

Received: December 11, 2019; Revised: February 18, 2020; Accepted: April 20, 2020

องค์ประกอบทางพฤกษเคมี และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดครามใหญ่
ที่สกัดด้วยแอลกอฮอล์ และน้ำ

Phytochemical contents and antioxidant activities of ethanolic and aqueous
extracts from *Indigofera suffruticosa* Mill.

พัทธวราภรณ์ อุดรสรรพ¹ พรรณนิภา แจ็กแดงพะเนา¹ ดาริณา ใจเสรี¹ สิริภพ เรืองศรี¹

พานิชา พงศ์นราทร¹ รัชฎาวรรณ อรรคานิมาตย์¹ และปราณี ศรีราช^{1*}

Patwarapohn Udonsan¹, Phannipha Chekdaengphanao¹, Dareena Jaiseree¹,

Siriphop Reungsri¹, Panicha Pongnarathorn¹, Ratchadawan Aukkanimart¹ and

Pranee Sriraj^{1*}

¹คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลอีสาน วิทยาเขตสกลนคร จังหวัดสกลนคร

*Corresponding Author E-mail Address : srirajp11@gmail.com

บทคัดย่อ

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาองค์ประกอบทางพฤกษเคมี และฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระของครามใหญ่ (*Indigofera suffruticosa* Mill.) ที่สกัดด้วย 95%, 50% แอลกอฮอล์ และน้ำคราม โดยศึกษาองค์ประกอบทางพฤกษเคมี ในใบคราม ได้ทำการตรวจวัดปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม ปริมาณฟลาโวนอยด์รวม และปริมาณคลอโรฟิลล์ สำหรับฤทธิ์ ในการต้านอนุมูลอิสระทำการศึกษาด้วยวิธี DPPH assay, ABTS assay และ FRAP assay จากการศึกษาครั้งนี้พบว่า สารสกัดใบครามที่สกัดด้วย 95% แอลกอฮอล์ มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม และปริมาณคลอโรฟิลล์มากที่สุด (30.37 ± 0.09 $\mu\text{g GAE/g DW}$ และ 0.14 ± 0.00 mg/g ตามลำดับ) เมื่อเทียบกับสารสกัดใบครามที่สกัดด้วย 50% แอลกอฮอล์ และ น้ำคราม สำหรับการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH assay, ABTS assay และ FRAP assay พบว่า สารสกัดใบ ครามที่สกัดด้วย 95% แอลกอฮอล์ มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระได้ดีกว่าสารสกัดใบครามที่สกัดด้วย 50% แอลกอฮอล์ และ น้ำคราม โดยวิธี DPPH assay และ ABTS assay มีค่า IC_{50} เท่ากับ 26.14 ± 0.29 $\mu\text{g/mL}$ และ 19.88 ± 0.93 $\mu\text{g/mL}$ ตามลำดับ และวิธี FRAP assay มีค่าการต้านอนุมูลอิสระ เท่ากับ 239.73 ± 0.17 $\text{mg FeSO}_4 \text{ equivalent/g extract}$ จากการศึกษา ความสัมพันธ์ขององค์ประกอบทางพฤกษเคมีในใบคราม และวิธีทดสอบฤทธิ์ การต้านอนุมูลอิสระ พบว่า การตรวจวัดปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมมีความสัมพันธ์กับฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระมากที่สุด

คำสำคัญ: องค์ประกอบทางพฤกษเคมี ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ สารสกัดคราม น้ำคราม

Abstract

The objective of this study was evaluated the phytochemical contents and the antioxidant activity of *Indigofera suffruticosa* Mill. extracted with 95%, 50% ethanol and aqueous. The chemical contents of the indigo leaves studying by measuring the amount of total phenolic content, total flavonoid content and chlorophyll content. For antioxidant activity, DPPH assay, ABTS assay and FRAP assay were studied. From this study found that indigo leaves extracts with 95% ethanol showed the highest amount of total phenolic contents and chlorophyll (30.37 ± 0.09 $\mu\text{g GAE/g DW}$ and 0.14 ± 0.00 mg/g , respectively), when compared with 50% ethanol and aqueous. For the study of antioxidant activity by DPPH assay, ABTS assay and FRAP assay, it was found that indigo leaves extracts with 95% ethanol had better antioxidant activity than indigo leaves extracts with 50% ethanol and aqueous, by DPPH assay and ABTS assay, the IC_{50} value were 26.14 ± 0.29 $\mu\text{g/mL}$ and 19.88 ± 0.93 $\mu\text{g/mL}$, respectively and the FRAP assay had an antioxidant value of 239.73 ± 0.17 mg FeSO_4 equivalent/g extract. The relationship of between phytochemical contents and antioxidant activities, it was found that the phenolic contents had the most relationship with the antioxidant activity.

Keywords: Phytochemical content, Antioxidant activity, ethanolic extracts of indigo, indigo aqueous

บทนำ

ครามเป็นพืชสกุล *Indigofera* โดยส่วนใหญ่ครามมักจะเกิดในเขตร้อนแถบแอฟริกา ตอนใต้ของทวีปเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ปัจจุบันพบอยู่ในประเทศแถบเขตร้อน (Chouisudsakunchai et al., 2010) และครามยังเป็นพืชที่พบมากในจังหวัดสกลนคร ครามที่นิยมนำมาใช้ 2 ชนิด คือ ครามเล็ก มีชื่อสามัญว่า common indigo มีชื่อพฤกษศาสตร์ว่า *Indigofera tinctoria* L. และครามใหญ่ มีชื่อสามัญว่า อะนิล (Anil) มีชื่อพฤกษศาสตร์ว่า *Indigofera suffruticosa* Mill. โดยมีสรรพคุณ คือ สรรพคุณตามตำราไทย ใบ เป็นยาขับพิษ แก้ไข้ตัวร้อน และแก้ปวดศีรษะ น้ำคั้นจากใบสดของครามช่วยบำรุงเส้นผม ป้องกันผมหงอก สารสกัดครามทั้งต้น (ยกเว้นใบ) เป็นส่วนผสมในสีที่ใช้ย้อมผม ครามเป็นสมุนไพรที่มีสารสำคัญจำนวนมาก ได้แก่ รุทีน (Rutin) ซึ่งเป็นสารที่อยู่ในกลุ่ม Flavonoid มีฤทธิ์ในการยับยั้งอาการภูมิแพ้ เพิ่มความแข็งแรงของเส้นเลือดฝอย นอกจากนี้ยังมีฤทธิ์ในการกำจัดแมลง (Moshki et al., 2017) อีพิคาเทชิน (Epicatechin) ที่ช่วยขับสารพิษในร่างกายและลดความเสี่ยงจากการเกิดโรคมะเร็ง กรดแกลลิก (Gallic acid) ที่ช่วยต้านอนุมูลอิสระยับยั้งแบคทีเรียในช่องปาก (Moshki et al., 2017) และนอกจากนี้ยังพบสารในกลุ่ม Quercetin เป็นจำนวนมาก (Chen et al., 2013) สารสกัดจากเมล็ดของครามมีสารสำคัญที่มีความเป็นพิษสูง ได้แก่ สารโพลีฟีน (Coumarin และกรด Chlorogenic) และ Flavonoids (Quercetin, Rutin และ Gallic acid) อัลคาลอย เทอพีนอยด์ และคาร์โบไฮเดรต (Moshki et al., 2017) นอกจากสารประกอบดังกล่าวยังพบสารอินดิโกและอินโดรูบิน (Calvo, 2007) สารสกัดใบคราม *Indigofera suffruticosa* Mill. ที่สกัดด้วยน้ำและเอทานอล พบ Syringic acid, p-coumaric acid, Vanillin, Syringaldehyde, Salicylic acid, Quercetin, Isoliquiritigenin และ Formononetin (Chen et al., 2013) การศึกษาทางเภสัชวิทยา สารสกัดครามมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (Singh et al., 2015) ยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย (Vijayan et al., 2018) กำจัดหนองพยาธิ Antioxidant (Singh et al., 2015) ป้องกันการเกิดมะเร็งผิวหนัง (Vijayan et al., 2018) Hepatoprotective (Singh et al., 2015) ครามเป็นพืชที่นิยมนำมาทำให้เกิดสี สีครามนั้นได้จากการสกัดส่วนของลำต้น และใบของต้นคราม แต่ส่วนของใบครามจะให้สีที่ดีที่สุด โดยผ่าน

กระบวนการแช่น้ำและหมัก เพื่อต้องการเปลี่ยนสารไกลโคไซด์อินดิแคน (Glycoside indican) ธรรมชาติที่พบอยู่ในพืชออกมาอยู่ในรูปของสีน้ำเงินโทนฟ้า เรียกว่า อิดิโกติน (Idigotin) ซึ่งเกิดจากน้ำหมักผสมกับน้ำปูนที่มีคุณสมบัติเป็นด่าง เมื่อผ่านกระบวนการดังกล่าวแล้วจะได้ออกมาในรูปแบบของเนื้อคราม มักนำมาใช้ประโยชน์ในการย้อมผ้า อย่างไรก็ตามในปัจจุบันยังไม่พบการศึกษาเกี่ยวกับปริมาณสารสำคัญ และฤทธิ์ทางชีวภาพในน้ำคราม

โดยครามที่นำมาศึกษาในครั้งนี้ คือ ครามใหญ่ มีชื่อวิทยาศาสตร์ คือ *Indigofera suffruticosa* Mill. (Ubon Ratchathani University, 2010) จากคุณสมบัติของคราม ในการศึกษาครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาองค์ประกอบทางพฤกษเคมีและฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระของครามใหญ่ (*Indigofera suffruticosa* Mill.) โดยศึกษาในส่วนของน้ำครามและสารสกัดครามที่ได้จากใบครามใหญ่

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ

ขั้นตอนและวิธีการทดลอง

1. การเตรียมตัวอย่างสมุนไพร นำใบครามที่ได้จากต้นครามที่เก็บจากคณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลอีสาน วิทยาเขตสกลนคร ตำบลแร่ อำเภอพังโคน จังหวัดสกลนคร มาล้างให้สะอาดและผึ่งให้แห้ง
2. การเตรียมสารสกัดใบครามที่สกัดด้วยแอลกอฮอล์ 95% และ 50% โดยทำการชั่งน้ำหนักคราม 1 กิโลกรัม นำใบครามมาสกัดด้วยแอลกอฮอล์ 95% และ 50% โดยนำใบครามปั่นรวมกับแอลกอฮอล์ 95% และ 50% จากนั้นเทใส่ถึงทึบแสง ปิดฝาให้มิดชิด ทำการหมักทิ้งไว้ 3 วัน โดยเขย่าสารให้เข้ากันทุกวัน เมื่อครบ 3 วันแล้วนำมารองด้วยผ้าขาวบางและกระดาษกรองสารเคมีขนาด 125 มิลลิเมตร นำมาทำการระเหยตัวทำละลายด้วยเครื่อง Rotary evaporator ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส
3. การเตรียมวัตถุดิบในการเตรียมน้ำหมักคราม โดยทำชั่งน้ำหนักคราม 1 กิโลกรัม แล้วนำมาปั่นผสมกับน้ำกลั่น จากนั้นทำการชั่งมะขามเปียก 1 กิโลกรัม นำมาคั้นกับน้ำกลั่น 1 ลิตร ชั่งด่าง (ปูนขาว) 500 กรัม นำมาละลายด้วยน้ำกลั่น 1 ลิตร และนำส่วนผสมทั้งหมด มาผสมลงในถัง เติมน้ำกลั่นให้ครบ 10 ลิตร หมักทิ้งไว้ทั้งหมด 7 วัน โดยเขย่าสารให้เข้ากันทุกวัน เมื่อครบ 7 วันแล้วนำมารองด้วยผ้าขาวบางและกระดาษกรองสารเคมี จากนั้นเก็บไว้ในถังทึบแสงปิดฝาให้มิดชิด
4. การตรวจวัดปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (Total phenolic content) โดยวิธี Foloin-Ciocalteu assay ดัดแปลงจากวิธีของ Nobosse et al. (2017) โดยใช้ gallic acid เป็นสารมาตรฐาน ทำการเตรียม Foloin-Ciocalteu reagent เตรียม 20% Sodium carbonate และสารสกัดที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นนำ Foloin-Ciocalteu reagent ปริมาณ 100 ไมโครลิตร, 20% Sodium carbonate ปริมาณ 80 ไมโครลิตร และสารสกัดปริมาณ 20 ไมโครลิตร ลงใน 96-Well plate จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 760 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Microplate Reader ทำการทดลอง 3 ซ้ำ และนำมาคำนวณปริมาณ Total phenolic component จากกราฟมาตรฐานของ gallic acid รายงานค่าในหน่วยของ $\mu\text{g GAE/g DW}$ (Nobosse et al., 2017)
5. การตรวจวัดปริมาณฟลาโวนอยด์รวม (Total flavonoid content) ดัดแปลงจากวิธีของ Nobosse et al. (2017) โดยเตรียมสารสกัดที่ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาณ 5 ไมโครลิตร ผสมด้วยน้ำกลั่นปริมาณ 130 ไมโครลิตร และ 5% Sodium nitrite (NaNO_2) ปริมาณ 7.5 ไมโครลิตร บ่มทิ้งไว้ในอุณหภูมิห้อง 5 นาที จากนั้นทำการเติม 10% Aluminium chloride (AlCl_3) ปริมาณ 7.5 ไมโครลิตร บ่มทิ้งไว้ในอุณหภูมิห้อง 5 นาที เติมน้ำ Sodium hydroxide (NaOH) ที่ความเข้มข้น 1 โมลาร์ ปริมาณ 50 ไมโครลิตร แล้วนำไปวัดค่าที่ความยาวคลื่น 510 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Microplate Reader ทำการทดลอง 3 ซ้ำ รายงานค่าในหน่วย g/100 g DM (Nobosse et al., 2017)

6. การตรวจวัดปริมาณคลอโรฟิลล์ (Chlorophyll content) ดัดแปลงจากวิธีของ Kaushal et al. (2013) โดยนำสารสกัดใบครามที่สกัดด้วยแอลกอฮอล์ 95%, แอลกอฮอล์ 50% และน้ำคราม แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 645 นาโนเมตร และ 663 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Microplate Reader ทำการทดลอง 3 ซ้ำ และคำนวณหาปริมาณคลอโรฟิลล์ ดังสมการที่ 1 (Kaushal et al., 2013)

$$\text{Chlorophyll (mg/kg)} = [(20.2 \times \text{Abs}_{645}) + (8.02 \times \text{Abs}_{663}) \times V / 100 \times V] \quad (1)$$

โดย Abs₆₄₅ และ Abs₆₆₃ มีค่าการดูดกลืนแสงที่ 645 และ 663 ตามลำดับ

V คือ ปริมาตรรวมของสารสกัดต่อหน่วยมิลลิลิตร

7. การหาฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระของครามและคุณสมบัติเบื้องต้นเทียบกับสารมาตรฐาน โดยใช้เทคนิค DPPH radical scavenging assay, ABTS radical scavenging assay และ Ferric reducing antioxidant power (FRAP)

(1) การหาฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH radical scavenging assay (DPPH assay) ดัดแปลงจากวิธีของ Phansawan (2013) โดยใช้ Trolox ที่เป็นสารมาตรฐาน และใช้เมทานอลเป็นตัวทำละลาย จากนั้นเตรียมตัวอย่างสารสกัดใบครามที่สกัดด้วยแอลกอฮอล์ 95%, แอลกอฮอล์ 50% และน้ำครามที่มีความเข้มข้น 1, 10, 20, 40, 60, 80, 100, 150, 200, 400, 600, 800 และ 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยใช้เมทานอลเป็นตัวทำละลาย หยดสารละลาย DPPH ความเข้มข้น 0.1 มิลลิโมลาร์ ลงในเมทานอล ใน 96-Well plate โดยหยด DPPH เป็นลำดับสุดท้าย ตั้งทิ้งไว้ 30 นาทีในที่มืด จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Microplate Reader นำข้อมูลที่ได้ไปคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การต้านอนุมูลอิสระ (% radical scavenging) โดยรายงานผลเป็นค่า IC₅₀ (Phansawan, 2013) ดังสมการที่ 2

$$\text{Radical Scavenging (\%)} = [1 - (\text{OD}_{\text{Extract}} - \text{OD}_{\text{Blank}}) / (\text{OD}_{\text{DPPH}} + \text{OD}_{\text{Blank}})] \times 100 \quad (2)$$

เมื่อ OD_{Blank} คือ ค่าดูดกลืนแสง (OD) Blank (เมทานอล)

OD_{DPPH} คือ ค่าดูดกลืนแสง (OD) DPPH solution (positive control)

OD_{Extract} คือ ค่าการดูดกลืนแสง (OD) ของสารสกัดที่นำมาทดสอบ

สร้างกราฟหาความสัมพันธ์ระหว่างเปอร์เซ็นต์การต้านอนุมูลอิสระ (% radical scavenging) และความเข้มข้นของสารที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ และคำนวณหาความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน Trolox และสารสกัดใบครามที่สกัดด้วย แอลกอฮอล์ 95%, แอลกอฮอล์ 50% และน้ำครามที่สามารถต้านอนุมูลอิสระได้ 50% (IC₅₀) (Phansawan, 2013)

(2) การหาฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS radical scavenging assay (ABTS assay) ดัดแปลงจากวิธีของ Phansawan (2013) โดยทำการเตรียมสารละลาย ABTS ความเข้มข้น 7 มิลลิโมลาร์ แล้วเติมสารละลาย Potassium persulfate ที่ความเข้มข้น 2.45 มิลลิโมลาร์ ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องในที่มืดเป็นเวลา 12-16 ชั่วโมง หลังจากครบ 16 ชั่วโมงแล้ว ดูดสารมา 1 มิลลิลิตร ใส่ใน tube 50 มิลลิลิตร ละลายสารด้วยน้ำกลั่น 40 มิลลิลิตร นำสารที่ละลายเข้ากันดีมาหยดลงใน 96-well plate จำนวน 3 หลุม นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง Microplate Reader ให้ได้ค่า OD เท่ากับ 0.7±0.02 จากนั้นนำสารสกัดใบครามที่สกัดด้วยแอลกอฮอล์ 95%, แอลกอฮอล์ 50% และน้ำครามที่ละลายในเอทานอล

95% ที่ความเข้มข้น 1, 10, 20, 40, 60, 80, 100, 150, 200, 400, 600, 800 และ 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ 25 มิลลิโมลาร์ Trolox, blank ปริมาณ 50 ไมโครลิตร ลงใน 96-well plate เติมน้ำสารละลาย ABTS ปริมาณ 100 ไมโครลิตร จากนั้นบ่มในที่มืดที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 นาที จึงนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Microplate Reader นำข้อมูลที่ได้ไปคำนวณหาค่าเปอร์เซ็นต์การต้านอนุมูลอิสระ (% radical scavenging) (Phansawan, 2013) ดังสมการที่ 3

$$\% \text{ Radical Scavenging (\%)} = [1 - (\text{OD}_{\text{Extract}} - \text{OD}_{\text{Blank}}) / (\text{OD}_{\text{ABTS}} + \text{OD}_{\text{Blank}})] \times 100 \quad (3)$$

เมื่อ OD_{Blank} คือ ค่าดูดกลืนแสง (OD) Blank (เอทานอล)

OD_{ABTS} คือ ค่าดูดกลืนแสง (OD) ABTS solution (positive control)

$\text{OD}_{\text{Extract}}$ คือ ค่าการดูดกลืนแสง (OD) ของสารสกัดที่นำมาทดสอบ

ทำการหาความสัมพันธ์ระหว่างเปอร์เซ็นต์การต้านอนุมูลอิสระ (% Radical scavenging) และความเข้มข้นของสารที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ และคำนวณหาความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน Trolox และสารสกัดใบครามด้วยแอลกอฮอล์ 95%, แอลกอฮอล์ 50% และน้ำครามที่สามารถต้านอนุมูลอิสระได้ 50% (IC_{50}) (Phansawan, 2013)

(3) การหาฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี Ferric reducing antioxidant power (FRAP) ดัดแปลงจากวิธีของ Phansawan (2013) โดยทำการเตรียม Acetate buffer 300 มิลลิโมลาร์ (pH 3.6) ปริมาณ 500 มิลลิลิตร จากนั้นเตรียมสารละลาย TPTZ ที่ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ และสารละลาย FeCl_3 นำสารที่ได้มาผสมกันในอัตราส่วน 10:1:1 ทำการเตรียมสารละลาย $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ที่ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ จากนั้นนำสารสกัดใบครามที่สกัดด้วยแอลกอฮอล์ 95%, แอลกอฮอล์ 50% และน้ำครามที่ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อไมโครลิตร, 10 มิลลิโมลาร์ $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, blank ปริมาณ 20 ไมโครลิตร ลงใน 96-well plate เติมน้ำสารละลาย FRAP ปริมาณ 80 ไมโครลิตร ทั้งไว้ในที่มืดเป็นเวลา 4 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 593 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Microplate Reader นำข้อมูลที่ได้ไปเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน ferrous sulfate (Phansawan, 2013)

8. การวัดค่าสีของสารสกัดใบครามที่สกัดด้วยแอลกอฮอล์ 95%, แอลกอฮอล์ 50% และน้ำคราม โดยนำสารสกัดมาวัดสีด้วยเครื่อง Colormeter (Hunter Lab, ColorFlex EZ) รายงานค่าในระบบ CIE L^* a^* และ b^* โดยค่า L^* คือ ค่าสว่าง (โดยไล่ระดับตั้งแต่ 1 คือ สีดำ-100 คือ สีขาว) a^* คือ ค่าสีเขียว-สีแดง (โดยค่าที่ติดลบจะให้ค่าเป็นสีเขียวและค่าที่เป็นบวกจะให้ค่าเป็นสีแดง) และ b^* คือ ค่าสีน้ำเงิน-สีเหลือง (โดยค่าที่ติดลบจะให้ค่าเป็นสีน้ำเงินและค่าที่เป็นบวกจะให้ค่าเป็นสีเหลือง) (Ratanasiriwat, 2013)

9. การวิเคราะห์ข้อมูล สถิติที่ใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูล ได้แก่ ค่าเฉลี่ย (Mean) ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Standard deviation) และเปรียบเทียบแต่ละกลุ่มด้วยสถิติ One-way Anova และ Pearson Correlation

ผลการวิจัย

ผลการตรวจวัดปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม โดยวิธี Folin-Ciocalteu assay ของสารสกัดใบคราม จากการศึกษาพบว่าสารสกัดใบครามที่สกัดด้วยแอลกอฮอล์ 95% มีสารประกอบฟีนอลิกมากที่สุด โดยมีปริมาณเท่ากับ 30.37 ± 0.09 $\mu\text{g GAE/g DW}$ รองลงมาคือ สารสกัดใบครามที่สกัดด้วยแอลกอฮอล์ 50% มีปริมาณเท่ากับ 27.19 ± 0.07 $\mu\text{g GAE/g DW}$ และน้ำคราม มีปริมาณเท่ากับ 20.14 ± 0.13 $\mu\text{g GAE/g DW}$ ตามลำดับ มีค่าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) แสดงให้เห็นว่า สารสกัดใบครามที่สกัดด้วยแอลกอฮอล์ 95% มีสารประกอบฟีนอลิกมากกว่าสารสกัดใบครามที่สกัดด้วยแอลกอฮอล์ 50% และน้ำคราม ดังตารางที่ 1

ผลการตรวจวัดปริมาณฟลาโวนอยด์รวมของสารสกัดใบคราม จากการศึกษาพบว่าสารสกัดใบครามที่สกัดด้วยแอลกอฮอล์ 50% มีปริมาณฟลาโวนอยด์รวมมากที่สุด โดยมีปริมาณเท่ากับ 831.66 ± 3.02 g/100 g DM รองลงมาคือ น้ำคราม มีปริมาณเท่ากับ 784.46 ± 1.79 g/100 g DM และสารสกัดใบครามที่สกัดด้วยแอลกอฮอล์ 95% มีปริมาณเท่ากับ 169.40 ± 3.66 g/100 g DM ตามลำดับ มีค่าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) แสดงให้เห็นว่าสารสกัดใบครามที่สกัดด้วยแอลกอฮอล์ 50% มีปริมาณฟลาโวนอยด์รวมมากกว่าสารสกัดใบครามที่สกัดด้วยแอลกอฮอล์ 95% และน้ำคราม ดังตารางที่ 1

ผลการตรวจวัดปริมาณคลอโรฟิลของสารสกัดใบคราม จากการศึกษาพบว่า สารสกัดใบครามที่สกัดด้วยแอลกอฮอล์ 95% มีปริมาณคลอโรฟิลมากที่สุด โดยมีปริมาณเท่ากับ 0.14 ± 0.00 มิลลิกรัมต่อกรัม รองลงมาคือ สารสกัดใบครามที่สกัดด้วยแอลกอฮอล์ 95% มีปริมาณเท่ากับ 0.12 ± 0.00 มิลลิกรัมต่อกรัม และน้ำครามมีปริมาณเท่ากับ 0.12 ± 0.00 มิลลิกรัมต่อกรัม ตามลำดับ มีค่าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) แสดงให้เห็นว่า สกัดใบครามที่สกัดด้วยแอลกอฮอล์ 95% มีปริมาณคลอโรฟิลมากกว่าสารสกัดใบครามด้วย 50% แอลกอฮอล์ และน้ำคราม ดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด ปริมาณรวมของสารฟลาโวนอยด์และปริมาณคลอโรฟิล

Extraction solvent	Total phenolic content ($\mu\text{g GAE/g DW}$)	Total flavonoid content (g/100 g DM)	Chlorophyll content (mg/g)
95% Ethanol	30.37 ± 0.09^b	169.40 ± 3.66^a	0.14 ± 0.00^b
50% Ethanol	27.19 ± 0.07^a	831.66 ± 3.02^c	0.12 ± 0.00^a
Aqueous	20.14 ± 0.13^c	784.46 ± 1.79^b	0.12 ± 0.00^a

หมายเหตุ: อักษรต่างกันในกลุ่มเดียวกัน แสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ $p < 0.05$

การทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH assay จากการศึกษาพบว่า สารสกัดใบครามที่สกัดด้วยแอลกอฮอล์ 95% มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระดีที่สุด โดยมีค่าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเทียบกับสารสกัดใบครามที่สกัดด้วยแอลกอฮอล์ 50% และน้ำคราม โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 26.14 ± 0.29 , 32.89 ± 2.81 และ 401.91 ± 0.59 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ($p < 0.05$) ดังตารางที่ 2

การทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS assay จากการศึกษาพบว่า สารสกัดใบครามที่สกัดด้วย แอลกอฮอล์ 50% มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระดีที่สุด โดยมีค่าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเทียบกับสารสกัดใบครามที่สกัดด้วยแอลกอฮอล์ 95% และน้ำคราม โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 18.82 ± 2.20 , 19.88 ± 0.93 และ 58.62 ± 0.55 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ($p < 0.05$) ดังตารางที่ 2

การทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP assay จากการศึกษาพบว่า สารสกัดใบครามที่สกัดด้วยแอลกอฮอล์ 95% มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระดีที่สุด โดยมีค่าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเทียบกับสารสกัดใบครามที่สกัด

ด้วยแอลกอฮอล์ 50% และน้ำคราม โดยมีค่าการต้านอนุมูลอิสระ เท่ากับ 239.73 ± 0.17 , 172.08 ± 0.10 และ 4.95 ± 2.04 mg FeSO₄ equivalent/g extract ตามลำดับ ($p < 0.05$) และมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระที่ดีเมื่อเทียบกับกราฟมาตรฐาน ferrous sulfate ดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระของคราม

Extraction solvent	Antioxidant activities		
	DPPH assay (IC ₅₀ µg/mL)	ABTS assay (IC ₅₀ µg/mL)	FRAP assay (mg FeSO ₄ equivalent/g extract)
Trolox	12.38 ± 0.48^a	30.54 ± 0.37^b	-
95% Ethanol	26.14 ± 0.29^b	19.88 ± 0.93^a	239.73 ± 0.17^c
50% Ethanol	32.89 ± 2.81^c	18.82 ± 2.20^a	172.08 ± 0.10^b
Aqueous	401.91 ± 0.59^d	58.62 ± 0.55^c	4.95 ± 2.04^a

หมายเหตุ: อักษรต่างกันในกลุ่มเดียวกัน แสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ $p < 0.05$

จากการความสัมพันธ์ขององค์ประกอบทางพฤกษเคมีในใบคราม กับฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ จากการศึกษพบว่า การตรวจวัดปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม มีความสัมพันธ์กับการทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH assay และ ABTS assay โดยมีค่า r เท่ากับ 0.996 และ 0.912 ตามลำดับ การตรวจวัดปริมาณรวมของสารฟลาโวนอยด์รวมมีความสัมพันธ์กับการทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS assay โดยมีค่า r เท่ากับ 0.952 และการตรวจวัดปริมาณคลอโรฟิลล์มีความสัมพันธ์กับการทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH assay มากที่สุด รองลงมาคือ การทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP assay และ ABTS assay โดยมีค่า r เท่ากับ 0.348, 0.313 และ 0.031 ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่า การตรวจวัดปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดมีความสัมพันธ์กับการทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระมากที่สุด ดังตารางที่ 3

ตารางที่ 3 ความสัมพันธ์ขององค์ประกอบในครามและวิธีทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH assay ABTS assay และ FRAP assay

Variables	TPC	TFC	CHL
DPPH	0.996	-0.396	0.348
ABTS	0.912	-0.673	0.031
FRAP	-0.436	0.952	0.313

หมายเหตุ: TPC คือ การตรวจวัดปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด

TFC คือ การตรวจวัดปริมาณรวมของสารฟลาโวนอยด์รวม

CHL คือ การตรวจวัดปริมาณคลอโรฟิลล์

ผลการวัดค่าสีของสารสกัดใบครามที่สกัดด้วยแอลกอฮอล์ 95%, 50% และน้ำคราม โดยการศึกษาคุณลักษณะด้านสีของสารสกัดครั้งนี้ได้นำสารสกัดใบครามที่สกัดด้วยแอลกอฮอล์ 95%, 50% และน้ำครามมาวัดสีด้วยเครื่อง Colormeter (Hunter Lab, ColorFlex EZ) จากการศึกษพบว่า สารสกัดใบครามที่สกัดด้วยแอลกอฮอล์ 95% และ 50% มีคุณลักษณะ

ด้านสีแสดงถึงค่าสีดำหรือสีเข้ม โดยมีสีแดงและสีเหลืองปนเล็กน้อย ส่วนน้ำคร้ามมีคุณลักษณะด้านสีแสดงถึงค่าสีขาวหรือสว่าง โดยลักษณะสีเหลืองและมีสีแดงปนเล็กน้อย ดังตารางที่ 4

ตารางที่ 4 การวัดค่าสีของสารสกัดใบครามด้วย 95% แอลกอฮอล์ 50% แอลกอฮอล์ และน้ำคร้าม

Extraction solvent	L*	a*	b*
95% Ethanol	2.24 ± 0.03	0.60 ± 0.01	0.84 ± 0.02
50% Ethanol	3.17 ± 0.23	10.58 ± 0.07	0.90 ± 0.05
Aqueous	28.90 ± 0.35	2.95 ± 0.28	24.04 ± 0.63

หมายเหตุ: ค่า L* คือ ค่าสว่าง (โดยไล่ระดับตั้งแต่ 1 คือ สีดำ – 100 คือ สีขาว), a* คือ ค่าสีเขียว - สีแดง (โดยค่าที่ติดลบจะให้ค่าเป็นสีเขียว และค่าที่เป็นบวกจะให้ค่าเป็นสีแดง) และ b* คือ ค่าสีน้ำเงิน - สีเหลือง (โดยค่าที่ติดลบจะให้ค่าเป็นสีน้ำเงิน และค่าที่เป็นบวกจะให้ค่าเป็นสีเหลือง)

การอภิปรายผล

จากการศึกษาการตรวจวัดปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมโดยวิธี Foloin-Ciocalteu assay ของสารสกัดใบครามจากการศึกษาพบว่า สารสกัดใบครามที่สกัดด้วยแอลกอฮอล์ 95% มีสารประกอบฟีนอลิกรวมมากที่สุด เนื่องจากสารประกอบฟีนอลิกเป็นสารที่มีความเป็นขี้ผึ้ง จึงสามารถละลายได้ดีในตัวทำละลายที่มีสภาพขี้ผึ้งที่ใกล้เคียงกัน ซึ่งส่วนใหญ่สารประกอบฟีนอลิกจะละลายได้ดีในตัวทำละลายอินทรีย์ที่มีสภาพขี้ผึ้งสูงในตัวทำละลายจำพวกแอลกอฮอล์ได้ดี ทำให้สารประกอบฟีนอลิกสามารถละลายได้ดีในเอทานอล (ภาเกล้า และชญาณิศ, 2558)

จากการศึกษาผลการตรวจวัดปริมาณฟลาโวนอยด์รวม ของสารสกัดใบครามที่สกัดด้วยแอลกอฮอล์ 95%, 50% และน้ำคร้าม แสดงให้เห็นว่าสารสกัดใบครามที่สกัดด้วยแอลกอฮอล์ 50% มีปริมาณฟลาโวนอยด์มากที่สุด โดยการศึกษาของ Nobosse et al. (2018) พบว่า การสกัดสารด้วยเอทานอลจะทำให้มีปริมาณรวมของสารฟลาโวนอยด์สกัดได้ดีที่สุดและครามเป็นพืชที่จัดอยู่ในวงศ์ Fabaceae ซึ่งมีสารสำคัญในกลุ่มฟลาโวนอยด์ เช่น Gallic acid และ Quercetin, Catechin and Cyanidin โดยปัจจุบันพบว่าสารประกอบในกลุ่มโพลีฟีนอลิก เช่น ฟลาโวนอยด์และฟีนิลโพรพานอยด์ เป็นสารที่มีบทบาทสำคัญในการต้านอนุมูลอิสระ (Pupaka, 2015)

จากการศึกษาผลการตรวจวัดปริมาณคลอโรฟิล พบว่า สารสกัดใบครามที่สกัดด้วยแอลกอฮอล์ 95% มีปริมาณคลอโรฟิลมากที่สุด โดยมีค่าเท่ากับ 0.14 ± 0.00 มิลลิกรัมต่อกรัม ($p < 0.05$) การศึกษาของ Areekul et al. (2015) พบว่า การสกัดคลอโรฟิลด้วยเอทานอลมีประสิทธิภาพดีกว่าการสกัดด้วยน้ำเนื่องจากความสามารถในการละลายของคลอโรฟิลในตัวทำละลายที่มีขี้ผึ้งปานกลาง

จากการศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดใบครามด้วยวิธี DPPH assay, ABTS assay และ FRAP assay พบว่า สารสกัดใบครามที่สกัดด้วยแอลกอฮอล์ 95% มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระได้ดี เมื่อเทียบกับสารสกัดใบครามที่สกัดด้วยแอลกอฮอล์ 50% และน้ำคร้าม โดยจากการทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH assay และ ABTS assay พบว่า สารสกัดใบครามที่สกัดด้วย 95% แอลกอฮอล์ มีค่า IC_{50} เท่ากับ 26.14 ± 0.29 และ 19.88 ± 0.93 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม ตามลำดับ และการทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP assay มีค่าการต้านอนุมูลอิสระ เท่ากับ 239.73 ± 0.17 mg FeSO₄ equivalent/g extract ซึ่งการศึกษาก่อนหน้านี้พบว่า สารสกัดครามมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระสูง เนื่องจากมีสารประกอบหลัก เช่น Gallic acid, Quercetin, Epicatechin, Rutin เป็นต้น ซึ่งสารดังกล่าวมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและต้านการอักเสบได้ดี (Asuntha et al., 2010; Singh et al., 2015)

จากการศึกษาความสัมพันธ์ขององค์ประกอบทางพฤกษเคมีในใบครามกับวิธีทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ พบว่าการตรวจวัดปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมมีความสัมพันธ์กับการทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระมากที่สุด โดยมีความสัมพันธ์กับการทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH assay จากการศึกษาแสดงให้เห็นว่า พืชที่มีสารประกอบฟีนอลิกจะมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ดี โดยการศึกษาก่อนหน้านี้ พบว่า ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมมีความสัมพันธ์เชิงเส้นกับความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระที่ทดสอบด้วยวิธี DPPH radical scavenging activity assay (Pourmorad et al., 2006) เนื่องจากโครงสร้างของสารประกอบฟีนอลิกส่วนใหญ่มีองค์ประกอบเป็นอนุมูลอิสระของไฮดรอกซิล จึงมีบทบาทสำคัญในคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระ (Miliauskas et al., 2004)

จากการศึกษาการวัดค่าสีของสารสกัดใบครามด้วยแอลกอฮอล์ 95%, 50% และน้ำคราม พบว่า สารสกัดใบครามที่สกัดด้วยแอลกอฮอล์ 95% และ 50% แสดงถึงค่าสีค่อนข้างดำและเข้ม เนื่องจากสีปกติของครามนั้นจะมีสีออกน้ำเงินเข้ม (Ubon Ratchathani University, 2010) ส่วนน้ำครามแสดงถึงค่าสีเหลือง เนื่องจากการเตรียมสีครามเป็นการทำให้ Indigo blue เปลี่ยนเป็น Indigo white Indigo blue หรือสีครามไม่ละลายน้ำแต่เมื่อถูกรีดิวซ์ไปอยู่ในรูปลิควิดหรือ Indigo white จะละลายน้ำได้ และใช้เป็นสีย้อม จากนั้น Indigo white จะถูกออกซิไดส์กลับไปเป็น Indigo blue ดังเดิม เมื่อสัมผัสกับอากาศซึ่งละลายได้ในต่าง (Sakon Nakhon Rajabhat University, 2013)

บทสรุป

จากการศึกษาองค์ประกอบทางพฤกษเคมีและฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดใบครามที่สกัดด้วยแอลกอฮอล์ 95%, 50% และน้ำคราม พบว่า สารสกัดใบครามที่สกัดด้วยแอลกอฮอล์ 95% มีองค์ประกอบทางพฤกษเคมีมากที่สุด และมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระที่ดีที่สุด เมื่อเทียบกับสารสกัดใบครามที่สกัดด้วยแอลกอฮอล์ 50% และน้ำคราม เนื่องจากการสกัดครามที่สกัดด้วย 95 % แอลกอฮอล์นั้นสามารถดึงสารสำคัญของครามออกมาได้ดีกว่าการสกัดครามที่สกัดด้วยแอลกอฮอล์ 50% และน้ำ แต่การสกัดครามด้วยน้ำจะมีประโยชน์ด้านการให้สีได้ดีการสกัดครามด้วยแอลกอฮอล์ 95% และ 50% อย่างไรก็ตาม สารสำคัญในครามมีอยู่หลากหลายชนิดและเพื่อเป็นประโยชน์ต่อทางการแพทย์จึงควรมีการศึกษาเพิ่มเติมต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ปราณี ศรีราช ผู้ช่วยศาสตราจารย์ภานิชา พงศ์นราทร และอาจารย์รัชฎาวรรณ อรรถนิมาตย์ อาจารย์ประจำสาขาวิชาแพทย์แผนไทย คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลอีสาน วิทยาเขตสกลนคร และสาขาวิชาแพทย์แผนไทย คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลอีสาน วิทยาเขตสกลนคร ที่ให้การสนับสนุน และให้คำปรึกษาในการดำเนินงานให้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

ภาเกล้า ภูมิใหญ่ และชญาณิสสา สุพา. (2558). ตัวทำละลายที่มีผลต่อฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดจากพืชสมุนไพร. ใน การประชุมวิชาการระดับชาติ สถาบันวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยราชภัฏกำแพงเพชร ครั้งที่ 2, 22 ธันวาคม 2558. มหาวิทยาลัยราชภัฏกำแพงเพชร. กำแพงเพชร. 627-635.

- Moshki M., Zamani-Alavijeh F. and Mojadam M. (2017). Efficacy of peer education for adopting preventive behaviors against head lice infestation in female elementary school students: A Randomised Controlled Trial. PLOS One. 12(9): 1-12.
- Areekul V., Saeku T., Cheuwongngam P. and Laorojpinoy T. (2015). Phenolic content, chlorophyll and antioxidant activities of black rice grass. In Proceedings of 53rd Kasetsart University Annual Conference, 3-6 Feb. 2015. Kasetsart University. Bangkok. 1145-1151.
- Asuntha G., Prasannaraju Y. and Prasad K.V.S.R.G. (2010). Effect of ethanol extract of *Indigofera tinctoria* Linn (Fabaceae) on lithium/pilocarpine-induced status epilepticus and oxidative stress in wistar rats. Tropical Journal of Pharmaceutical Research. 9(2): 149-15.
- Bakasso S., Lamien-Meda A., Lamien C.E., Kiendrebeogo M., Millogo J., Ouedraogo A.G. and Nacoulma O.G. (2008). Polyphenol contents and antioxidant activities of five *Indigofera* Species (Fabaceae) from Burkina Faso. Pakistan Journal of Biological Sciences. 11(11): 1429-1435.
- Calvo T.R. (2007). Uso sustentável de biodiversidade brasileira-prospecção químico-farmacológica em plantas superiores: *Alchornea glandulosa*, *Alchornea triplinervia* (Euphorbiaceae), *Indigofera truxillensis* e *Indigofera suffruticosa* (Fabaceae). Doctoral thesis, Universidade Estadual Paulista, São Paulo, Brazil.
- Chouisudsakunchai P., Phothikanith A. and Saithong A. (2010). The study of underarm bacterial inhibition properties of indigo dyed textiles. Sakon Nakhon graduate studies journal. 29: 57-66.
- Kaushal M., Sharma K.D. and Attri S. (2013). Effect of blanching on nutritional quality of dehydrated colocasia, *Colocasia esculenta* (L.) Schott leaves. Indian Journal of Natural Products and Resources. 4(2): 161-164.
- Chen T.Y., Sun H.L., Yao H.T., Lii C.K., Chen H.W., Chen P.Y., Li C.C. and Liu K.L. (2013). Suppressive effects of *Indigofera suffruticosa* Mill extracts on lipopolysaccharide-induced inflammatory responses in murine RAW 264.7 macrophages. Food and Chemical Toxicology. 55: 257-264.
- Miliauskas G., Venskutonis P.R. and Van B.T.A. (2004). Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extracts. Food Chemistry. 85(2): 231-237.
- Nobosse P., Fombang E.N. and Mbofung C.M.F. (2017). The effect of steam blanching and drying method on nutrients, phytochemicals and antioxidant activity of Moringa (*Moringa oleifera* L.) leaves. American Journal of Food Science and Technology. 5(2): 53- 60.
- Nobosse P., Fombang E.N. and Mbofung C.M.F. (2018). Effects of age and extraction solvent on phytochemical content and antioxidant activity of fresh Moringa oleifera L. leaves. Food science & Nutrition. 6(8): 2188-2198.
- Phansawan B. (2013). Free radicals, Antioxidants and antioxidant activity determination. Journal of Science & Technology, Thammasat University. 21(3): 275-286.
- Pourmorad F., Hosseinimehr S.J. and Shahabimajd N. (2006). Antioxidant activity, phenol and flavonoid contents of some selected Iranian medicinal plants. African Journal of Biotechnology. 5(11): 1142-1145.

- Pupaka D. (2015). The evaluation of phytochemical content, antioxidant activity and total phenolic content of the native mango in Chachoengsao province. *KKU Science Journal*. 43(2): 267-283.
- Ratanasiriwat P., Worawattanamateekul W. and Klaypradit W. (2013). Properties of encapsulated wasabi flavour and its application in canned food. *International Journal of Food Science and Technology*. 48(4): 749-757.
- Sakon Nakhon Rajabhat University. (2013). Kram. Accessed 11 Nov. 2018.
http://old.rdi.snru.ac.th/UserFiles/File/%202_7-8-56.pdf
- Singh R., Shushni M.A. and Belkheir A. (2015). Antibacterial and antioxidant activities of *Mentha piperita* L. 8(3): 322-328.
- Singh R., Sharma S. and Sharma V. (2015). Comparative and quantitative analysis of antioxidant and scavenging potential of *Indigofera tinctoria* Linn. extracts. *Journal Integrative Medicine*. 13(4): 269-278.
- Ubon Ratchathani University. 2010. Anila. Accessed 11 Nov. 2018.
<http://www.phargarden.com/main.php?action=viewpage&pid=193>
- Vijayan R., Joseph S. and Mathew B. (2018). Anticancer, antimicrobial, antioxidant, and catalytic activities of green-synthesized silver and gold nanoparticles using *Bauhinia purpurea* leaf extract. *Bioprocess and Biosystem Engineering*. 42(2): 305-319.