

นิพนธ์ต้นฉบับ

**ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ
ของสารสกัดจากใบไคร้หอม**

บุญเลี้ยง สุปิมพ์^{1*}, มธุรส ชลามาตย์¹, ปิยะพงษ์ ชุมศรี¹ และ อรทัย ปานเพชร¹

¹อาจารย์ประจำสาขาวิชาสาธารณสุขศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏเลย

*ผู้นิพนธ์ที่ให้การติดต่อ E-mail: bunliang_sp@yahoo.com

Received date: January 7, 2021; Revised date: July 20, 2021; Accepted date: September 11, 2021

บทคัดย่อ

ไคร้หอม สมุนไพรพื้นบ้านและมีสรรพคุณตามยาไทยแผนโบราณสำหรับการรักษาโรคภูมิแพ้ หอบหืด หวัด ไข้หวัด และไซนัสอักเสบ ซึ่งการมีฤทธิ์เป็นยาต้านอนุมูลอิสระมีความเกี่ยวข้องกับคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระ การวิจัยครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อตรวจหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากใบไคร้หอม โดยใช้เอทานอลและน้ำเป็นตัวทำละลายในการสกัดสาร การตรวจหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด ด้วยวิธี Folin - Ciocalteu การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากใบไคร้หอมด้วยวิธี DPPH และหาค่าความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากใบไคร้หอมด้วยวิธี FRAP ผลการวิจัยพบว่า สารสกัดด้วยเอทานอลมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด เท่ากับ 17.71 ± 1.05 ไมโครกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อมิลลิกรัมสารสกัดแห้ง มีค่า IC_{50} ในการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH เท่ากับ $1,380 \pm 0.02$ ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และค่า FRAP เท่ากับ 190.42 ± 0.01 ไมโครกรัมสมมูลของ Trolox ต่อมิลลิกรัมสารสกัดแห้ง และสารสกัดด้วยน้ำ มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดเท่ากับ 5.98 ± 0.29 ไมโครกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อมิลลิกรัมสารสกัดแห้ง มีค่า IC_{50} ในการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH เท่ากับ $11,240 \pm 1.33$ ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และค่า FRAP เท่ากับ 30.05 ± 0.76 ไมโครกรัมสมมูลของ Trolox ต่อมิลลิกรัมสารสกัดแห้ง โดยสารสกัดด้วยเอทานอลมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงกว่าสารสกัดด้วยน้ำอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05 ผลการศึกษานี้อาจใช้เป็นข้อมูลเบื้องต้นในการต่อยอดการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ทางชีวภาพอื่น ๆ ของสารสกัดใบไคร้หอมต่อไป

คำสำคัญ : ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด, ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ, สารสกัดจากใบไคร้หอม

Total phenolic content and antioxidant activities of *Sauropus thorelii* Leaf extract

Bunliang Suphim^{1*}, Maturot Chalamat¹, Piyapong Choomsri¹,
and Orathai Panpetch¹

¹Lecturer, Program of Public Health, Faculty of Science and Technology, Loei Rajabhat University

*Corresponding Author E-mail: bunliang_sp@yahoo.com

Abstract

Sauropus thorelii (Khai Hom) are tropical herbs and are regarded in Thai traditional medicine for the treatment of allergies, asthma, common cold, and sinusitis. This mechanism of action may be related to antioxidant properties. The research aimed to determine the total phenolic content and antioxidant activities of *Sauropus thorelii* leaf extract. *Sauropus thorelii* leaf was extracted by using ethanol and aqueous solvent. Total phenolic content was determined by Folin-Ciocalteu method. Antioxidant activities was investigated using DPPH and FRAP assay. The results showed that ethanol extract had the total phenolic contents of 17.71 ± 1.05 μg GAE/mg crude extract. Ethanol extract had the scavenging activity of DPPH radical with IC_{50} value of $1,380 \pm 0.02$ $\mu\text{g/mL}$, and had the reducing power with FRAP value of 190.42 ± 0.01 μg TEAC/mg crude extract. Aqueous extract had the total phenolic contents of 5.98 ± 0.29 μg GAE/mg crude extract. It had the scavenging activity of DPPH radical with IC_{50} value of $11,240 \pm 1.33$ $\mu\text{g/mL}$, and had the reducing power with FRAP value of 30.05 ± 0.76 μg TEAC/mg crude extract. The total phenolic content and antioxidant activities of *Sauropus thorelii* extract obtained by ethanol was statistically significantly higher than the extract obtained by aqueous at 0.05. These results may be used as preliminary data for further study of the antioxidant and biological activities of *Sauropus thorelii* extract.

Keywords: Total phenolic content, Antioxidant activities, *Sauropus thorelii* leaf extract

บทนำ

อนุมูลอิสระ เป็นสารที่มีบทบาทสำคัญมากในเซลล์ ทั้งในภาวะร่างกายปกติ และในภาวะที่เกิดพยาธิสภาพ อนุมูลอิสระเป็นสาเหตุทำให้เซลล์ตาย เกิดการกลายพันธุ์ของดีเอ็นเอในเซลล์ และก่อให้เกิดโรคต่าง ๆ ได้แก่ โรคชรา (aging) โรคมะเร็ง (cancer) โรคหัวใจขาดเลือด (coronary heart disease) โรคความจำเสื่อม (Alzheimer's disease) โรคข้ออักเสบ (arthritis) โรคภูมิแพ้ (allergies) โรคความดันโลหิตสูง โรคเหงือก โรคเกี่ยวกับสายตา ความผิดปกติของปอดและระบบประสาท โรคเกี่ยวกับทางเดินหายใจ โรคเกี่ยวกับความผิดปกติของผิวหนัง โรคลำไส้อักเสบ โรคเบาหวาน ภาวะดัดเบา ผลในกระเพาะ ภาวะอักเสบและรูมาติก และโรคซิสติกไฟโบรซิส เป็นต้น (1,2,3) การได้รับสารที่มีฤทธิ์ต่อต้านหรือยับยั้งการเกิดอนุมูลอิสระ จึงมีส่วนช่วยลดโอกาสในการเกิดโรคต่าง ๆ ของมนุษย์ได้ ดังนั้นการได้รับสารที่มีฤทธิ์ต่อต้านหรือยับยั้งการเกิดอนุมูลอิสระ จึงมีส่วนช่วยลดโอกาสในการเกิดโรคมะเร็งของมนุษย์ได้ สารที่นำมาใช้ต่อต้านหรือยับยั้งการเกิดอนุมูลอิสระ เรียกว่า สารต้านอนุมูลอิสระ เป็นสารที่ทำหน้าที่ต่อต้านหรือยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันจึงช่วยยับยั้งอนุมูลอิสระไม่ให้ทำลายองค์ประกอบของเซลล์ โดยสารต้านอนุมูลอิสระที่ร่างกายต้องการและใช้เป็นประจำ ได้แก่ วิตามิน ซี วิตามิน อี เบต้าแคโรทีน และฟลาโวนอยด์ต่าง ๆ ส่วนเป็นสารประกอบโพลีฟีนอล ซึ่งมีรายงานเกี่ยวกับความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของพืชพบว่ามีความสัมพันธ์กับปริมาณฟีนอลิก โดยพืชที่มีปริมาณฟีนอลิกสูงจะมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระมากขึ้นด้วย (4)

ไคร้หอมหรือสะเลียมหอม (*Sauropus thorelii*) เป็นพืชที่อยู่ในวงศ์ Euphorbiaceae ซึ่งมีการนำมาใช้เป็นยาแผนไทย โดยเฉพาะส่วนของใบที่นำมาใช้รักษาอาการไข้ โรคภูมิแพ้ หอบหืด หัวใจเรื้อรัง ไช้น้ำสออักเสบ ดอกนำมาใช้รักษาโรคกระเพาะ ความดันโลหิตสูง เบาหวาน อาการอักเสบ เป็นต้น (5) โดยพบว่ากลไกการเกิดอาการผิดปกติของร่างกาย เช่น ไข้ ภูมิแพ้ หอบหืด หัวใจเรื้อรัง และไช้น้ำสออักเสบ มีความเกี่ยวข้องกับอนุมูลอิสระของออกซิเจน (reactive oxygen species; ROS) เช่น ซูเปอร์ออกไซด์ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ไฮดรอกซิล กรดไฮโปคลอริก เพอร์ลิต เพอร์ออกซิล และอัลคิลที่เกิดขึ้นในร่างกายของมนุษย์ (6) ดังเช่น เมื่อมีอนุมูลอิสระของออกซิเจนเกิดขึ้นในระบบทางเดินหายใจจะทำให้เซลล์เกิดการอักเสบและมีการออกซิเดชันของกรดนิวคลีอิก โปรตีน และไขมันจากเยื่อหุ้มเซลล์ทำให้เซลล์เกิดความเสียหายและเกิดการอักเสบเรื้อรังทำให้เกิดโรคในระบบทางเดินหายใจ เช่น หอบหืด และโรคหลอดลมอุดกั้นเรื้อรัง (7) และการศึกษาบทบาทความสำคัญของอนุมูลอิสระออกซิเจนต่อการเกิดอาการไข้ในหนูทดลอง พบว่า ขณะที่ให้สารต้านอนุมูลอิสระออกซิเจนในเนื้อเยื่อต่าง ๆ ของหนู เช่น เลือด ตับ เนื้อเยื่อไขมัน และสมองส่วนไฮโปทาลามัส ซึ่งแสดงให้เห็นว่าอนุมูลอิสระออกซิเจนอาจมีบทบาทสำคัญในการเกิดภาวะออกซิเดชันในร่างกายขณะที่มีไข้ได้ (8) จากข้อค้นพบดังกล่าว อาจกล่าวได้ว่าการที่ไคร้หอมมีสรรพคุณในการรักษาโรคดังกล่าวน่าจะมีผลเกี่ยวข้องกับการมีคุณสมบัติในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ และจากการศึกษาที่ผ่านมาที่ได้มีการศึกษาเกี่ยวกับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของพืชในสกุลเดียวกับไคร้หอม ได้แก่ การศึกษาปริมาณฟีนอลิกและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจากสารสกัดจากผักหวานบ้าน (*Sauropus androgynus* Merr.) ที่สกัดโดยการแช่สกัดด้วย methanol พบว่าสารสกัดจากผักหวานบ้าน มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH โดยมีค่า IC₅₀ มากกว่า 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (9) การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสมุนไพรหรือผักลิ้นห่าน (*Sauropus spatulifolius*) พบว่าสารสกัดด้วยน้ำจากลิ้นห่านหรือผักลิ้นห่านมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และมีฤทธิ์เพิ่มการทำงานของเอนไซม์ superoxide dismutase ได้ (10) และการศึกษาในพืชที่อยู่วงศ์เดียวกับไคร้หอม (Euphorbiaceae) ได้แก่ สารสกัดหยาดเมฆตานอลของใบตองแตก (*Baliospermum solanifolium* (Burm.) Suresh) มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุด

ที่ค่า IC_{50} เท่ากับ 0.48 ± 0.02 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดสูงที่สุดมีค่า เท่ากับ 117.82 ± 2.32 มิลลิกรัมสมมูลกรดแกลลิกต่อกรัมสารสกัดหยาบ และสารสกัดหยาบเอทิลอะซิเตต มีค่าร้อยละการยับยั้งเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเตอเรสสูงที่สุด เท่ากับ 62.47 ± 1.47 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ที่ความเข้มข้น 2000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ⁽¹¹⁾ จากข้อมูลการทบทวนวรรณกรรมยังไม่พบข้อมูลรายงานการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ซึ่งอาจมีความเกี่ยวข้องกับสรรพคุณทางยาของไคร้หอม ดังนั้นผู้วิจัยจึงได้เล็งเห็นถึงความสำคัญของการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ โดยเลือกใช้ส่วนใบของไคร้หอมซึ่งเป็นส่วนที่นำมาใช้ประโยชน์ทางยาในการรักษาโรคต่าง ๆ เพื่อเป็นแนวทางในการพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ที่มีฤทธิ์ในต้านอนุมูลอิสระในอนาคตต่อไป

ระเบียบวิธีการศึกษา

1. สารเคมี

สารเคมี เช่น 2,2-ไดฟีนิล-1-ไพคริลไฮไดรซัล (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl; DPPH, Sigma-Aldrich, Germany), เมทานอล (Methanol, RCI Labscan, Thailand), โฟลีน-ซีโอคาลทูฟีนอล รีเอเจนต์ (Folin-Ciocalteu phenol reagent, LOBA CHEMIE PVT.CTE, India), 6-ไฮดรอกซีล-2,5,7,8-เตตราเมทิลโครแมน-2-กรดคาร์บอกซิลิก (โทรลอกซ์) (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid; Trolox, Sigma-Aldrich, USA), กรดแกลลิก (Gallic acid, Sigma-Aldrich, USA), 2,4,6-ทริส (2-ไพริดีน)-เอส-ไทอะซีน (2,4,6-tris(2-pyridyl)-s-triazine, Sigma-Aldrich, USA), โซเดียม คาร์บอเนต (Sodium carbonate; Na_2CO_3), เพอร์ริกคลอไรด์ (Iron (III) chloride hexahydrate, QReC, New Zealand), โซเดียม อะซิเตต (Sodium acetate, QReC, New Zealand), กรดกลาเซียอะซิติก (Acetic acid glacial, RCI Labscan, Thailand), กรดไฮโดรคลอริก (Hydrochloric acid, RCI Labscan, Thailand)

2. พืชสมุนไพรที่ใช้ในการศึกษา

สมุนไพรที่ใช้ในการศึกษาวิจัย คือ ใบแก่ของไคร้หอม โดยเก็บใบลำดับที่ 3 – 5 จากยอด ซึ่งปลูกในพื้นที่อำเภอเมือง จังหวัดเลย การยืนยันชนิดของพืชโดยการตรวจรายชื่อวิทยาศาสตร์ของพืช จากการนำภาพถ่ายเปรียบเทียบกับเอกสารวิชาการต่าง ๆ

3. วิธีการเตรียมสารสกัดหยาบ

การวิจัยครั้งนี้ ผู้วิจัยได้ดัดแปลงจากวิธีของ พวงรัตน์ ภักดีโชติ และคณะ และ Suparmi และคณะ ^(12, 13) โดยมีวิธีการดังนี้ นำใบของไคร้หอมมาล้างให้สะอาดผึ่งให้แห้งสนิทในที่ร่ม ตัดเป็นชิ้นเล็ก ๆ แล้วบดให้ละเอียดได้ 804 กรัม แบ่งมาสกัดในอัตราส่วนสมุนไพรกับตัวทำละลาย 1:5 โดยชั่ง 100 กรัม นำมาสกัดด้วยตัวทำละลาย 95% เอทานอล และน้ำ อย่างละ 500 มิลลิลิตรโดยวิธีการแช่หมัก ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3 วัน แต่ละวันจะเขย่าวันละ 1 ครั้ง แต่ละครั้งนาน 5 นาที นำมากรองเอากากออกด้วยผ้าขาวบาง และกรองด้วยกระดาษกรอง watchman[™] no.1 ทำจนครบ 804 กรัม ได้สารสกัดรวมทั้งหมด 3,500 มิลลิลิตร จากนั้นนำส่วนใสที่ได้ทั้งหมดไประเหยด้วยเครื่องกลั่นระเหยสารแบบหมุน (Rotary Evaporator (BUCHI® Rotavapor R – 124) ที่อุณหภูมิ 79 องศาเซลเซียส เพื่อระเหยตัวทำละลายเอทานอล ออกให้หมด สำหรับตัวทำละลายน้ำ ให้นำส่วนใสที่ได้ไประเหยด้วยเครื่องอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath) ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เพื่อระเหยตัวทำละลายน้ำออกให้หมด ซึ่งน้ำหนักสารสกัดหยาบ และนำมาคำนวณหา % Yield ของสารสกัดหยาบ แล้วเก็บสารที่แห้งใส่ขวดแก้วสีขาปิดฝาให้สนิท ติดฉลากชื่อสมุนไพร วันที่เตรียม เก็บในตู้เย็นอุณหภูมิไม่ต่ำกว่า 4 องศาเซลเซียส

4. การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (total phenolic contents)

การวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด ด้วยวิธี Folin - Ciocalteu method ⁽¹⁴⁾ มีวิธีการดังนี้ ซึ่งสารสกัดจากใบไคร้หอม 150 มิลลิกรัม ละลายด้วย 100% DMSO 1 มิลลิลิตร จากนั้นปิเปตสารละลายไคร้หอมที่ได้มา 0.04 มิลลิลิตร เติมน้ำใน 1.8 มิลลิลิตร ของ 10% Folin - Ciocalteu phenol reagent จากนั้นเติม 7.5% โซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3) จำนวน 1.2 มิลลิลิตร แล้วเขย่าหลอดทดลองให้สารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน บ่มที่อุณหภูมิห้องในที่มืด เป็นเวลา 1 ชั่วโมง วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร คำนวณหาปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดโดยเปรียบเทียบจากกราฟมาตรฐานกรดแกลลิก ที่ความเข้มข้น 0.625, 1.25, 2.5, 5, 10, 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร รายงานผลปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดเป็นไมโครกรัมสมมูลกรดแกลลิกต่อมิลลิกรัมน้ำหนักสารสกัดหยาบ ($\mu\text{g GAE/mg crude extract}$) ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

5. การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากใบไคร้หอมด้วยวิธี DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) assay

การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากใบไคร้หอม ด้วยวิธี DPPH ^(12, 15) มีวิธีการดังนี้ ซึ่งสารสกัดใบไคร้หอม 60 มิลลิกรัม ละลายด้วย 100% DMSO จำนวน 1 มิลลิลิตร จากนั้นปิเปตสารละลายใบไคร้หอม 0.1 มิลลิลิตร มาทำปฏิกิริยากับ 0.1mM DPPH ในปริมาตร 2.9 มิลลิลิตร โดยให้ความเข้มข้นของสารละลายจากใบไคร้หอมสุดท้ายในหลอดทดลอง ตั้งแต่ 15.625 – 2000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เขย่าหลอดทดลองให้สารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน บ่มในที่มืด เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำไปวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 515 นาโนเมตร เมื่อเปรียบเทียบกับหลอดที่ไม่ได้ใส่สารสกัดใบไคร้หอม โดยมีทรอลอกซ์ ที่ความเข้มข้น 3.125, 6.25, 12.5, 25, 50 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นสารมาตรฐานอ้างอิง จากนั้นนำมาคำนวณ %Radical scavenging activity ด้วยสูตร ดังนี้ $\% \text{Radical scavenging activity} = [(\text{Control OD} - \text{Crude extract OD}) / \text{Control OD}] \times 100$ และนำค่าที่ได้จากการคำนวณแต่ละความเข้มข้นไปคำนวณหาค่า the half maximal inhibitory concentration (IC_{50}) คือ ค่าความเข้มข้นของสารตัวอย่างที่ยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH ร้อยละ 50 ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

6. การหาค่าความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากใบไคร้หอม ด้วยวิธี FRAP (Ferric reducing/antioxidant potential)

การหาค่าความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากใบไคร้หอมด้วยวิธี FRAP ^(12,14,16) โดยมีวิธีการดังนี้ ซึ่งสารสกัดใบไคร้หอม 30 มิลลิกรัม นำมาละลายด้วย 100% DMSO 1 มิลลิลิตร จากนั้นปิเปตสารสกัดมาจำนวน 0.2 มิลลิลิตร มาทำปฏิกิริยากับ FRAP reagent (acetate buffer 300 มิลลิโมลาร์ pH 3.6 : 2,4,6 – tripyridyl-s-triazine 10 มิลลิโมลาร์ : FeCl_3 20 มิลลิโมลาร์ = 10 : 1 : 1) ในปริมาตร 2.8 ลิตร เขย่าหลอดทดลองให้สารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน นำไปบ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที แล้วนำไปวัดค่าอัตราการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 593 นาโนเมตร โดยมีทรอลอกซ์ ที่ความเข้มข้น 3.125, 6.25, 12.5, 25, 50 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นสารมาตรฐานอ้างอิง นำข้อมูลมาสร้างกราฟมาตรฐานในการหาปริมาณ Fe^{2+} ที่เกิดจากปฏิกิริยาของทรอลอกซ์ หรือสารสกัดใบไคร้หอม แสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเป็นค่า FRAP value ซึ่งหมายถึง ความสามารถในการรีดิวซ์ Fe^{3+} ไปเป็น Fe^{2+} ของสาร นั่นคือถ้าสารใดมีค่า FRAP value สูงก็จะสามารถรีดิวซ์ Fe^{3+} ไปเป็น Fe^{2+} ได้สูง ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

7. การวิเคราะห์ข้อมูล

วิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้สถิติเชิงพรรณนา ได้แก่ ค่าเฉลี่ย และส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน จาก 3 การทดลอง ของปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด และค่า FRAP หาค่า IC_{50} ในการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH โดยใช้ nonlinear regression ในโปรแกรม Sigma Plot และวิเคราะห์เปรียบเทียบปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากเอทานอลและน้ำ ด้วยสถิติ Independent t – test ด้วยโปรแกรม Sigma Plot

ผลการศึกษา

1. ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดใบไคร้หอม

จากการวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด ด้วยวิธี Folin - Ciocalteu พบว่า สารสกัดใบไคร้หอมที่สกัดด้วยเอทานอล มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด เท่ากับ 17.71 ± 1.05 ไมโครกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อมิลลิกรัมสารสกัดหยาบ และสารสกัดด้วยน้ำ มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด เท่ากับ 5.98 ± 0.29 ไมโครกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อมิลลิกรัมสารสกัดหยาบ และเมื่อวิเคราะห์เปรียบเทียบความแตกต่างของปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดระหว่างสารสกัดด้วยเอทานอลและน้ำ พบว่า สารสกัดด้วยเอทานอลมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดแตกต่างจากสารสกัดด้วยน้ำอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับ 0.05 (ตารางที่ 1 และ ภาพที่ 1)

2. ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากใบไคร้หอม

จากการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ด้วยวิธี DPPH พบว่า สารสกัดใบไคร้หอมที่สกัดด้วยเอทานอลและน้ำ มีค่าร้อยละในการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH เพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของสารสกัด โดยสารสกัดด้วยเอทานอลมีร้อยละในการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH อยู่ระหว่างร้อยละ 2.39 – 49.18 ที่ความเข้มข้น 15.625 – 2000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และสารสกัดด้วยน้ำ มีร้อยละในการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH อยู่ระหว่างร้อยละ 0.70 – 12.85 ที่ความเข้มข้น 15.625 – 2000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ภาพที่ 2) เมื่อนำมาคำนวณค่า IC_{50} ในการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH ของสารสกัดด้วย เอทานอล มีค่า เท่ากับ $1,380 \pm 0.02$ ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และสารสกัดด้วยน้ำ มีค่าเท่ากับ $11,240 \pm 1.33$ ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อวิเคราะห์เปรียบเทียบพบว่า สารสกัดด้วยเอทานอลและน้ำของใบไคร้หอมมีความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH น้อยกว่าสารมาตรฐานโทรลอกซ์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่วิเคราะห์เปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างสารสกัดด้วยเอทานอลและน้ำ พบว่า สารสกัดด้วยเอทานอลมีความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH สูงกว่าสารสกัดด้วยน้ำอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05 (ตารางที่ 1 และ ภาพที่ 3)

จากการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ด้วยวิธี FRAP พบว่า สารสกัดด้วยเอทานอล มีค่าความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (FRAP value) เท่ากับ 190.42 ± 0.01 ไมโครกรัมสมมูลของโทรลอกซ์ต่อมิลลิกรัมสารสกัดหยาบ และสารสกัดด้วยน้ำ มีค่าความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (FRAP value) เท่ากับ 30.05 ± 0.76 ไมโครกรัมสมมูลของโทรลอกซ์ต่อมิลลิกรัมสารสกัดหยาบ และ เมื่อวิเคราะห์เปรียบเทียบความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ พบว่า สารสกัดด้วยเอทานอลมีค่าความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระสูงกว่าสารสกัดด้วยน้ำอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05 (ตารางที่ 1 และภาพที่ 4)

อภิปรายผล

จากการวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากใบไคร้หอม ซึ่งในการวิจัยครั้งนี้ได้เลือกใช้เอทานอลและน้ำเป็นตัวทำละลายในการสกัดสาร จากผลการวิจัยพบว่า สารสกัดด้วยเอทานอลของใบไคร้หอม มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด เท่ากับ 17.71 ± 1.05 ไมโครกรัมสมมูลของกรดแกลกต่อมิลลิกรัมสารสกัดหยาบ และมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ โดยมีค่าร้อยละในการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH อยู่ระหว่างร้อยละ 2.39 – 49.18 มีค่า IC_{50} ในการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH เท่ากับ $1,380 \pm 0.02$ ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และมีความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ ด้วยวิธี FRAP เท่ากับ 190.42 ± 0.01 ไมโครกรัมสมมูลของโทรลอกซ์ต่อมิลลิกรัมสารสกัดหยาบ เมื่อเทียบกับสารมาตรฐานโทรลอกซ์ และสารสกัดด้วยน้ำของใบไคร้หอม มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด เท่ากับ 5.98 ± 0.29 ไมโครกรัมสมมูลของกรดแกลกต่อมิลลิกรัมสารสกัดหยาบ มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ โดยมีค่าร้อยละในการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH อยู่ระหว่างร้อยละ 0.70 – 12.85 มีค่า IC_{50} ในการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH เท่ากับ $11,240 \pm 1.33$ ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และมีความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ ด้วยวิธี FRAP เท่ากับ 30.05 ± 0.76 ไมโครกรัมสมมูลของโทรลอกซ์ต่อมิลลิกรัมสารสกัดหยาบ เมื่อเทียบกับสารมาตรฐานโทรลอกซ์ เมื่อวิเคราะห์เปรียบเทียบปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด ค่า IC_{50} ในการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH และความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ พบว่า สารสกัดด้วยเอทานอลมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด ค่า IC_{50} ในการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH และความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ สูงกว่าสารสกัดด้วยน้ำอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05 อาจเป็นเพราะว่า ตัวทำละลายเอทานอลอาจมีความสามารถในการสกัดสารสำคัญจากใบไคร้หอมได้มากกว่าตัวทำละลายน้ำ สอดคล้องกับการศึกษาของ Al-Rimawi และคณะ⁽¹⁷⁾ ที่ทำการศึกษาเกี่ยวกับปริมาณสารฟีนอลิกและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากพืช *Tragopogon porifolius* โดยใช้ตัวทำละลายต่างชนิดกัน คือ 100% เอทานอล 80% เอทานอล และน้ำ ผลการศึกษาพบว่า ปริมาณฟีนอลิกและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระพบมากที่สุดในสารที่สกัดด้วย 80% เอทานอล รองลงมาคือ 100% เอทานอล และน้ำ ตามลำดับ การศึกษาของ Nahak และ Sahu (2010)⁽¹⁸⁾ ที่ทำการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดใบผักหวาน (*Sauropus androgynus*) โดยใช้ใบผักหวานที่แห้งและบดละเอียด หมักแช่ในตัวทำละลายได้แก่ น้ำ และเอทานอล นาน 10 – 12 ชั่วโมง จากนั้นระเหยตัวทำละลายด้วยอุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส ผลการศึกษาพบว่า สารสกัดด้วยน้ำ มีปริมาณฟีนอลิก เท่ากับ 120 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และไม่สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH ได้ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาครั้งนี้ที่สารสกัดด้วยน้ำให้ค่า IC_{50} ในการยับยั้งอนุมูลอิสระที่มากกว่าความเข้มข้นที่ศึกษาซึ่งอาจกล่าวได้ว่าสารสกัดด้วยน้ำของใบไคร้หอมมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH น้อยมากหรือไม่มี สารสกัดด้วยเอทานอล มีปริมาณฟีนอลิก เท่ากับ 150 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ โดยมีค่า IC_{50} ในการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH เท่ากับ 16 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งมีค่าน้อยกว่าการศึกษาในครั้งนี้ การศึกษาของ Huda-Faujan และคณะ (2015)⁽¹⁹⁾ ที่ได้ทำการศึกษาปริมาณสารฟีนอลิกและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดใบของผักหวาน (*Sauropus androgynus*) โดยนำใบผักหวานมาอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส และนำมาหมักแช่ในตัวทำละลาย 70% เอทานอลและน้ำ จากนั้นระเหยตัวทำละลาย 70% เอทานอลที่อุณหภูมิ 75 องศาเซลเซียส และระเหยตัวทำละลายน้ำที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส ซึ่งอุณหภูมิที่ใช้ในการระเหยตัวทำละลายมีความใกล้เคียงกับการศึกษาครั้งนี้ คือ เอทานอล ใช้อุณหภูมิ 79 องศาเซลเซียส และน้ำ ใช้อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส ผลการศึกษาพบว่า ปริมาณฟีนอลิกของสารสกัดด้วยเอทานอล และน้ำ มีค่าเท่ากับ 6.97 และ 12.38 มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลกต่อกรัมสารสกัด และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ พบว่า สารสกัดด้วยเอทานอลและน้ำ

มีฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH เท่ากับ 78 และ 77 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ซึ่งมีค่านี้น้อยกว่าการศึกษาในครั้งนี้ โดยทั้ง 2 การศึกษานี้ใช้ใบผักหวานที่แห้งบดเป็นผงละเอียด ซึ่งแตกต่างจากการศึกษาในครั้งนี้ใช้ใบไคร้หอมสดแล้วบดให้ละเอียดก่อนหมักเข้ากับตัวทำละลาย และระยะเวลาในการหมักแช่ที่ต่างกัน อาจส่งผลต่อปริมาณสารสำคัญในสารสกัดได้ การศึกษาของ Rajeswari และคณะ (2018) ⁽²⁰⁾ ได้ทำการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH ของสารสกัดใบของผักหวาน (*Sauropus androgynus*) ผลการศึกษาพบว่า สารสกัดใบผักหวานสามารถยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH ได้ มีค่า IC_{50} เท่ากับ 49.62 ± 2.52 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งมีค่า IC_{50} น้อยกว่าการศึกษาครั้งนี้ โดยสิ่งที่เหมือนกับการศึกษาครั้งนี้คือใช้ตัวทำละลายเอทานอลในการสกัดสาร สิ่งที่ต่างกันคือ อุณหภูมิที่ใช้ในการระเหยตัวทำละลาย ใช้ 40 – 50 องศาเซลเซียส ขณะที่การศึกษาครั้งนี้ใช้อุณหภูมิ 79 องศาเซลเซียส และใช้ใบผักหวานที่ตากแห้งบดเป็นผงละเอียด ขณะที่การศึกษาครั้งนี้ใช้ใบไคร้หอมสดแล้วบดเป็นให้ละเอียดก่อนหมักเข้ากับตัวทำละลาย ซึ่งการที่ปริมาณสารฟีนอลิกและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของการศึกษาอื่นแตกต่างจากการศึกษาในครั้งนี้ อาจเกิดจากอุณหภูมิที่ใช้ในการระเหยตัวทำละลายดังกล่าวอาจมีผลทำให้ปริมาณสารสำคัญที่สกัดได้ลดลงหรือเสื่อมสภาพไป ดังที่พบในการศึกษาของ สมใจ ขจรชีพพันธุ์งาม (2549) ⁽²¹⁾ ที่ศึกษาอิทธิพลของอุณหภูมิ เวลา และตัวทำละลายที่มีต่อการสกัดสารเคอร์คูมินจากขมิ้นชัน (*Curcuma longa* Linn.) โดยทำการศึกษาใช้ตัวทำละลายเอทานอล และเมทานอล ที่อุณหภูมิ 25 – 50 องศาเซลเซียส ระยะเวลาในการสกัดอยู่ในช่วง 30 นาที – 24 ชั่วโมง ผลการศึกษาพบว่า สภาวะที่เหมาะสมในการสกัดที่ให้ปริมาณสารเคอร์คูมินสูงสุด คือ ใช้อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง เมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นปริมาณสารเคอร์คูมินที่สกัดได้จะลดลง และการศึกษาฤทธิ์ของสารสกัด 95% เอทานอลของพืชตระกูล Euphorbiaceae ได้แก่ เปล้าใหญ่ (*Croton persimilis* Müll.Arg.) มะเฒ่าควาย (*Antidesma punctulatum* Miq.) ในพื้นที่ลุ่มน้ำลี้ จังหวัดลำพูน พบว่า สารสกัดผลมะเฒ่าควายอ่อน มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมเท่ากับ 193.47 ± 4.63 มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อกรัมสารสกัดหยาบ มีความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH สูง ที่ IC_{50} 51.50 ± 3.30 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ด้วยวิธี DPPH assay และ มีค่า FRAP value เท่ากับ 1905.88 ± 13.04 ไมโครโมลาร์ต่อกรัมสารสกัดหยาบ ด้วยวิธี FRAP assay มากกว่าสารสกัดผลมะเฒ่าควายอ่อน และสารสกัดใบเปล้าใหญ่ ⁽²²⁾ จากผลการศึกษาจะเห็นได้ว่าไคร้หอม ซึ่งเป็นพืชที่อยู่ในสกุล (*Sauropus* sp.) เดียวกับ ผักหวาน และวงศ์ Euphorbiaceae เดียวกับ เปล้าใหญ่ และมะเฒ่าควาย แต่มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ต่างกันอย่างเห็นได้ชัด ซึ่งอาจเป็นเพราะไคร้หอม ผักหวาน เปล้าใหญ่ และมะเฒ่าควาย มีองค์ประกอบและปริมาณสารสำคัญที่ต่างกันอย่างเห็นได้ชัด โดยจากรายงานการศึกษาขององค์ประกอบของสารสำคัญในผักหวาน จะพบสารในกลุ่มเคอคูมิน แทนนิน ฟลาโวนอยด์ อัลคาลอยด์ และฟีนอล ^(23, 24) และสารกลุ่มเทอร์ปีนอยด์ ชื่อ ไฟตอล และ สควอนลิน ⁽²⁵⁾ ซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักที่พบในผักหวาน

บทสรุป

การศึกษาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดใบไคร้หอม พบว่า สารสกัดเอทานอลและน้ำของใบไคร้หอม มีสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ที่ค่อนข้างน้อยเมื่อเทียบกับสารมาตรฐาน ดังนั้นผลการศึกษาในครั้งนี้อาจใช้ข้อมูลพื้นฐานในการศึกษาเกี่ยวกับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารจากใบไคร้หอมต่อไปในอนาคต รวมทั้งศึกษาเพิ่มเติมในประเด็น อุณหภูมิและเวลาที่เหมาะสมในการสกัดสารจากใบไคร้หอม ศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยตัวทำละลายอื่น ๆ เช่น เมทานอล เฮกเซน ไดคลอโรมีเทน เป็นต้น ศึกษา

องค์ประกอบของสารสำคัญ และศึกษาฤทธิ์อื่น ๆ เพิ่มเติมเพื่อให้ได้ข้อมูลที่เป็นประโยชน์ในการใช้ไคร์หอมในการรักษาโรค เช่น ฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ ฤทธิ์ต้านการอักเสบ และฤทธิ์แก้แพ้ เป็นต้น

กิตติกรรมประกาศ

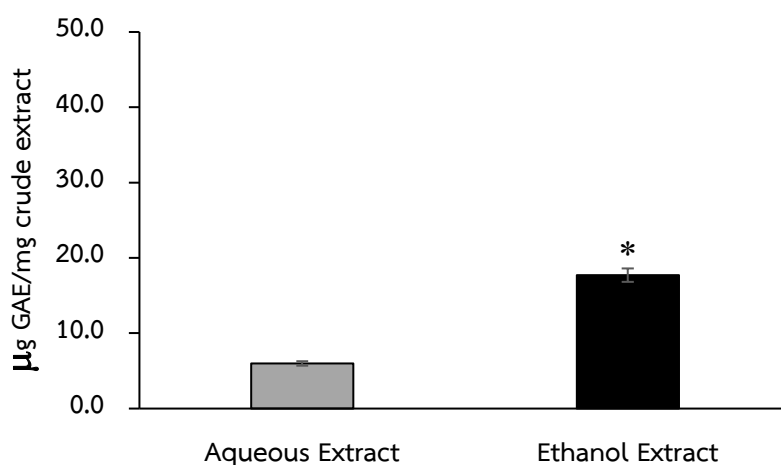
ขอขอบพระคุณกองสนับสนุนการวิจัยของบุคลากร มหาวิทยาลัยราชภัฏเลย ประจำปี 2561 ที่ให้ทุนอุดหนุนในการทำวิจัยในครั้งนี้

ตาราง ภาพ และแผนภาพ

ตารางที่ 1 ร้อยละผลผลิต ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดใบไคร้หอมที่สกัดด้วยเอทานอลและน้ำ

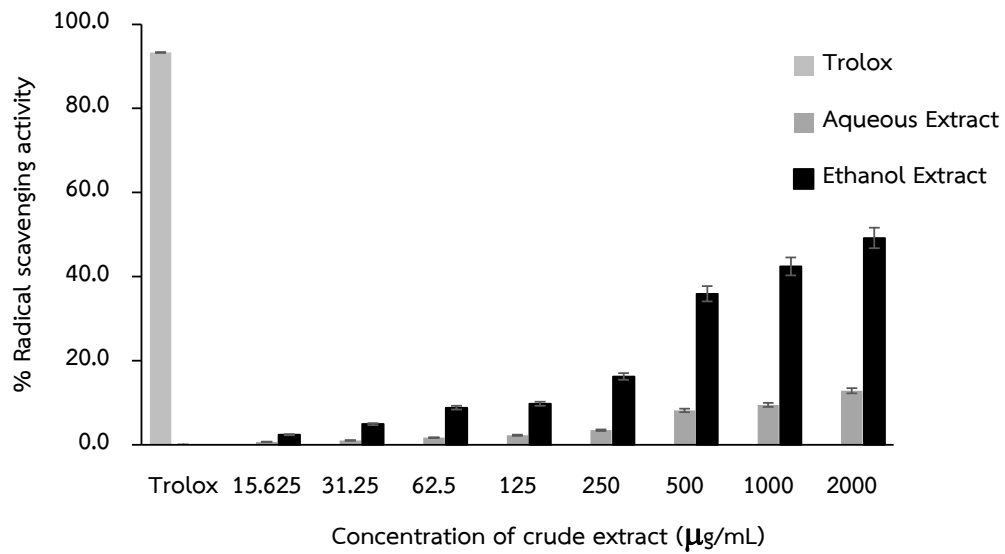
Crude extract	%Yield of crude extract	Total phenolic contents (μg GAE/mg crude extract)*	Antioxidant activities	
			IC ₅₀ of DPPH ($\mu\text{g/mL}$)*	FRAP assay (μg TEAC/mg crude extract)*
Trolox		-	24.54 $\pm$ 0.49	-
Ethanol extract	5.19	17.71 $\pm$ 1.05	1,380 $\pm$ 0.02	190.42 $\pm$ 0.01
Aqueous extract	10.56	5.98 $\pm$ 0.29	11,240 $\pm$ 1.33	30.05 $\pm$ 0.76

* mean $\pm$ SD, n = 3

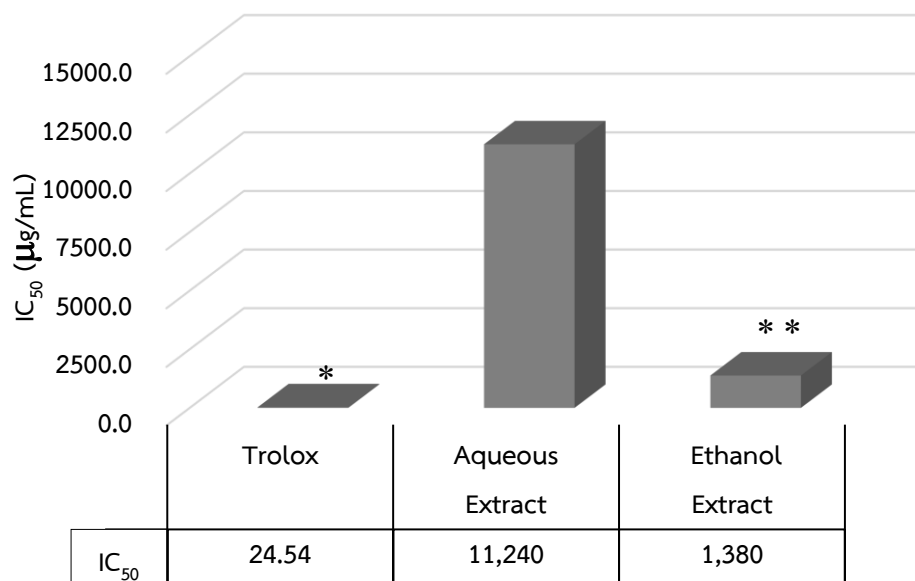


ภาพที่ 1 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดด้วยเอทานอล เปรียบเทียบกับสารสกัดด้วยน้ำของใบไคร้หอม

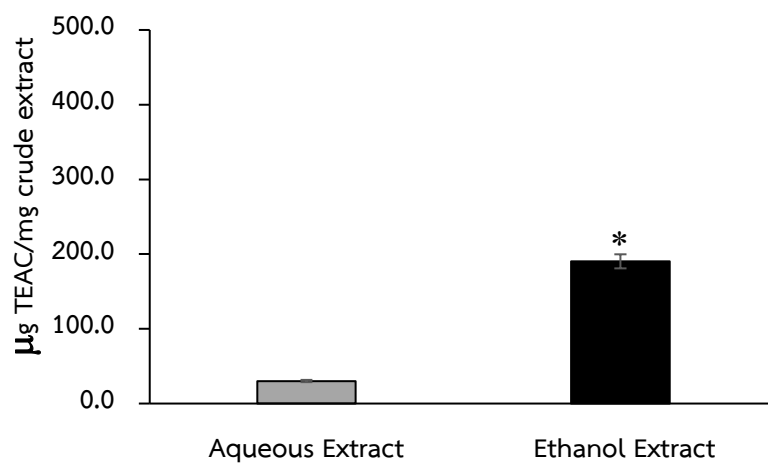
* มีค่าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05



ภาพที่ 2 ร้อยละการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH ของสารสกัดเอทานอลและน้ำจากใบไคร้หอม ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ เทียบกับโทรลอกซ์ที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร



ภาพที่ 3 ค่า IC₅₀ ในการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH ของสารสกัดด้วยเอทานอลและน้ำจากใบไคร้หอมเทียบสารมาตรฐานโทรลอกซ์ * การเปรียบเทียบโทรลอกซ์กับสารสกัดใบไคร้หอม และ ** การเปรียบเทียบสารสกัดด้วยเอทานอลกับน้ำของสารสกัดใบไคร้หอม โดยมีค่าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05



ภาพที่ 4 ค่าความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (FRAP value) ของสารสกัดด้วยเอทานอลเปรียบเทียบกับสารสกัดด้วยน้ำของใบไคร้หอมที่ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร * มีค่าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05

เอกสารอ้างอิง

1. Ames, B. N., Shigenaga, M. K., & Hagen, T. M. (1993). Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 90(17), 7915-7922.
2. Halliwell, B. (1999). Antioxidant defence mechanisms: from the beginning to the end (of the beginning). **Free radical research**, 31(4), 261-272.
3. Harman, D. (1956). Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. **Journal of gerontology**, 11(3), 298-300.
4. Daduang, J., Vichitphan, S., Daduang, S., Hongsprabhas, P., & Boonsiri, P. (2011). High phenolics and antioxidants of some tropical vegetables related to antibacterial and anticancer activities. **African Journal of Pharmacy and Pharmacology**, 5(5), 608 – 615.
5. ฐานข้อมูลพรรณไม้ องค์การสวนพฤกษศาสตร์ กระทรวงทรัพยากรและสิ่งแวดล้อม. (2556). ข้อมูลของไคร้หอม. ค้นวันที่ 1 สิงหาคม 2560, จาก <http://www.qsbg.org/Database/plantdb/mdp/medicinal-specimen.asp?id=670>
6. Halliwell, B. (1999). Reactive oxygen species in living systems: source, biochemistry, and role in human disease. **The American journal of medicine**, 91(3C), 14S-22S.
7. Ramírez-Prieto, M. T., García-Río, F., & Villamor, J. (2006). Role of oxidative stress in respiratory diseases and its monitoring. **Medicina clinica**, 127(10), 386-396.
8. Gomes, B., Firmino, M., Jorge, J. S., Ferreira, M., Rodovalho, T. M., Weis, S. N., Souza, G., Morais, P. C., Sousa, M. V., Souza, P., & Veiga-Souza, F. H. (2018). Increase of reactive oxygen species in different tissues during lipopolysaccharide-induced fever and antipyresis: an electron paramagnetic resonance study. **Free radical research**, 52(3), 351-361.
9. บังอร วงศ์รักษ์ และศศิลักษณ์ ปิยะสุวรรณ. (2549). **ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของผักพื้นบ้าน**. โครงการพิเศษ ปริญญาเภสัชศาสตรบัณฑิต คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล.
10. Wei, X., Li, Y., Li, M., Min, C., Lu, H., Li, Q., Yuan, J., Chen, C., Li, H., & Zhang, J. (2018). The protective effects of *Sauropus spatulifolius* on acute lung injury induced by lipopolysaccharide. **Journal of the science of food and agriculture**, 98(12), 4420 – 4426.
11. คงเดช สวาสดีพันธ์, ตามรัศมี สว่างกูร, อนุชิต ภาณุมาสวิวัฒน์ และภรภัทร สำอางค์. (2563). ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์อะซีติลโคลีนเอสเตอเรส. **PSRU Journal of Science and Technology**, 5(1), 107 – 122.
12. พวงรัตน์ รักดีโชติ, ยุพา คู่คงวิริยะพันธุ์ และวีระพล คู่คงวิริยะพันธุ์ (2546). การตรวจกรองฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดตำลึงและบัวบก. **ศรีนครินทร์เวชสาร**, 18(2), 78 – 84.

13. Suparmi, S., Fasitasari, M., Martosupono, M., & Mangimbulude, J. C. (2016). Comparisons of Curative Effects of Chlorophyll from *Sauropus androgynus* (L) Merr Leaf Extract and Cu-Chlorophyllin on Sodium Nitrate-Induced Oxidative Stress in Rats. **Journal of toxicology**, 1–7.
14. อติสร จำรูญ, พรณิภา ย้วยล, และบุษบา จ้อยร่อย. (2558). การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในกล้วยหินและกล้วยเล็บมือนาง. **วารสารพืชศาสตร์สงขลานครินทร์**, 2(1), 38 – 42.
15. Jandaruang, J., Siritapetawee, J., Thumanu, K., Songsiriritthigul, C., Krittanai, C., Daduang, S., Dhiravisit, A., & Thammasirirak, S. (2012). The effects of temperature and pH on secondary structure and antioxidant activity of *Crocodylus siamensis* hemoglobin. **The protein journal**, 31 (1), 43 – 50.
16. Shian, T. E., Abdullah, A., Musa, K. H., Maskat, M. Y., & Ghani, M. A. (2012). Antioxidant properties of three banana cultivars (*Musa acuminata* 'Berangan', 'Mas' and 'Raja') extracts. **Sains Malaysiana**, 41(3), 319 – 324.
17. Al-Rimawi, F., Rishmawi, S., Arikat, H. S., Khalid, F. M., Warad, I., & Salah, Z. (2016). Anticancer activity, antioxidant activity, and phenolic and flavonoids content of wild *Tragopogon porrifolius* plant extracts. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, 1 – 7.
18. Nahak, G., & Sahu, R. K. (2010). Free Radical Scavenging activity of Multivitamin Plant *Sauropus androgynus* L.Merr. **Researcher**, 2(11), 6 – 14.
19. Huda-Faujan, N., Rahim, Z. A., Rehan, M. M., & Ahmad, F. B. H. (2015). Comparative analysis of phenolic content and antioxidative activities of eight Malaysian traditional vegetables. **Malaysian Journal of Analytical Sciences**, 19(3), 611 – 624.
20. Rajeswari, B., Moorthy, S. K., Arumugam, M. & Shanmugavadivelu, C. M. (2018). Chemical Constituents of *Sauropus androgynus* and Evaluation of its Antioxidant Activity. **Research Journal of Phytochemistry**, 12, 7 – 13.
21. สมใจ ขจรชีพนันธุ์งาม. (2549). อิทธิพลของอุณหภูมิ เวลา และตัวทำละลายที่มีต่อการสกัดสารเคอร์คูมินจากขมิ้นชัน. **วิศวกรรมสาร มช.**, 33(3), 225 – 236.
22. สิวลี รัตนปัญญา. (2562). ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาในการยับยั้งการเจริญเติบโตในเซลล์มะเร็งของสาร สกัดหยาดจากพืชตระกูล Euphorbiaceae ในพื้นที่ลุ่มน้ำลี้ จังหวัดลำพูน. เชียงใหม่ : มหาวิทยาลัยราชภัฏเชียงใหม่.
23. Kuttinath, S., Haritha, K. H., & Rammohan, R. (2019). Phytochemical screening, antioxidant, antimicrobial, and antibiofilm activity of *Sauropus androgynus* leaf extracts. **Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research**, 12(4), 244 – 250.
24. Madhu, C. S., Manukumar, H. M., & Basavaraju, P. (2014). New-vista in finding antioxidant and anti-inflammatory property of crude protein extract from *Sauropus androgynus* leaf. **Acta scientiarum polonorum. Technologia alimentaria**, 13(4), 375 – 383.

25. Selvi, S., & Baskar, A. (2012). Evaluation of bioactive components and antioxidant activity of *Sauropus androgynus* plant extracts using GC-MS analysis. **International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research**, 12(2), 65 – 67.

