PS2-PS-5

ผลปลอดพิษของสารสกัดดอกอัญชันสีม่วงต่ออวัยวะระบบสืบพันธุ์เพศผู้ของหนูแรท

จาตุรณต์ บุรวัฒน์[1*], วรรณิศา สุโขรัมย์[1], รรินธร สัมฤทธิ์[1], สุภัจฉรี อรัญ[1], สิทธิชัย เอี่ยมสะอาด[2]

บทคัดย่อ

ผลปลอดพิษของสารสกัดดอกอัญชันสีม่วงต่ออวัยวะระบบสืบพันธ์เพศผู้ของหนูแรท

จาตุรณต์ บุรวัฒน์[1]*, วรรณิศา สุโขรัมย์[1], รรินธร สัมฤทธิ์[1], สุภัจฉรี อรัญ[1], สิทธิชัย เอี่ยมสะอาด[2]

บทนำ: ดอกอัญชันสีม่วงนิยมนำมาเป็นส่วนประกอบทั้งอาหารและเครื่องดื่มเพื่อเสริมสุขภาพ ในหลายประเทศรวมถึงประเทศไทย การแพทย์พื้นบ้านมีความเชื่อว่าอัญชันมีคุณสมบัติ ลดความเครียด บ้องกันแบคทีเรีย และลดการอักเสบได้ นอกจากนี้อัญชันได้รับการพิสูจน์ว่ามีสารต้านอนุมูลอิสระธรรมชาติ โดยสามารถป้องกันเซลล์ตับที่ถูกทำลายได้ แต่เนื่องจากยังไม่มีรายงานเกี่ยวกับผลของอัญชันต่อระบบสืบพันธุ์ ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาฤทธิ์ความเป็นพิษของดอกอัญชันต่อ testis, epididymis และจำนวนสเปิร์มในหนูแรทเพศผู้ **วิธีการ:** นำดอกอัญชันสีม่วงสดมาสกัดด้วยน้ำกลั่น และนำมาทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชันด้วยวิธีการ DPPH และ FRAP assays สำหรับการศึกษาความเป็นพิษ หนูแรทเพศผู้ 20 ตัว ถูกแบ่งออกเป็น 4 กลุ่ม (5 ตัว/กลุ่ม): 1) กลุ่มควบคุม, 2-4) กลุ่มที่ได้รับสารสกัดดอกอัญชัน (10, 50, 100 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว ตามลำดับ) หลังจากป้อนสารสกัดเป็นเวลา 28 วัน หนูแรททั้งหมดจะถูกทำให้ตายอย่างสงบ เพื่อเก็บ testis, epididymis และสเปิร์ม เพื่อทำการวิเคราะห์และเปรียบเทียบลักษณะโครงสร้างเนื้อเยื่อต่างๆ **ผลการวิจัย:** ค่า EC_{50} ของสารสกัดดอกอัญชันเท่ากับ 85.26 ± 9.12 µg/ml และค่า ค่า EC_{50} จาก FRAP value เท่ากับ 0.33 ± 0.01 mM ในการประเมินน้ำหนักอวัยวะสืบพันธุ์พบว่า ค่า absolute weight และ relative weight ของ Testis, Epididymis รวมทั้งจำนวนสเปิร์มระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับสารสกัดดอกอัญชันทุกขนาดไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ นอกจากนี้ยังไม่พบพยาธิสภาพในระดับ Light microscope ของ Testis และ Epididymis ในกลุ่มที่ได้รับสารสกัดดอกอัญชันเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม **สรุปผล:** สารสกัดดอกอัญชันสีม่วงมีระดับสารต้านอนุมูลอิสระสูง และไม่มีความเป็นพิษต่ออวัยวะของระบบสืบพันธุ์ในหนูแรทเพศผู้ เป็นไปได้ว่าในการศึกษาครั้งต่อไปสารสกัดดอกอัญชันจะถูกนำมาศึกษาเพื่อแสดงให้เห็นถึงผล การป้องกันการเกิดพยาธิสภาพเกี่ยวกับอัณฑะ

คำสำคัญ (Keywords): สารสกัดดอกอัญชัน (*Clitoria ternatea* flower extract*)*, DPPH, FRAP, testis, epididymis, สเปิร์ม

[1] นักศึกษาระดับบัณฑิตศึกษา ภาควิชากายวิภาคศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

[2] อ.ดร.สิทธิชัย เอี่ยมสะอาด อาจารย์ประจำสาขาวิชากายวิภาคศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

* **ติดต่อผู้นิพนธ์:** จาตุรณต์ บุรวัฒน์ ภาควิชากายวิภาคศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น โทร 0807545169,
E-mail: Burawat_banpong@hotmail.com

Abstract

Nontoxic Effects Of Clitoria Ternatea Purple-Flower Extract On Reproductive Organs In Male Rats

Jaturon Burawat*, Wannisa Sukhorum, Rarinthorn Samrid, Supatcharee Arun, Sitthichai Iamsaard

Introduction: *Clitoria ternatea* (CT) purple-flowers have been used as food and drinking additives in many countries including Thailand. In traditional medicine, CT is considered to have properties of anti-stress, anti-bacteria, and anti-inflammations. In addition, CT was proved as natural antioxidant that has hepatoprotective effects. To provide the safety information of CT on reproductive organs, this study aimed to observe the toxicity of CT on testis, epididymis, and sperm concentration in male rats. **Materials and Methods:** Fresh CT purple flowers were extracted using distilled-water. DPPH and

FRAP assays were used to determine antioxidant activities of the aqueous CT extract. For in vivo toxicity study, twenty adult male rats were divided into four groups (five rats per group): 1) control group, 2-4) CT-treated groups (10, 50, 100 mg/kg bw, respectively). After gastric administration for consecutive 28 days, all rats were sacrificed to collect testis, epididymis, and sperm for morphological examinations. **Results:** EC_{50} of CT extract was 85.26 ± 9.12 µg/ml and FRAP value was 0.33 ± 0.01 mM. The absolute and relative weights of testis and epididymis including sperm concentration between control and CT treated groups were not significantly different. Moreover, no histopathology of testis and epididymis in CT groups were observed as compared to the control group. **Conclusion:** CT purple-flower extract has high antioxidant levels and is not toxic to male reproductive organs. In further studies, the testicular-protective effect should be investigated.

Keywords: *Clitoria ternatea* (CT) extract, DPPH, FRAP, testis, epididymis, sperm

*Department of Anatomy, Faculty of medicine, Khon Kaen University, Thailand

บทนำ (Introduction)

อัญชัน (*Clitoria ternatea,* CT) เป็นพืชที่พบได้ทั่วไปในเอเชีย มีดอกสีขาวและสีม่วง ในประเทศไทยนิยมนำดอกสีม่วงมาสกัดทำเป็นน้ำดื่มเพื่อเสริมสุขภาพ และมีส่วนประกอบของ polyphenolic flavonoids, anthocyanin glycosides, pentacyclic triterpenoids และ phytosterols (Mukherjee *et al*., 2007) แพทยอายุรเวทนำดอกอัญชันมาใช้รักษาในการลดความเครียด ลดอาการซึมเศร้า ทั้งเป็นยาระงับประสาท (Mukherjee *et al*., 2008) มีงานวิจัยสนับสนุนว่าสารสกัดดอกอัญชันมีสารต้านอนุมูลอิสระหลายชนิด เช่น Glucoside (Kazuma *et al*., 2004), Malonylated flavonal glycosides (Kazuma *et al*., 2003) และยังสามารถป้องกันการทำลายเซลล์ตับที่ถูกชักนำด้วยพาราเซตามอลได้ (Nithianantham *et al*., 2011) อีกทั้งยังมีฤทธิ์ในการยับยั้งจุลชีพและโปรตีนพิษจากแมลงต่างๆ (Kelemu *et al*., 2004) อย่างไรก็ตามยังไม่มีการทดสอบความเป็นพิษของพืชชนิดนี้ โดยเฉพาะในส่วนดอกสีม่วงต่อปลอดภัยต่ออวัยวะของระบบสืบพันธุ์

วัตถุประสงค์ (Objective)

เพื่อศึกษาความเป็นพิษของสารสกัดดอกอัญชันต่อ testis, epididymis และจำนวนสเปิร์ม ในหนูแรทเพศผู้

วิธีดำเนินการวิจัย (Methods)

อุปกรณ์ และสารเคมี

2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), Ascorbic acid (vitamin C), Glacial acetic acid, Sodium acetate-3-hydrate, Ferric chloride, TPTZ (2,4,6-Tripyridyl-s-Triazine), Ferrous sulfate ($FeSO_4$), UV-vis spectrophotometer, microplate reader

สมุนไพร และการสกัด

เก็บดอกอัญชันสีม่วง 3 กิโลกรัม เพื่อมาสกัดด้วยน้ำกลั่น 2 ลิตร โดยใช้ homogenizer และเก็บค้างคืนไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นนำมาผ่านกระดาษกรอง และปั่นเหวี่ยงที่ 3000 rpm เป็นเวลา 15 นาที เมื่อสารแยกชั้นแล้วให้เลือกเก็บเฉพาะ supernatant เพื่อนำไปทำให้แห้งด้วย Freeze dryer แล้วทำการชั่งเพื่อบันทึกปริมาณของสารสกัดที่ได้

การทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน

- การทดสอบด้วยวิธี DPPH radical scavenging assay (Kriengsak *et al*, 2006)

เตรียมสารละลาย DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) ความเข้มข้น 100 µM ในสารละลาย absolute methanol และเตรียมสารสกัดตัวอย่างให้ได้ความเข้มข้นเท่ากับ 5, 10, 20, 30, 40, 50 และ 100 µg/ml ด้วย absolute methanol นำสารละลาย DPPH และสารสกัดตัวอย่างผสมให้เข้ากัน โดยให้ปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 2000 µl ทิ้งไว้เป็นเวลา 20 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 517 nm ทำการทดลอง 3 ซ้ำ โดยใช้ Vitamin C เป็นสารมาตรฐานในการเปรียบเทียบคำนวณหา % inhibition จากสมการ

$$\% \text{ inhibition} = \frac{\text{Abs control} - \text{Abs sample}}{\text{Abs control}} \times 100$$

- การทดสอบด้วยวิธี FRAP assay (Ronald *et al*, 2005)

เตรียมสารละลาย FRAP (Ferric reducing antioxidant power) reagent โดยผสม 300 mM acetate buffer (pH 3.6) กับ 10 mM TPTZ (2,4,6-Tris(2-pyridyl)-1,3,5-triazine)) solution และ 20 mM Ferric chloride solution ให้เข้ากัน เก็บโดยปราศจากแสง และเตรียมสารสกัดตัวอย่างให้ได้ความเข้มข้น 0.5 mg/ml ด้วย absolute methanol นำสารสกัดตัวอย่างผสมกับ FRAP reagent และน้ำกลั่น โดยให้ปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 100 µl ผสมให้เข้ากัน วัดค่าการดูดกลืนแสงในนาทีที่ 10 ที่ความยาวคลื่น 593 nm ทำการทดลอง 3 ซ้ำ โดยเปรียบเทียบกับสารละลายมาตรฐาน Ferrous sulfate คำนวณหาปริมาณ Relative antioxidant activity (FRAP value) จากกราฟมาตรฐานของ $FeSO_4$ ที่แสดง ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ $FeSO_4$ กับค่า absorbance โดยต้องเจือจางสารสกัดตัวอย่างให้อยู่ในช่วงกราฟมาตรฐาน

สัตว์ทดลองที่ใช้ในการวิจัย

หนูแรท สายพันธ์ Sprague - Dawley เพศผู้ วัยเจริญพันธุ์ น้ำหนักตัว 180-200 กรัม จำนวน 20 ตัว จากศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล ทำการเลี้ยง ณ ศูนย์สัตว์ทดลองภาคตะวันออกเฉียงเหนือ มหาวิทยาลัยขอนแก่น มีอัตราส่วนแสงสว่างกลางวันต่อกลางคืน เท่ากับ 12 ชม.ต่อ 12 ชม.โดยแบ่งหนูเป็น 4 กลุ่มๆ ละ 5 ตัว โดยการสุ่ม ได้แก่ กลุ่มควบคุม (Control), กลุ่มได้รับสารสกัดจากดอกอัญชัน 10 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว (มก./กก.นน.ตัว) (CT1), กลุ่มได้รับสารสกัดจากดอกอัญชัน 50 มก./กก.นน.ตัว(CT2) และกลุ่มได้สารสกัดจากดอกรับอัญชัน 100 มก./กก.นน.ตัว (CT3) การทดลองครั้งนี้จะให้หนูทุกกลุ่มการทดลองอดอาหารและน้ำเป็นระยะเวลา 2 ชั่วโมง ก่อนทำการป้อนสารสกัดดอกอัญชันหรือน้ำกลั่น (กลุ่มควบคุม) โดยวิธีการป้อนผ่านเข้าสู่กระเพาะอาหาร (gastric feeding) เป็นระยะเวลา 28 วันต่อเนื่อง ในวันที่ 29 ของการทดลอง หนูแรทจะถูกฆ่าอย่างสงบด้วยวิธี cervical dislocation (สิทธิชัย เอี่ยมสะอาด, 2546) แล้วผ่าช่องท้องเพื่อเก็บ Testis และ Epididymis ข้างขวาเพื่อมาชั่งน้ำหนักและทำการตัดย้อมสีด้วย Hematoxylin and Eosin เพื่อดูลักษณะทางจุลกายวิภาค และ Epididymis ข้างซ้ายเพื่อวิเคราะห์จำนวนสเปิร์ม (วรรณิศา สุไขรัมย์, 2555)

วิธีวิจัย

ชั่งน้ำหนักตัวหนูทุกตัวในวันแรกของการทดลอง ทำการทดลอง 28 วัน และทำการป้อนสารสกัดดอกอัญชันที่ละลายในน้ำปริมาณ 1 มิลลิลิตร/ตัว ในแต่ละกลุ่มดังนี้ กลุ่มควบคุม (Control) ได้รับการป้อนน้ำกลั่น (DW), กลุ่ม CT1 ได้รับสารสกัดอัญชัน 10 มก/กก.นน.ตัว, กลุ่ม CT2 ได้รับสารสกัดอัญชัน 50 มก/กก.นน.ตัว และกลุ่ม CT3 ได้รับสารสกัดอัญชัน 100 มก/กก.นน.ตัว

การวิเคราะห์ข้อมูล

การเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลอง ทำการวิเคราะห์ค่าทางสถิติโดยใช้ ANOVA และ independent paired t-test และแสดงผลเป็นค่า mean ± SD ค่า $p<0.05$ ถือว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ

ผลการศึกษาวิจัย (Results)

- ฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน

ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของสารสกัดดอกอัญชันเทียบกับวิตามินซี ด้วยวิธี DPPH assay และมีค่า FRAP assay พบว่าค่า EC_{50} สารสกัดดอกอัญชันจากการศึกษาฤทธิ์ต้านออกซิเดชันในวิธี DPPH assay เท่ากับ 85.26 ± 9.12 µg/ml และมี EC_{50} จากการศึกษาฤทธิ์ต้านออกซิเดชันใกล้เคียงกับวิตามินซีใน FRAP assay โดยมีค่าเท่ากับ 0.33 ± 0.01 mM (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 ค่า 50% Effective Concentration (EC_{50}) ของสารสกัดดอกอัญชัน และวิตามินซี ด้วยวิธี DPPH assay และ FRAP assay (n=5)

Antioxidant assays	สารสกัดดอกอัญชัน	วิตามินซี
DPPH radical scavenging assay	85.26 ± 9.12 µg/ml	5.02±0.46 µg/mL
FRAP value	0.33 ± 0.01 mM	0.44 ± 0.01 mM

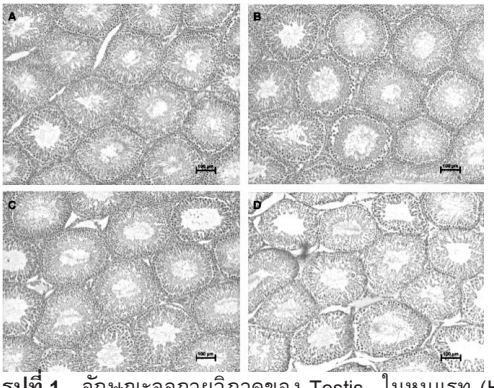
- ผลของสารสกัดอัญชันต่ออวัยวะสืบพันธุ์เพศผู้ของหนูแรท

ตารางที่ 2 แสดงให้เห็นว่า ค่า absolute weight และ relative weight ของ testis, epididymis รวมทั้งจำนวนสเปิร์มของกลุ่มที่ได้รับสารสกัดดอกอัญชันขนาด 10 มก/กก.นน.ตัว, 50 มก/กก.นน.ตัว และ 100 มก/กก.นน.ตัว ตามลำดับ เป็นเวลา 28 วัน ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ได้รับน้ำกลั่น (ตารางที่2) นอกจากนี้ ผลการศึกษาทางจุลกายวิภาคของเนื้อเยื่อ testis และ epididymis (รูปที่ 1 และ 2) พบว่ากลุ่มที่ได้รับสารสกัดดอกอัญชันในขนาดต่างๆ ยังมีการสร้างสเปิร์มใน Testis ปกติ การเรียงตัวของ seminiferous tubules แบบปกติ และยังไม่พบ

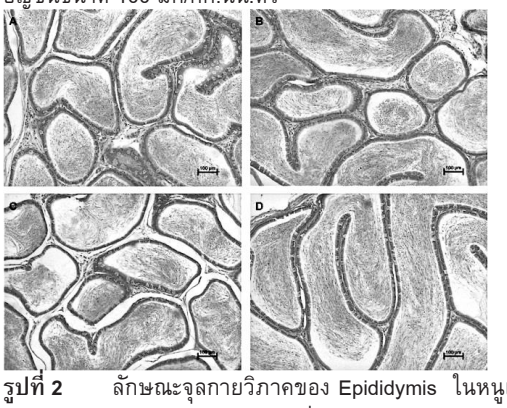
พยาธิสภาพของ Testicular epithelium และ Leydig cell เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (รูปที่ 1) และยังพบว่าโครงสร้างของ epididymis ในกลุ่มที่ได้รับสารสกัดดอกอัญชันในขนาดต่างๆ ไม่มีความแตกต่างกับกลุ่มควบคุม (รูปที่ 2) โดยแสดงความหนาแน่นของ spermatozoa ภายใน lumen และ epithelium ของ epididymis อยู่ในเกณฑ์ปกติ

ตารางที่ 2 แสดงน้ำหนักของ testis, epididymis และจำนวนสเปิร์ม ของหนูแรทกลุ่มควบคุมและที่ได้รับสารสกัดดอกอัญชัน ขนาด 10 mg/kg bw, 50 mg/kg bw และ100 mg/kg bw ตามลำดับ

	Control	CT10 mg/kg BW	CT50 mg/kg BW	CT100 mg/kg BW
Absolute weight (g)				
Testis	3.66 ± 0.11	3.67 ± 0.16	3.69 ± 0.22	3.90 ± 0.28
Epididymides and vas deferens	0.68 ± 0.03	0.68 ± 0.05	0.67 ± 0.05	0.69 ± 0.04
Relative weight (per BW, %)				
Testis	0.97 ± 0.04	1.04 ± 0.06	0.99 ± 0.13	1.00 ± 0.03
Epididymides and vas deferens	0.18 ± 0.01	0.19 ± 0.02	0.18 ± 0.03	0.18 ± 0.02
Sperm concentration (10^6 cells/ml)	29.44 ± 7.72	23.15 ± 8.51	30.85 ± 4.23	29.06 ± 9.21



รูปที่ 1 ลักษณะจุลกายวิภาคของ Testis ในหนูแรท (H&E): A) กลุ่มควบคุม; B) กลุ่มที่ได้รับอัญชันขนาด 10 มก/กก.นน.ตัว; C) กลุ่มที่ได้รับอัญชันขนาด 50 มก/กก.นน.ตัว; D) กลุ่มที่ได้รับอัญชันขนาด 100 มก/กก.นน.ตัว



รูปที่ 2 ลักษณะจุลกายวิภาคของ Epididymis ในหนูแรท (H&E): A) กลุ่มควบคุม; B) กลุ่มที่ได้รับอัญชันขนาด 10 มก/กก.นน.ตัว; C) กลุ่มที่ได้รับอัญชันขนาด 50 มก/กก.นน.ตัว; D) กลุ่มที่ได้รับอัญชันขนาด 100 มก/กก.นน.ตัว

อภิปรายผลและสรุปผล (Discussion and Conclusion)

อัญชันเป็นพืชสมุนไพรที่มีสรรพคุณทางยา ทั้งในส่วนของใบ ดอก และราก (Mukherjee *et al*., 2008) การศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นว่า ดอกอัญชันสีม่วงที่สกัดด้วยน้ำนั้นมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเทียบเท่าวิตามินซี (ตารางที่ 1) ดังนั้นการนำอัญชันดอกสีม่วงมาต้มเพื่อดื่มหรือนำมาเป็นส่วนประกอบของอาหารแบบฉบับดั้งเดิมเพื่อเป็นอาหารเสริมนั้น จะเป็นการช่วยเพิ่มสารต้านอนุมูลอิสระที่ได้จากธรรมชาติในเครื่องดื่มหรืออาหารได้

การศึกษาที่ผ่านมาพบว่า สารสกัดจากทุกส่วนของอัญชันนั้นปลอดภัยต่อทั้งโครงสร้างและการทำงานของอวัยวะที่สำคัญในร่างกาย เช่น ไตและตับ (Nithianantham *et al*., 2011) การศึกษาครั้งนี้เป็นรายงานการศึกษาครั้งแรกที่แสดงให้เห็นว่าสารสกัดจากดอกอัญชันสีม่วงนั้น ไม่เป็นพิษต่อโครงสร้างและหน้าที่ในระบบสืบพันธุ์เพศผู้ กล่าวคือ ไม่มีผลต่อน้ำหนักของ Testis, Epididymis และการสร้างสเปิร์ม (ตารางที่ 2) และยืนยันด้วยลักษณะที่ปกติทางจุลกายวิภาคของ Testis และ Epididymis (รูปที่ 1 และ 2) อาจจะกล่าวได้ว่าสารสกัดจากดอกอัญชันมีความปลอดภัยหรือไม่มีความเป็นพิษต่ออวัยวะสืบพันธุ์ในหนูแรทเพศผู้

กิตติกรรมประกาศ (Acknowledgements)

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากคณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น (เลขที่โครงการ I 55222) และได้รับเงินทุนอุดหนุนทั่วไปเพื่อสนับสนุนการทำวิทยานิพนธ์ประจำภาคปลาย ปีการศึกษา 2555 รหัสทุน 55211107 จากบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยขอนแก่น

เอกสารอ้างอิง (References)

วรรณิศา สุโขรัมย์. ผลของผงชูรสต่อโครงสร้างและหน้าที่ของอวัยวะในระบบสืบพันธุ์ของหนูแรทเพศผู้วัยเจริญพันธุ์. *วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต 2555*. สาขาวิชากายวิภาคศาสตร์ บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

สิทธิชัย เอี่ยมสะอาด. การศึกษาพิษแบบเฉียบพลันของสมุนไพรแฮ่มต่อตับ ไต หัวใจ ปอด และอัณฑะในหนูขาวเพศผู้. *วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต 2546*. สาขาวิชากายวิภาคศาสตร์ บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

Kazuma K, Kogawa K, Noda N, et al. Identification ofdelphinidin 3-O-(6"-O-malonyl)-β-glucoside-3'-O-β- glucoside, a postulated intermediate in the biosynthesis of ternatin C5 in the blue petals of *Clitoria ternatea* (butterfly pea). *Chemistry & Biodiversity 2004*; 1: 1762–1770.

Kazuma K, Noda N, Suzuki M, Malonylated flavonol glycosides from the petals of *Clitoria ternatea*. *Phytochemistry 2003;* 62: 229–237.

Kelemu S, Cardona C, Segura G. Antimicrobial and insecticidal protein isolated from seeds of *Clitoria ternatea*, a tropical forage legume. *Plant Physiology and Biochemistry 2004,* 42, 867–873.

Kriengsak T, Unaro jB, Kevin C, *et al*. Comparison of ABTS, DPPH, FRAP,and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. *Food Composition and Analysis 2006*; 19: 669–675.

Mukherjee PK, Kumar V, Houghton PJ, *et al*. Screening of Indian medicinal plants for acetyl cholinesterase inhibitory activity. *Phytother 2007*; 21: 1142-1145.

Mukherjee PK, Kumar, V, Kumar NS, *et al*. The Ayurvedic medicine Clitoria ternatea from traditional use to scientific assessment. *Ethnopharmacology* 2008; 120: 291-301.

Nithianantham K, Shyamala M, Chen Y, *et al.* Hepatoprotective Potential of Clitoria ternatea Leaf Extract Against Paracetamol Induced Damage in Mice. *Molecules 2011*; 16: 10134-10145.

Ronald LP, Xianli W, Karen S, et al. Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements. *Agricultural and food Chemistry 2005;* 53: 4290-4302.