

เอกสารนี้ออกโดย

วันที่ ๑๕ พฤษภาคม พ.ศ. ๒๕๕๙



## รายงานการวิจัย

สารต้านอนุมูลอิสระในผลิตภัณฑ์จากใบชา ใบหม่อน และใบมะรุม

Antioxidant Activities Assay in Mixture of Tea Leaves  
(*Camellia sinensis* Ktze.), Mulberry Leaves (*Morus alba* L.)  
and Horse Radish Leaves (*Moringa oleifera* Lam.)



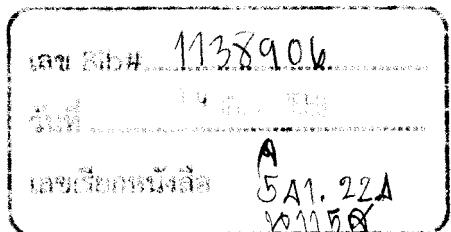
รายงานวิจัยฉบับนี้ได้รับเงินอุดหนุนการวิจัยจากงบประมาณกองทุนวิจัย  
มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา

พ.ศ. ๒๕๕๗

**ชื่องานวิจัย** สารต้านอนุมูลอิสระในผลิตภัณฑ์จากใบชา ใบหม่อน และใบมะรุม  
**ผู้วิจัย** นันธิดา ลีมสูญโข<sup>1</sup>  
**คณะ** วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี  
**ปี** 2557

### บทคัดย่อ

การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของชาสมุนไพรจากพืช 3 ชนิด ได้แก่ ใบชา ชาใบหม่อน และชาใบมะรุม โดยการทดสอบสารสกัดชาด้วยน้ำร้อน 100 องศาเซลเซียส ในอัตราส่วนต่าง ๆ ที่เวลา 2, 5, 10, 30 และ 60 นาที เพื่อหาอัตราส่วนและช่วงเวลาที่เหมาะสมแก่การชงชาสมุนไพรที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงสุด นำสารสกัดที่ได้ไปวิเคราะห์ทaborปริมาณสารประกอบฟินอลิกรวมและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH และ ABTS จากการศึกษาพบว่า สารสกัดใบชา มีปริมาณสารประกอบฟินอลิก รวมสูงสุดที่เวลา 2 นาที เท่ากับ  $80.45 \pm 0.04$   $\mu\text{g GAE/ml}$  มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH และ ABTS สูงสุดที่เวลา 60 นาที เท่ากับ  $88.58 \pm 0.00$  (ปริมาณ ascorbic acid  $35.00 \pm 0.01 \text{ ppmAA}/\mu\text{l}$ ) และ  $98.00 \pm 0.00$  เปอร์เซ็นต์ (ปริมาณ Trolox  $3.62 \pm 0.00 \text{ mg/ml}$ ) ตามลำดับ สารสกัดใบหม่อนและใบมะรุม มีปริมาณสารประกอบฟินอลิกรวมสูงสุดที่เวลา 60 นาที เท่ากับ  $43.71 \pm 0.66$  และ  $34.34 \pm 0.07$   $\mu\text{g GAE/ml}$  ตามลำดับ ใบหม่อนมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH และ ABTS สูงสุดที่เวลา 2 นาที เท่ากับ  $88.41 \pm 0.01$  (ปริมาณ ascorbic acid  $35.74 \pm 0.04 \text{ ppmAA}/\mu\text{l}$ ) และ  $98.06 \pm 0.00$  เปอร์เซ็นต์ (ปริมาณ Trolox  $3.41 \pm 0.00 \text{ mg/ml}$ ) ตามลำดับ ใบมะรุม มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH และ ABTS สูงสุดที่เวลา 2 นาที เท่ากับ  $87.98 \pm 0.07$  (ปริมาณ ascorbic acid  $37.59 \pm 0.01 \text{ ppmAA}/\mu\text{l}$ ) และ  $98.22 \pm 0.0$  เปอร์เซ็นต์ (ปริมาณ Trolox  $2.82 \pm 0.00 \text{ mg/ml}$ ) ตามลำดับ สารสกัดผสมทั้ง 3 ชนิดที่อัตราส่วนต่าง ๆ กัน พบร่วมกัน พบว่า ปริมาณสารประกอบฟินอลิกเพิ่มขึ้นตามเวลาการสกัดที่นานขึ้น เมื่อทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH พบร่วมกัน พบว่า สารสกัดผสมในชา+ใบหม่อน 0.5:1.5 w/w, ใบชา+ใบมะรุม 0.5:1.5 w/w, ใบหม่อน+ใบมะรุม 1.5:0.5 w/w และใบชา+ใบหม่อน+ใบมะรุมในอัตราส่วน 1.0:1.0:1.0 w/w มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงสุดที่เวลา 2 นาที เท่ากับ  $93.36 \pm 0.03$ ,  $93.70 \pm 0.00$ ,  $55.18 \pm 0.01$  และ  $96.51 \pm 0.00$  เปอร์เซ็นต์ (ปริมาณ ascorbic acid  $14.22 \pm 0.02$ ,  $12.70 \pm 0.02$ ,  $9.67 \pm 0.01$  และ  $0.52 \pm 0.01 \text{ ppmAA}/\mu\text{l}$ ) ตามลำดับ และ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ABTS พบร่วมกัน พบว่า สารสกัดผสมของใบชา+ใบหม่อน 1.5:0.5 w/w, ใบชา+ใบมะรุม 0.5:1.5 w/w, ใบหม่อน+ใบมะรุม 1.5:0.5 w/w และใบชา+ใบหม่อน+ใบมะรุม 1.5:1.0:0.5 w/w มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงสุดที่เวลา 2 นาที มีค่าเท่ากับ  $98.68 \pm 0.00$ ,  $98.39 \pm 0.01$ ,  $98.64 \pm 0.01$  และ  $98.62 \pm 0.00$  เปอร์เซ็นต์ (ปริมาณ Trolox  $1.15 \pm 0.00$ ,  $2.20 \pm 0.01$ ,  $1.65 \pm 0.00$  และ  $1.37 \pm 0.00 \text{ mg/ml}$ ) ตามลำดับ ซึ่งผลจากการศึกษาในครั้งนี้อัตราส่วนและเวลาที่ใช้ในการสกัดสามารถใช้เป็นข้อมูลนำไปใช้ในการชงชาให้มีคุณภาพและมีประโยชน์ต่อสุขภาพอีกด้วย



Research Title	Antioxidant Activities Assay in Mixture of Tea Leaves ( <i>Camellia sinensis</i> Ktze.), Mulberry Leaves ( <i>Morus alba</i> L.) and Horse Radish Leaves ( <i>Moringa oleifera</i> Lam.)
Researcher	Nunthida Limsettho
Faculty	Science and Technology
Year	2014

### Abstract

Tea leaves (*Camellia sinensis* L.), Tea Mulberry leaves (*Morus alba* L.) and Tea Moringa leaves (*Moringa oleifera* Lam.) are widely used in traditional herbal tea, based on the antioxidant property, 3 kinds of leaves were extracted with hot water at 100°C for 2, 5, 10, 30 and 60 minutes at various ratios. For the determination of total phenolic content (TPC), 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) free radical scavenging capacity assay and 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid (ABTS) cation radical scavenging assay. So, this study found that tea leaves extracted had the maximum of TPC at 2 minutes  $80.45 \pm 0.04$  µg GAE/ml and the maximum of radical scavenging activity DPPH and ABTS at 60 minutes were  $88.58 \pm 0.00\%$  (ascorbic acid  $35.00 \pm 0.01$  ppmAA/µl) and  $98.00 \pm 0.00\%$  (Trolox  $3.62 \pm 0.00$  mg/ml), respectively. Moringa and Mulberry leaves extracted had the maximum of TPC at 60 minutes were  $43.71 \pm 0.66$  and  $34.34 \pm 0.07$  µg GAE/ml respectively. Mulberry leaves extracted had the maximum of radical-scavenging activity DPPH and ABTS at 2 minutes were  $88.41 \pm 0.01\%$  (ascorbic acid  $35.74 \pm 0.04$  ppmAA/µl) and  $98.06 \pm 0.00\%$  (Trolox  $3.41 \pm 0.00$  mg/ml) respectively.. Moringa leaves extracted had the maximum of radical-scavenging activity DPPH and ABTS at 2 minutes were  $87.98 \pm 0.07$  (ascorbic acid  $37.59 \pm 0.01$  ppmAA/µl) and  $98.22 \pm 0.00\%$  (Trolox  $2.82 \pm 0.00$  mg/ml) respectively. However the mixed extracted at various ratios showed that the amount of TPC was increase when extraction longer. The mixture of Tea+Mulberry 0.5:1.5 w/w Tea+Moringa 0.5:1.5 w/w Mulberry+Moringa 1.5:0.5 w/w and Tea+Mulberry+Moringa 1.0:1.0:1.0 w/w/w leaves extracted showed that the maximum of % inhibition of DPPH at 2 minutes were  $93.36 \pm 0.03$ ,  $93.70 \pm 0.00$ ,  $55.18 \pm 0.01$  and  $96.51 \pm 0.00\%$  (ascorbic acid  $14.22 \pm 0.02$   $12.70 \pm 0.02$   $9.67 \pm 0.01$  and  $0.52 \pm 0.01$  ppmAA/µl), respectively, and the maximum of % inhibition of ABTS of the mixture of Tea+Mulberry 1.5:0.5 w/w Tea+Moringa 0.5:1.5 w/w Mulberry+Moringa 1.5:0.5 w/w and Tea+Mulberry+Moringa 1.5:1.0:0.5 w/w/w leaves extracted at 2 minutes were  $98.68 \pm 0.00$ ,  $98.39 \pm 0.01$ ,  $98.64 \pm 0.01$  and  $98.62 \pm 0.00\%$  (Trolox  $1.15 \pm 0.00$   $2.20 \pm 0.01$   $1.65 \pm 0.00$  and  $1.37 \pm 0.00$  mg/ml),

respectively. The antioxidant property of these plant suggest their possible use to prove their quality application.



## กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบพระคุณมหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา ที่ให้ทุนสนับสนุนการวิจัยเรื่อง สารต้านอนุมูลอิสระในผลิตภัณฑ์จากใบชา ใบหม่อน และใบมะรุม Antioxidant Activities Assay in Mixture of Tea Leaves (*Camellia sinensis* Ktze.), Mulberry Leaves (*Morus alba* L.) and Horse Radish Leaves (*Moringa oleifera* Lam.) ตามสัญญาเลขที่ ๒๐/๖๕๕๗ จากงบประมาณทุนสนับสนุนการวิจัยประจำปีงบประมาณ พ.ศ. ๒๕๕๗

ขอขอบคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์hexawinพร ชีพประສพที่เป็นที่ปรึกษาตลอดการดำเนินงานวิจัย และขอบคุณนางสาวยาเวณิ หมัดศิริ และนางสาวอาทิตย์ กะ สะอิ ที่ช่วยสืบค้นข้อมูล และดำเนินการในห้องปฏิบัติการ

ขอขอบคุณท่านผู้ทรงคุณวุฒิที่ได้ตรวจสอบ แก้ไข และแนะนำแนวทางในการทำโครงการวิจัย และขอบคุณโปรแกรมวิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลาที่กรุณาให้การสนับสนุนในด้านสถานที่และวัสดุอุปกรณ์ ทำให้งานวิจัยในครั้งนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี

นันธิดา ลิมสูโภ  
คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี



## สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ข
กิตติกรรมประกาศ	๑
บทที่ 1 บทนำ	๑
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	๓
2.1 อนุมูลอิสระ	๓
2.2 สารต้านอนุมูลอิสระ	๕
2.3 วิธีการวิเคราะห์หาถูกที่ต้านอนุมูลอิสระ	๗
2.4 ตัวอย่างพีช	๑๐
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย	๑๔
3.1 วัสดุอุปกรณ์ สารเคมีและเครื่องมือ	๑๔
3.2 กลุ่มตัวอย่าง	๑๔
3.3. การดำเนินงานวิจัย	๑๔
3.3.1. การเตรียมตัวอย่างพีช	๑๔
3.3.2. การสกัดตัวอย่างพีช	๑๔
3.3.3 การสกัดชา ที่เวลา 2, 5, 10, 30 และ 60 นาที	๑๖
3.3.4 การวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม	๑๖
3.3.5 การวิเคราะห์หาถูกที่ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH	๑๖
บทที่ 4 ผลการวิเคราะห์ข้อมูล/ผลการทดลองและวิจารณ์ผล	๑๘
4.1 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม	๑๘
4.2 ถูกที่ต้านอนุมูลอิสระจากการวิเคราะห์โดยวิธี DPPH	๒๑
4.3 ถูกที่ต้านอนุมูลอิสระจากการวิเคราะห์โดยวิธี ABTS	๒๕
บทที่ 5 สรุปผลและข้อเสนอแนะ	๓๑
บรรณานุกรม	๓๓

## สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 2.1 อนุมูลอิสระและสารที่เกี่ยวข้อง  
ตารางที่ 3.1 อัตราส่วนที่ใช้ในการสกัดชา

4

15



## สารบัญภาพ

หน้า

ภาพที่ 2.1 โครงสร้างทางเคมีของ DPPH radical	7
ภาพที่ 2.2 โครงสร้างทางเคมีของ ABTS	8
ภาพที่ 2.3 ใบชา (Tea leaves)	10
ภาพที่ 2.4 ใบหม่อน (mulberry leaves)	11
ภาพที่ 2.5 ใบมะรุม (Moringa leaves)	12
ภาพที่ 4.1 แสดงปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมของสารสกัดใบชา ใบหม่อนและใบมะรุม ที่เวลา 2 5 10 30 และ 60 นาที จากการทดลอง 3 ชั้ง (n=3) โดยนำเสนอค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน	18
ภาพที่ 4.2 แสดงปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมของสารสกัดผสมใบชา+ใบหม่อน ใบชา+ใบมะรุม และใบหม่อน+ใบมะรุมในอัตราส่วนต่าง ๆ ที่เวลา 2, 5, 10, 30 และ 60 นาที	19
ภาพที่ 4.3 แสดงปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมของสารสกัด ใบชา+ใบหม่อน+ใบมะรุม ในอัตราส่วนต่าง ๆ ที่เวลา 2, 5, 10, 30 และ 60 นาที	20
ภาพที่ 4.4 (A) แสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH ของสารสกัดใบชาใบหม่อน และใบมะรุมที่เวลา 2 5 10 30 และ 60 นาที จากการทดลอง 3 ชั้ง (n=3) โดยนำเสนอค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (B) แสดงปริมาณ Ascorbic acid (ppmAA/ $\mu$ l) ของสารสกัดใบชาใบหม่อน และใบมะรุมที่เวลา 2 5 10 30 และ 60 นาที จากการทดลอง 3 ชั้ง (n=3) โดยนำเสนอค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน	21
ภาพที่ 4.5 (A) แสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH ของสารสกัดผสม ใบชา+ใบหม่อน ใบชา+ใบมะรุมและใบหม่อน+ใบมะรุมในอัตราส่วนต่าง ๆ ที่เวลา 2 5 10 30 และ 60 นาที จากการทดลอง 3 ชั้ง (n=3) โดยนำเสนอค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (B) แสดงปริมาณ Ascorbic acid (ppm AA/ $\mu$ l) ของสารสกัดผสม ใบชา+ใบหม่อน ใบชา+ใบมะรุมและใบหม่อน+ใบมะรุมในอัตราส่วนต่าง ๆ ที่เวลา 2 5 10 30 และ 60 นาที จากการทดลอง 3 ชั้ง (n=3) โดยนำเสนอค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน	23
ภาพที่ 4.6 (A) แสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH ของสารสกัดผสม ใบชา+ใบหม่อน+ใบมะรุมในอัตราส่วนต่าง ๆ ที่เวลา 2 5 10 30 และ 60 นาที จากการทดลอง 3 ชั้ง (n=3)	

<p>โดยนำเสนอค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน</p> <p>(B) แสดงปริมาณ Ascorbic acid (ppm AA/<math>\mu</math>l) ของสารสกัดผสม ใบชา+ใบหม่อน+ใบมะรุมในอัตราส่วนต่าง ๆ ที่เวลา 2 5 10 30 และ 60 นาที จากการทดลอง 3 ชั้ (n=3) โดยนำเสนอค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน</p> <p><b>ภาพที่ 4.7 (A)</b> แสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี ABTS ของสารสกัดใบชาใบหม่อน และใบมะรุมที่เวลา 2 5 10 30 และ 60 นาที จากการทดลอง 3 ชั้ (n=3) โดยนำเสนอค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน</p> <p>(B) แสดงปริมาณ Trolox (mg/ml) ของสารสกัดใบชาใบหม่อนและใบมะรุม ที่เวลา 2 5 10 30 และ 60 นาที จากการทดลอง 3 ชั้ (n=3) โดยนำเสนอค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน</p>	24
<p><b>ภาพที่ 4.8 (A)</b> แสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี ABTS ของสารสกัดผสม ใบชา+ใบหม่อน ใบชา+ใบมะรุมและใบหม่อน+ใบมะรุมในอัตราส่วนต่าง ๆ ที่เวลา 2 5 10 30 และ 60 นาที จากการทดลอง 3 ชั้ (n=3) โดยนำเสนอค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน</p> <p>(B) แสดงปริมาณ Trolox (mg/ml) ของสารสกัดผสมใบชา+ใบหม่อน ใบชา+ใบมะรุมและใบหม่อน+ใบมะรุมในอัตราส่วนต่าง ๆ ที่เวลา 2 5 10 30 และ 60 นาที จากการทดลอง 3 ชั้ (n=3) โดยนำเสนอค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน</p>	26
<p><b>ภาพที่ 4.9 (A)</b> แสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี ABTS ของสารสกัดผสม ใบชา+ใบหม่อน+ใบมะรุม ในอัตราส่วนต่าง ๆ ที่เวลา 2 5 10 30 และ 60 นาที จากการทดลอง 3 ชั้ (n=3) โดยนำเสนอค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน</p> <p>(B) แสดงปริมาณ Trolox (mg/ml) ของสารสกัดผสม ใบชา+ใบหม่อน+ใบมะรุม ในอัตราส่วนต่าง ๆ ที่เวลา 2 5 10 30 และ 60 นาที จากการทดลอง 3 ชั้ (n=3) โดยนำเสนอค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน</p>	28
	29

## บทที่ 1

### บทนำ

#### 1.1 ที่มาและความสำคัญ

สารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) คือ โมเลกุลของสารที่สามารถจับกับตัวรับอิเล็กตรอนและสามารถยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชัน ซึ่งเป็นปฏิกิริยาการแลกเปลี่ยนอิเล็กตรอนจากสารหนึ่งไปยังตัวออกซิเดช์ ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์เป็นสารอนุมูลอิสระ (free radical) สารเหล่านี้จะเกิดปฏิกิริยาลูกโซ่และทำลายเซลล์ของร่างกาย สารต้านอนุมูลอิสระจะเข้ายุติปฏิกิริยาลูกโซ่เหล่านี้ด้วยการเข้าจับกับสารอนุมูลอิสระ และยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชัน โดยถูกออกซิเดช์ สารต้านอนุมูลอิสระส่วนใหญ่มักพบในพืช ปัจจุบันสารต้านอนุมูลอิสระจากพืช ผลไม้ สมุนไพรและเครื่องดื่มเป็นที่น่าสนใจเพิ่มขึ้น เนื่องจากมีการศึกษาค้นคว้าวิจัยแล้วว่าสารต้านอนุมูลอิสระสามารถช่วยป้องกันการเกิดโรคต่าง ๆ ได้ เช่น โรคความดัน โรคเบาหวาน โรคหัวใจ (Katsube et al., 2006) เครื่องดื่มที่อุดมไปด้วยสารกลุ่มโพลีฟินอลซึ่งมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและเป็นที่นิยมดีมีคือ น้ำชา ชาเขียว ชาดำ (Serafini et al., 1994) ไวน์อุ่น แดง (Aviram และ Eizirik, 1993) และพืชสมุนไพรท้องถิ่นของไทยที่รับความนิยมในการทำชาในปัจจุบันคือ ใบหม่อน (*Morus alba* L.) ที่อุดมไปด้วยสรรพคุณในการรักษาโรคต่าง ๆ มากมาย ป้องกันโรคเบาหวาน ลดความดันโลหิต ลดระดับน้ำตาลในเลือด (วิโรจน์ แก้วเรือง, 2551) มีสารต้านอนุมูลอิสระที่สำคัญ เช่น flavonoid phytoestrogen (Dewick, 1998) ส่วนใบมะรุม (*Moringa oleifera* Lam.) ก็เป็นพืชสมุนไพรของไทยที่มีสรรพคุณช่วยแก้เลือดออกตามไร้พัน ใช้ถอนพิษไข้ ใช้เป็นยาระบาย ต้านการเกิดแพลในกระเพาะอาหาร ฝ่าเชื้อแบคทีเรีย ขับปัสสาวะ ป้องกันมะเร็ง ลดความดันโลหิต และแก้อาการยักเสบ เป็นต้น (สนามชัย แพนดี และคณะ, 2555) มีสารต้านอนุมูลอิสระที่สำคัญ เช่น thiocarbamate (Kim, 1999) จากประโยชน์ของพืชสมุนไพรทั้งสามชนิด ดังนั้น งานวิจัยนี้จึงศึกษาฤทธิ์ของสารต้านอนุมูลอิสระจากสารสกัดใบชา ใบมะรุมและใบหม่อนในอัตราส่วนและเวลาต่าง ๆ เพื่อหาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงสุด เพื่อเป็นอีกทางเลือกในการเพิ่มน้ำคลื่นให้กับพืชสมุนไพรในท้องถิ่น และสนับสนุนให้มีการบริโภคชาที่ทำจากสมุนไพรท้องถิ่นมากขึ้น

#### 1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

- เพื่อทราบอัตราส่วนผสมของใบชา ใบหม่อน และใบมะรุมต่อ กิจกรรมต้านอนุมูลอิสระ
- เพื่อศึกษาฤทธิ์ของสารต้านอนุมูลอิสระจากสารสกัดใบชา ใบหม่อน และใบมะรุม

### 1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. เพิ่มมูลค่าให้กับชาติมาท้องตลาดด้วยใบหน่อนและใบมารุ่ม ซึ่งเป็นพืชสมุนไพรในท้องถิ่น
2. มีประโยชน์เพื่อการบูรณาการกับการเรียนการสอนรายวิชาชีวเคมี และปฏิบัติการชีวเคมี
3. ส่งเสริมการบริโภคพืชสมุนไพรในท้องถิ่น

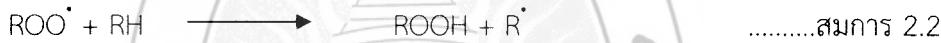
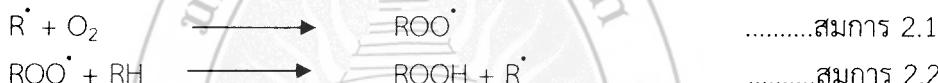


## บทที่ 2

### เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

#### 2.1 อนุมูลอิสระ

อนุมูลอิสระ (oxidant หรือ free radical) คือโมเลกุลหรือไอออนที่มีอิเล็กตรอนโดดเดี่ยวอยู่รอบนอก เป็นโมเลกุลที่ไม่เสถียรและมีความว่องไวต่อการเกิดปฏิกิริยาเคมีในลักษณะเป็นปฏิกิริยาลูกโซ่ (ดังสมการ 2.1 และ 2.2) และเกิดขึ้นในเซลล์ตลอดเวลา สามารถเข้าทำปฏิกิริยากับสารชีวโมเลกุลต่าง ๆ ที่อยู่รอบข้างได้ทันทีที่ถูกสร้างขึ้น มีความว่องไวในการเข้าทำปฏิกิริยามาก และสามารถดึงอิเล็กตรอนจากโมเลกุลอื่นมาแทนที่อิเล็กตรอนที่ขาดหายไปเพื่อให้ตัวเองเกิดความสมดุลหรือมีความเสถียร (พรพิพัฒ วิรชัวงศ์, 2011)



อนุมูลอิสระเป็นสาเหตุหลักที่ทำให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันในร่างกาย โดยมีตัวกระตุ้นสำคัญที่เรียกว่า Reactive Oxygen Species (ROS) หมายถึง โมเลกุลที่ว่องไวต่อการทำปฏิกิริยา ซึ่งอาจเป็นอนุมูลอิสระหรือไม่ใช่อนุมูลอิสระก็ได้ ตัวอย่างของอนุมูลอิสระและ ROS เช่น อนุมูลซูเปอร์ออกไซด์ (superoxide anion radical), อนุมูลไฮดรอกซิล (hydroxyl radical), อนุมูลเพอร์อ๊อกไซด์ (peroxide radical), อนุมูลเพอร์อ๊อกซิล (peroxyl radical), ไฮโดรเจนเพอร์อ๊อกไซด์ (hydrogen peroxide), โอโซน (ozone), ออกซิเจนอะตอมเดียว (singlet oxygen), และอนุมูลไฮโดรเจน (Hydrogen Radical) เป็นต้น (Malaisree et al., 2011) อนุมูลอิสระเหล่านี้ส่งผลให้เกิดความเสียหายแก่องค์ประกอบต่าง ๆ ภายในร่างกาย ไม่ว่าจะเป็นการเปลี่ยนสภาพโปรตีนและไขมันของเยื่อหุ้มเซลล์ การทำลายโครงสร้างดีเอ็นเอ (Ames et al., 1993) เป็นสาเหตุสำคัญของโรคหลายชนิด ได้แก่ โรคมะเร็ง โรคพาร์กินสัน โรคสมองฝืด โรคไขข้ออักเสบ โรคหัวใจ และโรคที่เกิดจากเซลล์และเนื้อเยื่อในร่างกายต่อต้านกันเอง (autoimmune) (Rangkadilok et al., 2007) นอกจากอนุมูลอิสระที่เกิดจากผลพลอยได้จากการใช้ออกซิเจนของกระบวนการแมมแแบบอิชิมของเซลล์ ยังเกิดจากปัจจัยจากสิ่งแวดล้อมภายนอก ได้แก่ กลพิษ การติดเชื้อโรค รังสียูวี ควันจากท่อไอเสียและควันบุหรี่ อนุมูลเหล่านี้สามารถถูกกำจัดหรือลดความรุนแรงด้วยสารต้านอนุมูลอิสระ ที่สามารถจับกับอนุมูลอิสระแล้วเกิดเป็นอนุมูลอิสระตัวใหม่ที่เสถียรกว่า ส่งผลให้วงจรการเกิดอนุมูลอิสระตัวใหม่หยุดลง

ตารางที่ 2.1 อนุมูลอิสระและสารที่เกี่ยวข้อง (โภกา วัชระคุปต์ และคณะ, 2549)

อนุมูลอิสระ	สารที่เกี่ยวข้อง
Reactive oxygen species (ROS)	
Superoxide, Superoxide anion ( $O_2^-$ )	$H_2O_2$ , Ozone ( $O_3$ )
Hydroxyl ( $HO^-$ )	Hypobromous acid ( $HOBr$ )
Hydroperoxyl ( $HO_2^-$ )	Hypochlorous acid ( $HOCl$ )
Peroxyl ( $RO_2^-$ )	Singlet oxygen ( $O_2^{\Delta g}$ )
Alkoxy (RO $^\cdot$ )	Organic peroxides (ROOH)
Carbonate ( $CO_3^-$ )	Peroxynitrite (ONOO $^-$ )
Carbon dioxide ( $CO_2^-$ )	Peroynitrous acid (ONOOH)
Reactive nitrogen species (RNS)	
Nitric oxide ( $NO^-$ )	
Nitrogen dioxide ( $NO_2^-$ ), ( $NO_2^-$ )	Nitrous acid ( $HNO_2$ ) Nitrosyl cation ( $NO^+$ ), Nitroxyl anion ( $NO^-$ ) Dinitrogen tetroxide ( $N_2O_4$ ) Dinitrogen trioxide ( $N_2O_3$ ) Peroxynitrite (ONOO $^-$ ) Peroynitrous acid (ONOOH)
Reactive chlorine species (RCS)	
Atomic chlorine ( $Cl^-$ )	Hypochlorous acid ( $HOCl$ ) Chloramines Chlorine gas ( $Cl_2$ )
Other	
Thietyl radical (RS $^\cdot$ )	

## 2.2 สารต้านอนุมูลอิสระ

สารต้านอนุมูลอิสระคือสารปริมาณน้อยที่สามารถป้องกันหรือชะลอการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของอนุมูลอิสระได้ (Halliwell, 2009) เป็นสารประกอบที่ทนต่อการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันในเซลล์ (Chattopadhyay et al., 2010) โดยสารเหล่านี้มีกลไกในการต้านอนุมูลอิสระหลายแบบ เช่น การจับกับอนุมูลอิสระโดยตรง ยับยั้งการสร้าง หรือเข้าจับกับโลหะ (Sies, 1992) ในสิ่งมีชีวิตจะมีระบบการป้องกันการทำลายเซลล์และเนื้อเยื่อจากอนุมูลอิสระประกอบด้วย สารต้านอนุมูลอิสระมากมายหลายชนิดที่ทำหน้าที่แตกต่างกันไป ซึ่งมีทั้งที่เป็นเอนไซม์และไม่เป็นเอนไซม์ สารประกอบที่ละลายในน้ำ และสารประกอบที่ละลายในไขมัน ซึ่งกลไกการทำงานของสารต้านอนุมูลอิสระมีหลายกลไก เช่น การตักจับอนุมูลอิสระ (radical scavenging) เป็นการทำให้โมเลกุลของอนุมูลอิสระมีความเสถียรขึ้น ซึ่งกลไกของปฏิกิริยาเกิดโดยการให้ไฮโดรเจน หรืออิเล็กตรอนแก่อนุมูลอิสระ การยับยั้งการทำงานของออกซิเจนที่ขาดอิเล็กตรอน (singlet oxygen quenching) จับกับโลหะที่สามารถเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันได้ (metal chelation) หยุดปฏิกิริยาการสร้างอนุมูลอิสระ (chain-breaking) และยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ (enzyme inhibition) ที่เร่งปฏิกิริยาอนุมูลอิสระ (เจนจิรา จิรัมย์ และคณะ, 2554)

แหล่งที่มาของสารต้านอนุมูลอิสระมี 2 แหล่ง ได้แก่ สารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์ (synthetic antioxidants) และสารต้านอนุมูลอิสระจากธรรมชาติ (natural antioxidant) ซึ่งสารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์เกิดจากการกระบวนการสังเคราะห์ทางเคมีเกิดเป็นสารประกอบพื้นอิสิก ได้แก่ สาร propyl gallate, 2-butylated hydroxyanisole, 3-butylate hydroxyanisole, (butylated hydroxytoluene, BHT) และ tertiary butylhydroquinone สารสังเคราะห์ดังกล่าวมีนิยมนำมาใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร เพื่อยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมันที่เป็นสาเหตุที่ทำให้อาหารมีกลิ่น สี และรสชาติเปลี่ยนแปลงไป สารต้านอนุมูลอิสระจากธรรมชาติสามารถพบได้ในสิ่งมีชีวิต ทั้งพืช และสัตว์ ซึ่งเป็นได้ทั้ง วิตามิน เอนไซม์ และสารอื่น ๆ ตัวอย่างของสารต้านอนุมูลอิสระที่เป็นวิตามิน เช่น vitamin C (พบที่โพรเพลาสซีม) vitamin E (พบที่เมมเบรน) และ glutathione (ป้องกันอันตรายจากอนุมูลอิสระที่ใช้โพรเพลาสซีมและเมมเบรน) สารต้านอนุมูลอิสระที่เป็นเอนไซม์ ได้แก่ glutathione peroxidase (GPX), glutathione reductase และ glutathione transferase ซึ่งทำหน้าที่ทำให้โมเลกุลของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ( $H_2O_2$ ) เป็นออกซิเจนและน้ำ ส่วนเอนไซม์ superoxide dismutase (SOD) สามารถเปลี่ยน  $O^{2-}$  เป็น  $H_2O_2$  สารต้านอนุมูลอิสระอื่น ๆ ได้แก่ carotenoids และ ubiquinones สามารถป้องกันอนุมูลอิสระออกซิเจนทั้งภายในเซลล์และภายนอกเซลล์ (สุพิศรา เตชะpermปรีชา, 2550) นอกจากนี้ยังแบ่งสารต้านอนุมูลอิสระในร่างกายตามระบบต้านอนุมูลอิสระ แบ่งได้ 2 ประเภท คือ ประเภทป้องกันการเกิดสารอนุมูลอิสระ ได้แก่ เอนไซม์ peroxide, peroxidase, glutathione peroxidase, catalase, cytochrome C, ทองแดง สังกะสี ซีเลเนียม เป็นต้น และประเภทที่สองคือ กลุ่มที่ทำลายปฏิกิริยาลูกโซ่ ได้แก่ albumin, uric acid, bilirubin, ubiquinone, sulfhydryl groups, cysteine เปต้าแครโธีน แคโรทีโนยด์

(carotenoid) วิตามินอี วิตามินซี เป็นต้น นอกจากนี้ยังมีสารประกอบฟิโนอลิก (phenolic compound) และสารกลุ่ม flavanoids (โภกา วัชระคุปต์, 2550)

สารต้านอนุมูลอิสระสามารถตอบได้ในรูปของสารประกอบฟิโนอลิก แครอทีนอยด์ และสารประกอบในโตรเจน (Velioğlu et al., 1998) แหล่งของสารต้านอนุมูลอิสระส่วนมากนั้นเกิดจากร่างกายสร้างเองไม่มีต้านอนุมูลอิสระ และส่วนที่สองคือกลุ่มของสารต้านอนุมูลอิสระจากวิตามิน เอ ซี อี หรือเบต้าแครอทีน รวมทั้งสารประกอบโพลีฟีนอล ซึ่งเป็นพฤกษเคมีที่สามารถตอบได้ในพืชและผลไม้

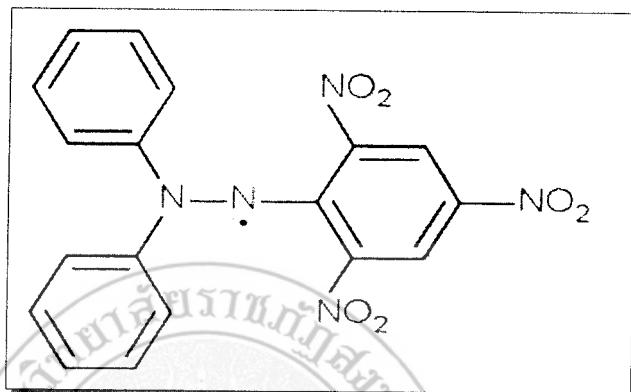
อย่างไรก็ตาม ในภาวะปกติร่างกายของคนเราจะมีการป้องกันการสะสมสารอนุมูลอิสระโดยการสร้างเองไม่มีต้านอนุมูลอิสระขึ้นมาควบคุมปริมาณสารอนุมูลอิสระให้อยู่ในภาวะที่สมดุล และอีกส่วนได้จากการต้านอนุมูลอิสระที่ร่างกายรับประทานเข้าไปจำพวกวิตามิน เบต้าแครอทีน และแครอทีนอยด์ รวมทั้งสารประกอบฟิโนอลิก (สิริพันธุ์ จุลกรังค์, 2545) เช่น

1. วิตามินซี หรือกรดแอสคอร์บิก ( $\text{AsCH}_2\text{O}_6$ ) มีคุณสมบัติละลายน้ำได้ดี จึงทำหน้าที่ต้านอนุมูลอิสระในเซลล์และอวัยวะที่มีน้ำเป็นองค์ประกอบหลัก มีหมู่ไฮดรอกซิล 2 หมู่ที่แตกตัวให้ไฮโดรเจนได้ปฏิกิริยาโดยรวมคือ การให้อิเล็กตรอน 1 ตัว ร่วมกับอะตอมไฮโดรเจนแก่อนุมูลอิสระ เป็นการทำจัดหรือสลายอนุมูลอิสระโดยเปลี่ยน  $\text{R}^+$  ให้เป็น  $\text{RH}$  จากการทำจัดนี้จะได้ออนุมูลอิสระตัวใหม่ที่มีความไวต่อคือ กรดแอสคอร์บิก

2. วิตามินอี หรือ tocopherol เป็นวิตามินที่ละลายได้ดีในไขมัน จากโครงสร้างมีได้หลายไอโซเมอร์ โดย  $\alpha$ -tocopherol เป็นไอโซเมอร์ที่มีฤทธิ์สูงสุด วิตามินอีเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่สำคัญของ เมมเบรนชั้นเมลิพิดเป็นองค์ประกอบ โดยป้องกันไม่ให้เกิดเมลิพิดเบอร์ออกซิเดชัน สารประกอบฟิโนอลิก คือ สารที่มีหมู่ OH บนวงอะโรมาติกตั้งแต่ 1 กลุ่มขึ้นไป พบรากในธรรมชาติ ได้แก่ พีชผัก ผลไม้ ชา เขียว ชาดำ ขุគโกแลต และไวน์แดง เป็นต้น ปัจจุบันสารประกอบ ฟิโนอลิกพบมากกว่า 8,000 ชนิด ในธรรมชาติ เช่น กรดฟิโนอลิก ฟินิลโพราฟานอยด์ และฟลาโวนอยด์ ไปจนถึงโครงสร้างโพลิเมอร์ที่ซับซ้อน เช่น ลิกนิน เมลานิน และแทนนิน เป็นต้น สารโพลีฟิโนอลิกมีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ มีบทบาทสำคัญในการต้านแบคทีเรีย ต้านไวรัส ต้านการอักเสบ และมีคุณสมบัติในการสลายลิมเลือด รวมไปถึงเป็นสารต้านการก่อมะเร็ง และสามารถลดความดันโลหิตในการสลายลิมเลือดได้ (Sahelian, 2011)

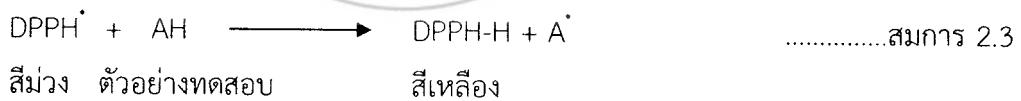
## 2.3 วิธีการวิเคราะห์หาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

### 2.3.1 การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH (diphenylpicrylhydrazyl radical scavenging assay)



ภาพที่ 2.1 โครงสร้างทางเคมีของ DPPH radical  
(ที่มา: <http://en.wikipedia.org/wiki/DPPH#mediaviewer/File:DPPH.svg>)

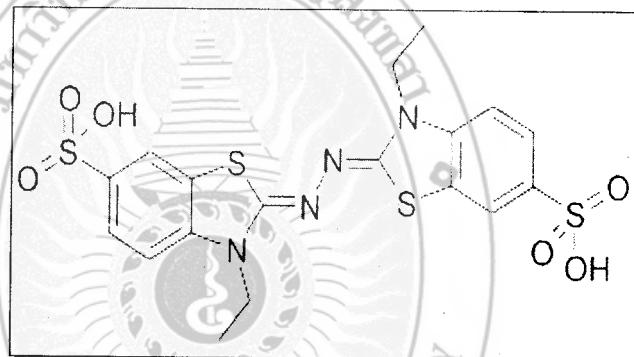
เป็นการทดสอบด้วยวิธีทางเคมีโดยใช้สาร DPPH<sup>+</sup> ซึ่งเป็นสารสังเคราะห์ที่อยู่ในรูปอนุมูลอิสระที่คงตัว มีความเสถียรและเป็นสารสีม่วง สามารถดูดกลืนแสงได้ที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร เมื่ออนุมูล DPPH<sup>+</sup> ทำปฏิกิริยากับสารต้านอนุมูลอิสระที่ละลายด้วยเมทานอล ตั้งทิ้งไว้ที่มีดีเป็นเวลา 30 นาที เพื่อให้เกิดปฏิกิริยาอย่างสมบูรณ์ก่อนนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง สีม่วงของอนุมูลอิสระจะลงจนกลายเป็นสีเหลืองอ่อนหรือไม่มีสี (ดังสมการ 2.3) ทำให้สามารถหาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารตัวอย่างได้โดยใช้เครื่องスペกโฟโตเรมิเตอร์ (spectrophotometer)



ข้อดีของวิธีนี้ คือ ทำได้ง่าย นิยมใช้เป็นวิธีเบื้องต้นในการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารจากธรรมชาติ ยกเว้นสารกลุ่มแครอทินอยด์ที่มีการดูดกลืนแสงในช่วงเดียวกัน ข้อเสียของวิธีนี้ คือ อนุมูล DPPH<sup>+</sup> มีความคงตัว ไม่ไวต่อปฏิกิริยาเหมือนอนุมูลที่เกิดในเซลล์หรือร่างกายจึงไม่สามารถแยกแยะจัดอันดับอนุมูลที่มีความไวสูงได้ นอกจากนี้โครงสร้างทางเคมีของอนุมูล DPPH<sup>+</sup> แสดงให้เห็นว่าอิเล็กตรอนเดียวของอนุมูลอิสระถูกบดบังด้วยวงบนซึ่ง 3 วง และหมุนในโตร หั้ง ๆ ที่สารต้านอนุมูลนั้นมีฤทธิ์ในการจัดอนุมูลเปอร์ออกซี นอกจากนี้สารดีวีซ์สามารถทำให้สีอนุมูล DPPH<sup>+</sup> จางลงได้อีกด้วย (Huang et al., 2006)

การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระนิยมใช้วิธี DPPH เพื่อศึกษาสารสกัดจากธรรมชาติ เช่น การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของน้ำมันหอมระ夷 (essential oil) และสารหอม (absolute) จาก พืช 3 ชนิด ได้แก่ กระเพรา ไพล และชิง โดยการวัดความสามารถในการจัดอนุมูล DPPH เปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน 3 ชนิด คือ trolox, quercetin และ keampferol (นิติมา วงศ์วัฒนา, กุล และคณะ, 2549) หรือการศึกษาปริมาณสารประกอบพืชนอликและความสามารถในการต้านอนุมูล อิสระจากการเมล็ดสบู่ดำ โดยสกัดด้วยตัวทำละลายเมทานอลบริสุทธิ์ 80 เปอร์เซ็นต์ และ 60 เปอร์เซ็นต์ นำมาหาปริมาณสารประกอบพืชนอликทั้งหมดด้วยวิธี Folin-Ciocalteu Reagent (FCR) และหาความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH (กัลยาณี วัฒนีรงค์, 2551)

### 2.3.2 การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี ABTS (ABTS radical cation decolorization assay)



ภาพที่ 2.2 โครงสร้างทางเคมีของ ABTS  
(ที่มา: <http://th.wikipedia.org/wiki/ไฟล์:ABTS.png>)

เป็นการวัดความสามารถในการลดลงของสือนุมูล ABTS<sup>+</sup> (2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) radical) ซึ่งเป็นสารสังเคราะห์ที่มีสีเขียวปนน้ำเงิน สามารถดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร เมื่อเติมสารทดสอบที่มีกิจกรรมต้านออกซิเดชัน จะทำให้อนุมูล ABTS<sup>+</sup> มีปริมาณลดลง ซึ่งทำให้สีจางลง สามารถหาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสาร ตัวอย่างได้จากการคำนวนสีที่จางลงของอนุมูล ABTS<sup>+</sup>

ข้อดีของวิธีการนี้ คือ อนุมูล ABTS<sup>+</sup> ละลายได้ดีในน้ำ และตัวทำละลายอินทรีย์จึงทำปฏิกิริยาได้อย่างรวดเร็ว และทำปฏิกิริยาได้ดีในช่วง pH กว้าง ส่วนข้อเสีย คือ อนุมูล ABTS<sup>+</sup> ไม่เป็นสารธรรมชาติที่พบในร่างกายหรือในเซลล์ของสิ่งมีชีวิต และต้องมีการทำปฏิกิริยากับสารอื่นก่อนถึงจะเกิดเป็นอนุมูลอิสระ (Chaitana et al., 2009)

วิธีการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS ยังเป็นวิธีที่นิยมใช้เพื่อศึกษาสารสกัดจากธรรมชาติ เช่นเดียวกับวิธี DPPH เช่น งานวิจัยของ จักรพันธุ์ จุลศรีไสวล (2549) ศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของพืชจากการ์ Zingiberaceae 5 ชนิด ได้แก่ ข่า ขี้นขัน ขมิ้นขาว ไฟล และไฟลดา ที่ สกัดด้วยน้ำ แอลกอฮอล์ และ continuous extraction แล้วนำมาทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS เปรียบเทียบกับ Trolox (milligram of trolox per gram of sample) เป็นต้น

### 2.3.3 การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี FRAP (ferric ion reducing antioxidant power assay)

วิธีการนี้อาศัยหลักการของสารต้านอนุมูลอิสระสามารถถ่ายเทอเล็กตรอนให้กับสารประกอบเชิงซ้อน  $[Fe(III)(TPTZ)_2]^{3+}$  ทำให้เกิดการเปลี่ยนรูปเป็น  $[Fe(II)(TPTZ)_2]^{2+}$  (ตั้งสมการ 2.4) ซึ่ง  $[Fe(II)(TPTZ)_2]^{2+}$  สามารถดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 593 นาโนเมตร โดยนำสารละลาย TPTZ (2,4,6-tri-(2-pyridyl)-s-triazine) ที่ละลายด้วยกรดไฮโดรคลอริกเจือจางมาทำปฏิกิริยากับสารละลายอะซิเตตบัฟเฟอร์และสารละลายเฟอร์ริกไฮดรอลิค ทำให้เกิดสารประกอบเชิงซ้อน  $[Fe(III)(TPTZ)_2]^{3+}$  จากนั้นทำการรีดิวช์เฟอร์ริกโดยการเติมสารละลายน้ำร้อน เฟอร์รัสซัลเฟตหรือสารตัวอย่างที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และตั้งทึ้งไว้ในที่มีดี ปริมาณของ  $[Fe(II)(TPTZ)_2]^{2+}$  ที่เกิดขึ้นสามารถประมาณความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระได้ในรูป FRAP value เทียบกับกราฟมาตรฐานของเฟอร์รัสซัลเฟต ( $FeSO_4$ )



ข้อดีของวิธีการนี้เป็นวิธีที่ง่าย ใช้เวลาไม่นาน ไม่แพ้งและสามารถทำซ้ำแล้วให้ผลเหมือนเดิม แต่ข้อเสีย คือ ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นเป็นปฏิกิริยาเคมีที่ไม่เกี่ยวข้องกับสภาวะร่างกายและสารละลายที่ใช้อ้างอิงต้องใช้น้ำปราศจากไอออน (ปรียันน์ บัวสด, 2549)

จากการศึกษางานวิจัยที่เกี่ยวข้องของ จินดาวัลย์ วิบูลย์อุทัย และคณะ (2553) ศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากตัวอย่างอาหารตามตำรับพืชผักพื้นบ้าน 6 ตำรับ ได้แก่ แ甘เขี้เหล็ก กับเนื้อวัว แ甘หน่อไม้ไสใบย่านาง แ甘หัวปลีกับซี่โครงหมูใส่ข้าวомและใบชะพลู ผัดผักโขมใส่หมูและกุ้ง ยำใบบัวบก คั่วผัดกับหมู ทำการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH และวิธี FRAP

## 2.4 ตัวอย่างพืช

### 2.4.1 ใบชา (Tea leaves)



ภาพที่ 2.3 ใบชา (Tea leaves)

ชื่อวิทยาศาสตร์ *Camellia sinensis* (L.) Kuntze จัดอยู่ในวงศ์ Camelliaceae มีชื่อสามัญ คือ ใบชาชา จัดเป็นเครื่องดื่มที่นิยมมากที่สุดในโลก/มีถิ่นกำเนิดมาจากแคว้นอัสสัมของประเทศไทย และตอนใต้ของจีน ประเทศที่ผู้คนนิยมดื่มมาก ได้แก่ ประเทศไทย อังกฤษ ญี่ปุ่น และจีน เป็นต้น การทำชาจะใช้ส่วนยอดและใบอ่อนของต้นชา กรรมวิธีในการผลิตชามักใช้วิธีการคั่วด้วยเม็ดส่วนชาขันรองจะเก็บใบที่ต่ำกว่าใบยอด และอบแห้งด้วยเครื่องอบ ใบชาที่ซื้อขายกันในท้องตลาด มี 3 ชนิดคือ ชาจีน (tea) ชาเขียว (green tea) และ ชาฝรั่ง (black tea) ทั้งหมดได้จากใบชาชนิดเดียวกัน แต่กรรมวิธีผลิตต่างกัน ดังนี้

ตัวอย่างใบชาที่ใช้ในงานวิจัยครั้งนี้จัดอยู่ในกลุ่มของชาจีน ซึ่งมีกรรมวิธีการผลิต ดังนี้ เก็บใบอ่อนมาคั่วให้แห้งโดยใช้มือเคล้าบนกระทะ หรืออบด้วยเครื่องอบ ชาจีนขันดีจะมีสีเหลืองทอง แบ่งเป็น 2 ชนิด คือ ชากลิ้น และชาคอ โดยที่ชากลิ้นจะมีกลิ่นหอมหวานดีมากกว่าชาคอ ส่วนชาคอเวลาดีมจะทำให้ขุ่นคอ กรรมวิธีผลิตชาเขียว จะนำใบชามาลวกในน้ำเดือดก่อน แล้วแช่น้ำเย็นทันทีเพื่อหยุดการทำงานของเซลล์และสี จนน้ำเหลืองน้ำไปค่อนข้าง จะได้ชาที่มีสีเขียวสดใส (บางตำรับใช้การนึ่งก่อนแล้วจึงนำมาอบให้แห้ง) เช่น ชาเขียวญี่ปุ่น ส่วนชาฝรั่งจะก้นใบชาสดมากองสุมกัน เพื่อให้เกิดกระบวนการหมัก นำมายังไห้เซลล์แตก จากนั้นนำไปคั่วให้แห้ง จะให้กลิ่นรสที่ต่างกัน (สมพร ภูติyanนท์, 2542)

จากการศึกษาวิจัยถึงสรรพคุณของชาในปัจจุบันมีมาอย่างต่อเนื่อง ทำให้สามารถทราบได้ว่า ในชา มีสารประกอบที่สำคัญ เช่น Catechins, Polyphenols, Caffeine, Theanine, Saponin เป็นต้น สารออกฤทธิ์ในกลุ่ม Polyphenol และ Catechin มีสรรพคุณที่เป็นประโยชน์ต่อสุขภาพคือ ทำให้ร่างกายสดชื่น เพราะมีการกระตุ้นระบบการขับถ่ายสารพิษออกจากร่างกาย ช่วยย่อยอาหาร ละลายไขมัน ป้องกันโรคกระเพาะอาหารที่เรื้อรัง ช่วยป้องกันและลดคลอเลสเตอรอลได้ดี สามารถป้องกันและต่อต้านการเกิดมะเร็ง (anticarcinogenic) สามารถลดความอ้วนได้ เป็นต้น นอกจากนี้สารฟลาโวนอยด์ในชาเขียวสามารถยับยั้งเอนไซม์เบคทีเรีย เชื้อรา ไมโคพลาสما และยีสต์ได้หลายชนิด สาร Catechins ในชาสามารถออกฤทธิ์ยับยั้งไวรัสได้หลายชนิด ขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของสาร Catechins

หากมีความเข้มข้นถึง 200 g/ml จะสามารถยับยั้งการจำลองตัวของเชื้อไวรัสไข้หวัดในเซลล์ MDCK (Madin-Darby canine kidney cell) ได้ (ณัฐธิดา สิริโยธิน, 2549)

#### 2.4.2 ใบหม่อน



ภาพที่ 2.4 ใบหม่อน (mulberry leaves)

ชื่อวิทยาศาสตร์ *Morus alba* L. จัดอยู่ในวงศ์ Moraceae มีชื่อสามัญ คือ white mulberry, mulberry ลักษณะทั่วไปเป็นไม้พุ่มขนาดย่อม ใบเดียวออกสลับสีเขียวเข้ม ขอบใบบิ่กเป็นฟันเลือย ผิวใบสากคาย ดอกเป็นดอกช่อลักษณะเป็นแท่ง ดอกตัวผู้ และตัวเมียแยกกัน ดอกย่อยมี 4 กลีบ ออกตามซอกใบที่ปลายกิ่ง ผลเป็นผลรวม ออกเป็นพวงกลมเล็ก เมื่อสุกมีสีน้ำเงินแดงถึงดำ หม่อนเป็นพืชดั้งเดิมของจีนและพบปลูกมากในที่ราบของประเทศไทยและบริเวณเทือกเขาหิมาลัย ที่สูงตั้งแต่ 3,300 เมตรขึ้นไป สรรคุณ คือ ช่วยลดความดันโลหิต ลดระดับคลอเลสเตอรอล มีแร่ธาตุ และวิตามินที่มีประโยชน์แก่ร่างกาย ลูกหม่อนมีรสชาติอร่อยมีปริมาณวิตามินซีสูง สำหรับใบหม่อนสามารถรับประทานได้เหมือนผักทั่วไปและผลิตเป็นชาได้ ใบหม่อนมีสารประกอบกลุ่มฟลาโวนสเตอรอยด์ กรดอะมิโน วิตามิน และแร่ธาตุต่าง ๆ (Kimura et al., 1995) ใช้เลี้ยงหนองใหม และมีการนำมาใช้เป็นยาสมุนไพรจีนเพื่อรักษาโรคความดัน และช่วยรักษาโรคเบาหวาน (Asano et al., 2001) รักษาไข้ ป้องกันตับ บำรุงดวงตา และความดันโลหิตต่ำ (Zhishen et al., 1999) ในประเทศไทย และประเทศญี่ปุ่นมีการนำไปหม่อนมาเป็นอาหารให้ผู้ป่วยที่เป็นโรคเบาหวานชนิดที่ 2 (Kim et al., 2003) Doi and Fujimoto (2000) ได้ทำการศึกษา箕踞กรรมต้านอนุมูลอิสระในใบหม่อน เมื่อสกัดใบหม่อนด้วย 1-butanol มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ดังนั้นการรับประทานชาใบหม่อนจึงเป็นที่นิยมเพิ่มมากขึ้น

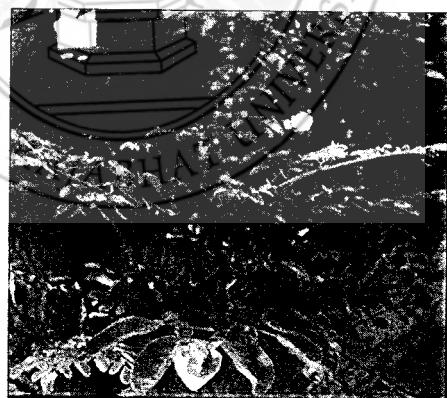
จากการศึกษางานวิจัยของ สุรพจน์ วงศ์ใหญ่และรัตติยา สำราญสกุล จากคณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยรังสิต ได้วิเคราะห์หาสารสำคัญหรือสารออกฤทธิ์ ที่มีสรรคุณทางเภสัชศาสตร์ พ.ศ. 2543–2545 พบร่วมกับในใบหม่อนมีสารเควอซิติน (quercetin) และเคมเฟอรอล (kaempferol) ซึ่งเป็นสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ (Flavonoids) ที่มีคุณสมบัติป้องกันการดูดซึมของน้ำตาลในลำไส้เล็ก ทำให้กระแสเลือดหมุนเวียนดี และหลอดเลือดแข็งแรง ยับยั้งการเกิดสารก่อมะเร็งเม็ดเลือด มะเร็ง

เต้านม และมะเร็งลำไส้ใหญ่ ลดอาการแพ้ต่างๆ และยืดอายุเม็ดเลือดขาว และสามารถดูดซึมเข้าสู่ร่างกายทางลำไส้เล็กและไม่เปลี่ยนแปลงสภาพ นอกจากนั้นยังพบรสโซลฟีฟินอล (polyphenols) มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้ดี โดยพบมากในใบหม่อนส่วนยอดมากกว่าใบอ่อน และพบในใบอ่อนมากกว่าใบแก่

และการศึกษางานวิจัยของวิโรจน์ แก้วเรือง (2010) พบว่า ใบหม่อนมีสาร Deoxynojirimycin ซึ่งมีผลในการลดระดับน้ำตาลในเลือด มีสาร gamma amino butyric acid) มีคุณสมบัติในการลดความดันโลหิต และสาร Phytosterol มีประสิทธิภาพในการลดระดับコレสเตอรอล

สิริพรรณ ตั้งสิริกุลชัย และอัญชลี ทิมเสถียร (2545) นักศึกษาภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตร คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง พบว่า ชาใบหม่อนอบแห้งมีปริมาณสารโพลีฟินอลโดยรวมน้อยกว่าใบหม่อนสด ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากการเกิดออกซิเดช์ หรือโพลีเมอร์ไรซ์ของสารประกอบฟีโนอลิก ขณะผ่านกระบวนการผลิตมีการนำน้ำชาที่ได้จากชาใบหม่อนไปทำการข้าวเชื้อด้วยวิธีพาสเจอร์ไซซ์ (pasteurization) ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที และนำใบไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส พบร่วงการพาสเจอร์ไซซ์ที่ระดับน้ำสามารถทำลายเชื้อที่ก่อให้เกิดโรคได้นานอย่างน้อย 15 วัน การซองชาใบหม่อนด้วยน้ำร้อน 80–90 องศาเซลเซียส จะรักษาปริมาณสารออกฤทธิ์ได้ดีที่สุด โดยน้ำชาที่ซองทิ้งไว้ในนาน 60 นาที จะมีสารเควอซิตินและเคเมเฟอรอลมากกว่าการซองชาใบหม่อนในระยะเวลาสั้น ๆ แต่ปริมาณโพลีฟินอลไม่แตกต่างกัน อีกทั้งการซองชาใบหม่อนด้วยน้ำร้อนจะทำให้สารสำคัญละลายออกมากได้ดีกว่าการซองด้วยน้ำเย็น ดังนั้นถ้าจะดีมีชาใบหม่อนควรซองชาใบหม่อนไว้นาน อย่างน้อย 6 นาที ก่อนดื่มจะได้คุณค่าทางโภชนาการและเภสัชวิทยา

#### 2.4.3 มะรุม



ภาพที่ 2.5 ใบมะรุม (Moringa leaves)

ชื่อวิทยาศาสตร์ *Moringa oleifera* Lam. จัดอยู่ในวงศ์ Moringaceae มีชื่อสามัญคือ drum stick หรือ horse radish ชื่อที่นำไปคือ มะค้อนก้อม (ภาคเหนือ), มะรุม (ภาคกลาง), ผักอีสาน (ภาคอีสาน) เป็นไม้ยืนต้น มีใบสแลบแบบขนนก 2 หรือ 3 ชั้น ลักษณะใบเป็นรูปไข่หัวกลับรูปคุ้ยนาน ใบมะรุมเต็มไปด้วยคุณค่าทางโภชนาการและสารอาหารมากมาย เป็นแหล่งของสารเบต้าแคโรทีน

วิตามินซี โปรตีน ธาตุเหล็ก (Fe) และโพแทสเซียม (K) ในมะรุมสามารถรับประทานสด นำไปปรุงอาหาร หรือจะบดเป็นผงละเอียดสามารถเก็บได้นานเป็นเดือน ส่วนต่าง ๆ ของต้นมะรุมถูกนำไปใช้เป็นยาสมุนไพรเพื่อรักษาโรคต่าง ๆ (Verma et al., 2009)

จากการศึกษาของจุ่นไหรัตน์ เกิดดอนแฟก (2552) พบรสสำคัญในเปลือกต้นมะรุมเป็นสารกลุ่ม Alkaloid ส่วนในเมล็ดมีสาร Benoid ส่วนดอกใช้ต้มทานเพื่อเตรียมอาหารและบำรุงโลหิต ส่วนรากทำเป็นยาชงดื่มขับปัสสาวะหรือใช้พอกเพื่อลดการอักเสบของบาดแผล ส่วนของน้ำยางใช้ผสมกับนมดีมแก้ปวดศีรษะ ส่วนใบมีวิตามินซีสูง ใช้ทานแก้เลือดออกตามไร้พันและช่วยลดความแห้งให้ออกจากน้ำยังพบว่าใบมีสารต้านอนุมูลอิสระ ช่วยลดน้ำตาลและลดคอเลสเตอรอลในเลือด

การตรวจสอบทางเคมีเบื้องต้นของใบ ฝัก และเปลือกต้นของมะรุม พบร่วมกันสารสำคัญในมะรุมและฝักมะรุม มีสารกลุ่ม tannins, phenolic compounds และ flavonoids (รัตติยา มากทรัพย์ และศศิวิมล วิชัยรัมย์, 2552) ในมะรุมสามารถป้องกันการเกิดเนื้องอก (Murakami et al., 1998) ใช้รักษาอาการปวดท้อง อาการบวม โรคหืด และไอ (Anwar et al., 2007) มีฤทธิ์ควบคุมการเกิดโรคหลอดเลือดอุดตัน และมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (Chumark et al., 2008) องค์ประกอบทางเคมีที่สำคัญในใบมะรุมคือสารประกอบฟีโนลิกและฟลาโวนอยด์ เช่น crypto-chlorogenic isoquercetin และ astragalin (Vongsak et al., 2012) ซึ่งสารประกอบเหล่านี้เป็นที่ทราบดีว่ามีกิจกรรมต้านการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน (Verma et al., 2009) ต้านการอักเสบ (Soromou et al., 2012) และโรคความดัน (Gasparotto et al., 2011) ดังนั้นจึงมีการนำใบมะรุมมาผลิตเป็นผลิตภัณฑ์ทางยาต่าง ๆ มากมาย

## บทที่ 3

### วิธีดำเนินการวิจัย

#### 3.1 วัสดุอุปกรณ์ สารเคมีและเครื่องมือ

- เครื่องเขนทริพิวจ์
- เครื่องยูวี วิสิเบลสเปกโตรเมทริ
- สารละลาย folin-ciocalteau's reagent
- สารละลาย DPPH (2,2-diphenyl -1-picrylhydrazyl)
- สารละลาย Gallic acid
- ABTS (2,2'-azino-bis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid)
- Trolox

#### 3.2 กลุ่มตัวอย่าง

ใบชา ใบหม่อนและใบมะรุมในพื้นที่จังหวัดสงขลา

#### 3.3. การดำเนินงานวิจัย

##### 3.3.1. การเตรียมตัวอย่างพิช

ใบชาแห้ง 100 เปอร์เซ็นต์ราสามม้า ผลิตโดยบริษัท ใบชาสามม้าจำกัด กรุงเทพมหานคร ซื้อจากร้านค้าทั่วไป ใบหม่อน เก็บใบสดจาก田稼บอยาง อำเภอเมืองจังหวัดสงขลา และใบมะรุม เก็บใบสดจาก田稼บกำแพงเพชร อำเภอตากภูมิ จังหวัดสงขลา

##### 3.3.2. การสกัดตัวอย่างพิช

นำตัวอย่างใบหม่อนและใบมะรุมสด มาล้างด้วยน้ำสะอาด ตั้งทึ้งไว้ให้แห้ง ชั่งน้ำหนัก ตัวอย่างก่อนอบ ใส่ลงในภาชนะที่ทนความร้อน แล้วนำไปอบที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (คงจนกระทั่งใบแห้งแลบอบอบ) ชั่งน้ำหนักตัวอย่างหลังอบบันทึกค่าที่ได้

นำตัวอย่างใบชา ใบหม่อน และใบมะรุมแห้งไปบดให้ละเอียดเก็บไว้ในภาชนะที่แห้ง สะอาดปิดฝาให้สนิท นำไปใช้สำหรับทำการสกัดในขั้นตอนต่อไป

ตารางที่ 3.1 อัตราส่วนที่ใช้ในการสกัดชา

ชนิดตัวอย่าง	อัตราส่วนผสม (กรัม)
ใบชา	1.0
ใบหม่อน	1.0
ใบมะรุม	1.0
ใบชา+ใบหม่อน	1.5:0.5
	1.0:1.0
	0.5:1.5
ใบชา+ใบมะรุม	1.5:0.5
	1.0:1.0
	0.5:1.5
ใบหม่อน+ใบมะรุม	1.5:0.5
	1.0:1.0
	0.5:1.5
ชา+ใบหม่อน+ใบมะรุม	1.0:1.0:1.0
	0.5:0.5:2.0
	1.5:1.0:0.5
	2.0:0.5:0.5
	0.5:1.5:1.0
	0.5:2.0:0.5
	1.0:0.5:1.5

### 3.3.3 การสกัดชาที่เวลา 2 5 10 30 และ 60 นาที

ชั้นน้ำหนักตัวอย่าง (ดังตารางที่ 3.1) ใส่ในของขานนำไปสกัดด้วยน้ำกลัน ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 5 10 30 และ 60 นาที ตามลำดับ ตั้งทึ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง หากมีตะกอนให้นำสารสกัดที่ได้ไปเช่นตระพิวร์ที่ 4000 rpm เป็นเวลา 10 นาที วัดปริมาณสารของสารละลายส่วนใส่ที่ได้บรรจุใส่ขวดเก็บตัวอย่าง ปิดฝาให้สนิท เขียนฉลากปิดไว้ข้างขวา เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นำสารสกัดตัวอย่างไปวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟินอลิกรวม (Total phenolic content (TPC)) และวิเคราะห์หาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) และวิธี 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid (ABTS)

### 3.3.4 การวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟินอลิกรวม

วิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟินอลิกรวมโดยวิธี Folin-ciocalteu's ตามวิธีการของ Chan et al, (2009) ปีเปตสารสกัดตัวอย่าง 300 ไมโครลิตร ใส่ในหลอดทดลอง เติมสารละลาย Folin-ciocalteu's 1.5 มิลลิลิตร และสารละลาย NaCO<sub>3</sub> (7.5% w/v) 1.2 มิลลิลิตร เขย่าสารละลายให้เข้ากัน ตั้งไว้ในที่มีเดือนเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตรโดยใช้สารละลาย Gallic acid เป็นสารละลายมาตรฐาน

### 3.3.5 การวิเคราะห์หาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH

วิเคราะห์หาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH ตามวิธีการของ Bua-in et al, (2009) ปีเปตสารสกัดตัวอย่างมา 2 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลอง เติมสารละลาย 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl 800 ไมโครลิตร (0.04 g/50 mL methanol) เขย่าสารละลายให้เข้ากัน ตั้งทึ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตรโดยใช้สารละลาย Ascorbic acid เป็นสารละลายมาตรฐานหาเบอร์เซ็นต์ (%) การแสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารตัวอย่างได้จากการคำนวณตามสูตร ดังนี้

$$\text{DPPH radical scavenging (\%)} = [(A_0 - A_s)/A_0] \times 100$$

โดย  $A_0$  = ค่าการดูดกลืนแสงของ DPPH

$A_s$  = ค่าการดูดกลืนแสงของ DPPH+สารตัวอย่าง

### 3.3.6 การวิเคราะห์หาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี ABTS

วิเคราะห์หาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี ABTS ตามวิธีการของ Choi et al, (2008) เตรียมสารละลาย ABTS โดยใช้ ABTS เข้มข้น 7 มิลลิโมลาร์ ทำปฏิกิริยากับสารละลายโพแทสเซียม Peroxide 7.45 มิลลิโมลาร์จากนั้นทึ้งไว้ในที่มีเดือนที่อุณหภูมิห้องนาน 16 ชั่วโมง นำสารละลาย ABTS ที่เตรียมไว้ทำการเจือจางด้วยเมทานอลให้ค่าการดูดกลืนแสงอยู่ในช่วง  $0.70 \pm 0.01$  และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 734 นาโนเมตร

ปีเปตสารสกัดตัวอย่างมา 500 ไมโครลิตร เติมสารละลายน้ำ ABTS ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลอดทดลอง เขย่าสารละลายให้เข้ากันดังที่ได้ 7 นาที แล้วนำไปรับค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตรโดยใช้สารละลาย Trolox เป็นสารละลายมาตรฐานหาเปอร์เซ็นต์ (%) การแสดงถูกต้องต้านอนุมูลอิสระของสารตัวอย่างได้จากการคำนวณตามสูตร ดังนี้

$$\text{ABTS radical scavenging (\%)} = [(A_0 - A_s)/A_0] \times 100$$

โดย  $A_0$  = ค่าการดูดกลืนแสงของ ABTS

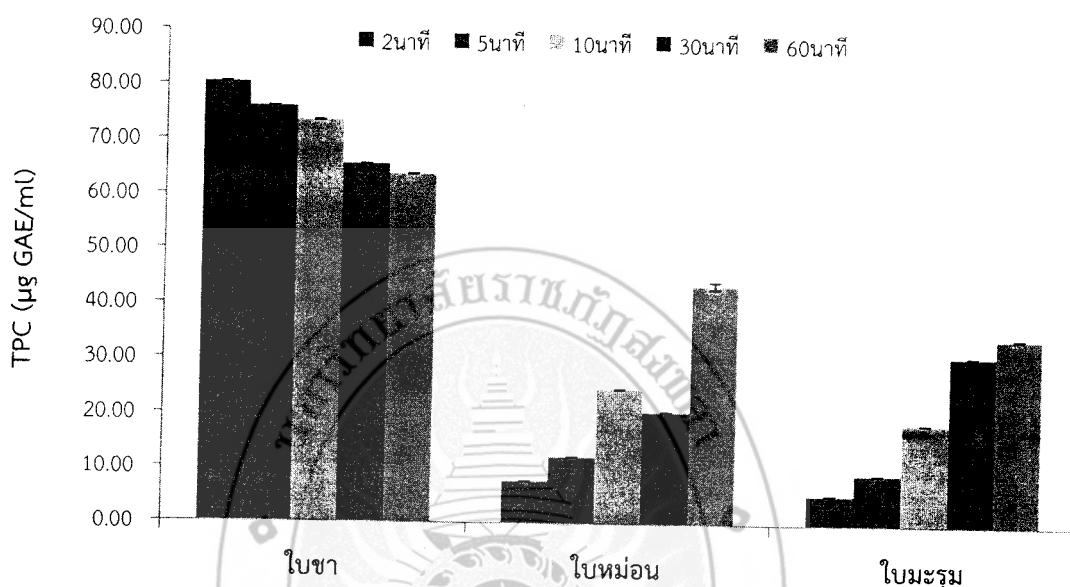
$A_s$  = ค่าการดูดกลืนแสงของ ABTS+สารตัวอย่าง



## บทที่ 4

### ผลการวิเคราะห์ข้อมูล/ผลการทดลองและวิจารณ์ผล

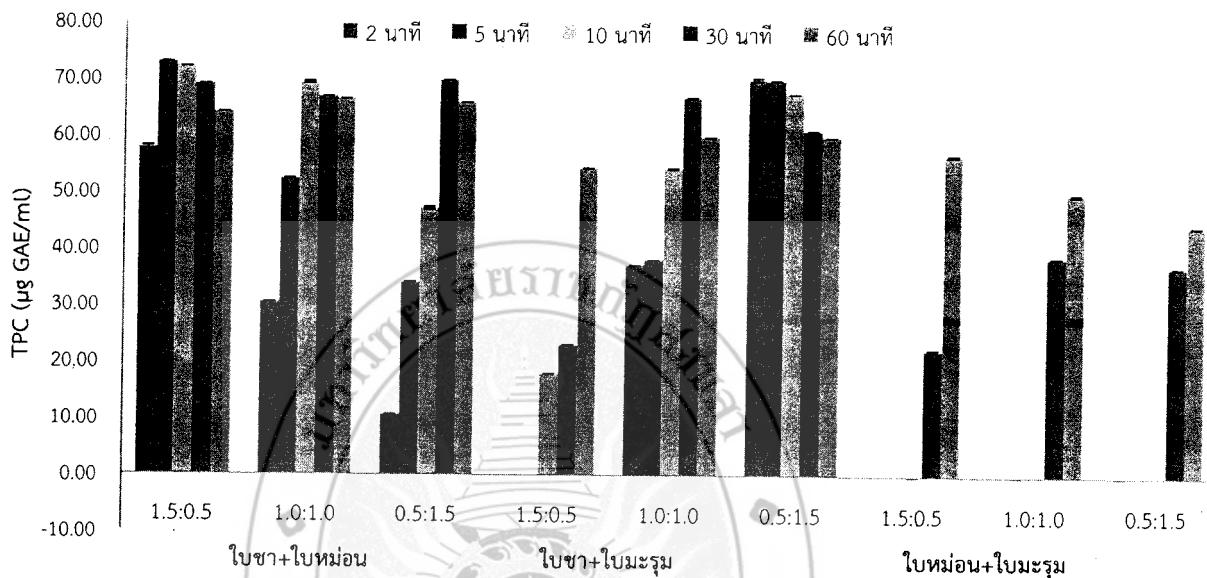
#### 4.1 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม



ภาพที่ 4.1 แสดงปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมของสารสกัดใบชา ใบม่วงและใบมะรุที่เวลา 2 5 10 30 และ 60 นาที จากการทดลอง 3 ชั้ง ( $n=3$ ) โดยนำเสนอด้วยค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

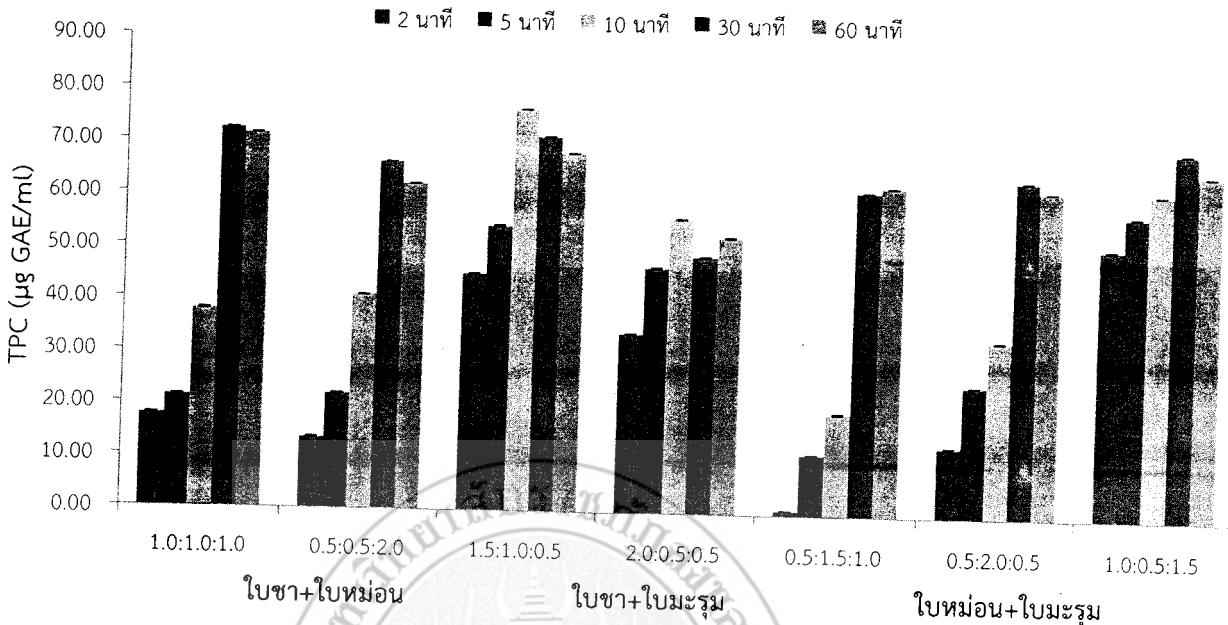
จากการวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม ซึ่งเป็นการวิเคราะห์หาปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดใบชา ใบม่วงและใบมะรุโดยการเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน Gallic acid ที่เวลา 2 5 10 30 และ 60 นาที พบว่า สารสกัดใบชา มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมสูงสุดที่เวลา 2 นาทีเท่ากับ  $80.45 \pm 0.04$   $\mu\text{g}/\text{GAE}/\text{ml}$  ใบม่วงกับใบมะรุ มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมสูงสุดที่เวลา 60 นาที เท่ากับ  $43.71 \pm 0.66$  และ  $34.34 \pm 0.07$   $\mu\text{g GAE}/\text{ml}$  ตามลำดับ (ภาพที่ 4.1) โดยเวลาที่สกัดมีผลต่อปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมของสารสกัดใบม่วงกับใบมะรุ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของบรรือ้ง สังข์ทอง และคณะ (2551) ได้ศึกษาหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมของสารสกัดใบม่วงที่สกัดด้วยเอทานอลเข้มข้นร้อยละ 50 ที่เวลาการสกัด 20-40 นาที พบว่า มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกสูงสุดที่เวลา 40 นาทีเท่ากับ  $294.529 \mu\text{g GAE}/\text{g}$  แต่สารสกัดใบชาเมื่อเพิ่มเวลาในการสกัดปริมาณฟีนอลิกรวมมีค่าลดลง เนื่องจากการสกัดชาพืชสมุนไพรในน้ำร้อนเป็นเวลานานอาจส่งผลให้สารสำคัญบางชนิดที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระถูกทำลายไป (Hidalgo et al., 2010) ปริมาณฟีนอลิกรวมของสารสกัดใบชาที่เวลาต่าง ๆ มีค่ามากกว่าสารสกัดใบม่วงและใบมะรุ ซึ่งสอดคล้องกับผลงานวิจัยของ Rice-Evans and Miller, (1996) พบว่าผลของสารสกัดใบชา มี

ปริมาณสารประกอบฟีโนลิกรวมสูงที่สุด และยังพบสารประกอบฟีโนลิกในสารสกัดใบหม่อนและใบมะรุมอีกด้วย ดังนั้นสารสกัดจากใบชา ใบหม่อนและใบมะรุมน่าจะมีฤทธิ์ต้านอนุមูลอิสระ เนื่องจากมีสารประกอบฟีโนลิกซึ่งเป็นสารต้านออกซิเดชันที่สำคัญชนิดหนึ่งที่พบมากในใบชา และพืชสมุนไพรบางชนิด



ภาพที่ 4.2 แสดงปริมาณสารประกอบฟีโนลิกรวมของสารสกัดผสมใบชา+ใบหม่อน ใบชา+ใบมะรุม และใบหม่อน+ใบมะรุมในอัตราส่วนต่าง ๆ ที่เวลา 2 5 10 30 และ 60 นาที จากการทดลอง 3 ชุด ( $n=3$ ) โดยนำเสนอด้วยค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

จากการวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีโนลิกรวมของสารสกัดผสมใบชา+ใบหม่อน ใบชา+ใบมะรุม และใบหม่อน+ใบมะรุมในอัตราส่วน 1.5:0.5 1.0:1.0 และ 0.5:1.5 w/w ที่เวลา 2 5 10 30 และ 60 นาที พบว่า สารสกัดผสมของใบชา+ใบหม่อนอัตราส่วน 1.5:0.5 w/w ที่เวลาสกัด 5 นาที มีปริมาณสารประกอบฟีโนลิกรวมสูงสุดมีค่าเท่ากับ  $72.97 \pm 0.00 \mu\text{g GAE/ml}$  สารสกัดผสมของใบชา+ใบมะรุมอัตราส่วน 0.5:1.5/w/w ที่เวลาสกัด 2 นาที มีปริมาณสารประกอบฟีโนลิกรวมสูงสุดมีค่าเท่ากับ  $70.07 \pm 0.28 \mu\text{g GAE/ml}$  ส่วนสารสกัดผสมของใบหม่อน+ใบมะรุมอัตราส่วน 1.0:0.5 w/w ที่เวลาสกัด 60 นาที มีปริมาณสารประกอบฟีโนลิกรวมสูงสุดมีค่าเท่ากับ  $56.65 \pm 0.14 \mu\text{g GAE/ml}$  (ภาพที่ 4.2) เนื่องจากใบชามีปริมาณสารประกอบฟีโนลิกรวมมากกว่าใบหม่อนและใบมะรุม (ภาพที่ 4.1) เมื่อนำใบชามาผสมกับใบหม่อนหรือใบมะรุม ทำให้ปริมาณสารประกอบฟีโนลิกมีค่าเพิ่มขึ้น แต่หากนำใบหม่อนกับใบมะรุมมาผสมกันปริมาณสารประกอบฟีโนลิกจะหายไป แต่ถ้าเพิ่มเวลาในการสกัดตั้งแต่ 30 นาทีเป็นต้นไป ปริมาณสารประกอบฟีโนลิกจะเพิ่มขึ้น



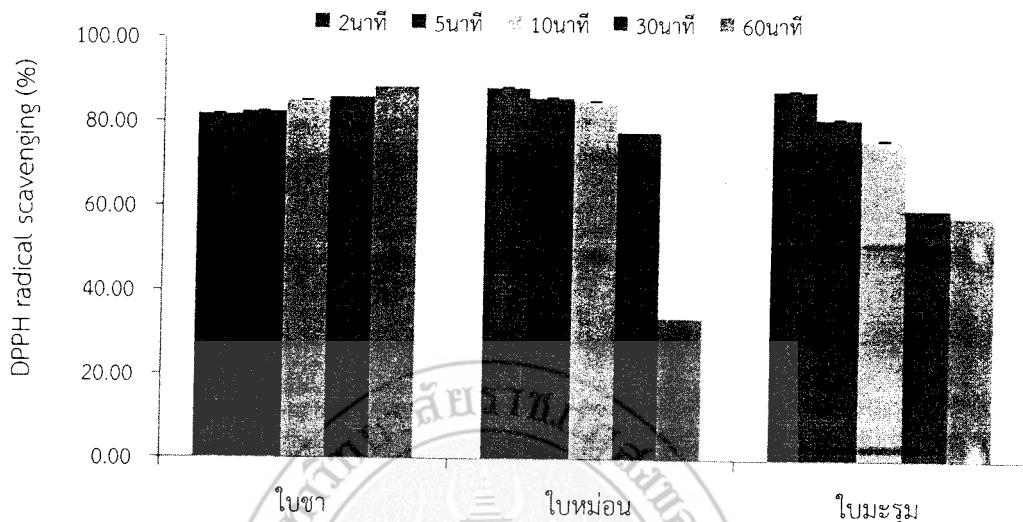
ภาพที่ 4.3 แสดงปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมของสารสกัดใบชา+ใบหม่อน+ใบมะรุม ในอัตราส่วนต่าง ๆ ที่เวลา 2, 5, 10, 30 และ 60 นาที จากการทดลอง 3 ชุด ( $n=3$ ) โดยนำเสนอด้วยเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

จากการวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมของสารสกัดผสมใบชา+ใบหม่อน+ใบมะรุม ในอัตราส่วน 1.0:1.0:1.0, 0.5:0.5:2.0, 1.5:1.0:0.5, 2.0:0.5:0.5, 0.5:1.5:1.0, 0.5:2.0:0.5 และ 1.0:0.5:1.5 w/w ที่เวลา 2 5 10 30 และ 60 นาที พบร่วมกันว่า สารสกัดผสมใบชา+ใบหม่อน+ใบมะรุม อัตราส่วน 1.5:1.0:0.5 w/w ที่เวลา 10 นาที มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมสูงสุดมีค่าเท่ากับ  $76.59 \pm 0.00 \mu\text{g GAE/ml}$  โดยส่วนใหญ่ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมสูงสุดจะเพิ่มขึ้นตามเวลาที่ใช้สกัด (ภาพที่ 4.3)

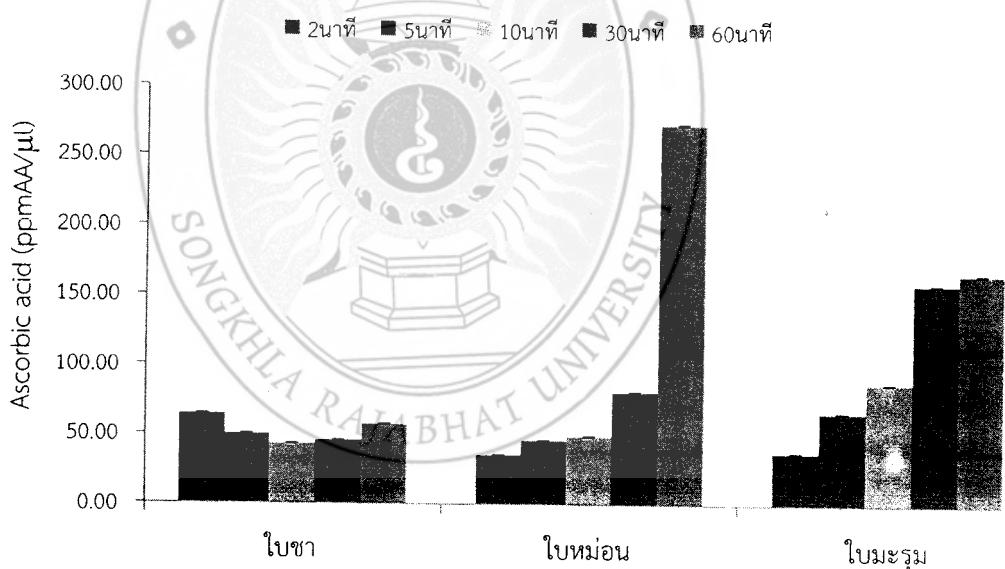
ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมที่แตกต่างกันขึ้นอยู่กับชนิดของพืช วิธีการที่ใช้ในการทดลอง และสารมาตรฐานที่ใช้ (Huda-Faujan et al., 2009) ซึ่งจากการทดลองของ Rice-Evans and Miller (1996) พบร่วมกันว่า สารสกัดผสมในอัตราส่วนต่าง ๆ จะมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมแตกต่าง กันตามอัตราส่วนของพืชและเวลาที่ใช้ในการสกัด ซึ่งสารสกัดผสมที่มีอัตราส่วนของใบชา มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมสูงกว่าสารสกัดผสมที่มีอัตราส่วนของใบหม่อนและใบมะรุม เนื่องจากสารประกอบฟีนอลิกจะพบมากที่สุดในใบชา และสารสกัดผสมทุก ๆ อัตราส่วนมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมสูงขึ้นตามระยะเวลาที่ใช้ในการสกัด

#### 4.2 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจากการวิเคราะห์โดยวิธี DPPH

(A)



(B)



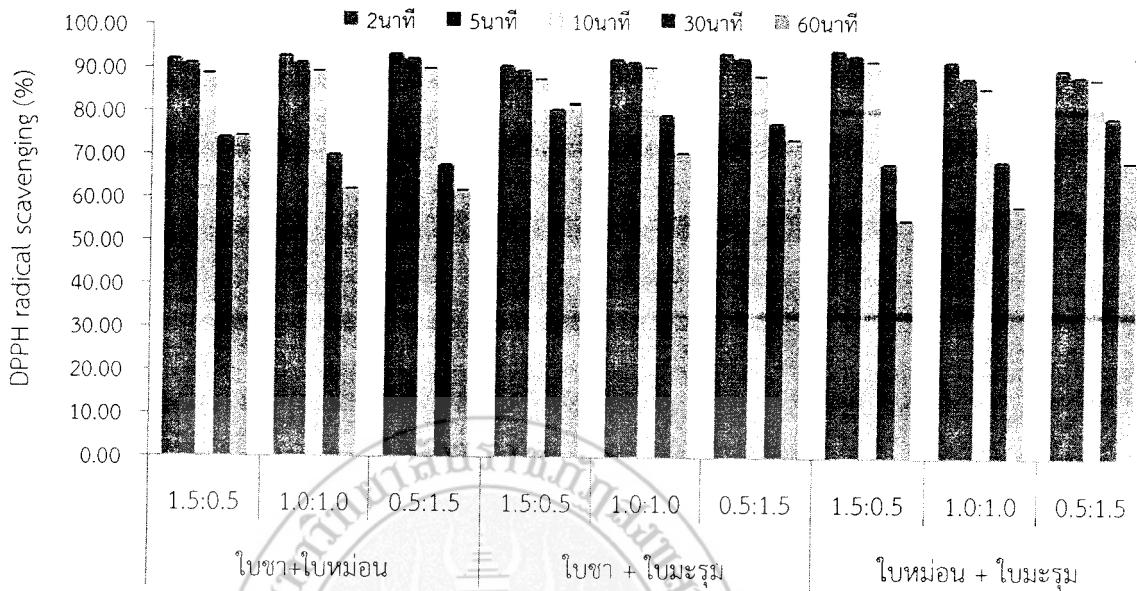
ภาพที่ 4.4 (A) แสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH ของสารสกัดใบชาใบหม่อนและใบมะรุ่มที่เวลา 2 5 10 30 และ 60 นาที จากการทดลอง 3 ช้ำ ( $n=3$ ) โดยนำเสนองค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

(B) แสดงปริมาณ Ascorbic acid (ppmAA/μl) ของสารสกัดใบชาใบหม่อนและใบมะรุ่มที่เวลา 2 5 10 30 และ 60 นาที จากการทดลอง 3 ช้ำ ( $n=3$ ) โดยนำเสนองค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

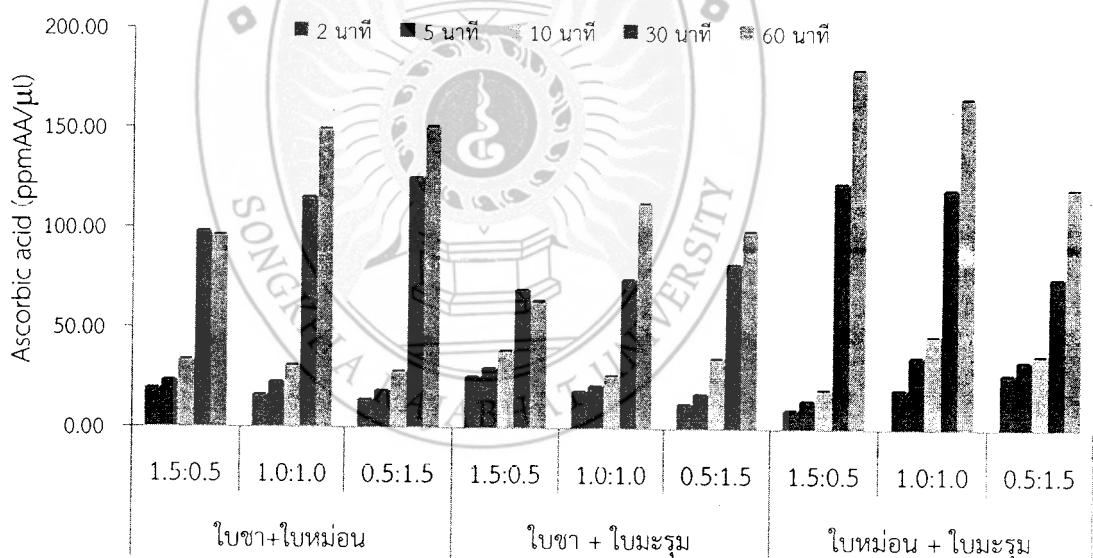
จากการวิเคราะห์หาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH ของสารสกัดใบชาในหม่อนและใบมะรุมที่เวลา 2 5 10 30 และ 60 นาที พบร้า สารสกัดใบชา มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงสุดที่เวลา 60 นาที มีค่าเท่ากับ  $88.58 \pm 0.04$  เปอร์เซ็นต์ (ปริมาณ ascorbic acid  $35.00 \pm 0.01$  ppmAA/ $\mu$ l) ในหม่อนกับใบมะรุมมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงสุดที่เวลา 2 นาที มีค่าเท่ากับ  $88.41 \pm 0.01$  และ  $87.98 \pm 0.07$  เปอร์เซ็นต์ (ปริมาณ ascorbic acid  $35.74 \pm 0.04$  และ  $37.59 \pm 0.01$  ppmAA/ $\mu$ l) ตามลำดับ (gap 4.4 A และ B) ผลการทดลองข้างต้นให้ผลใกล้เคียงกับงานวิจัยของ Moyo et al. (2012) ที่ทำการทดสอบหาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH ของสารสกัดใบมะรุมจากการสกัดด้วยน้ำซึ่งมีค่าเท่ากับ 83.56 เปอร์เซ็นต์และยังสอดคล้องกับงานวิจัยของ Jungmin et al. (2013) ที่ทำการทดสอบหาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH/ของสารสกัดใบชาและใบหม่อน จากการสกัดด้วยน้ำร้อนที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส พบร้า มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเท่ากับ 66.65 และ 82.96 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ



(A)

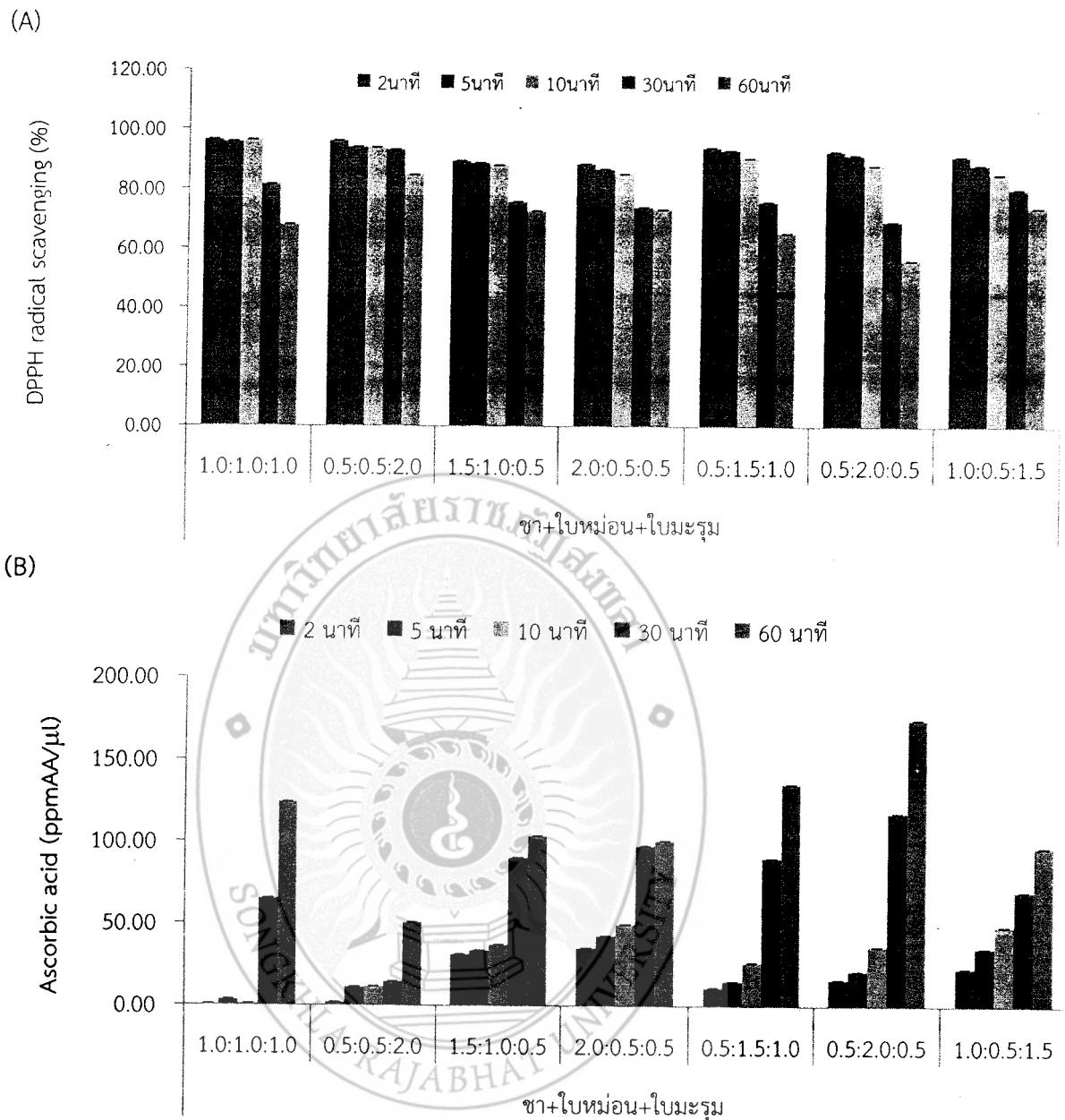


(B)



ภาพที่ 4.5 (A) แสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH ของสารสกัดผสมใบชา+ใบหม่อน ใบชา+ใบมะรุมและใบหม่อน+ใบมะรุมในอัตราส่วนต่าง ๆ ที่เวลา 2 5 10 30 และ 60 นาที จากการทดลอง 3 ชั้ง ( $n=3$ ) โดยนำเสนองค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

(B) แสดงปริมาณ Ascorbic acid (ppm AA/μl) ของสารสกัดผสมใบชา+ใบหม่อน ใบชา+ใบมะรุมและใบหม่อน+ใบมะรุมในอัตราส่วนต่าง ๆ ที่เวลา 2 5 10 30 และ 60 นาที จากการทดลอง 3 ชั้ง ( $n=3$ ) โดยนำเสนองค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน



ภาพที่ 4.6 (A) แสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH ของสารสกัดผสมใบชา+ใบหม่อน+ใบมะรุม ในอัตราส่วนต่าง ๆ ที่เวลา 2 5 10 30 และ 60 นาที จากการทดลอง 3 ช้ำ ( $n=3$ ) โดยนำเสนอค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

(B) แสดงปริมาณ Ascorbic acid (ppmAA/μl) ของสารสกัดผสมใบชา+ใบหม่อน+ใบมะรุม ในอัตราส่วนต่าง ๆ ที่เวลา 2 5 10 30 และ 60 นาที จากการทดลอง 3 ช้ำ ( $n=3$ ) โดยนำเสนอค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน



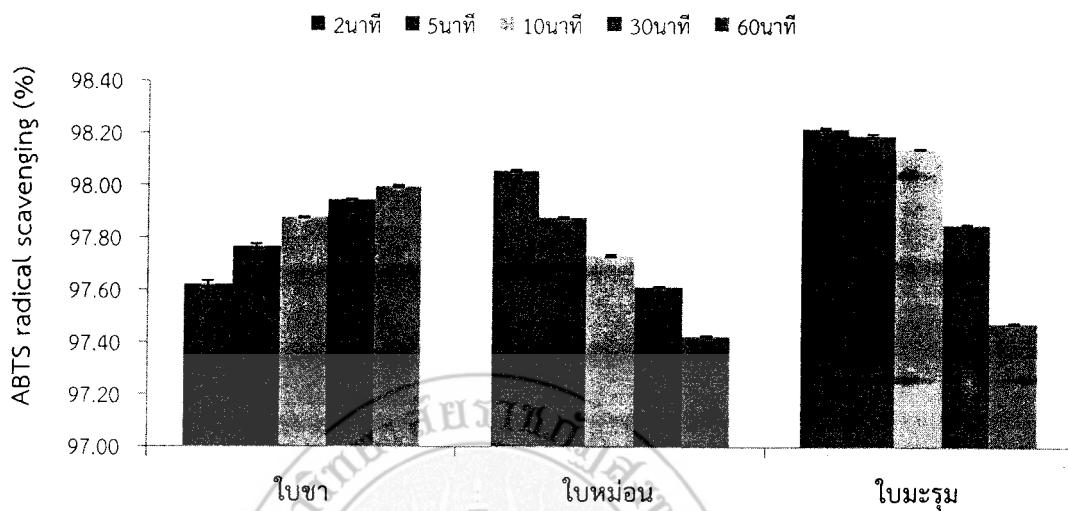
จากการวิเคราะห์หาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH ของสารสกัดผงสมใบชา+ใบหม่อนใบชา+ใบมะรุม และใบหม่อน+ใบมะรุม ในอัตราส่วน 1.5:0.5, 1.0:1.0 และ 0.5:1.5 ที่เวลา 2, 5, 10, 30 และ 60 นาทีพบว่า สารสกัดผงสมใบชา+ใบหม่อนอัตราส่วน 0.5:1.5 w/w มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงสุดมีค่าเท่ากับ  $93.36 \pm 0.03$  เปอร์เซ็นต์ (ปริมาณ ascorbic acid  $14.22 \pm 0.02$  ppmAA/ $\mu$ l) สารสกัดผงสมใบชา+ใบมะรุมอัตราส่วน 0.5:1.5 w/w มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงสุดมีค่าเท่ากับ  $93.70 \pm 0.00$  เปอร์เซ็นต์ (ปริมาณ ascorbic acid  $12.70 \pm 0.02$  ppmAA/ $\mu$ l) ส่วนสารสกัดผงสมใบหม่อน+ใบมะรุมมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงสุดในอัตราส่วน 1.5:0.5 w/w มีค่าเท่ากับ  $55.18 \pm 0.01$  เปอร์เซ็นต์ (ปริมาณ ascorbic acid  $9.67 \pm 0.01$  ppmAA/ $\mu$ l) โดยสารสกัดผงสมใบชา+ใบหม่อนใบชา+ใบมะรุม และใบหม่อน+ใบมะรุม ทุก ๆ อัตราส่วน มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงสุดที่เวลา 2 นาที (ภาพที่ 4.5)

และการวิเคราะห์หาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH/ของสารสกัดผงสมใบชา+ใบหม่อน+ใบมะรุม/ในอัตราส่วน 1.0:1.0:1.0 0.5:0.5:2 1.5:1.0:0.5 2.0:0.5:0.5 0.5:1.5:1.0 0.5:2.0:0.5 และ 1.0:0.5:1.5 w/w ที่เวลา 2, 5, 10, 30 และ 60 นาทีพบว่าสารสกัดผงสมใบชา+ใบหม่อน+ใบมะรุมอัตราส่วน 1.0:1.0:1.0 w/w มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงสุด มีค่าเท่ากับ  $96.51 \pm 0.00$  เปอร์เซ็นต์ (ปริมาณ ascorbic acid  $0.52 \pm 0.01$  ppmAA/ $\mu$ l) โดยมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงสุดที่เวลา 2 นาที (ภาพที่ 4.6 A และ B) จากผลการทดลองปริมาณ ascorbic ไม่สัมพันธ์กับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเนื่องจากปริมาณ ascorbic สูงสุดคือ สารสกัดผงสมใบชา+ใบหม่อน+ใบมะรุม/ในอัตราส่วน 0.5:2.0:0.5 ที่เวลาสกัด 60 นาที  $174.56 \pm 0.01$  ppmAA/ $\mu$ l แต่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ  $56.48 \pm 0.01$  เปอร์เซ็นต์

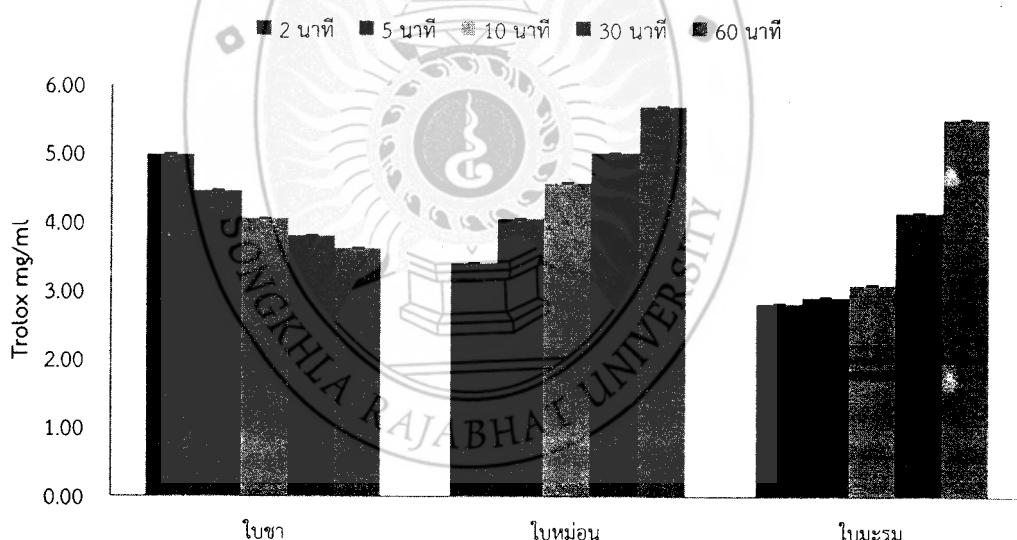
๙  
๙ A1.22A  
๖๗๕๘

### 4.3 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจากการวิเคราะห์โดยวิธี ABTS

(A)



(B)

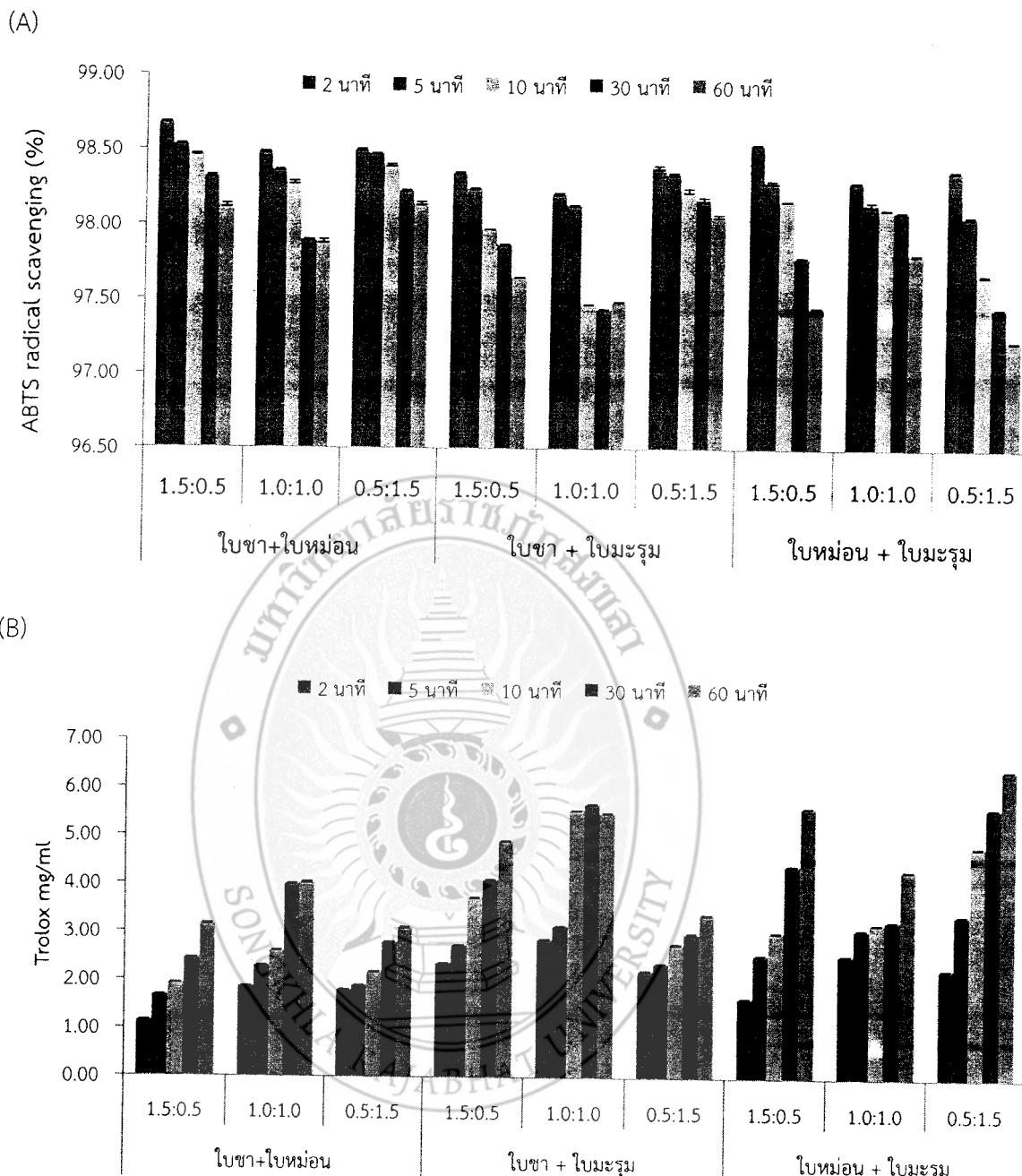


ภาพที่ 4.7 (A) แสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี ABTS ของสารสกัดใบชาใบหม่อนและใบมะรุ่มที่เวลา 2 5 10 30 และ 60 นาที จากการทดลอง 3 ชั้า ( $n=3$ ) โดยนำเสนองค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

(B) แสดงปริมาณ Trolox (mg/mL) ของสารสกัดใบชาใบหม่อนและใบมะรุ่มที่เวลา 2 5 10 30 และ 60 นาที จากการทดลอง 3 ชั้า ( $n=3$ ) โดยนำเสนองค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

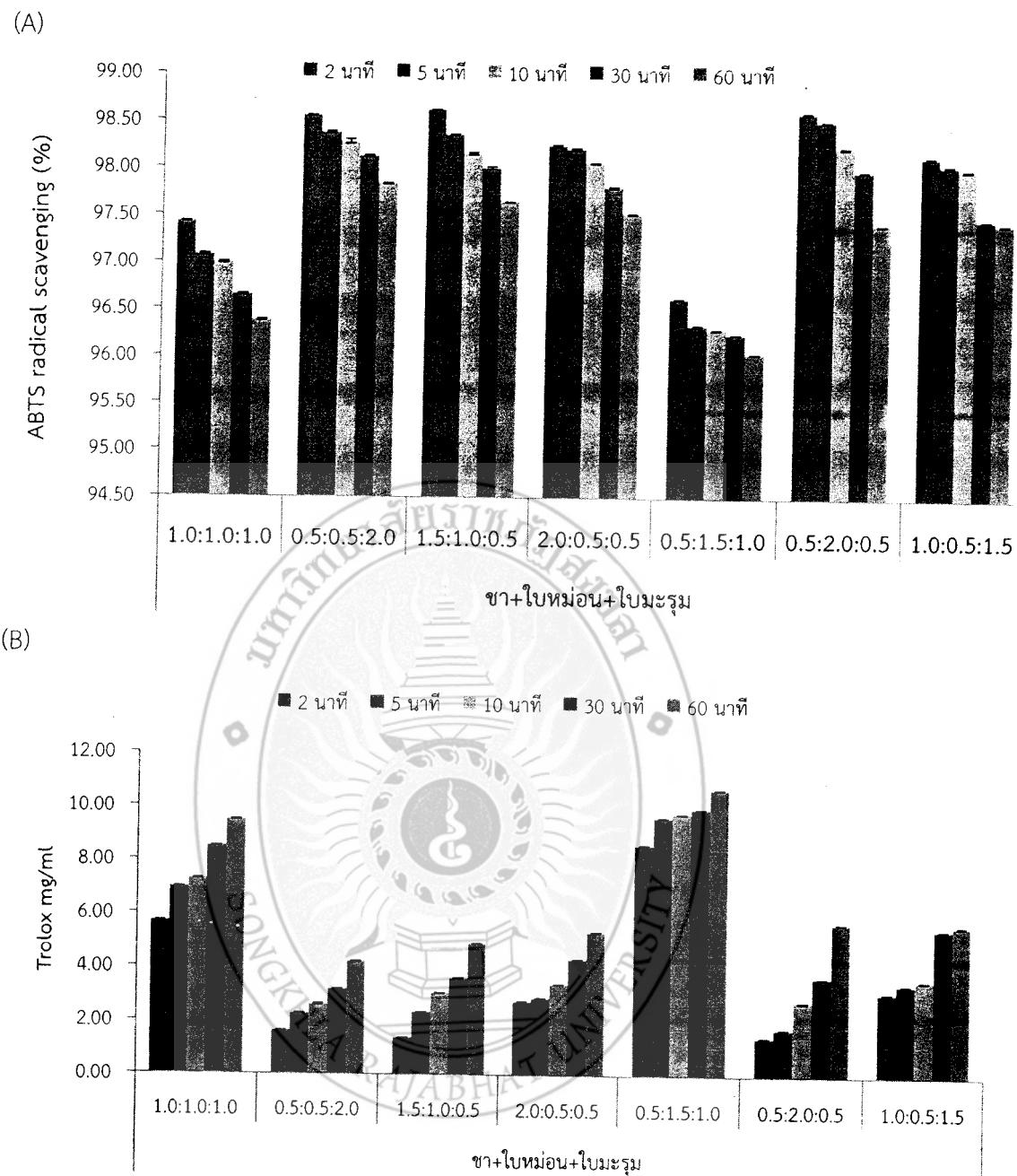
จากการวิเคราะห์หาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี ABTS ของสารสกัดใบชาใบหม่อนและใบมะรุนที่เวลา 2 5 10 30 และ 60 นาทีพบว่า สารสกัดใบชาเมქุทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงสุดที่เวลา 60 นาที มีค่าเท่ากับ  $98.00 \pm 0.00$  เปอร์เซ็นต์ (ปริมาณ Trolox  $3.62 \pm 0.00$  mg/ml) ใบหม่อนกับใบมะรุนเมქุทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงสุดที่เวลา 2 นาที มีค่าเท่ากับ  $98.06 \pm 0.00$  และ  $98.22 \pm 0.00$  เปอร์เซ็นต์ (ปริมาณ Trolox  $3.41 \pm 0.00$  และ  $2.82 \pm 0.00$  mg/ml) ตามลำดับ (ภาพที่ 4.7 A และ B) นอกจากนี้เมქุทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดใบชา ใบหม่อน และใบมะรุนมีค่าใกล้เคียงกับงานวิจัยของ Abd El-Moneim et al. (2011) พบร่วมกันว่าสารสกัดใบชาด้วยน้ำร้อนเมქุทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเท่ากับ  $88.5 \pm 0.37$  เปอร์เซ็นต์ สารสกัดใบหม่อนด้วยน้ำ เอทานอล และน้ำ:เอทานอล (50/50 v/v) เมქุทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเท่ากับ  $55.43 \pm 4.30$ ,  $44.93 \pm 2.00$  และ  $41.80 \pm 0.50$ /เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (Danijela et al., 2013) และสารสกัดใบมะรุนด้วยน้ำเมქุทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเท่ากับ 72.89 เปอร์เซ็นต์ (Moyo et al., 2012)





ภาพที่ 4.8 (A) แสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี ABTS ของสารสกัดผสมใบชา+ใบหม่อน ใบชา+ใบมะรุมและใบหม่อน+ใบมะรุมในอัตราส่วนต่าง ๆ ที่เวลา 2 5 10 30 และ 60 นาที จากการทดลอง 3 ชั้ง ( $n=3$ ) โดยนำเสนองค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

(B) แสดงปริมาณ Trolox (mg/mL) ของสารสกัดผสมใบชา+ใบหม่อน ใบชา+ใบมะรุมและใบหม่อน+ใบมะรุมในอัตราส่วนต่าง ๆ ที่เวลา 2 5 10 30 และ 60 นาที จากการทดลอง 3 ชั้ง ( $n=3$ ) โดยนำเสนองค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน



ภาพที่ 4.9 (A) แสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี ABTS ของสารสกัดผสมใบชา+ใบหม่อน+ใบมะรุม ในอัตราส่วนต่าง ๆ ที่เวลา 2 5 10 30 และ 60 นาที จากการทดลอง 3 ชุด ( $n=3$ ) โดยนำเสนองค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

(B) แสดงปริมาณ Trolox (mg/mL) ของสารสกัดผสมใบชา+ใบหม่อน+ใบมะรุม ในอัตราส่วนต่าง ๆ ที่เวลา 2 5 10 30 และ 60 นาที จากการทดลอง 3 ชุด ( $n=3$ ) โดยนำเสนอค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

จากการวิเคราะห์หากรีต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี ABTS ของสารสกัดผสมใบชา+ใบหม่อน ใบชา+ใบมะรุม และใบหม่อน+ใบมะรุมที่เวลา 2 5 10 30 และ 60 นาทีพบว่า สารสกัดผสมใบชา+ใบหม่อน มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงสุดในอัตราส่วน 1.5:0.5/w/w มีค่าเท่ากับ  $98.68 \pm 0.00$  เปอร์เซ็นต์ (ปริมาณ Trolox  $1.15 \pm 0.00$  mg/ml) สารสกัดผสมใบชา+ใบมะรุมมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงสุดในอัตราส่วน/0.5:1.5/w/w มีค่าเท่ากับ  $98.39 \pm 0.01$ /เปอร์เซ็นต์ (ปริมาณ Trolox  $2.20 \pm 0.01$  mg/ml) สารสกัดผสมใบหม่อน+ใบมะรุม มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงสุดในอัตราส่วน 1.5:0.5 w/w มีค่าเท่ากับ  $98.64 \pm 0.01$  เปอร์เซ็นต์ (ปริมาณ Trolox  $1.65 \pm 0.00$  mg/ml) โดยสารสกัดผสมใบชา+ใบหม่อนใบชา+ใบมะรุม และใบหม่อน+ใบมะรุม ทุกๆ อัตราส่วน มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงสุดที่เวลา 2 นาที (ภาพที่ 4.8 A และ B)

และจากการวิเคราะห์หากรีต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี ABTS/ของสารสกัดผสมใบชา+ใบหม่อน+ใบมะรุม ที่เวลา 2 5 10 30 และ 60 นาทีพบว่าสารสกัดผสมใบชา+ใบหม่อน+ใบมะรุม อัตราส่วน/1.5:1.0:0.5/w/w มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงสุด มีค่าเท่ากับ  $98.62 \pm 0.00$  เปอร์เซ็นต์ (ปริมาณ Trolox  $1.37 \pm 0.00$  mg/ml) โดยมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงสุดที่เวลา 2 นาที (ภาพที่ 4.9 A และ B) จากผลการทดลองปริมาณ Trolox ไม่สัมพันธ์กับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเช่นเดียวกับการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH เนื่องจากปริมาณ Trolox สูงสุดคือ สารสกัดผสมใบชา+ใบหม่อน+ใบมะรุม/ในอัตราส่วน 0.5:1.0:1.0 ที่เวลาสกัด 60 นาที  $10.69 \pm 0.01$  mg/ml แต่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ  $96.05 \pm 0.003$  เปอร์เซ็นต์

ดังนั้นจากการทดลอง พบว่า สารสกัดใบชา ใบหม่อน และใบมะรุม ในอัตราส่วนต่างๆ มีปริมาณสารประกอบฟินอลิกิรวม และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระแตกต่างกันตามระยะเวลาที่ใช้ในการสกัด และเมื่อเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH และ ABTS พบว่า มีค่าที่ใกล้เคียงกัน ซึ่งสารสกัดใบหม่อนและใบมะรุม มีปริมาณสารประกอบฟินอลิกิรวมแปรผกผันกับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ โดยมีปริมาณสารประกอบฟินอลิกิรวมสูงขึ้นแต่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระลดลงเมื่อทำการสกัดเป็นเวลานานขึ้น การสกัดชาด้วยพืชสมุนไพรในน้ำร้อนเป็นเวลานานส่งผลให้สารสำคัญบางชนิดที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระถูกทำลายไป (Hidalgo et al., 2010) ดังนั้นในการชงชาใบหม่อนและใบมะรุมเพื่อให้มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงสุด จึงไม่ควรชงที่เวลานาน ส่วนสารสกัดใบชา มีปริมาณสารประกอบฟินอลิกิรวมสูงกว่าสารสกัดใบหม่อน และใบมะรุม และมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเพิ่มขึ้นเมื่อทำการสกัดเป็นเวลานานขึ้น ทั้งนี้เนื่องจากใบชาที่นำมาใช้ในการทดลองเป็นใบชาแห้งสำเร็จรูป ซึ่งจากผลงานวิจัยของพรรตตน์ สินชัยพาณิชย์ (2011) พบว่า ชนิดหรือคุณภาพของใบชาที่ใช้มีผลต่อความแตกต่างขององค์ประกอบสำคัญทางเคมีที่สกัดได้โดยการแซ่ใบชาสำเร็จรูปในน้ำร้อนเป็นเวลานาน จะทำให้ชามีสีเข้ม มีกลิ่นหอม และมีรสชาติที่เข้มข้น กว่าการแซ่ในน้ำร้อนเป็นเวลาสั้น

## บทที่ 5

### สรุปผลและข้อเสนอแนะ

#### 5.1 สรุปผล

จากการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดใบชา ใบหม่อน และใบมะรุม ในอัตราส่วนต่างๆ ที่เวลา 2, 5, 10, 30 และ 60 นาที โดยทำการวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH และ ABTS สรุปได้ว่า

**ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม (Total phenolic content : TPC)**

1. สารสกัดใบชา มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมสูงสุดที่เวลา 2 นาทีเท่ากับ  $80.45 \pm 0.04 \text{ } \mu\text{g GAE/ml}$  ใบหม่อนกับใบมะรุม มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมสูงสุดที่เวลา 60 นาที เท่ากับ  $43.71 \pm 0.66$  และ  $34.34 \pm 0.07 \text{ } \mu\text{g GAE/ml}$  ตามลำดับ
2. สารสกัดผสมของใบชา+ใบหม่อน อัตราส่วน 1.5:0.5 w/w มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมสูงสุด เท่ากับ  $72.97 \pm 0.00 \text{ } \mu\text{g GAE/ml}$  สารสกัดผสมของใบชา+ใบมะรุม อัตราส่วน 0.5:1.5 w/w มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมสูงสุด เท่ากับ  $70.07 \pm 0.28 \text{ } \mu\text{g GAE/ml}$  และสารสกัดผสมของใบหม่อน+ใบมะรุม อัตราส่วน 1.0:10.5 w/w มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมสูงสุด เท่ากับ  $56.65 \pm 0.14 \text{ } \mu\text{g GAE/ml}$
3. สารสกัดผสมใบชา+ใบหม่อน+ใบมะรุม อัตราส่วน 1.5:1.0:0.5 w/w มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมสูงสุด เท่ากับ  $76.59 \pm 0.00 \text{ } \mu\text{g GAE/ml}$  ที่เวลา 10 นาที

**การวิเคราะห์โดยวิธี DPPH (Radical-scavenging activity using DPPH assay)**

1. สารสกัดใบชา มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงสุดที่เวลา 60 นาที เท่ากับ  $88.58 \pm 0.00$  เปอร์เซ็นต์ (ปริมาณ ascorbic acid  $35.00 \pm 0.01 \text{ ppmAA}/\mu\text{l}$ ) ใบหม่อนกับใบมะรุม มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงสุดที่เวลา 2 นาที เท่ากับ  $88.41 \pm 0.01$  และ  $87.98 \pm 0.07$  เปอร์เซ็นต์ (ปริมาณ ascorbic acid  $35.74 \pm 0.04$  และ  $37.59 \pm 0.01 \text{ ppmAA}/\mu\text{l}$ ) ตามลำดับ
2. สารสกัดผสมใบชา+ใบหม่อน อัตราส่วน 0.5:1.5 w/w มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงสุด เท่ากับ  $93.36 \pm 0.03$  เปอร์เซ็นต์ (ปริมาณ ascorbic acid  $14.22 \pm 0.02 \text{ ppmAA}/\mu\text{l}$ ) สารสกัดผสมใบชา+ใบมะรุม อัตราส่วน 0.5:1.5 w/w มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงสุด เท่ากับ  $93.70 \pm 0.00$  เปอร์เซ็นต์ (ปริมาณ ascorbic acid  $12.70 \pm 0.02 \text{ ppmAA}/\mu\text{l}$ ) และสารสกัดผสมใบใหม่อน+ใบมะรุม อัตราส่วน 1.5:0.5 w/w มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงสุด เท่ากับ  $55.18 \pm 0.01$  เปอร์เซ็นต์ (ปริมาณ ascorbic acid  $9.67 \pm 0.01 \text{ ppmAA}/\mu\text{l}$ ) โดยทุกอัตราส่วนมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงสุดที่เวลา 2 นาที
3. สารสกัดผสมใบชา+ใบหม่อน+ใบมะรุม อัตราส่วน 1.0:1.0:1.0 มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงสุด w/w เท่ากับ  $96.51 \pm 0.00$  เปอร์เซ็นต์ (ปริมาณ ascorbic acid  $0.52 \pm 0.01 \text{ ppmAA}/\mu\text{l}$ ) ที่เวลา 2 นาที

### การวิเคราะห์โดยวิธี ABTS (Radical-scavenging activity using ABTS assay)

- สารสกัดใบชาเม็ดทึบต้านอนุมูลอิสระสูงสุดที่เวลา 60 นาที เท่ากับ  $98.00 \pm 0.00$  เปอร์เซ็นต์ (ปริมาณ Trolox  $3.62 \pm 0.00$  mg/ml) ในหม้อน้ำกับในมะรุมเม็ดทึบต้านอนุมูลอิสระสูงสุดที่เวลา 2 นาที เท่ากับ  $98.06 \pm 0.00$  และ  $98.22 \pm 0.00$  เปอร์เซ็นต์ (ปริมาณ Trolox  $3.41 \pm 0.00$  และ  $2.82 \pm 0.00$  mg/ml) ตามลำดับ
- สารสกัดผสมใบชา+ใบหม่อนอัตราส่วน 1.5:0.5 w/w มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงสุด เท่ากับ  $98.68 \pm 0.00$  เปอร์เซ็นต์ (ปริมาณ Trolox  $1.15 \pm 0.00$  mg/ml) สารสกัดผสมใบชา+ใบมะรุม อัตราส่วน 0.5:1.5 w/w มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงสุด เท่ากับ  $98.39 \pm 0.01$  เปอร์เซ็นต์ (ปริมาณ Trolox  $2.20 \pm 0.01$  mg/ml) สารสกัดผสมใบหม่อน+ใบมะรุมอัตราส่วน 1.5:0.5 w/w มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงสุด เท่ากับ  $98.64 \pm 0.01$  เปอร์เซ็นต์ (ปริมาณ Trolox  $1.65 \pm 0.00$  mg/ml) โดยทุกอัตราส่วนมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงสุดที่เวลา 2 นาที
- สารสกัดผสมใบชา+ใบหม่อน+ใบมะรุมอัตราส่วน 1.5:1.0:0.5 w/w มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงสุด เท่ากับ  $98.62 \pm 0.00$  เปอร์เซ็นต์ (ปริมาณ Trolox  $1.37 \pm 0.00$  mg/ml) ที่เวลา 2 นาที

### 5.2 ข้อเสนอแนะ

ชาสมุนไพรเป็นเครื่องดื่มเพื่อสุขภาพที่นิยมบริโภคกันอย่างแพร่หลายในปัจจุบัน ซึ่งมีสรรพคุณทางยาและทางโภชนาการต่างๆ มากมาย ระยะเวลาและอัตราส่วนที่เหมาะสมแก่การชงชาสมุนไพรใบหม่อนและใบมะรุม ควรชงด้วยน้ำร้อนอุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส ในอัตราส่วน 1-2 กรัมต่อน้ำชา 1 ถ้วย ชงชาที่เวลา 2-10 นาที เนื่องจากเป็นช่วงเวลาที่สารต้านอนุมูลอิสระออกฤทธิ์ได้ดีที่สุด และทำให้ชาเมล็ด กลิ่น และรสชาติ ที่เฉพาะ เช่นเดียวกันกับชาสมุนไพรเจียวกุ้หลาน พบร้า การชงชาที่ผู้บริโภคให้การยอมรับมากที่สุด คือ ชงชาด้วยน้ำร้อนอุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส นาน 1-2 นาที (อนพล กิจพจน์ และคณะ, 2550)

## บรรณานุกรม

กัลยาณี วัฒนธีร่างกูร..(2551). ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกและความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระจากกาเกเมล์ดสบู่ดำ. มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

โครงสร้างทางเคมีของ DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl). (2550) สืบคันเมื่อวันที่ 12 มิถุนายน 2556, จากเว็บไซต์ <http://en.wikipedia.org/wiki/DPPH>.

โครงสร้างทางเคมีของ ABTS (2,2'-azino-bis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid). (2550). สืบคันเมื่อวันที่ 12 มิถุนายน 2556, จากเว็บไซต์ <http://th.wikipedia.org/wiki/ABTS>.

จุ่นพรัตน์ เกิดตอนแฟก..(2552).aสมุนไพรลดความดันโลหิตสูง. กรุงเทพมหานคร. สำนักพิมพ์ เชิญชวนตึง กรุ๊ป.

จักรพันธ์ จุลศรีไกวัล, ไชยวัฒน์ ไชยสุต, สุวรรณฯ เวชภกุล และสุนีย์ จันทร์สกาว..(2549). ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของน้ำมันหอมระ夷และการสกัดของพืชวงศ์/Zingiberaceae ในประเทศไทย. กรุงเทพมหานคร : คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

จินดาวัลย์ วิบูลย์อุทัย, ชิตารัตน์ สมดี และจิรา เพชรส. (2553). การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดใน/10 อาหารพืชผักพื้นบ้านที่ปรุงสำเร็จ. มหาวิทยาลัยมหาสารคาม.

เจนจิรา จิรัมย์ และประسنค์ สีหานาม (2554). อนุมูลอิสระและสารต้านอนุมูลอิสระ : แหล่งที่มาและกลไกการเกิดปฏิกิริยา, วารสารวิชาการ มหาวิทยาลัยราชภัฏกาฬสินธุ์ 1(1) : 59-70 ณัฐธิดา สิริโยธิน. (2549). ชาเขียว ดีมูกุ ดีมเป็น ต้านโรคหวัดยั่นโรคมะเร็ง. สืบคันเมื่อวันที่ 22 มีนาคม 2557 จาก <http://www.oknation.net>.

ปริยันันท์ บัวสด. (2549). การตรวจสอบความสามารถในการเป็นสารแอนตี้ออกซิเดนท์ของเครื่องดื่มชาโดยวิธีไซคลิกโวลาแม่เมตรี. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต บัณฑิตวิทยาลัย : มหาวิทยาลัยศิลปากร.

นิติมา วงศ์วัฒนานุกูล และคณะ..(2549)..ฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของพืชหอมและเครื่องเทศไทย. ผลงานวิชาการวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทยครั้งที่ 32 : กรุงเทพมหานคร.

พรพิพิญ วิรชวงศ์. (2011). อนุมูลอิสระ (free radicals), สารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidants). สืบคันเมื่อวันที่ 11 มิถุนายน 2550 จาก [www.gpo.or.th/rdi/html/antioxidants.html](http://www.gpo.or.th/rdi/html/antioxidants.html)

รัตติยา มากทรัพย์ และศศิวิมล วิชัยรัมย์. (2552). ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของมะรุม. สืบคันเมื่อวันที่ 22/มีนาคม/2557/จากเว็บไซต์ <http://www.pharmacy.mahidol.ac.th/th/service-research-special-abstract.php?num=41&year=2552>.

- วิโรจน์ แก้วเรือง. (2551). ชาใบหม่อนเครื่องดื่มบำรุงสุขภาพที่ยากจะปฏิเสธ. สืบค้นเมื่อวันที่ 22 มีนาคม 2557 จากเว็บไซต์ <http://www.gotoknow.org/blogs/posts/176052>.
- สมพร ภูติยานันท์ (2542). ความรู้เบื้องต้นเกี่ยวกับการแพทย์แผนไทยว่าด้วยสมุนไพรกับ การแพทย์แผนไทย. พิมพ์ครั้งที่ 3.กรุงเทพมหานคร.
- สุรพจน์ วงศ์ใหญ่ และรัตติยา สำราญสกุล (2545). การวิเคราะห์หาสารสำคัญหรือสารออกฤทธิ์ที่มี สรรพคุณทางเภสัชศาสตร์. คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยรังสิต.
- สิริพันธุ์ จุลกรังคะ/และคณะ (2545). โภชนาศาสตร์เบื้องต้น. พิมพ์ครั้งที่ 3.a สำนักพิมพ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพมหานคร. หน้า 290.
- สิริพรรณ ตั้งสิริกุลชัย และอัญชลี ทิพเสถียร. (2545). การศึกษาคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระใน ชาเขียวใบหม่อนพร้อมดื่ม. ภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตรคณะเทคโนโลยีการเกษตร : สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง. หน้า 40.
- สุพิศาลเดชะเปรมปรีชา.a(2550). นานาสาระงานเคมีทำเนียบธุรกิจและผลิตภัณฑ์เคมี. สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.a72-74.
- สนามชัย แพนดี, ไฟ祚ค ปัญจจะ และดรุณี/ศรีชนะ. (2555). การวิเคราะห์หาปริมาณสารอาหาร ในใบมะรุม. สถาบันวิชาเทคโนโลยีการเกษตร คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์.
- โสภา วัชระคุปต์, ปรีชา บุญจุ่ง, จันทนา บุณยะรัตน์ และมาลีรักษ์ อัตต์สินทอง. (2549). สารต้าน อนุมูลอิสระ. กรุงเทพมหานคร : พ.อ.ส.พรัตน์.
- โสภา วัชระคุปต์, ปรีชา บุญจุ่ง, จันทนา บุณยะรัตน์ และมาลีรักษ์/อัตต์สินทอง. (2550). สารต้านอนุมูล อิสระ. พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพมหานคร : นิวไทยมิตรการพิมพ์.
- Abd El-Moneim, M.R. AFIFY., Emad, A. SHALABY. and Hossam, S. EL-BELTAGI. (2011). Antioxidant Activity of Aqueous Extracts of Different Caffeine Products. *Journal of Medicinal Plants Research.* 5 (20) : 5071-5078.
- Ames, B.N., Shigenaga, M.K. and Hagen, T.M. (1993) "Oxidants, antioxidants and the degenerative disease of aging". *Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 90, 7915-7922.
- Anwar. F., Latif, S., Ashraf, M., Gilani, A.H., (2007), "Moringaoleifera : a food plant with multiple medicinal uses". *Phytother. Res.* 21, 17-25.
- Asano, N., Yamashita, T., Yasuda, K., Ikeda, K., Kizu, H., Kameda, Y., et al. (2001). "Polyhydroxylated alkaloids isolated from mulberry trees (*Morus alba L.*) and silkworm (*Bombyx mori L.*)". *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 49, 4208-4213.

- Aviram. M and Eias. K. (1993). "Dietary olive oil reduces low-density lipoprotein uptake by macrophage and decrease the susceptibility of the lipoprotein to undergo lipid peroxidation". *Annal of Nutrition and Metabolism.* 37, 75-84.
- Bua-in, S. and Paisooksantivatana Y. (2009). Essential Oil and Antioxidant Activity of Ginger (Zingiberaceae : Zingiber montanum) Collected from Various Parts of Thailand. *Kasetsart Journal (Natural Science).* 43 : 467-475.
- Chaitana, J., Niwatananun, W., Vejabhikul, S., Somna, S. and Chansakaow S. (2009). Volatile Constituents and Biological Activities of *Gardenia jasminoides*. *Journal of Health Research.* 23 (3) : 141-145.
- Chan, E.W.C., Lim, Y.Y., Wong, S.K., Lim, K.K., Tan, S.P., Lianto, F.S. and Yong, M.Y. (2009). Effects of Different Drying Methods on the Antioxidant Properties of Leaves and Tea of Ginger Species. *Journal of Food Chemistry.* 113 : 166-172.
- Chattopadhyay, K. and Chattopadhyay, B. D. (2008)."Effect of nicotine on lipid profile, peroxidation & antioxidant enzymes in female rats with restrictes dietary proein". *Journal of research and education in indian medicine.* 127, 571-576.
- Chen, C.C., Liu, L.K., J.D., Huang, H.P., Yang, M.Y. and Wang, H.J., (2005), "Mulberry extract inhibits the development of atherosclerosis in holesterol-fed rabbits". *Food Chem.* 91, 601-607.
- Chumark, P., Khunawat, P., Sanvarinda, Y. and Phornchirasilp, S., Morales, N.P., Phivthong-ngam, L., Ratanachamnong, P., Sriwat, S., Pongrapeeporn, K., (2008). "The *in vivo* and *ex vivo* antioxidant properties, hypolipidaemic and antiatherosclerotic activities of water extract of *Moringaoleifera Lam. Leaves*". *J. Ethnopharmacol.* 116, 439-446.
- Danijela, A. Kostić., Danica, S. Dimitrijević., Snežana, S. Mitić., Milan, N. Mitić., Gordana., Stojanović. and Ana, V. Živanović. (2013). Phenolic Content and Antioxidant Activities of Fruit Extracts of *Morus nigra* from Southeast Serbia. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research.* 12 (1) : 105-110.
- Dewick, P. M. (1998). Medicinal Natural Products Great Britain. John Wiley and sons.
- Doi, K., Kojima, Y. and Fujimoto. Y., (2000). "Mulberry leaf extract inhibits the oxidative modification of rabbit and human low density lipoprotein". *Journal of Biological and pharmaceutical Bulletin.* 23,(9..1066-1071.)

- Du, Q., Zheng, J. and Xu, Y., (2008) "Composition of anthocyanins in mulberry and their antioxidantactivity". *J. Food Compos. Anal.* 21, 390-395.
- Gasparotto, Jr., A., Gasparotto, F.M., Lourenco, E.L.B., Crestani, S., Stefanello, M.E.A., Salvador, M.J., da Silva-Santos, J.E., Marques, M.C.A., Kassuya, C.A.L. (2011). "Antihypertensive effects of isoquercitrin and extracts from *Tropaeolum majus* L.: evidence for the inhibition of angiotensin converting enzyme". *J. Ethnopharmacol.* 134, 363-372.
- Halliwell, B. (2009) "The wanderings of a free radical". *Free Radical Biology and Medicine*. 46, 531-542.
- Hidalgo, M., Sánchez-Moreno, C. and Pascual-Teresa, S. 2010. Flavonoid interaction and its effect on their antioxidant activity. *Food chemistry*. 121 : 691-696.
- Huang, X., Kakuda, Y. and Cui, W. (2001). Hydrocolloids in Emulsions: Particle Size Distribution and Interfacial Activity. *Food Hydrocolloids*. 15 : 533-542.
- Huda-Faujan, N., Noriham, A., Norrakiah, A.S. and Babji, A.S. (2009). Antioxidant Activity of Plants Methanolic Extracts Containing Phenolic Compounds. *Journal of Biotechnology*. 8 (3) : 484-489.
- Ibrahim, G., Saleh, ZA., and Naohito, A. (2013). Effect of Green Tea and Polyphenol son Mouse Liver. *Fitoterapia* 90 : 151-159.
- Jungmin, O., Heonjoo, J., Ah Reum, C. and Jaejoon, H. (2013). Antioxidant and Antimicrobial Ctivities of Various Leafy Herbal Teas. *Food Control*. 31 : 403-409.
- Katsume.T., Yamasaki, Y., Iwamoto, M. and Oka, S. (2003). "Hyaluronidase-inhibiting polysaccharide isolate and purified from hot water extract of sporophyll of *Undaria pinnatifida*". *Food Science and Technology Research*. 9, 25-29."
- Kim, J. W., Kim S. U., Lee. H. S., Kim, I., Ahn, M. Y., and Ryu, K.S. (2003). "Determination of 1- deoxynojirimycin in *Morus alba* L. leaves by derivatization with 9-fluorenylmethyl chloroformate followed by reversed-phase high-performance liquid chromatography". *Journal of Chromatography*. 1002, 93-99."
- Kim, S. Y., Gao, J.J., Lee, W.C., Ryu, K.S., Lee, K.R. and Kim, Y.C. (1999). Antioxidative Flavonoids from the leaves of *Morus alba*. *Archives of Pharmacal Research*. 22 : 81-85.
- Li. S.Z., (1982). "Compendium of Materiamedica". *People's Medical Press. Beijing*. pp. 2066-2067.

- Malaisree, M., Srisomang, R. and Boonphong, S. (2006). Chemical Constituents of *Lagerstroemia loudonii* Flower and Their Antioxidant Activities. *Naresuan University Science journal.* 2 (2) : 231–240.
- Moyo, B., Oyedemi, S., Masika, P.J. and Muchenje, V. (2012). Polyphenolic Content and Antioxidant Properties of *Moringa oleifera* Leaf Extract and Enzymatic Activity of Liver from Goats Supplemented with *Moringa oleifera* Leaves Sunflower Seed Cake. *Meat Science.* 91 : 441–447.
- Murakami, A., Kitazono, Y., Jiwajinda, S., Koshimizu, K., Ohigashi, H., (1998). “Niaziminin, a thiocarbamate from the leaves of *Moringa oleifera*, holds a strict structural requirement of tumor-promoter-induced Epstein-Barr virus activation”. *Planta Med.* 64 (4), 319-323.
- Rangkadilok, N., Sitthimonchai, S., Worasuttayangkurn, L., Mahidol, C., Ruchirawat M. and Satayavivad, J. (2007). Evaluation of Free Radical Scavenging and Antityrosinase Activities of Standardized Longan Fruit Extract. *Food chemistry Toxicol.* 45 : 328-336.
- Rice-Evans, C.A., Miller, N.J. and Paganga, G. (1996). Structure Antioxidant Activity Relationship of Flavonoid and Phenolic Acid. *Free Radical Biology and Medicine.* 20 : 953-956.
- Sahelian, R. (2011). Polyphenols Supplement Research Study, Health Benefit. <http://www.raysahelian.com>. 25 th March 2011.
- Scott, D.A. et al., (2005). “The influence of vitamin C on systemic makers of endothelial and inflammatory cell activation in smokers and non-smokers”. *Journal of Inflammation Research.* 54, 138-144.
- Serafini, M., Ghiselli, A., and Ferro-Luzzi, A. (1994). “Red wine, tea and antioxidants”. *Lancet.* 344, 626.
- Sies, H., Stahl, W., and Sundquist, A. (1992). “Antioxidant functions of vitamins, vitamin E and C, beta-carotene and other carotenoids”. *Annals of the New York Academy of sciences.* 368, 7-19
- Soromou.L.W., Chen, N., Jiang, L., Huo, M., Wei, M., Chu, X., Millimouno, F.M., Feng, H., Sidime, Y. and Deng, X. (2012). “Astragalin attenuates lipopolysaccharide induced inflammatory response by down-regulating NF-kB signaling pathway” *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 419, 256-261.

- Verma, A.R., Vijayakumar, M., Mathela, C.S. and Rao, C.V. (2009). "In vitro and In vivo antioxidant properties of different fractions of *Moringa oleifera* leaves". *Food Chem. Toxicol.* 47, 2196-2201.
- Velioglu, Y.S., Mazza, G., Gao, L. and Oomah, B.D. (1998). "Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables and grain products". *Journal of Agriculture and Food Chemistry.* 46, 4113-4117.
- Vinson, J. A., Dabbagh, Y.A., and Jang, J. (1995). Plant Flavonoids, Especially Tea Flavonols, are Powerful Antioxidants Using an in vitro Oxidation Model for Heart disease. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 43 : 2800-2802.

- Vongsak, B., Sithisarn, P. and Gritsanapan, W. (2013). "Bioactive contents and free radical scavenging activity of *Moringa oleifera* leaf extract under different storage conditions". *Journal of Industrial Crops and Products.* 49, 419-421.
- Zhishen, J., Mengcheng, T., and Jianming, W. (1999). "The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals". *Food Chemistry.* 64, 555-559

