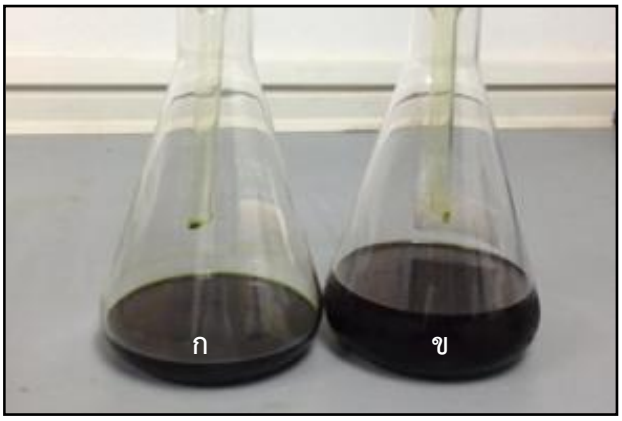
บทที่ 4
ผลการวิจัย

การสกัดใบลองกอง (extraction)

เมื่อนำใบลองกอง มาอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสแล้ว นำมาสกัดโดยวิธีการหมัก (maceration technique) ด้วยตัวทำละลายเมทานอล (100% methanol) และโพรพิลีนไกลคอล (100% propylene glycol, PG) ซึ่งทำการสกัดเป็นระยะเวลา 72 ชั่วโมง พบว่าสารสกัดในชั้นตัวทำละลายเมทานอล ได้สารละลายสีเขียวเข้มปนดำ และสารสกัดที่สกัดด้วยโพรพิลีนไกลคอล (propylene glycol, PG) ได้สารละลายมีสีเขียวเข้ม หนืด ดังแสดงในภาพที่ 4.1



ภาพที่ 4.1 แสดงลักษณะของสารสกัดใบลองกองในชั้นตัวทำละลาย (ก) โพรพิลีนไกลคอล (100% propylene glycol, PG) และ (ข) เมทานอล (100% methanol)

การทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ (free radical scavenging activity)

การศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ(free radical scavenging activity) ของสารสกัดใบลองกองในชั้นตัวทำลายเมาทานอล (methanolic extract) โพรพิลีนไกลคอล (PG extract) และวิตามินซี (L-ascorbic acid) ที่ความเข้มข้นต่างๆ ด้วยวิธี DPPH assay ผลการทดสอบดังแสดงในตารางที่ 4.1, 4.2 และ 4.3 ตามลำดับ

ตารางที่ 4.1 แสดงร้อยละของการต้านอนุมูลอิสระ (%free radical scavenging activity) ของสารสกัดใบลองกองในชั้นตัวทำละลายเมทานอล (methanolic extract)

ความเข้มข้นของสารสกัดใบลองกองในชั้นตัวทำละลายเมทานอล (mg/mL)	ร้อยละของการต้านอนุมูลอิสระ (%free radical scavenging activity)	IC_{50} ± SD (mg/mL)
0.4	3.86±0.06	15.64±0.03
0.8	7.73±0.05	
1.6	8.16±0.02	
3.2	10.66±0.40	
6.4	23.43±0.03	
12.8	38.97±0.04	
25.6	66.73±0.01	
50.0	84.29±0.01	

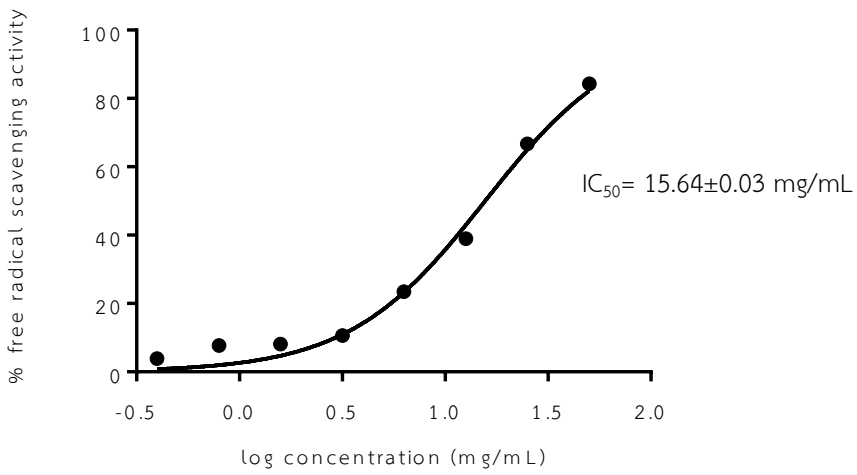
ตารางที่ 4.2 แสดงร้อยละของการต้านอนุมูลอิสระ (%free radical scavenging activity) ของสารสกัดใบลองกองในชั้นตัวทำละลายโพรพิลีนไกลคอล (PG extract)

ความเข้มข้นของสารสกัดใบลองกองในชั้นตัวทำละลายโพรพิลีนไกลคอล (mg/mL)	ร้อยละของการต้านอนุมูลอิสระ (%free radical scavenging activity)	IC_{50} ± SD (mg/mL)
0.4	0.11±0.29	6.76 ± 0.03
0.8	5.15±0.03	
1.6	7.94±0.31	
3.2	12.01±0.02	
6.4	58.04±0.17	
12.8	74.67±0.20	
25.6	79.07±0.10	
50.0	93.56±0.17	

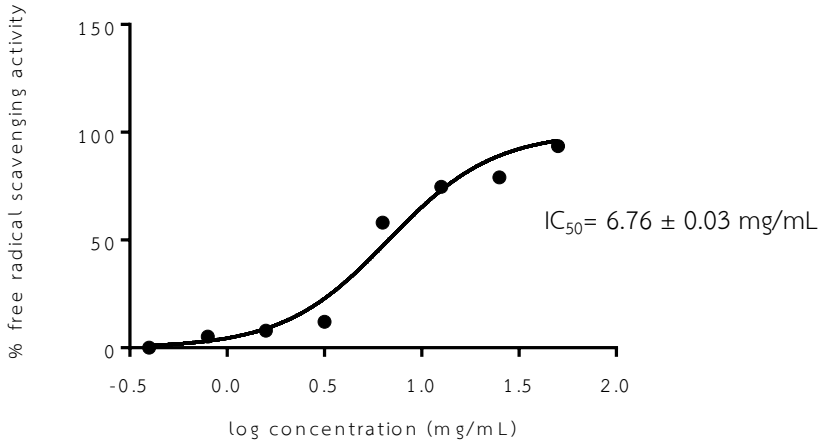
ตารางที่ 4.3 แสดงร้อยละของการต้านอนุมูลอิสระ (%free radical scavenging activity) ของวิตามินซี (L-ascorbic acid)

ความเข้มข้นของวิตามินซี (mg/mL)	ร้อยละของการต้านอนุมูลอิสระ (%free radical scavenging activity)	IC_{50} ± SD (mg/mL)
0.0016	9.59±0.05	0.023 ± 0.00015
0.0032	14.48±0.07	
0.0064	23.52±0.16	
0.0125	23.00±0.18	
0.025	37.69±0.09	
0.05	93.31±0.05	
0.10	97.01±0.02	
0.20	97.16±1.31	

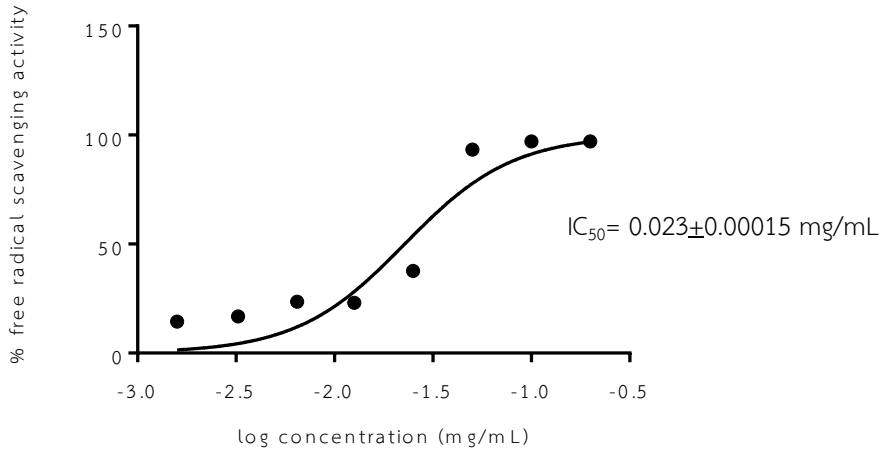
จากข้อมูลในตารางที่ 4.1, 4.2 และ4.3 แสดงให้เห็นว่า ทั้งสารสกัด (crude extract) และวิตามินซี (L-ascorbic acid) มีแนวโน้มให้ร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ (%free radical scavenging activity) เพิ่มขึ้น เมื่อความเข้มข้นของสารตัวอย่างสูงขึ้น (dose-dependent curve) เมื่อนำข้อมูลจากตารางพล๊อตกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้น (log concentration) และร้อยละของการต้านอนุมูลอิสระ (%free radical scavenging activity) เพื่อหาค่าการยับยั้งอนุมูลอิสระได้ 50% (half maximal inhibition concentration, IC_{50}) โดยใช้โปรแกรม Graph Pad Prism 6.05 พบว่าสารสกัดใบลองกองชั้นเมทานอล (methanolic extract), โพรพิลีนไกลคอล (PG extract) และวิตามินซี (L-ascorbic acid) มีค่า IC_{50} เท่ากับ 15.64±0.03, 6.76 ± 0.03 และ 0.023 ± 0.00015 mg/mL ตามลำดับ ดังแสดงในภาพที่ 4.2, 4.3 และ 4.4 ตามลำดับ



ภาพที่ 4.2 กราฟแสดงผลการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดใบลองกองชั้นเมทานอล (methanolic extract)



ภาพที่ 4.3 กราฟแสดงผลการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดใบลองกองชั้นโพรพิลีนไกลคอล (PG extract)



ภาพที่ 4.4 กราฟแสดงผลการต้านอนุมูลอิสระของวิตามินซี (L-ascorbic acid)

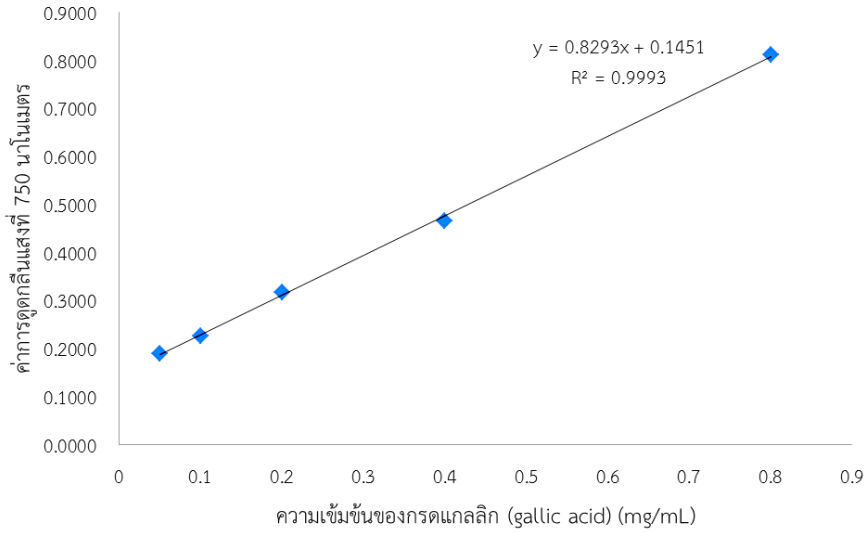
จากผลการทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ (free radical scavenging activity) ของสารสกัดใบลองกอง ด้วยวิธี DPPH scavenging assay ซึ่งเป็นวิธีที่นิยมใช้เป็นวิธีเบื้องต้นในการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจากสารที่มาจากธรรมชาติ ทดสอบเทียบกับสารต้านอนุมูลอิสระที่ให้ผลเชิงบวก (positive control) คือวิตามินซี (L-ascorbic acid) พบว่า สารสกัดใบลองกองในชั้นตัวทำละลายชั้นโพรพิลีนไกลคอล (PG extract)มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระที่ดีกว่าสารสกัดใบลองกองในชั้นชั้นเมทานอล (methanolic extract) และเมื่อเปรียบเทียบกับวิตามินซี พบว่าสารสกัดทั้ง 2 ชนิด มีความสามารถการต้านอนุมูลอิสระ DPPH น้อยกว่าวิตามินซี (L-ascorbic acid) ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากวิตามินซี เป็นสารบริสุทธิ์ที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยตรง ส่วนสารสกัดหยาบ (crude extract) ทั้ง 2 ชนิด ซึ่งมีองค์ประกอบทางเคมีหลากหลาย จึงทำให้เมื่อทดสอบด้วยวิธีนี้สารสกัดจึงมีประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระที่น้อยกว่าวิตามินซี

การวิเคราะห์หาปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด (Total Phenolic content) ในสารสกัดใบลองกอง

การวิเคราะห์หาปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด (Total Phenolic content) ในสารสกัดใบลองกองด้วยวิธี Folin–Ciocalteu assay เมื่อนำมาเทียบกับกราฟของสารมาตรฐาน (calibration curve) ของกรดแกลลิก (gallic acid) (ภาพที่ 4.5) พบว่า สารสกัดใบลองกองในชั้นตัวทำละลายเมาทานอล (methanolic extract) และชั้นโพรพิลีนไกลคอล (PG extract) มีปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดเท่ากับ 646.33 ± 5.36 และ853.13 ± 0.60 mgGAE/g สารสกัด ตามลำดับ จากผลการวิเคราะห์ดังกล่าว

แสดงให้เห็นว่า สารสกัดในชั้นโพรพิลีนไกลคอล (PG extract) มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดมากกว่าสารสกัดในชั้นตัวทำละลายเมทานอล (methanolic extract)

เมื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมด กับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดทั้ง 2 ชนิดพบว่าสารสกัดมีค่าการยับยั้งอนุมูลอิสระได้ 50% (IC_{50}) แปรผันตรงกับปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมด กล่าวคือ สารสกัดในชั้นตัวทำละลายโพรพิลีนไกลคอล (PG extract) ให้ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระที่สูงกว่าสารสกัดชั้นตัวทำละลายเมทานอล (methanolic extract) และมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดในปริมาณสูงด้วยเช่นกัน นั่นคือฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของสารสกัดชั้นโพรพิลีนไกลคอล อาจมาจากกลไกการยับยั้งอนุมูลอิสระของสารประกอบฟีนอลิก



ภาพที่ 4.5 กราฟมาตรฐาน (calibration curve) ของกรดแกลลิก (gallic acid)

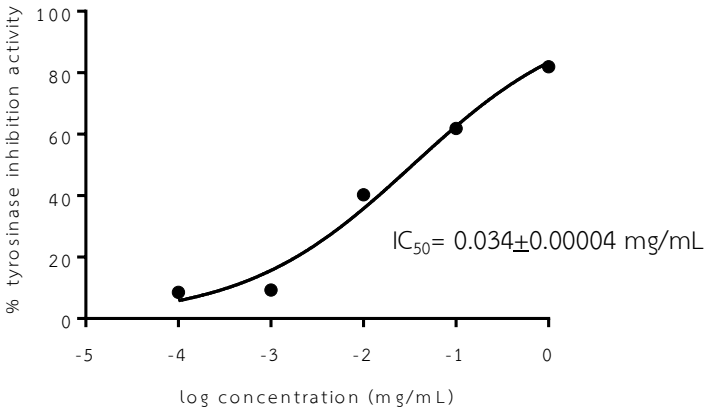
การทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส (tyrosinase inhibition assay)

การทดสอบการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส (tyrosinase inhibition assay) ทดสอบด้วยวิธี dopachrome method โดยใช้สารไทโรซีน (tyrosine) เป็นสารสับสเตรท (substrate) ผลการทดสอบดังแสดงในตารางที่ 4.4

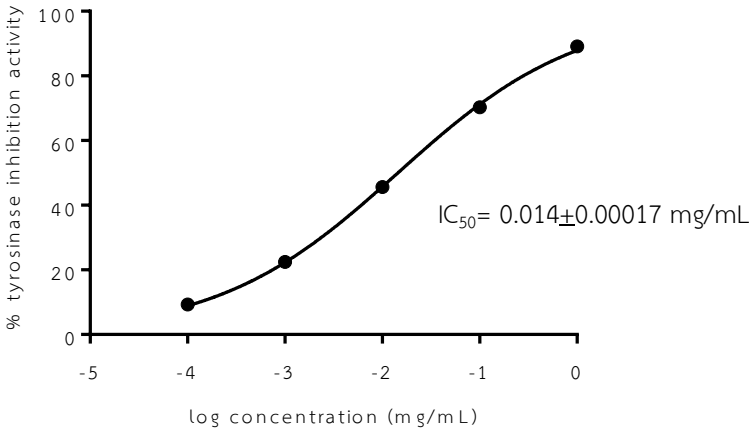
ตารางที่ 4.4 แสดงผลการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส (tyrosinase inhibition) ของสารสกัดใบลองกอง (longkong extract) และกรดโคจิก (kojic acid)

ความเข้มข้นสารตัวอย่าง (mg/mL)	ร้อยละของการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส (%tyrosinase inhibition activity)			IC_{50}±SD (mg/mL)		
	สารสกัดชั้นเมทานอล	สารสกัดชั้นโพรพิลีนไกลคอล	กรดโคจิก	สารสกัดชั้นเมทานอล	สารสกัดชั้นโพรพิลีนไกลคอล	กรดโคจิก
0.0001	8.53±0.25	9.30±0.18	23.36±1.45	0.034±0.00004	0.014±0.00017	0.020±0.003
0.001	9.29±0.11	22.43±0.28	36.97±0.83			
0.01	40.29±0.03	45.66±0.18	37.62±1.08			
0.1	61.90±0.03	70.31±0.16	52.10±3.05			
1.0	81.96±0.02	89.15±0.23	84.17±0.70			

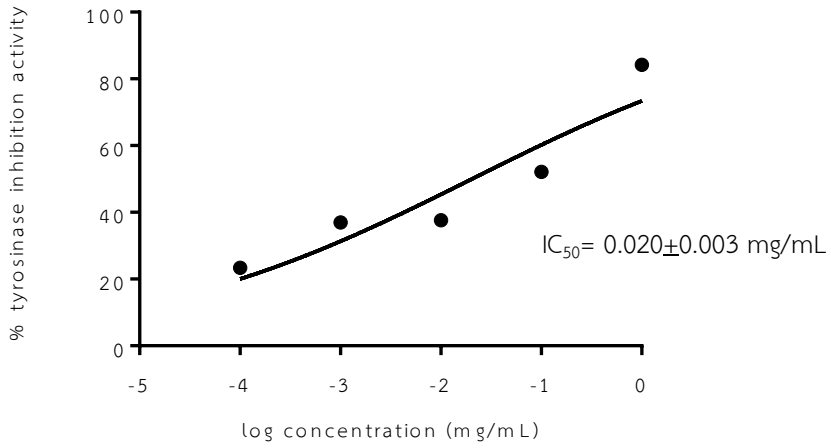
จากข้อมูลในตารางที่ 4.4 แสดงให้เห็นว่า สารสกัด (crude extract) และกรดจิก (kojic acid) มีแนวโน้มให้ร้อยละการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส (%tyrosinase inhibition activity) เพิ่มขึ้นเมื่อความเข้มข้นของสารตัวอย่างสูงขึ้น (dose-dependent curve) เมื่อนำข้อมูลจากตารางมาพล็อตกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้น (log concentration) และร้อยละของการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส (%tyrosinase inhibition activity) เพื่อหาค่าการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสได้ 50% (half maximal inhibition concentration, IC_{50}) โดยใช้โปรแกรม Graph Pad Prism 6.05 พบว่าสารสกัดใบลองกองชั้นโพรพิลีนไกลคอล (PG extract) มีการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสสูงกว่าสารสกัดชั้นตัวทำละลายเมทานอล (methanolic extract) มีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.014+0.00017 และ 0.034+0.00004 mg/mL ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับกรดโคจิก (kojic acid) ซึ่งมีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.020±0.003 mg/mL พบว่าสารสกัดชั้นโพร พิลีนไกลคอลมีการยับยั้งที่ดีกว่ากรดโคจิก แต่สารสกัดชั้นเมาทานอลมีการยับยั้งที่น้อยกว่ากรดโคจิก ดังแสดงในภาพที่ 4.6, 4.7 และ 4.8 ตามลำดับ



ภาพที่ 4.6 กราฟแสดงผลการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส (tyrosinase inhibition) ของสารสกัดใบลองกองชั้นเมทานอล (methanolic extract)



ภาพที่ 4.7 กราฟแสดงผลการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส (tyrosinase inhibition) ของสารสกัดใบลองกองชั้น โพรพิลีนไกลคอล (PG extract)



ภาพที่ 4.8 กราฟแสดงผลการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส (tyrosinase inhibition) ของกรดโคจิก (kojic acid)