

อายุของผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มสมุนไพรรางจืดในขวดปิดสนิท : สมบัติทางเคมีและกายภาพ และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

Shelf-life of Herbal Beverage from

***Thunbergia laurifolia* Lindl. in Bottles:**

Chemical and Physical Properties and Antioxidant Activities

กรรณิการ์ มหาสารกุล, นีรมล ศากยวงศ์* และปาริยา ณ นคร

ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

ศูนย์รังสิต ตำบลคลองหนึ่ง อำเภอคลองหลวง จังหวัดปทุมธานี 12120

วรพันธ์ นาคบรรพต และรุ่งลักขมี ประทุมชัย

ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม

ตำบลขามเรียง อำเภอกันทรวิชัย จังหวัดมหาสารคาม 44150

Kannika Mahasarakul, Niramol Sakkayawong* and Pariya Na Nakorn

Department of Biotechnology, Faculty of Science and Technology, Thammasat University,

Rangsit Center, Klong Nueng, Klong Luang, Pathum Thani 12120

Woranan Nakbanpote and Rungluksamee Pratoomchai

Department of Biology, Faculty of science, Mahasarakham University,

Khamriang, Kantarawichai, Maha Sarakham 44150

บทคัดย่อ

รางจืด (*Thunbergia laurifolia* Lindl.) เป็นพืชสมุนไพรที่มีสรรพคุณทางยาหลากหลาย จากความนิยมเครื่องดื่มสมุนไพรเพื่อสุขภาพจึงมีการนำรางจืดมาผลิตเป็นเครื่องดื่มสมุนไพร งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาชนิดของบรรจุภัณฑ์สำหรับเครื่องดื่มสมุนไพรรางจืดที่ผลิตจากการต้มใบและก้านสมุนไพรรางจืดตากแห้งด้วยวิธีการผลิตแบบพื้นบ้าน บรรจุภัณฑ์ที่ใช้ในการศึกษาคือขวด PET ขวด PP และขวดแก้ว และศึกษาอายุของผลิตภัณฑ์ที่แช่ในตู้เย็น 4 ± 1 °C ผลการศึกษาพบว่าเครื่องดื่มสมุนไพรรางจืดที่บรรจุในบรรจุภัณฑ์ทั้ง 3 ชนิด มีสมบัติไม่แตกต่างกันทั้งค่าพีเอช การดูดกลืนแสง สี กลิ่น รสชาติ ปริมาณสารฟีนอลิกและสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมด และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ โดยฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระมีแนวโน้มลดลงเมื่ออายุของผลิตภัณฑ์เพิ่มขึ้น อายุของผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มสมุนไพรรางจืดในระยะเวลา 14 วัน พบผลิตภัณฑ์ยังคงคุณภาพดี มีปริมาณจุลินทรีย์ปนเปื้อนอยู่เกณฑ์มาตรฐานเครื่องดื่มในภาชนะบรรจุที่ปิดสนิท และมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระลดลงจากวันที่ผลิตประมาณ 8 % และการศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าเครื่องดื่มสมุนไพรรางจืดมี

ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเทียบเคียงได้กับเครื่องดื่มชาเขียวซึ่งมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกและสารประกอบฟลาโวนอยด์ในปริมาณที่สูงกว่า

คำสำคัญ : รางจืด, ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ, อายุของผลิตภัณฑ์, บรรจุภัณฑ์

Abstract

Thunbergia laurifolia Lindl. or Rang Jeud (in Thai) is herbal medicine containing many pharmacology activities. As the growth of herbal beverages due to consumers believes in their health promoting property, *T. laurifolia* have been used for herbal beverage. This study aims to determine the effects of packaging materials (PET, PP and glass bottles) on herbal beverage from *T. laurifolia*, which was prepared from sun dried leaves and vines with local processing, and shelf-life in refrigerator (4 ± 1 °C). The results showed that there were no significant difference in pH, light absorbing, color, test and flavor, total phenolic content (TPC), total flavonoid content (TFC), and free radical scavenging activity (FRSA) between the three bottle materials. FRSA gradually decreased related to longer storage time. The herbal beverage in the three bottle materials had shelf-life of 14 days, with stable quality and only 8 % FRSA decrease. Contamination of microorganism found in our herbal beverage was in the standard of bottled beverage. In addition, this research revealed that our herbal beverage from *T. laurifolia* was comparable with some commercial green teas in FRSA, although the green tea had a higher TPC and TFC.

Keywords: *Thunbergia laurifolia*, antioxidant activity, shelf-life, packaging

1. คำนำ

รางจืด (*Thunbergia laurifolia* Lindl.) คือไม้เถาในวงศ์ Thunbergiaceae เป็นสมุนไพรชนิดหนึ่งที่พบสารสำคัญทางยาหลายชนิด (Chan *et al.*, 2011) คือ สารในกลุ่มไอริโดอยด์กลูโคไซด์ (iridoid glucosides) และอัลกอฮอล์กลูโคไซด์ (alcohol glucosides) (Kanchanapoom *et al.*, 2002) และพบสารกลุ่มโพลีฟีนอล (phenolic compounds) เช่น คาเฟอิก (caffeic) แกลลิก (gallic) อาพิจินิน (apigenin) โปรโตคาเทคฮูอิก (protocatechuic) เดลฟินิดิน (delphinidin) คลอโรจีนิก (chlorogenic) และฟลาโวนอยด์กลูโคไซด์ (flavonoid glucosides) ลูทีน (lutein) (Kanchanapoom *et al.*,

2002; Oonsivilai *et al.*, 2007) สรรพคุณทางยาของรางจืดคือฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant activity) (Oonsivilai *et al.*, 2008; Jiwajinda *et al.*, 2002; Chan *et al.*, 2010) ฤทธิ์ต้านการอักเสบ (anti-inflammatory activity) (Charumanee *et al.*, 1998) ฤทธิ์ต้านเบาหวาน (anti-diabetic effects) (Aritajat *et al.*, 2004) ฤทธิ์ช่วยปกป้องตับจากสารพิษ (hepatoprotective activity) เช่น แอลกอฮอล์ (Pramyothin *et al.*, 2005) มีฤทธิ์ในการขับสารพิษ (detoxifying effect) เช่น โลหะหนัก ยาเสพติด และยาปราบศัตรูพืช ช่วยฟื้นฟูอาการสมองเสื่อมในผู้ติดยาเสพติด (Thongsarrrd *et al.*, 2002; 2005) บรรเทาการถูกทำลายของเซลล์สมอง

และอาการความจำเสื่อมเนื่องจากพิษของตะกั่ว (Tangpong and Satarug, 2010) บรรเทาการถูกทำลายของเซลล์ตับและไตเนื่องจากพิษของแคดเมียม (Ruangyuttikarn *et al.*, 2013) ช่วยลดพิษจากการได้รับยาปราบศัตรูพืชพาราควอตซ์ (Usanawarong *et al.*, 2000) นอกจากนั้นการทดสอบความเป็นพิษ (chronic toxicity) ในสัตว์ทดลองแสดงให้เห็นว่าการบริโภคสารสกัดจากรางจืดในปริมาณ 20-2000 มิลลิกรัม/กิโลกรัม น้ำหนักตัว/วัน เป็นเวลา 1 เดือน มีความปลอดภัยและไม่ส่งผลกระทบต่อสุขภาพและพฤติกรรมของสัตว์ทดลอง (Chivapat *et al.*, 2009) ปัจจุบันสมุนไพรรางจืดจึงถูกบรรจุอยู่ในบัญชียาจากสมุนไพรที่มีฤทธิ์ถอนพิษไข้ แก้อ่อนใน และถอนพิษเบื่อเมาตามประกาศคณะกรรมการพัฒนาระบบยาแห่งชาติ เรื่องบัญชียาหลักแห่งชาติ พ.ศ. 2555

จากความนิยมเครื่องดื่มสมุนไพรเพื่อสุขภาพของผู้บริโภค จึงพบเครื่องดื่มสมุนไพรบรรจุขวดปิดสนิทที่ผลิตโดยผู้ประกอบการขนาดเล็กวางขายในตลาดนัดและร้านค้าปลีกในระดับท้องถิ่นซึ่งผลิตภัณฑ์ในกลุ่มเครื่องดื่มชาและน้ำผลไม้ในขวดปิดสนิทมักพบการเปลี่ยนสีและมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระลดลงเมื่ออายุของผลิตภัณฑ์นานขึ้น ทั้งนี้ขึ้นกับชนิดของบรรจุภัณฑ์ (Li *et al.*, 2012; Jayabalan *et al.*, 2008; Berlinet *et al.*, 2007; Ayhan *et al.*, 2001) โดยบรรจุภัณฑ์ที่นิยมใช้ใ้ในอุตสาหกรรมเครื่องดื่มบรรจุขวดปิดสนิท ได้แก่ ขวดพลาสติกใส polyethylene terephthalate (PET) ที่มีสมบัติป้องกันการแพร่ผ่านของก๊าซได้ดี และทนต่อแรงกระแทก ขวดพลาสติกขุ่น polypropylene (PP) ที่ทนต่อสารเคมีป้องกันการระเหยของน้ำและออกซิเจนและทนต่อแรงกระแทก และขวดแก้วใส (glass) ที่เป็นบรรจุภัณฑ์มาตรฐาน (benchmark standard) สำหรับผลิตภัณฑ์อาหาร มีสมบัติป้องกันการแพร่ผ่านของก๊าซ ทนต่อสารเคมี

แต่มีน้ำหนักมากและแตกง่ายเมื่อได้รับแรงกระแทก (Ashurst, 2009; Stöllman *et al.*, 1994) ซึ่งการเลือกวัสดุที่จะนำมาเป็นบรรจุภัณฑ์ ควรคำนึงถึงการคงสภาพของผลิตภัณฑ์ ความปลอดภัยของผู้บริโภค ต้นทุนการผลิต และความสวยงามของบรรจุภัณฑ์ (Lau and Wong *et al.*, 2000; Ashurst, 2009; Stöllman *et al.*, 1994)

งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษานิตของบรรจุภัณฑ์สำหรับเครื่องดื่มสมุนไพรรางจืดที่ผลิตจากการต้มใบและก้านสมุนไพรรางจืดตากแห้งด้วยวิธีการผลิตแบบพื้นบ้าน บรรจุภัณฑ์ที่ใช้ในการศึกษาคือขวดพลาสติก PET ขวดพลาสติก PP และขวดแก้ว และศึกษาอายุของผลิตภัณฑ์ที่แช่ในตู้เย็น $4\pm 1^{\circ}\text{C}$ โดยวิเคราะห์สี ปริมาณน้ำตาล ค่าพีเอช (pH) ปริมาณตะกอน ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด (total phenolic content, TPC) ปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด (total flavonoid content, TFC) และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (free radical scavenging activity, FRSA) ตรวจวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงสารสำคัญในผลิตภัณฑ์ ด้วยเครื่อง high performance chromatography (HPLC) และการตรวจสอบการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ข้อมูลที่ได้สามารถเป็นแนวทางแก่ผู้ผลิตในการปรับปรุงวิธีการผลิตคัดเลือกบรรจุภัณฑ์ และกำหนดอายุของผลิตภัณฑ์เพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่มีคุณภาพปลอดภัยต่อผู้บริโภค และเป็นการส่งเสริมการผลิตเครื่องดื่มสมุนไพรระดับอุตสาหกรรมในครัวเรือนที่สามารถใช้วัตถุดิบในท้องถิ่น

2. อุปกรณ์ และวิธีการ

2.1 การเตรียมเครื่องดื่มสมุนไพรรางจืด

สมุนไพรรางจืด (*Thunbergia laurifolia* Lindl.) ที่ใช้ในการทดลองเป็นชนิดดอกสีม่วงซึ่งปลูกโดยไม่ใช้สารเคมีใน ต.แก้ง อ.เมือง จ.มหาสาร

คาม เก็บตัวอย่างพืชในช่วงเดือนสิงหาคม-กันยายน 2555 นำมาแยกเป็นสองส่วนคือก้านและใบโดยไม่แยกขนาดใบ ตากแดดจนแห้งประมาณ 3 วัน ก่อนห่อด้วยกระดาษและเก็บในถุงพลาสติกเพื่อลดการสัมผัสแสงและอากาศ การเตรียมเครื่องต้มสมุนไพร 5 ลิตร ทำโดยนำใบ 50 กรัม และเถา 50 กรัม ไปล้างและแช่น้ำ 1 นาที เพื่อให้ตัวอย่างอ่อนตัวลงก่อนเทน้ำออก นำตัวอย่างรางจืดใส่หม้อและเติมน้ำ 2 ลิตร ต้มให้เดือดนาน 15 นาที กรองแยกการางจืดด้วยผ้าขาวบาง เติมน้ำเพิ่มอีก 3 ลิตร และเติมน้ำตาลทรายแดง 350 กรัม ต้มให้เดือดนาน 10 นาที (สูตรไม่ใส่น้ำตาลจะไม่เติมน้ำตาลในขั้นตอนนี้) เพิ่มกลิ่นหอมให้ผลิตภัณฑ์โดยใส่ใบเตย 3-4 ใบและต้มต่ออีก 5 นาที แยกใบเตยออกและปิดฝาหม้อตั้งทิ้งไว้จนอุณหภูมิลดลงประมาณ 75-80 °C ก่อนบรรจุเครื่องต้มสมุนไพรรางจืดในบรรจุภัณฑ์ 3 ชนิด คือขวดพลาสติก PET ขวดพลาสติก PP และขวดแก้วใส ซึ่งผ่านการลวกฆ่าเชื้อด้วยน้ำเดือดนาน 15 วินาที ปิดขวดให้สนิทและทิ้งให้อุณหภูมิของเครื่องต้มสมุนไพรในทุกบรรจุภัณฑ์เย็นลงประมาณ 30-35 °C ก่อนนำไปเก็บในตู้เย็นที่บดแสงซึ่งควบคุมอุณหภูมิที่ 4 ± 1 °C

2.2 การเก็บตัวอย่างและการวิเคราะห์ข้อมูล

สุ่มเก็บตัวอย่างผลิตภัณฑ์เครื่องต้มสมุนไพรรางจืดสูตรเติมน้ำตาลที่เก็บในตู้เย็นบรรจุภัณฑ์ละ 3 ข้างในแต่ละช่วงเวลาโดยเก็บตัวอย่างวันที่ 0, 1, 3, 5, 7 และ 14 มาวิเคราะห์ ปริมาณน้ำตาล ค่าพีเอช (pH) ปริมาณตะกอน ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด (TPC) ปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด (TFC) และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (FRSA) การตรวจสอบการปนเปื้อนจุลินทรีย์และการประเมินทางประสาทสัมผัส (sensory evaluation) ใช้ตัวอย่างวันที่ 0, 1, 7 และ 14 และการแยกสารประกอบด้วยเครื่อง HPLC ใช้ตัวอย่างวันที่ 14

ผลิตภัณฑ์เครื่องต้มสมุนไพรรางจืดสูตรไม่มีน้ำตาลและสูตรมีน้ำตาล ถูกนำมาเปรียบเทียบกับผลิตภัณฑ์เครื่องต้มชาเขียวสูตรมีน้ำตาลและไม่มีน้ำตาลจำนวน 2 ยี่ห้อ ที่ยังไม่หมดอายุและสุ่มซื้อจากร้านสะดวกซื้อโดยพิจารณาจากค่า TPC, TFC, FRSA และโครมาโตแกรม HPLC ที่วิเคราะห์ได้จากผลิตภัณฑ์แต่ละชนิด

รายงานผลการทดลองในรูปของค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติแบบ F-test และ one way ANOVA และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยรายคู่โดยวิธี Scheffe และวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างระยะเวลาในการเก็บรักษากับคุณภาพผลิตภัณฑ์โดยใช้ Pearson correlation

2.3 การตรวจสอบสมบัติทางเคมีและทางกายภาพ

วิเคราะห์ค่าความหวานในรูปของบริกซ์ (Brix) โดยเครื่อง hand refractometer (ATAGO, Japan) การวัดค่าพีเอชใช้เครื่อง pH meter (Model 215 Denver, Germany) วิเคราะห์การดูดกลืนแสง (light absorbing) ในช่วงความยาวคลื่น 400-700 นาโนเมตร โดยเครื่อง UV-Vis spectrophotometer (DU 730 Lifescience Beckman Coulter, USA) และวัดปริมาณตะกอนโดยการกรองตัวอย่างด้วยกระดาษกรอง Whatmant No. 2 และอบที่อุณหภูมิ 80 °C นาน 24 ชั่วโมง ซึ่งหาน้ำหนักตะกอนด้วยเครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง (Ohaus PA214, USA) นำค่าที่ได้มาคำนวณปริมาณตะกอนในหน่วยมิลลิกรัมต่อลิตร (mg/l) การประเมินทางประสาทสัมผัสใช้ผู้ทดสอบชิมในห้องปฏิบัติการที่ผ่านการอบรมและไม่เกี่ยวข้องกับการเตรียมเครื่องต้มสมุนไพรรางจืดจำนวน 3 คน อายุระหว่าง 35-45 ปี เพศชาย 1 คน และเพศหญิง 2 คน และใช้แบบสอบถามเชิงพรรณนาในการประเมินรสชาติของผลิตภัณฑ์

2.4 การตรวจสอบสมบัติต้านอนุมูลอิสระ

2.4.1 การวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด

การวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด (TPC) ใช้วิธี Folin-Ciocalteu method ดัดแปลงจาก Yoo *et al.* (2008) โดยใส่ตัวอย่าง 100 ไมโครลิตร ในหลอดไมโครเซนตริฟิวขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่น 10 % (v/v) Folin-Ciocalteu's reagent ปริมาตร 500 ไมโครลิตร และผสมให้เข้ากัน เติมน้ำกลั่น 7.5 % (w/v) Na_2CO_3 ปริมาตร 100 ไมโครลิตร และน้ำกลั่น 300 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันก่อนเก็บไว้ในที่มืดนาน 2 ชั่วโมง วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 731 นาโนเมตร วิเคราะห์ค่า TPC โดยเทียบกับกราฟสารละลายมาตรฐานซึ่งเตรียมจากกรดแกลลิก (gallic acid) คำนวณค่าในหน่วยมิลลิกรัมเทียบเท่ากรดแกลลิก (milligrams of gallic acid equivalents, GAE) ต่อลิตรของตัวอย่าง (mg GAE /l)

2.4.2 การวิเคราะห์ปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด

การวิเคราะห์ปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด (TFC) ดัดแปลงจากวิธีของ Yoo และคณะ (2008) โดยเติมน้ำกลั่น 1.25 มิลลิลิตร ในขวดสีชา เติมน้ำกลั่น 250 ไมโครลิตร และเติมน้ำกลั่น 5 % (w/v) NaNO_2 ปริมาตร 75 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากันและตั้งทิ้งไว้ 5 นาที ก่อนเติม 10 % (w/v) AlCl_3 ปริมาตร 150 ไมโครลิตร เขย่าแล้วตั้งทิ้งไว้ 6 นาที ก่อนเติม 1.0 M NaOH ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร และน้ำกลั่น 275 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากันก่อนตั้งทิ้งไว้ให้เกิดปฏิกิริยานาน 5 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 510 นาโนเมตร วิเคราะห์ค่า TFC โดยเทียบกับกราฟสารละลายมาตรฐานซึ่งเตรียมจากเคอร์ซีติน (quercetin) คำนวณค่าในหน่วยมิลลิกรัมเทียบเท่าเคอร์ซีติน (milligrams of

quercetin equivalents, QE) ต่อลิตรของตัวอย่าง (mg QE/l)

2.4.3 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระดัดแปลงจากวิธีของ Yoo และคณะ (2008) และ Cotelle และคณะ (1996) โดยเติมสารละลายอนุมูลอิสระเสถียร 0.08 mM DPPH (1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl) ปริมาตร 900 ไมโครลิตร ในหลอดไมโครเซนตริฟิวขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่น 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องเขย่า (vortex) นาน 10 วินาที ก่อนเก็บไว้ในที่มืดนาน 30 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 515 นาโนเมตร ใช้เมทานอลเป็น blank คำนวณค่าเปอร์เซ็นต์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (% FRSA) ดังสมการที่ (1) โดย A_c คือค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างควบคุม (ใช้น้ำกลั่นแทนตัวอย่างในการทำปฏิกิริยา) และ A_s คือค่าการดูดกลืนแสงที่เกิดจากการทำปฏิกิริยาของตัวอย่าง

Free radical scavenging activity (%) =

$$(A_c - A_s)/A_c \times 100 \quad (1)$$

2.5 การตรวจสอบการปนเปื้อนจุลินทรีย์

สุ่มตัวอย่างผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มสมุนไพรบรรจุขวดที่เก็บในตู้เย็นมาตรวจสอบการปนเปื้อนจุลินทรีย์ โดยตรวจการปนเปื้อนแบคทีเรียชนิดโคลิฟอร์ม (coliform) ด้วยวิธีเอ็มพีเอ็น (most probable number, MPN) ระบบ 3 หลอด ที่ระดับความเจือจาง 1:10, 1:100 และ 1:1000 ซึ่งประกอบด้วยขั้นประมาณการ (presumptive test for coliform) ใช้อาหาร Lauryl sulfate tryptose (LST) broth บ่มที่ 35 °C เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง และยืนยัน (confirmed test for coliform) ใช้อาหาร brilliant green bile (BGB) broth บ่มที่ 35 °C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นับจำนวนหลอดที่มีการสร้างก๊าซในหลอดดักก๊าซ (durham tube) และประมาณจำนวนเชื้อจากตารางค่าเอ็มพีเอ็น รายงานผลในหน่วย MPN

ต่อ 100 มิลลิลิตร ของตัวอย่าง (MPN/100 ml) และตรวจการปนเปื้อนเชื้อ *Escherichia coli* โดยการปิเปตตัวอย่างปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร เกลี่ยบนจานอาหาร eosin-methylene blue (EMB) agar บ่มที่อุณหภูมิ 35 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สังเกตโคโลนีที่มีสีเข้มกลางโคโลนีทั้งที่มีและไม่มีควมมั่นใจ (Hitchin *et al.*, 1992; Peeler *et al.*, 1992) การปนเปื้อนยีสต์และราตรวจโดยปิเปตตัวอย่างปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร เกลี่ยบนจานอาหาร potato dextrose agar (PDA) ซึ่งปรับพีเอชเป็น 3.5 ด้วย 10 % (w/v) tartaric acid บ่มที่อุณหภูมิ 25-30 °C เป็นเวลา 5 วัน (Mislivec *et al.*, 1992) นับจำนวนจุลินทรีย์ที่เกิดขึ้นบนจานอาหาร และคำนวณค่าในหน่วย colony forming unit (CFU) ต่อ มิลลิลิตรของตัวอย่าง (CFU/ml)

2.6 การแยกสารและวิเคราะห์สาร

การแยกและวิเคราะห์สารประกอบในเครื่องต้มสมุนไพรไพรรางจืดใช้เครื่อง high performance liquid chromatography (HPLC) (Shimadzu SIL-10AD, Japan) คอลัมน์ที่ใช้คือ C-18 ความยาว 25 มิลลิเมตร (Inertsil ODS-3 GL Sciences, USA) เฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) จัดแปลงจากวิธีของ Zuo แลคณะ (2002) เป็นแกรเดียนต์ระหว่างสารละลาย A คือ 3 % (v/v) acetic acid และสารละลาย B คือ 99.5 % (v/v) methanol โดยเริ่มป้อนสารละลาย A:B อัตราส่วน 100:0 เป็นเวลา 5 นาที และเพิ่มสัดส่วนของสารละลาย B เข้าสู่คอลัมน์จนมีสัดส่วนสารละลาย A:B เท่ากับ 40:60 ที่เวลา 60 นาที ควบคุมอัตราการไหลที่ 1 มิลลิลิตรต่อนาที ปริมาตรตัวอย่าง 20 ไมโครลิตร และอ่านค่าที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร ด้วย prominence diode array (PDA) detector (Shimadzu SPD-M20A, Japan) สารมาตรฐานที่ใช้ในการวิเคราะห์เปรียบเทียบ คือ caffeic acid (Sigma-Aldrich), catechin (Sigma-

Aldrich), epicatechin (Merck, English), gallic acid (Sigma-Aldrich), kaempferol (Sigma-Aldrich), rutin (Merck) และ apigenin (Calbiochem)

3. ผลการทดลองและอภิปราย

3.1 การเปลี่ยนแปลงทางเคมีและกายภาพ

การตรวจสอบคุณภาพทางเคมีและกายภาพของเครื่องต้มสมุนไพรไพรรางจืดซึ่งบรรจุในขวด PP, ขวด PET และขวดแก้ว และเก็บในตู้เย็น 4±1 °C โดยตรวจสอบผลิตภัณฑ์ ณ วันที่ผลิต (วันที่ 0) และหลังการผลิตวันที่ 1, 3, 5, 7 และ 14 พบว่าเครื่องต้มสมุนไพรไพรรางจืดในทั้งสามบรรจุภัณฑ์มีค่าพีเอชไม่แตกต่างกัน ($F = 0.064$, $P < 0.938$) คือมีค่าอยู่ระหว่าง 6.5-6.8 (Fig. 1a) และมีค่าความหวานประมาณ 7.2 บริกซ์ ในเครื่องต้มสมุนไพรไพรรางจืดมีการเกิดตะกอนตามธรรมชาติ โดยเครื่องต้มที่บรรจุในขวด PP และขวด PET มีปริมาณตะกอนไม่ต่างกัน ($F=11.684$, $P < 0.001$) คือ 0.18-0.40, 0.14-0.38 g/l และพบตะกอนในเครื่องต้มที่บรรจุในขวดแก้วสูงที่สุดเท่ากับ 0.27-0.45 g/l (Fig. 2b) ซึ่งการต้มตัวอย่างและการเตรียมตัวอย่างโดยต้มสมุนไพรในหม้อเดียวกันแต่แยกบรรจุลงในบรรจุภัณฑ์ การเรียงลำดับจากขวด PP, ขวด PET และขวดแก้ว อาจส่งผลให้ค่าตะกอนในบรรจุภัณฑ์มีความแปรปรวนสูง และเป็นสาเหตุให้เครื่องต้มสมุนไพรที่บรรจุในขวดแก้วมีปริมาณตะกอนสูงที่สุด การวัดค่าการดูดกลืนแสงในช่วงความยาวคลื่น 400-700 nm พบว่าการเก็บผลิตภัณฑ์ในตู้เย็นที่บ่มแสงในระยะเวลา 14 วัน ไม่ส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงสีของผลิตภัณฑ์ (Figure 1c) และการทดสอบชิมโดยผู้ทดสอบไม่พบความแตกต่างของสีและกลิ่นรสของเครื่องต้มสมุนไพรไพรรางจืดที่บรรจุในบรรจุภัณฑ์ขวด

ทั้ง 3 ชนิด ตลอดระยะเวลาการเก็บ 14 วัน (Table 1)

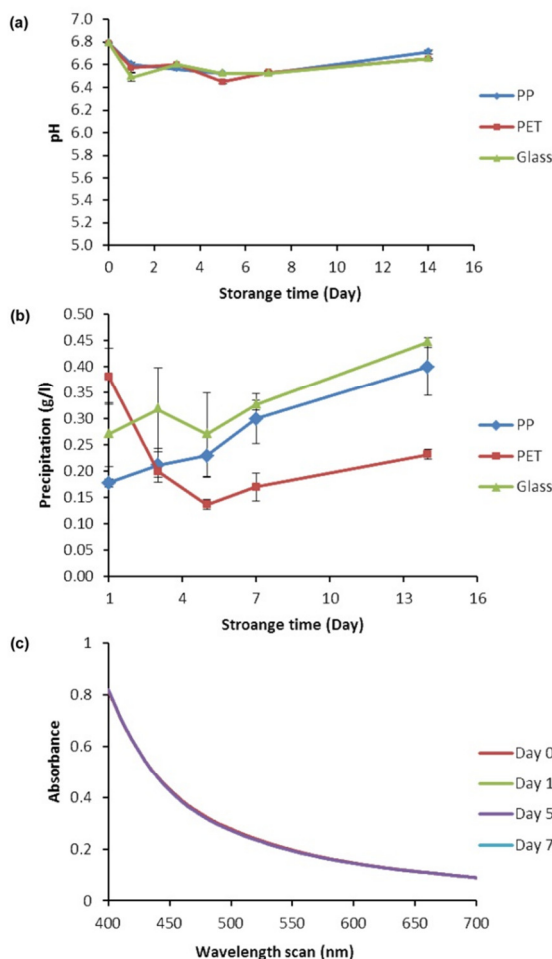


Figure 1 Precipitation, pH and absorbing light of herbal beverage from *T. laurifolia* in PP, PET and glass bottles on date of production and during 14 days storage at a constant temperature of 4 ± 1 °C, (a) pH, (b) precipitation, and (c) absorbing light. The data are giving as the means $\pm$ SD ($n = 3$).

3.2 การตรวจสอบการปนเปื้อนจุลินทรีย์

การตรวจสอบการปนเปื้อนจุลินทรีย์ในเครื่องดื่มสมุนไพรรางจืดบรรจุขวด PP, ขวด PET

และขวดแก้ว และเก็บในตู้เย็น 4 ± 1 °C ใช้ตัวอย่างผลิตภัณฑ์ ณ วันที่ผลิต (วันที่ 0) และหลังการผลิตวันที่ 1, 7 และ 14 การตรวจสอบการปนเปื้อนแบคทีเรียชนิดโคลิฟอร์มโดยวิธีเอ็มพีเอ็น ระบบ 3 หลอด ให้ผลเป็น 0-0-0 เมื่อนำไปเทียบตารางค่าเอ็มพีเอ็นที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 อ่านค่าได้ < 3 MPN/100 มิลลิลิตร แปลผลได้ว่าเครื่องดื่มสมุนไพรรางจืดมีปริมาณโคลิฟอร์มต่ำกว่า 3 ต่อเครื่องดื่ม 100 มิลลิลิตร และผลการเกลี่ยตัวอย่างเครื่องดื่มบนอาหาร EMB เพื่อตรวจนับแบคทีเรียและตรวจหาแบคทีเรียอีโคไล (*E. coli*) ไม่พบการเจริญของแบคทีเรียโคลิฟอร์มและอีโคไล (Table 1) การตรวจการปนเปื้อนยีสต์และราโดยการเกลี่ยตัวอย่างเครื่องดื่มเจือจาง 100 เท่า บนอาหาร PDA (pH 3.5) ไม่พบการเจริญของยีสต์และรา และเมื่อทดสอบซ้ำโดยใช้ตัวอย่างเครื่องดื่มซึ่งไม่ได้เจือจางพบการเจริญของยีสต์ 10-70 CFU/ml (Table 1) แสดงให้เห็นว่าระดับการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ในผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มสมุนไพรรางจืดอยู่ในมาตรฐานของเครื่องดื่มในภาชนะบรรจุที่ปิดสนิทที่ผ่านกรรมวิธีอื่นนอกเหนือจากวิธีสเตอริไลส์หรือยูเอชที ตามประกาศกระทรวงสาธารณสุขเรื่องเครื่องดื่มในภาชนะบรรจุที่ปิดสนิทฉบับที่ 214 พ.ศ. 2543 และฉบับที่ 4พ.ศ. 2554

3.3 การเปลี่ยนแปลงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

การตรวจสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของเครื่องดื่มสมุนไพรรางจืดบรรจุขวด PP, ขวด PET และขวดแก้ว ซึ่งเก็บในตู้เย็น 4 ± 1 °C ใช้ตัวอย่างผลิตภัณฑ์ ณ วันที่ผลิต (วันที่ 0) และหลังการผลิตวันที่ 1, 3, 5, 7 และ 14 พบว่าปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดในเครื่องดื่มลดลงจาก 100.94 ± 2.01 mg GA/l (วันที่ 0) เป็น $98-99$ mgGA/l ในวันที่ 3-14 หลังการผลิต โดยปริมาณฟีนอลิกในบรรจุภัณฑ์ทั้ง 3 ชนิด มีค่าไม่แตกต่างกัน ($F = 2.93$, $P = 0.063$)

(Fig. 2a) ส่วนปริมาณฟลาโวนอยด์ในเครื่องดื่มลดลงจาก 183.33 ± 0.67 mg QE/l (วันที่ 0) เป็น 176-180 mg QE/l ในวันที่ 1-14 หลังการผลิต โดยปริมาณฟลาโวนอยด์ในบรรจุภัณฑ์ทั้ง 3 ชนิด มีค่าไม่แตกต่างกัน ($F = 1.62$, $P = 0.209$) (Fig. 2b) การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเสถียร DPPH (Fig. 2c) พบว่าเครื่องดื่มสมุนไพรรางจืดในบรรจุ

ภัณฑ์ทั้ง 3 ชนิด มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระลดลงไม่แตกต่างกัน ($F = 0.08$, $P = 0.924$) และฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระลดลงเมื่ออายุของผลิตภัณฑ์นานขึ้น ($r = -0.812$, $P < 0.001$) โดยการศึกษาครั้งนี้พบผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มสมุนไพรรางจืดซึ่งเก็บในตู้เย็นมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระลดลงประมาณ 8 % เมื่อเก็บผลิตภัณฑ์นาน 14 วัน

Table 1 Color, taste, flavor and microbiological quality of herbal beverage from *T. laurifolia* in PP, PET and glass bottles on date of production and during 14 days storage at a constant temperature of 4 ± 1 °C

Packaging	Day	Color	Taste	Total plate counts (CFU/ml)*	Total yeasts and molds (CFU/ml)		Total coliforms (MPN/100 ml)
					Dilution 10^{-2}	Non dilution	
Herbal beverage	0	Brown	no change	nil	nil	N/A	<3
PP	1	Brown	no change	nil	nil	N/A	<3
PET		Brown	no change	nil	nil	N/A	<3
Glass		Brown	no change	nil	nil	N/A	<3
PP	7	Brown	no change	nil	nil	N/A	<3
PET		Brown	no change	nil	nil	N/A	<3
Glass		Brown	no change	nil	nil	N/A	<3
PP	14	Brown	no change	nil	nil	10	<3
PET		Brown	no change	nil	nil	70	<3
Glass		Brown	no change	nil	nil	10	<3

*Total plate counts on eosin-methylene blue (EMB) agar, N/A=not analysis

การตรวจสอบสารสำคัญในผลิตภัณฑ์ด้วยเครื่อง HPLC พบว่าเครื่องดื่มสมุนไพรรางจืดในบรรจุภัณฑ์ทั้ง 3 ชนิด มีโครมาโตแกรมลักษณะเดียวกัน (Fig. 3a) โดยการเปรียบเทียบกับสารมาตรฐานพบพีคของ catechin, caffeic acid และ rutin และพบพีคของสารประกอบที่ยังไม่สามารถระบุได้ที่ตำแหน่ง 10.69, 22.43, 24.08, 24.94, 26.20, 26.70 และ 28.19 นาที (Fig. 3a) ซึ่งอาจ

เป็นสารประกอบในกลุ่ม glycoside หรือ flavonoid เช่นเดียวกับที่พบสารกลุ่มนี้ในงานวิจัยของ Kanchanapoom และคณะ (2002) และ Oonsivilai และคณะ (2007) และการวิเคราะห์เชิงปริมาณเฉพาะพีคที่สามารถระบุได้พบว่าเครื่องดื่มสมุนไพรรางจืดมี catechin, rutin และ caffeic acid ประมาณ 0.408, 0.218 และ 0.188 mg/l ตามลำดับ

3.4 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของเครื่องดื่มสมุนไพรรางจืดและเครื่องดื่มชาเขียว

การเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระระหว่างเครื่องดื่มสมุนไพรรางจืด และเครื่องดื่มชาเขียว

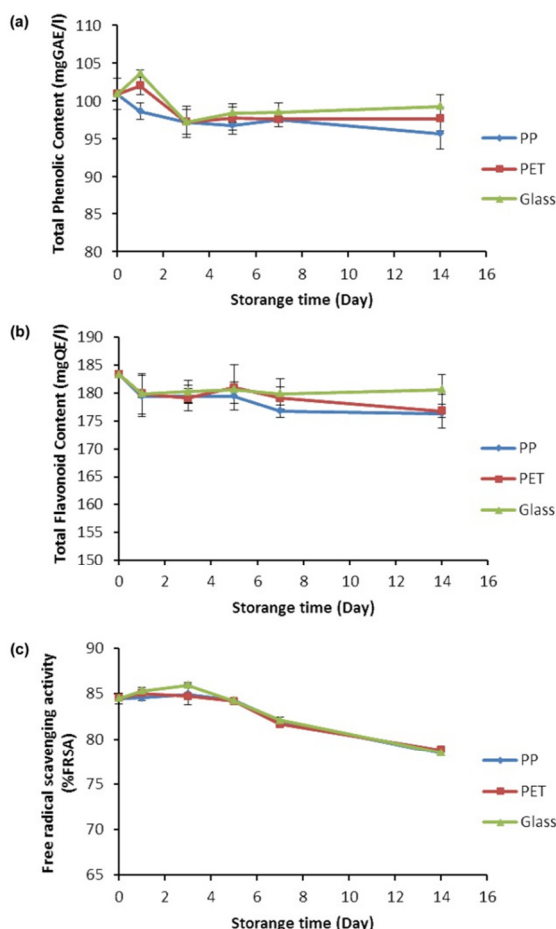


Figure 2 Antioxidant properties of herbal beverage from *T. laurifolia* in PP, PET and glass bottles on date of production and during 14 days storage at a constant temperature 4±1 °C, (a) Total phenolic content, (b) Total flavonoid content and (c) Free radical scavenging activity. The data are giving as the means ± SD ($n = 3$).

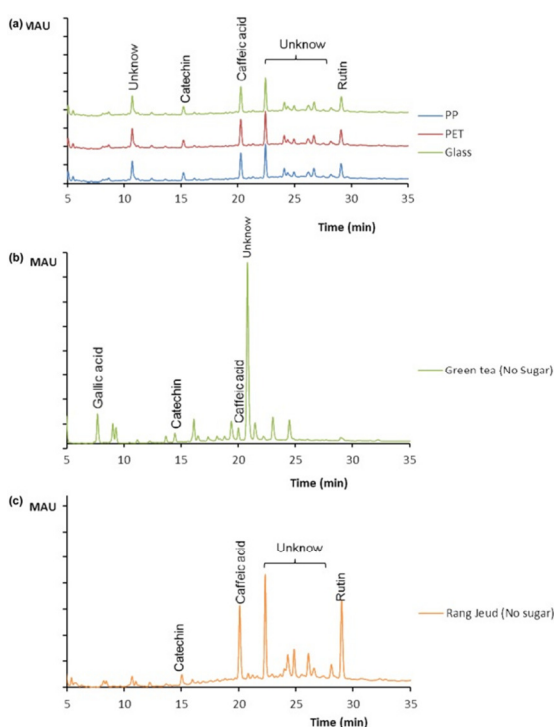


Figure 3 HPLC chromatograms of beverage from *T. laurifolia* (Rang jeud) and green tea, (a) herbal beverage from Rang Jeud in PP, PET and glass bottles on 14 days storage at a constant temperature 4±1 °C, (b) commercial green tea (brand B) with sugar and no-sugar, (c) herbal beverage from Rang Jeud (no sugar).

เขียวในขวดปิดสนิทที่ผลิตในระดับอุตสาหกรรมจำนวน 2 ยี่ห้อ ทั้งสูตรไม่มีน้ำตาลและสูตรที่มีน้ำตาล พบว่าปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมดและปริมาณสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมดในผลิตภัณฑ์มีความแตกต่างกัน ดังแสดงใน Fig. 4a และ Fig. 4b ตามลำดับ โดยเครื่องดื่มสมุนไพรรางจืดทั้ง 2 สูตรมีปริมาณฟีนอลิกและสารฟลาโวนอยด์ต่ำกว่าเครื่องดื่มชาเขียว แต่การเปรียบเทียบฤทธิ์ต้าน

อนุมูลอิสระพบว่าเครื่องต้มสมุนไพรรางจืดและเครื่องต้มชาเขียวมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระใกล้เคียงกัน (Fig. 4d) ซึ่งอาจเนื่องจากเครื่องต้มสมุนไพรรางจืดมีสารประกอบหลายตัวที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงกว่าสารประกอบที่มีอยู่ในชาเขียว (Kanchanapoom *et al.*, 2002; Oonsivilai *et al.*, 2007; Chen *et al.*, 2008) ดังสังเกตได้จากโครมาโตแกรมของเครื่องต้มชาเขียวและเครื่องต้มสมุนไพรรางจืดใน Fig. 3b และ Fig. 3c ตามลำดับ

4. สรุปผลการทดลอง

การศึกษาสมบัติทางเคมีและกายภาพและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของเครื่องต้มสมุนไพรรางจืดในขวดปิดสนิท 3 ชนิด คือ ขวด PP, ขวด PET และขวดแก้ว ที่เก็บในตู้เย็นที่บดแสงควบคุมอุณหภูมิที่ 4 ± 1 °C เป็นเวลา 14 วัน พบว่าเครื่องต้มสมุนไพรรางจืดที่บรรจุในบรรจุภัณฑ์ทั้ง 3 ชนิด มีสมบัติไม่แตกต่างกันทั้งค่าพีเอช การดูดกลืนแสง สี กลิ่น รสชาติ ปริมาณสารฟีนอลิกและสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมด และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ โดยฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระของเครื่องต้มสมุนไพรรางจืดมีแนวโน้มลดลงเมื่ออายุของผลิตภัณฑ์เพิ่มขึ้น การตรวจสอบอายุของผลิตภัณฑ์เครื่องต้มสมุนไพรรางจืดในบรรจุภัณฑ์ทั้ง 3 ชนิด ซึ่งเก็บตู้เย็น 4 ± 1 °C ที่บดแสง พบว่าในระยะเวลา 14 วัน ผลิตภัณฑ์ยังคงมีคุณภาพ มีปริมาณจุลินทรีย์ปนเปื้อนอยู่เกณฑ์มาตรฐานเครื่องต้มในภาชนะบรรจุที่ปิดสนิท และมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระลดลงจากวันผลิตเล็กน้อยประมาณ 8 % ผลการทดลองครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าผลิตภัณฑ์เครื่องต้มสมุนไพรรางจืดในขวดปิดสนิท ซึ่งเตรียมโดยกระบวนการผลิตเครื่องต้มสมุนไพรระดับอุตสาหกรรมในครัวเรือน มีอายุของผลิตภัณฑ์ 14 วัน ภายใต้การเก็บรักษาที่ 4 ± 1 °C การศึกษาสารประกอบในเครื่องต้มสมุนไพรรางจืดและการเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระกับเครื่อง-

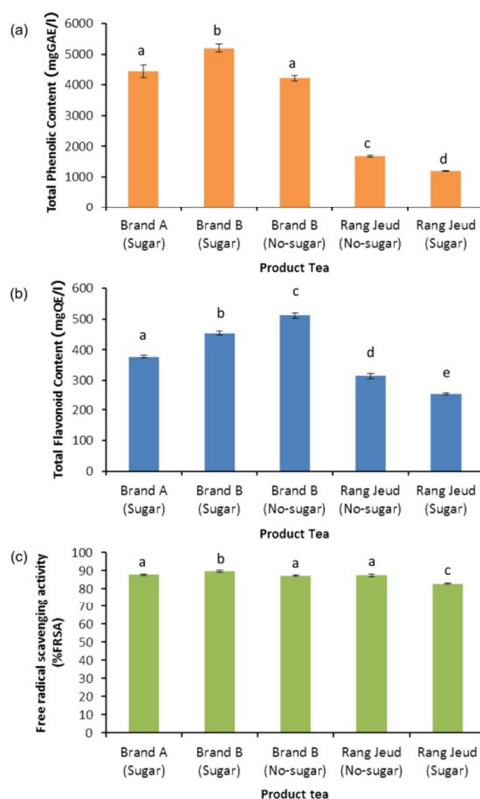


Figure 4 Antioxidant properties of herbal beverage from *T. laurifolia* and commercial green tea, formulas of with sugar and no-sugar, (a) Total phenolic content, (b) Total flavonoid content and (c) Free radical scavenging activity. The results shown with different letters on the error bars are significantly different ($P < 0.01$, Scheffe's test). The data are giving as the means $\pm$ SD ($n = 3$).

ต้มชาเขียวที่ผลิตในระดับอุตสาหกรรม พบว่าเครื่องต้มสมุนไพรรางจืดอาจมีสารประกอบที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระหลายชนิดจึงทำให้มีสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระที่เทียบเคียงได้กับเครื่องต้มชาเขียว ซึ่งมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิก และสารประกอบ

ปลาไว้นอยดึในปริมาณที่สูงกว่า

การศึกษาครั้งนี้เป็นการเก็บผลิตภัณฑ์ไว้ในตู้เย็นที่บแสงจึงอาจทำให้บรรจุภัณฑ์ขวด PP ที่มีลักษณะขุ่น และขวดใส เช่น ขวด PET และขวดแก้ว ให้ผลของอายุผลิตภัณฑ์ที่ไม่แตกต่างกัน ซึ่งแสงอาจมีผลต่อผลิตภัณฑ์เครื่องดื่ม (Ashurst, 2009; Stöllman *et al.*, 1994; Berlinet *et al.*, 2007) จึงควรมีการศึกษาเพิ่มเติมถึงอายุของผลิตภัณฑ์ภายใต้สภาวะที่มีแสง และศึกษาการควบคุมคุณภาพของผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มสมุนไพร ร้างจัด โดยเฉพาะปัจจัยที่มีผลต่อฤทธิ์ของสารต้านอนุมูลอิสระในเครื่องดื่มชาสมุนไพร (Chan *et al.*, 2010) เช่น การปลูกและอายุในการเก็บเกี่ยว การคัดเลือกขนาดของใบร้างจัด การทำแห้งสมุนไพร (Chan *et al.*, 2012; Chan *et al.*, 2011) ระยะเวลา และสัดส่วนของน้ำที่ใช้ในการต้มสมุนไพร รวมถึงสัดส่วนของน้ำตาล เพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่ได้มาตรฐานและเป็นที่ยอมรับของผู้บริโภค และเนื่องจาก ร้างจัดถูกบรรจุในบรรจุภัณฑ์จากสมุนไพร จึงควรระบุนข้อควรระวังในฉลากของผลิตภัณฑ์ คือ “ไม่แนะนำให้ใช้ในผู้ที่สงสัยว่าเป็นไข้เลือดออก ควรระวังการใช้ในผู้ป่วยโรคเบาหวานเพราะอาจทำให้เกิดภาวะน้ำตาลในเลือดต่ำ ควรระวังการใช้ในผู้ป่วยที่ต้องใช้ยาอื่นอย่างต่อเนื่องเพราะร้างจัดอาจเร่งการขับยาเหล่านั้นออกจากร่างกาย ทำให้ประสิทธิภาพของยาลดลง”

5. กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ที่ได้จัดสรรงบประมาณแผ่นดิน ประจำปี พ.ศ. 2555 เลขที่สัญญา 005/2555 สนับสนุนงานวิจัย และขอขอบคุณ คุณอนันต์นัท ไชยยะธนภัทร์ ผู้ประกอบการเครื่องดื่มสมุนไพรที่กรุณาถ่ายทอดวิธีการเก็บสมุนไพรร้างจัด และวิธีการเตรียมเครื่องดื่มสมุนไพรร้างจัดที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้

6. เอกสารอ้างอิง

- Aritajat, S., Wutterapol, S. and Saenphet, K., 2004, Anti-diabetic effect of *Thunbergia laurifolia* Linn. aqueous extract, Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health 35: 53-57.
- Ashurst, P.R., 2009. Packaging and the Shelf Life of Water and Carbonated Drinks, in “Food packaging and shelf life”, pp.157-177, In Robertson, G.L. (Ed.), Food Packaging and Shelf Life: A Practical Guide, CRC Press, Boca Raton.
- Ayhan, Z., Yeom, W.H., Zhang, H.Q. and Min, B.D., 2001, Flavor, color, and vitamin C retention of pulsed electric field processed orange juice in different packaging materials, J. Agric. Food. Chem. 49: 669-674.
- Berlinet, C., Brat, P. and Ducruet, V., 2007, Quality of orange juice in barrier packaging material, Packag. Tech. Sci. 21: 279-286.
- Charumane, S., Vejabhikul, S., Taesotikul, T., Nelsingha, W., Sirisaard, P. and Leelapornpisit, P., 1998, Development of topical anti-inflammatory preparations from *Thunbergia laurifolia* Lindl., Research Report, Faculty of Pharmacy, Chiangmai University, Chiangmai.
- Chan, E.W.C., Lim, Y.Y., Chong, K.L., Tan, J.B.L. and Wong, S.K., 2010, Antioxidant properties of tropical and temperate herbal teas, J. Food Compos. Anal. 23: 185-189.

- Chan, E.W.C., Eng, S.Y., Tan, Y.P. and Wong, Z.C., 2011. Phytochemistry and pharmacological properties of *Thunbergia laurifolia*: A review, *Pharmacognosy J.* 3: 1-6.
- Chan, E.W.C., Lye, P.Y., Tan, L.N., Eng, S.Y., Tan, Y.P. and Wong, Z.C., 2012, Effect of drying method and particle size on the antioxidant properties of leaves and teas of *Morus alba*, *Lagerstroemia speciosa* and *Thunbergia laurifolia*, *CI & CEQ.* 18: 465-472.
- Chen, Q., Guo, Z. and Zhao, J., 2008, Identification of green tea's [*Camellia sinensis* (L.)] quality level according to measurement of main catechins and caffeine contents by HPLC and support vector classification pattern recognition, *J. Pharmaceut. Biomed. Anal.* 48: 1321-1325.
- Chivapat, S., Chavalittumrong, P., Attawish, A., Bansiddhi, J., Padungpat, S., 2009, Chronic toxicity of *Thunbergia laurifolia* Lindl. Extract, *J. Thai Tradit. Altern. Med.* 7: 17-24.
- Cotelle, N., Bernier, J.L., Catteau, J.P., Pommery, J., Wallet, J.C. and Gaydou, E.M., 1996, Antioxidant properties of hydroxyl-flavones, *Free Radic. Biol. Med.* 20: 35-43.
- Hitchins, A.D., Hartman, P.A. and Todd, E.C.D., 1992, Coliforms-*Escherichia coli* and Its Toxins, pp.325-369, *In* Vanderzantand, C., Splittstoesser, D.F. (Eds.), *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods*, 3rd Ed., American Public Health Association, Washington, D.C.
- Jayabalan, R., Marimuthu, S., Thangaraj, P., Sathishkumar, M., Binupriya, A.R., Swaminathan, K. and Binupriya, A.R., 2008, Preservation of Kombucha Tea – Effect of temperature on tea components and free radical scavenging properties, *J. Agric. Food. Chem.* 56: 9064-9071.
- Jiwajinda, S., Santisopasri, V., Murakami, A., Kim, O.K., Kim, H.W. and Ohigashi, H., 2002, Suppressive effects of edible Thai plants on superoxide and nitric oxid generation, *Asian Pac. J. Cancer Prev.* 3: 215-223.,
- Kanchanapoom, T., Kasai, R. and Yamasaki, K., 2002, Iridoidglucosides from *Thunbergia laurifolia*, *Phytochemistry* 60: 769-771.
- Lau, O.W. and Wong, S.K., 2000, Contamination in food from packaging material, *J. Chrom. A.* 882: 255-270.
- Li, N., Taylor, L.S., Ferruzzi, M.G. and Mauer, L.J., 2012, Kinetic study of catechin stability: Effect of pH, concentration, and temperature, *J. Agric. Food. Chem.* 60: 12531-12539.
- Mislivec, P.B., Beuchat, L.R. and Cousin, M.A., 1992, Yeasts and molds, pp.239-263, *In* Vanderzantand, C., Splittstoesser, D.F. (Eds.), *Compendium of methods for the microbiological examination of foods*, 3rd Ed., American Public Health Association, Washington, D.C.

- Oonsivilai, R., Cheng, C., Bomser, J., Ferruzzi, G.M. and Ningsanond, S., 2007, Phytochemical profiling and phase II enzyme-inducing properties of *Thunbergia laurifolia* Lindl. (RC) extracts, J. Ethnopharmacol. 114: 300-306.
- Oonsivilai, R., Ferruzzi, M.G. and Ningsanond, S., 2008, Antioxidant activity and cytotoxicity of Rang Chuet (*Thunbergia laurifolia* Lindl.) extracts, As. J. Food Ag-Ind. 1: 116-128.
- Peeler, J.T., Houghtby, G.A. and Rainosek, A.P., 1992, The most Probable Number Technique, pp. 105-120, In Vanderzantand C., Splittstoesser, D.F. (Eds.), Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods, 3rd Ed., American Public Health Association, Washington, D.C.
- Pramyothin, P., Chirdchupunsare, H., Rungsipipat, A. and Chaichantipyuth, C., 2005, Hepatoprotective activity of *Thunbergia laurifolia* Linn. extract in rats treated with ethanol: *In vitro* and *in vivo* studies, J. Ethnopharmacol. 102: 408-411.
- Ruangyuttikarn, W., Chattaviriya, P., Morkmek, N., Chuncharunee, S. and Lertprasertsake, N., 2013, *Thunbergia laurifolia* leaf extract mitigates cadmiu toxicity in rats, Sci. Asia. 39: 19-25.
- Stöllman, U., Johansson, F. and Leufven, A., 1994, Packaging and Food Quality, in "Shelf life evaluation of foods", pp. 52-71, Man, C.M.D. and Jones, A.A. (Eds.), Blackie Academic & Professional, Glasfow.
- Tangpong, J. and Satarug, S., 2010, Alleviation of lead poisoning in the brain with aqueous leaf extract of the *Thunbergia laurifolia* (Linn.), Toxicol. Lett. 198: 83-88.
- Thongsaard, W. and Marsden, C.A., 2002, A herbal medicine used in the treatment of addiction mimics the action of amphetamine on *in vitro* rat striatal dopamine release, Neurosci. Lett. 329: 129-132.
- Thongsaard, W., Marsden, C.A., Morris, P., Prior, M. and Shah, Y.B., 2005, Effect of *Thunbergia laurifolia*, a Thai natural product used to treat drug addiction, on cerebral activity detected by functional magnetic resonance imaging in the rat, Psychopharmacology 180: 752-760.
- Usanawarong, S., Thesiri, T., Mahakunakorn, P. and Parasupattana, S., 2000, Effect of *Thunbergia laurifolia* Linn. on detoxification of paraquat, KKU Res. J. 5: 11-17. (In Thai)
- Yoo, K.M., Lee, C.H., Lee, H., Moon, B. and Lee, C.Y., 2008, Relative antioxidant and cytoprotective activities of common herbs, Food Chem. 106: 929-936.
- Zuo, Y., Chen, H. and Deng, Y., 2002, Simultaneous determination of catechin, caffeineandgallic acids in green, Oolong, black and pu-erh teas using HPLC with a photodiode array detector, Talanta 57: 307-316.