

# ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดเอทานอลจากดอกชงโค อัญชัน เข็มฝรั่งและพุฒอมพล

## Total Phenolic Contents and Antioxidant Activity From Ethanolic *Bauhinia Purpurea*, *Clitoria Ternatea*, *Ixora Coccinea* and *Calliandra Haematocephala* Flower Extracts

สุธีรา มณีฉาย,<sup>1</sup> ประสบอร รินทอง<sup>2</sup>

Suthira Maneechai,<sup>1</sup> Prasob-on Rinthong<sup>2</sup>

Received: 30 May 2016 ; Accepted: 25 October 2016

### บทคัดย่อ

การวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากดอกพืชสี่ชนิดคือชงโค (*Bauhinia purpurea* L., Fabaceae), อัญชัน (*Clitoria ternatea* L., Fabaceae), เข็มฝรั่ง (*Ixora coccinea* L., Rubiaceae) และ พุฒอมพล (*Calliandra haematocephala* Hassk., Fabaceae) สารสกัดหยาบที่ใช้ในการศึกษาเตรียมด้วยวิธีการสกัดแบบไหลย้อนกลับโดยใช้เอทานอลเป็นตัวทำละลาย ผลการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบ ฟีนอลิกด้วยวิธี Folin-Ciocalteu colorimetry พบว่าสารสกัดเอทานอลจากดอกพุฒอมพลมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกสูงที่สุดเท่ากับ 104.41±3.89 มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อกรัมสารสกัด ผลการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดด้วยวิธี DPPH และ ABTS พบว่าค่า IC<sub>50</sub> ของสารสกัดดอกพุฒอมพลมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุด ซึ่งมีค่า IC<sub>50</sub> เท่ากับ 30.74±0.38 และ 25.31±0.35 ไมโครกรัมต่อมิลลิตรตามลำดับ

คำสำคัญ: ชงโค อัญชัน เข็มฝรั่ง พุฒอมพล ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

### Abstract

This research aimed to determine total phenolic contents and antioxidant activity from four ethanolic flower extracts; *Bauhinia purpurea* L.; Fabaceae, *Clitoria ternatea* L.; Fabaceae, *Ixora coccinea* L.; Rubiaceae and *Calliandra haematocephala* Hassk.; Fabaceae. The crude flower extracts were prepared by the reflux method using ethanol as a solvent. The results of Folin-Ciocalteu colorimetry showed that the highest total phenolic content was found in *C. haematocephala* extract (104.41±3.89 mg of gallic acid equivalent (GAE) /g extract). The maximum antioxidant activity as well as lowest IC<sub>50</sub> by DPPH and ABTS assay were found in *C. haematocephala* crude extract which were 30.74±0.38 and 25.31±0.35 µg/mL, respectively.

**Keywords:** *Bauhinia purpurea*, *Clitoria ternatea*, *Ixora coccinea*, *Calliandra haematocephala*, antioxidant activity

<sup>1</sup> อาจารย์, คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม อำเภอกันทรวิชัย จังหวัดมหาสารคาม 44150

<sup>2</sup> ผู้ช่วยศาสตราจารย์, คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม อำเภอกันทรวิชัย จังหวัดมหาสารคาม 44150

<sup>1</sup> Lecturer Faculty of Biology, Faculty of Science, Mahasarakham University, Kantarawichai District, Maha Sarakham, 44150, 2 Assist. Prof., Faculty of Pharmacy, Mahasarakham University, Kantarawichai District, Maha Sarakham, 44150, Thailand

\* Corresponding author; Suthira Maneechai, Department of Biology, Faculty of Science, Mahasarakham University, Kantarawichai District, Mahasarakham, 44150, Thailand, E-mail : maneechaik@gmail.com



100 ไมโครโมลาร์ ปริมาตร 180 ไมโครลิตรใส่ลงไมโครเพลท บ่มในที่มืด อุณหภูมิห้องนาน 20 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วย microplate reader (SPECTRO star Nano, BMG LabTech) ที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร ได้ค่าการดูดกลืนแสงของสารตัวอย่าง (As) และใช้เมทานอลเป็น negative control (Ac) และมีวิตามินซีเป็น positive control คำนวณหาฤทธิ์การต้านออกซิเดชันจากสูตร

$$\% \text{ radical scavenging} = [(Ac - As)/Ac] \times 100$$

สร้างกราฟระหว่างความเข้มข้นของสารตัวอย่างกับ

% radical scavenging แล้วหาค่า IC<sub>50</sub>

**5. การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS**

ทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS radical cation decolorization assay โดยอ้างอิงจาก Payet<sup>9</sup> ซึ่งมีวิธีการทดสอบดังนี้ เตรียมสารละลาย ABTS โดยนำสารละลาย ABTS 7 มิลลิโมลาร์ ผสมกับสารละลาย 2.45 มิลลิโมล K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub> ในอัตราส่วน 1:10 ตั้งทิ้งไว้ในที่มืด อุณหภูมิห้อง นาน 12-16 ชั่วโมง เจือจางสารละลาย ABTS ด้วยเอทานอลและ วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร ให้มีค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 0.7±0.02 ผสมสารละลาย ABTS 280 ไมโครลิตร กับสารละลายตัวอย่าง 20 ไมโครลิตร ใส่ลงไมโครเพลท ตั้งทิ้งไว้ในที่มืด 5 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง

ด้วย microplate reader (SPECTRO star Nano, BMG LabTech) ที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร ได้ค่าการดูดกลืนแสงของสารตัวอย่าง (As) และใช้เอทานอลเป็น negative control และมีวิตามินซีเป็น positive control ได้ค่า Ac

คำนวณหาฤทธิ์การต้านออกซิเดชันจากสูตร

$$\% \text{ Inhibition} = [(Ac - As)/Ac] \times 100$$

**6. การวิเคราะห์ทางสถิติ (Statistical analysis)**

ปริมาณสารประกอบฟีนอลิก การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH และ ABTS assay ทั้งหมดทำการทดสอบซ้ำตัวอย่างละ 3 ครั้ง (n=3) แสดงผลในรูปค่าเฉลี่ยและหาค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (S.D.) วิเคราะห์ความแปรปรวนของข้อมูลด้วย ANOVA

**ผลการวิจัย**

สารสกัดดอกขงโคมีลักษณะเป็นของเหลวหนืดสีชมพูอ่อน สารสกัดดอกอัญชันมีลักษณะเป็นของเหลวหนืดสีฟ้าแกมม่วง สารสกัดดอกเข็มแดงเป็นของเหลวหนืดสีแดงแกมส้มและสารสกัดดอกพู่จอมพลเป็นของเหลวหนืดสีแดงแกมชมพูเข้ม นำหนักสารสกัดเอทานอลเท่ากับ 2.381, 3.810, 3.969 และ 4.052 กรัมตามลำดับ ดังแสดงใน (Table 1)

**Table 1** Percentage of yield

Sample	Weight (g.)	Percentage of yield
<i>Bauhinia purpurea</i>	2.381	23.76
<i>Clitoria ternatea</i>	3.810	38.00
<i>Ixora coccinea</i>	3.969	39.57
<i>Calliandra haematocephala</i>	4.052	39.34

**1. การศึกษาปริมาณสารประกอบฟีนอลิก**

ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกคำนวณได้จากกราฟมาตรฐานกรดแกลลิก ( $y=0.2565x-0.0006$ ,  $R^2=0.997$ ) พบว่าสารสกัดดอกพู่จอมพลมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกสูงที่สุดเท่ากับ 104.41±3.89 มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อกรัมสารสกัด รองลงมาคือสารสกัดดอกเข็มฝรั่ง ชงโคและอัญชัน โดยมีค่าเท่ากับ 74.58±1.49, 37.51±0.4 และ 24.59±0.90 มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อกรัมสารสกัด ตามลำดับ ดังแสดงใน (Table 2)

**2. การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ**

การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ทำการคัดกรองฤทธิ์เบื้องต้นโดยใช้สารสกัดที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ถ้าสารสกัดมีฤทธิ์ยับยั้งมากกว่า 50% นำสารสกัด

นั้นมาทำการค่า IC<sub>50</sub> ต่อไป การทดสอบฤทธิ์ด้วยวิธี DPPH assay พบว่าสารสกัดดอกพู่จอมพลมีเปอร์เซ็นต์ยับยั้งสูงที่สุด 93.8±0.3% และมีค่า IC<sub>50</sub> เท่ากับ 30.74±0.38 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร รองลงมาคือสารสกัดดอกเข็มฝรั่ง ชงโคและอัญชันตามลำดับ โดยที่สารมาตรฐานวิตามินซีมีค่า IC<sub>50</sub> เท่ากับ 6.14±0.19 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร การทดสอบฤทธิ์ด้วยวิธี ABTS assay พบว่าสารสกัดดอกพู่จอมพลที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรมีเปอร์เซ็นต์ยับยั้งสูงที่สุด 96.5±1.9%และมีค่า IC<sub>50</sub> เท่ากับ 25.31±0.35 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ รองลงมาคือสารสกัดดอกเข็มฝรั่ง ชงโคและอัญชันตามลำดับ โดยที่สารมาตรฐานวิตามินซีมีค่า IC<sub>50</sub> เท่ากับ 6.17±0.04 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ดังแสดงใน (Table 3)

**Table 2** Phenolic content of flower extracts.

Sample	Total Phenolic (mg GAE/ g extract )
<i>Bauhinia purpurea</i>	37.51±0.44 <sup>c</sup>
<i>Clitoria ternatea</i>	24.59±0.90 <sup>d</sup>
<i>Ixora coccinea</i>	74.58±1.49 <sup>b</sup>
<i>Calliandra haematocephala</i>	104.41±3.89 <sup>a</sup>

Values are expressed as mean ± SD (n = 3) of triplicate measurement. Different letters in the column indicate significant differences at P < 0.05

**Table 3** Antioxidant activity of the flower extracts.

Sample	DPPH		ABTs	
	% inhibition	IC <sub>50</sub> (mg/ml)	% inhibition	IC <sub>50</sub> (mg/ml)
<i>Bauhinia purpurea</i>	36.7±0.2	-	25.3±1.3	-
<i>Clitoria ternatea</i>	14.9±0.6	-	10.3±0.2	-
<i>Ixora coccinea</i>	75.6±1.1	67.73±4.12 <sup>a</sup>	88.4±1.6	53.73±2.00 <sup>a</sup>
<i>Calliandra haematocephala</i>	93.8±0.3	30.74±0.38 <sup>b</sup>	96.5±1.9	25.31±0.35 <sup>b</sup>
Ascorbic acid	94.4±0.5	6.14±0.19 <sup>c</sup>	99.4±0.2	6.17±0.04 <sup>c</sup>

Values are expressed as mean ± SD (n = 3) of triplicate measurement. Different letters in the column indicate significant differences at P < 0.05

## วิจารณ์ผลการวิจัย

จากผลการทดลองพบว่าสารสกัดเอทานอลของดอกพุฒอมพล มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกมากที่สุด รองลงมาคือดอกเข็มฝรั่ง ชงโคและอัญชันตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระทั้งสองวิธี ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระทั้งวิธี DPPH และ ABTS พบว่าสารสกัดดอกพุฒอมพลมีฤทธิ์ที่ดีที่สุด โดยพิจารณาจากค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งที่สูงกว่าและ IC<sub>50</sub> ที่ต่ำกว่า เมื่อเปรียบเทียบกับสารมาตรฐานคือวิตามินซี พบว่าสารสกัดจากดอกของพืชทั้งสี่ชนิดมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระต่ำกว่าวิตามินซีทั้งวิธีทดสอบ DPPH และ ABTS

โดยพบว่าสอดคล้องกับงานวิจัยของ อรสุรินทร์<sup>10</sup> ทำการศึกษาฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระในกลุ่มดอกไม้ที่มีดอกสีแดงและดอกสีขาว พบว่าดอกสีแดงมีสารประกอบฟีนอลิกและฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระดีกว่าดอกสีขาว และสอดคล้องกับงานวิจัยของ Youwei<sup>2</sup> รายงานว่ากลุ่มดอกไม้สีแดงมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่สูงกว่ากลุ่มดอกไม้สีอื่น โดยสีส้มต่างๆ ของกลีบดอกเกิดจากการสร้างสารแอนโทไซยานินที่มีโครงสร้างทางเคมีแตกต่างกัน แอนโทไซยานินเป็นรงควัตถุที่ละลายน้ำได้สามารถพบได้ในแควีโอลและเซลล์เนื้อเยื่อชั้นนอกของดอก สารแอนโทไซยานินเป็นสารประกอบในกลุ่มฟลาโวนอยด์ ซึ่งที่จัด

อยู่ในกลุ่มของสารประกอบฟีนอลิก<sup>11,12</sup> ซึ่งปริมาณสารประกอบฟีนอลิกที่มีในสารสกัดมีความสัมพันธ์กับความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระที่ทดสอบด้วยวิธี DPPH และ ABTS และจากรายงานของ Moharram<sup>13</sup> ได้ศึกษาสารสำคัญที่พบจากส่วนใบและต้นของพุฒอมพล พบสาร gallic acid, methyl gallate, caffeic acid, myricitrin, quercetin, afzelin และ isoquercetin เป็นต้น ซึ่งสารกลุ่มนี้ Lu<sup>14</sup> ได้รายงานการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH พบว่า quercetin มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระค่า IC<sub>50</sub> เท่ากับ 1.00 ± 0.01 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร, วิตามินซี มีค่า IC<sub>50</sub> เท่ากับ 0.60 ± 0.01 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ gallic acid มีค่า IC<sub>50</sub> เท่ากับ 1.50 ± 0.02 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่า วิตามินซีมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ดีที่สุดมีค่า IC<sub>50</sub> ดีกว่าสาร quercetin เกือบสองเท่า และ Omar<sup>15</sup> วิจัยสารสำคัญในส่วนดอกของพืช *Calliandra surinamensis* พบสาร 3-O-rhamnosylquercitrin, 5'-prenylated kaempferol และสาร quercetin ยังไม่มีการศึกษาสารสำคัญในดอกพุฒอมพลเพื่อใช้เป็นข้อมูลอธิบายความสัมพันธ์ระหว่างสารกับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ จึงควรมีการศึกษาสารสำคัญของดอกพุฒอมพลต่อไป

## สรุปผลการวิจัย

จากผลการทดลองข้างต้นพบว่าสารสกัดดอกทั้งสี่ชนิด โดยสามารถแบ่งเป็นกลุ่มดอกสีแดงแกมชมพูเข้มคือดอกพุฒจอมพล กลุ่มดอกสีแดงแกมส้มคือดอกเข็ม ดอกชงโคสีชมพูแกมม่วงอ่อน และดอกอัญชันสีฟ้าแกมม่วง มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกแตกต่างกัน โดยปริมาณสารประกอบฟีนอลิกที่มีในสารสกัดมีความสัมพันธ์กับความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระที่ทดสอบด้วยวิธี DPPH และ ABTS เนื่องจากสารประกอบฟีนอลิกมีประโยชน์ต่อสุขภาพ สามารถป้องกันโรคต่างๆ โดยเฉพาะโรคหัวใจขาดเลือดและโรคมะเร็ง<sup>16</sup> สารสกัดจากดอกไม้ไทยที่มีสารประกอบฟีนอลิกนี้ โดยเฉพาะดอกพุฒจอมพลอาจสามารถนำไปใช้เป็นทางเลือกในบริโภคดอกไม้เพื่อการส่งเสริมสุขภาพ และการพัฒนาผลิตภัณฑ์เสริมอาหารต่อไป

## กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณคณะวิทยาศาสตร์และคณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคามที่ให้ความอนุเคราะห์เครื่องมือและสถานที่ในการดำเนินงานวิจัยจนเสร็จสมบูรณ์

## เอกสารอ้างอิง

- [1] Ames, B.N., Shigenaga, M.K. and Hagen, T.M. Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1993; 90 (17): 7915-7922.
- [2] Youwei Z, Jinlian Z, Yonghong P. A comparative study on the free radical scavenging activities of some fresh flowers in Southern China. *Food Science and Technology*. 2007; 41:1586-1591.
- [3] Piao MJ, Yoo ES, Koh Y S, Kang HK., Kim J, Kim YJ, Kang HH, Hyun JW. Antioxidant effects of the ethanol extract from flower of *Camellia japonica* via scavenging of reactive oxygen species and induction of antioxidant enzymes. *International Journal of Molecular Sciences*. 2011; 12(4): 2618–2630.
- [4] Perez C, Anesini C. In vitro antibacterial activity of Argentine folk medicinal plants against *Salmonella typhi*. *Journal of Ethnopharmacology*. 1994; 44: 41-46.
- [5] Wetwitayaklung P, Phaechamud T, Limmatvapirat C, Keokitichai S. The study of antioxidant activities of edible flower extracts. *Acta Horticulturae*. 2008; 786: 185-191.
- [6] Choi EM, Hwang JK. Investigations of anti-inflammatory and antinociceptive activities of *Piper cuceba*, *Physalis angulate* and *Rosa hybrida*. *Journal of Ethnopharmacology*. 2003; 89: 171-175.
- [7] Amin I, Norazaidah Y, Hainida KIE. Antioxidant activity and phenolic content of raw and blanched *Amaranthus* species. *Food Chemistry*. 2006; 94: 47-52.
- [8] Likhitwitayawuid K, Klongsirivet C, Jongbunprasert V, Sritularak B, Wongseripatana S. Flavone with free radical scavenging activity from *Goniothalamus tenuifolius*. *Archives of Pharmacol Research*. 2006; 29: 199-202.
- [9] Payet B, Shum Cheong Sing A, Smadja J. Assessment of antioxidant activity of cane brown sugars by ABTS and DPPH radical scavenging assays: determination of their polyphenolic and volatile constituents. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2005; 53: 10074-10079.
- [10] อรุณรัตน์ ฮวบบางยาง, มัณฑนา บัวหนอง, เฉลิมชัย วงษ์อารี, ชัยรัตน์ เตชะวุฒิพร, วาริช ศรีละออง. การศึกษาคคุณค่าทางอาหารและความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระในดอกไม้ที่รับประทานได้. *วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร ปีที่ 41 ฉบับที่ 3/1 (พิเศษ)*. 2553; 381-384.
- [11] ศูนย์สารสนเทศวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักหอสมุดและศูนย์สารสนเทศวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี. แอนโทไซยานิน. ประมวลสารสนเทศพร้อมใช้ IR21. กรมวิทยาศาสตร์บริการ กระทรวงวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มิถุนายน: 2553 ได้จาก: <http://www.chaipanich.co.th/userfiles/files/แอนโทไซยานินกรมวิทย์.pdf>. July 4 2016.
- [12] Lee J, Durst RW, Wrolstad RE. Determination of total monomeric anthocyanin pigment content of fruit juices, beverages, natural colorants, and wines by the pH differential method: collaborative study.: *Journal of AOAC International*. 2005; 88: 1269-1278.
- [13] Moharram FA, Marzouk MS, Ibrahim MT Mabry TJ. Antioxidant galloylated flavonol glycosides from *Calliandra haematocephala*. *Natural Product Research*. 2006; 20: 927–934.
- [14] Lu Y, Khoo TJ, Wiart C. Antioxidant activity determination of citronellal and crude extracts of *Cymbopogon citratus* by 3 different methods. *Pharmacology & Pharmacy*. 2014; 5: 395-400.

- [15] Omar SM, Ahmat N, Azmin NFN, Sabandar CW, Muqarrabun LMRA. Isolation and characterization of chemical constituents from the flower of *Calliandra surinamensis* Benth. The Open Conference Proceedings Journal. 2013; 4: 179.
- [16] Newmark HL. Plant phenolics as potential cancer prevention agents. New York: Springer; 1996. P. 25-34 (Dietary Phytochemicals in Cancer Prevention and Treatment series Advances in Experimental Medicine and Biology; vol 401).