

ผลการทดลอง

1. การตรวจพิสูจน์ชนิดพืช (Plant identification)

ตรวจโดยเทียบกับข้อมูลในอนุกรมวิธานพืช ได้แก่ Flora of Thailand และ Flora of China และเปรียบเทียบกับตัวอย่างพืชแห้ง (Herbarium specimens) ในพิพิธภัณฑ์สมุนไพรร คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

โดยพืชสกุล *Gnetum* ซึ่งมีตัวอย่างพืชแห้งเก็บรักษาเอาไว้ในพิพิธภัณฑ์สมุนไพรร ได้แก่

- *G.capidatum* Bl.
- *G.latifolium* Bl. var *funiculare* Bl. (Mgf.)
- *G.leptostachyum* Bl.
- *G.microcarpum* Bl.
- *G.montanum* Mgf.

ตัวอย่างมะม่วงที่เก็บจากพื้นที่บ้านแม่ใจ อ.สันทราย จ.เชียงใหม่ เมื่อวันที่ 6 มิถุนายน 2552 เพื่อมาวิจัยในครั้งนี้แสดงในภาคผนวก ก และทำการตรวจเปรียบเทียบตัวอย่างพืชแห้งกับตัวอย่างพืชแห้งของมะม่วง (*G.montanum* Mgf.) ที่เก็บไว้ในพิพิธภัณฑ์สมุนไพรร แสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2: หมายเลขตัวอย่างพืชแห้งของมะม่วง (*G.montanum* Mgf.) ในพิพิธภัณฑ์สมุนไพรร คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ (ภาพแสดงในภาคผนวก ก)

Specimen number	ส่วนของพืชที่ตรวจ
2827 (87-639)	ใบ, ก้าน, เถา และเมล็ด
4963 (89-402)	ใบและก้าน
5165 (182)	ใบ
5702 (5506)	ใบ
7224 (90-450)	ใบและดอก
7301 (90-536)	ใบและเมล็ด
7605 (90-730)	ใบ, ก้าน, ดอก และเมล็ด
8667 (30)	ใบ

2. การสกัดและแยกสารสำคัญ

2.1 การสกัดสารสำคัญจากส่วนใบมะม่วง

ใบมะม่วงอบแห้งปริมาณ 309.57 กรัม นำมาสกัดด้วยการหมัก (maceration) ด้วยแอลกอฮอล์ 70% ได้สารสกัดหยาบด้วยแอลกอฮอล์ (crude alcoholic extract) ปริมาณ 105.89 กรัม คิดเป็น % ผลผลิตเท่ากับ 34.21 % ของพืชแห้ง

2.2 การสกัดสารสำคัญจากส่วนเถามะม่วง

เถามะม่วงแห้งบดปริมาณ 500 กรัม นำมาสกัดแบบต่อเนื่องด้วยแอลกอฮอล์ 95% โดยใช้ soxhlet apparatus ได้สารสกัดหยาบด้วยแอลกอฮอล์ (crude alcoholic extract) ปริมาณ 89.99 กรัม คิดเป็น % ผลผลิตเท่ากับ 18.00% ของพืชแห้ง

2.3 การสกัดแยกส่วนของสารสกัดหยาบส่วนเถา

สารสกัดหยาบด้วยแอลกอฮอล์ส่วนเถาปริมาณ 80 กรัม นำมากระจายใน 20% แอลกอฮอล์ในน้ำแล้วจึงทำการสกัดแยกส่วน (partition extraction) ด้วย hexane และ ethyl acetate (EtOAc) จนได้สารสกัดแยกส่วนชั้น hexane (partitioned hexane extract) สารสกัดแยกส่วน ethyl acetate (partitioned EtOAc extract) และสารสกัดชั้นน้ำ (aqueous extract) ชั่งน้ำหนัก หาปริมาณผลผลิต (% yield) และทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส ดังแสดงผลในตารางที่ 3

ตารางที่ 3: แสดงปริมาณ และ % ผลผลิต ของสารสกัดแยกส่วนจากสารสกัดหยาบส่วนเถา และฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส

สารสกัด	ปริมาณ (กรัม)	% ผลผลิต (ต่อปริมาณสารสกัดหยาบ 80 กรัม)	ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส (%inhibition at 1000 ppm)
Crude ethanolic extract	89.99	-	81.4
hexane extract (HE)	4.13	5.16	83.5
ethyl acetate (EtOAc) extract (EE)	15.21	19.01	97.6
aqueous extract (AE)	51.70	64.63	58.2

2.4 การทำสารสำคัญให้บริสุทธิ์

นำสารสกัดแยกส่วนชั้น ethyl acetate (EE) ซึ่งมีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสสูงสุด ปริมาณ 5 กรัม แยกด้วย silica (7734) column chromatography ที่มีตัวชะเป็น chloroform : methanol แบบ Gradient technique จนได้ fraction ทั้งหมด 15 fractions ให้ชื่อว่า EGM01 ถึง EGM15 นำทุก fractions ไปประเหตตัวทำลายจนแห้ง ชั่งน้ำหนัก หาปริมาณผลผลิต (% yield)

จากนั้นนำทุก fractions ไปทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส ดังแสดงผลในตารางที่ 4 พบว่า fraction EGM05 มีฤทธิ์ดีที่สุด จึงทำการแยก EGM05 ปริมาณ 350 มิลลิกรัม ต่อด้วย silica

(7734) column chromatography ที่มีตัวชะเป็น chloroform : methanol แบบ Gradient technique จนได้ fraction จำนวน 7 fractions ให้ชื่อว่า fraction EGM051 ถึง EGM057 ดังแสดงในตารางที่ 5 โดยมี fraction EGM052 ที่มีองค์ประกอบหลักที่ให้ฤทธิ์อยู่ในปริมาณมาก (327.7 มิลลิกรัม) จึงนำ fraction EGM052 ปริมาณ 327.7 มิลลิกรัม ไปแยกต่อด้วย silica (9385) column chromatography ที่มีตัวชะเป็น hexane:EtOAc:acetone แบบ Gradient technique จนได้ fraction จำนวน 12 fractions ให้ชื่อว่า fraction EGM052-1 ถึง EGM052-12 ดังแสดงในตารางที่ 6 โดยที่ fraction EGM052-3 ถึง EGM052-7 มีรูปแบบ chromatogram เหมือนกันจึงนำมารวมกันได้ปริมาณ 186.8 มิลลิกรัม แล้วนำไปแยกต่อด้วย เทคนิค size exclusion chromatography ที่มี Sephadex LH-20 เป็นเฟสคงที่ (stationary phase) และ acetone เป็นตัวชะ (eluent) จนได้สารบริสุทธิ์ ชื่อว่า GM001 ปริมาณ 184.1 มิลลิกรัม ดังแสดงในตารางที่ 7 รูปแบบ TLC chromatograms ของสารสกัดในขั้นตอนการแยกสารสำคัญและสารบริสุทธิ์ แสดงในภาคผนวก ค

ตารางที่ 4 แสดงปริมาณสารสกัด EGM01 ถึง EGM15 ที่แยกได้จากสารสกัดแยกส่วน EE และฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส

fraction	ปริมาณ (กรัม)	% ผลผลิต (ต่อปริมาณ EE 5 กรัม)	ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส (%inhibition at 1000 ppm)
EGM01	0.0142	0.28	32.2
EGM02	0.1056	2.11	31.6
EGM03	0.0869	1.74	28.2
EGM04	0.0398	0.80	43.7
EGM05	0.4097	8.19	83.3
EGM06	0.0912	1.82	76.2
EGM07	0.1243	2.49	75.6
EGM08	0.1304	2.61	72.8
EGM09	0.2364	4.73	69.7
EGM010	0.1051	2.10	71.2
EGM011	0.7206	14.41	48.9
EGM012	0.5077	10.15	40.9
EGM013	0.3661	7.32	42.4
EGM014	0.1381	2.76	43.7
EGM015	0.2267	4.53	62.9



สำนักงานหอสมุดมหาวิทยาลัยเชียงใหม่
 ห้องสมุดแม่โจ้
 วันที่ 13 มิ.ย. 2553
 หมายเลข..... 244808
 เลขที่ของหนังสือ.....

ตารางที่ 5 แสดงปริมาณสารสกัด EGM051 ถึง EGM057 ที่แยกได้จาก EGM05

fraction	ปริมาณ (กรัม)	% ผลผลิต (ต่อปริมาณ EGM05 0.350 กรัม)
EGM051	0.0111	3.17
EGM052	0.3277	93.63
EGM053	0.0040	1.14
EGM054	0.0032	0.91
EGM055	0.0020	0.57
EGM056	0.0015	0.43
EGM057	0.0002	0.06

ตารางที่ 6 แสดงปริมาณสารสกัด EGM052-1 ถึง EGM052-12 ที่แยกได้จาก EGM052

fraction	ปริมาณ (กรัม)	% ผลผลิต (ต่อปริมาณ EGM052 0.3277 กรัม)
EGM052-1	0.0108	3.30
EGM052-2	0.0364	11.11
EGM052-3	0.0507	15.47
EGM052-4	0.0294	8.97
EGM052-5	0.0328	10.01
EGM052-6	0.0496	15.14
EGM052-7	0.0243	7.41
EGM052-8	0.0093	2.84
EGM052-9	0.0170	5.19
EGM052-10	0.0068	2.08
EGM052-11	0.0184	5.61
EGM052-12	0.1136	34.67

หมายเหตุ: ทำการรวม fraction EGM052-3 ถึง EGM052-7 ซึ่งมีรูปแบบ TLC chromatograms เหมือนกันเข้าด้วยกัน

ตารางที่ 7 แสดงปริมาณสารสกัดและสารบริสุทธิ์ GM001 ที่แยกได้จาก EGM052-3 ถึง EGM052-7

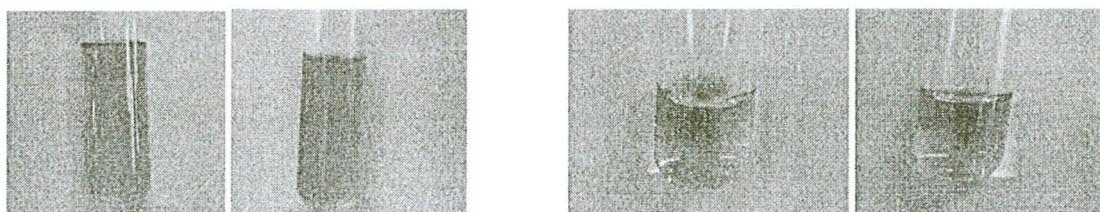
fraction	รวม fraction	ปริมาณ (กรัม)	% ผลผลิต (ต่อปริมาณ EGM052-3 ถึง EGM052-7 0.1868 กรัม)
1	1	0.0020	1.07
2	สารบริสุทธิ์ GM001	0.1841	98.55
3			
4			
5			
6	6	0.0002	0.11
7	7	0.0004	0.21

ดังนั้น จากตารางที่ 3 – ตารางที่ 7 จึงสามารถสรุปได้ว่าปริมาณสารบริสุทธิ์ GM001 คิดเป็น 0.184 % g/g ของเถาแห้ง 500 กรัม

3. การตรวจสอบชนิดสารองค์ประกอบด้วยวิธีทางเคมี

3.1 การตรวจสอบสารกลุ่มอัลคาลอยด์

น้ำยาทดสอบ Mayer's reagent : ผลที่ได้คือไม่เกิดตะกอนสีขาวนวลที่ชัดเจนทั้งในสารสกัดหยาบและสารสกัดแยกส่วน ethyl acetate (รูปที่ 1)



1A

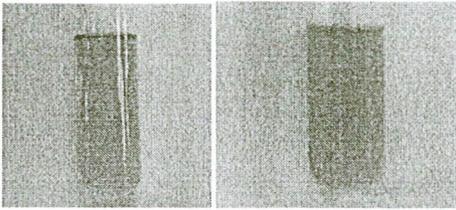
1B

รูปที่ 1: แสดงผลการตรวจสอบสารกลุ่มอัลคาลอยด์ด้วย Mayer's reagent โดย

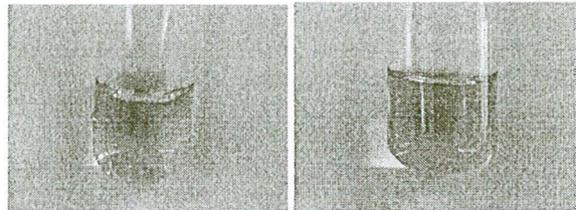
1A แสดงผลการตรวจสอบโดยใช้สารสกัดหยาบเอทานอล (หลอดซ้ายก่อนเติมน้ำยาทดสอบ หลอดขวาหลังเติมน้ำยาทดสอบ)

1B แสดงผลการตรวจสอบโดยใช้สารสกัดแยกส่วน Ethyl acetate (หลอดซ้ายก่อนเติมน้ำยาทดสอบ หลอดขวาหลังเติมน้ำยาทดสอบ)

น้ำยาทดสอบ Dragendorff's reagent : ผลที่ได้ คือ เมื่อเติมแล้วไม่เกิดตะกอนสีส้มในสารสกัด
ทั้ง 2 ส่วน



2A



2B

รูปที่ 2: แสดงผลการตรวจสอบสารกลุ่มอัลคาลอยด์ด้วย Dragendorff's reagent โดย

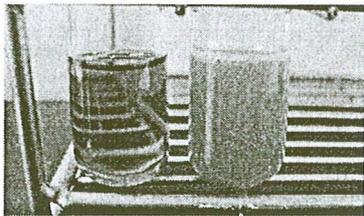
2A แสดงผลการตรวจสอบโดยใช้สารสกัดหยาบเอทานอล (หลอดซ้ายก่อนเติมน้ำยาทดสอบ หลอดขวาหลังเติมน้ำยาทดสอบ)

2B แสดงผลการตรวจสอบโดยใช้สารสกัดแยกส่วน Ethyl acetate (หลอดซ้ายก่อนเติมน้ำยาทดสอบ หลอดขวาหลังเติมน้ำยาทดสอบ)

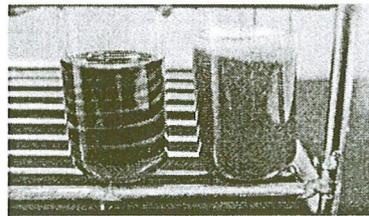
3.2 การตรวจสอบสารกลุ่มฟลาโวนอยด์

ทดสอบด้วยวิธี Shinoda's test

ผลที่ได้ : สารสกัดหยาบ Crude ethanol extract และ สารสกัดชั้น Ethyl acetate extract (EE) ได้ผลบวก โดยในสารสกัดหยาบเกิดปฏิกิริยาได้เร็วกว่า การเปลี่ยนแปลงสีของสารละลายชัดเจนและคงทนกว่าสารสกัดส่วน Ethyl acetate extract แสดงว่าในสารสกัดทั้งสองส่วนมีฟลาโวนอยด์เป็นองค์ประกอบ



3A = ethanol extract



3B = Ethyl acetate extract

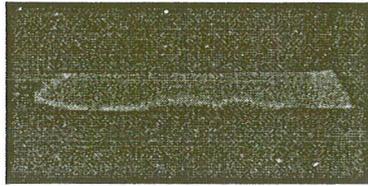
รูปที่ 3: แสดงผลการตรวจสอบสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ด้วยวิธี Shinoda's test โดย

3A แสดงผลการตรวจสอบโดยใช้สารสกัดหยาบ เทียบกับหลอดควบคุม (หลอดซ้าย)

3B แสดงผลการตรวจสอบโดยใช้สารสกัดแยกส่วน Ethyl acetate เทียบกับหลอดควบคุม (หลอดซ้าย)

3.3 การตรวจสอบสารกลุ่มคูมาริน

ผลที่ได้: สารสกัดหยาบ Crude ethanol extract และ สารสกัดชั้น Ethyl acetate extract (EE) ให้ผลบวกคือกระดาษกรองเรืองแสงสีเขียวอมฟ้า เมื่อนำมาส่องดูภายใต้แสงยูวีที่ความยาวคลื่น 365 นาโนเมตร นาน 1 นาที



4A = ethanol extract



4B = Ethyl acetate extract

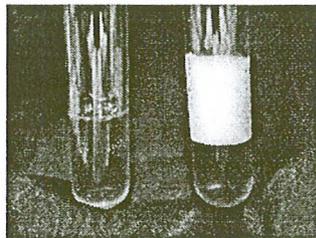
รูปที่ 4: แสดงผลการตรวจสอบสารกลุ่มคูมาริน โดย

4A แสดงผลการตรวจสอบโดยใช้สารสกัดหยาบ

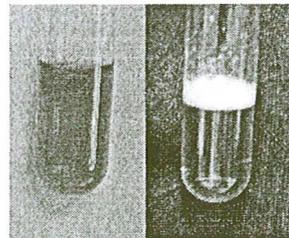
4B แสดงผลการตรวจสอบโดยใช้สารสกัดแยกส่วน Ethyl acetate

3.4 การตรวจสอบสารกลุ่มซาโปนิน

Froth test - เขย่าแรงๆ นาน 1 นาที : ผลที่ได้ คือ เกิดฟองรูปรังผึ้งที่คงทนนานกว่า 15 นาที



5A



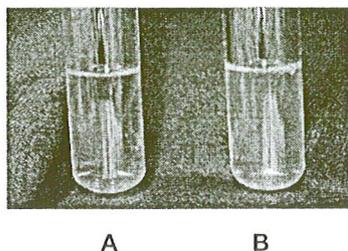
5B

รูปที่ 5: แสดงผลการตรวจสอบสารกลุ่มซาโปนินด้วยวิธี Froth test โดย

5A แสดงผลการตรวจสอบโดยใช้สารสกัดหยาบ เทียบกับหลอดควบคุม (หลอดซ้าย)

5B แสดงผลการตรวจสอบโดยใช้สารสกัดแยกส่วน Ethyl acetate (หลอดซ้าย)

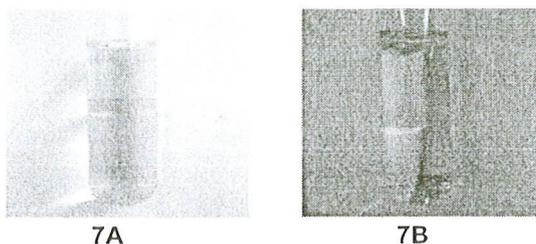
ต้มกับกรดเกลือเจือจาง แล้วเขย่าแรงๆ นาน 1 นาที : ผลที่ได้ คือ ไม่เกิดฟองรูปร่างผึ้ง (รูปที่ 6)



รูปที่ 6: แสดงผลการตรวจสอบสารกลุ่มซาโปนิน โดยการนำไปต้มกับกรดเกลือเจือจางโดย
 หลอด A แสดงผลการตรวจสอบโดยใช้สารสกัดหยาบ
 หลอด B แสดงผลการตรวจสอบโดยใช้สารสกัดแยกส่วน Ethyl acetate

3.5 การตรวจสอบสารกลุ่มแอนทราควิโนนไกลโคไซด์

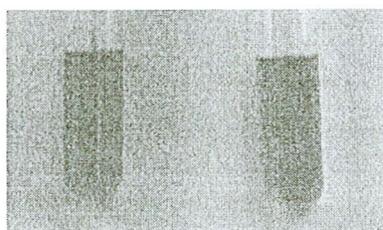
ทดสอบด้วยวิธี Borntrager's test : ผลที่ได้คือไม่เกิดผลบวกที่ชัดเจน กล่าวคือในชั้นของต่าง (ชั้นบนของสารละลาย) นั้น ไม่เป็นสีชมพูแดงทั้งในสารสกัดหยาบ และสารสกัดแยกส่วน Ethyl acetate (รูปที่ 7)



รูปที่ 7: แสดงผลการตรวจสอบสารกลุ่มแอนทราควิโนนไกลโคไซด์ด้วยวิธี Borntrager's test โดย
 7A แสดงผลการตรวจสอบโดยใช้สารสกัดหยาบ
 7B แสดงผลการตรวจสอบโดยใช้สารสกัดแยกส่วน Ethyl acetate

3.6 การตรวจสอบสารกลุ่มแทนนิน

เติม 1% เจลาติน 2-3 หยด : ผลที่ได้คือ เกิดผลบวกโดยเกิดตะกอนขุ่นขาวเพียงเล็กน้อย (รูปที่ 8)



8A



รูปที่ 8: แสดงผลการตรวจสอบสารกลุ่มแทนนินโดยเติม 1% เจลาติน

8A แสดงลักษณะของสารสกัดหยาบ (ซ้าย) และสารสกัดแยกส่วน

ethyl acetate (EE) ก่อนเติม 1% เจลาติน (ขวา)

8B แสดงความขุ่นเพียงเล็กน้อยของสารสกัดหยาบหลังเติม 1% เจลาติน

(หลอดซ้าย คือสารสกัดหยาบก่อนเติม 1% เจลาติน หลอดขวา คือ หลอดทดสอบ)

8C แสดงความขุ่นเพียงเล็กน้อยของสารสกัดแยกส่วน EE หลังเติม 1% เจลาติน

(หลอดซ้าย คือสารสกัดหยาบก่อนเติม 1% เจลาติน หลอดขวา คือ หลอดทดสอบ)

เมื่อเติม Ferric chloride (FeCl_3) TS ผลที่ได้คือเกิดผลบวก ดังนี้

- เกิดตะกอนสีน้ำเงิน แสดงว่ามี hydrolysable tannin หรือมี tannin ทั้งสองชนิด



รูปที่ 9: แสดงผลการตรวจสอบสารกลุ่มแทนนินด้วย Ferric chloride (FeCl_3) Test Solution โดย

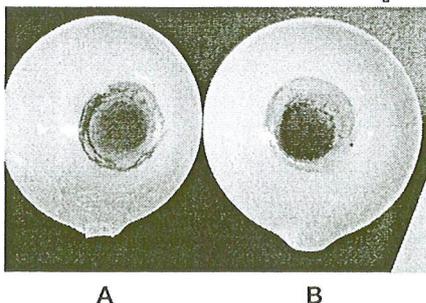
9A แสดงผลการตรวจสอบสารสกัดหยาบ

(หลอดซ้าย คือสารสกัดหยาบก่อนเติม FeCl_3 TS หลอดขวา คือ หลอดทดสอบ)

9B แสดงผลการตรวจสอบสารสกัดแยกส่วน Ethyl acetate

(หลอดซ้าย คือสารสกัดหยาบก่อนเติม FeCl_3 TS หลอดขวา คือ หลอดทดสอบ)

เมื่อเติม Vanillin-HCl test: ผลที่ได้คือเกิดผลบวก คือตะกอนสีชมพูแดง แสดงว่ามี condense tannin

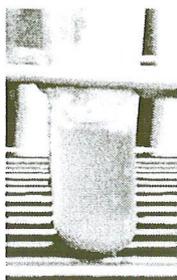


รูปที่ 10: แสดงผลการตรวจสอบสารกลุ่มแทนนินด้วยวิธี Vanillin-HCl test โดย

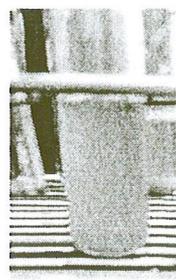
A แสดงผลการตรวจสอบโดยใช้สารสกัดหยาบ

B แสดงผลการตรวจสอบโดยใช้สารสกัดแยกส่วน Ethyl acetate

เมื่อเติมน้ำปูนใส : ผลที่ได้คือเกิดผลบวก โดยเกิดตะกอน และตะกอนอาจมีสีเทาแกมน้ำเงิน แสดงว่ามี *hydralsable tannin*



11A



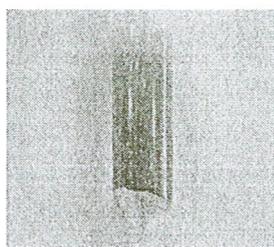
11B

รูปที่ 11: แสดงผลการตรวจสอบสารกลุ่มแทนนินด้วยน้ำปูนใส (Lime water) โดย

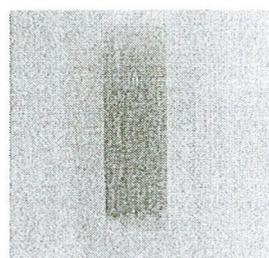
11A แสดงผลการตรวจสอบโดยใช้สารสกัดหยาบ

11B แสดงผลการตรวจสอบโดยใช้สารสกัดแยกส่วน Ethyl acetate

เมื่อเติม 10% กรดกำมะถัน และ น้ำยา 10% ตะกั่วอะซิเตด: ผลที่ได้คือเกิดผลบวก โดยเกิดตะกอนภายใน 15 นาที



12A



12B

รูปที่ 12: แสดงผลการตรวจสอบสารกลุ่มแทนนินด้วย 10% กรดกำมะถันและน้ำยา10%ตะกั่วอะซิเตด

12A แสดงผลการตรวจสอบโดยใช้สารสกัดหยาบ

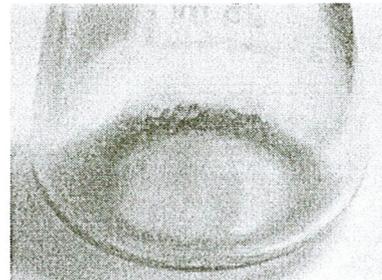
12B แสดงผลการตรวจสอบโดยใช้สารสกัดแยกส่วน Ethyl acetate

3.7 การตรวจสอบสารกลุ่มสติลบีโนอยด์

การตรวจสอบสารกลุ่มสติลบีโนอยด์ในสารสกัดหยาบโดยวิธี phosphoric acid – vanillin test ผลที่ได้คือเกิดผลบวกโดย สารละลายจะเปลี่ยนเป็นสีส้มอมชมพูแล้วค่อยๆ เข้มขึ้นเป็นสีม่วงแดงเมื่อนำมาต้มจนเดือด (รูปที่ 13)



13A



13B

รูปที่ 13: แสดงผลการตรวจสอบสารกลุ่มสติลบีโนอยด์ของสารสกัดหยาบ

เมื่อตรวจสอบด้วยวิธี phosphoric acid – vanillin test

13A สีส้มอมชมพูที่ปรากฏหลังเติม vanillin และ phosphoric acid

13B สีม่วงแดงที่เกิดขึ้นหลังจากนำ 13A ไปต้มจนเดือด

จากผลการตรวจสอบองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดหยาบ และสารสกัดแยกส่วนชั้น ethyl acetate ด้วยการทดสอบเบื้องต้นทางเคมี คาดว่า ในสารสกัดทั้ง 2 ส่วนควรมีสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ คูมาริน แทนนิน และ สติลบีโนอยด์ เป็นองค์ประกอบ

4. การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส

การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสในการศึกษาวิจัยครั้งนี้เป็นการศึกษาในระดับหลอดทดลอง (*in vitro* test) โดยใช้ L-DOPA เป็น substrate ของเอนไซม์ไทโรซิเนสที่ได้จากเห็ด (mushroom tyrosinase) และใช้ kojic acid เป็นสารมาตรฐาน ซึ่งในขั้นการทดสอบฤทธิ์เปรียบเทียบระหว่างสารสกัดหยาบส่วนใบ และส่วนเถาจะมีพบบว่า ส่วนเถามีฤทธิ์ที่ดีกว่า จึงนำสารสกัดหยาบส่วนเถามาศึกษาต่อ ดังนี้

4.1 การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสเพื่อคัดเลือกสารสกัดแยกส่วนที่มีฤทธิ์ดีที่สุด

นำสารสกัดหยาบด้วยเอทานอล และสารสกัดแยกส่วนได้แก่ สารสกัดแยกส่วน hexane (HE) สารสกัดแยกส่วน ethyl acetate (EE) และสารสกัดแยกส่วนชั้นน้ำ (AE) มาทดสอบฤทธิ์โดยใช้สารสกัดแต่ละชนิด 2 ความเข้มข้นคือที่ความเข้มข้น 1000 และ 5000 ppm ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 8

ตารางที่ 8 แสดงฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารสกัดหยาบ และสารสกัดแยกส่วน HE, EE และ AE

สารสกัด	% inhibition	
	1000 ppm	5000 ppm
สารสกัดหยาบ	81.4	83.0
สารสกัดแยกส่วน hexane (HE)	83.5	66.3
สารสกัดแยกส่วน ethyl acetate (EE)	97.6	87.3
สารสกัดแยกส่วนชั้นน้ำ (AE)	58.2	67.8

4.2 การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารสกัด (fractions) ที่แยกจาก EE

จากตารางที่ 8 จะเห็นว่า สารสกัดแยกส่วน ethyl acetate (EE) มีฤทธิ์ดีที่สุด จึงนำมาแยกต่อด้วยวิธีทางโครมาโทกราฟี ซึ่งได้ทั้งหมด 15 fractions (EGM01 ถึง EGM15) แล้วนำไปทดสอบฤทธิ์เพื่อคัดเลือก fraction ที่มีฤทธิ์ดีที่สุดไปแยกให้ได้สารบริสุทธิ์ต่อไป ผลการทดสอบฤทธิ์ของทั้ง 15 fractions ที่ความเข้มข้น 500 และ 1000 ppm เปรียบเทียบกับ kojic acid ที่ความเข้มข้น 50 และ 500 ppm แสดงในตารางที่ 9

ตารางที่ 9 แสดงฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารสกัด EGM01 ถึง EGM15

เปรียบเทียบกับ kojic acid

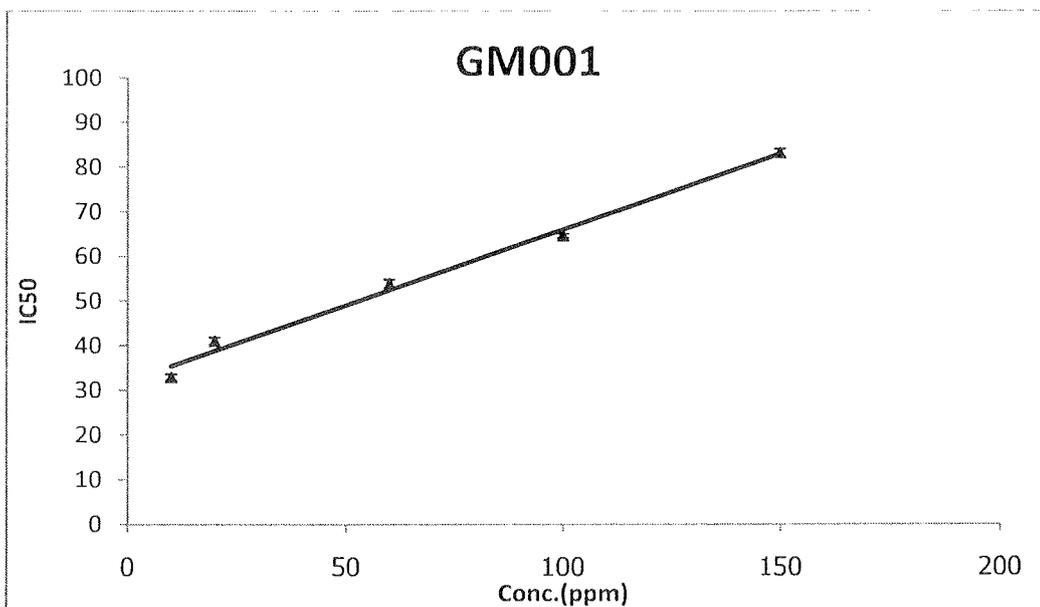
สารทดสอบ	% inhibition		
	50 ppm	500 ppm	1000 ppm
EGM01	-	20.7	32.2
EGM02	-	34.4	31.6
EGM03	-	33.8	28.2
EGM04	-	32.2	43.7
EGM05	-	63.8	83.3
EGM06	-	54.8	76.2
EGM07	-	36.2	75.4
EGM08	-	32.8	72.8
EGM09	-	37.8	69.7
EGM010	-	53.3	71.2
EGM011	-	38.1	48.9
EGM012	-	36.2	40.9
EGM013	-	37.8	42.4
EGM014	-	37.5	43.7
EGM015	-	34.7	62.9
Kojic acid	69.7	84.2	-

4.3 การหาความแรงในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารบริสุทธิ์ GM001

จากตารางที่ 9 จะได้ fraction EGM05 มีฤทธิ์ดีที่สุด จึงนำไปแยกต่อด้วยเทคนิคทางโครมาโทกราฟีจนได้สารบริสุทธิ์คือ GM001 จากนั้น นำ GM001 ไปประเมินความแรงด้วยค่า IC_{50} ของการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน kojic acid ซึ่งค่า IC_{50} ของ GM001 เท่ากับ 52.9 ppm ในขณะที่ IC_{50} ของ kojic acid เท่ากับ 36.5 ppm ตารางที่ 10 และ 11 แสดงฤทธิ์ในการยับยั้ง (% inhibition) เอนไซม์ไทโรซิเนส ของ GM001 และ kojic acid ตามลำดับ ส่วนรูปที่ 14 และ 15 แสดงกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นและฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของ GM001 และ kojic acid ตามลำดับ

ตารางที่ 10 ความเข้มข้นและ ฤทธิ์ในการยับยั้ง (% inhibition) เอนไซม์ไทโรซิเนส ของ GM001

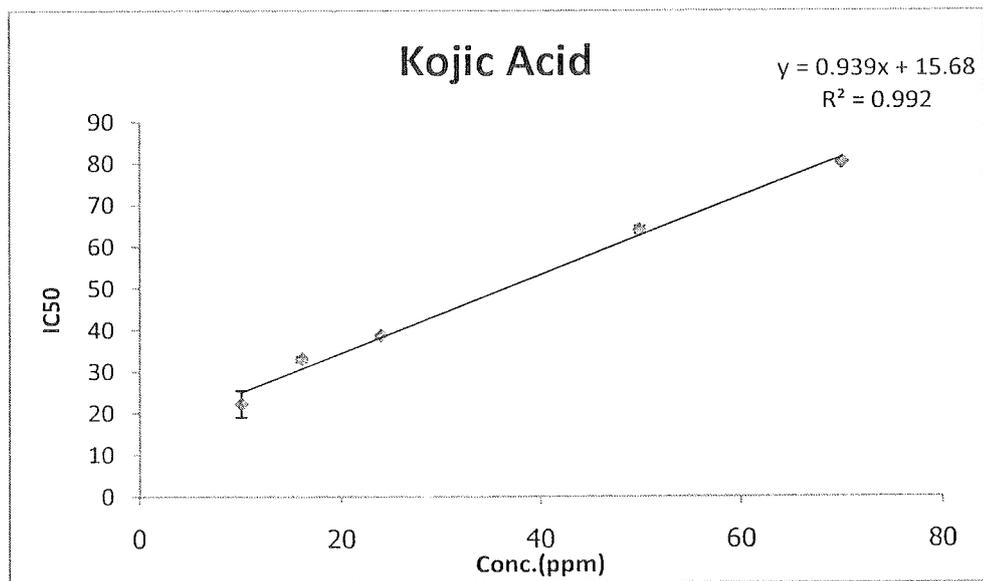
ความเข้มข้นของ GM001 (ppm)	%inhibition				Average % inhibition	SD
150	82.24	82.87	83.39	84.33	83.21	0.88
100	65.11	64.80	64.26	64.26	64.61	0.42
60	53.89	54.83	54.23	52.66	53.90	0.91
20	41.74	41.74	40.13	40.44	41.01	0.85
10	33.33	33.64	31.97	32.60	32.89	0.75



รูปที่ 14 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นและฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของ GM001

ตารางที่ 11 ความเข้มข้นและฤทธิ์ในการยับยั้ง (% inhibition) เอนไซม์ไทโรซิเนสของ kojic acid

ความเข้มข้นของ Kojic Acid (ppm)	%inhibition			Average % inhibition	SD
70	80.13	80.25	80.25	80.21	0.07
50	64.98	64.01	63.27	64.09	0.86
24	38.17	38.85	38.89	38.64	0.41
16	32.49	32.80	33.64	32.98	0.59
10	19.24	21.97	25.62	22.28	3.20



รูปที่ 15 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นและฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของ kojic acid

