

บทความวิจัย (Research Article)

การวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิก และความสามารถต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากดอกเก๊กฮวย

รวีสรา รื่นไวย*

Analysis of phenolic content and free radical scavenging capacity of *Chrysanthemum* flower extracts

Rawisara Ruenwai*

Division of Biotechnology, School of Agriculture and Natural Resources, University of Phayao, Phayao Province 56000

*Correspondence to: rawisara.rue@hotmail.com

Naresuan Phayao J. 2020;13(1):16-20.

Received; 17 October 2019; Revised: 12 March 2020; Accepted: 15 March 2020

บทคัดย่อ

การศึกษามุ่งหมายวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ของเก๊กฮวยดอกเหลือง (*Chrysanthemum indicum* Linn.) และเก๊กฮวยดอกขาว (*Chrysanthemum morifolium* Ramat.) ใช้ตัวทำละลาย 2 ชนิด เอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 95 และน้ำกลั่นปลอดเชื้อ ฟีนอลิกทั้งหมดของเก๊กฮวยดอกขาวสกัดด้วยเอทานอลสูงสุดเท่ากับ 343.40 ± 6.88 มก. สมมูลกรดแกลลิกต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ขณะที่ชนิดตัวทำละลายไม่มีผลต่อปริมาณฟีนอลิกของเก๊กฮวยดอกเหลือง การสกัดดอกทั้งสีเหลืองและสีขาวด้วยเอทานอลได้ปริมาณฟลาโวนอยด์สูงกว่าการสกัดด้วยน้ำกลั่น มีค่าเท่ากับ 455.75 ± 12.38 และ 441.92 ± 43.59 มก. สมมูลคาเทชินต่อกรัมน้ำหนักแห้งตามลำดับ ด้วยการวิเคราะห์ 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) สารสกัดด้วยเอทานอลของดอกขาวเทียบเคียงเท่ากับ 197.04 ± 1.57 มก. สมมูลวิตามินซีต่อกรัมน้ำหนักแห้ง นอกจากนี้ สารสกัดดอกเหลืองและดอกขาวสามารถในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสและยับยั้งการออกซิเดชันโดยไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p > 0.01$)

คำสำคัญ: เก๊กฮวยดอกเหลือง, เก๊กฮวยดอกขาว, ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ, สารประกอบฟีนอลิก

Abstract

The study was aimed to analyze the content of phenolic content and flavonoids of *Chrysanthemum indicum* and *Chrysanthemum morifolium* flower extracts by using 2 types of solvents, 95 percent ethanol, and sterile distilled water. The results showed that the total phenolic content of white *chrysanthemum* extracted with ethanol was highest as 343.40 ± 6.88 mg gallic acid equivalent per gram of dry weight (GAE/100 g DW), In the other hand, the type of solvent does not affect the phenolic content of yellow *chrysanthemum* flowers. Extraction of yellow and white flowers with ethanol resulted in a higher content of flavonoids than distilled water extracts, equivalent to 455.75 ± 12.38 and 441.92 ± 43.59 mg equivalent of catechin per gram of dry weight, respectively. Using 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) assay, the ethanol extract of white flower

was equal to 197.04 ± 1.57 mg vitamin C equivalent per gram of dry weight. In addition, the yellow and white flower extracts can reduce iron that can accelerate oxidation and were not significant ($p>0.01$).

Keywords: *Chrysanthemum indicum*, *Chrysanthemum morifolium*, free radical scavenging capacity, phenolic compound

บทนำ

เก็กฮวยดอกเหลือง (*Chrysanthemum indicum* Linn.) และเก็กฮวยดอกขาว (*Chrysanthemum morifolium* Ramat.) วงศ์ Compositae เจริญเติบโตดีในสภาพอากาศเย็น ปลูกมากทางภาคเหนือของประเทศไทย เริ่มปลูกก่อนฤดูฝนประมาณเดือนมิถุนายน ถึง สิงหาคม ดอกบานเต็มช่วงเดือนกันยายน ถึงธันวาคม การศึกษาของประเทศจีน เกาหลี และญี่ปุ่นรายงานสารประกอบทางเคมีของเก็กฮวยดอกขาว ประกอบด้วย ฟีนอลิก ฟลาโวนอยด์ โดยเฉพาะ caffeoylquinic acids (CQAs) [1,2] ส่วนเก็กฮวยดอกเหลืองประกอบด้วย ฟลาโวนอยด์ (quercitrin และ myricetin) อันเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) จัดสรรพิษ ดูดซับสารก่อมะเร็ง และต้านจุลชีพ [3]

สารสกัดของเก็กฮวยดอกเหลืองใช้เป็น ส่วนผสมในผลิตภัณฑ์หลายรูปแบบ อย่างเช่น สารป้องกันการเกิดสีน้ำตาล (antibrowning agents) ในผัก และผลไม้ [4] และสารออกฤทธิ์ (active ingredients) ในผลิตภัณฑ์ใช้กับผิวหนังเพื่อป้องกันอนุมูลอิสระ (antioxidant) ชะลอวัย (anti-aging) และทำให้ผิวขาว (whitening) [5] นอกจากนี้ ยังมีสารให้กลิ่นหอมหลาย ชนิดเกี่ยวข้องกับระบบการหายใจ หลอดเลือด และการขยายหลอดเลือด [6]

การศึกษามุ่งหมายกำหนดหาปริมาณฟีนอลิก ฟลาโวนอยด์ และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากดอกเก็กฮวย โดยใช้ตัวทำละลาย 2 ชนิด คือน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ และเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 95

วัสดุและวิธีการ

ใช้เก็กฮวยดอกขาว จากแหล่งตำบลแม่สาบ อำเภอสะเมิง จังหวัดเชียงใหม่ และเก็กฮวยดอกเหลือง พันธุ์สะเมาะ จากแหล่งตำบลแม่นาเรือ อำเภอเมือง จังหวัดพะเยา เก็บตัวอย่างช่วงดอกบานเต็มที่ แต่ละ

พื้นที่เก็บอย่างน้อย 5 ตำแหน่ง สุ่มเก็บ 10 ดอกต่อต้น ต่อครั้ง บรรจุถุง และระบุสถานที่ (รูป 1)



รูป 1 บน เก็กฮวยดอกขาว ล่าง เก็กฮวยดอกเหลือง

ล้างตัวอย่างด้วยน้ำกลั่น อบแห้ง ณ อุณหภูมิ 70°C บดเป็นผงละเอียดด้วยเครื่องปั่น บรรจุใส่ถุง กระดาษหุ้มโลหะบาง และเก็บ ณ อุณหภูมิห้อง สกัดสารตัวอย่างโดยวิธีการหมัก (maceration) ด้วยตัวทำละลาย 2 ชนิด คือน้ำกลั่นปลอดเชื้อ และเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 95 อัตราส่วน 1 ต่อ 19 (น้ำหนักต่อปริมาตร) เขย่าและทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง กรองด้วย Miracloth (Merck Biosciences, UK) และระเหยตัวทำละลายด้วย rotary evaporator (Heidolph, Switzerland) ซึ่งน้ำหนักแห้งพร้อมปรับปริมาตรของสารสกัดด้วยเอทานอล (Merck, Germany) และเก็บสารสกัดในขวดแก้วสีชา ณ อุณหภูมิ -20°C ก่อนการวิเคราะห์

วัดปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด โดยดัดแปลงวิธี Folin-Ciocalteu Colorimetric ของ Sharma [7] ใส่สารสกัด 0.2 มล. ในสารละลายเจือจาง 10 เท่าของ Folin-Ciocalteu (Merck, USA) ปริมาตร 1.5 มล. ผสมเข้ากัน

ทั้งหมด 5 นาที ก่อนเติมสารละลาย ร้อยละ 6 โซเดียมคาร์บอเนต (Ajax Finechem, Australia) 1.5 มล. บ่ม ณ อุณหภูมิ 25°C นาน 90 นาที จากนั้นวัดค่าการดูดกลืนแสง ณ ความยาวคลื่น 760 นาโนเมตร คำนวณปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดโดยเทียบกับสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิก (Sigma-Aldrich, China) ความเข้มข้น 20 ถึง 200 มก.ต่อลิตร หน่วยเป็น มก.สมมูลกรดแกลลิกต่อกรัม น้ำหนักแห้ง

วัดปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด โดยดัดแปลงวิธี aluminum chloride colorimetric assay ของ Zhishen [8] ใส่สารสกัด 0.5 มล. ในสารละลาย ร้อยละ 5 โซเดียมไนไตรต์ (Ajax Finechem, Australia) 0.15 มล. ทั้งหมด 6 นาที ก่อนเติมสารละลาย ร้อยละ 10 อลูมิเนียมคลอไรด์ (Ajax Finechem, Australia) 0.30 มล. ทั้งหมด 6 นาที และเติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (Ajax Finechem, Australia) ความเข้มข้น 1 N 1.0 มล. และน้ำกลั่น 1.0 มล. ผสมให้เข้ากัน จากนั้นวัดค่าการดูดกลืนแสง ณ ความยาวคลื่น 510 นาโนเมตร คำนวณปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมดโดยเทียบกับสารละลายมาตรฐานของคาเทชิน (Sigma-aldrich, China) ความเข้มข้น 20 ถึง 200 มก.ต่อลิตร หน่วยเป็น มก.สมมูลคาเทชินต่อกรัม น้ำหนักแห้ง

ตรวจสอบความสามารถต้านอนุมูลอิสระ โดยดัดแปลงวิธี 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) Radical Scavenging Capacity ของ Sharma [7] ใช้สารสกัด 0.1 มล. ทำปฏิกิริยากับสารละลาย DPPH (Aldrich, Germany) ความเข้มข้น 0.1 mM 3.9 มล. วัดค่าการดูดกลืนแสง ณ 517 นาโนเมตร ที่ 0 และ 30 นาที เทียบกับกราฟมาตรฐานของวิตามินซี (Chem-Supply, Australia) ความเข้มข้น 20 ถึง 200 มก.ต่อลิตร รายงานผลเป็นความสามารถต้านออกซิเดชัน DPPH (มก.สมมูลวิตามินซีต่อกรัม น้ำหนักแห้ง)

วิเคราะห์ความสามารถยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส โดยดัดแปลงวิธีของ Miceli [9] ใช้สารสกัด 1.0 มล. ผสมกับ 0.2 M phosphate buffer, pH 6.6 จำนวน 2.5 มล. และเติมสารละลาย ร้อยละ 1 potassium ferricyanide (Ajax Finechem, Australia) 2.5 มล. บ่ม ณ อุณหภูมิ 50°C นาน 20 นาที เติมสารละลาย ร้อยละ 10

trichloroacetic acid (Merck, USA) 2.5 มล. หมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที นำสารละลายส่วนใส 2.5 มล. ผสมน้ำปราศจากไอออน (deionized water) 2.5 มล. และร้อยละ 1 ferric chloride (Ajax Finechem, Australia) 0.5 มล. วัดค่าการดูดกลืนแสง ณ ความยาวคลื่น 700 นาโนเมตร เทียบกับกราฟมาตรฐานของวิตามินซีความเข้มข้น 10 ถึง 100 มิลลิกรัมต่อลิตร และรายงานผลหน่วยเป็นมิลลิกรัมสมมูลวิตามินซีต่อกรัม น้ำหนักแห้ง

ทุกการทดลองทดลองซ้ำ (replication) 3 ครั้ง วิเคราะห์ค่าเฉลี่ย ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน โดยโปรแกรมทางสถิติ และวิเคราะห์ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 99 ด้วยวิธี Duncan's new multiple range test (DMRT)

ผลการศึกษา

สารสกัดดอกเก็กฮวยดอกเหลืองและดอกขาว สกัดด้วยน้ำกลั่นมีปริมาณเท่ากับร้อยละ 11.08 ± 0.68 และ 12.33 ± 0.79 สูงกว่าสกัดด้วยเอทานอล เท่ากับร้อยละ 7.08 ± 0.37 และ 8.44 ± 0.29 ต่อน้ำหนักแห้งตามลำดับ

ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดเก็กฮวยดอกเหลือง เทียบกับกราฟมาตรฐานกรดแกลลิก ตามสมการ $Y=0.0072X + 0.0255$ ($R^2=0.9988$) ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของปริมาณฟีนอลิกระหว่างสารสกัดด้วยน้ำกลั่นและเอทานอล ขณะที่สารสกัดเก็กฮวยดอกขาวสกัดด้วยน้ำกลั่นเท่ากับ 334.40 ± 6.88 สูงอย่างมีนัยสำคัญกว่าสกัดด้วยเอทานอล เท่ากับ 297.49 ± 12.08 มก.สมมูลกรดแกลลิกต่อกรัม น้ำหนักแห้ง (ตาราง 1)

ปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมดของเก็กฮวยดอกเหลืองและดอกขาว เทียบกับกราฟมาตรฐานของคาเทชิน ตามสมการ $Y=0.004X + 0.057$ ($R^2= 0.9955$) ปริมาณฟลาโวนอยด์ของดอกเก็กฮวยทั้งสองสกัดด้วยเอทานอลเท่ากับ 455.75 ± 12.38 และ 441.92 ± 43.59 สูงอย่างมีนัยสำคัญกว่าสกัดด้วยน้ำกลั่น เท่ากับ 218.50 ± 4.68 และ 152.83 ± 20.30 มก.สมมูลคาเทชินต่อกรัม น้ำหนักแห้ง (ตาราง 1)

สารสกัดเก็กฮวยดอกขาวสกัดด้วยเอทานอลมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระดีที่สุดเท่ากับ 197.04 ± 1.57 มก. สมมูลของวิตามินซีต่อกรัม น้ำหนักแห้ง และแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเทียบกับสภาวะอื่น

สารสกัดเก็กฮวยดอกเหลืองและดอกขาวรับอิเล็กตรอนธาตุเหล็กและเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันโดยไม่มี ความแตกต่างทางสถิติ (ตาราง 2)

ตาราง 1 ปริมาณฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ทั้งหมดของดอกเก็กฮวยทั้งสองชนิดสกัดด้วยตัวทำละลาย

	เก็กฮวยดอกเหลือง		เก็กฮวยดอกขาว	
	น้ำกลั่น	เอทานอล	น้ำกลั่น	เอทานอล
ฟีนอลิกทั้งหมด (มก.สมมูลกรดแกลลิกต่อกรัม น้ำหนักแห้ง)	338.31 ± 8.36^{ab}	335.07 ± 25.99^{ab}	297.49 ± 12.08^b	343.40 ± 6.88^a
ฟลาโวนอยด์ทั้งหมด (มก.สมมูลคาเทชินต่อกรัม น้ำหนักแห้ง)	218.50 ± 4.68^b	455.75 ± 12.38^a	152.83 ± 20.30^b	441.92 ± 43.59^a

หมายเหตุ: ค่าเฉลี่ย $\pm$ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ตัวอักษรภาษาอังกฤษกำกับตัวเลขในแนวนอนแตกต่างกัน แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 99

ตาราง 2 การรับอิเล็กตรอนธาตุเหล็กและเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันของดอกเก็กฮวยทั้งสองชนิด

	เก็กฮวยดอกเหลือง		เก็กฮวยดอกขาว	
	น้ำกลั่น	เอทานอล	น้ำกลั่น	เอทานอล
ความสามารถต้านอนุมูลอิสระ DPPH (มก.สมมูลของวิตามินซีต่อกรัม น้ำหนักแห้ง)	182.83 ± 1.00^b	182.13 ± 1.20^b	186.87 ± 2.67^b	197.04 ± 1.57^a
ความสามารถรับอิเล็กตรอน (มก.สมมูลของวิตามินซีต่อกรัม น้ำหนักแห้ง)	296.75 ± 1.86^a	280.16 ± 11.45^a	265.25 ± 8.80^a	272.12 ± 22.21^a

หมายเหตุ: ค่าเฉลี่ย $\pm$ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ตัวอักษรภาษาอังกฤษกำกับตัวเลขในแนวนอนแตกต่างกัน แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 99

วิจารณ์

สิ่งมีชีวิตต่างสร้างกลไกในการป้องกันตนเองจากอนุมูลอิสระ หรือ reactive oxygen species (ROS) โดยสังเคราะห์สารต้านอนุมูลอิสระอันสามารถป้องกันหรือชะลอปฏิกิริยาออกซิเดชัน อย่างเช่น กลุ่มเอนไซม์ catalase glutathione peroxidase และ superoxide dismutase วิตามินซี วิตามินอี ฟลาโวนอยด์ และฟีนอลิก เป็นต้น [10] ผัก ผลไม้ และพืชสมุนไพรประกอบด้วยฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ ส่วนตัวทำละลายที่เหมาะสมเป็นประเด็นการศึกษาหนึ่ง การศึกษาแสดงความแตกต่างปริมาณสารสกัด อย่างเช่น สกัดดอกเก็กฮวยด้วยน้ำกลั่น ให้ปริมาณสารสกัดมากกว่าสกัดด้วยเอทานอล

สารสกัดเก็กฮวยดอกขาวด้วยเอทานอลต้านอนุมูลอิสระสูงกว่าเก็กฮวยดอกขาว สอดคล้องกับการศึกษาหนึ่งของประเทศจีน [11] ขณะที่สารสกัดเก็กฮวยทั้งสองชนิดรับอิเล็กตรอนธาตุเหล็กและเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ทั้งนี้ความสามารถต้านอนุมูลอิสระแตกต่างกัน อาจขึ้นกับโครงสร้างหรือลักษณะเฉพาะทางเคมีของฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ ได้แก่ จำนวนวงแหวนแอโรมาติก โครงสร้างหมู่ไฮดรอกซิล เป็นต้น [13]

สายพันธุ์เก็กฮวย สภาพอากาศ และสภาพแวดล้อม ความชื้น การเก็บตัวอย่าง และการเลือกตัวทำละลายอาจมีผลต่อปริมาณและองค์ประกอบของสารสกัด อย่างเช่น ฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ [13] ความแปรผันเหล่านี้เป็นประเด็นของการศึกษาระยะต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณมหาวิทยาลัยพะเยาผู้ให้การสนับสนุนทางการเงิน ด้วยทุนอุดหนุนโครงการวิจัยงบประมาณประจำปี 2560 รวมถึงขอบคุณเจ้าหน้าที่ผู้เกี่ยวข้องของหน่วยงานต่างๆ ประกอบด้วย ศูนย์พัฒนาโครงการหลวงสะโง๊ะ จังหวัดเชียงราย ห้องปฏิบัติการกลาง อาคารปฏิบัติการแปรรูปวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร และห้องปฏิบัติการเทคโนโลยีชีวภาพ คณะเกษตรศาสตร์ และทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยพะเยา ผู้ให้ความอนุเคราะห์สิ่งอำนวยความสะดวกในการศึกษา

เอกสารอ้างอิง

1. Luyen BTT, Tai BH, Thao NP, Cha JY, Lee HY, Lee YM, et al. Anti-inflammatory components of *Chrysanthemum indicum* flowers. *Bioorg. Med Chem Lett.* 2015;25(2): 266-9.
2. Cui G, Niu Y, Wang H, Dong J, Yuki H, Chen S. Rapid isolation and identification of active antioxidant ingredients from Gongju using HPLC-DAD-ESI-MS and postcolumn derivatization. *J Agric Food Chem.* 2012;60(21): 5407-13.
3. Wu LY, Gao HZ, Wang XL, Ye JH, Lu JL, Liang YR. Analysis of chemical composition of *Chrysanthemum indicum* flowers by GC/MS and HPLC. *J Med Plant Res.* 2010;4(5): 421-6.
4. Kim JH and Chang MS. Composition containing *Chrysanthemum indicum* L. extract for preventing discoloration. US patent no. 201401227369 A1
5. Choi KT, Kim JH, Cho HT, Lim SS, Kwak SS, Kim YJ. Dermatologic evaluation of cosmetic formulations containing *Chrysanthemum indicum* extract. *J Cosmet Dermatol.* 2016; 15(2):162-8.
6. Kim DS, Goo YM, Cho J, Lee J, Lee DY, Sin SM, et al. Effect of volatile organic chemicals in *Chrysanthemum indicum* Linné on blood pressure and electroencephalogram. *Molecules.* 2018;23(8):2063.
7. Sharma P, Gujral HS. Antioxidant potential of wheat flour chapattis as affected by incorporating barley flour. *LWT-Food Sci Technol.* 2014;56(1):118-23.
8. Zhishen J, Mengcheng T, Jianming W. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chem.* 1999;64(4):555-9.
9. Miceli N, Trovato A, Dugo P, Cacciola F, Donato P, Marino A, et al. Comparative analysis of flavonoid profile, antioxidant and antimicrobial activity of the berries of *Juniperus communis* L. var. *communis* and *Juniperus communis* L. var. *saxatilis* Pall. from Turkey. *J Agric Food Chem.* 2009; 57(15):6570-7.
10. Phansawan Buran. Free radicals, antioxidants and antioxidant activity determination. *J Sci Technol.* 2013;21(3):275-86.
11. Wang W, Wang H, Zhang Y, Zu Y. In vitro antioxidant and antimicrobial activity of anthotaxy extracts from *Dendranthema morifolium* (Ramat.) Tzvel. and *Chrysanthemum indicum* L. *J Med Plant Res.* 2013;7(36): 2657-61.
12. Zheng W, Wang SY. Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs. *J Agric Food Chem.* 2001;49(11):5165-70.
13. Sopittummakhun K, Rattanasinganchan P. Extraction and determination of antioxidant activity in herbal plant. *Huachiew Chalermprakiet Sci Technol J.* 2017;3(1):86-94.