Research Article

Received: June 2, 2018; Accepted: June 13, 2018

ผลของระยะเวลาการเก็บเกี่ยวต่อฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและปริมาณสารเอเซียติโคไซด์ในระบบปลูกแบบอินทรีย์และเคมีของบัวบก

Effect of Harvesting Time on Antioxidant Activity and Asiaticoside Content of Asiatic Penny Wort [*Centella asiatica* (Linn.) Urban] under Organic and Chemical Agricultural System

ภาวิณี อารีศรีสม*, นรินทร์ ท้าวแก่นจันทร์, เทิดศักดิ์ โทณลักษณ์,
กอบลาภ อารีศรีสม และสัตยา มั่นคง

สาขาวิทยาการสมุนไพร คณะผลิตกรรมการเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้
ตำบลหนองหาร อำเภอสันทราย จังหวัดเชียงใหม่ 50290

Pawinee Areesrisom*, Narin Toakaenchan, Therdsak Thonnalak,
Koblap Areesrisom and Sattaya Mankong

Department of Medicinal Plant Science, Faculty of Agricultural Production, Maejo University,
Nong Han, San Sai, Chiang Mai, 50290

บทคัดย่อ

บัวบกเป็นพืชสมุนไพรชนิดหนึ่งที่รู้จักกันแพร่หลาย นิยมนำมาบริโภคและแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์หลากชนิด อุดมไปด้วยสารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและสารเอเซียติโคไซด์ที่มีฤทธิ์ในการรักษาโรคต่าง ๆ มากมาย แต่ยังไม่มีการศึกษาถึงอิทธิพลของระยะเวลาเก็บเกี่ยวและชนิดของปุ๋ยต่อสารทุติยภูมิและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของพืชชนิดนี้มากนัก ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาอิทธิพลของระยะเวลาเก็บเกี่ยว (4, 6, 8, 10 และ 12 สัปดาห์) และผลของระบบปลูกแบบอินทรีย์และเคมีต่อฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและปริมาณสารเอเซียติโคไซด์ของบัวบก งานวิจัยนี้ได้วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (CRD) จากการทดลองพบว่าที่ระยะเวลาการเก็บเกี่ยวผลผลิตที่ 4 สัปดาห์ บัวบกมีปริมาณสารเอเซียติโคไซด์ สารประกอบฟีนอลิกรวมทั้งหมด และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุด ในขณะที่ชนิดของปุ๋ยไม่ส่งผลต่อปริมาณสารเอเซียติโคไซด์ สารประกอบฟีนอลิกรวมทั้งหมด และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในบัวบกอย่างมีนัยสำคัญ

คำสำคัญ : บัวบก; เอเซียติโคไซด์; ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ; ปุ๋ยอินทรีย์; ปุ๋ยเคมี

***ผู้รับผิดชอบบทความ :** areesrisom30@gmail.com
doi: 10.14456/tstj.2019.71

Abstract

Asiatic Penny Wort [*Centella asiatica* (Linn.) Urban] is well-known herb used to be consumed and processed into a variety of products. It is rich in antioxidant activity and asiaticoside that has been used for many disease treatments. Up to date, there has been no report on the response of secondary metabolites and antioxidant activity of this plant under different harvesting time and fertilizer. Therefore, this research aimed to investigate the influence of different harvesting times (4, 6, 8, 10 and 12 week) and the effects of organic and chemical agricultural systems on antioxidant activity and asiaticoside content of Asiatic Penny Wort. The experiment was conducted by using complete randomized design (CRD). The results revealed that the highest level of asiaticoside, total phenolic contents and antioxidant capacity were obtained in 4 week harvested plants, whereas the type of fertilizer showed not significantly different on asiaticoside, total phenolic contents and antioxidant activity in Asiatic Penny Wort.

Keywords: *Centella asiatica*; asiaticoside; antioxidant activity; organic fertilizer; chemical fertilizer

1. บทนำ

บัวบก [*Centella asiatica* (Linn.) Urban.] เป็นพืชผักสมุนไพรในเขตร้อน ชอบขึ้นในพื้นที่ชื้น แต่ไม่แฉะมากหรือน้ำท่วมขัง ขยายพันธุ์โดยการเพาะเมล็ด หรือตัดแยกไหลที่มีต้นอ่อนและราก พบมากในประเทศแถบยุโรปเรื่อยมาจนถึงแอฟริกาใต้ อินเดีย ปากีสถาน และศรีลังกา [1] บัวบกเป็นหนึ่งในพืชสมุนไพรในงานสาธารณสุขมูลฐาน และเป็นตัวยาที่ใช้ในตำรับอายุรเวท นิยมรับประทานสดเป็นผักเครื่องเคียงกับอาหารต่าง ๆ และนำมาแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ เช่น น้ำบัวบก ชาบัวบก บัวบกแคปซูล บัวบกมีรสขมเฝื่อน แก้เมื่อยขัด แก้ถ่ายท้อง เป็นยาอายุวัฒนะ แก้ปัสสาวะขัด แก้ฝี แก้บวม แก้เจ็บคอ สมานแผล [2] ในบัวบกพบสารที่มีคุณค่าทางโภชนาการหลายชนิด เช่น แคลเซียม ฟอสฟอรัส เหล็ก วิตามินเอ วิตามินอี วิตามินซี และกรดอะมิโนต่าง ๆ จึงถือได้ว่าเป็นพืชสมุนไพรที่มีประโยชน์ต่อร่างกายอย่างยิ่ง นอกจากนี้ในบัวบกยังมีองค์ประกอบทางเคมีสำคัญที่แสดงสมบัติการต้านอนุมูลอิสระ ได้แก่ สารกลุ่มไตรเทอปินอยด์ไกลโคไซด์ (triterpenoid glycoside) เช่น กรดเอเซียติก (asiatic acid) กรดมาเดคาสสิก (madecassic acid) มาเดคาสโซไซด์ (madecassoside) เอเซียติโคไซด์ (asiaticoside) [3] มีหลายงานวิจัยที่พิสูจน์ได้ว่าสารต้านอนุมูลอิสระมีบทบาทสำคัญในการลดความเสี่ยงจากการเกิดโรคต่าง ๆ เช่น โรคมะเร็ง โรคหัวใจ [4] ซึ่งสารต้านอนุมูลอิสระส่วนใหญ่พบในพืช ผัก และผลไม้ที่มีสารประกอบประเภทฟีนอลเป็นองค์ประกอบ [5] มีรายงานว่าปริมาณสารประกอบฟีนอลิกที่พบในผักและผลไม้มีความสัมพันธ์กับความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ [6] ซึ่งปริมาณของสารเหล่านี้ใช้เป็นตัวบ่งชี้ถึงคุณภาพของใบบัวบก [7] สารสำคัญที่สกัดได้มากที่สุดในใบบัวบก คือ สารเอเชียติโคไซค์ ซึ่งเป็นสารที่มีการนำมาใช้ประโยชน์ทางด้านเภสัชวิทยาอย่างแพร่หลาย มีฤทธิ์ในการรักษาโรคต่าง ๆ ได้แก่ แผลเปื่อย โรคเรื้อน สมานแผล ต้านการอักเสบ เป็นต้น [8]

การจัดประชุมร่วมกันระหว่างกรมส่งเสริมการเกษตร กระทรวงสาธารณสุข และภาคเอกชน เพื่อวิเคราะห์และคัดเลือกพืชสมุนไพรที่ขาดแคลน พบว่า

บัวบกเป็นหนึ่งใน 31 สมุนไพรไทย ที่หายากและขาดแคลน ต้องเร่งส่งเสริมและกระจายพันธุ์ [9] แต่การที่สมุนไพรจะก้าวสู่ตลาดโลกได้นั้น ต้องขึ้นอยู่กับคุณภาพของสมุนไพรชนิดนั้น ๆ เป็นหลัก ซึ่งต้องประกอบด้วยสิ่งสำคัญ คือ ปริมาณสารสำคัญในสมุนไพรต้องมีมากที่สุด และวัตถุดิบสมุนไพรจะต้องปลอดจากสารเคมีที่ปนเปื้อน ซึ่งปัจจัยสำคัญที่ช่วยเพิ่มผลผลิตให้แก่บัวบกได้เป็นอย่างมาก คือ การใส่ปุ๋ย โดยชนิดและอัตราปุ๋ยที่ใส่มีผลต่อการเจริญเติบโตและผลผลิตของบัวบกเป็นอย่างมาก เช่น จากการศึกษาของ บุษบา และรักเกียรติ พบว่าการให้ปุ๋ยทำให้อัตราการเจริญเติบโตของบัวบกเพิ่มขึ้น โดยการให้ปุ๋ยอินทรีย์ คือ ปุ๋ยมูลไก่ผสมแกลบก่อนปลูกและหลังย้ายปลูก 1 เดือน ทำให้บัวบกมีการเจริญเติบโตทางลำต้นสูงที่สุด แต่ปริมาณสารเอเชียติโคไซค์ในส่วนของแผ่นใบบัวบกสูงที่สุดเมื่อให้ปุ๋ยอินทรีย์ร่วมกับปุ๋ยเคมี [10] นอกจากนี้มีรายงานการศึกษาถึงอิทธิพลของการใช้ปุ๋ยอินทรีย์น้ำหมักและปุ๋ยเคมีต่อการเจริญเติบโต ผลผลิต และปริมาณสารสำคัญในบัวบกที่ปลูกในประเทศมาเลเซีย พบว่าการใช้ปุ๋ยอินทรีย์น้ำหมักความเข้มข้น 50 % ปริมาณ 1 ลิตร ร่วมกับปุ๋ยเคมี 50 % ของอัตราแนะนำ ช่วยทำให้บัวบกมีการเจริญเติบโตทางลำต้นสูงสุดอย่างมีนัยสำคัญ และทำให้มีปริมาณสารเอเชียติโคไซค์ มาเดคาสโซไซด์ และกรดเอเชียติก ในส่วนของใบ ก้านใบและราก มีค่าสูงสุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติอีกด้วย [11] อย่างไรก็ตาม ข้อมูลด้านเกษตรกรรมที่มีผลต่อสารสำคัญในบัวบกยังมีการศึกษาไม่มากนัก เพื่อเป็นแนวทางสำหรับเกษตรกรและผู้ประกอบการสำหรับใช้ในการผลิตบัวบกให้มีคุณภาพและได้มาตรฐาน มีปริมาณสารสำคัญสูง และปลอดภัยจากสารเคมีปนเปื้อน และเนื่องจากยังไม่มีงานวิจัยการใช้ปุ๋ยมูลวัวในบัวบก ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงศึกษาการใช้ปุ๋ยอินทรีย์ (ปุ๋ยมูลวัว) และปุ๋ยเคมีที่มีผลต่อปริมาณสารเอเชียติโคไซด์และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของบัวบก ซึ่งสามารถใช้เป็นแนวทางในการผลิตบัวบกที่มีคุณภาพและมีสารสำคัญสูง เป็นที่ยอมรับของผู้บริโภคสำหรับการแข่งขันในตลาดโลก รวมทั้งสามารถนำมาใช้แปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์ด้านสุขภาพ อาหาร ความงาม หรือด้านอื่น ๆ เพื่อการพึ่งพาตนเองได้ต่อไป

2. อุปกรณ์และวิธีการ

2.1 การวางแผนการทดลองปลูก

การทดลองครั้งนี้ได้ดำเนินการทดลองที่สาขาวิทยาการสมุนไพร คณะผลิตกรรมการเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้ วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (complete randomized design, CRD) ประกอบด้วย 4 สิ่งทดลอง ได้แก่ ไม่ให้ปุ๋ย ปุ๋ยมูลวัว 10 กรัมต่อต้น ปุ๋ยเคมี (สูตร 15-15-15) 5 กรัมต่อต้น และ ปุ๋ยมูลวัวผสมกับปุ๋ยเคมีในอัตราส่วน 5:2.5 กรัมต่อต้น สิ่งทดลองละ 3 ซ้ำ ซ้ำละ 40 ต้น โดยปลูกบัวบกในพื้นที่แปลงปลูกขนาด 1×1.5 เมตร จำนวน 12 แปลง โดยใช้หน่อของต้นบัวบกที่ผ่านการอนุบาลจากส่วนไหลของต้นบัวบกในถุงพลาสติกสีดำขนาด 2 นิ้ว เป็นระยะเวลา 1 เดือน ปลูกให้มีระยะห่าง 15×15 เซนติเมตร และให้ปุ๋ยทุก 1 สัปดาห์ ตลอดอายุการทดลอง ดูแลรักษาต้นบัวบกโดยควบคุมการให้น้ำ และกำจัดศัตรูพืชอย่างสม่ำเสมอ แล้วเก็บเกี่ยวบัวบกในส่วนของใบและก้านใบหลังจากปลูกครบระยะเวลา 4, 6, 8, 10 และ 12 สัปดาห์ ตามลำดับ เพื่อนำไปวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและปริมาณสารเอเชียติโคไซด์ต่อไป

2.2 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

การทดสอบสมบัติการต้านอนุมูลอิสระในบัวบกประกอบด้วย 3 วิธี คือ การหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (total phenolic content) ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH (DPPH radical

scavenging assay) และวิธี ABTS (ABTS radical scavenging assay) โดยมีขั้นตอนดังนี้

2.2.1 การเตรียมสารสกัดจากใบบัวบก

ชั่งตัวอย่างใบบัวบกที่ผ่านการหั่นเป็นชิ้นเล็ก ๆ และอบแห้งที่อุณหภูมิ 45 °C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง มา 9.0 กรัม สกัดตัวอย่างด้วยเมทานอล ปริมาตร 200 มิลลิลิตร โดยวิธีการสกัดแบบไหลย้อนกลับ (reflux) ใช้เวลาในการสกัดทั้งหมด 3 ชั่วโมง จากนั้นนำสารละลายที่สกัดได้มากรองและนำไประเหยให้แห้ง แล้วละลายสารสกัดหยาบด้วยเมทานอล ปริมาตร 25 มิลลิลิตร (360 มิลลิกรัมตัวอย่างต่อมิลลิลิตร) เก็บสารละลายที่ได้ไว้ในตู้เย็น เพื่อรอการวิเคราะห์ต่อไป

2.2.2 การหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด

การหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด ใช้วิธี Folin-Ciocalteu’s assay ซึ่งดัดแปลงมาจากงานวิจัยของ Namjooyan และคณะ [12] โดยปิเปตสารละลายตัวอย่างบัวบกที่สกัดได้มา 0.1 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลอง เติมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนตเข้มข้น 2.0 % (น้ำหนัก/ปริมาตร) ปริมาตร 2.0 มิลลิลิตร และสารละลาย Folin-Ciocalteu reagent ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ 30 นาที นำสารละลายที่เตรียมได้มาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร หาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดโดยเทียบกับกราฟมาตรฐานของกรดแกลลิก รายงานผลเป็นมิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อตัวอย่างน้ำหนักแห้ง 1 กรัม (mgGAE/g DW)

2.2.3 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

(1) การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH ดัดแปลงจากวิธีของ Singh และคณะ [13] โดยปิเปตสารละลายตัวอย่างที่ได้ 0.1 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลอง เติมสารละลาย DPPH เข้มข้น 0.1 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 2.9 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วตั้งทิ้งไว้ในที่มืด เป็นเวลา 30 นาที หลังจากนั้นจึงนำสารละลายที่เตรียมได้ มาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 515 นาโนเมตร ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (GENESYS 10S UV-VIS, Thermo Scientific) นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ของสารตัวอย่าง (As) มาคำนวณฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH เมื่อเปรียบเทียบกับค่าการดูดกลืนแสงของเมทานอลที่เป็นหลอดควบคุม (Ac) ซึ่งแสดงค่าร้อยละการยับยั้ง คำนวณได้จากสมการ % inhibition = [(Ac-As) ÷ Ac] x 100

(2) การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS ดัดแปลงจากวิธีของ Thaipong และคณะ [14] โดยเตรียมสารละลาย ABTS เข้มข้น 7 มิลลิโมลาร์ และสารละลาย potassium persulphate เข้มข้น 2.45 มิลลิโมลาร์ ผสมสารละลาย ABTS กับสารละลาย potassium persulphate ในอัตราส่วน 1:1 ตั้งทิ้งไว้ในอุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 20 ชั่วโมงก่อนนำไปใช้ หลังจากนั้นเจือจางด้วยเมทานอลในอัตราส่วน 1:60 จะได้สารละลาย $ABTS^{\bullet+}$

ปิเปตสารละลายสารสกัดตัวอย่างความเข้มข้น 360 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มา 0.1 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลอง เติมสารละลาย $ABTS^{\bullet+}$ ปริมาตร 2.0 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ในที่มืดเป็นเวลา 6 นาที หลังจากนั้นนำสารละลายที่เตรียมได้มาวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ของสารตัวอย่าง (As) มาคำนวณฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ABTS เมื่อเปรียบเทียบกับค่าการดูดกลืนแสงของเมทานอลที่เป็นหลอดควบคุม (Ac) ซึ่งแสดงค่าร้อยละการยับยั้ง คำนวณได้จากสมการ % inhibition = [(Ac-As) ÷ Ac] x 100

2.3 การทดสอบปริมาณสารเอเซียติโคไซด์

การวิเคราะห์หาปริมาณสารเอเชียติโคไซด์ ดัดแปลงจากงานวิจัยของ Rafamantanana และคณะ [15] โดยนำตัวอย่างบัวบกในส่วนของใบและก้านใบที่เก็บได้มาอบแห้งที่อุณหภูมิ 45 °C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง หลังจากนั้นบดให้ละเอียด และชั่งตัวอย่างที่ได้มา 3.0 กรัม สกัดแบบซอกห์เลต (soxhlet extraction) ด้วยสารละลายเมทานอลปริมาตร 100 มิลลิลิตร เป็นเวลา 4 ชั่วโมง แล้วนำสารละลายที่สกัดได้ระเหยจนแห้ง จากนั้นละลายและปรับปริมาตรด้วยเมทานอลปริมาตร 50 มิลลิลิตร

นำสารละลายตัวอย่างที่เตรียมได้ไปวิเคราะห์ปริมาณเอเชียติโคไซด์ด้วยเครื่อง HPLC (high performance liquid chromatography) โดยใช้คอลัมน์ชนิด C_{18} (250 x 4.6 มิลลิเมตร, 5 ไมโครเมตร) เฟสเคลื่อนที่ประกอบด้วยอะซีโตไนไตรล์และเมทานอลในสัดส่วน 80 : 20 (ปริมาตร/ปริมาตร) ที่อัตราการไหลเท่ากับ 1.0 มิลลิลิตร/นาที ตรวจวัดสัญญาณของเอเชียติโคไซด์ที่ความยาวคลื่น 206 นาโนเมตร นำพื้นที่ใต้กราฟของสารสกัดตัวอย่างบัวบกมาคำนวณหาปริมาณเอเชียติโคไซด์เทียบกับสารมาตรฐานเอเชียติโคไซด์ในช่วงความเข้มข้น 10-500 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร รายงานปริมาณเอเชียติโคไซด์ในตัวอย่างใบบัวบกในหน่วย กรัมต่อ 100 กรัมน้ำหนักแห้ง (g/100 g DW)

2.4 การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

งานวิจัยนี้วิเคราะห์ผลการทดสอบโดยวิเคราะห์ความแปรปรวน (analysis of variance, ANOVA) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % และวิเคราะห์ความแตกต่างของเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's new multiple range test (DMRT)

3. ผลการวิจัยและวิจารณ์

3.1 ผลการหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด

หลังจากการปลูกบัวบกตามแผนการทดลองที่ออกแบบไว้แล้ว เมื่อเก็บเกี่ยวบัวบกที่ระยะเวลาต่าง ๆ เพื่อนำไปวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด ผลการทดสอบที่ได้พบว่าเมื่อเก็บเกี่ยวที่ระยะเวลาหลังปลูก 4, 6, 8, 10 และ 12 สัปดาห์ ให้ผลทดสอบทางสถิติที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % กล่าวคือ ที่ระยะเวลาเก็บเกี่ยว 4 สัปดาห์ บัวบกจะให้ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดสูงสุด แต่เมื่อพิจารณาชนิดปุ๋ยพบว่าไม่มีผลต่อปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด ดังแสดงในตารางที่ 1 ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยสารประกอบฟีนอลิกในพืชสมุนไพรชนิดอื่น ๆ เช่น ภาวิณี และคณะ [16] ที่ศึกษาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมของจิงจูฉ่ายเมื่อเก็บเกี่ยวที่ระยะ 30, 60 และ 90 วัน พบว่าปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมมีมากสุดเมื่อเก็บเกี่ยวจิงจูฉ่ายที่ระยะ 30 วัน และมีปริมาณลดลงไปเรื่อย ๆ ตามระยะเวลาการปลูกหรือระยะเก็บเกี่ยวที่เพิ่มขึ้น สอดคล้องกับ Blum-Silva และคณะ [17] ที่ศึกษาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกในใบของ *Ilex paraguariensis* ที่มีอายุ 1, 2 และ 3 เดือน พบว่าอายุใบมีผลต่อการลดลงของปริมาณสารประกอบฟีนอลิกอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ทำนองเดียวกับ Mutalib [18] ที่วิเคราะห์สารประกอบฟีนอลิกรวมในใบหญ้าเอ็นยืดที่ 2 ระยะการเจริญเติบโต พบว่าใบในระยะที่พืชเจริญทางต้นและใบ (vegetative period) มีสารประกอบฟีนอลิกรวมมากกว่าใบในระยะที่เจริญด้านการสืบพันธุ์ (generative period) เช่นเดียวกับการศึกษาของ Rugna และคณะ [19] ที่เปรียบเทียบปริมาณสารโพลีฟีนอลในใบอ่อนและใบแก่ของ *Smilax campestris* Griseb พบว่าใบอ่อนมีปริมาณสารโพลีฟีนอลสูงกว่าใบแก่ถึง 15 % ส่วน Chua และคณะ [20] รายงานว่าสารสกัดจากใบอ่อนของฟ้าทะลายโจรมีสารประกอบฟีนอลิกรวมมากกว่าสารสกัดจากใบแก่

3.2 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

หลังจากปลูกบัวบกโดยให้ได้รับปุ๋ยชนิดต่างกัน และเก็บเกี่ยวที่ระยะเวลาแตกต่างกันแล้ว นำตัวอย่างบัวบกมาทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธีการทำลายอนุมูลอิสระ DPPH (DPPH radical scavenging assay) ร่วมกับการฟอกสีอนุมูลอิสระ ABTS (ABTS radical cation decolorization assay) โดยวิธี DPPH เป็นการทดสอบทางเคมีด้วยสารที่มีสมบัติเป็นอนุมูลอิสระ ซึ่งในการทดลองจะใช้อนุมูลอิสระดีพีพีเอช ($DPPH^•$) ซึ่งเป็นสารสังเคราะห์ที่อยู่ในรูปอนุมูลอิสระที่คงตัวและมีสีม่วง สามารถดูดกลืนแสงได้สูงสุดที่ความยาวคลื่น 515 นาโนเมตร เมื่อ $DPPH^•$ ทำปฏิกิริยากับสารต้านอนุมูลอิสระ (AH) ที่ละลายด้วยเอทานอล (สารที่ให้อิเล็กตรอน) จะทำให้สีม่วงค่อย ๆ จางลงจนเป็นสีเหลือง โดยสามารถหาการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของสารตัวอย่างจากการคำนวณสีที่จางลงของการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH ดังสมการ $DPPH^• + AH \rightarrow DPPH\text{-}H + A^•$ ส่วนวิธี ABTS เป็นวิธีการวัดความสามารถในการฟอกสีอนุมูลอิสระเอบีทีเอส ($ABTS^{•+}$) ซึ่งเป็นสารสังเคราะห์ที่มีสีเขียวปนน้ำเงิน สามารถดูดกลืนแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร เมื่อ $ABTS^{•+}$ ทำปฏิกิริยากับสารตัวอย่างที่ละลายด้วยเอทานอลเจือจางจะทำให้สีจางลง จึงสามารถหาความเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของสารตัวอย่างได้จากการคำนวณสีที่จางลงของการยับยั้งอนุมูลอิสระ $ABTS^{•+}$ ดังสมการ $ABTS^{•+} + AH \rightarrow ABTS$ (สีจางลง) $+ A^•$ ซึ่งเห็นได้ว่าวิธีทั้ง 2 วิธี นี้มีความมีความจำเพาะที่แตกต่างกัน จึงเป็นที่นิยมใช้ทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในตัวอย่างร่วมกัน ทั้งนี้เพื่อให้ผลการทดสอบมีความว่องไว ถูกต้อง เที่ยงตรง และแม่นยำ [21]

การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH ของบัวบก เมื่อปลูกโดยให้ปุ๋ยต่างชนิดกันและเก็บเกี่ยวที่ระยะเวลาแตกต่างกัน จากผลการวิเคราะห์พบว่าฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH มีผลแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % โดยที่ระยะเวลาเก็บเกี่ยว 4 สัปดาห์ จะให้ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุด แต่ชนิดของปุ๋ยที่ให้แก่บัวบกไม่มีผลต่อฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH (ตารางที่ 1)

ส่วนการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS พบว่าบัวบกมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระอยู่ในช่วงร้อยละ 7-21 (ตารางที่ 1) ซึ่งให้ผลการทดสอบไปในทิศทางเดียวกันกับปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH โดยพบว่าระยะเวลาการเก็บเกี่ยวที่ 4 สัปดาห์ บัวบกมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ABTS สูงที่สุด แต่ในส่วนของชนิดของปุ๋ยนั้นพบว่าไม่มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ

การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และปริมาณสารเอเซียติโคไซด์ของบัวบก เมื่อปลูกโดยให้ปุ๋ยชนิดแตกต่างกันและเก็บเกี่ยวที่ระยะเวลาแตกต่างกัน พบว่าชนิดของปุ๋ยไม่มีผลต่อปริมาณสารดังกล่าวอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในขณะที่ระยะเวลาเก็บเกี่ยวให้ผลทดสอบทางสถิติที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ โดยบัวบกจะให้ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงสุดเมื่อเก็บเกี่ยวที่ระยะเวลา 4 สัปดาห์ ทั้งนี้อาจเนื่องจากสารประกอบฟีนอลิกในบัวบกอยู่ในกลุ่มของสารประกอบฟีนอล ซึ่งเป็นสารเมแทบอไลท์ทุติยภูมิ (secondary metabolite) ที่พืชสร้างขึ้น โดยที่ระยะเวลาปลูก 4 สัปดาห์ ยังเป็นช่วงเริ่มต้นของการเจริญเติบโต ซึ่งคาดว่าบัวบกสร้างสารประกอบฟีนอลขึ้นมาเพื่อเป็นการป้องกันต้นอ่อนและใบอ่อนจากโรคและแมลง หรือปัจจัยอื่น ๆ ที่อาจเข้ามาทำลายในช่วงแรกของการเจริญเติบโต ซึ่งปริมาณสารประกอบฟีนอลิกที่พบในผักและผลไม้มีความสัมพันธ์กับความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ [6] สอดคล้องกับงานวิจัยของ Brasileiro และคณะ [22] ที่ศึกษาผลของฤดูกาลและ

ระยะเวลาในการเก็บเกี่ยวต้น *Talinum triangulare* (Jacq.) Willd ต่อปริมาณสารประกอบฟีนอลและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ จากผลการทดลองพบว่าปริมาณสารประกอบฟีนอลและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมีค่ามากที่สุดที่ระยะเวลาการเก็บเกี่ยว 30 วัน และจะลดลงตามระยะเวลาในการเก็บเกี่ยว ทั้งที่ปลูกในฤดูหนาวและฤดูร้อน ทั้งนี้เนื่องจากปัจจัยที่ส่งผลต่อการผลิตสารต้านอนุมูลอิสระในพืชทั่ว ๆ ไป มีอยู่ด้วยกันหลายปัจจัย เช่น ระยะเวลาการเก็บเกี่ยว สายพันธุ์ และสภาพภูมิอากาศ [23]

3.3 ผลการทดสอบปริมาณสารเอเซียติโคไซด์

สำหรับผลการวิเคราะห์ปริมาณสารเอเซียติโคไซด์ เมื่อนำสารสกัดตัวอย่างบัวบกที่เตรียมได้ไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC พบว่าสารเอเซียติโคไซด์มี

ตารางที่ 1 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH และ ABTS ของบัวบกเมื่อได้รับปุ๋ยและเก็บเกี่ยวที่ระยะเวลาแตกต่างกัน

ระยะเก็บเกี่ยว (สัปดาห์)	ชนิดของปุ๋ย	สารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (mgGAE/ g DW)	ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH (ร้อยละการยับยั้ง)	ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ABTS (ร้อยละการยับยั้ง)
4	ไม่ใส่ปุ๋ย	928.22±115.99^{a}	9.25±0.62^{abc}	17.76±0.85^{a}
	ปุ๋ยมูลวัว	925.11±66.39^{a}	9.27±0.55^{ab}	19.12±1.13^{a}
	ปุ๋ยมูลวัวผสมปุ๋ยเคมี	907.94±118.21^{a}	9.26±0.63^{abc}	19.53±1.74^{a}
	ปุ๋ยเคมี	911.90±139.29^{a}	9.28±0.24^{a}	19.83±1.64^{a}
6	ไม่ใส่ปุ๋ย	544.62±74.89^{de}	9.23±0.24^{abcde}	16.25±1.43^{abc}
	ปุ๋ยมูลวัว	598.41±27.01^{de}	9.23±0.69^{abcd}	16.54±1.94^{ab}
	ปุ๋ยมูลวัวผสมปุ๋ยเคมี	610.32±111.36^{cde}	9.24±0.49^{abcd}	17.62±2.95^{a}
	ปุ๋ยเคมี	504.05±42.19^{f}	9.24±0.66^{abc}	16.98±1.00^{a}
8	ไม่ใส่ปุ๋ย	512.44±22.25^{f}	9.18±0.68^{bcdefg}	17.07±1.97^{defgh}
	ปุ๋ยมูลวัว	629.28±57.99^{bcde}	9.20±0.07^{abcdefg}	11.57±2.97^{defg}
	ปุ๋ยมูลวัวผสมปุ๋ยเคมี	565.43±40.45^{de}	9.22±0.25^{abcdef}	12.46±0.61^{def}
	ปุ๋ยเคมี	585.18±83.56^{de}	9.21±0.24^{abcdef}	13.19±2.31^{bcd}
10	ไม่ใส่ปุ๋ย	661.46±65.56^{bcde}	9.15±0.50^{defg}	11.28±2.07^{defgh}
	ปุ๋ยมูลวัว	646.03±121.03^{bcde}	9.16±0.27^{defg}	8.27±2.54^{fghi}
	ปุ๋ยมูลวัวผสมปุ๋ยเคมี	608.99±115.85^{de}	9.20±0.41^{abcdefg}	12.77±2.40^{cde}
	ปุ๋ยเคมี	700.71±83.51^{bcd}	9.18±0.46^{cdfeg}	10.76±2.32^{defghi}
12	ไม่ใส่ปุ๋ย	662.34±45.82^{bcde}	9.12±0.20^{g}	7.08±1.76^{i}
	ปุ๋ยมูลวัว	761.11±22.01^{bc}	9.13±0.43^{fg}	7.45±2.44^{hi}
	ปุ๋ยมูลวัวผสมปุ๋ยเคมี	620.46±44.61^{bcde}	9.17±0.41^{cdefg}	9.05±2.78^{efghi}
	ปุ๋ยเคมี	766.40±54.98^{b}	9.25±0.46^{efg}	7.95±1.63^{ghi}

ตัวเลขแสดงค่าเฉลี่ย 3 ซ้ำ ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน; $^{a, b, ..., i}$ มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ต่อชนิดของปุ๋ยที่ให้แก่บัวบก

ตารางที่ 2 ปริมาณสารเอเซียติโคไซด์ของบัวบกเมื่อได้รับปุ๋ยและเก็บเกี่ยวที่ระยะเวลาแตกต่างกัน

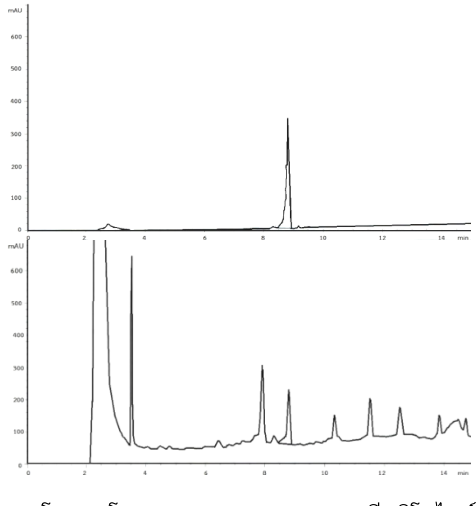
ระยะเก็บเกี่ยว (สัปดาห์)	ชนิดปุ๋ย	สารเอเซียติโคไซด์ (g/100 g DW)
4	ไม่ใส่ปุ๋ย	0.44±0.18^{ab}
	ปุ๋ยมูลวัว	0.50±0.03^{a}
	ปุ๋ยมูลวัวผสมปุ๋ยเคมี	0.43±0.07^{ab}
	ปุ๋ยเคมี	0.49±0.12^{a}
6	ไม่ใส่ปุ๋ย	0.37±0.10^{abc}
	ปุ๋ยมูลวัว	0.27±0.06^{bcde}
	ปุ๋ยมูลวัวผสมปุ๋ยเคมี	0.28±0.10^{bcd}
	ปุ๋ยเคมี	0.32±0.06^{bcd}
8	ไม่ใส่ปุ๋ย	0.26±0.12^{bcde}
	ปุ๋ยมูลวัว	0.25±0.05^{cde}
	ปุ๋ยมูลวัวผสมปุ๋ยเคมี	0.16±0.05^{def}
	ปุ๋ยเคมี	0.27±0.05^{bcde}
10	ไม่ใส่ปุ๋ย	0.30±0.09^{bcd}
	ปุ๋ยมูลวัว	0.17±0.08^{def}
	ปุ๋ยมูลวัวผสมปุ๋ยเคมี	0.21±0.04^{cdef}
	ปุ๋ยเคมี	0.16±0.03^{dfe}
12	ไม่ใส่ปุ๋ย	0.28±0.14^{bcd}
	ปุ๋ยมูลวัว	0.10±0.01^{ef}
	ปุ๋ยมูลวัวผสมปุ๋ยเคมี	0.07±0.01^{f}
	ปุ๋ยเคมี	0.20±0.06^{cdef}

ตัวเลขแสดงค่าเฉลี่ย 3 ซ้ำ ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน; $^{a, b, ..., f}$ มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ต่อชนิดของปุ๋ยที่ให้แก่บัวบก

ค่า retention time (RT) เท่ากับ 8.8 นาที เมื่อเปรียบเทียบกับสารมาตรฐานเอเซียติโคไซด์ ดังแสดงในรูปที่ 1 จากผลการทดสอบที่ระยะการเก็บเกี่ยวต่าง ๆ พบว่าบัวบกมีปริมาณสารเอเซียติโคไซด์ลดลงตามระยะเวลาเก็บเกี่ยวและมีปริมาณอยู่ในช่วง 0.07-0.50 g/100 g DW (ตารางที่ 2) โดยที่ระยะเวลาเก็บเกี่ยวหลังปลูก 4 สัปดาห์ บัวบกมีปริมาณสารเอเซียติโคไซด์มากที่สุดเท่ากับ 0.50 g/100 g DW เมื่อให้ปุ๋ยมูลวัว และรองลงมาเมื่อให้ปุ๋ยเคมี โดยมีปริมาณสารเอเซียติโคไซด์เท่ากับ 0.49 g/100 g DW แต่ชนิดของปุ๋ยไม่มีผลต่อปริมาณสารเอเซียติโคไซด์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ จิรพันธ์ [5] ที่ศึกษาปริมาณสารเอเซียติโคไซด์ในบัวบกที่มีอายุใบ 7, 18, 21 และ 28 วัน พบว่าใบบัวบกอายุ 28 วัน (4 สัปดาห์) มีปริมาณสารดังกล่าวมากที่สุด แต่งานวิจัยดังกล่าวไม่ได้ศึกษาใบบัวบกในช่วงอายุที่มากกว่านี้ ซึ่งโดยปกติทั่วไปเกษตรกรจะเก็บเกี่ยวบัวบกที่อายุ 60-90 วัน ในขณะที่ บุษบา และรักเกียรติ [10] วิเคราะห์ปริมาณสารเอเซียติโคไซด์ในบัวบกที่อายุ 12 สัปดาห์ หลังย้ายปลูก พบว่าบัวบกที่ได้รับปุ๋ยที่แตกต่างกันมีปริมาณสารเอเซียติโคไซด์แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยบัวบกที่ได้รับปุ๋ยอินทรีย์ร่วมกับปุ๋ยเคมีมีปริมาณสารเอเซียติโคไซด์สูงที่สุด รองลงมา คือ ปุ๋ยเคมี ส่วนบัวบกที่ใส่ปุ๋ยอินทรีย์และไม่มีการใส่ปุ๋ยมีปริมาณสารเอเซียติโคไซด์ต่ำที่สุด

ก

ข



รูปที่ 1 โครมาโทแกรมสารมาตรฐานเอเซียติโคไซด์ (ก) และสารสกัดตัวอย่างบัวบก (ข)

ผลการวิจัยครั้งนี้พบว่าปริมาณสารเอเซียติโคไซด์มีผลไปในทิศทางเดียวกันกับสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเมื่อตรวจสอบด้วยวิธี DPPH และ ABTS คือ มีปริมาณลดลงตามระยะการเก็บเกี่ยวที่เพิ่มขึ้น ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับงานวิจัยอื่น ๆ ซึ่งรายงานว่าพืชในระยะเก็บเกี่ยวที่มีสารทุติยภูมิสูงจะมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH สูงตามไปด้วย ได้แก่ ดอกตูมของดอกพระจันทร์ [24] กลีบเลี้ยงกระเจี๊ยบแดง [25] ใบเก๋ากี้ [26] เป็นต้น

4. สรุป

งานวิจัยนี้ได้ศึกษาอิทธิพลของระยะเวลาเก็บเกี่ยวผลผลิตที่ 4, 6, 8, 10 และ 12 สัปดาห์ และระบบปลูกที่เปรียบเทียบแบบอินทรีย์และแบบเคมีต่อปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมและสมบัติการต้านอนุมูลอิสระของบัวบกด้วยวิธี DPPH และ ABTS และปริมาณสารเอเซียติโคไซด์ ผลการทดลองพบว่าทั้งสมบัติการต้านอนุมูลอิสระและปริมาณสารเอเซียติโคไซด์ในบัวบกจะมีค่ามากสุดเมื่อเก็บเกี่ยวที่ระยะเวลา 4 สัปดาห์ คือ ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมมีค่าอยู่ในช่วง 907.94-928.22 mgGAE/g DW ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH อยู่ในช่วงร้อยละ 9.25-9.28 ส่วนฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ABTS อยู่ในช่วงร้อยละ 17.76-19.83 และให้ปริมาณสารเอเซียติโคไซด์อยู่ในช่วง 0.43-0.50 g/100 g DW ในขณะที่ชนิดของปุ๋ยไม่ส่งผลต่อปริมาณสารเอเซียติโคไซด์และสมบัติการต้านอนุมูลอิสระของบัวบก

5. กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงได้โดยได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากสำนักวิจัยและส่งเสริมวิชาการการเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้ ขอขอบคุณสาขาวิชาวิทยาการสมุนไพร คณะผลิตกรรมเกษตรมหาวิทยาลัยแม่โจ้ ที่ให้ความอนุเคราะห์สถานที่และอำนวยความสะดวกในด้านอุปกรณ์และสารเคมีตลอดการทดลอง จนทำให้งานทดลองสำเร็จอย่างสมบูรณ์

6. รายการอ้างอิง

[1] Kirtikar, K.R. and Basu, B.D., 1987, Indian medicinal plants, 2nd Ed., Bishen Singh Mahendra Pal Singh, Dehra Dun.

[2] คณะอนุกรรมการจัดทำตำราอ้างอิงยาสมุนไพรไทย, 2554, ตำราอ้างอิงสมุนไพรไทย : บัวบก, ว.การแพทย์แผนไทยและแพทย์ทางเลือก 9: 57-61.

[3] จันทรพร ทองเอกแก้ว, 2556, บัวบก: สมุนไพรมากคุณประโยชน์, ว.วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี. 15(3): 70-75.

[4] Chew, Y.L., Lim, Y.Y., Omar, M. and Khoo, K.S., 2008, Antioxidant activity of three edible seaweeds from two areas in South East Asia, J. Food Sci. Technol. 41: 1067-1072.

[5] นวลศรี รักอริยะธรรม และอัญชนา เจนวิถีสุข, 2545, แอนติออกซิเดนท์ : สารต้านมะเร็งในผัก-สมุนไพรไทย, นพบุรีการพิมพ์, เชียงใหม่, 281 น.

[6] Daduang, J., Vichitphan, S., Daduang, S., Hongsprabhas, P. and Boonsiri, P., 2011, High phenolics and antioxidants of some tropical vegetables related to anti bacterial and anticancer activities, Afr. J. Pharm. Pharmacol. 5: 608-615.

[7] Hashim, P., 2011, *Centella asiatica* in food and beverage applications and its potential antioxidant and neuroprotective effect, Int. Food Res. J. 18: 1215-1222.

[8] จิรพันธ์ ศรีทองกุล, 2553, อิทธิพลความแก่ใบ ความเข้มแสง และอุณหภูมิต่อการเปลี่ยนแปลงปริมาณสารเอเชียติโคไซด์และคุณภาพบัวบก [*Centella asiatica* (L.) Urban], วิทยานิพนธ์ปริญญาเอก, มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี, กรุงเทพฯ, 99 น.

[9] กลุ่มเผยแพร่และประชาสัมพันธ์, 2556, 31 สมุนไพรไทยที่หายากและขาดแคลน ต้องเร่งส่งเสริมและกระจายพันธุ์, ข่าวนโยบายที่ 91/2556, ส่วนส่งเสริมและเผยแพร่ สำนักพัฒนาการถ่ายทอดเทคโนโลยี กรมส่งเสริมการเกษตร, กรุงเทพฯ.

[10] บุษบา บัวคำ และรักเกียรติ แสนประเสริฐ, 2560, การเปรียบเทียบการเจริญเติบโตและผลผลิตบัวบก [*Centella asiatica* (L.) Urb.] ที่ปลูกโดยใช้ปุ๋ยเคมีและปุ๋ยอินทรีย์, ว.วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี 19(1): 101-110.

[11] Siddiqui, Y., Islam, T.M., Naidu, Y. and Meon, S., 2011, The conjunctive use of compost tea and inorganic fertilizer on the growth, yield and terpenoid content of *Centella asiatica* (L.) Urban, Sci. Hortic. 130: 289-295.

[12] Namjooyan, F., Azmi, M.E. and Rahmanian, V.R., 2010, Investigation of antioxidant activity and total phenolic content of various fractions of aerial parts of *Pimpinella Barbata* (DC.) Boiss, Jundishapur J. Nat. Pharm. Prod. 5: 1-5.

[13] Singh, R.P., Chidambara, K.N. and Jayaprakasha, G.K., 2002, Studies on the activity of pomegranate (*Punica granatum)* peel and seed extracts using in vitro models, J. Agric. Food Chem. 50: 81-86.

[14] Thaipong, K., Boonprakob, U., Crosby, K., Zevallos, L.C. and Byrne, D.H., 2006, Comparision of ABTS, DPPH, FRAP and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts, J. Food Compost. Anal. 19: 669-675.

[15] Rafamantanana, M.H., Rozet, E., Raoelison, G.E., Cheuk, K., Ratsimamang, S.U., Hubert, Ph. and Quetin-Leclercq, J., 2009, An improved HPLC-UV method for the simultaneous quantification of triterpenic glycosides and aglycones in leaves of *Centella asiatica* (L.) Urb (APIACEAE), J. Chromatogr. B 877:2396-2402.

[16] ภาวิณี อารีศรีสม, นรินทร์ ท้าวแก่นจันทร์, วารินสุทนต์, เทิดศักดิ์ โทณลักษณ์ และกอบลาภ อารีศรีสม, 2560, ผลของระยะเวลาเก็บเกี่ยวต่อการเจริญเติบโตและปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมของจิงจูฉ่าย, รายงานการประชุมวิชาการประจำปี 2560, มหาวิทยาลัยแม่โจ้, เชียงใหม่.

[17] Blum-Silva, C.H., Chaves, V.C., Schenkel, E.P., Coelho, G.C. and Reginatto, F.H., 2015, The influence of leaf age on methylxanthines, total phenolic content, and free radical scavenging capacity of Ilex paraguariensis aqueous extracts, Rev. Bras. Farmacogn. 25: 1-6.

[18] Mutalib., L.Y., 2015, effect of growth age period on biochemical composition of *plantago major* plant, Int. J. Cur. Res. Rev.

7: 6-10.

[19] Rugna, A.Z., Ricco, R.A., Gurni, A. and Wagner, M.L., 2008, Variation in leaves polyphenol content in *Smilax campestris* Griseb. -Smilacaceae-according to their development, Lat. Am. J. Pharm. 27: 247-249.

[20] Chua, L.S., Yap, K.C. and Jaganath, I.B., 2013, Comparison of total phenolic content, scavenging activity and HPLC-ESI-MS/MS profiles of both young and mature leaves and stems of *Andrographis paniculata*, Nat. Prod. Commun. 8: 1725-1729.

[21] บุหรัน พันธุ์สวรรค์, 2556, อนุมูลอิสระ สารต้านอนุมูลอิสระ และการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ, ว.วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 21(3): 275-286.

[22] Brasileiro, B.G., Leite, J.P.V., Casali, V.W.D., Pizziolo, V.R. and Coelho, O.G.L., 2015, The influence of planting and harvesting times on the total phenolic content and antioxidant activity of *Talinum triangulare* (Jacq.) Willd, Acta Sci. Agron. 37: 249-255.

[23] Gao, C.Y., Lu, Y.H., Tian, C.R., Xu, J.C., Guo, X.P., Zhou, R. and Hao., G., 2011, Main nutrients, phenolics, antioxidant activity, DNA damage protective effect and microstructure of *Sphallerocarpus gracilis* root at different harvest time, Food Chem. 127: 615-622.

[24] ภาณุมาศ ฤทธิไชย, ปิยาภัทร์ เข็มวิชัย, เยาวพา จิระเกียรติกุล และนภาพร ยังวิเศษ, 2558, การพัฒนาของดอกและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในดอกพระจันทร์ (*Ipomoea alba* L.), ว.วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 23(3): 497-509.

[25] Rahaman, C.H. and Pal, K., 2015, Phytoche mical and antioxidant studies of *Hibiscus sabdariffa* L. – an ethnomedicinal plant, Indo Am. J. Pharm. Res. 5: 1454-1462.

[26] Liu, S.C., Lin, J.T., Hu, C.C., Shen, B.Y., Chen, T.Y., Chang, Y.L., Shin, C.H. and Yang, D.J., 2017, Phenolic compositions and antioxidant attributes of leaves and stems from three inbred varieties of *Lycium chinense* Miller harvested at various times, Food Chem. 215: 284-291.