

บทที่ 4

ผลการวิจัย

1. ผลการสกัดสารต้านอนุมูลอิสระจากแก่นมะหาดด้วยตัวทำละลายชนิดต่างๆ

1.1 จากการสกัดสารจากแก่นมะหาดด้วยวิธีการแช่ในตัวทำละลาย (Maceration) เอทิลอะซิเตต เมทานอล และเอทานอล โดยการชั่งผงแก่นมะหาด 2.315 กิโลกรัม แช่ด้วยตัวทำละลายเอทิลอะซิเตตปริมาตร 15 ลิตร ทั้งหมด 5 ครั้ง จะได้สารละลายสีเหลือง เมื่อนำสารสกัดที่ได้มาระเหยเอาตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยสารแบบลดความดัน (Rotary Vacuum Evaporator) จะได้สารสกัดหยาบชั้นเอทิลอะซิเตต และนำกากพืชที่เหลือมาทำการสกัดต่อด้วยเมทานอลปริมาตร 15 ลิตร ทั้งหมด 5 ครั้ง จะได้สารละลายสีน้ำตาลเหลือง เมื่อนำสารสกัดที่ได้มาระเหยเอาตัวทำละลายออกจะได้สารสกัดหยาบชั้นเมทานอล

1.2 ชั่งผงแก่นมะหาด 1.5 กิโลกรัม แช่ด้วยตัวทำละลายเอทานอลปริมาตร 5 ลิตร ทั้งหมด 5 ครั้ง จะได้สารละลายสีน้ำตาลเหลืองเมื่อนำสารสกัดที่ได้มาระเหยเอาตัวทำละลายออกจะได้สารสกัดหยาบชั้นเอทานอล

ทำการชั่งและบันทึกน้ำหนักของสารสกัดหยาบที่ได้ในแต่ละชั้น และคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ของสารสกัดหยาบเมื่อเทียบกับน้ำหนักพืชแห้ง ดังแสดงผลการสกัดสารในตารางที่ 4.1

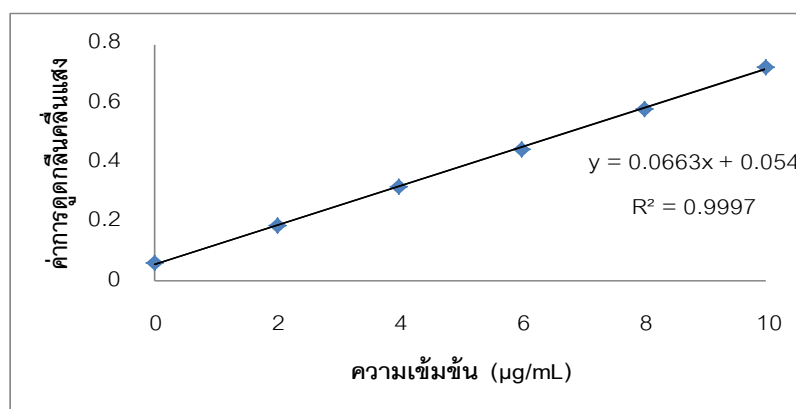
ตารางที่ 4.1 แสดงผลการสกัดสารด้วยตัวทำละลายชนิดต่างๆ

ตัวทำละลาย	น้ำหนักสารสกัดหยาบที่ได้ (กรัม)	ลักษณะของสารสกัดหยาบ	เปอร์เซ็นต์ของสารสกัดหยาบ (% กรัม / กรัมพืชแห้ง)
เอทิลอะซิเตต	137.81	ของแข็งสีเหลือง	5.95
เมทานอล	250.20	ของแข็งสีน้ำตาลเหลือง	10.81
เอทานอล	85.80	ของหนืดสีน้ำตาลเหลือง	5.72

จากผลการสกัดสารด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ชนิดต่างๆ พบว่าตัวทำละลายเมทานอลจะได้เปอร์เซ็นต์ของสารสกัดหยาบเมื่อเทียบกับน้ำหนักพืชแห้งมากที่สุด ส่วนการสกัดด้วยเอทิลอะซิเตตและเอทานอลจะได้เปอร์เซ็นต์ของสารสกัดหยาบใกล้เคียงกัน

2. ผลการวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (Total Phenolic content) ของสารสกัดหยาบจากแก่นมะหาดที่ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

2.1 นำสารละลายมาตรฐาน Gallic acid ความเข้มข้นต่างๆ ผสมกับ 10 % Folin-Ciocalteu phenol reagent และ 7.5 % โซเดียมคาร์บอเนต เก็บไว้ในที่มืดเป็นเวลา 1 ชั่วโมง นำไปวัดด้วยเครื่องอัลตราไวโอเลตวิสิเบิลสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (UV – VIS spectrophotometer) โดยวัดที่ความยาวคลื่น 725 นาโนเมตร เทียบกับชุดควบคุมที่ไม่มีสารตัวอย่าง โดยทำการวิเคราะห์ 3 ซ้ำ จะได้ผลการทดลองดังแสดงตารางที่ ก-1 (ภาคผนวก ก) เมื่อนำค่าที่ได้มาทำการพล็อตกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนคลื่นแสงและความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน จะได้กราฟที่มีสมการความชัน $y = 0.0663x + 0.054$ ที่มีค่า R^2 เท่ากับ 0.9997 ซึ่งมีค่าความน่าเชื่อถือใกล้เคียงกับ 1.0000 ดังภาพที่ 4.1



ภาพที่ 4.1 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนคลื่นแสงและความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน Gallic acid

2.2 นำสารสกัดหยาบเข้มข้น 10 µg/mL ผสมกับ 10 % Folin-Ciocalteu phenol reagent และ 7.5 % โซเดียมคาร์บอเนต เก็บไว้ในที่มืดเป็นเวลา 1 ชั่วโมง นำไปวัดด้วย UV – VIS spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 725 นาโนเมตร เทียบกับสารมาตรฐาน และนำค่าที่ได้มาทำการวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด จะได้ผลการทดลองดังแสดงตารางที่ ก-2 (ภาคผนวก ก) เมื่อนำค่าหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดหยาบจากแก่นมะหาด จะได้ผลดังแสดงข้อมูลในตารางที่ 4.2

ตารางที่ 4.2 แสดงปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดสารสกัดหยาบจากแก่นมะหาด

สารสกัดหยาบ	ปริมาณสารประกอบฟีนอลิก (mg GAE/g extract)			
	1	2	3	เฉลี่ย
เอทิลอะซิเตต	208.14	212.67	209.65	210.16 ± 2.30
เมทานอล	153.85	152.34	155.35	153.85 ± 1.51
เอทานอล	174.96	174.96	174.96	174.96 ± 0.00

จากผลการวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดในสารสกัดหยาบจากแก่นมะหาดโดยการสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ชนิดต่างๆ พบว่าสารสกัดหยาบชั้นเอทิลอะซิเตตจะมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกสูงสุด รองลงมาคือสารสกัดชั้นเอทานอลและเมทานอล เนื่องจากตัวทำละลายเอทิลอะซิเตตเป็นตัวทำละลายอินทรีย์ที่มีขั้วต่ำกว่าเอทานอลและเมทานอล ดังนั้นจึงสามารถสกัดสารพวกที่มีขั้วต่ำและขั้วสูงได้ในเวลาเดียวกันจึงสามารถสกัดสารสำคัญได้มากกว่า จากการสืบค้นข้อมูลพบว่า Nguyen และคณะ สามารถแยกสารประเภท triterpene สกัดชั้นเฮกเซนและเอทิลอะซิเตตของมะหาด (Nguyen, et al., 2010) นอกจากนี้ Povicit และคณะ สามารถแยกสารประเภทฟลาโวนอยด์ ซึ่งเป็นสารองค์ประกอบหลักในแก่นของมะหาด (Povicit, et al., 2010)

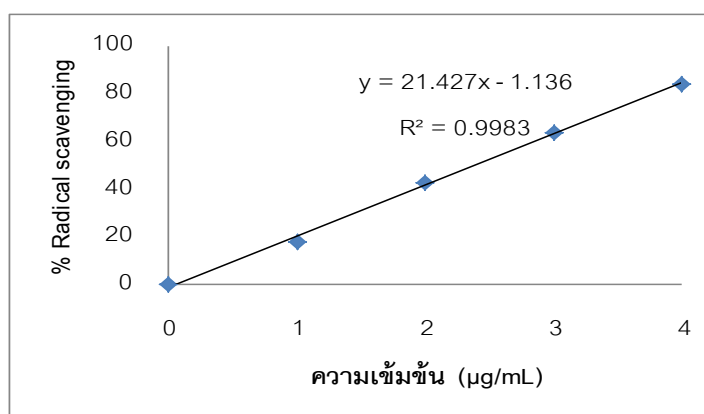
3. การตรวจสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยเทคนิคสคาเวนจิง (scavenging method) โดยวิธี DPPH ของสารสกัดจากแก่นมะหาด

3.1 จากการวิเคราะห์หาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยใช้วิตามินซีเป็นสารมาตรฐาน ที่ระดับความเข้มข้น 0, 1, 2, 3, 4 และ 5 µg/mL เมื่อผสมกับ 0.3 mM DPPH เขย่าให้เข้ากันและตั้งทิ้งไว้ในที่มืด 30 นาที นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 517 นาโนเมตร ด้วยเครื่องอัลตราไวโอเลตวิสิเบิลสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (UV – VIS Spectrophotometer) จะได้ค่าการดูดกลืนแสงและเมื่อคำนวณหาค่า % Radical scavenging ดังแสดงข้อมูลในตารางที่ ข-1 ถึง ข-2 (ภาคผนวก ข) โดยแสดงค่า % Radical scavenging เฉลี่ยในความเข้มข้นต่างๆ ดังแสดงในตารางที่ 4.3

ตารางที่ 4.3 แสดงค่า % Radical scavenging เฉลี่ยของสารละลายมาตรฐานวิตามินซี

ความเข้มข้น ($\mu\text{g/mL}$)	ค่า % Radical scavenging เฉลี่ย
0	0.000 ± 0.00
1	18.01 ± 0.07
2	42.47 ± 0.04
3	63.94 ± 0.04
4	84.17 ± 0.06
5	88.46 ± 0.00

เมื่อนำค่าที่ได้ไปทำการพล็อตกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า % Radical scavenging กับความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานจะได้กราฟดังแสดงในภาพที่ ข-1 (ภาคผนวก ข) พบว่าค่า % Radical scavenging จะเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานวิตามินซีและจะเริ่มคงที่เมื่อความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานวิตามินซีมากกว่า $4 \mu\text{g/mL}$ ดังนั้นเมื่อนำค่าความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานวิตามินซีตั้งแต่ 1 ถึง $4 \mu\text{g/mL}$ มาทำการพล็อตกราฟแสดงความสัมพันธ์กับค่า % Radical scavenging จะได้กราฟที่เป็นเส้นตรงที่สมการความชัน $y = 21.427x - 1.136$ ซึ่งจะมีค่า $R^2 = 0.9983$ ดังแสดงในภาพที่ 4.2 เมื่อคำนวณหาค่าความสามารถต้านอนุมูลอิสระ 50% (IC_{50}) ของสารละลายวิตามินซี จากสมการดังกล่าว จะมีค่าเท่ากับ $2.39 \mu\text{g/mL}$



ภาพที่ 4.2 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง % Radical scavenging กับความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานวิตามินซี

3.2 จากการวิเคราะห์หาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบขึ้นเอทิลอะซิเตต ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ จะได้ค่าการดูดกลืนคลีนแสงและเมื่อคำนวณหาค่า % Radical scavenging ดังแสดงข้อมูลในตารางที่ ข-3 ถึง ข-4 (ภาคผนวก ข) และโดยแสดงค่า % Radical scavenging เฉลี่ย ดังแสดงในตารางที่ 4.4

ตารางที่ 4.4 แสดงค่า % Radical scavenging เฉลี่ยของสารสกัดหยาบขึ้นเอทิลอะซิเตต

ความเข้มข้น ($\mu\text{g/mL}$)	ค่า % Radical scavenging เฉลี่ย
0	0.00 ± 0.00
20	23.31 ± 0.04
40	40.31 ± 0.04
60	57.21 ± 0.04
80	72.51 ± 0.06
100	87.48 ± 0.04

เมื่อทำการพล็อตกราฟหาความสัมพันธ์ระหว่าง % Radical scavenging กับความเข้มข้นต่างๆ ของสารสกัดหยาบจะได้กราฟเส้นตรงที่แสดงสมการค่าความชัน $y = 0.8599x + 3.8105$ และมีค่า $R^2 = 0.9937$ ดังแสดงในภาพที่ ข-2 (ภาคผนวก ข) เมื่อคำนวณหาค่าความสามารถต้านอนุมูลอิสระ 50% (IC_{50}) จะมีค่าเท่ากับ $53.71 \mu\text{g/mL}$

3.3 จากการวิเคราะห์หาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบขึ้นเมทานอล เมื่อคำนวณหาค่า Radical scavenging (%) จะได้ผลการคำนวณดังแสดงค่า % Radical scavenging เฉลี่ยดังแสดงในตารางที่ 4.5 เมื่อทำการพล็อตกราฟหาความสัมพันธ์ระหว่าง % Radical scavenging กับความเข้มข้นต่างๆ ของสารสกัดหยาบจะได้กราฟที่มีค่าความชัน $y = 0.7478x + 3.8586$ ดังแสดงในภาพที่ ข-3 (ภาคผนวก ข) เมื่อคำนวณหาค่าความสามารถต้านอนุมูลอิสระ IC_{50} ของสารสกัดหยาบขึ้นเมทานอลจะมีค่าเท่ากับ $61.70 \mu\text{g/mL}$

ตารางที่ 4.5 แสดงค่า % Radical scavenging เฉลี่ยของสารสกัดหยาบขึ้นเมทานอล

ความเข้มข้น ($\mu\text{g/mL}$)	ค่า % Radical scavenging เฉลี่ย
0	0.00 ± 0.00
20	21.58 ± 0.04
40	36.06 ± 0.04
60	49.54 ± 0.04
80	63.43 ± 0.04
100	76.89 ± 0.04

3.4 จากการวิเคราะห์หาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบขึ้นเมทานอล จะมีค่า % Radical scavenging เฉลี่ยดังแสดงในตารางที่ 4.6 เมื่อทำการพล็อตกราฟหาความสัมพันธ์จะได้กราฟดังแสดงในภาพที่ ข-4 (ภาคผนวก ข) เมื่อคำนวณหาค่า IC_{50} ของสารสกัดหยาบจากสมการ $y = 0.7614x + 3.7748$ จะมีค่าเท่ากับ $60.71 \mu\text{g/mL}$

ตารางที่ 4.6 แสดงค่า % Radical scavenging เฉลี่ยของสารสกัดหยาบขึ้นเมทานอล

ความเข้มข้น ($\mu\text{g/mL}$)	ค่า % Radical scavenging เฉลี่ย
0	0.00 ± 0.00
20	21.45 ± 0.04
40	36.64 ± 0.04
60	50.80 ± 0.04
80	63.85 ± 0.06
100	78.32 ± 0.04

จากผลการวิเคราะห์หาปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด และค่าความสามารถต้านอนุมูลอิสระ 50% (IC_{50}) ของสารสกัดหยาบจากแก่นมะหาด เมื่อนำมาเปรียบเทียบกับกันจะแสดงผลดังตารางที่ 4.7

ตารางที่ 4.7 ตารางเปรียบเทียบค่าความสามารถต้านอนุมูลอิสระ 50% (IC₅₀) ของสารสกัดหยาบเทียบกับสารละลายมาตรฐานวิตามินซี

สาร	IC ₅₀ (µg/mL)	ปริมาณสารประกอบฟีนอลิก (mg GAE/g extract)
สารละลายมาตรฐานวิตามินซี	2.39	-
สารสกัดหยาบชั้นเอทิลอะซิเตต	53.71	210.16 ± 2.30
สารสกัดหยาบชั้นเมทานอล	61.70	153.85 ± 1.51
สารสกัดหยาบชั้นเอทานอล	60.71	174.96 ± 0.00

จากตารางเปรียบเทียบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของสารมาตรฐานวิตามินซีและสารสกัดหยาบจากแก่นมะหาดชั้นต่างๆ พบว่าวิตามินซีจะมีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระดีกว่าสารสกัดหยาบจากแก่นมะหาดประมาณ 25 เท่า เมื่อเปรียบเทียบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบแต่ละชั้นมีฤทธิ์ที่ใกล้เคียงกัน โดยสารสกัดหยาบชั้นเอทิลอะซิเตตจะแสดงฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุด รองลงมาคือสารสกัดหยาบชั้นเอทานอล และเมทานอล ตามลำดับ ซึ่งผลของฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระจะสอดคล้องกับปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด พบว่าสารสกัดหยาบชั้นเอทิลอะซิเตตมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดสูงที่สุด จะแสดงฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุด เมื่อเทียบกับสารสกัดชั้นเมทานอล และเอทานอล (Singhatong et al., 2010)