ปริมาณสารพฤกษเคมีและฤทธิ์ต้านออกซิเดชันจากส่วนที่แตกต่างกันขององุ่นป่า (*Ampelocissus martini* Planch.)

Phytochemicals contents and antioxidation activity from different parts of wild grape (*Ampelocissus martini* Planch.) extracts

สุภัคศิริ คำก้อน,[1] ประสงค์ สีหานาม,[2] อัณศยา ท่อนโพธิ์[3*]
Supaksiri Khamgon,[1] Prasong Srihanam,[2] Ansaya Thonpho[3*]

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์ของงานวิจัย คือ เพื่อตรวจสอบปริมาณฟีนอลิกรวม ฟลาโวนอยด์รวม ซาโปนินรวม และแอนโธไซยานินรวม และฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของสารสกัดจากใบ ก้าน และลำต้นขององุ่นป่า (*Ampelocissus martinii* Planch.) รวมทั้งหาความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณสารพฤกษเคมีและฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของสารสกัด ผลการทดลองพบว่า สารสกัดจากใบองุ่นป่ามีปริมาณฟีนอลิก ฟลาโวนอยด์ และซาโปนินรวมสูงสุด ในขณะที่ สารสกัดจากก้านพบปริมาณแอนโธไซยานินรวมสูงสุด เมื่อทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชันด้วยวิธีการขจัดอนุมูลอิสระดีพีพีเอช และเอบีทีเอส พบว่าสารสกัดจากใบองุ่นป่า มีค่า IC_{50} ต่ำกว่าสารสกัดจากส่วนอื่นๆ แสดงว่ามีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันสูงสุด ซึ่งได้ผลคล้ายกันกับเมื่อตรวจสอบด้วยวิธีความสามารถในการรีดิวซ์โลหะเหล็ก (FRAP) และทองแดง (CUPRAC) ปริมาณสารพฤกษเคมีส่วนใหญ่มีความสัมพันธ์เชิงบวกกับฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน โดยเฉพาะฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ แสดงให้เห็นว่า ส่วนต่างๆ ขององุ่นป่า เป็นแหล่งของสารพฤกษเคมีที่มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันที่ดี ข้อมูลที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้สามารถนำไปใช้สำหรับการศึกษาในขั้นสูงต่อไป

คำสำคัญ : สารพฤกษเคมี องุ่นป่า ฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน

Abstract

This work aimed to investigate the total phenolic (TPC), flavonoid (TFC), saponin (TSC) and anthocyanin (TAC) contents of leaf, stalk and stem of wild grape (*Ampelocissus martinii* Planch.) extracts, the antioxidant activity as well as correlation between phytochemical contents and antioxidation activity of the extracts were also determined. The results found that the highest contents of TPC, TFC and TSC were found in the leaf extract while the stalk extract was found the highest of TAC. The antioxidation activity of wild grape extracts was investigated by DPPH and ABTS radicals scavenging assays. The results indicated that leaf extract

[1] นิสิตปริญญาโท, [2] รองศาสตราจารย์, [3*] อาจารย์, ภาควิชาเคมีและหน่วยวิจัยเคมี สร้างสรรค์และนวัตกรรม คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม อำเภอกันทรวิชัย จังหวัดมหาสารคาม 44150 ประเทศไทย

[1] Master degree student, [2] Assoc. Prof., [3*] Lecturer, Department of Chemistry and Creation and Innovation Chemistry Research Unit, Faculty of Science, Mahasarakham University, Kantharawichai District, Maha Sarakham 44150, Thailand.

* Corresponding author: Ansaya thonpho, Department of Chemistry, Faculty of Science, Mahasarakham University, Kantharawichai District, Maha Sarakham 44150, Thailand.

showed the lowest of IC_{50} values, which revealed the highest antioxidant capacity than other parts. The obtained result was similar trend to FRAP and CUPRAC assays. Almost phytochemicals contents were positively related to the antioxidant activity, especially phenolic and flavonoid. This work indicated that the different parts of wild grape are good sources of bioactive phytochemical. The results of this work would be used as information data for further study.

Keywords: phytochemical, wild grape, antioxidation activity

บทนำ

ในปัจจุบันมนุษย์ต้องเผชิญกับความเครียดที่นำไปสู่ภาวะความไม่สมดุลระหว่างการเกิดและการป้องกันอนุมูลอิสระ โดยอนุมูลอิสระ (free radical) ซึ่งมีอิเล็กตรอนชั้นนอกสุด (valence electron) ไม่ครบคู่ จึงไม่มีความเสถียร และสามารถแย่งชิงอิเล็กตรอนจากโมเลกุลที่อยู่ข้างเคียงผ่านปฏิกิริยาออกซิเดชันได้ดีในลักษณะของปฏิกิริยาลูกโซ่ ส่งผลให้โมเลกุลนั้นกลายเป็นอนุมูลอิสระ ซึ่งเป็นสาเหตุให้เกิดโรคเสื่อมหลายชนิด[1] เช่น โรคมะเร็ง โรคหัวใจ หลอดเลือดตีบ และโรคที่เกี่ยวข้องกับระบบสมอง[2,3] เป็นต้น โรคเสื่อมที่เกิดจากอนุมูลอิสระสามารถป้องกันได้ด้วย สารต้านออกซิเดชัน (antioxidant) หรือที่รู้จักกันดีในชื่อ สารต้านอนุมูลอิสระ แหล่งของสารต้านอนุมูลอิสระธรรมชาติที่พบมาก คือ พืช โดยเฉพาะ ผัก ผลไม้ และสมุนไพร สารประกอบในสารสกัดจากพืชเหล่านี้มีชื่อเฉพาะว่า "พฤกษเคมี (phytochemicals)"[4,5]

ในบรรดาพืช ผลไม้มักจะเป็นแหล่งการศึกษาสารที่มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันมาก ดังจะปรากฏจากรายงานวิจัยที่หลากหลาย ผลไม้ที่มีการศึกษาเกี่ยวกับสารพฤกษเคมีและฤทธิ์การต้านออกซิเดชันมากชนิดหนึ่ง คือ องุ่น (grape)[1] ซึ่งประกอบด้วยสารพฤกษเคมีในกลุ่มพอลิฟีนอล (polyphenols) เช่น แอนโธไซยานิน (anthocyanins) ฟลาวานอล (flavanols) ฟลาโวนอล (flavonols) กรดไฮดรอกซีเบนโซอิก (hydroxybenzoic acids) กรดไฮดรอกซีซินนามิก (hydroxycinnamic acids) และสทิลบีน (stilbenes) สารประกอบฟีนอลิกเหล่านี้ส่วนใหญ่เป็นสารในกลุ่มฟลาโวนอยด์ (flavonoids) ซึ่งฟลาโวนอยด์ที่พบมากในองุ่นเป็นกลุ่มฟลาวานอล หรือฟลาวาน-3-ออล (flavan-3-ols) จัดเป็นสารพฤกษเคมีที่มีคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant capacity) ที่มีประโยชน์ต่อสุขภาพหลายประการ ได้แก่ ช่วยลดความเสี่ยงในการเกิดมะเร็ง โรคหัวใจและโรคหลอดเลือด[1] ช่วยควบคุมระดับน้ำตาลในเลือด ยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมันในร่างกาย ซึ่งมีอยู่ในรูปของไลโพโปรตีนชนิด LDL (low density lipoprotein) และช่วยต้านการอักเสบ[6] รายงานวิจัยแสดงให้เห็นว่าสารพฤกษเคมี จะมีปริมาณและฤทธิ์ทางชีวภาพแตกต่างกันตามปัจจัยหลายอย่าง ไม่ว่าจะเป็นสายพันธุ์ของพืช สภาพภูมิอากาศ ระยะการเจริญเติบโต ลักษณะภูมิประเทศหรือแม้แต่ส่วนที่แตกต่างกัน[7]องุ่นป่า (wild grape) มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Ampelocissus martinii* Planch. เป็นผลไม้ป่าที่มีลักษณะคล้ายกับองุ่นที่ปลูกในเชิงพาณิชย์ จึงคาดว่าน่าจะมีสารพฤกษเคมีที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพคล้ายกับที่พบในองุ่น ในอดีตมีการนำส่วนต่างๆ ขององุ่นป่ามาใช้เป็นยารักษาโรคฝีและแก้อาการบวม ปัจจุบันยังไม่มีรายงานวิจัย ที่เกี่ยวกับสารพฤกษเคมีและฤทธิ์ต้าน-ออกซิเดชันของสารที่สกัดจากใบ ก้าน และลำต้นองุ่นป่าปรากฏมาก่อน โดยเฉพาะประเทศไทย ผู้วิจัยจึงมีความสนใจศึกษาเกี่ยวกับสารพฤกษเคมีและฤทธิ์ต้าน-ออกซิเดชันของสารสกัดจากส่วนต่างๆ ขององุ่นป่า เพื่อนำไปใช้เป็นข้อมูลในการศึกษาสมบัติของสารและประยุกต์ใช้ประโยชน์ต่อสุขภาพต่อไป

วิธีการทดลอง

การสกัดสารจากลำต้นองุ่นป่า

ทำได้โดย นำลำต้นองุ่นป่าแห้ง 2 กรัม ผสมกับตัวทำละลาย เมทานอล: กรดฟอร์มิก: น้ำ ในอัตราส่วน 50:2:48 (v/v/v) โดยใช้ปริมาตรตัวทำละลาย 20 มิลลิลิตร ทำการสกัดที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นนำไปปั่น (vortex) เป็นเวลา 10 นาที และเขย่าด้วยคลื่น

เสียง (sonication) เป็นเวลา 10 นาที[5] ก่อนนำไปกรองด้วยกระดาษ Whatman No. 1 จะได้สารสกัดหยาบ นำสารที่ได้ไปปั่นเหวี่ยง เพื่อแยกสารละลายใสและเศษตัวอย่างที่ 5000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำไประเหยตัวทำละลายด้วยเครื่องระเหยโดยการลดความดัน (rotary evaporator) ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส

การสกัดสารจากก้านอ่อนป่า

ทำได้โดย นำก้านอ่อนป่าแห้ง 10 กรัม ผสมกับตัวทำละลายเอทานอล โดยใช้ปริมาตรตัวทำละลาย 100 มิลลิลิตร ก่อนนำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 ชั่วโมง พร้อมทั้งเขย่าเป็นระยะ[4] แล้วกรองด้วยกระดาษ Whatman No. 1 จากนั้นนำสารไปปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกสารละลายใสและเศษตัวอย่างที่ 5000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำไประเหยตัวทำละลายด้วยเครื่องระเหยโดยการลดความดัน ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส

การสกัดสารจากใบอ่อนป่า

ทำได้โดย นำใบอ่อนป่าแห้ง 5 กรัม ผสมกับตัวทำละลายเอทานอล โดยใช้ปริมาตรตัวทำละลาย 50 มิลลิลิตร ก่อนนำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง พร้อมทั้งเขย่าเป็นระยะ[8] จากนั้นนำสารสกัดหยาบไปกรองด้วยกระดาษ Whatman No.1 ก่อนนำไปปั่นเหวี่ยง เพื่อแยกสารละลายใสและเศษตัวอย่างที่ 5000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำไประเหย ตัวทำละลายด้วยเครื่องระเหยโดยการลดความดัน ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส

การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม

การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม (total phenolic content, TPC) ใช้วิธี The Folin–Ciocalteu assay ทำได้โดยผสมสารสกัดตัวอย่าง ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร น้ำปราศจากไอออน ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร และ 10% Folin-Ciocalteu's reagent (1:10 in water, v/v) ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร เขย่าแล้วตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 5 นาที หลังจากนั้นเติมสารละลาย 7.5% Na_2CO_3 ปริมาตร 0.8 มิลลิลิตร เขย่าสารให้เป็นเนื้อเดียวกันแล้วตั้งทิ้งไว้ในที่มืด เป็นเวลา 30 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงของสารผสมที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร[9] โดยใช้เครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม แสดงในหน่วยมิลลิกรัมของกรดแกลลิก (GAE) ต่อน้ำหนักตัวอย่างแห้ง 1 กรัม (mg GAE/g dw)

การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์รวม

การวิเคราะห์สารประกอบฟลาโวนอยด์รวมของสารสกัดตามวิธีที่มีรายงานมาก่อน[10] โดยเติมสารสกัด ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลาย 5% $NaNO_2$ ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร แล้วตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 6 นาที จากนั้นเติม 10% $AlCl_3$ ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร นำสารผสมที่ได้ปั่นเหวี่ยงและตั้งไว้อีก 5 นาที เพื่อให้สารทำปฏิกิริยากัน จากนั้นเติมสารละลาย 1.0 M NaOH ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร แล้วตั้งทิ้งไว้ในที่มืดเป็นเวลา 15 นาที นำสารผสมที่ได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 510 นาโนเมตร โดยใช้เครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ ปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์รวม แสดงในหน่วยมิลลิกรัมของคาทิชิน (CE) ต่อน้ำหนักตัวอย่างแห้ง 1 กรัม (mg CE/g dw)

การวิเคราะห์ปริมาณแอนโธไซยานินรวม

การวิเคราะห์ปริมาณแอนโธไซยานินรวม ใช้วิธี pH-differential method[10] โดยเติมสารสกัด ปริมาตร 0.02 มิลลิลิตร และ potassium chloride buffer pH 1.0 ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ในหลอดทดลอง A และนำสารสกัด ปริมาตร 0.02 มิลลิลิตร และ sodium acetate buffer pH 4.5 ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ผสมกันในหลอดทดลอง B วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 510 และ 700 นาโนเมตร สำหรับหลอดทดลอง A และ B (Abs_A และ Abs_B) ตามลำดับ โดยใช้เครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ และคำนวณปริมาณสารแอนโธไซยานินรวมของสารสกัด โดยแสดงค่าในหน่วยมิลลิกรัมไซยานิดิน-3-กลูโคไซด์ (C3G) ต่อน้ำหนักตัวอย่างแห้ง 100 กรัม (mg C3G /100 g dw) ดังสมการ

ความเข้มข้น (mg/l) = $A \times Mw \times DF \times 10^3 / \sum \times L$

โดยที่

$A = (A_{510\ nm} - A_{700\ nm})\ pH_{1.0} - (A_{510\ nm} - A_{700\ nm})\ pH_{4.5}$

Mw = 449.2 g/mol for C3G (น้ำหนักโมเลกุลของไซยานิดิน-3-กลูโคไซด์)

$\sum$ = 26,900 L/mol/cm for C3G (โมลาร์แอฟซอฟ-ติวิตี้ของไซยานิดิน-3-กลูโคไซด์)

L = 1 cm (ความกว้างของ cuvette)

DF = Dilution factor of sample

10^3 = factor for conversion from g to mg

การวิเคราะห์ปริมาณซาโปนินรวม

การวิเคราะห์ปริมาณซาโปนินรวม ทำตามวิธีที่ มีรายงานมาก่อน[10] โดยเริ่มจากนำสารสกัดมา 0.5 มิลลิลิตร ใส่ลงไปในหลอดทดลอง หลังจากนั้นเติมสารละลาย 8% vanillin ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร และ 72% H_2SO_4 ปริมาตร 5 มิลลิลิตร นำไปบ่มใน อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath) ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นก่อนนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 560 นาโนเมตร ด้วยเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ ผลการทดลองที่ได้แสดงในหน่วยมิลลิกรัมของเอสซิน (Aes) ต่อน้ำหนักตัวอย่างแห้ง 1 กรัม (mg Aes/g dw)

การตรวจสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน

วิธีขจัดอนุมูล DPPH

ทำการตรวจสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของสารสกัดด้วยวิธีขจัดอนุมูล DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) ตามวิธีที่มีรายงานมาก่อน[11] โดยนำสารสกัดปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลาย 0.1 mM DPPH ในเมทานอล ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันและตั้งทิ้งไว้ในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร โดยทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้งจากสูตร

$$\% \text{ Inhibition} = [(A_0 - A_S) / A_0] \times 100$$

โดยที่

A_S = ค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัด

A_0 = ค่าการดูดกลืนแสงของสารควบคุม (วิตามินซี)

และฤทธิ์การต้านออกซิเดชันจะแสดงเป็นค่า IC_{50}

วิธีขจัดอนุมูล ABTS

การตรวจสอบฤทธิ์ต้านซิเดชันของสารสกัดด้วยวิธีขจัดอนุมูล ABTS (2,2-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid) ดัดแปลงตามวิธีที่มีรายงานมาก่อน[10] ขั้นแรกเตรียมอนุมูลอิสระ ABTS โดยการผสม 7 mM ABTS กับสารลาย 2.45 mM $K_2S_2O_8$ อัตราส่วน 1:1 ตั้งไว้ในที่มืดอุณหภูมิห้องเป็นเวลา 12-16 ชั่วโมง จนกระทั่งสถานะออกซิเดชัน (oxidative state) เกิดความเสถียร จากนั้นเจือจางด้วยน้ำกลั่น เพื่อให้ได้ค่าการดูดกลืนแสงประมาณ 0.70 ± 0.02 ที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร

ทำการตรวจสอบปฏิกิริยาโดยนำสารสารละลายอนุมูล ABTS ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมกับสารสกัด ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ในที่มืดเป็นเวลา 6 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร โดยทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง จากสูตรเดียวกันกับวิธีขจัดอนุมูล DPPH โดยใช้โทรล็อกซ์เป็นสารควบคุม

วิธีรีดิวซ์โลหะเหล็ก

ทำการตรวจสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของสารสกัดด้วยวิธี FRAP (ferric reducing activity power) ตามวิธีที่มีรายงานมาก่อน[12] ขั้นตอนแรกจะทำการเตรียมสารละลาย FRAP reagent ได้จากการผสมสารละลาย 10 mM TPTZ ปริมาตร 0.33 มิลลิลิตร ในสารละลาย 40 mM HCl, 20 mM $FeCl_3$ ปริมาตร 0.33 มิลลิลิตร และ acetate buffer pH 3.6 ปริมาตร 3.3 มิลลิลิตร ผสมสารทั้งหมดเข้าด้วยกันแล้วตั้งไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จากนั้นนำ FRAP reagent ปริมาตร 1.8 มิลลิลิตร ผสมกับสารสกัดปริมาตร 0.24 มิลลิลิตร ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องในที่มืดเป็นเวลา 15 นาที ก่อนจะนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 593 นาโนเมตร โดยใช้ $FeSO_4$ เป็น

สารมาตรฐาน ฤทธิ์การต้านออกซิเดชันของสารสกัดแสดงในหน่วยมิลลิโมลาร์ของ ferrous sulfate ต่อน้ำหนักตัวอย่างแห้ง 1 กรัม (mM $FeSO_4$/g dw)

วิธีรีดิวซ์โลหะทองแดง

การตรวจสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของสารสกัดด้วยวิธี CUPRAC (cupric ion reducing antioxidant capacity) ดัดแปลงตามวิธีที่มีรายงานมาก่อน[13] โดยการผสมสารละลาย 0.01 M $CuCl_2$ ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร กับสารละลาย 0.0075 M neocuproine ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร และ ammonium acetate buffer pH 7.0 ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร และสารสกัด 0.55 มิลลิลิตร จากนั้นนำสารผสมที่ได้ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที ก่อนจะนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร โดยใช้สารละลายโทรล็อกซ์ (TE) เป็นสารมาตรฐาน ฤทธิ์การต้านออกซิเดชันแสดงในหน่วยมิลลิกรัมของโทรล็อกซ์ต่อน้ำหนักตัวอย่างแห้ง 1 กรัม (mg TE/g dw)

การวิเคราะห์ทางสถิติ

ปริมาณสารพฤกษเคมีและฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของสารสกัดแสดงด้วยค่าร้อยละ ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ส่วนค่าสหสัมพันธ์ (correlation) ระหว่างปริมาณสารพฤกษเคมีและฤทธิ์ต้านออกซิเดชันวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม SPSS 19

ผลการทดลอง

ปริมาณสารพฤษกเคมีรวม

จาก Table 1 พบปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมมากที่สุดในสารสกัดจากใบ (12.23 ± 0.87 mg GAE/g dw) แต่พบปริมาณต่ำที่สุดในสารสกัดจากก้าน (3.49 ± 0.22 mg GAE/g dw) ปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์รวมของสารสกัดจากใบมีค่าสูงสุด (20.05 ± 1.38 mg CE/g dw) ซึ่งสูงกว่าสารสกัดจากก้าน (3.59 ± 0.31 mg CE/g dw) และลำต้น (2.63 ± 0.14 mg CE/g dw) ตามลำดับ ปริมาณแอนโธไซยานินรวม พบปริมาณมากที่สุดในสารสกัดจากก้าน (21.85 ± 5.26 mg C3G /100 g dw) รองลงมาพบในสารสกัดจากใบ (7.07 ± 1.54 mg C3G/100 g dw) ในขณะที่สารสกัดจากลำต้นตรวจไม่พบแอนโธไซยานิน ซึ่งผลที่ได้อาจเกี่ยวข้องกับความเข้มของสีสารสกัด เนื่องจากสีของสารสกัดจากก้านและใบมีความเข้มมากและมีปริมาณแอนโธไซยานินสูงกว่าสารสกัดที่มีสีจาง อีกทั้งปริมาณแอนโธไซยานินของสารสกัดจากพืชอื่นๆที่มีรายงานมาก่อน ยังสอดคล้องกับสีของสารสกัดด้วย[7] ปริมาณซาโปนินรวมพบในสารสกัดจากก้านและใบ คือ 9.68 ± 4.24 และ 12.85 ± 3.04 mg Aes/g dw ตามลำดับ แต่ไม่พบซาโปนินในสารสกัดจากลำต้น

จากรายงานวิจัยที่ศึกษาสารสกัดจากใบองุ่น (*Vitis labrusca* var. Bordo)[14] พบว่าปริมาณสารประกอบ ฟีนอลิกรวมมีค่าอยู่ในช่วง 19.00 ถึง 20.20 mg GAE/mL และปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์รวม มีปริมาณ 7.94 ถึง 8.95 µg rutuin/mL และรายงานการศึกษาสารสกัดใบองุ่นจากจังหวัดอาเซอไบจาน ประเทศอิหร่าน[7] พบว่า ปริมาณแอนโธไซยานินขององุ่นสายพันธุ์ Hosseini มีค่าสูงสุด คือ 10.32 mg/g dw รายงานการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมจากสารสกัดจากลำต้นองุ่นสายพันธุ์ *V. Vinifera* ในประเทศกรีก พบปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมอยู่ในช่วงระหว่าง 318.00 ถึง 415.00 mg GAE/g dw[15] ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัย[16]ที่ได้ทำการศึกษาสารสกัดจากลำต้นขององุ่นสายพันธุ์ *V. vinifera* ในประเทศกรีก พบปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมอยู่ในช่วงระหว่าง 345.00 ถึง 584.00 mg GAE/g dw จากการศึกษาสภาวะการสกัดสารพฤกษ-เคมีที่เหมาะสมจากลำต้นองุ่น (*Vitis vinifera* L.) สายพันธุ์ Portuguese พบว่า ความเข้มข้นของปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์รวมและแอนโธไซยานินรวมมีค่าอยู่ในช่วง 38.01 ถึง 71.49 mg CE/g dw และ 0.43 ถึง 1.62 mg/g dw ตามลำดับ[10] รวมทั้งรายงานวิจัยการตรวจวิเคราะห์ สกัดสารพอลิฟีนอลจากก้านองุ่นโดยใช้ เอทานอลในการสกัดพบปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม คือ 1.32 ถึง 1.98 g GAE/100 g dw[17]

เมื่อเปรียบเทียบปริมาณสารพฤกษเคมีที่ตรวจวิเคราะห์ในครั้งนี้ พบว่ามีค่าอยู่ในช่วงที่มีรายงานมาก่อน แสดงให้เห็นว่า องุ่นป่าประกอบด้วย

สารพฤกษ-เคมีที่มีปริมาณสูงเช่นเดียวกับองุ่น แม้ว่าปริมาณจะมีความแตกต่างกัน ทั้งนี้อาจมีสาเหตุมาจากหลายปัจจัยที่ส่งผลต่อปริมาณสารพฤกษเคมี เช่น สภาพภูมิอากาศ สายพันธุ์พืช ฤดูกาล ระยะการเจริญเติบโต รวมทั้ง เทคนิคและเครื่องมือที่ใช้ในการตรวจสอบ[7]

Table 1 Total phenolic content , total flavonoid content, total anthocyanin content and total saponin content of wild grape (*Ampelocissus martinii* Planch.) extracts from different parts (stalk, stem and leaf).

Phytochemicals	Stalk	Stem	Leaf
Total phenolic content [a]	3.49 ± 0.22	5.78 ± 0.37	12.23 ± 0.87
Total flavonoid content [b]	3.59 ± 0.31	2.63 ± 0.14	20.05 ± 1.38
Total anthocyanin content [c]	21.85 ± 5.26	ND	7.07 ± 1.54
Total saponin content [d]	9.68 ± 4.24	ND	12.85 ± 3.04

[a] mg GAE/g DW

[b] mg CE/g DW

[c] mg C3G/100 g DW

[d] mg Aes/g DW

ND = no detection

ฤทธิ์การต้านออกซิเดชัน

ทำการทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของสารสกัดด้วยวิธี คือ DPPH, ABTS, FRAP และ CUPRAC เปรียบเทียบกับสารมาตรฐานที่มีฤทธิ์ขจัดอนุมูลอิสระ ผลการทดลองแสดงดัง Table 2 พบว่า สารสกัดองุ่นป่าจากส่วนที่แตกต่างกันมีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันที่แตกต่างกัน โดยฤทธิ์การขจัดอนุมูล DPPH และ ABTS จะแสดงด้วยค่า IC_{50} (ความเข้มข้นของสารที่สามารถขจัดอนุมูลอิสระได้ร้อยละ 50) ถ้าค่าที่ได้ต่ำแสดงถึงฤทธิ์การขจัดอนุมูลอิสระที่ดี พบว่า ค่า IC_{50} ของสารสกัดจากองุ่นป่า เรียงจากมากไปน้อยได้ดังนี้ สารสกัดจากลำต้น > สารสกัดจากก้าน > สารสกัดจากใบ แสดงให้เห็นว่าสารสกัดจากใบ มีฤทธิ์ดักจับอนุมูล DPPH และ ABTS ที่ดีที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับสารสกัดจากส่วนอื่นๆ

การทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชันด้วยวิธี FRAP และ CUPRAC พบว่า สารสกัดจากใบมีประสิทธภาพในการรีดิวซ์โลหะได้ดีที่สุดทั้งสองวิธี สารสกัดจากก้านมีประสิทธิภาพต่ำสุด เมื่อทดสอบด้วยวิธี FRAP ในขณะที่สารสกัดจากลำต้นมีประสิทธิภาพต่ำสุด เมื่อตรวจสอบด้วยวิธี CUPRAC

Table 2 Antioxidant activity from different parts (stalk, stem and leaf) of wild grape extracts.

Methods	Stalk	Stem	Leaf
DPPH IC_{50} (µg/mL)	61.88 ± 11.48	174.65 ± 61.17	29.27 ± 11.24
ABTS IC_{50} (µg/mL)	13.76 ± 2.00	165.94 ± 65.43	12.97 ± 5.54
FRAP (mM $FeSO_4$/g DW)	12.15 ± 2.81	28.37 ± 2.98	209.01 ± 16.22
CUPRAC (mg TE/g DW)	10.44 ± 0.81	4.82 ± 0.87	41.58 ± 1.53

ค่าสหสัมพันธ์ระหว่างปริมาณสารพฤกษเคมีกับฤทธิ์การต้านออกซิเดชัน

การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณสารพฤกษเคมีในสารสกัดแต่ละส่วนขององุ่นป่าต่อฤทธิ์ต้านออกซิเดชันแสดงด้วยค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ ผลการทดลองแสดงดัง Table 3 จากตารางจะเห็นว่า ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ระหว่างปริมาณสารพฤกษเคมีและฤทธิ์การต้านออกซิเดชันของสารสกัด มีความสัมพันธ์กันในเชิงบวก แสดงให้เห็นว่า ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์มีบทบาทสำคัญต่อฤทธิ์การต้านออกซิเดชัน แต่ผลการทดสอบด้วยวิธี FRAP และ CUPRAC มีความสัมพันธ์ในเชิงลบกับปริมาณแอนโธไซยานิน ดังนั้น การบ่งชี้ความสัมพันธ์จำเป็นต้องวิเคราะห์ทางสถิติขั้นสูง เพื่อใช้ตัวแปรอื่นๆ ร่วมด้วยเพื่อให้เกิดความแม่นยำต่อไป นอกจากนี้ ในกรณีที่ไม่มีความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญระหว่างสารพฤกษเคมีและฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน แสดงให้เห็นว่าสารพอลิฟีนอลบางส่วนที่ตรวจพบในสารสกัดอาจออกฤทธิ์ต้านออกซิเดชันมาก แม้จะมีปริมาณน้อยเพราะลักษณะโครงสร้างของสาร ซึ่งเป็นสาเหตุทำให้เกิดความสัมพันธ์ไม่เป็นเส้นตรงระหว่างปริมาณฟีนอลิกและฤทธิ์ต้านออกซิเดชันก็เป็นได้ [18,19]

Table 3 Correlations between the antioxidant activities and total phytochemical contents extracted from different parts of wild grape.

Phytochemicals	DPPH	ABTS	FRAP	CUPRAC
Total phenolic content	0.678*	0.342	0.981**	0.916**
Total flavonoid content	0.806**	0.579	0.992**	0.994**
Total anthocyanin content	0.088	0.501	-0.283	-0.078
Total saponin content	0.627	0.782*	0.562	0.707*

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

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

สรุปผลการทดลอง

จากผลการทดลองสามารถสรุปผลได้ดังนี้

1. สารสกัดจากใบองุ่นป่ามีปริมาณสารพฤกษเคมีสูงสุด ในขณะที่ส่วนของลำต้นองุ่นป่ามีปริมาณสาร พฤกษเคมีต่ำที่สุด

2. สารสกัดจากใบองุ่นป่ามีปริมาณสารประกอบ ฟีนอลิกรวม สารประกอบฟลาโวนอยด์รวมและซาโปนินรวมสูงสุด ในขณะที่สารสกัดจากก้านองุ่นป่ามีปริมาณสารประกอบแอนโธไซยานินรวมสูงสุด

3. สารสกัดจากใบขององุ่นป่ามีฤทธิ์ต้านอกซิเดชันสูงสุดเมื่อทดสอบด้วยวิธี DPPH, ABTS, FRAP และ CUPRAC

4. ปริมาณสารพฤกษเคมีและฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของสารสกัด มีความสัมพันธ์กันในเชิงบวก แสดงให้เห็นว่า ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์รวม มีบทบาทสำคัญต่อฤทธิ์การต้านออกซิเดชัน

5. ใบ และก้านองุ่นป่า เป็นแหล่งของสารต้านอนุมูลอิสระจากธรรมชาติที่ดีที่มีศักยภาพในการนำไปประยุกต์ใช้ในด้านอาหาร โภชนาการ เภสัชกรรม และทางการแพทย์ได้

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณ นางสาวสุทธิญาพร นันทพล นิสิตระดับปริญญาตรี หลักสูตรวิทยาศาสตร-บัณฑิต สาขาเคมี ที่ช่วยเตรียมสารและตัวอย่างในการทดสอบ รวมทั้ง ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม ที่เอื้อเฟื้อเครื่องมือและสถานที่ในการวิจัย

เอกสารอ้างอิง

1. Meng JF, Fang YL, Qin MY, Zhuang XF, Zhang Z-W. Varietal differences among the phenolic profiles and antioxidant properties of four cultivars of spine grape (*Vitis davidii* Foex) in Chongyi County (China). Food Chem. 2012;134(4):2049-2056.

2. Poudel PR, Tamura H, Kataoka I, Mochioka R. Phenolic compounds and antioxidant activities of skins and seeds of five wild grapes and two hybrids native to Japan. J Food Compos Anal. 2008;21(8):622-625.

3. Ignea C, Dorobanţu CM, Mintoff CP, Branza-Nichita N, Ladomery MR, Kefalas P, et al. Modulation of the antioxidant/pro-oxidant balance, cytotoxicity and antiviral actions of grape seed extracts. Food Chem. 2013;141(4):3967-3976.

4. Spigno G, De Faveri DM. Antioxidants from grape stalks and marc: Influence of extraction procedure on yield, purity and antioxidant power of the extracts. J Food Eng. 2007;78(3):793-801.

5. Dias C, Domínguez-Perles R, Aires A, Teixeira A, Rosa E, Barros A, et al. Phytochemistry and activity against digestive pathogens of grape (*Vitis vinifera* L.) stem's (poly)phenolic extracts. LWT - Food Sci Technol. 2015;61(1):25-32.

6. Yang J, Martinson TE, Liu RH. Phytochemical profiles and antioxidant activities of wine grapes. Food Chem. 2009;116(1):332-339.

7. Farhadi K, Esmaeilzadeh F, Hatami M, Forough M, Molaie R. Determination of phenolic compounds content and antioxidant activity in skin, pulp, seed, cane and leaf of five native grape cultivars in West Azerbaijan province, Iran. Food Chem. 2016;199:847-855.

8. Araújo SdS, Fernandes TCC, Cardona YT, Almeida PMd, Marin-Morales MA, dos Santos AV, et al. Cytotoxic and genotoxic effects of ethanolic extract of *Euphorbia hyssopifolia* L. on HepG2 cells. J Ethnopharmacol. 2015;170:16-19.

9. Antoniolli A, Fontana AR, Piccoli P, Bottini R. Characterization of polyphenols and evaluation of antioxidant capacity in grape pomace of the cv. Malbec. Food Chem. 2015;178:172-178.

10. Domínguez-Perles R, Teixeira AI, Rosa E, Barros AI. Assessment of (poly)phenols in grape (V*itis vinifera* L.) stems by using food/pharma industry compatible solvents and Response Surface Methodology. Food Chem. 2014;164:339-346.

11. Ruiz-Moreno MJ, Raposo R, Cayuela JM, Zafrilla P, Piñeiro Z, Moreno-Rojas JM, et al. Valorization of grape stems. Ind Crop Prod. 2015;63:152-157.

12. Benzie IFF, Strain JJ. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "Antioxidant Power": The FRAP Assay. Anal Biochem. 1996;239(1):70-76.

13. Apak R, Güçlü K, Özyürek M, Karademir SE. Novel total antioxidant capacity index for dietary polyphenols and vitamins C and E, ssing their cupric ion reducing capability in the presence of neocuproine: CUPRAC Method. J Agr Food Chem. 2004;52(26):7970-7981.

14. Dani C, Oliboni LS, Agostini F, Funchal C, Serafini L, Henriques JA, et al. Phenolic content of grapevine leaves *(Vitis labrusca* var. Bordo) and its neuroprotective effect against peroxide damage. Toxicol in Vitro. 2010;24(1):148-153.

15. Sahpazidou D, Geromichalos GD, Stagos D, Apostolou A, Haroutounian SA, Tsatsakis AM, et al. Anticarcinogenic activity of polyphenolic extracts from grape stems against breast, colon, renal and thyroid cancer cells. Toxicol Lett. 2014;230(2):218-224.

16. Apostolou A, Stagos D, Galitsiou E, Spyrou A, Haroutounian S, Portesis N, et al. Assessment of polyphenolic content, antioxidant activity, protection against ROS-induced DNA damage and anticancer activity of *Vitis vinifera* stem extracts. Food Chem Toxicol. 2013;61:60-68.

17. Pujol D, Liu C, Fiol N, Olivella MÀ, Gominho J, Villaescusa I, et al. Chemical characterization of different granulometric fractions of grape stalks waste. Ind Crop Prod. 2013;50:494-500.

18. Barros A, Gironés-Vilaplana A, Teixeira A, Collado-González J, Moreno DA, Gil-Izquierdo A, et al. Evaluation of grape (*Vitis vinifera* L.) stems from Portuguese varieties as a resource of (poly)phenolic compounds: A comparative study. Food Res Int. 2014;65, Part C:375-384.

19. Hyun TK, Kim HC, Ko YJ, Kim JS. Antioxidant, α-glucosidase inhibitory and anti-inflammatory effects of aerial parts extract from Korean crowberry (*Empetrum nigrum* var. *japonicum*). Saudi J Bio Sci. 2016;23(2):181-188.