บทที่ 4
ผลการวิเคราะห์ข้อมูล

อภิปรายผลการทดลอง

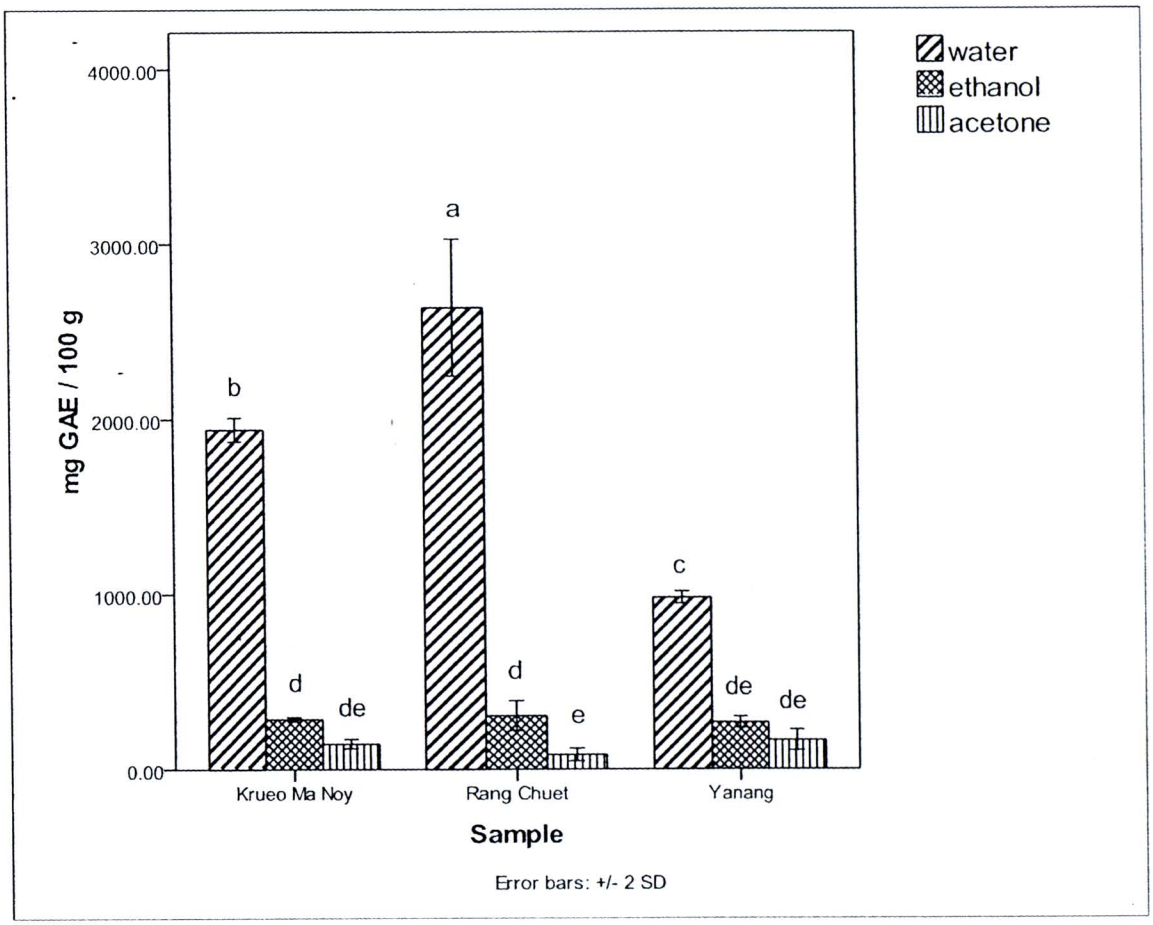
1. การวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด

ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดในสารสกัดย่านาง รางจืด และเครือหมาน้อยที่สกัดด้วยตัวทำละลายที่แตกต่างกันคือ น้ำ, เอทานอล, และอะซีโตน วิเคราะห์โดยการใช้ Folin-Ciocalteu reagent ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดแต่ละชนิดได้แสดงไว้ในตารางที่ 1 ซึ่งพบว่าตัวอย่างที่สกัดด้วยน้ำมีปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดสูงกว่าเอทานอล และอะซีโตน โดยรางจืดที่สกัดด้วยน้ำมีปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดสูงสุด (2,634.87 mg GAE /100 g RM) ตามด้วยเครือหมาน้อยและย่านางที่สกัดด้วยน้ำ (1,940.73 mg GAE /100 g RM และ 978.99 mg GAE /100 g RM ตามลำดับ) ส่วนรางจืดที่สกัดด้วยอะซีโตนมีปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดต่ำสุด (81.58 mg GAE / 100 g RM) โดยปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดในสารสกัดรางจืดมีปริมาณใกล้เคียงกับการศึกษาของรัชฎาพรและคณะ (2006)

ตารางที่ 1 : ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดย่านาง รางจืด และเครือหมาน้อยที่สกัดด้วยตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ

Samples	Total Phenolics (mg GAE / 100 g RM)		
	Water	Ethanol	Acetone
Rang Chuet	2634.87 ± 195.054[a]	305.24 ± 43.436	81.58 ± 18.121
Yanang	978.99 ± 17.348	267.03 ± 16.416	164.56 ± 29.684
Krueo Ma Noy	1940.73 ± 33.845	284.74 ± 6.454	144.66 ± 13.355

[a] หมายถึง ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน



รูปที่ 4 : เปรียบเทียบปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดของสารของสารสกัดย่านาง, รางจืด, และเครือหมาน้อย ที่สกัดด้วยตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ (mg GAE / 100 g RM) โดยตัวอักษรที่ต่างกันหมายถึง ค่าเฉลี่ยมีความแตกต่างกันที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($P < 0.05$)

เมื่อทำการเปรียบเทียบกับรางจืดกับสมุนไพรประเภทชงดื่ม เช่น Tropical herbal tea, Temperature herbal tea และ Camellia tea พบว่า สารสกัดรางจืดน้ำมีประปริมาณของ Total phenolic ใกล้เคียงกับกลุ่ม Tropical herbal tea เช่น ใบกระเพรา, ตะไคร้, ใบบัวบก (Chan, et al., 2010)

2. การวิเคราะห์ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ

2.1 การวิเคราะห์ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระด้วย 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH)

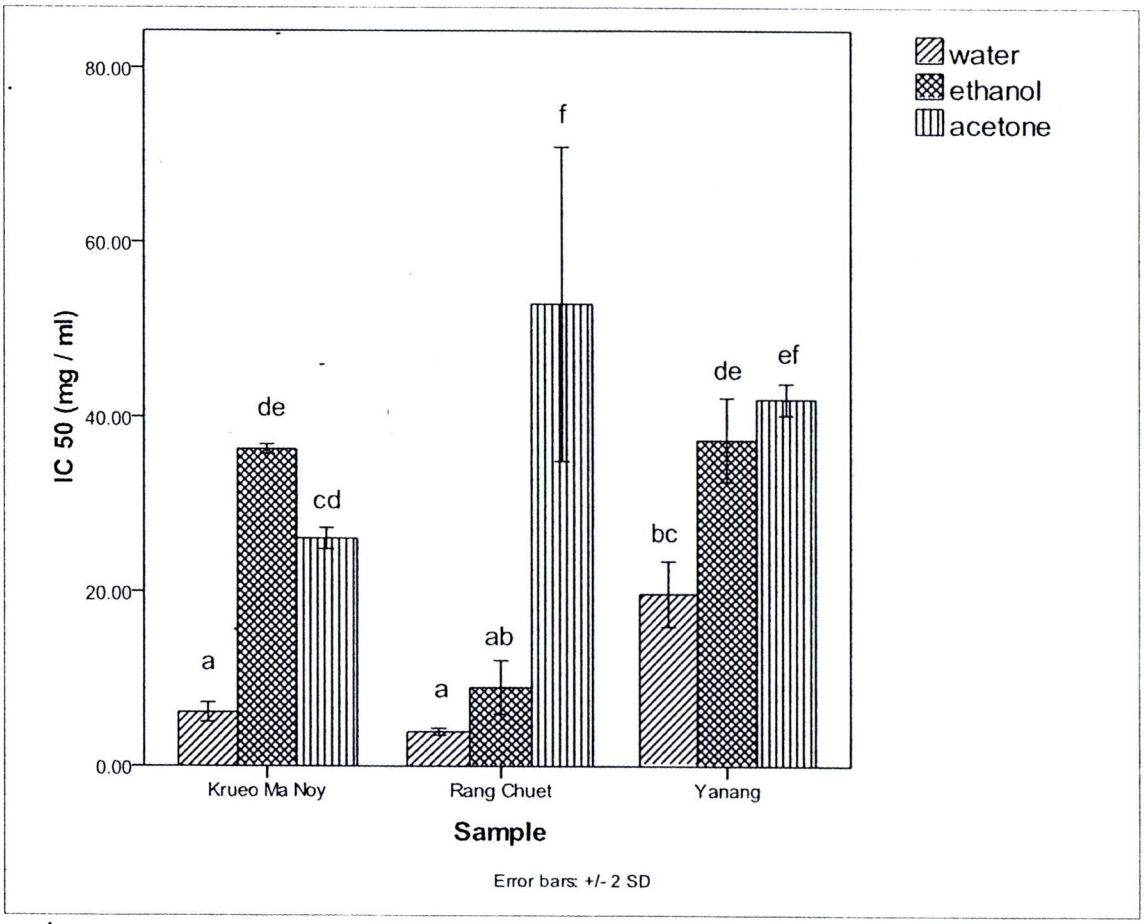
การวิเคราะห์ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระด้วย 1,1-diphenyl-2-picrylhy-drazyl (DPPH) เป็นการศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดในการรวมตัวกับ DPPH ที่อยู่ในรูปอนุมูลอิสระที่เสถียรที่อยู่ในสารละลาย โดย DPPH คือ อนุภาคอิสระที่เสถียรและสามารถรับอิเล็กตรอนได้ เมื่อได้รับอะตอมไฮโดรเจนจากโมเลกุลอื่นจะทำให้เปลี่ยนเป็นโมเลกุลที่ไม่เป็นอนุมูลอิสระ

ในการศึกษาได้วิเคราะห์ความสามารถของสารสกัดในการทำให้ความเข้มข้นของ DPPH• ลดลง 50% (IC_{50}) โดยใช้ BHT และ Ascorbic acid เป็นตัวควบคุมได้แสดงไว้ในตารางที่ 2 โดยพบว่า รางจืดที่สกัดด้วยน้ำมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระสูงสุด (3.920 mg / ml) ตามด้วยเครือหมาน้อยที่สกัดด้วยน้ำ (6.170 mg / ml) และรางจืดที่สกัดด้วยเอทานอล (9.015 mg / ml) ส่วนรางจืดที่สกัดด้วยอะซีโตนพบว่ามีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระต่ำสุด (52.910 mg / ml)

ตารางที่ 2 : ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระด้วย 1,1-diphenyl-2-picrylhy-drazyl (DPPH) ของสารสกัดย่านาง, รางจืด, และเครือหมาน้อยที่สกัดด้วยตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ

Samples	IC_{50} (mg / ml)		
	Water	Ethanol	Acetone
Rang Chuet	3.920 ± 0.198 [a]	9.015 ± 1.534	52.910 ± 8.994
Yanang	19.715 ± 1.874	37.340 ± 2.404	41.980 ± 0.905
Krueo Ma Noy	6.170 ± 0.099	36.300 ± 0.283	26.060 ± 0.608
BHT	0.339 ± 0.039 mg / ml		
Ascorbic cid	0.036 ± 0.007 mg / ml		

[a] หมายถึง ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน



รูปที่ 5 : เปรียบเทียบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระด้วย 1,1-diphenyl-2-picrylhy-drazyl (DPPH) ของสารของสารสกัดย่านาง, รางจืด, และเครือหมาน้อยที่สกัดด้วยตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ (IC_{50} mg/ml) โดยตัวอักษรที่ต่างกันหมายถึง ค่าเฉลี่ยมีความแตกต่างกันที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($P < 0.05$)

2.2 การวิเคราะห์ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระด้วย 2,2'-Azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)

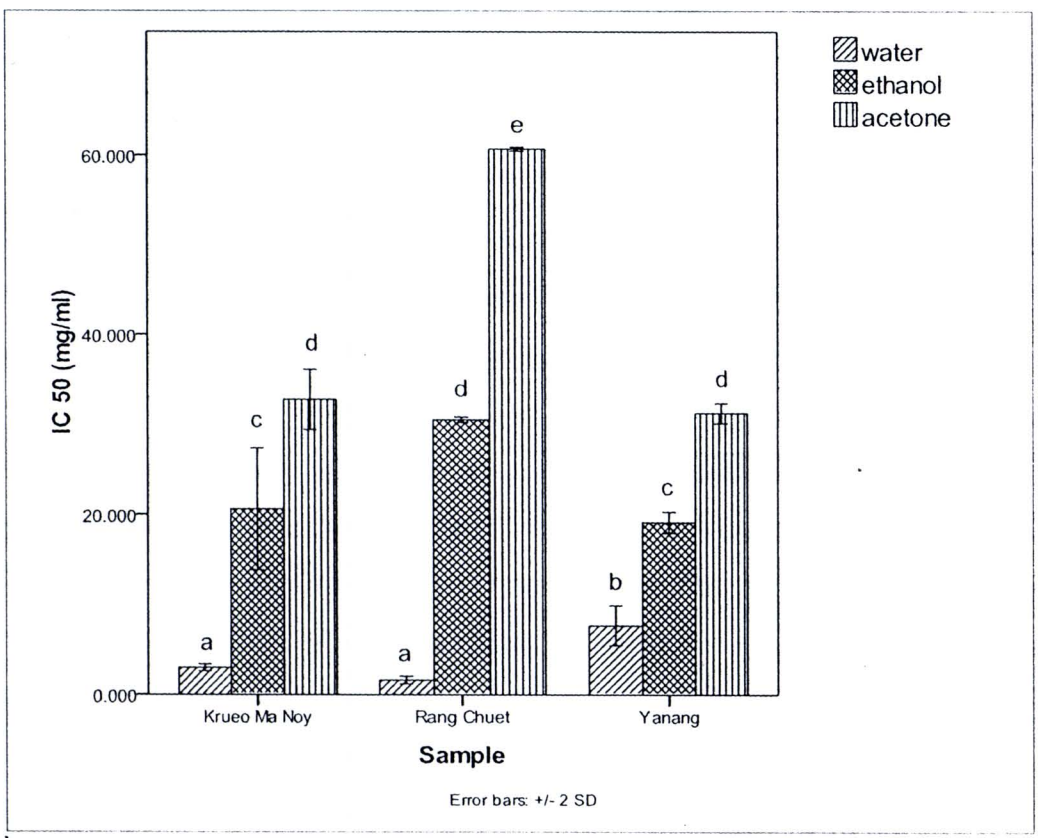
เป็นการวัดความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัด โดย ABTS จะถูกเปลี่ยนเป็นอนุมูลอิสระด้วยการเติมโซเดียมเปอร์ซัลเฟต ($K_2S_2O_8$) และดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร

ในการศึกษาได้วิเคราะห์ความสามารถของสารสกัดโดยใช้ BHT และ Trolox เป็นตัวควบคุม ได้แสดงไว้ในตารางที่ 3 โดยพบว่า รางจืดที่สกัดด้วยน้ำมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระสูงสุด (1.598 mg / ml) ตามด้วยเครือหมาน้อยและย่านางที่สกัดด้วยน้ำ (2.973 mg / ml, และ 7.676 mg / ml ตามลำดับ) ส่วนรางจืดที่สกัดด้วยอะซีโตนพบว่ามีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระต่ำสุด (60.647 mg / ml)

ตารางที่ 3 : ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระด้วย 2,2'-Azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) ของสารสกัดย่านาง, รางจืด, และเครือหมาน้อยที่สกัดด้วยตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ

Samples	IC_{50} (mg / ml)		
	Water	Ethanol	Acetone
Rang Chuet	1.598 ± 0.211[a]	30.477 ± 0.159	60.647 ± 0.118
Yanang	7.676 ± 1.112	19.114 ± 0.595	31.221 ± 0.558
Krueo Ma Noy	2.973 ± 0.202	20.599 ± 3.384	32.744 ± 1.678
BHT	0.0853 ± 0.0094		
Trolox	0.0488 ± 0.0078		

[a] หมายถึง ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน



รูปที่ 6 : เปรียบเทียบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระด้วย 2,2'-Azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) ของสารของสารสกัดย่านาง, รางจืด, และเครือหมาน้อยที่สกัดด้วยตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ (IC_{50} mg/ml) โดยตัวอักษรที่ต่างกันหมายถึง ค่าเฉลี่ยมีความแตกต่างกันที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($P < 0.05$)

2.3 การวัดสมบัติการต้านอนุมูลอิสระทั้งหมด

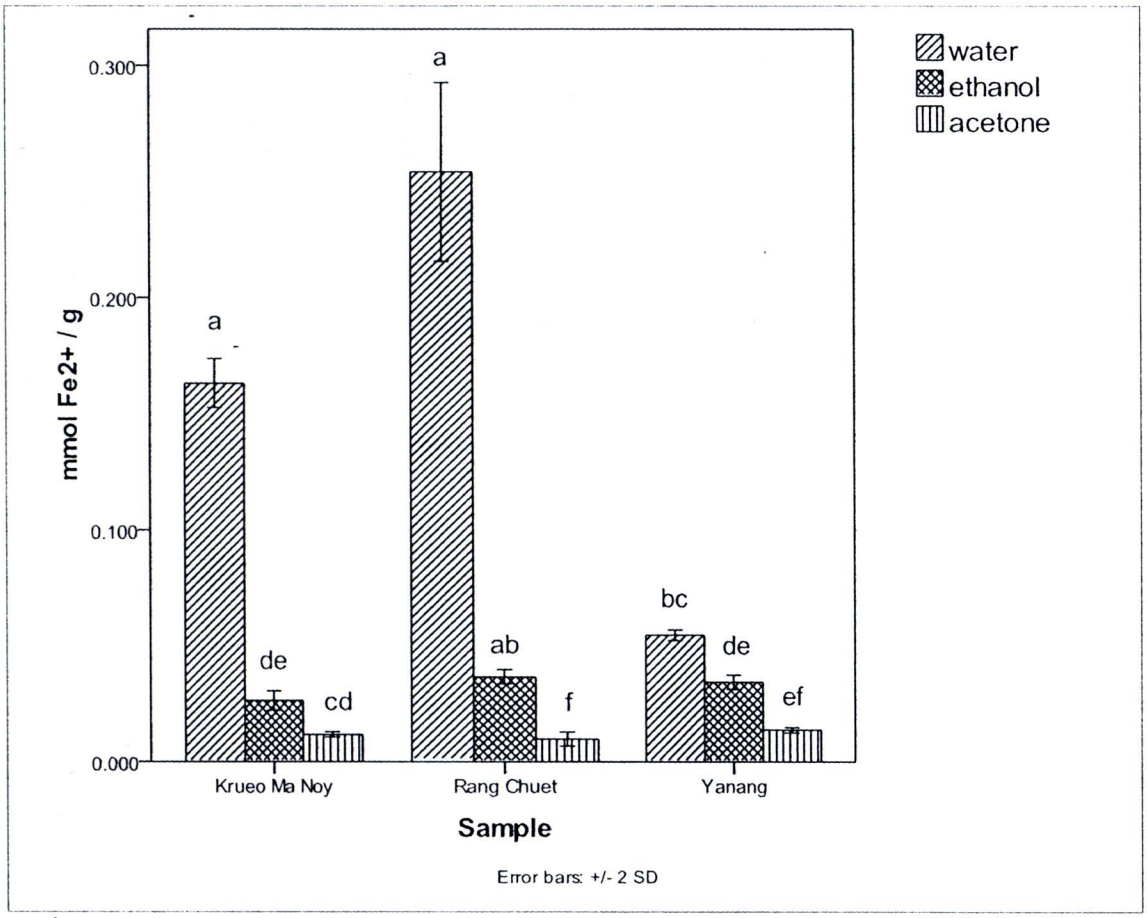
Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP) Assay เป็นการวัดความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระทั้งหมดซึ่งเกิดจากการรีดิวซ์ โดยใช้สารประกอบเชิงซ้อนของเหล็กเฟอริค Fe^{3+} กับ TPTZ (ferric tripyridyltriazine) ได้สารประกอบเชิงซ้อนของเหล็กเฟอรัส Fe^{2+} กับ TPTZ ซึ่งมีสีน้ำเงิน และดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 593 นาโนเมตร

ในการศึกษาสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัด พบว่าตัวอย่างที่สกัดด้วยน้ำมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระสูงกว่าเอทานอล และอะซีโตน ดังแสดงในตารางที่ 4 โดยรางจืดที่สกัดด้วยน้ำมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระสูงสุด (0.254 mmol Fe^{2+}/g RM) ตามด้วยเครือหมาน้อยและย่านางสกัดด้วยน้ำ (0.163 mmol Fe^{2+}/g RM และ 0.054 mmol Fe^{2+}/g RM ตามลำดับ) และรางจืดที่สกัดด้วยอะซีโตนมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระต่ำสุด (0.010 mmol Fe^{2+}/g RM)

ตารางที่ 4 : สมบัติในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดย่านาง, รางจืด, และเครือหมาน้อยที่สกัดด้วยตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ

Samples	Total Antioxidant activity (mmol Fe^{2+} / g RM)		
	Water	Ethanol	Acetone
Rang Chuet	0.254 ± 0.0193 [a]	0.037 ± 0.0015	0.010 ± 0.0015
Yanang	0.054 ± 0.0012	0.034 ± 0.0015	0.014 ± 0.0006
Krueo Ma Noy	0.163 ± 0.0053	0.026 ± 0.0021	0.012 ± 0.0010
BHT	2.369 ± 0.141		

[a] หมายถึง ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน



รูปที่ 7 : เปรียบเทียบสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระของสารของสารสกัดย่านาง, รางจืด, และเครือหมาน้อยที่สกัดด้วยตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ (mmol Fe^{2+} / g RM) โดยตัวอักษรที่ต่างกันหมายถึงค่าเฉลี่ยมีความแตกต่างกันที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($P < 0.05$)

จากการศึกษาความสามารถในการต้านออกซิเดชันของสารสกัดสมุนไพรทั้งสามชนิดด้วยวิธี DPPH assay, ABTS assay และ FRAP assay พบว่า สารสกัดน้ำมีคุณสมบัติในการต้านออกซิเดชันได้ดีที่สุด โดยสามารถเรียงลำดับความสามารถในการต้านออกซิเดชันตามชนิดของสมุนไพรทั้งสามชนิดได้ ดังนี้ รางจืด เครือหมาน้อย และย่านาง หากเปรียบเทียบกับสารมาตรฐานคือ BHT, Ascorbic acid และ Trolox พบว่าสารสกัดสมุนไพรทั้งสามชนิดมีประสิทธิภาพต่ำกว่าสารมาตรฐาน และความสามารถในการต้านออกซิเดชันของสารสกัดจะสอดคล้องกับปริมาณของ Total phenolic ที่มีในตัวอย่าง หากสารสกัดใดมีปริมาณของ Total phenolic มากจะมีความสามารถในการต้านออกซิเดชันมากเช่นกัน ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาความสัมพันธ์ของปริมาณฟีนอลิกกับความสามารถในการเป็นสารต้านออกซิเดชันของ Jacobo- Velazquez และคณะ(2009)

การศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์

การทดสอบในห้องทดลอง (In vitro) โดยใช้เซลล์ไลน์ และส่วนประกอบของเซลล์ ทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดที่ความเข้มข้นต่างๆนั้น ให้ผลที่เชื่อถือได้และเป็นที่ยอมรับ ในขณะที่ผลการทดสอบในสัตว์ทดลองมักจะทดสอบที่ปริมาณสารเคมีสูงเกินความเป็นจริงหลายเท่า ซึ่งอาจไม่สอดคล้องการปริมาณที่มนุษย์ได้รับจริง นอกจากนี้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเซลล์ ยังประหยัดเวลางบประมาณ สามารถที่จะทดลองซ้ำได้มากกว่า และที่สำคัญไม่ต้องเผชิญกับองค์กรเอกชนที่ต่อต้านการใช้สัตว์ทดลองอีกด้วย (Cetin et.al., 2005)

ตารางที่ 5 แสดงค่า IC_{50} (µl/ml) ของสารสกัดย่านาง เครือหมาน้อย และรางจืดต่อ Caco-2 cell lines

ประเภทของสมุนไพร	ชื่อวิทยาศาสตร์	การสกัด	IC_{50} (µl/ml)
ย่านาง	*Tiliacora triandra* (Colebr.) Diels	น้ำ	>200
		แอทานอล	>350
		อะซีโตน	>200
เครือหมาน้อย	*Cissampelos pareira*	น้ำ	198±14
		แอทานอล	>200
		อะซีโตน	>200
รางจืด	*Thunbergia Laurifolia* Lindl.	น้ำ	170±12
		แอทานอล	ND
		อะซีโตน	>200

การศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารสกัดสมุนไพรคือ รางจืด เครือหมาน้อยและย่านางใน Caco-2 cell lines โดยวิธี MTT assay (Mossman, 1983) พบว่า ค่า IC_{50} ของสารสกัดทุกชนิดมีค่ามากกว่า 100 µg/ml ดังแสดงในตารางที่ 5 และตัวอย่างควบคุมคือ 0.1 % DMSO ไม่ทำให้เกิดพิษต่อเซลล์เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ที่มีเฉพาะอาหารเลี้ยงเซลล์เท่านั้น ดังนั้นจึงถือว่า สารสกัดรางจืด เครือหมาน้อยและย่านาง จัดอยู่ในกลุ่มของสารที่มีความพิษต่ำต่อ Caco-2 cell lines ในปี 2006 Okonogi และคณะ ได้ทำการศึกษาความสามารถในการต้านออกซิเดชันและความเป็นพิษของเปลือกผลไม้บางชนิดต่อ Caco-s cell linesและ peripheral blood mononuclear cells พบว่า สารสกัดจากเปลือกเงาะมีประสิทธิภาพในการเป็นสารต้านการเกิดออกซิเดชันจากธรรมชาติและเหมาะสำหรับการในไปใช้เป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่มีจากธรรมชาติในผลิตภัณฑ์อาหารหรือผลิตภัณฑ์ยา เนื่องจากมีปริมาณของสารต้านออกซิเดชันค่อนข้างสูงและมีความเป็นพิษต่ำ (IC_{50} > 100 ug/ml)

Boivin และคณะ (2009) ได้รายการว่าสารสกัดจากผักตระกูลกะหล่ำ มีความสามารถในการยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็งได้ ซึ่งความสามารถในการยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์นี้จะแตกต่างกันในเซลล์มะเร็งแต่ละชนิด และยังขึ้นอยู่กับความสามารถในการเป็นตัวต้านการเกิดออกซิเดชันของ

พืชแต่ละชนิดอีกด้วย ดังนั้นสมุนไพรทั้งสามชนิดคือ ย่านาง เครือหมาน้อย และรางจืดความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่แตกต่างกัน ดังนั้นความสามารถในการยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์จึงแตกต่างกันไปด้วย และสอดคล้องกับการศึกษาของ Oonsivilai และคณะ(2008) โดยได้ทำการ ศึกษาความเป็นพิษของสารสกัดรางจืดต่อเซลล์ชนิดต่างๆ รวมทั้ง Caco-2 cell line พบว่า การสกัดด้วย petroleum ether มีพิษกับเซลล์มากกว่าสารสกัดอื่นๆ และสารสกัดน้ำจะมีค่า IC_{50} เท่ากับ 147±15 ซึ่งใกล้เคียงกัน และนอกจากนี้ ยังพบว่าความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งจะแตกต่างกันตามแต่ชนิดของเซลล์