

บทที่ 5

อภิปรายผล สรุปผล และข้อเสนอแนะ



อภิปรายผล

1. การศึกษาด้านพิษเคมี

1.1 การตรวจสอบกลุ่มสารเบื้องต้น

จากการทดสอบสารกลุ่ม phenolic compounds flavonoids และ steroids พบในสมุนไพรผักพื้นบ้านเกือบทุกชนิด ซึ่งสารดังกล่าวนับว่าเป็นสารทุติยภูมิ (secondary metabolites) พื้นฐานที่พบได้ทั่วไปในพืช (Stahl W. 2003) การตรวจพบสารจำพวก flavonoids ในเพกา สอดคล้องกับงานวิจัยของ Roy MK (2007) ที่พบสาร Baicalein ซึ่งเป็น flavonoid ชนิดหนึ่ง จากการศึกษายังพบสารกลุ่ม Alkaloid ในเพกาและกระถิน แต่ไม่พบในพืชชนิดอื่นรวมทั้งย่านาง ต่างจากการศึกษาของ นักวิจัยที่รายงานพบสารจำพวก alkaloid ในรากย่านาง (Chalerm Saiin และ Sutthatip Markmee, 2003) อาจจะเนื่องมาจากการศึกษาครั้งนี้ ใช้ใบในการศึกษา จึงมีสารจำพวก alkaloid ดังกล่าวน้อยจึงตรวจไม่พบ จากการศึกษาไม่พบสารจำพวก Anthraquinone ในพืชสมุนไพรผักพื้นบ้านชนิดใดเลย อาจเป็นเพราะว่า สารจำพวก Anthraquinone จะพบได้ในสมุนไพรที่มีฤทธิ์เป็นยาระบายเท่านั้น ส่วนพืชที่ใช้ในการศึกษา ไม่มีสรรพคุณเด่นในด้านเป็นยาระบายเลย

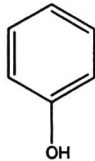
1.2 การแยกสารสำคัญ และพิสูจน์สูตรโครงสร้าง

1.2.1 การแยกสาร A และ การพิสูจน์สูตรโครงสร้าง

จากการแยกสารสำคัญพบว่า เป็นสารที่ถูกชะด้วย mobile phase คือ ethyl acetate : methanol (1:1) แสดงว่าเป็นสารที่ค่อนข้างมีขั้วหรือมีขั้วปานกลาง จาก $^1\text{H-NMR}$ spectrum พบสัญญาณส่วนใหญ่อยู่ระหว่าง 1- 2.2 ppm แสดงว่า เป็นสัญญาณโปรตอนของ $-\text{CH}_2-$ และ $-\text{CH}_3-$ แต่ส่วนใหญ่สัญญาณทับซ้อนกัน พบ สัญญาณโปรตอนที่ 7.3 ppm (สัญญาณไม่สมบูรณ์) เป็นสัญญาณโปรตอนของ aromatic ring อย่างไรก็ตาม H-NMR spectrum นี้ อาจเป็นสัญญาณ ที่ไม่สมบูรณ์สัญญาณไม่ชัดเจน จึงทำให้ไม่ทราบว่ามีจำนวนโปรตอน จาก Mass spectrum พบ molar mass $[\text{M}^+]$ เท่ากับ 281 ซึ่งทำให้ทราบว่า มี Nitrogen อะตอม และอาจเทียบได้กับสารที่มีสูตรเคมีคือ $\text{C}_{17}\text{H}_{15}\text{NO}_3$ จาก IR spectrum เห็นสัญญาณที่เด่นชัด ประมาณ 3,000-3,400 cm^{-1} เป็นสัญญาณของ $-\text{OH}$ ส่วนสัญญาณที่ 2800 – 2900 cm^{-1} เป็นสัญญาณของ C-H stretching สัญญาณปานกลาง ที่ 1,600 cm^{-1} เป็นสัญญาณของ $-\text{C}=\text{C}-$ ซึ่งแสดงว่าในโมเลกุลมีพันธะคู่

จากการตรวจสอบด้วย ปฏิกริยาเคมี โดยให้ผลบวกกับน้ำยาทดสอบ Mayer's reagent แสดงว่าเป็นสาร Alkaloid (มี Nitrogen ในโมเลกุล) และให้ผลบวกกับ FeCl_3 's testing solution แสดงว่าสารนี้เป็นสาร phenolic compound ในโมเลกุล จากการตรวจสอบด้วย TLC สามารถดูดกลืนแสง UV ได้เนื่องจากตรวจพบ spot ที่ 254 nm จะเห็นเป็น spot สีดำ แสดงว่าสารดังกล่าวมี Chromophor โดยที่ Chromophor ของสารนี้ที่เป็นไปได้มากที่สุดคือ Benzene ring (จากข้อมูลอื่นๆ ที่กล่าวมา)

จากข้อมูลดังกล่าว ทำให้ไม่ทราบสูตรโครงสร้างที่แน่นอน แต่สรุปได้ว่ามี อะตอมและหมู่ฟังก์ชันที่สำคัญได้แก่



Phenolic compound

- N (nitrogen หรือ amine)

- OH (hydroxyl group)

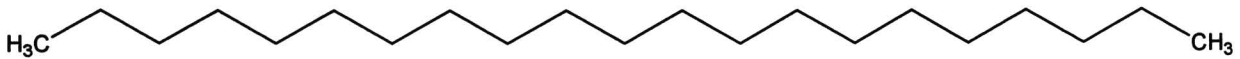
- CH₂- / -CH₃- และ -C-O -

จากข้อมูลสรุปได้ว่า สาร A เป็นสารกลุ่ม alkaloid ซึ่งยังไม่ทราบโครงสร้างที่แน่นอน ในที่นี้จะใช้คำว่า Phenolic alkaloid A จึงควรจะมีการหาสูตรโครงสร้างที่แน่นอนอีกครั้งหนึ่ง โดยต้องมีข้อมูล H-NMR, C-NMR, รวมทั้งข้อมูล ที่เป็น 2D spectrum ของ NMR เช่น HSQC, HMBC เป็นต้น จากบททวนเอกสารพบว่า นักวิจัยท่านอื่น ยังใช้คำว่า Unknown alkaloid ที่มี molar mass เท่ากับ 281 (Rosemann GM, 2006)

1.2.2 การแยกสาร B และ การพิสูจน์สูตรโครงสร้าง

จากการแยกสารที่เป็นการแยกชุดเดียวกันกับสาร A พบว่า สาร B เป็นสารที่ถูกชะด้วย mobile phase คือ hexane : dichloromethane (80:20) แสดงว่าเป็นสารที่มีขั้วน้อย ง จาก ¹H-NMR spectrum พบสัญญาณส่วนใหญ่อยู่ระหว่าง 1- 2.0 ppm แสดงว่า เป็นสัญญาณโปรตอนของ -CH₂- และ -CH₃- แต่ส่วนใหญ่สัญญาณทับซ้อนกัน พบ สัญญาณโปรตอนที่ 7.3 ppm (สัญญาณไม่สมบูรณ์) เป็นสัญญาณโปรตอนของ aromatic ring อย่างไรก็ตาม H-NMR spectrum นี้ อาจเป็นสัญญาณ ที่ไม่สมบูรณ์สัญญาณ เนื่องจากข้อมูลต่อๆ ไปพบว่า ไม่พบ aromatic ring ในสูตรโครงสร้างของสาร B จาก Mass spectrum พบ peak สุดท้ายเป็นเท่ากับ 295 ซึ่งน่าจะเป็น peak ของ [M⁺ - H] เนื่องจาก จากการตรวจสอบด้วยปฏิกิริยาเคมี และ จาก spectrum ของ IR ไม่มี สัญญาณของ N และจากการตรวจสอบด้วยปฏิกิริยาสี ไม่ใช่สารกลุ่ม alkaloid (ไม่มี Nitrogen) ดังนั้น Molar mass [M⁺] เท่ากับ 296 และอาจเทียบได้กับสารที่มีสูตรเคมีคือ C₂₁H₄₄ จาก IR spectrum เห็นสัญญาณที่เด่นชัดแห่งเดียวคือสัญญาณด้านขวาของ 3,000 cm⁻¹ เป็นสัญญาณของ C-H stretching ไม่พบสัญญาณที่แสดงถึงการมีธาตุ Oxygen หรือ Nitrogen จากการตรวจสอบด้วย ปฏิกิริยาเคมี โดยให้ผลลบกับ น้ำยาทดสอบ Mayer's reagent แสดงว่าไม่ใช่สาร Alkaloid (ไม่มี Nitrogen ในโมเลกุล) และให้ผลลบกับ FeCl₃ 's testing solution แสดงว่าสารนี้เป็น ไม่ใช่สารจำพวก phenolic compound จากการตรวจสอบด้วย TLC ภายใต้อุณหภูมิที่ 254 nm จะไม่เห็น spot สีดำ แสดงว่าสารดังกล่าวไม่มี Chromophor แสดงว่าสารนี้ ไม่มี ลักษณะ ที่เป็น aromatic ring, หรือ ไม่มี carbonyl group เป็นต้น

จาก mass spectrum พบว่าทุก peak เหมือนกันกับข้อมูล mass spectrum ของ *n*-Henicosane (Munawwer, 2004) ซึ่งเป็นสารจำพวก alkane สายยาว ตามสูตรโครงสร้างดังด้านล่าง



การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดและสารที่แยกได้

ฤทธิ์ด้านการก่อกลายพันธุ์

สารหลักที่แสดงฤทธิ์ การก่อกลายพันธุ์ที่ได้จาก nitrite treated 1-aminopyrene ในการศึกษาครั้งนี้ คือ 1-nitropyrene จากการทดสอบฤทธิ์ด้านการก่อกลายพันธุ์ พบว่าสารสกัดชะพลูแสดงฤทธิ์ด้านการก่อกลายพันธุ์ของเชื้อ *Salmonella* ระดับ “มาก” ทั้งสองสายพันธุ์คือ ชะพลู ย่านาง กระถิน ผักปลัง และมีฤทธิ์ยับยั้งระดับ “มาก” ในสายพันธุ์ TA 98 คือ เพกา ยอ ผักเม็ก ผักชี ในขณะที่ ผักแพว มีฤทธิ์ยับยั้งการก่อกลายพันธุ์ระดับ “มาก” ในสายพันธุ์ TA 100 ส่วนสารสกัดจากผลยอ มีบางความเข้มข้นให้ผลในระดับ “น้อย” ทั้งสองสายพันธุ์ ผลการศึกษาของพืชสมุนไพรผักพื้นบ้านครั้งนี้สอดคล้องกับงานวิจัยที่มีการศึกษาก่อนหน้านี้ เช่น การศึกษาของ Yen *et al.* (2001) พบว่าผักปลังมีฤทธิ์ด้านการก่อกลายพันธุ์ของ 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline (IQ) ใน *S. typhimurium* TA 98 และ TA 100 ฤทธิ์ด้านการก่อกลายพันธุ์ครั้งนี้ อาจมาจากกลุ่มสารที่เรียกว่า phenolic compounds หรือ สารจำพวก flavonoids โดยมีรายงานของสารกลุ่มนี้ มีฤทธิ์ด้านการก่อกลายพันธุ์ที่แรง (Edenharder *et al.*, 1997) นอกจากนี้ยังมีรายงานว่า phenolic compounds ที่พบในน้ำผลไม้เป็นส่วนสำคัญในการแสดงฤทธิ์ antimutagenic (Mitscher *et al.*, 1992)

จากการศึกษาของ Jayaprakasha *et al.* (2007) พบว่า สารสกัดจากผักปลังมีฤทธิ์ antimutagenic ที่แรง โดย Hour *et al.*, (1999) ได้เสนอกลไกที่ทำให้สารสกัดจากผักปลังมีฤทธิ์ดังกล่าวที่ดีคือ สารสกัดผักปลังที่มีสารจำพวก phenolic compounds อาจจะไปยับยั้งการขนส่ง mutagen ไปยัง cytosol โดยสารจำพวก phenolic compound จะจับกับโปรตีนที่ใช้ในการขนส่ง ที่ Outer membrane

จากรายงานพบว่าสารที่มีฤทธิ์ด้านการก่อกลายพันธุ์และด้านมะเร็งมักจะพบในอาหารที่มาจากพืชผัก (Wannee RK *et al.*, 1998) และจากการศึกษาครั้งนี้พบว่า สมุนไพรผักพื้นบ้านที่มีฤทธิ์ด้านการก่อกลายพันธุ์ที่ดี ได้แก่ ชะพลู เพกา ย่านาง ผักปลัง ผักเม็ก กระถิน ผักชี และ ผักแพว ควรจะได้รับการส่งเสริมให้ประชาชนบริโภคเพื่อเป็น สมุนไพรผักพื้นบ้านเพื่อสุขภาพต่อไป

จากผลการทดสอบสารประกอบ A (alkaloid) และ สารประกอบ B (*n*-Henicosane) โดยความเข้มข้นที่ใช้ทดสอบคือ 0.25 – 2 mg/plate ผลจากการทดสอบส่วนใหญ่อยู่ในระดับ “มาก” ส่วนสาร B ส่วนใหญ่อยู่ในระดับปานกลาง ตามความเข้มข้น นั้นแสดงว่า สารบริสุทธิ์ของสารที่แยกได้ก็มีศักยภาพในการป้องกันการก่อกลายพันธุ์ที่ดีด้วย

การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ของสารสกัดสมุนไพรผักพื้นบ้าน เปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน ascorbic acid ด้วยวิธี DPPH scavenging method พบว่า เพกา รองลงมา คือ ผักแพว ย่านาง กระถิน ผักเม็ก ขอ ชะพลู มีฤทธิ์ดี เมื่อเปรียบเทียบกับผลการต้านอนุมูลอิสระของ ascorbic acid ส่วนสารสกัดจาก ผักปลั่ง ผักชี และผักหวานบ้าน ซึ่งให้ค่า EC_{50} มากกว่า $100 \mu\text{g/ml}$ ในขณะที่ ascorbic acid ให้ค่า EC_{50} เท่ากับ $5.61 \pm 0.37 \mu\text{g/ml}$ (ค่า EC_{50} น้อยแสดงว่ามีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ดี) จากรายงานของ Su BN (2005) พบว่าสารสกัดจากลูกข่อย มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ดีเช่นกัน นอกจากนี้ยังมีรายงานว่า สารสกัดจากผักแพวยังมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ดีด้วย (Pannangpetch *et al.*, 2002). อนึ่งเป็นที่ทราบกันว่าสารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ อาจช่วยป้องกันโรคหัวใจ ผิวหนังเหี่ยวย่น เบาหวาน อัลไซเมอร์ (Comelli. 2009) รวมทั้งการป้องกันโรคมะเร็ง (Blot *et al.*, 1993 and Omenn *et al.*, 1994) ดังนั้น สมุนไพรผักพื้นบ้านเหล่านี้จึงเป็นพืชที่น่าสนใจในการศึกษาค้นคว้าเพิ่มเติมต่อไป จากผลของการศึกษาของสารที่แยกได้ ได้แก่ สาร A ที่แยกจากใบย่านางพบว่า มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ดีกว่า สาร B ซึ่งเป็นสารจำพวกไขมัน เนื่องจาก สาร A เป็นสารจำพวก alkaloid ที่มีวง phenolic อยู่ในโมเลกุลทำให้มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ดีกว่า สอดคล้องกับ (Rice-Evans *et al.*, 1997) ที่พบว่าสารจำพวก phenolics จะมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ดี ทำให้อนุมูลอิสระกลายเป็นสารที่อยู่ในสภาพคงตัว (Stabilized radicals)

การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย

จากการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรค ด้วยวิธี disk diffusion method และวิธี Macrodilution method ต่อเชื้อแบคทีเรีย ทั้งสามชนิดคือ *Staphylococcus aureus* ATTC 25923 ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมบวก *Escherichia coli* ATTC 25922 และ *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมลบ ของสารสกัดสมุนไพรผักพื้นบ้านทั้ง 10 ชนิด พบว่า สารสกัด 10 ชนิดสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียได้ แต่ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้เพียงชนิดเดียวคือ *S. aureus* ผลการทดสอบนี้สอดคล้องกับการศึกษาก่อนหน้านี้ ที่พบว่าสารสกัดจากพืชส่วนใหญ่ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกได้ดีกว่าแบคทีเรียแกรมลบ (Kabuki *et al.*, 2000) ทั้งนี้ อาจเนื่องมาจาก แบคทีเรียแกรมลบ มี outer membrane ซึ่งเป็น lipopolysaccharide ล้อมรอบผนังเซลล์ ซึ่งจะช่วยจำกัดการไหลเข้าสารจำพวก bioactive compound (Burt, 2004)

สรุปผล

จากการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ ของพืชสมุนไพรผักพื้นบ้าน โดยเก็บตัวอย่างพืช 10 ชนิด ในจังหวัดมหาสารคาม ที่ใช้ในการวิจัยได้แก่ ผักแพว เพกา ย่านาง ผักเม็ก ผักกระถิน ผักชี ผักปลั่ง ชะพลู ผักหวานบ้านและสกัดพืชสมุนไพรแต่ละตัวอย่าง ด้วยตัวทำละลาย (solvent) คือ 80 % ethanol ระเหยแห้งด้วยเครื่อง rotary evaporator คำนวณหา % yield นำสารสกัดไปทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ และผลการทดสอบเป็นดังนี้

1. ทดสอบฤทธิ์ด้านการก่อกลายพันธุ์ ด้วยวิธีของเอมส์ (Ames, 1972) ในเชื้อ *Salmonella typhimurium* สายพันธุ์ TA98 และ TA100 พบว่า สารสกัดแสดงฤทธิ์ด้านการก่อกลายพันธุ์ของเชื้อ *Salmonella* ระดับ “ มาก ” ทั้งสองสายพันธุ์คือ ชะพลู ย่านาง กระถิน ผักปลัง และมีฤทธิ์ยับยั้งระดับ “ มาก ” ในสายพันธุ์ TA 98 คือ เพกา ขอ ผักปลัง ผักเม็ก ผักชี กระถิน ผักชี ในขณะที่ ผักแพว มีฤทธิ์ยับยั้งการก่อกลายพันธุ์ระดับ “ มาก ” ในสายพันธุ์ TA 10 ส่วนสารสกัดจากขมิ้น มีบางความเข้มข้นให้ผลในระดับ “น้อย” ทั้งสองสายพันธุ์

2. ทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ด้วยวิธี DPPH Scavenging method ผลการทดสอบพบว่า สารสกัดสมุนไพรที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมากเท่ากัน สี่ชนิดคือ เพกา ผักแพว ย่านาง กระถิน ตามด้วย ผักเม็ก ขมิ้น ชะพลู ผักปลัง ผักชี และผักหวานบ้าน เมื่อเทียบกับสารมาตรฐานคือ Ascorbic acid ($EC_{50} = 5.61 \pm 0.37 \mu\text{g/ml}$)

3. ทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรค ด้วยวิธี disk diffusion method ต่อเชื้อ *Staphylococcus aureus* ATTC 25923 , *Escherichia coli* ATTC 25922 และ *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 แต่พบว่า ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้เพียงชนิดเดียวคือ *S. aureus* ซึ่งพบว่าสารสกัดจาก ผักเม็ก ยับยั้งได้ดีที่สุด จากการหาค่าความเข้มข้นน้อยที่สุดในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย (Minimum inhibitory concentration, MIC) ของสารสกัดต่อการยับยั้งแบคทีเรียที่ใช้ทดสอบ โดยพบว่า สารสกัดจากชะพลู ให้ค่า MIC น้อยที่สุดคือ 4 mg/ml ต่อเชื้อ *S. aureus* และพบว่าสมุนไพรผักพื้นบ้านอื่น ออกฤทธิ์ไม่ดี

4. จากการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดพืชสมุนไพรผักพื้นบ้าน ตามวิธีของ Trease and Evans (1989) พบว่า สารกลุ่มต่างๆ ได้แก่ กลุ่ม alkaloids condensed, tannins, phenolic compounds, triterpenes, steroids, flavonoids และ saponins

5. ได้นำสารสกัดด้วย ethanol พืชสมุนไพรย่านาง มา ศึกษาต่อ เนื่องจากมีฤทธิ์ทางชีวภาพดี และมีศักยภาพ ที่จะส่งเสริมให้พัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์เพื่อป้องกันมะเร็ง พบว่า จากการแยกสารด้วยเทคนิคโครมาโตกราฟีโดยใช้ conventional column ได้สาร A และ B โดยสาร A ยังพิสูจน์โครงสร้างยังไม่แน่ชัด โดยสาร A มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 281 เป็นสารจำพวก Phenolic alkaloids ส่วนสาร B หลังจากพิสูจน์สูตรโครงสร้างแล้วพบว่าคือสาร *n*- Henicosane

6. จากการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารที่แยกได้จากใบย่านางพบว่า สาร A มีฤทธิ์มากกว่าสาร B และจากการทดสอบฤทธิ์ด้านการก่อกลายพันธุ์โดยใช้ความเข้มข้น ที่ใช้ทดสอบคือ 0.25 – 2 mg/plate ผลจากการทดสอบทุกความเข้มข้นของสาร A อยู่ในระดับ “มาก” ใน *Salmonella* TA 98 และ TA 100 ส่วนสาร B ส่วนใหญ่อยู่ในระดับกลาง ทั้งใน *Salmonella* TA 98 และ TA 100

ข้อเสนอแนะ

ข้อเสนอแนะในการนำไปใช้

1. เนื่องจากผลการทดสอบฤทธิ์ด้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ด้านการก่อกลายพันธุ์ ของย่านาง ดี จึงควรสนับสนุนให้มีการวิจัยต่อยอดเพื่อให้มีการแปรรูปสมุนไพรผักพื้นบ้านเหล่านี้เป็นผลิตภัณฑ์เสริมอาหารหรือเครื่องดื่มสมุนไพร เพื่อประโยชน์ด้านบำรุงสุขภาพ และป้องกันโรคโดยเฉพาะโรคมะเร็ง
2. ควรเผยแพร่ข้อมูลเพื่อให้ประชาชนทั่วไปได้ทราบคุณค่าสมุนไพรผักพื้นบ้าน โดยเฉพาะที่ออกฤทธิ์ด้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ด้านการก่อกลายพันธุ์ที่ดี ได้แก่ ผักแพว ย่านาง กระถิน ชะพลู ผักปลัง

ข้อเสนอแนะในการวิจัยครั้งต่อไป

1. จัดทำมาตรฐานผงชา เพื่อประโยชน์ในการควบคุมคุณภาพ
2. ทดสอบฤทธิ์ด้านเซลล์มะเร็ง ของพืชสมุนไพรที่มีฤทธิ์ดี เช่น ผักแพว ย่านาง กระถิน ชะพลู ผักปลัง ทั้งในหลอดทดลองและสัตว์ทดลอง
3. ควรมีการทำวิจัยเพื่อพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์สุขภาพ ให้มีความสะดวกในการบริโภค และเพื่อการพาณิชย์