สารพฤกษเคมีและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากกากไวน์องุ่นป่า (*Ampelocissus martinii* Planch.)

วิทยานิพนธ์

ของ

เกียรติศักดิ์ รัตนคุณศาสน์

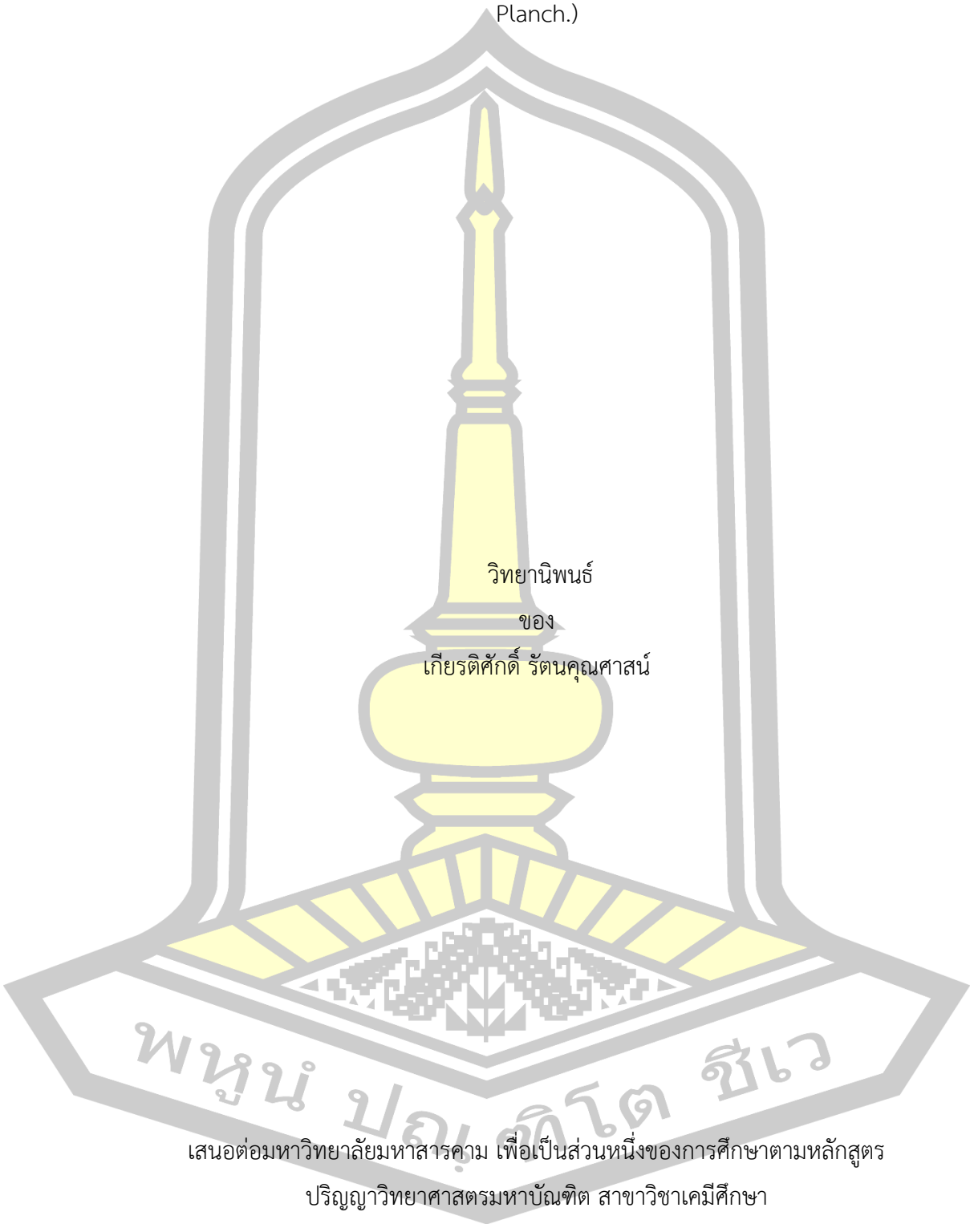
เสนอต่อมหาวิทยาลัยมหาสารคาม เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเคมีศึกษา

กรกฎาคม 2564

ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยมหาสารคาม

สารพฤกษเคมีและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากกากไวน์องุ่นป่า (*Ampelocissus martinii* Planch.)



วิทยานิพนธ์

ของ

เกียรติศักดิ์ รัตนคุณศาสน์

เสนอต่อมหาวิทยาลัยมหาสารคาม เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเคมีศึกษา

กรกฎาคม 2564

ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยมหาสารคาม

Phytochemicals and Antioxidant Activity from the Extract of Wild Grape (*Ampelocissus martinii* Planch.) Wine Residues

Kiattisak Rattanacunsart

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of Requirements

for Master of Science (Chemistry Education)

July 2021

Copyright of Mahasarakham University

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ได้พิจารณาวิทยานิพนธ์ของนายเกียรติศักดิ์ รัตนคุณศาสน์ แล้วเห็นสมควรรับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเคมีศึกษา ของมหาวิทยาลัยมหาสารคาม

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ
(ผศ. ดร. คมศร ลมไธสง)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(รศ. ดร. ประสงค์ สีหานาม)

.....กรรมการ
(ผศ. ดร. สิริพิศ พิศชวนชม)

.....กรรมการ
(ผศ. ดร. เสนีย์ เครือเนตร)

มหาวิทยาลัยอนุมัติให้รับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเคมีศึกษา ของมหาวิทยาลัยมหาสารคาม

.....

(ศ. ดร. ไพโรจน์ ประมวล) (รศ. ดร. กริสน์ ชัยมูล)
คณบดีคณะวิทยาศาสตร์ คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

พหุน ปณฺฑิโต ลิเว

ชื่อเรื่อง สารพฤกษเคมีและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากกากไวน์องุ่นป่า (*Ampelocissus martinii* Planch.)

ผู้วิจัย เกียรติศักดิ์ รัตนคุณศาสน์

อาจารย์ที่ปรึกษา รองศาสตราจารย์ ดร. ประสงค์ สีหานาม

ปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต **สาขาวิชา** เคมีศึกษา

มหาวิทยาลัย มหาวิทยาลัยมหาสารคาม **ปีที่พิมพ์** 2564

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อตรวจคัดกรองปริมาณสารพฤกษเคมีทั้งหมด ได้แก่ ฟีนอลิก (TPC) ฟลาโวนอยด์ (TFC) ซาโปนิน (TSC) คอนเดนส์แทนนิน (CDT) และโพรแอนโทไซยานิดิน (TPAC) และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากกากองุ่นป่า (*Ampelocissus martinii* Planch.) ที่ผ่านการหมักไวน์ ผลการทดลอง พบว่า ปริมาณสารพฤกษเคมีสูงสุดพบในสารสกัดจากกากไวน์ที่ได้จากผลองุ่นอ่อนและปริมาณคอนเดนส์แทนนินมีปริมาณสูงสุด อย่างไรก็ตาม ตรวจพบปริมาณโพรแอนโทไซยานิดิน ฟีนอลิกและซาโปนินสูงเช่นกัน เมื่อทำการวิเคราะห์ชนิดและปริมาณสารพฤกษเคมีด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC) ผลการทดลอง พบว่า gallic acid, quercetin, resveratrol และ epicatechin เป็นสารหลักที่ตรวจพบในสารสกัดจากกากไวน์องุ่นป่าอ่อนและสุก ในขณะที่ในสารสกัดจากกากไวน์องุ่นป่าแก่จะมี caffeic acid แทน epicatechin เมื่อตรวจสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบด้วยวิธีดักจับอนุมูล DPPH และ ABTS พบว่า สารสกัดทั้งหมดมีค่า IC_{50} ต่ำ ซึ่งแสดงให้เห็นว่า สารสกัดที่ตรวจสอบมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระสูง ในทางตรงกันข้าม สารสกัดทุกตัวอย่างมีค่าต่ำเมื่อทดสอบด้วยวิธี FRAP อย่างไรก็ตาม สารสกัดให้ค่าสูงเมื่อทดสอบด้วยวิธี CUPRAC โดยมีค่าสูงกว่าเมื่อทดสอบด้วยวิธี FRAP ประมาณ 120 เท่า สารพฤกษเคมีที่พบในสารสกัดมีค่าสหสัมพันธ์กับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระแตกต่างกัน ผลการทดลองที่ได้นี้แสดงให้เห็นว่ากากองุ่นป่าที่ผ่านการหมักไวน์เป็นแหล่งสำคัญของสารพฤกษเคมีที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ดี

คำสำคัญ : กากไวน์องุ่นป่า, สารพฤกษเคมี, ไวน์, ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ, สหสัมพันธ์

TITLE Phytochemicals and Antioxidant Activity from the Extract of Wild Grape (*Ampelocissus martinii* Planch.) Wine Residues

AUTHOR Kiattisak Rattanacunsart

ADVISORS Associate Professor Prasong Srihanam , Ph.D.

DEGREE Master of Science **MAJOR** Chemistry Education

UNIVERSITY Mahasarakham University **YEAR** 2021

ABSTRACT

The objective of this work was to screen the total phytochemicals; phenolic (TPC), flavonoid (TFC), saponin (TSC), condensed tannin (CDT) and proanthocyanidin (TPAC) contents and antioxidant activity of wild grape (*Ampelocissus martinii* Planch.) pomace extracts derived from wine production. The results found that the highest contents of phytochemicals were found in the immature extract and the CDT has the highest content. However, the TPAC, TPC and TSC also found in high contents. Types and contents of phytochemicals in the extracts were analyzed by high performance liquid chromatography (HPLC). The results indicated that gallic acid, quercetin, resveratrol and epicatechin are the main phenolic compounds in the immature and ripe of wild grape wine pomaces, while caffeic acid was another substance found in mature of wild grape wine pomace instead the epicatechin. The antioxidant activity of the extracts investigated by DPPH and ABTS radicals scavenging assays indicated that all extracts have low values of IC_{50}, which revealed the highest antioxidant capacity. Contrast all extracts showed low reducing power potential by FRAP assay. However, they have high reducing power on CUPRAC assay which was higher potential than FRAP over 120 folds. The phytochemicals showed a different correlations to the antioxidant activity. This work indicated that the wild grape pomace from wine production is a good source of bioactive phytochemicals with high potential of antioxidant activity.

Keyword : Wild grape pomace, phytochemicals, wine, antioxidant activity, correlation

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์เล่มนี้สำเร็จสมบูรณ์ได้ด้วยดีเพราะได้รับความกรุณาชี้แนะและช่วยเหลือ อย่างดียิ่งจาก รองศาสตราจารย์ ดร. ประสงค์ สีหานาม อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ผู้ให้คำแนะนำในการทำวิจัย ตลอดจนตรวจแก้ไขในการเขียนวิทยานิพนธ์จนสำเร็จลุล่วง

ขอขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. คมศร ลมไธสง ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. เสนีย์ เครือเนตร และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สิริพิศ พิศชวนชม ผู้ทรงคุณวุฒิสอบวิทยานิพนธ์ ที่ให้คำแนะนำวิธีการทำวิจัยตั้งแต่เริ่มต้นจนสำเร็จสมบูรณ์

ขอขอบพระคุณเจ้าหน้าที่ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม ที่อำนวยความสะดวกในการเบิกอุปกรณ์และสารเคมีสำหรับการทดลอง

ขอขอบคุณนายพงศธร โมธรรม ที่ช่วยแนะนำวิธีการสกัดสาร การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและการจัดการข้อมูลที่ได้จากผลการทดลอง

ขอขอบพระคุณบิดามารดา ที่อบรมเลี้ยงดูจนเติบใหญ่และสนับสนุนการศึกษา ขอบคุณครอบครัวที่ให้ความอบอุ่น ให้กำลังใจ และคอยเคียงข้างตลอดมา คุณค่าและประโยชน์อันพึงมีจากวิทยานิพนธ์นี้ ผู้วิจัยขอน้อมบูชาพระคุณบิดามารดาและบูรพาจารย์ทุกท่านที่ได้อบรมสั่งสอนวิชาความรู้และให้ความเมตตาแก่ผู้วิจัยมาโดยตลอด คุณความดีของทุกท่านจะยังคงอยู่ในใจด้วยความรักและเคารพตลอดไป รวมทั้งครอบครัวผู้อยู่เบื้องหลังและสนับสนุนกำลังใจมาโดยตลอด

เกียรติศักดิ์ รัตนคุณศาสน์

พหูน ปณฺฑิโต ชีเว

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... จ
กิตติกรรมประกาศ ..... ฉ
สารบัญ ..... ช
สารบัญตาราง ..... ญ
สารบัญรูปภาพ ..... ฏ
บทที่ 1 บทนำ 1
1.1 หลักการและเหตุผล 1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย 3
1.3 ผลที่คาดว่าจะได้รับจากงานวิจัย 3
1.4 ขอบเขตของงานวิจัย 3
1.5 นิยามศัพท์เฉพาะ 4
1.6 สถานที่ดำเนินการวิจัย 4
บทที่ 2 เอกสารงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 5
2.1 ความหมายของอนุมูลอิสระ 5
2.2 การเกิดอนุมูลอิสระ 6
2.3 บทบาทของอนุมูลอิสระต่อร่างกาย 6
2.4 โรคเสื่อม 7
2.5 สารต้านอนุมูลอิสระ 9
2.6 สารต้านอนุมูลอิสระธรรมชาติ 9
2.7 สารพฤกษเคมี 12

2.8 สารพฤกษเคมีในองุ่นและฤทธิ์ทางชีวภาพ 14
2.9 การตรวจสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน 16
2.10 องุ่นป่า 20
2.11 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับปริมาณสารพฤกษเคมีและฤทธิ์ทางชีวภาพในกากไวน์ 21
บทที่ 3 วิธีการทดลอง 23
3.1 วัตถุดิบในการทดลอง 23
3.2 การเตรียมสารสกัดจากกากไวน์ 23
3.3 การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม 23
3.4 การวิเคราะห์ปริมาณฟลาโวนอยด์รวม 23
3.5 การวิเคราะห์ปริมาณซาโปนินรวม 24
3.6 การวิเคราะห์ปริมาณโพรแอนโธไซยานิดินส์รวม 24
3.7 การตรวจสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ 24
3.8 การวิเคราะห์ชนิดและปริมาณฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ 26
3.9 การวิเคราะห์ทางสถิติ 26
บทที่ 4 ผลการทดลอง 27
4.1 ร้อยละในการสกัด 27
4.2 ปริมาณสารพฤกษเคมี 27
4.3 การวิเคราะห์ชนิดและปริมาณสารพฤกษเคมี 29
4.4 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ 36
4.5 ค่าสหสัมพันธ์ระหว่างปริมาณสารพฤกษเคมีกับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ 38
บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง 41
บรรณานุกรม 42
ภาคผนวก ก การคำนวณปริมาณสารพฤกษเคมีและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ 60
ภาคผนวก ข ข้อมูลผลการทดลองหาปริมาณสารพฤกษเคมีและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ 64

ประวัติผู้เขียน 75

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 1 ฤทธิ์และกลไกการออกฤทธิ์ของสารพฤกษเคมี 13
ตารางที่ 2 ร้อยละการได้กลับคืนของสารสกัดจากกากไวน์องุ่นป่า 27
ตารางที่ 3 ปริมาณสารพฤกษเคมีในสารสกัดจากกากไวน์องุ่นป่า 29
ตารางที่ 4 ชนิดและปริมาณสารพฤกษเคมีของสารสกัดจากกากไวน์องุ่นป่า 36
ตารางที่ 5 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากกากไวน์องุ่นป่า 38
ตารางที่ 6 สัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ระหว่างสารพฤกษเคมีและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ 40
ตารางที่ 7 ตัวอย่างค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดจากกากไวน์องุ่นป่า 62
ตารางที่ 8 การทดลองศึกษาน้ำหนักของสารสกัดหยาบ ด้วยวิธีการสกัด 65
ตารางที่ 9 ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร เพื่อทดสอบหาปริมาณฟินอลิกรวม (TPC) 66
ตารางที่ 10 ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 510 นาโนเมตร เพื่อทดสอบหาปริมาณฟลาโวนอยด์รวม (TFC) 67
ตารางที่ 11 ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 560 นาโนเมตร เพื่อทดสอบหาปริมาณซาโปนินรวม (TSC) 68
ตารางที่ 12 ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 500 นาโนเมตร เพื่อทดสอบหาปริมาณคอนเดนส์แทนนินรวม (CDT) 69
ตารางที่ 13 ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 500 นาโนเมตร เพื่อทดสอบหาปริมาณโพรแอนโธไซยานิดินส์รวม (TPAC) 70
ตารางที่ 14 ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 nm เพื่อทดสอบหาปริมาณร้อยละของความสามารถในการยับยั้งการเกิดอนุมูลอิสระ DPPH ของสารสกัดจากกากไวน์องุ่นป่า 71
ตารางที่ 15 ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 nm เพื่อทดสอบหาปริมาณร้อยละของความสามารถในการยับยั้งการเกิดอนุมูลอิสระ ABTH ของสารสกัดจากกากไวน์องุ่นป่า 72

ตารางที่ 16 ฤทธิ์การรีดิวซ์โลหะของสารสกัดตรวจสอบด้วยวิธี ferric reducing antioxidant power (FRAP) ของสารสกัดจากกากไวน์องุ่นป่า 73

ตารางที่ 17 ฤทธิ์การรีดิวซ์โลหะของสารสกัดตรวจสอบด้วยวิธี cupric reducing antioxidant capacity (CUPRAC) ของสารสกัดจากกากไวน์องุ่นป่า 74

พหูน ปณ ฑิโต ชีเว

สารบัญรูปภาพ

หน้า

รูปที่ 1 การเหนี่ยวนำด้วยสภาวะออกซิเดชันและการอักเสบที่นำไปสู่สภาวะเครียดออกซิเดชันที่สัมพันธ์กับ โรคเสื่อม 8

รูปที่ 2 สมมติฐานเพื่ออธิบายความสัมพันธ์ระหว่างสภาวะเครียดออกซิเดชันและการตายหรือการหยุดทำงานของเซลล์ 8

รูปที่ 3 โครงสร้างเคมีของสารต้านอนุมูลอิสระบางชนิด: (a) ascorbic acid, (b) 8-carotene, ... 11

รูปที่ 4 โครงสร้างเคมีของสารประกอบฟีนอลิกบางชนิด: catechin (a), caffeic acid (b), chlorogenic acid (c), ouercetin (d), gallic acid (e), kaempferol (f) 13

รูปที่ 5 โครงสร้างเคมีของ ABTS (2,2'-azino-bis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid) 17

รูปที่ 6 โครงสร้างเคมีของอนุมูล DPPH 18

รูปที่ 7 กลไกการเกิดปฏิกิริยาของ FRAP 18

รูปที่ 8 แสดงโครงสร้าง CUPRAC reagent ทำปฏิกิริยากับสารต้านอนุมูลอิสระ 19

รูปที่ 9 ผลขององุ่นป่าระยะการเจริญเติบโตต่างกัน คือ อ่อน (1), แก่ (2), และสุก (3) 20

รูปที่ 10 HPLC chromatograms (ความยาวคลื่น 280 nm, 306 nm, 320 nm และ 360 nm) ของสารมาตรฐาน: (1) gallic acid, (2) catechin, (3) caffeic acid, (4) epicatechin, (5) *p*-coumaric acid, (6) ferulic acid, (7) rutin, (8) myricetin, (9) resveratol, และ (10) quercetin 32

รูปที่ 11 HPLC chromatograms ของสารสกัดจากกากไวน์องุ่นป่าอ่อน 33

รูปที่ 12 HPLC chromatograms ของสารสกัดจากกากไวน์องุ่นป่าแก่ 34

รูปที่ 13 HPLC chromatograms ของสารสกัดจากกากไวน์องุ่นป่าสุก 35

รูปที่ 14 กราฟมาตรฐานของ Gallic acid สำหรับตรวจสอบปริมาณฟีนอลิกรวม 61

รูปที่ 15 กราฟมาตรฐานของ Gallic acid คำนวณ % inhibition 63

บทที่ 1
บทนำ

1.1 หลักการและเหตุผล

อนุมูลอิสระจะส่งผลต่อเซลล์ในร่างกายให้อยู่ในสภาวะเครียด (oxidative stress) ซึ่งถือเป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้เซลล์บาดเจ็บ และนำไปสู่ความผิดปกติของร่างกายและโรคที่เรียกว่า โรคเสื่อม เช่น โรคมะเร็ง โรคหัวใจ ระบบภูมิคุ้มกันบกพร่อง และความชรา (Al-Shoaibi et al., 2012; Perumalla and Hettiarachchy, 2011; Poudel et al., 2008) การอักเสบเรื้อรัง ภูมิคุ้มกันเสื่อม เบาหวาน ความดัน ต้อกระจก ข้ออักเสบ มาลาเรีย สะเก็ดเงิน และสมองเสื่อม (Tsao and Deng, 2004) สภาวะความเครียดยังก่อให้เกิดไม่สมดุลและมีผลกระทบต่อสารชีวโมเลกุลโดยเฉพาะดีเอ็นเอและโปรตีนและก่อให้เกิดโรคกับสารทั้งสองชนิด (Shahab et al., 2012) ปัจจุบัน ค้นพบสารที่ช่วยป้องกันอันตรายจากอนุมูลอิสระที่เรียกว่า สารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) ซึ่งเป็นสารที่ทำหน้าที่ให้อิเล็กตรอนแก่อนุมูลอิสระโดยที่โครงสร้างยังคงเสถียร สารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระพบทั้งในธรรมชาติและสังเคราะห์ อย่างไรก็ตาม สารต้านอนุมูลอิสระจากธรรมชาติได้รับการยอมรับมากกว่าในปัจจุบัน (Suhaj, 2006) ในช่วง 10 ปี ที่ผ่านมานักวิจัยได้ให้ความสนใจในการตรวจสอบและวิจัยฤทธิ์ของสารกลุ่มพฤกษเคมีธรรมชาติมากขึ้น สารกลุ่มนี้มีรายงานว่าสามารถพบได้ทั้งที่เป็นสารในทางโภชนาการและสารอื่นที่ไม่นำมาบริโภค และมีผลในการควบคุมหรือป้องกันโรคเสื่อมของร่างกาย (Renuka Devi and Arumughan, 2007)

สารพฤกษเคมี คือ สารออกฤทธิ์ในพืชชนิดต่างๆ และมีผลต่อการประยุกต์ใช้ในทางเภสัชกรรม แหล่งที่พบสารต้านอนุมูลอิสระในธรรมชาติที่สำคัญ คือ พืช โดยเฉพาะผัก ผลไม้และสมุนไพร จากอดีตที่ผ่านมา การใช้สมุนไพรสำหรับรักษาโรคพบว่ามีกระจายทั่วโลกและยังคงมีต่อเนื่องจนกระทั่งปัจจุบัน โดยเฉพาะอย่างยิ่งในประเทศกลุ่มกำลังพัฒนา (Zheng and Storz, 2000) เหตุที่พืชเป็นแหล่งสำคัญของสารต้านอนุมูลอิสระ เป็นเพราะพืชจะมีการสร้างสารกลุ่มที่ไม่เกี่ยวข้องกับการดำรงชีวิต หรือ secondary metabolites เช่น ฟีนอล (phenols), ฟลาโวนอยด์ (flavonoids), ควินิน (quinines), แทนนิน (tannins), อัลกาลอยด์ (alkaloids), ซาโปนินส์ (saponins) และสเตอรอล (sterols) (Alghazeer et al., 2012) เพื่อทำหน้าที่เฉพาะ เช่น การต่อต้านการรุกรานจากศัตรูหรือพรางตัวจากศัตรู ในอดีต มนุษย์รู้จักประโยชน์ของพืชนอกจากเป็นอาหาร คือ นำมาใช้บำบัดโรคที่เรียกว่าสมุนไพร (Desai, 2010) ต่อมามีการพัฒนายาจำนวนมากซึ่งสกัดได้จากพืชและพบว่ามีผลดีในการรักษาโรค มีราคาถูกและก่อให้เกิดอาการข้างเคียงน้อย (Bennett et al., 2011) ในปัจจุบัน

สารสกัดจากพืชถูกนำมาใช้ในวงการเภสัชกรรมแล้วจำนวนมาก (Mengulluoglu and Soylu, 2012; Verrier et al., 2008)

องุ่น (Grapes) ประกอบด้วยสารพฤกษเคมี (phytochemicals) ที่มีคุณค่าต่อสุขภาพจำนวนมาก (Pezzuto, 2008) โดยพบว่าสารกลุ่มสำคัญ ได้แก่ ฟีนอลิก เช่น monomeric flavanols, catechin, epicatechin, dimeric, trimeric, polymeric procyanidins, phenolic acids (gallic acid) หรือ anthocyanins (Yilmaz and Toledo, 2004) สารที่พบในองุ่นเหล่านี้มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระสูงเมื่อเทียบกับสารกลุ่มเดียวกันที่มาจากแหล่งอื่น นอกจากนี้ ยังพบว่า สารที่พบในองุ่นสามารถป้องกันโรคมะเร็งและโรคหัวใจได้ดี (Bianchini and Vainio, 2003) มีการศึกษาส่วนต่างๆ ขององุ่นและพบว่าในแต่ละส่วนขององุ่นจะมีปริมาณสารออกฤทธิ์และชนิดของสารแตกต่างกันไป แต่ส่วนใหญ่มีโครงสร้างแบบฟีนอลที่ต่อกันหลายวง สารสกัดจากองุ่นมีฤทธิ์ในการต่อต้านเชื้อแบคทีเรียก่อโรค (Samappito and Butkhup, 2010) ต่อต้านการกลายพันธุ์ (antimutagenic), ต่อต้านการก่อมะเร็ง (antineoplastic) ลดปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมันความหนาแน่นต่ำ (reduce low density lipoprotein (LDL) oxidation) และ ลดการอักเสบ (allergic inflamemation) สารกลุ่มโปรไซยานิดิน (procyanidins) ในเมล็ดองุ่นมีฤทธิ์ในการต้านการอักเสบ (anti-inflammatory), ป้องกันข้อต่ออักเสบ (antiarthritic), ป้องกันการแพ้ (antiallergic), ป้องกันมะเร็ง (anti-cancer), ป้องกันโรคหัวใจ (prevents heart disease) ป้องกันผิวหนังเหี่ยวย่น ยับยั้งการบวมจากสารกระตุ้น ช่วยเพิ่มความแข็งแรงของผนังหลอดเลือดฝอยและช่วยในการมองเห็น (Small and Kim, 2011) ผลิตภัณฑ์จากองุ่นที่สำคัญอย่างหนึ่ง คือ ไวน์ มีนักวิจัยได้นำกากองุ่นที่เหลือจากการผลิตไวน์มาสกัดสารพฤกษเคมีและตรวจสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัด พบว่า สารสกัดจากกากไวน์องุ่นประกอบด้วยสารพฤกษเคมีหลายชนิดและยังมีฤทธิ์ทางชีวภาพที่หลากหลายอีกด้วย (Bekhit et al., 2019; Lingua et al., 2016; Peixoto et al., 2018)

องุ่นป่า (wild grape; *Ampelocissus martinii* Planch.) พบได้ทั่วไปในประเทศไทย เวียดนาม กัมพูชา ลาว มาเลเซีย บอร์เนียวและฟิลิปปินส์ ในอดีตชาวบ้านในพื้นที่ห่างไกลตัวเมืองใช้เป็นสมุนไพร สำหรับรักษาโรคฝีและอาการบวมจากการอักเสบ อย่างไรก็ตาม การศึกษาเกี่ยวกับสารพฤกษเคมีในองุ่นป่า ยังมีรายงานน้อยมากโดยเฉพาะอย่างยิ่งในประเทศไทย ทั้งที่ลำต้น ใบ สีและขั้นการเจริญของผลองุ่นป่ามีลักษณะคล้ายองุ่นที่ปลูกเพื่อการค้า จึงอาจเป็นไปได้ว่า สารพฤกษเคมีที่ประกอบอยู่ในผลองุ่นป่าอาจมีชนิดและปริมาณคล้ายกับองุ่นซึ่งเป็นผลไม้ที่มีการศึกษาสารพฤกษเคมีและฤทธิ์ทางชีวภาพอย่างแพร่หลาย

Ampelocissus อยู่ในจีนัส VITACEAE ซึ่งประกอบด้วยสมาชิกมากกว่า 90 สปีชีส์ พบได้ทั่วไปใน เขตร้อนแถบแอฟริกา เอเชีย อเมริกากลาง บริเวณชายทะเล สารพฤกษเคมีในพืชกลุ่มนี้ได้แก่ tannins, gallotannins, flavanols และสารประกอบฟีนอลิกอื่นๆ ซึ่งสารเหล่านี้ มีฤทธิ์ทาง

ชีวภาพที่ดี เช่น มีสมบัติในการป้องกันโรคเสื่อมที่เกิดจากอนุมูลอิสระ ยับยั้งการเจริญและเหนี่ยวนำการตายของเซลล์มะเร็งหลายชนิด ยับยั้งและฆ่าเชื้อจุลินทรีย์หรือช่วยชะลอความแก่ชรา ดังนั้น จึงได้รับความสนใจใน การศึกษาเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ โดยเฉพาะการศึกษาและตรวจสอบแหล่งของสารพฤกษเคมี เพื่อที่จะสกัดเอาสารเหล่านั้นมาประยุกต์ใช้เสริมสุขภาพที่ดีแก่ร่างกายและพัฒนาเป็นส่วนประกอบในด้านเภสัชกรรม

องุ่นป่า เป็นพืชที่เกิดเองตามธรรมชาติ มีความทนทานต่อสภาพแวดล้อมที่รุนแรงและออกผลเป็นฤดูกาล ดังนั้น องค์ประกอบของสารพฤกษเคมีอาจมีความแตกต่างกันในแต่ละส่วนของลำต้นและผล เช่นเดียวกับที่เคยมีรายงานมาก่อนในการศึกษาพืชชนิดอื่น การศึกษาเกี่ยวกับกากองุ่นป่าที่ผ่านการหมักไวน์ยังไม่มีรายงานมาก่อนจึงเป็นเรื่องที่น่าสนใจที่จะทำการศึกษาสารพฤกษเคมีและฤทธิ์ทางชีวภาพของกากองุ่นป่าที่ผ่านการหมักไวน์เพื่อเพิ่มมูลค่าของวัสดุเศษเหลือได้

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1) เพื่อตรวจสอบปริมาณสารพฤกษเคมีในสารสกัดจากกากขององุ่นป่า (*Ampelocissus martinii* Planch.) ที่ผ่านการหมักไวน์

2) เพื่อตรวจสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของสารพฤกษเคมีในสารสกัดจากกากไวน์องุ่นป่า

3) เพื่อหาความสัมพันธ์ระหว่างสารพฤกษเคมีและฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของสารสกัดกากไวน์องุ่นป่า

1.3 ผลที่คาดว่าจะได้รับจากงานวิจัย

1) ได้ปริมาณสารพฤกษเคมีในสารสกัดจากกากขององุ่นป่า (*Ampelocissus martinii* Planch.) ที่ผ่านการหมักไวน์

2) ได้ฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของสารพฤกษเคมีในสารสกัดจากกากไวน์องุ่นป่า

3) ได้ความสัมพันธ์ระหว่างสารพฤกษเคมีและฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของสารสกัดกากไวน์องุ่นป่า

1.4 ขอบเขตของงานวิจัย

นำผลองุ่นป่าที่มีระยะการเจริญเติบโตแตกต่างกัน ได้แก่ อ่อน แก่และสุก มาหมักไวน์เป็นระยะเวลา 1 สัปดาห์ จากนั้น แยกไวน์และกากองุ่นป่า แล้วนำกากองุ่นป่ามาทำการสกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอล นำสารสกัดไปตรวจสอบสารพฤกษเคมีและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและหาความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณสารพฤกษเคมีและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

1.5 นิยามศัพท์เฉพาะ

กากไวน์ ส่วนของของแข็งที่บีบแยกออกจากของเหลวในกระบวนการหมักไวน์

1.6 สถานที่ดำเนินการวิจัย

ภาควิชาเคมี (SC1-406) คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม

บทที่ 2
เอกสารงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ความหมายของอนุมูลอิสระ

อนุมูลอิสระ (free radical) คือ โมเลกุลที่มีอิเล็กตรอนวงนอกสุดไม่ครบคู่ (Gilbert, 2000) ซึ่งส่งผลให้ไม่มีความเสถียร ตัวอย่างอนุมูลอิสระที่มีรายงาน ได้แก่ superoxide, hydroxyl, peroxyl ($RO_2^{\cdot}$) alkoxyl ($RO^{\cdot}$), and hydroperoxyl ($HO_2^{\cdot}$), nitric oxide, nitrogen dioxide ($^{\cdot}NO_2$), hydrogen peroxide, hypochlorous acid (HOCl), hypobromous acid (HOBr), and peroxynitrite ($ONOO^-$) (Evans and Halliwell, 2001) ปัจจุบันอนุมูลอิสระสามารถจำแนกได้เป็น 6 กลุ่มใหญ่ๆ (Denev et al., 2012) ดังนี้

2.1.1 Superoxides

Superoxides ($O_2^{\cdot}$) เป็นอนุมูลประจุลบที่เกิดในร่างกายโดยปฏิกิริยาออกซิเดชันอัตโนมัติของสารชีวโมเลกุล เช่น กลีเซอรอลดีไฮด์ $FMNH_2$, $FADH_2$ อะดรีนาลีน โดปามีน โดยเอนไซม์ NADPH oxidases ในเซลล์ตับ หรือเอนไซม์อื่นๆ เช่น xanthine oxidase และ xanthine dehydrogenase ซึ่งรีดิวซ์ O_2 ไปเป็น $O_2^{\cdot-}$ และ dopamine กระบวนการขนส่งอิเล็กตรอนในไมโตคอนเดรียและฮีโมโกลบิน เป็นแหล่งเกิด $O_2^{\cdot-}$ ของร่างกาย

2.1.2 Hydrogen peroxides

Hydrogen peroxides (H_2O_2) มักเกิดในร่างกายในหลายเนื้อเยื่อของร่างกาย โดยเฉพาะไมโตคอนเดรีย โดยทั่วไป H_2O_2 เกิดโดยเอนไซม์ monoamine oxidases และเปลี่ยนรูปของ $O_2^{\cdot-}$

2.1.3 Hydroxyl radicals

Hydroxyl radicals ($^{\cdot}OH$) มักเกิดผ่านปฏิกิริยาเฟนตัน (Fenton reactions) ปฏิกิริยานี้เร่งโดยการเปลี่ยนแปลงไอออนของโลหะโดยเฉพาะ Fe^{3+} การเหนี่ยวนำ H_2O_2 ด้วยแสง UV การทำปฏิกิริยาของกรด hypochlorous ด้วย $O_2^{\cdot-}$

2.1.4 Peroxyl และ alkoxyl radicals

Peroxyl radicals ($HO_2^{\cdot}$) และ alkoxyl radicals ($RCO_2^{\cdot}$) ซึ่งเป็นตัวออกซิไดซ์ที่ดี อนุมูลดังกล่าวนี้เกิดจากการสลายตัวของสาร peroxides หรือผ่านปฏิกิริยา carbon-centered radicals ที่มี $O_2^{\cdot}$

2.1.5 Singlet oxygen

Singlet oxygen ($^1O_2$) เกิดจากปฏิกิริยาเร่งของแสง ส่งผลเสียต่อการเกิดความเสียหายต่อผิวหนังและตา

2.1.6 Peroxynitrites

Peroxynitrites ($ONOO^-$) เกิดจากปฏิกิริยาระหว่างอนุมูลอิสระ superoxide กับ NO โดยการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ nitric oxide synthetase

2.2 การเกิดอนุมูลอิสระ

ในร่างกายที่ต้องการออกซิเจนในการดำรงชีวิตมักจะมีการผลิตอนุมูลอิสระกลุ่ม ROS, RNS และ reactive chlorine species (Fridovich, 1999) นอกจากนี้ ยังพบกลุ่ม NOS ซึ่งต้องการออกซิเจนเช่นกัน รวมทั้ง tetrahydrobiopterin, nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH), calmodulin, flavin adenine dinucleotide (oxidized; FAD), flavin mononucleotide (FMN), และ heme สารที่มีสมบัติรีดิวซ์ต่างๆ สามารถก่อให้เกิดอนุมูลได้เช่นกัน เช่น NADPH, NADH, $FADH_2$ ในไมโทคอนเดรีย หรือแม้แต่ปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารต่างๆ เช่น dopamine, epinephrine และ norepinephrine, flavins และ hemoglobin ที่มีโลหะทรานซิชันรวมทั้งการใช้ออกซิเจนของ Cytochrome P-450 เป็นต้น (Fridovich, 1999; Wu et al., 2002)

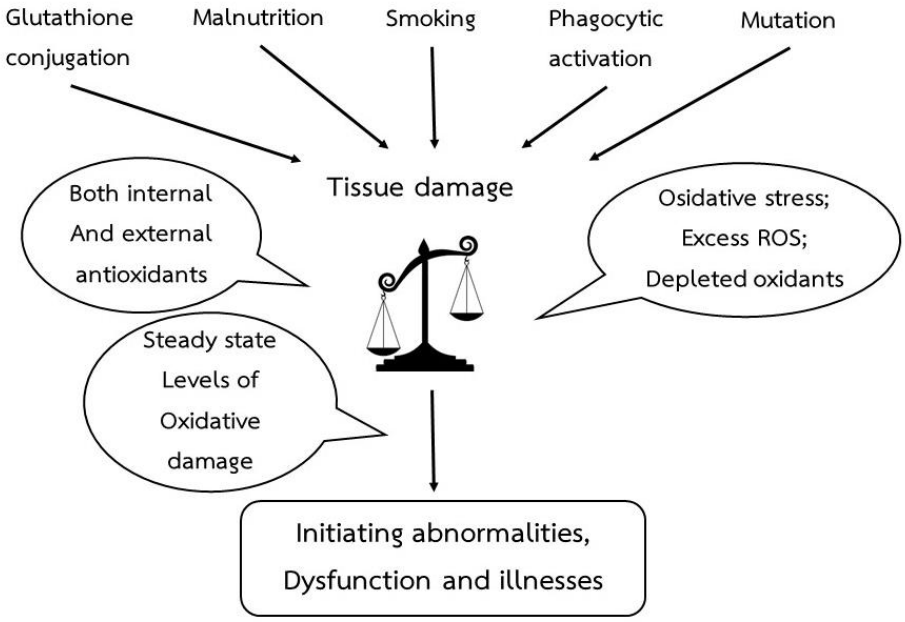
2.3 บทบาทของอนุมูลอิสระต่อร่างกาย

อนุมูลอิสระก่อให้เกิดความเสียหาต่อเซลล์และเนื้อเยื่อของร่างกาย โดยเฉพาะ ROS ที่ถือว่ามีผลร้ายแรงในการเปลี่ยนแปลงระบบร่างกายของสิ่งมีชีวิต เนื่องจาก ROS เกี่ยวข้องกับระบบการทำงานของร่างกายที่ใช้ออกซิเจนในกระบวนการการหายใจ (Zhen et al., 2013) เมื่อมีปริมาณ ROS มากขึ้นจะสามารถทำลายเซลล์และสร้างความเสียให้แก่สารชีวโมเลกุลต่างๆ เช่น DNA โปรตีนและไขมัน (Borg and Schaich, 1984; Kohen and Nyska, 2002) ในลักษณะของปฏิกิริยาลูกโซ่และส่งผลให้เกิดภาวะอย่างหนึ่งในร่างกาย เรียกว่า “สภาวะเครียดออกซิเดชัน (oxidative stress)” (McCord, 2000; ROCK et al., 1996; Zheng and Storz, 2000) อนุมูลอิสระมีบทบาทต่อการ

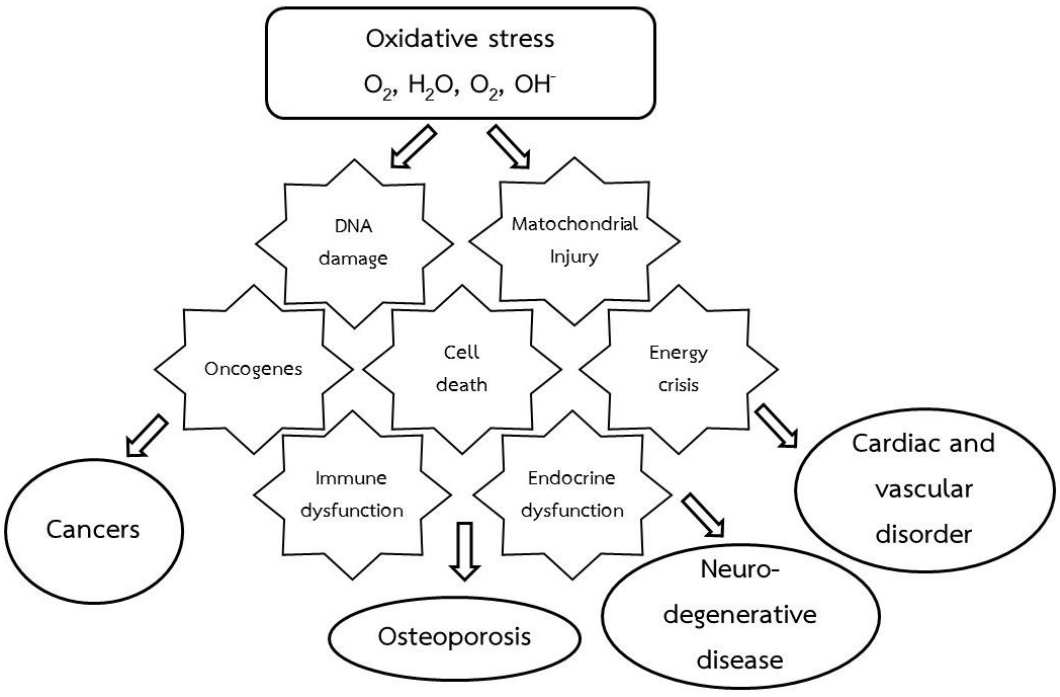
เหนี่ยวนำของตัวนำส่งสัญญาณ การลอกแบบของยีน การควบคุมหน้าที่ของเอนไซม์ guarylate cyclase (Lander, 1997; Zheng and Storz, 2000) ผลต่อพัฒนาการของเซลล์ การเกาะตัวและการสร้างระบบเลือด ระบบหมุนเวียนโลหิตของร่างกายและระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายโดยไนตริกอกไซด์ NOX (Fridovich, 1999) แม้ว่าอนุมูลอิสระจะมีความสำคัญต่อระบบต่างๆในร่างกาย แต่หากมีการผลิตมากเกินไป อาจส่งผลเสียต่อเซลล์ได้ (Fridovich, 1999; McCord, 2000) ยกตัวอย่างเช่น ROS ที่เกิดจากการเหนี่ยวนำของรังสีมีผลต่อสมบัติทางกายภาพ เคมีและการเสริมภูมิคุ้มกันของเอนไซม์ SOD ซึ่งมีผลต่อการอักเสบของเซลล์อีกต่อหนึ่ง อนุมูลอิสระส่งผลต่อการทำลายเซลล์ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมและเป็นตัวกลางนำไปสู่การเกิดโรคเรื้อรังหลายชนิด แต่อีกทางหนึ่ง อนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นนี้มีบทบาทสำคัญในการทำลายเชื้อโรคด้วยการกระตุ้นการทำงานของเซลล์เม็ดเลือดขาวและเซลล์เม็ดเลือดแดง (McCord, 2000) จึงกล่าวได้ว่า อนุมูลอิสระมีบทบาททั้งดีและไม่ดีต่อร่างกาย

2.4 โรคเสื่อม

อนุมูลอิสระ ไม่ว่าจะเป็น reactive oxygen-species (ROS), reactive nitrogen species (RNS), carbon-centered radicals, and sulfur-centered radicals (Ohinata et al., 2000) ล้วนก่อให้เกิดความเสียหายต่อเซลล์และเนื้อเยื่อของร่างกาย โดยเฉพาะ ROS ที่ถือว่ามีผลร้ายแรงในการเปลี่ยนแปลงระบบร่างกายของสิ่งมีชีวิต เนื่องจาก ROS เกี่ยวข้องกับระบบการทำงานของร่างกายที่ใช้ออกซิเจนในกระบวนการการหายใจ (Zhen et al., 2013) เมื่อมีปริมาณ ROS มากขึ้นจะสามารถทำลายเซลล์และสร้างความเสียให้แก่สารชีวโมเลกุลต่างๆ เช่น DNA โปรตีนและไขมัน (Kohen and Nyska, 2002) ในลักษณะของปฏิกิริยาลูกโซ่และส่งผลให้เกิดภาวะอย่างหนึ่งในร่างกาย เรียกว่า “สภาวะเครียดออกซิเดชัน (oxidative stress)” (McCord, 2000; ROCK et al., 1996) สภาวะนี้ได้รับการศึกษาและยืนยันแล้วว่า ทำให้เกิดโรคเสื่อม (degenerative disease) หลายชนิดและปัจจุบันถือเป็นปัญหาที่สำคัญของผู้คนทั่วโลก (Sailaja et al., 2011) นอกจากนี้ยังส่งผลให้อวัยวะต่างๆในร่างกายทำงานผิดปกติ ไม่ว่าจะเป็นระบบประสาท การไหลเวียนโลหิต ระบบภูมิคุ้มกัน (DeMartino and Slaughter, 1999; Shringarpure et al., 2001) โรคมะเร็ง เบาหวาน ไขข้ออักเสบ โรคหัวใจ (Dalle Donne et al., 2006; Wu et al., 2002) ดังแสดงในรูปที่ 1 และรูปที่ 2



รูปที่ 1 การเหนี่ยวนำด้วยสภาวะออกซิเดชันและการอักเสบที่นำไปสู่สภาวะเครียดออกซิเดชันที่สัมพันธ์กับ โรคเสื่อมดัดแปลงจาก(Saeidnia and Abdollahi, 2013)



รูปที่ 2 สมมติฐานเพื่ออธิบายความสัมพันธ์ระหว่างสภาวะเครียดออกซิเดชันและการตายหรือการหยุดทำงานของเซลล์ดัดแปลงจาก(Saeidnia and Abdollahi, 2013)

2.5 สารต้านอนุมูลอิสระ

นักวิจัยได้คิดค้นเพื่อหาสารที่สามารถต้านฤทธิ์อันตรายจากอนุมูลอิสระ ซึ่งมีชื่อว่า สารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) ซึ่งสารต้านอนุมูลอิสระ สามารถยับยั้งอันตรายของอนุมูลอิสระได้โดยการหยุดปฏิกิริยาลูกโซ่ของอนุมูลอิสระ (Chattopadhyay and Chattopadyay, 2008) สารต้านอนุมูลอิสระมีทั้งที่เป็นเอนไซม์และไม่ใช่เอนไซม์ ซึ่งมีกลไกในการยับยั้งแตกต่างกัน เช่น การดักจับ (radical scavenging) การเปลี่ยนสถานะ (singlet oxygen quenching) การจับโลหะตัวก่อปฏิกิริยา (metal chelation) การสลายลูกโซ่ (chain breaking) การยับยั้งเอนไซม์ตัวเร่ง (enzyme inhibition) หรือหลายอย่างรวมกัน (synergism) (Singal et al., 1988) โดยทั่วไป สารต้านอนุมูลอิสระสามารถแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ๆ คือ มาจากธรรมชาติและได้จากการสังเคราะห์ ซึ่งสารที่ได้จากการสังเคราะห์ เช่น BHA, BHT นิยมใช้ในอุตสาหกรรมหลายชนิดและมีฤทธิ์สูง อย่างไรก็ตาม สารสังเคราะห์มักมีผลข้างเคียงที่ไม่พึงประสงค์ต่อสุขภาพ (Yanishlieva and Marinova, 2001) ส่วนสารต้านอนุมูลอิสระที่ได้จากธรรมชาติ เช่น Vitamin C, vitamin E, flavonoid, anthocyanin, carotenoids lay ubiquinones, glutathione. gluta-thione peroxidase (GPX), glutathione reductase, glutathione transferase las superoxide dismutase (SOD) (เปลี่ยน O_2 เป็น H_2O_2) (Takci et al., 2013)

2.6 สารต้านอนุมูลอิสระธรรมชาติ

สารต้านอนุมูลอิสระธรรมชาติแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ๆ ดังรายละเอียด

2.6.1 สารต้านอนุมูลอิสระที่เป็นเอนไซม์

ในร่างกายคนประกอบด้วยเอนไซม์หลายชนิดที่ทำหน้าที่เป็นสารต้านอนุมูลอิสระ เช่น superoxide dismutases, glutathione peroxidases และ Catalase เนื่องจากสามารถปกป้องอวัยวะหรือ สารชีวโมเลกุลจากอนุมูลอิสระเอนไซม์ superoxide dismutases ทำหน้าที่เปลี่ยน superoxide anions ให้ เป็น hydrogen peroxide โดยเอนไซม์ประกอบด้วยเอนไซม์ย่อย คือ catalase ที่ทำหน้าที่เปลี่ยน hydrogen peroxide ให้เป็นน้ำและออกซิเจน ขณะที่เอนไซม์ glutathione peroxidases จะทำหน้าที่ให้อิเล็กตรอน 2 ตัว เพื่อยับยั้ง peroxides ซึ่งเป็นสารตั้งต้นของปฏิกิริยา Fenton reaction (Rahman, 2007)

2.6.2 สารต้านอนุมูลอิสระที่ไม่ใช่เอนไซม์

สารต้านอนุมูลอิสระกลุ่มนี้ ส่วนใหญ่เป็นวิตามินและสารพฤกษเคมี ดังรายละเอียดต่อไปนี้

Vitamin C และ vitamin E ช่วยบำรุงสุขภาพและป้องกันโรคหลายชนิด Vitamin C เป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่ละลายน้ำได้และเป็นสารที่ทำหน้าที่ป้องกันอนุมูลอิสระในเลือดและพลาสมา Vitamin E ประกอบด้วยโครงสร้างที่ใหญ่กว่าวิตามินซี มีโครงสร้างที่คล้ายคลึงกัน 4 รูปแบบ โครงสร้างที่พบมากที่สุด คือ tocopherol ซึ่งจัดเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่ละลายในลิพิด (Carocho and Ferreira, 2013; Niki et al., 2018)

Vitamin K เป็นอีกหนึ่งสารที่ละลายในลิพิด ทำหน้าที่เปลี่ยนกลูตาเมตให้เป็น carboxyglutamates ในโปรตีนชนิดต่างๆ มีหลายโครงรูป แต่โครงรูปที่ถือว่ามีความสำคัญและทำหน้าที่ต้านอนุมูลอิสระดีที่สุด คือ 1,4-naphthoquinone (Carocho and Ferreira, 2013)

Carotenoids คือ กลุ่มสารสีที่สังเคราะห์ในพืชและจุลินทรีย์ โครงสร้างของแคโรทีนอยด์ประกอบด้วยโครงสร้างพันธะคู่ภายในซึ่งแสดงบทบาทสำคัญในการต้านอนุมูลอิสระ เนื่องจากทำให้เกิดการเควนชิง (quenching) ของ singlet oxygen และทำให้แคโรทีนอยด์ถูกกระตุ้น แล้วส่งต่อให้กับอนุมูลอิสระตัวอื่นๆ ได้ต่อไป (Carocho and Ferreira, 2013)

Coenzyme Q10 มีความสำคัญในเมทาบอลิซึมของเซลล์และลูกโซ่หายใจ ทำหน้าที่ป้องกันการเกิดอนุมูลเพอรอกซี่เช่นเดียวกับวิตามินอี (Turunen et al., 2004)

Uric acid คือ ผลิตภัณฑ์สุดท้ายในเมแทบอลิซึมเพียวรีนนิวคลีโอไทด์ ในร่างกายมนุษย์ช่วยป้องกันไม่ให้ฮีโมโกลบินทำปฏิกิริยากับ peroxides นอกจากนี้ ยังช่วยป้องกันการแตกของเม็ดเลือดแดงและจับกิน singlet oxygen และอนุมูล hydroxyl อย่างมีประสิทธิภาพ (Burjanivova et al., 2006)

Glutathione คือ tripeptide ที่อยู่ภายในเซลล์ ช่วยปกป้องเซลล์จากอนุมูลอิสระ โดยการให้อิเล็กตรอนหรืออะตอมไฮโดรเจนแก่อนุมูลอิสระ นอกจากนี้ ยังเป็นตัวการสำคัญในการสร้างสารต้านอนุมูลอิสระตัวอื่น เช่น ascorbate (Carocho and Ferreira, 2013)

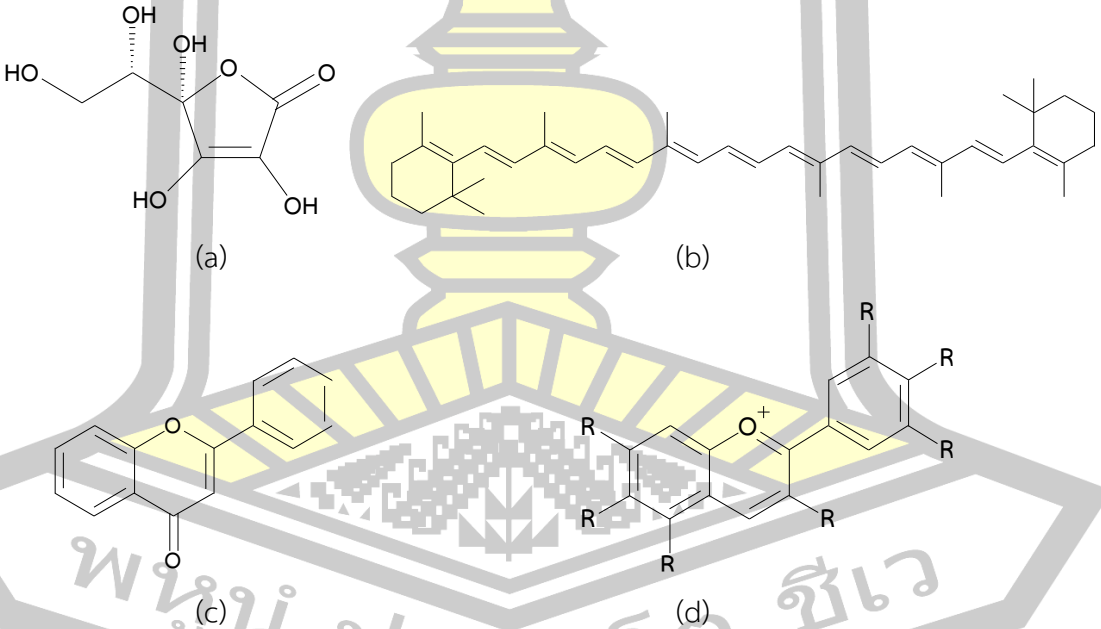
Minerals ส่วนใหญ่พบในปริมาณเล็กน้อย ทำหน้าที่สำคัญในกระบวนการเมแทบอลิซึม ตัวอย่างแร่ธาตุที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ เช่น selenium, Copper, manganese และ zinc แม้ว่าแร่ธาตุต่างๆ ที่กล่าวมาจะไม่ได้ออกฤทธิ์โดยตรงต่ออนุมูลอิสระ แต่มีความสำคัญต่อการทำงานของเอนไซม์ที่ต่อต้านอนุมูลอิสระ เช่น metalloenzymes, glutathione peroxidase และ thioredoxinreductase (Tabassum et al., 2010)

Flavonoids คือ กลุ่มของสารเคมีที่ประกอบด้วยโครงคาร์บอน 15 อะตอม ประกอบด้วยวงเบนซิน 2 วง ที่จับกับสายคาร์บอน 3 ตำแหน่ง คือ C6-C3-C6 ซึ่งโครงคาร์บอนนี้ ทำให้เกิดความหลากหลายของโครงสร้างเคมี ซึ่งแบ่งเป็นหลายกลุ่ม เช่น flavones, flavonols, flavanones, flavononols, flavanes, flavanols, anthocyanidins, anthocyanins, chalcones และ dihydro-chalcones ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของฟลาโวนอยด์เกี่ยวข้องกับหมู่ phenolic hydroxyl ที่

จับในวงเบนซินและทำหน้าที่เป็นตัวรีดิวซ์ (reducing agents), hydrogen donators, singlet oxygen quenchers, superoxide radical scavengers และ metal chelators ตัวอย่างฟลาโวนอยด์ที่สำคัญ ได้แก่ catechin, catechin gallate, quercetin and kaempferol (Procházková et al., 2011)

Phenolic acids โดยทั่วไปแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ๆ คือ benzoic acids และ cinnamic acids ซึ่งพบมากในรูป hydroxybenzoic และ hydroxycinnamic acids และพบทั้งในรูปที่เป็นอิสระและรูปที่ติดกับโมเลกุลอื่น ทำหน้าที่เป็น chelators และตัวดักจับอนุมูลอิสระ โดยเฉพาะ hydroxyl และ peroxyl radicals, superoxide anions และ peroxynitrites ในบรรดากรดฟีนอลิก gallic acid ถือว่ามีความสำคัญที่สุดเนื่องจากเป็นสารตั้งต้นของแทนนินส์ที่ถูกสลายทั้งหมดและยังเป็นส่วนประกอบในแทนนินส์โครงสร้างแข็ง (Baderschneider and Winterhalter, 2001)

ในบรรดาสารต้านอนุมูลอิสระธรรมชาติ สารประกอบจากพืชถือเป็นแหล่งที่มีมากที่สุด ซึ่งสารต้านอนุมูลอิสระที่มาจากพืช เรียกว่า สารพฤกษเคมี (phytochemicals) เช่น vitamin, B-carotene, carotenoid และ polyphenol (Kim et al., 2006) รูปที่ 3 แสดงโครงสร้างสารต้านอนุมูลอิสระบางชนิดที่มาจากธรรมชาติ



รูปที่ 3 โครงสร้างเคมีของสารต้านอนุมูลอิสระบางชนิด: (a) ascorbic acid, (b) 8-carotene, (c) flavonoid และ (d) anthocyanin

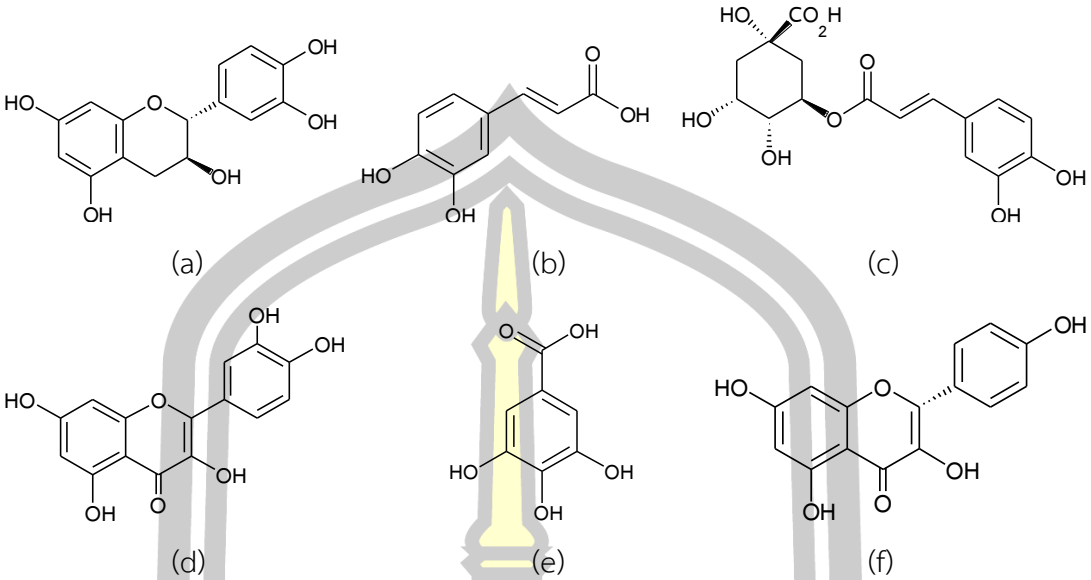
2.7 สารพฤกษเคมี

สารพฤกษเคมี คือ สารเคมีที่สร้างโดยพืชซึ่งมีคุณสมบัติในการป้องกันโรคเสื่อมที่เกิดจากอนุมูลอิสระได้ เป็นสารที่ไม่จำเป็นในการเจริญเติบโตของพืชแต่จำเป็นในกระบวนการป้องกันอันตรายต่อพืช สารกลุ่มนี้ที่สำคัญ คือ สารประกอบพอลีฟีนอล เช่น ฟลาโวนอยด์ หรือ คาเทชิน (Decker, 1995; Fang et al., 2002) มีรายงานที่กล่าวถึงฤทธิ์ของสารกลุ่มนี้ต่ออนุมูลอิสระ เช่น เพิ่มความทนทานของเม็ดเลือดแดงต่อ สภาวะเครียดออกซิเดชัน (Fang, 1998) ยับยั้งการดัดแปลงไลโพโปรตีนความหนาแน่นต่ำ (Cousin et al., 2001) ลดความเข้มข้นซีรัมในคลอเรสเตอรอลและเพิ่มความเข้มข้นของไลโพโปรตีนความหนาแน่นสูง ยับยั้งการเจริญและเหนี่ยวนำการตายของเซลล์มะเร็งหลายชนิด (Fang, 1998; Yang et al., 1998)

สารต้านออกซิเดชันกลุ่มวิตามิน เช่น vitamins C และ E ช่วยปกป้องอนุมูล ROS ได้แต่ฤทธิ์อาจสู้สารประกอบที่พบในพืชไม่ได้ (Bors et al., 1990) ทั้งนี้เนื่องมาจากโครงสร้างทางเคมีของสารพฤกษเคมีประกอบด้วยวงเบนซินที่ทำให้อิเล็กตรอนสามารถเคลื่อนที่ได้ดีทำให้เมื่อจับกับอนุมูลอิสระแล้วยังมีความเสถียรและไม่เกิดปฏิกิริยาลูกโซ่ ลักษณะกลไกเช่นนี้ เรียกว่า การดักจับหรือการจับกินอนุมูลอิสระ (Steinmetz and Potter, 1991; Stich and Rosin, 1984) นอกจากนี้สิ่งที่น่าสนใจอย่างมากของสารพอลิฟีนอล คือ ฤทธิ์ในการต้านเซลล์มะเร็ง (Huang et al., 1992) ซึ่งทำให้มีการศึกษาสารพฤกษเคมีอย่างกว้างขวาง สารพฤกษเคมีแบ่งออกเป็นหลายประเภทตามลักษณะโครงสร้างทางเคมีและจำนวนคาร์บอนที่เป็นองค์ประกอบได้ดังนี้

สารประกอบฟีนิลิก ถือเป็นสารพฤกษเคมีกลุ่มใหญ่ที่สุดที่มีในพืช สามารถแบ่งออกเป็น 3 ชนิดด้วยกัน คือ ฟลาโวนอยด์ กรดฟีนอลิกและพอลิฟีนอล ซึ่งในบรรดาสารทั้ง 3 กลุ่มที่กล่าวมา ฟลาโวนอยด์ถือเป็นสารกลุ่มใหญ่ที่สุดและยังเป็นสารประกอบที่มีการศึกษาอย่างแพร่หลายที่สุด (Ozdal et al., 2013) ส่วนกรดฟีนอลิกที่พบมาก คือ hydroxybenzoic และ hydroxyl-cinnamic acids ส่วนพอลิฟีนอลที่พบมากที่สุด คือ แทนนินส์ (tannins)

ฟลาโวนอยด์เป็นสารธรรมชาติที่ได้รับความสนใจศึกษาฤทธิ์ที่จะนำมาใช้ในการรักษาโรคเสื่อม ฟลาโวนอยด์ปรากฏในหลายรูปแบบ เช่น aglycones, glucosides และอนุพันธ์ของหมู่เมธิล (methylated derivatives) ปัจจุบัน มีการค้นพบฟลาโวนอยด์มากกว่า 5,000 ชนิด ซึ่งประมาณ 650 คือ ฟลาโวน (favones) และประมาณกว่า 1,030 คือ flavonoids (Pretorius et al., 2003) รูปที่ 4 แสดงโครงสร้างของสารประกอบฟีนอลิกบางชนิด



(a) (b) (c)

(d) (e) (f)

รูปที่ 4 โครงสร้างเคมีของสารประกอบฟีนอลิกบางชนิด: catechin (a), caffeic acid (b), chlorogenic acid (c), ouercetin (d), gallic acid (e), kaempferol (f) (Ozdal et al., 2013)

จากรายงานที่ผ่านมา สารพฤกษเคมีสามารถป้องกันโรคได้หลายชนิดด้วยกลไกการออกฤทธิ์ที่แตกต่าง กันดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ฤทธิ์และกลไกการออกฤทธิ์ของสารพฤกษเคมี(Kumar et al., 2008; Patel and Wunderlich, 2010)

สารพฤกษเคมี	ฤทธิ์	กลไกการออกฤทธิ์
Alkaloids	ต้านไวรัส	จับกับผนังเซลล์และ DNA
Coumarins	ต้านไวรัส	จับกับ DNA
Flavonoid	ต้านจุลินทรีย์	จับกับผนังเซลล์
	แก้ท้องร่วง	ยับยั้งการปล่อยสาร autocoids และ prostaglandins ยับยั้งการขับถ่ายของเหลว
Glycosides	แก้ท้องร่วง	ย้ายน้ำผ่านผนังเซลล์ ยับยั้งผนังลำไส้ไม่ให้ปล่อยสารสื่อ
Polyphenols and Tannins	ต้านจุลินทรีย์	ประสาท actylcholine
	แก้ท้องร่วง	ยับยั้งการปล่อยสาร autocoids และ prostaglandins ยับยั้งการขับถ่ายน้ำ
	แก้พยาธิ	
Quinones	ต้านจุลินทรีย์	ยับยั้งเอนไซม์ และจับกับผนัง DNA

สารพฤกษเคมี	ฤทธิ์	กลไกการออกฤทธิ์
Saponins	แก้ท้องร่วง	จับกับผนังเซลล์ ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์
Steroids	แก้พยาธิ	ยับยั้งการปลดปล่อยอีสตามีน
	แก้ท้องร่วง	เพิ่มการส่งผ่านผนัง
Terpenoids	ต้านจุลินทรีย์	เพิ่มการดูดกลับโซเดียมและน้ำของลำไส้เล็ก
Tannins	ต้านจุลินทรีย์	ยับยั้งการปล่อยสาร autocoids และ prostaglandins ยับยั้งการขับถ่ายของเหลว

ปัจจุบัน การศึกษาเกี่ยวกับสารพฤกษเคมีได้รับความสนใจมากและมีการวิจัยเพิ่มขึ้นมาก (Mejia et al., 2009) พบว่า คาเทชิน จากใบชาช่วยป้องกันเยื่อหุ้มประสาทจากอนุมูลอิสระที่เหนี่ยวนำจากโลหะได้ (Suraphad et al., 2017) ตรวจสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชันและต้านไขมันจากส้มโอ (*Citrus grandis* L. Osbeck) ในประเทศไทย ซึ่งพบว่า สารสกัดจากส้มโอช่วยต้านไขมันได้และยังมีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันได้ดีด้วย

ตลอดระยะที่ผ่านมา มีการพัฒนาวิธีการตรวจสอบฤทธิ์ของสารสกัดจากพืชที่หลากหลาย (Floegel et al., 2011) ซึ่งวิธีที่ง่าย สะดวกและนิยมมากวิธีหนึ่ง คือ เทคนิคทางสเปกโทรสโกปี เช่น DPPH assay, ABTS assay และ FRAP assay (Abu Bakar et al., 2009; Kim et al., 2003; Ma and Vosseller, 2013; Nguyen et al., 2015; Nour et al., 2013; Sati et al., 2013; Thaipong et al., 2006) นอกจากนี้ ยังมีวิธีอื่นที่ได้รับความนิยมเช่นกัน เช่น trolox equivalent antioxidant capacity assay (TEAC), hydroxyl radical scavenging activity (HRSA), superoxide radical scavenging activity (SRSA) (Mäkynen et al., 2013) และ cupric reducing antioxidant capacity assay (CUPRAC) (Bektaşoğlu et al., 2006)

2.8 สารพฤกษเคมีในองุ่นและฤทธิ์ทางชีวภาพ

จากรายงานการศึกษาที่ผ่านมา มีพืชหลากหลายชนิดที่ระบุว่าประกอบด้วยสารพฤกษเคมีจำนวนมากและมีฤทธิ์ทางชีวภาพที่ดี โดยเฉพาะพืชสมุนไพร ผักและผลไม้ ซึ่งพืชเหล่านี้ พบว่าประกอบด้วย สารประกอบฟีนอลิกที่หลากหลายและมีผลในการทำลายหรือป้องกันอนุมูลอิสระที่ดี (Cousin et al., 2001; Fang, 1998; Fang et al., 2002; Pyo et al., 2004)

องุ่น (Grapes) เป็นผลไม้ที่ได้รับความสนใจและมีรายงานการศึกษาสารพฤกษเคมีมากชนิดหนึ่ง ปัจจุบันมีรายงานการศึกษาที่กล่าวไว้ว่า องุ่นประกอบด้วยสารพฤกษเคมีในปริมาณมากและเป็น

แหล่งของสารพฤกษเคมีที่ดีและมีฤทธิ์ทางชีวภาพสูง โดยเฉพาะฤทธิ์การต้านออกซิเดชันสารพฤกษเคมีที่พบในองุ่น ได้แก่ anthocyanins, resveratrol (Pezzuto, 2008), anthocyanins (Yang et al., 2009), สารประกอบ ฟีนอลิก เช่น catechin, epicatechin gallate, procyanidin B1, rutin, gallic acid, caffeic acid, *p*-coumaric acid, pelargonidin-3-glucoside, cyanidin-3-glucoside, cyaniding-3,5diglucoside and dolphin- idin-3-glucoside (Lima et al., 2014) เป็นต้น และมีรายงานการวิจัยยืนยัน แล้วว่า สารพฤกษเคมี ที่พบในองุ่นมีฤทธิ์ทางชีวภาพที่ดี ดังรายละเอียดต่อไปนี้

2.8.1 Antioxidant activity

ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารประกอบชีวภาพจากองุ่นมีการศึกษาจำนวนมาก ได้แก่ การดักจับอนุมูลอิสระ ยับยั้งปฏิกิริยา lipid oxidation, reducing power และความสามารถในการจับโลหะ (metal chelating) (Meyer and Schulz, 1997; Tsuchiya et al., 1996) สารสกัดจากส่วนต่างๆ ขององุ่น ไม่ว่าจะเป็นน้ำคั้นสด ไวน์ ใบ กิ่ง ลำต้น ล้วนมีฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน สารสำคัญที่เกี่ยวกับฤทธิ์ดังกล่าวนี้ คือ สารประกอบพอลิฟีนอล ซึ่งขึ้นอยู่กับหลายปัจจัย เช่น สายพันธุ์ ส่วนประกอบของดิน สภาพอากาศ ภูมิศาสตร์และการเพาะปลูก (Bruno and Sparapano, 2007)

2.8.2 Antimicrobial activity

สารสกัดจากองุ่นมีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียได้ดีทั้งแกรมบวกและแกรมลบ (Jayaprakasha et al., 2003) โดยเฉพาะอย่างยิ่ง สารสกัดจากเมล็ดองุ่นที่มีรายงานว่ามีประสิทธิภาพสูงกว่าสารสกัดจากส่วนอื่นๆขององุ่น (Ychas and Aroutounian, 2009)

2.8.3 Cardioprotective action

น้ำสกัดจากองุ่นช่วยลดอาการ hypercholesterolemic-induced platelet aggregation ในกระต่ายได้ (Shanmueanayagam et al., 2007) นอกจากนี้ มีรายงานเกี่ยวกับสาร antho-cyanins จากผิวองุ่นและไวน์องุ่น สามารถยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ phosphodiesterase-5 ซึ่งช่วยลดอาการเสียงของโรคหัวใจจากสภาวะ vasorelaxation (Dell'Agli et al., 2005; Ychas and Aroutounian, 2009) สารสกัดจากองุ่นช่วยลดปริมาณ plasma cholesterol (Auger et al., 2004) และเพิ่มปริมาณ high density lipoprotein (HDL) แต่ลดปริมาณ low density lipoprotein (LDL) (Castilla et al., 2006)

2.8.4 Anticancer activities

มีรายงานการวิจัยจำนวนมากที่ศึกษาเกี่ยวกับฤทธิ์ต้านมะเร็งของสารสกัดองุ่น (Jung et al., 2006) พบว่าน้ำองุ่นสามารถยับยั้งการก่อมะเร็งจากความเสียหายของ DNA ในหนูได้ (Singletary et al., 2003) พบว่า สารสกัดจากองุ่นสามารถยับยั้งการสังเคราะห์ DNA ในเซลล์มะเร็งเต้านม มีการค้นพบสารสกัดจากผิวองุ่นซึ่งสามารถควบคุมการตายของเซลล์ คือ hosphatidylinositol 3-kinase-Akt และ mitogen-activated protein kinase Survival path-ways โดยสารสกัดจากองุ่นจะไปลดระดับการลอกแบบของยีน Akt และเพิ่มการสลาย proteosome (Hudson et al., 2007)

2.8.5 Antiaging activity

มีหลักฐานยืนยันแน่ชัดว่าสารสกัดจากองุ่นน่าจะช่วยลดความแก่ชราอันเนื่องมาจากการสั่งการของระบบประสาทได้ (Joseph et al., 2005) การรับประทานสารสกัดจากเมล็ดองุ่นช่วยลดการถูกทำลายของ DNA ที่จะนำไปสู่ความชราได้ นอกจากนี้ นักวิจัยยังกล่าวว่า สารสกัดจากองุ่นช่วยต่อต้านปฏิกิริยา lipid peroxidation ในระบบประสาทส่วนกลางของหนูแก่ได้ (Balu et al., 2006)

2.8.6 Anti-glycation activity

Protein glycation เกิดจากปฏิกิริยาระหว่างกลูโคสและหมู่อะมิโนของโปรตีน ทำให้เกิดหมู่ที่แตกต่างกันในโครงสร้างโปรตีน ซึ่งรู้จักในชื่อ advanced glycation end-products (AGEs) (Singh and Rajamani, 2001) มีรายงานแน่ชัดแล้วว่า protein glycation ทำให้เกิดโรคหลายชนิด เช่น เบาหวาน หลอดเลือดอุดตัน ไตวายและสมองเสื่อม สารสกัดจากผิวองุ่นเป็นสารต้านออกซิเดชันซึ่งสามารถกดการสังเคราะห์ AGEs ได้ (Fiori et al., 2014; Jariyapamornkoon et al., 2013)

2.9 การตรวจสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน

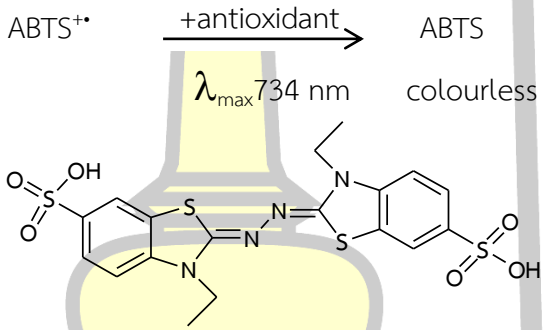
ตลอดเวลาที่ผ่านมามีการพัฒนาวิธีการตรวจสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชันที่หลากหลาย ซึ่งวิธีที่ทำได้ง่ายและสะดวก คือ วิธีทางสเปกโทรสโกปี เช่น DPPH assay, ABTS assay, ORAC assay และ FRAP assay (Baker, 2009; Kim et al., 2003; Thaipong et al., 2006) นอกจากนี้ ยังมีวิธีอื่นที่ได้รับความนิยมอีก เช่น trolox equivalent antioxidant capacity assay (TEAC), hydroxyl radical scavenging activity (HRSA), superoxide radical scavenging activity (SRSA) (Mäkynen et al., 2013) และ cupric reducing antioxidant capacity assay (CUPRAC) (Bektaşoğlu et al., 2006) โดยรายละเอียดมี ดังนี้

2.9.1 วิธีดักจับอนุมูลอิสระ ABTS

วิธีดักจับอนุมูลอิสระ ABTS นี้เป็นวิธีวัดทางอ้อมโดยใช้สาร 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid) หรือ ABTS มีสูตรโมเลกุล $C_{18}H_{18}N_4O_6S_4$ (ดังรูปที่ 5) มาทำให้เป็นอนุมูลอิสระโดยการถูกออกซิไดซ์ด้วยโพแทสเซียมเปอร์ซัลเฟต ให้กลายเป็น $ABTS^{+\bullet}$ ซึ่งเป็นอนุมูลที่มีสีฟ้า-เขียว มีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุด (λ_{max}) ที่ 660, 734 และ 820 nm แต่จะนิยมวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 734 nm (Re et al., 1999) และสามารถนำไปคำนวณเป็น % inhibition

ผลการวิเคราะห์จะคำนวณเป็นค่าที่สัมพันธ์กับสารต้านออกซิเดชันมาตรฐาน Trolox จึงมีชื่อว่า Trolox Equivalent Antioxidant Capacity (TEAC)

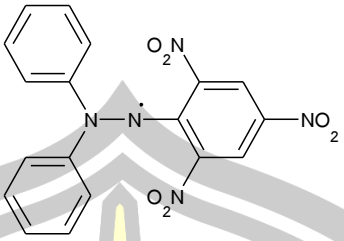
ข้อดีของวิธีนี้ คือ ทำได้ง่าย และอนุมูล $ABTS^{+\bullet}$ จะทำปฏิกิริยาอย่างรวดเร็วกับสารต้านออกซิเดชัน นอกจากนี้ อนุมูล $ABTS^{+\bullet}$ ละลายได้ทั้งในน้ำและตัวทำละลายอินทรีย์ จึงทำให้ศึกษาได้ทั้งในสารที่ละลายในน้ำและละลายในไขมัน ส่วนข้อเสียของวิธีนี้ คือ ABTS ไม่ใช่สารตามธรรมชาติ



รูปที่ 5 โครงสร้างเคมีของ ABTS (2,2'-azino-bis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid) (Zulueta et al., 2009)

2.9.2 วิธีดักจับอนุมูลอิสระ DPPH

อนุมูล $DPPH^{\bullet}$ (2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical) (ดังรูปที่ 6) เป็นอนุมูลไนโตรเจนที่คงตัว มีสีม่วง อยู่ในรูปอนุมูลอิสระอยู่แล้ว โดยไม่ต้องผ่านการเตรียมให้เป็นอนุมูลอิสระเหมือนกับกรณีอนุมูล $ABTS^{+\bullet}$ การวิเคราะห์เป็นการวัดความสามารถของสารสกัดในการกำจัดอนุมูลอิสระ โดยวิธีให้ไฮโดรเจนอะตอม การวัดทำโดยใช้เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) วัดการลดลงของสี เมื่อเติมสารต้านออกซิเดชันลงไป โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร (li et al., 2001)



รูปที่ 6 โครงสร้างเคมีของอนุมูล DPPH

อนุมูลอิสระ DPPH ใช้ในการทดสอบความสามารถในการทำลายอนุมูลอิสระ (scavenging activity) ของสารสกัดมีสีม่วงในเมทานอลและเมื่อได้รับ H จะเปลี่ยนเป็นสารละลายสีเหลือง (Blois, 1958) ตามสมการดังนี้

$$DPPH^{\bullet} + RH \longrightarrow DPPH\text{-}H + R^{\bullet}$$

สีม่วง ตัวอย่างทดสอบ สีเหลือง

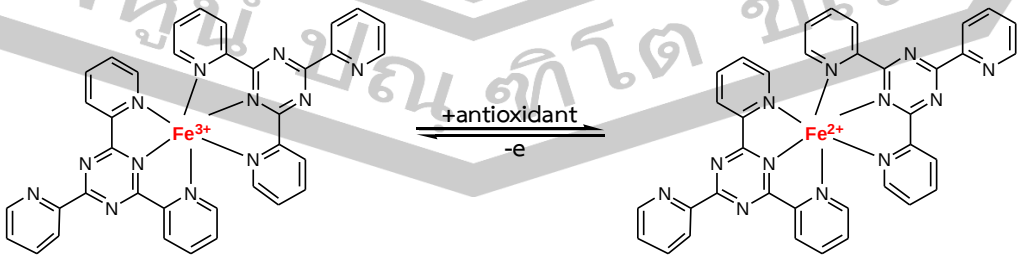
ค่าที่วัดได้จะแสดงความสามารถในการต้านออกซิเดชันออกมาเป็นค่า % inhibition

ข้อดีของวิธีนี้ คือ ทำได้ง่าย นิยมใช้เป็นวิธีเบื้องต้นในการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลของสารต้านออกซิเดชันจากธรรมชาติ

ข้อเสียของวิธีนี้ คือ อนุมูล $DPPH^{\bullet}$ มีความคงตัวไม่ว่องไวต่อการทำปฏิกิริยาเหมือนอนุมูลที่เกิดในเซลล์หรือร่างกาย ดังนั้นวิธีนี้จึงไม่สามารถแยกแยะหรือจัดอันดับอนุมูลที่มีความไวสูงได้

2.9.3 การวิเคราะห์ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP (ferric ion reducing antioxidant power)

การวิเคราะห์ความสามารถในการรีดิวซ์เฟอริก (ferric ion reducing antioxidant power (FRAP)) ของสารต้านอนุมูลอิสระโดยวิธีนี้ อาศัยหลักการถ่ายเทอิเล็กตรอนของสารต้านอนุมูลอิสระให้กับสารประกอบเชิงซ้อน $[Fe(III)\ (TPTZ)_2]^{3+}$ ทำให้เกิดการเปลี่ยนรูปเป็น $[Fe(II)\ (TPTZ)_2]^{2+}$ ดังแสดงในรูปที่ 7



รูปที่ 7 กลไกการเกิดปฏิกิริยาของ FRAP (Benzie & Szeto, 1999)

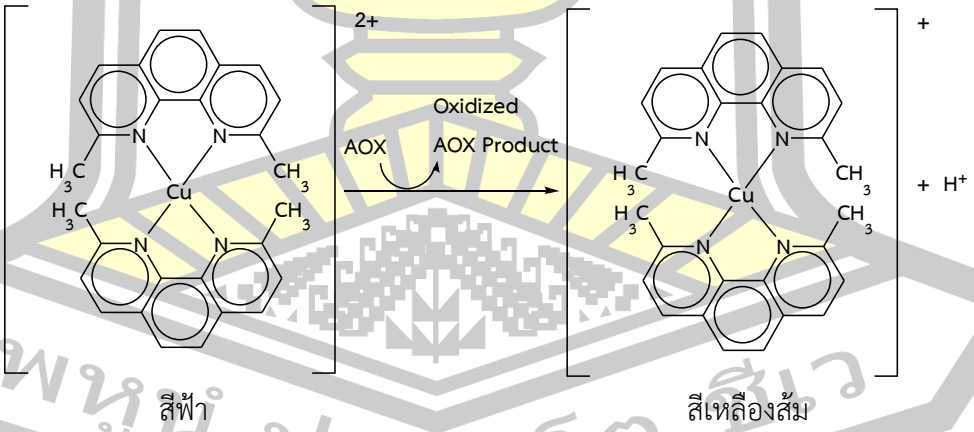
ซึ่งสารในรูป $[Fe(II)(TPTZ)_2]^{2+}$ สามารถดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 593 นาโนเมตร ปริมาณของ $[Fe(II)(TPTZ)_2]^{2+}$ ที่เกิดขึ้นสามารถประมาณความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระได้ในรูป FRAP value เทียบกับกราฟมาตรฐานของเฟอร์รัสซัลเฟต ($FeSO_4$) ซึ่งขั้นตอนโดยละเอียดของวิธีนี้ ได้แก่ การทำให้เกิดสารประกอบเชิงซ้อน $[Fe(III)(TPTZ)_2]^{3+}$ ที่ประกอบด้วยการนำสารละลาย TPTZ (2,4,6-tri (2-pyridyl)-striazine) ที่ละลายด้วยกรดไฮโดรคลอริกเจือจางมาทำปฏิกิริยากับสารละลายอะซิเตตบัพเฟอร์และสารละลายเฟอริกไตรคลอไรด์เฮกซะไฮเดรต จากนั้นทำการรีดิวซ์เฟอร์ริกโดยการเติมสารละลายมาตรฐานเฟอร์รัสซัลเฟตหรือสารตัวอย่าง (สารต้านอนุมูลอิสระ) และตั้งทิ้งไว้ในที่มืด วิธีนี้เป็นวิธีที่ง่าย ใช้เวลาน้อย ราคาถูก และสามารถทำซ้ำแล้วให้ผลเหมือนเดิม แต่ข้อเสีย คือ ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นเป็นปฏิกิริยาเคมีที่ไม่เกี่ยวข้องกับสภาวะของร่างกายและสารละลายที่ใช้อ้างอิงต้องใช้น้ำปราศจากไอออน (deionized water) (Pulido et al., 2000)

2.9.4 การวิเคราะห์ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี CUPRAC (cupric reducing antioxidant capacity)

วิธีการนี้อาศัยหลักการของสารต้านอนุมูลอิสระสามารถถ่ายเทอิเล็กตรอนให้กับสารประกอบเชิงซ้อน $[Cu(II)(Nc)_2]^{2+}$ ทำให้เกิดการเปลี่ยนรูปเป็น $[Cu(I)(Nc)_2]^{+}$ ดังสมการ

$$Cu(Nc)^{2+} + Ar(OH)_n \longrightarrow nCu(Nc)_2^{+} + Ar(=O)_n + nH^{+}$$

สีฟ้า → สีเหลืองส้ม



รูปที่ 8 แสดงโครงสร้าง CUPRAC reagent ทำปฏิกิริยากับสารต้านอนุมูลอิสระ

ซึ่ง $[Cu(I)(Nc)_2]^{+}$ มีความสามารถในการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร ปริมาณของ $[Cu(I)(Nc)_2]^{+}$ ที่เกิดขึ้นสามารถประมาณความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระได้ ซึ่งขั้นตอนโดยละเอียดของวิธีการนี้ ได้แก่ การทำให้เกิดสารประกอบเชิงซ้อน $[Cu(II)(Nc)_2]^{2+}$

ประกอบด้วยนำสารละลาย $CuCl_2$ มาทำปฏิกิริยากับสารละลาย ammonium acetate และสารละลาย neocuproene จากนั้นทำการรีดิวซ์คอปเปอร์โดยการเติมสารต้านอนุมูลอิสระ ปฏิกิริยานี้เกิดได้สมบูรณ์ภายใน 30 นาที (Apak et al., 2013)

2.10 องุ่นป่า

องุ่นป่า (wild grape; *Ampelocissus martini* Planch.) พบได้ทั่วไปในประเทศไทย เวียดนาม กัมพูชา ลาว มาเลเซีย บอร์เนียวและฟิลิปปินส์ (Wen et al., 2013) มีชื่อวิทยาศาสตร์ดังนี้ Kingdom: Plantae, Division: Magnoliophyta, Class: Magnoliopsida, Order: Theales, Family: Vitaceae, Genus: *Ampelocissus*, Species: *martinii*

เป็นสมุนไพรพื้นบ้านมาช้านาน ลำต้นและผลขององุ่นป่ามีลักษณะคล้ายองุ่นที่ปลูกเพื่อการค้า นอกจากนี้ สีและขั้นการเจริญของผลยังมีลักษณะคล้ายกันอีกด้วย (รูปที่ 9) จึงอาจเป็นไปได้ว่าสารพฤกษเคมีที่ประกอบอยู่ในผลองุ่นป่าอาจมีความคล้ายกับองุ่นซึ่งเป็นผลไม้ที่มีการศึกษาสารพฤกษเคมีและฤทธิ์ทางชีวภาพอย่างแพร่หลาย อย่างไรก็ตาม การศึกษาเกี่ยวกับสารพฤกษเคมีในองุ่นป่ายังมีน้อยมากโดยเฉพาะอย่างยิ่งในประเทศไทย

(1) (2) (3)

รูปที่ 9 ผลขององุ่นป่าระยะการเจริญเติบโตต่างกัน คือ อ่อน (1), แก่ (2), และสุก (3)

Ampelocissus อยู่ในจีนัส VITACEAE ซึ่งประกอบด้วยสมาชิกมากกว่า 90 สปีชีส์ พบได้ทั่วไปในเขตร้อนแถบแอฟริกา เอเชีย อเมริกากลาง ชายทะเล การศึกษาพืชกลุ่มนี้ เริ่มจาก A. *latifolia*, เนื่องจากมีชื่อพ้องกับ *Vitislatifolia* ในประเทศอินเดีย (Chen and Manchester, 2007) พืชในกลุ่มนี้ส่วนใหญ่เป็นพืชสมุนไพรหรือไม้ยืนต้นและมีดอกช่อมักเป็นเถาและเลื้อยตามต้นไม้ ผลมีลักษณะคล้ายลูกองุ่น ประกอบด้วย 1-4 เมล็ด มีโครโมโซมแบบ diploid จำนวน 40 (2n=40) ตัวอย่างพืช ได้แก่ *Anusrugosa* L., *Ambrosia artemisiifolia* L., *Scutellariabarbata* D. Don, *Tabernaem-ontana divaricate*, *Larreadivaricate*, *Prunus Africana* และ Uapacakirkiana เป็นต้น สารพฤกษเคมีในพืชกลุ่มนี้ ได้แก่ tannins, gallotannins, flavanols (Muchuweti et al., 2006) สารสกัดจาก *Prunusafricana* และ *Warburgiougandensis* ใช้รักษาโรคหอบหืด (Karani

et al., 2013), สารประกอบฟีนอลิกสำหรับยับยั้งการเจริญของเซลล์จาก *Larreadivaricata* (Cav.) (Palacio et al., 2012) และแคโรทีนอยด์จาก *Scutellariabarbato* D. Don (Liu et al., 2014)

2.11 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับปริมาณสารพฤกษเคมีและฤทธิ์ทางชีวภาพในกากไวน์

(Muñoz-Bernal et al., 2021) รายงานการวิจัยของประชาชนที่บริโภคไวน์แดงและอาหารแถบเมดิเตอเรเนียนจะมีอัตราเสี่ยงต่อการเกิดโรคหัวใจต่ำ ทั้งนี้เกิดจากสารกลุ่มพอลิฟีนอลในไวน์แดง นอกจากนี้กากไวน์ก็ถือเป็นแหล่งของสารประกอบฟีนอลที่ดีอีกเช่นกัน สารประกอบฟีนอลช่วยป้องกันการเกาะกันของเกล็ดเลือดส่งผลต่อการเกิดโรคหัวใจดังกล่าว สารประกอบฟีนอลในไวน์แดงและกากไวน์ยังช่วยป้องกันไม่ให้เกิดอนุมูลออกซิเจนรวมทั้งปฏิกิริยาออกซิเดชันของลิพิดโดยเฉพาะลิพิดที่มีความหนาแน่นต่ำ ยิ่งกว่านั้นสารประกอบฟีนอลบางตัว เช่น เรสเวอราทรอล ยังช่วยส่งเสริมการสร้างเอนไซม์ที่เร่งการผลิตไนตริกออกไซม์และ vasorelaxation โดยสรุปแล้ว สารกลุ่มพอลิฟีนอลในไวน์แดงและกากไวน์ทำงานร่วมกันในการป้องกันการเกิดโรคหัวใจ

(Jiménez-Martínez et al., 2019) ศึกษาผลของสารฟีนอลต่อคุณภาพไวน์ พบว่าสารบางตัว เช่น แทนนินส์ เกี่ยวข้องกับรสฝาดของไวน์หรือแอนโทไซยานินส์จะทำให้สีและคุณภาพของไวน์เปลี่ยนแปลง ดังนั้นการทดสอบปริมาณแทนนินส์อาจช่วยลดความฝาดของผลิตภัณฑ์ไวน์ได้ การศึกษาครั้งนี้ใช้กากองุ่นที่ใช้ผลิตไวน์แดงมาทดสอบ ผลการทดลอง พบว่าปริมาณของเปลือกองุ่นและระยะเวลาการหมักจะส่งผลต่อรสชาติและสีของไวน์ อย่างไรก็ตามคุณภาพของไวน์ยังขึ้นกับความแตกต่างของพันธุ์องุ่นด้วยเนื่องจากประกอบด้วยแทนนินส์และแอนโทไซยานินส์ปริมาณต่างกัน ผลการวิจัยชี้ให้เห็นว่า กากไวน์ถือเป็นตัวอย่างที่น่าสนใจในการนำมาใช้ผลิตไวน์ซ้ำที่มีคุณภาพสูง

(Bekhit et al., 2019) ศึกษาผลของตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดรวมทั้งกากไวน์ที่มาจากส่วนที่แตกต่างกันต่อรูปแบบของสารประกอบฟีนอลและฤทธิ์ต้านเชื้อไข้หวัดใหญ่ของสารสกัด โดยพบว่าตัวทำละลายมีผลต่อปริมาณฟีนอลที่ได้ สารสกัดจากกากไวน์มีฤทธิ์ต้านไวรัสไข้หวัดใหญ่ได้ดีกว่าสารสกัดอื่น อย่างไรก็ตาม ฤทธิ์ต้านไวรัสไข้หวัดใหญ่ไม่เกี่ยวข้องกับปริมาณสารฟีนอลิก

(Peixoto et al., 2018) ทำการตรวจสอบรูปแบบสารประกอบฟีนอลในสารสกัดจากกากไวน์และความสัมพันธ์กับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ความเป็นพิษต่อเซลล์และฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของสารสกัด ผลการทดลอง พบว่ากากไวน์ส่วนเมล็ดจะมีปริมาณสารประกอบฟีนอลสูงที่สุด รวมทั้งฤทธิ์ทางชีวภาพที่ตรวจสอบด้วย กากของผิวองุ่นจะมีสารแอนโทไซยานินส์ กรดคูมาริกและเฮกโซไซด์สูงที่สุด ผลการทดลองยังชี้ให้เห็นถึงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณสารฟีนอลกับฤทธิ์ทางชีวภาพ ดังนั้น กากไวน์จึงเป็นแหล่งของสารประกอบฟีนอลที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ต้านแบคทีเรียและฤทธิ์ยับยั้งเซลล์อีกด้วย สามารถนำไปใช้ในโรงงานอาหาร เภสัชกรรมและเครื่องสำอางได้

(Lingua et al., 2016) ทำการตรวจสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่เกี่ยวกับองุ่นแดง 3 สายพันธุ์ที่นำมาผลิตไวน์ในประเทศอาเจนตินา ซึ่งพบว่าฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมีความสัมพันธ์กับปริมาณสารฟีนอลที่เป็นองค์ประกอบ ปริมาณพอลิฟีนอลทั้งในองุ่น ไวน์และกากไวน์ สามารถฟื้นชีพของยีสต์จากสภาวะเครียดได้ โดยสารฟีนอลในตัวอย่างจะช่วยเหนี่ยวนำเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องในการยับยั้งอนุมูลอิสระที่อยู่ในเซลล์ยีสต์ ในองุ่นจะมีปริมาณสารฟีนอลมากกว่าในไวน์และกากไวน์ ดังนั้น ปริมาณสารฟีนอลขึ้นกับตัวอย่างที่นำมาทดสอบและสายพันธุ์ขององุ่นด้วย

(Cheng et al., 2012) ศึกษาผลของตัวทำละลายต่อความหลากหลายของสารประกอบฟีนอลในกากไวน์ รวมทั้งฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและต้านจุลชีพของสารสกัดดังกล่าว ผลการทดลองชี้ให้เห็นว่า ตัวทำละลายที่แตกต่างกันส่งผลต่อรูปแบบของสารประกอบฟีนอลที่แตกต่างกัน นอกจากนี้ กากขององุ่นสายพันธุ์ต่างกันจะมีฤทธิ์ต้านจุลชีพที่แตกต่างกัน อย่างไรก็ตาม สารสกัดที่มีฤทธิ์ต้านจุลชีพสูงจะมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระต่ำหรือปานกลาง

พหูน ปณฺฑิโต ชีเว

บทที่ 3
วิธีการทดลอง

3.1 วัตถุดิบในการทดลอง

ผลองุ่นป่า (*Ampelocissus martini* Planch.) เก็บจากป่าบริเวณตำบลห้วยหินลาด อำเภอสุวรรณภูมิ จังหวัดร้อยเอ็ด ในช่วงปลายเดือนมิถุนายน ถึง ปลายเดือนกันยายน พ.ศ. 2563 นำมาผึ่งแดดก่อนนำไปอบให้แห้ง แบ่งระยะขององุ่นป่าเป็น 3 ระยะการเจริญเติบโต คือ ผลอ่อน ผลแก่ ผลสุก โดยพิจารณาจากสีของผลองุ่นป่า ซึ่งผลอ่อนสีเขียว ผลแก่สีชมพู ผลสุกสีม่วงดำ

3.2 การเตรียมสารสกัดจากกากไวน์

นำกากองุ่นป่าในแต่ละระยะการเจริญเติบโตที่ผ่านการหมักไวน์เป็นเวลา 2 สัปดาห์มาอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส แล้วนำมาบดให้มีขนาดเล็ก จากนั้นนำไปสกัดโดยใช้เอทานอลเป็นตัวทำละลายด้วยวิธีการรีฟลั๊ก (reflux) เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง ทำการสกัดซ้ำ 3 ครั้ง แล้วนำสารสกัดมากรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 หลังจากนั้นนำสารสกัดที่ได้จากการกรองไประเหยเอทานอลออกด้วยเครื่อง rotary evaporator จะได้สารสกัดหยาบเอทานอล นำสารสกัดหยาบที่ได้เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ก่อนที่จะนำไปวิเคราะห์ต่อไป

3.3 การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม

วิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม (Total phenolic content) โดยวิธี Folin-Clocalteu โดยนำตัวอย่างของสารสกัดมา 0.2 มิลลิลิตร ใส่ลงไปในหลอดทดลอง หลังจากนั้นเติมสารละลาย Folin-Clocalteau 1 มิลลิลิตรและเติมโซเดียมคาร์บอเนตความเข้มข้น 7.5 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 0.8 มิลลิลิตร เขย่าแล้วตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 30 นาที หลังจากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร ด้วยเครื่องสเปกโตโฟโตมิเตอร์ (GENESYSTM10, USA) ผลการทดลองที่ได้นำมาคำนวณหาปริมาณฟีนอลิกรวมจากกราฟมาตรฐานของกรดแกลลิกและแสดงผลในหน่วยมิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อกรัมน้ำหนักแห้ง (mg GAE/g DW)

3.4 การวิเคราะห์ปริมาณฟลาโวนอยด์รวม

วิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์รวม (Total flavonoid content) โดยวิธี aluminium chloride Colorimetric ตามวิธีที่ดัดแปลงจากวิธีการของ (Abu Bakar et al. (2009) โดยนำตัวอย่างของสารสกัดมา 0.2 มิลลิลิตร ใส่ลงไปในหลอดทดลอง หลังจากนั้นเติมสารละลาย 5%

$NaNO_2^-$ 0.2 มิลลิลิตร และ 10% $AlCl_3$ ปริมาตร 0.15 มิลลิลิตร เขย่าแล้วตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 5 นาที หลังจากนั้นเติม 0.1 M NaOH ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร และปรับปริมาตรให้ได้เท่ากับ 2.5 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 510 นาโนเมตร ด้วยเครื่องสเปคโตโฟโตมิเตอร์ (GENESYSTM10, USA) ผลการทดลองที่ได้นำมาคำนวณหาปริมาณฟลาโวนอยด์รวมจากกราฟมาตรฐานของ catechin และ แสดงผลในหน่วยมิลลิกรัมสมมูลของ catechin ต่อกรัมน้ำหนักแห้ง (mg CE/g DW)

3.5 การวิเคราะห์ปริมาณซาโปนินรวม

การวิเคราะห์หาซาโปนินรวม (Total saponin content) ตามวิธีที่ดัดแปลงจากวิธีการของ Hiai, Oura and Nakajima (1976) โดยเริ่มจากการนำตัวอย่างของสารสกัดมา 0.5 มิลลิลิตร ใส่ลงไปในหลอดทดลอง หลังจากนั้นเติมสารละลาย 8% vanillin 0.5 มิลลิลิตร และ H_2SO_4 เข้มข้น 72% ปริมาตร 5 มิลลิลิตร นำไปบ่มใน Waterbath ที่ 60 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 นาที และตั้งไว้ให้เย็น แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 560 นาโนเมตร ด้วยเครื่องสเปคโตโฟโตมิเตอร์ (GENESYSTM10, USA) ผลการทดลองที่ได้นำมาคำนวณหาปริมาณซาโปนินจากกราฟมาตรฐานของ aescin แสดงผลในหน่วยมิลลิกรัมสมมูลของ aescin ต่อกรัมน้ำหนักแห้ง (mg AES/g DW)

3.6 การวิเคราะห์ปริมาณโพรแอนโธไซยานิดินส์รวม

การตรวจวิเคราะห์ปริมาณโพรแอนโทไซยานิดินใช้วิธี vanillin-HCl method ตามวิธีการของ (Bordiga et al., 2011) โดยผสมสารสกัด 0.25 มิลลิลิตร กับสารละลาย vanillin ความเข้มข้นร้อยละ 4 ที่ละลายในเอทานอล นำมาผสมกับ hydrochloric acid ความเข้มข้นร้อยละ 37 (อัตรา 1:1, v/v) จำนวน 0.75 มิลลิลิตร ผสมสารให้เข้ากันดี หลังจากนั้นบ่มใน water bath อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที วัดค่า absorbance ด้วยเครื่อง UV spectrophotometer ที่ความยาวเคลื่อน 500 นาโนเมตร คำนวณหาปริมาณของสารโพรแอนโทไซยานิดิน จากกราฟมาตรฐาน ของ catechin แสดงผลในหน่วยมิลลิกรัมสมมูลของ catechin ต่อกรัมน้ำหนักแห้ง (mg CE/g DW)

3.7 การตรวจสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ

3.7.1 ฤทธิ์การดักจับอนุมูลอิสระ

ฤทธิ์การดักจับอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบตรวจสอบด้วยวิธี 2,2'-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) โดยการประยุกต์วิธีของ Thaipong et al. (2006) ขั้นตอนโดยย่อ มีดังนี้

นำสารสกัดหยาบปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลาย 0.1 mM DPPH ปริมาตร 2.0 มิลลิลิตร จากนั้น บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง UV-Vis spectrophotometer แล้วนำไปหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้งดังสมการที่ 1

$$\text{Inhibition (\%)} = (A_S\text{-}A_C / A_C) \times 100 \quad \text{.....(1)}$$

โดย A_S คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัด

A_C คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารควบคุม

การทดลองใช้ BHA ที่ละลายด้วยเมทานอลเป็นสารควบคุม ฤทธิ์การดักจับอนุมูล DPPH แสดงด้วย ค่า IC_{50} ในการทดลองแต่ละครั้ง ทำการวัดจำนวน 3 ครั้ง

3.7.2 ฤทธิ์การรีดิวซ์โลหะ

ฤทธิ์การรีดิวซ์โลหะของสารสกัดตรวจสอบด้วยวิธี ferric reducing antioxidant power (FRAP) ด้วยการประยุกต์ตามวิธีการของ Zhang et al. (2013) ขั้นตอนโดยย่อ มีดังนี้ นำสารสกัดหยาบ 100 ไมโครลิตร ผสมกับ 3 มิลลิลิตร สารละลาย FRAB ที่ประกอบด้วยสารละลาย 10 mM TPTZ, 300 mM acetate buffer pH 3.6, 20 mM ferric chloride in 40 mM HCl (อัตราส่วน 1:10:1) นำสารละลายทั้งหมดมาผสมกับน้ำปราศจากไอออน ปริมาตร 300 ไมโครลิตร จากนั้นปล่อยให้ทำปฏิกิริยาที่ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 นาที นำสารละลายไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 593 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง UV-Vis spectrophotometer ฤทธิ์การรีดิวซ์เหล็กของสารสกัดแสดงด้วยค่า ปริมาณมิลลิกรัมโทรลอกซ์ต่อกรัมของน้ำหนักแห้ง (mg TE/g DW)

3.7.3 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระประจุบวก

ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระประจุบวกของสารสกัดตรวจสอบด้วยวิธี 2,2’ -azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline sulphonate) (ABTS) ด้วยการประยุกต์วิธีการของ Zuleata et al. (2009) ขั้นตอนโดยย่อ มีดังนี้ เตรียม stock solution โดยการผสมระหว่าง 7 mM ABTS และ 2.45 mM potassium persulphate ($K_2S_2O_8$) จากนั้นเตรียม working solution โดยการเติม $K_2S_2O_8$ ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลาย ABTS ปริมาตร 10 มิลลิลิตร แล้วนำสารละลายทั้งสองผสมกันที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 16 ชั่วโมงในที่มืด นำสารสกัดหยาบ 0.5 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลายผสมที่เตรียมไว้ปริมาตร 1 มิลลิลิตร แล้วทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที นำสารละลายไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง UV-Vis spectrophotometer ฤทธิ์การต้านอนุมูล ABTS แสดงด้วยค่า IC_{50}

3.7.4 ฤทธิ์รีดิวซ์โลหะทองแดง

ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระโลหะทองแดงของสารสกัดตรวจสอบด้วยวิธี Cupric reducing antioxidant capacity (CUPRAC) ด้วยการประยุกต์ตามวิธีการของ Apak et al. (2004) ขั้นตอนโดยย่อ มีดังนี้ เตรียมสารละลายผสมระหว่าง $CuCl_2$ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร นีโอคูโปรอิน (neocuproin) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร แอมโมเนียมอะซิเตต ($NH_4CH_3COO^-$) pH 7 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร และสารสกัด ปริมาตร 1.1 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที นำสารละลายไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง UV-Vis spectrophotometer ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดแสดงด้วยค่าปริมาณมิลลิกรัมโทรลอกซ์ต่อกรัมของน้ำหนักแห้ง (mg TE/g DW)

3.8 การวิเคราะห์ชนิดและปริมาณฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์

ทำการวิเคราะห์ชนิดและปริมาณฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ของสารสกัดด้วยด้วยเครื่อง RP-HPLC (Shimadzu LC-20AC pumps (Shimadzu Co., Kyoto, Japan), SPD-M20A โดยใช้ diode array เป็นตัวตรวจวัด และคอลัมน์ Inetsil ODS-3, C18 (4.6 mm x 250 mm, i.d. 5 µm) สภาวะการชะคอลัมน์ดัดแปลงตามวิธีของ (Butsart and Siriamornpun, 2010) เฟสเคลื่อนที่ประกอบด้วย 1.2% acitic acid ในน้ำปราศจากไอออน (pH 2.7) (solvent A) และ acetonitrile (sovent B) ปรับอัตราการไหลที่ 0.8 มิลลิลิตรต่อนาที ทำการชะด้วยระบบเกรเดียนท์ (gradient elution) ปรับอุณหภูมิคลอลัมน์เป็น 38 องศาเซลเซียส และฉีดสารสกัดปริมาตร 20 ไมโครลิตร โดยวัดสเปคตรัมการดูดกลืนแสงในช่วง 200-600 นาโนเมตร ทำการแยกสารประกอบในสารสกัดโดยเปรียบเทียบเวลาที่ปรากฏสเปคตรัมกับสารมาตรฐานแต่ละชนิด (external standard method) และคำนวณหาปริมาณจากการเทียบกับสมการเส้นตรงของสารมาตรฐาน

3.9 การวิเคราะห์ทางสถิติ

ปริมาณสารพฤกษเคมีและค่าการต้านออกซิเดชันของสารสกัดแสดงด้วยค่าร้อยละ ± ค่าเบี่ยงเบน มาตรฐาน ส่วนความสัมพันธ์ (correlation) ระหว่างปริมาณสารพฤกษเคมีและฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน วิเคราะห์ด้วยโปรแกรม SPSS Software for Windows (version 19)

บทที่ 4
ผลการทดลอง

4.1 ร้อยละในการสกัด

การเลือกตัวทำละลายในการสกัดสารสำคัญจากพืชมีความสำคัญต่อการศึกษาวิจัย เพราะเกี่ยวข้องกับปริมาณและชนิดของสารประกอบที่ได้ ซึ่งตัวทำละลายอินทรีย์ที่นิยมใช้ในการสกัดมาก คือ เมทานอลและเอทานอล (Martin-Puzon and Rivera, 2015; Mazandarani M, 2012; Onivogui et al., 2015; Zhang et al., 2018) ในการทดลองนี้ ได้ทำการสกัดสารจากกากไวน์องุ่นป่า โดยใช้เอทานอลเป็นตัวทำละลาย ตามวิธีของ Spigno and Faverind (2007) และ Aradio et al. (2015) เนื่องจากเอทานอลเป็นตัวทำละลายอินทรีย์ที่สามารถละลายสารพฤกษเคมีในกลุ่ม สเตียรอยด์ เทอร์นอยด์ อัลคาลอยด์ ฟลาโวนอยด์ พอลิฟีนอลและแทนนินได้ดี (Suárez-Ruiz et al. (2012) สารพฤกษเคมีส่วนใหญ่ที่เป็นโมเลกุลที่มีขั้วสามารถละลายได้ดีในตัวทำละลายที่มีขั้ว ส่วนโมเลกุลที่ไม่มีขั้วสามารถละลายในตัวทำละลายที่ไม่มีตัวเป็นไปตามกฎ like dissolves like rule (Reichardt and Welton, 2011) ในการทดลองครั้งนี้ ใช้เอทานอลเป็นตัวทำละลายและร้อยละการได้กลับคืนของสารสกัดแสดงดังตารางที่ 2 จากตาราง พบว่า กากไวน์องุ่นป่าแก่มีร้อยละการได้กลับคืนสูงที่สุด รองลงมา คือ กากไวน์องุ่นป่าสุกและกากไวน์องุ่นป่าอ่อน ตามลำดับ

ตารางที่ 2 ร้อยละการได้กลับคืนของสารสกัดจากกากไวน์องุ่นป่า

ตัวอย่าง	ร้อยละการได้กลับคืน
กากไวน์องุ่นอ่อน	$6.497^{a} \pm 0.470$
กากไวน์องุ่นแก่	$13.752^{c} \pm 0.552$
กากไวน์องุ่นสุก	$9.612^{b} \pm 0.422$

* ตัวอักษรแสดงค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในคอลัมน์เดียวกันที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p < 0.05$)

4.2 ปริมาณสารพฤกษเคมี

ปริมาณฟีนอลิก (TPC) ฟลาโวนอยด์ (TFC) ซาโปนิน (TSC) คอนเดนส์แทนนิน (CDT) และโพรแอนโทไซยานิดินส์รวม (TPAC) ที่วัดได้จากสารสกัดกากไวน์องุ่นป่าของแต่ละช่วงการเจริญเติบโต คือ อ่อน แก่และสุก ให้ผลการทดลองที่แตกต่างกัน ดังแสดงในตารางที่ 3 จากตาราง พบว่า ปริมาณฟีนอลิกรวม มีปริมาณมากที่สุดในสารสกัดจากกากไวน์องุ่นป่าอ่อน คือ 105.444 ± 0.347

mg GAE/g DW รองลงมา คือ สารสกัดจากกากไวน์องุ่นป่าสุก (66.500 ± 0.667 mg GAE/g DW) และพบปริมาณฟีนอลิกต่ำที่สุดในสารสกัดจากกากไวน์องุ่นป่าแก่ (46.500 ± 0.882 mg GAE/g DW) ปริมาณฟลาโวนอยด์รวม พบปริมาณสูงสุดในสารสกัดจากกากไวน์องุ่นป่าอ่อน (22.323 ± 1.400 mg CE/g DW) รองลงมา คือ สารสกัดกากไวน์องุ่นป่าแก่ (20.000 ± 0.606 mg CE/g DW) และสารสกัดกากไวน์องุ่นป่าสุก (18.081 ± 0.350 mg CE/g DW) ตามลำดับ ปริมาณซาโปนินรวมของสารสกัดกากไวน์องุ่นป่าอ่อน พบปริมาณสูงสุด (77.143 ± 3.780 mg AES/g DW) รองลงมา คือ สารสกัดกากไวน์องุ่นป่าแก่ (51.048 ± 1.574 mg AES/g DW) และสุก (23.571 ± 0.714 mg AES/g DW) ตามลำดับ ปริมาณคอนเดนส์แทนนินรวมพบมากที่สุดในสารสกัดกากไวน์องุ่นป่าอ่อน (334.222 ± 12.673 mg CE/g DW) รองลงมา คือ สารสกัดจากกากไวน์องุ่นป่าแก่ (237.333 ± 1.333 mg CE/g DW) และสุก (224.889 ± 3.355 mg CE/g DW) ตามลำดับ ส่วนปริมาณโพรแอนโทไซยานิดินส์รวมพบมากที่สุดในสารสกัดจากกากไวน์องุ่นป่าอ่อน (120.800 ± 1.622 mg CE/g DW) รองลงมา คือ สารสกัดจากกากไวน์องุ่นป่าสุก (56.889 ± 1.540 mg CE/g DW) และต่ำที่สุดในสารสกัดจากกากไวน์องุ่นป่าแก่ (31.067 ± 2.095 mg CE/g DW)

จากตารางจะเห็นว่า ในสารสกัดจกกากไวน์องุ่นอ่อนจะมีปริมาณสารพฤกษเคมีที่ทำการตรวจสอบสูงที่สุดทุกชนิด ส่วนในสารสกัดจากกากไวน์องุ่นป่าแก่จะมีปริมาณฟลาโวนอยด์และซาโปนินส์รวมสูงกว่าในสารสกัดจากกากไวน์องุ่นป่าสุก ในขณะที่สารสกัดจากกากไวน์องุ่นป่าสุกจะมีปริมาณของฟีนอลิกและโพรแอนโทไซยานิดินส์รวมสูงกว่าในสารสกัดจากกากไวน์องุ่นป่าแก่ แสดงให้เห็นว่า ในผลอ่อนขององุ่นป่าอุดมไปด้วยสารพฤกษเคมี ซึ่งคาดว่าเกี่ยวข้องกับบทบาทในการปกป้องผลขององุ่นป่า รวมทั้งมีการสะสมสารเพื่อนำไปใช้ในเมตาบอไลต์ของผลเพื่อให้เกิดการเจริญเติบโตในระยะต่อไปจึงมีการสะสมมาก ส่วนในผลองุ่นป่าแก่ซึ่งพบปริมาณฟลาโวนอยด์และซาโปนินส์รวมสูงปานกลางเมื่อเทียบกับผลสุก คาดว่าเป็นเพราะสีของผลแก่ซึ่งมีสีแดงและรสชาติของผลจะเริ่มลดความเปรี้ยวไปเป็นรสหวานมากขึ้น ส่วนในผลสุกจะมีปริมาณของฟีนอลิกและโพรแอนโทไซยานิดินส์รวมสูง เนื่องมาจากสีขององุ่นป่าซึ่งจะมีสีม่วงดำหรือน้ำเงินเข้ม ซึ่งองค์ประกอบของผลที่มีสีดังกล่าวมักจะตรวจพบว่าเป็นฟีนอลิกและโพรแอนโทไซยานิดินส์สูง เมื่อเปรียบเทียบกับรายงานการศึกษาในองุ่นปลูก พบว่า ปริมาณสารพฤกษเคมีที่ตรวจสอบครั้งนี้ มีค่าอยู่ในช่วงที่มีรายงานการศึกษามาก่อน ตัวอย่างเช่น รายงานวิจัยของ Dani et al. (2010) ที่พบว่า สารสกัดจากใบองุ่น (*Vitis lubrusca* var. Bordo) มีปริมาณฟีนอลิกรวมอยู่ระหว่าง 19.0 ± 0.05 - 20.2 ±1.80 mg GAE และปริมาณฟลาโวนอยด์รวม ระหว่าง 4.4 ± 0.4 - 8.95 ± 0.5 ug rutin (Farhadi et al., 2016) ตรวจหาปริมาณแอนโธไซยานินในสารสกัดใบองุ่นสายพันธุ์ Hosseini พบว่า มีค่า 220.81 mg/g DW เมื่อเปรียบเทียบกับรายงานการศึกษาในองุ่นสายพันธุ์ *V. Vinifera* ของ Sahpazidou (Sahpazidou et al., 2014), Anastasiadi (Anastasiadi et al., 2010), Anastasiadi (Anastasiadi et al., 2012)

และ (Sahpazidou et al., 2014) พบว่าปริมาณฟีนอลิกรวมอยู่ในช่วงระหว่าง 318 - 415 mg GAE/g DW ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ (Domínguez-Perles et al., 2014) ที่ทำการศึกษาสารพฤกษเคมีในลำต้นองุ่น (*Vitis vinifera* L.) สายพันธ์ Portuguese พบว่า มีปริมาณฟลาโวนอยด์และแอนโธไซยานินรวม ระหว่าง 38.01 - 71.49 mg CE/g DW และ 0.43 - 1.62 mg/g DW ตามลำดับและรายงานการตรวจสอบสารพฤกษเคมีจากก้านองุ่น ที่พบปริมาณฟีนอลิกรวม 1.32-1.98 g GAE/100 g DW (Pujol et al., 2013)

เมื่อเทียบกับรายงานดังที่กล่าวมา ปริมาณสารพฤกษเคมีในสารสกัดจากกากไวน์องุ่นป่ามีปริมาณสูงเช่นเดียวกับสารสกัดจากส่วนต่างๆ ขององุ่นปลูก แม้ว่าปริมาณจะมีความแตกต่างกันบ้าง ทั้งนี้อาจเป็นผลมาจากหลายปัจจัยที่ส่งผลต่อปริมาณสารพฤกษเคมีได้ เช่น สภาพภูมิอากาศ ภูมิประเทศ สายพันธุ์พืช ฤดูกาล ระยะการเจริญเติบโต ระบบชลประทาน รวมทั้ง เทคนิคและเครื่องมือในการตรวจวิเคราะห์ (Antoniolli et al., 2015; Gil et al., 2012)

ตารางที่ 3 ปริมาณสารพฤกษเคมีในสารสกัดจากกากไวน์องุ่นป่า

กากไวน์องุ่นป่า	TPC (mg GAE/g DW)	TFC (mg QE/g DW)	TSC (mg AES/g DW)	CDT (mg CE/g DW)	TPAC (mg CE/g DW)
อ่อน	105.444^{c}±0.347	22.323^{c}±1.400	77.143^{c}±3.780	334.222^{b}±12.673	120.800^{c}±1.622
แก่	46.500^{a}±0.882	20.000^{b}±0.606	51.048^{b}±1.574	237.333^{a}±1.333	31.067^{a}±2.095
สุก	66.500^{b}±0.667	18.081^{a}±0.350	23.571^{a}±0.714	224.889^{a}±3.355	56.889^{b}±1.540

* ตัวอักษรแสดงค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในคอลัมน์เดียวกันที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p < 0.05$)

4.3 การวิเคราะห์ชนิดและปริมาณสารพฤกษเคมี

ทำการวิเคราะห์ปริมาณสารพฤกษเคมีในสารสกัดจากกากไวน์ด้วยเครื่อง RP-HPLC เนื่องจากเป็นหนึ่งในวิธีการที่ใช้อย่างแพร่หลายในการระบุและตรวจสอบปริมาณสารพฤกษเคมีในพืชและผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติ (Mendoza et al., 2020; Nag et al., 2019) ปริมาณและชนิดของฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์จำแนกโดยเปรียบเทียบตำแหน่ง retention time กับสารมาตรฐานและคำนวณโดยใช้กราฟมาตรฐานภายนอก โดยสารมาตรฐาน gallic acid, catechin และ epicatechin ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 280 nm, caffeic acid, *p*-coumaric acid และ ferulic acid ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 320 nm, resveratrol ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 306 nm สุดท้าย rutin, myricetin

และ quercetin ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 360 nm (รูปที่ 9) ผล HPLC chromatograms ของสารสกัดจากกากไวน์องุ่นป่าแสดงดังรูปที่ 10 - 13 และผลของปริมาณสารพฤกษเคมีสรุปดังตารางที่ 4 ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า สารสกัดจากกากไวน์องุ่นป่าอ่อนมีปริมาณสารรวมสูงที่สุด (8.616 mg/g Dw) รองลงมาคือสกัดจากกากไวน์องุ่นป่าแก่และสกัดจากกากไวน์องุ่นป่าสุก ตามลำดับ เมื่อพิจารณาชนิดของสารพฤกษเคมีที่พบมากในสารสกัดจากกากไวน์องุ่นป่า พบว่า มีความแตกต่างกันเล็กน้อย ดังรายละเอียดต่อไปนี้

สารสกัดจากกากไวน์องุ่นป่าอ่อน พบปริมาณ quercetin สูงที่สุด (3.528 mg/g DW) ในขณะที่ในองุ่นป่าแก่และสุก พบในปริมาณพอ ๆ กัน รองลงมา คือ resveratrol (1.874 mg/g DW) สารนี้พบมากที่สุดในองุ่นอ่อนและค่อย ๆ ลดลงตามระยะการเจริญเติบโตของผล สารที่พบมากอีกชนิดหนึ่ง คือ gallic acid (1.427 mg/g DW) สารชนิดนี้ พบปริมาณใกล้เคียงกับองุ่นป่าสุกแต่น้อยกว่าที่พบในองุ่นป่าแก่ สารอีกชนิดหนึ่งที่พบในปริมาณสูงในกากไวน์องุ่นป่าอ่อน คือ epicatechin (1.065 mg/g DW) สารนี้เป็นฟลาโวนอยด์ที่มีปริมาณค่อนข้างสูงเมื่อเปรียบเทียบกับฟลาโวนอยด์อื่น เช่น catechin, rutin และ myricetin

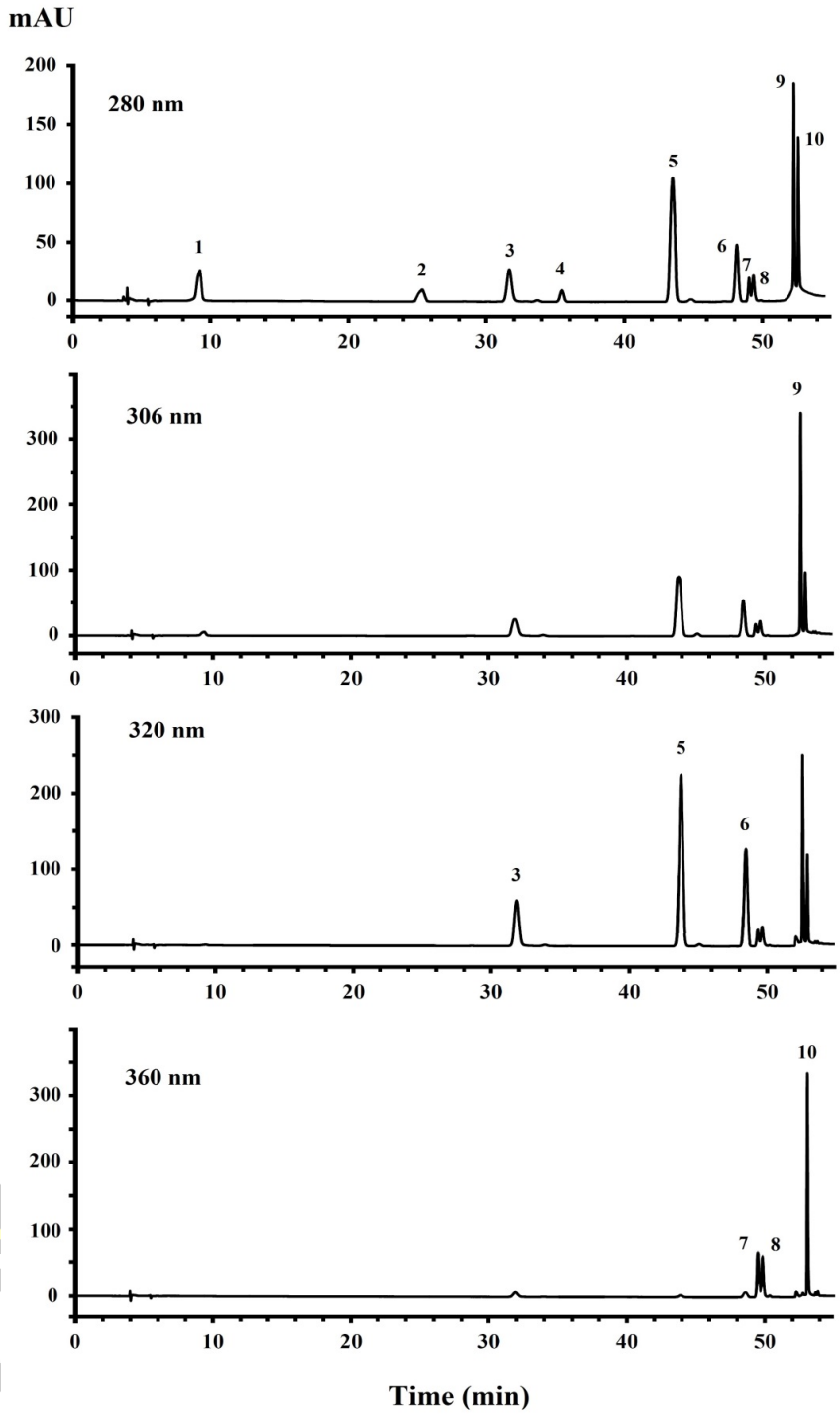
สารสกัดจากกากไวน์องุ่นป่าแก่ พบปริมาณ gallic acid สูงที่สุด (3.262 mg/g DW) ในขณะที่ในองุ่นป่าแก่และสุก พบในปริมาณพอๆ กัน รองลงมา คือ quercetin (1.923 mg/g DW) สารนี้พบในปริมาณใกล้เคียงกับองุ่นสุก สารที่พบมากอีกชนิดหนึ่ง คือ resveratrol (0.651 mg/g DW) สารชนิดนี้ พบปริมาณใกล้เคียงกับองุ่นป่าสุกแต่น้อยกว่าที่พบในองุ่นป่าอ่อนมาก สารอีกชนิดหนึ่งที่พบในปริมาณสูงในกากไวน์องุ่นป่าแก่ คือ caffeic acid (0.288 mg/g DW) ปริมาณของสารนี้พบใกล้เคียงกับองุ่นป่าอ่อน แต่ตรวจไม่พบในสารสกัดจากกากไวน์องุ่นป่าสุก

สารสกัดจากกากไวน์องุ่นป่าสุก พบปริมาณ quercetin สูงที่สุด (1.900 mg/g DW) ซึ่งมีปริมาณใกล้เคียงกับองุ่นป่าแก่ รองลงมา คือ gallic acid (1.445 mg/g DW) สารนี้พบในปริมาณใกล้เคียงกับองุ่นอ่อน แต่ต่ำกว่าในองุ่นป่าแก่ สารที่พบมากอีกชนิดหนึ่ง คือ resveratrol (0.651 mg/g DW) สารชนิดนี้ พบปริมาณใกล้เคียงกับองุ่นป่าแก่แต่น้อยกว่าที่พบในองุ่นป่าอ่อนมาก สารอีกชนิดหนึ่งที่พบในปริมาณสูงในกากไวน์องุ่นป่าสุก คือ epicatechin (0.455 mg/g DW) ปริมาณของสารนี้ประมาณครึ่งหนึ่งที่พบในองุ่นป่าอ่อน แต่สูงกว่าที่พบในสารสกัดจากกากไวน์องุ่นป่าแก่

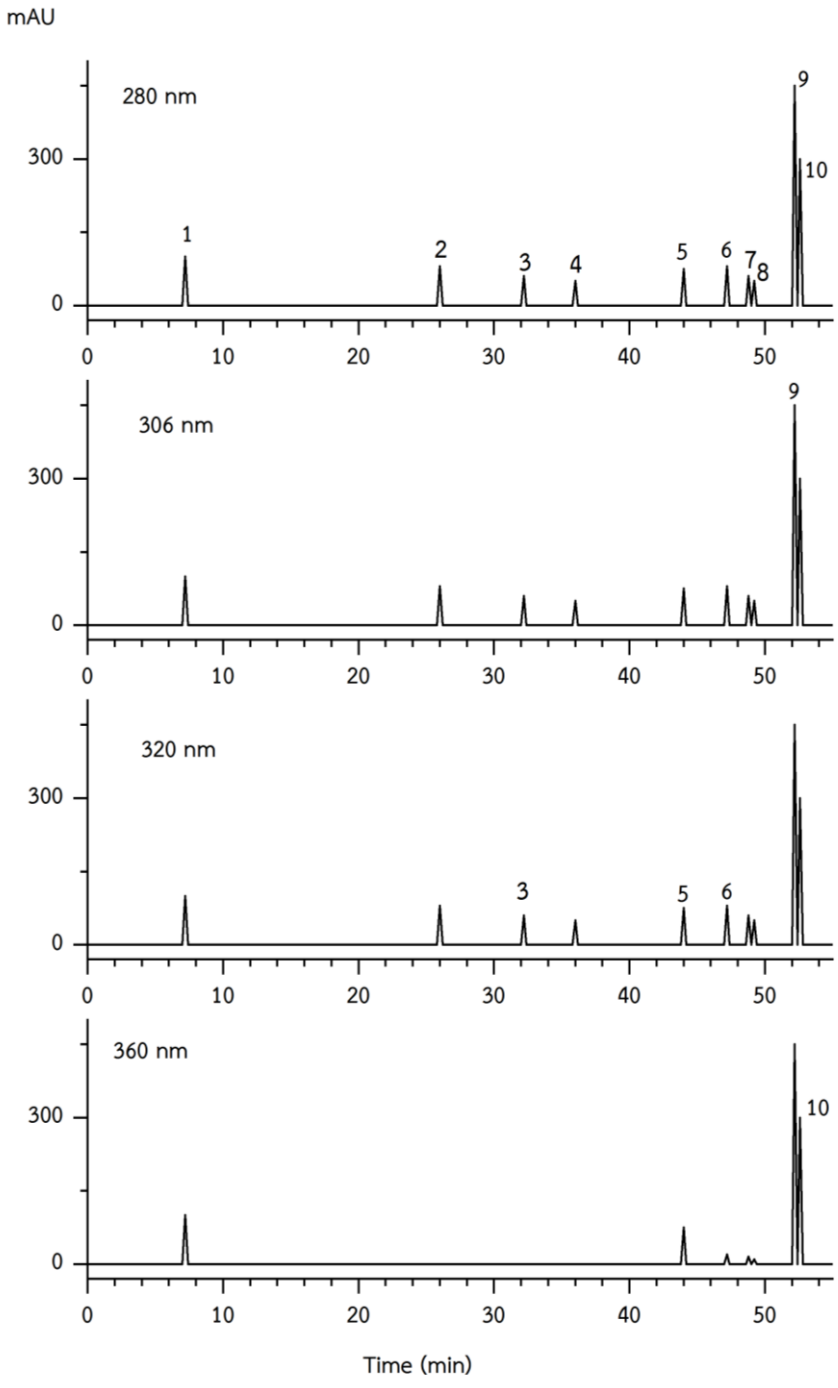
ทั้ง epicatechin และ catechin เป็นสารประกอบฟีนอลิกเชิงเดี่ยวของโพรแอนโทไซยานิดินส์ ซึ่งสารทั้งสองมักพบเป็นส่วนใหญ่ในเมล็ด (Perumalla and Hettiarachchy, 2011) อย่างไรก็ตาม ยังสามารถตรวจพบสารในกลุ่ม flavonol เช่น myricetin และ rutin ซึ่งพบในกากไวน์องุ่นป่าอ่อนสูงที่สุดและปริมาณค่อย ๆ ลดลงเมื่อระยะการเจริญเติบโตเพิ่มขึ้น สิ่งที่น่าสนใจอย่างหนึ่ง คือ ในกากไวน์องุ่นป่า ตรวจพบ quercetin ในปริมาณสูงในทุกตัวอย่าง แม้ในรายงานการวิจัยก่อนหน้านี้จะระบุว่า quercetin ซึ่งเป็นหนึ่งในสาร flavonol จะมีปริมาณค่อนข้างต่ำหรือตรวจไม่พบในพืช

กลุ่มองุ่นก็ตาม (Burin et al., 2014) ผลจากตารางที่ 4 ชี้ให้เห็นว่า ฟลาโวนอยด์เป็นสาระสำคัญในกากไวน์องุ่นป่า และถือเป็นสารประกอบฟีนอลิกที่สำคัญในพืช ผลที่ได้นี้สอดคล้องกับรายงานการวิจัยที่เคยกล่าวไว้ก่อนนี้ (Burin et al., 2014; Liu et al., 2012) สารฟีนอลิกที่พบมากตัวหนึ่งซึ่งมีรายงานวิจัยเคยระบุว่าพบปริมาณเล็กน้อย และพบในบางส่วนของผล เช่น ที่บริเวณผิวเท่านั้น คือ resveratrol แต่ผลการทดลองที่ตรวจพบในครั้งนี้ ค่อนข้างขัดแย้งกับที่เคยมีรายงานไว้ (Pastrana-Bonilla et al., 2003; Yilmaz and Toledo, 2004) เนื่องจาก resveratrol ตรวจพบทั้ง 3 ตัวอย่าง ในปริมาณค่อนข้างสูงโดยเฉพาะในกากไวน์องุ่นป่าอ่อน ซึ่งผลที่ได้นี้ อาจเนื่องมาจากผิวของผลองุ่นป่ามีการสะสมของสารชนิดนี้มาก สารในกลุ่มกรดฟีนอลิกที่ตรวจพบในปริมาณสูงอีกชนิดหนึ่ง คือ gallic acid นอกจากนี้ ยังตรวจพบ *p*-coumaric acid ในกากไวน์องุ่นป่าสุก และ ferulic acid ในกากไวน์องุ่นป่าอ่อนอีกด้วย ซึ่งสารทั้งสองมีส่วนสำคัญในการออกฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดอีกด้วย ปริมาณและชนิดของสารพฤกษเคมีขึ้นอยู่กับหลายปัจจัยที่ส่งผลให้ปริมาณที่ตรวจพบแตกต่างกัน ปัจจัยเหล่านั้น ได้แก่ สายพันธุ์พืช สภาพภูมิประเทศ ความชื้นหรือความแห้งแล้ง การสัมผัสโรค ความชำนาญของเกษตรกร เป็นต้น (Bruno and Sparapano, 2007; Thonpho et al., 2019)

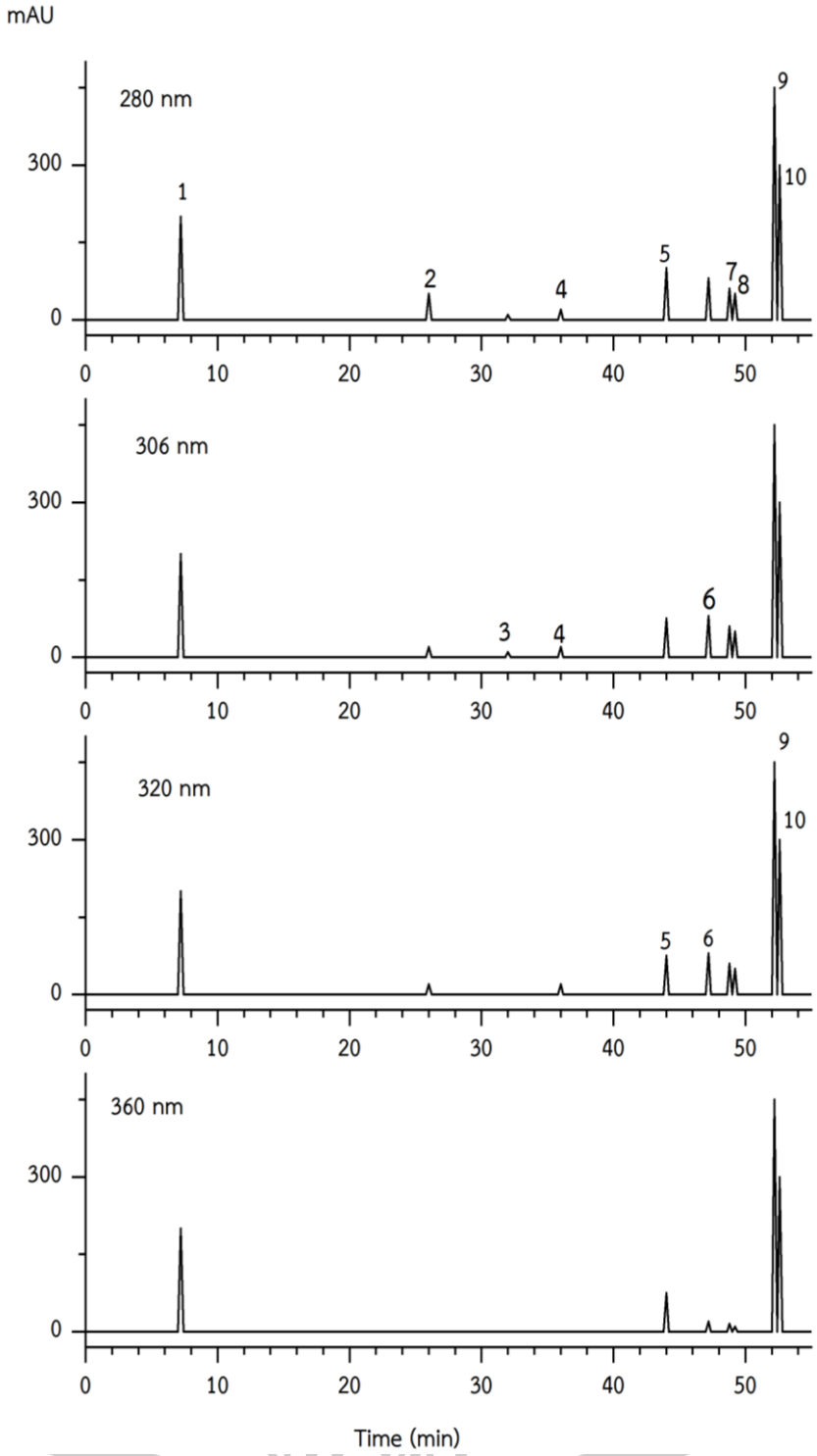
พหุน ปณ ฑิโต ชีเว



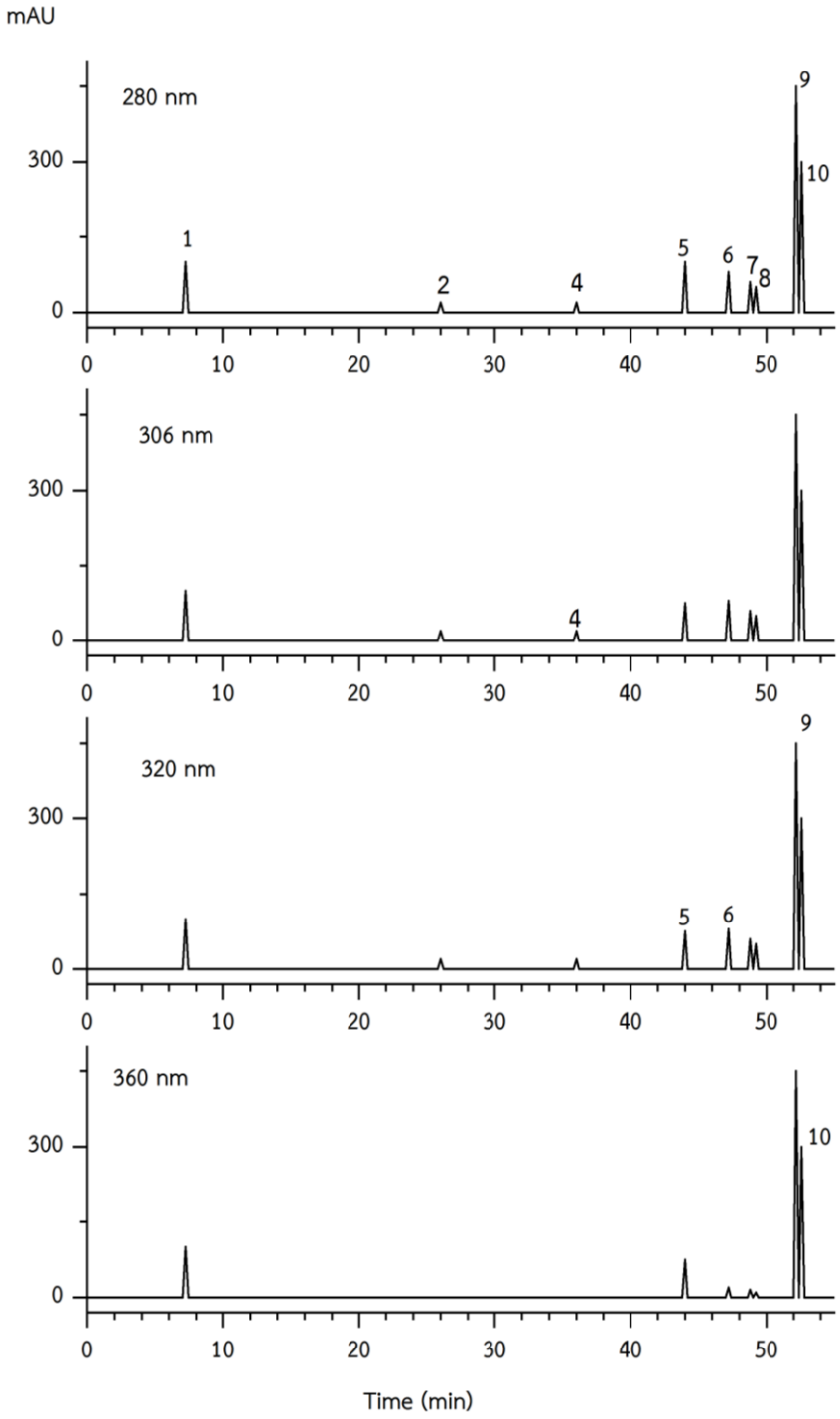
รูปที่ 10 HPLC chromatograms (ความยาวคลื่น 280 nm, 306 nm, 320 nm และ 360 nm) ของสารมาตรฐาน: (1) gallic acid, (2) catechin, (3) caffeic acid, (4) epicatechin, (5) *p*-coumaric acid, (6) ferulic acid, (7) rutin, (8) myricetin, (9) resveratol, และ (10) quercetin



รูปที่ 11 HPLC chromatograms ของสารสกัดจากกากไวน์องุ่นป่าอ่อน



รูปที่ 12 HPLC chromatograms ของสารสกัดจากกากไวน์องุ่นป่าแก่



รูปที่ 13 HPLC chromatograms ของสารสกัดจากกากไวน์องุ่นป่าสุก

ตารางที่ 4 ชนิดและปริมาณสารพฤกษเคมีของสารสกัดจากกากไวน์องุ่นป่า

สารพฤกษเคมี	สารสกัดจากกากไวน์		
	องุ่นป่าอ่อน (mg/g DW)	องุ่นป่าแก่ (mg/g DW)	องุ่นป่าสุก (mg/g DW)
Gallic acid	$1.427^{a} \pm 0.002$	$3.262^{b} \pm 0.002$	$1.445^{a} \pm 0.002$
Caffeic acid	$0.283^{b} \pm 0.000$	$0.288^{c} \pm 0.000$	ND
p-Coumaric acid	$0.069^{a} \pm 0.002$	$0.095^{b} \pm 0.001$	$0.123^{c} \pm 0.000$
Ferulic acid	$0.307^{b} \pm 0.100$	$0.172^{a} \pm 0.007$	$0.172^{a} \pm 0.005$
Resveratrol	$1.874^{b} \pm 0.783$	$0.651^{a} \pm 0.018$	$0.531^{a} \pm 0.009$
Catechin	$0.008^{a} \pm 0.007$	$0.058^{a} \pm 0.009$	$0.033^{a} \pm 0.042$
Epicatechin	$1.065^{c} \pm 0.027$	$0.088^{a} \pm 0.005$	$0.455^{b} \pm 0.015$
Quercetin	$3.528^{a} \pm 0.135$	$1.923^{a} \pm 0.015$	$1.900^{a} \pm 0.002$
Rutin	$0.034^{a} \pm 0.041$	$0.052^{a} \pm 0.045$	$0.058^{a} \pm 0.002$
Myricetin	$0.021^{a} \pm 0.019$	$0.012^{a} \pm 0.004$	$0.006^{a} \pm 0.001$
Total	**8.616 ± 1.116**	**6.601 ± 0.106**	**4.723 ± 0.078**

ND=Non-detected

* ตัวอักษรแสดงค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในแถวเดียวกันที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p < 0.05$)

4.4 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

ทำการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดด้วยวิธีดักจับอนุมูล DPPH และ ABTS และฤทธิ์รีดิวซ์โลหะด้วยวิธี FRAP และ CUPDAC ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 5 พบว่า สารสกัดจากกากไวน์องุ่นป่าในระยะเวลาการเจริญเติบโตที่แตกต่างกันให้ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) โดยฤทธิ์การดักจับอนุมูล DPPH และ ABTS จะแสดงเป็นค่า IC_{50} ซึ่งหมายถึง ความเข้มข้นของสารที่สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระได้ร้อยละ 50 (Spatafora et al., 2013) กล่าวคือ ถ้าค่าที่ทดสอบต่ำจะแสดงถึงฤทธิ์การดักจับอนุมูลอิสระมาก แต่ถ้าค่าที่ได้สูงแสดงถึงฤทธิ์การดักจับอนุมูลอิสระที่ต่ำ จากตาราง พบว่า ฤทธิ์การดักจับอนุมูล DPPH และ ABTS จะแปรผกผันกับความเข้มข้นของสารที่ทดสอบ โดยค่า IC_{50} ของสารสกัดจากกากไวน์องุ่นป่าอ่อนมีค่าต่ำที่สุด รองลงมา คือ สารสกัดจากกากไวน์องุ่นป่าสุกและแก่ ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าสารสกัดกากไวน์องุ่นป่าอ่อนมีฤทธิ์ดักจับอนุมล DPPH และ ABTS ดีที่สุด โดยสารสกัดทั้ง 3 มีความจำเพาะต่อ

อนุมูล ABTS มากกว่าอนุมูล DPPH เนื่องจากมีค่า IC_{50} ต่ำกว่ามาก ผลการทดลองสอดคล้องกับรายงานวิจัยก่อนหน้านี้ที่ระบุว่า สารฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์สามารถดักจับอนุมูล DPPH และ ABTS ได้ดี (Pantidos et al., 2014; Upadhya et al., 2015) แสดงว่า ปริมาณสูงฟีนอลิกส่งผลต่อการกำจัดอนุมูลอิสระสูง เนื่องจากสารในกลุ่มฟีนอลลิกมีโครงสร้างเป็นวงแหวนอะโรมาติกต่อกับหมู่ไฮดรอกซิล (-OH) โดยกลไกการต้านอนุมูลอิสระ คือ เมื่อสารประกอบฟีนอลิกถูกอนุมูลอิสระดึงอิเล็กตรอนออกไป โครงสร้างของสารประกอบฟีนอลิกที่มีความหนาแน่นของอิเล็กตรอนสูง สามารถเกิดการเคลื่อนย้ายไปทั่วโครงสร้างได้และทำให้โครงสร้างเกิดความเสถียร (Rib ereau-Gayon and Pascal, 2006)

การทดสอบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระสามารถตรวจด้วยวิธีรีดิวซ์โลหะไอรอน (FRAP) และคอบเปอร์ (CUPRAC) ได้อีกด้วย โดยวิธี FRAP เป็นการวัดความสามารถในการรีดิวซ์สารประกอบเชิงซ้อนของเหล็ก Fe(I) เป็น Fe(II) ส่วนวิธี CUPRAC เป็นการวัดความสามารถในการรีดิวซ์ Cu(II) เป็น Cu(I) ซึ่งทั้ง 2 วิธี เป็นกลไกในการส่งผ่านอิเล็กตรอนจากสารสกัดที่มีสารพฤกษเคมีไปรีดิวซ์สารอื่น (Amari et al., 2014; Selasi et al., 2015) โดยไอออนของโลหะจะทำหน้าที่เป็นตัวเหนี่ยวนำให้เกิดอนุมูลอิสระด้วยปฏิกิริยาออกซิเดชันและสารพฤกษเคมีจะไปยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของโลหะนั้น (Pinelo et al., 2005) ผลการทดลองที่แสดงในตารางที่ 5 พบว่าประสิทธิภาพการยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารสกัดจากกากไวน์องุ่นป่าอ่อนมีค่าสูงที่สุด รองลงมา คือ สารสกัดจากกากไวน์องุ่นป่าสุกและสารสกัดจากกากไวน์องุ่นป่าแก่ เมื่อเปรียบเทียบระหว่างวิธี FRAP และ CUPRAC พบว่า สารสกัดจะให้ค่าที่ตรวจด้วยวิธี CUPRAC สูงกว่า ทั้งนี้อาจเกิดจากวิธีการวิเคราะห์ที่แตกต่างกัน เนื่องจากวิธี CUPRAC เป็นการวิเคราะห์หาความสามารถในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันที่ใช้ช่วงพีเอชที่พบภายในเซลล์ (physiological pH) ต่างจากวิธี FRAP ที่ใช้ช่วงพีเอชเป็นกรด (Apak et al., 2007) อีกทั้งวิธี CUPRAC สามารถเกิดปฏิกิริยาสมบูรณ์ภายในเวลาที่ทำการทดลอง ในขณะที่วิธี FRAP สามารถเกิดปฏิกิริยาได้เพิ่มขึ้นเมื่อตั้งทิ้งไว้ ดังนั้น การวัดตามเวลาที่กำหนดอาจไม่ใช่ค่าที่เกิดจากปฏิกิริยาสมบูรณ์ และวิธี FRAP สามารถเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารต้านอนุมูลอิสระได้กับสารจำพวกน้ำตาลและกรดซิตริกที่มีอยู่ทั่วไปในพืชซึ่งต่างจากวิธี CUPRAC ที่ไม่สามารถเกิดขึ้นได้

ตารางที่ 5 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากกากไวน์องุ่นป่า

สารสกัดจากกากไวน์	DPPH (IC_{50} mg/mL)	ABTS (IC_{50} mg/mL)	FRAP (μM Fe^{2+}/g DW)	CUPRAC (mg TE/g DW)
องุ่นป่าอ่อน	0.179^{a} ± 0.005	0.011^{a} ± 0.000	2.165^{c} ± 0.010	350.926^{c} ± 11.578
องุ่นป่าแก่	0.282^{b} ± 0.018	0.018^{c} ± 0.000	1.048^{a} ± 0.017	115.370^{a} ± 3.902
องุ่นป่าสุก	0.189^{a} ± 0.005	0.016^{b} ± 0.001	1.349^{b} ± 0.043	220.741^{b} ± 3.699

* ตัวอักษรแสดงค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในคอลัมน์เดียวกันที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p < 0.05$)

4.5 ค่าสหสัมพันธ์ระหว่างปริมาณสารพฤกษเคมีกับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

ค่าสหสัมพันธ์ระหว่างปริมาณสารพฤกษเคมีและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบจากกากไวน์องุ่นป่าแสดงด้วยค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (r) ซึ่งโดยทั่วไปค่า r จะมีค่าตั้งแต่ -1 ถึง 1 ถ้าค่า r เป็นลบ (-) แสดงว่า ตัวแปรที่ศึกษามีความสัมพันธ์ตรงกันข้าม หากเข้าใกล้ 0 แสดงว่าตัวแปรมีความสัมพันธ์น้อย หรือถ้าเป็น 0 แสดงว่าตัวแปรไม่มีความสัมพันธ์กันเลย แต่ถ้าหากเป็นบวก (+) แสดงว่าตัวแปรมีความสัมพันธ์ในทิศทางเดียวกัน ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 6

จากตารางแสดงว่าปริมาณฟีนอลิกรวมมีค่าสหสัมพันธ์สูงต่อวิธีการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระทุกวิธีทดสอบ ดังนี้ ฤทธิ์การดักจับอนุมูล DPPH (r = -0.799 หรือ 79.9 %) ABTS (r = -0.991 หรือ 99.1%) ฤทธิ์รีดิวซ์โลหะไอรอน (FRAP) (r = 0.996 หรือ 99.6%) และ ฤทธิ์รีดิวซ์โลหะคอปเปอร์ (CUPRAC) (r = 0.991 หรือ 99.1%) จากค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์จะเห็นว่าฟีนอลิกมีความจำเพาะต่ออนุมูลประจุบวก (ABTS) และรีดิวซ์โลหะได้ดีกว่าอนุมูลที่เป็นกลางอย่าง DPPH ฟีนอลิกมีความสัมพันธ์กับฟลาโวนอยด์และซาโปนินส์ค่อนข้างสูง แต่มีความสัมพันธ์กับโพรแอนโธไซยานิดินส์และคอนเดนส์แทนนินสูง

ในขณะที่ฟลาโวนอยด์รวมมีความสัมพันธ์กับฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระแตกต่างกันไปในแต่ละวิธีทดสอบ โดยฟลาโวนอยด์รวมมีค่าสหสัมพันธ์กับฤทธิ์การดักจับอนุมูล DPPH ต่ำ (r = -0.148 หรือ 14.8%) แต่มีความสัมพันธ์กับวิธี ABTS ค่อนข้างสูง (r = -0.676 หรือ 67.6%) รวมทั้งฤทธิ์รีดิวซ์โลหะไอรอน (FRAP) (r = 0.691 หรือ 69.1%) ส่วนฤทธิ์รีดิวซ์โลหะคอปเปอร์ (CUPRAC) อยู่ในระดับปานกลาง (r = 0.553 หรือ 55.3%) ฟลาโวนอยด์รวมมีความสัมพันธ์กับซาโปนินส์และคอนเดนส์แทนนินสูง แต่มีความสัมพันธ์กับโพรแอนโธไซยานิดินส์และฟีนอลิกในระดับปานกลางสูง

ปริมาณซาโปนินส์รวมมีค่าสหสัมพันธ์กับวิธีทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระคล้ายกับฟลาโวนอยด์รวม คือ มีค่าสหสัมพันธ์กับฤทธิ์การดักจับอนุมูล DPPH ต่ำมาก (r = -0.080 หรือ 8.0%) แต่มีความสัมพันธ์กับวิธี ABTS ค่อนข้างสูง (r = -0.660 หรือ 66.0%) รวมทั้งฤทธิ์รีดิวซ์โลหะไอรอน (FRAP) (r = 0.691 หรือ 69.1%) ส่วนฤทธิ์รีดิวซ์โลหะคอปเปอร์ (CUPRAC) อยู่ในระดับปานกลาง (r = 0.532 หรือ 53.2%) ซาโปนินส์รวมมีความสัมพันธ์กับฟลาโวนอยด์ ฟีนอลิกและคอนเดนส์แทนนิน สูง แต่มีความสัมพันธ์กับโพรแอนโธไซยานิดินส์ในระดับค่อนข้างสูง

ปริมาณคอนเดนส์แทนนินรวมมีค่าสหสัมพันธ์ปานกลางกับวิธีดักจับอนุมูล DPPH (r = -0.480 หรือ 48.0%) แต่มีค่าสหสัมพันธ์ระดับสูงกับวิธี ABTS (r = -0.913 หรือ 91.3%) ฤทธิ์รีดิวซ์โลหะไอรอน (FRAP) (r = 0.925 หรือ 92.5%) และฤทธิ์รีดิวซ์โลหะคอปเปอร์ (CUPRAC) (r = 0.833 หรือ 83.3%) คอนเดนส์แทนนินรวมมีความสัมพันธ์ระดับสูงกับฟีนอลิกและโพรแอนโธไซยานิดินส์สูง แต่มีความสัมพันธ์ในระดับค่อนข้างสูงกับซาโปนินส์และฟลาโวนอยด์

ปริมาณโพรแอนโธไซยานิดินส์รวมมีค่าสหสัมพันธ์สูงกับทุกวิธีที่ทดสอบ ดังนี้ ฤทธิ์การดักจับอนุมูล DPPH (r = -0.761 หรือ 76.1%), ABTS (r = -0.992 หรือ 99.2%) ฤทธิ์รีดิวซ์โลหะไอรอน (FRAP) (r = 0.997 หรือ 99.7%) และฤทธิ์รีดิวซ์โลหะคอปเปอร์ (CUPRAC) (r = 0.982 หรือ 98.2%) โพรแอนโธไซยานิดินส์รวมมีความสัมพันธ์ระดับสูงกับฟีนอลิกและคอนเดนส์แทนนินสูง แต่มีความสัมพันธ์ในระดับค่อนข้างสูงกับซาโปนินส์และฟลาโวนอยด์

ผลการทดลองชี้ให้เห็นว่าสารพฤกษเคมีทั้ง 5 ชนิด ออกฤทธิ์ต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันแตกต่างกันโดยสารที่มีฤทธิ์ดักจับอนุมูลอิสระที่มีประจุเป็นกลาง DPPH ได้สูง คือ ฟีนอลิกรวมและโพรแอนโธไซยานิดินส์รวม ส่วนสารอื่นมีฤทธิ์ค่อนข้างต่ำ แต่สารทั้ง 5 ชนิดมีฤทธิ์ดักจับอนุมูลอิสระประจุบวก ABTS ได้ในระดับค่อนข้างสูงถึงสูง สารทุกชนิดที่ตรวจสอบมีฤทธิ์รีดิวซ์โลหะไอรอนและทองแดงในระดับปานกลาง ค่อนข้างสูง และสูงเป็นส่วนใหญ่ ข้อมูลนี้แสดงให้เห็นค่าสหสัมพันธ์กันในเชิงบวกระหว่างสารพฤกษเคมีและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยก่อนหน้านี้ที่พบว่าสารกลุ่มพอลิฟีนอลสามารถดักจับอนุมูลอิสระได้เพราะมีโครงสร้างเคมีที่ประกอบด้วยหมู่ฟีนอลซึ่งมีสมบัติเป็นนิวคลีโอไฟล์ (nucleophile) ที่ดี (Lopes et al., 1999) เมื่อปริมาณสารพฤกษเคมีมากจะทำให้มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระเพิ่มขึ้นด้วย อีกทั้งเมื่อให้อิเล็กตรอนแล้วสารพอลิฟีนอลจะรวมตัวกันเกิดเป็นพอลิฟีนอลใหม่ ที่มีความเสถียรยิ่งขึ้น (Barizah and Bakar, 2011; Feng et al., 2014; Zhishen et al., 1999) อย่างไรก็ตาม สารพอลิฟีนอลบางชนิดที่ตรวจพบในสารสกัดอาจออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมากแม้จะมีปริมาณน้อยเพราะลักษณะโครงสร้างของสารซึ่งเป็นสาเหตุทำให้เกิดความสัมพันธ์ไม่เป็นเส้นตรงระหว่างปริมาณฟีนอลิกและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระก็เป็นได้ (Barros et al., 2014; Hyun et al., 2016)

ตารางที่ 6 สัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ระหว่างสารพฤษเคมีและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

Factors	TPC	TFC	TSC	CDT	TPRAC	DPPH	ABTS	FRAP	CUPRAC
TPC	1	.636	.635	.894**	.997**	-.799**	-.991**	.996**	.991**
TFC		1	.907**	.889**	.665	-.148	-.676*	.691*	.553
TSC			1	.899**	.676*	-.080	-.660	.691*	.532
CDT				1	.916**	-.480	-.913**	.925**	.833**
TPRAC					1	-.761*	-.992**	.997**	.982**
DPPH						1	.776*	-.751*	-.864**
ABTS							1	-.992**	-.980**
FRAP								1	.977**
CUPRAC									1

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

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

พหุน ปณ ฑิโต ชีเว

บทที่ 5
สรุปผลการทดลอง

สารสกัดจากกากไวน์องุ่นป่า (*Ampelocissus martinii* Planch.) เป็นแหล่งของสารพฤกษเคมีที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูง สามารถสรุปผลการทดลองได้ ดังนี้

1. เมื่อใช้เอทานอลเป็นตัวทำละลายในการสกัดสาร กากไวน์องุ่นป่าแก่มีร้อยละการได้กลับคืนสูงที่สุด รองลงมา คือ กากไวน์องุ่นป่าสุกและกากไวน์องุ่นป่าอ่อน ตามลำดับ

2. สารพฤกษเคมีที่ตรวจสอบมีปริมาณแตกต่างกันในแต่ละช่วงการเจริญเติบโตของผล โดยปริมาณสารพฤกษเคมีรวมทุกชนิด พบมากที่สุดในสารสกัดจากกากไวน์องุ่นป่าอ่อน

3. ผลการวิเคราะห์ชนิดและปริมาณสารพฤกษเคมีด้วย HPLC พบสารหลักที่สำคัญทั้ง 10 ชนิด โดยสารสกัดจากกากไวน์องุ่นป่าอ่อนและสุกมี quercetin ปริมาณสูงที่สุด ในขณะที่สารสกัดจากกากไวน์องุ่นป่าแก่ มี gallic acid ปริมาณสูงที่สุด

4. สารสกัดจากกากไวน์องุ่นป่าในระยะเวลาการเจริญเติบโตที่แตกต่างกันให้ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) โดยสารสกัดจากกากไวน์องุ่นป่าอ่อนมีฤทธิ์สูงที่สุด รองลงมา คือ สารสกัดจากกากไวน์องุ่นป่าสุกและสารสกัดจากกากไวน์องุ่นป่าแก่ ตามลำดับ

5. สารพฤกษเคมีที่ทำการตรวจสอบทุกชนิดมีความสัมพันธ์กับฤทธิ์ดักจับอนุมูลอิสระ ABTS ฤทธิ์รีดิวซ์โลหะไอรอนและคอบเปอร์ในระดับค่อนข้างสูงถึงสูง ส่วนฤทธิ์ดักจับอนุมูลอิสระ DPPH ความสัมพันธ์ระดับสูงกับฟีนอลิกและโพรแอนโทไซยานิดินส์รวม

6. กากไวน์องุ่นป่าเป็นแหล่งของสารพฤกษเคมีที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงที่อาจนำไปประยุกต์ใช้ในด้านอาหาร โภชนาการ เภสัชกรรมและทางการแพทย์ต่อไป

พหูน ปณ ฑิโต ชีเว

บรรณานุกรม

บรรณานุกรม

Abu Bakar, M. F., Mohamed, M., Rahmat, A., & Fry, J. (2009). Phytochemicals and antioxidant activity of different parts of bambangan (Mangifera pajang) and tarap (Artocarpus odoratissimus). *Food Chemistry*, *113*(2), 479–483. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.07.081

Al-Shoaibi, Z., Al-Mamary, M. A., AL-Habori, M. A., Al-Zubain, A. S., & Abdelwahab, S. I. (2012). In vivo antioxidative and hep atop rotective effects of palm date fruits (Phoenix dactylifera). *International Journal of Pharmacology*, *8*(3), 185–191. https://doi.org/10.3923/ijp.2012.185.191

Alghazeer, R., El-Saltani, H., Saleh, N., Al-Najjar, A., & Hebail, F. (2012). Antioxidant and antimicrobial properties of five medicinal Libyan plants extracts. *Natural Science*, *04*(05), 324–335. https://doi.org/10.4236/ns.2012.45045

Amari, N. O., Bouzouina, M., Berkani, A., & Lotmani, B. (2014). Phytochemical screening and antioxidant capacity of the aerial parts of Thymelaea hirsuta L. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, *4*(2), 104–109. https://doi.org/10.1016/S2222-1808(14)60324-8

Anastasiadi, M., Pratsinis, H., Kletsas, D., Skaltsounis, A. L., & Haroutounian, S. A. (2010). Bioactive non-coloured polyphenols content of grapes, wines and vinification by-products: Evaluation of the antioxidant activities of their extracts. *Food Research International*, *43*(3), 805–813. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2009.11.017

Anastasiadi, M., Pratsinis, H., Kletsas, D., Skaltsounis, A. L., & Haroutounian, S. A. (2012). Grape stem extracts: Polyphenolic content and assessment of their in vitro antioxidant properties. *LWT - Food Science and Technology*, *48*(2), 316–322. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2012.04.006

Antoniolli, A., Fontana, A. R., Piccoli, P., & Bottini, R. (2015). Characterization of polyphenols and evaluation of antioxidant capacity in grape pomace of the cv. Malbec. *Food Chemistry*, *178*, 172–178. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.01.082

Apak, R., Güçlü, K., Demirata, B., Özyürek, M., Çelik, S. E., Bektaşoğlu, B., Berker, K. I., &

Özyurt, D. (2007). Comparative evaluation of various total antioxidant capacity assays applied to phenolic compounds with the CUPRAC assay. *Molecules*, *12*(7), 1496–1547. https://doi.org/10.3390/12071496

Baderschneider, B., & Winterhalter, P. (2001). Isolation and characterization of novel benzoates, cinnamates, flavonoids, and lignans from Riesling wine and screening for antioxidant activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *49*(6), 2788–2798. https://doi.org/10.1021/jf010396d

Baker, H. (2009). Characterization for the interaction of nickel(II) and copper(II) from aqueous solutions with natural silicate minerals. *Desalination*, *244*(1–3), 48–58. https://doi.org/10.1016/j.desal.2008.05.017

Balu, M., Sangeetha, P., Murali, G., & Panneerselvam, C. (2006). Modulatory role of grape seed extract on age-related oxidative DNA damage in central nervous system of rats. *Brain Research Bulletin*, *68*(6), 469–473. https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2005.10.007

Barizah, N., & Bakar, A. (2011). *IRJFE_75_03-Incentivefordisclosure.pdf*. *75*(75).

Barros, A., Gironés-Vilaplana, A., Teixeira, A., Collado-González, J., Moreno, D. A., Gil-Izquierdo, A., Rosa, E., & Domínguez-Perles, R. (2014). Evaluation of grape (Vitis vinifera L.) stems from Portuguese varieties as a resource of (poly)phenolic compounds: A comparative study. *Food Research International*, *65*(PC), 375–384. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.07.021

Bekhit, A. E. D. A., Cheng, V. J., Zhang, H., Mros, S., Mohamed Ahmed, I. A., Al-Juhaimi, F. Y., Bekhit, A. A., & McConnell, M. (2019a). Effect of extraction system and grape variety on anti-influenza compounds from wine production residue. *Food Control*, *99*(June 2018), 180–189. https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2018.12.036

Bekhit, A. E. D. A., Cheng, V. J., Zhang, H., Mros, S., Mohamed Ahmed, I. A., Al-Juhaimi, F. Y., Bekhit, A. A., & McConnell, M. (2019b). Effect of extraction system and grape variety on anti-influenza compounds from wine production residue. *Food Control*, *99*(January), 180–189. https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2018.12.036

Bektaşoğlu, B., Esin Çelik, S., Özyürek, M., Güçlü, K., & 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*(3), 1194–1200. https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2006.05.038

Bennett, W. L., Maruthur, N. M., Singh, S., Segal, J. B., Wilson, L. M., Chatterjee, R., Marinopoulos, S. S., Puhan, M. A., Ranasinghe, P., Block, L., Nicholson, W. K., Hutfless, S., Bass, E. B., & Bolen, S. (2011). Comparative effectiveness and safety of medications for type 2 diabetes: An update including new drugs and 2-drug combinations. *Annals of Internal Medicine*, *154*(9), 602–618. https://doi.org/10.7326/0003-4819-154-9-201105030-00336

Benzie, I. F. F., & Szeto, Y. T. (1999). Total antioxidant capacity of teas by the ferric reducing/antioxidant power assay. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *47*(2), 633–636. https://doi.org/10.1021/jf9807768

Bianchini, F., & Vainio, H. (2003). Wine and resveratrol: Mechanisms of cancer prevention? *European Journal of Cancer Prevention*, *12*(5), 417–425. https://doi.org/10.1097/00008469-200310000-00011

Blois, M. S. (1958). Antioxidant determinations by the use of a stable free radical [10]. *Nature*, *181*(4617), 1199–1200. https://doi.org/10.1038/1811199a0

Borg, D. C., & Schaich, K. M. (1984). Cytotoxicity from Coupled Redox Cycling of Autoxidizing Xenobiotics and Metals: A Selective Critical Review and Commentary on Work-in-Progress. *Israel Journal of Chemistry*, *24*(1), 38–53. https://doi.org/10.1002/ijch.198400007

Bors, W., Heller, W., Michel, C., & Saran, M. (1990). Flavonoids as antioxidants: Determination of radical-scavenging efficiencies. *Methods in Enzymology*, *186*(C), 343–355. https://doi.org/10.1016/0076-6879(90)86128-I

Bruno, G., & Sparapano, L. (2007). Effects of three esca-associated fungi on Vitis vinifera L.: V. Changes in the chemical and biological profile of xylem sap from diseased cv. Sangiovese vines. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, *71*(4–6), 210–229. https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2008.02.005

Burin, V. M., Ferreira-Lima, N. E., Panceri, C. P., & Bordignon-Luiz, M. T. (2014). Bioactive compounds and antioxidant activity of Vitis vinifera and Vitis labrusca grapes: Evaluation of different extraction methods. *Microchemical Journal*, *114*, 155–163. https://doi.org/10.1016/j.microc.2013.12.014

Burjanivova, T., Madzo, J., Muzikova, K., Meyer, C., Schneider, B., Votava, F.,

Marschalek, R., Stary, J., Trka, J., & Zuna, J. (2006). Prenatal origin of childhood AML occurs less frequency than in childhood ALL. *BMC Cancer*, *6*, 1–7. https://doi.org/10.1186/1471-2407-6-100

Carocho, M., & Ferreira, I. C. F. R. (2013). A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. *Food and Chemical Toxicology*, *51*(1), 15–25. https://doi.org/10.1016/j.fct.2012.09.021

Castilla, P., Echarri, R., Dávalos, A., Cerrato, F., Ortega, H., Teruel, J. L., Lucas, M. F., Gómez-Coronado, D., Ortuño, J., & Lasunción, M. A. (2006). Concentrated red grape juice exerts antioxidant, hypolipidemic, and antiinflammatory effects in both hemodialysis patients and healthy subjects. *American Journal of Clinical Nutrition*, *84*(1), 252–262. https://doi.org/10.1093/ajcn/84.1.252

Chattopadhyay, K., & Chattopadyay, 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*(6), 571–576.

Chen, I., & Manchester, S. R. (2007). Seed morphology of modern and fossil Ampelocissus (Vitaceae) and implications for phytogeography. *American Journal of Botany*, *94*(9), 1534–1553. https://doi.org/10.3732/ajb.94.9.1534

Cheng, V. J., Bekhit, A. E. D. A., McConnell, M., Mros, S., & Zhao, J. (2012). Effect of extraction solvent, waste fraction and grape variety on the antimicrobial and antioxidant activities of extracts from wine residue from cool climate. *Food Chemistry*, *134*(1), 474–482. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.02.103

Cousin, M. A., Tan, T. C., & Robinson, P. J. (2001). Protein phosphorylation is required for endocytosis in nerve terminals: Potential role for the dephosphins dynamin I and synaptojanin, but not AP180 or amphiphysin. *Journal of Neurochemistry*, *76*(1), 105–116. https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2001.00049.x

Dalle-Donne, I., Rossi, R., Colombo, R., Giustarini, D., & Milzani, A. (2006). Biomarkers of oxidative damage in human disease. *Clinical Chemistry*, *52*(4), 601–623. https://doi.org/10.1373/clinchem.2005.061408

Decker, E. A. (1995). The Role of Phenolics, Conjugated Linoleic Acid, Carnosine, and Pyrroloquinoline Quinone as Nonessential Dietary Antioxidants. *Nutrition*

Reviews, *53*(3), 49–58. https://doi.org/10.1111/j.1753-4887.1995.tb01502.x

Dell'Agli, M., Galli, G. V., Vrhovsek, U., Mattivi, F., & Bosisio, E. (2005). In vitro inhibition of human cGMP-specific phosphodiesterase-5 by polyphenols from red grapes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *53*(6), 1960–1965. https://doi.org/10.1021/jf048497+

DeMartino, G. N., & Slaughter, C. A. (1999). The proteasome, a novel protease regulated by multiple mechanisms. *Journal of Biological Chemistry*, *274*(32), 22123–22126. https://doi.org/10.1074/jbc.274.32.22123

Denev, P. N., Kratchanov, C. G., Ciz, M., Lojek, A., & Kratchanova, M. G. (2012). Bioavailability and Antioxidant Activity of Black Chokeberry (Aronia melanocarpa) Polyphenols: In vitro and in vivo Evidences and Possible Mechanisms of Action: A Review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, *11*(5), 471–489. https://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2012.00198.x

Desai, N. S. chavan. (2010). *International Journal of Pharma and Bio Sciences ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF TETRAPLEURA TETRAPTERA TAUB . POD EXTRACTS*. *1*(4), 1–4.

Domínguez-Perles, R., Teixeira, A. I., Rosa, E., & Barros, A. I. (2014). Assessment of (poly)phenols in grape (Vitis vinifera L.) stems by using food/pharma industry compatible solvents and Response Surface Methodology. *Food Chemistry*, *164*, 339–346. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.05.020

Evans, P., & Halliwell, B. (2001). Micronutrients: oxidant/antioxidant status. *British Journal of Nutrition*, *85*(S2), S67. https://doi.org/10.1049/bjn2000296

Fang, Y. Z. (1998). Effect of Lu-Duo-Wei on Scavenging Superoxide and Hydroxyl Radicals in vitro. *American Journal of Chinese Medicine*, *26*(2), 153–158. https://doi.org/10.1142/S0192415X98000208

Fang, Y. Z., Yang, S., & Wu, G. (2002). Free radicals, antioxidants, and nutrition. *Nutrition*, *18*(10), 872–879. https://doi.org/10.1016/S0899-9007(02)00916-4

Farhadi, K., Esmaeilzadeh, F., Hatami, M., Forough, M., & Molaie, R. (2016). 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 Chemistry*, *199*, 847–855.

https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.12.083

Feng, S., Luo, Z., Zhang, Y., Zhong, Z., & Lu, B. (2014). Phytochemical contents and antioxidant capacities of different parts of two sugarcane (Saccharum officinarum L.) cultivars. *Food Chemistry*, *151*, 452–458. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.11.057

Fiori, L., Lavelli, V., Duba, K. S., Sri Harsha, P. S. C., Mohamed, H. Ben, & Guella, G. (2014). Supercritical CO2 extraction of oil from seeds of six grape cultivars: Modeling of mass transfer kinetics and evaluation of lipid profiles and tocol contents. *Journal of Supercritical Fluids*, *94*, 71–80. https://doi.org/10.1016/j.supflu.2014.06.021

Floegel, A., Kim, D. O., Chung, S. J., Koo, S. I., & 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*(7), 1043–1048. https://doi.org/10.1016/j.jfca.2011.01.008

Fridovich, I. (1999). Fundamental aspects of reactive oxygen species, or what's the matter with oxygen? *Annals of the New York Academy of Sciences*, *893*, 13–18. https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1999.tb07814.x

Gil, M., Pontin, M., Berli, F., Bottini, R., & Piccoli, P. (2012). Metabolism of terpenes in the response of grape (Vitis vinifera L.) leaf tissues to UV-B radiation. *Phytochemistry*, *77*, 89–98. https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2011.12.011

Gilbert, D. L. (2000). Fifty years of radical ideas. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *899*, 1–14. https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2000.tb06172.x

Huang, J., Grunes, D., & Kochian, L. (1992). Aluminum effects on the kinetics of calcium uptake into cells of the wheat root apex. *Planta*, *188*(3). https://doi.org/10.1007/bf00192809

Hudson, T. S., Hartle, D. K., Hursting, S. D., Nunez, N. P., Wang, T. T. Y., Young, H. A., Arany, P., & Green, J. E. (2007). Inhibition of prostate cancer growth by muscadine grape skin extract and resveratrol through distinct mechanisms. *Cancer Research*, *67*(17), 8396–8405. https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-4069

Hyun, T. K., Kim, H. C., Ko, Y. J., & Kim, J. S. (2016). Antioxidant, α-glucosidase

inhibitory and anti-inflammatory effects of aerial parts extract from Korean crowberry (Empetrum nigrum var. japonicum). *Saudi Journal of Biological Sciences*, *23*(2), 181–188. https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2015.02.008

Ii, M. P., Complexes, C., Hou, J., Boichenko, V. a, Diner, B. a, & Mauzerall, D. (2001). *Thermodynamics of Electron Transfer in Oxygenic Photosynthetic Reaction Centers : Volume Change , Enthalpy , and Entropy of Electron-Transfer Reactions in*. *C*, 7117–7125.

Jariyapamornkoon, N., Yibchok-anun, S., & Adisakwattana, S. (2013). Inhibition of advanced glycation end products by red grape skin extract and its antioxidant activity. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, *13*. https://doi.org/10.1186/1472-6882-13-171

Jayaprakasha, G. K., Selvi, T., & Sakariah, K. K. (2003). Antibacterial and antioxidant activities of grape (Vitis vinifera) seed extracts. *Food Research International*, *36*(2), 117–122. https://doi.org/10.1016/S0963-9969(02)00116-3

Jiménez-Martínez, M. D., Bautista-Ortín, A. B., Gil-Muñoz, R., & Gómez-Plaza, E. (2019). Comparison of fining red wines with purified grape pomace versus commercial fining agents: effect on wine chromatic characteristics and phenolic content. *International Journal of Food Science and Technology*, *54*(4), 1018–1026. https://doi.org/10.1111/ijfs.13881

Joseph, J. A., Shukitt-Hale, B., & Casadesus, G. (2005). Reversing the deleterious effects of aging on neuronal communication and behavior: beneficial properties of fruit polyphenolic compounds. *The American Journal of Clinical Nutrition*, *81*(1 Suppl), 313–316. https://doi.org/10.1093/ajcn/81.1.313s

Karani, L. W., Tolo, F. M., Karanja, S. M., & Khayeka-Wandabwa, C. (2013). Safety of prunus africana and warburgia ugandensis in asthma treatment. *South African Journal of Botany*, *88*, 183–190. https://doi.org/10.1016/j.sajb.2013.07.007

Kim, D. O., Jeong, S. W., & Lee, C. Y. (2003). Antioxidant capacity of phenolic phytochemicals from various cultivars of plums. *Food Chemistry*, *81*(3), 321–326. https://doi.org/10.1016/S0308-8146(02)00423-5

Kim, S., Lee, K. W., Park, J., Lee, H. J., & Hwang, I. K. (2006). Effect of drying in antioxidant activity and changes of ascorbic acid and colour by different drying

and storage in Korean red pepper (Capsicum annuum, L.). *International Journal of Food Science and Technology*, *41*(SUPPL. 1), 90–95. https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2006.01349.x

Kohen, R., & Nyska, A. (2002). Oxidation of biological systems: Oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. *Toxicologic Pathology*, *30*(6), 620–650. https://doi.org/10.1080/01926230290166724

Kumar, N. S., Pulok, K. M., Bhad, S., Saha, B. P., & Pal, B. C. (2008). Inhibition of cholinesterase and amyloid-&bgr; aggregation by resveratrol oligomers from Vitis amurensis. *Phytotherapy Research*, *22*(4), 544–549. https://doi.org/10.1002/ptr

Lander, H. M. (1997). An essential role for free radicals and derived species in signal transduction. *The FASEB Journal*, *11*(2), 118–124. https://doi.org/10.1096/fasebj.11.2.9039953

Lima, F. S. de, Kurozawa, L. E., & Ida, E. I. (2014). The effects of soybean soaking on grain properties and isoflavones loss. *LWT - Food Science and Technology*, *59*(2P2), 1274–1282. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.04.032

Lingua, M. S., Fabani, M. P., Wunderlin, D. A., & Baroni, M. V. (2016). In vivo antioxidant activity of grape, pomace and wine from three red varieties grown in Argentina: Its relationship to phenolic profile. *Journal of Functional Foods*, *20*, 332–345. https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.10.034

Liu, B., Han, G., Zhang, Z., Liu, R., Jiang, C., Wang, S., & Han, M. Y. (2012). Shell thickness-dependent Raman enhancement for rapid identification and detection of pesticide residues at fruit peels. *Analytical Chemistry*, *84*(1), 255–261. https://doi.org/10.1021/ac202452t

Liu, H. L., Chen, B. H., Kao, T. H., & Shiau, C. Y. (2014). Carotenoids composition in Scutellaria barbata D. Don as detected by high performance liquid chromatography-diode array detection-mass spectrometry-atmospheric pressure chemical ionization. *Journal of Functional Foods*, *8*(1), 100–110. https://doi.org/10.1016/j.jff.2014.03.008

Lopes, L. V., Cunha, R. A., & Ribeiro, J. A. (1999). Increase in the number, G protein coupling, and efficiency of facilitatory adenosine A(2A) receptors in the limbic

cortex, but not striatum, of aged rats. *Journal of Neurochemistry*, *73*(4), 1733–1738. https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.1999.731733.x

Ma, Z., & Vosseller, K. (2013). O-GlcNAc in cancer biology. *Amino Acids*, *45*(4), 719–733. https://doi.org/10.1007/s00726-013-1543-8

Mäkynen, K., Jitsaardkul, S., Tachasamran, P., Sakai, N., Puranachoti, S., Nirojsinlapachai, N., Chattapat, V., Caengprasath, N., Ngamukote, S., & Adisakwattana, S. (2013). Cultivar variations in antioxidant and antihyperlipidemic properties of pomelo pulp (Citrus grandis [L.] Osbeck) in Thailand. *Food Chemistry*, *139*(1–4), 735–743. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.02.017

Martin-Puzon, J. J. R., & Rivera, W. L. (2015). Free-radical scavenging activity and bioactive secondary metabolites from various extracts of Glinus oppositifolius (L.) Aug. DC. (Molluginaceae) roots, stems and leaves. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, *5*(9), 711–715. https://doi.org/10.1016/S2222-1808(15)60918-5

Mazandarani M. (2012). Effects of solvent type on phenolics and flavonoids content and antioxidant activities in Onosma dichroanthum Boiss. *Journal of Medicinal Plants Research*, *6*(28). https://doi.org/10.5897/jmpr11.1460

McCord, J. M. (2000). The evolution of free radicals and oxidative stress. *American Journal of Medicine*, *108*(8), 652–659. https://doi.org/10.1016/S0002-9343(00)00412-5

Mejia, L. A., Korgaonkar, C. K., Schweizer, M., Chengelis, C., Novilla, M., Ziemer, E., Williamson-Hughes, P. S., Grabiel, R., & Empie, M. (2009). A 13-week dietary toxicity study in rats of a Napin-Rich Canola Protein Isolate. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, *55*(3), 394–402. https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2009.09.008

Mendoza, D., Arias, J. P., Cuaspud, O., Ruiz, O., & Arias, M. (2020). FT-NIR spectroscopy and RP-HPLC combined with multivariate analysis reveals differences in plant cell suspension cultures of Thevetia peruviana treated with salicylic acid and methyl jasmonate. *Biotechnology Reports*, *27*, e00519. https://doi.org/10.1016/j.btre.2020.e00519

Mengulluoglu, M., & Soylu, S. (2012). Antibacterial activities of essential oils extracted from medicinal plants against seed-borne bacterial disease agent, Acidovorax

avenae subsp. citrulli. *Research on Crops*, *13*(2), 641–646.

Meyer, J. E. W., & Schulz, G. E. (1997). Energy profile of maltooligosaccharide permeation through maltoporin as derived from the structure and from a statistical analysis of saccharide- protein interactions. *Protein Science*, *6*(5), 1084–1091. https://doi.org/10.1002/pro.5560060515

Muchuweti, M., Ndhlala, A. R., & Kasiamhuru, A. (2006). Analysis of phenolic compounds including tannins, gallotannins and flavanols of Uapaca kirkiana fruit. *Food Chemistry*, *94*(3), 415–419. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.11.030

Muñoz-Bernal, Ó. A., De La Rosa, L. A., Rodrigo-García, J., Martínez-Ruíz, N. del R., Sáyago-Ayerdi, S. G., Rodriguez, L., Fuentes, E., Palomo, I., & Alvarez-Parrilla, E. (2021). Phytochemical Characterization and Antiplatelet Activity of Mexican Red Wines and Their By-products. *South African Journal of Enology and Viticulture*, *42*(1), 77–90.

Nag, M., Celiker, H., Verschueren, L., Smout, S., Willegems, M., Upadhyay, R., Rolin, C., Papadopoulos, N., Genoe, J., Dehaene, W., Steudel, S., Heremans, P., & Myny, K. (2019). P-12: High Performance Dual-gate Dual-layer Amorphous Oxide Semiconductors TFTs on PI Foil for Display Application. *SID Symposium Digest of Technical Papers*, *50*(1), 1255–1258. https://doi.org/10.1002/sdtp.13161

Nguyen, V. T., Bowyer, M. C., Vuong, Q. Van, Altena, I. A. V., & Scarlett, C. J. (2015). Phytochemicals and antioxidant capacity of Xao tam phan (Paramignya trimera) root as affected by various solvents and extraction methods. *Industrial Crops and Products*, *67*, 192–200. https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.01.051

Niki, E., The, N., & Tsuchihashi, H. (2018). *C , vitamin E , and*. *62*(March).

Nour, V., Trandafir, I., & Cosmulescu, S. (2013). HPLC determination of phenolic acids, flavonoids and juglone in walnut leaves. *Journal of Chromatographic Science*, *51*(9), 883–890. https://doi.org/10.1093/chromsci/bms180

Ohinata, Y., Yamasoba, T., Schacht, J., & Miller, J. M. (2000). Glutathione limits noise-induced hearing loss. *Hearing Research*, *146*(1–2), 28–34. https://doi.org/10.1016/S0378-5955(00)00096-4

Onivogui, G., Diaby, M., Chen, X., Zhang, H., Kargbo, M. R., & Song, Y. (2015). Antibacterial and antifungal activities of various solvent extracts from the leaves

and stem bark of Anisophyllea laurina R. Br ex Sabine used as traditional medicine in Guinea. *Journal of Ethnopharmacology*, *168*(1800), 287–290. https://doi.org/10.1016/j.jep.2015.03.055

Ozdal, T., Capanoglu, E., & Altay, F. (2013). A review on protein-phenolic interactions and associated changes. *Food Research International*, *51*(2), 954–970. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2013.02.009

Palacio, L., Cantero, J. J., Cusidó, R. M., & Goleniowski, M. E. (2012). Phenolic compound production in relation to differentiation in cell and tissue cultures of Larrea divaricata (Cav.). *Plant Science*, *193–194*, 1–7. https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2012.05.007

Pantidos, N., Boath, A., Lund, V., Conner, S., & McDougall, G. J. (2014). Phenolic-rich extracts from the edible seaweed, ascophyllum nodosum, inhibit α-amylase and α-glucosidase: Potential anti-hyperglycemic effects. *Journal of Functional Foods*, *10*, 201–209. https://doi.org/10.1016/j.jff.2014.06.018

Pastrana-Bonilla, E., Akoh, C. C., Sellappan, S., & Krewer, G. (2003). Phenolic content and antioxidant capacity of muscadine grapes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *51*(18), 5497–5503. https://doi.org/10.1021/jf030113c

Patel, B. A., & Wunderlich, R. E. (2010). Dynamic pressure patterns in the hands of olive baboons (papio anubis) during terrestrial locomotion: Implications for cercopithecoid primate hand morphology. *Anatomical Record*, *293*(4), 710–718. https://doi.org/10.1002/ar.21128

Peixoto, C. M., Dias, M. I., Alves, M. J., Calhelha, R. C., Barros, L., Pinho, S. P., & Ferreira, I. C. F. R. (2018). Grape pomace as a source of phenolic compounds and diverse bioactive properties. *Food Chemistry*, *253*(November 2017), 132–138. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.01.163

Perumalla, A. V. S., & Hettiarachchy, N. S. (2011). Green tea and grape seed extracts - Potential applications in food safety and quality. *Food Research International*, *44*(4), 827–839. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.01.022

Pezzuto, J. M. (2008). Grapes and human health: A perspective. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *56*(16), 6777–6784.

https://doi.org/10.1021/jf800898p

Pinelo, M., Rubilar, M., Jerez, M., Sineiro, J., & Núñez, M. J. (2005). 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*, *53*(6), 2111–2117. https://doi.org/10.1021/jf0488110

Poudel, P. R., Tamura, H., Kataoka, I., & Mochioka, R. (2008). Phenolic compounds and antioxidant activities of skins and seeds of five wild grapes and two hybrids native to Japan. *Journal of Food Composition and Analysis*, *21*(8), 622–625. https://doi.org/10.1016/j.jfca.2008.07.003

Pretorius, J. C., Magama, S., & Zietsman, P. C. (2003). Growth inhibition of plant pathogenic bacteria and fungi by extracts from selected South African plant species. *South African Journal of Botany*, *69*(2), 186–192. https://doi.org/10.1016/S0254-6299(15)30344-6

Procházková, D., Boušová, I., & Wilhelmová, N. (2011). Antioxidant and prooxidant properties of flavonoids. *Fitoterapia*, *82*(4), 513–523. https://doi.org/10.1016/j.fitote.2011.01.018

Pujol, D., Liu, C., Fiol, N., Olivella, M. À., Gominho, J., Villaescusa, I., & Pereira, H. (2013). Chemical characterization of different granulometric fractions of grape stalks waste. *Industrial Crops and Products*, *50*, 494–500. https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.07.051

Pulido, R., Bravo, L., & Saura-Calixto, F. (2000). Antioxidant activity of dietary polyphenols as determined by a modified ferric reducing/antioxidant power assay. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *48*(8), 3396–3402. https://doi.org/10.1021/jf9913458

Pyo, Y. H., Lee, T. C., Logendra, L., & Rosen, R. T. (2004). Antioxidant activity and phenolic compounds of Swiss chard (Beta vulgaris subspecies cycla) extracts. *Food Chemistry*, *85*(1), 19–26. https://doi.org/10.1016/S0308-8146(03)00294-2

Rahman, K. (2007). Studies on free radicals, antioxidants, and co-factors. *Clinical Interventions in Aging*, *2*(2), 219–236.

Re, R., PEllEGRINI, N., PROTEGGENTE, A., PANNALA, A., YANG, M., & EVAN, C. R. (1999).

Development and characterisation of carbon nanotube-reinforced polyurethane foams. *EMPA Activities*, *26*(2007), 51.

Renuka Devi, R., & Arumughan, C. (2007). Phytochemical characterization of defatted rice bran and optimization of a process for their extraction and enrichment. *Bioresource Technology*, *98*(16), 3037–3043. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2006.10.009

ROCK, C. L., JACOB, R. A., & BOWEN, P. E. (1996). Update on the Biological Characteristics of the Antioxidant Micronutrients. In *Journal of the American Dietetic Association* (Vol. 96, Issue 7, pp. 693–702). https://doi.org/10.1016/s0002-8223(96)00190-3

Saeidnia, S., & Abdollahi, M. (2013). Toxicological and pharmacological concerns on oxidative stress and related diseases. *Toxicology and Applied Pharmacology*, *273*(3), 442–455. https://doi.org/10.1016/j.taap.2013.09.031

Sahpazidou, D., Geromichalos, G. D., Stagos, D., Apostolou, A., Haroutounian, S. A., Tsatsakis, A. M., Tzanakakis, G. N., Hayes, A. W., & Kouretas, D. (2014). Anticarcinogenic activity of polyphenolic extracts from grape stems against breast, colon, renal and thyroid cancer cells. *Toxicology Letters*, *230*(2), 218–224. https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2014.01.042

Sailaja, A. K., Amareshwar, P., & Chakravarty, P. (2011). Different Techniques Used for the Preparation of Nanoparticles Using. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Science*, *3*(2), 45–50.

Samappito, S., & Butkhup, L. (2010). Analysis of anthocyanin, flavonoids, and phenolic acid contents of ten fruits and antioxidant activity. *International Journal of Fruit Science*, *10*(3), 264–280. https://doi.org/10.1080/15538362.2010.510421

Sati, P., Pandey, A., Rawat, S., & 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*(9), 804–809. https://doi.org/10.1016/j.jopr.2013.09.001

Selasi, G. N., Nicholas, A., Jeon, H., Lee, Y. C., Yoo, J. R., Heo, S. T., & Lee, J. C. (2015). Genetic basis of antimicrobial resistance and clonal dynamics of carbapenem-resistant Acinetobacter baumannii sequence type 191 in a Korean hospital.

Infection, Genetics and Evolution, *36*, 1–7. https://doi.org/10.1016/j.meegid.2015.09.001

Shahab, U., Moinuddin, Ahmad, S., Dixit, K., Abidi, S. M. A., Alam, K., & Ali, A. (2012). Acquired immunogenicity of human DNA damaged by N-hydroxy-N-acetyl-4-aminobiphenyl. *IUBMB Life*, *64*(4), 340–345. https://doi.org/10.1002/iub.1008

Shringarpure, R., Grune, T., & Davies, K. J. A. (2001). Protein oxidation and 20S proteasome-dependent proteolysis in mammalian cells. *Cellular and Molecular Life Sciences*, *58*(10), 1442–1450. https://doi.org/10.1007/PL00000787

Singal, P. K., Petkau, A., Gerrard, J. M., Hrushovetz, S., & Foerster, J. (1988). Free radicals in health and disease. *Molecular and Cellular Biochemistry*, *84*(2), 121–122. https://doi.org/10.1007/BF00421045

Singh, P., & Rajamani, V. (2001). REE geochemistry of recent clastic sediments from the Kaveri floodplains, Southern India: Implication to source area weathering and sedimentary processes. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, *65*(18), 3093–3108. https://doi.org/10.1016/S0016-7037(01)00636-6

Singletary, S. E., Allred, C., Ashley, P., Bassett, L. W., Berry, D., Bland, K. I., Borgen, P. I., Clark, G. M., Edge, S. B., Hayes, D. F., Hughes, L. L., Hutter, R. V. P., Morrow, M., Page, D. L., Recht, A., Theriault, R. L., Thor, A., Weaver, D. L., Wieand, H. S., & Greene, F. L. (2003). Staging system for breast cancer: Revisions for the 6th edition of the AJCC Cancer Staging Manual. *Surgical Clinics of North America*, *83*(4), 803–819. https://doi.org/10.1016/S0039-6109(03)00034-3

Small, P., & Kim, H. (2011). IMMUNOLOGY Allergic rhinitis. *Allergy, Asthma & Clinical Immunology*, *7*(Suppl 1), S3. http://www.aacijournal.com/content/7/S1/S3

Spatafora, C., Barbagallo, E., Amico, V., & Tringali, C. (2013). Grape stems from Sicilian Vitis vinifera cultivars as a source of polyphenol-enriched fractions with enhanced antioxidant activity. *LWT - Food Science and Technology*, *54*(2), 542–548. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2013.06.007

Steinmetz, K. A., & Potter, J. D. (1991). Vegetables, fruit, and cancer. II. Mechanisms. *Cancer Causes and Control*, *2*(6), 427–442. https://doi.org/10.1007/BF00054304

Stich, H. F., & Rosin, M. P. (1984). Micronuclei in exfoliated human cells as a tool for studies in cancer risk and cancer intervention. *Cancer Letters*, *22*(3), 241–253.

https://doi.org/10.1016/0304-3835(84)90159-9

Suárez-Ruiz, I., Flores, D., Mendonça Filho, J. G., & Hackley, P. C. (2012). Review and update of the applications of organic petrology: Part 1, geological applications. *International Journal of Coal Geology*, *99*, 54–112. https://doi.org/10.1016/j.coal.2012.02.004

Suhaj, M. (2006). Spice antioxidants isolation and their antiradical activity: a review. *Journal of Food Composition and Analysis*, *19*(6–7), 531–537. https://doi.org/10.1016/j.jfca.2004.11.005

Suraphad, P., Suklaew, P. O., Ngamukote, S., Adisakwattana, S., & Mäkynen, K. (2017). The effect of isomaltulose together with green tea on glycemic response and antioxidant capacity: A single-blind, crossover study in healthy subjects. *Nutrients*, *9*(5). https://doi.org/10.3390/nu9050464

Tabassum, A., Bristow, R. G., & Venkateswaran, V. (2010). Ingestion of selenium and other antioxidants during prostate cancer radiotherapy: A good thing? *Cancer Treatment Reviews*, *36*(3), 230–234. https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2009.12.008

Takci, Z., Simsek, G. G., Karabulut, H., Buran, Y., & Karadag, A. S. (2013). Effect of systemic isotretinoin therapy on mucociliary clearance and nasal surface mucosa in acne patients. *Journal of Drugs in Dermatology*, *12*(8).

Thaipong, K., Boonprakob, U., Crosby, K., Cisneros-Zevallos, L., & Hawkins Byrne, D. (2006). Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. *Journal of Food Composition and Analysis*, *19*(6–7), 669–675. https://doi.org/10.1016/j.jfca.2006.01.003

Thonpho, A., Wongnarat, C., Simcheur, W., & Srihanam, P. (2019). *Phytochemicals and antioxidant activity in seed and pulp of wild grape (Ampelocissus martinii Planch .) extracts*. *16*(March), 1–11.

Tsao, R., & Deng, Z. (2004). Separation procedures for naturally occurring antioxidant phytochemicals. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, *812*(1-2 SPEC. ISS.), 85–99. https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2004.09.028

Tsuchiya, H., Sato, M., Miyazaki, T., Fujiwara, S., Tanigaki, S., Ohyama, M., Tanaka, T., & Iinuma, M. (1996). Comparative study on the antibacterial activity of

phytochemical flavanones against methicillin-resistant Staphylococcus aureus. *Journal of Ethnopharmacology*, *50*(1), 27–34. https://doi.org/10.1016/0378-8741(96)85514-0

Turunen, M., Olsson, J., & Dallner, G. (2004). Metabolism and function of coenzyme Q. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, *1660*(1–2), 171–199. https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2003.11.012

Upadhya, V., Pai, S. R., & Hegde, H. V. (2015). Effect of method and time of extraction on total phenolic content in comparison with antioxidant activities in different parts of Achyranthes aspera. *Journal of King Saud University - Science*, *27*(3), 204–208. https://doi.org/10.1016/j.jksus.2015.04.004

Verrier, P. J., Bird, D., Burla, B., Dassa, E., Forestier, C., Geisler, M., Klein, M., Kolukisaoglu, Ü., Lee, Y., Martinoia, E., Murphy, A., Rea, P. A., Samuels, L., Schulz, B., Spalding, E. J., Yazaki, K., & Theodoulou, F. L. (2008). Plant ABC proteins - a unified nomenclature and updated inventory. *Trends in Plant Science*, *13*(4), 151–159. https://doi.org/10.1016/j.tplants.2008.02.001

Wen, J., Lu, L., & Boggan, J. K. (2013). Diversity and evolution of vitaceae in the philippines. *Philippine Journal of Science*, *142*(3), 223–244.

Wu, Y., Fan, R., & Yang, P. (2002). *Block-by-Block Growth of Single-Crystalline Si / SiGe Superlattice Nanowires*. *2*(2), 83–86.

Yang, J., Martinson, T. E., & Liu, R. H. (2009). Phytochemical profiles and antioxidant activities of wine grapes. *Food Chemistry*, *116*(1), 332–339. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.02.021

Yang, Z., Geng, Y., Xu, D., Kaplan, H. B., & Shi, W. (1998). A new set of chemotaxis homologues is essential for Myxococcus xanthus social motility. *Molecular Microbiology*, *30*(5), 1123–1130. https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1998.01160.x

Yanishlieva, N. V., & Marinova, E. M. (2001). Stabilisation of edible oils with natural antioxidants. *European Journal of Lipid Science and Technology*, *103*(11), 752–767. https://doi.org/10.1002/1438-9312(200111)103:11<752::aid-ejlt752>3.3.co;2-s

Ychas, G. E. O. H. N. E. N., & Aroutounian, S. E. A. H. (2009). *<Anastasiadi M 2009.pdf>*. 457–463.

Yilmaz, Y., & Toledo, R. T. (2004). Major Flavonoids in Grape Seeds and Skins:

Antioxidant Capacity of Catechin, Epicatechin, and Gallic Acid. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *52*(2), 255–260. https://doi.org/10.1021/jf030117h

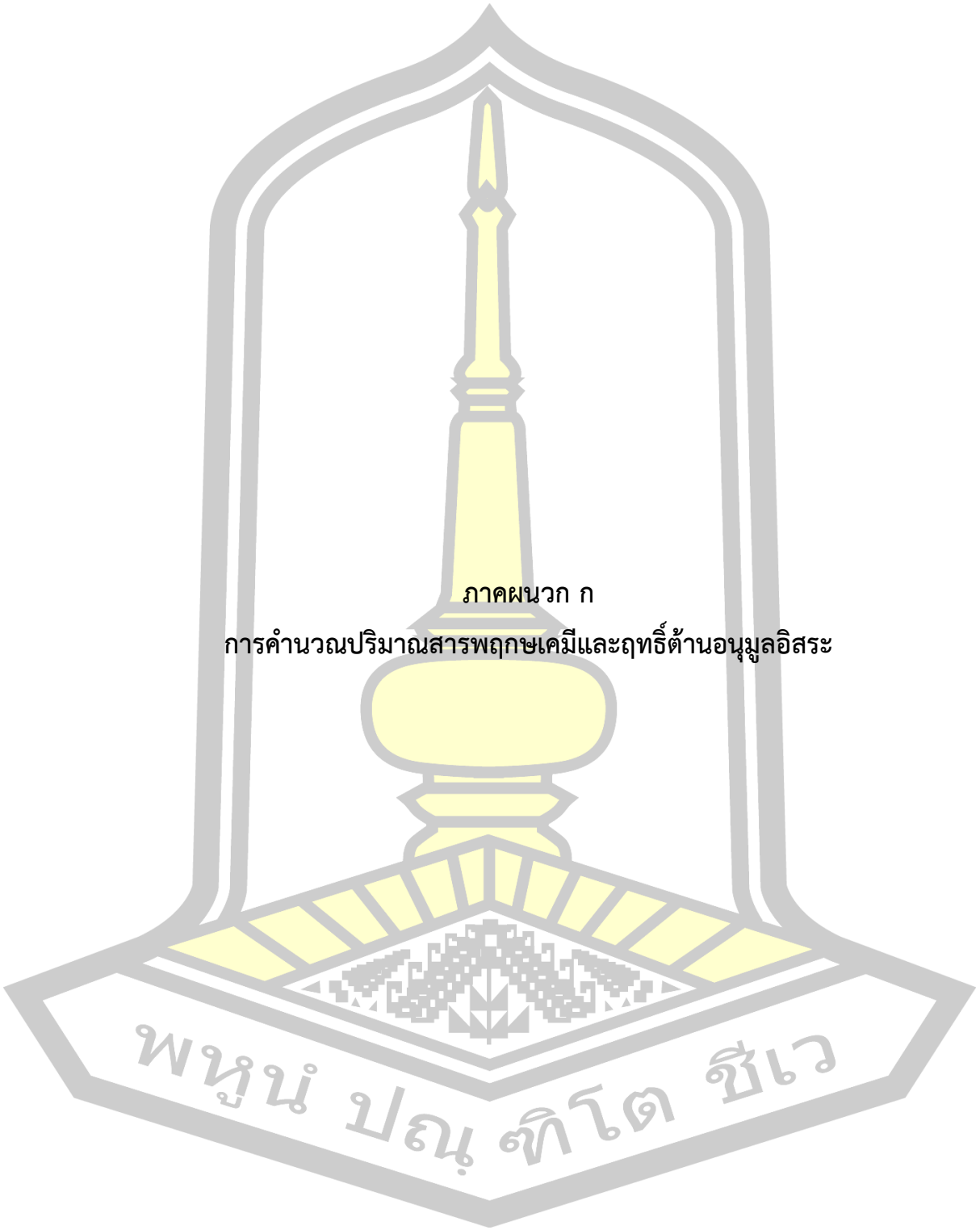
Zhang, H., Birch, J., Yang, H., Xie, C., Kong, L., Dias, G., & Bekhit, A. E. D. (2018). Effect of solvents on polyphenol recovery and antioxidant activity of isolates of Asparagus Officinalis roots from Chinese and New Zealand cultivars. *International Journal of Food Science and Technology*, *53*(10), 2369–2377. https://doi.org/10.1111/ijfs.13829

Zhen, Y. F., Zhang, J., Liu, X. Y., Fang, H., Tian, L. B., Zhou, D. H., Kosten, T. R., & Zhang, X. Y. (2013). Low BDNF is associated with cognitive deficits in patients with type 2 diabetes. *Psychopharmacology*, *227*(1), 93–100. https://doi.org/10.1007/s00213-012-2942-3

Zheng, M., & Storz, G. (2000). Redox sensing by prokaryotic transcription factors. *Biochemical Pharmacology*, *59*(1), 1–6. https://doi.org/10.1016/S0006-2952(99)00289-0

Zhishen, J., Mengcheng, T., & Jianming, W. (1999). The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. In *Food Chemistry* (Vol. 64, Issue 4, pp. 555–559). https://doi.org/10.1016/S0308-8146(98)00102-2

Zulueta, A., Esteve, M. J., & Frígola, A. (2009). ORAC and TEAC assays comparison to measure the antioxidant capacity of food products. *Food Chemistry*, *114*(1), 310–316. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.09.033



ภาคผนวก ก
การคำนวณปริมาณสารพฤกษเคมีและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

การคำนวณหาปริมาณฟีนอลิกรวมของสารสกัดจากกากไวน์องุ่นป่าอ่อน

นำสารสกัดหยาบจากกากไวน์องุ่นป่าอ่อนมาชั่ง 0.025 g ละลายด้วยเอทานอล 50 mL จะได้ความเข้มข้น 0.5 mg/mL

ดังนั้น **stock ความเข้มข้น 0.5 mg/mL ปริมาตร 50 mL**

ตัวอย่างที่มีความเข้มข้น 0.5 mg/mL เพื่อวิเคราะห์หา TPC และวัด Absorbance = 0.284

- **Dilution factor** = (0.5 mg/mL) /(0.5 mg/mL) = **1**
- ค่า absorbance นำไปแทนค่า y จากสมการของกราฟมาตรฐาน เพื่อหาค่า x

จากสมการ $y = 0.012x$

$X = 0.632/0.012$

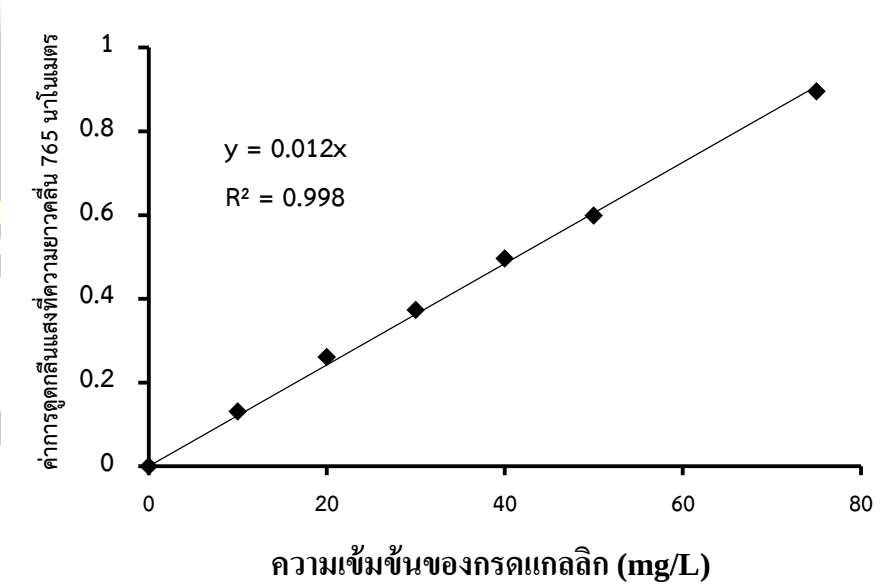
X = 52.667 (mg GAE/L)

นำไปแทนค่าจากสมการ :

$$\text{Content (mg GAE/g)} = \frac{X\,(\text{mg GAE/L}) \times \text{Dilution factor} \times [\text{total volume of extract (mL)}]}{\text{Sample weight(g)} \times 1000}$$

$$= \frac{52.667\ (\text{mg GAE/L})\text{X1X50(mL)}}{0.025\ (\text{g})\text{X1000}}$$

TPC ของตัวอย่าง = 105.334 mg GAE/g extract



รูปที่ 14 กราฟมาตรฐานของ Gallic acid สำหรับตรวจสอบปริมาณฟีนอลิกรวม

หมายเหตุ : การคำนวณหาปริมาณฟีนอลิกรวม (TPC) คอนเดนส์แทนนินรวม (CDT) โพรแอนโทรไซยานิดินส์ (TPAC) ซาโปรนินส์ (TSC) สามารถคำนวณได้เช่นเดียวกับวิธีข้างต้น เพียงแต่ใช้กราฟมาตรฐานของ Gallic acid quercetin catechin และ aesin ตามลำดับ เพื่อการเปรียบเทียบ

การคำนวณหาค่า IC_{50}

ตัวอย่าง การหาค่า IC_{50} ของตัวอย่างสารสกัดหยาบจากกากไวน์องุ่นป่าอ่อนที่วิเคราะห์ DPPH

1) นำตัวอย่างสารสกัดหยาบจากกากไวน์องุ่นป่าอ่อนที่ความเข้มข้นต่างๆ ไปวิเคราะห์ DPPH แล้ววัด absorbance (A1, A2, A3 คือ จำนวนซ้ำ) แล้วหาค่าเฉลี่ย ได้ดังตารางที่ 7

ตารางที่ 7 ตัวอย่างค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดจากกากไวน์องุ่นป่า

mg/ml	A1	A2	A3	average
0.01	1.824	1.854	1.886	1.847
0.20	1.208	1.252	1.260	1.232
0.30	0.792	0.788	0.794	0.791
0.40	0.518	0.474	0.476	0.496
0.50	0.000	0.000	0.000	0.000

2) คำนวณหา % inhibition จากสูตร

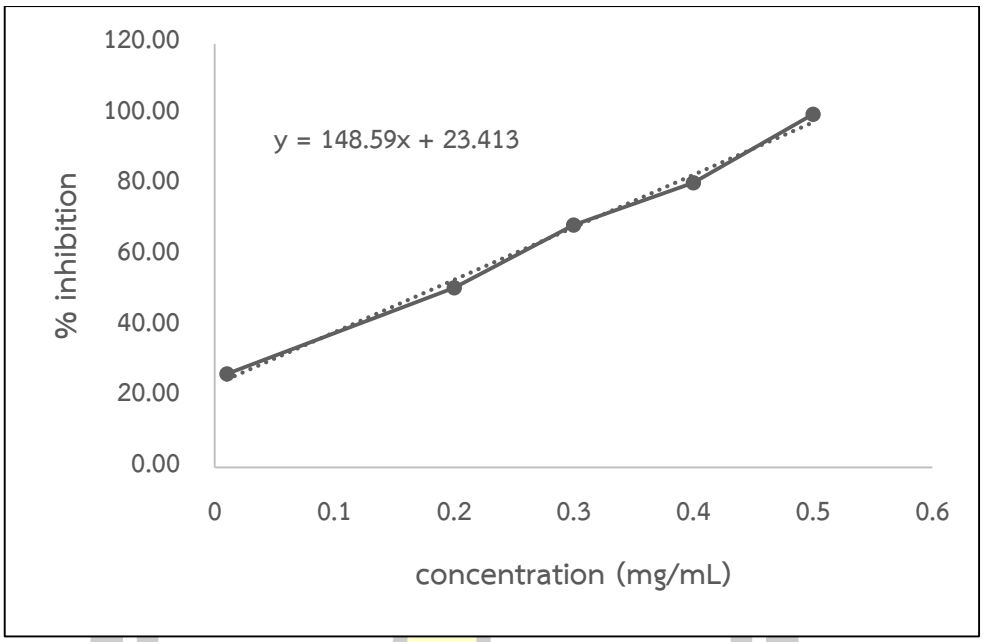
$$\text{DPPH (\%)} = [(A_{control} - A_{sample})/ A_{control}] \times 100$$

$A_{control}$ = หลอดที่ไม่ใส่ตัวอย่าง (ใช้เมทานอลแทน)

A_{sample} = หลอดที่มีตัวอย่างด้วย

ได้ค่าดังตาราง แล้วนำไป plot กราฟ

พหุน ปณฺฑิโต ชีเว



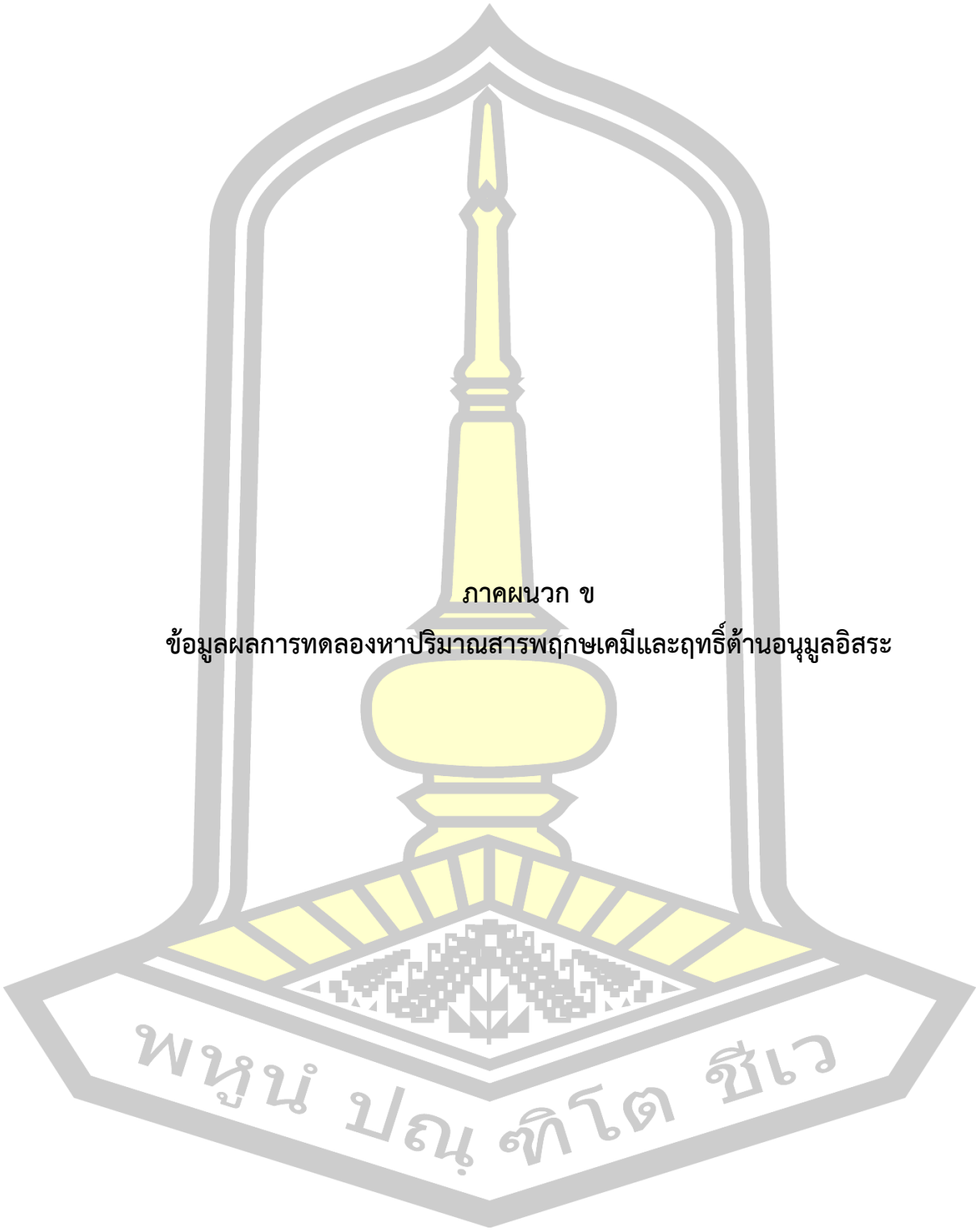
รูปที่ 15 กราฟมาตรฐานของ Gallic acid คำนวณ % inhibition

3) จะได้สมการ y = 148.59x + 23.413 แล้วแทนค่า y ด้วย 50 เพื่อหาค่า IC_{50}

50 = 148.59x + 23.413

X = 0.179 mg/mL หรือ 109 µg/mL = IC_{50}

พหุน ปณฺ ฑิโต ชีเว



ภาคผนวก ข

ข้อมูลผลการทดลองหาปริมาณสารพฤกษเคมีและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

ตารางที่ 8 การทดลองศึกษาน้ำหนักของสารสกัดหยาบ ด้วยวิธีการสกัด

ส่วนของกากไวน์องุ่นป่า	จำนวนครั้งที่ใช้ในการสกัด	น้ำหนักตัวอย่างแห้งที่ใช้ในการสกัด (g)	น้ำหนักแห้งของภาชนะที่บรรจุ (g)	น้ำหนักของสารสกัดหยาบแห้ง + ภาชนะที่บรรจุ (g)	น้ำหนักแห้งของสารสกัดหยาบ (g)	ร้อยละผลได้ของสารสกัดหยาบ (g)
อ่อน	ครั้งที่ 1	20.000	142.248	143.620	1.372	6.861
	ครั้งที่ 2	20.000	174.484	175.677	1.193	5.966
	ครั้งที่ 3	20.000	163.040	164.373	1.333	6.665
แก่	ครั้งที่ 1	20.000	137.027	139.872	2.844	14.222
	ครั้งที่ 2	20.000	142.250	145.028	2.778	13.890
	ครั้งที่ 3	20.000	142.239	144.868	2.629	13.144
สุก	ครั้งที่ 1	20.000	163.056	165.072	2.016	10.081
	ครั้งที่ 2	20.000	137.008	138.907	1.899	9.493
	ครั้งที่ 3	20.000	174.482	176.334	1.852	9.262

ตารางที่ 9 ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร เพื่อทดสอบหาปริมาณฟินอลิกรวม (TPC)

ส่วนของกากไวน์องุ่นป่า	จำนวนครั้งที่ใช้ในการวัด	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 nm	ปริมาณฟินอลิกทั้งหมด (mg GAE/mL)	ปริมาณฟินอลิกทั้งหมด (mg GAE/g crude extract)	ค่าเฉลี่ยปริมาณฟินอลิกทั้งหมด (mg GAE/g crude extract)	SD
อ่อน	ครั้งที่ 1	0.632	52.667	105.333	105.444	0.347
	ครั้งที่ 2	0.631	52.583	105.167		
	ครั้งที่ 3	0.635	52.917	105.833		
แก่	ครั้งที่ 1	0.281	23.417	46.833	46.500	0.882
	ครั้งที่ 2	0.283	23.583	47.167		
	ครั้งที่ 3	0.273	22.750	45.500		
สุก	ครั้งที่ 1	0.399	33.250	66.520	66.500	0.667
	ครั้งที่ 2	0.395	32.917	65.833		
	ครั้งที่ 3	0.403	33.583	67.167		

ตารางที่ 10 ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 510 นาโนเมตร เพื่อทดสอบหาปริมาณฟลาโวนอยด์รวม (TFC)

ส่วนของกากไวน์องุ่นป่า	จำนวนครั้งที่ใช้ในการวัด	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 510 nm	ปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด (mg QE/mL)	ปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด (mg QE/g crude extract)	ค่าเฉลี่ยปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด (mg QE/g crude extract)	SD
อ่อน	ครั้งที่ 1	0.079	11.969	23.939	22.323	1.40
	ครั้งที่ 2	0.071	10.757	21.515		
	ครั้งที่ 3	0.071	10.757	21.515		
แก่	ครั้งที่ 1	0.066	10.024	20.000	19.393	0.606
	ครั้งที่ 2	0.068	10.303	20.606		
	ครั้งที่ 3	0.064	9.696	19.393		
สุก	ครั้งที่ 1	0.059	8.939	17.878	17.878	0.350
	ครั้งที่ 2	0.061	9.242	18.484		
	ครั้งที่ 3	0.059	8.939	17.878		

ตารางที่ 11 ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 560 นาโนเมตร เพื่อทดสอบหาปริมาณซาโปนินรวม (TSC)

ส่วนของกากไวน์องุ่นป่า	จำนวนครั้งที่ใช้ในการวัด	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 560 nm	ปริมาณซาโปนินทั้งหมด (mg AES/mL)	ปริมาณซาโปนินทั้งหมด (mg AES/g crude extract)	ค่าเฉลี่ยปริมาณซาโปนินทั้งหมด (mg AES/g crude extract)	SD
อ่อน	ครั้งที่ 1	0.053	37.857	75.714	77.143	3.780
	ครั้งที่ 2	0.057	40.714	81.428		
	ครั้งที่ 3	0.052	37.142	74..285		
แก่	ครั้งที่ 1	0.037	26.428	52.857	51.048	1.574
	ครั้งที่ 2	0.035	25.143	50.286		
	ครั้งที่ 3	0.035	25.000	50.000		
สุก	ครั้งที่ 1	0.016	11.785	23.571	23.571	0.714
	ครั้งที่ 2	0.017	12.143	24.286		
	ครั้งที่ 3	0.016	11.428	22.857		

ตารางที่ 12 ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 500 นาโนเมตร เพื่อทดสอบหาปริมาณคอนเดนส์แทนนินรวม (CDT)

ส่วนของกากไวน์องุ่นป่า	จำนวนครั้งที่ใช้ในการวัด	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 500 nm	ปริมาณคอนเดนส์แทนนินทั้งหมด (mg CE/mL)	ปริมาณคอนเดนส์แทนนินทั้งหมด (mg CE/g crude extract)	ค่าเฉลี่ยปริมาณคอนเดนส์แทนนินทั้งหมด (mg CE/g crude extract)	SD
อ่อน	ครั้งที่ 1	0.260	173.333	346.667	334.222	12.673
	ครั้งที่ 2	0.251	167.333	334.667		
	ครั้งที่ 3	0.241	160.667	321.333		
แก่	ครั้งที่ 1	0.178	118.667	237.333	237.333	1.333
	ครั้งที่ 2	0.177	118.000	236.000		
	ครั้งที่ 3	0.179	119.333	238.667		
สุก	ครั้งที่ 1	0.169	112.667	225.333	224.889	3.355
	ครั้งที่ 2	0.171	114.000	228.000		
	ครั้งที่ 3	0.166	110.667	221.333		

ตารางที่ 13 ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 500 นาโนเมตร เพื่อทดสอบหาปริมาณโพรแอนโธไซยานิดินส์รวม (TPAC)

ส่วนของกากไวน์องุ่นป่า	จำนวนครั้งที่ใช้ในการวัด	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 500 nm	ปริมาณโพรแอนโธไซยานิดินส์ทั้งหมด (mg CE/mL)	ปริมาณโพรแอนโธไซยานิดินส์ทั้งหมด (mg CE/g crude extract)	ค่าเฉลี่ยโพรแอนโธไซยานิดินส์ทั้งหมด (mg CE/g crude extract)	SD
อ่อน	ครั้งที่ 1	0.090	60.000	120.000	120.800	1.622
	ครั้งที่ 2	0.089	59.867	119.733		
	ครั้งที่ 3	0.092	61.333	122.667		
แก่	ครั้งที่ 1	0.022	14.600	29.200	31.067	2.095
	ครั้งที่ 2	0.023	15.333	30.667		
	ครั้งที่ 3	0.025	16.667	33.333		
สุก	ครั้งที่ 1	0.044	29.333	58.667	56.889	1.540
	ครั้งที่ 2	0.042	28.000	56.000		
	ครั้งที่ 3	0.042	28.000	56.000		

ตารางที่ 14 ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 nm เพื่อทดสอบหาปริมาณร้อยละของความสามารถในการยับยั้งการเกิดอนุมูลอิสระ DPPH ของสารสกัดจากกากไวน์องุ่นป่า

ส่วนของกากไวน์องุ่นป่า	ความเข้มข้นของสารสกัด (mg/mL)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 nm ของสารสกัดในแต่ละครั้ง					ร้อยละของความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH				
		ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ค่าเฉลี่ย	SD	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ค่าเฉลี่ย	SD
อ่อน	0.01	1.824	1.854	1.886	1.847	1.855	27.705	26.516	25.248	26.490	1.229
	0.2	1.208	1.252	1.260	1.232	1.240	52.121	50.376	50.059	50.852	1.110
	0.3	0.792	0.788	0.794	0.792	0.791	68.609	68.797	68.529	68.635	0.121
	0.4	0.518	0.474	0.476	0.497	0.489	9.469	81.213	81.134	80.605	0.985
	0.5	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	100.00	0.000
แก่	0.01	1.131	1.166	1.201	1.166	0.035	19.730	17.246	14.762	17.246	2.484
	0.2	0.809	0.863	0.879	0.850	0.850	42.583	38.751	37.615	39.650	2.603
	0.3	0.599	0.695	0.668	0.654	0.654	57.488	50.674	52.590	53.584	3.514
	0.4	0.488	0.535	0.499	0.507	0.507	65.366	62.030	64.585	63.993	1.745
	0.5	0.318	0.337	0.379	0.345	0.345	77.431	76.082	73.101	75.538	2.215
สุก	0.01	1.067	1.051	1.092	1.066	0.022	25.053	25.408	22.498	24.320	1.588
	0.2	0.670	0.701	0.699	0.690	0.173	52.449	50.248	50.390	51.029	1.231
	0.3	0.496	0.461	0.503	0.487	0.023	64.798	67.282	64.301	65.460	1.597
	0.4	0.300	0.295	0.268	0.288	0.017	78.708	79.063	80.979	79.584	1.222
	0.5	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	100.00	100.00	100.00	100.00	0.000

ตารางที่ 15 ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 nm เพื่อทดสอบหาปริมาณร้อยละของความสามารถในการยับยั้งการเกิดอนุมูลอิสระ ABTH ของสารสกัดจากกากไวน์องุ่นป่า

ส่วนของกากไวน์องุ่นป่า	ความเข้มข้นของสารสกัด (mg/mL)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 nm ของสารสกัดในแต่ละครั้ง					ร้อยละของความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระ ABTH				
		ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ค่าเฉลี่ย	SD	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ค่าเฉลี่ย	SD
อ่อน	0.001	0.358	0.356	0.370	0.361	0.008	9.824	10.327	6.801	8.984	1.907
	0.005	0.288	0.298	0.285	0.290	0.007	27.456	24.937	28.212	26.868	1.715
	0.01	0.199	0.222	0.217	0.213	0.012	49.874	44.081	45.340	46.432	3.047
	0.02	0.067	0.067	0.069	0.068	0.001	83.123	83.123	82.620	82.955	0.291
แก่	0.001	0.303	0.305	0.307	0.305	0.002	15.126	14.566	14.006	14.566	0.560
	0.005	0.276	0.273	0.280	0.276	0.004	22.689	23.529	21.569	22.596	0.984
	0.01	0.235	0.243	0.243	0.240	0.005	34.174	31.933	31.933	32.680	1.294
	0.02	0.162	0.162	0.157	0.160	0.003	54.622	54.622	56.022	55.089	0.809
สุก	0.001	0.332	0.343	0.343	0.339	0.006	5.413	2.279	2.279	3.324	1.809
	0.005	0.283	0.309	0.298	0.297	0.013	19.373	11.966	15.100	15.480	3.718
	0.01	0.236	0.242	0.234	0.237	0.004	32.764	31.054	33.333	32.384	1.186
	0.02	0.137	0.135	0.138	0.137	0.137	60.969	61.538	60.684	61.064	0.435

ตารางที่ 16 ฤทธิ์การรีดิวซ์โลหะของสารสกัดตรวจสอบด้วยวิธี ferric reducing antioxidant power (FRAP) ของสารสกัดจากกากไวน์องุ่นป่า

ส่วนของกากไวน์องุ่นป่า	จำนวนครั้งในการวัด	ค่าการดูดกลืนแสง	ความเข้มข้นของสารสกัด (mg/L)			ความเข้มข้นของสารสกัด (mg/g)			ความเข้มข้นของสารสกัด (µM)		
			ความเข้มข้น	ค่าเฉลี่ย	SD	ความเข้มข้น	ค่าเฉลี่ย	SD	ความเข้มข้น	ค่าเฉลี่ย	SD
อ่อน	ครั้งที่ 1	0.900	0.121	0.120	0.001	0.605	0.602	0.003	2.176	2.165	0.010
	ครั้งที่ 2	0.893	0.120			0.600			2.159		
	ครั้งที่ 3	0.564	0.120			0.600			2.159		
แก่	ครั้งที่ 1	0.432	0.058	0.058	0.001	0.290	0.291	0.005	1.044	1.048	0.017
	ครั้งที่ 2	0.441	0.059			0.296			1.066		
	ครั้งที่ 3	0.427	0.057			0.287			1.032		
สุก	ครั้งที่ 1	0.538	0.072	0.075	0.002	0.362	0.375	0.012	1.301	1.349	0.043
	ครั้งที่ 2	0.564	0.076			0.379			1.364		
	ครั้งที่ 3	0.572	0.077			0.384			1.383		

ตารางที่ 17 ฤทธิ์การรีดิวซ์โลหะของสารสกัดตรวจสอบด้วยวิธี cupric reducing antioxidant capacity (CUPRAC) ของสารสกัดจากกากไวน์องุ่นป่า

ส่วนของกากไวน์องุ่นป่า	จำนวนครั้งในการวัด	ค่าการดูดกลืนแสง			ความเข้มข้นของสารสกัด (mg/L)			ความเข้มข้นของสารสกัด (mg/g)		
		ค่า	ค่าเฉลี่ย	SD	ความเข้มข้น	ค่าเฉลี่ย	SD	ความเข้มข้น	ค่าเฉลี่ย	SD
อ่อน	ครั้งที่ 1	0.636	0.632	0.021	35.333	35.093	1.158	353.333	350.926	11.578
	ครั้งที่ 2	0.609			33.833			338.333		
	ครั้งที่ 3	0.650			36.111			361.111		
แก่	ครั้งที่ 1	0.215	0.208	0.007	11.944	11.537	0.370	119.444	115.370	3.902
	ครั้งที่ 2	0.207			11.500			115.000		
	ครั้งที่ 3	0.201			11.167			111.667		
สุก	ครั้งที่ 1	0.403	0.397	0.007	22.389	22.074	0.370	223.889	220.741	3.699
	ครั้งที่ 2	0.399			22.167			221.667		
	ครั้งที่ 3	0.390			21.667			216.667		

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ	นายเกียรติศักดิ์ รัตนคุณศาสน์
วันเกิด	19 สิงหาคม พ.ศ.2528
สถานที่เกิด	จ.กรุงเทพมหานคร
สถานที่อยู่ปัจจุบัน	139/40 ถนนถีนานนท์ ต.ตลาด อ.เมืองมหาสารคาม จ.มหาสารคาม
ตำแหน่งหน้าที่การงาน	ข้าราชการครู
สถานที่ทำงานปัจจุบัน	โรงเรียนเหล่ายาววิทยาคาร อ.บรบือ จ.มหาสารคาม
ประวัติการศึกษา	พ.ศ. 2551 ปริญญาตรี วิทยาศาสตรบัณฑิต สาขา เคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม พ.ศ. 2564 ปริญญาโท วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขา เคมีศึกษา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม

พหูน ปณ ฑิโต ชีเว