

<b>Thesis Title</b>	Antioxidative Activity of Polyphenolic Compounds Extracted from Seed Coat of <i>Tamarindus indica</i> Linn.	
<b>Author</b>	Miss Ganniga Pumthong	
<b>Master of Science</b>	Biochemistry	
<b>Examining Committee</b>	Maitree Suttajit, Ph.D.	Chairman
	Prapon Wilairat, Ph.D.	Member
	Porn-ngarm Limtrakul, Ph.D.	Member
	Ratana Banjerdpongchai, M.D., Ph.D.	Member

#### Abstract

At the present, antioxidant is one of health supplement compound that is derived from nature and used for health. Screening tests have shown that antioxidant is mostly obtained from seeds of plants and seed coat of *tamarindus indica* Linn. with particular astringent taste contains compounds with high antioxidative activity. In this study, it was aimed to determine biochemical properties of polyphenolic compounds in tamarind seed. The coat parts of tamarind seeds were extracted with 70% ethanol followed by chloroform and the remaining extract of aqueous fraction was collected. The extract was dried and completely dissolved in methanol and this solution was used in following experiments. Chemical analysis as well as UV absorption and IR spectra of the extract compared with oligomeric proanthocyanidin (OPC), commercially extracted from pine barks and grape seeds, showed similar results indicating that the extract of tamarind seed coat contained polyphenolic compounds, so-called OPC. TLC chromatogram demonstrated that the extract contained at least six components. The extract had no peroxidase inhibitory effect and showed potent antioxidant scavenging activity against peroxy radicals generated by ABTS/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/peroxidase and ABTS/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/metmyoglobin systems, against hydroxyl radicals produced by ABTS/ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/ FeCl<sub>3</sub> (Fenton reaction) and superoxide anions generated by hypoxanthine-xanthine oxidase (neotetrazolium) system. Antioxidant mechanism of the extract partially resembled curcumin playing a

role as an iron-chelator and acted as a scavenger against free radical but quite differed from that of vitamin E, Trolox and vitamin C. In addition, the effect of the tamarind seed-coat extract against oxidative damage of erythrocyte membrane generated by tert-Butylperoxide and  $\text{FeCl}_3$ , was measured by determining malondialdehyde (MDA). It was found that the extract could effectively prevent lipid peroxidation in a dose dependent manner. The extract could also protect  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase in red blood cell membrane from oxygen free radical damage. In conclusion, tamarind seed coat contains high amount of polyphenolic compounds which exhibit strong antioxidative activity. The main active antioxidant isolated was chemically proved to be oligomeric proanthocyanidins which function as a scavenger against peroxy radicals, hydroxyl radicals and superoxide anions *in vitro*. It also acts as a protective agent against lipid peroxidation and oxidative damage of  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase in red blood cell membrane.

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์	ฤทธิ์แอนติออกซิแดนซ์ของสารโพลีฟีนอลที่สกัดจากเปลือก หุ้มเมล็ดมะขาม	
ชื่อผู้เขียน	นางสาว กรรณิการ์ พุ่มทอง	
วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต	สาขาวิชาชีวเคมี	
คณะกรรมการการสอบวิทยานิพนธ์	รศ. ดร. ไมตรี สุทธิจิตต์	ประธานกรรมการ
	ศ. ดร. ประพนธ์ วิไลรัตน์	กรรมการ
	รศ. ดร. พวงาม ล้อมตระกูล	กรรมการ
	ดร. พญ. รัตนา บรรเจิดพงศ์ชัย	กรรมการ

### บทคัดย่อ

ในปัจจุบันนี้มีการพัฒนาสารธรรมชาติมาเป็นผลิตภัณฑ์เสริมสุขภาพกันมากขึ้น และแอนติออกซิแดนซ์ ก็เป็นสารเสริมสุขภาพชนิดหนึ่ง จากการศึกษาเบื้องต้นพบว่า สารที่มีฤทธิ์เป็นแอนติออกซิแดนซ์มักจะมีพบในส่วนเมล็ดของพืช และผลของการศึกษาพบว่าเมล็ดมะขาม (*Tamarindus indica* Linn) มีสารที่มีคุณสมบัติเป็นแอนติออกซิแดนซ์สูงมาก และโดยเฉพาะเปลือกหุ้มเมล็ดซึ่งเป็นส่วนที่มีรสฝาด ในการทดลองนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อตรวจสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีของสารโพลีฟีนอลที่สกัดจากเมล็ดมะขาม โดยผู้วิจัยได้นำเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามมาสกัดด้วย 70% เอทานอลตามด้วยคอลโรฟอร์ม และเก็บส่วนของสารสกัดที่ละลายอยู่ในน้ำ หลังจากนั้นทำให้แห้งซึ่งพบว่าสารสกัดนี้จะละลายได้ดีในเมทานอล สารละลายที่ได้จะถูกนำไปใช้ในการทดลองอื่นๆต่อไป เนื่องจากผลการทดสอบคุณสมบัติทางเคมีที่จำเพาะต่อสารในกลุ่มแทนนินชนิดรวมตัวแน่น (condensed tannin) และ ผลของ spectra จากการตรวจวัดการดูดกลืนแสงในช่วงแสงยูวี (UV) และ IR ผลเปรียบเทียบกับสารสกัดโพลิโกเมอริค โพรแอนโทไซยานิดิน (โอฟีซี) ที่สกัดได้จากเปลือกต้นสนและจากเมล็ดองุ่น พบว่าให้ผลการทดสอบที่เหมือนกัน ซึ่งแสดงว่าเป็นสารสกัดที่ได้จากเมล็ดมะขามนี้มีสารที่เรียกว่าโอฟีซีอยู่ ซึ่งเป็นสารโพลีฟีนอลในกลุ่มแทนนินชนิดรวมตัวแน่น (condensed tannin) อีกทั้งยังพบว่าสารสกัดประกอบด้วยสารอย่างน้อย 6 ชนิดรวมกันเมื่อแยกด้วยTLC และเมื่อทดสอบความสามารถในการต่อต้านสารอนุมูลอิสระออกซิเจนพบว่า สารสกัดไม่มีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส แต่มีฤทธิ์ในการเป็นแอนติออกซิแดนซ์ที่ยับยั้งการทำงานของอนุมูลอิสระออกซิเจนชนิดเปอร์ออกซิล ในปฏิกิริยาของ ABTS/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/ Peroxidase และ ABTS/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/metmyoglobin และยับยั้งการทำงานของอนุมูลอิสระไฮดรอกซิล ในปฏิกิริยา

ของ ABTS/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/FeCl<sub>3</sub> (Fenton reaction) และรวมทั้งซูเปอร์ออกไซด์แอนไอออน ในปฏิกิริยาของ hypoxanthine-xanthine oxidase (neotetrazolium) กลไกการออกฤทธิ์ของสารสกัดที่ยับยั้งการทำงานของสารอนุมูลอิสระ จะมีบางส่วนคล้ายกับเคอร์คิวมิน คือในแง่ของการเป็นสารที่สามารถจับอิออนเหล็ก (iron-chelator) และทำหน้าที่จับกับสารอนุมูลอิสระโดยตรง แต่ค่อนข้างแตกต่างกับการทำงานของวิตามินอี ไทรลอกซ์ (Trolox) และวิตามินซี นอกจากนี้ในการศึกษาผลของสารสกัดต่อการป้องกันความเสียหายต่อเยื่อหุ้มเซลล์เม็ดเลือดแดงในระบบที่มีการสร้างสารอนุมูลอิสระโดยปฏิกิริยา tert-butylperoxide และเพอร์ออกไซด์ และการตรวจวัดปริมาณของมาลดอนไดอัลดีไฮด์ (MDA) พบว่าสารสกัดมีความสามารถป้องกันการเกิด ลิปิดเปอร์ออกซิเดชัน โดยยับยั้งการเกิด MDA แบบแปรผันตามความเข้มข้น และสามารถป้องกันการทำลาย Ca<sup>2+</sup>-ATPase ในเยื่อหุ้มเซลล์เม็ดเลือดแดงด้วยสารอนุมูลอิสระออกซิเจน สรุปได้ว่าเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามมีสารโพลีฟีนอลซึ่งได้รับการพิสูจน์ทางเคมีว่าเป็นโพลิโกเมอริค โพรแอนโทไซยานิดิน ซึ่งมีฤทธิ์ต่อต้านอนุมูลอิสระชนิดเปอร์ออกซิด ไฮดรอกซิด และซูเปอร์ออกไซด์ในหลอดทดลองได้อย่างมีประสิทธิภาพ และสามารถป้องกันปฏิกิริยาลิปิดเปอร์ออกซิเดชัน และการทำลายเอนไซม์ทำลาย Ca<sup>2+</sup>-ATPase ในเมมเบรนของเม็ดเลือดแดงจากอนุมูลอิสระออกซิเจนได้