ความสามารถในการต้านออกซิเดชันของมะรุมด้วยวิธี ABTS และ FRAP

Antioxidant Activities of *Moringa Oleifera* using ABTS and FRAP Methods

อุกฤต มากศรทรง (Ukit Maksonsong)* ดร.นวพร ลาภส่งผล (Dr.Nawaporn Lapsongphon)**

บทคัดย่อ

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระในส่วนต่างๆจากมะรุม (ใบ เมล็ด เปลือก และเนื้อมะรุม) โดยใช้ตัวทำละลายในการสกัดได้แก่ น้ำ 50% เอทานอล และ 95% เอทานอล นำตัวอย่างไปเขย่าเป็นเวลา 24 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นนำมากรองด้วยกระดาษกรอง วิเคราะห์ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS และ วิธี FRAP ผลการทดลองพบว่า ตัวอย่างใบมะรุมที่สกัดด้วย 50% เอทานอล มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ ABTS และ FRAP มีค่าสูงที่สุดคือ 42.97 mg trolox eq./g และ 0.59 mg ferrous eq./g จากการศึกษายังพบว่า ตัวทำละลายที่ใช้การสกัดส่วนต่างๆจากใบมะรุมที่ต่างกันมีผลต่อความสามารถในการยับยั้งออกซิเดชัน โดยตัวละลายที่สามารถสกัดสารได้ดี และมีค่าความสามารถออกซิเดชันได้สูงที่สุดคือ 50% เอทานอล รองลงมา เป็น น้ำ และ 95% เอทานอล ตามลำดับ ดังนั้นสารสกัดจากมะรุมสามารถใช้เป็นสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีความสามารถในการต้านออกซิเดชันสูง

ABSTRACT

The objective of this study was to investigate antioxidant activities in different parts of moringa *(Moringa oleifera)*. Leaf, seed, peel and pulp of moringa were extracted with various solvents (water, 50 and 95% ethanol). The sample solutions were shaked for 24 hours at room temperature. Then they were filtrated with filter paper. The supernatants were determined using ABTS and FRAP methods. Results showed that the highest antioxidant activities determined by ABTS and FRAP was found in moringa leaf extracted with 50% ethanol 42.97 mg trolox eq./g and 0.59 mg ferrous eq./g respectively. In this study, antioxidant activities of different various parts of moringa were varied with solvents. However, the highest antioxidant activities of leaf, seed, peel and pulp were found in the sample that extracted using 50% ethanol follow by water and 95% ethanol. Therefore, moringa leaf could be used to extract the bioactive compound as it had high antioxidant properties.

คำสำคัญ: มะรุม สารต้านออกซิเดชัน การสกัดด้วยตัวทำละลาย

Keywords: *Moringa, Antioxidant, Solvent extraction*

** นักศึกษา หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีอาหาร คณะเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี*

*** อาจารย์ สาขาวิชาเทคโนโลยีอาหาร คณะเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี*

บทนำ

มะรุม มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Moringa oleifera* เป็นพืชสมุนไพรชนิดหนึ่งที่พบมากในประเทศไทยและประเทศในเขตร้อน มีประโยชน์สามารถนำมารับประทานได้หลายส่วนทำให้มีการศึกษา และนำมาใช้ประโยชน์ในด้านอุตสาหกรรมมากขึ้นทั้งทางด้านอาหาร ยา เครื่องสำอาง และสิ่งทอ เป็นต้น (Farooq et al., 2012) จากงานวิจัยพบว่าส่วนต่างๆของมะรุม เช่น ฝัก ใบ ราก ดอก เมล็ดมีสาระสำคัญ และมีฤทธิ์ทางชีวภาพที่หลากหลาย โดยในใบมะรุมพบว่ามีองค์ประกอบที่พบมากที่สุด คือ โปรตีน คิดเป็น 19.15-28.80% (Jongrungruangchok et al., 2010) และมีสารสำคัญอื่น เช่น เบต้าแคโรทีน วิตามินซี ธาตุเหล็ก แคลเซียม และโพแทสเซียม ในปริมาณที่สูง (Sreelatha and Padma, 2009) ส่วนในเมล็ดมะรุมพบว่ามีสารในกลุ่มฟลาโวนอยด์ เช่น catechin, epicatechin, และquercetin (Govardhan et al., 2013) ซึ่งสารเหล่านี้ยังมีคุณสมบัติยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชัน ซึ่งปฏิกิริยาออกซิเดชันเป็นปฏิกิริยาการแลกเปลี่ยนอิเล็กตรอนจากสารตัวหนึ่งไปยังตัวออกซิไดซ์ ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์เป็นสารอนุมูลอิสระ ซึ่งปัจจุบันสารต้านอนุมูลอิสระส่วนใหญ่มักพบในพืช ผลไม้ และสมุนไพรเป็นที่สนใจเพิ่มขึ้น เนื่องจากมีการศึกษาค้นคว้าวิจัยว่าสารต้านอนุมูลอิสระสามารถช่วยป้องกันการเกิดโรคต่างๆได้ เช่น โรคความดัน โรคเบาหวาน โรคหัวใจ (Farooq et al., 2012) อย่างไรก็ตามงานวิจัยหลายแห่งได้ศึกษาเกี่ยวความสามารถในการต้านออกซิเดชันของใบมะรุม (Sreelatha and Padma, 2009; Muhammad et at., 2015) สำหรับการศึกษาในฝักมะรุม โดยแยกเป็นส่วนของเปลือก เนื้อ และเมล็ด ยังมีการศึกษาค่อนข้างจากัด ดังนั้นการศึกษาสารสกัดจากเปลือก เนื้อ และเมล็ดมะรุมมาใช้ประโยชน์จึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่น่าสนใจ โดยวัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้เพื่อศึกษาความสามารถในการต้านออกซิเดชันของสารสกัดด้วยตัวทำละลายต่างๆ จากใบเปลือก เนื้อ และเมล็ดมะรุม และศึกษากลไกการต้านออกซิเดชันของสารสกัดด้วยอนุมูลอิสระ ABTS และความสามารถในการรีดิวซ์เหล็กเฟอริค

วัตถุประสงค์การวิจัย

1. เพื่อศึกษาตัวทำละลายได้แก่ น้ำ และเอทานอล ในการสกัดสารต้านออกซิเดชันจากส่วนต่างๆของมะรุม
2. เพื่อศึกษาความสามารถในการต้านออกซิเดชันด้วยวิธี ABTS และ FRAP

วิธีการวิจัย

การเตรียมวัตถุดิบตั้งต้น

คัดแยกใบมะรุมโดยเลือกใบที่มีสีเขียวสด ซึ่งใบมะรุมที่ใช้ในการทดลองเก็บมาจากสวนในมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี จังหวัดปทุมธานี ปี พ.ศ. 2561 ส่วนฝักมะรุมได้มาจากตลาดไท จังหวัดปทุมธานี ปี พ.ศ. 2561เลือกฝักที่สมบูรณ์มาล้างทำความสะอาด จากนั้นแยกมะรุมออกเป็น 3 ส่วน คือ เมล็ด เนื้อ และเปลือกมะรุม นำอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ประมาณ 24 ชั่วโมง หรือจนกว่าจะได้ความชื้น 10 เปอร์เซ็นต์ นำตัวอย่างที่ได้ไปบด และร่อนผ่านตะแกรงขนาด 1 mm เก็บตัวอย่างไว้ที่ -20 องศาเซียส เพื่อรอการสกัดและวิเคราะห์ในขั้นตอนต่อไป

การสกัดมะรุมด้วยตัวทำละลายต่างๆ

ชั่งตัวอย่าง (ใบ เมล็ด เนื้อ เปลือกมะรุม) 2.5 กรัม สกัดด้วยตัวทำละลาย 3 ชนิด ได้แก่ น้ำ 50% เอทานอล และ 95% เอทานอล ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ด้วยอัตราส่วนตัวอย่างต่อตัวทำละลาย 0.25:10 (w/v) เขย่าด้วยความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที ที่ทีอุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นกรองตัวอย่างผ่านกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 และปรับ

ปริมาตรให้ครบ 100 มิลลิลิตร ด้วยตัวทำละลายที่ใช้สกัด จากนั้นเก็บตัวอย่างไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อรอการวิเคราะห์ในขั้นต่อไป

การทดสอบด้วยอนุมูลอิสระ 2,2' –azinobis (3-ethy-benzothiazoline-6-sulfonate (ABTS)

วิธีการวิเคราะห์การต้านอนุมูลอิสระ ABTS ดัดแปลงวิธีการจาก Re et al. (1999) ABTS ถูกสร้างขึ้นด้วยการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันด้วยการผสมสาร ABTS ที่ความเข้มข้น 7 มิลลิโมลาร์ กับโพแทสเซียมเปอร์ซัลเฟตที่ความเข้มข้นสุดท้าย 2.45 มิลลิโมลาร์ ในสารละลายฟอสเฟตบัพเฟอร์เข้มข้น10 มิลลิโมลาร์ (pH 7.4) เก็บไว้ที่มืดเป็นเวลา 12-16 ชั่วโมง ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ ABTS วิเคราะห์โดยเริ่มเจือจางสารละลายให้อนุมูลอิสระABTS มีค่าการดูดกลืนแสงที่มีความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร เท่ากับ 0.70 (± 0.02) ด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์เข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ (pH 7.4) ปริมาตร 1980 ไมโครลิตร ผสมกับตัวอย่างสารสกัดปริมาณ 20 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน และเก็บไว้ที่มืดเป็นเวลา 5 นาที วัดกิจกรรมที่ค่าดูดกลืนแสงความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร แสดงความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ ABTS ของตัวอย่างในหน่วยเทียบเท่ามิลลิกรัมของ trolox ต่อกรัมตัวอย่าง (mg trolox eq./g)

ความสามารถในการรีดิวซ์เหล็กเฟอริค (ferric reducing antioxidant power assay, FRAP assay)

การวิเคราะห์ความสามารถในการรีดิวซ์เหล็กเฟอริคดัดแปลงจากวิธีการของ Benzie and Strain (1996) ดังนี้ ผสมสารละลายบัฟเฟอร์อะซิเตรทที่ความเข้มข้น 300 มิลลิโมลาร์ (pH 3.6) ปริมาตร 25 มิลลิลิตร สารละลาย 2,4,6-tripyridyl-*s*-triazine (TPTZ) ที่ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร ในสารละลายกรดไฮโดรคลอริคที่ความเข้มข้น 40 มิลลิโมลลาร์ และสารละลาย $FeCl_3.6H_2O$ ที่ความเข้มข้น 20 มิลลิโมลลาร์ ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร บ่มสารละลายดังกล่าวที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาทีก่อนนำไปใช้ (FRAP reagent) ความสามารถในการรีดิวซ์เหล็กเฟอริคของตัวอย่าง วิเคราะห์โดยใช้สารละลายตัวอย่างสกัดจำนวน 40 ไมโครลิตร ผสมกับน้ำกลั่นปริมาตร 200 ไมโครลิตร และ FRAP reagent ปริมาตร 1800 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 593 นาโนเมตร รายงานความสามารถในการรีดิวซ์เหล็กเฟอริคของตัวอย่าง แสดงในหน่วยเทียบเท่ามิลลิกรัมของ ferrous ต่อกรัมตัวอย่าง (mg ferrous eq./g)

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

การวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) ตามแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (completely randomized design; CRD) ทำการทดลอง 3 ซ้ำ และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (DMRT) ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

ผลการวิจัยและอภิปรายผล

จากการทดลองการสกัด ใบ เปลือก เนื้อ และ เมล็ดมะรุม ที่สกัดด้วยตัวทำละลาย น้ำ 50% เอทานอล และ 95% เอทานอล ผลการวิเคราะห์ความสามารถในการต้านออกซิเดชันด้วยวิธีความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระ ABTS แสดงดังตารางที่ 1 พบว่าตัวทำละลาย 50% เอทานอล สามารถสกัดสารที่มีความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระ ABTS จากใบได้สูงที่สุด ($P<0.05$) และสูงกว่าการใช้น้ำ และ 95% เอทานอล ตามลำดับ จากผลการทดลองดังกล่าวสอดคล้องกับงานวิจัยของ Vongsak et al. (2013) ว่าตัวทำละลายเอทานอลเข้มข้น 50% หรือ 70% เป็นตัวทำละลายที่สามารถสกัดสารที่ช่วยในการยับยั้งอนุมูลอิสระจากใบมะรุมได้มากกว่าการใช้น้ำหรือเอทานอลบริสุทธิ์ในการสกัด

เมื่อเปรียบเทียบที่ตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดชนิดเดียวกัน พบว่า สารสกัดจากใบมะรุมมีความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระ ABTS สูงที่สุดและสูงกว่าสารที่สกัดได้จาก เมล็ด เนื้อ และเปลือกมะรุม อย่างมีนัยสำคัญทาง

สถิติ (P<0.05) ซึ่งจากการทดลอง ใบมะรุมที่สกัดด้วย 50% เอทานอล มีค่าความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระ ABTS สูงสุดคิดเป็น 42.97 mg trolox eq./g รองลงมาคือ ตัวอย่างใบมะรุมที่สกัดด้วยน้ำ มีค่าความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระ ABTS คิดเป็น 39.23 mg trolox eq./g

จากการศึกษาพบว่าการวิเคราะห์ความความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระ ABTS เป็นเทคนิคที่ใช้ในการวัดฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระให้ผลการทดลองที่สอดคล้องกับการใช้วิธีวิเคราะห์ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH (Burits and Bucar, 2000) โดยสารต้านอนุมูลอิสระที่วิเคราะห์จากสกัดใบมะรุมได้มีคุณสมบัติในการรีดิวซ์หรือให้ไฮโดรเจนกับ $ABTS^{\bullet +}$ ซึ่งเป็นสารสีน้ำเงินและดูดกลืนแสงที่ 734 นาโนเมตร กลายเป็นสารที่ไม่มีสี (Re et al., 1999) โดยจากงานวิจัยของ Sreelatha and Padma (2009) รายงานว่าในใบมะรุมมีกรดแอสคอร์บิก 5.81-6.60 mg/g โทโคฟีรอล 5.63-6.53 μg/g และ แคโรทีนอยด์ทั้งหมด 85.20-92.38 mg/g

ตารางที่ 1 ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ ABTS ในสารสกัดด้วยตัวทำละลายต่างๆจาก ใบ เปลือก เนื้อ และเมล็ด มะรุม

Moringa oleifera	ABTS inhibitory activities (mg trolox eq./g)		
	Water	50% ethanol	95% ethanol
Leaf	$39.23^{bA} \pm 0.73$	$42.97^{aA} \pm 2.38$	$14.64^{cA} \pm 0.02$
Peel	$17.29^{aD} \pm 1.06$	$13.97^{bC} \pm 0.15$	$4.58^{cB} \pm 1.12$
Pulp	$23.23^{aC} \pm 0.88$	$19.47^{bB} \pm 0.06$	$4.41^{cB} \pm 0.08$
Seed	$29.49^{aB} \pm 1.83$	$12.78^{bD} \pm 0.03$	$3.67^{cB} \pm 0.24$

หมายเหตุ: อักษรภาษาอังกฤษตัวพิมพ์เล็กเหนือตัวเลขที่ต่างกันในแนวนอน และอักษรภาษาอังกฤษตัวพิมพ์ใหญ่เหนือตัวเลขที่ต่างกันในแนวตั้ง หมายถึง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05)

การตรวจสอบความสามารถในการรีดิวซ์เหล็กเฟอริค (FRAP assay) เป็นการวัดความสามารถรวมในการรีดิวซ์สารประกอบเชิงซ้อนของเหล็ก Fe^{3+}-TPTZ (ferric tripyridyltriazine) จะถูกรีดิวซ์โดยสารที่มีคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระได้เป็นสารประกอบเชิงซ้อนเหล็ก Fe^{2+} -TPTZ (ferrous tripyridyltriazine) ซึ่งให้ผลเป็นสีน้ำเงินรายงานผลเป็น ค่า FRAP value ในหน่วย mg ferrous eq./g (Pelletta, 2003)

ผลการวิเคราะห์ความสามารถในการรีดิวซ์เหล็กเฟอริค (ตารางที่ 2) พบว่าเมื่อเปรียบเทียบการใช้ตัวทำละลายในการสกัดที่ต่างกัน การใช้ 50% เอทานอล ในการสกัด สามารถสกัดสารที่มีความสามารถในการรีดิวซ์เหล็กเฟอริคสูงที่สุด รองลงมาคือ การใช้น้ำ และ 95% เอทานอล ตามลำดับ แต่เมื่อเปรียบเทียบที่ตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดเดียวกันพบว่าสารสกัดจากใบ และมะรุม มีความสามารถในการรีดิวซ์เหล็กเฟอริคสูงสุด รองลงมา เปลือก และเนื้อมะรุมตามลำดับ โดยการทดลองพบว่า สารสกัดจากใบมะรุมที่สกัดด้วย 50% เอทานอล มีความสามารถในการรีดิวซ์เหล็กเฟอริค สูงสุดคิดเป็น 0.59 mg ferrous eq./g รองลงมาคือ สารสกัดจากใบมะรุมที่สกัดด้วยน้ำ คิดเป็น 0.32 mg ferrous eq./g จากผลการทดลองแสดงว่าในตัวอย่างใบและเมล็ดมะรุมมีบทบาทสำคัญในการต้านออกซิเดชันด้วยวิธีรีดิวซ์เหล็กเฟอริค จากการศึกษาพบว่า สารที่พบในเมล็ดมะรุมเป็นสารในกลุ่มฟลาโวนอยด์ เช่น catechin, epicatechin, และ quercetin เป็นต้น (Govardhan et al., 2013)

ตารางที่ 2 ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ FRAP ในสารสกัดด้วยตัวทำละลายต่างๆจาก ใบ เปลือก เนื้อ และเมล็ด มะรุม

Moringa oleifera	Ferric reducing activities (mg ferrous eq./g)		
	Water	50% ethanol	95% ethanol
Leaf	$0.32^{bA} \pm 0.00$	$0.59^{aA} \pm 0.00$	$0.16^{cA} \pm 0.01$
Peel	$0.12^{aC} \pm 0.00$	$0.13^{aC} \pm 0.01$	$0.03^{bC} \pm 0.00$
Pulp	$0.25^{aB} \pm 0.03$	$0.23^{aB} \pm 0.04$	$0.04^{bBC} \pm 0.00$
Seed	$0.13^{aC} \pm 0.00$	$0.13^{aC} \pm 0.02$	$0.05^{bB} \pm 0.01$

หมายเหตุ: อักษรภาษาอังกฤษตัวพิมพ์เล็กเหนือตัวเลขที่ต่างกันในแนวนอน และอักษรภาษาอังกฤษตัวพิมพ์ใหญ่เหนือตัวเลขที่ต่างกันในแนวตั้ง หมายถึง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

สรุปผลการวิจัย

การวิเคราะห์ความสามารถในการต้านออกซิเดชันของสารสกัดจาก ใบ เปลือก เนื้อ และเมล็ด ที่สกัดด้วย น้ำ เอทานอลเข้มข้น 50% และ 95 % พบว่าวิธีการวิเคราะห์ด้วยความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระ ABTS และความสามารถในการรีดิวซ์เหล็กเฟอริค ให้ผลการทดลองที่สอดคล้องกัน คือ ใบมะรุมที่สกัดด้วย 50 % เอทานอล แสดงค่าความสามารถในการต้านออกซิเดชันสูงที่สุด โดยค่าความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระ ABTS คิดเป็น 42.97 mg trolox eq./g และความสามารถในการรีดิวซ์เหล็กเฟอริค คิดเป็น 0.59 mg ferrous eq./g, ตามลำดับ

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณคณะเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี ศูนย์รังสิต อาจารย์และบุคลากรในสาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีอาหารทุกท่านที่ให้คำปรึกษาและคำแนะนำ รวมถึงข้อเสนอแนะต่างๆ

เอกสารอ้างอิง

Amic D, Beslo D and Trinajstic N. Structure-radical scavenging activity relationships of flavonoids. Croatica Chemica Acta 2003; 76: 55–61.

Benzie IFF, and Strain JJ. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power” the FRAP assay. Analytical Biochemistry 1996; 239: 70-76.

Burits M, and Bucar F. Antioxidant activity of Nigella sativa essential oil. Phytotherapy Research, 2000; 14: 323-328.

Farooq F, Rai M, Tiwari A, Khan A, and Farooq S. Medicinal properties of *Moringa oleifera*: An overview of promising healer. Journal of Medicinal Plants Research 2012; 26(27): 4368-4374.

Govardhan Singh RS, Negi PS, and Radha C. Phenolic composition antioxidant and antimicrobial activities of free and bound phenolic extracts of *Moringa oleifera* seed flour. Journal of Functional Foods 2013; 5: 1883-1891.

Jongrungruangchok S, Bunrathep S, and Songsak T. Nutrients and minerals content of eleven different samples of *Moringa oleifera* cultivated in Thailand. Journal of Health Research 2010; 24(3): 123-127.

Muhammad AA, Arulselvan P, Karthivashan G. and, Fakurazi S. In vitro antioxidant properties of bioactive fraction of *Moringa oleifera*. Journal of Natural Products and Biomedical Research 2015; 1(2): 51-56.

Sreelatha S, and Padma PR. Antioxidant activity and total phenolic content of *Moringa oleifera* leaves in two stages of maturity. Plant Foods for Human Nutrition 2009; 64: 303-311.

Pelletta N, Serafini M, Colombi B, Rio DD, Salvatore S, Bianchi M, and Brighenti F. Total antioxidant capacity of plant foods, beverages and oils consumed in Italy assessed by three different in vitro assays. Journal of Nutrition 2003, 133(9): 2812-2819.

Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, and Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. Free Radical Biology and Medicine 1999; 26: 1231- 1237.

Vongsak B, Sithisarn P, Mangmool S, Thongpraditchote S, Wongkrajang Y, Gritsanapan W. Maximizing total phenolics, total flavonoids contents and antioxidant activity of *Moringa Oleifera* leaf extract by the appropriate extraction method. Industrial Crops and Products 2013; 44: 566-571.