http://journal.rmutp.ac.th/

การวิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดใบกะเปียดเครือ

หวันฮูดา ปะดุกา[1] ปัญจพร สันทัดเลขา[1, 2] ทวีภรณ์ คีรีคช[1, 2] และ นงลักษณ์ กุลวรรัตต์[1, 2]*

[1] คณะการแพทย์แผนไทย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่

[2] ศูนย์วิจัยและนวัตกรรมเวชศาสตร์แผนไทย คณะการแพทย์แผนไทย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

[1, 2] 15 ถนนกาญจนวณิชย์ ตำบลคอหงส์ อำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา 90110

รับบทความ 15 ธันวาคม 2563 แก้ไขบทความ 1 พฤษภาคม 2564 ตอบรับบทความ 4 มิถุนายน 2564

บทคัดย่อ

กะเปียดเครือ (*Premna trichostoma* Miq.) จัดอยู่ในวงศ์ Lamiaceae มีการกระจายพันธุ์ในแถบเอเชีย รวมถึงประเทศไทย หมอพื้นบ้านใช้ใบ คั้นน้ำดื่ม ชโลม และอาบ รักษาอาการไข้ ตัวร้อน การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อวิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญ และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดน้ำจากใบกะเปียดเครือ โดยวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมด้วยวิธี Folin-Ciocalteu Method วิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์รวมด้วยวิธี Aluminium Chloride Method วิเคราะห์หาปริมาณสาร Apigenin และ Kaempferol ด้วยเทคนิคโครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง และทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH และ ABTS ผลการศึกษาพบว่า สารสกัดใบกะเปียดเครือมีปริมาณฟีนอลิกรวม ปริมาณฟลาโวนอยด์รวม ปริมาณสาร Apigenin และ Kaempferol เท่ากับ 46.45±15.30 มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อน้ำหนักสารสกัด 1 กรัม 25.48±2.02 มิลลิกรัมสมมูลของเคทาชินต่อน้ำหนักสารสกัด 1 กรัม 11.16±0.04 ไมโครกรัมต่อน้ำหนักสารสกัด 1 กรัม และ 4.54±0.08 ไมโครกรัมต่อน้ำหนักสารสกัด 1 กรัม ตามลำดับ ค่า IC_{50} จากการทดสอบด้วยวิธี DPPH และ ABTS เท่ากับ 117.50±1.22 และ 36.14±1.53 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ การศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าสารสกัดใบกะเปียดเครือมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ โดยมีสารออกฤทธิ์ในกลุ่มฟีนอลิก และฟลาโวนอยด์ ซึ่งแสดงให้เห็นศักยภาพของสารสกัดใบกะเปียดเครือในการนำไปพัฒนาเป็นยาต่อไป

คำสำคัญ : ใบกะเปียดเครือ; ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม; ปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์รวม; ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

**** ผู้นิพนธ์ประสานงาน โทร: +66 7428 2722, ไปรษณีย์อิเล็กทรอนิกส์: nonglukkunworarath@gmail.com***

http://journal.rmutp.ac.th/

Determination of Active Constituents and Antioxidant Activity of *Premna trichostoma* Miq. Leaf Extract

Wanhuda Paduka[1] Punjaporn Sunthudlakhar[1, 2] Thaweeporn Keereekoch[1, 2] and Nongluk Kunworarath[1, 2]*

[1] Faculty of Traditional Thai Medicine, Prince of Songkla University, Hat Yai Campus

[2] Traditional Thai Medical Research and Innovation Center, Faculty of Traditional Thai Medicine, Prince of Songkla University

[1, 2] 15 Kanchanawanit Road, Kho Hong sub-district, Hat Yai district, Songkhla 90110

Received 15 December 2020; Revised 1 May 2021; Accepted 4 June 2021

Abstract

Premna trichostoma Miq. (Lamiaceae) mainly distribute in Asia including Thailand. Folk healers use this plant to treat fever as a juice, splash, and bathe. The aims of this study are to evaluate the quantity of active constituents and antioxidant activity of *P. trichostoma* leaf extract. Total phenolic compounds were determined using Folin-Ciocalteu method. Total flavonoid contents were determined by Aluminum chloride method. The amount of apigenin and kaempferol contents were analyzed by high performance liquid chromatography (HPLC). In addition, the antioxidant activity was evaluated by DPPH and ABTS assay. The results showed that total phenolic contents, total flavonoid contents, and the amount of apigenin and kaempferol of *P. trichostoma* leaf extract was 46.45±15.30 mg GAE/g extract, 25.48±2.02 mg CE/g extract, 11.16±0.04 and 4.54±0.08 µg/g extract, respectively. The IC_{50} values from the DPPH and ABTS assay was 117.50±1.22 and 36.14±1.53 µg/ml, respectively. This study shows the antioxidant properties and active constituents of *P. trichostoma* leaf extract which indicates the potentials for further development of this plant.

Keywords : *Premna trichostoma*; Total Phenolic Content; Total Flavonoid Content; Antioxidant Activity

**** Corresponding Author. Tel.: +66 7428 2722, E-mail Address: nonglukkunworarath@gmail.com***

1. บทนำ

พืชสมุนไพรเป็นแหล่งของสารพฤกษเคมี (Phytochemicals) ที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ ตัวอย่างของสารพฤกษเคมีที่สำคัญ ได้แก่ แอลคาลอยด์ (Alkaloids) มีฤทธิ์ต้านการอักเสบ และใช้เป็นยาระงับปวด [1] สารประกอบฟีนอลิก (Phenolic Compound) มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ [3] ต้านการอักเสบ ระงับปวด [2] และลดไข้ [4] สารประกอบฟลาโวนอยด์ (Flavonoid Compound) มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ต้านการอักเสบ ระงับปวด [5] และลดไข้ [6] ดังนั้นการศึกษาองค์ประกอบทางพฤกษเคมี และฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดจากพืชสมุนไพรจึงมีความสำคัญต่อการนำสมุนไพรไปใช้รักษาโรค โดยเฉพาะอย่างยิ่งฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ซึ่งเป็นที่ทราบกันดีว่าอนุมูลอิสระ คืออะตอมหรือโมเลกุลของสารที่มีอิเล็กตรอนโดดเดี่ยว 1 อิเล็กตรอนขาดคู่ทำให้อะตอมหรือโมเลกุลนั้นดึงเอาอิเล็กตรอนจากอะตอมหรือโมเลกุลอื่นมาเข้าคู่เพื่อให้อะตอมหรือโมเลกุลนั้นเสถียรมากขึ้น ส่งผลให้อะตอมหรือโมเลกุลที่ถูกดึงอิเล็กตรอนไป กลายเป็นอนุมูลอิสระ เกิดเป็นปฏิกิริยาลูกโซ่ ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงเชิง

เคมีหรือเชิงกายภาพของเซลล์ ทำให้เซลล์เสียหาย สูญเสียหน้าที่ และส่งผลให้เป็นโรคที่เกิดจากความเสื่อมสภาพของร่างกาย (Degenerative Disease) ดังนั้นอนุมูลอิสระที่มีมากเกินไปจะทำให้เพิ่มความเสี่ยงต่อการเกิดโรคหลายชนิด เช่น โรคมะเร็ง โรคหลอดเลือดตีบ อีกทั้งยังมีผลทำให้เกิดไข้ [7], [8] และการอักเสบในส่วนต่าง ๆ ของร่างกาย [9]

กะเปียดเครือ (*Premna trichostoma* Miq.) จัดอยู่ในวงศ์ Lamiaceae มีการกระจายพันธุ์ในแถบเอเชียรวมถึงในประเทศไทย ซึ่งพบได้ในป่าดิบชื้นบริเวณโขดหิน และพื้นที่ชื้นโดยเฉพาะบริเวณน้ำตก [10] หมอพื้นบ้านในอำเภอควนโดน และอำเภอควนกาหลง จังหวัดสตูล เรียกพืชชนิดนี้ว่า “กาลูหมูด” ซึ่งมีรสยา คือ รสจืดเย็น จึงมีการนำใบกะเปียดเครือสดคั้นน้ำดื่ม ชโลม และอาบ เพื่อรักษาอาการไข้ ตัวร้อน อีกทั้งยังพบรายงานการใช้สมุนไพรในสกุล *Premna* ในคนท้องถิ่นแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้และแอฟริกาตะวันออก เพื่อรักษาไข้หวัด อาการปวดหัว ปวดท้อง แก้ไอ และรักษาโรคมาลาเรีย จากรายงานการวิจัยพบว่าพืชในสกุล *Premna* 20 ชนิด มีสารพฤกษเคมีที่หลากหลาย ได้แก่ Glyceroglycolipids, Favonoid, Ceramides, Iridoid Glycosides, Megastigmane, Diterpenoids, Sesquiterpene, Phenylthanoid และ Lignans ซึ่งสารประกอบดังกล่าวมีฤทธิ์ต้านจุลชีพ ต้านอนุมูลอิสระ ต้านการอักเสบ และมีฤทธิ์เสริมสร้างภูมิคุ้มกัน [11] นอกจากนี้ยังมีรายงานพบว่า *Premna foetida* Reinw. ex Blume ซึ่งเป็นพืชสกุลเดียวกับกะเปียดเครือ มีสาร Quercetin, Apigenin และ Kaempferol ซึ่งสารดังกล่าวมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ [12] แต่ยังไม่พบการศึกษาสารพฤกษเคมีและฤทธิ์ทางชีวภาพของกะเปียดเครือ ดังนั้นการศึกษาครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อวิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญและทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดน้ำจากใบกะเปียดเครือ เพื่อเป็นข้อมูลเบื้องต้นในการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพอื่น ๆ และเพื่อเป็นข้อมูลสนับสนุนการใช้สมุนไพรชนิดนี้ของหมอพื้นบ้าน

2. ระเบียบวิธีวิจัย

2.1 ตัวอย่างพืชและวิธีเตรียมสารสกัด

สมุนไพรที่ใช้ในการศึกษา คือ ใบกะเปียดเครือที่เก็บจากตำบลทุ่งนุ้ย อำเภอควนกาหลง จังหวัดสตูล ทำการตรวจสอบเอกลักษณ์พืชโดย รศ.ดร.จรัล ลีรติวงศ์ (Voucher Specimen W. Paduka 1) และเก็บตัวอย่างพรรณไม้แห้งไว้ที่พิพิธภัณฑ์พืช ภาควิชาชีววิทยา มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ นำใบกะเปียดเครือสดมาล้างทำความสะอาด ผึ่งให้แห้ง หั่นเป็นชิ้นเล็ก ๆ ตำให้ละเอียด ผสมน้ำกลั่นในอัตราส่วน 2:1 (w/v) คั้นเอาแต่น้ำ กรองผ่านกระดาษกรองเบอร์ 1 ด้วยเครื่อง Buchner Suction Filter นำสารละลายที่ได้มาทำให้แห้งโดยใช้เครื่อง Freeze Dry คำนวณหาร้อยละของสารสกัดหยาบ (% Yield Crude Extract) ตามสูตรคำนวณ และเก็บสารสกัดไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ก่อนทำการทดสอบต่อไป

$$\% \text{ Yield} = \frac{\text{น้ำหนักของสารสกัดหยาบ}}{\text{น้ำหนักของสมุนไพรสดที่ใช้}} \times 100$$

2.2 การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิก (Total Phenolic Content)

วิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมด้วยวิธี Folin-Ciocalteu Method ซึ่งดัดแปลงจาก Hsieh และคณะ [13] โดยใช้กรดแกลลิกเป็นสารมาตรฐาน ทำการทดสอบโดยผสมสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิก (ความเข้มข้น 0.05-0.8 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) หรือสารสกัดใบกะเปียดเครือ (ความเข้มข้น 0.0312-10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร กับสารละลาย Folin-Ciocalteu Reagent ปริมาตร 0.25 มิลลิลิตร และน้ำกลั่น ปริมาตร 3.9 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 นาที จากนั้นเติมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3) ที่ความเข้มข้นร้อยละ 20 ปริมาตร 0.75 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 ชั่วโมง วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 760 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Spectrophotometer Plate Reader ทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง และหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมของสารตัวอย่างจากกราฟมาตรฐานกรดแกลลิก ในหน่วยมิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อน้ำหนักสารสกัด 1 กรัม (mg GAE/g Extract)

2.3 การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟลาโนนอยด์ (Total Flavonoid Content)

วิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์รวม ด้วยวิธี Aluminium Chloride Method [14] โดยใช้เคทาชินเป็นสารมาตรฐาน

ทำการทดสอบโดยนำสารละลายมาตรฐานคาเทชิน (ความเข้มข้น 0.05-0.8 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) หรือสารสกัดใบกะเปียดเครือ (ความเข้มข้น 1.25-40 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ผสมกับสารละลายโซเดียมไนไตร ($NaNO_2$) ที่ความเข้มข้นร้อยละ 5 ปริมาตร 75 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที และเติมสารละลายอะลูมิเนียมคลอไรด์ ($AlCl_3$) ที่ความเข้มข้นร้อยละ 10 ปริมาตร 150 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 6 นาที หลังจากนั้นเติม 1 โมลาร์ โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ปริมาตร 5 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 510 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Spectrophotometer Plate Reader ทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง และหาปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์รวมของสารตัวอย่างจากกราฟมาตรฐานคาเทชิน ในหน่วยมิลลิกรัมสมมูลของคาเทชินต่อน้ำหนักสารสกัด 1 กรัม (mg CE/g Extract)

2.4 การวิเคราะห์ปริมาณสาร Quercetin, Apigenin และ Kaempferol

การวิเคราะห์ปริมาณ Quercetin, Apigenin และ Kaempferol จากสารสกัดใบกะเปียดเครือโดยวิธี High Performance Liquid Chromatography (HPLC) ซึ่งดัดแปลงจาก Dianita และ Jantan [12] โดยใช้คอลัมน์ Hypersil ODS C18 (250 × 4.0 มิลลิเมตร 5 ไมโครเมตร) วัฏภาคเคลื่อนที่ประกอบด้วย วัฏภาคเคลื่อนที่ A คือ 0.1% Phosphoric Acid และ B คือ Acetonitrile ใช้การวิเคราะห์แบบ Gradient Elution โดยมีอัตราส่วนของวัฏภาคเคลื่อนที่ A:B ที่เวลาต่าง ๆ ดังนี้ นาทีที่ 0 อัตราส่วน 85:15 นาทีที่ 20 อัตราส่วน 15:85 นาทีที่ 22-25 อัตราส่วน 0:100 และนาทีที่ 28-30 อัตราส่วน 85:15 อัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที อุณหภูมิคอลัมน์ 25 องศาเซลเซียส ปริมาตรฉีด 20 ไมโครลิตร และตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 360 นาโนเมตร

วิเคราะห์ปริมาณ Quercetin, Apigenin และ Kaempferol โดยเตรียมสารละลายมาตรฐาน Quercetin (Sigma Aldrich, Singapore), Apigenin (Sigma Aldrich, Singapore) และ Kaempferol (Sigma Aldrich, Singapore) ในเมทานอล ที่ความเข้ม 0.1, 0.5, 1, 2 และ 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และเตรียมตัวอย่างโดยชั่งสารสกัดใบกะเปียดเครือ 0.5 กรัม ละลายในเมทานอล 3 มิลลิลิตร ผสมสารละลายโดยใช้เครื่องเขย่าสารแบบสั่น (Vortex) 1 นาที เขย่าอีก 6 ชั่วโมง หลังจากนั้น Ultrasonication 30 นาที และหมุนเหวี่ยง (Centrifuge) เพื่อนำส่วนใสกรองผ่านเมมเบรน ขนาด 0.22 ไมโครเมตร และฉีดเข้าเครื่อง HPLC แต่ละตัวอย่างทำการวิเคราะห์ซ้ำ 3 ครั้ง จากนั้นสร้างกราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นของสารมาตรฐานกับพื้นที่ใต้กราฟ (Peak Area) ของสารมาตรฐาน และคำนวณหาปริมาณสาร Quercetin, Apigenin และ Kaempferol ในสารสกัดใบกะเปียดเครือจากกราฟมาตรฐาน

2.5 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

2.5.1 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH (2,2-diphenyl-1 picrylhydrazyl) Assay

ทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH [13] โดยเตรียมสารละลาย DPPH ความเข้มข้น 80 ไมโครโมลาร์ ในเมทานอล นำสารละลาย DPPH ปริมาตร 200 ไมโครลิตร และสารละลายใบกะเปียดเครือปริมาตร 20 ไมโครลิตร มาผสมให้เข้ากัน บ่มในที่มืด ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Spectrophotometer Plate Reader ทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาคำนวณค่าร้อยละความสามารถในการทำลายอนุมูลอิสระ (% Radical Scavenging) จากนั้นหาค่าความเข้มข้นของสารสกัดสมุนไพรที่ทำให้ความเข้มข้น DPPH ลดลงร้อยละ 50 (IC_{50}) โดยคำนวณจากสมการเส้นตรงของความสัมพันธ์ระหว่างเปอร์เซ็นต์ต้านอนุมูลอิสระ และความเข้มข้นของสารสกัดสมุนไพรที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ซึ่งสารสกัดที่ให้ค่า IC_{50} ต่ำ แสดงว่ามีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระดี เนื่องจากสามารถยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH ได้ดี โดยการทดลองนี้ใช้ Trolox (ความเข้มข้น 10-0.3125 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) เป็นสารมาตรฐาน และใช้เมทานอลเป็น Blank

$$\%\,\text{Radical Scavenging} = \frac{OD_{control} - OD_{sample}}{OD_{control}} \times 100$$

โดยที่

$OD_{control}$ คือ ค่าดูดกลืนแสงของ Blank

OD_{sample} คือ ค่าดูดกลืนแสงของสารสกัด

2.5.2 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS (2-2′- azinobis (3-ethyl-benzothiazoline-6-sulfonic acid)) Assay

ทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS Assay [16] โดยสารละลาย $ABTS^{\bullet+}$ ได้จากการนำ ABTS ละลายด้วยน้ำ ให้ได้ความเข้มข้น 7 มิลลิโมลาร์ แล้วนำสารละลาย $ABTS^{\bullet+}$ มาผสมกับสารละลาย 2.45 มิลลิโมลาร์ $K_2S_2O_2$ ในอัตราส่วน 1:0.5 บ่มในที่มืดที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 12-16 ชั่วโมง จากนั้นนำสารละลาย $ABTS^{\bullet+}$ มาเจือจางด้วยเอทานอล และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร ให้ได้ค่าการดูดกลืนแสง เท่ากับ 0.70±0.02

ในการทดสอบให้นำสารละลาย $ABTS^{\bullet+}$ ที่เตรียมไว้ปริมาตร 200 ไมโครลิตร และสารสกัดกะเปียดเครือปริมาตร 20 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน บ่มสารละลายในที่มืดที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 6 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร รายงานผลเป็นค่าความเข้มข้นที่สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระได้ร้อยละ 50 (IC_{50}) โดยการทดลองนี้ใช้ Trolox (ความเข้มข้น 20-0.3125 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) เป็นสารมาตรฐาน และเอทานอลเป็น Blank

$$\%\,\text{Radical Scavenging} = \frac{OD_{control} - OD_{sample}}{OD_{control}} \times 100$$

โดยที่

$OD_{control}$ คือ ค่าดูดกลืนแสงของ Blank

OD_{sample} คือ ค่าดูดกลืนแสงของสารสกัด

วิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้สถิติพื้นฐาน ได้แก่ การหาค่าเฉลี่ย (Mean) และการหาค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) ด้วยโปรแกรมไมโครซอฟต์เอ็กเซล (Microsoft Excel)

3. ผลการศึกษาและอภิปรายผล

3.1 การเตรียมสารสกัด

การเตรียมสารสกัดใบกะเปียดเครือ โดยใช้ใบสดสกัดด้วยน้ำ เป็นการอ้างอิงตามการใช้ของหมอพื้นบ้านที่นำใบสดคั้นน้ำดื่ม ชโลมและอาบ รักษาอาการไข้ตัวร้อน โดยสารสกัดใบกะเปียดเครือที่สกัดด้วยวิธีคั้นน้ำมีลักษณะเป็นผงสีน้ำตาลเข้ม ได้น้ำหนักสารสกัดเท่ากับ 29.54 กรัม คิดเป็นร้อยละของสารสกัดหยาบเท่ากับร้อยละ 1.52

3.2 ปริมาณโดยรวมของสารประกอบฟีนอลิกและสารประกอบฟลาโวนอยด์

ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมของสารสกัดใบกะเปียดเครือ เมื่อวิเคราะห์ด้วยวิธี Folin-Ciocalteu โดยใช้กรดแกลลิกเป็นสารมาตรฐาน พบว่า สารสกัดใบกะเปียดเครือมีปริมาณฟีนอลิกรวมเท่ากับ 46.45±15.30 มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อน้ำหนักสารสกัด 1 กรัม และจากการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์รวมด้วยวิธี Aluminium Chloride โดยใช้เคทาชินเป็นสารมาตรฐาน พบว่าสารสกัดใบกะเปียดเครือมีปริมาณฟลาโวนอยด์รวมเท่ากับ 25.48±2.02 มิลลิกรัมสมมูลของเคทาชินต่อน้ำหนักสารสกัด 1 กรัม (ตารางที่ 1)

จากการศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าสารสกัดใบกะเปียดเครือมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิก และสารประกอบฟลาโวนอยด์ จากรายงานวิจัยก่อนหน้านี้พบว่าสารในกลุ่มฟีนอลิกเป็นสารกลุ่มใหญ่ที่พบมากในพืช และมีความสัมพันธ์กับความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ [17] เมื่อสารประกอบฟีนอลิกให้อะตอมไฮโดรเจนแก่อนุมูลอิสระไปแล้ว อนุมูลอิสระของสารประกอบฟีนอลิกค่อนข้างเสถียร ดังนั้นจึงไม่ทำปฏิกิริยาอื่นต่อไป ยิ่งไปกว่านั้นอนุมูลอิสระของสารประกอบฟีนอลิกบางชนิดยังสามารถรวมตัวกับอนุมูลอิสระอื่นได้ด้วย จึงทำให้สารประกอบฟีนอลิกมีคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระโดยการลดจำนวนอนุมูลอิสระลง [18], [19] และสารฟลาโวนอยด์จัดเป็นสารประกอบในกลุ่มฟีนอลิกที่มีบทบาทสำคัญในการต้านอนุมูลอิสระหรือต้านออกซิเดชัน โดยประสิทธิภาพของการต้านออกซิเดชันขึ้นอยู่กับโครงสร้าง และหมู่ที่

เข้ามาแทนที่ [18] นอกจากนี้ยังพบว่าสารประกอบฟีนอลิก และฟลาโวนอยด์มีฤทธิ์ทางชีวภาพอื่น ๆ อีก เช่น ฤทธิ์ต้านการอักเสบ ฤทธิ์ระงับปวด [5], [19] และฤทธิ์ลดไข้ [4], [6]

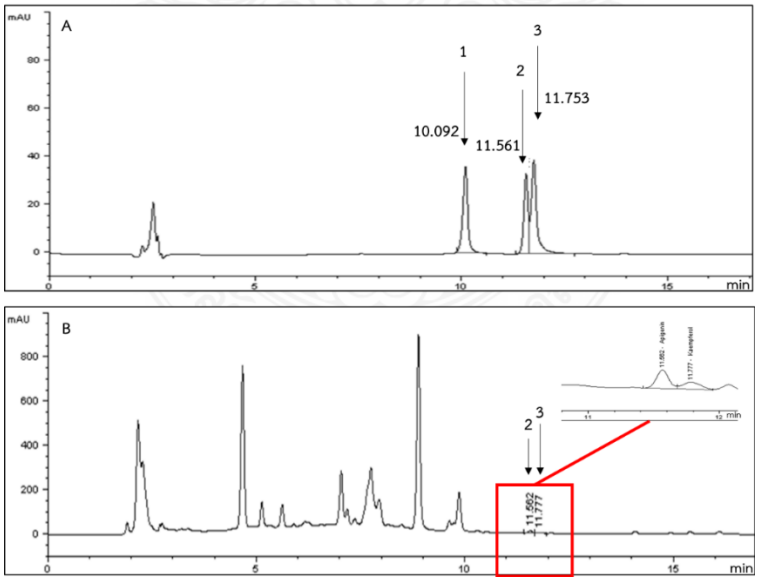
ตารางที่ 1 ปริมาณสารสำคัญที่พบในสารสกัดใบกะเปียดเครือ (n=3)

สารสำคัญ	ปริมาณสารสำคัญ
Total Phenolic Content	46.45±15.30 mg GAE/g Extract
Total Flavonoid Content	25.48±2.02 mg CE/g Extract
Quercetin	ND
Apigenin	11.16±0.04 µg/g Extract
Kaempferol	4.54±0.08 µg/g Extract

**ND ตรวจไม่พบ

3.3 ปริมาณสาร Quercetin, Apigenin และ Kaempferol

การวิเคราะห์ปริมาณ Quercetin, Apigenin และ Kaempferol โดยวิธี HPLC จากโครมาโตแกรมของสารมาตรฐาน พบ Peak ของ Quercetin, Apigenin และ Kaempferol ที่ Retention Time 10.0, 11.5 และ 11.7 นาที ตามลำดับ (รูปที่ 1A) และโครมาโตแกรมของสารสกัดใบกะเปียดเครือ พบ Peak ที่มี Retention Time ตำแหน่งเดียวกับ Peak ของ Apigenin และ Kaempferol แยกออกจากกราฟรบกวนอื่น ๆ อย่างชัดเจน แต่ไม่พบ Peak ของ Quercetin (รูปที่ 1B) และเพื่อยืนยันว่าเป็น Peak ของสารมาตรฐาน จึงทำการใส่สารมาตรฐานทั้ง 3 ในสารสกัดใบกะเปียดเครือและวิเคราะห์ปริมาณสารทั้ง 3 ซ้ำอีกครั้ง พบ Peak ที่ตำแหน่งเดิม และมีพื้นที่ใต้กราฟเพิ่มขึ้น แสดงว่า Peak ที่พบในโครมาโตแกรมของสารสกัดสมุนไพร Retention Time ที่ 11.5 นาที คือ Peak ของ Apigenin และที่ 11.7 นาที คือ Peak ของ Kaempferol ผลการวิเคราะห์ปริมาณ Quercetin, Apigenin และ Kaempferol ของสารสกัดใบกะเปียดเครือ พบว่า มีปริมาณสาร Apigenin เท่ากับ 11.16±0.04 ไมโครกรัมต่อน้ำหนักสารสกัด 1 กรัม และมีปริมาณสาร Kaempferol เท่ากับ 4.54±0.08 ไมโครกรัมต่อน้ำหนักสารสกัด 1 กรัม แต่ไม่พบปริมาณของสาร Quercetin (ตารางที่ 1)



รูปที่ 1 (A) แสดง HPLC โครมาโตแกรมของสารละลายมาตรฐาน และ (B) โครมาโตแกรมของสารสกัดใบกะเปียดเครือ (1) Quercetin, (2) Apigenin และ (3) Kaempferol ที่ความยาวคลื่น 360 นาโนเมตร

การศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าสารสกัดใบกะเปียดเครือมีปริมาณสาร Apigenin และ Kaempferol ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาก่อนหน้านี้ที่ทำการแยกสารประกอบฟลาโวนอยด์ใน *P. foetida* ซึ่งเป็นพืชสกุลเดียวกันกับกะเปียดเครือ ด้วยวิธี RP-HPLC Analysis พบว่า มีสาร Quercetin, Apigenin และ Kaempferol เป็นองค์ประกอบ ซึ่งสารดังกล่าวสามารถต้านอนุมูลอิสระได้ [12] สาร Apigenin เป็นสารประกอบในกลุ่มฟลาโวนอยด์ที่พบในพืชทั่วไป มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ [20] ต้านการอักเสบ [21] และระงับปวด [22] โดย Apigenin ทำให้ปริมาณ TNF-α และ IL-1β ลดลง สาร Kaempferol เป็นสารประกอบฟลาโวนอยด์ในธรรมชาติ พบในผลไม้ ผักและสมุนไพร [23] สาร Kaempferol มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ โดยการให้ไฮโดรเจนและเปลี่ยนเป็น Phenoxyl Radical ซึ่ง Phenoxyl Radical สามารถทำปฏิกิริยากับอนุมูลอิสระอื่นได้อีก [24] นอกจากนี้สาร Kaempferol ยังมีฤทธิ์ต้านการอักเสบ [23] ต้านจุลชีพ [25] และสามารถลดปวดได้ [26] จากฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดกะเปียดเครือ (ตารางที่ 2) พบว่ามีความสอดคล้องกับฤทธิ์ของ Apigenin และ Kaempferol สารประกอบดังกล่าวจึงอาจเป็นสารสำคัญออกฤทธิ์ของสารสกัดใบกะเปียดเครือ การทำปริมาณวิเคราะห์ด้วย HPLC ของ Apigenin และ Kaempferol และการหาวิธีวิเคราะห์ที่เหมาะสมโดยวิธี System Suitability และ Method Validation จึงมีความสำคัญต่อการศึกษาต่อไปในอนาคต

จากลักษณะ HPLC chromatogram ของสารสกัดใบกะเปียดเครือ (รูปที่ 1B) แสดงให้เห็นว่าสารสกัดใบกะเปียดเครือยังประกอบด้วยพฤกษเคมีอีกหลายชนิด ซึ่งเป็นส่วนประกอบหลักในกะเปียดเครือ เมื่อพิจารณาจากปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมและปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์รวม ซึ่งพบปริมาณสูงในกะเปียดเครือ สารประกอบหลัก ดังแสดงผลที่ Retention Time ในช่วง 5-10 นาที อาจเป็นสารกลุ่มฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ กะเปียดเครือจึงมีความน่าสนใจในการศึกษาถึงสารสำคัญออกฤทธิ์ และการหากลไกการออกฤทธิ์ด้านต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องต่อไป

3.4 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

3.4.1 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH

การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH รายงานค่าเป็น IC_{50} ที่แสดงถึงความเข้มข้นของสารสกัดที่ทำให้ความเข้มข้นของอนุมูลอิสระ DPPH ลดลงร้อยละ 50 จากการทดสอบพบว่า สารสกัดใบกะเปียดเครือมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 117.50±1.22 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ตารางที่ 2) โดยวิธี DPPH เป็นการทดสอบทางเคมีด้วยสารที่มีสมบัติเป็นอนุมูลอิสระซึ่งในการทดลองจะใช้อนุมูลอิสระ DPPH ซึ่งเป็นสารอนุมูลอิสระสังเคราะห์ที่คงตัวและมีสีม่วง สามารถดูดกลืนแสงได้ที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร เมื่อ DPPH ทำปฏิกิริยากับสารต้านอนุมูลอิสระจะทำให้สีม่วงค่อย ๆ จางลง จึงสามารถนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้จากการทดลองมาคำนวณหาค่าความเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของสารตัวอย่างได้ [27]

3.4.2 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS

การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS รายงานค่าเป็น IC_{50} ที่แสดงถึงความเข้มข้นของสารสกัดที่ทำให้ความเข้มข้นของอนุมูลอิสระ ABTS ลดลงร้อยละ 50 จากการทดสอบพบว่า สารสกัดใบกะเปียดเครือมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 36.14±1.53 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ตารางที่ 2) โดยวิธี ABTS เป็นวิธีการวัดความสามารถในการฟอกสีอนุมูลอิสระ $ABTS^{\bullet+}$ ซึ่งเป็นสารสังเคราะห์ที่มีสีเขียวปนน้ำเงิน มีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร เมื่อ $ABTS^{\bullet+}$ ทำปฏิกิริยากับสารตัวอย่างจะทำให้สีจางลงจึงสามารถหาความเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของสารตัวอย่างได้จากการคำนวณค่าการดูดกลืนแสงของการยับยั้งอนุมูลอิสระ $ABTS^{\bullet+}$ [27]

ตารางที่ 2 แสดงฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดใบกะเปียดเครือ (n=3)

ตัวอย่าง	IC_{50} (µg/ml)	
	DPPH assay	ABTS assay
สารสกัดใบกะเปียดเครือ	117.50±1.22	36.14±1.53
Trolox	4.07±0.06	4.12±0.50

จะเห็นได้ว่าวิธี DPPH และ ABTS เป็นการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ที่มีความจำเพาะแตกต่างกัน

จึงมักใช้ทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในตัวอย่างร่วมกัน ทั้งนี้เพื่อให้ผลการทดสอบมีความว่องไว ถูกต้องเที่ยงตรง และแม่นยำ [27] โดยวิธี ABTS สามารถทำปฏิกิริยากับสารต้านอนุมูลอิสระได้ทั้งกลุ่มที่ละลายได้ดีในไขมัน (Lipophilic) และละลายได้ดีในน้ำ (Hydrophilic) ในขณะที่วิธี DPPH ซึ่งมีความจำเพาะต่อสารต้านอนุมูลอิสระในกลุ่มที่ละลายได้ดีในสารละลายขั้วปานกลาง เช่น สารละลายกลุ่มแอลกอฮอล์ เป็นต้น [28], [29] จากผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระพบว่า เมื่อทำการทดสอบด้วยวิธี ABTS สารสกัดใบกะเปียดเครือแสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้ดีกว่าการทดสอบด้วยวิธี DPPH จึงอาจสรุปได้ว่า สารต้านอนุมูลอิสระจากสารสกัดใบกะเปียดเครือเป็นสารกลุ่มที่ละลายได้ดีในน้ำ ซึ่งผลการทดสอบนี้สอดคล้องกับลักษณะ HPLC Chromatogram (Retention Time ที่ 5 ถึง 10 นาที) ซึ่งแสดงให้เห็นว่าสารสำคัญจากสารสกัดใบกะเปียดเครือส่วนใหญ่เป็นสารกลุ่มที่ละลายได้ดีในน้ำ อีกทั้งยังมีความสอดคล้องกับลักษณะการใช้งานของหมอพื้นบ้าน ที่มีการนำใบกะเปียดเครือมาคั้นด้วยน้ำเพื่อใช้ในการรักษาโรคต่าง ๆ [11]

จากการศึกษาก่อนหน้านี้ พบว่าอนุมูลอิสระที่เพิ่มขึ้นในสมองส่วนไฮโปทาลามัสมีผลทำให้อุณหภูมิของร่างกายเพิ่มสูงขึ้น ส่งผลให้เกิดไข้ [8], [30] การศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าสารสกัดใบกะเปียดเครือมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ โดยมีสารออกฤทธิ์ในกลุ่มฟีนอลิก และฟลาโวนอยด์ ดังนั้นกะเปียดเครืออาจจะมีฤทธิ์ลดไข้โดยผ่านกลไกการต้านอนุมูลอิสระ ทั้งนี้ควรมีการศึกษาฤทธิ์ลดไข้ของสารสกัดใบกะเปียดเครือเพื่อยืนยันสรรพคุณตามการใช้งานของหมอพื้นบ้านต่อไปในอนาคต

4. สรุป

จากการศึกษาแสดงให้เห็นว่าสารสกัดใบกะเปียดเครือมีสารฟีนอลิก ฟลาโวนอยด์ Apigenin และ Kaempferol และมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ดังนั้นฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดใบกะเปียดเครืออาจจะเป็นผลมาจากสารดังกล่าว ทั้งนี้ควรมีการทดสอบฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา และสารสำคัญออกฤทธิ์ของสารสกัดใบกะเปียดเครือเพิ่มเติม

5. กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ ได้รับทุนสนับสนุนงบประมาณจากทุนวิจัยองค์ความรู้ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ (รหัสโครงการ TTM6302062S) และขอขอบคุณ นายหยา มาลินี นายอดินันท์ ปะดุกา และนางฮาตี เป้งทอง หมอพื้นบ้านในอำเภอควนโดน ที่ให้ข้อมูลภูมิปัญญาพื้นบ้านเกี่ยวกับการใช้พืชชนิดนี้

6. เอกสารอ้างอิง

[1] S. Noppamas. *Diagnostic Pharmacy Medicines and natural products*, 3rd ed. Bangkok: Sengtian printing, 2011.

[2] W. E. M. Lands and A. M. Hanel, “Phenolic anticyclooxygenase agents in antiinflammatory and analgesic therapy,” *Prostaglandins,* vol. 24, no. 2, pp. 271-277, 1982.

[3] F. P. R. de Morais, T. B. Pessato, E. Rodrigues, L. Peixoto Mallmann, L. R. B. Mariutti and F. M. Netto, “Whey protein and phenolic compound complexation: Effects on antioxidant capacity before and after *in vitro* digestion,” *Food Research International,* vol. 133, p. 109104, 2020.

[4] F. Pope, “Phenol in enteric fever.1,” *The Lancet,* vol. 133, no. 3424, pp. 728-729, 1889.

[5] S. S. El-Hawary, M. F. Yousif, A. A. Abdel Motaal and L. M. Abd-Hameed, “Bioactivities, phenolic compounds and *in-vitro* propagation of *Lippia citriodora* Kunth cultivated in Egypt,” *Bulletin of Faculty of Pharmacy, Cairo University,* vol. 50, no. 1, pp. 1-6, 2012.

[6] H.-J. Zhi, H.-Y. Zhu, Y.-Y. Zhang, Y. Lu, H. Li and D.-F. Chen, “*In vivo* effect of quantified flavonoids-enriched extract of *Scutellaria baicalensis* root on acute lung injury induced by influenza A virus,” *Phytomedicine,* vol. 57, pp. 105-116, 2019.

[7] S. Wrotek, J. Sobocinska, H.M. Kozłowski, M. Pawlikowska, T. Jedrzejewski and A. Dzialuk,

"New Insights into the Role of Glutathione in the Mechanism of Fever," *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 21, no. 4, 2020.

[8] T. Y. Kao, W. T. Huang, C. P. Chang and M. T. Lin, "Aspirin may exert its antipyresis by inhibiting the N-methyl-D-aspartate receptor-dependent hydroxyl radical pathways in the hypothalamus," *Journal of Pharmacological Sciences*, vol. 103, no. 3, pp. 293-298, 2007.

[9] S. Jutharat, "Phytochemical screening and biological activities of *Dolichandrone serrulata,"* M.S. thesis, Dept. M.Sc., BUU Univ., Chon Buri, Thailand, 2016.

[10] L. Charan, "Systematics and conservation of the genera *Premna* L. and *Callicarpa* L. (LAMIACEAE) in Thailand and Indo-China," Ph.D. dissertation, Dept. Biology. KUU Univ., Khon kaen, Thailand, 2008.

[11] R. Dianita and I. Jantan, "Ethnomedicinal uses, phytochemistry and pharmacological aspects of the genus *Premna*: a review," *Pharm Biol,* vol. 55, no. 1, pp. 1715-1739, 2017.

[12] R. Dianita and I. Jantan, "Inhibition of Human Platelet Aggregation and Low-Density Lipoprotein Oxidation by *Premna foetida* Extract and Its Major Compounds," *Molecules,* vol. 24, no. 8, 2019.

[13] M. C. Hsieh, Y. J. Shen, Y. H. Kuo and L. S. Hwang, "Antioxidative activity and active components of longan (*Dimocarpus longan* Lour.) flower extracts," *Journal of Agricultural and Food Chemistry,* vol. 56, no. 16, pp. 7010-7016, 2008.

[14] J. Zhishen, T. Mengcheng and W. Jianming, "The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals," *Food Chemistry,* vol. 64, no. 4, pp. 555-559, 1999.

[15] W. Chanthasri, N. Puangkeaw, N. Kunworarath, P. Jaisamut, S. Limsuwan, K. Maneenoon, P. Choochana and S. Chusri, "Antioxidant capacities and total phenolic contents of 20 polyherbal remedies used as tonics by folk healers in Phatthalung and Songkhla provinces, Thailand," *BMC Complementary and Alternative Medicine,* vol. 18, no. 1, p. 73, 2018.

[16] R. Re, N. Pellegrini, A. Proteggente, A. Pannala, M. Yang and C. Rice-Evans, "Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay," *Free Radical Biology and Medicine,* vol. 26, no. 9, pp. 1231-1237, 1999.

[17] M. Kurzawa, A. Filipiak-Szok, E. Kłodzinska and E. Szłyk, "Determination of phytochemicals, antioxidant activity and total phenolic content in *Andrographis paniculata* using chromatographic methods," *Journal of Chromatography B,* vol. 995-996, pp. 101-106, 2015.

[18] J. Nisa, "Phytochemical screening and biologycal activities of *Dendrobium* spp.," M.S. thesis, Dept. M.Sc. (Chemical education), BUU Univ., Chon Buri, Thailand, 2016.

[19] A. S. Oliveira, L. M. Cercato, M. T. D. S. Souza, A. J. O. Melo, B. D.. S. Lima, M. C. Duarte, A. S. Araujo, A. M. O. Silva and E. A. Camargo, "The ethanol extract of *Leonurus sibiricus* L. induces antioxidant, antinociceptive and topical anti-inflammatory effects," *Journal of Ethnopharmacology,* vol. 206, pp. 144-151, 2017.

[20] D. Tang, K. Chen, L. Huang and J. Li, "Pharmacokinetic properties and drug interactions of apigenin, a natural flavone," *Expert Opinion on Drug Metabolism and Toxicology,* vol. 13, no. 3, pp. 323-330, 2017.

[21] P.-Y. Jiang, X.-J. Zhu, Y.-N. Zhang, F.-F. Zhou and X.-F. Yang, "Protective effects of apigenin

on LPS-induced endometritis via activating Nrf2 signaling pathway," *Microbial Pathogenesis,* vol. 123, pp. 139-143, 2018.

[22] M. M. G. Pinheiro, F. Boylan and P. D. Fernandes, "Antinociceptive effect of the *Orbignya* speciosa Mart. (Babassu) leaves: Evidence for the involvement of apigenin," *Life Sciences,* vol. 91, no. 9, pp. 293-300, 2012.

[23] M. Shields, "Chapter 14 - Chemotherapeutics," in *Pharmacognosy*, S. Badal and R. Delgoda, Eds. Boston: Academic Press, 2017, pp. 295-313.

[24] K. P. Devi, D. S. Malar, S. F. Nabavi, A. Sureda, J. Xiao, S. M. Nabavi and M. Daglia, "Kaempferol and inflammation: from chemistry to medicine," *Pharmacological Research,* vol. 99, pp. 1-10, 2015.

[25] A. M. Potshangbam, R. S. Rathore, and P. Nongdam, "Discovery of sulfone-resistant dihydropteroate synthase (DHPS) as a target enzyme for kaempferol, a natural flavanoid," *Heliyon,* vol. 6, no. 2, p. e03378, 2020.

[26] J. E. T. do Nascimento, S. M. de Morais, D. S. de Lisboa, M. D. O. Sousa, S. A. A. R. Santos, F. E. A. Magalhaes and A. R. Campos, "The orofacial antinociceptive effect of Kaempferol-3-O-rutinoside, isolated from the plant *Ouratea fieldingiana*, on adult zebrafish (*Danio rerio*)," *Biomedicine and Pharmacotherapy,* vol. 107, pp. 1030-1036, 2018.

[27] Ph. Burun, "Free radicals, antioxidants and antioxidant activity determination," *Thai Journal of Science and Technology*, vol. 21, no. 3, pp. 275-286, 2013.

[28] R. Apak, M. Ozyurek, K. Guclu and E. Capanoglu, "Antioxidant activity/capacity measurement. 1. Classification, physiochemical principles, mechanisms, and electron transfer (ET)-based assays," *Journal of Agricultural and Food Chemistry,* vol. 64, no. 5 , pp. 997-1027, 2016.

[29] R. Apak, M. Ozyurek, K. Guclu and E. Capanoglu, "Antioxidant activity/capacity measurement. 2. Hydrogen atom transfer (HAT)-based, mixed-mode (electron transfer (ET)/HAT), and lipid peroxidation assays," *Journal of Agricultural and Food Chemistry,* vol. 64, no. 5, pp. 102, 2016.

[30] W. T. Huang, M. T. Lin and C. P. Chang, "An NMDA receptor-dependent hydroxyl radical pathway in the rabbit hypothalamus may mediate lipopolysaccharide fever," *Neuropharmacology*, vol. 50, no. 4, pp. 504-511, 2006.