

สมบัติบางประการและฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของลิ้นทะเล

Some Properties and Antioxidant Activity of Cuttlebone

จิตาพร ชัยศิลป์, สมจิต ดำริห์อนันต์, เฉลิมวุฒิ สมปาก

และนิรมล ศากยวงศ์*

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

ศูนย์รังสิต ตำบลคลองหนึ่ง อำเภอคลองหลวง จังหวัดปทุมธานี 12120

Titaporn Chaisin, Somchit Damrianant, Chalermwoot Sompark

and Niramol Sakkayawong*

Department of Biotechnology, Faculty of Science and Technology, Thammasat University,

Rangsit Centre, Khlong Nueng, Khlong Luang, Pathum Thani 12120

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้ได้ศึกษาเปรียบเทียบประสิทธิภาพการต้านอนุมูลอิสระของลิ้นทะเลที่ผ่านความร้อน ลิ้นทะเลที่ไม่ผ่านความร้อน ไคตินและไคโตซาน รวมทั้งศึกษาประสิทธิภาพการต้านอนุมูลอิสระของลิ้นทะเลที่เหมาะสมร่วมกับน้ำมะนาว โดยวิธีที่นำมาใช้ในการทดสอบ ได้แก่ การยับยั้งอนุมูลอิสระดีพีพีเอช และอนุมูลอิสระไฮดรอกซิล พบว่าลิ้นทะเลที่ผ่านความร้อนอุณหภูมิ 250 องศาเซลเซียส เวลา 15 นาที ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีการยับยั้งอนุมูลอิสระดีพีพีเอชร้อยละ 61.28 และยับยั้งอนุมูลอิสระไฮดรอกซิลร้อยละ 54.14 เมื่อนำลิ้นทะเลมาผ่านขั้นตอนการเตรียมเป็นไคตินและไคโตซาน พบว่าร้อยละผลผลิตของไคตินและไคโตซานที่ได้มีค่า 37.95 และ 69.10 ตามลำดับ และเมื่อใช้เทคนิค Fourier transform infrared (FT-IR) ในการตรวจสอบปฏิกิริยาการกำจัดหมู่เอซเทิลออกของไคตินเป็นไคโตซาน พบว่าค่าระดับการกำจัดหมู่เอซเทิล (degree of deacetylation, % DD) มีค่าร้อยละ 87.50 นอกจากนี้พบว่าประสิทธิภาพการยับยั้งอนุมูลอิสระดีดีพีเอชและอนุมูลอิสระไฮดรอกซิลของลิ้นทะเล ไคตินและไคโตซานให้การยับยั้งน้อยกว่าร้อยละ 50 เมื่อศึกษาการต้านอนุมูลอิสระของลิ้นทะเลที่เหมาะสมร่วมกับน้ำมะนาว พบว่าลิ้นทะเลที่ผ่านความร้อนอุณหภูมิ 250 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ที่ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นลิ้นทะเลที่เหมาะสมที่นำมาใช้ร่วมกับน้ำมะนาว โดยให้การยับยั้งอนุมูลอิสระดีดีพีเอชร้อยละ 93.85 และยับยั้งอนุมูลอิสระไฮดรอกซิลร้อยละ 76.78 ตามลำดับ

คำสำคัญ : ลิ้นทะเล; ไคโตซาน; DPPH radical; hydroxyl radical

Abstract

Comparisons of antioxidant activities by scavenging assays of DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) and hydroxyl radicals, among unheated/heated cuttlebones, chitin and chitosan were studied. Phosphoric acid extracts of heated cuttlebones at temperature 250 °C for 15 min at

concentration 10 mg/mL showed a potent antioxidant effects, 61.28 % DPPH inhibition and 54.14 % hydroxyl radicals inhibition. Chitin and chitosan were prepared from cuttlebones with the yields of 37.95 and 69.10 %, respectively. By means of the Fourier transform infrared (FT-IR) technique, degree of deacetylation (DD) of chitosan was 87.50 %. The scavenging activities of DPPH and hydroxyl radical inhibition of unheated cuttlebone, chitin and chitosan were less than 50 %. The heated cuttlebones were further selected for adding with lemon juice, those effects in scavenging DPPH and hydroxyl radical inhibition were 93.85 and 76.78 %, respectively.

Keywords: cuttlebone; chitosan; DPPH radical; hydroxyl radical

1. คำนำ

ลันทะเลจัดเป็นของเสียทางอุตสาหกรรมอาหาร เนื่องจากลันทะเลเป็นส่วนที่อยู่แกนกลางของหมึกกระดอง ไม่นิยมนำมาบริโภค ทำหน้าที่เพียงช่วยพยุงตัวให้หมึกกระดองเคลื่อนไหวในน้ำได้อย่างรวดเร็ว องค์ประกอบที่สำคัญของลันทะเลคือ ไคตินและไคโตซาน ซึ่งจัดเป็นโพลีเมอร์ที่อยู่ร่วมกันในธรรมชาติ โดยไคตินเป็นพอลิเมอร์สายยาวเป็นองค์ประกอบของหน่วยย่อยอนุพันธ์น้ำตาลกลูโคสมีชื่อว่า N-acetyl glucosamine ส่วนไคโตซานเป็นพอลิเมอร์ของหน่วยย่อยที่ชื่อว่า glucosamine มากกว่า 60 เปอร์เซ็นต์ ขึ้นไป (ประภัสสร, 2557) นอกจากนี้มีหมู่อะมิโนที่แสดงสมบัติพิเศษเช่น ละลายได้ในกรดอินทรีย์เจือจาง สามารถจับกับอ็อกซเจนของโลหะได้ดี และมีฤทธิ์ทางชีวภาพ (Cadman *et al.*, 2012) รวมถึงเป็นสารที่สกัดได้จากธรรมชาติ ดังนั้นลันทะเลจึงเป็นแหล่งของไคตินและไคโตซานที่มีราคาต้นทุนต่ำ เหมาะสำหรับการพัฒนาเพื่อใช้ประโยชน์ต่อไป (Ramasamy *et al.*, 2014)

ภูมิปัญญาชาวบ้านในสมัยก่อน มีการนำลันทะเลมาเป็นส่วนประกอบของยารักษาสิวและฝ้า โดยนำลันทะเลที่สะอาดมาบั้งเผาไฟให้ร้อนจนมีสีเหลืองอ่อน จากนั้นบดให้ละเอียดผสมกับน้ำมันาวจนเป็นเนื้อเหนียวข้น นำไปทาบริเวณที่เป็นสิวและ

ผื่นก่อนนอน จนถึงเช้าจึงล้างออก เชื่อว่าลันทะเลที่มีสรรพคุณรskemกร่อย จึงสามารถฆ่าเชื้อโรคได้ นอกจากนี้ มีการใช้ลันทะเลเป็นส่วนประกอบของยากวาดคอเด็กซึ่งมีสรรพคุณแก้เม็ดหรือตุ่มที่เกิดในช่องปากและลำคอ (ชยันต์ และคณะ, 2542) จากงานวิจัยของ จักรพงศ์ และพนิดา ในปี พ.ศ. 2555 พบว่าเมื่อให้ความร้อนแก่ลันทะเล มีผลทำให้แคลเซียมคาร์บอเนตที่เป็นองค์ประกอบของลันทะเลมีโครงสร้างที่เปลี่ยนแปลงไป ปัจจุบันมีการนำลันทะเลมาพัฒนาและประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมเกษตร ทางการแพทย์ และเภสัชกรรม เช่น ผลิตภัณฑ์เสริมอาหารเพื่อคุณภาพในการลดไขมันและคอเลสเตอรอล เครื่องสำอาง สารเร่งการเจริญเติบโตในพืชและสัตว์ สารเคลือบผลไม้เพื่อยืดอายุการเก็บรักษา และแผ่นฟิล์มปิดแผล ช่วยให้แผลหายเร็ว (ศูนย์เทคโนโลยีโลหะและวัสดุแห่งชาติ, 2547) จากงานวิจัยของ Vino และคณะ ในปี ค.ศ. 2012 เมื่อนำลันทะเล *Sepia aculeata* มาศึกษาไคโตซานและไคโตซานซัลเฟต พบว่าไคโตซานประกอบด้วยธาตุแคลเซียม 30 ppm โซเดียม 0.092 ppm ทองแดง 0.172 ppm แมกนีเซียม 3.601 ppm แมงกานีส 0.264 ppm และสังกะสี 0.924 ppm ค่า DA (degree of acetylation) เมื่อทดสอบด้วย IR spectroscopy มีค่าเท่ากับ 49.9 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อทดสอบด้วย UV spectrophotometer มีค่า

เท่ากับ 40.56 เปอร์เซ็นต์ ไคโตซานซัลเฟตแสดงฤทธิ์การกำจัดอนุมูลอิสระในระดับที่สูง โดยการกำจัดอนุมูลซูเปอร์ออกไซด์ ($O_2^{\bullet-}$) มีค่าเท่ากับ 88.60 เปอร์เซ็นต์ และการกำจัดอนุมูลไฮดรอกซิล ($OH^{\bullet}$) มีค่าเท่ากับ 72.1 เปอร์เซ็นต์ ส่วนการแย่งจับโลหะหนักของไคโตซานซัลเฟต อยู่ในระดับปานกลางมีค่าเท่ากับ 62.6 เปอร์เซ็นต์ที่ความเข้มข้น 1,000 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ขณะเดียวกันการแสดงฤทธิ์ในการให้อิเล็กตรอน อยู่ในระดับต่ำโดยที่ความเข้มข้นของไคโตซานซัลเฟต 0.75 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 0.300 เมื่อเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน BHA และ ascorbic acid ที่มีค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 2.305 และ 2.05 ตามลำดับ จึงสรุปได้ว่าไคโตซานและไคโตซานซัลเฟตที่ได้จากลิ้นทะเล มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ ความสามารถในการให้อิเล็กตรอน ความสามารถในการแย่งจับกับธาตุโลหะหนักของไคโตซานและไคโตซานซัลเฟตมีค่าเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้น (Vino *et al.*, 2012)

ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมุ่งเน้นศึกษาเพื่อเปรียบเทียบสมบัติบางประการของลิ้นทะเลที่ผ่านการให้ความร้อน และไม่ผ่านการให้ความร้อน ในการออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ เพื่อยับยั้งอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นได้แก่ อนุมูล DPPH และอนุมูลไฮดรอกซิล ($OH^{\bullet}$) เพื่อพัฒนาเป็นส่วนประกอบใช้งานด้านเวชสำอางต่อไป

2. อุปกรณ์และวิธีการ

2.1 การเตรียมผงลิ้นทะเล

นำลิ้นทะเลมาล้างน้ำให้สะอาด ตากให้แห้ง และผ่านการให้ความร้อนด้วยตู้อบ (Memmert, U30 oven, เยอรมนี) อุณหภูมิ 250 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15, 30, 45 และ 60 นาที บดให้ละเอียดโดยใช้เครื่องบด (Sharp, EM-ICE, ไทย) เป็นเวลา 15 นาที และแยกขนาดลิ้นทะเลด้วยเครื่องเขย่าคัด

แยกอนุภาคด้วยตะแกรง (Shieve shaker) (Retsch, AS200-Digit, เยอรมนี) จะได้ขนาดอนุภาคน้อยกว่า 0.063, 0.070, 0.105, 0.177 และ 0.505 มิลลิเมตร โดยในการทดลองเลือกใช้ช่วงลิ้นทะเลขนาดน้อยกว่า 0.063 มิลลิเมตรและเก็บใส่ถุงซิปล็อคเพื่อป้องกันความชื้น

2.2 ขั้นตอนการเตรียมโคตินและไคโตซานจากลิ้นทะเล

ลิ้นทะเล 100 กรัม ที่ผ่านการล้างน้ำ และตากให้แห้งแล้ว หักให้เป็นชิ้นเล็กขนาด 3-5 เซนติเมตร ใส่ในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 2 โมลาร์ ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร กวนที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นกรองเอาสารละลายทิ้ง ล้างน้ำจนโซเดียมไฮดรอกไซด์หมดเพื่อกำจัดโปรตีน และกำจัดแร่ธาตุด้วยกรดไฮโดรคลอริก ความเข้มข้น 2 โมลาร์ ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร กวนที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 ชั่วโมง เนื่องจากจะมีก๊าซเกิดขึ้นจากการทำปฏิกิริยา ดังนั้นควรทำการคนเป็นระยะ ๆ ในช่วงแรกของการปฏิกิริยา จากนั้นกรองเอาส่วนที่เป็นสารละลายทิ้ง ล้างน้ำจนกรดไฮโดรคลอริกหมด อบให้แห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ได้โคตินและเปลี่ยนเป็นไคโตซานโดยใช้สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 50 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร กวนที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง กรองเอาสารละลายทิ้ง ใช้เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (Beckman, PHL 32, สหรัฐอเมริกา) ปรับให้พีเอชอยู่ในช่วง 6.5-6.8 และอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ได้ไคโตซาน จากนั้นคำนวณหาร้อยละผลผลิตของโคตินและไคโตซาน

2.3 การเตรียมลิ้นทะเลผสมน้ำมันมะนาว

น้ำมันมะนาวจำนวน 10 ลูก หั่นและคั้นมะนาวให้ได้ปริมาตร 100 มิลลิลิตร และกรองด้วยระบบสูญญากาศ (Rocker 400, ใต้หวัน) นำลิ้น

ทะเลขขนาด 0.063 มิลลิเมตร มาละลายกับน้ำมะนาว ให้ได้ความเข้มข้น 0.1, 0.5, 1.0, 5.0 และ 10.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร กวนที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นกรองด้วยระบบสุญญากาศอีกครั้ง สารละลายตัวอย่างที่ได้เก็บไว้ทดสอบในขั้นตอนต่อไป

2.4 การทดสอบอนุมูลอิสระ

2.4.1 วิธี DPPH radical scavenging
ดัดแปลงมาจากวิธีของ Shimada และคณะ (1992) และกรณิการ์ และคณะ (2556)

นำผงลิ้นทะเลจากวิธีข้างต้นที่ไม่ผ่านความร้อน ผงลิ้นทะเลที่ผ่านความร้อนอุณหภูมิ 250 องศาเซลเซียส ไคติน ไคโตซาน และลิ้นทะเลที่ละลายกับน้ำมะนาว โดยเตรียมสารละลายให้แต่ละตัวอย่างมีความเข้มข้น 0.1, 0.5, 1.0, 5.0 และ 10.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ด้วยตัวทำละลายเมทานอล จากนั้นปิเปตสารละลายตัวอย่างปริมาตร 100 ไมโครลิตร เติมสารละลาย DPPH ความเข้มข้น 0.08 มิลลิโมลาร์ ในเมทานอล ปริมาตร 900 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากัน ตั้งไว้ในที่มืด 30 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง UV spectrophotometer (Shimadzu, UV-1601, ญี่ปุ่น) โดยใช้สารละลายวิตามินซีเป็นสารมาตรฐาน คำนวณเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการต้านอนุมูลอิสระจากสมการ 2.1 คือ $\text{Inhibition (\%)} = [(A_{\text{control 517 nm}} - A_{\text{sample 517 nm}}) \times 100] \div A_{\text{control 517 nm}}$

2.4.2 วิธี hydroxyl radical scavenging
ดัดแปลงมาจากวิธีของ Halliwell และคณะ (1987)

นำสารละลายที่ประกอบด้วยผงลิ้นทะเลที่ผ่านและไม่ผ่านความร้อน ไคตินและไคโตซาน และลิ้นทะเลที่ละลายกับน้ำมะนาว ความเข้มข้น 0.1, 0.5, 1.0, 5.0 และ 10.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 100 ไมโครลิตร กับน้ำตาลดีออกซีไรโบส 0.28 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ไฮโดร-เจนเปอร์ออกไซด์ 500 ไมโครโมลาร์

ปริมาตร 100 ไมโครลิตร เฟอร์ริกคลอไรด์ 500 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 50 ไมโครลิตร กรดอีทิลีนไดอะมีน เททราอะซีติก 100 ไมโครโมลาร์ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร สารละลายวิตามินซี 100 ไมโครโมลาร์ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร และโพแทสเซียมฟอสเฟต บัฟเฟอร์ 20 มิลลิโมลาร์ (ค่าพีเอช 7.4) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมสาร (Scientific Industries, G560E, สหรัฐอเมริกา) นำไปใส่ตู้บ่ม (Binder, ED240, สหรัฐอเมริกา) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที จากนั้นเติมกรดไทโอบาร์บิทริก 1 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) 1 มิลลิลิตร และกรดไตรคลอโรอะซิติก 2 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) 1 มิลลิลิตร นำมาใส่ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Julabo, TW, เยอรมนี) เป็นเวลา 15 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง นำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 532 นาโนเมตรโดยเครื่อง UV spectrophotometer (Shimadzu, UV-1601, ญี่ปุ่น) และใช้สารละลายกรดวิตามินซีเป็นสารมาตรฐาน คำนวณเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการต้านอนุมูลอิสระจากสมการ 2.2 คือ $\text{Inhibition (\%)} = [(A_{\text{control 532 nm}} - A_{\text{sample 532 nm}}) \times 100] \div A_{\text{control 532 nm}}$

3. ผลและวิจารณ์

3.1 การเตรียมไคตินและไคโตซานจากลิ้นทะเล

การเตรียมไคตินและไคโตซานจากลิ้นทะเล เตรียมโดยการเติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ เพื่อกำจัดโปรตีน และกำจัดแร่ธาตุโดยใช้กรดไฮโดรคลอริก อบให้แห้งอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส จนแห้งได้ไคติน และเปลี่ยนเป็นไคโตซานโดยใช้สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ จากตารางที่ 1 พบว่าร้อยละผลผลิตของไคตินจากลิ้นทะเล มีค่าเท่ากับ 37.95 เปอร์เซ็นต์ และร้อยละผลผลิตของไคโตซานจากลิ้นทะเลมีค่าเท่ากับ 69.10 เปอร์เซ็นต์

ดังนั้นสามารถสรุปได้ว่าในลันทะเลมีโครงสร้างของไคตินเป็นองค์ประกอบรวมอยู่และสามารถนำมาผ่านกระบวนการกำจัดหุ้มอะเซทิลเพื่อเปลี่ยนรูปเป็นไคโตซานได้ ซึ่งสอดคล้องกับข้อมูลของศูนย์เทคโนโลยีโลหะและวัสดุแห่งชาติ (2547) ที่ได้รวบรวมไว้ว่าแหล่งวัตถุดิบในการสกัดไคตินได้มาจากเปลือกของสัตว์ตระกูลครัสเตเชียนจำพวกปู กุ้ง และแครงหมึก คิดเป็นประมาณ 15-20 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักตัวแห้ง) และตามปกติไคตินจะอยู่ร่วมกับโปรตีน เม็ดสี ไขมัน และแคลเซียมคาร์บอเนตในเปลือกของสัตว์ดังกล่าว ได้มีการพัฒนาวิธีการต่างๆ ในการสกัดไคติน แต่มีขั้นตอนหลัก คือ (1) การสกัดเอาแร่ธาตุออกด้วยกรดไฮโดรคลอริก และ (2) กำจัดโปรตีนด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ แต่การใช้ดังทำให้เกิดการเปลี่ยนไคตินเป็นไคโตซานได้ ในบางกรณีมีการใช้เอนไซม์ในการย่อยโปรตีนออกไป (Roberts *et al.*, 1992) ซึ่งเหมาะสำหรับการสกัด

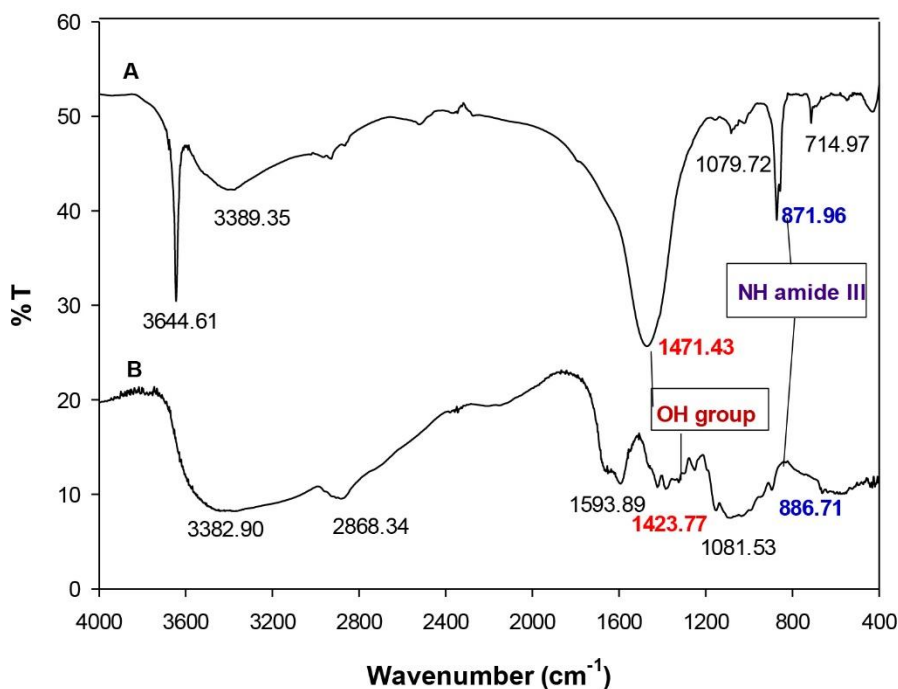
เพื่อแยกเอาไคตินออกมาเพียงอย่างเดียว

ตารางที่ 1 ร้อยละผลผลิตของไคตินและไคโตซานจากลันทะเล

สารตัวอย่าง	ร้อยละผลผลิต
ไคติน	37.95
ไคโตซาน	69.10

3.2 การศึกษาโครงสร้างและองค์ประกอบของไคโตซาน

การศึกษาโครงสร้างและองค์ประกอบของไคโตซาน โดยนำไคโตซานที่ได้จากลันทะเลและไคโตซานมาตรฐานจากเปลือกกุ้งมาตรวจสอบด้วยเทคนิค Fourier transform infrared (FT-IR) ซึ่งได้โครมาโทแกรมดังรูปที่ 1



รูปที่ 1 Fourier transform infrared (FT-IR) ศึกษาโครงสร้างและองค์ประกอบของไคโตซานจากลันทะเล (A) และไคโตซานจากเปลือกกุ้ง (B)

รูปที่ 1 พบว่าโคโตซานที่ได้จากลั่นทะเลและโคโตซานมาตรฐานจากเปลือกกุ้งมีหมู่ OH group มีเลขคลื่น 1471.43 cm^{-1} และ 1423.77 cm^{-1} ตามลำดับ และ NH Amide III มีเลขคลื่น 871.96 cm^{-1} และ 886.81 cm^{-1} ตามลำดับ แสดงถึงโคโตซานที่ได้จากลั่นทะเลมีองค์ประกอบที่คล้ายคลึงกับโคโตซานมาตรฐานจากเปลือกกุ้ง แต่ลักษณะโครงสร้างฟิสิกส์แตกต่างกัน และจากตารางที่ 2 เมื่อศึกษาการก่อกำจัดหมู่อะซีทิลพบว่าระดับการก่อกำจัดหมู่อะซีทิลของโคโตซานจากลั่นทะเลและโคโตซานจากเปลือกกุ้งมีค่า 87.5 และ 89.0 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานของ ศูนย์เทคโนโลยีโลหะและวัสดุแห่งชาติ (2547) ที่พบว่าโคตินและโคโตซานเป็นสารสกัดที่ได้จากธรรมชาติ คุณภาพของวัตถุดิบจึงไม่คงที่ ขึ้นอยู่กับปัจจัยทางธรรมชาติที่ยากแก่การควบคุม โดยแหล่งกำเนิดของวัตถุดิบมีผลต่อสมบัติของโคตินและโคโตซานที่ได้ คือ ลักษณะโครงสร้างของผลึกโคตินที่ได้จากเปลือกกุ้งและกระดองปูจะมีลักษณะโครงสร้างเป็นเส้นใยเรียงซ้อนกันสลับไปมาหลายชั้นในคนละทิศ (antiparallel) และแน่น ทำให้มีโครงสร้างแข็งแรงมากที่สุด ในขณะที่โครงสร้างผลึกของโคตินที่ได้จากแกนหมึกจะอยู่ในรูปของบีตา มีลักษณะโครงสร้างเป็นเส้นใยเรียงซ้อนกันไปในทิศทางเดียวกันหลายชั้น (parallel) แต่ไม่แน่นมากเหมือนชนิดอัลฟา ทำให้โครงสร้างแข็งแรงน้อย (Yen *et al.*, 2008; Vairamani *et al.*, 2013) ส่วนปฏิกิริยา deacetylation ที่ให้ได้ ค่า DD เท่ากับ 90 เปอร์เซ็นต์ นั้นทำได้ยากในขั้นตอนเดียว ซึ่งขนาดของวัตถุดิบจะมีผลต่อความสามารถในการแทรกตัวเข้าทำปฏิกิริยา และมีผลต่อสมบัติของโคโตซานที่ได้ (Kurita *et al.*, 1977) นอกจากนี้ในการทำปฏิกิริยาดังกล่าวยังต้องใช้ขั้นตอนอื่นเพิ่ม เช่น การล้างด้วยน้ำหรือการละลายแล้วตกตะกอนก่อนนำกลับมา deacetylation อีกครั้งเพื่อเพิ่ม % DD ให้มากขึ้น

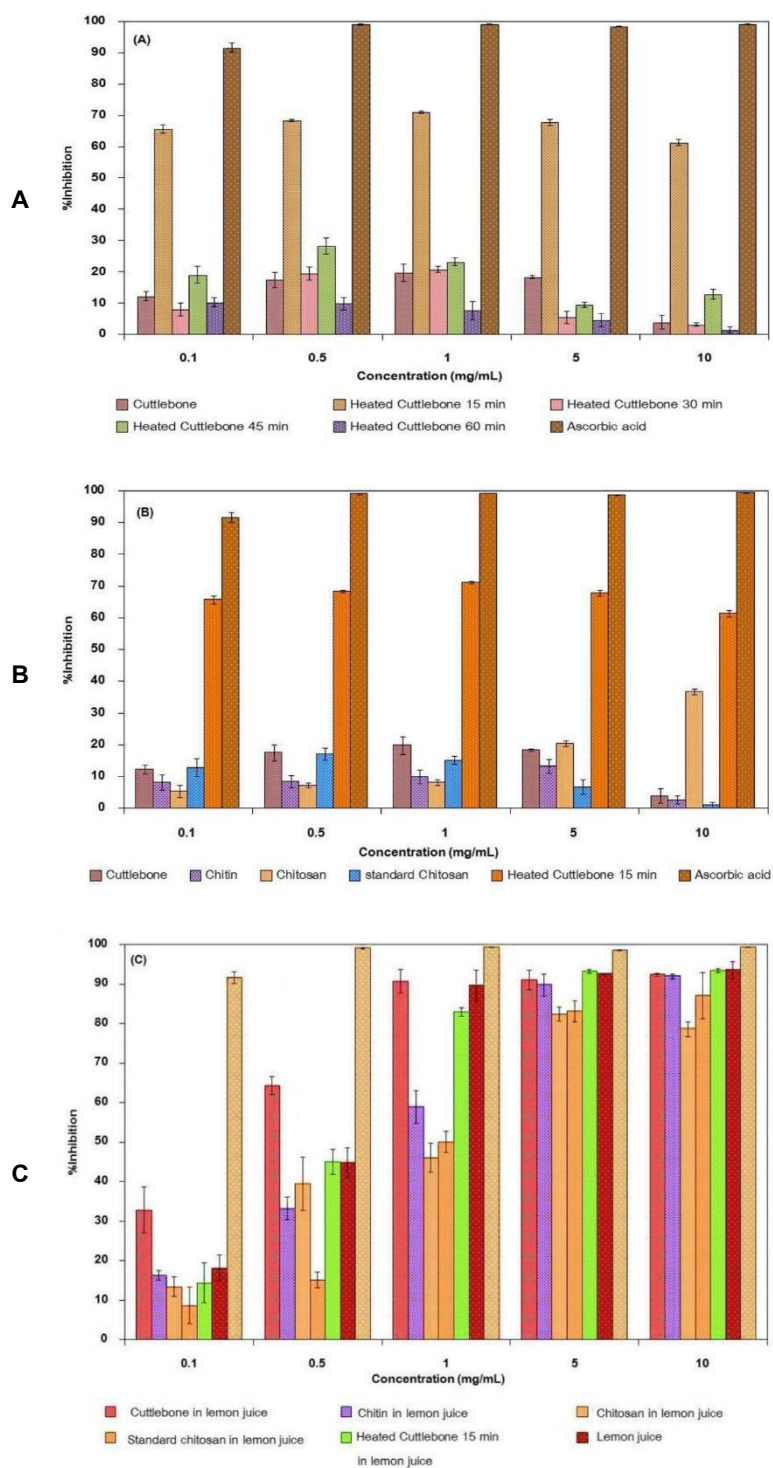
(Roberts, 1997)

ตารางที่ 2 ระดับการก่อกำจัดหมู่อะซีทิล (% DD) ของโคโตซานและโคโตซานมาตรฐาน

ชนิดของโคโตซาน	Degree of deacetylation (% DD)
ลั่นทะเล	87.50
กุ้ง	89.00

3.3 การยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH ของลั่นทะเล

การศึกษาเปอร์เซ็นต์ในการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH จัดแปลงจากวิธีของ Shimada และคณะ (1992) โดยใช้ลั่นทะเลที่ผ่านและไม่ผ่านความร้อนผสมกับสารละลายอนุมูลอิสระ DPPH ตั้งทิ้งไว้ในที่มืด แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 517 นาโนเมตร จากรูปที่ 2A พบว่าลั่นทะเลที่ผ่านความร้อนอุณหภูมิ 250 องศาเซลเซียส เวลา 15 นาที ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ให้การยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH ดีที่สุด เท่ากับ 61.28 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเทียบกับสารละลายมาตรฐานกรวดิตามินซียังคงให้ค่าที่ต่ำกว่าสารละลายมาตรฐานกรวดิตามินซีที่ความเข้มข้นเดียวกัน แต่ในขณะที่ลั่นทะเลที่ผ่านการให้ความร้อนที่ระยะเวลาที่มากกว่า 15 นาทีให้ค่าการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH ค่อนข้างต่ำ เนื่องมาจากระยะเวลาที่ยาวขึ้นทำให้ลั่นทะเลไหม้เกรียมมากเกินไปค่าการยับยั้งจึงมีค่าลดลง เนื่องจากการให้ความร้อนที่อุณหภูมิสูงในเวลาที่เหมาะสม จะไปทำลายโครงสร้างพันธะของแคลเซียมคาร์บอเนต ทำให้เพิ่มสมบัติในการละลายของสารได้ดียิ่งขึ้น ถ้าเพิ่มเวลานานขึ้นอาจเป็นตัวกระตุ้นให้เกิดอนุมูลอิสระขึ้นมาใหม่แทน (จักรพงษ์ และพนิตา, 2555)



รูปที่ 2 การยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH ของล้นทะเลที่ผ่านความร้อนอุณหภูมิ 250 องศาเซลเซียส และไม่ผ่านความร้อน (A) การยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH ของล้นทะเล ไคตินและไคโตซาน (B) และการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH ของล้นทะเลที่เหมาะสมร่วมกับน้ำมะนาว (C)

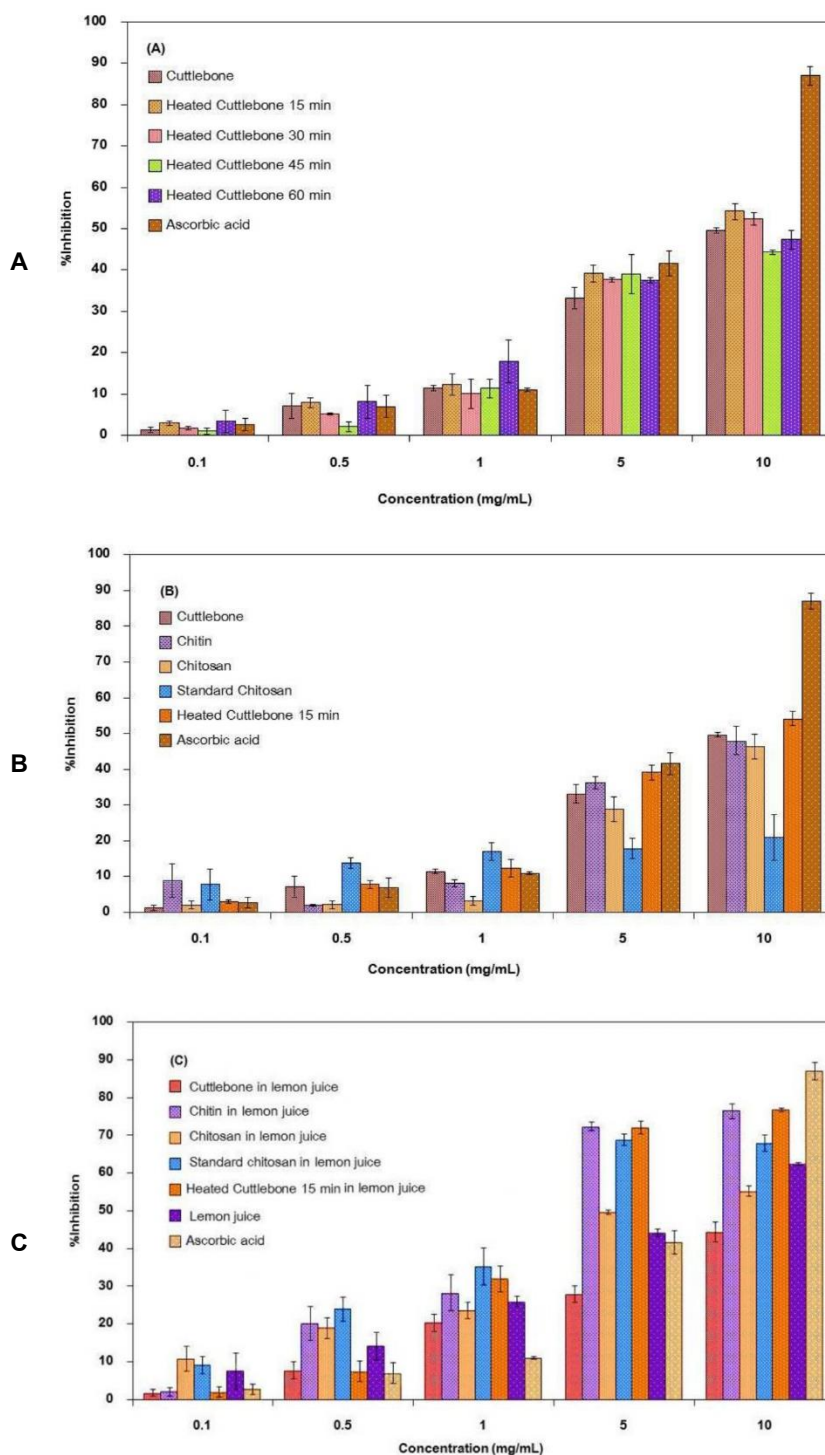
เมื่อพิจารณาถึงลิ้นทะเลที่ไม่ผ่านความร้อน ไคตินและไคโตซานที่เตรียมได้ แสดงในรูป 2B พบว่าให้ค่าการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH น้อยกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งค่าการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH ที่ได้จากไคตินและไคโตซานนี้สอดคล้องกับงานวิจัยของ Yen และคณะ (2008) ที่พบว่าไคโตซานจากเปลือกปูและเห็ดหอมมีประสิทธิภาพในการยับยั้งอนุมูล DPPH ไม่ค่อยสูงนักโดยอยู่ในช่วง 28.4-52.3 เปอร์เซ็นต์ และจากงานวิจัยของ Ramasamy และคณะ (2014) ที่ศึกษาฤทธิ์การยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH จากไคโตซานจากลิ้นทะเล *Sepia kabiensis* พบว่ามีค่ายับยั้งอนุมูล DPPH เท่ากับ 46.17 เปอร์เซ็นต์ โดยไคโตซานจะมีประสิทธิภาพการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH ที่เพิ่มขึ้นเมื่อทำให้เกิดปฏิกิริยา alkylation ของโครงสร้างของน้ำตาลของไคโตซานโดยจะทำให้มีการละลายที่เพิ่มมากขึ้นด้วย (Lin และ Chou, 2004) ซึ่งในการทดลองนี้มีการใช้กรดฟอร์มิกละลายลิ้นทะเล ไคตินและไคโตซาน อาจทำให้ประสิทธิภาพการยับยั้งลดลงเนื่องจากการละลายที่ไม่ดี ควรใช้กรดอะซิติกเป็นตัวทำละลายที่ดีกว่า

เมื่อศึกษาการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH ของลิ้นทะเลร่วมกับน้ำมะนาว แสดงในภาพ 2C พบว่าลิ้นทะเลที่ผ่านความร้อนอุณหภูมิ 250 องศาเซลเซียส เวลา 15 นาที ความเข้มข้น 5 และ 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ให้การยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH เท่ากับ 93.85 เปอร์เซ็นต์ ไม่แตกต่างกับการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH ของน้ำมะนาว และสารละลายกรดวิตามินซีที่ความเข้มข้นเดียวกันแสดงให้เห็นว่าการใช้ลิ้นทะเลละลายผสมกับน้ำมะนาวนั้น คาดว่าเป็นผลมาจากฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของตัวทำละลายมะนาวเพียงอย่างเดียว

3.4 ผลของการยับยั้งอนุมูลอิสระ hydroxyl ของลิ้นทะเล

การศึกษาเปอร์เซ็นต์ในการยับยั้งอนุมูลอิสระ hydroxyl ดัดแปลงจากวิธีของ Halliwell และคณะ (1987) โดยใช้ลิ้นทะเลที่ผ่านและไม่ผ่านความร้อนผสมกับสารละลายต่าง ๆ จากนั้นจึงสังเคราะห์ hydroxyl radical (OH[•]) ด้วยน้ำตาลดีออกซีไรโบสโดยใช้ปฏิกิริยา Fenton reaction model system ทำได้โดยเมื่อเติมกรดไทโอบาร์บิทริก (TBA) และกรดไตรคลอโรอะซิติก (TCA) ทำให้เกิดสีชมพูนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 532 นาโนเมตร จากรูปที่ 3A พบว่าลิ้นทะเลที่ผ่านความร้อนอุณหภูมิ 250 องศาเซลเซียส เวลา 15 นาที ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ให้การยับยั้งอนุมูลอิสระ hydroxyl 54.14 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระ hydroxyl ที่สูงกว่าลิ้นทะเลที่ผ่านความร้อน 250 องศาเซลเซียส ในเวลา 30, 45 และ 60 นาที เนื่องมาจากระยะเวลาที่มากขึ้นทำให้ลิ้นทะเลไหม้เกรียมมากเกินไปค่าการยับยั้งจึงมีค่าลดลง และเมื่อเทียบกับสารละลายมาตรฐานกรดวิตามินซี ยังคงให้ค่าที่ต่ำกว่าที่ความเข้มข้นเดียวกันนอกจากนี้อาจเนื่องมาจากลิ้นทะเลที่ผ่านความร้อนในเวลาที่เหมาะสมโครงสร้างพันธะของแคลเซียมคาร์บอเนตถูกทำลาย ทำให้เพิ่มสมบัติในการละลายของสารได้ดียิ่งขึ้น แต่ถ้าเวลานานเกินไปอาจทำให้เกิดอนุมูลอิสระขึ้นมาใหม่ทดแทน (จักรพงษ์ และพนิตา, 2555) น่าจะมีผลทำให้ค่าการยับยั้งอนุมูลอิสระ hydroxyl ลดลงได้

เมื่อพิจารณาถึงลิ้นทะเลที่ไม่ผ่านความร้อน ไคตินและไคโตซานที่เตรียมได้จากลิ้นทะเลแสดงในรูป 3B พบว่าให้ค่าการยับยั้งอนุมูลอิสระ hydroxyl น้อยกว่าลิ้นทะเลที่ผ่านความร้อนอุณหภูมิ 250 องศาเซลเซียส เวลา 15 นาที ที่ความเข้มข้น 5 และ 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งมีค่าการยับยั้งอนุมูลไฮดรอกซิล 40-50 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเป็นค่าที่ไม่สูงเทียบเท่ากับงานวิจัยของ Ramasamy และคณะ (2014) ที่ศึกษาฤทธิ์การยับยั้งอนุมูลอิสระ hydroxyl



รูปที่ 3 การยับยั้งอนุมูลอิสระ hydroxyl ของลิ้นทะเลที่ผ่านความร้อนอุณหภูมิตั้งแต่ 250 องศาเซลเซียส และไม่ผ่านความร้อน (A) การยับยั้งอนุมูลอิสระ hydroxyl ของลิ้นทะเล ไคตินและไคโตซาน (B) และการยับยั้งอนุมูลอิสระ hydroxyl ของลิ้นทะเลที่เหมาะสมร่วมกับน้ำมะนาว (C)

จากโคโตซานในลันทะเล *Sepia kabiensis* โดยพบว่ามีการยับยั้งอนุมูล hydroxyl สูงสุดที่ 62.39 เปอร์เซ็นต์ ทั้งนี้อาจเนื่องจากการใช้กรดฟอร์มิกเป็นตัวทำลายทำให้ลันทะเล โคตินและโคโตซานดังกล่าวมีการละลายที่ไม่ดีทำให้การยับยั้งอนุมูล hydroxyl มีค่าต่ำไปด้วย ซึ่งจริง ๆ แล้วจากงานวิจัยของ Yen และคณะ (2008) พบว่าโคโตซานจะมีสมบัติในการยับยั้งอนุมูลอิสระ hydroxyl สูงถึง 62.3-77.6 เปอร์เซ็นต์ และค่ายับยั้งอนุมูลอิสระ hydroxyl จะแปรผันตามค่าระดับการกำจัดหมู่อะเซทิล (degree of deacetylation, % DD) ของโคโตซาน เมื่อโคโตซานที่มีหมู่อะมิโนมากขึ้นจะส่งผลต่อการยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชันของกรดลิโนเลอิก และการเพิ่มปฏิกิริยาการต้านอนุมูลอิสระ (Yen *et al.*, 2007) อย่างไรก็ตาม การยับยั้งอนุมูลอิสระ hydroxyl ของ ลันทะเลที่ไม่ผ่านความร้อน โคตินและโคโตซาน และลันทะเลที่ผ่านความร้อน ยังคงมีค่าน้อยกว่าสารละลายมาตรฐานกรดวิตามินซีอย่างมีนัยสำคัญ

นอกจากนี้ เมื่อศึกษาการยับยั้งอนุมูลอิสระ hydroxyl ของลันทะเลร่วมกับน้ำมะนาว แสดงในรูป 3C พบว่าลันทะเลที่ผ่านความร้อน อุณหภูมิ 250 องศาเซลเซียส เวลา 15 นาที ความเข้มข้น 5 และ 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ร่วมกับมะนาว ให้การยับยั้งอนุมูลอิสระ hydroxyl เท่ากับ 70.12 และ 76.78 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ สูงกว่าการยับยั้งอนุมูลอิสระ hydroxyl ของน้ำมะนาว และสารละลายกรดวิตามินซีเพียงอย่างเดียวที่ความเข้มข้นเดียวกัน แสดงให้เห็นว่าลันทะเลที่ผ่านความร้อน อุณหภูมิ 250 องศาเซลเซียส เวลา 15 นาที ส่งเสริมการยับยั้งอนุมูลอิสระ hydroxyl เมื่อผสมร่วมกับมะนาว

4. สรุป

การเปลี่ยนลันทะเลให้เป็นโคตินด้วยวิธีการ-

ใช้ต่างในการกำจัดโปรตีน และใช้กรดเพื่อกำจัดแร่ธาตุปนเปื้อน พบว่าผลผลิตของโคตินมีค่าเท่ากับ 37.95 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อเปลี่ยนโคตินเป็นโคโตซานโดยใช้ต่างเข้มข้นสูง ได้ผลผลิตของโคโตซานมีค่าสูงถึง 69.10 เปอร์เซ็นต์ เมื่อตรวจสอบปฏิกิริยา deacetylation โดยใช้เทคนิค Fourier transform infrared (FT-IR) พบว่าค่าระดับการกำจัดหมู่อะเซทิลของโคโตซาน 87.50 เปอร์เซ็นต์ เมื่อศึกษาประสิทธิภาพการต้านอนุมูลอิสระของลันทะเลโดยวิธี DPPH radicals และ hydroxyl radicals (OH[•]) พบว่าลันทะเลที่ผ่านความร้อนอุณหภูมิ 250 องศาเซลเซียส เวลา 15 นาที ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ให้การยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH เท่ากับ 61.28 เปอร์เซ็นต์ และยับยั้งอนุมูลอิสระ hydroxyl เท่ากับ 54.14 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ ประสิทธิภาพการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH และอนุมูลอิสระ hydroxyl ของลันทะเล โคตินและโคโตซานให้การยับยั้งน้อยกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ เมื่อศึกษาการต้านอนุมูลอิสระของลันทะเลที่เหมาะสมร่วมกับน้ำมะนาว พบว่าลันทะเลที่ผ่านความร้อนอุณหภูมิ 250 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ที่ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นลันทะเลที่เหมาะสมที่นำมาใช้ร่วมกับน้ำมะนาวโดยให้การยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH เท่ากับ 93.85 เปอร์เซ็นต์ และยับยั้งอนุมูลอิสระ hydroxyl เท่ากับ 76.78 เปอร์เซ็นต์

5. รายการอ้างอิง

กรรณิการ์ มหาสารกุล, นิรมล ศากยวงศ์, ปาริยา ณ นคร, วรพันธ์ นาคบรรพต และรุ่งลักษณ์ ประทุมชัย, 2556, อายุของผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มสมุนไพรรางจืดในขวดปิดสนิท : สมบัติทางเคมีและกายภาพ และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ, Thai J. Sci. Technol. 2: 141-152.
จักรพงษ์ ไชยบุรี และพนิตา สุมานะตระกูล, 2555,

- การผลิตน้ำมันไบโอดีเซลจากน้ำมันปาล์มโดยใช้ตัวเร่งปฏิกิริยาจากกระดองปลาหมึก, ว. วิทยาศาสตร์บูรพา 2: 1-7.
- ชยันต์ พิเชียรสุนทร, แม้นมาศ ชาลิต และวิเชียร จีรวงส์, 2542, คำอธิบายตำราพระโอสถพระนารายณ์, สำนักพิมพ์อมรินทร์, กรุงเทพฯ.
- ปภัสนธร สุรพัฒน์วารณ, ไคตินและไคโตซาน, แหล่งที่มา : <http://www.gpo.or.th/rdi/html/chitin.html>, 10 มกราคม 2559.
- ศูนย์เทคโนโลยีโลหะและวัสดุแห่งชาติ, การผลิตไคตินและไคโตซาน, แหล่งที่มา : <http://www.mtec.or.th/images/pdf/chitin-chitosan/chapter3.pdf>, 15 มกราคม 2559.
- Cadman, J., Zhou, S., Chen, Y. and Li, Q., 2012, Cuttlebone: characterization, application and development of biomimetic materials, J. Biomech. Eng. 9: 367-376.
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C. and Aruoma, O.I., 1987, The deoxyribose method: A simple test-tube assay for determination of rate constants for reactions of hydroxyl radicals, Anal. Biochem. 165: 215-219.
- Kurita, K., Sannan, T. and Iwakura, Y., 1977, Studies on chitin, Preparation of pure chitin, poly (N-acetyl-D-glucosamine), from the water-soluble chitin, Macromol. Chem. Phys. 178: 2595-2602.
- Lin, H.Y. and Chou, C.C., 2004, Antioxidant activities of water-soluble disaccharide chitosan derivatives, Food Res. Int. 37: 883-889.
- Ramasamy, P., Subhapradha, N., Shanmugam, V. and Shanmugam, A., 2014, Extraction, characterization and antioxidant property of chitosan from cuttlebone *Sepia kobeensis* (Hoyle 1885), Int. J. Biol. Macromol. 64: 202-212.
- Roberts, G., Baxter, A., Dillon, M. and Anthony, K.D., 1992, Improved method for i.r. determination of the degree of N-acetylation of chitosan, Int. J. Boil. Macromol. 14: 166-169.
- Roberts, G.A., 1997, Chitosan production routes and their role in determining the structure and properties of the product, Chitin Sci. 3: 22-31.
- Shimada, K., Fujikawa, K., Yahara, K. and Nakamura, T., 1992, Antioxidative properties of xanthan on the autoxidation of soybean oil in cyclodextrin emulsion, J. Agric. 40: 945-948.
- Vino, A.B., Ramasamy, P., Shanmugam, V. and Shanmugam, A., 2012, Extraction, characterization and in vitro antioxidative potential of chitosan and sulfated chitosan from cuttlebone of *Sepia aculeata* Orbigny, Asian Pac. J. Trop. Biomed. 2: 334-341.
- Vairamani, S., Subhapradha, N., Ramasamy, P., Raveendran, S., Srinivasan, A. and Shanmugam, S., 2013, Physicochemical characteristics and antioxidant efficacy of chitosan from the internal shell of spineless cuttlefish *Sepiella inermis*, Prep. Biochem. Biotech. 43: 696-716.
- Yen, M.T., Tseng, Y.H., Li, R.C. and Mau, J.L., 2007, Antioxidant properties of fungal chitosan from shitake stipes, LWT-Food Sci. Technol. 40: 255-261.
- Yen, M.T., Yang, J.H. and Mau, J.L., 2008, Antioxidant properties of chitosan from crab shells, Carbohydr. Polym. 74: 840-844.