

การใช้คลื่นอัลตราโซนิกเสริมในการสกัดสารประกอบฟีนอลิกจากใบหญ้าปักไหม และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

พรพรรณ สิริมนต์^{1*} และ ธิติมา วงษ์ศิริ²

¹ศูนย์บริการทางการศึกษา มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี (ราชบุรี) จ.ราชบุรี 70150

²สำนักวิจัยและบริการวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี จ.ทท. 10140

บทคัดย่อ

การศึกษาผลของการใช้คลื่นอัลตราโซนิกร่วมกับตัวทำละลายเอทานอลในการสกัดแยกสารในกลุ่มฟีนอลิกจากใบหญ้าปักไหม ได้ศึกษา 3 ปัจจัยหลักที่มีผลต่อการสกัด ได้แก่ ความเข้มข้นของตัวทำละลายเอทานอล อุณหภูมิ และระยะเวลาในการสกัด จากผลการศึกษาพบว่า สภาวะที่เหมาะสมในการสกัดสารประกอบฟีนอลิกจากใบหญ้าปักไหมโดยใช้คลื่นอัลตราโซนิกร่วมในการสกัด คือ การสกัดโดยใช้ตัวทำละลายเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 70 โดยปริมาตร ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที ที่สภาวะนี้ให้เปอร์เซ็นต์ผลผลิตของสารสกัดร้อยละ 19.87 ของน้ำหนักแห้ง ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดที่สกัดได้เท่ากับ 129.89 ไมโครกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อกรัมของน้ำหนักตัวอย่างแห้ง เมื่อทดสอบฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบที่ได้จากสภาวะการสกัดที่เหมาะสมนี้ พบว่ามีประสิทธิภาพในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระค่อนข้างสูง โดยมีความเข้มข้นที่กำจัดอนุมูลอิสระได้ร้อยละ 50 (IC₅₀) จากวิธี DPPH เท่ากับ 2.16 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และจากวิธี ABTS เท่ากับ 2.14 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เทียบกับน้ำหนักสารสกัดหยาบ

คำสำคัญ: ฤทธิ์กำจัดอนุมูลอิสระ หญ้าปักไหม ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด และการสกัดด้วยอัลตราโซนิก

*ผู้เขียนให้ติดต่อ: E-mail: siramon_p@hotmail.com

Ultrasonic-assisted extraction of phenolic compounds from *Paederia pilifera* Hook. f. leaves and its antioxidant activity

Pornpun Siramon^{1*} and Thitima Wongsheeree²

¹King Mongkut's University of Technology Thonburi (Ratchaburi Campus), Ratchaburi 70150, Thailand

²Institute for Scientific and Technological Research and Services, King Mongkut's University of Technology Thonburi, Bangkok 10140, Thailand

Abstract

Effect of ultrasonic-assisted extraction of phenolic compounds from *Paederia pilifera* Hook. f. leaves was investigated. In the extraction process, 3 main parameters: ethanol concentration, extraction temperature and extraction time were used to determine the optimal extraction condition of phenolic compounds from the sample. It was found that the extraction of sample with 70% (v/v) ethanol at 50 °C for 60 minutes gave the highest total phenolic content (129.89 µg GAE/g). The antioxidant activities of crude extract from the optimal extraction condition was further investigated by 2 radical scavenging assays namely, the 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) and 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) (ABTS). The results revealed that the crude extract exhibited relatively high antioxidant activities with IC₅₀ values of 2.16 mg/ml by DPPH, and 2.14 mg/ml by ABTS methods, respectively.

Keywords: Free radical scavenging activity, *Paederia pilifera* Hook. f., Total phenolic content and Ultrasonic extraction

*Corresponding author: E-mail: siramon_p@hotmail.com

บทนำ

สารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) ได้รับความสนใจ และมีบทบาทสำคัญมากขึ้นในปัจจุบัน เนื่องจากมีคุณสมบัติในการช่วยปกป้องเซลล์ที่ถูกทำลายหรือได้รับความเสียหายจากอนุมูลอิสระ (free radical) ซึ่งอนุมูลอิสระนี้เป็นปัจจัยเสี่ยงนำไปสู่การเกิดโรคร้ายแรงที่เป็นสาเหตุสำคัญของการเสียชีวิตในมนุษย์ เช่น โรคมะเร็ง เนื่องจาก ความดันโลหิตสูง โรคหลอดเลือดในสมอง และโรคหัวใจ (Manok and Limcharoen, 2015) สารต้านอนุมูลอิสระที่มีมาจาก 2 แหล่ง ได้แก่ จากการสังเคราะห์ (synthetic antioxidant) และจากธรรมชาติ (natural antioxidant) ซึ่งสารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์เกิดจากการกระบวนการสังเคราะห์ทางเคมีได้เป็นสารประกอบฟีนอลิก ได้แก่ Propyl gallate (PG), Butylated hydroxyanisole (BHA), Butylated hydroxytoluene (BHT) และ Tertiary butylhydroquinone (TBHQ) สารกลุ่มนี้ถูกนำมาใช้โดยทั่วไปในอุตสาหกรรมต่างๆ เนื่องจากมีสภาพคงตัว และมีประสิทธิภาพที่ดีกว่าสารต้านอนุมูลอิสระจากธรรมชาติโดยทั่วไป แต่สารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์ยังมีข้อจำกัดในด้านความปลอดภัยในการใช้ระยะยาวของผู้บริโภค (Phansawan, 2013) ปัจจุบันสารต้านอนุมูลอิสระจากธรรมชาติจึงได้รับความสนใจ และมีการศึกษาวิจัยเพิ่มมากขึ้นเรื่อยๆ โดยเฉพาะกลุ่มฟีนอลิก เพื่อนำมาพัฒนาใช้เป็นสารต้านอนุมูลอิสระทางเลือก ทดแทนการใช้สารสังเคราะห์ (Arruda *et al.*, 2017)

สารประกอบฟีนอลิก (Phenolic compounds) เป็นกลุ่มของสารต้านอนุมูลอิสระหลักที่พบในผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ สารประกอบกลุ่มนี้มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ดีในปัจจุบันจึงมีการนำสารประกอบกลุ่มนี้มาประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร ยา และเครื่องสำอางอย่างแพร่หลาย (Murray *et al.*, 2008) กระบวนการสกัดสารประกอบฟีนอลิกพื้นฐานที่ใช้กันโดยทั่วไป คือ การสกัดด้วยตัวทำละลาย (solvent extraction) ร่วมกับการใช้ความร้อน

และไม่ใช้ความร้อน (Chotimarkon *et al.*, 2008; Solomon *et al.*, 2014) ในปัจจุบันมีการนำคลื่นอัลตราซาวด์มาประยุกต์ใช้ร่วมกับการใช้ตัวทำละลายในการสกัดตัวอย่าง (Wongwanich and Banjong, 2016) ซึ่งวิธีการนี้ช่วยลดระยะเวลา และใช้อุณหภูมิต่ำในการสกัด เหมาะสำหรับการสกัดสารในกลุ่มที่ไม่ทนต่อความร้อน (Rodrigues and Pinto, 2007)

หญ้าพังกา มีชื่อวิทยาศาสตร์คือ *Paederia pilifera* Hook. f. อยู่ในวงศ์ RUBIACEAE มีชื่อเรียกแตกต่างกันไปตามแต่ละท้องถิ่น เช่น หญ้าตดหมา จ้าป่า หลอด ตดหมุดตดหมา เกาอ่อน (เชียงใหม่) พอกู (กะเหรี่ยง-กาญจนบุรี) เป็นวัชพืชที่พบได้ตามสวน และพื้นที่ทั่วไปของประเทศไทย ลักษณะเป็นไม้เถาเลื้อย มีขนละเอียดสีขาวปกคลุมกิ่งก้าน และลำต้น ใบเดี่ยว เรียงตรงข้ามเป็นคู่ๆ รูปไข่ค่อนข้างยาว ปลายใบแหลม หลังใบมีขนห่างๆ ท้องใบเกลี้ยง (Chuakul *et al.*, 1996) มีสรรพคุณตามตำราพื้นบ้านคือ ใช้เป็นสมุนไพรแก้ท้องอืดเพื่อ ขับลม ขับปัสสาวะ พอกแก้ปวดศีรษะ รักษาแผล ลำไส้อักเสบ ไช้อักเสบ มีรายงานวิจัยพบว่าสารสกัดจากรากของหญ้าพังกามีปริมาณสารประกอบ ฟีนอลิก และกรดแอสคอบิกสูง รวมทั้งมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูง นอกจากนี้ยังพบว่าสารสกัดนี้สามารถทำให้ผลในกระเพาะอาหารของหนูทดลองลดลงอย่างมีนัยสำคัญ (Saenphet *et al.*, 2014) จากการสืบค้นข้อมูลพบว่า รายงานวิจัยเกี่ยวกับฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของใบหญ้าพังกามีจำนวนน้อยมาก ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีความสนใจในการศึกษากระบวนการสกัดสารประกอบฟีนอลิกจากใบหญ้าพังกา โดยใช้ตัวทำละลายเอทานอลร่วมกับการใช้คลื่นอัลตราโซนิก และตรวจสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบที่ได้ด้วยวิธี 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) และวิธี 2,2'-Azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) (ABTS) และเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบกับ BHT ซึ่งเป็นสารเคมีสังเคราะห์ที่ใช้เป็นสารต้านการเกิดออกซิเดชันในอุตสาหกรรมอาหาร และเครื่องสำอาง โดยทั่วไป

วิธีดำเนินการวิจัย

1. การรวบรวมและเตรียมตัวอย่างหญ้าฟังกโหม

รวบรวมตัวอย่างหญ้าฟังกโหม จากอำเภอจอมบึง จังหวัดราชบุรี ในช่วงเดือนกุมภาพันธ์ 2560 ส่งภาพพืชตัวอย่างไปทำการตรวจสอบที่สำนักงานหอพรรณไม้ กรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่า และพันธุ์พืช ซึ่งได้รับการระบุว่าพืชตัวอย่างคือ หญ้าฟังกโหม (*Paederia pilifera* Hook. f.)

นำพืชตัวอย่างที่รวบรวมได้มาล้างให้สะอาด ตัดเอาส่วนใบให้มีขนาดเล็ก จากนั้นนำมาอบในตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส จนตัวอย่างมีน้ำหนักคงที่ (ความชื้นน้อยกว่า 10%) แล้วจึงนำมาบดด้วยเครื่องบดละเอียดสำหรับใช้ในการสกัดต่อไป

2. การหาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดสารกลุ่มฟีนอลิกจากตัวอย่าง

การศึกษาเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดสารกลุ่มฟีนอลิกจากตัวอย่าง โดยออกแบบการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Design; CRD) ศึกษาปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการทดลอง ได้แก่ ความเข้มข้นของตัวทำละลายเอทานอล อุณหภูมิ และระยะเวลาการสกัด กำหนดจำนวนการทดลอง 3 ซ้ำของการทดลอง การทดลองประกอบไปด้วย 2 ขั้นตอน คือ

2.1 การหาความเข้มข้นของตัวทำละลายเอทานอลที่เหมาะสมในการสกัดตัวอย่าง

ทำการสกัดตัวอย่างที่เตรียมได้จากข้อ 1 โดยการแช่ตัวอย่างในตัวทำละลายเอทานอลที่ 3 ระดับความเข้มข้น คือ 50% 70% และ 95% โดยปริมาตร ใช้อัตราส่วนของตัวอย่างต่อตัวทำละลายเท่ากับ 1:100 (น้ำหนัก/ปริมาตร) สกัดที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในเครื่องควบคุมอุณหภูมิเป็นเวลา 72 ชั่วโมง ทำการกรองแยกกากออก นำไประเหยด้วยเครื่องระเหยแห้งระบบสุญญากาศแบบหมุน จากนั้นหาปริมาณผลผลิตสารสกัดและตรวจวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (total phenolic content) ในสารสกัดที่ได้โดยใช้วิธี

Folin-ciocalteu reagent (Singleton and Rossi, 1965) โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ และคำนวณหาปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดจากกราฟมาตรฐานของสารละลายกรดแกลลิก (Gallic acid, Sigma-Aldrich) เพื่อหาความเข้มข้นของตัวทำละลายที่มีประสิทธิภาพมากที่สุดในการสกัดตัวอย่าง

2.2 การหาอุณหภูมิ และระยะเวลาที่เหมาะสมในการสกัดตัวอย่างโดยใช้คลื่นอัลตราโซนิค

ทำการสกัดตัวอย่างด้วยตัวทำละลายที่เหมาะสมที่ได้จากข้อ 2.1 คือ สารละลายเอทานอลความเข้มข้น ร้อยละ 70 โดยปริมาตร โดยใช้อัตราส่วนตัวอย่างต่อตัวทำละลายเท่ากับ 1:100 (น้ำหนัก/ปริมาตร) โดยทำการสกัดด้วยเครื่อง sonicator (Bandelin sonorex digitec, รุ่น DT 510H, 35 kHz, 16 W) ที่อุณหภูมิ 30 และ 50 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 30 60 และ 120 นาที จากนั้นทำการหาปริมาณผลผลิตสารสกัดและตรวจวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดที่สกัดได้จากสภาวะต่างๆ ตามวิธีการเดียวกับข้อ 2.1 เพื่อหาอุณหภูมิ และระยะเวลาที่เหมาะสมในการสกัดตัวอย่าง

3. การศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดที่ได้ในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ

ทดสอบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบที่ได้จากสภาวะการสกัดที่เหมาะสมจากข้อ 2 โดยวิธี DPPH (Siramon and Ohtani, 2007) และ ABTS (Re *et al.*, 1999) และเปรียบเทียบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระกับสารมาตรฐาน BHT

4. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

นำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of variance; ANOVA) และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยผลการทดลองด้วยวิธี Duncan's new multiple range test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป

ผลการวิจัย

1. ความเข้มข้นของตัวทำละลายเอทานอลที่เหมาะสมในการสกัดสารประกอบฟีนอลิกจากตัวอย่าง

การศึกษาเพื่อหาความเข้มข้นของตัวทำละลายเอทานอลที่เหมาะสมในการสกัดตัวอย่างหญ้าปักไหม (Fig. 1) พบว่าสารละลายเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 70 โดยปริมาตร เป็นความเข้มข้นที่มีประสิทธิภาพในการสกัดมากที่สุด ซึ่งให้ปริมาณผลผลิตการสกัดร้อยละ 20.69 ของน้ำหนักแห้ง และปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดที่สกัดได้สูงที่สุดเท่ากับ 29.66 ไมโครกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อกรัมของน้ำหนักตัวอย่างแห้ง ดังแสดงผลใน Table 1



Fig. 1 Leaves of *P. pilifera*

Table 1 Extraction yield and total phenolic contents of *P. pilifera* leaves from different solvent concentration

Ethanol concentration	% Yield ^{*,**}	Total phenolic contents (µg GAE /g) ^{*,**}
50% (v/v)	21.10±0.13 ^a	26.99±0.75 ^b
70% (v/v)	20.69±0.11 ^a	29.66±0.41 ^a
95% (v/v)	12.24±0.06 ^b	15.57±1.13 ^c

* Data were based on dry weight basis.

**Value are mean ±SD (n=3). Different superscripts in the same column indicate the significant differences (p<0.05).

2. อุณหภูมิ และระยะเวลาที่เหมาะสมในการสกัดสารประกอบฟีนอลิกจากตัวอย่าง

การศึกษาเพื่อหาอุณหภูมิ และระยะเวลาที่เหมาะสมในการสกัดตัวอย่างโดยใช้ตัวทำละลายเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 70 โดยปริมาตร (ตัวทำละลายที่เหมาะสม) พบว่าการสกัดตัวอย่างที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 60 นาที เป็นสภาวะการสกัดที่ให้ค่าปริมาณฟีนอลิกสูงที่สุด เท่ากับ 129.89 ไมโครกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อกรัมของน้ำหนักตัวอย่างแห้ง และให้ค่าผลผลิตการสกัดร้อยละ 19.87 ของน้ำหนัก ดังแสดงผลใน Table 2

Table 2 Extraction yield and total phenolic contents of *P. pilifera* leaves from each extraction condition

Temp. (°C)	Time (min)	Yield (%) ^{*, **}	Total phenolic contents (µg GAE/g) ^{*, **}
30	30	21.39±0.36 ^a	120.59±1.18 ^d
	60	20.99±0.40 ^{ab}	124.17±1.50 ^{bc}
	120	20.44±0.31 ^{bc}	122.02±1.02 ^{cd}
50	30	19.09±0.41 ^d	125.36±1.13 ^b
	60	19.87±0.36 ^c	129.89±1.42 ^a
	120	20.03±0.35 ^c	121.31±1.47 ^d

* Data were based on dry weight basis.

** Value are mean ±SD (n=3). Different superscripts in the same column indicate the significant differences (p<0.05).

3.ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของตัวอย่างสารสกัดหยาบ

แสดงผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของตัวอย่างสารสกัดหยาบที่ได้จากสภาวะที่เหมาะสม โดยวิธี DPPH และ ABTS ใน Table 3

Table 3 Antioxidant activity (IC₅₀, mg/ml) by DPPH and ABTS assays of crude sample from optimal extraction condition

Sample	IC ₅₀ by DPPH [*]	IC ₅₀ by ABTS [*]
Crude <i>P. pilifera</i> leaves	2.16	2.14
BHT	0.18	0.22

* Data were based on crude sample weight.

จากผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระทั้ง 2 วิธีพบว่าตัวอย่างสารสกัดหยาบมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระค่อนข้างสูง (IC₅₀ วิธี DPPH = 2.16 mg/ml และ IC₅₀ วิธี ABTS = 2.14 mg/ml) เมื่อเปรียบเทียบกับประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระของตัวอย่างสารสกัดกับสารมาตรฐาน BHT พบว่าตัวอย่างสารสกัดหยาบมีประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระต่ำกว่า BHT ทั้ง 2 วิธี

สรุปและวิจารณ์ผลการวิจัย

สภาวะที่เหมาะสมในการสกัดสารประกอบฟีนอลิกจากใบหญ้าพังกาโมโดยใช้ตัวทำละลายร่วมกับคลื่นอัลตราโซนิก คือ การสกัดตัวอย่างด้วยตัวทำละลายเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 70 โดยปริมาตร ใช้อัตราส่วนตัวอย่างต่อตัวทำละลายเท่ากับ 1:100 (น้ำหนัก/ปริมาตร) โดยทำการสกัดด้วยเครื่อง sonicator ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที ที่สภาวะนี้ให้ค่าผลผลิตสารสกัดร้อยละ 19.87 ของน้ำหนักแห้ง และค่าปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดที่สกัดได้สูงที่สุดเท่ากับ 129.89 ไมโครกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อกรัมของน้ำหนักตัวอย่างแห้ง การศึกษาฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบที่ได้จากสภาวะการสกัดที่เหมาะสม ได้เลือกทำการทดสอบเปรียบเทียบ 2 วิธีการคือ DPPH และ ABTS ซึ่งวิธีการทั้งสองเป็นที่นิยมใช้ในการทดสอบการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดพืชโดยทั่วไป เนื่องจาก ง่าย สะดวก และรวดเร็ว โดยการวัดความสามารถของสารทดสอบในการกำจัดอนุมูลอิสระโดยวิธีให้ไฮโดรเจนอะตอมกับอนุมูล DPPH[•] และ ABTS^{•+} จากผลการศึกษาพบว่าสารสกัดตัวอย่างมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระค่อนข้างสูง (ต่ำกว่า BHT) ซึ่งสารประกอบฟีนอลิกที่สกัดได้จากใบหญ้าพังกาโมนี้ สามารถใช้เป็นสารต้านอนุมูลอิสระทางเลือกจากธรรมชาติทดแทนสารเคมีสังเคราะห์ที่มีการใช้อยู่ในปัจจุบันได้

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
และโครงการอนุรักษ์พันธุพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริฯ

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี (อพสธ. มจร.)
ที่สนับสนุนทุนในการวิจัย และขอขอบคุณสำนักงานหอ
พรรณไม้ กรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่า และพันธุ์พืช ที่ให้
ความอนุเคราะห์ตรวจสอบ และระบุชนิดของพืชตัวอย่าง

References

- Arruda, H.S., Pereira, G.A. and Pastore, G.M. 2017. Optimization of extraction parameters of total phenolics from *Annona crassiflora* Mart. (Araticum) fruits using response surface methodology. Food Anal. Methods. 10(1): 100-110.
- Chotimarkon, C., Benjakul, S. and Silalai, N. 2008. Antioxidant components and properties of five long-grained rice bran extracts from commercial available cultivars in Thailand. Food Chem. 111: 636-841.
- Chuakul, W., Saralamp, P., Paonil, W. and Temsiririrkkul, R., 1996. Samunpri puenban lanna. Amarin Printing and Publishing Public Co. Ltd : Bangkok. 264 pp. (in Thai)
- Manok, S. and Limcharoen, P. 2015. Investigating antioxidant activity by DPPH, ABTS and FRAP assay and total phenolic compounds of herbal extracts in Ya-hom thepphachit. Advance science. 15(1): 106-117. (in Thai)
- Murray, J.C., Burch, J.A., Streilein, R.D., Lannacchione, M.A., Hall, R.P. and Pinnell, S.R. 2008. A tropical antioxidant solution containing vitamins C and E stabilized by ferulic acid provides protection for human skin against damage caused by ultraviolet irradiation. J. Am. Acad. Dermatol. 59: 418-425.
- Phansawan, B. 2013. Free radicals, Antioxidants and Antioxidant Activity Determination. Thammasat J. Sci. Tech. 21(3): 275-286. (in Thai)
- 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 Radic. Biol. Med. 26: 1231-1237.
- Rodrigues, S. and Pinto, G.A.S. 2007. Ultrasound extraction of phenolic compounds from coconut (*Cocos nucifera*) shell powder. J. Food Eng. 80: 869-872.
- Saenphet, K., Saenphet, S. and Jirakittirat, K. 2014. Gastroprotective effects and antioxidant activities of *Paederia pilifera* Hook. f. root extract. Chiang Mai J. Sci. 41(5.1): 1121-1131.

- Salomon, S., Sevilla, I., Betancourt, R., Romero, A., Nuevas-Paz, L. and Acosta-Esquivarosa, J. 2014. Extraction of mangiferin from *Mangifera indica* L. leaves using microwave assisted technique. Emir. J. Food Agric. 26(7): 616-622.
- Singleton, V.L. and Rossi, J.A. 1965. Colorimetry of total phenolics and phosphomolybdicphosphotungstic acid reagents. Am. J. Enol. Vitic. 6: 144-158.
- Siramon, P. and Ohtani, Y. 2007. Antioxidative and antiradical activities of *Eucalyptus camaldulensis* leaf oils from Thailand. J. Wood Sci. 53(6): 498-504.
- Wongwanich, W and Banjong, K. 2016. Factors affecting on maceration and ultrasound-assisted extraction of unrefined grape seed oil. King Mongkut's Agri. J. 34(3): 9-21. (in Thai)