

การต้านออกซิเดชันและการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรค ของสารสกัดจากเปลือกและเมล็ดองุ่น

ชลธิรา กาวี¹, จันทนา อารมย์ดี², อรวรรณ มณฑาทิรต์³, วัชร คุณกิตติ⁴

Received: 24 October 2014

Accepted: 7 January 2015

บทคัดย่อ

บทนำ: กากองุ่นคือเปลือกและเมล็ดองุ่นที่เป็นวัสดุเศษเหลือจากอุตสาหกรรมการผลิตไวน์หรือน้ำองุ่นซึ่งมีการศึกษาพบว่าสารสกัดจากเปลือกและเมล็ดองุ่นมีสารองค์ประกอบที่มีประสิทธิภาพในการต่อต้านอนุมูลอิสระสามารถยับยั้งเชื้อได้หลายชนิด ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาถึงความสามารถของสารสกัดจากเปลือกและเมล็ดองุ่นแดงด้วยตัวทำละลาย 3 ชนิด ได้แก่ น้ำปรับ pH 3 ethanol และ acetone ในการต่อต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), Lipid peroxidation, Ferric ion Reducing Power Assay (FRAP) และการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียก่อโรค 4 ชนิด คือ *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Bacillus subtilis*, and *Escherichia coli* **วิธีดำเนินการวิจัย:** ทำการสกัดสารจากเปลือกและเมล็ดองุ่นด้วยตัวทำละลาย 3 ชนิดแล้วนำไปวิเคราะห์หาปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH, Lipid peroxidation, และ FRAP แล้วทำการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตและฤทธิ์ฆ่าเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธี broth dilution และ agar diffusion assay **ผลการวิจัย:** สารสกัดจากเปลือกและเมล็ดองุ่นด้วยน้ำปรับ pH 3 ให้ปริมาณ yield สูงสุด เป็นร้อยละ 10.032 ± 0.104 และ 8.873 ± 0.144 โดยนำหนักต่อน้ำหนักตัวอย่างแห้ง การสกัดด้วย ethanol มีประสิทธิภาพในการสกัดสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดสูงสุด โดยพบในเมล็ดเท่ากับ 34.20 ± 0.001 และเปลือกเท่ากับ 32.16 ± 0.001 มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อตัวอย่างแห้ง 1 กรัม ตามลำดับ เมื่อทดสอบเปรียบเทียบประสิทธิภาพการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากเปลือกและเมล็ดองุ่นพบว่าสารสกัดจากเมล็ดด้วย ethanol ให้ประสิทธิภาพ ในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระมากกว่าเปลือก โดยค่า IC_{50} ของสารสกัดที่ได้มีความสัมพันธ์กับปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด และมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียจากมากไปน้อยดังนี้คือ *B. Subtilis*, *E. coli*, *S. aureus* และ *S. epidermidis* **สรุปผลการวิจัย:** สารสกัดจากเปลือกและเมล็ดองุ่นมีประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระและยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียก่อโรคบางชนิดได้

คำสำคัญ: เปลือกและเมล็ดองุ่น สารประกอบฟีนอลิก สารต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย

วารสารเภสัชศาสตร์อีสาน 2558; 11(1): 30-43

¹ นักศึกษาปริญญาโท สาขาวิชาเภสัชภัณฑ์ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น จังหวัดขอนแก่น 40002

² ประด; รองศาสตราจารย์ อาจารย์ประจำภาควิชาเภสัชเคมี คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น จังหวัดขอนแก่น 40002

³ ประด; อาจารย์ประจำภาควิชาเภสัชเคมี คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น จังหวัดขอนแก่น 40002

⁴ ประด; รองศาสตราจารย์, อาจารย์ประจำภาควิชาเทคโนโลยีเภสัชกรรม คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น จังหวัดขอนแก่น 40002

* **ติดต่อผู้พิมพ์:** วัชร คุณกิตติ อาจารย์ประจำภาควิชาเทคโนโลยีเภสัชกรรม คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น 40002
อีเมล: watku@kku.ac.th

Antioxidant and Antibacterial Activities of Grape Seed and Peel Extracts

Chontira Khawee¹, Chantana Aromdee², Orawan Monthakantirat³, Watcharee Khunkitti^{4*}

Abstract

Introduction: Grape pomace, which is a waste material in grapes, is a rich source of phenolic compounds, and has been reported to contain natural antioxidants and antimicrobial agents. The objectives of this research is to provide a quantitative analysis of the total phenolic contents from red grape peel and seed extracted using 3 different solvents: water at pH 3, ethanol and acetone. The extracts were tested for antioxidant activities and anti-bacterial action against *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Bacillus subtilis*, and *Escherichia coli*. **Methods:** A quantitative analysis of the total phenolic contents from grape seed and peel extracts with water at pH 3, ethanol and acetone were conducted. Their antioxidant activities, including free radical scavenging capacity using Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), Lipid peroxidation, Ferric ion Reducing Power Assay (FRAP) and antimicrobial activity were tested by using the broth dilution method and agar diffusion assay. **Results:** Seed and peel extracted with water at pH 3 gave the highest percent yield (%w/w, dry weight) of 10.032 ± 0.104 and 8.873 ± 0.144 , respectively. The ethanolic extracts of grape seeds and peels contained the highest of total phenolic compounds of 34.20 ± 0.001 and 32.16 ± 0.00 milligram gallic acid equivalents/gram dry weight sample, respectively. The ethanolic extract from grape seed showed the highest antioxidant activity. In addition, the IC_{50} correlated with the total phenolic compounds. The effectiveness of antibacterial activity in descending order was *B. subtilis*, *E. coli*, *S. aureus* and *S. epidermidis*. **Conclusion:** Grape seed and peel extracts appeared to have the potential antioxidant action and antibacterial activity against some bacterial pathogens.

Keywords: grape seed and peel, total phenolic compounds, free Radicals Scavenging capacity, antibacterial activity

IJPS 2015; 11(1): 30-43

¹ Master degree in Pharmaceutical program, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Khon Kaen University, Khon Kaen Province 40002

² Ph.D., Associate Professor, Lecturer, Department of Pharmaceutical Chemistry, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Khon Kaen University, Khon Kaen Province 40002

³ Ph.D., Lecturer, Department of Pharmaceutical Chemistry, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Khon Kaen University, Khon Kaen Province 40002

⁴ Ph.D., Associate Professor, Lecturer, Department of Pharmaceutical Technology, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Khon Kaen University, Khon Kaen Province 40002

* **Corresponding author:** Watcharee Khunkitti, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Khon Kaen University, Muang District, Khon Kaen Province, Thailand 40002 E-mail: watkhu@kku.ac.th

บทนำ

องุ่น (*Vitis vinifera*) ประกอบด้วยสารพฤกษเคมีหลากหลาย โดยเฉพาะสารกลุ่มฟีนอลิกที่มีคุณสมบัติในการต่อต้านอนุมูลอิสระ (antioxidants) ซึ่งมีประสิทธิภาพในการลดความเสี่ยงก่อโรคหลายชนิด อาทิเช่น โรคหลอดเลือดหัวใจ โรคมะเร็ง โรคเบาหวาน (Malovana et al., 2001; Kim et al., 2009) รวมทั้งมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย (Katalinic et al., 2010) นอกจากการรับประทานแบบผลสดแล้วยังมีการแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์อื่นๆได้แก่ ไวน์ น้ำผลไม้ แยม เป็นต้น ซึ่งในกระบวนการผลิตดังกล่าวจะเหลือกากซึ่งประกอบไปด้วยเปลือกและเมล็ดเหลือทิ้งที่สามารถนำไปแปรรูปทางอุตสาหกรรมได้ต่าง ๆ กัน จากข้อมูลการวิจัยพบว่าในเปลือกและเมล็ดขององุ่นมีสารต่อต้านอนุมูลอิสระที่มาจากธรรมชาติอันเป็นประโยชน์สำคัญคือสารกลุ่มฟีนอลิก (Guerrero et al., 2009) กระบวนการสกัดกากที่เหลือจากการแปรรูปน่าจะส่งผลต่อประสิทธิภาพทางชีววิทยา เนื่องจากสารสกัดแต่ละชนิดมีชีวต่างกันทำให้ได้สารประกอบที่น่าจะมีฤทธิ์ที่ต่างกัน นอกจากนี้ยังมีการศึกษาพบว่า สารสกัดองุ่นมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อก่อโรคหลายชนิด (Shoko et al., 1999; Jayaprakasha et al., 2002; Vatterm et al., 2004) งานวิจัยนี้จึงมุ่งศึกษาผลของตัวทำละลายต่างชนิดที่มีชีวต่างกันต่อปริมาณสารประกอบฟีนอลิกที่สกัดได้ การเปรียบเทียบความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระด้วย 3 วิธี ได้แก่ การทดสอบฤทธิ์กำจัดอนุมูลอิสระด้วยวิธี Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเกิด lipid peroxidation inhibition และความสามารถในการรีดิวซ์เฟอร์ริกของสารต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี Ferric ion Reducing Power Assay (FRAP) และประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรค 4 ชนิดได้แก่ *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*

วิธีดำเนินการวิจัย

1.1 เครื่องมือและสารเคมี

เครื่องมือ: Endecott, Rotary evaporator (EYELA): Tokyo Rikakikai, Japan Microplate reader: Biorad Microplate Reader, pH meter: Corning Ion Analyzer 250 Analytical Instrument Recycle, Inc. USA, UV spectrophotometer: Shimadzu.

สารเคมี: Butylated hydroxytoluene (BHT), Sodium lauryl sulphate (SLS) (บริษัทเอกตรงเคมีภัณฑ์), propylene glycol, Vitamin E acetate, Citric acid (บริษัทวันรุต หน้าเขียน), Ethanol, Folin-Ciocalteu phenol reagent (Merk Germany), Tryptic soy agar, Tryptic soy broth, (Becton, USA, Vitamin E, Glutathione, Thiobarbituric acid (TBA) (Sigma-Aldrich Germany), 2-diphenyl-1-1-picrylhydrazil (DPPH), Trolox (Fluka, Germany), 2,2 azobis (2-aminopropane) dihydrochloride (ABAP) (Aldrich, Germany)

1.2 การเตรียมตัวอย่าง

นำกากองุ่นแดง (แยกเปลือกและเมล็ด) อบจนแห้งในตู้อบที่ 55 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ให้มีความชื้นประมาณ 8-10 % บดให้ละเอียด ร่อนผ่านตะแกรงขนาด 60 mesh เก็บตัวอย่างที่ผ่านการร่อนไว้ที่อุณหภูมิ -20 °C เพื่อใช้วิเคราะห์เปลือกและเมล็ดองุ่น

1.3 การศึกษาประสิทธิภาพของวิธีการสกัดสารในเมล็ดและเปลือกองุ่นด้วยตัวทำละลาย 3 ชนิด

1.3.1 วิธีสกัดสารจากเมล็ดและกากองุ่น

นำตัวอย่างที่ผ่านการบดมาสกัดโดยชั่งตัวอย่าง 1 กรัม ต่อตัวทำละลาย 3mL ใช้ตัวทำละลาย 3 ชนิด ได้แก่ น้ำปรับ pH เท่ากับ 3 ด้วยสารละลายกรดซิตริก สารละลาย ethanol สารละลาย acetone (Rafaela et al., 2010) โดยสกัดที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 สัปดาห์ จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 1,200 rpm

เป็นเวลา 15 นาที แล้วนำมารองด้วยกระดาษกรอง Whatman No. 4 เก็บสารละลายที่กรองได้ไปทำการศึกษาต่อไป

1.3.2 วิเคราะห์ %yield ที่ได้จากการสกัด

นำส่วนใสที่ได้จากการกรองไประเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องสูญญากาศ แล้วนำมาวิเคราะห์ %yield ที่ได้จากการสกัด โดยทำการทดลองตัวอย่างละ 3 ซ้ำ นำค่าที่ได้ไปคำนวณตามสูตร

$$\% \text{ w/w Yield} = \frac{\text{น้ำหนักตัวอย่างหลังระเหยตัวทำละลายออก} \times 100}{\text{น้ำหนักตัวอย่างแห้งเริ่มต้น}}$$

1.4 การวิเคราะห์ปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมด (Total phenolic content)

ดูดสารสกัดองุ่นปริมาตร 50 μL เติมน้ำกลั่น 0.95 ml ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง vortex mixture จากนั้นดูดสารละลายที่เจือจางแล้วปริมาตร 1 ml ใส่ลงในหลอดทดลอง เติม 10% Folin Ciocalteu phenol reagent ปริมาตร 5 ml ผสมให้เข้ากันทันที จากนั้นเติมน้ำกลั่น 7.5% sodium carbonate ปริมาตร 4 ml ผสมให้เข้ากัน การเตรียม blank ใช้ น้ำกลั่นแทนตัวอย่างและเติมสารเคมีเช่นเดียวกันตามขั้นตอน ตั้งทิ้งไว้ให้เกิดปฏิกิริยาเป็นเวลา 2 ชั่วโมง 30 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 760 nm เทียบกับ blank (ทำการทดลอง 3 ซ้ำ แล้วหาค่าเฉลี่ย) นำค่าที่ได้มาคำนวณหาปริมาณสารฟีนอลิก โดยเทียบผลกับกราฟของสารละลายมาตรฐาน gallic acid (Kim and Lee, 2002)

1.5 การตรวจวัดคุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระ

โดยสารสกัดที่นำมาทดสอบเตรียมโดยซึ่งสารตัวอย่างหลังระเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องสูญญากาศแล้วจำนวน 1 g นำมาละลายด้วยตัวทำละลายที่ทดสอบได้แก่น้ำปรับ pH เท่ากับ 3 ด้วยสารละลายกรดซัลฟิวริก สารละลาย ethanol สารละลาย

acetone ปริมาตร 100 ml จะให้ความเข้มข้นเริ่มต้นที่ 1% w/v เพื่อทำการเจือจางต่อไป ส่วนการศึกษาเปอร์เซ็นต์การยับยั้งจะทำการเจือจางด้วยตัวทำละลายให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 1 mg/ml

1.5.1 การทดสอบคุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระ 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) Radical Scavenging Capacity Assay

เติมสารสกัดปริมาตร 50 μL ลงใน microliter plate 96 หลุม เจือจางความเข้มข้นของสารสกัดด้วยตัวทำละลายที่ใช้ โดยวิธี 2-fold dilution ที่ละ 50 μL เติมสารละลาย DPPH ความเข้มข้น 20 ppm (เตรียมโดยชั่ง 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl 0.0020 g ละลายใน methanol ปรับปริมาตรให้ครบ 100 ml) ปริมาตร 50 μL ลงทุกหลุม ผสมกันในแต่ละหลุมเป็นเวลา 5 นาที นำไปเก็บในที่มืด 25 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง Microplate reader ที่ความยาวคลื่น 517 nm เทียบกับค่าการดูดกลืนแสงของ blank และสารมาตรฐาน BHT, Vitamin E acetate และ Trolox[®] นำผลที่ได้มาคำนวณหาค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH (%Antioxidation Index, %AI) ของสารสกัดและสารมาตรฐานดังสมการที่ [1] ทำการหาค่า 50% inhibition concentration (IC_{50}) หมายถึงความเข้มข้นของสารต้านออกซิเดชันที่สามารถกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH[•] ได้ร้อยละ 50

$$\% \text{AI, \% Inhibition} = \frac{\text{Abs}_{\text{control}} - (\text{Abs}_{\text{sample}} - \text{Abs}_{\text{blank}})}{\text{Abs}_{\text{control}}} \times 100 \quad [1]$$

$\text{Abs}_{\text{control}}$ คือ ค่าการดูดกลืนแสงของหลอดควบคุม

$\text{Abs}_{\text{sample}}$ คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัด หรือ สารมาตรฐาน

$\text{Abs}_{\text{blank}}$ คือ ค่าการดูดกลืนแสงของ blank

1.5.2 การทดสอบการยับยั้งลิปิดเปอร์ออกซิเดชันของสารสกัดจากเปลือกและเมล็ดองุ่นโดยวิธี Ferric Thiocyanate Colorimetric (FTC)

เติม 5% w/v linoleic acid ใน 80% ethanol 50 μ L เติมสารสกัดเปลือกและเมล็ดองุ่นที่ความเข้มข้น 10, 20, 30, 40, 50 μ L/mL เติมสารละลาย ABAP (2,2 azobis (2-aminopropane) dihydrochloride) 0.07 M 10 μ L ตั้งไว้ให้เกิดปฏิกิริยา 10 นาที เติม 20% acetic acid 150 μ L ผสมให้เข้ากัน ตั้งไว้ให้เกิดปฏิกิริยา 5 นาที ทำการ incubate ที่อุณหภูมิ 70 °C นาน 1 ชั่วโมง แล้วนำสารสกัดมาทำการวิเคราะห์โดยเติม 75% ethanol ใน microplate 96 หลุม ปริมาตร 160 μ L เติมสารสกัดทดสอบ ปริมาตร 20 μ L, 30% ammonium thiocyanate ปริมาตร 10 μ L และ 10 mM ferrous chloride ปริมาตร 10 μ L ลงใน microplate 96 หลุม ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 500 nm ด้วยเครื่อง microplate reader เปรียบเทียบกับ การดูดกลืนแสงของ blank และสารมาตรฐาน BHT, Vitamin E acetate และ Trolox[®] นำผลที่ได้มาคำนวณหาค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งของสารสกัด (%Antioxidation Index, %AI) ของสารสกัดและสารมาตรฐาน จากสมการที่ [1] นำผลที่ได้มาคำนวณหาค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งของสารสกัด (%Antioxidation Index, %AI) และสารมาตรฐาน และหาค่าความเข้มข้นของตัวอย่างที่สามารถยับยั้งการเกิดไลปิดเปอร์ออกซิเดชันที่ร้อยละ 50 (IC₅₀)

1.5.3 การทดสอบความสามารถในการรีดิวซ์เฟอร์ริกของสารต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี Ferric ion Reducing Power Assay (FRAP)

เติม phosphate buffer pH 6.6 ปริมาตร 250 μ L ลงในหลอดทดลอง จากนั้นเติมสารสกัดเปลือกและเมล็ดองุ่นปริมาตร 250 μ L แล้วตามด้วย 1% w/v potassiumhexacyanoferrate ปริมาตร 250 μ L ผสมกันในแต่ละหลุม นำไป incubate ที่อุณหภูมิ 50 °C เป็นเวลา 20 นาที เติม 10% trichloroacetic acid ปริมาตร 250 μ L ที่อุณหภูมิห้อง ผสมกันในแต่ละหลุม ตั้งทิ้งไว้ 10 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่

800 rpm 10 นาที ปิเปิดส่วนใสปริมาตร 30 μ L น้ำกลั่น 160 μ L และ 0.1% ferric chloride 10 μ L ลงใน microliter plate 96 หลุมผสมกันในแต่ละหลุม ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 593 nm ด้วยเครื่อง microplate reader คำนวณค่า FRAP value เทียบกับสารมาตรฐาน นำผลที่ได้มาคำนวณหาค่า Reducing power ของสารสกัด (%Antioxidation Index, %AI) และสารมาตรฐาน และหาค่าความเข้มข้นของตัวอย่างที่สามารถรีดิวซ์เฟอร์ริกได้ที่ร้อยละ 50 (IC₅₀)

1.6 ประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดจากเปลือกและเมล็ดองุ่น

1.6.1 การหาค่าการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียโดยวิธี Agar Diffusion Assay

นำอาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptic soy agar ปริมาตร 20 ml เทลงใน plate รอจนอาหารแข็งตัว จากนั้นนำเชื้อแบคทีเรียแต่ละชนิดที่เตรียมไว้ปริมาตร 200 μ L ใส่ลงบนอาหารวันแข็งและทำการเกลี่ยเชื้อให้กระจายทั่วผิวน้ำอาหารด้วย sterile spreader เาะหลุมให้มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 6 mm แล้วนำสารสกัดจากเปลือกและเมล็ดองุ่นที่สกัดด้วยตัวทำละลายทั้ง 3 ชนิด ได้แก่ น้ำ pH 3, ethanol และ acetone โดยใช้ 0.25% selenium sulfide และ 0.2% ketoconazole เป็นตัวควบคุมบวก ใช้ตัวทำละลายแต่ละชนิดที่ใช้สกัดเป็นตัวควบคุมลบ หยดลงในหลุม ปริมาตร หลุมละ 45 μ L จากนั้นบ่มเพาะเชื้อโดยอุณหภูมิที่ใช้ในการ incubate 37°C, 24 ชั่วโมงแล้วอ่านผลโดยวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงกลมที่ไม่มีเชื้อขึ้น (inhibition zone) หากพบว่ามี inhibition zone เกิดขึ้นแสดงว่าสารดังกล่าวมีฤทธิ์ต่อการยับยั้งเชื้อ (Torrunguang et al., 2007) ทั้ง 4 ชนิดคือ *E. coli* DMST 6722, *S. epidermidis* DMST 12853, *B. subtilis* DMST 15896, *S. aureus* DMST 2658 เทียบกับ 0.25% selenium sulfide และ 0.2% ketoconazole

1.6.2 การหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ใช้ยับยั้งและฆ่าเชื้อแบคทีเรีย (Minimum Inhibitory Concentration, MIC และ Minimum Bactericidal Concentration, MBC)

ปิเปตสารสกัดจากเปลือกและเมล็ดองุ่นโดยให้ความเข้มข้นเริ่มต้น 1 mg/mL ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptic soy broth 50 μ L แล้วเจือจางลดความเข้มข้นลงทีละครึ่งแบบ 2-fold serial dilution เติมเชื้อแบคทีเรียที่เตรียมไว้แล้ว 4 ชนิด ปริมาณ 50 μ L (มีปริมาณเชื้อ 10^6 CFU/ml) ลงใน microtiter 96-well plate เขย่าให้ผสมกันดีแล้วเลี้ยงต่อในตู้บเลี้ยงเชื้อที่ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมงโดยใช้ 0.25% selenium sulfide และ 0.2% ketoconazole เป็นกลุ่มควบคุมที่จะมีการตอบสนอง (positive control) อ่านผลจากการเจริญเติบโตของเชื้อ หากสารสกัดจากเปลือกและเมล็ดองุ่นสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตได้ก็จะแสดงผลคือไม่มีตะกอนของเชื้อให้เห็นความเข้มข้นของสารสกัดจากเปลือกและเมล็ดองุ่นน้อยที่สุดที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียคือค่า MIC (Torrunguang et al., 2007) หาค่า MBC โดยทำการเพาะเชื้อจากหลุม MIC เป็นต้นไป ลงบน Tryptic soy agar แล้วนำไปเข้าตู้บเลี้ยงเชื้อที่ 37°C, 24 ชั่วโมงอ่านค่า MIC จากความเข้มข้นน้อยที่สุดของสารสกัด

จากเปลือกและเมล็ดองุ่นที่ไม่มีโคโลนีของเชื้อเจริญ (Torrunguang et al., 2007; Microbial population count, 2010)

1.7 การวิเคราะห์ทางสถิติ

วางแผนการทดลองแบบสุ่ม (Completely Random Design; CRD) ตรวจสอบวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) และเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างชุดทดลอง โดยวิธี Tukey's test โดยใช้โปรแกรมสถิติสำเร็จรูป SPSS version 17 ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

ผลการวิจัย

การศึกษาปริมาณของสารฟีนอลิก และประสิทธิภาพการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH, Lipid peroxidation inhibition, FRAP จากเปลือกและเมล็ดองุ่นที่สกัดด้วยตัวทำละลาย 3 ชนิด ได้แก่ น้ำ ปรับ pH 3 ethanol และ acetone โดยสกัดที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 สัปดาห์พบว่าชนิดของตัวทำละลายส่งผลต่อค่า %yield โดยการสกัดเปลือกและเมล็ดองุ่นด้วยน้ำ ให้ yield สูงที่สุดเป็น 10.032 ± 0.104 และ 8.873 ± 0.144 %w/w ตามลำดับ การสกัดเมล็ดองุ่นด้วย acetone ให้ yield สูงที่สุดเท่ากับ 7.514 ± 0.706 %w/w (รายละเอียดดังตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 Yield (% w/w) ที่ได้จากเปลือกและเมล็ดองุ่นด้วยตัวทำละลายชนิดต่างๆ

part	solvents	dielectric constant (units) (ϵ)	yield (%w/w) $\pm$ SD
เปลือก	water pH 3	78.5	10.032 ± 0.104^a
	ethanol	24.3	7.483 ± 0.041
	acetone	20.7	6.782 ± 0.006
เมล็ด	water pH 3	78.5	8.873 ± 0.144^a
	ethanol	24.3	7.388 ± 0.056
	acetone	20.7	7.514 ± 0.706

ϵ = เป็นค่าคงที่ของ dielectric constant

*: $p < 0.05$: Tukey HSD among solvent

a: $p < 0.05$: Student T test; compound between peel and seed

จากการวิเคราะห์ปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมดพบว่าสารสกัดเปลือกและเมล็ดองุ่นด้วยตัวทำละลายต่างชนิดกันส่งผลให้ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดแตกต่างกัน โดยเทียบกับกราฟมาตรฐาน กรดแกลลิก ผลการสกัดเปลือกและเมล็ดองุ่นด้วย ethanol ให้ปริมาณฟีนอลิกสูงที่สุด โดยเท่ากับ 34.165 ± 1.037 และ

34.195 ± 0.903 มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อตัวอย่างแห้ง 1 กรัม ซึ่งสูงกว่าการสกัดด้วยน้ำ pH 3 และ acetone โดยสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดจากเมล็ดที่สกัดด้วย ethanol และ acetone ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (รายละเอียดดังตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดเปลือกและเมล็ดองุ่นด้วยตัวทำละลายชนิดต่างๆ

Part	Solvents	Total phenolic compounds (GAE/g DW) $\pm$ SD
เปลือก	water pH 3	$19.517 \pm 0.913^{*ac}$
	ethanol	$32.165 \pm 1.037^{*ab}$
	acetone	$24.377 \pm 0.891^{*bc}$
เมล็ด	water pH 3	$23.539 \pm 0.925^{*ab}$
	ethanol	$34.195 \pm 0.903^{*b}$
	acetone	$32.216 \pm 0.881^{*a}$

GAE/g DW= gallic acid equivalents/gram dry weight

*: $p < 0.05$; Tukey HSD among the solvents

a, b, c: $p < 0.05$; Student T test ;compound between peel and seed

หมายเหตุ อักษรที่แตกต่างกันหมายถึงคู่ตัวอย่างที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

การตรวจวัดคุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH พบว่า การสกัดเปลือกด้วย acetone ให้ประสิทธิภาพในการต่อต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุด ส่วนสารสกัดจากเมล็ดด้วย ethanol ให้ประสิทธิภาพในการต่อต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุด วิธีการยับยั้งลิปิดเปอร์ออกซิเดชันพบว่า สกัดเปลือกและเมล็ดด้วย

ethanol ให้ประสิทธิภาพในการต้านออกซิเดชันสูงที่สุดและในเมล็ดมีประสิทธิภาพแตกต่างจากเปลือกอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ส่วนการวิเคราะห์ความสามารถในการรีดิวซ์เฟอร์ริกของด้วยวิธี FRAP พบว่าสารสกัดจากเมล็ดและเปลือกด้วย ethanol มีประสิทธิภาพดีที่สุด (รายละเอียดดังตารางที่ 3)

ตารางที่ 3 การเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการต้านออกซิเดชันของสารสกัดองุ่นที่ความเข้มข้น 1 mg/ml ด้วยวิธี DPPH, LPI และ FRAP

		DPPH (%AI)	LPI (%Inhibition)	FRAP (%Reducing power)
เปลือก	water pH 3	$64.746 \pm 1.031^{*ac}$	$40.559 \pm 0.302^{*ac}$	$36.046 \pm 0.323^{*ac}$
	Ethanol	$91.705 \pm 1.002^{*ab}$	$91.264 \pm 1.662^{*ab}$	$54.511 \pm 0.169^{*ab}$
	acetone	$92.396 \pm 0.921^{*bc}$	$42.747 \pm 0.753^{*bc}$	$53.001 \pm 0.222^{*bc}$
เมล็ด	water pH 3	$65.437 \pm 1.106^{*ac}$	$38.838 \pm 0.323^{*ac}$	$35.524 \pm 0.214^{*ac}$
	Ethanol	$94.847 \pm 1.213^{*ab}$	$98.531 \pm 0.575^{*ab}$	$55.517 \pm 0.433^{*ab}$
	acetone	$90.322 \pm 1.091^{*bc}$	$88.350 \pm 0.048^{*bc}$	$54.904 \pm 0.370^{*bc}$

ตารางที่ 3 การเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการต้านออกซิเดชันของสารสกัดองุ่นที่ความเข้มข้น 1mg/ml ด้วยวิธี DPPH, LPI และ FRAP (ต่อ)

		DPPH (%AI)	LPI (%Inhibition)	FRAP (%Reducing power)
VitaminE acetate	Ethanol	96.543 ± 0.903 ^{***}	90.886 ± 0.006 ^{***}	-
BHT	Ethanol	98.617 ± 0.955 ^{***}	90.143 ± 0.030 ^{***}	31.338 ± 1.304 ^{***}
Trolox [®]	Ethanol	97.780 ± 0.892 ^{***}	90.679 ± 0.004 ^{***}	-
Glutathione	Water	-	90.572 ± 0.002 ^{***}	33.279 ± 3.921 ^{***}
Vitamin C	Water	-	-	30.128 ± 2.014 ^{***}

*: $p \leq 0.05$; Tukey HSD one way ANOVA

a, b, c: $p \leq 0.05$: Student T test ;compound between peel and seed

ค่าความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระที่ร้อยละ 50 (IC_{50}) พบว่าสารสกัดจากเปลือกด้วย ethanol มีประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH ดีที่สุดแต่สารสกัดเมล็ดด้วย acetone จะสามารถกำจัดอนุมูลอิสระได้ดีที่สุดในการวิเคราะห์ความสามารถในการยับยั้งการเกิดลิปิดเปอร์ออกซิเดชัน และการหาค่าความสามารถในการยับยั้งที่ร้อยละ 50

(IC_{50}) พบว่าสารสกัดจากเมล็ดและเปลือกด้วย ethanol มีประสิทธิภาพ ดีที่สุดและสารสกัดจากเมล็ดด้วย ethanol ให้ประสิทธิภาพแตกต่างจากเปลือกอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) และการหาค่าความสามารถในการวัดฟอสโฟริลด้วยวิธี FRAP สารสกัดจากเมล็ดและเปลือกด้วย ethanol ให้ประสิทธิภาพดีที่สุด (รายละเอียดดังตารางที่ 4)

ตารางที่ 4 การเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการต้านออกซิเดชันที่ IC_{50} ด้วยวิธี DPPH, LPI, และ FRAP

Part	Solvent	$IC_{50} \pm SD$		
		DPPH (mg/ml)	LPI (mg/ml)	FRAP (mg/ml)
เปลือก	water pH 3	1.004 ± 0.041 ^{*ac}	1.603 ± 0.031 ^{*ac}	1.803 ± 0.048 ^{*ac}
	Ethanol	0.510 ± 0.101 ^{*ab}	0.657 ± 0.073 ^{*ab}	0.858 ± 0.003 ^{*ab}
	acetone	0.600 ± 0.085 ^{*bc}	1.297 ± 0.054 ^{*bc}	1.046 ± 0.003 ^{*bc}
เมล็ด	water pH 3	0.792 ± 0.056 ^{*ac}	1.335 ± 0.012 ^{*ac}	1.459 ± 0.006 ^{*ac}
	Ethanol	0.973 ± 0.013 ^{*ab}	0.516 ± 0.056 ^{*ab}	0.832 ± 0.032 ^{*ab}
	acetone	0.934 ± 0.001 ^{*bc}	0.559 ± 0.006 ^{*bc}	0.899 ± 0.006 ^{*bc}
Vitamin acetate	Ethanol	0.518 ± 0.103 ^{***}	0.550 ± 0.006 ^{***}	ND
BHT	Ethanol	0.507 ± 0.101 ^{***}	0.555 ± 0.030 ^{***}	1.593 ± 0.014 ^{***}
Trolox [®]	Ethanol	0.511 ± 0.052 ^{***}	0.551 ± 0.004 ^{***}	-
Glutathione	Water	-	0.552 ± 0.002 ^{***}	1.502 ± 0.021 ^{***}
Vitamin C	Water	-	-	1.659 ± 0.014 ^{***}

ND: Not Done

*: $p \leq 0.05$; Tukey HSD one way ANOVA

a, b, c: $p \leq 0.05$: Student T test ;compound between peel and seed

การหาค่าการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียโดยวิธี Agar diffusion technique พบว่า สารสกัดจากเมล็ดด้วย ethanol ให้ประสิทธิภาพดีที่สุดเรียงลำดับจากมากไปน้อยดังนี้ *B. Subtilis*, *E. coli*, *S.aureus* และ *S. epidermidis* มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของ inhibition zone เท่ากับ 20.65 ± 0.22 , 19.61 ± 0.02 , 18.64 ± 0.20 และ 17.96 ± 0.12

มิลลิเมตร ตามลำดับ (รายละเอียดดังตารางที่ 5) นอกจากนี้การหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ใช้ยับยั้งและฆ่าเชื้อแบคทีเรีย (MIC, MBC) ของสารสกัดจากเปลือกและเมล็ดองุ่นพบว่าการสกัดเมล็ดด้วย ethanol ให้ผลในการยับยั้งและฆ่าเชื้อ *S. epidermidis* ดีที่สุด โดยมีค่า MIC เท่ากับ 0.25 mg/ml และ MBC เท่ากับ 0.5 mg/ml (รายละเอียดดังตารางที่ 6)

ตารางที่ 5 การทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของสารสกัด 3% w/w จากเปลือกและเมล็ดองุ่นโดยวิธี Agar Diffusion Assay

part	solvents	Inhibition zone (mm) $\pm$ SD			
		<i>E. coli</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>B. Subtilis</i>	<i>S. aureus</i>
Peel	water pH 3	17.88 $\pm$ 0.05	18.01 $\pm$ 0.35	17.24 $\pm$ 0.02	18.12 $\pm$ 0.12
	ethanol*	18.51 $\pm$ 0.01	18.59 $\pm$ 0.01	18.96 $\pm$ 0.22	19.46 $\pm$ 0.23
	acetone	14.60 $\pm$ 0.00	16.26 $\pm$ 0.14	18.19 $\pm$ 0.06	16.68 $\pm$ 0.06
Seed	water pH 3	17.75 $\pm$ 0.01	16.14 $\pm$ 0.00	17.75 $\pm$ 0.37	17.86 $\pm$ 0.13
	ethanol*	19.61 $\pm$ 0.02	17.96 $\pm$ 0.12	20.65 $\pm$ 0.22	18.64 $\pm$ 0.20
	acetone	15.60 $\pm$ 0.01	16.68 $\pm$ 0.01	16.55 $\pm$ 0.01	16.48 $\pm$ 0.08
ketoconazole 0.2%		18.03 $\pm$ 0.02	17.06 $\pm$ 0.20	20.36 $\pm$ 0.12	19.06 $\pm$ 0.02
Selenium sulfide 0.25%		19.04 $\pm$ 0.02	19.44 $\pm$ 0.11	21.02 $\pm$ 0.14	22.16 $\pm$ 0.21

*: $p < 0.05$; Tukey HSD one way ANOVA

ตารางที่ 6 แสดงค่า MIC และ MBC ของสารสกัดจากเปลือกและเมล็ดองุ่น

part	solvents	ค่า MIC และ MBC (mg/ml)							
		<i>E. coli</i>		<i>S. epidermidis</i>		<i>B. subtilis</i>		<i>S. aureus</i>	
		MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
Peel	water pH 3	1	1	0.5	1	0.75	1	0.5	1
	ethanol*	0.5	1	0.25	0.5	0.25	1	0.25	0.75
	acetone	0.5	1	0.25	1	0.5	0.75	0.5	1
Seed	water pH 3	0.75	1	0.5	1	0.5	0.5	0.5	1
	ethanol*	0.352	0.75	0.25	0.5	0.25	0.75	0.25	0.75
	acetone	0.352	0.75	0.25	1	0.5	0.75	0.25	1
ketoconazole 0.2%*		0.5	0.5	0.25	0.5	0.25	0.5	0.25	0.5
Selenium sulfide 0.25%*		0.325	0.5	0.25	0.325	0.125	0.125	0.25	0.5

MIC = Minimum Inhibitory Concentrations, MBC = Minimum Bactericidal Concentrations

*: $p < 0.05$; Tukey HSD one way ANOVA

อภิปรายและสรุปผลการวิจัย

การศึกษาประสิทธิภาพของวิธีการสกัดสารในเมล็ดและเปลือกองุ่นด้วยตัวทำละลาย 3 ชนิด คือ น้ำปรับ pH 3, ethanol และ acetone วิเคราะห์ % yield ที่ได้จากการสกัด ผลการศึกษาพบว่าชนิดของตัวทำละลายส่งผลต่อค่า % yield ที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) การสกัดเปลือกและเมล็ดองุ่นด้วยน้ำปรับ pH 3 ให้ % yield สูงกว่าการสกัดด้วย ethanol และ acetone ส่วนการสกัดเปลือกองุ่นด้วยน้ำปรับ pH 3 ให้ % yield สูงกว่าเมล็ด คือ เท่ากับ 10.032 ± 0.104 ในเมล็ดเท่ากับ 8.873 ± 0.144 ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Passos et al. (2009) เนื่องจากในเปลือกองุ่นมีสารที่เป็น hydrophilic เช่น น้ำตาล โปรตีน และสารประกอบฟีนอลิกที่มีปริมาณสูงกว่าสารที่เป็นกลุ่ม hydrophobic ทำให้การใช้น้ำและ ethanol สกัดจึงได้ % yield ที่สูงกว่าการสกัดด้วย acetone ส่วนในเมล็ดองุ่นนั้นมีสารที่เป็นกลุ่ม hydrophobic เช่น oil ต่างๆ ในปริมาณที่สูงกว่าเปลือกจึงทำให้การสกัดด้วย acetone ได้ % yield สูงกว่าในเปลือก (Poudle et al., 2008)

การทดสอบหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดจากสารสกัดเปลือกและเมล็ดองุ่นพบว่า ethanol สามารถสกัดสารที่มีปริมาณฟีนอลิกสูงสุด รองลงมาคือ acetone และน้ำปรับ pH 3 ($p < 0.05$) ผลการทดลองที่ได้มีความสอดคล้องกับ Yilmaz and Toledo (2006) จากการสกัดสารประกอบฟีนอลิกและศึกษาคุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระจากเปลือกและเมล็ดองุ่นทั้งชนิดสีแดงและเขียว โดยใช้ตัวทำละลายคือ ethanol, methanol, acetone และน้ำ พบว่าการสกัดองุ่นด้วยตัวทำละลาย ethanol ให้ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกและคุณสมบัติการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระดีที่สุดสอดคล้องกับงานวิจัยของ Zhao and Hall (2008) ที่พบว่า ethanol มีประสิทธิภาพในการสกัดสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดจากลูกเกดสูงที่สุดเมื่อเทียบกับการใช้น้ำ อีกทั้งงานวิจัยของ Bao et al. (2005) ที่พบ

ว่าการสกัดสารฟีนอลิกจากเปลือกและเมล็ดองุ่นด้วย ethanol ให้ปริมาณสารสูงที่สุด เนื่องจากโครงสร้างของสารประกอบ ฟีนอลิกเป็น benzene ring ที่มีหมู่ไฮดรอกซิลอย่างน้อยหนึ่งหมู่ในโมเลกุลจึงมีคุณสมบัติมีขั้ว ดังนั้นการใช้ตัวทำละลายที่มีขั้วได้แก่ ethanol ทำให้มีความสามารถในการละลายสารประกอบฟีนอลิกได้ดี แต่ผลจากการทดลองการใช้น้ำปรับ pH 3 ซึ่งเป็นตัวทำละลายที่มีขั้วแต่ให้ปริมาณสารฟีนอลิกน้อยกว่าการสกัดด้วย acetone นั้นอาจเป็นไปได้ว่าทำให้เกิดกลไกบางอย่างเช่น การทำให้ฟีนอลิกไปจับกับโปรตีนแล้วเกิดการตกตะกอน หรือสารฟีนอลิกบางชนิดอาจจับกันอยู่ในรูปแบบ condense ทำให้ไม่ละลายน้ำ (Huang et al., 2005; Stalikas, 2007) ส่วน acetone เป็นตัวทำละลายที่มีขั้วต่ำจึงทำให้การละลายสารฟีนอลิกได้ไม่ดี และจากการทดลองพบว่าสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดที่สกัดได้จาก ethanol ในเมล็ดมีปริมาณสูงกว่าเปลือก เนื่องจากในเมล็ดพืชจะมีการสะสมสารประกอบฟีนอลิกไว้จำนวนมากเพื่อการขยายพันธุ์ (Vine et al., 1981)

จากผลการวิเคราะห์ประสิทธิภาพในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH แสดงให้เห็นว่าสารสกัดจากเมล็ดด้วย ethanol มีประสิทธิภาพในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุดมากกว่าในสารสกัดจากเปลือก และมากกว่าน้ำ pH 3 และ acetone ตามลำดับ อาจกล่าวได้ว่าประสิทธิภาพในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระมีความแปรผันตามปริมาณของสารประกอบฟีนอลิกซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Poudle et al. (2008) พบว่าสารประกอบฟีนอลิกและประสิทธิภาพการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระในเปลือกและเมล็ดขององุ่นมีความแตกต่างกันขึ้นอยู่กับสายพันธุ์และประสิทธิภาพการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระนั้นจะแปรผันตามปริมาณสารประกอบฟีนอลิก เนื่องจากกลไกการทดสอบฤทธิ์ความเป็นสารต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH คือสารสกัดจากเปลือกและเมล็ดองุ่นที่มีฤทธิ์เป็นสารต้านออกซิเดชันนั้นมีความสามารถ

ในการให้ไฮโดรเจนแก่ DPPH ให้เปลี่ยนเป็น DPPHH จากองค์ประกอบได้แก่สารกลุ่มฟีนอลิกที่มีโครงสร้างเป็น benzene ring มีออกซิเจน 2 อะตอมอยู่ในโมเลกุล จึงทำให้มีความสามารถในการดึงอิเล็กตรอนเข้าหาตัวมันเองได้ดี ส่งผลให้มีความเป็นลบมากหรือมีค่าพลังงานอิเล็กโตรเนกาติวิตีสูง (electronegativity) ทำให้ไฮโดรเจนตัวที่อยู่ไกลสุดมีความเป็นบวกมาก และสามารถหลุดออกไปได้ง่ายกว่าในทำนองเดียวกันกับผลการศึกษาฤทธิ์การเกิดปฏิกิริยาลิปิดเปอร์ออกซิเดชันโดยวิธี Ferric Thiocyanate Colorimetric (FTC) พบว่าสารสกัดจากเมล็ดด้วย ethanol พบว่ามีฤทธิ์ในการยับยั้งการเกิดลิปิดเปอร์ออกซิเดชันสูงที่สุด โดยมีค่าเท่ากับ $98.531 \pm 0.575\%$ และในเปลือกเท่ากับ $91.264 \pm 1.662\%$ ตามลำดับ พบว่ามีประสิทธิภาพใกล้เคียงกับสารมาตรฐาน Vitamin E acetate, BHT, Trolox® และ Glutathione และมีความแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p \text{ value} > 0.05$ ส่วนค่า IC_{50} ในการต้านออกซิเดชันด้วยวิธี FTC ของสารสกัดจากเปลือกและเมล็ดองุ่น พบว่าสารสกัดจากเมล็ดด้วย ethanol มีค่า IC_{50} ต่ำที่สุด คือ เท่ากับ 0.516 ± 0.056 และเปลือกเท่ากับ 0.657 ± 0.073 ตามลำดับ และมีความแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ $p > 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน การทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดองุ่นในการยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาลิปิดเปอร์ออกซิเดชันด้วยวิธี FTC เป็นวิธีที่ใช้วัดปริมาณ lipid hydroperoxide ในระยะเริ่มต้นของปฏิกิริยา lipid peroxidation จากการที่ lipid hydroperoxide เกิดออกซิไดซ์เฟอร์รัสไอออน (Fe^{2+}) เป็นเฟอร์ริกไอออน (Fe^{3+}) ที่สามารถตรวจสอบปริมาณของ Fe^{3+} จากการทำปฏิกิริยากับแอมโมเนียมไรโอไซยาเนต ($NH_4 SCN$) เกิดเป็นสารประกอบ $Fe(SCN)_3$ ที่มีสีแดงโดยดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 500nm การทดลองจะใช้กรดไขมันไม่อิ่มตัว linoleic acid เป็นแหล่งของ lipid hydroperoxide ดังนั้นสารต้านออกซิเดชันที่มีประสิทธิภาพสูงจึงสามารถยับยั้ง

ปริมาณ lipid hydroperoxide ในระยะเริ่มต้นของปฏิกิริยา lipid peroxidation ได้มาก สามารถตรวจวัดได้จากปริมาณสารประกอบ $Fe(SCN)_3$ ที่ลดลง นอกจากนี้การศึกษารีดอกซ์ในการต้านออกซิเดชันโดยวิธี FRAP Assay พบว่าสารสกัดจากเมล็ดด้วย ethanol มีฤทธิ์เป็นสารรีดิวซ์ที่สูงที่สุด โดยมีค่าเท่ากับ 55.517 ± 0.833 และในเปลือกเท่ากับ 54.511 ± 1.169 ตามลำดับ ค่า IC_{50} ด้วยวิธี FRAP Assay ของสารสกัดจากเปลือกและเมล็ดองุ่น พบว่าสารสกัดจากเมล็ดด้วย ethanol มีค่า IC_{50} ต่ำที่สุด เท่ากับ 0.832 ± 0.032 ส่วนในเปลือก เท่ากับ 0.858 ± 0.003 ตามลำดับวิธีนี้เป็นวิธีวัดความสามารถในการต้านออกซิเดชันทั้งหมดซึ่งเกิดจากการรีดิวซ์ โดยใช้สารประกอบเชิงซ้อนของเหล็กเฟอร์ริก Fe^{3+} กับ TPTZ (ferric tripyridyltriazine) จากการสกัดสารประกอบกลุ่มฟีนอลิกทั้งหมดที่มีคุณสมบัติเป็นสารต้านออกซิเดชันโดยโครงสร้างเป็น benzene ring นั้นจะมีหมู่ไฮดรอกซิล ที่สามารถให้ไฮโดรเจนอะตอมกับอนุมูลอิสระได้ ซึ่งจะทำให้เกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนของเหล็กเฟอร์รัส Fe^{2+} กับ TPTZ ที่มีสีน้ำเงิน สามารถวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 593 nm และจากผลการศึกษาประสิทธิภาพการเป็นสารต้านออกซิเดชันทั้ง 3 วิธี คือ การกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH การยับยั้งการเกิดลิปิดเปอร์ออกซิเดชันและการเป็นสารรีดิวซ์ซึ่งพบว่า ethanol เป็นตัวทำละลายที่ให้ประสิทธิภาพในการสกัดสารประกอบฟีนอลิกดีที่สุดซึ่งสารประกอบเหล่านี้มีคุณสมบัติในการต่อต้านออกซิเดชันได้สูง โดยสารสกัดของเมล็ดองุ่นด้วยตัวทำละลายดังกล่าวให้ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกสูงที่สุด ดังนั้นจึงให้ประสิทธิภาพในการทดสอบทั้ง 3 วิธี สูงตามไปด้วยเช่นกัน ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาของ Paudle et al. (2008) ที่พบว่าในส่วนเปลือกและเมล็ดองุ่นพบสารประกอบฟีนอลิกหลายชนิด โดยประสิทธิภาพการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระในเปลือกและเมล็ดองุ่นมีความแตกต่างกันออกไปแล้วแต่ชนิด

นอกจากนี้ยังพบว่าประสิทธิภาพการเป็นสารต้านออกซิเดชันในส่วนของเมล็ดจะมีสูงมากกว่าในส่วนเปลือกโดยขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ และนอกจากนี้ประสิทธิภาพการเป็นสารต้านออกซิเดชันจะแปรผันตามปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด โดยยังสอดคล้องกับงานวิจัยของ Xu et al. (2010) ที่วัดประสิทธิภาพการเป็นสารต้านออกซิเดชันด้วยวิธี DPPH, ABTS และ FRAP และพบว่าประสิทธิภาพการเป็นสารต้านออกซิเดชันที่มีค่ามากจะแปรผันตามปริมาณของสารฟีนอลิกทั้งหมด (Kim et al., 2002)

สารสำคัญในเปลือกและเมล็ดองุ่นที่ประกอบไปด้วยสารกลุ่มฟีนอลิกหลากหลายชนิดที่มีรายงานว่ามีประสิทธิภาพในการต่อต้านเชื้อจุลินทรีย์ต่างๆ หลายชนิด (Shoko et al., 1999; Jayaprakasha et al., 2003; Vatter et al., 2004) จากผลการทดลองพบว่า 3% w/w ของสารสกัดจากเมล็ดด้วย ethanol ให้ประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ใกล้เคียงกับ 0.2% ketoconazole และ 0.25% selenium sulfide ($p>0.05$) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Lee et al. (2004) และ Rupasinghe and Clegg (2007) ได้วัดประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ 5 ชนิด ได้แก่ *Bacillus cereus*, *Salmonella infantis*, *Campylobacter coli*, *E. coli*. และ *S. aureus*. พบว่าสารประกอบฟีนอลิกมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อที่ทำการทดสอบดังกล่าวทั้งหมด อีกทั้งงานวิจัยของ Jayaprakasha et al. (2003) ที่ได้ทำการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัด (crude extracts) จากเมล็ดองุ่นแดง (*Vitis vinifera*) ต่อการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ 6 ชนิด ได้แก่ *B. cereus*, *B. coagulans*, *B. subtilis*, *S. aureus*, *E. coli* และ *Ps. aeruginosa* เมื่อนำสารสกัดจากเปลือกและเมล็ดด้วยตัวทำละลายทั้ง 3 ชนิดนั้นไปทำการหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ใช้ยับยั้งการเจริญเติบโต (MIC) และค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ใช้ฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ (MBC) จากการทดลองพบว่าผลของสารสกัดเมล็ดองุ่นด้วย ethanol ให้ประสิทธิภาพในการยับยั้งและฆ่าเชื้อ

จุลินทรีย์ได้สูงกว่าเปลือกและเป็นตัวทำละลายที่มีประสิทธิภาพมากกว่าน้ำ pH 3 และ acetone

โดยสรุปจากการศึกษาผลของชนิดตัวทำละลายที่ใช้สกัดต่อ % yield ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด สมบัติการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH, lipid peroxidation, FRAP และประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของเปลือกและเมล็ดองุ่นพบว่า สารสกัดจากเมล็ดองุ่นด้วย ethanol มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกมากที่สุดมีคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระและประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียสูงกว่าสารสกัดจากเปลือกองุ่นแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญ ($p>0.05$)

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับงบประมาณสนับสนุนจากทุนโครงการพัฒนานักวิจัยและงานวิจัยเพื่ออุตสาหกรรม (พวอ.) ร่วมกับ บริษัทวิลเลจ ฟาร์ม อำเภอวังน้ำเขียว จังหวัดนครราชสีมา และทุนส่งเสริมการทำวิทยานิพนธ์และการศึกษาอิสระ บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยขอนแก่น ประจำปี 2556

References

- Bao J, Cai Y, Sun M, Wang G, Corke H. Anthocyanins, flavonoids and free radical scavenging activity on Chinese bayberry (*Myrica rubra*) extracts and their color properties and stability. *J Agri Food Chem.* 2005; 53: 2327-32.
- Guerrero RF, Liazid, Palma M, Puertas. Barrio G, Gil-Izquierdo A, et al., Phenolic characterization of red grapes autochthonous to Andalusia. *Food Chem.* 2009; 112: 949-955.

- Huang DJ, Ou BX, Prior RL. The chemistry behind antioxidant capacity assays. *J Agri Food Chem.* 2005; 53(6): 1841-56.
- Jayaprakasha GK, Selvi T, Sakariah KK, Antibacterial and antioxidant activities of grape (*Vitis vinifera*) extracts. *Food Res Inter* 2003; 36: 117-122.
- Katalinic V, SmoleMozina S, Skroza D, Generalic I, Abramovic H, Milos M, et al. Polyphenolic profile, antioxidant properties and antimicrobial activity of grape skin extracts of 14 *Vitis vinifera* varieties grown in Dalmatia (Croatia). *Food Chem.* 2010; 119: 715-23.
- Kim DO, Lee CY. Extraction and isolation of polyphenolics. *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*. R.E. Wrolstad. New York; Wiley. 2002.
- Kim TJ, Silva JL, Weng WL, Chen WW, Corbitt M, Jung YS, et al., Inactivation of *Enterobactersakazakii* by water-soluble muscadine seed extracts. *Inter J Food Microbio.* 2009; 129: 295-299.
- Lee JH, Talcott ST, Fruit maturity and juice extraction influences ellagic acid derivatives and other antioxidant polyphenolics in muscadine grapes. *Food Chem.* 2004; 52: 361-366.
- Malovana S, Montelongo FJG, Rodriguez-Delgado MA, Optimisation of sample preparation for the determination of trans-resveratrol and other poly phenolic compounds in wines by high performance liquid chromatography. *Analy chim Acta.* 2001; 428: 245-253.
- Microbial population count [online]. 2010 Dec 31 [cited 2013 Dec 1]. Available from: <http://science.kmutt.ac.th/class/mic291/mic291lab7.doc>
- Passos CP, Yilmaz S, Silva CM, Coimbra MA, Enhancement of grape seed oil extraction using a cell wall degrading enzyme cocktail. *Food Chem.* 2009; 115: 48-53.
- Poudel PR, Tamura H, Kataoka I, Mochioka R. Phenolic compounds and antioxidant activities of skin and seeds of five wild grapes and two hybrids native to Japan. *J Food Comp Ana.* 2008; 21: 622-5.
- Rafaela GM, Gloria LM, Mónica G, Antioxidant activity in banana peel extracts: Testing extraction conditions and related bioactive compounds. *Food Chem.* 2010; 119: 1030-1039.
- Rupasinghe V, Clegg HPS, Total antioxidant capacity, total phenolic content, mineral elements and histamine concentration in wines of different fruit sources. *J Agri Food Chem.* 2007; 40: 210-15.
- Shoko T, Soichi T, Megumi MM, Eri F, Jun K, Michiko W. Isolation and Identification of an antibacterial compound from grape and it application to food. *Nippon NogeikagakuKaishi.* 1999; 73: 125-8.
- Stalikas CD. Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids. *J Sep Sci.* 2007; 30(18): 3268-95.
- Torrunguang K, Vichienroj P, Chutimaworapan S, Antibacterial activity of mangosteen pericarp extract against cariogenic *Streptococcus mutans*. *Chula Univ Dent.* 2007; 30:1-10.

- Vatterm DA, Lin YT, Shetty LK. Antimicrobial activity against select food-borne pathogens by phenolic antioxidants enriched in cranberry pomace by solid-state bioprocessing using the food grade fungus *Rhizopus oligosporus*. *Proc Biochem*. 2004; 39: 1939-46.
- Vine RP. *Commercial Wine making, Process and Control*. London: Chapman and Hall; 1981.
- Xu C, Yali Z, Lei C, Jiang L. Phenolic compounds and antioxidant properties of different grape cultivars grown in China. *Food Chem*. 2010; 119(4): 1557-65.
- Yilmaz Y, Toledo RT. Oxygen radical absorbance capacities of grape/wine industry by products and effect of solvent type on extraction of grape seed polyphenols. *J Food Comp Ana*. 2006; 19: 41-4.
- Zhao B. and Hall C.A., Composition and antioxidant activity of raisin extracts obtained from various solvents. *Food Chemistry*. 2008; 108: 511-518.