



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ: สารประกอบฟีนอลิกและฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดจากส่วนต่าง ๆ ของเร่ว
และการพัฒนาผลิตภัณฑ์ชาใบเร่ว

Phenolic compounds and antioxidant activity of extracts from various fractions of Reaw
(*Amomum Chinense* C.) and product development of *Amomum Chinense* C. leaf Tea

โดย

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุนันท์ บุตรศาสตร์
มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม

สนับสนุนโดยสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย และ
มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม

กุมภาพันธ์ พ.ศ. 2561

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ : MRG 5480177

ชื่อโครงการ : สารประกอบฟีนอลิกและฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดจากส่วนต่าง ๆ ของเร่ว และการพัฒนาผลิตภัณฑ์ชาใบเร่ว

ชื่อนักวิจัย : สุนันท์ บุตรศาสตร์

สาขาเทคโนโลยีการอาหาร คณะเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม

E-mail Address: sbutsat@hotmail.com

ระยะเวลาโครงการ : 15 มิถุนายน 2554 ถึง 14 มิถุนายน 2556

บทคัดย่อ

ในการวิจัยนี้วิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกและฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดจากลำต้นใต้ดินและใบเร่ว สายพันธุ์ *Amomum Chinense* C. และวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกในระหว่างกระบวนการผลิตชาใบเร่ว โดยแบ่งการวิจัยออกเป็น 3 ขั้นตอน ขั้นตอนที่ 1 ศึกษาผลของตัวทำละลาย 4 ชนิด ได้แก่ น้ำกลั่น 80% เมทานอล 80% เอทานอล และ 80% อะซิโตน และระยะเวลาในการสกัด 3 ช่วง ได้แก่ 6 ชั่วโมง 12 ชั่วโมง และ 24 ชั่วโมง ในการสกัดส่วนของลำต้นใต้ดินและใบเร่ว พบว่า สภาวะที่เหมาะสมในการสกัดใบเร่วที่ดีที่สุด คือ 80% เมทานอล สกัดนาน 12 ชั่วโมง ส่วนการสกัดลำต้นใต้ดินสามารถใช้ 80% เอทานอล หรือ 80% เมทานอล สกัดนาน 6 ชั่วโมง เป็นสภาวะที่เหมาะสมที่สุด สารสกัดใบเร่วมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์โดยรวมสูงกว่าลำต้นใต้ดิน รวมทั้งมีประสิทธิภาพด้านการเกิดออกซิเดชันของสารสกัดใบเร่วสูงกว่าสารสกัดลำต้นใต้ดินในทุกส่วนสกัด นอกจากนี้องค์ประกอบของกรดฟีนอลิกที่ตรวจพบโดยเทคนิค HPLC ในสารสกัดจากใบเร่วซึ่งพบมากที่สุด คือ กรดคลอโรจีนิก ส่วนสารสกัดจากลำต้นใต้ดินเร่ว พบว่ามีกรดแกลลิกมากที่สุด องค์ประกอบของฟลาโวนอยด์ที่พบมากในสารสกัดของใบเร่ว คือ คาเทชิน และรูทีน ในขณะที่สารสกัดของลำต้นใต้ดินเร่ว ที่พบมากที่สุด คือ เคอร์เซติน

ขั้นตอนที่ 2 เป็นการศึกษาผลของการเตรียมใบเร่วขั้นต้นที่ผ่านการลวกในน้ำเดือดนาน 30 วินาที และ 60 วินาที เทียบกับใบเร่วสด ที่มีต่อปริมาณสารประกอบฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์โดยรวม และฤทธิ์ด้านการเกิดออกซิเดชันในใบเร่วระหว่างกระบวนการผลิตเป็นชาใบเร่ว พบว่าใบเร่วที่ผ่านการลวกในน้ำเดือดมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์โดยรวม รวมทั้งความสามารถในการต้านการเกิดออกซิเดชันสูงกว่าใบเร่วสด และเมื่อนำมาผ่านขั้นตอนการคั่วและอบแห้ง พบว่า ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกในใบเร่วสดและใบเร่วที่ลวกในน้ำเดือดมาก่อน ปริมาณสารฟีนอลิกโดยรวมมีแนวโน้มลดลงเมื่อผ่านการคั่ว และกลับเพิ่มขึ้นเมื่อผ่านการอบแห้ง ในขณะที่ปริมาณฟลาโวนอยด์โดยรวมเมื่อนำมาคั่วและอบแห้งมีปริมาณเพิ่มขึ้น และผลการวิเคราะห์ฤทธิ์ด้านการ

เกิดออกซิเดชันของสารสกัดจากใบเร่วในระหว่างกระบวนการผลิตชาใบเร่วทั้ง 3 วิธี พบว่า ปริมาณสารฟีนอลิกโดยรวมมีความสัมพันธ์เชิงบวกสูงมากกับความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH ($R^2 = 0.607$) และ ABTS ($R^2 = 0.627$) รวมทั้งความสามารถในการรีดิวซ์เฟอริกไอออน ($R^2 = 0.721$) ที่ระดับนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.01$) นอกจากนี้ผลการตรวจวิเคราะห์ชนิดและปริมาณของกรดฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์โดยเทคนิค HPLC พบว่า องค์ประกอบของกรดฟีนอลิกที่พบมากที่สุดในใบเร่ว คือ กรดคลอโรจีนิก ส่วนฟลาโวนอยด์ที่พบมากที่สุด คือ รุทีน รองลงมา คือ คาเทชิน ตามลำดับ ใบเร่วที่ผ่านการลวกในน้ำเดือดนาน 30 วินาที และ 60 วินาที มีปริมาณกรดคลอโรจีนิกและรุทีนสูงกว่าใบเร่วสด และพบว่าการให้ความร้อนในระหว่างการคั่วและอบแห้งเพื่อระเหยนํ้าออกไป ส่งผลทำให้ปริมาณกรดคลอโรจีนิกและรุทีนในใบเร่วมีความแตกต่างกัน ($p < 0.05$) โดยที่กรดคลอโรจีนิกในใบเร่วที่ผ่านการลวกในน้ำเดือด 30 วินาที มีปริมาณสูงกว่าใบเร่วที่ลวกน้ำเดือดนาน 60 วินาที แต่ปริมาณรุทีนไม่แตกต่างกัน จากผลการวิจัยนี้พบว่าปริมาณกรดคลอโรจีนิกและรุทีนในใบเร่วที่ผ่านการลวกในน้ำเดือดมาก่อนเมื่อนำมาคั่วและอบแห้งแนวโน้มนำปริมาณกรดคลอโรจีนิกและรุทีนจะมีความคงตัวสูงกว่าใบเร่วสด

สำหรับการวิจัยตอนสุดท้ายเป็นการเปรียบเทียบวิธีการสกัดชาใบเร่วโดยใช้การแช่ด้วยนํ้าอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 6 ชั่วโมง กับการชงด้วยนํ้าร้อนอุณหภูมิ 95 ± 2 องศาเซลเซียส ร่วมกับการคั่นนาน 5 นาที วิเคราะห์ปริมาณสารฟีนอลิกและฤทธิ์ต้านการเกิดออกซิเดชันของผลิตภัณฑ์ชาใบเร่ว พบว่า ชาใบเร่วที่ผ่านการลวกใบเร่วมาก่อนเมื่อนำมาสกัดโดยการแช่ด้วยนํ้าอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 6 ชั่วโมง และการชงในนํ้าร้อนอุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส มีปริมาณกรดฟีนอลิกไม่แตกต่างกัน ในขณะที่ปริมาณฟลาโวนอยด์ในชาใบเร่วที่สกัดด้วยนํ้าอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 6 ชั่วโมง มีปริมาณสูงกว่าการชงในนํ้าร้อนอุณหภูมิ 95 ± 2 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที สำหรับองค์ประกอบของกรดฟีนอลิกที่ตรวจพบในชาใบเร่วที่สกัดด้วยนํ้า คือ กรดคลอโรจีนิก รองลงมา คือ กรดคาเฟอิก และกรดไซรินจิก ตามลำดับ ส่วนองค์ประกอบฟลาโวนอยด์ที่พบในชาใบเร่วที่สกัดด้วยนํ้า คือ รุทีน คาเทชิน อีพิกัลโลคาเทชินแกลเลต และเคเวเชอทิน ผลจากการวิจัยนี้รายงานองค์ประกอบและปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สำคัญในส่วนต่าง ๆ ของเร่ว ตลอดจนผลของตัวทำละลายและสภาวะการสกัดชาใบเร่วที่เหมาะสม ดังนั้นจึงสามารถนำองค์ความรู้ที่เกิดขึ้นไปใช้ในการเพิ่มศักยภาพการใช้ประโยชน์จากใบเร่ว เช่น นำไปผลิตเป็นชาสมุนไพรเพื่อสุขภาพ เป็นต้น

คำสำคัญ : กรดฟีนอลิก กรดคลอโรจีนิก ฟลาโวนอยด์ รุทีน สารต้านออกซิเดชัน ใบเร่ว

Abstract

Project Code : MRG 5480177

Project Title : Phenolic compounds and biological activity of extracts of various fractions of Reaw (*Amomun Chinense* C.) and product development of *Amomun Chinense* C. leaf tea

Investigator : Sunan Butsat

Division of Food Technology, Faculty of Agricultural Technology,
Rajabhat Mahasarakham University

E-mail Address: sbutsat@hotmail.com

Project Period : 15 June 2011 ถึง 14 June 2013

Abstract

The objectives of this research were to determine phenolic compounds and biological activities of extracts obtained from rhizome and leaf of Reaw (*Amomum Chinense* C.) and examine phenolic compounds produced during processing of tea from *A. chinense* leaf. This research was divided into three experiments. Firstly, study on the effect of solvent types and extraction times on the contents of phenolic and flavonoid and antioxidant activities in rhizome and leaf extracts of *A. chinense*. Four solvents were used as extracting solvents including distilled water, 80% methanol, 80% ethanol and 80% acetone and three times as 6, 12 and 24 hours. The results found that the optimal extracting conditions of *A. chinense* leaf were 80% methanol for 12 h. Whereas the optimal conditions used for extracting the phenolic compounds from *A. chinense* rhizome were 80% methanol as well as 80% ethanol for 6 h. Leaf extracts exhibited higher the total phenolic and flavonoid contents, associated with higher antioxidant capacities compared to rhizome extracts. In addition, the principal phenolic acid components in leaf extract identified by HPLC was chlorogenic acid. Whereas gallic acid was found as the main component in rhizome extract. Flavonoid components detected were catechin and rutin. While the major flavonoid found in rhizome extract was quercetin.

The second experiment was to study on the effect of pretreatment *A. chinense* leaf using blanching with boiled water for 30 second and 60 second compared to control (fresh leaf) and examined changing on stability of phenolic compounds during *A. chinense* leaf tea processing. The results indicated that the *A. chinense* leaf blanched with boiled water had higher phenolic and flavonoid contents associated with antioxidant capacities than those of fresh leaf. The phenolic contents in both of fresh and blanched leaves were decreased by roasting step and increased again after drying process. However, the flavonoid content was increased in during roasting and drying. The antioxidant activities in *A. chinense* leaf extracts based on three methods found that the highest correlation among the total phenolic content and antioxidant assays was found between the DPPH ($R^2 = 0.607$) and ABTS ($R^2 = 0.627$), associated with FRAP assay ($R^2 = 0.721$) at significant level ($p < 0.01$). In addition, HPLC analysis identified phenolic acids and flavonoids in *A. chinense*

leaf extracts. The result showed that the most quantity of chlorogenic acid found in leaf extracts. While the major flavonoids presented in extracts were rutin and catechin, respectively. The *A. chinense* leaves blanching in boiled water for 30s and 60s showed the higher amount of chlorogenic acid and rutin compared with fresh leaf. Moreover during roasting and drying processes the water evaporated resulting in the content of chlorogenic acid and rutin had different significance ($p < 0.05$). The blanched leaf for 30s had the amount of chlorogenic acid higher than that of blanched leaf for 60s but the rutin content had no difference. This result indicated that the pretreatment of *A. chinense* leaf with blanching with boiled water before roasting and drying processes further resulting for retaining stability of phenolic acid and flavonoid contents compared with fresh leaf.

The final study was to compare extracting method of *A. chinense* leaf tea pretreated with initial differently process. Two methods were used for extracting including shaking with water at 37°C for 6 h in an incubator shaker and immersion with boiled water at $95 \pm 2^{\circ}\text{C}$ for 5 minutes. The results found that the quantity of the phenolic acid contents and antioxidant activity of tea of *A. chinense* leaf treated with boiled water blanching in both extracts were not significant. Whereas the flavonoid content in water extract shaking at 37°C for 6 h showed higher than immersion in boiled water at $95 \pm 2^{\circ}\text{C}$ for 5 minutes. Furthermore, the chlorogenic acid was the most detected in *A. chinense* leaf tea water extract followed by caffeic acid and syringic acid respectively. For the flavonoids found in *A. chinense* leaf tea water extract were rutin, catechin epigallocatechin gallate and quercetin. This study has provided basic knowledge of bioactive composition and content in leaf and rhizome of *A. chinense* as well as the effect of extracting solvent and processing on those compounds. Therefore these findings lead to increase potential application of *A. chinense* leaf as herbal tea contributed for human health.

Keywords : phenolic acid, chlorogenic acid, flavonoids, rutin, antioxidants, *A. chinense* leaf

บทสรุปผู้บริหาร

ปัจจุบันมีการนำพืชสมุนไพรชนิดต่าง ๆ มาใช้เป็นอาหารในลักษณะการชงเป็นเครื่องดื่มกันอย่างแพร่หลาย โดยการนำส่วนต่าง ๆ ของพืช ได้แก่ ใบ ดอก ผล มาผ่านกระบวนการทำให้แห้งแล้วลดขนาดให้เล็กลงโดยการตัด สับ หรือบด แล้วนำไปบรรจุลงในซองสำหรับการแช่เพื่อชงดื่ม หรือการต้ม ซึ่งเครื่องดื่มสมุนไพรที่นิยมกันมากในปัจจุบันมีหลากหลาย และอาจได้มาจากพืชสมุนไพรชนิดเดียวหรือผสมกับพืชสมุนไพรชนิดอื่น ได้แก่ ชาเขียว ชาใบหม่อน ชาใบเตย ชาตะไคร้ เป็นต้น

เร่วเป็นพืชในวงศ์ขิง (Zingiberaceae) มีเหง้าหรือลำต้นอยู่ใต้ดิน ลำต้นเหนือดินเป็นกาบของใบที่เรียงหุ้มซ้อนกัน ลักษณะใบเดี่ยว รูปใบหอกหรือรูปขอบขนาน เรียงสลับระนาบเดียว ออกดอกเป็นช่อที่เหง้า แทงขึ้นมาเหนือผิวดิน ส่วนของช่อดอกจะมีสีชมพูที่โคนกลีบดอกและมีขีดสีเป็นริ้วแดงสองข้างของกลีบดอก ส่วนของผลเร่วออกเป็นกระจุกทรงกลม ผลอ่อนจะมีสีเขียว และจะเปลี่ยนเป็นสีแดงเมื่อผลแก่ มีลักษณะคล้ายผลเงาะขนาดเล็ก ผิวเป็นขนเหมือนหนามสีแดง เมล็ดสีน้ำตาลมีเยื่อบาง ๆ หุ้มอยู่ ขอบขึ้นในที่ร่ม ดินร่วนซุย ความชื้นสูง เร่วมีชื่อเรียกต่าง ๆ กัน ได้แก่ เร่วใหญ่ เร่วน้อย เร่วแดง เร่วดง เร่วหอม เป็นต้น สำหรับเร่วใหญ่ มีลักษณะเป็นผลทรงกลมจนถึงทรงรีคล้ายรูปไข่ ผลถูกแบ่งออกเป็น 3 พู ด้วยเยื่อชั้นบาง ๆ เมล็ดเป็นแบบกลุ่ม สีน้ำตาลอ่อนจนถึงน้ำตาลเข้ม แต่ละเมล็ดมีร่องรอยแตก ขณะที่เร่วน้อยมีลักษณะเป็นผลทรงกลมจนถึงทรงรี ผลถูกแบ่งเป็น 3 พู เมล็ดเป็นแบบกลุ่มและสีน้ำตาลเช่นเดียวกับเร่วใหญ่ แต่แตกต่างกันที่เร่วน้อยมักมีขนาดผลที่เล็กกว่าและเมล็ดไม่มีร่องรอยแตก เร่วที่มีอยู่ในประเทศไทยมีหลากหลายสายพันธุ์ ซึ่งมีสารประกอบหลากหลายชนิด สำหรับงานวิจัยครั้งนี้แบ่งออกเป็น 3 ขั้นตอน ขั้นตอนที่ 1 สกัดส่วนของลำต้นใต้ดินและใบเร่ว สายพันธุ์ *Amomum Chinense* C. โดยใช้ตัวทำละลาย 4 ชนิด ได้แก่ น้ำ 80% เมทานอล 80% เอทานอล และ 80% แอซีโตน และระยะเวลาในการสกัด 3 ช่วง ได้แก่ 6 12 และ 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นวิเคราะห์ปริมาณสารฟีนอลิก และฟลาโวนอยด์โดยรวมและหาประสิทธิภาพด้านการเกิดออกซิเดชันของสารสกัดจากส่วนของลำต้นใต้ดินและใบเร่ว พบว่า สารสกัดที่ได้จากใบเร่วในตัวทำละลายแต่ละชนิด มีปริมาณฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์โดยรวมสูงกว่าสารสกัดจากลำต้นใต้ดินเร่ว และสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดใบเร่ว คือ 80% เมทานอล นาน 12 ชั่วโมง ส่วนสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดลำต้นใต้ดินเร่ว คือ 80% เอทานอล หรือ 80% เมทานอล ในระยะเวลา 6 ชั่วโมง และประสิทธิภาพการด้านการเกิดออกซิเดชันของสารสกัดจากใบเร่วมีฤทธิ์ในการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH และ ABTS^{•+} รวมทั้งความสามารถในการรีดิวซ์เพอริกไดออกไซด์สูงกว่าสารสกัดจากลำต้นใต้ดิน ปริมาณกรดฟีนอลิกที่ตรวจพบโดยเทคนิค HPLC ในส่วนสกัดของใบเร่ว ประกอบด้วย กรดคลอโรจีนิก กรดซินนามิก กรดเฟอร์ริก กรดคาเฟอิก กรดแอลลาจิก และกรดซินแนปิก และองค์ประกอบฟลาโวนอยด์ที่ตรวจพบ ได้แก่ คาเทชิน รูทีน อีพิกัลโลคาเทชิน แกลเลต และเคเวซิทิน สำหรับส่วนสกัดของลำต้นใต้ดิน ตรวจพบกรดแกลลิก กรดโพรโทคาเทอซิก กรดวานิลิก ซึ่งมีปริมาณไม่มาก สำหรับองค์ประกอบฟลาโวนอยด์ในส่วนสกัดของลำต้นใต้ดินที่ตรวจพบ ได้แก่ เคเวซิทิน ร่องลงมา คือ คาเทชิน อีพิกัลโลคาเทชิน แกลเลต และรูทีน ตามลำดับ

ขั้นตอนที่ 2 ศึกษาผลของการลวกใบเร่วในน้ำเดือดนาน 30 และ 60 วินาที เทียบกับใบเร่วสด ต่อการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบของกรดฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ในสารสกัดใบเร่วระหว่างกระบวนการแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์ชาใบเร่ว พบว่า ปริมาณความชื้นในใบเร่วจะลดลงเมื่อนำไปผ่านการคั่วและอบแห้ง และใบเร่วที่ผ่านการลวกในน้ำเดือดมีปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมดในใบเร่วมีแนวโน้มลดลงเมื่อผ่านขั้นตอนการคั่ว และกลับเพิ่มขึ้นเมื่อผ่านการอบแห้ง ในขณะที่ปริมาณฟลาโวนอยด์โดยรวมเมื่อนำมาคั่วและอบแห้งมีปริมาณเพิ่มขึ้น พบความสัมพันธ์เชิงบวกระหว่างปริมาณสารฟีนอลิกโดยรวมกับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH และ ABTS^{•+} รวมทั้งความสามารถในการรีดิวซ์เพอริกไดออกไซด์ ผลการตรวจวิเคราะห์ชนิดและปริมาณของกรดฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์โดยเทคนิค HPLC พบว่า องค์ประกอบของกรดฟีนอลิกที่พบมากที่สุดในใบเร่ว คือ กรดคลอโรจีนิก ส่วนฟลาโวนอยด์ที่พบมากที่สุด คือ รูทีน ร่องลงมา คือ คาเทชิน ตามลำดับ ใบเร่วที่ผ่านการลวกในน้ำเดือดนาน 30 วินาที และ 60 วินาที มีปริมาณกรดคลอโรจีนิกและรูทีนสูงกว่าใบเร่วสด และพบว่าการให้ความร้อนในระหว่างการคั่วและอบแห้งเพื่อระเหยน้ำออกไปส่งผลทำให้ปริมาณกรดคลอโรจีนิกและรูทีนในใบเร่วมีความแตกต่างกัน ($p < 0.05$) โดยที่ใบเร่วที่ผ่านการลวกในน้ำเดือด 30 วินาที มีปริมาณกรดคลอโรจีนิกสูงกว่าใบเร่วที่ลวกน้ำเดือดนาน 60 วินาที แต่ปริมาณรูทีนไม่แตกต่างกัน ผลการวิจัยนี้พบว่าใบเร่วที่ผ่านการลวกในน้ำเดือดมาก่อน เมื่อนำมาคั่วและอบแห้งแล้วมีปริมาณกรดคลอโรจีนิกและรูทีนจะมีความคงตัวสูงกว่าใบเร่วสด และผลการวิจัยตอนสุดท้ายเปรียบเทียบวิธีการสกัดชาใบเร่วที่มาจากใบเร่วที่มีการเตรียมขั้นตอนต่างกัมาสกัดด้วยน้ำอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 6 ชั่วโมง เทียบกับการชงด้วยน้ำร้อนอุณหภูมิ 95 ± 2 องศาเซลเซียส ร่วมกับการค่นนาน 5 นาที พบว่า ชาใบเร่วที่ผ่านการลวกใบเร่วมาก่อนเมื่อนำมาสกัดโดยการเขย่าด้วยน้ำอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 6 ชั่วโมง มีปริมาณกรดฟีนอลิกไม่แตกต่างกันกับการชงในน้ำร้อนอุณหภูมิ 95 ± 2 องศาเซลเซียส

ในขณะที่ปริมาณสารฟลาโวนอยด์ในชาใบเร่วที่สกัดด้วยน้ำอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 6 ชั่วโมง มีปริมาณสูงกว่าการชงในน้ำร้อนอุณหภูมิ 95 ± 2 องศาเซลเซียส คนนาน 5 นาที สำหรับองค์ประกอบของกรดฟีนอลิกที่ตรวจพบในชาใบเร่วที่สกัดด้วยน้ำ คือ กรดคลอโรจีนิก ร่องลงมา คือ กรดคาเฟอิก และกรดไซรินจิก ตามลำดับ ส่วนองค์ประกอบฟลาโวนอยด์ที่พบในชาใบเร่วที่สกัดด้วยน้ำ คือ รูทีน คาเทชิน อีพิกัลโลคาเทชินแกลเลต และเคอเซอทิน

ผลจากการวิจัยครั้งนี้ รายงานองค์ประกอบและปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สำคัญในส่วนต่าง ๆ ของเร่ว ตลอดจนผลของตัวทำละลายและสภาวะการสกัดชาใบเร่วที่เหมาะสม ดังนั้นจึงสามารถนำองค์ความรู้ที่เกิดขึ้นไปใช้ในการเพิ่มศักยภาพการใช้ประโยชน์จากใบเร่ว เช่น นำไปผลิตเป็นชาสมุนไพรเพื่อสุขภาพ เป็นต้น

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา (สกอ.) และมหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม เป็นอย่างสูงที่เป็นผู้สนับสนุนให้ทุนอุดหนุนในการทำวิจัยครั้งนี้ และขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.ศิริธร ศิริอมรพรรณ ผู้ทรงคุณวุฒิที่เป็นผู้ให้คำปรึกษา และข้อเสนอแนะต่าง ๆ ทำให้งานวิจัยครั้งนี้สำเร็จตามวัตถุประสงค์ ขอขอบคุณ ดร.ปราโมทย์ ไตรบุญ กลุ่มวิจัยพฤกษศาสตร์และพืชไร่ กองคุ้มครองพันธุ์พืช พืชไร่พันธุ์พืช สรีนธร กรมวิชาการเกษตร ที่อนุเคราะห์ในการบ่งชี้สายพันธุ์ตัวอย่างพืชที่ใช้ในงานวิจัยครั้งนี้ และขอบคุณนักวิทยาศาสตร์ และนักศึกษาสาขาวิชาเทคโนโลยีการอาหาร คณะเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม ที่ช่วยจัดเตรียมวัสดุ อุปกรณ์ และสารละลายเคมี ที่ใช้สำหรับการวิจัย รวมทั้งอำนวยความสะดวกทำให้งานวิจัยสำเร็จลุล่วงด้วยดี

ผศ.ดร.สุนันท์ บุตรศาสตร์

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ	(1)
Abstract	(3)
บทสรุปผู้บริหาร	(5)
กิตติกรรมประกาศ	(7)
สารบัญ	(8)
สารบัญภาพ	(9)
สารบัญตาราง	(10)
บทที่ 1 บทนำ	1
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	4
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย	23
บทที่ 4 ผลการวิจัยและอภิปรายผล	29
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ	51
บรรณานุกรม	53
ภาคผนวก	58
ประวัติผู้วิจัย	74
บทความวิจัยที่เผยแพร่	76

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
2.1	ส่วนประกอบต่าง ๆ ของเร่ว <i>Amomum chinense</i> Chun ex T.L. Wu	5
2.2	ส่วนประกอบต่าง ๆ ของเร่วตัวอย่างที่ใช้ในการวิจัย	5
2.3	โครงสร้างพื้นฐานของฟลาโวนอยด์ชนิดต่าง ๆ	8
2.4	โครงสร้างแทนนิน	9
2.5	โครงสร้างกรดฟีนอลิกบางชนิด	9
2.6	ปฏิกิริยาของสารต้านอนุมูลอิสระกับอนุมูล DPPH	17
2.7	โครงสร้างทางเคมีของ ABTS	18
3.1	ขั้นตอนการผลิตชาใบเร่ว	28
จ-1	โครมาโทแกรมของสารฟีนอลิกมาตรฐาน (A) สารสกัดของใบเร่วในตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ	64
ฉ-1	โครมาโทแกรมของสารมาตรฐานของกรดฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ (MixPF) และสารสกัดจากใบเร่วในระหว่างขั้นตอนการเตรียมขั้นต้น	66
ฉ-2	โครมาโทแกรมของสารสกัดจากใบเร่วในระหว่างขั้นตอนการคั่ว	67
ฉ-3	โครมาโทแกรมของสารสกัดจากใบเร่วในระหว่างขั้นตอนการอบแห้ง	68
ช-1	โครมาโทแกรมของสารมาตรฐานของกรดฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ (MixPF) และสารสกัดของชาใบเร่วที่สกัดด้วยน้ำอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 6 ชั่วโมง	70
ช-2	โครมาโทแกรมของสารมาตรฐานของกรดฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ (MixPF) และสารสกัดของชาใบเร่วที่ผ่านการเตรียมขั้นต้นจากใบเร่วสด	71
ช-3	โครมาโทแกรมของสารมาตรฐานของกรดฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ (MixPF) และสารสกัดของชาใบเร่วที่ผ่านการเตรียมขั้นต้นจากใบเร่วลวกในน้ำเดือดนาน 30 วินาที	72
ช-4	โครมาโทแกรมของสารมาตรฐานของกรดฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ (MixPF) และสารสกัดของชาใบเร่วที่ผ่านการเตรียมขั้นต้นจากใบเร่วลวกในน้ำเดือดนาน 60 วินาที	73

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
2.1 จำนวนคาร์บอน โครงสร้างหลัก กลุ่ม และชนิดสารประกอบฟีนอลิก	8
2.2 สารต้านออกซิเดชันในพืชบางชนิด	14
4.1 ปริมาณสารสกัดที่ได้ สารประกอบฟีนอลิกโดยรวม และฟลาโวนอยด์โดยรวมในใบเร่ว และลำต้นใต้ดินเร่ว ที่สกัดด้วยตัวทำละลายและระยะเวลาต่างกัน	29
4.2ฤทธิ์ต้านออกซิเดชันในใบเร่วและลำต้นใต้ดินเร่วที่สกัดด้วยตัวทำละลายและระยะเวลาต่างกัน	31
4.3 สัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ระหว่างสารประกอบฟีนอลิกโดยรวม ฟลาโวนอยด์โดยรวม และกิจกรรมการยับยั้ง การเกิดออกซิเดชันของสารสกัดจากใบเร่ว และลำต้นใต้ดินเร่วที่สกัดด้วยตัวทำละลายและระยะเวลาใน การสกัดต่างกัน	32
4.4 องค์ประกอบของกรดฟีนอลิกในสารสกัดใบเร่วในตัวทำละลายและระยะเวลาในการสกัดต่างกัน	33
4.5 องค์ประกอบของฟลาโวนอยด์ในสารสกัดใบเร่วในตัวทำละลายและระยะเวลาในการสกัดต่างกัน	34
4.6 องค์ประกอบของกรดฟีนอลิกในสารสกัดลำต้นใต้ดินเร่วที่สกัดด้วยตัวทำละลายและระยะเวลาในการสกัด ต่างกัน	36
4.7 องค์ประกอบของฟลาโวนอยด์ในสารสกัดลำต้นใต้ดินเร่วที่สกัดด้วยตัวทำละลายและระยะเวลาในการสกัด ต่างกัน	37
4.8 ปริมาณความชื้นของตัวอย่างใบเร่วในแต่ละขั้นตอนระหว่างการแปรรูปเป็นชาใบเร่ว	38
4.9 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกโดยรวมในใบเร่วระหว่างขั้นตอนแปรรูปเป็นชาใบเร่วที่สกัดด้วย ตัวทำละลายต่างกัน	39
4.10 ปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์โดยรวมในใบเร่วระหว่างขั้นตอนแปรรูปเป็นชาใบเร่วที่สกัดด้วย ตัวทำละลายต่างกัน	40
4.11 ความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH ในใบเร่วระหว่างขั้นตอนแปรรูปเป็นชาใบเร่วที่สกัดด้วย ตัวทำละลายต่างกัน	41
4.12 ความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระ ABTS ^{•+} ในใบเร่วระหว่างขั้นตอนแปรรูปเป็นชาใบเร่วที่สกัดด้วย ตัวทำละลายต่างกัน	42
4.13 ความสามารถในการรีดิวซ์เฟอริกไอออนในใบเร่วระหว่างขั้นตอนแปรรูปเป็นชาใบเร่วที่สกัดด้วย ตัวทำละลายต่างกัน	43
4.14 สัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ระหว่างสารประกอบฟีนอลิกโดยรวม และการยับยั้งการเกิดออกซิเดชันของสาร สกัดจากใบเร่วที่สกัดด้วยตัวทำละลายต่างกัน	44
4.15 สัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ระหว่างสารฟลาโวนอยด์โดยรวม และการยับยั้งการเกิดออกซิเดชันของสารสกัด จากใบเร่วที่สกัดด้วยตัวทำละลายต่างกัน	44
4.16 ปริมาณองค์ประกอบของกรดฟีนอลิกในใบเร่วระหว่างขั้นตอนการแปรรูปเป็นชาใบเร่วที่สกัดด้วย 80% เมทานอล	46
4.17 ปริมาณองค์ประกอบของฟลาโวนอยด์ในใบเร่วระหว่างขั้นตอนการแปรรูปเป็นชาใบเร่วที่สกัดด้วย 80% เมทานอล	47
4.18 ปริมาณสารฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์โดยรวมและฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของชาใบเร่วที่ชงด้วยวิธีต่างกัน	48
4.19 สัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ระหว่างสารฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์โดยรวม และฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของ สารสกัดชาใบเร่ว	48
4.20 ชนิดและปริมาณกรดฟีนอลิกในชาใบเร่วที่ผ่านการเตรียมขั้นต้นและวิธีการชงต่างกัน	49
4.21 ชนิดและปริมาณฟลาโวนอยด์ในชาใบเร่วที่ผ่านการเตรียมขั้นต้นและวิธีการชงต่างกัน	50

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญ

ปัจจุบันกระแสนิยมสมุนไพรกำลังมีความนิยมและมีความสำคัญเพิ่มขึ้นเป็นอย่างมากทั้งด้านอุตสาหกรรมอาหาร ยา และเครื่องสำอาง สารสกัดจากพืชสมุนไพรเป็นสารธรรมชาติที่มีคุณสมบัติและประโยชน์อย่างมากมาย เช่น สามารถต้านการเกิดมะเร็ง บรรเทาอาการอักเสบและยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ เครื่องเทศและสมุนไพรได้ถูกนำมาใช้กันอย่างแพร่หลายมาเป็นเวลานาน งานวิจัยทางระบาดวิทยาแนะนำว่าพืชสมุนไพรเป็นแหล่งสารต้านการเกิดออกซิเดชันซึ่งช่วยป้องกันสุขภาพและต่อต้านเชื้อโรค (Miller, 1999) และการบริโภคสารต้านออกซิเดชัน ช่วยลดความเสี่ยงของการเกิดโรคมะเร็ง โรคหัวใจ ความดัน (Marco และคณะ, 1997; Vision และคณะ, 2001) ผู้บริโภคจำนวนมากให้ความสำคัญต่อสุขภาพของตนเอง จึงหันมาใส่ใจกับการบริโภคอาหารที่มีประโยชน์และปลอดภัยกันมากขึ้นโดยมีการนำสมุนไพรมาบริโภคในรูปของอาหาร ยารักษาโรคและผลิตภัณฑ์อาหารเสริม สารพฤกษเคมีในพืชที่มีความสามารถต้านการเกิดออกซิเดชัน คือ สารฟีนอลิก ได้แก่ ฟลาโวนอยด์ กรดฟีนอลิก แอนโทไซยานินส์ และแทนนิน (Djeridane และคณะ, 2006; Wong และคณะ, 2006) ซึ่งมีรายงานว่าสามารถต้านการเกิดออกซิเดชัน ต้านการเกิดมะเร็ง เป็นสารที่ช่วยชะลอและยับยั้งการเกิดออกซิเดชันของลิพิด และเมื่อเติมลงในอาหารช่วยลดความเหม็นหืน ช่วยเพิ่มคุณค่าทางโภชนาการยืดอายุอาหาร (Fukumoto และ Mazza, 2000) ในปัจจุบันมีการใช้สมุนไพรในผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ มากขึ้นโดยเฉพาะพืชวงศ์ขิง (Zingiberaceae) ได้แก่ ขิง ข่า ขมิ้น และไพล ถูกนำมาวิจัยเพื่อใช้ประโยชน์ในด้านที่เป็นยารักษาโรค เครื่องสำอาง และอุตสาหกรรมอาหาร เนื่องจากสารพฤกษเคมีของพืชวงศ์นี้มีฤทธิ์ต้านการเกิดออกซิเดชัน ช่วยลดการอักเสบ ลดความดันโลหิต และช่วยแก้ปวด เป็นต้น

เร่ว เป็นพืชสมุนไพรตระกูลเดียวกับขิง และข่า จัดอยู่ในวงศ์ Zingiberaceae พบได้ในป่าดิบในภาคตะวันออกเฉียงใต้ รวมทั้งแถบจังหวัดระยอง จันทบุรี ตราด ลำต้นใต้ดินหรือเหง้าของเร่ว สามารถใช้เป็นเครื่องเทศที่นำมาปรุงเป็นอาหารได้หลายชนิด ช่วยทำให้อาหารมีกลิ่นหอมน่ารับประทานและยังสามารถดับกลิ่นคาวในอาหารประเภทเนื้อสัตว์ได้ นอกจากเป็นอาหารแล้วเร่วยังมีสรรพคุณทางยา เช่น ช่วยขับลม รักษาโรคท้องอืด ท้องเสีย คลื่นไส้ อาเจียน รักษาอาการไอที่มีเสมหะ ช่วยย่อยอาหาร ช่วยขจัดเหงื่อ กำจัดพิษออกมทางเหงื่อ และช่วยให้กระเพาะอาหารแข็งแรง มีรายงานวิจัยที่ศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของพืชวงศ์ขิง 5 ชนิด ได้แก่ ขิง ข่า ขมิ้นชัน กระชายและเร่วหอม โดยการสกัดด้วยไอน้ำเปรียบเทียบกับ การสกัดด้วยตัวทำละลายปิโตรเลียมอีเทอร์และเอทานอล พบว่าองค์ประกอบในน้ำมันหอมระเหยของส่วนลำต้นใต้ดินของเร่วหอมที่กลั่นด้วยไอน้ำ (93.1%) และสกัดด้วยปิโตรเลียมอีเทอร์ (48.7%) เป็นสารเมทิลคาร์วicol (methyl chavicol) ส่วนในสารสกัดเอทานอลเป็นแอนีโธล (anethole) และเมื่อทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย พบว่า น้ำมันหอมระเหยของเร่วหอมสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย 4 ชนิด ได้แก่ *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* และ *Listeria monocytogenes* (Natta และคณะ, 2008) โดยทั่วไปการบริโภคเร่วมีทั้งในรูปแบบเร่วสดและเร่วแห้ง เร่วเป็นพืชที่มีน้ำมันหอม

ระเหยอยู่ ซึ่งมีสารสำคัญ ได้แก่ เบต้าไพเนน (β -pinene) และแอลฟาไพเนน (α -pinene) นอกจากนี้ยังมีสารกลุ่มมอนอเทอร์พีนอยด์ (monoterpenoids) ได้แก่ แอลฟาเทอร์พีนีออล (α -terpineol) ไอโซพินแคมโฟล (isopinocampheol) 1,8-ซินีโอล (1,8-cineole) และพาราไซมิน (p-cymene) (Yang และคณะ, 2008) แต่อย่างไรก็ตามสารประกอบที่มีอยู่ในเร่วมีหลากหลายและในแต่ละส่วนของพืชมีความแตกต่างกัน รวมทั้งเร่วที่พบในประเทศไทยมีหลากหลายสายพันธุ์และเร่วที่นำมาใช้ในงานวิจัยครั้งนี้ คือ *Amomum chinense* Chun ex T. L. Wu ซึ่งงานวิจัยทางวิทยาศาสตร์โดยเฉพาะข้อมูลพื้นฐานทางด้านชนิดและปริมาณสารพฤกษเคมีหรือสารด้านการเกิดออกซิเดชันในส่วนของใบและลำต้นใต้ดินของเร่วสายพันธุ์นี้ยังไม่มีการศึกษาวิจัยที่แพร่หลายมากนัก ดังนั้นผู้วิจัยจึงสนใจที่จะศึกษาชนิดและปริมาณของสารประกอบฟีนอลิกในส่วนของลำต้นใต้ดินและใบของเร่วสายพันธุ์ดังกล่าว รวมทั้งศึกษาฤทธิ์ด้านการเกิดออกซิเดชันของสารสกัดจากลำต้นใต้ดินและใบของเร่ว และเพื่อเป็นข้อมูลในการศึกษาวิจัยและใช้ประโยชน์จากเร่วในการผลิตชาสมุนไพรต่อไป

1.2 วัตถุประสงค์

1.2.1 ศึกษาผลของระยะเวลาและตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดสารต้านอนุมูลอิสระจากส่วนลำต้นใต้ดินและส่วนใบเร่ว

1.2.2 ทดสอบความสามารถในการต้านการเกิดออกซิเดชันของสารสกัด รวมทั้งวิเคราะห์ชนิดและปริมาณสารประกอบฟีนอลิกในสารสกัดจากส่วนลำต้นใต้ดินและส่วนใบเร่ว

1.2.3 ศึกษาผลของการเตรียมชั้นต้นที่มีต่อความคงตัวของสารออกฤทธิ์ในใบเร่วระหว่างขั้นตอนการผลิตเป็นชาใบเร่ว

1.2.4 เปรียบเทียบวิธีการสกัดชาใบเร่วที่มีต่อองค์ประกอบของสารประกอบฟีนอลิกและฤทธิ์ด้านการเกิดออกซิเดชันของชาใบเร่ว

1.3 สมมติฐานของการทดลอง

เร่ว เป็นพืชที่อยู่ในวงศ์ Zingiberaceae ซึ่งเป็นวงศ์เดียวกับขิง ขมิ้น และ โพล มีรายงานว่า พืชตระกูลนี้ประกอบด้วยสารพฤกษเคมีที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพต่าง ๆ เช่น ฤทธิ์ด้านการเกิดออกซิเดชัน ฤทธิ์ด้านการอักเสบ ดังนั้น เร่ว อาจมีสารพฤกษเคมีที่มีฤทธิ์ในการต้านการเกิดออกซิเดชัน

1.4 รูปแบบการวิจัย

เป็นการวิจัยเชิงทดลอง

1.5 ขอบเขตของการวิจัย

1.5.1 ตัวอย่างพืชที่ใช้ในการทดลอง คือ เร่ว สายพันธุ์ *Amomum chinense* Chun ex T. L. Wu โดยส่วนของพืชที่นำมาศึกษา คือ ลำต้นใต้ดิน และใบ

1.5.2 ตัวทำละลาย 4 ชนิด ได้แก่ น้ำ 80% เมทานอล 80% เอทานอล และ 80% แอซีโตน และระยะเวลาในการสกัด 3 ระดับ คือ 6 ชั่วโมง 12 ชั่วโมง และ 24 ชั่วโมง

1.5.3 วิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกโดยรวม ฟลาโวนอยด์โดยรวม และทดสอบกิจกรรมการต้านการเกิดออกซิเดชัน 3 วิธี คือ DPPH ABTS และ FRAP ในสารสกัดจากส่วนลำต้นใต้ดินและใบเร่ว

1.5.4 วิเคราะห์ชนิดและปริมาณกรดฟีนอลิก และฟลาโวนอยด์ ในผลิตภัณฑ์ชาใบเร่วที่ผ่านการเตรียมขึ้นต้นต่างกัน 3 แบบ คือ สด (ไม่ลวก) ลวกน้ำเดือด 30 วินาที และลวกน้ำเดือด 60 วินาที

1.6 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.6.1 ทำให้ทราบถึงชนิดของตัวทำละลายและระยะเวลาที่เหมาะสมในการสกัดส่วนของลำต้นใต้ดินและใบเร่วที่มีฤทธิ์ในการต้านการเกิดออกซิเดชัน

1.6.2 ทำให้ทราบถึงความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระของส่วนสกัดจากส่วนของลำต้นใต้ดินและใบเร่ว

1.6.3 ทำให้ทราบถึงชนิดและปริมาณสารประกอบฟีนอลิกในส่วนสกัดจากส่วนของลำต้นใต้ดินและใบเร่ว

1.6.4 เป็นข้อมูลพื้นฐานที่เป็นประโยชน์สำหรับอุตสาหกรรมการผลิตชาสมุนไพรจากใบเร่ว

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ข้อมูลเกี่ยวกับเร่ว

เร่ว เป็นพืชสมุนไพร จัดอยู่ในวงศ์ Zingiberaceae เช่นเดียวกับ กระวาน ข่า และขิง เร่วมีหลากหลายสายพันธุ์ เช่น เร่วหอม เร่วแดง เร่วใหญ่ สำหรับเร่วหอม มีชื่อวิทยาศาสตร์ *Amomum villosum* (var) *xanthioides* Wall ชื่อสามัญ Bustard cardamom, Tavoy cardamom ชื่อท้องถิ่น ผาละ Pha-la (Shan-Chiang Mai) หมากอ๊ มะอ๊ (เชียงใหม่) เร่ว (ภาคกลาง) หมากเน้ง (อีสาน) หมากน่ง (สระบุรี) (ภาณุพรรณ, 2541)

เร่วเป็นพืชล้มลุก มีเหง้าหรือลำต้นอยู่ใต้ดิน ใบมีลักษณะยาวเรียวยาว ปลายใบแหลมและห้อยโค้งลง ก้านใบมีขนาดสั้น ออกดอกเป็นช่อจากยอดที่แทงขึ้นมาจากเหง้า ดอกมีสีขาวก้านช่อดอกสั้น ผลมีขนสีแดงปกคลุม เมล็ดมีสีน้ำตาล เร่วมีหลายชนิด เช่น เร่วหอม เร่วช้าง เร่วกอ ซึ่งเร่วเหล่านี้มีลักษณะต้นแตกต่างกัน

เร่วใหญ่ ชื่อสามัญ หมากเน้ง เป็นไม้ล้มลุก มีเหง้าใต้ดิน ต้นสูง 2-4 เมตร ใบเดี่ยวรูปหอกขอบขนานเรียวยาวออกสลับกันกว้าง 2-7 เซนติเมตร ยาว 30-50 เซนติเมตร คล้ายใบกระวาน ดอกเป็นช่อ มี 10-15 ดอก ก้านยาวราว 10 เซนติเมตร ดอกย่อยสีขาวแซมชมพู รูปแตรปากอ้า แทงออกจากเหง้าใต้ดินข้างต้น ผลรูปไข่ผิวเป็นหนามคล้ายเงาะแต่สั้นกว่าขนาดประมาณ 15-20 เซนติเมตร สุกมีสีแดง มีเมล็ดกลุ่มภายใน 10-20 เมล็ด ลักษณะเหมือนเมล็ดเร่วน้อย ต่างกันที่เร่วน้อยออกผลที่ปลายต้นพบขึ้นตามป่าดิบเขา

เร่วธรรมดา หรือเร่วกระวาน ลำต้นเรียบสีน้ำตาลเขียวเข้มโคนต้นสีขาว เหง้าใต้ดินสีขาวนวล ไม่มีกลิ่นหอม ดอกแทงช่อดอกยาว 4-6 เซนติเมตร ดอกสีแดง ขนาด 2.5 - 4 เซนติเมตร ผลออกเป็นช่อ เปลือกผลมีขนคล้ายผลเงาะ ขนาด 1.5 - 2 เซนติเมตร ภายในมีเมล็ดสีน้ำตาลเข้มเรียงตัวอัดกันแน่นอยู่เป็นจำนวนมาก ผลของเร่วกระวาน ใช้เป็นเครื่องเทศ ใช้ปรุงยาขับลม แก้ท้องอืดเฟ้อ จุกเสียด

เร่วหอม ส่วนรากมีกลิ่นหอม ลูกเร่วหอม ลำต้นสาก สีเขียวอมแดง โคนต้นสีแดงเรื่อ เหง้าใต้ดินสีส้มชมพู มีกลิ่นหอม เร่วหอมใช้รากเป็นเครื่องเทศปรุงน้ำกวยเตี๋ยวเนื้อเสียง แกงป่า ผัดเผ็ด และน้ำต้มเนื้อ สารสกัดจากลูกเร่ว มีคุณสมบัติในการรักษาโรคกระเพาะอาหารที่เกิดจากเชื้อ *Helicobacter pylori* ซึ่งเป็นสาเหตุของการเกิดมะเร็งในกระเพาะอาหาร (Lee และคณะ, 2007) นอกจากนี้ยังมีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียที่ปนเปื้อนมากับอาหารได้อีกด้วย (Natta และคณะ, 2008) เมื่อนำไหลและเหง้าของเร่วหอมมาทำการสกัดน้ำมันหอมระเหยด้วยวิธีการกลั่นด้วยไอน้ำ พบว่า ที่อุณหภูมิ 120 - 125 องศาเซลเซียส ภายใต้ความดัน 30 psi ให้ผลผลิตน้ำมันอยู่ในช่วง 0.13 - 0.25% โดยน้ำหนักต่อน้ำหนักสด น้ำมันมีลักษณะใสและมีความหนาแน่นอยู่ระหว่าง 0.91 - 0.98 ขึ้นอยู่กับความอ่อนแก่ของวัตถุดิบ ผลผลิตของน้ำมันหอมระเหยที่สกัดได้จากใบและเหง้าของเร่วหอมมีเปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักไม่แตกต่างกัน การสกัดด้วยแอลกอฮอล์ในรูปของสารสกัดทิ้งเจอรีให้สารสกัดสีน้ำตาลมีกลิ่นหอม สารสกัดทั้งสองรูปสามารถนำไปเป็นส่วนผสมในผลิตภัณฑ์จำพวกลูกกวาด น้ำยาบ้วนปาก ยาสีฟัน และผลิตภัณฑ์อื่น ๆ ได้ จากการทำให้แห้ง พบว่า ไหลของเร่วหอม มีเปอร์เซ็นต์น้ำสูงถึง 83% (เร่วสดหนัก 10 กิโลกรัม อบแล้วเหลือน้ำหนักแห้ง 1.7 กิโลกรัม) อบแล้วยังมีกลิ่นหอม สามารถนำไปใช้เป็นแท่งสำหรับคนเครื่องดื่มร้อน เช่น กาแฟ หรือชา เพื่อให้กลิ่นหอม เช่นเดียวกับเปลือกอบเชย (cinnamon) ได้

สำหรับเร่วที่นำมาใช้ในการวิจัยครั้งนี้ มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Amomum chinense* Chun ex T.L. Wu พบได้ในป่าดิบในภาคตะวันออกเฉียงใต้ ลำต้นบนดินสูง 1.5 - 1.8 เมตร ใบเดี่ยว เรียงสลับ รูปใบหอกกว้าง 3.5 - 7.5 เซนติเมตร ยาว 30 - 45 เซนติเมตร ผิวใบเรียบ ดอกช่อเชิงลดออกเป็นกระจุกรูปทรงกลม ยาวประมาณ 2.5 เซนติเมตร ก้านช่อดอกสั้นมาก ดอกย่อยจำนวนมากมีใบประดับ กลีบดอกเชื่อมติดกันเป็นหลอดยาวไม่เกิน 2.5 เซนติเมตร ปลายแยกเป็นแฉกรูปขอบขนานยาว 0.8 - 1.2 เซนติเมตร เกสรตัวผู้มีลักษณะคล้ายกลีบดอกรูปโล่กว้าง 1.2 - 1.8 เซนติเมตร ผลแห้งแตกได้เปลือกแข็งรูปขอบ

ขนานมีสัน 3 สัน สีน้ำตาลอ่อนยาวไม่เกิน 2.5 เซนติเมตร ดังภาพที่ 2.1 และส่วนต่าง ๆ ของเร่วตัวอย่างที่ใช้ในการวิจัยครั้งนี้ มีลักษณะดังภาพที่ 2.2



ภาพที่ 2.1 ส่วนประกอบต่างๆ ของเร่ว *Amomum chinense* Chun ex T. L. Wu
ที่มา: Chun, 2000



ภาพที่ 2.2 ส่วนประกอบต่างๆ ของเร่วตัวอย่างที่ใช้ในการวิจัย

การปลูกเร่วนิยมใช้เหง้าหรือหน่อมากกว่าใช้เมล็ด เนื่องจากจะให้ดอกผลที่เร็วกว่า โดยเริ่มปลูกในเดือนมิถุนายน-สิงหาคม ควรปลูกได้ร่มเงาไม้ใหญ่ ระยะปลูกประมาณ 1-2 เมตร ตัดแยกหน่อออกจากต้นเดิม ตัดหน่อเหลือประมาณ 1 คืบ แล้วนำไปชำหรือปลูกในแปลงปลูก ผลของเร่วจะเก็บเกี่ยวได้ในปีที่ 4 ในช่วงเดือนสิงหาคม – กันยายน เร่วกอหนึ่งอาจให้ดอกประมาณ 20 ช่อ และเมื่อทำให้แห้งจะเหลือประมาณ 30 – 35 กิโลกรัม ส่วนต่าง ๆ ของเร่วมีสรรพคุณทางยา เช่น เมล็ดในของผลแก่จัด นำมาบดเป็นผงรับประทานครั้งละ 1-3 ครั้ง หลังอาหาร แก้อาการท้องอืด ท้องเฟ้อ ขับลมแน่นจุกเสียด ราก แก้กษัย แก้อาการไข้ เชื้อรา ลำต้น แก้กษัยเหียน อาเจียน ใบ แก้ปัสสาวะพิการ ขับลม ดอก แก้พิษอันเกิดเป็นเม็ดผื่นคันตามร่างกาย ผล รักษาโรคริดสีดวงทวาร แก้อาการท้องอืด ท้องเฟ้อ แก้ปวดท้อง นอกจากนี้ส่วนของเมล็ด สามารถใช้เป็นเครื่องเทศในการปรุงอาหาร ลำต้นใต้ดินหรือเหง้าของเร่ว สามารถใช้เป็นเครื่องเทศที่นำมาปรุงเป็นอาหารได้หลายชนิด ช่วยให้อาหารมีกลิ่นหอมรับประทานและยังสามารถดับกลิ่นคาวในอาหารประเภทเนื้อสัตว์ได้ นอกจากนี้ยังเป็นอาหารแล้วเร่วยังมีสรรพคุณทางยา เช่น ช่วยขับลม รักษาโรคท้องอืด ท้องเสีย คลื่นไส้ อาเจียน รักษาอาการไอที่มีเสมหะ ช่วยย่อยอาหาร ช่วยขจัดเหงื่อ กำจัดพิษออกมาทางเหงื่อ และช่วยให้กระเพาะอาหารแข็งแรง โดยทั่วไปการบริโภคเร่วมีทั้งในรูปเร่วสดและเร่วแห้ง

ผลเร่ว *Amomum cannicarpum* เมื่อนำมากลั่นด้วยไอน้ำและนำไปแยกด้วย GC-MS พบว่าในน้ำมันหอมระเหยมีสารสำคัญซึ่งมีองค์ประกอบหลัก ได้แก่ เบต้าไพเนน (β -pinene) อีเลมอล (elemol) และแอลฟาคาไดโนล (α -cadinol) ซึ่งมีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียทั้งชนิดแกรมบวกและแกรมลบ (Sabulal และคณะ 2006) นอกจากนี้สารสกัดด้วยน้ำของเร่วพันธุ์ *Amomum villosum* พบว่ามีสารฟลาโวนไกลโคไซด์ 2 ชนิด (Sun และ คณะ, 2002) ในขณะที่รากของ *Amomum cannicarpum* เมื่อนำมาสกัดด้วยเมทานอลและปิโตรเลียมอีเทอร์ พบว่าสารสกัดจากรากในส่วนสกัดทั้งสองชนิดสามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบได้ระดับปานกลาง แต่ไม่ยับยั้งเชื้อรา (Mathew และคณะ, 2003) น้ำมันหอมระเหยจากส่วนลำต้นใต้ดินของ *Amomum cannicarpum* ที่ได้จากการกลั่นด้วยไอน้ำ เมื่อนำมาวิเคราะห์ด้วย GC และ GC-MS สามารถแยกสารได้ 34 ชนิด ซึ่งองค์ประกอบหลัก คือ เบต้าเทอร์ปีนอล (β -terpeniols) เบต้าไพเนน (β -pinene) และแอลฟาไพเนน (α -pinene) ช่วยลดการอักเสบ และลดอาการปวดในผู้ป่วยได้ นอกจากนี้ยังมีงานวิจัยที่ศึกษาฤทธิ์ด้านการเกิดออกซิเดชันและหาปริมาณสารประกอบฟีนอลโดยรวมจากส่วนสกัดของต้นเร่วหอม (*Etlingera paviana*) และว่านสาวหลง (*Amomum biflorum*) โดยนำส่วนของลำต้นใต้ดินของเร่วหอมและว่านสาวหลงไปอบแห้ง บดละเอียด หลังจากนั้นนำไปสกัดด้วยเอทานอล และทำการแยกส่วนสารสกัดด้วย เฮกเซน เอทิลอะซิเตต และน้ำ ทดสอบฤทธิ์การกำจัดอนุมูล DPPH และความสามารถในการรีดิวซ์ พบว่า ส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตตของต้นเร่วหอม มีฤทธิ์กำจัดอนุมูล DPPH และปริมาณสารประกอบฟีนอลโดยรวมสูงที่สุด และพบว่าฤทธิ์การกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH มีความสัมพันธ์กับปริมาณฟีนอลโดยรวมด้วยค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์เท่ากับ .9731 (ปริยานุช อินทรธรรด , 2551) ในขณะที่สุนันทา วิบูลย์จัน (1989) สกัดเมล็ดแห้งเร่วด้วยวิธีการต่างกัน โดยวิธีแรก สกัดด้วยเอทานอล หลังจากนั้นนำไปสกัดแยกส่วนโดยใช้ตัวทำละลายที่มีสภาพขั้วแตกต่างกันและนำแต่ละส่วนของตัวทำละลายแต่ละชนิดไปแยกด้วยโครมาโทกราฟีชนิดคอลัมน์ สารประกอบที่แยกได้ คือ geraniol, geranyl acetate และกรควานิสิก และสเตอรอยด์ ส่วนวิธีที่สอง สกัดด้วยตัวทำละลายต่างกัน ได้แก่ เฮกเซน คลอโรฟอร์ม เมทานอล และเอทานอล สกัดเมล็ดเร่วโดยตรง หลังจากนั้นนำสารสกัดแต่ละส่วนไปทำให้บริสุทธิ์โดยใช้วิธีการเดียวกับวิธีแรก ซึ่งสารประกอบที่แยกได้ คือ borneol, bornyl acetate, geraniol, geranyl acetate, camphor, palmitic acid และ vanilic acid

กฤติกา นรจิตร และคณะ (2550) ศึกษาประสิทธิภาพการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของน้ำมันหอมระเหยที่สกัดจากพืชวงศ์ขิง 5 ชนิด ได้แก่ ขิง (*Zingiber officinale* Roscoe) ข่า (*Alpinia galanga*) ขมิ้นชัน (*Curcuma longa* L.) กระชาย (*Boesenbergia pandurata* Holt.) และเร่วหอม (*Amomum xanthioides* Wall) มาสกัดด้วยวิธีต้มกลั่น และสกัดด้วยตัวทำละลาย 2 ชนิด คือ เอทานอล และปิโตรเลียมอีเทอร์ โดยทดสอบประสิทธิภาพด้วยวิธีการยับยั้งอนุมูล DPPH และวิธีการฟอกจางสีเบต้าแคโรทีน พบว่า ประสิทธิภาพน้ำมันหอมระเหยที่สกัดจากเอทานอลสูงกว่าที่สกัดจากปิโตรเลียมอีเทอร์ และการต้มกลั่น โดยสารสกัดขิงที่สกัดด้วยเอทานอล และสารสกัดขิงที่สกัดจากกากที่เหลือด้วยเอทานอล สามารถเข้าทำปฏิกิริยา

กับ DPPH ได้ดีที่สุด ซึ่งมีค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง เท่ากับ 23.75 และ 23.01 ตามลำดับ ส่วนการทดสอบด้วยวิธีการฟอกจางสีเบต้าแคโรทีน สารสกัดเข้มข้นที่สกัดจากกากที่เหลือด้วยเอทานอล และสารสกัดเข้มข้นที่สกัดด้วยเอทานอล สามารถยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชันได้ดีที่สุดร้อยละ 86.20 และ 78.21 ตามลำดับ เมื่อวิเคราะห์องค์ประกอบของสารหอมระเหยทั้งหมดด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีแบบแก๊ส-แมสสเปก (GC-MS) พบว่า สารประกอบหลักในขิง ได้แก่ zingiberene และ farnesene ขมิ้นชัน ได้แก่ turmerone และ curcunone ในขณะที่สารประกอบหลักของข่าและเร่วหอมที่สกัดได้จากการต้มกลั่น คือ methyl chavicol ส่วนที่สกัดด้วยเอทานอล คือ fraxanol และ anethole ตามลำดับ ส่วนน้ำมันหอมระเหยของกระชายที่สกัดด้วยการต้มกลั่นและสกัดด้วยตัวทำละลายทั้งสองชนิดมี γ -terpinene และ geraniol เป็นสารประกอบหลัก ตามลำดับ และวิธีการสกัดน้ำมันหอมระเหยจากพืชวงศ์ขิงที่ดีที่สุด คือ การสกัดด้วยเอทานอล ซึ่งให้ปริมาณน้ำมันหอมระเหยสูงที่สุด ยกเว้น เร่วหอม ซึ่งพบว่าเมื่อสกัดด้วยปิโตรเลียมอีเทอร์ให้ปริมาณน้ำมันหอมระเหยสูงกว่าสกัดด้วยเอทานอล ส่วนการทดสอบความสามารถของสารสกัดต่อการยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชันในน้ำมันถั่วเหลืองเก็บที่อุณหภูมิ 98 องศาเซลเซียส โดยศึกษาค่าเพอร์ออกไซด์ และปริมาณกรดไทโอบาร์บิทูริก พบว่า สารสกัดเข้มข้นที่สกัดด้วยเอทานอลมีประสิทธิภาพยับยั้งการเกิดผลิตภัณฑ์ขั้นต้นของปฏิกิริยาออกซิเดชันได้ดีที่สุด โดยมีค่าเพอร์ออกไซด์เท่ากับ 32 มิลลิอิกวาเลนซ์เพอร์ออกไซด์ต่อ 1 กิโลกรัมของน้ำมันถั่วเหลือง แต่ความสามารถในการยับยั้งการเกิดผลิตภัณฑ์ขั้นต้นสองตัว

Kim และคณะ (2007) ทำการสกัด *Amomum xanthioides* Wallich ด้วยเมทานอล และแยกส่วนต่างๆ ในเฮกเซน เอทิลอะซิเตต บิวทานอล และน้ำกลั่น ทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดส ของส่วนสกัดต่างๆ โดยใช้พาราโนโตรฟินิลแอลฟา-ดี-กลูโคไพราโนไซด์ เป็นซับสเตรท พบว่า ส่วนสกัดเอทิลอะซิเตตมีฤทธิ์ในการยับยั้งสูงที่สุดเมื่อนำไปทำให้บริสุทธิ์โดยใช้คอลัมน์ Sephadex LH-20 โดยชะด้วยตัวทำละลาย 50%, 75% และ 100% เมทานอล ตามลำดับ และแยกโดย HPLC ในคอลัมน์ C-18 พิกที่มีความสามารถในการยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดส วิเคราะห์โครงสร้างด้วย ¹H-NMR และ ¹³C-NMR สามารถสรุปได้ว่า คือ สารเคอิจิทริน (Quercitrin) และความสามารถในการยับยั้งเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดส ได้ 55.7% ที่ระดับความเข้มข้น 0.5 mg/mL การยับยั้งของ acarbose ซึ่งเป็นสารสังเคราะห์ที่ยับยั้งเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดส ได้ 32.4% ที่ระดับความเข้มข้นเดียวกัน ดังนั้น *Amomum xanthioides* Wallich สามารถใช้เป็นสาร hypoglycemic

2.2 สารประกอบฟีนอลิก

สารประกอบฟีนอลิก (phenolic compounds) เป็นสารเมทาบอลไลต์ลำดับที่สองของพืช ทำหน้าที่เป็นสารป้องกันโรคพืช นอกจากนี้ยังมีบทบาทเกี่ยวข้องกับคุณลักษณะด้านสีที่ปรากฏอยู่ในพืช สารประกอบฟีนอลิกเป็นสารกลุ่มใหญ่ที่พบในพืชมีประมาณ 8,000 ชนิด ซึ่งมีโครงสร้างและสมบัติทางเคมีต่างกัน (Robbins, 2003) โดยทั่วไปสารประกอบฟีนอลิกมีโครงสร้างพื้นฐานเป็นวงแหวนอะโรมาติก มีหมู่ไฮดรอกซิล (-OH) อย่างน้อยหนึ่งหมู่หรือมากกว่าในโมเลกุล สารประกอบฟีนอลิกที่พบในธรรมชาติมีหลายกลุ่มและมีลักษณะโครงสร้างทางเคมีแตกต่างกัน สารประกอบฟีนอลิกสามารถจำแนกเป็นกลุ่มตามโครงสร้างที่แตกต่างกันของจำนวนคาร์บอนและหมู่ที่เข้ามาแทนที่ในตำแหน่งต่างๆ ดังตารางที่ 2.1

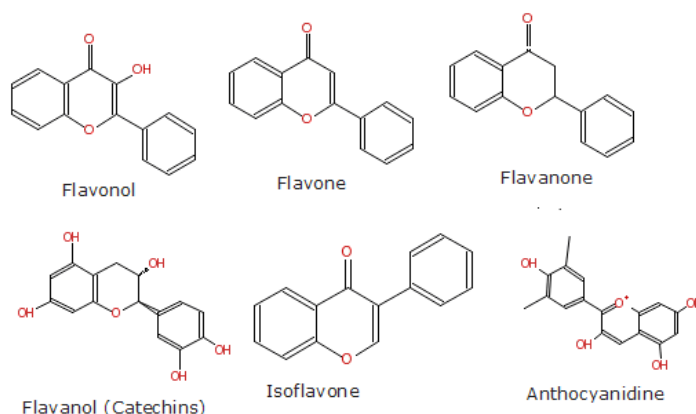
สารประกอบฟีนอลิกแต่ละกลุ่มมีโครงสร้างและองค์ประกอบแตกต่างกัน จะพบได้ในผักหรือผลไม้ต่างชนิดกัน ในธรรมชาติสารประกอบฟีนอลิกที่อยู่ในรูปอิสระจะพบเพียงเล็กน้อย โดยส่วนใหญ่จะพบในรูปที่รวมอยู่กับสารประกอบอื่นๆ ซึ่งมีทั้งชนิดที่ละลายได้ในตัวทำละลายอินทรีย์และที่อยู่ในรูปที่จับกับสารโพลีเมอร์ที่ไม่ละลายน้ำ ซึ่งเป็นส่วนประกอบของผนังเซลล์พืช โดยมักพบสารประกอบฟีนอลิกอยู่ร่วมกับโมเลกุลของน้ำตาล เช่น น้ำตาลกลูโคส (glucose) กาแลคโตส (galactose) แรมโนส (rhamnose) ไกโคส (xylose) อะราบิโนส (arabinose) และอนุพันธ์ของน้ำตาล เช่น กรดคูโครินิก กรดกาแลคตูโรนิก ในรูปของไกลโคไซด์ (glycoside) (ดลฤดี, 2551)

ตารางที่ 2.1 จำนวนคาร์บอน โครงสร้างหลัก กลุ่ม และชนิดสารประกอบฟีนอลิก

จำนวนคาร์บอน	โครงสร้างหลัก	กลุ่ม	ชนิดสารประกอบ
7	C ₆ -C ₁	กรดฟีนอลิก	กรดพาราไฮดรอกซิลเบนซอิก
9	C ₆ -C ₃	กรดซินนามิก	กรดคาเฟอิก
		คูมาริน	สโคโพลินซิคัส
10	C ₆ -C ₄	แนพทาควิโนน	จิงโตน
13	C ₆ -C ₁ -C ₆	แซนโทน	แมงโกสทิน, แมนจิเฟริน
14	C ₆ -C ₂ -C ₆	สตีลบิล	เรสเวราทอล
15	C ₆ -C ₃ -C ₆	ฟลาวานอล	แคมเฟอรอล
		เควซิทิน	ฟลาวานอล-คาเทชิน
n	(C ₆ -C ₃) ₂	ลิกนิน	ไพโนเรซิทอล

ที่มา : Harbone (1999)

2.2.1 ฟลาโวนอยด์ (flavonoids) เป็นสารกลุ่มหลักในกลุ่มสารประกอบฟีนอลิกที่พบได้ทั่วไปในผักและผลไม้ ซึ่งเป็นสารที่มีผู้นิยมศึกษามากที่สุด โดยมีโครงสร้างหลักเป็นไดฟีนิลโพรเพน (diphenyl propane) ประกอบด้วยคาร์บอนทั้งหมด 15 อะตอมจัดเรียงตัวเป็นวงแหวน 3 วงเรียงต่อกัน (C₆-C₃-C₆) ให้ชื่อว่า วงแหวน A วงแหวน B และวงแหวน C มีการเรียกชื่อตำแหน่งคาร์บอนตำแหน่งต่าง ๆ บนวงแหวน ซึ่งสารแต่ละกลุ่มย่อยของฟลาโวนอยด์มีโครงสร้างที่แตกต่างกันที่พันธะคู่บนวงแหวน A และวงแหวน B นอกจากนั้นยังมีความแตกต่างเมื่อมีหมู่ต่าง ๆ เช่น หมู่ไฮดรอกซิล (-OH) และหมู่เมทอกซิล (-OCH₃) หรือน้ำตาลชนิดต่างๆ เข้ามาแทนที่บริเวณคาร์บอนตำแหน่งต่างๆ บนวงแหวน ตัวอย่างสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ ได้แก่ แอนโทไซยานิน ฟลาเวน ฟลาวานอล ฟลาโวนอล ฟลาโวนอน ฟลาโวนอล ฟลาโวน และแอนโทไซยานิดิน ซึ่งมีโครงสร้างดังภาพที่ 3

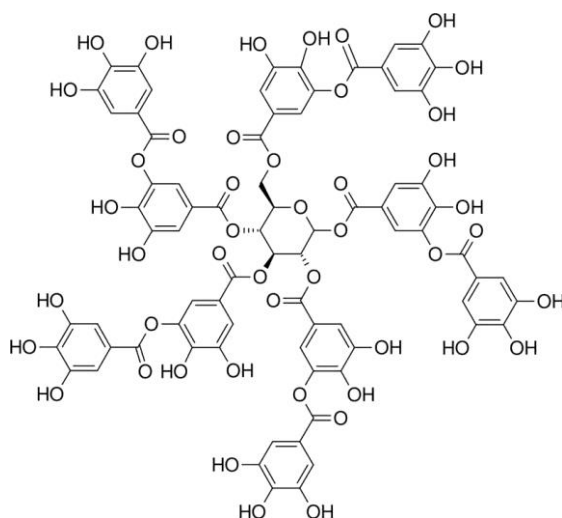


ภาพที่ 2.3 โครงสร้างพื้นฐานของฟลาโวนอยด์ชนิดต่าง ๆ

ที่มา : Lakhanpal and Rai. 2007

2.2.2 แทนนิน (tannin) เป็นสารที่มีโมเลกุลใหญ่และโครงสร้างซับซ้อน มีสถานะเป็นกรดอ่อน เป็นสารที่ทำให้เกิดสฟัดในพืช สามารถยับยั้งการเกิดเอนไซม์ที่ช่วยย่อยอาหารในกระเพาะสัตว์ แทนนิน แบ่งออกได้ 2 ชนิด คือ คอนเดนส์ แทนนิน (condensed tannins) หรือ โปรแอนโทไซยานิน (proanthocyanin) พบได้ในส่วนเปลือก ต้น และแก่นไม้เป็นส่วนใหญ่ และสารไฮโดรไลซ์แทนนิน (hydrolysable tannins) พบมากในส่วนใบ ผัก และส่วนที่ปูดออกมาจากปกติเมื่อต้นไม้

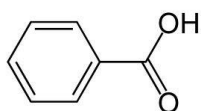
ได้รับอันตราย แทนนินมีคุณสมบัติตกตะกอนโปรตีนทำให้หนังสือตัวไม่เน่าเปื่อยจึงนิยมใช้ในอุตสาหกรรมฟอกหนัง ฤทธิ์ฆ่าเชื้อของแทนนินใช้เป็นยารักษาโรคท้องเสีย และนอกจากนั้นแทนนินยังมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียได้



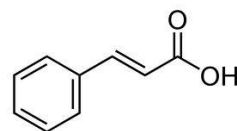
ภาพที่ 2.4 โครงสร้างแทนนิน

ที่มา : Okuda and Ito (2011)

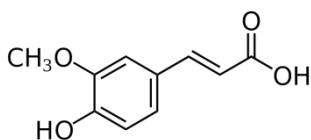
2.2.3 กรดฟีนอลิก (phenolic acid) ประกอบไปด้วยอนุพันธ์ของกรดเบนโซอิก ซึ่งเป็นเอสเทอร์อย่างง่ายที่อยู่ในรูปของกรดไฮโดรคาร์บอกซิลิก ได้แก่ กรดแกลลิก กรดวานิลลิก และอนุพันธ์ของกรดซินนามิก อยู่ในรูปของไกลโคไซด์ ได้แก่ กรดเฟอรูริก คาเฟอิก กรดคลอโรจีนิก



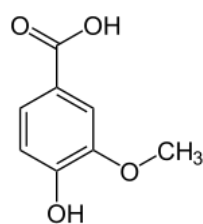
กรดเบนโซอิก



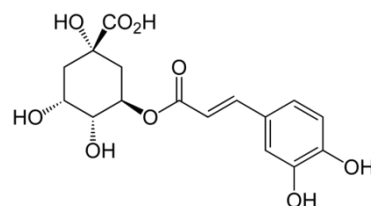
กรดซินนามิก



กรดเฟอรูริก



กรดวานิลลิก



กรดคลอโรจีนิก

ภาพที่ 2.5 โครงสร้างกรดฟีนอลิกบางชนิด

ที่มา : Shahidi and Nackz (2004)

2.3 อนุมูลอิสระ

อนุมูลอิสระ (free radicals) คือ โมเลกุลที่มีอิเล็กตรอนโดดเดี่ยวอยู่รอบนอก และมีอายุสั้นมากประมาณ 1 หรือ 10^{-3} - 10^{-10} วินาที จึงจัดว่าเป็นโมเลกุลที่ไม่เสถียรและว่องไวต่อการเกิดปฏิกิริยาเคมีโดยสามารถตรวจวัดด้วยอิเล็กตรอนสปินเรโซแนนซ์ (electron spin resonance, ESR) โมเลกุลหรือไอออนชนิดนี้เป็นตัวก่อให้เกิดปฏิกิริยาถูกไซ้ เป็น

สารที่มีอิเล็กตรอนอิสระอยู่ว่องวอกของอะตอมหรือโมเลกุลจึงมีความว่องไวในการเข้าทำปฏิกิริยาโดยรับอิเล็กตรอนจากสารอื่นๆ โกลีเคียมส่งผลให้ตัวเองเสถียรขึ้น ขณะเดียวกันก็ชักนำให้สารที่ให้อิเล็กตรอนไปนั้นอิเล็กตรอนไม่ครบคู่จนกลายเป็นสารที่มีความรุนแรง ซึ่งถ้าเกิดในระบบของสิ่งมีชีวิตอาจทำอันตรายกับส่วนประกอบสำคัญของเซลล์รอบๆ บริเวณนั้นๆ ไม่ว่าจะเป็นโปรตีน ไขมัน คาร์โบไฮเดรต หรือดีเอ็นเอ ทำให้สารชีวโมเลกุลเหล่านี้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างและเสียหายที่การทำงาน ดังนั้นในภาวะที่มีการสร้างอนุมูลอิสระเป็นจำนวนมากจะก่อให้เกิดการบาดเจ็บของเซลล์ซึ่งเป็นกลไกสำคัญก่อให้เกิดพยาธิสภาพต่างๆ ได้ โดยปกติแล้วมักจะกล่าวถึงเฉพาะอนุมูลอิสระที่เป็นสาเหตุทำให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันในร่างกาย แต่ในความเป็นจริงจะมีตัวกระตุ้นที่สำคัญเรียกว่าอนุมูลออกซิเจนที่ว่องไว (reactive oxygen species, ROS) ซึ่งจะหมายถึงโมเลกุลที่ว่องไวต่อการทำปฏิกิริยา ซึ่งอาจเป็นอนุมูลอิสระหรือไม่ใช้อนุมูลอิสระ (nonradicals) ก็ได้ตัวอย่างของอนุมูลอิสระและอนุมูลออกซิเจนที่ว่องไว เช่น อนุมูลซูเปอร์ออกไซด์ ($O_2^{\cdot-}$) อนุมูลไฮดรอกซิล ($HO^{\cdot}$) อนุมูลเปอร์ออกไซด์ ($ROO^{\cdot}$) ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) โอโซน (O_3) ซิงเกิลออกซิเจน (1O_2) อนุมูลไฮโดรเจน ($H^{\cdot}$) และอนุมูลเมทิล ($CH_3^{\cdot}$) เป็นต้น

อนุมูลอิสระมีบทบาทสำคัญในกระบวนการเกิดโรคต่าง ๆ หลายชนิด การมีอนุมูลอิสระมากเกินไปจนสมดุลก่อให้เกิดภาวะที่เซลล์และร่างกายถูกออกซิไดซ์ หรือภาวะเครียดเนื่องจากการเกิดออกซิเดชัน (oxidative stress) ซึ่งสามารถนำไปสู่การทำลายเซลล์และเนื้อเยื่อของสิ่งมีชีวิตได้ โดยทั่วไปการสร้างอนุมูลอิสระเกิดขึ้นตลอดเวลา แต่ร่างกายมีระบบในการป้องกันตัวเอง และสามารถช่วยลดความรุนแรงจากพิษของอนุมูลอิสระได้โดยอาศัยสารต้านการเกิดออกซิเดชัน (antioxidant) ซึ่งเป็นสารที่สามารถทำปฏิกิริยากับอนุมูลอิสระได้โดยตรง หรือหยุดปฏิกิริยาถูกใช้ไม่ให้เกิดอันตรายต่อการเกิดออกซิเดชันที่มีอยู่ตามธรรมชาติ เช่น วิตามินซี หรือ กรดแอสคอร์บิก (ascorbic acid), วิตามินอี (α -Tocopherol) และ กลูตาไธโอน (glutathione) เป็นต้น จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าสมุนไพรและผักพื้นบ้านไทยหลายชนิดมีสารประกอบฟีนอลิก (phenolic compound) ซึ่งมีคุณสมบัติเป็นสารต้านการเกิดออกซิเดชันที่ทำหน้าที่ป้องกันการเกิดภาวะเครียดเนื่องจากเกิดออกซิเดชันของอนุมูลอิสระ ทำให้ปัจจุบันผู้คนให้ความสำคัญ และหันมาบริโภคสมุนไพรและผักพื้นบ้านไทยมากขึ้นเพื่อเสริมสร้างสุขภาพที่ดี (โอภา และคณะ, 2550)

2.3.1 การเกิดอนุมูลอิสระ

1) อนุมูลอิสระที่เกิดในร่างกาย เป็นผลจากในร่างกายของเรามีกระบวนการเผาผลาญอาหารหรือกระบวนการเมแทบอลิซึมเกิดขึ้นตลอดเวลา ซึ่งเป็นผลจากปฏิกิริยาเคมีและกิจกรรมของเซลล์ในร่างกายที่ต้องดำเนินการตามปกติ ตัวอย่างเช่น ในกระบวนการหายใจจะเกิดออกซิเจนที่มีประจุลบ ซึ่งก็คือ อนุมูลอิสระสามารถรวมตัวกับ ไลโปโปรตีนชนิดความหนาแน่นต่ำ (low density lipoprotein, LDL) ได้ดี และยังสามารถรวมตัวกับสารบางชนิดในร่างกายก่อให้เกิดสารพิษที่ทำลายเนื้อเยื่อหรืออาจไปเปลี่ยนแปลงข้อมูลทางพันธุกรรมในดีเอ็นเอ ทำให้เซลล์ปกติเปลี่ยนสภาพไปเป็นเซลล์มะเร็ง เป็นต้น

2) อนุมูลอิสระที่มาจากนอกร่างกาย ซึ่งเกิดได้หลายปัจจัยด้วยกัน คือ จากการได้รับเชื้อโรค เช่น การติดเชื้อไวรัส หรือเชื้อแบคทีเรีย โรคเกี่ยวกับภูมิคุ้มกัน เช่น ข้ออักเสบรูมาตอยด์ จากรังสี เช่น รังสีอัลตราไวโอเล็ต รังสีเอกซ์ รังสีแกมมา จากมลภาวะ เช่น คาร์บอนหรือ แก๊สจากท่อไอเสียรถยนต์ เช่น ไนโตรออกไซด์ ไนโตรเจนไดออกไซด์ เขม่าจากเครื่องยนต์ ผ่นจากกระบวนการประกอบอาหาร เช่น การย่างเนื้อสัตว์ที่มีส่วนประกอบของไขมันสูง การนำน้ำมันที่ใช้ทอดอาหารที่มีอุณหภูมิสูงๆ กลับมาใช้ซ้ำ ทำให้เกิดอาหารประเภทเกรียมไหม้หรือเกิดจากการปิ้งย่างหรือจากยาบางชนิด เช่น โดโซรูบิซิน (doxorubicin) เพนิซิลลามีน (penicillamine) พาราเซตามอล (paracetamol) (อนันต์, 2551)

2.3.2 อนุมูลอิสระในระบบต่างๆ ของร่างกาย

1) อนุมูลอิสระกับระบบหลอดเลือดและหัวใจ เกิดจากปฏิกิริยาออกซิเดชันของลิพิด (lipid peroxidation) แล้วทำให้หลอดเลือดผิดปกติ อักเสบและอุดตัน เกิดภาวะขาดเลือดชั่วคราวในระยะแรกและเมื่อมีเลือดกลับไปเลี้ยงใหม่ทำให้สภาพทางชีวเคมีของเซลล์เปลี่ยนไปทำให้มีอนุมูลอิสระเกิดขึ้นทวีคูณและทำหน้าที่สื่อสัญญาณในวิถีทางต่างๆ ที่ทำให้เซลล์ตายอันเป็นสาเหตุของการเกิดโรคภาวะขาดเลือดชั่วคราวในระยะแรก และภาวะมีเลือด และออกซิเจนกลับมาเลี้ยงเซลล์ใหม่ (reperfusion) เนื่องมาจากการกระตุ้นให้มีการสร้างอนุมูลซูเปอร์ออกไซด์แอนไอออนจำนวนมาก และการกระตุ้นกระบวนการอักเสบทำให้เซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันหลุดลอกจากหลอดเลือดและปล่อยสารไซโตไคน์ (cytokines) และทำให้เกิดอนุมูลอิสระขึ้นได้

2) อนุมูลอิสระกับระบบภูมิคุ้มกัน ระบบภูมิคุ้มกันช่วยปกป้องร่างกายจากสิ่งแปลกปลอมหรือเชื้อโรค ทั้งภายในและภายนอก ร่างกาย ระบบภูมิคุ้มกันยังทำหน้าที่ในการตรวจตรา และทำลายเซลล์มะเร็งต่างๆ ที่แปลกปลอมเข้ามา สารต้านอนุมูลอิสระมีส่วนช่วยในการเพิ่มประสิทธิภาพในการกำจัดเซลล์ ซึ่งเป็นกระบวนการหนึ่งในการต่อสู้กับมะเร็งและเซลล์ที่มีการติดเชื้อ

3) อนุมูลอิสระกับเซลล์ประสาทในสมอง พบว่าเซลล์ประสาทบางส่วนได้รับผลกระทบและเกิดความเสียหายจากอนุมูลอิสระผลกระทบต่อเซลล์ประสาทนี้ ได้แก่ โรคเสื่อมของเซลล์ประสาท เช่น โรคพาร์กินสันที่มีอาการสั่น กล้ามเนื้อตาย และการเคลื่อนไหวลำบาก โรคอัลไซเมอร์ เราสามารถป้องกันเซลล์ประสาทจากอนุมูลอิสระ ที่เกิดขึ้นตามวัยที่เพิ่มขึ้นได้โดยการยับยั้งการเพิ่มขึ้นของการก่อตัวของอนุมูลอิสระ อย่างไรก็ตามผลจากการป้องกันการก่อตัวของอนุมูลอิสระเมื่อเกิดขึ้นในช่วงแรกๆ จะได้ผลที่ดีกว่า

4) อนุมูลอิสระกับการต่อต้านเซลล์มะเร็ง เซลล์มะเร็งสามารถก่อตัวได้เมื่อกลไกพันธุกรรมของเซลล์มีการเปลี่ยนแปลง สาเหตุที่สนับสนุนการเกิดของเซลล์มะเร็ง ได้แก่ การถ่ายทอดทางพันธุกรรม สารพิษจากสิ่งแวดล้อม รังสี อาหารที่บริโภคเข้าไปและสาเหตุอื่นๆ มะเร็งแต่ละชนิดมีความจำเพาะ และมีความเสี่ยงที่แตกต่างกัน จึงทำให้การบำบัดรักษาเป็นไปได้ยากอนุมูลอิสระเป็นสาเหตุที่ก่อให้เกิดความเสียหายต่อกลไกทางพันธุกรรมแก่เซลล์หลายชนิด และสนับสนุนให้เกิดความเสี่ยงต่อการก่อตัวของมะเร็งด้วย การต่อต้านมะเร็งหลายชนิด สามารถทำได้โดยการบริโภคสารต้านอนุมูลอิสระในปริมาณที่เหมาะสม ซึ่งวิธีที่ดีที่สุดคือ เริ่มบริโภคสารต้านอนุมูลอิสระก่อนที่มะเร็งจะเกิดขึ้นจะดีกว่าที่จะบริโภคหลังจากที่มะเร็งได้เกิดขึ้นแล้ว

5) อนุมูลอิสระกับการต่อต้านวัยชรา อายุที่เพิ่มมากขึ้นทำให้ร่างกายมีการเปลี่ยนแปลง อาทิ ระบบเลือดและหัวใจมีความเสี่ยงสูงขึ้นจากเส้นเลือดแข็งตัว ระบบภูมิคุ้มกันในการต่อต้านมะเร็งบางชนิดลดน้อยลง ระบบประสาทบางส่วนในสมองไม่สามารถสร้างเซลล์ประสาทตัวใหม่มาทดแทนเซลล์เก่าที่ถูกทำลายโดยอนุมูลอิสระ จะเห็นได้ว่าปัจจัยต่างๆ ที่สนับสนุนการเกิดมะเร็งเกิดขึ้นตลอดช่วงชีวิตของมนุษย์ ซึ่งการทำลายดีเอ็นเอมีสะสมเพิ่มมากขึ้นตามอายุที่เพิ่มขึ้น สิ่งต่างๆ เหล่านี้สามารถแก้ไขได้ด้วยการบริโภคสารต้านอนุมูลอิสระ

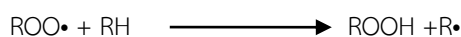
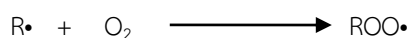
2.3.3 อนุมูลอิสระกับการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมันในอาหาร

ปฏิกิริยาการเกิดออกซิเดชันในน้ำมันและไขมันเป็นปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นได้เองโดยปฏิกิริยาจะเกิดขึ้นที่พันธะคู่ของกรดไขมันไม่อิ่มตัวกับออกซิเจนในอากาศอย่างช้าๆ ทำให้เกิดเป็นผลิตภัณฑ์ของปฏิกิริยาออกซิเดชันขึ้นเริ่มต้น ขั้นที่สอง และขั้นที่สาม กลไกการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของน้ำมันและไขมันในอาหารสามารถแบ่งเป็น 3 ขั้นตอน ดังนี้ (ดลฤดี, 2551)

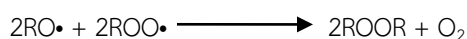
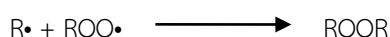
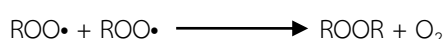
1) ขั้นเริ่มต้น (initiation) เป็นขั้นตอนที่กรดไขมันแตกตัวเป็นอนุมูลอิสระ โดยมีแสง อุณหภูมิ เป็นตัวเร่งดังสมการ



2) ขั้นที่สอง (propagation) เป็นปฏิกิริยาต่อเนื่องของอนุมูลอิสระที่ทำปฏิกิริยากับโมเลกุลของออกซิเจน เกิดเป็นอนุมูลอิสระของเพอร์ออกไซด์ ซึ่งไม่เสถียรสามารถทำปฏิกิริยากับกรดไขมันอิสระอื่น ๆ เกิดเป็นอนุมูลอิสระกรดไขมันต่าง ๆ



3) ขั้นสุดท้าย (termination) เป็นปฏิกิริยาสุดท้ายที่ทำให้ผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นไม่ได้เป็นอนุมูลอิสระ (non-radical products)



ปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมันในอาหาร ส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงคุณภาพของอาหาร โดยก่อให้เกิดกลิ่นเหม็นหืนเกิดการเปลี่ยนแปลงสี และกลิ่นรสรวมถึงส่งผลให้สูญเสียคุณค่าทางอาหาร และมีความเป็นพิษซึ่งการเติมสารต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันก็จะสามารถช่วยป้องกันการเปลี่ยนแปลงดังกล่าวได้ และยังช่วยยืดอายุการเก็บรักษาอาหารได้นานขึ้น

2.4 สารต้านการเกิดออกซิเดชัน

สารต้านการเกิดออกซิเดชัน (antioxidants) คือ โมเลกุลของสารที่สามารถจับอนุมูลอิสระและสามารถยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชันของโมเลกุลสารอื่นๆ ได้ (Halliwell, 1995) ปฏิกิริยาออกซิเดชันเป็นปฏิกิริยาที่เกี่ยวข้องกับการแลกเปลี่ยนอิเล็กตรอนจากสารตัวหนึ่งไปยังตัวออกซิไดซ์ ปฏิกิริยานี้ให้ผลิตภัณฑ์เป็นสารอนุมูลอิสระซึ่งสารเหล่านี้จะเกิดปฏิกิริยาลูกโซ่และทำลายเซลล์ของร่างกาย สารต้านการเกิดออกซิเดชันจะเข้าไปยุติการเกิดปฏิกิริยาลูกโซ่โดยเข้าไปจับกับสารอนุมูลอิสระและยับยั้งการเกิดออกซิเดชันโดยถูกออกซิไดซ์ ดังนั้นสารต้านการเกิดออกซิเดชันจึงเป็นตัวรีดิวซ์ เช่น กรดแอสคอร์บิก และสารในกลุ่มสารประกอบฟีนอลิก สารต้านการเกิดออกซิเดชันเป็นสารจำนวนน้อยที่สามารถป้องกันหรือชะลอการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันโดยอนุมูลอิสระต่างๆ ได้ มีกลไกการทำงานหลายแบบ เช่น ดักจับ (scavenge) อนุมูลอิสระโดยตรง ยับยั้งการสร้างอนุมูลอิสระหรือเข้าจับ (chelete) กับเหล็ก ป้องกันการสร้างอนุมูลอิสระ เป็นต้น

สารต้านการเกิดออกซิเดชันเป็นสารพวกเอนไซม์ สารที่สามารถทำปฏิกิริยาในเซลล์ซึ่งรวมถึงสารเกือบทุกชนิดในร่างกาย เช่น โปรตีน ไขมัน คาร์โบไฮเดรต ดีเอ็นเอ แต่ในบางสภาวะที่ร่างกายมีปริมาณอนุมูลอิสระมากจนระบบสารต้านการเกิดออกซิเดชันทำงานไม่ทัน จะเกิดสภาวะที่เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันสูงมากจะส่งผลกระทบต่อเซลล์ เช่น ทำให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของดีเอ็นเอ โปรตีน คาร์โบไฮเดรต และเกิดการทำลายโมเลกุลที่มีพันธะซัลไฮดริล และเยื่อหุ้มเซลล์ก่อเกิดผลเสียต่อเซลล์ และการทำลายเซลล์ทำให้เกิดความแก่ และรุนแรงไปถึงการเกิดเป็นโรค เช่น เส้นเลือดตีบโรคเกี่ยวกับภูมิคุ้มกัน และโรคมะเร็ง (อนันต์, 2551)

2.4.1 ประเภทของสารต้านการเกิดออกซิเดชัน

1) สารต้านการเกิดออกซิเดชันปฐมภูมิ (primary antioxidant) เป็นสารที่ทำหน้าที่หยุดปฏิกิริยาลูกโซ่ของการเกิดอนุมูลอิสระในปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมันโดยการให้อนุมูลไฮโดรเจน ($H^\cdot$) หรืออิเล็กตรอนแก่อนุมูลอิสระโดยตรงเป็นผลให้อนุมูลนั้นกลายเป็นสารที่มีความเสถียรขึ้น สารในกลุ่มนี้ส่วนใหญ่ ได้แก่ สารประกอบกลุ่มฟีนอลิก เช่น ฟลาโวนอยด์ ยูกลีโนล และวานิลิน เป็นต้น สารโทโคฟีรอลธรรมชาติ ซึ่งมีรายงานว่าสารต้านการเกิดออกซิเดชันชนิดนี้จะทำหน้าที่ได้ดีที่ความเข้มข้นต่ำ ๆ แต่เมื่อความเข้มข้นสูงขึ้นอาจกลายเป็นสารเสริมฤทธิ์ออกซิเดชันได้ (Rajalakshmi และ Narasimhan, 1996) และสารต้านการเกิดออกซิเดชันสังเคราะห์ ได้แก่ แกลเลต บิวทิลเลตไฮดรอกซิลอะนิโซล เทอร์ทิลบิวทิลไฮโดรควินิน

2) ตัวจับออกซิเจน (oxygen scavenger) สารในกลุ่มนี้ไม่ทำปฏิกิริยาโดยตรงกับอนุมูลอิสระแต่จะช่วยให้การทำงานของสารต้านการเกิดออกซิเดชันปฐมภูมิ ในลักษณะต่าง ๆ เช่น การเข้าทำปฏิกิริยากับออกซิเจนจึงเป็นการช่วยกำจัดออกซิเจนในระบบปิด การจับไอออนของเหล็ก การดูดซับรังสียูวีไว ซึ่งสารเหล่านี้ ได้แก่ วิตามินซี กรดอัสคอร์บิก กรดไอโซแอสคอร์บิก และโซเดียมอัสคอร์เบต เป็นต้น

3) สารต้านการเกิดออกซิเดชันทุติยภูมิ (secondary antioxidant) สารในกลุ่มนี้ทำหน้าที่สลายโมเลกุลของลิพิดไฮโดรเปอร์ออกไซด์ให้เป็นสารที่มีความเสถียร ได้แก่ ไดลอริลไฮโอโพรพิโอเนต และกรดไทโอโพรพิโอนิก

4) สารต้านการเกิดออกซิเดชันในกลุ่มเอนไซม์ (enzymic antioxidant) สารในกลุ่มนี้ทำหน้าที่กำจัดออกซิเจน หรืออนุพันธ์ของออกซิเจนโดยเฉพาะไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ได้แก่ เอนไซม์ต่าง ๆ ซึ่งแบ่งเป็นเอนไซม์ต้านการเกิดออกซิเดชัน ชั้นที่หนึ่ง (primary antioxidant enzyme) และเอนไซม์ช่วยในการต้านออกซิเดชัน (auxiliary antioxidant enzyme)

5) สารคีเลต (chelating agent หรือ sequestrant) สารในกลุ่มนี้ทำหน้าที่จับกับไอออนของโลหะ เช่น เหล็กและทองแดง ซึ่งเป็นไอออนที่ส่งเสริมและเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมัน ทำให้เกิดสารประกอบเชิงซ้อนที่เสถียร ได้แก่ กรดซิตริก กรดอะมิโน เอทิลีนไดอะมีนเตตระแอสติกแอซิด (EDTA)

2.4.2 แหล่งที่มาของสารต้านการเกิดออกซิเดชัน แบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม ดังนี้ (ดลฤดี, 2551)

1) สารต้านการเกิดออกซิเดชันสังเคราะห์ ได้แก่ บิวทิลเลตไฮดรอกซิลอะนิโซล (butylated hydroxyl anisole, BHA) บิวทิลเลตไฮดรอกซิลทอลูอิน (butylated hydroxyl toluene, BHT) เทอร์ทิลบิวทิลไฮโดรควินิน (tertiary butyl hydro quinine, TBHQ) โพรพิลแกลเลต (propyl gallate, PG) เป็นต้น ใช้เติมลงในอาหารเพื่อป้องกันการเสื่อมเสียของผลิตภัณฑ์อาหารอันเนื่องมาจากสารต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันขององค์ประกอบไขมันและน้ำมันในอาหาร แต่มักมีข้อจำกัดในเรื่องความเป็นพิษต่อผู้บริโภค

2) สารต้านการเกิดออกซิเดชันในธรรมชาติมี 4 ประเภทได้แก่

- สารต้านออกซิเดชันในกลุ่มของเอนไซม์ที่สร้างได้ในร่างกาย ได้แก่ คาตาเลส (catalase) ซูเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเทส (superoxide dismutase) และ กลูตาไธโอนเปอร์ออกซิเดส (glutathione peroxidase) เป็นต้น
- สารต้านออกซิเดชันในกลุ่มของวิตามิน ได้แก่ วิตามินอี วิตามินซี และวิตามินเอ
- สารต้านออกซิเดชันในกลุ่มของแร่ธาตุ ได้แก่ ซีลีเนียม และสังกะสี ซึ่งทำหน้าที่เป็นโคแฟกเตอร์ (co-factors) ของเอนไซม์ต้านออกซิเดชัน
- สารต้านออกซิเดชันในกลุ่มของสารพฤกษเคมี (phytochemicals) ได้แก่ แคโรทีน (carotene) ไลโคปีน (lycopene) แซนโทฟิลล์ (xanthophyll) แทนนิน (tannin) และ ฟลาโวนอยด์ (flavonoids) เป็นต้น

ตารางที่ 2.2 สารต้านออกซิเดชันในพืชบางชนิด

ชนิดของพืช	ชนิดของสารต้านออกซิเดชัน
ชาเขียว	อีพิกัลโลคาเทชินแกลเลต อีพิกัลโลคาเทชิน และอีพิกัลโลคาเทชินแกลเลต
กานพลู ข่า ตะไคร้	ยูจินอล
วานิลลา	วานิลลิน
พริก	แคปไซซิน
งา	เซซามอล เซซามอลไดเมอรัล เซซาโมลิน และเซซามินอล
ผักและผลไม้ที่มีสีเหลือง สีส้ม	แคโรทีนอยด์
ถั่วเหลือง	เจนสทิน ไอโซฟลาโวน
ผักและผลไม้ที่มีสีม่วง และ สีส้ม	แอนโทไซยานิน
โรสแมรี่	คาร์โนซอล กรดโรสมารินิก กรดคาร์โนซิก และโรสมาริดิฟีนอล
ขมิ้น	เตตระไฮโดรเคอร์คูมิน
พริกไทยดำ	กรดเพอรูลิก
ผลไม้	วิตามินซี
ชา	เอสเทอร์ของกรดแกลลิก

ที่มา : พิมพ์เพ็ญ และนิธิยา (2555)

2.4.3 กลไกการทำงานของสารต้านอนุมูลอิสระ

- การดักจับอนุมูลอิสระ (radical scavenging) โดยการให้ไฮโดรเจนหรืออิเล็กตรอนแก่อนุมูลอิสระ
- ยับยั้งการทำงานของซิงเกิลออกซิเจน (singlet oxygen quenching) โดยการเปลี่ยนซิงเกิลออกซิเจน (1O_2) ให้อยู่ในรูปของทริปเลตออกซิเจน (3O_2) และปล่อยพลังงานที่ได้รับออกไปในรูปความร้อน โดยสารกลุ่มแคโรทีนอยด์ 1 โมเลกุลสามารถทำปฏิกิริยากับซิงเกิลออกซิเจนได้ถึง 1,000 โมเลกุล (Sies และคณะ, 1992)
- จับกับโลหะที่สามารถเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันได้ (metal chelation) สารที่สามารถจับไอออนของเหล็ก (Fe^{2+}) และไอออนทองแดง (Cu^{2+}) ได้ เช่น ฟลาโวนอยด์ กรดฟอสฟอริก และกรดซิตริก
- หยุดหรือยับยั้งปฏิกิริยาที่จะเกิดต่อเนื่องของสารอนุมูลอิสระ (chain breaking) เช่น วิตามินอี สามารถป้องกันเยื่อหุ้มเซลล์ถูกทำลายจากปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมัน โดยทำหน้าที่เป็นตัวรับอิเล็กตรอนจากอนุมูลเปอร์ออกซิล ($ROO^\cdot$)
- การเสริมฤทธิ์ (synergism) สารชนิดนี้จะช่วยสนับสนุนให้สารต้านอนุมูลอิสระทำงานได้ดีขึ้น เช่น การทำงานร่วมกันระหว่างแอลฟาโทโคฟีรอลกับกรดแอสคอร์บิก โดยที่กรดแอสคอร์บิกไม่สามารถทำงานในระบบไฮโดรโฟบิก (hydrophobic) ได้เหมือนกับแอลฟาโทโคฟีรอล แต่จะให้ห่อหุ้มไฮโดรเจนแก่อนุมูลแอลฟาโทโคฟีรอล เปอร์ออกซิล ที่เกิดจากการทำปฏิกิริยาระหว่างแอลฟาโทโคฟีรอลกับอนุมูลเปอร์ออกซิล เปลี่ยนรูปกลับไปเป็นแอลฟาโทโคฟีรอลที่สามารถทำงานได้ (Frankel, 1996)
- ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาอนุมูลอิสระ (enzyme inhibition) สารประกอบฟีนอลิกบางชนิด เช่น ฟลาโวนอยด์ กรดฟีนอลิก และแกลเลต สามารถยับยั้งไลพอกซิจีเนส โดยสามารถเข้าจับกับไอออนของเหล็กซึ่งเป็นโคแฟกเตอร์ ยังผลต่อการทำงานของเอนไซม์ดังกล่าว (Puerta, 1999)

2.5 การสกัดสารสำคัญจากพืช

การสกัดสารสำคัญจากพืชทำได้หลายวิธี ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับลักษณะเนื้อเยื่อและปริมาณน้ำในพืช ชนิดของสารสกัด สมบัติของสารในการทนความร้อน ชนิดของตัวทำละลายที่ใช้จะมีข้อดี ข้อจำกัดที่ต่างกัน แต่ก่อนจะทำการสกัด จำเป็นต้องมีการทำให้ตัวอย่างพืชมีขนาดเล็กลงจนสามารถสกัดสารออกมาอย่างมีประสิทธิภาพ โดยทั่วไปการสกัดเบื้องต้นไม่ว่าสกัดด้วยวิธีการใดหรือตัวทำละลายใด องค์ประกอบที่ได้เป็นของผสม ซึ่งเรียกว่า สารสกัดหยาบ (crude extract) เป็นสิ่งที่สกัดออกมาจากพืชโดยใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ สารสกัดหยาบมีองค์ประกอบทั้งที่มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา เรียกว่าสารสำคัญ (bioactive compound) และองค์ประกอบที่ไม่มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา ซึ่งเรียกว่า สารไม่สำคัญ (non active compound) ชนิดและสัดส่วนขององค์ประกอบในสารสกัดจะผันแปรไปตามสภาพการผลิตและสภาวะที่ใช้ในการสกัด การสกัดสารสำคัญจากพืชทำได้หลายวิธี ได้แก่

1) maceration เป็นการสกัดสารสำคัญโดยหมักพืชกับตัวทำละลายภายในภาชนะปิดทิ้งไว้ 7 วัน หมั่นคนหรือเขย่าอยู่บ่อยๆ เมื่อครบกำหนดค่อยรินเอาสารสกัดออกมาให้ได้มากที่สุด แล้วนำไปกรอง ถ้าต้องการสกัดให้หมดจำเป็นต้องสกัดหลายครั้ง วิธีนี้มีข้อดีคือไม่ถูกความร้อน ข้อเสียคือสิ้นเปลืองตัวทำละลาย

2) percolation เป็นการสกัดสารแบบต่อเนื่องโดยนำพืชมาหมักกับตัวทำละลายพอขึ้นทิ้งไว้ 1 ชั่วโมง เพื่อให้พองตัวเต็มที่แล้วค่อยๆ บรรจุลงในภาชนะหลังจากนั้นเติมตัวทำละลายลงไปให้ระดับตัวทำละลายสูงเหนือพืชตัวอย่าง ประมาณ 0.5 เซนติเมตร ทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง จึงค่อยเริ่มไขเอาตัวทำละลายออก โดยค่อยเติมตัวทำละลายอย่าให้แห้ง เก็บสารสกัดจนสารสกัดสมบูรณ์ ปีบกากเอาตัวทำละลายออกมาให้มากที่สุด นำสารสกัดมารวมกันแล้วกรอง

3) เครื่องสกัดซอกซ์เลต (soxhlet extractor) เป็นการสกัดแบบต่อเนื่องใช้ตัวทำละลายที่มีจุดเดือดต่ำ สกัดโดยใช้ความร้อน ทำให้ตัวทำละลายในขวดระเหยไปแล้วกลั่นตัวลงมาในทิมเบิล (thimble) ที่บรรจุสมุนไพรไว้เมื่อตัวทำละลายในขวดที่สกัดสาร (extracting chamber) สูงถึงระดับจะทำให้สารสกัดไหลกลับลงไปในขวดนี้ เมื่อได้รับความร้อนจากหม้ออังน้ำ ตัวทำละลายจึงระเหยขึ้นไปและกระทบกับเครื่องควบแน่นจะกลั่นตัวลงมาสกัดสารใหม่วนเวียนเช่นนี้จนเกิดการสกัดสมบูรณ์ การสกัดแบบนี้จะใช้ความร้อนทำให้สารเคมีบางชนิดสลายตัวไป

4) การสกัดโดยใช้ตัวทำละลายสองชนิด (liquid-liquid extraction) เป็นการสกัดสารจากสารละลาย ซึ่งเป็นของเหลวในตัวละลายอีกชนิดหนึ่งซึ่งไม่ผสมกับตัวทำละลายชนิดแรกแบ่งเป็น 2 ชนิด คือ

- ตัวทำละลายที่สกัดเบากว่าตัวทำละลายที่ใช้ละลายสาร (extractant lighter)
- ตัวทำละลายที่สกัดหนักกว่าตัวทำละลายที่ใช้ละลายสาร (raffinate lighter)

วิธีสกัดนี้มีจุดประสงค์ คือ แยกสารที่ละลายน้ำออกจากสารที่ละลายได้ในตัวทำละลายอินทรีย์และแยกสารที่มีสมบัติเป็นกรดหรือเบส โดยสกัดด้วยสารละลายเบสและกรดตามลำดับแล้วนำมาสะเทิน แล้วนำมาสกัดใหม่ด้วยตัวทำละลายอินทรีย์อีกครั้งหนึ่ง (งามเนตร, 2553)

2.5.1 การเลือกตัวทำละลาย

ตัวทำละลายเป็นตัวแปรสำคัญในการสกัด ถ้าเลือกได้เหมาะสมการสกัดจะได้ผลดี การเลือกตัวทำละลายควรมีคุณสมบัติดังนี้

- 1) เป็นตัวทำละลายที่ละลายสารที่ต้องการสกัดได้ดี
- 2) ไม่ระเหยง่ายหรือยากไป
- 3) ไม่ทำปฏิกิริยากับสารที่เราต้องการสกัด
- 4) ไม่เป็นพิษ

5) ราคาเหมาะสม

ในการใช้ตัวทำละลายต้องอาศัยหลักเกณฑ์ต่อไปนี้

- 1) สารละลายและตัวทำละลายมีสมบัติการมีขั้วคล้ายคลึงกัน
 - 2) สารละลายที่ต้องการออกมากที่สุดและสารที่ไม่ต้องการออกมาน้อยที่สุดเช่นกัน
- แรงที่เกี่ยวข้องในการละลายที่สำคัญ คือ

- 1) dispersion force แรงเกิดจาก transient charge induced ในโมเลกุลตัวทำละลายพวกไม่มีขั้ว จะประกอบไปด้วยโมเลกุลที่รวมตัวกันไม่เป็นระเบียบ ทำให้สารที่ไม่มีขั้วเข้าไปแทรกตัวได้ง่าย
- 2) dipole - dipole force พบในตัวทำละลายมีขั้ว เกิดจากการเหนี่ยวนำโมเลกุลให้เป็นขั้วบวกและขั้วลบ ทำให้โมเลกุลของตัวทำละลายที่มีขั้วจับกันแน่น พวกที่ไม่มีขั้วแทรกตัวเข้าไปได้ยาก
- 3) H - bonding พันธะไฮโดรเจนสามารถสร้าง H-bonding กับตัวทำละลายได้ดี ก็จะละลายได้ดีด้วย

2.5.2 การทำให้สารสกัดเข้มข้น

เมื่อสกัดสารจากพืชด้วยตัวทำละลายที่เหมาะสมแล้ว สารที่ได้มักมีปริมาณเจือจางมาก ทำให้นำไปแยกส่วนไม่สะดวก และไม่มีประสิทธิภาพจึงจำเป็นต้องนำมาทำให้เข้มข้นก่อนอาจทำได้หลายวิธีคือ

1) การกลั่นในสุญญากาศ (distillation in vacuum) เป็นวิธีการระเหยแห้งโดยการระเหยตัวทำละลายออกที่อุณหภูมิต่ำ และลดความดันลงให้เกิดเป็นสุญญากาศใช้ปั๊มสุญญากาศเครื่องมือที่ใช้ คือเครื่องระเหยแบบสุญญากาศ ประกอบไปด้วยสามส่วน คือ ขวดกลั่น เครื่องควบแน่นและขวดที่รองรับสารที่กลั่นได้ ซึ่งขวดกลั่นที่ใส่ตัวอย่างจะหมุนตลอดเวลาที่ทำงานและจะแช่อยู่ในหม้ออ่างไอน้ำเพื่อให้การกระจายของไอน้ำทั่วถึงและสม่ำเสมอ

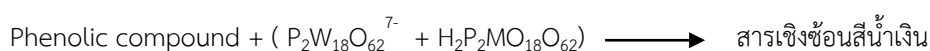
2) การระเหยแบบอิสระ (free evaporation) คือ การระเหยให้แห้งด้วยหม้ออ่างไอน้ำ หรือแผ่นให้ความร้อน บางครั้งอาจเป่าอากาศร้อนลงไปในสารสกัดด้วยเพื่อการระเหยเร็วขึ้น

3) การแช่แข็ง (freezing) ถ้าเป็นสารสกัดด้วยน้ำใช้เครื่องทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (freeze dryer) แต่ถ้าเป็นตัวทำละลายอื่นเฉพาะตัวทำละลายเท่านั้นที่แข็ง ซึ่งจะแยกด้วยการปั่นเหวี่ยง

4) อัลตราฟิลเตรชัน (ultrafiltration) เป็นการทำให้สารสกัดให้เข้มข้น โดยใช้แผ่นเมมเบรน (membrane) ใช้กับสารที่มีโมเลกุลสูงกว่า 5000

2.6 การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกโดยรวม

ในการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกโดยรวม โดยการทำปฏิกิริยากับสารละลายฟอสฟอโมลิบดโมลิบในสภาวะที่เป็นด่าง โดยอาศัยปฏิกิริยารีดอกซ์ ในการทำให้เกิดปฏิกิริยาเนื่องจากโมลิบโดทังสเตนในสารละลายฟอสฟอโมลิบซึ่งมีสีเหลืองของ Mo (VI) เมื่อได้รับอิเล็กตรอนจากสารต้านออกซิเดชันแล้วจะเปลี่ยนไปเป็นรูป Mo (V) ซึ่งมีสีน้ำเงิน ติดตามโดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 760 นาโนเมตร ด้วยเครื่องยูวี-วิสิเบิล สเปกโตรโฟโตมิเตอร์ โดยใช้กรดแกลลิกเป็นสารมาตรฐาน และรายงานในหน่วยมิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิก ต่อ 1 กรัมตัวอย่างแห้ง ซึ่งปฏิกิริยาที่เกิดขึ้น ดังสมการ



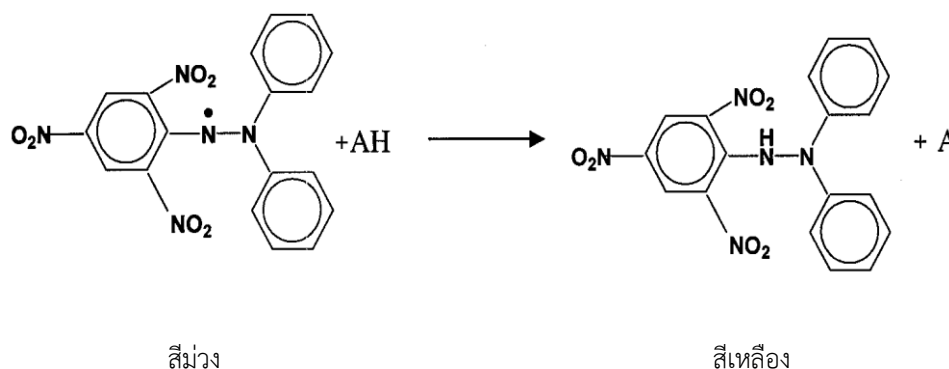
2.7 การวิเคราะห์ปริมาณสารฟลาโวนอยด์

การวิเคราะห์ปริมาณสารฟลาโวนอยด์ โดยการทำปฏิกิริยาระหว่างสารสกัดกับสารละลายอะลูมิเนียมคลอไรด์ สารละลายโซเดียมไนไตรต์ และสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 510 นาโนเมตร นำค่าที่ได้เทียบกับกราฟมาตรฐานของคาเทชินรายงานในหน่วย มิลลิกรัมสมมูลของคาเทชิน ต่อ 1 กรัม น้ำหนักแห้ง

2.8 การวัดความสามารถในการต้านการเกิดออกซิเดชัน

2.8.1 ความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระ 1, 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radicals (DPPH)

อนุมูล DPPH เป็นอนุมูลอิสระที่เสถียรและสามารถรับอิเล็กตรอนได้อีก เพื่อเปลี่ยนให้เป็นโมเลกุลที่ไม่เป็นอนุมูลอิสระ และเมื่อได้รับอะตอมไฮโดรเจนจากโมเลกุลอื่นจะทำให้สารดังกล่าวกลายเป็นโมเลกุลที่ไม่เป็นอนุมูลอิสระ ที่มีความคงตัวสูง ดังนั้นความสามารถของสารต้านการเกิดออกซิเดชันที่ศึกษาเป็นการศึกษาประสิทธิภาพของสารต้านการเกิดออกซิเดชัน ในการรวมตัวกับอนุมูลที่อยู่ในรูปอนุมูลอิสระที่เสถียรในสารละลายโดยการทดสอบจะใช้สารละลาย DPPH ซึ่งมีสีม่วงเข้มทำปฏิกิริยากับสารต้านการเกิดออกซิเดชันในระยะเวลาที่กำหนด ถ้าตัวอย่างมีปริมาณสารต้านออกซิเดชันมากจะทำให้สารละลาย DPPH มีสีอ่อนลง และวัดค่าดูดกลืนแสงของสารละลายที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร (รุ่งโรจน์, 2551) กลไกการทำปฏิกิริยามีขั้นตอนดังนี้



ภาพที่ 2.6 ปฏิกิริยาของสารต้านอนุมูลอิสระกับอนุมูล DPPH
ที่มา : ระวีวรรณ และ ทรงพร (2549)

และสามารถนำไปคำนวณเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง DPPH ได้ตามสูตร

$$\% \text{ การยับยั้ง DPPH} = \left(\frac{A_0 - A_s}{A_s} \right) \times 100$$

เมื่อ A_0 = การดูดกลืนแสงของแบล็ค (น้ำ + DPPH)

A_s = การดูดกลืนแสงของสารสกัดตัวอย่าง (สารสกัด + DPPH)

ผลการวิเคราะห์คำนวณเป็นค่าความสัมพันธ์ระหว่างสารต้านออกซิเดชัน กับสารละลายมาตรฐานโทรล๊อกซ์ (Trolox) จึงมีชื่อว่า Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) รายงานผลเป็นปริมาณไมโครโมลโทรล๊อกซ์ ต่อ 1 กรัมตัวอย่างแห้ง ($\mu\text{mol TE/g}$)

2.8.2 ความสามารถในการยับยั้งอนุมูล 2, 2'-azino-bis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid (ABTS)

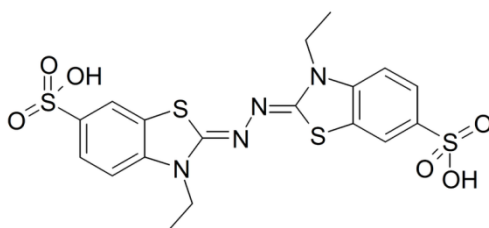
วิธีนี้เป็นวิธีวัดทางอ้อมโดยใช้สารมีสูตรโมเลกุล $C_{18}H_{18}N_4O_6S_4$ มาทำให้เป็นอนุมูลอิสระโดยการถูกออกซิไดซ์ด้วยโพแทสเซียมเปอร์ซัลเฟตให้กลายเป็น $ABTS^{+•}$ ซึ่งเป็นอนุมูลที่มีสีฟ้าเขียว มีค่าการดูดกลืนแสงที่ 660, 734 และ 820 นาโนเมตร แต่จะนิยมวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 734 นาโนเมตร โดยปรับค่าการดูดกลืนแสงเริ่มต้น $ABTS^{+•}$ ให้เป็น 0.700 ± 0.02 เมื่อเติมสารทดสอบที่มีกิจกรรมต้านออกซิเดชันจะทำให้ $ABTS^{+•}$ ลดลงซึ่งทำให้สีจางลงและสามารถนำไปคำนวณเป็นเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง $ABTS^{+•}$ ได้ตามสูตร (จุฬาลักษณ์, 2551)

$$\% \text{ การยับยั้ง } ABTS^{+•} = \left[\frac{A_0 - A_s}{A_s} \right] \times 100$$

เมื่อ A_0 = การดูดกลืนแสงของแบล็ค (น้ำ + $ABTS^{+•}$)

A_s = การดูดกลืนแสงของสารสกัดตัวอย่างหรือสารมาตรฐาน (สารสกัด + $ABTS^{+•}$)

ผลการวิเคราะห์จะคำนวณเป็นค่าความสัมพันธ์ระหว่างสารต้านออกซิเดชันกับมาตรฐานโทรลล็อกซ์ ข้อดีของวิธีนี้คือทำได้ง่ายอนุมูล $ABTS^{+•}$ ละลายได้ทั้งในน้ำและตัวทำละลายอินทรีย์ สามารถทำปฏิกิริยาอย่างรวดเร็วกับสารต้านออกซิเดชัน จึงทำให้ศึกษาได้ทั้งในสารที่ละลายในน้ำหรือละลายในไขมันส่วนข้อเสียของวิธีนี้คือ ABTS ไม่เป็นตามธรรมชาติที่ก่อให้เกิดอนุมูลในเซลล์หรือร่างกาย

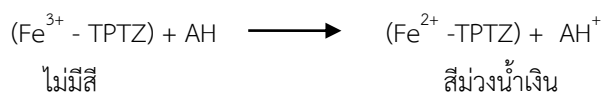


ภาพที่ 2.7 โครงสร้างทางเคมีของ ABTS

ที่มา : จุฬาลักษณ์ (2551)

2.8.3 ความสามารถในการรีดิวซ์เฟอร์ริกไอออน (ferric reducing ability power, FRAP)

วิธีนี้เป็นการวัดความสามารถในการรีดิวซ์เฟอร์ริกไอออน โดยนำมาประยุกต์ใช้ในการวัดปริมาณการยับยั้งอนุมูลอิสระในพืช ซึ่งจะเป็นการวัดการเกิดปฏิกิริยารีดักชันของสาร 2,4,6-Tripyridyl-S-triazine (TPTZ) จากสารที่ไม่มีสีกลายเป็นสารที่มีสี ภายใต้สภาวะที่เป็นกรดที่มีค่าพีเอชเท่ากับ 3.6 กลไกวิธีนี้จะเป็นการถ่ายโอนอิเล็กตรอนเดี่ยว เป็นการวัดปริมาณการยับยั้งอนุมูลอิสระที่มีอยู่ทั้งหมดในตัวอย่างที่นำมาทดสอบ ดังนั้นหากสารสกัดใดให้อิเล็กตรอนเพื่อเปลี่ยน Fe^{3+} - TPTZ ไปเป็น Fe^{2+} - TPTZ ได้จะมีความการดูดกลืนแสงเพิ่มขึ้น ซึ่งแสดงว่าสารสกัดนั้นมีความสามารถในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันโดยการรีดิวซ์เฟอร์ริกไอออน (Fe^{3+}) ไปเป็น เฟอร์รัสไอออน (Fe^{2+}) ได้ดี สารใดที่ทำให้มีค่าการดูดกลืนแสงเพิ่มขึ้นจะมีปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระมาก ดังปฏิกิริยา



ข้อแตกต่างระหว่างวิธีการวัดความสามารถในการยับยั้งอนุมูล DPPH และความสามารถในการรีดิวซ์เฟอริกไอออน (FRAP) คือ วิธี DPPH จะทดสอบการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารอนุมูลอิสระที่สามารถให้ไฮโดรเจนอะตอม หรือให้อิเล็กตรอนกับอนุมูล DPPH ได้ ส่วนวิธี FRAP เป็นการทดสอบความสามารถในการรีดิวซ์เฟอริกไอออนที่สารสกัดสามารถให้อิเล็กตรอนกับ Fe^{3+} -TPTZ (ประภัสรา, 2551)

2.9 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.9.1 งานวิจัยภายในประเทศ

อุดมลักษณ์ และคณะ (2548) ทำการสกัดน้ำมันหอมระเหยจากกานพลู ชิง และอบเชยโดยวิธีการกลั่นด้วยน้ำและไอน้ำ เพื่อศึกษาการยับยั้งเชื้อรา 4 ชนิด ในผลิตภัณฑ์ขนมอบ ได้แก่ *Aspergillus flavus*, *Eurotium sp.*, *Penicillium chrysogenum* และ เชื้อ *Rhizopus stolonifer* ด้วยวิธี disc agar diffusion พบว่า น้ำมันอบเชย ออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Eurotium sp.*, *P. chrysogenum* และ *A. flavus* ได้ดีที่สุด นอกจากนั้นพบว่าน้ำมันกานพลูออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *R. stolonifer* ในขณะที่น้ำมันอบเชยและน้ำมันขิงไม่ออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อราชนิดนี้

ระวีวรรณ และทรงพร (2549) ศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH และปริมาณสารฟีนอลรวมของสารสกัดพืชสมุนไพรไทย 8 ชนิด ในจังหวัดอุบลราชธานี ตัวทำละลายที่ใช้ คือ เอทิลแอลกอฮอล์ และเอทานอล พบว่า สารสกัดในเอทานอลแสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้สูงกว่าสารสกัดในเอทิลแอลกอฮอล์ และปริมาณสารฟีนอลรวมในสารสกัดเอทานอล มีค่าอยู่ในช่วง 5.4 ถึง 41.5 มิลลิกรัมกรดแกลลิก ต่อกรัมของสารสกัด นอกจากนี้พบว่าปริมาณสารฟีนอลรวม และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดมีความสัมพันธ์กันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

ศศิธร (2549) ศึกษาฤทธิ์ต้านออกซิเดชันโดยการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH และปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมของส่วนสกัดเอทานอลจากลำต้นใต้ดินของพืชวงศ์ Zingiberaceae 4 ชนิด ได้แก่ เร่ว (*Amomum xanthioides* Wall.) กระวาน (*Amomum krevanh* Pierre.) ว่านชักมดลูก (*Curcuma xanthorrhiza* Roxb.) และกระเทียม (*Zingiber zerumbet* Smith.) ส่วนสกัดของว่านชักมดลูกมีค่า IC_{50} เท่ากับ 292.95 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร รองลงมา คือ เร่ว กระเทียม และกระวาน มีค่า IC_{50} เท่ากับ 779.62, 824.68 และ 1,162.12 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ส่วนการทดสอบความสามารถในการรีดิวซ์ของส่วนสกัดจากพืชทุกชนิดมีลักษณะแปรผันตรงกับความเข้มข้นของสารทดสอบ โดยว่านชักมดลูกมีความสามารถในการรีดิวซ์ที่สูงอย่างเด่นชัดที่ความเข้มข้น 500 ถึง 2,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วนปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมของส่วนสกัดว่านชักมดลูก กระเทียม เร่ว และกระวาน มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมเท่ากับ 103.5, 46.6, 38.6 และ 22.1 มิลลิกรัมกรดแกลลิกต่อกรัมของส่วนสกัด ตามลำดับ

กฤติกา และคณะ (2550) ศึกษาประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย และการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของน้ำมันหอมระเหยที่สกัดจากพืชวงศ์ขิง 5 ชนิด ได้แก่ ขิง ข่า ขมิ้นชัน กระชาย และเร่วหอม โดยการต้มกลั่นและการสกัดด้วยตัวทำละลาย 2 ชนิด (ปิโตรเลียม และเอทานอล) ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบของสารหอมระเหยด้วยเทคนิคแก๊สโครมาโตกราฟี-แมสสเปกโตรเมทรี (gas chromatography-mass spectrometry, GC-MS) พบว่าสารประกอบหลักในขิง ได้แก่ ซิงจิเบอรีน (zingiberene) และฟานีซีน (farnesene) ส่วนขมิ้นชัน ได้แก่ เทอเมอร์โนน (turmerone) และเคอโลน (curlone) ในขณะที่สารประกอบหลักของข่าและเร่วหอมที่สกัดด้วยการต้มกลั่น คือ เมทิลชาวิคอล (methyl chavicol) ส่วนที่สกัดด้วยเอทานอล คือ ฟาซีโอล (farnesol) และอะนิโซล (anethole) ตามลำดับ ส่วนน้ำมันหอมระเหยของกระชายที่สกัดด้วยการต้มกลั่นและสกัดด้วยตัวทำละลายทั้ง 2 ชนิด มี β -terpinene และ geraniol เป็นสารประกอบหลักตามลำดับ ซึ่งพบว่า วิธีการสกัดน้ำมันหอมระเหยจากพืชวงศ์ขิงที่ดีที่สุด คือ การสกัดด้วยเอทานอล ซึ่งให้ปริมาณน้ำมันหอมระเหยสูงที่สุด ยกเว้น เร่วหอม ที่พบว่าเมื่อสกัดด้วยปิโตรเลียม ให้ปริมาณน้ำมันหอมระเหยสูงกว่าสกัดด้วยเอทานอล และการทดสอบโดยวิธี DPPH พบว่าสารสกัดขิงที่สกัดด้วยเอทานอล และสารสกัดขิงที่สกัดจากกาคที่เหลือน้ำมันหอมระเหยสามารถเข้าทำปฏิกิริยา กับ

อนุมูลอิสระโดยได้ค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง DPPH เท่ากับ 23.75 และ 23.01 ตามลำดับ และพบว่าความสามารถในการเข้าทำปฏิกิริยากับอนุมูลอิสระเพิ่มขึ้นเมื่อความเข้มข้นของสารสกัดสูงขึ้นเมื่อทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชันโดยวิธี β -carotene bleaching method พบว่าสารสกัดขมิ้นชันที่สกัดจากกากที่เหลือด้วยเอทานอล มีความสามารถในการยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชันได้ดีที่สุด (ร้อยละ 86.2) รองลงมาเป็นสารสกัดขมิ้นชันที่สกัดด้วยเอทานอล (ร้อยละ 78.21) สำหรับปริมาณสารประกอบฟีนอลิกโดยรวม พบสูงสุดในน้ำมันหอมระเหยที่สกัดจากกากที่เหลือด้วยเอทานอล รองลงมา ได้แก่ ขมิ้นชันที่สกัดด้วยเอทานอล ซึ่งที่สกัดด้วยเอทานอล และสารสกัดจากกากขิง มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกโดยรวมเท่ากับ 38.41, 29.62, 24.22 และ 23.55 มิลลิกรัมต่อกรัมของสารสกัด ตามลำดับ

กัญญารัตน์ ภิรมย์มัน (2550) ศึกษาฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของส่วนสกัดย่อยเฮกเซน เอทิลแอลกอฮอล์ และส่วนสกัดย่อยน้ำของต้นกระตือป๋า (*Zingiber thorelii* Gagnep.) และว่านริดสีดวง (*Curcuma* sp.) พบว่าส่วนสกัดเอทิลแอลกอฮอล์ของต้นกระตือป๋ามีฤทธิ์ในการกำจัดอนุมูล DPPH และมีฤทธิ์ในการรีดิวซ์สูงสุด รองลงมา คือ บีเอชที และกรดแอสคอร์บิก ส่วนสกัดย่อยเอทิลแอลกอฮอล์ของว่านริดสีดวงมีฤทธิ์กำจัดอนุมูล DPPH และฤทธิ์ในการรีดิวซ์สูงสุด รองลงมา คือ ส่วนสกัดย่อยเฮกเซน และส่วนสกัดย่อยน้ำ ตามลำดับ ปริมาณสารฟีนอลิกรวมในส่วนสกัดย่อยเอทิลแอลกอฮอล์ของกระตือป๋าและว่านริดสีดวงมีปริมาณสารประกอบฟีนอลรวมสูงที่สุด และพบว่าความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณสารประกอบฟีนอลิกกับฤทธิ์ต้านออกซิเดชันมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ เท่ากับ 0.9822

ดลฤดี (2551) ศึกษาผลของความร้อนต่อการเปลี่ยนแปลงปริมาณสารประกอบฟีนอลิกและความสามารถในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันในเปลือกผลไม้ 3 ชนิด ได้แก่ มะม่วงแก้ว ส้มเขียวหวาน และกล้วยน้ำว้า โดยให้ความร้อนกับเปลือกผลไม้ทั้งสามชนิดที่อุณหภูมิและระยะเวลาที่ต่างกัน คือ อุณหภูมิ 50, 100, 150, และ 200 องศาเซลเซียส ในระยะเวลา 10, 20, 40, 60, 90, และ 120 นาที พบว่า การให้ความร้อนกับเปลือกมะม่วงแก้วที่อุณหภูมิ 150 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 120 นาที สามารถเพิ่มปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดและความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ได้ สูงสุด ในขณะที่เปลือกมะม่วงแก้วผ่านความร้อนที่อุณหภูมิ 200 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที มีความสามารถในการรีดิวซ์เพอริกไอออนเพิ่มขึ้นสูงสุด การให้ความร้อนกับเปลือกส้มเขียวหวานที่อุณหภูมิ 200 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที มีผลทำให้ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH และสามารถในการรีดิวซ์เพอริกไอออนในเปลือกส้มเขียวหวานเพิ่มขึ้นสูงสุด ในขณะที่การให้ความร้อนกับเปลือกกล้วยน้ำว้าที่อุณหภูมิ 150 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที สามารถเพิ่มปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH และความสามารถในการรีดิวซ์เพอริกไอออนเพิ่มขึ้นสูงสุด

ปริญญช อินทร์รอด (2551) ศึกษาฤทธิ์ต้านออกซิเดชันและปริมาณสารประกอบฟีนอลรวมของส่วนสกัดจากต้นเร่วหอม (*Etlingera pavieana*) และว่านสาวหลง (*Amomum biflorum*) โดยใช้ตัวทำละลายในการสกัดประกอบด้วยเฮกเซน เอทิลแอลกอฮอล์ และน้ำ ผลการทดสอบพบว่า ส่วนสกัดย่อยเอทิลแอลกอฮอล์ของเร่วหอมและว่านสาวหลงมีฤทธิ์กำจัดอนุมูล DPPH สูงที่สุด รองลงมา คือ ส่วนสกัดย่อยน้ำ และส่วนสกัดย่อยเฮกเซน ตามลำดับ นอกจากนี้พบว่า ส่วนสกัดเอทิลแอลกอฮอล์ของต้นเร่วหอมและว่านสาวหลงมีความสามารถในการรีดิวซ์สูงสุด ส่วนความสามารถในการคีเลทไอออนของโลหะ พบว่าส่วนสกัดย่อยเฮกเซนของต้นเร่วหอม และส่วนสกัดย่อยน้ำของต้นว่านสาวหลงมีความสามารถในการคีเลทไอออนของโลหะสูงที่สุด ปริมาณสารประกอบฟีนอลรวมสูงที่สุดในส่วนสกัดย่อยเอทิลแอลกอฮอล์ของเร่วหอมและว่านสาวหลง มีความสัมพันธ์เชิงบวกระหว่างปริมาณสารประกอบฟีนอลรวมกับฤทธิ์การกำจัดอนุมูล DPPH ด้วยค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ เท่ากับ 0.9731

ปิยศิริ (2551) วิเคราะห์ปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระ 4 ชนิด คือ สารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด สารเบต้า-แคโรทีน วิตามินซี และวิตามินอี ในพืชพื้นบ้านในภาคใต้ 6 ชนิด คือ ผลมะขวิด ดอกดาหลา ผลหว่า ดอกเข็ม ใบตำมั่ง และใบเหมียง พบว่า สารสกัดจากพืชเกือบทั้งหมดมีสารต้านอนุมูลอิสระในปริมาณที่สามารถวิเคราะห์ได้ ยกเว้น เบต้า-แคโรทีน จากใบตำมั่ง และใบเหมียง รวมถึงวิตามินซีจากใบตำมั่ง

รุ่งโรจน์ (2551) ศึกษาสารต้านอนุมูลอิสระจากสารสกัด ผักกระถิน (*Leucaena leucocephala* wit.) ผักแว่น (*Marsdenia glabra* Cost.) และผักคาวตอง (*Houttuynia cordata* Thunb.) ในส่วนที่รับประทานได้โดยการสกัดแบบต่อเนื่องด้วยเอทิลแอลกอฮอล์ แอซีโตน และเมทานอล เพื่อหาประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH พบว่า แอซีโตนมีประสิทธิภาพในการสกัดสูงสุดโดยสารสกัดจากผักกระถิน ผักคาวตอง และผักแว่น มีการยับยั้งอนุมูลอิสระคิดเป็นร้อยละ 93.15, 90.14 และ 95.57 ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับสารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์ พบว่า สารสกัดในแอซีโตนจากผักกระถินมีประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระใกล้เคียงกับบีเอชเอ นอกจากนี้สารสกัดในแอซีโตนจากผักแว่น และผักคาวตอง มีประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระดีกว่าบีเอชเอ และการศึกษาผลของแสง อากาศ และอุณหภูมิต่อความคงตัวของสารต้านอนุมูลอิสระในสารสกัด พบว่าอากาศมีผลทำให้ประสิทธิภาพการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดลดลงมากที่สุดเมื่อเก็บรักษานาน 20 วัน

ธนศักดิ์ และคณะ (2554) ศึกษาสารประกอบฟีนอลิกและความสามารถต้านออกซิเดชันของกระชายเหลือง โดยใช้ตัวทำละลาย 4 ชนิด ได้แก่ แอซีโตน 80% เอทานอล 80% เมทานอล และน้ำ พบว่ากระชายเหลืองที่สกัดด้วยแอซีโตนมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด และปริมาณฟลาโวนอยด์มากที่สุด และยังพบว่าความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH และ ABTS^{•+} ของกระชายเหลืองที่สกัดด้วย 80% เอทานอล และแอซีโตน มีประสิทธิภาพสูงสุด

วิภาดา และยิ่งยง (2554) ศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระปริมาณสารประกอบฟีนอลิกและปริมาณแคโรทีนอยด์ของสารสกัดพืชสกุลชิง 10 ชนิด ที่มีอายุประมาณ 10 - 12 เดือน ทำให้แห้งด้วยชุดควบคุมอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และสกัดด้วยตัวทำละลาย 95% เอทานอล กลั่นที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลานาน 1 วัน กรองผ่านกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 4 และวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH พบว่า สารสกัดของ *Z. montanum* มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงสุด (IC_{50}) เท่ากับ 36.3 ± 2.60 มิลลิกรัมต่อมิลลิกรัม และไม่มีพืชสกุลชิงชนิดใดที่แสดงสมบัติการต้านอนุมูลอิสระแรงเท่ากับวิตามินซี และสารสกัดของ *Z. montanum* มีปริมาณแคโรทีนอยด์รวมสูงที่สุด 0.769 % ซึ่งฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากพืชสกุลชิงมีความแตกต่างกันในแต่ละชนิด ส่วนปริมาณแคโรทีนอยด์รวมไม่มีความสัมพันธ์กับความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ

2.9.2 งานวิจัยต่างประเทศ

Chan และคณะ (2008) ศึกษาความสัมพันธ์ของปริมาณสารประกอบฟีนอลรวมและฤทธิ์การกำจัดอนุมูล DPPH จากพืชวงศ์ชิง 26 ชนิด ซึ่งลำต้นใต้ดินของพืชวงศ์ชิง 14 ชนิด พบว่าส่วนของใบและลำต้นใต้ดินของพืช 8 ชนิด พบว่า ใบของพืชสกุล *Etlingera* มีปริมาณสารฟีนอลรวมและฤทธิ์ในการกำจัดอนุมูล DPPH สูงที่สุด โดยที่ใบของดาหลาขาวและปุดย่นแดง มีค่าสูงกว่าลำต้นใต้ดิน 7 ถึง 8 เท่า และพบว่าใบของข่า (*Alpinia galanga*) มีความสามารถในการคีเลตไอออนของโลหะ Fe^{+2} สูงกว่าลำต้นใต้ดินมากถึง 20 เท่า และพบว่าใบของดาหลาขาวแสดงฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสสูงที่สุด ตามด้วยใบของดาหลาหอม (*Etlingera fulgens*) และปุดย่นแดง ซึ่งมีความสามารถในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสสูงกว่าตัวควบคุม

Rusak และคณะ (2008) ศึกษาประสิทธิภาพของตัวทำละลายในการสกัดสารประกอบฟีนอลิกจากใบชาขาวและใบชาเขียวชนิดของ พบว่าประสิทธิภาพในการสกัดสารประกอบฟีนอลิกขึ้นอยู่กับระยะเวลาและชนิดของตัวทำละลายที่ใช้สกัด องค์ประกอบของสารประกอบฟีนอลิกที่แยกโดยเทคนิค HPLC ส่วนใหญ่ คือ คาเทชิน 4 ชนิด มีฟลาโวนอล 3 ชนิด และฟลาโวน 1 ชนิด ที่พบในปริมาณเล็กน้อย ระยะเวลาในการสกัดมีผลต่อปริมาณคาเทชินที่สกัดได้จากชาเขียวชนิดของ แต่ไม่มีผลต่อชาขาว ชาเขียวมีปริมาณสารฟีนอลิกมากกว่าชาขาว การเติมน้ำมะนาวช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการสกัดสารฟีนอลิกในชาขาว และสารละลายเอทานอล 40% มีประสิทธิภาพในการสกัดคาเทชินได้ดี

Ghasemzadeh, Jaafar และ Rahmat (2010) สกัดสารฟีนอลิกจากส่วนต่าง ๆ ได้แก่ ใบ ลำต้นใต้ดิน และ ลำต้น ของชิงอ่อนสองสายพันธุ์ (Halia Bara และ Halia Bentong) ซึ่งเป็นสมุนไพรในประเทศมาเลเซีย โดยนำตัวอย่างพืชมา ทำแห้งแบบเยือกแข็ง และสกัดด้วยเมทานอล ในอัตราส่วน 1: 50 (น้ำหนักต่อปริมาตร) โดยเยาเป็นเวลานาน 1 ชั่วโมง ที่ อุณหภูมิห้อง ด้วยเครื่องเขย่าแบบหมุน พบว่า ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์โดยรวมในส่วนสกัดจากใบสูง ที่สุด รองลงมา คือ ลำต้นใต้ดิน และลำต้น ตามลำดับ นอกจากนี้พบว่าสายพันธุ์ Halia Bara มีปริมาณสารฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์โดยรวมสูงกว่าสายพันธุ์ Halia Bentong ประสิทธิภาพในการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH ของสารสกัดจากส่วนของใบสูง กว่าส่วนของลำต้นใต้ดินและลำต้น ในขณะที่สารสกัดจากส่วนของลำต้นใต้ดินมีความสามารถในการรีดิวซ์เพอริกสูงกว่สาร สกัดจากใบ และพบว่าปริมาณสารประกอบฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ในสารสกัดจากส่วนของใบและลำต้นใต้ดินของชิงอ่อน สายพันธุ์ Halia Bara มีความสัมพันธ์เชิงบวกกับกิจกรรมการยับยั้งการเกิดออกซิเดชัน

Chew และคณะ (2011) ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดสารฟีนอลิกจากพืชสมุนไพรพื้นบ้านของ มาเลเซีย ที่ชื่อว่า Pegaga หรือ *Centella asiatica* โดยใช้เอทานอลเป็นตัวทำละลายในการสกัด โดยการแปรความเข้มข้น ของเอทานอลในน้ำ รวมทั้งศึกษาผลของอุณหภูมิและระยะเวลาในการสกัดที่แตกต่างกัน พบว่า สภาวะที่เหมาะสมในการสกัด *C. asiatica* คือ การใช้ 40% เอทานอล เป็นตัวทำละลายในการสกัดที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส นาน 60 นาที ซึ่งมีปริมาณ สารฟีนอลิกโดยรวม เท่ากับ 12.03 มิลลิกรัมกรดแกลลิกต่อกรัมตัวอย่างแห้ง ปริมาณฟลาโวนอยด์โดยรวม เท่ากับ 5.61 มิลลิกรัมคาเทชินต่อกรัมตัวอย่างแห้ง และความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH และ ABTS มีค่าเท่ากับ 19.43 และ 7.30 ไมโครโมลโทรลล็อกซ์ต่อกรัมตัวอย่างแห้ง ตามลำดับ

Ghasemzadeh, Jaafar และ Rahmat (2011) ศึกษาผลของชนิดตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดสารฟีนอลิกจากส่วนต่าง ๆ (ใบ ลำต้น และลำต้นใต้ดิน) ของชิงอ่อน 2 สายพันธุ์ (Halia Bara และ Halia Bentong) ในประเทศ มาเลเซีย โดยใช้ตัวทำละลาย 3 ชนิด ได้แก่ เมทานอล แอซีโตน และคลอโรฟอร์ม พบว่า สารสกัดด้วยเมทานอล มี ประสิทธิภาพในการสกัดสารฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์จากส่วนต่าง ๆ ของชิงอ่อนได้ดีกว่าตัวทำละลายอื่น รวมทั้ง ความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH ในสารสกัดด้วยเมทานอล มีประสิทธิภาพสูงกว่าตัวทำละลายอื่นเช่นกัน เมื่อ วิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC พบว่า องค์ประกอบหลักของสารฟลาโวนอยด์ที่พบในส่วนของชิงอ่อน คือ เคเวเชอทิน รูทีน และ คาเทชิน นอกจากนี้พบว่าปริมาณสารฟีนอลิกที่สกัดได้จากส่วนของใบชิงอ่อนทั้งสองสายพันธุ์ มีมากที่สุด รองลงมาคือ ลำต้น ใต้ดิน และลำต้น ตามลำดับ

Rosnani และคณะ (2011) ศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดสารต้านการเกิดออกซิเดชันจาก *Zingiber zerumbet* Oleoresin โดยใช้เครื่องสกัดซอกท์เลต และวางแผนทดลองโดยใช้เทคนิค Box-Behnken ซึ่งมีตัวแปร อิสระที่ศึกษา ได้แก่ ระยะเวลาในการสกัด (8, 10 และ 12 ชั่วโมง) ชนิดของตัวทำละลาย (เฮกเซน แอซีโตน และเอทานอล) และสภาวะที่ใช้ในการล้าง (ล้างด้วยไอน้ำ, ล้างด้วยน้ำร้อน และไม่ล้าง) ผลการศึกษาพบว่า ตัวแปรที่เหมาะสมที่ทำให้ปริมาณ ร้อยละของสารสกัดที่ได้และฤทธิ์การต้านออกซิเดชันสูงสุด คือ การสกัดด้วยเอทานอลในระยะเวลา 12 ชั่วโมง และไม่ล้าง ปริมาณสาร oleoresin ที่สกัดได้เท่ากับ 13.05% โดยน้ำหนัก

Shian และคณะ (2012) ศึกษาผลของตัวทำละลายต่อฤทธิ์ต้านการเกิดออกซิเดชันของสารสกัดจาก เนื้อเยื่อกล้วยโดยใช้ตัวทำละลายบริสุทธิ์ ได้แก่ เมทานอล เอทานอล แอซีโตน และสารละลายของตัวทำละลายเหล่านี้ความ เข้มข้นระหว่าง 50 – 70% พบว่า สารละลายแอซีโตน 70% มีประสิทธิภาพในการสกัดสารต้านออกซิเดชันมากกว่าตัวทำ ละลายอื่น

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 ตัวอย่างพืชในการทดลอง

ตัวอย่างพืช ที่ใช้ในงานวิจัยคือ เร่ว สายพันธุ์ *Amomum chinense* Chun ex T.L. Wu ซึ่งเก็บมาจากวัดถ้ำโสม จังหวัดมุกดาหาร โดยใช้ส่วนใบ และลำต้นใต้ดิน

3.2 สารเคมี อุปกรณ์ เครื่องแก้ว และเครื่องมือ

3.2.1 สารเคมี

- 1) เมทานอล (Methanol; CH_3OH , Merck, Germany)
- 2) อะซิโตน (Acetone; $\text{C}_3\text{H}_6\text{O}$, Merck, Germany)
- 3) เอทานอล (Ethanol; $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$, Merck, Germany)
- 4) โฟลิน-ซีโอคัลเทอ (Folin-Ciocalteu reagent: analytical grade)
- 5) โซเดียมคาร์บอเนต (Sodium carbonate anhydrous; Na_2CO_3 ; analytical grade)
- 6) กรดแกลลิก (Gallic acid; $(\text{HO})_3\text{C}_6\text{H}_2\text{CO}_2\text{H}$; analytical grade)
- 7) 1, 1'-ไดฟีนิล-2-พิกริล-ไฮไดรซัล (1, 1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl, DPPH; $\text{C}_{18}\text{H}_{12}\text{N}_5\text{O}_6$)
- 8) บัฟเฟอร์ พีเอช 3.6 ($\text{CH}_3\text{COONa} + \text{CH}_3\text{COOH}$)
- 9) 2, 4, 6 ไตรไพริดีลไตรอะซีน (2, 4, 6-tripyriddy-s-triazine, TPTZ) in 40 mM HCl
- 10) เฟอร์รัสซัลเฟตแอนไฮไดรรัส (FeSO_4)
- 11) เฟอร์ริกคลอไรด์ ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)
- 12) โทรลอคซ์ (trolox, $\text{C}_{14}\text{H}_{18}\text{O}_4$)
- 13) 2, 2'-อะซีนโนบิส -3- เอทิลเบนไทอะโซลิน-6-ซัลโฟนิก แอซิด (2, 2'-azino-bis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid))diammonium salt (ABTS, $\text{C}_{18}\text{H}_{18}\text{N}_4\text{O}_6\text{S}_4$)
- 14) โพแทสเซียมเปอร์ซัลเฟต ($\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$)
- 15) โซเดียมไนไตรท์ (NaNO_2)
- 16) โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH)
- 17) สารมาตรฐานคาเทชิน ($\text{C}_{15}\text{H}_{14}\text{O}_6$)

3.2.2 อุปกรณ์ เครื่องแก้ว

- 1) ปีกเกอร์
- 2) ขวดรูปชมพู่
- 3) ขวดปรับปริมาตร
- 4) กระบอกตวง
- 5) บิวเรต
- 6) ปิเปต
- 7) แท่งแก้วคนสารละลาย
- 8) กรวยกรอง
- 9) หลอดทดลอง
- 10) ไมโครปิเปต
- 11) นาฬิกาจับเวลา
- 12) ขวดใส่สาร
- 13) โถดูดความชื้น

3.2.3 เครื่องมือ

- 1) เครื่องยวี่-วิลเลเบิล สเปกโตรโฟโตมิเตอร์ รุ่น Lambda 12 บริษัทเพอร์กิล เอลเมอร์
- 2) เครื่อง HPLC รุ่น LC20A Series บริษัท Shimadzu
- 3) เครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิ รุ่น NB-205QF บริษัท เอ็น-ไบโอเทค
- 4) เครื่องวัดพีเอช
- 5) เครื่องระเหยสุญญากาศ
- 6) ตู้แช่แข็ง
- 7) ตู้อบลมร้อน Membert
- 8) เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 4 ตำแหน่ง บริษัทเมลเลอร์

3.3 การเตรียมตัวอย่างและการหาความชื้น

3.3.1 การเตรียมตัวอย่าง

นำเร่งมาทำความสะอาด ทำการแยกส่วนของตัวอย่างใบและลำต้นใต้ดินของเร่ง โดยส่วนใบเลือกเฉพาะใบอ่อนที่เป็นสามใบบนสุดของส่วนยอด ลำต้นใต้ดินเลือกเฉพาะส่วนที่อยู่ใต้ดิน หั่นให้มีขนาดเล็กที่สุด นำตัวอย่างไปทำแห้งโดยใช้ตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส จนน้ำหนักคงที่เก็บไว้ในภาชนะปิดสนิท เพื่อนำไปใช้ในการทดลองต่อไป

3.3.2 การหาความชื้น

ชั่งตัวอย่างใบ และลำต้นใต้ดินเร่งสด ที่ลดขนาดแล้ว 5 กรัม นำมาอบในตู้อบลมร้อนอุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส จนได้น้ำหนักคงที่ คำนวณหาปริมาณความชื้นในตัวอย่าง โดยใช้สูตร

$$\text{ปริมาณความชื้น (\%)} = \frac{\text{น้ำหนักตัวอย่างก่อนอบ} - \text{น้ำหนักตัวอย่างหลังอบ}}{\text{น้ำหนักตัวอย่างก่อนอบ}} \times 100$$

3.4 การศึกษาผลของตัวทำละลาย และระยะเวลาในการสกัดต่อปริมาณร้อยละของผลผลิตที่ได้ ปริมาณสารฟีนอลิกโดยรวม ฟลาโวนอยด์โดยรวม และความสามารถด้านการเกิดออกซิเดชันของสารสกัดจากใบและลำต้นใต้ดินของเร่ง

3.4.1 การสกัดและการหาปริมาณร้อยละผลผลิตที่ได้

ในการวิจัยครั้งนี้จะทำการสกัดตัวอย่างใบเร่งและลำต้นใต้ดินของเร่ง โดยใช้ตัวทำละลาย 4 ชนิด ได้แก่ น้ำ 80% เมทานอล 80% เอทานอล และ 80% อะซิโตน และระยะเวลาที่ใช้ในการสกัด 3 ระดับ คือ 6 12 และ 24 ชั่วโมง โดยใช้อัตราส่วนของตัวอย่างต่อตัวทำละลายเท่ากับ 1:10 (น้ำหนัก/ปริมาตร) โดยมีขั้นตอนดังนี้

1) ชั่งตัวอย่างใบและลำต้นใต้ดินที่ผ่านการอบแห้งชนิดละ 1.0000 กรัม (3 ซ้ำ) เติมตัวทำละลาย จำนวน 10 มิลลิลิตร ลงในขวดแต่ละใบปิดจุกให้สนิท

2) นำไปสกัดด้วยเครื่องเขย่า (Model NB-205 QF บริษัท N-Biotek) ที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 6 ชั่วโมง 12 ชั่วโมง และ 24 ชั่วโมง ตามลำดับ

3) นำของผสมที่สกัดได้มารองแบบสุญญากาศ หลังจากนั้นนำสารสกัดไประเหยเพื่อแยกตัวทำละลายออก โดยใช้เครื่องระเหยแบบสุญญากาศ (rotary vacuum evaporator) นำสารสกัดหยาบที่ได้ไปทำแห้งแบบเยือกแข็ง (freeze dry) แล้วชั่งน้ำหนักสารสกัดหยาบที่ได้คำนวณหาร้อยละผลผลิตที่ได้ (percentage yield) โดยใช้สูตร

$$\text{ร้อยละผลผลิตที่ได้} = \frac{\text{น้ำหนักสารสกัดหยาบ}}{\text{น้ำหนักสารตัวอย่าง}} \times 100$$

3.4.2 การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกโดยรวม

ในการวิเคราะห์หาปริมาณฟีนอลิกโดยรวม ดัดแปลงมาจากวิธีการของ Li และคณะ (2008) โดยนำสารสกัดมาทำปฏิกิริยากับสารละลายฟอลิน ในสภาวะที่เป็นเบส วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 760 นาโนเมตร ด้วยเครื่องยูวี-วิสิเบิล สเปกโตรโฟโตมิเตอร์ ใช้สารละลายกรดแกลลิกเป็นสารมาตรฐาน รายงานผลเป็นค่ามิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อ 1 กรัมตัวอย่างแห้ง (mg GAE/g dw) โดยมีขั้นตอนการทดลองดังนี้

1) ปิเปตสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิกที่มีความเข้มข้นในช่วง 10 – 100 มิลลิกรัมต่อลิตร มาชนิดละ 0.2 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง แล้วเติมสารละลายฟอลิน 1 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ 5 นาที หลังจากนั้นเติมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3) ร้อยละ 10 จำนวน 0.8 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรให้ได้ 5 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น เขย่าให้เข้ากันตั้งทิ้งไว้ 60 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 760 นาโนเมตร และสร้างกราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิก

2) ปิเปตสารสกัดตัวอย่างจำนวน 0.2 มิลลิลิตร แล้วเติมสารละลายฟอลิน 1 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ 5 นาที หลังจากนั้นเติมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3) ร้อยละ 10 จำนวน 0.8 มิลลิลิตร และปรับปริมาตรจนได้ 5 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่นเขย่าให้เข้ากันตั้งทิ้งไว้ 60 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 760 นาโนเมตร แล้วคำนวณหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกโดยรวมในสารสกัด โดยเทียบกับกราฟมาตรฐานกรดแกลลิก

3.4.3 การวิเคราะห์ปริมาณฟลาโวนอยด์โดยรวม

ในการวิเคราะห์หาปริมาณฟลาโวนอยด์โดยรวม โดยดัดแปลงจากวิธีการของ Ozsoy และคณะ (2007) โดยการทำปฏิกิริยาระหว่างสารสกัดกับสารละลายอะลูมิเนียมคลอไรด์ (AlCl_3) สารละลายโซเดียมไนไตรท์ (NaNO_2) และสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 510 นาโนเมตร นำค่าที่ได้เทียบกับกราฟมาตรฐานของคาเทชินรายงานในหน่วย มิลลิกรัมสมมูลของคาเทชิน ต่อ 1 กรัมตัวอย่างแห้ง โดยมีขั้นตอนทดลองดังนี้

1) ปิเปตสารละลายมาตรฐานคาเทชินที่มีความเข้มข้นในช่วง 10 – 100 มิลลิกรัมต่อลิตร มาชนิดละ 0.5 มิลลิลิตร แล้วเติมสารละลายโซเดียมไนไตรท์ร้อยละ 5 ปริมาตร 0.3 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ 5 นาที จากนั้นเติมสารละลายอะลูมิเนียมไตรคลอไรด์ร้อยละ 10 ปริมาตร 0.3 มิลลิลิตร และเติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 1 โมลาร์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันตั้งทิ้งไว้ 5 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 510 นาโนเมตร สร้างกราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐานคาเทชิน

2) ปิเปตสารสกัดตัวอย่างปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร แล้วเติมสารละลายโซเดียมไนไตรท์ร้อยละ 5 ปริมาตร 0.3 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ 5 นาที แล้วจากนั้นเติมสารละลายอะลูมิเนียมไตรคลอไรด์ร้อยละ 10 ปริมาตร 0.3 มิลลิลิตร และเติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 1 โมลาร์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันตั้งทิ้งไว้ 5 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 510 นาโนเมตร เทียบกับกราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐานคาเทชิน

3.4.4 ความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH

การหากิจกรรมการยับยั้งอนุมูลอิสระในสารสกัดใบและลำต้นใต้ดินของเร่ว ด้วยวิธี DPPH โดยดัดแปลงจากวิธีของ Chew และคณะ (2011) โดยมีขั้นตอนดังนี้

1) ปิเปตสารละลายมาตรฐานโทรลิกซ์ ที่มีความเข้มข้นในช่วง 0.05 – 0.4 มิลลิโมลาร์ สารสกัดตัวอย่าง และน้ำ (แบลงค์) ชนิดละ 0.2 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองแต่ละหลอด เติมสารละลาย DPPH 1.8 มิลลิลิตร ในแต่ละหลอดเขย่าแล้วทิ้งในที่มืดที่อุณหภูมิห้องนาน 30 นาที

2) วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร ด้วยเครื่องยูวี-วิสิเบิล สเปกโตรโฟโตมิเตอร์

3) คำนวณเปอร์เซ็นต์การยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH ของสารละลายมาตรฐานโทรลิกซ์และสารสกัดตัวอย่าง โดยใช้สูตรดังนี้

$$\% \text{ การยับยั้ง DPPH} = \frac{(A_0 - A_s) \times 100}{A_0}$$

เมื่อ A_0 = การดูดกลืนแสงของแบลงค์ (น้ำ+DPPH)

A_s = การดูดกลืนแสงของสารสกัดตัวอย่าง หรือสารละลายมาตรฐานไทรอล็อกซ์

(สารสกัดตัวอย่าง หรือสารละลายมาตรฐาน + DPPH)

4) นำค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH ของสารมาตรฐานไทรอล็อกซ์ (ความเข้มข้น 0.05 – 0.4 มิลลิโมลาร์) กับค่าการดูดกลืนแสง ไปสร้างกราฟมาตรฐาน

5) นำค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH ของสารสกัด ไปเทียบกับกราฟมาตรฐานสารละลายไทรอล็อกซ์ คำนวณและรายงานผลเป็นปริมาณไมโครโมลไทรอล็อกซ์ ต่อ 1 กรัมตัวอย่างแห้ง ($\mu\text{mol TE/g}$)

3.4.5 ความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS

การหากิจกรรมการยับยั้งอนุมูลอิสระของสารสกัดจากใบและลำต้นใต้ดินของเร่ว โดยดัดแปลงจากวิธีของ Chew และคณะ (2011) โดยมีขั้นตอนดังนี้

1) ปิเปตสารละลายมาตรฐานไทรอล็อกซ์ที่มีความเข้มข้นในช่วง 0.05 – 0.4 มิลลิโมลาร์ สารละลายตัวอย่าง และน้ำ (แบลงค์) ชนิดละ 0.2 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองแต่ละหลอด เติมสารละลาย $\text{ABTS}^{+\cdot}$ 1.8 มิลลิลิตร ในแต่ละหลอด เขย่าแล้วทิ้งในที่มืดที่อุณหภูมิห้องนาน 30 นาที

2) วัดค่าการดูดกลืนแสงของสารในแต่ละหลอด ที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร ด้วยเครื่องยูวี-วิสิเบิล สเปกโตรโฟโตมิเตอร์

3) คำนวณเปอร์เซ็นต์การยับยั้งอนุมูลอิสระ $\text{ABTS}^{+\cdot}$ ของสารสกัด และสารละลายมาตรฐานไทรอล็อกซ์ โดยใช้สูตร

$$\% \text{ การยับยั้ง ABTS}^{+\cdot} = \frac{(A_0 - A_s) \times 100}{A_0}$$

เมื่อ A_0 = การดูดกลืนแสงของแบลงค์ (น้ำ+ $\text{ABTS}^{+\cdot}$)

A_s = การดูดกลืนแสงของสารสกัดตัวอย่าง หรือสารละลายมาตรฐานไทรอล็อกซ์ (สารสกัดตัวอย่าง หรือสารละลายมาตรฐาน + $\text{ABTS}^{+\cdot}$)

4) นำค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งอนุมูลอิสระ $\text{ABTS}^{+\cdot}$ ของสารละลายมาตรฐานไทรอล็อกซ์ แต่ละความเข้มข้น 0.05 – 0.4 มิลลิโมลาร์ ไปสร้างกราฟมาตรฐาน

5) นำค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งอนุมูลอิสระ $\text{ABTS}^{+\cdot}$ ของสารสกัดตัวอย่าง เทียบกับกราฟมาตรฐานสารละลายไทรอล็อกซ์ และรายงานผลการยับยั้งอนุมูลอิสระ ABTS ของสารสกัด เป็นปริมาณไมโครโมลไทรอล็อกซ์ ต่อ 1 กรัมตัวอย่างแห้ง ($\mu\text{mol TE/g}$)

3.4.6 การวัดความสามารถในการรีดิวซ์เฟอร์ริกไอออน (ferric reducing ability power, FRAP)

เป็นการวัดความสามารถในการเป็นตัวรีดิวซ์ของสารต้านอนุมูลอิสระในสารตัวอย่าง โดยดัดแปลงจากวิธีของ Benzie และ Szeto (1999) โดยมีขั้นตอนดังนี้

1) ปิเปตสารละลายมาตรฐานเฟอร์รัสซัลเฟตที่มีความเข้มข้นในช่วง 0.05 – 0.4 มิลลิโมลาร์ และสารสกัดตัวอย่าง ชนิดละ 0.2 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองแต่ละหลอด เติม FRAP reagent 1.8 มิลลิลิตร ในแต่ละหลอด เขย่าแล้วนำวางใน water bath ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 30 นาที

- 2) วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 593 นาโนเมตร ด้วยเครื่องยูวี-วิสิเบิลสเปกโตรโฟโตมิเตอร์
- 3) นำค่าการดูดกลืนแสงและความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานเพอร์สซัลเฟต ไปสร้างกราฟมาตรฐาน
- 4) คำนวณความสามารถในการเป็นตัวรีดิวซ์ของสารต้านอนุมูลอิสระในสารสกัดตัวอย่าง โดย

เทียบกับสารละลายมาตรฐานเพอร์สซัลเฟต รายงานในรูปของไมโครโมลเพอร์สซัลเฟต ต่อ 1 กรัมตัวอย่างแห้ง

3.5 การวิเคราะห์ชนิดและปริมาณของสารประกอบฟีนอลิก และฟลาโวนอยด์ โดยเครื่อง HPLC

เป็นการวิเคราะห์ชนิดและปริมาณสารประกอบฟีนอลิก และฟลาโวนอยด์ ในสารสกัดจากส่วนลำต้นใต้ดิน ส่วนของใบเร็ว และขาในเร็ว โดยใช้เครื่อง HPLC ยี่ห้อ Shimadzu , PDA detector โดยดัดแปลงจากวิธีของ Sbutsat and Siriamornpun (2010) โดยมีขั้นตอนดังนี้

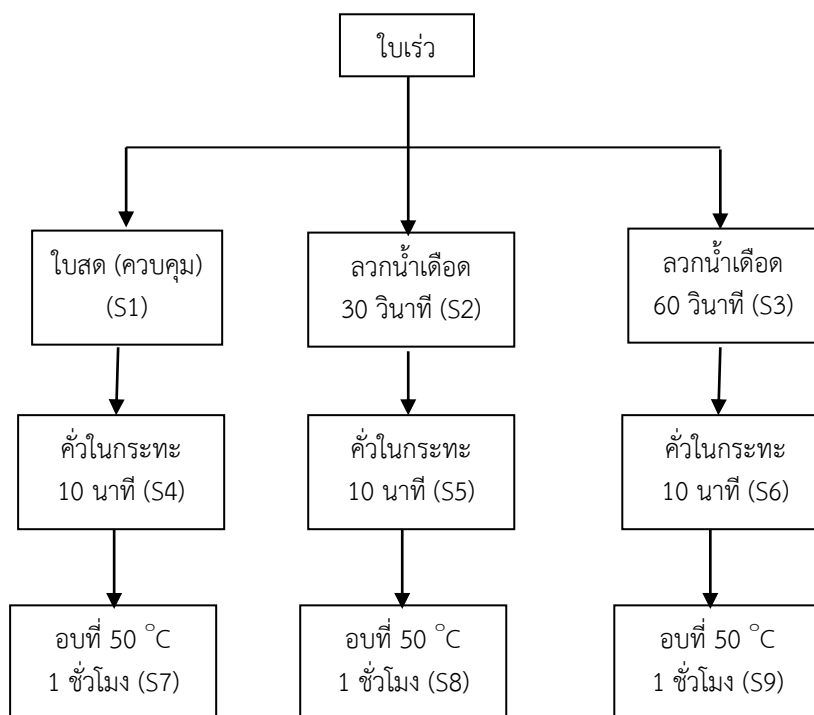
1) นำสารสกัดที่ได้ไปกรองผ่าน syringe tip filter PTFE ขนาด 0.45 ไมโครเมตร เก็บไว้ในขวด vial สีชา ขนาด 2 มิลลิลิตร

2) ฉีดสารสกัด 20 ไมโครลิตร เข้าเครื่อง HPLC โดยใช้คอลัมน์ Intertsil ODS-5 μm x 4.6 mm x 250 mm โดยใช้เฟสเคลื่อนที่ประกอบด้วย 1% กรดแอซีติก (A) และแอซีโตไนไทรล์ (B) การชะด้วยอัตราเร็ว 0.8 มิลลิลิตรต่อนาที ที่ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ระบบแกรเดียนท์ ดังนี้ 0 นาที (95:5) 5 นาที (91:9) 22 นาที (88:12) 38 นาที (82:18) 43 นาที (77:23) 44 นาที (10:90) 45 นาที (80:20) และคงไว้นานถึง 55 นาที และ 60 นาที (95:5)

3) ตรวจวัดอนุพันธ์ของกรดไฮดรอกซีเบนโซอิกและฟลาโวนอล ที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร อนุพันธ์ กรดไฮดรอกซีซินนามิก ที่ความยาวคลื่น 320 นาโนเมตร และฟลาโวนอลที่ความยาวคลื่น 360 นาโนเมตร คำนวณโดยการ เทียบกับกราฟมาตรฐานของสารละลายกรดฟีนอลิก และฟลาโวนอยด์แต่ละชนิด

3.6 การศึกษาผลของการเตรียมขึ้นต้นต่อปริมาณสารฟีนอลิกและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของใบเร็วในระหว่างกระบวนการผลิตชาใบเร็ว

โดยแบ่งตัวอย่างใบเร็วเป็น 3 กลุ่ม คือ ใบเร็วสด (ควบคุม, S1) ใบเร็วที่ลวกในน้ำเดือดนาน 30 วินาที (S2) และใบเร็วที่ลวกในน้ำเดือด นาน 60 วินาที (S3) หลังจากนั้นนำใบเร็วทั้ง 3 กลุ่ม ไปทำการผลิตเป็นชาใบเร็วตามกระบวนการผลิตชา สมุนไพรในครัวเรือน (ภาพที่ 3.1) โดยเริ่มจากการนำใบเร็วไปล้างทำความสะอาด และกรีดเอาเส้นกลางใบออก นำไปลวกใน น้ำเดือด และจุ่มลงในน้ำเย็น ผึ่งให้สะเด็ดน้ำ แล้วหั่นเป็นฝอย นำไปคั่วบนกระทะไฟปานกลางนาน 10 นาที หลังจากนั้นนำไป อบในตู้อบลมร้อนอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 1 ชั่วโมง นำมาบรรจุลงในซองชาปิดผนึก ได้ตัวอย่างผลิตภัณฑ์ชา ใบเร็ว (S7 S8 และ S9) และนำตัวอย่างในแต่ละขั้นตอนไปตรวจวิเคราะห์ปริมาณความชื้น ปริมาณสารฟีนอลิก ฟลาโวนอยด์ โดยรวม ทดสอบฤทธิ์ด้านการเกิดออกซิเดชันทั้ง 3 วิธี รวมทั้งวิเคราะห์องค์ประกอบของกรดฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์



ภาพที่ 3.1 ขั้นตอนการผลิตชาใบเร่ว

3.7 ศึกษาผลของวิธีการสกัดชาใบเร่วที่มีการชงต่างกัน

นำตัวอย่างผลิตภัณฑ์ชาใบเร่วในขั้นตอนสุดท้าย (S7 S8 และ S9) มาศึกษาผลของวิธีการสกัด โดยการเขย่าด้วยน้ำ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 6 ชั่วโมง เทียบกับการชงด้วยน้ำร้อน 95 ± 2 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที หลังจากนั้นนำ สารสกัดที่ได้ไปวิเคราะห์หาสารฟีนอลิก ฟลาโวนอยด์โดยรวม ทดสอบประสิทธิภาพในการต้านการเกิดออกซิเดชัน และ วิเคราะห์องค์ประกอบของกรดฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์โดยเครื่อง HPLC

3.8 การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

ในการทดลองครั้งนี้ทำการสกัดตัวอย่างชนิดละ 3 ซ้ำ ข้อมูลปริมาณความชื้น ร้อยละผลผลิตที่ได้ ปริมาณ สารประกอบฟีนอลิกโดยรวม ปริมาณฟลาโวนอยด์โดยรวม ความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH, ABTS⁺ และ ความสามารถในการรีดิวซ์เฟอริกไอออน รายงานในรูปค่าเฉลี่ย $\pm$ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน และวิเคราะห์ความแปรปรวนทาง เดียวโดยใช้โปรแกรม SPSS เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's multiple range test ที่ระดับนัยสำคัญ $p \leq 0.05$ และ วิเคราะห์ค่าความสัมพันธ์ระหว่างสารประกอบฟีนอลิกโดยรวม และความสามารถต้านการเกิดออกซิเดชันโดยประเมินจากค่า สัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์เพียร์สัน (Pearson's correlation coefficient)

บทที่ 4
ผลการวิจัยและอภิปรายผล

ตอนที่ 1 ศึกษาผลของชนิดตัวทำละลายและระยะเวลาในการสกัดสารประกอบฟีนอลิกและการทดสอบฤทธิ์ต้านการเกิดออกซิเดชันในส่วนของลำต้นใต้ดินและใบเร่ว

เมื่อนำส่วนของลำต้นใต้ดิน และใบเร่วมาสกัดด้วยตัวทำละลาย 4 ชนิด ประกอบด้วย น้ำ สารละลาย 80% เมทานอล 80% เอทานอล และ 80% แอซีโตน และใช้ระยะเวลาในการสกัดต่างกัน 3 ช่วง คือ 6 ชั่วโมง 12 ชั่วโมง และ 24 ชั่วโมง ผลการวิจัยพบว่า

4.1 ปริมาณสารสกัดที่ได้ ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกโดยรวมและฟลาโวนอยด์โดยรวมในสารสกัดใบเร่วและลำต้นใต้ดินเร่ว

ตารางที่ 4.1 ปริมาณสารสกัดที่ได้ สารประกอบฟีนอลิกโดยรวม และฟลาโวนอยด์โดยรวม ในใบเร่ว และลำต้นใต้ดินเร่ว ที่สกัดด้วยตัวทำละลายและระยะเวลาต่างกัน

เวลา (ชั่วโมง)	ตัวทำละลาย	ใบเร่ว			ลำต้นใต้ดิน		
		%yield (g/100 g dw)	TPC (mg GAE/g dw)	TFC (mg CC/g dw)	%yield (g/100 g dw)	TPC (mg GAE/g dw)	TFC (mg CC/g dw)
6	น้ำกลั่น	2.23 ± 0.60 d	0.50 ± 0.05 g	0.47 ± 0.07 f	3.97 ± 0.03 bc	0.19 ± 0.01 d	0.27 ± 0.01 c
	80% เมทานอล	6.27 ± 0.49 b	7.06 ± 0.53 bc	7.37 ± 0.38 b	6.72 ± 0.11 a	2.86 ± 0.32 ab	3.48 ± 0.51 b
	80% เอทานอล	5.50 ± 0.67 b	5.26 ± 0.36 de	5.45 ± 0.14 de	6.08 ± 0.08 a	2.88 ± 0.50 ab	4.16 ± 0.42 a
	80% แอซีโตน	3.75 ± 0.75 c	4.41 ± 0.48 ef	4.51 ± 0.23 e	3.23 ± 0.02 c	1.78 ± 0.25 c	4.52 ± 0.23 a
12	น้ำกลั่น	2.48 ± 0.17 d	0.22 ± 0.04 h	0.40 ± 0.04 f	4.18 ± 0.36 b	0.21 ± 0.03 d	0.31 ± 0.02 c
	80% เมทานอล	7.20 ± 0.42 a	8.33 ± 1.55 a	9.04 ± 0.94 a	6.78 ± 0.13 a	2.50 ± 0.65 b	2.99 ± 0.37 b
	80% เอทานอล	6.43 ± 0.24 ab	5.95 ± 0.34 cd	6.42 ± 0.84 c	6.20 ± 0.27 a	2.90 ± 0.49 ab	4.08 ± 0.41 a
	80% แอซีโตน	4.95 ± 0.61 c	4.71 ± 0.55 def	5.04 ± 0.22 de	2.71 ± 0.36 c	1.91 ± 0.35 c	4.23 ± 0.29 a
24	น้ำกลั่น	2.68 ± 0.25 d	0.06 ± 0.01 i	0.14 ± 0.01 g	3.32 ± 0.05 bc	0.22 ± 0.06 d	0.56 ± 0.19 c
	80% เมทานอล	6.45 ± 0.69 ab	7.63 ± 1.18 ab	8.75 ± 0.97 a	6.64 ± 0.05 a	2.77 ± 0.16 ab	2.99 ± 0.58 b
	80% เอทานอล	6.12 ± 0.44 b	5.82 ± 0.65 d	5.67 ± 0.63 cd	5.86 ± 0.09 a	3.18 ± 0.07 a	4.08 ± 0.11 a
	80% แอซีโตน	4.41 ± 0.50 c	3.91 ± 0.59 f	5.10 ± 0.18 de	2.67 ± 0.27 c	1.92 ± 0.29 c	4.23 ± 0.09 a

ตัวอักษรต่างกัน (a-i) ในคอลัมน์เดียวกันมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < .05$)

จากข้อมูลในตารางที่ 4.1 ปริมาณผลผลิตที่สกัดได้จากส่วนของใบในตัวทำละลายต่างกัน มีปริมาณแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) โดยที่สารสกัดด้วย 80% เมทานอล และ 80% เอทานอลในส่วนของใบเร่วมีปริมาณสารสกัดที่ได้สูงกว่าสารสกัดด้วย 80% อะซีโตนและน้ำ ในทำนองเดียวกันสารสกัดจากส่วนของลำต้นใต้ดินของเร่วที่สกัดด้วย 80% เมทานอล และ 80% เอทานอล มีปริมาณสารสกัดที่ได้สูงกว่าสารสกัดด้วยน้ำและสารสกัดด้วย 80% อะซีโตน และพบว่าสารสกัดจากส่วนของใบเร่วมีปริมาณสารสกัดที่ได้สูงกว่าสารสกัดจากส่วนของลำต้นใต้ดินในตัวทำละลายทุกชนิดที่ใช้

เมื่อพิจารณาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดในสารสกัดจากใบ พบว่า สารสกัด 80% เมทานอล นาน 12 ชั่วโมง จะให้ปริมาณสารฟีนอลิกโดยรวมสูงที่สุด รองลงไปคือ สารสกัด 80% เมทานอล นาน 24 ชั่วโมง และ 6 ชั่วโมง ตามลำดับ ในขณะที่ สารสกัดด้วยน้ำ มีปริมาณสารฟีนอลิกโดยรวมต่ำที่สุด และเมื่อเวลาในการสกัดเพิ่มขึ้นปริมาณสารฟีนอลิกในสารสกัดด้วยน้ำมีปริมาณลดลง ซึ่งผลการทดลองสอดคล้องกับงานวิจัยของ Ghasemzadeh et al (2011) พบว่าเมทานอลเป็นตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดสารประกอบฟีนอลิกจากชิงอ่อนได้มากกว่าตัวทำละลายอื่น

สำหรับสารสกัดจากลำต้นใต้ดินของเร่ว พบว่า การสกัดด้วย 80% เอทานอล นาน 24 ชั่วโมง มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกโดยรวมสูงที่สุด แต่อย่างไรก็ตามพบว่า การสกัดด้วย 80% เมทานอล และ 80% เอทานอล ในระยะเวลาการสกัด 6 ชั่วโมง และ 12 ชั่วโมง มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกโดยรวมไม่แตกต่างกัน ซึ่งมีปริมาณฟีนอลิกสูงกว่าสารสกัดด้วย 80% อะซิโตน และ สารสกัดด้วยน้ำ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ ระวีวรรณ และทรงพร (2549) ที่ศึกษาปริมาณสารฟีนอลิกในพืชสมุนไพรที่พบทั่วไป ในจังหวัดอุบลราชธานี ได้แก่ เหียง กระบก แมงลักคา หูเสือ มะพอก มะสัง และตูมกาขาว พบว่า สารสกัดจากเอทานอลใน สมุนไพรไทย 8 ชนิด มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกสูงกว่าสารสกัดด้วยเอทิลอะซิเตท และสารสกัดด้วยน้ำ มีปริมาณ สารประกอบฟีนอลิกต่ำที่สุด

ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดในสารสกัดจากส่วนของใบเร่ว สูงกว่าในสารสกัดจากส่วนของลำต้นใต้ดินประมาณ 2 เท่า ในทุกตัวทำละลาย ยกเว้นในสารสกัดด้วยน้ำที่มีปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมดในใบและลำต้นใต้ดินไม่แตกต่างกัน

เมื่อพิจารณาปริมาณฟลาโวนอยด์โดยรวมในสารสกัดจากใบเร่ว พบว่า สารสกัดด้วย 80% เมทานอล ที่ระยะเวลาในการ สกัด 12 ชั่วโมง มีปริมาณฟลาโวนอยด์สูงที่สุด และไม่แตกต่างกับที่สกัดนาน 24 ชั่วโมง รองลงมา คือ สารสกัด 80% เอทานอล และสารสกัดด้วย 80% แอซิโตน นาน 12 ชั่วโมง และ 24 ชั่วโมง ตามลำดับ มีปริมาณฟลาโวนอยด์ ไม่แตกต่างกัน ส่วนสารสกัด ด้วยน้ำ มีปริมาณฟลาโวนอยด์ต่ำสุด และเมื่อเวลาสกัดนานขึ้นปริมาณสารฟลาโวนอยด์ที่ได้ลดลง

ในขณะที่สารสกัดจากลำต้นใต้ดินเร่ว พบว่า สารสกัด 80% แอซิโตน และสารสกัด 80% เอทานอล มีปริมาณ สารประกอบฟลาโวนอยด์โดยรวมสูงที่สุด และไม่แตกต่างเมื่อระยะเวลาการสกัดต่างกัน รองลงมา คือ สารสกัด 80% เมทานอล และสารสกัดด้วยน้ำ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ ธนศักดิ์ และคณะ (2554) ศึกษาผลของตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดกระชาย เหลือง พบว่า สารสกัดแอซิโตนมีปริมาณฟลาโวนอยด์มากที่สุด รองลงมา ได้แก่ สารสกัด 80% เอทานอล สารสกัด 80% เมทานอล และน้ำ ตามลำดับ

นอกจากนี้พบว่า สารสกัดจากใบเร่วในตัวทำละลายแต่ละชนิด มีปริมาณฟลาโวนอยด์โดยรวมสูงกว่าสารสกัดจากลำต้น ใต้ดินเร่ว ยกเว้นสารสกัดด้วยน้ำมีปริมาณฟลาโวนอยด์โดยรวมไม่แตกต่างกัน

4.2 ผลการทดสอบฤทธิ์การต้านออกซิเดชันของสารสกัดจากใบเร่ว และลำต้นไต้ดินเร่ว โดยวิธี DPPH ABTS และ FRAP

ตารางที่ 4.2 ฤทธิ์ต้านออกซิเดชันในใบเร่วและลำต้นไต้ดินเร่วที่สกัดด้วยตัวทำละลายและระยะเวลาต่างกัน

เวลา (ชั่วโมง)	ตัวทำละลาย	ใบเร่ว			ลำต้นไต้ดิน		
		DPPH	ABTS	FRAP	DPPH	ABTS	FRAP
		($\mu\text{mol TE/g dw}$)	($\mu\text{mol TE/g dw}$)	($\mu\text{mol TE/g dw}$)	($\mu\text{mol TE/g dw}$)	($\mu\text{mol TE/g dw}$)	($\mu\text{mol TE/g dw}$)
6	น้ำกลั่น	1.18 $\pm$ 0.07 e	1.10 $\pm$ 0.06 g	3.93 $\pm$ 0.15 f	0.97 $\pm$ 0.01 d	0.57 $\pm$ 0.03 e	2.27 $\pm$ 0.03 g
	80% เมทานอล	71.93 $\pm$ 1.51 a	50.04 $\pm$ 3.75 a	82.50 $\pm$ 3.39 b	7.25 $\pm$ 0.12 a	15.50 $\pm$ 0.22 a	11.78 $\pm$ 1.65 f
	80% เอทานอล	55.35 $\pm$ 4.77 d	38.62 $\pm$ 1.05 d	54.58 $\pm$ 2.29 cd	7.07 $\pm$ 0.25 a	15.58 $\pm$ 0.09 a	61.68 $\pm$ 4.58 a
	80% แอซีโตน	0.97 $\pm$ 0.19 e	13.79 $\pm$ 1.33 e	49.88 $\pm$ 7.93 de	1.47 $\pm$ 0.07 c	9.02 $\pm$ 0.55 c	37.91 $\pm$ 6.57 de
12	น้ำกลั่น	0.97 $\pm$ 0.11 e	0.43 $\pm$ 0.10 h	1.49 $\pm$ 0.40 g	0.96 $\pm$ 0.06 d	0.77 $\pm$ 0.02 e	2.33 $\pm$ 0.25 g
	80% เมทานอล	70.22 $\pm$ 1.97 ab	46.27 $\pm$ 2.24 b	117.89 $\pm$ 10.74 a	7.07 $\pm$ 0.14 a	15.70 $\pm$ 0.29 a	42.82 $\pm$ 2.34 cd
	80% เอทานอล	65.56 $\pm$ 4.28 c	42.64 $\pm$ 1.76 c	79.02 $\pm$ 1.93 b	7.26 $\pm$ 0.25 a	15.74 $\pm$ 0.06 a	54.35 $\pm$ 0.50 b
	80% แอซีโตน	0.71 $\pm$ 0.14 e	6.73 $\pm$ 1.02 f	53.27 $\pm$ 6.87 cd	1.54 $\pm$ 0.09 c	8.16 $\pm$ 0.53 d	32.42 $\pm$ 5.82 e
24	น้ำกลั่น	0.44 $\pm$ 0.09 f	0.29 $\pm$ 0.06 h	0.09 $\pm$ 0.02 h	0.33 $\pm$ 0.20 e	0.87 $\pm$ 0.17 e	1.65 $\pm$ 0.07 h
	80% เมทานอล	66.37 $\pm$ 3.96 bc	46.32 $\pm$ 2.86 b	86.54 $\pm$ 7.94 b	7.30 $\pm$ 0.31 a	15.21 $\pm$ 0.19 a	46.60 $\pm$ 3.62 c
	80% เอทานอล	62.17 $\pm$ 2.70 c	37.21 $\pm$ 1.84 d	60.79 $\pm$ 3.05 c	6.70 $\pm$ 0.16 b	13.32 $\pm$ 0.60 b	52.93 $\pm$ 3.08 b
	80% แอซีโตน	0.75 $\pm$ 0.15 e	7.36 $\pm$ 1.13 f	43.55 $\pm$ 4.01 e	1.66 $\pm$ 0.19 c	8.76 $\pm$ 0.73 c	33.40 $\pm$ 5.79 e

ตัวอักษรต่างกัน (a-h) ในคอลัมน์เดียวกันมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < .05$)

จากตารางที่ 4.2 พบว่า ความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH และ ABTS ของสารสกัดจากใบเร่ว ที่สกัดด้วยสารละลาย 80% เมทานอล เวลา 6 ชั่วโมง มีประสิทธิภาพในการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH และ ABTS ได้ดีที่สุด และระยะเวลาสกัด 12 ชั่วโมง มีความสามารถในการรีดิวซ์ดีที่สุด รองลงมา คือ สารสกัดจากใบเร่วที่สกัดด้วย 80% เอทานอล ที่เวลา 12 ชั่วโมง และ 6 ชั่วโมง ตามลำดับ ตามด้วยสารสกัดด้วย 80% แอซีโตน และน้ำ

สำหรับส่วนสกัดจากลำต้นไต้ดินเร่ว พบว่า ส่วนสกัดด้วย 80% เมทานอล และ 80% เอทานอล มีประสิทธิภาพในการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH และ ABTS ไม่แตกต่างกันที่ระยะเวลาการสกัด 6 ชั่วโมง และ 12 ชั่วโมง ส่วน 24 ชั่วโมง พบว่าส่วนสกัด 80% เมทานอล มีประสิทธิภาพการยับยั้งสูงกว่า 80% เอทานอล ตามด้วยส่วนสกัด 80% แอซีโตน และน้ำตามลำดับ

นอกจากนั้นเมื่อเปรียบเทียบระหว่างสารสกัดจากใบเร่วกับสารสกัดจากลำต้นไต้ดินเร่ว พบว่า ส่วนสกัด 80% เมทานอล และ 80% เอทานอล ในส่วนของใบเร่ว มีความสามารถในการยับยั้ง ABTS สูงกว่าสารสกัดจากลำต้นไต้ดินเร่ว ประมาณ 6.5 และ 5.5 เท่า ตามลำดับ ยกเว้นสารสกัดด้วยน้ำของลำต้นไต้ดินเร่ว ที่เวลาสกัด 12 ชั่วโมง และ 24 ชั่วโมง มีประสิทธิภาพการยับยั้งอนุมูล ABTS สูงกว่าสารสกัดจากใบเร่ว ประมาณ 1.5 เท่า

สำหรับความสามารถในการรีดิวซ์โดยวิธี FRAP พบว่า ส่วนสกัดจากใบเร่ว ด้วย 80% เมทานอล นาน 12 ชั่วโมง มีความสามารถในการรีดิวซ์สูงที่สุด รองลงไป คือ ส่วนสกัด 80% เมทานอล ที่เวลา 6 ชั่วโมง และส่วนสกัด 80% เอทานอล 12 ชั่วโมง ไม่แตกต่างกัน ตามด้วยส่วนสกัด 80% แอซีโตน และน้ำตามลำดับ

ในขณะที่สารสกัดจากส่วนของลำต้นไต้ดินเร่ว ที่สกัดด้วย 80% เอทานอล มีความสามารถในการรีดิวซ์โดยวิธี FRAP สูงกว่าส่วนสกัดในตัวทำละลายอื่น ๆ ในทุกช่วงระยะเวลาที่สกัด

เมื่อเปรียบเทียบระหว่างส่วนสกัดจากใบเร็วและลำต้นใต้ดินเร็ว พบว่า สารสกัดจากใบเร็วด้วย 80% เมทานอล มีความสามารถในการรีดิวซ์สูงกว่าลำต้นใต้ดินเร็ว ประมาณ 2 เท่า ส่วนสารสกัดด้วย 80% เอทานอล และ 80% แอซีโตน ในส่วนของใบเร็วมีความสามารถสูงกว่าส่วนของลำต้นใต้ดินประมาณ 1 เท่า

4.3 ความสัมพันธ์ระหว่างสารประกอบฟีนอลิกกับฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของสารสกัดใบเร็ว และลำต้นใต้ดินเร็ว

ตารางที่ 4.3 สัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ระหว่างสารประกอบฟีนอลิกโดยรวม ฟลาโวนอยด์โดยรวม และกิจกรรมการยับยั้งการเกิดออกซิเดชันของสารสกัดจากใบเร็ว และลำต้นใต้ดินเร็ว ที่สกัดด้วยตัวทำละลายและระยะเวลาในการสกัดต่างกัน

	ใบเร็ว					ลำต้นใต้ดินเร็ว				
	TPC	TFC	DPPH	ABTS	FRAP	TPC	TFC	DPPH	ABTS	FRAP
TPC	1	.982**	.805**	.873**	.975**	1	.823**	.846**	.944**	.827**
TFC	.982**	1	.784**	.853**	.969**	.823**	1	.468**	.753**	.789**
DPPH	.805**	.784**	1	.977**	.805**	.846**	.468**	1	.916**	.668**
ABTS	.873**	.853**	.977**	1	.868**	.944**	.753**	.916**	1	.798**
FRAP	.975**	.969**	.805**	.868**	1	.827**	.789**	.668**	.798**	1

หมายเหตุ ** ที่ระดับนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.01$)

* ที่ระดับนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

จากตารางที่ 4.3 พบว่า ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดในสารสกัดของใบเร็วมีความสัมพันธ์เชิงบวกสูงมากกับปริมาณสารฟลาโวนอยด์ และกิจกรรมการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH และ ABTS⁺⁺ รวมทั้งมีความสัมพันธ์กับความสามารถในการรีดิวซ์เฟอริกไอออน แสดงว่าสารประกอบที่มีอยู่ในใบเร็วมีความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH และ ABTS⁺⁺ และมีความสามารถในการรีดิวซ์เฟอริกไอออนเนื่องจากปริมาณสารประกอบฟีนอลิกที่มีอยู่ในสารสกัด

ในทำนองเดียวกันปริมาณสารประกอบฟีนอลิกโดยรวม และฟลาโวนอยด์โดยรวมในสารสกัดของลำต้นใต้ดินเร็ว มีความสัมพันธ์เชิงบวกกับกิจกรรมต้านการเกิดออกซิเดชันในการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH และ ABTS

ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด ปริมาณฟลาโวนอยด์ในสารสกัดของลำต้นใต้ดินเร็ว มีความสัมพันธ์เชิงบวกสูงมากกับความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH ($r = 0.865$, $p \leq 0.01$) และ ABTS⁺⁺ ($r = 0.862$, $p \leq 0.01$) และมีความสัมพันธ์กับความสามารถในการรีดิวซ์เฟอริกไอออน ($r = 0.950$, $p \leq 0.05$)

4.4 ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบของสารฟีนอลิกโดยเทคนิค HPLC

ตารางที่ 4.4 องค์ประกอบของกรดฟีนอลิกในสารสกัดใบเร่วในตัวทำละลายและระยะเวลาในการสกัดต่างกัน

ตัวทำละลาย	เวลาสกัด (ชั่วโมง)	ปริมาณองค์ประกอบของกรดฟีนอลิก (µg/g)						
		ChA	CFA	FA	SnA	EA	CmA	Total PA
น้ำกลั่น	6	146.58 ± 5.73 f	20.57 ± 1.68 h	30.61 ± 1.21 g	2.05 ± 0.10 f	6.71 ± 0.47 gh	1.28 ± 0.25 e	207.80 ± 6.12 g
	12	163.37 ± 6.07 f	35.54 ± 3.36 g	15.83 ± 0.63 h	2.08 ± 0.12 f	5.25 ± 0.53 h	0.53 ± 0.03 e	222.60 ± 6.99 g
	24	190.82 ± 4.49 f	37.09 ± 1.56 g	15.14 ± 0.65 h	4.25 ± 0.84 f	3.58 ± 0.39 h	1.99 ± 0.26 e	252.87 ± 4.89 g
80% เมทานอล	6	1747.59 ± 44.73 a	187.85 ± 8.61 a	285.83 ± 9.60 a	39.78 ± 0.72 a	68.77 ± 4.53 a	711.97 ± 48.64 a	3041.79 ± 67.48 a
	12	1441.21 ± 74.36 b	150.47 ± 6.15 b	241.02 ± 4.90 c	33.97 ± 4.05 bc	50.05 ± 7.42 c	691.38 ± 20.84 a	2608.10 ± 78.08 b
	24	1442.52 ± 57.61 b	150.80 ± 7.53 b	258.53 ± 6.62 b	29.76 ± 0.40 bcd	62.19 ± 2.86 b	620.67 ± 32.76 a	2564.47 ± 67.09 b
80% เอทานอล	6	1287.41 ± 77.72 c	88.36 ± 7.01 d	224.95 ± 10.72 d	28.84 ± 3.18 cd	29.00 ± 2.48 e	601.92 ± 49.09 b	2260.48 ± 92.90 cd
	12	1214.75 ± 69.73 c	102.41 ± 7.94 c	244.88 ± 7.62 c	29.27 ± 3.80 bcd	37.26 ± 7.21 d	715.79 ± 26.99 a	2344.36 ± 77.13 c
	24	1048.38 ± 57.74 d	103.15 ± 4.09 c	224.12 ± 10.88 d	34.79 ± 8.18 ab	27.85 ± 1.16 e	603.97 ± 45.93 b	2042.26 ± 75.14 d
80% แอซีโตน	6	775.45 ± 59.38 e	56.46 ± 3.84 f	144.14 ± 11.29 f	18.01 ± 0.79 e	19.06 ± 1.02 f	279.24 ± 33.60 c	1292.36 ± 69.27 f
	12	767.84 ± 20.97 e	65.97 ± 6.45 ef	151.60 ± 4.99 f	19.56 ± 0.66 e	12.34 ± 1.35 g	183.33 ± 26.46 d	1200.64 ± 34.76 f
	24	1085.68 ± 57.39 d	72.72 ± 3.62 e	188.21 ± 6.87 e	25.74 ± 1.11 d	8.24 ± 0.65 gh	176.23 ± 3.18 d	1556.82 ± 58.01 e

ตัวอักษรที่ต่างกันในแต่ละคอลัมน์ มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (3 ซ้ำ)

ChA = กรดคลอโรจีนิก CFA = กรดคาเฟอิก FA = กรดเฟอร์ริก SnA = กรดซินแนปพิค EA = กรดแอลลิจิก CmA = กรดซินนามิก total PA = กรดฟีนอลิกทั้งหมด

4.5 ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบของฟลาโวนอยด์โดยเทคนิค HPLC

ตารางที่ 4.5 องค์ประกอบของฟลาโวนอยด์ในสารสกัดใบเร่วในตัวทำละลายและระยะเวลาในการสกัดต่างกัน

ตัวทำละลาย	เวลาสกัด (ชั่วโมง)	ปริมาณองค์ประกอบของฟลาโวนอยด์ ($\mu\text{g/g}$)				
		CC	EGCG	Ru	QCT	Total FA
น้ำกลั่น	6	111.15 $\pm$ 1.86 h	5.19 $\pm$ 0.56 h	166.27 $\pm$ 9.65 g	1.78 $\pm$ 0.04 g	284.39 $\pm$ 9.85 f
	12	148.63 $\pm$ 3.45 h	9.79 $\pm$ 0.31 h	243.65 $\pm$ 8.95 h	1.25 $\pm$ 0.05 g	403.31 $\pm$ 9.60 f
	24	182.59 $\pm$ 4.96 h	8.51 $\pm$ 0.72 h	145.64 $\pm$ 8.65 i	1.24 $\pm$ 0.11 g	337.98 $\pm$ 9.99 f
80% เมทานอล	6	2337.36 $\pm$ 57.88 a	155.99 $\pm$ 3.38 b	1748.21 $\pm$ 21.43 a	52.67 $\pm$ 9.60 bcd	4294.23 $\pm$ 62.55 a
	12	1899.07 $\pm$ 30.68 d	93.55 $\pm$ 1.35 d	1583.41 $\pm$ 47.55 b	53.31 $\pm$ 1.16 bc	3629.35 $\pm$ 56.62 bc
	24	2019.74 $\pm$ 55.62 bc	100.37 $\pm$ 7.22 d	1571.10 $\pm$ 55.15 bc	48.90 $\pm$ 3.19 cde	3740.12 $\pm$ 78.73 b
80% เอทานอล	6	2091.20 $\pm$ 60.63 b	217.19 $\pm$ 6.75 a	1361.62 $\pm$ 50.96 e	58.79 $\pm$ 4.67 ab	3728.80 $\pm$ 79.63 b
	12	2089.10 $\pm$ 53.05 b	215.26 $\pm$ 18.10 a	1506.69 $\pm$ 41.20 c	64.57 $\pm$ 4.46 a	3875.62 $\pm$ 69.71 b
	24	1954.93 $\pm$ 49.08 cd	117.09 $\pm$ 6.20 c	1432.17 $\pm$ 47.97 d	62.72 $\pm$ 9.89 a	3566.91 $\pm$ 69.62 c
80% แอซีโตน	6	1159.11 $\pm$ 59.38 e	34.71 $\pm$ 1.49 g	726.85 $\pm$ 50.97 g	32.01 $\pm$ 5.53 f	1952.67 $\pm$ 78.45 d
	12	749.05 $\pm$ 19.94 g	58.34 $\pm$ 0.77 f	990.50 $\pm$ 38.42 f	44.19 $\pm$ 1.50 de	1842.08 $\pm$ 43.32 e
	24	894.22 $\pm$ 22.28 f	77.03 $\pm$ 1.72 e	1041.14 $\pm$ 40.82 f	40.83 $\pm$ 2.27 e	2053.22 $\pm$ 46.59 d

ตัวอักษรที่ต่างกันในแต่ละคอลัมน์ มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

ค่าที่แสดงตัวเลขเป็นค่าเฉลี่ย $\pm$ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน ในการทดลอง 3 ซ้ำ

CC = คาเทชิน EGCG = อีพิกัลโลคาเทชินแกลเลต Ru = รูทีน QCT = เควเซอทีน Total FA = ฟลาโวนอยด์ทั้งหมด

จากตารางที่ 4.4 พบว่า ส่วนสกัดใบเร็วด้วย 80% เมทานอล มีองค์ประกอบของกรดฟีนอลิกปริมาณสูงที่สุด รองลงมา คือ ส่วนสกัด 80% เอทานอล ส่วนสกัด 80% แอซีโตน และน้ำกลั่น ตามลำดับ นอกจากนี้พบว่า ระยะเวลาในการสกัด 6 ชั่วโมง มีปริมาณกรดฟีนอลิกสูงที่สุด และปริมาณลดลงเมื่อเพิ่มระยะเวลาในการสกัด องค์ประกอบหลักของกรดฟีนอลิกที่ตรวจพบในสารสกัดจากใบเร็วในทุกตัวทำละลายมีแนวโน้มคล้ายคลึงกัน คือ กลุ่มกรดไฮดรอกซีซินนามิก ได้แก่ กรดคลอโรจีนิก กรดซินนามิก กรดแอลลิจิก กรดเฟอรูลิก และกรดคาเฟอิก สำหรับอนุพันธ์ของกรดไฮดรอกซีเบนโซอิกพบในปริมาณน้อย

จากตารางที่ 4.5 ปริมาณฟลาโวนอยด์ในใบเร็วที่ตรวจพบโดยเทคนิค HPLC พบว่า ส่วนสกัด 80% เมทานอล มีปริมาณมากที่สุด รองลงมา คือ ส่วนสกัด 80% เอทานอล ส่วนสกัด 80% แอซีโตน และส่วนสกัดน้ำ ตามลำดับ ระยะเวลาในการสกัดมีแนวโน้มเช่นเดียวกันกับปริมาณกรดฟีนอลิก คือ เมื่อเพิ่มระยะเวลาในการสกัดนานขึ้นปริมาณสารฟลาโวนอยด์ลดลง ทั้งนี้อาจเนื่องจากการสลายตัวของสารเมื่อเวลานานขึ้น องค์ประกอบของฟลาโวนอยด์ที่ตรวจพบในส่วนสกัดของใบเร็วเรียงลำดับดังนี้ คือ คาเทชิน รูทีน อีพิกัลโลคาเทชินแกลเลต และเคเวเชอทิน ตามลำดับ นอกจากนี้พบว่าใบเร็วที่สกัดด้วย 80% เมทานอล มีปริมาณคาเทชิน 2.33 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง และรูทีน 1.75 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ซึ่งสูงกว่าในชิงอ่อนที่รายงานโดย Ghasemzadeh et al (2010) พบคาเทชิน 0.56 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง และรูทีน 0.32 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง

4.6 ปริมาณองค์ประกอบของกรดฟีนอลิกในสารสกัดลำต้นใต้ดินเร็วที่สกัดด้วยตัวทำละลายและระยะเวลาในการสกัดต่างกัน

ตารางที่ 4.6 องค์ประกอบของกรดฟีนอลิกในสารสกัดลำต้นใต้ดินเร็วที่สกัดด้วยตัวทำละลายและระยะเวลาในการสกัดต่างกัน

ตัวทำละลาย	ระยะเวลา (ชั่วโมง)	ปริมาณกรดฟีนอลิก ($\mu\text{g/g}$)						
		GA	PCCA	p-OH	VA	SyA	SnA	Total PA
น้ำกลั่น	6	3.03 ± 0.13 g	2.36 ± 0.07 d	0.35 ± 0.04 ef	1.65 ± 0.07 f	ND	0.24 ± 0.02 cd	7.63 ± 0.20 h
	12	3.13 ± 0.17 g	2.77 ± 0.09 d	0.41 ± 0.03 e	2.26 ± 0.10 e	ND	0.29 ± 0.03 c	8.86 ± 0.22 h
	24	1.73 ± 0.09 h	0.95 ± 0.07 e	0.23 ± 0.03 f	1.27 ± 0.06 f	ND	0.19 ± 0.02 d	4.37 ± 0.19 i
80% เมทานอล	6	266.09 ± 4.84 b	7.90 ± 0.66 b	2.03 ± 0.17 b	4.94 ± 0.22 b	2.87 ± 0.10 de	0.49 ± 0.04 ab	284.32 ± 4.89 b
	12	282.68 ± 10.73 a	8.07 ± 0.54 b	1.84 ± 0.21 c	4.85 ± 0.50 bc	7.85 ± 0.60 b	0.42 ± 0.05 b	305.71 ± 10.77 a
	24	288.34 ± 16.09 a	13.10 ± 1.00 a	2.68 ± 0.04 a	5.45 ± 0.06 a	13.48 ± 1.20 a	0.47 ± 0.08 ab	323.52 ± 16.17 a
80% เอทานอล	6	195.13 ± 10.19 c	5.65 ± 0.51 c	0.57 ± 0.05 d	4.41 ± 0.63 c	2.88 ± 0.09 de	0.45 ± 0.01 ab	209.09 ± 10.22 d
	12	200.93 ± 5.89 c	5.73 ± 0.85 c	0.73 ± 0.10 d	4.68 ± 0.09 bc	3.07 ± 0.09 d	0.52 ± 0.07 a	215.66 ± 5.95 d
	24	212.80 ± 6.07 c	6.33 ± 0.45 c	0.72 ± 0.09 d	4.83 ± 0.22 bc	5.43 ± 0.29 c	0.47 ± 0.08 ab	230.58 ± 6.10 c
80% แอซีโตน	6	148.91 ± 8.84 d	0.46 ± 0.04 e	0.39 ± 0.02 ef	3.50 ± 0.17 d	2.15 ± 0.29 e	0.28 ± 0.03 c	155.69 ± 8.85 e
	12	35.71 ± 1.18 f	0.43 ± 0.07 e	0.26 ± 0.01 ef	2.56 ± 0.16 e	2.10 ± 0.12 e	0.25 ± 0.03 cd	41.31 ± 1.20 g
	24	41.49 ± 1.19 e	1.04 ± 0.06 e	0.38 ± 0.02 ef	3.87 ± 0.32 bc	2.85 ± 0.37 de	0.23 ± 0.01 cd	49.86 ± 1.29 f

ตัวอักษรที่ต่างกันในแต่ละคอลัมน์ มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

ค่าที่แสดงตัวเลขเป็นค่าเฉลี่ย $\pm$ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน ในการทดลอง 3 ซ้ำ

GA = กรดแกลลิก PCCA = กรดโพรโทคาเทอูอิก p-OH = กรดพาราไฮดรอกซิลเบนโซอิก VA = กรดวานิลิก SyA = กรดไซรินจิก SnA = กรดซินแนปพินิก Total PA = กรดฟีนอลิกทั้งหมด

4.7 ปริมาณองค์ประกอบของฟลาโวนอยด์ในสารสกัดลำต้นใต้ดินเร็วที่สกัดด้วยตัวทำละลายและระยะเวลาในการสกัดต่างกัน

ตารางที่ 4.7 องค์ประกอบของฟลาโวนอยด์ในสารสกัดลำต้นใต้ดินเร็วที่สกัดด้วยตัวทำละลายและระยะเวลาในการสกัดต่างกัน

ตัวทำละลาย	ระยะเวลา (ชั่วโมง)	ปริมาณฟลาโวนอยด์ ($\mu\text{g/g}$)				
		CC	EGCG	Ru	QCT	Total FA
น้ำกลั่น	6	4.74 $\pm$ 0.43 gh	ND	0.75 $\pm$ 0.03 f	3.45 $\pm$ 0.11 f	8.94 $\pm$ 0.44 g
	12	6.02 $\pm$ 0.13 efg	ND	1.30 $\pm$ 0.06 d	4.23 $\pm$ 0.07 f	11.55 $\pm$ 0.16 g
	24	3.95 $\pm$ 0.06 h	ND	0.50 $\pm$ 0.06 g	4.21 $\pm$ 0.03 f	8.66 $\pm$ 0.09 g
80% เมทานอล	6	7.30 $\pm$ 0.14 de	7.87 $\pm$ 0.65 b	2.12 $\pm$ 0.13 d	46.24 $\pm$ 4.36 b	63.53 $\pm$ 4.41 b
	12	9.83 $\pm$ 0.66 bc	7.83 $\pm$ 0.79 b	1.61 $\pm$ 0.37 c	49.08 $\pm$ 1.31 b	68.35 $\pm$ 1.71 b
	24	10.97 $\pm$ 1.13 b	10.90 $\pm$ 0.40 a	1.77 $\pm$ 0.10 c	56.18 $\pm$ 3.46 a	79.82 $\pm$ 3.66 a
80% เอทานอล	6	6.43 $\pm$ 0.68 ef	5.71 $\pm$ 0.14 c	1.82 $\pm$ 0.05 bc	32.43 $\pm$ 0.80 c	46.39 $\pm$ 1.06 d
	12	6.48 $\pm$ 0.73 ef	6.83 $\pm$ 0.99 b	2.03 $\pm$ 0.07 ab	37.56 $\pm$ 4.54 c	52.90 $\pm$ 4.70 c
	24	5.23 $\pm$ 0.25 fgh	3.99 $\pm$ 0.03 d	1.76 $\pm$ 0.08 c	56.59 $\pm$ 9.42 a	67.57 $\pm$ 9.42 b
80% แอซีโตน	6	27.78 $\pm$ 1.66 a	10.91 $\pm$ 0.33 a	1.05 $\pm$ 0.03 e	16.04 $\pm$ 1.79 e	55.78 $\pm$ 2.46 c
	12	8.64 $\pm$ 1.06 cd	7.64 $\pm$ 0.99 b	1.24 $\pm$ 0.18 de	23.43 $\pm$ 2.06 d	40.95 $\pm$ 2.53 e
	24	7.54 $\pm$ 1.10 de	7.55 $\pm$ 0.29 b	1.02 $\pm$ 0.08 e	18.25 $\pm$ 2.28 de	34.36 $\pm$ 2.55 f

ตัวอักษรที่ต่างกันในแต่ละคอลัมน์ มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

ค่าที่แสดงตัวเลขเป็นค่าเฉลี่ย $\pm$ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน ในการทดลอง 3 ซ้ำ

CC = คาเทชิน EGCG = อีพิกัลโลคาเทชินแกลเลต Ru = รูทีน QCT = เควเซอทีน Total FA = ฟลาโวนอยด์ทั้งหมด

จากตารางที่ 4.6 และ 4.7 พบว่า ปริมาณองค์ประกอบของกรดฟีนอลิก และฟลาโวนอยด์ที่พบในส่วนสกัดของลำต้นใต้ดินเร็ว มีปริมาณน้อยเมื่อเทียบกับส่วนสกัดจากใบเร็ว และกรดฟีนอลิกที่พบมากสุดในส่วนของลำต้นใต้ดินเร็ว คือ กรดแกลลิก ซึ่งพบในส่วนสกัดของ 80% เมทานอล และ 80% เอทานอล สำหรับองค์ประกอบของฟลาโวนอยด์ในส่วนของลำต้นใต้ดินจะพบน้อยมากเช่นเดียวกัน และส่วนใหญ่จะพบในส่วนสกัด 80% เมทานอล และ 80% เอทานอล เช่นกัน ซึ่งฟลาโวนอยด์ที่พบมากในส่วนของลำต้นใต้ดินเร็ว คือ เควเซทิน

จากผลการวิจัยในตอนต้นที่ 1 พบว่า สารประกอบฟีนอลิกจะพบมากในส่วนของใบเร็ว และส่วนสกัดที่มีฤทธิ์ด้านการเกิดออกซิเดชันได้ดี คือ ส่วนสกัดที่อยู่ในตัวทำละลายที่มีขั้ว คือ 80% เมทานอล และ 80% เอทานอล ดังนั้นในการทำการวิจัยในขั้นตอนต่อไปจึงได้วางแผนเพื่อศึกษาการนำใบเร็วไปใช้ประโยชน์ในการแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์ชาใบเร็ว

ตอนที่ 2 ผลของการเตรียมขั้นตอนต่อการเปลี่ยนแปลงของสารประกอบฟีนอลิกในใบเร็วระหว่างกระบวนการผลิตชาใบเร็ว

นำใบเร็วมาศึกษาผลของการเตรียมขั้นตอน เปรียบเทียบระหว่างใบเร็วสดกับใบเร็วที่ลวกในน้ำเดือดนาน 30 วินาที และ 60 วินาที และวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกในตัวอย่างใบเร็วแต่ละขั้นตอนระหว่างการผลิตชาใบเร็วแบบครัวเรือน ได้ผลการวิจัยดังนี้

4.8 ปริมาณความชื้นในตัวอย่างใบเร็วระหว่างที่ผ่านขั้นตอนต่าง ๆ ในการผลิตชาใบเร็ว

เมื่อนำใบเร็วสด (ควบคุม) และใบเร็วที่ผ่านการลวกด้วยน้ำเดือดนาน 30 วินาที และ 60 วินาที หลังจากนั้นนำตัวอย่างทั้ง 3 ไปผ่านขั้นตอนการคั่วในกะทะ นาน 10 นาที และตามด้วยการอบแห้งในตู้อบลมร้อน ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง และวิเคราะห์หาปริมาณความชื้นของตัวอย่างได้ผลดังตารางที่ 4.8

ตารางที่ 4.8 ปริมาณความชื้นของตัวอย่างใบเร็วในแต่ละขั้นตอนระหว่างการผลิตเป็นชาใบเร็ว

ขั้นตอนแปรรูป	ตัวอย่าง	สัญลักษณ์	ปริมาณความชื้น (%)
1. การเตรียมขั้นต้น	ใบเร็วสด	S1	71.25±0.19 ^b
	ใบเร็วลวกน้ำเดือด 30 วินาที	S2	76.03±0.95 ^a
	ใบเร็วลวกน้ำเดือด 60 วินาที	S3	75.41±0.30 ^a
2. การคั่ว 10 นาที	ใบเร็วสด คั่ว 10 นาที	S4	3.92±0.17 ^e
	ใบเร็วลวกน้ำเดือด 30 วินาที คั่ว 10 นาที	S5	6.75±0.56 ^d
	ใบเร็วลวกน้ำเดือด 60 วินาที คั่ว 10 นาที	S6	10.42±0.26 ^c
3. การอบแห้ง 50°C 1 ชั่วโมง	ใบเร็วสด คั่ว 10 นาที อบแห้ง 1 ชั่วโมง	S7	3.42±0.01 ^{ef}
	ใบเร็วลวกน้ำเดือด 30 วินาที คั่ว 10 นาที อบแห้ง 1 ชั่วโมง	S8	3.84±0.03 ^e
	ใบเร็วลวกน้ำเดือด 60 วินาที คั่ว 10 นาที อบแห้ง 1 ชั่วโมง	S9	3.06±0.02 ^f

ตัวอักษรที่ต่างกันในกลุ่มเดียวกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

จากตารางที่ 4.8 พบว่าในขั้นที่ 1 (การเตรียมขั้นต้น) ใบเร็วสดที่ไม่ผ่านการลวก มีปริมาณความชื้นต่ำกว่าใบเร็วที่ผ่านการลวกทั้ง 30 วินาทีและ 60 วินาที ทั้งนี้เนื่องมาจากใบเร็วที่ผ่านการลวกจะดูดน้ำเข้าไปในเซลล์พืชได้มากจึงทำให้มีปริมาณความชื้นมาก แต่อย่างไรก็ตามใบเร็วที่ผ่านการลวกในเวลา 30 วินาทีและ 60 วินาที มีปริมาณความชื้นไม่แตกต่างกัน สำหรับขั้นที่ 2 (การคั่ว) ใบเร็วสดและใบเร็วที่ลวกน้ำเดือด เมื่อนำมาคั่วและอบแห้ง (ขั้นตอนที่ 3) ทำให้ปริมาณความชื้นลดลง เพราะการคั่วและการอบแห้งเป็นการให้ความร้อน จึงทำให้น้ำที่อยู่ในใบเร็วระเหยกลายเป็นไอ ทำให้ปริมาณความชื้นลดลง แต่อย่างไรก็ตามปริมาณความชื้นในใบเร็วที่ผ่านการลวกจะสูงกว่าใบเร็วสด เพราะน้ำที่อยู่ในใบเร็วที่ผ่านการลวกมีปริมาณน้ำในเซลล์พืชมากกว่า

เมื่อใช้ระยะเวลาในการคั่วและการอบแห้งเท่ากันจึงทำให้น้ำที่เหลืออยู่ในใบเร็วที่ลวกมีมากกว่าใบเร็วที่ไม่ผ่านการลวก ซึ่งสอดคล้องกับผลการวิจัยของ สุจินดา และ อิศรพงษ์ (2547) พบว่าความชื้นในใบบวบที่ผ่านการลวกน้ำร้อนและลวกด้วย 0.1% NaHCO_3 ในน้ำร้อน สูงกว่าใบบวบที่ไม่ผ่านการลวก อย่างไรก็ตามความชื้นของผลิตภัณฑ์สุดท้ายที่ได้ใน ชั้นที่ 3 (ซาใบเร็ว) พบว่ามีปริมาณความชื้นในช่วง 3.06 - 3.84% โดยน้ำหนัก ซึ่งเป็นไปตามข้อกำหนดประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ (280) พ.ศ.2547 เรื่อง มาตรฐานไพร ได้กำหนดให้ชาสมุนไพรต้องมีความชื้นไม่เกินร้อยละ 10 ของน้ำหนัก

4.9 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกโดยรวม

เมื่อนำใบเร็วสดที่ไม่ผ่านการลวกและใบเร็วที่ผ่านการลวกมาแปรรูปตามขั้นตอนในการผลิตชาสมุนไพร โดยผ่านการคั่วและการอบแห้ง มาสกัดด้วยตัวทำละลาย 2 ชนิด คือ 80% เมทานอล และ 1% HCl ใน 80% เมทานอล และนำสารสกัดมาวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกโดยรวม และรายงานผลในรูปของปริมาณกรดแกลลิก (มิลลิกรัมกรดแกลลิก ต่อน้ำหนัก 1 กรัมตัวอย่างแห้ง) ได้ผลดังตารางที่ 4.9

ตารางที่ 4.9 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกโดยรวมในใบเร็วระหว่างขั้นตอนแปรรูปเป็นชาใบเร็วที่สกัดด้วยตัวทำละลายต่างกัน

ขั้นตอนแปรรูป	ตัวอย่าง	มิลลิกรัมกรดแกลลิก ต่อน้ำหนัก 1 กรัมตัวอย่างแห้ง	
		80% เมทานอล	1% HCl ใน 80% เมทานอล
1. การเตรียมขั้นต้น	S1	39.36±2.01 ^e	70.74±0.43 ^{ef}
	S2	57.76±0.80 ^a	102.09±7.55 ^a
	S3	55.60±0.19 ^a	92.62±0.95 ^b
2. การคั่ว 10 นาที	S4	29.56±1.02 ^g	55.01±4.05 ^g
	S5	42.46±2.47 ^d	79.31±2.82 ^{cd}
	S6	44.46±2.76 ^{cd}	73.95±1.64 ^{de}
3. การอบแห้ง 50°C 1 ชั่วโมง	S7	33.03±0.17 ^f	82.41±6.96 ^c
	S8	48.40±2.75 ^b	72.67±4.07 ^{def}
	S9	46.46±0.77 ^{bc}	65.84±2.81 ^f

อักษร (a-g) ที่แตกต่างกันภายในคอลัมน์เดียวกัน มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

ตารางที่ 4.9 พบว่า ในสารสกัด 80% เมทานอล ของใบเร็วที่ผ่านการคั่วและการอบแห้ง มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกโดยรวมลดลง เมื่อเทียบกับใบเร็วสดและใบเร็วที่ผ่านการลวก ทั้งนี้เนื่องจากความร้อนในระหว่างกระบวนการคั่วและการอบแห้งทำให้เซลล์ถูกทำลายและออกซิเจนในอากาศเข้าไปทำปฏิกิริยากับสารประกอบฟีนอลิก ทำให้เกิดการสูญเสียสารประกอบฟีนอลิกโดยรวม แต่อย่างไรก็ตามพบว่า ใบเร็วที่ผ่านการลวกแล้วนำมาคั่วหรืออบแห้งยังคงมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกสูงกว่าใบเร็วที่ไม่ผ่านการลวกเมื่อนำมาคั่วและอบแห้ง ทั้งนี้เนื่องจากการลวกจะไปยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์พอลิฟีนอลออกซิเดส ทำให้ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกในใบเร็วยังคงอยู่ในระหว่างการคั่วและการอบแห้ง และสอดคล้องกับงานวิจัยของ สิวะรินทร์ (2548) ที่พบว่า กาบใบกะหล่ำปลีที่มีการลวกก่อนอบแห้งทำให้ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกยังคงอยู่เมื่อเทียบกับกาบใบกะหล่ำปลีที่ไม่ลวก

ในทำนองเดียวกันในสารสกัด 1% HCl ใน 80% เมทานอล ของใบเร็วที่ผ่านการลวกมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกสูงกว่าใบเร็วที่ไม่ผ่านการลวก ยิ่งไปกว่านั้นพบว่าใบเร็วที่สกัดด้วย 1% HCl ใน 80% เมทานอล มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกมากกว่าใบเร็วที่สกัดด้วย 80% เมทานอล เนื่องจากสารประกอบฟีนอลิกที่พบส่วนใหญ่ในพืชจะอยู่ในรูปที่ยึดเกาะกับโมเลกุลของสารอื่น เช่น น้ำตาล ดังนั้นกรดจะไปไฮโดรไลซ์ทำให้ปล่อยสารประกอบฟีนอลิกในรูปอิสระออกมาจึงทำให้ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกในสารสกัดที่มีกรดผสมอยู่ในตัวทำละลายสูงกว่าตัวทำละลายเพียงอย่างเดียว โดยจะเห็นได้จากงานวิจัยของ Rusak และคณะ (2008) ที่พบว่า การเติมน้ำมะนาวลงไปจะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการสกัดสารฟีนอลิกจากใบชา

4.10 ปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์โดยรวม

เมื่อนำใบเร่วสดที่ไม่ผ่านการลวกและใบเร่วที่ผ่านการลวกมาแปรรูปตามขั้นตอนในการผลิตชาสมุนไพร โดยผ่านการคั่ว และการอบแห้ง มาสกัดด้วยตัวทำละลาย 2 ชนิดคือ 80% เมทานอล และ 1% HCl ใน 80% เมทานอล เมื่อนำสารสกัดมา วิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์โดยรวม รายงานผลในรูปของปริมาณเคอเวอเซอทิน (มิลลิกรัมเคอเวอเซอทินต่อน้ำหนัก 1 กรัมตัวอย่างแห้ง) ได้ผลดังตารางที่ 4.10

ตารางที่ 4.10 ปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์โดยรวมในใบเร่วระหว่างขั้นตอนแปรรูปเป็นชาใบเร่วที่สกัดด้วยตัวทำละลาย ต่างกัน

ขั้นตอนแปรรูป	ตัวอย่าง	มิลลิกรัมเคอเวอเซอทินต่อน้ำหนัก 1 กรัมตัวอย่างแห้ง	
		80% เมทานอล	1% HCl ใน 80% เมทานอล
1. การเตรียมขั้นต้น	S1	168.26±8.95 ^d	142.70±9.11 ^e
	S2	243.76±12.53 ^c	183.60±3.58 ^{cd}
	S3	254.96±10.07 ^c	175.39±9.65 ^d
2. การคั่ว 10 นาที	S4	242.20±23.50 ^c	206.84±14.18 ^c
	S5	386.82±23.55 ^a	238.04±13.26 ^b
	S6	315.85±22.48 ^b	240.57±38.05 ^b
3. การอบแห้ง 50°C 1 ชั่วโมง	S7	197.45±22.99 ^d	242.23±11.08 ^b
	S8	307.74±22.11 ^b	279.77±12.58 ^a
	S9	324.32±25.42 ^b	272.67±4.77 ^a

อักษร (a-e) ที่แตกต่างกันภายในคอลัมน์เดียวกัน มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

จากข้อมูลในตารางที่ 4.10 พบว่า ในสารสกัด 80% เมทานอล ของใบเร่วที่ผ่านการคั่วและการอบแห้ง มีปริมาณ สารประกอบฟลาโวนอยด์เพิ่มขึ้น เมื่อเทียบกับใบเร่วสด (ขั้นที่ 1) ทั้งที่ลวกและไม่ลวก ทั้งนี้อาจกล่าวได้ว่าความร้อนทำให้เกิดการ เปลี่ยนแปลงโดยสามารถจะไปทำให้สารโพลีฟีนอลและสารประกอบฟลาโวนอยด์ที่ยึดเกาะกับสารอื่นในผนังเซลล์ของพืช สามารถ จะถูกสกัดออกมาได้ง่าย ซึ่งจะเห็นได้จาก งานวิจัยของ (Zhang และคณะ 2010) การใช้ความร้อนในการอบ Buckwheat ที่ อุณหภูมิ 80 °C และ 120 °C นาน 40 นาที และ 20 นาที ตามลำดับ ทำให้ปริมาณฟลาโวนอยด์เพิ่มขึ้น 20 - 30% นอกจากนี้ Choi และคณะ (2010) พบว่า สารประกอบโพลีฟีนอลในเห็ดชิตาเกะ (shiitake) มีปริมาณสูงขึ้น เมื่อเพิ่มอุณหภูมิและระยะเวลา ในการอบ และความร้อนสามารถไปยับยั้งเอนไซม์ที่ทำให้เกิดออกซิเดชันที่อยู่ภายในพืช ดังนั้นจึงเป็นเหตุผลให้ปริมาณสารต้าน อนุมูลอิสระเพิ่มขึ้น

ในทำนองเดียวกันในสารสกัด 1% HCl ใน 80% เมทานอล ของใบเร่วที่ผ่านการลวกมีปริมาณ สารฟลาโวนอยด์สูงกว่า ใบเร่วที่ไม่ผ่านการลวกในแต่ละขั้นตอน และเมื่อเปรียบเทียบระหว่างสารสกัด 80% เมทานอล และ 1% HCl ใน 80% เมทานอล พบว่า ใบเร่วที่สกัดด้วย 80% เมทานอล มีปริมาณสาร ฟลาโวนอยด์มากกว่าในใบเร่วที่สกัดด้วย 1% HCl ใน 80% เมทานอล ทั้งนี้ อาจเนื่องมาจากกรดทำให้สารฟลาโวนอยด์ถูกทำลายจึงทำให้มีปริมาณลดลง

4.11 ความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH ของสารสกัดจากใบเร่ว

เมื่อนำใบเร่วสดและใบเร่วที่ผ่านการลวกในน้ำเดือดมาผ่านการคั่ว (ขั้นที่ 2) และการอบแห้ง (ขั้นที่ 3) และนำมาสกัดด้วยตัวทำละลาย 2 ชนิด คือ 80% เมทานอล และ 1% HCl ใน 80% เมทานอล เมื่อนำสารสกัดมาวิเคราะห์หาความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH และรายงานผลเป็นปริมาณสมมูลของสารโทรลิกซ์ ($\mu\text{mol TE/g}$) ได้ผลดังตารางที่ 4.11

ตารางที่ 4.11 ความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH ในใบเร่ว ระหว่างขั้นตอนแปรรูปเป็นชาใบเร่ว ที่สกัดด้วยตัวทำละลายต่างกัน

ขั้นตอนแปรรูป	ตัวอย่าง	ปริมาณสมมูลของสารโทรลิกซ์ ($\mu\text{mol TE/g}$)	
		80% เมทานอล	1% HCl ใน 80%เมทานอล
1. การเตรียมชิ้นต้น	S1	31.20 $\pm$ 1.72 ^c	51.13 $\pm$ 3.80 ^{bc}
	S2	37.97 $\pm$ 0.86 ^a	70.16 $\pm$ 10.25 ^a
	S3	35.50 $\pm$ 2.07 ^b	60.59 $\pm$ 4.31 ^{ab}
2. การคั่ว 10 นาที	S4	9.78 $\pm$ 0.83 ^d	41.97 $\pm$ 3.92 ^{cd}
	S5	10.83 $\pm$ 0.94 ^d	65.97 $\pm$ 7.60 ^a
	S6	10.35 $\pm$ 0.59 ^d	69.06 $\pm$ 7.71 ^a
3. การอบแห้ง 50°C 1 ชั่วโมง	S7	8.87 $\pm$ 0.36 ^d	35.32 $\pm$ 5.54 ^d
	S8	9.29 $\pm$ 0.47 ^d	66.66 $\pm$ 6.04 ^a
	S9	9.68 $\pm$ 0.50 ^d	64.76 $\pm$ 3.39 ^a

อักษร (a-d) ที่แตกต่างกันภายในคอลัมน์เดียวกัน มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

จากตารางที่ 4.11 พบว่า สารสกัด 80% เมทานอล จากใบเร่วที่ผ่านการลวกมีประสิทธิภาพในการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH ได้ดีกว่าใบเร่วสดในทุกๆ ขั้นตอนการแปรรูป แต่อย่างไรก็ตามพบว่า ใบเร่วสดและใบเร่วที่ผ่านการลวกในน้ำเดือด เมื่อนำมาคั่ว (ขั้นที่ 2) และอบแห้ง (ขั้นที่ 3) ทำให้ประสิทธิภาพในการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH ลดลง เมื่อเปรียบเทียบกับขั้นที่ 1 (การเตรียม) ทั้งนี้เนื่องมาจากความร้อนทำให้สารประกอบฟีนอลิกเกิดการสลายตัว

ในทำนองเดียวกันสารสกัด 1% HCl ใน 80% เมทานอล จากใบเร่วที่ผ่านการลวกจะมีประสิทธิภาพในการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH ได้ดีกว่าใบเร่วสด และแนวโน้มใบเร่วที่ผ่านการลวกและใบเร่วสดเมื่อได้รับความร้อน โดยการคั่วและการอบแห้งทำให้ความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH ลดลงเช่นกัน เมื่อเปรียบเทียบกับขั้นที่ 1 ยกเว้นใบเร่วที่ลวก 60 วินาที เมื่อนำมาคั่วและอบแห้งมีผลทำให้ความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH สูงขึ้น

เมื่อเปรียบเทียบสารสกัดในตัวทำละลายต่างกันพบว่า สารสกัดใบเร่วใน 1% HCl ใน 80% เมทานอล มีประสิทธิภาพในการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH สูงกว่าสารสกัด 80% เมทานอล เพราะกรดไปไฮโดรไลซ์สารประกอบฟีนอลิกในใบเร่ว ทำให้สารประกอบฟีนอลิกเพิ่มขึ้น ซึ่งสารประกอบฟีนอลิกมีฤทธิ์ในการยับยั้งอนุมูลอิสระได้ดี

4.12 ความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระ ABTS^{•+} ของสารสกัดจากใบเร่ว

เมื่อนำใบเร่วสดและใบเร่วที่ผ่านการลวกในน้ำเดือด มาแปรรูปตามขั้นตอนในการผลิตชาสมุนไพร โดยผ่านการคั่วและการอบแห้ง มาสกัดด้วยตัวทำละลาย 2 ชนิดคือ 80% เมทานอล และ 1% HCl ใน 80% เมทานอล เมื่อนำสารสกัดมาวิเคราะห์หาความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระ ABTS^{•+} และรายงานผลเป็นปริมาณสมมูลของสาร Trolox ต่อน้ำหนัก 1 กรัมตัวอย่างแห้ง ($\mu\text{mol TE/g}$) ได้ผลดังตารางที่ 4.12

ตารางที่ 4.12 ความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระ ABTS^{•+} ในใบเร่ว ระหว่างขั้นตอนแปรรูปเป็นชาใบเร่ว ที่สกัดด้วยตัวทำละลายต่างกัน

ขั้นตอนแปรรูป	ตัวอย่าง	ปริมาณสมมูลของสาร Trolox ($\mu\text{mol TE/g}$)	
		80% เมทานอล	1% HCl ใน 80% เมทานอล
1. การเตรียมชิ้นต้น	S1	21.21 $\pm$ 1.11 ^c	28.93 $\pm$ 2.10 ^b
	S2	25.92 $\pm$ 1.29 ^b	32.09 $\pm$ 3.89 ^a
	S3	28.19 $\pm$ 0.71 ^a	28.48 $\pm$ 1.84 ^b
2. การคั่ว 10 นาที	S4	6.21 $\pm$ 0.50 ^d	7.11 $\pm$ 0.06 ^c
	S5	6.78 $\pm$ 0.25 ^d	7.39 $\pm$ 0.20 ^c
	S6	7.07 $\pm$ 0.31 ^d	7.89 $\pm$ 1.34 ^c
3. การอบแห้ง 50°C 1 ชั่วโมง	S7	5.89 $\pm$ 0.56 ^d	7.92 $\pm$ 0.42 ^c
	S8	6.61 $\pm$ 0.21 ^d	8.19 $\pm$ 0.22 ^c
	S9	6.40 $\pm$ 0.75 ^d	7.51 $\pm$ 0.86 ^c

อักษร (a-d) ที่แตกต่างกันภายในคอลัมน์เดียวกัน มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

จากข้อมูลในตารางที่ 4.12 พบว่าสารสกัด 80% เมทานอล ของใบเร่วในขั้นตอนการเตรียมชิ้นต้น ที่ผ่านการลวกมีความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระ ABTS^{•+} ได้ดีกว่าใบเร่วสดที่ไม่ผ่านการลวก ทั้งนี้เนื่องจากการลวกไปยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์พอลิฟีนอลออกซิเดส จึงทำให้สารประกอบฟีนอลิกไม่ถูกออกซิเดชัน เมื่อนำใบเร่วทั้งสามตัวอย่างไปผ่านขั้นตอนการคั่วและการอบแห้งในขั้นตอนที่ 2 และ 3 พบว่า ความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระ ABTS^{•+} ลดลง ทั้งนี้เนื่องมาจากความร้อนและออกซิเจนในอากาศเข้าไปทำปฏิกิริยากับสารประกอบฟีนอลิก จึงทำให้เกิดการสูญเสียสารประกอบฟีนอลิกโดยรวม ในกระบวนการคั่วและการอบแห้ง แต่อย่างไรก็ตามพบว่า ตัวอย่างใบเร่วในขั้นตอนการคั่วและการอบแห้งที่มาจากใบเร่วที่มีการลวกด้วยน้ำเดือด ความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระ ABTS^{•+} สูงกว่าใบเร่วสด

ในทำนองเดียวกันความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระ ABTS^{•+} ในสารสกัด 1% HCl ใน 80% เมทานอล จากใบเร่วที่ผ่านการแปรรูปในแต่ละขั้นตอนมีแนวโน้มคล้ายคลึงกับสารสกัด 80% เมทานอล และพบว่า ความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระ ABTS^{•+} ของสารสกัดใบเร่วในตัวทำละลายทั้ง 2 ชนิด มีค่าต่างกันเล็กน้อย

4.13 ความสามารถในการรีดิวซ์เฟอร์ริกไอออนโดยวิธี FRAP ของสารสกัดจากใบเร่ว

เมื่อนำใบเร่วสดและใบเร่วที่ผ่านการลวกในขั้นตอนที่ 1 (การเตรียม) มาแปรรูปตามขั้นตอนในการผลิตชาสมุนไพร โดยผ่านการคั่วและการอบแห้ง มาสกัดด้วยตัวทำละลาย 2 ชนิดคือ 80% เมทานอล และ 1% HCl ใน 80% เมทานอล เมื่อนำสารสกัดมาวิเคราะห์หาความสามารถในการรีดิวซ์เฟอร์ริกไอออน และรายงานผลเป็นไมโครโมลเฟอร์รัสซิลเฟตต่อ 1 กรัมตัวอย่างแห้ง ได้ผลดังตารางที่ 4.13

ตารางที่ 4.13 ความสามารถในการรีดิวซ์เฟอร์ริกไอออนในใบเร่ว ระหว่างขั้นตอนแปรรูปเป็นชาใบเร่วที่สกัดด้วยตัวทำละลายต่างกัน

ขั้นตอนแปรรูป	ตัวอย่าง	ไมโครโมลเฟอร์รัสซิลเฟตต่อ 1 กรัมตัวอย่างแห้ง	
		80% เมทานอล	1% HCl ใน 80% เมทานอล
1. การเตรียมขั้นต้น	S1	0.59±0.05 ^b	1.70±0.55 ^c
	S2	0.79±0.08 ^a	2.20±0.17 ^a
	S3	0.85±0.07 ^a	2.01±0.04 ^b
2. การคั่ว 10 นาที	S4	0.34±0.01 ^{de}	0.59±0.07 ^e
	S5	0.30±0.02 ^e	0.79±0.09 ^d
	S6	0.38±0.03 ^{de}	0.79±0.51 ^d
3. การอบแห้ง 50°C 1 ชั่วโมง	S7	0.35±0.02 ^{de}	0.61±0.17 ^e
	S8	0.42±0.04 ^{cd}	0.75±0.00 ^d
	S9	0.48±0.07 ^c	0.75±0.46 ^d

อักษร (a-e) ที่แตกต่างกันภายในคอลัมน์เดียวกัน มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

จากข้อมูลในตารางที่ 4.13 พบว่าในขั้นตอนการเตรียมขั้นต้น ใบเร่วที่ผ่านการลวกในน้ำเดือดนาน 30 วินาที และ 60 วินาที เมื่อสกัดด้วย 80% เมทานอล มีความสามารถในการรีดิวซ์เฟอร์ริกไอออนได้สูงกว่าใบเร่วสด แต่อย่างไรก็ตามระยะเวลาในการลวกไม่มีผลต่อความสามารถในการรีดิวซ์ สำหรับขั้นตอนการคั่ว พบว่า ใบเร่วสดและใบเร่วที่ผ่านการลวกเมื่อนำมาคั่ว (ขั้นที่ 2) และอบแห้ง (ขั้นที่ 3) มีความสามารถในการรีดิวซ์ลดลงเมื่อเทียบกับใบเร่วสดและใบเร่วที่ผ่านการลวก (ขั้นที่ 1) แสดงว่าความร้อนมีผลทำให้ความสามารถของในการรีดิวซ์ลดลง ทั้งนี้เนื่องมาจากปฏิกิริยาออกซิเดชันในระหว่างกระบวนการทำแห้งทำให้มีการสูญเสียสารประกอบโพลีฟีนอลรวมทั้งความสามารถในการต้านการเกิดออกซิเดชันลดลง (Chan และคณะ, 2009)

ในทำนองเดียวกัน สารสกัด 1% HCl ใน 80% เมทานอล จากใบเร่วที่ผ่านการลวกมีความสามารถในการรีดิวซ์สูงกว่าใบเร่วสด (ขั้นที่ 1) เมื่อนำมาผ่านขั้นตอนการคั่ว (ขั้นที่ 2) และการอบแห้ง (ขั้นที่ 3) ทำให้ความสามารถในการรีดิวซ์ลดลง และเมื่อเปรียบเทียบระหว่างสารสกัด 80% เมทานอล และสารสกัด 1% HCl ใน 80% เมทานอล พบว่า สารสกัด 1% HCl ใน 80% เมทานอล มีความสามารถในการรีดิวซ์สูงกว่าสารสกัด 80% เมทานอล เนื่องมาจากกรดไปไฮโดรไลซ์สารฟีนอลิกซึ่งอยู่ในใบเร่วในรูปของสารเชิงซ้อนจึงทำให้ปล่อยสารประกอบฟีนอลิกที่อยู่ในรูปอิสระออกมา

4.14 ความสัมพันธ์ระหว่างสารประกอบฟีนอลิกโดยรวมและการยับยั้งการเกิดออกซิเดชันของสารสกัดจากใบเร่ว

ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกโดยรวม และความสามารถในการยับยั้งการเกิดออกซิเดชันของสารสกัดจากใบเร่ว โดยวิธียับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH, ABTS⁺⁺ และความสามารถในการรีดิวซ์เฟอริกไอออน มีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ ดังตารางที่ 4.14

ตารางที่ 4.14 สัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ระหว่างสารประกอบฟีนอลิกโดยรวม และการยับยั้งการเกิดออกซิเดชันของสารสกัดจากใบเร่วที่สกัดด้วยตัวทำละลายต่างกัน

ผลลัพธ์	สัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์สารประกอบฟีนอลิก (r)	
	80% เมทานอล	1% HCl ใน 80% เมทานอล
ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH	0.607 ^{**}	0.355
ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ ABTS ⁺⁺	0.627 ^{**}	0.619 ^{**}
ความสามารถในการรีดิวซ์เฟอริกไอออน (FRAP)	0.721 ^{**}	0.709 ^{**}

หมายเหตุ ^{**} ที่ระดับนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.01$)

จากตารางที่ 4.14 พบว่า ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกโดยรวม ในสารสกัดจากใบเร่วที่สกัดด้วย 80% เมทานอล มีความสัมพันธ์เชิงบวกสูงมากกับความสามารถในการต้านการเกิดออกซิเดชันทั้ง 3 วิธี โดยพบว่า ความสามารถในการรีดิวซ์เฟอริกไอออน มีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์กับสารประกอบฟีนอลิกสูงที่สุด ($r = 0.721$, $p \leq 0.01$) รองลงมาคือ ABTS⁺⁺ และ DPPH ตามลำดับแต่ไม่พบความสัมพันธ์ระหว่าง DPPH กับสารประกอบฟีนอลิกในสารสกัดใบเร่วของ 1% HCl ใน 80% เมทานอล ในขณะที่ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกที่อยู่ในสารสกัด 1% HCl ใน 80% เมทานอล มีความสัมพันธ์เชิงบวกสูงมากกับความสามารถในการรีดิวซ์เฟอริกไอออนและความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ ABTS⁺⁺

4.15 ความสัมพันธ์ระหว่างสารฟลาโวนอยด์โดยรวม และการยับยั้งการเกิดออกซิเดชันของสารสกัดจากใบเร่ว

ปริมาณสารฟลาโวนอยด์ และความสามารถในการยับยั้งการเกิดออกซิเดชันของสารสกัดจากใบเร่ว โดยวิธียับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH, ABTS⁺⁺ และความสามารถในการรีดิวซ์เฟอริกไอออน มีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ ดังตารางที่ 4.15

ตารางที่ 4.15 สัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ระหว่างสารฟลาโวนอยด์โดยรวม และการยับยั้งการเกิดออกซิเดชันของสารสกัดจากใบเร่วที่สกัดด้วยตัวทำละลายต่างกัน

ผลลัพธ์	สัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์สารฟลาโวนอยด์ (r)	
	80% เมทานอล	1% HCl ใน 80% เมทานอล
ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH	-0.448 [*]	0.160
ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ ABTS ⁺⁺	-0.426 [*]	-0.788 ^{**}
ความสามารถในการรีดิวซ์เฟอริกไอออน (FRAP)	-0.344	-0.725 ^{**}

หมายเหตุ ^{*} ที่ระดับนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

^{**} ที่ระดับนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.01$)

จากตารางที่ 4.15 พบว่า ปริมาณสารฟลาโวนอยด์ ในสารสกัดจากใบเร่วที่สกัดด้วย 80% เมทานอล มีความสัมพันธ์เชิงลบกับความสามารถในการต้านการเกิดออกซิเดชันของ DPPH, ABTS โดยพบว่าความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH มีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์กับฟลาโวนอยด์ ($r = -0.448$, $p \leq 0.05$) รองลงมาคือ ABTS⁺ ตามลำดับแต่ไม่พบความสัมพันธ์ระหว่างสารประกอบฟีนอลิก กับสารฟลาโวนอยด์ในสารสกัดใบเร่วของ 80% เมทานอล ในขณะที่ปริมาณสารฟลาโวนอยด์ที่อยู่ในสารสกัด 1% HCl ใน 80% เมทานอล มีความสัมพันธ์เชิงลบมากกับความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ ABTS⁺ และความสามารถในการรีดิวซ์เพอริกไฮดรอกไซด์ แต่ไม่มีความสัมพันธ์กับสารประกอบฟีนอลิกและความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH

4.16 ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบของสารฟีนอลิกในใบเร่วระหว่างขั้นตอนการแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์ชาใบเร่วที่สกัดด้วย 80% เมทานอล โดยเทคนิค HPLC

เมื่อนำตัวอย่างใบเร่วที่ผ่านขั้นตอนการแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์ใบเร่วทั้ง 9 ตัวอย่าง มาสกัดด้วย 80% เมทานอล และนำสารสกัดที่ได้ไปตรวจวิเคราะห์ชนิดและปริมาณองค์ประกอบของกรดฟีนอลิกโดยเทคนิค HPLC ได้ผลดังตารางที่ 4.16

จากตารางที่ 4.16 พบว่า องค์ประกอบของกรดฟีนอลิกในใบเร่วที่มีปริมาณมากที่สุด คือ กรดคลอโรจีนิค รองลงมา คือ กรดพาราไฮโดรซีเบนโซอิก และกรดไซรินจิก ใบเร่วที่ผ่านการลวกในน้ำเดือด นาน 30 วินาที (s2) เมื่อนำมาผ่านการคั่ว (s5) และการอบแห้ง (s8) พบว่า มีปริมาณกรดฟีนอลิกโดยรวมสูงที่สุด รองลงมา คือ ใบเร่วที่ลวกนาน 60 วินาที และผ่านการคั่ว (s6) และการอบแห้ง (s9) ส่วนใบเร่วสด (s1) มีปริมาณกรดฟีนอลิกลดลงเมื่อนำไปคั่ว (s4) และอบแห้ง (s7) ทั้งนี้อาจเนื่องจากความร้อนทำให้เกิดการสลายตัวของกรดฟีนอลิกบางชนิด ในขณะที่ใบเร่วที่ลวกด้วยน้ำเดือด (s2 และ s3) เมื่อนำไปคั่วและอบแห้ง พบว่ามีปริมาณกรดฟีนอลิกเพิ่มขึ้น ทั้งนี้อาจเป็นเพราะการลวกไปยับยั้งการทำงานของเอนไซม์และมีปริมาณน้ำในเซลล์มากกว่าใบเร่วสด ดังนั้นเมื่อนำมาผ่านการคั่วและการอบแห้งจึงทำให้การสลายตัวของกรดฟีนอลิกช้าลง

ตารางที่ 4.16 ปริมาณองค์ประกอบของกรดฟีนอลิกในใบเร่วระหว่างขั้นตอนการแปรรูปเป็นชาใบเร่วที่สกัดด้วย 80% เมทานอล

ตัวอย่าง	ปริมาณกรดฟีนอลิก ($\mu\text{g/g dw}$)								
	GA	PCCA	p-OH	ChA	VA	SyA	FA	EA	Total
s1	9.13 $\pm$ 1.14 b	1.73 $\pm$ 0.17 f	100.71 $\pm$ 7.89 d	1153.13 $\pm$ 86.84 e	48.50 $\pm$ 4.50 e	75.28 $\pm$ 2.54 e	16.16 $\pm$ 1.66 c	110.08 $\pm$ 9.38 ab	1514.72 $\pm$ 87.88 e
s2	22.67 $\pm$ 2.91 a	1.76 $\pm$ 0.09 f	299.39 $\pm$ 8.27 b	3312.83 $\pm$ 222.75b	53.90 $\pm$ 1.07 e	328.91 $\pm$ 43.11 ab	16.68 $\pm$ 2.93 c	105.84 $\pm$ 7.70 c	4141.98 $\pm$ 227.20 b
s3	3.00 $\pm$ 0.38 f	0.17 $\pm$ 0.06 g	276.63 $\pm$ 5.58 c	1977.09 $\pm$ 79.25 d	24.96 $\pm$ 1.37 f	314.24 $\pm$ 13.40 b	20.35 $\pm$ 4.16 b	113.15 $\pm$ 3.69 a	2729.59 $\pm$ 80.77 d
s4	4.65 $\pm$ 0.97 de	3.00 $\pm$ 0.35 cd	70.03 $\pm$ 4.57 e	420.39 $\pm$ 10.42 g	70.19 $\pm$ 3.60 d	10.66 $\pm$ 0.94 f	29.59 $\pm$ 3.49 a	72.89 $\pm$ 4.72 d	681.40 $\pm$ 13.37 f
s5	6.39 $\pm$ 0.55 c	5.25 $\pm$ 0.76 a	310.66 $\pm$ 15.45 a	3842.82 $\pm$ 67.68 a	175.31 $\pm$ 12.57 a	217.99 $\pm$ 28.66 d	24.11 $\pm$ 1.06 b	100.50 $\pm$ 2.45 c	4683.03 $\pm$ 76.20 a
s6	5.50 $\pm$ 0.35 d	3.59 $\pm$ 0.27 c	318.94 $\pm$ 14.85 a	2448.30 $\pm$ 109.96 c	140.58 $\pm$ 9.91 c	267.32 $\pm$ 13.94 c	21.99 $\pm$ 3.24 b	115.14 $\pm$ 3.81 a	3321.36 $\pm$ 112.38 c
s7	4.53 $\pm$ 0.24 e	2.07 $\pm$ 0.30 e	66.72 $\pm$ 3.44 f	686.73 $\pm$ 13.88 f	50.14 $\pm$ 4.71 e	220.92 $\pm$ 8.85 d	23.79 $\pm$ 2.45 b	66.34 $\pm$ 2.68 e	1121.24 $\pm$ 17.84 e
s8	5.19 $\pm$ 0.49 d	3.97 $\pm$ 0.07 b	325.19 $\pm$ 5.49 a	3606.63 $\pm$ 67.41 b	157.42 $\pm$ 5.36 b	251.67 $\pm$ 9.81 c	21.36 $\pm$ 2.52 b	96.06 $\pm$ 3.43 c	4467.49 $\pm$ 68.68 a
s9	2.72 $\pm$ 0.15 g	2.94 $\pm$ 0.15 d	308.65 $\pm$ 2.53 ab	2383.83 $\pm$ 93.29 c	141.64 $\pm$ 7.42 c	378.94 $\pm$ 12.90 a	16.56 $\pm$ 0.68 c	109.93 $\pm$ 1.31 b	3345.21 $\pm$ 94.51 c

อักษรที่ต่างกันภายในคอลัมน์เดียวกัน มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

GA = กรดแกลลิก PCCA= กรดโพรโทคาเทอซิก p-OH = กรดพาราไฮดรอกซีเบนโซอิก ChA = กรดคลอโรจีนิก VA = กรดวานิลลิก SyA = กรดไซรินจิก FA = กรดเฟอรูริก EA = กรดแอสเลจิก

4.17 ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบของสารฟลาโวนอยด์ในใบเร่วระหว่างขั้นตอนการแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์ชาใบเร่วที่สกัดด้วย 80% เมทานอล โดยเทคนิค HPLC

เมื่อนำตัวอย่างใบเร่วที่ผ่านขั้นตอนการแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์ใบเร่วทั้ง 9 ตัวอย่าง มาสกัดด้วย 80% เมทานอล และนำสารสกัดที่ได้ไปตรวจวิเคราะห์ชนิดและปริมาณองค์ประกอบของฟลาโวนอยด์โดยเทคนิค HPLC ได้ผลดังตารางที่ 4.17

ตารางที่ 4.17 ปริมาณองค์ประกอบของฟลาโวนอยด์ในใบเร่วระหว่างขั้นตอนการแปรรูปเป็นชาใบเร่วที่สกัดด้วย 80% เมทานอล

ตัวอย่าง	ปริมาณฟลาโวนอยด์ ($\mu\text{g} / \text{g dw}$)				
	CC	EGCG	Ru	QCT	Total
s1	936.76 $\pm$ 20.60 c	97.85 $\pm$ 18.85	4325.75 $\pm$ 310.78 c	ND	5360.36 $\pm$ 312.03 d
s2	1744.03 $\pm$ 77.09 a	794.81 $\pm$ 29.70 c	4525.76 $\pm$ 492.59 c	ND	7064.60 $\pm$ 499.47 c
s3	1498.92 $\pm$ 64.18 b	582.40 $\pm$ 12.18 f	4800.32 $\pm$ 331.82 a	ND	6881.64 $\pm$ 338.19 c
s4	217.16 $\pm$ 44.40 d	432.71 $\pm$ 52.25 g	3616.73 $\pm$ 228.49 d	153.86 $\pm$ 6.62 b	4420.46 $\pm$ 238.65 e
s5	1764.84 $\pm$ 71.47 a	1340.63 $\pm$ 56.83 a	4770.32 $\pm$ 199.69 ab	48.61 $\pm$ 2.30 e	7924.40 $\pm$ 219.59 a
s6	1622.51 $\pm$ 93.71 b	657.21 $\pm$ 35.06 e	4678.30 $\pm$ 88.58 b	68.86 $\pm$ 1.44 d	7026.88 $\pm$ 133.64 c
s7	207.08 $\pm$ 2.83 d	733.03 $\pm$ 17.21 d	4268.40 $\pm$ 232.88 c	211.54 $\pm$ 13.42 a	5420.05 $\pm$ 233.92 d
s8	1817.17 $\pm$ 43.25 a	841.36 $\pm$ 38.36 b	4936.93 $\pm$ 221.74 a	72.38 $\pm$ 5.31 c	7667.84 $\pm$ 229.21 ab
s9	1565.99 $\pm$ 46.00 b	1219.86 $\pm$ 119.55 a	4729.29 $\pm$ 65.96 ab	72.49 $\pm$ 0.83 c	7587.63 $\pm$ 144.08 b

อักษรที่แตกต่างกันภายในคอลัมน์เดียวกัน มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

CC = คาเทชิน EGCG = อีพิกัลโลคาเทชินแกลเลต Ru = รูทีน QCT = เควเซทิน

จากตารางที่ 4.17 พบว่า องค์ประกอบของฟลาโวนอยด์รวมในใบเร่วแต่ละตัวอย่างมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) โดยพบว่า ตัวอย่างใบเร่วในขั้นตอนการเตรียมขั้นต้น คือ s1 (ใบสด) มีปริมาณฟลาโวนอยด์โดยรวมน้อยกว่าใบเร่ว s2 (ลวกน้ำเดือด 30 วินาที) และ s3 (ลวกน้ำเดือด 60 วินาที) และเมื่อนำใบเร่วทั้ง 3 ตัวอย่าง มาผ่านขั้นตอนการคั่วและการอบแห้งเพื่อผลิตเป็นชาใบเร่ว พบว่า การลวกใบเร่วก่อนนำมาคั่วและอบแห้ง ส่งผลทำให้ปริมาณสารฟลาโวนอยด์สูงกว่าใบเร่วที่ไม่ผ่านการลวก ทั้งนี้อาจเป็นเพราะการลวกเป็นการกำจัดเอนไซม์พอลิฟีนอลออกซิเดส จึงทำให้สารประกอบพอลิฟีนอลยังคงเหลืออยู่ในใบเร่วมากกว่า พบว่า ปริมาณสารฟลาโวนอยด์ใน (s5) มีปริมาณมากที่สุด 7,924.40 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง และไม่แตกต่างกับเมื่อนำไปผ่านการอบแห้ง (s8) รองลงมา คือ ใบเร่วที่ผ่านการลวกน้ำเดือด 60 วินาที และนำมาคั่ว 10 นาที ตามด้วยการอบแห้ง (s9) ซึ่งมีปริมาณฟลาโวนอยด์รวม เท่ากับ 7,667.84 และ 7,587.63 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ และองค์ประกอบของสารฟลาโวนอยด์ที่ตรวจพบเรียงตามลำดับดังนี้ รุทีน คาเทชิน อีพิกัลโลคาเทชินแกลเลต และเควเซทินตามลำดับ

จากผลการวิจัยตอนที่ 2 บ่งชี้ว่าการเตรียมใบเร่วขั้นต้นโดยการลวกในน้ำเดือดก่อนนำมาคั่วและอบแห้งส่งผลทำให้สามารถรักษาความคงตัวของกรดฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ในใบเร่วได้ดีกว่าใบเร่วสด

ตอนที่ 3 ผลการวิเคราะห์ปริมาณสารฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ในผลิตภัณฑ์ชาใบเร่วที่ชงด้วยวิธีการต่างกัน

นำผลิตภัณฑ์ชาใบเร่วที่ผ่านขั้นตอนการเตรียมขั้นต้นต่างกัน (ไม่ลวก ลวกน้ำเดือด 30 วินาที และลวกน้ำเดือด 60 วินาที) มาศึกษาผลของการชงชาใบเร่ว 2 วิธี คือ การเขย่าด้วยน้ำที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 6 ชั่วโมง และการใช้น้ำร้อนอุณหภูมิ 95 ± 2 องศาเซลเซียส คนนาน 5 นาที เมื่อนำสารสกัดที่ได้มาวิเคราะห์ปริมาณสารฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์โดยรวม และทดสอบกิจกรรมการต้านออกซิเดชัน 3 วิธี ได้ผลดังนี้

4.18 ผลของการเตรียมขั้นต้นและวิธีการสกัดต่อปริมาณฟีนอลิกโดยรวม ฟลาโวนอยด์โดยรวม และการต้านออกซิเดชันในผลิตภัณฑ์ชาใบเร่ว

ตารางที่ 4.18 ปริมาณสารฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์โดยรวม และฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของชาใบเร่วที่ชงด้วยวิธีต่างกัน

การเตรียมขั้นต้น	การสกัดชาใบเร่ว	TPC	TFC	DPPH	ABTS	FRAP
		(mg GAE/g dw)	(mg CC/g dw)	($\mu\text{mol TE/g dw}$)	($\mu\text{mol TE/g dw}$)	($\mu\text{mol TE/g dw}$)
ไม่ลวก	เขย่าน้ำ 37 °C, 6 h	12.76 ± 1.01 d	12.36 ± 0.66 c	62.99 ± 0.72 d	51.06 ± 1.70 b	50.39 ± 1.35 d
	น้ำร้อนคน 5 นาที	6.22 ± 0.72 e	9.26 ± 0.12 d	65.83 ± 0.19 b	52.82 ± 0.66 ab	30.92 ± 5.00 e
ลวก 30 วินาที	เขย่าน้ำ 37 °C, 6 h	26.30 ± 1.34 a	18.15 ± 0.27 a	62.09 ± 0.29 d	54.08 ± 0.94 a	172.42 ± 0.96 a
	น้ำร้อนคน 5 นาที	20.44 ± 0.14 b	13.05 ± 0.29 c	64.40 ± 0.32 c	51.34 ± 0.08 b	115.95 ± 0.87 b
ลวก 60 วินาที	เขย่าน้ำ 37 °C, 6 h	26.46 ± 1.12 a	17.64 ± 0.31 a	62.08 ± 0.74 d	54.16 ± 0.61 a	174.55 ± 3.80 a
	น้ำร้อนคน 5 นาที	17.88 ± 0.51 c	16.42 ± 0.46 b	68.21 ± 0.79 a	49.23 ± 0.97 c	86.68 ± 3.87 c

อักษรที่แตกต่างกันภายในคอลัมน์เดียวกัน มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

จากตารางที่ 4.18 พบว่า ใบเร่วที่ผ่านการลวกด้วยน้ำเดือดนาน 30 วินาที และ 60 วินาที เมื่อนำมาผ่านขั้นตอนการแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์ชาใบเร่ว พบว่า ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์โดยรวมในชาใบเร่วมีค่าสูงกว่าชาใบเร่วที่ไม่ผ่านการลวก และแนวโน้มกิจกรรมการต้านออกซิเดชันของสารสกัดในชาใบเร่วที่มีการเตรียมขั้นต้นโดยการลวกใบเร่วด้วยน้ำเดือดจะสูงกว่าชาใบเร่วที่ไม่มีการลวก และพบความสัมพันธ์เชิงบวกระหว่างปริมาณสารฟีนอลิก และฟลาโวนอยด์โดยรวมกับความสามารถในการรีดิวซ์ไอออนของเหล็ก โดยมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์เท่ากับ 0.973 และ 0.863 ตามลำดับ ที่ระดับนัยสำคัญ 0.01

ตารางที่ 4.19 สัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ระหว่างสารฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์โดยรวม และฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของสารสกัดชาใบเร่ว

	TPC	TFC	DPPH	ABTS	FRAP
TPC	1	0.903**	(-)0.498*	0.341	0.973**
TFC	0.903**	1	(-)0.297	0.211	0.863**
DPPH	(-)0.498*	(-)0.297	1	(-)0.622**	(-)0.560*
ABTS	0.341	0.211	(-)0.622**	1	0.504*
FRAP	0.973**	0.863**	(-)0.560*	0.504*	1

หมายเหตุ ** ที่ระดับนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.01$)

* ที่ระดับนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

4.20 ผลการวิเคราะห์ชนิดและปริมาณของกรดฟีนอลิกในผลิตภัณฑ์ชาใบเร่วผ่านขั้นตอนการเตรียมขั้นต้นต่างกันและวิธีการชงต่างกันโดยเทคนิค HPLC

นำผลิตภัณฑ์ชาใบเร่วที่ผ่านขั้นตอนการเตรียมขั้นต้นต่างกัน (ไม่ลวก ลวกน้ำเดือด 30 วินาที และลวกน้ำเดือด 60 วินาที) มาศึกษาผลของการชงชาใบเร่ว 2 วิธี คือ การเขย่าด้วยน้ำที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 6 ชั่วโมง และการใช้น้ำร้อนอุณหภูมิ $95 \pm 2^{\circ}\text{C}$ คนนาน 5 นาที เมื่อนำสารสกัดที่ได้มาวิเคราะห์กรดฟีนอลิกโดยเทคนิค HPLC ได้ผลดังตารางที่ 4.20

ตารางที่ 4.20 ชนิดและปริมาณกรดฟีนอลิกในชาใบเร่วที่ผ่านการเตรียมขั้นต้นและวิธีการชงต่างกัน

การเตรียม ใบเร่วขั้นต้น	การชง ชาใบเร่ว	ปริมาณกรดฟีนอลิก ($\mu\text{g} / \text{g dw}$)								
		p-OH	ChA	VA	CFA	SyA	p-CA	FA	EA	Total PA
ไม่ลวก	เขย่าน้ำ 37°C	$9.93 \pm$	276.63	$40.88 \pm$	$16.98 \pm$	$14.38 \pm$	$7.18 \pm$	$16.59 \pm$	$66.68 \pm$	$449.25 \pm$
	6 h	1.15 e	± 8.46 c	4.21 c	2.28 c	2.76 e	1.30 d	2.54 b	1.20 c	10.63 d
	น้ำร้อน $95 \pm 2^{\circ}\text{C}$	$8.14 \pm$	328.13	$22.38 \pm$	$1.64 \pm$	$6.85 \pm$	$20.65 \pm$	$9.61 \pm$	$32.13 \pm$	429.53
	คน 5 นาที	1.04 e	± 31.87 c	3.17 e	0.30 c	0.42 e	2.68 b	1.75 c	3.55 f	± 32.38 d
ลวก 30 วินาที	เขย่าน้ำ 37°C	$65.80 \pm$	1041.62	$54.52 \pm$	200.28	$174.40 \pm$	$29.27 \pm$	$20.70 \pm$	$78.19 \pm$	1664.78
	6 h	2.97 b	± 91.47 b	1.10 b	± 11.07 a	12.88 a	4.33 a	2.73 a	2.60 b	± 93.26 b
	น้ำร้อน $95 \pm 2^{\circ}\text{C}$	$40.35 \pm$	1303.79	$39.15 \pm$	$4.32 \pm$	$125.10 \pm$	$28.82 \pm$	$22.96 \pm$	$51.62 \pm$	1616.11
	คน 5 นาที	2.19 c	± 92.48 a	4.23 c	0.66 c	6.47 c	5.63 a	3.12 a	1.22 d	± 93.06 b
ลวก 60 วินาที	เขย่าน้ำ 37°C	$71.55 \pm$	1401.21	$65.33 \pm$	$165.35 \pm$	$158.57 \pm$	$14.22 \pm$	$14.77 \pm$	$86.62 \pm$	1977.62
	6 h	0.86 a	± 41.75 a	2.34 a	19.35 b	2.96 b	1.43 c	0.80 b	2.82 a	± 46.29 a
	น้ำร้อน $95 \pm 2^{\circ}\text{C}$	$29.57 \pm$	$1024.79 \pm$	$30.14 \pm$	$1.89 \pm$	$74.94 \pm$	$3.61 \pm$	$9.76 \pm$	$40.73 \pm$	1215.43
	คน 5 นาที	5.93 d	117.85 b	2.72 d	0.39 c	8.07 d	0.63 d	1.76 c	3.37 e	± 118.37 c

อักษรที่แตกต่างกันภายในคอลัมน์เดียวกัน มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

p-OH = กรดพาราไฮดรอกซิลเบนโซอิก ChA = กรดคลอโรจีนิก VA = กรดวานิลลิก CFA = กรดคาเฟอิก SyA = กรดไซรินจิก

p-CA = กรดพาราควมาริก FA = กรดเฟอร์ริก EA = กรดแอลลิจิก total PA = กรดฟีนอลิกทั้งหมด

จากตารางที่ 4.20 ปริมาณกรดฟีนอลิกในผลิตภัณฑ์ชาใบเร่วที่ผ่านการลวกใบเร่วมาก่อนจะมีปริมาณกรดฟีนอลิกสูงกว่าชาใบเร่วที่ไม่ผ่านการลวก ซึ่งสอดคล้องกับผลการวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกโดยรวม และพบว่าองค์ประกอบของกรดฟีนอลิกที่พบส่วนมาก คือ กรดคลอโรจีนิก รองลงมา คือ กรดคาเฟอิก และกรดไซรินจิก

สำหรับวิธีการชงชาใบเร่วด้วยน้ำร้อนอุณหภูมิ $95 \pm 2^{\circ}\text{C}$ คนนาน 5 นาที เทียบกับการชงในน้ำที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 6 ชั่วโมง พบว่า ปริมาณกรดฟีนอลิกรวมที่พบในชาใบเร่วทั้งสองไม่แตกต่างกัน ยกเว้นตัวอย่างชาใบเร่วที่ผ่านการลวก 60 วินาที ที่พบว่าการเขย่านาน 6 ชั่วโมง สูงกว่าการคนในน้ำร้อน แต่อย่างไรก็ตาม วิธีการชงชาสำหรับบริโภคทั่วไปใช้การชงหรือจุ่มแช่ในน้ำร้อนต้มเดือด ประมาณ 5-10 นาที

4.21 ผลการวิเคราะห์ชนิดและปริมาณของฟลาโวนอยด์ในผลิตภัณฑ์ชาใบเร่วผ่านขั้นตอนการเตรียมขั้นต้นต่างกันและวิธีการชงต่างกันโดยเทคนิค HPLC

นำผลิตภัณฑ์ชาใบเร่วที่ผ่านขั้นตอนการเตรียมขั้นต้นต่างกัน (ไม่ลวก ลวกน้ำเดือด 30 วินาที และลวกน้ำเดือด 60 วินาที) มาศึกษาผลของการชงชาใบเร่ว 2 วิธี คือ การเขย่าด้วยน้ำที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 6 ชั่วโมง และการใช้น้ำร้อนอุณหภูมิ 95 ± 2 องศาเซลเซียส คนนาน 5 นาที เมื่อนำสารสกัดที่ได้มาวิเคราะห์ฟลาโวนอยด์โดยเทคนิค HPLC ได้ผลดังตารางที่ 4.21

ตารางที่ 4.21 ชนิดและปริมาณฟลาโวนอยด์ในชาใบเร่วที่ผ่านการเตรียมขั้นต้นและวิธีการชงต่างกัน

การเตรียม ใบเร่วขั้นต้น	การชงชาใบเร่ว	ปริมาณฟลาโวนอยด์ ($\mu\text{g/g dw}$)				
		CC	EGCG	Ru	QCT	Total
ไม่ลวก	เขย่าน้ำ 37 °C, 6 h	53.88 $\pm$	127.58 $\pm$	2654.50 $\pm$	19.28 $\pm$	2855.24 $\pm$
		4.39 d	9.58 a	283.10 b	1.98 c	283.30 c
	น้ำร้อน 95 °C คน 5 นาที	86.63 $\pm$	62.66 $\pm$	1395.39 $\pm$	14.23 $\pm$	1558.91 $\pm$
		9.92 d	4.84 b	232.31 c	1.69 d	232.58 e
ลวก 30 วินาที	เขย่าน้ำ 37 °C, 6 h	865.58 $\pm$	121.76 $\pm$	4160.02 $\pm$	38.22 $\pm$	5185.58 $\pm$
		70.65 a	7.89 a	71.27 a	2.69 a	100.70 a
	น้ำร้อน 95 °C คน 5 นาที	676.54 $\pm$	54.82 $\pm$	2941.36 $\pm$	30.10 $\pm$	3702.82 $\pm$
		55.13 b	2.14 b	186.72 b	3.39 b	194.73 b
ลวก 60 วินาที	เขย่าน้ำ 37 °C, 6 h	873.90 $\pm$	125.80 $\pm$	4372.06 $\pm$	41.66 $\pm$	5413.42 $\pm$
		36.99 a	1.12 a	196.85 a	2.92 a	200.32 a
	น้ำร้อน 95 °C คน 5 นาที	429.21 $\pm$	55.63 $\pm$	1703.78 $\pm$	18.84 $\pm$	2207.46 $\pm$
		57.66 c	1.91 b	73.63 c	2.68 cd	93.58 d

อักษรที่แตกต่างกันภายในคอลัมน์เดียวกัน มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

CC = คาเทชิน EGCG = อีพิกัลโลคาเทชินแกลเลต Ru = รูทีน QCT = เควเซอทีน Total FA = ฟลาโวนอยด์ทั้งหมด

จากตารางที่ 4.21 ปริมาณฟลาโวนอยด์ที่ตรวจพบในผลิตภัณฑ์ชาใบเร่วที่ผ่านการลวกใบเร่วมาก่อนจะมีแนวโน้มคล้ายคลึงกับปริมาณกรดฟีนอลิก ซึ่งพบว่าใบเร่วที่ผ่านการลวกมาก่อนเมื่อนำมาผลิตเป็นชาพบว่า มีปริมาณฟลาโวนอยด์สูงกว่าผลิตภัณฑ์ชาใบเร่วที่ไม่ผ่านการลวก และพบว่าองค์ประกอบของฟลาโวนอยด์ที่ตรวจพบเรียงลำดับดังนี้ รูทีน คาเทชิน อีพิกัลโลคาเทชิน และเควเซอทีน ตามลำดับ

สำหรับวิธีการเขย่าด้วยน้ำที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 6 ชั่วโมง พบว่ามีปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมดสูงกว่าการชงด้วยน้ำร้อน 95 ± 2 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที ในทุกตัวอย่าง

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกและทดสอบฤทธิ์การต้านออกซิเดชันของสมุนไพรว่าสวายพันธุ์ *Amomum Chinense* C. โดยใช้ส่วนของลำต้นใต้ดิน และส่วนของใบเร่ว นำมาสกัดด้วยตัวทำละลายต่างกัน 4 ชนิด และระยะเวลาที่ใช้ในการสกัด 3 ช่วงเวลา เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดสารประกอบฟีนอลิก และทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งการเกิดออกซิเดชันของสารสกัดในแต่ละตัวทำละลาย หลังจากนั้นนำส่วนที่มีศักยภาพในการต้านการเกิดออกซิเดชันมาแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มชาสมุนไพร โดยศึกษาผลของการเตรียมขึ้นต้นสำหรับใบเร่ว และติดตามการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบของสารประกอบฟีนอลิกในระหว่างกระบวนการผลิตชาใบเร่ว และศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของชาใบเร่ว โดยการทดสอบสารสกัดชาใบเร่วโดยใช้วิธีเขย่าด้วยน้ำอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 6 ชั่วโมง เปรียบเทียบกับการชงชาใบเร่วด้วยน้ำร้อนอุณหภูมิ 95 ± 2 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที โดยผลการวิจัยสรุปได้ดังนี้

ตอนที่ 1 ผลของตัวทำละลายและระยะเวลาในการสกัดสารประกอบฟีนอลิกจากใบเร่วและลำต้นใต้ดินเร่ว พบว่าตัวทำละลาย และระยะเวลาที่เหมาะสมในการสกัดสารประกอบฟีนอลิกในใบเร่ว คือ สารละลาย 80% เมทานอล นาน 12 ชั่วโมง และการสกัดส่วนของลำต้นใต้ดิน สามารถใช้สารละลาย 80% เมทานอล หรือสารละลาย 80% เอทานอล ในเวลา 6 ชั่วโมง ซึ่งจะให้ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกสูงที่สุด และมีประสิทธิภาพในการต้านการเกิดออกซิเดชันทั้ง 3 วิธี คือ การยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH ABTS^{•+} และการรีดิวซ์เฟอริกไอออน (FRAP) มากที่สุด

ส่วนสกัดของใบเร่วมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิก และฟลาโวนอยด์โดยรวมสูงกว่าส่วนสกัดจากลำต้นใต้ดิน ประมาณ 2 เท่า ในทุกตัวทำละลาย และประสิทธิภาพของสารสกัดจากใบเร่วมีฤทธิ์ต้านการเกิดออกซิเดชันสูงกว่าส่วนสกัดที่มาจากลำต้นใต้ดิน และปริมาณสารฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ที่ตรวจพบโดยเทคนิค HPLC ในส่วนของใบเร่ว พบว่าองค์ประกอบของกรดฟีนอลิกที่พบ คือ กรดคลอโรจีนิค กรดซินนามิก กรดแอลลิจิก กรดเฟอรูลิก และกรดคาเฟอิก ส่วนองค์ประกอบของฟลาโวนอยด์ในใบเร่ว คือ คาเทชิน รูทีน อีพิกัลโลคาเทชินแกลเลต และเคเวเชอทิน ในขณะที่ส่วนในลำต้นใต้ดินจะพบสารประกอบฟีนอลิกปริมาณน้อย และองค์ประกอบกรดฟีนอลิกที่พบในลำต้นใต้ดินเร่ว คือ กรดแกลลิก

ตอนที่ 2 การตรวจติดตามความคงตัวของสารฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ในใบเร่ว ระหว่างขั้นตอนการแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์ชาใบเร่ว โดยการศึกษาผลของการเตรียมขึ้นต้นต่างกัน (ใบเร่วสดกับใบเร่วที่ผ่านการลวกในน้ำเดือดระยะเวลาต่างกัน 30 วินาที และ 60 วินาที) พบว่า การลวกใบเร่วก่อนนำมาผลิตชาใบเร่ว ส่งผลทำให้สารฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ในใบเร่วมีความคงตัวสูงกว่าใบเร่วที่ไม่ผ่านการลวกในทุกตัวอย่าง และขั้นตอนการคั่วและการอบแห้งซึ่งเป็นการให้ความร้อนทำให้ปริมาณสารฟีนอลิกสลายตัวไปบางส่วนจึงทำให้ปริมาณลดลงเมื่อเทียบกับขั้นตอนแรก แต่สารฟลาโวนอยด์โดยรวมในใบเร่วที่ผ่านการลวกและนำมาผ่านขั้นตอนให้ความร้อนโดยการคั่วและอบแห้งมีปริมาณเพิ่มขึ้น การใช้ 1% HCl ใน 80% เมทานอลสกัดตัวอย่างใบเร่วที่ผ่านขั้นตอนการแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์ชาใบเร่ว พบว่า ปริมาณสารฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ รวมทั้งประสิทธิภาพในการต้านการเกิดออกซิเดชันของสารสกัดสูงกว่าที่สกัดโดยใช้ 80% เมทานอล เนื่องจากกรดไฮโดรคลอริกและทำให้มีสารประกอบฟีนอลิกในรูปอิสระออกมาเพิ่มขึ้น

สำหรับปริมาณกรดฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ที่ตรวจโดยเทคนิค HPLC ในใบเร่วระหว่างที่ผ่านขั้นตอนต่าง ๆ ระหว่างการแปรรูปเป็นชาใบเร่ว พบว่า ปริมาณกรดฟีนอลิกที่พบโดยรวมในใบเร่วที่ผ่านการลวกมีปริมาณสูงกว่าใบเร่วสด 2-3 เท่า และเมื่อผ่านขั้นตอนการคั่วและอบแห้ง พบว่า ใบเร่วสดเมื่อคั่วและอบแห้งทำให้ปริมาณสารฟีนอลิกลดลง แต่ใบเร่วที่ผ่านการลวกมาก่อนแล้วจึงนำมาคั่วและอบแห้ง พบว่า ปริมาณสารฟีนอลิกมีแนวโน้มการเปลี่ยนแปลงเพิ่มขึ้น และองค์ประกอบที่ตรวจพบโดยเทคนิค HPLC คือ กรดคลอโรจีนิค กรดพาราไฮดรอกซิลเบนโซอิก กรดไซรินจิก และกรดแอลลิจิก ตามลำดับ ส่วนองค์ประกอบฟลาโวนอยด์ที่พบ คือ รูทีน คาเทชิน อีพิกัลโลคาเทชินแกลเลต และเคเวเชอทิน

ตอนที่ 3 การวิเคราะห์ปริมาณกรดฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ในชาใบเร่วที่มีการสกัดโดยวิธีต่างกัน นำชาใบเร่วมาสกัดโดยการเขย่าด้วยน้ำอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 6 ชั่วโมง เทียบกับการชงด้วยน้ำร้อนอุณหภูมิ 95 ± 2 องศาเซลเซียส คนนาน 5 นาที พบว่า

ปริมาณความชื้นในผลิตภัณฑ์ชาใบเร่วอยู่ในช่วงร้อยละ 3.06 - 3.84 ซึ่งเป็นไปตามเกณฑ์มาตรฐานของผลิตภัณฑ์ชาสมุนไพร ที่กำหนดค่าความชื้นไม่มากกว่าร้อยละ 10 โดยน้ำหนัก และพบว่าปริมาณสารประกอบฟีนอลิกโดยรวมในชาใบเร่วอยู่ในช่วง 6.22 - 26.46 มิลลิกรัมกรดแกลลิกต่อกรัมตัวอย่างแห้ง สารฟลาโวนอยด์โดยรวม อยู่ในช่วง 9.26 - 18.15 มิลลิกรัมคาเทชินต่อกรัมตัวอย่างแห้ง ความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH และ ABTS^{•+} มีค่าอยู่ในช่วง 62.08 - 68.21 และ 49.23-54.16 ไมโครโมลโพลีฟีนอลต่อกรัมตัวอย่างแห้ง ตามลำดับ และความสามารถในการรีดิวซ์เพอริกไดออกไซด์ มีค่าอยู่ในช่วง 30.92 - 174.42 ไมโครโมลโพลีฟีนอลต่อกรัมตัวอย่างแห้ง

การสกัดชาใบเร่วด้วยน้ำอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 6 ชั่วโมงมีปริมาณสารฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์โดยรวมรวมทั้งประสิทธิภาพในการยับยั้งอนุมูลอิสระ ABTS และความสามารถในการรีดิวซ์เพอริกไดออกไซด์สูงกว่าการชงในน้ำร้อนอุณหภูมิ 95 ± 2 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที แต่ความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH ของชาใบเร่วที่ชงด้วยน้ำร้อนสูงกว่าการแช่ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

ปริมาณกรดฟีนอลิกที่พบในชาใบเร่ว มีปริมาณกรดคลอโรจีนิก มากที่สุด อยู่ในช่วง 1,024.79-1,401.21 ไมโครกรัมต่อกรัมตัวอย่างแห้ง รองลงมา คือ กรดคาเฟอิก อยู่ในช่วง 165.35 - 200.28 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง และฟลาโวนอยด์ที่พบมากที่สุด คือ รูทีน อยู่ในช่วง 2,941.36 - 4,372.06 ไมโครกรัมต่อกรัมตัวอย่างแห้ง รองลงมา คือ คาเทชิน อยู่ในช่วง 429.21 - 873.90 ไมโครกรัมต่อกรัมตัวอย่างแห้ง

สรุปผลจากการวิจัยครั้งนี้ พบว่า องค์ประกอบและปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สำคัญในส่วนต่าง ๆ ของเร่ว คือ กรดคลอโรจีนิก รูทีน และคาเทชิน โดยเฉพาะอย่างยิ่งใบเร่วมีประสิทธิภาพในการต้านการเกิดออกซิเดชันได้ดี ดังนั้นจึงสามารถนำใบเร่วไปแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์ชาสมุนไพรเพื่อสุขภาพได้

5.2 ข้อเสนอแนะ

อาจมีการนำใบเร่วไปผสมกับใบพืชสมุนไพรชนิดอื่น ที่สามารถเพิ่มกลิ่น และรสชาติ หรือนำไปแปรรูปเป็นเครื่องดื่มสำเร็จรูป รวมทั้งเป็นการเพิ่มความสามารถต้านออกซิเดชันให้สูงขึ้น และการศึกษาความสามารถด้านการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ หรือการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส ของเร่วสายพันธุ์ *Amomum Chinense* C. เพื่อจะได้เป็นข้อมูลที่สามารถนำไปพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์อาหารอื่น ๆ หรือนำไปพัฒนาเป็นยา และเครื่องสำอางได้

บรรณานุกรม

- กฤติกา นรจิตร์ ญัฐฐา เลหากุลจิตต์ และอรพิน เกิดชูชื่น. 2550. ประสิทธิภาพการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของน้ำมันหอมระเหยที่สกัดจากพืชวงศ์ขิง 5 ชนิด. *อาหาร*. 37(3): 265-280.
- กันญารัตน์ ภิรมย์มัน. 2550. *ฤทธิ์ต้านออกซิเดชันและปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมของส่วนสกัดจากต้นกระเทียมป่าและว่านริดสีดวง*. ปริญญานิพนธ์ วิทยาศาสตร์บัณฑิต ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา. งามเนตร ระพันธ์. 2553. *การพัฒนาสารสกัดสมุนไพรจากสารสกัดใบขนุนตาบ๊วย*. วิทยานิพนธ์ วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยราชภัฏวไลยอลงกรณ์.
- จารวิ สุขประเสริฐ. 2550. *การเกิดและการป้องกันอนุมูลอิสระในตัวเอง*. กลุ่มฝึกอบรมเทคนิคทางห้องปฏิบัติการ วิทยาศาสตร์ชีวภาพ สำนักพัฒนาศักยภาพนักวิทยาศาสตร์ห้องปฏิบัติการ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์.
- จุฬาลักษณ์ ทวีบุตร. 2551. *การเพิ่มการสะสมแอนโทไซยานินในรากสะสมอาหารของกวาวเครือแดง (Butea superba Roxb.) ด้วยเอทิลฟอนและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดกวาวเครือแดง*. วิทยานิพนธ์ วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี.
- ดลฤดี จันทระปาโล. 2551. *ผลของความร้อนต่อปริมาณสารประกอบฟีนอลิกและสมบัติการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันของเปลือกผลไม้บางชนิดและผลของอุณหภูมิและ pH ต่อความเสถียรของสารประกอบฟีนอลิกและสมบัติการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันในสารสกัดจากเปลือกมะม่วง*. วิทยานิพนธ์ วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหาร.
- ธนศักดิ์ แซ่เลี้ยว ศศิธร จันทนารามกุล และวรรณจิรา ภาควิชาชีวเคมี. 2554. *ผลของตัวทำละลายต่อปริมาณสารประกอบฟีนอลิกและความสามารถในการต้านออกซิเดชันของกระชายเหลือง (Boesenbergia pandurata)*. ภาควิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- ปิยศิริ สุนทรนนท์. 2551. *สารต้านอนุมูลอิสระในดอกดาหลา*. วิทยานิพนธ์ วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.
- ปริยานุช อินทร์รอด. 2551. *ฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน และปริมาณสารประกอบฟีนอลรวมของส่วนสกัดจากต้นเร่วหอมและว่านสาวหลง*. ปริญญานิพนธ์ วิทยาศาสตร์บัณฑิต ภาควิชาชีวเคมี มหาวิทยาลัยบูรพา.
- ประภัสรา ศิริจันทร์แสง. 2551. *สมบัติและฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของไวน้กระชายดำ*. วิทยานิพนธ์ วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยขอนแก่น.
- พิมพ์เพ็ญ พรเฉลิมพงศ์ และนิธยา รัตนพานนท์. 2555. *สารต้านออกซิเดชัน*. online 22 ธันวาคม 2555. www.foodnetworksolution.com
- ภาณุพรรณศรี. 2541. *สมุนไพรสำคัญ วิเคราะห์ทางวิทยาศาสตร์แล้ว*. โรงพิมพ์รุ่งแสงการพิมพ์. 239 หน้า.
- ระวีวรรณ แก้วอมตวงศ์ และทรงพร จึงมั่นคง. 2549. ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH และปริมาณสารฟีนอลรวมของสารสกัดพืชสมุนไพรไทยบางชนิด. *วารสารวิชาการมหาวิทยาลัยอุบลราชธานี*. 8(2): 76-88.
- รุ่งโรจน์ เหน้คำ. 2551. *สมบัติของสารต้านอนุมูลอิสระที่สกัดจากผักกระถิน ผักแล้ว และผักคาวตอง*. วิทยานิพนธ์ วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.
- วิภาดา กันทยศ และยิ่งยง ไพสุสานติวัฒนา. 2554. ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและปริมาณแคโรทีนอยด์รวมในพืชสกุลขิงบางชนิดในประเทศไทย. *วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร*. 42(2) พิเศษ: 389-392.
- ศศิธร อุทตธี. 2549. *ฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน และปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมของส่วนสกัดเอทานอลของพืชบางชนิดในวงศ์ Zingiberaceae*. ปริญญานิพนธ์ วิทยาศาสตร์บัณฑิต ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา.
- สุนันทา วิบูลย์จัน. 1989. *การวิจัยทางด้านเคมีของสมุนไพรเร่ว*. รายงานวิจัย คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล.

- สุปรานี จอมแจ้ง. 2551. ปริมาณน้ำมันหอมระเหยจากเหง้ากระชายดำ (*Kaempferia parviflora* Wall. ex Bak.) และขมิ้นดำ (*Curcuma aeruginosa* Roxb.) (Zingiberaceae) ที่อายุการเก็บเกี่ยวแตกต่างกัน. วิทยานิพนธ์ วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (ชีววิทยา) มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.
- สุรัตน์วดี จิระจินดา มณฑา วงศ์มณีโรจน์ และณัฐวัฒน์ คลังทรัพย์. การพัฒนาผลิตภัณฑ์จากพืชในสกุลเร็ว. สถาบันวิจัย และพัฒนา กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- อติยา เรืองจักรเพ็ชร. 2550. ผลของปฏิกิริยาการเกิดสีน้ำตาลในมะขามป้อม และอายุของมะกอกน้ำ ต่อปริมาณฟีนอลิก ฟลาโวนอยด์ และกิจกรรมของสารต้านออกซิเดชัน. วิทยานิพนธ์ วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- อนันต์ สกุลกิม. 2551. อนุมูลอิสระ สารอันตรายต่อสุขภาพและร่างกาย. *ก้าวทันโลกวิทยาศาสตร์*. 8(1): 28-33.
- อุดมลักษณ์ สุขอิตตะ วิชัย หฤทัยธนาสันต์ และอุไรวรรณ ดิลกคุณานันท์. 2548. การศึกษาประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยจากพืชสมุนไพรบางชนิดในการยับยั้งเชื้อราที่ทำให้เกิดการเสื่อมเสียในผลิตภัณฑ์ขนมอบ. การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 43: 634-640.
- โอภา วัชรคุปต์ ปรีชา บุญจู จันทนา บุญยะรัตน์ และมาลีรักษ์ อัดตสินทอง. 2550. สารต้านอนุมูลอิสระ. พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพมหานคร: นิวไทม์มิตรการพิมพ์. 262 หน้า
- Ali, N.I.M., Annegowda, H.V., Mansor, S.M., Ismail, S., Ramanathan, S. and Mordi, M.N. 2012. Phytochemical screening, antioxidant and analgesic activities of *Croton argyratus* ethanolic extracts. *Journal of Medicinal Plants Research*, 6(21): 3724-3731.
- Benzie, I.F. and Strain, J.J. 1996. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: The FRAP assay. *Analytical Biochemistry*, 239: 70-76.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E. and Berset, C. 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Food Science and Technology*, 28: 25-30.
- Butsat, S. and Siriamornpun, S. 2010. Phenolic acid and antioxidant activities in husk of different Thai rice varieties. *Food Science and Technology International*, 16: 329-336.
- Chan, E.W.C. Lim, Y.Y., Wong, L.F., Lianto, F.S., Wong, S.K., Lim, K.K., Joe, C.E. and Lim, T.Y. 2008. Antioxidant and tyrosinase inhibition properties of leaves and rhizomes of ginger species. *Food Chemistry*, 109(3): 477-483.
- Chan, E.W.C. et al. 2009. Caffeoylquinic acids from leaves of *Etlingera* species (Zingiberaceae). *LWT-Food Science and Technology*, 42(5): 1026-1030.
- 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. *Food Chemistry*, 113(1): 166-172.
- Chew, K.K., Ng, S.Y., Thoo, Y.Y., Khoo, M.Z., Wan Aida, W.M. and Ho, C.W. 2011. Effect of ethanol concentration, extraction time and extraction temperature on the recovery of phenolic compounds and antioxidant capacity of *Centella asiatica* extracts. *International Food Research Journal*, 18: 571-578.
- Chun, W.U 2000. *Flora of China Illustrations*. 26: 1-431
- Djeridane A., Yousfi M., Nadjemi B., Boutassouna Stocker P. and Vidal N. 2006. Antioxidant of some Algerian medicine plants extracts containing phenolic compounds. *Food Chemistry*, 97: 654-660.
- Frankel, E.N. 1996. Antioxidants in lipid foods and their impact on food quality. *Food Chemistry*, 57(1): 51-55.

- Fukumoto, L.R. and Mazza, G. 2000. Assessing antioxidants and prooxidant activities of phenolic compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(8): 3597-3604.
- Ghasemzadeh A., Jaafar H. Z. E. and Rahmat A. 2010. Antioxidant activities, total phenolics and flavonoids content in two varieties of Malaysia young ginger (*Zingiber officinale* Roscoe). *Molecules*, 15: 4324-4333.
- Ghasemzadeh, A., Jaafar, H. Z. E. and Rahmat, A. 2011. Effect of solvent type on phenolics and flavonoids content and antioxidant activities in two varieties of young ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) extracts. *Journal of Medicinal Plants Research*, 5(7): 1147-1154.
- Halliwel, B. 1995. Antioxidant characterization: Methodology and mechanism. *Biochemical Pharmacology*, 49(10): 1341-1348.
- Halliwel, B. 1996. Antioxidant in human health and disease. *Annual Review of Nutrition*. 16: 33-50.
- Halliwel, B. 1996. Antioxidant in human health and disease. *Pharmacology*. 49(10): 1341-1348.
- Harborne, J.B., Baxter, H. and Moss, G.P. 1999. Phytochemical dictionary: Handbook of bioactive compounds from plants. 2nd ed. Taylor & Francis, London.
- Hasham-Hisam, R., Noor, N.M., Roslan, M.N., Sarmidi, M.R. and Aziz, R.A. 2011. Optimization of extraction conditions of antioxidant activity from *Zingiber zerumbet* Oleoresin. *Journal of Applied Sciences*, 11 (13): 2394-2399.
- Kim, Y.M., Kim, M.J., Zhang, J., Joo, H.J., Hwang, J.Y., Kim, J.I. and Choi, Y.S. 2007. Isolation of an active compound with alpha-glucosidase inhibitory activity from *Amomum xanthioides* Wallich. *FASEB Journal*, 21: 845 – 854.
- Lakhanpal, P. and Rai, D.K. 2007. Quercetin: a versatile flavonoid. *Internet Journal of Medical Update*, 2(2): 22-37.
- Lapornik, B., Prosek, M. and Wondra, A.G. 2005. Comparison of extracts prepared from plant by-products using different solvents and extraction time. *Journal of Food Engineering*, 71: 214-222.
- Lee, Y.S., Kang, M.H., Cho, S.Y. and Jeong, C.S. 2007. Effects of constituents of *Amomum xanthioides* on gastritis in rats and on growth of gastric cancer cells. *Archives of Pharmacol Research*, 30(4): 436-443.
- Li, H., Wong, C., Cheng, K. and Chen, F. 2008. Antioxidant properties *in vitro* and total phenolic contents in methanol extracts from medicinal plants. *Lebensmittel- Wissenschaft und-Technologie*, 41(3): 385-390.
- Lim, Y.Y. and Murtijaya, J. 2007. Antioxidant properties of *Phyllanthus amarus* extracts affected by different drying methods. *LWT-Food Science and Technology*, 40(9): 1664-1669.
- Liyana-Pathirana, C. and Shahidi, F. 2005. Optimization of extraction of phenolic compounds from wheat using response surface methodology. *Food Chemistry*, 93(1): 47-56.
- Mathew, J.J., Shiburaj, S.S. and George, V.V. 2003. Antimicrobial activity of *Amomum cannicarpum*. *Fitoterapia*, 74(5): 476-478.
- Marco, D., Joseph, V. and John, K. 1997. Mechanism of disease: antioxidants and atherosclerotic heart disease. *New England Journal of Medicine*, 6: 408-416.

- Miller, J.A. 1999. Functional foods and Health promotion. *Journal of Nutrition*, 129 (7 Suppl) : 1395S – 1397S
- Natta, L., Orapin, K., Krittika, N. and Pantip, B. 2008. Essential oil from five Zingiberaceae for anti food-borne bacteria. *International Food Research Journal*, 15(3): 337-346
- Okuda, T. and Ito, H. 2011. Tannins of constant structure in medicinal and food plants-hydrolyzable tannins and polyphenols related to tannins. *Molecules*, 16: 2191-2217.
- Ozsoy, N., Can, A., Yanardag, R. and Akev, N. 2007. Antioxidant activity of *Smilax Excelsa* L. leaf extracts. *Food Chemistry*, 110(3): 571-583.
- Prieto, P., Pineda, M. and Aguilar, M. 1999. Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E. *Analytical Biochemistry*, 269: 337-341.
- Puerta, T. 1999. Inhibition of leukocytes lipoxygenase by phenolics from virgin olive oil. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 57: 445-449.
- Rajalakshmi, D. and Narasimhan, S. 1996. Food antioxidants: source and methods of evaluations. In Food antioxidants, edited by Madhavi, D.L., Deshpande, S.S., Salunhe, D.K. (Marcel Decker, New York), pp 65-158.
- Robbins, R.J. 2003. Phenolic acids in foods: an overview of analytical methodology. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 51: 2866-2887.
- Rosnani, H.H., Noor, N.M., Roslan, M.N., Sarmidi, M.R. and Aziz, R.A. 2011. Optimization of extraction conditions of antioxidant activity from *Zingiber zerumbet* oleoresin. *Journal of Applied Sciences*, 11: 2394-2399.
- Rusak, G.; Komes, D., Likic, S., Horzic, D. and Kovac, M. 2008. Phenolic content and antioxidant activity Of green and white tea extracts depending on extraction conditions and the solvent used. *Food Chemistry*, 110(4): 852-858.
- Sabulal B., Dan M., Pradeep N. S., Valsamma R. K. and George V. 2006. Composition and antimicrobial activity of essential oil from the fruits of *Amomum cannicarpum*. *Acta Pharmaceutica*, (56)4: 473-480.
- Sanchez-Moreno C. 2002. Methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems. *Food Science and Technology International*, 8: 121-137.
- Shahidi, F. and Nackz, M. 2004. Phenolics in food and nutraceuticals. CRC Press. Washigton D.C. EEUU. pp 483-490.
- 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.
- Sun L., Yu J.G., Zhou L.D., Luo X.Z., Din W. and Yang S.L. 2002. Two flavone glycosides from Chinese traditional medicine *Amomum villosum*. *China Journal of Chinese Materia Medica*, 27 (1): 36-38.

- Tian, F., Li, B., Ji, B., Yang, J., Zhang, G., Chen, Y. and Luo, Y. 2009. Antioxidant and antimicrobial activities of consecutive extracts from *Galla chinensis*: The polarity effects the bioactivities. *Food Chemistry*, 113(1): 173-179.
- Vision J., Su X., Zubik L. and Bose P. 2001. Phenol antioxidation quantity and quality in foods: fruit. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 11: 5315-5321.
- Wong C., Li H., Cheng K. and Feng C.A. 2006. A systematic survey of antioxidant activity of 30 Chinese medicinal plants using the ferric reducing antioxidant power assay. *Food Chemistry*, 97: 705-711.
- Yang Y., Yan R.W., Cai X.Q., Zheng Z.L. and Zou G.L. 2008. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Amomum tsao-ko*. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 88(12): 2111-2116.

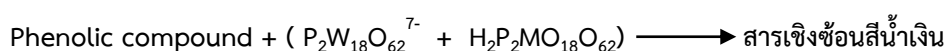
ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

การหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด

หลักการ

ปริมาณสารสกัดทำปฏิกิริยากับสารละลายโฟลีน ในสภาวะที่เป็นด่าง วิธีนี้จะเป็นการวัดสีของสารเชิงซ้อนสีน้ำเงินที่เกิดขึ้น โดยอาศัยปฏิกิริยารีดอกซ์ที่เกิดเนื่องจากโมลิบโดทังสเตนรีเอเจนต์ และดูการเปลี่ยนสีของสารประกอบซึ่งมีสีเหลืองเมื่อได้รับอิเล็กตรอนจากสารต้านอนุมูลอิสระเปลี่ยนเป็นสีน้ำเงิน วิเคราะห์โดยการวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 760 นาโนเมตร ซึ่งปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นดังสมการ



วิธีการทดลอง

1. การเตรียมสารละลายมาตรฐานแกลลิกให้มีความเข้มข้น 10, 20, 40, 80 และ 100 มิลลิกรัมต่อลิตร จากสารละลายมาตรฐานแกลลิกเข้มข้น 1000 มิลลิกรัมต่อลิตร
2. ปิเปตสารละลายทั้ง 5 ความเข้มข้น ชนิดละ 0.2 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลองแต่ละหลอด เติม Folin-Ciocalteu reagent 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน แล้วเติมโซเดียมคาร์บอเนต 10 เปอร์เซ็นต์ 0.8 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรให้ได้ 5 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น พักไว้ในอุณหภูมิห้อง 1 ชั่วโมง
3. นำสารละลายข้อ 2. ที่ได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 760 นาโนเมตร ด้วยเครื่องยูวี-วิสิเบิลสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ เพื่อสร้างกราฟมาตรฐานสารละลายกรดแกลลิก
4. ปิเปตสารสกัดตัวอย่าง 0.2 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง เติม Folin-Ciocalteu reagent 1 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ 5 นาที แล้วเติมโซเดียมคาร์บอเนต 10 เปอร์เซ็นต์ จำนวน 0.8 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรให้ได้ 5 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น พักไว้ในอุณหภูมิห้อง 1 ชั่วโมง นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 760 นาโนเมตร ด้วยเครื่องยูวี-วิสิเบิลสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ แล้ว คำนวณหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดโดยเทียบกับกราฟมาตรฐานกรดแกลลิก
5. รายงานผลเป็นมิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อตัวอย่างหนัก 1 กรัม น้ำหนักแห้ง (mg GAE/g dry weight)

$$\text{ปริมาณสารประกอบฟีนอลิก} = \frac{\text{มิลลิกรัมกรดแกลลิก}}{\text{กรัมของสารตัวอย่าง}}$$

ภาคผนวก ค

การวัดกิจกรรมการยับยั้งอนุมูลอิสระ ABTS

หลักการ

เป็นวิธีวัดทางอ้อมโดยใช้สาร ABTS ทำให้เป็นอนุมูลอิสระ โดยการออกซิไดซ์ด้วยโพแทสเซียมเปอร์ซัลเฟตให้กลายเป็น ABTS^{•+} ซึ่งเป็นอนุมูลที่มีสีฟ้าเขียว เมื่อเติมสารทดสอบที่มีกิจกรรมต้านออกซิเดชันจะทำให้ ABTS^{•+} ลดลง ซึ่งทำให้สีจางลง วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 734 นาโนเมตร

วิธีการทดลอง

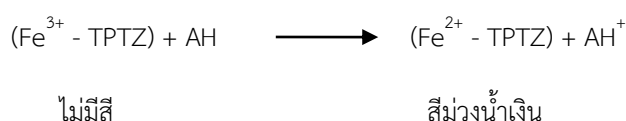
1. ปิเปตสารสกัด และสารละลายมาตรฐานโทรลล็อกซ์ ความเข้มข้น 0.05 – 0.4 มิลลิโมลาร์ ชนิดละ 0.2 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองแต่ละหลอด เติมสารละลาย ABTS^{•+} ที่มีความเข้มข้น 0.1 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 1.8 มิลลิลิตร เขย่าแล้วทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องภายใต้สภาวะมืดเป็นเวลา 30 นาที
2. วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร
3. นำค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งอนุมูลอิสระ ของสารละลายมาตรฐานโทรลล็อกซ์ ความเข้มข้น 0.05 – 0.4 มิลลิโมลาร์ ไปสร้างกราฟมาตรฐาน
4. นำค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งอนุมูลอิสระของสารสกัดตัวอย่าง เทียบกับสารละลายมาตรฐานโทรลล็อกซ์ และคำนวณความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระ ABTS^{•+}
5. รายงานผลเป็นปริมาณไมโครโมลโทรลล็อกซ์ ต่อน้ำหนักแห้ง 1 กรัม โดยใช้สูตรดังนี้

$$\% \text{ การยับยั้ง} = \frac{(A_0 - A_s)}{A_0} \times 100$$

เมื่อ A_0 = การดูดกลืนแสงของแบลนด์ (น้ำ + ABTS^{•+})
 A_s = การดูดกลืนแสงของสารสกัด (ตัวอย่าง หรือสารละลายมาตรฐาน + ABTS^{•+})

หลักการ

เป็นการวัดความสามารถในการรีดิวซ์ เพอริกไฮดรอกซีในสารเชิงซ้อนของเพอริกกับสาร 2,4,6-Tri (2-pyridyl) - S - triazine (TPTZ) จากสารที่ไม่มีสีเป็นสารที่มีสีฟ้า ภายใต้สภาวะที่เป็นกรดที่มีค่าพีเอชเท่ากับ 3.6 หากสารใดให้อิเล็กตรอนเพื่อเปลี่ยน Fe^{3+} - TPTZ ไปเป็น Fe^{2+} - TPTZ ได้จะมีค่าการดูดกลืนแสงเพิ่มขึ้น ซึ่งแสดงว่าสารนั้นมีความสามารถในการรีดิวซ์เหล็ก (Fe^{3+}) ไปเป็น (Fe^{2+}) ได้ดี สารใดที่ทำให้มีการดูดกลืนแสงเพิ่มขึ้น จะมีปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระมากวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 593 นาโนเมตร ดังสมการ



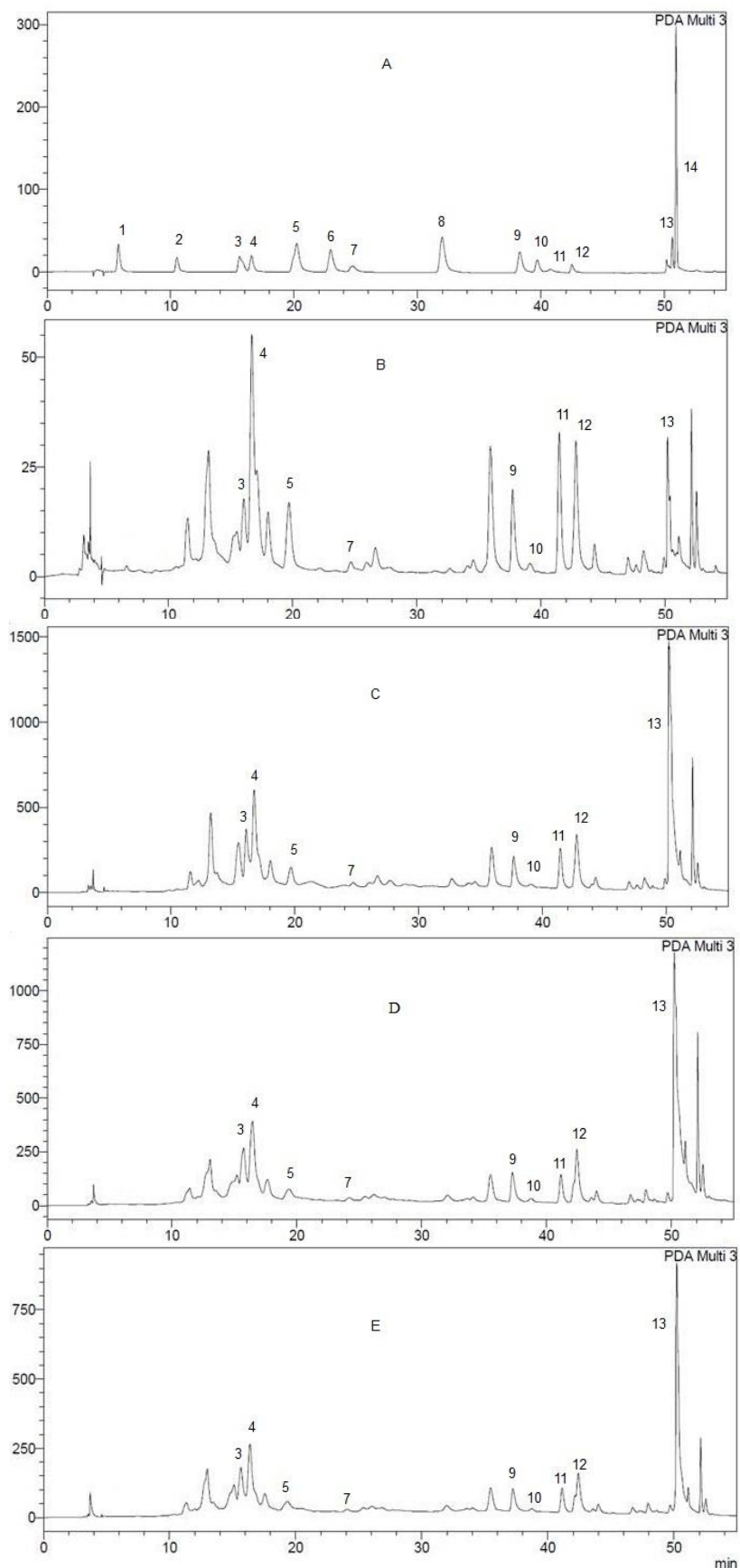
1. การเตรียม FRAP reagent ซึ่งจะประกอบไปด้วยสารละลาย 3 ชนิด ดังนี้

- 1.1 สารละลายบัฟเฟอร์ พีเอช 3.6 ($\text{CH}_3\text{COONa} + \text{CH}_3\text{COOH}$)
- 1.2 สารละลาย TPTZ 10 มิลลิลิตร ในกรดไฮโดรคลอริก 40 มิลลิโมลาร์
- 1.3 สารละลายเฟอร์ริก (III) คลอไรด์ ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) 20 มิลลิโมลาร์
2. ผสมสารละลายทั้งสามชนิดด้วยอัตราส่วน 10: 1: 1 โดยปริมาตร นำไปไว้ใน water bath ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เวลา 30 นาที ก่อนนำไปใช้
3. เตรียมสารละลายมาตรฐาน FeSO_4 1 มิลลิโมลาร์ เจือจางให้มีความเข้มข้นต่างกัน 5 ความเข้มข้น คือ 0.05, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 มิลลิโมลาร์
4. ปิเปตสารละลายมาตรฐาน FeSO_4 แต่ละความเข้มข้น 0.2 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองเดิม FRAP reagent 1.8 มิลลิลิตร อุ่นใน water bath ที่ 37 องศาเซลเซียส เวลา 30 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 593 นาโนเมตร เพื่อสร้างกราฟมาตรฐาน
5. ปิเปตสารสกัดตัวอย่าง 0.2 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองแต่ละหลอด เติม FRAP reagent 1.8 มิลลิลิตร เขย่า แล้วนำไปไว้ใน water bath ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 593 นาโนเมตร ด้วยเครื่องยูวี-วิสิเบิลสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ นำไปเทียบกับกราฟมาตรฐาน
6. รายงานค่า FRAP ในรูปของไมโครโมลเฟอร์รัสซัลเฟต ต่อ 1 กรัมตัวอย่างแห้ง

$$\text{ค่า FRAP} = \frac{\text{ไมโครโมลเฟอรูลซัลเฟต}}{\text{กรัมของสารตัวอย่าง}}$$

ภาคผนวก จ

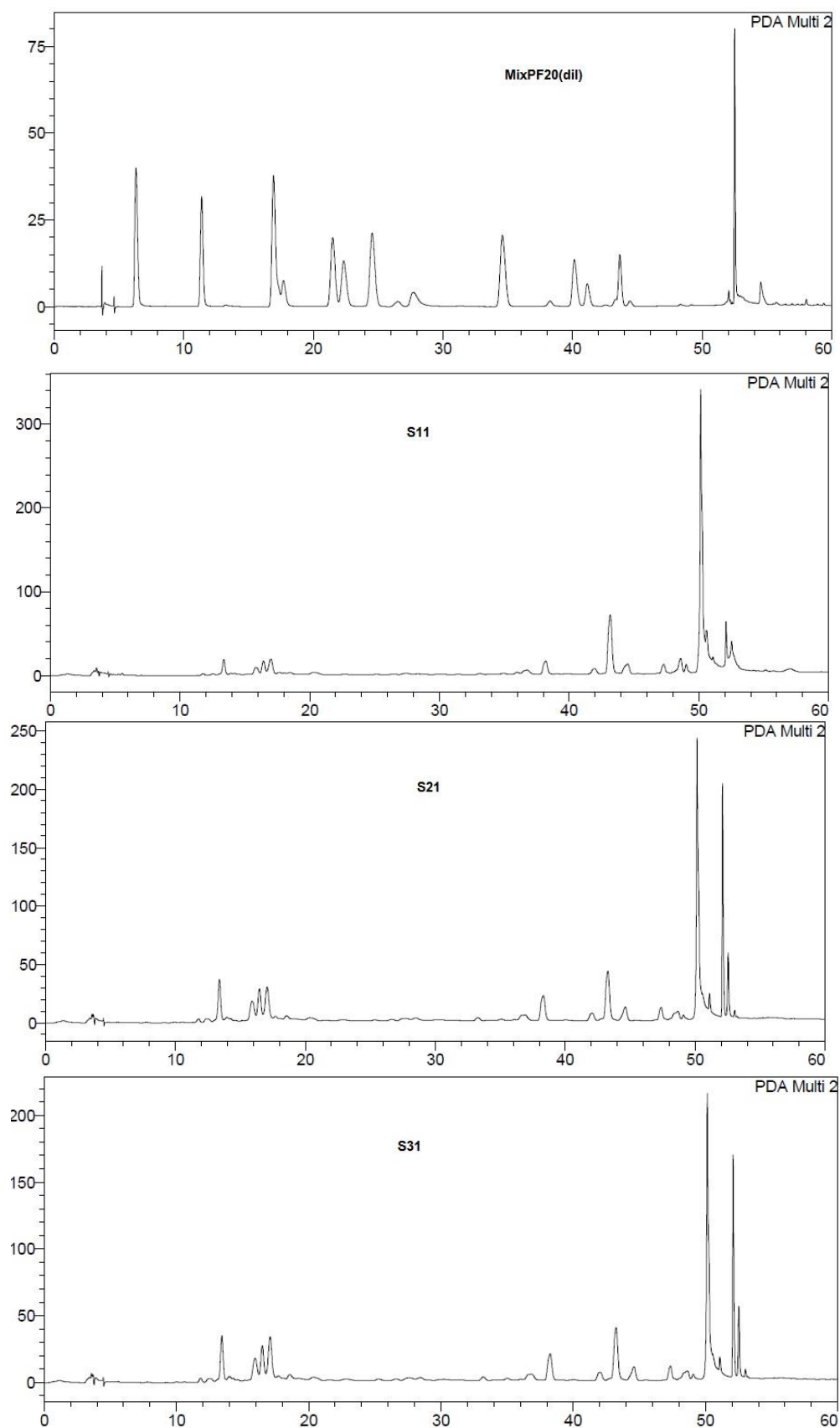
โครมาโทแกรมของสารสกัดจากใบเร่วในตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ



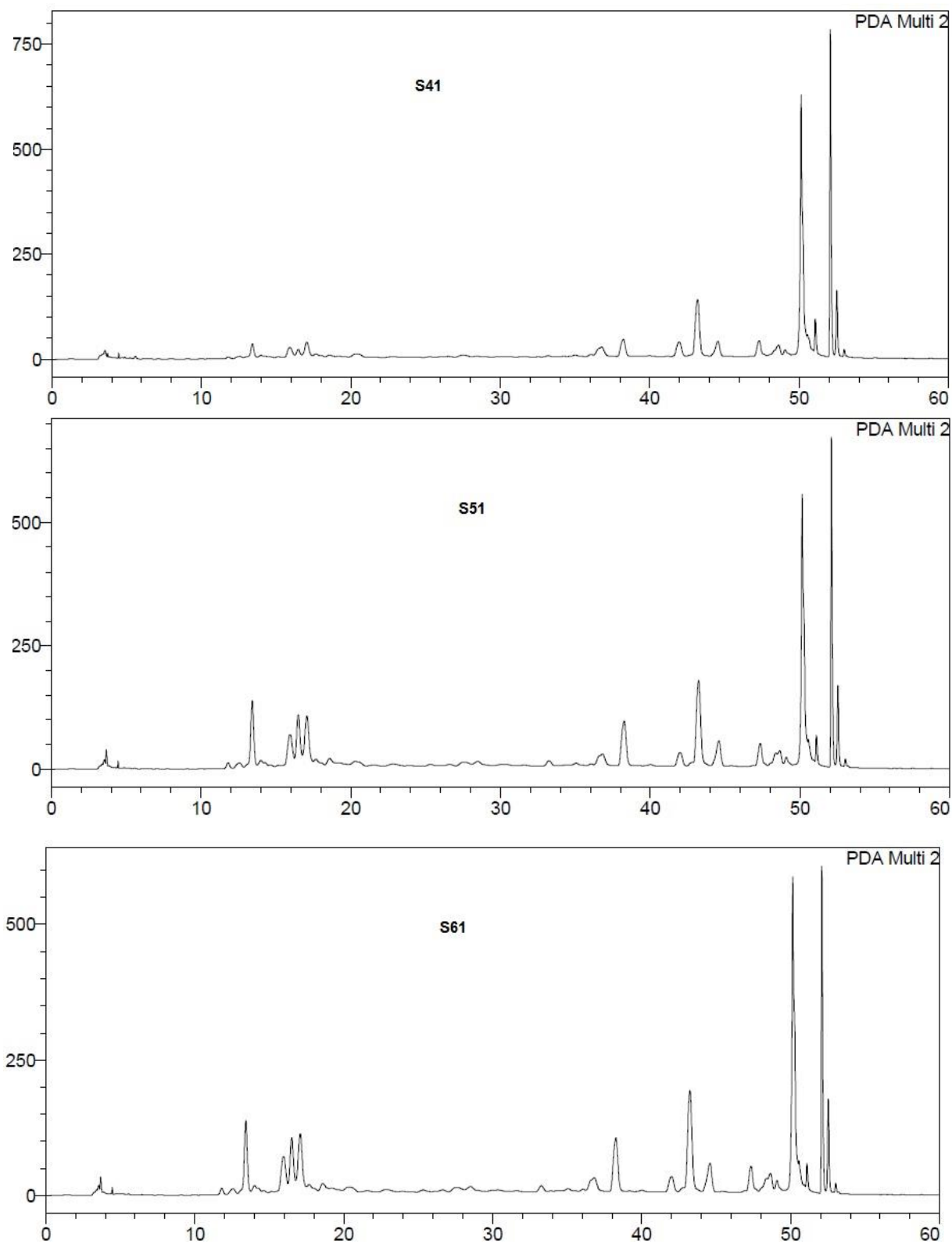
ภาพผนวก จ-1 โครมาโทแกรมของสารฟีนอลิกมาตรฐาน (A) สารสกัดของใบเร่วตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ น้ำกลั่น (B) 80% เมทานอล (C) 80% เอทานอล (D) และ 80% แอซีโตน (E)
 1 = กรดแกลลิก 2 = กรดโพรโทคาเทอูอิก 3 = คาเทชิน 4 = กรดคลอโรจีนิก 5 = กรดคาเฟอิก
 6 = กรดไซรินจิก 7 = อีพิกัลโลคาเทชินแกลเลต 8 = กรดพาราควมาริก 9 = กรดเฟอร์ริก
 10 = กรดซินแนปพิค 11 = กรดแอลลาจิก 12 = รุทีน 13 = เควเซทิน 14 = กรดทรานซินนามิก

ภาคผนวก ฉ

โครมาโทแกรมของสารสกัดจากใบเร่วในระหว่างขั้นตอนการผลิตชาใบเร่ว



ภาพผนวก ฉ-1 โครมาโทแกรมของสารมาตรฐานของกรดฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ (MixFA)
 และสารสกัดจากใบเร่วในระหว่างขั้นตอนการเตรียมขั้นต้น
 S11 = ใบเร่วสด S21 = ใบเร่วลวกน้ำเดือด 30 วินาที S31 = ใบเร่วลวกน้ำเดือด 60 วินาที

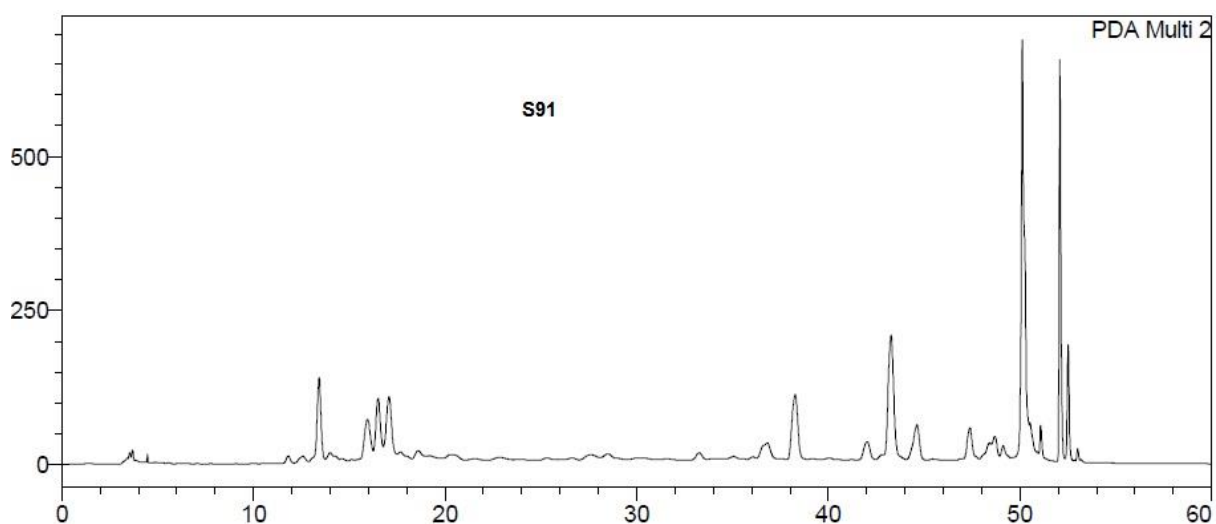
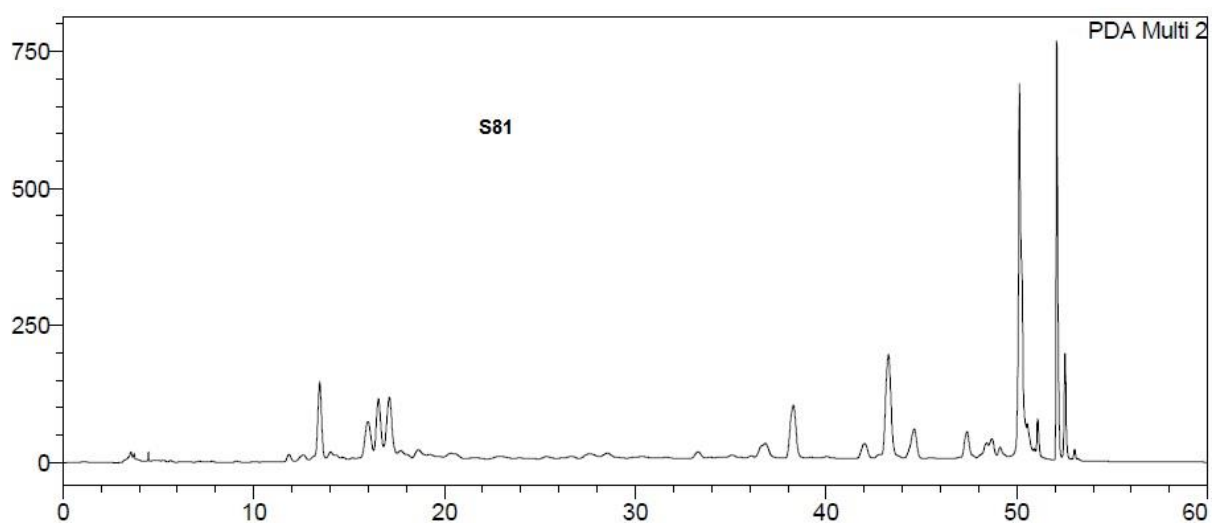
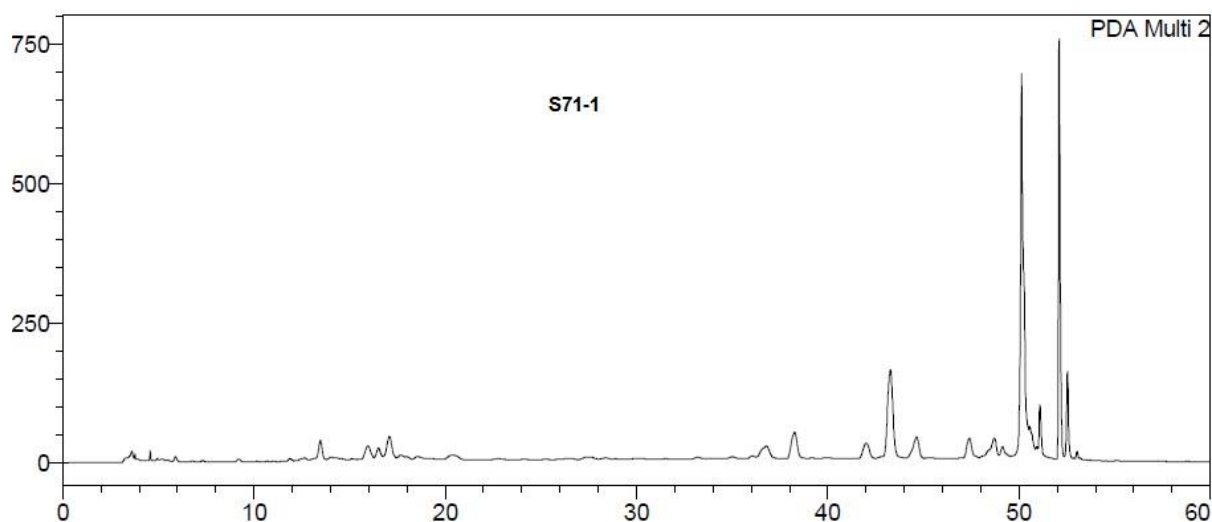


ภาพผนวก ฉ-2 โครมาโทแกรมของสารสกัดจากใบเร่วในระหว่างขั้นตอนการคั่ว

S41 = ใบเร่วสด คั่ว 10 นาที

S51 = ใบเร่วลวกน้ำเดือด 30 วินาที คั่ว 10 นาที

S61 = ใบเร่วลวกน้ำเดือด 60 วินาที คั่ว 10 นาที



ภาพผนวก ฉ-3 โครมาโทแกรมของสารสกัดจากใบเร่วในระหว่างขั้นตอนการอบแห้ง

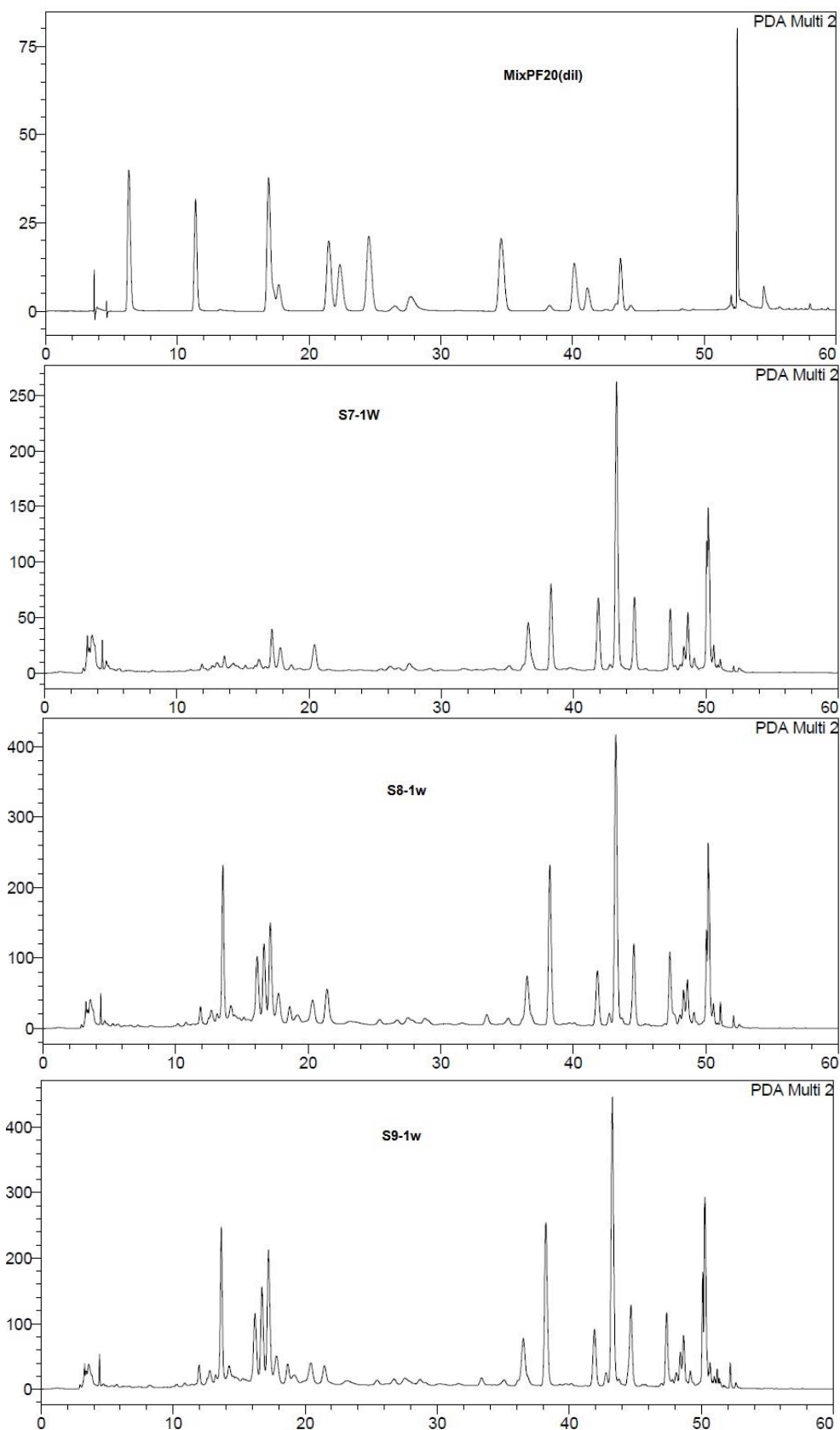
S71 = ใบเร่วสด คั่ว 10 นาที และอบแห้ง 50 องศาเซลเซียส 1 ชั่วโมง

S81 = ใบเร่วลวกน้ำเดือด 30 วินาที คั่ว 10 นาที และอบแห้ง 50 องศาเซลเซียส 1 ชั่วโมง

S91 = ใบเร่วลวกน้ำเดือด 60 วินาที คั่ว 10 นาที และอบแห้ง 50 องศาเซลเซียส 1 ชั่วโมง

ภาคผนวก ข

โครมาโทแกรมของขาไ้เร็วที่สกัดด้วยน้ำอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 6 ชั่วโมง
และขาไ้เร็วที่ขงในน้ำร้อนอุณหภูมิ 95 ± 2 องศาเซลเซียส คนนาน 5 นาที



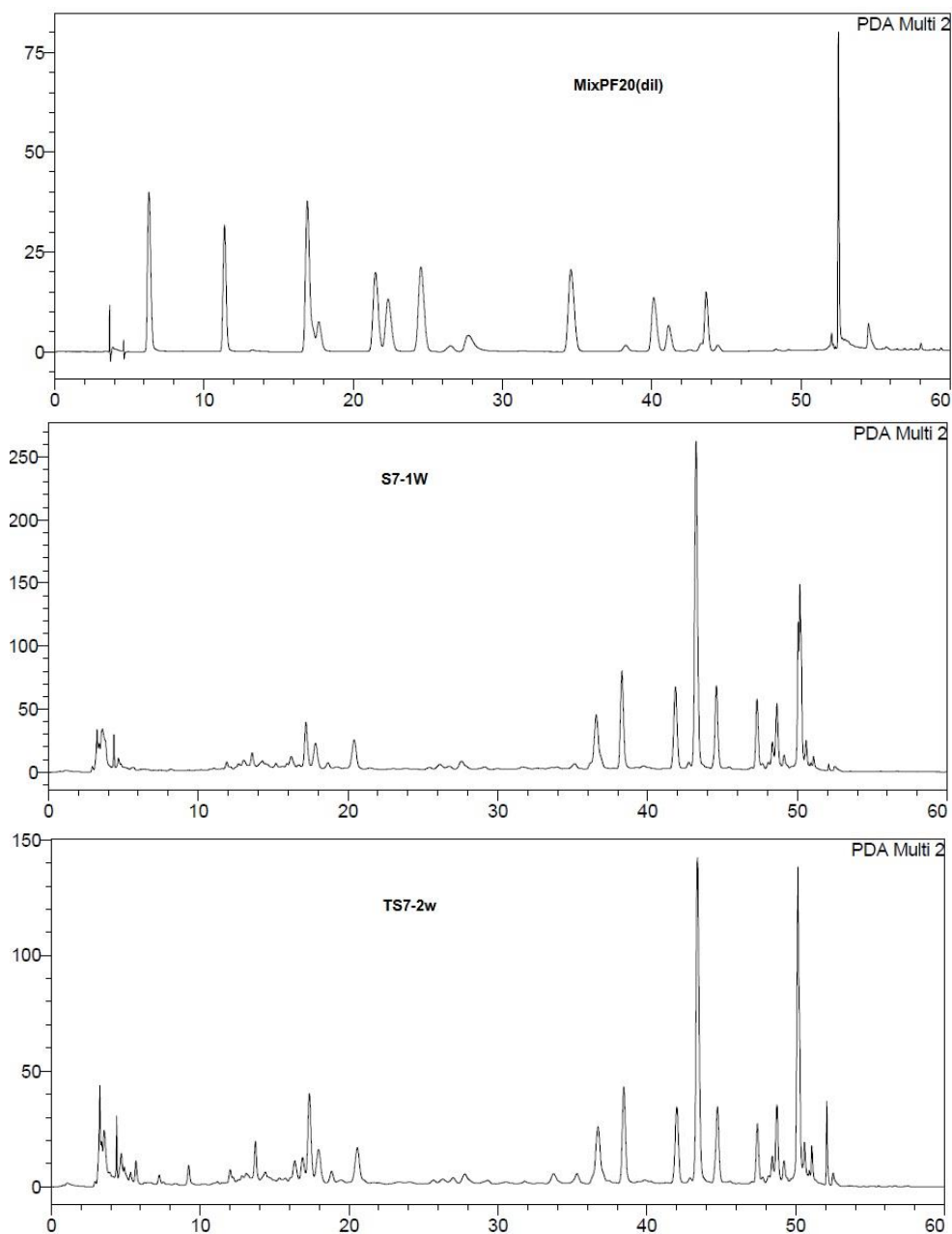
ภาคผนวก ข-1 โครมาโทแกรมของสารมาตรฐานกรดฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ (Mix PF)

และสารสกัดของชาใบเร่วที่สกัดด้วยน้ำอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 6 ชั่วโมง

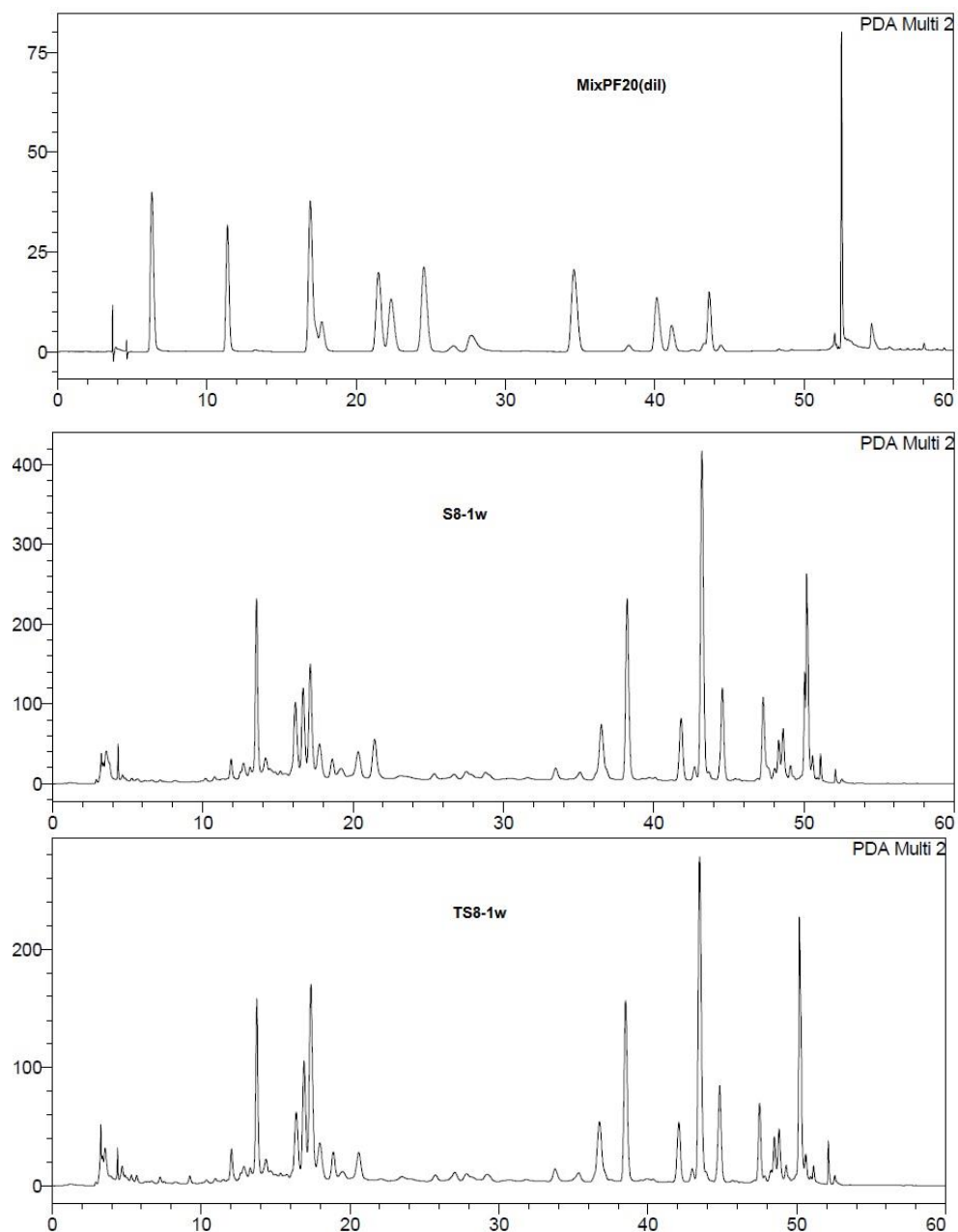
S7-1W =ชาใบเร่วที่ได้มาจากใบเร่วสด ผ่านการคั่ว และอบแห้ง

S8-1W =ชาใบเร่วที่ได้มาจากใบเร่วลวกน้ำเดือด 30 วินาที ผ่านการคั่ว และอบแห้ง

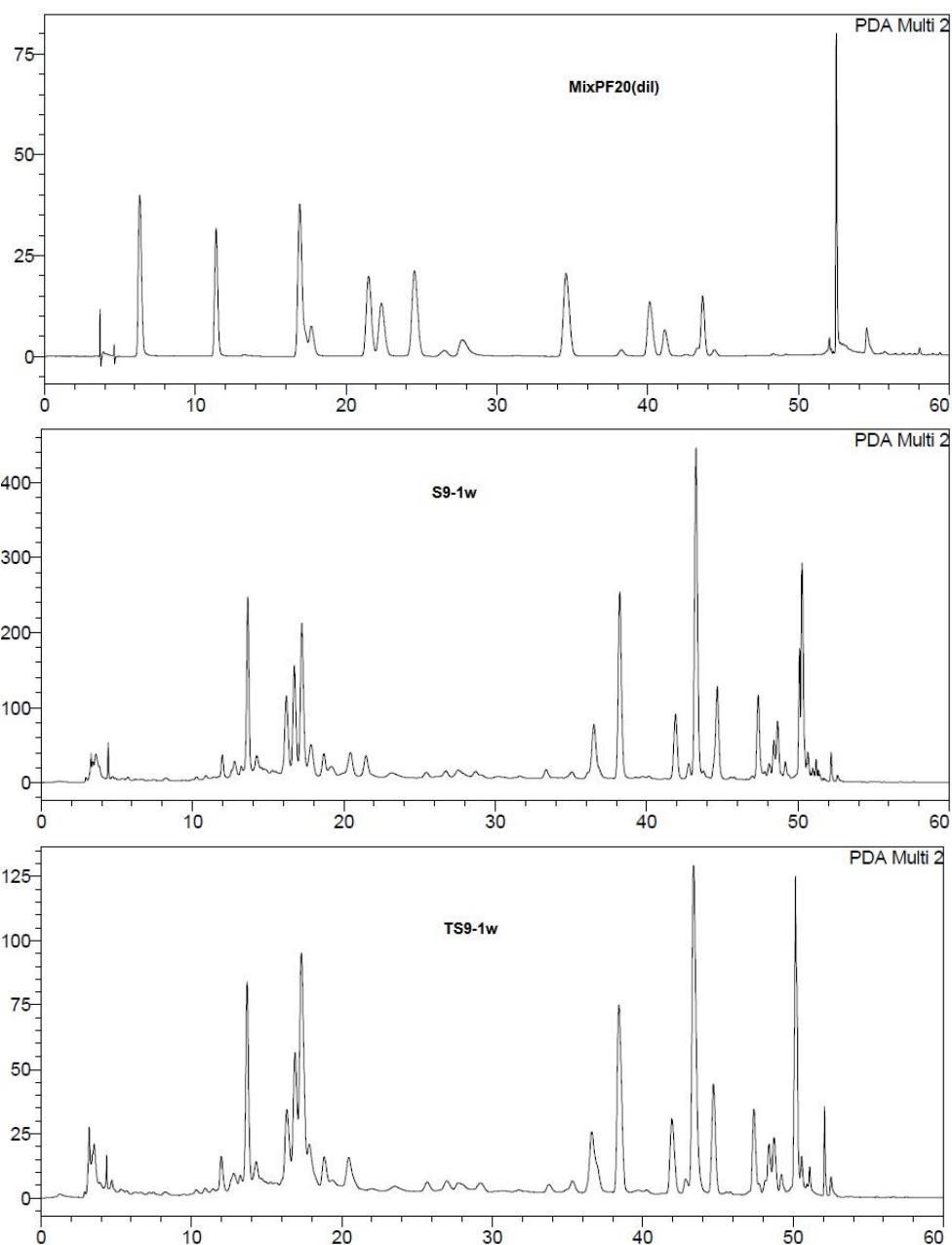
S9-1W =ชาใบเร่วที่ได้มาจากใบเร่วลวกน้ำเดือด 60 วินาที ผ่านการคั่ว และอบแห้ง



ภาคผนวก ข-2 โครมาโทแกรมของสารมาตรฐานกรดฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ (PF) และสารสกัดของชาใบเร่ว
 ที่ผ่านการเตรียมขั้นต้นจากใบเร่วสด
 S7-1W = สกัดด้วยน้ำอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 6 ชั่วโมง
 TS7-1W = สกัดด้วยน้ำร้อนอุณหภูมิ 95 ± 2 องศาเซลเซียส คณนาน 5 นาที



ภาคผนวก ข-3 โครมาโทแกรมของสารมาตรฐานกรดฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ (Mix PF) และสารสกัดของชาใบเร่ว
 ที่ผ่านการเตรียมขั้นต้นจากใบเร่วลวกในน้ำเดือดนาน 30 วินาที
 S8-1W = สกัดด้วยน้ำ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 6 ชั่วโมง
 TS8-1W = สกัดด้วยน้ำร้อนอุณหภูมิ 95 ± 2 องศาเซลเซียส คณนาน 5 นาที



ภาคผนวก ข-4 โครมาโทแกรมของสารมาตรฐานกรดฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ (Mix PF) และสารสกัดของชาใบเร่ว
 ที่ผ่านการเตรียมขึ้นต้นจากใบเร่วลวกในน้ำเดือดนาน 60 วินาที
 S9-1w = สกัดด้วยน้ำอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 6 ชั่วโมง
 TS9-1w = สกัดด้วยน้ำร้อนอุณหภูมิ 95 ± 2 องศาเซลเซียส คณนาน 5 นาที

ประวัติผู้วิจัย

ชื่อ-นามสกุล ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุนันท์ บุตรศาสตร์
สังกัด สาขาวิชาเทคโนโลยีการอาหาร คณะเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
 โทรศัพท์ที่ทำงาน 043-725439 โทรสาร 043-722117 มือถือ 086-7160257
 Email: sbutsat@hotmail.com

ประวัติการศึกษา

2519-2523 วิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาเคมี มหาวิทยาลัยรามคำแหง
 2528-2530 วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาการสอนเคมี มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
 2547-2548 คหกรรมศาสตรบัณฑิต สาขาธุรกิจอาหาร มหาวิทยาลัยสุโขทัยธรรมาธิราช
 2549-2552 ปรัชญาดุษฎีบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีการอาหาร มหาวิทยาลัยมหาสารคาม

ประสบการณ์การทำงาน

2524-2525 อาจารย์อัตราจ้าง โรงเรียนอานวยศิลป์ กรุงเทพฯ
 2526-2537 อาจารย์ โรงเรียนโพธิ์ทองพัฒนวิทยา อำเภอโพธิ์ทอง จังหวัดร้อยเอ็ด
 2537-2551 ผู้ช่วยศาสตราจารย์ สาขาวิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
 2552-2556 ผู้ช่วยศาสตราจารย์ สาขาเทคโนโลยีการอาหาร คณะเทคโนโลยีการเกษตร
 มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
 2557-ปัจจุบัน ประธานสาขาวิชาธุรกิจอาหารและโภชนาการ คณะเทคโนโลยีการเกษตร
 มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม

ผลงานทางวิชาการและงานวิจัย

สุนันท์ บุตรศาสตร์ 2542. เอกสารประกอบการสอน คู่มือปฏิบัติการเคมี1 สถาบันราชภัฏมหาสารคาม
 สุนันท์ บุตรศาสตร์ 2542. เทคโนโลยีเกี่ยวกับปิโตรเลียม สถาบันราชภัฏมหาสารคาม
 สุนันท์ บุตรศาสตร์ 2547. การวิเคราะห์สารพิษตกค้างในผักบริเวณตลาดสดเทศบาลเมืองมหาสารคาม. รายงานวิจัย
 มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
 นิตยา แซ่ซิ้ม สุนันท์ บุตรศาสตร์ ทองสุข พละมา เนตรชนก จันทร์สว่าง และอรุณรัตน์ อุทัยคุ 2548. การติดตามคุณภาพ
 น้ำบาดาลในเขตจังหวัดมหาสารคามเพื่อการบริโภคที่ดี. รายงานวิจัย. สภาวิจัยแห่งชาติ.
 สุนันท์ บุตรศาสตร์ 2549. การตรวจสอบคุณภาพน้ำบริเวณห้วยคเค้างในเขตมหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม รายงานวิจัย
 มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม.
 นิตยา แซ่ซิ้ม สุนันท์ บุตรศาสตร์ อรุณ โมนะตระกูล และเนตรชนก จันทร์สว่าง 2549. บทเรียนวิทยาศาสตร์ท้องถิ่น เรื่อง
 ดินเค็ม ในกรณีศึกษาบริเวณพื้นที่หนองบ่อ อำเภอบรบือ จังหวัดมหาสารคาม. รายงานวิจัย สำนักงาน
 คณะกรรมการการอุดมศึกษา.

ผลงานที่ได้รับการตีพิมพ์

สำราญ พิมราช สุนันท์ บุตรศาสตร์ อีระรัตน์ ชินแสน และถวัลย์ เกตมาลา. 2558. ปริมาณกาบาและกิจกรรมต้านอนุมูล
 อิสระของข้าวกล้องงอกพันธุ์พื้นเมือง 5 สายพันธุ์. เกษตรพระวรุณ. 12(1) : 35-40.
 Butsat, S., Weerapreeyakul, N. and Siriamornpun S. 2009. Change in phenolic acids and antioxidant
 activity in Thai rice husk at five growth stages during grain development. *Journal of Agricultural
 and Food Chemistry*, 57: 4566-4571.
 Butsat, S. and Siriamornpun, S. 2010. Antioxidant capacities and phenolic compounds of the husk, bran,
 and endosperm of Thai rice. *Food Chemistry*, 119(2): 606-613.

- Butsat, S.** and Siriamornpun, S. 2010. Phenolic acids and antioxidant activities in husk of different Thai rice varieties. *Food Science and Technology International*, 16:329-336.
- Butsat, S.** and Utaikoo, A. 2011. **Effect of drying methods on total phenolic content and antioxidant activity of crude extract from krapranghom (*paederia foetida*) root.** 1st International Conference on Science and Agricultural Technology, 21-22 July, 2011. Rajabhat Mahasarakham University, Mahasarakham province, Thailand
- Butsat, S.** and Siriamornpun, S. 2016. Effect of solvent types and extraction times on phenolic and flavonoid contents and antioxidant activity in leaf extracts of *Amomum Chinense* C. *International Food Research Journal*, 23(1) : 180-187
- Butsat, S.,** Boonsrichana, T., Porutso, Y. and Suttipapha, W. 2017. **Physicochemical properties and antioxidant activity of fruit yogurts.** The 7th International Conference on Sciences and Social Sciences. 11-12 January 2018. Rajabhat Mahasarakham University, 710-718
- Pimratch, S., **Butsat, S.** and Kesmala, T. 2015. Application of blue-green algae and mineral fertilization to direct seedling lowland rice. *Science Asia*, 41(5): 305-314

Effect of solvent types and extraction times on phenolic and flavonoid contents and antioxidant activity in leaf extracts of *Amomum chinense* C.

¹Butsat, S. and ²Siriamornpun, S.

¹Rajabhat Mahasarakham University, Division of Food Technology, Faculty of Agricultural Technology, Mahasarakham, Thailand

²Research Unit of Process and Product Development of Functional Foods, Department of Food Technology and Nutrition, Faculty of Technology Mahasarakham University, Mahasarakham, Thailand

Article history

Received: 28 January 2015

Received in revised form:

19 June 2015

Accepted: 26 June 2015

Abstract

The present study determined the phenolic and flavonoid contents in *Amomum chinense* C. leaf extracts obtained using four extracting solvents (distilled water, 80% methanol, 80% ethanol and 80% acetone) with various extraction times (6h, 12h and 24h) at 37°C. All extraction conditions significantly ($p < 0.05$) affected the phenolic contents and antioxidant activity of the leaf extracts. The optimal conditions used for extracting the phenolic compounds from *A. chinense* leaves were 80% methanol for 12h, which provided a higher amount of phenolics and antioxidant activity compared to the other conditions tested. There was a strong correlation between total phenolic content and antioxidant activities based on the three assays with correlation coefficients of 0.805, 0.873 and 0.975 for DPPH, ABTS and FRAP assays, respectively. HPLC analyses of all extracts revealed that the major phenolic acids identified in the tested extracts were chlorogenic acid, cinnamic acid, ferulic acid and caffeic acid, whereas catechin, rutin and quercetin were the major of flavonoids.

Keywords

Antioxidant capacity
Phenolic compounds
Extraction
Amomum chinense
RP-HPLC

© All Rights Reserved

Introduction

Herbs and spices are potent plants used as food, which contain antioxidant compounds (Dragland *et al.*, 2003). Several studies investigated the phenolic compounds found in herbs and spices, and they showed antioxidant capacities (Shan *et al.*, 2005; Norhaiza *et al.*, 2009). The herb plants in the family Zingiberaceae are widely used as medicine and food ingredients, and include *Zingiber officinale*, *Curcuma longa*, *Alpinia galangal* and *Amomum xanthioides* (Wu *et al.*, 2012). They contain several phenolic compounds and possess health promoting properties (Elzaawely *et al.*, 2007; Chan *et al.*, 2008; Ghasemzadeh *et al.*, 2010). The properties of the phenolic compounds presented in each plant material showed different antioxidant capacities depending on the factors used in the extraction, such as solvent type, extraction time, solvent concentration, extraction temperature and particle size of samples (Naczka and Shahidi, 2004; Sultana *et al.*, 2009; Chew *et al.*, 2011).

Amomum chinense Chun ex T.L. Wu., known as Reaw in Thai, is a member of the family Zingiberaceae. It is 1-1.5 m tall, its leaf sheath is conspicuously concave veined and the ligule is purple. It has been used for prevention and treatment

of cold, flu and cough. *Amomum* species are well known as medicinal herbs in South-east Asia and China, such as *Amomum tsao-ko* Crevost & Lemarie, *Amomum villosum* Lour., *Amomum krevanh* Pierre ex Gagnep and *Amomum xanthioides* Wall. Several studies have indicated that medicinal *Amomum* plants possess more potent antioxidant activity than common fruits and vegetables (Gan *et al.*, 2010; Makchuchit *et al.*, 2010). There are some reports in the literature that an essential oil in *A. xanthioides* seeds contain bornyl acetate, camphor, camphorene, limonene, beta-pinene, bitter orange oil alcohols (nerolidol), α -pinene, camphene, eucalyptol essential oils, linalool, alpha-pepper allyl guaiacyl alcohol (guaiaol) and others (Sabulal *et al.*, 2006). Recently, a water soluble portion was isolated from the methanolic extract of the *Amomum* seed, which is used as a medicine for stomachic and digestive disorders (Yamazaki *et al.*, 2000), and it contains monoterpenoid glucosides (Kitajima and Ishikawa, 2003). In addition, Kikuzaki *et al.* (2001) reported that the seed of *Amomum subulatum* presented an antioxidant activity and have potential health benefits. However, the antioxidant activity and phenolic compounds of crude extract from the leaves of other varieties of *Amomum*, especially *A. chinense* in Thailand, have not been reported. In addition, the

*Corresponding author.

Email: sbutsat@hotmail.com

quantity of phenolic compounds in various plants depends on the type of extraction conditions used (Lapornik *et al.*, 2005; Sultana *et al.*, 2009; Chew *et al.*, 2011). Results of previous studies showed that the difference in polarities of the extracting solvents and extraction time might influence the solubility of the chemical constituents and other antioxidants in plants, such as black and black mate and plant by-products (Lapornik *et al.*, 2005; Turkmen *et al.*, 2006), *Moringa oleifera* leaves (Siddhuvaj and Becker, 2003) and grape marc (Spignovet *et al.*, 2007). Therefore, in this study we aimed to determine the content and composition of phenolics and flavonoids from the leaves of *A. chinense*, and to evaluate the antioxidant activity of leaf extracts affected by various solvents and extraction times.

Materials and Methods

Chemicals and plant material

Trolox(6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethyl-chromane-2-carboxylic acid), DPPH(2,2'-diphenyl-1-hydrazyl), ABTS(2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt), potassium persulfate, sodium carbonate, Folin-Ciocalteu reagent, catechin and gallic acid were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). All chemicals used in the experiments were analytical grade. The leaf of *A. chinense* Chun ex T.L. Wu (local Thai name Reaw or Maak Naeng) was collected from northeastern Thailand and authenticated by Pramote Triboon from the Plant Varieties Protection Division, Bangkok Herbarium, Thailand.

Preparation of leaf extracts

The leaves of *A. chinense* were washed to remove contaminants and dried at 50°C in a hot air oven. Then the dried sample was blended and passed through a 35 mesh sieve to obtain particle size unity. Dried samples were extracted with four solvents (distilled water, 80% methanol, 80% ethanol and 80% acetone) in a flask at a sample to solvent ratio of 1:10 (w/v). The mixtures were extracted using an incubator shaker (NB-205QF) at 200 rpm and 37°C for extraction times of 6h, 12h and 24h. The extracts were filtered and then evaporated to dryness under a reduced pressure and the extraction yields were then measured.

Determination of total phenolic content

Total phenolic contents (TPC) of the extracts were determined using Folin-Ciocalteu reagent according to the method of Butsat and Siriamornpun (2010). Briefly, 0.2 ml of the extract was transferred

in triplicate to separate flasks containing of 1.0 ml of a 1/10 dilution of Folin Ciocalteu's reagent in distilled water. Then, 0.8 ml of Na₂CO₃ (10% w/v) was added in each flask and the final volume was adjusted to 5 ml with distilled water. The flasks were kept at room temperature for 60 min and then the absorbance of the extracts was measured at 760 nm in a Perkin-Elmer UV-Visible spectrophotometer (Lambda12). The TPC was expressed as milligram gallic acid equivalent per gram dried sample (mg GAE/g dw).

Determination of total flavonoid content

Total flavonoid contents (TFC) of the extracts were measured according to the method of Sultana *et al.* (2009) with some modifications. The extract (0.5 ml) was transferred to a 5 ml volumetric flask and 0.3 ml of 5% NaNO₂ was added to the flask, wait for 5 min, 0.3 ml of 10% AlCl₃ was added to the mixture and wait for 6 min then 1 ml of 1M NaOH was added. The mixture solution was adjusted to 5 ml with distilled water and allowed to stand for 30 min. The absorbance of the extract was measured at 510 nm and standard catechin was used to make the calibration curve. The TFC was expressed as milligram catechin equivalents per gram dried sample (mg CE/g dw). All experiments were analyzed in triplicate.

DPPH radical scavenging activity

DPPH radical scavenging activity was measured according to the method of Butsat and Siriamornpun (2010). Briefly, 0.2 ml of the sample extracts was pipette into a test tube, then 1.8 ml of 0.1 mM methanolic DPPH was added and swirled to mix. The mixture was incubated at room temperature in the dark for 30 min. The absorbance of the sample was measured at 517 nm using a Perkin-Elmer UV-Visible spectrophotometer versus methanol as a solvent blank. Trolox with a concentration range of 0.05 – 0.40 mM was used as a positive standard. All experiments were performed in triplicate. The result was expressed as micromole Trolox equivalent per gram dried sample (μmol TE/g dw).

ABTS radical scavenging activity

ABTS radical scavenging activity was measured using the method of Rusak *et al.* (2008) with some modification. Briefly, ABTS radicals (ABTS^{o+}) were prepared by mixing 88 ml of 140 mM potassium persulfate solution and 5 ml of 7 mM ABTS, and letting it stand in the dark for 16 h. Freshly-prepared ABTS^{o+} was diluted with distilled water to an absorbance of 0.7 ± 0.05 at 734 nm. The extracts (0.2 ml) were mixed with 1.8 ml of diluted ABTS^{o+} solution and left to stand for 6 min, after which the

absorbance of the mixed extracts was measured at 734 nm. Trolox in the concentration range of 0.05 – 0.5 mM was used as a standard to create a calibration curve. The results were expressed as μmol Trolox equivalent per gram dried sample ($\mu\text{mol TE/g dw}$).

Ferric reducing ability power (FRAP) assay

The FRAP assay was conducted following Benzie and Szeto (1999), with some modifications. Firstly, the FRAP reagent was prepared by mixing acetate buffer (pH 3.6), 10 mM TPTZ in 40 mM HCl and 20 mM $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ at a ratio of 10:1:1 respectively. Pipette 0.2 ml of extract into a test tube and mix with 1.8 ml of FRAP reagent and incubate at 37°C in a water bath for 30 min. The absorbance of the mixed solution was measured at 593 nm and Trolox (0.10–0.50 mM) was used to make a standard calibration curve. All measurements were performed in triplicate and expressed as μmol Trolox equivalent per gram dried sample ($\mu\text{mol TE/g dw}$).

Identification of phenolic acids and flavonoids compounds

The identification was done by RP-HPLC according to a modified method described by Sharma *et al.* (2005). Extracted samples were filtered through a 0.45 μm PTFE syringe tip filter using a 20 μl sample loop. The sample was analyzed using a RP-HPLC system equipped with a Shimadzu PDA detector on a reverse phase (RP C-18) column Interstil ODS-5 μm x 4.6 mm x 250 mm. The flow rate was set at 0.8 ml/min at 37°C. To perform this study a gradient of two mobile phases was used. Solvent A: 1% aqueous acetic acid solution (pH 2.7), and solvent B: acetonitrile. The gradient profile was linearly altered as follows (total run time 65 minutes): 0 min, 95:5; 5 min, 91:9; 22 min, 88:12; 38 min, 82:18; 43 min, 77:23; 44 min, 10:90; 45 min, 80:20 and hold until 55 min; 60 min, 95:5. After each run, the system was reconditioned for 10 min before analysis of the next sample. Under these conditions, 20 μl of each sample were injected. External polyphenolic standards were used as the external reference. Individual polyphenols in the sample were identified by comparison of their retention times with the external polyphenolic standards. The detection was carried out at 280 nm for hydroxybenzoic acids and flavanols, at 320 nm for hydroxycinnamic acids and 360 nm for flavonols. All sample analyses were done in triplicate.

Statistical analysis

The experiments were carried out in triplicate and the results were expressed as means $\pm$ standard deviations. Statistical analysis of variance was

performed by ANOVA and significant differences between the means were determined by Duncan's Multiple Range Test. In addition, correlation coefficients were calculated at a significant difference confident limit of 95%.

Results and Discussion

Extraction yield, total phenolic content and total flavonoid content

The difference in polarities of the extraction solvents might influence the solubility of the chemical constituents in a sample and its extraction yield. Therefore, the selection of an appropriate solvent system is one of the most relevant steps in optimizing the recovery of TPC, TFC and other antioxidant compounds from a sample (Ghasemzadeh *et al.*, 2011). Table 1 shows a list of the extraction yields, TPC and TFC obtained from the four solvent extractions of *A. chinense* leaves. The 80% methanol extract of *A. chinense* leaves for 12h gave the greatest yield, whereas the water extract in the same extraction time had the lowest yield. However, no significant differences in extraction yield between the 80% methanol and 80% ethanol were detected at all extraction times. Our results are similar to those reported by Ghasemzadeh *et al.* (2011), where the methanol solvent was most effective in extracting phenolic compounds from young ginger. According to some researchers, aqueous methanol and ethanol have been proven as effective solvents to extract phenolic compounds from different plants (Siddhuraju and Becker, 2003; Sultana *et al.*, 2009). Our findings are in agreement with a previous investigation by Sultana *et al.* (2009) who reported that the higher extract yields were found in the 80% aqueous methanol of selected medicinal plants, included *M. oleifera*, *Azadirachta indica*, *Terminalia arjuna*, *Acacia nilotica*, *Eugenia jambolana* and *Aloe barbadensis*.

The phenolic and flavonoid contents in different extracts of *A. chinense* leaves are shown in Table 1. The TPC was between 0.06 to 8.33 mg GAE/g dw. The TFC varied from 0.14 to 9.04 mg CC/g dw. The highest phenolic and flavonoid contents obtained were from 80% methanol, followed by 80% ethanol, 80% acetone and distilled water. In this study the TPC of the 80% methanol extract was found to be higher than *Amomum kravanh* (2.77 mg GAE/g dw) but similar to *A. tsao-ko* (7.15 mg GAE/g dw) and *A. villosum* (9.29 mg GAE/g dw), which were reported by Gan *et al.* (2010). These results are in agreement with the findings of Ghasemzadeh *et al.* (2011) who reported that methanolic extracts from

Table 1. Effect of solvent type and extraction time on antioxidant activity, extraction yield and total phenolic and total flavonoid contents of extracts from leaves of *Amomum chinense* C.

Time (h)	Solvent	Extraction yield (g/100 g dw)	TPC (mg GAE/g dw)	TFC (mg CC/g dw)
6	Distilled water	4.68 ± 0.29 c	0.50 ± 0.05 g	0.47 ± 0.07 f
	80% Methanol	6.27 ± 0.49 b	7.06 ± 0.53 bc	7.37 ± 0.38 b
	80% Ethanol	5.50 ± 0.67 b	5.26 ± 0.36 de	5.45 ± 0.14 de
	80% Acetone	3.75 ± 0.75 c	4.41 ± 0.48 ef	4.51 ± 0.23 e
12	Distilled water	2.48 ± 0.17 d	0.22 ± 0.04 h	0.40 ± 0.04 f
	80% Methanol	7.20 ± 0.42 a	8.33 ± 1.55 a	9.04 ± 0.94 a
	80% Ethanol	6.43 ± 0.24 ab	5.95 ± 0.34 cd	6.42 ± 0.84 c
	80% Acetone	4.95 ± 0.61 c	4.71 ± 0.55 def	5.04 ± 0.22 de
24	Distilled water	2.68 ± 0.25 d	0.06 ± 0.01 i	0.14 ± 0.01 g
	80% Methanol	6.45 ± 0.69 ab	7.63 ± 1.18 ab	8.75 ± 0.97 a
	80% Ethanol	6.12 ± 0.44 b	5.82 ± 0.65 d	5.67 ± 0.63 cd
	80% Acetone	4.41 ± 0.50 c	3.91 ± 0.59 f	5.10 ± 0.18 de

Values are mean ± SD; n=3.

Different letters within the same column denote significant differences (p < 0.05)

Table 2. Effect of solvent type and extraction time on antioxidant activity of extracts from leaf of *Amomum chinense* C.

Time (h)	Solvent	DPPH (μmol TE/g dw)	ABTS (μmol TE/g dw)	FRAP (μmol TE/g dw)
6	Distilled water	1.18 ± 0.07 e	1.10 ± 0.06 g	3.93 ± 0.15 f
	80% Methanol	71.93 ± 1.51 a	50.04 ± 3.75 a	82.50 ± 3.39 b
	80% Ethanol	55.35 ± 4.77 d	38.62 ± 1.05 d	54.58 ± 2.29 cd
	80% Acetone	0.97 ± 0.19 e	13.79 ± 1.33 e	49.88 ± 7.93 de
12	Distilled water	0.97 ± 0.11 e	0.43 ± 0.10 h	1.49 ± 0.40 g
	80% Methanol	70.22 ± 1.97 ab	46.27 ± 2.24 b	117.89 ± 10.74 a
	80% Ethanol	65.56 ± 4.28 c	42.64 ± 1.76 c	79.02 ± 1.93 b
	80% Acetone	0.71 ± 0.14 e	6.73 ± 1.02 f	53.27 ± 6.87 cd
24	Distilled water	0.44 ± 0.09 f	0.29 ± 0.06 h	0.09 ± 0.02 h
	80% Methanol	66.37 ± 3.96 bc	46.32 ± 2.86 b	86.54 ± 7.94 b
	80% Ethanol	62.17 ± 2.70 c	37.21 ± 1.84 d	60.79 ± 3.05 c
	80% Acetone	0.75 ± 0.15 e	7.36 ± 1.13 f	43.55 ± 4.01 e

Data are expressed as mean ± SD of triplicate experiments. Values in the same column bearing different letters are significantly different at p < 0.05.

young ginger parts were more effective compared to those extracted by acetone and chloroform. Similarly, aqueous methanol was found to be more effective in recovering the highest amount of phenolic compounds from *M. oleifera* leaves (Siddhuraju and

Becker, 2003). Solvents with different polarities have significant effects on the phenolic content (Turkmen *et al.*, 2006). In addition, the TPC and TFC values in all extracts, except for the water extract, increased when the extraction time was prolonged from 6h

Table 3. Phenolic acid composition of extracted samples from *Amomum Chinese* leaves under different conditions

Solvent	time (h)	ChA ($\mu\text{g/g}$)	CFA ($\mu\text{g/g}$)	FA ($\mu\text{g/g}$)	SnA ($\mu\text{g/g}$)	EA ($\mu\text{g/g}$)	CmA ($\mu\text{g/g}$)	Total PA ($\mu\text{g/g}$)
Distilled water	6	146.58 $\pm$ 5.73 f	20.57 $\pm$ 1.68 h	30.61 $\pm$ 1.21 g	2.05 $\pm$ 0.10 f	6.71 $\pm$ 0.47 gh	1.28 $\pm$ 0.25 e	207.80 $\pm$ 6.12 g
	12	163.37 $\pm$ 6.07 f	35.54 $\pm$ 3.36 g	15.83 $\pm$ 0.63 h	2.08 $\pm$ 0.12 f	5.25 $\pm$ 0.53 h	0.53 $\pm$ 0.03 e	222.60 $\pm$ 6.99 g
	24	190.82 $\pm$ 4.49 f	37.09 $\pm$ 1.56 g	15.14 $\pm$ 0.65 h	4.25 $\pm$ 0.84 f	3.58 $\pm$ 0.39 h	1.99 $\pm$ 0.26 e	252.87 $\pm$ 4.89 g
80% MeOH	6	1747.59 $\pm$ 44.73 a	187.85 $\pm$ 8.61 a	285.83 $\pm$ 9.60 a	39.78 $\pm$ 0.72 a	68.77 $\pm$ 4.53 a	711.97 $\pm$ 48.64 a	3041.79 $\pm$ 67.48 a
	12	1441.21 $\pm$ 74.36 b	150.47 $\pm$ 6.15 b	241.02 $\pm$ 4.90 c	33.97 $\pm$ 4.05 bc	50.05 $\pm$ 7.42 c	691.38 $\pm$ 20.84 a	2608.10 $\pm$ 78.08 b
	24	1442.52 $\pm$ 57.61 b	150.80 $\pm$ 7.53 b	258.53 $\pm$ 6.62 b	29.76 $\pm$ 0.40 bcd	62.19 $\pm$ 2.86 b	620.67 $\pm$ 32.76 a	2564.47 $\pm$ 67.09 b
80% EtOH	6	1287.41 $\pm$ 77.72 c	88.36 $\pm$ 7.01 d	224.95 $\pm$ 10.72 d	28.84 $\pm$ 3.18 cd	29.00 $\pm$ 2.48 e	601.92 $\pm$ 49.09 b	2260.48 $\pm$ 92.90 cd
	12	1214.75 $\pm$ 69.73 c	102.41 $\pm$ 7.94 c	244.88 $\pm$ 7.62 c	29.27 $\pm$ 3.80 bcd	37.26 $\pm$ 7.21 d	715.79 $\pm$ 26.99 a	2344.36 $\pm$ 77.13 c
	24	1048.38 $\pm$ 57.74 d	103.15 $\pm$ 4.09 c	224.12 $\pm$ 10.88 d	34.79 $\pm$ 8.18 ab	27.85 $\pm$ 1.16 e	603.97 $\pm$ 45.93 b	2042.26 $\pm$ 75.14 d
80% Acetone	6	775.45 $\pm$ 59.38 e	56.46 $\pm$ 3.84 f	144.14 $\pm$ 11.29 f	18.01 $\pm$ 0.79 e	19.06 $\pm$ 1.02 f	279.24 $\pm$ 33.60 c	1292.36 $\pm$ 69.27 f
	12	767.84 $\pm$ 20.97 e	65.97 $\pm$ 6.45 ef	151.60 $\pm$ 4.99 f	19.56 $\pm$ 0.66 e	12.34 $\pm$ 1.35 g	183.33 $\pm$ 26.46 d	1200.64 $\pm$ 34.76 f
	24	1085.68 $\pm$ 57.39 d	72.72 $\pm$ 3.62 e	188.21 $\pm$ 6.87 e	25.74 $\pm$ 1.11 d	8.24 $\pm$ 0.65 gh	176.23 $\pm$ 3.18 d	1556.82 $\pm$ 58.01 e

Values are expressed as means in $\mu\text{g/g} \pm \text{SD}$ (n=3) of dry sample.

Different letters in the same column show significant differences ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test.

ChA = chlorogenic acid, CFA = caffeic acid, FA = ferulic acid, SnA = sinapinic acid, EA = ellagic acid, CmA = cinnamic acid

to 12h. However, the amount of TPC and TFC in the tested extracts decreased as the extraction time increased to 24h.

Antioxidant activities of *A. chinense* leaf extracts

Antioxidant activities in plant extracts were measured by well-known methods, such as DPPH, ABTS and FRAP due to their simplicity, stability, accuracy and reproducibility (Stratil *et al.*, 2006). According to the statistical results of the antioxidant activity based on the three assays, significant differences were found between the values obtained in all extracts. For antioxidant activity, most results were also shown to be influenced by the extracting solvent and time.

As indicated in Table 2, the antioxidant activity of the 80% methanol extract exhibited the greatest antioxidant activities in all tested assays, followed by 80% ethanol, 80% acetone and distilled water extracts. The 80% methanol for 6h gave the highest antioxidant activity based on DPPH and ABTS radical scavenging ability, whereas the highest FRAP value was found in the 80% methanol for 12h.

The DPPH radical scavenging activity of the 80% methanol extract ranged from 66.37 to 71.93 $\mu\text{mole TE/g dw}$, with the highest activity being found at 6h; however, there were no significant differences between extracts at 6h and 12h with 80% methanol. Whereas, the leaf extracts with 80% acetone and distilled water for all extraction times were the least reactive with values ranging from 0.71 to 0.97 $\mu\text{mole TE/g dw}$ and 0.44 to 1.18 $\mu\text{mole TE/g dw}$, respectively.

The ABTS radical scavenging activity was

expressed a TEAC value with the range of 46.27 to 50.04 $\mu\text{mole TE/g dw}$ in the 80% methanol extract, 37.21 to 42.64 $\mu\text{mole TE/g dw}$ in the 80% ethanol extract, 6.73 to 13.79 $\mu\text{mole TE/g dw}$ in the 80% acetone extract and 0.29 to 1.10 37.21 to 42.64 $\mu\text{mole TE/g dw}$ in the water extract.

For the FRAP value, the 80% methanol extracts showed the highest reducing ability with FRAP values ranging from 82.50 to 117.89 $\mu\text{mole TE/g dw}$, followed by 80% ethanol, 80% acetone and water extracts. The present results are similar to those of Ghasemzadeh *et al.* (2010) who observed that the leaves of ginger with high TFC and TPC also had high antioxidant activities.

The results in Tables 1 and 2 indicated the influence of the extracting solvent on the phenolic and flavonoid contents as well as antioxidant activities of *A. chinense* leaf extracts. There were strongly positive correlations between the concentration of the phenolic compounds and the antioxidant activities. The correlation coefficients (r) calculated from linear regression analysis between TPC and DPPH, ABTS and FRAP assays were 0.805, 0.873 and 0.975 ($p < 0.01$), respectively. The correlations between TFC and antioxidant activities based on the three assays were $r = 0.784$ for DPPH, $r = 0.853$ for ABTS and $r = 0.969$ for FRAP assays. This finding was similar to those reported by Kubola *et al.* (2008) who studied bitter melon fractions and Alothman *et al.* (2009) who reported that there was a good correlation between the TPC and antioxidant capacity of fruits, include pineapple, banana and guava.

Table 4. Flavonoid contents in extracted samples from *Amomum Chinese* leaves under different conditions

Solvent	time (h)	CC ($\mu\text{g/g}$)	EGCG ($\mu\text{g/g}$)	Ru ($\mu\text{g/g}$)	QCT ($\mu\text{g/g}$)	Total ($\mu\text{g/g}$)
Distilled water	6	111.15 $\pm$ 1.86 h	5.19 $\pm$ 0.56 h	166.27 $\pm$ 9.65 g	1.78 $\pm$ 0.04 g	284.39 $\pm$ 9.85 f
	12	148.63 $\pm$ 3.45 h	9.79 $\pm$ 0.31 h	243.65 $\pm$ 8.95 h	1.25 $\pm$ 0.05 g	403.31 $\pm$ 9.60 f
	24	182.59 $\pm$ 4.96 h	8.51 $\pm$ 0.72 h	145.64 $\pm$ 8.65 i	1.24 $\pm$ 0.11 g	337.98 $\pm$ 9.99 f
80% MeOH	6	2337.36 $\pm$ 57.88 a	155.99 $\pm$ 3.38 b	1748.21 $\pm$ 21.43 a	52.67 $\pm$ 9.60 bod	4294.23 $\pm$ 62.55 a
	12	1899.07 $\pm$ 30.68 d	93.55 $\pm$ 1.35 d	1583.41 $\pm$ 47.55 b	53.31 $\pm$ 1.16 bc	3629.35 $\pm$ 56.62 bc
	24	2019.74 $\pm$ 55.62 bc	100.37 $\pm$ 7.22 d	1571.10 $\pm$ 55.15 bc	48.90 $\pm$ 3.19 cde	3740.12 $\pm$ 78.73 b
80% EtOH	6	2091.20 $\pm$ 60.63 b	217.19 $\pm$ 6.75 a	1361.62 $\pm$ 50.96 e	58.79 $\pm$ 4.67 ab	3728.80 $\pm$ 79.63 b
	12	2089.10 $\pm$ 53.05 b	215.26 $\pm$ 18.10 a	1506.69 $\pm$ 41.20 c	64.57 $\pm$ 4.46 a	3875.62 $\pm$ 69.71 b
	24	1954.93 $\pm$ 49.08 cd	117.09 $\pm$ 6.20 c	1432.17 $\pm$ 47.97 d	62.72 $\pm$ 9.89 a	3566.91 $\pm$ 69.62 c
80% Acetone	6	1159.11 $\pm$ 59.38 e	34.71 $\pm$ 1.49 g	726.85 $\pm$ 50.97 g	32.01 $\pm$ 5.53 f	1952.67 $\pm$ 78.45 d
	12	749.05 $\pm$ 19.94 g	58.34 $\pm$ 0.77 f	990.50 $\pm$ 38.42 f	44.19 $\pm$ 1.50 de	1842.08 $\pm$ 43.32 e
	24	894.22 $\pm$ 22.28 f	77.03 $\pm$ 1.72 e	1041.14 $\pm$ 40.82 f	40.83 $\pm$ 2.27 e	2053.22 $\pm$ 46.59 d

Values are expressed as means in $\mu\text{g/g} \pm \text{SD}$ ($n=3$) of dry sample.

Different letters in the same column show significant differences ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test.

CC = catechin, EGCG = epigallocatechin gallate, Ru = rutin, QCT = quercetin

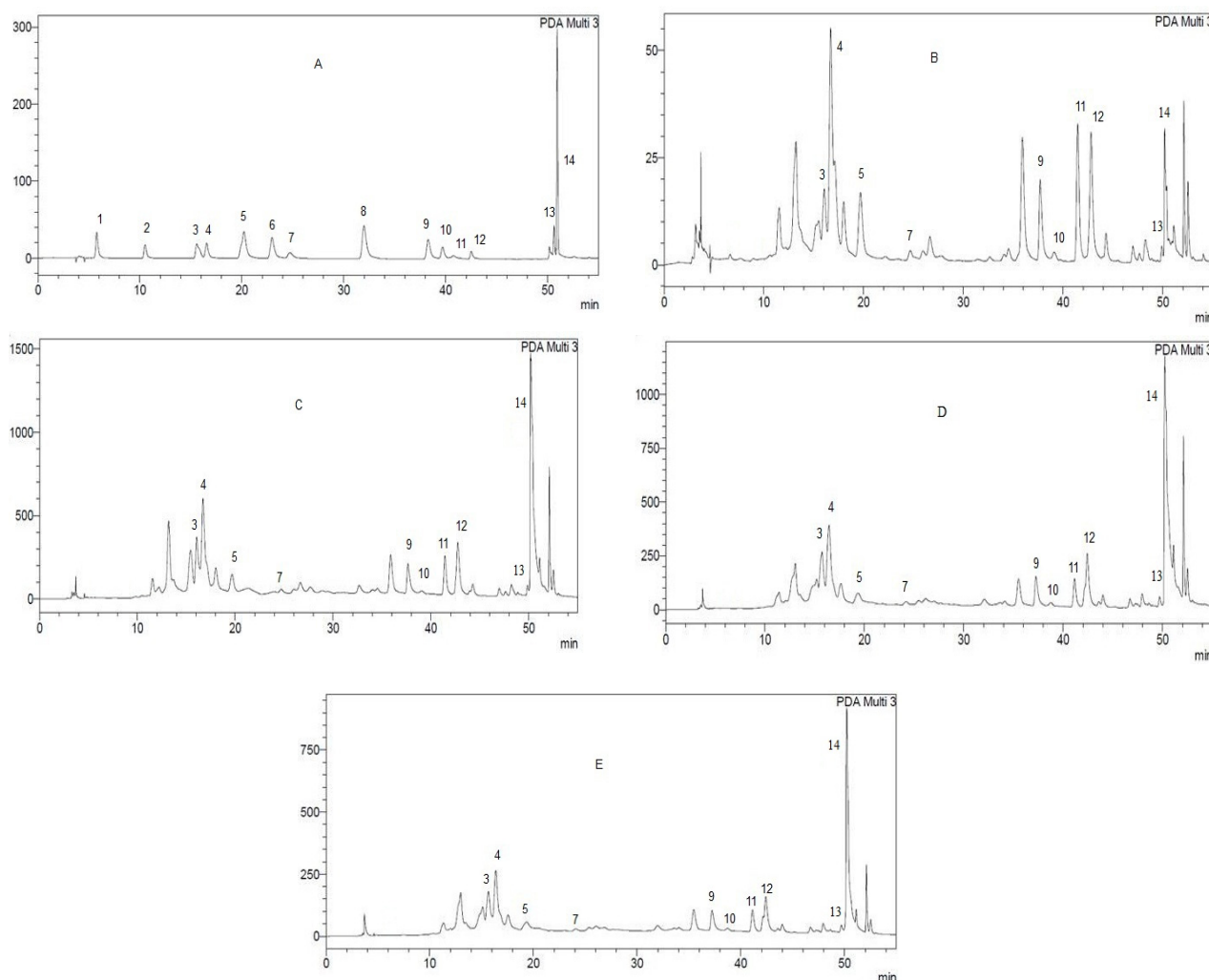


Figure 1. HPLC chromatogram of a mixture of phenolic standards (A), extracts of *Amomum Chinese* leaves in water (B), 80% methanol (C), 80% ethanol (D) and 80% acetone (E) obtained using a gradient elution system by PDA detector at 280 nm

1 = gallic acid, 2 = protocatechuic acid, 3 = catechin, 4 = chlorogenic acid, 5 = caffeic acid, 6 = syringic acid, 7 = epigallo-catechin gallate, 8 = p-coumaric acid, 9 = ferulic acid, 10 = sinapic acid, 11 = ellagic acid, 12 = rutin, 13 = quercetin, 14 = t-cinnamic acid

Qualitative and quantitative analysis of phenolic acids and flavonoids compounds

The HPLC chromatograms of standard phenolic compounds and the extracts of *A.chinense* leaves from different extraction solvents and extraction times are shown in figure 1. There were numerous peaks that were not identified due to a lack of suitable standards. The samples were analyzed from at least three replications at 280 nm for hydroxybenzoic acids and flavanols, 320 nm for hydroxycinnamic acids and 360 nm for flavonols.

Quantitative analysis of individual phenolic compounds by HPLC showed that the 80% aqueous methanol was the best extraction solvent for phenolic compounds. These results showed that the most important compounds identified in the 80% methanol extract were hydroxycinnamic acids, including chlorogenic acid followed by trans-cinnamic acid, ellagic acid, ferulic acid and caffeic acid (Table 3). Whereas, hydroxybenzoic acids were found in small quantities and are not shown. High contents of catechin, rutin, epigallocatechin gallate and quercetin were obtained from 80% methanol followed by 80% ethanol, 80% acetone and distilled water, respectively (Table 4). This finding showed that the 80% methanol extract of *A. chinense* leaves had a higher content of catechin (2.33 mg/g dw) and rutin (1.75 mg/g dw) than reported by Ghasemzadeh *et al.* (2010), who reported that the methanol extract of Malaysian young ginger had high contents of catechin (0.56 mg/g DW) and rutin (0.32 mg/g dw).

Conclusion

These results clearly demonstrated that the solvent type is important in the extraction of antioxidant compounds from *A. chinense* leaves, whereas the extraction times slightly affected the amount of phenolics and flavonoids as well as antioxidant activities. 80% methanol showed potentially for extracting phenolic compounds from *A. chinense* leaves by having the greatest antioxidant activity, followed by 80% ethanol, 80% acetone and distilled water. Strong correlations were found between the phenolic and flavonoid contents and their antioxidant activities. Overall, *A. chinense* leaves contain chlorogenic acid, cinnamic acid, catechin and rutin that possess antioxidant activity; therefore, they could be a useful source of natural antioxidants.

Acknowledgements

The authors are thankful to Rajabhat Mahasarakham University and Thailand Research

Fund (MRG5480177) for providing financial support for this research and other facilities. We also wish to thank Dr. Jolyon Dodgson, Faculty of Science, Mahasarakham University for his help improving the English.

References

- Benzie, I.F. and Szeto, Y.T. 1999. Total antioxidant capacity of teas by the ferric reducing antioxidant power assay. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47(2): 633-636.
- Butsat, S. and Siriamornpun, S. 2010. Antioxidant capacities and phenolic compounds of the husk, bran and endosperm of Thai rice. *Food Chemistry* 119: 606-613.
- Chan, E.W.C., Lim, Y.Y., Wong, F.L. and Lianto, F.S. 2008. Antioxidant and tyrosinase inhibition properties of leaves and rhizomes in ginger species. *Food Chemistry* 109: 477-483.
- 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. *Food Chemistry* 113(1): 166-172.
- Chew, K.K., Ng, S.Y., Thoo, Y.Y., Khoo, M.Z., Wan Aida, W.M. and Ho, C.W. 2011. Effect of ethanol concentration, extraction time and extraction temperature on the recovery of phenolic compounds and antioxidant capacity of *Centella asiatica* extracts. *International Food Research Journal* 18: 571-578.
- Dragland, S., Senoo, H., Wake, K., Holte, K. and Blomhoff, R. 2003. Several culinary and medicinal herbs are important sources of dietary antioxidants. *Journal of Nutrition* 133(5): 1286-1290.
- Elzaawely, A.A., Xuan, T.D. and Tawata, S. 2007. Essential oils, kava pyrones and phenolic compounds from leaves and rhizomes of *Alpinia zerumbet* and their antioxidant activity. *Food Chemistry* 103: 486-494.
- Gan, R.Y., Kuang, L., Xu, X.R., Zhang, Y., Xia, E.Q., Song, F.L. and Li, H.B. 2010. Screening of natural antioxidants from traditional Chinese medicinal plants associated with treatment of rheumatic disease. *Molecule* 15: 5988-5997.
- Ghasemzadeh, A., Jaafar, H. Z. E., Rahmat, A., Wahab, P. E. M. and Halim, M. R. A. 2010. Effect of different light intensities on total phenolics and flavonoids synthesis and anti-oxidant activities in young ginger varieties (*Zingiber officinale* Roscoe). *International Journal of Molecular Sciences* 11: 3885-3897.
- Ghasemzadeh, A., Jaafar, H. Z. E. and Rahmat, A. 2011. Antioxidant activities, total phenolics and flavonoids content in two varieties of Malaysia young ginger (*Zingiber officinale* Roscoe). *Molecule* 15: 4324-4333.
- Katalinic, V., Milos, M. and Jukic, M. 2006. Screening of 70 medicinal plant extracts for antioxidant capacity and total phenols. *Food Chemistry* 94: 550-557.
- Kikuzaki, H., Kawai, Y. and Nakatani, N. 2001. Diphenyl-

- 2-picrylhydrazyl radical scavenging active compounds from greater cardamom (*Amomum sabulatum* Roxb.). Journal of Nutritional Science and Vitaminology 47(2):167-171.
- Kitajima, J. and Ishikawa, T. 2003. Water-soluble constituents of *Amomum* seed. Chemical and Pharmaceutical Bulletin 51(7): 890-893.
- Lapornik, B., Prosek, M. and Wondra, A. G. 2005. Comparison of extracts prepared from plant by-products using different solvents and extraction time. Journal of Food Engineering 71: 214-222.
- Makchuchit, S., Itharat, S. and Tewtrakul, S. 2010. Antioxidant and nitric oxide inhibition activities of Thai medicinal plants. Journal Medicine Association Thai, 93(Supplement 7): S227-S235.
- Naczki, M. and Shahidi, F. 2004. Extraction and analysis of phenolics in food. Journal of Chromatography A 1054(1-2): 95-111.
- Norhaiza, M., Maziah, M. and Hakiman, M. 2009. Antioxidant properties of leaf extracts of a popular Malaysian herb, *Labisia pumila*. Journal of Medicinal Plants Research 3:217-223.
- Rusak, G., Komes, D., Likic, S., Horzic, D. and Kovac, M. 2008. Phenolic content and antioxidant capacity of green and white tea extracts depending on extraction conditions and the solvent used. Food Chemistry 110:852-858.
- Sabulal, B., Dan, M., Pradeep, N.S., Valsamma, R.K. and George, V. 2006. Composition and antimicrobial activity of essential oil from the fruit of *Amomum cannicarpum*, Acta Pharmaceutica Scientia 56: 473-480.
- Shan, B., Cai, Y.Z., Sun, M. and Corke, H. 2005. Antioxidant capacity of 26 spice extracts and characterization of their phenolic constituents. Journal of Agricultural and Food Chemistry 53: 7749-7757.
- Sharma, V., Gulati, A., Ravindranath, S.D. and Kumar, V. 2005. A simple and convenient method for analysis of tea biochemical by reverse phase HPLC. Journal of Food Composition and Analysis 18: 583-594.
- Siddhuvaj, P. and Becker, K. 2003. Antioxidant properties of various solvent extracts of total phenolic constituents from three different agroclimatic origins of drumstick tree (*Moringa oleifera* Lam) leaves. Journal of Agricultural and Food Chemistry 54: 2144-2155.
- Stratil, P., Klejdus, B. and Kuban, V. 2006. Determination of total content of phenolic compounds and their antioxidant activity in vegetables-Evaluation of spectrophotometric methods. Journal of Agricultural and Food Chemistry 54(3): 607-616.
- Sultana, B., Anwar, F. and Ashraf, M. 2009. Effect of extraction solvent/technique on the antioxidant activity of selected medicinal plant extracts. Molecules 14: 2167-2180.
- Turkmen, N., Sari, F. and Velioglu, Y.S. 2006. Effect of extraction solvents on concentration and antioxidant activity of black and black mate polyphenols determined by ferrous tartate and Folin-Ciocalteu methods. Food Chemistry 99: 838-841.
- Wu, M., Guo, P., Tsui, S.W., Chen, H. and Zhao, Z. 2012. An ethnobotanical survey of medicinal spices used in Chinese hotpot. Food Research International 48: 226-232.
- Yamazaki, T., Matsushita, Y., Kawashima, K., Someya, M., Nakajima, Y. and Kurashige, T. 2000. Evaluation of the pharmacological activity of extracts from *Amomi Semen* on the gastrointestinal tracts. Journal of Ethnopharmacology 71: 331-335.