CORRELATION OF PHYTOCHEMICAL CONTENTS ON ANTIOXIDANT ACTIVITIES OF WILD GRAPE (*AMPELOCISSUS MARTINII* PLANCH.) FRUIT EXTRACTS

SURISA SRISUWAN

A thesis submitted in partial fulfillment of the requirements for the degree of Master of Science in Chemistry Education at Mahasarakham University

April 2015

All rights reserved by Mahasarakham University

Mahasarakham University

CORRELATION OF PHYTOCHEMICAL CONTENTS ON ANTIOXIDANT ACTIVITIES OF WILD GRAPE (*AMPELOCISSUS MARTINII* PLANCH.) FRUIT EXTRACTS

SURISA SRISUWAN

A thesis submitted in partial fulfillment of the requirements for the degree of Master of Science in Chemistry Education at Mahasarakham University

April 2015

All rights reserved by Mahasarakham University

Mahasarakham University

The examining committee has unanimously approved this thesis, submitted by Miss Surisa Srisuwan, as a partial fulfillment of the requirements for the Master of Science degree in Chemistry Education at Mahasarakham University.

Examining Committee

.....	Chairman
(Asst. Prof. Muntana Nakornriab, Ph.D.)	(Faculty graduate committee)
.....	Committee
(Asst. Prof. Prasong Srihanam, Ph.D.)	(Advisor)
.....	Committee
(Ansaya Thonpho, Ph.D.)	(Co-advisor)
.....	Committee
(Onanong Cheerarot, Ph.D.)	(Faculty graduate committee)
.....	Committee
(Pornpimol Ponkham, Ph.D.)	(External expert)

Mahasarakham University has granted approval to accept this thesis as a partial fulfillment of the requirements for the Master of Science degree in Chemistry Education.

.....	.....
(Prof. Wichian Magtoon, Ph.D.)	(Prof. Pradit Terdtoon, Ph.D.)
Dean of the Faculty of Science	Dean of Graduate School

April 30, 2015

The examining committee has unanimously approved this thesis, submitted by Miss Surisa Srisuwan, as a partial fulfillment of the requirements for the Master of Science degree in Chemistry Education at Mahasarakham University.

Examining Committee

……	Chairman
(Asst. Prof. Muntana Nakornriab, Ph.D.)	(Faculty graduate committee)
……	Committee
(Asst. Prof. Prasong Srihanam, Ph.D.)	(Advisor)
……	Committee
(Ansaya Thonpho, Ph.D.)	(Co-advisor)
……	Committee
(Onanong Cheerarot, Ph.D.)	(Faculty graduate committee)
……	Committee
(Pornpimol Ponkham, Ph.D.)	(External expert)

Mahasarakham University has granted approval to accept this thesis as a partial fulfillment of the requirements for the Master of Science degree in Chemistry Education.

…….....	…….....
(Prof. Wichian Magtoon, Ph.D.)	(Prof. Pradit Terdtoon, Ph.D.)
Dean of the Faculty of Science	Dean of Graduate School
	…… 2015

Mahasarakham University

ACKNOWLEDGEMENTS

This thesis was financially supported by Mahasarakham University (Grant year 2013).

The thesis would not have been accomplished without the help from several people. I deeply appreciate Asst. Prof. Dr. Prasong Srihanam and Dr. Ansaya Thonpho, my advisor for their guidance, encouraging, invaluable comments and suggestions throughout this study. I would like to thanks Asst. Prof. Dr. Muntana Nakornriab, Dr. Onanong Cheerarot, Department of Chemistry, Faculty of Science, Mahasarakham University and Dr. Pornpimol Ponkham, Department of Chemistry, Faculty of Science and Technology, Rajabhat Mahasarakham University for their comments and suggestions.

I would like to thanks Miss Chuleerat Wangnarat, Ph.D. candidate for suggestion and help in preparation of wild grape extracts.

I would like to thanks Mr. Kowit Meeyen for instruction and training of SPSS statistical software.

I would like to thanks Dr. Paiboon Ketkaew, Director of Benchamatheputit Phetchaburi School, and teachers of Benchamatheputit Phetchaburi School for support this study.

I would like to thanks all my friends for their helpful sincerity, impression friendship and encouragement.

Finally, I wish express very special thanks to my family for their kindness, understanding, encouraging and support in every way on my study.

Surisa Srisuwan

Mahasarakham University

TITLE Correlation of phytochemical contents on antioxidant activities of wild grape (*Ampelocissus martinii* Planch.) fruit extracts
CANDIDATE Miss Surisa Srisuwan
DEGREE Master of Science degree in Chemistry Education
ADVISORS Asst. Prof. Dr. Prasong Srihanam
Dr. Ansaya Thonpho
UNIVERSITY Mahasarakham University **YEAR** 2015

ABSTRACT

Wild grape (*Ampelocissus martinii* Planch.) is a local fruit, limited information on relation between its phytochemicals and antioxidation activity study is available reports. The aims of this work are 1) to find the most suitable solvent for extraction of wild grape fruit to obtain the highest phytochemical contents and antioxidant activity 2) to determine antioxidation activities of the extracts and 3) to study the relation of phytochemical contents and their antioxidant activity. Many solvents with different polarity including ethanol, methanol and water were chosen as solvent extraction. The wild grape extracts were then determined their phytochemicals; phenolic, flavonoid, saponin, anthocyanin and proanthocyanidin. In addition, several methods such as free radical scavenging activity of $DPPH^{\bullet}$ (DPPH assay) and $ABTS^{\bullet+}$ (ABTS assay), Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC assay), Ferric reducing antioxidant potential (FRAP assay) and Cupric reducing antioxidant capacity (CUPRAC assay) were selected for antioxidant activity determination. The results showed that the methanolic extract had the highest contents of phenolic, flavonoid and anthocyanin with significant difference ($P<0.01$), while saponin was the highest in ethanolic extract. Proantho- cyanidin had similar contents comparison between methanolic and ethanolic extracts. Moreover, all phytochemicals found in water extract showed the lower contents than both solvents. The results of antioxidant activity indicated that the different polarities of solvents affected on the antioxidant activity of wild grape extracts with significant difference. Among the extracts, methanolic extract revealed the highest antioxidant activity in all tested methods. However, the activity of wild grape extracted had lower than standard compounds, except trolox and CUPRAC assay. Correlation analysis of phytochemical content and antioxidant activity indicated that high

Mahasarakham University

correlation was obtained, especially flavonoid and anthocyanin. The results obtained from this work suggested that wild grape fruit is a good source of phytochemicals which composed of good biological activity. It is promissed that the wild grape fruit could develop as nutritional food additives to support health benefits.

Keywords: anthocyanin, flavonoid, phenolic, proanthocyanidin, saponin

ชื่อเรื่อง ความสัมพันธ์ของปริมาณสารพฤกษเคมีต่อฤทธิ์การต้านออกซิเดชันของสารสกัดจากผลองุ่นป่า (*Ampelocissus martinii* Planch.)
ผู้แต่ง นางสาวสุริสา ศรีสุวรรณ์
ปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต **สาขาวิชา** เคมีศึกษา
กรรมการควบคุม ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ประสงค์ สีหานาม
อาจารย์ ดร.อัณศยา ท่อนโพธิ์
มหาวิทยาลัย มหาวิทยาลัยมหาสารคาม **ปีที่พิมพ์** 2558

บทคัดย่อ

องุ่นป่า (*Ampelocissus martinii* Planch.) เป็นผลไม้พื้นเมืองที่มีรายงานการศึกษาเกี่ยวกับความสัมพันธ์ของปริมาณสารพฤกษเคมีและฤทธิ์การต้านออกซิเดชันไม่มากนัก จุดประสงค์ของการวิจัยครั้งนี้ คือ 1) เพื่อหาตัวทำละลายที่เหมาะสมในการสกัดผลองุ่นป่าเพื่อให้ได้ปริมาณสารพฤกษเคมีและมีฤทธิ์การต้านออกซิเดชันสูงที่สุด 2) เพื่อตรวจสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของสารสกัด และ 3) ศึกษาความสัมพันธ์ของปริมาณสารพฤกษเคมีต่อฤทธิ์การต้านออกซิเดชัน ในการสกัดใช้ตัวทำละลายที่มีขั้วแตกต่างกัน คือ เอธานอล เมธานอล และน้ำ ทำการตรวจสอบชนิดและปริมาณสารพฤกษเคมี ได้แก่ ฟีนอลิก ฟลาโวนอยด์ ซาโปนิน แอนโธไซยานิน และโพรแอนโธไซยานิดิน และทดสอบฤทธิ์การต้านออกซิเดชันด้วยวิธีที่แตกต่างกัน ได้แก่ วิธีการดักจับอนุมูลอิสระดีพีพีเอช (DPPH assay) และเอบีทีเอส (ABTS assay) การดักจับอนุมูลอิสระเทียบกับโทรล็อกซ์ (TEAC assay) พลังรีดิวซ์ไอออนเหล็ก (FRAP assay) และทองแดง (CUPRAC assay) ผลการทดลอง พบว่า สารสกัดองุ่นป่าด้วยเมธานอลให้ปริมาณฟีนอลิก ฟลาโวนอยด์ และแอนโธไซยานินสูงสุดอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.01$) ในขณะที่สารสกัดด้วยเอธานอลให้ปริมาณซาโปนินสูงสุด โพรแอนโธไซยานิดินมีปริมาณไม่แตกต่างกันเมื่อเปรียบเทียบระหว่างเอธานอลและเมธานอล ส่วนสารสกัดด้วยน้ำมีปริมาณสารพฤกษเคมีทุกชนิดต่ำที่สุด ผลการทดสอบฤทธิ์การต้านออกซิเดชันพบว่า ตัวทำละลายที่มีขั้วแตกต่างกันให้ผลการทดสอบแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ โดยสารสกัดด้วยเมธานอลมีฤทธิ์การต้านออกซิเดชันสูงที่สุดในทุกๆ วิธีการทดสอบ อย่างไรก็ตามสารสกัดจากผลองุ่นป่ามีฤทธิ์การต้านออกซิเดชันต่ำกว่าสารต้านออกซิเดชันมาตรฐาน ยกเว้นโทรล็อกซ์ เมื่อทดสอบด้วยวิธี CUPRAC และเมื่อทำการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณสารพฤกษเคมีกับฤทธิ์การต้านออกซิเดชัน พบว่า ปริมาณพฤกษเคมีและฤทธิ์การต้านออกซิเดชันมีความสัมพันธ์กันสูง โดยเฉพาะฟลาโวนอยด์และแอนโธไซยานิน งานวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่าองุ่นป่าเป็นแหล่งของสารพฤกษเคมีที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่ดี ซึ่งเหมาะจะนำไปพัฒนาเป็นอาหารเสริมเพื่อสุขภาพได้

คำสำคัญ: แอนโธไซยานิน ฟลาโวนอยด์ ฟีนอลิก โพรแอนโธไซยานิดิน ซาโปนิน

Mahasarakham University

CONTENTS

	Page
ACKNOWLEDGEMENTS	i
ABSTRACT (in English)	ii
ABSTRACT (in Thai)	iv
CONTENTS	v
LIST OF TABLES	vii
LIST OF FIGURES	viii
LIST OF ABBREVIATIONS	x
CHAPTER 1 INTRODUCTION	1
1.1 Rationale and background	1
1.2 Objective of the research	2
1.3 Scope of the research	2
1.4 Expected results of the research	3
1.5 Definition of terms	3
CHAPTER 2 LITERTURE REVIEW	5
2.1 Degenerative diseases	5
2.2 Free radicals	6
2.3 Antioxidants	11
2.4 Wild grape	20
2.5 Research related on antioxidant and phytochemicals	22
CHAPTER 3 RESEARCH METHODOLOGY	24
3.1 Materials	24
3.2 Chemicals	24
3.3 Instruments	25
3.4 Methods	26
3.4.1 Wild grape extraction	26
3.4.2 Phytochemical determination	27
3.4.3 Antioxidant assay	33
3.4.4 Statistical analysis	37

Mahasarakham University

CHAPTER 4 RESULT AND DISCUSSION 38
4.1 Effect of solvent extraction on phytochemical contents 38
4.2 Effect of solvent extraction on antioxidant activities 40
4.3 Comparison of antioxidant activity between wild grape extracts and standard compound 43
4.4 Correlation between phytochemical contents and antioxidation activity 47
CHAPTRR 5 CONCLUSIONS 50
REFERENCES 51
APPENDICES 65
Appendices A Preparation of solutions 66
Appendices B Calibration curves of standard 71
Appendices C Research output 76
BIOGRAPHY 93

Mahasarakham University

LIST OF TABLES

			Page
Table	2.1	Reactive oxygen and nitrogen species of biological interest	10
Table	2.2	Activities and action mechanism of some phytochemicals	16
Table	3.1	Chemicals used in the research	24
Table	3.2	Instrument used in the research	25
Table	4.1	Effect of solvent extraction on various phytochemical contents	39
Table	4.2	Antioxidant activity of different wild grape fruit extracts	40
Table	4.3	Correlation between phytochemical content and antioxidant activities	48

Mahasarakham University

LIST OF FIGURES

			Page
Figure	2.1	Organs affected by oxidative damage	6
Figure	2.2	Chemical structure of some natural antioxidants	12
Figure	2.3	The structure of various phenolic compounds	15
Figure	2.4	Structure of 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical (DPPH radical)	17
Figure	2.5	Structure of 2.2'-Azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt	18
Figure	2.6	Mechanism of FRAP assay	19
Figure	2.7	Mechanism of CUPRAC assay	20
Figure	2.8	Wild grape fruit	21
Figure	3.1	Diagram shows the step to prepare crude extracts of wild grape fruit	27
Figure	3.2	Diagram shows the step of total phenolic content analysis	28
Figure	3.3	Diagram shows the process for total flavonoid content determination	29
Figure	3.4	Diagram shows the process for total anthocyanin content determination	30
Figure	3.5	Diagram shows the process for total saponin content determination	31
Figure	3.6	Diagram shows the process for total proanthocyanidin content determination	32
Figure	3.7	Diagram shows the process of DPPH assay	33
Figure	3.8	Diagram shows the process of ABTS assay	34
Figure	3.9	Diagram shows the process of FRAP assay	36
Figure	3.10	Diagram shows the process of CUPRAC assay	37
Figure	4.1	Comparison of IC_{50} values of wild grape extract and standard compounds using DPPH and ABTS assay	43
Figure	4.2	Comparison of antioxidant activity of wild grape extract and standard compounds using TEAC assay	44
Figure	4.3	Comparison of antioxidant activity of wild grape extract and standard compounds using FRAP assay	45

Mahasarakham University

Figure 4.4 Comparison of antioxidant activity of wild grape extract and standard compounds using CUPRAC assay 46
Figure B.1 Calibration curve of standard gallic acid 72
Figure B.2 Calibration curve of standard quercetin 72
Figure B.3 Calibration curve of standard aescin 73
Figure B.4 Calibration curve of standard catechin 73
Figure B.5 Calibration curve of standard trolox (ABTS assay) 74
Figure B.6 Calibration curve of standard $FeSO_4$ 74
Figure B.7 Calibration curve of standard trolox (CUPRAC assay) 75

Mahasarakham University

LIST OF ABBREVIATIONS

Abs	Absorbance
ABTS	2,2'-azino-bis-(3-ethybenzothiazoline sulphonate)
Aes	Aescin
AR	Analytical reagent
ARDS	Acute respiratory distress syndrome
BHA	Butylated hydroxytoluene
^{o}C	Degree celcius
C3GE	Cyanidin 3-glucoside equivalent
CE	Catechin equivalent
COPD	Chronic obstructive pulmonary disease
CUPRAC	Cupric reducing antioxidant capacity
Df	Dilution factor
DM	Diabetes mellitus
DNA	Deoxyribonucleic acid
DPPH	2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl
etc.	Et cetera
FRAP	Ferric reducing antioxidant potential
g	Gram
GAE	Gallic acid equivalent
GI	Glycemic index
GPX	Glutathione peroxidase
h	Hour
IHD	Ischemic heart disease
kg	Kilogram
M	Molar
mg	Milligram
mL	Milliliter
mmol	Millimole
MW	Molecular weight
nm	Nanometer

Mahasarakham University

No	Number
OFR	Oxygen free radical
p	Critical p-value
PUD	Peptic ulcer disease
QE	Quercetin equivalent
RNS	Reactive nitrogen species
ROS	Reactive oxygen species
RT	Room temperature
s	Second
SD	Standard deviation
SOD	Superoxide dismutase
TAC	Total anthocyanin content
TE	Trolox equivalent
TEAC	Trolox equivalent antioxidant capacity
TFC	Total flavonoid content
TPC	Total phenolic content
TPTZ	2,4,6-Tripyridyl-s-Triazine
TSC	Total saponin content
ε	Molar absorptivity
µL	Microliter
µg	Microgram

Mahasarakham University

CHAPTER 1

INTRODUCTION

1.1 Rationale and background

Free radical is molecular or ion that is not fully outermost electron pairs, incur unstable molecules and oxidation reaction from adjacent molecules, resulting in molecules that lack an electron into a free radical, called a chain reaction (Gilbert, 2000). Free radicals caused by metabolism process in the body and external environment. The free radicals will affect to organs and leads degenerative symptoms such as cancer, heart disease and related brain systems (Golden *et al*., 2002; McCarthy and Shah, 2003; Valko *et al*., 2007; Pham-Huy *et al*., 2008). These diseases can be prevented by substances called “antioxidation” or “antioxidant”. Antioxidants are inhibiting the oxidation reaction of free radicals. They have several actions and behave differently as radical scavenging, singlet oxygen quenching, metal chelation, chain-breaking, synergism and enzyme inhibition (Yoshikawa *et al*, 2000). Antioxidants generally found in vegetables, fruits and herbs (Hwang *et al*., 2006). The antioxidant extracted from plants have a name “phytochemical” and could be divided into many types including polyphenol, flavonoid, quinine, tannin, alkaloid, steroid, saponin and anthocyanin (Fang *et al*., 2002; Cliff *et al*., 2007; Pezzuto, 2008; Alghazeer *et al*., 2012). These compounds are useful for health treatment such as inhibitors of the enzyme that can trigger cancer (Hasaniya *et al*., 1997), anti-inflammatory activity, apoptotic induction effect, blood platelet aggregation (Hou, 2003) and bioactive compounds to attract interest due to their safety and health benefits. Grapes are a popular fruit for study of phytochemical and antioxidant activity. Many reports indicated that phytochemical of grape extract shows excellent free radical protection and also various diseases (Lima *et al*., 2014).

Wild grape (*Ampelocissus martinii* Planch.) is a local wild fruit, which has a stem and fruit very similar to cultivated grape. Therefore, it might be composed of phytochemical as like as compose in the grape. The wild grape is an herbaceous climber and durable weather than grape, found in the North and Northeast of Thailand.

Mahasarakham University

CHAPTER 2

LTERATURE REVIEW

2.1 Degenerative diseases

The free radical species include regenerative oxygen-species (ROS), reactive nitrogen species (RNS), carbon-centered radicals, and sulfer-centered radicals (Miller *et al*., 1990). Among them, ROS represent the most important class generated in living systems. The ROS is derived from the contradictory roles that oxygen plays in metabolism (We *et al*., 2013). Excessive ROS may have detrimental effects by targeting cellular components indiscriminately including DNA, proteins and lipids (Kohen and Nyska, 2002). A result of an unfavourable critical balance between free radical and antioxidant leading to term called "oxidative stress" (McCord, 2000; Rock *et al*., 2009). The oxidative stress resulting in a series of events which deregulated the cellular functions and play a major role in the development of chronic and degenerative diseases for many organs as shown in Figure 2.1 (Sailaja *et al*., 2011). In addition, declines in the overall proteolytic capacity of cell have been observed (Cuervo and Dice, 2000; Keller *et al*., 2000; Bulteau *et al*., 2002). Usually, the native protein was degraded by proteolysis. The proteolysis was also altered and misfolded forms of protein (DeMartino and Slauhter, 1999; Shringarpure *et al*., 2001). It is an important step in cellular processes as diverse as degradation of plasma membrane receptors and lumen proteins (Strous *et al*., 1996), activation of gene transcription (Traenckner *et al*., 1995; Cuervo *et al*., 1998), and induction/propagation of apoptosis (Deiss *et al*., 1996; Ferri and Kroemer, 2001). The importance of proteolytic function in maintenance of cellular viability is evident in numerous diseases, including Alzheimer's disease (Nixon *et al*., 2000), diabetes (Horie *et al*., 1997), atherosclerosis (Sparrow *et al*., 1989), and ischemia/reperfusion injury (Keller *et al*., 2000), in which loss in cellular function appears related to defects in cellular proteolytic systems. Basal changes in the activities of these systems as a function of age might therefore contribute to the enhanced fragility of cells from aged organisms relative to young and adult counterparts, potentially through an altered ability to respond appropriately to (patho) physiological stimuli

Mahasarakham University

(Szweda *et al*., 2002). Oxygen free radical (OFR); ROS and RNS are products of normal cellular metabolism. They are well recognized for playing a dual role as both deleterious and beneficial to living systems (Wu and Cederbaum, 2003).

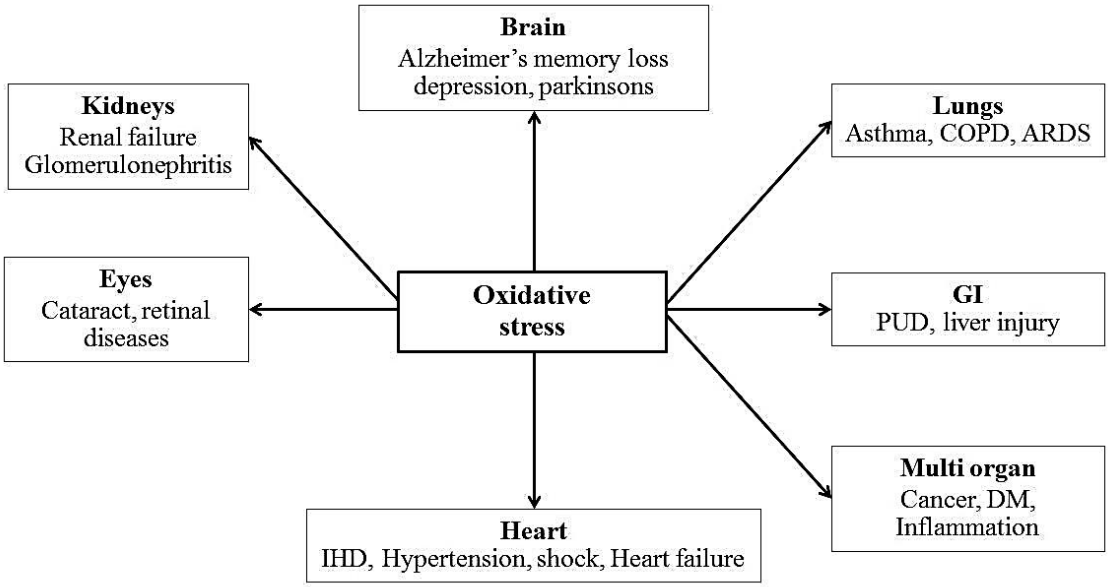


Figure 2.1 Organs affected by oxidative damage (Sailaja *et al*., 2011).

2.2 Free radicals

2.2.1 What are free radicals

Free radicals are defined as molecules having an unpaired electron in the outer orbit (Gilbert, 2000) with unstable and very reactive. Various free radicals are reported such as superoxide, hydroxyl, peroxyl ($RO_2^{\bullet}$), alkoxyl ($RO^{\bullet}$), and hydroperoxyl ($HO_2^{\bullet}$) radicals. Nitric oxide and nitrogen dioxide ($^{\bullet}NO_2$) are two nitrogen free radicals which are studied highly of their effect on health. Oxygen and nitrogen free radicals can be converted to other non-radical reactive species, such as hydrogen peroxide, hypochlorous acid (HOCl), hypobromous acid (HOBr), and peroxynitrite ($ONOO^-$). Reactive oxygen species (ROS), reactive nitrogen species (RNS), and reactive chlorine species are produced in animals and humans under physiologic and pathologic

Mahasarakham University

conditions (Evans and Halliwll, 2001). Thus, ROS and RNS include radical and non-radical species.

2.2.2 Biological roles of free radicals

Free radicals may play an important role in the origin of life and biological evolution, implicating their beneficial effects on the organisms (McCord, 2000). For example, oxygen radicals exert critical actions such as signal transduction, gene transcription, and regulation of soluble guanylate cyclase activity in cells (Lander, 1997; Zheng and Storz, 2000). Also, NO is one of the most wide spread signaling molecules and participates in virtually every cellular and organ function in the body (Ignarro *et al*., 1999). Physiologic levels of NO produced by endothelial cells are essential for regulating the relaxation and proliferation of vascular smooth muscle cells, leukocyte adhesion, platelet aggregation, angiogenesis, thrombosis, vascular tone, and hemodynamics (Ignarro *et al*., 1999). In addition, NO produced by neurons serves as a neurotransmitter, and NO generated by activated macrophages is an important mediator of the immune response (Freidovich, 1999). However, as oxidants and inhibitors of enzymes containing an iron-sulfur center, free radicals and other reactive species cause the oxidation of biomolecules which leads to cell injury and death (Freidovich, 1999; McCord, 2000). For example, radiation-induced ROS markedly alter the physical, chemical, and immunologic properties of SOD (Fang, 1991), which further exacerbates oxidative damage in cells. The cytotoxic effect of free radicals is deleterious to mammalian cells and mediates the pathogenesis of many chronic diseases, but is responsible for the killing of pathogens by activated macrophages and other phagocytes in the immune system (McCord, 2000). Thus, there are “two faces” of free radicals in biology in that they serve as signaling and regulatory molecules at physiologic levels but as highly deleterious and cytotoxic oxidants at pathologic levels (Freidovich, 1999).

2.2.3 Production of free radicals

Oxygen is required for the generation of all ROS, RNS, and reactive chlorine species (Freidovich, 1999). The major reactions for the production of oxygen and nitrogen free radicals in the body is not formed from L-arginine by one of the three NO synthase (NOS) isoforms: nNOS, iNOS and eNOS (Wu and Morris, 1998). All NOS isoforms require oxygen, tetrahydrobiopterin, nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH), calmodulin, flavin adenine dinucleotide (oxidized; FAD), flavin

Mahasarakham University

mononucleotide (FMN), and heme for catalytic activity, whereas Ca^{2+} is essential for nNOS and eNOS activity (Wu and Morris, 1998). In contrast, superoxide is generated from O_2 by multiple pathways: 1) NADPH oxidation by NADPH oxidase; 2) oxidation of xanthine or hypoxanthine by xanthine oxidase; 3) oxidation of reducing equivalents (e.g., nicotinamide adenine dinucleotide NADPH and $FADH_2$) via the mitochondrial electron transport system; 4) autoxidation of monoamines (e.g., dopamine, epinephrine, and norepinephrine), flavins, and hemoglobin in the presence of trace amounts of transition metals; 5) one-electron reduction of O_2 by cytochrome P-450; and 6) one-electron reduction of O_2 by nNOS or eNOS when arginine or tetrahydrobiopterin is deficient (Wu and Morris, 1998; Freidovich, 1999; Gilbert, 2000; Evans and Halliwll, 2001).

Superoxide dismutase converts O_2^- to H_2O_2. Hydrogen peroxide is also produced through two-electron reduction of O_2 by cytochrome P-450, D-amino acid oxidase, acetyl coenzyme A oxidase, or uric acid oxidase (Fang, 2002; Evans and Halliwll, 2001; Freidovich, 1999). Further, the oxidation of sarcosine in the pathway of glycine metabolism leads to H_2O_2 formation. In the presence of water and oxygen, ionizing radiation results in the production of O_2^-, H_2O_2, and $^{\bullet}OH$, with $^{\bullet}OH$ being the major deleterious ROS (Fang, 1991). NO can react with O_2^- or H_2O_2 to form $ONOO^-$, whose oxidant potential is greater than that of O_2^- or H_2O_2 alone (Freidovich, 1999; McCord, 2000). As a strong oxidant, HOCl is generated from H_2O_2 and Cl^- by myeloperoxidase (a heme enzyme) particularly in immunologically activated phagocytes.

When free radicals and other reactive species (e.g., $^{\bullet}OH$, $HOO^{\bullet}$, $ONOO^-$) extract a hydrogen atom from an unsaturated fatty acyl chain [e.g., ω-6 polyunsaturated fatty acid (PUFA)], a carbon centered lipid radical ($L^{\bullet}$) is produced. This is followed by the addition of oxygen to $L^{\bullet}$ to yield a lipid peroxyl radical ($LOO^{\bullet}$). $LOO^{\bullet}$ further propagates the peroxidation chain reaction by abstracting a hydrogen atom from a nearby unsaturated fatty acid. The resulting lipid hydroperoxide (LOOH) can easily decompose to form a lipid alkoxyl radical ($LO^{\bullet}$). This series of ROS-initiated lipid peroxidation reactions with the production of lipid peroxyl and alkoxyl radicals, collectively called *chain propagation*, occurs in mammalian cells, such that oxygen free radicals may cause damage far in excess of their initial reaction products.

Mahasarakham University

The mitochondrial electron transport system is a source of superoxide (Freidovich, 1999). Because NADH, NADPH, and $FADH_2$ are produced almost exclusively via the aerobic metabolism of protein, fat, and glucose, an increase in dietary energy intake enhances mitochondrial free radical production, which results in oxidative stress. Thus, calorie restriction reduces the generation of free radical species and retards aging in animals (Sohal, 1996). Under physiologic conditions, approximately 1% to 3% of the O_2 consumed by the body is converted into superoxide and other ROS (Sohal, 1996). Throughout the lifecycle, any person may be at a risk of oxidative stress induced by high rates of oxygen use (e.g., strenuous work and competitive sports), the autoimmune activation of immune system cells (e.g., respiratory burst of polymorphonuclear and mononuclear cells), and environmental factors (e.g., pollutants containing NO, nitro-gen dioxide, and hydroxyl radicals). Prolonged exposure to free radicals, even at a low concentration, may result in the damage of biologically important molecules and potentially lead to DNA mutation, tissue injury, and disease (McCord, 2000; Freidovich, 1999). Thus, although molecular oxygen is absolutely essential for aerobic life, it can be toxic under certain conditions. This phenomenon has been termed the oxygen paradox (Gilbert, 2000). The example of the free radicals is listed in Table 2.1.

Mahasarakham University

Table 2.1 Reactive oxygen and nitrogen species of biological interest (Devasagayam *et al*., 2004)

Reactive species	Symbol	Half Life (in sec)	Reactivity / Remarks
Reactive oxygen species :			
Superoxide cardiovascular	$O2^{\bullet -}$	10^{-6}s	Generated in mitochondria, in system and others
Hydrogen H_2O_2 stable			Formed in our body by large peroxide number of reactions and yields potent species like $^{\bullet}OH$
Peroxyl radical	$ROO^{\bullet}$s		Reactive and formed from lipids, proteins, DNA, sugars etc. during oxidative damage
Organic hydroperoxide	ROOH	stable	Reacts with transient metal ions to yield reactive species
Singlet oxygen	$^1O_2$	10^{-6} s	Highly reactive, formed during photosensitization and chemical reactions
Ozone $^1O_2$	O_3	s	Present as an atmospheric pollutant, can react with various molecules, yielding
Reactive nitrogen species:			
Nitric oxide	$NO^{\bullet}$s		Neurotransmitter and blood pressure regulator, can yield potent oxidants during pathological states
Peroxynitrite	$ONOO^-$	10^{-3} s	Formed from $NO^{\bullet}$ and superoxide, highly reactive
Peroxynitrous acid	ONOOH	fairly stable	Protonated form of $ONOO^-$
Nitrogen	NO_2	s	Formed during atmospheric dioxide pollution

Mahasarakham University

2.3 Antioxidants

Free radicals can be inhibited by substances called antioxidants. Research has released antioxidants are substances that are beneficial to the body (Chattopadhyay *et al*., 2008). Antioxidants help to decrease free radical change. In life protection cell and tissue destruction of free radicals contains antioxidants of many types for different functions. There are both enzymatic and non-enzymatic, the compound is soluble in water and fat. The mechanics of it, there are many series such as radical scavenging, singlet oxygen quenching, metal chelation, chain-breaking, synergism and enzyme inhibition (Yoshikawa *et al*., 2000). The free radical scavengers are shows such equation 2.1 and 2.2.

$$R^{\bullet} + AH \longrightarrow RH + A^{\bullet} \qquad \text{(equation 2.1)}$$

$$RO^{\bullet} + AH \longrightarrow ROH + A^{\bullet} \qquad \text{(equation 2.2)}$$

Antioxidants can be divided into two groups, synthetic and natural antioxidants. Synthetic antioxidants caused by chemical synthesis as phenolic compounds, such as propyl gallate, 2-butylated hydroxyl anisole, 3-butylate hydroxyl anisole, butylated hydroxyl toluene (BHT) and tertiary butyl hydroquinone. These compounds are commonly used in the food industry, to inhibit the oxidation of fat in foods that cause odor, color and taste changes. They are stability more than natural antioxidants. However, there are limitations on the safety of consumers (Pokorny *et al*., 2001), while natural antioxidants found in both plants and animals such as vitamin C, vitamin E, flavonoid, anthocyanin, carotenoids and ubiquinones, glutathione, glutathione peroxidase (GPX), glutathione reductase, glutathione transferase (change H_2O_2 to O_2 and H_2O) and superoxide dismutase (SOD) (change $O_2^{\bullet -}$ to H_2O_2) (Buran, 2013).

Under normal conditions, the body will prevent the formation of free radicals by antioxidant enzyme was regulated in a state of equilibrium. Other antioxidants such as vitamin, β-carotene, carotenoid and polyphenol are derived from vegetable, fruit and herb (Hwang *et al*., 2006). Figure 2.2 shows the structure of some natural antioxidants.

Mahasarakham University

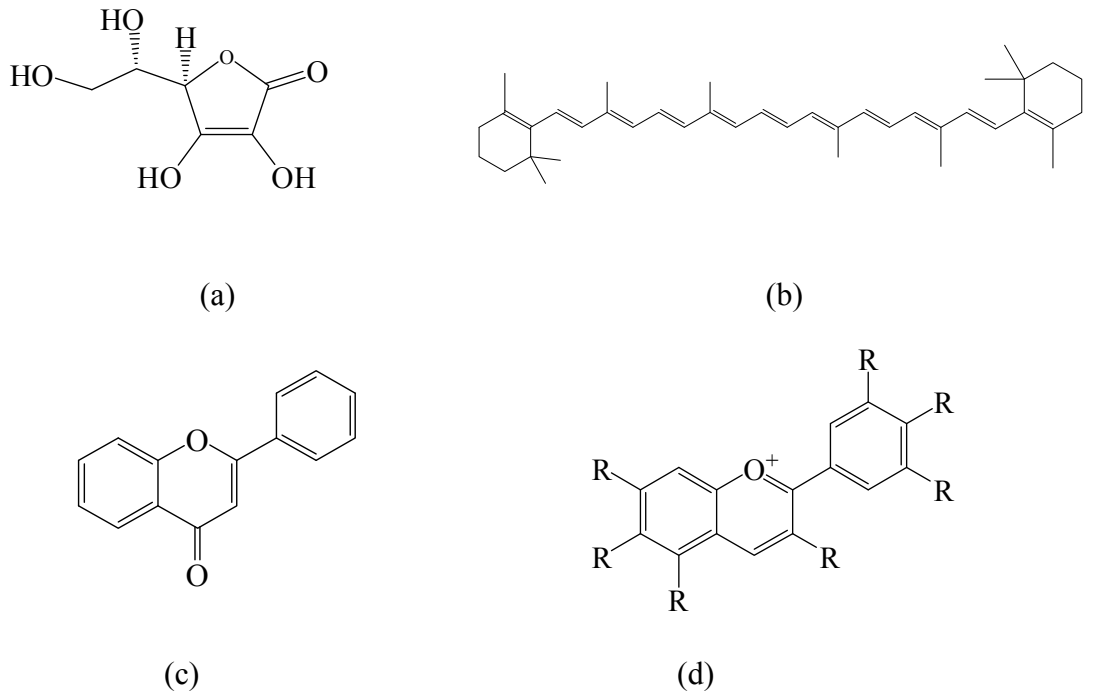


Figure 2.2 Chemical structure of some natural antioxidants: (a) ascorbic acid, (b) β -carotene, (c) flavonoid, (d) anthocyanin.

2.3.1 Phytochemicals

1) Introduction to phytochemicals

Phytochemicals are plant chemicals that have protective or disease preventive properties. They are not required by the human body for sustaining life. Several studies show that phytochemical has the ability to reduce free radicals in the organism. In phenolic and polyphenol compounds found in plants have exhibited excellent antioxidant such as flavonoid and catechin (Decker, 1995; Fang, 2002). The literatures on the benefit of phenolic compounds in tea that scavenge free radical to prevent and treat of diseases by increase red blood cell resistance to oxidative stress (Fang *et al*., 1998), inhibit oxidative modification of low-density lipoprotein (Voudin *et al*., 2000), decrease serum concentrations of total cholesterol and increase serum concentrations of high density lipoprotein in humans (Fang *et al*., 1998), inhibit the growth and induce apoptosis of several human cancer cell lines in vitro (Fang *et al*, 1998; Yang *et al*., 1998) etc. have been published.

Mahasarakham University

2) Types of phytochemical

Among the causes of the major chronic health problems, harmful free radicals and reactive oxygen species (ROS) have been found to play an important role (German *et al*., 1998; Keher, 1993). Radicals and ROS such as the superoxide anion ($O_2^{\bullet-}$), hydroxyl radical ($OH^{\bullet}$) and peroxy radical ($ROO^{\bullet}$) have been implicated as mediators of degenerative and chronic deteriorative, inflammatory, and autoimmune diseases (Nice and Yalpami, 1997; Heliovaara *et al*., 1994), diabetes, vascular disease and hypertension (Gey, 1986; Harris, 1992), cancer and hyperplastic diseases (Ames *et al*., 1993; Ferguson, 1994), cataract formation (Ames *et al*., 1993; Gershoff, 1993), emphysema (Rice-Evans and Diplock, 1993), arthritis, malaria, multiple sclerosis, myocardial ischemia-reperfusion injury (Nice and Yalpami, 1997), immune system decline, and brain dysfunction as well as the aging process (Ames *et al*., 1993).

Antioxidants such as vitamins C and E are essential for the protection against ROS. However, the majority of the antioxidant activity of a fruit or vegetable may be from compounds such as phenolic acids and flavonoids, rather than from vitamin C, E or β-carotene (Bors *et al*., 1990). Intake of controlled diets richin fruits and vegetables increased significantly the antioxidant capacity of plasma. This increase could not be explained by the increase in the plasma α-tocopherol or carotenoid concentration (Cao *et al*., 1998).

Antioxidant phytochemicals such as flavonoids are therefore the focus of many recent studies. The antioxidant activity of these compounds is predominantly determined by their structures, in particular the electron delocalization over an aromatic nucleus, in those based on a phenolic structure. When these compounds react with a free radical, it is the delocalization of the gained electron over the phenolic antioxidant, and the stabilization by the resonance effect of the aromatic nucleus, that prevents the continuation of the free radical chain reaction. This is often called radical scavenging, but polyphenolic compounds inhibit oxidation through a variety of mechanisms (Steinmetz and Potter, 1991; Stich and Rosin, 1984). Synthetic antioxidants such as butylated hydroxyl anisole (BHA) and butylated hydroxyl toluene (BHT) only tend to have one mode of action, i.e. via free radical scavenging, and are not able to sequester metal ions through the metal catalyzed route (Nice and Yalpani, 1997). The anticancer

Mahasarakham University

activity of flavonoid has been attributed to a large variety of different mechanisms (Huang *et al*., 1992).

3) Classification of phytochemicals

The classification of phytochemicals can be divided from their ring structure and the number of carbon atoms substituting the ring and linking them together.

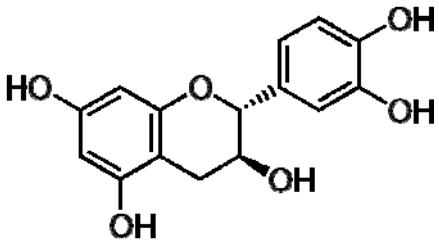
Phenolic compounds

Phenolic compounds are the largest group of phytochemicals and the most widely distributed in the plant kingdom. The phenolic compounds can be grouped into 3 types such as flavonoids, phenolic acids, and polyphenols. Flavonoids are the largest group of plant phenols and the most studied (Ozdal *et al*., 2013). Phenolic acids are diverse groups which widely extended of hydroxybenzoic and hydroxycinnamic acids. Furthermore, it is also found of polyphenolic such as tannins, are compounds of high molecular weight.

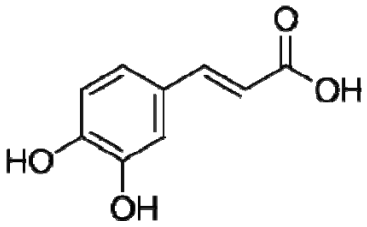
Flavonoids

The flavonoids are members of a class of natural compounds that recently has been the subject of considerable therapeutic interest. They play a major role in successful medical treatments from the past up to recent. They are ubiquitous among vascular plants and occur as aglycones, glucosides and methylated derivatives. Now flavonoids have been described so far of more than 5,000 types from the parts of plants normally consumed by humans and approximately 650 flavones and 1,030 flavonoids are known (Pretorius, 2003). Some structures of phenolic compounds show in Figure 2.3.

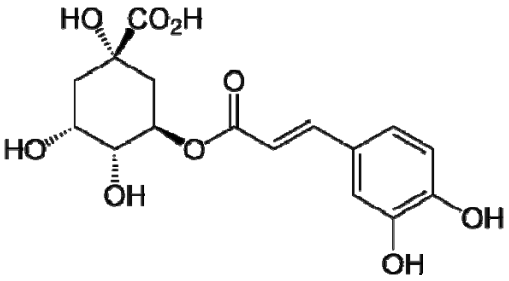
Mahasarakham University



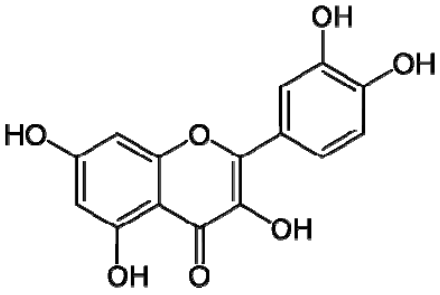
Catechin



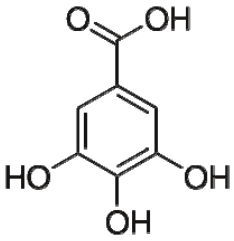
Caffeic acid



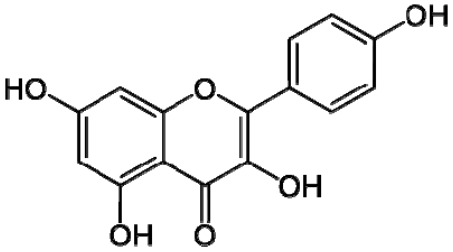
Chlorogenic acid



Quercetin



Gallic acid



Kaempferol

Figure 2.3 The structure of various phenolic compounds (Ozdal *et al*., 2013)

Mahasarakham University

With previous reports, phytochemicals show various activities for prevention many diseases by different mechanism of action as shown in Table 2.2.

Table 2.2 Activities and action mechanism of some phytochemicals. (Kumar *et al*., 2010; Patel *et al*., 2010; Sutar *et al*., 2011)

Phytochemicals	**Activity**	**Mechanism of action**
Alkaloids	Antimicrobial	Intercalates into cell wall and DNA of parasites
Coumarins	Antiviral	Interaction with eukaryotic DNA
Flavonoid	Antimicrobial	Complex with cell wall, binds to adhesions
	Antidiarrheal	Inhibits release of autocoids and prostaglandins, inhibits contraction caused by spasmogens, stimulates normalization of the deranged water transport across the mucosal cell, inhibits GI release of actylcholine
Glycosides	Antidiarrheal	
Polyphenols and Tannins	Antimicrobial	
	Antidiarrheal	Inhibits release of autocoids and prostaglandins
	Anthelmintic	
Quinones	Antimicrobial	Binds to adhesins, enzyme inhibition, substrate deprivation, complex with cell wall, membrane Interaction with eukaryotic DNA
Saponins	Antidiarrheal	Bind to adhesins, complex with cell wall, inactivates enzymes
Steroids	Anthelmintic	Inhibits histamine release in vitro
	Antidiarrheal	Possesses membrane permeabilizing properties
Terpenoids	Antimicrobial	Enhance intestinal absorption of Na^+ and water, Membrane disruption
Tannins	Antimicrobial	Inhibits release of autocoids and prostaglandins

Mahasarakham University

2.3.2 Antioxidant activity determination

Quantitative analysis of antioxidant activity is analyzed to determine the amount of antioxidants in the sample.

1) 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl radical scavenging capacity assay (DPPH assay)

DPPH assay analysis using anti-oxidation ability by 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl as a reagent. 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl is a stable radical in the solvent methanol. This solution is purple and light absorption at a wavelength of 517 nm. The structure of DPPH radical shows in Figure 2.4.

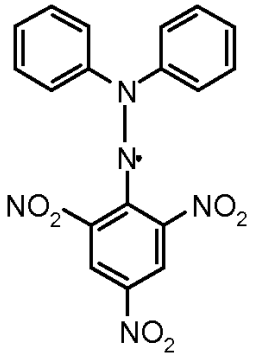


Figure 2.4 Structure of 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical (DPPH radical)

The reaction mechanism of $DPPH^{\bullet}$ with antioxidant (AH) or radical species ($R^{\bullet}$) is shown by the equation 2.3 and 2.4.

$$DPPH^{\bullet} + AH \longrightarrow DPPH\text{-}H + A^{\bullet} \qquad \text{(equation 2.3)}$$

$$DPPH^{\bullet} + R^{\bullet} \longrightarrow DPPH\text{-}R \qquad \text{(equation 2.4)}$$

If the sample has a higher ability to resist oxidation, the intensity of the purple solution is reduced. The results are reported as 50% inhibitory concentration (IC_{50}), which represents the amount of antioxidants that cause the concentration of DPPH remaining 50% (Lo and Cheung, 2005). The IC_{50} values achieved by graphing the relationship between % inhibitions with concentration of substances. The % inhibition content is calculated as follows:

Mahasarakham University

$$\text{Inhibition (\%)} = \left(\frac{Abs_{control} - Abs_{sample}}{Abs_{control}}\right) \times 100$$

Advantages of DPPH assay are quick, convenient, easy to analyze, accuracy and high reproducibility. The disadvantage is the inability of the blood antioxidant activity, because reactive protein precipitated in alcohol.

2) 2.2'-Azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) cation radical scavenging (ABTS) assay

ABTS assay analysis using anti-oxidation ability by 2.2'-Azino-bis (3-ethylbenzothia- zoline-6-sulfonic acid) diammonium salt as a reagent (Figure 2.5). It is a stable radical in the aqueous solution. This solution is green and light absorption at a wavelength of 734 nm. The structure of ABTS radical shows in Figure 2.5.

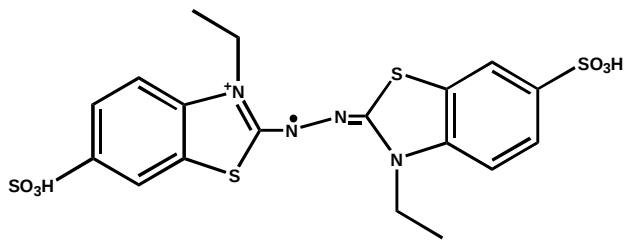


Figure 2.5 Structure of 2.2'-Azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt.

There are many ways to cause ABTS cation radical.

1) The enzyme reaction for catalyzes oxidation of ABTS cation radical as peroxidase and myoglobin etc.

2) The chemical reaction to cause ABTS cation radical as manganese dioxide, potassium persulfate and 2,2'-azo-bis-(2-amidinopropane) (ABAP) etc.

Mechanism of $ABTS^{\bullet+}$ and $ABTS^{\bullet+}$ inhibition by antioxidant shown in equation 2.5 and 2.6 respectively.

$$OH + ABTS \longrightarrow ABTS^{\bullet+} + H_2O \qquad \text{(equation 2.5)}$$

$$ABTS^{\bullet+} + AH \longrightarrow ABTS + A^{\bullet} \qquad \text{(equation 2.6)}$$

Mahasarakham University

If the sample has a higher ability to resist oxidation, the intensity of the green solution is reduced. The results are similar to the DPPH reported as IC_{50}. Otherwise, inhibition of $ABTS^{\bullet+}$ by trolox standard, called trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC). The results of this analysis are calculated as a fixed value relative to the standard antioxidant Trolox (Zulueta *et al*., 2009).

3) Ferric reducing antioxidant power (FRAP assay)

FRAP assay is another method used to determine its ability to resist oxidation by redox reaction. The principle is to track the changing colors of ferric tripyridyltriazine (Fe^{3+}-TPTZ) metal compounds. The Fe^{3+}-TPTZ receives electrons from antioxidants and then changed to ferrous tripyridyltriazine (Fe^{2+}-TPTZ) in the blue-violet (Benzie and Szeto, 1999). The mechanism of FRAP assay as shown in Figure 2.6.

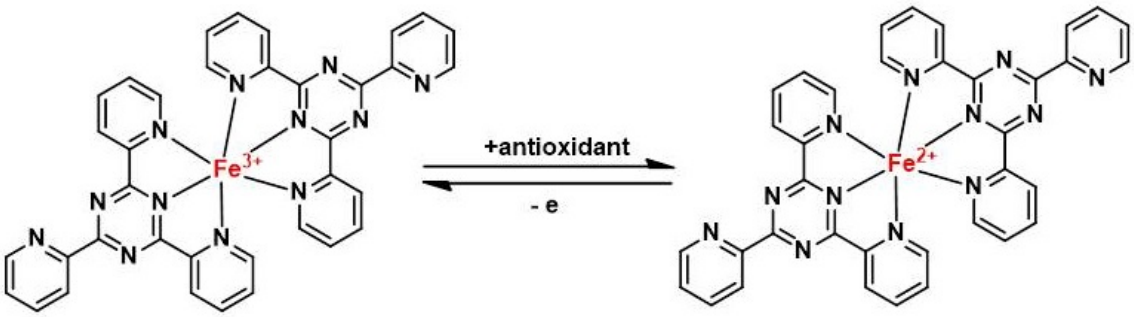


Figure 2.6 Mechanism of FRAP assay.

FRAP assay can track reactions by measuring the absorbance at 595 nm wavelength. Then study the ability of antioxidants in the sample by comparison to a standard curve. The ferrous sulfate used as a standard curve and report experimental results as FRAP value. This method has the advantage of low cost, convenient, fast and simple experiments with reproducibility as well (Pulido *et al*., 2000).

Mahasarakham University

4) Cupric reducing antioxidant capacity (CUPRAC assay)

CUPRAC assay is another method used to determine its ability to resist oxidation by redox reactions. This method is used to analyze copper (II)-neocuproin ($Cu(Nc)_2^{2+}$) reagent as the chromogenic oxidant. This reagent is easy to use, stable, inexpensive, and responds to both polar and non-polar antioxidants. The antioxidant hydroxyls are change to the corresponding quinones in the CUPRAC redox reaction, producing a chromogen of Cu(I)-neocuproine ($Cu(Nc)_2^{+}$) absorbing at 450 nm wavelength (Apak *et al*., 2004). CUPRAC assay and FRAP assay is similar but different reaction to the reaction of FRAP assay was born at pH3.6 but reaction of CUPRAC assay born at pH7. The mechanism of CUPRAC assay as shown in Figure 2.7.

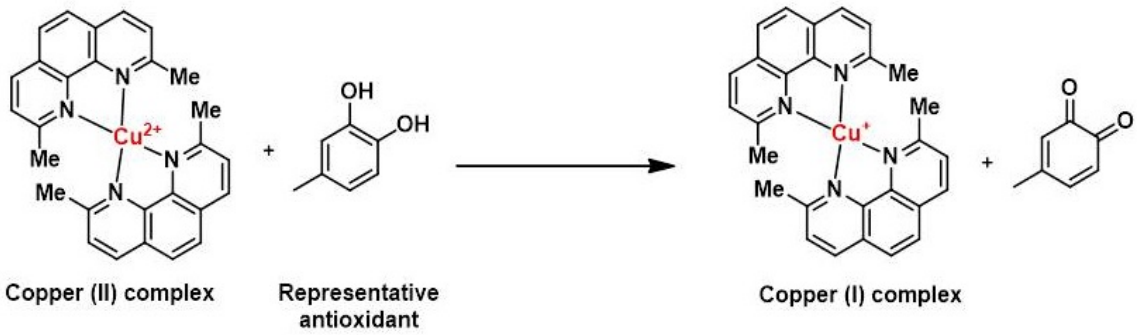


Figure 2.7 Mechanism of CUPRAC assay.

2.4 Wild grape

Wild grape *(Ampelocissus martinii* Planch.) is generally found in Thailand. It is a traditional herb ingredient and has been used for a long history. The stem and fruit of wild grape are similar to cultivated grape (Figure 2.8). In addition, colors and stages of fruit development also follow the same pattern. Therefore, the phytochemicals and their activities of the wild grape fruits may be similar to those found in the cultivated grape. Until now, information about some activities of wild grape phytochemicals are rare available.

Mahasarakham University

Figure 2.8 Wild grape fruit

Ampelocissus is a genus of VITACEAE having 90 or more species found variously in tropical Africa, Asia, Central America, and Oceania. The type species, *A. latifolia*, was originally treated under its basionym, *Vitislatifolia*, and was collected from the Indian subcontinent (Chen and Manchester, 2007). Species of Ampelocissus are herbaceous or woody, hermaphroditic or polygamo-dioecious flowering plants with tendrils for climbing. Fruits are grape-like berries having 1-4 seeds. Their diploid chromosomal number is 40 (2n=40). Example of the plant is in a group *Ampelocissus* as *Alnusrugosa* L., *Ambrosia artemisiifolia* L., *Scutellariabarbata* D. Don, *Tabernaem-ontana divaricate*, *Larreadivaricate*, *Prunus Africana* and *Uapacakirkiana* etc.

The phytochemical and biological activity of the plants in this group are reported including tannins, gallotannins and flavanols of *Uapacakirkiana* fruit" (Muchuwet *et al*., 2006), "*Prunusafricana* and *Warburgiaugandensis* in asthma treatment" (Karani *et al*., 2013), phenolic compound production in relation to differentiation in cell and tissue cultures of *Larreadivaricata* (Cav.) (Palacio *et al*., 2012) and carotenoids in *Scutellariabarbata* D. Don as detected by high performance

Mahasarakham University

liquid chromatography-diode array detection-massspectrometry-atmospheric pressure chemical ionization (Liu *et al*., 2014) etc.

2.5 Research related on antioxidant and phytochemicals

Recent interest in phytochemical on health benefits has been increasely reported. Mejia *et al*., (2009) found that catechins of green tea can neuroprotection with beneficial effects on vascular function and mental performance. Mäkynen *et al*., (2013) examined the antioxidant and antihyperlipidemic properties of 6 pomelo (*Citrus grandis* L. Osbeck) cultivars in Thailand. The results suggest that pomelo provides significant health benefits and may be used for developing functional foods. This was due to they had antihyperlipidemic properties including the inhibition of pancreatic lipase and cholesterol esterase, cholesterol micelle formation and bile acid binding.

The study of plant extracts about their antioxidant activities was gradually increased due to people are starting to focus on health. Different assays have been introduced to measure antioxidant capacity of foods and biological samples (Floegel *et al*., 2011). The common widely of spectrophotometric assays has been applied including DPPH assay, ABTS assay, ORAC assay and FRAP assay (Kim *et* al., 2002; Thaipong *et al*., 2006; Bakar *et al*., 2009; Ma *et al*., 2013; Nour *et al*., 2013; Sati *et al*., 2013; Vuong *et al*., 2013). Moreover, other approach such as trolox equivalent antioxidant capacity assay (TEAC), hydroxyl radical scavenging activity (HRSA), superoxide radical scavenging activity (SRSA) (Mäkynen *et al*., (2013) and cupric reducing antioxidant capacity assay (CUPRAC) (Bektaşoğlu *et al*., 2006) were also used for antioxidant of phytochemical assay.

In both synthetic and natural antioxidants are widely used in many food products and concerning about the safety of the synthetic antioxidant in dietary, natural antioxidant have attracted considerable attention of users and researchers (Ramalakshmi *et al*., 2008). Several vegetable, fruit and medicinal plants are being viewed as an easily available and potent source of antioxidant. It is well known that natural occurring antioxidant could be significantly lost as a consequence of free radical processing (Rababah *et al*., 2011). Many studies have shown that antioxidant phytochemicals especially polyphenols are good resources of natural antioxidants, which could prevent

Mahasarakham University

the oxidative damage caused by free radical, as well as different health protective action (Fang *et al*., 1998; Voudin *et al*., 2000; Fang *et al*., 2002; Pyo *et al*., 2004; Pierson *et al*., 2012). The natural antioxidants that many researchers interested in study are phenolic (Sati *et al*., 2013), flavonoid, proanthocyanidin (Pierson *et al*., 2012), anthocyanin (Konczak and Zhang, 2004; Lule and Xia, 2005; Nichenametla *et al*., 2006), and saponin (Man *et al*., 2010; Vuong *et al*., 2013).

Grapes are one of the most interested fruits since it contain large amounts of phytochemical including anthocyanins and resveratrol, which offer health benefits (Pezzuto, 2008). Grape phenolics are the major dietary sources of anthocyanins, which are responsible for the colouring of black, red and purple, however they are lacking in white grapes (Yang *et al*., 2009). The phenolic compounds of grapes are catechin, epicatechin gallate, procyanidin B1, rutin, gallic acid, caffeic acid, p-coumaric acid, pelargonidin-3-glucoside, cyanidin-3-glucoside, cyaniding-3,5-diglucoside and dolphin-idin-3-glucoside (Lima *et al*., 2014).

Mahasarakham University

Wild grape fruits generated during July to October and it is acid taste. In addition, it has been used as a folk remedy for pox and reduce swelling. However, there is not much available data reporting on their phytochemical and antioxidant activities of wild grape fruits. This reason attractive interested in studies of phytochemical contents and their correlation on antioxidant activities of wild grape fruit extract.

1.2 Objectives of the research

1.2.1 To find the suitable solvent for extraction of wild grape fruits with high phytochemical contents and antioxidant activities

1.2.2 To determine antioxidant activities of the wild grape fruit extracts

1.2.3 To study the correlation of phytochemical contents and antioxidant activities of the wild grape fruit extracts

1.3 Scope of the research

The wild grape *(Ampelocissus martinii* Planch.) fruits were collected, dried and grounded before extraction by different polarity solvents; water, methanol and ethanol. The crude extracts were then evaporated by rotary evaporator. All of extracts were determined for their phytochemical contents such as total phenolic, total flavonoid, total anthocyanin and total saponin. The antioxidation activities of each extracts were then evaluated by DPPH, ABTS, TEAC, FRAP and CUPRAC assays, after that comparison with standard solution as trolox, vitamin C and BHA. Finally, correlation of phytochemical contents and antioxidation activities of the wild grape fruit extracts was performed.

Mahasarakham University

1.4 Expected results of the research

1.4.1 Find the suitable solvent used for extraction of wild grape fruits to obtain high phytochemical contents and antioxidant activities

1.4.2 Obtain the basic data of antioxidant activities of the wild grape fruit extracts

1.4.3 Correlation of the phytochemical contents on antioxidant activities of wild grape fruit extracts would be obtained

1.5 Definition of terms

Anthocyanin	pigment compound with phenol group in structure
Antioxidant	a molecule which can inhibited oxidation reaction of radical substances
Correlation	relation between phytochemical contents and antioxidant activities analyzed by statistic method
Crude extract	first extracts obtained from extraction process
Extraction	separation process of phytochemical from wild grape fruits using polar solvents
Free radical	atom or molecule which composed of an unpaired electron
IC_{50}	concentration of an inhibitor where the response is reduced by half
% Inhibition	concentration percentage of substance to inhibit free radicals
Oxidation reaction	a reaction involved in electron donating
Phenolic	compounds which composed of phenol group in structure
Phytochemical	chemical compound that occur naturally in plants
Saponin	compound composed of glycoside group in structure

CHAPTER 3

RESEARCH METHODOLOGY

3.1 Materials

Wild grape (*Ampelocissus martinii* Planch.) fruits were collected from Roi-Et province, Thailand during July to October, 2014. They were then dried at 40 ˚C for 3 days to remain their moisture less than 5 % of fresh weights in an oven. The dried wild grape fruits were then grounded into powder using pestle and mortar.

3.2 Chemicals

All chemicals used in this research shown in Table 3.1.

Table 3.1 Chemicals used in the research.

Name	Formula	Grade	Company
2, 2'-azino-bis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid) (ABTS)	$C_{18}H_{18}N_4O_6S_4$	AR	Sigma-Aldrich
2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl	$C_{18}H_{12}N_5O_6$	AR	Sigma-Aldrich
2, 4, 6-Tri (2-pyridyl)-s-triazine (TPTZ)	$C_{18}H_{12}N_6$	AR	Acros organics
3, 4, 5-hydroxly-benzoic acid	$C_7H_6O_5$	AR	Acros organics
Acetic acid glacial	$C_2H_4O_2$	AR	Merck
Aescin	$C_{55}H_{86}O_{24}$	AR	Sigma-Aldrich
Aluminium chloride	$AlCl_3$	AR	Merck
Ammonium acetate	$C_2H_7NO_2$	AR	Merck
Butylatedhydroxyanisole (BHA)	$C_{11}H_{16}O_2$	AR	Sigma-Aldrich
Catechin	$C_{15}H_{14}O_6$	AR	Sigma-Aldrich
Copper (II) chloride	$CuCl_2$	AR	Merck
Ethanol	C_2H_5OH	AR	Merck
Ferric chloride hexahydrate	$FeCl_3.6H_2O$	AR	Carlo Erba

Mahasarakham University

Table 3.1 Chemicals used in the research (Continued).

Name	Formula	Grade	Company
Folin-Ciocalteu's Reagent	-	AR	Carlo Erba
Hydrochloric acid	HCl	AR	Merck
L-Ascorbic acid	$C_6H_8O_6$	AR	Univar
Methanol	CH_3OH	AR	Merck
Neocuproine	$C_{14}H_{12}N_2$	AR	Sigma-Aldrich
Potassium persulfate	$K_2S_2O_8$	AR	Merck
Quercetin	$C_{15}H_{10}O_7$	AR	Sigma-Aldrich
Sodium acetate	$C_2H_3NaO_2$	AR	Merck
Sodium carbonate	Na_2CO_3	AR	Merck
Sodium hydroxide	NaOH	AR	Merck
Sodium nitrite	$NaNO_2$	AR	Acros organics
Sulfuric acid	H_2SO_4	AR	Merck
Trolox	$C_{14}H_{18}O_4$	AR	Sigma-Aldrich
Vanillin	$C_8H_8O_3$	AR	Sigma-Aldrich
Distilled water	H_2O	-	-

3.3 Instruments

Instruments used in the research shown in Table 3.2.

Table 3.2 Instruments used in the research.

Instruments	Model
Shaker, PSU-20	Platform Shaker
UV-Vis spectrophotometer	Perkin Elmer
Vacuum rotary evaporator	Buchi Rotavapor R-210

Mahasarakham University

3.4 Methods

3.4.1 Wild grape extraction

The extraction is followed the method of Vuong *et al*., (2013) with some modifications. Briefly, the 25 g of dried wild grape powder was extracted with 250 mL of solvents; methanol and ethanol at room temperature for 3 h, while water extraction was performed at 70˚C for 20 min. The extraction was 3 repeats and all solution extracts of each solvent were pool together. The extracts were filtered using thin white cloth and following by Whatman No.1 filter paper to remove the residue. The extract solution was evaporated the solvents by rotary evaporator at 40˚C under vacuum for 30 min.
The dried crude extracts of wild grape fruit were then stored at 4˚C. The extraction steps are shown in Figure 3.1.

Mahasarakham University

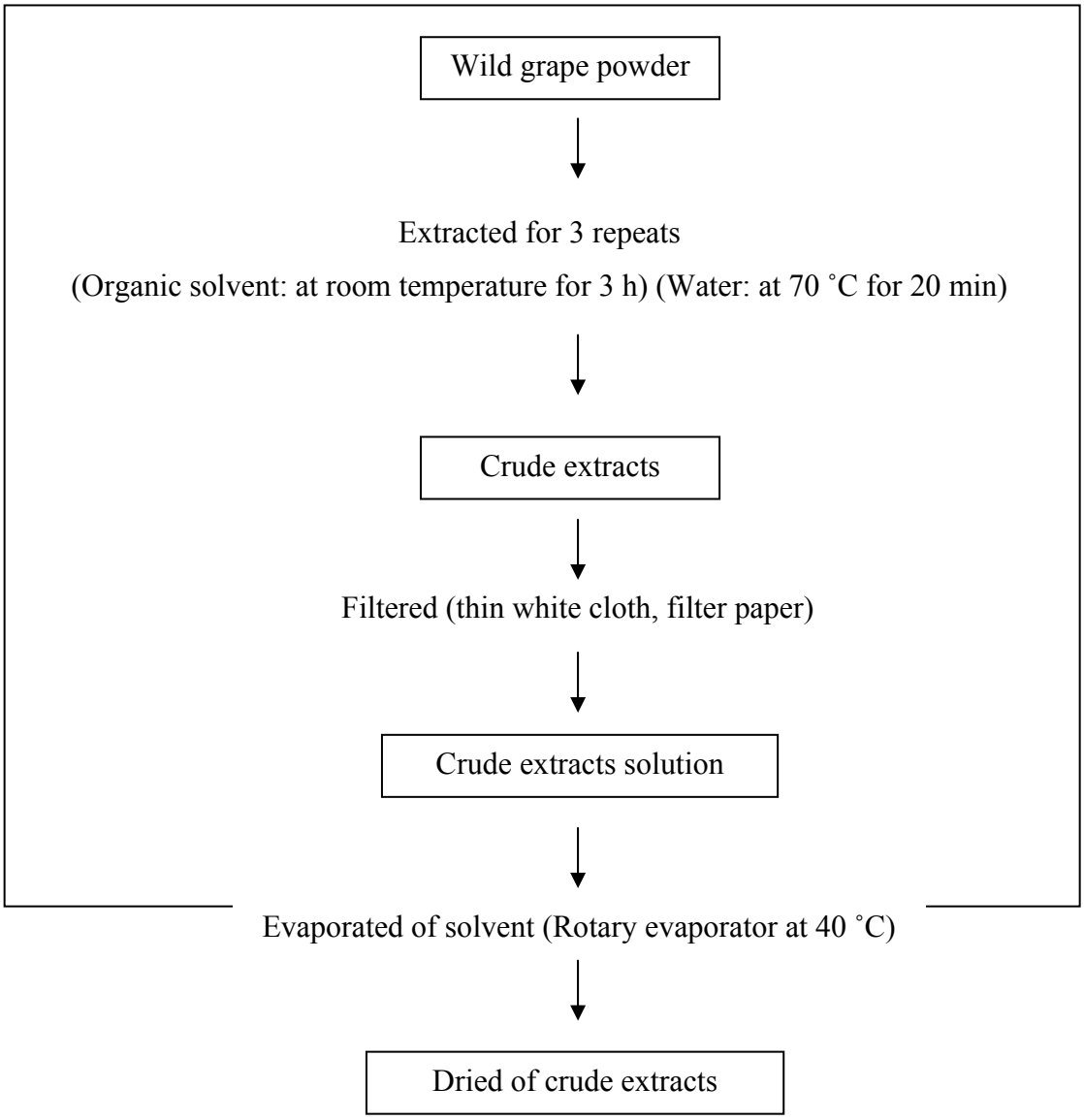


Figure 3.1 Diagram shows the step to prepare crude extracts of wild grape fruit.

3.4.2 Phytochemical determination

1) Total phenolic content

The total phenolic content (TPC) was determined using a modified colourimetric method (Škerget *et al*., 2005). A 0.2 mL of crude extract solution was mixed with 1 mL of 10% Folin-Ciocalteu reagent, before incubating at room temperature for 5 min. After that, 0.8 mL of 7.5% of Na_2CO_3 solution was added into the mixture solution before standing at room temperature for 30 min. Then, the mixture solution was measured at 765 nm using UV-Vis spectrophotometer. Gallic acid was

Mahasarakham University

used as standard for a calibration curve. The total phenolic contents were indicated as mg gallic acid equivalent (GAE)/g of crude extract. The process for TPC determination was shown in Figure 3.2.

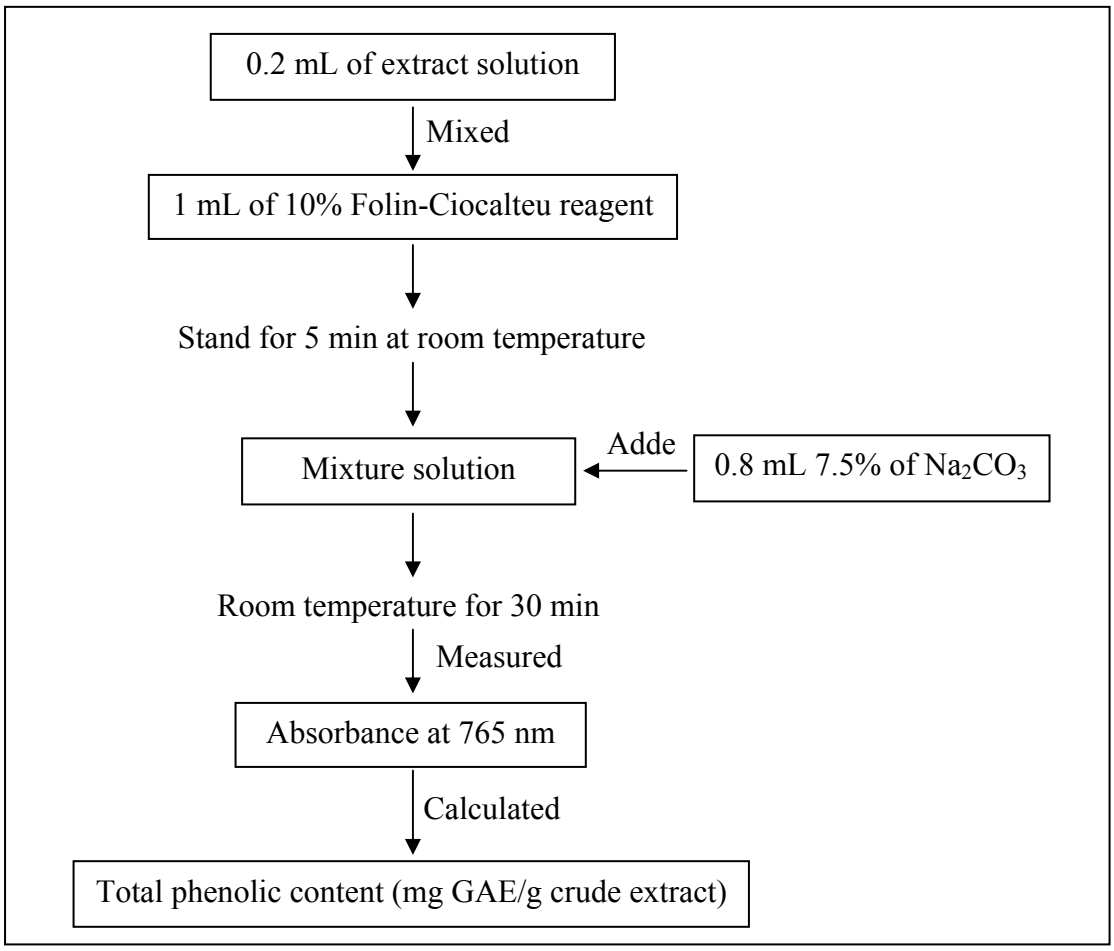


Figure 3.2 Diagram shows the step of total phenolic content analysis.

2) Total flavonoid content

The total flavonoid content (TFC) of the wild grape was measured using a modified method of Zhishen *et al*., (1999). Briefly, 0.5 mL of wild grape extracts were mixed with 0.2 mL of distilled water and 0.1 mL of 5% $NaNO_2$ was subsequently added. The mixture was then incubated at room temperature for 6 min before adding 0.2 mL of 10% $AlCl_3$, then standing for 5 min. The mixture solution was then mixed with 0.5 mL of 1 M NaOH and leaving for 15 min at room temperature. The absorbance at 510 nm was measured using UV-Vis spectrophotometer. Quercetin was used as

Mahasarakham University

standard for a calibration curve. The total flavonoid contents were indicated as mg quercetin equivalent (QE)/g of crude extract. The process for TFC determination was shown in Figure 3.3.

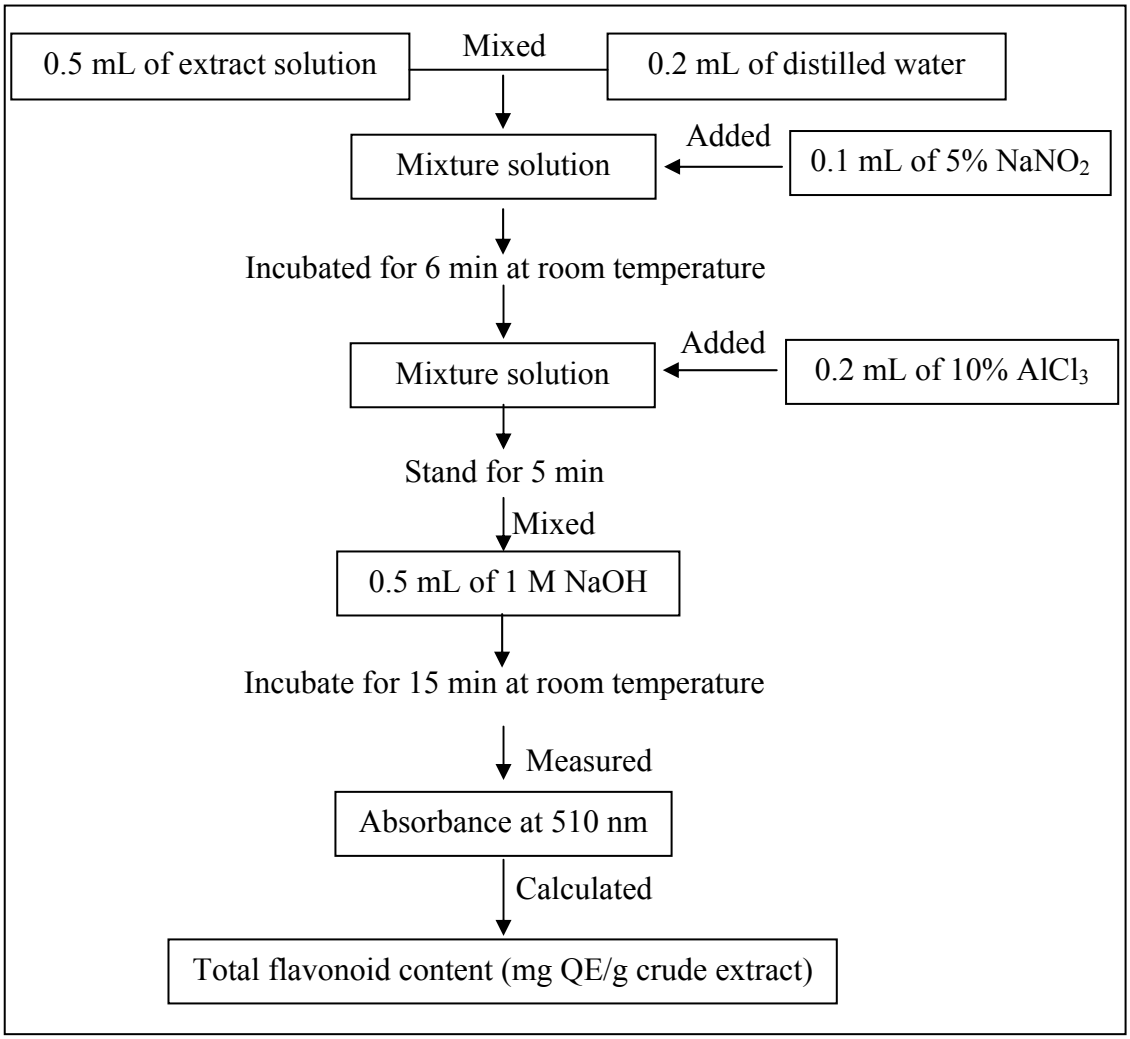


Figure 3.3 Diagram shows the process for total flavonoid content determination.

3) Total anthocyanin content

Total anthocyanin content (TAC) was performed using the method of Boyles and Wrolstad (1993). The extract solution was mixed with 0.025 M KCl buffer pH 1 at 1:2 ratio of extract to buffer. On the other hand, the extract solution was mixed with a sodium acetate buffer pH 4.5 at the same ratio. The absorbance was measured at 510 and 700 nm using UV-Vis spectrophotometer. Total anthocyanin content was

Mahasarakham University

calculated by comparison with total monomeric anthocyanin mg/kg cyanidin 3-glucoside equivalent (C3GE) as followed formula;

$$\text{Total anthocyanin (mg/100g)} = \Delta A \times MW \times Df \times 1000 / (\varepsilon \times l)$$

$$\Delta A = (A_{510} - A_{700})_{pH\,1.0} - (A_{510} - A_{700})_{pH\,4.5}$$

Where A_{510} is the absorbance of the extract mixed with KCl buffer, A_{700} is the absorbance of the extract mixed sodium acetate buffer, MW is a molecular weight of cyaniding 3-glucoside, Df is a dilution factor of sample, ε is an absorbtivity of cyaniding 3-glucoside and l is a path length in cm of cuvette. The process for TAC determination was shown in Figure 3.4.

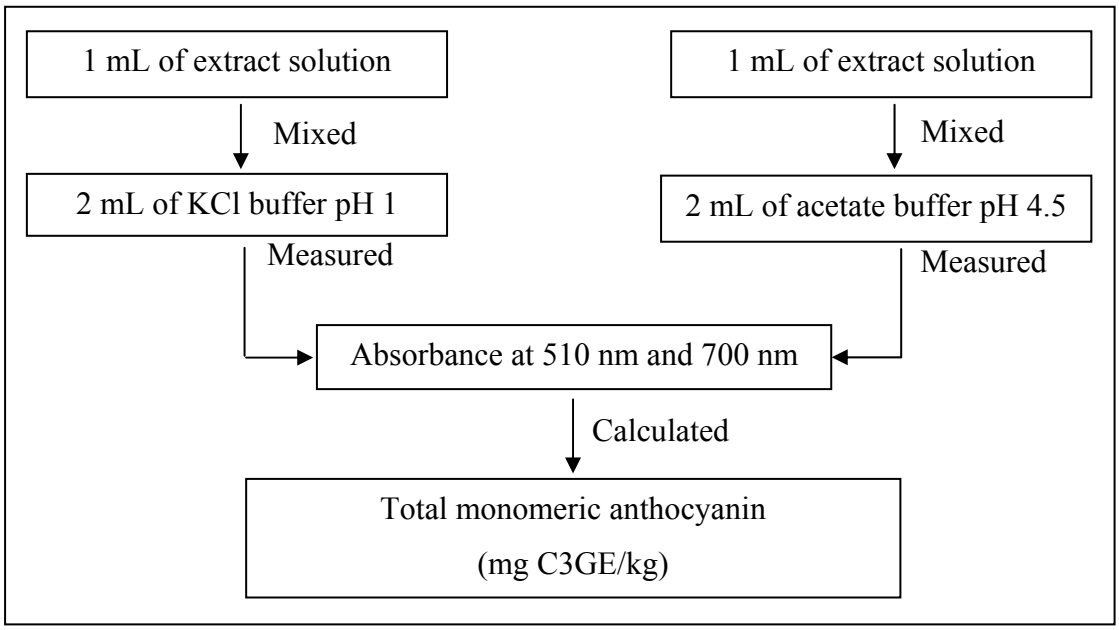


Figure 3.4 Diagram shows the process for total anthocyanin content determination.

Mahasarakham University

4) Total saponin content

The total saponin content (TSC) was assessed as described by Hiai *et al.*, (1976). Briefly, 0.5 mL of extract solution was mixed with 0.5 mL of 8% of vanillin. The mixture solution was mixed with 5 mL concentrated H_2SO_4 (72%) before incubation in a water bath at 60 ˚C for 15 min and then cooled on ice to room temperature. The mixture solution was measured of absorbance at 560 nm. Aescin was used as standard for a calibration curve and the results were expressed as mg of aescin equivalents per gram of dried wild grape (mg Aes/g crude extract). The process for TSC determination was shown in Figure 3.5.

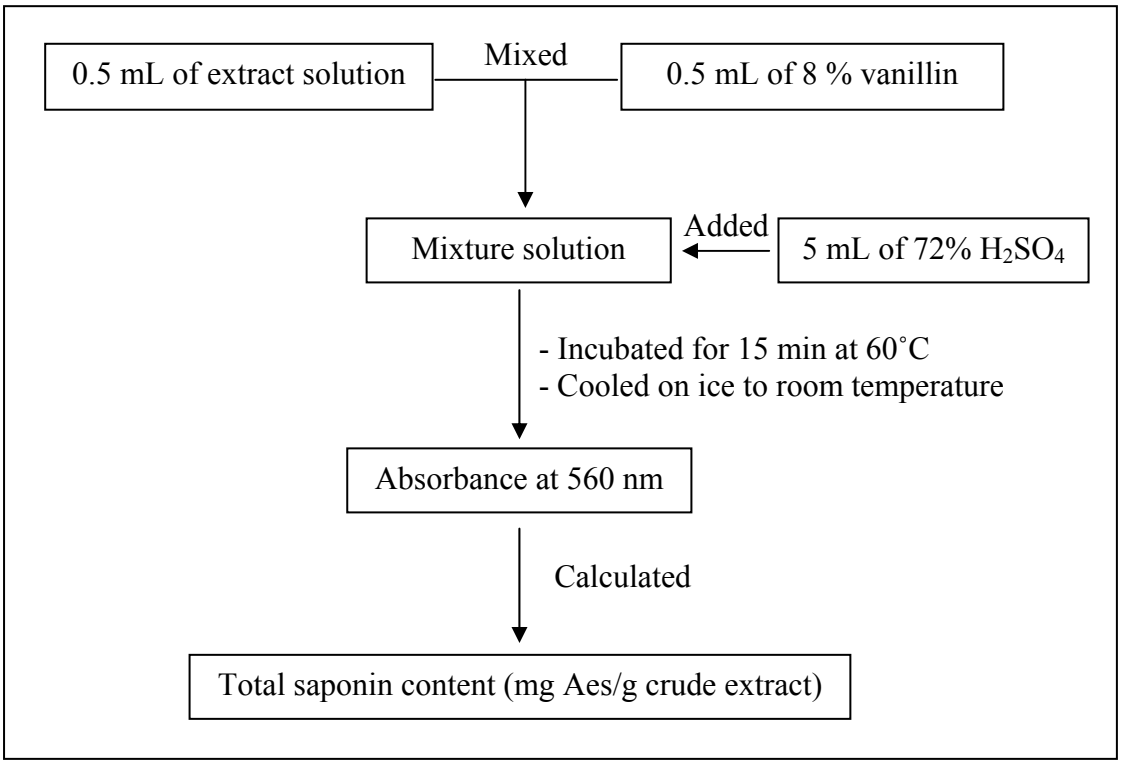


Figure 3.5 Diagram shows the process for total saponin content determination.

Mahasarakham University

5) Total proanthocyanidin content

The content of proanthocyanidin was performed with the method of Li *et al*., (2006). 0.25 mL of sample was mixed with 1.5 mL of 4% vanillin followed by 0.75 mL concentration HCl and incubation at room temperature for 15 min before measuring at 500 nm. Calibration curve was used catechin as the standard and the results were expressed as mg of catechin equivalents per gram of sample (mg CE/g of crude extract). The process for total proanthocyanidin content determination was shown in Figure 3.6.

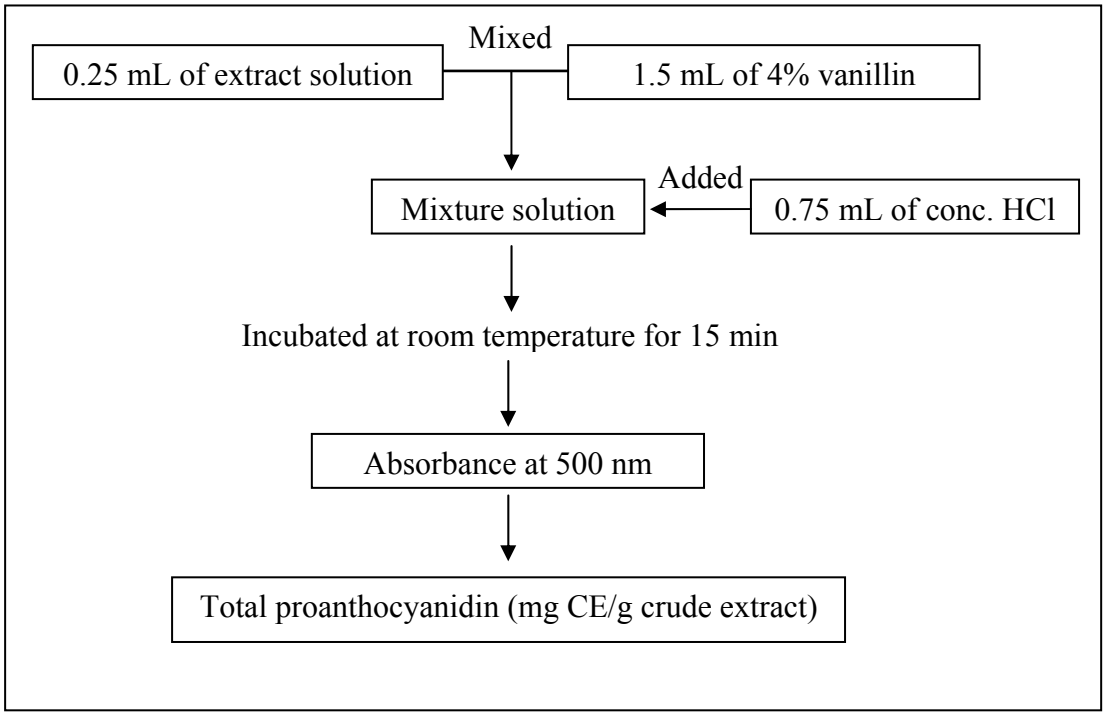


Figure 3.6 Diagram shows the process for total proanthocyanidin content determination.

Mahasarakham University

3.4.3 Antioxidant assays

1) 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) assay

DPPH assay is carried out to measure the free radical scavenging activity as described by Thaipong *et al*., (2006), with some modifications. Crude extracts were concentrated in methanol followed by mixing with methanol solution of DPPH. After 30 min incubation period at room temperature in the dark covered with aluminum foil, the absorbance was read at 517 nm. Butylated hydroxyl anisol (BHA), vitamin C and trolox were used as positive control for comparison and solvent mixed with 0.1 mM DPPH solution was taken as control. The percent scavenging was calculated by following formula;

$$\text{Inhibition (\%)} = [(A_{517} \text{ of control} - A_{517} \text{ of sample}) / A_{517} \text{ of control}] \times 100$$

Where $A_{control}$ is the absorbance of the solvent mixed with DPPH solution and A_{sample} is the absorbance of the extract solution. Extract concentration providing 50% scavenging (IC_{50}) is calculated from the graph-plotted inhibition percentage against extract concentration. The diagram of DPPH assay was showed in Figure 3.7.

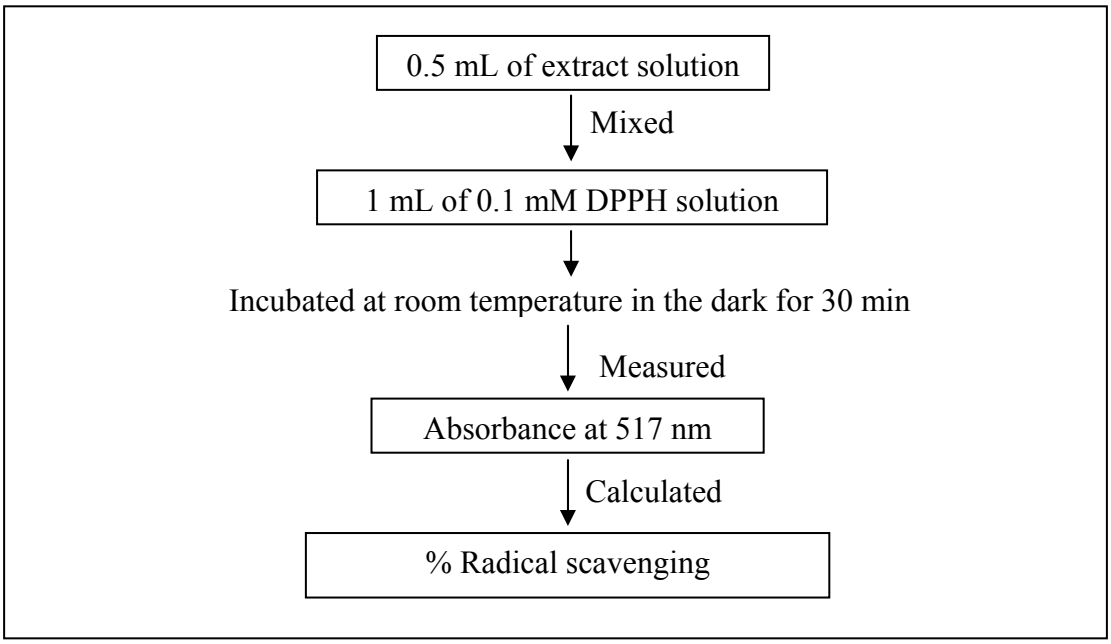


Figure 3.7 Diagram shows the process of DPPH assay.

Mahasarakham University

2) 2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline sulphonate) (ABTS) assay

The ABTS assay is performed following the method of Zuleata *et al*., (2009). The stock solution includes a 7 mM ABTS and 2.45 mM potassiumpersulphate ($K_2S_2O_8$) solutions. The working solution was then prepared by adding 10 mL $K_2S_2O_8$ to 10 mL ABTS solution. The two solutions were mixed well and allowed to react for 16 h at room temperature in the dark. Butylated hydroxyl anisol (BHA), vitamin C and trolox were used as positive control for comparison. Crude sample extracts (0.5 mL) were allowed to react with 1 mL ABTS in the dark at room temperature for 5 min then the absorbance was measured at 734 nm using UV-Vis spectrophotometer. The results were expressed as concentration providing 50% scavenging (IC_{50}). The diagram of ABTS assay was showed in Figure 3.8.

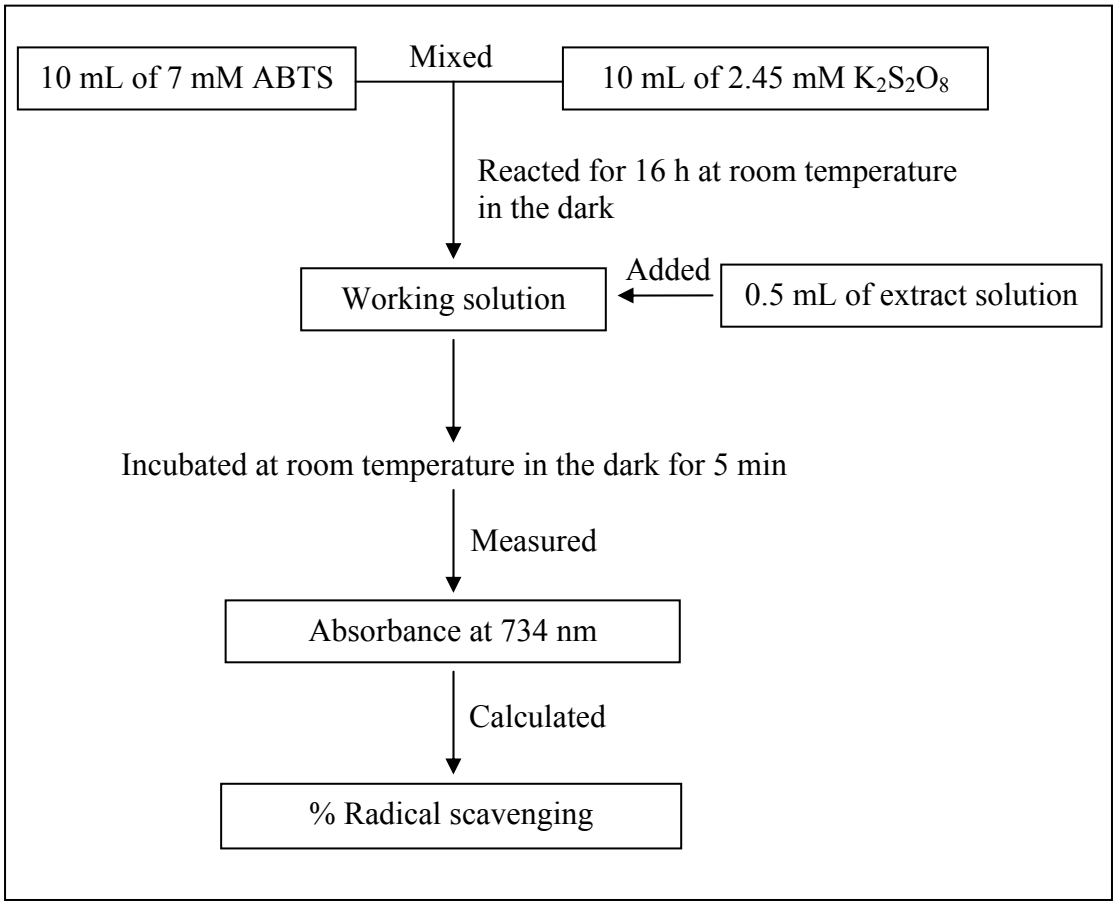


Figure 3.8 Diagram shows the process of ABTS assay.

Mahasarakham University

3) Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) assay

The standard TEAC assay described by Berg *et al*., (1999) is used with minor modifies for determination of the TEAC value. This assay evaluated the total radical scavenging capacity based on the ability of a compound to scavenge the stable ABTS radical ($ABTS^{\bullet+}$) in 5 min. The blue-green $ABTS^{\bullet+}$ was produced through the reaction between 7 mM ABTS and 2.45 mm potassium persulfate in water. This solution was stored in the dark for 16 h before use. The concentrated $ABTS^{\bullet+}$solution was diluted to a final absorbance of 0.70±0.02 at 734 nm at 37 ˚C. Stock solutions of trolox were prepared in ethanol. Crude sample extracts (0.5 mL) were allowed to react with 1 mL ABTS in the dark at room temperature for 5 min then the absorbance was measured at 734 nm using UV-Vis spectrophotometer. The TEAC was calculated by relating the decrease absorbance of a trolox solution. The results were expressed as mg of trolox equivalent per g of dried weight.

4) Ferric reducing antioxidant potential (FRAP) assay

The FRAP assay was conducted according to Zhang *et al*., (2013). The working solution is prepared by mixing 25 mL of acetate buffer pH 3.6 (3.1 g of $CH_3COONa.3H_2O$ and 16 mL of CH_3COOH), 2.5 mL TPTZ solution (10 mM TPTZ in 40 mM HCl) and 2.5 mL of 20 mM $FeCl_3.6H_2O$ solution and incubating at 37 ˚C before use. Crude extracts as samples or distilled water as blank (200 µL) were allowed to react with 2.8 mL of the working solution for 30 min in dark at 37˚C. Absorbance was measured at 593 nm using UV-Vis spectrophotometer. $FeSO_4$ was used as standard to establish a standard curve. The FRAP antioxidant activity was expressed as mmol of Fe^{2+} equivalents per g of crude extract of sample. The diagram of FRAP assay was shown in Figure 3.9.

Mahasarakham University

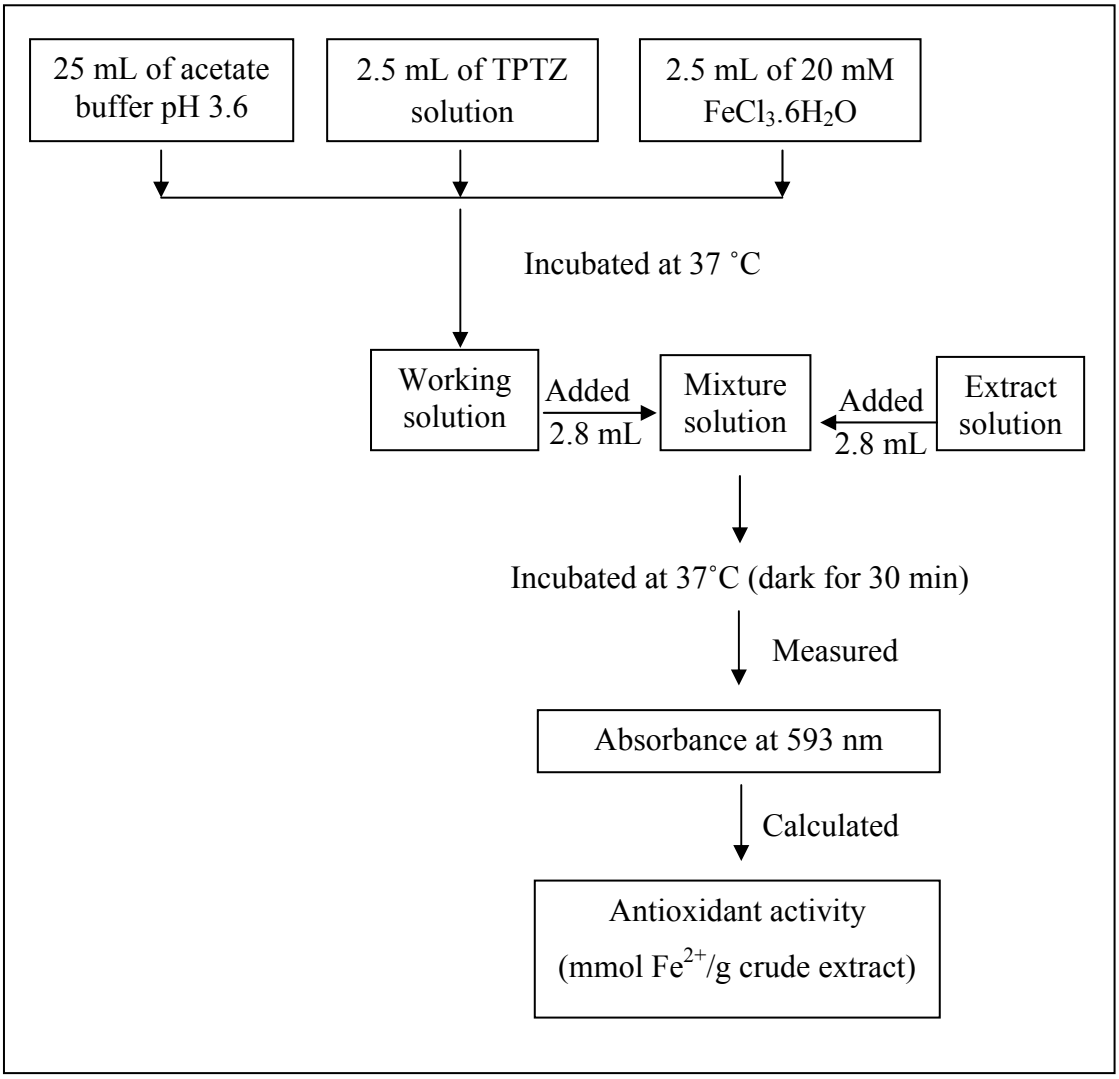


Figure 3.9 Diagram shows the process of FRAP assay.

5) Cupric reducing antioxidant capacity (CUPRAC) assay

The CUPRAC assay was explained by Apak *et al*., (2004). Briefly, 1 mL of $CuCl_2$, 1 mL of neocuproin, 1 mL NH_4Ac pH 7 and 1.1 mL of extract were mixed in a test tube. The mixture solution was incubated at 37˚C for 30 min. The absorbance at 450 nm was then measured. Trolox was used as standard for calibration curve. The data were indicated as mg of trolox equivalent (TE)/g of crude extract. The diagram of CUPRAC assay was shown in Figure 3.10.

Mahasarakham University

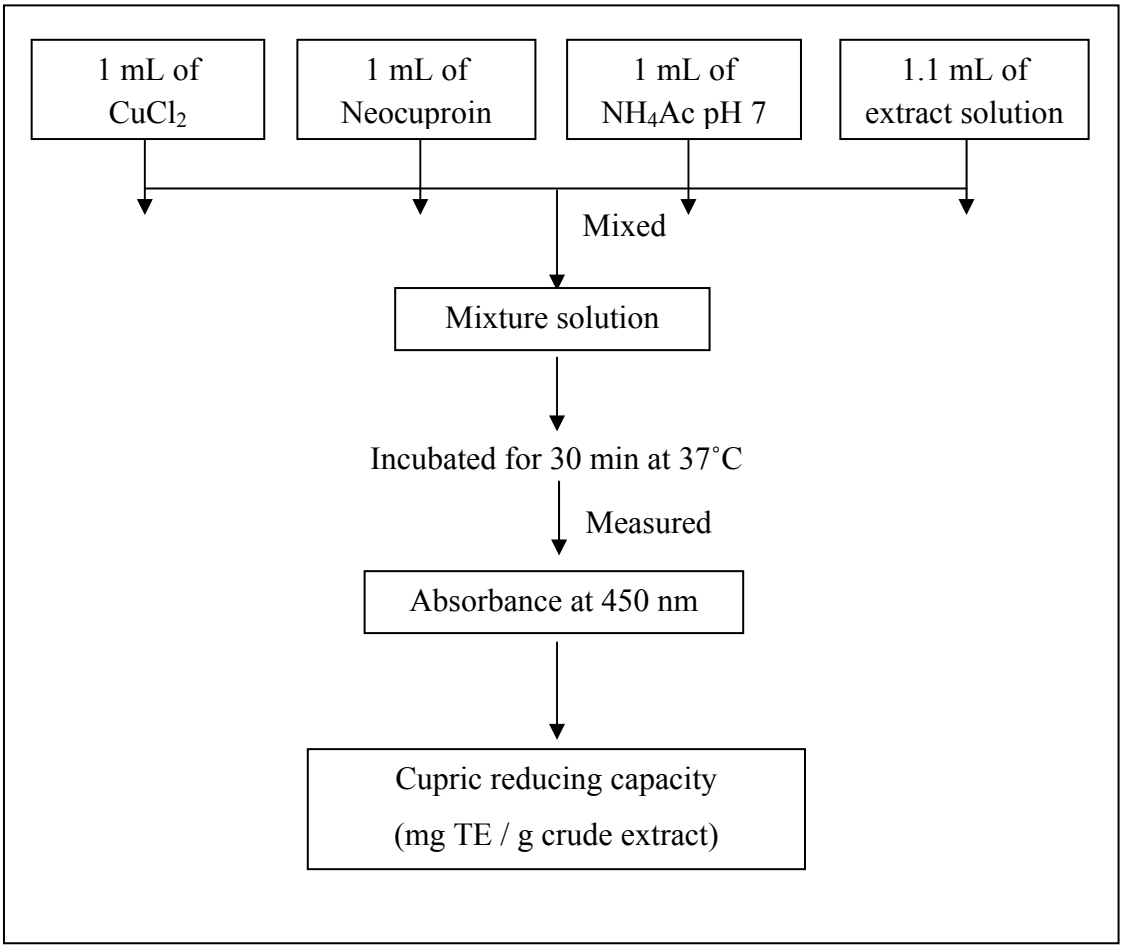


Figure 3.10 Diagram shows the process of CUPRAC assay.

3.4.4 Statistical analysis

Statistical analyses are performed using Excel software (Microsorft Office 2010) for calculating the means and the standard error of the mean. Results are expressed as the mean ± standard deviation (SD). Determination of f-test (one-way ANOVA) and correlation on phytochemical and antioxidant activity is analyzed by using SPSS software for Windows (version 19).

Mahasarakham University

CHAPTER 4

RESULT AND DISCUSSION

4.1 Effect of solvent extraction on phytochemical content

The most common method used for extraction many compounds in fruits is solvent extraction. In addition, the sample used for extraction must be prepared in powder by grinding, drying or lyophilizing before soaking in solvent (Merken and Beecher, 2000). In this work, the three solvent extracts of wild grape (*Ampelocissus martinii* Planch.) fruits; water, methanol and ethanol were chosen. Phytochemicals composed in the extracts were determined as shown in Table 4.1.

Generally, all of phytochemicals revealed high level content in methanolic extract, except total saponin which was the highest content in ethanolic extract. The concentrations of total phenolics (2.19 ± 0.01 mg/g gallic acid equivalent); flavonoids (17.65 ± 0.03 mg/g quercetin equivalent); anthocyanins (15.36 ± 0.04 mg/kg cyanidin 3-glucoside equivalent); saponins (8.18 ± 0.03 mg/g aescin equivalent) and proanthocyanidins (2.22 ± 0.03 mg/g catechin equivalent), were obtained from methanolic extract while that of ethanolic extract was phenolics (1.73 ± 0.01 mg/g gallic acid equivalent), flavonoids (15.65 ± 0.02 mg/g quercetin equivalent), anthocyanins (12.48 ± 0.02 mg/kg cyanidin 3-glucoside equivalent), saponins (9.79 ± 0.01 mg/g aescin equivalent) and proanthocyanidins (2.18 ± 0.03 mg/g catechin equivalent), respectively.

Among the solvent extracts used, distilled water showed the lowest concentration of phenolics (0.38 ± 0.01 mg/g gallic acid equivalent), flavonoids (4.40 ± 0.01 mg/g quercetin equivalent), anthocyanins (2.41 ± 0.01 mg/kg cyanidin 3-glucoside equivalent), saponins (1.46 ± 0.01 mg/g aescin equivalent) and proanthocyanidin (0.21 ± 0.01 mg/g catechin equivalent) contents. The phytochemicals found in water extract were very low when compared with other solvents. With methanolic extract, flavonoids were the highest level content and slightly higher than that of anthocyanin. Moreover, the phenolics and proanthocyanidins contents showed vary similar concentration. The obtained results are similar tendency of ethanolic extract. However, the ethanolic extract showed that flavonoids are the highest

Mahasarakham University

concentration and slightly higher than that of anthocyanin. Proanthocyanidins found slightly higher content than phenolic and both were lower contents than found in methanolic extract.

Methanol and ethanol are the most common solvents used for extraction phytochemicals (Cacace and Mazza, 2003; Awika *et al*., 2005; Amr and Al-Tamimi, 2007). Methanol is the most efficient for extraction which confirmed with previous reports (Kapasakalidis *et al*., 2006; Castaňeda-Ovande *et al*., 2009). However, ethanol is preferred for extraction due to its low toxicity than that methanol. Water extraction of wild grape fruits under difference condition of methanol and ethanol was performed and determined its phytochemicals. The highest phytochemical content was flavonoids followed by anthocyanin and saponin. In generally, the phytochemicals found in water extract were similar trend in comparison with other solvents. However, all amounts of phytochemicals were about 5-fold lower that of methanolic extract. The multiple comparison test base on Duncan's and Scheffe's methods indicated that methanolic extract was the most effective solvent than ethanol and water with significant difference ($p<0.01$) almost phytochemicals, except proanthocyanidins.

Table 4.1 Effect of solvent extraction on various phytochemical contents.

Phytochemical	**Ethanol**	**Methanol**	**Distilled water**
Total phenolic content (mg GAE/g)	1.73 ± 0.01^{a}	2.19 ± 0.01^{b}	0.38 ± 0.01^{c}
Total flavonoid content (mg QE/g)	15.65 ± 0.02^{a}	17.65 ± 0.03^{b}	4.40 ± 0.01^{c}
Total anthocyanin (mg C3GE/kg)	12.48 ± 0.02^{a}	15.36 ± 0.04^{b}	2.41 ± 0.01^{c}
Total saponin (mg Aes/g)	9.79 ± 0.01^{a}	8.18 ± 0.03^{b}	1.46 ± 0.01^{c}
Total proanthocyanidin (mg CE/g)	2.18 ± 0.03^{a}	2.22 ± 0.03^{a}	0.21 ± 0.01^{b}

The values are mean ± standard deviations for part three extractions and those in the same row not sharing the same superscript letter are significantly different from each other ($P<0.01$)

With previous report, phytochemical contents were significantly influenced by solvent polarity. In this work, the solvent using for extraction was different dielectric constant (ε) as water ε=80, methanol ε=33 and ethanol ε=24.55 in room temperature (Vuong *et al*., 2013). The obtained results indicated that chemical structure of each

Mahasarakham University

phytochemicals should be related on yield extraction as well as the solvent characteristic. Therefore, the extraction using different solvent systems might be influenced on the biological activity, especially antioxidant activities.

4.2 Effect of solvent extraction on antioxidant activity

It is well known that fruits and vegetables are rich sources of polyphenolic compounds. The benefits to health on human body of such polyphenolic compounds have been previously reported (Kubola and Siriamornpun, 2011; Pierson *et al*., 2012; Mäkynen *et al*., 2013; Sati *et al*., 2013). The main biological property of the phytochemicals is an antioxidant which played a vital role in the prevention and treatment of many types of diseases (Mäkynen *et al*., 2013; Sati *et al*., 2013; Vuong *et al*., 2013). In this work, different methods have been used for determination of antioxidant activity of wild grape fruits solvent extracts including 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) assay, 2,2'-azino-bis-(3-ethybenzo-thiazoline sulphonate) (ABTS) assay, trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) assay, ferric reducing antioxidant potential (FRAP) assay and cupric reducing antioxidant capacity (CUPRAC) assay. The results were shown in Table 4.2.

Table 4.2 Antioxidant activity of different wild grape fruit extracts.

Determination methods	Ethanol	Methanol	Distilled water
DPPH assay (IC_{50} µg/mL)	63.08 ± 1.92^{a}	41.50 ± 0.31^{b}	255.13 ± 8.60^{c}
ABTS assay (IC_{50} µg/mL)	28.42 ± 0.94^{a}	18.96 ± 0.18^{b}	156.80 ± 0.32^{c}
TEAC assay (mg TE/g)	13.28 ± 0.02^{a}	20.94 ± 0.01^{b}	2.23 ± 0.01^{c}
FRAP assay (mmol Fe^{2+}/g)	12.00 ± 0.01^{a}	15.76 ± 0.01^{b}	1.54 ± 0.01^{c}
CUPRAC assay (mg TE/g)	17.13 ± 0.02^{a}	29.16 ± 0.01^{b}	2.33 ± 0.01^{c}

The values are mean ± standard deviations for part three extractions and those in the same row not sharing the same superscript letter are significantly different from each other ($P<0.01$)

Mahasarakham University

4.2.1 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) assay

DPPH assay was used to determine antioxidant activity and is one of the most employed methods. This was due to it is simple, efficient and inexpensive. It is widely used as a reference point (Bondet *et al*., 1997; Chen *et al*., 2013). The result of DPPH assay was presented by 50% inhibitory concentration (IC_{50}), which means the amount of antioxidants that can be removed the $DPPH^{\bullet}$ radicals concentration by 50% (Lo and Cheung, 2005; Molyneux, 2004; Kedare and Singh, 2011). As shown in Table 4.2, the IC_{50} of methanolic extract showed the lowest value (41.50±0.31 µg/mL) followed by ethanolic extract (63.08±1.92 µg/mL) and water extract (255.13±8.60 µg/mL). The results revealed that the $DPPH^{\bullet}$ radical scavenging of wild grape extracts varied by solvent use. In addition, the IC_{50} values were significantly differed ($P<0.01$) by solvent use as well. $DPPH^{\bullet}$ is a stable free radical and can accept an electron or a hydrogen atom from antioxidant molecule.

4.2.2 2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline sulphonate) (ABTS) assay

The ABTS assay was used to determine the scavenging cation of $ABTS^{\bullet+}$ radicals. As shown in Table 4.2, the solvent extracts were able to inhibit $ABTS^{\bullet+}$ radicals with similar trend of $DPPH^{\bullet}$ radicals. The percentage inhibition of $ABTS^{\bullet+}$ radicals by the wild grape fruit extracts was varied by solvent application. The results showed that methanolic extract had the lowest value of IC_{50} (18.96±0.18 µg/mL), then ethanolic extract (28.42±0.94 µg/mL) and water extract (156.80±0.32 µg/mL), respectively. This result might be concluded that the methanol should be most effective solvent to extract high concentration of phytochemical and more helping in quenching free radical (Ligangli *et al*., 2002).

4.2.3 Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) assay

In the TEAC assay as shown in Table 4.2, the antioxidant capacity ranged from 2.23±0.01 - 20.94±0.01 mg Trolox/g. The TEAC values showed that the methanolic extract of wild grape fruit had the highest (20.94±0.01 mg Trolox/g), then ethanolic extract (13.28±0.02 mg Trolox/g), and the lowest of water extract (2.23±0.01 mg Trolox/g), respectively. The obtained results indicated that the TEAC values were significant difference at $P<0.01$ depending on the solvent extraction used.

Mahasarakham University

4.2.4 Ferric reducing antioxidant potential (FRAP) assay

The FRAP assay is generally used to determine the antioxidant ability on Fe^{3+} - Fe^{2+} reduction (Benzie and Strain, 1996). The Fe^{3+}- TPTZ complex (Fe^{3+} tripyridyltriazine) was formed and indicated in blue color. This complex was changed into violet of ferrous tripyridyltriazine (Fe^{2+}- TPTZ) by antioxidant (Benzie and Szeto, 1999; Kubola and Siriamornpun, 2011). The FRAP values of the wild grape fruit extracts are shown in Table 4.2. The results indicated that the methanolic extract (15.76±0.01 mmol Fe^{2+}/g) had the greatest reducing power, followed by ethanolic extract (12.00±0.01 mmol Fe^{2+}/g) and then water extract (1.54±0.01 mmol Fe^{2+}/g), respectively. The results showed similar trend as each extracts were significant difference at $P<0.01$.

4.2.5 Cupric reducing antioxidant capacity (CUPRAC) assay

The CUPRAC assay is commonly used to test the reduction power of antioxidant as same as FRAP assay. However, the metal in reaction was Cu^{2+} which instead of Fe^{3+}. The Cu^{2+}- neocuproin [$Cu(Nc)_2^{2+}$] was changed to Cu^{+}- neocuproin [$Cu(Nc)_2^{+}$] by antioxidant. The CUPRAC values of the wild grape fruit extracts are shown in Table 4.2. The methanolic extract showed the highest reducing ability (29.16±0.01 mg Trolox/g), followed by ethanolic extract (17.13±0.02 mg Trolox/g) and water extract (2.33±0.01 mg Trolox/g). The obtained CUPRAC values were different significant depending on solvent extraction at $P<0.01$.

Mahasarakham University

4.3 Comparison of antioxidant activity between wild grape extracts and standard compound

To know the antioxidant potential of wild grape solvent extracts, comparison of antioxidant activity was performed by comparing to standard compounds; butylated hydroxytoluene (BHA), Vitamin C and Trolox. As shown in Figure 4.1, the IC_{50} values of the wild grape extracts obtained from DPPH and ABTS assays were higher than that of all standard compounds. However, ABTS assay showed lower value than DPPH. As previous known, all of antioxidant standards; vitamin C, trolox and BHA are usually used in many products. The results showed that vitamin C had antioxidant capacity higher than the extract about 5.25 and 2 folds by DPPH and ABTS assays, respectively. Trolox had higher antioxidant capacity than the extracts about 3.23 and 1.40 folds while BHA was about 2.50 and 3 folds by DPPH and ABTS assays. The results indicated that the wild grape extracts should be further purified to obtain the phytochemical specifically reacted to free radicals in order to increase their antioxidant activities. The crude extracts might be composed of other substances which can prevent of the extracts and free radicals interaction.

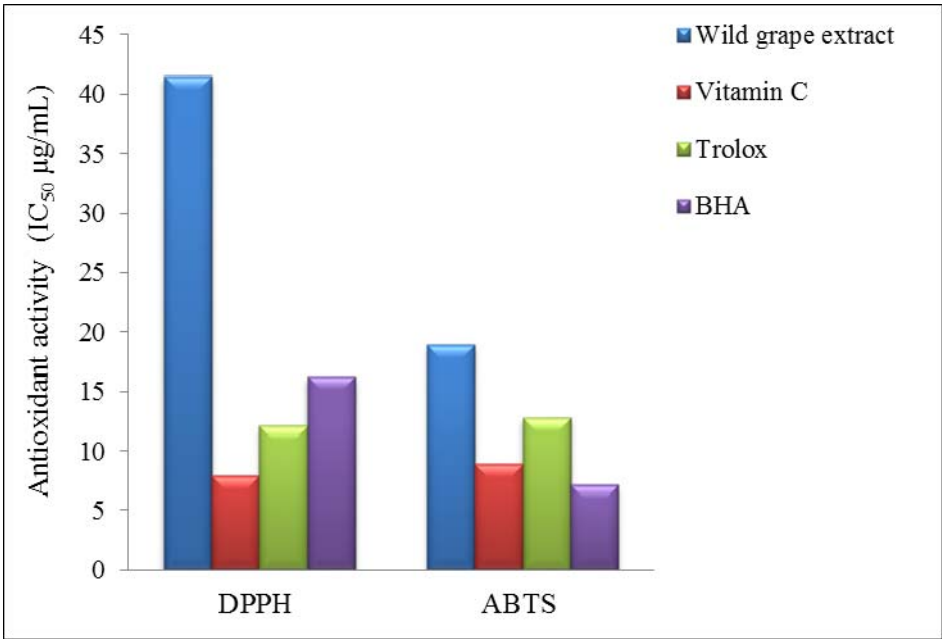


Figure 4.1 Comparison of IC_{50} values of wild grape extract and standard compounds using DPPH and ABTS assay.

Mahasarakham University

Figure 4.2 showed the antioxidant activity of wild grape extracts comparison with standard compounds obtained by TEAC assay. The results indicated that BHA had the highest antioxidant activity (36.50 mg TE/g), followed by vitamin C (31.25 mg TE/g) while the antioxidant activity of wild grape extract (20.94 mg TE/g) was similar potential with Trolox (19.75 mg TE/g). It should be suggested that the structure and functional groups of substances are the main factor on antioxidant activity. By previous reports, the type of functional groups like hydroxy (-OH) and methoxy (-$OHCH_3$) as well as their position are affected on the activity (Mariod *et al*., 2009). Moreover, methoxy group which found in BHA showed high potential antioxidant than hydroxyl or carboxyl group.

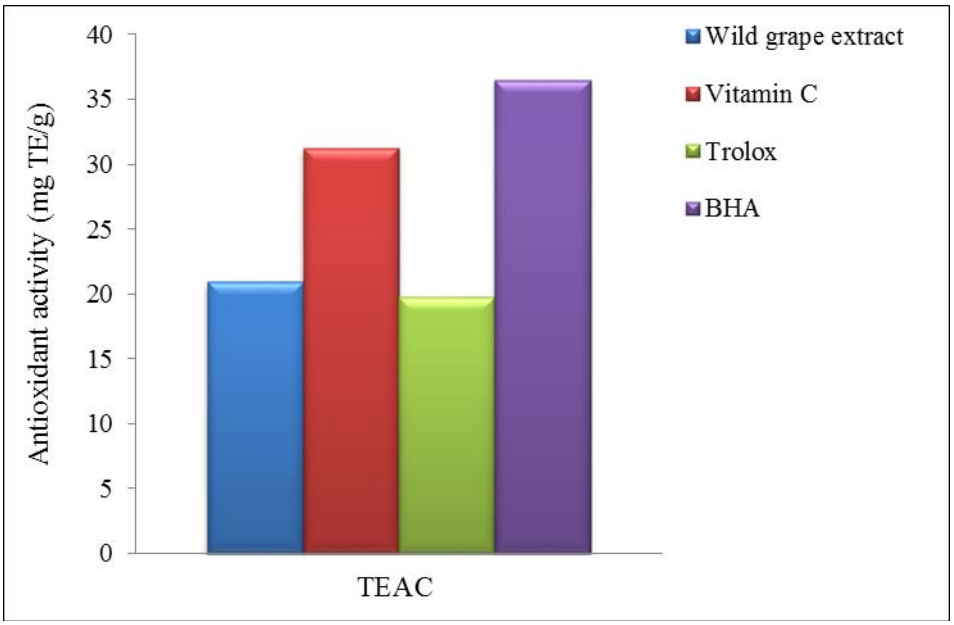


Figure 4.2 Comparison of antioxidant activity of wild grape extract and standard compounds using TEAC assay.

Mahasarakham University

Figure 4.3 showed the reducing power of the wild grape extract comparison to standards compounds by FRAP assay. The results indicated that the wild grape extract had the lowest reducing power. With the same concentration, the wild grape extract had about 2 folds lower activities than standard used. This results suggested that the wild grape extract is not good activity for reducing power on free radicals which induced by metal. However, this is result from only FRAP assay that may have other factors involved in the reaction such as purity of the extract or solvent used to extract.

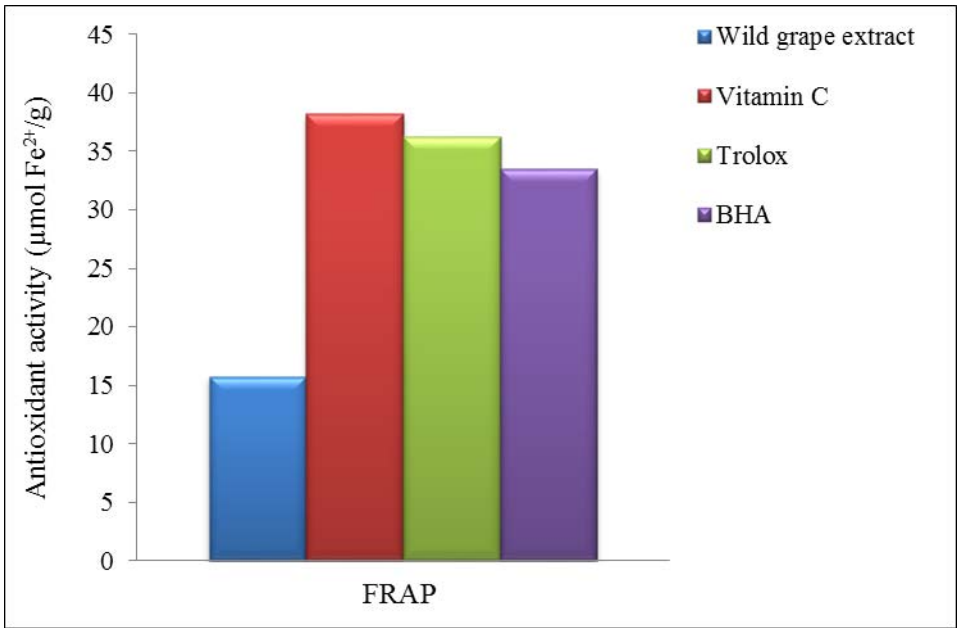


Figure 4.3 Comparison of antioxidant activity of wild grape extract and standard compounds using FRAP assay.

Mahasarakham University

Figure 4.4 showed the total antioxidant activity of the wild grape extract and standard obtained by CUPRAC assay. The antioxidant activity of the extract was higher than Trolox and slightly lower than vitamin C. With this assay, the antioxidant activity of the BHA showed the highest value than other assay. Among the standard compounds, different potential was also observed. This result might be suggested that the action of these compounds on each free radical should be varied depending on chemical structure and components as well as the oxidative mechanism. It is slightly varied data which obtained from FRAP assay as shown in Figure 4.3 since activity of the wild grape extract was similar to vitamin C, but higher than trolox. This result confirmed that the active compounds in the extract are varied both in types and functions as well as chemical structures.

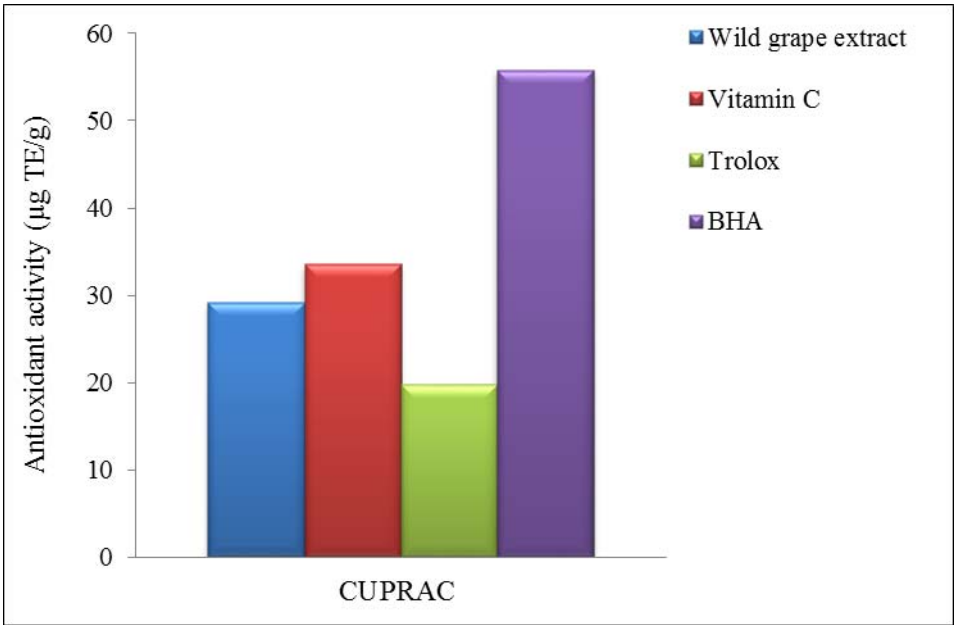


Figure 4.4 Comparison of antioxidant activity of wild grape extract and standard compounds using CUPRAC assay.

Mahasarakham University

4.4 Correlation between phytochemical contents and antioxidation activity

The phytochemical linked health benefits including antioxidant has been reported (Visioli *et al*., 2011; Kubola and Siriamornpun, 2011; Vuong, 2012; Vuong *et al*., 2013; Sati *et al*., 2013; Mäkynen *et al*., 2013). The antioxidant properties of phytochemicals can be neutralized free radicals by their redox reaction. Many mechanism of antioxidant has been reported, however, radical scavenging by donating an electron to free radicals is a commonly explaination theory (Tsao, 2010; Visioli *et al*., 2011). Moreover, reduction rate of the Fenton reaction, preventing oxidation caused by some reactive radicals were also purposed (Tsao, 2010).

A correlation analysis was performed to determine the contribution of phytochemicals in wild grape fruit extract on free radical scavenging capacity, reducing power and total antioxidant activity. The results shown in Table 4.3. With DPPH assay, all phytochemicals presented negative correlation antioxidant activity. The presentation of phytochemicals resulted to decrease the IC_{50} values. This means that the free radicals were scavenged by phytochemicals, which directly increased according to the phytochemicals increase. It is supposed that the DPPH assay was high correlated with the phytochemicals in ordered; flavonoid > proanthocyanidin > anthocyanin > phenolic > saponin, respectively. The negative correlation between phytochemicals and antioxidant activity was also found by ABTS assay. The correlation was in odered, proanthocyanidin > flavonoid > anthocyanin > phenolic > saponin, respectively.
The radical scavenging activity from the wild grape extracts might be caused from phytochemicals compounds that are capable of donating hydrogen to a free radical to remove abnormal electron. The ability of the wild grape extracts to scavenge DPPH could also inhibit of $ABTS^{\bullet+}$ formation (Igbinosa *et al*., 2011). The result can be implied that flavonoid and proanthocyanidin was strongly correlated with scavenging activity by DPPH and ABTS assays. This study was similar result with previous reports (Bakar *et al*., 2009; Igbinosa *et al*., 2011).

Mahasarakham University

The TEAC, FRAP and CUPRAC assays are antioxidant methods by reducing power of phytochemicals on metal ion. With this principle, the ability of phytochemicals to transfer electron is a major indicator of their potential as an antioxidant (Meir *et al*., 1995). The correlation analysis between reducing power of the wild grape extract by antioxidant assays as shown in Table 4.3. All of phytochemicals showed positives correlation on TEAC, FRAP and CUPRAC assays. Among the assay, FRAP showed the highest values of correlation, followed by TEAC and CUPRAC, respectively. Besides the phytochemicals, phenolic showed the highest reducing power and followed in ordered; anthocyanin > flavonoid > proanthocyanidin > saponin, respectively.

Table 4.3 Correlation between phytochemical content and antioxidant activities

	DPPH	**ABTS**	**TEAC**	**FRAP**	**CUPRAC**
Total phenolic content	-0.987**	-0.983**	0.985**	1.000**	0.976**
Total flavonoid content	-0.998**	-0.997**	0.961**	0.993**	0.948**
Anthocyanin	-0.992**	-0.988**	0.979**	0.999**	0.969**
Saponin	-0.961**	-0.970**	0.824**	0.904**	0.798**
Proanthocyanidin	-0.996**	-0.999**	0.920**	0.971**	0.902**

** Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed)

The reducing power is concerned with the concentration of the phytochemicals, which use their action by flouting the free radical chain through donating hydrogen atom compounds (Chu *et al*., 2000). Phenolic compounds have been widely studied about their oxidative processes (Siquet *et al*., 2006; Barreira *et al*., 2008). It is well known that phenolic compounds can act in a structure – dependent manner and chelate transition metals (Barreira *et al*., 2008; Fresco *et al*., 2006). Several studied exhibited high correlation between the total phenolic content and antioxidant activity of plant extracts (Butsat *et al*., 2009), especially by FRAP assay (Bukar *et al*., 2009).
In addition, the free radical scavenging activity was strongly correlated with total flavonoid content (Buka *et al*., 2009).

Mahasarakham University

Plant phenolic compounds are major substances acting as primary free radical inhibition alone or synergistic system (Shahidi *et al*, 1994). However, the mechanism of actions was unclear. The previous study showed that many mechanism such as absorb and neutralize free radicals, quench active oxygen species and decompose radicals might be involved (Duh *et al*., 1999).

Flavonoids are one of major phenolic compounds. They can trap ROS and inhibit free radicals by direct scavenging activity. This was due to the phenolic hydroxyl groups in the structure that allow donating electrons to make the more stable and less reactive of the free radicals (Nijveldt *et al*., 2001).

Saponins have been reported as health benefits phytochemical which can prevent and reduce various diseases risk (Guclu - Ustundag and Mazza, 2007; Wang *et al*., 2012). This work found that saponin had the lowest content as well as both antioxidant activities and correlation analysis. The reason might be explained that wild grape fruit are similar cultivated grape. Its fruit had sour taste like citrus fruits, therefore, the saponin should not be main phytochemical in wild grape.

Anthocyanins are the most important pigments of the vascular plants. These pigments are responsible of the shiny orange, pink, red, violet and blue colours in the flowers and fruits of some plants (Castaňeda - Ovando *et al*., 2009). There are reports that natural anthocyanins are healthy pigments, especially degenerative diseases protection (Kong *et al*., 2003; Konczak and Zhang, 2004; Stintzing and Carle, 2004; Lule and Xia, 2005; Nichenametla *et al*., 2006). The obtained results by this work showed that the wild grape fruit extracts have high content of anthocyanins as well as their antioxidant activities. This should be supposed that the anthocyanins content might be related to the color of wild grape fruit since its color has green, red, violet and black.

All of results indicated that good correlations between radical scavenging activities, reducing power and phytochemical contents of the wild grape extracts was obtained. This work suggests that the wild grape extract composed of several active compounds which could be donated electron to free radicals and stable those of their chain reactions.

Mahasarakham University

CHAPTER 5

CONCLUSIONS

The data on wild grape fruit extracts indicated that the wild grape fruit is a good source of phytochemicals, with moderate levels of total phenolic, flavonoid, anthocyanin, saponin and proanthocyanidin. All of phytochemicals found in this work showed high scavenging activity and reducing power on free radical. Among the solvent extraction, methanol is a suitable solvent for extraction of wild grape fruit since it had the highest both of phytochemicals and antioxidant activity. The results indicated that the different solvent extraction of the wild grape fruit had different activities of antioxidant capacity. The negative correlation between IC_{50} values and scavenging activity of the wild grape fruit extracts means that increasing of phytochemicals resulted in a decrease of free radical contents. On the other hand, the positive correlation revealed the reduction power of wild grape extracts on the power reactive processing of free radicals. This work indicated that wild grape fruit is an effective source of natural antioxidants. The data obtained by this study provide a valuable information for developing wild grape fruit as nutritional food additives to enhance health benefits via their phytochemicals and antioxidant activity.

Mahasarakham University

Wild grape	wild fruit which similar to cultivated grape using as the main plants for this experiment

REFERENCES

REFERENCES

Alghazeer, R., El-Saltain, H., Saleh, N., Al-Najjar, A. and Hebail, F. (2012). Antioxidant and antibacterial properties of five medicinal libyan plants extracts. *Natural Science*, 4, 324-335.

Ames, B.N., Shigenaga, M.K. and Hagen, T.M. (1993). Oxidants, antioxidants and the degenerative diseases of ageing. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 90, 7915-7922.

Amr, A. and Al-Tamimi, E. (2007). Stability of the crude extracts of *Ranunculus asiaticus* anthocyanins and their use as food colourants. *International Journal of Food Science and Tecnology*, 42, 985-991.

Apak, K., Güçlü, M. and Özyürek, S.E. (2004). Novel total antioxidant capacity index for dietary polyphenols and vitamins C and E, using their cupric ion reducing capability in the presence of neocuproine: CUPRAC method. *Agricultural and Food Chemistry*, 52, 7970-7981.

Awika, J.M., Rooney, L.W. and Waniska, R.D. (2005). Anthocyanins from black sorghum and their antioxidant properties. *Food Chemistry*, 90, 293-301.

Bakar, M.F.A., Mohamed, M., Rahmat, A. and Fry, J. (2009). Phytochemicals and antioxidant activity of different parts of bambangan (*Mangifera pajang*) and trap (*Artocarpus odoratissimus*). *Food Chemistry*, 113, 479-483.

Barreira, C.M.J., Ferreira, C.F.R.I., Beatriz, M., Oliveira, P.P.J. and Pereira, A. (2008). Antioxidant activities of the extracts from chestnut flower, leaf, skins and fruit. *Food Chemistry*, 107, 1106-1113.

Bektaşoğlu, B., Çelik, S.E., Özyürek, M., Güçlü, K. and Apak, R. (2006). Novel hydroxyl radical scavenging antioxidant activity assay for water-soluble antioxidants using a modified CUPRAC method. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 345, 1194-1200.

Benzie, I.F.F. and Strain, J.J. (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": The FRAP assay. *Analytical Biochemistry*, 239, 70-76.

Benzie, I.F.F. and Szeto, Y.T. (1999). Total antioxidant capacity of teas by the ferric reducing/antioxidant power assay. *Agricultural and Food Chemistry*, 47, 633-636.

Berg, R.V.D., Haenen, G.R.M., Berg, H.V.D. and Bast, A. (1999). Applicability of an improved trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) assay for evaluation of antioxidant capacity measurements of mixtures. *Food Chemistry*, 66, 511-517.

Bondet, V., Brand-Williams, W. and Berset, C. (1997). Kinetics and mechanisms of antioxidant activity using the DPPH$^{\bullet}$ free radical method. *LWT-Food Science and Technology*, 28, 25-30.

Bors, W.H., Werner, Michel, C. and Saran, M. (1990). Flavonoids as antioxidants: determination of radical scavenging efficiencies. *Methods Enzymology*, 186, 343-355.

Boyles, M.J. and Wrolstad, R.E. (1993). Anthocyanin composition of red raspberry juice: influences of cultivar, processing, and environmental factors. *Journal of Food Science*, 58, 1135-1141.

Bulteau, A.L., Szweda, L.I. and Friguet, B. (2002). Age-dependent declines in proteasome activity in the heart. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 397, 298-304.

Buran, P. (2013). Free radical, antioxidant and antioxidant activity determination. *Journal of Science Technology*, 3, 275-286.

Butsat, S., Weerapreeyakul, N. and Siriamornpun, S. (2009). Changes in phenolic acids and antioxidant activity in Thai rice husk at five growth stages during grain development. *Journal of Agicultural and Food Chemistry*, 57, 4566-4571.

Cacace, J.E. and Mazza, G. (2003). Mass transfer process during extraction of phenolic compounds from milled berries. *Journal of Food Engineering*, 59, 379-389.

Cao, G., Booth, S.L., Sadowski, J.A. and Prior, R.L. (1998). Increases in human plasma antioxidant capacity after consumption of controlled diets high in fruit and vegetables. *American Journal of Clinical Nutrition*, 68, 1081-1087.

Castaňeda-Ovando, A., Pacheco-Hernández, M.L., Páez-Hernández, M.E, Rodríguez, J.A. and Andrés Galán-Vidal, C. (2009). Chemical studies of anthocyanidins: A review. *Food Chemistry*, 113, 859-871.

Mahasarakham University

Chattopadhyay, K. and Chattopadhyay, B.D. (2008). Effect of nicotine on lipid profile, peroxidation & antioxidant enzymes in female rats with restricted dietary protein. *Indian Journal of Medical Research*, 127, 571-576.

Chen, I. and Manchester, S.R. (2007). Seed morphology of modern and fossil *Ampelocissus* (Vitaceae) and implications for phytogeography. *American Journal of Botany*, 94, 1534-1553.

Chen, Z., Bertin, R. and Froldi, G. (2013). EC_{50} estimation of antioxidant activity in DPPH assay using several statistical programs. *Food Chemistry*, 138, 414-420.

Chu, Y., Chang, C. and Hsu, H. (2000). Flavonoid content of several vegetables and their antioxidant activity. *Journal of Science Food Agriculture*, 80, 561-566.

Cliff, M.A., King, M.C. and Schlosser, J. (2007). Anthocyanin, phenolic composition, colour measurement and sensory analysis of BC commercial red wines. *Food Research International*, 40, 92-100.

Cuervo, A.M., Hu, W., Lim, B. and Dice, J.F. (1998). I kappa B is a substrate for a selective pathay of lysosomal proteolysis. *Molecular Biology of the Cell*, 9, 1995-2010.

Cuervo, A.M. and Dice, J.F. (2000). Age-related decline in chaperone mediated autophagy. *Journal of Biological Chemistry*, 275, 31505-31513.

Decker, E.A. (1995). The role of phenolics, conjugated linoleic acid, carnosine and pyrrolquinolinequinone as nonessential dietary antioxidants. *Nutrition Reviews*, 5, 49-53.

Deiss, L.P., Galin, H., Berissi, H., Cohen, O. and Kimchi, A. (1996). Cathepsin D protease mediates programmed cell death induced by interferon-gamma, Fas/APO-1 and TNF-alpha. *EMBO Journal*, 15, 3861-3870.

DeMartino, G.N. and Slaughter, C.A. (1999). The proteasome, a novel protease regulated by multiple mechanisms. *Journal of Biological Chemistry*, 274, 22123-22126.

Devasagayam, T.P.A., Tilak, J.C., Boloor, K.K., Sane, K.S. Ghaskadbi, S.S. and Lele, R.D. (2004). Free radicals and antioxidant in human health: current status and future prospects. *Journal of the Association of Physicians of India*, 52, 794-804.

Mahasarakham University

Duh, P.D., Tu, Y.Y. and Yen, G.C. (1999). Antioxidant activity of water extract of Harng Jyur (*Chrysanthemum morifolium* Ramat.). *Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie*, 32, 269-277.

Evans, P. and Halliwll, B. (2001). Micronutrients: oxidant/antioxidant status. *British Journal of Nutrition*, 85, 67-74.

Fang, Y.Z. (1991). Effac of ionizing radiation on superoxide dismutase in vitro and in *vivo*. In: Fang, Y.Z. (English edition). Beijing: Atomic Energy Press, *Advances in Free Radical Biology and Medicine*, 1, 54-59.

Fang, Y.Z., Sun, C.P. and Tian, X.H. (1998). Effect of Lu-Duo-Wei on scavenging superoxide and hydroxyl radicals in vitro. *The American Journal of Chinese Medicine*, 26,153-158.

Fang, Y.Z., Yang, S. and Wu, G. (2002). Free radicals and nutrition. *Nutrition*, 18, 872-879.

Ferguson, L.R. (1994). Antimutagens as cancer chemopreventive agents in the diet. *Mutation Research*, 307, 395-410.

Ferri, K.F. and Kroemer, G. (2001). Organell-specific initiation of cell death pathways. *Nature Cell Biology*, 3, E225-E263.

Floegel, A., Kimb, D.O., Chung, S.J., Koo, S.I. and Chun, O.K. (2011). Comparison of ABTS/DPPH assays to measure antioxidant capacity in popular antioxidant-rich US foods. *Journal of Food Composition and Analysis*, 24, 1043-1048.

Freidovich, I. (1999). Fundamental aspects of reactive oxygen species, or what's the matter with oxygen. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 893, 13-20.

Fresco, P., Borges, F., Diniz, C. and Marques, M.P.M. (2006). New insights on the anticancer properties of dietary polyphenols. *Medicinal Research Reviews*, 26, 747-766.

German, J.B., Dillard, C.J., Bidlack, W.R., Omaye, S.T., Meskin, M.S. and Johner, D. (1998). Phytochemicals-A New Paradigm, Technomic Publishing Company Inc. *Lancaster, Pennsylvania, USA*, 13-32.

Gershoff, S.N. (1993). Vitamin C (ascorbic acid): new roles, new requirements. *Nutrition Reviews*, 51, 313-326.

Mahasarakham University

Gey, K.F. (1986). On the antioxidant hypothesis with regard to arteriosclerosis. *Bibliotheca Nutritia Dietetica*, 37, 53-91.

Gilbert, D.L. (2000). Fifty years of radical ideas. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1, 899-906.

Golden, T.R., Hinerfeld, D.A. and Melov, S. (2002). Oxidative stress and aging: Beyond correlation. *Aging Cell*, 1, 117-123.

Guclu-Ustundag, O. and Mazza, G. (2007). Saponins: properties, applications and processing. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 47, 231-258.

Harris, W.S. (1992). The prevention of atherosclerosis with antioxidants. *Clinical Cardiology*, 15, 636-640.

Hasaniya, N., Youn, K., Xu, M., Hernaez, J. and Dashwood, R. (1997). Inhibitory activity of green and black tea in a free radical-generatin system using 2-amino-3 methylimidazoquinolone as substrate. *Japanese Journal of Cancer Research*, 88, 553-558.

Heliovaara, M., Knekt, P. Aho, K., Aaran, R.K., Alfthan G. and Aromaa, A. (1994). Serum antioxidants and risk of rheumatoid arthritis. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 5, 51-53.

Hiai, S., Oura, H. and Nakajima, T. (1976). Color reaction of some sapogenins and saponins with vanillin and sulfuric acid. *Planta Medica*, 29, 116-122.

Horie, K., Miyata, T., Maeda, K., Miyata, S., Sugiyama, S., Sakai, H., Strihou, C.Y., Monnier, V.M., Witztum, J.L. and Kurokawa, K. (1997). Immunohistochemical colocalization of glycoxidayion products and lipid peroxidation products in diabetic renal glomerular lesions. Implication for glycoxidative stress in the pathogenesis of diabetic nephropathy. *Journal of Clinical Investigation*, 100, 2995-3004.

Hou, D.X. (2003). Potential mechanisms of cancer chemoprevention by anthocyanins. *Current Molecular Medicine*, 3, 149-159.

Huang, M.T., Ferraro, T., Ho, T., Lee, C.Y. and Huang, M.T. (1992). Phenolic compounds in food and their effects on health, American chemical society. *Washington, DC*, 8, 33.

Mahasarakham University

Hwang, H., Chen, T., Nines, R.G., Shin, H.C. and Stoner, G.D. (2006). Photochemoprevention of UVB-induced skin carcinogenesis in SKH-1 mice by brown algae polyphenols. *Internationnal Journal of Cancer*, 119, 2742-2749.

Igbinosa, O., Igbinosa, I.H., Chigor, V.N., Uzunuigbe, O.E., Oyedemi, S.O., Odjadjare, E., Okoh, A.I. and Igbinosa, E.O. (2011). Polyphenolic Contents and Antioxidant Potential of Stem Bark Extracts from *Jatropha curcas* (Linn). *International Journal of Molecular Sciences*, 12, 2958-2971.

Ignarro, L.J., Cirino, G., Casini, A. and Napoli, C. (1999). Nitric oxide as a signaling molecule in the vascular system: an overview. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, 34, 879-886.

Kapasakalidis, P.G., Rastall, R.A. and Gordon, M.H. (2006). Extraction of polyphenols from processed black currant (*Ribes nigrum* L.) residues. *Journal of Aqricultural and Food Chemistry*, 54, 4016-4021.

Karani, L. W., Tolo, F.M., Karanja, S.M. and Khayek-Wandabwa, C. (2013). Safety of *Prunusafricana* and *Warburgiaugandensis* in asthma treatment. *South African Journal of Botany*, 88, 183-190.

Kedare, S.B. and Singh, R.P. (2011). Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay. *Journal of Food Science and Technology*, 48, 412-422.

Keher, J.P. (1993). Free radicals as mediators of tissue injury and disease. *Critical Reviews in Toxicology*, 23, 21-48.

Keller, J.N., Huang, F.F., Zhu, H., Yu, J., Ho, Y.S. and Kindy, T.S. (2000). Oxidation stressassociated impairment of proteasome activity during ischemia reperfusion injury. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 20, 1467-1473.

Kim, D.O., Lee, K.W., Lee, H.J. and Lee, C.Y. (2002). Vitamin C equivalent antioxidant capacity (VCEAC) of phenolic phytochemicals. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 3713-3717.

Kohen, R. and Nyska, A. (2002). Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, anti-oxidants, redox reactions, and methods for their quantification. *Toxicologic Pathology*, 30, 620-650.

Konczak, I., and Zhang, W. (2004). Anthocyanins-more than nature's colours. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 5, 239-240.

Mahasarakham University

Kong, J.M., Chia, L.S., Goh, N.K., Chia, T.F. and Brouillard, R. (2003). Analysis and biological activities of anthocyanins. Phytochemistry, 64, 923-933.

Kubola, J. and Siriamornpun, S. (2011). Phytochemicals and antioxidant activity fruit fractions (peel, pulp, aril and seed) of Thai gas (*Momordica cochinchinensis* Spreng). *Food Chemistry*, 127, 1138-1145.

Kumar, R., Sharma, R.J.,Bairwa, K., Roy, R.K. and Kumar, A. (2010) Pharmacological review on natural antidiarrhoel agents. *Der PharmaChemica*, 2, 66-93.

Lander, H.M. (1997). An essential role for free radicals and derived species in signal transduction. *The FASEB Journal*, 11, 118-124.

Li, Y., Guo, C., Yang, J., Wei, J., Xu, J. and Cheng, S. (2006). Evaluation of antioxidant properties of pomegranate peel extract in comparison with pomegranate pulp extract. *Food Chemistry*, 96, 254–260.

Ligangli, Y.H., Scott, M., Jonathan, M., John, W. and Ming, Q. (2002). Free radical scavenging properties of wheat extracts. *Journal of Agriculture Food Chemistry*, 50, 1619-1624.

Lima, M. S., Silani, I.S.V., Toaldo, I.M., Corrêac, L.C., Biasotoc, A.C.T., Pereira, G.E., Bordignon-Luiz, M.T. and Ninowe, J.L. (2014). Phenolic compounds, organic acids and antioxidant activity of grape juices produced from new Brazilian varieties planted in the Northeast Region of Brazil. *Food Chemistry*, 161, 94-103.

Liu, H.L., Chen, B. H., Kao, T.H. and Shiau, C.Y. (2014). Carotenoids composition in *Scutellariabarbata* D. Don as detected by high performance liquid chromatography-diode array detection-mass spectrometry-atmospheric pressure chemical ionization. *Journal of Functional Food*, 8C, 100-110.

Lo, K.M. and Cheung, P.C.K. (2005). Antioxidant activity of extracts from the fruiting bodies of *Agrocybe aegerita* var. alba, *Food Chemistry*, 89, 533-539.

Lule, S.U. and Xia, W. (2005). Food phenolics, pros and cons: A review. *Food Reviews International*, 21, 367-388.

Ma, T., Tian, C., Luo, J., Zhou, R., Sun, X. and Ma, J. (2013). Influence of technical processing units on polyphenols and antioxidant capacity of carrot (*Daucus carrot* L.) juice. *Food Chemistry*, 141, 1637-1644.

Mahasarakham University

Mac Carthy, P. and Shah, A.M. (2003). Oxidative stress and heart failure.*Coronary Artery Disease*, 14, 109-113**.**

Mäkynen, K., Jitsaardkul, S., Tachasamran, P., Sakai, N., Puranachoti, S., Nirojsinlapachai, N., Chattapat, V., Caengprasath, N., Ngamukote, S. and Adisakwattana, S. (2013). Cultivar variations in antioxidant and antihyperlipidemic properties of pomelo pulp (*Citrus grandis* [L.] Osbeck) in Thaland. *Food Chemistry*, 139, 735-743.

Man, S., Gao, W., Zhang, Y., Huang, L. and Liu, C. (2010). Chemical study and medical application of saponins as anti-cancer agents. *Fitoterapia*, 81, 703-714.

Mariod, A. A., Ibrahim, R. M., Ismail, M., and Ismail, N. (2009). Antioxidant activity and phenolic content of phenolic rich fractions obtained from black cumin (*Nigella sativa*) seedcake. *Food Chemistry*, 116, 306-312

McCord, J.M. (2000). The evolution of free radicals and oxidative stress. *American Journal of Medicine*, 108, 652-657.

Meir, S., Kanner, B., Akiri, B., Lord, J., Newman, J. and Hadas, S.P. (1995). Determination and involvement of aqueous reducing compounds in oxidative defense systems of various compounds in oxidative defense systems of various senescing leaves. *Journal of Agriculture Food Chemistry*, 43, 1813-1819.

Mejia, E.G., Ramirez-Mares, M.V. and Puangpraphant, S. (2009). Bioactive compound of tea: Cancer, inflammation and behavior. *Brain, Behavior, and Immunity*, 23, 721-731.

Merken, H.M. and Beecher, G.R. (2000). Measurement of food flavonoids by high performance liquid chromatography: A review. *Journal of Argricultural and Food Chemistry*, 48, 577-599.

Miller, D.M., Buettner, G.R. and Aust, S.D. (1990). Transitionmetals as catalysts of “autoxidation” reactions. *Free Radical Biology & Medicine*, 8, 95-108.

Molyneux, P. (2004). The use of the stable free radical diphenyl picrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin Journal of Science and Technology*, 26, 211-219.

Mahasarakham University

Muchuwet, M., Ndhlala, A.R. and Kasiamhuru, A. (2006). Analysis of phenolic compounds including tannins, gallotannins and flavanols of *Uapacakirkiana* fruit. *Food Chemistry*, 94, 415-419.

Nice, D. and Yalpani, M. (1997). New technologies for healthy foods &nutraceuticals, ATL Press Inc. *Science Publishers, Shrewsbury*, 105-123.

Nichenametla, S.N., Taruscio, T.G., Barney, D.L. and Exon, J.H. (2006). A review of the effects and mechanisms of polyphenolics in cancer. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 46, 161-183.

Nijveldt, R.J., Nood, E., Hoorn, D.E.C., Boelens, P.G., Norren, K. and Leeuwen, P.A.M. (2001). Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. *American Society for Clinical Nutrition*, 74, 418-425.

Nixon, R.A., Cataldo, A.M. and Mathews, P.M. (2000). Theendosomal-lysosomal system of neurons in Alzheimer's disease pathogenesis: a review. *Neurochemical Research*, 25, 1161-1172.

Nour, V. Stampar, F., Veberic, R. and Jakopic, J. (2013). Anthocyanins profile, total phenolics and antioxidant activity of black currant ethanolic extracts as influenced by genotype and ethanol concentration. *Food Chemistry*, 141, 961-966.

Ozdal, T., Capanoglu, E. and Altay, F. (2013). A review on protein–phenolic interactions and associated changes. *Food Research International*, 51, 954-970.

Palacio, L., Cantero, J.J., Cusidó, R.M. and Goleniowski, M.E. (2012). Phenolic compound production in relation to differentiation in cell and tissue cultures of *Larrea divaricata* (Cav.). *Plant Science*, 193, 1-7.

Patel, J. Kumar, G.S., Qureshi, M.S. and Jena, P.K. (2010). Anthelmintic activity of ethanolic extract of whole plant of Eupatorium odoratum. *International Journal of Phytomedicine*, 2, 127-132.

Pezzuto, J.M. (2008). Grapes and human health: A perspective. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 6777-6784.

Pham-Huy, L.A., He, H. and Pham-Huvc, C. (2008). Free radicals, antioxidants in disease and health. *International Journal of Biomedical Science*, 4, 89-96.

Mahasarakham University

Pierson, J.T., Dietzgen, R.G., Shaw, P.N., Roberts-Thomson, S.J., Monteith, G.R. and Gidley, M.J. (2012). Major Australian tropical fruit biodiversity: bioactive compounds and their bioactivities. *Molecular Nutrition & Food Research*, 56, 357-387.

Pokorny, J., Yanishlieva, N. and Gordon, M., (2001). Antioxidants in Food: Practical Applications. *CRC Press New York*, 108, 653-657.

Pretorius, J.C. (2003). Flavonoids: A review of Its commercial application potential as anti-infective agents. *Current Medicinal Chemistry-Anti Infective Agents*, 2, 335-353.

Pulido, R., Bravo, L. and Calixto, F.S. (2000). Antioxidant activity of dietary polyphenols as determined by a modified ferric aeducing/antioxidant power assay, *Agricultural and Food Chemistry*, 48, 3396-3402.

Pyo, Y.H., Lee, T.C., Logendra, L. and Rosen, R.T. (2004). Antioxidant activity and phenolic compounds of Swiss chard (*Beta vulgaris* subsp. *cycla*) extracts. *Food Chemistry*, 85, 19-26.

Rababah, T.M., Mahasneh, M.A., Kilani, I., Yang, W., Alhamad, M., Ereifej, K. and Datt, M.A. (2011). Effect of jam processing and storage on total phenolics, antioxidant activity and anthocyanins of different fruits. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 91, 1096-1102.

Ramalakshmi, K., Kubra, I.R. and Rao, L.J.M. (2008). Antioxidant potential of low-grade coffee beans. *Food Research International*, 41, 96-103.

Rice-Evans, C.A., Diplock, A.T. (1993). Current status of antioxidant therapy. *Free Radical Biology & Medicine*, 15, 77-96.

Rock, C.L., Jacob, R.A. and Bowen, P.E. (2009). Update of biological characteristics of the antioxidant micronutrients-Vitamin C, Vitamin E and the carotenoids. *Journal of the American Dietetic Association*, 96, 693-702.

Sailaja, R.P., Kalva, S., Yerramilli, A. and Mamidi, S. (2011). Free radicals and tissue damage: Role of antioxidant. *Free Radical and Antioxidants*, 1, 2-7.

Sati, P., Pandey, A., Pawat, S. and Rani, A. (2013). Phytochemicals and antioxidants in leaf extracts of *Ginkgo biloba* with reference to location, seasonal variation and solvent system. *Journal of Pharmacy Research*, 7, 804-809.

Mahasarakham University

Shahidi, F., Wanasundar, U.N. and Amarowicz, R. (1994). Natural antioxidant from low pungency mustard flour. *Food Research International*, 27, 489-493.

Shringarpure, R., Grune, T. and Davies, K.J. (2001). Protein oxidation and 20S proteasome-dependent proteolysis in mammalian cell. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 58,1442-1450.

Siquet, C., Paiva Martins, F., Lima, J.L.F.C., Reis, S. and Borges, F. (2006). Antioxidant profile of dihydroxy and trihydroxyphenolic acid: A structure-activity relationship study. *Free Radical Research*, 40, 433-442.

Škerget, M., Kotnik, P., Hadolin, M., Hraš, A.R., Simonic, M. and Knez, Ž. (2005). Phenols, proanthocyanidins, flavones andflavonols in some plant materials and their antioxidant activities. *Food Chemistry*, 89, 191-198.

Sohal, R.S. and Weindruch, R. (1996). Oxidative stress, caloric restriction, and aging. *Science*, 128, 379-385.

Sparrow, C.P., Parthasarathy, S. and Steinberg, D.A. (1989). Macrophage receptor that recognizes oxidized low density lipoprotein but not acetylated low density lipoprotein. *Journal of Biological Chemistry*, 264, 2599-2604.

Steinmetz, K.A. and Potter, J.D. (1991). Vegetables, fruit and cancer. II: Mechanisms. *Cancer Causes Control*, 2, 427-442.

Stich, H.F. and Rosin, M.P. (1984). Adv. Naturally occurring phenolics as antimutage - nic and anticarcinogenic agent.In Nutritional and Toxicological Aspects of Food Safety, Friedman. *Journal of Biology and Medicine*, 177, 1-25.

Stintzing, F.C. and Carle, R. (2004). Functional properties of anthocyanins and betalains in plants, food, and in human nutrition. *Trends in Food Science and Technology*, 15, 19-38.

Strous, G.J., Van Kerkhof, P., Govers, R., Ciechanover, A. and Schwartz, A.L. (1996). The ubiquitin conjugation system is required for ligand-induced endocytosis and degradation of the growth hormone receptor. *EMBO Journal*, 15, 3806-3812.

Sutar, N., Garai, R., Sharma, U.S. and Sharma, U.K. (2011). Anthelmintic activity of platycladusorientalis leaves extract. *International Journal of Parasitology Research*, 2, 1-3.

Mahasarakham University

Szweda, P.A., Friguet, B. and Szweda, L.I. (2002). Proteolysis, free radicals, and aging. *Free Radical Biology & Medicine*, 33, 29-36.

Thaipong, K., Boonprakob, U., Crosby, K., Cisneros-Zevallos, L. and Byrne, D.H. (2006). Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19, 669-675.

Traenckner, E.B., Pahl, H.L., Henkel, T., Schmidt, K.N., Wilk, S. and Baeuerle, P.A. (1995). Phosphorylation of human I kappa B-alpha on serines 32 and 36 controls I kappa B-alpha proteolysis and NF kappa B activation in response to diverse stimuli. *EMBO Journal*, 15, 3861-3870.

Tsao, R. (2010). Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols. *Nutrients*, 2, 1233-1246.

Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M.T., Mazur, M. and Telser, J. (2007). Free radicals and antiox-idants in normal physiological functions and human disease. *International Biochem Cell Biol*ogy, 39, 44-84.

Visioli, F., De La Lastra, C.A., Andres-Lacueva, C., Aviram, M., Calhau, C. and Cassano, A. (2011). Polyphenols and human health: a prospectus. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 51, 524-546.

Voudin, K.A., Shukitt-Hale, B., Mackonnons, Kalt, W. and Joseph, J.A. (2000). Polyphenols enhance red blood cell resistance to oxidative stress in vitro and in *vivo.Biochimicaet Biophysica Acta*, 117, 1523-1540.

Vuong, Q.V. (2004). Epidemiological evidence linking tea consumption to human health: A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 54, 523-536.

Vuong, Q.V., Hirun, S., Roach, P.D., Bowyer, M.C., Phillips, P.A. and Scarlett, C.J. (2013). Effect of extraction condition on total phenolic compmpounds and antioxidant activities of *Carica Papaya* leaf aqueous extracts. *Journal of Herbal Medicine*, 3, 104-111.

Wang, J., Liu, Y., Zhao, J., Zhang, W. and Pang, X. (2012). Saponins extracted from byproduct of *Asparagus officinalis* L. suppress tumour cell migration and invasion through targeting Rho GTPase signalling pathway. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 93, 1492-1498.

Mahasarakham University

We, J.Q., Kosten, T.R. and Zhang, X.Y. (2013). Free radicals, antioxidant defense systems, and schizophrenia. *Progress in Neuro-Psychopharmacology &Biological Psychatry*, 46, 200-206.

Wu, D. and Cederbaum, A.I. (2003). Alcohol, Oxidative strees, and Free radical damage. *Alcohol Research & Health*, 4, 277-284.

Wu, G. and Morris, S.M. (1998). Arginine metabolism: nitric oxide and beyond. *Biochemical Journal*, 336, 1-17.

Yang, G.Y., Liao, J., Kim, K., Yurkow, E.J. and Yang, C.S. (1998). Inhibition of growth and induction of apoptosis in human cancer cell lines by tea polyphenols. *Carcinogenesis*, 19, 611.

Yang, J., Martinson, T.E. and Liu, R.H. (2009). Phytochemical profiles and antioxidant activities of wine grapes. *Food Chemistry*, 116, 332-339.

Yoshikawa, T., Toyokuni, S. and Yamamoto, Y. (2000). Free radicals in chemistry biology and medicine. *OICA International, London*, 27, 1-6.

Zhang, R., Zeng, Q., Deng, Y., Zang, M., Wei, Z., Zhang, Y. and Tang, X. (2013). Phenolic profiles and antioxidant activity of litchi pulp of different cultivars cultivated in Southern China. *Food Chemistry*, 136, 1169-1176.

Zheng, M. and Storz, G. (2000). Redox sensing by prokaryotic transcription factors. *Biochem Pharmacol*, 59, 1-6.

Zhishen, J., Mengcheng, T. and Jianming, W. (1999). The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chemistry*, 64, 555-559.

Zulueta, A., Esteve, M.J. and Frigola, A. (2009). ORAC and TEAC assay comparison to measure the antioxidant capacity of food products. *Food Chemistry*, 114, 310-316.

Mahasarakham University

APPENDICES

APPENDIX A

Preparation of solutions

1. Preparation of reagents for total phenolic content

1.1 Preparation of 10% Folin-Ciocalteu reagent

A 10% Folin-Ciocalteu reagent was prepared by dilution 10 mL of Folin-Ciocalteu reagent in 90 mL of distilled water.

1.2 Preparation of 7.5% sodium carbonate

A 7.5% sodium carbonate solution was prepared by dissolving 7.5002 g of Na_2CO_3 in 100 mL of distilled water.

1.3 Preparation of stock standard (1,000 mg/L) gallic acid

Stock standard solution of gallic acid was prepared by dissolving 0.1012 g of gallic acid and made up to volume with distilled water in 100 mL volumetric flask.

2. Preparation of reagents for total flavonoid content

2.1 Preparation of 5% sodium nitrite solution

A 5% sodium nitrite solution was prepared by dissolving 5.0025 g of $NaNO_2$ in 100 mL of distilled water.

2.2 Preparation of 10% aluminium chloride solution

A 10% aluminium chloride solution was prepared by dissolving 10.0200 g of $AlCl_3$ in 100 mL of distilled water.

2.3 Preparation of stock standard (100 mg/L) quercetin

Stock standard solution quercetin was prepared by dissolving 0.0103 g of quercetin and made up to volume with distilled water in 100 mL volumetric flask.

3. Preparation of reagents for total saponin content

3.1 Preparation of 8% vanillin

A 8% vanillin solution was prepared by dissolving 8.0025 g of vanillin in 100 mL of distilled water.

3.2 Preparation of stock standard (0.5 mg/mL) β-aescin

Stock standard solution β-aescin was prepared by dissolving 0.0125 g of β-aescin and made up to volume with methanol in 25 mL volumetric flask.

Mahasarakham University

4. Preparation of reagents for total anthocyanin content

4.1 Preparation of 0.025 M potassium chloride buffer pH 1

A 0.025 M potassium chloride buffer pH 1 was prepared by dissolving 0.0932 g of KCl in 50 mL of distilled water. HCl was use as balance to obtain pH 1.

4.2 Preparation of 0.025 M sodium acetate buffer pH 4.5

A 0.025 M sodium acetate buffer pH 4.5 was prepared by dissolving 0.1701 g of CH_3COONa in 50 mL of distilled water. CH_3COOH was use as balance to obtain pH 4.5.

5. Preparation of reagents for total proanthocyanidin content

5.1 Preparation of 4% vanillin

A 4% vanillin solution was prepared by dissolving 4.1004g of vanillin in 100 mL of distilled water.

5.2 Preparation of stock standard (1 mg/mL) catechin

Stock standard solution catechin was prepared by dissolving 0.0251 g of catechin and made up to volume with distilled water in 25 mL volumetric flask.

6. Preparation of reagents for 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl assay (DPPH)

6.1 Preparation of 0.1 mM DPPH radical

A 0.1 mM DPPH radical was prepared by dissolving 0.0232 g of DPPH in 500 mL of methanol and left in dark room.

6.2 Preparation of stock standard 2 mg/mL trolox

Stock standard solution of trolox was prepared by dissolving 0.0550 g of trolox and made up to volume with distilled water in 25 mL volumetric flask.

6.3 Preparation of stock standard 2 mg/mL BHA

Stock standard solution of BHA was prepared by dissolving 0.0510 g of BHA and made up to volume with ethanol in 25 mL volumetric flask.

Mahasarakham University

6.4 Preparation of stock standard 2 mg/mL Vitamin C

Stock standard solution of vitamin C was prepared by dissolving 0.0510 g of vitamin C and made up to volume with distilled water in 25 mL volumetric flask.

7. Preparation of reagents for 2,2'-azino-bis-(3-ethybenzothiazoline sulphonate) assay (ABTS)

7.1 Preparation of 7 mM $ABTS^{\bullet+}$

A 7 mM ABTS was prepared by dissolving 0.0380 g of ABTS in 10 mL of distilled water.

7.2 Preparation of $K_2S_2O_8$ solution

A 2.45 mM of $K_2S_2O_8$ was prepared by dissolving 0.0330 g of $K_2S_2O_8$ in 50 mL of distilled water.

8. Preparation of reagents for ferric reducing antioxidant power assay (FRAP)

8.1 Preparation of 300 mM sodium acetate buffer, pH 3.6

A 0.025 M sodium acetate buffer (pH 3.6) solution was prepared by dissolving 24.624 g of $CH_3COONa{\cdot}3H_2O$ in 500 mL of deionized water. The pH value of 0.3 M of the solution was adjusted using CH_3COOH and made up to volume with deionized water in a 1000 mL volumetric flask.

8.2 Preparation of 10 mM TPTZ

A 10 mM TPTZ solution was prepared by dissolving 0.0789 g of TPTZ in 25 mL and made up to volume with 40 mM HCl in 25 mL volumetric flask.

8.3 Preparation of 20 mM ferric chloride solution

A 20 mM ferric chloride solution was prepared by dissolving 0.1655 g of $FeCl_3$ in 50 mL and made up to volume with deionized water in 50 mL volumetric flask.

8.4 Preparation of 40 mM hydrochloric acid

A 40 mM hydrochloric acid was prepared by dilute 3.30 mL of 37% HCl in 1000 mL and made up to volume with deionized water in 1000 mL volumetric flask.

Mahasarakham University

8.5 Preparation of 10 mM Ferrous sulphate solution

Stock standard solution of 10 mM $FeSO_4$ was prepared by dissolving 0.0140 g of $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ in 5 mL and made up to volume with methanol in 5 mL volumetric flask.

9. Preparation of reagents for cupric reducing antioxidant capacity (CUPRAC) assay

9.1 Preparation of 0.01 M $CaCl_2$

A 0.01 M $CaCl_2$ was prepared by dissolving 0.0852 g of $CaCl_2$ in 50 mL of distilled water.

9.2 Preparation of ammonium acetate buffer pH 7

Ammonium acetate buffer pH 7 was prepared by dissolving 3.8540 g of CH_3COONH_4 in 50 mL of distilled water and CH_3COOH or NH_3 was use as balance to obtain pH 7.

9.3 Preparation of 0.0075 M neocuproin

A 0.0075 M of neocuproin was prepared by dissolving 0.0780 g of neocuproin in 50 mL of ethanol.

Mahasarakham University

APPENDIX B

Calibration curves of standard

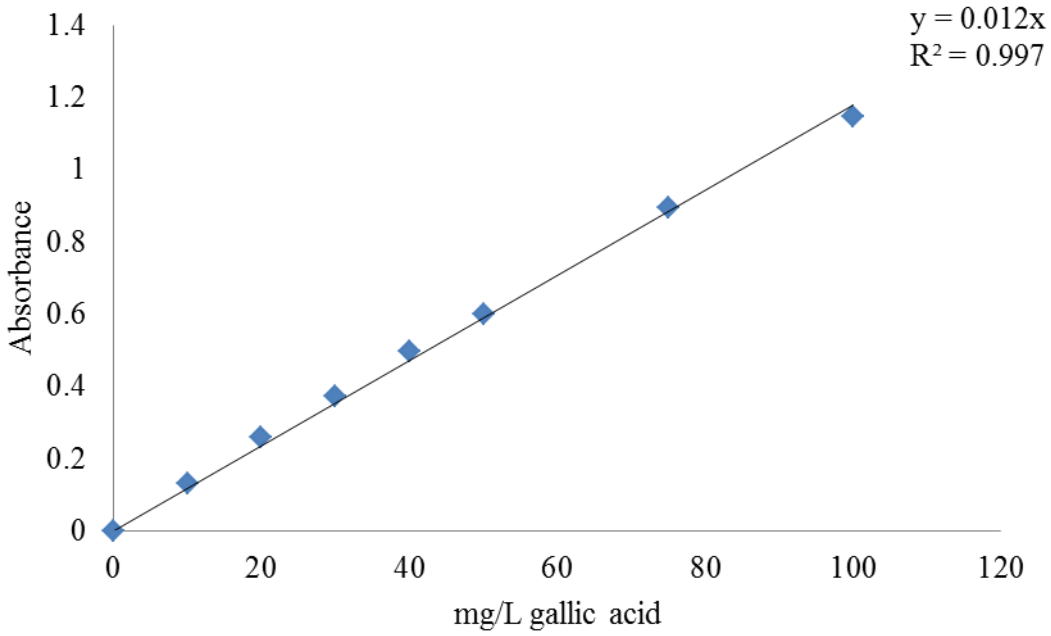


Figure B.1 Calibration curve of standard gallic acid.

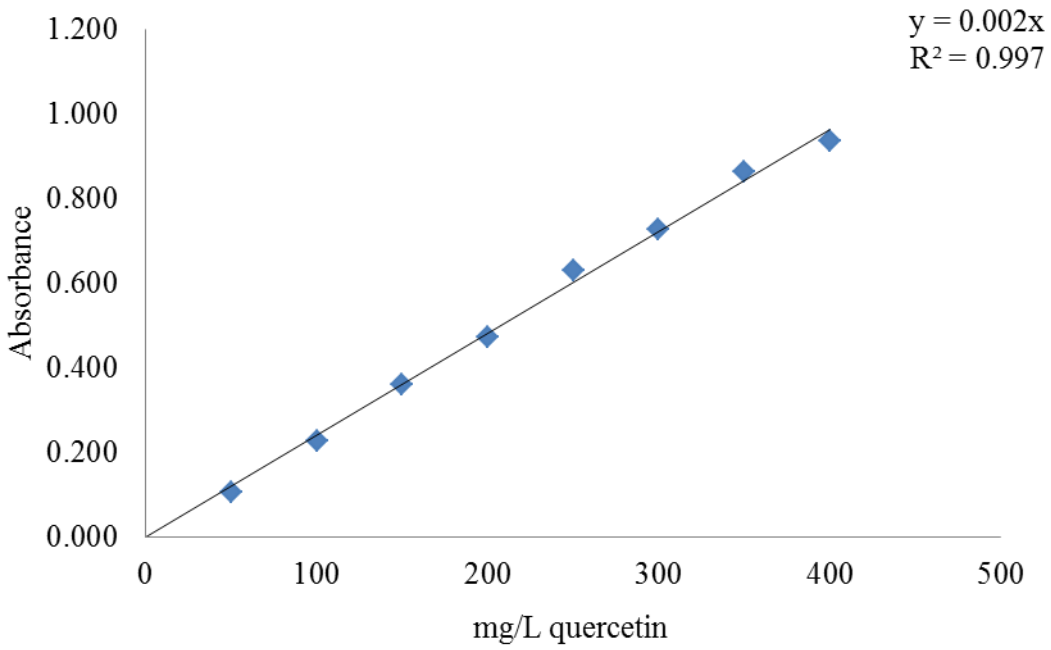


Figure B.2 Calibration curve of standard quercetin.

Mahasarakham University

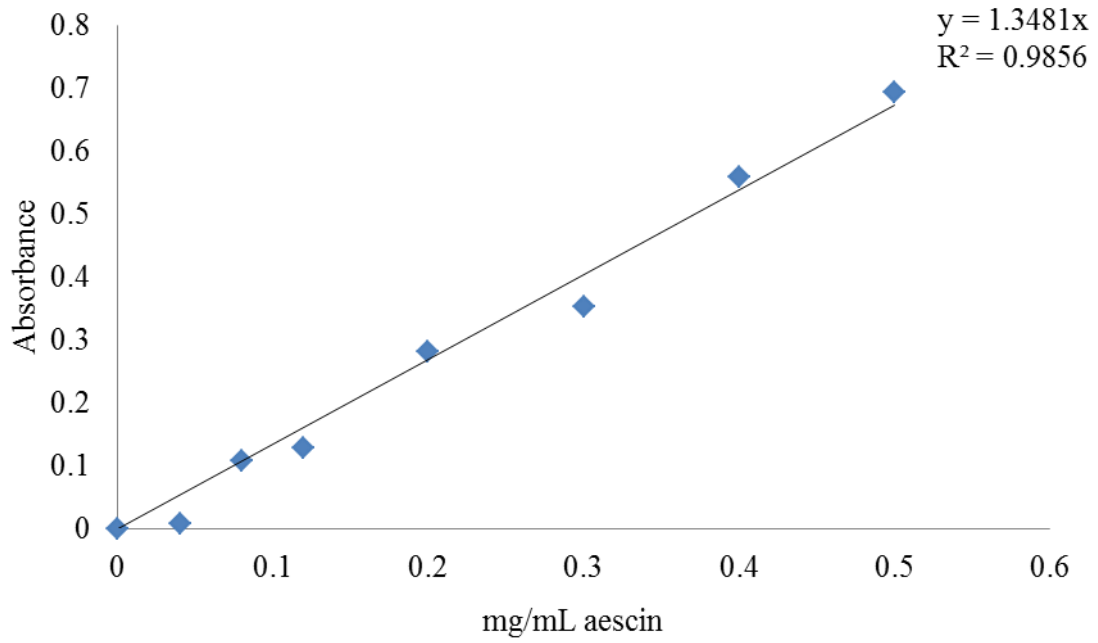


Figure B.3 Calibration curve of standard aescin.

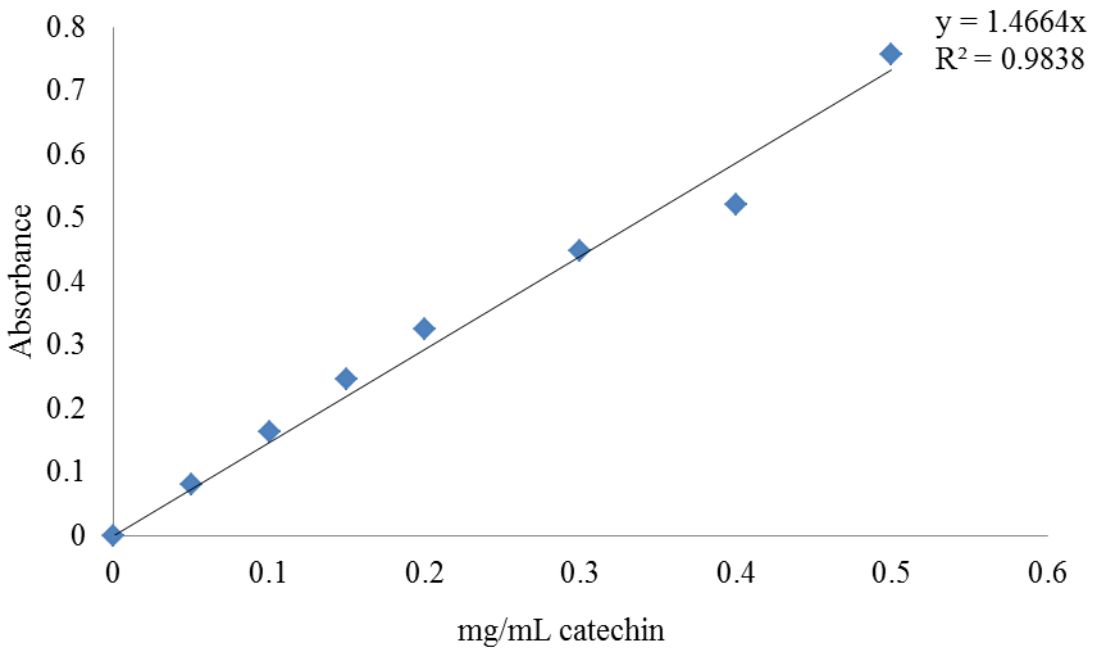


Figure B.4 Calibration curve of standard catechin.

Mahasarakham University

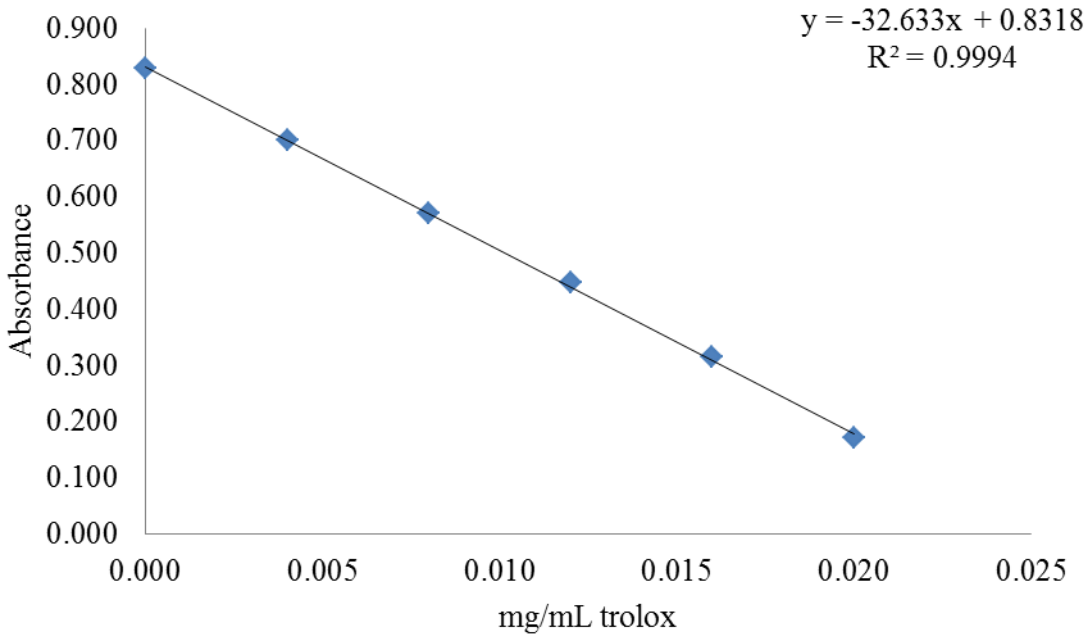


Figure B.5 Calibration curve of standard trolox (ABTS assay).

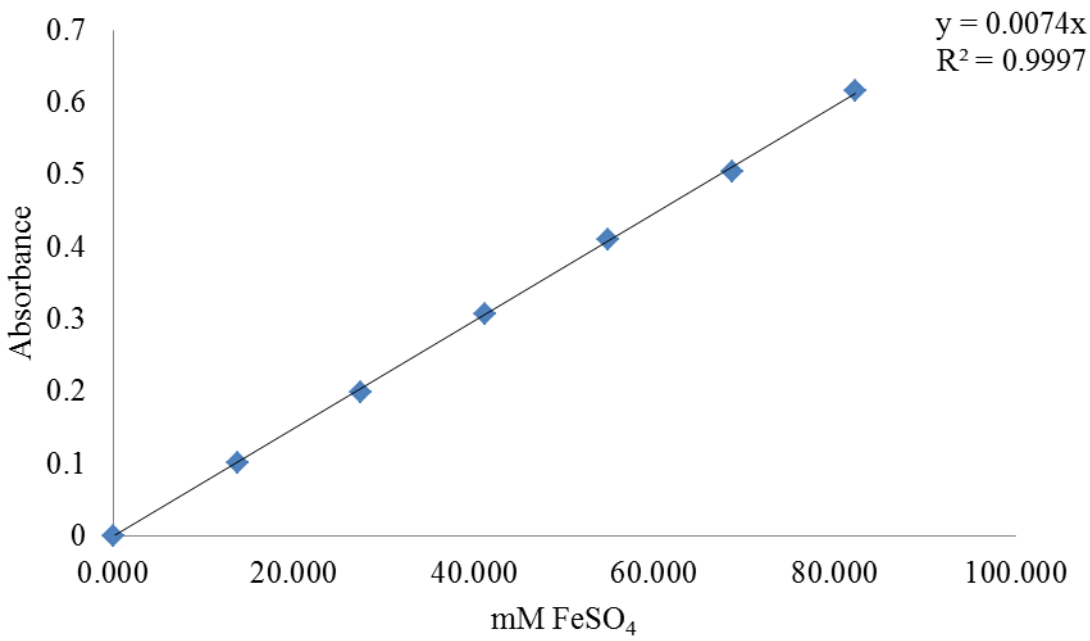


Figure B.6 Calibration curve of standard $FeSO_4$.

Mahasarakham University

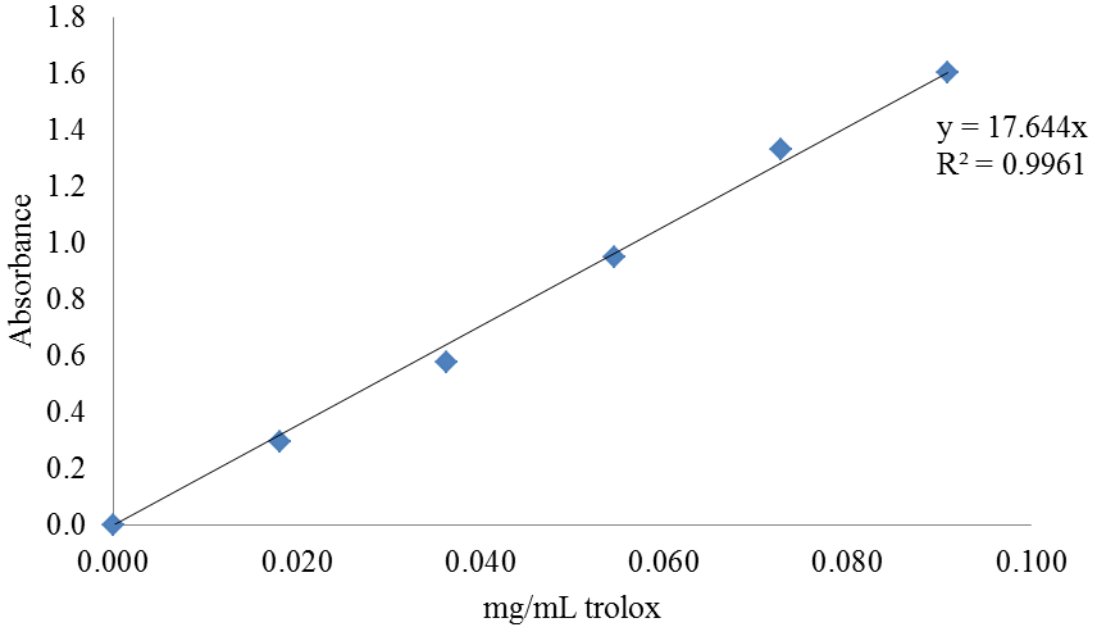


Figure B.7 Calibration curve of standard trolox (CUPRAC assay).

Mahasarakham University

APPENDIX C

Research output

มหาวิทยาลัยมหาสารคาม

มอบเกียรติบัตรฉบับนี้ เพื่อแสดงว่างานวิจัยเรื่อง

สารสกัดจากผลองุ่นป่า: พฤกษเคมีและฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน

โดย

สุริสา ศรีสุวรรณ์

เป็นผลงานที่ได้รับรางวัลการนำเสนอภาคโปสเตอร์ ชมเชย สาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี
ในการประชุมทางวิชาการ "มหาวิทยาลัยมหาสารคามวิจัย ครั้งที่ 10"
ระหว่างวันที่ 11 – 12 เดือน กันยายน พ.ศ. 2557 ณ คณะมนุษยศาสตร์และสังคมศาสตร์
มหาวิทยาลัยมหาสารคาม ตำบลขามเรียง อำเภอกันทรวิชัย จังหวัดมหาสารคาม

(ศาสตราจารย์ ปรีชา ประเทพา)
รองอธิการบดีฝ่ายวิชาการและวิจัย
ประธานคณะกรรมการจัดการประชุมทางวิชาการ

Mahasarakham University

Wild grape (*Ampelocissus martinii* Planch.) fruit extracts: Phytochemical and antioxidant activities

MAHASARAKHAM UNIVERSITY

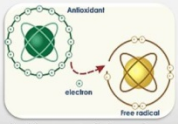
Surisa Srisuwan, Ansaya Thonpho and Prasong Srihanam

Department of Chemistry Faculty of Science, Mahasarakham University, Kantharawichai District, Maha Sarakham 44150, Thailand

Introduction

Degenerative diseases

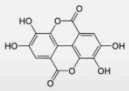
- Aging process
- Cancer
- Immune diseases
- Cardiovascular diseases
- Neurological diseases



Antioxidant neutralizing a free radical

Example of Synthetic and Natural antioxidants

BHT



Polyphenolic

Phytochemicals

- chemical compounds that occur naturally in plants
- bioactive non-nutrient chemical compounds and have protective or disease preventive properties

Bioactive of phytochemicals

- Antioxidants
- Reduce the incidence of cancer
- Immunity
- Control the action of hormones
- Antibacterial
- Antimicrobia
- Antidiarrheal
- Anthelmintic

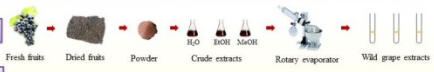
Found in plants, especially in fruits, vegetables and helps. Grapes are a popular fruit for study of phytochemical and antioxidant activity.

Wild grape is a wild fruit, which have a stem and fruit very similar to cultivated grape.

Objective

1. To find the suitable solvent for extraction of wild grape fruit with high phytochemical content and antioxidant activities
2. To determine antioxidant activity of the wild grape fruit extracts
3. To study the correlation of phytochemical contents and antioxidant activities of the wild grape fruit extracts

Wild grape extracts



Phytochemical contents

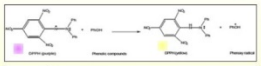
Total Phenolic: Extracts solution → Folin-Ciocalteu's reagent → Na_2CO_3 → Absorbance 765 nm

Total Flavonoid: Extracts solution → $NaNO_2$ → $AlCl_3$ → NaOH → Absorbance 510 nm

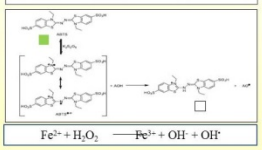
Antioxidant activities

Methods

DPPH assay



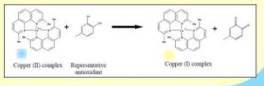
ABTS assay



FRAP assay

$Fe^{2+} + H_2O_2 \longrightarrow Fe^{3+} + OH^- + OH^{\bullet}$

CUPRAC assay



Result and Discusstion

Table 1 Total phenolic and total flavonoid contents in wild grape extracts.

Solvents	Total phenolics (mg GAE/g DW)	Total flavonoids (mg QE/g DW)
Methanol	222.37±0.010[a]	604.56±0.03[a]
Ethanol	176.27±0.015[b]	536.52±0.02[b]
Distilled Water	38.64±0.010[c]	75.57±0.006[c]

As shown in table 1, method extract showed the highest of total phenolic (TPC) and flavonoid (TFC) contents of 222.34 mg GAE/g DW and 604.56 mg QE/g DW, respectively. The ethanol extract is second most of TPC and TFC and the water extract. The different TPC and TFC might be caused from the polarity of solvent. This results indicated that the polarity of phenolic and flavonoid might be similar or close up to methanol.

Table 2 Antioxidation activity of wild grape fruit extracts by DPPH, $ABTS^{+}$, FRAP and CUPRAC assays.

Extracts	DPPH IC_{50} (µg/mL)	$ABTS^{+}$ IC_{50} (µg/mL)	FRAP (mM $FeSO_4$/g DW)	CUPRAC (µg TE/g DW)
Methanolic	13.836±0.102	6.321±0.062	3.50±0.014	1065.0±0.01
Ethanolic	21.051±0.639	9.454±0.311	2.53±0.004	625.0±0.02
Distilled water	85.182±2.866	52.248±0.105	0.403±0.006	84.6±0.01
Trolox	4.039±0.064	4.260±0.082	6.07±0.027	-
Vitamin C	2.629±0.034	2.368±0.035	1.93±0.018	-

As shown in table 2, the antioxidant activities are varied by different solvent extracts. The antioxidation activities of the extract are the highest in methanol all of total method and then ethanol and water, respectively. This might be related selected from the content of phytochemical since methanol extract obtained the highest TPC and TFC

Table 3 The correlation coefficient (r) values of phytochemicals and antioxidant activity regression analysis.

Assay	TPC	TFC	DPPH	$ABTS^{+}$	FRAP	CUPRAC
TPC	1	0.992	0.758	0.973	0.998*	0.976
TFC	0.992	1	0.671	0.937	0.982	0.941
DPPH	0.758	0.671	1	0.888	0.800	0.882
ABTS	0.973	0.937	0.888	1	0.986	1.000**
FRAP	0.998*	0.982	0.800	0.986	1	0.988
CUPRAC	0.976	0.941	0.882	1.000**	0.988	1

Table 3 showed the relation of phytochemicals and antioxidant activities. The results indicated that phytochemicals and antioxidant activities are directly related in all of tested methods. This means the antioxidant activities increased when the content of phytochemical increased.

Conclusion

Methanol is a suitable solvent for wild grape extract to obtain the highest phytochemicals and antioxidant activities. The wild grape extract showed similar antioxidant activities comparison to trolox and vitamin C. Both phenolic and flavonoid contents are directly related on their antioxidant activities

Acknowledgements

Department of Chemistry, Faculty of Science , Mahasarakham University and Miss Chuleerat Wangnarat for suggestion and help in prepration wild grape extract.

References

Yang J, Martinson TE, Liu RH. Phytochemical profiles and antioxidant activities of wine grapes, Food Chemistry 2009;116:332-339

Vuong QV, Hirun S, Roach PD, Bowyer MC, Phillips PA, Scarlett CJ. Effect of extraction condition on total phenolic compmpounds and antioxidant activities of Carica Papaya leaf aqueous extracts, Journal of herbal medicine 2013;3:104-111

MRC#10
MSU to World Class
The 10th Mahasarakham University Research Conference
การประชุมทางวิชาการ มหาวิทยาลัยมหาสารคามวิจัย ครั้งที่ 10
วารสาร
วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี
มหาวิทยาลัยมหาสารคาม
ฉบับพิเศษ

สารบัญ

หน้า

การประเมินน้ำท่าโดยข้อมูลฝนเชิงพื้นที่ กรณีศึกษาลุ่มน้ำลำตะคองตอนบน..... 292
เจษฎา ตงศิริ, อนงค์ฤทธิ์ แข็งแรง, รัตนา หอมวิเชียร
พิษเฉียบพลันและพิษกึ่งเรื้อรังของสารสกัดใบขนุน..... 300
ศศิธร สร้อยพิจิตร , ธีรพร กทิศาสตร์ ,ชูศรี ตลับมุข
ความพึงพอใจของผู้ใช้บัณฑิตคณะพยาบาลศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคามต่อผล การเรียนรู้ของบัณฑิต..... 308
นริสา วงศ์พนารักษ์ , กนกจันทร์ เขม้นการ อัจฉรา ชัยชาญ สุภาพร อาญาเมือง
การสำรวจระบบการเลี้ยงโคนมและคุณภาพน้ำนมดิบของเกษตรกรรายย่อย..... 322
วาสนา ศิริแสน, มนกานต์ อินทรกำแหง, สุภาวดี ปีระเต
คุณสมบัติทางเคมี และเคมีกายภาพของเส้นใยอาหารที่มีสารต้านอนุมูลอิสระจากมะม่วงสายพันธุ์แก้วเขียว (*Mangifera indica L.*)..... 333
สหขวัญ โรจนคุณธรรม, อังคณา จันทรพลพันธ์
การพัฒนาพันธุ์แตงขาวหนามดำเพื่อสร้างเอกลักษณ์ผลิตภัณฑ์ผักอินทรีย์บ้านเกิ้งแบบมีส่วนร่วมของชุมชน..... 342
พัฒนา ภาสอน, สุรพล แสนสุข, สุรพล ยอดศิริ, คมกริช วงศ์ภาคำ
การพัฒนาสุขภาพผู้ป่วยเบาหวานชนิดที่ 2 ตามบริบทชุมชน:โดยใช้กระบวนการพยาบาลชุมชน..... 350
สมเสาวนุช จมูศรี, เกื้อพันธ์ กลั่นการดี,เปมิกา บุตรจันทร์, วัชรนุช จันทคุณ,
สุทธิวรร เขตคาม, สุภาพร มาลีวรรณ์,สุรางคณา คงเสือ,อภิวัฒน์ ปัจมนต์
ความชุกของการติดเชื้อปรสิตในระบบทางเดินอาหารของสุนัขจรและแมวจรในจังหวัดมหาสารคาม..... 361
เกียรติศักดิ์ พิมพ์จ่อง , กชพร ไวสู้ศึก, วสุพล ชาแท่น, สุภาวดี ปีระเต
จำนวนโครโมโซมของพืชวงศ์ขิงในอุทยานแห่งชาติภูแลนคา จังหวัดชัยภูมิ..... 367
ลลิตา คำแท่ง, สุรพล แสนสุข, ปิยะพร แสนสุข, สุดารัตน์ ถนนแก้ว
สารสกัดจากผลองุ่นป่า: พฤกษเคมีและฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน..... 373
สุริสา ศรีสุวรรณ์ , อัณศยา ท่อนโพธิ์, ประสงค์ สีหานาม
การพัฒนาความสามารถนักเรียนในโรงเรียนส่งเสริมสุขภาพ: กรณีศึกษาโรงเรียนชนบทจังหวัดมหาสารคาม..... 383
สมเสาวนุช จมูศรี

Mahasarakham University

สารสกัดจากผลองุ่นป่า: พฤกษเคมีและฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน

Wild Grape *(Ampelocissus martinii* Planch.) Fruit Extracts: Phytochemical and Antioxidant Activities

สุริสา ศรีสุวรรณ์[1], อัณศยา ท่อนโพธิ์[2], ประสงค์ สีหานาม[3*]

Surisa Srisuwan[1], Ansaya Thonpho[2], Prasong Srihanam[3*]

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้ คือ เพื่อทำการสกัดผลองุ่นป่าด้วยตัวทำละลาย 3 ชนิดคือเอธานอล เมธานอลและน้ำ จากนั้นทำการระเหยตัวทำละลายด้วย rotary evaporator ตรวจสอบสารพฤกษเคมีโดยวิเคราะห์หาปริมาณฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ทั้งหมดด้วยวิธี Folin-Ciocalteu และ colorimetric aluminum chloride ตามลำดับ ผลการทดลอง พบว่า ปริมาณฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ทั้งหมดในผลองุ่นป่าที่สกัดด้วยเมธานอลมีค่าสูงกว่าที่สกัดด้วยเอธานอลและน้ำอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อตรวจสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชันโดยวิธี DPPH (IC_{50} = 13.8 μg/mL), ABTS (IC_{50} = 6.3 μg/mL), FRAP (3.5 mM $FeSO_4$/g) และ CUPRAC (1065 μg TE/g) สรุปได้ว่า สารสกัดผลองุ่นป่าด้วยเมธานอลมีฤทธิ์การต้านออกซิเดชันสูงกว่าที่สกัดด้วยเอธานอลและน้ำ โดยพบว่าปริมาณฟีนอลิกมีความสัมพันธ์โดยตรงกับฤทธิ์ต้านออกซิเดชันที่ตรวจสอบด้วยวิธี FRAP ซึ่งมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (r) เท่ากับ 0.998 การศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าผลองุ่นป่าอาจจะเป็นผลไม้ที่ประกอบด้วยสารพฤกษเคมีที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่ดี

คำสำคัญ: สารสกัด ฟลาโวนอยด์ อนุมูลอิสระ ฟีนอลิก ตัวทำละลาย

Abstract

This work was aimed to extract wild grape (*Ampelocissus Martinii* Planch.) fruits with 3 solvents; ethanol, methanol and distilled water. The solvent was then evaporated by using rotary evaporator. Total phenolic and flavonoid contents were investigated by using Folin-Ciocalteu and colorimetric aluminum chloride assays, respectively. The results showed that methanol extract obtained significantly higher total phenolic and flavonoid contents than ethanol and distilled water extracts. In addition, the methanol extracts had higher antioxidant activities than other extracts when measured by DPPH (IC_{50} = 13.8 μg/mL), ABTS (IC_{50} = 6.3 μg/mL), FRAP (3.5 mM $FeSO_4$/g) and CUPRAC (1065 μg TE/g). The positive correlation coefficients were observed (r = 0.998) between total

[1] นิสิตปริญญาโท สาขาเคมีศึกษา [2]อาจารย์ [3*]ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม อำเภอกันทรวิชัย จังหวัดมหาสารคาม 44150

[1]Master's degree student (Education chemistry), [2]Lecturer, [3*]Asst. Prof., Faculty of Science, Mahasarakham University, Kantharawichai District, Maha Sarakham 44150, Thailand.

Mahasarakham University

phenolic content and FRAP values. In conclusion, the wild grape fruits should be a novel source of phytochemicals with good bioactivity.

Keywords: extracts, flavonoid, free radical, phenolic, solvent

บทนำ

อิสระ (free radicals) เป็นโมเลกุลหรือไอออนที่ มีอิเล็กตรอนชั้นนอกสุด (valence electron) ไม่ครบคู่ จึงทำให้โมเลกุลไม่มีความเสถียร สามารถแย่งชิงอิเล็กตรอน (oxidation reaction) จากโมเลกุลที่อยู่ข้างเคียงได้ ส่งผลให้โมเลกุลนั้นขาดอิเล็กตรอนกลายเป็นอนุมูลอิสระ ในลักษณะของปฏิกิริยาลูกโซ่[1] อนุมูลอิสระเกิดจากกระบวนการเมตาบอลิซึมภายในร่างกาย และจากสภาวะแวดล้อมภายนอกร่างกาย ซึ่งอนุมูลอิสระเหล่านี้จะส่งผลต่ออวัยวะต่างๆ ซึ่งนำไปสู่โรคเสื่อม เช่น โรคมะเร็ง โรคหัวใจ หลอดเลือดตีบ และโรคที่เกี่ยวข้องกับระบบสมอง[2-5] เป็นต้น โรคเสื่อมที่เกิดจากอนุมูลอิสระสามารถป้องกันได้ด้วย สารต้านออกซิเดชัน (antioxidation) หรือที่รู้จักกันดีคือ "สารต้านอนุมูลอิสระ" แหล่งของสารต้านอนุมูลอิสระ ที่พบมากคือ พืช โดยเฉพาะ ผัก ผลไม้ และสมุนไพร[6] สารประกอบในสารสกัดจากพืชเหล่านี้มีชื่อเฉพาะว่า "พฤกษเคมี (phytochemicals)" ได้แก่ สารกลุ่มฟีนอล ฟลาโวนอยด์ ควินิน แทนนิน อัลคาลอยด์ สเตียรอยด์ ซาโปนิน และแอนโธไซยานิน[7-10] ผลไม้ที่มีการศึกษาเกี่ยวกับสารพฤกษเคมีและฤทธิ์การต้านออกซิเดชันมากชนิดหนึ่ง คือ องุ่น (grape) จากรายงานผลการศึกษาชี้ให้เห็นว่า องุ่นมีสารพฤกษเคมีหลายชนิด ที่มีฤทธิ์ในการป้องกันอนุมูลอิสระได้ดีเยี่ยม และยังช่วยป้องกันโรคหลายชนิดอีกด้วย[11,12]

องุ่นป่า(wild grape) มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Ampelocissus martinii* Planch. เป็นผลไม้ป่าที่มีลักษณะคล้ายกับองุ่น ผลสุกมีสีม่วงแดง จึงเชื่อว่าน่าจะมีสารพฤกษเคมีที่มีฤทธิ์คล้ายกับที่พบในองุ่น เป็นพืชล้มลุกที่ทนต่อ สภาพอากาศ ที่เปลี่ยนแปลง พบได้ทั่วไปทางภาคเหนือและภาคอีสานของประเทศไทย ออกผลในช่วงฤดูฝน ผลสด มีรสเปรี้ยว ชาวบ้านนิยมนำมารับประทานกับส้มตำ และใช้เป็นยาพื้นบ้านรักษาโรคฝีและแก้อาการบวม ปัจจุบันยังไม่มีการรายงานข้อมูล ที่เกี่ยวกับสารพฤกษเคมีในองุ่นป่า และฤทธิ์ทางชีวภาพของสารที่สกัดจากองุ่นป่ามากนัก ผู้วิจัยจึงได้มีความสนใจ ในการศึกษาปริมาณของสารพฤกษเคมี และความสัมพันธ์กับฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของสารสกัดจากองุ่นป่าด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ เพื่อเป็นข้อมูลในการศึกษาในระดับต่อไป

วัสดุสารเคมีและวิธีการทดลอง

วัสดุและสารเคมี

ทีพีทีแซด (2,4,6-Tripyridyl-s-Triazine), โซเดียมไนไตรท์ (sodium nitrite), กรดแกลลิก (gallic acid), บีเอชเอ (butylated hydroxyanisole), วิตามินซี (ascorbic acid), อะซิเตต บัฟเฟอร์ (acetate buffer)ซื้อจากบริษัท Acros organics (USA) ส่วนอะลูมิเนียมคลอไรด์ (aluminium chloride), เมธานอล (methanol), เอธานอล (ethanol), กรดไฮโดรคลอริก (hydrochloric acid), โซเดียมไฮดรอกไซด์ (sodium hydroxide) ซื้อจากบริษัท Merck (USA) สารที่ใช้ตรวจสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน ได้แก่ โฟลินซิโอเคาทูรีเอเจนต์ (Folin–Ciocalteu reagent), ไอรอน (III) คลอไรด์ (iron(III) chloride), ไอรอน(II) ซัลเฟต (iron(II) sulfate), คอปเปอร์(II) คลอไรด์ (copper(II) chloride), โพแทสเซียมเปอร์ซัลเฟต (potassium

Mahasarakham University

persulfate), โซเดียมคาร์บอเนต (sodium carbonate) จากบริษัท Carlo Erba (Italy) ดีพีพีเอช (DPPH) (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl), โทรล็อกซ์ (trolox), เควอซิทิน (quercetin), นีโอคิวโปรอิน (neocuproine) และเอบีทีเอส(2,2'-azino-bis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulpho- nic acid)) ซื้อจากบริษัท Sigma-Aldrich (USA) โดยสารเคมีทั้งหมดที่ใช้เป็นเกรดสำหรับการวิเคราะห์ (AR grade) ผลองุ่นป่า เตรียมโดยการเก็บผลสุกที่มีสีม่วงแดงจากจังหวัดร้อยเอ็ด ประเทศไทย ในช่วงเดือนกรกฎาคม พ.ศ. 2556 แล้วนำมาอบที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน เพื่อให้มีความชื้นเหลืออยู่น้อยกว่า 5 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นนำไปบดให้ละเอียดและเก็บไว้ที่ภาชนะผิดผนึก

วิธีการทดลอง

การสกัดสารพฤกษเคมี

ชั่งผงองุ่นป่าแห้งที่บดละเอียดแล้วปริมาณ 25 กรัม สกัดด้วยตัวทำละลาย 3 ชนิด คือ น้ำ เมธานอล และเอธานอล ปริมาตร 250 มิลลิลิตร โดยวิธีการสกัดทำตามวิธีของ Vuong และคณะ[13] โดยการสกัดด้วยเมธานอลและเอธานอลทำที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ส่วนการสกัดด้วยน้ำทำที่อุณหภูมิ 70 องศา-เซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที ทำการสกัดซ้ำ 3 ครั้งในทุกๆ ตัวทำละลาย จากนั้นนำสารสกัดที่ได้ไประเหยตัวทำลายออกด้วย rotary evaporator จนกระทั่งน้ำหนักของสารสกัดที่ได้น้อยกว่า 10% ของน้ำหนักองุ่นป่าที่ชั่งมาในตอนเริ่มต้น ชั่งให้ได้น้ำหนัก ที่แน่นอน จากนั้นใช้ตัวทำละลาย 20 มิลลิลิตร ละลายสารสกัดหยาบกลับมาเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำไปใช้งาน

การตรวจสอบหาปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด

การตรวจสอบหาปริมาณฟีนอลิก ทำตามวิธี Škerget และคณะ[14] และดัดแปลงอัตราส่วนของสารตัวอย่างและสารละลายที่ใช้ โดยนำสารละลายตัวอย่าง ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลาย โฟลินซิโอ-เคาทูรีเอเจนต์ เข้มข้น 10% ปริมาตร 1 มิลลิลิตร แล้วตั้งไว้ในที่มืดเป็นเวลา 5 นาที จากนั้นเติมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต ความเข้มข้น 7.5% ปริมาตร 0.8 มิลลิลิตร แล้วตั้งสารละลายไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที ก่อนจะนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร โดยใช้สารละลายกรดแก-ลลิก (gallic acid) เป็นสารมาตรฐาน ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดหาได้จากการนำค่าการดูดกลืนแสงของสารตัวอย่างเทียบกับกราฟมาตรฐาน ปริมาณที่ได้แสดงในหน่วยมิลลิกรัมของกรดแกลลิกต่อผลองุ่นป่าแห้งปริมาณ 1 กรัม (mg GAE/gDW)

การตรวจสอบหาปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด

การตรวจสอบหาปริมาณฟลาโวนอยด์ ใช้วิธีเดียวกับ Zhishen และคณะ[15] โดยนำสารละลายตัวอย่าง ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลายโซเดียมไนไตรท์ ความเข้มข้น 5% ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร แล้วตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 6 นาที จากนั้นเติมสารลายอะลูมิเนียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 10% ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร ตั้งไว้อีก 5 นาที แล้วเติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 1 โมลาร์ ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร และเติมน้ำกลั่นเพื่อปรับปริมาตรให้ได้ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร ก่อนนำสารผสม ที่ได้ไปเก็บไว้ในที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 นาที ก่อนจะนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 510 นาโนเมตร โดยใช้เควอซิทิน (quercetin) เป็นสารมาตรฐาน ปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมดหาได้จากการนำค่าการดูดกลืนแสงของสารตัวอย่างเทียบกับกราฟมาตรฐาน ปริมาณที่ได้แสดงในหน่วย มิลลิกรัมของเควอซิทินต่อผลองุ่นป่าแห้งปริมาณ 1 กรัม (mg QE/gDW)

การตรวจสอบฤทธิ์การต้านออกซิเดชันด้วยวิธี DPPH

การตรวจสอบฤทธิ์การต้านออกซิเดชันด้วยวิธี DPPH ทำตามวิธี Thaipong และคณะ[16]

Mahasarakham University

โดยผสมสารละลายตัวอย่าง ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร และ สารละลาย DPPH ความเข้มข้น 0.1 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร แล้วนำสารผสมที่ได้เก็บไว้ในที่มืด ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง จากสูตร

$$Inhibition\ (\%) = [\ \frac{A_{control} - A_{sample}}{A_{control}}\ ] \times 100$$

ฤทธิ์การต้านออกซิเดชันจะแสดงเป็นค่า IC_{50} คือ ความเข้มข้นของสารที่สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระได้ 50 เปอร์เซ็นต์

การตรวจสอบฤทธิ์การต้านออกซิเดชันด้วยวิธี FRAP

ทำการตรวจวัดฤทธิ์การต้านออกซิเดชันด้วยวิธี FRAP ทดลองตามวิธีของ Benzie[17] โดยผสมอะซีเตต บัฟเฟอร์ ที่มีค่าพีเอช 3.6 ปริมาตร 3.3 มิลลิลิตร กับ สารละลายไอรอน(III) คลอไรด์ ความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 0.33 มิลลิลิตร และสารละลายทีพีทีแซด (TPTZ) ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 0.33 มิลลิลิตร แล้วตั้งไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำสารผสมที่ได้ ปริมาตร 1.8 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลายตัวอย่าง ปริมาตร 0.06 มิลลิลิตร แล้วเจือจางด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 0.18 มิลลิลิตร ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 4 นาที ก่อนจะนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 593 นาโนเมตร โดยใช้ไอรอน(II) ซัลเฟต เป็นสารมาตรฐาน ฤทธิ์การต้านออกซิเดชัน หาได้จากการนำค่าการดูดกลืนแสงของสารตัวอย่างเทียบกับกราฟมาตรฐาน ปริมาณที่ได้แสดงในหน่วย มิลลิโมลาร์ ของไอรอน(II) ซัลเฟตต่อผลองุ่นป่าแห้งปริมาณ 1 กรัม (mM $FeSO_4$/g DW)

การตรวจสอบฤทธิ์การต้านออกซิเดชันด้วยวิธี ABTS

เตรียมสารอนุมูลอิสระ ABTS โดยการผสม ABTS ความเข้มข้น 7 มิลลิโมลาร์ กับสารละลายโพแทสเซียมเปอร์ซัลเฟต ความเข้มข้น 2.45 มิลลิโมลาร์ อัตราส่วน 1:1 ตามวิธี Zuleata และคณะ[18] ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 16 ชั่วโมง แล้วเจือจางด้วยน้ำกลั่น เพื่อให้ได้ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร ประมาณ 0.7 จากนั้นนำสารผสมที่เตรียมได้ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลายตัวอย่าง 0.5 มิลลิลิตร ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที ก่อนจะนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้งอนุมูลอิสระ ฤทธิ์การต้านออกซิเดชันที่ได้แสดงเป็นค่า IC_{50} ดังที่ได้อธิบายไว้ข้างต้น

การตรวจสอบฤทธิ์การต้านออกซิเดชันด้วยวิธี TEAC

การตรวจสอบด้วยวิธีนี้ ทำตามวิธี Berg และคณะ[19] ทำการทดลอง เช่นเดียวกับการตรวจสอบฤทธิ์การต้านออกซิเดชันด้วยวิธี ABTS โดยสร้างกราฟมาตรฐานของโทรล็อกซ์ที่มีความเข้มข้นแตกต่างกัน แล้วนำค่าการดูดกลืนแสงของสารตัวอย่าง มาคำนวณหาปริมาณโทรล็อกซ์ ผลที่ได้แสดงในหน่วย มิลลิกรัมของโทร-ล็อกซ์ต่อผลองุ่นป่าแห้งปริมาณ 1 กรัม (mgTE/g DW)

การตรวจสอบฤทธิ์การต้านออกซิเดชันด้วยวิธี CUPRAC

ทำการทดลองตามวิธีของ Apakและคณะ[20] แต่ดัดแปลงอัตราส่วนของสารตัวอย่างและสารละลาย โดยการผสมสารละลายคอปเปอร์(II) คลอไรด์ ที่มีความเข้มข้น 0.01 โมลาร์ปริมาตร 1 มิลลิลิตร กับสารละลายนีโอคิวโปรอิน ความเข้มข้น 0.0075 โมลาร์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร และแอมโมเนียมอะซีเตตบัฟเฟอร์ ที่มีพีเอช 1 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร และสารละลายตัวอย่าง 1.1

Mahasarakham University

มิลลิลิตร จากนั้นนำสารผสมที่ได้ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที ก่อนจะนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร โดยใช้สารละลายโทรล็อกซ์ สร้างเป็นกราฟมาตรฐาน นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาเปรียบเทียบและคำนวณหาฤทธิ์การต้านออกซิเดชั่น แสดงในหน่วยไมโครกรัมของโทรล็อกซ์ต่อผลองุ่นป่าแห้งปริมาณ 1 กรัม (μg TE/g DW)

การวิเคราะห์ทางสถิติ

การวิเคราะห์ทางสถิติโดยใช้โปรแกรมไมโครซอฟต์เอ็กเซล เวอร์ชัน 2010 สำหรับการคำนวณค่าเฉลี่ย ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน และความคลาดเคลื่อนของค่าเฉลี่ย และใช้โปรแกรม SPSS เวอร์ชัน 19 ในการคำนวณค่าความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณสารพฤกษเคมีกับฤทธิ์การต้านออกซิเดชัน

ผลและอภิปรายผล

ปริมาณสารพฤกษเคมี

ปริมาณฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์รวม ที่วัดได้จากสารสกัดผลองุ่นป่าโดยใช้ตัวทำละลายแตกต่างกัน คือ เมธานอล เอธานอล และน้ำ ให้ผลการทดลองที่แตกต่างกันอย่างชัดเจน ดังแสดงใน Table 1

Table 1 Total phenolic and total flavonoid contents in wild grape extracts.

Solvents	Total phenolics (mg GAE/g DW)	Total flavonoids (mg QE/g DW)
Methanol	222.37±0.010[a]	604.56±0.03[a]
Ethanol	176.27±0.015[b]	536.52±0.02[b]
Distilled Water	38.64±0.010[c]	75.57±0.006[c]

Superscripts with different letters are significantly different at $p < 0.05$ within the same column.

จาก Table 1 พบว่า ผลองุ่นป่าที่สกัดด้วยเมธานอล ให้ปริมาณฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์รวมสูงที่สุด คือ ปริมาณฟีนอลิก 222.37 mg GAE/g DW และฟลาโวนอยด์ 604.56 mg QE/g DW ตามด้วยเอธานอล และน้ำ ซึ่งให้ปริมาณฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ต่ำที่สุด โดยสารสกัดเมธานอลจะมีปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดสูงเป็น 1.2 และ 5.8 เท่าของสารสกัด เอธานอลและน้ำ ตามลำดับ ทั้งนี้เนื่องมาจากความมีขั้วของตัวทำละลายที่แตกต่างกัน โดยน้ำมีสภาพขั้วสูงสุด ตามด้วยเมธานอล และเอธานอล แสดงว่าฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์มีสภาพขั้วใกล้เคียงกับเมธานอล ดังนั้นเมธานอล จึงเป็นตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดผลองุ่นป่าเพื่อตรวจสอบปริมาณสารพฤกษเคมี ได้ดีที่สุด ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของSati และคณะ[21] ที่ทำการทดลองโดยสกัดใบแปะก๊วย และ Lai และคณะ[22] ที่ ทำการทดลองโดยสกัดข้าวจาปอนิกา ก็ให้ผลของตัวทำละลายในทำนองเดียวกัน โดยทั่วไปการสกัดเป็นขั้นตอนสำคัญที่จะทำให้ได้มาซึ่งสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากพืชและส่วนต่างๆ ของพืช ซึ่งปริมาณ องค์ประกอบ และความบริสุทธิ์ของสารออกฤทธิ์ที่ได้จากการสกัดนั้นขึ้นอยู่ กับโครงสร้าง หรือลักษณะเฉพาะทางเคมี รวมทั้งสภาพขั้วของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ จำนวนของตัวอย่าง และสภาวะหรือวิธีการสกัด เช่น ชนิดของตัวทำละลาย เวลา อุณหภูมิ ตลอดจนสิ่งรบกวนต่างๆ ในขั้นตอนการสกัด เป็นต้น

ฤทธิ์การต้านออกซิเดชัน

จากการตรวจสอบฤทธิ์การต้านออกซิเดชันของสารสกัดจากผลองุ่นป่า ด้วยวิธีต่างๆ คือ DPPH, FRAP, ABTS และ CUPRAC เปรียบกับสารมาตรฐานที่มีฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระ แสดงดัง Table 2 จะเห็นว่าผลองุ่นป่าที่สกัดด้วยตัวทำละลายแตกต่างกันให้ฤทธิ์การต้านออกซิเดชันที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) โดยการสกัดที่ใช้เมธานอลเป็นตัวทำละลาย

Mahasarakham University

ให้ฤทธิ์การต้านออกซิเดชันสูงที่สุดในทุกๆวิธีการทดสอบ ถัดมา คือ เอธานอล และน้ำตามลำดับ ทั้งนี้เนื่องมากจากการใช้เมธานอลเป็นตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดให้ปริมาณสารพฤกษเคมีสูงตามที่ได้อภิปรายมาแล้วทำให้สามารถออกฤทธิ์ต้านออกซิเดชันได้ดี โดยทั่วไปสารประกอบฟีนอลิกเป็นสารกลุ่มหลักในพืชที่มีบทบาทสำคัญในการต้านอนุมูลอิสระ เนื่องจากมีหมู่ ไฮดรอกซิลอยู่จำนวนมาก ทำให้สามารถเกิดปฏิกิริยา รีดอกซ์กับอนุมูลอิสระ โดยสารพอลิฟีนอลจะให้อิเล็กตรอนแก่อนุมูลอิสระ ทำให้เป็นกลาง ส่วนพอลิฟี-นอลที่เสียอิเล็กตรอนไปแล้วจะรวมตัวกันเองเกิดเป็นสารพอลิฟีนอลใหม่ที่เสถียร[23,24] โดยวิธีการทดสอบ DPPH และ ABTS จะแสดงผลเป็นค่า IC_{50} หมายถึงความเข้มข้นของสารต้านอนุมูลอิสระ ที่สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระได้ครึ่งหนึ่ง ถ้าค่าที่ได้ต่ำแสดงถึงฤทธิ์การดักจับอนุมูลอิสระที่ดี แต่ถ้าค่าที่ได้สูง แสดงถึงฤทธิ์การดักจับอนุมูลอิสระที่ไม่ดี จากการทดลองเปรียบเทียบระหว่างสารสกัดกับสารมาตรฐานที่มีฤทธิ์การต้านออกซิเดชันได้ดี คือ โทรล็อกซ์ กับวิตามินซี พบว่า สารสกัดจากองุ่นป่า โดยเฉพาะที่สกัดด้วย เมธานอล ยังให้ฤทธิ์การต้านออกซิเดชันที่น้อยกว่าสารมาตรฐาน ซึ่งจากงานวิจัยก่อนหน้านี้ พบว่า ความมีขั้วของตัวทำละลายและชนิดของสารต้านออกซิเดชันที่แตกต่างกันจะมีผลต่อประสิทธิภาพของการสกัดและฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของสารสกัดที่ได้[25,26] อย่างไรก็ตาม การใช้สารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์อาจเป็นอันตรายต่อร่างกายของมนุษย์ เมื่อได้รับในปริมาณที่มากเกินไป หรืออาจมีการสะสมภายในร่างกายในระยะยาวส่งผลทำให้เกิดโรคต่างๆ ตามมาได้ เช่น โรคมะเร็ง ตับ และความดันโลหิตสูง[27] เป็นต้น

Table 2 Antioxidation activity of wild grape fruit extracts by DPPH, $ABTS^{+}$, FRAP and CUPRAC assays.

Extracts	DPPH IC_{50} (μg/mL)	$ABTS^{+}$ IC_{50} (μg/mL)	FRAP (mM $FeSO_4$/g DW)	CUPRAC (μg TE/g DW)
Methanolic	13.836 ± 0.102^{c}	6.321 ± 0.062^{c}	3.50 ± 0.014^{b}	1065.0 ± 0.01^{a}
Ethanolic	21.051 ± 0.639^{b}	9.454 ± 0.311^{b}	2.53 ± 0.004^{c}	625.0 ± 0.02^{b}
Distilled water	85.182 ± 2.866^{a}	52.248 ± 0.105^{a}	0.403 ± 0.006^{e}	84.6 ± 0.01^{c}
Trolox	4.039 ± 0.064^{d}	4.260 ± 0.082^{d}	6.07 ± 0.027^{a}	-
Vitamin C	2.629 ± 0.034^{e}	2.368 ± 0.035^{e}	1.93 ± 0.018^{d}	-

Superscripts with different letters are significantly different at $p < 0.05$ within the same column.

Mahasarakham University

Table 3 The correlation coefficient (r) values of phytochemicals and antioxidant activity regression analysis.

Assay	TPC (mg GAE/g DW)	TFC (mg QE/g DW)	DPPH IC_{50} (μ g/mL)	ABTS IC_{50} (μ g/mL)	FRAP (mM $FeSO_4$/g DW)	CUPRAC (μg TE/g DW)
TPC (mg GAE/g DW)	1	0.992	0.758	0.973	0.998*	0.976
TFC (mg QE/g DW)	0.992	1	0.671	0.937	0.982	0.941
DPPH IC_{50} (μg/mL)	0.758	0.671	1	0.888	0.800	0.882
ABTS IC_{50} (μg/mL)	0.973	0.937	0.888	1	0.986	1.000**
FRAP (mM $FeSO_4$/g DW)	0.998*	0.982	0.800	0.986	1	0.988
CUPRAC (μg TE/g DW)	0.976	0.941	0.882	1.000**	0.988	1

*Correlation is significant at the 0.05 level (2-tailed).

**Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed)

Mahasarakham University

ส่วนวิธี FRAP และ CUPRAC เป็นวิธีการทดสอบฤทธิ์การต้านออกซิเดชันอีกวิธีหนึ่ง โดยไอออนของโลหะ จะทำหน้าที่เป็นอนุมูลอิสระ และพอลิฟีนอลจะไปยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของโลหะ ที่เรียกว่าปฏิกิริยาเฟนตัน (Fenton reaction)[26] จากผลการทดสอบ พบว่าสารสกัดผลองุ่นป่าที่ใช้ เมธานอล และ เอธานอล เป็นตัวทำละลาย สามารถรีดิวไอออนของโลหะได้ดีกว่าวิตามินซีซึ่งเป็นสารมาตรฐาน

ความสัมพันธ์ของปริมาณสารพฤกษเคมีกับฤทธิ์การต้านออกซิเดชัน

จากการศึกษาถึงความสัมพันธ์ของปริมาณสาร พฤกษเคมีในผลองุ่นป่าต่อฤทธิ์การต้านออกซิเดชันแสดงค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ดัง Table 3 พบว่าปริมาณฟีนอลิกและ ฟลาโวนอยด์มีความสัมพันธ์กับฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระทุกๆ วิธีการทดสอบ โดยค่าสหสัมพันธ์ระหว่างวิธี FRAP กับ ปริมาณฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ คือ 0.998 และ 0.982 ตามลำดับ ค่าสหสัมพันธ์ระหว่างวิธี ABTS กับ ปริมาณฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ คือ 0.973 และ 0.937 ตามลำดับ ค่าสหสัมพันธ์ระหว่างวิธี CUPRAC กับ ปริมาณฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ คือ 0.976 และ 0.941 ตามลำดับ และค่าสหสัมพันธ์ระหว่างวิธี DPPH กับ ปริมาณของ ฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ คือ 0.758 และ 0.671 ตามลำดับ ซึ่งข้อมูลที่ได้มีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์กันในเชิงบวก ข้อมูลที่ได้เชื่อมโยงกับงานวิจัยก่อนหน้านี้[28-30] พบว่าปริมาณสารประกอบฟีนอลิกมีบทบาทสำคัญต่อฤทธิ์การต้านออกซิเดชัน เมื่อปริมาณของ ฟี-นอลิก หรือ ปริมาณฟลาโวนอยด์เพิ่มขึ้น จะส่งผลให้ประสิทธิภาพในการต้านออกซิเดชันเพิ่มสูงขึ้นด้วย

สรุปผล

จากการศึกษางานวิจัยนี้สามารถสรุปได้ว่าตัวทำละลายที่เหมาะสมในการสกัดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของ ผลองุ่นป่าคือ เมธานอล ที่ให้ปริมาณสารพฤกษเคมี ที่สูงที่สุดและฤทธิ์การต้านออกซิเดชันที่สูงที่สุดด้วยเช่นกัน เมื่อเทียบกับสารมาตรฐานโทรล็อกและ วิตามินซี พบว่าสารสกัดจากผลองุ่นป่าให้ฤทธิ์การต้านออกซิเดชันที่ใกล้เคียงกับสารมาตรฐาน และในวิธีการทดสอบด้วย ABTS ให้ฤทธิ์การต้านออกซิเดชัน ที่ค่อนข้างสูง การทดสอบด้วยวิธี FRAP สารสกัดจากผลองุ่นป่า ให้ฤทธิ์ที่ดีกว่าสารมาตรฐานวิตามินซี ปริมาณฟีนอลิก และฟลาโวนอยด์ในผลองุ่นป่า มีความ สัมพันธ์กับฤทธิ์การต้านออกซิเดชันอย่างมีนัยสำคัญ อย่างไรก็ตามงานวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่า องุ่นป่าอาจเป็นแหล่งของสารต้านอนุมูลอิสระจากธรรมชาติที่ดี ซึ่งช่วยในการเสริมสร้างสุขภาพและช่วยลดภาวะเสี่ยงในการเกิดโรคเรื้อรังต่างๆ ที่มีสาเหตุมาจากอนุมูลอิสระ หรือภาวะเครียดออกซิเดชันในมนุษย์เราได้ นอกจากนี้อาจมีความเป็นไปได้สูงที่จะนำองุ่นป่ามาประยุกต์ใช้ในด้านอาหาร โภชนาการ เภสัชกรรม และทางการแพทย์

เอกสารอ้างอิง

1. Gilbert DL. Fifty years of radical ideas, Annals of the New York Academy of Sciences 2000;899:1-14
2. Golden TR, Hinerfeld DA, Melov S. Oxidative stress and aging: Beyond correlation, Aging Cell 2002;1:117-123
3. McCarthy P, Shah AM. Oxidative stress and heart failure, Coronary Artery Disease 2003; 14:109-113
4. Valko M, Leibfritzb D, Moncola J, Croninc MTD, Mazura M, Telserd J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease, International Journal of Biochemistry & Cell Biology 2007;39:4484-4489

Mahasarakham University

มิลลิลิตร จากนั้นนำสารผสมที่ได้ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที ก่อนจะนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร โดยใช้สารละลายโทรล็อกซ์ สร้างเป็นกราฟมาตรฐาน นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาเปรียบเทียบและคำนวณหาฤทธิ์การต้านออกซิเดชั่น แสดงในหน่วยไมโครกรัมของโทรล็อกซ์ต่อผลองุ่นป่าแห้งปริมาณ 1 กรัม (µg TE/g DW)

การวิเคราะห์ทางสถิติ

การวิเคราะห์ทางสถิติโดยใช้โปรแกรมไมโครซอฟต์เอ็กเซล เวอร์ชัน 2010 สำหรับการคำนวณค่าเฉลี่ย ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน และความคลาดเคลื่อนของค่าเฉลี่ย และใช้โปรแกรม SPSS เวอร์ชัน 19 ในการคำนวณค่าความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณสารพฤกษเคมีกับฤทธิ์การต้านออกซิเดชัน

ผลและอภิปรายผล

ปริมาณสารพฤกษเคมี

ปริมาณฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์รวม ที่วัดได้จากสารสกัดผลองุ่นป่าโดยใช้ตัวทำละลายแตกต่างกัน คือ เมธานอล เอธานอล และน้ำ ให้ผลการทดลองที่แตกต่างกันอย่างชัดเจน ดังแสดงใน Table 1

Table 1 Total phenolic and total flavonoid contents in wild grape extracts.

Solvents	Total phenolics (mg GAE/g DW)	Total flavonoids (mg QE/g DW)
Methanol	222.37±0.010[a]	604.56±0.03[a]
Ethanol	176.27±0.015[b]	536.52±0.02[b]
Distilled Water	38.64±0.010[c]	75.57±0.006[c]

Superscripts with different letters are significantly different at $p < 0.05$ within the same column.

จาก Table 1 พบว่า ผลองุ่นป่าที่สกัดด้วยเมธานอล ให้ปริมาณฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์รวมสูงที่สุด คือ ปริมาณฟีนอลิก 222.37 mg GAE/g DW และฟลาโวนอยด์ 604.56 mg QE/g DW ตามด้วยเอธานอล และน้ำ ซึ่งให้ปริมาณฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ต่ำที่สุด โดยสารสกัดเมธานอลจะมีปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดสูงเป็น 1.2 และ 5.8 เท่าของสารสกัด เอธานอลและน้ำ ตามลำดับ ทั้งนี้เนื่องมาจากความมีขั้วของตัวทำละลายที่แตกต่างกัน โดยน้ำมีสภาพขั้วสูงสุด ตามด้วยเมธานอล และเอธานอล แสดงว่าฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์มีสภาพขั้วใกล้เคียงกับเมธานอล ดังนั้นเมธานอล จึงเป็นตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดผลองุ่นป่าเพื่อตรวจสอบปริมาณสารพฤกษเคมี ได้ดีที่สุด ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของSati และคณะ[21] ที่ทำการทดลองโดยสกัดใบแปะก๊วย และ Lai และคณะ[22] ที่ ทำการทดลองโดยสกัดข้าวจาปอนิกา ก็ให้ผลของตัวทำละลายในทำนองเดียวกัน โดยทั่วไปการสกัดเป็นขั้นตอนสำคัญที่จะทำให้ได้มาซึ่งสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากพืชและส่วนต่างๆ ของพืช ซึ่งปริมาณ องค์ประกอบ และความบริสุทธิ์ของสารออกฤทธิ์ที่ได้จากการสกัดนั้นขึ้นอยู่ กับโครงสร้าง หรือลักษณะเฉพาะทางเคมี รวมทั้งสภาพขั้วของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ จำนวนของตัวอย่าง และสภาวะหรือวิธีการสกัด เช่น ชนิดของตัวทำละลาย เวลา อุณหภูมิ ตลอดจนสิ่งรบกวนต่างๆ ในขั้นตอนการสกัด เป็นต้น

ฤทธิ์การต้านออกซิเดชัน

จากการตรวจสอบฤทธิ์การต้านออกซิเดชันของสารสกัดจากผลองุ่นป่า ด้วยวิธีต่างๆ คือ DPPH, FRAP, ABTS และ CUPRAC เปรียบกับสารมาตรฐานที่มีฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระ แสดงดัง Table 2 จะเห็นว่าผลองุ่นป่าที่สกัดด้วยตัวทำละลายแตกต่างกันให้ฤทธิ์การต้านออกซิเดชันที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) โดยการสกัดที่ใช้เมธานอลเป็นตัวทำละลาย

Mahasarakham University

ให้ฤทธิ์การต้านออกซิเดชันสูงที่สุดในทุกๆวิธีการทดสอบ ถัดมา คือ เอธานอล และน้ำตามลำดับ ทั้งนี้เนื่องมากจากการใช้เมธานอลเป็นตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดให้ปริมาณสารพฤกษเคมีสูงตามที่ได้อภิปรายมาแล้วทำให้สามารถออกฤทธิ์ต้านออกซิเดชันได้ดี โดยทั่วไปสารประกอบฟีนอลิกเป็นสารกลุ่มหลักในพืชที่มีบทบาทสำคัญในการต้านอนุมูลอิสระ เนื่องจากมีหมู่ ไฮดรอกซิลอยู่จำนวนมาก ทำให้สามารถเกิดปฏิกิริยา รีดอกซ์กับอนุมูลอิสระ โดยสารพอลิฟีนอลจะให้อิเล็กตรอนแก่อนุมูลอิสระ ทำให้เป็นกลาง ส่วนพอลิฟี-นอลที่เสียอิเล็กตรอนไปแล้วจะรวมตัวกันเองเกิดเป็นสารพอลิฟีนอลใหม่ที่เสถียร[23,24] โดยวิธีการทดสอบ DPPH และ ABTS จะแสดงผลเป็นค่า IC_{50} หมายถึงความเข้มข้นของสารต้านอนุมูลอิสระ ที่สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระได้ครึ่งหนึ่ง ถ้าค่าที่ได้ต่ำแสดงถึงฤทธิ์การดักจับอนุมูลอิสระที่ดี แต่ถ้าค่าที่ได้สูง แสดงถึงฤทธิ์การดักจับอนุมูลอิสระที่ไม่ดี จากการทดลองเปรียบเทียบระหว่างสารสกัดกับสารมาตรฐานที่มีฤทธิ์การต้านออกซิเดชันได้ดี คือ โทรล็อกซ์ กับวิตามินซี พบว่า สารสกัดจากองุ่นป่า โดยเฉพาะที่สกัดด้วย เมธานอล ยังให้ฤทธิ์การต้านออกซิเดชันที่น้อยกว่าสารมาตรฐาน ซึ่งจากงานวิจัยก่อนหน้านี้ พบว่า ความมีขั้วของตัวทำละลายและชนิดของสารต้านออกซิเดชันที่แตกต่างกันจะมีผลต่อประสิทธิภาพของการสกัดและฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของสารสกัดที่ได้[25,26] อย่างไรก็ตาม การใช้สารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์อาจเป็นอันตรายต่อร่างกายของมนุษย์ เมื่อได้รับในปริมาณที่มากเกินไป หรืออาจมีการสะสมภายในร่างกายในระยะยาวส่งผลทำให้เกิดโรคต่างๆ ตามมาได้ เช่น โรคมะเร็ง ตับ และความดันโลหิตสูง[27] เป็นต้น

Table 2 Antioxidation activity of wild grape fruit extracts by DPPH, $ABTS^{+\cdot}$, FRAP and CUPRAC assays.

Extracts	DPPH· IC_{50} (μg/mL)	$ABTS^{+\cdot}$ IC_{50} (μg/mL)	FRAP (mM $FeSO_4$/g DW)	CUPRAC (μg TE/g DW)
Methanolic	13.836 ± 0.102^{c}	6.321 ± 0.062^{c}	3.50 ± 0.014^{b}	1065.0 ± 0.01^{a}
Ethanolic	21.051 ± 0.639^{b}	9.454 ± 0.311^{b}	2.53 ± 0.004^{c}	625.0 ± 0.02^{b}
Distilled water	85.182 ± 2.866^{a}	52.248 ± 0.105^{a}	0.403 ± 0.006^{e}	84.6 ± 0.01^{c}
Trolox	4.039 ± 0.064^{d}	4.260 ± 0.082^{d}	6.07 ± 0.027^{a}	-
Vitamin C	2.629 ± 0.034^{e}	2.368 ± 0.035^{e}	1.93 ± 0.018^{d}	-

Superscripts with different letters are significantly different at $p < 0.05$ within the same column.

Mahasarakham University

Table 3 The correlation coefficient (r) values of phytochemicals and antioxidant activity regression analysis.

Assay	TPC (mg GAE/g DW)	TFC (mg QE/g DW)	DPPH IC_{50} (μ g/mL)	ABTS IC_{50} (μ g/mL)	FRAP (mM $FeSO_4$/g DW)	CUPRAC (μg TE/g DW)
TPC (mg GAE/g DW)	1	0.992	0.758	0.973	0.998*	0.976
TFC (mg QE/g DW)	0.992	1	0.671	0.937	0.982	0.941
DPPH IC_{50} (μg/mL)	0.758	0.671	1	0.888	0.800	0.882
ABTS IC_{50} (μg/mL)	0.973	0.937	0.888	1	0.986	1.000**
FRAP (mM $FeSO_4$/g DW)	0.998*	0.982	0.800	0.986	1	0.988
CUPRAC (μg TE/g DW)	0.976	0.941	0.882	1.000**	0.988	1

*Correlation is significant at the 0.05 level (2-tailed).

**Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed)

Mahasarakham University

ส่วนวิธี FRAP และ CUPRAC เป็นวิธีการทดสอบฤทธิ์การต้านออกซิเดชันอีกวิธีหนึ่ง โดยไอออนของโลหะ จะทำหน้าที่เป็นอนุมูลอิสระ และพอลิฟีนอลจะไปยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของโลหะ ที่เรียกว่าปฏิกิริยาเฟนตัน (Fenton reaction)[26] จากผลการทดสอบ พบว่าสารสกัดผลองุ่นป่าที่ใช้ เมธานอล และ เอธานอล เป็นตัวทำละลาย สามารถรีดิวไอออนของโลหะได้ดีกว่าวิตามินซีซึ่งเป็นสารมาตรฐาน

ความสัมพันธ์ของปริมาณสารพฤกษเคมีกับฤทธิ์การต้านออกซิเดชัน

จากการศึกษาถึงความสัมพันธ์ของปริมาณสาร พฤกษเคมีในผลองุ่นป่าต่อฤทธิ์การต้านออกซิเดชันแสดงค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ดัง Table 3 พบว่าปริมาณฟีนอลิกและ ฟลาโวนอยด์มีความสัมพันธ์กับฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระทุกๆ วิธีการทดสอบ โดยค่าสหสัมพันธ์ระหว่างวิธี FRAP กับ ปริมาณฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ คือ 0.998 และ 0.982 ตามลำดับ ค่าสหสัมพันธ์ระหว่างวิธี ABTS กับ ปริมาณฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ คือ 0.973 และ 0.937 ตามลำดับ ค่าสหสัมพันธ์ระหว่างวิธี CUPRAC กับ ปริมาณฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ คือ 0.976 และ 0.941 ตามลำดับ และค่าสหสัมพันธ์ระหว่างวิธี DPPH กับ ปริมาณของ ฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ คือ 0.758 และ 0.671 ตามลำดับ ซึ่งข้อมูลที่ได้มีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์กันในเชิงบวก ข้อมูลที่ได้เชื่อมโยงกับงานวิจัยก่อนหน้านี้[28-30] พบว่าปริมาณสารประกอบฟีนอลิกมีบทบาทสำคัญต่อฤทธิ์การต้านออกซิเดชัน เมื่อปริมาณของ ฟี-นอลิก หรือ ปริมาณฟลาโวนอยด์เพิ่มขึ้น จะส่งผลให้ประสิทธิภาพในการต้านออกซิเดชันเพิ่มสูงขึ้นด้วย

สรุปผล

จากการศึกษางานวิจัยนี้สามารถสรุปได้ว่าตัวทำละลายที่เหมาะสมในการสกัดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของ ผลองุ่นป่าคือ เมธานอล ที่ให้ปริมาณสารพฤกษเคมี ที่สูงที่สุดและฤทธิ์การต้านออกซิเดชันที่สูงที่สุดด้วยเช่นกัน เมื่อเทียบกับสารมาตรฐานโทรล็อกและ วิตามินซี พบว่าสารสกัดจากผลองุ่นป่าให้ฤทธิ์การต้านออกซิเดชันที่ใกล้เคียงกับสารมาตรฐาน และในวิธีการทดสอบด้วย ABTS ให้ฤทธิ์การต้านออกซิเดชัน ที่ค่อนข้างสูง การทดสอบด้วยวิธี FRAP สารสกัดจากผลองุ่นป่า ให้ฤทธิ์ที่ดีกว่าสารมาตรฐานวิตามินซี ปริมาณฟีนอลิก และฟลาโวนอยด์ในผลองุ่นป่า มีความ สัมพันธ์กับฤทธิ์การต้านออกซิเดชันอย่างมีนัยสำคัญ อย่างไรก็ตามงานวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่า องุ่นป่าอาจเป็นแหล่งของสารต้านอนุมูลอิสระจากธรรมชาติที่ดี ซึ่งช่วยในการเสริมสร้างสุขภาพและช่วยลดภาวะเสี่ยงในการเกิดโรคเรื้อรังต่างๆ ที่มีสาเหตุมาจากอนุมูลอิสระ หรือภาวะเครียดออกซิเดชันในมนุษย์เราได้ นอกจากนี้อาจมีความเป็นไปได้สูงที่จะนำองุ่นป่ามาประยุกต์ใช้ในด้านอาหาร โภชนาการ เภสัชกรรม และทางการแพทย์

เอกสารอ้างอิง

1. Gilbert DL. Fifty years of radical ideas, Annals of the New York Academy of Sciences 2000;899:1-14
2. Golden TR, Hinerfeld DA, Melov S. Oxidative stress and aging: Beyond correlation, Aging Cell 2002;1:117-123
3. McCarthy P, Shah AM. Oxidative stress and heart failure, Coronary Artery Disease 2003; 14:109-113
4. Valko M, Leibfritzb D, Moncola J, Croninc MTD, Mazura M, Telserd J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease, International Journal of Biochemistry & Cell Biology 2007;39:4484-4489

Mahasarakham University

BIOGRAPHY

Mahasarakham University

BIOGRAPHY

Name	Miss Surisa Srisuwan
Date of birth	July 09, 1987
Place of birth	Chumphon, Thailand
Institutions attended	
2011	Srinakharinwirot University: Bachelor of Science (Science-Chemistry; B.Ed)
2015	Mahasarakham University: Master of Science degree (Chemistry Education; M.Sc)
Position and work place	
	Teacher, Benchamatheputit Phetchaburi School, Phetchaburi, Thailand
Contact address	
	143 Moo 1, Tambon Salui, Thasea District, Chumphon, 86140 Thailand. Tel: 098-5845190 E-mail: surisasrisuwan@gmail.com

Research output

Srisuwan, S., Thonpho, A. and Srihanam, P. (2014). Wild grape (*Ampelocissus martinii* Planch.) fruit extracts: Phytochemical and antioxidant activities. *Journal of Science and Technology Mahasarakham University Research Conference Special*, 373-382.