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.

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 และใช้เป็นยาพื้นบ้านรักษาโรคผิวและแก้อาการบวม 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

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) ผลงุ่นป่า เตรียมโดยการเก็บผลสุกที่มีสีม่วงแดงจากจังหวัดร้อยเอ็ด ประเทศไทย ในช่วงเดือนกรกฎาคม พ.ศ. 2556 แล้วนำมาอบที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน เพื่อให้มีความชื้นเหลืออยู่น้อยกว่า 5 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นนำไปบดให้ละเอียดและเก็บไว้ที่ภาชนะผิดผนึก

วิธีการทดลอง

การสกัดสารพฤกษเคมี

ชั่งผงงุ่นป่าแห้งที่บดละเอียดแล้วปริมาณ 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% ของน้ำหนักงุ่นป่าที่ชั่งมาในตอนเริ่มต้น 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 ปริมาณที่ได้แสดงในหน่วยมิลลิกรัมของกรดแกลลิกต่อผลงุ่นป่าแห้งปริมาณ 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 มิลลิกรัมของเควอซิทินต่อผลงุ่นป่าแห้งปริมาณ 1 กรัม (mg QE/gDW)

การตรวจสอบฤทธิ์การต้านออกซิเดชันด้วยวิธี DPPH

การตรวจสอบฤทธิ์การต้านออกซิเดชันด้วยวิธี DPPH ทำตามวิธี Thaipong และคณะ[16]

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) ซัลเฟตต่อผลอุ่นป่าแห้งปริมาณ 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-ล็อกซ์ต่อผลอุ่นป่าแห้งปริมาณ 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

มิลลิลิตร จากนั้นนำสารผสมที่ได้ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที ก่อนจะนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร โดยใช้สารละลายโทรล็อกซ์ สร้างเป็นกราฟมาตรฐาน นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาเปรียบเทียบและคำนวณหาฤทธิ์การต้านออกซิเดชั้น 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

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	$DPPH^{\cdot}$ 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.

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} (μg/mL)	$ABTS^{+}$ IC_{50} (μg/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)

.

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

ความสัมพันธ์ของปริมาณสารพฤกษเคมีกับฤทธิ์การต้านออกซิเดชัน

จากการศึกษาถึงความสัมพันธ์ของปริมาณสาร พฤกษเคมีในผลงุ่นป่าต่อฤทธิ์การต้านออกซิเดชันแสดงค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ดัง 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 ผลงุ่นป่าคือ เมธานอล ที่ให้ปริมาณสารพฤกษเคมี ที่สูงที่สุดและฤทธิ์การต้านออกซิเดชันที่สูงที่สุดด้วยเช่นกัน เมื่อเทียบกับสารมาตรฐานโทรล็อกและ วิตามินซี พบว่าสารสกัดจากผลงุ่นป่าให้ฤทธิ์การต้านออกซิเดชันที่ใกล้เคียงกับสารมาตรฐาน และในวิธีการทดสอบด้วย ABTS ให้ฤทธิ์การต้านออกซิเดชัน ที่ค่อนข้างสูง การทดสอบด้วยวิธี FRAP สารสกัดจากผลงุ่นป่า ให้ฤทธิ์ที่ดีกว่าสารมาตรฐานวิตามินซี ปริมาณฟีนอลิก และฟลาโวนอยด์ในผลงุ่นป่า มีความสัมพันธ์กับฤทธิ์การต้านออกซิเดชันอย่างมีนัยสำคัญ อย่างไรก็ตามงานวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่า งุ่นป่าอาจเป็นแหล่งของสารต้านอนุมูลอิสระจากธรรมชาติที่ดี ซึ่งช่วยในการเสริมสร้างสุขภาพและช่วยลดภาวะเสี่ยงในการเกิดโรคเรื้อรังต่างๆ ที่มีสาเหตุมาจากอนุมูลอิสระ หรือภาวะเครียดออกซิเดชันในมนุษย์เราได้ นอกจากนี้อาจมีความเป็นไปได้สูงที่จะนำงุ่นป่ามาประยุกต์ใช้ในด้านอาหาร 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

5. Pham-Huy LA, He H, Pham-Huvc C. Free radicals, antioxidants in disease and health, International Journal of Biomedical Science 2008;4:89-96
6. Hwang H, Chen T, Nines RG, Shin HC, Stoner GD. Photochemoprevention of UVB- induced skin carcinogenesis in SKH-1 mice by brown algae polyphenols, Internationnal Journal of Cancer 2006;119:2742-2749
7. Fang YZ, Yang S, Wu D. Free radicals and nutrition, Nutrition 2002;18:872-879
8. Cliff MA, King MC, Schlosser J. Anthocyanin, phenolic composition, colour measurement and sensory analysis of BC commercial red wines, Food Research International 2007;40: 92–100
9. Pezzuto JM. Grapes and human health: A perspective, Journal of Agricultural and Food Chemistry 2008;56:6777–6784
10. Alghazeer R, El-Saltain H, Saleh N, Al-Najjar A, Hebail F. Antioxidant and antibacterial properties of five medicinal Libyan plants extracts, Natural Science 2012;4:324-335
11. Yang J, Martinson TE, Liu RH. Phytochemical profiles and antioxidant activities of wine grapes, Food Chemistry 2009;116:332-339
12. Atanassova M, Georieva S, Ivancheva K. Tatal phenolic and flavonoid contents antioxi- dant capacity and biological contaminants medicinal herbs, Journal of the University of Chemical Technology and Metallurgy 2011;46: 81-88
13. 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
14. Škerget M, Kotnik P, Hadolin M, Hraš AR, Simonic M, Knez Ž. Phenols, proanthocya- nidins, flavones and flavonols in some plant materials and their antioxidant activities, Food Chemistry 2005;89:191–198
15. Zhishen J, Mengcheng T, Jianming W. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals, Food Chemistry 1999;64:555–559
16. Thaipong K, Boonprakob U, Crosby K, Cisneros-Zevallos L, Byrne DH. Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts, Journal of Food Composition and Analysis 2006;19:669–675
17. Benzie IFF, Szeto YT. Total antioxidant capacity of teas by the ferric derucing/ antioxidant power assay. Agricultural and Food Chemistry, 1999;47:633-636
18. Zuleata A, Esteve MJ, Frigola A. ORAC and TEAC assay comparison to measure the antioxidant capacity of food products, Food Chemistry 2009;114:310-316
19. Berg R, Haenen G, Berg H, Bast A. Applica- bility of an improved Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) assay for evalua- tion of antioxidant capacity measurements of mixtures, Food Chemistry 1999;66:511-517

20. Apak K, Güçlü M, Özyürek SE, Karademir J. Karademir. Agricultural and Food Chemistry, 2004;52:7970-7981
21. Sati P, Pandey A, Rawat S, Rani A. Phytochemicals and antioxidants in leaf extracts of *Ginkgo biloba* with reference to location, seasonal variation and solvent system, Journal of Pharmacy research 2013;7:804-809
22. Lai P, Li KY, Lu S, Chen H. Phytochemical and antioxidant properties of solvent extracts from *Japonica* rice bran, Food Chemistry 2009;117:538-544
23. Tsao R. Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols, Nutrients 2010;2:1231–1246
24. Visioli F, Lastra CA, Andres-Lacueva C, Aviram M, Calhau C, Cassano A. Polyphenols and human health: a prospectus, Critical Reviews in Food Science and Nutrition 2011; 51:524–46
25. Lafka TI, Sinanoglou V, Lazos ES. On the extraction and antioxidant activity of phenolic compounds from winery wastes, Food Chemis- try 2007;104:1206-1214
26. Pinelo M, Rubilar M, Jerez M, Sineiro J, Núñez MJ. Effect of solvent, temperature, and solvent-to solid ratio on the total phenolic content and antiradical activity of extracts from different components of grape pomace, Journal of Agricultural and Food Chemistry 2005;53:2111–2117
27. Pokorny J, Yanishlieva N, Gordon M. Antioxidants in food: practical applications, New York: CRC Press 2001;47:380-388
28. Abu Bakar MF, Mohamed M, Rahmat A, Fry J. Phytochemicals and antioxidant activity of different parts of bambangan (*Mangiferapa- jang*) and tarap (*Artocarpusodo ratissimus*), Food Chemistry 2009;113:479–483
29. Butsat S, Weerapreeyakul N, Siriamornpun S. Changes in phenolic acids and antioxidant activity in Thai rice husk at five growth stages during grain development, Journal of Agricultural and Food Chemistry 2009;57: 4566-457
30. Rice-Evans CA, Miller NT, Paganga G. Antioxidant properties of phenolic compounds, Trends in Plant Science 1997;4:304-330