Published online: 26 July 2019

การเปรียบเทียบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดใบคนทีสอและใบคนทีเขมา

Comparison on Biological Activities of *Vitex trifolia* and *Vitex negundo* Leaves

ฐณาณิ ธนวรรณวิวัฒน์

อีเมล: 6051701264@lamduan.mfu.ac.th

หลักสูตรวิทยาศาตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์เครื่องสำอาง

สำนักวิชาวิทยาศาสตร์เครื่องสำอาง มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง

ดร. ณัตฐาวุฒิ ฐิติปราโมทย์ อาจารย์ที่ปรึกษา

อีเมล: natthawut.thi@mfu.ac.th

สำนักวิชาวิทยาศาสตร์เครื่องสำอาง มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง

Mae Fah Luang University

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อวิเคราะห์และเปรียบเทียบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดใบคนทีสอ (*Vitex trifolia*) และใบคนทีเขมา (*Vitex negundo*) โดยวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบรวมฟีนอลิก ฟลาโวนอยด์ โปรแอนโทไซยานิดิน พร้อมทั้งฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (ฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH ความสามารถในการรีดิวซ์เฟอร์รัสซัลเฟต และฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระ ABTS) และฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส โดยนำมาสกัดด้วยตัวทำละลาย 4 ชนิดคือ น้ำกลั่น เมทานอล 95% เอทานอล และอะซิโตน โดยจากการทดลองพบว่า สารสกัดใบคนทีเขมาที่สกัดด้วยอะซิโตน ให้ปริมาณสารประกอบรวมฟีนอลิกมากที่สุดเท่ากับ 44.26±0.10 มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อกรัมสารสกัด และให้ปริมาณสารประกอบรวมฟลาโวนอยด์มากที่สุดเท่ากับ 33.31±0.01 มิลลิกรัมสมมูลของเคอร์ซิตินต่อกรัมสารสกัด และยังมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH มากที่สุดเท่ากับ 268.32±0.56 มิลลิกรัมสมมูลของโทรล็อกซ์ต่อกรัมสารสกัด และสารสกัดใบคนทีเขมาที่สกัดด้วย 95% เอทานอล มีความสามารถในการรีดิวซ์เฟอร์รัสซัลเฟตมากที่สุดเท่ากับ 172.03±1.57 มิลลิกรัมสมมูลของโทรล็อกซ์ต่อกรัมสารสกัด และมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ABTS มากที่สุดเท่ากับ 257.84±0.04 มิลลิกรัมสมมูลของโทรล็อกซ์ต่อกรัมสารสกัด ส่วนสารสกัดใบคนทีสอที่สกัดด้วยเมทานอล มีปริมาณสารประกอบรวมโปรแอนโทไซยานิดินมากที่สุดเท่ากับ 22.87±0.48 มิลลิกรัมสมมูลของคาเตชินต่อกรัมสารสกัด และสารสกัดที่สกัดด้วย 95% เอทานอลยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสมากที่สุดเท่ากับร้อยละ 22.59±0.05 นอกจากนี้สารสกัดใบคนทีเขมามีปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพสูงกว่าและมีปริมาณฤทธิ์ทางชีวภาพที่ดีกว่าสารสกัดใบคนทีสอ ผลการศึกษา

แสดงให้เห็นว่า สารสกัดใบคนทีเขมาและใบคนทีสอสามารถนำไปประยุกต์ใช้เพื่อเป็นสารออกฤทธิ์ในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางสำหรับผิวได้

คำสำคัญ : คนทีสอ/คนทีเขมา/โปรแอนโทไซยานิดิน/ฟีนอลิก/ฟลาโวนอยด์/ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ/ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส

Abstract

The purposes of this research were to extract and compare the bioactive and their biological activities of *Vitex trifolia* and *Vitex negundo* leaves extracted with four solvents (DI water, methanol, 95%ethanol and acetone). The extracts were investigated for total phenolic content (TPC), total flavonoid content (TFC), total proanthocyanidin content (TPAC), antioxidant activity (DPPH radical scavenging, ferric reducing antioxidant power and ABTS radical scavenging activities) and anti-tyrosinase activity. The results were found that *Vitex negundo* leaves extracted by acetone showed the highest TPC of 44.26±0.10 mg gallic acid/g sample, the highest TFC of 33.31±0.01 mg Quercetin/g sample, and the highest inhibition against DPPH of 268.32±0.56 mg Trolox/g sample. In addition, *Vitex negundo* leaves extracted by 95%ethanol showed the highest antioxidant activity in FRAP and ABTS assay with the TEAC value of 172.03±1.57 and 257.84±0.04 mg Trolox/g sample, respectively. Moreover, *Vitex trifolia* leaves extracted by methanol showed the highest TPAC of 22.87±0.48 mg catechin/g sample and the ethanolic showed the highest anti-tyrosinase activity of 22.59±0.05 % tyrosinase inhibition. In addition, *Vitex negundo* leaves was better than *Vitex trifolia* leaves in extraction of bioactive compound and biological activity. The study suggested that *Vitex negundo* extract and *Vitex trifolia* extract might be used as active ingredient in skincare and others.

Keywords : antioxidant/antityrosinase/flavonoid/phenolic/proanthocyanidin/*Vitex trifolia*/*Vitex negundo*

บทนำ

คนที (*Vitex* genus) เป็นตระกูลพืชสมุนไพรที่มีสายพันธุ์อยู่ประมาณ 270 สายพันธุ์ ในประเทศไทยสายพันธุ์ที่โดดเด่นและพบได้มากคือ คนทีสอ (*Vitex trifolia*) และคนทีเขมา (*Vitex negundo*) ซึ่งเป็นสมุนไพรเก่าแก่ที่ปรากฏอยู่ในตำราอายุรเวชของอินเดีย มีประวัติการใช้มาอย่างยาวนาน ในตำรายาแผนโบราณมีรายงานการนำมาใช้เพื่อใช้รักษาโรคเช่น แก้ไข้ แก้ไอ ขับเสมหะ แก้ปวดหัว และยังพบว่าใบคนทีสอและใบคนทีเขมามีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ซึ่งเป็นส่วนสำคัญในการช่วยชะลอและยับยั้ง

Mae Fah Luang University

การเกิด Reactive Oxygen Species ที่ส่งผลให้ร่างกายเกิดสภาวะ oxidative stress ซึ่งทำให้เกิดการแก่ก่อนวัยได้ นอกจากนั้นยังมีฤทธิ์ต้านการอักเสบและฤทธิ์ต้านแบคทีเรียที่สามารถนำมาใช้ประโยชน์ในทางเครื่องสำอางได้ แต่การนำสารสกัดจากพืชทั้ง 2 สายพันธุ์นี้มาประยุกต์ใช้ในทางเครื่องสำอางนั้นยังไม่เป็นที่แพร่หลายมากนัก จึงเป็นที่มาของวัตถุประสงค์ของการวิจัยนี้ที่ต้องการศึกษาเปรียบเทียบฤทธิ์ทางชีวภาพของใบคนทีสอและใบคนทีเขมา เพื่อนำไปประยุกต์ใช้เป็นสารออกฤทธิ์ในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางสำหรับผิวได้

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1 เพื่อสกัดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากใบคนทีสอและใบคนทีเขมา ด้วยตัวทำละลายที่แตกต่างกัน

2. เพื่อทดสอบหาปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ (สารประกอบรวมฟีนอลิก สารประกอบรวมฟลาโวนอยด์ สารประกอบรวมโปรแอนโทไซยานิดิน) ของสารสกัดใบคนทีสอและใบคนทีเขมา

3. เพื่อทดสอบวิเคราะห์และเปรียบเทียบฤทธิ์ทางชีวภาพ (ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส) ของสารสกัดใบคนทีสอและใบคนทีเขมา

ขอบเขตการวิจัย

สกัดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากใบคนทีสอและใบคนทีเขมาด้วยตัวทำละลายที่แตกต่างกัน 4 ชนิดคือ น้ำกลั่น เมทานอล 95% เอทานอล และอะซิโตน นำมาทดสอบหาปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ (ฟีนอลิก ฟลาโวนอยด์ และโปรแอนโทไซยานิดิน) และฤทธิ์ทางชีวภาพ (ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส) วิเคราะห์และเปรียบเทียบฤทธิ์ทางชีวภาพและความสัมพันธ์ด้วยสถิติ

ทบทวนวรรณกรรม

คนทีสอ (*Vitex trifolia*) เป็นไม้พุ่มไม้ผลัดใบ ลำต้นมีขนาดกลางสูงประมาณ 6 เมตร เป็นพืชใบเลี้ยงคู่ มีใบย่อย 3 ใบ ออกดอกเป็นช่อแขนงสีม่วงอมขาว ผลเป็นทรงกลมขนาดเล็กเท่าเม็ดพริกไทย อุดมไปด้วยสารพฤกษเคมีที่สำคัญมากมาย เช่น อัลคาลอยด์ ซับโปนิน แทนนิน ฟีนอล เทอร์พินอล ฟลาโวนอยด์ และสเตียรอยด์ เป็นต้น (Mary et al., 2014) จากงานวิจัยของ Matsui et al. (2009) ทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบโดยนำใบคนทีสอที่สกัดด้วยน้ำไปทดสอบกับสาร Lipopolysaccharide พบว่าประสิทธิภาพในการต่อต้านการอักเสบของสารสกัดใบคนทีสอขึ้นอยู่กับปริมาณและระยะเวลาที่ใช้เป็นตัวแปรในการยับยั้ง interleukin (IL)-1β, IL-6 และการสังเคราะห์ iNOS mRNA แต่กลับได้ผลเพียงเล็กน้อยกับ tumor necrosis factor (TNF)-α ยิ่งไปกว่านั้นสารสกัดนี้ยังช่วยลด LPS-

Mae Fah Luang University

dependant IL-10 anti-inflammatory cytokine ได้อีกด้วย ซึ่งผลการทดลองนี้ได้รับการยืนยันโดย ELISA ซึ่งได้ใช้แอนติ้บอดี้แบบเฉพาะในการทดสอบ IL-6, IL-10 และ TNF-α ในหนูทดลอง ส่วนคนทีเขมา (*Vitex negundo*) เป็นไม้พุ่มไม้ผลัดใบ ลำต้นมีขนาดกลางสูงประมาณ 6 เมตร เป็นพืชใบเลี้ยงคู่ มีใบย่อย 5 ใบ ออกดอกเป็นช่อแขนงสีม่วงอมขาว ผลเป็นทรงกลมขนาดเล็กเท่าเม็ดพริกไทย อุดมไปด้วยสารพฤกษเคมีที่สำคัญมากมาย ทั้งอัลคาลอยด์ แทนนิน ซับโปนิน ฟีนอล ฟลาโวนอยด์ ลิกนิน อิริดอยด์ เทอร์พีน และเสตียรอยด์ (Meena et al., 2011) จากงานวิจัยของ Ul-Haq et al. (2006) ทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส โดยนำรากของต้นคนทีเขมามาสกัดด้วยเมทานอล พบว่า มีสารลิกแนนอยู่ถึง 8 ชนิด ได้แก่ negundin A, negundin B, 6-hydroxy-4-(4-hydroxy-3- methoxy)-3-hydroxymethyl-7-methoxy-3, 4-dihydro-2-naphthaledehyde, vitrofolal E, (+)-lyoniresinol, (+)-lyoniresinol-3[α]-O-[β]-D-glucoside, (+),(-)- pinoresinol and (+)-diasyringaresinol ซึ่งสารเหล่านี้ช่วยในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสได้ ถึงแม้ว่าพืชทั้ง 2 สายพันธุ์นี้จะมีลักษณะทางพันธุศาสตร์ที่คล้ายกัน แต่กลับมีลักษณะใบที่แตกต่างกันโดยสิ้นเชิง จึงเป็นที่มาของงานวิจัยนี้ที่ต้องการศึกษาเปรียบเทียบฤทธิ์ทางชีวภาพของใบคนทีสอและใบคนทีเขมา โดยการสกัดด้วยตัวทำละลายที่แตกต่างกัน 4 ชนิดคือ น้ำกลั่น เมทานอล 95% เอทานอล และอะซิโตน ซึ่งเป็นตัวทำละลายที่ไม่มีสี ไม่ทำปฏิกิริยากับสารที่ต้องการสกัด และสามารถละลายสารสกัดได้ดี (Thombre et al., 2013)

วิธีดำเนินงานวิจัย

1. วิธีสกัดสาร

นำใบคนทีสอและใบคนทีเขมามาล้างแล้วอบในตู้อบแห้งที่อุณภูมิ 50 องศาเซลเซียสจนแห้งกรอบ นำไปบดให้ละเอียดแล้วชั่งอย่างละ 10 กรัม เติมตัวทำละลาย 4 ชนิดคือ น้ำกลั่น เมทานอล 95% เอทานอล และอะซิโตนอย่างละ 100 มิลลิลิตร ทำการแช่หมักที่อุณภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง กรองสารสกัดแล้วนำสารละลายที่ได้ไประเหยแห้งด้วยเครื่อง Rotary evaporator

2. ศึกษาปริมาณสารประกอบรวมฟีนอลิกด้วยวิธี Folin-ciocalteu assay

นำสารสกัดใบคนทีสอและใบคนทีเขมาปริมาตร 60 ไมโครลิตรกับสารละลาย Folin-Ciocalteu ปริมาตร 300 ไมโครลิตรผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ 1 นาทีที่อุณหภูมิห้อง เติมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนตเข้มข้น 7% ปริมาตร 240 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน ทิ้งให้เกิดปฏิกิริยาในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร คำนวณหาปริมาณสารประกอบรวมฟีนอลิกในรูปมิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อกรัมสารสกัด (Singleton & Rossi, 1965) โดยใช้กรดแกลลิก (Gallic acid) เป็นสารละลายมาตรฐาน

3. ศึกษาปริมาณสารประกอบรวมฟลาโวนอยด์ด้วยวิธี Aluminum chloride colorimetry

Mae Fah Luang University

นำสารสกัดใบคนทีสอและใบคนทีเขมาปริมาตร 100 ไมโครลิตรผสมกับ 95%เอทานอล ปริมาตร 300 ไมโครลิตร เติมสารละลายอลูมิเนียมคลอไรด์เข้มข้น 10% ปริมาตร 20 ไมโครลิตรเขย่าให้เข้ากัน เติมสารละลายโพแทสเซียมอะซิเตทเข้มข้น 1 M ปริมาตร 20 ไมโครลิตรและน้ำกลั่นปริมาตร 560 ไมโครลิตรผสมให้เข้ากัน ทิ้งให้เกิดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 415 นาโนเมตร คำนวณหาปริมาณสารประกอบรวมฟลาโวนอยด์ในรูปมิลลิกรัมสมมูลของเคอร์ซิตินต่อกรัมสารสกัด (Chang et al., 2002) โดยใช้เคอร์ซิติน (Quercetin) เป็นสารละลายมาตรฐาน

4. ศึกษาปริมาณสารประกอบรวมโปรแอนโทไซยานิดิน

นำสารสกัดใบคนทีสอและใบคนทีเขมาปริมาตร 200 ไมโครลิตรกับสารละลายวานิลลินเข้มข้น 1% ปริมาตร 500 ไมโครลิตรผสมให้เข้ากัน เติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 25% ปริมาตร 500 ไมโครลิตรผสมให้เข้ากัน ทิ้งให้เกิดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้องในที่มืดเป็นเวลา 15 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 500 นาโนเมตร คำนวณหาปริมาณสารประกอบรวมโปรแอนโทไซยานิดินในรูปมิลลิกรัมสมมูลของคาเตชินต่อกรัมสารสกัด (Singleton & Rossi, 1965) โดยใช้คาเตชิน (Catechin) เป็นสารละลายมาตรฐาน

5. ศึกษาปริมาณฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH

นำสารสกัดใบคนทีสอและใบคนทีเขมาปริมาตร 30 ไมโครลิตรผสมกับสารละลาย DPPH ปริมาตร 570 ไมโครลิตร ทิ้งให้เกิดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้องในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 515 นาโนเมตร คำนวณหาปริมาณฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในรูปมิลลิกรัมสมมูลของโทรล็อกซ์ต่อกรัมสารสกัด (Sharma & Bhat, 2009) โดยใช้โทรล็อกซ์ (Trolox) เป็นสารละลายมาตรฐาน

6. ศึกษาปริมาณฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP

นำสารละลาย TPTZ 10 มิลลิลิตรกับสารละลายเฟอริกคลอไรด์ 10 มิลลิลิตรและโซเดียมอะซิเตทบัฟเฟอร์ 100 มิลลิลิตรผสมให้เข้ากัน นำสารสกัดใบคนทีสอและใบคนทีเขมาปริมาตร 30 ไมโครลิตรกับสารละลาย FRAP ปริมาตร 570 ไมโครลิตรผสมให้เข้ากันอย่างรวดเร็ว ทิ้งให้เกิดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้องในที่มืดเป็นเวลา 15 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 593 นาโนเมตร คำนวณหาปริมาณฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในรูปมิลลิกรัมสมมูลของโทรล็อกซ์ต่อกรัมสารสกัด (Prior et al., 2005) โดยใช้โทรล็อกซ์ (Trolox) เป็นสารละลายมาตรฐาน

7. ศึกษาปริมาณฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS

นำสารละลาย ABTS กับสารละลายโพแทสเซียมเปอซัลเฟตปริมาตร 100 ไมโครลิตรในอัตราส่วน 1:1 (v/v) ผสมให้เข้ากัน ทิ้งให้เกิดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้องในที่มืดเป็นเวลา 15 ชั่วโมง นำมาเจือจางด้วยสารละลายฟอสเฟสบัฟเฟอร์ ในอัตราส่วน 1:20 (v/v) นำสารสกัดใบคนทีสอและใบคนที

Mae Fah Luang University

เขมาปริมาตร 30 ไมโครลิตรกับสารละลาย ABTS ปริมาตร 570 ไมโครลิตรผสมให้เข้ากันอย่างรวดเร็ว ทิ้งให้เกิดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้องในที่มืดเป็นเวลา 15 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร คำนวณหาปริมาณฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในรูปมิลลิกรัมสมมูลของโทรล็อกซ์ต่อกรัมสารสกัด โดยใช้โทรล็อกซ์ (Trolox) เป็นสารละลายมาตรฐาน

8. ศึกษาปริมาณฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส

นำสารสกัดใบคนทีสอและใบคนทีเขมาปริมาตร 120 ไมโครลิตรผสมกับ Tyrosinase mushroom ที่ความเข้มข้น 29.4 ยูนิตในสารละลาย 0.1 โมลาร์ปริมาตร 120 ไมโครลิตรและฟอสเฟสบัฟเฟอร์ปริมาตร 240 ไมโครลิตรผสมให้เข้ากัน ทิ้งให้เกิดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 20 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร คำนวณหาค่าร้อยละปริมาณการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส (Lida et al., 1995) โดยใช้กรดโคจิก (Kojic acid) เป็นสารละลายมาตรฐาน

9. วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

นำข้อมูลที่ศึกษาได้มาวิเคราะห์ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูปทางสถิติ SPSS โดยแสดงผลที่ได้เป็นค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (STD) และประเมินความแตกต่างระหว่างกลุ่มด้วยสถิติ One-way ANOVA ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($p<0.05$)

ผลการวิจัยและอภิปรายผล

ปริมาณสารสกัดหยาบของใบคนทีสอและใบคนทีเขมา

จากการนำใบคนทีสอและใบคนทีเขมามาสกัดด้วยตัวทำละลาย 4 ชนิด คือ น้ำกลั่น เมทานอล 95% เอทานอล และอะซิโตน พบว่าทั้ง 2 สายพันธุ์นี้ได้ผลออกมาคล้ายกันคือ ตัวทำละลาย เมทานอล 95% เอทานอล และอะซิโตน ให้สารสกัดสีเขียวเข้มอมดำ ส่วนตัวทำละลายน้ำกลั่นให้สารสกัดสีน้ำตาล นำมาคำนวณหาปริมาณร้อยละผลผลิตได้ดังนี้ สารสกัดใบคนทีสอที่สกัดด้วยน้ำกลั่น ให้ปริมาณร้อยละผลผลิตสารสกัดมากที่สุดเท่ากับ 17.53±0.30 รองลงมาได้แก่ เมทานอล 95% เอทานอล และอะซิโตน ให้ปริมาณร้อยละผลผลิตสารสกัดเท่ากับ 15.37±0.56, 9.93±0.40 และ5.33±0.51 ตามลำดับ ส่วนสารสกัดใบคนทีเขมาที่สกัดด้วยน้ำกลั่น ให้ปริมาณร้อยละผลผลิตสารสกัดมากที่สุดเท่ากับ 18.23±0.25 รองลงมาได้แก่ เมทานอล 95% เอทานอล และอะซิโตน ให้ปริมาณร้อยละผลผลิต สารสกัดเท่ากับ 16.20±0.30, 10.50±0.55 และ 7.50±1.01 ตามลำดับ

ปริมาณสารประกอบรวมฟีนอลิก

เมื่อนำสารสกัดใบคนทีสอและใบคนทีเขมามาทำการทดสอบปริมาณสารประกอบรวมฟีนอลิกพบว่า สารสกัดใบคนทีสอที่สกัดด้วย 95% เอทานอล ให้ปริมาณสารประกอบรวมฟีนอลิกมากที่สุดเท่ากับ 19.54±0.09 มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อกรัมสารสกัด รองลงมาได้แก่ เมทานอล อะซิ

Mae Fah Luang University

โตน และน้ำกลั่น ให้ปริมาณสารประกอบรวมฟีนอลิกเท่ากับ 14.80±0.48, 11.85±0.14 และ 10.86±0.13 มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อกรัมสารสกัดตามลำดับ ส่วนสารสกัดใบคนทีเขมาที่สกัดด้วยอะซิโตน ให้ปริมาณสารประกอบรวมฟีนอลิกมากที่สุดเท่ากับ 44.26±0.10 มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อกรัมสารสกัด รองลงมาได้แก่ 95% เอทานอล เมทานอล และน้ำกลั่น ให้ปริมาณสารประกอบรวมฟีนอลิกเท่ากับ 22.32±0.06, 19.77±0.05 และ 12.03±0.03 มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อกรัมสารสกัดตามลำดับ

ปริมาณสารประกอบรวมฟลาโวนอยด์

เมื่อนำสารสกัดใบคนทีสอและใบคนทีเขมามาทำการทดสอบปริมาณสารประกอบรวมฟลาโวนอยด์พบว่า สารสกัดใบคนทีสอที่สกัดด้วยอะซิโตน ให้ปริมาณสารประกอบรวมฟลาโวนอยด์มากที่สุดเท่ากับ 16.96±0.00 มิลลิกรัมสมมูลของเคอร์ซิตินต่อกรัมสารสกัด รองลงมาได้แก่ 95% เอทานอล เมทานอล และน้ำกลั่น ให้ปริมาณสารประกอบรวมฟลาโวนอยด์เท่ากับ 15.70±0.08, 11.05±0.01 และ 5.60±0.06 มิลลิกรัมสมมูลของเคอร์ซิตินต่อกรัมสารสกัดตามลำดับ ส่วนสารสกัดใบคนทีเขมาที่สกัดด้วยอะซิโตน ให้ปริมาณสารประกอบรวมฟลาโวนอยด์มากที่สุดเท่ากับ 33.31±0.01 มิลลิกรัมสมมูลของเคอร์ซิตินต่อกรัมสารสกัด รองลงมาได้แก่ 95% เอทานอล เมทานอล และน้ำกลั่น ให้ปริมาณสารประกอบรวมฟลาโวนอยด์เท่ากับ 17.46±0.02, 16.13±0.00 และ 7.77±0.00 มิลลิกรัมสมมูลของเคอร์ซิตินต่อกรัมสารสกัดตามลำดับ

ปริมาณสารประกอบรวมโปรแอนโทไซยานิดิน

เมื่อนำสารสกัดใบคนทีสอและใบคนทีเขมามาทำการทดสอบปริมาณสารประกอบรวมโปรแอนโทไซยานิดินพบว่า สารสกัดใบคนทีสอที่สกัดด้วยเมทานอล ให้ปริมาณสารประกอบรวมโปรแอนโทไซยานิดินมากที่สุดเท่ากับ 22.87±0.48 มิลลิกรัมสมมูลของคาเตชินต่อกรัมสารสกัด รองลงมาได้แก่ 95% เอทานอล อะซิโตน และน้ำกลั่น ให้ปริมาณสารประกอบรวมโปรแอนโทไซยานิดินเท่ากับ 22.15±0.89, 16.81±0.54 และ 13.90±1.11 มิลลิกรัมสมมูลของคาเตชินต่อกรัมสารสกัดตามลำดับ ส่วนสารสกัดใบคนทีเขมาที่สกัดด้วยอะซิโตน ให้ปริมาณสารประกอบรวมโปรแอนโทไซยานิดินมากที่สุดเท่ากับ 16.72±0.92 มิลลิกรัมสมมูลของคาเตชินต่อกรัมสารสกัด รองลงมาได้แก่ เมทานอล 95% เอทานอล และน้ำกลั่น ให้ปริมาณสารประกอบรวมโปรแอนโทไซยานิดินเท่ากับ 13.95±0.52, 12.47±0.73 และ 7.48±0.74 มิลลิกรัมสมมูลของคาเตชินต่อกรัมสารสกัดตามลำดับ

ปริมาณฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH

เมื่อนำสารสกัดใบคนทีสอและใบคนทีเขมามาทำการทดสอบปริมาณฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระพบว่า สารสกัดใบคนทีสอที่สกัดด้วยอะซิโตน มีปริมาณฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมากที่สุดเท่ากับ 229.86±2.12 มิลลิกรัมสมมูลของโทรล็อกซ์ต่อกรัมสารสกัด รองลงมาได้แก่ น้ำกลั่น เมทานอล และ 95% เอทานอล มีปริมาณฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเท่ากับ 228.82±0.26, 211.51±4.16 และ 191.13±4.61

Mae Fah Luang University

มิลลิกรัมสมมูลของโทรล็อกซ์ต่อกรัมสารสกัดตามลำดับ ส่วนสารสกัดใบคนทีเขมาที่สกัดด้วยอะซิโตน มีปริมาณฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมากที่สุดเท่ากับ 268.32±0.56 มิลลิกรัมสมมูลของโทรล็อกซ์ต่อกรัมสารสกัด รองลงมาได้แก่ เมทานอล น้ำกลั่น และ95% เอทานอล มีปริมาณฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเท่ากับ 257.75±5.42, 237.30±1.64 และ 230.81±1.59 มิลลิกรัมสมมูลของโทรล็อกซ์ต่อกรัมสารสกัดตามลำดับ

ปริมาณฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP

เมื่อนำสารสกัดใบคนทีสอและใบคนทีเขมามาทำการทดสอบปริมาณฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ พบว่า สารสกัดใบคนทีสอที่สกัดด้วยเมทานอล มีปริมาณฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมากที่สุดเท่ากับ 148.46±2.96 มิลลิกรัมสมมูลของโทรล็อกซ์ต่อกรัมสารสกัด รองลงมาได้แก่ 95% เอทานอล อะซิโตน และน้ำกลั่น มีปริมาณฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเท่ากับ 131.93±4.16, 98.10±1.18 และ 97.62±1.12 มิลลิกรัมสมมูลของโทรล็อกซ์ต่อกรัมสารสกัดตามลำดับ ส่วนสารสกัดใบคนทีเขมาที่สกัดด้วย 95% เอทานอล มีปริมาณฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมากที่สุดเท่ากับ 172.03±1.57 มิลลิกรัมสมมูลของโทรล็อกซ์ต่อกรัมสารสกัด รองลงมาได้แก่ เมทานอล อะซิโตน และน้ำกลั่น มีปริมาณฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเท่ากับ 151.81±0.09, 146.21±0.10 และ 82.19±0.31 มิลลิกรัมสมมูลของโทรล็อกซ์ต่อกรัมสารสกัดตามลำดับ

ปริมาณฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS

เมื่อนำสารสกัดใบคนทีสอและใบคนทีเขมามาทำการทดสอบปริมาณฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ พบว่า สารสกัดใบคนทีสอที่สกัดด้วยเมทานอล มีปริมาณฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมากที่สุดเท่ากับ 225.48±0.07 มิลลิกรัมสมมูลของโทรล็อกซ์ต่อกรัมสารสกัด รองลงมาได้แก่ 95% เอทานอล อะซิโตน และน้ำกลั่น มีปริมาณฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเท่ากับ 217.93±0.07, 189.40±0.12 และ 170.25±0.15 มิลลิกรัมสมมูลของโทรล็อกซ์ต่อกรัมสารสกัดตามลำดับ ส่วนสารสกัดใบคนทีเขมาที่สกัดด้วย 95% เอทานอล มีปริมาณฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมากที่สุดเท่ากับ 257.84±0.04 มิลลิกรัมสมมูลของโทรล็อกซ์ต่อกรัมสารสกัด รองลงมาได้แก่ เมทานอล อะซิโตน และน้ำกลั่น มีปริมาณฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเท่ากับ 254.35±0.05, 240.59±0.08 และ 215.28±0.10 มิลลิกรัมสมมูลของโทรล็อกซ์ต่อกรัมสารสกัดตามลำดับ

ปริมาณฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส

เมื่อนำสารสกัดใบคนทีสอและใบคนทีเขมามาทำการทดสอบปริมาณฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส พบว่าสารสกัดใบคนทีสอที่สกัดด้วย 95% เอทานอล ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสมากที่สุดเท่ากับร้อยละ 22.59±0.05 รองลงมาได้แก่ น้ำกลั่น อะซิโตน และเมทานอล ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสเท่ากับร้อยละ 11.22±0.06, 10.51±0.03 และ 8.39±0.01 ตามลำดับ ส่วนสารสกัดใบคนทีเขมาที่สกัดด้วย 95% เอทานอล ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสมากที่สุดเท่ากับร้อยละ 20.73±0.05 รองลงมาได้แก่ อะซิโตน น้ำกลั่น และเมทานอล ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสเท่ากับร้อยละ 12.03±0.03, 11.54±0.06 และ 8.40±0.01 ตามลำดับ

ตารางที่ 1 เปรียบเทียบปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดใบคนทีสอและใบคนทีเขมาใน

Mae Fah Luang University

แต่ละตัวทำละลาย

สารสกัด	ตัวทำละลาย	สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ		
		TPC	TFC	TPAC
ใบคนทีสอ	น้ำกลั่น	$10.86\pm0.13^{d, B}$	$5.60\pm0.06^{d, B}$	$13.90\pm1.11^{d, A}$
	เมทานอล	$14.80\pm0.48^{b, B}$	$11.05\pm0.01^{c, B}$	$22.87\pm0.48^{a, A}$
	95% เอทานอล	$19.54\pm0.09^{a, B}$	$15.70\pm0.08^{b, B}$	$22.15\pm0.89^{b, A}$
	อะซิโตน	$11.85\pm0.14^{c, B}$	$16.96\pm0.00^{a, B}$	$16.81\pm0.54^{c, A}$
ใบคนทีเขมา	น้ำกลั่น	$12.03\pm0.03^{d,A}$	$7.77\pm0.00^{d, A}$	$7.48\pm0.74^{d, B}$
	เมทานอล	$19.77\pm0.05^{c, A}$	$16.13\pm0.00^{c, A}$	$13.95\pm0.52^{b, B}$
	95% เอทานอล	$22.32\pm0.06^{b, A}$	$17.46\pm0.02^{b, A}$	$12.47\pm0.73^{c, B}$
	อะซิโตน	$44.26\pm0.10^{a, A}$	$33.31\pm0.01^{a, A}$	$16.72\pm0.92^{a, A}$

หมายเหตุ. Mean ± S.D (n=5) ตัวอักษรยกพิมพ์เล็ก (a, b, c, d) ที่แตกต่างกันในแต่ละตัวทำละลาย และตัวอักษรยกพิมพ์ใหญ่ (A, B) ในสารสกัดทั้ง 2 ชนิดที่ตัวทำละลายเดียวกัน แสดงให้เห็นว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) (ANOVA tukey test และและ t test)

ตารางที่ 2 เปรียบเทียบปริมาณฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดใบคนทีสอและใบคนทีเขมาในแต่ละตัวทำละลาย

สารสกัด	ตัวทำละลาย	ฤทธิ์ทางชีวภาพ			
		DPPH	FRAP	ABTS	Anti-tyrosinase
ใบคนทีสอ	น้ำกลั่น	$228.82\pm0.26^{a,B}$	$97.62\pm1.12^{c, A}$	$170.25\pm0.15^{d, B}$	$11.22\pm0.06^{b, \mathbf{B}}$
	เมทานอล	$211.51\pm4.16^{b, B}$	$148.46\pm2.96^{a, B}$	$225.48\pm0.07^{a, B}$	$8.39\pm0.01^{d, A}$
	95%เอทานอล	$191.13\pm4.61^{c, B}$	$131.93\pm4.16^{b, B}$	$217.93\pm0.07^{b, B}$	$22.59\pm0.05^{\mathbf{a}, A}$
	อะซิโตน	$229.86\pm2.12^{a, B}$	$98.10\pm1.18^{c, B}$	$189.40\pm0.12^{c, B}$	$10.51\pm0.03^{c, B}$
ใบคนทีเขมา	น้ำกลั่น	$237.30\pm1.64^{c, A}$	$82.19\pm0.31^{d, B}$	$215.28\pm0.10^{d, A}$	$11.54\pm0.06^{c, \mathbf{A}}$
	เมทานอล	$257.75\pm5.42^{b, A}$	$151.81\pm0.09^{b, A}$	$254.35\pm0.05^{b, A}$	$8.40\pm0.01^{d, A}$
	95%เอทานอล	$230.81\pm1.59^{d, A}$	$172.03\pm1.57^{a, A}$	$257.84\pm0.04^{a, A}$	$20.73\pm0.05^{\mathbf{a}, \mathbf{B}}$
	อะซิโตน	$268.32\pm0.56^{a, A}$	$146.21\pm0.10^{c, A}$	$240.59\pm0.08^{c, A}$	$12.03\pm0.03^{\mathbf{b}, A}$

หมายเหตุ. Mean ± S.D (n=5) ตัวอักษรยกพิมพ์เล็ก (a, b, c, d) ที่แตกต่างกันในแต่ละตัวทำละลาย และตัวอักษรยกพิมพ์ใหญ่ (A, B) ในสารสกัดทั้ง 2 ชนิดที่ตัวทำละลายเดียวกัน แสดงให้เห็นว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) (ANOVA tukey test และและ t test)

Mae Fah Luang University

อภิปรายผลการวิจัย

เมื่อนำผลที่ได้จากการทดสอบปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพและฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดใบคนทีสอและใบคนทีเขมามาเปรียบเทียบกัน พบว่าสารสกัดใบคนทีเขมาให้ปริมาณสารประกอบฟีนอลิก สารประกอบฟลาโวนอยด์ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH และ ABTS มากกว่าใบคนทีสอในทุกตัวทำละลาย ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Saklani et al. (2017) พบว่าสารสกัดใบคนทีเขมาที่สกัดด้วย เอทานอล มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิก สารประกอบฟลาโวนอยด์ และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมากกว่าใบคนทีสอ และพบว่าสารฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ที่มีปริมาณสูงจะมีปริมาณฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงตามไปด้วย สารสกัดใบคนทีเขมายังมีปริมาณฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ FRAP มากกว่าสารสกัดใบคนทีสอในตัวทำละลาย 95% เอทานอล เมทานอล อะซิโตน แต่มีปริมาณน้อยกว่าในตัวทำละลายน้ำกลั่น และยังมีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสมากกว่าสารสกัดใบคนทีสอในตัวทำละลาย อะซิโตน น้ำกลั่น เมทานอล แต่มีปริมาณน้อยกว่าในตัวทำละลาย 95% เอทานอล ส่วนสารสกัดใบคนทีสอนั้นพบว่าให้ปริมาณสารโปรแอนโทไซยานิดินมากกว่าใบคนทีเขมาในทุกตัวทำละลาย จากผลการทดลองพบว่า อะซิโตนเป็นตัวทำละลายที่สามารถสกัดฟีนอลิก ฟลาโวนอยด์ และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (DPPH) ออกมาได้ดีที่สุด ส่วน 95% เอทานอลเป็นตัวทำละลายที่สามารถสกัดฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (FRAP และ ABTS) และฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส ออกมาได้ดีที่สุด จะเห็นได้ว่าตัวทำละลายอินทรีย์จะสกัดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพออกมาได้ดีเพราะต่างก็เป็นสารอินทรีย์เหมือนกันจึงเกิดการละลายกันตามหลักการ like dissolve like (ธนศักดิ์ แซ่เลี่ยว และคณะ, 2551)

เมื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพและฤทธิ์ทางชีวภาพของใบคนทีสอพบว่า ปริมาณสารประกอบรวมฟีนอลิกมีค่าความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) กับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH (ค่าความสัมพันธ์เชิงลบ), FRAP, ABTS และฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส (ค่าความสัมพันธ์เชิงบวกระดับสูง) ส่วนปริมาณสารประกอบรวมฟลาโวนอยด์ มีค่าความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) กับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ABTS ซึ่งเป็นค่าความสัมพันธ์เชิงบวกระดับปานกลาง ส่วนสารประกอบรวมโปรแอนโทไซยานิดินมีค่าความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) กับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ FRAP และABTS ซึ่งเป็นค่าความสัมพันธ์เชิงบวกระดับสูง สำหรับใบคนทีเขมาพบว่า ปริมาณสารประกอบรวมฟีนอลิกมีค่าความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) กับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH และ FRAP ซึ่งเป็นค่าความสัมพันธ์เชิงบวกระดับปานกลาง ปริมาณสารประกอบรวมฟลาโวนอยด์มีค่าความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) กับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH และ FRAP ซึ่ง

Mae Fah Luang University

เป็นค่าความสัมพันธ์เชิงบวกระดับปานกลาง ปริมาณสารประกอบรวมโปรแอนโทไซยานิดินมีค่าความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) กับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH, FRAP และABTS ซึ่งเป็นค่าความสัมพันธ์เชิงบวกระดับปานกลาง

จากผลการวิจัยนี้ สารสกัดใบคนทีเขมามีปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพและฤทธิ์ทางชีวภาพสูงกว่าสารสกัดใบคนทีสอ จึงสามารถนำไปประยุกต์ใช้เพื่อเป็นสารออกฤทธิ์ในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางสำหรับผิวได้

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณสาขาวิชาวิทยาศาสตร์เครื่องสำอาง มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง ที่อนุเคราะห์สารเคมี อุปกรณ์และสถานที่ในการทำวิจัย

รายการอ้างอิง

ธนศักดิ์ แซ่เลี่ยว, ศศิธร จันทนวรางกูร และวรรณี จิรภาคย์กุล. (2551). ผลของตัวทำละลายต่อปริมาณสารประกอบฟีนอลิกและความสามารถต้านออกซิเดชันของกระชายเหลือง (Boesenbergia pandurata). ใน *การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร* ครั้งที่ 46: สาขาอุตสาหกรรมเกษตร (538-545). กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

Dhanani, T.,Shah, S., & Kumar, S. (2015). A validated high performance liquid chromatography method for determination of three bioactive compounds, *p*-hydroxybenzoic acid, negundoside and agnuside in *Vitex*species.*Macedonian Journal of Chemistry and Chemical Engineering,34*(2), 321-331.

Kadir, F. A., Kassim, N. M., Abdulla, M. A., & Yehye, W. A. (2013). Hepatoprotective role of ethanolic extract of Vitex negundo in Thioacetamide-Induced liver fibrosis in male rats. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine,* 2013, 739850. doi: 10.1155/2013/739850

Lida, K., Hase, K., Shimomura, K., Sudo, S., Namba, T. (1995). Potent inhibitors of tyrosinase activity and melanin biosynthesis from Rheum offcinale. *Planta Med., 61*(5).

Manjunatha, B. K., & Vidya, S. M. (2008). Hepatoprotective activity of *Vitex trifolia* against carbon tetrachloride-induced hepatic damage. *Indian J Pharm Sci.,70*(2), 241-245.

Mary, R. N. I., Meenashree, B., & Vasanthi, V. J. (2014). Screening of antibacterial activity and quantitative analysis of phytochemicals in Vitex trifolia. *Int. J. Curr. Microbiol, 3*.

Mae Fah Luang University

Matsui, M., Kumar-Roine, S., Darius, H. T., Chinain, M., Pauillac, S. (2009). Characterisation of the anti-inflammatory potential of *Vitex trifolia* L. (Labiatae), a multipurpose plant of the Pacific traditional medicine. *Journal of Ethnopharmacology*,126(3), 427-433.

Meena, A, K., Niranjan, U. S., Rao, M. M., Padhi, M. M., &Babu, R. (2011).A review of the important chemical constituents andmedicinal uses of Vitexgenus. *Asian Journal of Traditional Medicines*, 6(2), 54-60.

Prior, R. L., Wu, X., & Schaich, K. (2005). Standardized methods for the determination ofantioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *J. Agric. FoodChem., 53*, 4290-4302.

Rabeta, M. S., & An Nabil, Z.(2013). Total phenolic compounds and scavenging activity in *Clitoria ternatea* and *Vitex negundo* linn. *International Food Research Journal,20*(1).

Saklani, S., Mishra, A. P., Chandra, H., Atanassova, M. S., Suleria, H. A. R. (2017). Comparative evaluation of polyphenol contents and antioxidant activities between ethanol extracts of *Vitex negundo* and *Vitex trifolia* L. leaves by different methods. *Plants (Basel), 6*(4), E45. doi: 10.3390/plants6040045.

Sharma, O. P., & Bhat, T. K. (2009). DPPH antioxidant assay revisited. *Food Chem.,113*,1201.

Singh, P., Mishra, G., Srivastava, S., Srivastava, S., Khosa, R. L. (2011). Phytopharmacological review of *Vitex negundo* (Sambhalu). *Pharmacologyonline, 2.*

Singleton,V. L., & Rossi, J. A. (1965) Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdicphosphotungstic acid reagents. *Am. J. Enol. Vitic., 16*, 144-158.

Thombre, R., Jagtap, R., &Patil, N. (2013). Evaluation of phytoconsituents, antibacterial, antioxidant and cytotoxic activity of *Vitex negundo* L. and *Tabernaemontana Divaricata* L. *International Journal of Pharma and Bio Sciences,4*(1), 389-396.

Mae Fah Luang University