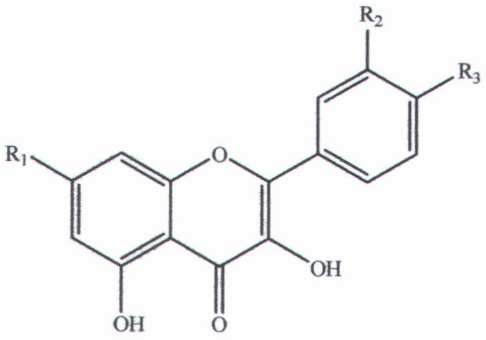
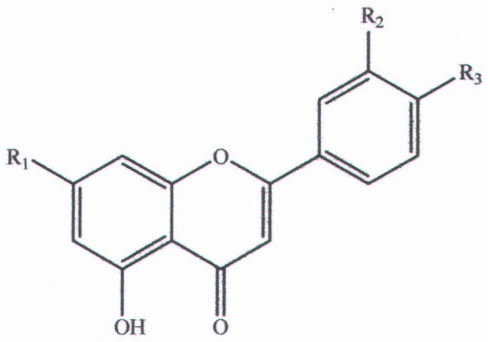
ผลการทดลอง วิจารณ์ผล และสรุปผลการทดลอง

ตอนที่ 1 : การสกัด แยกสารให้บริสุทธิ์และทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส

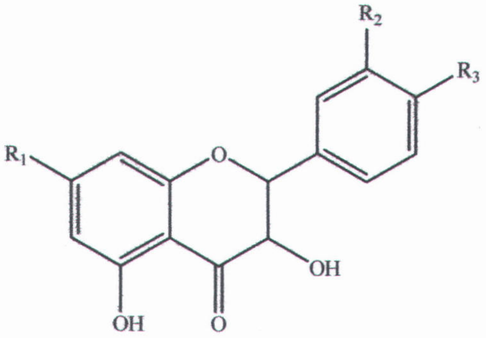
องค์ประกอบทางเคมีที่แยกได้จากใบหนาดมีทั้งหมด 9 สาร โดยเป็นสารประเภท flavonols 3 สาร คือ quercetin (**1**), rhamnetin (**2**), tamarixetin (**3**) สารประเภท flavones 2 สารคือ luteolin (**4**) และ luteolin-7-methyl ether (**5**) สารประเภท dihydroflavonols 2 สารคือ dihydroquercetin-4′-methyl ether (**6**) และ dihydroquercetin-7,4′-dimethyl ether (**7**) สารประเภท flavanones 2 สารคือ 5,7,3′,5′-tetrahydroxyflavanone (**8**) และ blumeatin (**9**)



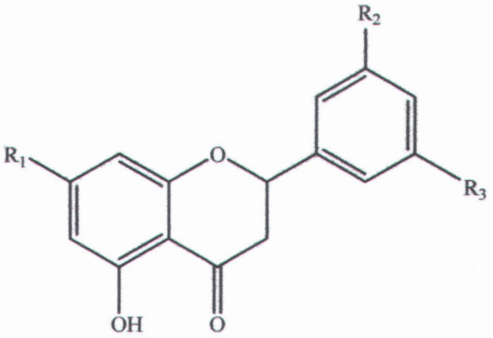
	R_1	R_2	R_3
(1) Quercetin	OH	OH	OH
(2) Rhamnetin	OCH_3	OH	OH
(3) Tamarixetin	OH	OH	OCH_3



	R_1	R_2	R_3
(4) Luteolin	OH	OH	OH
(5) Luteolin-7-methyl ether	OCH_3	OH	OH



	R_1	R_2	R_3
(6) Dihydroquercetin-4'-methylether	OH	OH	OCH_3
(7) Dihydroquercetin-7,4'-dimethylether	OCH_3	OH	OCH_3



	R_1	R_2	R_3
(8) 5,7,3',5'-Tetrahydroxyflavanone	OH	OH	OH
(9) Blumeatin	OCH_3	OH	OH

ภาพที่ 3 องค์ประกอบทางเคมีที่แยกได้จากใบหนาด

ตารางที่ 2 ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารสกัดใบหนาด (*Blumea balsamifera* DC) ($n = 3$)

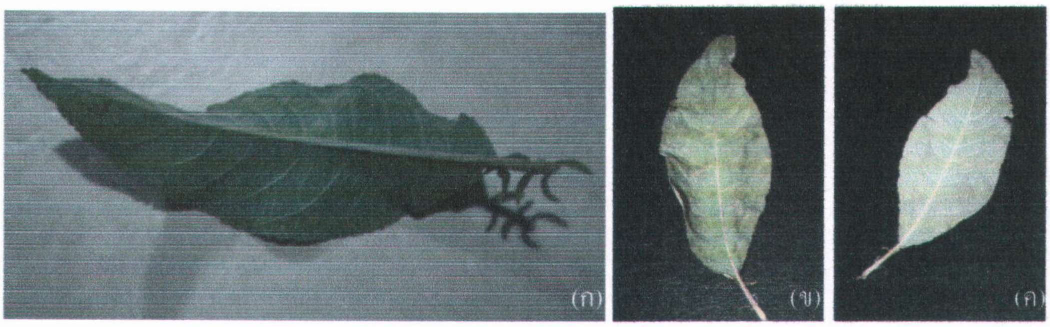
สารสกัด	**IC_{50} (mg/ml)**
Hexane extract	0.319 ± 0.002
Ethylacetate extract	0.206 ± 0.004
Water extract	0.345 ± 0.008

ตารางที่ 3 ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารบริสุทธิ์จากใบหนาด (*Blumea balsamifera* DC)

สารประกอบ	**IC_{50} (mM)** ±SD
Quercetin (**1**)	0.072 ± 0.004
Rhamnetin (**2**)	0.107 ± 0.017
Tamarixetin (**3**)	0.144 ± 0.004
Luteolin (**4**)	0.258 ± 0.015
Luteolin-7-methyl ether (**5**)	0.350 ± 0.002
Dihydroquercetin-4′-methyl ether (**6**)	0.115 ± 0.013
Dihydroquercetin-7,4′-dimethyl ether (**7**)	0.162 ± 0.042
5,7,3′,5′-Tetrahydroxyflavanone (**8**)	0.423 ± 0.049
Blumatin (**9**)	0.624 ± 0.029
Kojic acid	0.009 ± 0.005
Arbutin	0.233 ± 0.025

ตอนที่ 2 : การเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสสารสกัดใบหนาดจากแหล่งที่ต่างกัน

สารสกัดใบหนาด



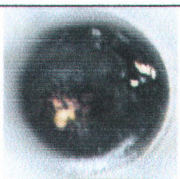
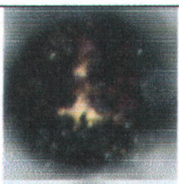
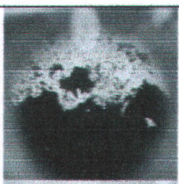
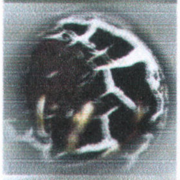
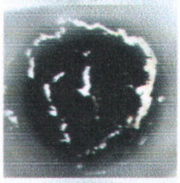
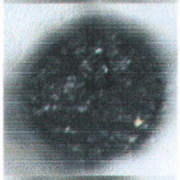
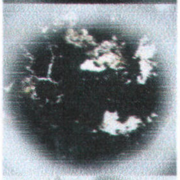
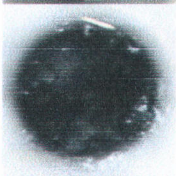
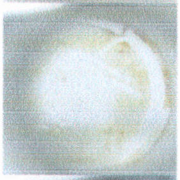
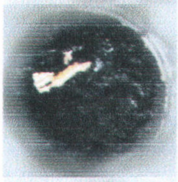
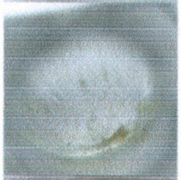
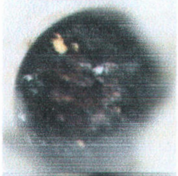
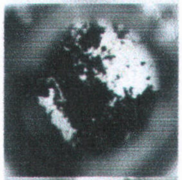
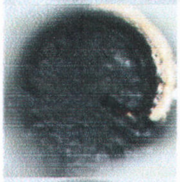
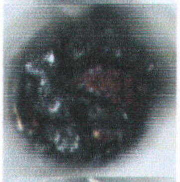
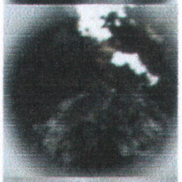
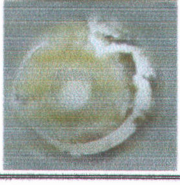
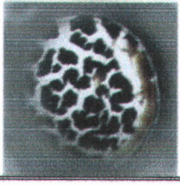
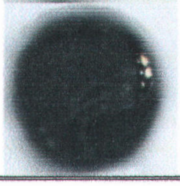
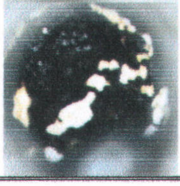
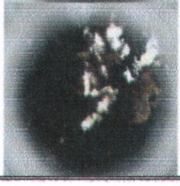
ภาพที่ 3 ลักษณะทางกายภาพของใบหนาด; ใบสด (ก) และใบแห้ง (ข), (ค)

ใบหนาด (**ภาพที่ 3** ก-ค) เก็บรวบรวมจากจังหวัดเชียงราย ในอำเภอต่างๆ 7 อำเภอ นำใบมาตากลมให้แห้งแล้วสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ ได้แก่ เฮกเซน, ไดคลอโรมีเทน (DCM), เอทิลอาซิเตท (EtOAc), เอทานอล (EtOH) และน้ำกลั่น หลังจากแช่ใบหนาดแห้งในตัวทำละลาย 12 ชั่วโมง นำสารสกัดกรองผ่านกระดาษกรองเบอร์ 1 แล้วไปทำให้แห้งด้วยระบบสุญญากาศ

สารสกัดด้วยเฮกเซนมีสีเหลืองลักษณะกึ่งแข็งกึ่งเหลว, สารสกัดด้วยไดคลอโรมีเทนมีสีเขียวเข้มแกมเหลืองลักษณะหนืดกึ่งแข็งกึ่งเหลว, ส่วนสารสกัดด้วยเอทิลอาซิเตทและเอทานอลมีสีดำแกมเขียวเข้มลักษะหนืดกึ่งแข็งกึ่งเหลวและสารสกัดด้วยน้ำกลั่นมีสีดำลักษณะแข็งแห้ง (ตารางที่ 4)

เมื่อเปรียบเทียบร้อยละผลได้ของสารสกัดใบหนาด พบว่า สารสกัดด้วยเฮกเซนมีร้อยละผลได้น้อยที่สุด เนื่องมาจากเฮกเซนเป็นตัวทำละลายอินทรีย์ที่มีขั้วต่ำ จึงไม่สามารถสกัดหรือละลายสารในใบหนาดซึ่งเป็นจำพวกฟลาโวนอยด์ที่มีหมู่ไฮดรอกซีหลายหมู่ ในขณะที่ตัวทำละลายอินทรีย์ที่มีขั้วสูงกว่าเฮกเซน ได้แก่ ไดคลอโรมีเทน เอทิลอาซิเตท เอทานอล และน้ำกลั่น แสดงร้อยละผลได้ของสารสกัดใบหนาดสูงกว่าโดยเพิ่มมากขึ้นตามขั้ว และตามความสามารถในการสกัดสารจำพวกฟลาโวนอยด์ที่มีหมู่ไฮดรอกซีหลายหมู่ สารสกัดด้วยน้ำกลั่นมีร้อยละผลได้มากที่สุด และสารสกัดจากอำเภอพญาเม็งรายแสดงร้อยละผลได้มากที่สุดเมื่อเทียบในตัวทำละลายอินทรีย์ต่างๆ ดังแสดงในตารางที่ 4 และ 5

ตารางที่ 4 ลักษณะทางกายภาพของสารสกัดใบหนาดจากอำเภอต่างๆ ในจังหวัดเชียงราย

แหล่ง	Types of solvent extraction				
	Hexane	DCM	EtOAc	EtOH	Water
CHK					
CHS					
DL					
MCH					
MS					
PMR					
WCH					

CHK; อำเภอเชียงของ, CHS; อำเภอเชียงแสน, DL; อำเภอดอยหลวง, MCH; อำเภอแม่จัน, MS; อำเภอแม่สาย, PMR; อำเภอพญาเม็งราย, WCH; อำเภอเวียงชัย

ตารางที่ 5 ร้อยละผลได้ของสารสกัดใบหนาดจากอำเภอต่างๆ ในจังหวัดเชียงราย

แหล่ง	ร้อยละผลได้ ชนิดตัวทำละลายอินทรีย์				
	Hexane	DCM	EtOAc	EtOH	Water
CHK	0.63	0.99	1.90	3.97	4.70
CHS	0.47	0.58	1.27	3.56	3.68
DL	0.50	0.65	1.68	3.41	5.22
MCH	0.32	0.53	1.44	3.55	3.64
MS	0.43	0.50	1.35	3.45	2.91
PMR	0.63	1.41	5.08	5.11	6.59
WCH	0.56	0.92	2.18	4.14	4.14

CHK; อำเภอเชียงของ, CHS; อำเภอเชียงแสน, DL; อำเภอดอยหลวง, MCH; อำเภอแม่จัน, MS; อำเภอแม่สาย, PMR; อำเภอพญาเม็งราย, WCH; อำเภอเวียงชัย

4.3 การทดสอบหาผลปริมาณสารประกอบฟีโนลิคทั้งหมด

ผลรวมสารประกอบฟีโนลิคของสารสกัดใบหนาดทดสอบโดยวิธี Folin Ciocalteu ซึ่งสารเคมีชนิดนี้จะทำปฏิกิริยากับหมู่ไฮดรอกซีของฟีโนลิค และในการทดลองนี้จะเทียบปริมาณสารประกอบฟีโนลิคของสารสกัดโดยใช้สมการของแกลลิคแอซิดในหน่วยไมโครกรัมต่อมิลลิกรัมของสารสกัด ดังแสดงในตารางที่ 4.4

สารสกัดด้วยเอทิลอาซีเตทแสดงปริมาณสารประกอบฟีโนลิคทั้งหมด ซึ่งปริมาณผลรวมสารประกอบฟีโนลิคลดลงตามความสามารถในการสกัดสารประกอบฟีโนลิคของตัวทำละลายอินทรีย์ ดังนี้ สารสกัดด้วยเอทิลอาซิเตท > สารสกัดด้วยเอทานอล > สารสกัดด้วยไดคลอโรมีเทน > สารสกัดด้วยน้ำกลั่น > สารสกัดด้วยเฮกเซน ซึ่งสารประกอบที่มีกลุ่มฟีนอลหลายหมู่ในพืชจะถูกสกัดได้ด้วยความสามารถในการละลายของตัวทำละลาย ตัวทำละลายที่มีขั้วสูงมีผลต่อการสกัดสารประกอบฟีโนลิคที่มีขั้วสูงในปริมาณที่มากกว่าตัวทำละลายที่มีขั้วต่ำ (Naczk&Shahidi, 2006) จากงานวิจัยใบหนาดพบว่า ในสารสกัดใบหนาดประกอบด้วยสารจำพวกฟลาโวนอยด์ที่มีกลุ่มไฮดรอกซีหลายหมู่ ซึ่งสามารถละลายได้น้อยในตัวทำละลายที่มีขั้วต่ำ เช่น เฮกเซน ยิ่งไปกว่านั้นสารประกอบในสารสกัดใบหนาดประกอบด้วยสารจำพวกอะไกลโคน หรือ โมเลกุลที่ไม่มีน้ำตาลเป็นส่วนประกอบ จึงละลายในน้ำได้น้อย

จากการเปรียบเทียบผลรวมสารประกอบฟีโนลิคของสารสกัดใบหนาดในแต่ละอำเภอพบว่าใบหนาดจากอำเภอดอยหลวงที่สกัดด้วยเอทิลอะซิเตทมีปริมาณผลรวมสารประกอบฟีโนลิ

คสูงสุด คือ 620.92±0.02 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัมของสารสกัด แต่ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญกับสารสกัดจากอำเภอพญาเม็งรายและอำเภอเวียงชัย ($p < 0.05$) นอกจากนี้จากผลการทดลองสามารถกล่าวได้ว่า สารสกัดใบหนาดจากอำเภอเชียงของ, อำเภอเชียงแสน, อำเภอแม่จัน และอำเภอแม่สายมีปริมาณผลรวมสารประกอบฟีโนลิคที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งลดลงตามลำดับ ($p < 0.05$) สำหรับสารสกัดที่ได้ร้อยละผลได้สูงแต่แสดงปริมาณผลรวมสารประกอบฟีโนลิคน้อยเป็นเพราะในสารสกัดประกอบด้วยสารประกอบจำพวกที่ไม่ใช่ฟีนอลิกและไม่สามารถทำปฏิกิริยากับ Folin Ciocalteu

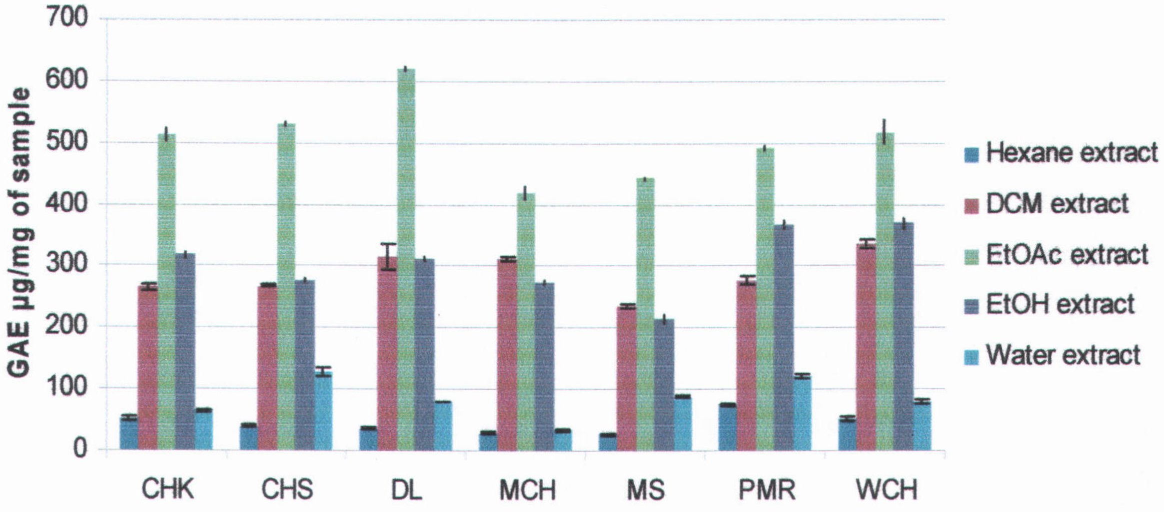
ตารางที่ 6 ปริมาณผลรวมสารประกอบฟีโนลิคของสารสกัดใบหนาด

แหล่ง	GAE µg/mg of sample				
	Types of solvent extraction				
	Hexane[e]	DCM[c]	EtOAc[a]	EtOH[b]	Water[d]
CHK[i]	52.08±2.79	265.33±5.77	514.08±10.5	317.42±5.02	64.58±2.27
CHS[h]	38.42±2.00	268.08±1.62	529.58±3.25	276.67±2.79	128.67±6.64
DL[f]	36.00±1.75	313.75±20.73	620.92±4.06	312.83±4.02	80.75±0.43
MCH[j]	29.42±2.91	310.50±3.78	420.58±10.04	273.92±2.32	33.58±1.77
MS[k]	26.17±1.89	235.25±4.42	442.17±2.08	216.50±6.99	88.00±2.88
PMR[g]	75.83±1.60	276.58±7.87	491.75±2.24	368.17±6.63	120.67±4.40
WCH[fg]	51.92±2.55	336.00±8.35	517.42±18.64	370.17±9.23	78.67±3.62

ค่าที่แสดงในตารางเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

[a-e] ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ที่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญในแถวเดียวกัน ($p < 0.05$)

[f-k] ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ที่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญในคอลัมน์เดียวกัน ($p < 0.05$)



ภาพที่ 4 แผนภูมิแสดงผลรวมสารประกอบฟีโนลิคของสารสกัดใบหนาด

4.4 การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระโดยวิธี 2-2′-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH)

ฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระของ DPPH ซึ่งสามารถสังเกตได้จากค่าดูดกลืนแสงที่ 515 นาโนเมตร ที่ DPPH มีการฟอกสีจากสีม่วงเป็นสีเหลือง เนื่องจากสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระโดยการให้ไฮโดรเจนในการทำพันธะเป็น DPPH-H ซึ่งมีความคงตัวมากขึ้น สำหรับค่าดูดกลืนแสงที่ยิ่งน้อย แสดงว่าสารยับยั้งอนุมูลอิสระยิ่งสามารถให้ไฮโดรเจนได้อย่างรวดเร็ว (Nessa, 2004) สำหรับการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระของฟลาโวนอยด์ที่พบในสารสกัดใบหนาด 6 ชนิด และนำเปรียบเทียบความสามารถกับสารต้านอนุมูลอิสระที่รู้กันทั่วไปคือ Ascorbic acid, BHA และ BHT ผลปรากฏว่า Quercetin มีค่า SC_{50} 0.002 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งแสดงความสามารถในการเป็นสารยับยั้งอนุมูลอิสระได้ดีกว่า ascorbic acid (SC_{50} 0.004 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) จากการทดสอบฟลาโวนอยด์และสารต้านอนุมูลอิสระด้วยสารละลาย DPPH พบว่า มีความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระลดลงตามลำดับดังนี้ Quercetin (1) > ascorbic acid > Blumatin (9) > 5,7,3',5'-Tetrahydroxyflavanone (8) > Butylated hydroxytanisole (BHA) > Dihydroquercetin-4'-methyl ether (6) > Butylated hydroxytoluene (BHT) > Dihydroquercetin-7,4'-dimethyl ether (7) ดังแสดงในตารางที่ 7

ตารางที่ 7 ความเข้มข้นของฟลาโวนอยด์ที่พบในสารสกัดใบหนาดที่สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระได้ที่ร้อยละ 50

สารประกอบ	SC_{50} (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)
Ascorbic acid	0.004
Butylated hydroxyanisole (BHA)	0.0097
Butylated hydroxytoluene (BHT)	0.140
Quercetin (1)	0.002
Dihydroquercetin-4'-methyl ether (6)	0.103
Dihydroquercetin-7,4'-dimethyl ether (7)	0.190
5,7,3',5'-Tetrahydroxyflavanone (8)	0.007
Blumeatin (9)	0.006

สารสกัดใบหนาดด้วยเอทิลอาซิเตทมีความสามารถยับยั้งอนุมูลอิสระสูงสุด โดยร้อยละที่แสดงความสามารถยับยั้งอนุมูลอิสระ และปริมาณผลรวมสารประกอบฟีโนลิคมีความสัมพันธ์กันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับ 0.01 มีค่าความสัมพันธ์ 0.903 โดยใช้ทฤษฎี Pearson correlation ดังนั้นสารสกัดที่มีปริมาณผลรวมสารประกอบฟีโนลิคสูง จะแปรผันตรงกับร้อยละฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระที่มีค่าสูงด้วย

สารสกัดใบหนาดด้วยเอทิลอาซิเตทแสดงร้อยละฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระสูงสุดอย่างมีนัยสำคัญ คือ 97.35±0.01 ($p < 0.05$) เพราะตัวทำละลายเอทิลอาซิเตทสามารถสกัดกลุ่มฟีนอลได้มากกว่า ซึ่งมีไฮดรอกซีหลายหมู่ หรือเป็นตัวทำละลายอินทรีย์ที่มีขั้วสูง นอกจากนี้สารสกัดจากอำเภอพญาเม็งรายมีฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระสูงสุดอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ดังแสดงในตารางที่ 8 และภาพที่ 5

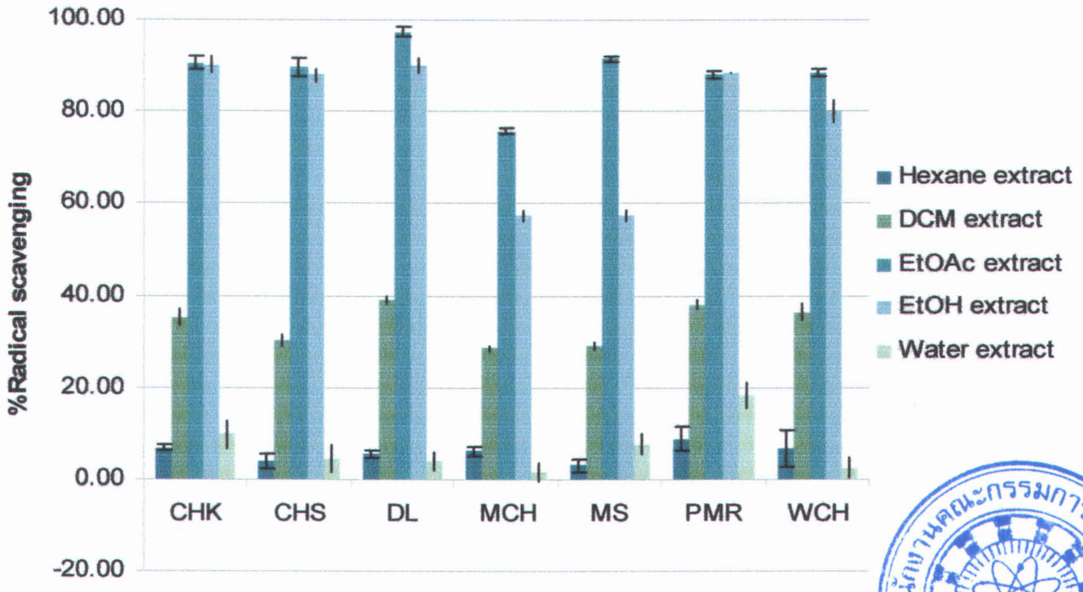
ตารางที่ 8 ฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระของสารสกัดใบหนาด

แหล่ง	% Scavenging activity				
	Types of solvent extraction				
	Hexane[d]	DCM[c]	EtOAc[a]	EtOH[b]	Water[d]
CHK[f]	6.78±0.59	35.18±1.66	90.57±1.40	90.18±1.80	9.73±2.84
CHS[g]	3.82±1.57	30.13±1.21	89.59±2.07	87.85±1.53	4.47±2.89
DL[f]	5.55±0.67	39.03±0.67	97.35±0.91	90.06±1.44	4.02±2.00
MCH[i]	6.22±1.07	28.53±0.70	75.79±0.67	57.39±1.09	1.70±1.99
MS[h]	2.96±1.51	29.02±0.67	91.56±0.56	57.46±1.26	7.70±2.38
PMR[e]	8.87±2.57	37.95±0.93	87.92±0.77	88.39±0.14	18.11±2.76
WCH[g]	6.84±3.95	36.41±1.99	88.48±0.65	80.11±2.51	2.43±2.26

ค่าที่แสดงในตารางเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

[a-d] ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ที่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญในแถวเดียวกัน ($p < 0.05$)

[e-i] ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ที่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญในคอลัมน์เดียวกัน ($p < 0.05$)



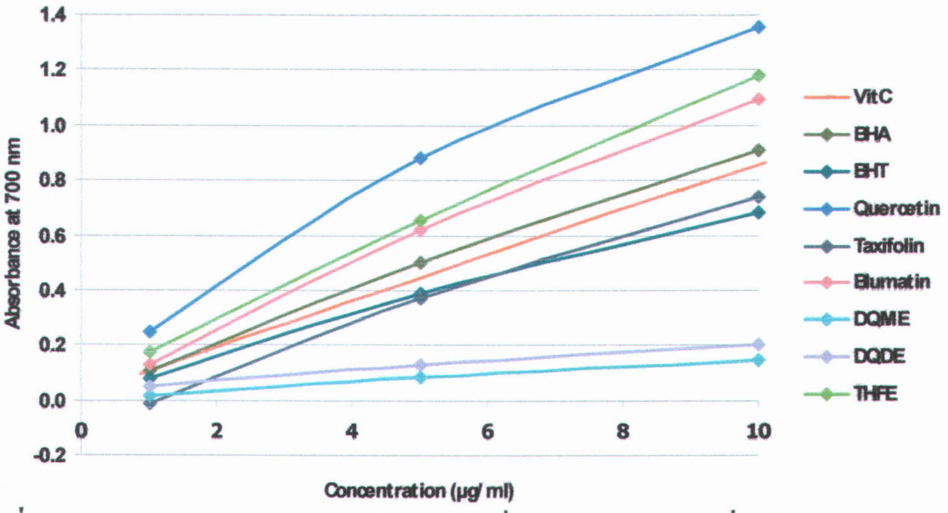
ภาพที่ 5 แผนภูมิแสดงฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระของสารสกัดใบหนาด

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ห้องสมุดงานวิจัย

4.5 การทดสอบความสามารถในการรีดักชั่น

ความสามารถในการรีดักชั่นสามารถวัดปฏิกิริยาของสารที่เปลี่ยน $[Fe(CN)_6]^{3-}$ เป็น $[Fe(CN_6)]^{4-}$ ซึ่งเป็นสารประกอบที่มีสีฟ้า เนื่องมาจากประจุ Fe^{3+} ที่เหลืออยู่ในระบบ การทำปฏิกิริยาที่เกิดจากการรีดักชั่นของ Fe^{3+} (ferricyanide) ใน stoichiometry ที่เหลืออยู่ในระบบด้วยสารต้านอนุมูลอิสระ โดยจะวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 700 นาโนเมตร ถ้าหากค่าดูดกลืนแสงมากก็แสดงว่าเกิดปฏิกิริยามากและสารตัวอย่างนั้นมีความสามารถในการรีดักชั่นสูง

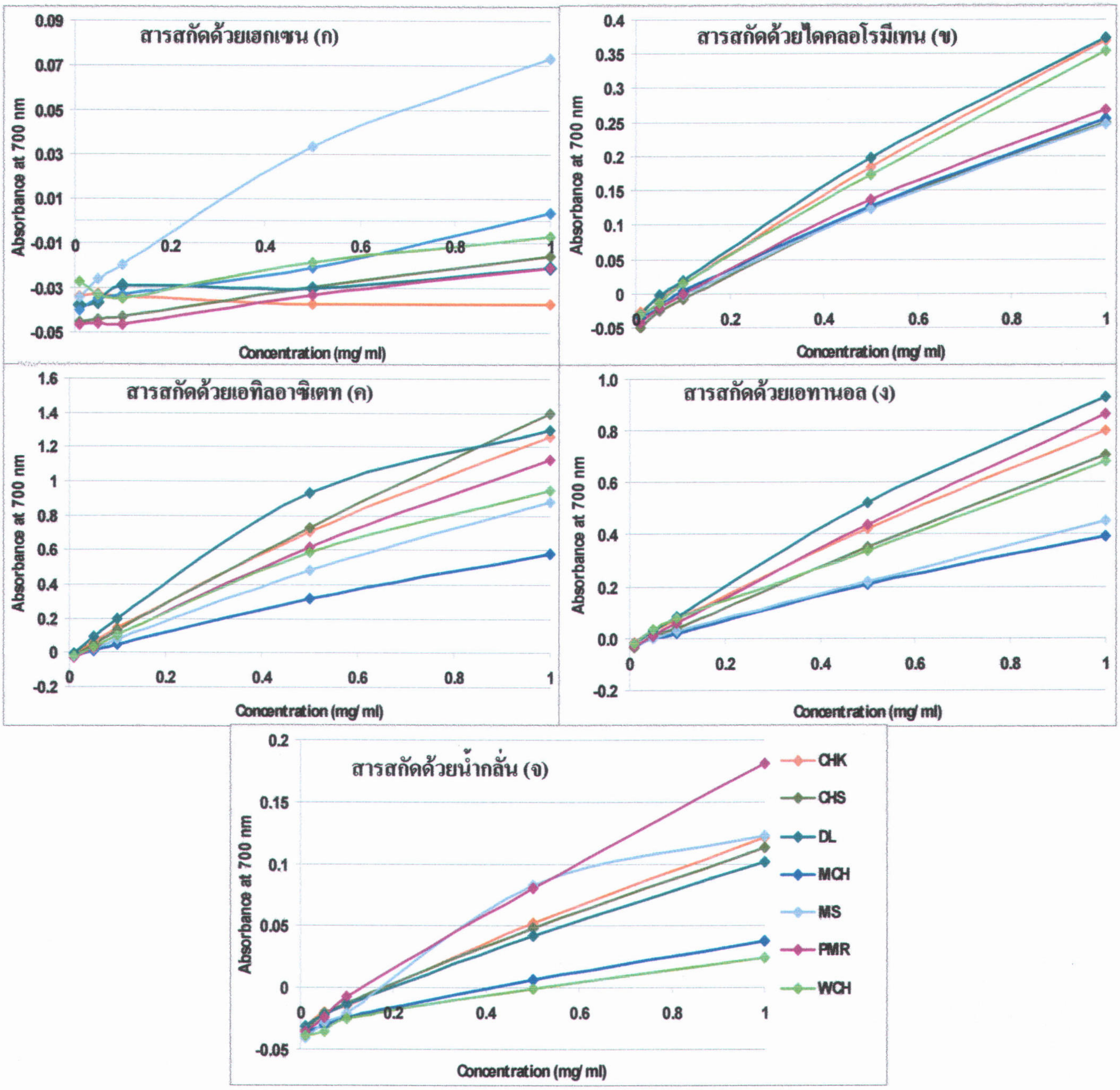
ฟลาโวนอยด์ที่พบในสารสกัดใบหนาด 6 ชนิด เทียบปฏิกิริยาความสามารถในการรีดักชั่นกับ Ascorbic acid ที่เป็นสารยับยั้งอนุมูลอิสระ ดังแสดงในกราฟ ภาพที่ 6 ความสามารถในการรีดักชั่นเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของฟลาโวนอยด์ ความสามารถในการรีดักชั่นของ Quercetin (1), 5,7,3',5'-Tetrahydroxyflavanone (8) และ Blumatin (9) มากกว่า ascorbic acid ส่วน Dihydroquercetin-4'-methyl ether (6) และ Dihydroquercetin-7,4'-dimethyl ether (7) มีความสามารถในการรีดักชั่นต่ำมาก นอกจากนี้จะพบว่า Quercetin มีความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH และ ความสามารถในการรีดักชั่นดีกว่า ascorbic acid



ภาพที่ 6 กราฟเส้นแสดงความสามารถในการรีดักชั่นของฟลาโวนอยด์ที่พบในสารสกัดใบหนาด

สารสกัดใบหนาดด้วยเฮกเซนแสดงค่าความสามารถในการรีดักชั่นน้อยที่สุด ดังภาพที่ 7 ก และสารสกัดใบหนาดด้วยเอทิลอะซิเตทแสดงค่าดูดกลืนแสงมากที่สุด ดังรูปภาพที่ 7 ค สารสกัดใบหนาดด้วยไดคลอโรมีเทน, เอทิลอะซิเตท และ เอทานอลที่มาจากอำเภอดอยหลวงแสดงค่าดูดกลืนแสงที่มาก แต่สารสกัดจากอำเภอแม่จันแสดงค่าดูดกลืนแสงน้อยที่สุด ดังแสดงในรูปภาพที่ 7 ข, ค, ง แนวโน้มเส้นกราฟของค่าดูดกลืนแสงของความสามารถในการรีดักชั่นมีความสัมพันธ์กับปริมาณ

ผลรวมสารประกอบฟีโนลิคและฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระ ซึ่งอธิบายได้จากสารสกัดใบหนาดจากอำเภอดอยหลวงที่มีปริมาณผลรวมสารประกอบฟีโนลิคและมีฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระที่สูง สรุปได้ว่าชนิดของตัวทำละลายที่ใช้สกัดและแหล่งของพืช มีผลต่อความสามารถในการรีดักชั่นและมีความสัมพันธ์กับปริมาณผลรวมสารประกอบฟีโนลิค และฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระ



ภาพที่ 7 กราฟเส้นแสดงความสามารถในการรีดักชั่นของสารสกัดใบหนาด; สารสกัดด้วยเฮกเซน (ก), สารสกัดด้วยไดคลอโรมีเทน (ข), สารสกัดด้วยเอทิลอาซิเตท (ค), สารสกัดด้วยเอทานอล (ง) และสารสกัดด้วยน้ำกลั่น (จ)

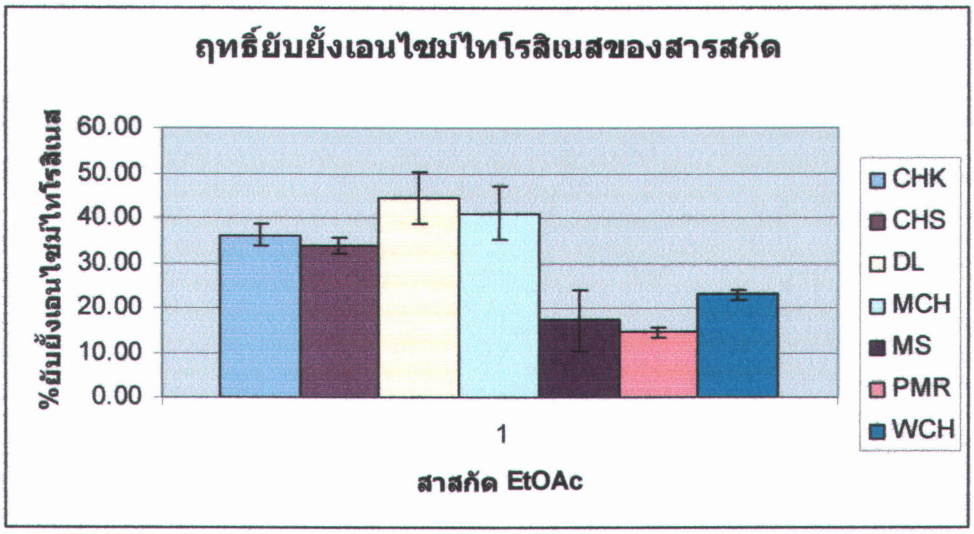
4.7 การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรสิเนส

เมื่อนำสารสกัดด้วยเอทิลอาซิเตทมาทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรสิเนสด้วยวิธี Dopachrome ทดสอบปฏิกิริยาโดยใช้ L-dopa เป็นสารตั้งต้นทำปฏิกิริยากับเอนไซม์ไทโรสเนสผลิต Dopachorme ซึ่งดูดกลืนแสงที่ 475 นาโนเมตร หากสารสกัดมีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรสิเนสก็จะมีค่าดูดกลืนแสงที่ต่ำ เพราะเกิด Dopachrome น้อย โคจิกแอซิดมีฤทธิ์เป็นสารยับยั้งเอนไซม์ไทโรสิเนส และที่ความเข้มข้น 1.4 ไมโครโมลาร์ แสดงร้อยละยับยั้งเอนไซม์ไทโรสิเนสเป็น 76.51 สารสกัดจากอำเภอดอยหลวงที่สกัดด้วยเอทิลอาซิเตทมีฤทธิ์ยับยั้งมากกว่าสารสกัดที่ได้จากอำเภออื่น แต่จากการเปรียบเทียบร้อยละฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรสิเนสของสารสกัดใบหนาดไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญของแหล่งของพืชจากอำเภอต่างๆ

ตารางที่ 9 ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรสิเนสของสารสกัดใบหนาด

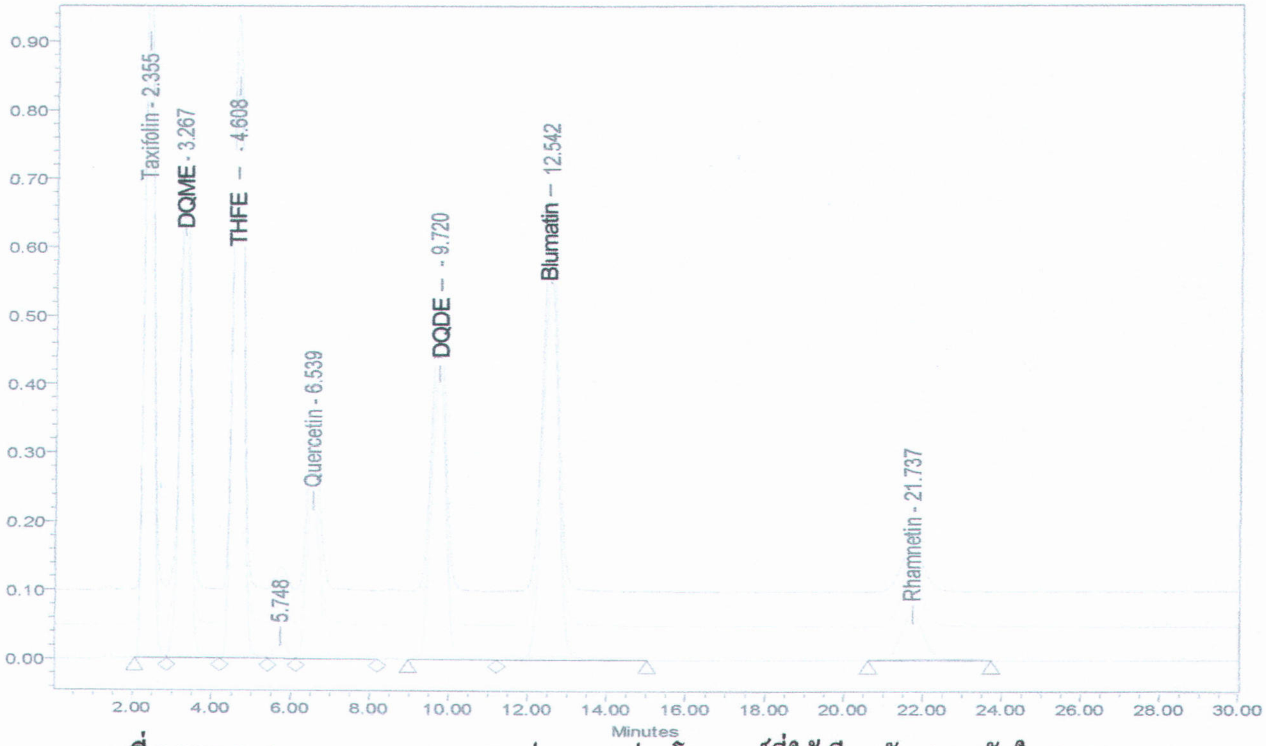
แหล่ง	% ยับยั้งเอนไซม์ไทโรสิเนสของสารสกัด EtOAc
CHK	36.14 ± 2.41
CHS	33.73 ± 1.81
DL	44.28 ± 5.72
MCH	40.96 ± 6.02
MS	17.17 ± 6.93
PMR	14.46 ± 1.20
WCH	22.89 ± 1.20

ค่าที่แสดงในตารางเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ทำการทดลอง 3 ซ้ำ



ภาพที่ 8 แผนภูมิแสดงฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรสิเนสของสารสกัดใบหนาด

4.8 การวิเคราะห์เชิงปริมาณโดยวิธี HPLC



ภาพที่ 9 HPLC chromatogram ของสารประกอบฟลาโวนอยด์ที่ใช้เทียบกับสารสกัดใบหนาด

ตารางที่ 10 ข้อมูลกราฟของสารประกอบฟลาโวนอยด์ (*n*=3)

Compounds	Retention time (min)	Regression equation	*r*	Linear range (µg/ml)
Taxifolin	2.360	Y=243328.6x+76058.78	0.9989	11.07-199.23
DQME	3.264	Y=188236.7x+59778.86	0.9998	11.06-199.20
THFE	4.612	Y=248833.3x+81410.94	0.9998	11.10-199.24
Quercetin	6.556	Y=19870.22x+26552.24	0.9999	11.79-199.62
DQDE	9.721	Y=159165.4x+51500.51	0.9999	11.16-199.26
Blumeatin	12.537	Y=195328.9x+77413.42	0.9999	11.44-199.56
Rhamnetin	21.754	Y=27645.97-1838.44x	0.9999	6.13-100.03

จากสมการ $y= ax + b$, x อ้างถึงความเข้มข้นของาสารประกอบฟลาโวนอยด์ (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร, y แทนพื้นที่ใต้กราฟ, และ r แสดง correlation coefficient ของสมการเส้นตรง

ตารางที่ 11 ปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ในสารสกัดใบหนาด

		ปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ในสารสกัดใบหนาด (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)				
สารสกัด		DQME (6)	DQDE (7)	THFE (8)	Blumeatin (9)	ปริมาณรวมสาร ประกอบฟลาโวนอยด์ (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)
Hexane	CHK	nd	4.7±0.8	nd	nd	4.70
	CHS	nd	7.8±0.1	nd	nd	7.80
	DL	nd	6.1±0.1	nd	nd	6.10
	MCH	nd	8.1±0.4	nd	nd	8.10
	MS	nd	nd	nd	nd	0.00
	PMR	nd	7.7±0.5	nd	nd	7.70
	WCH	nd	10.2±0.3	nd	nd	10.20
DCM	CHK	29.3±0.0	26.3±0.8	nd	7.7±0.1	63.30
	CHS	16.8±0.1	26.3±0.6	nd	9.9±0.1	53.00
	DL	23.4±0.1	36.2±0.1	nd	12.4±0.1	72.00
	MCH	41.6±1.4	49.6±1.0	nd	9.6±0.4	100.80
	MS	10.1±0.1	20.4±0.7	nd	12.6±0.1	43.10
	PMR	25.1±0.1	45.5±0.6	nd	17.9±0.0	88.50
	WCH	50.7±0.2	38.1±0.1	nd	16.1±0.0	104.90
EtOAc	CHK	28.1±0.0	12.4±0.0	5.3±0.0	5.9±0.1	51.70
	CHS	32.2±0.0	14.5±0.1	6.4±0.1	12.1±0.1	65.20
	DL	22.6±0.0	6.2±0.0	2.9±0.0	3.9±0.0	35.60
	MCH	28.9±0.1	13.8±0.0	3.7±0.0	9.1±0.0	55.50
	MS	17.2±0.0	7.7±0.0	2.5±0.0	9.8±0.0	37.20
	PMR	35.6±0.0	13.2±0.0	13.8±0.0	11.7±0.0	74.30
	WCH	48.8±0.1	11.6±0.1	15.2±0.0	11.1±0.0	86.70
EtOH	CHK	5.7±0.0	3.0±0.1	nd	0.6±0.0	9.30
	CHS	nd	nd	nd	0.5±0.0	0.50
	DL	6.7±0.0	4.4±0.1	0.2±0.0	2.9±0.0	14.20
	MCH	5.1±0.0	3.6±0.0	nd	1.0±0.0	9.70
	MS	1.6±0.0	0.3±0.0	nd	1.4±0.0	3.30
	PMR	11.4±0.0	10.3±0.0	3.7±0.0	8.8±0.0	34.20
	WCH	23.1±0.0	6±0.1	6.7±0.7	4±0.0	39.80

ค่าที่แสดงในตารางเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ทำการฉีดทดลอง 3 ซ้ำ

HPLC chromatogram ของสารสกัดใบหนาดที่ 285 นาโนเมตรนั้นแสดงสารประกอบฟลาโวนอยด์จำนวน 4 ชนิด ได้แก่ DQME (**6**), DQDE (**7**), THFE (**8**) และ blumeatin (**9**) ซึ่งสารประกอบชนิดอื่นที่ไม่พบในสารสกัดใบหนาด ได้แก่ quercetin และ rhamnetin สารประกอบเหล่านี้อาจสกัดได้ในปริมาณที่น้อยและไม่สามารถตรวจบอกปริมาณได้ สารสกัดใบหนาดด้วยเฮกเซนตรวจพบ DQDE เพียงชนิดเดียวเท่านั้นและมีปริมาณสารน้อยมาก เพราะคุณสมบัติที่มีขั้วต่ำของเฮกเซนที่สามารถสกัดสารที่มีความเป็นขั้วต่ำและในปริมาณที่น้อยกว่าตัวทำละลายชนิดอื่น สารสกัดด้วยไดคลอโรมีเทน, เอทิลอาซิเตท และเอทานอลแสดงสารประกอบฟลาโวนอยด์ ดังแสดงในตารางที่ 4.9 ในทางตรงกันข้ามสารสกัดด้วยน้ำกลั่นไม่พบสารประกอบที่ 285 นาโนเมตร ซึ่งสารประกอบที่สกัดได้ด้วยน้ำกลั่นนั้นมีความเป็นขั้วสูงและไม่สามารถตรวจปริมาณได้ด้วยระบบการวิเคราะห์แบบนี้

การที่สารสกัดด้วยเอทิลอาซิเตทและเอทานอลแสดงฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระสูง อาจเป็นเพราะอิทธิพลมาจากการที่มีสารประกอบฟลาโวนอยด์สูง โดยเฉพาะ THFE ที่พบเฉพาะในสารสกัดด้วยเอทิลอาซิเตทและเอทานอล สารประกอบฟลาโวนอยด์ที่มีความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญต่อฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระเทียบเป็น DQME (0.517), THFE (0.585) และ blumeatin (0.421) ที่ระดับ 0.01 โดยทฤษฎี Pearson correlation แต่ DQDE มีความสัมพันธ์เพียง 0.055 ซึ่งมีความสัมพันธ์อย่างไม่เป็นนัยสำคัญ สำหรับฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรสิเนสไม่พบความสัมพันธ์กับสารประกอบฟลาโวนอยด์เหล่านี้ตามทฤษฎี Pearson correlation