ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดเมทานอลจากดอกไม้หอมห้าชนิด

Antioxidant activities and total phenolic contents of methanolic extract from five fragrant flowers.

สุรพงศ์ รัตนะ[1]*, บรรลือ สังข์ทอง[2]

Surapong Rattana[1]* , Bunleu Sungthong[2]

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อหาฤทธิ์ต้านนอนุมูลอิสระ และปริมาณสารฟีนอลิก ของสารสกัดเมทานอลของกลีบดอกของดอกไม้หอมห้าชนิดคือ ดาหลา (*Etlingera elatior* (Jack) R.M. Smith) พิกุล (*Mimusops elengi* L.) แก้ว(*Murraya paniculata* (L.) Jack) บัวหลวง (*Nelumbo nucifera* Gaerth) และกุหลาบ (*Rosa* sp.) หาปริมาณฟีนอลิกด้วย Folin-Ciocalteumethod และทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ด้วย DPPH และ ABTS methods

สารสกัดที่ให้ปริมาณฟีนอลิกมากที่สุดได้แก่ กุหลาบ เมื่อเปรียบเทียบกับสารสกัดอื่น (p<0.05) และให้ฤทธิ์ต้านอนุมูลสระมากที่สุดด้วย โดยมีค่า EC_{50}ในการทดสอบด้วยวิธี DPPH และ ABTS เท่ากับ 12.26 ± 0.80 และ 8.93 ± 1.10 µg/mL ตามลำดับ แตกต่างกับพืชอื่น (p<0.05) แต่ไม่แตกต่างกับ ascorbic acid (p>0.05) และเมื่อทดสอบความสัมพันธ์ ด้วย Pearson Correlation พบว่าปริมาณฟีนอลิกมีความสัมพันธ์กับการออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH และ ABTS อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (r =0.899 และ 0.943)ตามลำดับ

คำสำคัญ: ดอกไม้ สารฟีนอลิก ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

---

[1]นักวิจัย, [2] ผู้ช่วยศาสตราจารย์, หน่วยปฏิบัติการวิจัยเภสัชเคมีและผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม ตำบลขามเรียง อำเภอกันทรวิชัย จังหวัดมหาสารคาม 44150

[1]Researcher, [2] Asst. Prof., Pharmaceutical Chemistry and Natural Products Research Unit, Faculty of Pharmacy, Mahasarakham University, Khamriang, Kantharawichai, MahaSarakham 44150, Thailand

* Corresponding author, e-mail: Surapong Rattana, Faculty of Pharmacy, Mahasarakham University, Khamriang, Kantharawichai, MahaSarakham 44150, Thailand , surapong.rattana@yahoo.com

Abstract

This study aimed to investigate antioxidant activities and total phenolic contents of 5 fragrant flower methanolic extracts comprise *Etlingera elatior* (Jack) R.M. Smith, *Mimusops elengi* L., *Murraya paniculata* (L.) Jack, *Nelumbo nucifera* Gaerth and *Rosa* sp. Total phenolic contents were determined by Folin-Ciocalteu method. Antioxidant capacities were carried out by DPPH and ABTS methods compared with L-ascorbic acid.

Rosa sp. extract showed the highest phenolic content ($p<0.05$) and showed the highest antioxidant capacities with EC_{50} =12.26 ± 0.80 and8.93 ± 1.10 µg/mL for DPPH and ABTS methods, respectively. These finding exhibited significant difference comparing with other flower extracts($p<0.05$) . However,significant difference was not observed compared with L-ascorbic acid($p>0.05$). The Pearson Correlation revealed that phenolic content was significantly correlated with DPPH and ABTS radical scavenging activities (r =0.899 and0.943, respectively).

Keywords: flower, total phenolic, antioxidant

บทนำ

อนุมูลอิสระในร่างกายมนุษย์ มีปัจจัยที่เกิดขึ้นมากมายทั้งภายในและภายนอกร่างกาย วิถีชีวิตในปัจจุบันที่เปลี่ยนแปลงไป การไม่ใส่ใจสุขภาพ ไม่ว่าจะเป็นเรื่องการคัดเลือกคุณค่าและปริมาณของอาหารที่รับประทานที่ไม่เหมาะสม การพักผ่อนไม่เพียงพอ ไม่มีเวลาสำหรับการออกกำลังกาย การมีความเครียดท่ามกลางสภาวะแวดล้อม และมลภาวะรอบตัว ซึ่งล้วนเป็นปัจจัยที่เพิ่มอนุมูลอิสระในตัวเราทั้งสิ้น ซึ่งในวงการแพทย์ พบว่าเป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้เซลล์เสื่อม นำไปสู่การแก่ชราหรือความเสี่ยงต่อการเกิดโรคต่างๆ เช่น โรคหัวใจ โรคมะเร็ง โรคเบาหวาน โรคความดันโลหิตสูง เป็นต้น[1] ทำให้พบปัญหาสุขภาพจากโรคเรื้อรังมากขึ้นในช่วงอายุที่น้อยลง จากรายงานการศึกษาต่างๆพบว่า สารพฤกษเคมีจำนวนมาก โดยเฉพาะสารกลุ่มฟีนอลิก มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ[2]การได้รับสารธรรมชาติที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิระ จึงลดความเสี่ยงและความรุนแรงโรคเรื้อรังที่มีสาเหตุมาจากอนุมูลอิสระได้

ดอกไม้ทั้ง 5 ชนิด คือ ดอกดาหลา ดอกพิกุล ดอกแก้ว ดอกบัวหลวง และดอกกุหลาบ เป็นไม้ดอกหอม ที่เกิดขึ้นและเพาะพันธุ์ง่ายในประเทศไทย ราคาถูก ผู้วิจัยจึงมีความประสงค์ที่จะศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมด เพื่อคัดเลือกสารสกัดที่มีฤทธิ์ดีและมีปริมาณสารสำคัญสูง ไปพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติ เพื่อลดอันตรายจากภาวะปริมาณอนุมูลอิสระสูงในร่างกาย และลดความเสี่ยงในการเกิดโรคเรื้องรังต่างๆด้วย

วัสดุอุปกรณ์และวิธีการศึกษา

การสกัด

ทำการสกัดและทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของดอกไม้ 5 ชนิดได้ แก่ ดาหลา (*Etlingera elatior* (Jack) R.M. Smith) พิกุล (*Mimusops elengi* L.) แก้ว (*Murraya paniculata* (L.) Jack) บัวหลวง (*Nelumbo nucifera* Gaerth) และกุหลาบ (*Rosa* sp.) โดยใช้ส่วนของกลีบดอกสมบูรณ์ ที่เก็บบริเวณมหาวิทยาลัยมหาสารคาม ในช่วงเดือนพฤษภาคม พ.ศ.2559นำมาทำความสะอาด ผึ่งลมให้แห้ง และ อบ

ด้วย hot air oven ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง บดให้เป็นผงละเอียด และทำการสกัดด้วยคลื่นเสียงความถี่สูง ด้วยเครื่อง sonicator ความแรง 40% เป็นเวลา 30 นาที โดยใช้ตัวทำละลายคือ methanol อัตราส่วนของสารตัวอย่างและตัวทำละลายเท่ากับ 1:10 %w/v จากนั้นกรองเอาสารละลายด้วยกระดาษกรองเบอร์ 0 นำสารละลายที่ได้ไปทำการระเหยแห้งด้วย rotary evaporator และทำแห้งโดย freeze dryer ทำการบันทึกน้ำหนัก และลักษณะของสารสกัดหยาบที่ได้ เก็บสารสกัดในภาชนะปิด ที่อุณหภูมิห้อง เพื่อทำการทดสอบฤทธิ์ต่อไป

การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

1. วิธี DPPH free radical scavenging activity เป็นวิธีการทดสอบฤทธิ์ต้านปฏิกิริยาออกซิเดชัน โดยทำปฏิกิริยาระหว่างสารตัวอย่าง กับ DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazy) ซึ่งเป็นสีม่วง เมื่อทำปฏิกิริยากับสารต้านอนุมูลอิสระ จะเปลี่ยนเป็น DPPH:H ซึ่งไม่มีสี โดยดัดแปลงวิธีทดสอบมาจาก Zhang et al.[3]คือ เตรียมสารตัวอย่างที่ความเข้มข้นต่างๆ ในสารละลาย methanol ดูดมา 100 ไมโครลิตร ทำปฏิกิริยากับ สารละลาย 0.16 mM DPPH ใน methanol ปริมาตร 100 ไมโครลิตร บ่ม 30 นาทีในที่มืด แล้วนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร โดยมีสารต้านอนุมูลอิสระที่ใช้เป็น positive control ได้แก่ L-ascorbic acid นำไปคำนวณค่าตามสมการที่ 1 DPPH scavenging effect (%) = [(Acontrol – Asample)/ Acontrol] x 100 (โดยที่ Acontrol, Asampleคือ สารละลายDPPH ที่ไม่เติมสารสกัด และ สารละลาย DPPH ที่เติมสารสกัด) จากนั้นนำไปคำนวณหาค่า EC_{50}ของสารสกัดแต่ละชนิด และเปรียบเทียบกับค่า EC_{50}ของ L-ascorbic acid

2. วิธี ABTS scavenging activity เป็นการทดสอบโดย ABTS (2,2'-Azino-bis-(3-ethybenzothiazoline-6-sulfonic acid diammonium salt) จะถูกเปลี่ยนเป็นอนุมูลอิสระที่มีประจุบวกด้วยการเติม potassium persulfate เมื่อเกิดปฏิกิริยากับสารต้านอนุมูลอิสระจะเปลี่ยนจากสีเขียวเป็นไม่มีสี โดยทดสอบโดยดัดแปลงมาจากวิธีของ Rahim et al.[4]เตรียมสารละลาย ABTS โดยการผสม 75 mM ABTS กับ 1.225 mM potassium persulfate ในน้ำกลั่น บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 16 ชั่วโมง จากนั้นนำมาเจือจางด้วย methanol จนสารละลายมีค่าดูดกลืนแสงเท่ากับ 0.7 ที่ค่าความยาวคลื่น 415 นาโนเมตร การทำปฏิกิริยาทำได้โดย เตรียมสารตัวอย่างที่ความเข้มข้นต่างๆ ในสารละลาย methanol ดูดมา 100 ไมโครลิตร ทำปฏิกิริยากับ สารละลาย ABTS ใน methanol ปริมาตร 300 ไมโครลิตร บ่ม 1ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง แล้วนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 415 นาโนเมตร โดยมีสารต้านอนุมูลอิสระที่ใช้เป็น positive control ได้แก่ L-ascorbic acid นำไปคำนวณค่าตามสมการที่ 2ABTS scavenging effect (%) = [(Acontrol – Asample)/ Acontrol] x 100 (โดยที่Acontrol, Asampleคือ สารละลายABTS ที่ไม่เติมสารสกัด และ สารละลาย ABTS ที่เติมสารสกัด) จากนั้นนำไปคำนวณหาค่า EC_{50}ของสารสกัดแต่ละชนิด และเปรียบเทียบกับค่า EC_{50}ของ L-ascorbic acid

การหาปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมดด้วยวิธี Folin-Ciocalteu

เตรียมสารละลายมาตรฐาน gallic acid ความเข้มข้น 1 – 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร นำสารละลายแต่ละความเข้มข้นมา1 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่น 1.5 มิลลิลิตร ตามด้วยสารละลาย FolinCiocalteu reagent 10% 0.5 มิลลิลิตรผสมให้เข้ากัน ทิ้งไว้ 1 นาที จากนั้นเติม sodium carbonate 7.5 % ลงไป 1 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 740 นา

โนเมตร นำค่าที่ได้ไปสร้างกราฟมาตรฐาน ระหว่างค่าการดูดกลืนแสง (y) และความเข้มข้นสารละลาย gallic acid (x) เตรียมสารสกัด 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ทำปฏิกิริยาเช่นเดียวกับ gallic acid เมื่อได้ค่าดูดกลืนแสงของสารตัวอย่างแล้ว นำไปเปรียบเทียบกับกราฟสารละลาย gallic acid ซึ่งปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมดจะวิเคราะห์ในรูปมิลลิกรัมสมมูล gallic acid / กรัมของสารสกัด โดยดัดแปลงวิธีมาจาก Zhang et al. [3]

การหาค่าความสัมพันธ์ระหว่างฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระและประมาณสารฟีนอลิก

ทำการหาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ ตามวิธีข้างต้น โดยใช้สารสกัดทดสอบที่ความเข้มข้นเดียว คือ ที่ 0.025 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรของสารสกัดดอกไม้ ทั้ง 5 ชนิด เพื่อหาค่า % DPPH scavenging effect และ % ABTS scavenging effect ตามสมการที่ 1 และ 2 ตามลำดับ นำค่า % scavenging effect ในแต่ละวิธีไปการหาค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์เพียร์สัน (Pearson correlation coefficient, r) โดยเปรียบเทียบกับปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมด ค่า r เข้าใกล้ 1 มาก แสดงว่า มีความสัมพันธ์มาก[5]

การทดสอบทางสถิติ

ทดสอบค่าความแตกต่างของฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดดอกไม้ 5 ชนิด โดยการวิเคราะห์ความแปรปรวนโดยวิธี ANOVA ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% จากนั้นเปรียบเทียบความแตกต่างรายคู่โดย Duncan multiple rang test (DMRT) และวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณสารฟีนอลิกและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH และ ABTS ด้วยการหาค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์เพียร์สัน (Pearson correlation coefficient, r)

ผลการศึกษาและวิจารณ์

การสกัดสารสกัดดอกไม้ 5 ชนิด ด้วยเครื่อง sonicatorและใช้ methanol เป็นสารละลาย พบว่าได้ปริมาณสารสกัด ดังแสดงใน Table 1 และเมื่อทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH และ ABTS พบว่าได้ค่า EC_{50}ของสารสกัดดอกไม้ 5 ชนิด ดังแสดงใน Table 2 และการหาปริมาณสารฟีนอกลิกทั้งหมด ดังแสดงใน Figure 1 และผลวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณสารฟีนอลิกและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ดังแสดงใน Figure 2 และ Table 3

จากผลการศึกษาในครั้งนี้ พบว่า พืชที่มีค่าการต้านอนุมูลอิสระน้อยจะแปลผันตรงต่อปริมาณสารฟีนอลิกที่น้อยตามไปด้วย คือ สารสกัดดอกแก้วและดอกพิกุล พบว่าสารสกัดดอกแก้วมีองค์ประกอบทางเคมีที่เป็นสารกลุ่ม coumarin[6]และจากการศึกษาดอกพิกุลของ Shailajan et al.[7] พบสารกลุ่ม terpenoidsเช่น beta-sitosterol, lupeolเป็นต้น และพบสารฟีนอลิก คือgallic acid และจากพืชตัวอย่างพบสารสกัดมีสารฟีนอลิก เป็นองค์ประกอบจำนวนมาก ซึ่งสารสกัดที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงคือ ดาหลา บัวหลวง องค์ประกอบทางเคมีของดาหลา คือ caffeoylquinic acid, chlorogenic acid, quecetinและ iso-quecetin[8] บัวหลวง มีสารพฤกษเคมีต่างๆ เช่น keamferol, quercetin และอนุพันธ์ เป็นต้น[9] และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุดคือ กุหลาบ องค์ประกอบทางเคมีของกุหลาบ คือ anthocyanins, quercetins, catechin, และ phenolic acids[10]ซึ่งสารสกัดทั้งหมดนี้มีสารกลุ่มฟีนอลลิกเป็นองค์ประกอบอยู่แล้ว เพียงแต่ต้องพัฒนาวิธีการสกัดที่เหมาะสมที่จะได้สารออกฤทธิ์ต่างๆมากขึ้น ซึ่งต้องมีการศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการสกัดต่อไป

Table 1 Scientific name and % yield of extracts

Scientific name	Family	% yields
Etlingera elatior (Jack) R.M. Smith	Zingiberaceae	4.7 ± 0.28
Mimusops elengi L.	Sapotaceae	6.9 ± 0.56
Murraya paniculata (L.) Jack	Rutaceae	8.7 ± 0.73
Nelumbo nucifera Gaerth	Nelumbonaceae	3.7 ± 0.15
Rosa sp.	Rosaceae	5.6 ± 0.21

Table 2 antioxidant activities of flower extracts and L-ascorbic acid

Plant sample	EC_{50} (µg/mL)	
	DPPH	ABTS
E. elatior	117.96 ± 5.19 [b]	88.90 ± 19.48 [b]
M. elengi	190.427 ± 25.83 [c]	192.35 ± 25.83 [c]
M. paniculata	1442.24 ± 13.22 [d]	508.04 ± 79.08 [d]
N. nucifera	133.95 ± 4.24 [b]	62.32 ± 5.15 [b]
Rosa sp.	12.26 ± 0.80 [a]	8.93 ± 1.10 [a]
L-ascorbic acid	3.37 ± 0.01 [a]	7.63 ± 0.13 [a]

* The different letters in the same column showed the significant difference ($p<0.05$).

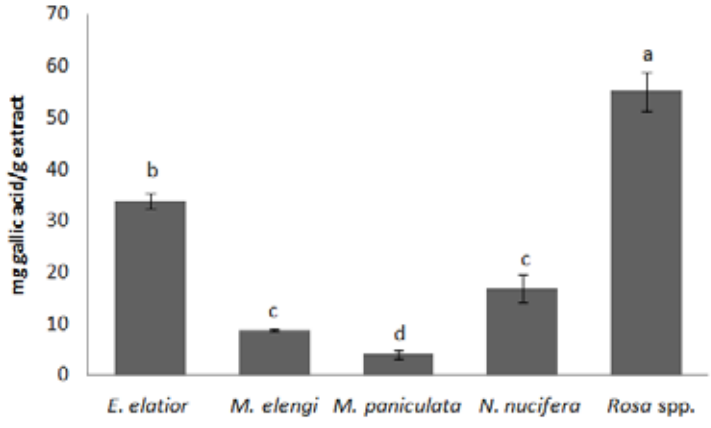

Figure 1 The phenolic content of 5 fragrant flower extracts. The different letters showed the significant difference ($p<0.05$).

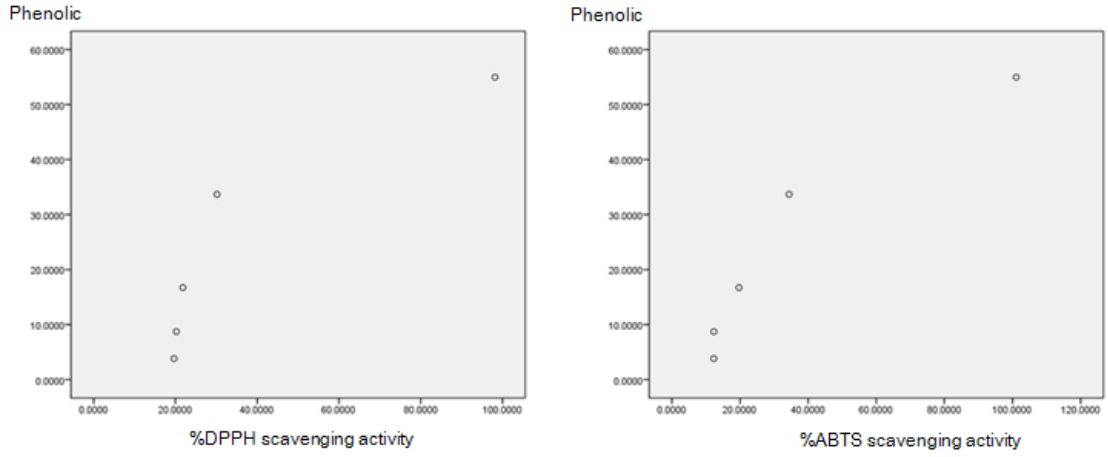

Figure 2 The Correlation between phenolic content and DPPH and ABTS scavenging activities

Table 3 The Correlation between phenolic content and DPPH, ABTS scavenging activities using Pearson correlation coefficient

Phenolic and DPPH				Phenolic and ABTS			
		Phenolic	DPPH			Phenolic	ABTS
Phenolic	Pearson Correlation	1	.899*	Phenolic	Pearson Correlation	1	.943*
	Sig. (2-tailed)		.038		Sig. (2-tailed)		.016
	N	5	5		N	5	5
DPPH	Pearson Correlation	.899*	1	ABTS	Pearson Correlation	.943*	1
	Sig. (2-tailed)	.038			Sig. (2-tailed)	.016	
	N	5	5		N	5	5

*. Correlation is significant at the 0.05 level

สรุปผลการศึกษา

สารสกัดที่ให้ปริมาณฟีนอลิกมากที่สุดได้แก่ กุหลาบ เมื่อเปรียบเทียบกับสารสกัดอื่น ($p<0.05$) และให้ฤทธิ์ต้านอนุมูลสระมากที่สุด โดยให้ค่า EC_{50}ในการทดสอบด้วย DPPH และ ABTS เท่ากับ 12.26 ± 0.80และ 8.93 ± 1.10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ แตกต่างกับพืชอื่น ($p<0.05$) แต่ไม่แตกต่างกับ L-ascorbic acid ($p>0.05$) และเมื่อทดสอบความสัมพันธ์ ด้วย Pearson Correlation ปริมาณฟีนอลลิกมีความสัมพันธ์กับการออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH และ ABTS อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($r=0.899$ และ 0.943 ตามลำดับ)

เอกสารอ้างอิง

1. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MTD, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. Int J Biochem Cell Biol 2007; 39: 44-84.
2. Pereira DM, Valentão P, PereiraJA, AndradePB. Phenolic: From chemistry to biology. Molecules 2009; 14: 2202-2211.
3. Zhang WW, Duan XJ, Huang HL, Zhang Y, Wang BG,. Evaluation of 28 marine algae from the Qingdao coat for antioxidative capacity and determination of antioxidant efficiency and total phenolic content of fractions derived from *Symphyocladia latiuscula* (Rhodomelaceae). J. Appl. Phycol. 2007; 19: 97 – 108.
4. Rahim AA, Rocca E, Steinmetz J, Kassim MJ, Ibrahim MS, Osman H,. Antioxidant activities of mangrove *Rhizophora apiculate* bark extract. Food Chem. 2008; 107(1): 200-207.
5. Mukaka MM. Statistics Corner: A guide to appropriate use of Correlation coefficient in medical research. MMJ. 2012; 24(3): 69-71.
6. Wu TS, Liou MJ, KuohCS,.Coumarins of the flowers of *Murraya paniculata*. Phytochem. 1989; 28(1): 293-294.
7. Shailajan S, GurjarD,. Evaluation of *Mimosops elengi* L. flowers using pharmacognostic approach. Phcog. Commn. 2015; 5(1): 83-92.
8. Chan EWC, Lim YY, Wong SK,.Phytochemistry and Pharmacological Properties of *Etlingera elatior*: A Review.Pharmacog. J. 2011; 3(22): 6-10.
9. Mehta NR, Patani EPPPV, Shah B. *Nelumbo nucifera* (Lotus): A review on ethanobotany, phytochemistry and pharmacology. Indian J.Pharm.Biol.Res. 2013; 1(4):152-167.
10. Schmitzer V, Veberic R, Osterc G, Stampar F, Changes in the phenolic concentration during flower development of rose 'KORcrisett'. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 2009; 134(5): 491–496.