การประเมินฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมของโฟลิโอสไลเคนชนิด *Parmotrema tinctorum* (Despr. ex Nyl.) Hale

Evaluation of Antioxidant Activity and Total Phenolic Content of Foliose Lichen Species *Parmotrema tinctorum* (Despr. ex Nyl.) Hale

อัมรินทร์ ธงจันทร์[1,2] อารีรัตน์ ใสส่อง[1,2] นุจรี ชำนาญทัพ[1,2] กฤษฎา จำปาทาสี[1,2] และ ขวัญเรือน นาคสุวรรณ์กุล[1,2*]

Ammarin Tongjan[1,2], Areerat Saisong[1,2], Nucharee Chamnantap[1,2], Kritsada Champatasi[1,2] and Khwanyuruan Naksuwankul[1,2*]

Received date: 17 ต.ค. 65 Revised date: 12 ธ.ค. 66 Accepted date: 18 ธ.ค. 66

DOI: https://doi.org/10.55003/kmaj.2024.08.16.013

บทคัดย่อ

ไลเคนคือสิ่งมีชีวิตที่อยู่ร่วมกันระหว่างราและสาหร่าย ไลเคนสร้างสารทุติยภูมิที่มีความเฉพาะเจาะจงและแตกต่างจากสิ่งมีชีวิตอื่น ทำให้ไลเคนมีความน่าสนใจเกี่ยวกับสารสำคัญที่สะสมในทัลลัสไลเคน การวิจัยครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อประเมินฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมของโฟลิโอสไลเคนชนิด *Parmotrema tinctorum* จากสารสกัดหยาบด้วยการหมักกับเมทานอล อะซิโตน และเอทิลอะซิเตทที่อุณหภูมิห้อง ทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) และ Ferric reducing antioxidant power (FRAP) และวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดด้วยวิธี Folin-Ciocaltue phenol จากผลการทดลองพบว่าปริมาณสารสกัดหยาบด้วยตัวทำละลายเมทานอลมีร้อยละของผลผลิตมากที่สุดเท่ากับ 34.74 รองลงมาคือ อะซิโตน และเอทิลอะซิเตท ตามลำดับ ส่วนปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมสูงที่สุดคือ สารสกัดเอทิลอซิเตท เท่ากับ 83.15±12.52 mg GAE/g DW รองลงมาคือ อะซิโตน และเมทานอลเท่ากับ 754.55±14.90 และ 443.94±11.36 mg GAE/g DW ศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH พบว่าสารสกัดด้วยเมทานอลมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุด มีค่า IC_{50} = 4.61±0.04 mg/mL รองลงมาคือ สารสกัดด้วยเอทิลอะซิเตท และอะซิโตน ส่วนฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP พบว่าสารสกัดด้วยเมทานอลมีค่า F value เท่ากับ 2096.27±9.24 mg Fe/g extract รองลงมาคือ สารสกัดด้วยอะซิโตน และเอทิลอะซิเตท ตามลำดับ

คำสำคัญ: โฟลิโอสไลเคน สารประกอบฟีนอลิกรวม ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

Abstract

Lichens are symbiosis between fungi and algae. Lichens can produce specific secondary metabolites which are different from other organisms. Lichens are of interest due to the accumulation of secondary metabolites in their thallus. The objective of this research was to determine the antioxidant activity and total phenolic content of foliose lichen species, *Parmotrema tinctorum.* The lichen was macerated with methanol, acetone, and ethyl acetate at room temperature to obtain the crude extract. Antioxidant activity of crude extract was analyzed by 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) assay and Ferric reducing antioxidant power (FRAP) assay. Phenolic content was analyzed by Folin-Ciocaltue phenol method. The result showed that the crude extract by methanol gave the highest yield at 34.74 followed by acetone ethyl acetate, respectively. The highest yield of total phenolic content was found in ethyl acetate crude extract at 83.15±12.52 mg GAE/g DW, followed

[1] ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม จ.มหาสารคาม 44150

[2] หน่วยวิจัยเห็ดและไลเคนส์เพื่อการใช้ประโยชน์อย่างยั่งยืน จ.มหาสารคาม 44150

[1] Department of Biology, Faculty of Science, Mahasarakham University, Maha Sarakham, 44150

[2] Mushroom and Lichens for Sustainable Utilization Research Unit, Mahasarakham University, Maha Sarakham, 44150

* Corresponding author: khwanruan.p@msu.ac.th

by acetone and methanolic at 754.55±14.90 and 443.94±11.36 mg GAE/g DW, respectively. The highest antioxidant activity was found in DPPH assay value with methanolic extract at IC_{50} = 4.61±0.04 mg/mL, then ethyl acetate and acetone, respectively. While FRAP assay was shown to be highest in the methanolic extract at 2096.27±9.24 mg Fe/g extract, followed by acetone and ethyl acetate, respectively.

Keywords: foliose lichen, total phenolic content, antioxidant activity

คำนำ

ไลเคน (lichen) เป็นสิ่งมีชีวิตที่อาศัยอยู่รวมกันแบบพึ่งพาอาศัยระหว่างราและสาหร่าย หรือระหว่างราและไซยาโนแบคทีเรีย รูปแบบในการเจริญเติบโตของไลเคนเป็นแบบพิเศษทำให้ไลเคนสามารถใช้เป็นดัชนีชี้วัดคุณภาพของอากาศได้และใช้ประโยชน์ที่หลากหลาย (Naksuwankul, 2015) ไลเคนประกอบด้วยราและสาหร่ายจึงสามารถสร้างสารเคมีชนิดทุติยภูมิหรือเรียกว่าสารไลเคน (Secondary metabolites) ส่วนใหญ่สร้างจากส่วนของราและสารเคมีพบเฉพาะในไลเคนไม่พบในพืชชนิดอื่น จึงสามารถใช้สารไลเคนในจำแนกชนิดได้ ไลเคนบางชนิดสร้างสารเคมีเฉพาะเจาะจงจึงจำแนกชนิดได้ด้วยสารเคมี การใช้ประโยชน์จากไลเคนนอกจากใช้เป็นดัชนีชี้วัดทางคุณภาพอากาศแล้วยังใช้ประโยชน์ด้านอื่น ๆ ได้แก่ ใช้เป็นสีย้อมผ้าขนสัตว์ ใช้เป็นส่วนผสมของพีเอชเปเปอร์ (pH paper) ใช้ผสมในน้ำหอม ใช้บอกอายุของหิน ใช้เป็นส่วนผสมในแป้งขนมปัง ใช้ในพิธีกรรมทางศาสนา มีหลักฐานการใช้ประโยชน์มาตั้งแต่สมัยอียิปโบราณ นอกจากนี้ในประเทศญี่ปุ่นและประเทศจีนมีการใช้เป็นชาหรือเครื่องดื่มบำรุงร่างกายเนื่องจากไลเคนมีสารสำคัญที่มีประโยชน์ ในประเทศยุโรปใช้ไลเคนเป็นส่วนผสมของลูกอมเพื่อช่วยย่อยหลังรับประทานอาหาร (Papong, 2012a; 2012b)

ไลเคนชนิด *P. tinctorum* (Despr. ex Nyl.) Hale จัดเป็นไลเคนแบบโฟลิโอส (foliose) (Figure 1) จำแนกอยู่ในวงศ์ Parmeliaceae ซึ่งเป็นไลเคนวงศ์ที่มีสมาชิกมากที่สุดวงศ์หนึ่ง ลักษณะที่สำคัญของไลเคนชนิดนี้เป็นโลบ (Lobe) ทัลลัสกว้างขนาดใหญ่ประมาณ 3-30 เซนติเมตร มีซีเลีย (Cilia) ยาวสีดำขนาด 2 มิลลิเมตร ผิวด้านบนทัลลัสสีเทา เรียบ พบลักษณะคล้ายร่างแหหรือรอยแตกขนาดเล็ก พบไอซิเดีย (Isidia) ขนาดเล็กไม่แตกแขนงจนถึงแตกแขนงเล็กน้อยคล้ายปะการัง (Coralloid branched) จำนวนมาก พบบริเวณปลายขอบโลบ ไม่พบซอรีเดีย (Soredia) ผิวด้านล่างทัลลัสสีดำ ตรงกลางทัลลัสพบไรซีน (Rhizines) ไม่แตกแขนง แอโพทีเซีย (Apothecia) รูปถ้วยพบน้อย แอสโคสปอร์ (Ascospores) รูปทรงรีจนถึงรูปทรงรีกว้าง พบสารไลเคน Atranorin, Chloroatranorin, Lecanoric acid และ Orsellinic acid เป็นไลเคนชนิดที่พบการแพร่กระจายได้ทั่วโลก (Nash et al., 2002) อนุมูลอิสระ (Free radicals) เป็นสารที่มีอิเล็กตรอนอิสระอยู่ในวงนอกของอะตอมหรือโมเลกุล อนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นพบได้ทั้งจากแหล่งภายใน และภายนอกร่างกาย สิ่งมีชีวิตทุกชนิดที่ใช้ออกซิเจนในการดำรงชีวิตจะมีอนุมูลอิสระของออกซิเจนในกระบวนการเมแทบอลิซึมต่าง ๆ ของเซลล์ จากกระบวนการเผาผลาญอาหารของร่างกาย และการออกกำลังกายอย่างหนักเป็นอนุมูลอิสระที่มาจากแหล่งภายในร่างกาย ส่วนแหล่งภายนอกอาจเกิดจากปัจจัยจากสิ่งแวดล้อม เช่น รังสียูวี โอโซน ควันจากท่อไอเสียรถยนต์ และควันบุหรี่ การติดเชื้อจากแบคทีเรียและไวรัส เป็นต้น อนุมูลอิสระส่วนใหญ่ไม่คงตัว และไวต่อการทำปฏิกิริยาโดยเฉพาะอย่างยิ่งอนุมูลไฮดรอกซิล (Hydroxyl radical) ที่มีความว่องไวสูงสุด (Halliwell, 1995) อนุมูลอิสระเหล่านี้ทำให้เกิดความเสียหายต่อองค์ประกอบต่าง ๆ ของเซลล์ภายในร่างกาย แต่อย่างไรก็ตาม สิ่งมีชีวิตทุกชนิดมีระบบที่สามารถกำจัดอนุมูลอิสระได้เรียกว่า สารต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidants) ซึ่งเป็นกลไกของร่างกายที่จะสร้างสารต้านอนุมูลอิสระขึ้นมาประกอบด้วยสารหรือเอนไซม์ต่าง ๆ ที่สามารถช่วยชะลอ ยับยั้งหรือป้องกันปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารที่ไวต่อการเกิดปฏิกิริยา โดยร่างกายจะสร้างสารต้านอนุมูลอิสระให้สมดุลกับปริมาณอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้น แต่ถ้าเมื่อใดเกิดภาวะไม่สมดุลเกิดขึ้นทำให้เกิดสภาวะที่เรียกว่า Oxidative stress คือมีปริมาณอนุมูลอิสระมากเกินกว่าที่ระบบต้านอนุมูลอิสระจะกำจัดได้ซึ่งทำให้เกิดอนุมูลอิสระส่วนเกินหรือหลงเหลืออยู่จะไปทำลายเซลล์เป็นอันตรายต่ออวัยวะและเนื้อเยื่อต่าง ๆ เป็นสาเหตุของการแก่ และอาจเรื้อรังจนนำไปสู่การเกิดโรคได้ เช่น เส้นเลือดตีบ โรคหลอดเลือดหัวใจ โรคเกี่ยวกับภูมิคุ้มกัน โรคพาคินสัน โรคอัลไซเมอร์ โรคมะเร็ง เป็นต้น (Ames et al., 1993) ร่างกายเรามีกลไกในการกำจัดอนุมูลอิสระได้ 2 วิธี คือ 1) ใช้เอนไซม์ต่าง ๆ ในร่างกาย เช่น Catalase (CAT),

Glutathione peroxidase (GPX) และ Superoxide dismutase (SOD) และ 2) วิธีไม่ใช้เอนไซม์ ได้แก่ วิตามินอี (Alpha-tocopherol) เบต้าคาโรทีน (Beta-carotene) และวิตามินซี เป็นต้น ซึ่งเป็นสารช่วยควบคุมอนุมูลอิสระต่าง ๆ ให้อยู่ในระดับที่สมดุล

สารต้านอนุมูลอิสระที่สำคัญ มี 3 ประเภท ได้แก่

1) สารต้านอนุมูลอิสระที่พบในร่างกาย และจัดเป็นเอนไซม์ ได้แก่ Catalase (CAT), Glutathione peroxidase (GPX), Superoxide dismutase (SOD), Glutathione reductase (GR) และ Glutathione S-transferase (GST) เป็นต้น

2) สารต้านอนุมูลอิสระที่พบในร่างกายแต่ไม่จัดเป็นเอนไซม์ ได้แก่ Albumin, Bilirubin, Uric acid, Glutathione, Ceruloplasmin, Transferrin, Haptoglobin, Hepopexin และ Cysteine เป็นต้น

3) สารต้านอนุมูลอิสระที่พบในอาหาร และไม่จัดเป็นเอนไซม์ ได้แก่ Tocopherols, Carotenoids, Ascorbic acid, Steroids, Gallic acid และ Flavonoids เป็นต้น

ดังนั้นการได้รับสารต้านอนุมูลอิสระจากภายนอกร่างกายจึงเป็นทางเลือกที่ช่วยเสริมและป้องกันอันตรายจากอนุมูลอิสระต่าง ๆ (Department of Clinical Microscopy, 2023)

การศึกษาเกี่ยวกับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจากไลเคนได้รับความสนใจจากนักวิจัยเนื่องจากมีสารไลเคนที่มีความแตกต่างจากสารที่สร้างโดยพืชอื่น ๆ พบการศึกษาในไลเคนกลุ่มฟรุติโคส (Fruticose) ชนิด *Cladonia furcata* และกลุ่มโฟลิโอส (Foliose) ได้แก่ *Hypogymnia physodes, Lasallia pustulata, Parmelia caperata* และ *P. sulacata* พบว่าไลเคนกลุ่มโฟลิโอสชนิด *L. pustulata* แสดงผลการต้านอนุมูลอิสระได้ดีที่สุดในสารสกัดด้วยอะซิโตน เมทานอล และน้ำ จากการทดสอบด้วยวิธี DPPH และสอดคล้องกับปริมาณสารประกอบฟีนอลิก และฟลาโวนอยด์ที่มีปริมาณมากในไลเคนชนิดที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้ดี (Kosanic et al., 2011) ไลเคนสกุล *Parmotrema* หลายชนิด เช่น *P. pseudotinctorum, P. stuppeum* และ *P. tinctorum* สกัดด้วยเมทานอลพบว่าชนิดที่มีร้อยละการยับยั้งสูงสุด คือ *P. pseudotinctorum* (Fernandez-Moriano et al., 2016) จากข้อมูลที่กล่าวมาข้างต้นเกี่ยวกับการใช้ประโยชน์จากไลเคนในประเทศต่าง ๆ และหลากหลายวิธีการใช้ เช่น ใช้ผสมในอาหาร ใช้เป็นเครื่องดื่ม ประเภทชาทำให้ไลเคนมีศักยภาพที่น่าสนใจสำหรับการพัฒนานำไปใช้ประโยชน์ในอนาคตได้ ดังนั้น การวิจัยครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อประเมินฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมของโฟลิโอสไลเคนชนิด *P. tinctorum* ที่ทำการสกัดด้วยการหมักกับเมทานอล อะซิโตน และเอทิลอะซิเตทที่อุณหภูมิห้อง ทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) และ Ferric reducing antioxidant power (FRAP) และวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมด้วยวิธี Folin-Ciocaltue phenol เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานในการใช้ประโยชน์จากไลเคนกลุ่มโฟลิโอสต่อไปในอนาคต

Figure 1 Habitat of thallus lichen *P. tinctorum* growth on bark.

วิธีการศึกษา

ตัวอย่างโฟลิโอสไลเคน

ตัวอย่างโฟลิโอสไลเคนชนิด *P. tinctorum* ที่ใช้ในการวิจัยได้จากป่าธรรมชาติในจังหวัดมุกดาหาร เตรียมทัลลัสโฟลิโอสไลเคนอบให้แห้งในตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นนำมาบดเป็นชิ้นขนาดเล็กนำไปชั่ง 5 กรัม จำนวน 3 ครั้ง นำตัวอย่างไลเคนจำนวน 5 กรัม หมักกับเมทานอลปริมาตร 300 มิลลิลิตร ในขวดดูแลนและนำไปเขย่า 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นกรองส่วนสารละลายด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 นำกากที่เหลือไปหมักด้วยเมทานอลซ้ำอีก 2 ครั้ง แล้วกรองสารละลายรวมกัน นำสารละลายทั้งหมดไประเหยตัวทำละลายด้วยเครื่อง Evaporator เก็บไว้ในขวดเก็บสารและนำไปแช่ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส จากนั้นทำให้แห้งด้วยเครื่อง Freeze dryer และเก็บสารสกัดหยาบในขวดปิดมิดชิดเพื่อนำไปทดสอบต่อไป การสกัดด้วยอะซิโตนและเอทิลอะซิเตท นำตัวอย่างไลเคนอย่างละ 5 กรัม มาหมักกับสารละลายทั้ง 2 ชนิดและทำตามขั้นตอนเหมือนกับการหมักด้วยเมทานอล นำสารสกัดหยาบมาหาปริมาณร้อยละของผลผลิต (% Yield) ดังนี้

ร้อยละของผลผลิต = น้ำหนักตัวอย่างหลังการสกัด / น้ำหนักตัวอย่างแห้งก่อนการสกัด x 100

การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบไลเคนด้วยวิธี DPPH assay

เตรียมสารละลาย DPPH ความเข้มข้น 0.1 mM โดยชั่ง DPPH 0.0079 กรัม ละลายในเอทานอลปริมาตร 200 มิลลิลิตร เตรียมสารละลายมาตรฐานโทรลอกซ์เข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยชั่งโทรลอกซ์ 0.0005 กรัม ละลายในเอทานอลและปรับปริมาตรให้ครบ 10 มิลลิลิตร นำสารละลายโทรลอกซ์เข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร มาเจือจางด้วยเอทานอลให้มีความเข้มข้น 0, 5, 10, 20, 25 และ 30 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เติมสารละลาย DPPH 3 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันตั้งทิ้งไว้ในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 514 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง UV-Visible spectrophotometer ทำการทดลอง 3 ซ้ำ นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปคำนวณหา % Radical scavenging activity และ คำนวณค่า IC_{50} การสร้างกราฟมาตรฐานโทรลอกซ์จากค่า % Radical scavenging activity ที่มีความเข้มข้น 0, 5, 10, 20, 25 และ 30 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อคำนวณหาค่า IC_{50} และใช้เพื่อหาค่า antioxidant capacity ตามวิธีของ Wannawet & Thiangphet (2017)

$$\% \text{ Radical scavenging activity} = \left[(\text{Control OD} - \text{Sample OD}) / \text{Control OD}\right] \times 100$$

เมื่อ Control OD คือ ค่าการดูดกลืนแสงของ DPPH

เมื่อ Sample OD คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารตัวอย่าง

การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบไลเคน โดยชั่งสารสกัดหยาบตัวอย่างละ 0.1 กรัม ละลายด้วยตัวทำลายที่ใช้สกัดและเติมให้ครบปริมาตร 10 มิลลิลิตร นำมาเจือจางให้มีความเข้มข้น 0, 1000, 2000, 3000, 4000, 5000, 7000 และ 9000 มิลลิกรัมต่อลิตร ปิเปตมาปริมาตร 1 มิลลิลิตร และทำตามขั้นตอนเหมือนกับสารมาตรฐานโทรลอกซ์ ทำการทดลอง 3 ซ้ำ นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปคำนวณหา % Radical scavenging activity และ คำนวณค่า IC_{50}

การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบไลเคนด้วยวิธี FRAP assay

เตรียมสารละลาย FRAP reagent (Acetate buffer 300 มิลลิโมล pH 3.6 : 2,4,6-tripyridyl-s-triazine (TPTZ) 10 มิลลิโมล : $FeCl_3$ 20 มิลลิโมล = 10 : 1 : 1) โดยชั่ง $FeCl_3$ ความเข้มข้น 20 มิลลิโมล 0.054 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร ชั่ง 2,4,6-tripyridyl-s-triazine (TPTZ) ความเข้มข้น 10 มิลลิโมล 0.031 กรัม ละลายในกรดไฮโดรคลอริก 10 มิลลิลิตร (ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส) เตรียม Acetate buffer โดยชั่ง Sodium acetate 1.8 กรัม เติม Acetic acid 8 มิลลิลิตร ปรับด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 500 มิลลิลิตร ปรับ pH 3.6 เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นเติมน้ำกลั่น 12 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที

เตรียมสารมาตรฐาน Ferrous sulfate ปริมาตร 2,000 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยชั่ง Ferrous sulfate 0.02 กรัม ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร สร้างกราฟมาตรฐาน Ferrous sulfate นำสารมาตรฐาน Ferrous sulfate ที่เตรียมได้มาเจือ

จางในน้ำกลั่นให้มีความเข้มข้น 400, 800, 1200 และ 1600 มิลลิกรัมต่อลิตร ปิเปตมา 1 มิลลิลิตร จากนั้นเติม FRAP reagent 1 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ 4 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง UV-Visible spectrophotometer ทำการทดลอง 3 ซ้ำ จากนั้นนำค่าความเข้มข้นของสารมาตรฐาน Ferrous sulfate มาเขียนกราฟมาตรฐานและหาความชันเพื่อใช้วิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในสารสกัดหยาบไลเคนต่อไป (Saechen, et al. 2020; Benzie & Strain, 1996)

การเตรียมตัวอย่างสารสกัดหยาบโฟลิโอสไลเคนโดยชั่งตัวอย่างละ 0.01 กรัม ละลายด้วยตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัด ปริมาตร 10 มิลลิลิตร จากนั้นนำมาเจือจางด้วยตัวทำละลายให้มีความเข้มข้น 100, 200, 300, 400 และ 500 มิลลิกรัมต่อลิตร ปิเปตมาปริมาตร 1 มิลลิลิตรใส่หลอดทดลอง และทำตามขั้นตอนเหมือนกับสารมาตรฐาน Ferrous sulfate ทำการทดลอง 3 ซ้ำ จากนั้นนำไปคำนวณฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP ในสารสกัดหยาบไลเคนเทียบกับกราฟมาตรฐาน Ferrous sulfate

การทดสอบปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมของสารสกัดหยาบไลเคนด้วยวิธี Folin-Ciocaltue phenol method

เตรียมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนตเข้มข้นร้อยละ 7.5 โดยชั่งโซเดียมคาร์บอเนต 7.5 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรให้ครบ 100 มิลลิลิตร เตรียมสารละลาย Folin-Ciocaltue phenol reagent เข้มข้นร้อยละ 10 โดยผสมสารละลาย Folin-Ciocaltue phenol reagent ปริมาตร 10 มิลลิลิตรกับน้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้ครบ 100 มิลลิลิตร

เตรียมสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิกเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาตร 10 มิลลิลิตร โดยชั่งกรดแกลลิก 0.0005 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่นและปรับปริมาตรให้ครบ 10 มิลลิลิตร สร้างกราฟมาตรฐานกรดแกลลิกโดยนำสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิกเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร มาเจือจางด้วยน้ำกลั่นให้มีความเข้มข้น 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, และ 18 มิลลิกรัมต่อลิตร ปิเปตสารละลายปริมาตร 1 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร เติมสารละลาย Folin-Ciocaltue phenol reagent เข้มข้นร้อยละ 10 ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันแล้วเติมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนตเข้มข้นร้อยละ 7.5 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เขย่าให้สารละลายผสมกันตั้งทิ้งไว้ในที่มืด 30 นาที นำสารละลายไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 760 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง UV-Visible spectrophotometer ทำการทดลอง 3 ซ้ำ นำค่าการดูดกลืนแสงและความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิกมาเขียนกราฟมาตรฐานเพื่อเปรียบเทียบปริมาณสารประกอบฟีนอลิกในสารสกัดหยาบของไลเคนต่อไป ตามวิธีของ Rattana & Sungthong (2016)

การวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมในสารสกัดหยาบของไลเคน โดยเตรียมสารละลายตัวอย่างไลเคนความเข้มข้น 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาตร 10 มิลลิลิตร โดยชั่งสารสกัดหยาบไลเคน 0.01 กรัม ละลายด้วยตัวทำละลายที่ใช้สกัดแล้วปรับปริมาตรให้ครบ 10 มิลลิลิตร นำสารละลายมาเจือจางด้วยน้ำกลั่นให้มีความเข้มข้น 100, 200 และ 300 มิลลิกรัมต่อลิตร ปิเปตสารละลายมา 1 มิลลิลิตร ทำตามขั้นตอนเหมือนกับสารมาตรฐานกรดแกลลิกดังที่กล่าวมาข้างต้น ทำการทดลอง 3 ซ้ำ แล้วนำค่าการวัดการดูดกลืนแสงที่ได้ไปคำนวณหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมในสารสกัดหยาบจากกราฟมาตรฐานกรดแกลลิก

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ทำการทดลอง 3 ซ้ำ วิเคราะห์ความแปรปรวนของค่าเฉลี่ยของข้อมูลแบบทางเดียว (One-way ANOVA) รายงานผลด้วยค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน และทดสอบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยรายคู่หรือการเปรียบเทียบเชิงพหุคูณ (Multiple comparison) ด้วยวิธีการทดสอบ Tukey-Kramer ด้วยโปรแกรม IBM SPSS Statistics เวอร์ชั่น 23 วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomize Design)

ผลการศึกษาและวิจารณ์

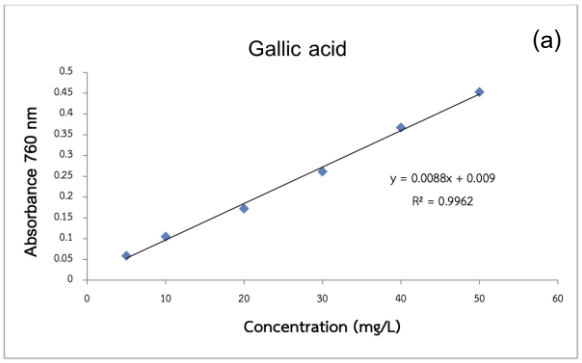
จากผลการสกัดสารจากโฟลิโอสไลเคนชนิด *P. tinctorum* พบว่าสารสกัดหยาบที่ได้ร้อยละของผลิตมากที่สุด คือ หมักด้วยตัวทำละลายเมทานอลเท่ากับร้อยละ 34.74±0.20 รองลงมาคือ อะซิโตน (ร้อยละ 30.79±0.20) และ เอทิลอซิเตท (ร้อยละ 27.18±0.10) ตามลำดับ (Table 1) จากสารสกัดหยาบโฟลิโอสไลเคนนำไปทดสอบหาปริมาณของสารประกอบฟีนอลิกรวมโดยเปรียบเทียบกับสารมาตรฐานกรดแกลลิก จากสมการ Y = 0.0088x + 0.009 โดยมีค่า R^2 = 0.9962 (Figure 2 (a)) พบว่าสารสกัดที่หมักด้วยอะซิโตนมีปริมาณของสารประกอบฟีนอลิกรวมมากที่สุดเท่ากับ 83.15±12.52 mg GAE/g DW รองลงมาคือ สารสกัดที่หมักด้วยเอทิลอะซิเตท (75.45±14.90 mg GAE/g DW) และเมทานอล (44.39±11.36 mg GAE/g DW) ตามลำดับ (Table 2) ซึ่งพบว่าสารสกัดที่หมักด้วยอะซิโตนมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกสูงเมื่อเปรียบเทียบกับน้ำหนักกรัมแห้งของตัวอย่าง เนื่องจากเป็นการวัดปริมาณสารประกอบฟีนอลิกจากสารสกัดที่เข้มข้นที่ผ่านขบวนการหมัก และระเหยตัวทำละลายพร้อมทั้งทำให้แห้งเป็นผงแล้วจึงมีความเข้มข้นสูงและมีปริมาณของสารประกอบฟีนอลิกสูงด้วยเช่นกัน

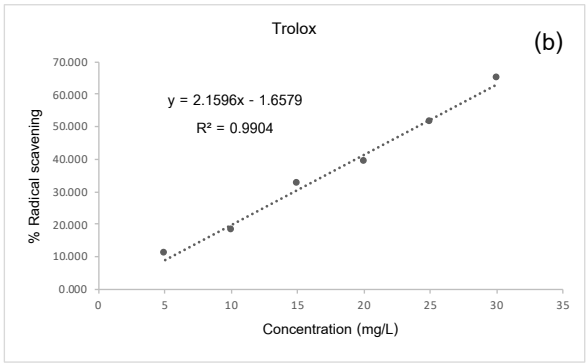
Table 1 Percentage of yield from foliose lichen *P. tinctorum* crude extract with tree differences solvent

Solvent	Color and character	% Yield
Methanol	Power and light green	34.74±0.20[a]
Acetone	Power and white	30.79±0.20[b]
Ethyl acetate	Power and yellow	27.18±0.10[a]

[a-c] Different superscript letters within each row are significantly different ($P<0.05$).

ส่วนการวิเคราะห์ความสามารถของฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบโฟลิโอสไลเคนชนิด *P. tinctorum* ด้วยวิธี DPPH assay พบว่า สารสกัดหยาบที่สกัดด้วยเมทานอลมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระดีที่สุด โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 4612.15±44.92 mg/L รองลงมาคือสารสกัดด้วยเอทิลอะซิเตทและอะซิโตนมีค่า IC_{50} ใกล้เคียงกัน (Table 2) โดยเปรียบเทียบกับสารมาตรฐานโทรลอกซ์ (Figure 2 (b)) มีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.02±0 การวิเคราะห์ความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP assay โดยเทียบกับสารมาตรฐานเฟอรัสซัลเฟต จากสมการ Y = 0.0005x + 0.0516 โดยมีค่า R^2 = 0.9994 (Figure 2 (c)) พบว่าสารสกัดด้วยเมทานอลมีค่ามากที่สุดเท่ากับ 2096.27±9.24 mg Fe/g extract อะซิโตนเท่ากับ 1982.93±12.86 mg Fe/g extract และเอทิลอะซิเตทน้อยที่สุดเท่ากับ 990.13±27.30 mg Fe/g extract (Table 2)





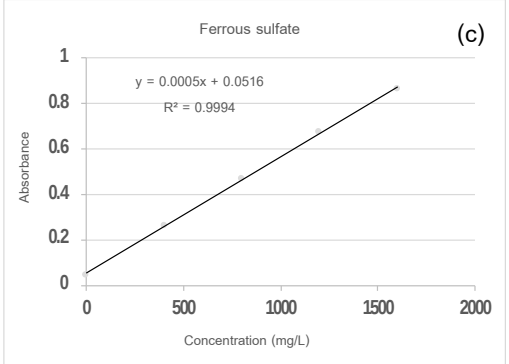


Figure 2 Standard graph for comparison with *P. tinctorum* crude extract. Standard graph of gallic acid for phenolic compound (a), Standard graph of trolox for % radical scavenging in DPPH assay (b), Standard graph of ferrous sulfate for ferrous sulfate in FRAP assay (c).

Table 2 Total phenolic content and antioxidant activities of *P. tinctorum* crude extract from three differences solvent

Solvents	Total phenolic content (mg GAE/g DW)	Antioxidant activities DPPH (IC_{50} mg/L)	Antioxidant activities FRAP (mg Fe/g extract)
Methanol	44.39±11.36^{c}	4612.15±44.92^{c}	2096.27±9.24^{a}
Acetone	83.15±12.52^{a}	7882.08±67.69^{a}	1982.93±12.8^{b}
Ethyl acetate	75.45±14.90^{b}	7528.44±129.41^{b}	990.13±27.30^{c}
Trolox	-	0.02±0	-
F-test	2861.29	1241.50	3346.43

F-test Significant at 0.001 probability levels.

$^{a-c}$ Different superscript letters within each row are significantly different ($P<0.05$).

การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบจากไลเคนในครั้งนี้ดำเนินการด้วย 2 วิธีคือ DPPH assay และวิธี FRAP assay พบว่าสารสกัดด้วยเมทานอลมีความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระได้ดีที่สุดทั้ง 2 วิธีสอดคล้องกัน และสอดคล้องกับรายงานของ Sharma & Kalikotay (2012) วิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH assay ของไลเคนชนิด *P. reticulatum* และสกัดด้วยเมทานอลมีค่า IC_{50} เท่ากับ 4.39 μg/ml ส่วนสารสกัดด้วยเอทานอลมีค่า IC_{50} เท่ากับ 4.023 μg/ml ซึ่งเห็นว่าการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธีนี้ได้รับความนิยมอย่างแพร่หลาย เช่นเดียวกับวิธี FRAP assay สารสกัดด้วย เมทานอลของไลเคนชนิดนี้ก็มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุด ส่วนปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของไลเคนชนิดนี้ที่สกัดด้วย เมทานอลเปรียบเทียบกับสารมาตรฐานกรดแทนนิก เท่ากับ 151±0.577 μg Tannic acid equivalent/mg ซึ่งมีปริมาณสูงกว่าสารสกัดด้วยเอทานอล (Sharma & Kalikotay, 2012) ส่วนรายงานการเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดไลเคนชนิด *P. tinctorum* ด้วยลำดับของสารสกัดเพิ่มขึ้นตามการมีขั้วของสารละลาย ได้แก่ ปิโทรเลียมอีเทอร์ (Petroleum ether) เอทิลอะซิเตท (Ethyl acetate) อะซิโตน (Acetone) เมทานอล (Methanol) และน้ำ (Water) วิเคราะห์ด้วยวิธี DPPH assay โดยเปรียบเทียบกับสารมาตรฐานกรดแอสคอร์บิก (Ascorbic acid) ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ดีที่สุดคือ สารสกัดด้วยอะซิโตน รองลงมาคือ เมทานอลและปิโทรเลียมอีเทอร์ตามลำดับ (Ganesan et al., 2015) รวมทั้งไลเคนชนิดอื่นก็ยังมีผลการศึกษาสอดคล้องกัน เช่น ไลเคนชนิด *Cetraria aculeata* ที่สกัดด้วยเมทานอลมีรายงานว่าฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงกว่าสกัดด้วยเอทิลอะซิเตทเมื่อวิเคราะห์ด้วยวิธี DPPH assay เช่นเดียวกับปริมาณของสารประกอบฟีนอลิกรวมมีปริมาณมากกว่า (Tomovic et al., 2015)

Table 3 Percentage radical scavenging of *P. tinctorum* crude extract from differences concentration in DPPH assay

Concentration (mg/L)	% Radical scavenging			
	Methanol	Acetone	Ethyl acetate	F-test

1000	18.62±0.87[a]	7.07±0.50[b]	8.42±0.13[b]	351.90
3000	37.15±1.38[a]	17.47±0.69[c]	21.91±0.48[b]	1319.19
5000	52.79±0.45[a]	30.44±0.35[c]	31.46±0.38[b]	3060.32
7000	ND	44.54±0.44[b]	47.46±1.29[a]	3422.52
9000	ND	57.90±1.14[a]	59.49±0.32[a]	7394.83

ND = No data

F-test Significant at 0.001 probability levels.

[a-c] Different superscript letters within each row are significantly different ($P<0.05$).

Table 4 Antioxidant activities of *P. tinctorum* crude extract from differences concentration in FRAP assay

Concentration	Mg Fe/g Extract			
(mg/L)	Methanol	Acetone	Ethyl acetate	F-test
100	1848.00±72.11[a]	2034.67±120.55[a]	1047.33±20.82[b]	122.78
200	1907.33±30.55[b]	2244.00±30.00[a]	1048.67±32.53[c]	1182.43
300	2271.55±20.37[a]	2007.11±73.44[b]	926.89±51.24[c]	541.59
400	2202.00±27.84[a]	2123.67±11.55[b]	979.33±34.49[c]	2009.53

F-test Significant at 0.001 probability levels.

[a-c] Different superscript letters within each row are significantly different ($P<0.05$).

จากข้อมูลร้อยละของการกำจัดอนุมูลอิสระ (% Radical scavenging) จากสารสกัดไลเคนที่มีความเข้มข้นของสารแตกต่างกันทั้ง 3 ตัวทำละลายด้วยวิธี DPPH assay (Table 3) พบว่าแนวโน้มการกำจัดอนุมูลอิสระมีมากขึ้นเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารสกัดมากขึ้นในทั้ง 3 ตัวทำละลาย โดยเฉพาะสารสกัดด้วยอะซิโตน และเอทิลอะซิเตทมีค่าใกล้เคียงกันตามลำดับความเข้มข้นของสาร ส่วนสารสกัดด้วยเมทานอลแสดงค่าการกำจัดอนุมูลอิสระได้ดีกว่าในสารสกัดด้วยอะซิโตน และเอทิลอะซิเตทเมื่อเปรียบเทียบกับความเข้มข้นที่เท่ากัน ส่วนการทดสอบการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP assay สารสกัดด้วยเมทานอลมีความสามารถต้านอนุมูลอิสระได้ดีที่สุดในความเข้มข้นเท่ากับ 300 mg/L (Table 4) แต่จะลดลงเล็กน้อยเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารสกัดขึ้นเป็น 400 mg/L และสารสกัดด้วยอะซิโตนมีประสิทธิภาพเพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มความเข้มข้นถึง 200 mg/L และประสิทธิภาพจะลดลงเล็กน้อยเมื่อเพิ่มความเข้มข้นถึง 300 - 400 mg/L เช่นเดียวกับสารสกัดด้วยเอทิลอะซิเตทมีค่าเพิ่มขึ้นในความเข้มข้น 100 – 200 mg/L และจะลดลงเล็กน้อยเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารสกัดขึ้นเป็น 300 - 400 mg/L แสดงว่าประสิทธิภาพในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดเมื่อทดสอบด้วยวิธี FRAP assay จะมีประสิทธิภาพดีที่สุดในระดับความเข้มข้นที่แตกต่างกันขึ้นอยู่กับตัวทำละลายของสารสกัดนั้น ๆ

สรุปผลการศึกษา

จากการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและปริมาณของฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดหยาบโฟลิโอสไลเคนชนิด *P. tinctorum* จากตัวทำละลาย 3 ชนิด ที่แตกต่างกันคือ เมทานอล อะซิโตนและเอทิลอะซิเตท ความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระได้ดีคือสารสกัดด้วยเมทานอลทั้ง 2 วิธีสอดคล้องกันคือ DPPH assay และ FRAP assay แต่ในทางตรงข้ามกันปริมาณของสารประกอบฟีนอลิกรวมที่มีปริมาณมากที่สุดคือ สารสกัดด้วยเอทิลอะซิเตท ส่วนสารสกัดด้วยเมทานอลมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมน้อยที่สุด แสดงว่าฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่อยู่ในสารสกัดหยาบไลเคนแม้มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม

น้อยก็มีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระได้หรืออาจเป็นสารอื่นนอกเหนือจากสารประกอบฟีนอลิกรวมที่แสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในสารสกัดหยาบไลเคน เช่น สารประกอบฟลาโวนอย์ สารประกอบแทนนิน เป็นต้น

เอกสารอ้างอิง

Ames, B. N., Shigenaga, M. K., & Hagen, T. M. (1993). Oxidants, antioxidants and degenerative diseases of aging. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 90, 7915–22.

Benzie, I. F. F., & Strain, J. J. (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "Antioxidant Power" The FRAP assay. **Analytical Biochemistry**, 239, 70-76.

Department of Clinical Microscopy, Faculty of Allied Health Sciences, Chulalongkorn University. (2005**). Free Radicals and Antioxidants**. Retrieved from: http://www.microscopy.ahs.chula.ac.th/Micros/NEWS/antioxidant.htm

Fernandez-Moriano, C., Gomez-Serranillos, M. P., & Crespo, A. (2016). Antioxidant potential of lichen species and their secondary metabolites: A systematic review. **Pharmaceutical Biology**, 54(1), 1-17.

Ganesan, A., Thangapandian, M., Ponnusamy, P., Sundararaj, J. P., & Nayaka, S. (2015). Antioxidant and antibacterial activity of parmeliod lichens from Shevaroy hills of Eastern Ghats, India. **International Journal of Pharm Tech Research**, 8(9), 13-23.

Halliwell, B. (1995). How to characterize an antioxidant: an update. **Biochemical Society Symposium**, 61, 85-91.

Kosanic, M, Rankovic, B., & Vukojevic, J. (2011). Antioxidant properties of some lichen species. **Journal Food Science and Technology**, 48(5), 584-590.

Naksuwankul, K. (2015). **Lichen Taxonomy**. 1st ed. Siripun (1954) Co.,Ltd.

Nash, T. H., Ryan, B. D., Gries, C., & Bungartz, F. (2002). **Lichen Flora of the Greater Sonoran Desert Region**. 1st ed. Lichen Herbarium.

Papong, K. (2012a). Lichen: Bioindicator for Air Pollution. **KKU Science Journal**, 40(1), 13-23.

Papong, K. (2012b). Lichen for Traditional Medicine. **Thai Journal of Botany**, 4(1), 1-13.

Rattana, S., & Sungthong, B. (2016). Antioxidant activities and total phenolic contents of methanolic extract from five fragrant flowers. In **Proceedings of the 12th Mahasarakham University Research Conference,** pp. 1-5. Mahasarakham University.

Saechen, D., Rinkam, Ch., Lankaew, J., Wisutthithada, W., & Sriyam, S. (2020). Total phenolic compounds and antioxidant activity in Wampee (*Clausena lansium* (Lour.) Skeels). **Journal of Innovative Technology Research**, 4(2), 12-21.

Sharma, B. C. & Kalikotay, S. (2012). Screening of antioxidant activity of lichens *Parmotrema reticulatum* and *Usnea* sp. from Darjeeling hills, India. **International Organization of Scientific Research Journal of Pharmacy**, 2(6), 54-60.

Tomovic, J., Rancic, A., Vsiljevic, P., Maskovic, P., Zivanovic S., Manojlovic, N., & Sovrlic, M. (2015). Antioxidant activity of lichen Cetraria aculeata. **Praxis Medica**, 44(1), 107-113.

Wannawet, R., & Thiangphet, P. (2017). Determination antioxidant activity and total phenolic compounds of Bean sprouts. In **Proceeding of National conference 4th Research Institute, Ratchapat Kampangphet University**, pp. 1035-1040. Ratchapat Kampangphet University.