ความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระและองค์ประกอบทางพฤกษเคมีของใบพืชไม้ผลเขตร้อนบางชนิด

ปานทิพย์ บุญส่ง[1]* และ วัลภา เนตรดวงตา[1]

บทคัดย่อ

การวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาองค์ประกอบสารพฤกษเคมีและความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระโดยใช้วิธี DPPH จากใบมะม่วง ใบฝรั่ง และใบสับปะรดที่สกัดด้วยตัวทำละลาย 3 ชนิดคือ เอทานอล อะซิโตน และปิโตรเลียมอีเทอร์ พบว่าใบสับปะรดที่สกัดด้วยเอทานอลและอะซิโตนให้จำนวนสารพฤกษเคมีได้มากที่สุด ได้แก่ สเตอรอยด์ แอลคาลอยด์ เทอร์พีนอยด์ ฟลาโวนอยด์ และแทนนิน ส่วนสารสกัดจากใบฝรั่งและสารสกัดจากใบมะม่วงให้จำนวนสารพฤกษเคมีที่น้อยรองลงมาตามลำดับ นอกจากนั้นยังพบว่าสารสกัดจากใบสับปะรดที่สกัดด้วยเอทานอลให้ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมสูงที่สุด เท่ากับ 64.20 mg GAE / 100 g DW แต่สารสกัดจากใบสับปะรดที่สกัดด้วยปิโตรเลียมอีเทอร์ให้ปริมาณสารประกอบฟีนอลิก รวมน้อยที่สุดเท่ากับ 15.14 mg GAE / 100 g DW ส่วนความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระของสารสกัดจากใบสับปะรดที่สกัดด้วยเอทานอลให้ปริมาณร้อยละการกำจัดอนุมูลอิสระสูงที่สุดเท่ากับ 75.25 แต่สารสกัดจากใบมะม่วงที่สกัดด้วยอะซิโตนให้ปริมาณร้อยละการกำจัดอนุมูลอิสระน้อยที่สุดเท่ากับ 21.78

คำสำคัญ: สารพฤกษเคมี ใบมะม่วง ใบฝรั่ง ใบสับปะรด กำจัดอนุมูลอิสระ

[1] อาจารย์และนักวิจัย ภาควิชาวิทยาศาสตร์ประยุกต์และสังคม วิทยาลัยเทคโนโลยีอุตสาหกรรม มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าพระนครเหนือ

* ผู้นิพนธ์ประสานงาน โทรศัพท์ 0-2555-2000 ต่อ 6621 อีเมล: ziazhe_pb@hotmail.com

รับเมื่อ 15 เมษายน 2557 ตอบรับเมื่อ 24 กรกฎาคม 2557

Radical Scavenging Activity and Phytochemical Compositions of Some Tropical Fruit Plant Leaves

Panthip Boonsong[1]* and Wanlapa Natedungta[1]

Abstract

The purpose of this study was to investigate phytochemical compositions and radical scavenging activity in leaves of mango, guava and pineapple extracted by 3 organic solvents: ethanol, acetone and petroleum ether. The results showed that the pineapple leaves extracted by ethanol and acetone gave the largest amount of phytochemical compounds such as steroids, alkaloids, terpenoids, flavonoids and tannins. The guava and mango leaves respectively gave smaller amount of phytochemical compounds. Moreover, the pineapple leaves extracted by ethanol gave the largest amount of phenolic compounds at 64.20 mg GAE/ 100 g DW while extracted by petroleum ether the smallest at 15.14 mg GAE/100 g DW. The percentage of radical scavenging activity in pineapple leaves extracted by ethanol was the highest at 75.25 per cent but mango leaves extracted by acetone got the lowest at 21.78 per cent.

Keywords: Phytochemical, Mango Leaves, Guava Leaves, Pineapple Leaves, Radical Scavenging

[1] Lecturer and Researcher, Department of Social and Applied Science, College of Industrial Technology, King Mongkut's University of Technology North Bangkok.

* Corresponding Author, Tel. 0-2555-2000 Ext. 6621, E-mail: ziazhe_pb@hotmail.com

Received 15 April 2014; Accepted 24 July 2014

1. บทนำ

พืชผักสมุนไพรเป็นแหล่งวัตถุดิบที่สำคัญแหล่งหนึ่งของสารพฤกษเคมี (Phytochemicals) ซึ่งถูกใช้มาตั้งแต่สมัยโบราณเพื่อรักษาโรคต่างๆ และใช้บำรุงร่างกาย [1] กระทั่งในปัจจุบันก็ยิ่งได้รับความนิยมเพิ่มมากขึ้น เนื่องจากสารสกัดในพืชผักสมุนไพรซึ่งเป็นสารเคมีที่พบเฉพาะในพืชและได้จากธรรมชาติมีฤทธิ์ทางชีวภาพและประสิทธิภาพที่เป็นประโยชน์ต่อร่างกาย อีกทั้งเกิดผลข้างเคียงน้อย นอกจากนั้นยังช่วยเพิ่มมูลค่าให้กับผลิตผลและของเหลือทิ้งทางการเกษตร และเพื่อช่วยลดการนำเข้าของยาหรือสารเคมีที่มีราคาแพงจากต่างประเทศ โดยสารประกอบเคมีในพืชสามารถจำแนกได้เป็น 2 พวกใหญ่ๆ คือ Primary Metabolite และ Secondary Metabolite ซึ่งสาร Primary Metabolites เป็นสารที่มีอยู่ในพืชชั้นสูงทั่วไปโดยเป็นสารที่ได้มาจากผลิตผลของกระบวนการสังเคราะห์แสง (Phytosynthesis) และการหายใจ (Respiration) ได้แก่ สารจำพวกคาร์โบไฮเดรต ไขมัน กรดอะมิโน โปรตีน รวมถึงสารที่จำเป็น (Essential) ต่อการดำรงชีวิตของพืชต่างๆ ส่วนสาร Secondary Metabolites ซึ่งเป็นกลุ่มของสารพฤกษเคมี ที่เป็นสารประกอบเชิงซ้อนกลุ่มใหญ่ มีลักษณะโมเลกุลที่ซับซ้อน โดยได้จากการเปลี่ยนสาร Primary Metabolites ด้วยกระบวนการชีวสังเคราะห์แล้วเกิดเป็นสาร Secondary Metabolites ที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่สำคัญที่สุด และมีลักษณะพิเศษแตกต่างกันไปตามชนิดของพืช สารพฤกษเคมีสามารถแบ่งกลุ่มตามโครงสร้างโมเลกุลที่สำคัญคือสารในกลุ่ม สเตอรอยด์ (Steroids) แอลคาลอยด์ (Alkaloids) เทอร์พีนอยด์ (Terpenoids) ฟลาโวนอยด์ (Flavonoids) และแทนนิน (Tannins) [2] สารพฤกษเคมีเป็นสาร Non-essential Metabolites ที่มีความสำคัญมากในการดำรงชีวิตของพืชคือ เพื่อช่วยป้องกันโรคและป้องกันศัตรูพืชให้พืชอยู่รอด โดยสารกลุ่มสเตอรอยด์เป็นสารที่มีการผ่านกระบวนการชีวสังเคราะห์เปลี่ยนแปลงมาจากสารกลุ่มไตรเทอร์พีนอยด์ โดยมีโครงสร้างคาร์บอนเป็นวงแหวน 4 วงเชื่อมต่อกัน แต่จะแตกต่างกันที่หมู่ฟังก์ชันนอลที่ติดอยู่กับวงแหวนเหล่านี้ สเตอรอยด์เป็นสารที่พบได้ทั้งในพืชและสัตว์ ทำหน้าที่สำคัญอย่างหนึ่งคือการเป็นฮอร์โมน นอกจากนั้นยังสามารถใช้เป็นยาต้านการอักเสบ และใช้เป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์ยา ส่วนสารกลุ่มแอลคาลอยด์ เป็นสารที่ประกอบด้วยไนโตรเจน โดยสังเคราะห์จากกรดอะมิโนมีฤทธิ์เป็นด่าง พบมากในพืชใบเลี้ยงคู่มากกว่าพืชใบเลี้ยงเดี่ยว มีคุณสมบัติในการป้องกันอันตรายจากโรคและแมลง และช่วยกระตุ้นการเจริญเติบโตของพืช อีกทั้งยังเป็นสารที่มีบทบาทสำคัญมากทางด้านเภสัชวิทยาโดยมีฤทธิ์ต้านอักเสบ บรรเทาอาการเจ็บปวด รักษาโรคเก๊าท์ รักษาโรคมาลาเรีย และต้านมะเร็ง สารกลุ่มแทนนิน เป็นสารประกอบจำพวกพอลิฟีนอลที่มีโครงสร้างซับซ้อน ซึ่งมีอยู่ในพืชหลายชนิด เป็นสารที่ช่วยป้องกันพืชจากการทำลายโดยแมลง แบคทีเรีย และรา เนื่องจากแทนนินมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ โดยถูกนำไปสะสมในใบ ผล เปลือก หรือลำต้น นอกจากนั้นแทนนินสามารถทำปฏิกิริยากับโปรตีน ใช้ในอุตสาหกรรมฟอกหนัง รักษาโรคท้องร่วง และยับยั้งอาการของโรคมะเร็ง ขณะที่สารกลุ่มฟลาโวนอยด์เป็นสารกลุ่มที่พบมากในพืช ในรูปของอะไกลโคน (Aglycone) และไกลโคไซด์ (Glycoside) โดยถูกสังเคราะห์ขึ้นจาก Shikimic Acid Pathway ส่วนใหญ่เป็นสารให้สีในดอก ผล และใบ ใช้สำหรับการล่อแมลงและสัตว์เพื่อการผสมเกสร ช่วยควบคุมการเจริญเติบโตของพืช ช่วยต้านเชื้อราและแบคทีเรีย สามารถป้องกันพืชจากรังสีอัลตราไวโอเลต อีกทั้งมีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา เช่น ช่วยเพิ่มความแข็งแรงของหลอดเลือดฝอย มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน ต้านอักเสบ และเพิ่มภูมิคุ้มกันให้กับร่างกาย [3]-[5] สารกลุ่มเทอร์พีนอยด์ เป็นสารที่ประกอบด้วยหน่วยย่อยเป็น Isoprenoid ได้แก่ Monoterpene, Diterpene และ Triterpene เป็นต้น ส่วนใหญ่พบในลักษณะของน้ำมันหอมระเหย ทำให้พืชมีกลิ่นและรส ซึ่งมีฤทธิ์ในการยับยั้งเซลล์มะเร็ง ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์และยับยั้งเชื้อไวรัส นอกจากนี้ยังเป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์วิตามิน จะเห็นได้ว่าโดยส่วนใหญ่สารพวก Secondary Metabolite หรือ

สารพฤกษเคมีมีสรรพคุณทางยา มีฤทธิ์ทางชีวภาพและให้คุณสมบัติแตกต่างกัน ไม่ว่าจะเป็นการออกฤทธิ์แบบฮอร์โมนของมนุษย์ การเป็น Enzyme Stimulants เพื่อกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ อีกทั้งยังเป็นสาร Anti-bacterial และการออกฤทธิ์แบบ Physical Action ในการจับเยื่อเซลล์เพื่อป้องกันการจับติดของเชื้อโรค นอกจากนั้นโดยเฉพาะอย่างยิ่งการเป็นสาร Antioxidants การมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเพื่อป้องกันเซลล์และการเป็นสารต้านมะเร็งในสิ่งมีชีวิต ซึ่งเป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดโรคภัยที่ร้ายแรง [6] เนื่องจากอนุมูลอิสระ (Free Radicals) เป็นสารที่ไม่เสถียรสามารถเกิดปฏิกิริยาได้อย่างว่องไว ซึ่งสามารถทำปฏิกิริยากับโมเลกุลต่าง ๆ ในร่างกายได้ เช่น ไขมัน โปรตีน หรือสารพันธุกรรม ทำให้ภาวะที่อนุมูลอิสระมีปริมาณมากเกินไปอาจก่อให้เกิดอันตรายแก่ร่างกาย เรียกภาวะนี้ว่า Oxidative Stress ซึ่งเกี่ยวข้องกับการเกิดโรคร้ายหลายชนิด ดังนั้นความสามารถในต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant Activity) ซึ่งมีความสัมพันธ์โดยตรงกับ Phenolic Compounds เนื่องจากเป็นสารที่ให้อิเล็กตรอน (Electron Donating Agents) ที่ดี โดยสามารถประเมินศักยภาพการเป็นสารกำจัดอนุมูลอิสระ (Free Radical Scavengers) หรือสารต้านการออกซิเดชัน (Antioxidants) ด้วยการหา Total Phenolic Compounds (TPC) ได้หลายวิธี อีกทั้งสามารถยับยั้งปฏิกิริยาลูกโซ่ของ Free Radicals [7]

พืชไม้ผลเขตร้อน ได้แก่ มะม่วง ฝรั่ง และสับปะรด เป็นพืชผลไม้เศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศไทย มีการปลูกกันอย่างแพร่หลายมากขึ้นเกือบทุกภาคของประเทศไทย และสามารถส่งออกไปจำหน่ายยังต่างประเทศ ซึ่งมะม่วง (Mango) เป็นผลไม้ในเขตร้อนมีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า Mangifera indica L. อยู่ในวงศ์ Anacardiaceae มีถิ่นกำเนิดอยู่ในประเทศอินเดีย และประเทศในแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ได้แก่ ไทย พม่า และมาเลเซีย มะม่วงเป็นผลไม้ที่ได้รับความนิยมปลูกกันอย่างกว้างขวาง เนื่องจากปลูกง่าย สามารถปลูกได้ดีในสภาพดินแทบทุกชนิด ประกอบกับผลมีรสชาติอร่อย สามารถรับประทานได้ทั้งผลดิบและผลสุก สามารถแปรรูปเก็บไว้รับประทานนอกฤดูกาลได้ ส่วนฝรั่ง (Guava) มีชื่อทางวิทยาศาสตร์คือ Psidium guajava L. อยู่ในวงศ์ Myrtaceae เป็นพืชที่นิยมปลูกโดยทั่วไปเพื่อรับประทานผลสด มีลักษณะเป็นไม้ยืนต้นขนาดเล็กถึงขนาดกลาง ใบเดี่ยวติดกับลำต้นแบบเรียงตรงกันข้าม ผลฝรั่งมีหลายรูปร่าง โดยมีลักษณะกลมเนื้อข้างในสีนวลถึงสีแดง มีเมล็ดจำนวนมาก ใบฝรั่งที่แก่สมบูรณ์เต็มที่และผลดิบอ่อนมีรสฝาดมีฤทธิ์ฝาดสมานแก้ท้องเสีย และส่วนอื่นๆ ของฝรั่ง เช่น ราก ต้น ใบ ใช้เป็นยารักษาเกี่ยวกับกระเพาะอาหารแก้อาการอาเจียน ท้องร่วงและโรคบิดได้ รักษาแผลเปื่อย โรคมาลาเรีย และอาการปวดฟัน [8] ส่วนสับปะรด (Pineapple) มีชื่อทางวิทยาศาสตร์คือ Ananas comosus L. (Merr.) อยู่ในวงศ์ Bromeliaceae เป็นพืชล้มลุก เจริญเติบโตได้ดีในเขตร้อน สามารถทนทานต่อความแห้งแล้ง ขยายพันธุ์ได้ง่าย ใบเป็นใบเดี่ยวลักษณะเรียวยาวเป็นร่อง ผลเป็นแบบผลรวม มีเอนไซม์ที่สำคัญคือ เอนไซม์โบรมีเลน (Bromelain) เป็นเอนไซม์ช่วยย่อยโปรตีน ผลสุกมีรสหวาน สามารถช่วยบรรเทาการอักเสบ ป้องกันการอุดตันของหลอดเลือด ซึ่งโดยส่วนใหญ่ผลผลิตทางการเกษตรที่ต้องการของเกษตรกรเป็นผลไม้จากพืชเหล่านี้ ในขณะที่ใบมะม่วง ใบฝรั่ง และใบสับปะรด กลายเป็นวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร ซึ่งโดยส่วนใหญ่มักถูกกำจัดทิ้ง หรืออาจนำไปใช้ในการทำปุ๋ยและอาหารสัตว์เท่านั้น จะเห็นได้ว่าการใช้ประโยชน์ของใบพืชไม้ผลเหล่านี้มีอยู่อย่างจำกัด จึงมีความจำเป็นที่ต้องตรวจสอบองค์ประกอบทางเคมีเบื้องต้นของสารพฤกษเคมี และฤทธิ์ทางชีวภาพจากใบพืชเหล่านี้ ดังนั้นวัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้ก็เพื่อศึกษาความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระและองค์ประกอบทางพฤกษเคมีของใบพืชไม้ผลเขตร้อน ได้แก่ ใบมะม่วง ใบฝรั่ง และใบสับปะรด เพื่อใช้เป็นข้อมูลเบื้องต้นที่จะนำไปพัฒนาต่อในด้านต่างๆ ได้ เช่น ด้านเภสัชกรรม ด้านอาหาร ด้านสุขภาพ และด้านเครื่องสำอาง นอกจากนั้นยังเป็นการเพิ่มมูลค่าให้กับวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรอีกด้วย

2. อุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย

2.1 การเตรียมสารสกัดจากใบพืชด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ [9]-[11]

นำใบพืชไม้ผลเขตร้อน 3 ชนิด ได้แก่ ใบมะม่วง (พันธุ์อกร่อง) ใบฝรั่ง (พันธุ์เวียดนาม) และใบสับปะรด (พันธุ์ปัตตาเวีย) โดยการตัดเก็บเฉพาะใบช่วงระยะใบกลางอ่อนกลางแก่จากไร่ผลไม้ในจังหวัดกาญจนบุรี มากำจัดสิ่งเจือปนออก ล้างทำความสะอาดและผึ่งให้แห้งเป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำใบพืชไปอบต่อในตู้อบไฟฟ้าที่อุณหภูมิ 50°C เป็นเวลา 12 ชั่วโมง จากนั้นปั่นให้ละเอียดโดยใช้เครื่องบดไฟฟ้าและร่อนด้วยตะแกรงร่อน นำใบพืชบดละเอียดที่เตรียมไว้ใส่ลงในขวดรูปชมพู่ แล้วเติมตัวทำละลาย 3 ชนิด คือ เอทานอล อะซิโตน และปิโตรเลียมอีเทอร์ โดยใช้อัตราส่วนของใบพืชต่อตัวทำละลายอินทรีย์ 1 : 10 ปิดให้สนิทด้วย Aluminium Foil และ Parafilm แช่ทิ้งไว้ 24 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง หลังจากนั้นกรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 4 นำตัวทำละลายที่อิ่มตัวด้วยสารสกัดไประเหยเอาตัวทำละลายออกด้วยเครื่อง Rotary Evaporator ใช้อุณหภูมิ 30°C จนตัวทำละลายระเหยออกจนหมด นำสารสกัดที่ได้บรรจุในขวดแก้วสีชา แล้วนำไปวิเคราะห์องค์ประกอบของสารพฤกษเคมีเบื้องต้น หาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม และความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระของสารสกัดจากใบพืชไม้ผลเขตร้อน

2.2 การวิเคราะห์องค์ประกอบของสารพฤกษเคมีเบื้องต้น

นำสารสกัดจากใบพืชที่ได้จากการสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ต่าง ๆ มาตรวจสอบสารพฤกษเคมีเบื้องต้น ได้แก่ สเตอรอยด์ แอลคาลอยด์ เทอร์พีนอยด์ ฟลาโวนอยด์ และแทนนิน

2.2.1 การทดสอบสเตอรอยด์

นำสารสกัดแต่ละชนิดมาอย่างละ 2 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลองแต่ละหลอด จากนั้นค่อย ๆ เติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้น (conc. H_2SO_4) จนปริมาตรครบ 2 มิลลิลิตร สังเกตผลที่ได้เกิดสารละลายสีน้ำตาลแดงขึ้นแสดงว่าพบสเตอรอยด์

2.2.2 การทดสอบแอลคาลอยด์

เติมสารสกัดแต่ละชนิดลงในหลอดทดลองปริมาตร 2 มิลลิลิตร จากนั้นเติมสารละลายแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์เข้มข้นร้อยละ 26 (26% NH_4OH) เป็นปริมาตร 2 มิลลิลิตร หากมีตะกอนเกิดขึ้นแสดงว่าพบแอลคาลอยด์

2.2.3 การทดสอบเทอร์พีนอยด์

นำสารสกัดแต่ละชนิดใส่ลงในหลอดทดลองในปริมาตร 5 มิลลิลิตร และเติมคลอโรฟอร์ม ($CHCl_3$) ปริมาตร 2 มิลลิลิตร จากนั้นค่อย ๆ เติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้น (conc. H_2SO_4) ปริมาตร 2 มิลลิลิตร สังเกตผลที่ได้เกิดเป็นสีน้ำตาลแดงขึ้นที่ระหว่างรอยต่อของสารละลายแสดงว่าพบเทอร์พีนอยด์

2.2.4 การทดสอบฟลาโวนอยด์

นำสารสกัดแต่ละชนิดใส่ลงในหลอดทดลองเป็นปริมาตร 2 มิลลิลิตร จากนั้นเติมสารละลายเลท (IV) อะซิเตตเข้มข้นร้อยละ 10 (10% $Pb(CH_3COO)_4$) เป็นปริมาตร 2 มิลลิลิตร หากเกิดตะกอนสีเหลืองขึ้นแสดงว่าพบฟลาโวนอยด์

2.2.5 การทดสอบแทนนิน

นำสารสกัดแต่ละชนิดมาอย่างละ 2 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลอง จากนั้นเติมสารละลายเฟอร์ริกคลอไรด์เข้มข้นร้อยละ 10 (10% $FeCl_3$) จำนวน 2-3 หยด สังเกตผลที่ได้เกิดสารละลายสีเขียวดำ หรือน้ำเงินดำขึ้นแสดงว่าพบแทนนิน

2.3 การวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม

นำสารสกัดตัวอย่างปริมาตร 200 ไมโครลิตร เติมสารละลายของ Folin-Ciocalteu's Reagent ที่ทำการเจือจาง 10 เท่า ปริมาตร 800 ไมโครลิตร ซึ่งการเตรียมสารละลายเจือจาง 10 เท่า ทำโดยปิเปต Folin-Ciocalteu's Reagent ปริมาตร 10 มิลลิลิตรใส่ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น จากนั้นเติมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต

เข้มข้นร้อยละ 7.5 (7.5% $NaCO_3$) ปริมาตร 4 มิลลิลิตร ซึ่งเตรียมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนตโดยชั่งสารโซเดียมคาร์บอเนต 7.5 กรัม ละลายในน้ำกลั่นใส่ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น จากนั้นเติมสารทั้งหมดแล้วเขย่าผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนคลื่นแสงที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร โดยทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ และใช้กรดแกลลิก (Gallic Acid) ความเข้มข้น 10-100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เป็นสารละลายมาตรฐาน โดยทำการทดลองเช่นเดียวกับสารสกัดตัวอย่างข้างต้น โดยเปลี่ยนจากสารสกัดตัวอย่างเป็นสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิก และนำค่าที่ได้ไปสร้างกราฟมาตรฐาน จากนั้นนำผลที่ได้จากการทดสอบสารสกัดจากใบพืชไปเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานเพื่อคำนวณหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมในสารสกัด

2.4 การวิเคราะห์ความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ

การทดสอบความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) Assay ทำการเตรียมสารละลาย DPPH เข้มข้น 2 มิลลิโมลาร์ โดยชั่งสาร DPPH หนัก 7.9 มิลลิกรัม ละลายในเมทานอล ใส่ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตรด้วยเมทานอล จากนั้นทำการทดสอบความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระของสารสกัดโดยนำสารสกัดตัวอย่างปริมาตร 100 ไมโครลิตร เติมสารละลาย DPPH ปริมาตร 200 ไมโครลิตร และเมทานอล ปริมาตร 2.8 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันและตั้งทิ้งไว้ในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนคลื่นแสงที่ความยาวคลื่น 515 นาโนเมตร โดยทั้งหมดทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ ส่วนชุดควบคุม (Control) และสารละลายมาตรฐานคือ กรดแอสคอบิก (Ascorbic Acid) ที่ความเข้มข้น 10-50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร โดยทำการทดลองเช่นเดียวกับสารสกัดตัวอย่างข้างต้น โดยเปลี่ยนจากสารสกัดตัวอย่างเป็นน้ำกลั่น และสารละลายมาตรฐานกรดแอสคอบิกที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ตามลำดับ จากนั้นนำค่าการดูดกลืนคลื่นแสงไปคำนวณร้อยละการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH (% DPPH Radical Scavenging Activity) จากสมการ

% DPPH Radical Scavenging Activity

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

เมื่อ $A_{control}$ = ค่าการดูดกลืนคลื่นแสงของชุดควบคุม

A_{sample} = ค่าการดูดกลืนคลื่นแสงของชุดตัวอย่าง

ซึ่งนำค่า % DPPH Radical Scavenging Activity ของสารละลายมาตรฐานกรดแอสคอบิกที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ที่ได้ไปสร้างกราฟมาตรฐาน จากนั้นนำผลที่ได้จากการคำนวณของสารสกัดจากใบพืชไปเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานเพื่อพิจารณาเปรียบเทียบ

2.5 การวิเคราะห์ทางสถิติ

การทดสอบตัวอย่างๆ ละ 3 ซ้ำ ในการศึกษาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม และความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ โดยวิเคราะห์ค่าสถิติของข้อมูล ได้แก่ ค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (±S.D.) ซึ่งวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนด้วยวิธี ANOVA ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

3. ผลการทดลองและอภิปรายผล

3.1 การวิเคราะห์องค์ประกอบสารพฤกษเคมีเบื้องต้นของสารสกัดจากใบพืชด้วยตัวทำละลายอินทรีย์

จากการวิเคราะห์องค์ประกอบสารพฤกษเคมีจากใบมะม่วง ใบฝรั่ง และใบสับปะรด ที่สกัดด้วยตัวทำละลาย 3 ชนิดคือ เอทานอล อะซิโตน และปิโตรเลียมอีเทอร์ แสดงดังตารางที่ 1 พบว่าในใบมะม่วงที่สกัดด้วย เอทานอล และอะซิโตน มีสเตอรอยด์ เทอร์พีนอยด์ ฟลาโวนอยด์ และแทนนินเป็นองค์ประกอบ ส่วนใบมะม่วงที่สกัดด้วยปิโตรเลียมอีเทอร์พบสารสารสเตอรอยด์เท่านั้น ใบฝรั่งที่สกัดด้วยเอทานอลมีสเตอรอยด์เทอร์พีนอยด์ฟลาโวนอยด์ และแทนนินเป็นองค์ประกอบ ใบฝรั่งที่สกัดด้วยอะซิโตนพบสเตอรอยด์ ฟลาโวนอยด์ และแทนนินเป็นองค์ประกอบ

ส่วนใบฝรั่งที่สกัดด้วยปิโตรเลียมอีเทอร์พบ สเตอรอยด์ แอลคาลอยด์ และเทอร์พีนอยด์เป็นองค์ประกอบ ในขณะที่ใบสับปะรดที่สกัดด้วยเอทานอลและอะซิโตนพบ สเตอรอยด์ แอลคาลอยด์ เทอร์พีนอยด์ ฟลาโวนอยด์ และแทนนิน เป็นองค์ประกอบ ส่วนใบสับปะรดที่สกัดด้วยปิโตรเลียมอีเทอร์พบสเตอรอยด์ และเทอร์พีนอยด์เป็นองค์ประกอบเท่านั้น นอกจากนั้นจะเห็นได้ว่าใบสับปะรดให้ปริมาณสารพฤกษเคมีได้มากที่สุด รองลงมาคือ ใบฝรั่ง และใบมะม่วง ตามลำดับ อีกทั้งตัวทำละลายเอทานอลเป็นตัวทำละลายอินทรีย์ที่มีขั้วสูงสามารถสกัดสารพฤกษเคมีในตัวอย่างใบพืชทั้งสามชนิดได้มากที่สุด รองลงมาเป็นอะซิโตน เป็นตัวทำละลายอินทรีย์ที่มีขั้วปานกลาง ส่วนปิโตรเลียมอีเทอร์เป็นตัวทำละลายอินทรีย์ที่ไม่มีขั้วสามารถสกัดสารพฤกษเคมีในตัวอย่างใบพืชทั้งสามชนิดได้น้อยที่สุด ดังนั้นสารพฤกษเคมีส่วนใหญ่ที่เป็นโมเลกุลที่มีขั้วจึงสามารถละลายได้ดีในตัวทำละลายที่มีขั้ว ส่วนโมเลกุลที่ไม่มีขั้วสามารถละลายในตัวทำละลายที่ไม่มีขั้วเป็นไปตามกฎ Like Dissolves Like Rule [12] นอกจากนั้นมีรายงานว่าเอทานอลสามารถละลายสารพฤกษเคมีในกลุ่มสเตอรอยด์ เทอร์พีนอยด์ แอลคาลอยด์ ฟลาโวนอยด์ พอลิฟีนอล และแทนนินได้ดี ส่วนอะซิโตนสามารถละลายสารพฤกษเคมีในกลุ่ม ฟลาโวนอยด์ และฟีนอลได้ดี ในขณะที่ปิโตรเลียมอีเทอร์สามารถละลายสารพฤกษเคมีในกลุ่มเทอร์พีนอยด์ แอลคาลอยด์ คูมาลิน กรดไขมัน และแคโรทีนอยด์ได้ดี [13]

ตารางที่ 1 องค์ประกอบสารพฤกษเคมีจากใบมะม่วง ใบฝรั่ง และใบสับปะรด ที่สกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ 3 ชนิด คือ เอทานอล (EtOH) อะซิโตน (AC) และปิโตรเลียมอีเทอร์ (PE)

สารสกัด	สารพฤกษเคมี	ตัวทำละลายอินทรีย์		
		EtOH	AC	PE
ใบมะม่วง	สเตอรอยด์	+	+	+
	แอลคาลอยด์	-	-	-
	เทอร์พีนอยด์	+	+	-
	ฟลาโวนอยด์	+	+	-
	แทนนิน	+	+	-

ตารางที่ 1 องค์ประกอบสารพฤกษเคมีจากใบมะม่วง ใบฝรั่ง และใบสับปะรด ที่สกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ 3 ชนิด คือ เอทานอล (EtOH) อะซิโตน (AC) และปิโตรเลียมอีเทอร์ (PE) (ต่อ)

สารสกัด	สารพฤกษเคมี	ตัวทำละลายอินทรีย์		
		EtOH	AC	PE
ใบฝรั่ง	สเตอรอยด์	+	+	+
	แอลคาลอยด์	-	-	+
	เทอร์พีนอยด์	+	-	+
	ฟลาโวนอยด์	+	+	-
	แทนนิน	+	+	-
ใบสับปะรด	สเตอรอยด์	+	+	+
	แอลคาลอยด์	+	+	-
	เทอร์พีนอยด์	+	+	+
	ฟลาโวนอยด์	+	+	-
	แทนนิน	+	+	-

3.2 การวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม

จากผลการวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมของสารสกัดจากใบมะม่วง ใบฝรั่ง และใบสับปะรด เปรียบเทียบกับสารมาตรฐานกรดแกลลิค แล้วนำมาคำนวณปริมาณสารประกอบฟีนอลิกจาก Linear Regression Equation ของกราฟมาตรฐานของกรดแกลลิค ซึ่งสมการคือ $y = 0.0026x + 0.0113$ ($R^2 = 0.9944$) โดยที่ x คือความเข้มข้นของสาร และ y = ค่าการดูดกลืนคลื่นแสง จากการศึกษาพบว่าสารสกัดจากใบสับปะรดที่สกัดด้วยเอทานอลให้ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมสูงที่สุด เท่ากับ 64.20 ± 2.53 mg GAE / 100 g DW (Dry Weight) รองลงมาเป็นสารสกัดจากใบมะม่วงที่สกัดด้วยเอทานอล และสารสกัดจากใบฝรั่งที่สกัดด้วยอะซิโตนให้ปริมาณสารประกอบ ฟีนอลิกรวมเท่ากับ 59.98 ± 3.64 และ 59.88 ± 1.89 mg GAE / 100 g DW ตามลำดับ แต่สารสกัดจากใบสับปะรดที่สกัดด้วยปิโตรเลียมอีเทอร์ให้ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมน้อยที่สุดเท่ากับ 15.14 ± 5.42 mg GAE / 100 g DW ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับสารสกัดจากใบฝรั่งที่สกัดด้วยปิโตรเลียมอีเทอร์ให้ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมน้อยที่สุดเท่ากับ 15.16 ± 4.78 mg

GAE / 100 g DW นอกจากนั้นจะเห็นได้ว่าใบสับปะรดให้ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมได้มากที่สุด รองลงมาคือใบฝรั่ง และใบมะม่วง ตามลำดับ ส่วนสารสกัดที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอลให้ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมได้มากที่สุด รองลงมาคืออะซิโตน และปิโตรเลียมอีเทอร์ ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 2 ซึ่งผลการวิเคราะห์สอดคล้องกับผลขององค์ประกอบสารพฤกษเคมีเบื้องต้นจากใบมะม่วงใบฝรั่งและใบสับปะรดที่สกัดด้วยตัวทำละลายทั้ง 3 ชนิด โดยที่เอทานอลสามารถสกัดสารพฤกษเคมีได้มากที่สุด เมื่อเทียบกับตัวทำละลายคือ อะซิโตน และปิโตรเลียมอีเทอร์ เนื่องมาจากเอทานอลสามารถละลายสารพฤกษเคมีพวกสารประกอบฟีนอลิกในกลุ่มพอลิฟีนอลและฟลาโวนอยด์ได้ดี [13], [14]

ตารางที่ 2 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมโดยแสดงเป็นค่ามิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกในตัวอย่างแห้ง 100 กรัม จากใบมะม่วง ใบฝรั่ง และใบสับปะรด ที่สกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ 3 ชนิดคือ เอทานอล (EtOH) อะซิโตน (AC) และปิโตรเลียมอีเทอร์ (PE)

สารสกัด	ตัวทำละลาย	ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม (mg GAE / 100 g DW)[1]
ใบมะม่วง	EtOH	59.98 ± 3.64
	AC	46.76 ± 2.91
	PE	16.70 ± 6.63
ใบฝรั่ง	EtOH	58.30 ± 1.32
	AC	59.88 ± 1.89
	PE	15.16 ± 4.78
ใบสับปะรด	EtOH	64.20 ± 2.53
	AC	60.52 ± 3.11
	PE	15.14 ± 5.42

[1] ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Average ± S.D.), n = 3

3.3 การวิเคราะห์ความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ

จากผลการวิเคราะห์ความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระของใบมะม่วง ใบฝรั่ง และใบสับปะรด ที่สกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ทั้ง 3 ชนิด โดยใช้วิธี DPPH ดังแสดงในตารางที่ 3 พบว่าสารสกัดจากใบสับปะรดที่สกัดด้วยเอทานอลให้ปริมาณร้อยละการกำจัดอนุมูลอิสระสูงที่สุดเท่ากับ 75.25 ± 3.67 และรองลงมาคือ สารสกัดจากใบสับปะรดที่สกัดด้วยอะซิโตน และที่สกัดด้วยปิโตรเลียมอีเทอร์ให้ปริมาณร้อยละการกำจัดอนุมูลอิสระเท่ากับ 71.29 ± 6.19 และ 69.66 ± 2.23 ตามลำดับ แต่สารสกัดจากใบมะม่วงที่สกัดด้วยอะซิโตนให้ปริมาณร้อยละการกำจัดอนุมูลอิสระน้อยที่สุดเท่ากับ 21.78 ± 8.24 นอกจากนั้นยังพบว่าสารสกัดจากใบสับปะรดให้ปริมาณร้อยละการกำจัดอนุมูลอิสระได้มากที่สุด รองลงมาคือ สารสกัดจากใบฝรั่ง และใบมะม่วง ตามลำดับ ส่วนสารสกัดที่สกัดด้วยตัวทำละลาย เอทานอลให้ปริมาณร้อยละการกำจัดอนุมูลอิสระได้มากที่สุด ซึ่งสอดคล้องกับผลของปริมาณสารประกอบ ฟีนอลิกรวมของใบมะม่วง ใบฝรั่ง และใบสับปะรด โดยที่เอทานอลสามารถสกัดพวกสารประกอบฟีนอลิกในกลุ่มพอลิฟีนอล และฟลาโวนอยด์ได้ดี [13], [14] จึงมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมมากที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับตัวทำละลายอื่น ซึ่งปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมมากส่งผลให้ปริมาณการกำจัดอนุมูลอิสระสูง [15] เนื่องจากสารในกลุ่มฟีนอลลิกมีโครงสร้างเป็น Aromatic Ring ต่อกับ Hydroxyl Group ทำให้สารประกอบฟีนอลิกส่วนใหญ่เป็นโมเลกุลที่มีขั้วและสามารถละลายได้ดีในตัวทำละลายที่มีขั้ว เช่น แอลกอฮอล์ โดยสารประกอบฟีนอลิกมีกลไกการต้านอนุมูลอิสระคือ เมื่อสารประกอบฟีนอลิกถูกสารอนุมูลอิสระดึงอิเล็กตรอนออกไป ทำให้โมเลกุลเกิดการสูญเสียอิเล็กตรอน แต่เนื่องจากโครงสร้างของสารประกอบ ฟีนอลิกที่มีความหนาแน่นของอิเล็กตรอนสูง จึงทำให้อิเล็กตรอนที่มีอยู่อย่างหนาแน่นนั้นสามารถเกิดการเคลื่อนย้ายไปทั่วโครงสร้างได้และทำให้โครงสร้างเกิดการเสถียร ส่วนสารอนุมูลอิสระเมื่อดึงอิเล็กตรอนไปก็ทำให้มีโครงสร้างที่เสถียรขึ้น [16] ในขณะที่ตัวทำละลายปิโตรเลียมอีเทอร์มีปริมาณสารประกอบ ฟีนอลิกรวมน้อยที่สุด แต่ให้ปริมาณร้อยละการกำจัดอนุมูลอิสระได้สูงอาจเนื่องมาจากปิโตรเลียม

อีเทอร์สามารถละลายสารพฤกษเคมีในกลุ่มแคโรทีนอยด์ เบต้าแคโรทีน และวิตามินที่ละลายในไขมันได้ดี [13] ซึ่งเป็นสารต้านอนุมูลอิสระธรรมชาติที่สามารถพบได้ในใบพืชทั่วไป จึงเป็นผลให้สารสกัดที่สกัดด้วยปิโตรเลียมอีเทอร์ให้ปริมาณการกำจัดอนุมูลอิสระสูง

ตารางที่ 3 ปริมาณร้อยละการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH จากใบมะม่วง ใบฝรั่ง และใบสับปะรด ที่สกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ 3 ชนิดคือ เอทานอล (EtOH) อะซิโตน (AC) และปิโตรเลียมอีเทอร์ (PE)

สารสกัด	ตัวทำละลาย	ปริมาณร้อยละการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH[1]
ใบมะม่วง	EtOH	32.67 ± 2.97
	AC	21.78 ± 8.24
	PE	31.46 ± 1.14
ใบฝรั่ง	EtOH	31.68 ± 8.07
	AC	39.60 ± 7.47
	PE	40.43 ± 4.05
ใบสับปะรด	EtOH	75.25 ± 3.67
	AC	71.29 ± 6.19
	PE	69.66 ± 2.23

[1] ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Average ± S.D.), n = 3

4. สรุป

จากการศึกษาองค์ประกอบทางพฤกษเคมีและความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระของใบพืชไม้ผลเขตร้อน ได้แก่ ใบมะม่วง ใบฝรั่ง และใบสับปะรด สามารถสรุปได้ว่าใบสับปะรดที่สกัดด้วยเอทานอลและอะซิโตนให้จำนวนสารพฤกษเคมีได้มากที่สุด โดยพบสเตอรอยด์ แอลคาลอยด์ เทอร์พีนอยด์ ฟลาโวนอยด์ และแทนนิน นอกจากนั้นสารสกัดจากใบสับปะรดที่สกัดด้วยเอทานอลให้ปริมาณสารประกอบ ฟีนอลิกรวมสูงที่สุด และให้ปริมาณร้อยละการกำจัดอนุมูลอิสระสูงที่สุดด้วย ซึ่งนอกจากนั้นจะเห็นได้ว่าสามารถประยุกต์นำสารสกัดจากใบมะม่วง ใบฝรั่ง และใบสับปะรดมาใช้เป็นสารกำจัดอนุมูลอิสระในอาหารและเครื่องสำอางได้

เอกสารอ้างอิง

[1] S. Hassanpour, N. Maheri-Sis, B. Eshratkhan, and F.Baghbani, "Plants and secondary metabolites (Tannins): A review," *International Journal of Forest, Soil and Erosion*, vol. 1, no. 1, pp. 47-53, 2011.

[2] S.D. Muthukrishnan and A. Subramaniyan, "Phytochemical Constituents of Gloriosa superba Seed, Tuber and Leaves," *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*, vol. 3, no. 3, pp. 111-117, 2012.

[3] D. Beer, E. Joubert, W.C.A. Gelderblom, and M. Manley, "Phenolic compounds: A review of their possible role as in vivo antioxidants of wine," *South African Journal of Enology and Viticulture*, vol. 23, no. 2, pp. 48-61, 2002.

[4] F. Pourmorad, S.J. Hosseinimehr, and N. Shahabimajd, "Antioxidant activity, phenol and flavonoid contents of some selected Iranian medicinal plants," *African Journal of Biotechnology*, vol. 5, no. 11, pp. 1142-1145, 2006.

[5] G.N. Sharma, S.K. Dubey, N. Sati, and J. Sanadya, "Anti-inflammatory activity and total phavonoid content of Aegle marmelos seeds," *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Drug Research*, vol. 3, no. 3, pp. 214-218, 2011.

[6] L.A. Pham-Huy, H. He, and D. Pham-Huy, "Free radicals, antioxidants in disease and health," *International Journal of Biomedical Science*, vol. 4, no. 2, pp. 89-96, 2008.

[7] B. Halliwell, R. Aeschbach, J. Löliger, and O.I. Aruoma, "The characterization of antioxidants," *Food Chemistry and Toxicology*, vol. 33, pp. 601-617, 1995.

[8] S.I. Abdelrahim, A.Z. Almagboul, M.E.A. Omer,

A. Elegami, "Antimicrobial activity of *Psidium guajava* L.," Fitoterapia, vol. 73, pp. 713-715, 2002.

[9] D. Dahiru, A.R. Malgwi, and H.S. Sambo, "Growth Inhibitory Effect of Senna siamea Leaf Extracts on Selected Microorganisms," *American Journal of Medicine and Medical Sciences*, vol. 3, no. 5, pp.103-107, 2013.

[10] Maobe A.G., E. Gatebe, L. Gitu, and H. Rotich, "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*, vol. 5, no. 1, pp. 01-06, 2013.

[11] R.K. Obi, F.C. Nwanebu, U.U. Ndubuisi-Nnaji, L.N. Onuoha, and N. Chiegboka," Ethanolic Extraction and Phytochemical Screening of Two Nigerian Herbs on Pathogens Isolate from Wound Infections," *Pharmacie Globale (IJCP)*, vol. 10, no. 2, pp. 1-5, 2011.

[12] C. Reichardt and T. Welton, Solvents and Solvent Effects in Organic Chemistry, Wiley-VCH, Weinheim, 2011.

[13] R.R. Mendonca-Filho, *Bioactive Phyto-compounds: New Approaches in the Phytosciences*, Modern Phytomedicine. Turning Medicinal Plants into Drugs, Ahman, I., Aqil, F. and Owais, M. (Ed.), 2012.

[14] M. Pinelo, M. Lara, J.S. Maria, and C.N. Maria, "Solvent effect on quercetin antioxidant capacity," *Food Chemistry*, vol. 88, no. 2, pp. 201-207, 2004.

[15] N. Paixao, R. Perestrelo, J.C. Marques, and J.S. Camara, "Relationship between antioxidant capacity and total phenolic content of red, rose´ and white wines," *Food Chemistry*, vol. 105, pp. 204-214, 2007.

[16] P. Pietta, "Flavonoids as antioxidants," *Journal of Natural Product*, vol. 63, pp. 1035-1042, 2000.