ผลของอุณหภูมิที่มีต่อปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารสกัดหยาบใบสารภีน้ำ

ณพัฐอร บัวฉุน[1*]

[1]คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏวไลยอลงกรณ์ ในพระบรมราชูปถัมภ์ จังหวัดปทุมธานี
*napattaorn@vru.ac.th

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงคเพื่อศึกษาผลของอุณหภูมิที่มีต่อปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารสกัดหยาบใบสารภีน้ำ โดยทำการอบใบสารภีน้ำที่อุณหภูมิ 3 ระดับ คือ 45 65 และ 85 องศาเซลเซียส จนน้ำหนักคงที่ นำตัวอย่างไปบดให้ละเอียดแช่ในตัวทำละลายเอทานอลนาน 7 วัน กรอง และระเหยตัวทำละลายให้แห้งจะได้สารสกัดหยาบใบสารภีน้ำ นำไปวิเคราะห์ปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมด ปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส พบว่า ที่อุณหภูมิ 45 และ 65 องศาเซลเซียส มีปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมด (261.17 และ 259 มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อกรัมน้ำหนักสารสกัดแห้ง) และปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด (89.19 และ 85.23 มิลลิกรัมสมมูลของเคอร์ซิตินต่อกรัมน้ำหนักสารสกัดแห้ง) ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.5$) และเมื่อทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส พบว่า ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (IC_{50} เท่ากับ 11.29 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) และฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส (IC_{50} เท่ากับ 16.10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) ได้สูงกว่าที่อุณหภูมิ 65 และ 85 องศาเซลเซียส เมื่อเทียบกับสารสกัด Trolox และ Kojic acid (IC_{50} เท่ากับ 14.96 และ 20.58 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ) ผลการทดลองที่ได้จะเป็นข้อมูลฐานสำคัญในการพัฒนาเพิ่มมูลค่าสารภีน้ำโดยมีข้อมูลสนับสนุนทางวิทยาศาสตร์ต่อสรรพคุณ และสามารถนำไปพัฒนาต่อยอดเป็นส่วนผสมในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางได้

คำสำคัญ: อุณหภูมิ ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส สารภีน้ำ

Effect of Temperature on Total Phenolic Antioxidant Activity and Tyrosinase Inhibition Activity of *Elaeocarpus Hygrophilus* Kurz

Napattaorn Buachoon[1*]

[1]Faculty of Science and Technology, Valaya Alongkorn Rajabhat University under the Royal Patronage Pathum Thani Province
*napattaorn@vru.ac.th

Abstract

This research aimed to investigate the effects of temperature on the total phenolic content, antioxidant activity, and tyrosinase inhibition activity of crude extracts from *Elaeocarpus Hygrophilus* Kurz leaves. The leaves were dried at three different temperatures 45, 65, and 85 degrees Celsius until they reached a constant weight. The dried samples were then ground and soaked in ethanol solvent for 7 days. After filtering and evaporating the solvent, the crude extracts were analyzed for total phenolic content, total flavonoid content, antioxidant activity, and tyrosinase inhibition activity. The findings showed that the total phenolic content at 45 and 65 degrees Celsius (261.17 and 259 mg GAE/g extract) and the total flavonoid content (89.19 and 85.23 mg QE/g extract) were not significantly different ($p \leq 0.5$). When examining antioxidant activity and tyrosinase inhibition activity, it was found that the extracts at 45 degrees Celsius had higher antioxidant activity (IC_{50} of 11.29 mg/ml) and tyrosinase inhibition activity (IC_{50} of 16.10 mg/ml) compared to those at 65 and 85 degrees Celsius. These values were also higher than those anti-tyrosinase activity of Trolox and Kojic acid extracts (IC_{50} of 14.96 and 20.58 mg/ml, respectively). The results offer valuable baseline data for enhancing the value of *Elaeocarpus Hygrophilus* Kurz through scientific evidence supporting its properties. This could lead to the development of these extracts as ingredients in cosmetic products.

Keywords: Temperature, Total Phenolic, Antioxidant Activity, Tyrosinase Inhibition Activity, *Elaeocarpus Hygrophilus* Kurz

1. บทนำ

ในปัจจุบันจะพบว่ามีการนำพืชสมุนไพร ทั้งพืชผัก ผลไม้ ต่าง ๆ ที่มีอยู่ในธรรมชาติเพื่อนำมาพัฒนาหรือแปรรูปหรือนำมาเป็นส่วนหนึ่งในการผลิตยาและเครื่องสำอาง อันเนื่องมาจากพืชสมุนไพรต่างที่มีอยู่ในธรรมชาติล้วนแต่มีความปลอดภัยต่อผู้บริโภคและยังมีประสิทธิภาพที่สามารถเทียบเคียงกับสารสังเคราะห์ที่มีอยู่ในปัจจุบันซึ่งมมีราคาที่ค่อนข้างแพงและอาจก่อให้เกิดอาการแพ้ หรือก่อให้เกิดอันตรายได้ พืชสมุนไพรในธรรมชาติหลายชนิดสามารถที่จะนำมาใช้ในการบำรุงผิว ปกป้องผิวพรรณ มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ และความสามารถในการชะลอความชราภาพ รวมถึงคุณสมบัติในการลดความเข้มของสีผิว

อนุมูลอิสระ (free radicals) คือ อะตอมหรือโมเลกุลที่มีอิเล็กตรอนคู่โดดเดี่ยวหนึ่งหรือมากกว่าหนึ่งอิเล็กตรอน [1] ผลิตจากกระบวนการเมทาบอลิซึมปกติภายในเซลล์ [2] หรือได้รับจากแหล่งภายนอก เช่น มลพิษ ควันบุหรี่ รังสี และยารักษาโรค [3] เมื่อร่างกายมีอนุมูลอิสระที่มากเกินกว่าที่ร่างกายจะสามารถกำจัดได้ ทำให้เกิดภาวะเครียดออกซิเดชัน (oxidative stress) ขึ้น ซึ่งเป็นกระบวนการที่อันตรายที่สามารถเปลี่ยนแปลงเยื่อหุ้มเซลล์ และโครงสร้างอื่น ๆ เช่น โปรตีน และดีเอ็นเอ ภาวะเครียดออกซิเดชัน เกิดจากความไม่สมดุลระหว่างผลผลิตและการใช้งานของอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้น ทำให้

เซลล์ไม่สามารถกำจัดอนุมูลอิสระที่มีมากเกินได้ ทำให้เกิดโรคที่ต่าง ๆ ได้แก่ มะเร็ง โรคหัวใจ หลอดเลือด รูมาตอยด์ อัลไซเมอร์ พาร์กินสัน และภาวะขาดเลือด [4] อนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นกับร่างกายสามารถป้องกันได้ด้วยสารต้านอนุมูลอิสระซึ่งเป็นสารที่ทำหน้าที่ในการยังยั้ง ทำลายหรือกำจัดอนุมูลอิสระออกจากร่างกาย การสร้างสารอนุมูลอิสระเป็นกลไกในการป้องกันความเสียหายจากอนุมูลอิสระของร่างกาย [5] สารต้านอนุมูลอิสระสามารถพบได้ในอาหารจำพวก พืช ผัก ผลไม้ ถั่วต่าง ๆ สมุนไพรหลายชนิด โดยในแต่ละส่วนของพืชจะมีปริมาณของชนิดของสารต้านอนุมูลอิสระแตกต่างกันไป จากการศึกษา พบว่า พืช ผัก สมุนไพรมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ เนื่องจากมีประกอบได้สารพฤกษเคมี เช่น อุดมไปด้วยสารประกอบที่ออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ เช่น สารประกอบฟีนอล (phenolic compound) ฟลาโวนอยด์ (flavonoid) สารประกอบฟีนอลิก แทนนิน วิตามินซี วิตามินอี และแคโรทีนอยด์ (carotenoid) ซึ่งพืชที่มีคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระหลายชนิด มักมีคุณสมบัติทำให้ผิวขาวรวมอยู่ด้วย [6,7] ดังนั้น การใช้สารประกอบจากพืชทดแทนสารสังเคราะห์จะเป็นการช่วยลดต้นทุนการผลิตและไม่มีผลข้างเคียงต่อผู้บริโภคอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส

สารภีน้ำ หรือ สมอพิพ่าย มีชื่อวิทยาศาสตร์คือ *Elaeo*carpus *hygrophilus* Kurz จัดอยู่ในวงศ์ Elaeocarpaceae เป็นไม้ต้น ผลัดใบ ลำต้นมีเปลือกต้นสีน้ำตาลอ่อน ใบเป็นใบเลี้ยงเดี่ยวเรียงเวียนสลับ รูปไข่กลับหรือรูปขอบขนานแกมรูปไข่กลับ กว้าง 2–5.5 เซนติเมตร ยาว 5–12 เซนติเมตร ปลายใบมน โคนใบสอบแคบ ขอบใบหยักมนห่าง ๆ ท้องใบมีขนเล็กน้อย มีหูใบร่วงง่าย ก้านใบสีแดง ใบอ่อนเป็นสีเขียวอมเหลือง ก้านใบอ่อนเป็นสีออกแดงเข้ม ส่วนก้านใบแก่เป็นสีแดงอมน้ำตาล จากการศึกษาพบว่า ส่วนต่าง ๆ ของสารภีน้ำมีสรรพคุณหลายอย่าง ได้แก่ ดอกเป็นยาบำรุงธาตุในร่างกาย แก้พิษโลหิต และกำเดา ผลมีรสเปรี้ยวอมหวาน ช่วยแก้อาการกระหายน้ำ ช่วยทำให้ชุ่มคอ แก้เสมหะในลำคอ เปลือกต้นแห้งมีรสเฝื่อน นำมาชงกับน้ำรับประทานเป็นยาฟอกเลือดหลังการคลอดบุตรของสตรี นอกจากนี้ยังพบว่า ในผลพบวิตามินซี คลอโรฟิลล์เอ คลอโรฟิลล์บี คลอโรฟิลล์รวม ฟลาโวนอยด์ และสารฟีนอลิก [8,9]

ปัจจุบันงานวิจัยที่ใบของต้นสารภีน้ำยังมีค่อนข้างจำกัด งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของอุณหภูมิที่มีต่อปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารสกัดหยาบใบสารภีน้ำ เพื่อเป็นข้อมูลเบื้องต้น สำหรับใช้ประโยชน์ในงานวิจัยที่เกี่ยวข้องอื่น ๆ ต่อไป

2. วิธีการศึกษา

1. การเตรียมตัวอย่าง

เตรียมตัวอย่างใบสารภีน้ำโดยคัดเฉพาะใบแก่ จากจังหวัดสระบุรี ล้างให้สะอาดด้วยน้ำ ผึ่งให้แห้ง หั่นเป็นชิ้นเล็ก แล้วนำไปอบด้วยตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 45, 65 และ 85 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง จนน้ำหนักคงที่ บดให้ละเอียดด้วยเครื่องบด ชั่งให้ทราบน้ำหนักที่แน่นอน โดยเลือกจากการศึกษาข้อมูลเบื้องต้นที่พบว่า การอบด้วยตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิและเวลาดังกล่าวจะให้สารสกัดหยาบและฤทธิ์ทางชีวภาพในปริมาณที่สูง

2. การเตรียมสารสกัดตัวอย่าง

นำผงของใบสารภีน้ำที่อบที่อุณหภูมิ 45, 65 และ 85 องศาเซลเซียส มาจำนวนละ 250 กรัม สกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอล 95 % ที่ปริมาตร 1 ลิตร ด้วยวิธีการแช่หมัก (Maceration) ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน หลังจากนั้นทำการกรองเก็บสารละลาย และนำไประเหยด้วยเครื่องระเหยสารแบบหมุนภายใต้สุญญากาศ (Rotary evaporator) ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส จะได้เป็นสารสกัดหยาบ นำไปเก็บไว้ในที่มืดที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

3. การหาปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด (ดัดแปลงวิธีจาก Singleton et al., 1999) [10]

เตรียมสารสกัดหยาบตัวอย่างแต่ละอุณหภูมิที่ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปิเปตมาอย่างละ 0.2 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันและเติมสารละลาย 10% Folin-ciocalteu reagent ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน เติมสารละลาย 7.5% โซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3) ปริมาตร 2 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันบ่มในที่มืดที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 90 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร ด้วยเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ (UV-Vis spectrophotometer) เตรียมสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิกที่มีความเข้มข้นเป็น 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 และ 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ทำปิเปตมาอย่างละ 0.2 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันและเติมสารละลาย 10% Folin-ciocalteu reagent ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน เติมสารละลาย 7.5% โซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3) ปริมาตร 2 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันบ่มในที่มืดที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 90 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร ด้วยเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ สำหรับการทดลองชุดควบคุมใช้น้ำกลั่น ทำการวิเคราะห์หาปริมาณฟีนอลิก

ทั้งหมดในสารสกัดหยาบตัวอย่างโดยเทียบจากกราฟมาตรฐานของกรดแกลลิกในหน่วยมิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อกรัมน้ำหนักสารสกัดแห้ง (mg GAE/g extract) แต่ละตัวอย่างทำการทดลอง 3 ซ้ำ

4. การหาปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด (ดัดแปลงวิธีจาก Gracelin et al., 2013) [11]

เตรียมสารสกัดหยาบตัวอย่างแต่ละอุณหภูมิให้มีความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปิเปตสารละลายตัวอย่างมาอย่างละปริมาตร 1 มิลลิลิตร เติมสารละลาย 10% อะลูมิเนียมไตรคลอไรด์ ($AlCl_3$) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน บ่มในที่มืดที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที เติมสารละลาย 10% กรดอะซิติก (CH_3COOH) ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 5 มิลลิลิตร นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 420 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง UV-Vis microplate reader เตรียมสารละลายมาตรฐานเคอร์ซิติน (Quercetin) ให้มีความเข้มข้นเป็น 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 และ 0.5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ทำการปิเปตสารละลายมาตรฐานแต่ละความเข้มข้นมาอย่างละปริมาตร 1 มิลลิลิตร เติมสารละลาย 10% อะลูมิเนียมไตรคลอไรด์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน บ่มในที่มืดที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที เติมสารละลาย 10% กรดอะซิติก ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน่ำกลั่นจนครบ 5 มิลลิลิตร นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 420 นาโนเมตร ในหน่วยมิลลิกรัมสมมูลของเคอร์ซิตินต่อกรัมน้ำหนักสารสกัดแห้ง (mg QE/g extract) แต่ละตัวอย่างทำการทดลอง 3 ซ้ำ

5. การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH Radical scavenging activity (ดัดแปลงวิธีจาก Prommuak et al., 2008) [12]

เตรียมสารละลาย DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) ความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์ ในสารละลาย absolute ethanol เตรียมสารสกัดหยาบตัวอย่างที่มีความเข้มข้น 25, 50, 250, 500 และ 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปิเปตสารละลายมาตรฐานหรือสารสกัดที่มีความเข้มข้นต่างๆ ปริมาตร 50 ไมโครลิตร หยดสารสกัดลงใน 96 well plate หลุมละ 100 ไมโครลิตร เติมสารละลาย DPPH อีก 100 ไมโครลิตรเขย่าให้เข้ากัน บ่มในที่มืดที่อุณหภูมิห้อง นาน 30 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 516 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง UV-Vis microplate reader โดยใช้ Trolox เป็นสารมาตรฐาน แต่ละตัวอย่างทำการทดลอง 3 ซ้ำ คำนวณหา % Radical scavenging จากสูตร

$$\% \text{ Radical scavenging} = [(Ac - As)/Ac] \times 100$$

โดย Ac คือ ค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ของสารละลาย DPPH

As คือ ค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ของสารตัวอย่างผสมกับ DPPH

ค่าที่ได้มาคำนวณหาค่า 50% inhibitory concentration (IC_{50}) จากกราฟระหว่างความเข้มข้นของสารสกัด และ % Radical scavenging โดยใช้ Trolox เป็นสารละลายมาตรฐานเพื่อเปรียบเทียบ

6. การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสโดยวิธี Dopachrome (ดัดแปลงวิธีจาก Long et al., 2002 และ Masuda et al., 2005) [13,14]

เตรียมสารสกัดหยาบตัวอย่างแต่ละอุณหภูมิที่ความเข้มข้น 0.01, 0.05, 0.1, 0.5 และ 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ปริมาตร 40 ไมโครลิตร ลงใน 96-well plate เติม Phosphate buffer pH 6.5 เข้มข้น 0.1 โมลาร์ ปริมาตร 80 ไมโครลิตร เติมเอนไซม์ไทโรซิเนสความเข้มข้น 30 unit/มิลลิลิตร ปริมาตร 40 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน เติม L-DOPA (L-3,4-dihydroxyphenylalanine) เข้มข้น 2.5 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 490 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง UV-Vis microplate reader นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้คำนวณ %Inhibition ดังสมการ

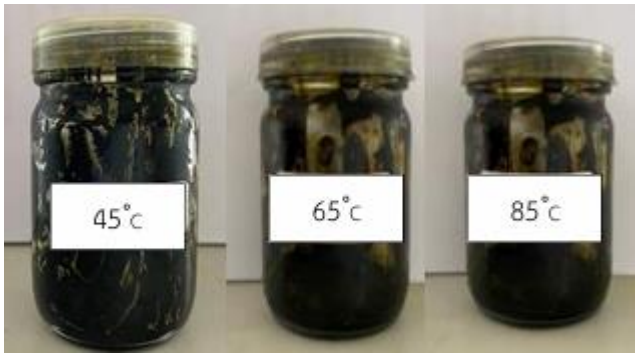
$$\% \text{ Inhibition} = [(A_{492\ control} - A_{492\ sample})/A_{492\ control}] \times 100$$

เปรียบเทียบกับกรดโคจิก(Kojic acid) ซึ่งเป็นสารมาตรฐาน จากนั้นคำนวณหาค่าการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสได้ 50 เปอร์เซ็นต์ (IC_{50}) พล็อตกราฟระหว่างค่าร้อยละการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส และความเข้มข้นของสารสกัด

3. ผลการวิจัยและอภิปรายผล

จากการนำใบสารภีน้ำมาทำการอบที่อุณหภูมิ 45, 65 และ 85 องศาเซลเซียส แล้วนำมาสกัดโดยวิธีการแช่ด้วยตัวทำละลายเอทานอล 95% เป็นระยะเวลา 7 วัน จากนั้นนำไประเหยแห้งด้วยเครื่องระเหยสารแบบหมุนภายใต้สุญญากาศ และนำไปเก็บไว้ในที่มืดที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส พบว่าสารสกัดหยาบจากใบสารภีน้ำที่อุณหภูมิต่าง ๆ มีลักษณะทางกายภาพเป็นของเหลวข้นหนืดสีเขียวเข้มจนถึงสีดำ ดังภาพที่ 1 จากนั้นทำการชั่งน้ำหนักสารสกัดหยาบที่ได้ คำนวณหาร้อยละของส่วนสารสกัดหยาบเทียบกับน้ำหนักแห้งของตัวอย่าง (250 กรัม) พบว่า ร้อยละของส่วนต่าง ๆ ของสารสกัดหยาบสารภีน้ำมีค่า

ระหว่าง 6.03 % - 8.79 % ดังแสดงข้อมูลในตารางที่ 1 โดยพบว่า การนำใบสารภีน้ำมาทำการอบที่อุณหภูมิ 85 องศาเซลเซียส มีแนวโน้มที่จะสกัดได้สารสกัดได้มากกว่าการใช้อุณหภูมิต่าง ๆ ที่สูงขึ้น อาจเนื่องมาจากเมื่อทำการอบใบสารภีน้ำโดยใช้อุณหภูมิที่สูงขึ้นอาจจะเข้าไปทำลายผนังเซลล์ของพืชทำให้ตัวทำละลายสามารถผ่านเข้าไปในเซลล์และสกัดสารสกัดออกมาได้มากขึ้น [17]



ภาพที่ 1 สารสกัดหยาบจากใบสารภีน้ำที่อุณหภูมิ 45, 65 และ 85 องศาเซลเซียส

1. ผลการศึกษาปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด

จากการนำสารสกัดใบสารภีน้ำที่ทำการอบที่อุณหภูมิ 45, 65 และ 85 องศาเซลเซียส มาทำการหาปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด โดยใช้วิธี Folin-ciocalteu และนำมาคำนวณหาปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมดจากกราฟมาตราฐานกรดแกลลิก ในหน่วยของมิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อกรัมน้ำหนักสารสกัดแห้ง (mg GAE/g extract) พบว่า สารสกัดหยาบใบสารภีน้ำที่ทำการอบที่อุณหภูมิ 45, 65 และ 85 องศาเซลเซียส มีปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดในช่วง 132.20 - 195.91 มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อกรัมน้ำหนักสารสกัดแห้ง โดยสารสกัดหยาบใบสารภีน้ำที่ทำการอบที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส มีปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดสูงที่สุดเท่ากับ 195.91 ± 0.83 มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อกรัมน้ำหนักสารสกัดแห้ง รองลงมาคือใบสารภีน้ำที่ทำการอบที่อุณหภูมิ 65 และ 85 องศาเซลเซียส มีค่าเท่ากับ 169.54 ± 0.61 และ 132.20 ± 1.34 มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อกรัมน้ำหนักสารสกัด ตามลำดับ ดังแสดงข้อมูลในตารางที่ 1

จากการทดลองพบว่า เมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นส่งผลทำให้มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกลดลง เนื่องจากเสื่อมสลายได้ง่ายด้วยความร้อน [15] และการใช้ความร้อนในกระบวนการแปรรูปมีส่วนทำให้ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกลดลง โดยทั่วไปในธรรมชาติพบสารประกอบฟีนอลิกได้หลายชนิด ซึ่งที่พบมากสุดจะเป็นกลุ่มฟลาโวนอยด์และโพลิฟีนอล เช่น ลิกนิน และ แทนนิน ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกในอาหารและเครื่องดื่มที่มาจากพืชผักและผลไม้จะแตกต่างกันออกไปตามชนิดของพืช โครงสร้างของพืช และงานวิจัยนี้สอดคล้องกับการศึกษาของ Butkhup et al. [16] ที่ทำการศึกษาการทำแห้งชาใบหม่อนด้วยตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิต่ำ (50 องศาเซลเซียส) จะทำให้ชาใบหมอนมีฤทธิ์ตานอนุมูลอิสระสูงที่สุด เนื่องจากความร้อนมีผลต่อฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ [17,18] และสอดคล้องกับการศึกษาของ Niamnuy et al.ม [19] ที่พบว่าอุณหภูมิอบแห้งส่งผลให้ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดในบัวบกต่างกัน โดยการอบแห้งบัวบกที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดสูงกว่าการอบแห้งที่อุณหภูมิ 60 และ 70 องศาเซลเซียส การสูญหายของสารประกอบฟีนอลิกจะเกิดขึ้นเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้น เนื่องจากความร้อนทำให้เกิดการสลายของพันธะที่กรดฟีนอลิกจับกับองค์ประกอบอื่น เช่น โปรตีน หรือเกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของกรดฟีนอลิกส่งผลให้ไม่สามารถสกัดหรือวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลิก [20] การตอบสนองต่ออุณหภูมิอบแห้งยังขึ้นอยู่กับรูปแบบของสารประกอบฟีนอลิกในตัวอย่าง โดยสารประกอบฟีนอลิกที่อยู่ในรูปที่ถูกตรึงกับองค์ประกอบอื่น (bound phenolic form) มีการเสื่อมสภาพสูงกว่าสารประกอบฟีนอลิกที่อยู่ในรูปอิสระ (free phenolic form) เมื่ออุณหภูมิอบแห้งเพิ่มขึ้น [21]

2. ผลการศึกษาปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด

สารสกัดเอทานอลจากใบสารภีน้ำที่ทำการอบที่อุณหภูมิ 45, 65 และ 85 องศาเซลเซียส มาศึกษาปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด พบว่า สารสกัดหยาบจากใบสารภีน้ำมีปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมดสูงที่สุดเท่ากับ 63.80 ± 0.75 มิลลิกรัมสมมูลของเคอร์ซิตินต่อกรัมน้ำหนักสารสกัดแห้ง โดยสารสกัดหยาบใบสารภีน้ำที่ทำการอบที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส มีปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมดในช่วง 45.37-63.80 มิลลิกรัมสมมูลของเคอร์ซิตินต่อกรัมน้ำหนักสารสกัดแห้ง

รองลงมาคือใบสารภีน้ำที่ทำการอบที่อุณหภูมิ 65 และ 85 องศาเซลเซียส มีค่าเท่ากับ 56.23 ± 0.23 และ 49.83 ± 1.30 มิลลิกรัมสมมูลของเคอร์ซิตินต่อกรัมน้ำหนักสารสกัดแห้ง ตามลำดับ ดังแสดงข้อมูลในตาราง 1 ผลจากการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าความร้อนส่งผลต่อปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมดในใบบัวบก โดยอุณหภูมิที่เพิ่มขึ้นส่งผลให้ปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมดลดลง ซึ่งเป็นไปในทิศทางเดียวกับปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของใบบัวบกที่ กล่าวไปแล้วข้างต้น สอดคล้องกับรายงานของ Zainol et al., [22] ที่พบว่าการอบด้วยลมร้อนที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง ส่งผลให้ปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมดในส่วนของก้านใบและรากบัวบกลดลง 76 และ 97 % ซึ่งฟลาโวนอยด์แต่ละชนิดมีการตอบสนองต่ออุณหภูมิที่ต่างกันขึ้นอยู่กับจำนวนและการจัดเรียงตัวของหมู่ไฮดรอกซิลในโครงสร้างของฟลาโวนอยด์ชนิดนั้น ๆ โดยเฉพาะคาเตชิน เอพิคาเตชิน แกลโลคาเตชิน และเอพิแกลโลคาเตชิน เป็นฟลาโวนอยด์ที่ทนความร้อนได้ดี [23]

3. ผลการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH Radical scavenging activity

สารสกัดเอทานอลจากสารสกัดหยาบใบสารภีน้ำที่ทำการอบที่อุณหภูมิ 45, 65 และ 85 องศาเซลเซียส ที่มีความเข้มข้น 25, 50, 250, 500 และ 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มาหาค่าเปอร์เซ็นต์ยับยั้งการดักจับอนุมูลอิสระ DPPH โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 516 นาโนเมตร และนำมาคำนวณค่า IC_{50} พบว่า สารสกัดหยาบใบสารภีน้ำที่ทำการอบที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงสุดโดยมีค่า IC_{50} อยู่ที่ 14.89 ± 0.16 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร รองลงมาคือ ใบสารภีน้ำที่ทำการอบที่อุณหภูมิ 65 และ 85 องศาเซลเซียส มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยมีค่า IC_{50} อยู่ที่ 16.92 ± 0.32 และ 19.25 ± 0.29 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ เมื่อเทียบกับสารมาตรฐาน Trolox ที่มีค่า IC_{50} เท่ากับ 14.96 ± 0.65 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ดังแสดงข้อมูลในตาราง 1 จากผลการทดลองที่ได้จะพบว่าอุณหภูมิมีผลต่อความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH ซึ่งสัมพันธ์กับปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด และปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด เมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นจะส่งผลต่อฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ลดลง [21] โดยเฉพาะอย่างยิ่งสารประกอบฟีนอลิก และฟลาโวนอยด์ ซึ่งเป็นสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพหลักในการยับยั้งอนุมูลอิสระในพืช

4. ผลการศึกษาฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสโดยวิธี Dopachrome

สารสกัดเอทานอลจากสารสกัดหยาบใบสารภีน้ำที่ทำการอบที่อุณหภูมิ 45, 65 และ 85 องศาเซลเซียส นำมาทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส ด้วยวิธี Dopachrome method และเทียบกับสารมาตรฐาน Kojic acid พบว่า สารสกัดหยาบใบสารภีน้ำที่ทำการอบที่อุณหภูมิต่างๆ มีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสได้ไม่แตกต่างกัน โดยสารสกัดหยาบใบสารภีน้ำที่ทำการอบที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสได้สูงที่สุดโดยมีค่า IC_{50} อยู่ที่ 18.44 ± 0.29 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร รองลงมาคือ 65 และ 85 องศาเซลเซียส โดยมีค่า IC_{50} อยู่ที่ 20.22 ± 0.81 และ 21.16 ± 0.31 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ เมื่อเทียบกับสารมาตรฐาน Kojic acid ที่มีค่า IC_{50} เท่ากับ 20.58 ± 0.34 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ดังแสดงข้อมูลในตารางที่ 1 จากการทดลอง พบว่า สารสกัดหยาบใบสารภีน้ำที่อบที่อุณหภูมิสูงขึ้น ส่งผลให้มีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสลดลง ทั้งนี้อาจจะเนื่องมากจากสารกลุ่มฟีนอลิกมีความสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสได้โดยสารกลุ่มฟีนอลิกสามารถแย่งขับกับธาตุโลหะทองแดงได้ดีกว่า L-DOPA ซึ่งเป็น Substrate ของเอนไซม์ไทโรซิเนสให้ธาตุโลหะทองแดงของเอนไซม์ไทโรซิเนสไม่สามาถเข้าจับกับ L-DOPA ได้ กระบวนการสังเคราะห์เมลานินจึงไม่เกิด ดังนั้นใบสารภีน้ำที่อบที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกสูงจึงแสดงฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซมไทโรซิเนสได้สูงที่สุด [24]

ตารางที่ 1 ร้อยละสารสกัดหยาบ ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด ฟลาโวนอยด์ทั้งหมด ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส ของสารสกัดภีน้ำ

ใบสารภีน้ำ	% Yield Crude Extract	ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด (mg GAE/g extract)	ปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด (mg QE/g extract)	ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ(IC_{50}) (mg/ml)	ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส (IC_{50}) (mg/ml)
อบที่ 45°C	6.03	195.91 ± 0.83	63.80 ± 0.75	14.89 ± 0.16	18.44 ± 0.29
อบที่ 65°C	8.10	169.54 ± 0.61	56.23 ± 0.23	16.92 ± 0.32	20.22 ± 0.81
อบที่ 85°C	8.79	132.20 ± 1.34	49.83 ± 1.30	19.25 ± 0.29	21.16 ± 0.31
Trolox	-	-	-	14.96 ± 0.65	-
Kojic acid	-	-	-	-	20.58 ± 0.34

จากการทดลองหาปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด ปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสในใบสารภีน้ำที่ทำการอบที่อุณหภูมิแตกต่างกัน 3 ระดับ คือ 45, 65 และ 85 องศาเซลเซียส ผลการวิเคราะห์ พบว่า เมื่ออุณหภูมิในการอบสูงขึ้นจะส่งผลให้ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด ฟลาโวนอยด์ทั้งหมด ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสลดลง อย่างไรก็ตามปัจจัยที่ส่งผลกระทบโดยตรงต่อความคงตัวของสารประกอบฟีนอลิกและสารประกอบฟลาโวนอยด์ รวมทั้งฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส ได้แก่ อุณหภูมิ และความเป็นกรดด่าง เป็นต้น และจากการทดลอง ยังพบอีกว่า สารสกัดหยาบใบสารภีน้ำที่อบที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส มีปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด ฟลาโวนอยด์ทั้งหมด ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสสูงที่สุด รองลงมาคือ อบที่อุณหภูมิ 65 และ 85 องศาเซลเซียส ซึ่งผลการวิจัยนี้สอดคล้องกับงานวิจัยของ Butkhup et al. [16] การทำแห้งชาใบหม่อนด้วยตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิต่ำ (50 องศาเซลเซียส) จะทำให้ชาใบหม่อนมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุด เนื่องจากความร้อนมีผลต่อฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ [17,18] และสอดคล้องกับการศึกษาของ Niamnuy et al. [19] ที่พบว่าอุณหภูมิอบแห้งส่งผลให้ปริมาณสารประกอบฟีนอลิคทั้งหมดในใบบัวบกต่างกัน โดยการอบแห้งบัวบกที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดสูงกว่าการอบแห้งที่อุณหภูมิ 60 และ 70 องศาเซลเซียส การสูญหายของสารประกอบฟีนอลิกจะเกิดขึ้นเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้น เนื่องจากความร้อนทำให้เกิดการสลายของพันธะที่กรดฟีนอลิกจับกับองค์ประกอบอื่น เช่น โปรตีน หรือเกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของกรดฟีนอลิกส่งผลให้ไม่สามารถสกัดหรือวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลิก [20] การตอบสนองต่ออุณหภูมิอบแห้งยังขึ้นอยู่กับรูปแบบของสารประกอบฟีนอลิกในตัวอย่าง โดยสารประกอบฟีนอลิคที่อยู่ในรูปที่ถูกตรึงกับองค์ประกอบอื่น (bound phenolic form) มีการเสื่อมสภาพสูงกว่าสารประกอบฟีนอลิกที่อยู่ในรูปอิสระ (free phenolic form) เมื่ออุณหภูมิอบแห้งเพิ่มขึ้น [21] และสอดคล้องกับงานวิจัยของ Taokaenchan et al. [25] ศึกษาผลของอุณหภูมิที่ใช้ในการต่อคุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระของชาแก่นฝาง (*Caesalpinia sappan* L.) พบว่า เมื่อใช้อุณหภูมิในการอบชาฝางสูงมากขึ้น ปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมด และฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระดีพีพีเอชก็จะมีค่าลดลงตามซึ่งสารต้านอนุมูลอิสระเป็นสารที่มีความไวต่ออุณหภูมิจึงทำให้เมื่อใช้อุณหภูมิที่สูงขึ้นจะส่งผลทำให้สารต้านอนุมูลอิสระสลายตัวไป ถึงแม้จะใช้เวลาในการอบที่น้อยลงเนื่องจากสารประกอบฟีนอลสามารถละลายได้ในน้ำและถูกทำลายได้ด้วยความร้อนหรือการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างจากสารพวกไกลโคไซด์เป็นสารอะไกลโคน ซึ่งการใช้ความร้อนที่อุณหภูมิสูงจะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทั้งคุณค่าทางโภชนาการและคุณสมบัติของสารต้านออกซิเดชัน [26] ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด กับปริมาณฟวาโวนอยด์ทั้งหมด ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ทดสอบด้วยวิธี DPPH และฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสที่ทดสอบด้วยวิธี Dopachrome ในสารสกัดหยาบใบสารภีน้ำมีความสัมพันธ์กัน

4. สรุปผล

จากการศึกษาปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด ปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสในใบสารภีน้ำที่ทำการอบที่อุณหภูมิ คือ 45 65 และ 85 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และสกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอล พบว่า สารสกัดหยาบใบสารภีน้ำที่ทำการอบที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส มีปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด ปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมดสูงที่สุด และเมื่อนำไปหาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระพบว่า สารสกัดหยาบใบสารภีน้ำที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุด เมื่อเทียบกับสารมาตรฐาน Trolox และสารสกัดหยาบใบสารภีน้ำที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสได้ดีที่สุดเมื่อกับสารมาตรฐาน Kojic acid จากผลการทดลองพบว่า สารสกัดหยาบใบสารภีน้ำที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส มีองค์ประกอบของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระ และยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส สามารถที่จะนำไปพัฒนาเพิ่มมูลค่าสารภีน้ำโดยมีข้อมูลสนับสนุนทางวิทยาศาสตร์ต่อสรรพคุณ

5. เอกสารอ้างอิง

[1] Halliwell, B., & Gutteridge, J.M.C. (2015). *Free Radicals in Biology and Medicine.OUP*. Oxford.

[2] Cheeseman, K.H., & Slater, T.F. (1993). An introduction to free radical biochemistry. *British medical bulletin*, 49(3), 481-493.

[3] Pham-Huy, L.A., He, H., & Pham-Huy, C. (2008). Free radicals, antioxidants in disease and health. *International journal of biomedical science*, 4(2), 89-96.

[4] Tangvarasittichai, S. (2015). Oxidative stress, insulin resistance, dyslipidemia and type 2 diabetes mellitus. *World Journal of Diabetes*, 6(3), 456-480.

[5] Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M.T.D., Mazur, M., & Telser, J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 39(1), 44-84.

[6] Solano, F., Briganti, S., Picardo, M. & Ghanem, G. (2006). Hypopigmenting agents: an updated review on biological, chemical and clinical aspects. *Pigment Cell and Melanoma Research*, 19, 550-571

[7] Oroian, M., & Escriche, I. (2015). Antioxidants: Characterization, natural sources, extraction and analysis. *Food Research International*, 74, 10-36.

[8] Joomwong, A., Neungsean, P., & Nakorn, B. (2018). The study on Physical and Chemical Quality of Ma Kok Nam. *Agricultural Science Journal*, *49*(1), 479-482.

[9] Ruangchakpe, A., & Sajjaanantakul, T. (2550). Effect of Spanish Plum (Elaeocarpus hygrophilus Kurz.) Maturity on Total Phenolics, Flavonoids and Antioxidant Activity. *Agricultural Science Journal*, *38*(5), 127-130.

[10] Singleton, V. L., Orthofer, R., & Lamuela-Raventos, R. R. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology,* 299, 152-178.

[11] Gracelin, DHS, Britto AJD, & Kumar BJR. (2013). Qualitative and quantitative analysis of phytochemicals in five Pteris Species. *International Journal of Pharmaceutical Sciences,* 5(1), 105-107.

[12] Prommuak, C., D-Eknamkul, W. & Shotipruk, A. (2008). Extraction of flavonoids and carotenoids from thai silk waste and antioxidant activity of extract, *Separation and Purification Technology,* 62, 444-448.

[13] Long,Z.P., Hyang, R.P., Yun, K.P., Seung, K.L., Jeong, H.P. & Man, K.P. (2002). Mushroom tyrosinase inhibition activity of some chromones. *Journal Chemical and Pharmaceutical Bulletin, 50(3),* 309-311.

[14] Masuda, T., Yamashita, D., Takeda, Y. & Yonemori, S. (2005). Screening for tyrosinase inhibitors among extract of seashore plants and identification of potent inhibitors from *Garcinia subelliptica*. *Bioscience, Biotechnology, and Agrochemistry,* 69(1), 197-201.

[15] Saran Lapanithiporn, Natta Laohakunjit & Orapin Kerdchoechuen. (2012). Physico-chemical composition and antioxidant activity of cashew apple juice. Agricultural Science Journal, 43(2), 409-412.

[16] Butkhup, L., Khanonphrom, I., & Sumappito, S. (2014). Influence of thd drying process on flavonoid contents and their effects on antioxidant activity of mulberry (*Morus alba* L.)*,* 27(1), 1-11.

[17] Siritrakulsak, P., & Smla, S., (2015). Effects of Conventional Cooking Method on Antioxidant Content in Moonflower. Khon Kaen Agriculture Journal, 43(1), 875-880.

[18] Cheeraoatiyut, K. (2009). Product Innovation of Hight Calcium Rice Vegetative Seasoning from Water Meal (*Wolffia globose).* [Degree of Master, Chulalongkorn University].

[19] Niamnuy, C., Charoenchaitrakool, M., Mayachiew, P. & Devahastin, S. (2013). Bioactive compounds and bioactivities of *Centella asiatica* (L.) Urban prepared by different drying methods and conditions. *Drying Technology*, 31, 2007-2015.

[20] Martin-Cabrejas, M.A., Aguilera, Y., Pedrosa, M.M., Cuadrado, C., Hernandez, T., Diaz, S. & Esteban, R.M. (2009). The impact of dehydration process on antinutrients and protein digestibility of some legume flours. *Food Chemistry*, 114. 1063-1068.

[21] Rodríguez, K., Ah-Hen, K.S., Vega-Galvez, A., Valeria Vasquez A., Quispe-Fuentes, I., Rojas, P. & Lemus-Mondaca, R. (2016). Changes in bioactive components and antioxidant capacity of *maqui,*

Aristotelia chilensis [Mol] Stuntz, berries during drying. *LWT- Food Science and Technology*, 65, 537-542.

[22] Zainol, M.K.M., Abdul-Hamid, A., Bakar, F.A. & Dek, S.P. (2009). Effect of different drying methods on the degradation of selected flavonoids in *Centella asiatica*. *The International Food Research Journal*, 16, 531-537.

[23] Hallamn, P.C.H. (2001). Evidence for health benefits of plant phenols: local or systemic effects. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 81, 842-852.

[24] Bae-Harboe, Y.S.C., & Park, H.Y. (2012). Tyrosinase: A central regulatory protein for cutaneous pigmentation. *Journal of Investigative Dermatology*, 132(12), 2678-2680.

[25] Taokaenchan, N., Areseesom, P., Tangtragoon, T., Kongbuntad, W., Tarachai, Y,. & Kawaree, R., (2017). Effect of drying temperature on the antioxidant properties and nutritional value of Fang quince tea. Science Working Group Club RSPG 8th Symposium, Thai resources: So much potential is available, Silpakorn University.

[26] Pokorn, J., & Schmidt, S. (2010). *Effects of processing and storage on antioxidant efficacy in foods*. In Oxidants in foods and beverages and antioxidant applications. Woodhead Publishing, Cambridge.