คุณสมบัติต้านออกซิเดชันของผลไม้ไทย

นางสาวสุพรรณี แก้วสุทธิ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาชีวเวชเคมี ภาควิชาชีวเคมี
คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2546

ISBN 974-17-5436-1

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ANTIOXIDATIVE PROPERTY OF THAI FRUITS

Miss Supannee Kaewsutthi

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science in Biomedicinal Chemistry
Department of Biochemistry
Faculty of Pharmaceutical Sciences
Chulalongkorn University
Academic Year 2003

ISBN 974-17-5436-1

Thesis Title	ANTIOXIDATIVE PROPERTY OF THAI FRUITS
By	Miss Supannee Kaewsutthi
Field of Study	Biomedicinal Chemistry
Thesis Advisor	Associate Professor Piyawan Surinrut, Ph.D.

Accepted by the Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University in Partial Fulfillment of the Requirements for the Master's Degree

.....Dean of the Faculty of Pharmaceutical Sciences
(Associate Professor Boonyong Tantisira, Ph.D.)

THESIS COMMITTEE

.....Chairman
(Associate Professor Sunanta Pongsamart, Ph.D.)

..... Thesis Advisor
(Associate Professor Piyawan Surinrut, Ph.D.)

.....Member
(Assistant Professor Niyada Kiatying-Angsulee, Ph.D.)

.....Member
(Associate Professor Somboon Tanasupawat, Ph.D.)

สุพรรณี แก้วสุทธิ : คุณสมบัติต้านออกซิเดชันของผลไม้ไทย. (ANTIOXIDATIVE PROPERTY OF THAI FRUITS) อาจารย์ที่ปรึกษา: รศ. ดร. ปิยวรรณ์ สุรินทร์รัฐ, 79 หน้า. ISBN 974-17-5436-1

สารหลายชนิดในพืชสามารถป้องกันการเกิดโรคที่มีสาเหตุเนื่องจาก oxidative stress เช่น โรคมะเร็ง, โรคหัวใจและหลอดเลือด, ต้อกระจก, การทำงานที่ผิดปกติของสมองและระบบภูมิคุ้มกัน และการอักเสบ สารเหล่านี้ส่วนใหญ่เป็น polyphenolic compound ซึ่งพบได้ทั่วไปในพืชทั้งส่วนที่บริโภคได้และบริโภคไม่ได้ วัตถุประสงค์ของการทดลองเพื่อตรวจสอบปริมาณ polyphenolic และคุณสมบัติต้านออกซิเดชันของผลไม้ไทย เพื่อหาแหล่งที่ดีของอาหารที่มีสารต้านออกซิเดชัน ในการศึกษานี้เราได้หาปริมาณ polyphenolic ในผลไม้ 28 ชนิดโดยใช้วิธี Folin-Ciocalteu และหาคุณสมบัติต้านออกซิเดชันในผลไม้โดยใช้วิธี 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) รวมทั้งคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระ superoxide anion, hydroxyl radical และทดสอบคุณสมบัติในการป้องกันการแตกตัวของเซลล์เม็ดเลือดแดงของคน จากการทดลองพบว่าปริมาณ polyphenolic ในผลไม้มีค่าตั้งแต่ 3.243 $\pm$ 0.303 ถึง 2120.526 $\pm$ 141.244 mg GAE/g wet weight ผลไม้ที่มีปริมาณ polyphenolic น้อย (< 30 mg GAE/g wet weight) ได้แก่ แตงโม, ชมพู่, กล้วยหอม, เนื้ออุ่น, น้ำมะนาว, มะม่วงแรด, มะละกอ, เงาะ, สัปปะรด, กล้วยไข่, ขนุน, ทุเรียน, น้ำส้ม, มะม่วงเขียวเสวย, ส้มโอ และสละ ผลไม้ที่มีปริมาณ polyphenolic ปานกลาง (30-80 mg GAE/g wet weight) ได้แก่ เนื้อมังคุด, ลำไย, มะม่วงน้ำดอกไม้, มะไฟ, ระกำ, ลูกยอ, แอปเปิล, ลิ้นจี่, ฝรั่ง, เนื้อลองกอง, ส้ม, มะเฟือง, น้อยหน่า, พุทรา, กระท้อน (เนื้อสีขาว), มะปราง และเปลือกอุ่น (ไวท์มะละกา) ผลไม้ที่มีปริมาณ polyphenolic มาก (> 80 mg GAE/g wet weight) ได้แก่ เปลือกอุ่น (ไวท์สเปน), กล้วยน้ำว้า, เมล็ดลองกอง, เปลือกอุ่น (ป๊อกดำ), กระท้อน (เนื้อสีน้ำตาล) และเปลือกมังคุด คุณสมบัติต้านออกซิเดชันในผลไม้มีค่า IC_{50} ตั้งแต่ 0.149 ถึง 513.974 mg/ml ผลไม้ที่มีคุณสมบัติต้านออกซิเดชันได้สูง (IC_{50} < 20 mg/ml) ได้แก่ เปลือกมังคุด, เปลือกอุ่น, กระท้อน, กล้วยน้ำว้า, มะปราง, เมล็ดลองกอง, มะเฟือง, ฝรั่ง, มะไฟ, ลิ้นจี่, แอปเปิล, พุทรา, ระกำ, สละ, เนื้อมังคุด, ลำไย, ลูกยอ, น้อยหน่า, ส้ม และส้มโอ ผลไม้ที่มีคุณสมบัติต้านออกซิเดชันได้ปานกลาง (IC_{50} 20-100 mg/ml) ได้แก่ ทุเรียน, เนื้อลองกอง, เนื้ออุ่น, กล้วยไข่, มะละกอ, เงาะ, น้ำส้ม, สัปปะรด, กล้วยหอม, ชมพู่ และน้ำมะนาว ผลไม้ที่มีคุณสมบัติต้านออกซิเดชันได้น้อย (IC_{50} > 100 mg/ml) ได้แก่ ขนุน และแตงโม คุณสมบัติในการต้าน superoxide anion ที่เกิดจาก PMS/NADPH system ในผลไม้ 6 ชนิด พบว่า มะม่วงน้ำดอกไม้ > เมล็ดลองกอง > กล้วยน้ำว้า > ฝรั่ง > เนื้อลองกอง > ทุเรียน คุณสมบัติในการต้าน hydroxyl radical ที่เกิดจาก Fenton system พบว่า มะม่วงน้ำดอกไม้ > เนื้อลองกอง > กล้วยน้ำว้า > เมล็ดลองกอง > ฝรั่ง > ทุเรียน ผลของสารสกัดผลไม้ต่อการแตกตัวของเซลล์เม็ดเลือดแดงที่ถูกกระตุ้นโดย 2,2'-azobis(2-methylpropionamidine) dihydrochloride (AAPH) พบว่า มะม่วงน้ำดอกไม้สามารถป้องกันการแตกตัวของเซลล์เม็ดเลือดแดงได้ดีที่สุด (ยับยั้งได้ 91%) แต่ทุเรียนป้องกันการแตกตัวของเซลล์เม็ดเลือดแดงได้น้อยที่สุด (ยับยั้งได้ 58%) กล้วยน้ำว้า, ฝรั่ง, เนื้อลองกอง และเมล็ดลองกองป้องกันการแตกตัวของเซลล์เม็ดเลือดแดงได้ปานกลาง (ยับยั้งได้ 71-81%)

ภาควิชา.....ชีวเคมี..... ลายมือชื่อนิสิต.....

สาขาวิชา.....ชีวเวชเคมี..... ลายมืออาจารย์ที่ปรึกษา.....

ปีการศึกษา.....2546.....

4476627633 : MAJOR BIOMEDICINAL CHEMISTRY
KEY WORDS: ANTIOXIDANT/ FRUITS/ POLYPHENOLICS/ RADICAL SCAVENGING ACTIVITY

SUPANNEE KAEWSUTTHI: ANTIOXIDATIVE PROPERTY OF THAI FRUITS. THESIS ADVISOR: ASSOCIATE PROFESSOR PIYAWAN SURINRUT, Ph.D., 79 pp. ISBN 974-17-5436-1

Phytochemicals in plants have been reported to prevent oxidative stress related diseases such as cancer, cardiovascular disease, cataracts, brain and immune-system dysfunction and inflammation. Polyphenolic compounds are commonly found in plants both edible and nonedible parts. The aim of this study was to evaluate different varieties of Thai fruits for their total polyphenolic content and their antioxidant property in order to find potential sources of edible and natural antioxidants. In this study, the total polyphenolic contents in 28 varieties of fruits were determined by Folin-Ciocalteu method. Antioxidant property of tested fruits were determined by using 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) method. Specific free radical scavenging activities; superoxide anion scavenging activity, hydroxyl radical scavenging activity and the protective effect of fruits on hemolysis of human red blood cells (RBCs) were also elucidated. Total polyphenolic contents in fruits varied widely from 3.243 ± 0.303 to 2120.526 ± 141.244 mg GAE/g wet weight: low levels (< 30 mg GAE/g wet weight) were found in watermelon, rose apple, fragrant banana, grape pulp, lemon juice, mango (Rad), papaya, rambutan, pineapple, banana (Kai), jackfruit, durian, orange juice, mango (Kiow-Sa-Wooei), pomelo, and sa-la; moderate levels (30-80 mg GAE/g wet weight) were found in mangosteen pulp, longan, mango (Nam-Dok-Mai), ma-fai, zalacca, indian mulberry, apple, litchi, guava, longkong pulp, orange, carambola, custard apple, jujube, santol (white pulp), plum mango, and grape skin (White Malaca); high levels (> 80 mg GAE/g wet weight) were found in grape skin (White Spain), banana (Nam-Var), longkong seed, grape skin (Pok-Dum), santol (brown pulp), and mangosteen hull. The DPPH radical scavenging of fruit extracts measured as IC_{50} varied from 0.149 to 513.974 mg/ml: mangosteen hull, grape skin, santol, banana (Nam-Var), plum mango, mango, longkong seed, carambola, guava, ma-fai, litchi, apple, jujube, zalacca, sa-la, mangosteen pulp, longan, indian mulberry, custard apple, orange, and pomelo showed strong activity to scavenge the DPPH radical (IC_{50} < 20 mg/ml); moderate antioxidant activity was found in durian, longkong pulp, grape pulp, banana (Kai), papaya, rambutan, orange juice, pineapple, fragrant banana, rose apple, and lemon juice (IC_{50} from 20 - 100 mg/ml); low antioxidant activity (IC_{50} > 100 mg/ml) was found in jackfruit and watermelon. The superoxide scavenging abilities of the six fruit extracts generated in a PMS/NADPH system are as follows: mango (Nam-Dok-Mai) > longkong seed > banana (Nam-Var) > guava > longkong pulp > durian. The hydroxyl radicals were generated by the Fenton system. The order of hydroxyl radical scavenging capabilities of six fruit extracts are mango (Nam-Dok-Mai) > longkong pulp > banana (Nam-Var) > longkong seed > guava > durian. The protective effect of fruits on hemolysis of human RBCs, induced by 2,2'-azobis(2-methylpropionamidine) dihydrochloride (APPH) radicals was investigated. The results demonstrated that among the six fruit extracts, mango (Nam-Dok-Mai) possesses the strongest effect (91% inhibition) to prevent human erythrocyte membrane from hemolysis while durian has the weakest effect (58% inhibition) against human erythrocyte hemolysis; banana, guava, longkong pulp, and longkong seed have moderate capability (71-81% inhibition) to prevent human erythrocyte membrane from hemolysis.

Department.....Biochemistry..... Student's signature.....Supannee Kaewsutthi

Field of study ..Biomedicinal..Chemistry ... Advisor's signature.....P. Surinrut

Academic year.....2003.....

ACKNOWLEDGEMENTS

I wish to express my deepest appreciation and grateful thank to my thesis advisor, Associate Professor Dr. Piyawan Surinrut of Department of Biochemistry, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University, for her guidance, suggestion and encouragement throughout the course of this study.

I would like to thank the thesis committee for their construction suggestions and critical review of this thesis.

I would like to thank my teachers, my friends, and all staff of the central laboratory, Faculty of Sciences, Chulalongkorn University for their kindness and help.

I would like to thank the Ministry of University Affairs and Graduate School for granting partial financial support to fulfill this study.

I would like to thank Aumpornpun Klaimook, Saiyan Klaisuwan, and all staff of Blood Bank Red Cross for providing blood samples.

Finally, I am deeply grateful to my parents for their encouragement, understanding and supporting throughout my graduate study.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

CONTENTS

Page

ABSTRACT (Thai).....iv

ABSTRACT (English).....v

ACKNOWLEDGEMENTS.....vi

CONTENTS.....vii

LIST OF TABLE.....viii

LIST OF FIGURES.....ix

LIST OF ABBREVIATIONS.....xi

CHAPTER I GENERAL BACKGROUND.....1

CHAPTER II MATERIALS AND METHODS.....21

CHAPTER III RESULTS AND DISCUSSIONS.....29

CHAPTER IV CONCLUSIONS.....66

REFERENCES.....68

APPENDICES.....75

VITA.....79

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

LIST OF TABLES

Table Page

1. Active oxygen and related species.....2
2. Formation of active oxygen species.....4
3. Defense system *in vivo* against oxidative damage.....11
4. Antioxidant in the dietary.....12
5. Total polyphenolic contents in fruit extracts.....32
6. IC_{50} values of DPPH radical scavenging activities in fruit extracts.....37
7. IC_{50} values of the superoxide anion scavenging activities of fruit extracts.....47
8. Scavenging effect of mango (Nam-Dok-Mai) on hydroxyl radical.....49
9. Scavenging effect of longkong pulp on hydroxyl radical.....50
10. Scavenging effect of on longkong seed hydroxyl radical.....51
11. Scavenging effect of banana (Nam-Var) on hydroxyl radical.....52
12. Scavenging effect of guava on hydroxyl radical.....53
13. Scavenging effect of durian on hydroxyl radical.....54
14. Inhibitory effects of fruit extracts on human erythrocyte hemolysis initiated by AAPH.....65

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

LIST OF FIGURES

Figure Page

1. Oxidants from normal metabolism....3
2. Chain reaction of free radical....6
3. Atom (or group) abstraction....7
4. β-scission reaction....7
5. Addition reaction....7
6. Sources and reaction of free radical and active oxygen species....9
7. Structure of chalcone....14
8. Structure of flavones....14
9. Structures of flavonols....15
10. Structure of flavanones....16
11. Structures of flavan-3-ols....16
12. Structure of anthocyanidins....17
13. Structure of isoflavones....17
14. Structure of neoflavone....17
15. Flavonoids biosynthetic pathway....18
16. Standard curve of gallic acid....31
17. Schema of the reactions between the DPPH radical and various oxidizable groups....34
18. A logarithmic regression curve of gallic acid....36
19. Correlation between total GAE (mg/g wet weight) and IC_{50} value of DPPH radical scavenging activity....39
20. A logarithmic regression curve of mango (Nam-Dok-Mai) on superoxide scavenging activity....41
21. A logarithmic regression curve of longkong seed on superoxide scavenging activity....42
22. A logarithmic regression curve of longkong pulp on superoxide scavenging activity....43
23. A logarithmic regression curve of guava on superoxide scavenging activity....44

LIST OF FIGURES (CONT.)

Figure Page

24. A logarithmic regression curve of banana (Nam-Var) on superoxide scavenging activity....45
25. A logarithmic regression curve of durian on superoxide scavenging activity....46
26. Effects of mango (Nam-Dok-Mai) extract on human erythrocyte hemolysis initiated by AAPH....58
27. Effects of banana (Nam-Var) extract on human erythrocyte hemolysis initiated by AAPH....59
28. Effects of guava extract on human erythrocyte hemolysis initiated by AAPH....60
29. Effects of longkong pulp extract on human erythrocyte hemolysis initiated by AAPH....61
30. Effects of longkong seed extract on human erythrocyte hemolysis initiated by AAPH....62
31. Effects of durian extract on human erythrocyte hemolysis initiated by AAPH....63

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

LIST OF ABBREVIATIONS

AAPH	=	2,2'-azobis(2-methylpropionamidine) dihydrochloride
°C	=	Degree Celsius
conc.	=	concentration
cont.	=	Continue
DPPH	=	2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl
etc.	=	et cetera
et al.	=	et alii (and other)
Fig.	=	Figure
g	=	gram
l	=	liter
MDA	=	Malondialdehyde
mg	=	Milligram (s)
min	=	Minute
ml	=	Milliter (s)
mM	=	Millimolar
NBT	=	Nitroblue tretrazolium
NADPH	=	nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
nm	=	nanometer
PMS	=	Phenazine methosulfate
RBCs	=	Red blood cells
ROS	=	Reactive Oxygen Species
rpm	=	round per minute
TBA	=	Thiobarbituric acid
TCA	=	Thichloroacetic acid
µl	=	Microliter (s)
µM	=	Micromolar

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย