ต่อปริมาณของกรดไขมันทั้งหมดที่ได้จากสารสกัดสำหรับรายโพรงในตัวทำละลายที่แตกต่างกัน

ตาราง 2-4 แสดงพื้นที่ใต้กราฟแต่ละเวลาของกรดไขมันแต่ละชนิดและอนุพันธ์อื่น ๆ ของสาหร่ายโพรงใน  
ตัวทำละลายที่แตกต่างกัน

ชนิดของกรดไขมัน และอนุพันธ์อื่น ๆ	เวลา	Ethyl acetate	Chloroform:Methanol	95% ethanol
BHT	5.385	509913	409342	386659
Heptadecane	8.429	1000524	283296	655882
Methyl Z-11-tetradecenoate	8.711	3365525	3335961	1380121
Myristic acid	8.915	459263	399140	593675
Pentadecanoic acid	11.035	206161	0	377384
2-Undecanone	11.482	314029	246784	650479
7-Hexadecenoic acid	12.839	266898	0	260621
Palmitic acid	13.485	7166506	6376138	8105188
Pentadecanoic acid	14.915	2793274	3306236	5712764
Oleic acid	15.625	4384235	4764111	5206465
9,12-Octadecadienoic acid	17.292	226288	0	1247781
12-Octadecenoic acid	17.458	688118	261985	0
Oleic acid	17.589	366042	270616	481552
Isooleic acid	17.827	349036	456698	618773
Stearic acid	18.129	1857559	693946	1689786
Heneicosylic acid	19.796	2402076	2197624	3070336
Succinic acid	20.059	280700	213190	320349
Caprylic acid	21.659	424750	296303	1411154
Behenic acid	27.245	216940	0	0
Lignoceric acid	32.555	222397	0	0



ภาพ 2-19 แสดงร้อยละของกรดไขมันและอนุพันธ์อื่น ๆ ต่อปริมาณของกรดไขมันทั้งหมดที่ได้จากสารสกัดสาหร่ายลินินมังกรในตัวทำละลายที่แตกต่างกัน

ตาราง 2-5 แสดงพื้นที่ใต้กราฟแต่ละเวลาของกรดไขมันแต่ละชนิดและอนุพันธ์อื่น ๆ ของสารร่ายลีนมังกร  
ในตัวทำละลายที่แตกต่างกัน

ชนิดของกรดไขมัน และอนุพันธ์อื่น ๆ	เวลา	Ethyl acetate	Chloroform:Methanol	95% ethanol
Tetradecane	3.882	216132	1062114	0
Lauric acid	5.399	569340	1302654	616451
Tridecyl acid	7.028	648010	3040582	378437
1-Dodecene	7.986	893309	3180093	652884
Heptadecane	8.438	1435901	4601145	478181
Methyl Z-11-tetradecenoate	8.73	4214857	5253773	5149314
Myristic acid	8.934	1335284	6402851	793963
Dodecanal dimethylacetal	9.95	451081	799837	416293
Pentadecanoic acid	11.083	2601168	9278271	1554241
2-Pentadecanone	11.506	1120357	3650009	556014
Palmitic acid	13.5	7168417	0	5248370
Penicillamine	15.702	491380	0	1087075
Artemesia alcohol	16.651	232698	1075049	0
Linoleic acid	17.497	1656221	0	992154
Oleic acid	17.711	2333862	4908942	1511944
Stearic acid	18.134	1865860	2718892	736900
Caprylic acid	19.641	1279447	2850253	602227
Methyl 3- methoxytetradecanoate	20.093	1272164	0	638270
4-Tetradecanone	20.676	923600	0	680703
Azelaic dihydrazide	24.435	466096	1897349	327742
Erucic acid	26.672	263674	647690	0

## บทที่ 3

### อภิปราย สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

#### 3.1 อภิปรายผลการวิจัย

จากการศึกษาเปรียบเทียบ ชนิดและปริมาณของไขมันจากตัวอย่างสารสกัดสาหร่ายสีเขียว (สาหร่ายผักกาดทะเล และสาหร่ายพวงองุ่น) และสาหร่ายสีแดง (สาหร่ายโพรง และสาหร่ายลีนมังกร) ที่มีทั้งแบบสดและแห้ง ในตัวทำละลาย Ethyl acetate, 95% ethanol และ Chloroform:Methanol พบว่า ในสารสกัดสาหร่ายแห้ง พบไขมันชนิด Phosphatidylcholine (PC) และ Phosphatidylethanolamine (PE) อยู่มากในสาหร่ายพวงองุ่นที่สกัดใน 95% ethanol สาหร่ายลีนมังกรและสาหร่ายผักกาดที่สกัดด้วย Chloroform:Methanol และในสารสกัดสาหร่ายสด พบมากในสาหร่ายพวงองุ่นและสาหร่ายผักกาดทะเล ที่สกัดใน Chloroform:Methanol เนื่องจากพบไขมันในตัวอย่งสารสกัดสาหร่ายแห้งมากกว่าสาหร่ายสด นั้น อาจจะมาจกสาหร่ายแห้งมีองค์ประกอบของสารที่แตกต่างจากสาหร่ายสดและไม่มีน้ำเป็นองค์ประกอบรวมเหมือนสาหร่ายสด เพราะน้ำอาจจะไปเจือจางสารในขั้นตอนการสกัด

นอกจากนี้การศึกษาเปรียบเทียบชนิดของกรดไขมัน และอนุพันธ์อื่น ๆ จากตัวอย่างสารสกัดสาหร่ายสีเขียวและสาหร่ายสีแดง พบว่า สาหร่ายสีเขียวที่สกัดด้วย Chloroform:Methanol พบ C14:0, C16:0, C18:0, C18:1n9, C20:0, C22:0, C22:1n9 และ C24:0 ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Ratana-arporn ที่ศึกษาองค์ประกอบของกรดไขมันในสาหร่ายพวงองุ่น โดยในงานวิจัยนี้จะพบกรดไขมันชนิด C16:0 มากที่สุด และงานวิจัยของ Frikha ที่ศึกษาในสาหร่ายผักกาดทะเล (Ratana-arporn and Chirapart, 2006; Frikha et al., 2011) ส่วนที่สกัดด้วย 95% ethanol พบ C14:0, C15:0, C16:0, C18:0, C18:2n6, C20:0, C22:0, C22:1n9 และ C24:0 และส่วนที่สกัดด้วย Ethyl acetate พบ C14:0, C15:0, C16:0, C18:0, C18:1n9, C18:2n6, C20:0, C22:0, C22:1n9 และ C24:0 ซึ่งสาหร่ายสีเขียวที่สกัดด้วย 95% ethanol และ Ethyl acetate ยังไม่พบการศึกษาในงานวิจัยอื่น ๆ และจากตัวอย่างสาหร่ายสีแดงที่สกัดด้วย Chloroform:Methanol พบ C8:0, C13:0, C14:0, C15:0, C16:0, C18:0, C18:1n9, C18:2n6, C21:0 และ C22:1n9 ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ McCauley ที่ศึกษาองค์ประกอบของกรดไขมันในสาหร่ายโพรง (McCauley et al., 2015) ส่วนที่สกัดด้วย 95% ethanol พบ C7:0, C8:0, C13:0, C14:0, C15:0, C16:0, C17:0, C18:0, C18:1n9 และ C22:0 และส่วนที่สกัดด้วย Ethyl acetate พบ C13:0, C14:0, C15:0, C16:0, C18:0, C18:1n9, C18:2n6, C20:0 และ C24:0 ซึ่งสาหร่ายสีแดงที่สกัดด้วย 95% ethanol และ Ethyl acetate ยังไม่พบการศึกษาในงานวิจัยอื่น ๆ จะเห็นได้ว่าตัวอย่างสาหร่ายสีเขียวและสาหร่ายสีแดงในตัวทำละลายที่แตกต่างกัน ซึ่งกรดไขมันส่วนใหญ่ที่พบนั้นจะเป็นกรดไขมันอิ่มตัว กรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงเดี่ยว (MUFA) และกรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อน (PUFA) โดยจะพบกรดไขมันที่เหมือนกันทั้งในสาหร่ายสีเขียวและสาหร่ายสีแดง เช่น C14:0, C16:0, C18:0, C18:1n9 และ C22:1n9 เป็นต้น ซึ่งเป็นกรดไขมันส่วนใหญ่ที่พบในสาหร่ายทะเล (Dawczynski et al., 2007) และกรดไขมันเหล่านี้สามารถนำมาใช้ประโยชน์ในด้านต่าง ๆ ได้มาก และสาหร่ายทะเลยังมีสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพต่าง ๆ เช่น ต้านเชื้อแบคทีเรีย ต้านการอักเสบ ต้านเชื้อไวรัส ต้านเชื้อรา ต้านมะเร็ง โรคมะเร็ง ความดันโลหิตสูง และต้านอนุมูลอิสระ (Silva et al., 2013) นอกจากนั้นสาหร่ายทะเลยังอุดมไปด้วยสารอาหารหลายชนิดที่เป็นประโยชน์ ดังนั้นสาหร่ายทะเล น่าจะเป็นทางเลือกหนึ่งที่สามารถนำไปต่อยอดในด้านต่าง ๆ ได้



### 3.2 สรุปผลการทดลอง

จากการทดลองการศึกษาเปรียบเทียบ ชนิดและปริมาณของไขมันจากสารสกัดสาหร่ายสีเขียวและสาหร่ายสีแดง พบไขมันชนิด PC และ PE อยู่มากในสาหร่าย *U. rigida* และ *C. lentillifera* ที่สกัดด้วย Chloroform:Methanol เมื่อเทียบกับสาหร่ายชนิดต่าง ๆ และจากการศึกษาเปรียบเทียบชนิดของกรดไขมัน โดยในสาหร่าย 4 ชนิด พบคุณลักษณะเด่นของกรดไขมันชนิดไม่อิ่มตัว ร่องลงมาเป็นชนิดไม่อิ่มตัวเชิงซ้อนและไม่อิ่มตัวเชิงเดี่ยว กรดไขมันหลักที่พบ ได้แก่ C16:0, C18:0, C18:1n9, C22:0, C22:1ω9 เป็นต้น ซึ่งกรดไขมันเหล่านี้สามารถนำมาใช้ประโยชน์ในด้านต่าง ๆ ได้ เช่น ใช้ในอุตสาหกรรมอาหารและเครื่องสำอาง ตลอดจนสามารถนำไปพัฒนาเป็นยารักษาโรคได้

### 3.3 ข้อเสนอแนะ

3.3.1 ขั้นตอนการทำสาหร่ายให้แห้ง ควรใช้การอบแทนการตาก เพื่อป้องกันฝุ่นหรือสิ่งปนเปื้อนที่กับอากาศก่อนนำมาแช่ในตัวทำละลาย

3.3.2 ศึกษาการสกัดองค์ประกอบทางเคมีที่สำคัญและฤทธิ์ทางชีวภาพอื่น ๆ

3.3.3 ศึกษาการสกัดสารสำคัญด้วยการใช้น้ำเป็นตัวทำละลายเพื่อความปลอดภัยในการใช้ประโยชน์

## เอกสารอ้างอิง

1. Atanassova, M., Georgieva, S. and Ivancheva, K. (2011). Total phenolic and total flavonoid contents, antioxidant capacity and biological contaminants in medicinal herbs. *Journal of the University of Chemical Technology and Metallurgy*, 46, 81-88.
2. Chew, Y.L., Lim, Y.Y., Omar, M. and Khoo, S.K. (2008). Antioxidant activity of three edible seaweeds from two areas in South East Asia. *Food Science and Technology*, 41(6), 1067-1072.
3. Chisti Y. (2007). Biodiesel from microalgae. *Biotechnol. Adv.* 25:294-306.
4. Chiu, S.T., Tsai, R.T., Hsu, J.P., Liu, C.H. and Cheng, W. (2008). Dietary sodium alginate administration to enhance the non-specific immune responses, and disease resistance of the juvenile grouper *Epinephelus fuscoguttatus*. *Aquaculture*, 277, 66–72.
5. Dawczynski, C., Schubert, R., and Jahreis, G. (2007). Amino acids, fatty acids, and dietary fibre in edible seaweed products. *Food Chemistry*, 103, 891–899.
6. Frikha, F., Kammoun, M., Hammami, N., Mchirgui, R.A., Belbahri, L., Gargouri, Y., Miled, N., and Ben-Rebah, F. (2011). Chemical composition and some biological activities of marine algae collected in Tunisia. *Ciencias Marinas*, 37(2), 113–124.
7. Li, K., Li, X. M., Ji, N. Y. and Wang, B. G. (2007). Natural bromophenols from the marine red algae polysiphonia urceolate (Rhodomelaceae) structural elucidation and DPPH radical scavenging activity. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 15(15), 6627-6631.
8. Lohrmann, N.L., Logan, B.A., and Johnson, A.S. (2004). Seasonal Acclimatization of Antioxidants and Photosynthesis in *Chondrus crispus* and *Mastocarpus stellatus*, Two Co-Occurring Red Algae With Differing Stress Tolerances. *Biol. Bull*, 207(3), 225-232.
9. McCauley, J. I., Meyer, B. J., Winberg, P. C., Ranson, M. & Skropeta, D. (2015). Selecting Australian marine macroalgae based on the fatty acid composition and anti-inflammatory activity. *Journal of Applied Phycology*, 27 (5), 2111-2121.
10. Nakai, M., Kageyama, N., Nakahara, K. and MiKi, W. (2006). Phlorotannins as radical scavengers from the extract of *Sargassum ringgoldiaum*. *Marine Biotechnology*, 8, 409-414.
11. Ratana-arporn, P., and Chirapart A. (2006). Nutritional Evaluation of Tropical Green Seaweeds *Caulerpa lentillifera* and *Ulva reticulata*. *Kasetsart J. (Nat. Sci.)*, 40, 75-83.

12. Silva, M., Vieira, L., Almeida, A.P., and Kijjoa, A. (2013). The Marine Macroalgae of the Genus *Ulva*: Chemistry, Biological Activities and Potential Applications. *Oceanography*, 1(1), 1-6.
13. Weerawatanakorn, M. (2013). Chemical reactions between proteins and polyphenols and human biological consequences of reaction. *Burapha Science Journal*. (1), 210-218.
14. Yang, J.H., Mau, J.L., Ko, P.T., and Huang, L.C. (2000). Antioxidant properties of fermented soybean broth. *Food Chem.*, 71(2), 294-254.
15. Yangthong, M., Hutadilok-Towatana, N. and Phromkunthong, W. (2009). Antioxidant activities of four edible seaweeds from the southern coast of Thailand. *Plant Foods Human Nutrient*, 64(3), 218-223.
16. Yangthong, M., Thawonsuwan, J., Hutadilok-Towatana, N. and Phromkunthog, W. (2012). Effects of the hot-water extract from *Sargassum* sp. on antibacterial activity, non-specific immunity and TBARs production in Asian Sea Bass (*Lates calcarifer*, Bloch). *Kasetsart University Fisheries Research Bulletin*, 36(3), 30-42.

# ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

การเตรียมสาร

1. Buffer

### 1.1 Buffer สำหรับ TLC

Methyl acetate	25	ml
1-propapnol	25	ml
Chloroform	10	ml
0.25% KCl	9	ml

## 2. Stock solution

### 2.1 0.25% KCl 100 ml

KCl	0.25	g
Distilled water	100	ml

### 2.2 primuline 100 ml

Primuline	5	mg
Acetone	80	ml
Distilled water	20	ml

