ว.วิทย. มข. 45(3) 531-542 (2560) KKU Sci. J. 45(3) 531-542 (2017)

ฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน ปริมาณฟีนอลิก ฟลาโวนอยด์และแอลคาลอยด์ของสารสกัดลำต้นนกกระลิงแดง

Antioxidant Activity, Total Phenolics, Flavonoid and Alkaloid Contents of *Capparis kerrii* Craib Stem Extracts

วัชราภรณ์ ประภาสะโนบล[1*] และพิชิต สุดตา[1]

[1]สาขาวิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบุรี อำเภอเมือง จังหวัดเพชรบุรี 76000

[*]Corresponding Author. E-mail: vatcharaporn.pra@mail.pbru.ac.th

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน ปริมาณฟีนอลิก ฟลาโวนอยด์และแอลคาลอยด์รวมของสารสกัดลำต้นนกกระลิงแดงที่สกัดด้วยเฮกเซน ไดคลอโรมีเทน แอซิโตนและเมทานอล ทำการตรวจสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชันโดยวิธี DPPH พบว่าสารสกัดแอซิโตนมีความสามารถในการต้านออกซิเดชันสูงที่สุด (IC_{50} = 2.12 $\pm$ 0.01 mg/ml) และมีฤทธิ์สูงกว่าสารมาตรฐาน BHT (IC_{50} = 14.05 $\pm$ 0.05 mg/ml) ประมาณ 6.6 เท่า การหาปริมาณฟีนอลิก ฟลาโวนอยด์และแอลคาลอยด์วิเคราะห์ด้วยวิธี Folin-Ciocalteu Colorimetric aluminium chloride และ Bromocresol Green method ตามลำดับ ผลการวิจัยพบว่าปริมาณสารฟีนอลิกรวมของทุกสารสกัดไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p > 0.05$) ส่วนปริมาณฟลาโวนอยด์รวมสูงสุดพบในสารสกัดเฮกเซนมีค่า 140.0 $\pm$ 0.01 มิลลิกรัมสมมูลเควอซิทินต่อกรัมสารสกัด ซึ่งแตกต่างจากสารสกัดชนิดอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) และปริมาณแอลคาลอยด์สูงสุดพบในสารสกัดแอซิโตน คือ 1,684.95 ± 0.02 มิลลิกรัมสมมูลของอะโทรพีนต่อกรัมสารสกัด จากผลการวิจัยครั้งนี้พบว่าความสามารถในการต้านออกซิเดชันของสารสกัดลำต้นนกกระลิงแดงมีความสัมพันธ์โดยตรงกับปริมาณสารฟีนอลิกและแอลคาลอยด์รวมที่ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ r เท่ากับ 0.991 และ 0.686 ตามลำดับ แต่มีความสัมพันธ์เชิงลบกับปริมาณฟลาโวนอยด์รวมของสารสกัดซึ่งมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์เป็น 0.966

ABSTRACT

This research aims to study the antioxidant activity, total phenolic, flavonoid and alkaloid contents of hexane, dichloromethane, acetone and methanol extracts from dried stem of *Capparis kerrii* Craib. The antioxidant activity was evaluated by DPPH assays. The results showed that acetone extract (IC_{50} = 2.12±0.01 mg/ml) exhibited higher antioxidant potential than BHT standard (IC_{50} = 14.05±0.05 mg/ml) about 6.6 times. Total phenolic, flavonoid and alkaloid contents were investigated using Folin-Ciocalteu, colorimetric aluminium chloride assays and Bromocresol green method, respectively. The results showed that there was no significant difference on the total phenolic contents ($p > 0.05$) in all extracts. The highest total flavonoid content found in hexane extract ($p < 0.05$) was 140.0 ± 0.01 mg QE/g crude extract and the highest total alkaloid in extracts of acetone was 1,684.95 ± 0.02 mg AE/g crude extract. In addition, the positive correlation coefficients were observed between the antioxidant potential and total phenolic content (r = 0.991) and alkaloid content (r = 0.686), respectively. However, the negative correlation coefficients were found (r = 0.966) between the antioxidant activity and total flavonoid content.

คำสำคัญ : ฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน ฟีนอลิก ฟลาโวนอยด์ แอลคาลอยด์ นกกระลิงแดง

Keywords : Antioxidant activity, Phenolics, Flavoniod alkaloid, *Capparis kerrii* Craib

บทนำ

อนุมูลอิสระ (free radical) เป็นอะตอมโมเลกุลหรือไอออนที่มีอิเล็กตรอนที่ไม่มีคู่ (Lu et al., 2010) จะมีความว่องไวสูงในการเข้าทำปฏิกิริยากับโมเลกุลชีวภาพอย่าง ดีเอ็นเอ โปรตีน เนื้อเยื่อไขมัน (Temple, 2000) ซึ่งอนุมูลอิสระเหล่านี้สามารถกำจัดได้ด้วยสารต้านออกซิเดชัน (antioxidant) ดังนั้นสารต้านออกซิเดชันจึงมีความสำคัญและน่าสนใจที่จะศึกษาฤทธิ์ต้านออกซิเดชันและปริมาณของสารต้านออกซิเดชันในพืชสมุนไพรเพื่อเป็นแหล่งของสารต้านออกซิเดชันที่สำคัญ โมเลกุลที่มีคุณสมบัติเป็นสารต้านออกซิเดชัน ได้แก่ สารประกอบฟีนอลิก (phenolic compounds) วิตามิน (vitamins) เช่น วิตามินซีและวิตามินอี เป็นต้น พอลิแซคคาไรด์ (polysaccharides) เปปไทด์ (peptides) โปรตีน (proteins) กรดอินทรีย์ (organic acids) แคโรทีนอยด์ (carotenoids) แอลคาลอยด์ (alkaloids) และนิวคลีโอไทด์ (nucleotides) เป็นต้น (Stajić et al., 2013)

สารต้านออกซิเดชัน เป็นสารที่สามารถยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชัน ลดปริมาณอนุมูลอิสระในร่างกาย สามารถเกิดคีเลตกับไอออนโลหะในร่างกายและป้องกันการเกิดปฏิกิริยาเปอร์ออกซิเดชันของไขมัน (Lipid peroxidation) (Pieniz et al., 2009) การรับประทานอาหารที่มีสารต้านออกซิเดชันเป็นองค์ประกอบจะช่วยป้องกันและลดโอกาสการเกิดโรคหัวใจและหลอดเลือด (cardiovascular diseases) มะเร็ง (cancer) เบาหวาน (diabetes mellitus) ต้อกระจก (cataracts) ข้ออักเสบ (arthritis) ภาวะชรา

ก่อนกำหนด (premature aging) และอื่น ๆ ซึ่งเป็นโรคที่เกิดจากการเกิดอนุมูลอิสระภายในร่างกาย ดังนั้นการได้รับสารต้านออกซิเดชันจะทำให้ร่างกายมีความสามารถในการดักจับอนุมูลอิสระได้ดีขึ้น (Mourao et al., 2011) เพื่อช่วยลดโอกาสการเกิดโรคเหล่านี้ได้

พืชวงศ์กุ่มบก (Capparaceae) เป็นพืชสมุนไพรที่เป็นทั้งไม้ล้มลุก ไม้พุ่ม ไม้พุ่มคล้ายไม้ยืนต้นขนาดเล็กและไม้เลื้อยมีทั้งหมด 39 สกุลและ 650 สปีชีส์ กระจายทั่วไปในพื้นที่เขตอบอุ่นทั่วโลก (Hamed et al., 2007) โดยพบว่าพืชในสกุล *Capparis* เป็นสกุลที่พบมากที่สุดในประเทศไทยและทั่วโลกของพืชวงศ์นี้ (Wiriyakarun et al., 2554; Hamed et al., 2007) ในไทยพบพืชสกุลนี้ ได้แก่ ค้อนกลอง (*Capparis grandis,* L.f.) พุงแก (*Capparis siamensis* Kurz) หนามโมนา (*Capparis monantha* Jacobs) ซึ่งพืชสกุลนี้หลายชนิดมีสรรพคุณที่น่าสนใจ เช่น คุณสมบัติในการต้านการอักเสบ ระงับปวด ต้านเชื้อแบคทีเรีย รักษาโรคความดัน ป้องกันตับถูกทำลายและต้านเบาหวาน เป็นต้น (Chahlia, 2009, Mali et al., 2004) มีรายงานองค์ประกอบทางเคมีของพืชสกุล *Capparis* หลายกลุ่ม ได้แก่ กลุ่มสเตอรอล เช่น β- sitosterol (Yu et al., 2006) กลุ่มกลูโคซิโนเลต เช่น guanosine glucoibelin sinigrin glucobrassicin และ glucocapparin (Daxenbichler et al., 1991) และสารกลุ่มหลักที่พบเกือบทุกส่วนของพืชสกุลนี้คือ กลุ่มแอลคาลอยด์เช่น capparisinine codonocarpine cadabicine capparidisine capparisine 15-*N*-acetylcapparisin และ flazine (Rathee et al., 2011) และที่สำคัญยังพบกลุ่มฟลาโวนอยด์และฟีนอลิกหลายชนิด เช่น quercetin 3-O-gentiobioside apigenin kaempferol isorhamnetin และ isorhamnetin 3-O-rutiniside (Afsharypuor et al., 1998) ซึ่งนับว่าเป็นกลุ่มสารที่สำคัญที่สามารถแสดงฤทธิ์ต้านออกซิเดชันได้ (Ghasemzadeh et al., 2010)

นกกระลิงแดง (*Capparis kerrii* Craib.) เป็นไม้พุ่มยืนต้นขนาดเล็ก ตามหลักแพทย์แผนโบราณมีการนำส่วน ของพืช เช่น ใบ ดอก ผลและลำต้นไปใช้เป็นยาสมุนไพรเพื่อรักษาอาการเจ็บป่วยต่าง ๆ เช่น อาการปวดเมื่อย ปวดฟัน แก้ไข้ แก้ร้อนใน ช่วยในการขับลม รักษาอาการแผลอักเสบ รักษาริดสีดวงและรักษามะเร็ง เป็นต้น (Suwansin, 2010) กลุ่มผู้วิจัยจึงได้ศึกษาเบื้องต้นถึงฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งในมนุษย์ 3 ชนิด ได้แก่ มะเร็งช่องปากชนิด KB มะเร็งเต้านมชนิด MCF-7 และมะเร็งปอดชนิด NCl- H 187 ของสารสกัดเฮกเซน ไดคลอโรมีเทน แอซิโตนและเมทานอล โดยทดสอบฤทธิ์ที่ระดับความเข้มข้นของสารสกัดสูงสุด 50.0 μg/mL พบว่าสารสกัดไดคลอโรมีเทนแสดงฤทธิ์ความเป็นพิษที่ดีต่อเซลล์มะเร็ง KB 99.61% เซลล์มะเร็ง MCF-7 94.65% และ NCl-H187 ที่ 100.01% สารสกัดแอซิโตนมีฤทธิ์ต่อเซลล์ KB ที่ 99.38% และ NCl-H187 ที่ 100.18% ดังนั้นนกกระลิงแดงอาจเป็นแหล่งของสารต้านมะเร็งที่มีศักยภาพสูงได้ และจากการศึกษาสารพฤกษเคมีเบื้องต้นในสารสกัดลำต้นของนกกระลิงแดงพบสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพหลายชนิด ได้แก่ ไตรเทอร์พีน ฟลาโวนอยด์ คาร์ดิแอกไกลโคไซด์และแอลคาลอยด์ (Sudta et al., 2015)

จากที่กล่าวมาข้างต้นพบว่ายังมีข้อมูลวิจัยเกี่ยวกับนกกระลิงแดงไม่มากนัก เนื่องจากนกกระลิงแดงเป็นพืชหายากที่พบในท้องถิ่นจังหวัดเพชรบุรีและมีฤทธิ์ทางชีวภาพที่น่าสนใจ ดังนั้นงานวิจัยนี้มี

วัตถุประสงค์เพื่อศึกษาฤทธิ์การต้านออกซิเดชัน ปริมาณสารประกอบฟีนอลิก ฟลาโวนอยด์และแอลคาลอยด์ของสารสกัดจากลำต้นนกกระลิงแดง เนื่องจากหากสารสกัดจากลำต้นนกกระลิงแดงมีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันที่ดีและปริมาณสารต้านออกซิเดชันสูงจะเป็นแหล่งของสารต้านออกซิเดชันที่ดีสามารถใช้เป็นยาหรือผลิตภัณฑ์เสริมอาหารเพื่อหลีกเลี่ยงการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของเซลล์ในร่างกายได้ (Lamien-Meda et al., 2008) อีกทั้งอาจใช้เป็นข้อมูลเชิงวิชาการเพื่อสนับสนุนการนำสมุนไพรท้องถิ่นไปใช้ประโยชน์ตามภูมิปัญญา สำหรับการป้องกันหรือรักษาโรคหัวใจและหลอดเลือด มะเร็งและเบาหวาน เป็นต้น หรือแม้แต่การนำข้อค้นพบจากการวิจัยไปต่อยอดเชิงลึกในอนาคต

วิธีการดำเนินการวิจัย

เครื่องมือและสารเคมี

เครื่องมือสำคัญที่ใช้ในการวิจัย ได้แก่ rotary evaporator (Buchi B-500, Switzerland) เครื่อง UV-Visible spectrophotometer (Shimadza UV-1601, Australia) สารเคมีที่สำคัญ ได้แก่ DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) BCG (Bromocresol Green) เควอซิทิน (quercetin) กรดแกลลิก (gallic acid) และอะโทรพีน (Atropine) ซื้อจากบริษัท Sigma-Aldrich (USA) โซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3) โซเดียมไนไทรท์ ($NaNO_2$) และอลูมิเนียมคลอไรด์ ($AlCl_3$) ซื้อจากบริษัท Univar (Australia) และ BHT (Butylated hydroxytoluene) จากบริษัท Fluka (Germany) และตัวทำละลายทุกชนิดที่ใช้ในงานวิจัยนี้เป็นเกรดสำหรับการวิเคราะห์ (AR grade)

แหล่งที่มาของตัวอย่างพืช

ตัวอย่างลำต้นของนกกระลิงแดงเก็บจากป่าโป่งสลอด อ.บ้านลาด จ.เพชรบุรี เมื่อเดือนเมษายน พ.ศ.2557 ผ่านการตรวจเอกลักษณ์และชื่อวิทยาศาสตร์โดยการเปรียบเทียบกับตัวอย่างพันธุ์ไม้และเก็บตัวอย่างพันธุ์ไม้แห้งที่สำนักงานหอพรรณไม้ กรมอุทยานแห่งชาติสัตว์ป่าและพันธุ์พืชโดย ผศ. นันท์นภัส สุวรรณสินธุ์

การเตรียมสารสกัด

นำลำต้นของนกกระลิงแดงมาหั่นให้มีขนาดเล็กและผึ่งลมให้แห้ง บดให้ละเอียดด้วยเครื่องบด ชั่งผงลำต้นนกกระลิงแดงหนัก 250 กรัม บรรจุในขวดแก้วที่แห้งและสะอาด สกัดด้วยเฮกเซนโดยการแช่หมัก (maceration) พืชเป็นเวลา 3 วันที่อุณหภูมิห้อง กรองด้วยกระดาษกรอง ระเหยตัวทำละลายด้วยเครื่องระเหยแบบหมุน (rotary evaporator) ทำซ้ำ 3 ครั้งจะได้สารสกัดเฮกเซน นำกากพืชมาแช่หมักต่อด้วยตัวทำละลายที่มีสภาพขั้วสูงขึ้น ได้แก่ ไดคลอโรมีเทน แอซิโตนและเมทานอล จะได้สารสกัดไดคลอโรมีเทน แอซิโตนและเมทานอล ตามลำดับ เก็บสารสกัดที่แห้งไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการทดลองขั้นตอนต่อไป

การทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน โดยวิธี DPPH assay ซึ่งเป็นความสามารถของสารสกัดที่ดักจับอนุมูลอิสระ DPPH โดยดัดแปลงมาจากวิธีของ Karagozler et al. (2008) โดยใช้ BHT เป็นสารมาตรฐาน มีวิธีการทดลองดังนี้ เตรียมสารละลาย DPPH ในเอทานอลที่ความเข้มข้น 0.05 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองขนาดเล็ก ให้ได้ปริมาตรรวมสุดท้ายเป็น 6 มิลลิลิตร แบ่งชุดการทดสอบเป็น 3 ชุด (ชุด A, B และ C) ดังนี้

ชุด A (สารตัวอย่าง) = สารตัวอย่าง 3 มิลลิลิตร + สารละลาย DPPH 3 มิลลิลิตร

ชุด B (สารไร้สิ่งตัวอย่าง) = สารตัวอย่าง 3 มิลลิลิตร + เอทานอล 3 มิลลิลิตร

ชุด C (สารควบคุม) = เอทานอล 3 มิลลิลิตร + สารละลาย DPPH 3 มิลลิลิตร

ผสมสารให้เข้ากันและตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องในที่มืด เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 517 นาโนเมตร โดยใช้เครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ คำนวณหา % Radical Scavenging (สมการ 1) และ IC_{50}

$$\%\text{Radical Scavenging} = (A_{control} - A_{sample}) \times 100 / A_{control} \quad (1)$$

เมื่อ $A_{control}$ คือ ค่าการดูดกลืนแสงของชุด C

A_{sample} คือ ค่าการดูดกลืนแสงของชุด A – ค่าการดูดกลืนแสงของชุด B

ค่า IC_{50} คำนวณได้จากการสร้างกราฟมาตรฐานระหว่าง % Radical Scavenging ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆของสารสกัด เมื่อค่า IC_{50} คือความเข้มข้นของสารสกัดที่ทำให้ค่า % Radical Scavenging ลดลงร้อยละ 50 ซึ่งคำนวณได้จากกราฟมาตรฐานระหว่าง % Radical Scavenging และความเข้มข้นของสารสกัด

การหาปริมาณฟีนอลิกรวม

การหาปริมาณฟีนอลิกรวมด้วยวิธี Folin-Ciocalteu ซึ่งดัดแปลงมาจากวิธีของ Singleton and Rossi (1965) โดยใช้กรดแกลลิกเป็นสารมาตรฐานที่ช่วงความเข้มข้น 0 – 1.000 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยผสมสารสกัดหรือสารมาตรฐานปริมาตร 0.05 มิลลิลิตร ผสมกับ Folin-Ciocalteu reagent ปริมาตร 0.25 มิลลิลิตร และสารละลาย 20% โซเดียมคาร์บอเนต จำนวน 0.25 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นจนปริมาตรครบ 5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันจากนั้นตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร การหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมของสารสกัดคำนวณจากกราฟมาตรฐานกรดแกลลิก แสดงผลเป็นหน่วยมิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อกรัมสารสกัด (mg GAE/g crude extract) การวิเคราะห์สารตัวอย่างทำซ้ำ 3 ครั้ง

การหาปริมาณฟลาโวนอยด์รวม

การหาปริมาณฟลาโวนอยด์รวมของสารสกัดโดยใช้วิธี Aluminium chloride colorimetric method (ดัดแปลงจากวิธีของ Zhishen และคณะ, 1999) นำสารสกัดความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรมา 0.5 มิลลิลิตรผสมกับน้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร เติมสารละลายโซเดียมไนไทรท์ (5% (w/w) $NaNO_2$) ปริมาตร 0.15 มิลลิลิตร ปล่อยทิ้งไว้ 6 นาที จากนั้นเติมสารละลายอลูมิเนียมคลอไรด์ (10% $AlCl_3$) ปริมาตร 0.15 มิลลิลิตร และปล่อยทิ้งไว้ 6 นาทีแล้วเติมสารละลาย 4% NaOH ลงไปปริมาตร 2 มิลลิลิตรในสารผสม และเติมน้ำเพื่อปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 5 มิลลิลิตร ผสมสารละลายให้เข้ากันและปล่อยไว้อีก 15 นาทีที่อุณหภูมิห้อง และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 510 นาโนเมตร โดยมีแบลงค์เป็นสารละลายผสมที่เติมน้ำแทนสารสกัด โดยใช้เควอซิทิน (quercetin) เป็นสารมาตรฐานที่ช่วงความเข้มข้น 0 - 0.3200 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาณของฟลาโวนอยด์รวมของสารสกัดคำนวณจากกราฟมาตรฐานของเควอซิทินและแสดงผลออกมาเป็นมิลลิกรัมสมมูลของเควอซิทินต่อกรัมของสารสกัด (mg QE/g crude extract) การวิเคราะห์สารตัวอย่างทำซ้ำ 3 ครั้ง

การหาปริมาณแอลคาลอยด์รวม

การหาปริมาณแอลคาลอยด์รวมของสารสกัด โดยใช้วิธีทำปฏิกิริยากับ Bromocresol Green (ดัดแปลงจากวิธีของ Fazel และคณะ, 2010) นำสารสกัด 1 มิลลิกรัมมาละลายในกรดไฮโดรคลอริก 2 นอร์มอล (2N HCl) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร นำสารละลายที่ได้สกัดด้วยคลอโรฟอร์ม ($CHCl_3$) 10 มิลลิลิตร 3 ครั้ง ปรับ pH ของสารละลายให้เป็นกลางด้วย สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.1 นอร์มอล (0.1 N NaOH) และเติมสารละลายโบรโมครีซอล กรีน (BCG) และสารละลายฟอสเฟตบัพเฟอร์ (pH 4.7) อย่างละ 5 มิลลิลิตร เขย่าสารผสมจนเกิดสารเชิงซ้อนและนำมาสกัดด้วยคลอโรฟอร์มปริมาตร 1 2 3 และ 4 มิลลิลิตร รวมสารสกัดที่ได้ใส่ในขวดวัดปริมาตรขนาด 10 มิลลิลิตรและปรับปริมาตรด้วยคลอโรฟอร์ม และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 470 นาโนเมตร โดยใช้อะโทรพีน (atropine) เป็นสารมาตรฐานที่ช่วงความเข้มข้น 0 – 12 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาณแอลคาลอยด์รวมของสารสกัดคำนวณจากกราฟมาตรฐานของอะโทรพีนและแสดงผลเป็นมิลลิกรัมสมมูลของอะโทรพีนต่อกรัมของสารสกัด (mg AE/g crude extract) การวิเคราะห์สารตัวอย่างทำซ้ำ 3 ครั้ง

สถิติที่ใช้วิเคราะห์

การวิเคราะห์ทางสถิติโดยใช้โปรแกรมไมโครซอฟต์เอ็กเซล เวอร์ชัน 2010 สำหรับการคำนวณค่าเฉลี่ย ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานและความคลาดเคลื่อนของค่าเฉลี่ย และใช้โปรแกรม SPSS เวอร์ชัน 19 ในการคำนวณค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ระหว่างฤทธิ์ต้านออกซิเดชันกับปริมาณฟีนอลิก ฟลาโวนอยด์และแอลคาลอยด์รวมของสารสกัด

ผลการวิจัยและวิจารณ์ผล

สารสกัดจากลำต้นนกกระลิงแดงมีลักษณะเป็นของเหลวหนืดสีเหลืองถึงน้ำตาลเข้ม น้ำหนักสารสกัดเฮกเซน ไดคลอโรมีเทน แอซิโตนและเมทานอลมีค่าเท่ากับ 1.98, 2.30, 3.38 และ 11.21 กรัม ตามลำดับ ซึ่งคิดเป็นร้อยละโดยน้ำหนักเท่ากับ 0.79 0.92 1.35 และ 4.48 ตามลำดับ ดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ลักษณะทางกายภาพและปริมาณของสารสกัดลำต้นนกกระลิงแดง

สารสกัด	ลักษณะทางกายภาพ	น้ำหนัก (กรัม)	ร้อยละโดยน้ำหนัก[a]
เฮกเซน	ของเหลวหนืด สีเหลืองอ่อน	1.98	0.79
ไดคลอโรมีเทน	ของเหลวหนืด สีน้ำตาลอ่อน	2.30	0.92
แอซิโตน	ของเหลวหนืด สีน้ำตาลอมแดง	3.38	1.35
เมทานอล	ของเหลวหนืด สีน้ำตาลเข้ม	11.21	4.48

a หมายถึง ร้อยละโดยน้ำหนักของสารสกัดเทียบกับน้ำหนักพืชแห้ง

จากตารางที่ 1 พบว่าการสกัดด้วยตัวทำละลายที่ต่างกันทำให้ได้ปริมาณสารสกัดที่ต่างกัน โดยสารสกัด เมทานอลมีปริมาณมากที่สุดร้อยละ 4.48 รองลงมาเป็นสารสกัดแอซิโตนร้อยละ 1.35 แสดงว่าสารในลำต้นนกกระลิงแดงส่วนใหญ่มีขั้วสูงจึงสามารถสกัดได้ด้วยตัวทำละลายที่มีขั้วสูงอย่างเมทานอลและแอซิโตน ตามลำดับ

การทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน

การทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชันด้วยวิธี DPPH assay รายงานผลเป็นค่า IC_{50} (จากกราฟ

y = mx+c ; R^2 =1) โดยพิจารณาจากค่าที่มีค่าน้อยจะมีความสามารถในการต้านออกซิเดชันสูง พบว่าสารสกัดเฮกเซน ไดคลอไรมีเทน แอซิโตนและเมทานอล มีค่า IC_{50} เท่ากับ 105.21±0.65 12.46±0.08 2.12±0.01 และ 40.53±0.13 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ในขณะที่สารมาตรฐาน BHT มีค่า IC_{50} เท่ากับ 14.05±0.05 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน DPPH

สารสกัด	สมการกราฟมาตรฐาน	ค่า IC_{50} (mg/ml)
เฮกเซน	y = 0.402x + 7.706 (R^2 = 0.996)	105.21±0.65
ไดคลอไรมีเทน	y = 2.734x + 15.940 (R^2 = 0.978)	12.46±0.08
แอซิโตน	y = 12.480x + 23.580 (R^2 = 0.938)	2.12±0.01
เมทานอล	y = 0.925x + 12.510 (R^2 = 0.959)	40.53±0.13
BHT	y = 3.202x + 5.000 (R^2 = 0.985)	14.05±0.05

จากตารางที่ 2 พบว่าสารสกัดชนิดต่าง ๆ ของลำต้นนกกระลิงแดงมีความสามารถในการต้านออกซิเดชันได้แตกต่างกัน (อย่างมีระดับนัยสำคัญที่ 0.05) โดยสารสกัดแอซิโตนมีความสามารถในการต้านออกซิเดชันสูงที่สุดที่ค่า IC_{50} เท่ากับ 2.12±0.01 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรและมีประสิทธิภาพในการต้านออกซิเดชัน DPPH ได้ดีกว่าสารมาตรฐาน BHT (IC_{50} = 14.05±0.05 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ประมาณ 6.6 เท่า รองลงมาเป็นสารสกัดไดคลอโรมีเทน (IC_{50} = 12.46 ±0.08 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ซึ่งมีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันใกล้เคียงกับสารมาตรฐาน BHT ส่วนสารสกัดที่มีความสามารถในการต้านออกซิเดชันต่ำที่สุดคือสารสกัดเฮกเซนมีค่า IC_{50} เท่ากับ 105.21±0.65 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

ปริมาณฟีนอลิก ฟลาโวนอยด์และแอลคาลอยด์รวม

ปริมาณฟีนอลิกรวมคำนวณได้จากกราฟมาตรฐานกรดแกลลิก (y = 0.191x + 0.005, R^2 = 0.9980) รายงานผลเป็นมิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อกรัมสารสกัด พบว่าปริมาณฟีนอลิกรวมของสารสกัดเฮกเซน ไดคลอโรมีเทน แอซิโตน และเมทานอล มีค่าเป็น 23.80± 0.01 27.50± 0.01 28.15± 0.01 และ 26.95± 0.02 มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อกรัมสารสกัด ตามลำดับ ปริมาณฟลาโวนอยด์รวมคำนวณได้จากกราฟมาตรฐานเควอซิทิน (y = 2.674x + 0.04, R^2 = 0.9940) รายงานผลเป็นมิลลิกรัมสมมูลของเควอซิทินต่อกรัมสารสกัด พบว่าปริมาณฟลาโวนอยด์รวมของสารสกัดเฮกเซน ไดคลอโรมีเทน แอซิโตน และเมทานอล มีค่าเป็น 140.0± 0.01 30.0± 0.01 20.0± 0.02 และ 35.0± 0.01 มิลลิกรัมสมมูลของเควอซิทินต่อกรัมสารสกัด ตามลำดับ และปริมาณแอลคาลอยด์รวมคำนวณได้จากกราฟมาตรฐานอะโทรพีน (y=0.052x+0.002, R^2 =0.992) รายงานผลเป็นมิลลิกรัมสมมูลของอะโทรพีนต่อกรัมสารสกัด พบว่าปริมาณแอลคาลอยด์รวมของสารสกัดเฮกเซน ไดคลอโรมีเทน แอซิโตน และเมทานอล มีค่าเป็น 327.32± 0.02 565.14± 0.03 1,684.95± 0.02 และ 1,111.11 ± 0.01 มิลลิกรัมสมมูลของอะโทรพีนต่อกรัมสารสกัด ตามลำดับ ดังตารางที่ 3

ตารางที่ 3 ปริมาณฟีนอลิก ฟลาโวนอยด์และแอลคาลอยด์รวมของสารสกัด

สารสกัด	ปริมาณฟีนอลิกรวม (mg GAE/g crude extract)	ปริมาณฟลาโวนอยด์รวม (mg QE/g crude extract)	ปริมาณแอลคาลอยด์รวม (mg AE/g crude extract)
เฮกเซน	23.80± 0.01	140.00± 0.01[a]	327.32± 0.02[a]
ไดคลอโรมีเทน	27.50± 0.01	30.00± 0.01[b]	565.14± 0.03[a]
แอซิโตน	28.15± 0.01	20.00± 0.02[b]	1,684.95± 0.02[b]
เมทานอล	26.95± 0.02	35.00± 0.01[b]	1,111.11 ± 0.01[b]

Superscripts with different letters are significantly different at $p < 0.05$ within the same column

จากตารางที่ 3 พบว่าสารสกัดลำต้นนกกระลิงแดงโดยใช้ตัวทำละลายที่แตกต่างกัน คือ เฮกเซน ไดคลอโรมีเทน แอซิโตนและเมทานอล มีปริมาณฟีนอลิกไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p > 0.05$) และพบว่าสารสกัดเฮกเซนมีปริมาณฟลาโวนอยด์สูงที่สุดคือ 140.00± 0.01 มิลลิกรัมสมมูลของเควอซิทินต่อกรัมสารสกัด โดยมีปริมาณฟลาโวนอยด์เป็น 4.6 7.0 และ 4.0 เท่าของสารสกัดไดคลอโรมีเทน แอซิโตนและเมทานอล แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบว่าในสารสกัดไดคลอโรมีเทน แอซิโตนและเมทานอลมีปริมาณฟลาโวนอยด์ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p>0.05$) แสดงว่าฟลาโวนอยด์ที่เป็นองค์ประกอบในลำต้นนกกระลิงแดงมีสภาพขั้วใกล้เคียงกับเฮกเซน แต่จากปริมาณฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ที่พบในสารสกัดต่าง ๆ ของนกกระลิงแดงส่วนใหญ่ไม่มีความแตกต่างกันแม้จะใช้ตัวทำละลายที่มีความมีขั้วแตกต่างกันในการสกัดก็ตาม และพบปริมาณแอลคาลอยด์สูงที่สุดในสารสกัด แอซิโตน รองลงมาเป็นสารสกัดเมทานอล คือ 1,684.95± 0.02 และ 1,111.11 ± 0.01 มิลลิกรัมสมมูลของอะโทรพีนต่อกรัมสารสกัด ตามลำดับ พบว่าไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($p > 0.05$) แต่ปริมาณแอลคาลอยด์แตกต่างจากสารสกัดเฮกเซนและไดคลอโรมีเทนอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) จากผลการวิจัยพบว่าตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดที่มีขั้วแตกต่างกันจะสามารถสกัดสารพฤกษเคมีออกมาจากพืชในปริมาณที่แตกต่างกัน ซึ่งโดยทั่วไปการสกัดเป็นขั้นตอนที่สำคัญที่จะทำให้ได้มาซึ่งสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากพืชและส่วนต่าง ๆ ของพืช ซึ่งปริมาณ องค์ประกอบและความบริสุทธิ์ของสารออกฤทธิ์ที่ได้จากสารสกัดนั้นขึ้นอยู่กับโครงสร้าง หรือลักษณะเฉพาะทางเคมีรวมทั้งสภาพขั้วของสารออกฤทธิ์ จำนวนของตัวอย่างและสภาวะหรือวิธีการสกัด เช่น ชนิดของตัวทำละลาย เวลา อุณหภูมิ ตลอดจนสิ่งรบกวนต่าง ๆ ในขั้นตอนการสกัด เป็นต้น และเมื่อเปรียบเทียบปริมาณฟีนอลิก ฟลาโวนอยด์และแอลคาลอยด์ในสารสกัดต่าง ๆ พบว่าสารสกัดของนกกระลิงแดงมีปริมาณแอลคาลอยด์สูงกว่าสารพฤกษเคมีชนิดอื่น ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Rathee และคณะ (2011) ที่กล่าวว่าสารแอลคาลอยด์เป็นสารกลุ่มหลักที่พบในพืชสกุล *Capparis*

ความสัมพันธ์ของฤทธิ์ต้านออกซิเดชันกับปริมาณฟีนอลิก ฟลาโวนอยด์และแอลคาลอยด์รวม

จากการศึกษาถึงความสัมพันธ์ของปริมาณฟีนอลิก ฟลาโวนอยด์และแอลคาลอยด์รวมในสารสกัดลำต้นนกกระลิงแดงต่อฤทธิ์การต้านออกซิเดชัน แสดงค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ดังตารางที่ 4

ตารางที่ 4 ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ของฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน ปริมาณฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์รวม

Correlation	ปริมาณฟีนอลิก (mgGAE/gcrude extract)	ปริมาณฟลาโวนอยด์ (mgQE/gcrude extract)	ปริมาณแอลคาลอยด์ (mgAE/gcrude extract)	DPPH assay IC_{50} (mg/mL)
ปริมาณฟีนอลิก (mgGAE/g crude extract)	1	-0.989*	0.740	-0.991**
ปริมาณฟลาโวนอยด์ (mgQE /g crude extract)	-0.989*	1	-0.707	0.966*
ปริมาณแอลคาลอยด์ (mgAE/g crude extract)	0.740	-0.707	1	-0.686
DPPH assay IC_{50} (mg/mL)	-0.991**	0.966*	-0.686	1

* Correlation is significant at the 0.05 level (2-tailed)

** Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed)

จากตารางที่ 4 พบว่าปริมาณฟีนอลิก ฟลาโวนอยด์และแอลคาลอยด์มีความสัมพันธ์กับฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน โดยค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ระหว่างฤทธิ์ต้านออกซิเดชันกับปริมาณฟีนอลิก ฟลาโวนอยด์และแอลคาลอยด์ คือ 0.991 (เชิงลบ) 0.966 (เชิงบวก) และ 0.686 (เชิงลบ) ตามลำดับ เนื่องจากฤทธิ์ต้านออกซิเดชันรายงานเป็นค่า IC_{50} (mg/mL) โดยพิจารณาจากค่าที่มีค่าน้อยจะมีความสามารถในการต้านออกซิเดชันสูง แสดงว่าปริมาณฟีนอลิกและแอลคาลอยด์มีบทบาทสำคัญต่อฤทธิ์ต้านออกซิเดชันซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Stajic และคณะ (2013) และพบว่าปริมาณฟีนอลิกมีผลต่อประสิทธิภาพในการต้านออกซิเดชันมากกว่าแอลคาลอยด์จากค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ที่สูงกว่า แสดงว่าเมื่อปริมาณฟีนอลิกสูงจะส่งผลให้ประสิทธิภาพในการต้านออกซิเดชันเพิ่มสูงขึ้นด้วย แต่ปริมาณฟลาโวนอยด์ไม่มีผลต่อประสิทธิภาพในการต้านออกซิเดชัน จากงานวิจัยนี้พบว่าปริมาณสารฟีนอลิกมีความสัมพันธ์กับความสามารถในการต้านออกซิเดชันสอดคล้องกับรายงานของ Pourmorad et al.(2006) ที่พบว่าสารสกัดที่มีปริมาณสารฟีนอลิกสูงจะมีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันสูงด้วย เนื่องจากสารประกอบฟีนอลิกเป็นสารต้านออกซิเดชันที่ทำหน้าที่เป็น free radical terminators (Abdel-Hameed, 2009) ที่มีโครงสร้างหลักประกอบด้วยวงอะโรมาติก (aromatic ring) แทนที่ด้วยหมู่ไฮดรอกซิล (hydroxyl group) ที่สามารถใช้ดักจับอนุมูลอิสระได้ ดังนั้นเมื่อสารสกัดมีปริมาณสารฟีนอลิกสูงจึงส่งผลให้มีแนวโน้มในการต้านออกซิเดชันได้สูงด้วย แต่พบว่าปริมาณฟลาโวนอยด์รวมที่วิเคราะห์ได้มีความสัมพันธ์เชิงลบกับความสามารถในการต้านออกซิเดชัน เมื่อสารสกัดมีปริมาณฟลาโวนอยด์สูงขึ้นแต่ทำให้มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันลดต่ำลง ซึ่งแตกต่างจากรายงานของ Pourmorad et al.(2006) ที่พบว่าสารสกัดที่มีปริมาณฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ใน

ปริมาณที่สูงจะมีความสามารถในการต้านออกซิเดชันสูงด้วย ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากสารฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ที่พบในสารสกัดลำต้นนกกระลิงแดงนั้นมีปริมาณน้อยกว่าเมื่อเทียบกับปริมาณของแอลคาลอยด์ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Rathee et al. (2011) ที่พบว่าแอลคาลอยด์เป็นสารกลุ่มหลักที่พบเกือบทุกส่วนของพืชสกุลนี้

สรุปผลการวิจัย

จากผลการวิจัยทำให้ทราบความสามารถในการต้านออกซิเดชัน ปริมาณฟีนอลิก ฟลาโวนอยด์และแอลคาลอยด์รวมของสารสกัดลำต้นนกกระลิงแดง พบว่าสารสกัดแอซิโตนมีความสามารถในการต้านออกซิเดชันได้สูงที่สุดและสูงกว่าสารมาตรฐาน BHT และพบว่าสารสกัดชนิดต่าง ๆ มีปริมาณฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) มีเพียงสารสกัดเฮกเซนเท่านั้นที่มีปริมาณฟลาโวนอยด์แตกต่างจากสารสกัดชนิดอื่น และพบว่าสารสกัดแอซิโตนและเมทานอลมีปริมาณแอลคาลอยด์สูงกว่าสารสกัดเฮกเซนและไดคลอโรมีเทนอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อหาความสัมพันธ์ของปริมาณสารกับฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน พบว่าประสิทธิภาพในการต้านออกซิเดชัน DPPH ของสารสกัดลำต้นนกกระลิงแดงมีความสัมพันธ์กับปริมาณฟีนอลิกรวมของสารสกัดที่วิเคราะห์ได้มากที่สุด รองลงมาเป็นปริมาณแอลคาลอยด์ แต่มีความสัมพันธ์เชิงลบกับปริมาณฟลาโวนอยด์รวม เมื่อเปรียบเทียบปริมาณฟีนอลิก ฟลาโวนอยด์และแอลคาลอยด์ของสารสกัดลำต้นนกกระลิงแดงพบว่ามีปริมาณแอลคาลอยด์ในระดับที่สูงกว่าสารกลุ่มอื่นในตัวทำละลายที่มีขั้วและมีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันที่สอดคล้องกัน ดังนั้นจึงน่าสนใจที่จะสกัดและแยกสารกลุ่มแอลคาลอยด์ที่บริสุทธิ์ของพืชชนิดนี้เพื่อนำมาศึกษาองค์ประกอบทางเคมีและฤทธิ์ทางชีวภาพที่เกี่ยวข้องกับฤทธิ์ต้านออกซิเดชันและฤทธิ์อื่นๆ ที่น่าสนใจต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณสาขาวิชาเคมีและศูนย์วิทยาศาสตร์และวิทยาศาสตร์ประยุกต์ มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบุรี ที่อนุเคราะห์สารเคมีบางชนิด เครื่องมือและสถานที่ในการทำวิจัยครั้งนี้จนเสร็จสมบูรณ์

เอกสารอ้างอิง

Abdel-Hameed, E.S. (2009). Total phenolic contents and free radical scavenging activity of certain Egyptian Ficus species leaf samples. Food Chemistry 114: 1271–1277.

Afsharypuor, S., Jeiran, K., and Jazy, A.A. (1998). First investigation of the flavor profiles of the leaf: ripe fruit and root of *Capparis spinose var. mucronifolia* from Iran. *Pharmaceutica* Acta Helvetiae 72: 307-309.

Chahlia, N. (2009). Effect of Capparisdeciduu on hypolipidemic activity in rats. Journal of Medicinal Plants Research 3: 481-484.

Daxenbichler, M.E., Spencer, G.F., Carlson, D.G., Rose, G.B., Brinker, A.M., and Powell, R.G. (1991). Gucosinolate composition of seeds from 297 species of Wild plants. Phytochemistry 30: 2623-2638.

Fazel, S., Hamidreza, M., Rouhollah, G., and Mohammadreza, V. (2010). Spectrophotometric determination of total alkaloids in some Iranian medicinal plants. Journal of Applied Horticulture 12(1): 69-70.

Ghasemzadeh, A., Jaafar, H.Z.E., and Rahmat, A. (2010). Antioxidant activities, total phenolics and flavonoids content in two varieties of

Malaysia young ginger (*Zingiber officianle* Roscoe). Molecules 15: 4324-4333.

Harmed, A.R., Abdel-Shafeek, K.A., Abdel-Azim, N.S., Ismail, S.I., and Hammouda, F.M. (2007). Chemical investigation of some *Capparis* species growing in Egypt and their anti-oxidant activity. Evidence-Based Complementary & Alternative Medicine 4: 25-28.

Karagozler, A.A., Erdag, B., Emek, Y.C. and Uygun, D.A. (2008). Antioxidant activity and proline content of leaf extracts from *Dorystoecha-shastata*. Food Chemistry 111: 400-407.

Lamien-Meda, A., Lamien, C. E., Compaor, M. M. Y., Meda, R. N. T., Kiendrebeogo,M., Zeba, B., et al. (2008). Polyphenol content and antioxidant activity of fourteen wild edible fruits from Burkina Faso. Molecules 13: 581–594.

Lu, J.M., Lin, P.H., Yao, Q., and Chen, C. (2010) Chemical and molecular mechanisms of antioxidants: experimental approaches and model systems. Journal of Cellular and Molecular Medicine 14: 840–860.

Mali, R., Hundiwale, J., Sonawane, R., Patil, R., and Hatapakki, B. (2004). Evaluation of *Capparis decidua* for anthelmentric and anti-microbial activities. Indian Journal of Natural Products 20: 10-13.

Mourao, F., Umeo, S. H., Takemura, O. S., Linde, G. A., and Colauto, N. B. (2011). Antioxidant activity of Agaricus brasiliensis basidiocarps on different maturation phases. Brazilian Journal of Microbiology 42(1): 197–202.

Pieniz, S., Colpo, E., Oliveira, V. R., Estefanel, V., and Andreazza, R. (2009). Avaliacao in vitro do potencial antioxidante de frutase hortalias. Cienciae Agrotecnologia 33(2): 552–559.

Pourmorad, F., Hosseinimehr, S.J., and Shahabimajd, N. (2006). Antioxidant activity, phenol and flavonoid contents of some selected Iranian medicinal plants. African Journal of Biotechnology 5(11): 1142-1145.

Rathee, S., Rathee, P., and Kumar, V. (2011). Phytochemical and pharmacological potential of kair (*Capparis decidua*). *International Journal* Phytomedicine 2: 10-17.

Singleton, V.L., and Rossi, Jr. J.A. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phos-phortungstic acid reagents. *American* Journal of Enology and Viticulture 16: 144-158.

Stajić, M., Vukojević, J., Knežević, A., Laušević, S.D., and Milovanović, I. (2013). Antioxidant protective effects of mushroom metabolites. Current Topics in Medicinal Chemistry13: 2660–2676.

Sudta, P., Prapasanobol, V. and Suwansin, N. (2015). Phytochemicals and cytotoxic activity of some capparis plants . In Proceeding the 9th Rambhaibarni Research National Conference. (pp. 306-316). Thailand : Chantaburi.

Suwansin, N. (2010). *Flora in Pongsalood forest at Phetchaburi province*. Phetchaburi Rajabhat University.Thailand : Phetchaburi. (in Thai)

Temple, N.J. (2000). Antoxidant and disease: more questions than answers. Nutrition Research 20: 449–459.

Wiriyakarun*, S.,* Thammathaworn, A., Chantaranothai, P. (2002). Comparative leaf anatomy of capparidaceae in Thailand. *KKU Research* Journal (Graduate studies) 2: 69-71. (in Thai)

Yu, Y., Gao, H., Tang., Z., Song, X., and Wu, L. (2006). Several phenolic acids from the fruit of *Capparis spinose*. Asian journal of traditional medicines 1: 1-4.

Zhishen, J., Mengcheng, T., Jianming, W. (1999). Determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. Food Chemistry 6: 555-559.

❑❑❑❑❑