

Thesis Title Antioxidant Activity and Stability of *Rafflesia kerrii* Meijer

Flower Extract

Author Miss Rinrampai Puttipan

Degree Master of Science (Pharmaceutical Sciences)

Thesis Advisory Committee

Assoc. Prof. Dr. Siriporn Okonogi

Advisor

Asst. Prof. Dr. Sunee Chansakaw

Co-advisor

ABSTRACT

Bua Phut (*Rafflesia kerrii* Meijer) is one of folk medicines that local people have used restore the uterus of post-natal's women, cure infectious disease, reduce fever, and even as sexual stimulant. The plant has less scientific data on biological activity, particularly on antioxidant action which has not yet been investigated by anyone. The aim of this study was to determine antioxidant activity of *R. kerrii* in comparison with 4 other species of medicinal plants which has been used as raw materials in cosmetic products; i.e. Damask rose (*Rosa damascena*), Torch ginger (*Etilingera elatior* (Jack) R.M.Smith, Cheburic myrobalan (*Terminalia chebula* Retz.), and Beleric myrobalan (*Terminalia bellirica* (Gaertn.) Roxb.). All extracts are in liquid form, which obtained by maceration with a mixture of propylene glycol and water.

The extracts were coded as RM, DR, EE, MB, and BM, respectively. Evaluation of antioxidant activity was carried out using the 2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzo-thiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt (ABTS), 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), Ferric reducing antioxidant power (FRAP), and β -carotene bleaching assays. Determination of total phenolic content and total flavonoid content was done by using Folin-ciocalteu and aluminium chloride colorimetric assays, respectively. The results of ABTS, DPPH, FRAP, β -carotene bleaching, Folin-ciocalteu, and aluminium chloride colorimetric assays were expressed as the antioxidant capacity equivalent to the concentration of standard Trolox (TEAC), the concentration of the extract required to inhibit 50% of the initial DPPH free radical (IC_{50}), the ferric reducing ability equivalent to the concentration of ferrous sulphate (EC), % inhibition, the amount of phenolic content equivalent to amount of gallic acid (GAE), and the amount of flavonoid content equivalent to amount of quercetin (QE) values, respectively. The results showed that RM possessed the highest TEAC and GAE value of 3.10 mM/mg extract and 1.19 mg/mg extract, respectively. Moreover, it showed the lowest IC_{50} value of 0.06 mg/ml. MB revealed the highest EC value, % inhibition, and QE value of 16.63 mM/mg extract, 81.14 %, and QE 0.18 mg/mg extract, respectively. Further study on extract of dried powder of *R. kerrii* flowers by maceration with 95% ethanol, obtained RME, and different polar solvents; i.e. n-hexane, ethyl acetate, n-butanol, and methanol on fractionated extraction obtained the extract coded RMH, RMA, RMB, and RMM, respectively. The extracts were determined for yields and antioxidant activity. The results showed that the RME has the highest %yield of 42.03 % and the highest % inhibition of 61.04 %. The RMM possessed the highest TEAC value of 22.00 mM/mg extract, EC value of 151.75

mM/mg extract, and GAE value of 11.62 mg/mg extract. The RMH revealed the lowest antioxidant activity but the highest QE value of 2.41 mg/mg extract. RM and RMM were used for physicochemical properties and stability. The solubility study indicated that RMM was slightly soluble in water and polar solvent, and not soluble in non-polar solvent. Propylene glycol can improve better water solubility of RMM. Phytochemical screening demonstrated that RM and RMM contained flavonoid glycoside and tannin. The extracts showed the maximum absorbance (λ_{\max}) at 273 and 276 nm, respectively, similar to that of gallic acid ($\lambda_{\max} = 274$ nm). The HPLC (high performance liquid chromatography) finger print of RM and RMM exhibited that both extracts have gallic acid. The stability study carried out by accelerated condition at 40 °C 75% RH for 4 months of RM, RMM, and RMM solution (dissolved in 50% propylene glycol). The result indicated that the physical characteristic as color and odor of RM and RMM solution has not changed. RMM has changed physical characteristic from dried powder to homogenous melt and hard, but color and odor have not changed. Antioxidant activity and total phenolic content of RM, RMM, and RMM solution were slightly changed. The total flavonoid content was decreased significantly. It was indicated the extracts were good stable. Temperature has not affected to *R. kerrii* extracts both liquid form and solid form.

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์

ฤทธิ์ต้านออกซิเดชันและความคงสภาพของสารสกัดดอก
บัวผุด

ผู้เขียน

นางสาวรินรำไพ พุทธิพันธ์

ปริญญา

วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (วิทยาศาสตร์เภสัชกรรม)

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

รศ. ดร. ศิริพร โอโกโนกิ อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก
ผศ. ดร. สุนีย์ จันทร์สกา อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

บทคัดย่อ

ดอกบัวผุดเป็นพืชสมุนไพรชนิดหนึ่งที่พบในป่าร้อนชื้นทางภาคตะวันออกเฉียงใต้ของประเทศไทย ดอกบัวผุดถือว่าเป็นพืชสมุนไพรชนิดหนึ่งที่ชาวบ้านนำมาใช้พื้นฟูมดลูกสตรีหลังคลอดให้กลับมาสู่ปกติ รักษาโรคติดเชื้อ ลดไข้ และใช้เป็นยาบำรุงทางเพศ อย่างไรก็ตามสรรพคุณเหล่านี้ยังไม่ได้รับการยืนยันในทางการแพทย์ตะวันตก พืชนี้มีข้อมูลทางวิทยาศาสตร์ด้านฤทธิ์ทางชีวภาพน้อยมาก โดยเฉพาะฤทธิ์ต้านออกซิเดชันซึ่งยังไม่มีใครศึกษา งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของดอกบัวผุดร่วมกับพืชสมุนไพรชนิดอื่นอีก 4 ชนิดที่จะนำไปใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตเครื่องสำอาง คือ ดอกกุหลาบมอญ, ดอกดาหลา, ผลสมอไทย และผลสมอพิเภก สารสกัดทั้งหมดอยู่ในรูปสารสกัดเหลวที่สกัดโดยวิธีแช่อยู่ด้วยสารผสมโพธิ์ลิ้นไกลคอลลกับน้ำ สารสกัดมีรหัส ดังนี้ RM, DR, EE, MB และ BM ตามลำดับ การประเมินฤทธิ์ต้านออกซิเดชันจะใช้วิธี 2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzo-thiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt (ABTS), 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), Ferric reducing antioxidant power (FRAP), และ β -carotene bleaching การประเมินปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมและปริมาณสารฟลาโวนอยด์รวมใช้วิธี Folin-ciocalteu และ Aluminium chloride colorimetric ตามลำดับ ผลที่ได้จากวิธี ABTS, DPPH, FRAP, β -carotene bleaching, Folin-ciocalteu และ Aluminium chloride colorimetric แสดงเป็นค่าความสามารถในการต้านออกซิเดชันเทียบเท่ากับค่าความเข้มข้นของสารมาตรฐาน Trolox (TEAC), ความเข้มข้นของสารสกัดที่สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH เริ่มต้นได้

50 เปอร์เซ็นต์ (IC_{50}), ความสามารถในการรีดิวซ์เทียบเท่ากับความเข้มข้นของ ferrous sulphate (EC), เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง, ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกเทียบเท่ากับปริมาณของ gallic acid (GAE), และปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์เทียบเท่ากับปริมาณของ quercetin (QE) ตามลำดับ ผลการทดลองพบว่า RM มีค่า TEAC และค่า GAE สูงสุด คือ 3.10 มิลลิโมลาร์/กรัมของสารสกัด และ 1.19 มิลลิกรัม/มิลลิกรัมสารสกัดตามลำดับ นอกจากนี้ RM มีค่า IC_{50} น้อยที่สุด คือ 0.06 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร MB มีค่า EC, %Inhibition ค่า QE มากที่สุด คือ 16.63 มิลลิโมลาร์/กรัมของสารสกัด, 81.14 %, และ 0.18 มิลลิกรัม/มิลลิกรัมของสารสกัด ตามลำดับ การศึกษาในขั้นต่อไป นำผงดอกบัวผุดแห้งมาสกัดด้วยวิธีแช่ขุ่ย โดยใช้สารละลาย 95% เอทานอลในการสกัด ได้สารสกัดหยาบ (RME) และใช้สารละลายที่มีขั้วต่างกัน ได้แก่ เฮกเซน, เอทิลอะซิเตท, บิวทานอล และเมทานอล ในการสกัดแบบลำดับส่วน สารสกัดที่ได้มีสัญลักษณ์ ดังนี้ RMH, RMA, RMB, and RMM ตามลำดับ นำสารสกัดที่ได้ไปหาผลผลิตที่ได้และทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน จากผลการทดลองพบว่า RME ให้เปอร์เซ็นต์ผลผลิตสูงสุด 42.03 เปอร์เซ็นต์ และมีค่า %Inhibition สูงสุด 61.04 % RMM มีค่า TEAC 22.88 มิลลิโมลาร์/กรัมของสารสกัด, ค่า EC 151.75 มิลลิโมลาร์/กรัมของสารสกัด, ค่า GAE 11.62 มิลลิกรัม/มิลลิกรัมของสารสกัด และค่า IC_{50} 5.19 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร RMH มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันน้อยที่สุดแต่มีค่า QE สูงที่สุด 2.41 มิลลิกรัม/มิลลิกรัมของสารสกัด นำ RM และ RMM มาศึกษาสมบัติทางเคมีกายภาพและความคงสภาพ การศึกษาการละลาย พบว่า RMM ละลายได้เล็กน้อยในน้ำและสารละลายที่มีขั้วสูง และไม่ละลายในสารละลายที่ไม่มีขั้ว โพลฟีลีนไกลคอล สามารถช่วยให้ RMM ละลายในน้ำได้ดีขึ้น การทดสอบทางพิษวิทยาเบื้องต้น พบว่า RM และ RMM มีสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ไกลโคไซด์และแทนนิน สารสกัดค่าการดูดกลืนแสงสูงสุด (λ_{max}) ที่ 273 และ 276 นาโนเมตร ตามลำดับ ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับ Gallic acid (λ_{max} = 274 นาโนเมตร) ภายหลังการพื้มน้ำมือ HPLC (high performance liquid chromatography) ของ RM และ RMM พบว่าสารสกัดทั้งสองชนิดมี Gallic acid การทดสอบความคงสภาพของ RM, RMM, และ สารละลาย RMM (ละลายใน 50 เปอร์เซ็นต์โพรพิลีนไกลคอล) ศึกษาภายใต้สภาวะเร่งที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ความชื้น 75 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 4 เดือน พบว่าลักษณะทางกายภาพ สี และ กลิ่นของ RM และ สารละลาย RMM ไม่มีการเปลี่ยนแปลง ลักษณะทางกายภาพของ RMM มีการเปลี่ยนแปลงจากลักษณะผงแห้งเป็นเนื้อเดียวกันและแข็ง แต่สีและกลิ่นไม่เปลี่ยนแปลง ฤทธิ์ต้านออกซิเดชันและ ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมของ RM, RMM, และสารละลาย RMM มีการเปลี่ยนแปลงเล็กน้อย ปริมาณสารฟลาโวนอยด์รวมมีค่าลดลง จากผลการทดลองสามารถสรุปได้ว่าสารสกัดดอกบัวผุดมีความคงสภาพที่ดี อุณหภูมิไม่มีผลต่อความคงสภาพของสารสกัดดอกบัวผุดทั้งในรูปแบบสารสกัดเหลวและของแข็ง