

การคัดเลือกและการประเมินสมุนไพรในการผลิตคอมบูชาที่มีฤทธิ์ต้าน
อนุมูลอิสระสูง

SCREENING AND EVALUATION OF HERBAL PLANTS FOR HIGH
ANTIOXIDANT KOMBUCHA PRODUCTION

นราทิพย์ วงศ์ไทย
NARATHIP WONGTHAI

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ.2562

การคัดเลือกและการประเมินสมุนไพรในการผลิตคอมบูชาที่มีฤทธิ์ต้าน
อนุมูลอิสระสูง

SCREENING AND EVALUATION OF HERBAL PLANTS FOR HIGH
ANTIOXIDANT KOMBUCHA PRODUCTION

นราธิพย์ วงศ์ไทย
NARATHIP WONGTHAI

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
พ.ศ.2562

SCREENING AND EVALUATION OF HERBAL PLANTS FOR HIGH
ANTIOXIDANT KOMBUCHA PRODUCTION

NARATHIP WONGTHAI

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF THE REQUIREMENT FOR THE
DEGREE OF MASTER OF SCIENCE IN BIOTECHNOLOGY
DEPARTMENT OF BIOLOGY FACULTY OF SCIENCE
KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

2019

KMITL-2019-SC-M-020-008

COPYRIGHT 2019

FACULTY OF SCIENCE

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การคัดเลือกและการประเมินสมุนไพรในการผลิตคอมบูชาที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูง
ชื่อนักศึกษา	นางสาวนราทิพย์ วงศ์ไทย
รหัสประจำตัว	59605112
ปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)
ภาควิชา	ชีววิทยา
พ.ศ.	2562
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์	รศ.ดวงใจ โอชัยกุล

บทคัดย่อ

คอมบูชาเป็นเครื่องดื่มชาหมักเพื่อสุขภาพที่เกิดจากการนำชาดำไปหมักร่วมกับแบคทีเรียและยีสต์โดยใช้น้ำตาลทรายเป็นแหล่งคาร์บอน ปัจจุบันมีการพัฒนาเครื่องดื่มคอมบูชาโดยใช้สมุนไพรชนิดอื่นมาหมักแทนชาดำเพื่อเพิ่มฤทธิ์ทางชีวภาพและระดับความพึงพอใจในการบริโภค รวมทั้งยังเป็นการเพิ่มทางเลือกในการดูแลสุขภาพให้แก่ผู้บริโภคมากขึ้น ในการศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระและปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระของคอมบูชาจากสมุนไพร 10 ชนิด ได้แก่ เกสรบัวหลวง (*Nelumbo nucifera*) ผลเก๋ากี้ (*Lycium barbarum*) ใบหม่อน (*Morus alba* Linn.) ใบย่านาง (*Tiliacora triandra*) ดอกกระเจี๊ยบ (*Hibiscus sabdariffa* L.) ตะไคร้ (*Cymbopogon nardus* Rendle) ผลมะตูม (*Aegle marmelos*) ผลหล่อฮั้งก้วย (*Siraitia grosvenorii*) ดอกอัญชัน (*Clitoria ternatea*) และชาอู่หลง (*Camellia sinensis*) เพื่อคัดเลือกคอมบูชาจากสมุนไพรที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูง จากผลการศึกษาพบว่า ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและสารต้านอนุมูลอิสระของคอมบูชาที่มีปริมาณเพิ่มขึ้นในระหว่างการหมัก โดยเฉพาะอย่างยิ่ง คอมบูชาจากชาอู่หลง คอมบูชาจากอัญชันและคอมบูชาจากเกสรบัวหลวงมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH และ ABTS สูงกว่าคอมบูชาจากสมุนไพรชนิดอื่น โดยคอมบูชาจากอัญชันมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH และ ABTS สูงที่สุด มีค่าการดักจับอนุมูลอิสระ DPPH และค่าการดักจับอนุมูลอิสระ ABTS เท่ากับ 98.41 ± 0.09 และ 99.95 ± 0.01 ในวันที่ 20 ของการหมัก ตามลำดับ จากการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระภายในเซลล์ HEK-293 พบว่าคอมบูชาจากอัญชันที่หมักเป็นเวลา 12 วันสามารถกระตุ้นการแสดงออกของยีนที่สามารถผลิตเอนไซม์ที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ได้แก่ ยีน Mn-SOD ยีน GPx-1 และยีน HO-1 ได้สูงกว่าคอมบูชาจากชาอู่หลงและชาที่ไม่ผ่านกระบวนการหมัก แสดงให้เห็นว่าคอมบูชาที่มีผลกระตุ้นการสร้างเอนไซม์ที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ นอกจากนี้ยังพบว่าคอมบูชาจากอัญชันที่

หมักเป็นเวลา 5 ถึง 12 วัน ยังมีคะแนนความพึงพอใจโดยรวมอยู่ในระดับชอบปานกลาง เมื่อนำคอมบูชาจากอัญชันผ่านการฆ่าเชื้อด้วยการพาสเจอร์ไรซ์และเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง พบว่าสามารถเก็บรักษาได้ไม่น้อยกว่า 56 วัน โดยมีการเปลี่ยนแปลงทางเคมีและทางจุลินทรีย์เล็กน้อย

คำสำคัญ : ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ สมุนไพร คอมบูชา ชาอู่หลง อัญชัน

Thesis Title	Screening and evaluation of herbal plants for high antioxidant kombucha production
Student Name	Ms. Narathip Wongthai
Student ID	59605112
Degree	Master of Science (Biotechnology)
Department	Biology
Year	2019
Thesis Advisor	Assoc. Prof. Duangjai Ochaikul

Abstract

Kombucha is a healthy fermented tea beverage produced by fermentation of black tea with bacteria, yeast, and sugar carbon source. Recently, other herbs have replaced black tea in kombucha fermentation to provide some medicinal properties, attract new customers, and create more health care options. This research aimed to investigate the antioxidant activity and content of 10 herbal kombucha analogues including lotus pollen (*Nelumbo nucifera*), goji berry fruit (*Lycium barbarum*), mulberry leave (*Morus alba* Linn.), yanang leave (*Tiliacora triandra*), okra flower (*Hibiscus sabdariffa* L.), lemongrass (*Cymbopogon nardus* Rendle), bael fruit (*Aegle marmelos*), Luo Han Guo fruit (*Siraitia grosvenorii*), butterfly pea flower (*Clitoria ternatea*), and oolong tea (*Camellia sinensis*). In the investigation process, it was found that kombucha's antioxidant content and antioxidant activity increased during fermentation. Oolong kombucha, butterfly pea kombucha, and lotus pollen kombucha provided a higher percentage antioxidant activity against DPPH and ABTS than kombucha from other herbs did. Butterfly pea kombucha provided the highest percentage antioxidant activity against DPPH (98.41 ± 0.09) and ABTS radicals (99.95 ± 0.01) on the 20th day of fermentation. Butterfly pea Kombucha fermented for 12 days was able to stimulate expression of genes such as Mn-SOD, GPx-1, and HO-1 in HEK-293 cells line to produce antioxidant enzymes better than Oolong kombucha and tea could. It shown that kombucha has a stimulating effect on antioxidant

enzyme production. In addition, butterfly pea kombucha fermented for 5 to 12 days achieved a moderate user satisfaction score. When kombucha from butterfly pea was pasteurized and stored at room temperature, it can be kept anti-oxidatively active for at least 56 days. Which has slighty chemical and microboial changes.

Keywords: Antioxidant activity, Herb, Kombucha, Oolong tea, Butterfly pea

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์นี้จัดทำขึ้นตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ สามารถสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดีโดยได้รับความกรุณาจากอาจารย์ที่ปรึกษา รศ.ดวงใจ โอชัยกุล และประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ รศ.ดร.ภก.ศุภโชค มั่งมุล ที่คอยให้ความรู้ คำแนะนำและความช่วยเหลือต่างๆในการทำวิทยานิพนธ์ครั้งนี้

ข้าพเจ้าขอขอบคุณ ผศ.ดร.สุทธิจิต ศรีวัชรกุล กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ที่กรุณาสละเวลาตรวจสอบและให้คำแนะนำ ตลอดจนแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้ถูกต้องมากขึ้น

สุดท้ายนี้ขอขอบพระคุณอาจารย์ปรารธนา กังสดาลัย จาก KMITL Research and Innovation Services ที่คอยให้คำปรึกษาการทำวิทยานิพนธ์และบทความวิจัยฉบับภาษาอังกฤษให้แก่ข้าพเจ้าตลอดมา

นราทิพย์ วงศ์ไทย

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญ	จ
สารบัญตาราง	ท
สารบัญรูป	ณ
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของงานวิจัย	1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย	2
1.3 ขอบเขตของงานวิจัย	2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	2
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	3
2.1 คอมบูชา (Kombucha)	3
2.1.1 ประวัติความเป็นมาของเครื่องดื่มคอมบูชา	3
2.1.2 กระบวนการผลิตเครื่องดื่มคอมบูชาและปฏิกิริยาในระหว่างกระบวนการหมัก	4
2.1.2.1 กระบวนการหมักแอลกอฮอล์ของจุลินทรีย์	6
2.1.3 จุลินทรีย์ที่พบในเครื่องดื่มคอมบูชา	7
2.1.3.1 แบคทีเรียเซลลูโลส	7
2.1.3.1.1 <i>Acetobacter</i>	9
2.1.3.2 ยีสต์	9
2.1.3.2.1 <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	10
2.1.4 ประโยชน์และข้อควรระวังในการบริโภคคอมบูชา	11
2.1.4.1 วิตามินและเกลือแร่	11
2.1.4.2 เอทานอล	12
2.2 สมุนไพรที่นำมาใช้ในการศึกษา	12
2.2.1 ชาอู่หลง	12
2.2.1.1 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์	13
2.2.1.2 สารพฤกษเคมี	13
2.2.1.3 สรรพคุณและฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา	14
2.2.1.4 กระบวนการผลิตชาอู่หลง	14

2.2.2 บัวหลวง	14
2.2.2.1 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์	15
2.2.2.2 สารพฤกษเคมี	15
2.2.2.3 สรรพคุณและฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา	15
2.2.3 เก่ากั	16

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
2.2.3.1 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์	16
2.2.3.2 สารพฤกษเคมี	16
2.2.3.3 สรรพคุณและฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา	17
2.2.4 ใบย่านาง	17
2.2.4.1 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์	18
2.2.4.2 สารพฤกษเคมี	18
2.2.4.3 สรรพคุณและฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา	18
2.2.5 ใบหม่อน	19
2.2.5.1 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์	19
2.2.5.2 สารพฤกษเคมี	19
2.2.5.3 สรรพคุณและฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา	20
2.2.6 กระจี้บ	20
2.2.6.1 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์	21
2.2.6.2 สารพฤกษเคมี	21
2.2.6.3 สรรพคุณและฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา	21
2.2.7 ตะไคร้หอม	22
2.2.7.1 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์	22
2.2.7.2 สารพฤกษเคมี	22
2.2.7.2.1 สารสำคัญที่ไม่ใช่น้ำมันหอมระเหย	22
2.2.7.2.2 สารสำคัญที่เป็นน้ำมันหอมระเหย	22
2.2.7.3 สรรพคุณและฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา	23
2.2.8 มะตูม	23
2.2.8.1 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์	23
2.2.8.2 สารพฤกษเคมี	24
2.2.8.3 สรรพคุณและฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา	24

2.2.9 หล่อฮั้งก้วย	24
2.2.9.1 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์	25
2.2.9.2 สารพฤกษเคมี	25
2.2.9.3 สรรพคุณและฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา	25
2.2.10 อัญชัน	26
2.2.10.1 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์	26
2.2.10.2 สารพฤกษเคมี	26
2.2.10.3 สรรพคุณและฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา	27
2.3 อนุมูลอิสระ	27
2.3.1 การเกิดอนุมูลอิสระ	27

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
2.3.1.1 ปัจจัยภายในร่างกายที่เหนี่ยวนำให้เกิดอนุมูลอิสระ	27
2.3.1.2 ปัจจัยภายนอกในร่างกายที่ทำให้เกิดอนุมูลอิสระ	28
2.3.2 ชนิดของอนุมูลอิสระที่สำคัญในร่างกาย	29
2.3.2.1 อนุมูลอิสระกลุ่มออกซิเจน	29
2.3.2.1.1 อนุมูลอิสระซูเปอร์ออกไซด์	29
2.3.2.1.2 อนุมูลอิสระไฮดรอกซิล	30
2.3.2.1.3 ไฮโดรเจนเพอออกไซด์	30
2.3.2.1.4 อนุมูลอิสระเพอรอกซิล	31
2.3.2.1.5 ซิงเกิลทออกซิเจน	31
2.3.2.2 อนุมูลอิสระกลุ่มไนโตรเจน	31
2.3.2.2.1 อนุมูลไนตริกออกไซด์	31
2.3.2.2.2 เพอรอกซิลไนไตรท์	31
2.4 สารต้านอนุมูลอิสระ	32
2.4.1 แหล่งที่มาของสารต้านอนุมูลอิสระ	33
2.4.1.1 สารต้านอนุมูลอิสระภายในร่างกาย	33
2.4.1.1.1 เอนไซม์ที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ	34
2.4.1.1.1.1 เอนไซม์ซูเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเทส	34
2.4.1.1.1.2 เอนไซม์คะตะเลส	34
2.4.1.1.1.3 เอนไซม์กลูตาไธโอนเพอรอกซิเดส	34
2.4.1.1.1.4 เอนไซม์เฟส II	34

2.4.1.1.2 สารต้านอนุมูลอิสระที่ไม่ใช่เอนไซม์	35
2.4.1.2 สารต้านอนุมูลอิสระจากแหล่งภายนอก	35
2.4.1.2.1 สารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์	35
2.4.1.2.2 สารต้านอนุมูลอิสระจากธรรมชาติ	35
2.6 การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ	40
2.6.1 การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระทางเคมี	40
2.6.1.1 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH	40
2.6.1.2 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ABTS	41
2.6.2 การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระทางชีวภาพ	42
2.6.2.1 การทดสอบฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระออกซิเจนภายในเซลล์	42
2.7 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	42
บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย	49
3.1 ตัวอย่างที่ใช้ในการทดลอง	49
3.2 อาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์	49
3.3 สารเคมีที่ใช้ในการศึกษาการต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์	49

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
3.3.1 สารเคมีสำหรับทดสอบฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธีดีพีพีเอช (DPPH)	49
3.3.2 สารเคมีสำหรับทดสอบฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธีเอบีทีเอส (ABTS)	49
3.3.3 สารเคมีสำหรับวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด	49
3.3.4 สารเคมีสำหรับวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมด	49
3.3.5 สารเคมีสำหรับวิเคราะห์ปริมาณกรดอะซิติก	50
3.3.6 สารเคมีสำหรับวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด	50
3.3.7 สารเคมีสำหรับวิเคราะห์ปริมาณแอลกอฮอล์	50
3.3.8 สารเคมีสำหรับวิเคราะห์ทางจุลินทรีย์	50
3.4 สารที่ใช้ในการศึกษาการต้านอนุมูลอิสระภายในเซลล์	50
3.4.1 เซลล์ที่ใช้ในการทดสอบ	50
3.4.2 อาหารที่ใช้ในการเลี้ยงเซลล์	50
3.4.3 สารเคมีที่ใช้ในการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ (Cytotoxicity test)	50
3.4.4 สารเคมีที่ใช้ในการทดสอบฤทธิ์ด้านการเกิดออกซิเดชันของสารตัวอย่าง	51
3.4.5 สารเคมีที่ใช้ในการทดสอบฤทธิ์ด้านการเกิดออกซิเดชันต่อการสร้างเอนไซม์ที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ	51

3.5 เครื่องมือและอุปกรณ์	51
3.6 การเตรียมหัวเชื้อในการหมักคอมบูชา	53
3.7 การคัดเลือกสเม้นไพรคอมบูชาที่มีประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระ	53
3.7.1 การหมักคอมบูชาจากพีชสเม้นไพร	53
3.7.2 การวิเคราะห์	53
3.7.2.1 การทดสอบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของคอมบูชาจากสเม้นไพร 10 ชนิด	53
3.7.2.2 การทดสอบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ ABTS ของคอมบูชาจากสเม้นไพร 10 ชนิด	54
3.7.2.3 การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด	55
3.7.2.3.1 การทำกราฟมาตรฐานกรดแกลลิก	55
3.7.2.3.2 การวิเคราะห์	55
3.7.2.4 การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมด	56
3.7.2.4.1 การทำกราฟมาตรฐานเคอเวซิทิน	56
3.7.2.4.2 การวิเคราะห์	56
3.8 การเปลี่ยนแปลงคุณภาพระหว่างกระบวนการหมักของคอมบูชาจากสเม้นไพรที่คัดเลือกได้	56
3.8.1 การวิเคราะห์	57
3.8.1.1 การทดสอบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH	57
3.8.1.2 การทดสอบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ ABTS	57
3.8.1.3 ค่าพีเอช	57

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
3.8.1.4 ปริมาณกรดอะซิติกโดยใช้เครื่องโครมาโตกราฟีแบบของเหลวประสิทธิภาพสูง (High performance liquid chromatography, HPLC)	57
3.8.1.4.1 การเตรียมตัวอย่าง	57
3.8.1.4.2 สภาวะที่ใช้สำหรับวิเคราะห์ปริมาณกรดอะซิติก	57
3.8.1.4.3 การทำกราฟมาตรฐานกรดอะซิติก	58
3.8.1.5 ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดโดยวิธีฟินอล-ซัลฟูริก	58
3.8.1.5.1 กราฟมาตรฐานกลูโคส	58
3.8.1.5.2 การวิเคราะห์	58
3.8.1.6 การวิเคราะห์ปริมาณแอลกอฮอล์ โดยใช้เครื่องวิเคราะห์และแยกสารโดยใช้แก๊ส (Gas chromatography, GC)	58

3.10.2.2 การวิเคราะห์ปริมาณยีสต์และรา	66
3.11 การวิเคราะห์ทางสถิติ	67
บทที่ 4 ผลการวิจัยและอภิปรายผล	70
4.1 การคัดเลือกสมุนไพรเพื่อนำมาใช้ในการผลิตคอมบูชา	70
4.1.1 ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของคอมบูชาจากสมุนไพร 10 ชนิด	70
4.1.1.1 ค่าดักจับอนุมูลอิสระ DPPH	70
4.1.1.2 ค่าการดักจับอนุมูลอิสระ ABTS	71
4.1.2 ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดและปริมาณฟลาโวนอยด์ของคอมบูชาจากสมุนไพร 10 ชนิด	74
4.2 การเปลี่ยนแปลงระหว่างกระบวนการหมักของคอมบูชาจากชาอู่หลง คอมบูชาจากเกสรบัวหลวงและคอมบูชาจากอัญชัน	76
4.2.1 คุณลักษณะทางเคมี	76
4.2.1.1 พีเอช	76
4.2.1.2 ปริมาณกรดอะซิติก	77
4.2.3.3 ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด	78
4.2.3.4 ปริมาณแอลกอฮอล์	80
4.2.2 ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของคอมบูชาจากชาอู่หลง คอมบูชาจากเกสรบัวหลวงและคอมบูชาจากอัญชัน	82
4.2.2.1 ค่าการดักจับอนุมูลอิสระ DPPH	82
4.2.2.2 ค่าการดักจับอนุมูลอิสระ ABTS	84
4.2.2.3 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดและปริมาณฟลาโวนอยด์	86
4.2.3 การทดสอบทางประสาทสัมผัส	90
4.2.3.1 ด้านสี	90
4.2.3.2 ด้านกลิ่น	91
4.2.3.4 ด้านรสเปรี้ยว	91
4.2.3.5 ด้านรสหวาน	91
4.2.3.6 ด้านความกลมกล่อม	91
4.2.3.7 ด้านความชอบโดยรวม	91
4.3 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระภายในเซลล์ของเครื่องดื่มคอมบูชา	95

สารบัญ (ต่อ)

4.3.1	ความเป็นพิษต่อเซลล์	95
4.3.2	ฤทธิ์ต้านการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของอนุมูลภายในเซลล์	97
4.3.2.1	การวัดปริมาณ Reactive oxygen species (ROS) ที่เกิดขึ้นภายในเซลล์ โดยใช้เครื่อง Fluorescent microplate reader	97
4.3.3	ผลของอนุมูลต่อการสร้าง mRNA ของยีนต้านอนุมูลอิสระ (mRNA gene expression)	99
4.4	ศึกษาคุณภาพของอนุมูลจากอัญชันระหว่างการเก็บรักษา	101
4.4.1	คุณภาพทางเคมี	101
4.4.2	ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH	102
4.4.3	ปริมาณสารประกอบฟีนอลิก	103
4.4.4	ปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด ยีสต์และรา	104
บทที่ 5	สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ	108
5.1	สรุปผลการวิจัย	108
5.2	ข้อเสนอแนะ	109
	เอกสารอ้างอิง	111
	ภาคผนวก	126
	ภาคผนวก ก	127
	ภาคผนวก ข	128
	ภาคผนวก ค	131
	ภาคผนวก ง	132
	ประวัติผู้เขียน	256

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
2.1 โครงสร้าง ชื่อ และแหล่งที่พบของฟลาโวนอยด์ประเภทต่าง ๆ	39
3.1 ลำดับ sequence ของ primers ของเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระชนิดต่าง ๆ ที่ใช้ในการทำ RT-qPCR	63
4.1 ค่าการดักจับอนุมูลอิสระ DPPH และความเข้มข้นของคอมบูชาจากสมุนไพรแต่ละชนิดที่สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH ได้ เปอร์เซ็นต์ 50 (IC ₅₀) โดยหมักที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 วัน	69
4.2 ค่าการดักจับอนุมูลอิสระ ABTS และความเข้มข้นของคอมบูชาจากสมุนไพรแต่ละชนิดที่สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระ ABTS ได้ เปอร์เซ็นต์ 50 (IC ₅₀) โดยหมักที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 วัน	72
4.3 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ของคอมบูชาจากสมุนไพร 10 ชนิด	74
4.4 ค่าพีเอชของคอมบูชาจากชาอู่หลง คอมบูชาจากเกสรบัวหลวงและคอมบูชาจากอัญชันหมัก ณ อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 20 วัน	75
4.5 ปริมาณกรดอะซิติกของคอมบูชาจากชาอู่หลง คอมบูชาจากเกสรบัวหลวงและคอมบูชาจากอัญชันหมัก ณ อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 20 วัน	77
4.6 ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดของคอมบูชาจากชาอู่หลง คอมบูชาจากเกสรบัวหลวงและคอมบูชาจากดอกอัญชันที่หมัก ณ อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 20 วัน	77
4.7 ปริมาณเอทานอลของคอมบูชาจากชาอู่หลง คอมบูชาจากเกสรบัวหลวงและคอมบูชาจากดอกอัญชันหมัก ณ อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 20 วัน	78
4.8 ค่าการดักจับอนุมูลอิสระ DPPH ของคอมบูชาจากชาอู่หลง คอมบูชาจากเกสรบัวหลวงและคอมบูชาจากอัญชันระหว่างการหมักที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 20 วัน	82
4.9 ค่าความเข้มข้นของคอมบูชาจากชาอู่หลง คอมบูชาจากเกสรบัวหลวงและคอมบูชาจากอัญชันที่สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH ให้ลดลงได้ เปอร์เซ็นต์ 50(IC ₅₀) ในระหว่างการหมักที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 20 วัน	83
4.10 ค่าการดักจับอนุมูลอิสระ ABTS ของคอมบูชาจากชาอู่หลง คอมบูชาจากเกสรบัวหลวงและคอมบูชาจากอัญชันระหว่างการหมักที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 20 วัน	85
4.11 ค่าความเข้มข้นของคอมบูชาจากชาอู่หลง คอมบูชาจากเกสรบัวหลวงและคอมบูชาจากอัญชันระหว่างการหมักที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 20 วันที่สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระ ABTS ให้ลดลงได้ 50 เปอร์เซ็นต์ (IC ₅₀)	85

4.12 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของคอมบูชาจากชาอู่หลง คอมบูชาจากเกสรบัวหลวงและ คอมบูชาจากอัญชันที่หมักเป็นระยะเวลา 20 วัน ณ อุณหภูมิห้อง	89
4.13 ปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ของคอมบูชาจากชาอู่หลง คอมบูชาจากเกสรบัวหลวงและ คอมบูชาจากอัญชันที่หมักเป็นระยะเวลา 20 วัน ณ อุณหภูมิห้อง	88
4.14 การทดสอบทางประสาทสัมผัสของคอมบูชาจากชาอู่หลง คอมบูชาจากเกสรบัวหลวงและ คอมบูชาจากอัญชันที่หมักในระยะเวลาที่แตกต่างกัน	89
4.15 การเปลี่ยนแปลงคุณภาพทางเคมีของคอมบูชาจากอัญชันในระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 56 วัน	101
4.16 การเปลี่ยนแปลงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของคอมบูชาจากอัญชันในระหว่างกระบวนการเก็บ	102

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่	หน้า
รักษาที่อุณหภูมิห้องเป็นระยะเวลา 56 วัน	
4.17 การเปลี่ยนแปลงสารประกอบฟีนอลิกของคอมบูชาจากอัญชันในระหว่างกระบวนการเก็บรักษา ที่อุณหภูมิห้องเป็นระยะเวลา 56 วัน	103
4.18 การเปลี่ยนแปลงของปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด ยีสต์และราในระหว่างการเก็บรักษาของคอมบูชา จากอัญชันที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 56 วัน	104
ง-1 ค่าการดักจับอนุมูลอิสระ DPPH ของคอมบูชาจากสมุนไพรร 10 ชนิด ที่หมักเป็นเวลา 10 วัน ที่ อุณหภูมิห้อง	132
ง-2 ความเข้มข้นของคอมบูชาจากสมุนไพรรแต่ละชนิดที่สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH ได้ 50 เปอร์เซ็นต์ เซ็นต์ (IC ₅₀) โดยหมักที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 วัน	134
ง-3 ค่าการดักจับอนุมูลอิสระ ABTS ของคอมบูชาจากสมุนไพรร 10 ชนิด ที่หมักเป็นเวลา 10 วัน ที่ อุณหภูมิห้อง	136
ง-4 ความเข้มข้นของคอมบูชาจากสมุนไพรรแต่ละชนิดที่สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระ ABTS ได้ 50 เปอร์เซ็นต์ เซ็นต์ (IC ₅₀) โดยหมักที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 วัน	138
ง-5 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกของคอมบูชาจากสมุนไพรร 10 ชนิด ที่หมักเป็นเวลา 10 วัน ณ อุณหภูมิห้อง	140
ง-6 ปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ของคอมบูชาจากสมุนไพรร 10 ชนิด ที่หมักเป็นเวลา 10 วัน ณ อุณหภูมิห้อง	142
ง-7 การเปลี่ยนแปลงของค่า pH ระหว่างการหมักของคอมบูชาจากชาอู่หลง คอมบูชาจากเกสรบัวหลวง และคอมบูชาจากอัญชันที่หมักเป็นเวลา 20 วัน ณ อุณหภูมิห้อง	144
ง-8 การเปลี่ยนแปลงของปริมาณกรดอะซิติกระหว่างการหมักของคอมบูชาจากชาอู่หลง คอมบูชาจาก	149

	เกสรบัวหลวงและคอมบูชาจากอัญชันที่หมักเป็นเวลา 20 วัน ณ อุณหภูมิห้อง	
ง-9	การเปลี่ยนแปลงปริมาณน้ำตาลทั้งหมดระหว่างการหมักของคอมบูชาจากชาอู่หลง คอมบูชาจาก เกสรบัวหลวงและคอมบูชาจากอัญชันที่หมักเป็นเวลา 20 วัน ณ อุณหภูมิห้อง	155
ง-10	การเปลี่ยนแปลงปริมาณเอทานอลระหว่างการหมักของคอมบูชาจากชาอู่หลง คอมบูชาจากเกสร บัวหลวงและคอมบูชาจากอัญชันที่หมักเป็นเวลา 20 วัน ณ อุณหภูมิห้อง	161
ง-11	การเปลี่ยนแปลงค่าการดักจับอนุมูลอิสระ DPPH ระหว่างการหมักของคอมบูชาจากชาอู่หลง คอม บูชาจากเกสรบัวหลวงและคอมบูชาจากอัญชันที่หมักเป็นเวลา 20 วัน ณ อุณหภูมิห้อง	167
ง-12	การเปลี่ยนแปลงค่า IC ₅₀ ต่ออนุมูลอิสระ DPPH ระหว่างการหมักของคอมบูชาจากชาอู่หลง คอมบู ชาจากเกสรบัวหลวงและคอมบูชาจากอัญชันที่หมักเป็นเวลา 20 วัน ณ อุณหภูมิห้อง	173
ง-13	การเปลี่ยนแปลงค่าการดักจับอนุมูลอิสระ ABTS ระหว่างการหมักของคอมบูชาจากชาอู่หลง คอม บูชาจากเกสรบัวหลวงและคอมบูชาจากอัญชันที่หมักเป็นเวลา 20 วัน ณ อุณหภูมิห้อง	179
ง-14	การเปลี่ยนแปลงค่า IC ₅₀ ต่ออนุมูลอิสระ ABTS ระหว่างการหมักของคอมบูชาจากชาอู่หลง คอมบู ชาจากเกสรบัวหลวงและคอมบูชาจากอัญชันที่หมักเป็นเวลา 20 วัน ณ อุณหภูมิห้อง	185
ง-15	การเปลี่ยนแปลงปริมาณสารประกอบฟีนอลิกระหว่างการหมักของคอมบูชาจากชาอู่หลง คอมบูชา จากเกสรบัวหลวงและคอมบูชาจากอัญชันที่หมักเป็นเวลา 20 วัน ณ อุณหภูมิห้อง	191

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
ง-16	การเปลี่ยนแปลงปริมาณฟลาโวนอยด์ระหว่างการหมักของคอมบูชาจากชาอู่หลง คอมบูชาจาก เกสรบัวหลวงและคอมบูชาจากอัญชันที่หมักเป็นเวลา 20 วัน ณ อุณหภูมิห้อง	197
ง-17	ความพึงพอใจของผู้บริโภคที่มีต่อคอมบูชาจากชาอู่หลง คอมบูชาจากเกสรบัวหลวงและคอมบูชา จากอัญชันในระหว่างการหมัก ที่หมักเป็นเวลา 20 วัน ณ อุณหภูมิห้อง	203
ง-18	ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระภายในเซลล์ของชาอู่หลงที่ไม่ผ่านกระบวนการหมัก ชาอัญชันที่ไม่ผ่าน กระบวนการหมัก คอมบูชาจากชาอู่หลงและคอมบูชาจากอัญชันที่หมักเป็นเวลา 15 วัน	233
ง-19	การเหนี่ยวนำการสร้าง mRNA ของ Antioxidant enzyme ของชาอู่หลงที่ไม่ผ่านกระบวนการ การหมัก ชาอัญชันที่ไม่ผ่านกระบวนการหมัก คอมบูชาจากชาอู่หลงและคอมบูชาจากอัญชันที่ หมักเป็นเวลา 15 วัน	235
ง-20	การเปลี่ยนแปลงระหว่างการรักษาของคอมบูชาจากอัญชัน โดยเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้องเป็น เวลา 56 วัน	242

สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
2.1 กระบวนการผลิตเครื่องดื่มคอมบูชา	4
2.2 ปฏิกริยาที่เกิดขึ้นในระหว่างกระบวนการหมักคอมบูชา	5
2.3 ลักษณะของเครื่องดื่มคอมบูชาจากชาดำและแผ่นเซลล์ูโลสที่เกิดขึ้น	5
2.4 กระบวนการผลิตแอลกอฮอล์โดยจุลินทรีย์	6
2.5 โครงสร้างทางเคมีของเซลล์ูโลส	8
2.6 เซลล์ูโลสจากแบคทีเรีย (ข้าว) และเซลล์ูโลสจากพืช (ข้าว)	8
2.7 ลักษณะของแบคทีเรีย <i>Acetobacter xylinum</i>	9
2.8 ลักษณะของยีสต์ <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	11
2.9 ชาอู่หลง (<i>Camellia sinensis</i>)	13
2.10 ลักษณะของดอกและเกสรตัวผู้ของบัวหลวง (<i>Nelumbo nucifera</i>)	15
2.11 แก้วกึ่งหรือกอลจีเบอร์รี่ (<i>Lycium barbarum</i>)	16
2.12 ลำต้น ใบ และผล ของใบย่านาง (<i>Tiliacora triandra</i>)	18
2.13 หม่อน (<i>Morus alba</i> Linn.)	19
2.14 กระจีบบ (<i>Hibiscus sabdariffa</i> L.)	20
2.15 ตะไคร้หอม (<i>Cymbopogon nardus</i> Rendle)	22
2.16 มะตูม (<i>Aegle marmelos</i>)	23
2.17 หล่อฮั้งก้วย (<i>Siraitia grosvenorii</i>)	25
2.18 อัญชัน (<i>Clitoria ternatea</i>)	26
2.19 ที่มาของอนุมูลอิสระกลุ่มออกซิเจนที่เกิดขึ้นจากในและนอกร่างกายและสมดุลของระบบ ต้านอนุมูลอิสระภายในร่างกาย	28
2.20 ลักษณะโครงสร้างพื้นฐานของสารประกอบโพลีฟีนอล	37
2.21 การเกิดปฏิกริยาระหว่างอนุมูลอิสระ DPPH กับสารต้านอนุมูลอิสระ	41
2.22 การเกิดปฏิกริยาระหว่างอนุมูลอิสระ ABTS กับสารต้านอนุมูลอิสระ	42
4.1 ค่าการดักจับอนุมูลอิสระ DPPH และ ABTS (ร้อยละ) ของคอมบูชาจากสมุนไพร ชนิดหมักที่ 10 อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 วัน	73
4.2 ค่า IC ₅₀ ของคอมบูชาจากสมุนไพรทั้ง 10 ชนิด ที่ถูกกระตุ้นด้วยอนุมูลอิสระ DPPH และ ABTS	73

- 4.3 การเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชและปริมาณกรดอะซิติกของคอมบูซาจากซาอู่หลง คอมบูซาจากเกสรบัวหลวงและคอมบูซาจากอัญชันในระหว่างกระบวนการหมัก 20 วัน
- 4.4 การเปลี่ยนแปลงปริมาณน้ำตาลทั้งหมดและปริมาณเอทานอลของคอมบูซาจากซาอู่หลง 81

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่	หน้า
คอมบูซาจากเกสรบัวหลวงและคอมบูซาจากอัญชันในระหว่างกระบวนการหมัก 20 วัน	
4.5 ค่าความเข้มข้นของคอมบูซาจากซาอู่หลง คอมบูซาจากเกสรบัวหลวงและคอมบูซาจากอัญชันที่สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH ให้ลดลงได้ เปอร์เซ็นต์ 50(IC ₅₀) ในระหว่างการหมักที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 20 วัน	84
4.6 ค่าความเข้มข้นของคอมบูซาจากซาอู่หลง คอมบูซาจากเกสรบัวหลวงและคอมบูซาจากอัญชันระหว่างการหมักที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 20 วัน ที่สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระ ABTS ให้ลดลงได้ 50 เปอร์เซ็นต์ (IC ₅₀)	89
4.7 การเปลี่ยนแปลงปริมาณสารประกอบฟีนอลิกในระหว่างกระบวนการหมักของคอมบูซาจากซาอู่หลง คอมบูซาจากเกสรบัวหลวงและคอมบูซาจากอัญชัน หมักที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 20 วัน	89
4.8 การเปลี่ยนแปลงปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ในระหว่างกระบวนการหมักของคอมบูซาจากซาอู่หลง คอมบูซาจากเกสรบัวหลวงและคอมบูซาจากอัญชัน หมักที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 20 วัน	90
4.9 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ HEK-293 ของซาอู่หลงที่ไม่ผ่านกระบวนการหมัก (A) ซาอู่หลงที่ไม่ผ่านกระบวนการหมัก (B) คอมบูซาจากซาอู่หลง (C) และคอมบูซาจากอัญชัน (D)	96
4.10 ฤทธิ์ต้านการออกซิเดชันของคอมบูซา โดยการวัดปริมาณ ROS ภายในเซลล์ด้วย fluorescent reader	98
4.11 การทดสอบฤทธิ์ของคอมบูซาจากซาอู่หลง (OK) คอมบูซาจากอัญชัน (PK) ซาอู่หลงที่ไม่ผ่านกระบวนการหมัก (OT) และซาอู่หลงที่ไม่ผ่านกระบวนการหมัก (PT) ต่อการสร้าง mRNA ของ antioxidant enzymes (mRNA expression)	100

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของงานวิจัย

ขณะนี้สถานการณ์เศรษฐกิจของอุตสาหกรรมอาหารและเครื่องดื่มสุขภาพกำลังเติบโต เนื่องจากผู้บริโภค โดยเฉพาะกลุ่มผู้บริโภคสมัยใหม่ที่รักษาสุขภาพและต้องการความสะดวกรวดเร็ว นั้น มีการบริโภคอาหารและเครื่องดื่มที่มีคุณภาพ มีความปลอดภัย เป็นอาหารที่เป็นธรรมชาติ ไม่ผ่านกระบวนการปรุงแต่ง และดีต่อสุขภาพ ส่งผลให้การผลิตและการจำหน่ายอาหารและเครื่องดื่มเพื่อสุขภาพภายในประเทศมีแนวโน้มขยายตัวและน่าสนใจในอนาคต ปัจจุบันมีผลิตภัณฑ์อาหารและเครื่องดื่มเพื่อสุขภาพที่น่าสนใจ เช่น อาหารออร์แกนิก (Organic food) อาหารที่ไม่ผ่านการปรุงรส (Clean food) ขนมทานเล่นเพื่อสุขภาพต่าง ๆ น้ำผลไม้สกัดเย็น รวมถึงเครื่องดื่มคอมบูชา (Kombucha) ซึ่งเป็นเครื่องดื่มชาหมักที่เป็นที่รู้จักในกลุ่มคนรักสุขภาพ (จาร์รี่ และคณะ, 2561 ; ศูนย์วิจัยเศรษฐกิจ ธุรกิจ และเศรษฐกิจฐานราก, 2561b)

คอมบูชาเป็นเครื่องดื่มชาชนิดหนึ่ง que พัฒนาขึ้นมาเพื่อเพิ่มทางเลือกในการดูแลสุขภาพ มีสรรพคุณในเรื่องของการล้างสารพิษต่าง ๆ ในร่างกาย รวมถึงลดปริมาณคอเลสเตอรอล บำรุงตับไต ลดความอ้วน ป้องกันไม่ให้เกิดอาการท้องร่วง ยับยั้งเซลล์มะเร็ง มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรค เพิ่มระบบภูมิคุ้มกัน ลดเลื้อนริ้วรอย และให้พลังงาน (Dufresne and Farnworth, 2000) คอมบูชาสามารถผลิตได้โดยนำน้ำชาหมักร่วมกับแบคทีเรียและยีสต์ที่เป็นหัวเชื้อคอมบูชา และใช้น้ำตาลเป็นแหล่งพลังงาน คอมบูชามีส่วนผสมของสารให้กลิ่นรสที่สำคัญในเครื่องดื่มคอมบูชา เช่น กรดอะซิติก (Acetic acid) กรดออกซาลิก (Oxalic acid) กรดแซคคาริก (Saccharic acid) กรดคาร์บอนิก (Carbonic acid) กรดกลูโคนิก (Gluconic acid) กรดคีโตกลูโคนิก (Ketogluconic acid) และน้ำตาลฟรุกโตส (Fructose) ทำให้คอมบูชามีรสชาติเปรี้ยวและหวานคล้ายเครื่องดื่มไซเดอร์ (Cider) นอกจากนี้ ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระของคอมบูชาเป็นผลมาจากสารประกอบโพลีฟีนอล (Polyphenol) ในใบชา กรดแอสคอร์บิก (Ascorbic acid) วิตามิน (Vitamin) และแร่ธาตุ (Mineral) ซึ่งทำให้คอมบูชามีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระมากกว่าเครื่องดื่มชาปกติ (Chen and Liu, 2000 ; Dufresne and Farnworth, 2000 ; Mayser *et al.*, 1995 ; Cvetkovic *et al.*, 2008) จากการศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งอนุมูลอิสระสังเคราะห์ของคอมบูชาที่ผลิตจากชาดำ ชาเขียว และชาชนิดอื่น ๆ ของ Jayabalan *et al.*, (2008a) พบว่า คอมบูชาประกอบด้วยสารประกอบฟีนอลิกที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระดีพีพีเอช (DPPH radical) อนุมูลอิสระซูเปอร์ออกไซด์ (Superoxide radical) และอนุมูลอิสระไฮดรอกซิล (OH radical) นอกจากนี้ พบว่าเมื่อเพิ่มระยะเวลาการหมัก คอมบูชาจะมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเพิ่มสูงขึ้น

ในปัจจุบัน เครื่องดื่มคอมบูชาได้รับความสนใจที่จะนำมาวิจัยและศึกษาเพิ่มมากขึ้น โดยเฉพาะ

ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระของคอมบูชา โดยใช้สมุนไพรรวมถึงสารสกัดชนิดต่าง ๆ มาใช้แทนชาดำในการผลิตเพื่อพัฒนาเครื่องดื่มคอมบูชา แต่ยังไม่มีการวิจัยใดที่ใช้สมุนไพรไทยมาใช้ในการหมักคอมบูชา ซึ่งงานวิจัยนี้ต้องการนำพืชสมุนไพรชนิดต่าง ๆ ที่มีในประเทศไทยมาใช้เป็นวัตถุดิบในการหมักคอมบูชาเพื่อผลิตเครื่องดื่มคอมบูชารสชาติใหม่ที่มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระสูงและเป็นเครื่องดื่มที่มีประโยชน์ต่อร่างกาย ในงานวิจัยนี้จึงมุ่งเน้นในการผลิตและการศึกษาฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระของคอมบูชาจากสมุนไพร 10 ชนิด รวมถึงศึกษาอายุการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มคอมบูชาจากสมุนไพรที่คัดเลือกได้

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

- 1) ศึกษาฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระของคอมบูชาจากสมุนไพรที่จะนำมาใช้ในการหมักคอมบูชา
- 2) ศึกษาการเปลี่ยนแปลงคุณภาพทางเคมีและฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระในระหว่างกระบวนการหมักของคอมบูชาจากสมุนไพรที่คัดเลือกได้
- 3) ศึกษาฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระภายในเซลล์ของผลิตภัณฑ์คอมบูชาที่คัดเลือกได้
- 4) ศึกษาการเปลี่ยนแปลงคุณภาพทางกายภาพ คุณภาพทางเคมี คุณภาพทางจุลินทรีย์และการทดสอบการยอมรับของผู้บริโภคระหว่างการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์คอมบูชาที่ผลิตได้

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

คัดเลือกคอมบูชาที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงจากสมุนไพร 10 ชนิด ได้แก่ เกสรบัวหลวง เก๋ากี้ ไบย่านาง ดอกกระเจี๊ยบ ตะไคร้ มะตูม หล่อฮั้งก้วย อัญชัน และชาอู่หลง โดยศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH อนุมูลอิสระ ABTS และศึกษาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ เพื่อผลิตเครื่องดื่มคอมบูชาจากสมุนไพรที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูง โดยใช้ชาอู่หลงเป็นชุดควบคุม จากนั้นศึกษาการเปลี่ยนแปลงคุณภาพทางเคมีและฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระในระหว่างกระบวนการหมักคอมบูชาจากสมุนไพรที่คัดเลือกได้ จากนั้นศึกษาฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระภายในเซลล์ รวมถึงศึกษาอายุการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มคอมบูชา

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

- 1) สามารถผลิตคอมบูชาจากสมุนไพรที่มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระสูงและเป็นที่ยอมรับของผู้บริโภค
- 2) สามารถนำสมุนไพรที่มีในประเทศไทยมาเพิ่มมูลค่าให้สูงขึ้น โดยนำมาผลิตเครื่องดื่มที่มีประโยชน์ต่อสุขภาพ

บทที่ 2

ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 คอมบูชา (Kombucha)

2.1.1 ประวัติความเป็นมาของเครื่องดื่มคอมบูชา

เครื่องดื่มคอมบูชา (Kombucha beverages) มีประวัติความเป็นมาที่ค่อนข้างซับซ้อนและมีหลากหลายเรื่องราวที่เล่าต่อกันมา กล่าวกันว่าคอมบูชาคือเครื่องดื่มชาหมักชนิดหนึ่งที่มีต้นกำเนิดในประเทศจีน ตั้งแต่ยุคสมัยจักรพรรดิฉินซีฮ่องเต้ (Qinshi Huangdi) ชาวจีนในยุคนั้นนิยมหมักเครื่องดื่มคอมบูชา ตั้งแต่ระดับครัวเรือนเนื่องจากเชื่อกันว่า เครื่องดื่มคอมบูชาเป็นเครื่องดื่มแห่งความอมตะเพราะมีสรรพคุณเป็นอาหารอายุวัฒนะ ชะลอความแก่ชราและใช้ในการรักษาโรคบางชนิด ชาวจีนในยุคนั้น ได้มีการตั้งชื่อเครื่องดื่มชนิดนี้ว่า ฮงชากู (Hóngchágu) ซึ่งมีความหมายว่า ชาแห่งความอมตะ (Crum *et al.*, 2016) อีกหนึ่งเรื่องราวของประวัติความเป็นมาของเครื่องดื่มคอมบูชาที่มีการกล่าวถึงที่มาของชื่อเรียกคอมบูชานั้นระบุว่า ชื่อเรียกคอมบูชามาจากชื่อของนายแพทย์ชาวเกาหลีนามว่า คิมมู (Kim-Mu) นายแพทย์คนนี้ได้นำชาหมักมาถวายการรักษาแก่จักรพรรดิอิงเจียว (Emperor Ingyo) แห่งประเทศญี่ปุ่นในคริสต์ศตวรรษ 415 ตั้งแต่นั้นเป็นต้นมาชาหมักชนิดดังกล่าวจึงถูกเรียกว่า คอมบูชา (Kombucha) ตามชื่อของนายแพทย์คิมมู (Roth, 2007; Chamberlain and Aston, 2005) ข้อมูลประวัติความเป็นมาของคอมบูชาที่ถูกบันทึกไว้มีการค้นพบเป็นครั้งแรกในศตวรรษที่ 19 ที่ประเทศรัสเซีย ต่อมาในยุคสมัยสงครามโลกครั้งที่ 2 สงครามครั้งนั้นทำให้มีการแลกเปลี่ยนวัฒนธรรมของแต่ละประเทศ ดังนั้นคอมบูชาจึงเป็นที่รู้จักกันอย่างกว้างขวางและมีชื่อเรียกแตกต่างกันในแต่ละประเทศ เช่น ในประเทศเยอรมันจะเรียกเครื่องดื่มชาหมักชนิดนี้ว่า Mo-Gu หรือ Fungojapon ประเทศรัสเซีย เรียก Miracle mushroom หรือ Volga mushroom หรือ Tea-Kvass mushroom นอกจากนี้เครื่องดื่มคอมบูชายังมีชื่อเรียกอื่น ๆ มากมาย ได้แก่ Kombucha mushroom และ Kombucha scoby ซึ่งเป็นชื่อที่ใช้กันอย่างสามัญ (Frank, 1996) เครื่องดื่มคอมบูชามีรสชาติเปรี้ยวหวานคล้ายกับเครื่องดื่มไซเดอร์ (Cider) เนื่องจากคอมบูชามีสารให้กลิ่นรสที่สำคัญ คือ ฟรุคโตส (Fructose) กรดอะซิติก (Acetic acid) และกรดกลูโคนิก (Gluconic acid) เป็นหลัก นอกจากนี้ยังประกอบไปด้วย เอทิลกลูโคเนท (Ethyl-gluconate) กรดออกซาลิก (Oxalic acid) กรดแซคคาริก (Saccharic acid) กรดคีโตไกลโคนิก (Ketoglyconic acid) กรดซักซินิก (Succinic acid) กรดคาร์บอนิก (Carbonic acid) กรดกลูคูโรนิก (Glucuronic acid) กรดแอสคอบิก (Ascorbic acid) ไทอะมิน (Thiamin) ไรโบฟลาวิน (Riboflavin) และเกลือแร่ที่จำเป็นต่อร่างกายอีกหลายชนิด (Beaufort *et al.*, 2018) รวมถึงก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์และแอลกอฮอล์ สารประกอบอินทรีย์ต่าง ๆ เหล่านี้มีคุณสมบัติในการกำจัดสารพิษต่าง ๆ ภายในร่างกาย (Linde *et al.*, 2013) รักษาโรคข้อเข่าเสื่อม (Yavari *et al.*, 2011) บรรเทาอาการอักเสบ (Allen, 1998) ป้องกันโรคเบาหวาน ป้องกันโรคทางเดินอาหาร รักษาระดับ

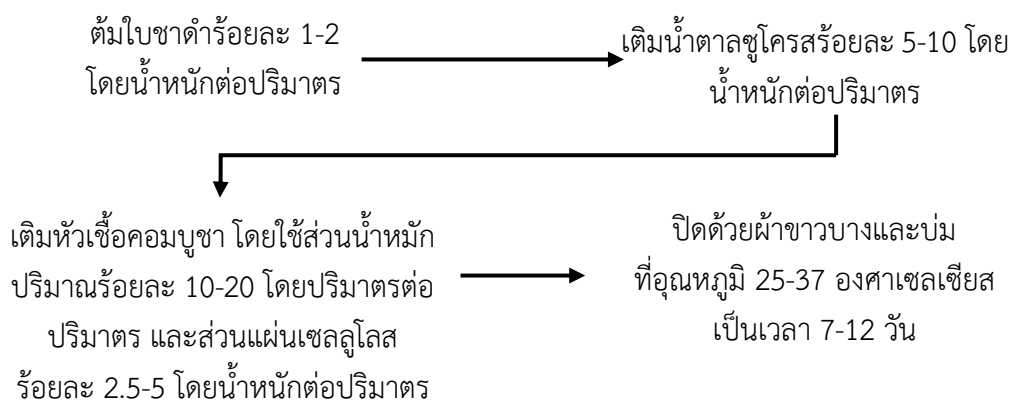
คลอเรสเตอรอล ป้องกันโรคความดันโลหิตสูงและโรคมะเร็ง (Alouloeut *et al.*, 2012) ดังนั้นคอมพิวเตอร์จึงกลายเป็นเครื่องดื่มชนิดหนึ่งที่มีประโยชน์อย่างมากในการรักษาโรคชนิดต่าง ๆ

สรรพคุณของคอมพิวเตอร์ขึ้นอยู่กับคุณภาพของวัตถุดิบที่นำมาใช้ผลิตคอมพิวเตอร์ เนื่องจากวัตถุดิบแต่ละชนิดจะมีองค์ประกอบทางเคมีที่แตกต่างกัน เช่น ปริมาณคาเฟอีน (Caffeine) เทอฟีลีน (Theophylline) เทอโบรมีน (Theobromine) และสารโพลีฟีนอล (Polyphenol) เช่น คาเทชิน (Catechins) เป็นต้น (พรรัตน์, 2550)

2.1.2 กระบวนการผลิตเครื่องดื่มคอมพิวเตอร์และปฏิกิริยาในระหว่างกระบวนการหมัก

การผลิตเครื่องดื่มคอมพิวเตอร์เป็นที่นิยมผลิตกันอย่างแพร่หลายในระดับครัวเรือน เนื่องจากสามารถทำได้ง่ายและไม่ซับซ้อน ดังนั้นจึงไม่มีมาตรฐานในการผลิตเครื่องดื่มคอมพิวเตอร์ที่ชัดเจน ผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มคอมพิวเตอร์ส่วนใหญ่จึงยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัดถึงชนิดและปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ที่ดำเนินกิจกรรมระหว่างกระบวนการหมักเพราะในทางปฏิบัติจะนำเชื้อจุลินทรีย์จากการหมักครั้งแรกมาใช้เป็นหัวเชื้อในกระบวนการหมักครั้งต่อไป (พรรัตน์, 2550)

ถึงแม้ว่าการผลิตเครื่องดื่มคอมพิวเตอร์ส่วนใหญ่จะผลิตกันในระดับครัวเรือนแต่ผลการศึกษาความปลอดภัยของเครื่องดื่มคอมพิวเตอร์นั้นแทบจะไม่พบว่าคอมพิวเตอร์มีอัตราการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ที่เป็นพิษและก่อให้เกิดอันตรายแก่ร่างกายของมนุษย์ เครื่องดื่มคอมพิวเตอร์ส่วนใหญ่มีค่าความเป็นกรด-เบสประมาณ 2.5 ซึ่งค่าความเป็นกรดเบสดังกล่าวทำให้เกิดข้อจำกัดของการเจริญของจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรคส่งผลให้เครื่องดื่มคอมพิวเตอร์ไม่เกิดการปนเปื้อนและมีความปลอดภัยต่อการบริโภค (Markov *et al.*, 2003)

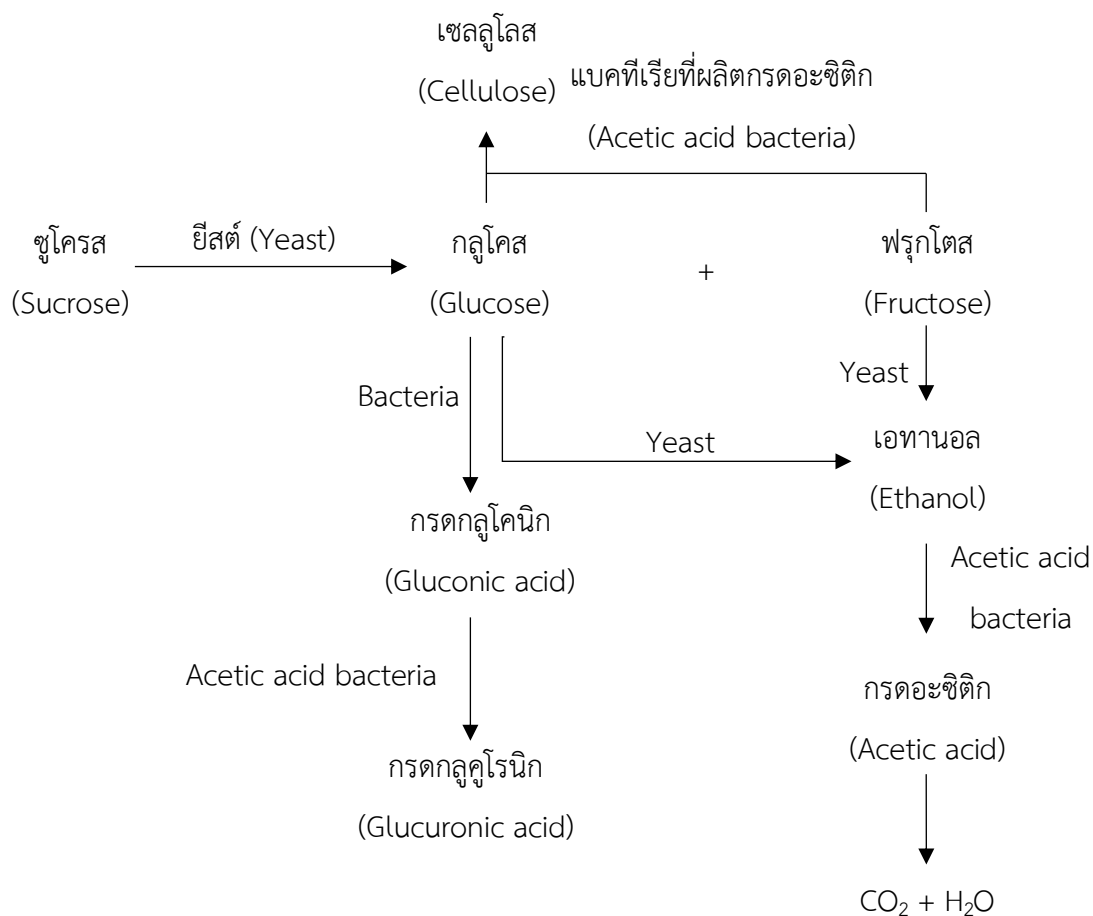


รูปที่ 2.1 กระบวนการผลิตเครื่องดื่มคอมพิวเตอร์

ที่มา: Kallel *et al.*, (2012)

กิจกรรมการหมักคอมพิวเตอร์เกิดจากการทำงานร่วมกันของจุลินทรีย์กลุ่มแบคทีเรียและยีสต์ โดยนิยมใช้น้ำตาลทรายหรือน้ำตาลซูโครสเป็นแหล่งพลังงานของจุลินทรีย์ในกระบวนการหมักคอมพิวเตอร์ ในระยะแรกน้ำตาลซูโครสจะถูกย่อยด้วยเอนไซม์จากจุลินทรีย์ให้กลายเป็นน้ำตาลโมเลกุล

เล็ก ๆ ได้แก่ น้ำตาลกลูโคสและน้ำตาลฟรุกโตส ต่อมาน้ำตาลทั้งสองชนิดนี้จะถูกหมักต่อเป็นเอทานอลโดยยีสต์และแผ่นเซลลูโลสโดยแบคทีเรีย แสดงดังรูปที่ 2.2 และ 2.3



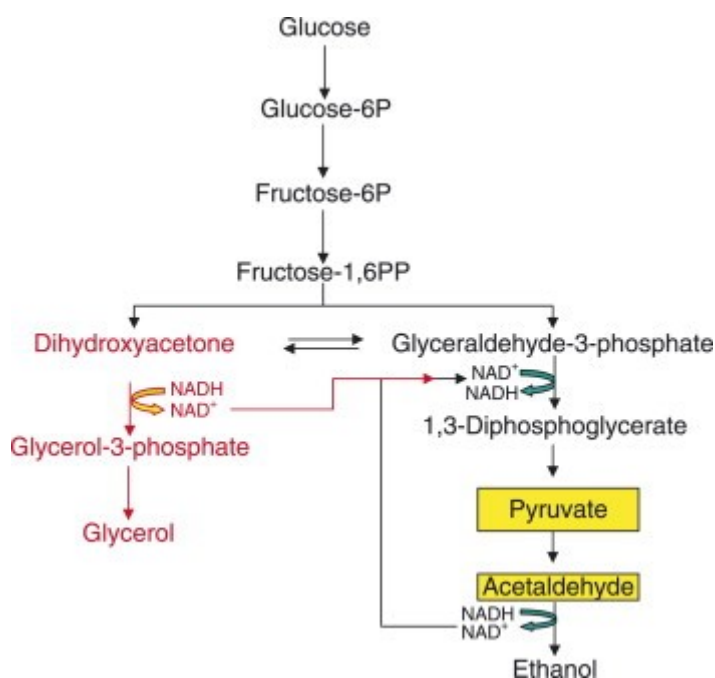
รูปที่ 2.2 ปฏิกริยาที่เกิดขึ้นในระหว่างกระบวนการหมักคอมบูชา
ดัดแปลงจาก: Markov *et al.*, (2003)



รูปที่ 2.3 ลักษณะของเครื่องดื่มคอมบูชาจากชาดำและแผ่นเซลลูโลสที่เกิดขึ้น

2.1.2.1 กระบวนการหมักแอลกอฮอล์ของจุลินทรีย์

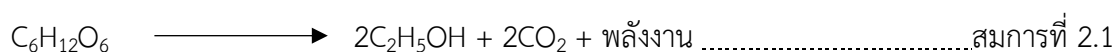
กระบวนการผลิตแอลกอฮอล์ของจุลินทรีย์ (Alcoholic fermentation) เป็นกระบวนการสลายอาหารแบบไม่ใช้ออกซิเจน (Anaerobic fermentation) โดยเริ่มต้นจากวิถีไกลโคไลซิส (Glycolysis pathway) เช่นเดียวกับการสลายอาหารแบบใช้ออกซิเจน กล่าวคือ กระบวนการผลิตแอลกอฮอล์ของจุลินทรีย์จะเริ่มต้นจากการสลายกลูโคส 1 โมเลกุล ให้กลายเป็นกรดไพรูวิก (Pyruvic acid) 2 โมเลกุล แล้วปล่อยพลังงานในรูปของอะดีโนซีนไตรฟอสเฟต (Adenosine triphosphate, ATP) 2 โมเลกุล และไฮโดรเจน (H^+) 4 อะตอม จากนั้นอะตอมของไฮโดรเจนที่เกิดขึ้นจะรวมตัวกับนิโคตินาไมด์อะดีนีนไดนิวคลีโอไทด์ (Nicotinamide adenine dinucleotide, NAD) และถ่ายทอดอะตอมของไฮโดรเจนให้กับแอซิทัลดีไฮด์ (Acetaldehyde) ไปใช้ในกระบวนการผลิตแอลกอฮอล์ ดังรูปที่ 2.4



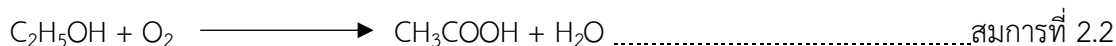
รูปที่ 2.4 กระบวนการผลิตแอลกอฮอล์โดยจุลินทรีย์

ที่มา: Ciani *et al.*, (2008)

ดังนั้นกระบวนการผลิตเอทานอลจึงเป็นการใช้น้ำตาลกลูโคสเป็นสารตั้งต้น และได้ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์และพลังงานเป็นผลพลอยได้ ดังสมการที่ 2.1



สภาวะที่เกิดขึ้นข้างต้นเป็นสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของกลุ่มแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตกรดอะซิติก (Acetic acid bacteria) เช่น *Acetobacter* เป็นต้น ดังสมการที่ 2.2



Acetobacter เป็นแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตกรดอะซิติกที่มีความสามารถในการผลิตกรดอะซิติก กรดกลูโคนิกและเซลลูโลส ซึ่งสภาวะความเป็นกรดที่เพิ่มขึ้นสามารถเร่งการเจริญเติบโตของยีสต์และทำให้ยีสต์ผลิตแอลกอฮอล์ได้ดีขึ้น ในสภาวะที่มีปริมาณแอลกอฮอล์นั้นก็สามารถช่วยกระตุ้นการเจริญของ *Acetobacter* และทำให้สามารถผลิตกรดอะซิติกได้ดีขึ้นเช่นกัน ปริมาณแอลกอฮอล์ที่ผลิตได้ในเครื่องต้มคอมบูชาที่มีปริมาณไม่สูงเท่าเครื่องต้มแอลกอฮอล์ทั่วไปเนื่องจากแบคทีเรีย *Acetobacter* สามารถออกซิไดซ์แอลกอฮอล์ไปเป็นแอซิทัลดีไฮด์และสารให้กลิ่นรสอื่น ๆ โดยปกติเครื่องต้มคอมบูชาที่มีปริมาณแอลกอฮอล์ไม่เกิน 10 กรัมต่อลิตร ส่วนปริมาณกรดทั้งหมดมีค่าน้อยกว่า 30 กรัมต่อลิตร (Greenwalt, 2000; Dufresne and Farnworth, 2000)

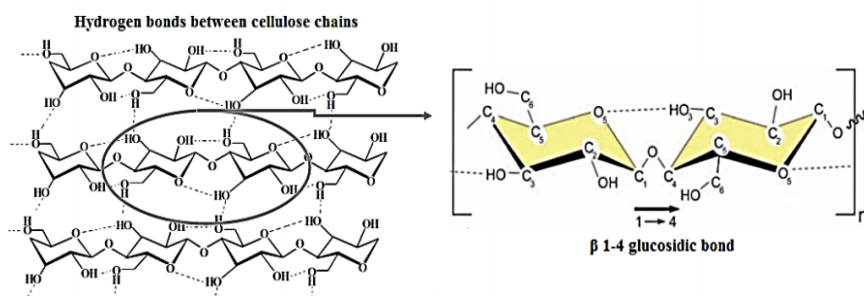
2.1.3 จุลินทรีย์ที่พบในเครื่องต้มคอมบูชา

กลุ่มแบคทีเรียและยีสต์ที่มีบทบาทสำคัญในการหมักเครื่องต้มคอมบูชาส่วนใหญ่เป็นกลุ่มแบคทีเรียที่ต้องการอากาศในการเจริญเติบโตและสามารถสร้างแผ่นเซลลูโลสได้ เช่น *Acetobacter aceti*, *Acetobacter xylinum* และ *Acetobacter pasteurianus* เป็นต้น รวมถึงกลุ่มยีสต์ที่สามารถผลิตแอลกอฮอล์ เช่น *Saccharomyces cerevisiae* และ *Zygosaccharomyces bailii* เป็นต้น จุลินทรีย์เหล่านี้สามารถเจริญได้ในอาหารที่มีความเป็นกรดสูง มีน้ำตาลสูง และเป็นจุลินทรีย์ที่มีความสำคัญในอุตสาหกรรมการผลิตเครื่องต้มแอลกอฮอล์และอาหารหมัก (Greenwalt et al., 2000; Liu et al., 1996; Jayabalan, 2014)

2.1.3.1 แบคทีเรียเซลลูโลส

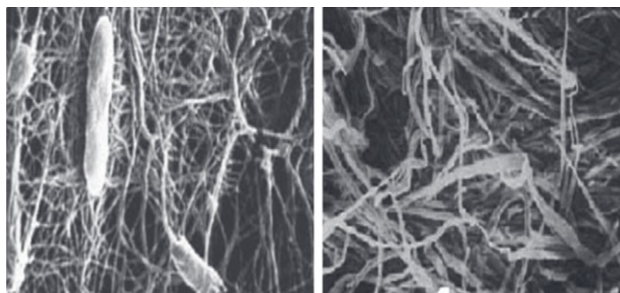
แบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตเซลลูโลส (Bacterial Cellulose (BC) Producer) ได้ถูกค้นพบเมื่อปีค.ศ. 1886 ซึ่งแบคทีเรียในกลุ่มนี้ ได้แก่ *Acetobacter*, *Sarcina*, *Achromobacter*, *Aerobacter*, *Pseudomonas*, *Agrobacterium*, *Alcaligenes*, *Azotobacter* และ *Rhizobium* (Deinema and Zevenhuizen, 1971) เซลลูโลสที่ถูกสร้างขึ้นโดยแบคทีเรีย (Bacterial cellulose) เป็นชีววัสดุธรรมชาติที่มีความบริสุทธิ์สูง ปราศจากลิกนิน (Lignin) และเฮมิเซลลูโลส (Hemicellulose) เซลลูโลสชนิดนี้ไม่สามารถละลายในสารละลายกรดต่างที่อุณหภูมิห้อง แต่สามารถละลายได้ในสารละลายกรดที่มีความเข้มข้นสูงที่อุณหภูมิ 120–130 องศาเซลเซียส (Haigler, 1985)

โครงสร้างของเซลลูโลสจากแบคทีเรียเป็นคาร์โบไฮเดรตชนิดโฮโมโพลีแซคคาไรด์เชิงเส้น (Homopolysaccharide) ประกอบด้วยโมเลกุลของน้ำตาลกลูโคสที่เชื่อมต่อกันเป็นสายยาวด้วยพันธะเบต้า-1,4-ไกลโคซิดิก (β -1,4-glycosidic bond) เรียกว่า ไมโครไฟบริล (Microfibril) เส้นใยไมโครไฟบริลที่แบคทีเรียสร้างขึ้นมามีขนาดเล็กกว่าเส้นใยของพืชชั้นสูงและเส้นใยสังเคราะห์ (Hsieh *et al.*, 2008) เส้นใยไมโครไฟบริลจะวางตัวอยู่ในลักษณะเป็นสายยาวเรียงขนานกัน โดยแต่ละเส้นจะเชื่อมกันด้วยพันธะไฮโดรเจนภายในโมเลกุลทำให้เซลลูโลสในธรรมชาติสามารถคงรูปอยู่ได้ โดยเรียกเส้นใยไมโครไฟบริลที่มีการเชื่อมต่อกันว่า ไฟบริล (Fibril) แสดงดังรูปที่ 2.5 และ 2.6



รูปที่ 2.5 โครงสร้างทางเคมีของเซลลูโลส

ที่มา: Poletto *et al.*, (2010)



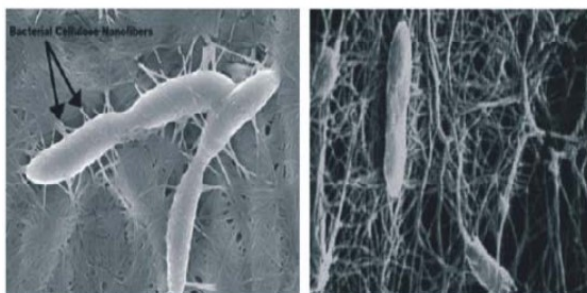
รูปที่ 2.6 เซลลูโลสจากแบคทีเรีย (ซ้าย) และเซลลูโลสจากพืช (ขวา)

ที่มา: Keshk and El-Kott (2017)

แบคทีเรียที่สามารถพบได้ในเครื่องดื่มคอมบูชาและสามารถผลิตเซลลูโลสได้ ได้แก่ แบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตกรดอะซิติกเป็นส่วนใหญ่ เช่น *Acetobacter xylinum*, *Acetobacter aceti* และ *Acetobacter pasteurianus* รวมทั้ง *Gluconobacter oxydans* เป็นต้น (Watawana *et al.*, 2015; Greenwalt *et al.*, 2000; Vina *et al.*, 2014; Jia *et al.*, 2004) ซึ่งลักษณะทางชีวภาพ ลักษณะทางกายภาพ รวมถึงสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของแบคทีเรียเหล่านี้ จะแตกต่างกันออกไป

2.1.3.1.1 *Acetobacter*

Acetobacter เป็นแบคทีเรียที่สามารถพบได้ในเครื่องดื่มคომบูชาเป็นส่วนใหญ่และมีความสำคัญในการผลิตกรดชนิดต่าง ๆ ที่เป็นสารประกอบสำคัญในเครื่องดื่มคอมบูชา แบคทีเรีย *Acetobacter* เป็นแบคทีเรียแกรมลบที่ต้องการออกซิเจนในการเจริญ (Gram negative aerobic) แบคทีเรียกลุ่มนี้สามารถใช้เอทานอล กลูโคสและกลีเซอรอลเป็นแหล่งของคาร์บอน แบคทีเรีย *Acetobacter* สามารถสร้างกรดอะซิติกและออกซิไดซ์ต่อไปให้กลายเป็นคาร์บอนไดออกไซด์และน้ำในสภาวะที่มีออกซิเจน แบคทีเรียกลุ่มนี้สามารถเจริญได้ดีในอุณหภูมิระหว่าง 25-30 องศาเซลเซียส พีเอชที่เหมาะสมต่อการเจริญในช่วงพีเอช 5.4-6.3 แบคทีเรีย *Acetobacter* มีลักษณะที่แตกต่างกันออกไปตามแต่ละสายพันธุ์ เช่น บางสายพันธุ์อาจมีรูปร่างเป็นท่อน (Rod) หรือกลม (Cocci) บางสายพันธุ์อาจมีหรือไม่มีแฟลกเจลลา (Flagella) โคลีนีมีสีขาหรือชมพู เป็นต้น (รูปที่ 2.7) (Kerster *et al.*, 2006)



รูปที่ 2.7 ลักษณะของแบคทีเรีย *Acetobacter xylinum*

ที่มา: Mohammad *et al.*, (2014)

Acetobacter สามารถคัดแยกได้จากเครื่องดื่มคอมบูชา น้ำส้มสายชู เครื่องดื่มแอลกอฮอล์ เช่น เบียร์ ไวน์และไซเดอร์ เป็นต้น นอกจากนี้ยังสามารถแยกได้จากผลไม้ เช่น องุ่น ฝรั่ง มะเฟือง มังคุด มะม่วง กัลย มะละกอ ดอกไม้ และอื่น ๆ เช่น น้ำมะพร้าว เมล็ดปาล์มและเต้าหู้ เป็นต้น (Kerster *et al.*, 2006)

2.1.3.2 ยีสต์

ยีสต์ (Yeast) ถูกค้นพบครั้งแรกในค.ศ. 1680 โดยนักวิทยาศาสตร์ชื่อว่า Antonie Philips van Leeuwenhoek ยีสต์เป็นสิ่งมีชีวิตเซลล์เดียว (Unicellular) ในอาณาจักรเห็ดรา (Kingdom fungi) ยีสต์ส่วนใหญ่ถูกจัดอยู่ในไฟลัม Ascomycota เช่น *Saccharomyces* และ *Candida* เป็นต้น ยีสต์บางสายพันธุ์ถูกจัดอยู่ในไฟลัม Basidiomycetes เช่น *Filobasidiella* และ *Rhodotorula* (Hawksworth, 2004) ส่วนใหญ่สืบพันธุ์โดยการแตกหน่อ (Budding) เซลล์ยีสต์ประกอบด้วยเซลล์ที่เรียงต่อกันเป็นสาย เรียกว่า ซูโดไมซีเลียม (Pseudomycelium) บางชนิดสามารถ

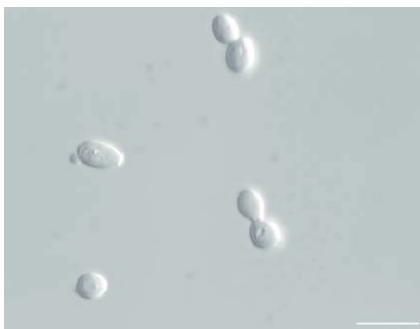
สร้างเส้นใยที่แท้จริง (True mycelium) เช่นเดียวกับเชื้อรา รูปร่างของเซลล์ยีสต์มีหลายรูปแบบ เช่น รูปร่างกลม รูปไข่ รูปไข่ปลายแหลม รูปคนโท สามเหลี่ยม ทรงกระบอก และเลมอน เป็นต้น ยีสต์สามารถพบได้ทั่วไปในธรรมชาติทั้งในดิน ในน้ำ และในส่วนต่าง ๆ ของพืช บางชนิดอาจพบอยู่กับแมลงและในกระเพาะอาหารของสัตว์บางชนิด ยีสต์มักจะเจริญในแหล่งที่มีน้ำตาลความเข้มข้นสูงหรือตามสภาวะแวดล้อมที่เหมาะสมสำหรับการเจริญของยีสต์แต่ละสายพันธุ์ เช่น *Saccharomyces* เป็นยีสต์ที่สามารถเจริญได้ดีในสภาวะที่มีน้ำตาลสูง เช่น น้ำหวานของดอกไม้ ตามผิวของผลไม้ที่สุกงอมหรือมีตำหนิ และในน้ำผลไม้ที่เกิดการหมัก เป็นต้น (สาวิตรี, 2549)

ยีสต์ถูกนำมาใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตเครื่องดื่มไวน์ตั้งแต่ศตวรรษที่ 19 ปัจจุบันยีสต์ถูกใช้ในการผลิตเครื่องดื่มและอาหาร รวมถึงในด้านอื่น ๆ กันอย่างแพร่หลาย ยีสต์ที่ใช้ในอุตสาหกรรมส่วนใหญ่ คือ *S. cerevisiae* (Barnett and Barnett, 2011) ยีสต์บางชนิดสามารถก่อโรคในคนและสัตว์ได้ โดยเฉพาะ *Candida albicans*, *Histoplasma* และ *Blastomyces* เป็นต้น (Hawksworth, 2004) ยีสต์ส่วนใหญ่ที่นำมาใช้ในการผลิตคอมบูชา ได้แก่ *Saccharomyces* sp., *Zygosaccharomyces kombuchaensis*, *Torulopsis* sp., *Pichia* spp., *Brettanomyces* sp., และ *Zygosaccharomyces bailii* เป็นต้น (Watawana et al., 2015; Greenwalt et al., 2000; Vina et al., 2014) ซึ่งยีสต์แต่ละสายพันธุ์ที่กล่าวมาข้างต้นนั้นมึลักษณะที่แตกต่างกันออกไป

2.1.3.2.1 *Saccharomyces cerevisiae*

ยีสต์ส่วนใหญ่ที่พบในเครื่องดื่มคอมบูชา คือ *Saccharomyces cerevisiae* ซึ่งเป็นยีสต์ที่ถูกนำมาใช้ในอุตสาหกรรมอาหารอย่างแพร่หลาย เซลล์ของยีสต์ชนิดนี้จะรวมตัวกันอยู่อย่างหลวม ๆ และลอยอยู่กับฟองก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ที่บริเวณผิวหน้าของเครื่องดื่มคอมบูชา

Saccharomyces cerevisiae มีการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ โดยการแตกหน่อรอบเซลล์ ไม่สามารถเจริญเติบโตในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน แต่สามารถผลิตสารสำคัญในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจนได้ ยีสต์ชนิดนี้สามารถใช้น้ำตาลกลูโคส กลูโคส ฟรักโทสและแมนโนสเป็นแหล่งคาร์บอน สามารถใช้แอมโมเนียมซัลเฟต ((NH₄)₂SO₄) เป็นแหล่งไนโตรเจน สามารถใช้โพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K₂HPO₄) และไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (Na₂HPO₄) เป็นแหล่งฟอสเฟต สามารถใช้ซัลเฟต (SO₄) เป็นแหล่งซัลเฟอร์ได้ โดยมีอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญอยู่ระหว่าง 28-32 องศาเซลเซียสและมีพีเอชที่เหมาะสมเท่ากับ 4 นอกจากนี้ยีสต์ชนิดนี้ยังต้องการฟอสฟอรัสและไบโอตินสำหรับการเจริญ *Saccharomyces cerevisiae* มีหลากหลายสายพันธุ์ เช่น แชมเปญ (Champagne) และเบอร์กันดี (Burgundy) ที่นิยมใช้ในการผลิตเครื่องดื่มไวน์ในอุตสาหกรรม โดยแต่ละสายพันธุ์จะมีลักษณะที่แตกต่างกันออกไป เช่น เซลล์มีลักษณะกลม รูปทรงกระบอกหรือรูปรี บางสายพันธุ์สามารถสร้างซูโดไมซีเลียมและไม่พบการสร้างเส้นใยที่แท้จริง บางสายพันธุ์สามารถสร้างแอสโคสปอร์ (Ascospore) รูปกลมหรือรูปไข่ โดยปกติมีจำนวน 1-4 สปอร์ต่อแอสคัส (Ascus) แสดงดังรูปที่ 2.8 (Pitt and Hocking, 2009; Salari and Salari, 2017)



รูปที่ 2.8 ลักษณะของยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae*

ที่มา: Kabir *et al.*, (2012)

2.1.4 ประโยชน์และข้อควรระวังในการบริโภคคอมบูชา

คอมบูชาเป็นเครื่องดื่มชาหมักเพื่อสุขภาพที่อุดมไปด้วยจุลินทรีย์โพรไบโอติก (Probiotic) ที่มีประโยชน์ รวมถึงสารอินทรีย์และสารอนินทรีย์ที่มาจากวัตถุดิบที่ใช้ในการหมัก ได้แก่ กรดอะซิติก (Acetic acid) กรดกลูโคนิก (Gluconic) กรดกลูโครนิก (Glucuronic acid) กรดซิตริก (Citric) กรดแลคติก (L-lactic) กรดมาลิก (Malic) กรดทาร์ทาริก (Tartaric) และกรดไพรูวิก (Pyruvic) เป็นต้น อีกทั้งยังประกอบไปด้วยน้ำตาล ได้แก่ ซูโครส (Sucrose) กลูโคส (Glucose) และฟรุกโตส (Fructose) เป็นต้น วิตามินที่ละลายน้ำได้ ได้แก่ วิตามินบี1 บี2 บี6 บี12 และวิตามินซี เป็นต้น แร่ธาตุต่าง ๆ ได้แก่ แมงกานีส (Manganese) เหล็ก (Iron) นิกเกิล (Nickel) ทองแดง (Copper) และสังกะสี (Zinc) เป็นต้น สารประกอบแอนไอออน (Anions) ได้แก่ ฟลูออไรด์ (Fluoride) คลอไรด์ (Chloride) ไอโอดีน (Iodide) ไนเตรต (Nitrate) ฟอสเฟต (Phosphate) และซัลเฟต (Sulphate) เป็นต้น อีกทั้งยังประกอบไปด้วยกรดอะมิโน (Amino acids) เอนไซม์ไฮโดรไลติก (Hydrolytic enzymes) เอทานอล (Ethanol) สารประกอบโพลีฟีนอล (Polyphenols) สารดีเอสแอล (D-saccharic acid-1,4-lactone, DSL) และผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ ที่ผลิตจากจุลินทรีย์ภายในคอมบูชา (Jayabalan *et al.*, 2014; Jayabalan *et al.*, 2010) ซึ่งสารที่กล่าวมาข้างต้น มีประโยชน์และโทษที่แตกต่างกัน

2.1.4.1 วิตามินและเกลือแร่

วิตามินและเกลือแร่ (Vitamins and Minerals) เป็นสารที่มีความจำเป็นอย่างมากต่อการทำงานของกระบวนการต่าง ๆ ในร่างกาย ซึ่งในระหว่างการหมักเครื่องดื่มคอมบูชา วิตามินและเกลือแร่เหล่านี้จะมีปริมาณเพิ่มขึ้นเนื่องจากกิจกรรมของจุลินทรีย์ที่นำมาใช้ในการผลิต (Bauer-Petrovska and Petroskevskaja Tozi, 2000) แต่ถ้าหากร่างกายได้รับปริมาณของวิตามินหรือเกลือแร่ที่มากเกินไปอาจส่งผลกระทบต่อร่างกายได้ โดยไม่ควรตรวจพบเกลือแร่ในเลือดเกิน 0.1-0.2 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในเครื่องดื่มคอมบูชาส่วนใหญ่ประกอบด้วยปริมาณเกลือแร่อยู่ระหว่าง 0.004-0.462 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (ATSDR, 2007) ซึ่งอาจจะไม่ก่อให้เกิดอันตรายใน

ร่างกายของผู้ใหญ่ แต่สามารถก่อให้เกิดผลเสียในร่างกายของเด็กได้ ฉะนั้นเด็กจึงไม่ควรบริโภคเครื่องดื่มชนิดนี้ เนื่องจากอาจจะมีปริมาณเกลือแร่ที่สูงเกินความต้องการของร่างกาย (Markowitz, 2011)

2.1.4.2 เอทานอล

เอทานอล (Ethanol) สามารถถูกผลิตได้โดยยีสต์และมีปริมาณเพิ่มขึ้นในระหว่างกระบวนการหมักคอมบูชา (Chen and Liu, 2000) การบริโภคแอลกอฮอล์เพียงเล็กน้อยสามารถยับยั้งความเสี่ยงที่จะเกิดโรคบางชนิดได้ เช่น โรคกล้ามเนื้อหัวใจขาดเลือด (Ischemic heart disease, IHD) หรือโรคหลอดเลือดแดงโคโรนารี (Coronary heart disease, CHD) เป็นต้น แต่ถ้าหากบริโภคในปริมาณที่มากเกินไป อาจส่งผลให้เกิดผลเสียต่อร่างกายและระบบประสาท

นอกจากนี้ยังมีงานวิจัยที่ศึกษาเกี่ยวกับคุณประโยชน์ของเครื่องดื่มคอมบูชา เช่น Deghrigue *et al.*, (2013) พบว่าคอมบูชาที่ผลิตจากชาเขียวและชาดำสามารถยับยั้งเซลล์มะเร็งได้ Vazques-Cabral *et al.*, (2017) พบว่าคอมบูชาจากใบโหระพาสามารถลดสภาวะการอักเสบได้ Sun *et al.*, (2015) พบว่าคอมบูชาจากชาดำกับต้นอ่อนข้าวสาลีมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงสุดในอัตราส่วน 1 ต่อ 1 เครื่องดื่มคอมบูชาจึงเป็นเครื่องดื่มที่สามารถฟื้นฟูสภาพร่างกาย เนื่องจากมีสรรพคุณที่หลากหลาย เช่น ช่วยในระบบขับถ่าย บรรเทาอาการอ่อนเพลีย ลดระดับคอเลสเตอรอลและความดันโลหิต ลดความเสี่ยงในการเกิดไมเกรน ช่วยในการทำงานของตับและขับสารพิษ เป็นต้น (ฉัตรชัย, 2557)

ถึงแม้ว่าการบริโภคเครื่องดื่มคอมบูชาจะมีประโยชน์ แต่อาจจะมีผลข้างเคียงอื่น ๆ เช่น อาจทำให้เกิดอาการเวียนศีรษะและคลื่นไส้ ซึ่งสามารถเกิดได้ในผู้ป่วยที่มีระบบภูมิคุ้มกันบกพร่อง (Smolinske, 2005) ผู้ป่วยที่เป็นโรคกระเพาะอาหารและผู้ป่วยโรคไต (Kovacevic *et al.*, 2014) เป็นต้น ซึ่งผลข้างเคียงเหล่านี้สามารถเกิดขึ้นได้น้อยมาก ส่วนใหญ่เกิดจากการปนเปื้อนของภาชนะบรรจุคอมบูชา (Jayabalan, 2014) ถึงอย่างไรก็ตามศูนย์ป้องกันและควบคุมโรค (Centers for disease control and prevention, CDC) (1994) แนะนำการบริโภคเครื่องดื่มคอมบูชาในปริมาณที่เหมาะสม คือ 4 ออนซ์ต่อวัน

2.2 สมุนไพรที่นำมาใช้ในการศึกษา

2.2.1 ชาอู่หลง

ชาจีน (*Camellia sinensis*) เป็นสายพันธุ์ชาที่สามารถทนต่ออุณหภูมิต่ำและสภาพแวดล้อมที่ผันผวนได้ดี สายพันธุ์ชาจีนที่พบเห็น ได้แก่ ชาอู่หลง ชิงชิ่งต้าฟ่ง สู่ยี่เสียนฟูหลิน ฟุหลิน ตาเป่ย เป็นต้น ชาสามารถจัดจำแนกได้ดังนี้ (ธีรพงษ์, 2555)

อาณาจักร (Kingdom): Plantae

ดิวิชัน (Division): Magnoliophyta

อันดับ (Order): Theales

วงศ์ (Family): Theaceae

จีนัส (Genus): *Camellia* L.

สปีชีส์ (Species): *Camellia sinensis*

2.2.1.1 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

ชาเป็นไม้พุ่ม ผิวลำต้นเรียบ กิ่งอ่อนปกคลุมด้วยขนอ่อน ใบมีสีเขียวค่อนข้างกลม ขอบใบหยักเป็นรูปโค้งเล็กน้อย ส่วนปลายของหยักฟันเลื่อยมีสีดำ ดอกของชาเป็นดอกสมบูรณ์เพศ ผลของชามีลักษณะคล้ายแคปซูล ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 2-4 เซนติเมตร เมื่อผลแก่เต็มที่เปลือกจะแตกออก เมล็ดมีลักษณะกลม เส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 10-14 มิลลิเมตร ผิวของเมล็ดเรียบและมีสีน้ำตาล (ศุภานารถ และอัญชลี, 2536) (รูปที่ 2.9)



รูปที่ 2.9 ชาอู่หลง (*Camellia sinensis*) โดย A คือ ส่วนประกอบของ *Camellia sinensis*, B คือ ดอก, C คือ ใบ, D คือ กระจเปาะ และ E คือ เมล็ด

ที่มา: Baibado *et al.*, (2011)

2.2.1.2 สารพฤกษเคมี

ใบชาประกอบด้วยสารประกอบโพลีฟีนอล 6 กลุ่ม คือ ฟลาโวนอล (Flavanols) ไฮดรอกซีฟลาโวนอล (Hydroxy-4-flavonols) แอนโทไซยานิน (Anthocyanin) ฟลาโวน (Flavones) กรดฟีนอลิก (Phenolic acid) และคาเทชิน (Catechins) ซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักในใบชา (ธีรพงษ์, 2555) ชนิดของคาเทชินที่พบได้ส่วนใหญ่ในใบชา ได้แก่ อีพิกัลโลคาเทชิน แกลเลท (Epigallocatechin-3-gallate, EGCG) อีพิกัลโลคาเทชิน (Epigallocatechin, EGC) อีพิกคาเทชินแกลเลท (Epicatechin-3-gallate, ECG) และอีพิกคาเทชิน (Epicatechin, EC) เป็นต้น (Zhen *et al.*, 2002; Davis *et al.*, 1997)

ชาอู่หลงเป็นชาที่ผ่านกระบวนการหมักเพียงบางส่วน กระบวนการหมักนั้นทำให้เอนไซม์พอลิฟีนอลออกซิเดส (Polyphenoloxidase) เร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันของคาเทชินและเกิดปฏิกิริยาพอลิเมอร์ไรเซชัน นอกจากคาเทชินแล้ว ชาอู่หลงยังประกอบด้วยสารในกลุ่มที่เอฟลาวิน

(Theaflavins) ที่เป็นสารสีเหลืองเข้มจนถึงส้มแดงพร้อมทั้งให้รสฝาดและสารในกลุ่มทีอะรูบิจิน (Thearubigins) ที่เป็นสารที่เกิดจากการรวมตัวกันของคาเทชินจนเป็นพอลิเมอร์ ที่มีคุณสมบัติละลายน้ำได้ดีพร้อมกับให้สีน้ำตาลแดงถึงน้ำตาลเข้มในน้ำชา (Subramanian *et al.*, 1999) สารทั้งสองกลุ่มนี้เป็นองค์ประกอบสำคัญที่ส่งผลต่อสี กลิ่น และรสชาติของชาที่ผ่านกระบวนการหมัก

อย่างไรก็ตาม สารประกอบโพลีฟีนอลในใบชาจะมีชนิดและปริมาณแตกต่างกันตามปัจจัย ได้แก่ สายพันธุ์ชา ฤดูกาลเก็บเกี่ยว สภาพภูมิอากาศ ความอุดมสมบูรณ์ของดิน การจัดการหลังการเก็บเกี่ยวและกระบวนการผลิตชา เป็นต้น ซึ่งกระบวนการผลิตชาถือได้ว่าเป็นส่วนสำคัญที่สุดที่ส่งผลต่อชนิดและปริมาณของสารประกอบโพลีฟีนอลในชาอย่างมีนัยสำคัญ (Fernandez *et al.*, 2002)

2.2.1.3 สรรพคุณและฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา

ชาอู่หลงสามารถช่วยลดความเสี่ยงของการเกิดมะเร็งต่าง ๆ (Yuan *et al.*, 2011) ช่วยลดความเสี่ยงของการเกิดโรคหัวใจและหลอดเลือด (Deka and Vita, 2011) ช่วยควบคุมระดับน้ำตาลในเลือดของผู้ป่วยโรคเบาหวาน (Shoji and Nakashima, 2006) และลดความอ้วน (Rains *et al.*, 2011)

2.2.1.4 กระบวนการผลิตชาอู่หลง

ชาอู่หลงเป็นชาที่ผ่านกระบวนการหมักเพียงบางส่วน (Partially fermented tea) วิธีการผลิตเริ่มจากการตากชา (Outdoor withering) ประมาณ 20-40 นาที โดยการผึ่งแดด ต่อมาใบชาจะถูกผึ่งต่อในที่ร่ม (Indoor withering) พร้อมเขย่า การผึ่งในที่ร่มและเขย่าทำให้ใบชาช้ำทำให้เกิดการหมักเพียงบางส่วนที่ทำให้เอนไซม์พอลิฟีนอลออกซิเดสเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันของคาเทชินเกิดการรวมตัวกันของคาเทชินเป็นสารประกอบใหม่ ทำให้ชาอู่หลงมีสี กลิ่น และรสชาติที่ต่างไปจากชาชนิดอื่น จากนั้นนำใบชาไปนวด (Rolling) ขึ้นรูปให้เป็นเม็ด และนำไปอบแห้ง (ธีรพงษ์, 2555)

2.2.2 บัวหลวง

บัวหลวงเป็นพืชน้ำ ที่จัดเป็นไม้ดอกในเขตร้อนของทวีปเอเชีย มีชื่อเรียกแตกต่างกันไปตามท้องถิ่น เช่น บุนทริก ปุณทริก ปทุม ปัทมา สัตตบุษย์ บัวฉัตรขาว สัตตบงกชและบัวฉัตรชมพู เป็นต้น บัวหลวงสามารถจัดจำแนกได้ดังนี้ (อังคณา, 2551)

อาณาจักร (Kingdom): Plantae

ดิวิชัน (Division): Magnoliophyta

อันดับ (Order): Nymphaeales

วงศ์ (Family): Nelumbonaceae

จีนัส (Genus): *Nelumbo*

สปีชีส์ (Species): *Nelumbo nucifera*

2.2.2.1 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

ลำต้นมีทั้งส่วนเหง้าที่อยู่ใต้ดินและส่วนไหลบัวที่อยู่เหนือดินใต้น้ำ เหง้ามีสี

เหลืองเป็นท่อนยาวมีปล้อง รากเป็นรากฝอยสีขาวบริเวณข้อของลำต้น บัวเป็นพืชใบเลี้ยงเดี่ยว ใบมีลักษณะกลมขนาดใหญ่ ดอกบัวเป็นดอกเดี่ยวและเป็นดอกสมบูรณ์เพศและมีกลิ่นหอม ฐานรองดอกมีลักษณะเป็นรูปกรวย เรียกว่า ฝักบัวหรือผล ฝักบัวจัดเป็นผลกลุ่ม (Aggregate fruit) ประกอบด้วยผลย่อยที่มีเปลือกหนาสีเขียว ด้านในมีสีขาว เรียกว่า เมล็ดบัว ภายในมีกลีบเลี้ยง 2 ใบ สีขาว ต้นอ่อน (Embryo) มีสีเขียวเข้ม เรียกว่า ดีบัว ซึ่งมีรสขม บัวหลวงสามารถขยายพันธุ์ด้วยวิธีการใช้เมล็ดหรือวิธีการแยกไหลบัว (อังคณา, 2551) (รูปที่ 2.10)

2.2.2.2 สารพฤกษเคมี

เกสรบัวมีสารประกอบโพลีฟีนอล ในกลุ่มฟลาโวนอยด์หลายชนิด เช่น เควอซิติน (Quercetin) แอลคาลอยด์ (Alkaloid) ลูเทโอลิน (Luteolin) ไอโซเควอเซทิน (Isoquercetin) และลูเทโอลินกลูโคไซด์ (Luteolin glucoside) เป็นต้น (อังคณา, 2551)



รูปที่ 2.10 ลักษณะของดอกและเกสรตัวผู้ของบัวหลวง (*Nelumbo nucifera*)

2.2.2.3 สรรพคุณและฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา

เกสรตัวผู้ของดอกบัวหลวงมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและป้องกันการเกิดโรคเบาหวาน มีสารแอลคาลอยด์ที่พบในบัวหลวงมีฤทธิ์ช่วยให้ผ่อนคลาย ลดอาการปวดและอาการอักเสบ สารสกัดจากเกสรบัวหลวงสามารถเข้าสู่ชั้นใต้ผิวหนังได้ดีทำให้สามารถชะลอการเกิดเม็ดสีเมลานิน (Melanin) ได้ สามารถทำให้ผิวหนังกระชับ เนื่องจากสารสกัดดังกล่าวประกอบไปด้วยสารต้านอนุมูลอิสระที่สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส (Tyrosinase) วิตามินเอในเกสรบัวหลวงมีฤทธิ์ช่วยให้ผิวหนังอ่อนนุ่ม (อังคณา, 2551) ช่วยป้องกันการเกิดการแตกของเม็ดเลือดแดง (Hemolysis) (Yeung, 1985) ช่วยลดการเกิดภาวะหลังเร็ว (Premature ejaculation) (Bown, 1995) และลดความเสี่ยงในการเกิดภาวะที่มีเลือดออกผิดปกติจากโพรงมดลูก (Uterine bleeding) (Yeung and Himche, 1985) ปัจจุบันจึงมีการนำสารสกัดจากเกสรบัวหลวงมาผลิตเป็นเครื่องสำอางประเภทครีมบำรุงผิวและครีมกันแดด (อังคณา, 2551)

2.2.3 เก๋ากี้

เก๋ากี้รู้จักในชื่อทางการค้าว่า โกจิเบอร์รี่ (Goji berry) เป็นพืชสมุนไพรจีนโบราณที่มี

สรรพคุณเหมือนกันและเป็นพืชท้องถิ่นในทวีปเอเชียและยุโรป เก่าก็สามารถจัดจำแนกได้ดังนี้ (ราชบัณฑิตยสถาน, 2538)

อาณาจักร (Kingdom): Plantae

ดิวิชัน (Division): Magnoliophyta

อันดับ (Order): Solanales

วงศ์ (Family): Solanaceae

จีนัส (Genus): *Lycium*

สปีชีส์ (Species): *Lycium barbarum*

2.2.3.1 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

เก่าก็เป็นไม้พุ่มสูงประมาณ 1-2 เมตร มีหนามคมตามง่ามใบ ใบมีลักษณะคล้ายสี่เหลี่ยมข้าวหลามตัดมุมมน เป็นใบสั้นและแผ่ออกเล็กน้อย ดอกเป็นดอกเดี่ยวออกตามง่ามใบ มีกลีบเลี้ยงติดกันคล้ายรูปประฆัง กลีบดอกมีสีเหลือง ผลเก่าก็มีลักษณะกลมรี ขนาดเล็ก สีแดงส้ม มีเมล็ดสีขาวจำนวนมาก เก่าก็สามารถขยายพันธุ์ได้โดยการเพาะเมล็ด (ราชบัณฑิตยสถาน, 2538) (รูปที่ 2.11)



รูปที่ 2.11 เก่าหรือกอลจิเบอร์รี่ (*Lycium barbarum*)

ที่มา: Sangiovanni *et al.*, (2017)

2.2.3.2 สารพฤกษเคมี

ผลเก่าก็ประกอบไปด้วยสารต้านอนุมูลอิสระในกลุ่มของสารประกอบโพลีฟีนอลและฟลาโวนอยด์สูงกว่าพืชทั่วไป มีสารเบต้าแคโรทีนซึ่งเป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์วิตามินเอ สารโพลีแซคคาไรด์ (*Lycium barbarum* polysaccharides, LBPs) บีเทน (Betaine) ฟีนอลิก (Phenolics) แคโรทีนอยด์ (Carotenoids) เช่น ซีแซนทีน (Zeaxanthin) กับเบต้าแคโรทีน (Beta-Carotene) เป็นต้น เซเรโบไซด์ (Cerebroside) วิตามินซีชนิด (2-O-beta-d-glucopyranosyl-L-ascorbic acid, AA-2-beta-G) เบต้าไซโตสเตอรอล (Beta-sitosterol) ฟลาโวนอยด์ (Flavonoids) และวิตามินต่าง ๆ เช่น ไรโบฟลาวิน (Riboflavin) ไทอามีน (Thiamine) และวิตามินซี (L-Ascorbic

acid) เป็นต้น นอกจากนี้ยังประกอบไปด้วยแร่ธาตุที่สำคัญ ได้แก่ แคลเซียม สังกะสี เหล็ก เจอมนันเนียม เซเรเนียม และฟอสฟอรัส เป็นต้น (Amagase and Nance, 2008)

2.2.3.3 สรรพคุณและฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา

ผลของเก๋ากี้มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ ชะลอความชรา (Amagase and Nance, 2008) สาร LBP ในเก๋ากี้สามารถต้านอนุมูลอิสระและลดปฏิกิริยาออกซิเดชันที่เกิดจากอนุมูลอิสระกลุ่มไฮโดรเจนและออกซิเจน ลดปฏิกิริยาการเกิดการสลายตัวของไขมัน (Lipid peroxidation) รวมถึงอนุมูลอิสระสังเคราะห์ เช่น DPPH และ ABTS เป็นต้น (Lin *et al.*, 2009; Wu *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2013; Qi *et al.*, 2014) นอกจากนี้สาร LBP ยังสามารถเพิ่มประสิทธิภาพของเอนไซม์ที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant enzyme activity) เช่น เอนไซม์ซูเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเทส (Superoxide dismutase, SOD) เอนไซม์คะตะเลส (Catalase, CAT) และเอนไซม์กลูตาไธโอน (Glutathione peroxidase, GSH-Px) เป็นต้น (Deng *et al.*, 2003; Yi *et al.*, 2013; Niu *et al.*, 2008; Amagase *et al.*, 2009) และยังช่วยเสริมสร้างระบบภูมิคุ้มกัน (Brubaker *et al.*, 2011; Chang and So, 2008) บำรุงระบบประสาทและช่วยในการมองเห็น (Amagase and Nance, 2008; Gao *et al.*, 2017) เพิ่มประสิทธิภาพของระบบเมแทบอลิซึม (Metabolism) ควบคุมระดับน้ำตาล ป้องกันการเกิดเนื้องอกและป้องกันการเกิดโรคทางสายตา (Amagase and Nance, 2008) ยับยั้งการเกิดการตายของเซลล์ (Apoptosis) (Wu *et al.*, 2015) รักษาอาการปวดท้องและมีบุตรยาก (Gao *et al.*, 2017) แก้วิงเวียนศีรษะ ปวดหัว (Gao *et al.*, 2017) คนจีนโบราณนิยมนำผลเก๋ากี้แห้งใส่ในอาหารจีนประเภทต้มเพื่อเพิ่มรสให้กลมกล่อม (Amagase and Nance, 2008)

2.2.4 ไบยานาง

ไบยานาง หรือ หมื่นปี บ่ เฒ่า เป็นพืชที่สามารถพบได้ทั่วไปตามป่าที่มีความชุ่มชื้น เช่น ป่าผสมผลัดใบ ป่าดงดิบและป่าโปร่งในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ สามารถจัดจำแนกได้ดังนี้ (Rattana *et al.*, 2010)

อาณาจักร (Kingdom): Plantae

อันดับ (Order): Ranunculales

วงศ์ (Family): Menispermaceae

จีนัส (Genus): *Tiliacora*

สปีชีส์ (Species): *Tiliacora triandra*

2.2.4.1 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

ไบยานางเป็นไม้เถาเลื้อยเกี่ยวพันกับไม้อื่น ต้นมีลักษณะเป็นเถากลมขนาดเล็กสีเขียว โดยเถาแก่มีผิวเรียบและมีสีเข้ม ส่วนเถาอ่อนจะมีขนอ่อนปกคลุม ไบยานางเป็นพืชที่มีหัวใต้ดิน รากของยานางมีขนาดใหญ่ ใบเป็นใบเดี่ยวคล้ายใบพริกไทย มีลักษณะเป็นรูปไข่ ขนาดใบยาว 5-10 เซนติเมตร กว้าง 2-4 เซนติเมตร ขอบใบเรียบ ผิวใบเป็นคลื่นเล็กน้อยและมัน มีดอกสีเหลือง

เล็ก ผลมีลักษณะกลมรีและมีขนาดเล็ก เมล็ดมีรูปร่างคล้ายเกือกม้า ย่านางสามารถขยายพันธุ์โดยใช้เมล็ดหรือหัว คุณค่าทางอาหารของใบย่านาง สามารถใช้เป็นเครื่องปรุงรสเพื่อเพิ่มความกลมกล่อมของแกงหน่อไม้ ซุปหน่อไม้ แกงขนุน แกงอ่อมและหมกต่าง ๆ (Rattana *et al.*, 2010) (รูปที่ 2.12)



รูปที่ 2.12 ลำต้น ใบ และผล ของใบย่านาง (*Tiliacora triandra*)

ที่มา: Chaveerach *et al.*, (2016)

2.2.4.2 สารพฤกษเคมี

ใบย่านางอุดมไปด้วยสารเบต้าแคโรทีนและแร่ธาตุต่าง ๆ ในปริมาณสูง เช่น แคลเซียม ธาตุเหล็ก สารโพลีแซคคาไรด์ สารโพลีฟีนอล แคลเซียมออกซาเลท อัลคาลอยด์ในกลุ่มไอโซควิโนลีน (Isoquinoline) สารออกโซเอโนโลบิน (Oxoanolobine) กรดโอเลอิก (Oleic acid) กรดปาล์มมิติก (Palmitic acid) สาร 5-ไฮดรอกซีเมทิล-2-ฟูแรนคาร์บอกซาลดีไฮด์ (5-hydroxymethyl-2-furancarboxaldehyde) สาร 2,6-ไดเมทิล-3-(เมทอกซีเมทิล)-เบนโซควิโนน (2,6-dimethyl-3-(methoxymethyl)-benzoquinone) วิตามินอีหรือโทโคฟีรอล (Tocopherol) สารบิสเบนซิลิโซควิโนลีน (Bisbenzylisoquinoline) สารทีเรียโคลินิน (Tiliacorinine) สารทีเรียโคลิน (Tiliacorine) และสารนอทีเรียโคลินิน (Nortiliacorinine) เป็นต้น (Chaveerach *et al.*, 2016; Mahidol *et al.*, 1994; Wiriyaichitra and Phuriyakorn, 1981)

2.2.4.3 ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา

สารสกัดเอทานอลของใบย่านางมีฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus* ซึ่งเป็นแบคทีเรียก่อโรคในทางเดินอาหาร (ชุตินันท์ และคณะ, 2552) มีฤทธิ์ต้านสารอนุมูลอิสระ (Ingkaninan *et al.*, 2003) มีฤทธิ์ต้านการอักเสบ (Nanasombat and Teckchuen, 2009) และมีฤทธิ์ต้านการทำงานของเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรส (Acetylcholine esterase) (Phadungkit *et al.*, 2012)

2.2.5 ใบหม่อน

หม่อนเป็นไม้พุ่มขนาดกลางมีถิ่นกำเนิดแถบเทือกเขาหิมาลัยและจีนตอนใต้ สามารถพบเห็นได้ในภาคเหนือและภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย (ศุทธิณี และศศิธร, 2554)

อาณาจักร (Kingdom): Plantae

ดิวิชัน (Division): Magnoliophyta

อันดับ (Order): Urticales

วงศ์ (Family): Moraceae

จีนัส (Genus): *Morus*

สปีชีส์ (Species): *Morus alba* Linn.

2.2.5.1 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

ลำต้นของหม่อนมีลักษณะตั้งตรงแตกกิ่งเล็กน้อย เปลือกของลำต้นมีสีน้ำตาลแดง ใบเป็นใบเดี่ยวสีเขียวเข้ม มีลักษณะเป็นรูปไข่ ผิวใบสาก ปลายใบเรียวแหลม ดอกเป็นดอกช่อรูปทรงกระบอก มีกลีบดอกสีขาวหม่นหรือสีขาวแกมเขียว ช่อดอกเป็นทางกระรอกยาว ประมาณ 2 เซนติเมตร ผลเป็นผลรวมรูปทรงกระบอกและมีสีเขียว เมื่อสุกจะมีสีม่วงแดงเข้มเกือบดำ ฉ่ำน้ำ มีรสหวานอมเปรี้ยว (ศุทธิณี และศศิธร, 2554) (รูปที่ 2.13)



รูปที่ 2.13 หม่อน (*Morus alba* Linn.)

ที่มา: Devi *et al.*, (2013) และ Thome (1885)

2.2.5.2 สารพฤกษเคมี

ใบหม่อนประกอบด้วยสารแคโรทีน (Carotene) กรดซัคซินิก (Succinic acid) อะดีนีน (Adenine) โคลีน (Choline) วิตามินซี (Ascorbic acid) รุทีน (Rutin) เควอเซทิน (Quercetin) (ศุทธิณี และศศิธร, 2554; Bandna *et al.*, 2013) วิตามินบี 1 (Vitamin B1) กรดโฟลิก (Folic acid) กรดโฟลินิก (Folinic acid) วิตามินดี (Vitamin D) เอ็น-บิวทานอล (N-Butanol) เอ็น-บิวทิลอัลดีไฮด์ (N-Butylaldehyde) เบต้า-แกมมา-เฮกซีนอล (Beta-Gamma-Hexenol) แคลเซียมมาเลท (Calcium malate) กรดซัคซินิก (Succinic) เมทิล-เอทิลอะซีตัลดีไฮด์ (Methyl-Ethyl Acetaldehyde) ไอโซบิวทิลอัลดีไฮด์ (Isobutylaldehyde) กรดทาทาร์ลิก (Tartaric acids) แซนโทฟิล (Xanthophyll) ไอโซควเอร์ซิทริน (Isoquercitrin) และแทนนิน (Tannins) เป็นต้น

(Anonymous, 2001) นอกจากนี้ใบหม่อนยังประกอบไปด้วยสารอัลคอลลอยด์อื่น ๆ อีกมากสูงถึง 15 ชนิด (Asano *et al.*, 2001)

2.2.5.3 สรรพคุณและฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา

ใบหม่อนเป็นสมุนไพรที่มีรสจืด มีฤทธิ์ลดไข้ แก้อ่อนในกระหายน้ำ แก้ไอระงับประสาท สามารถนำมาต้มน้ำเพื่อนำมาล้างตา รักษาอาการตาแดงและตาฝ้าฟาง มีฤทธิ์ลดความดันโลหิต มีฤทธิ์ต้านฮีสตามีน (Histamine) ลดการบีบตัวของลำไส้(นิจศิริ และธวัชชัย, 2547; วิทย์, 2536) และลดความอยากอาหารและลดการดูดซึ่มกลูโคสในกระแสเลือด (Kim *et al.*, 1999)

2.2.6 กระเจี๊ยบ

กระเจี๊ยบเป็นสมุนไพรเขตร้อน มีถิ่นกำเนิดในแถบแอฟริกา ปัจจุบันมีการกระจายพันธุ์ไปทั่วโลก เช่น อินเดีย มาเลเซียและประเทศไทย (ราชบัณฑิตยสถาน, 2556)

อาณาจักร (Kingdom): Plantae

ดิวิชัน (Division): Magnoliophyta

อันดับ (Order): Malvales

วงศ์ (Family): Malvaceae

จีนัส (Genus): *Hibiscus*

สปีชีส์ (Species): *Hibiscus sabdariffa* L.



รูปที่ 2.14 กระเจี๊ยบ (*Hibiscus sabdariffa* L.)

ที่มา: Osman *et al.*, (2011)

2.2.6.1 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

ลำต้นของกระเจี๊ยบมีสีม่วงแดงและมีลักษณะเป็นทรงพุ่ม สูงประมาณ 1-2.5 เมตร มีขอบใบเรียบหรืออาจมีรอยหยักเว้า 3 หยัก ดอกเป็นดอกเดี่ยวสีแดงม่วง มีกลีบเลี้ยงประมาณ 5 กลีบ ผลมีลักษณะเป็นรูปรีปลายแหลมยาวประมาณ 2.5 เซนติเมตร ผลอ่อนมีสีเขียว ส่วนผลแก่จะแห้งแล้วแตกเป็น 5 แฉก ภายในผลมีเมล็ดสีน้ำตาล ลักษณะคล้ายรูปไตจำนวนมาก ผลกระเจี๊ยบมีกลีบเลี้ยงหนาสีแดงทอหุ้ม เรียกส่วนนี้ว่า กลีบกระเจี๊ยบหรือกลีบรองดอก (Calyx) หรือที่

คนทั่วไปเข้าใจว่าเป็นดอกกระเจี๊ยบ กระเจี๊ยบสามารถขยายพันธุ์โดยใช้เมล็ด (ราชบัณฑิตยสถาน , 2556) (รูปที่ 2.14)

2.2.6.2 สารพฤกษเคมี

กลีบดอกของกระเจี๊ยบแดงอุดมไปด้วยสารสำคัญหลายชนิด ได้แก่ สารแอนโทไซยานิน เช่น เดลฟินิดีน (Delphinidine) และไซยานิดีน (Cyanidine) เป็นต้น สารโพลีฟีนอล เช่น กรดโปรโตคาเทอิก (Protocatechic acid) เป็นต้น สารประกอบฟลาโวนอยด์ ได้แก่ กอสซีเพติน (Gossypetin) เอสคิวเลทิน (Esculetin) โพลีแซคคาไรด์เคอควิซิน (Polysaccharidesquercetin) และเพคติน (Pectin) และกรดอินทรีย์หลายชนิด เช่น กรดแอสคอร์บิก (Ascorbic acid) กรดซิตริก (Citric acid) กรดมาลิก (Malic acid) และกรดทาทาร์ริก (Tartaric acid) เป็นต้น (ชนันดา, 2559)

2.2.6.3 สรรพคุณและฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา

กระเจี๊ยบมีฤทธิ์ในการลดไขมันในเส้นเลือด ลดน้ำหนัก ลดความดันโลหิต ลดความเหนียวข้นของเลือด รักษาโรคเส้นเลือดแข็งเปราะ ลดระดับน้ำตาลในเลือด ป้องกันโรคหัวใจ (นิจศิริ และ ธวัชชัย, 2547; Hansawasdi *et al.*, 2000; Hansawasdi *et al.*, 2001; Preuss *et al.*, 2007; Carvajal-Zarrabal *et al.*, 2005; Chang *et al.*, 2006; Chen *et al.*, 2003; Chen *et al.*, 2004)) ช่วยขับปัสสาวะ ลดการอักเสบของระบบทางเดินปัสสาวะ ป้องกันการเกิดนิ่ว (นิจศิริ และ ธวัชชัย, 2547; Sharaf, 1962) ป้องกันการติดเชื้อหลังการผ่าตัด ต้านเชื้อแบคทีเรีย ต้านเชื้อราและปรสิตบางชนิด (นิจศิริ และธวัชชัย, 2547; Olaleye, 2007) ช่วยย่อยอาหาร ช่วยเคลือบแผลในกระเพาะอาหารทำให้แผลหายเร็วขึ้น ล้างพิษ ต้านอนุมูลอิสระ ชะลอความแก่ชรา ทำให้ผิวพรรณสดใส (นิจศิริ และ ธวัชชัย, 2547; Duh and Yen, 1997; Farombi and Fakoya, 2005) เพิ่มภูมิคุ้มกันให้ร่างกาย เพิ่มการหลั่งน้ำดีจากตับ แก้อาการทำให้ร่างกายสดชื่น (นิจศิริ และ ธวัชชัย, 2547) ลดสภาวะการอักเสบ (Reanmongkol and Itharat, 2007) ป้องกันสภาวะตับอักเสบ (Ajiboye *et al.*, 2011) บำรุงเซลล์ประสาท (Wang *et al.*, 2011) และต้านมะเร็ง (Tseng *et al.*, 2000)

2.2.7 ตะไคร้หอม

ตะไคร้หอมมีถิ่นกำเนิดในประเทศอินโดนีเซีย ศรีลังกา พม่า อินเดีย ไทย ในทวีปอเมริกาใต้และคองโก (กาญจนา, 2552)

อาณาจักร (Kingdom): Plantae

ดิวิชัน (Division): Magnoliophyta

อันดับ (Order): Cyperales

วงศ์ (Family): Poaceae

จีนัส (Genus): *Cymbopogon*

สปีชีส์ (Species): *Cymbopogon nardus* Rendle

2.2.7.1 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

ตะไคร้เป็นพืชล้มลุก สูงประมาณ 4-6 ฟุต ใบเป็นใบเดี่ยว มีลักษณะยาว

เรียว ปลายใบมีขนหนาม ลำต้นรวมกันเป็นกอ มีกลิ่นหอม ออกดอกเป็นช่อ แต่ละช่อมีดอกย่อยสีเหลืองจำนวนมาก ผลเป็นผลแห้ง (กาญจนา, 2552; นิจศิริ และ รัชชัย, 2547) (ดังรูปที่ 2.15)



รูปที่ 2.15 ตะไคร้หอม (*Cymbopogon nardus* Rendle)

ที่มา: Machraoui *et al.*, (2018)

2.2.7.2 สารพฤกษเคมี

สารพฤกษเคมีที่สำคัญของตะไคร้แบ่งออกเป็นของ 2 ประเภท คือ

2.2.7.2.1 สารสำคัญที่ไม่ใช่น้ำมันหอมระเหย

สารสำคัญที่ไม่ใช่น้ำมันหอมระเหย ได้แก่ กรดคาเฟอิก (Caffeic acid) กรดโคลโรจีนิก (Chlorogenic acid) กรดคิวนาริก (P-coumaric acid) คิมโบโพจีนอล (Cymbopogonol) คิมโบโพโกน (Cymbopogone) คิมโบโกนอล (Cymbogonol) คิมมาโรไซด์ (Cymaroside) ฟรุกโตส (Fructose) ไอโซสโกพาริน (Isoscoparin) ลูเทโอลิน (Luteolin) ออกตาโคซานอล (Octacosanol) โอเรียนทิน (Orientin) รามโนซิล (2"-O-rhamnosyl) ซาโปนิน (Saponin) เบต้าซิโตสเตอรอล (beta-Sitosterol) ซูโครส (Sucrose) และเซอเทียจาโปนิน (Swertajaponin) เป็นต้น (Parirat, 2012)

2.2.7.2.2 สารสำคัญที่เป็นน้ำมันหอมระเหย

สารสำคัญที่เป็นน้ำมันหอมระเหย ได้แก่ ซิทราล (Citral) ทรานซ์ ไอโซซิทราล (Trans-isocitral) ลิโมนีน (Limonene) ยูจีนอล (Eugenol) ลินาลูล (Linalool) เจอรานีโอล (Geraniol) คาริโอฟีลลีนออกไซด์ (Caryophyllene oxide) เจอรานีลอะซิเตท (Geranyl acetate) 6-เมทิล 5-เฮพเทน-2-วัน (6-Methyl 5-hepten-2-one) 4-โนนาโนน (4-Nonanone) เมทิลเฮพทีโนน (Methyl heptennone) ซิโตรเนลลอล (Citronellol) ไมร์ซีน (Myrcene) และการบูร (Camphor) เป็นต้น (กาญจนา, 2552; กมลวรรณ, 2551)

2.2.7.3 สรรพคุณและฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา

ต้นตะไคร้สามารถใช้เป็นยารักษาโรคผิวหนังในช่องปาก มีฤทธิ์ขับลมในลำไส้ ขับประจำเดือน มีฤทธิ์ลดไข้และแก้ไอเจียน (วิทย์, 2536)

2.2.8 มะตูม

มะตูมเป็นไม้ผลยืนต้นพื้นเมืองของทวีปอินเดียและเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ โดยมีการเพาะปลูกทั่วไปในอินเดีย รวมทั้งในศรีลังกา แหลมมลายูตอนเหนือ เกาะชวาและฟิลิปปินส์ (นิตดา และทวีทอง, 2550)

อาณาจักร (Kingdom): Plantae

ดิวิชัน (Division): Magnoliophyta

อันดับ (Order): Sapindales

วงศ์ (Family): Rutaceae

จีนัส (Genus): *Aegle*

สปีชีส์ (Species): *Aegle marmelos*



รูปที่ 2.16 มะตูม (*Aegle marmelos*)

ที่มา: Baliga *et al.*, (2011)

2.2.8.1 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

ลำต้นมีความสูง 18 เมตร เปลือกลำต้นมีสีเทาเรียบเป็นร่องตื้น เนื้อไม้แข็ง มีกลิ่นหอม โคนต้นและกิ่งก้านมีหนามแหลมยาวและแข็ง ใบเป็นใบประกอบแบบขนนกซึ่งประกอบด้วยใบย่อยรูปไข่หรือรูปหอกจำนวน 3 ใบมองดูคล้ายตรีศูลของพระศิวะ ดอกมีสีขาวหรือขาวอมเขียวและมีกลิ่นหอม ผลมีเปลือกแข็งเรียบและมีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 5-15 เซนติเมตร เนื้อผลเหนียวข้น มีกลิ่นหอม และมีเมล็ดจำนวนมากแทรกอยู่ในเนื้อผล โดยเมล็ดจะมีขนหนาปกคลุม (นิตดา และทวีทอง, 2550) (ดังรูปที่ 2.16)

2.2.8.2 สารพฤกษเคมี

เนื้อมะตูมประกอบด้วย สารที่มีลักษณะเป็นเมือก ได้แก่ มิวคิลเลจ (Mucilage) และเพคติน (Pectin) เป็นต้น สารที่มีรสฝาด ได้แก่ แทนนิน (Tannin) สารคิมาริน (Coumarins) และอาร์จินิน (Arginine) เป็นต้น สารประกอบฟลาโวนอยด์ เช่น ริวทีน (Rutin) เป็น

ต้น สารอัลคาลอยด์ เช่น แอลฟาฟาจีรีน (Alpha-Fagarine) เป็นต้น สารที่ให้กลิ่นหอม (Volatile oil) ในมะตูมส่วนใหญ่มาจากกลิ่นของสารซีลินาโลโกลไซด์ (Z-linalooloxide) นอกจากนี้มะตูมยังมี น้ำมันหอมระเหยชนิดอื่น ๆ และมีน้ำตาลอะราบินอส (Arabinose) กาแลคโตส (Galactose) และ กลูโคส (Glucose) เป็นองค์ประกอบ (สุนทรีย, 2525)

2.2.8.3 สรรพคุณและฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา

ผลมะตูมแห้งสามารถนำมาชงดื่ม บรรเทาอาการท้องเสีย ส่วนผลสุกมีฤทธิ์ เป็นยาระบาย และช่วยย่อยอาหาร (นิจศิริ และธวัชชัย, 2547)

2.2.9 หล่อฮั้งก้วย

หล่อฮั้งก้วยหรือลูกออร์หันท้เป็นพืชสมุนไพรจีนชนิดหนึ่ง หล่อฮั้งก้วยสามารถจัด จำแนกได้ดังนี้ (วีไลพร และอาทิตรา, 2553)

อาณาจักร (Kingdom): Plantae

วงศ์ (Family): Cucurbitaceae

จีนัส (Genus): *Siraitia*

สปีชีส์ (Species): *Siraitia grosvenorii*



รูปที่ 2.17 หล่อฮั้งก้วย (*Siraitia grosvenorii*) โดย 1 คือ กิ่ง, 2 คือ ใบ, 3 คือ ดอก และ 4 คือ ผล ที่มา: Chun *et al.*, (2014)

2.5.8.1 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

ผลของหล่อฮั้งก้วยมีลักษณะกลมเหมือนไข่เป็ด มีเปลือกแข็งล้อมรอบเนื้อ ผลไม้แต่มีความเปรี้ยว ในช่วงที่ยังไม่สุกผลจะมีสีเขียวและเข้มขึ้นเรื่อย ๆ จนกลายเป็นสีเขียวเข้มแกมดำ (วีไลพร และอาทิตรา, 2553) (รูปที่ 2.17)

2.2.9.2 สารพฤกษเคมี

ผลของหล่อฮั้งก้วยประกอบด้วย น้ำตาลซูโครส (Sucrose) น้ำตาลกลูโคส (Glucose) น้ำตาลฟรุกโตส (Fructose) วิตามินซี (Ascorbic acid) กรดไลโนเลอิก (Linoleic acid)

กรดโอเลอิก (Oleic acid) กรดปาล์มมิติก (Palmitic acid) กรดสเตียริก (Stearic acid) กรดลอริก (Lauric acid) กรดไมริสติก (Myristic acid) และดี-แมนนิทอล (D-mannitol) เมื่อนำหล่อฮั่งก้วยมา สกัดจะให้สารที่ให้ความหวานแทนน้ำตาลชื่อว่า โมโกรไซด์ (Mogrosides) ซึ่งเป็นสารที่อยู่ในกลุ่มไกลโคไซด์ และไตรเทอเพนไกลโคไซด์ (Triterpene Glycosides) ซึ่งเป็นสารที่ให้ความหวานแทนน้ำตาล ประมาณ 250-300 เท่า แต่ไม่ให้อพลังงาน ดังนั้นจึงไม่ส่งผลต่อระดับน้ำตาลในเลือด นอกจากนี้สารโมโกรไซด์ยังมีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของเนื้องอกที่ผิวหนังของผู้ป่วยได้ (วิไลพร และอาทิตรา, 2553; เมฆม, 2558)

2.2.9.3 สรรพคุณและฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา

ผลของหล่อฮั่งก้วย มีฤทธิ์รักษาอาการไอ เจ็บคอ มีฤทธิ์ลดอาการอักเสบ ขับเสมหะ มีฤทธิ์บรรเทาอาการโรคกระเพาะเฉียบพลัน และ ท้องผูก (เมฆม, 2558)

2.2.10 อัญชัน

อัญชัน (Butterfly pea) มีชื่อเรียกตามท้องถิ่น ได้แก่ เอื้องชัน แดงชัน ฮูบี่ก็อสิง หล้าลินจัน มีถิ่นกำเนิดในแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ โดยจะเป็นพืชที่เป็นไม้เลื้อยเขตร้อน ตั้งแต่อดีตจนถึงปัจจุบันมีการนำสารสีจากดอกอัญชัน ซึ่งเป็นสารแอนโทไซยานิน มาใช้ในการประกอบอาหาร เช่น การทำไวน์ การทำขนมโบราณ ยา ตลอดจนเครื่องสำอาง เนื่องจากมีประโยชน์ต่อสุขภาพ และมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ อัญชันสามารถจัดจำแนกได้ดังนี้ (นิจศิริ และธวัชชัย, 2547)

อาณาจักร (Kingdom): Plantae

ดิวิชัน (Division): Magnoliophyta

อันดับ (Order): Fabales

วงศ์ (Family): Fabaceae

จีนัส (Genus): *Clitoria*

สปีชีส์ (Species): *Clitoria ternatea*

2.2.10.1 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

อัญชันเป็นไม้เนื้ออ่อนที่มีขนปกคลุมบริเวณลำต้น ใบเป็นใบประกอบแบบขนนก มีใบย่อยรูปไข่ กว้างประมาณ 2-3 เซนติเมตรและยาวประมาณ 3-5 เซนติเมตร ปลายใบแหลม โคนใบมน ผิวใบด้านล่างมีขนหนาปกคลุม อัญชันมีหลายหลากสีเช่น ดอกสีขาว ฟ้ำ และม่วง ดอกเป็นดอกเดี่ยว รูปทรงคล้ายฝายหอยเชลล์ กลีบคลุมรูปกลม ปลายเว้าเป็นแฉ่ง ตรงกลางมีสีเหลือง มีทั้งดอกซ้อนและดอกชั้นเดียว ดอกชั้นเดียวกลีบดอกข้างนอกจะมีขนาดใหญ่ ตรงกลางมีกลีบสีเหลือง ส่วนกลีบชั้นในขนาดเล็กดอกซ้อนกลีบดอกทั้งชั้นนอกและชั้นในจะมีขนาดเท่ากัน ซ้อนเวียนเป็นเกลียว แสดงดังรูปที่ 2.18 อัญชันเป็นพืชที่มีการออกดอกเกือบตลอดปี ผลมีลักษณะเป็นฝักแบน ภายในมีเมล็ดรูปไตสีดำ 5-10 เมล็ดต่อฝัก (นิจศิริ และธวัชชัย, 2547) (ดังรูปที่ 2.18)



รูปที่ 2.18 อัญชัน (*Clitoria ternatea*)

2.2.10.2 สารพฤษเคมี

กลีบของดอกอัญชันมีสารแอนโทไซยานินหลายชนิด ส่วนใหญ่เป็นสารเทอนาทิน (Ternatins) ซึ่งเป็นสารโพลีอะคิเลทเดพินิตินกลูโคไซด์ (Acylated delphinidin glucoside) (Kazuma *et al.*, 2003) ดอกอัญชันสีม่วง สีฟ้าและมีขาวจะมีชนิดและปริมาณสารแอนโทไซยานินที่แตกต่างกัน แต่ดอกอัญชันสีน้ำเงินที่มีกลีบดอกเดี่ยวหรือดอกซ้อนมีชนิดของสารสำคัญไม่แตกต่างกัน สีที่แตกต่างกันของแอนโทไซยานิน เกิดจากโครงสร้างเรโซแนนซ์ (Resonant structure) ของอออนฟลาโวลีเทียม (Flavylium ion) ซึ่งเป็นโครงสร้างหลักของแอนโทไซยานิน (Anthocyanidin) เป็นอะไกลโคน (Aglycone) ของแอนโทไซยานิน นอกจากนี้ยังมีงานวิจัยที่ศึกษาสารประกอบและประโยชน์ของส่วนต่าง ๆ ของอัญชัน เช่น ราก เมล็ด ใบ ก้าน และดอก โดยพบว่าดอกอัญชันสีม่วงจะมีสารในกลุ่มเทอนาทิน (Ternatins) ได้แก่ เทอนาทินเอ เทอนาทินบี และเทอนาทินดี สารให้สีในดอกคือ สารเดพินิติน (Delphinidin-3,5-diglucoside) เดพินิตินกลูโคไซด์ (Delphinidin-3-O-beta-D-glucoside) และเมโทซีเดพินิตินเบต้ากลูโคไซด์ (3'-Methoxydelphinidine-3-O-beta-D-glucoside) (พิชานันท์, 2557) นอกจากนี้ยังพบประกอบฟลาโวนอยด์ต่าง ๆ เช่น เคมฟีรอล (Kaempferol) เควอซีติน (Quercetin) ไมริเซติน (Myricetin) โรบินิน (Robinin) โลบีลินิน (Lobelinins) และดีเอซิลเทอนาทิน (Deacylternatin) (Terahara *et al.*, 1989; Singh and Tiwari, 2010)

2.2.10.3 สรรพคุณและฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา

สารสกัดจากดอกอัญชันมีฤทธิ์กระตุ้นการเรียนรู้และความจำ ช่วยคลายความเครียดและวิตกกังวล มีฤทธิ์ช่วยลดระดับน้ำตาลในเลือด ช่วยให้นอนหลับ แก้ไข้ แก้ปวด ต้านการอักเสบ สารสกัดเมทานอลจากดอกอัญชันมีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ที่ยับยั้งการเจริญของเส้นขน สารสกัดจากดอกอัญชันมีฤทธิ์กระตุ้นการงอกของเส้นขน (Zingare *et al.*, 2013) กระตุ้นการสร้างเม็ดสีเมลานิน (Kumar *et al.*, 2012) และเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (Kumar *et al.*, 2012)

2.3 อนุมูลอิสระ

อนุมูลอิสระ (Free radical) คือ โมเลกุลหรืออะตอมที่ไม่เสถียรเนื่องจากขาดอิเล็กตรอนอย่างน้อย 1 อิเล็กตรอน จึงมีความว่องไวในการเกิดปฏิกิริยากับโมเลกุลหรืออะตอมข้างเคียงเพื่อทำให้ตัวเองเสถียรขึ้น ทำให้โมเลกุลข้างเคียงสูญเสียอิเล็กตรอนและกลายเป็นอนุมูลอิสระตัวใหม่ ซึ่งจะเข้าทำปฏิกิริยากับโมเลกุลอื่นต่อไปเป็นปฏิกิริยาลูกโซ่ (Chain reaction) (Cheeseman and Slater, 1993) ในสภาวะที่มีการสร้างอนุมูลอิสระเป็นจำนวนมากสามารถก่อให้เกิดการบาดเจ็บของเซลล์และเกิดปฏิกิริยากับสารพันธุกรรมและเยื่อหุ้มเซลล์ เช่น ดีเอ็นเอ โปรตีน คาโบไฮเดรตและไขมัน ซึ่งเป็นกลไกสำคัญที่ก่อให้เกิดพยาธิสภาพต่าง ๆ เช่น การแก่ก่อนวัยอันควร โรคหลอดเลือดหัวใจ โรคพาร์กินสัน (Parkinson) โรคความจำเสื่อม (Alzheimer) ต้อกระจก ริ้วรอย ไขข้ออักเสบ รวมถึงโรคมะเร็ง (Ames *et al.*, 1992)

2.3.1 การเกิดอนุมูลอิสระ

โดยปกติอนุมูลอิสระสามารถเกิดขึ้นภายในร่างกายผ่านกระบวนการเมแทบอลิซึม (Metabolism) ดังนั้นอนุมูลอิสระส่วนใหญ่ที่สามารถพบได้ในร่างกายของสิ่งมีชีวิตที่ใช้ออกซิเจนในการดำรงชีวิต คือ อนุมูลอิสระอิสระที่มีออกซิเจนเป็นองค์ประกอบ (Reactive oxygen species, ROS) การเกิดอนุมูลอิสระมีสาเหตุมาจากปัจจัยภายใน (Endogenous sources) และภายนอกในร่างกาย (Exogenous sources)

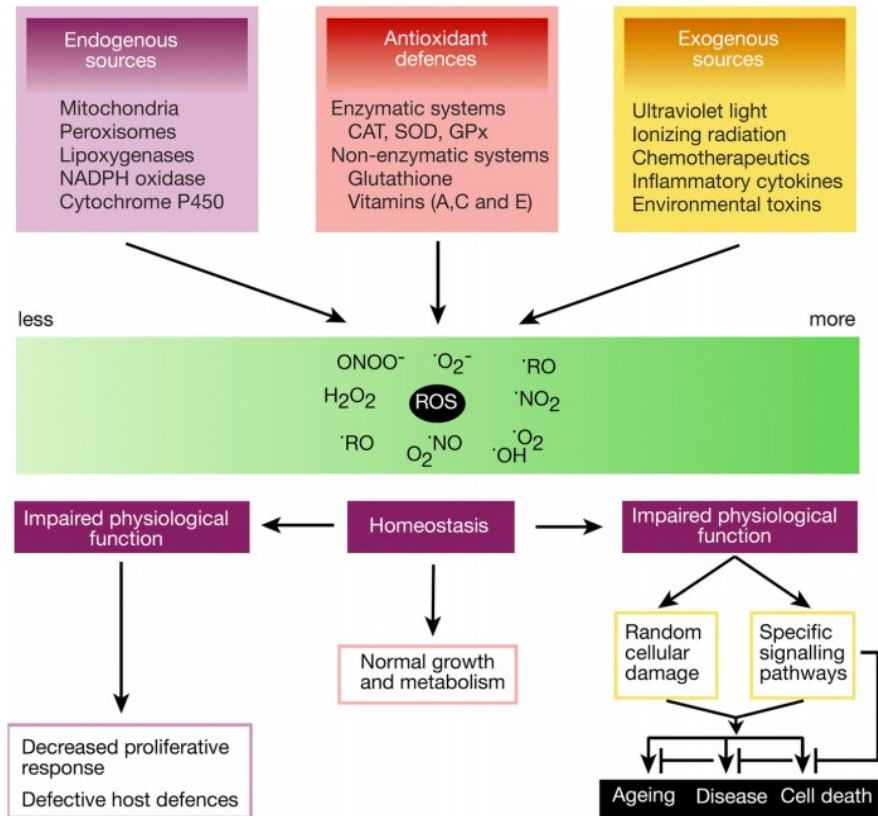
2.3.1.1 ปัจจัยภายในร่างกายที่เหนี่ยวนำให้เกิดอนุมูลอิสระ

อนุมูลอิสระกลุ่มออกซิเจนสามารถเกิดขึ้นได้ผ่านกระบวนการต่าง ๆ ภายในร่างกาย เช่น กระบวนการสร้าง ATP ที่ใช้ออกซิเจนเป็นตัวรับอิเล็กตรอนในกระบวนการหายใจระดับเซลล์ ปฏิกิริยาออกซิเดชันที่เกิดขึ้นภายในร่างกาย (Auto-oxidation) (Nawar, 1996) การทำงานของเอนไซม์บางชนิด เช่น เอนไซม์แซนทีนออกซิเดส (Xanthine oxidase, XO) เป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ในกระบวนการสลายเบสพิวรีน (Purine) และเอนไซม์ไลโปออกซิจีเนส (Lipoxygenase, LOX) เป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ในการเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันของกรดไขมันไม่อิ่มตัวสูง (Polyunsaturated Fatty Acid) (Halliwell *et al.*, 1995) นอกจากนี้กลไกการป้องกันตัวเองของร่างกายเมื่อถูกสิ่งแปลกปลอม (pathogen) เข้าบุกรุกหรือการกำจัดสิ่งแปลกปลอมของเม็ดเลือดขาวก็สามารถสร้างอนุมูลอิสระขึ้นได้เช่นกัน โดยเรียกปรากฏการณ์นี้ว่า oxidative burst (Konstan and Berger, 1993) และโลหะทรานซิชันต่าง ๆ ที่สามารถเร่งการสร้างอนุมูลอิสระไฮดรอกซิลในปฏิกิริยาเฟนตัน (Fenton's Reaction) (Halliwell, 1999) ภาวะความเครียดทางจิตใจและร่างกาย เช่น การอักเสบ การฟาโกไซโทซิส (Phagocytosis) การทำงานของเพอรอกซิโซม (Peroxisomes) (Valacchi *et al.*, 2004)

2.3.1.2 ปัจจัยภายนอกในร่างกายที่ทำให้เกิดอนุมูลอิสระ

สิ่งแวดล้อมภายนอกนั้นมีอิทธิพลอย่างมากในการกระตุ้นให้เกิดอนุมูลอิสระ โดยเฉพาะอย่างยิ่ง รังสีต่าง ๆ เช่น รังสีแกมมา รังสีอัลตราไวโอเล็ต และรังสีเอ็กซ์ เป็นต้น นอกจากนี้

ปัจจัยภายนอกที่มีผลต่อการเกิดอนุมูลอิสระในร่างกาย ได้แก่ สุนัขแม่เหล็ก สารปรุงแต่งอาหาร รวมถึงมลพิษทางสิ่งแวดล้อม เช่น ควันท่อไอเสีย ควันบุหรี่ สารพิษหรือสารเคมีต่าง ๆ เช่น ยาต้านมะเร็ง การออกกำลังกายที่หักโหมเกินไป รวมถึงโภชนาการ และเครื่องสำอางประเภท เช่น แอลกอฮอล์ เป็นต้น (Valacchi *et al.*, 2004; Bagchi and Puri, 1998; Ebadi, 2001; Bast *et al.*, 1991)



รูปที่ 2.19 ที่มาของอนุมูลอิสระกลุ่มออกซิเจนที่เกิดขึ้นจากในและนอกร่างกายและสมดุลของระบบต้านอนุมูลอิสระภายในร่างกาย

ที่มา: Li *et al.*, (2013)

2.3.2 ชนิดของอนุมูลอิสระที่สำคัญในร่างกาย

สารที่มีความสามารถในการออกซิไดซ์สารชีวโมเลกุลในร่างกาย เรียกว่า Reactive species (RS) ซึ่งส่วนใหญ่แล้วจะอยู่ในรูปของอนุมูลอิสระที่มีออกซิเจนเป็นองค์ประกอบ (reactive oxygen species, ROS) และยังพบในรูปของอนุมูลอิสระที่มีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบ (reactive nitrogen species, RNS) ตามโมเลกุลที่สามารถทำให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน RS นั้นไม่จำเป็นว่า จะต้องอยู่ในรูปของ free radical เสมอไป สารประกอบบางโมเลกุลที่อยู่ในรูป non-radical แต่ไวต่อการเกิดปฏิกิริยา oxidation เช่น ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ก็จัดเป็นสารที่มีความสามารถในการ

ออกซิไดซ์สารชีวโมเลกุลในร่างกายเช่นกัน (Lockwood, 2007) อนุมูลอิสระสามารถแบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่ ดังนี้

2.3.2.1 อนุมูลอิสระกลุ่มออกซิเจน

อนุมูลอิสระกลุ่มออกซิเจน (Reactive oxygen species, ROS) เป็นอนุมูลอิสระที่มีออกซิเจนเป็นองค์ประกอบ เกิดขึ้นจากกระบวนการเมแทบอลิซึมภายในเซลล์ของสิ่งมีชีวิตที่ใช้ ออกซิเจน (Birben *et al.*, 2012) รวมไปถึงเกิดขึ้นในกลไกการป้องกันตัวเองของร่างกายจากเชื้อจุลินทรีย์ต่าง ๆ หากร่างกายมีกระบวนการดังกล่าวที่มากเกินไป หรือการที่ร่างกายขาดสารต้านอนุมูลอิสระจะทำให้มีการสะสมของ ROS มากขึ้นและทำให้เกิดสถานะเครียดออกซิเดชันได้ ซึ่งหากเกิดเพียงระยะเวลาสั้น ๆ เพียงชั่วขณะจะไม่ส่งผลกระทบต่อสุขภาพมากนัก (Nimse and Pal, 2015) แต่หากเกิดภาวะดังกล่าวเป็นเวลานานจะท าให้มีความเสี่ยงที่จะมีผลไปทำลายเนื้อเยื่อต่าง ๆ เยื่อหุ้มเซลล์ รวมถึง DNA และจะนำไปสู่โรคในหลายระบบและนำไปสู่ความเสื่อมของอวัยวะต่าง ๆ ได้ อนุมูลอิสระกลุ่มออกซิเจนแบ่งออกได้ ดังนี้

2.3.2.1.1 อนุมูลอิสระซูเปอร์ออกไซด์

อนุมูลอิสระซูเปอร์ออกไซด์ (Superoxide radical, $O_2^{\cdot-}$) สามารถพบได้ในสิ่งมีชีวิตที่ใช้ ออกซิเจนทุกชนิด อนุมูลอิสระชนิดนี้เกิดจากกระบวนการขนส่งอิเล็กตรอนภายในเซลล์ไมโทคอนเดรีย (Mitochondria) อนุมูลอิสระซูเปอร์ออกไซด์สามารถใช้ในการทำลายสิ่งแปลกปลอมและกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันภายในร่างกายได้ (Halliwall and Gutteridge, 1984) หากไม่มีสารนี้จะทำให้ร่างกายสามารถต้านทานเชื้อโรคได้น้อย นอกจากนี้หากร่างกายมีปริมาณอนุมูลอิสระซูเปอร์ออกไซด์มากเกินไป อนุมูลอิสระชนิดนี้สามารถทำปฏิกิริยาเพนตันกับไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ได้ผลิตภัณฑ์เป็นอนุมูลไฮดรอกซิล ซึ่งเป็นสารออกซิไดซ์ที่มีความว่องไวสูง (Davies, 1995) อนุมูลอิสระซูเปอร์ออกไซด์สามารถสร้างไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ได้จากซูเปอร์ออกไซด์โดยอาศัยปฏิกิริยาของเอนไซม์ซูเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเทส (Superoxide dismutase, SOD) (Akon and Min, 1998) นอกจากนี้อนุมูลอิสระซูเปอร์ออกไซด์ยังสามารถสร้างอนุมูลอิสระไฮโปคลอไรต์ ($HOCl^{\cdot}$) เม็ดเลือดขาวชนิดนิวโทรฟิลด้วยเอนไซม์ไมอีโลเปอร์ออกซิเดส (Myeloperoxidase) และสามารถสร้างอนุมูลอิสระไฮดรอกซิลเมื่อมีโลหะทรานซิชัน (Sen, 1995) โดยปกติร่างกายจะมีวิธีการรับมือกับอนุมูลอิสระซูเปอร์ออกไซด์ โดยเซลล์ของผนังหลอดเลือดจะผลิตไนตริกออกไซด์มาทำปฏิกิริยากับอนุมูลอิสระชนิดนี้ในกระแสเลือดเกิดเป็นไนเตรตไอออน เพื่อลดความรุนแรงของอนุมูลอิสระชนิดนี้

2.3.2.1.2 อนุมูลอิสระไฮดรอกซิล

อนุมูลอิสระไฮดรอกซิล (Hydroxyl radical, OH^{\cdot}) สามารถเกิดได้จากหลายปฏิกิริยา เช่น ปฏิกิริยาฮาเบอร์-ไวส์ (Haber-Weiss reaction) ปฏิกิริยาการแตกตัวของโมเลกุลน้ำในร่างกายและการแตกตัวของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เมื่อถูกความร้อนหรือรังสี (Halliwell, 1989) โดยปกติในร่างกายอัตราการเกิดอนุมูลอิสระไฮดรอกซิลโดยอาศัยจากการแตกตัว

ของสารตั้งต้นอย่างเดียวนั้นต่ำมาก แต่อนุมูลอิสระไฮดรอกซิลที่เกิดจากการแตกตัวของไฮโดรเจนเพอออกไซด์ (H_2O_2) ที่มีโลหะทรานซิชันอยู่ในระบบ เช่น เหล็กของเหล็ก (Fe^{2+}) และทองแดง (Cu^+) ซึ่งโลหะทรานซิชันจะไปทำลายพันธะที่ยึดเหนี่ยวระหว่างออกซิเจนของสารไฮโดรเจนเพอออกไซด์ได้ง่าย และได้ผลิตภัณฑ์เป็นอนุมูลอิสระไฮดรอกซิล (OH^*) และไฮดรอกไซด์ไอออน (Hydroxide ion, OH^-) เรียกปฏิกิริยาที่มีโลหะเป็นตัวเร่งนี้ว่า ปฏิกิริยาเฟนต์ัน (Fenton reaction) (Siti *et al.*, 2015; Halliwell, 1999) เนื่องจากไฮโดรเจนเพอออกไซด์และโลหะทรานซิชันเหล่านี้สามารถพบได้ในร่างกาย ร่างกายจึงมีการสร้างอนุมูลอิสระไฮดรอกซิลตลอดเวลา โดยอัตราเร็วจะขึ้นอยู่กับพีเอชของร่างกาย อนุมูลอิสระไฮดรอกซิลเป็นอนุมูลอิสระที่มีความสามารถในการออกซิไดซ์ที่รุนแรงที่สุดและมีความว่องไวต่อการทำปฏิกิริยากับโมเลกุลรอบข้างได้อย่างรวดเร็ว ดังนั้นอนุมูลอิสระไฮดรอกซิลจึงเป็นอันตรายต่อสิ่งมีชีวิตสูงกว่าอนุมูลอิสระชนิดอื่น ๆ แต่เนื่องจากอนุมูลอิสระชนิดนี้ไม่สามารถผ่านข้ามผนังเซลล์และมีครึ่งชีวิตที่สั้นมาก จึงมักทำปฏิกิริยากับผนังเซลล์ที่พบใกล้ที่สุด อนุมูลอิสระชนิดนี้สามารถถูกพบได้มากบริเวณนัยน์ตาและปอด (Halliwell and Gutteridge, 1984)

2.3.2.1.3 ไฮโดรเจนเพอออกไซด์

ไฮโดรเจนเพอออกไซด์ (Hydrogen peroxide, H_2O_2) เกิดจากกระบวนการขนส่งอิเล็กตรอนในไมโทคอนเดรีย ปฏิกิริยาของเอนไซม์ที่มีโรโบฟลาวินเป็นโคเอนไซม์ ปฏิกิริยาออกซิเดชันของควิโนน ปฏิกิริยาออกซิไดซ์ของสารประกอบที่มีหมู่ซัลไฟดริล (Sulphydryl group) เป็นองค์ประกอบ และปฏิกิริยาของเอนไซม์ดีสมิวเทส ไฮโดรเจนเพอออกไซด์เป็นสารที่มีความคงตัวในเซลล์ของสิ่งมีชีวิตและสามารถผ่านเข้าออกเยื่อหุ้มเซลล์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ ซึ่งเป็นสารที่ไม่จัดเป็นสารอนุมูลอิสระ แต่จัดเป็นสารตั้งต้นที่ทำให้เกิดอนุมูลอิสระอื่น ๆ ได้ (Siti *et al.*, 2015) โดยไฮโดรเจนเพอออกไซด์สามารถส่งเสริมการกระตุ้นการแสดงออกของยีนบางชนิด เช่น ยีนที่เกี่ยวข้องกับไวรัส HIV และเป็นตัวออกซิไดซ์เข้าทำลายผนังเซลล์ โปรตีน และดีเอ็นเอให้เสียหาย อย่างไรก็ตามไฮโดรเจนเพอออกไซด์เป็นสิ่งที่ร่างกายขาดไม่ได้ เนื่องจากทำหน้าที่เป็นตัวส่งสัญญาณระดับเซลล์และเป็นสารที่ใช้ในการสร้างฮอร์โมนไทรอยด์ของเอนไซม์ไทรอยด์ออกซิเดส (Thyroid oxidase) (Halliwell and Cross, 1994)

2.3.2.1.4 อนุมูลอิสระเพอรอกซิล

อนุมูลอิสระเพอรอกซิล (Peroxy radical, ROO^*) เกิดจากปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมันที่มีพันธะคู่หลายตำแหน่ง (Polyunsaturated fatty acid, PUFA) อนุมูลอิสระเพอรอกซิลมีส่วนร่วมทำให้เกิดปฏิกิริยาลูกโซ่ที่สร้างความเสียหายต่อกรดไขมันที่เป็นองค์ประกอบของเยื่อหุ้มเซลล์ (Birben *et al.*, 2012)

2.3.2.1.5 ซิงเกิลออกซิเจน

ซิงเกิลออกซิเจน (Singlet oxygen, $^1O_2^*$) เกิดจากการดึงอิเล็กตรอนอิสระหนึ่งตัวออกจากโมเลกุลของออกซิเจนหรือเติมพลังงานให้กับโมเลกุลของออกซิเจน (Halliwell, 2006) เป็นสารที่มีความว่องไวในการเกิดปฏิกิริยาแต่ไม่จัดเป็นสารอนุมูลอิสระ สามารถ

พบได้มากในบริเวณที่มักสัมผัสกับออกซิเจน เช่น เลนส์เรติน่าและผิวหนัง (Halliwell and Gutteridge, 1984) ซึ่งเกลทออกซิเจนในร่างกายทำหน้าที่เป็นโมเลกุลส่งสัญญาณ หากมีมากเกินไป ซึ่งเกลทออกซิเจนจะเข้าทำปฏิกิริยาออกซิเดชันกับสารอินทรีย์ได้หลากหลายชนิด ได้แก่ กรดไขมันไม่อิ่มตัว สารประกอบอะโรมาติก และกรดอะมิโน เป็นต้น และเกิดเป็นอนุมูลอิสระเพอรอกไซด์ (Halliwell, 2006)

2.3.2.2 อนุมูลอิสระกลุ่มไนโตรเจน

อนุมูลอิสระกลุ่มไนโตรเจน (Reactive nitrogen species, RNS) เป็นอนุมูลอิสระที่มีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบหลักที่สามารถพบได้ทั้งภายนอกและภายในร่างกาย (Siti *et al.*, 2015) อนุมูลอิสระกลุ่มนี้ ได้แก่

2.3.2.2.1 อนุมูลไนตริกออกไซด์

อนุมูลไนตริกออกไซด์ (Nitric oxide, NO[•]) เป็นอนุมูลอิสระที่พบได้ทั่วไปในบรรยากาศ ซึ่งเกิดจากการเผาไหม้ของเชื้อเพลิงในเครื่องยนต์และโรงงานอุตสาหกรรม สามารถรวมตัวกับโลหะทรานซิชันหรือโอปรีตินที่มีโลหะทรานซิชันเป็นองค์ประกอบ (Metalloprotein) ได้ และสามารถเข้าจับกับฮีโมโกลบินได้เร็วกว่าโมเลกุลของออกซิเจนจนเกิดการขัดขวางกระบวนการขนส่งออกซิเจน (Stamler *et al.*, 1992) นอกจากนี้อนุมูลไนตริกออกไซด์สามารถทำปฏิกิริยากับซูเปอร์ออกไซด์เกิดเป็นอนุมูลเพอรอกซิลไนไตรท์ (Peroxynitrite, ONOO[•]) หรือถูกออกซิไดซ์เป็นไนไตรท์ (NO₂) ซึ่งสามารถทำลายเซลล์ถุงลม (Alveoli) และผนังหลอดเลือด (Vascular endothelium) ภายในปอดได้ (Stephens *et al.*, 1972; Foubert *et al.*, 1992; Huie and Padmaga, 1993)

2.3.2.2.2 เพอรอกซิลไนไตรท์

เพอรอกซิลไนไตรท์ (Peroxyl nitrite, ONOO[•]) เป็นอนุมูลอิสระที่มีความเป็นพิษต่อเซลล์และมีความว่องไวสูง แต่มีความจำเพาะในการเกิดปฏิกิริยากับชีวโมเลกุลของเซลล์บางชนิดเท่านั้น เช่น กลูตาไธโอน (Glutathione) กรดอะมิโนไทโรซีน (Tyrosine) และกรดอะมิโนซิสเทอีน (Cysteine) เป็นต้น เพอรอกซิลไนไตรท์เกิดจากอนุมูลอิสระไนตริกออกไซด์ (NO[•]) ทำปฏิกิริยากับอนุมูลอิสระซูเปอร์ออกไซด์ อนุมูลอิสระไนตริกออกไซด์นั้นเป็นตัวส่งสัญญาณที่สำคัญและเป็นอนุมูลอิสระที่สร้างจากเซลล์ผนังหลอดเลือด เซลล์สมอง เซลล์เม็ดเลือดขาว มีหน้าที่ควบคุมการบีบตัวของกล้ามเนื้อเรียบของหลอดเลือด การส่งกระแสประสาท (Halliwell and Cross, 1994)

2.4 สารต้านอนุมูลอิสระ

ร่างกายมนุษย์มีระบบป้องกันอันตรายที่เกิดจากอนุมูลอิสระ นั่นคือ สารต้านอนุมูลอิสระ สารต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant compound) คือ สารที่สามารถยับยั้งหรือชะลอการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของอนุมูลอิสระ สารเหล่านี้มีกลไกการยับยั้งสารอนุมูลอิสระด้วยกันหลายแบบ โดยสามารถแบ่งได้ 6 กลไก (Yanishlieva, 2001) ได้แก่

กลไกที่ 1 กลไกการดักจับอนุมูลอิสระ (Free radical scavenging) โดยสารต้านอนุมูลอิสระจะเป็นตัวให้อิเล็กตรอนแก่อนุมูลอิสระโดยตรง เกิดเป็นอนุมูลอิสระตัวใหม่ที่มีความรุนแรงน้อยลงหรือเกิดเป็นผลิตภัณฑ์ที่มีความเสถียร สารต้านอนุมูลอิสระที่มีกลไกแบบนี้ ได้แก่ บิวทิลไฮดรอกซีโทลูอีน (Butylated hydroxytoluene, BHT) และวิตามินอี เป็นต้น

กลไกที่ 2 กลไกการยับยั้งการทำงานของซิงเกิลออกซิเจน (Singlet oxygen quenching) โดยสารต้านอนุมูลอิสระจะเปลี่ยนซิงเกิลออกซิเจน (Singlet oxygen, $^1O_2^*$). ให้อยู่ในรูปของทรินเพิลออกซิเจน (Triplet oxygen, $^3O_2^*$). และปลดปล่อยพลังงานที่ได้รับในรูปของความร้อน สารต้านอนุมูลอิสระที่มีกลไกแบบนี้ ได้แก่ สารกลุ่มแคโรทีนอยด์ เป็นต้น

กลไกที่ 3 กลไกการเข้าจับกับโลหะเพื่อป้องกันการสร้างอนุมูลอิสระ (Metal chelating) สารต้านอนุมูลอิสระกลุ่มนี้สามารถจับกับไอออน (II) ไอออน (Fe^{2+}) และคอปเปอร์ (II) ไอออน (Cu^{2+}) ซึ่งเป็นโลหะสำคัญที่สามารถเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันในร่างกายรวมถึงเร่งการเกิดอนุมูลอิสระต่าง ๆ ได้แก่ ฟลาโวนอยด์ กรดซิตริก กรดฟอสฟอริก และวิตามินซี เป็นต้น

กลไกที่ 4 กลไกการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาการสร้างอนุมูลอิสระ (Enzyme inhibition) เช่น สารประกอบฟีนอลิกบางชนิดเช่น ฟลาโวนอยด์ กรดฟีนอลิก และแกแลคสามารถยับยั้งเอนไซม์ลิพอกซีจีเนส (Lipoxygenase) โดยจับกับไอออนของเหล็กที่เป็นโคแฟกเตอร์ของเอนไซม์ ซึ่งทำให้เอนไซม์ดังกล่าวไม่สามารถทำงานได้ (Puerta, 1999)

กลไกที่ 5 กลไกการหยุดปฏิกิริยาการสร้างอนุมูลอิสระ (Chain-breaking) เช่น วิตามินอีที่ทำหน้าที่เป็นตัวรับอิเล็กตรอน (Electron-acceptor antioxidants) จากอนุมูลเพอรอกซิล (Peroxyl radical) ซึ่งสามารถป้องกันการทำลายเยื่อหุ้มเซลล์จากการออกซิเดชันของกรดไขมัน (Lipid autooxidation)

กลไกที่ 6 กลไกการสนับสนุนสารต้านอนุมูลอิสระให้ทำงานได้ดีขึ้นหรือการเสริมฤทธิ์ (Synergism) เช่น การทำงานร่วมกันระหว่างแอลฟาโทโคฟีรอล (Alpha-Tocopherol) กับกรดแอสคอร์บิก (Ascorbic acid) .โดยแอลฟาโทโคฟีรอลจะทำปฏิกิริยากับอนุมูลเพอรอกซิล จากนั้นกรดแอสคอร์บิกจะให้ไฮโดรเจนอะตอมแก่อนุมูลอิสระแอลฟาโทโคฟีรอลเพอรอกซิล (Alpha-Tocopherol peroxy) ทำให้เปลี่ยนรูปกลับไปเป็นแอลฟาโทโคฟีรอลที่สามารถทำงานได้ต่อไป (Frankel, 1998)

โดยธรรมชาติร่างกายสามารถสร้างสารต้านอนุมูลอิสระเพื่อกำจัดอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นจากกระบวนการต่าง ๆ ภายในเซลล์ เช่น สารต้านอนุมูลอิสระที่เป็นเอนไซม์ ได้แก่ เอนไซม์ซูเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเทส (Superoxide dismutase) เอนไซม์กลูตาไธโอนเพอรอกซิเดส (Glutathione peroxidase) เอนไซม์คะตาเลส (Catalase) เป็นต้น และสารต้านอนุมูลอิสระที่ไม่ใช่เอนไซม์ ได้แก่ ยูเรท (Urate) บิลิรูบิน (Bilirubin) และทรานเฟอร์ริน (Transferrin) เป็นต้น

2.4.1 แหล่งที่มาของสารต้านอนุมูลอิสระ

2.4.1.1 สารต้านอนุมูลอิสระภายในร่างกาย

สารต้านอนุมูลอิสระภายในร่างกาย (Endogenous antioxidant) คือ สารต้านอนุมูลอิสระที่ร่างกายสามารถสังเคราะห์เองได้ สามารถพบได้ทั่วไปในเนื้อเยื่อหรือเซลล์ของสิ่งมีชีวิต สามารถจำแนกได้เป็น 2 กลุ่ม ดังนี้

2.4.1.1.1 เอนไซม์ที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

เอนไซม์ที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (Enzymatic antioxidant) คือ เอนไซม์ที่มีฤทธิ์ในการกำจัดอนุมูลอิสระ โดยปกติในระหว่างกระบวนการเมแทบอลิซึมนั้น จะเกิดสถานะเครียดออกซิเดชัน ทำให้เกิดอนุมูลอิสระ โดยเฉพาะอย่างยิ่ง อนุมูลอิสระกลุ่มออกซิเจน โดยอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นจะถูกควบคุมให้อยู่ในระดับที่ไม่เป็นอันตรายต่อเซลล์ของสิ่งมีชีวิต โดยอาศัยกลไกการทำงานร่วมกันของเอนไซม์ที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ซึ่งเอนไซม์แต่ละชนิดจะมีโมเลกุลของอนุมูลอิสระเป้าหมายที่แตกต่างกัน ตัวอย่างของเอนไซม์ที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ได้แก่

1. เอนไซม์ซูเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเทส

เอนไซม์ซูเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเทส (Superoxide dismutase, SOD) เป็นเอนไซม์ที่สามารถพบได้ในเซลล์ทุกชนิดและมีโคแฟกเตอร์ คือ ทองแดง สังกะสี และแมงกานีส เป็นต้น ในเซลล์ยูคาริโอตหรือในร่างกายของมนุษย์ สามารถจำแนกชนิดของเอนไซม์ SOD ได้ 2 ชนิด ได้แก่ เอนไซม์ Mn-SOD ที่พบได้ในเมทริกซ์ของไมโทคอนเดรีย เป็นเอนไซม์ที่บริเวณแอกทิพที่มีแมงกานีสเป็นองค์ประกอบ และเอนไซม์ Cu/Zn-SOD ที่พบได้ในไซโตซอล (Cytosol) เป็นเอนไซม์ที่บริเวณแอกทิพมีทองแดงกับสังกะสีเป็นองค์ประกอบ เอนไซม์ SOD เป็นเอนไซม์ที่ใช้ในการเร่งปฏิกิริยาการสลายตัวของอนุมูลอิสระซูเปอร์ออกไซด์ให้กลายเป็นออกซิเจนและไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (Nordberg and Arner, 2001) ดังสมการ



เมื่อเกิดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ขึ้น ดังนั้นจึงต้องมีเอนไซม์ที่ใช้กำจัดอนุมูลอิสระชนิดนี้ต่อ เช่น เอนไซม์กลูตาไธโอนเพอออกซิเดสและเอนไซม์คะตะเลส เอนไซม์ซูเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเทส มีประโยชน์ในการป้องกันร่างกายในสถานะขาดออกซิเจน โดยเฉพาะในผู้ป่วยที่ผ่าตัดหัวใจ (Halliwell and Grootveld, 1987) แต่ถ้าหากร่างกายมีปริมาณเอนไซม์ชนิดนี้มากเกินไปจะก่อให้เกิดกระบวนการ lipid peroxidation ได้ เนื่องจากมีปริมาณของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เกิดขึ้น

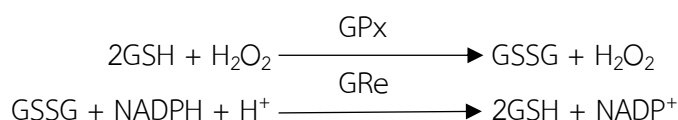
2. เอนไซม์คะตะเลส

เอนไซม์คะตะเลส (Catalase, CAT) สามารถพบได้ในอวัยวะหลายชนิดของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (Bergmeyer, 1965) โดยเฉพาะอย่างยิ่ง ในเพอโรซโซม (Peroxisomes) เอนไซม์คะตะเลสสามารถเร่งปฏิกิริยาการสลายตัวของอนุมูลอิสระไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ เป็นน้ำและออกซิเจนได้ นอกจากนี้เอนไซม์ชนิดนี้ยังสามารถทำลายโครงสร้างของเอนไซม์

กลุ่มไฮดรอกซิลที่เกิดขึ้นผ่านปฏิกิริยาเพนตัน นอกจากนี้ยังสามารถจับกับเซลล์ NADPH เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพได้อีกด้วย (Fridovich, 1999; Halliwell, 1999; Kirkman and Gaetami, 1984; Kirkman *et al.*, 1999)

3. เอนไซม์กลูตาไธโอนเพอรอกซิเดส

เอนไซม์กลูตาไธโอนเพอรอกซิเดส (Glutathione peroxidase, GPx) เป็นเอนไซม์ที่สำคัญในการจัดการกับอนุมูลอิสระไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ในเซลล์ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม เอนไซม์ชนิดนี้สามารถพบได้ส่วนใหญ่ในไซโทพลาสซึมและไมโทคอนเดรียและสามารถแบ่งออกได้เป็น 4 ชนิด คือ GPx1 จนถึง GPx4 โดยแต่ละชนิดจะประกอบไปด้วยซีลีโนซิสทีน (Selenocysteine) ซึ่งเป็นเอนไซม์เพียงชนิดเดียวในร่างกายมนุษย์ที่ประกอบด้วยธาตุชนิดนี้ เอนไซม์ GPx1 และ GPx4 เป็นชนิดที่สามารถพบได้มากที่สุด เอนไซม์ชนิดนี้สามารถลดอนุมูลอิสระไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์โดยใช้สารกลูตาไธโอนเป็นสารตั้งต้น ให้กลายเป็น กลูตาไธโอนไดซัลไฟด์ (Glutathione disulfide, GSSG) น้ำและแอลกอฮอล์ โดยกลูตาไธโอนไดซัลไฟด์ ที่เกิดขึ้นสามารถเปลี่ยนกลับเป็นกลูตาไธโอนได้ด้วยเอนไซม์กลูตาไธโอนรีดักเทส (Glutathione reductase, GRe) ดังสมการ (Maiorino *et al.*, 1995; Epp *et al.*, 1983)



4. เอนไซม์เฟส II

Phase II xenobiotic detoxification enzyme เป็นเอนไซม์ที่อยู่ในไมโทคอนเดรียที่ทำหน้าที่เปลี่ยนสารต่าง ๆ ให้สามารถละลายน้ำได้มากขึ้นเพื่อให้ร่างกายได้ขับสารเหล่านี้ผ่านทางปัสสาวะ พบมากในเซลล์ตับ ได้แก่ ฮีโมออกซิจีเนส-1 (Hemeoxygenase-1, HO-1) และแมงกานีส-ซูเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเทส (Manganese superoxide dismutase, Mn-SOD) เป็นต้น (Halliwell and Cross, 1994)

2.4.1.1.2 สารต้านอนุมูลอิสระที่ไม่ใช่เอนไซม์

สารต้านอนุมูลอิสระที่ไม่ใช่เอนไซม์ คือ สารต้านอนุมูลอิสระชนิดอื่น ๆ ที่ไม่ใช่เอนไซม์ที่ได้มาจากการสังเคราะห์ภายในเซลล์ เช่น กรดไลโปอิก (lipoic acid) โคเอนไซม์ คิว (Coenzyme Q) อัลบูมิน (Albumin) กลูตาไทโอน (Glutathione, GSH) และแอล-คาร์นิทีน (L-Carnithine) เป็นต้น สารต้านอนุมูลอิสระกลุ่มนี้เป็นสารที่มีความสามารถในการให้อิเล็กตรอน (Reducing agent) แก่อนุมูลอิสระ โดยใช้กลไกการดักจับอนุมูลอิสระ ทำให้อนุมูลอิสระมีความเสถียร (Noori, 2012)

2.4.1.2 สารต้านอนุมูลอิสระจากแหล่งภายนอก

สารต้านอนุมูลอิสระจากแหล่งภายนอก (Exogenous antioxidant) เป็นสาร

ต้านอนุมูลอิสระที่ได้จากการรับประทานอาหารหรือผลิตภัณฑ์อาหารเสริม เช่น ผัก ผลไม้ สมุนไพร และวิตามินชนิดต่าง ๆ เป็นต้น สามารถแบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่ ๆ ดังนี้

2.4.1.2.1 สารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์

สารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์ (Synthetic antioxidant) เป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่ได้จากการสังเคราะห์ทางเคมี นิยมใช้ในโรงงานอุตสาหกรรมอาหารเพื่อยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมันอันเป็นสาเหตุสำคัญของการเปลี่ยนแปลงคุณลักษณะต่าง ๆ เช่น กลิ่น สี และรสชาติ เป็นต้น ตัวอย่างของสารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์ ได้แก่ โพรพิลแกลเลต (Propyl gallate) บิวทิลไฮดรอกซีแอนนิโซล (Butylated hydroxyanisole, BHA) บิวทิลไฮดรอกซีโทลูอีน (Butylated hydroxytoluene, BHT) และเทอร์เทียรีบิวทิลไฮดรอกควิโนน (Tertiary butylhydroquinone, TBHQ) เป็นต้น ซึ่งสารเหล่านี้มีประสิทธิภาพและความคงตัวสูงกว่าสารต้านอนุมูลอิสระจากธรรมชาติ แต่มีข้อจำกัดของการใช้เนื่องจากปัญหาด้านความปลอดภัยในการบริโภค (Yang and Wang, 1993)

2.4.1.2.2 สารต้านอนุมูลอิสระจากธรรมชาติ

สารต้านอนุมูลอิสระจากธรรมชาติ (Natural antioxidant) สามารถพบได้ทั้งในจุลินทรีย์ สัตว์และพืช เช่น วิตามิน เกลือแร่ กรดไขมันจำเป็น รวมถึงสารที่มีโครงสร้างเป็นสารประกอบฟีนอลิก เช่น โพลีฟีนอล แซนโทน และฟลาโวนอยด์ เป็นต้น (Sen *et al.*, 2014) นอกจากนี้กล่าวมาข้างต้นแล้ว สารที่มีประโยชน์ต่อสุขภาพอื่น ๆ เช่น ในผักกาดเขียว เช่น กระเทียมและหัวหอม จะมีสารประกอบซัลเฟอร์จำนวนมากที่สามารถถูกไฮโดรไลซ์ด้วยเอนไซม์ภายในร่างกายไปกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ phase II (Fehey *et al.*, 1997) ตัวอย่างของสารต้านอนุมูลอิสระที่ได้จากธรรมชาติมีดังนี้

1. วิตามินและเกลือแร่

วิตามินและเกลือแร่เป็นสารที่ร่างกายต้องการน้อยแต่ขาดไม่ได้ เนื่องจากมีความจำเป็นต่อการทำงานของร่างกาย เช่น การลำเลียงสารอาหารหลัก ได้แก่ โปรตีน ไขมันและคาร์โบไฮเดรต ไปใช้ในการสร้างเนื้อเยื่อและผลิตพลังงานในการดำรงชีวิต ทำหน้าที่เป็นโครงสร้างของร่างกาย เป็นองค์ประกอบของเซลล์เนื้อเยื่อ เส้นประสาท เอนไซม์ รวมไปถึงฮอร์โมนต่าง ๆ ตัวอย่างวิตามินที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ มีดังนี้

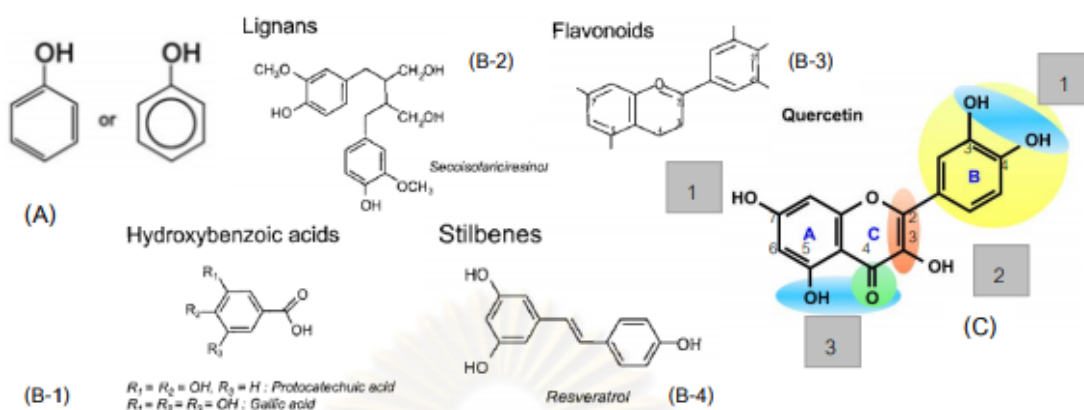
2. กรดแอสคอร์บิกหรือวิตามินซี

กรดแอสคอร์บิก (Ascorbic acid) หรือวิตามินซี เป็นสารประกอบที่มีคาร์บอน 6 อะตอม ภายในมีหมู่ไฮดรอกซิล 4 หมู่ กรดแอสคอร์บิกจึงสามารถละลายน้ำได้ดีและสามารถออกฤทธิ์ในส่วนที่เป็นของเหลวภายในเซลล์และในไซโทซอล กลไกในการออกฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระของแอสคอร์บิกจะใช้กลไกการดักจับอนุมูลอิสระ โดยการให้อิเล็กตรอนหรือไฮโดรเจนอะตอมแก่อนุมูลอิสระ กรดแอสคอร์บิกสามารถพบได้ในผัก ผลไม้บางชนิด โดยผักและผลไม้ที่มี

วิตามินซีสูง ได้แก่ ส้ม แตงโม มะละกอ มะเขือเทศ สับปะรดและองุ่น เป็นต้น กรดแอสคอร์บิกสามารถสลายตัวได้ง่ายในบรรยากาศที่มีความร้อน แสง ความชื้น โลหะหนัก และในสภาวะที่เป็นด่าง จึงมีการสังเคราะห์กรดแอสคอร์บิกเป็นอาหารเสริมเพื่อชดเชยการสูญเสียวิตามินตามธรรมชาติ (ฉัตรชัย, 2552)

3. สารประกอบโพลีฟีนอล ฟลาโวนอยด์และสารประกอบอื่นๆ

นอกจากวิตามินและเกลือแร่แล้ว สมุนไพรและพืชหลายชนิดยังมีสารต้านอนุมูลอิสระชนิดอื่น ๆ ยกตัวอย่างเช่น *Garcinia indica* (kokam) ซึ่งเป็นเครื่องเทศของประเทศอินเดีย (Mishra *et al.*, 2006) ดอกอัญชันที่ใช้เป็นสีผสมอาหารของขนมไทย ตลอดจนเป็นส่วนผสมของเครื่องสำอางต่าง ๆ ในประเทศไทย (Zingare *et al.*, 2013) เป็นต้น สารเหล่านี้มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและสามารถยับยั้งปฏิกิริยาออกซิไดซ์ได้ (Ardestani and Yazdanparast, 2007) จึงมีการนำพืชสมุนไพรเหล่านี้มาใช้อย่างแพร่หลายในการรักษาและบำรุงสุขภาพตั้งแต่อดีตจนถึงปัจจุบัน สารประกอบในพืชสมุนไพรเหล่านี้ส่วนใหญ่ คือ สารโพลีฟีนอล (polyphenol) ซึ่งเป็นสารที่พืชสร้างขึ้นเพื่อใช้ป้องกันตัวเองจากสิ่งแวดล้อมที่เป็นอันตราย มีสูตรโครงสร้างเป็นหมู่ phenol ต่อกันมากกว่า 2 หมู่ขึ้นไป ดังรูปที่ 2.20



รูปที่ 2.20 ลักษณะโครงสร้างพื้นฐานของสารประกอบโพลีฟีนอล

โดย A คือ หมู่ฟีนอล (Phenol) ซึ่งลักษณะโครงสร้างของโพลีฟีนอลหลัก มี 4 ประเภท ได้แก่

B-1 คือ Phenolic acid

B-2 คือ Lignans

B-3 คือ ฟลาโวนอยด์

B-4 คือ Stilbenes

C แสดงหมู่ฟังก์ชันบนโครงสร้างฟลาโวนอยด์ที่มีผลต่อการออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

ที่มา: อติตยา (2551)

ในธรรมชาติ โพลีฟีนอลมีรูปแบบที่หลากหลายจากการบิดโครงสร้างและการไฮโดรไลซ์น้ำออกจากโมเลกุล นอกจากนี้โพลีฟีนอลสามารถเชื่อมกับโพลีฟีนอลตัว

อื่นๆ และหมู่น้ำตาล โดยมีผลต่อลักษณะทางเคมี ลักษณะทางกายภาพ และฤทธิ์ทางชีวภาพของโพลีฟีนอล ดังรูปที่ 2.20 B-1 ถึง B-4 แต่สารโพลีฟีนอลในพืชมักสูญเสียและแตกสลายไปตั้งแต่ในกระบวนการปรุงอาหาร ดังนั้นร่างกายจึงมักได้รับฟลาโวนอยด์ในปริมาณที่ต่ำกว่ากรดฟีนอลิกเสมอ เนื่องจากสารประกอบฟลาโวนอยด์สามารถสลายตัวได้ง่าย ยกเว้นสารแอนโทไซยานินที่ทนต่อการแตกสลาย ฤทธิ์ทางชีวภาพของโพลีฟีนอลในการป้องกันและยับยั้งอนุมูลอิสระขึ้นกับหมู่ฟังก์ชัน ดังรูปที่ 2.20C

โพลีฟีนอลประกอบได้ด้วยหมู่ไฮดรอกซิล ณ ตำแหน่งคาร์บอนที่ 3 บนวงแหวน AC และตำแหน่งคาร์บอนที่ 3 กับ 4 บนวงแหวน B และมีพันธะคู่ระหว่างคาร์บอนตำแหน่งที่ 2 และ 3 เรียกโครงสร้างแบบนี้ว่า Catechol o-dihydroxy ซึ่งสามารถเสริมฤทธิ์ป้องกันเซลล์ได้ดีกว่าการมีหมู่ไฮดรอกซิล ณ ตำแหน่งใดตำแหน่งหนึ่ง รวมทั้งออกซิเจนในตำแหน่งที่ 4 บนวงแหวน C ทำให้อิเล็กตรอนวงแหวนอย่างเสถียร โดยไม่ทำปฏิกิริยากับสารอื่น (Ishige *et al.*, 2001) โดยบริเวณเหล่านี้มีความสามารถในการรับอิเล็กตรอนมากที่สุดและคงตัวอยู่ได้หลังจากรับอิเล็กตรอนไปแล้ว (Knakt *et al.*, 2002) จึงทำให้โพลีฟีนอลมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระได้ดีกว่าวิตามินอีและวิตามินซี นอกจากนี้ โพลีฟีนอลยังกระตุ้นการทำงานของสารต้านอนุมูลอิสระอื่น ๆ เช่น เอนไซม์ phase II เป็นต้น ร่างกายของมนุษย์สามารถดูดซึมสารประกอบโพลีฟีนอลตามคุณสมบัติการละลายน้ำ โดยพบว่าสารประกอบโพลีฟีนอลสามารถละลายน้ำได้ลดลงเมื่อเติมหมู่ไฮดรอกซิล น้ำตาล หรือไอออนลงในโมเลกุล แต่จะมีความสามารถในการผ่านเข้าผนังเซลล์ได้ง่ายขึ้น (Ishige *et al.*, 2001) โดยปกติแล้วหมู่น้ำตาลในสารประกอบโพลีฟีนอลสามารถถูกตัดออกโดยเอนไซม์จากแบคทีเรียในทางเดินอาหารและถูกดูดซึมเข้าสู่ร่างกายบริเวณลำไส้เล็ก (Tapiero *et al.*, 2002) สารประกอบโพลีฟีนอล (Polyphenol) ส่วนใหญ่สามารถพบได้ในผัก ผลไม้ ธัญพืช ชา กาแฟ ไวน์แดงและคอมบูชา (Sealbert *et al.*, 2005) มีฤทธิ์ยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันภายในเซลล์ (Oxidative stress) ที่สามารถก่อให้เกิดโรคต่าง ๆ ภายในร่างกาย เช่น โรคมะเร็งและโรคหัวใจ (Manach, 2004) ส่วนใหญ่สารประกอบโพลีฟีนอลที่พบในเครื่องดื่มคอมบูชามาจากสารประกอบต่างๆ ภายในใบชาและถูกสร้างขึ้นโดยจุลินทรีย์ในระหว่างกระบวนการหมัก (Jayabalan *et al.*, 2008; Chu and Chen, 2006) สารประกอบโพลีฟีนอลสามารถแบ่งออกได้เป็น 4 ประเภท ได้แก่

3.1) กรดฟีนอลิก

กรดฟีนอลิก (Phenolic acid) มีปริมาณร้อยละ 30 ของโพลีฟีนอลทั้งหมด กรดฟีนอลิกที่พบได้มากที่สุดคือ กรดคาเฟอิก (Caffeic acid) กรดฟีนอลิกในธรรมชาติจะสร้างพันธะเอสเทอร์กับน้ำตาล เช่น กรดการ์ลิก (Garlic acid) (Scalbert and Williamson, 2000) มีงานวิจัยชี้ว่ากรดคาเฟอิก เมื่อฤทธิ์ในการยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็งเต้านม เมื่อทำงานร่วมกับกรดพีเอเอ (3,4-dihydroxy-phenylacetic acid, PAA) เนื่องจากไปยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ nitric oxide synthase และกระตุ้นให้เซลล์ตาย (Kampa *et al.*, 2004)

นอกจากนี้กรดฟีนอลิกยังสามารถพบได้ในผลไม้จำพวก พลัม แอปเปิล เชอร์รี่ เช่น กรดคลอโรจีนิก (Chlorogenic acid) ซึ่งมีฤทธิ์เป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (Bouayed *et al.*, 2007)

3.2) ลิกนิน

ลิกนิน (lignin) สามารถพบได้ในเมล็ดปอ (Flaxseed) ลิกนินสามารถจับกับ Estrogen receptor ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งเต้านม และสามารถลดการดูดซึมไขมันเข้าเซลล์ลำไส้

3.3) สติเบนส์

สติเบนส์ (Stibenes) เป็นสารที่สามารถพบได้ในพืชสมุนไพรต่าง ๆ และไวน์แดง สามารถยับยั้งการเกิดมะเร็งได้ (Guengerich *et al.*, 2003)

3.4) ฟลาโวนอยด์

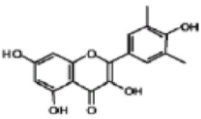
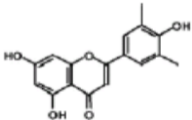
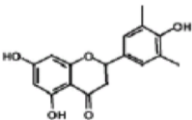
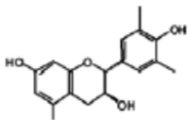
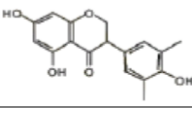
ฟลาโวนอยด์เป็นสารประกอบโพลีฟีนอลที่พบมากที่สุดร้อยละ 60 สามารถพบมากในพืชผักและผลไม้ มีสูตรโครงสร้างเป็น - คาร์บอนเชื่อมกับวงแหวนไพแรน เรียกว่า CHO Tricyclic flavalium cation หรือ Flavon skeleton มีคุณสมบัติเป็นรงควัตถุที่สามารถกรองแสงที่มีความยาวคลื่นที่จำเพาะเจาะจงและทำหน้าที่เป็นสารต้านอนุมูลอิสระ ได้แก่ ฟลาโวนอยด์สามารถจับกับโลหะทรานซิชันเพื่อไม่ให้เข้าร่วมปฏิกิริยาในการสร้างอนุมูลอิสระและจับกับโมเลกุลออกซิเจนและไนโตรเจนที่ไวต่อการทำปฏิกิริยา ฟลาโวนอยด์ที่ทำการขจัดออกแล้วยังสามารถดักจับอนุมูลอิสระต่อไปได้อีก ฟลาโวนอยด์สามารถเหนี่ยวนำการทำงานของเอนไซม์เฟส II ที่เป็นกลไกสำคัญในการป้องกันและกำจัดสารพิษออกจากเซลล์ ฟลาโวนอยด์ที่ไม่ได้ทำปฏิกิริยากับโลหะนั้นจะสามารถเข้าจับกับเป้าหมายเฉพาะได้โดยตรง เช่น รีเซพเตอร์ ผนังเซลล์ เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการส่งสัญญาณสื่อสารของเซลล์และควบคุมการแสดงออกของยีนทั้งในระดับการถอดรหัส (Transcription) และการแปลรหัส (Translation) เป็นต้น ซึ่งความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระนั้นขึ้นอยู่กับโครงสร้างของฟลาโวนอยด์และคุณสมบัติของฟลาโวนอยด์ ฟลาโวนอยด์ที่ไม่ได้ถูกดูดซึม สามารถช่วยดูแลรักษาระบบทางเดินอาหารโดยเฉพาะเซลล์กระเพาะอาหารและลำไส้ (Walle, 2004)

ฟลาโวนอยด์สามารถแบ่งได้ 6 ประเภทตามโครงสร้างระหว่างวงแหวนและการออกซิเดชันของออกซิเจนบนวงแหวน ได้แก่ ฟลาโวนอล (Flavonol) ฟลาโวน (Flavones) ฟลาวาโนน (Flavanones) ฟลาวานอล (Flavanols) ไอโซฟลาโวน (Isoflavones) และแอนโทไซยานิน (Anthocyanidins) ดังตารางที่ 2.1

บทบาทของสารต้านอนุมูลอิสระยังเป็นที่ถกเถียงกันอยู่ในปัจจุบัน เนื่องจากยังมีบทความและงานวิจัยอื่น ๆ ที่ให้ผลไม่สอดคล้องกันในการศึกษาความสามารถของสารต้านอนุมูลอิสระภายนอกร่างกาย (In vitro) โดยการวัดด้วยวิธีทางเคมี เช่น การวัดปริมาณอนุมูลอิสระออกซิเจน (Oxygen radical absorbance assay, ORAC) และการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระดีพีพีเอช (Diphenyl-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging assay) เป็นต้น ซึ่ง

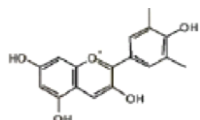
จากการทดสอบภายนอกร่างกายอาจพบว่าให้ผลค่าการต้านอนุมูลอิสระสูงกว่าความเป็นจริง ซึ่งเมื่อนำมาทดสอบกับเซลล์เพาะเลี้ยง สัตว์ทดลอง (In vivo) หรือทดสอบทางคลินิก (Clinical trial) แล้วพบว่าไม่เป็นผลตามที่คาดหมาย เช่น รายงานบางส่วนกล่าวว่าวิตามินซีและวิตามินอีขนาดสูง ๆ สามารถลดอัตราการตายและป้องกันการเกิดโรคหัวใจได้ แต่งานวิจัยบางส่วนกลับพบว่า วิตามินทั้งสองชนิดนี้ไม่สามารถป้องกันโรคใด ๆ ได้ อีกทั้งยังสามารถกลายเป็นอนุมูลอิสระเสียเอง เมื่ออยู่ในสภาพที่ไม่เหมือนอนุมูลอิสระ (Podmore *et al.*, 1998) อาจเป็นเพราะปัจจัยแวดล้อมต่าง ๆ ที่แตกต่างกันในการทดลอง ดังนั้นจึงจำเป็นต้องมีการกำหนดมาตรฐานการวิจัยด้านนี้ให้ครบถ้วนเพื่อผลที่ถูกต้อง

ตารางที่ 2.1 โครงสร้าง ชื่อ และแหล่งที่พบของฟลาโวนอยด์ประเภทต่าง ๆ

ประเภทของสารประกอบ ฟลาโวนอยด์และโครงสร้าง	ตัวอย่าง	แหล่งที่พบ
ฟลาวานอล (Flavanols) 	EGCG Epigallocatechin Catechin	ชอคโกแลต ถั่ว ใบชาอู่หลง เกสรบัวหลวง ใบหม่อน ไวน์แดง แอปเปิล ตะไคร้หอม เซอร์รี่และแอปพริคอต
ฟลาโวน (Flavones) 	Luteolin Apigenin Chrysin	ใบชาอู่หลง ผลเก๋ากี้ เกสรบัวหลวง ตะไคร้หอม พริกไทย ไทม์และขึ้นช่ายฝรั่ง
ฟลาวาโนน(Flavanones) 	Naringenin Hesperidin Eriodiatyl	ผลไม้ตระกูลส้ม
ฟลาโวนอล (Flavonols) 	Quercetin Myricetin Kaempferol Rutin	ดอกอัญชัน หัวหอม แอปเปิล เซอร์รี่ บล็อกโคลี่ มะเขือเทศ เบอร์รี่ ใบชาและไวน์แดง
ไอโซฟลาโวนอยด์ (Isoflavonoids) 	Genistein Daidzein	ถั่วเหลือง

ตารางที่ 2.1 (ต่อ) โครงสร้าง ชื่อ และแหล่งที่พบของฟลาโวนอยด์ประเภทต่าง ๆ

ประเภทของสารประกอบ ฟลาโวนอยด์และโครงสร้าง	ตัวอย่าง	แหล่งที่พบ
แอนโทไซยานิดิน (Anthocyanidins)	Pelargonidin Cyanidin Malvidin	ใบชาอยู่หลง ผลเชอร์รี่ ดอก กระเจี๊ยบ สตอเบอร์รี่ ดอก อัญชัน ไวน์แดง ข้าวดำและ ข้าวแดง



ที่มา: อติตยา, 2551

2.6 การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

2.6.1 การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระทางเคมี

2.6.1.1 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระดีพีพีเอช

การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระดีพีพีเอช (Diphenyl-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging assay) เป็นการทดสอบด้วยวิธีทางเคมีโดยใช้สารที่มีคุณสมบัติเป็นอนุมูลอิสระ คือ อนุมูลอิสระ DPPH เพื่อทดสอบความสามารถในการให้ไฮโดรเจนอะตอมของสารต้านอนุมูลอิสระ DPPH เป็นสารสังเคราะห์ที่อยู่ในรูปอนุมูลอิสระที่คงตัวและมีสีม่วง สามารถดูดกลืนแสงได้ที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร เมื่ออนุมูลอิสระ DPPH ทำปฏิกิริยากับสารต้านอนุมูลอิสระ จะทำให้สีม่วงจางลง ดังรูปที่ 2.6 สามารถหาความเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของตัวอย่างได้จากการคำนวณตามสูตร (บุหรัน, 2556)

$$\text{ร้อยละของฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ DPPH} = \left(1 - \frac{\text{ค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่าง}}{\text{ค่าการดูดกลืนแสงของ DPPH}}\right) \times 100$$

การหาค่าฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธีนี้สามารถทำได้ง่าย สะดวกและรวดเร็ว แต่เนื่องสารอนุมูลอิสระ DPPH ค่อนข้างมีความเสถียร ไม่ไวต่อปฏิกิริยาเหมือนอนุมูลอิสระในร่างกาย จึงสามารถเกิดปฏิกิริยาได้น้อยกว่าอนุมูลอิสระปกติและต้องวัดในปฏิกิริยาที่เป็นแอลกอฮอล์ซึ่งทำให้โปรตีนตกตะกอนและการปนเปื้อนสารหรือโลหะอื่นอาจรบกวนการเกิดปฏิกิริยาทำให้สีของอนุมูลอิสระ DPPH จางลงได้

2.6.2 การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระภายในเซลล์

ก่อนการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระภายในเซลล์จะต้องทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ (Cytotoxicity test) ก่อน เพื่อหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารต้านอนุมูลอิสระที่ไม่ทำอันตรายต่อเซลล์ โดยใช้สาร 3-(4,5-ไดเมทิล-2-ไทอะโซลิล)-2,5-ไดฟีนิลเตตราโซลียมโบรมไนด์ (3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, MTT assay) หลักการของ MTT assay คือ เซลล์ที่มีชีวิตจะสามารถใช้เอนไซม์ไมโทคอนเดรียรีดักเตส (Mitochondrial reductase) รีดิวซ์สาร MTT ที่มีสีเหลืองให้เปลี่ยนเป็นผลึกของฟอร์มazan (Formazan crystal) ที่มีสีม่วง โดยสามารถดูดกลืนแสงที่มีความยาวคลื่นประมาณ 550-600 นาโนเมตร ซึ่งค่าการดูดกลืนแสงนี้จะเป็นสัดส่วนโดยตรงกับความเข้มข้นของผลึกฟอร์มazanที่มีสีม่วง (Stochert *et al.*, 2012)

2.6.2.1 การทดสอบฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระออกซิเจนภายในเซลล์

การทดสอบฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระออกซิเจนภายในเซลล์ (Intracellular ROS level) เป็นการทดสอบโดยใช้สาร 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA) ในการวิเคราะห์ปริมาณอนุมูลอิสระออกซิเจนภายในเซลล์ ซึ่งโดยปกติ DCFH-DA เป็นสารไม่เรืองแสงและไม่มีขั้ว แต่สามารถถูกออกซิไดซ์ด้วยเอนไซม์เอสเทอเรส (Esterase) ภายในเซลล์ให้กลายเป็น 2',7'-dichlorofluorescein (DCF) ที่สามารถเรืองแสงได้ (excitation 492-495 นาโนเมตร, emission 517-527 นาโนเมตร)

2.7 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Jayabalan *et al.*, (2007) ได้ทำการศึกษาการเปลี่ยนแปลงสารประกอบโพลีฟีนอลในระหว่างกระบวนการหมักคอมบูชาจากชาดำ ชาเขียวและกากชาพบว่า สารโพลีฟีนอลในคอมบูชาลดลงในระหว่างกระบวนการหมัก สารดังกล่าว ได้แก่ อีพิคาเทชิน (Epicatechin, EC) อีพิคาเทชินแกลเลท (Epicatechin gallate, ECG) อีพิแกลโลคาเทชิน (Epigallocatechin, EGC) อีพิแกลโลคาเทชินแกลเลท (Epigallocatechin gallate, EGCG) และเทียฟลาวิน (Theaflavin, TF) ซึ่งการลดลงของสารชีวภาพโดยเฉพาะสารกลุ่มคาเทชินนี้อาจเป็นผลมาจากเอนไซม์ที่ยีสต์และแบคทีเรียในคอมบูชาปล่อยออกมาเรื่อยๆ

Velicanski *et al.*, (2007) ได้ทำการศึกษาฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของคอมบูชาจากสระระแหงพบว่า คอมบูชาจากสระระแหงมีฤทธิ์เพิ่มขึ้นจากชาสระระแหงที่ไม่ผ่านกระบวนการหมัก

Jayabalan *et al.*, (2008a) ได้ทำการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH และปริมาณของสารประกอบฟีนอลิกของคอมบูชาจากชาดำ ชาเขียวและกากชาในระหว่างกระบวนการหมัก พบว่า ชาทั้งสามชนิด มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและปริมาณสารประกอบฟีนอลิกเพิ่มขึ้นในระหว่างกระบวนการหมัก

Jayabalan *et al.*, (2008b) ได้ทำการศึกษากลไกของอนุมูลอิสระที่ใช้ในการฆ่าเชื้อต่อปริมาณของสารประกอบในคอมบูชาและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของคอมบูชาจากชาดำ โดยใช้อนุมูล 60, 65 และ 68 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที พบว่า สารประกอบโพลีฟีนอลและคุณภาพของชาดำคงที่ในระหว่างการเก็บ แต่มีประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระลดลง อาจเนื่องจากการเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมีในระหว่างกระบวนการหมัก

Malbaša *et al.*, (2011) ได้ศึกษากลไกของหัวเชื้อคอมบูชาต่อฤทธิ์ในการยับยั้งอนุมูลอิสระ โดยใช้หัวเชื้อที่คัดแยกได้ 3 ตัวอย่าง คือ หัวเชื้อผสมระหว่างแบคทีเรียที่สร้างกรดอะซิติกและ *Zygosaccharomyces* sp., หัวเชื้อผสมระหว่างแบคทีเรียที่สร้างกรดอะซิติกและ *Saccharomyces cerevisiae*, และหัวเชื้อปกติ โดยหมักร่วมกับชาดำและชาเขียวที่มีน้ำตาลซูโครสความเข้มข้นร้อยละ 7 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร บ่ม 28 องศาเซลเซียส เวลา 10 วัน จากนั้นทำการทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH พบว่า หัวเชื้อทั้ง 3 ตัวอย่างสามารถนำมาใช้ในการหมักคอมบูชาได้และมีฤทธิ์ในการยับยั้งอนุมูลอิสระ คอมบูชาที่เตรียมจากชาดำจะมีฤทธิ์ในการยับยั้งอนุมูลอิสระสูงที่สุดเมื่อหมักร่วมกับหัวเชื้อผสมระหว่างแบคทีเรียที่สร้างกรดอะซิติกกับยีสต์ *Zygosaccharomyces* sp. และคอมบูชาที่เตรียมจากชาเขียวจะมีฤทธิ์ในการยับยั้งอนุมูลอิสระสูงที่สุดเมื่อหมักร่วมกับหัวเชื้อปกติ โดยคอมบูชาจากชาทั้ง 2 ชนิด ได้แก่ชาดำและชาเขียวมีปริมาณกรดทั้งหมดและวิตามินซีสูง

Pawinee *et al.*, (2012) ได้ทำการศึกษาปริมาณสารประกอบฟีนอลิก ฟลาโวนอยด์ และฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ ABTS ของชาอู่หลง กระเจี๊ยบ ชาใบหม่อนและชาตะไคร้ พบว่า ชาอู่หลงมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์สูงกว่ากระเจี๊ยบ ใบหม่อน และตะไคร้ ตามลำดับ และจากการศึกษาฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ ABTS พบว่า ชาอู่หลงมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ABTS ในรูปของกรดแอสคอร์บิก เท่ากับ 83 มิลลิกรัมของกรดแอสคอร์บิกต่อร้อยละ 1 มิลลิกรัม ซึ่งมีความสูงกว่ากระเจี๊ยบ ใบหม่อน และตะไคร้ ตามลำดับ

Manjula *et al.*, (2013) ศึกษาชนิดและปริมาณสารประกอบอัลคาลอยด์ แทนนิน โกลโคไซด์ เรซิน สเตอรอยด์ ซาโปนิน ฟลาโวนอยด์และฟีนอลของสารสกัดเมทานอลจากดอกอัญชัน โดยนำไปทำปฏิกิริยากับสารละลายอะลูมิเนียมคลอไรด์ ($AlCl_3$) ความเข้มข้นร้อยละ 1 จากการทดลองพบว่า ดอกอัญชันประกอบด้วยสารอัลคาลอยด์ แทนนิน โกลโคไซด์ เรซินและฟลาโวนอยด์ โดยมีปริมาณของสารประกอบฟลาโวนอยด์เท่ากับ 42 ± 1 มิลลิกรัมต่อกรัมของสารสกัด

Caili *et al.*, (2014) พบว่าคอมบูชาที่หมักด้วยชาเขียว ชาดำ และชาผง มีฤทธิ์ในการยับยั้งอนุมูลอิสระ โดยคอมบูชาที่เตรียมจากชาเขียวมีฤทธิ์ในการยับยั้งอนุมูลอิสระของ DPPH ชูเปอร์

ออกไซด์ไอออน และอนุมูลอิสระไฮดรอกซิลสูงที่สุด ในขณะที่ชาดำมีความสามารถในการรีดิวซ์ของสารต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุด การเปลี่ยนแปลงของปริมาณโพรไบโอติกของคอมบูชาจากชาเขียวในระหว่างการเก็บรักษาพบว่า กลุ่มแบคทีเรียที่สร้างกรดอะซิติกลดลง เมื่อเก็บรักษาเป็นระยะเวลา 8 วัน และแบคทีเรียที่สร้างกรดแลคติกมีชีวิตรอดเหลือเพียงร้อยละ 0.98

Sun *et al.*, (2014) ศึกษาชนิดและปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระของคอมบูชาที่ผลิตจากการนำชาดำไปหมักร่วมกับน้ำตาลอ่อนข้าวสาลีคั้นสดในอัตราส่วนผสมที่แตกต่างกัน บ่มที่อุณหภูมิ 21 ± 1 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 12 วัน โดยวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดโดยวิธี Folin-Ciocalteu colorimetric method ปริมาณฟลาโวนอยด์รวมถึงศึกษาชนิดของสารประกอบฟีนอลิกด้วยเครื่อง HPLC และศึกษาฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ระหว่างกระบวนการหมัก พบว่าคอมบูชาจากชาดำและต้นข้าวสาลีมีส่วนประกอบของกรดฟีนอลิกที่หลากหลายชนิด ซึ่งจะพบคาเฟอิก (Caffeic) เป็นส่วนใหญ่ พบกรดแกลลิก (Gallic acid) กรดคลอโรเจนิค (Chlorogenic acid) กรดฟีรูลิก (Ferulic acid) รุทีน (Rutin) และคาเทชิน (Catechin) ซึ่งสารประกอบฟีนอลิกเหล่านี้มีปริมาณสูงขึ้นตามระยะเวลาการหมัก นอกจากนี้คอมบูชาที่หมักร่วมกับชาดำและข้าวสาลีในอัตราส่วน 1 ต่อ 1 มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH สูงสุด

Vats. (2014) ได้ทำการศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งอนุมูลอิสระของสารสกัดจากดอกอัญชัน (*Clitoria ternatea*) โดยสกัดด้วยเมทานอล และศึกษาปริมาณสารประกอบฟีนอลิก ด้วยวิธี Folin-Ciocalteu method และปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ รวมถึงศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH พบว่า อัญชันมีปริมาณของสารประกอบฟีนอลิกเท่ากับ 204 ± 1.2 ไมโครกรัมแกลลิกต่อมิลลิกรัมของสารสกัด ปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์เท่ากับ 80 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัมของสารสกัด และมีฤทธิ์ในการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 480 ± 1.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม

ชานนท์ และอนุรักษ์ (2559) ได้ทำการศึกษาฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH และวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลของสารสกัดเอทานอลของชาดำ ไบหม่อนและไບย่านาง พบว่าสารสกัดชาดำมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH สูงกว่ากรดแอสคอบิก โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 8.97 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม ส่วนสารสกัดจากไบหม่อนและไບย่านางมีค่า IC_{50} เท่ากับ 80.41 และ 70.36 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม ตามลำดับ นอกจากนี้จากการวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลของสารสกัดชาดำ ไบหม่อนและไບย่านาง พบว่า สมุนไพรทั้ง 3 ชนิด มีปริมาณสารประกอบฟีนอลเท่ากับ 74.32 ± 1.93 , 93.12 ± 1.10 และ 82.75 ± 5.26 มิลลิกรัมแกลลิกต่อกรัมของสารสกัด

Pure A.E. and Pure M.E. (2016) ได้ทำการศึกษาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของคอมบูซาจากเปลือกกล้วย ตำแย และชาดำ โดยหมักเป็นระยะเวลา 21 วัน พบว่าคอมบูซาจากชาดำ ตำแย และเปลือกกล้วยมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกเท่ากับ 265.5 ppmGAE, 188 ppmGAE และ 155 ppmGAE ตามลำดับ โดยมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกต่างจากน้ำชาดำ ชาดำแยและชาเปลือกกล้วย ซึ่งน้ำชาเหล่านี้มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกเท่ากับ 530.5 ppmGAE, 173 ppmGAE และ 136.5 ppmGAE จากผลการทดลองพบว่า การนำเปลือกกล้วยและตำแยมาใช้ในการหมักคอมบูซาจะสามารถเพิ่มปริมาณของสารประกอบฟีนอลิกได้ นอกจากนี้ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของคอมบูซาจากชาดำ ตำแย และเปลือกกล้วย มีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.73, 1.06 และ 1.12 ไมโครลิตรต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

อนก และบุญยกฤต (2560) ได้ทำการศึกษาประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระจากพืชผักสมุนไพรพื้นบ้าน ได้แก่ ดอกอัญชัน ขมิ้น ใบเตย มะรุม กระจี้บ โหระพา สะระแหน่ มะตูม ข่า ขิง มะขาม กะเพรา ตะไคร้ แมงลักและมะนาว โดยทำการศึกษาปริมาณของสารประกอบฟีนอลิกของสารสกัดเมทานอลจากสมุนไพร ใช้กรดแกลลิกเป็นสารมาตรฐาน พบว่ากระจี้บมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกสูงที่สุด รองลงมาคือมะตูม โดยปริมาณสารประกอบฟีนอลิกของสารสกัดสมุนไพรจะอยู่ในช่วง 0.42-4.83 มิลลิกรัมของกรดแกลลิก จากการศึกษาปริมาณของฟลาโวนอยด์โดยใช้เคเทชินเป็นสารมาตรฐาน พบว่า สารสกัดดอกอัญชันมีปริมาณฟลาโวนอยด์สูงสุด รองลงมาคือ กระจี้บ โดยอยู่ในช่วง 0.09-8.65 มิลลิกรัมของคาเทชิน ซึ่งดอกอัญชันกับกระจี้บมีปริมาณฟลาโวนอยด์สูงใกล้เคียงกัน เนื่องจากสมุนไพรทั้งสองชนิดนี้มีสารแอนโทไซยานิน ซึ่งจัดอยู่ในกลุ่มฟลาโวนอยด์ นอกจากนี้จากการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH พบว่า กระจี้บมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH สูงสุด โดยมีค่าเท่ากับ 21.21 ไมโครโมลของโทลอกซ์ตอกรั่มของสารสกัด และจากการศึกษาฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ ABTS พบว่า มะตูมและกระจี้บมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระใกล้เคียงกัน มีค่าเท่ากับ 13.53 และ 13.38 ไมโครโมลของโทลอกซ์ตอกรั่มของสารสกัด ตามลำดับ

Anantachoke *et al.*, (2016) ได้ทำการศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของผลไม้ไทยต่อภาวะเครียดออกซิเดชันที่ถูกเหนี่ยวนำด้วยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์และการส่งเสริมการผลิตเอนไซม์ที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในเซลล์ไตของมนุษย์ (HEK-293) พบว่า สารสกัดจากผลไม้ไทย เช่น เม่าไขปลา (*Antidesma ghaesembilla*) ตะลิงปลิง (*Averrhoa bilimbi*) เซอร์รี่สเปน (*Malpighia glabra*) มะม่วง (*Mangifera indica*) กระจ้อ้น (*Sandoricum koetjape*) ชมพู่มะเหมี่ยว (*Syzygium malaccense*) และพุทราจีน (*Ziziphus jujube*) มีฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระไฮโดรเจนเพอออกไซด์ภายในเซลล์ นอกจากนี้ สารสกัดจากผลไม้ไทยเหล่านี้ยังสามารถเพิ่มการแสดงออกของยีนที่สามารถผลิตเอนไซม์คะตะเลส กลูต้าไธโอนเพอออกซิเดส-1 และแมงกานีสซูเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเทสได้

Jaisupa *et al.*, (2017) ได้ทำการศึกษาฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระภายในเซลล์ของสารสกัดเปลือกมังคุด รวมถึงการส่งเสริมการแสดงออกของยีนที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์คะตะเลส และฮีโมออกซีจีเนส-1 พบว่า สารสกัดจากเปลือกมังคุดมาทดสอบฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระไฮโดรเจนเพอออกไซด์ในเซลล์นิวโรบลาสโตมา (Neuroblastoma cell, SK-N-SH) ได้ และสามารถเหนี่ยวนำให้เซลล์นิวโรบลาสโตมาและเซลล์ไตของมนุษย์ (HEK-293) ผลิต mRNA ที่เกี่ยวข้องกับการสร้างเอนไซม์คะตะเลสและเอนไซม์ฮีโมออกซีจีเนส-1 ได้ โดยสารสกัดชนิดนี้สามารถต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์ DPPH ได้อีกด้วย ซึ่งฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระดังกล่าวเป็นผลมาจากสารอีพิคาเทชิน (epicatechin) และสารโพรแอนโทไซยานิน (proanthocyanin) ที่สามารถพบได้ในเปลือกมังคุด

บทที่ 3

วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.1 ตัวอย่างที่ใช้ในการทดลอง

สมุนไพรอบแห้งจำนวน 10 ชนิด ดังตารางที่ 3.1 และหัวเชื้อคอมบูชาจากจังหวัดเชียงใหม่ ประเทศไทย สำหรับการเตรียมสมุนไพรเพื่อนำมาหมักคอมบูชานั้น เกสรบัวหลวง ใบย่านาง ใบหม่อน และอัญชันจะถูกเตรียมตามวิธีของ Pure A.E. and Pure M.E. (2016) โดยสมุนไพรจะถูกนำมาล้างน้ำให้สะอาดและอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1-2 วันหรือจนกว่าจะแห้ง ส่วนสมุนไพรชนิดอื่นเป็นสมุนไพรสำเร็จรูปที่ผ่านการอบหรือตากแห้งมาแล้ว

ตารางที่ 3.1 สมุนไพรที่ใช้ในการผลิตคอมบูชา

สมุนไพร	ส่วนที่ใช้	สารสำคัญ	แหล่งที่มา
ชาอู่หลง (<i>Camellia sinensis</i>)	ใบ	Flavanols, Anthocyanin, Flavones, Theaflavins และ Catechins (Zhen <i>et al.</i> , 2002; Subramanian <i>et al.</i> , 1999)	ยี่ห้อสามม้า (เบอร์หนึ่ง)
บัวหลวง (<i>Nelumbo nucifera</i>)	เกสร	Quercetin, Alkaloid, Luteolin และ Luteolin glucoside เป็นต้น (อังคณา, 2551)	บึงบอระเพ็ด จ.นครสวรรค์
เก๋ากี้ (<i>Lycium barbarum</i>)	ผล	<i>Lycium barbarum</i> polysaccharides, Phenolics acid, และ Ascorbic acid (Amagase and Nance, 2008)	ร้านขายยา สมุนไพรจีน จ.กรุงเทพฯ
หม่อน (<i>Morus alba</i> Linn.)	ใบ	Carotene, Succinic acid, Adenine, Choline, Ascorbic acid, Quercetin, Xanthophyll, Folic acid และ Isoquercitrin (ศุทธิณี และศศิธร, 2554; Bandna <i>et al.</i>)	จ.กรุงเทพฯ
กระเจี๊ยบ (<i>Hibiscus sabdariffa</i> L.)	ดอก	Delphinidine, Protocatechic acid, Cyanidine, Gossypetin, Esculetin และ Ascorbic acid (ชนันดา, 2559)	ร้านขายยา สมุนไพรจีน จ.กรุงเทพฯ

ตารางที่ 3.1 (ต่อ) สมุนไพรที่ใช้ในการผลิตคอมบูชา

สมุนไพร	ส่วนที่ใช้	สารสำคัญ	แหล่งที่มา
ย่านาง (<i>Tiliacora triandra</i>)	ใบ	Tiliacorinine, Tiliacorine, Oleic acid, Tocopherol, Bisbenzylisoquinoline, Nortiliacorinine และ Palmitic acid (Wiryachitra and Phuriyakorn, 1981)	ตลาดวงเวียนใหญ่ จ.กรุงเทพฯ
ตะไคร้ (<i>Cymbopogon nardus</i> Rendle)	ต้น	Cymbopogone, Citral, Caffeic acid, Orientin, Sucrose และ Isoscoparin (Parirat, 2012; กาญจนานันท์, 2552; กมลวรรณ, 2551)	ตลาดวงเวียนใหญ่ จ.กรุงเทพฯ
มะตูม (<i>Aegle marmelos</i>)	ผล	Mucilage, Tannin, Coumarins, Rutin และ Z-linalooloxide (สุนทรีย์, 2525)	ร้านขายยาสมุนไพรจีน จ.กรุงเทพฯ
หล่อฮั้งก้วย (<i>Siraitia grosvenorii</i>)	ผล	Ascorbic acid, Linoleic acid, Lauric acid, D-mannitol และ Mogrosides (วิไลพร และอาทิตรา, 2553; เมชฌ, 2558)	ร้านขายยาสมุนไพรจีน จ.กรุงเทพฯ
อัญชัน (<i>Clitoria ternatea</i>)	ดอก	Ternatins, Quercetin, Kaempferol, Myricetin, Lobelinins Delphinidin-3,5-diglucoside, Deacylternatin และ (Terahara <i>et al.</i> , 1989; Singh and Tiwari, 2010)	จ.ปทุมธานี

3.2 อาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์

3.2.1 อาหารสูตร Plate count agar (PCA)

3.2.2 อาหารสูตร Dichloran Rose Bengal Chloramphenicol Agar (DRBC Agar)

3.2.3 น้ำตาลอ้อยที่ไม่ผ่านการฟอกสี (สูตรออร์แกนิก ตราวังขนาย)

3.3 สารเคมีที่ใช้ในการศึกษาการต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์

3.3.1 สารเคมีสำหรับทดสอบฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธีดีพีพีเอช (DPPH)

3.3.1.1 สารละลายอนุมูลอิสระ DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl, DPPH) ความเข้มข้น 0.2 มิลลิโมลาร์

เตรียมโดยการชั่งอนุมูลอิสระ DPPH 0.789 มิลลิกรัม ปรับปริมาตรด้วยเอทานอลบริสุทธิ์ จนมีปริมาตรเท่ากับ 10 มิลลิลิตร

3.3.2 สารเคมีสำหรับทดสอบฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธีเอบีทีเอส (ABTS)

3.3.2.1 สารละลายอนุมูลอิสระ ABTS (2,2'-azino-bis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid), ABTS) ความเข้มข้น 7 มิลลิโมลาร์

เตรียมโดยการชั่งอนุมูลอิสระ ABTS 38.4 มิลลิกรัม ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น จนมีปริมาตรเท่ากับ 10 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปผสมกับสารละลายโพแทสเซียมซัลเฟต ความเข้มข้น 2.4 มิลลิโมลาร์ ในอัตราส่วน 1 ต่อ 1 หลังจากนั้นบ่มสารละลายผสมในที่มีดเป็นเวลา 14-16 ชั่วโมง นำสารละลายที่ได้มาเจือจางก่อนใช้ โดยเจือจางสารละลายอนุมูลอิสระ ABTS ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 60 มิลลิลิตร จนได้ค่าการดูดกลืนแสงที่ 754 นาโนเมตร เท่ากับ 0.706 ± 0.01

3.3.2.2 สารละลายโพแทสเซียมซัลเฟต (Potassium sulfate, K_2SO_4) ความเข้มข้น 2.4 มิลลิโมลาร์

เตรียมโดยการชั่งโพแทสเซียมซัลเฟต 6.6231 มิลลิกรัม ละลายในน้ำกลั่น จากนั้นปรับปริมาตรจนมีปริมาตรเท่ากับ 10 มิลลิลิตร

3.3.3 สารเคมีสำหรับวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด

3.3.3.1 สารละลายโฟลีน (Folin-ciocalteu reagent) ความเข้มข้นร้อยละ 10 โดยปริมาตร

3.3.3.2 สารละลายโซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3) ความเข้มข้นร้อยละ 7.5 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร

3.3.3.3 สารมาตรฐานกรดแกลลิก (Gallic acid)

3.3.4 สารเคมีสำหรับวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมด

3.3.4.1 สารละลายโซเดียมไนไตรต์ ($NaNO_2$) ความเข้มข้นร้อยละ 3 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร

3.3.4.2 สารละลายอะลูมิเนียมคลอไรด์ ($AlCl_3$) ความเข้มข้นร้อยละ 10 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร

3.3.4.3 สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ความเข้มข้น 1 โมลต่อลิตร

เตรียมโดยการชั่งโซเดียมไฮดรอกไซด์ 4 กรัม ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนมีปริมาตรเท่ากับ 100 มิลลิลิตร

3.3.4.4 สารมาตรฐานเคอควิติน (Quercetin)

3.3.5 สารเคมีสำหรับวิเคราะห์ปริมาณกรดอะซีติกด้วยเครื่อง HPLC

- 3.3.5.1 สารละลายแอมโมเนียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต ($\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$) ความเข้มข้น 0.1 โมลต่อลิตร pH 2.5
- 3.3.5.2 สารมาตรฐานกรดอะซิติก
- 3.3.5.3 สารละลายไฮโดรเจนฟอสเฟต สำหรับปรับ pH
- 3.3.5.4 น้ำบริสุทธิ์สำหรับใช้ในเครื่อง HPLC
- 3.3.6 สารเคมีสำหรับวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด**
 - 3.3.6.1 สารละลายฟินอล ความเข้มข้นร้อยละ 5 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร
 - 3.3.6.2 กรดซัลฟิวริก (H_2SO_4) ความเข้มข้นร้อยละ 95.5 โดยปริมาตร
 - 3.3.6.3 สารมาตรฐานกลูโคส
- 3.3.7 สารเคมีสำหรับวิเคราะห์ปริมาณแอลกอฮอล์**
 - 3.3.7.1 สารละลายโพรพานอล (N-propanol) ความเข้มข้นร้อยละ 10 โดยปริมาตร
- 3.3.8 สารเคมีสำหรับวิเคราะห์ทางจุลินทรีย์**
 - 3.3.8.1 สารละลายบัฟเฟอร์ (Butterfield's phosphate buffer)
 - 3.3.8.2 สารละลายเปปโติน ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร
- 3.4 สารที่ใช้ในการศึกษาการต้านอนุมูลอิสระภายในเซลล์**
 - 3.4.1 เซลล์ที่ใช้ในการทดสอบ**
 - 3.4.1.1 เซลล์ไตของมนุษย์ชนิด HEK293 (Embryonic kidney cell)
 - 3.4.2 อาหารที่ใช้ในการเลี้ยงเซลล์**
 - 3.4.2.1 อาหาร Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)
 - 3.4.2.2 ซีรั่มฟิวคัล (Fetal bovine serum, FBS)
 - 3.4.2.3 สารผสมของยาปฏิชีวนะ 2 ชนิด ได้แก่ ยาเพนิซิลลิน (Penicillin) และสเตรปโตไมซิน (Streptomycin)
 - 3.4.3 สารเคมีที่ใช้ในการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ (Cytotoxicity test)**
 - 3.4.3.1 สารละลาย Trypsin-EDTA ความเข้มข้นร้อยละ 0.25%
 - 3.4.3.2 สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาลีน (Phosphate-buffered saline, PBS)
 - 3.4.3.3 สารละลาย 3-(4,5-ไดเมทิลไทอะโซล-2-อิล)-2,5-ไดฟีนิลเตตราโซเลียมโบรไมด์ (3-(4,5-dimethylthiazol-2yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide, MTT)
 - 3.4.3.4 ไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (Dimethyl sulfoxide, DMSO)
 - 3.4.4 สารเคมีที่ใช้ในการทดสอบฤทธิ์ด้านการเกิดออกซิเดชันของสารตัวอย่าง**
 - 3.4.4.1 สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาลีน

- 3.4.4.2 สารละลาย Trypsin-EDTA ความเข้มข้นร้อยละ 0.25%
- 3.4.4.3 สารละลาย DCF-DA
- 3.4.4.4 กรดแอสคอร์บิกหรือวิตามินซี (L-ascorbic acid) ความเข้มข้น 100 μM
- 3.4.4.5 สารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (Hydrogenperoxide, H_2O_2)

3.4.5 สารเคมีที่ใช้ในการทดสอบฤทธิ์ต้านการเกิดออกซิเดชันต่อการสร้าง mRNA ของ เอนไซม์ที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

- 3.4.5.1 สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาลิน
- 3.4.5.2 ไลซิสบัฟเฟอร์ (Lysis buffer)
- 3.4.5.3 สารละลายเบต้าเมอแคปโทเอทานอล (β -mercaptoethanol)
- 3.4.5.4 ชุดสกัดอาร์เอ็นเอ (GeneJET RNA purification kit)
- 3.4.5.5 ชุด PCR (ชุดทำ real time RT-qPCR, KAPA biosystems)

3.5 เครื่องมือและอุปกรณ์

- 3.5.1 หม้อนึ่งอัติโนมัติ (Autoclave) (TOMY ES-315, Japan)
- 3.5.2 ตู้อบลมร้อน (Hot air oven) (Mettmert IN 110, Germany)
- 3.5.3 ตู้เขี่ยเชื้อ (Laminar flow) (Telstar BIO II Advance, Spain)
- 3.5.4 ตู้เขี่ยเชื้อ (Laminar flow) (Biological safty cabinet, Germany)
- 3.5.5 ตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ (Cell incubator) (Heracell vios 160i, Germany)
- 3.5.6 ตู้บ่มเชื้อ 35 องศาเซลเซียส (Incubator) (Mettmert INB 500, Germany)
- 3.5.7 ตู้บ่มเชื้อ 25 องศาเซลเซียส (Incubator) (Mettmert INB 500, Germany)
- 3.5.8 เครื่องอ่านปฏิกิริยาบนไมโครเพลท (Mettler-Toledo FLUOStar Omega, America)
- 3.5.9 เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Shimadzu UV-1800, Japan)
- 3.5.10 เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge) (Hermle Z 383 K, Germany)
- 3.5.11 เครื่องโครมาโตกราฟีแบบของเหลวประสิทธิภาพสูง (High performance liquid chromatography, HPLC) (Shimadzu CTO-10AS vp column oven, SPD-M20A diode array detector and DGU-20A5R degassing unit, Germany)
- 3.5.12 เครื่องวิเคราะห์และแยกสารโดยใช้แก๊ส (Gas chromatography, GC) (Shimadzu GC-2014, Germany)
- 3.5.13 เครื่องวัดค่าความเป็นกรดต่าง (pH meter) (Clean PH200 & PH500, China)
- 3.5.14 เครื่อง Ultrasonic sonicator (Crest, America)
- 3.5.15 เครื่องชั่งน้ำหนักที่ตำแหน่ง (Balance) (Sartorius BSA224S-CW, Germany)
- 3.5.16 เครื่อง Vortex (SI Genie 2, America)

- 3.5.17 ไมโครปิเปตขนาด 0.5-10 ไมโครลิตร ,10-100 ไมโครลิตร, 20-200 ไมโครลิตร และ 100-1000 ไมโครลิตร (Thermo Scientific, America)
- 3.5.18 พาสเจอร์ปิเปต (Pasture pipette)
- 3.5.19 ขวดคูแรนขนาด 50, 250, 500 มิลลิลิตร (Duran, Germany)
- 3.5.20 หลอดไมโครเซ็นทริฟิวก์ (Microcentrifuge tube) (Eppendorf, America)
- 3.5.21 หลอดทดลองแก้ว ขนาด 10 มิลลิลิตร (Glass test tube)
- 3.5.22 หลอดทดลองสำหรับทำ PCR ขนาด 0.2 มิลลิลิตร (Agilent technologies AriaMx 96 Tube strips, Great Britain)
- 3.5.23 ขวดแก้วเล็ก (Vial) ขนาด 2 มิลลิลิตร
- 3.5.24 กระดาษกรอง ชนิดเซลลูโลสอะซิเตท (Cellulose Acetate Filter) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.45 ไมโครเมตร (Sartorius Stedium biotech, Germany)
- 3.5.25 กระดาษกรอง ชนิดพอลิเททระฟลูออโรเอทีลีน (Polytetrafluoroethylene, PTFE) สำหรับเครื่องโครมาโตกราฟีแบบของเหลวประสิทธิภาพสูง ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.2 ไมโครเมตร (Whatman, United State Kingdom)
- 3.5.26 6-well cell culture plate
- 3.5.27 12-well cell culture plate
- 3.5.28 96-well cell culture plate
- 3.5.29 หลอดฉีดยา (Syring) ขนาด 5 มิลลิลิตร (NIPRO Syringe, Thailand)
- 3.5.30 ขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร
- 3.5.31 จานแก้วเพาะเชื้อ (Petri dish)
- 3.5.32 ปีกเกอร์ ขนาด 50, 500 และ 1,000 มิลลิลิตร (PYREX DE-M-15, Germany)
- 3.5.33 บิวเรต (Burette) (ISO lab, Germany)
- 3.5.34 แท่งแก้วรูปตัว L
- 3.5.35 คิวเวตชนิดควอตซ์ (Quartz Cuvette) (Starna Scientific, England)
- 3.5.36 ไมโครเพลทขนาด 96 หลุม (96-well plates) (NUNC, United state kingdom)
- 3.5.37 โหลแก้วสำหรับเพาะเลี้ยงคอมบูซาขนาด 500 และ 1000 มิลลิลิตร
- 3.5.38 ผ้าขาวบาง
- 3.5.39 หลอดเซนติฟิวส์ ขนาด 50 มิลลิลิตร (Falcon conical centrifuge tubes, America)
- 3.5.40 ขวดปรับปริมาตร ขนาด 10,50,100 และ 1000 มิลลิลิตร (Schott Duran, Germany)

3.6 การเตรียมหัวเชื้อในการหมักคอมบูชา

เตรียมน้ำชาอุณหภูมิห้องความเข้มข้นร้อยละ 1.2 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร โดยการแช่ใบชาอุณหภูมิห้องในน้ำอุณหภูมิ 98 ± 2 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที จากนั้นกรองใบชาออกแล้วเติมน้ำตาลอ้อยที่ไม่ผ่านการขัดสีปริมาตร 100 กรัมต่อน้ำชา 1 ลิตร (ความเข้มข้นร้อยละ 10 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) คนให้น้ำตาลละลาย นำน้ำชาหวานที่เตรียมได้แบ่งลงในโหลหมักคอมบูชาและทิ้งให้เย็น เติมแผ่นเซลล์ลูโลสจากหัวเชื้อคอมบูชาเดิมลงไปร้อยละ 3 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร และน้ำหมักคอมบูชาจากหัวเชื้อเดิมร้อยละ 10 โดยปริมาตรต่อปริมาตร ปิดปากขวดด้วยผ้าขาวบางที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว จากนั้นบ่มหัวเชื้อคอมบูชาที่ได้ที่อุณหภูมิห้อง (30 ± 2 องศาเซลเซียส) เป็นระยะเวลา 10 วัน (Jayabalan, 2008a)

3.7 การคัดเลือกสมุนไพรคอมบูชาที่มีประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระ

3.7.1 การหมักคอมบูชาจากพืชสมุนไพร

นำสมุนไพรอบแห้งแต่ละชนิด (หัวข้อที่ 3.1) ได้แก่ เกสรบัวหลวง เก้าอี้ ไบยานาง ใบหม่อน กระจับปี่ ตะไคร้ มะตูม หล่อฮังก้วย อัญชันและชาอุณหภูมิห้อง ความเข้มข้นร้อยละ 1 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร แช่ในน้ำอุณหภูมิ 98 ± 2 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที กรองสมุนไพรออกและเติมน้ำตาลอ้อยความเข้มข้นร้อยละ 15 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร เติมหัวเชื้อคอมบูชาที่ได้จากข้อ 3.6 โดยใช้ส่วนน้ำหมักความเข้มข้นร้อยละ 10 โดยปริมาตร และส่วนแผ่นเซลล์ลูโลสความเข้มข้นร้อยละ 3 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ปิดด้วยผ้าขาวบางที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว บ่มที่อุณหภูมิห้อง (30 องศาเซลเซียส ± 2) เป็นระยะเวลา 10 วัน เก็บตัวอย่างคอมบูชาโดยปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 5000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที เพื่อตกตะกอนเซลล์และเซลล์ลูโลส นำส่วนใส (Supernatant) ที่ได้ทดสอบฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ ได้แก่ อนุมูลอิสระ DPPH และอนุมูลอิสระ ABTS แสดงผลในรูปร้อยละของการต้านอนุมูลอิสระ (Percentages of scavenging activity) และคำนวณหาความเข้มข้นของคอมบูชาที่สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระได้ร้อยละ 50 (The half maximal inhibitory concentration, IC_{50}) เพื่อคัดเลือกคอมบูชาจากสมุนไพรที่มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระสูง (Battikh *et al.*, 2012)

3.7.2 การวิเคราะห์

3.7.2.1 การทดสอบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของคอมบูชาจากสมุนไพร 10 ชนิด

การทดสอบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของคอมบูชาด้วยอนุมูลอิสระ DPPH ทำการทดลองโดยอ้างอิงจาก Blois (1958) นำตัวอย่างคอมบูชาเจือจางด้วยน้ำกลั่นให้มีความเข้มข้นลดลง 2 เท่า (Two-fold serial dilution) จากนั้นนำตัวอย่างคอมบูชาในแต่ละความเข้มข้นปริมาตร 100 ไมโครลิตร ผสมกับสารละลายของอนุมูลอิสระ DPPH ความเข้มข้น 0.2 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ใน 96-well plates บ่มที่อุณหภูมิ 25-30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ระดับความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร ทำการคำนวณหาค่า

ร้อยละของการต้านอนุมูลอิสระ DPPH (DPPH Scavenging percentage) ดังสมการที่ 1 และ
 คำนวณหาความเข้มข้นของคอมบูชาสมุนไพรที่สามารถต้านอนุมูลอิสระ DPPH ได้ร้อยละ 50 (IC₅₀)
 ดังสมการที่ 2 โดยทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ

$$\text{ร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ DPPH} = ((\Delta A_{\text{control}} - \Delta A_{\text{sample}}) / \Delta A_{\text{control}}) \times 100 \dots \dots \dots (1)$$

ให้ $\Delta A_{\text{control}}$ คือ ผลต่างของค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายอนุมูลอิสระ DPPH กับเอทานอล
 $(A_{\text{control}} - \text{Blank}_{\text{control}})$

ΔA_{sample} คือ ผลต่างของค่าการดูดกลืนแสงของคอมบูชาที่ถูกกระตุ้นด้วยอนุมูลอิสระ DPPH กับ
 คอมบูชาที่ละลายในเอทานอล $(A_{\text{sample}} - \text{Blank}_{\text{sample}})$

สร้างกราฟระหว่างความเข้มข้นของตัวอย่างคอมบูชา (แกน x) กับร้อยละของ
 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของคอมบูชา (แกน y) เพื่อหาสมการเส้นตรง $y = ax + b$ จากนั้นนำค่าความชัน
 ของกราฟ (a) และค่าจุดตัดแกน y (b) ที่ได้มาคำนวณหาความเข้มข้นของคอมบูชาที่สามารถยับยั้ง
 อนุมูลอิสระได้ร้อยละ 50 (IC₅₀) ตามสูตร

$$IC_{50} = \frac{50 - b}{a} \dots \dots \dots (2)$$

3.7.2.2 การทดสอบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ ABTS ของคอมบูชาจาก สมุนไพร 10 ชนิด

การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ABTS ของคอมบูชาสมุนไพรโดยวัดค่าการ
 ฟอกสีอนุมูลอิสระ ABTS ทำการทดลองโดยอ้างอิงจาก Arnao *et al.*, (2001) นำตัวอย่างคอมบูชา
 มาเจือจางด้วยน้ำกลั่นให้มีความเข้มข้นลดลง 2 เท่า (2-fold serial dilution) จากนั้นนำตัวอย่างคอม
 บูชาในแต่ละความเข้มข้นปริมาตร 50 ไมโครลิตร ผสมกับสารละลาย ABTS ที่เตรียมไว้ ปริมาตร 100
 ไมโครลิตร (อัตราส่วน 1 ต่อ 2) ใน 96-well plates บ่มที่อุณหภูมิ 25-30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7
 นาที นำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้
 คำนวณหาร้อยละการยับยั้งอนุมูลอิสระ ABTS และคำนวณหาความเข้มข้นของคอมบูชาที่สามารถ
 ยับยั้งอนุมูลอิสระ ABTS ได้ร้อยละ 50 (IC₅₀) ดังสมการที่ 1 และ 2 จากหัวข้อ 3.7.2.1

3.7.2.3 การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด

วิเคราะห์ปริมาณของสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดด้วยวิธี Folin-Ciocalteu
 method ตามวิธีของ Chidambara *et al.*, (2002) มีหลักการ คือ สารประกอบฟีนอลิกในตัวอย่าง

จะทำปฏิกิริยากับสารละลายฟอลีน (Folin-Ciocalteu reagent) เกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนสีน้ำเงิน ซึ่งสามารถดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร

3.7.2.3.1 การทำกราฟมาตรฐานกรดแกลลิก

เตรียมสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิกเข้มข้นเริ่มต้น 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นำมาเจือจางให้มีระดับความเข้มข้นเท่ากับ 1000, 750, 500, 250, 100, 50, 25 และ 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปิเปตสารละลายกรดแกลลิกมาตรฐานในแต่ละความเข้มข้นลงใน 96-well plates ปริมาตร 20 ไมโครลิตรเติมสารละลาย Folin-Ciocalteu reagent ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ทิ้งไว้ 5 นาที เติมสารละลายสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต ปริมาตร 80 ไมโครลิตร ทิ้งไว้ 30 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร

3.7.2.3.2 การวิเคราะห์

นำตัวอย่างคอมบูชาปริมาตร 20 ไมโครลิตร เติมสารละลาย Folin-Ciocalteu reagent ความเข้มข้นร้อยละ 10 โดยปริมาตรต่อปริมาตร ปริมาตร 100 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากัน ตั้งพักไว้ที่อุณหภูมิ 25-30 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 5 นาที เติมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3) ความเข้มข้นร้อยละ 7.5 โดยปริมาตรต่อปริมาตร ปริมาตร 80 ไมโครลิตร พักไว้ที่อุณหภูมิ 25-30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นวัดค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร ใน 96-well plates โดยใช้สารละลายกรดแกลลิกเป็นสารมาตรฐาน ทำการทดสอบตัวอย่างละ 3 ซ้ำ จากนั้นคำนวณปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมในรูปมิลลิกรัมของกรดแกลลิกต่อสารสกัด 1 มิลลิลิตร (Gallic Acid Equivalents ,GAE) ดังสมการ

$$\text{สารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (ไมโครกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อมิลลิลิตร)} = [(A_{765} - B) / M] \times D$$

- โดย A_{765} คือ ค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่าง
 B คือ จุดตัดแกน y ของกราฟมาตรฐานกรดแกลลิก
 M คือ ค่าความชันของกราฟมาตรฐานกรดแกลลิก
 D คือ ค่าการเจือจางของตัวอย่าง

3.7.2.4 การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมด

3.7.2.4.1 การทำกราฟมาตรฐานเคอเวอซิทิน

เตรียมสารละลายมาตรฐานเคอเวอซิทินความเข้มข้นเริ่มต้น 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นำมาเจือจางให้มีระดับความเข้มข้นเท่ากับ 1000, 750, 500, 250, 100, 50, 25 และ 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปิเปตสารละลายเคอเวอซิทินมาตรฐานในแต่ละความเข้มข้นลงในหลอดทดลอง ปริมาตร 100 ไมโครลิตร จากนั้นเติมน้ำกลั่นลงไป 400 ไมโครลิตร เติมสารละลาย

โซเดียมไนไตรท์ปริมาณ 30 ไมโครลิตร ทิ้งไว้ 5 นาที เติมสารละลายอะลูมิเนียมคลอไรด์ปริมาณ 30 ไมโครลิตร ทิ้งไว้ 6 นาที เติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ปริมาณ 200 ไมโครลิตร ทิ้งไว้ 15 นาที ปรับปริมาตรสารละลายให้เท่ากับ 1000 ไมโครลิตร ปิเปตสารละลายลงไปใน 96-well plates หลุมละ 200 ไมโครลิตร นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 510 นาโนเมตร

3.7.2.4.2 การวิเคราะห์

วิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมดโดยใช้วิธี Crystalline aluminium chloride assay ซึ่งดัดแปลงจากวิธีการทดสอบของกรองจันทร์และสมจิตต์ (2557) โดยผสมตัวอย่างคอมบูชาปริมาณ 100 ไมโครลิตร น้ำกลั่นปริมาณ 400 ไมโครลิตร และสารละลายโซเดียมไนไตรท์ (NaNO_2) ความเข้มข้นร้อยละ 3 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ปริมาตร 30 ไมโครลิตร ลงในหลอด Eppendorf ตั้งทิ้งไว้ 5 นาที จากนั้นผสมสารละลายอะลูมิเนียมไตรคลอไรด์ ความเข้มข้นร้อยละ 10 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ปริมาตร 30 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ 6 นาที เพื่อกระตุ้นให้เกิดโครงสร้างของฟลาโวนอยด์อะลูมิเนียมคอมเพล็กซ์ (Flavonoid-Aluminium Complex) จากนั้นผสมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ความเข้มข้น 1 โมลต่อลิตร ปริมาตร 200 ไมโครลิตร แล้วปรับปริมาตรให้เป็น 1 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น แบ่งใส่ใน 96-well plates ปริมาตร หลุมละ 200 ไมโครลิตร นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ระดับความยาวคลื่น 510 นาโนเมตร นำค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างเทียบกับกราฟค่าดูดกลืนแสงของสารต้านอนุมูลอิสระควอซิทิน (QE) แล้วทำการคำนวณหาปริมาณฟลาโวนอยด์

จากการศึกษาความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH และ ABTS รวมถึงการวิเคราะห์ปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระ ผู้วิจัยได้คัดเลือกคอมบูชาจากสมุนไพรที่มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระสูงเพื่อนำมาศึกษาในหัวข้อถัดไป

3.8 การเปลี่ยนแปลงคุณภาพระหว่างกระบวนการหมักของคอมบูชาจากสมุนไพรที่คัดเลือกได้

นำคอมบูชาสมุนไพรที่มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระสูงจำนวน 3 ชนิด จากหัวข้อ 3.7.1 ศึกษาการเปลี่ยนแปลงคุณภาพทางเคมีและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในระหว่างกระบวนการหมักเป็นระยะเวลา 20 วัน เก็บตัวอย่างในวันที่ 0, 5, 7, 9, 12, 15 และ 20 เพื่อนำมาวิเคราะห์ โดยเตรียมหัวเชื้อที่จะใช้ในการหมักเช่นเดียวกับหัวข้อ 3.6 และเตรียมตัวอย่างคอมบูชาจากสมุนไพรเช่นเดียวกับหัวข้อ 3.7.1 เก็บตัวอย่างคอมบูชาที่ได้ไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที นำส่วนใสที่ได้วิเคราะห์ค่าพีเอช ปริมาณกรดอะซิติก ปริมาณแอลกอฮอล์ ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกและปริมาณฟลาโวนอยด์รวมถึง ศึกษาฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์ ได้แก่ อนุมูลอิสระ DPPH และอนุมูลอิสระ ABTS โดยแสดงผลในรูปของร้อยละของการต้านอนุมูลอิสระ (Percentages of scavenging activity) และคำนวณหาความเข้มข้นของคอมบูชาที่สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระได้ร้อยละ

50 (The half maximal inhibitory concentration, IC_{50}) รวมทั้งฆ่าเชื้อคอมบูซาจากสมุนไพรที่ผ่านกระบวนการหมักข้างต้นที่อุณหภูมิ 85-90 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที เพื่อทดสอบความพึงพอใจของผู้บริโภค

3.8.1 การวิเคราะห์

3.8.1.1 การทดสอบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH (Blois, 1958)

3.8.1.2 การทดสอบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ ABTS (Arnao *et al.*, 2001)

3.8.1.3 ค่าพีเอช โดยใช้เครื่อง pH meter

3.8.1.4 การวิเคราะห์ปริมาณกรดอะซิติกโดยใช้เครื่องโครมาโตกราฟีแบบของเหลวประสิทธิภาพสูง (High performance liquid chromatography, HPLC)

3.8.1.4.1 การเตรียมตัวอย่าง

นำตัวอย่างคอมบูซาที่ผ่านการปั่นเหวี่ยงแล้วมากรองต่อโดยใช้กระดาษกรองชนิด PTFE ขนาด 0.2 ไมครอน ลงในขวดแก้ว ขนาด 2 มิลลิลิตร

3.8.1.4.2 สภาวะที่ใช้สำหรับวิเคราะห์ปริมาณกรดอะซิติก

นำตัวอย่างคอมบูซาที่เตรียมได้มาวิเคราะห์ด้วยเทคนิคโครมาโตกราฟีแบบของเหลวประสิทธิภาพสูง โดยใช้สภาวะดังนี้

Column : C18 5 μ m, 150×4.6 mm I.D.

Eluent : 0.1 M $NH_4H_2PO_4$ in H_2O (pH 2.5, H_2PO_4)

Column temperature : 40°C

Detection : UV 210 nm

Inject volume : 20 μ l

Mode : Low pressure gradient

Total pump A flow : 1 ml/minutes

นำข้อมูลที่ได้เปรียบเทียบกับพื้นที่ใต้กราฟของกรดอะซิติกมาตรฐานเพื่อหาปริมาณกรดอะซิติกในตัวอย่าง รายงานในหน่วยกรัมต่อลิตร

3.8.1.4.3 การทำกราฟมาตรฐานกรดอะซิติก

นำกรดอะซิติกความเข้มข้นร้อยละ 0.1, 0.5 และ 1 วิเคราะห์ด้วยเทคนิคโครมาโตกราฟีแบบของเหลวประสิทธิภาพสูง โดยใช้สภาวะเดียวกันกับหัวข้อข้างต้น

3.8.1.5 ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดโดยวิธีฟินอล-ซัลฟูริก (Dubois *et al.*, 1956)

3.8.1.5.1 กราฟมาตรฐานกลูโคส

เตรียมสารละลายมาตรฐานกลูโคสเข้มข้นเริ่มต้น 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นนำมาเจือจางให้มีระดับความเข้มข้นเท่ากับ 1000, 750, 500, 250, 100, 50, 25 และ 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นำสารละลายมาตรฐานกลูโคสในแต่ละระดับความเข้มข้นปริมาตร 1 มิลลิลิตร เติมสารละลายฟีนอล (Phenol) ความเข้มข้นร้อยละ 5 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ปริมาตร 1 มิลลิลิตรลงในตัวอย่าง บ่ม 5 นาที แล้วเติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้น (Sulfuric Acid, H_2SO_4) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 25-30 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร

3.8.1.5.2 การวิเคราะห์

เจือจางตัวอย่างคอมบูชาโดยใช้ระดับการเจือจาง 1 เท่า, 1000 เท่า, 2000 เท่า และ 4000 เท่า จากนั้นนำตัวอย่างคอมบูชาในแต่ละระดับการเจือจางปริมาตร 1 มิลลิลิตร เติมสารละลายฟีนอลความเข้มข้นร้อยละ 5 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ปริมาตร 1 มิลลิลิตรลงในตัวอย่าง บ่ม 5 นาที แล้วเติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้นปริมาตร 5 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 25-30 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร คำนวณหาปริมาณน้ำตาลทั้งหมดเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานกลูโคส

3.8.1.6 การวิเคราะห์ปริมาณแอลกอฮอล์ โดยใช้เครื่องวิเคราะห์และแยกสารโดยใช้แก๊ส (Gas chromatography, GC)

3.8.1.6.1 การเตรียมตัวอย่าง

นำตัวอย่างคอมบูชาปริมาตร 500 ไมโครลิตร ผสมกับสารละลายโพรพานอล (N-propanol) ความเข้มข้นร้อยละ 10 โดยปริมาตร ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ลงในขวดไวแอลขนาด 1 มิลลิลิตร

3.8.1.6.2 สภาวะที่ใช้สำหรับวิเคราะห์ปริมาณแอลกอฮอล์ของคอมบูชา

- 1) Inlet
 - 1.1) Inlet mode : Split
 - 1.2) Inlet temperature : 150 °C
 - 1.3) Pressure : 87.1 kPa
 - 1.4) Split ratio : 100 : 1
 - 1.5) Split flow : 3 ml/min
 - 1.6) Total flow : 244.1 ml/min
 - 1.7) Carrier gas : Helium gas
- 2) Column: Capillary column (DB1) 5 μ m, 30 m \times 0.32 mm I.D.
 - 2.1) Oven temperature: 60 °C
 - 2.2) Colum mode: Constant flow

2.3) Initial flow: 0.5 ml/min

3) Detector

3.1) Detector temperature: 180°C

3.2) Hydrogen flow: 30.0 ml/min

3.3) Air flow: 350.0 ml/min

3.4) Make up gas: Nitrogen gas

3.5) Make up flow: 35.0 ml/min

เปรียบเทียบข้อมูลที่ได้ออกกับพื้นที่ใต้กราฟของสารมาตรฐานเอทานอลเพื่อหาปริมาณเอทานอลในตัวอย่าง รายงานค่าเป็นกรัมต่อลิตร

3.8.1.7 การทดสอบทางประสาทสัมผัส

นำคอมบูชาจากสมุนไพรมาทดสอบการยอมรับของผู้บริโภคโดยใช้วิธีการประเมินทางประสาทสัมผัส (Sensory Evaluation) แบบ 9-Point Hedonic Scale ตัวอย่างคอมบูชาจากสมุนไพรมะนาวจะผ่านการพาสเจอร์ไรซ์ที่อุณหภูมิ 85-90 องศาเซลเซียส นาน 1-2 นาที ก่อนนำมาทดสอบ ซึ่งให้ผู้เข้าร่วมการทดสอบให้คะแนนตั้งแต่ 1 ถึง 9 คะแนน โดยที่คะแนนที่ 1 หมายถึง ไม่ชอบมากที่สุด, 2 หมายถึง ไม่ชอบมาก, 3 หมายถึง ไม่ชอบปานกลาง, 4 หมายถึง ไม่ชอบเล็กน้อย, 5 หมายถึง เฉย ๆ, 6 หมายถึง ชอบเล็กน้อย, 7 หมายถึง ชอบปานกลาง, 8 หมายถึง ชอบมาก และ 9 หมายถึง ชอบมากที่สุด โดยใช้ผู้ทดสอบชิมทั้งหมด 30 คน ซึ่งจะทำการประเมินทางประสาทสัมผัสในด้าน สี กลิ่น ความเปรี้ยว ความหวาน ความกลมกล่อม และความชอบโดยรวม จากนั้นคัดเลือกคอมบูชาจากสมุนไพรมะนาว 1 ชนิดที่มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระสูงและได้คะแนนทดสอบทางประสาทสัมผัสเป็นที่ยอมรับของผู้บริโภคมาใช้ในการศึกษาฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระภายในเซลล์ในหัวข้อ 3.9 โดยเปรียบเทียบกับชาที่ไม่ผ่านกระบวนการหมัก

3.9 ศึกษาฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระภายในเซลล์

3.9.1 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ (Cytotoxicity test) ของคอมบูชาสมุนไพรมะนาว โดยวิธี MTT assay

3.9.1.1 การเพาะเลี้ยงเซลล์สำหรับทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์

เพาะเลี้ยงเซลล์ Human embryonic kidney 293 cells (HEK-293) จำนวน 1×10^4 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ใน 96-well plates ด้วยอาหารชนิด DMEM ที่ประกอบด้วยฟิวทัลโบริน เซรั่ม ความเข้มข้นร้อยละ 10 และยาปฏิชีวนะเพนิซิลินกับสเตปโตไมซิน ความเข้มข้นร้อยละ 1 บ่มในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ความเข้มข้นร้อยละ 5 ภายใต้อุณหภูมิ 37 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

3.9.1.2 การเตรียมสารตัวอย่างคอมบูซาสำหรับทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์

นำคอมบูซาจากสมุนไพรที่คัดเลือกได้และน้ำชาของสมุนไพรที่ไม่ผ่านกระบวนการหมักมาเจือจางกับสารละลายดีเอ็มอีเอ็มในอัตราส่วน 1:1, 1:4, 1:9, 1:49, 1:99, 1:499, 1:999 และตัวอย่างคอมบูซาที่ไม่ได้ถูกเจือจาง ตามลำดับ โดยเปรียบเทียบกับคอมบูซาจากชาอู่หลงและชาอู่หลงที่ไม่ผ่านกระบวนการหมัก

3.9.1.3 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ด้วยวิธี MTT assay

เติมคอมบูซาและน้ำชาในแต่ละระดับการเจือจางปริมาตร 5 ไมโครลิตร ลงในเซลล์ที่อยู่ใน 96-wells plates (total volume 200 μ l) ที่บ่มไว้ โดยใช้ น้ำที่ปราศจากเอนไซม์นิวคลีเอสเป็นกลุ่มควบคุม (Control) โดยตัวอย่างในแต่ละความเข้มข้นจะทำซ้ำสองครั้ง (Duplicated well) บ่มในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ 24 ชั่วโมง จากนั้นนำอาหารเลี้ยงเซลล์และสารกระตุ้นออกจากเซลล์ แล้วนำสารละลาย MTT ปริมาตร 100 ไมโครลิตรใส่ลงในแต่ละหลุมเป็นเวลา 3 ชั่วโมงในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ หลังจากนั้นเซลล์จะถูกล้างด้วย PBS หนึ่งครั้งและใส่สารละลายไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (DMSO) ปริมาตร 100 ไมโครลิตรลงในเซลล์แต่ละหลุม เพื่อละลาย Formazan crystal ซึ่งจะเกิดเป็นสารละลายสีม่วง จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ระดับความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร โดยค่าการดูดกลืนแสงดังกล่าวจะแปรผันกับจำนวนเซลล์ภายในหลุม คำนวณหาร้อยละของจำนวนเซลล์ในแต่ละหลุม (Cell viability percentages) ตามสูตร

$$\text{ร้อยละจำนวนเซลล์ที่มีอยู่ในหลุม} = \frac{\text{ค่าการดูดกลืนแสงของเซลล์ในสารตัวอย่าง}}{\text{ค่าการดูดกลืนแสงของชุดควบคุม}} \times 100$$

3.9.2 การทดสอบฤทธิ์ต้านการเกิดออกซิเดชันของคอมบูซา

ทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของคอมบูซาจากสมุนไพรที่คัดเลือกได้ คอมบูซาจากชาอู่หลง น้ำชาอู่หลงและน้ำสมุนไพร โดยการวัดปริมาณอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นจากการเหนี่ยวนำด้วยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (Measurement of intracellular reactive oxygen species, ROS)

3.9.2.1 การเพาะเลี้ยงเซลล์สำหรับทดสอบฤทธิ์ต้านการเกิดออกซิเดชัน

นำเซลล์ HEK-293 จำนวน 1×10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ใน 12-well plates ปริมาตรหลุมละ 1000 ไมโครลิตร ในอาหารเช่นเดียวกับหัวข้อ 3.9.1.1 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยใช้เซลล์ HEK-293 ซึ่งจะแบ่งการทดลองออกเป็นกลุ่มดังนี้

กลุ่มที่ 1 HEK-293 ที่ได้รับน้ำ (Vehicle)

กลุ่มที่ 2 HEK-293 ที่ถูกกระตุ้นด้วยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (200 μ M)

กลุ่มที่ 3 HEK-293 ที่ได้รับกรดแอสคอบิก (100 μ M) ก่อนถูกกระตุ้นด้วยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์

กลุ่มที่ 4 HEK-293 ที่ได้รับคอมบูซาจากสมุนไพรมะขามที่คัดเลือกได้ความเข้มข้นร้อยละ 2 โดยปริมาตรต่อปริมาตร และความเข้มข้นร้อยละ 0.5 โดยปริมาตรต่อปริมาตร ก่อนถูกกระตุ้นด้วยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์

กลุ่มที่ 5 HEK-293 ที่ได้รับน้ำชาจากสมุนไพรมะขามที่คัดเลือกได้ความเข้มข้นร้อยละ 2 โดยปริมาตรต่อปริมาตร และความเข้มข้นร้อยละ 0.5 โดยปริมาตรต่อปริมาตร ก่อนถูกกระตุ้นด้วยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์

3.9.2.2 การเตรียมตัวอย่าง

เปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์เป็น DMEM ที่ประกอบด้วยฟิวทัลโบรินเซรัม ความเข้มข้นร้อยละ 1 และยาปฏิชีวนะเพนิซิลินกับสเตปโตไมซิน ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 บน 12-well plates จากนั้นใส่สารตัวอย่างที่เตรียมไว้ดังหัวข้อที่ 3.8.2.1 เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ก่อนจะถูกกระตุ้นด้วยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) ความเข้มข้นร้อยละ 1 ปริมาตร 3.5 ไมโครลิตร เป็นเวลา 2 ชั่วโมง เพื่อให้เกิด ROS จากนั้นล้างเซลล์ด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ปริมาตร 900 ไมโครลิตร

3.9.2.3 การวัดปริมาณ ROS ที่เกิดขึ้นภายในเซลล์

ทำการวัดปริมาณ ROS ที่เกิดขึ้นภายในเซลล์โดยใช้สารเรืองแสงดีซีเอฟ (2,7-dichlorodihydro-fluorescein diacetate, DCF-DA) โดยใช้ Fluorescent microplate reader เติมน้ำ DCF-DA ปริมาตร 1000 ไมโครลิตร ลงไปในเซลล์แต่ละหลุม เป็นเวลา 30 นาที ซึ่งเมื่อทำปฏิกิริยากับ ROS ที่เกิดขึ้นภายในเซลล์จะได้สารเรืองแสงที่ชื่อว่า DCF จากนั้นเก็บเซลล์ไว้ในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำเซลล์ไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 8000 รอบต่อนาทีนาน 5 นาที ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส เติมน้ำละลาย Triton X-100 lysis buffer (TritonX) ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน จากนั้นแบ่งใส่ 96-well black microplates ปริมาตรหลุมละ 90 ไมโครลิตร ทำการวัดปริมาณการเปล่งแสงของ DCF (Fluorescent intensity) โดยใช้ Multi-detection microplate reader (BioTek Instruments) ที่ระดับความยาวคลื่น 488 นาโนเมตร สำหรับความยาวคลื่นกระตุ้น (Excitation) และที่ความยาวคลื่น 535 นาโนเมตร สำหรับความยาวคลื่นที่คายพลังงาน (Emission) ทำการคำนวณปริมาณ ROS ที่เกิดขึ้นภายในเซลล์ตามสูตร

$$\text{ร้อยละของปริมาณ ROS ที่เกิดขึ้นภายในเซลล์} = \frac{\text{ค่าการเรืองแสงของตัวอย่าง}}{\text{ค่าการเรืองแสงของ Vehicle}} \times 100$$

3.9.3 การทดสอบฤทธิ์ด้านการเกิดออกซิเดชันของอนุมูลอิสระของอนุมูลอิสระ (Measurement of mRNA expression of antioxidant enzyme)

เป็นการทดสอบว่าสารสกัดดังกล่าวสามารถกระตุ้นการสร้างอนุมูลอิสระ (antioxidant enzymes) ได้หรือไม่ โดยการวัดปริมาณของ mRNA ที่เพิ่มขึ้นหลังการกระตุ้นด้วยสารสกัดตัวอย่าง เนื่องจากปริมาณที่เพิ่มขึ้นของอนุมูลอิสระต่าง ๆ จะเป็นตัวบ่งบอกถึงฤทธิ์ด้านอนุมูลอิสระ

3.9.3.1 การเพาะเลี้ยงเซลล์สำหรับการสกัดอาร์เอ็นเอ

เพาะเลี้ยงเซลล์ HEK-293 จำนวน 2×10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ใน 6-well plates ปริมาตรหลุมละ 2 มิลลิลิตร โดยใช้อาหารเช่นเดียวกับหัวข้อ 3.8.1.1 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์เป็น DMEM ที่ประกอบด้วยฟีทิลโบรวินเซรัม ความเข้มข้นร้อยละ 1 และยาปฏิชีวนะเพนิซิลินกับสเตปโตไมซิน ความเข้มข้นร้อยละ 0.1

3.9.3.2 การเตรียมตัวอย่าง

ใส่สารกระตุ้นหรือตัวอย่างอนุมูลอิสระและน้ำซาลงไป หลุมละ 20 ไมโครลิตร และใช้สาร DMSO ปริมาตรหลุมละ 1 ไมโครลิตร เป็นชุดควบคุม

3.9.3.3 การสกัดอาร์เอ็นเอของเซลล์โดยใช้ชุดสกัด GeneJet RNA purification kit (Thermo Scientific)

นำอาหาร DMEM ออกจากเพลทเซลล์ จากนั้นล้างเซลล์ด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (PBS) ปริมาตร 1 มิลลิลิตรต่อหลุม จากนั้นนำไลซิสบัฟเฟอร์ (Lysis buffer) ที่ประกอบด้วยเบต้าเมอแคปโตเอทานอล (β -mercaptoethanol) ปริมาตร 600 ไมโครลิตร เพื่อขูดเซลล์ออก นำสารละลายเซลล์ที่ขูดได้ใส่ใน Eppendorf ผสมให้เข้ากัน เติมน้ำเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 96-100 ปริมาตร 360 ไมโครลิตร จากนั้นนำสารละลายแบ่งใส่ GeneJET RNA Purification Column พร้อมกับ Collection tube แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที จนกว่าตัวอย่างจะหมด จากนั้นเปลี่ยน Collection tube อันใหม่ และล้างด้วย Wash buffer I ปริมาตร 700 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที ที่มีส่วนใสที่ผ่านการกรองออก จากนั้นล้างด้วย Wash buffer II ปริมาตร 700 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที ล้างด้วย Wash buffer II ซ้ำอีกครั้ง แต่ใช้ปริมาณเพียง 250 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10000 รอบต่อนาที นาน 2 นาที ย้ายชุดกรองลงสู่ RNase-free microcentrifuge tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร จากนั้นเติมน้ำปราศจากอนุมูลอิสระปริมาณ 50 ไมโครลิตร จากนั้นปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 9000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที เก็บอาร์เอ็นเอได้ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส

3.9.3.4 การวัดปริมาณของ mRNA ของ antioxidant enzymes โดยวิธี RT-qPCR

ตารางที่ 3.2 ลำดับ sequence ของ primers ของเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระชนิดต่าง ๆ ที่ใช้ในการทำ RT-qPCR

ไพรเมอร์ (Gene specific primers)		ลำดับนิวคลีโอไทด์ (Sequences)
Human GPx-1	Sense	5'-ctcttcgagaagtgcgaggt-3'
	Antisense	5'-tcgatgtcaatggtctggaa-3'
Human catalase	Sense	5'-gcagatacctgtgaactgtc-3'
	Antisense	5'-gtagaatgtccgcacctgag-3'
Human heme oxygenase-1	Sense	5'-caggcagagaatgctgag-3'
	Antisense	5'-gcttcacatagcgtgca-3'
Human Mn-SOD	Sense	5'-gcacattaacgcgcagatca-3'
	Antisense	5'-agcctcagcaactctcctt-3'
Human GRe	Sense	5'-cagtgggactcacggaagat-3'
	Antisense	5'-ttcactgcaacagcaaaacc-3'
Human GAPDH (ตัวควบคุม)	Sense	5'-cgagatccctcaaaatcaa-3'
	Antisense	5'-gtcttctgggtggcagtgat-3'

หมายเหตุ: Catalase (CAT), Glutathione peroxidases-1 (GPx-1), Heme oxygenase-1 (HO-1), Glyceraldehyde 3- phosphate dehydrogenase (GAPDH), Manganese superoxide dismutases (Mn-SOD) และ Glutathione reductase (GRe)

นำอาร์เอ็นเอ (RNA) ที่สกัดได้จากเซลล์มาวัดปริมาณของเอ็มอาร์เอ็นเอ (mRNA) ที่เพิ่มขึ้นหลังการกระตุ้นด้วยอนุมูลอิสระโดยใช้ชุดทดสอบ KAPA SYBR FAST One-step RT-qPCR kit (KAPA biosystems) เตรียมชุด Kit ของเอนไซม์ต่าง ๆ ได้แก่ เอนไซม์คะตาเลส (Catalase, CAT) เอนไซม์กลูตาไธโอนเพอรอกซิเดส (Glutathione peroxidases-1, GPx-1) เอนไซม์ฮีโมออกซีจีเนส (Heme oxygenase-1, HO-1) เอนไซม์แมงกานีสซูเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเทส (Manganese

superoxide dismutases, Mn-SOD) เอนไซม์กลูต้าไธโอนรีดักเทส (Glutathione reductase, GRe) และเอนไซม์กลีเซอรอลดีไฮด์ทรีฟอสเฟสดีไฮโดรจีเนส (Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase, GAPDH) ในหลอดไมโครเซนติพีทส์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร โดยใส่น้ำปราศจากเอนไซม์นิวคลีเอส ปริมาตร 50 ไมโครลิตร เขียว แดง ม่วง ส้ม รวมถึงไพรเมอร์ของแต่ละเอนไซม์ ปริมาตรอย่างละ 2 ไมโครลิตร แบ่งใส่หลอดพีซีอาร์ปริมาตร 17.5 ไมโครลิตร จากนั้นใส่ RNA ที่สกัดได้ ปริมาตร 2 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน วิเคราะห์ตัวอย่างโดยใช้เครื่อง AriaMx Asilent Real Time PCR system (Asilent) เพื่อวิเคราะห์ปริมาณ mRNA และ primer ที่ใช้ในการวัดการสร้างเอนไซม์ที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระชนิดต่าง ๆ ดังตารางที่ 1 จากนั้นนำค่าที่ได้มาคำนวณหาปริมาณของเอ็มอาร์เอนเอของเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระตามสูตร

3.10 การศึกษาอายุการเก็บรักษาคอมบูชาสมุนไพรมะนาว

ฆ่าเชื้อคอมบูชาที่คัดเลือกได้ด้วยวิธีการพาสเจอร์ไรซ์ที่อุณหภูมิ 85-90 องศาเซลเซียส นาน 1-2 นาที จากนั้นบรรจุขวด เก็บที่อุณหภูมิห้อง โดยเก็บตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์คุณภาพของเครื่องดื่มคอมบูชาจากสมุนไพรมะนาวทุก 14 วัน เป็นระยะเวลาทั้งสิ้น 54 วัน ดังนี้

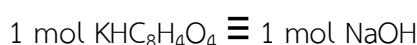
3.10.1 การวิเคราะห์ทางเคมี

3.10.1.1 ค่าพีเอช ด้วย pH meter

3.10.1.2 การวิเคราะห์ปริมาณกรดทั้งหมดในรูปกรดอะซิติก โดยวิธีการไทเทรต

1) การหาความเข้มข้นที่แน่นอนของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์

ใช้สารละลายมาตรฐานปฐมภูมิโพแทสเซียมไฮโดรเจนพาทาเลต (KHC₈H₄O₄, KHP) ความเข้มข้น 0.1 โมลต่อลิตรเป็นสารมาตรฐาน นำโพแทสเซียมไฮโดรเจนพาทาเลตที่ผ่านการอบที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ปริมาณ 0.50 กรัม ลงในขวดรูปชมพู่ เติมน้ำกลั่นปริมาตร 50 มิลลิลิตร แล้วเทใส่ขวดรูปชมพู่ (ทำการทดลอง 2 ครั้ง) หยดสารละลายฟีนอล์ฟทาลีน 2-3 หยด จากนั้นนำสารละลายตัวอย่างคอมบูชามาไทเทรตกับสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่เตรียมได้ จนสารละลายเปลี่ยนเป็นสีชมพูอ่อน บันทึกปริมาตร NaOH ที่ใช้ และนำมาคำนวณความเข้มข้นของ NaOH ที่แน่นอน



การคำนวณ



$$M_{\text{NaOH}} V_{\text{NaOH}} = \frac{\text{mgKHP}}{\text{gfw.KHP}}$$

$$M_{\text{NaOH}} = \frac{\text{mgKHP}}{\text{gfw.KHP} \times V_{\text{NaOH}}}$$

2) การวิเคราะห์

นำตัวอย่างคอมบูชาปริมาณ 5 มิลลิลิตร เจือจางด้วยน้ำปราศจากคาร์บอนไดออกไซด์ ปริมาตร 45 มิลลิลิตร หยดสารละลายฟีนอล์ฟทาลีน 2-3 หยด จากนั้นนำสารละลายตัวอย่างคอมบูชามาไทเทรตกับสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 0.1 โมลต่อลิตร บันทึกปริมาตรของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ทำให้สารละลายตัวอย่างเปลี่ยนเป็นสีชมพู (จุดยุติ) แล้วนำไปคำนวณตามสูตร

$$\text{ปริมาณกรดทั้งหมด (ร้อยละ)} = \frac{C \times V \times M.W. \times 100}{1000 \times \text{ปริมาตรของตัวอย่าง}}$$

โดย C = ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน NaOH (โมลต่อลิตร)
 V = ปริมาตรของสารละลายมาตรฐาน NaOH ที่ใช้
 M.W. = มวลโมเลกุลของกรดอะซิติก มีค่าเท่ากับ 60.05 กรัม

3.10.1.3 การวิเคราะห์ปริมาณแอลกอฮอล์ โดยใช้เครื่องวิเคราะห์และแยกสารโดยใช้แก๊ส (Gas chromatography, GC) ดังหัวข้อ 3.8.1.6

3.10.1.5 การทดสอบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ โดยใช้วิธี DPPH ดังหัวข้อ 3.7.2.1

3.10.1.6 การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด โดยใช้วิธี Folin-ciocalteu method ดังหัวข้อ 3.7.1.7

3.10.2 การวิเคราะห์ทางจุลินทรีย์

3.10.2.1 การวิเคราะห์ปริมาณจุลินทรีย์ที่มีชีวิตทั้งหมด

วิเคราะห์ปริมาณจุลินทรีย์ที่มีชีวิตทั้งหมด (Total viable plate count) โดยอ้างอิงจาก BAM (2001) เจือจางตัวอย่างโดยการใช้ Butterfield's phosphate-buffered dilution water จากนั้นนับจำนวนในแต่ระดับความเจือจาง ระดับความเจือจางละ 1 มิลลิลิตร ลงในเพลท วิธีโดยใช้วิธี Pour plate ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Plate count agar (PCA) กลับเพลทและนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 ± 1 องศาเซลเซียส นาน 48 ± 2 ชั่วโมง จากนั้นนับจำนวนโคโลนีที่เชื้อเจริญบนเพลทโดยเลือกเพลทที่มีจำนวนโคโลนีระหว่าง 25–250 โคโลนี บันทึกจำนวนโคโลนีและระดับความ

เชื้อจางที่นับได้ทั้งหมด คำนวณและรายงานผลในหน่วย CFU ต่อมิลลิลิตร ตัวอย่าง โดยมีการคำนวณ ดังนี้

1) กรณีที่โคโลนีอยู่ในช่วง 25-250 โคโลนี เลือกระดับการเชื้อจางเพียง

2 ระดับ

$$TVC = \frac{\sum C}{[(1 \times n_1) + (0.1 \times n_2)] \times d}$$

$\sum C$ คือ ผลรวมจำนวนโคโลนีทั้งหมดที่สามารถนับจำนวนได้

n_1 คือ จำนวนเพลทที่สามารถนับโคโลนีได้เมื่อใช้สารตัวอย่างที่มีการเชื้อจางน้อย

n_2 คือ จำนวนเพลทที่สามารถนับโคโลนีได้เมื่อใช้สารตัวอย่างที่มีการเชื้อจางมากขึ้น

d คือ ระดับการเชื้อจางของสารละลายตัวแรก

2) กรณีที่โคโลนีอยู่ในช่วง 25-250 โคโลนี เพียง 1 ระดับความเชื้อจาง

$$TVC = \frac{\sum C}{n \times d}$$

$\sum C$ คือ ผลรวมจำนวนโคโลนีทั้งหมดที่สามารถนับจำนวนได้

n คือ จำนวนเพลทที่สามารถนับโคโลนีได้

d คือ ระดับการเชื้อจางของสารละลายตัวแรก

3.10.2.2 การวิเคราะห์ปริมาณยีสต์และรา

วิเคราะห์ปริมาณยีสต์และรา (Yeasts and molds) อ้างอิงจาก BAM (2001) เชื้อจางตัวอย่างด้วยสารละลายเปปโตนความเข้มข้นร้อยละ 0.1 (Peptone water) นำตัวอย่างในแต่ละระดับความเชื้อจาง ระดับความเชื้อจางละ 0.1 มิลลิลิตร ลงในเพลทที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ Dichloran rose bengal chloramphenical agar (DRBC) ด้วยวิธี spread plate นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส โดยไม่ต้องกลับเพลท เป็นระยะเวลา 5 วัน จากนั้นนำมานับจำนวนโคโลนี โดยเลือกเพลทที่มีจำนวนโคโลนีระหว่าง 10-150 โคโลนี บันทึกจำนวนโคโลนีและระดับความเชื้อจางที่นับได้ทั้งหมด คำนวณและรายงานผลในหน่วย CFU ต่อมิลลิลิตร

กรณีที่โคโลนีอยู่ในช่วง 10-150 โคโลนี

$$MYC = \frac{\sum C}{3 \times d} \times 10$$

MYC คือ จำนวนราและยีสต์ที่นับได้ (Mold and Yeast Count)

- ΣC คือ ผลรวมจำนวนโคโลนีทั้งหมดที่สามารถนับจำนวนได้
- d คือ ระดับการเจือจางของสารละลายที่นับจำนวนโคโลนีได้

3.11 การวิเคราะห์ทางสถิติ

1) การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติของการวิเคราะห์ทางเคมี ทางชีวภาพ และทางประสาทสัมผัส โดยใช้การวางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Design, CRD) โดยมีชุดการทดลอง การทดลองละ 3 ซ้ำ นำผลการทดลองมาวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม SPSS และวิเคราะห์ความแปรปรวนด้วยตาราง ANOVA เปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของแต่ละชุดการทดลองด้วยวิธีวิเคราะห์แบบ Duncan's New Multiple Range Test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

2) การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติของการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระภายในเซลล์ใช้การวางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Design, CRD) โดยมีชุดการทดลอง การทดลองละ 4-5 ซ้ำ นำผลการทดลองมาวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม SPSS และวิเคราะห์ความแปรปรวนด้วยตาราง ANOVA เปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของแต่ละชุดการทดลองด้วยวิธีวิเคราะห์แบบ Turkey's Honestly Significant Different (HSD) ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

บทที่ 4

ผลการวิจัยและอภิปรายผล

4.1 การคัดเลือกสมุนไพรเพื่อนำมาใช้ในการผลิตคอมบูชา

4.1.1 ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของคอมบูชาจากสมุนไพร 10 ชนิด

เมื่อนำสมุนไพรที่มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาจำนวน 10 ชนิด ได้แก่ เกสรบัวหลวง เก้าอี้ ใบย่านาง ใบหม่อน กระจี้บ ตะไคร้ มะตูม หล่อฮังถั่ว กล้วยชันและชาอู่หลง ความเข้มข้นร้อยละ 1 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร หมักเป็นเครื่องดื่มคอมบูชาของสมุนไพรแต่ละชนิดด้วยหัวเชื้อคอมบูชาทางการค้าเป็นเวลา 10 วัน จากนั้นนำน้ำหมักของคอมบูชาจากสมุนไพรแต่ละชนิดทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH และ ABTS โดยแสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของคอมบูชาจากสมุนไพรแต่ละชนิดในรูปของร้อยละการดักจับอนุมูลอิสระ (Scavenging activity percentages) และค่าความเข้มข้นของคอมบูชาจากสมุนไพรที่สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระได้ 50 เปอร์เซ็นต์ (IC₅₀) พบว่าคอมบูชาจากสมุนไพรแต่ละชนิดมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH และ ABTS ได้แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 (ตารางที่ 4.1 และ 4.2)

4.1.1.1 ค่าดักจับอนุมูลอิสระ DPPH

เมื่อนำคอมบูชาจากสมุนไพร 10 ชนิด ทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH พบว่าคอมบูชาจากสมุนไพรทุกชนิดสามารถยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH ได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยเฉพาะอย่างยิ่ง คอมบูชาจากชาอู่หลง คอมบูชาจากกล้วยชันและคอมบูชาจากเกสรบัวหลวงสามารถยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH ได้สูงกว่าคอมบูชาจากสมุนไพรชนิดอื่นได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ จากผลการทดลองในตารางที่ 4.1 พบว่าคอมบูชาจากชาอู่หลงมีค่าการดักจับอนุมูลอิสระ DPPH เท่ากับร้อยละ 96.68 ± 0.28 และมีค่า IC₅₀ เท่ากับ 17.54 ± 0.51 ไมโครลิตรต่อมิลลิลิตร ผลการทดลองดังกล่าวอาจมีค่าแตกต่างจากงานวิจัยอื่น เนื่องจากงานวิจัยส่วนใหญ่นิยมใช้ชาดำในการผลิตคอมบูชา โดยชาดำเป็นชาที่ผลิตโดยการนำใบชาไปคั่วแล้วหมักเป็นระยะเวลานาน ๆ ซึ่งแตกต่างจากกรรมวิธีการผลิตชาอู่หลงที่ผลิตโดยการนำใบชามาคั่วและหมักโดยใช้ระยะเวลาสั้น เช่น จากงานวิจัยของ Essawwet *et al.*, (2015) พบว่าความเข้มข้นของคอมบูชาจากชาดำที่สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH ให้ลดลง 50 เปอร์เซ็นต์ มีค่าเท่ากับ 30-270 ไมโครลิตรต่อมิลลิลิตร ซึ่งมีค่าแตกต่างจากคอมบูชาจากชาอู่หลง (ตารางที่ 4.1) คอมบูชาจากชาอู่หลงมีประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH สูงกว่าคอมบูชาจากชาดำอาจเพราะว่าชาอู่หลงมีปริมาณสารที่อะรุบิจินและทีเอฟลาวินซึ่งเป็นสารในกลุ่มฟลาโวนอลสูงกว่าชาดำ (Xie *et al.*, 1993) ชานนและอนุรักษ์ (2559) พบว่าสารสกัดเอทานอลของชามีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH สูงกว่ากรดแอสคอบิก โดยมีค่า IC₅₀ เท่ากับ 8.97 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากตารางที่ 4.1 พบว่าคอมบูชาจากกล้วยชันมีค่าการดักจับอนุมูลอิสระ DPPH เท่ากับร้อยละ 95.68 ± 0.57 และมีค่า IC₅₀ เท่ากับ 20.61 ± 0.35 ไมโครลิตรต่อมิลลิลิตร จากงานวิจัยของอเนกและ

บุญยกฤต (2560) ได้ศึกษาประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของสารสกัดเมทานอลจากสมุนไพรชนิดอื่น นอกจากดอกอัญชัน ได้แก่ กระจี้บและตะไคร้ เป็นต้น โดยนำสารสกัดเมทานอลจากสมุนไพรแต่ละชนิดปริมาตร 150 ไมโครลิตรมาทดสอบด้วยวิธี DPPH radical scavenging ability โดยสารสกัดแต่ละชนิดจะถูกกระตุ้นด้วยสารละลาย DPPH ความเข้มข้น 0.6 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 3 มิลลิลิตร (อัตราส่วน 50 ต่อ 1) พบว่าสารสกัดจาก กระจี้บและตะไคร้มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH เทียบเท่ากับ 21.21 และ 1.02 ไมโครโมลโทรลออกซ์ต่อกรัมของตัวอย่าง ($\mu\text{mol Trolox equivalents/g}$) ตามลำดับ และพบว่ากระจี้บมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH สูงสุด

จากงานวิจัยของ Zheng *et al.*, (2012) ศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของสารสกัดเอทานอลของเกสรบัวหลวง พบว่ามีค่า IC_{50} อยู่ในช่วง 11.13 ถึง 20.90 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และสามารถต้านอนุมูลอิสระ DPPH ได้อย่างมีประสิทธิภาพมากกว่า BHT อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของเกสรบัวหลวงแต่ละพื้นที่จะมีค่าแตกต่างกันขึ้นอยู่กับสถานที่และวิธีในการเพาะปลูก ซึ่งจากผลการทดลองในตารางที่ 4.1 พบว่าคอมบูชาจากเกสรบัวหลวงมีค่า IC_{50} เท่ากับ 26.77 ± 0.36 ไมโครลิตรต่อมิลลิลิตร และมีค่าการดักจับอนุมูลอิสระ DPPH เท่ากับ 94.76 ± 0.22 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ยังมีงานวิจัยหลายงานวิจัยที่ศึกษาเกี่ยวกับฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระของสมุนไพรชนิดต่าง ๆ ซึ่งส่วนใหญ่จะศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจากสารสกัดเอทานอลของสมุนไพร ดังเช่น จากงานวิจัยของชานนท์ และอนุรักษ์ (2559) ได้ทำการศึกษาฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของสารสกัดเอทานอลของใบหม่อนและใบย่านาง พบว่าสารสกัดจากใบหม่อนและใบย่านางมีค่า IC_{50} เท่ากับ 80.41 และ 70.36 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ซึ่งจากงานวิจัยนี้ได้ทำให้ใบหม่อนและใบย่านางหมักเป็นเครื่องดื่มคอมบูชา พบว่าคอมบูชาจากใบหม่อนและคอมบูชาจากใบย่านางมีค่า IC_{50} เท่ากับ 32.28 ± 2.74 และ 51.51 ± 1.38 ไมโครลิตรต่อมิลลิลิตร ซึ่งมีค่าต่ำกว่าสารสกัดเอทานอลของใบหม่อนและใบย่านางจากงานวิจัยข้างต้น แสดงให้เห็นว่าการนำสมุนไพรหมักเป็นเครื่องดื่มคอมบูชาทำให้มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH สูงขึ้น อาจเนื่องจากฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระของคอมบูชานั้นเป็นผลมาจากสารประกอบโพลีฟีนอล กรดแอสคอบิกและสาร DSL ในคอมบูชา รวมถึงการสร้างสารประกอบชนิดใหม่และการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของสารโพลีฟีนอลด้วยเอนไซม์จากแบคทีเรียและยีสต์ในระหว่างกระบวนการหมักคอมบูชา (Jayabalan *et al.*, 2014) จึงทำให้คอมบูชาจากใบหม่อนและใบย่านางมีประสิทธิภาพในการยับยั้งอนุมูลอิสระสูงกว่าใบหม่อนและใบย่านางที่ไม่ผ่านกระบวนการหมัก ซึ่งผลการวิจัยข้างต้นยังคล้ายคลึงกับงานวิจัยของจารุวรรณ และขวัญดาว (2559) ที่พบว่าชาจากใบย่านางที่ผลิตโดยใช้วิธีการเดียวกันกับการผลิตชาอู่หลงมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH เท่ากับร้อยละ 34.01 ซึ่งมีฤทธิ์ต่ำกว่าคอมบูชาจากใบย่านางในตารางที่ 4.1 (ร้อยละ 85.51 ± 0.50) แสดงให้เห็นว่าเมื่อนำใบย่านางมาหมักเป็นคอมบูชาจะทำให้ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH เพิ่มขึ้น นอกจากนี้ยังพบว่าชาใบย่านางมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ต่ำกว่าสารบิวทิลเลตไฮดรอกซีโทลูอีน (Butylated hydroxytoluene; BHT) ซึ่งการนำใบย่านางมาหมักเป็นคอมบูชาอาจทำให้มีฤทธิ์สูงกว่าชาที่ไม่ผ่านกระบวนการหมักและสารต้านอนุมูลอิสระบางชนิดอีกด้วย

ตารางที่ 4.1 ค่าการดักจับอนุมูลอิสระ DPPH และความเข้มข้นของคอมบูชาจากสมุนไพรแต่ละชนิดที่สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH ได้ 50 เปอร์เซ็นต์ (IC₅₀) โดยหมักที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 วัน

คอมบูชาจากสมุนไพร	ค่าดักจับอนุมูลอิสระ DPPH	
	ค่าการดักจับอนุมูลอิสระ (เปอร์เซ็นต์)	IC ₅₀ (ไมโครลิตรต่อมิลลิลิตร)
คอมบูชาจากชาอู่หลง	96.68 ^a ±0.28	17.54 ^s ±0.51
คอมบูชาจากหม่อน	92.07 ^d ±1.10	32.28 ^e ±2.74
คอมบูชาจากตะไคร้	81.81 ^s ±1.30	65.54 ^b ±0.41
คอมบูชาจากใบย่านาง	85.45 ^f ±0.51	51.51 ^c ±1.38
คอมบูชาจากมะตูม	68.98 ^h ±1.74	136.17 ^a ±4.87
คอมบูชาจากหล่อฮั้งก้วย	86.88 ^f ±0.17	41.21 ^d ±0.71
คอมบูชาจากกระเจี๊ยบ	93.86 ^c ±1.63	31.95 ^e ±0.06
คอมบูชาจากเกสรบัวหลวง	94.76 ^{bc} ±0.22	26.77 ^f ±0.36
คอมบูชาจากอัญชัน	95.68 ^{ab} ±0.57	20.61 ^s ±0.35
คอมบูชาจากเก๋ากี้	89.34 ^e ±0.86	31.92 ^e ±1.12

หมายเหตุ

- ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (จำนวน 3 ซ้ำ)
- a,b,c,d,e,f,g,h ตัวอักษรแตกต่างกันในแนวตั้งแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p \leq 0.05$)

งานวิจัยของ Wuttisin and Boonsook (2019) พบว่าฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของหล่อฮั้งก้วยที่สกัดด้วยน้ำเป็นตัวทำละลายมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH เท่ากับ 47.396 ± 1.946 ไมโครกรัมโทรลอคซ์ต่อมิลลิกรัมตัวอย่าง ($\mu\text{gTEAC}/\text{mg}$) ซึ่งมีค่าสูงกว่าสารสกัดเอทานอลของหล่อฮั้งก้วย ทั้งนี้อาจเนื่องจากความเหมาะสมของตัวทำละลายต่อชนิดของสารสกัด เช่น ความมีขี้ว เป็นต้น การนำสมุนไพรมาหมักคอมบูชาอาจถือเป็นการสกัดสารสำคัญจากสมุนไพรด้วยน้ำและเอนไซม์จากจุลินทรีย์ในระหว่างกระบวนการหมัก ซึ่งอาจมีผลการทดลองแตกต่างจากผลการทดลองในงานวิจัยอีกหลายงานวิจัย เนื่องจากยังไม่มีรายงานการนำสมุนไพรเหล่านี้มาหมักและศึกษาเกี่ยวกับฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระจากสมุนไพรดังกล่าว นอกจากนี้ประสิทธิภาพการยับยั้งอนุมูลอิสระของคอมบูชายังขึ้นอยู่กับชนิดของสมุนไพรและจุลินทรีย์ที่นำมาใช้ในการหมัก โดยจุลินทรีย์แต่ละชนิดสามารถเจริญและผลิตสารต้านอนุมูลอิสระในสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญแตกต่างกัน นอกจากนี้

สมุนไพรบางชนิดอาจมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ซึ่งส่งผลต่อฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของคอมบูชา (Malbasa *et al.*, 2011) เช่นงานวิจัยของ Malbasa *et al.*, (2011) ได้ศึกษาความแตกต่างของฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของคอมบูชาจากใบชาที่หมักโดยใช้หัวเชื้อคอมบูชาที่แตกต่างกัน ได้แก่ หัวเชื้อผสมระหว่างแบคทีเรียอะซิติกกับยีสต์ *Zygosaccharomyces* sp. หัวเชื้อผสมระหว่างแบคทีเรียอะซิติกกับยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* และหัวเชื้อคอมบูชาทางการค้า พบว่าหัวเชื้อผสมของแบคทีเรียอะซิติกกับยีสต์ *Zygosaccharomyces* sp. มีความเหมาะสมต่อการผลิตสารต้านอนุมูลอิสระของคอมบูชาจากชาดำโดยมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงกว่าคอมบูชาจากชาดำที่หมักจากหัวเชื้อชนิดอื่น เช่นเดียวกันกับคอมบูชาจากชาเขียวที่ผลิตจากการใช้หัวเชื้อทางการค้ามีประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH สูงกว่าคอมบูชาจากชาเขียวที่หมักจากหัวเชื้อชนิดอื่นเช่นกัน ดังนั้นหัวเชื้อคอมบูชาแต่ละชนิดจึงมีความเหมาะสมและจำเพาะต่อการหมักคอมบูชาจากสมุนไพรแตกต่างกัน

4.1.1.2 ค่าการดักจับอนุมูลอิสระ ABTS

เมื่อนำคอมบูชาจากสมุนไพรจำนวน 10 ชนิดทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ABTS พบว่าคอมบูชาจากสมุนไพรทุกชนิดสามารถยับยั้งอนุมูลอิสระ ABTS ได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยเฉพาะอย่างยิ่ง คอมบูชาจากอัญชัน คอมบูชาจากชาอู่หลง คอมบูชาจากกระเจี๊ยบและคอมบูชาจากเกสรบัวหลวงมีค่าการดักจับอนุมูลอิสระเท่ากับร้อยละ 97.89 ± 1.73 , 97.50 ± 1.81 , 97.73 ± 0.24 และ 96.52 ± 0.50 ตามลำดับ คอมบูชาจากชาอู่หลงมีความเข้มข้นของคอมบูชาที่สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระ ABTS ให้ลดลงได้ 50 เปอร์เซ็นต์ (IC_{50}) เท่ากับ 16.49 ± 0.20 ไมโครลิตรต่อมิลลิลิตร (ตารางที่ 4.2) ซึ่งต่ำกว่าคอมบูชาจากสมุนไพรชนิดอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p \leq 0.05$) รองลงมาคือคอมบูชาจากอัญชัน คอมบูชาจากกระเจี๊ยบและคอมบูชาจากเกสรบัวหลวงซึ่งมีค่า IC_{50} ใกล้เคียงกันเมื่อเปรียบเทียบทางสถิติ จากงานวิจัยของเอนกและบุญยกฤต (2560) ศึกษาประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระ ABTS ของสารสกัดเมทานอลจากดอกอัญชันและกระเจี๊ยบ โดยนำสารสกัดเมทานอลจากสมุนไพรแต่ละชนิดปริมาตร 150 ไมโครลิตร ผสมกับสารละลาย ABTS ความเข้มข้น 2.45 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 2.85 มิลลิลิตร พบว่าสารสกัดจากดอกอัญชันและกระเจี๊ยบมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ABTS เท่ากับ 10.31 และ 16.50 ไมโครโมล Trolox ต่อกรัมของตัวอย่าง ($\mu\text{mol Trolox equivalents/g}$) ตามลำดับ

จากผลการทดลองในตารางที่ 4.1 และ 4.2 พบว่าคอมบูชาจากสมุนไพรชนิดต่าง ๆ มีความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระที่แตกต่างกันอาจเป็นผลเนื่องมาจากชนิดของสารต้านอนุมูลอิสระที่เป็นองค์ประกอบอยู่ในผลิตภัณฑ์คอมบูชาแต่ละชนิด เช่น สารประกอบฟีนอลิก ฟลาโวนอยด์ รวมถึงวิตามินและแร่ธาตุต่าง ๆ โดยเฉพาะอย่างยิ่ง ชาอู่หลงมีค่า IC_{50} ที่สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH และ ABTS ได้โดดเด่นกว่าคอมบูชาชนิดอื่น อีกทั้งยังมีค่าการดักจับอนุมูลอิสระสูง ดังรูปที่ 4.1 และ 4.2 นอกจากนี้คอมบูชาจากชาอู่หลง คอมบูชาจากอัญชันและคอมบูชาจากเกสรบัวหลวงมีประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH และ ABTS สูงกว่าคอมบูชาที่ผลิตจากสมุนไพร

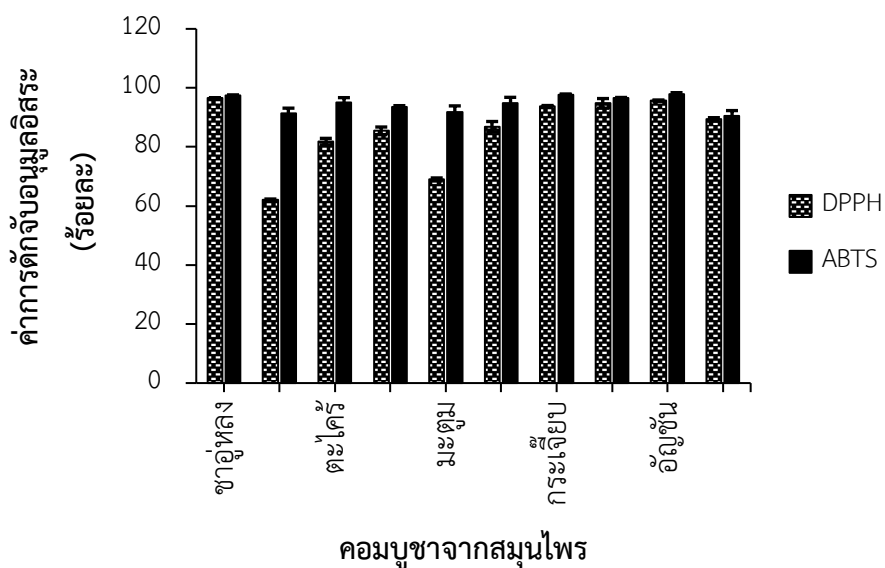
ชนิดอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p \leq 0.05$) อาจเป็นผลเนื่องมาจากชนิดและปริมาณของสารต้านอนุมูลอิสระจำพวกสารประกอบฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ภายในคอมบูชาจากชาอู่หลง เช่น คาเทชินชนิดต่าง ๆ เป็นต้น คอมบูชาจากอัญชัน เช่น เคอซีทิน เคมฟีรอลและเทอนาทิน เป็นต้น และคอมบูชาจากเกสรบัว เช่น เคอซีทินและลูเทโอลิน เป็นต้น (Zhen *et al.*, 2002; Davis *et al.*, 1997; Subramanian *et al.*, 1999; อังคณา, 2551; Terahara *et al.*, 1989; Singh and Tiwari, 2010)

ตารางที่ 4.2 ค่าการดักจับอนุมูลอิสระ ABTS และความเข้มข้นของคอมบูชาจากสมุนไพรแต่ละชนิดที่สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระ ABTS ได้ 50 เปอร์เซ็นต์ (IC_{50}) โดยหมักที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 วัน

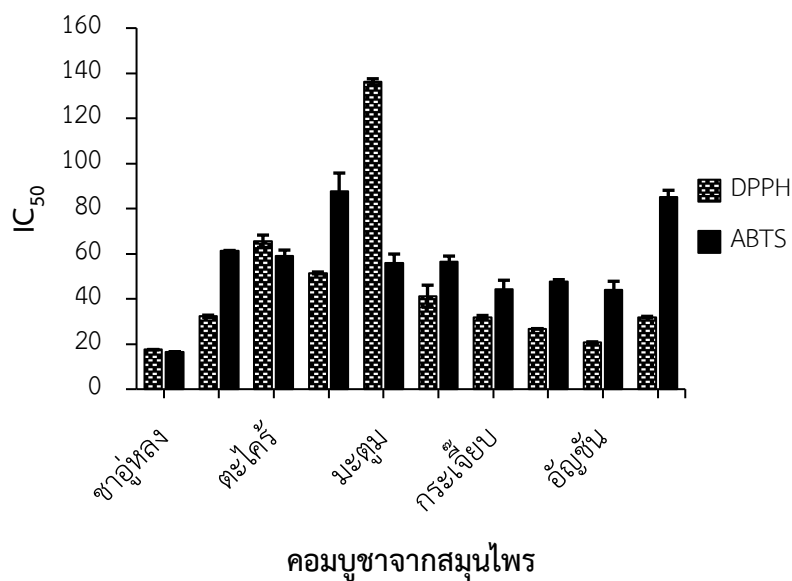
คอมบูชาจากสมุนไพร	ค่าการดักจับอนุมูลอิสระ ABTS	
	ค่าการดักจับอนุมูลอิสระ (เปอร์เซ็นต์)	IC_{50} (ไมโครลิตรต่อมิลลิกรัม)
คอมบูชาจากชาอู่หลง	97.50 ^{ab} ±1.81	16.49 ^d ±0.20
คอมบูชาจากหม่อน	91.33 ^{ef} ±1.53	61.26 ^b ±2.65
คอมบูชาจากตะไคร้	95.17 ^{bcd} ±0.51	58.99 ^b ±8.02
คอมบูชาจากใบย่านาง	93.48 ^{de} ±2.15	87.74 ^a ±3.92
คอมบูชาจากมะตูม	91.76 ^{ef} ±1.94	55.96 ^b ±2.51
คอมบูชาจากหล่อฮั้งก้วย	94.87 ^{cd} ±0.21	56.47 ^b ±4.07
คอมบูชาจากกระเจี๊ยบ	97.73 ^a ±0.24	44.20 ^c ±0.84
คอมบูชาจากเกสรบัวหลวง	96.52 ^{abc} ±0.50	47.69 ^c ±3.71
คอมบูชาจากอัญชัน	97.89 ^a ±1.73	44.10 ^c ±3.07
คอมบูชาจากเก๋ากี้	90.59 ^f ±0.36	85.06 ^a ±1.02

หมายเหตุ

- ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (จำนวน 3 ซ้ำ)
- a,b,c,d,e,f ตัวอักษรแตกต่างกันในแนวตั้งแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p \leq 0.05$)



รูปที่ 4.1 ค่าการดักจับอนุมูลอิสระ DPPH และ ABTS (ร้อยละ) ของคอมบูชาจากสมุนไพร 10 ชนิด หมักที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 วัน



รูปที่ 4.2 ค่า IC₅₀ ของคอมบูชาจากสมุนไพรทั้ง 10 ชนิด ที่ถูกกระตุ้นด้วยอนุมูลอิสระ DPPH และ ABTS

4.1.2 ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดและปริมาณฟลาโวนอยด์ของคอมบูชาจากสมุนไพร 10 ชนิด

เมื่อศึกษาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกของคอมบูชาจากสมุนไพร 10 ชนิด โดยวิเคราะห์ด้วยวิธี Folin-Ciocalteu method และแสดงปริมาณสารประกอบฟีนอลิกในรูปมิลลิกรัมของกรดแกลลิกต่อมิลลิลิตรของตัวอย่าง วิเคราะห์ปริมาณของสารประกอบฟลาโวนอยด์ด้วยวิธี Crystalline

aluminium chloride assay แสดงปริมาณฟลาโวนอยด์ในรูปมิลลิกรัมของแควอซิทินต่อมิลลิลิตรของตัวอย่าง พบว่าคอมบูชาจากสมุนไพรทั้ง 10 ชนิดมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p \leq 0.05$) (ตารางที่ 4.3)

ตารางที่ 4.3 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ของคอมบูชาจากสมุนไพร 10 ชนิด

คอมบูชาจากสมุนไพร	ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด ($\mu\text{gGAE/ml}$)	ปริมาณฟลาโวนอยด์ ($\mu\text{gQE/ml}$)
คอมบูชาจากชาอู่หลง	505.34 ^a ±1.70	741.50 ^a ±9.01
คอมบูชาจากหม่อน	264.66 ^e ±3.66	312.33 ^b ±5.20
คอมบูชาจากตะไคร้	191.62 ^h ±2.53	99.83 ^{gh} ±2.89
คอมบูชาจากใบย่านาง	203.56 ^g ±0.41	129.83 ^e ±1.44
คอมบูชาจากมะตูม	280.05 ^d ±7.79	212.33 ^c ±1.44
คอมบูชาจากหล่อฮังก้วย	216.97 ^f ±1.47	144.00 ^d ±7.50
คอมบูชาจากกระเจียบ	300.89 ^c ±2.97	91.50 ^h ±0.50
คอมบูชาจากเกสรบัวหลวง	376.77 ^b ±7.57	307.33 ^b ±7.22
คอมบูชาจากอัญชัน	204.76 ^g ±4.40	97.33 ^h ±2.89
คอมบูชาจากเก๋ากี้	202.85 ^g ±1.45	108.17 ^f ±5.20

หมายเหตุ

- ค่าเฉลี่ย \pm ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (จำนวน 3 ซ้ำ)
- ตัวอักษรแตกต่างกันในแนวตั้งแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p \leq 0.05$)

สารประกอบฟีนอลิกในธรรมชาติจะมีปริมาณที่แตกต่างกับขึ้นอยู่กับชนิดของพืช พื้นที่การปลูก รวมถึงสภาพภูมิประเทศ (Vajragupta *et al.*, 2006) ซึ่งจากผลการทดลองในตารางที่ 4.3 พบว่าคอมบูชาจากชาอู่หลงมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดและปริมาณฟลาโวนอยด์สูงกว่าคอมบูชาจากสมุนไพรชนิดอื่น โดยมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกเทียบเท่ากับ 505.34±1.70 ไมโครกรัมแกลลิกต่อมิลลิลิตร และมีปริมาณฟลาโวนอยด์เทียบเท่ากับ 741.50±9.01 ไมโครกรัมแควอซิทินต่อมิลลิลิตร ซึ่งจากงานวิจัยของ Lobo *et al.*, (2017) พบว่าคอมบูชาจากชาดำมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกเท่ากับ 670 ไมโครกรัมแกลลิกต่อมิลลิลิตร ปริมาณฟลาโวนอยด์ของคอมบูชาจากชาดำมีปริมาณเทียบเท่ากับ 1569.2±1.3 ไมโครกรัมแควอซิทินต่อมิลลิลิตร ซึ่งชาดำเป็นการนำใบชามาผลิตด้วยกรรมวิธีที่แตกต่างจากการผลิตชาอู่หลง โดยชาดำเป็นการนำใบชาหมักเป็นระยะ

เวลานาน ทำให้เกิดสารประกอบชนิดใหม่ขึ้นในระหว่างกระบวนการหมัก ดังนั้นชาดำจึงมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์สูงกว่าชาอู่หลง

ในขณะที่คอมบูชาจากอัญชัน คอมบูชาจากกระเจี๊ยบมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกเท่ากับ 204.76 ± 4.40 และ 300.89 ± 2.97 ไมโครกรัมแกลลิกต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และมีปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์เท่ากับ 97.33 ± 2.89 และ 91.50 ± 0.50 ไมโครกรัมเคอเวอซิทินต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ กระเจี๊ยบมีสารประกอบฟีนอลิกในกลุ่มฟลาโวนอยด์ในปริมาณสูงโดยเฉพาะในกลุ่มแอนโทไซยานิน จากงานวิจัยของเอนกและบุญยกฤต (2560) พบว่าสารสกัดจากดอกอัญชันและกระเจี๊ยบมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิก เท่ากับ 1.87 และ 4.83 มิลลิกรัมแกลลิกต่อกรัมของตัวอย่าง ตามลำดับ และมีปริมาณฟลาโวนอยด์ในรูปมิลลิกรัมคาเทชินที่ เท่ากับ 8.65 และ 7.96 มิลลิกรัมคาเทชินต่อกรัมของตัวอย่าง ตามลำดับ ซึ่งอัญชันและกระเจี๊ยบมีสารต้านอนุมูลอิสระกลุ่มเดียวกันคือ แอนโทไซยานิน ซึ่งอยู่ในกลุ่มฟลาโวนอยด์ จัดเป็นสารสีที่มีประสิทธิภาพต่อต้านอนุมูลอิสระสูงกว่าวิตามินซี วิตามินอีและเบต้าแคโรทีน (Chen *et al.*, 2006)

ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกของคอมบูชาจากเกสรบัวหลวงจากตารางผลการทดลองที่ 4.3 พบว่ามีค่าเท่ากับ 376.77 ± 7.57 ไมโครกรัมแกลลิกต่อมิลลิลิตร และมีปริมาณฟลาโวนอยด์เท่ากับ 307.33 ± 7.22 ไมโครกรัมเคอเวอซิทินต่อมิลลิลิตร ปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระในเกสรบัวหลวงเหล่านี้นสามารถพบได้ในงานวิจัยหลายงานวิจัย เช่น จากงานวิจัยของกาญจนา และคณะ (2017) ศึกษาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกจากดอกบัวหลวงพันธุ์สัตตบงกชที่สกัดด้วยเอทานอลที่สภาวะแตกต่างกัน พบว่าบัวหลวงมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกอยู่ในช่วง 83.60 ± 0.00 ถึง 137.31 ± 0.01 มิลลิกรัมแกลลิกต่อกรัมตัวอย่าง และงานวิจัยของสุชาติาและปวีณา (2015) ศึกษาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกของเกสรบัวหลวงที่สกัดด้วยเอทานอล พบว่าเกสรบัวหลวงมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกเท่ากับ 181.292 ppm

ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระของคอมบูชาที่เกิดขึ้นเป็นผลมาจากชนิดและปริมาณสารประกอบฟีนอลิกและปริมาณฟลาโวนอยด์ที่พบได้ในคอมบูชา จากผลการทดลองในตารางที่ 4.1, 4.2 และ 4.3 พบว่าคอมบูชาจากชาอู่หลง คอมบูชาจากเกสรบัวหลวงและคอมบูชาจากอัญชันมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH และ ABTS สูงกว่าคอมบูชาที่ผลิตจากสมุนไพรชนิดอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p < 0.05$) และมีปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระที่สูง ผู้วิจัยจึงนำคอมบูชาจากสมุนไพรทั้ง 3 ชนิดมาศึกษาการเปลี่ยนแปลงในระหว่างกระบวนการหมักเพื่อหาระยะเวลาที่เหมาะสมในกระบวนการหมักคอมบูชาจากสมุนไพรแต่ละชนิด

4.2 การเปลี่ยนแปลงระหว่างกระบวนการหมักของคอมบูชาจากชาอู่หลง คอมบูชาจากเกสรบัวหลวงและคอมบูชาจากอัญชัน

4.2.1 คุณลักษณะทางเคมี

4.2.1.1 พีเอช

เมื่อนำคอมบูชาจากซาอู่หลง คอมบูชาจากเกสรบัวหลวงและคอมบูชาจากดอกอัญชันศึกษาการเปลี่ยนแปลงระหว่างกระบวนการหมักได้ผลการทดลองดังตารางที่ 4.4 พบว่าคอมบูชาทั้งสามชนิดมีพีเอชเริ่มต้นอยู่ในช่วง 4.31-4.44 ค่าพีเอชของคอมบูชามีการลดลงตลอดระยะเวลาหมัก โดยวันสุดท้ายของการหมัก (20 วัน) คอมบูชาจากซาอู่หลง คอมบูชาจากเกสรบัวหลวงและคอมบูชาจากอัญชันมีพีเอชเท่ากับ 2.59, 2.58 และ 2.58 ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Chen and Liu (2006) รายงานว่าค่าพีเอชของคอมบูชาจะลดลงระหว่างกระบวนการหมัก โดยคอมบูชาจากชาดำและคอมบูชาจากชาดำผสมสระแหน่มีพีเอชในวันสุดท้ายของการหมัก (7 วัน) ประมาณ 2.0 ค่าพีเอชที่ลดลงเป็นผลเนื่องมาจากการสร้างกรดอินทรีย์ชนิดต่าง ๆ โดยเฉพาะกรดอะซิติกในระหว่างกระบวนการหมักของเชื้อ *Acetobacter* sp. ซึ่งเป็นจุลินทรีย์ที่พบได้เป็นส่วนใหญ่ในการหมักคอมบูชา นอกจากนี้มีการสร้างกรดอินทรีย์ชนิดอื่นระหว่างกระบวนการหมัก เช่น กรดกลูโคโรนิกและกรดแลคติก เป็นต้น (Loncar *et al.*, 2000; Jayabalan *et al.*, 2007)

ตารางที่ 4.4 ค่าพีเอชของคอมบูชาจากซาอู่หลง คอมบูชาจากเกสรบัวหลวงและคอมบูชาจากอัญชันหมัก ณ อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 20 วัน

ระยะเวลาหมัก (วัน)	pH		
	คอมบูชา จากซาอู่หลง	คอมบูชา จากเกสรบัวหลวง	คอมบูชา จากอัญชัน
0	4.31 ^a ±0.01	4.44 ^a ±0.01	4.40 ^a ±0.14
5	3.65 ^b ±0.01	3.22 ^b ±0.01	3.50 ^b ±0.01
7	3.57 ^{bc} ±0.01	3.17 ^{bc} ±0.01	3.28 ^c ±0.03
9	3.53 ^c ±0.06	3.08 ^c ±0.01	3.18 ^{cd} ±0.01
12	3.36 ^d ±0.02	2.94 ^d ±0.03	3.05 ^d ±0.03
15	3.10 ^e ±0.02	2.79 ^e ±0.06	2.89 ^e ±0.03
20	2.59 ^f ±0.15	2.58 ^f ±0.04	2.58 ^f ±0.03

หมายเหตุ

- ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (จำนวน 3 ซ้ำ)
- a,b,c,d,e,f ตัวอักษรแตกต่างกันในแนวตั้งแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p \leq 0.05$)

4.2.1.2 ปริมาณกรดอะซิติก

เมื่อนำคอมบูชาจากซาอู่หลง คอมบูชาจากเกสรบัวหลวงและคอมบูชาจากดอกอัญชันวิเคราะห์ปริมาณกรดอะซิติกด้วยเครื่อง HPLC ได้ผลดังตารางที่ 4.5 พบว่าปริมาณกรดอะ

ซิติคของคอมบูซาทั้งสามชนิดจะเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาการหมัก วันสุดท้ายของการหมัก (20 วัน) คอมบูซาจากซาอู่หลง คอมบูซาจากเกสรบัวหลวงและคอมบูซาจากอัญชันมีปริมาณกรดอะซิติกสูงสุดเท่ากับ 4.18, 2.73 และ 1.20 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ จากงานวิจัยของ Jayabalan *et al.*, (2007) ศึกษาการเปลี่ยนแปลงปริมาณกรดอะซิติกของคอมบูซาจากซาเขียวเป็นเวลา 18 วัน พบว่ามีปริมาณกรดอะซิติกสูงสุด 9.5 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 15 ซึ่งสูงกว่าปริมาณกรดอะซิติกที่ได้จากการหมักคอมบูซาทั้งสามชนิด ในการทดลองนี้อาจเนื่องจากความแตกต่างของวัตถุดิบและชนิดของหัวเชื้อที่ใช้หมัก

ตารางที่ 4.5 ปริมาณกรดอะซิติกของคอมบูซาจากซาอู่หลง คอมบูซาจากเกสรบัวหลวงและคอมบูซาจากอัญชันหมัก ณ อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 20 วัน

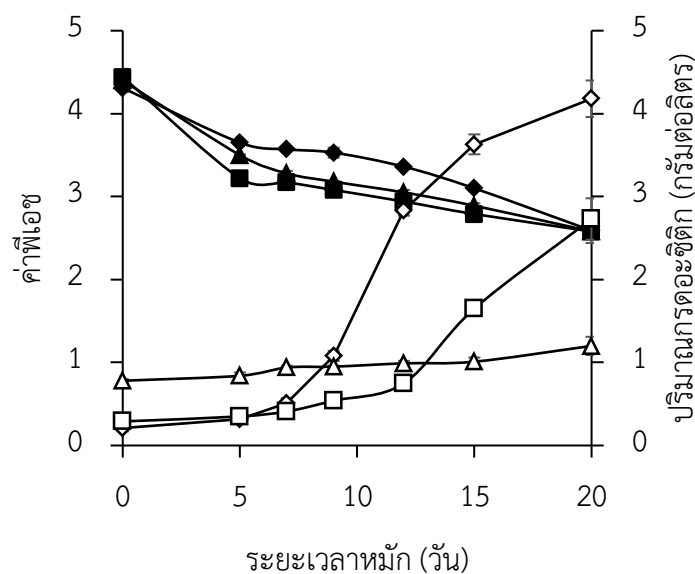
ระยะเวลาหมัก (วัน)	ปริมาณกรดอะซิติก (กรัมต่อลิตร)		
	คอมบูซาจากซาอู่หลง	คอมบูซาจากเกสรบัวหลวง	คอมบูซาจากอัญชัน
0	0.21 ^f ±0.04	0.29 ^e ±0.02	0.78 ^c ±0.02
5	0.32 ^f ±0.03	0.35 ^e ±0.01	0.84 ^c ±0.04
7	0.51 ^e ±0.06	0.41 ^{de} ±0.04	0.94 ^b ±0.02
9	1.08 ^d ±0.06	0.54 ^d ±0.03	0.95 ^b ±0.01
12	2.83 ^c ±0.06	0.75 ^c ±0.01	0.99 ^b ±0.03
15	3.63 ^b ±0.12	1.65 ^b ±0.03	1.01 ^b ±0.05
20	4.18 ^a ±0.22	2.73 ^a ±0.25	1.20 ^a ±0.11

หมายเหตุ

- ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (จำนวน 3 ซ้ำ)
- a,b,c,d,e,f ตัวอักษรแตกต่างกันในแนวตั้งแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p \leq 0.05$)

Chen and Liu (2006) ศึกษาการเปลี่ยนแปลงปริมาณกรดอะซิติกระหว่างกระบวนการหมักคอมบูซาเป็นเวลา 60 วัน พบว่าช่วงแรกปริมาณกรดอะซิติกเพิ่มขึ้นและมีปริมาณกรดสูงสุดในวันที่ 30 (11 กรัมต่อลิตร) หลังจากนั้นปริมาณกรดจะลดลงเหลือ 8 กรัมต่อลิตร การที่ปริมาณกรดอะซิติกลดลงอาจเนื่องมาจากถูกออกซิไดซ์ด้วยเอนไซม์จากจุลินทรีย์ในคอมบูซาเกิดเป็นสารประกอบชนิดอื่น ๆ ในระหว่างกระบวนการหมัก

Skocinska *et al.*, (2017) ศึกษาการเปลี่ยนแปลงปริมาณกรดอะซิติกของคอมบูชาจากชาเขียวผสมชาดำโดยใช้น้ำตาลซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอน หมักที่อุณหภูมิ 20, 25 และ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 วัน พบว่าคอมบูชาที่มีปริมาณกรดอะซิติกเพิ่มขึ้นในระหว่างกระบวนการหมักและมีปริมาณสูงสุดในวันสุดท้ายของการหมัก (10 วัน) ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับผลการทดลองที่ได้ (1.08 ± 0.06 กรัมต่อลิตร) ปริมาณกรดอะซิติกที่เกิดขึ้นในคอมบูชาเกิดจากการที่จุลินทรีย์ในหัวเชื้อคอมบูชาใช้น้ำตาลกลูโคสผลิตเป็นกรดอะซิติก ขณะเดียวกันน้ำตาลกลูโคสบางส่วนถูกนำไปใช้ในการผลิตเซลล์ูโลสในระหว่างกระบวนการหมัก



รูปที่ 4.3 การเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชและปริมาณกรดอะซิติกของคอมบูชาจากชาอู่หลง, คอมบูชาจากเกสรบัวหลวงและคอมบูชาจากอัญชันในระหว่างกระบวนการหมัก 20 วัน
หมายเหตุ ให้สัญลักษณ์ค่าพีเอช (—●— คอมบูชาจากชาอู่หลง, —■— คอมบูชาจากเกสรบัวหลวง และ —▲— คอมบูชาจากอัญชัน) ปริมาณกรดอะซิติก (—◇— คอมบูชาจากชาอู่หลง, —□— คอมบูชาจากเกสรบัวหลวง และ —△— คอมบูชาจากอัญชัน)

เมื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างการเปลี่ยนแปลงของค่าพีเอชและปริมาณกรดอะซิติกระหว่างกระบวนการหมักคอมบูชาทั้งสามชนิด (รูปที่ 4.3) พบว่าคอมบูชาทั้งสามชนิดมีค่าพีเอช ลดลงตลอดระยะเวลาการหมัก 20 วัน ขณะเดียวกันปริมาณกรดอะซิติกจะเพิ่มขึ้นตลอดระยะเวลาการหมัก ซึ่งให้ผลการทดลองทำนองเดียวกับ Rodrigo *et al.*, (1948) ที่รายงานว่าพีเอชจะแปรผกผันกับปริมาณกรดทั้งหมดในรูปกรดอะซิติก ปริมาณกรดอะซิติกที่เพิ่มขึ้นอาจเป็นผลมาจากคอมบูชาเกิดจากการหมักของแบคทีเรียและยีสต์ เช่น *Acetobacter xylinum*, *Acetobacter aceti* และ *Acetobacter pasteurianus* รวมทั้ง *Gluconobacter oxydans* เป็นต้น ซึ่งจุลินทรีย์เหล่านี้

สามารถผลิตกรดอะซิติคขึ้นได้ในระหว่างกระบวนการหมัก (Watawana *et al.*, 2015 ; Greenwalt *et al.*, 2000 ; Vina *et al.*, 2014; Jia *et al.*, 2004) นอกจากนี้คอมบูชายังประกอบไปด้วยกรดอินทรีย์อีกหลากหลายชนิด เช่น กรดออกซาลิก กรดแซคคาริก กรดคีโตไกลโคินิก กรดซัคซินิก กรดคาร์บอนิก กรดกลูโคโรนิกและกรดแอสคอบิก เป็นต้น ซึ่งกรดอินทรีย์เหล่านี้ล้วนมีประโยชน์ต่อร่างกายและมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรบบางชนิดอีกด้วย (Linde *et al.*, 2013) แต่ถ้าหากคอมบูชามีปริมาณกรดอินทรีย์ที่มีความเข้มข้นสูงเกินไปอาจก่อให้เกิดผลเสียต่อร่างกายของผู้บริโภค ดังนั้นเครื่องดื่มคอมบูชาส่วนใหญ่จึงมีค่าความเป็นกรด-เบสประมาณ 2.5 ซึ่งค่าความเป็นกรดเบสดังกล่าวก็สามารถเกิดข้อจำกัดของการเจริญของจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรคส่งผลให้เครื่องดื่มคอมบูชาไม่เกิดการปนเปื้อนและมีความปลอดภัยต่อการบริโภค (Markov *et al.*, 2003)

4.2.3.3 ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด

เมื่อนำคอมบูชาจากชาอู่หลง คอมบูชาจากเกสรบัวหลวงและคอมบูชาจากดอกอัญชันวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดด้วยวิธี phenol-sulfuric assay แสดงผลดังตารางที่ 4.6

ตารางที่ 4.6 ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดของคอมบูชาจากชาอู่หลง คอมบูชาจากเกสรบัวหลวงและคอมบูชาจากดอกอัญชันหมัก ณ อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 20 วัน

ระยะเวลาหมัก (วัน)	ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (กรัมต่อลิตร)		
	คอมบูชา จากชาอู่หลง	คอมบูชา จากเกสรบัวหลวง	คอมบูชา จากอัญชัน
0	70.00 ^a ±1.00	70.83 ^a ±1.30	70.37 ^a ±0.55
5	69.19 ^a ±0.73	65.60 ^b ±0.46	65.36 ^b ±0.20
7	63.33 ^b ±1.53	58.42 ^c ±0.42	62.36 ^c ±0.20
9	44.00 ^c ±1.00	40.12 ^d ±0.05	32.62 ^d ±0.44
12	30.00 ^d ±1.00	18.70 ^e ±0.30	25.67 ^e ±0.67
15	27.38 ^e ±0.27	18.51 ^e ±0.25	24.26 ^f ±0.26
20	27.02 ^e ±0.08	18.53 ^e ±0.28	20.59 ^g ±0.50

หมายเหตุ

- ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (จำนวน 3 ซ้ำ)
- a,b,c,d,e,f,g ตัวอักษรแตกต่างกันในแนวตั้งแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p \leq 0.05$)

ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดของคอมบูชาทั้งสามชนิดมีปริมาณลดลงตลอดระยะเวลาการหมัก โดยคอมบูชาทั้งสามชนิดมีปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นอยู่ในช่วง 70.00-70.83 กรัมต่อลิตร เมื่อสิ้นสุดกระบวนการหมัก พบว่าคอมบูชาจากซาอู๋หลง คอมบูชาจากเกสรบัวหลวงและคอมบูชาจากอัญชันมีปริมาณน้ำตาลลดลงเหลือ 27.02, 18.53 และ 20.59 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ การที่ปริมาณน้ำตาลลดลงอาจเนื่องมาจากจุลินทรีย์ที่มีในหัวเชื้อคอมบูชาซึ่งส่วนใหญ่เป็นยีสต์และแบคทีเรียอะซิติก ใช้น้ำตาลซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอนในการเจริญเติบโตและนำไปใช้ในการผลิตแอลกอฮอล์รวมทั้งกรดอินทรีย์ชนิดต่าง ๆ (Frank, 1995; Hobbs, 1995) ซึ่งผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับการทดลองของ Rodrigo *et al.*, (1948) ซึ่งได้ศึกษาการเปลี่ยนแปลงของน้ำตาลซูโครสระหว่างหมักคอมบูชาจากชาดำ พบว่าปริมาณน้ำตาลซูโครสลดลงตลอดระยะเวลาการหมัก จากผลการทดลองที่ได้พบว่าคอมบูชาจากซาอู๋หลง คอมบูชาจากเกสรบัวหลวงและคอมบูชาจากอัญชันในวันสุดท้ายของการหมัก (20 วัน) มีปริมาณน้ำตาลทั้งหมดแตกต่างกัน อาจเนื่องมาจากสมุนไพรทั้งสามชนิดมีองค์ประกอบของสารออกฤทธิ์ที่แตกต่างกัน ซึ่งสารเหล่านี้อาจมีผลต่อการเจริญของจุลินทรีย์ในหัวเชื้อคอมบูชา

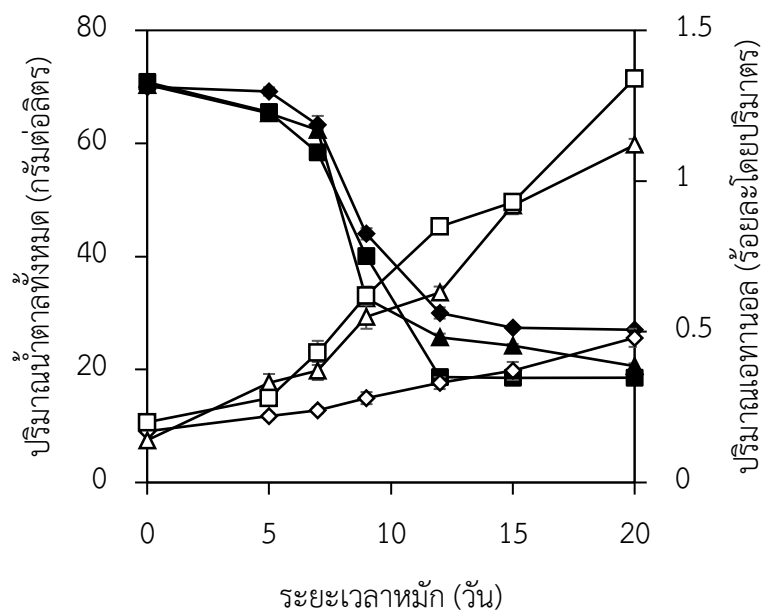
4.2.3.4 ปริมาณแอลกอฮอล์

ตารางที่ 4.7 ปริมาณเอทานอลของคอมบูชาจากซาอู๋หลง คอมบูชาจากเกสรบัวหลวงและคอมบูชาจากดอกอัญชันหมัก ณ อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 20 วัน

ระยะเวลาหมัก (วัน)	ปริมาณเอทานอล (% v/v)		
	คอมบูชา จากซาอู๋หลง	คอมบูชา จากเกสรบัวหลวง	คอมบูชา จากอัญชัน
0	0.17 ^f ±0.02	0.20 ^s ±0.01	0.14 ^f ±0.01
5	0.22 ^e ±0.01	0.28 ^f ±0.02	0.33 ^e ±0.03
7	0.24 ^e ±0.01	0.43 ^e ±0.04	0.37 ^e ±0.03
9	0.28 ^d ±0.02	0.62 ^d ±0.03	0.55 ^d ±0.04
12	0.33 ^c ±0.02	0.85 ^c ±0.02	0.63 ^c ±0.02
15	0.37 ^b ±0.03	0.93 ^b ±0.02	0.92 ^b ±0.03
20	0.48 ^a ±0.03	1.34 ^a ±0.02	1.12 ^a ±0.02

หมายเหตุ

- ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (จำนวน 3 ซ้ำ)
- a,b,c ตัวอักษรแตกต่างกันในแนวตั้งแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p \leq 0.05$)



รูปที่ 4.4 การเปลี่ยนแปลงปริมาณน้ำตาลทั้งหมดและปริมาณเอทานอลของคอมบุชาจากช่อหลง คอมบุชาจากเกสรบัวหลวงและคอมบุชาจากอัญชันในระหว่างกระบวนการหมัก 20 วัน
หมายเหตุ ให้สัญลักษณ์ปริมาณน้ำตาล (—◆— คอมน้ำตาลจากช่อหลง, —■— คอมน้ำตาลจากเกสรบัวหลวง และ —▲— คอมน้ำตาลจากอัญชัน) ปริมาณเอทานอล (—◇— คอมน้ำตาลจากช่อหลง, —□— คอมน้ำตาลจากเกสรบัวหลวง และ —△— คอมน้ำตาลจากอัญชัน)

เมื่อนำคอมบุชาจากช่อหลง คอมบุชาจากเกสรบัวหลวงและคอมบุชาจากดอกอัญชันวิเคราะห์ปริมาณแอลกอฮอล์ด้วยเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี แสดงผลการทดลองดังตารางที่ 4.7 พบว่าคอมบุชาจากช่อหลง คอมบุชาจากเกสรบัวหลวงและคอมบุชาจากอัญชันมีปริมาณแอลกอฮอล์เริ่มต้นเท่ากับร้อยละ 0.17, 0.20 และ 0.14 ปริมาณแอลกอฮอล์จะเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาการหมัก วันสุดท้ายของการหมัก (20 วัน) คอมบุชาจากช่อหลง คอมบุชาจากเกสรบัวหลวงและคอมบุชาจากอัญชันมีปริมาณแอลกอฮอล์สูงสุดร้อยละ 0.48, 1.34 และ 1.12 โดยปริมาตร ซึ่งการทดลองของ Chen and Liu (2000) ศึกษาปริมาณแอลกอฮอล์ของคอมบุชาจากชาดำ ใช้น้ำตาลซูโครสความเข้มข้น 100 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน หมักเป็นระยะเวลา 60 วัน พบว่าคอมบุชาจากชาดำมีปริมาณแอลกอฮอล์สูงสุดร้อยละ 0.5-0.6 โดยปริมาตร ในวันที่ 20 ของการหมัก ซึ่งปริมาณแอลกอฮอล์ที่ได้ใกล้เคียงกับงานวิจัยนี้ (ร้อยละ 0.48 โดยปริมาตร) การทดลองของ Reiss (1994) รายงานว่าปริมาณแอลกอฮอล์เพิ่มขึ้นในระหว่างกระบวนการหมัก เมื่อเปรียบเทียบความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณน้ำตาลทั้งหมดกับปริมาณแอลกอฮอล์ที่เปลี่ยนแปลงระหว่างกระบวนการหมัก พบว่าปริมาณน้ำตาลทั้งหมดลดลงตามระยะเวลาการหมัก ขณะที่ปริมาณแอลกอฮอล์เพิ่มขึ้น แสดงดังรูปที่ 4.4

4.2.2 ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของคอมบูชาจากชาอู่หลง คอมบูชาจากเกสรบัวหลวงและคอมบูชาจากอัญชัน

4.2.2.1 ค่าการดักจับอนุมูลอิสระ DPPH

เมื่อนำคอมบูชาจากชาอู่หลง คอมบูชาจากเกสรบัวหลวงและคอมบูชาจากอัญชันทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH พบว่าคอมบูชาทั้งสามชนิดมีค่าการดักจับอนุมูลอิสระ DPPH เพิ่มขึ้นตามระยะเวลาหมัก โดยในวันที่ 20 ของการหมักพบว่าคอมบูชาจากอัญชันมีค่าการดักจับอนุมูลอิสระ DPPH สูงสุดมีค่าเท่ากับร้อยละ 98.41 ± 0.09 รองลงมาเป็นคอมบูชาจากชาอู่หลงและคอมบูชาจากเกสรบัวหลวงซึ่งมีค่าการดักจับอนุมูลอิสระร้อยละ 97.44 ± 0.19 และ 95.20 ± 0.14 ตามลำดับ แสดงดังตารางที่ 4.8

ตารางที่ 4.8 ค่าการดักจับอนุมูลอิสระ DPPH ของคอมบูชาจากชาอู่หลง คอมบูชาจากเกสรบัวหลวง และคอมบูชาจากอัญชันระหว่างการหมักที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 20 วัน

ระยะเวลาหมัก (วัน)	ค่าการดักจับอนุมูลอิสระ (เปอร์เซ็นต์)		
	คอมบูชา จากชาอู่หลง	คอมบูชา จากเกสรบัวหลวง	คอมบูชา จากอัญชัน
0	$83.61^g \pm 0.34$	$85.54^g \pm 0.10$	$88.81^g \pm 0.39$
5	$88.54^f \pm 0.02$	$87.58^f \pm 0.03$	$92.48^f \pm 0.15$
7	$90.73^e \pm 0.01$	$88.45^e \pm 0.13$	$93.15^e \pm 0.01$
9	$93.76^d \pm 0.70$	$92.84^d \pm 0.77$	$95.56^d \pm 0.06$
12	$95.17^c \pm 0.18$	$93.60^c \pm 0.10$	$96.18^c \pm 0.06$
15	$96.18^b \pm 0.06$	$94.39^b \pm 0.35$	$97.35^b \pm 0.40$
20	$97.44^a \pm 0.19$	$95.20^a \pm 0.14$	$98.41^a \pm 0.09$

หมายเหตุ

- ค่าเฉลี่ย \pm ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (จำนวน 3 ซ้ำ)
- a,b,c ตัวอักษรแตกต่างกันในแนวตั้งแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p < 0.05$)

สำหรับค่าความเข้มข้นของคอมบูชาที่สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH ให้ลดลง 50 เปอร์เซ็นต์ (IC_{50}) พบว่าคอมบูชาทั้งสามชนิดมีค่า IC_{50} ลดลงตลอดระยะเวลาหมัก โดยคอมบูชาจากชาอู่หลงมีค่า IC_{50} ต่ำกว่าคอมบูชาจากเกสรบัวหลวงและคอมบูชาจากอัญชันในช่วง 7 วันของการหมัก หลังจากนั้น IC_{50} ของคอมบูชาจากชาอู่หลงและคอมบูชาจากอัญชันจะมีค่าใกล้เคียงกัน

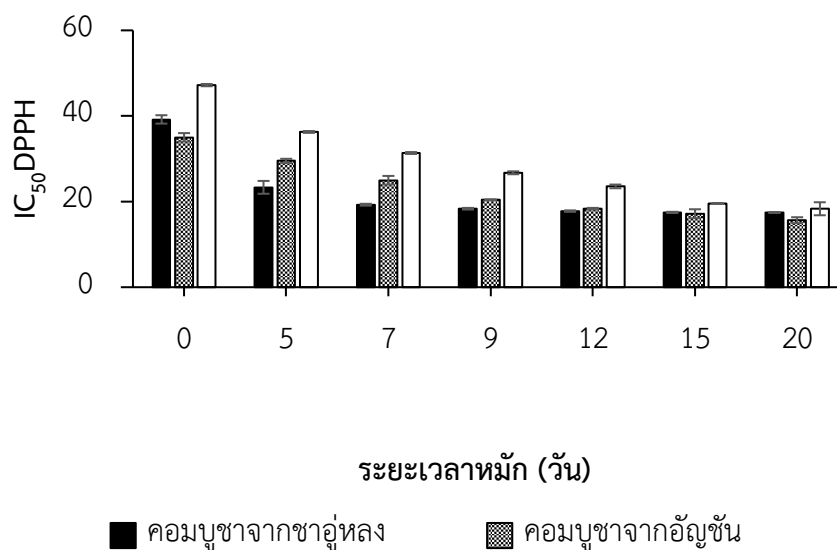
แสดงดังตารางที่ 4.9 และรูปที่ 4.5 ผลการทดลองดังกล่าวเป็นไปในทิศทางเดียวกันกับงานวิจัยของ Jayabalan *et al.*, (2008) รายงานว่าฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของผลิตภัณฑ์คอมบูชานั้นจะเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาหมัก และจากงานวิจัยของ Lobo *et al.*, (2017) ศึกษาฤทธิ์การยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH ของคอมบูชาจากชาดำโดยใช้หัวเชื้อคอมบูชาทางการค้าและเปรียบเทียบกับน้ำชาที่ไม่ผ่านการหมัก พบว่าคอมบูชาจากชาดำมีประสิทธิภาพในการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH ได้สูงกว่าน้ำชาที่ไม่ผ่านการหมักอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เนื่องจากคอมบูชาสามารถถ่ายเทอิเล็กตรอนและอะตอมไฮโดรเจนให้แก่อนุมูลอิสระได้สูงกว่าชาที่ไม่ผ่านกระบวนการหมัก (Huang *et al.*, 2005)

ตารางที่ 4.9 ความเข้มข้นของคอมบูชาจากชาอู่หลง คอมบูชาจากเกสรบัวหลวงและคอมบูชาจากอัญชันที่สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH ให้ลดลงได้ 50 เปอร์เซ็นต์ (IC₅₀) ในระหว่างการหมักที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 20 วัน

ระยะเวลาหมัก (วัน)	IC ₅₀ (ไมโครลิตรต่อมิลลิตร)		
	คอมบูชา จากชาอู่หลง	คอมบูชา จากเกสรบัวหลวง	คอมบูชา จากอัญชัน
0	39.20 ^a ±0.98	47.21 ^a ±0.26	35.01 ^a ±0.99
5	23.33 ^b ±1.50	36.27 ^b ±0.21	29.50 ^b ±0.50
7	19.27 ^c ±0.22	31.35 ^c ±0.22	25.00 ^c ±1.00
9	18.34 ^{cd} ±0.19	26.73 ^d ±0.34	20.44 ^d ±0.08
12	17.78 ^d ±0.17	23.55 ^e ±0.43	18.33 ^e ±0.20
15	17.48 ^d ±0.14	19.59 ^f ±0.06	17.17 ^e ±1.04
20	17.46 ^d ±0.07	18.33 ^g ±1.52	15.65 ^f ±0.70

หมายเหตุ

- ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (จำนวน 3 ซ้ำ)
- a,b,c ตัวอักษรแตกต่างกันในแนวตั้งแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p \leq 0.05$)



รูปที่ 4.5 ค่าความเข้มข้นของคอมบูชาจากซาอู่หลง คอมบูชาจากเกสรบัวหลวงและคอมบูชาจากอัญชันที่สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH ให้ลดลงได้ 50 เปอร์เซ็นต์ (IC₅₀) ในระหว่างการหมักที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 20 วัน

4.2.2.2 ค่าการดักจับอนุมูลอิสระ ABTS

ตารางที่ 4.10 ค่าการดักจับอนุมูลอิสระ ABTS ของคอมบูชาจากซาอู่หลง คอมบูชาจากเกสรบัวหลวง และคอมบูชาจากอัญชันระหว่างการหมักที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 20 วัน

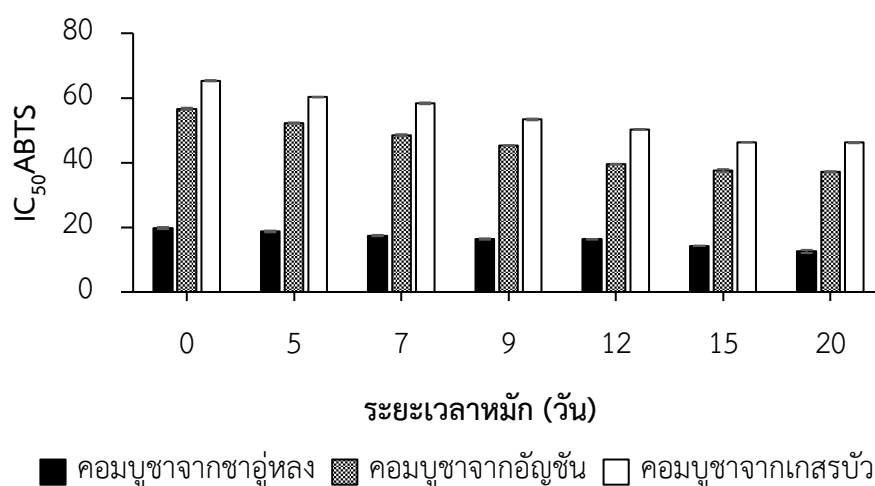
ระยะเวลาหมัก (วัน)	ค่าการดักจับอนุมูลอิสระ (เปอร์เซ็นต์)		
	คอมบูชา จากซาอู่หลง	คอมบูชา จากเกสรบัวหลวง	คอมบูชา จากอัญชัน
0	97.76 ^f ±0.00	91.96 ^f ±0.83	93.65 ^d ±0.86
5	98.08 ^e ±0.16	93.12 ^e ±0.13	95.66 ^c ±0.32
7	98.23 ^d ±0.06	95.10 ^d ±0.69	95.98 ^c ±0.87
9	98.58 ^c ±0.02	96.17 ^c ±1.09	97.62 ^b ±0.38
12	99.56 ^b ±0.02	98.45 ^b ±0.15	99.87 ^a ±0.01
15	99.73 ^a ±0.01	99.72 ^a ±0.11	99.90 ^a ±0.02
20	99.84 ^a ±0.03	99.86 ^a ±0.01	99.95 ^a ±0.01

ตารางที่ 4.11 ความเข้มข้นของคอมบูชาจากชาอู่หลง คอมบูชาจากเกสรบัวหลวงและคอมบูชาจากอัญชันระหว่างการหมักที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 20 วันที่สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระ ABTS ให้ลดลงได้ 50 เปอร์เซ็นต์ (IC_{50})

ระยะเวลาหมัก (วัน)	IC_{50} (ไมโครลิตรต่อมิลลิตร)		
	คอมบูชา จากชาอู่หลง	คอมบูชา จากเกสรบัวหลวง	คอมบูชา จากอัญชัน
0	19.76 ^a ±0.32	65.33 ^a ±0.20	56.64 ^a ±0.33
5	18.72 ^b ±0.26	60.25 ^b ±0.10	52.28 ^b ±0.14
7	17.44 ^c ±0.20	58.33 ^c ±0.26	48.45 ^c ±0.33
9	16.37 ^d ±0.21	53.35 ^d ±0.26	45.26 ^d ±0.11
12	16.28 ^d ±0.04	50.28 ^e ±0.04	39.54 ^e ±0.09
15	14.28 ^e ±0.04	46.32 ^f ±0.06	37.58 ^f ±0.40
20	12.53 ^f ±0.48	46.17 ^f ±0.17	37.18 ^f ±0.16

หมายเหตุ

- ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (จำนวน 3 ซ้ำ)
- a,b,c ตัวอักษรแตกต่างกันในแนวตั้งแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p < 0.05$)



รูปที่ 4.6 ความเข้มข้นของคอมบูชาจากชาอู่หลง คอมบูชาจากเกสรบัวหลวงและคอมบูชาจากอัญชันระหว่างการหมักที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 20 วันที่สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระ ABTS ให้ลดลงได้ 50 เปอร์เซ็นต์ (IC_{50})

เมื่อนำคอมบูชาจากซาอู่หลง คอมบูชาจากเกสรบัวหลวงและคอมบูชาจากอัญชันทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ABTS พบว่าคอมบูชาทั้งสามชนิดมีค่าการดักจับอนุมูลอิสระ ABTS เพิ่มขึ้นตามระยะเวลาหมัก คอมบูชาจากอัญชันหมัก 20 วัน สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระ ABTS ได้สูงสุด โดยมีร้อยละค่าการดักจับอนุมูลอิสระ ABTS เท่ากับ 99.95 ± 0.01 รองลงมาเป็นคอมบูชาจากซาอู่หลงและคอมบูชาจากเกสรบัวหลวงซึ่งมีค่าการดักจับอนุมูลอิสระ ABTS ร้อยละ 99.84 ± 0.03 และ 99.86 ± 0.01 ตามลำดับ แสดงดังตารางที่ 4.10

สำหรับความเข้มข้นของคอมบูชาที่สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระ ABTS ให้ลดลง 50 เปอร์เซ็นต์ (IC_{50}) พบว่าคอมบูชาทั้งสามชนิดมีค่า IC_{50} ลดลงตามระยะเวลาหมัก โดยคอมบูชาจากซาอู่หลงมีค่า IC_{50} ต่ำสุด รองลงมาเป็นคอมบูชาจากอัญชันและคอมบูชาจากเกสรบัวหลวง ตามลำดับ แสดงดังตารางที่ 4.11 และรูปที่ 4.6 ซึ่งจากผลการทดลองดังกล่าว พบว่าฤทธิ์ในการยับยั้งอนุมูลอิสระของคอมบูชาจะเพิ่มมากขึ้นในระหว่างการหมัก นอกจากนี้ประสิทธิภาพของการยับยั้งอนุมูลอิสระของคอมบูชานั้นขึ้นอยู่กับชนิดของวัตถุดิบที่ใช้ในกระบวนการหมัก รวมถึงชนิดของจุลินทรีย์ที่ใช้หมัก อย่างไรก็ตามถ้าใช้ระยะเวลาในการหมักที่นานเกินไป อาจจะทำให้ผลิตภัณฑ์คอมบูชาไม่เป็นที่ยอมรับและก่อให้เกิดผลเสียแก่ผู้บริโภค เนื่องจากมีปริมาณกรดอินทรีย์ที่สูง (Jayabalan *et al.*, 2014)

4.2.3 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดและปริมาณฟลาโวนอยด์

เมื่อนำคอมบูชาจากซาอู่หลง คอมบูชาจากเกสรบัวหลวงและคอมบูชาจากอัญชันมาปั่นเหวี่ยงและนำส่วนใสมาศึกษาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ พบว่าคอมบูชาจากสมุนไพรทั้ง 3 ชนิด มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ในปริมาณที่แตกต่างกัน (ตารางที่ 4.12 และ 4.13) จากผลการทดลองในตารางที่ 4.12 พบว่าปริมาณสารประกอบฟีนอลิกของคอมบูชาทั้งสามชนิดจะเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาหมัก โดยคอมบูชาจากซาอู่หลงมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกสูงกว่าคอมบูชาชนิดอื่น โดยมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกเท่ากับ 555.00 ± 1.00 ไมโครกรัมแกลลิกต่อมิลลิลิตรในวันสุดท้ายของการหมัก ขณะที่คอมบูชาจากเกสรบัวหลวงและคอมบูชาจากอัญชันมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกเท่ากับ 403.00 ± 2.00 และ 269.08 ± 3.33 ไมโครกรัมแกลลิกต่อมิลลิลิตรตามลำดับ

จากการวิเคราะห์ปริมาณฟลาโวนอยด์ของคอมบูชาจากซาอู่หลง คอมบูชาจากเกสรบัวหลวงและคอมบูชาจากดอกอัญชันเปรียบเทียบกับสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐานแควอซิทิน ในหน่วยไมโครกรัมของแควอซิทินต่อมิลลิลิตรของตัวอย่างพบว่า ตัวอย่างคอมบูชาที่ผลิตจากสมุนไพรทั้งสามชนิดมีปริมาณฟลาโวนอยด์ในปริมาณที่แตกต่างกัน (ตารางที่ 4.13)

ตารางที่ 4.12 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของคอมบูชาจากชาอู่หลง คอมบูชาจากเกสรบัวหลวงและคอมบูชาจากอัญชันที่หมักเป็นระยะเวลา 20 วัน ณ อุณหภูมิห้อง

ระยะเวลาหมัก (วัน)	ปริมาณสารประกอบฟีนอลิก ($\mu\text{gGAE/ml}$)		
	คอมบูชา จากชาอู่หลง	คอมบูชา จากเกสรบัวหลวง	คอมบูชา จากอัญชัน
0	353.60 ^f ±2.36	254.33 ^f ±1.53	163.62 ^f ±5.54
5	404.12 ^e ±0.87	298.33 ^e ±7.64	159.10 ^f ±0.68
7	454.33 ^d ±5.13	326.33 ^d ±1.53	172.33 ^e ±2.52
9	504.67 ^c ±1.53	351.67 ^c ±2.08	194.33 ^d ±2.08
12	509.00 ^c ±1.00	369.67 ^b ±8.74	207.67 ^c ±3.79
15	531.00 ^b ±1.00	397.00 ^a ±2.65	228.64 ^b ±0.34
20	555.00 ^a ±1.00	403.00 ^a ±2.00	269.08 ^a ±3.33

หมายเหตุ

- ค่าเฉลี่ย \pm ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (จำนวน 3 ซ้ำ)
- a,b,c ตัวอักษรแตกต่างกันในแนวตั้งแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p \leq 0.05$)

จากผลการทดลองในตารางที่ 4.13 พบว่าคอมบูชาทั้งสามชนิดมีปริมาณฟลาโวนอยด์เพิ่มขึ้นตามระยะเวลาหมัก โดยคอมบูชาจากชาอู่หลงมีปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์สูงกว่าคอมบูชาชนิดอื่น มีค่าเท่ากับ 863.89 ± 1.47 ไมโครกรัมแควอซิทินต่อมิลลิลิตร รองลงมาคือคอมบูชาจากเกสรบัวหลวงและคอมบูชาจากอัญชัน ตามลำดับ

จากงานวิจัยของ Lobo *et al.*, (2017) ศึกษาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ของคอมบูชาจากชาดำ พบว่าคอมบูชาจากชาดำมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกเท่ากับ 67.0 ± 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อเปรียบเทียบกับปริมาณสารประกอบฟีนอลิกของชาดำที่ไม่ผ่านกระบวนการหมักที่มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกเท่ากับ 64.0 ± 0.7 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อเปรียบเทียบปริมาณสารประกอบฟีนอลิกของเครื่องดื่มทั้งสองชนิดพบว่ามีความไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 เมื่อวิเคราะห์ปริมาณฟลาโวนอยด์ในคอมบูชาจากชาดำ พบว่าคอมบูชาจากชาดำมีปริมาณฟลาโวนอยด์เท่ากับ 156.92 ± 1.3 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งมีปริมาณฟลาโวนอยด์สูงกว่าชาดำที่ไม่ผ่านกระบวนการหมักที่มีปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์เท่ากับ 143.59 ± 1.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

ตารางที่ 4.13 ปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ของคอมบูชาจากชาอู่หลง คอมบูชาจากเกสรบัวหลวงและคอมบูชาจากอัญชันที่หมักเป็นระยะเวลา 20 วัน ณ อุณหภูมิห้อง

ระยะเวลาหมัก (วัน)	ปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ ($\mu\text{gQE/ml}$)		
	คอมบูชา จากชาอู่หลง	คอมบูชา จากเกสรบัวหลวง	คอมบูชา จากอัญชัน
	0	613.38 ^s ±2.43	323.87 ^f ±3.18
5	641.67 ^f ±1.17	351.23 ^e ±1.00	173.75 ^f ±0.23
7	682.86 ^e ±2.59	359.91 ^e ±11.86	192.58 ^e ±2.48
9	751.95 ^d ±1.46	391.28 ^d ±11.50	205.88 ^d ±1.51
12	782.33 ^c ±3.45	411.45 ^c ±1.91	210.95 ^c ±0.91

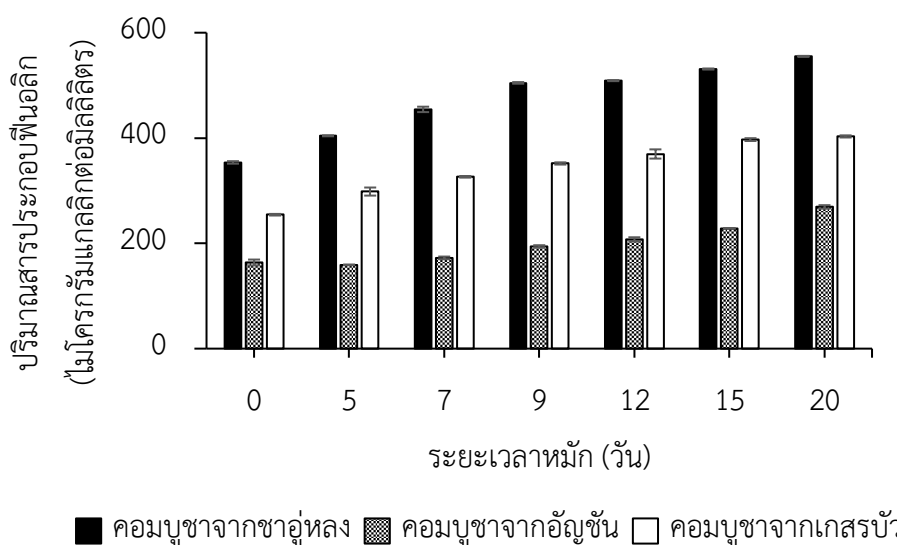
หมายเหตุ

- ค่าเฉลี่ย \pm ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (จำนวน 3 ซ้ำ)
- a,b,c ตัวอักษรแตกต่างกันในแนวตั้งแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p \leq 0.05$)

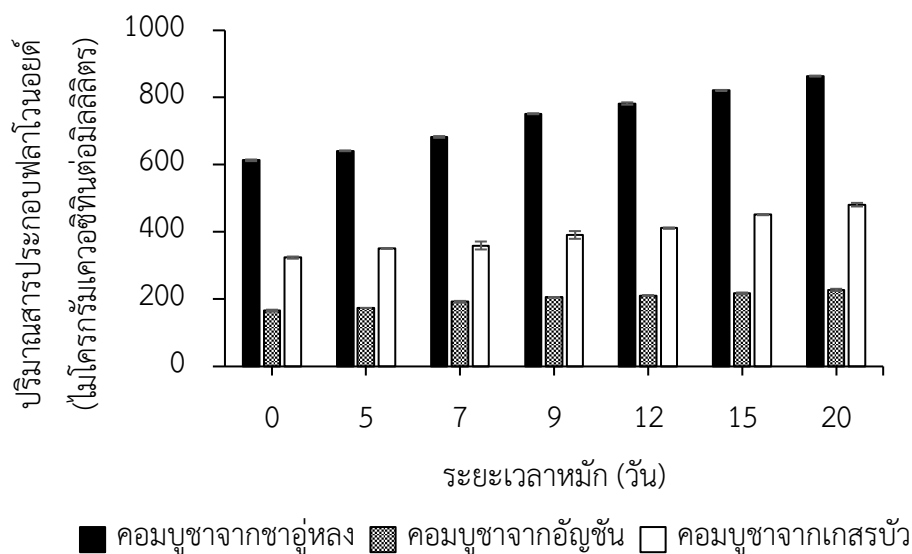
จากงานวิจัยของ Jayabalan *et al.*, (2008a) ได้ศึกษาการเปลี่ยนแปลงปริมาณของสารประกอบฟีนอลิกของคอมบูชาจากชาดำ ชาเขียวและกากชาในระหว่างกระบวนการหมัก พบว่าคอมบูชาทั้งสามชนิดมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกเพิ่มขึ้นในระหว่างกระบวนการหมัก และงานวิจัยของ Sun *et al.*, (2014) ศึกษาชนิดและปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระของคอมบูชาที่ผลิตจากการนำชาดำไปหมักร่วมกับน้ำตาลอ่อนข้าวสาลีคั้นสดในอัตราส่วนผสมที่แตกต่างกัน บ่มที่อุณหภูมิ 21 ± 1 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 12 วัน โดยวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดโดยวิธี Folin-Ciocalteu colorimetric method ศึกษาปริมาณฟลาโวนอยด์รวมถึงชนิดของสารประกอบฟีนอลิกด้วยเครื่อง HPLC พบว่าคอมบูชาจากชาดำและต้นอ่อนข้าวสาลีมีส่วนประกอบของกรดฟีนอลิกหลายชนิดโดยประกอบด้วยคาเฟอิก (Caffeic) เป็นส่วนใหญ่ พบกรดแกลลิก (Gallic acid) กรดคลอโรเจนิค (Chlorogenic acid) กรดฟีรูลิก (Ferulic acid) รุทีน (Rutin) และคาเทชิน (Catechin) ซึ่งสารประกอบฟีนอลิกเหล่านี้มีปริมาณสูงขึ้นตามระยะเวลาการหมักเช่นเดียวกันกับปริมาณสารประกอบฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ของคอมบูชาจากชาอู่หลง คอมบูชาจากเกสรบัวหลวงและคอมบูชาจากอัญชัน (รูปที่ 4.7 และรูปที่ 4.8) นอกจากนี้ผลการทดลองดังกล่าวยังสอดคล้องกับการทดลองของ Pure A.E. and Pure M.E. (2016) ได้ทำการศึกษาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกของคอมบูชาจากเปลือกกล้วย ตำแย และชาดำ โดยหมักเป็นระยะเวลา 21 วัน พบว่าคอมบูชาจากชาดำ ตำแยและเปลือกกล้วยมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกเท่ากับ 265.5, 188 และ 155 ppmGAE

ตามลำดับ โดยมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกต่างจากน้ำชาดำ ชาดำแยมและชาเปลือกกล้วยที่ไม่ผ่านกระบวนการหมัก ซึ่งน้ำชาเหล่านี้มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกเท่ากับ 530.5, 173 และ 136.5 ppmGAE ซึ่งการนำสมุนไพรไปหมักเป็นเครื่องดื่มคอมบูชาทำให้สารประกอบฟีนอลิกมีปริมาณเพิ่มมากขึ้น

จากการวิเคราะห์คุณภาพทางเคมีและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของคอมบูชาทั้งสามชนิดพบว่าคอมบูชาจากอัญชันมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH และ ABTS ใกล้เคียงหรือสูงกว่าคอมบูชาจากชาอู่หลงซึ่งปกติจะใช้ชาอู่หลงหมักเป็นคอมบูชาทางการค้า



รูปที่ 4.7 การเปลี่ยนแปลงปริมาณสารประกอบฟีนอลิกในระหว่างกระบวนการหมักของคอมบูชาจากชาอู่หลง คอมบูชาจากเกสรบัวหลวงและคอมบูชาจากอัญชัน หมักที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 20 วัน



รูปที่ 4.8 การเปลี่ยนแปลงปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ในระหว่างกระบวนการหมักของคอมบูชาจากชาอู่หลง คอมบูชาจากเกสรบัวหลวงและคอมบูชาจากอัญชัน หมักที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 20 วัน

4.2.3 การทดสอบทางประสาทสัมผัส

เมื่อตัวอย่างคอมบูชาจากชาอู่หลง คอมบูชาจากเกสรบัวและคอมบูชาจากอัญชันที่หมักเป็นระยะเวลา 5, 7, 9, 12, 15 และ 20 วัน ผ่านการพาสเจอร์ไรซ์ที่อุณหภูมิ 85 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที มาทดสอบการยอมรับของผู้บริโภคที่มีต่อผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มคอมบูชา โดยใช้วิธีการประเมินทางประสาทสัมผัส โดยใช้การให้คะแนนแบบ 9-Point Hedonic Scale และใช้ผู้ทดสอบชิมทั้งหมด 30 คน ทำการประเมินทางประสาทสัมผัสในด้านสี กลิ่น ความเปรี้ยว ความหวาน ความกลมกล่อม และความชอบรวม ได้ผลดังตารางที่ 4.14 ผู้เข้าร่วมการทดสอบจะให้คะแนนตั้งแต่ 1 ถึง 9 คะแนน โดยที่คะแนนที่ 1 หมายถึง ไม่ชอบมากที่สุด, 2 หมายถึง ไม่ชอบมาก, 3 หมายถึง ไม่ชอบปานกลาง, 4 หมายถึง ไม่ชอบเล็กน้อย, 5 หมายถึง เฉย ๆ, 6 หมายถึง ชอบเล็กน้อย, 7 หมายถึง ชอบปานกลาง, 8 หมายถึง ชอบมาก และ 9 หมายถึง ชอบมากที่สุด

4.2.3.1 ด้านสี

คอมบูชาจากชาอู่หลง คอมบูชาจากเกสรบัวหลวงและคอมบูชาจากอัญชัน มีคะแนนความชอบด้านสีลดลงเล็กน้อยเมื่อหมักนานขึ้น โดยคอมบูชาจากชาอู่หลง คอมบูชาจากเกสรบัวหลวงและคอมบูชาจากอัญชันมีคะแนนความพึงพอใจในด้านสีในวันสุดท้ายของการหมักในระดับชอบปานกลางถึงชอบมาก โดยมีคะแนน 7.27, 7.10 และ 7.67 ตามลำดับ

4.2.3.2 ด้านกลิ่น

คอมบูชาจากชาอู่หลง คอมบูชาจากเกสรบัวหลวงและคอมบูชาจากอัญชัน มีคะแนนความชอบด้านกลิ่นลดลงเล็กน้อยเมื่อหมักนานขึ้น โดยคอมบูชาจากชาอู่หลง คอมบูชาจากเกสรบัวหลวงและคอมบูชาจากอัญชันมีคะแนนความพึงพอใจในด้านกลิ่นในวันสุดท้ายของการหมักในระดับเฉย ๆ ถึงชอบปานกลาง โดยมีคะแนน 5.23, 5.70 และ 6.17 ตามลำดับ

4.2.3.3 ด้านรสเปรี้ยว

คอมบูชาจากชาอู่หลง คอมบูชาจากเกสรบัวหลวงและคอมบูชาจากอัญชัน มีคะแนนความชอบด้านความเปรี้ยวลดลงเมื่อหมักนานขึ้น โดยคอมบูชาจากชาอู่หลง คอมบูชาจากเกสรบัวหลวงและคอมบูชาจากอัญชันมีคะแนนความพึงพอใจในด้านความเปรี้ยวในวันสุดท้ายของการหมักในระดับไม่ชอบเล็กน้อย โดยมีคะแนน 4.20, 4.37 และ 4.83 ตามลำดับ

4.2.3.4 ด้านรสหวาน

คอมบูชาจากชาอู่หลง คอมบูชาจากเกสรบัวหลวงและคอมบูชาจากอัญชัน มีคะแนนความชอบด้านความหวานลดลงเมื่อหมักนานขึ้น โดยคอมบูชาจากชาอู่หลง คอมบูชาจากเกสรบัวหลวงและคอมบูชาจากอัญชันมีคะแนนความพึงพอใจในด้านความหวานในวันสุดท้ายของการหมักในระดับไม่ชอบเล็กน้อยถึงเฉย ๆ โดยมีคะแนน 4.57, 4.57 และ 4.90 ตามลำดับ

4.2.3.5 ด้านความกลมกล่อม

คอมบูชาจากชาอู่หลง คอมบูชาจากเกสรบัวหลวงและคอมบูชาจากอัญชัน มีคะแนนความชอบด้านความกลมกล่อมลดลงเมื่อหมักนานขึ้น โดยคอมบูชาจากชาอู่หลง คอมบูชาจากเกสรบัวหลวงและคอมบูชาจากอัญชันมีคะแนนความพึงพอใจในด้านความกลมกล่อมในวันสุดท้ายของการหมักในระดับไม่ชอบเล็กน้อยถึงเฉย ๆ โดยมีคะแนน 4.47, 4.73 และ 5.03 ตามลำดับ

4.2.3.6 ด้านความชอบโดยรวม

คอมบูชาจากชาอู่หลง คอมบูชาจากเกสรบัวหลวงและคอมบูชาจากอัญชัน มีคะแนนความชอบด้านความชอบโดยรวมลดลงเมื่อหมักนานขึ้น โดยคอมบูชาจากชาอู่หลง คอมบูชาจากเกสรบัวหลวงและคอมบูชาจากอัญชันมีคะแนนความพึงพอใจในด้านความชอบโดยรวมในวันสุดท้ายของการหมักในระดับไม่ชอบเล็กน้อยถึงเฉย ๆ โดยมีคะแนน 4.57, 4.97 และ 5.37 ตามลำดับ คอมบูชาจากอัญชันที่หมักเป็นระยะเวลา 5 ถึง 12 วันได้รับคะแนนความพึงพอใจอยู่ในระดับชอบปานกลางถึงชอบมากโดยได้รับคะแนนความพึงพอใจในช่วง 7.03 ถึง 7.50 ในขณะที่คอมบูชาจากชาอู่หลงได้รับคะแนนความพึงพอใจสูงสุดเท่ากับ 6.47 (หมัก 5 วัน)

จากผลการประเมินความพึงพอใจของผู้บริโภคโดยการประเมินทางประสาทสัมผัสจากตารางที่ 4.14 สรุปได้ว่าผลิตภัณฑ์ที่หมักเป็นระยะเวลาานอาจจะมีผลต่อคะแนนความพึงพอใจของผู้บริโภค โดยเฉพาะคอมบูชาที่หมักเป็นระยะเวลา 20 วันได้รับคะแนนความพึงพอใจของผู้บริโภคต่ำสุดผู้บริโภคมีแนวโน้มในการยอมรับคอมบูชาที่หมักเป็นระยะเวลาไม่เกิน 15 วัน ซึ่งอยู่ในระดับชอบปานกลาง ผลิตภัณฑ์คอมบูชาเป็นผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากกระบวนการหมักโดยจุลินทรีย์ซึ่งอาจส่งผลต่อคุณภาพทางประสาทสัมผัสในด้าน สี กลิ่น รสชาติและลักษณะเนื้อสัมผัสทำให้การยอมรับของผู้บริโภคลดลงได้ (Umme *et al.*, 2001) นอกจากนี้ยังมีปัจจัยอื่น ๆ ที่ส่งผลต่อคะแนนความพึงพอใจของผู้บริโภคที่มีต่อตัวอย่าง เช่น อุณหภูมิและเวลาในการฆ่าเชื้อ รวมถึงอุณหภูมิและระยะเวลาในการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ เป็นต้น (Shaw *et al.*, 1993; Umme *et al.*, 2001)

ในการศึกษาต่อไปได้คัดเลือกคอมบูชาจากอัญชันที่หมักเป็นเวลา 12 วัน ซึ่งมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH และ ABTS สูง ผู้บริโภคมีความพึงพอใจในผลิตภัณฑ์พอสมควร นำมาศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระภายในเซลล์ เปรียบเทียบกับคอมบูชาจากชาอู่หลงที่หมักเป็นเวลาเท่ากัน ซึ่งเป็นคอมบูชาที่นิยมหมักทางการค้า

ตารางที่ 4.14 การทดสอบทางประสาทสัมผัสของคอมบูชาจากชาอู่หลง คอมบูชาจากเกสรบัวหลวงและคอมบูชาจากอัญชันที่หมักในระยะเวลาที่แตกต่างกัน

ชนิดของคอมบูชา	คะแนนความพึงพอใจของผู้บริโภค						
	ระยะเวลาหมัก	สี	กลิ่น	ความเปรี้ยว	ความหวาน	ความกลมกล่อม	ความชอบโดยรวม
คอมบูชา จาก ชาอู่หลง	5	7.40 ^a ±1.248	6.37 ^{ab} ±1.732	6.03 ^a ±1.671	6.60 ^a ±1.380	6.37 ^a ±1.650	6.47 ^a ±1.548
	7	7.23 ^a ±1.331	6.23 ^{ab} ±1.695	5.80 ^{ab} ±1.495	6.03 ^{ab} ±1.402	5.97 ^{ab} ±1.273	6.10 ^{ab} ±1.125
	9	7.03 ^a ±1.586	6.17 ^{ab} ±1.533	5.93 ^{ab} ±1.741	5.63 ^b ±1.497	5.83 ^{ab} ±1.642	5.93 ^{ab} ±1.617
	12	6.87 ^a ±1.655	5.73 ^{ab} ±1.701	5.20 ^{abc} ±2.172	5.27 ^{bc} ±1.837	5.37 ^{bc} ±1.771	5.40 ^{bc} ±1.714
	15	7.27 ^a ±1.484	5.60 ^{ab} ±1.734	4.87 ^{bc} ±2.209	5.20 ^{bc} ±1.827	4.90 ^c ±1.729	5.00 ^c ±1.640
	20	7.27 ^a ±1.413	5.23 ^b ±2.128	4.20 ^c ±2.172	4.57 ^c ±2.079	4.47 ^c ±2.080	4.57 ^c ±2.176
คอมบูชา จาก เกสรบัวหลวง	5	7.17 ^a ±1.367	7.13 ^a ±1.332	6.37 ^a ±1.732	6.87 ^a ±1.676	6.83 ^a ±1.599	7.07 ^a ±1.437
	7	7.03 ^a ±1.299	6.83 ^a ±1.555	6.67 ^{ab} ±1.626	6.63 ^a ±1.474	6.80 ^a ±1.518	7.10 ^a ±1.423
	9	7.00 ^a ±1.287	6.00 ^b ±1.702	5.87 ^{ab} ±1.676	6.33 ^a ±1.668	6.27 ^a ±1.311	6.47 ^a ±1.432
	12	7.00 ^a ±1.313	5.97 ^b ±1.650	5.60 ^b ±1.694	6.07 ^a ±1.311	6.23 ^a ±1.431	6.37 ^a ±1.474
	15	7.17 ^a ±1.392	5.93 ^b ±1.617	4.33 ^c ±2.264	4.87 ^b ±1.995	5.27 ^b ±1.874	5.43 ^b ±1.888
	20	7.10 ^a ±1.322	5.70 ^b ±1.664	4.37 ^c ±2.125	4.57 ^b ±1.736	4.73 ^b ±1.660	4.97 ^b ±1.691

หมายเหตุ

- ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (จำนวน 3 ซ้ำ)
- เมื่อพิจารณาคอมบูชาชนิดเดียวกัน ^{a,b,c} ตัวอักษรแตกต่างกันในแนวตั้งแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p \leq 0.05$)

ตารางที่ 4.14 (ต่อ) การยอมรับของผู้บริโภคในด้านสีที่มีต่อผลิตภัณฑ์คอมบูชาจากชาอุหลง คอมบูชาจากเกสรบัวหลวงและคอมบูชาจากอัญชัน

ชนิดของคอมบูชา	คะแนนความพึงพอใจของผู้บริโภค						
	ระยะเวลาหมัก	สี	กลิ่น	ความเปรี้ยว	ความหวาน	ความกลมกล่อม	ความชอบโดยรวม
คอมบูชา จากอัญชัน	5	7.77 ^a ±1.006	6.83 ^a ±1.487	6.67 ^a ±1.626	7.13 ^a ±1.502	7.20 ^a ±1.215	7.50 ^a ±1.196
	7	7.77 ^a ±1.040	6.83 ^a ±1.315	6.57 ^a ±1.695	6.70 ^a ±1.418	6.97 ^a ±1.542	7.03 ^a ±1.377
	9	7.77 ^a ±0.935	6.57 ^a ±1.406	6.87 ^a ±1.548	7.07 ^a ±1.172	7.10 ^a ±1.185	7.37 ^a ±1.098
	12	7.73 ^a ±0.944	6.33 ^a ±1.373	6.37 ^a ±1.903	6.60 ^a ±1.567	6.77 ^a ±1.331	7.00 ^a ±1.287
	15	7.77 ^a ±1.006	6.37 ^a ±1.450	5.10 ^b ±2.234	5.23 ^b ±1.870	5.60 ^b ±1.940	5.83 ^b ±2.086
	20	7.67 ^a ±1.028	6.17 ^a ±1.416	4.83 ^b ±2.119	4.90 ^b ±1.826	5.03 ^b ±1.810	5.37 ^b ±1.790

หมายเหตุ

- ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (จำนวน 3 ซ้ำ)
- เมื่อพิจารณาคอมบูชาชนิดเดียวกัน ^{a,b,c} ตัวอักษรแตกต่างกันในแนวตั้งแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p < 0.05$)

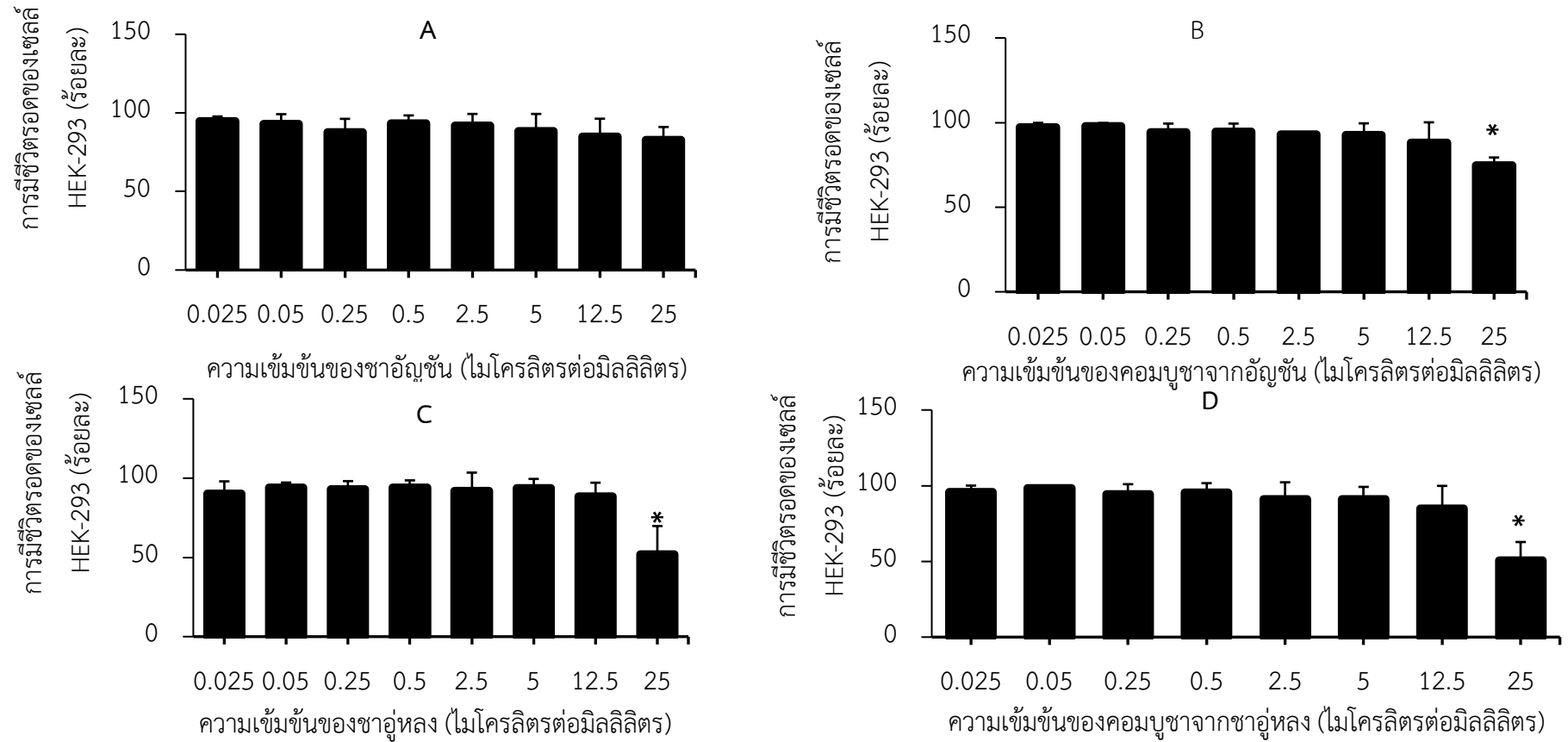
4.3 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระภายในเซลล์ของเครื่องดื่มคอมบูชา

4.3.1 ความเป็นพิษต่อเซลล์

ก่อนการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระภายในเซลล์ของสิ่งมีชีวิต จำเป็นต้องศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ของตัวอย่างเสียก่อน เพื่อหาความเข้มข้นของคอมบูชาที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ จากการนำคอมบูชาจากชาอู่หลงและคอมบูชาจากอัญชันที่หมักเป็นระยะเวลา 12 วัน ชาอู่หลงและชาอัญชันที่ไม่ผ่านกระบวนการหมัก ทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ (Cytotoxicity testing) ในเซลล์ HEK-293 เนื่องจากเซลล์ชนิดนี้เป็นเซลล์ปกติและมีการศึกษาถึงฤทธิ์ต้านออกซิเดชันอย่างแพร่หลาย

เมื่อนำชาอู่หลงที่ไม่ผ่านกระบวนการหมัก ชาอัญชันที่ไม่ผ่านกระบวนการหมัก คอมบูชาจากชาอู่หลงและคอมบูชาจากอัญชันความเข้มข้น 0.025 ถึง 25 ไมโครลิตรต่อมิลลิลิตร ใส่ลงในตัวอย่างเซลล์ HEK-293 ความเข้มข้น 1×10^4 เซลล์ต่อหลุม ได้ผลการทดลองดังรูปที่ 4.9 พบว่าชาอัญชันที่ไม่ผ่านกระบวนการหมักที่ระดับความเข้มข้น 0.025 ถึง 25 ไมโครลิตรต่อมิลลิลิตร ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ HEK-293 ที่ใช้ทดสอบ (รูปที่ 4.9 A) โดยชาอัญชันที่ไม่ผ่านกระบวนการหมักความเข้มข้นน้อยกว่า 25 ไมโครลิตรต่อมิลลิลิตร มีจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตมากกว่าร้อยละ 90 เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (Control) ขณะที่คอมบูชาจากอัญชันที่ระดับความเข้มข้น 0.025 ถึง 12.5 ไมโครลิตรต่อมิลลิลิตร ชาอู่หลงที่ไม่ผ่านกระบวนการหมักและคอมบูชาจากชาอู่หลงไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ HEK-293 ที่ใช้ทดสอบ (รูปที่ 4.9 B-D) โดยชาอู่หลงที่ไม่ผ่านกระบวนการหมัก คอมบูชาจากชาอู่หลงและคอมบูชาจากอัญชันที่ความเข้มข้นน้อยกว่า 12.5 ไมโครลิตรต่อมิลลิลิตร มีจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตมากกว่าร้อยละ 90 เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (Control) เมื่อความเข้มข้นของชาอู่หลงที่ไม่ผ่านกระบวนการหมัก คอมบูชาจากชาอู่หลงและคอมบูชาจากอัญชันเพิ่มขึ้นมากกว่าหรือเท่ากับ 25 ไมโครลิตรต่อมิลลิลิตร พบว่าจำนวนเซลล์ HEK-293 ที่มีชีวิตมีจำนวนลดลงเหลือน้อยกว่าร้อยละ 80 เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม

ดังนั้นจึงเลือกชาอู่หลงที่ไม่ผ่านกระบวนการหมัก ชาอัญชันที่ไม่ผ่านกระบวนการหมัก คอมบูชาจากชาอู่หลงและคอมบูชาจากอัญชันความเข้มข้น 5 และ 20 ไมโครลิตรต่อมิลลิลิตร เพื่อทำการทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชันในเซลล์ต่อไป เนื่องจากที่ความเข้มข้นดังกล่าวไม่เป็นพิษต่อเซลล์



รูปที่ 4.9 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ HEK-293 ของชาอัญชันที่ไม่ผ่านกระบวนการหมัก (A) คอมบูชาจากอัญชัน (B) ชาอู่หลงที่ไม่ผ่านกระบวนการหมัก (C) และคอมบูชาจากชาอู่หลง (D) (จำนวนครั้งของการทดลอง เท่ากับ 5 ครั้ง)* แสดงถึงแตกต่างจากชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p \leq 0.05$)

4.3.2 ฤทธิ์ด้านการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของคอมบูซาภายในเซลล์

4.3.2.1 การวัดปริมาณ Reactive oxygen species (ROS) ที่เกิดขึ้นภายในเซลล์ โดยใช้เครื่อง Fluorescent microplate reader

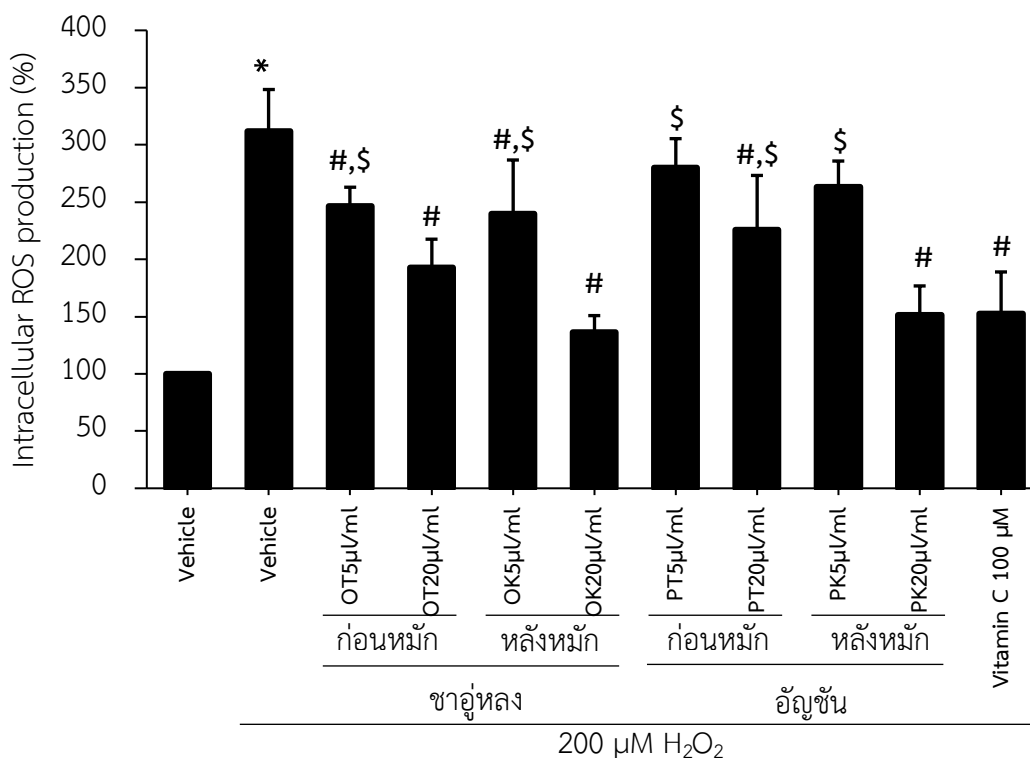
ในการทดลองนี้จะใช้ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) เป็นตัวกระตุ้นให้เกิดการสร้าง ROS และทำการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของคอมบูซา โดยดูว่าคอมบูซาสามารถลดการเกิด ROS ที่ถูกเหนี่ยวนำด้วย H_2O_2 ได้หรือไม่

จากการทดสอบฤทธิ์ด้านการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของคอมบูซาจากซาอู่หลง คอมบูซาจากอัญชัน ซาอู่หลงที่ไม่ผ่านกระบวนการหมักและซาอัญชันที่ไม่ผ่านกระบวนการหมัก ความเข้มข้น 5 และ 20 ไมโครลิตรต่อมิลลิลิตร พบว่าเมื่อเซลล์ HEK-293 ถูกกระตุ้นด้วย H_2O_2 ปริมาณ 200 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 2 ชั่วโมงจะทำให้ปริมาณของอนุมูลอิสระออกซิเจนเพิ่มขึ้นภายในเซลล์ (Intracellular ROS production) อย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมซึ่งใช้ตัวทำละลาย Vehicle เพียงอย่างเดียว (รูปที่ 4.10)

จากผลการทดลองในรูปที่ 4.10 เมื่อเซลล์ HEK-293 ได้รับคอมบูซาจากซาอู่หลง (OK) และซาอู่หลงที่ไม่ผ่านกระบวนการหมัก (OT) ความเข้มข้น 5 และ 20 ไมโครลิตรต่อมิลลิลิตร ก่อนที่จะถูกกระตุ้นด้วย H_2O_2 พบว่าคอมบูซาจากซาอู่หลง (OK) และซาอู่หลงที่ไม่ผ่านกระบวนการหมัก (OT) มีแนวโน้มที่จะลดปริมาณของ ROS ที่เกิดขึ้นภายในเซลล์ได้อย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งฤทธิ์ในการยับยั้งการสร้างอนุมูลอิสระ ROS ของคอมบูซาจากซาอู่หลงและซาอู่หลงที่ไม่ผ่านกระบวนการหมักที่ความเข้มข้น 20 ไมโครลิตรต่อมิลลิลิตร ใกล้เคียงกับฤทธิ์ของกรดแอสคอร์บิก (สารต้านอนุมูลอิสระ) ที่ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

เมื่อเซลล์ HEK-293 ได้รับคอมบูซาจากอัญชัน (PK) และซาอัญชันที่ไม่ผ่านกระบวนการหมัก (PT) ความเข้มข้น 5 ไมโครลิตร ก่อนที่จะถูกกระตุ้นด้วย H_2O_2 พบว่าคอมบูซาจากอัญชันและซาอัญชันที่ไม่ผ่านกระบวนการหมัก ไม่มีผลลดปริมาณของ ROS ที่เกิดขึ้นภายในเซลล์ แต่เมื่อความเข้มข้นของคอมบูซาจากอัญชันและซาอัญชันที่ไม่ผ่านกระบวนการหมักเพิ่มขึ้นเป็น 20 ไมโครลิตรต่อมิลลิลิตร พบว่าสามารถลดปริมาณ ROS ที่เกิดขึ้นได้อย่างมีนัยสำคัญ (รูปที่ 4.10) ซึ่งฤทธิ์ในการยับยั้งการสร้างอนุมูลอิสระ ROS ของคอมบูซาจากอัญชันความเข้มข้น 20 ไมโครลิตรต่อมิลลิลิตร ใกล้เคียงกับฤทธิ์ของกรดแอสคอร์บิกที่ความเข้มข้น 10 ไมโครลิตรต่อมิลลิลิตร

ดังนั้นคอมบูซาจากซาอู่หลง ซาอู่หลงที่ไม่ผ่านกระบวนการหมักและคอมบูซาจากอัญชัน ความเข้มข้น 20 ไมโครลิตรสามารถลดปริมาณ ROS ที่เกิดขึ้นได้อย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งมีฤทธิ์ใกล้เคียงกับกรดแอสคอร์บิก



รูปที่ 4.10 ฤทธิ์ต้านการออกซิเดชันของคอมบูชา โดยการวัดปริมาณ ROS ภายในเซลล์ด้วย fluorescent reader (จำนวนครั้งการทดลองเท่ากับ 5 ครั้ง) โดยให้ Vehicle คือ เซลล์ HEK-293 ที่ไม่ได้รับตัวอย่าง (ชุดควบคุม), OK คือ คอมบูชาจากชาอู่หลง, OT คือ ชาอู่หลงที่ไม่ผ่านกระบวนการหมัก, PK คือ คอมบูชาจากอัญชัน และ PT คือ ชาอัญชันที่ไม่ผ่านกระบวนการหมัก

หมายเหตุ

- * หมายถึงแตกต่างจากเซลล์ที่ไม่ได้รับตัวอย่าง (Vehicle) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p \leq 0.05$)
- # หมายถึงแตกต่างจากเซลล์ที่ได้รับ H_2O_2 ความเข้มข้น 200 ไมโครโมลาร์ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p \leq 0.05$)
- \$ หมายถึงแตกต่างจากเซลล์ที่ได้รับกรดแอสคอร์บิกความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p \leq 0.05$)
- ค่าเฉลี่ย \pm ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (จำนวน 5 ซ้ำ)

4.3.3 ผลของคอมบูชาต่อการสร้าง mRNA ของยีนต้านอนุมูลอิสระ (mRNA gene expression)

จากผลการศึกษาข้างต้น จะเห็นว่าคอมบูชาจากชาอู่หลง คอมบูชาจากอัญชัน ชาอู่หลงที่ไม่ผ่านกระบวนการหมักและชาอัญชันที่ไม่ผ่านกระบวนการหมักที่ความเข้มข้น 20 ไมโครลิตรต่อ

มิลลิลิตร สามารถปริมาณของ ROS ที่เกิดขึ้นภายในเซลล์ได้ แสดงให้เห็นว่าคอมบูชาและชาจากสมุนไพรดังกล่าวมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ดังนั้นจึงนำคอมบูชาและชาจากสมุนไพรเหล่านี้มาศึกษาทดลองในการออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ โดยวัดปริมาณ mRNA ของยีนต้านอนุมูลอิสระต่าง ๆ เช่น คตะเลส (Catalase, CAT) กลูต้าไธโอนเพอรอกซิเดส (Glutathione peroxidases-1, GPx-1) ฮีโมออกซีจีเนส (Heme oxygenase-1, HO-1) แมงกานีสซูเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเทส (Manganese superoxide dismutases, Mn-SOD) และกลูต้าไธโอนรีดักเทส (Glutathione reductase, GRe) เป็นต้น ซึ่งสารสำคัญที่พบได้ในคอมบูชาและชาจากสมุนไพรอาจมีผลเพิ่มการสร้างเอนไซม์ต่าง ๆ นี้ได้และได้ผลการทดลองดังรูปที่ 4.11

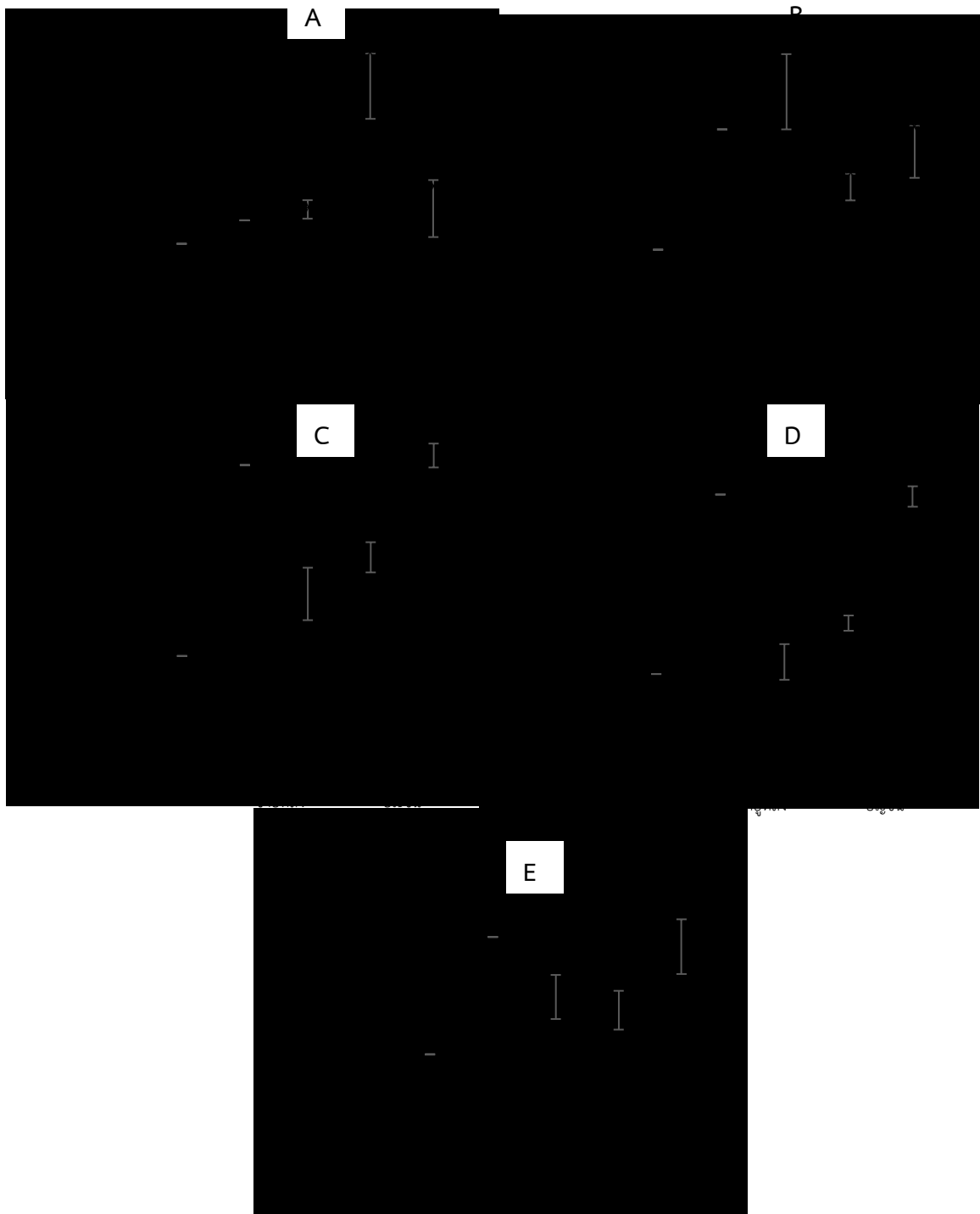
เมื่อกระตุ้นเซลล์ HEK-293 ด้วยคอมบูชาจากชาอู่หลง (OK) คอมบูชาจากอัญชัน (PK) และชาอัญชันที่ไม่ผ่านกระบวนการหมัก (PT) ที่ความเข้มข้น 20 ไมโครลิตรต่อมิลลิลิตร พบว่าสามารถเพิ่มการสร้าง mRNA (mRNA expression) ของ CAT ได้อย่างมีนัยสำคัญ (รูปที่ 4.11A) เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (Vehicle) ในขณะที่ชาอู่หลงที่ไม่ผ่านกระบวนการหมัก (OT) ที่ความเข้มข้น 20 ไมโครลิตรต่อมิลลิลิตร ไม่มีผลต่อการสร้าง mRNA ของ CAT

เมื่อกระตุ้นเซลล์ HEK-293 ด้วยคอมบูชาจากชาอู่หลง (OK) ชาอู่หลงที่ไม่ผ่านกระบวนการหมัก (OT) คอมบูชาจากอัญชัน (PK) และชาอัญชันที่ไม่ผ่านกระบวนการหมัก (PT) ที่ความเข้มข้น 20 ไมโครลิตรต่อมิลลิลิตร พบว่าสามารถเพิ่มการสร้าง mRNA (mRNA expression) ของ GRe ได้อย่างมีนัยสำคัญ (รูปที่ 4.11B) เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (Vehicle)

เมื่อกระตุ้นเซลล์ HEK-293 ด้วยคอมบูชาจากชาอู่หลง (OK) ชาอู่หลงที่ไม่ผ่านกระบวนการหมัก (OT) คอมบูชาจากอัญชัน (PK) และชาอัญชันที่ไม่ผ่านกระบวนการหมัก (PT) ที่ความเข้มข้น 20 ไมโครลิตรต่อมิลลิลิตร พบว่าสามารถเพิ่มการสร้าง mRNA (mRNA expression) ของ HO-1 ได้อย่างมีนัยสำคัญ (รูปที่ 4.11C) เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (Vehicle)

เมื่อกระตุ้นเซลล์ HEK-293 ด้วยชาอู่หลงที่ไม่ผ่านกระบวนการหมัก (OT) คอมบูชาจากอัญชัน (PK) และชาอัญชันที่ไม่ผ่านกระบวนการหมัก (PT) ที่ความเข้มข้น 20 ไมโครลิตรต่อมิลลิลิตร พบว่าสามารถเพิ่มการสร้าง mRNA (mRNA expression) ของ Mn-SOD ได้อย่างมีนัยสำคัญ (รูปที่ 4.11D) เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (Vehicle) ในขณะที่คอมบูชาจากชาอู่หลง (OK) ที่ความเข้มข้น 20 ไมโครลิตรต่อมิลลิลิตร ไม่มีผลต่อการสร้าง mRNA ของ Mn-SOD

เมื่อกระตุ้นเซลล์ HEK-293 ด้วยคอมบูชาจากชาอู่หลง (OK) ชาอู่หลงที่ไม่ผ่านกระบวนการหมัก (OT) และคอมบูชาจากอัญชัน (PK) ที่ความเข้มข้น 20 ไมโครลิตรต่อมิลลิลิตร พบว่าสามารถเพิ่มการสร้าง mRNA (mRNA expression) ของ GPx-1 ได้อย่างมีนัยสำคัญ (รูปที่ 4.11E) เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (Vehicle) ในขณะที่ชาอัญชันที่ไม่ผ่านกระบวนการหมัก (PT) ที่ความเข้มข้น 20 ไมโครลิตรต่อมิลลิลิตร ไม่มีผลต่อการสร้าง mRNA ของ GPx-1



รูปที่ 4.11 การทดสอบฤทธิ์ของคอมบูชาจากชาอู่หลง (OK) คอมบูชาจากอัญชัน (PK) ชาอู่หลงที่ไม่ผ่านกระบวนการหมัก (OT) และชาอัญชันที่ไม่ผ่านกระบวนการหมัก (PT) ต่อการสร้าง mRNA ของ antioxidant enzymes (mRNA expression)

หมายเหตุ

- ค่าเฉลี่ย \pm ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (จำนวน 4 ซ้ำ)

- * หมายถึงแตกต่างจากกลุ่มควบคุม (Vehicle) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p \leq 0.05$)

4.4 ศึกษาคุณภาพของคอมบูชาจากอัญชันระหว่างการเก็บรักษา

4.4.1 คุณภาพทางเคมี

จากการผลิตคอมบูชาที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงในหัวข้อ 4.1- 4.3 พบว่าคอมบูชาจากอัญชันที่หมัก 12 วัน มีประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ABTS และอนุมูลอิสระออกซิเจนภายในเซลล์ จึงนำคอมบูชาจากอัญชันมาผลิตเป็นเครื่องดื่มคอมบูชาและฆ่าเชื้อผ่านวิธีพาสเจอร์ไรซ์ที่อุณหภูมิ 85 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาทีและศึกษาการเปลี่ยนแปลงในระหว่างการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์คอมบูชาที่อุณหภูมิห้อง เมื่อนำผลิตภัณฑ์คอมบูชาจากอัญชันที่ผ่านการฆ่าเชื้อศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางเคมี ได้แก่ พีเอช ปริมาณกรดทั้งหมด (ร้อยละกรดอะซิติก) ปริมาณเอทานอลและปริมาณน้ำตาลทั้งหมดในระหว่างการเก็บรักษาเป็นระยะเวลา 56 วัน เก็บตัวอย่างวิเคราะห์ผลทุก 14 วัน ได้ผลการทดลองดังตารางที่ 4.15

ตารางที่ 4.15 การเปลี่ยนแปลงคุณภาพทางเคมีของคอมบูชาจากอัญชันในระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 56 วัน

ระยะเวลาเก็บรักษา (วัน)	พีเอช	ปริมาณกรด ทั้งหมด (ร้อยละโดย ปริมาตร)	ปริมาณเอทานอล (ร้อยละโดย ปริมาตร)	ปริมาณน้ำตาล ทั้งหมด (กรัมต่อลิตร)
ก่อนผ่านการฆ่าเชื้อ	2.84 ^a ±0.04	1.09 ^a ±0.07	0.95 ^a ±0.01	26.36 ^a ±0.87
หลังผ่านการฆ่าเชื้อ	2.84 ^a ±0.02	1.09 ^a ±0.08	0.92 ^a ±0.03	25.67 ^a ±3.05
14	2.83 ^a ±0.05	1.10 ^a ±0.08	0.93 ^a ±0.04	26.33 ^a ±0.18
28	2.81 ^a ±0.05	1.07 ^a ±0.07	0.92 ^a ±0.02	25.62 ^a ±0.49
42	2.85 ^a ±0.04	1.12 ^a ±0.02	0.93 ^a ±0.01	25.23 ^a ±0.90
56	2.83 ^a ±0.05	1.09 ^a ±0.06	0.91 ^a ±0.03	25.57 ^a ±1.40

หมายเหตุ

- ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (จำนวน 3 ซ้ำ)
- a,b,c,d ตัวอักษรแตกต่างกันในแนวตั้งแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p \leq 0.05$)

จากผลการทดลองในตารางที่ 4.15 พบว่าค่าพีเอช ปริมาณกรดทั้งหมดในรูปกรดอะซิติก ปริมาณเอทานอลและปริมาณน้ำตาลทั้งหมดมีการเปลี่ยนแปลงเล็กน้อยตลอดระยะเวลาการเก็บรักษาเป็นเวลา 56 วัน โดยมีค่าพีเอชอยู่ในช่วง 2.81 ± 0.05 ถึง 2.85 ± 0.04 มีปริมาณกรดทั้งหมดในรูปกรดอะซิติกอยู่ในช่วงร้อยละ 1.09 ± 0.07 ถึง 1.12 ± 0.02 ปริมาณเอทานอลอยู่ในช่วงร้อยละ 0.91 ± 0.03 ถึง 0.95 ± 0.01 และมีปริมาณน้ำตาลทั้งหมดอยู่ในช่วง 25.23 ± 0.90 ถึง 26.36 ± 0.87 กรัมต่อลิตร

4.4.2 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH

เมื่อนำคอมบูชาจากอัญชันที่เก็บรักษาในระยะเวลาที่แตกต่างกันทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH พบว่าคอมบูชาจากอัญชันมีฤทธิ์การยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH ลดลงในระหว่างกระบวนการเก็บรักษาอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 (ตารางที่ 4.16)

ตารางที่ 4.16 การเปลี่ยนแปลงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของคอมบูชาจากอัญชันในระหว่างกระบวนการเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้องเป็นระยะเวลา 56 วัน

ระยะเวลาเก็บรักษา (วัน)	ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH	
	ค่าการดักจับอนุมูลอิสระ (เปอร์เซ็นต์)	IC ₅₀ (ไมโครลิตรต่อมิลลิลิตร)
ก่อนผ่านการฆ่าเชื้อ	$95.96^a \pm 1.75$	$18.33^e \pm 1.16$
หลังผ่านการฆ่าเชื้อ	$90.47^b \pm 0.46$	$25.29^d \pm 0.13$
14	$89.35^b \pm 0.25$	$27.75^c \pm 0.17$
28	$86.20^c \pm 0.46$	$28.50^c \pm 0.13$
42	$81.86^d \pm 2.05$	$31.72^b \pm 2.16$
56	$74.86^e \pm 2.18$	$35.73^a \pm 0.47$

หมายเหตุ

- ค่าเฉลี่ย \pm ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (จำนวน 3 ซ้ำ)
- a,b,c,d,e ตัวอักษรแตกต่างกันในแนวตั้งแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p \leq 0.05$)

จากผลการทดลองในตารางที่ 4.16 พบว่าฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของคอมบูชาจากดอกอัญชันมีแนวโน้มลดลงตามระยะเวลาในการเก็บรักษา โดยเริ่มต้นมีค่าการดักจับอนุมูลอิสระ DPPH ร้อยละ 90.47 ± 0.46 เมื่อเก็บรักษาเป็นเวลา 56 วัน ค่าการดักจับอนุมูลอิสระจะลดลงเหลือร้อยละ 74.86 ± 2.18 และมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

อาจเนื่องจากขวดที่ใช้บรรจุคอมบูชาเป็นขวดแก้วใส เมื่อโดนแสงในระหว่างการเก็บรักษามีผลทำให้ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ลดลง (Jayabalan *et al.*, 2008)

4.4.3 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิก

เมื่อนำคอมบูชาจากอัญชันศึกษาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกในระหว่างการเก็บรักษาพบว่าคอมบูชาจากดอกอัญชันมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกลดลง มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกเริ่มต้น 225.28 ± 1.12 ไมโครกรัมแกลลิกต่อมิลลิลิตร เมื่อเก็บรักษาเป็นเวลา 56 วัน พบว่าปริมาณสารประกอบฟีนอลิกลดลงเล็กน้อยเหลือ 220.99 ± 0.58 ไมโครกรัมแกลลิกต่อมิลลิลิตร เมื่อวิเคราะห์ทางสถิติ พบว่าคอมบูชาจากอัญชันมีปริมาณฟีนอลิกไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 (ตารางที่ 4.17) สอดคล้องกับการทดลองของ Jayabalan *et al.*, (2008) ซึ่งได้รายงานปริมาณสารประกอบฟีนอลิกของคอมบูชาจากชาดำจะมีค่าค่อนข้างคงที่ในระหว่างกระบวนการเก็บรักษาในขณะที่ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของคอมบูชาจากชาดำจะมีค่าลดลง ซึ่งฤทธิ์ทางชีวภาพของคอมบูชาจะขึ้นอยู่กับชนิดของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่เป็นองค์ประกอบของคอมบูชา รวมถึงอุณหภูมิที่อาจจะไม่เหมาะสมในระหว่างการเก็บรักษา

ตารางที่ 4.17 การเปลี่ยนแปลงสารประกอบฟีนอลิกของคอมบูชาจากอัญชันในระหว่างกระบวนการเก็บรักษา ที่อุณหภูมิห้องเป็นระยะเวลา 56 วัน

ระยะเวลาเก็บรักษา (วัน)	ปริมาณสารประกอบฟีนอลิก (ไมโครกรัมแกลลิกต่อมิลลิลิตร)
ก่อนผ่านการฆ่าเชื้อ	$231.55^a \pm 3.92$
หลังผ่านการฆ่าเชื้อ	$225.28^b \pm 1.12$
14	$224.27^{bc} \pm 0.10$
28	$222.66^{bc} \pm 1.12$
42	$223.69^{bc} \pm 0.50$
56	$220.99^c \pm 0.58$

หมายเหตุ

- ค่าเฉลี่ย \pm ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (จำนวน 3 ซ้ำ)
- a,b,c ตัวอักษรแตกต่างกันในแนวตั้งแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p \leq 0.05$)

4.4.4 ปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด ยีสต์และรา

เมื่อนำคอมบูชาจากดอกอัญชันศึกษาการเปลี่ยนแปลงของจุลินทรีย์ทั้งหมด ยีสต์และราในระหว่างการเก็บรักษาเป็นระยะเวลา 56 วัน พบว่า การฆ่าเชื้อด้วยวิธีพาสเจอร์ไรซ์ดังกล่าวสามารถ

ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยไม่พบการเจริญของจุลินทรีย์ตลอดอายุเวลาการเก็บรักษา

ตารางที่ 4.18 การเปลี่ยนแปลงของปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด ยีสต์และราในระหว่างการเก็บรักษาของคอมบูชาจากอัญชันที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 56 วัน

ระยะเวลาเก็บรักษา (วัน)	ปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด (CFU/ml)	ยีสต์และรา (CFU/ml)
ก่อนผ่านการฆ่าเชื้อ	2.33×10^7	7.87×10^6
หลังผ่านการฆ่าเชื้อ	N/A	N/A
14	N/A	N/A
28	N/A	N/A
42	N/A	N/A
56	N/A	N/A

หมายเหตุ N/A หมายถึง ไม่พบการเจริญของจุลินทรีย์

จากผลการทดลองในตารางที่ 4.18 พบว่าคอมบูชาจากอัญชันที่ผ่านกระบวนการหมักเป็นระยะเวลา 12 วัน มีปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดเท่ากับ 2.33×10^7 CFU ต่อมิลลิลิตร และมีปริมาณยีสต์ราเท่ากับ 7.87×10^6 CFU ต่อมิลลิลิตร คอมบูชาจากอัญชันที่ผ่านการฆ่าเชื้อด้วยวิธีพาสเจอร์ไรซ์ที่อุณหภูมิ 85 องศาเซลเซียส 15 นาที เก็บรักษาเป็นเวลา 56 วัน ไม่พบการเจริญของจุลินทรีย์ ซึ่งการเปลี่ยนแปลงคุณภาพทางจุลินทรีย์นั้นนอกจากจะขึ้นอยู่กับอุณหภูมิที่ใช้ในการฆ่าเชื้อแล้ว ยังขึ้นอยู่กับปัจจัยอื่น ๆ ได้แก่ ชนิดของภาชนะที่บรรจุ อุณหภูมิและระยะเวลาในการเก็บรักษา (Umme *et al.*, 2001) กระบวนการใช้ความร้อนในการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ในเครื่องดื่มที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเป็นอีกหนึ่งวิธีที่สามารถทำได้ง่าย รวดเร็วและมีประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ การฆ่าเชื้อด้วยความร้อนในงานวิจัยต่าง ๆ เช่น งานวิจัยของ Singh-Khurdiya *et al.*, (1996) ศึกษาการเปลี่ยนแปลงคุณภาพทางจุลินทรีย์ในระหว่างกระบวนการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์น้ำฝรั่งอัดลมบรรจุขวดแก้วที่พาสเจอร์ไรซ์ด้วยอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสนาน 30 นาที พบว่าเครื่องดื่มที่ได้ตรวจไม่พบปริมาณจุลินทรีย์ และสามารถเก็บรักษาได้นาน 3 เดือนที่อุณหภูมิห้อง (23-41 องศาเซลเซียส) โดยยังคงได้รับการยอมรับทางประสาทสัมผัสด้านสี รสชาติและการยอมรับโดยรวม จากงานวิจัยของ Yoem *et al.*, (2000) ได้ศึกษาคุณภาพทางจุลินทรีย์ของน้ำส้มภายหลังการให้ความร้อนระดับพาสเจอร์ไรซ์โดยให้น้ำส้มไหลผ่านแผ่นแลกเปลี่ยนความร้อนที่อุณหภูมิ 94.6 องศาเซลเซียสนาน 30 วินาที บรรจุในขวดพลาสติก แล้วเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส พบว่าน้ำส้มมีปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด 6 log

CFU/ml และภายหลังการพาสเจอร์ไรซ์มีปริมาณจุลินทรีย์ลดลงน้อยกว่า 1 log CFU/ml ตลอดระยะเวลาการเก็บรักษา 112 วัน จากผลการทดลองในหัวข้อ 4.4 จะพบว่า การฆ่าเชื้อคอมบูชาจากอัญชันด้วยวิธีพาสเจอร์ไรซ์ที่อุณหภูมิ 85 องศาเซลเซียส เวลา 15 นาที มีประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์โดยไม่พบการเปลี่ยนแปลงทางเคมีและทางจุลินทรีย์ระหว่างการเก็บรักษา (56 วัน) แต่การฆ่าเชื้อด้วยความร้อนรวมถึงการเก็บรักษาเป็นระยะเวลานาน อาจมีผลให้ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและปริมาณสารประกอบฟีนอลิกมีค่าลดลง

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

จากการคัดเลือกสมุนไพรจำนวน 10 ชนิด ได้แก่ เกสรบัวหลวง เก่าก็ ไบยานาง ใบหม่อน กระเจี๊ยบ ตะไคร้ มะตูม หล่อฮังก้วย อัญชันและชาอู่หลง มาผลิตเป็นเครื่องดื่มคอมบูชาและศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระภายนอกและภายในเซลล์ การเปลี่ยนแปลงทางกายภาพระหว่างกระบวนการหมักและอายุการเก็บรักษา สามารถสรุปผลการทดลองได้ดังนี้

1. การคัดเลือกสมุนไพรที่สามารถผลิตเครื่องดื่มคอมบูชาที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูง

จากการหมักคอมบูชาจากสมุนไพร 10 ชนิด พบว่าคอมบูชาจากชาอู่หลง คอมบูชาจากอัญชันและคอมบูชาจากเกสรบัวที่หมักร่วมกับหัวเชื้อคอมบูชาทางการค้าเป็นระยะเวลา 10 วัน มีประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH และอนุมูลอิสระ ABTS สูงกว่าคอมบูชาที่ผลิตจากสมุนไพรชนิดอื่น นอกจากนี้ยังมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ในปริมาณสูงเช่นกัน โดยคอมบูชาจากชาอู่หลงมีค่าการดักจับอนุมูลอิสระ DPPH เท่ากับร้อยละ 96.68 ± 0.28 และมีค่า IC_{50} เท่ากับ 17.54 ± 0.51 ไมโครลิตรต่อมิลลิลิตร คอมบูชาจากอัญชันมีค่าการดักจับอนุมูลอิสระ DPPH เท่ากับร้อยละ 95.68 ± 0.57 และมีค่า IC_{50} เท่ากับ 20.61 ± 0.35 ไมโครลิตรต่อมิลลิลิตร คอมบูชาจากเกสรบัวหลวงมีค่าการดักจับอนุมูลอิสระ DPPH เท่ากับร้อยละ 94.76 ± 0.22 และมีค่า IC_{50} เท่ากับ 26.77 ± 0.36 ไมโครลิตรต่อมิลลิลิตร ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระดังกล่าวอาจเป็นผลเนื่องจากชนิดและปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระส่วนใหญ่ในกลุ่มสารประกอบฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ที่เป็นองค์ประกอบในสมุนไพรที่นำมาใช้ในการหมักคอมบูชา ได้แก่ คาเทชินที่เป็นองค์ประกอบในชาอู่หลง สารแอนโทไซยานินที่เป็นองค์ประกอบในอัญชันและเคอเวซิทินที่เป็นองค์ประกอบในเกสรบัวหลวง โดยพบว่าคอมบูชาจากชาอู่หลงมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดและปริมาณฟลาโวนอยด์สูงกว่าคอมบูชาจากสมุนไพรชนิดอื่น โดยมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกเท่ากับ 505.34 ± 1.70 ไมโครกรัม แกลลิกต่อมิลลิลิตร และมีปริมาณฟลาโวนอยด์เท่ากับ 741.50 ± 9.01 ไมโครกรัมเคอเวซิทินต่อมิลลิลิตร ในขณะที่คอมบูชาจากอัญชันมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกเท่ากับ 204.76 ± 4.40 ไมโครกรัมแกลลิกต่อมิลลิลิตร และมีปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์เท่ากับ 97.33 ± 2.89 ไมโครกรัมเคอเวซิทินต่อมิลลิลิตร ซึ่งอัญชันมีสารแอนโทไซยานินจัดอยู่ในกลุ่มฟลาโวนอยด์และถูกจัดเป็นสารสีที่มีประสิทธิภาพต่อต้านอนุมูลอิสระสูงกว่าวิตามินซี วิตามินอีและเบต้าแคโรทีน สำหรับคอมบูชาจากเกสรบัวหลวงมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกเท่ากับ 376.77 ± 7.57 ไมโครกรัมแกลลิกต่อมิลลิลิตร และมีปริมาณฟลาโวนอยด์เท่ากับ 307.33 ± 7.22 ไมโครกรัมเคอเวซิทินต่อมิลลิลิตร

2. การคัดเลือกระยะเวลาหมักที่เหมาะสมต่อการผลิตเครื่องดื่มคอมบูชาที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูง

จากการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH และ ABTS ของคอมบูชาจากซาอู่หลง คอมบูชาจากเกสรบัวหลวงและคอมบูชาจากอัญชันตลอดระยะเวลาการหมักทั้งสิ้น 20 วัน พบว่าคอมบูชาจากซาอู่หลงและคอมบูชาจากอัญชันมีประสิทธิภาพในการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH และ ABTS สูง โดยประสิทธิภาพการยับยั้งอนุมูลอิสระจะแปรผันตรงกับระยะเวลาหมัก โดยจะมีประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุดเมื่อหมักเป็นระยะเวลา 20 วัน จากการทดสอบการยอมรับของผู้บริโภคที่มีต่อผลิตภัณฑ์คอมบูชาทั้งสามชนิด พบว่าผลิตภัณฑ์คอมบูชาที่หมักเป็นระยะเวลาในช่วง 5 ถึง 12 วันได้รับการยอมรับจากผู้บริโภค และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของผลิตภัณฑ์คอมบูชาที่หมักเป็นระยะเวลา 12 วันสูง จึงได้คัดเลือกคอมบูชาจากซาอู่หลงและคอมบูชาจากอัญชันมาศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระภายในเซลล์ต่อไป

3. การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระภายในเซลล์

จากการนำคอมบูชาจากซาอู่หลงและคอมบูชาจากอัญชันไปศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระภายในเซลล์โดยเปรียบเทียบกับวิตามินซี พบว่าคอมบูชาจากสมุนไพรทั้งสองชนิดที่ความเข้มข้น 20 ไมโครลิตรต่อมิลลิลิตรสามารถยับยั้งการเกิดอนุมูลอิสระออกซิเจนภายในเซลล์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยมีประสิทธิภาพใกล้เคียงกับกรดแอสคอร์บิกหรือวิตามินซี และมีประสิทธิภาพสูงกว่าชาที่ไม่ผ่านกระบวนการหมักอีกด้วย เป็นผลเนื่องมาจากคอมบูชาสามารถกระตุ้นยีนส์ที่สามารถผลิตเอนไซม์ที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ได้แก่ Catalase, GRe, Mn-SOD, GPx-1 และ HO-1 เป็นต้น กลไกในการออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของคอมบูชา อาจเกิดขึ้นจากการที่สารสำคัญที่พบในคอมบูชาดังกล่าวมีผลกระตุ้นการสร้างเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการต้านอนุมูลอิสระ

4. การศึกษาอายุการเก็บรักษาของผลิตภัณฑ์คอมบูชา

จากการนำคอมบูชาจากอัญชันที่ผ่านวิธีพาสเจอร์ไรซ์ที่อุณหภูมิ 85 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที โดยบรรจุในขวดแก้วมาศึกษาอายุการเก็บรักษาเป็นเวลา 56 วัน พบว่าประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH และคุณลักษณะทางเคมีของผลิตภัณฑ์คอมบูชามีการเปลี่ยนแปลงเพียงเล็กน้อย

5.2 ข้อเสนอแนะ

1. การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของเครื่องดื่มคอมบูชา โดยการนำคอมบูชาไปทดสอบกับอนุมูลอิสระ DPPH และ ABTS เป็นวิธีที่สะดวกและรวดเร็ว อย่างไรก็ตาม อนุมูลอิสระแต่ละชนิดมีกลไกในการทำให้เกิดความเสื่อมสภาพของเซลล์สิ่งมีชีวิตที่แตกต่างกัน ดังนั้นจึงควรทำการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระชนิดอื่น ๆ ด้วย เช่น อนุมูลอิสระซูเปอร์ออกไซด์ อนุมูลอิสระเพอร์ริกไอออน เป็นต้น

นอกจากนี้การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในงานวิจัยครั้งนี้เป็นเพียงการทดสอบในหลอดทดลอง (In vitro) อาจจะทำให้การศึกษาเพิ่มเติมของฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของคอมบูชาต่อการต้านอนุมูลอิสระภายในสัตว์ทดลอง

2. จากการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของคอมบูชาภายในเซลล์ไต ชนิด HEK-293 พบว่าคอมบูชาสามารถก่อให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ได้ ดังนั้นการบริโภคคอมบูชาต้องคำนึงถึงปริมาณที่เหมาะสมในการบริโภคเพื่อความปลอดภัยของผู้บริโภค โดยศึกษาความเข้มข้นของผลิตภัณฑ์คอมบูชาที่สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระหรือมะเร็งได้ดีและมีความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติที่น้อยที่สุด

3. การศึกษาความสามารถของผลิตภัณฑ์คอมบูชาในการกระตุ้นยีนที่สามารถผลิตเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระ อาจทำการศึกษาฤทธิ์กระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ที่ผลิตได้ หรือการสร้างโปรตีนของ antioxidant enzyme เพื่อศึกษากลไกการยับยั้งอนุมูลอิสระของคอมบูชาดังกล่าว

นอกจากนี้คอมบูชาจากสมุนไพรชนิดอื่น ๆ อาจมีประสิทธิภาพยับยั้งอนุมูลอิสระภายในเซลล์ที่แตกต่างกัน ขึ้นอยู่กับชนิดของสารประกอบภายในคอมบูชา นอกจากประสิทธิภาพการยับยั้งอนุมูลอิสระของคอมบูชาแต่ละชนิดแล้ว คอมบูชาที่ผลิตจากสมุนไพรชนิดใหม่อาจมีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาและฤทธิ์ทางชีวภาพที่น่าสนใจ ซึ่งอาจทำให้ผลิตภัณฑ์คอมบูชากลายเป็นเครื่องดื่มทางเลือกที่เป็นที่นิยมในกลุ่มผู้บริโภคและสามารถใช้ในการบำรุงและบรรเทาอาการของผู้ป่วยมะเร็งหรือโรคชนิดอื่น ๆ ได้

เอกสารอ้างอิง

- กาญจนา ขยัน. 2552. “การอบแห้งตะไคร้ด้วยเทคนิคการให้ความร้อนแบบไดอิเล็กตริกโดยใช้เครื่องอบไมโครเวฟที่ควบคุมอุณหภูมิได้.” วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาการหลังการเก็บเกี่ยว, มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.
- กรองจันทร์ รัตน์ประดิษฐ์ และ สมจิตต์ ปาละภาค. 2557. “การตรวจสอบฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาใบขลุ่ยและผลของระยะเวลาการเก็บรักษาต่อความสามารถในการออกฤทธิ์.” รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์. สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยบูรพา.
- กมลวรรณ ตระการชัยวงศ์ 2551. “การพัฒนาครีมจากชาดำ น้ำมันตะไคร้และน้ำมันมะนาวและศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการใช้ครีมบรรเทาอาการเซลล์ลูไลท์บริเวณหน้าท้อง.” วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ความงามและสุขภาพ คณะเภสัชศาสตร์, มหาวิทยาลัยขอนแก่น.
- จรรย์ ปิ่นทอง ธนภรณ์ จิตตินันท์ ประภัสสร แสงสุขสันต์ และณัคนางค์ กุลนาถศิริ. 2561. “สังคมสูงวัยกับความท้าทายของตลาดแรงงานไทย.” โครงการศึกษาด้านโครงสร้างเศรษฐกิจไทยที่มีนัยต่อการดำเนินนโยบาย. สายนโยบายการเงิน. ธนาคารแห่งประเทศไทย. กรกฎาคม 2561.
- จาร์วรรณ ภูซัง และขวัญดาว แจ่มแจ่ม. 2559. “การผลิตชาต้านอนุมูลอิสระจากรางจืดและใบย่านาง.” ใน การประชุมวิชาการระดับชาติ มหาวิทยาลัยราชภัฏกำแพงเพชร ครั้งที่ 3. 1: 599-605.
- ฉัตรชัย ไตรทอง. 2552. “วิตามินซี (Ascorbic acid).” *แพทยสารทหารอากาศ*. 55(1): 32-41.
- ชานนท์ นัยจิต และ อนุรักษ์ เชื้อมั่ง. 2559. “การประเมินฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ สารประกอบบรอมฟินอลและนิโคตินของสมุนไพรรไทย 15 ชนิด.” *วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี*. 24(2): 352-361.
- ชุตินันท์ ประสิทธิ์ภูริปริษา เอกชัย ดำเกลี้ยง พยุงศักดิ์ สุรินตะ และวสันต์ ดีล้ำ. 2552. “ฤทธิ์ปรับภูมิคุ้มกัน ต้านออกซิเดชันและต้านจุลชีพของสารสกัดผักพื้นบ้านและสมุนไพรรไทยอีสาน.” *วารสารเภสัชศาสตร์อีสาน*. 5(2) : 99-107.
- ชนันดา ศรีบุญไทย. 2559. “ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและสารทุติยภูมิของกระเจี๊ยบแดง (*Hibiscus sabdariffa* L.).” วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีการเกษตร, มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์.
- นิจศิริ เรืองรังสี และ ธวัชชัย มัลลละคุปต์. 2547. *สมุนไพรรไทย*. กรุงเทพมหานคร. : สำนักพิมพ์ พีเฮลตี้.
- นิดดา หงส์วิวัฒน์ และ ทวีทอง หงส์วิวัฒน์. 2550. *ผลไม้ 111 ชนิด คุณค่าอาหารและการกิน*.

- กรุงเทพมหานคร. : สำนักพิมพ์แสงแดด: 147-148.
- เนตรนภา เมยกลาง และ เฉลิม เรื่องวิริยะชัย. 2557. “การหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกและฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระในเครื่องดื่มน้ำผลไม้.” *วารสารวิจัยมหาวิทยาลัยขอนแก่น ฉบับบัณฑิตศึกษา*. 14(4): 69-79.
- ดุชนิ ณะบริพัฒน์. 2555. **จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม**. กรุงเทพมหานคร : คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.
- ธีรพงษ์ เทพกรณ์. 2555. “ชา: กระบวนการผลิต และองค์ประกอบทางเคมีจากการหมัก.” *วารสารวิทยาศาสตร์บูรพา*. 17(2): 189-196.
- บุหรัน พันธุ์สุวรรณ. 2556. “อนุมูลอิสระ สารต้านอนุมูลอิสระและการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ.” *วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี*. 21(3): 275-286.
- พรรัตน์ สิ้นชัยพานิช. 2550. “เครื่องดื่มชาหมัก.” *วารสารอาหาร*. 37(1): 33-38.
- พิชานันท์ ลีแก้ว. 2557. “อัญชัน.” *จุลสารข้อมูลสมุนไพร*. 32: 10-17.
- เมฆม สอดส่องกฤษ. 2558. **ข้อมูลสมุนไพรจีน**. อุบลราชธานี: โรงพิมพ์มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี.
- ราชบัณฑิตสถาน. 2538. “อนุกรมวิธานพืช อักษร ก.” กรุงเทพมหานคร. สำนักพิมพ์เพื่อนพิมพ์.
- ราชบัณฑิตยสถาน. 2556. “พจนานุกรม ฉบับราชบัณฑิตยสถาน พ.ศ. ๒๕๕๔ เฉลิมพระเกียรติพระบาทสมเด็จพระเจ้าอยู่หัว เนื่องในโอกาสพระราชพิธีมหามงคลเฉลิมพระชนมพรรษา 70.” 5: 25.
- วิทย์ เทียงบูรณธรรม. 2536. **พจนานุกรมสมุนไพรไทย**. กรุงเทพมหานคร : สำนักพิมพ์สุริยบรรณ.
- วิไลพร จอมพล และ อาทิสรา ขุนสิทธิ์. 2553. “การใช้น้ำหล่ออึ้งก้วยทดแทนน้ำตาลมะพร้าวในกระยาสารท.” *วิทยานิพนธ์ปริญญาตรี ภาควิชาคหกรรมศาสตร์ คณะเทคโนโลยีคหกรรมศาสตร์, มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลพระนคร*.
- ศุทธิณี ลีลาเหมรัตน์ และ ศศิธร ตรงจิตภักดี. 2554. “องค์ประกอบทางเคมีและคุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระของกากลูกหม่อน.” 548-555. ใน **การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 49** 1-4 ก.พ. 2554. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ : กรุงเทพมหานคร
- ศุภานารถ เกตุเจริญ และ อัญชลี พัดมีเทศ. 2536. “ชา.” *กองเกษตรสัมพันธ์. กรมส่งเสริมการเกษตร*.
- ศูนย์วิจัยเศรษฐกิจ ธุรกิจ และเศรษฐกิจฐานราก. 2561a. “รายงานการวิเคราะห์/วิจัยธุรกิจและอุตสาหกรรมในแต่ละภูมิภาคครั้งแรกของปี 2561.” *GSB Research: ส่วนเศรษฐกิจรายสาขา*. ศูนย์วิจัยเศรษฐกิจ ธุรกิจ และเศรษฐกิจฐานราก. : 1-30.
- ศูนย์วิจัยเศรษฐกิจ ธุรกิจ และเศรษฐกิจฐานราก. 2561b. “Sunrise-Sunset Industry.” *GSB Research.*: ส่วนเศรษฐกิจรายสาขา. ศูนย์วิจัยเศรษฐกิจ ธุรกิจ และเศรษฐกิจฐานราก.: 1-7.

- สาวิตรี ลิ้มทอง. 2549. **ยีสต์: ความหลากหลายและเทคโนโลยีชีวภาพ**. กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
- สุนทรีย์ สิงหบุตรา. 2525. สรรพคุณสมุนไพร 200 ชนิด.
[Online]. Available: http://www.rspg.or.th/plants_data/herbs/herbs_200.htm.
- อเนก หาลี และ บุญยกฤต รัตนพันธุ์. 2560. “การศึกษาประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระจากพืชผักสมุนไพรพื้นบ้าน 15 ชนิด.” *วารสารวิจัยและพัฒนา มจร*. 40(2): 283-293.
- อังคณา เทียนกล้า. 2551. **ไม้ดอกประเภทหัว**. คณะเทคโนโลยีการเกษตร. มหาวิทยาลัยราชภัฏ: สกลนคร.
- เอมอร ตรีภิญโญยศ. 2551. **รู้จักอนุมูลอิสระ Antioxidant**. กรุงเทพมหานคร. บริษัท แอปเปิ้ล ฟรืนด์ตั้ง กรู๊ป จำกัด
- Allen, C.M. 1998. “Past research on kombucha tea. *The kombucha FAQ part 6. Research and test result*” Available from http://persweb.direct.ca/chaugen/kombucha_faq_part06.html.
- Aloulou, A., Hamden, K., Elloumi, D., Ali, M.B., Hargafi, K., Jaouadi, B., Ayadi, F., Elfeki, A. and Ammar, E. 2012. “Hypoglycemic and antilipidemic properties of kombucha in alloxan- induced diabetic rats.” *BMC Complementary and Alternative Medicine*. 12; 12-63.
- Amagase, H. and Nance, D.M. 2008. “A randomized, double-blind, placebo-controlled, clinical study of the general effects of a standardized *Lycium barbarum* (goji) juice, GoChi™.” *The Journal of Alternative and Complement Medicine*. 14(4) : 403-412.
- Ames, B.N. and Shigenaga, M.K. 1992. “Oxidant are a major contributor to aging.” *Annals of the New York Academy of Sciences*. 663: 85-96.
- Arnao, M.B., Cano, A. and Acosta, M. 2001. “The hydrophilic and lipophilic contribution to total antioxidant activity.” *Food Chemistry*. 73: 239–244.
- Agency for Toxic Substances and Disease Registry. 2017. **Public health statement lead. U.S. Department of Health and Human Services**, Public Health Service. Retrieved June 11, 2017.
- Bagchi, K. and Puri, S. 1998. “Free radicals and antioxidants in health and disease.” *East Mediterranean Health Journal*. 4: 350–360.
- Bandna, D., Neha, S., Dinesh, K. and Kamal, J. 2013. “*Morus alba linn.*: A phytopharmacological review.” *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. 5(2): 14-18.

- Barnett, J.A. and Barnett, L. 2011. **Yeast Research a Historical Overview**. Washigton. ASM Press.
- Bast, A., Haenen, G.R. and Doelman, C.J. 1991. "Oxidants and antioxidants: state of the art." *The American Journal of Medicine*. 91: 2-13.
- Battikh, H., Chaieb, K., Bakhrouf, A. and Ammar, E. 2012. "Antibacterial and antifungal activities of black and green kombucha teas." *Journal of Food Biochemistry*. 37 : 231–236.
- Baliga, M.S., Bhat, H.P., Joseph,N. and Fazal, F. 2011. "Phytochemistry and medicinal uses of the bael fruit (*Aegle marmelos* Correa): A concise review." *Food Research International*, 44(7), 1768–1775.
- Bauer-Petrovska, B. and Petrushevska-Tozi, L. 2000. "Mineral and water-soluble vitamin contents in the kombucha drink." *International Journal Food Sciences Technical*. 35: 201–205.
- Beaufort, S., Villarreal, S.A., Souchard, J.P. and Taillandier P. 2018. "Understanding kombucha tea fermentation: a review." *Journal of Food Science*. 83(3): 580-588.
- Birben, E., Sahiner, U.M., Sackesen, C. and Erzurum, S. 2012. "Oxidative stress and antioxidant defense." *World Allergy Organization Journal*. 5(1): 9-19.
- Blois, M.S. 1958. "Antioxidant determinations by the use of a stable free radical." *Nature*. 181: 1199-1200.
- Caili, F., Fen, Y., Zeli, C., Fanying, X. and Juan, L. 2014. "Antioxidant activities of kombucha prepared from three different substrates and changes in content of probiotics during storage." *Food Science and Technology*. 34(1) : 123-126.
- Chamberlain, B.H. and Aston, W.G. 2005. **The Kojiki: Records of Ancient Matters**. Rutland. Tuttle Publishing.
- Chaveerach, A., Lertsatitthanakorn, P., Tanee, T., Puangjit, N., Patarapadungkit, N. and Sudmoon, R. 2016. "Chemical constituents, antioxidant property, cytotoxicity and genotoxicity of *Tiliacora triandra*." *International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research*. 8(5): 722-729.
- Cheeseman, K.H. and Slater, T.F. 1993. "An introduction to free radicals chemistry." *British Medical Bulletin*. 49: 481–493.

- Chen, C. and Liu, B.Y. 2000. "Changes in major components of tea fungus metabolites during prolonged fermentation." *Journal of Applied Microbiology*. 89(5): 834–934.
- Chidambara, K. N., Jayaprakasha, G. K. and Singh, R. P. 2002. "Studies on antioxidant activity of pomegranate (*Punica granatum*) peel extract using in vivo models." *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 50: 4791-4795.
- Crum, H., Gory, A.L. and Katz, S.E. 2016. **The big book of kombucha: brewing, Flavoring and enjoying the health benefits of fermented tea.** Storey publishing.: 329-356.
- Cvetkovic, D., Markov, S., Djuric, M., Savic, D. and Velicanski, A. 2008. "Specific interfacial area as a key variable in scaling-up Kombucha fermentation." *Journal of Food Engineering*. 85: 387-392.
- Davies, K.J. 1995. "Oxidative stress: the paradox of aerobic life." *Biochemical Society Symposia*. 61: 1-31.
- Davis, A. L., Lewis, J. R., Cai, Y., Powell, C., Davis, A. P., Wilkins, J. P. G., Pudney, P. and Clifford, M.N. 1997. "A polyphenolic pigment from black tea." *Phytochemistry*. 46: 1397-1402.
- Deinema, M.H. and Zevenhuizen, L.P. 1971. "Formation of cellulose fibrils by gram negative bacteria and their role in bacterial flocculation." *Archives of Microbiology*. 78(1): 42-51.
- Deka, A. and Vita, J.A. 2011. "Tea and cardiovascular disease." *Pharmacological Research*. 64: 136-145.
- Devi, B., Sharma, N., Kumar, D. and Jeet, K. 2013. "*Morus alba* linn: a phytopharmacological review." *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. 5(2): 14-18.
- Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A. and Smith, F. 1956. "Colorimetric method for determination of sugar and related substances." *Analytical Chemistry*. 28: 350-365.
- Dufresne, C. and Farnworth, E. 2000. "Tea, Kombucha, and health: a review." *Food Research International*. 33(6): 409–421.
- Ebadi, M. 2001. **Antioxidants and free radicals in health and disease.** Arizona. Prominent Press.

- Essawet, N.A., Cvetkovic, D., Velicanski, A., Brunet, J.C., Vulic, J., Maksimovic, V. and Markov, S. 2015. "Polyphenols and antioxidant activity of kombucha beverage enriched with coffeeberry extract." *Chemical Industry and Chemical Engineering Quarterly*. 21(3):399-409.
- Fahey, J.W., Zhang, Y. and Talalay, P. 1997. "Broccoli sprouts: an exceptionally rich source of inducers of enzymes that protect against chemical carcinogens." 10367-10372. In **Proceedings of the national academy of sciences of the united states of America**. United states.
- Fernandez, P.L., Pablos, F., Martin, M.J. and Gonzales, A.G. 2002. "Study of catechin and xantine tea profiles as geographical tracers." *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 50: 1833-1839.
- Foubert, L., Fleming, B., Latimer, R., Jonas, M., Oduro, A., Borland, C. and Higenbottam, T. 1992. "Safety guide lines for use of nitric oxide." *The Lancet Journals*. 339(8809): 1615-1616.
- Frank, G.W. 1995. **Kombucha: healthy beverage and natural remedy from the Far East, its correct preparation and use**. Austria. House Wilhelm Ennsthaler Publishing.
- Frankel, E.N., Bosanek, C.A., Meyer, A.S., Siliman, K. and Kirk, L.L. 1998. "Commercial grape juices inhibit the *in vitro* oxidation of human low-density lipoproteins." *Journal of the American Oil Chemists' Society*. 46: 834-838.
- García-Alonso, F. J., Bravo, S., Casas, J., Pérez-Conesa, D., Jacob, K. and Periago, M. J. 2009. "Changes in antioxidant compounds during the shelf life of commercial tomato juices in different packaging materials." *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 57(15) :6815–6822.
- Greenwalt, C.J. Steinraus, K.H. and Ledford, R. A. 2000. "Kombucha, the fermented tea: microbiology, composition, and claimed health effects." *Journal of Food Protection*. 63(7): 976–981.
- Gupta, R.K., Patel, A.K. and Shah, N. 2014. "Oxidative stress and antioxidants in disease and cancer: a review." *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*. 15 : 4405–4409.
- Haigler, C.H. 1985. "The functions and biogenesis of native cellulose." 30-83. In Nevell, T.P. and Zeronian, S.H. **Cellulose chemistry and its applications**. New York. Halsted Press.

- Halliwell, B. 1999 "Antioxidant defense mechanism: from beginning to the end. (of the beginning)." *Free Radical Research*. 31: 261-272.
- Halliwell, B., Aeschbach, R., Loliger, J. and Arouma, O.I. 1995. "The characterization of antioxidant." *Food and Chemical Toxicology*. 33(7): 601-617.
- Halliwell, B. 2006. "Reactive species and antioxidant. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life." *American Society Plant Biochemistry*. 141: 312-322.
- Halliwell, B. and Gutteridge, J.M.C. 1984. "Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metal and disease." *Journal of Biochemistry*. 219:1-14.
- Halliwell, B. 1989. **Tell me about free radicals, doctor: review**. Royal society of medicine press. 82: 747
- Halliwell, B. and Cross, C.E. 1994 "Oxygen-derived species: their relation to human disease and environmental stress." *Environmental Health Perspectives*. 102: 5-12.
- Halliwell, B. and Grootveld, M. 1987. "The measurement of free radical reactions in humans. Some thoughts for future experimentation." *Federation of European Biochemical Societies*. 213: 9-14.
- Hawksworth, D.L. 2004. "Fungal diversity and its implications for genetic resource collections" *Studies in Mycology*. 50: 9-18.
- Hen, P.N., Kuo, W.H., Chiang, C.L., Chiou, H.L., Hsieh, Y.S. and Chu, S.C. 2006. "Black rice anthocyanins inhibit cancer cells invasion via repressions of MMPs and u-PA expression," *Journal of Chemico- Biological Interactions*. 163: 218-229.
- Huie, R.E. and Padmaga, S. 1993. "The reaction of NO with superoxide." *Free Radical Research Communications*. 18: 196-199.
- Hsieh, Y.C., Yano, H., Nogi, M. and Eichhorn, S.J. 2008. "An estimation of the young's modulus of bacterial cellulose filaments." *Cellulose*. 15(4) : 507-513.
- Ingkaninan, K., Temkitthawon, P., Chuenchon, K., Yuyaem, T. and Thongnoi, W. 2003. "Screening for acetylcholinesterase inhibitory activity in plants used in Thai traditional rejuvenating and neurotonic remedies. " *Journal of Ethnopharmacology*. 89: 261-264.
- Ishige, K., Schubert, D. and Sagara, D. 2001. "Flavonoids protect neuronal cell from oxidative stress by distinct mechanisms." *Free Radical Biology and Medicine*. 30(4): 433-446.

- Jayabalan, R., Malbasa, R.V., Loncar, E.S., Vitas, J.S. and Sathishkumar, M. 2014. "A review on kombucha tea-microbiology, composition, fermentation, beneficial effects, toxicity and tea fungus." *Comprehensive Review in Food Science and Food Safety*. 13: 538-550.
- Jayabalan, R., Malini, K., Sathishkumar, M., Swaminathan, K. and Yun, S.E. 2010. "Biochemical characteristics of tea fungus produced during Kombucha fermentation." *Food Science and Biotechnology*. 19: 843-847.
- Jayabalan, R., Marimuthu, S. and Swaminathan, K. 2007. "Changes in content of organic acids and tea polyphenols during kombucha tea fermentation." *Food Chemistry*. 102 : 392-398.
- Jayabalan, R., Marimuthu, S., Thangaraj, P., Sathishkumar, M., Binupriya, A. R., Swaminathan, K. and Sei, E.Y. 2008b. "Preservation of kombucha tea effect of temperature on tea components and free radical scavenging properties." *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 56 : 9064.
- Jayabalan, R., Subathradevi, P., Marimuthu, S., Sathishkumar, M. and Swaminathan, K. 2008a. "Changes in free-radical scavenging ability of kombucha tea during fermentation." *Food Chemistry*. 109: 227-234.
- Jia, S., Ou, H., Chen, G., Choi, D., Cho, K., Okabe, M. and Cha, W.S. 2004. "Cellulose production from *Gluconobacter oxydans* TQ- B2. " *Biotechnology and Bioprocess Engineering*. 9:166.
- Kabir, M.A., Hussain, M.A. and Ahmad, Z. 2012. "*Candida albicans*: a model organism for studying fungal pathogens." *International Scholarly Research Network Microbiology*. 2012: 5.
- Kallel, L., Desseaux, V., Hamdi, M., Stocker, P. and Ajandouz, E.H. 2012. "Insights into the fermentation biochemistry of Kombucha teas and potential impacts of Kombucha drinking on starch digestion." *Food Research International*. 49(1): 226-232.
- Kazuma, K., Noda, N. and Suzuki, M. 2003. "Molonylated flavonol glycosides from the petals of *Clitoria ternatea*." *Phytochemistry*. 62(2): 229-237.
- Kerstens, K., Lisdiyanti, P., Komagata, K. and Swings, J. 2006. "The family *Acetobacteraceae*: the genera *Acetobacter*, *Acidomonas*, *Asaia*, *Gluconalobacter*, *Gluconobacter* and *Kozakia*." 163- 200. in Dworkin, M.,

- Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K. H. and Stackebrandt, E. . ” **The Prokaryotes**. 3rdedition. New York. Springer-Verlag.
- Keshk, S.M.A.S. and El-Kott, A.F. 2017. “Natural bacterial biodegradable medical polymers.” *Science and Principles of Biodegradable and Bioresorbable Medical Polymers*. 295–319.
- Konstan, M.W. and Berger, M. 1993. “Infection and inflammation of the lung in cystic fibrosis.” 219-276. In Davis, P.B. **Cystic Fibrosis**. New York. Marcel Dekkers.
- Kumar, N., Rungseevijitprapa, W., Narkkhong, N.A., Suttajit, M. and Chaiyasut, C. 2012. “5 α -reductase inhibition and hair growth promotion of some Thai plants traditionally used for hair treatment.” *Journal of Ethnopharmacology*. 139(3) : 765-771.
- Lahouel, M., Boulkour, S., Narimane, S. and Fillastre, J.P. 2004. “Protective effect of flavonoids against the toxicity of vinblastine, cyclophosphamide and paracetamol by inhibition of lipid peroxidation and increase of liver glutathione.” *Haema*. 7:59-67.
- Li, H., Horke, S. and Förstermann, U. 2013. “Oxidative stress in vascular disease and its pharmacological prevention.” *Trends in Pharmacological Sciences*. 34(6): 313-319.
- Li, C., Lin, L.M., Sui, F., Wang, Z.M., Huo, H.R., Dai, L. and Jiang, T.L. 2014. “Chemistry and pharmacology of *Siraitia grosvenorii*: A review.” *Chinese Journal of Natural Medicines*. 12(2): 89–102.
- Li, H., Horke, S. and Förstermann, U. 2013. “Oxidative stress in vascular disease and its pharmacological prevention.” *Trends in Pharmacological Sciences*. 34(6):313-9
- Liang, N. and Kitts, D.D. 2014. “Antioxidant property of coffee components: assessment of methods that define mechanisms of action.” *Molecule*. 19(11): 19180-19208.
- Liu, C.H., Hsu, W.H., Lee, F.L. and Liao, C.C. 1996. “The isolation and identification of microbes from a fermented tea beverage, Haipao and their interactions during Haipao fermentation.” *Food Microbiology*. 13 : 407–415.
- Lobo, R.O., Dias, F.O. and Shenoy, C.K. 2017. “Kombucha for healthy living: evaluation of antioxidant potential and bioactive compounds.” *International Food Research Journal*. 24(2): 541-546.

- Lockwood, B. 2007. **Nutraceuticals: A Guide for Healthcare Professionals**. Second ed. London: Pharmaceutical Press
- Machraoui, M., Kthiri, Z., Jabeur, M.B. and Hamada, W. 2018. "Ethnobotanical and phytopharmacological notes on *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf." *Journal of New Sciences*. 55(5): 3642-3652.
- Mahidol, C., Sahakitpichan, P. and Ruchirawat, S. 1994. "Bioactive natural products from Thai plants." *Journal of Pure and Applied Chemistry*. 66: 2353-2356.
- Malbaša, R., Lončar, E. S., Vitas, J. and Čanadanović-Brunet, J. 2011. "Influence of starter cultures on the antioxidant activity of kombucha beverage." *Food Chemistry*. 127(15): 1727-1731.
- Manjula, P., Mohan, C. H., Sreekanth, D., Keerthi, B. and Prathibha, B. D. 2013. "Phytochemical analysis of *Clitoria ternatea* linn., a valuable medicinal plant." *The Journal of the Indian Botanical Society*. 92(3&4): 173-178.
- Markov, S., Jerinic, M.V., Cvetkovic, D.D., Loncar, E. and Malbasa, R. 2003. "Kombucha functional beverage: composition characteristics and process of biotransformation." *Hemjska Industrija Journal*. 57(10): 456-462.
- Markowitz, M. 2011. Lead poisoning. **Nelson textbook of pediatrics**. Philadelphia, PA: Elsevier Saunders.
- Maturin, L.J. and Peeler, J.T. 2001. "Chapter 3 aerobic plate count." In Food and Drug Administration. **Bacteriological analytical manual**. 8th ed. USA.
- Mayser, P., Fromme, M.P., Leitzmann, S.C. and Grunder, CK. 1995. "The yeast spectrum of the tea fungus Kombucha." *Mycoses*. 38: 289-295.
- Mishra, A., Bapat, M.M., Tilak, J.C. and Devasagayam, T.P.A. 2006. "Antioxidant activity of *Garcinia indica* (kokam) and its syrup." *Current Science Association*. 91(1): 90-93.
- Min, D.B. and Lee, H.O. 1998. "Lipid oxidation of edible oil." 283-296. In Akon, C.C. and Min, D.B. **Food Lipid**. New York. Marcel Dekkers.
- Mohammad, S.M., Rahman, N.A., Khalil, M.S. and Abdullah, S.R.S. 2014. "An overview of biocellulose production using *Acetobacter xylinum* culture." *Advances in Biological Research*. 8(6) : 307-313.
- Osman, M., Golam, F., Saberi, S., Majid, N. A., Nagoor, N.H. and Zulqarnain, M. 2011. "Morpho-agronomic analysis of three roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) mutants in tropical Malaysia." *Australian Journal of Crop Science*. 5(10): 1150-1156.

- Nanasombat, S. and Teckchuen, N. 2009. "Antimicrobial, antioxidant and anticancer activities of Thai local vegetables." *Journal of Medicinal Plants Research*. 3(5): 443-449.
- Nawar, W.W. 1996. "Lipid." 210-243. In Fennema, O.R. **Food Chemistry**. New York: Marcel Dekkers.
- Nimse, S.B. and Pal, D. 2015. "Free radicals, natural antioxidants and their reaction mechanisms." *RSC Advances*. 5(35): 27986-28006.
- Pure, A.E. and Pure, M.E. 2016. "Antioxidant and antibacterial activity of kombucha beverages prepared using banana peel, common nettles and black tea infusions." *Applied Food Biotechnology*. 3(2): 125-130.
- Phadungkit, M., Somdee, T. and Kangsadalampai, K. 2012. "Phytochemical screening, antioxidant and antimutagenic activities of selected Thai edible plant extracts." *Journal of Medicinal Plants Research*. 6(5): 662-666.
- Pitt, J.I. and Hocking, A. 2009. **Fungi and food spoilage**. Science and Business Media, New York: Springer.
- Poletto, M., Dettenborn, J., Pistor, V., Zeni, M. and Zattera, A.J. 2010. "Materials produced from plant biomass." *Journal of Materials Research*. 13(3): 375-379.
- Podmore, I.D., Griffiths, H.R., Herbert, K.E., Mistry, N., Mistry, P. and Lunec, J. 1998. "Vitamin C exhibits pro-oxidant properties." *Nature*. 392(6676): 559.
- Puerta, T. 1999. "Inhibition of leukocytes lipooxygenase by phenolics from virgin olive oil." *Biochemical Pharmacology Journal*. 57(4): 445-449.
- Parirat, K. 2012. "Review article: ตะไคร้." *Thai Journal of Pharmacology*. 34(2): 37-51.
- Rains, T.M., Agarwal, S. and Maki, K.C. 2011. "Antiobesity effects of green tea catechins." *Journal of Nutritional Biochemistry*. 22: 1-7.
- Rattana, S., Phadungkit, M. and Cushnie, B. 2010. "Phytochemical screening, flavonoid content and antioxidant activity of *Tiliacora Triandra* Leaf extract." **The 2nd Annual International Conference of Northeast Pharmacy Research**. 13-14 February 2010. Faculty of Pharmacy. Mahasarakham: Mahasarakham University.
- Roth, S. 2007. **Kombucha fermenting a revolution in health drinks**. Pittsburg Post-Gazette June 07

- Salari, R. and Salari, R. 2017. "Investigation of the best *Saccharomyces cerevisiae* growth condition." *Electronic Physician*. 9(1): 3592-3597.
- Sangiovanni, E. , Fumagalli, M. and Dell'Agli, M. 2017. "Chapter 18: Berries. Gastrointestinal protection against oxidative stress and inflammation." 243–258. In Gracia-Sancho, J. and Salvad, J. **Gastrointestinal tissue. Oxidative Stress and Dietary Antioxidants**. United states: America.
- Sen, C.K. 1995. "Oxidants and Antioxidants in exercise." *Journal of Applied Physiology*. 79: 675-686.
- Sen, Li., Guowei, C., Chao, Z., Man, W., Shuyan, W. and Qing, L. 2014. "Research progress of natural antioxidants in foods for the treatment of diseases." *Food Science and Human Wellness*. 3 :110–116.
- Shoji, Y. and Nakashima, H. 2006. "Glucose-lowering effect of powder formulation of African black tea extract in KK- A(y) / TaJcl diabetic mouse." *Pharmacol Research*. 29 : 786-794.
- Singh, J. and Tiwari, K.N. 2010. "Evaluation of cotyledonary node of *Clitoria ternatea* L. for high frequency *in vitro* axillary shoot proliferation." *Asian Journal of Plant Science*. 9(6) : 351-357.
- Siti, N.H., Kamisah, Y. and Kamsiah, J. 2015. "The role of oxidative stress, antioxidants and vascular inflammation in cardiovascular disease." *Vascular pharmacology*. 71: 40-56.
- Sreeramulu, G. , Zhu, Y. and Knol, W. 2000. "Kombucha fermentation and its antioxidant activity." *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 48(6): 2589-2594.
- Stamler, J.S., Singel, D.J. and Loscalzo, J. 1992. "Biochemistry of nitric oxide and its redox-activated forms." *Science*. 258(5090): 1898-1902.
- Stephens, R.J., Evans, M.J. and Freeman, G. 1972. "Early response of lung to low levels of nitrogen dioxide." *Archives of Environmental Health*. 24: 160-179.
- Subramanian, N. , Venkatesh, P. , Ganguli, S. and Sinkar, V.P. 1999. "Role of polyphenoloxidase and peroxidase in the generation of black tea theaflavins." *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 47 : 2571-2678.
- Sun, T.Y., Li, J.S. and Chen, C. 2014. "Effects of blending wheatgrass juice on enhancing phenolic compounds and antioxidant activities of traditional kombucha beverage." *Journal of Food and Drug Analysis*. 23(4): 709-718.

- Xie, B., Shi, H., Chen, Q. and Ho, C.-T. 1993. "Antioxidant properties of fractions and polyphenol constituents from green, oolong and black teas." 77-84. in National Science Council. **Proceedings of the National Science Council**. Taiwan: China.
- Tarra, J.B., Mei, Y., Xiaofang, P. and Yeung, H.C. "Biological activities and functions of *Camellia sinensis* (tea)." *Herbal Medicines and Nutraceuticals*. 18(1): 31-35.
- Terahara, N., Saito, N., Honda, T. and Toki, K. 1989. "Structure of ternatin D1, an acylated anthocyanin from *Clitoria ternatea* flowers." *Tetrahedron Letters*. 30(39) : 5305-5308.
- Thome, O.W. 1885. 165. In Einscannen and Kurt Stüber. **Flora von detschland osterreich und der schweiz**. Switzerland.
- Tournas, V., Stack, M.E., Mislivec, P.B., Koch H.A. and Bandler, R. 2001. "Chapter 18 yeasts, molds and mycotoxins. " In Food and Drug Administration. **Bacteriological analytical manual**. 8th ed. United states: America.
- Vajragupta, O., Boonchoong, P., Boonyarat, C. and Utsintong, M., 2006. **Redical Scavenging Agents**. Chulalongkorn University, Bangkok. (In Thai)
- Valacchi, G., Pagnin, E., Corbacho, A.M., Olano, E., Davis, P.A., Packer, L. and Cross, C.E. 2004. "In vivo ozone exposure induces antioxidant/stress-related responses in murine lung and skin." *Free Radical Biology and Medicine*. 36: 673-681.
- Vats, S. 2014. "Antioxidant activity of *Clitorea ternatea* L. and *Origanum vulgare* L.: a comparative analysis." *Researcher*. 6(11): 56-58.
- Velicanski, A.S., Cvetkovic, D.D., Markov, S.L., Saponiac, V.T.T. and Savatovic, S.M. 2007. "Antimicrobial and antioxidant activity of lemon blam kombucha." *Acta Periodica Technologica*. 38: 165-172.
- Velicanski, A. S. , Cvetkovic, D. D. , Markov, S. L. , Saponiac, V. T. T. and Vulic, J. J. 2014. "Antioxidant and antibacterial activity of the beverage obtained by fermentation of sweetened lemon balm (*Melissa officinalis* L.) tea with symbiotic consortium of bacteria and yeasts." *Food Technology Biotechnology*. 52(4): 420-429.
- Venkatachalam, H., Yogendra, N. and Jayashree, B.S. 2012. "Synthesis, characterization and antioxidant activities of synthetic chalcones and flavones." *APCBEE Procedia*. 3: 209-213.

- Vina, I., Semjonovs, P., Linde, R. and Denina, I. 2013. "Current evidence on physiological activity and expected health effects of kombucha fermented beverage." *Journal of Medicinal Food*. 17(2):179-188.
- Vohra, B., Fazry, S., Sairi, F. and Othman, B.A. 2019. "Effects of medium variation and fermentation time on the antioxidant and antimicrobial properties of kombucha." *Malaysian Journals of Fundamental and Applied Sciences*. 298-302.
- Walle, T., Browning, A.M., Steed, L.L., Reed, S.G. and Walle, K.U. 2005. "Flavonoid glucosides are hydrolyzed and thus activated in the oral cavity in humans." *The Journal of Nutrition*. 135 : 48–52.
- Walle, T. 2004. "Absorption and metabolism of flavonoids." *Free Radical Biology and Medicine*. 36(7):829-837.
- Watawana, M. I., Jayawardena, N., Gunawardhana, C. B. and Waisundara, V. Y. 2015. "Health, wellness, and safety aspects of the consumption of kombucha." *Journal of Chemistry*. 1-11.
- Wiryachitra, P. and Phuriyakorn, B. 1981. "Alkaloids of *Tiliacora triandra*." *Australian journal of Chemistry*. 34: 2001-2004.
- Wuttisin, N. and Boonsook, W. 2019. "Total phenolic, flavonoid contents and antioxidant activity of *Siraitia grosvenorii* fruits extracts." *Food and Applied Bioscience Journal*. 7(3): 131-141.
- Yang, C.S. and Wang, Z.Y. 1993. "Tea and cancer: review." *Journal of the National Cancer Institute*. 85: 1038-1049.
- Yanishlieva, N.V. 2001. "Inhibition oxidation." 22-70. In Pokorny, J., Yanishlieva, N.V. and Gordon, H. **Antioxidants in food practical applications**. Cambridge. Woodhead publishing.
- Yavari, N., Assadi, M.M., Moghadam, M.B. and Larijani, K. 2011. "Optimizeing glucuronic acid production using tea fungus grape juice by response surface methodology." *Australian Journal of Basic and Applied Science*. 5(11); 1788-1794.
- Young, I.S. and Woodside, J.V. 2001. "Antioxidants in health and disease." *Journal of Clinical Pathology*. 54: 176–86.
- Yuan, J.M., Sun, C. and Butler, L.M. 2011. "Tea and cancer prevention: Epidemiological studies." *Pharmacological Research*. 64 : 123-135.

- Zegler, J. 2018. **Global food and drink trend 2019**. Mintel Food and Drink.
- Zhen, Y., Chen, Z., Chen, S. and Chen, M. 2002. **Tea: Bioactivity and Therapeutic Potential**. London. CRC Press.
- Zheng, L.J., Wu, Y.B., Wu, J.G., Tan, C.J., Yi, J. Chen, T.Q. and Wu, J.Z. 2012. "Antioxidant activity of lotus (*Nelumbo nucifera* Gaerth.) receptacles of eleven cultivars grown in China." *Journal of Medicinal Plants Research*. 6(10): 1902-1911.
- Zingare, M. L., Zingare, P. L., Dubey, A. K. and Ansari, A. 2013. "*Clitoria ternatea* (aparajita): a review of the antioxidant, antidiabetic and hepatoprotective potentials." *International Journal of Pharmacy and Biological Sciences*. 3(1) : 203-213

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. อาหารสูตร Plate count agar (PCA)

เคซีนที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ (Casein enzymic hydrolysate)	5	กรัม
ยีสต์สกัด (Yeast extract)	2.5	กรัม
น้ำตาลเดกโทรส (Dextrose)	1	กรัม
วุ้น (Agar)	15	กรัม

ชั่งอาหารสำเร็จรูป 23.5 กรัม ละลายลงในน้ำกลั่นปริมาตร 1000 มิลลิลิตร ปรับพีเอชให้ได้ 7.0 ± 0.2 จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

2. อาหารสูตร Dichloran Rose Bengal Chloramphenicol Agar (DRBC Agar)

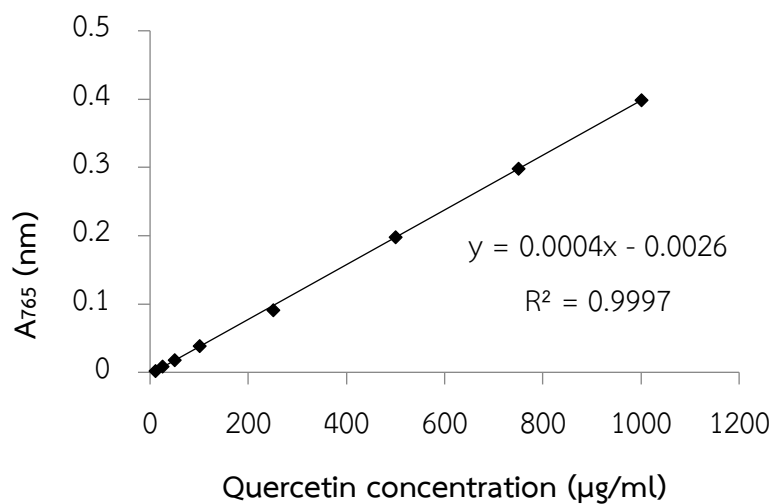
Enzymatic digest of animal tissue	5	กรัม
น้ำตาลกลูโคส	10	กรัม
โมโนโพแทสเซียมฟอสเฟต (Monopotassium phosphate)	1	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟต (Magnesium sulfate)	0.5	กรัม
โรสเบงกอล (Rose bengal)	0.025	กรัม
Dichloran	0.002	กรัม
คลอแรมฟินิคอล (Chloramphenicol)	0.1	กรัม
วุ้น (Agar)	15	กรัม

ชั่งอาหารสำเร็จรูป 31.6 กรัม ละลายลงในน้ำกลั่นปริมาตร 1000 มิลลิลิตร ปรับพีเอชให้ได้ 5.6 ± 0.2 จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

ภาคผนวก ข

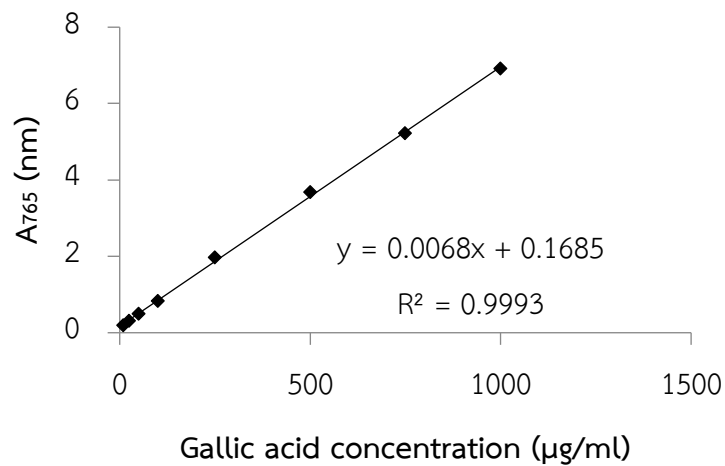
กราฟมาตรฐาน

กราฟมาตรฐานควอซีทินเพื่อใช้ในการคำนวณความเข้มข้นของสารประกอบฟลาโวนอยด์ ตามวิธีของกรองจันทร์และสมจิตต์ (2557)



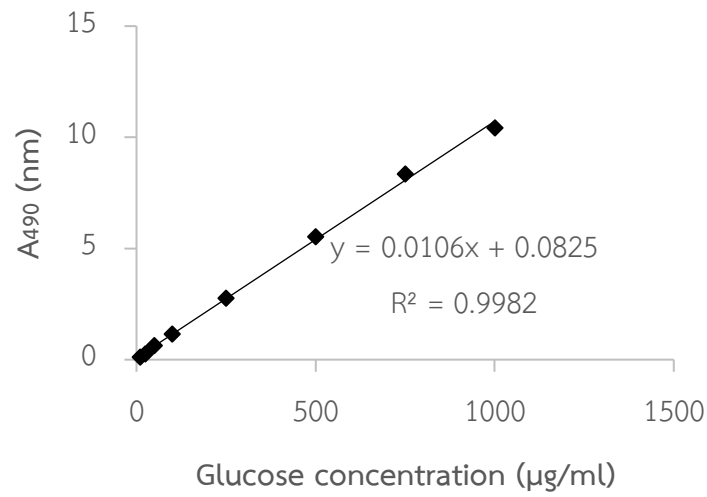
รูปที่ ข1 กราฟมาตรฐานของความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของควอซีทินกับค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 510 นาโนเมตร

กราฟมาตรฐานกรดแกลลิกเพื่อใช้ในการคำนวณความเข้มข้นของสารประกอบฟีนอลิก ตามวิธีของ Chidambara *et al.*, (2002)



รูปที่ ข2 กราฟมาตรฐานของความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของกรดแกลลิกกับค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร

กราฟมาตรฐานน้ำตาลกลูโคสเพื่อใช้ในการคำนวณปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ตามวิธีของ Dubois *et al.*, (1956)



รูปที่ ข3 กราฟมาตรฐานของความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสกับค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร

ภาคผนวก ค

แบบสอบถามการประเมินทางประสาทสัมผัส

แบบประเมินความพึงพอใจต่อคอมบูชา

คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

คำชี้แจง : แบบประเมินนี้เป็นการเก็บข้อมูลความคิดเห็นและความพึงพอใจของนักศึกษาและอาจารย์ที่มีต่อคอมบูชา ทั้งนี้เพื่อนำความคิดเห็นและความพึงพอใจที่ได้ไปปรับปรุงรสชาติของคอมบูชาให้มีความเหมาะสมและเป็นที่ยอมรับในกลุ่มผู้บริโภค

ตอนที่ 1 : ระดับความพึงพอใจ : โปรดใส่คะแนนความพึงพอใจ โดยให้ คะแนน 1-9 โดย

- 9 = ชอบมากที่สุด (Like extremely) 4 = ไม่ชอบเล็กน้อย (Dislike slightly)
 8 = ชอบมาก (Like very much) 3 = ไม่ชอบปานกลาง (Dislike moderately)
 7 = ชอบปานกลาง (Like moderately) 2 = ไม่ชอบมาก (Dislike very much)
 6 = ชอบเล็กน้อย (Like slightly) 1 = ไม่ชอบมากที่สุด (Dislike extremely)
 5 = เฉย ๆ (Neither like nor dislike)

คุณภาพ	คะแนนเต็ม	รหัสตัวอย่าง		
		1	2	3
สี	9			
กลิ่น	9			
ความเปรี้ยว	9			
ความหวาน	9			
ความกลมกล่อม	9			
ความชอบโดยรวม	9			

ข้อเสนอแนะอื่นๆ

.....

ภาคผนวก ง

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ตารางที่ ง-1 ค่าการดักจับอนุภาคลิสรระ DPPH ของคอมบูชาจากสมุนไพร 10 ชนิด ที่หมักเป็นเวลา 10 วัน ที่อุณหภูมิห้อง

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Min	Max	
					Lower Bound	Upper Bound			
					คอมบูชาจากชาดำ	3			96.6767
คอมบูชาจากใบหม่อน	3	92.0667	1.10151	.63596	89.3304	94.8030	91.00	93.20	
คอมบูชาจากตะไคร้	3	81.8100	1.29549	.74795	78.5918	85.0282	80.43	83.00	
คอมบูชาจากใบย่านาง	3	85.4533	.50649	.29242	84.1951	86.7115	85.00	86.00	
คอมบูชาจากมะตูม	3	68.9833	1.73949	1.00430	64.6622	73.3045	67.00	70.25	
คอมบูชาจากหล่อ ฮั้งก้วย	3	86.8767	.17214	.09939	86.4490	87.3043	86.68	87.00	
คอมบูชาจากกระเจี๊ยบ	3	93.8633	1.62666	.93915	89.8225	97.9042	92.00	95.00	
คอมบูชาจากเกสรบัว	3	94.7567	.21779	.12574	94.2156	95.2977	94.58	95.00	
คอมบูชาจากอัญชัน	3	95.6833	.56501	.32621	94.2798	97.0869	95.12	96.25	
คอมบูชาจากเก๊กฮวย	3	89.3367	.86373	.49868	87.1910	91.4823	88.36	90.00	
Total	30	88.5507	8.16236	1.49024	85.5028	91.5985	67.00	97.00	
Model			Fixed Effects	1.00214	.18296	88.1690	88.9323		
			Random Effects	2.66112		82.5308	94.5705		

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	1912.016	9	212.446	211.541	.000
Within Groups	20.086	20	1.004		
Total	1932.101	29			

Duncan^a

ตัวอย่าง	N	Subset for alpha = 0.05							
		1	2	3	4	5	6	7	8
คอมบูชาจากมะตูม	3	68.9833							
คอมบูชาจากตะไคร้	3		81.8100						
คอมบูชาจากใบย่านาง	3			85.4533					
คอมบูชาจากหล่อฮังก้วย	3			86.8767					
คอมบูชาจากเก๋ากี้	3				89.3367				
คอมบูชาจากใบหม่อน	3					92.0667			
คอมบูชาจากกระเจี๊ยบ	3						93.8633		
คอมบูชาจากเกสรบัว	3						94.7567	94.7567	
คอมบูชาจากอัญชัน	3							95.6833	95.6833
คอมบูชาจากชาดำ	3								96.6767
Sig.		1.000	1.000	.097	1.000	1.000	.288	.271	.239

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

ตารางที่ ง-2 ความเข้มข้นของคอมบูชาจากสมุนไพรแต่ละชนิดที่สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH ได้ 50 เปอร์เซ็นต์ (IC_{50}) โดยหมักที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 วัน

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Min	Max
					Lower Bound	Upper Bound		
คอมบูชาจากชาดำ	3	17.54333	.505602	.291909	16.28735	18.79932	17.000	18.000
คอมบูชาจากใบหม่อน	3	32.28000	2.740219	1.582066	25.47292	39.08708	30.000	35.320
คอมบูชาจากตะไคร้	3	65.53667	.405010	.233833	64.53057	66.54277	65.250	66.000
คอมบูชาจากใบย่านาง	3	51.51000	1.378514	.795885	48.08558	54.93442	50.280	53.000
คอมบูชาจากมะตูม	3	136.17333	4.867251	2.810109	124.08241	148.26426	132.000	141.520
คอมบูชาจากหล่อฮังก้วย	3	41.20667	.712835	.411555	39.43589	42.97745	40.620	42.000
คอมบูชาจากกระเจี๊ยบ	3	31.94667	.061101	.035277	31.79488	32.09845	31.880	32.000
คอมบูชาจากเกสรบัว	3	26.76667	.361709	.208833	25.86813	27.66520	26.350	27.000
คอมบูชาจากอัญชัน	3	20.61333	.346747	.200194	19.75197	21.47470	20.330	21.000
คอมบูชาจากเก๋ากี้	3	31.92333	1.116975	.644886	29.14861	34.69805	30.770	33.000
Total	30	45.55000	33.727072	6.157693	32.95610	58.14390	17.000	141.520
Model								
Fixed Effects			1.884926	.344139	44.83214	46.26786		
Random Effects				11.041485	20.57243	70.52757		

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	32916.886	9	3657.432	1029.408	.000
Within Groups	71.059	20	3.553		
Total	32987.945	29			

Duncan

ตัวอย่าง	N	Subset for alpha = 0.05						
		1	2	3	4	5	6	7
คอมบูชาจากชาดำ	3	17.54333						
คอมบูชาจากอัญชัน	3	20.61333						
คอมบูชาจากเกสร บัว	3		26.76667					
คอมบูชาจากเก๋ากี้	3			31.92333				
คอมบูชาจาก กระเจี๊ยบ	3			31.94667				
คอมบูชาจากใบ หม่อน	3			32.28000				
คอมบูชาจากหล่อ ฮังก้วย	3				41.20667			
คอมบูชาจากใบ ย่านาง	3					51.51000		
คอมบูชาจากตะไคร้	3						65.53667	
คอมบูชาจากมะตูม	3							136.17333
Sig.		.060	1.000	.829	1.000	1.000	1.000	1.000

ตารางที่ ง-3 ค่าการดักจับอนุมลิสระ ABTS ของคอมบูชาจากสมุนไพร 10 ชนิด ที่หมักเป็นเวลา 10 วัน ที่อุณหภูมิห้อง

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Min	Max
					Lower Bound	Upper Bound		
คอมบูชาจากชาดำ	3	97.5033	1.80832	1.04404	93.0112	101.9955	96.00	99.51
คอมบูชาจากใบหม่อน	3	91.3333	1.52753	.88192	87.5388	95.1279	90.00	93.00
คอมบูชาจากตะไคร้	3	95.1700	.51098	.29501	93.9007	96.4393	94.62	95.63
คอมบูชาจากใบย่านาง	3	93.4757	2.14934	1.24092	88.1364	98.8149	91.00	94.87
คอมบูชาจากมะตูม	3	91.7584	1.94132	1.12082	86.9359	96.5809	90.63	94.00
คอมบูชาจากหล่อฮังก้วย	3	94.8667	.21385	.12347	94.3354	95.3979	94.62	95.00
คอมบูชาจากกระเจี๊ยบ	3	97.7267	.23861	.13776	97.1339	98.3194	97.56	98.00
คอมบูชาจากเกสรบัว	3	96.5203	.50124	.28939	95.2752	97.7655	96.00	97.00
คอมบูชาจากอัญชัน	3	97.8887	1.72618	.99661	93.6006	102.1767	96.56	99.84
คอมบูชาจากเก๋ากี้	3	90.5900	.36097	.20841	89.6933	91.4867	90.32	91.00
Total	30	94.6833	2.89356	.52829	93.6028	95.7638	90.00	99.84
Model								
Fixed Effects			1.33104	.24301	94.1764	95.1902		
Random Effects				.87639	92.7008	96.6658		

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	207.375	9	23.042	13.006	.000
Within Groups	35.433	20	1.772		
Total	242.809	29			

Duncan^a

ตัวอย่าง	N	Subset for alpha = 0.05					
		1	2	3	4	5	6
คอมบูชาจากเก๋ากี้	3	90.5900					
คอมบูชาจากใบหม่อน	3	91.3333	91.3333				
คอมบูชาจากมะตูม	3	91.7584	91.7584				
คอมบูชาจากใบย่านาง	3		93.4757	93.4757			
คอมบูชาจากหล่อฮังก้วย	3			94.8667	94.8667		
คอมบูชาจากตะไคร้	3			95.1700	95.1700	95.1700	
คอมบูชาจากเกสรบัว	3				96.5203	96.5203	96.5203
คอมบูชาจากชาดำ	3					97.5033	97.5033
คอมบูชาจากกระเจียบ	3						97.7267
คอมบูชาจากอัญชัน	3						97.8887
Sig.		.322	.076	.155	.165	.054	.262

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

ตารางที่ ง-4 ความเข้มข้นของคอมบูชาจากสมุนไพรแต่ละชนิดที่สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระ ABTS ได้ 50 เปอร์เซ็นต์ (IC₅₀) โดยหมักที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 วัน

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Min	Max
					Lower Bound	Upper Bound		
คอมบูชาจากชาดำ	3	16.49000	.204634	.118145	15.98166	16.99834	16.265	16.665
คอมบูชาจากใบหม่อน	3	61.25700	2.647457	1.528510	54.68035	67.83365	59.260	64.260
คอมบูชาจากตะไคร้	3	58.99267	8.020806	4.630815	39.06788	78.91745	51.326	67.326
คอมบูชาจากใบย่านาง	3	87.73467	3.917192	2.261592	78.00382	97.46551	83.231	90.350
คอมบูชาจากมะตูม	3	55.96283	2.511209	1.449847	49.72464	62.20102	53.326	58.326
คอมบูชาจากหล่อฮังก้วย	3	56.47333	4.067398	2.348314	46.36936	66.57731	51.954	59.840
คอมบูชาจากกระเจี๊ยบ	3	44.19513	.839182	.484502	42.11049	46.27978	43.325	45.000
คอมบูชาจากเกสรบัว	3	47.69307	3.708993	2.141388	38.47942	56.90672	43.610	50.854
คอมบูชาจากอัญชัน	3	44.09588	3.069980	1.772454	36.46963	51.72214	40.562	46.100
คอมบูชาจากเก๋ากี้	3	85.06070	1.024469	.591477	82.51578	87.60562	84.326	86.231
Total	30	55.79553	20.057151	3.661918	48.30606	63.28499	16.265	90.350
Model								
Fixed Effects			3.667611	.669611	54.39874	57.19231		
Random Effects				6.497111	41.09804	70.49302		

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	11397.363	9	1266.374	94.145	.000
Within Groups	269.027	20	13.451		
Total	11666.390	29			

Duncan^a

ตัวอย่าง	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
คอมบูชาจากชาดำ	3	16.49000			
คอมบูชาจากอัญชัน	3		44.09588		
คอมบูชาจากกระเจี๊ยบ	3		44.19513		
คอมบูชาจากเกสรบัว	3		47.69307		
คอมบูชาจากมะตูม	3			55.96283	
คอมบูชาจากหล่อฮังก้วย	3			56.47333	
คอมบูชาจากตะไคร้	3			58.99267	
คอมบูชาจากใบหม่อน	3			61.25700	
คอมบูชาจากเก๋ากี้	3				85.06070
คอมบูชาจากไผ่ย่านาง	3				87.73467
Sig.		1.000	.269	.119	.383

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

ตารางที่ ง-5 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกของคอมบูชาจากสมุนไพร 10 ชนิด ที่หมักเป็นเวลา 10 วัน ณ อุณหภูมิห้อง

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Min	Max
					Lower Bound	Upper Bound		
					คอมบูชาจากชาดำ	3		
คอมบูชาจากใบหม่อน	3	264.6618	3.65879	2.11240	255.5729	273.7507	261.43	268.63
คอมบูชาจากตะไคร้	3	191.6226	2.53155	1.46159	185.3339	197.9113	188.78	193.63
คอมบูชาจากใบย่านาง	3	203.5588	.40938	.23636	202.5419	204.5758	203.19	204.00
คอมบูชาจากมะตูม	3	280.0505	7.78902	4.49699	260.7015	299.3995	271.43	286.57
คอมบูชาจากหล่อฮังก้วย	3	216.9657	1.47305	.85047	213.3064	220.6249	215.54	218.49
คอมบูชาจากกระเจี๊ยบ	3	300.8906	2.97490	1.71756	293.5005	308.2807	298.50	304.22
คอมบูชาจากเกสรบัว	3	376.7696	7.57363	4.37264	357.9557	395.5835	368.49	383.34
คอมบูชาจากอัญชัน	3	204.7598	4.40275	2.54193	193.8228	215.6968	201.72	209.81
คอมบูชาจากเก๋ากี้	3	202.8480	1.45085	.83765	199.2439	206.4521	201.87	204.51
Total	30	274.7471	96.43431	17.60642	238.7379	310.7562	188.78	506.91
Model	Fixed Effects		4.16420	.76028	273.1611	276.3330		
	Random Effects			31.58415	203.2987	346.1954		

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	269340.878	9	29926.764	1725.821	.000
Within Groups	346.812	20	17.341		
Total	269687.690	29			

Duncan^a

ตัวอย่าง	N	Subset for alpha = 0.05							
		1	2	3	4	5	6	7	8
คอมบูชาจากตะไคร้	3	191.6226							
คอมบูชาจากเก๋ากี้	3		202.8480						
คอมบูชาจากใบย่านาง	3		203.5588						
คอมบูชาจากอัญชัน	3		204.7598						
คอมบูชาจากหล่อฮั้งก้วย	3			216.9657					
คอมบูชาจากใบหม่อน	3				264.6618				
คอมบูชาจากมะตูม	3					280.0505			
คอมบูชาจากกระเจี๊ยบ	3						300.8906		
คอมบูชาจากเกสรบัว	3							376.7696	
คอมบูชาจากชาดำ	3								505.3431
Sig.		1.000	.602	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

ตารางที่ ง-6 ปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ของคอมบูชาจากสมุนไพร 10 ชนิด ที่หมักเป็นเวลา 10 วัน ณ อุณหภูมิห้อง

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Min	Max
					Lower Bound	Upper Bound		
					คอมบูชาจากชาดำ	3		
คอมบูชาจากใบหม่อน	3	312.3333	5.20416	3.00463	299.4055	325.2612	306.50	316.50
คอมบูชาจากตะไคร้	3	99.8333	2.88675	1.66667	92.6622	107.0044	96.50	101.50
คอมบูชาจากใบย่านาง	3	129.8333	1.44338	.83333	126.2478	133.4189	129.00	131.50
คอมบูชาจากมะตูม	3	212.3333	1.44338	.83333	208.7478	215.9189	211.50	214.00
คอมบูชาจากหล่อฮังก้วย	3	144.0000	7.50000	4.33013	125.3690	162.6310	136.50	151.50
คอมบูชาจากกระเจี๊ยบ	3	91.5000	.50000	.28868	90.2579	92.7421	91.00	92.00
คอมบูชาจากเกสรบัว	3	307.3333	7.21688	4.16667	289.4056	325.2611	299.00	311.50
คอมบูชาจากอัญชัน	3	97.3333	2.88675	1.66667	90.1622	104.5044	94.00	99.00
คอมบูชาจากเก๋ากี้	3	108.1667	5.20416	3.00463	95.2388	121.0945	104.00	114.00
Total	30	224.4167	193.13222	35.26096	152.2999	296.5334	91.00	749.00
Model	Fixed Effects		5.14620	.93956	222.4568	226.3766		
	Random Effects			63.27986	81.2677	367.5656		

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	1081171.875	9	120130.208	4536.068	.000
Within Groups	529.667	20	26.483		
Total	1081701.542	29			

Duncan^a

ตัวอย่าง	N	Subset for alpha = 0.05						
		1	2	3	4	5	6	7
คอมบูชาจากกระเจียว	3	91.5000						
คอมบูชาจากอัญชัน	3	97.3333						
คอมบูชาจากตะไคร้	3	99.8333	99.8333					
คอมบูชาจากเก๋ากี้	3		108.1667					
คอมบูชาจากใบย่านาง	3			129.8333				
คอมบูชาจากหล่อ ฮังก้วย	3				144.0000			
คอมบูชาจากมะตูม	3					212.3333		
คอมบูชาจากเกสรบัว	3						307.3333	
คอมบูชาจากใบหม่อน	3						312.3333	
คอมบูชาจากชาดำ	3							741.5000
Sig.		.074	.061	1.000	1.000	1.000	.248	1.000

ตารางที่ ง-7 การเปลี่ยนแปลงของค่า pH ระหว่างการหมักของคอมบูชาจากซาอู่หลง คอมบูชาจาก เกสรบัวและคอมบูชาจากอัญชันที่หมักเป็นเวลา 20 วัน ณ อุณหภูมิห้อง

คอมบูชาจากซาอู่หลง

ระยะเวลาหมัก	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Min	Max
					Lower Bound	Upper Bound		
0 วัน	3	4.3100	.01000	.00577	4.2852	4.3348	4.30	4.32
5 วัน	3	3.6533	.00577	.00333	3.6390	3.6677	3.65	3.66
7 วัน	3	3.5700	.01000	.00577	3.5452	3.5948	3.56	3.58
9 วัน	3	3.5333	.01528	.00882	3.4954	3.5713	3.52	3.55
12 วัน	3	3.3633	.04041	.02333	3.2629	3.4637	3.32	3.40
15 วัน	3	3.1000	.10000	.05774	2.8516	3.3484	3.00	3.20
20 วัน	3	2.5867	.07767	.04485	2.3937	2.7796	2.50	2.65
Total	21	3.4452	.50342	.10986	3.2161	3.6744	2.50	4.32
Model								
Fixed								
Effects			.05090	.01111	3.4214	3.4691		
Random								
Effects				.19985	2.9562	3.9343		

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	5.032	6	.839	323.779	.000
Within Groups	.036	14	.003		
Total	5.069	20			

Duncan^a

ตัวอย่าง	N	Subset for alpha = 0.05					
		1	2	3	4	5	6
20 วัน	3	2.5867					
15 วัน	3		3.1000				
12 วัน	3			3.3633			
9 วัน	3				3.5333		
7 วัน	3				3.5700	3.5700	
5 วัน	3					3.6533	
0 วัน	3						4.3100
Sig.		1.000	1.000	1.000	.393	.065	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

คอมบูชาจากเกสรบัว

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Min	Max
					Lower Bound	Upper Bound		
					0 วัน	3		
5 วัน	3	3.2233	.02517	.01453	3.1608	3.2858	3.20	3.25
7 วัน	3	3.1700	.03000	.01732	3.0955	3.2445	3.14	3.20
9 วัน	3	3.0833	.07638	.04410	2.8936	3.2731	3.00	3.15
12 วัน	3	2.9367	.03512	.02028	2.8494	3.0239	2.90	2.97
15 วัน	3	2.7900	.08544	.04933	2.5778	3.0022	2.70	2.87
20 วัน	3	2.5800	.07000	.04041	2.4061	2.7539	2.50	2.63
Total	21	3.1748	.57364	.12518	2.9136	3.4359	2.50	4.52
Model	Fixed							
	Effects		.07131	.01556	3.1414	3.2081		
	Random							
	Effects			.22731	2.6186	3.7310		

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	6.510	6	1.085	213.347	.000
Within Groups	.071	14	.005		
Total	6.581	20			

Duncan^a

ตัวอย่าง	N	Subset for alpha = 0.05					
		1	2	3	4	5	6
20 วัน	3	2.5800					
15 วัน	3		2.7900				
12 วัน	3			2.9367			
9 วัน	3				3.0833		
7 วัน	3				3.1700	3.1700	
5 วัน	3					3.2233	
0 วัน	3						4.4400
Sig.		1.000	1.000	1.000	.159	.375	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

คอมบูซาจากอัญชัน

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Min	Max	
					Lower Bound	Upper Bound			
					0 วัน	3			4.4000
5 วัน	3	3.5000	.10000	.05774	3.2516	3.7484	3.40	3.60	
7 วัน	3	3.2833	.01528	.00882	3.2454	3.3213	3.27	3.30	
9 วัน	3	3.1767	.05508	.03180	3.0399	3.3135	3.12	3.23	
12 วัน	3	3.0500	.01000	.00577	3.0252	3.0748	3.04	3.06	
15 วัน	3	2.8867	.10263	.05925	2.6317	3.1416	2.80	3.00	
20 วัน	3	2.5800	.10583	.06110	2.3171	2.8429	2.50	2.70	
Total	21	3.2681	.55320	.12072	3.0163	3.5199	2.50	4.50	
Model									
			Fixed Effects	.08027	.01752	3.2305	3.3057		
			Random Effects		.21877	2.7328	3.8034		

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	6.030	6	1.005	155.995	.000
Within Groups	.090	14	.006		
Total	6.121	20			

Duncan^a

ตัวอย่าง	N	Subset for alpha = 0.05					
		1	2	3	4	5	6
20 วัน	3	2.5800					
15 วัน	3		2.8867				
12 วัน	3			3.0500			
9 วัน	3			3.1767	3.1767		
7 วัน	3				3.2833		
5 วัน	3					3.5000	
0 วัน	3						4.4000
Sig.		1.000	1.000	.074	.126	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

ตารางที่ ง-8 การเปลี่ยนแปลงของปริมาณกรดอะซิติกระหว่างการหมักของคอมบูชาจากซาอู่หลง คอมบูชาจากเกสรบัวและคอมบูชาจากอัญชันที่หมักเป็นเวลา 20 วัน ณ อุณหภูมิห้อง

คอมบูชาจากซาอู่หลง

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Min	Max	
					Lower Bound	Upper Bound			
					0 วัน	3			.2067
5 วัน	3	.3200	.02646	.01528	.2543	.3857	.30	.35	
7 วัน	3	.5067	.05508	.03180	.3699	.6435	.45	.56	
9 วัน	3	1.0800	.05568	.03215	.9417	1.2183	1.03	1.14	
12 วัน	3	2.8333	.05774	.03333	2.6899	2.9768	2.80	2.90	
15 วัน	3	3.6333	.11547	.06667	3.3465	3.9202	3.50	3.70	
20 วัน	3	4.1800	.21633	.12490	3.6426	4.7174	4.00	4.42	
Total	21	1.8229	1.59958	.34906	1.0947	2.5510	.17	4.42	
Model									
			Fixed Effects	.10137	.02212	1.7754	1.8703		
			Random Effects		.63639	.2657	3.3801		

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	51.030	6	8.505	827.634	.000
Within Groups	.144	14	.010		
Total	51.173	20			

Duncan^a

ตัวอย่าง	N	Subset for alpha = 0.05					
		1	2	3	4	5	6
0 วัน	3	.2067					
5 วัน	3	.3200					
7 วัน	3		.5067				
9 วัน	3			1.0800			
12 วัน	3				2.8333		
15 วัน	3					3.6333	
20 วัน	3						4.1800
Sig.		.192	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

คอมบูชาจากเกสรบัว

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval		Min	Max
					for Mean			
					Lower Bound	Upper Bound		
0 วัน	3	.2867	.01528	.00882	.2487	.3246	.27	.30
5 วัน	3	.3500	.01000	.00577	.3252	.3748	.34	.36
7 วัน	3	.4100	.03606	.02082	.3204	.4996	.38	.45
9 วัน	3	.5367	.02517	.01453	.4742	.5992	.51	.56
12 วัน	3	.7500	.01000	.00577	.7252	.7748	.74	.76
15 วัน	3	1.6467	.03055	.01764	1.5708	1.7226	1.62	1.68
20 วัน	3	2.7333	.25166	.14530	2.1082	3.3585	2.50	3.00
Total	21	.9590	.86706	.18921	.5644	1.3537	.27	3.00
Model								
Fixed Effects			.09757	.02129	.9134	1.0047		
Random Effects				.34391	.1175	1.8006		

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	14.903	6	2.484	260.924	.000
Within Groups	.133	14	.010		
Total	15.036	20			

Duncan^a

ตัวอย่าง	N	Subset for alpha = 0.05				
		1	2	3	4	5
0 วัน	3	.2867				
5 วัน	3	.3500				
7 วัน	3	.4100	.4100			
9 วัน	3		.5367			
12 วัน	3			.7500		
15 วัน	3				1.6467	
20 วัน	3					2.7333
Sig.		.163	.134	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

คอมบูชาจากอัญชัน

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Min	Max
					Lower Bound	Upper Bound		
					0 วัน	3		
5 วัน	3	.8433	.04163	.02404	.7399	.9468	.81	.89
7 วัน	3	.9367	.01528	.00882	.8987	.9746	.92	.95
9 วัน	3	.9517	.00764	.00441	.9327	.9706	.95	.96
12 วัน	3	1.0133	.04933	.02848	.8908	1.1359	.98	1.07
15 วัน	3	.9933	.02517	.01453	.9308	1.0558	.97	1.02
20 วัน	3	1.1967	.10504	.06064	.9357	1.4576	1.09	1.30
Total	21	.9593	.13282	.02898	.8988	1.0197	.76	1.30
Model								
Fixed Effects			.04859	.01060	.9365	.9820		
Random Effects				.05038	.8360	1.0826		

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.320	6	.053	22.575	.000
Within Groups	.033	14	.002		
Total	.353	20			

Duncan^a

ตัวอย่าง	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
0 วัน	3	.7800		
5 วัน	3	.8433		
7 วัน	3		.9367	
9 วัน	3		.9517	
15 วัน	3		.9933	
12 วัน	3		1.0133	
20 วัน	3			1.1967
Sig.		.133	.095	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

ตารางที่ ง-9 การเปลี่ยนแปลงปริมาณน้ำตาลทั้งหมดระหว่างการหมักของคอมบูชาจากซาอู่หลง คอมบูชาจากเกสรบัวและคอมบูชาจากอัญชันที่หมักเป็นเวลา 20 วัน ณ อุณหภูมิห้อง

คอมบูชาจากซาอู่หลง

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Min	Max
					Lower Bound	Upper Bound		
					0 วัน	3		
5 วัน	3	69.1933	.72947	.42116	67.3812	71.0054	68.58	70.00
7 วัน	3	63.3333	1.52753	.88192	59.5388	67.1279	62.00	65.00
9 วัน	3	44.0000	1.00000	.57735	41.5159	46.4841	43.00	45.00
12 วัน	3	30.0000	1.00000	.57735	27.5159	32.4841	29.00	31.00
15 วัน	3	27.3833	.26690	.15409	26.7203	28.0463	27.10	27.63
20 วัน	3	27.0167	.07638	.04410	26.8269	27.2064	26.95	27.10
Total	21	47.2752	18.87022	4.11782	38.6856	55.8649	26.95	71.00
Model	Fixed Effects		.92138	.20106	46.8440	47.7065		
	Random Effects			7.51180	28.8945	65.6559		

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	7109.816	6	1184.969	1395.833	.000
Within Groups	11.885	14	.849		
Total	7121.701	20			

Duncan^a

ตัวอย่าง	N	Subset for alpha = 0.05				
		1	2	3	4	5
20 วัน	3	27.0167				
15 วัน	3	27.3833				
12 วัน	3		30.0000			
9 วัน	3			44.0000		
7 วัน	3				63.3333	
5 วัน	3					69.1933
0 วัน	3					70.0000
Sig.		.634	1.000	1.000	1.000	.302

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

คอมบูชาจากเกสรบัว

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Min	Max
					Lower Bound	Upper Bound		
					0 วัน	3		
5 วัน	3	65.6033	.45742	.26409	64.4670	66.7396	65.25	66.12
7 วัน	3	58.4233	.41525	.23975	57.3918	59.4549	58.14	58.90
9 วัน	3	40.1200	.05196	.03000	39.9909	40.2491	40.06	40.15
12 วัน	3	18.7000	.30000	.17321	17.9548	19.4452	18.40	19.00
15 วัน	3	18.5133	.25007	.14438	17.8921	19.1345	18.34	18.80
20 วัน	3	18.5367	.28113	.16231	17.8383	19.2350	18.35	18.86
Total	21	41.5319	22.27018	4.85975	31.3946	51.6692	18.34	72.33
Model								
Fixed Effects			.57527	.12553	41.2627	41.8011		
Random Effects				8.87058	19.8264	63.2374		

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	9914.586	6	1652.431	4993.173	.000
Within Groups	4.633	14	.331		
Total	9919.219	20			

Duncan^a

ตัวอย่าง	N	Subset for alpha = 0.05				
		1	2	3	4	5
15 วัน	3	18.5133				
20 วัน	3	18.5367				
12 วัน	3	18.7000				
9 วัน	3		40.1200			
7 วัน	3			58.4233		
5 วัน	3				65.6033	
0 วัน	3					70.8267
Sig.		.712	1.000	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

คอมบูชาจากอัญชัน

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Min	Max
					Lower Bound	Upper Bound		
					0 วัน	3		
5 วัน	3	65.3633	.19502	.11260	64.8789	65.8478	65.14	65.50
7 วัน	3	62.5400	.44136	.25482	61.4436	63.6364	62.12	63.00
9 วัน	3	32.6167	.43108	.24889	31.5458	33.6875	32.15	33.00
12 วัน	3	25.6667	.66583	.38442	24.0126	27.3207	25.10	26.40
15 วัน	3	24.2600	.26230	.15144	23.6084	24.9116	23.98	24.50
20 วัน	3	20.5867	.49702	.28696	19.3520	21.8213	20.21	21.15
Total	21	43.0581	20.83505	4.54658	33.5741	52.5421	20.21	71.00
Model								
Fixed Effects			.45962	.10030	42.8430	43.2732		
Random Effects				8.29947	22.7500	63.3662		

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	8679.028	6	1446.505	6847.282	.000
Within Groups	2.958	14	.211		
Total	8681.985	20			

Duncan^a

ตัวอย่าง	N	Subset for alpha = 0.05						
		1	2	3	4	5	6	7
20 วัน	3	20.5867						
15 วัน	3		24.2600					
12 วัน	3			25.6667				
9 วัน	3				32.6167			
7 วัน	3					62.5400		
5 วัน	3						65.3633	
0 วัน	3							70.3733
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

ตารางที่ ง-10 การเปลี่ยนแปลงปริมาณเอทานอลระหว่างการหมักของคอมบูชาจากซาอู่หลง คอมบูชาจากเกสรบัวและคอมบูชาจากอัญชันที่หมักเป็นเวลา 20 วัน ณ อุณหภูมิห้อง

คอมบูชาจากซาอู่หลง

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Min	Max
					Lower Bound	Upper Bound		
0 วัน	3	.1733	.02082	.01202	.1216	.2250	.15	.19
5 วัน	3	.2150	.01323	.00764	.1821	.2479	.21	.23
7 วัน	3	.2357	.01250	.00722	.2046	.2667	.23	.25
9 วัน	3	.2767	.01528	.00882	.2387	.3146	.26	.29
12 วัน	3	.3300	.02000	.01155	.2803	.3797	.31	.35
15 วัน	3	.3730	.03110	.01795	.2958	.4502	.34	.40
20 วัน	3	.4800	.02646	.01528	.4143	.5457	.45	.50
Total	21	.2977	.10143	.02213	.2515	.3438	.15	.50
Model								
Fixed Effects			.02093	.00457	.2879	.3075		
Random Effects				.03980	.2003	.3951		

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.200	6	.033	75.988	.000
Within Groups	.006	14	.000		
Total	.206	20			

Duncan^a

ตัวอย่าง	N	Subset for alpha = 0.05					
		1	2	3	4	5	6
0 วัน	3	.1733					
5 วัน	3		.2150				
7 วัน	3		.2357				
9 วัน	3			.2767			
12 วัน	3				.3300		
15 วัน	3					.3730	
20 วัน	3						.4800
Sig.		1.000	.246	1.000	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

คอมบูชาจากเกสรบัว

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Min	Max
					Lower Bound	Upper Bound		
					0 วัน	3		
5 วัน	3	.2767	.01528	.00882	.2387	.3146	.26	.29
7 วัน	3	.4333	.03786	.02186	.3393	.5274	.39	.46
9 วัน	3	.6167	.02517	.01453	.5542	.6792	.59	.64
12 วัน	3	.8467	.02082	.01202	.7950	.8984	.83	.87
15 วัน	3	.9300	.02000	.01155	.8803	.9797	.91	.95
20 วัน	3	1.3400	.02000	.01155	1.2903	1.3897	1.32	1.36
Total	21	.6627	.38510	.08404	.4874	.8380	.19	1.36
Model								
Fixed Effects			.02299	.00502	.6519	.6734		
Random Effects				.15324	.2877	1.0376		

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	2.959	6	.493	933.237	.000
Within Groups	.007	14	.001		
Total	2.966	20			

Duncan^a

ตัวอย่าง	N	Subset for alpha = 0.05						
		1	2	3	4	5	6	7
0 วัน	3	.1953						
5 วัน	3		.2767					
7 วัน	3			.4333				
9 วัน	3				.6167			
12 วัน	3					.8467		
15 วัน	3						.9300	
20 วัน	3							1.3400
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

คอมบูชาจากอัญชัน

Descriptives

EthanolPeaK

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum	Between-Component Variance
					Lower Bound	Upper Bound			
					0 วัน	3			
5 วัน	3	.3300	.02646	.01528	.2643	.3957	.31	.36	
7 วัน	3	.3733	.02517	.01453	.3108	.4358	.35	.40	
9 วัน	3	.5533	.04041	.02333	.4529	.6537	.51	.59	
12 วัน	3	.6267	.02082	.01202	.5750	.6784	.61	.65	
15 วัน	3	.9167	.03055	.01764	.8408	.9926	.89	.95	
20 วัน	3	1.1200	.02000	.01155	1.0703	1.1697	1.10	1.14	
Total	21	.5798	.32664	.07128	.4311	.7284	.13	1.14	
Model									
Fixed Effects			.02616	.00571	.5675	.5920			
Random Effects				.12985	.2620	.8975			.11779

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	2.124	6	.354	517.231	.000
Within Groups	.010	14	.001		
Total	2.134	20			

Duncan^a

ตัวอย่าง	N	Subset for alpha = 0.05					
		1	2	3	4	5	6
0 วัน	3	.1383					
5 วัน	3		.3300				
7 วัน	3		.3733				
9 วัน	3			.5533			
12 วัน	3				.6267		
15 วัน	3					.9167	
20 วัน	3						1.1200
Sig.		1.000	.062	1.000	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

ตารางที่ ง-11 การเปลี่ยนแปลงค่าการดักจับอนุมูลอิสระ DPPH ระหว่างการหมักของคอมบูชาจากซาอู่หลง คอมบูชาจากเกสรบัวและคอมบูชาจากอัญชันที่หมักเป็นเวลา 20 วัน ณ อุณหภูมิห้อง

คอมบูชาจากซาอู่หลง

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Min	Max
					Lower Bound	Upper Bound		
					0 วัน	3		
5 วัน	3	88.5433	.01528	.00882	88.5054	88.5813	88.53	88.56
7 วัน	3	90.7333	.01155	.00667	90.7046	90.7620	90.72	90.74
9 วัน	3	93.7600	.69721	.40253	92.0280	95.4920	93.15	94.52
12 วัน	3	95.1667	.17474	.10088	94.7326	95.6007	95.02	95.36
15 วัน	3	96.1800	.06083	.03512	96.0289	96.3311	96.14	96.25
20 วัน	3	97.4433	.19009	.10975	96.9711	97.9155	97.25	97.63
Total	21	92.2048	4.65379	1.01554	90.0864	94.3231	83.21	97.63
Model								
Fixed Effects			.31050	.06776	92.0594	92.3501		
Random Effects				1.85122	87.6750	96.7345		

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	431.806	6	71.968	746.478	.000
Within Groups	1.350	14	.096		
Total	433.155	20			

Duncan^a

ตัวอย่าง	N	Subset for alpha = 0.05						
		1	2	3	4	5	6	7
0 วัน	3	83.6067						
5 วัน	3		88.5433					
7 วัน	3			90.7333				
9 วัน	3				93.7600			
12 วัน	3					95.1667		
15 วัน	3						96.1800	
20 วัน	3							97.4433
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

คอมบูซาจากเกสรบัว

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Min	Max
					Lower Bound	Upper Bound		
					0 วัน	3		
5 วัน	3	87.5767	.03215	.01856	87.4968	87.6565	87.54	87.60
7 วัน	3	88.4533	.13051	.07535	88.1291	88.7775	88.35	88.60
9 วัน	3	92.8367	.76487	.44160	90.9366	94.7367	92.00	93.50
12 วัน	3	93.6000	.10000	.05774	93.3516	93.8484	93.50	93.70
15 วัน	3	94.3933	.34775	.20078	93.5295	95.2572	94.00	94.66
20 วัน	3	95.2000	.13856	.08000	94.8558	95.5442	95.12	95.36
Total	21	91.0857	3.62826	.79175	89.4341	92.7373	85.45	95.36
Model								
Fixed Effects			.33027	.07207	90.9311	91.2403		
Random Effects				1.44134	87.5589	94.6125		

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	261.759	6	43.626	399.963	.000
Within Groups	1.527	14	.109		
Total	263.286	20			

Duncan^a

ตัวอย่าง	N	Subset for alpha = 0.05						
		1	2	3	4	5	6	7
0 วัน	3	85.5400						
5 วัน	3		87.5767					
7 วัน	3			88.4533				
9 วัน	3				92.8367			
12 วัน	3					93.6000		
15 วัน	3						94.3933	
20 วัน	3							95.2000
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

คอมบูชาจากอัญชัน

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Min	Max
					Lower Bound	Upper Bound		
					0 วัน	3		
5 วัน	3	92.4833	.15275	.08819	92.1039	92.8628	92.35	92.65
7 วัน	3	93.1500	.01000	.00577	93.1252	93.1748	93.14	93.16
9 วัน	3	95.5633	.05508	.03180	95.4265	95.7001	95.51	95.62
12 วัน	3	96.1800	.06083	.03512	96.0289	96.3311	96.14	96.25
15 วัน	3	97.3533	.39577	.22850	96.3702	98.3365	96.90	97.63
20 วัน	3	98.4100	.08660	.05000	98.1949	98.6251	98.36	98.51
Total	21	94.5638	3.14374	.68602	93.1328	95.9948	88.53	98.51
Model								
Fixed Effects			.22192	.04843	94.4599	94.6677		
Random Effects				1.25031	91.5044	97.6232		

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	196.973	6	32.829	666.608	.000
Within Groups	.689	14	.049		
Total	197.662	20			

Duncan^a

ตัวอย่าง	N	Subset for alpha = 0.05						
		1	2	3	4	5	6	7
0 วัน	3	88.8067						
5 วัน	3		92.4833					
7 วัน	3			93.1500				
9 วัน	3				95.5633			
12 วัน	3					96.1800		
15 วัน	3						97.3533	
20 วัน	3							98.4100
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

ตารางที่ ง-12 การเปลี่ยนแปลงค่า IC_{50} ต่ออนุมูลอิสระ DPPH ระหว่างการหมักของคอมบูชาจากซาอู่หลง คอมบูชาจากเกสรบัวและคอมบูชาจากอัญชันที่หมักเป็นเวลา 20 วัน ณ อุณหภูมิห้อง

คอมบูชาจากซาอู่หลง

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Min	Max
					Lower Bound	Upper Bound		
0 วัน	3	39.2000	.98489	.56862	36.7534	41.6466	38.10	40.00
5 วัน	3	23.3333	1.50444	.86859	19.5961	27.0706	21.60	24.30
7 วัน	3	19.2733	.21939	.12667	18.7283	19.8183	19.10	19.52
9 วัน	3	18.3367	.18610	.10745	17.8744	18.7990	18.14	18.51
12 วัน	3	17.7867	.17214	.09939	17.3590	18.2143	17.59	17.91
15 วัน	3	17.4767	.14189	.08192	17.1242	17.8291	17.35	17.63
20 วัน	3	17.4567	.07234	.04177	17.2770	17.6364	17.41	17.54
Total	21	21.8376	7.54377	1.64619	18.4037	25.2715	17.35	40.00
Model								
Fixed Effects			.69396	.15144	21.5128	22.1624		
Random Effects				2.99660	14.5052	29.1700		

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	1131.428	6	188.571	391.563	.000
Within Groups	6.742	14	.482		
Total	1138.170	20			

Duncan^a

ตัวอย่าง	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
20 วัน	3	17.4567			
15 วัน	3	17.4767			
12 วัน	3	17.7867			
9 วัน	3	18.3367	18.3367		
7 วัน	3		19.2733		
5 วัน	3			23.3333	
0 วัน	3				39.2000
Sig.		.173	.121	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

คอมบูชาจากเกสรบัว

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Min	Max
					Lower Bound	Upper Bound		
					0 วัน	3		
5 วัน	3	36.2667	.20817	.12019	35.7496	36.7838	36.10	36.50
7 วัน	3	31.3500	.21794	.12583	30.8086	31.8914	31.20	31.60
9 วัน	3	26.7300	.33867	.19553	25.8887	27.5713	26.51	27.12
12 วัน	3	23.5500	.43139	.24906	22.4784	24.6216	23.14	24.00
15 วัน	3	19.5900	.05568	.03215	19.4517	19.7283	19.54	19.65
20 วัน	3	18.3267	1.51662	.87562	14.5592	22.0942	17.00	19.98
Total	21	29.0029	9.71320	2.11959	24.5815	33.4243	17.00	47.50
Model								
Fixed Effects			.62826	.13710	28.7088	29.2969		
Random Effects				3.86416	19.5476	38.4581		

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	1881.399	6	313.567	794.414	.000
Within Groups	5.526	14	.395		
Total	1886.925	20			

Duncan^a

ตัวอย่าง	N	Subset for alpha = 0.05						
		1	2	3	4	5	6	7
20 วัน	3	18.3267						
15 วัน	3		19.5900					
12 วัน	3			23.5500				
9 วัน	3				26.7300			
7 วัน	3					31.3500		
5 วัน	3						36.2667	
0 วัน	3							47.2067
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

คอมบูชาจากอัญชัน

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Min	Max
					Lower Bound	Upper Bound		
					0 วัน	3		
5 วัน	3	29.5000	.50000	.28868	28.2579	30.7421	29.00	30.00
7 วัน	3	25.0000	1.00000	.57735	22.5159	27.4841	24.00	26.00
9 วัน	3	20.4433	.07572	.04372	20.2552	20.6314	20.39	20.53
12 วัน	3	18.3267	.20033	.11566	17.8290	18.8243	18.12	18.52
15 วัน	3	17.1733	1.04409	.60281	14.5797	19.7670	16.00	18.00
20 วัน	3	15.6467	.69587	.40176	13.9180	17.3753	15.23	16.45
Total	21	23.0138	6.81220	1.48654	19.9129	26.1147	15.23	36.00
Model								
Fixed Effects			.74166	.16184	22.6667	23.3609		
Random Effects				2.70276	16.4004	29.6272		

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	920.421	6	153.403	278.889	.000
Within Groups	7.701	14	.550		
Total	928.121	20			

Duncan^a

ตัวอย่าง	N	Subset for alpha = 0.05					
		1	2	3	4	5	6
20 วัน	3	15.6467					
15 วัน	3		17.1733				
12 วัน	3		18.3267				
9 วัน	3			20.4433			
7 วัน	3				25.0000		
5 วัน	3					29.5000	
0 วัน	3						35.0067
Sig.		1.000	.078	1.000	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

ตารางที่ ง-13 การเปลี่ยนแปลงค่าการดักจับอนุภาคลิสรระ ABTS ระหว่างการหมักของคอมบูชาจากซาอู่หลง คอมบูชาจากเกสรบัวและคอมบูชาจากอัญชันที่หมักเป็นเวลา 20 วัน ณ อุณหภูมิห้อง

คอมบูชาจากซาอู่หลง

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Min	Max
					Lower Bound	Upper Bound		
					0 วัน	3		
5 วัน	3	98.0748	.15547	.08976	97.6886	98.4611	97.96	98.25
7 วัน	3	98.2299	.06142	.03546	98.0774	98.3825	98.16	98.27
9 วัน	3	98.5776	.02079	.01200	98.5260	98.6293	98.56	98.60
12 วัน	3	99.5579	.01498	.00865	99.5206	99.5951	99.54	99.57
15 วัน	3	99.7255	.00896	.00517	99.7033	99.7478	99.72	99.73
20 วัน	3	99.8367	.02517	.01453	99.7742	99.8992	99.81	99.86
Total	21	98.8234	.82163	.17929	98.4494	99.1974	97.76	99.86
Model								
Fixed Effects			.06471	.01412	98.7931	98.8537		
Random Effects				.32663	98.0241	99.6226		

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	13.443	6	2.240	535.017	.000
Within Groups	.059	14	.004		
Total	13.502	20			

Duncan^a

ตัวอย่าง	N	Subset for alpha = 0.05					
		1	2	3	4	5	6
0 วัน	3	97.7613					
5 วัน	3		98.0748				
7 วัน	3			98.2299			
9 วัน	3				98.5776		
12 วัน	3					99.5579	
15 วัน	3						99.7255
20 วัน	3						99.8367
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	.054

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

คอมบูชาจากเกสรบัว

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Min	Max
					Lower Bound	Upper Bound		
					0 วัน	3		
5 วัน	3	93.1157	.12618	.07285	92.8023	93.4291	93.03	93.26
7 วัน	3	95.1040	.68619	.39617	93.3994	96.8086	94.33	95.62
9 วัน	3	96.1650	1.09379	.63150	93.4479	98.8822	95.15	97.33
12 วัน	3	98.4453	.15215	.08785	98.0674	98.8233	98.36	98.62
15 วัน	3	99.7233	.11150	.06438	99.4463	100.0003	99.64	99.85
20 วัน	3	99.8600	.01000	.00577	99.8352	99.8848	99.85	99.87
Total	21	96.3387	3.02588	.66030	94.9613	97.7160	91.00	99.87
Model								
Fixed Effects			.58697	.12809	96.0640	96.6134		
Random Effects				1.18956	93.4279	99.2494		

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	178.296	6	29.716	86.251	.000
Within Groups	4.823	14	.345		
Total	183.119	20			

Duncan^a

ตัวอย่าง	N	Subset for alpha = 0.05					
		1	2	3	4	5	6
0 วัน	3	91.9573					
5 วัน	3		93.1157				
7 วัน	3			95.1040			
9 วัน	3				96.1650		
12 วัน	3					98.4453	
15 วัน	3						99.7233
20 วัน	3						99.8600
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	.780

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

คอมบูชาจากอัญชัน

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Min	Max
					Lower Bound	Upper Bound		
					0 วัน	3		
5 วัน	3	95.6617	.32075	.18519	94.8649	96.4585	95.36	96.00
7 วัน	3	95.9837	.86490	.49935	93.8351	98.1322	95.00	96.63
9 วัน	3	97.6205	.38177	.22041	96.6721	98.5689	97.24	98.00
12 วัน	3	99.8686	.01191	.00688	99.8390	99.8982	99.86	99.88
15 วัน	3	99.9022	.01679	.00969	99.8605	99.9439	99.89	99.92
20 วัน	3	99.9473	.00462	.00267	99.9359	99.9588	99.94	99.95
Total	21	97.5189	2.42016	.52812	96.4173	98.6206	93.00	99.95
Model								
Fixed Effects			.49732	.10852	97.2862	97.7517		
Random Effects				.94986	95.1947	99.8432		

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	113.681	6	18.947	76.606	.000
Within Groups	3.463	14	.247		
Total	117.144	20			

Duncan^a

ตัวอย่าง	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
0 วัน	3	93.6487			
5 วัน	3		95.6617		
7 วัน	3		95.9837		
9 วัน	3			97.6205	
12 วัน	3				99.8686
15 วัน	3				99.9022
20 วัน	3				99.9473
Sig.		1.000	.441	1.000	.857

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

ตารางที่ ง-14 การเปลี่ยนแปลงค่า IC_{50} ต่ออนุมูลอิสระ ABTS ระหว่างการหมักของคอมบูชาจากซาอู่หลง คอมบูชาจากเกสรบัวและคอมบูชาจากอัญชันที่หมักเป็นเวลา 20 วัน ณ อุณหภูมิห้อง

คอมบูชาจากซาอู่หลง

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Min	Max	
					Lower Bound	Upper Bound			
					0 วัน	3			19.7600
5 วัน	3	18.7233	.26083	.15059	18.0754	19.3713	18.53	19.02	
7 วัน	3	17.4433	.20429	.11795	16.9359	17.9508	17.21	17.59	
9 วัน	3	16.3733	.20599	.11893	15.8616	16.8850	16.14	16.53	
12 วัน	3	16.2767	.03786	.02186	16.1826	16.3707	16.25	16.32	
15 วัน	3	14.2767	.03786	.02186	14.1826	14.3707	14.25	14.32	
20 วัน	3	12.8267	.47711	.27546	11.6415	14.0119	12.30	13.23	
Total	21	16.5257	2.30055	.50202	15.4785	17.5729	12.30	20.13	
Model									
			Fixed Effects	.26387	.05758	16.4022	16.6492		
			Random Effects		.91233	14.2933	18.7581		

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	104.876	6	17.479	251.036	.000
Within Groups	.975	14	.070		
Total	105.851	20			

Duncan^a

ตัวอย่าง	N	Subset for alpha = 0.05					
		1	2	3	4	5	6
20 วัน	3	12.8267					
15 วัน	3		14.2767				
12 วัน	3			16.2767			
9 วัน	3			16.3733			
7 วัน	3				17.4433		
5 วัน	3					18.7233	
0 วัน	3						19.7600
Sig.		1.000	1.000	.661	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

คอมบูชาจากเกสรบัว

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Min	Max
					Lower Bound	Upper Bound		
0 วัน	3	65.3300	.19672	.11358	64.8413	65.8187	65.12	65.51
5 วัน	3	60.2500	.10000	.05774	60.0016	60.4984	60.15	60.35
7 วัน	3	58.3267	.25891	.14948	57.6835	58.9698	58.13	58.62
9 วัน	3	53.3533	.26274	.15169	52.7006	54.0060	53.15	53.65
12 วัน	3	50.2767	.03786	.02186	50.1826	50.3707	50.25	50.32
15 วัน	3	46.3167	.05774	.03333	46.1732	46.4601	46.25	46.35
20 วัน	3	46.1733	.16623	.09597	45.7604	46.5863	46.02	46.35
Total	21	54.2895	6.93125	1.51252	51.1345	57.4446	46.02	65.51
Model								
Fixed Effects			.17614	.03844	54.2071	54.3720		
Random Effects				2.76085	47.5340	61.0451		

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	960.409	6	160.068	5159.527	.000
Within Groups	.434	14	.031		
Total	960.843	20			

Duncan^a

ตัวอย่าง	N	Subset for alpha = 0.05					
		1	2	3	4	5	6
20 วัน	3	46.1733					
15 วัน	3	46.3167					
12 วัน	3		50.2767				
9 วัน	3			53.3533			
7 วัน	3				58.3267		
5 วัน	3					60.2500	
0 วัน	3						65.3300
Sig.		.336	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

คอมบูชาจากอัญชัน

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Min	Max
					Lower Bound	Upper Bound		
					0 วัน	3		
5 วัน	3	52.2800	.13856	.08000	51.9358	52.6242	52.12	52.36
7 วัน	3	48.6567	.32655	.18853	47.8455	49.4679	48.35	49.00
9 วัน	3	45.2567	.10504	.06064	44.9957	45.5176	45.15	45.36
12 วัน	3	39.5433	.08622	.04978	39.3292	39.7575	39.45	39.62
15 วัน	3	37.5833	.40415	.23333	36.5794	38.5873	37.15	37.95
20 วัน	3	37.1767	.15631	.09025	36.7884	37.5650	37.01	37.32
Total	21	45.3052	7.22032	1.57560	42.0186	48.5919	37.01	57.00
Model								
Fixed Effects			.25110	.05480	45.1877	45.4228		
Random Effects				2.87543	38.2693	52.3412		

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	1041.779	6	173.630	2753.739	.000
Within Groups	.883	14	.063		
Total	1042.662	20			

Duncan^a

ตัวอย่าง	N	Subset for alpha = 0.05					
		1	2	3	4	5	6
20 วัน	3	37.1767					
15 วัน	3	37.5833					
12 วัน	3		39.5433				
9 วัน	3			45.2567			
7 วัน	3				48.6567		
5 วัน	3					52.2800	
0 วัน	3						56.6400
Sig.		.067	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

ตารางที่ ง-15 การเปลี่ยนแปลงปริมาณสารประกอบฟีนอลิกระหว่างการหมักของคอมบูชาจากซาอู่หลง คอมบูชาจากเกสรบัวและคอมบูชาจากอัญชันที่หมักเป็นเวลา 20 วัน ณ อุณหภูมิห้อง

คอมบูชาจากซาอู่หลง

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Min	Max
					Lower Bound	Upper Bound		
					0 วัน	3		
5 วัน	3	404.1174	.86999	.50229	401.9562	406.2786	403.15	404.85
7 วัน	3	454.3333	5.13160	2.96273	441.5857	467.0809	450.00	460.00
9 วัน	3	504.6667	1.52753	.88192	500.8721	508.4612	503.00	506.00
12 วัน	3	509.0000	1.00000	.57735	506.5159	511.4841	508.00	510.00
15 วัน	3	531.0000	1.00000	.57735	528.5159	533.4841	530.00	532.00
20 วัน	3	555.0000	7.00000	4.04145	537.6110	572.3890	547.00	560.00
Total	21	473.1030	69.05737	15.06955	441.6685	504.5375	352.12	560.00
Model	Fixed Effects		3.50454	.76475	471.4628	474.7432		
	Random Effects			27.48830	405.8415	540.3644		

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	95206.449	6	15867.741	1291.971	.000
Within Groups	171.945	14	12.282		
Total	95378.394	20			

Duncan^a

ตัวอย่าง	N	Subset for alpha = 0.05					
		1	2	3	4	5	6
0 วัน	3	353.6035					
5 วัน	3		404.1174				
7 วัน	3			454.3333			
9 วัน	3				504.6667		
12 วัน	3				509.0000		
15 วัน	3					531.0000	
20 วัน	3						555.0000
Sig.		1.000	1.000	1.000	.152	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

คอมบูซาจากเกสรบัว

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Min	Max
					Lower Bound	Upper Bound		
					0 วัน	3		
5 วัน	3	298.3333	7.63763	4.40959	279.3604	317.3062	290.00	305.00
7 วัน	3	326.3333	1.52753	.88192	322.5388	330.1279	325.00	328.00
9 วัน	3	351.6667	2.08167	1.20185	346.4955	356.8378	350.00	354.00
12 วัน	3	369.6667	8.73689	5.04425	347.9630	391.3703	360.00	377.00
15 วัน	3	397.0000	2.64575	1.52753	390.4276	403.5724	395.00	400.00
20 วัน	3	403.0000	2.00000	1.15470	398.0317	407.9683	401.00	405.00
Total	21	342.9048	51.29318	11.19309	319.5564	366.2531	253.00	405.00
Model								
Fixed Effects			4.70056	1.02575	340.7048	345.1048		
Random Effects				20.37554	293.0476	392.7619		

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	52310.476	6	8718.413	394.583	.000
Within Groups	309.333	14	22.095		
Total	52619.810	20			

Duncan^a

ตัวอย่าง	N	Subset for alpha = 0.05					
		1	2	3	4	5	6
0 วัน	3	254.3333					
5 วัน	3		298.3333				
7 วัน	3			326.3333			
9 วัน	3				351.6667		
12 วัน	3					369.6667	
15 วัน	3						397.0000
20 วัน	3						403.0000
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	.140

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

คอมบูชาจากอัญชัน

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Min	Max
					Lower Bound	Upper Bound		
					0 วัน	3		
5 วัน	3	159.0955	.67756	.39119	157.4124	160.7787	158.33	159.62
7 วัน	3	172.3333	2.51661	1.45297	166.0817	178.5849	170.00	175.00
9 วัน	3	194.3333	2.08167	1.20185	189.1622	199.5045	192.00	196.00
12 วัน	3	207.6667	3.78594	2.18581	198.2619	217.0715	205.00	212.00
15 วัน	3	228.6442	.34439	.19883	227.7887	229.4997	228.31	229.00
20 วัน	3	269.0759	3.33202	1.92374	260.7987	277.3531	265.61	272.26
Total	21	199.2521	37.72188	8.23159	182.0813	216.4229	158.33	272.26
Model								
Fixed Effects			3.10159	.67682	197.8004	200.7037		
Random Effects				14.99315	162.5652	235.9390		

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	28324.130	6	4720.688	490.722	.000
Within Groups	134.678	14	9.620		
Total	28458.809	20			

Duncan^a

ตัวอย่าง	N	Subset for alpha = 0.05					
		1	2	3	4	5	6
5 วัน	3	159.0955					
0 วัน	3	163.6157					
7 วัน	3		172.3333				
9 วัน	3			194.3333			
12 วัน	3				207.6667		
15 วัน	3					228.6442	
20 วัน	3						269.0759
Sig.		.096	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

ตารางที่ ง-16 การเปลี่ยนแปลงปริมาณฟลาโวนอยด์ระหว่างการหมักของคอมบูชาจากซาอู่หลง คอมบูชาจากเกสรบัวและคอมบูชาจากอัญชันที่หมักเป็นเวลา 20 วัน ณ อุณหภูมิห้อง

คอมบูชาจากซาอู่หลง

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Min	Max
					Lower Bound	Upper Bound		
0 วัน	3	613.3800	2.43039	1.40319	607.3426	619.4174	610.62	615.20
5 วัน	3	641.6667	1.16642	.67343	638.7691	644.5642	640.32	642.36
7 วัน	3	682.8633	2.58748	1.49388	676.4357	689.2910	680.12	685.26
9 วัน	3	751.9533	1.45658	.84096	748.3350	755.5717	751.00	753.63
12 วัน	3	782.3340	3.45204	1.99304	773.7587	790.9093	780.32	786.32
15 วัน	3	821.1667	1.59152	.91886	817.2131	825.1202	820.14	823.00
20 วัน	3	863.8900	1.46857	.84788	860.2419	867.5381	862.32	865.23
Total	21	736.7506	88.98289	19.41766	696.2460	777.2551	610.62	865.23
Model								
Fixed Effects			2.16103	.47157	735.7391	737.7620		
Random Effects				35.44431	650.0215	823.4797		

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	158293.697	6	26382.283	5649.273	.000
Within Groups	65.380	14	4.670		
Total	158359.077	20			

Duncan^a

ตัวอย่าง	N	Subset for alpha = 0.05						
		1	2	3	4	5	6	7
0 วัน	3	613.3800						
5 วัน	3		641.6667					
7 วัน	3			682.8633				
9 วัน	3				751.9533			
12 วัน	3					782.3340		
15 วัน	3						821.1667	
20 วัน	3							863.8900
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

คอมบูชาจากเกสรบัว

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Min	Max
					Lower Bound	Upper Bound		
					0 วัน	3		
5 วัน	3	351.2300	1.00000	.57735	348.7459	353.7141	350.23	352.23
7 วัน	3	359.9067	11.85553	6.84479	330.4559	389.3574	346.23	367.26
9 วัน	3	391.2833	11.49960	6.63930	362.7167	419.8499	378.25	400.00
12 วัน	3	411.4467	1.91106	1.10335	406.6993	416.1940	409.32	413.02
15 วัน	3	451.5967	1.49433	.86275	447.8845	455.3088	450.26	453.21
20 วัน	3	481.3533	5.32158	3.07242	468.1338	494.5729	475.69	486.25
Total	21	395.8124	53.88690	11.75909	371.2834	420.3414	320.26	486.25
Model								
Fixed Effects			6.74093	1.47099	392.6574	398.9673		
Random Effects				21.35115	343.5680	448.0568		

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	57439.798	6	9573.300	210.679	.000
Within Groups	636.162	14	45.440		
Total	58075.960	20			

Duncan^a

ตัวอย่าง	N	Subset for alpha = 0.05					
		1	2	3	4	5	6
0 วัน	3	323.8700					
5 วัน	3		351.2300				
7 วัน	3		359.9067				
9 วัน	3			391.2833			
12 วัน	3				411.4467		
15 วัน	3					451.5967	
20 วัน	3						481.3533
Sig.		1.000	.137	1.000	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

คอมบูชาจากอัญชัน

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Min	Max
					Lower Bound	Upper Bound		
					0 วัน	3		
5 วัน	3	173.7467	.23352	.13482	173.1666	174.3268	173.54	174.00
7 วัน	3	192.5833	2.47734	1.43030	186.4293	198.7374	190.32	195.23
9 วัน	3	205.8820	1.50647	.86976	202.1397	209.6243	204.32	207.33
12 วัน	3	210.9533	.91309	.52717	208.6851	213.2216	210.32	212.00
15 วัน	3	217.2900	2.66321	1.53761	210.6742	223.9058	215.32	220.32
20 วัน	3	227.6467	3.36097	1.94046	219.2975	235.9958	225.32	231.50
Total	21	199.1474	21.70973	4.73745	189.2653	209.0296	163.32	231.50
Model								
Fixed Effects			2.28223	.49802	198.0793	200.2156		
Random Effects				8.61584	178.0652	220.2296		

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	9353.331	6	1558.888	299.292	.000
Within Groups	72.920	14	5.209		
Total	9426.251	20			

Duncan^a

ตัวอย่าง	N	Subset for alpha = 0.05						
		1	2	3	4	5	6	7
0 วัน	3	165.9300						
5 วัน	3		173.7467					
7 วัน	3			192.5833				
9 วัน	3				205.8820			
12 วัน	3					210.9533		
15 วัน	3						217.2900	
20 วัน	3							227.6467
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

ตารางที่ ง-17 ความพึงพอใจของผู้บริโภคที่มีต่อคอมบูชาจากซาอู่หลง คอมบูชาจากเกสรบัวและคอมบูชาจากอัญชันในระหว่างการหมัก ที่หมักเป็นเวลา 20 วัน ณ

อุณหภูมิห้อง

คอมบูชาจากซาอู่หลง

		N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Min	Max	
						Lower Bound	Upper Bound			
สี	หมัก 5 วัน	30	7.4000	1.24845	.22793	6.9338	7.8662	5.00	9.00	
	หมัก 7 วัน	30	7.2333	1.33089	.24299	6.7364	7.7303	5.00	9.00	
	หมัก 9 วัน	30	7.0333	1.58622	.28960	6.4410	7.6256	2.00	9.00	
	หมัก 12 วัน	30	6.8667	1.65536	.30223	6.2485	7.4848	2.00	9.00	
	หมัก 15 วัน	30	7.2667	1.48401	.27094	6.7125	7.8208	4.00	9.00	
	หมัก 20 วัน	30	7.2667	1.41259	.25790	6.7392	7.7941	4.00	9.00	
	Total		180	7.1778	1.44993	.10807	6.9645	7.3910	2.00	9.00
	Model	Fixed Effects			1.45968	.10880	6.9630	7.3925		
	Random Effects				.10880 ^a	6.8981 ^a	7.4575 ^a			

		N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Min	Max
						Lower Bound	Upper Bound		
กลิ่น	หมัก 5 วัน	30	6.3667	1.73172	.31617	5.7200	7.0133	2.00	9.00
	หมัก 7 วัน	30	6.2333	1.69550	.30955	5.6002	6.8664	2.00	9.00
	หมัก 9 วัน	30	6.1667	1.53316	.27992	5.5942	6.7392	2.00	9.00
	หมัก 12 วัน	30	5.7333	1.70057	.31048	5.0983	6.3683	2.00	9.00
	หมัก 15 วัน	30	5.6000	1.73404	.31659	4.9525	6.2475	2.00	9.00
	หมัก 20 วัน	30	5.2333	2.12835	.38858	4.4386	6.0281	1.00	9.00
	Total	180	5.8889	1.78413	.13298	5.6265	6.1513	1.00	9.00
	Model	Fixed Effects			1.76318	.13142	5.6295	6.1483	
	Random Effects				.17902	5.4287	6.3491		

		N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Min	Max
						Lower Bound	Upper Bound		
ความเปรี้ยว	หมัก 5 วัน	30	6.0333	1.67091	.30507	5.4094	6.6573	4.00	9.00
	หมัก 7 วัน	30	5.8000	1.49482	.27292	5.2418	6.3582	2.00	8.00
	หมัก 9 วัน	30	5.9333	1.74066	.31780	5.2834	6.5833	2.00	8.00
	หมัก 12 วัน	30	5.2000	2.17192	.39654	4.3890	6.0110	1.00	9.00
	หมัก 15 วัน	30	4.8667	2.20866	.40324	4.0419	5.6914	1.00	9.00
	หมัก 20 วัน	30	4.2000	2.17192	.39654	3.3890	5.0110	1.00	8.00
	Total	180	5.3389	2.01437	.15014	5.0426	5.6352	1.00	9.00
	Model	Fixed Effects			1.93084	.14392	5.0548	5.6229	
	Random Effects				.29369	4.5839	6.0938		

		N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Min	Max
						Lower Bound	Upper Bound		
ความหวาน	หมัก 5 วัน	30	6.6000	1.37966	.25189	6.0848	7.1152	4.00	9.00
	หมัก 7 วัน	30	6.0333	1.40156	.25589	5.5100	6.5567	4.00	9.00
	หมัก 9 วัน	30	5.6333	1.49674	.27327	5.0744	6.1922	3.00	8.00
	หมัก 12 วัน	30	5.2667	1.83704	.33540	4.5807	5.9526	2.00	9.00
	หมัก 15 วัน	30	5.2000	1.82700	.33356	4.5178	5.8822	2.00	9.00
	หมัก 20 วัน	30	4.5667	2.07918	.37960	3.7903	5.3430	1.00	9.00
	Total	180	5.5500	1.78846	.13330	5.2870	5.8130	1.00	9.00
	Model	Fixed Effects			1.69035	.12599	5.3013	5.7987	
	Random Effects				.28941	4.8060	6.2940		

		N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Min	Max
						Lower Bound	Upper Bound		
ความกลมกล่อม	หมัก 5 วัน	30	6.3667	1.65015	.30127	5.7505	6.9828	3.00	9.00
	หมัก 7 วัน	30	5.9667	1.27261	.23235	5.4915	6.4419	3.00	8.00
	หมัก 9 วัน	30	5.8333	1.64177	.29974	5.2203	6.4464	2.00	8.00
	หมัก 12 วัน	30	5.3667	1.77110	.32336	4.7053	6.0280	2.00	9.00
	หมัก 15 วัน	30	4.9000	1.72906	.31568	4.2544	5.5456	2.00	9.00
	หมัก 20 วัน	30	4.4667	2.08001	.37976	3.6900	5.2434	1.00	8.00
	Total	180	5.4833	1.80463	.13451	5.2179	5.7488	1.00	9.00
	Model	Fixed Effects			1.70738	.12726	5.2322	5.7345	
	Random Effects				.29005	4.7377	6.2289		

		N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Min	Max
						Lower Bound	Upper Bound		
ความชอบ โดยรวม	หมัก 5 วัน	30	6.4667	1.54771	.28257	5.8887	7.0446	4.00	9.00
	หมัก 7 วัน	30	6.1000	1.12495	.20539	5.6799	6.5201	4.00	8.00
	หมัก 9 วัน	30	5.9333	1.61743	.29530	5.3294	6.5373	2.00	8.00
	หมัก 12 วัน	30	5.4000	1.71404	.31294	4.7600	6.0400	2.00	9.00
	หมัก 15 วัน	30	5.0000	1.64002	.29942	4.3876	5.6124	2.00	8.00
	หมัก 20 วัน	30	4.5667	2.17641	.39736	3.7540	5.3794	1.00	8.00
	Total	180	5.5778	1.76861	.13182	5.3176	5.8379	1.00	9.00
	Model	Fixed Effects			1.66540	.12413	5.3328	5.8228	
	Random Effects				.29309	4.8244	6.3312		

ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
ธม	Between Groups	5.578	5	1.116	.524	.758
	Within Groups	370.733	174	2.131		
	Total	376.311	179			
กลิ่น	Between Groups	28.844	5	5.769	1.856	.104
	Within Groups	540.933	174	3.109		
	Total	569.778	179			
ความเปรี้ยว	Between Groups	77.628	5	15.526	4.164	.001
	Within Groups	648.700	174	3.728		
	Total	726.328	179			
ความหวาน	Between Groups	75.383	5	15.077	5.277	.000
	Within Groups	497.167	174	2.857		
	Total	572.550	179			
ความกลมกล่อม	Between Groups	75.717	5	15.143	5.195	.000
	Within Groups	507.233	174	2.915		
	Total	582.950	179			
ความชอบ โดยรวม	Between Groups	77.311	5	15.462	5.575	.000
	Within Groups	482.600	174	2.774		
	Total	559.911	179			

๑๗

Duncan^a

Day	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	
หมัก 12 วัน	30		6.8667
หมัก 9 วัน	30		7.0333
หมัก 7 วัน	30		7.2333
หมัก 15 วัน	30		7.2667
หมัก 20 วัน	30		7.2667
หมัก 5 วัน	30		7.4000
Sig.			.224

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 30.000.

กลิ่น

Duncan^a

Day	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
หมัก 20 วัน	30	5.2333	
หมัก 15 วัน	30	5.6000	5.6000
หมัก 12 วัน	30	5.7333	5.7333
หมัก 9 วัน	30	6.1667	6.1667
หมัก 7 วัน	30	6.2333	6.2333
หมัก 5 วัน	30		6.3667
Sig.		.050	.137

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 30.000.

ความเปรี้ยว

Duncan^a

Day	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
หมัก 20 วัน	30	4.2000		
หมัก 15 วัน	30	4.8667	4.8667	
หมัก 12 วัน	30	5.2000	5.2000	5.2000
หมัก 7 วัน	30		5.8000	5.8000
หมัก 9 วัน	30		5.9333	5.9333
หมัก 5 วัน	30			6.0333
Sig.		.059	.051	.130

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 30.000.

ความหวาน

Duncan^a

Day	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
หมัก 20 วัน	30	4.5667		
หมัก 15 วัน	30	5.2000	5.2000	
หมัก 12 วัน	30	5.2667	5.2667	
หมัก 9 วัน	30		5.6333	
หมัก 7 วัน	30		6.0333	6.0333
หมัก 5 วัน	30			6.6000
Sig.		.132	.083	.196

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 30.000.

ความกลมกล่อม

Duncan^a

Day	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
หมัก 20 วัน	30	4.4667		
หมัก 15 วัน	30	4.9000		
หมัก 12 วัน	30	5.3667	5.3667	
หมัก 9 วัน	30		5.8333	5.8333
หมัก 7 วัน	30		5.9667	5.9667
หมัก 5 วัน	30			6.3667
Sig.		.054	.202	.258

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 30.000.

ความชอบโดยรวม

Duncan^a

Day	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
หมัก 20 วัน	30	4.5667		
หมัก 15 วัน	30	5.0000		
หมัก 12 วัน	30	5.4000	5.4000	
หมัก 9 วัน	30		5.9333	5.9333
หมัก 7 วัน	30		6.1000	6.1000
หมัก 5 วัน	30			6.4667
Sig.		.068	.126	.246

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 30.000.

คอมบูชาจากเกสรบัว

		N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Min	Max	
						Lower Bound	Upper Bound			
สี	หมัก 5 วัน	30	7.1667	1.36668	.24952	6.6563	7.6770	4.00	9.00	
	หมัก 7 วัน	30	7.0333	1.29943	.23724	6.5481	7.5185	4.00	9.00	
	หมัก 9 วัน	30	7.0000	1.28654	.23489	6.5196	7.4804	4.00	9.00	
	หมัก 12 วัน	30	7.0000	1.31306	.23973	6.5097	7.4903	4.00	9.00	
	หมัก 15 วัน	30	7.1667	1.39168	.25409	6.6470	7.6863	4.00	9.00	
	หมัก 20 วัน	30	7.1000	1.32222	.24140	6.6063	7.5937	4.00	9.00	
	Total		180	7.0778	1.31368	.09792	6.8846	7.2710	4.00	9.00
	Model	Fixed Effects			1.33046	.09917	6.8821	7.2735		
	Random Effects				.09917 ^a	6.8229 ^a	7.3327 ^a			

		N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Min	Max
						Lower Bound	Upper Bound		
กลิ่น	หมัก 5 วัน	30	7.1333	1.33218	.24322	6.6359	7.6308	4.00	9.00
	หมัก 7 วัน	30	6.8333	1.55549	.28399	6.2525	7.4142	4.00	9.00
	หมัก 9 วัน	30	6.0000	1.70193	.31073	5.3645	6.6355	3.00	9.00
	หมัก 12 วัน	30	5.9667	1.65015	.30127	5.3505	6.5828	3.00	9.00
	หมัก 15 วัน	30	5.9333	1.61743	.29530	5.3294	6.5373	3.00	9.00
	หมัก 20 วัน	30	5.7000	1.66402	.30381	5.0786	6.3214	3.00	9.00
	Total	180	6.2611	1.65575	.12341	6.0176	6.5046	3.00	9.00
	Model	Fixed Effects			1.59158	.11863	6.0270	6.4952	
	Random Effects				.23561	5.6555	6.8668		

		N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Min	Max
						Lower Bound	Upper Bound		
ความเปรี้ยว	หมัก 5 วัน	30	6.3667	1.73172	.31617	5.7200	7.0133	2.00	9.00
	หมัก 7 วัน	30	6.6667	1.62594	.29685	6.0595	7.2738	3.00	9.00
	หมัก 9 วัน	30	5.8667	1.67607	.30601	5.2408	6.4925	2.00	9.00
	หมัก 12 วัน	30	5.6000	1.69380	.30924	4.9675	6.2325	2.00	8.00
	หมัก 15 วัน	30	4.3333	2.26416	.41338	3.4879	5.1788	1.00	9.00
	หมัก 20 วัน	30	4.3667	2.12511	.38799	3.5731	5.1602	1.00	9.00
	Total	180	5.5333	2.05348	.15306	5.2313	5.8354	1.00	9.00
	Model	Fixed Effects			1.86919	.13932	5.2584	5.8083	
	Random Effects				.40396	4.4949	6.5718		

		N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Min	Max
						Lower Bound	Upper Bound		
ความหวาน	หมัก 5 วัน	30	6.8667	1.67607	.30601	6.2408	7.4925	3.00	9.00
	หมัก 7 วัน	30	6.6333	1.47352	.26903	6.0831	7.1836	4.00	9.00
	หมัก 9 วัน	30	6.3333	1.66782	.30450	5.7106	6.9561	2.00	9.00
	หมัก 12 วัน	30	6.0667	1.31131	.23941	5.5770	6.5563	3.00	8.00
	หมัก 15 วัน	30	4.8667	1.99540	.36431	4.1216	5.6118	1.00	9.00
	หมัก 20 วัน	30	4.5667	1.73570	.31689	3.9185	5.2148	1.00	9.00
	Total	180	5.8889	1.85174	.13802	5.6165	6.1612	1.00	9.00
	Model	Fixed Effects			1.65710	.12351	5.6451	6.1327	
	Random Effects				.38870	4.8897	6.8881		

		N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Min	Max
						Lower Bound	Upper Bound		
ความกลม กลม	หมัก 5 วัน	30	6.8333	1.59921	.29197	6.2362	7.4305	3.00	9.00
	หมัก 7 วัน	30	6.8000	1.51771	.27709	6.2333	7.3667	4.00	9.00
	หมัก 9 วัน	30	6.2667	1.31131	.23941	5.7770	6.7563	4.00	9.00
	หมัก 12 วัน	30	6.2333	1.43078	.26122	5.6991	6.7676	3.00	8.00
	หมัก 15 วัน	30	5.2667	1.87420	.34218	4.5668	5.9665	2.00	9.00
	หมัก 20 วัน	30	4.7333	1.65952	.30299	4.1137	5.3530	2.00	9.00
	Total	180	6.0222	1.73674	.12945	5.7668	6.2777	2.00	9.00
	Model	Fixed Effects			1.57556	.11743	5.7904	6.2540	
	Random Effects				.34637	5.1318	6.9126		

		N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Min	Max
						Lower Bound	Upper Bound		
ความชอบ โดยรวม	หมัก 5 วัน	30	7.0667	1.43679	.26232	6.5302	7.6032	4.00	9.00
	หมัก 7 วัน	30	7.1000	1.42272	.25975	6.5687	7.6313	4.00	9.00
	หมัก 9 วัน	30	6.4667	1.43198	.26144	5.9320	7.0014	4.00	9.00
	หมัก 12 วัน	30	6.3667	1.47352	.26903	5.8164	6.9169	3.00	9.00
	หมัก 15 วัน	30	5.4333	1.88795	.34469	4.7284	6.1383	2.00	9.00
	หมัก 20 วัน	30	4.9667	1.69143	.30881	4.3351	5.5983	2.00	9.00
	Total	180	6.2333	1.73720	.12948	5.9778	6.4888	2.00	9.00
	Model	Fixed Effects			1.56714	.11681	6.0028	6.4639	
	Random Effects				.35413	5.3230	7.1437		

ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
สี	Between Groups	.911	5	.182	.103	.991
	Within Groups	308.000	174	1.770		
	Total	308.911	179			
กลิ่น	Between Groups	49.961	5	9.992	3.945	.002
	Within Groups	440.767	174	2.533		
	Total	490.728	179			
ความเปรี้ยว	Between Groups	146.867	5	29.373	8.407	.000
	Within Groups	607.933	174	3.494		
	Total	754.800	179			
ความหวาน	Between Groups	135.978	5	27.196	9.904	.000
	Within Groups	477.800	174	2.746		
	Total	613.778	179			
ความกลม กล่อม	Between Groups	107.978	5	21.596	8.700	.000
	Within Groups	431.933	174	2.482		
	Total	539.911	179			
ความชอบ โดยรวม	Between Groups	112.867	5	22.573	9.191	.000
	Within Groups	427.333	174	2.456		
	Total	540.200	179			

๗

Duncan^a

Day	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	
หมัก 9 วัน	30		7.0000
หมัก 12 วัน	30		7.0000
หมัก 7 วัน	30		7.0333
หมัก 20 วัน	30		7.1000
หมัก 5 วัน	30		7.1667
หมัก 15 วัน	30		7.1667
Sig.			.680

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 30.000.

กลิ่น

Duncan^a

Day	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
หมัก 20 วัน	30	5.7000	
หมัก 15 วัน	30	5.9333	
หมัก 12 วัน	30	5.9667	
หมัก 9 วัน	30	6.0000	
หมัก 7 วัน	30		6.8333
หมัก 5 วัน	30		7.1333
Sig.		.514	.466

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 30.000.

ความเปรียบ

Duncan^a

Day	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
หมัก 15 วัน	30	4.3333		
หมัก 20 วัน	30	4.3667		
หมัก 12 วัน	30		5.6000	
หมัก 9 วัน	30		5.8667	5.8667
หมัก 5 วัน	30		6.3667	6.3667
หมัก 7 วัน	30			6.6667
Sig.		.945	.136	.119

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 30.000.

ความหวาน

Duncan^a

Day	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
หมัก 20 วัน	30	4.5667	
หมัก 15 วัน	30	4.8667	
หมัก 12 วัน	30		6.0667
หมัก 9 วัน	30		6.3333
หมัก 7 วัน	30		6.6333
หมัก 5 วัน	30		6.8667
Sig.		.484	.089

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 30.000.

ความกลมกล่อม

Duncan^a

Day	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
หมัก 20 วัน	30	4.7333	
หมัก 15 วัน	30	5.2667	
หมัก 12 วัน	30		6.2333
หมัก 9 วัน	30		6.2667
หมัก 7 วัน	30		6.8000
หมัก 5 วัน	30		6.8333
Sig.		.192	.183

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 30.000.

ความชอบโดยรวม

Duncan^a

Day	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
หมัก 20 วัน	30	4.9667	
หมัก 15 วัน	30	5.4333	
หมัก 12 วัน	30		6.3667
หมัก 9 วัน	30		6.4667
หมัก 5 วัน	30		7.0667
หมัก 7 วัน	30		7.1000
Sig.		.250	.100

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 30.000.

คอมบูชาจากอัญชัน

		N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Min	Max	
						Lower Bound	Upper Bound			
สี	หมัก 5 วัน	30	7.7667	1.00630	.18372	7.3909	8.1424	5.00	9.00	
	หมัก 7 วัน	30	7.7667	1.04000	.18988	7.3783	8.1550	5.00	9.00	
	หมัก 9 วัน	30	7.7667	.93526	.17075	7.4174	8.1159	5.00	9.00	
	หมัก 12 วัน	30	7.7333	.94443	.17243	7.3807	8.0860	5.00	9.00	
	หมัก 15 วัน	30	7.7667	1.00630	.18372	7.3909	8.1424	5.00	9.00	
	หมัก 20 วัน	30	7.6667	1.02833	.18775	7.2827	8.0507	5.00	9.00	
	Total		180	7.7444	.98095	.07312	7.6002	7.8887	5.00	9.00
	Model	Fixed Effects			.99424	.07411	7.5982	7.8907		
Random Effects					.07411 ^a	7.5539 ^a	7.9349 ^a			

		N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Min	Max
						Lower Bound	Upper Bound		
กลิ่น	หมัก 5 วัน	30	6.8333	1.48750	.27158	6.2779	7.3888	4.00	9.00
	หมัก 7 วัน	30	6.8333	1.31525	.24013	6.3422	7.3245	4.00	9.00
	หมัก 9 วัน	30	6.5667	1.40647	.25679	6.0415	7.0919	4.00	9.00
	หมัก 12 วัน	30	6.3333	1.37297	.25067	5.8207	6.8460	4.00	9.00
	หมัก 15 วัน	30	6.3667	1.44993	.26472	5.8253	6.9081	2.00	9.00
	หมัก 20 วัน	30	6.1667	1.41624	.25857	5.6378	6.6955	3.00	9.00
	Total	180	6.5167	1.41214	.10525	6.3090	6.7244	2.00	9.00
	Model	Fixed Effects			1.40912	.10503	6.3094	6.7240	
	Random Effects				.11279	6.2267	6.8066		

		N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Min	Max
						Lower Bound	Upper Bound		
ความเปรี้ยว	หมัก 5 วัน	30	6.6667	1.68836	.30825	6.0362	7.2971	2.00	9.00
	หมัก 7 วัน	30	6.5667	1.69550	.30955	5.9336	7.1998	2.00	9.00
	หมัก 9 วัน	30	6.8667	1.54771	.28257	6.2887	7.4446	3.00	9.00
	หมัก 12 วัน	30	6.3667	1.90251	.34735	5.6563	7.0771	1.00	9.00
	หมัก 15 วัน	30	5.1000	2.23375	.40783	4.2659	5.9341	1.00	9.00
	หมัก 20 วัน	30	4.8333	2.11861	.38680	4.0422	5.6244	1.00	9.00
	Total	180	6.0667	2.01835	.15044	5.7698	6.3635	1.00	9.00
	Model	Fixed Effects			1.88053	.14017	5.7900	6.3433	
	Random Effects				.35569	5.1523	6.9810		

		N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Min	Max	
						Lower Bound	Upper Bound			
ความหวาน	หมัก 5 วัน	30	7.1333	1.50249	.27432	6.5723	7.6944	3.00	9.00	
	หมัก 7 วัน	30	6.7000	1.41787	.25887	6.1706	7.2294	3.00	9.00	
	หมัก 9 วัน	30	7.0667	1.17248	.21406	6.6289	7.5045	5.00	9.00	
	หมัก 12 วัน	30	6.6000	1.56690	.28608	6.0149	7.1851	4.00	9.00	
	หมัก 15 วัน	30	5.2333	1.86960	.34134	4.5352	5.9315	1.00	9.00	
	หมัก 20 วัน	30	4.9000	1.82606	.33339	4.2181	5.5819	1.00	9.00	
	Total	180	6.2722	1.78708	.13320	6.0094	6.5351	1.00	9.00	
	Model	Fixed Effects			1.57732	.11757	6.0402	6.5043		
		Random Effects				.39266	5.2629	7.2816		
	Model	Fixed Effects			1.53128	.11414	6.2192	6.6697		
Random Effects					.36885	5.4963	7.3926			

		N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Min	Max	
						Lower Bound	Upper Bound			
ความกลม กล่อม	หมัก 5 วัน	30	7.2000	1.21485	.22180	6.7464	7.6536	4.00	9.00	
	หมัก 7 วัน	30	6.9667	1.54213	.28155	6.3908	7.5425	3.00	9.00	
	หมัก 9 วัน	30	7.1000	1.18467	.21629	6.6576	7.5424	4.00	9.00	
	หมัก 12 วัน	30	6.7667	1.33089	.24299	6.2697	7.2636	4.00	9.00	
	หมัก 15 วัน	30	5.6000	1.94049	.35428	4.8754	6.3246	1.00	9.00	
	หมัก 20 วัน	30	5.0333	1.80962	.33039	4.3576	5.7091	2.00	9.00	
	Total		180	6.4444	1.72145	.12831	6.1913	6.6976	1.00	9.00
	Model	Fixed Effects			1.53128	.11414	6.2192	6.6697		
		Random Effects				.36885	5.4963	7.3926		
	Model	Fixed Effects			1.51348	.11281	6.4607	6.9060		
Random Effects					.35650	5.7669	7.5997			

		N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Min	Max
						Lower Bound	Upper Bound		
ความชอบ โดยรวม	หมัก 5 วัน	30	7.5000	1.19626	.21841	7.0533	7.9467	5.00	9.00
	หมัก 7 วัน	30	7.0333	1.37674	.25136	6.5193	7.5474	4.00	9.00
	หมัก 9 วัน	30	7.3667	1.09807	.20048	6.9566	7.7767	5.00	9.00
	หมัก 12 วัน	30	7.0000	1.28654	.23489	6.5196	7.4804	4.00	9.00
	หมัก 15 วัน	30	5.8333	2.08580	.38081	5.0545	6.6122	1.00	9.00
	หมัก 20 วัน	30	5.3667	1.79046	.32689	4.6981	6.0352	2.00	8.00
	Total	180	6.6833	1.69282	.12618	6.4344	6.9323	1.00	9.00
	Model	Fixed Effects			1.51348	.11281	6.4607	6.9060	
	Random Effects				.35650	5.7669	7.5997		

ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
สี	Between Groups	.244	5	.049	.049	.998
	Within Groups	172.000	174	.989		
	Total	172.244	179			
กลิ่น	Between Groups	11.450	5	2.290	1.153	.334
	Within Groups	345.500	174	1.986		
	Total	356.950	179			
ความเปรี้ยว	Between Groups	113.867	5	22.773	6.440	.000
	Within Groups	615.333	174	3.536		
	Total	729.200	179			
ความหวาน	Between Groups	138.761	5	27.752	11.155	.000
	Within Groups	432.900	174	2.488		
	Total	571.661	179			
ความกลมกล่อม	Between Groups	122.444	5	24.489	10.444	.000
	Within Groups	408.000	174	2.345		
	Total	530.444	179			
ความชอบโดยรวม	Between Groups	114.383	5	22.877	9.987	.000
	Within Groups	398.567	174	2.291		
	Total	512.950	179			

๑๗

Duncan^a

Day	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	
หมัก 20 วัน	30		7.6667
หมัก 12 วัน	30		7.7333
หมัก 5 วัน	30		7.7667
หมัก 7 วัน	30		7.7667
หมัก 9 วัน	30		7.7667
หมัก 15 วัน	30		7.7667
Sig.			.740

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 30.000.

กลีน

Duncan^a

Day	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	
หมัก 20 วัน	30		6.1667
หมัก 12 วัน	30		6.3333
หมัก 15 วัน	30		6.3667
หมัก 9 วัน	30		6.5667
หมัก 5 วัน	30		6.8333
หมัก 7 วัน	30		6.8333
Sig.			.112

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 30.000.

ความเปรียบ

Duncan^a

Day	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
หมัก 20 วัน	30	4.8333	
หมัก 15 วัน	30	5.1000	
หมัก 12 วัน	30		6.3667
หมัก 7 วัน	30		6.5667
หมัก 5 วัน	30		6.6667
หมัก 9 วัน	30		6.8667
Sig.		.584	.355

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 30.000.

ความหวาน

Duncan^a

Day	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
หมัก 20 วัน	30	4.9000	
หมัก 15 วัน	30	5.2333	
หมัก 12 วัน	30		6.6000
หมัก 7 วัน	30		6.7000
หมัก 9 วัน	30		7.0667
หมัก 5 วัน	30		7.1333
Sig.		.414	.238

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 30.000.

ความกลมกล่อม

Duncan^a

Day	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
หมัก 20 วัน	30	5.0333	
หมัก 15 วัน	30	5.6000	
หมัก 12 วัน	30		6.7667
หมัก 7 วัน	30		6.9667
หมัก 9 วัน	30		7.1000
หมัก 5 วัน	30		7.2000
Sig.		.154	.325

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 30.000.

ความชอบโดยรวม

Duncan^a

Day	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
หมัก 20 วัน	30	5.3667	
หมัก 15 วัน	30	5.8333	
หมัก 12 วัน	30		7.0000
หมัก 7 วัน	30		7.0333
หมัก 9 วัน	30		7.3667
หมัก 5 วัน	30		7.5000
Sig.		.234	.249

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 30.000.

ตารางที่ ง-18 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระภายในเซลล์ของชาอู่หลงที่ไม่ผ่านกระบวนการหมัก ชาอู่ชุ่นที่ไม่ผ่านกระบวนการหมัก คอมบูชาจากชาอู่หลงและคอมบูชาจากอู่ชุ่น ที่หมักเป็นเวลา 15 วัน

ROS

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Min	Max	
					Lower Bound	Upper Bound			
ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์	5	311.9618	36.37347	16.26671	266.7982	357.1254	253.82	350.83	
Ascorbic acid	5	152.3006	36.66777	16.39833	106.7716	197.8297	120.69	214.69	
อู่หลงคอมบูชา 20 ไมโครลิตร	5	136.5694	14.28343	6.38774	118.8342	154.3046	115.83	155.74	
อู่หลงคอมบูชา 5 ไมโครลิตร	5	239.7695	46.99500	21.01680	181.4175	298.1215	187.47	284.48	
ชาอู่หลง 20 ไมโครลิตร	5	192.9926	24.59838	11.00073	162.4497	223.5355	162.51	222.60	
ชาอู่หลง 5 ไมโครลิตร	5	246.5863	16.39192	7.33069	226.2330	266.9396	228.34	262.63	
อู่ชุ่นคอมบูชา 20 ไมโครลิตร	5	151.2762	25.48769	11.39844	119.6291	182.9234	113.89	181.94	
อู่ชุ่นคอมบูชา 5 ไมโครลิตร	5	263.1761	22.70417	10.15361	234.9852	291.3670	245.08	299.73	
ชาดอกอู่ชุ่น 20 ไมโครลิตร	5	225.5823	47.70004	21.33211	166.3548	284.8097	148.61	270.19	
ชาดอกอู่ชุ่น 5 ไมโครลิตร	5	279.8212	25.58674	11.44274	248.0510	311.5913	236.15	299.71	
Total	50	220.0036	63.93869	9.04230	201.8324	238.1748	113.89	350.83	
Model									
			Fixed Effects	31.70009	4.48307	210.9430	229.0642		
			Random Effects		18.86348	177.3315	262.6758		

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	160123.840	9	17791.538	17.705	.000
Within Groups	40195.816	40	1004.895		
Total	200319.656	49			

Tukey HSD^a

ตัวอย่าง	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
อู่หลงคอมบูชา 20 ไมโครลิตร	5	136.5694			
อัญชันคอมบูชา 20 ไมโครลิตร	5	151.2762			
Ascobic acid	5	152.3006			
ชาอู่หลง 20 ไมโครลิตร	5	192.9926	192.9926		
ชาดอกอัญชัน 20 ไมโครลิตร	5		225.5823	225.5823	
อู่หลงคอมบูชา 5 ไมโครลิตร	5		239.7695	239.7695	
ชาอู่หลง 5 ไมโครลิตร	5		246.5863	246.5863	246.5863
อัญชันคอมบูชา 5 ไมโครลิตร	5			263.1761	263.1761
ชาดอกอัญชัน 5 ไมโครลิตร	5			279.8212	279.8212
ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์	5				311.9618
Sig.		.166	.219	.206	.062

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 5.000.

ตารางที่ ง-19 การเหนี่ยวนำการสร้าง mRNA ของ Antioxidant enzyme ของชาอู่หลงที่ไม่ผ่านกระบวนการหมัก ชาอู่ชุ่นที่ไม่ผ่านกระบวนการหมัก คอมบูชาจากชาอู่หลงและคอมบูชาจากอู่ชุ่นที่หมักเป็นเวลา 15 วัน

		N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Min	Max
						Lower Bound	Upper Bound		
						CAT	คอมบูชาจากชาอู่หลง		
	ชาอู่หลง	4	1.2775	.10720	.05360	1.1069	1.4481	1.16	1.42
	คอมบูชาจากอู่ชุ่น	4	1.4200	.08042	.04021	1.2920	1.5480	1.35	1.52
	ชาอู่ชุ่น	4	2.8800	.33784	.16892	2.3424	3.4176	2.56	3.32
	ชุดควบคุม	4	1.0000	.00000	.00000	1.0000	1.0000	1.00	1.00
	Total	20	1.5965	.69175	.15468	1.2728	1.9202	1.00	3.32
	Model								
	Fixed Effects			.16346	.03655	1.5186	1.6744		
	Random Effects				.32960	.6814	2.5116		

		N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for		Min	Max
						Mean			
						Lower Bound	Upper Bound		
GRe	คอมบูชาจากชาอู่หลง	4	2.5875	.15628	.07814	2.3388	2.8362	2.41	2.79
	ชาอู่หลง	4	2.4350	.44755	.22377	1.7228	3.1472	2.03	2.98
	คอมบูชาจากอัญชัญ	4	2.1650	.12871	.06436	1.9602	2.3698	2.04	2.33
	ชาอัญชัญ	4	1.7450	.30621	.15311	1.2577	2.2323	1.42	2.04
	ชุดควบคุม	4	1.0000	.00000	.00000	1.0000	1.0000	1.00	1.00
	Total	20	1.9865	.62862	.14056	1.6923	2.2807	1.00	2.98
	Model	Fixed Effects			.25887	.05788	1.8631	2.1099	
	Random Effects				.28511	1.1949	2.7781		
Mn-SOD	คอมบูชาจากชาอู่หลง	4	1.1900	.11944	.05972	.9999	1.3801	1.02	1.30
	ชาอู่หลง	4	3.8175	.27500	.13750	3.3799	4.2551	3.56	4.14
	คอมบูชาจากอัญชัญ	4	3.7925	.42960	.21480	3.1089	4.4761	3.15	4.03
	ชาอัญชัญ	4	1.7975	.15457	.07728	1.5515	2.0435	1.58	1.93
	ชุดควบคุม	4	1.0000	.00000	.00000	1.0000	1.0000	1.00	1.00
	Total	20	2.3195	1.29182	.28886	1.7149	2.9241	1.00	4.14
	Model	Fixed Effects			.24427	.05462	2.2031	2.4359	
	Random Effects				.62061	.5964	4.0426		

		N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for		Min	Max
						Mean			
						Lower Bound	Upper Bound		
GPx-1	คอมบูชาจากชาอู่หลง	4	1.6525	.21793	.10896	1.3057	1.9993	1.43	1.93
	ชาอู่หลง	4	2.3325	.25025	.12512	1.9343	2.7307	2.14	2.68
	คอมบูชาจากอัญชัญ	4	2.2175	.27645	.13823	1.7776	2.6574	2.06	2.63
	ชาอัญชัน	4	1.4950	.31097	.15548	1.0002	1.9898	1.31	1.96
	ชุดควบคุม	4	1.0000	.00000	.00000	1.0000	1.0000	1.00	1.00
	Total	20	1.7395	.54421	.12169	1.4848	1.9942	1.00	2.68
	Model	Fixed Effects			.23801	.05322	1.6261	1.8529	
	Random Effects				.24437	1.0610	2.4180		
HO-1	คอมบูชาจากชาอู่หลง	4	1.7800	.19391	.09695	1.4715	2.0885	1.50	1.92
	ชาอู่หลง	4	3.4025	.32541	.16270	2.8847	3.9203	3.02	3.72
	คอมบูชาจากอัญชัญ	4	3.5175	.37375	.18688	2.9228	4.1122	3.13	3.89
	ชาอัญชัน	4	2.2375	.14705	.07353	2.0035	2.4715	2.03	2.36
	ชุดควบคุม	4	1.0000	.00000	.00000	1.0000	1.0000	1.00	1.00
	Total	20	2.3875	1.01073	.22601	1.9145	2.8605	1.00	3.89
	Model	Fixed Effects			.24690	.05521	2.2698	2.5052	
	Random Effects				.48082	1.0525	3.7225		

ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
CAT	Between Groups	8.691	4	2.173	81.321	.000
	Within Groups	.401	15	.027		
	Total	9.092	19			
GRE	Between Groups	6.503	4	1.626	24.260	.000
	Within Groups	1.005	15	.067		
	Total	7.508	19			
MNSOD	Between Groups	30.812	4	7.703	129.098	.000
	Within Groups	.895	15	.060		
	Total	31.707	19			
GPX1	Between Groups	4.777	4	1.194	21.083	.000
	Within Groups	.850	15	.057		
	Total	5.627	19			
HO1	Between Groups	18.495	4	4.624	75.848	.000
	Within Groups	.914	15	.061		
	Total	19.410	19			

CAT

Tukey HSD^a

ตัวอย่าง	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
ชุดควบคุม	4	1.0000		
ซาอู่หลง	4	1.2775	1.2775	
คอมบูชาจากซาอู่หลง	4		1.4050	
คอมบูชาจากอัญชั้ย	4		1.4200	
ซาอัญชัน	4			2.8800
Sig.		.168	.733	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 4.000.

GRe

Tukey HSD^a

ตัวอย่าง	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
ชุดควบคุม	4	1.0000		
ซาอัญชัน	4		1.7450	
คอมบูชาจากอัญชั้ย	4		2.1650	2.1650
ซาอู่หลง	4			2.4350
คอมบูชาจากซาอู่หลง	4			2.5875
Sig.		1.000	.200	.196

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 4.000.

Mn-SOD

Tukey HSD^a

ตัวอย่าง	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
ชุดควบคุม	4	1.0000		
คอมบูชาจากชาอู่หลง	4	1.1900		
ชาอู่ชั้น	4		1.7975	
คอมบูชาจากอู่ช้ย	4			3.7925
ชาอู่หลง	4			3.8175
Sig.		.804	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 4.000.

GPx-1

Tukey HSD^a

ตัวอย่าง	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
ชุดควบคุม	4	1.0000		
ชาอู่ชั้น	4	1.4950	1.4950	
คอมบูชาจากชาอู่หลง	4		1.6525	
คอมบูชาจากอู่ช้ย	4			2.2175
ชาอู่หลง	4			2.3325
Sig.		.066	.879	.957

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 4.000.

HO-1

Tukey HSD^a

ตัวอย่าง	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
ชุดควบคุม	4	1.0000		
คอมบูชาจากชาอู่หลง	4		1.7800	
ชาอู่ชั้น	4		2.2375	
ชาอู่หลง	4			3.4025
คอมบูชาจากอู่ชี้ย	4			3.5175
Sig.		1.000	.116	.962

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 4.000.

ตารางที่ ง-20 การเปลี่ยนแปลงระหว่างการเก็บรักษาของคอมบูชาจากอัญชัน โดยเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 56 วัน

พีเอช

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Min	Max
					Lower Bound	Upper Bound		
					อายุเก็บรักษา 0 วัน	3		
อายุเก็บรักษา 14 วัน	3	2.8333	.04726	.02728	2.7159	2.9507	2.78	2.87
อายุเก็บรักษา 28 วัน	3	2.8100	.05000	.02887	2.6858	2.9342	2.76	2.86
อายุเก็บรักษา 42 วัน	3	2.8467	.04163	.02404	2.7432	2.9501	2.80	2.88
อายุเก็บรักษา 56 วัน	3	2.8333	.04933	.02848	2.7108	2.9559	2.80	2.89
ก่อนฆ่าเชื้อ	3	2.8600	.01000	.00577	2.8352	2.8848	2.85	2.87
Total	18	2.8372	.03675	.00866	2.8189	2.8555	2.76	2.89
Model								
Fixed Effects			.03958	.00933	2.8169	2.8575		
Random Effects				.00933 ^a	2.8132 ^a	2.8612 ^a		

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.004	5	.001	.531	.749
Within Groups	.019	12	.002		
Total	.023	17			

Duncan^a

ตัวอย่าง	N	Subset for alpha = 0.05
		1
อายุเก็บรักษา 28 วัน	3	2.8100
อายุเก็บรักษา 14 วัน	3	2.8333
อายุเก็บรักษา 56 วัน	3	2.8333
อายุเก็บรักษา 0 วัน	3	2.8400
อายุเก็บรักษา 42 วัน	3	2.8467
ก่อนฆ่าเชื้อ	3	2.8600
Sig.		.187

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

ปริมาณกรดทั้งหมด

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Min	Max
					Lower Bound	Upper Bound		
					อายุเก็บรักษา 0 วัน	3		
อายุเก็บรักษา 14 วัน	3	1.0888	.07732	.04464	.8967	1.2808	1.01	1.16
อายุเก็บรักษา 28 วัน	3	1.1043	.07687	.04438	.9134	1.2953	1.03	1.19
อายุเก็บรักษา 42 วัน	3	1.0716	.07184	.04148	.8931	1.2500	1.03	1.15
อายุเก็บรักษา 56 วัน	3	1.1233	.02082	.01202	1.0716	1.1750	1.10	1.14
ก่อนฆ่าเชื้อ	3	1.0900	.06083	.03512	.9389	1.2411	1.05	1.16
Total	18	1.0950	.05766	.01359	1.0663	1.1237	1.01	1.19
Model								
Fixed Effects			.06582	.01551	1.0612	1.1288		
Random Effects				.01551 ^a	1.0551 ^a	1.1349 ^a		

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.005	5	.001	.209	.952
Within Groups	.052	12	.004		
Total	.057	17			

Duncan^a

ตัวอย่าง	N	Subset for alpha = 0.05
		1
อายุเก็บรักษา 42 วัน	3	1.0716
อายุเก็บรักษา 14 วัน	3	1.0888
ก่อนฆ่าเชื้อ	3	1.0900
อายุเก็บรักษา 0 วัน	3	1.0920
อายุเก็บรักษา 28 วัน	3	1.1043
อายุเก็บรักษา 56 วัน	3	1.1233
Sig.		.398

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

ปริมาณน้ำตาทั้งหมด

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Min	Max
					Lower Bound	Upper Bound		
					อายุเก็บรักษา 0 วัน	3		
อายุเก็บรักษา 14 วัน	3	25.6667	3.05505	1.76383	18.0775	33.2558	23.00	29.00
อายุเก็บรักษา 28 วัน	3	26.3267	.18009	.10398	25.8793	26.7740	26.15	26.51
อายุเก็บรักษา 42 วัน	3	25.6233	.48542	.28026	24.4175	26.8292	25.15	26.12
อายุเก็บรักษา 56 วัน	3	25.2333	.90185	.52068	22.9930	27.4737	24.30	26.10
ก่อนฆ่าเชื้อ	3	25.5700	1.40043	.80854	22.0911	29.0489	24.15	26.95
Total	18	25.7972	1.31324	.30953	25.1442	26.4503	23.00	29.00
Model								
Fixed Effects			1.47945	.34871	25.0375	26.5570		
Random Effects				.34871 ^a	24.9008 ^a	26.6936 ^a		

a. Warning: Between-component variance is negative. It was replaced by 0.0 in computing this random effects measure.

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	3.053	5	.611	.279	.916
Within Groups	26.265	12	2.189		
Total	29.318	17			

Duncan^a

ตัวอย่าง	N	Subset for alpha = 0.05
		1
อายุเก็บรักษา 56 วัน	3	25.2333
ก่อนฆ่าเชื้อ	3	25.5700
อายุเก็บรักษา 42 วัน	3	25.6233
อายุเก็บรักษา 14 วัน	3	25.6667
อายุเก็บรักษา 28 วัน	3	26.3267
อายุเก็บรักษา 0 วัน	3	26.3633
Sig.		.412

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

เอทานอล

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Min	Max
					Lower Bound	Upper Bound		
อายุเก็บรักษา 0 วัน	3	.9200	.02646	.01528	.8543	.9857	.89	.94
อายุเก็บรักษา 14 วัน	3	.9310	.03554	.02052	.8427	1.0193	.89	.95
อายุเก็บรักษา 28 วัน	3	.9223	.01940	.01120	.8741	.9705	.90	.94
อายุเก็บรักษา 42 วัน	3	.9250	.01323	.00764	.8921	.9579	.91	.94
อายุเก็บรักษา 56 วัน	3	.9133	.03215	.01856	.8335	.9932	.89	.95
ก่อนฆ่าเชื้อ	3	.9500	.01000	.00577	.9252	.9748	.94	.96
Total	18	.9269	.02391	.00563	.9151	.9388	.89	.96
Model								
Fixed Effects			.02466	.00581	.9143	.9396		
Random Effects				.00581 ^a	.9120 ^a	.9419 ^a		

a. Warning: Between-component variance is negative. It was replaced by 0.0 in computing this random effects measure.

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.002	5	.000	.796	.573
Within Groups	.007	12	.001		
Total	.010	17			

Duncan^a

ตัวอย่าง	N	Subset for alpha = 0.05
		1
อายุเก็บรักษา 56 วัน	3	.9133
อายุเก็บรักษา 0 วัน	3	.9200
อายุเก็บรักษา 28 วัน	3	.9223
อายุเก็บรักษา 42 วัน	3	.9250
อายุเก็บรักษา 14 วัน	3	.9310
ก่อนฆ่าเชื้อ	3	.9500
Sig.		.125

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH

		N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Min	Max
						Lower Bound	Upper Bound		
IC ₅₀	อายุเก็บรักษา 0 วัน	3	25.2867	.12702	.07333	24.9711	25.6022	25.14	25.36
	อายุเก็บรักษา 14 วัน	3	27.7500	.17321	.10000	27.3197	28.1803	27.65	27.95
	อายุเก็บรักษา 28 วัน	3	28.4967	.13051	.07535	28.1725	28.8209	28.36	28.62
	อายุเก็บรักษา 42 วัน	3	31.7167	2.16449	1.24967	26.3398	37.0936	30.32	34.21
	อายุเก็บรักษา 56 วัน	3	35.7303	.47521	.27436	34.5499	36.9108	35.32	36.25
	ก่อนฆ่าเชื้อ	3	18.3333	1.15470	.66667	15.4649	21.2018	17.00	19.00
	Total	18	27.8856	5.61742	1.32404	25.0921	30.6791	17.00	36.25
	Model	Fixed Effects			1.02529	.24166	27.3591	28.4122	
	Random Effects				2.41253	21.6840	34.0872		

		N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Min	Max
						Lower Bound	Upper Bound		
ร้อยละด้าน อนุมูลอิสระ	อายุเก็บรักษา 0 วัน	3	95.3767	.23544	.13593	94.7918	95.9615	95.15	95.62
	อายุเก็บรักษา 14 วัน	3	92.3000	.24556	.14177	91.6900	92.9100	92.03	92.51
	อายุเก็บรักษา 28 วัน	3	88.6667	2.59396	1.49762	82.2229	95.1104	85.71	90.56
	อายุเก็บรักษา 42 วัน	3	81.8567	2.05125	1.18429	76.7611	86.9523	79.62	83.65
	อายุเก็บรักษา 56 วัน	3	74.8567	2.17611	1.25637	69.4509	80.2624	73.34	77.35
	ก่อนฆ่าเชื้อ	3	95.9600	1.74860	1.00955	91.6162	100.3038	94.00	97.36
	Total	18	88.1694	7.96599	1.87760	84.2080	92.1308	73.34	97.36
	Model	Fixed Effects			1.77224	.41772	87.2593	89.0796	
	Random Effects				3.40111	79.4266	96.9123		

ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
IC ₅₀	Between Groups	523.827	5	104.765	99.660	.000
	Within Groups	12.615	12	1.051		
	Total	536.442	17			
ร้อยละต้านอนุมูลอิสระ	Between Groups	1041.080	5	208.216	66.293	.000
	Within Groups	37.690	12	3.141		
	Total	1078.770	17			

IC₅₀Duncan^a

ตัวอย่าง	N	Subset for alpha = 0.05				
		1	2	3	4	5
ก่อนฆ่าเชื้อ	3	18.3333				
อายุเก็บรักษา 0 วัน	3		25.2867			
อายุเก็บรักษา 14 วัน	3			27.7500		
อายุเก็บรักษา 28 วัน	3			28.4967		
อายุเก็บรักษา 42 วัน	3				31.7167	
อายุเก็บรักษา 56 วัน	3					35.7303
Sig.		1.000	1.000	.390	1.000	1.000

ร้อยละด้านอนุมูลอิสระ

Duncan^a

ตัวอย่าง	N	Subset for alpha = 0.05				
		1	2	3	4	5
อายุเก็บรักษา 56 วัน	3	74.8567				
อายุเก็บรักษา 42 วัน	3		81.8567			
อายุเก็บรักษา 28 วัน	3			88.6667		
อายุเก็บรักษา 14 วัน	3				92.3000	
อายุเก็บรักษา 0 วัน	3				95.3767	95.3767
ก่อนฆ่าเชื้อ	3					95.9600
Sig.		1.000	1.000	1.000	.055	.694

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

ปริมาณสารประกอบฟีนอลิก

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Min	Max
					Lower Bound	Upper Bound		
อายุเก็บรักษา 0 วัน	3	225.2767	1.12091	.64716	222.4922	228.0612	224.32	226.51
อายุเก็บรักษา 14 วัน	3	224.2653	.09993	.05769	224.0171	224.5136	224.15	224.33
อายุเก็บรักษา 28 วัน	3	222.6607	1.12472	.64936	219.8667	225.4546	221.36	223.32
อายุเก็บรักษา 42 วัน	3	223.6933	.49692	.28690	222.4589	224.9278	223.12	224.00
อายุเก็บรักษา 56 วัน	3	220.9867	.57735	.33333	219.5524	222.4209	220.32	221.32
ก่อนฆ่าเชื้อ	3	231.5467	3.91619	2.26101	221.8183	241.2750	228.64	236.00
Total	18	224.7382	3.72550	.87811	222.8856	226.5909	220.32	236.00
Model Fixed Effects			1.75348	.41330	223.8377	225.6387		
Random Effects				1.48717	220.9153	228.5611		

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	199.052	5	39.810	12.948	.000
Within Groups	36.896	12	3.075		
Total	235.948	17			

Duncan^a

ตัวอย่าง	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
อายุเก็บรักษา 56 วัน	3	220.9867		
อายุเก็บรักษา 28 วัน	3	222.6607	222.6607	
อายุเก็บรักษา 42 วัน	3	223.6933	223.6933	
อายุเก็บรักษา 14 วัน	3	224.2653	224.2653	
อายุเก็บรักษา 0 วัน	3		225.2767	
ก่อนฆ่าเชื้อ	3			231.5467
Sig.		.055	.116	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ	นางสาวนราทิพย์ วงศ์ไทย
วัน เดือน ปีเกิด	20 ธันวาคม 2536
ที่อยู่ปัจจุบัน	9/163 ซอยนภาลัย5 หมู่บ้านศุภาลัยสุวรรณภูมิ ถนนลาดกระบัง ลาดกระบัง กทม. 10520
ชื่อสถานศึกษา	สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ผลงานทางวิชาการ	Wongthai, N. and Ochaikul, D. 2019. “The antioxidant activity and phenolic content of several herbal kombucha analogues.” In Proceeding of 21 st Food Innovation Asia Conference 2019 (FIAC 2019) Future Food Innovation for Better Health and Wellness. Bangkok: Bangkok International Trade and Exhibition Centre (Bitec bangna). 13-15 June 2019.