

ฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดจากพืชท้องถิ่นบางชนิดในอำเภอปากพนัง จังหวัดนครศรีธรรมราช: ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และ ฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย

Biological Activities of Extracts from Some Local Plants in Pakpanang, Nakhon Si Thammarat Province: Antioxidant and Antibacterial Activity

มณฑล เลิศคนาวนิชกุล^{1,2*} กิจศักดิ์ ชววิสิฐ³ และ พูลสิทธิ์ หิรัญสาย¹

Monthon Lertcanawanichakul^{1,2,*}, Kittisak Chawawisit³ and Poonsit Hiransai¹

Received: 21 April 2017, Revised: 2 January 2018, Accepted: 3 May 2019

บทคัดย่อ

การศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดพืชครั้งนี้เป็นการวิจัยเชิงพรรณนาโดยมีวัตถุประสงค์ในการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ของสารสกัดพืชท้องถิ่นบางชนิด (ส้มโอทับทิมสยาม แก้วมังกร แห้วจุด ข่าวไข่มดรีน) ในอำเภอปากพนัง จังหวัดนครศรีธรรมราช การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธีทดสอบดีพีพีเอช/เอบีทีเอส และทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ด้วยวิธีซึมผ่านเข้าเนื้ออุ่น ปรากฏว่าสารสกัดด้วยน้ำหรือสกัดด้วยเอทานอลจากส้มโอทับทิมสยาม แก้วมังกร แห้วจุด ข่าวไข่มดรีน แสดงฤทธิ์ทางชีวภาพที่แตกต่างกัน โดยพบว่ามิเฉพาะสารสกัดด้วยเอทานอลของพืชเท่านั้นที่แสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ รวมไปถึงแสดงฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย แต่ไม่มีฤทธิ์ต้านยีสต์

คำสำคัญ: ปากพนัง, สารสกัดจากพืช, ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ, ฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย

¹ สำนักวิชาสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์ ตำบลไทยบุรี อำเภอท่าศาลา จังหวัดนครศรีธรรมราช 80161

¹ School of Allied Health Sciences, Walailak University, Thaiburi, Thasala, Nakhon Si Thammarat 80161, Thailand.

² หน่วยวิจัยโรคเขตร้อน สถาบันวิจัยวิทยาการสุขภาพ มหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์ ตำบลไทยบุรี อำเภอท่าศาลา จังหวัดนครศรีธรรมราช 80161

² Tropical Medicine Research Unit, Research Institute for Health Sciences, Walailak University, Thaiburi, Thasala, Nakhon Si Thammarat 80161, Thailand.

³ หน่วยวิจัยการใช้ประโยชน์ผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ มหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์ ตำบลไทยบุรี อำเภอท่าศาลา จังหวัดนครศรีธรรมราช 80161

³ The Research Unit of Natural Product Utilization, Walailak University, Thaiburi, Thasala, Nakhon Si Thammarat 80161, Thailand.

* ผู้รับผิดชอบประสานงาน ไปรษณีย์อิเล็กทรอนิกส์ (Corresponding author, e-mail): lmonthon55@gmail.com

ABSTRACT

The aim of this descriptive study are to investigate anti-oxidant and anti-bacterial activities of the extracts from some local plants (TubTim Siam pomelo, dragon fruit, Haew Jud and Khai Mod Rin rice) in Pak Panung, Nakhon Si Thammarat. Anti-oxidant activity and anti-bacterial activity were investigated by DPPH/ABTS free radical scavenging assay and agar well diffusion method, respectively. It was found that aqueous and crude ethanolic extracts from Tub-Tim Siam pomelo, Haew Jud, dragon fruit, Khai Mod Rin rice had the different biological activity. The results showed that only ethanolic crude extracts from plants did show anti-oxidant, including possessed the anti-bacterial activity but did not show anti-fungal activity.

Key words : Pakpanang, plant extract, anti-oxidant activity, anti-bacterial activity

บทนำ

ปัญหาสารมลพิษจากภาคเกษตรกรรมและอุตสาหกรรมตกค้างในสิ่งแวดล้อมมีอยู่เป็นจำนวนมาก รวมทั้งสารเคมีบางชนิดในอาหารและเครื่องสำอางยังทำให้ผู้บริโภคเกิดการแพ้หรือเกิดผลข้างเคียงในระยะยาว ซึ่งส่งผลโดยตรงต่อสิ่งมีชีวิตที่ไปสัมผัสโดนกับสารพิษเหล่านั้น ทำให้การใช้สารสกัดจากพืชที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพจึงกลายเป็นสิ่งที่มีการสนใจอย่างกว้างขวาง มีการนำสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในพืชไปใช้ประโยชน์ทั้งทางการแพทย์ ด้านเกษตรกรรม ด้านอุตสาหกรรม เป็นต้น ทำให้สารสกัดจากพืชได้รับความนิยมเพิ่มมากขึ้น เนื่องจากเป็นสารเคมีที่พบเฉพาะในพืชและได้จากธรรมชาติมีฤทธิ์ทางชีวภาพ และประสิทธิภาพที่เป็นประโยชน์ต่อร่างกาย อีกทั้งเกิดผลข้างเคียงน้อย นอกจากนั้นยังช่วยเพิ่มมูลค่าให้กับผลิตภัณฑ์และของเหลือทิ้งทางการเกษตร และเพื่อช่วยลดการนำเข้าของยาหรือสารเคมีที่มีราคาแพงจากต่างประเทศ

พืชเป็นแหล่งวัตถุดิบที่สำคัญแหล่งหนึ่ง ของสารพฤกษเคมีซึ่งถูกใช้มาตั้งแต่สมัยอดีตเพื่อรักษาโรคต่างๆ และใช้บำรุงร่างกาย (Hassanpour *et al*, 2011) ในที่นี้จะกล่าวถึงฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัด

จากพืชในสองด้านคือฤทธิ์ทางด้านการใช้ด้านอนุมูลอิสระและด้านแบคทีเรียก่อโรค ซึ่งมีผู้ศึกษาวิจัยอย่างกว้างขวางในประเทศไทย โดยเฉพาะความสนใจศึกษาสารต้านอนุมูลอิสระจากธรรมชาติ เนื่องจากมีความเชื่อมั่นว่าปลอดภัยในการบริโภคมากกว่าสารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์ทางเคมี สารต้านอนุมูลอิสระจากธรรมชาติที่พบส่วนใหญ่ ได้แก่ สารประกอบฟีนอล (Phenolic compounds) เช่น ฟลาโวนอยด์ (Flavonoids) และแอนโทไซยานิน (Anthocyanins) เป็นต้น (Yen and Hsieh, 1997; Sanchez-Moreno *et al.*, 2000; Pokorny *et al.*, 2001) นอกจากนี้ยังมีสารในกลุ่มแคโรทีนอยด์ (Carotenoids) และ คลอโรฟิลล์ (Chlorophylls) ที่นอกจากเป็นรงควัตถุที่จำเป็นในกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสงแล้ว ยังมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระได้ดี (Pokorny *et al.*, 2001; Hsu *et al.*, 2013) สารต้านอนุมูลอิสระจากธรรมชาติส่วนใหญ่ได้จากการรับประทานอาหารที่มีสารต้านอนุมูลอิสระเป็นองค์ประกอบ ซึ่งพบมากในพืช จึงมีการศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระในพืชหลายชนิด อาทิ บัวบก ขี้เหล็ก ตำลึง แมงลัก กระเพรา (Saenthaweesuk *et al.*, 2012) ข้าวไทย (นวลอนงค์

และคณะ, 2561) และกระเจียบ (Christian and Jackson, 2009) เป็นต้น รวมไปถึงผลไม้รสเปรี้ยว เช่น ส้ม (บันทรวรรณ และคณะ, 2559) อีกทั้งยังมีรายงานเกี่ยวกับสารประกอบฟีนอลิกที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสามารถยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคได้ด้วยเช่นกัน (พงศธร และคณะ, 2551; Esekhiagbe *et al.*, 2009; Senful *et al.*, 2009) เช่นที่พบมีรายงานในสารสกัดจากเปลือกแก้วมังกร เป็นต้น (Masomrong and Suntornsuk, 2014) อย่างไรก็ตามการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพทั้งฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์นั้นมักเน้นศึกษาในพืชสมุนไพรสวนครัว ยังมีข้อมูลส่วนน้อยที่รายงานในผลไม้และข้าว โดยเฉพาะในพืชประจำถิ่นในพื้นที่อำเภอปากพนัง จังหวัดนครศรีธรรมราช รายงานวิจัยนี้จะเป็นการศึกษาเพื่อให้ได้ข้อมูลยืนยันเบื้องต้นทางวิทยาศาสตร์ของสารพฤกษเคมีจากพืชท้องถิ่นบางชนิดในอำเภอปากพนัง จังหวัดนครศรีธรรมราช ประเทศไทย ที่เกี่ยวข้องกับการต้านอนุมูลอิสระและด้านแบคทีเรียก่อโรค เพื่อเป็นข้อมูลเบื้องต้นสำหรับผู้สนใจที่จะศึกษาค้นคว้าในด้านนี้ต่อไป หรืออาจจะเป็นการช่วยส่งเสริมและเพิ่มมูลค่าของพืชท้องถิ่นอย่างยั่งยืน

วิธีดำเนินการวิจัย

1. การเตรียมสารสกัดพืช

1.1 การเตรียมสารสกัดพืชด้วยเอทานอล

(Obi *et al.*, 2011; Dahiru *et al.*, 2013; Maobe *et al.*, 2013)

นำส่วนของพืชท้องถิ่น จำนวน 4 ชนิด ได้แก่ หัวของแห้วจูด เนื้อของผลส้มโอ เนื้อของผลแก้วมังกร เมล็ดข้าวโพดคั่ว โดยการไปจัดหาจากไร่สวนผลไม้ใน อำเภอปากพนัง จังหวัดนครศรีธรรมราช มาล้างทำความสะอาดและล้างให้แห้งเป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำส่วนของพืชไป

อบต่อในตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง หรือจนแห้ง บดให้ละเอียดโดยใช้เครื่องบดไฟฟ้า (ยกเว้นเนื้อผลไม้ไม่ต้องอบให้แห้งและไม่ต้องบดละเอียด) นำส่วนของพืชที่เตรียมไว้จำนวน 10 กรัม ใส่ลงในขวดคูแรน (Duran) แล้วเติมตัวทำละลายเอทานอล ปริมาตร 50 มิลลิลิตร เขย่าผสมให้เข้ากันแล้วนำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกตะกอนที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที แยกเก็บส่วนใสแล้วนำไปกรองกรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 4 จากนั้นนำไประเหยเอาเอทานอลออกด้วยเครื่อง Rotary Evaporator ใช้ อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส จนเอทานอลระเหยออกจนหมด จากนั้นละลายด้วย 100% DMSO ให้มีความเข้มข้น 50 มิลลิกรัม (ของแข็ง) ต่อ มิลลิตร (mg solid/ml) สารสกัดที่ได้ตั้งรหัสเป็น E แล้วนำไปวิเคราะห์ฤทธิ์ทางด้านชีวภาพ หาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม และความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ รวมไปถึงฤทธิ์ต้านแบคทีเรียก่อโรค

1.2 การเตรียมสารสกัดพืชด้วยน้ำ

ทำการสกัดสารพฤกษเคมีเช่นเดียวกับ “การเตรียมสารสกัดจากพืชด้วยเอทานอล” แต่เปลี่ยนตัวทำละลายจาก เอทานอลเป็นน้ำ จากนั้นนำไปทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (Lyophilization) นำตะกอนที่ได้มาละลายด้วย 100% DMSO ให้มีความเข้มข้น 50 มิลลิกรัม (ของแข็ง) ต่อ มิลลิตร (mg solid/ml) สารสกัดที่ได้ติดฉลากเป็น W แล้วนำไปวิเคราะห์ฤทธิ์ทางด้านชีวภาพ หาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม และความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ รวมไปถึงฤทธิ์ต้านแบคทีเรียก่อโรค

2. วิธีวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (Re *et al.*, 1999)

2.1 โดยวิธีเอ บี ที เอส (ABTS radical scavenging assay)

แยกเตรียมสารสกัดจากพืชในข้างต้นความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม ใน DMSO แล้วไปเปิดมาปริมาตร 20 ไมโครลิตร ลงใน 96 well microtiter plate จากนั้นไปเปิดสารละลายสต็อก 2, 2'-azino-bis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid) หรือ ABTS มีสูตรโมเลกุล $C_{18}H_{18}N_4O_6S_4$ (ABTS ปริมาณ 0.0385 กรัม ซึ่งสาร Potassium persulfate ปริมาณ 0.0066 กรัม ผสมกับน้ำกลั่นปราศจากไอออน ปริมาตร 10 มิลลิกรัม) ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 12-16 ชั่วโมง ก่อนนำมาทดสอบ จากนั้นนำสต็อกที่เตรียมไว้ ปริมาตร 180 ไมโครลิตร ผสมกับตัวอย่างสารสกัดพืช บ่มที่อุณหภูมิห้องในที่มืดเป็นเวลา 10 นาที แล้วนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร

คำนวณ % inhibition จากสูตร [% inhibition = $(1 - OD \text{ sample} / OD \text{ blank}) \times 100$] สร้างกราฟมาตรฐาน Trolox ที่ความเข้มข้นต่างๆ โดยกำหนดแกน y เป็น % Inhibition และ แกน x เป็นความเข้มข้นของสารมาตรฐาน Trolox (เตรียมสารละลายมาตรฐาน Trolox ที่ความเข้มข้นต่างๆ กัน (5, 10, 20, 40, 60, 80 และ 100 $\mu\text{g/ml}$) ใน DMSO

คำนวณความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระเอ บี ที เอส ของสารสกัดพืชจากสมการเส้นตรงของกราฟมาตรฐาน Trolox โดยหน่วยของความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ เอ บี ที เอส แสดงเป็นหน่วย mg Trolox / 1 g extract (Trolox equivalent antioxidant capacity; TEAC)

2.2 โดยวิธีดี พี ที เอส (DPPH radical scavenging assay)

แยกเตรียมสารละลายมาตรฐานหรือสารสกัดพืชที่เตรียมไว้ ปริมาตร 75 ไมโครลิตร ใน 96 well

microtiter plate จากนั้นเติมสารละลาย DPPH ความเข้มข้น 0.2 mM (ซึ่งสาร DPPH ปริมาณ 0.0020 กรัม ผสมกับเมทานอลปริมาตร 25 มิลลิกรัม) ลงไปผสมปริมาตร 150 ไมโครลิตร แล้วนำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 515 นาโนเมตร

เปอร์เซ็นต์ความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH สามารถคำนวณตามสูตรดังนี้ % inhibition = $[1 - (OD \text{ sample} / OD \text{ blank})] \times 100$ สร้างกราฟมาตรฐาน ascorbic acid ที่ความเข้มข้นต่างๆ โดยกำหนดแกน y เป็น % inhibition และแกน x เป็นความเข้มข้นของสารมาตรฐาน ascorbic acid คำนวณความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH ของสารสมุนไพร จากสมการเส้นตรงของกราฟมาตรฐาน ascorbic acid โดยหน่วยของความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH แสดงเป็นหน่วย mg vitamin C / 1 g extract (Vitamin C equivalent antioxidant capacity; VCEAC)

2.3 การรายงานฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

การตรวจความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ใช้วิธีวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 517 นาโนเมตร และรายงานผลเป็นค่า IC50 เปรียบเทียบค่าที่ได้กับวิตามินซี ซึ่งเป็นกลุ่มควบคุมเชิงบวกในการทดลอง ส่วนวิธี ABTS จะใช้การวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 734 นาโนเมตร และรายงานผลเป็นค่า IC50 เปรียบเทียบค่าที่ได้กับวิตามินซี ซึ่งเป็นกลุ่มควบคุมเชิงบวกในการทดลอง

3. การตรวจวัดปริมาณฟีนอลด้วยวิธี Folin-Ciocalteu (Singleton *et al.*, 1999)

ไปเปิดสารละลายมาตรฐาน gallic acid (ในตัวอย่างละลาย DMSO ที่ความเข้มข้น 50, 100, 150, 200 and 250 มิลลิกรัมต่อมิลลิกรัม) หรือสารสกัดพืช ที่ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิกรัม ปริมาตร 12.5 ไมโครลิตร ใน 96 well microtiter plate และเติมน้ำ

กลั่นหุลุมละ 50 ไมโครลิตร จากนั้นปิเปต Folin-Ciocalteu phenol reagent หุลุมละ 12.5 ไมโครลิตร และบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 6 นาที แล้วปิเปต 7% ของ sodium carbonate และน้ำกลั่น ลงไปหุลุมละ 125 ไมโครลิตร และ 100 ไมโครลิตร ตามลำดับ ทำการบ่มที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส นาน 45 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายสีฟ้าที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง micro plate reader

สร้างกราฟมาตรฐาน gallic acid ที่ความเข้มข้นต่างๆ โดยกำหนดแกน y เป็น OD และแกน x เป็นความเข้มข้นของสารมาตรฐาน คำนวณหาปริมาณฟีนอลิกในตัวอย่างโดยนำมาเทียบกับสารมาตรฐาน gallic acid และแสดงหน่วยของฟีนอลิกเป็น gallic acid equivalent (mg GAE) ต่อสาร 1 กรัม

4. การตรวจสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของตัวอย่างสารสกัดพืช

เตรียมจานเพาะเชื้อทดสอบและการทดสอบ โดยวิธี agar well diffusion (Kwaadsteniet *et al.*, 2005) โดยเพาะเลี้ยงเชื้อทดสอบในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Mueller Hinton (MH) ด้วยการเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง จากนั้นไปปรับให้มีปริมาณเชื้อประมาณ 1.5×10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร แล้วนำไปป้ายลงบนผิวหน้าจานอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MH วางให้ผิวหน้าแห้งจึงเจาะหลุมทดสอบในจานอาหารเลี้ยงเชื้อดังกล่าว ให้มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 0.6-0.8 มิลลิเมตร จากนั้นนำตัวอย่างสารสกัดพืชหยดลงไปหลุมทดสอบๆ ละ 100 ไมโครลิตร นำไปบ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สังเกตวงใสของการยับยั้งเชื้อ (inhibition zone)

5. การวิเคราะห์ข้อมูลและสถิติที่ใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูล

วิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้สถิติเชิงพรรณนา โดยทำการหาค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน โดยเทียบกับกลุ่มสารควบคุมการทดสอบ ได้แก่ Gallic acid Trolox วิตามินซี ของฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

ผลการวิจัยและวิจารณ์ผล

1. ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

จากการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS และ DPPH และปริมาณของสารฟีนอลรวมของสารสกัดพืชจากท้องถิ่นที่ปลูกในพื้นที่ปากพวง ได้แก่ ส้มโอ 2 สายพันธุ์ (ส้มโอพันธุ์ทองดีและส้มโอพันธุ์ทับทิมสยาม) แก้วมังกร ข้าวโพดคั่ว และเห็ดหูหนู จำนวนรวม 8 ตัวอย่าง แสดงข้อมูลดังตารางที่ 1 พบว่า

1. ส้มโอทั้ง 2 พันธุ์ที่เก็บในระหว่างเดือนธันวาคม 2556 (ตัวอย่างหมายเลข 1 ของแต่ละสายพันธุ์) มีองค์ประกอบส่วนที่ละลายน้ำได้ในปริมาณที่ใกล้เคียงกัน และยังพบว่าฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและปริมาณฟีนอลรวมไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ สำหรับส้มโอสายพันธุ์ทับทิมสยามในตัวอย่างหมายเลข 2-4 ที่เก็บในระหว่างเดือนกุมภาพันธ์ 2557 และนำมาทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องตามธรรมชาติ ภายหลังจากเก็บจากต้น เป็นเวลา 5, 8 และ 10 วันตามลำดับ พบว่ามีระดับการต้านอนุมูลอิสระต่ำกว่าอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างที่เก็บในเดือนธันวาคม 2556 และนอกจากนี้ตัวอย่างหมายเลขตัวอย่างที่ 4 มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS สูงที่สุด และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH ของส้มโอทั้ง 2 สายพันธุ์จะได้สูงกว่าการตรวจด้วยวิธี ABTS

2. ตัวอย่างแก้วมังกรที่นำมาศึกษา พบว่าส่วนของสารที่ละลายในน้ำจะมีคุณสมบัติด้านอนุมูลอิสระต่ำกว่าส่วนที่ละลายในตัวทำละลายเอทานอล และสารจากแก้วมังกรในส่วนที่ละลายในเอทานอลมีฤทธิ์ด้านอนุมูลอิสระสูงที่สุดในการทดสอบครั้งนี้ เมื่อนำผลรวมของความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระทั้งในส่วนที่ละลายในน้ำและละลายในเอทานอล จะเห็นได้ว่าแก้วมังกรแสดงฤทธิ์ด้านอนุมูลอิสระได้ดีที่สุด ซึ่งน่าจะเป็นผลมาจากส่วนที่ละลายในเอทานอลมีปริมาณของฟีนอลรวมสูงที่สุด

3. ข้าวไข่มดรีนสามารถหาฤทธิ์ด้านอนุมูลอิสระได้เพียงส่วนที่ละลายในน้ำได้เท่านั้น เนื่องจากข้อจำกัดของวิธีที่ใช้ในการศึกษา โดยในส่วนของสารที่ละลายในเอทานอล เมื่อนำมาศึกษาฤทธิ์ด้านอนุมูลอิสระทั้งด้วยวิธี ABTS และ DPPH จะเกิดตะกอนของสารเกิดขึ้น ทำให้ไม่สามารถวัดและรายงานผลได้ อีกทั้งปริมาณสารที่สามารถสกัดได้นั้นมีน้อย จึงไม่เพียงพอกับการนำมาศึกษาหาปริมาณฟีนอลรวมได้ แต่จากข้อมูลฤทธิ์ด้านอนุมูลอิสระเฉพาะในส่วนที่นำมาศึกษาได้ จะพบว่าสารสำคัญส่วนที่ละลายในน้ำของข้าวไข่มดรีนมีฤทธิ์ด้านอนุมูลอิสระมากกว่าสารสำคัญที่ละลายในน้ำที่ได้จากตัวอย่างชนิดอื่นๆ

4. สำหรับการศึกษาตัวอย่างเหหัวจูด พบว่าความร้อนที่ใช้ในการต้ม มีผลทำให้ระดับความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระเพิ่มขึ้น ทั้งส่วนที่ละลายในน้ำและส่วนที่ละลายในเอทานอลแต่จะมีผลทำให้ปริมาณฟีนอลรวมลดต่ำลงอย่างมีนัยสำคัญ นอกจากนี้ยังพบว่าฤทธิ์ด้านอนุมูลอิสระที่ทดสอบด้วยวิธี DPPH ของเหหัวจูดมีค่าต่ำกว่าทดสอบด้วยวิธี ABTS เช่นเดียวกันกับที่พบในข้าวไข่มดรีน

เอทานอลสามารถสกัดสารพฤกษเคมีได้มากกว่าน้ำ (ตารางที่ 1) อะซิโตน และปิโตรเลียมอีเทอร์ เนื่องมาจากเอทานอลสามารถละลาย

สารพฤกษเคมีพวกสารประกอบฟีนอลิกในกลุ่มฟอลิฟีนอลและฟลาโวนอยด์ได้ดี (Pinelo *et al.*, 2004; Mendonca-Filho, 2012) ซึ่งปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมมากส่งผลให้ปริมาณการกำจัดอนุมูลอิสระสูง (Paixao *et al.*, 2007) เนื่องจากสารในกลุ่มฟีนอลิกมีโครงสร้างเป็น Aromatic Ring ต่อกับ Hydroxyl Group ทำให้สารประกอบฟีนอลิกส่วนใหญ่เป็นโมเลกุลที่มีขั้วและสามารถละลายได้ดีในตัวทำละลายที่มีขั้ว เช่น แอลกอฮอล์ โดยสารประกอบฟีนอลิกมีกลไกการต้านอนุมูลอิสระคือเมื่อสารประกอบฟีนอลิกถูกสารอนุมูลอิสระดึงอิเล็กตรอนออกไป ส่งผลให้โมเลกุลเกิดการสูญเสียอิเล็กตรอน แต่เนื่องจากโครงสร้างของสารประกอบฟีนอลิกที่มีความหนาแน่นของอิเล็กตรอนสูง จึงช่วยให้อิเล็กตรอนที่มีอยู่อย่างหนาแน่นนั้นสามารถเกิดการเคลื่อนย้ายไปทั่วโครงสร้างได้และทำให้โครงสร้างเกิดการเสถียร ส่วนสารอนุมูลอิสระเมื่อดึงอิเล็กตรอนไปก็ทำให้มีโครงสร้างที่เสถียรขึ้น (Pietta, 2000) อย่างไรก็ตาม ซัลเฟอร์ไดออกไซด์ ปริมาณน้ำตาล aromatic amines กรดแอสคอร์บิก กรดอินทรีย์ และอื่นๆ อีกมากอาจส่งผลให้พบค่าฟีนอลิกที่สูงเกินจริงเมื่อวิเคราะห์ด้วย Folin-Ciocalteu reagent (Waterhouse, 2002; Huang *et al.*, 2005) ทำให้การรายงานผลนั้นสูงเกินจริง และการวัดสีด้วยวิธีนี้ไม่เกี่ยวข้องกับโครงสร้างของสารประกอบฟีนอลิกแต่อย่างใด (Huang *et al.*, 2005) นอกจากนี้ในกลุ่มของสารประกอบฟีนอลิกซึ่งอาจแบ่งเป็น 5 กลุ่มย่อย คือ flavonols, anthocyanins, hydroxycinnamates, flavanones, flavan-3-ols และ oligomeric procyanidins พบว่ากลุ่มของ flavanones มีความสามารถในการให้ไฮโดรเจนอะตอมได้น้อยกว่ากลุ่มของ anthocyanins และ flavonols มาก ฤทธิ์ด้านอนุมูลอิสระของผักผลไม้บางชนิดจึงถูก

วิเคราะห์ว่ามีน้อยกว่าโดยไม่สัมพันธ์กับปริมาณฟีนอลิกที่ปรากฏอยู่จริง (Proteggente *et al.*, 2002) โดยที่จากการศึกษาในครั้งนี้พบว่าสารส่วนที่ละลายในเอทานอลของแก้วมังกรจะมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระทั้งที่ทดสอบด้วยวิธี ABTS และ DPPH สูงที่สุด ซึ่งส่วนหนึ่งน่าจะเป็นผลมาจากการสกัดส่วนดังกล่าวมีปริมาณสารฟีนอลรวมมากที่สุด ในส่วนของส้มโอพันธุ์ทับทิมสยามพบว่าตัวอย่างที่เก็บในช่วงเดือนธันวาคม 2556 จะมีค่าการต้านอนุมูลอิสระสูงกว่าตัวอย่างที่เก็บได้ในเดือนกุมภาพันธ์ 2557 และการเก็บส้มโอพันธุ์ทับทิมสยามไว้นานประมาณ 10 วันภายหลังจากการเก็บจากต้น จะมีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระเพิ่มขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับภูมิปัญญาของชุมชนโดยจะมีการบ่มเก็บส้มโอไว้ประมาณ 1-2 อาทิตย์ภายหลังจากการเก็บเกี่ยวจากต้น จะให้รสชาติและคุณค่าของส้มโอดีกว่าการนำมารับประทานโดยทันที ในส่วนของแก้วมังกรแสดงให้เห็นว่าแก้วมังกรคั้นจะมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ดีกว่าแก้วมังกรดิบ แม้ว่ากระบวนการคั้นจะส่งผลให้มีปริมาณสารฟีนอลรวมลดต่ำลงก็ตาม อย่างไรก็ตามการทดสอบในครั้งนี้เป็นเพียงข้อมูลเบื้องต้นที่จะนำไปพัฒนาต่อเท่านั้น เนื่องจากอุปสรรคและข้อจำกัดในเรื่องของจำนวนตัวอย่างและระยะเวลาในการเก็บเกี่ยวตัวอย่างที่อาจจะส่งผลต่อความน่าเชื่อถือของข้อมูลในการทดลอง อย่างไรก็ตามวิธี decolorimetric assay สามารถวิเคราะห์สารต้านอนุมูลอิสระได้เฉพาะกลุ่มที่มีความสามารถในการรับ-ให้อิเล็กตรอนหรือให้ไฮโดรเจนอะตอมแก่อนุมูลอิสระในกลุ่มเปอร์ออกไซด์เท่านั้น ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในกลุ่มที่ละลายในไขมัน เช่น วิตามินอี หรือกลุ่มที่มีฤทธิ์ในการกำจัดออกซิเจนอะตอมเดี่ยว เช่น เบต้าแคโรทีน ไม่สามารถทำการวิเคราะห์ได้ด้วยวิธีนี้ การนำเสนออันดับของฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในผัก-ผลไม้ที่วิเคราะห์ด้วยวิธี decolorimetric assay จึงต้อง

พิจารณาถึงข้อจำกัดของวิธี มิฉะนั้นจะสร้างความเข้าใจที่ผิดพลาดและคลาดเคลื่อนให้แก่ผู้บริโภคได้

2. ฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์

สารสกัดพืชจากตัวทำละลายเอทานอลเท่านั้นที่แสดงฤทธิ์ด้านการเจริญของจุลินทรีย์และฤทธิ์ดังกล่าวจะมีความแตกต่างกันออกไปในแต่ละตัวอย่างสารสกัด แต่ส่วนใหญ่แล้วแสดงฤทธิ์ได้น้อยทั้งในแบคทีเรียแกรมบวก แบคทีเรีย แกรมลบ แต่ไม่สามารถต้านจุลินทรีย์ในกลุ่มยีสต์ ดังแสดงในตารางที่ 2 โดยที่การสกัดสมุนไพรด้วยเมทานอลมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อมากที่สุด ในขณะที่สกัดด้วยน้ำไม่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ อย่างไรก็ตามไม่มีสารสกัดใดสามารถต้านเชื้อยีสต์ *Candida albicans* ได้รายงานวิจัยเกี่ยวกับพืชสมุนไพรในการด้านการเจริญของเชื้อจะมีความแตกต่างกันออกไปในแต่ละชนิดของพืชดังกล่าว และส่วนใหญ่ความสามารถในการต้านเชื้อมักจะเป็นฤทธิ์ของสารสกัดที่ได้มาจากพืชสมุนไพร (จิราภรณ์ และ เรือนแก้ว, 2555; Obi *et al.*, 2011; Dahiru *et al.*, 2013; Maobe *et al.*, 2013) หรือจากเปลือกผลไม้ (พงศธร และคณะ, 2551) แต่พบฤทธิ์ดังกล่าวได้น้อยในเนื้อผลไม้ และฤทธิ์ของสารสกัดพืชด้วยเอทานอลที่ต้านเชื้อได้ดีกว่าสารสกัดจากน้ำเนื่องมาจากสารพฤษเคมีที่สำคัญส่วนใหญ่สามารถสกัดออกมาได้ด้วยเอทานอลดีกว่าน้ำดังที่ได้วิจารณ์ไว้ในส่วนของฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในข้างต้น (จิราภรณ์ และ เรือนแก้ว, 2555; Pietta, 2000; Pinelo *et al.*, 2004; Paixao *et al.*, 2007; Obi *et al.*, 2011; Mendonca-Filho, 2012; Dahiru *et al.*, 2013) ทั้งนี้เนื่องจากสารประกอบฟีนอลิกที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสามารถยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคได้ (พงศธร และคณะ, 2551; Esekhiagbe *et al.*, 2009; Senful *et al.*, 2009)

ตารางที่ 1ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและปริมาณฟีนอลรวมในสารสกัดพืชท้องถิ่นจากพื้นที่ปากพนัง

ตัวอย่าง	หมายเลข ตัวอย่าง	วิธีการ สกัด	%yield of extract	การต้านอนุมูลอิสระ (μ mole Trolox/g)		ปริมาณ ฟีนอลรวม (mg Gal/g)
				ABTS	DPPH	
ส้มโอ (พันธุ์ทองดี)	1	AE	6.42	28.12 $\pm$ 6.71	363.93 $\pm$ 34.73	33.51 $\pm$ 7.04
ส้มโอ (พันธุ์ทับทิมสยาม)	1	AE	6.96	35.18 $\pm$ 1.43	307.30 $\pm$ 31.38	28.21 $\pm$ 2.24
	2	AE	13.23	9.73 $\pm$ 1.45	18.35 $\pm$ 1.25	26.91 $\pm$ 5.26
	3	AE	12.75	9.58 $\pm$ 1.08	18.19 $\pm$ 1.44	26.61 $\pm$ 3.71
	4	AE	12.17	12.24 $\pm$ 0.99	18.16 $\pm$ 1.83	26.21 $\pm$ 6.00
แก้วมังกร	1	AE	8.09	15.42 $\pm$ 1.13	ND	15.04 $\pm$ 4.48
		EE	2.63	83.26 $\pm$ 48.07	584.47 $\pm$ 106.36	58.56 $\pm$ 10.80
ข้าวไข่มดรีน	1	AE	0.73	54.21 $\pm$ 7.72	41.42 $\pm$ 2.14	ND
		EE	1.32	ND	ND	
แห้วจูด	1	AE	4.30	33.92 $\pm$ 2.63	7.27 $\pm$ 0.21	41.58 $\pm$ 5.82
		EE	1.27	ND	ND	25.56 $\pm$ 3.01

ND: ไม่สามารถรายงานผล; AE: ส่วนที่ละลายในน้ำ; EE: ส่วนที่ละลายในเอทานอล

ตารางที่ 2ฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ของสารสกัดเอทานอลจากพืช

จุลินทรีย์	แก้วมังกร	ส้มโอ	แห้วจูด	ข้าวไข่มดรีน
แบคทีเรียแกรมบวก				
<i>B. cereus</i> ATCC 11778	-	+	-	+
<i>M. luteus</i> TISTR 884	+	-	-	+
<i>S. aureus</i> TISTR 517	+	-	-	+
แบคทีเรียแกรมลบ				
<i>E. coli</i> TISTR 887	+	-	-	+
<i>Ps. aeruginosa</i> TISTR 1467	+	-	-	+
<i>S. Typhimurium</i> TISTR 292	+	-	-	+
ยีสต์				
<i>C. albicans</i> BCC 5390	-	-	-	-

+ มีฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์; - ไม่มีฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์

B. cereus, *Bacillus cereus*; *M. luteus*, *Micrococcus luteus*; *S. aureus*, *Staphylococcus aureus*; *E. coli*, *Escherichia coli*, *Ps. aeruginosa*, *Pseudomonas aeruginosa*; *S. Typhimurium*, *Salmonella Typhimurium*; *C. albicans*, *Candida albicans*

สรุป

การศึกษานี้ไม่สามารถตรวจพบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์อย่างเด่นชัดจากสารสกัดส้มโอ แก้วมังกร ข้าวโพดคั่วแห้งสด ดังนั้นในการศึกษาวิจัยครั้งต่อไปควรมุ่งศึกษาถึงการเปลี่ยนแปลงปริมาณสารประกอบฟีนอลิกและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในขั้นตอนต่างๆ ของการเก็บรักษาผลไม้ เพื่อให้ทราบว่าในขั้นตอนดังกล่าวมีผลลดหรือเพิ่มปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระหรือไม่อย่างไร เพื่อให้เป็นแนวทางในการเพิ่มคุณค่าผลไม้ให้ได้ประโยชน์ของสารต้านอนุมูลอิสระสูงสุด สำหรับฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์อาจต้องมีการศึกษาการสกัดสารพฤกษเคมีจากเปลือกผลไม้มาศึกษาควบคู่กับสารสกัดจากเนื้อผลไม้เพื่อเป็นการยืนยันฤทธิ์ที่ดีในการต้านเชื้อจากพืชท้องถิ่นที่นำมาศึกษาเพื่อเป็นการเพิ่มมูลค่าพืชท้องถิ่นอย่างยั่งยืน และควรบริโภคพืชหลากหลายชนิดร่วมกัน โดยเฉพาะพืชที่มีสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระซึ่งเป็นประโยชน์นานาประการต่อร่างกาย ช่วยควบคุมการทำงานในระบบต่างๆ ของร่างกายให้เกิดความสมดุล ช่วยชะลอความเสื่อม ช่วยป้องกันและรักษาโรคเป็นประโยชน์ต่อภูมิคุ้มกันของร่างกาย มีเส้นใยสูงจึงป้องกันโรคอ้วน อย่างไรก็ตามเพื่อเป็นประโยชน์ทางด้านโภชนาการจึงควรที่จะบริโภคพืชที่มีสารประกอบที่หลากหลาย เพื่อให้เพียงพอกับความต้องการของร่างกาย นอกจากนี้ควรบริโภคพืชที่สดสะอาด เพื่อที่จะได้รับสารที่มีประโยชน์ต่อร่างกายได้ครบและได้รับคุณค่าทางด้านโภชนาการที่สำคัญของร่างกาย

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณมหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์ และสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) ที่สนับสนุนด้านวิชาการและทุนวิจัย (WU-

TRF_ABC5601, WU-IRG-62-021) และนักวิจัยมหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์ ที่ให้การสนับสนุนและเข้ามามีส่วนร่วมงานวิจัย

เอกสารอ้างอิง

- จิราภรณ์ บุรากร และ เรือนแก้ว ประพศิต. 2555. ผลของสารสกัดสมุนไพรพื้นบ้านไทยจำนวน 7 ชนิดต่อการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย. *วารสารการแพทย์แผนไทยและการแพทย์ทางเลือก* 10(1): 12-22.
- นวลอนงค์ เสมสังข์, ณกมล แก้วลังการ์ และ วิรพงษ์ จันทะชัย. 2561. ปริมาณฟลาโวนอยด์ สารประกอบ ฟีนอลทั้งหมดและฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากข้าวไทย. *แหล่งที่มา*: http://WWW.research.cmru.ac.th/research59/ris/download.php?download_file=article&no=545, 27 มีนาคม 2561.
- บัณฑิตวรณ ธุระพระ, จันทนา บุญยะรัตน์, เขียวเรศ ชูลิจิต และ สุภาวดี ดาวดี. 2559. การวิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญและฤทธิ์ต้านออกซิเดชันในส้ม. *วารสารเภสัชศาสตร์อีสาน* 11(ฉบับพิเศษ): 80-91.
- พงศธร ลือสุวรรณ, จิตศิริ รัชตพันธุ์ และ ศศิธร จันทนวรณ. 2551. สารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด สมบัติการต้านอนุมูลอิสระและการต้านจุลินทรีย์ของเปลือกผลไม้, น. 554-561. ใน *เรื่องเต็มการประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 46 (สาขาอุตสาหกรรมเกษตร)*. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

Christian, K.R. and Jackson, J.C. 2009. Changes in total phenolic and monomeric anthocyanin composition and antioxidant activity of

- three varieties of Sorrel (*Hibiscus sabdariffa*) during maturity. **Journal of Food Composition and Analysis** 22: 663-667.
- Dahiru, D., Malgwi, A.R. and Sambo, H.S. 2013. Inhibitory effect of *Senna siamea* leaf extracts on selected microorganisms. **American Journal of Medicine and Medical Sciences** 3(5): 103-107.
- Esekhiagbe, M., Agatemor, M.M.U. and Agatemor, C. 2009. Phenolic content and antimicrobial potentials of *Xylopia aethiopica* and *Myristica argentea*. **Macedonian Journal of Chemical Engineering** 28(2): 159-162.
- Hassanpour, S., Maheri-Sis, N., Eshratkhan, B. and Baghbani, F. 2011. Plants and secondary metabolites (Tannins): A review. **International Journal of Forest, Soil and Erosion** 1(1): 47-53.
- Hsu, C., Chao, P., Hu, S. and Yang, C. 2013. The antioxidant and free radical scavenging activities of chlorophylls and pheophytins. **Food and Nutrition Sciences** 4: 1-8.
- Huang, D., Ou, B. and Prior, R.L. 2005. The chemistry behind antioxidant capacity assays. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 53: 1841-1856.
- Kwaadsteniet, M.D.E, Todorov, S.D., Knoetze, H. and Dicks, L.M.T. 2005. Characterization of a 3944 Da bacteriocin, produced by *Enterococcus mundtii* ST15, with activity against Gram-positive and Gram-negative bacteria. **International Journal of Food Microbiology** 105: 433-434.
- Maobe, A.G., Gatebe, E., Gitu, L. and Rotich, H. 2013. Preliminary phytochemical screening of eight selected medicinal herbs used for the treatment of Diabetes, Malaria and Pneumonia in Kisii Region, Southwest Kenya. **European Journal of Applied Sciences** 5(1): 1-6.
- Masomrong, K. and Suntornsuk, W. 2014. Antioxidant and antibacterial activities of natural extract from Dragon fruit peel. **Agricultural Science Journal** 45(2)(Suppl.): 269-272).
- Mendonca-Filho, R.R. 2012. Bioactive phytocompounds: New approaches in the phytosciences, pp. 1-23. In Ahmad, I., Aqil, F. and Owais, M., eds. **Modern Phytomedicine. Turning Medicinal Plants into Drugs.** WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim.
- Obi, R.K., Nwanebu, F.C., Ndubuisi-Nnaji, U.U., Onuoha, L.N. and Chiegboka, N. 2011. Ethanolic extraction and phytochemical screening of two Nigerian herbs on pathogens isolate from wound infections. **Pharmacie Globale (IJCP)** 10(2): 1-5.
- Paixao, N., Perestrelo, R., Marques, J.C. and Camara, J.S. 2007. Relationship between antioxidant capacity and total phenolic content of red, rose' and white wines. **Food Chemistry** 105: 204-214.
- Pietta, P. 2000. Flavonoids as antioxidants. **Journal of Natural Product** 63: 1035-1042.

- Pinelo, M., Lara, M., Maria, J.S. and Maria, C.N. 2004. Solvent effect on quercetin antioxidant capacity. **Food Chemistry** 88(2): 201-207.
- Pokorny, J., Yanishlieva, N. and Gordon, M. 2001. **Antioxidants in Food : Practical Applications**. CRC Press, New York.
- Proteggente, A.R., Pannala, A.S., Paganga, G., Buren, L.V., Wagner, E., Wiseman, S. and van de Put, E. 2002. The antioxidant activity of regularly consumed fruit and vegetables reflects their phenolic and vitamin C composition. **Free Radicals Research** 6(2): 217-233.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M. and Rice-Evans, C. 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology & Medicine** 26: 1231-1237.
- Saenthaweesuk, S., Jongtamklang, D., Somchan, T. and Thobunluepop, P. 2012. Total Phenolics content, antioxidant and antimicrobial activities of some herbs. **Khon Kaen Agriculture Journal** 40 (Supplement 2): 480-483.
- Sanchez-Moreno, C., Jimenez-Escoria, A. and Saura-Calixto, F. 2000. Study of low-density lipoprotein oxidizability indexes to measure the antioxidant activity of dietary polyphenols. **Nutrition Research** 20: 941-953.
- Senful, M., Yildiz, E., Gungor, N., Cetin, B., Eder, Z. and Ercisli, S. 2009. Total phenolic content, antioxidant and antimicrobial activities of some medicinal plant. **Pakistan Journal of Pharmaceutical Science** 22(1): 102-106.
- Singleton, V.L., Orthofer, R. and Lamuela-Raventós, R.M. 1999. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-ciocalteu reagent. **Methods in Enzymology** 299: 152-178
- Waterhouse, A.L. 2002. Determination of total phenolics. **Current Protocols in Food Analytical Chemistry** 6: 11.1.1-11.1.8.
- Yen, G.C. and Hsieh, C.L. 1997. Antioxidant effect of dopamine and related compounds. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry** 61(10): 1646-1649.