

Thesis Title	Capacity Prediction and Identification of Antioxidative Compounds in Thai Indigenous Vegetables	
Author	Mr. Trakul Prommajak	
Degree	Doctor of Philosophy (Food Science and Technology)	
Advisory Committee	Asst. Prof. Dr. Suthat Surawang	Advisor
	Prof. Emeritus Dr. Nithiya Rattanapanone	Co-advisor
	Asst. Prof. Dr. Noppol Leksawasdi	Co-advisor

ABSTRACT

Thirty three Thai indigenous vegetables were extracted in 60% aqueous ethanol at the ratio of 1 g fresh vegetable per 5 ml solvent. Antioxidant capacities of the extracts determined by 4 methods, including 2,2'-azinobis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt (ABTS) assay, 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) assay, ferric reducing antioxidant capacity (FRAP) assay and Folin-Ciocalteu reducing capacity (FCRC) assay, were 5.64-247.83 mmol TE/100 g DW, 0.79-310.15 mmol TE/100 g DW, 4.41-306.13 mmol TE/100 g DW and 0.81-19.95 g GAE/100 g DW, respectively. Antioxidant capacities obtained by 4 assays had significant positive correlation with correlation coefficient more than 0.98. The vegetables can be categorized into 3 groups based on their antioxidant capacity. The group with high antioxidant capacity included young leaves of white fig, Thai olive and mango cv. 'Talapnak', 'Chok Anan' and 'Nam Dok Mai'.

Infrared (IR) and proton nuclear magnetic resonance (^1H NMR) spectra were acquired from freeze-dried vegetable extracts. Full IR spectra and integrated data of NMR peaks were used as explanatory variables, while antioxidant capacities were used as response variables in partial least square regression (PLSR). The models obtained from IR-PLSR were adequate to predict the antioxidant capacity of

vegetable extracts. Coefficients of determination (R^2) were more than 0.97 for calibration models and more than 0.89 for cross-validation models. However, the model obtained from NMR-PLSR was less predictable, with R^2 more than 0.82 for calibration models and more than 0.52 for validation models. The effect of functional groups on antioxidant capacity was determined by regression coefficients of PLSR models with wavenumber in IR and chemical shift in NMR. It was found that aromatic ring and hydroxyl group of phenolic compounds were responsible for antioxidant activity of the vegetable extracts.

Simultaneous determination of antioxidants in the 33 vegetables extracts was performed by high-performance liquid chromatography (HPLC) in combination with ABTS assay, which quantified antioxidant capacity of separated compounds. The HPLC coupled with mass spectrometer (MS) was used for identification of chemical composition of the molecules. Major antioxidants in the extracts can be classified into 6 groups: hydroxycinnamic acids, hydroxybenzoic acids, flavonoids, xanthenes, benzophenones and hydroxycoumarin. Hydroxycinnamic acids and flavonoids were found in most vegetables. The 3-caffeoylquinic acid in young leaf of white fig had the highest antioxidant capacity. In flavonoids group, quercetin derivatives were mostly found. Xanthenes and benzophenones were major antioxidants in young leaves of 3 mango cultivars.

Box-Behnken design was used to investigate the effect of ultrasonic frequency (30-170 kHz), extraction time (15-45 min) and ethanol concentration (20-80%) on ultrasonic-assisted extraction of 3- and 5-caffeoylquinic acids from dried young leaf of white fig. It was found that the yield of antioxidants increased with the lower ultrasonic frequency and longer extraction time. The optimal condition was extraction with an ethanol concentration of 80% under ultrasonic frequency of 35 kHz for 45 min, which resulted in 38.34 and 36.37 mg/g DW of 3- and 5-caffeoylquinic acids, respectively.

หัวข้อวิทยานิพนธ์

การทํานายความสามารถและการบ่งชี้สารต้านออกซิเดชัน
ในผักพื้นบ้านของไทย

ผู้เขียน

นายตระกูล พรหมจักร

ปริญญา

วิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต
(วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร)

คณะกรรมการที่ปรึกษา

ผศ. ดร. สุทัศน์ สุระวัง อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก
ศ. เกียรติคุณ ดร. นิธิยา รัตนานนท์ อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
ผศ. ดร. นพพล เล็กสวัสดิ์ อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

บทคัดย่อ

ผักพื้นบ้านของไทย 33 ชนิดที่สกัดด้วยสารละลายเอทานอลความเข้มข้น 60% ในอัตราส่วนผักสด 1 กรัมต่อตัวทำละลาย 5 มิลลิลิตร เมื่อนำสารสกัดมาวัดความสามารถในการต้านออกซิเดชัน 4 วิธี ได้แก่ วิธีเกลือแอมโมเนียมของกรด 2,2'-อะซิโนบิส (3-เอทิลเบนโซไทอะโซลีน-6-ซัลโฟนิค) (ABTS) วิธี 1,1-ไดฟีนิล-2-พิกริลไฮดราซิล (DPPH) วิธีความสามารถในการรีดิวซ์เฟอร์ริก (FRAP) และวิธีความสามารถในการรีดิวซ์ฟูลิโน-ซีโอแคลเทีย (FCRC) พบว่ามีค่าเท่ากับ 5.64-247.83 มิลลิโมลสมมูลโทรลอกซ์ต่อ 100 กรัมน้ำหนักแห้ง, 0.79-310.15 มิลลิโมลสมมูลโทรลอกซ์ต่อ 100 กรัมน้ำหนักแห้ง, 4.41-306.13 มิลลิโมลสมมูลโทรลอกซ์ต่อ 100 กรัมน้ำหนักแห้ง และ 0.81-19.95 กรัมสมมูลกรดแกลลิกต่อ 100 กรัมน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ ค่าการต้านออกซิเดชันที่วิเคราะห์ได้จากทั้ง 4 วิธีสอดคล้องไปในทิศทางเดียวกันอย่างมีนัยสำคัญและมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์มากกว่า 0.98 ผักทั้ง 33 ชนิดแบ่งออกได้เป็น 3 กลุ่มตามความสามารถในการต้านออกซิเดชัน กลุ่มที่มีความสามารถในการต้านออกซิเดชันสูงประกอบด้วยใบอ่อนของผักเสี้ยน มะกอกไทย มะม่วงพันธุ์ตลับนาค โชคอนันต์ และน้ำดอกไม้มะนาว

เมื่อนำสารสกัดที่ได้ไปทำห้ำแบบแซ่เยือกแข็งและนำไปวัดสเปกตรัมอินฟราเรด (IR) และโปรตอนนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์ (^1H NMR) จากนั้นนำค่าสเปกตรัมทั้งหมดในช่วง IR และค่าอินทิเกรตของพีค NMR มาใช้เป็นตัวแปรต้น และใช้ค่าความสามารถในการต้านออกซิเดชันเป็นตัวแปรตามในการสร้างแบบจำลองพาร์เซียลลีสต์สแควร์รีเกรสชัน (PLSR) พบว่าแบบจำลองที่

ได้จาก IR-PLSR มีประสิทธิภาพในการทำนายความสามารถในการต้านออกซิเดชันของผักพื้นบ้าน โดยมีค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (R^2) ของแบบจำลองมาตรฐานมากกว่า 0.97 และของแบบจำลองยืนยันความถูกต้องมากกว่า 0.89 อย่างไรก็ตาม แบบจำลองที่ได้จาก NMR-PLSR มีประสิทธิภาพในการทำนายการต้านออกซิเดชันน้อยกว่า โดยมีค่า R^2 ของแบบจำลองมาตรฐานมากกว่า 0.82 และของแบบจำลองยืนยันความถูกต้องมากกว่า 0.52 เมื่อนำค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ของแบบจำลอง PLSR ร่วมกับเลขคลื่นจาก IR และตำแหน่งการเลื่อนทางเคมีจาก NMR ไปบ่งชี้หมู่ฟังก์ชันที่มีผลเชิงบวกต่อความสามารถในการต้านออกซิเดชัน พบว่าวงแหวนเอโรแมติกและหมู่ไฮดรอกซิลในสารประกอบฟีนอลมีบทบาทสำคัญต่อการต้านออกซิเดชันของสารสกัดจากผักพื้นบ้าน

เมื่อนำสารสกัดจากผักสดมาบ่งชี้ชนิดของสารต้านออกซิเดชันโดยใช้เทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC) ร่วมกับการวัดความสามารถในการต้านออกซิเดชันของสารที่แยกได้ด้วยวิธี ABTS แบบต่อเนื่อง และบ่งชี้องค์ประกอบโมเลกุลของสารด้วย HPLC-MS พบว่าสารต้านออกซิเดชันหลักที่แยกได้แบ่งออกเป็น 6 กลุ่ม ได้แก่ กรดไฮดรอกซีซินนามิก กรดไฮดรอกซีเบนโซอิก ฟลาโวนอยด์ แชนโทน เบนโซฟีโนน และไฮดรอกซีคูมาริน โดยสารกลุ่มกรดไฮดรอกซีซินนามิกและฟลาโวนอยด์พบในผักเกือบทุกชนิด สารที่มีความสามารถในการต้านออกซิเดชันมากที่สุดคือ กรด 3-แคลฟีโอดิควินิกที่พบในใบอ่อนของผักเห็ด ผลาโวนอยด์ที่พบมากเป็นอนุพันธ์ของเคอร์ซีทิน สำหรับแชนโทนและเบนโซฟีโนนเป็นสารต้านออกซิเดชันหลักในใบอ่อนของมะม่วงทั้ง 3 พันธุ์

เมื่อวางแผนการทดลองแบบบอซซ์-เบนเคนเพื่อศึกษาผลของความถี่ของคลื่นอัลตราโซนิก (35-170 กิโลเฮิร์ตซ์) ระยะเวลาในการสกัด (15-45 นาที) และความเข้มข้นของเอทานอล (20-80%) ต่อการสกัดกรด 3- และ 5-แคลฟีโอดิควินิกจากใบอ่อนของผักเห็ดอบแห้งโดยใช้คลื่นอัลตราโซนิกเพื่อช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการสกัด พบว่าปริมาณสารต้านออกซิเดชันเพิ่มมากขึ้นเมื่อความถี่ของคลื่นอัลตราโซนิกลดลงและระยะเวลาในการสกัดนานขึ้น สภาวะที่เหมาะสมในการสกัดคือการสกัดด้วยสารละลายเอทานอลความเข้มข้น 80% ภายใต้อัลตราโซนิกความถี่ 35 กิโลเฮิร์ตซ์ เป็นเวลา 45 นาที ซึ่งได้ปริมาณของกรด 3- และ 5-แคลฟีโอดิควินิก 38.34 และ 36.37 มิลลิกรัมต่อกรัมผักอบแห้ง ตามลำดับ