

การศึกษาโปรไฟล์และความสัมพันธ์ของสารเมแทบอลิต์ในสาหร่ายทะเล
Sargassum polycystum *Caulerpa lentillifera* และ *Gracilaria fisheri*
 A Study of Metabolite Profiles and Relationships in the Seaweeds
Sargassum polycystum, *Caulerpa lentillifera* and *Gracilaria fisheri*

อรัชพร ทองโอหาร^{1,2} ทิวธวัช นาพิรุณ¹ และสุเปญญา จิตตพันธ์^{1,2*}
 Arachaporn Thong-olran^{1,2}, Tiwtawat Napiroon¹ and Supenya Chittapun^{1,2*}

บทคัดย่อ

สาหร่ายทะเลมีความหลากหลายทางชีวภาพสูงและผลิตสารเมแทบอลิต์ทุติยภูมิที่มีศักยภาพสำหรับการพัฒนาในหลากหลายอุตสาหกรรม งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อวิเคราะห์โปรไฟล์และความสัมพันธ์ของสารเมแทบอลิต์ที่สกัดได้จากส่วนลิโปฟิลิก (lipophilic) ของสาหร่ายทะเล 3 ชนิดที่พบในประเทศไทย ได้แก่ *Sargassum polycystum* *Caulerpa lentillifera* และ *Gracilaria fisheri* โดยนำสาหร่ายทั้งสามชนิดมาแช่หมักด้วยเมทานอลและแยกสารด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟีโดยใช้ตัวทำละลายเฮกเซนต่อเอทิลอะซิเตท (อัตราส่วน 85-95:15-5 โดยปริมาตร) ประเมินความสัมพันธ์ขององค์ประกอบด้วยการจัดกลุ่ม (cluster analysis) และ principal component analysis (PCA) ผลการศึกษาพบสารเมแทบอลิต์ 112 ชนิด จัดกลุ่มตามโครงสร้างทางเคมีได้ 26 กลุ่ม สารสำคัญหลักในสาหร่ายทะเล *S. polycystum* และ *C. lentillifera* คือ สเตียรอยด์ (24 และ 23 เพอร์เซ็นต์ตามลำดับ) ในขณะที่ *G. fisheri* มีกรดไขมันไม่อิ่มตัวเอสเทอร์เป็นสารเด่น (21 เพอร์เซ็นต์) การวิเคราะห์พบความคล้ายคลึงขององค์ประกอบสารเมแทบอลิต์หลักระหว่าง *S. polycystum* และ *C. lentillifera* ซึ่งแตกต่างจาก *G. fisheri* และระบบตัวทำละลายนี้สามารถแยกสารกลุ่มกรดไขมันไม่อิ่มตัวเอสเทอร์จาก *S. polycystum* ในส่วนสารสกัดแบบส่วนที่ 2 และสเตียรอยด์จาก *C. lentillifera* และ *G. fisheri* ในส่วนสารสกัดแบบส่วนที่ 3 งานวิจัยนี้ชี้ให้เห็นถึงศักยภาพของสาหร่ายทะเลทั้งสามชนิดในฐานะวัตถุดิบสำหรับการสกัดสารเมแทบอลิต์ และแสดงให้เห็นว่าข้อมูลความสัมพันธ์ของสารเมแทบอลิต์สามารถนำไปประยุกต์ใช้เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพกระบวนการสกัด อันจะนำไปสู่การพัฒนาผลิตภัณฑ์ในอุตสาหกรรมต่าง ๆ ได้ในอนาคต

¹ สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ศูนย์รังสิต

² หน่วยวิจัยสาหร่ายและแพลงก์ตอน คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ศูนย์รังสิต

* Corresponding author e-mail: supenyac@tu.ac.th

DOI: <https://doi.org/10.65217/wichchajnstu.2025.v44i2.265605>

Received: 9 December 2024, Revised: 30 January 2025, Accepted: 10 February 2025

คำสำคัญ: สาหร่ายทะเล การแยกส่วน สารสกัดหยาบลีโปฟิลิก โครมาโทกราฟี-แมสสเปกโตรเมตรี การจัดกลุ่ม

Abstract

Seaweeds exhibit high biodiversity and produce secondary metabolites with potential applications in various industries. This study aims to analyze the profiles and relationships of metabolites extracted from the lipophilic fractions of three seaweed species commonly found in Thailand, including *Sargassum polycystum*, *Caulerpa lentillifera*, and *Gracilaria fisheri*. The seaweeds were extracted using methanol and fractionated by column chromatography with hexane:ethyl acetate as the solvent system at ratios ranging from 85-95:15-5 (%v/v). Chemical compositions were analyzed using gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS), and their relationships were assessed using cluster analysis and Principal Component Analysis (PCA). A total of 112 metabolites were identified and classified into 26 major groups according to their chemical structures. Steroids were the dominant compounds in *S. polycystum* and *C. lentillifera* (24% and 23%, respectively), whereas unsaturated fatty acid esters were predominant in *G. fisheri* (21%). Cluster analysis and PCA revealed similarities in the key metabolite compositions of *S. polycystum* and *C. lentillifera*, which were distinct from those of *G. fisheri*. This solvent system effectively isolated unsaturated fatty acid esters in Fraction 2 of *S. polycystum* and steroids in Fraction 3 from both *C. lentillifera* and *G. fisheri*. This research highlights the potential of these three seaweed species as raw materials for metabolite extraction and demonstrates that metabolite relationship data can be applied to optimize extraction processes, paving the way for product development in various industries.

Keywords: Seaweeds, Fractionation, Lipophilic crude extract, Gas chromatography-mass spectrometry, Cluster analysis

บทนำ

สาหร่ายทะเลเป็นสิ่งมีชีวิตที่มีความหลากหลายทางชีวภาพสูง และสร้างสารเมแทบอไลต์ทุติยภูมิ (secondary metabolites) ที่มีโครงสร้างทางเคมีแตกต่างกันซึ่งมีศักยภาพในการพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ที่มีมูลค่าสูงเป็นจำนวนมาก (Cornish and Garbary, 2010) จากงานวิจัยที่ผ่านมาได้รายงานสารเมแทบอไลต์จากสาหร่ายทะเลที่มีศักยภาพในการนำไปใช้ประโยชน์มากมาย เช่น แอสตาแซนธิน (astaxanthin) เป็นสารกลุ่มแคโรทีนอยด์ (carotenoids) (สายัณห์ และคณะ, 2566) มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระมากกว่าวิตามินอี 500 เท่า มีฤทธิ์ต้านการอักเสบ (Elbahnaswy and Elshopakey,

2024) และสามารถลดการแสดงออกและกิจกรรมของเอนไซม์เมทริกซ์เมทัลโลโปรตีนเนส (matrix metalloproteinases: MMPs) ซึ่งส่งผลทำให้สามารถป้องกันริ้วรอยที่เกิดจากแสงยูวีได้ (Imokawa, 2019) และฟูโคแซนทิน (fucoxanthin) เป็นสารในกลุ่มแคโรทีนอยด์ มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) ฤทธิ์ต้านการอักเสบ (anti-inflammatory) (Kumarasinghe and Gunathilaka, 2024) และมีฤทธิ์ต้านเบาหวาน (anti-diabetic) ซึ่งมีส่วนช่วยในการชะลอกระบวนการสะสมไขมันในเซลล์ (Sayuti *et al.*, 2023) จากคุณสมบัติของสารเมแทบอลิต์ต่าง ๆ ทำให้นิยมนำสารสกัดจากสาหร่ายทะเลมาพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์และอาหารเสริม นอกจากนี้สาหร่ายทะเลยังมีกรดไฮยาลูรอน (hyaluronic acid) ซึ่งเป็นสารช่วยรักษาความชุ่มชื้น (Farage *et al.*, 2007) ซึ่งนิยมใช้ในอุตสาหกรรมเครื่องสำอางอีกด้วย

การสกัดสารเมแทบอลิต์จากสาหร่ายทะเลมีด้วยกันหลายวิธี เช่น การสกัดด้วยตัวทำละลาย การสกัดด้วยเอนไซม์ การสกัดด้วยคลื่นความถี่สูง การสกัดด้วยคลื่นไมโครเวฟ การสกัดด้วยของไหลความดันสูง และการสกัดสารด้วยของไหลวิกฤตยิ่งยวด (Batool and Mena, 2020) การเลือกวิธีการสกัดสารจากสาหร่ายทะเลควรพิจารณาถึงคุณสมบัติของสารเป้าหมายที่ต้องการ จากงานวิจัยที่ผ่านมา การสกัดสารจากสาหร่ายทะเลใช้วิธีที่หลากหลาย เช่น การสกัดฟูโคแซนทินจากสาหร่าย *Undaria pinnatifida* ใช้วิธีคาร์บอนไดออกไซด์เหนือวิกฤต (supercritical CO₂ extraction) มีประสิทธิภาพสูง ซึ่งไม่ทำให้สารเสื่อมสภาพจากความร้อนและมีสิ่งเจือปนน้อยทำให้ง่ายต่อการทำให้บริสุทธิ์ (Yin *et al.*, 2022) การสกัดสารฟีนอลิกจากสาหร่ายทะเล *Sargassum polycystum* ด้วยตัวทำละลายต่างกัน พบว่าการสกัดด้วยอะซิโตน 70 เปอร์เซ็นต์ ทำให้ได้ปริมาณสารฟีนอลิกมากที่สุด รองลงมา คือ สารละลายอะซิโตน 50 เปอร์เซ็นต์ และเอทิลอะซิเตท 100 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าตัวทำละลายที่แตกต่างกันสามารถสกัดสารจากสาหร่ายทะเลได้ปริมาณแตกต่างกัน (Wu *et al.*, 2022) ฉะนั้นการพัฒนาวิธีการแยกสาร (fractionation) ที่มีประสิทธิภาพ จะช่วยเพิ่มความแม่นยำในการแยกสารสำคัญและลดความซับซ้อนของกระบวนการทำให้บริสุทธิ์ ซึ่งการพัฒนากระบวนการแยกสารนั้นต้องอาศัยข้อมูลชนิดของสารเมแทบอลิต์ที่สกัดได้เพื่อเป็นแนวทางในการออกแบบวิธีการแยกสาร อันจะเป็นประโยชน์ต่อการศึกษาสารจากสาหร่ายในอนาคต จากการศึกษาที่ผ่านมาส่วนใหญ่ มุ่งเน้นการวิเคราะห์องค์ประกอบเฉพาะในสาหร่ายทะเลแต่ละชนิด ยังขาดการศึกษาเปรียบเทียบและวิเคราะห์ความสัมพันธ์ขององค์ประกอบเมแทบอลิต์ระหว่างสาหร่ายกลุ่มต่าง ๆ ซึ่งโปรไฟล์และความสัมพันธ์ขององค์ประกอบเมแทบอลิต์ระหว่างสาหร่ายกลุ่มต่าง ๆ สามารถใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการเลือกชนิดของสาหร่ายที่ใช้เป็นวัตถุดิบในการสกัดสารสำคัญ รวมทั้งข้อมูลความสัมพันธ์ของเมแทบอลิต์ยังสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการพัฒนาผลิตภัณฑ์จากสาหร่าย และการค้นหาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพชนิดใหม่ได้อีกด้วย งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาโปรไฟล์และความสัมพันธ์ของเมแทบอลิต์ที่สกัดได้จากส่วนของลิโปฟิลิก (lipophilic) ของสาหร่ายทะเลชนิดที่พบได้มากในประเทศไทย ชนิด *S. polycystum* *C. lentillifera* และ *G. fisheri* และศึกษากระบวนการการสกัดสารเพื่อให้ได้กลุ่มสารสำคัญหลักของสาหร่ายทะเลทั้งสามชนิด

วิธีดำเนินการวิจัย

1. การสกัดสารออกฤทธิ์จากสาหร่ายทะเล

เก็บตัวอย่างสาหร่ายทะเลสีน้ำตาล *S. polycystum* จากหาดขนอม จังหวัด นครศรีธรรมราช ในช่วงเดือนมกราคม พ.ศ. 2565 สาหร่ายทะเลสีเขียว *C. lentillifera* จากจังหวัด เพชรบุรี ในช่วงเดือนมกราคม พ.ศ. 2565 และสาหร่ายทะเลสีแดง *G. fisheri* จากจังหวัดสงขลา ในช่วงเดือนสิงหาคม พ.ศ. 2566 จำแนกชนิดของสาหร่ายตามคู่มือของ Coppejans *et al.* (2010) Ng *et al.* (2017) Noiraksar and Ajisaka (2009) และ Price (2011) และยืนยันการระบุชนิดโดย ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.บงกช วิชาชูเชิด มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

นำตัวอย่างสาหร่ายทะเลมาล้างน้ำให้สะอาด อบแห้งด้วยตู้อบลมร้อน (ยี่ห้อ BINDER , ประเทศเยอรมัน) ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง และบดให้ละเอียดเป็นผง สกัดสารออกฤทธิ์จากสาหร่ายทะเลโดยการแช่หมัก (maceration) โดยชั่งตัวอย่างสาหร่ายทะเลแห้ง ชนิดละ 500 กรัม ใส่ในขวดวัดปริมาตร (volumetric flask) 3,000-4,000 มิลลิลิตร เติมน้ำตาล ปริมาตร 1,500 มิลลิลิตร นำไปวางทิ้งไว้ในตู้มืด เป็นเวลา 7-10 วัน จากนั้นกรองตัวอย่างผ่านกระดาษ กรอง Whatman No. 1 นำสารที่สกัดได้มาระเหยแห้งภายใต้ความดันสุญญากาศด้วยเครื่องกลั่น ระเหยสารแบบหมุน (rotary evaporator) (ยี่ห้อ Heidolph รุ่น Hei-VAP, ประเทศเยอรมัน) ที่ความเร็ว 100-120 รอบต่อนาที (rpm) ความดัน 150-200 มิลลิบาร์ (mbar) อุณหภูมิ 45-60 องศาเซลเซียส เติมน้ำกลั่นและน้ำกลั่นลงไปใช้อัตราส่วน 1:1 แล้วเขย่าให้เข้ากันกับตัวอย่าง ตั้งทิ้งไว้ 30-45 นาที สารจะแยกเป็น 2 ส่วน ได้แก่ ส่วนไฮโดรฟิลิก (hydrophilic) และส่วนลิโปฟิลิก (ดัดแปลงวิธี มาจาก (Napiroon *et al.*, 2021) ไซแยกส่วนลิโปฟิลิกและนำไประเหยตัวทำละลายคลอโรฟอร์มออก จะได้สารสกัดหยาบส่วนลิโปฟิลิก (lipophilic crude extract) (Zhang and Lin, 2008) เก็บรักษา ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปแยกส่วนด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟี (column chromatography) ต่อไป

2. การแยกสารด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี

โหลดตัวอย่างสารสกัดหยาบส่วนลิโปฟิลิก 3 กรัมลงในคอลัมน์ และใช้เทคนิคคอลัมน์ โครมาโทกราฟี ใช้เฟสคงที่ (stationary phase) เป็นซิลิกาเจล 60N ขนาดอนุภาค 40-63 ไมโครเมตร ยี่ห้อ Cica 50-70 กรัม และเฟสเคลื่อนที่ คือ ตัวทำละลายเฮกเซนต่อเอทิลอะซิเตท ในอัตราส่วน 85-95:15-5 โดยปริมาตรต่อปริมาตร ซึ่งเป็นอัตราส่วนที่เหมาะสมในการแยกส่วนของสาร (ดัดแปลงวิธี มาจาก Buathong *et al.*, 2019) และทำการเก็บสารสกัดแบบส่วน (fraction) โดยกำหนดส่วนละ 50 มิลลิลิตร

3. การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีด้วยเทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟี-แมสสเปกโตรเมตรี

วิเคราะห์ชนิด ด้วยเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี-แมสสเปกโตรมิเตอร์ (gas chromatography - mass spectrometry: GC-MS) รุ่น Agilent 122-5532UI ใช้คอลัมน์ DB-5ms Ultra Inert Liner รุ่น Agilent 5190-2293 โดยสภาวะที่ใช้วิเคราะห์หาองค์ประกอบของสารด้วย เครื่อง GC-MS คือ อัตราการไหล 1.5 มิลลิลิตรต่อนาที ปริมาตรตัวอย่างที่ฉีด 10 ไมโครลิตร โดยใช้ เทคนิคหัวฉีดแบบ splitless ใช้เวลาในการวิเคราะห์ 58 นาที อุณหภูมิ (เริ่มต้น) 100 องศาเซลเซียส คงอุณหภูมิ (hold time) 3 นาที อุณหภูมิ (สุดท้าย) 310 องศาเซลเซียส

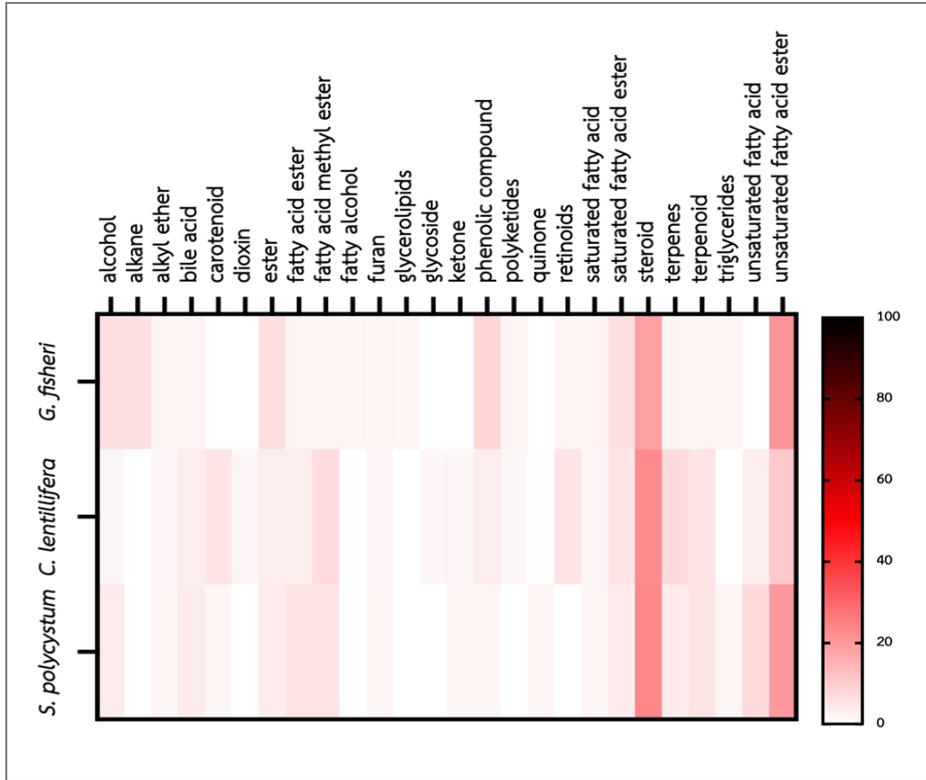
4. การวิเคราะห์ข้อมูลการจัดกลุ่มสารสำคัญ

จัดกลุ่มสารหายทะเลทั้งสามชนิดด้วยข้อมูลสารสำคัญที่สกัดได้จากส่วนลิโปฟิลิก โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป Prism เวอร์ชัน 10 และแสดงผลเป็นแผนที่ความร้อน (heat map) โดยใช้ความเข้มของสีเป็นตัวบ่งชี้ข้อมูล เพื่อช่วยให้เห็นความแตกต่างและคล้ายคลึงขององค์ประกอบของกลุ่มสารเมแทบอไลต์ในสาหร่ายทะเล ร่วมกับการจัดกลุ่มองค์ประกอบของสารเมแทบอไลต์ที่สกัดได้จากสาหร่ายทะเลด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป PC-ORD เวอร์ชัน 7.11 (McCune and Mefford, 2016) ข้อมูลที่ใช้ คือ องค์ประกอบของสารเมแทบอไลต์ และแปลงข้อมูลเบื้องต้นโดยใช้ลอการิทึม (log-transformation) เพื่อให้ข้อมูลมีการกระจายแบบปกติ จากนั้นใช้การจัดกลุ่มแบบสองทาง (two-way cluster analysis) ที่คู่ขนานกับการวิเคราะห์องค์ประกอบหลัก (principal components analysis: PCA) เพื่อวิเคราะห์ความผันแปรระหว่างตัวอย่าง และจัดกลุ่มองค์ประกอบของสารเมแทบอไลต์ในสาหร่ายทะเลโดยใช้ convex hull polygons

ผลการวิจัย

1. โปรไฟล์ของสารเมแทบอไลต์ในสาหร่ายทะเล

พบสารเมแทบอไลต์ที่สกัดได้จากส่วนลิโปฟิลิกของสาหร่ายทะเลทั้งสามชนิด รวมทั้งสิ้น 112 สาร ซึ่งสามารถจัดกลุ่มตามสารสำคัญหลัก (major compounds) ออกเป็น 26 กลุ่ม ได้แก่ แอลกอฮอล์ (alcohol) แอลเคน (alkane) อัลคิลอีเทอร์ (alkyl ether) กรดน้ำดี (bile acid) แคโรทีนอยด์ ไดออกซิน (dioxin) เอสเทอร์ (ester) กรดไขมันเอสเทอร์ (fatty acid ester) กรดไขมันเมทิลเอสเทอร์ (fatty acid methyl ester) แอลกอฮอล์ไขมัน (fatty alcohol) ฟูแรน (furan) กลีเซอรอลลิพิด (glycerollipids) ไกลโคไซด์ (glycoside) คีโตน (ketone) สารประกอบฟีนอลิก (phenolic compounds) โพลีคีไทด์ (polyketides) ควิโนน (quinone) เรตินอยด์ (retinoids) กรดไขมันอิ่มตัว (saturated fatty acid) กรดไขมันอิ่มตัวเอสเทอร์ (saturated fatty acid ester) สเตียรอยด์ (steroid) เทอร์พีน (terpenes) เทอร์พีนอยด์ (terpenoid) ไตรกลีเซอไรด์ (triglycerides) กรดไขมันไม่อิ่มตัว (unsaturated fatty acid) และกรดไขมันไม่อิ่มตัวเอสเทอร์ (unsaturated fatty acid ester) เมื่อวิเคราะห์องค์ประกอบของกลุ่มสารที่สกัดได้จากสาหร่ายทะเลทั้งสามชนิด พบว่าสารสำคัญเด่นของสาหร่ายทะเล *S. polycystum* และ *C. lentillifera* คือ สเตียรอยด์ โดยมีองค์ประกอบสูงสุด เท่ากับ 24 และ 23 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ รองลงมา ได้แก่ กรดไขมันไม่อิ่มตัวเอสเทอร์ มีองค์ประกอบเท่ากับ 20 และ 11 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งต่างจากสาหร่ายทะเล *G. fisheri* ที่พบกรดไขมันไม่อิ่มตัวเอสเทอร์ เป็นองค์ประกอบหลักเท่ากับ 21 เปอร์เซ็นต์ รองลงมา ได้แก่ สเตียรอยด์ มีองค์ประกอบเท่ากับ 19 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้สาหร่ายทะเลทั้งสามชนิดยังพบสารในกลุ่มอัลคิลอีเทอร์ ฟูแรน และกรดไขมันอิ่มตัว คิดเป็นสัดส่วน 2 เปอร์เซ็นต์ ขององค์ประกอบที่เท่ากัน ดังภาพที่ 1



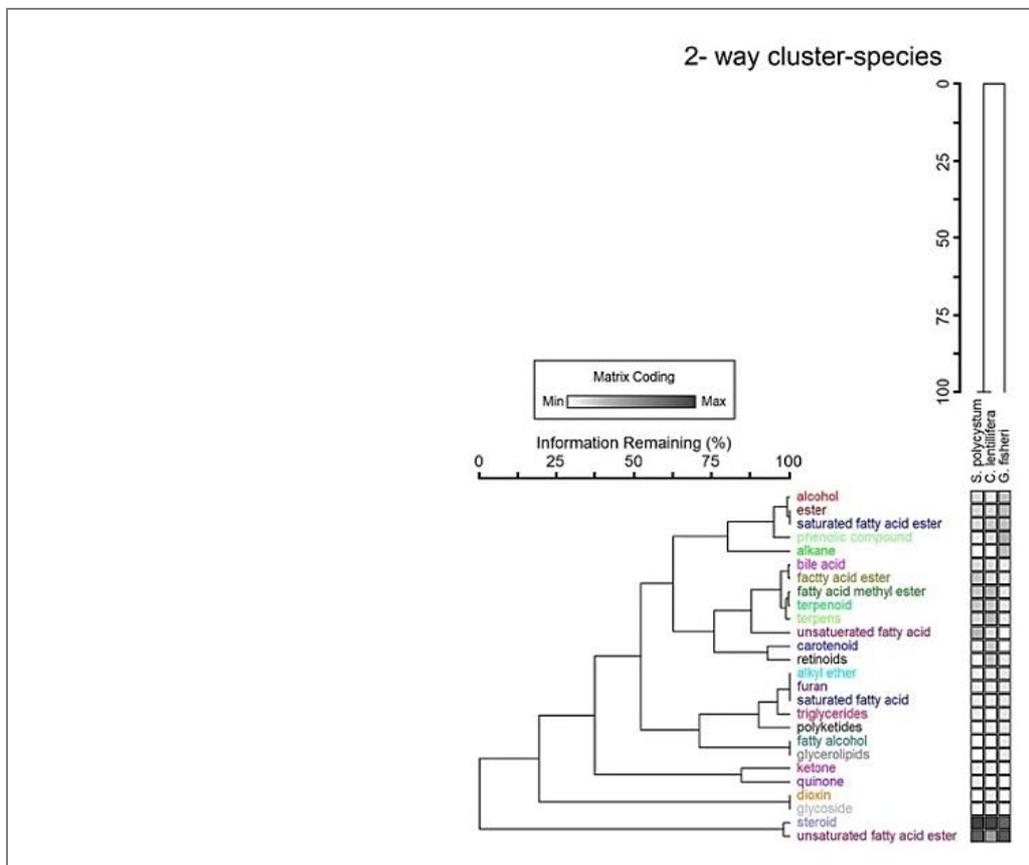
ภาพที่ 1 โพรไฟล์องค์ประกอบของสารเมแทบอไลต์ที่สกัดได้จากส่วนลิโปฟิลิกของสาหร่ายทะเล *S. polycystum* *C. lentillifera* และ *G. fisheri*

2. ความสัมพันธ์ของกลุ่มสารสำคัญหลักที่สกัดได้จากสาหร่ายทะเลทั้งสามชนิด

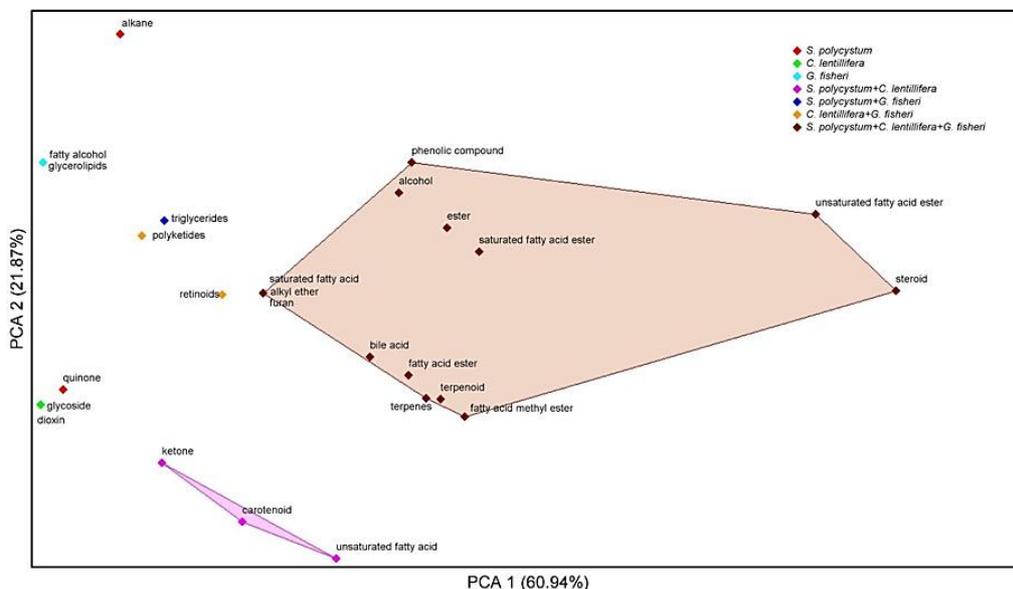
จากการวิเคราะห์การจัดกลุ่มแบบสองทางของกลุ่มสารสำคัญหลักที่เป็นองค์ประกอบของสาหร่ายทะเลทั้งสามชนิด พบว่า *S. polycystum* มีองค์ประกอบของสารสำคัญหลักที่สกัดได้จากส่วนของไลโปฟิลิกคล้ายคลึงกับ *C. lentillifera* มากที่สุดถึง 100 เปอร์เซ็นต์ และสาหร่ายทะเลทั้งสองชนิดนี้มีองค์ประกอบของสารสำคัญหลักต่างจาก *G. fisheri* (ภาพที่ 2)

จากการจำแนกสารสำคัญจากสาหร่ายทะเลทั้งสามชนิดด้วย PCA แสดงดังภาพที่ 3 โดยแกนที่ 1 สามารถอธิบายข้อมูลได้ 60.94 เปอร์เซ็นต์ และแกนที่ 2 อธิบายข้อมูลได้ทั้งสิ้น 21.87 เปอร์เซ็นต์ รวมทั้งสิ้นสามารถอธิบายข้อมูลได้ 82.81 เปอร์เซ็นต์ พบว่ากลุ่มสารสำคัญหลักที่พบเป็นองค์ประกอบในสาหร่ายทะเลทั้งสามชนิดมีทั้งสิ้น 14 กลุ่ม ได้แก่ แอลกอฮอล์ อัลคิลอีเทอร์ กรดน้ำดี เอสเทอร์ กรดไขมันเอสเทอร์ กรดไขมันเมทิลเอสเทอร์ ฟูแรน สารประกอบฟีนอลิก กรดไขมันอิ่มตัว กรดไขมันไม่อิ่มตัวเอสเทอร์ สเตียรอยด์ เทอร์พีน เทอร์พีนอยด์ และกรดไขมันไม่อิ่มตัวเอสเทอร์ กลุ่มสารสำคัญที่พบเป็นองค์ประกอบใน *S. polycystum* และ *C. lentillifera* มีทั้งสิ้น 3 กลุ่ม ได้แก่ แคโรทีนอยด์ คีโตน และกรดไขมันไม่อิ่มตัว กลุ่มสารสำคัญที่พบได้ทั้งใน *C. lentillifera* และ *G. fisheri* มีทั้งหมด 2 กลุ่ม ได้แก่ โพลีคีไทด์ และเรตินอยด์ กลุ่มสารสำคัญที่พบเป็นองค์ประกอบใน *S. polycystum* และ *G. fisheri* มีทั้งหมด 1 กลุ่ม ได้แก่ ไตรกลีเซอไรด์ และกลุ่มสารสำคัญที่พบเป็น

องค์ประกอบในสาหร่ายทะเลชนิดใดชนิดหนึ่ง ได้แก่ กลุ่มสารสำคัญที่พบได้เฉพาะ *S. polycystum* มี 1 กลุ่ม ได้แก่ ควิโนน และกลุ่มสารสำคัญที่พบได้เฉพาะ *C. lentillifera* มีทั้งหมด 2 กลุ่ม ได้แก่ ไดออกซิน และไกลโคไซด์ ส่วนกลุ่มสารที่สามารถพบได้เฉพาะใน *G. fisheri* มีทั้งหมด 3 กลุ่ม ได้แก่ แอลเคน แอลกอฮอล์ไขมัน และกลีเซอรอลลิพิด ดังภาพที่ 3



ภาพที่ 2 เดนโดแกรม (dendrogram) ของการวิเคราะห์การจัดกลุ่มแบบสองทาง กลุ่มสารสำคัญหลักทั้งหมด 26 ตัว ที่พบในสาหร่ายทะเลทั้งสามชนิด



ภาพที่ 3 PCA แสดงการจัดกลุ่มของกลุ่มสารสำคัญที่สกัดได้จากส่วนลิโปฟิลิกจากสาหร่ายทะเลทั้งสามชนิด

3. กระบวนการสกัดสารสำคัญในกลุ่มสเตียรอยด์และกรดไขมันไม่อิ่มตัวเอสเทอร์จากสารสกัดหยาบ

จากการศึกษาพบว่ากลุ่มสารเมแทบอไลต์หลักที่พบในสาหร่ายทะเลทั้งสามชนิด คือ สเตียรอยด์และกรดไขมันไม่อิ่มตัวเอสเทอร์ ซึ่งมีกระบวนการสกัดดังนี้ นำสารสกัดหยาบส่วนลิโปฟิลิกของสาหร่ายทะเลทั้งสามชนิด ที่ได้จากวิธีแช่หมักด้วยเมทานอล จากนั้นนำมาระเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องกลั่นระเหยสารแบบหมุน และนำมาแยกส่วน (partition) ในกรวยแยกโดยใช้ตัวทำละลายน้ำกลั่นกับไดคลอโรมีเทนเป็นอัตราส่วน 1:1 ตั้งทิ้งไว้ 30-45 นาที สารจะแยกเป็น 2 ส่วน ได้แก่ ส่วนไฮโดรฟิลิก และส่วนลิโปฟิลิก ไขแยกส่วนลิโปฟิลิกและนำไประเหยตัวทำละลายไดคลอโรมีเทนออก ได้เป็นสารสกัดหยาบส่วนลิโปฟิลิก นำมาแยกผ่านคอลัมน์โครมาโทกราฟี โดยใช้อัตราส่วนตัวทำละลาย เฮกเซน : เอทิลอะซิเตท เท่ากับ 85-95 : 15-5 โดยปริมาตรต่อปริมาตร เป็นเฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) และทำการเก็บสารสกัดส่วนละ 50 มิลลิลิตร จะพบกรดไขมันไม่อิ่มตัวเอสเทอร์และสเตียรอยด์ในสารสกัดแบบส่วนที่ 2 และ 3 ตามลำดับ ดังภาพที่ 4

(Tahir *et al.*, 2018) ส่วนสารกลุ่มสเตียรอยด์สามารถแยกได้จากสารสกัดแบบส่วนที่ 3 ของการสกัดสาหร่ายทะเล *C. lentillifera* และ *G. fisheri* ซึ่งสารกลุ่มสเตียรอยด์นี้มีการรายงานว่าสามารถสกัดได้จาก *U. fasciata* ซึ่งมีฤทธิ์ต้านการอักเสบ (Naikwadi *et al.*, 2023) และต้านมะเร็ง (Sundarraj *et al.*, 2012) และจาก *U. expansa Rhizoclonium riparium Codium isabelae C. sertularioides Spyridia filamentosa G. vermiculophylla* และ *Padina durvillaei* ที่สกัดด้วยตัวทำละลายเฮกเซน ซึ่งมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ต้านการอักเสบ ต้านมะเร็ง และป้องกันโรคหัวใจ (Zhang *et al.*, 2021) จากฤทธิ์ของสารสำคัญต่าง ๆ แสดงให้เห็นว่าสารสกัดจากสาหร่ายทะเลมีศักยภาพในการพัฒนาศึกษา และประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมยา อาหารเสริม และเครื่องสำอางได้ (Bialek *et al.*, 2016; Millman and Ross, 2003; Pulikkottil *et al.*, 2013)

จากข้อมูลกลุ่มสารเมแทบอลิต์ที่มีจำนวนมากทำให้ยากในการสกัดแยกสารแต่ละชนิด การจัดกลุ่มสารสำคัญจะช่วยให้สามารถนำไปประยุกต์ในกระบวนการสกัดสารได้ งานวิจัยนี้จึงได้จัดสารเมแทบอลิต์ตามกลุ่มสารสำคัญโดยอาศัยความสัมพันธ์ทางเคมี (Ullah *et al.*, 2024) และใช้โปรแกรม PC-ORD ในการวิเคราะห์การจัดกลุ่มสาหร่ายตามองค์ประกอบของสารสำคัญ รวมทั้งแสดงการกระจายตัวของกลุ่มสารสำคัญในสาหร่ายด้วยแผนที่ความร้อน (Ito *et al.*, 2014) จากการจัดกลุ่มองค์ประกอบของสารสำคัญในสาหร่ายทะเลทั้งสามชนิด พบกลุ่มสารทั้งสิ้น 14 กลุ่มที่เป็นองค์ประกอบในสาหร่ายทะเลทุกชนิด เช่น สารกลุ่มเทอร์พีนอยด์ที่มีการรายงานพบได้ทั้งในพืช สาหร่าย แมลง และจุลชีพ (ศิริวรรณ และประไพรัตน์, 2566) ซึ่งมีฤทธิ์ต้านการอักเสบและต้านมะเร็ง จึงนิยมนำไปพัฒนาในทางการแพทย์ รวมทั้งยังสามารถนำไปใช้เป็นส่วนผสมในน้ำหอมหรือการใช้ในอุตสาหกรรมเครื่องสำอาง แอลกอฮอล์อีกด้วย (Fan *et al.*, 2023) สารกลุ่มควิโนนเคยมีการรายงานพบใน *S. polycystum* ซึ่งมีฤทธิ์ในการต้านมะเร็ง ต้านเชื้อเอชไอวี (HIV) และต้านแบคทีเรีย สามารถนำไปพัฒนาใช้ในอุตสาหกรรมยา (Ferreira *et al.*, 2021) เป็นต้น

จากการวิเคราะห์องค์ประกอบของกลุ่มสารสำคัญที่สกัดได้จากส่วนลิโปฟิลิกในสาหร่ายทะเลทั้งสามชนิด พบว่า *S. polycystum* และ *C. lentillifera* มีองค์ประกอบของสารสำคัญที่คล้ายคลึงกันมากที่สุด และต่างจากสาหร่ายทะเล *G. fisheri* ผลการศึกษาความสัมพันธ์นี้แตกต่างจากการจัดสายวิวัฒนาการของสาหร่ายที่รายงานว่าสาหร่ายสีเขียวมีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับสาหร่ายสีแดงมากกว่าสาหร่ายสีน้ำตาล (Chan and Bhattacharya, 2010) ทั้งนี้สารสกัดส่วนลิโปฟิลิกของสาหร่ายสีเขียวและน้ำตาลมีความคล้ายคลึงกันอาจสะท้อนถึงการปรับตัวให้เข้ากับสภาพแวดล้อม ที่จะช่วยเพิ่มอัตราการรอดชีวิตและความได้เปรียบในการแข่งขันในแหล่งที่อยู่อาศัยทางทะเลที่หลากหลาย (Chhetri *et al.*, 2023) อย่างไรก็ตามหากจะนำข้อมูลองค์ประกอบของสารสำคัญไปประยุกต์ใช้ในการจัดลำดับสายวิวัฒนาการควรต้องเพิ่มเติมข้อมูลสารสกัดในส่วนของปฐมภูมิและในส่วนของไฮโดรฟิลิก ด้วยรวมทั้งเพิ่มจำนวนชนิดของสาหร่ายในแต่ละกลุ่มให้มากขึ้น จะได้เป็นฐานข้อมูลในการนำไปประยุกต์ใช้ร่วมกับการจัดลำดับสายวิวัฒนาการต่อไป

จากองค์ประกอบของสารสำคัญที่พบในสาหร่ายทะเลทั้งสามชนิด แสดงให้เห็นถึงศักยภาพของสาหร่ายทะเลในการใช้เป็นวัตถุดิบเพื่อสกัดสารสำคัญและนำไปใช้ในอุตสาหกรรมด้านต่าง ๆ รวมทั้งสามารถประยุกต์ใช้กระบวนการแยกสารสำคัญในส่วนองลิโปฟิลิกตามที่รายงานไว้ไปประยุกต์ใช้เพื่อสกัดสารสำคัญและนำไปศึกษาพัฒนาและประยุกต์ในอุตสาหกรรมด้านต่าง ๆ ต่อไป

สรุปผลการวิจัย

จากการสกัดสาหร่ายทะเลทั้งสามชนิดโดยเมทานอลและแยกส่วนลิโปฟิลิกไปวิเคราะห์พบสารเมแทบอลิต์ทั้งสิ้น 112 ชนิด และสามารถจัดกลุ่มสารสำคัญได้ทั้งสิ้น 26 กลุ่ม โดยกลุ่มสารสำคัญที่เป็นองค์ประกอบหลักในสาหร่ายทะเลทั้งสามชนิด ได้แก่ *S. polycystum* *C. lentillifera* และ *G. fisheri* คือ สเตียรอยด์และกรดไขมันไม่อิ่มตัวเอสเทอร์ โดยสามารถแยกสารกลุ่มกรดไขมันไม่อิ่มตัวเอสเทอร์จากสาหร่ายทะเล *S. polycystum* ได้ในสารสกัดแบบส่วนที่ 2 และสามารถแยกสารกลุ่มสเตียรอยด์จากสาหร่ายทะเล *C. lentillifera* และสาหร่ายทะเล *G. fisheri* ได้ในสารสกัดแบบส่วนที่ 3 และจากการวิเคราะห์องค์ประกอบของกลุ่มสารสำคัญพบว่า *S. polycystum* และ *C. lentillifera* มีความคล้ายคลึงกันมากที่สุด โดยสารสำคัญที่แยกได้สามารถนำไปพัฒนาผลิตภัณฑ์ใหม่ได้ในอนาคต

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากเงินอุดหนุนการทำกิจกรรมส่งเสริมและสนับสนุนการพัฒนาวิทยาศาสตร์ วิจัย และนวัตกรรม (ววน.) ทุนสนับสนุนงานพื้นฐาน TUFF 06/2567 นอกจากนี้ขอขอบคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.เทพปัญญา เจริญรัตน์ สำหรับขั้นตอนการเตรียมชีวมวลสาหร่ายทะเล ขอขอบคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.บงกช วิชาชูเชิด สำหรับการระบุชนิดของสาหร่ายทะเล ขอขอบคุณ ดร.สุเมธ คงเกียรติไพบูลย์ และนางสาวงามพัคตร์ ทายะนา ที่ช่วยในการวิเคราะห์สารสำคัญ ขอขอบคุณ นางสาวนิตา แซ่ตั้ง และอาจารย์วิจิตรา เฉิดฉิม สำหรับคำแนะนำในการวิเคราะห์ข้อมูลการจัดกลุ่มสารสำคัญในสาหร่ายทะเล และสาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ที่ให้การสนับสนุนเครื่องมือและอุปกรณ์พื้นฐานในการศึกษาวิจัยครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

- ศิริวรรณ ศรีสิทธิ์ และประไพรัตน์ สีพลไกร. (2566). เทอร์พีนอยด์ที่แยกได้จากมะดูก. *วารสารวิทยาศาสตร์บูรพา*, 28(3), 2087-2100.
- สายัญห์ นันชนะนะ สุพรรณษา ชันธโสภา และนาริสรา วงศ์สิงห์. (2566). ผลของความเข้มแสงต่อการเจริญเติบโตและการผลิตสารสีแคโรทีนอยด์ (carotenoids) ของสาหร่ายสายพันธุ์ *Chlorococcum* sp. TISTR 8266. *วารสารวิชา มหาวิทยาลัยราชภัฏนครศรีธรรมราช*, 42(1), 120-134, doi: <https://doi.org/10.65217/wichchajstru.2023.v42i1.256500>.
- Batool, A. and Mena, F. (2020). Concentration and purification of seaweed components by chromatography methods. In Tiwari, B.K. and Troy, D. (Eds.). *Sustainable seaweed technologies*, pp. 315-370. Amsterdam: Elsevier.
- Bialek, A., Bialek, M., Jelinska, M. and Tokarz, A. (2016). Fatty acid profile of new promising unconventional plant oils for cosmetic use. *International Journal of Cosmetic Science*, 38(4), 382-388, doi: <https://doi.org/10.1111/ics.12301>.

- Buathong, R., Schindler, F., Schinnerl, J., Valant-Vetschera, K., Bacher, M., Pottthast, A., Rosenau, T. and Vajrodaya, S. (2019). Uncommon fatty acids, iridoids and other secondary metabolites from the medicinal plant species *Ixora cibdela* Craib (Rubiaceae). *Phytochemistry Letters*, 33, 77-80, doi: <https://doi.org/10.1016/j.phytol.2019.07.011>.
- Chan, C.X. and Bhattacharya, D. (2010). The origin of plastids. *Nature Education*, 3(9), 84.
- Chhetri, B.K., Mojib, N., Moore, S.G., Delgadillo, D.A., Burch, J.E., Barrett, N.H., Gaul, D.A., Marquez, L., Soapi, K., Nelson, H.M., Quave, C.L. and Kubanek, J. (2023). Cryptic chemical variation in a marine red alga as revealed by nontargeted metabolomics. *ACS Omega*, 8(15), 13899-13910, doi: <https://doi.org/10.1021/acsomega.3c00301>.
- Coppejans, E., Prathep, A., Leliaert, F., Lewmanomont, K. and De Clerck, O. (2010). *Seaweeds of Mu Ko Tha Lae Thai (SE Thailand): Methodologies and field guide to the dominant species (Vol. 11)*. Bangkok: Biodiversity Research and Training Program.
- Cornish, M.L. and Garbary, D.J. (2010). Antioxidants from macroalgae: Potential applications in human health and nutrition. *Algae*, 25(4), 155-171, doi: <https://doi.org/10.4490/algae.2010.25.4.155>.
- Elbahnaswy, S. and Elshopakey, G.E. (2024). Recent progress in practical applications of a potential carotenoid astaxanthin in aquaculture industry: A review. *Fish Physiology and Biochemistry*, 50(1), 97-126, doi: <https://doi.org/10.1007/s10695-022-01167-0>.
- Fan, M., Yuan, S., Li, L., Zheng, J., Zhao, D., Wang, C., Wang, H., Liu, X. and Liu, J. (2023). Application of terpenoid compounds in food and pharmaceutical products. *Fermentation*, 9(2), 119, doi: <https://doi.org/10.3390/fermentation9020119>.
- Farage, M.A., Miller, K.W., Elsner, P. and Maibach, H.I. (2007). Structural characteristics of the aging skin: A review. *Cutaneous and Ocular Toxicology*, 26(4), 343-357, doi: <https://doi.org/10.1080/15569520701622951>.
- Ferreira, V.F., de Carvalho, A.S., Ferreira, P.G., Lima, C.G.S. and da Silva, F.C. (2021). Quinone-based drugs: An important class of molecules in medicinal chemistry. *Medicinal Chemistry*, 17(10), 1073-1085, doi: <https://doi.org/10.2174/1573406416666201106104756>.
- Imokawa, G. (2019). The xanthophyll carotenoid astaxanthin has distinct biological effects to prevent the photoaging of the skin even by its postirradiation treatment. *Photochemistry and Photobiology*, 95(2), 490-500, doi: <https://doi.org/10.1111/php.13039>.

- Ito, K., Sakata, K., Date, Y. and Kikuchi, J. (2014). Integrated analysis of seaweed components during seasonal fluctuation by data mining across heterogeneous chemical measurements with network visualization. *Analytical Chemistry*, 86(2), 1098-1105, doi: <https://doi.org/10.1021/ac402869b>.
- Kumarasinghe, H.S. and Gunathilaka, M.D.T.L. (2024). A systematic review of fucoxanthin as a promising bioactive compound in drug development. *Phytochemistry Letters*, 61, 52-65, doi: <https://doi.org/10.1016/j.phytol.2024.03.009>.
- McCune, B. and Mefford, M.J. (2016). *PC-ORD: Multivariate analysis of ecological data. Version 7*. Retrieved 27 November 2024, from: <https://static1.squarespace.com/static/58f588c93e00be17785ced5d/t/5bcccc404785d3d9aac3e266/1540148334020/PBooklet7.pdf>.
- Millman, R.B. and Ross, E.J. (2003). Steroid and nutritional supplement use in professional athletes. *The American Journal on Addictions*, 12(s2), S48-S54, doi: <https://doi.org/10.1111/j.1521-0391.2003.tb00556.x>.
- Naikwadi, P.H., Phatangare, N.D. and Mane, D.V. (2023). Active anti-inflammatory potency of γ -sitosterol from *Woodfordia floribunda* Salisb. *The Journal of Plant Science Research*, 38(2), 691-700, doi: <https://doi.org/10.32381/JPSR.2022.38.02.23>.
- Napiroon, T., Tanruean, K., Poolprasert, P., Bacher, M., Balslev, H., Poopath, M. and Santimaleeworagun, W. (2021). Cannabinoids from inflorescences fractions of *Trema orientalis* (L.) Blume (Cannabaceae) against human pathogenic bacteria. *PeerJ*, 9, e11446, doi: <https://doi.org/10.7717/peerj.11446>.
- Nazarudin, M.F., Alias, N.H., Balakrishnan, S., Wan Hasnan, W.N.I., Noor Mazli, N.A.I., Ahmad, M.I., Md Yasin, I.-S., Isha, A. and Aliyu-Paiko, M. (2021). Chemical, nutrient and physicochemical properties of brown seaweed, *Sargassum polycystum* C. Agardh (Phaeophyceae) collected from Port Dickson, Peninsular Malaysia. *Molecules*, 26(17), 5216, doi: <https://doi.org/10.3390/molecules26175216>.
- Nazarudin, M.F., Isha, A., Mastuki, S.N., Ain, N.M., Mohd Ikhsan, N.F., Abidin, A.Z. and Aliyu-Paiko, M. (2020). Chemical composition and evaluation of the α -glucosidase inhibitory and cytotoxic properties of marine algae *Ulva intestinalis*, *Halimeda macroloba*, and *Sargassum ilicifolium*. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2020(1), 2753945, doi: <https://doi.org/10.1155/2020/2753945>.
- Ng, P.K., Lin, S.M., Lim, P.E., Hurtado, A.Q., Phang, S.M., Yow, Y.Y. and Sun, Z. (2017). Genetic and morphological analyses of *Gracilaria firma* and *G. changii* (Gracilariaceae, Rhodophyta), the commercially important agarophytes in western Pacific. *Plos One*, 12(7), e0182176, doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0182176>.

- Noiraksar, T. and Ajisaka, T. (2009). Taxonomy and distribution of *Sargassum* (Phaeophyceae) in the Gulf of Thailand. In *Proceedings of the 19th International Seaweed Symposium* (pp. 513-527). Dordrecht: Springer.
- Price, I.R. (2011). A taxonomic revision of the marine green algal genera *Caulerpa* and *Caulerpella* (Chlorophyta, Caulerpaceae) in northern (tropical and subtropical) Australia. *Australian Systematic Botany*, 24(3), 137-213, doi: <https://doi.org/10.1071/SB10033>.
- Pulikkottil, B.J., Dauwe, P., Daniali, L. and Rohrich, R.J. (2013). Corticosteroid use in cosmetic plastic surgery. *Plastic and Reconstructive Surgery*, 132(3), 352e-360e, doi: <https://doi.org/10.1097/PRS.0b013e31829acc60>.
- Sayuti, N.H., Muhammad Nawawi, K.N., Goon, J.A., Mokhtar, N.M., Makpol, S. and Tan, J.K. (2023). A review of the effects of fucoxanthin on NAFLD. *Nutrients*, 15(8), 1954, doi: <https://doi.org/10.3390/nu15081954>.
- Sundarraj, S., Thangam, R., Sreevani, V., Kaveri, K., Gunasekaran, P., Achiraman, S. and Kannan, S. (2012). γ -Sitosterol from *Acacia nilotica* L. induces G2/M cell cycle arrest and apoptosis through c-Myc suppression in MCF-7 and A549 cells. *Journal of Ethnopharmacology*, 141(3), 803-809, doi: <https://doi.org/10.1016/j.jep.2012.03.014>.
- Tahir, N., Qader, K., Azeez, H. and Rashid, J. (2018). Inhibitory allelopathic effects of *Moringa oleifera* Lamk plant extracts on wheat and *Sinapis arvensis* L. *Allelopathy Journal*, 44, 35-48, doi: <https://doi.org/10.26651/allelo.j./2018-44-1-1152>.
- Tapotubun, A.M., Rieuwpassa, F., Supratman, U. and Setha, B. (2019). Effect of different drying methods on phytochemical content of *Caulerpa lentillifera* from Kei islands. *International Journal of ChemTech Research*, 12(6), 109-115, doi: <https://doi.org/10.20902/IJCTR.2019.120614>.
- Teramukai, K., Kakui, S., Beppu, F., Hosokawa, M. and Miyashita, K. (2020). Effective extraction of carotenoids from brown seaweeds and vegetable leaves with edible oils. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 60, 102302, doi: <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2020.102302>.
- Torres, P., Santos, J.P., Chow, F. and dos Santos, D.Y.A.C. (2019). A comprehensive review of traditional uses, bioactivity potential, and chemical diversity of the genus *Gracilaria* (Gracilariales, Rhodophyta). *Algal Research*, 37, 288-306, doi: <https://doi.org/10.1016/j.algal.2018.12.009>.

- Ullah, T., Muhammad, Z., Shah, I. A., Bourhia, M., Nafidi, H.-A., Mohammad Salamatullah, A. and Ali Younous, Y. (2024). Multivariate analysis of the summer herbaceous vegetation and environmental factors of the sub-tropical region. *Scientific Reports*, 14(1), 15657, doi: <https://doi.org/10.1038/s41598-024-63780-8>.
- Wu, Y., Gao, H., Wang, Y., Peng, Z., Guo, Z., Ma, Y., Zhang, R., Zhang, M., Wu, Q. and Xiao, J. (2022). Effects of different extraction methods on contents, profiles, and antioxidant abilities of free and bound phenolics of *Sargassum polycystum* from the South China Sea. *Journal of Food Science*, 87(3), 968-981, doi: <https://doi.org/10.1111/1750-3841.16051>.
- Yin, S., Niu, L., Shibata, M., Liu, Y. and Hagiwara, T. (2022). Optimization of fucoxanthin extraction obtained from natural by-products from *Undaria pinnatifida* stem using supercritical CO₂ extraction method. *Frontiers in Nutrition*, 9, 981176, doi: <https://doi.org/10.3389/fnut.2022.981176>.
- Zhang, K., Li, T., Shan, X., Lu, R., Zhang, S. and Xu, H. (2021). Cholesterol: Bioactivities, structural modification, mechanisms of action, and structure-activity relationships. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*, 21(14), 1830-1848, doi: <https://doi.org/10.2174/1389557521666210105123320>.
- Zhang, L.-L. and Lin, Y.-M. (2008). Tannins from *Canarium album* with potent antioxidant activity. *Journal of Zhejiang University SCIENCE B*, 9(5), 407-415, doi: <https://doi.org/10.1631/jzus.B0820002>.