ฤทธิ์การต้านอนุมูลและการหาปริมาณหมู่ฟีนอลในผลสดและเมล็ดมะขามป้อมอบแห้ง ใบหว้าสด และใบแก่ต้นหูกวาง

(Antioxidant Activities and Phenolic Contents of Malacea Fruits and Dried Seeds, Jambolan Plum Leaves and Bengal Almond Dried Leaves)

โดย...พรเทียน เปรมโกรสร
ภาควิชาวิทยาศาสตร์พื้นฐาน คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

บทความวิจัย
วิทยาศาสตร์

บทคัดย่อ

สารสกัดจากผลสดมะขามป้อม เมล็ดมะขามป้อมอบแห้ง (Phyllanthus emblica Linn. fruits and seeds) ใบหว้าสด (Syzygium cumini (L.) Skeels leaves) และใบแก่ต้นหูกวาง (Terminalia catappa Linn. leaves) ถูกนำมาศึกษาศักยภาพในฤทธิ์เป็นสารต้านอนุมูล (antioxidant activity) โดยอาศัยการฟอกสีสารละลายอนุมูล DPPH$^{\bullet}$ (2,2-Diphenyl -1-picryhydrazyl radical) และวัดค่าการดูดกลืนแสง (absorbance) ที่ลดลงที่ความยาวคลื่น 515 nm พบว่าฤทธิ์การต้านอนุมูลของผลสดมะขามป้อมมีค่าสูงสุด (EC_{50} = 24.00 μg / mL รองลงมาได้แก่ ใบหว้าสด ใบแก่ต้นหูกวาง และเมล็ดมะขามป้อมอบแห้ง (EC_{50} = 58.18, 82.30 และ 359.60 μg / mL ตามลำดับ) นอกจากนี้ยังได้ทำการวิเคราะห์หาปริมาณหมู่ฟีนอลโดยใช้ Folin -Ciocalteu reagent โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 nm และรายงานผลในรูปค่า GAE (gallic acid equivalent, mg gallic acid / 100 mg, sample) พบว่าค่า GAE ของสารสกัดจากผลสดมะขามป้อม ใบแก่ต้นหูกวาง ใบหว้าสด และเมล็ดมะขามป้อมอบแห้งมีค่าเท่ากับ 5.64, 2.56, 2.39 และ 0.32 mg, gallic acid / 100 mg, sample ตามลำดับ

Abstract

The study aims to evaluate antioxidant activities of fruits and dried seeds of Malacea (Phyllanthus emblica Linn. leaves and dried seeds), Jambolan Plum leaves (Syzygium cumini (L.) Skeels) and dried Bengal Almond leaves (Terminalia catappa Linn.) using DPPH (2,2-Diphenyl-1-picryhydrazyl radical) assay and observed absorbance beached of a solution at 515 nm. The Malacea fruits found the highest antioxidant activity (EC_{50} = 24.00 μg / mL). The EC_{50} of Jambolan Plum leaves, dried Bengal Almond leaves and dried Malacea seeds is 58.18, 82.30 and 359.60 μg/mL, respectively. The phenol groups determination used by Folin-Ciocalteu reagent and observed absorbance at 765 nm. Their values reported in term of GAE (gallic acid equivalent, mg gallic acid / 100 mg, sample), the Malacea fruits, dried Bengal Almond leaves, Jambolan Plum leaves and dried Malacea seeds equals 5.64, 2.56, 2.39 and 0.32 mg, gallic acid / 100 mg, sample, respectively.

บทนำ

จนกระทั่งถึงปัจจุบันประเทศไทยมีพืช ผัก ผลไม้มากมายหลายชนิด คนไทยได้นำพืชผักผลไม้ทั้งที่รับประทานได้และรับประทานไม่ได้มาใช้ประโยชน์เป็นจำนวนมาก พืชบางชนิดยังใช้เป็นสมุนไพรในการรักษาโรคต่างๆ ได้อีกด้วย เช่น มีการศึกษาในต่างประเทศพบว่า สารสกัดจากมะขามป้อม (*Phyllanthus emblica* Linn.) ใช้เป็นสารป้องกันตับถูกทำลายโดยการกระตุ้นของแอลกอฮอล์และยาพาราเซตามอล[1] สารสกัดจากใบและเมล็ดหว้า (*Syzygium cumini* (L.) Skeels leaves and seeds) มีฤทธิ์ลดระดับน้ำตาลในเลือด (antihyperglycemic effect) โดยเฉพาะใบหว้ามีการชงเป็นชาเพื่อดื่มและรักษาโรคเบาหวานได้หลายชนิด[2]

สารสกัดจากผลต้นหูกวาง (*Terminalia catappa* Linn. (combretaceae) fruits) มีฤทธิ์ลดระดับน้ำตาลในเลือด[3] มีฤทธิ์ต่อต้านจุลชีพ (antimicrobial activity)[4] มีฤทธิ์กระตุ้นความต้องการทางเพศของหนูทดลอง (aphrodisiac action)[5] เป็นต้น สารเคมีที่มีอยู่ในพืชแต่ละชนิดมีอยู่มากมายนับร้อยชนิดและสารเคมีแต่ละชนิดก็จะออกฤทธิ์กับร่างกายในสิ่งมีชีวิตที่แตกต่างกัน ในงานวิจัยนี้เราให้ความสนใจในพืชทั้งสามชนิดในอีกแง่มุมหนึ่ง คือ ฤทธิ์ต่อต้านอนุมูล (antioxidant activity) เนื่องจากอนุมูล (radical) เป็นอนุภาคที่ร่างกายคนเราสร้างขึ้นมาได้หลายทาง เช่น ในขบวนการสร้างพลังงานในไมโตคอนเดรียโดยขบวนการที่อาศัยออกซิเจนที่เรียกว่า *"ออกซิเดเตทีฟ ฟอสฟอริเรชัน"* (oxidative phosphorylation) จะทำให้เกิดผลพลอยได้อนุมูลของออกซิเจน (reactive oxygen species, ROS) คือ ซูปเปอร์ออกไซด์ แอนไอออน (superoxide anion, $O_2^{\bullet -}$) และอนุมูลไฮดรอกซิล (hydroxyl radical, $HO^{\bullet}$)[6] อนุมูลที่เกิดขึ้นในร่างกาย (เช่น $HO^{\bullet}$) สามารถทำลาย DNA[7] ทำให้เกิดออกซิเดชันของโปรตีน (protein oxidation)[8] กระตุ้นให้เกิด lipid peroxidation[9] ทำให้เกิดโรคต่างๆ เช่น มะเร็ง (cancer), Parkinson's disease, Alzheimer's disease, โรคเกี่ยวกับหลอดเลือดและหัวใจ (cardiovascular disease)[10] ในสภาวะปกติร่างกายจะรักษาระดับอนุมูลให้อยู่ในสภาวะที่เหมาะสม แต่ในบางสภาวะร่างกายมีการสร้างอนุมูลขึ้นมามากเกินไป ทำให้เกิดความไม่สมดุล (imbalance) ระหว่างสารต้านอนุมูลและสารอนุมูล ซึ่งก่อให้เกิดภาวะจากออกซิเดชันมาก (oxidative stress) จึงนำไปสู่การเกิดโรคต่างๆ ดังที่กล่าวมาข้างต้น

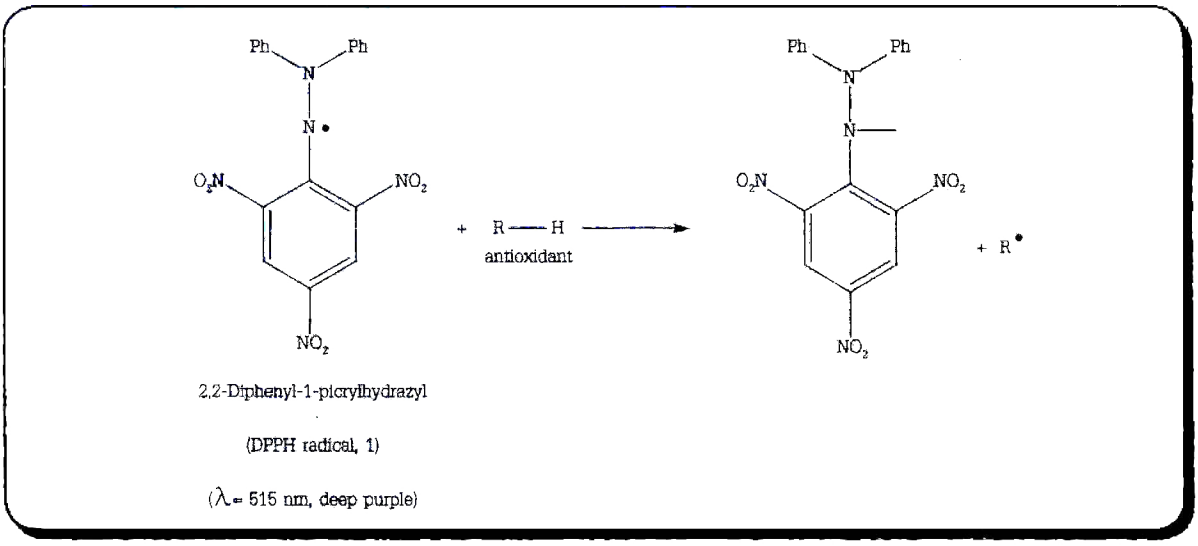
Frei, B.[11] ได้ทำการศึกษาการป้องกันโรคมะเร็งและโรคเกี่ยวกับหัวใจและหลอดเลือด โดยให้กลุ่มทดสอบได้รับสารอาหารเสริมที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูล (antioxidant supplements) พบว่าสามารถช่วยขจัดอนุมูลและสามารถช่วยให้ร่างกายป้องกันโรคต่าง ๆ ได้ โดยที่อาหารเสริมเหล่านั้นไม่มีผลข้างเคียงที่รุนแรงต่อร่างกายและมีความเป็นพิษต่อร่างกายน้อยมาก

ในผักพื้นบ้านของไทยที่พบฤทธิ์สารต้านอนุมูลค่อนข้างสูง ได้แก่ หญ้าหวาน ผักเชียงดา ชะพลู หม่อน ไพล[12] เนียมหูเสือ ผักติ้วแดง ผักติ้วขาว ผักเม็ก เป็นต้น[13] องค์ประกอบภายในที่เป็นสารสำคัญที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลที่พบในพืชหลายชนิด เช่น วิตามินซี (vitamin C หรือ ascorbic acid) พบในผลไม้ที่มีรสเปรี้ยว, วิตามินอี (α-tocopherol) พบในข้าวโพด เมล็ดฝ้าย ดอกคำฝอย ถั่วเหลือง และน้ำมันรำข้าว, β-carotene พบในข้าวโพด น้ำผลไม้คั้น แครอท ไข่แดง เนย และนม ในผักพื้นเมืองพบในย่านาง ตำลึง ผักแพ้ว ยอดแค เป็นต้น ซึ่งมีฤทธิ์ป้องกัน / ลดอัตราเสี่ยงของการเกิดโรคมะเร็ง, caffeic acid และ chlorogenic acid พบในชา กาแฟ,[13] สารกลุ่ม polyphenol ได้แก่ catechin, epigallocatechin gallate (EGCG) พบในใบชา, anthocyanins[14] พบในข้าวเหนียวดำ ถั่วดำ เป็นต้น สารสำคัญที่พบในพืชเหล่านี้มีฤทธิ์ต้านอนุมูลได้ (antioxidant) และในการทดสอบในห้องปฏิบัติการจะอาศัยสมการที่ 1 ดังนี้

$$\underset{\text{radical}}{R^{\bullet}} + \underset{\text{antioxdant}}{R_1\text{—}H} \longrightarrow R\text{—}H^{\bullet +} + R_1 \qquad \ldots(1)$$

ผลการทดลองและการวิเคราะห์การหาค่า EC_{50} ของผลมะขามป้อม และเมล็ดมะขามป้อมอบแห้ง ใบหว้าสด และใบแก่ต้นหูกวาง

ในการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจะใช้สารละลายอนุมูลของ DPPH (2,2-Diphenyl-1-picryhydrazyl radical, 1) ทำปฏิกิริยากับสารต้านอนุมูล (antioxidant) ในสารสกัด ปฏิกิริยาเกิดขึ้นดังสมการ 2 โดยนำตัวอย่างผลสดมะขามป้อม เมล็ดมะขามป้อมอบแห้ง ใบหว้าสด และใบแก่ต้นหูกวางมาบดแล้วชั่งน้ำหนักที่แน่นอน ใช้ 80%, MeOH (aq) เป็นตัวทำละลายเพื่อสกัดสารออกฤทธิ์ออกจากพืชดังกล่าว นำสารสกัดที่ได้ไปเตรียมความเข้มข้นที่เหมาะสมต่างๆ จำนวน 5 ชุด จากนั้นนำสารละลายที่ความเข้มข้นต่างๆ มาผสมกับสารละลาย DPPH ด้วยอัตราส่วน 1 : 1 ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง (25-28 °C) นาน 30 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ลดลง (ที่ 515 nm) ด้วยเครื่อง Spectrophotometer (Spectronic 20+) บันทึกค่าการดูดกลืนแสง (A_{30}) (สารตัวอย่างแต่ละความเข้มข้นจะทำการทดลอง 3 ครั้งแล้วนำมาหาค่าเฉลี่ย)



...(2)

นำสารละลายอนุมูล $DPPH^{\bullet}$ ผสมกับ 80% MeOH (aq) ด้วยอัตราส่วน 1 : 1 นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงเริ่มต้น บันทึกค่าเป็น Ac (control) นำค่าที่ได้คำนวณหา % antioxidant activity (%AA) ดังสมการ 3 เขียนกราฟระหว่างความเข้มข้นรวม (total concentration of sample) กับ %AA คำนวณหาค่า EC_{50} (50%, effective concentration) จากสมการเส้นตรงที่ได้

$$\%AA = \left(\frac{A_c - A_{30}}{A_c} \right) \times 100 \qquad ...(3)$$

ผลการทดลองได้แสดงไว้ในตารางที่ 1 (ในการทดลองนี้เราใช้ ascorbic acid เป็นสารอ้างอิงในการเปรียบเทียบ) ส่วนการหาปริมาณหมู่ฟีนอลจะใช้ Folin – Ciocalteu reagent[15] ในการทดสอบโดยใช้ gallic acid เป็นสารมาตรฐาน แล้วรายงานในรูป GAE (gallic acid equivalent, mg gallic acid / 100 mg sample) ดังตารางที่ 1

ตาราง 1

แสดงค่า EC_{50} โดย DPPH assay และค่า GAE ด้วย Folin – Ciocalteu reagent ของสารสกัดจากพืช 3 ชนิด

ตัวอย่าง	EC_{50} [a]	GAE [b]	% ความชื้น [c]
ผลสดมะขามป้อม	24.00	5.64	-
เมล็ดมะขามป้อมอบแห้ง	359.60	0.32	79
ใบหว้าสด	58.18	2.39	74
ใบแก่ต้นหูกวาง	82.30	2.56	46
Ascorbic acid	1.96	-	-

[a] ในเทอมของ μg / mL

[b] ในเทอมของ mg, gallic acid / 100 mg, sample

[c] ได้จากการอบสารตัวอย่างที่ 90 – 100 °C นาน 6 ชม. จนกระทั่งน้ำหนักคงที่ (ดูวิธีการทดลอง)

ในการทดลองเราใช้ 80% MeOH (aq) เป็นตัวทำละลาย ซึ่งเชื่อว่าจะสกัดสารต้านอนุมูลที่ละลายในตัวทำละลายอินทรีย์ (MeOH) และตัวทำละลายอนินทรีย์ (H_2O) ออกมาได้ และค่าฤทธิ์ต้านอนุมูลที่ได้น่าจะเป็นค่ารวมทั้งหมดของสารออกฤทธิ์ จากตารางที่ 1 จะเห็นว่าสารสกัดจากผลสดมะขามป้อมมีฤทธิ์ต้านอนุมูลสูงที่สุด รองลงมา ได้แก่ ใบหว้าสด ใบแก่ต้นหูกวาง และเมล็ดมะขามป้อมอบแห้ง ตามลำดับ จะเห็นได้ว่าแม้ว่าสารสกัดจากผลสดมะขามป้อมมีความแรงน้อยกว่าสารอ้างอิง ascorbic acid ประมาณ 12 เท่า แต่ยังถือว่ามีค่าค่อนข้างสูงและเนื่องจากผลสดมะขามป้อมมีรสเปรี้ยวซึ่งมีวิตามินซีอยู่ในปริมาณสูง[13] และอาจเชื่อว่ามีสารต้านอนุมูลกลุ่มอื่นรวมอยู่ด้วย ส่วนใบหว้าสด และใบแก่ต้นหูกวางก็มีฤทธิ์ต้านอนุมูลในระดับปานกลาง ส่วนเมล็ดมะขามป้อมอบแห้งมีฤทธิ์ต้านอนุมูลต่ำที่สุด ซึ่งอาจเกิดจากสารต้านอนุมูลถูกความร้อนทำให้เกิดการสลายตัวไปบางส่วน

จากการวิเคราะห์หาปริมาณหมู่ฟีนอลด้วย Folin – Ciocalteu reagent[15] พบว่าผลสดมะขามป้อมมีค่า GAE สูงสุด ส่วนใบแก่ต้นหูกวางและใบหว้าสดมีค่าใกล้เคียงกัน และเมล็ดมะขามป้อมอบแห้งมีค่ามีค่า GAE ต่ำที่สุด หากพิจารณาฤทธิ์การต้านอนุมูล (EC_{50}) กับค่าปริมาณหมู่ฟีนอล (GAE) ของสารสกัดจากผลสดมะขามป้อม พบว่าจะมีค่าที่สอดคล้องกัน กล่าวคือ ค่า GAE มีค่าสูงจะแสดงฤทธิ์การต้านอนุมูลสูงตามไปด้วย ในขณะที่ค่า GAE ของใบหว้าสดและใบแก่ต้นหูกวางมีค่าใกล้เคียงกันแต่ฤทธิ์การต้านอนุมูลของใบหว้าสดกลับมีฤทธิ์ที่แรงกว่า (EC_{50} ต่ำกว่า) ของใบแก่ต้นหูกวาง ทั้งนี้เชื่อว่าเป็นผลจากสารต้านอนุมูลจำพวก nonphenolic ในใบหว้าสดมีปริมาณมากและแสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลกับสารละลายอนุมูล $DPPH^{\bullet}$ ได้ดีกว่าของใบแก่ต้นหูกวาง อย่างไรก็ตาม ในพืชมีสารเคมีมากมายหลายชนิด และสารเคมีแต่ละชนิดก็มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลได้แตกต่างกัน ในการแยก และพิสูจน์เอกลักษณ์สารแต่ละชนิดในรูปสารบริสุทธิ์ก็เป็นงานอีกขั้นตอนหนึ่งที่ควรได้รับการศึกษาค้นคว้าในลำดับถัดไป

อุปกรณ์และสารเคมี

DPPH (2,2-Diphenyl-1-picryhydrazyl radical, assay 90%) จาก Sigma Chemical Co.) MeOH (เกรดอุตสาหกรรม นำมากลั่นที่ 66 – 67 °C ก่อนนำไปใช้), น้ำกลั่น, Folin – Ciocalteu reagent และ Gallic Acid (จาก Fluka Chemical), Sodium Carbonate (จาก Reidel – dettaën) ascorbic acid (จาก Polskie Odczynnki Chemiczne S.A.), Spectronic20+, ตู้อบ, ใบหว้า, มะขามป้อม และใบแก่ต้นหูกวาง (เก็บในช่วงเดือน มค.-กพ.)

วิธีการทดลอง

1. การเตรียมสารสกัด

นำสารตัวอย่างมาบดด้วยโกร่งให้ละเอียด ชั่งสารตัวอย่าง 1.000 g เติม 80%, MeOH (aq) 20 mL นำของผสมไปคนให้เข้ากันที่อุณหภูมิห้อง (25-28 °C) ประมาณ 20 - 30 นาที กรองผ่านกระดาษกรอง (Whatman No.1001 110) ล้างตะกอนด้วย 80%, MeOH (aq) ปรับปริมาตรเป็น 25 mL จะได้ stock solution ความเข้มข้นประมาณ 40,000 μg / mL ทำการทดลองเช่นเดิม โดยเปลี่ยนเป็นสารตัวอย่างอื่น (กรณีเมล็ดมะขามป้อมให้นำไปอบที่ 90 - 100 °C นาน 2-3 ชม. แล้วจึงบดเพื่อทดลองต่อไป)

2. การหา % ความชื้น

นำสารตัวอย่างมาชั่ง จดน้ำหนักที่แน่นอนไว้ จากนั้นนำสารตัวอย่างไปอบที่ 90 – 100 °C นาน 6 ชม. จนกระทั่งน้ำหนักคงที่ นำมาชั่งและจดน้ำหนักที่แน่นอนอีกครั้ง คำนวณหา % ความชื้นจาก

$$\%\text{ความชื้น} = \frac{\text{น้ำหนักสารตัวอย่างที่หายไป} \times 100}{\text{น้ำหนักสารตัวอย่างก่อนอบ}}$$

% ความชื้นของใบแก่ต้นหูกวาง ใบหว้าสด และผลสดมะขามป้อมเท่ากับ 46, 74, 79 %ตามลำดับ

3. การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลกับสารละลายอนุมูล DPPH•

เจือจางสารตัวอย่าง stock solution ให้มีความเข้มข้นที่เหมาะสมหลาย ๆ ความเข้มข้น ปิเปตสารสกัดแต่ละความเข้มข้นเท่ากับ 2.0 mL รวมกับ 200 μM, DPPH จำนวน 2.0 mL ลงในหลอดทดลอง จำนวน 3 ชุด (ใช้ 80% MeOH (aq) เป็น blank และใช้สารละลายอนุมูล DPPH• : MeOH (aq) อัตราส่วน 1 : 1 เป็นสารละลายควบคุม, Ac) ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง (25-28 °C) นาน 30 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 515 nm นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาหาค่าเฉลี่ย นำไปคำนวณหา %AA ตามสมการ 3 เขียนกราฟระว่าง %AA กับความเข้มข้นรวมของสารตัวอย่าง (μg / mL) คำนวณหา EC_{50} จากสมการเส้นตรงที่ได้ จากนั้นทำการทดลองเช่นเดิมกับสารตัวอย่าง stock solution อื่น ในการทดลองจะใช้ ascorbic acid เป็นสารอ้างอิง

4. การหาปริมาณหมู่ฟีนอล

ปิเปตสารสกัดความเข้มข้นที่เหมาะสม 2.0 mL ลงในหลอดทดลองตามด้วย Folin – Ciocalteu reagent, น้ำกลั่น และ 7.5% (w/v) Na_2CO_3 อย่างละ 0.4, 3.6 และ 4.0 mL ตามลำดับ ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 1 ชม. กรองสารละลายด้วย microfibre filter glass (Whatman Cat. No. 1822 090) นำสารละลายไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 765 nm คำนวณหาค่า GAE โดยสร้าง calibration curve จากสารมาตรฐาน gallic acid

สรุป

ในงานชิ้นนี้สารสกัดจากพืชสามชนิดถูกนำมาทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลด้วย DPPH assay พบว่าฤทธิ์การต้านอนุมูลสามารถเรียงลำดับความแรงจากมากไปน้อยได้ ดังนี้ ผลสดมะขามป้อม > ใบหว้าสด > ใบแก่ต้นหูกวาง > เมล็ดมะขามป้อมอบแห้ง พร้อมกันนี้ได้ทำการหาปริมาณหมู่ฟีนอลด้วย Folin – Ciocalteu reagent และรายงานในเทอมของ GAE ซึ่งสามารถเรียงลำดับจากค่ามากไปน้อยได้ คือ ผลมะขามป้อม > ใบแก่ต้นหูกวาง > ใบหว้าสด > เมล็ดมะขามป้อมอบแห้ง

ในผลสดมะขามป้อมมีค่าฤทธิ์ต้านอนุมูลค่อนข้างสูงเมื่อเทียบกับตัวอย่างอื่น จึงน่าสนใจในการศึกษาวิเคราะห์หาสารออกฤทธิ์สำคัญในระดับสูงต่อไป ส่วนเมล็ดมะขามป้อมอบแห้งนั้น มีค่าฤทธิ์ต้านอนุมูลค่อนข้างต่ำ ทั้งนี้อาจเป็นเพราะมีสารออกฤทธิ์สำคัญอยู่น้อยและ/หรือ สารเหล่านั้นอาจถูกทำลายบางส่วนในขั้นตอนที่ถูกความร้อน...

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอขอบคุณ ผศ.บรรเทิง ศิลป์สกุลสุข เป็นอย่างสูง ที่ให้คำแนะนำที่มีประโยชน์และให้การสนับสนุนการทำงานของข้าพเจ้าเป็นอย่างดี

References

1. Gulati, R.K., Agarwal, S. and Agrawal, S.S. (1995). Hepatoprotective studies on *Phyllanthus emblica* Linn. and quercetin. *Indian J. Exp. Biol.*, 33, 261.
2. (a) Teixeira, C.C., Pino, L.P., Kessler, F.H., Knijnik, L. Pinco, C.P., Gastaldo, G.J. and Fuchs, F.D. (1997). The effect of *Syzygium cumini* (L.) skeels on post-prandial blood glucose levels in non-diabetic rats and rats with streptozotocin-induced diabetes mellitus. *J. Ethnopharmacol*, 56, 209.
   (b) Teixeira, C.C., Rava, C.A., Mallman da Silva, P., Melchior, R., Argenta, R., Anselmi, F., Almeida, C.R. and Fuchs, F.D. (2000). Absence of antihyperglycemic effect of jambolan in experimental and clinical models. *J. Ethnopharmacol*, 71, 343.
   (c) Teixeira, C.C., Fuchs, F.D., Weinert, L.S. and Esteves, J. (2006). The efficacy of folk medicines in the management of type 2 diabetes mellitus: results of a randomized controlled trial of *Syzygium cumini* (L.) Skeels. *J. Clin. Pharm. Ther.*, 31, 1.
3. Nagappa, A.N., Thakurdesai, P.A., Venkat Rao, N. and Singh, J. (2003). Antidiabetic activity of *Terminalia catappa* Linn. Fruits. J. Ethnopharmacol, 88, 45.
4. Pawar, S.P. and Pal, S.C. (2002). Antimicrobial activity of extracts of *Terminalia catappa* root. *Indian J. Med. Sci.* 56, 276.
5. Ratnasooriya, W.D. and Dharmasiri, M.G. (2000). Effects of *Terminalia catappa* seeds on sexual behaviour and fertility of male rats, *Asian J. Androl.*, 2, 213.
6. Gutteridge, J.M.C. and Halliwell, B. (1994). Antioxidants in nutrition, health, and disease. Oxford: Oxford University Press.
7. D'Odorico, A., Bortolan, S., Cardin, R., D'Inca, R., Martines, D., Ferronato, A., and Sturniolo, G.C. (2001). Reduced plasma antioxidant concentrations and increased oxidative DNA damage in inflammatory bowel disease. *Scand. J. Gastroenterol*, 36, 1287.
8. Mat, J.M. and Blance, M. (2000). Chemical and biological activity of fre radical scavengers' in allergic disease. *Clin. Chim. Acta.*, 296, 1.
9. Stohs, S.J. (1995). The role of free radicals in toxicity and disease. *J. Basic Clin. Physiol Pharmacol.*, 6, 205.
10. Giasson, B. I., Ischiropoulos, H., Lee, V. M. Y. and Trojanowski, J. Q. (2002). The relationship between oxidative/nitrosative stress and pathological inclusions in Alzheimer's and Parkinson's diseases. *Free Radical Biology* and *Medicine*, 32, 1264.
11. Frei, B. (1994). Natural antioxidants in human health and disease. San Diego: Academic Press.
12. นวลศรี รักอริยะธรรม และอัญชนา เจริญสุข. (2545) แอนติออกซิแดนท์: สารต้านมะเร็งในผัก – สมุนไพรไทย. เชียงใหม่: นพบุรีการพิมพ์.
13. ปวีณา ช่วงทิพย์. (2546). ฤทธิ์กำจัดอนุมูลอิสระและต้านออกซิเดชันของพืชผักพื้นบ้าน. [วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต] มหาวิทยาลัยขอนแก่น.
14. วันดี กฤษณพันธ์. (2539). สมุนไพรสารพัดประโยชน์. คณะเภสัชศาสตร์. มหาวิทยาลัยมหิดล.
15. (a) Mongkolsilp, S., Pongbupakit, I., Sae-Lee, N. and Sitthithaworn, W. (2004). Radical scavening activity and total phenolic content of medicinal plants used in primary health care. *S.W.U. J. Pharm. Sci.*, 9, 32.
   (b) Lee, K.W., Kim, Y. J., Lee, H. J. and Lee, C. Y., (2003). Cocoa has more phenolic phytochemicals and a higher antioxidant capacity than teas and red wine. *J. Agric. Food Chem.*, 51, 7292.
   (c) Singh, D.K., Srivastava, B. and Sahu, A. (2003). Spectrophotometric determination of ajmalin and brucine by Folin – Ciocalteu's reagent. *J. Serb. Chem. Soc.*, 68, 685.