RMUTP Research Journal Special Issue
The 5th Rajamangala University of Technology National Conference

ประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบกิ่งมะขวิดที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

EFFICIENCY OF Feronia limonia Swingle BRANCH CRUDE EXTRACT ASANTIOXIDANT

จันทิมา นามโชติ[1*] ศศมล ผาสุข[2] ปัณณ์รภัส ถกลภักดี[3]

[1]นักศึกษา [2]ผู้ช่วยศาสตราจารย์ [3]อาจารย์ สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ศึกษา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี
มหาวิทยาลัยราชภัฏวไลยอลงกรณ์ ในพระบรมราชูปถัมภ์ จังหวัดปทุมธานี 13180

บทคัดย่อ

วิจัยนี้มีวัตถุประสงค์ เพื่อศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ แยกองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดหยาบกิ่งมะขวิด โดยนำกิ่งมะขวิดสกัดด้วยเอทานอลและนำสารสกัดหยาบกิ่งมะขวิดที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมาเป็นส่วนผสมในผลิตภัณฑ์โลชั่น ผลการวิจัยพบว่า สารสกัดหยาบจากกิ่งมะขวิดมีปริมาณฟีนอลิกและแทนนินทั้งหมด เท่ากับ 42.08 และ 52.22 μg/ml และมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 12.55 μg/ml ในขณะที่ BHT และ BHA มีค่า IC_{50} เท่ากับ 8.96 และ 9.61 μg/ml ตามลำดับ แยกสารสกัดหยาบกิ่งมะขวิดได้เป็น 4 กลุ่ม (F1, F2, F3, F4) และพบว่าสารกลุ่ม F2 มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมากที่สุด โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 9.53 μg/ml เมื่อวิเคราะห์ด้วย GC-MS พบว่ามีโครงสร้างเป็น Hexadecanoic acid, Ethyl ester, Trimethylsilyl ester และ Dioctyl ester ผลิตภัณฑ์โลชั่นที่ได้ มีสีขาว ไม่มีกลิ่น เนื้อโลชั่นไม่แยกชั้น และมีความเป็นกรด–ด่าง เท่ากับ 8

Abstract

The objective of this research were to focus the antioxidant activity and separated the chemical compound of crude extract from *Feronia limonia* Swingle branch. After that, the optimum antioxidant of crude extract was used to prepare the antioxidant lotion. The result showed that crude extract had total phenolic and total tannin contents 41.99 and 52.35 μg/ml ; respectively and also had antioxidant activity (IC_{50}) 12.55 μg/ml, Whereas BHT and BHA had IC_{50} 8.96 and 9.61 μg/ml. The separation of crude extract can be separated into four groups (F1, F2, F3, F4) and the results showed that F2 has the strongest activity against the others with IC_{50} = 9.53 μg/ml. Then, F2 was analyzed with GC-MS and found that the structure were Hexadecanoic acid, Ethyl ester, Trimethylsilyl ester and Dioctyl ester. The lotion was odorless, white color with no phase separation with pH 8.0

คำสำคัญ : สารสกัดหยาบ กิ่งมะขวิด อนุมูลอิสระ

Keywords : Crude Extract, *Feronia limonia* Swingle branch, Antioxidant

[*]*ผู้นิพนธ์ประสานงานไปรษณีย์อิเล็กทรอนิกส์ juntima_1982@hotmail.com โทร. 08 7667 4423*

1. บทนำ

สภาพเศรษฐกิจ สังคมและสิ่งแวดล้อมที่เปลี่ยนแปลงไปของประเทศไทย ทำให้ประชากรมีพฤติกรรมการบริโภคและวิถีการดำรงชีวิตคล้ายคลึงกับสังคมตะวันตก ปัญหาที่ตามมาคือร่างกายได้รับสารพิษในรูปแบบต่างๆ เช่น ผนังหลอดเลือดแข็งตัวทำให้เกิดการอักเสบ เกิดการทำลายเนื้อเยื่อรุนแรงขึ้น ความชรา ความเสื่อมของร่างกาย และเกิดการกลายพันธุ์ของเซลล์ ซึ่งเป็นสาเหตุทำให้เกิดโรคต่างๆ ได้แก่ โรคอ้วน โรคหัวใจและหลอดเลือด โรคข้ออักเสบ และโรคมะเร็ง เป็นต้น ร่างกายมนุษย์ใช้ออกซิเจนในกระบวนการเมตาบอลิซึม ซึ่งเป็นกระบวนการเผาผลาญต่างๆ ในร่างกายของสิ่งมีชีวิตและเป็นผลให้เกิดอนุมูลอิสระของออกซิเจน โดยปกติร่างกายจะมีระบบควบคุมป้องกันอนุมูลอิสระที่เรียกว่า ระบบแอนติออกซิแดนท์ (Antioxidant defense system) แต่ถ้าร่างกายไม่สามารถควบคุมและป้องกันปริมาณของอนุมูลอิสระให้อยู่ในระดับปกติที่ไม่เป็นอันตรายต่อร่างกายได้เรียกว่า เกิดภาวะความเครียดของออกซิเจน (Oxidative stress) โดยอนุมูลอิสระที่มีปริมาณเพิ่มมากขึ้นจะก่อให้เกิดความเสียหายและเป็นอันตรายต่อร่างกายซึ่งจะนำไปสู่การกลายพันธุ์ โดยจะเข้าทำปฏิกิริยากับไขมันที่ผนังเซลล์กับโปรตีน เอนไซม์คาร์โบไฮเดรต และดีเอ็นเอ ดังนั้นการใช้สารที่มีคุณสมบัติเป็นสารแอนติออกแดนท์ (Antioxidant) จะช่วยยับยั้งการเกิดอนุมูลอิสระไม่ให้ทำลายองค์ประกอบของเซลล์ สารต้านอนุมูลอิสระมีอยู่จำนวนมาก ทั้งที่ได้จากการสังเคราะห์ขึ้น และที่มีอยู่ในธรรมชาติ เช่น ในพืชโดยทั่วไปจะพบสารต้านอนุมูลิสระ ได้แก่ โคเอนไซม์ เอนไซม์คิวเทน (Beyer, 1992) ซึ่งสอดคล้องกับ สมหมาย ปัตตาลี (2551) กล่าวว่า พืชที่มีความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระมักจะมีสารประกอบหลัก คือ สารฟีนอลิก ได้แก่ ฟลาวานอยด์ กรดฟีนอลิก และแอนโธไซยานิน ซึ่งพบทั่วไปในใบ ลำต้นและเปลือกของพืช กลไกการต้านอนุมูลอิสระของสารประกอบฟีนอลิกจะอยู่ในรูปของการกำจัดอนุมูลอิสระ ด้วยการให้ไฮโดรเจนอะตอมและการกำจัดออกซิเจนที่ขาดอิเล็กตรอน รวมทั้งการรวมตัวกับโลหะ

จากการศึกษางานวิจัยเกี่ยวกับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ พบว่างานวิจัยของกัลยาณี วัฒนธีรางกูร (2551) ได้ศึกษาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกและความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระจากกากเมล็ดสบู่ดำ โดยสกัดด้วยตัวทำละลายเมธานอลบริสุทธิ์ 80% เมธานอล และ 60% เมธานอล และนำมาหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดด้วยวิธี Folin – Ciocalteu Reagent (FCR) พบว่าปริมาณสารประกอบฟีนอลิกในสารสกัดที่สกัดได้ อยู่ในช่วง 26.4-85.28 mg% เมื่อหาความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH assay (2,2 diphenyl – 1 – picryhydrazyl), และวิธี 1,10 – phenanthroline พบว่าสารสกัดมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้ โดยมีเปอร์เซ็นต์การต้านอนุมูลอิสระอยู่ในช่วง 78-92 ซึ่งจะสอดคล้องกับปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดจากกากเมล็ดสบู่ดำและเมื่อทดสอบการทำปฏิกิริยากับ 1,10 – phenanthroline พบว่าประสิทธิภาพของสารสกัดในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดอยู่ในช่วง 94-123 ppm Fe^{2+} จากการศึกษางานวิจัยดังกล่าวพบว่าสารสกัดที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเป็นสารสกัดที่พบได้ในตัวอย่างพืช ผู้วิจัยจึงได้ทำการศึกษาค้นคว้าสรรพคุณของตัวอย่างพืชหลายชนิดที่มีอยู่ในท้องถิ่น พบว่าพืชที่น่าสนใจ คือ มะขวิด *(Feronia limonia* Swingle) ซึ่งมีลักษณะทางพฤกษศาสตร์ คือ เป็นไม้ยืนต้น สูง 6 – 10 เมตร ใบประกอบแบบขนนก เรียงสลับ ใบย่อย 5-7 ใบ

เนื้อใบมีต่อมน้ำมันกระจายอยู่ที่บริเวณขอบใบ ดอกช่อออกที่ปลายกิ่งหรือที่ซอกใบประกอบด้วยดอกตัวผู้และดอกสมบูรณ์เพศอยู่ในต้นเดียวกัน กลีบดอกสีเหลืองแกมเขียวเจือด้วยสีแดง ผลสดมีรูปทรงกลม เมื่อสุกจะมีสีเทาแกมน้ำตาล จากข้อมูลสรรพคุณพบว่า ส่วนเปลือกต้นสามารถแก้บวม แก้ตัวพยาธิ แก้ตกโลหิต ส่วนใบใช้ยาแก้ฟกบวม แก้ท้องร่วง แก้ตกโลหิต (ห้ามโลหิตระดูสตรี) ขับลม ฝาดสมาน ดอกแก้ลงท้อง แก้ฝีเปื่อยพัง แก้บวม แก้ตัวพยาธิ แก้ตกโลหิต ผลมะขวิดใช้แก้บวม แก้ตัวพยาธิ แก้ตกโลหิต เป็นยาบำรุงทำให้สดชื่นเจริญอาหาร บำบัดโรคท้องเสีย รักษาโรคที่เกี่ยวกับทางเดินอาหาร รักษาโรคลักปิด-ลักเปิด และจากข้อมูลการวิจัยยังพบสารประกอบฟีนอลิก (Phenolic) เป็นองค์ประกอบอยู่ด้วย (สำนักงานข้อมูลสมุนไพร : 2542) ซึ่งสารกลุ่มนี้มีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระด้วย

ผู้วิจัยจึงสนใจที่จะนำกิ่งมะขวิดมาทำการสกัดเพื่อศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และนำผลการศึกษาที่ได้ไปทำผลิตภัณฑ์โลชั่นที่มีส่วนผสมของสารสกัดกิ่งมะขวิดซึ่งมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ทดสอบสมบัติทางกายภาพและเคมีบางประการเพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานในการศึกษาขั้นสูงต่อไป

1.1 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1.1.1 เพื่อศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบกิ่งมะขวิด

1.1.2 เพื่อแยกและศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดหยาบกิ่งมะขวิดที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

1.1.3 เพื่อทำผลิตภัณฑ์โลชั่นผสมสารสกัดหยาบกิ่งมะขวิดที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและทดสอบสมบัติทางกายภาพและเคมีบางประการ

1.1.4 เพื่อพัฒนาชุดฝึกอบรมเกี่ยวกับการใช้สารสกัดหยาบกิ่งมะขวิดมาใช้ในผลิตภัณฑ์โลชั่น

1.2 ขอบเขตของการวิจัย

1.2.1 ตัวอย่างพืชที่ใช้ในการวิจัย คือ มะขวิด *(Feronia limonia* Swingle) วงศ์ Rutaceae จากตำบลบ้านแหลม อำเภอบางปลาม้า จังหวัดสุพรรณบุรี โดยส่วนที่นำมาใช้ในการวิจัยนี้คือ กิ่งมะขวิด

1.2.2 ตัวทำลายที่ใช้ในการสกัด คือ เอทานอล

1.2.3 การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดมะขวิด โดยวิธี DPPH radical

1.2.4 ทำการแยกสารโดยใช้เทคนิคโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์

1.2.5 วิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี โดยเทคนิค GC/MS

2. วิธีการทดลอง

2.1 การสกัดสารจากกิ่งมะขวิด

2.1.1 การเตรียมสารสกัดหยาบจากกิ่งมะขวิด

นำกิ่งมะขวิดที่มีความยาวเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 5-8 เซนติเมตร มาสับให้เป็นชิ้นบางๆ หรือชิ้นเล็กๆ นำไปตากแดดจนแห้งแล้วนำไปบดละเอียด ชั่งน้ำหนักกิ่งมะขวิด 3 กิโลกรัม เติมตัวทำละลายเอทานอลปริมาตร 5,000 มิลลิลิตร สกัดโดยการแช่ในขวดโหล ปิดภาชนะทิ้งไว้ 6-7 วัน ที่อุณหภูมิห้อง ในการแช่ทำการเขย่าหรือคนบ่อยๆ เมื่อครบกำหนด นำไปกรองแยกสารสกัดหยาบด้วยผ้าขาวบาง แล้วกรองโดยเครื่องกรองสุญญากาศ ผ่านกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 นำสารที่สกัดได้มาระเหยเอทานอลออก โดยใช้เครื่องระเหยสุญญากาศ แล้วนำมาทำให้แห้งอีกครั้งด้วยเครื่องระเหยแห้งแบบเยือกแข็ง จะได้สารสกัดหยาบ ชั่งน้ำหนักของสารที่สกัดได้

2.2 หาปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดและแทนนินทั้งหมด

2.2.1 การวิเคราะห์หาปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมดเทียบกับกรดแกลลิก

นำสารสกัดกิ่งมะขวิดมาหาปริมาณฟีนอลิก โดยดัดแปลงจากวิธีของ Hou *et al*. (2003) ให้สารประกอบฟีนอลิกทำปฏิกิริยากับ Folin – Ciocalteu Reagent (FCR) โดยใช้กรดแกลลิกเป็นสารมาตรฐาน มีขั้นตอนดังนี้

2.2.1.1 การเตรียมสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิกเข้มข้น 1000 ppm และ 100 ppm

สารละลายมาตรฐานกรดแกลลิกเข้มข้น 1000 ppm ทำโดยชั่งกรดแกลลิก 0.025 กรัม ละลายในเอทานอลบริสุทธิ์และปรับปริมาตรให้เป็น 25 มิลลิลิตร ในขวดปรับปริมาตร จากนั้นเจือจางสิบเท่าให้ได้สารมาตรฐานกรดแกลลิกเข้มข้น 100 ppm ด้วยการปิเปตมา 2.5 มิลลิลิตร เจือจางด้วยเอทานอลให้ได้ปริมาตร 25 มิลลิลิตร ในขวดวัดปริมาตร

2.2.12 การสร้างกราฟมาตรฐานกรดแกลลิก

1. นำสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิกเข้มข้น 100 ppm มาเจือจางด้วยเอทานอลให้มีความเข้มข้นเป็น 0, 20, 40, 60 และ 80 ppm ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร โดยแยกแต่ละหลอดการทดลอง

2. จากนั้นนำทุกหลอดมาเติมน้ำ 2.5 มิลลิลิตร และเติมสารละลายเฟอร์รินปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันดีและเติมโซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3) เข้มข้น 7% ปริมาตร 2 มิลลิลิตร

3. นำไปเขย่าให้สารผสมกันด้วยเครื่องผสม (Vortex) ตั้งทิ้งไว้ในที่มืด 90 นาที

4. วัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 748 นาโนเมตร (A_{748}) จากนั้นนำค่า A_{748} และความเข้มข้นของสารมาตรฐานแกลลิกมาเขียนกราฟมาตรฐานและหาค่าความชัน (m) เพื่อใช้วิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกในสารสกัดต่อไป

2.2.1.3 การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกในสารสกัดกิ่งมะขวิด

1. นำสารสกัดกิ่งมะขวิดมาตัวอย่างละ 0.05 กรัม มาละลายด้วยเอทานอลปริมาตร 20 มิลลิลิตร

2. นำสารสกัดที่เตรียมได้จากข้อ 1 ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลอง

3. นำสารสกัดมาเติมน้ำ 2.5 มิลลิลิตร และเติมสารละลายเฟอร์รินปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันดี และเติม 7% Na_2CO_3 ปริมาตร 2 มิลลิลิตร

4. นำไปเขย่าให้สารผสมกันด้วยเครื่องผสม ตั้งทิ้งไว้ในที่มืด 90 นาที

5. นำไปวิเคราะห์ค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดช่วงความยาวคลื่น 200 - 800 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง UV-vis Spectrophotometer และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 748 นาโนเมตร

6. หาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกจากกราฟมาตรฐานกรดแกลลิกที่ทำในวันเดียวกัน โดยทำการทดลองตัวอย่างละ 3 ซ้ำ

7. คำนวณหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดในสารสกัด

2.2.2 การวิเคราะห์หาปริมาณแทนนินทั้งหมดเทียบกับกรดแทนนิก

นำสารสกัดกิ่งมะขวิดมาหาปริมาณแทนนินโดยดัดแปลงจากวิธีของ Hou *et al.* (2003) โดยให้สารประกอบแทนนินทำปฏิกิริยากับ Folin- Ciocalteu Reagent (FCR) โดยใช้กรดแทนนิกเป็นสารมาตรฐาน มีขั้นตอนที่สำคัญดังนี้

2.2.2.1 การเตรียมสารละลายมาตรฐานแทนนิกเข้มข้น 1000 ppm และ 100 ppm

สารละลายมาตรฐานแทนนิกเข้มข้น 1000 ppm ทำโดยชั่งแทนนิก 0.025 กรัม ละลายในเอทานอลบริสุทธิ์และปรับปริมาตรให้เป็น 25 มิลลิลิตร ในขวดปรับปริมาตร จากนั้นเจือจางสิบเท่าให้ได้สารมาตรฐานแทนนิกเข้มข้น 100 ppm ด้วยการปิเปตมา 2.5 มิลลิลิตร เจือจางด้วยเอทานอลให้ได้ปริมาตร 25 มิลลิลิตร ในขวดวัดปริมาตร

2.2.2.2 การสร้างกราฟมาตรฐานกรดแทนนิก

1. นำสารละลายมาตรฐานกรดแทนนิกเข้มข้น 100 ppm มาเจือจางด้วยเอทานอลให้มีความเข้มข้นเป็น 0, 20, 40, 60 และ 80 ppm ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร โดยแยกแต่ละหลอดการทดลอง

2. จากนั้นนำทุกหลอดมาเติมน้ำ 2.5 มิลลิลิตร และเติมสารละลายเฟอร์รินปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันดีและเติมโซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3) เข้มข้น 7% ปริมาตร 2 มิลลิลิตร

3. นำไปเขย่าให้สารผสมกันด้วยเครื่องผสม ตั้งทิ้งไว้ในที่มืด 90 นาที

4. วัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 760 นาโนเมตร (A_{760}) จากนั้นนำค่า A_{760} และความเข้มข้นของสารมาตรฐานกรดแทนนิกมาเขียนกราฟมาตรฐานและหาค่าความชัน (m) เพื่อใช้วิเคราะห์ปริมาณแทนนินในสารสกัดต่อไป

2.2.2.3 การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบแทนนินในสารสกัดกิ่งมะขวิด

1. นำสารสกัดกิ่งมะขวิดจำนวน 0.05 กรัม มาละลายด้วยเอทานอลปริมาตร 20มิลลิลิตร

2. นำสารสกัดที่เตรียมได้จากข้อ 1 มาปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลอง

3. นำสารสกัดมาเติมน้ำ 2.5 มิลลิลิตร และเติมสารละลายเฟอร์รินปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันดี และเติม 7% Na_2CO_3 ปริมาตร 2 มิลลิลิตร

4. นำไปเขย่าให้สารผสมกันด้วยเครื่องผสม ตั้งทิ้งไว้ในที่มืด 60 นาที

5. นำไปวิเคราะห์ค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดช่วงความยาวคลื่น 200 - 800 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง UV-vis Spectrophotometer และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 760 นาโนเมตร

6. หาปริมาณสารประกอบแทนนินจากกราฟมาตรฐานกรดแทนนิกที่ทำในวันเดียวกัน โดยทำการทดลองตัวอย่างละ 3 ซ้ำ

7. คำนวณหาปริมาณสารประกอบแทนนินทั้งหมดในสารสกัด

2.3 การศึกษาสมบัติการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากกิ่งมะขวิด โดยการวัดสมบัติในการยับยั้ง DPPH radical

1. ชั่ง BHT 0.01 กรัม ใส่ในขวดวัดปริมาตร 100 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วย Absolute ethanol จนได้สารละลาย BHT ที่มีความเข้มข้น 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

2. ปิเปตสารละลาย BHT ที่มีความเข้มข้น 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ปริมาตร 1.25, 2.50, 3.75, 5.00, 6.25 มิลลิลิตร ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 25 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วย Absolute etanol จะได้สารละลาย BHT ที่มีความเข้มข้น 5, 10, 15, 20, และ 25 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ

3. ชั่งสารสกัดกิ่งมะขวิด 0.01 กรัม ใส่ในขวดวัดปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วย Absolute ethanol จะได้สารละลายของสารสกัดที่มีความเข้มข้น 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ปิเปตสารละลายของสารสกัดจากมะขวิดที่มีความเข้มข้น 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ปริมาตร 5, 10, 15, 20 และ 25 มิลลิลิตร ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 25 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วย Absolute ethanol จะได้สารละลายของสารสกัดจากมะขวิดที่มีความเข้มข้น 20, 40, 60, 80, 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

4. ปิเปตสารละลาย BHT ที่มีความเข้มข้นต่างๆ ความเข้มข้นละ 500 ไมโครลิตร ลงในหลอดทดลอง เติม 0.1 มิลลิโมลาร์ DPPH ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ลงไปในหลอดทดลอง ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง Vortex mixer ตั้งทิ้งไว้ที่อุณภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร และทำการทดลอง 3 ซ้ำ

5. ปิเปตสารละลายของสารสกัดกิ่งมะขวิดที่มีความเข้มข้นต่างๆ ความเข้มข้นละ 500 ไมโครลิตร ลงไปในหลอดทดลอง เติม 0.1 มิลลิโมลาร์ DPPH ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ลงไปในหลอดทดลอง ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง vortex mixer ตั้งทิ้งไว้ที่อุณภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร และทำการทดลอง 3 ซ้ำ

6. ชั่ง BHA 0.01 กรัม ใส่ในขวดวัดปริมาตร 100 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วย Absolute ethanol จนได้สารละลาย BHA ที่มีความเข้มข้น 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

7. ปิเปตสารละลาย BHA ที่มีความเข้มข้น 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ปริมาตร 1.25, 2.50, 3.75, 5.00, 6.25 มิลลิลิตร ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 25 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วย Absolute etanol จะได้สารละลาย BHA ที่มีความเข้มข้น 5, 10, 15, 20, และ 25 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ

8. ปิเปตสารละลาย BHA ที่มีความเข้มข้นต่างๆ ความเข้มข้นละ 500 ไมโครลิตร ลงในหลอดทดลอง เติม 0.1 มิลลิโมลาร์ DPPH ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ลงไปในหลอดทดลอง ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง Vortex mixer ตั้งทิ้งไว้ที่อุณภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร และทำการทดลอง 3 ซ้ำ

9. คำนวณหา % inhibition

10. พล็อตกราฟหาค่า IC_{50} เปรียบเทียบกับ BHA, BHT และสารสกัดจากกิ่งมะขวิด

การคำนวณหา % inhibition

$$\% \text{ inhibition} = \frac{\text{control} - \text{sample}}{\text{control}} \times 100$$

ในการรายงานค่าจะรายงานค่าเป็น IC_{50} ซึ่งได้จากการสร้างกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง % inhibition กับความเข้มข้นซึ่งความเข้มข้นที่ 50% inhibition จะมีค่าเป็น IC_{50}

2.4 การแยกองค์ประกอบทางเคมี

2.4.1 การแยกด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีแบบรงคเลขผิวบาง

โดยเตรียมสารละลายของสารตัวอย่างจากตัวทำละลายที่เหมาะสมที่สามารถละลายสารตัวอย่างได้ดีที่สุด ใช้หลอด Capillary แต้มสารลงบนแผ่น TLC อะลูมิเนียม แล้ววางในแก้วที่มีตัวทำละลายอิ่มตัวอยู่ ปล่อยให้ตัวทำละลายซึมขึ้นไปจนสุดพื้นผิวหน้าตัวดูดซับ นำแผ่น TLC อะลูมิเนียม ไปตรวจสอบหาตำแหน่งสารโดยส่องด้วยเครื่องส่องรังสีเหนือม่วง เปลี่ยนระบบตัวทำละลายอินทรีย์จนกระทั่งได้ระบบตัวทำละลายที่ให้ผลการแยกดีที่สุด

2.4.2 การแยกด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟี

2.4.2.1 การเตรียมคอลัมน์

ใช้ซิลิกาเจลสำหรับบรรจุลงในคอลัมน์ชั่งมา 30 เท่าของสารสกัด ผสมซิลิกาเจลกับตัวทำละลายเฮกเซน แล้วทำให้มีลักษณะไม่ข้นไม่เหลวจนเกินไปและไม่มีฟองอากาศเทผ่านคอลัมน์ที่มีสำลีและทรายละเอียดที่สะอาดปิดอยู่ด้านล่างคอลัมน์ ในระหว่างที่บรรจุซิลิกาควรใช้ลูกยางเคาะข้างๆ คอลัมน์เพื่อให้บรรจุแน่นและเรียบสม่ำเสมอ

2.4.2.2 การเตรียมสารเพื่อบรรจุในคอลัมน์

นำสารสกัดกิ่งมะขวิดใส่ลงในบีกเกอร์ใส่ตัวทำละลายเอทานอลลงไป และคนให้สารละลายเข้ากัน นำไประเหยด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุนจนเอทานอลระเหยออกหมดจึงนำสารสกัดกิ่งมะขวิดที่ได้ไปใส่ลงในคอลัมน์โครมาโทกราฟี

2.4.2.3 การบรรจุสารลงคอลัมน์

1. นำคอลัมน์ที่เตรียมเพื่อบรรจุมาตรวจดูว่าคอลัมน์แน่นสม่ำเสมอดีแล้วทำการโรยปิดสเลอรีด้วยทราย นำสารที่เตรียมไว้เพื่อบรรจุคอลัมน์ ค่อยๆ โรยอย่างช้าๆ ให้สารลงไปนอนก้นอย่างสม่ำเสมอ แล้วค่อยๆ เทใหม่ทำเช่นนี้จนสารหมด

2. ค่อยๆ ชะสารด้วยตัวทำละลายผสมระหว่างไดคลอโรมีเทน : เมทานอล โดยเก็บสารที่แยกได้ครั้งละ 70 มิลลิลิตร

3. ทำการเก็บสารที่แยกได้ จนกระทั่งสารตัวอย่างออกจากคอลัมน์หมด โดยสังเกตสีของสารละลายที่ออกมาเป็นสีเดียวกับตัวทำละลาย

4. นำสารแต่ละขวดที่แยกไประเหยให้แห้งด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศ แล้วเก็บสารที่ได้ไว้ในขวดเขียนหมายเลขเรียงตามลำดับ

5. ทำการรวมสารที่แยกได้ ด้วยวิธีการแยกสารสกัดโดยวิธี TLC ซึ่งใช้ตัวทำละลายจากอัตราส่วนที่เหมาะสมที่หาได้ข้างต้น ใส่ลงในแก้ว ใช้หลอดแคพพิลลารีจุ่มลงในขวด จุดสารลงบนแผ่น TLC แผ่นละ 3 จุด ใส่ลงในแก้ว สังเกตดูว่าตัวทำละลายนั้นสูงถึงขีดบน นำแผ่น TLC ออกมาวางให้แห้ง นำไปส่องดูด้วยเครื่องส่องรังสีเหนือม่วง สังเกตระยะห่างของสารแต่ละสารของแต่ละขวดที่สารเคลื่อนที่ ขวดใดเคลื่อนที่เท่ากันหรือใกล้เคียงกันให้นำมารวมเป็นขวดเดียวกัน

6. นำสารที่รวมส่วนที่เหมือนกันเข้าด้วยกัน ได้สารทั้งหมด 4 กลุ่ม แล้วนำไปหาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระอีกครั้ง

2.5 ศึกษาประสิทธิภาพการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของสารที่แยกได้

2.5.1 การวัดสมบัติในการยับยั้ง DPPH radical ทำการทดลองกลุ่มสารที่แยกได้

1. ชั่งสารจากกลุ่ม F2 0.01 กรัม ใส่ในขวดวัดปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วย Absolute ethanol จะได้สารละลายของสารสกัดที่มีความเข้มข้น 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ปิเปตสารละลายของสารสกัดกิ่งมะขวิดที่มีความเข้มข้น 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ปริมาตร 5, 10, 15, 20 และ 25 มิลลิลิตร ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 25 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วย Absolute ethanol จะได้สารละลายของสารสกัดกิ่งมะขวิดที่มีความเข้มข้น 20, 40, 60, 80, 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

2. ปิเปตสารละลายของสารกลุ่ม F2 ที่มีความเข้มข้นต่างๆ ความเข้มข้นละ 500 ไมโครกรัม ลงไปในหลอดทดลอง เติม 0.1 มิลลิโมลาร์ DPPH ปริมาตร 500 ไมโครกรัม ลงไปในหลอดทดลอง ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง Vortex mixer ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร และทำการทดลองจำนวน 3 ซ้ำ

3. ทำการทดลองตามวิธีข้อ 1. และ 2. โดยเปลี่ยนเป็นสารกลุ่ม F3 และ F4 และพล็อตกราฟหาค่า IC_{50} เปรียบเทียบกับ BHT, BHA และสารที่แยกได้

2.6 การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของสารด้วยเทคนิค GC/MS

นำสารกลุ่มที่แยกได้และมีประสิทธิภาพการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระดีที่สุดจากข้อ 2.5.1 ไปวิเคราะห์เพื่อหาองค์ประกอบทางเคมีของสารด้วยเทคนิค GC/MS

2.7 การทำผลิตภัณฑ์โลชั่น

นำสารกลุ่มที่แยกได้และมีประสิทธิภาพการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระดีที่สุดจากข้อ 2.5.1 มาทำผลิตภัณฑ์โลชั่น ทดสอบสมบัติทางกายภาพบางประการ เช่น สี กลิ่น การแยกชั้นของเนื้อโลชั่น การทดสอบทางเคมีบางประการโดยวัดความเป็นกรด-ด่าง เป็นต้น

2.7.1 ขั้นตอนการทำผลิตภัณฑ์โลชั่น

นำสารสกัดกิ่งมะขวิดที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ดีที่สุดไปผสมกับสาร base ของโลชั่น และกวนด้วยเครื่อง Homogenizer กวนจนเนื้อสารมีลักษณะเป็นโลชั่น

3. ผลการทดลองและวิจารณ์ผล

3.1 ผลการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดหยาบกิ่งมะขวิด

ตารางที่ 1 แสดงปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดหยาบกิ่งมะขวิด

สารสกัดกิ่งมะขวิด	จำนวนครั้งที่ใช้วัด			ค่าเฉลี่ย
	1	2	3	
ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 748 นาโนเมตร	0.5885	0.5881	0.5878	0.5881
ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)	41.98	42.04	42.11	42.08

จากตารางที่ 1 พบว่าปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดหยาบกิ่งมะขวิดเทียบกับกราฟมาตรฐานกรดแกลลิก เท่ากับ 42.08 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

3.2. ผลการวิเคราะห์ปริมาณแทนนินทั้งหมดของสารสกัดหยาบกิ่งมะขวิด

ตารางที่ 2 แสดงปริมาณสารแทนนินทั้งหมดของสารสกัดหยาบกิ่งมะขวิด

สารสกัดกิ่งมะขวิด	จำนวนครั้งที่ใช้วัด			ค่าเฉลี่ย
	1	2	3	
ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร	0.5428	0.5424	0.5419	0.5423
ปริมาณแทนนินทั้งหมด (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)	54.31	54.27	54.24	52.22

จากตารางที่ 2 พบว่าปริมาณแทนนินทั้งหมดของสารสกัดหยาบกิ่งมะขวิดเทียบกับกราฟมาตรฐานกรดแทนนิก เท่ากับ 52.22 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

3.3 ผลการศึกษาสมบัติการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบกิ่งมะขวิด

โดยวิธี DPPH radical ที่ความเข้มข้น 20 – 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร พบว่า % inhibition ของสารสกัดหยาบกิ่งมะขวิด เท่ากับ 55.98-80.45% มีค่า IC_{50} เท่ากับ 12.55 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

3.4 ผลการแยกองค์ประกอบทางเคมีจากสารสกัดหยาบกิ่งมะขวิดด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟแบบคอลัมน์

จากการแยกองค์ประกอบทางเคมีจากสารสกัดหยาบกิ่งมะขวิดด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ พบว่าแยกได้สารทั้งหมด 147 แฟรกชัน เมื่อนำสารมารวมโดยวิธีโครมาโทรกราฟีแบบรงคเลขผิวบาง ได้ผลดังตารางที่ 3

ตารางที่ 3 ผลการรวมกลุ่มสารสกัดหยาบกิ่งมะขวิดที่แยกด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์

กลุ่มสาร	น้ำหนักสาร (กรัม)	ลักษณะสาร
F1	-	ไม่มีสาร
F2	4.52	สีน้ำตาลแดง
F3	6.63	สีน้ำตาลแดง
F4	1.43	สีน้ำตาลแดง

จากตารางที่ 3 พบว่า เมื่อรวมกลุ่มสารด้วยวิธีโครมาโทกราฟีแบบรงคเลขผิวบาง ภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต 254 นาโนเมตร สามารถรวมสารที่แสดงเหมือนกัน ได้กลุ่มสารทั้งหมด 4 กลุ่ม แต่กลุ่ม F1 ไม่มีสาร F2, F3 และ F4 เนื้อสารมีลักษณะเป็นสารข้นหนืดสีน้ำตาลแดง

3.5 ผลการทดสอบประสิทธิภาพฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของกลุ่มสารที่แยกได้

การวัดสมบัติในการยับยั้ง DPPH radical ของสารกลุ่ม F2-F4 ได้ผลดังตารางที่ 4

ตารางที่ 4 ค่า IC_{50} ของ BHT BHA สารสกัดหยาบกิ่งมะขวิด และสารกลุ่ม F2-F4

สารตัวอย่าง	IC_{50} (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)
BHT	8.96
BHA	9.61
สารสกัดหยาบกิ่งมะขวิด	12.55
F2	9.53
F3	12.18
F4	14.29

จากตารางที่ 4 พบว่าค่า IC_{50} ของ BHT , BHA สารสกัดหยาบกิ่งมะขวิด และสารกลุ่ม F2-F4 เท่ากับ 8.96, 9.61, 12.55, 9.53, 12.18, 14.29 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ ค่า IC_{50} ของสารกลุ่ม F2 มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้ดีที่สุด

3.6 ผลการพัฒนาผลิตภัณฑ์โลชั่น

พบว่าสมบัติทางกายภาพและเคมีบางประการของผลิตภัณฑ์โลชั่นที่มีส่วนผสมของสารสกัดหยาบกิ่งมะขวิด มีสีขาว ไม่มีกลิ่น ไม่พบการแยกชั้นของเนื้อโลชั่น และมีค่าความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 8

4. สรุป

สารสกัดหยาบกิ่งมะขวิด มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยยับยั้ง DPPH radical ได้ เนื่องจากผลการวิเคราะห์หาปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดในสารสกัดกิ่งมะขวิด พบว่ามีปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด เท่ากับ 42.08 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และแทนนินทั้งหมด เท่ากับ 52.22 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ซึ่งจากการศึกษาวิจัยพบว่าสารประกอบฟีนอลิกมีฤทธิ์ต้านอนุมูล

อิสระได้ สอดคล้องกับงานวิจัยของ กัลยาณี วัฒนธีรางกูร (2551) ได้ศึกษาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกและความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระจากกากเมล็ดสบู่ดำ พบว่า สารสกัดมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้ โดยมีเปอร์เซ็นต์การต้านอนุมูลอิสระอยู่ในช่วง 78-92 และขวัญเรือน สินสายออ (2555) ได้ศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบจากผลหมาก โดยวิเคราะห์หาปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดและแทนนินทั้งหมด ทดสอบประสิทธิภาพการต้านอนุมูลอิสระจากสารสกัดหยาบจากผลหมาก พบว่า สารสกัดหยาบจากผลหมากมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้ โดยมี % inhibition ของสารสกัดเท่ากับ 55.98–90.45%

5. กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณสถาบันส่งเสริมการสอนวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี (สสวท.) ที่ให้ทุนสนับสนุนการทำวิจัยในครั้งนี้ และขอขอบคุณศูนย์วิทยาศาสตร์ อาจารย์สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ศึกษา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏวไลยอลงกรณ์ ในพระบรมราชูปถัมภ์ ตลอดจนเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการที่ได้ให้คำแนะนำในการใช้เครื่องมือวิเคราะห์ และให้ความช่วยเหลือในการใช้ห้องปฏิบัติการ ทำให้งานวิจัยสำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

6. เอกสารอ้างอิง

กัลยาณี วัฒนธีรางกูร. 2551. **ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกและความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระจากกากเมล็ดสบู่ดำ.** ปริญญาวิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาวิชาเคมีสำหรับครู มหาวิทยาลัยขอนแก่น

คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ. 2552. **เครื่องสำอางเพื่อความงามและสุขภาพ.** กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์กรุงเทพเวชสาร.

จิตติมา ทิสุวรรณ และภาวิณี อันดารา. 2549. **การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดหยาบเมทานอลจากสบู่เลือด.** ปริญญาวิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาวิชาเคมี มหาวิทยาลัยราชภัฏวไลยอลงกรณ์ ในพระบรมราชูปถัมภ์.

จิรัชดาภา ปลื้มลมัย และศุภมาส สาทนิยม. 2550. **โลชั่นสมุนไพรเพื่อผิวขาว.** ปริญญาเภสัชศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาเภสัชวินิจฉัย มหาวิทยาลัยมหิดล.

เนตรนภา เพ็ญศรี และพราวมาศ แก้วประการ. 2550. **การพัฒนาโลชั่นกันแดดจากสารสกัดแอลกอฮอล์กระแจะ.** ปริญญาเภสัชศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาเภสัชวินิจฉัย มหาวิทยาลัยมหิดล.

ประภัสรา ศิริขันธ์แสง. 2551. **คุณสมบัติและฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของไวน์กระชายดำ.** วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

ภารดี เทียมดวงตะวัน และมรกต ภาณุพงศ์สวัสดิ์. 2553. **การพัฒนาโลชั่นกันแดดจากสารสกัดใบรางจืด.** ปริญญาเภสัชศาสตรบัณฑิต มหาวิทยาลัยมหิดล.

รัตนา อินทรานุปกรณ์. 2550. **การตรวจสอบและการสกัดแยกสารสำคัญจากสมุนไพร.** กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

สมหมาย ปัตตาลี. 2551. **การศึกษาคุณภาพของน้ำหมักชีวรูปที่ผลิตจากผลมะหลอด.** ปริญญาการศึกษาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิทยาศาสตร์ศึกษา มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒประสานมิตร.

สมโภช ฤกษ์สมโภชน์. 2550. **การศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดจากผลมะคำดีควาย เมล็ด น้อยหน่า และเมล็ดจามจุรีที่มีฤทธิ์ในการกำจัดหมัดสุนัข.** วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิตสาขาวิชาวิทยาศาสตร์ศึกษา มหาวิทยาลัยราชภัฏวไลยอลงกรณ์ ในพระบรมราชูปถัมภ์.

สุพิศรา เตชะเปรมปรีชา. มปป.. **นานาสาระงานเคมี ทำเนียบธุรกิจและผลิตภัณฑ์เคมี.** สถาบันวิจัยเคมี สถาบันเทคโนโลยีราชมงคล. นนทบุรี: บริษัทกระแสธุรกิจ จำกัด. 72–74.

สำนักงานข้อมูลสมุนไพร คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล. 2542. **สมุนไพรไม้พื้นบ้าน.**กรุงเทพฯ.

ออนจิลา บัวประเสริฐ. 2549. **การศึกษาโครงสร้างของสารประกอบบางชนิดในสารสกัดกระเทียมที่มีสมบัติต้านอนุมูลอิสระ.** วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ศึกษา มหาวิทยาลัยราชภัฏวไลยอลงกรณ์ ในพระบรมราชูปถัมภ์.

Adom, K.K and Liu, H.R. 2002. **Antioxidant activity of grains.** Journal of Agricultural and Food Chemistry. 50:6182-6187

Beyer, R.E. 1992. **An Analysis of Role of Coenzyme Q in Free Radical Generation and As Antioxidant**. Biochemistry and Cell Biology. 70: 390 – 403.

Hou. W.C., Lin, R.D., Cheng, K.T., Hung, Y.T., Cho, C.H., Chen, C.H., Hwang, S.Y., Lee, M.H. 2003. Freeradical – scavenging activity of Taiwanese native plant. Phytomedicine. 10: Iss. 2/3 ; 170.

Lee, J.C., et al. 2002. Antioxidant property of ethanol extract of the stem opuntia ficus-indicar var. saboten. Journai of Agricultural and Food Chemistry. 50:6490-6496

Noguchi, Noriko; Niki, Etsuo. 1998. Chemistry of active oxygen species and antioxidant. In Antioxidant status, diet, nutrition, and health. Papas, Andreas M. pp. 9-13. London: CRC press.

Strain, J.J and Benzie, I.F.F. 1999. Antioxdants. In Encyclopedia of Human Nutrition. Michele,J.Sadler; Strain,J.J.; & BenJamin Caballero. Pp.95-105. San Diego:Academic press.

Wang. et.al. 1997. Oxygen radical absorbing capacity of anthrocyanins. J.Agric. Food Chem. 45.304-309.