บทที่ 4

ผลการวิเคราะห์ข้อมูล

การศึกษาด้านพฤกษเคมี

1. การตรวจสอบทางเคมีเบื้องต้นของสารสกัดสมุนไพร (Phytochemical screening)

นำสารสกัดหยาบที่ได้ไปทดสอบหากลุ่มสารสำคัญ ได้แก่ alkaloids, tannins, triterpenes, saponins, flavonoiods, anthraquinones, cardiac glycoside และ saponins พบสารสำคัญตามตาราง 2

ตาราง 2 องค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดสมุนไพร

Scientific name ชื่อไทย	Alkaloid	Condensed tannins	Phenolic compound	Triterpene	Steroid	Flavonois	Saponis	Antraquinone
Oroxylum indicum เพกา	+	-	+	-	+	+	-	-
Tiliacora triandra ย่านาง	-	+	-	+	-	+	+	-
Morinda citrfolia ยอ	-	-	+	-	+	+	-	-
Basella alba ผักปลัง	-	-	+	-	+	-	-	-
Syzygium gratum ผักเม็ก	-	-	+	-	+	-	-	-
Leucaena glauca กระถิน	+	+	-	-	+	+	+	-
Coraindrum sativa ผักชี	-	-	+	+	-	+	-	-
Piper sarmentosum	+	-	+	+	-	-	-	-

ชะพลู								
Polygonum odoratum ผักแพว	-	+	-	+	-	+	+	-
Sauropus androgyrus ผักหวานบ้าน	-	-	+	-	+	-	-	-

- ตรวจไม่พบ + ตรวจพบ

ผลการทดสอบการต้านฤทธิ์การก่อกลายพันธุ์ (antimutagenic activity)

จากการทดสอบฤทธิ์ต้านการก่อกลายพันธุ์ ด้วยวิธีของเอมส์ (Ames, 1972) ในเชื้อ *Salmonella typhimurium* สายพันธุ์ TA98 และ TA100 ในความเข้มข้นของสารสกัด 3.75, 7.5, 15 และ 30 มิลลิกรัม/เพลต แล้วคำนวณหา % ต้านการก่อกลายพันธุ์จากสูตร (Percent inhibition) และแปลผลดังนี้: ถ้าค่ามากกว่า 60 % จัดว่ามีฤทธิ์มาก, 40 – 60 % จัดว่ามีฤทธิ์ปานกลาง, 20 – 40% จัดว่ามีฤทธิ์น้อย และน้อยกว่า 20 %จัดว่าไม่มีฤทธิ์ (Yuan *et al.*, 1995) ผลการทดสอบ ตามตาราง 3

สารสกัดชะพลูแสดงฤทธิ์ต้านการก่อกลายพันธุ์ของเชื้อ *Salmonella* ระดับ " มาก " ทั้งสองสายพันธุ์ คือ ชะพลู ย่านาง กระถิน ผักปลัง และมีฤทธิ์ยับยั้งระดับ " มาก " ในสายพันธุ์ TA 98 คือ เพกา ยอ ผักปลัง ผักเม็ก ผักชี กระถิน ผักชี ในขณะที่ ผักแพว มีฤทธิ์ยับยั้งการก่อกลายพันธุ์ระดับ " มาก " ในสายพันธุ์ TA 10 ส่วนสารสกัดจากยอ มีบางความเข้มข้นให้ผลในระดับ"น้อย" ทั้งสองสายพันธุ์

ตาราง 3 Antimutagenic activity of the herbal extracts

Family name	Scientific name	Concentration (mg/plate)	%Inhibition	
			TA 98	TA100
Bignoniaceae	*Oroxylum indicum* เพกา	3.75	75.43 ± 3.83	-13.16 ± 2.16
		7.5	84.38 ± 1.77	-14.43 ± 3.89
		15	89.91 ± 2.07	21.39 ± 1.03
		30	97.95 ± 3.76	35.06 ± 1.53
Menispermaceae	*Tiliacora triandra* ย่านาง	3.75	44.84 ± 8.98	43.26 ± 3.46
		7.5	47.65 ± 4.10	47.74 ± 1.08
		15	50.09 ± 2.56	48.63 ± 1.77
		30	51.37 ± 5.73	58.84 ± 10.81
Rubiaceae	*Morinda citrfolia* ยอ	3.75	8.09 ± 1.94	3.75 ± 0.75
		7.5	37.33 ± 2.13	27.63 ± 1.19

		15	51.52 ± 0.11	57.59 ± 10.33
		30	74.30 ± 15.57	78.49 ± 3.10
Basellaceae	*Basella alba* ผักปลัง	3.75	77.48 ± 1.41	54.06 ± 1.52
		7.5	82.71± 5.33	59.77 ± 2.64
		15	83.84 ± 2.28	63.02 ± 6.83
		30	86.08 ± 2.78	63.11 ± 2.54
Myrtaceae	*Syzygium gratum* ผักเม็ก	3.75	83.26 ± 7.21	-42.30 ± 4.78
		7.5	86.96 ± 2.10	6.23 ± 1.99
		15	85.68 ± 1.12	21.15 ± 1.36
		30	91.85 ± 2.20	45.43 ± 2.12
Mimosaceae	*Leucaena glauca* กระถิน	3.75	65.99 ± 3.00	61.49 ± 9.22
		7.5	64.87 ± 8.00	57.07 ± 2.85
		15	62.14 ± 2.60	55.25 ± 3.05
		30	89.29 ± 2.90	40.73 ± 13.92
Umbelliferae	*Coraindrum sativa* ผักชี	3.75	62.87 ± 12.71	-0.18 ± 0.12
		7.5	69.13 ± 2.94	-12.89 ± 1.31
		15	76.41 ± 13.04	-24.24 ± 6.85
		30	91.24 ± 9.84	85.1 ± 9.78
Piperaceae	*Piper sarmentosum* ชะพลู	3.75	87.67 ± 2.61	79.66 ± 1.51
		7.5	88.46 ± 9.82	75.72 ± 9.76
		15	91.02 ± 2.15	82.35 ± 11.48
		30	97.24 ± 9.44	91.33 ± 2.42
Polygonaceae	*Polygonum odoratum* ผักแพว	3.75	28.92 ± 4.76	64.48 ± 11.57
		7.5	29.69 ± 7.93	67.12 ± 1.55
		15	48.15 ± 3.51	78.78 ± 2.43
		30	70.49 ± 8.77	76.59 ± 12.76
Euphorbiaceae	*Sauropus androgyrus* ผักหวานบ้าน	3.75	83.55 ± 13.92	14.49 ± 1.48
		7.5	88.72 ± 16.07	42.52 ± 2.09
		15	89.25 ± 4.01	43.64 ± 2.83
		30	94.42 ± 5.79	44.58 ± 6.25

ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

จากผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ของสารสกัดสมุนไพรผักพื้นบ้าน ทั้ง 10 ชนิด เปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน ascorbic acid ด้วยวิธี DPPH scavenging method พบว่า สารสกัดจาก เพกา แสดงฤทธิ์ดีที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับสารสกัดสมุนไพรอื่น โดยให้ค่า EC 50 เท่ากับ 12.69 ± 1.02 μg/ml แต่ฤทธิ์น้อยกว่า สารมาตรฐาน Ascorbic acid ซึ่งให้ค่า EC 50 เท่ากับ 5.61 ± 0.37 μg/ml สารสกัดสมุนไพรผักพื้นบ้านที่แสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ รองลงมา คือ ผักแพว ย่านาง กระถิน ผักเม็ก ยอ ชะพลู ผักปลัง ผักชี และผักหวานบ้าน ตามลำดับ จากการทดสอบทางสถิติ พบว่า เพกา ผักแพว ย่านาง กระถิน เท่ากัน โดยมีฤทธิ์รองลงมาจากสารมาตรฐาน ascorbic acid ($P \leq 0.05$) รายละเอียดดังแสดงในตาราง 4

ตาราง 4 Free radical scavenging activity of the herbal extracts [1]

Family name	Scientific name	50% DPPH scavenging activity (EC_{50} μg/ml)
Bignoniaceae	*Oroxylum indicum* เพกา	12.69 ± 1.02 [B] *
Menispermaceae	*Tiliacora triandra* ย่านาง	14.51 ± 0.67 [B]
Rubiaceae	*Morinda citrfolia* ยอ	36.27 ± 1.08 [D]
Basellaceae	*Basella alba* ผักปลัง	102.99 ± 4.37 [F]
Myrtaceae	*Syzygium gratum* ผักเม็ก	31.91 ± 2.20 [C]
Mimosaceae	*Leucaena glauca* กระถิน	19.44 ± 0.20 [B]
Umbelliferae	*Coraindrum sativa* ผักชี	111.25 ± 12.35 [F]
Piperaceae	*Piper sarmentosum* ชะพลู	58.87 ± 3.89 [E]
Polygonaceae	*Polygonum odoratum* ผักแพว	12.71 ± 0.28 [B]
Euphorbiaceae	*Sauropus androgyrus*	179.11 ± 15.11 [G]

	ผักหวานบ้าน	
Ascorbic acid		5.61 ± 0.37 [A]

[1] ทดสอบด้วยวิธี DPPH scavenging method

* อักษรที่ต่างกันในคอลัมน์เดียวกัน แสดงถึงค่าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) (One-way ANOVA)

การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียโดยวิธี disk diffusion method และ macro broth dilution method

2.3.1 การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรค ด้วยวิธี disk diffusion method จากการนำสารสกัดสมุนไพรผักพื้นบ้าน จำนวน 10 ชนิด ที่ความเข้มข้น5 mg/ml มาทดสอบประสิทธิภาพการยังยั้งการเจริญของเชื้อ แบคทีเรีย จำนวน 3 ชนิด คือ *Staphylococcus aureus* ATTC 25923 , *Esherichia coli* ATTC 25922 และ *Psudomonas aeruginosa* ATCC 27853 พบว่าสารสกัด 10 ชนิดสามารถยังยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียได้ แต่ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้เพียงชนิดเดียวคือ *S. aureus* ซึ่งสารสกัดจากผักพื้นบ้านทั้ง 10 ชนิดมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ แบคทีเรียได้แตกต่างกัน แต่สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้เพียงชนิดเดียวคือ *S. aureus* ซึ่งพบว่าสารสกัดจาก ผักเม็ก ยับยั้งได้ดีที่สุด จากการหาค่าความเข้มข้นน้อยที่สุดในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย (Minimum inhibitory concentration,MIC) ของสารสกัดต่อการยับยั้งแบคทีเรียที่ใช้ทดสอบ โดยพบว่า สารสกัดจาก**ชะพลู** ให้ค่า MIC น้อยที่สุดคือ 4 mg/ml ต่อเชื้อ *S. aureus* , *E. coli* ส่วนค่า MIC ของสารสกัดสมุนไพรผักพื้นบ้านอื่น ต่อเชื้อทั้ง 3 ชนิด มีค่ามากกว่า 16 mg/ml (ออกฤทธิ์ไม่ดี)

ตาราง 5 ผลการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของสมุนไพรผักพื้นบ้าน

ชนิดผักพื้นบ้าน	ผลการยับยั้งเชื้อโดยวัดเส้นผ่านศูนย์กลาง inhibiton zone (mm.)			ค่า MIC (mg/ml)		
	S .aureus	*E .coli*	*Ps. aeruginosa*	*S.aureus*	*E.coli*	*Ps. aeruginosa*
ผักแพว	8.00	-	-	›16	›16	›16
ผักเม็ก	10.00	-	-	›16	›16	›16
ผักชี	8.00	-	-	›16	›16	›16
ผักปลัง	8.00	-	-	›16	›16	›16
เพกา	-	-	-	›16	›16	›16
ยอ	-	-	-	›16	›16	›16
ชะพลู	9.00	-	-	4	4	›16
ย่านาง	-	-	-	›16	›16	›16
กระถิน	7.60	-	-	16	›16	›16
ผักหวานบ้าน	7.60	-	-	›16	›16	›16
amoxicillin 10mcg/disk	10.00	-	-	N/A	N/A	N/A
Norfloxacin	-	20.00	-	N/A	N/A	N/A

- หมายถึง ไม่เกิด inhibition zone

- N/A หมายถึง ไม่ได้ทดสอบ

[1] ทดสอบด้วยวิธี Disk diffusion method โดยขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของ disk เท่ากับ 5.5 มิลิเมตร

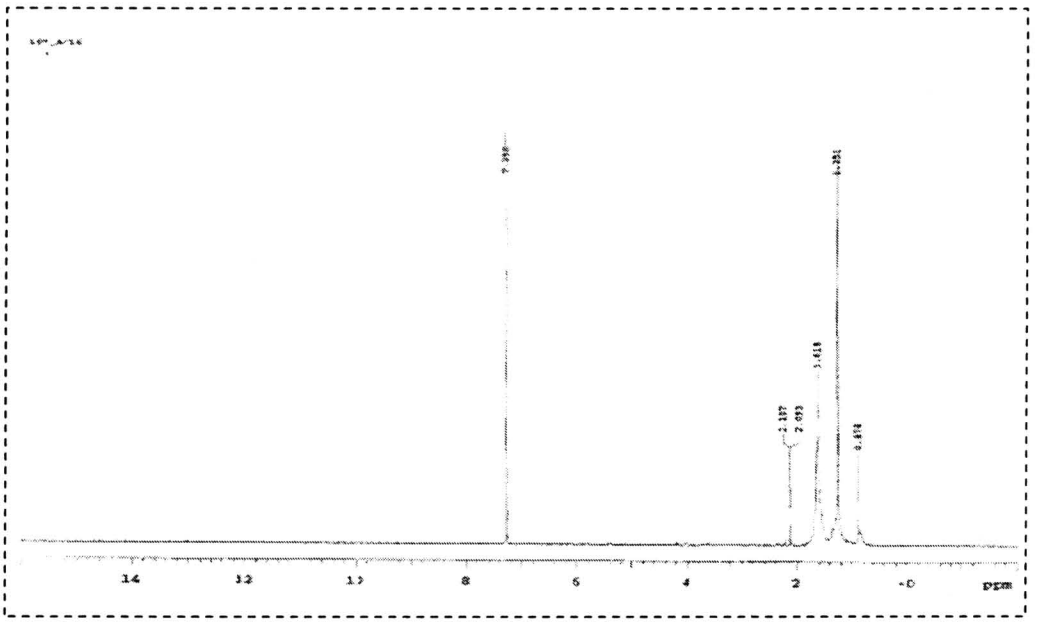
[2] ทดสอบด้วยวิธี Macro broth dilution method

ผลการพิสูจน์สูตรโครงสร้างของสารประกอบ A

การตรวจสอบด้วยเทคนิค Spectroscopy

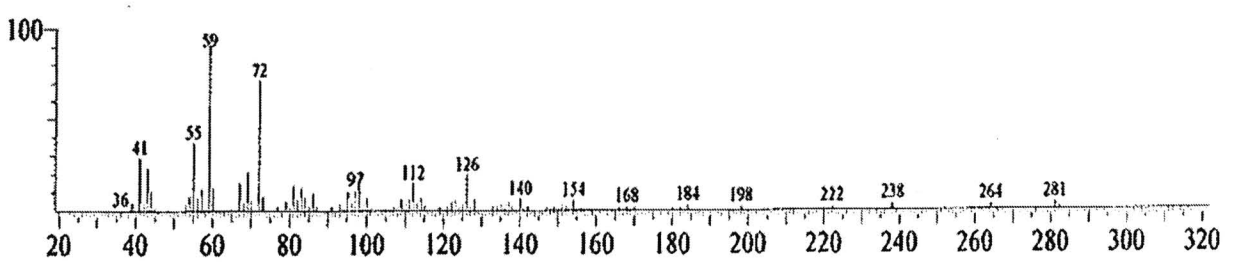
ข้อมูล **^{1}H-NMR** spectrum, IR spectrum, MS spectrum ดังมีรายละเอียดดังนี้

ตาราง 5 ^{1}H-NMR (400 MHz, CD_3OD) data of compound A

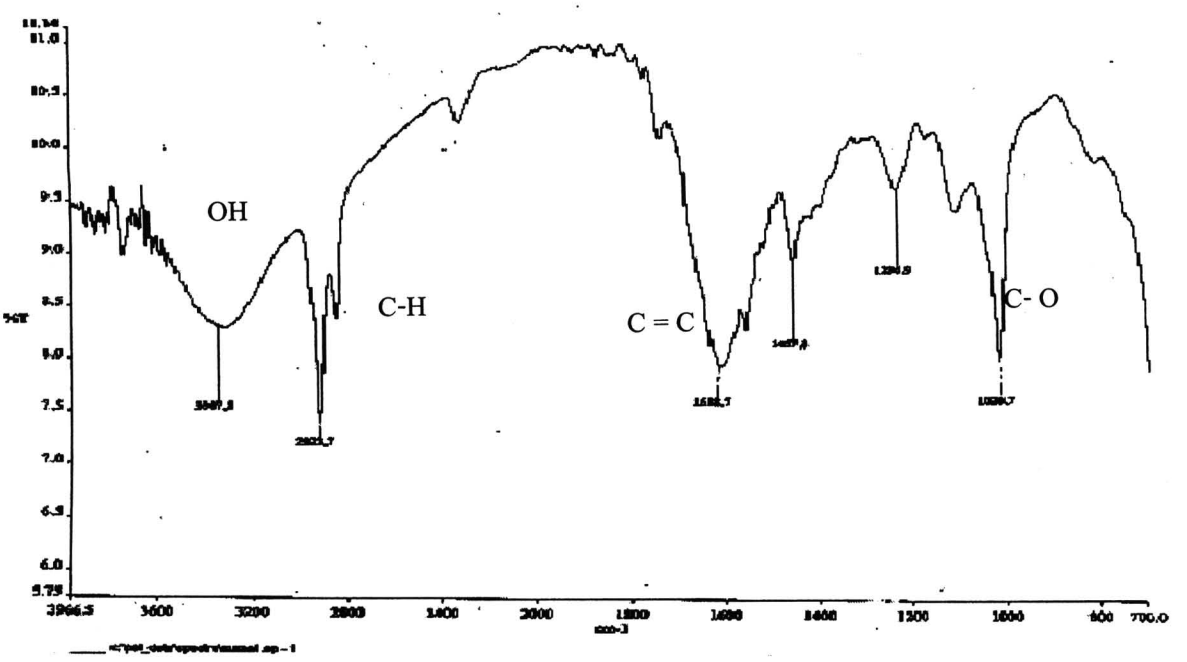


ภาพประกอบ 9 ^{1}H-NMR spectrum (400 MHz, CD_3OD) ของสารประกอบ A

จาก mass spectrum พบว่า มี M+ (Molar mass) เท่ากับ 281 แสดงว่ามี Nitrogen ในโมเลกุล เทียบเท่ากับสารประกอบที่มีสูตรโมเลกุลคือ $C_{17}H_{15}NO_3$



ภาพประกอบ 10 Mass spectrum ของสารประกอบ A



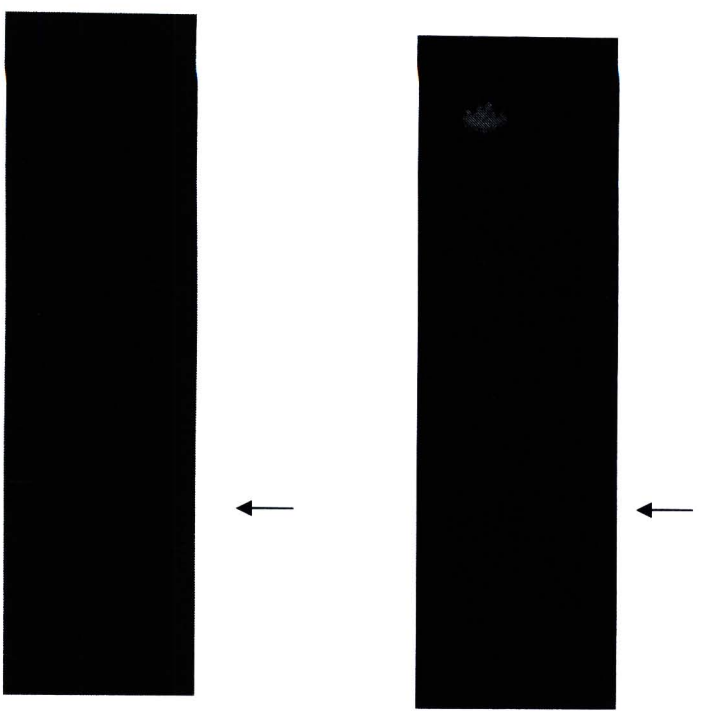
ภาพประกอบ 11 IR spectrum ของสารประกอบ A

การพิสูจน์เอกลักษณ์ด้วยปฏิกิริยาเคมี

นำสารละลายของสารประกอบ A มาทดสอบกับ น้ำยาทุดสอบ Mayer's reagent ให้ผลบวก แสดงว่าเป็นสาร Alkaloid (มี Nitrogen ในโมเลกุล) ให้ผลบวกกับ $FeCl_3$'s test แสดงว่าเป็น Phenolic compounds

การพิสูจน์เอกลักษณ์ด้วย TLC

นำสาร A ไปละลาย Methanol แล้วนำไป spot บนแผ่น TLC สามารถดูดกลืนแสงที่ 254 nm เรืองแสงสีดำ-แดง ที่ความยาวคลื่น 366 nm และ พบว่าเป็นสารสีเหลืองอ่อน ที่ visible light ภาพประกอบ 8

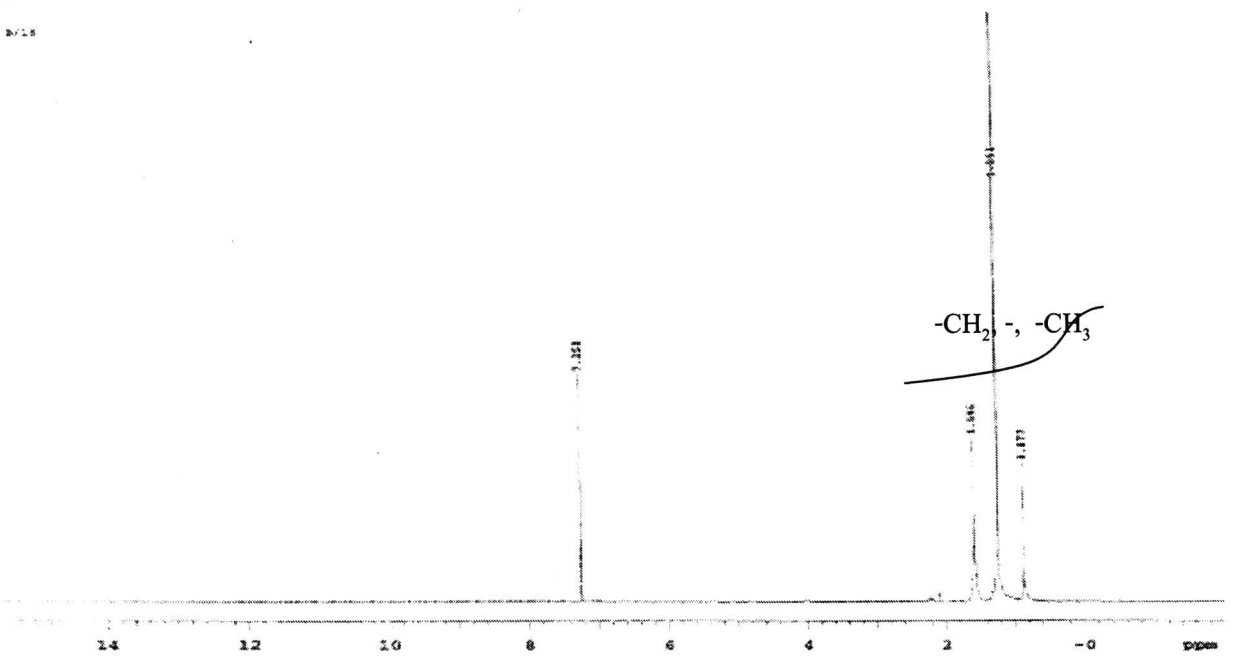


ภาพประกอบ 12 TLC Chromatogram ของ Crude extract (1) และสารประกอบ A โดยใช้ระบบตัวทำละลายคือ $CHCl_3$: MeOH (9: 1) ตรวจวัดที่ 254 nm(A), ที่ 366 nm(B)

ผลการพิสูจน์สูตรโครงสร้างของสารประกอบ B

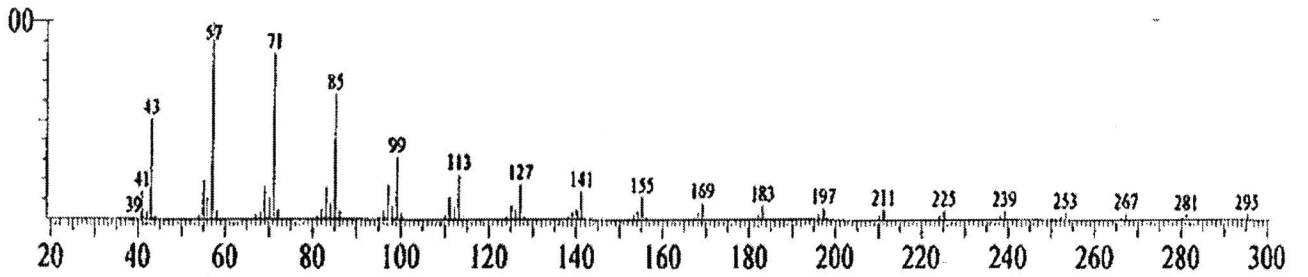
การตรวจสอบด้วยเทคนิค Spectroscopy

จากข้อมูล **^{1}H-NMR** spectrum, spectrum, IR spectrum, MS spectrum ของสารประกอบ B ตามรายละเอียดต่อไปนี้

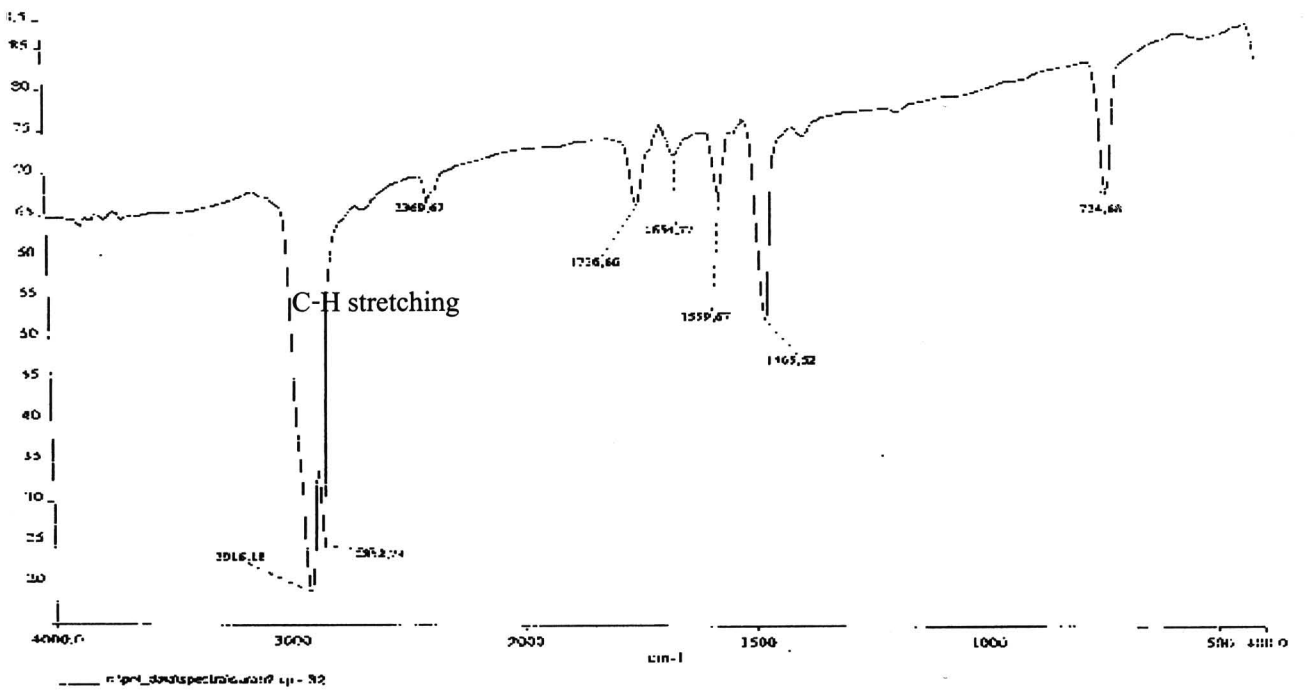


ภาพประกอบ 13 ^{1}H-NMR spectrum (400 MHz, CD_3OD) ของสารประกอบ B

จาก mass spectrum พบว่า มี m/z ท้ายสุด (Molar mass) เท่ากับ 295 (M^+ - 1) จาก IR spectrum ไม่มี Nitrogen สูตรโมเลกุลที่เข้าได้คือ $C_{21}H_{44}$ ดังนั้น Molar mass เท่ากับ 296



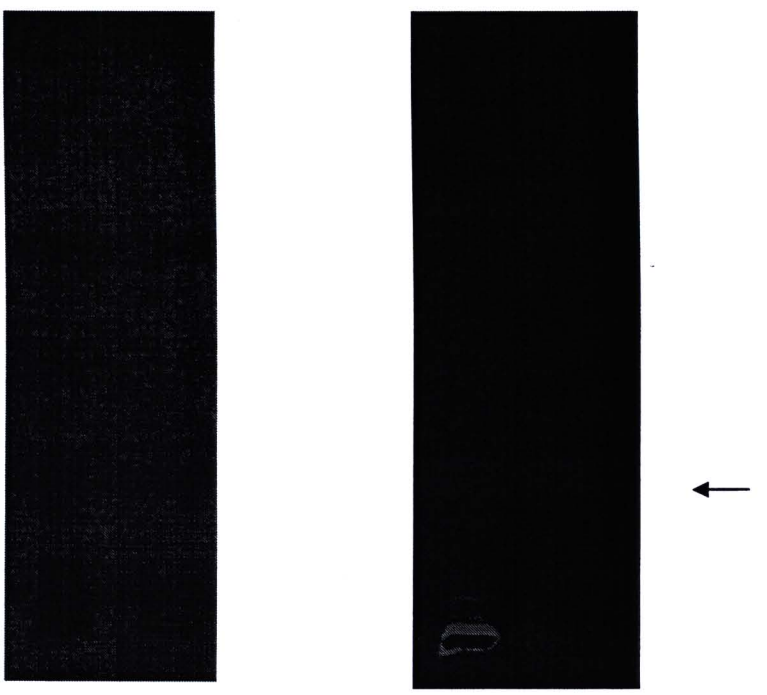
ภาพประกอบ 14 Mass spectrum ของสารประกอบ B



ภาพประกอบ 15 IR spectrum ของสารประกอบ A

การพิสูจน์เอกลักษณ์ด้วย TLC

นำสาร A ไปละลาย Chloroform แล้วนำไป spot บนแผ่น TLC หลังจาก develop ด้วย solvent system แล้วตรวจสอบภายใต้แสง UV ที่ความยาวคลื่น 254 nm ไม่พบ Spot ใดๆ แต่เมื่อนำไปตรวจสอบด้วยแสง UV ที่ความยาวคลื่น 366 nm จะเรืองแสงสีฟ้า (ภาพประกอบ 12)



1 2 1 2

ภาพประกอบ 16 TLC Chromatogram ของ Crude extract (1) และสารประกอบ B โดยใช้ระบบตัวทำละลายคือ Hexane : $CHCl_3$: (8:2) ตรวจสอบภายใต้แสง UV ความยาวคลื่น 254 nm(A), และ 366 nm(B),

การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้

1) ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านการก่อกลายพันธุ์

จากการทดสอบฤทธิ์ทางต้านการกลายพันธุ์ ของสารที่แยกได้จากใบย่านาง โดยใช้ความเข้มข้นของสารประกอบ A และ B ระหว่าง 0.25 mg/plate – 2 mg/plate พบว่า สาร A มีฤทธิ์ต้านการก่อกลายพันธุ์ในระดับ "มาก" ทั้งใน TA 98 และ TA 100 ส่วนสารประกอบ B มีฤทธิ์ต้านการก่อกลายพันธุ์ส่วนใหญ่อยู่ในระดับปานกลาง (รายละเอียดตามตาราง 6)

ตาราง 6 Antimutagenic activity of the isolated compounds

Compounds	Concentration (mg/plate)	%Inhibition	
		TA 98	TA100
A	0.25	35.88 ± 13.97	62.22 ± 12.17
	0.5	45.55 ± 24.50	45.89 ± 7.25
	1	48.32 ± 5.76	50.63 ± 3.92
	2	71.72 ± 8.21	61.56 ± 2.72
B	0.25	31.02 ± 0.41	18.99 ± 2.97
	0.5	8.74 ± 2.19	15.65 ± 11.97
	1	21.38 ± 8.77	28.83 ± 8.85
	2	62.25 ± 15.61	39.97 ± 4.86

จากการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ของสารประกอบ A, B และ สารมาตรฐาน ascorbic acid พบว่า ascorbic acid มีฤทธิ์ดีที่สุด รองลงมาคือสาร A และ สาร B ตามลำดับ และจากทดสอบทางสถิติพบว่าผลเป็นเช่นเดียวกันกับที่กล่าวมา ($P < 0.05$) รายละเอียดดังแสดงตามตาราง 7

ตาราง 7 Free radical scavenging activity of the isolated compounds

Compounds	EC_{50} of DPPH assay (μg/ml)
A	26.31 ± 0.03^{B}
B	103.67 ± 0.16^{C}
Ascorbic acid	5.26 ± 0.57^{A}

[1] ทดสอบด้วยวิธี DPPH scavenging method

* อักษรที่ต่างกันในคอลัมน์เดียวกัน แสดงถึงค่าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) (One-way ANOVA)