รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

เรื่อง ฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดหยาบเอทานอลจากหม่อน (*Morus alba Linn.*) และกาวไหม (*Bombyx mori.*) เพื่อการตั้งสูตรตำรับผลิตภัณฑ์บำรุงผิวขาว

Biological activity of crude ethanol extracted from mulberry (*Morus alba Linn*.) and silk sericin protein (*Bombyx mori*.) for skin whitening cosmatics products

ผู้วิจัย

ผศ.ดร.วิชุดา จันทร์ข้างแรม
อาจารย์สุนทรต์ ชูลักษณ์

โครงการวิจัยประเภทงบประมาณเงินรายได้ จากเงินอุดหนุนรัฐบาล
(งบประมาณแผ่นดิน) ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. ๒๕๖๐
มหาวิทยาลัยบรูพา

รหัสโครงการ๓๓/๒๕๖๐
สัญญาเลขที่๓๓/๒๕๖๐

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

เรื่อง ฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดหยาบเอทานอลจากหม่อน (*Morus alba Linn*.) และกาวไหม (*Bombyx mori*.) เพื่อการตั้งสูตรตำรับผลิตภัณฑ์บำรุงผิวขาว

Biological activity of crude ethanol extracted from mulberry (*Morus alba Linn*.) and silk sericin protein (*Bombyx mori*.) for skin whitening cosmatics products

ผู้วิจัย

ผศ.ดร.วิชุดา จันทร์ข้างแรม
คณะวิทยาศาสตร์และสังคมศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา วิทยาเขตสระแก้ว

ตุลาคม ๒๕๖๑

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากงบประมาณเงินรายได้จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน) ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. ๒๕๖๐ มหาวิทยาลัยบูรพา ผ่านสำนักงานคณะกรรมการการวิจัยแห่งชาติ สัญญาเลขที่ ๓๓/๒๕๖๐

ผศ.ดร.วิชุดา จันทร์ข้างแรม

ตุลาคม ๒๕๖๑

บทคัดย่อ

การศึกษาสารสกัดหยาบด้วยเอทานอลของกาวไหมและหม่อนนำมาวิเคราะห์กิจกรรมการต้านออกซิเดชันและปริมาณสารฟีนอลิกโดยรวมด้วยวิธีต่างๆ ได้แก่ ABTS (๒,๒'-azino-bis (๓-ethylbenzthiazoline-๖-sulphonic)) , DPPH (๒,๒-Diphenyl-๑-picrylhdrazyl radical) และ ferric reducing antioxidant power (FRAP) หาปริมาณฟีนอลิกโดยรวมด้วยวิธี Folin-Ciocalteu หาปริมาณฟลาโวนอยด์โดยรวมโดยใช้วิธี aluminum chloride colorimetric assay การหาปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Lowry assay และการหาฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสด้วยวิธี Dopachrome โดยมีสารไทโรซีนเป็นสารตั้งต้น ผลการทดลองพบว่า เมื่อวัด กิจกรรมการต้านออกซิเดชันด้วยวิธี DPPH กาวไหมพันธุ์เหลืองสุรินทร์มีค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง (% inhibition) ที่ต่ำที่สุด (๙.๒๕๗±๐.๐๐๓) หม่อนสายพันธุ์นครราชสีมา ๖๐ สามารถรีดิวซ์ TPRZ-Fe (III) complex ไปเป็น TPRZ-Fe(II) ได้สูงที่สุด(๔๙๐.๕๑๘±๐.๐๑๑) และหม่อนพันธุ์นครราชสีมา๖๐ หม่อนพันธุ์สกลนครมีกิจกรรมการกำจัดอนุมูลอิสระ ๒,๒'-azino-bis (๓-ethylbenzthiazoline-๖-sulphonic acid (ABTS) ที่ใกล้เคียงกัน (๙๗.๗๒๕±๐.๐๐๒, ๙๗.๘๘๐±๐.๐๐๑๙ ตามลำดับ) ปริมาณฟีนอลิกโดยรวมสูงที่สุดพบในหม่อนพันธุ์สกลนคร (๓๕๗๔.๗๓๑µg/ ๑ g สารตัวอย่าง) ขณะที่กาวไหมสายพันธุ์นางน้อยศรีษะเกษปริมาณฟีนอลิกต่ำที่สุด (๖๒.๘๗๑ µg/ ๑ g สารตัวอย่าง) ปริมาณฟลาโวนอยด์โดยรวมพบว่าหม่อนพันธุ์สกลนครมีปริมาณฟลาโวนอยด์โดยรวมสูงที่สุด (๕๑๕๒๗.๓๗ µg/ ๑ g สารตัวอย่าง) การหาปริมาณโปรตีนในสารสกัดหยาบของกาวไหมและหม่อนจะพบว่าในหม่อนพันธุ์สกลนครจะมีปริมาณโปรตีนที่มากที่สุด (๖๒๓๔.๙๓๓ µg/g) และในกาวไหมสายพันธุ์ไหมอีรี่ (ไหมป่า) มีโปรตีนน้อยที่สุด (๑๐๖.๓๓๓ µg/g) สารสกัดหยาบของกาวไหมมีการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสที่สูงกว่าในสารสกัดหยาบจากหม่อน จากผลการวิจัยทั้งหมดชี้ให้เห็นว่า หม่อนทั้ง ๒ สายพันธุ์จะมีปริมาณฟีนอลิกโดยรวมและปริมาณฟลาโวนอยด์โดยรวมสูง และส่งผลให้มีฤทธิ์ในการต้านออกซิเดชันได้อย่างมีประสิทธิภาพ

คำสำคัญ สารสกัดหยาบ กิจกรรมการต้านออกซิเดชัน ฟีนอลิก ฟลาโวนอยด์ เอนไซม์ไทโรซิเนส

Abstract

In this study, the crude ethanol extracts of silk sericin and mulberry were analyzed for phenolic antioxidant activity by ABTS (2,2'-azino-bis (3-ethylbenzthiazoline-6- DPPH (2,2-Diphenyl-1-picrylhdrazyl radical) and ferric reducing antioxidant power (FRAP). Total phenolic compound was determined by Folin-Ciocalteu assay. The total flavonoid content was determined by using an aluminum chloride colorimetric assay. The protein content was analyzed by Lowry assay and tyrosinase inhibition assay was also determined. The results showed that, when measured by DPPH, Luang Surin had the lowest percentage of inhibition (9.257 ± 0.003). Mulberry strain Nakhon Ratchasima 60 has highest reducing power (490.518 ± 0.011) that convert TPRZ-Fe (III) into TPRZ-Fe (II). The Nakhon Ratchasima 60 and Sakon Nakhon have approximately similar level of antioxidant activity when determined by 2,2'-azine bis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid (ABTS) assay. (97.725 ± 0.002, 97.880 ± 0.0019, respectively) The highest total phenolic content was found in Sakon Nakhon (3574.731 μg / 1 g sample) while the lowest phenolic content (62.871 μg / 1 g) was detected in Nang Noi Sri Saket. The highest total flavonoid content was found in Sakon Nakhon (51527.37 μg / 1 g sample). The protein content of crude extract Sakon Nakhon has the highest protein level (6234.933 μg / g) whereas the eri silk possesses the lowest protein content (106.333 μg / g). The crude ethanol extracted showed higher inhibitory activity of tyrosinase enzyme than that of the mulberry extracts. The results from this research suggested that the two types of mulberry had a high total phenolic content and also high total flavonoid content with correspond to the level of its antioxidant activity.

KEYWORDS: CRUDE EXTRACT ANTIOXIDANT ACTIVITY PHENOLIC FLAVONOID TYROSINASE ENZYME

สารบัญ

หน้า

บทที่ ๑ บทนำ.....๑
ความสำคัญและที่มาของปัญหา.....๑
วัตถุประสงค์.....๒
แนวคิดในการทำวิจัย.....๒
บทที่ ๒ เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....๔
งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....๑๐
บทที่ ๓ วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการทดลอง.....๑๒
บทที่ ๔ ผลการวิจัย.....๑๘
บทที่ ๕ สรุปผลการวิจัย.....๔๑
เอกสารอ้างอิง.....๔๘
ภาคผนวก.....๔๒
รายงานการเงิน.....๕๔
ประวัติผู้วิจัย.....

บทที่ 1
ที่มาและความสำคัญ

โปรตีนไหม (Silk Protein) หรือเซริซีน (Sericin) หรือกาวไหม เป็นส่วนที่สำคัญของเส้นไหม โดยเป็นผลิตภัณฑ์พอลิเมอร์จากธรรมชาติ (natural polymer product) ที่สร้างจาก หนอนไหม, *Bombyx mori* ทำหน้าที่ในการยึดเส้นใยไฟโบรอินในโครงสร้างของเส้นไหมไว้ด้วยกัน ทำให้เมื่อนำเส้นไหมมาทอเป็นผ้าจะมีความเงางามและมีราคาค่อนข้างสูง องค์ประกอบสำคัญที่ได้จากส่วนของใยไหม ทั้งจากรังและเส้นจะมี 2 ชนิด คือ ผงไหมจากกาวไหม ซึ่งมีประมาณ 20-30% และผงไหมจากเส้นไหม (Fibrous Protein หรือ Fibroin) อีกประมาณ 70-80% โดย เซริซินจะมีลักษณะเป็น Amorphous Matrix ทำหน้าที่เป็นกาวเชื่อม Fibroin Filaments ไว้ด้วยกัน มีกรดอะมิโน 18 ชนิด เซริซิน จะมีสารสำคัญบางชนิดที่ช่วยป้องกันผิวแห้ง ลดการเจริญเติบโตของ ไวรัส และมีสารต้านการเจริญเติบโตของไวรัส

เซริซินประกอบด้วยกรดอะมิโนจำพวกมีขั้ว จึงทำให้ละลายน้ำได้ ประกอบด้วยเซริซินอย่างน้อย 6 ชนิด ที่มีขนาดโมเลกุลตั้งแต่ 6 ถึง 467 กิโลดาลตัน กรดอะมิโนที่พบมากกว่าร้อยละ 70 ได้แก่ เซรีน (serine), แอสปาติก (aspartic), กลูตามิก (glutamic), อาร์จินีน (arginine), ทรีโอนีน(threonine) และ ไลซีน (lysine) เซริซินมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ยับยั้งการทำลายเซลล์โดย Oxygen Free Radicals มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียบางชนิดซึ่งเป็นสาเหตุของโรคผิวหนัง ช่วยรักษาแผล และเป็นสารให้ความชุ่มชื้น (Moisturizer) กระตุ้นการสร้างคอลลาเจน (Callagen) ที่เพิ่มความยืดหยุ่นของผิว (Skin Elasticity) และความอ่อนเยาว์ให้แก่ผิว (Skin Rejuvination)

สารต้านอนุมูลอิสระซึ่งมีคุณสมบัติในการป้องกันการเกิดอนุมูลอิสระทำลายหรือยับยั้งอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาลูกโซ่ทำให้สะอนุมูลอิสระมีจำนวนน้อยลงทำให้ความเสี่ยงของการเกิดโรคลดลง ดังนั้นสารต้านอนุมูลอิสระจึงช่วยลดความเสี่ยงต่อการเกิดโรคร้ายได้ ในผักผลไม้มีสารต้านอนุมูลอิสระหลายชนิด เช่น วิตามินซี เบต้าแคโรทีน(beta-carotene) สารกลุ่มโพลีฟีนอลิก(polyphenolics) เช่น ฟลาโวนอยด์ (flavonoids) เป็นต้น ในปัจจุบันมีรายงานเกี่ยวกับสารในกลุ่มโพลีฟีนอลิก ว่าเป็นสารที่มีบทบาทสำคัญในการต้านอนุมูลอิสระ

Tyrosinase หรือ Tyrosinase polyphenol oxidase เป็น copper enzyme ที่พบได้ทั้งในเชื้อรา พืชและสัตว์ ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (Mayer, 2006; Oetting, 2000) เป็นตัวเร่งขั้นตอนแรกของปฏิกิริยาการสร้างเม็ดสีเมลานิน (Sanchez Ferrer et al., 1995; Seo et al., 2003) โดยไทโรซิเนสเป็นเอนไซม์ที่ทำงานเกี่ยวข้องกับกระบวนการเปลี่ยนสีน้ำตาลของเห็ด ผัก ผลไม้การลอกคราบในแมลง การเกิดสีผิว สีผม สีตาของสัตว์ เป็นเอนไซม์ที่ควบคุมกระบวนการสังเคราะห์เมลานิน สารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสจะลดกระบวนการสังเคราะห์เม็ดสีเมลานิน ช่วยป้องกันการสะสมของเม็ดสีเมลานิน และนำกลับมาใช้ในกระบวนการอุตสาหกรรมเครื่องสำอางเพื่อทำให้ผิวขาวปัจจุบันเครื่องสำอางที่มาจากสมุนไพรได้รับความนิยม ซึ่งมีการศึกษาและคัดเลือกสมุนไพรที่มีความสามารถในการนำมาพัฒนาเป็นครีมบำรุงผิวขาวและสารต้านอนุมูลอิสระเพื่อป้องกันริ้วรอยก่อนวัยด้วยเช่นเจลล้างหน้าและแผ่นแปะจากสารสกัดมะขามป้อม

งานวิจัยนี้จะเป็นการศึกษาองค์ประกอบต่างในกาวไหมและทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ ของสารที่สกัดมาจากกาวไหม และนำข้อมูลที่ได้ไปพัฒนาสารที่มีประโยชน์ในอุตสาหกรรมเครื่องสำอางต่อไป

วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1.เพื่อศึกษาสารสำคัญในหม่อนและกาวไหม

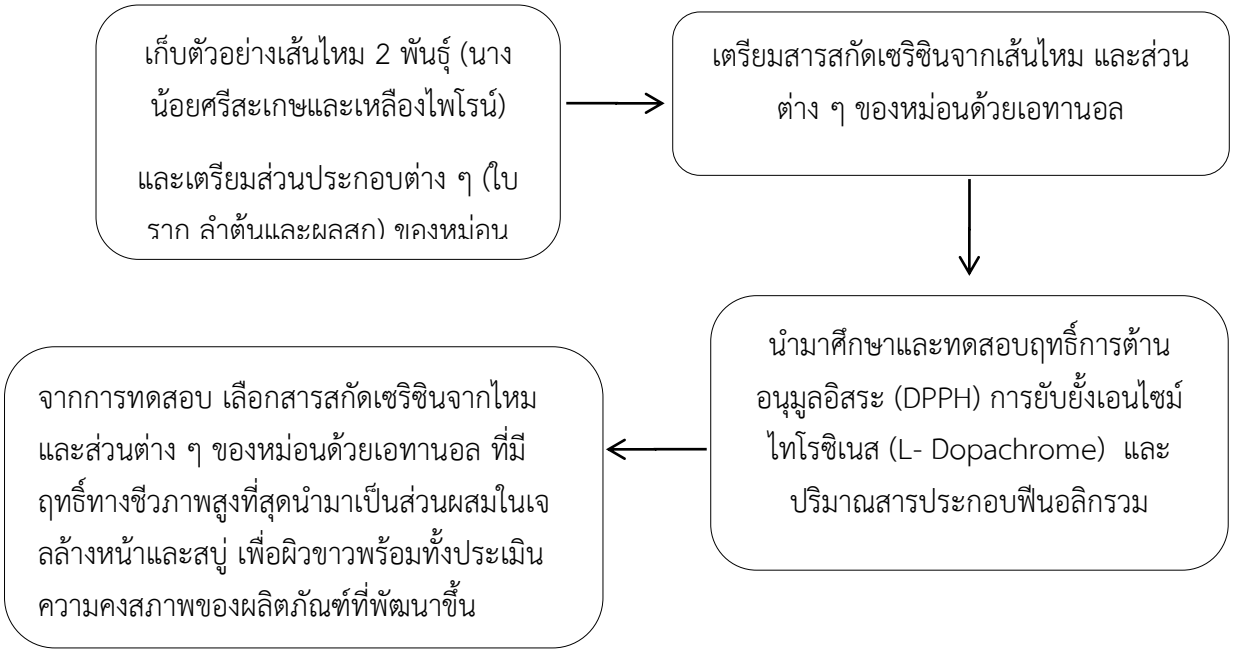
2.เพื่อศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดหยาบเอทานอลในหม่อนและกาวไหม

3.เพื่อวิเคราะห์ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส การวิเคราะห์ปริมาณสารฟลาโวนอยด์รวม และวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมของสารสกัดหยาบเอทานอลจากหม่อนและเซริซินจากไหม

ขอบเขตของโครงการวิจัย

การศึกษาวิจัยในครั้งนี้ ใช้กลุ่มตัวอย่างหม่อน 3 พันธุ์ ได้แก่ พันธุ์ส่งเสริม พันธุ์พื้นเมือง พันธุ์กินลูก และตัวอย่างไหม 2 พันธุ์ ได้แก่ นางน้อยศรีสะเกษและเหลืองไพโรจน์ โดยการเปรียบเทียบฤทธิ์ทางชีวภาพและความคงตัวของสารสกัดหยาบเอทานอล เพื่อเป็นข้อมูลในการเป็นวัตถุดิบ ที่เป็นสารสกัดจากธรรมชาติ มาเป็นส่วนผสมในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง ที่สามารถนำไปใช้ในชีวิตประจำวันได้ และยังเป็นการเพิ่มมูลค่าของสินค้าเกษตรให้เกิดประโยชน์สูงสุด

กรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย



ผลสำเร็จและความคุ้มค่าของการวิจัยที่คาดว่าจะได้รับ

ได้สารสกัดจากธรรมชาติ ที่มีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส และสารต้านอนุมูลอิสระ เป็นการเพิ่มมูลค่าของที่ไม่ได้ใช้แล้ว หรือผลพลอยได้จากผลิตผลทางการเกษตร ให้นำมาใช้ให้เกิดประโยชน์สูงสุด โดยการนำสารที่ได้ไปใช้ในเครื่องสำอาง หรืออุตสาหกรรมเครื่องสำอาง ทดแทนสารเคมีสังเคราะห์ ผลการวิจัยที่ได้นี้ จะนำไปอบรมเชิงปฏิบัติการ เกี่ยวกับการนำสารสกัดโปรตีนกาวไหมมาใช้ในเครื่องสำอางให้กับผู้ที่สนใจ เพื่อเป็นพื้นฐานในการศึกษาและเป็นข้อมูลในการประโยชน์สารสกัดจากธรรมชาติ ในการพัฒนาเป็นสูตรตำรับในเครื่องสำอาง เพื่อสร้างรายได้ต่อไป

บทที่ 2
เอกสารที่เกี่ยวข้อง

ประเภทของหม่อน

หม่อน หรือ มัลเบอร์รี่ (Mulberry)

ชื่อสามัญ Mulberry tree, White Mulberry

ชื่อวิทยาศาสตร์ Morus alba Linn.

จัดอยู่ในวงศ์ ขนุน (MORACEAE)

สมุนไพรหม่อน มีชื่อท้องถิ่นอื่น ๆ ว่า มอน (ภาคตะวันออกเฉียงเหนือหรือภาคอีสาน), ซึงเฮียะ ซึงเอียะ (จีนแต้จิ๋ว), ซางเย่ (จีนกลาง) เป็นต้น

สามารถแบ่งประเภทของหม่อนตามวัตถุประสงค์การนำไปใช้ได้เป็น 2 ประเภท คือ หม่อนที่ปลูกเพื่อรับประทานผลสด หรือ black mulberry (*Morus nigra* Linn.) ซึ่งมีผลโตเป็นช่อ เมื่อผลสุกจะมีสีดำ มีรสอมเปรี้ยวอมหวาน นิยมใช้รับประทานผลสดหรือนำไปแปรรูปทำเป็นอาหารและเครื่องดื่มได้ หม่อนที่ปลูกเพื่อเลี้ยงไหม หรือ white mulberry (*Morus alba* Linn.) หม่อนชนิดนี้มีผลลักษณะเป็นช่อขนาดเล็ก เมื่อสุกแล้วผลจะมีสีแดง มีรสเปรี้ยว ไม่ค่อยนิยมเป็นที่รับประทาน แต่มีใบขนาดใหญ่และมีปริมาณใบมาก ซึ่งสามารถที่จะใช้เป็นอาหารของหนอนไหมได้เป็นอย่างดี

ลักษณะของหม่อน

ต้นหม่อน จัดเป็นไม้พุ่มขนาดกลางหรือไม้ยืนต้นขนาดเล็ก มีลำต้นตั้งตรง สูงได้ประมาณ 2.5 เมตร บางพันธุ์สูงได้ประมาณ 3-7 เมตร แตกกิ่งก้านไม่มากนัก เปลือกลำต้นเรียบเป็นสีน้ำตาลแดง สีขาวปนสีน้ำตาล หรือสีเทาปนขาว ส่วนเปลือกรากเป็นสีน้ำตาลแดงหรือสีเหลือแดง มีเส้นร้อยแตกที่เปลือกผิว พบได้ทั่วไปในป่าดิบ ในประเทศไทยปลูกกันมากทางภาคเหนือและภาคตะวันออกเฉียงเหนือ

ใบหม่อน ใบเป็นใบเดี่ยว ออกเรียงสลับ ลักษณะของใบเป็นรูปไข่ หรือรูปไข่กว้าง ปลายใบแหลมยาว โคนใบเว้าเป็นรูปหัวใจหรือค่อนข้างตัด ขอบใบเรียบหรือหยักเว้าเป็นพู (ขึ้นอยู่กับสาพันธุ์ที่ปลูก) ใบอ่อนขอบใบจักเป็นพูสองข้างไม่เท่ากัน ขอบพูจักเป็นซี่ฟัน ใบมีขนาดกว้างประมาณ 8-14 เซนติเมตร และยาวประมาณ 12-16 เซนติเมตร แผ่นใบเป็นสีเขียวเข้มเรียบเงา ท้องใบเป็นสีเขียวอ่อน ใบค่อนข้างหนา หลังใบสากระคายมือ เส้นใบมี 3 เส้น ออกจากโคนยาวไปถึงกลางใบ และเส้นใบออกจากเส้นกลางใบอีก 4 คู่ เส้นร่างแหเห็นได้ชัดเจนจากด้านล่าง ก้านใบเรียวเล็ก ยาวประมาณ 1-1.5 เซนติเมตร มีหูใบเป็นรูปแถบแคบปลายแหลม ยาวได้ประมาณ 0.2-0.5 เซนติเมตร

ดอกหม่อน ดอกเป็นช่อตามซอกใบและปลายยอด ดอกเป็นแบบแยกเพศแต่อยู่บนต้นเดียวกัน ลักษณะของดอกเป็นรูปทรงกระบอก ช่อดอกเพศผู้และช่อดอกเพศเมียจะอยู่ต่างช่อกัน ดอกย่อยมีขนาดเล็ก วงกลีบรวมเป็นสีขาวหม่นหรือเป็นสีขาวแกมสีเขียว ช่อดอกเป็นหางกระรอก ยาวได้ประมาณ 2 เซนติเมตร ดอกเพศผู้ วงกลีบรวมมีแฉก 4 แฉก เกลี้ยง ส่วนดอกเพศเมีย วงกลีบรวมมีแฉก 4 แฉก เกลี้ยง ขอบมีขน เมื่อเป็นผลจะอวบน้ำ รังไข่เกลี้ยง ก้านเกสรเพศเมียมี 2 อัน

ผลหม่อน เป็นผลที่เกิดจากช่อดอก ผลเป็นผลรวมอยู่ในกระจุกเดียวกัน โดยจะออกตามซอกใบ ลักษณะของผลเป็นรูปทรงกระบอก ยาวประมาณ 1-2.5 เซนติเมตร ผลเป็นสีเขียว เมื่อผลสุกแล้วจะเปลี่ยนเป็นสีม่วงแดงเข้มหรือสีม่วงดำ เกือบดำ เนื้อนิ่ม ฉ่ำน้ำ และมีรสหวานอมเปรี้ยว (“หม่อน”[Online]. (Dec. 28, 2017))

การเลี้ยงไหมโดยเก็บใบหม่อนจากต้นที่มีอยู่ตามธรรมชาติได้เริ่มมีมาตั้งแต่ 4,000 กว่าปีมาแล้ว ต่อมาเมื่อมีการเลี้ยงไหมมากขึ้น จึงต้องมรการปลูกหม่อนและทำสวนหม่อนมมากขึ้น หม่อนที่มีอยู่ในประเทศไทยมีมากมายหลากหลายชนิด ทั้งที่กำเนิดภายในประเทศ และนำเข้าจากต่างประเทศ

พันธุ์หม่อน

พันธุ์หม่อนที่นิยมปลูกไว้ใช้สำหรับการเลี้ยงไหมในประเทศไทยมีมากมายหลายพันธุ์ พันธุ์หม่อนพื้นเมืองของไทยมีชื่อเรียกตามสภาพท้องถิ่น หรือบางทีอาจจะมีการเรียกชื่อซ้ำกัน พันธุ์หม่อนจากต่างประเทศและพันธุ์ไทยลูกผสม

พันธุ์หม่อนพื้นเมืองของไทยได้มีการรวบรวมไว้ ได้แก่ หม่อนน้อย หม่อนสร้อย หม่อนแดง หม่อนแก้ว ชนบท หม่อนไผ่ หม่อนคุณไพ หม่อนแกวอุบล หม่อนใหญ่อุบล หม่อนตาดำ เป็นต้น

นอกจากนี้ยังมีการนำพันธุ์หม่อนจากต่างประเทศเข้ามาปลูกหลายพันธุ์เช่น จาก

ประเทศจีน	Hluin Jio No. 44
อินเดีย,ศรีลังกา	kanwa 2 S. 54
เกาหลี	Kear yan Soeban
อินโดนีเซีย	Sulawasi, M. latifolai
ยุโรป	Tonkin Multical-Bulle, Moretti Moretiano
ญี่ปุ่น	Kokuso, Kaiyo Nezamigaeshi, Ichi-nose Shujakkuishi, Kenmochi, Ooshimaso, Oubanezumi

นอกจากหม่อนพันธุ์ต่างประเทศ นักวิชาการของประเทศไทยเองได้ผสมพันธุ์หม่อนเพื่อรวบรวมลักษณะเด่นของหม่อนทั้งในประเทศไทยและในต่างประเทศเข้าด้วยกันหลายพันธุ์ ซึ่งพันธุ์ที่ให้ผลผลิตสูงเหมาะสมแก่การนำไปเลี้ยงไหม จึงทำให้อาชีพการปลูกหม่อนเลี้ยงไหมในประเทศไทยมีการพัฒนา ก้าวหน้ายิ่งขึ้น

มีพันธุ์ที่ได้รับการรับรองจากกรมวิชาเกษตรและพันธุ์ที่ได้รับการแนะนำจากกรมวิชาการเกษตรหลายพันธุ์ เช่น หม่อนน้อย หม่อนพันธุ์นครราชสีมา 60 พันธุ์บุรีรัมย์ 60 เป็นต้น โดยผู้วิจัยได้ทำการคัดเลือกพันธุ์หม่อนที่สนใจจะศึกษาจากหม่อนพันธุ์นครราชสีมา 60 และ หม่อนพันธุ์ ซึ่งมีลักษณะดังต่อไปนี้

1. พันธุ์หม่อน : หม่อนพันธุ์นครราชสีมา 60

เมื่อปี พ.ศ. 2518 มร.คาซูชิโร่ ยามากาว่า (Kazushiro Yamakawa) นำพันธุ์หม่อนจากญี่ปุ่นมาปลูกเพื่อศึกษาการปรับตัวจำนวน 6 พันธุ์ คือ เคนโมจิ (Kenmochi) ชูจากุยจิ (Shujakuichi) อิชิโนเซ่ (Ichinose) เนซูมิไกชิ (Nezumigeishi) ไคเรียว (Kairyo) และ โอชิมาโซ (Oshimaso) ที่ศูนย์วิจัยหม่อนไหมนครราชสีมา ปี พ.ศ. 2520 - 2523 นายพินัย ห้างทองแดง และคณะ นำเมล็ดพันธุ์หม่อนที่ได้จากการผสมข้ามพันธุ์โดยธรรมชาติของหม่อนทั้ง 6 พันธุ์ ปลูกศึกษาพันธุ์ที่ศูนย์วิจัยหม่อนไหมนครราชสีมา จำนวน 480 สายพันธุ์ และ

คัดเลือกสายพันธุ์ที่ให้ผลผลิตสูงได้ 28 สายพันธุ์ แต่หม่อนดังกล่าว มีการพักตัวหลังตัดแต่งในฤดูหนาว ในปี พ.ศ. 2524 ทำการผสมพันธุ์หม่อนสายพันธุ์ ซูจากุยจิ เบอร์ 18 (เพศเมีย) ที่ให้ผลผลิตใบสูงกับหม่อนแก้ว ชนบท (เพศผู้) ที่มีการเจริญเติบโตดีหลังการแต่งกิ่ง จนได้หม่อนลูกผสมที่ผ่านการคัดเลือกช่วงแรก 300 สายพันธุ์ ปี พ.ศ. 2525 - 2526 คัดเลือกพันธุ์หม่อนลูกผสมที่ให้ผลผลิตสูงและคุณภาพใบดีเหมาะสำหรับการเลี้ยงไหม จำนวน 13 สายพันธุ์ และปี พ.ศ.2527 - 2530 ปลูกเปรียบเทียบผลผลิตเบื้องต้นในท้องถิ่นเกษตรกร ที่ศูนย์วิจัยหม่อนไหมนครราชสีมา สถานีทดลองเกษตรที่สูงขุนวาง สถานีทดลองหม่อนไหมสกลนคร สถานีทดลองหม่อนไหมเลย และไร่เกษตรกร จังหวัดนครราชสีมา โดยใช้หม่อนน้อยเป็นพันธุ์เปรียบเทียบมาตรฐาน ในที่สุดได้หม่อนสายพันธุ์ดีเด่น 1 สายพันธุ์ คือ เคบี 20 หรือ พันธุ์ นครราชสีมา 60 ที่มีการเจริญเติบโตดี ให้ผลผลิตใบและลักษณะทางการเกษตรอื่น ๆ ดีกว่าหม่อนทุกสายพันธุ์ในทุกสถานที่ (ศูนย์หม่อนไหมเฉลิมพระเกียรติฯ ตาก “พันธุ์หม่อน”[Online]. (Dec. 28, 2017)

<u>ลักษณะทั่วไป</u>

ใบรูปไข่ สีเขียว มีความนุ่ม ผิวใบเรียบมากกว่าหม่อนน้อย ก้านใบยาว การเรียงตัวของใบ 2/5 ขนาดของใบ 18.3×23.3 เซนติเมตร ความเลื่อมมันใบมากกว่าหม่อนน้อย ลำต้นมีสีเทา ทรงต้นตั้งตรง ระยะข้อปล้อง 4.1 เซนติเมตร การเจริญเติบโต 276.33 เซนติเมตรต่อ 12 เดือน การแตกกิ่ง 4.5 กิ่งต่อ 12 เดือน น้ำหนัก 100 ใบ หนัก 440.87 กรัม (“หม่อน-ชื่อพันธุ์-นครราช”[Online]. (Dec. 28, 2017))

<u>ลักษณะเด่น</u>

- ให้ผลผลิตใบหม่อนต่อไร่สูงกว่าพันธุ์หม่อนน้อยในทุกฤดูกาล โดยให้ผลผลิตเฉลี่ยต่อไร่ต่อปี3600 กิโลกรัม สามารถเลี้ยงไหมได้กว่า 8-9 กล่อง
- เจริญเติบโตได้ดี ในสภาพพื้นที่ทั่วไปตั้งแต่พื้นที่ราบจนพื้นที่ที่สูงกว่าระดับน้ำทะเล 1000 เมตร
- เป็นพันธุ์ที่มีการเจริญเติบโตและมีความสามารถในการแตกกิ่งหลังตัดแต่งดีกว่าหม่อนน้อยในทุกฤดูกาล
- มีอัตราส่วนใบต่อกิ่งมากกว่าร้อยละ 50
- -ก้านใบ(petiole) มีลักษณะใหญ่ ยาว และแข็ง ทำให้เหมาะสมกับการเลี้ยงไหมแบบกิ่ง เมื่อนำใบหม่อนไปเลี้ยงรังไหมแล้วทำให้ชั้นเลี้ยงไหมโปร่ง อากาศถ่ายเท
- ใบหม่อนมีลักษณะนุ่ม หนา ปานกลาง ทำให้เหี่ยวช้าหลังเก็บเกี่ยวสามารถเก็บไว้ได้นาน หนอนไหมจึงได้กินใบหม่อนที่สดอยู่เสมอ
- ใบหม่อนร่วงง่าย เมื่ออยู่ในสภาพแวดล้อมที่เหมาะสม ทำให้ผลผลิตใบหม่อนสูงขึ้นและสามารถมีอายุการเก็บเกี่ยวได้นาน
- ใบหม่อนมีคุณค่าทางอาหารสูงใกล้เคียงกับหม่อนน้อย
- เป็นพันธุ์หม่อนที่ต้านโรคราแป้ง(powdery mildew) ได้ดี ตรงกันข้ามกับหม่อนน้อยที่ไม่ต้านทานโรคนี้
- เป็นพันธุ์ที่มีทรงต้นแบบตั้งตรง (up right) ทำให้สะดวกในการเขตกรรมและดูแลรักษา

<u>การปลูกหม่อนพันธุ์นครราชสีมา 60</u>

สามารถปลูกได้ทุกสภาพพื้นที่

ข้อจำกัด

เป็นพันธุ์หม่อนที่ท่อนพันธุ์ออกรากได้ยากกว่าหม่อนน้อย การขยายพันธุ์จึงควรทำด้วยการติดตา

2.พันธุ์หม่อน : หม่อนพันธุ์สกลนคร

ได้จากการผสมพันธุ์ระหว่างหม่อนพันธุ์คุณไพ tetraploid (2n = 56) กับหม่อนพันธุ์ลุน 40 (2n = 28) ได้หม่อนลูกผสม triploid ในปี พ.ศ. 2538 ที่สถานีทดลองหม่อนไหมสกลนครในปี พ.ศ. 2538 - 2541 คัดเลือกได้พันธุ์ SKN-M95-3-82 ในปี พ.ศ. 2542 - 2545 ปลูกเปรียบเทียบพันธุ์ในท้องถิ่นต่าง ๆที่สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตรเขตที่ 3 ส่วนแยกหม่อนไหมศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรชัยภูมิ เลย สุรินทร์ และสกลนครและศูนย์หม่อนไหมเฉลิมพระเกียรติ ฯ ศรีสะเกษ ได้นำข้อมูลเสนอเป็นพันธุ์แนะนำต่อคณะอนุกรรมการการปรับปรุงพันธุ์ 2547 และจะได้รวบรวมข้อมูล เพื่อเสนอเป็นพันธุ์รับรองต่อไปเมื่อสิ้นสุดการเปรียบเทียบพันธุ์ในท้องถิ่นในปี 2550

ลักษณะประจำพันธุ์

- เป็นหม่อนเพศผู้มีช่อดอกค่อนข้างใหญ่
- ใบใหญ่แผ่นใบเรียบ รูปไข่ ค่อนข้างกว้าง ส่วนใบรูปหัวใจ ผิวหยาบ ขอบใบเป็นหยัก ปลายใบแหลมสั้น การเรียงตัวแบบสลับ
- ลำต้นตั้งตรง กิ่งมีสีเขียวหม่นปนเทา ปลายกิ่งออกสีน้ำตาล
- ระยะข้อปล้องสั้น
- ความสูงของต้น 1.80 เมตร
- ใบร่วงช้า
- มีความทนทานเพลี้ยไฟได้ดี
- มีความต้านทานโรครากเน่า
- ให้ผลผลิตในสภาพท้องถิ่นประมาณ 2,500 กิโลกรัม/ไร่/ปี
- มีความทนทานต่อสภาวะแห้งแล้งได้ดี
- ออกรากดีเมื่อมีการปักชำ ขยายพันธุ์ง่าย สามารถใช้ท่อนพันธุ์ปลูกในแปลงได้โดยตรงหรือปักชำก่อนปลูก มีการเจริญเติบโตรวดเร็ว หลังการตัดแต่ง
- ผลผลิตใบสด 3,507 กก./ไร่

ลักษณะทางการเกษตร

- ความสูงของต้น (75วัน) หลังการตัดต่ำมากกว่า 1.80 เมตร
- ระยะระหว่างข้อถี่ (น้อยกว่า 5 เซนติเมตร)
- ขนาดของใบใหญ่ (24 x 26 เซนติเมตร)
- น้ำหนักใบ/ต้น 1 ปี/การเก็บเกี่ยว 4 ครั้ง (จากแปลงทดลอง) มากกว่า 3 กิโลกรัม
- ผลผลิตใบ/ต้น/ปี/การเก็บเกี่ยว 4 ครั้ง (จากแปลงทดลอง) มากกว่า 3,000 กิโลกรัม
- ผลผลิตใบ/ต้น/ปี/การเก็บเกี่ยว 4 ครั้ง (จากแปลงเกษตรกร) 2,512 กิโลกรัม
- การขยายพันธุ์สามารถขยายพันธุ์ด้วยท่อนพันธุ์

การปลูกหม่อนพันธุ์สกลนคร

การปลูกหม่อนเลี้ยงไหมส่วนใหญ่จะมีการปลูกหม่อนเลี้ยงไหมในภาคตะวันออกเฉียงเหนือกันมาก เพราะการเลี้ยงไหมสามารถทำรายได้ให้แก่เกษตรกร ฉะนั้นการปลูกหม่อนเลี้ยงไหมเป็นอีกกิจกรรมหนึ่งของศูนย์ศึกษาการพัฒนาภูพานอันเนื่องมาจากพระราชดำริ ได้มีการสนับสนุนและส่งเสริมให้เกษตรกรปลูกคือพันธุ์สกลนคร (หนังสือคู่มือหม่อนพันธุ์สกลนครและไหมพันธุ์นางตุ่ย.,2555)

คุณสมบัติทางเภสัชวิทยาของหม่อน ในใบหม่อนพบว่ามีคุณสมบัติทางเภสัชวิทยา ดังนี้

1. เปลือกรากของต้นหม่อน พบว่ามีสาร Betulinic acidm Mulberrinm Mulberrochromene,B-amyrin,Cyclomulberrin,Cyclomulberrochromene, Undecaprenol, Dodecaprenol, ยาง, น้ำตาลกลูโคส เป็นต้น
2. กิ่งหม่อน พบว่ามีสาร Morin, Maclurin, 4-tetrahydroxybenzophenone, กลูโคส Adenine เป็นต้น
3. ใบหม่อน พบว่ามีสาร Adenine, Amylase, Choline, Crocarotene, Isoquercutrin, Succinic acid, Trigonelline, วิตามินเอ, วิตามินบี, วิตามินบี2, วิตามินซี, แร่ธาตุ, แคลเซียม, กลูโคส, แทนนิน เป็นต้น และยังพบสาร Bioflavonoid และสาร Glycoprotein, Moran A เป็นสารลดน้ำตาลในเลือด ส่วนอีกข้อมูลหนึ่งระบุว่าใบมีสารในกลุ่มอัลคาลอยด์ (ได้แก่ calystegin B-2, 1-deoxy ribitol, fagomine, nojirimycin, zeatin riboside), สารในกลุ่มฟลาโวนอยด์ (ได้แก่ albafuran C, astragalin, aromadendrin, chalcomoracin, kaempferol, kuwanol, kuwanon, quercetin, quercitrin, moracetin, morin, rutin), สารในกลุ่มคูมาริน (ได้แก่ bergapten, marmesin, scopoletin, umbelliferone), สารในกลุ่มลิกแนน (ได้แก่ broussonin A, broussonin B)
4. ผลหม่อน พบว่ามีสาร Saccharides 27%, Citric acid 3%, กลูโคส, แทนนิน, เกลือแร่, วิตามินเอ, วิตามินบี, วิตามินซี, แคลเซียม, และ Cyanidin เป็นต้น ส่วนเมล็ดหม่อนพบ Urease
5. เนื้อไม้พบสาร Morin ส่วนลำต้นประกอบไปด้วย SteroidalSapogenin เปลือกพบ **α**-amyrin
6. สาร GABA (gamma amino butyric acid) ซึ่งจะช่วยลดความดันโลหิต ซึ่งพบว่า ใบหม่อน 100 กรัม มีสาร GABA 230 มิลลิกรัม
7. สาร deoxynojirimycin ช่วยลดระดับน้ำตาลในเลือด ในใบหม่อนแห้งมีอยู่ประมาณ 0.1% ซึ่งสารนี้มีเฉพาะในใบหม่อนเท่านั้น ออกฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ที่ย่อยน้ำตาลจากลำไส้ ทำให้สารนี้มีผลในการลดระดับน้ำตาลในเลือด สำหรับผู้ป่วยโรคเบาหวาน
8. สาร phytosterol นั้นจะช่วยลดระดับคลอเลสเตอรอล และป้องกันการจับตัวกันของลิ่มเลือด จึงช่วยป้องกันโรคหลอดเลือดหัวใจอุดตัน ในใบหม่อน 100 กรัม มีสาร sitosterol ซึ่งเป็นสาร phytosterol ชนิดหนึ่งอยู่ 46 มิลลิกรัม ซึ่งมากกว่าชาเขียวถึง 3.3 เท่า
9. สารสกัดจากใบหม่อนมีฤทธิ์ในการยับยั้งสารก่อกลายพันธุ์มะเร็งเต้านมในสัตว์ทดลองได้
10. สาร Mulberofuran A มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของรา
11. สาร Sangenone c มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย

โปรตีนเซริซิน

เซริซินมีลักษณะเป็น amorphous matrix ทำหน้าที่เป็นกาวเชื่อมเส้นใยไฟโบรอิน (fibroin filaments) ไวด้วยกัน เป็นโปรตีนหรือไกลโคโปรตีนที่ละลายน้ำได้ (Gamo et al., 1977) ประกอบด้วยโปรตีนอย่างน้อย 6 ชนิด ที่มีขนาดโมเลกุลตั้งแต่ 6-467 กิโลดาลตัน (Kato et al., 1998;Takasu et al., 2002; Wu et al., 2007) โดยเซริซินขนาดโมเลกุลเล็กละลายน้ำไดง่ายกว่าโมเลกุลใหญ่โดยทั่วไปโปรตีนเซริซินประกอบด้วยกรดอะมิโน 18 ชนิด จำพวกมีขั้วจึงทำให้เซริซินละลายน้ำไดดีที่พบมากกว่าร้อยละ 70 ไดแก serine, aspartic acid, glutamic acid, arginine, threonine และ lysine ความสามารถในการละลายน้ำของเซริซินแบ่งได้เป็น 4กลุมแยกตามการละลายจากมากไปหานอย ไดแก sericin I, II, III และ IV ที่เรียงจากชั้นนอกสุดเข้าหาชั้นในสุดภายในโครงสร้าง amorphous matrix (Komatsu, 1980a)
โดยร้อยละ 80 ของกรดอะมิโนในโปรตีนเซริซินและไฟโบรอิน มีแขนงข้างเคียงเป็นไฮโดรฟิลิก ทำให้โปรตีนไหมดูดซับน้ำได้ดี โดยโปรตีนเซริซินมีกรดอะมิโนเซอรีนและไกลซีนเป็นองค์ประกอบอยู่ในปริมาณสูง และยังเป็นวัสดุที่เข้ากันได้ (compatible) กับเซลล์ของมนุษย์ อีกทั้งสามารถเสื่อมสลายทางชีวภาพได้ จึงเหมาะแก่การนำมาใช้ทางการแพทย์และเวชสำอาง เช่น สบู่ แชมพูสระผม ครีมและโลชั่น เป็นต้น

โปรตีนเซริซินเป็นโปรตีนที่สามารถสกัดได้หลายวิธี กรรมวิธีในการสกัดส่วนใหญ่ไม่ยุ่งยากซับซ้อนจากแหล่งของเสียจากอุตสาหกรรมไหมและวิธีการสกัดที่นิยมใช้กันทั่วไปคือ การต้มกับน้ำเดือด และอาจใช้กรดหรือด่างช่วย (Zhao et al., 2007) เพื่อกำจัดไหมเซริซินออกจนหมดแล้วจึงนำเส้นไหมที่ได้ไปถักทอต่อไป

ปัจจุบันการกู้คืนและนำมาใช้ใหม่ของ เซริซิน ที่มักทิ้งโดยอุตสาหกรรมสิ่งทอไม่เพียง แต่ช่วยลดปัญหาด้านสิ่งแวดล้อม แต่ยังมีมูลค่าทางวิทยาศาสตร์และการค้าสูง ได้รับความสนใจในการใช้ประโยชน์ทางด้านชีวการแพทย์เนื่องจากไมกอใหเกิดอาการแพ หรือระคายเคืองต่อเซลล์มนุษย์ (Gregory et al., 2003) ไมเปนพาหะหรือสารกอโรคมีฤทธิ์ตาน อนุมูลอิสระ ยับยั้งการทำลายเซลลโดย reactive oxygen species ปองกันการเกิดเซลลมะเร็ง มีการนำไปใชในการควบคุมนอกจากนั้นยังมีฤทธิ์ตานเชื้อแบคทีเรียบางชนิดซึ่งเปนสาเหตุของโรคผิวหนังและชวยรักษาแผลใหหายเร็วขึ้น (Zhang, 2002) สมบัติทางเคมีกายภาพของโมเลกุลมีความสำคัญต่อการประยุกต์ใช้ในด้าน ชีววิทยาทางการแพทย์จำนวนมากและได้รับอิทธิพลจากวิธีการสกัดและสายพันธุ์ไหมซึ่งอาจนำไปสู่การเปลี่ยนแปลงของน้ำหนักโมเลกุลและความเข้มข้นของกรดอะมิโนของ sericin การปรากฏตัวของกรดอะมิโนที่ไม่ชอบน้ำสูงและมีศักยภาพในการต้านอนุมูลอิสระทำให้ เซริซินสามารถนำไปใช้ในอุตสาหกรรมอาหารและเครื่องสำอางได้ ความชุ่มชื้นช่วยให้บ่งชี้ว่าเป็นตัวช่วยในการรักษาบาดแผลกระตุ้นการงอกของเซลล์การป้องกันรังสีอัลตราไวโอเลตและการกำหนดครีมและแชมพู ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่เกี่ยวข้องกับการย่อยได้ของเซซิซินที่ขยายตัวในสาขาทางการแพทย์เช่นสารต่อต้านมะเร็งสารต้านจุลชีพและสารต้านการอักเสบสารกันเลือดทำหน้าที่ในด้านสุขภาพลำไส้ใหญ่ช่วยเพิ่มอาการท้องผูกและปกป้องร่างกายจากโรคอ้วนด้วยการปรับปรุงโปรไฟล์ไขมันในพลาสมา นอกจากนี้คุณสมบัติของ เซริซิน ยังช่วยให้สามารถใช้เป็นตัวกลางในการเพาะเลี้ยงและการเก็บรักษา cryopreservation ในด้านวิศวกรรมเนื้อเยื่อและการจัดส่งยาเพื่อแสดงให้เห็นถึงการใช้งานอย่างมีประสิทธิภาพเป็นวัสดุชีวภาพที่สำคัญ (Regina Ines Kunz et al.,2016)ไหมเซริซินยังสามารถกระตุ้นการผลิตคอลลาเจนและเพิ่มการสร้างเยื่อบุผิวในบาดแผลได้อีกด้วย (Aramwith and Bang .,2014)และช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของเซลล์ นำไปใช้ทดแทนซีรั่มในการเลี้ยงเซลล์ในห้องปฏิบัติการได้ (Terada et al., 2005);

เอนไซมม์ไทโรซิเนส (Tyrosinase enzyme)

เอนไซม์ไทโรซิเนส หรือที่เรียกว่า polyphenol oxidase เป็นเอนไซม์ในกลุ่ม metalloenzyme ที่ใช้ทองแดง (Cu) เป็นโคแฟคเตอร์ มีหน้าที่ทำงานร่วมกับออกซิเจนเพื่อเล่นให้เกิดปฏิกิริยาได้เร็วขึ้น (**Seo, S.Y et al.,2003**) เป็นเอนไซม์สำคัญในกระบวนการสังเคราะห์เมลานินซึ่งเกี่ยวข้องกับการกำหนดสีผิว ผม และเส้นขนของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (**Parvez S et al.**,2007) นอกจากนี้การเกิด browning reaction โดยเอนไซม์ไทโรซิเนส จะทำให้คุณภาพอาหารลดลงและการสูญเสียทางเศรษฐกิจของผลิตภัณฑ์อาหาร (**Kim YJ.** Et al.,2005)

เอนไซม์ไทโรซิเนสมีบทบาทสำคัญในการควบคุมการสร้างเม็ดสีเมลานินของผิวหนังโดยทำหน้าที่เร่งการเปลี่ยนกรดอะมิโนชนิดไทโรซีน (Tyrosine) ไปเป็นสารโดปา (DOPA) ด้วยปฏิกิริยาไฮดรอกซิเลชัน และเปลี่ยนโดปาไปเป็นโดปาควิโนน (Dopaquinone) ด้วยปฏิกิริยาออกซิเดชันจากนั้นโดปาควิโนนจะถูกเปลี่ยนผ่านสารตัวกลางอีกหลายตัว จนเกิดโพลีเมอไรเซชันไปเป็นเม็ดสีเมลานินจนได้เม็ดสี 2 ชนิดคือ ชนิดสีดำหรือสีน้ำตาลเรียกว่า ยูเมลานิน (Eumelanin) และชนิดสีเหลืองหรือสีส้ม เรียกว่า ฟีโอเมลานิน (Phaeomelanin) สัดส่วนของยูเมลานินและฟีโอเมลานิน ในแต่ละคนจะแตกต่างกันขึ้นอยู่กับเชื้อชาติและพันธุกรรม รวมถึงการได้รับรังสียูวีจากแสงแดด (พลอยขวัญ กาญจนสุรัตน์, 2557)

จากการศึกษากลไกการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส พบว่าสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ได้โดยจับกับ บริเวณที่เป็น Active site ของเอนไซม์คือส่วนที่เป็น $Cu2^{+}$ ซึ่งจะขัดขวางการเข้าจับกันระหว่างสารตั้งต้นกับเอนไซม์ทำให้เอนไซม์ไม่สามารถทำงานได้สารที่สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสได้จะเป็นสารประกอบพวก Aromatic acid, Aromaticaldehyde, Tropolone, Kojic acid และ Salicylic acid โดยโครงสร้างที่มีความเป็น Hydrophobic จะสามารถยับยั้งของเอนไซม์ไทโรซิเนสได้ดี (นริศา คาแก่น, 2551)

สารฟีนอลิกทั้งหมด (total phenolic)

สารประกอบฟีนอลิก (phenolic compound) หรือ สารประกอบฟีนอล เป็นสารที่พบได้ตามธรรมชาติ ในพืชหลายชนิด เช่น ผัก ผลไม้ เครื่องเทศ สมุนไพร ถั่วเมล็ดแห้ง เมล็ดธัญพืช ซึ่งถูกสร้างขึ้นเพื่อประโยชน์ในการเจริญเติบโต ฟีนอลิกทั้งหมดเป็นสารอินทรีย์ที่ละลายน้ำได้ อยู่ในรูปสารประกอบอนุพันธ์ไกลโคไซด์ (glycoside) กับน้ำตาลชนิดต่างๆ ที่เป็นโมโนแซคคาไรด์ (monosaccharides)ไดแซคคาไรด์ (disaccharides) หรือโอลิโกแซคคาไรด์ (oligosaccharides) (Bravo, 1998; Tsao,2010) ปริมาณสารจะแตกต่างกันขึ้นกับปัจจัยหลายประการ ทั้งปัจจัยทางพันธุกรรม สิ่งแวดล้อม ความแตกต่างในการเจริญเติบโตของพืช ความสุกงอมของผล ฤดูกาลเก็บเกี่ยวและการเก็บรักษา เช่น ปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมดในแบล็คเบอร์รี่ และสตรอเบอรี่ จะลดลงเมื่อผลไม้สุกมากขึ้น (Wang and Lin, 2000) อนุมูลอิสระ (free radical) คือโมเลกุลของสารที่ขาดอิเลกตรอน ไป 1 ตัว ทำให้เกิดความไม่เสถียร (Cheeseman and Slater, 1993) ต้องไปแย่งจับกับอิเลกตรอนของสารอื่นเพื่อให้เกิดความเสถียร มีรายงานว่าสารฟีนอลิกทั้งหมดในพืชมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ โดยเป็นตัวที่ให้อิเลกตรอนหรือไฮโดรเจนอะตอมแก่อนุมูลอิสระ ทำให้สารอนุมูลอิสระเสถียร (Shon et al., 2003) ซึ่งอาจอยู่ในรูปของ ดักจับอนุมูลอิสระ (free radical scavengers) (Rice-Evans and Miller, 1996) หรือเหนี่ยวนำให้ร่างกายสร้างสารที่มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ เช่น เอนไซม์คะตะเลส (catalase) เอนไซม์ซูเปอร์ออกไซด์ ดิสมิวเทส (superoxide dismutase) และเอนไซม์กลูตาไธโอนเปอร์ออก

ซิเดส (glutathione peroxidase) (Li et al.,2006; Du et al., 2007) มีรายงานวิจัยพบว่าสารประกอบฟีนอลิกช่วยในการต้านมะเร็ง (**Wahle KW** etbal.,2010) และการรับประทานผักผลไม้ยังช่วยลดความเสี่ยงของลดความเสี่ยงของการเกิดโรคหัวใจ (Hertog et al., 1995)

งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

เกียรติชัย ด้วงสี (2553) ศึกษาการใช้สารสกัดโปรตีนจากรังไหมเสียรังสีขาวและรังสีเหลืองโดยการใช้สารสกัดจากธรรมชาติจากด่างของขี้เถ้าแกลบและด่างของขี้เถ้าผักโขมหนาม ใช้น้ำกรอง และน้ำกลั่นในการศึกษาเปรียบเทียบการหาระยะเวลาการสกัดที่เหมาะสมโดยการนำรังไหมสีขาวและรังไหมสีเหลืองอย่างละ 10 รัง มาต้มสกัดกับน้ำด่างขี้เถ้าแกลบกับน้ำด่างขี้เถ้าผักโขมหนาม 100 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียสเปรียบเทียบที่ระยะเวลา 30 60 และ 90 นาที ใช้น้ำกรองและน้ำกลั่นในการเปรียบเทียบกับการใช้น้ำด่างจากขี้เถ้า พบว่าที่เวลา 90 นาทีทั้งรังไหมสีขาวและรังไหมสีเหลืองให้เปอร์เซ็นต์โปรตีนสูงที่สุดรองลงมาคือระยะเวลา 60 และ 30 นาทีตามลำดับ

สุพัตรา บุตราช และสุธาสินี ทัพพสารพงศ์ (2555) ศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระและการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของไหมเซริซินพันธุ์ UB1 X UB5 โดยเปรียบเทียบกับไหมเซริซิน ที่มีจำหน่ายทางการค้า โดยทำการสกัดเซริซินจากรังไหมพัน UB1 X UB5 ด้วยน้ำร้อนที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 6 ชั่วโมงจากนั้นนำมาศึกษาหาน้ำหนักโมเลกุลของเซริซิน (UB1 X UB5 จุลไหมไทยและแก้วหลวง) ด้วยวิธี SDS - PAGE แล้วศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของไหมเซริซิน โดยวิธี DPPH Assay และศึกษาฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสด้วยวิธี Dopachrome จากการศึกษาพบว่าเซริซิน ที่สกัดได้โดยวิธีการต้มในน้ำร้อนที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 6 ชั่วโมงให้ปริมาณผงเซริซินร้อยละ 12.60 โดยน้ำหนัก ขนาดน้ำหนักโมเลกุลของไหมเซริซิน อยู่ระหว่าง 30 - 250 กิโลดาลตันและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของเซริซินมี UB1 X UB5 มี % scavenging activity สูงสุดเท่ากับร้อยละ 70.00 ในขณะที่เซริซินจุลไหมไทยและแก้วหลวงมีค่าเท่ากับร้อยละ 16.67 และ 23.33 ตามลำดับและ เซริซินมี UB1 X UB5 จุลไหมไทย แก้วหลวงมีฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสเท่ากับร้อยละ 33.33 50.00 และ 50.00 ตามลำดับ

Jin-Hong Wu et al., (2007) ได้ศึกษาการเตรียมผงเซริซิน ที่ได้จากน้ำเสียของอุตสาหกรรมเส้นไหมโดยการสกัดด้วย 75% เอทานอลพบว่าผงเซริซินที่สกัดได้มีความบริสุทธิ์สูงมีขนาดโมเลกุลอยู่ในช่วง 14 - 97 กิโลดาลตันและมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระและการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสมากถึง 20% เมื่อเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่มีเซริซิน

Takuya et al., (2006) ได้ศึกษาสารสกัดจากใบหม่อนสด (morus alba L.) และใบหม่อนที่ทำให้สำหรับชงเป็นชาด้วยเอทานอลความเข้มข้น 60% พบว่ามีสาระสำคัญที่สามารถต้านอนุมูลอิสระชนิดฟลาโวนอยด์ ไกลโคไซต์ (flavonol glycosides) ที่มีฤทธิ์ต้านไขมันชนิดแอลดีแอลในกระแสเลือดได้ นอกจากใบหม่อนแล้วยังพบรายงานการวิจัยส่วนผลหม่อน จากการศึกษา ผลสีขาว สีแดง และสีดำของหม่อนต่างสายพันธุ์ ผลปรากฏว่าผลสีดำมีปริมาณของสารประกอบฟีนอลิกและปริมาณฟลาโวนอยด์สูงที่สุด และในผลหม่อนสีขาว พบกรดไขมันจำเป็นแบบไม่อิ่มตัว (Polyunsaturated fatty acid) และเป็นกรดไขมันกลุ่มโอเมก้า 6 ได้แก่ ลิโนเลอิกในปริมาณที่สูงสุด นอกจากนี้ยังพบธาตุอาหารต่างๆเช่น ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส โพแทสเซียม

แคลเซียม แมกนีเซียม โซเดียม เหล็ก ทองแดง แมงกานีส และสังกะสี ตามลำดับ (Sezai and Emine, 2007) และยังพบว่าเป็นแหล่งที่สำคัญของสารแอนโทไซยานิน (Anthocyanin) (Pornanong et al., 2010)

บทที่ 3
วัสดุ อุปกรณ์ สารเคมี และวิธีการทดลอง

3.1 วัสดุ อุปกรณ์

1	หลอดทดลอง	CORNING Centristar
2	Autopipett 20 100 200 1000 Tips	Harikul Calibration Laboratory
3	บีกเกอร์ ขนาด 50 500	SCHOTT DURAN
4	กระบอกตวง	witeg Diffico
5	ขวดดูแรน	SCHOTT DURAN
6	Cuvett	VWR We Enable Science
7	Eppendrop	Haiman Shengbang Experiment Equipment
8	กระดาษกรองเบอร์ 1	Whatman
9	กรวยกรอง	SCHOTT DURAN
10	ขวดรูปชมพู่	SCHOTT DURAN
11	เครื่องเซนติฟิวส์	Thermo SCIENTIFIC
12	เครื่องวัดสเปกโตร	LaboMed,Inc
13	เครื่องถ่ายรูปเจล	ProteinSimple
14	Water bath	Thermo SCIENTIFIC
15	เครื่องชั่งไฟฟ้า 2 และ 4 ตำแหน่ง	OHAUS
16	Vortex	Scientific Industries

3.2 สารเคมี

1	di-potassium hydrogen or thophosphate (potassium phosphate , dibasic)	ajax finechem pty ltd
2	potassium dihydrogen phosphate	carlo erba reagents
3	potassium ferricyanide	ajax finechem pty ltd
4	trichloroacetic acid	carlo erba
5	Iron (lll) chloride hexahydrate (ferric chloride)	chem – supply
6	3,4 – dihydroxy -L- phenylalanine	sigma – Aldrich
7	gallic acid	acros organics
8	quercetin hydrate	Aldrich
9	L-ascorbic acid	ajax fincehem
10	potassium acetate	ajax finechem
11	aluminium chloride hydrated	ajax finechem
12	tyrosinase	sigma- Aldrich
13	bradford utra	expeneon

14	DPPH	sigma- Aldrich
15	Folin Ciocalteu reagent	sigma- Aldrich
16	EDTA	MERCK
17	Methanol	Pro-Analysis
18	Sodium carbonate (Na2CO3)	ajax finechem
19	Sodium nitrite (NaNO2)	ajax finechem
20	ABTS	CALBIOCHEM
21	Potassium persulfate (K2S2O8)	ajax finechem
22	L-Dopa	sigma- Aldrich
23	Marker	ENZMART BIOTECH
24	สารละลายมาตรฐาน Bovine serum albumin (BSA)	sigma- Aldrich

3.3 วิธีการทดลอง

การเตรียมสารสกัดตัวอย่างด้วยเอทานอล

นำเส้นไหมและส่วนต่างๆของหม่อนมาหมักด้วยตัวทำละลาย โดยที่อัตราส่วนคือ เส้นไหมหรือส่วนของหม่อน 2 กรัม ต่อเอทานอล 60 มิลลิลิตร หมักทิ้งไว้เป็นเวลา 7 วัน เมื่อครบกำหนดเวลากรองเอาตะกอนออกด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 แล้วนำไปเก็บไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

การหาปริมาณโปรตีนโดยวิธี Lowry assay (Lowry et al., 1951)

การหาปริมาณโปรตีนเซริซินวัดปริมาณโปรตีนเซริซินที่สกัดด้วย Lowry assay คำนวณปริมาณของโปรตีนจากกราฟมาตรฐานที่ได้จากการวัดปริมาณโปรตีนมาตรฐาน Bovine serum albimin (BSA) ที่ความเข้มข้น 0 25 50 100 150 200 250 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร การเตรียมกราฟมาตรฐาน BSA โดยชั่ง BSA 1 mg ผสมกับน้ำกลั่น 1 ml เก็บเป็น Stock ใส่สารละลาย BSA 0 25 50 100 150 200 250 ไมโครลิตรและน้ำกลั่นให้มีปริมาตร 500 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน เติม Lowry reagent หลอดละ 0.7 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ทิ้งไว้ในที่มืด ที่อุณหภูมิห้อง 20 นาที จากนั้นเติม Folin phenol reagent หลอดละ 0.1 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ในที่มืด ที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาว 750 นาโนเมตร นำค่าที่ได้ไปวิเคราะห์จะได้กราฟมาตรฐานโปรตีน

การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH radical scavenging assay (Devi et al., 2008)

ศึกษาค่าการดูดกลืนแสงที่ลดลงของสารละลาย DPPH ซึ่งเป็นสารอนุมูลอิสระที่เสถียร มีสีม่วงเข้ม ดูดกลืนแสงได้ที่ความยาวคลื่น 515 นาโนเมตร เมื่อทำปฏิกิริยากับสารที่สามารถให้อิเล็กตรอนแก่ DPPH แล้วจะเกิดเป็นสารประกอบที่เสถียร ทำให้สีม่วงจางลง ซึ่งตรวจสอบได้โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสง

เตรียมสารละลาย 2,2-Diphenyl-1-picrylhdrazyl radical (DPPH) ความเข้มข้น 0.1 มิลลิโมลาร์ ละลายใน methanol เก็บให้พ้นแสง จากนั้นเติมสารละลายตัวอย่าง ชนิดต่างๆ ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตรในหลอดทดลอง และเติมสารละลาย DPPH ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร บ่มในที่มืดเป็นเวลา 20 นาที และนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร โดยใช้ methanol เป็น blank และใช้ vitamin c ที่

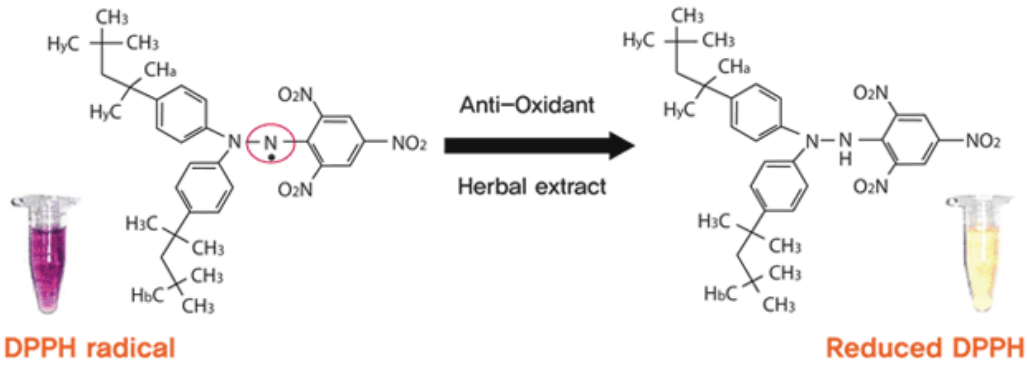
ความเข้มข้นต่างๆ เป็นสารมาตรฐาน และนำค่าที่ได้มาคำนวณหาค่าการยับยั้งอนุมูลอิสระเทียบกับ vitamin c

คำนวณเป็น % Inhibition (SC_{50}) = [(A-B)/C]×100

โดยที่

A คือ ค่าการดูดกลืนแสงเริ่มต้นของ DPPH

B คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารตัวอย่างที่ทำปฏิกิริยากับ DPPH



<u>การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยใช้ FRAP assay หรือ Ferric reducing antioxidant power</u> (Benzie, 1999)

ความสามารถในการรีดิวซ์ทำได้โดยนำสารตัวอย่าง 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรในเมทานอล 1 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลายฟอสเฟสบัฟเฟอร์ (phosphate buffer) เข้มข้น 0.2 มิลลิโมลาร์ pH 6.6 ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตรและสารละลายโพแทสเซียมเฟอริกไซยาไนด์($K_3Fe(CN)_6$) ความเข้มข้นร้อยละ 1 โดยมวลต่อปริมาตร ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันบ่มที่อุณหภูมิ 50°C เป็นเวลา 30 นาที เติมสารละลายกรดไตรคลอโรอะซิติก (CCl_3COOH) ความเข้มข้นร้อยละ 10 โดยมวลต่อปริมาตร ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3000 g เป็นเวลา 10 นาที จากนั้น ปิเปตสารละลายส่วนบน ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่น 2.5 มิลลิลิตร และเติมสารละลายเฟอร์ริกคลอไรด์($FeCl_3$) เข้มข้นร้อยละ 0.1 โดยมวลต่อปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน จากนั้นนำไปวัดค่าการดูกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 700 นาโนเมตร โดยใช้น้ำกลั่นเป็น blank และใช้ gallic acid ที่ความเข้มข้น 10 20 40 80 160 320 µg/ml เป็นสารละลายมาตรฐาน คำนวณความสามารถในการรีดิวซ์จากกราฟมาตรฐานของแกลลิก

<u>การทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS decolorization scavenging effect</u> (Re et al., 1999)

เตรียมสารละลาย ABTS โดยเตรียม 2.45 มิลลิโมลาร์ โพแสเซียมเปอร์ซัลเฟต($K_2S_2O_8$) ใน 7 มิลลิโมลาร์ ABTS เก็บไว้ในที่มืดที่อุณห๓มิห้องเป็นเวลา 12 – 16 ชั่วโมงจะได้สารละลาย ABTS ก่อนนำไปใช้ต้องเจือจางด้วยน้ำกลั่นให้มีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตรเท่ากับ 0.70±0.02

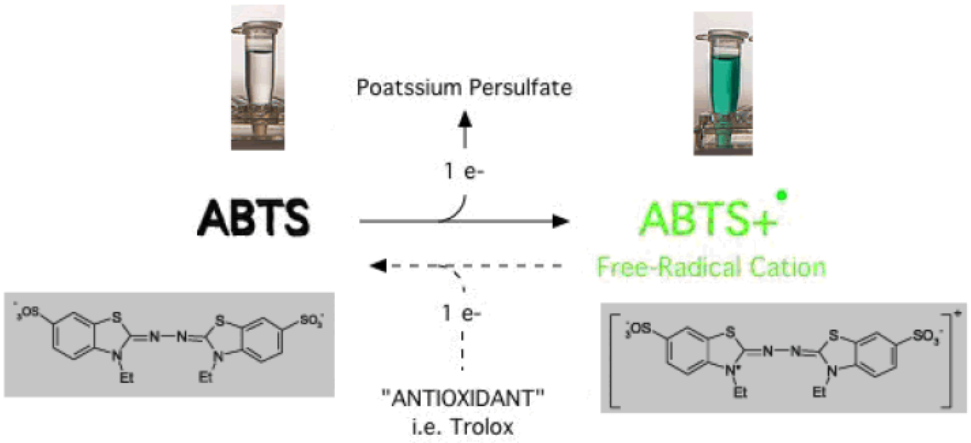
วิเคราะห์ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ จากกราฟมาตรฐานที่ได้จากการวัดปริมาณ Vitamin C ที่ความเข้มข้น 0 2 4 8 16 32 64 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร การเตรียมกราฟมาตรฐาน Vitamin C โดยชั่ง Vitamin C 1 mg ผสมกับน้ำกลั่น 1 ml เก็บเป็น Stock ใส่สารละลาย Vitamin C ปริมาตร 0 25 50 100 150 200 250 ไมโครลิตรและเติมเมทานอลให้มีปริมาตร 500 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วเติม ABTS 3 มิลลิลิตร บ่มในที่มืดททที่อุณห๓มิห้อง 30 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร โดยใช้เมทานอลเป็น blank และนำค่าที่ได้มาคำนวณหาค่าการยับยั้งอนุมูลอิสระเทียบกับ vitamin c

คำนวณเป็น % Inhibition (SC_{50}) = [(A-B)/C]×100

โดยที่

A คือ ค่าการดูดกลืนแสงเริ่มต้นของ ABTS

B คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารตัวอย่างที่ทำปฏิกิริยากับ ABTS



<u>การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (Total Phenolics Content)</u> (Sing leton et al., 1999)

วิธีการทดสอบหาผลรวมสารประกอบฟีนอลิกในสารสกัดหยาบโดยใช้ Folin-Ciocalteu โดยใส่สารมาตรฐาน (หรือเอทานอลบริสุธิ์; กรดแกลลิค) ปริมาตร 0.25 มิลลิลิตร ผสมกับน้ำกลั่น ปริมาตร 0.25 มิลลิลิตร หลังจากนั้นเติมสารละลาย Folin Ciocalteu's phenol ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตรทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที แล้วเติม 7.5% โซเดียมคาร์บอเนต ปริมาตร 2 มิลลิลิตร บ่มในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที นำมาวัดที่ค่าการดูดกลืนแสงที่ 760 นาโนเมตร โดยใช้ น้ำกลั่น เป็น blank และใช้ gallic acid ที่ความเข้มข้น 10 20 40 80 160 320 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นสารละลายมาตรฐาน และหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดโดยคำนวณเทียบกับปริมาณกรดแกลลิค (GAE) ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรของตัวอย่าง คำนวนปริมาณโพลีฟีนอลทั้งหมด จากสมการ

$$C=cV/M$$

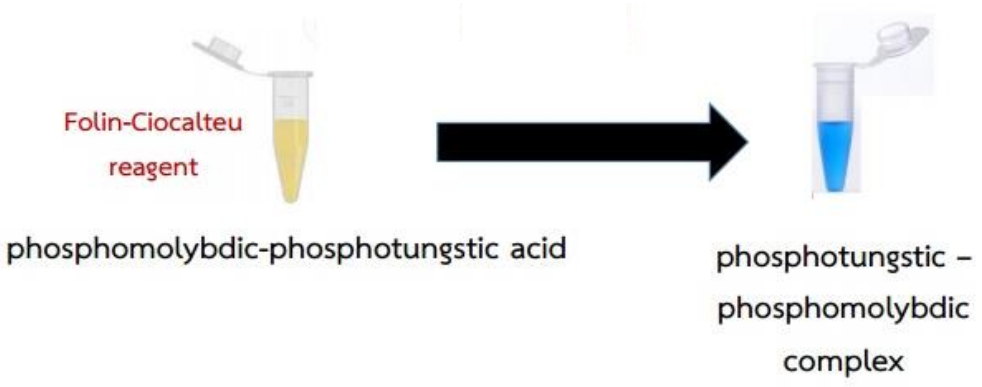
เมื่อ

C = ปริมาณโพลีฟีนอลที่เทียบจากกราฟมาตรฐานแกลลิค (mg/g GAE)

C = ความเข้มข้นของกรดแกลลลิค (mg/ml)

V = ปริมาณของสารสกัด (ml)

M = น้ำหนักของสารสกัด (g)



3) ความเข้มข้นร้อยละ 10 โดยมวลต่อปริมาตร ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ผสมเมทานอล 1 มิลลิลิตร ผสมโพแทสเซียมอะซิเตท($C_2H_3KO_2$) ความเข้มข้น 1 โมลาร์ ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร และเติมน้ำกลั่น ปริมาตร 2.8 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน บ่มในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที นาที และนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 415 นาโนเมตร โดยใช้ methanol เป็น blank และใช้ Quercetin ที่ความเข้มข้น 0 20 40 60 80 100 120 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นสารมาตรฐาน และหาปริมาณสารสารฟลาโวนอยด์โดยคำนวณเทียบกับปริมาณ Quercetin ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรของตัวอย่าง

<u>การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสด้วยวิธี Dopachrome</u> (Long et al., 2002)

วิธีการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสด้วยวิธี Dopachrome โดยเตรียมสารละลายโพแทสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ pH 6.8 ปริมาตร 0.3 มิลลิลิตร และหยดสารสกัดตัวอย่าง (หรือสารบริสุทธ์, เอทานอล, kojic acid; สารละลายมาตรฐาน) ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันและผสมเอนไซม์ไทโรซิเนส ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร และบ่มในที่มืดเป็นเวลา 10 นาที หลังจากนั้นเติมสารละลาย L-dopa 0.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันและบ่นในที่มืดเป็นเวลา 10 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 475 นาโนเมตร โดยใช้น้ำกลั่นเป็น blank และใช้ vitamin c ที่ความเข้มข้น 0 10 20 40 80 160 320 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นสารละลายมาตรฐาน นำค่าที่ได้มาคำนวณหาค่าการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสเทียบกับ vitamin C คำนวณเป็น % Inhibition จากสมการ

$$\% \text{ Inhibition} = [(A-B) - (C-D)]/ (A-B) \times 100$$

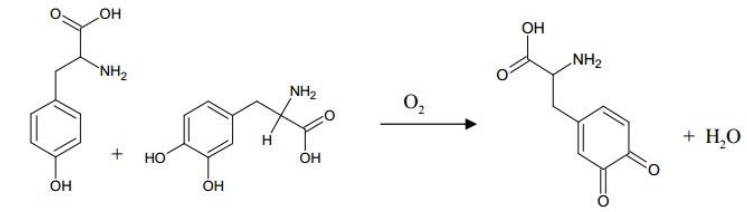
เมื่อ

A = ค่าการดูดกลืนแสงของเอนไซม์ที่ไม่มีสารสกัด

B = ค่าการดูดกลืนแสงของชุดควบคุม

C = ค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดที่มีเอนไซม์

D = ค่าการดูดกลืนแสงเฉพาะสารสกัดไม่มีเอนไซม์



L-Tyrosine L-DOPA DOPAquinone

บทที่ 4
ผลการทดลองและการวิเคราะห์ผลการทดลอง

การคำนวณหาปริมาณโปรตีนในสารตัวอย่างโดยวิธี Lowry assay

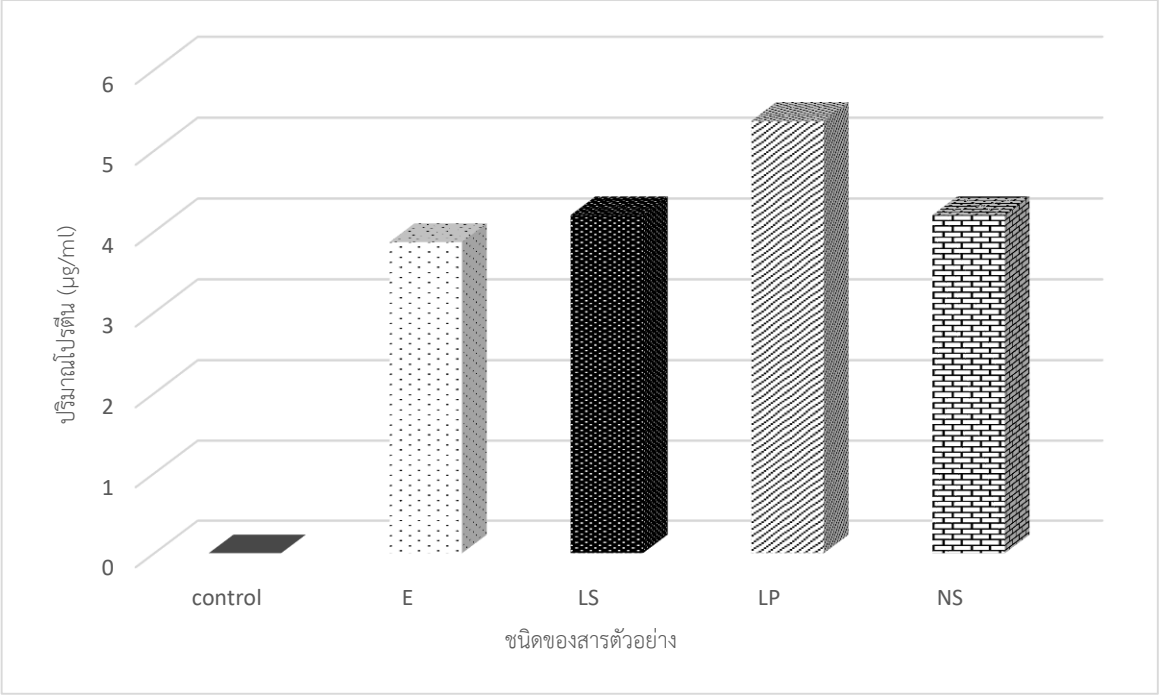
ตารางที่ 4-1 ปริมาณโปรตีนในสารตัวอย่างกาวไหมและหม่อน (สด/แห้ง) ชนิดต่างๆ

สารตัวอย่าง			ปริมาณโปรตีน (µg/ml)	ปริมาณโปรตีนทั้งหมด (µg)	ปริมาณโปรตีน (µg/g)
กาวไหม		E	3.867±0.001	212.667	106.333
		LS	4.200±0.001	239.400	119.700
		LP	5.367±0.004	305.900	152.950
		NS	4.200±0.001	243.600	121.800
หม่อนพันธุ์ นครราชสีมา 60	สด	ใบ	122.304±0.034	20166.030	1008.302
		ต้น	203.867±0.027	14270.678	713.534
		ราก	1075.400±0.031	144103.645	2401.727
		ผล	1374.067±0.045	316035.410	1053.451
	แห้ง	ใบ	133.700±0.013	22060.528	2206.053
		ต้น	169.034±0.014	12677.513	1267.751
		ราก	728.367±0.064	58269.347	5826.935
หม่อนพันธุ์สกลนคร	สด	ใบ	145.867±0.006	30923.733	1546.187
		ต้น	171.700±0.011	8585.000	429.250
	แห้ง	ใบ	129.533±0.003	22668.333	2266.833
		ต้น	156.367±0.008	12509.333	1250.933
		ราก	779.367±0.032	62349.333	6234.933

** หมายเหตุ E คือ อีรี่, LS คือ เหลืองสุรินทร์, LP คือ เหลืองไพโรจน์, NS คือ นางน้อยศรีษะเกษ

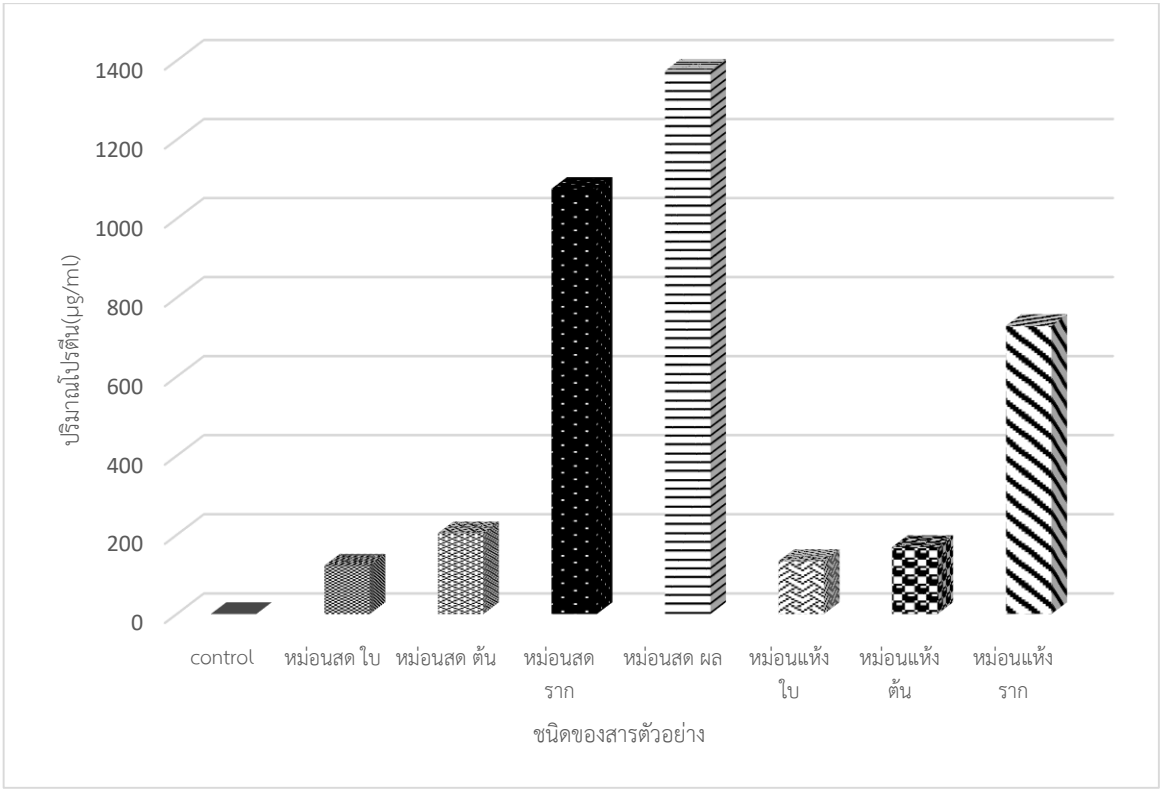
ผลการหาปริมาณโปรตีนของตัวอย่างกาวไหม และหม่อนพันธุ์นครราชสีมา 60 และพันธุ์สกลนคร ทั้งชนิดสดและแห้ง แสดงดังตารางที่ 4-1 พบว่าปริมาณโปรตีนทั้งหมดของกาวไหมมีปริมาณระหว่าง 212.667 – 305.900 ไมโครกรัม ปริมาณโปรตีนทั้งหมดของหม่อนพันธุ์นครราชสีมา 60 อยู่ระหว่าง 12617.513 ถึง 316035.410 ไมโครกรัม ปริมาณโปรตีนทั้งหมดของหม่อนพันธุ์สกลนครอยู่ระหว่าง

8585.000 – 30923.733 ไมโครกรัม โดยกาวไหมเหลืองไพโรจน์ให้ปริมาณโปรตีนทั้งหมดมากที่สุดคือ 305.900 ไมโครกรัม คิดเป็นปริมาณโปรตีนต่อ 1 กรัมตัวอย่างเท่ากับ 152.950 ไมโครกรัม ผลหม่อนสดนครราชสีมา 60 ให้ปริมาณโปรตีนทั้งหมดสูงที่สุดคือ 316035.410 ไมโครกรัม คิดเป็นปริมาณโปรตีนต่อ 1 กรัมตัวอย่างเท่ากับ 1053.451 ไมโครกรัม รากหม่อนสดนครราชสีมา 60 ให้ปริมาณโปรตีนทั้งหมด 144103.645 ไมโครกรัม แต่ให้ปริมาณโปรตีนต่อ 1 กรัมตัวอย่างมากที่สุด = 2401.727 ไมโครกรัม รากหม่อนแห้งนครราชสีมา 60 ให้ปริมาณโปรตีนทั้งหมดมากที่สุดคือ 58269.347 ไมโครกรัม คิดเป็นปริมาณโปรตีนต่อ 1 กรัมเท่ากับ 5826.935 ไมโครกรัม ใบหม่อนสดสกลนครให้ปริมาณโปรตีนทั้งหมดมากที่สุดคือ 30923.733 ไมโครกรัม คิดเป็นปริมาณต่อ 1 กรัมตัวอย่างเท่ากับ 1546.187 ไมโครกรัม รากหม่อนแห้งสกลนครให้ปริมาณโปรตีนทั้งหมดมากที่สุดคือ 62349.333 ไมโครกรัม คิดเป็นปริมาณโปรตีนต่อ 1 กรัมตัวอย่างเท่ากับ 62349.333 ไมโครกรัม ซึ่งรากหม่อนแห้งสกลนครให้ปริมาณโปรตีนต่อ 1 กรัมตัวอย่างมากที่สุดคือ 6234.933 ไมโครกรัม

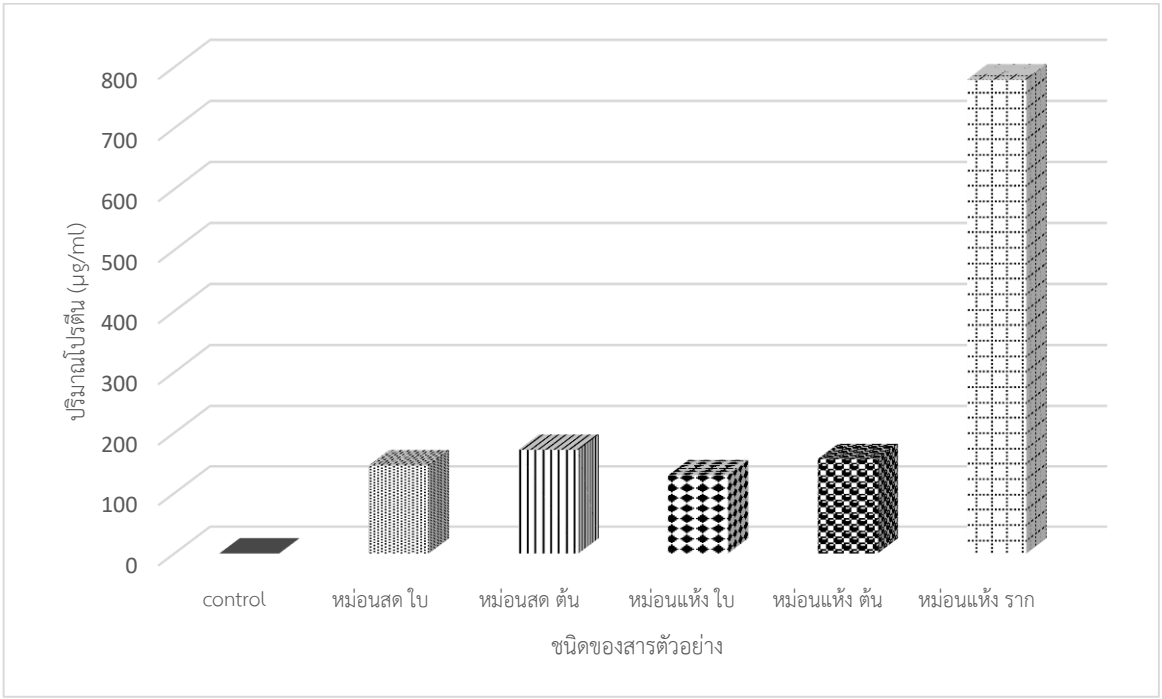


ภาพที่ 4-1.1 ปริมาณโปรตีนของสารตัวอย่างกาวไหม โดยวิธี Lowry assay

** หมายเหตุ E คือ อีรี่, LS คือ เหลืองสุรินทร์, LP คือ เหลืองไพโรจน์, NS คือ นางน้อยศรีษะเกษ



ภาพที่ 4-1.2 ปริมาณโปรตีนของหม่อนพันธุ์นครราชสีมา 60 (สด/แห้ง) โดยวิธี Lowry assay



ภาพที่ 4-1.3 ปริมาณโปรตีนหม่อนพันธุ์สกลนคร (สด/แห้ง) โดยวิธี Lowry assay

การวิเคราะห์หาปริมาณสารฟลาโวนอยด์

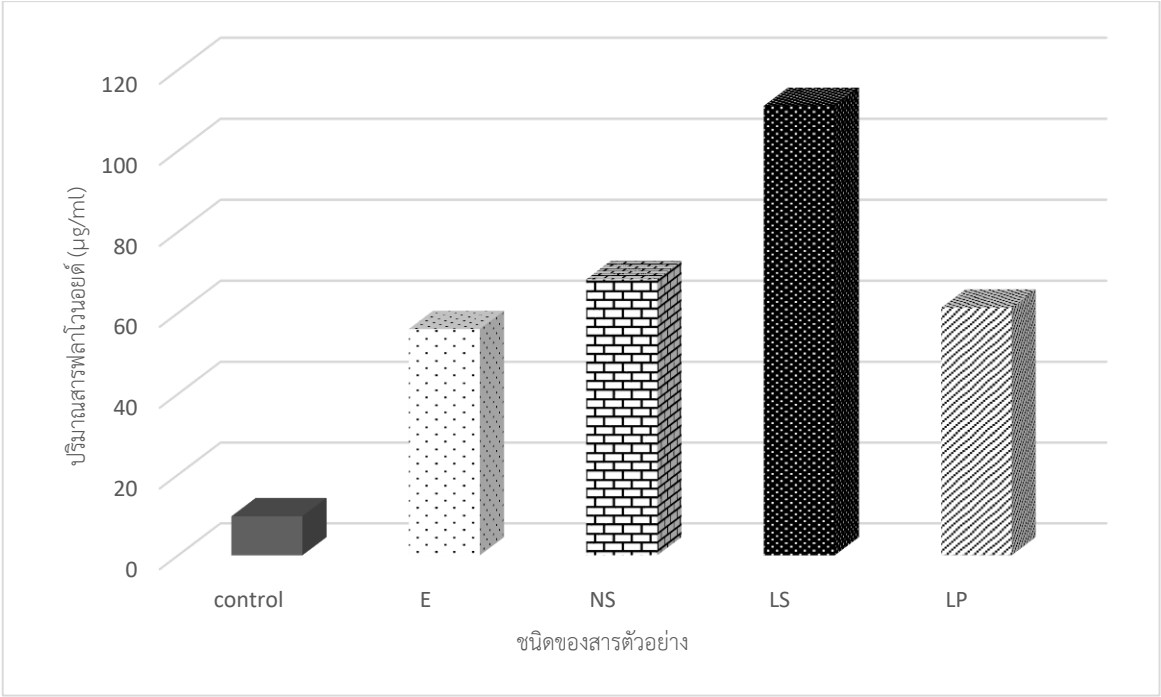
ตารางที่ 4-2 ปริมาณสารฟลาโวนอยด์ในสารตัวอย่างกาวไหมและหม่อน (สด/แห้ง) ชนิดต่างๆ

สารตัวอย่าง			ปริมาณกรดแกลลิก (µg/ml)	ปริมาณฟลาโวนอยด์ (µg/ 1 g สารตัวอย่าง)
กาวไหม		E	56.000±0.012	1540.00
		NS	68.281±0.004	1946.00
		LS	111.088±0.006	3166.00
		LP	61.263±0.011	1776.63
หม่อนพันธุ์ นครราชสีมา 60	สด	ใบ	2033.895±0.006	18305.05
		ต้น	1268.632±0.002	4440.21
		ราก	4405.474±0.037	9838.89
		ผล	1648.632±0.015	1263.95
	แห้ง	ใบ	2661.263±0.006	43910.84
		ต้น	989.684±0.006	7422.63
		ราก	3098.105±0.035	24784.84
หม่อนพันธุ์สกลนคร	สด	ใบ	1809.684±0.003	19182.65
		ต้น	1353.895±0.012	3384.74
	แห้ง	ใบ	2944.421±0.027	51527.37
		ต้น	1277.053±0.009	10216.42
		ราก	2761.263±0.033	22090.11

** หมายเหตุ E คือ อีรี่, LS คือ เหลืองสุรินทร์, LP คือ เหลืองไพโรจน์, NS คือ นางน้อยศรีษะเกษ

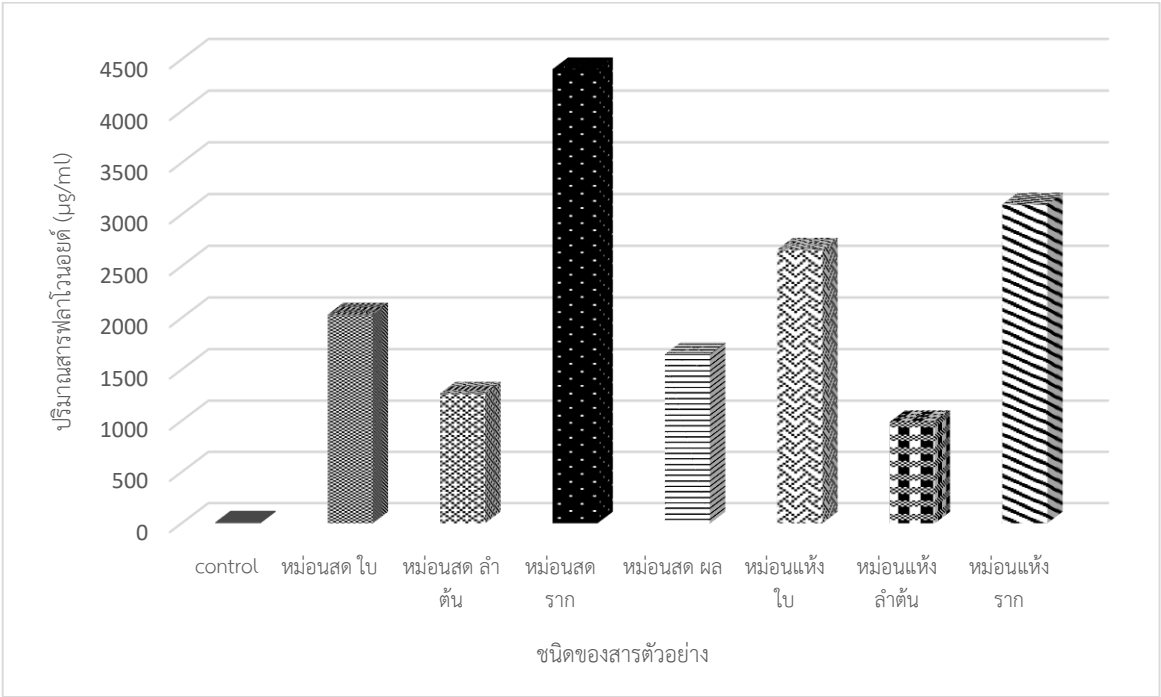
ผลการทดสอบหาปริมาณสารฟลาโวนอยด์ของตัวอย่างกาวไหมและใหมนครราชสีมา 60 และสกลนครทั้งสดและแห้งคำนวณได้จากสมการ $y = 0.0019x - 0.0044$ $R^2 = 0.9941$ เทียบกับปริมาณกรดแกลลิกพบว่ากาวไหมมีปริมาณฟลาโวนอยด์อยู่ระหว่าง 61.263 – 111.088 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยกาวไหมนางเหลืองไพโรจน์ มีปริมาณฟลาโวนอยด์มากที่สุดคือ 111.088 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร หม่อนพันธุ์

นครราชสีมา 60 มีปริมาณฟลาโวนอยด์อยู่ระหว่าง 989.684 – 4405.474 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยราก หม่อนสดมีปริมาณฟลาโวนอยด์มากที่สุดคือ 4405.474 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร หม่อนพันธุ์สกลนครมี ปริมาณฟลาโวนอยด์อยู่ระหว่าง 1277.053 – 2944.421 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยใบหม่อนแห้งมี ปริมาณฟลาโวนอยด์มากที่สุดคือ 2944.421 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อคิดปริมาณฟลาโวนอยด์ต่อ 1 กรัม ของสารตัวอย่าง พบว่ากาวไหมเหลืองไพโรจน์มีปริมาณฟลาโวนอยด์มากที่สุดคือ 3166.00 ไมโครกรัม ตัวอย่างใบหม่อนแห้งและใบหม่อนสด พันธุ์นครราชสีมา 60 มีปริมาณฟลาโวนอยด์มากที่สุดคือ 43910.84 และ 18305.05 ไมโครกรัม ตามลำดับ และตัวอย่างใบหม่อนแห้งและใบหม่อนสด พันธุ์สกลนครมีปริมาณ ฟลาโวนอยด์มากที่สุดคือ 51527.37 และ 19182.65 ไมโครกรัม ตามลำดับ

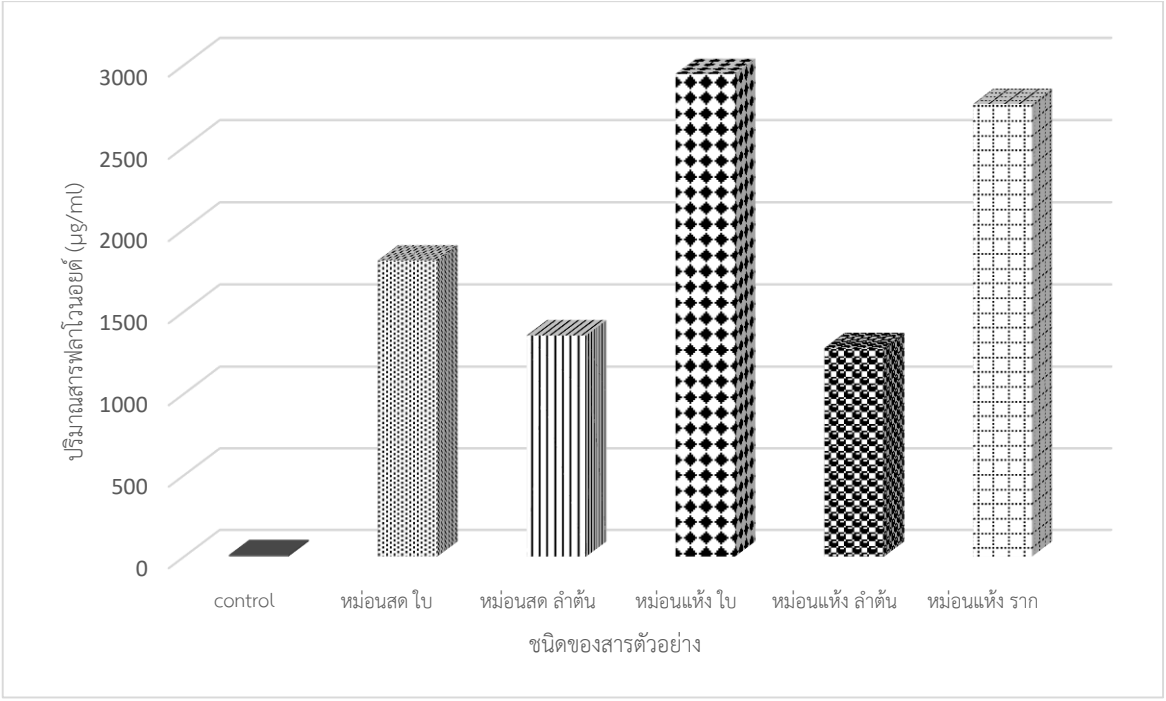


ภาพที่ 4-2.1 ปริมาณสารฟลาโวนอยด์รวมในสารตัวอย่างกาวไหมชนิดต่างๆ

** หมายเหตุ E คือ อีรี่, LS คือ เหลืองสุรินทร์, LP คือ เหลืองไพโรจน์, NS คือ นางน้อยศรีษะเกษ



ภาพที่ 4-2.2 ปริมาณสารฟลาโวนอยด์รวมในหม่อนพันธุ์นครราชสีมา 60 (สด/แห้ง)



ภาพที่ 4-2.3 ปริมาณสารฟลาโวนอยด์รวมในหม่อนพันธุ์สกลนคร (สด/แห้ง)

การวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกด้วยวิธี Folin-Ciocalteu method

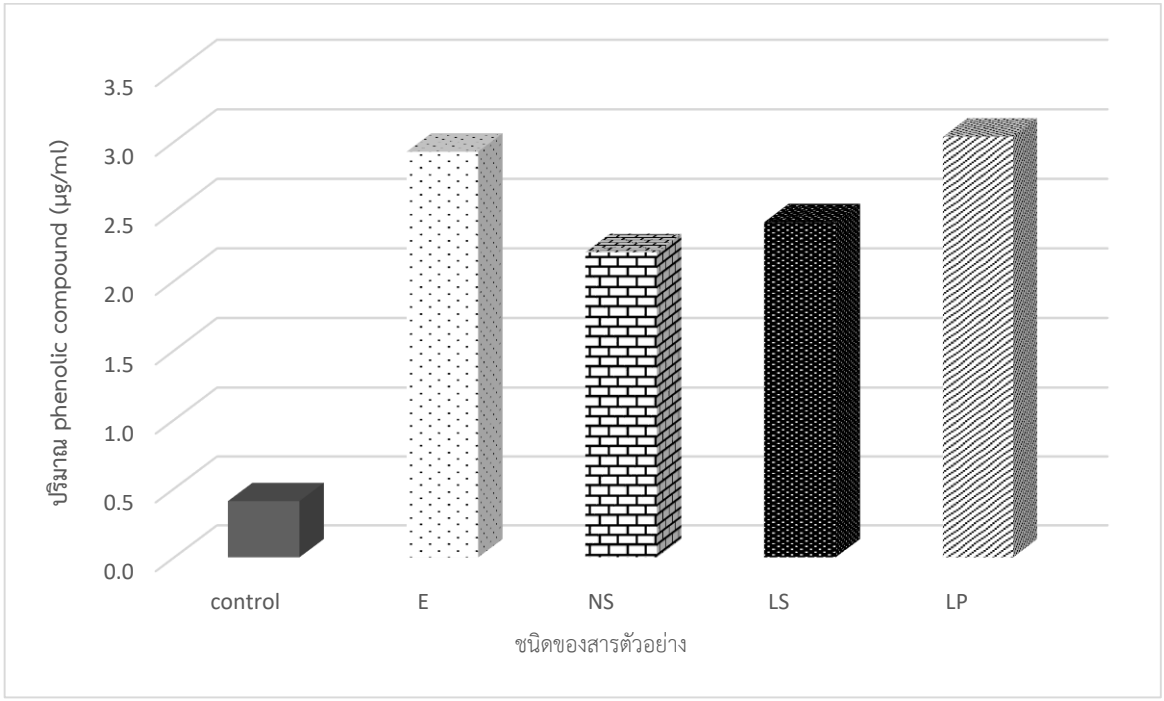
ตารางที่ 4-3 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกในสารตัวอย่างกาวไหมและหม่อน (สด/แห้ง) ชนิดต่างๆ

สารตัวอย่าง			ปริมาณกรดแกลลิก (µg/ml)	ปริมาณฟีนอลิก (µg/ 1 g สารตัวอย่าง)
กาวไหม		E	2.928±0.007	80.520
		NS	2.206±0.003	62.871
		LS	2.421±0.004	68.999
		LP	3.035±0.006	88.051
หม่อนพันธุ์ นครราชสีมา 60	สด	ใบ	160.492±0.071	1444.424
		ต้น	254.501±0.081	890.753
		ราก	419.939±0.166	937.863
		ผล	428.310±0.238	328.371
	แห้ง	ใบ	183.072±0.013	3020.691
		ต้น	277.773±0.003	2083.295
		ราก	444.977±0.113	3559.816
หม่อนพันธุ์สกลนคร	สด	ใบ	255.806±0.001	2711.548
		ต้น	272.704±0.056	681.759
	แห้ง	ใบ	204.270±0.051	3574.731
		ต้น	255.960±0.058	2047.680
		ราก	407.573±0.137	3260.584

** หมายเหตุ E คือ อีรี่, LS คือ เหลืองสุรินทร์, LP คือ เหลืองไพโรจน์, NS คือ นางน้อยศรีษะเกษ

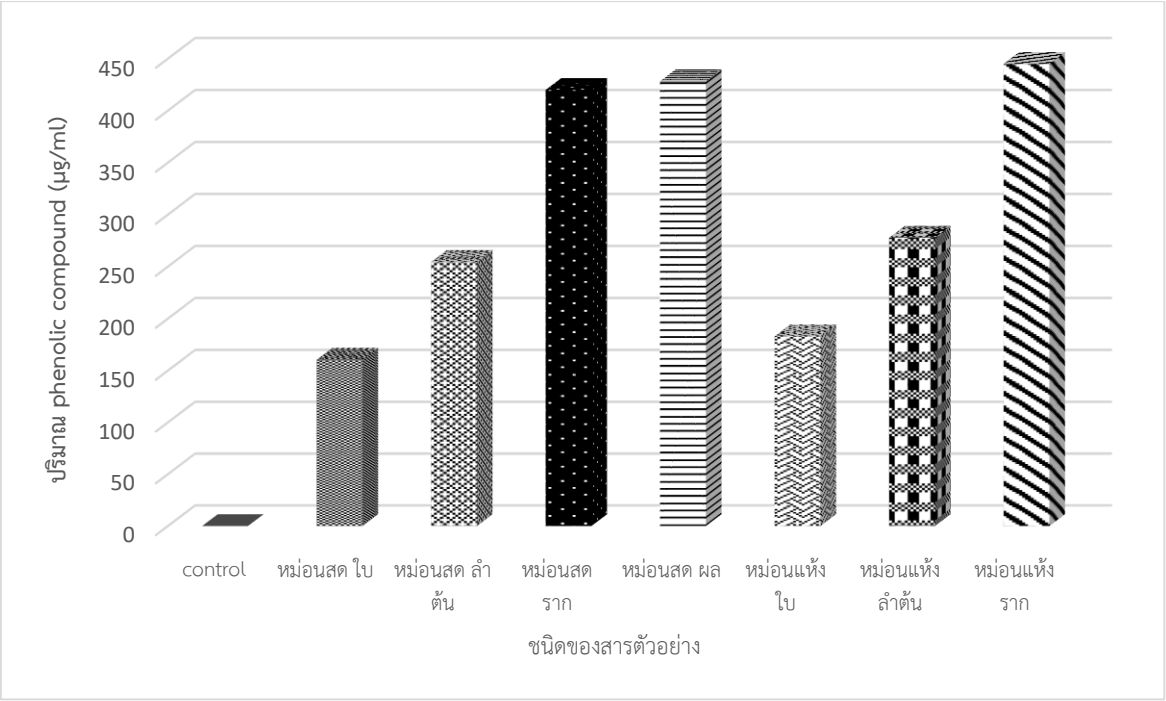
ผลจากการทดสอบหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกของตัวอย่างกาวไหมและหม่อนพันธุ์นครราชสีมา 60 และสกลนคร ทั้งสดและแห้ง คำนวณได้จาก $y = 0.0217x + 0.0028$ มีค่า $R^2 = 0.999$ แสดงดังตารางที่ 3 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมเทียบกับปริมาณกรดแกลลิก พบว่ากาวไหมมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิก อยู่ระหว่าง 2.206 - 3.035 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในกาวไหมเหลืองไพโรจน์มี

ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกมากที่สุดคือ 3.035 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร หม่อนพันธุ์นครราชสีมา 60 มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกอยู่ระหว่าง 160.492 – 444.977 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร รากแห้ง ผลสด และรากสดหม่อนนครราชสีมา 60 มีปริมาณฟีนอลิกมากที่สุดคือ 444.977, 428.310 และ 4119.939 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ หม่อนสกลนครมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกอยู่ระหว่าง 204.270 – 407.573 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร รากหม่อนแห้งและต้นหม่อนสดสกลนครมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกมากที่สุดคือ 407.573 และ 272.704 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ โดยหม่อนพันธุ์นครราชสีมา 60 มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกมากกว่าหมอนสกลนคร

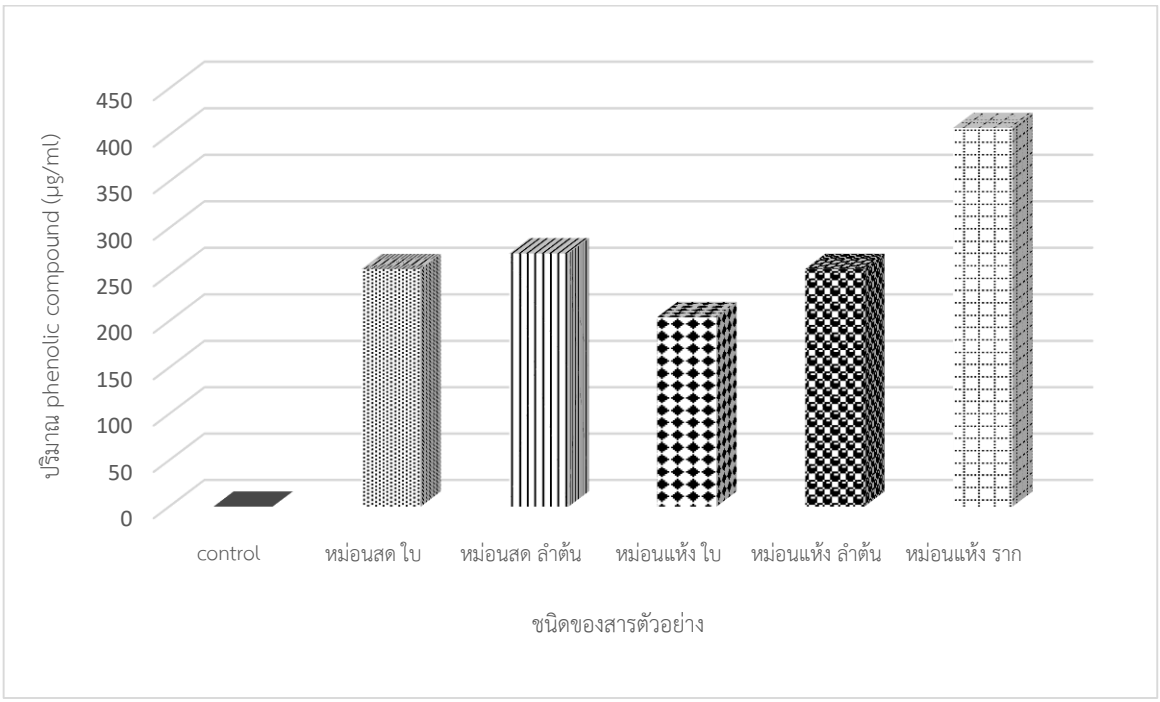


ภาพที่ 4-3.1 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกในสารตัวอย่างกาวไหมชนิดต่างๆ

** หมายเหตุ E คือ อีรี่, LS คือ เหลืองสุรินทร์, LP คือ เหลืองไพโรจน์, NS คือ นางน้อยศรีษะเกษ



ภาพที่ 4-3.2 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกในหม่อนพันธุ์นครราชสีมา 60 (สด/แห้ง)



ภาพที่ 4-3.3 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกในหม่อนสกลนคร (สด/แห้ง)

การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

ตารางที่ 4-4 ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH radical scavenging assay , reducing power , ABTS decolorization scavenging effect

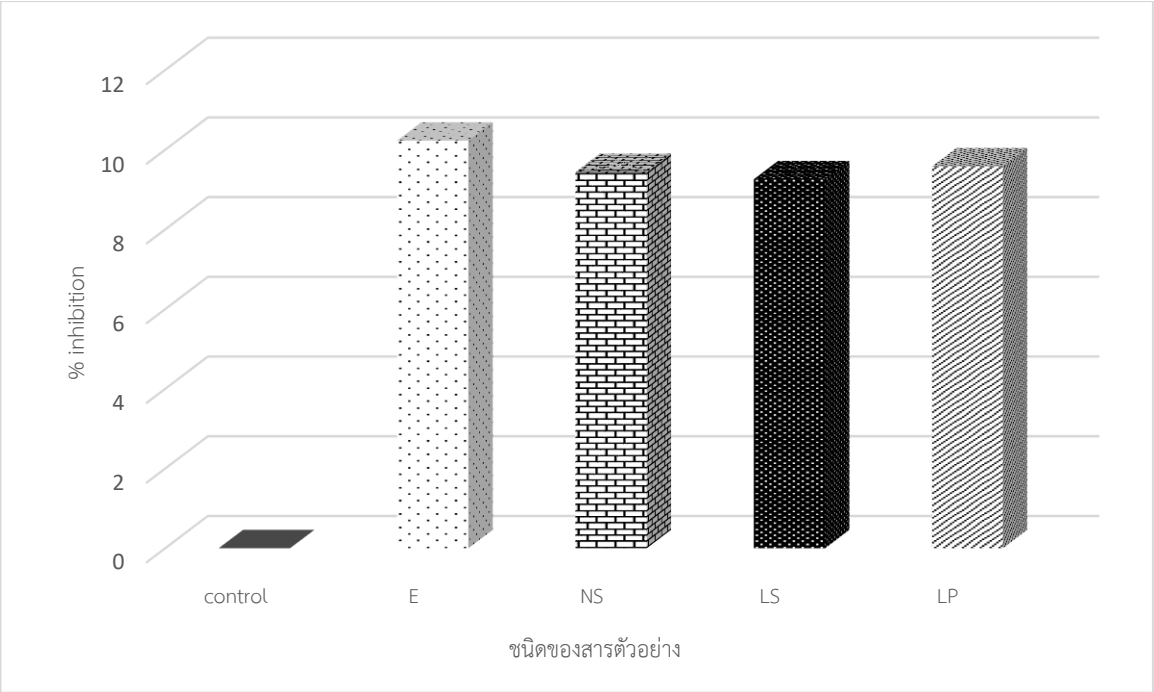
สารตัวอย่าง			ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ				
			DPPH		Reducing power	ABTS	
			% inhibition	ปริมาณวิตามินซี (µg/ml)	ความสามารถในการรีดิวซ์ (กรดแกลลิก) (µg/ml)	% inhibition	ปริมาณวิตามินซี (µg/ml)
กาวไหม		E	10.226±0.013	1.619	2.861±0.002	1.551±0.002	0.658
		NS	9.437±0.002	1.488	3.338±0.001	2.947±0.005	1.112
		LS	9.257±0.003	1.458	3.248±0.001	2.585±0.004	0.994
		LP	9.580±0.007	1.512	3.457±0.001	2.637±0.003	1.011
หม่อนพันธุ์นครราชสีมา 60	สด	ใบ	38.967±0.004	32.003	70.187±0.015	94.984±0.002	0.165
		ต้น	57.086±0.017	47.075	57.687±0.002	97.725±0.002	0.159
		ราก	92.752±0.001	76.742	490.518±0.011	96.225±0.001	0.162
		ผล	59.921±0.020	49.433	1403.482±0.008	90.279±0.001	0.175
	แห้ง	ใบ	31.288±0.005	25.616	126.020±0.018	91.779±0.002	0.172
		ต้น	56.225±0.023	46.359	76.556±0.025	97.725±0.002	0.159
		ราก	93.721±0.005	77.548	351.232±0.019	95.140±0.005	0.165
หม่อนพันธุ์สกลนคร	สด	ใบ	55.723±0.003	45.941	121.675±0.003	97.311±0.001	31.760
		ต้น	53.463±0.009	44.060	65.604±0.003	97.880±0.001	31.945
	แห้ง	ใบ	45.389±0.020	37.345	114.711±0.005	94.881±0.000	30.971
		ต้น	57.804±0.011	47.672	83.996±0.011	97.570±0.002	31.844
		ราก	92.860±0.004	76.831	292.304±0.011	90.848±0.004	29.661

** หมายเหตุ E คือ อีรี่, LS คือ เหลืองสุรินทร์, LP คือ เหลืองไพโรจน์, NS คือ นางน้อยศรีษะเกษ

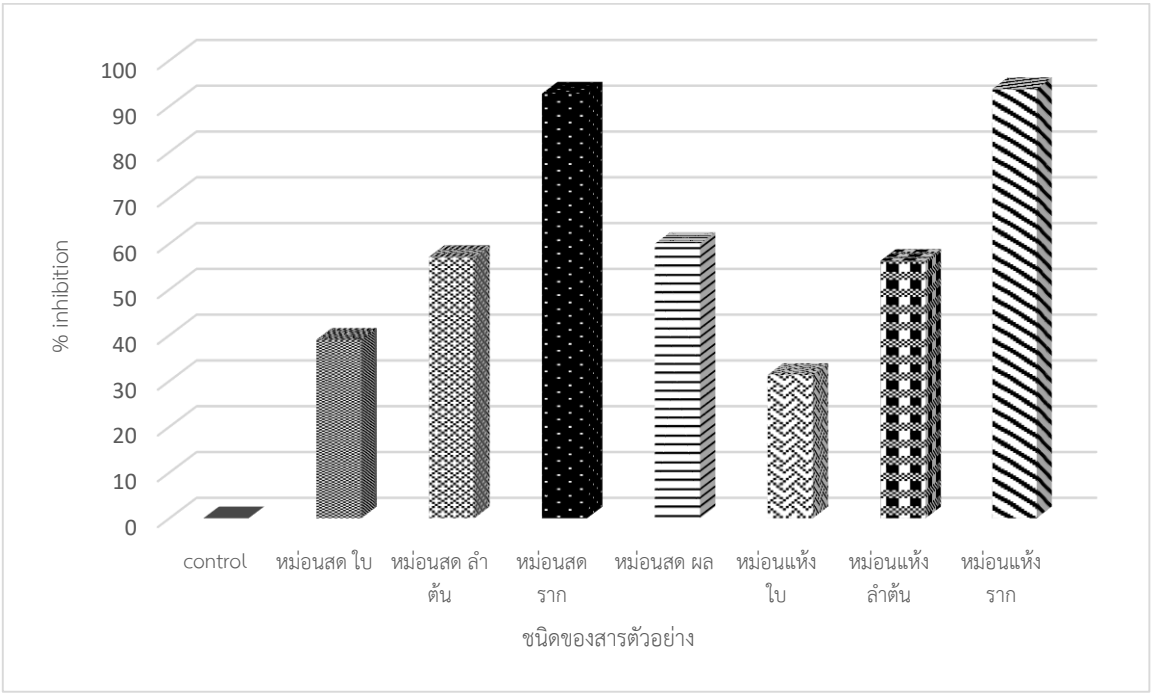
ผลการศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของกาวไหมและหม่อนพันธุ์นครราชสีมา 60 และพันธุ์สกลนครทั้งชนิดสดและแห้ง ด้วยการหาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH แสดงข้อมูลดังตารางที่ 2 พบว่ากาวไหมมีค่าความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระอยู่ระหว่าง 9.257 - 10.226 โดยกาวไหมอีรี่มีค่าความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระมากที่สุดคือ 10.226 หม่อนพันธุ์นครราชสีมา 60 มีค่าความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระอยู่ระหว่าง 31.288 ถึง 93.721 โดยรากของหม่อนนครราชสีมา 60 ทั้งแห้งและสด มีค่าความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระมากที่สุดคือ 93.721 และ 92.752 ตามลำดับ และหม่อนพันธุ์สกลนครมีค่าความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระอยู่ระหว่าง 53.463 – 92.860 โดยรากหม่อนแห้งและใบหม่อนสดมีค่าความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระมากที่สุดคือ 92.860 และ 55.723 ตามลำดับ

ผลการศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของกาวไหมและหม่อนพันธุ์นครราชสีมา 60 และพันธุ์สกลนครทั้งชนิดสดและแห้ง ด้วยการหาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี reducing power คำนวณได้จาก $y = 0.0112x + 0.0262$ มีค่า $R^2 = 0.9939$ แสดงข้อมูลดังตารางที่ 2 เทียบกับกรดแกลลิก พบว่ากาวไหมมีความสามารถในการรีดิวซ์อยู่ระหว่าง 2.861 – 3.457 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยกาวไหมเหลืองไพโรจน์มีความสามารถในการรีดิวซ์มากที่สุดคือ 3.457 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร หม่อนพันธุ์นครราชสีมา 60 มีความสามารถในการรีดิวซ์อยู่ระหว่าง 57.687 – 1403.482 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยผลหม่อนสดและรากหม่อนแห้งมีความสามารถในการรีดิวซ์มากที่สุดคือ 1403.482 และ 351.232 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และหม่อนพันธุ์สกลนครมีความสามารถในการรีดิวซ์อยู่ระหว่าง 65.604 – 292.304 ไมโครกรัม โดยรากหม่อนแห้งและใบหม่อนสดมีความสามารถในการรีดิวซ์มากที่สุดคือ 292.304 และ 121.675 ไมโครกรัม ตามลำดับ

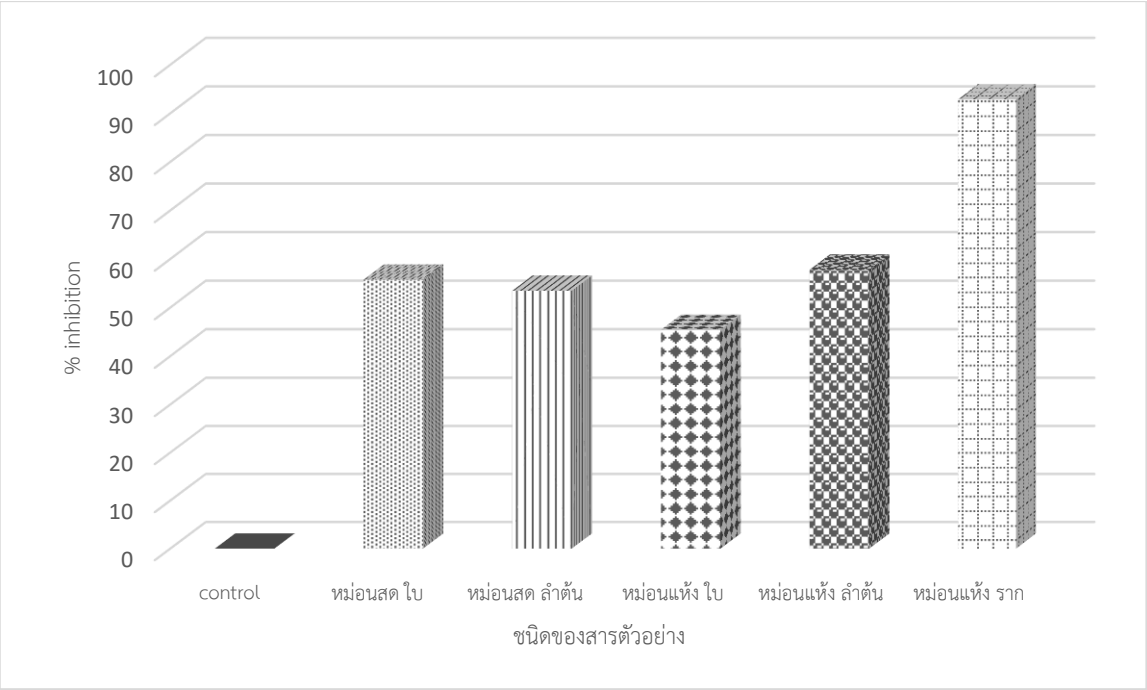
ผลการศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของกาวไหมและหม่อนพันธุ์นครราชสีมา 60 และพันธุ์สกลนครทั้งชนิดสดและแห้ง ด้วยการหาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS แสดงข้อมูลดังตารางที่ 2 พบว่ากาวไหมมีค่าความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระอยู่ระหว่าง 1.551 – 2.947 โดยกาวไหมนางน้อยศรีษะเกษมีค่าความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระมากที่สุดคือ 2.947 หม่อนพันธุ์นครราชสีมา 60 มีค่าความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระอยู่ระหว่าง 90.279 - 97.725 โดยต้นของหม่อนนครราชสีมา 60 ทั้งสดและแห้ง มีค่าความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระมากที่สุดคือ 97.725 และหม่อนพันธุ์สกลนครมีค่าความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระอยู่ระหว่าง 90.848 – 97.880 โดยต้นหม่อนสกลนครทั้งสดและแห้งมีค่าความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระมากที่สุดคือ 97.880 และ 97.570 ตามลำดับ ซึ่งทั้งหม่อนนครราชสีมา 60 และหม่อนสกลนครมีค่าความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระที่สูงไม่แตกต่างกัน



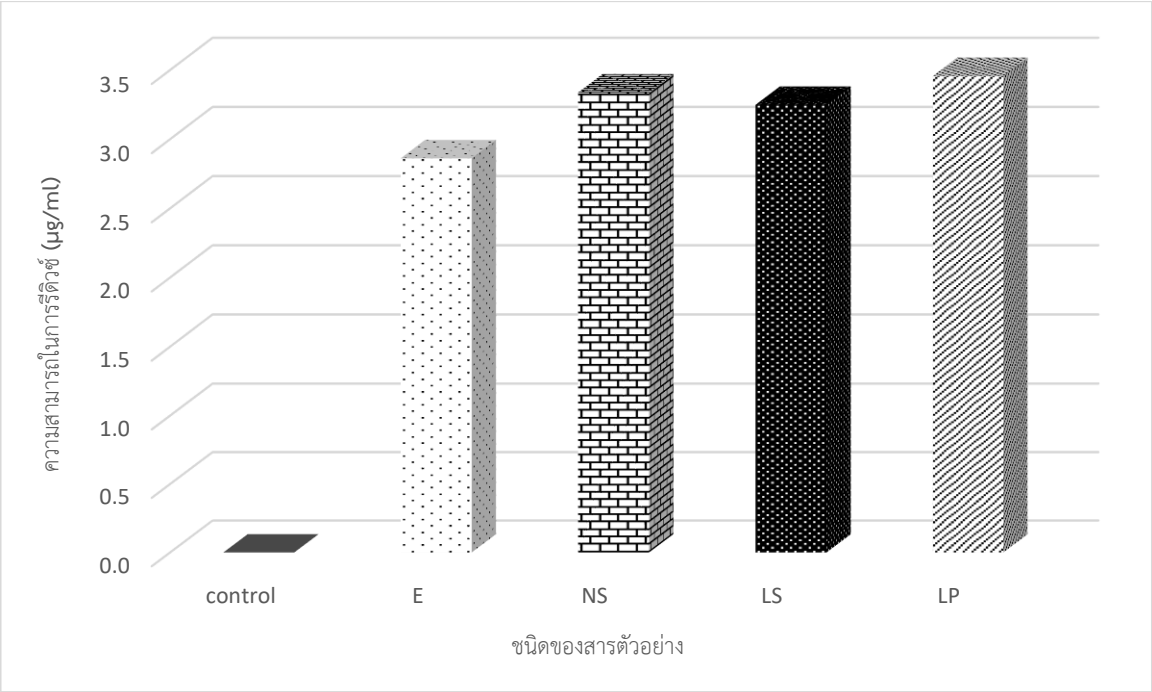
ภาพที่ 4-4.1 % inhibition ของสารตัวอย่างกาวไหม โดยวิธี DPPH radical scavenging assay
** หมายเหตุ E คือ อีรี่, LS คือ เหลืองสุรินทร์, LP คือ เหลืองไพโรจน์, NS คือ นางน้อยศรีษะเกษ



ภาพที่ 4-4.2 % inhibition ของสารตัวอย่างกาวไหมและหม่อนพันธุ์นครราชสีมา 60 (สด/แห้ง) โดยวิธี DPPH radical scavenging assay

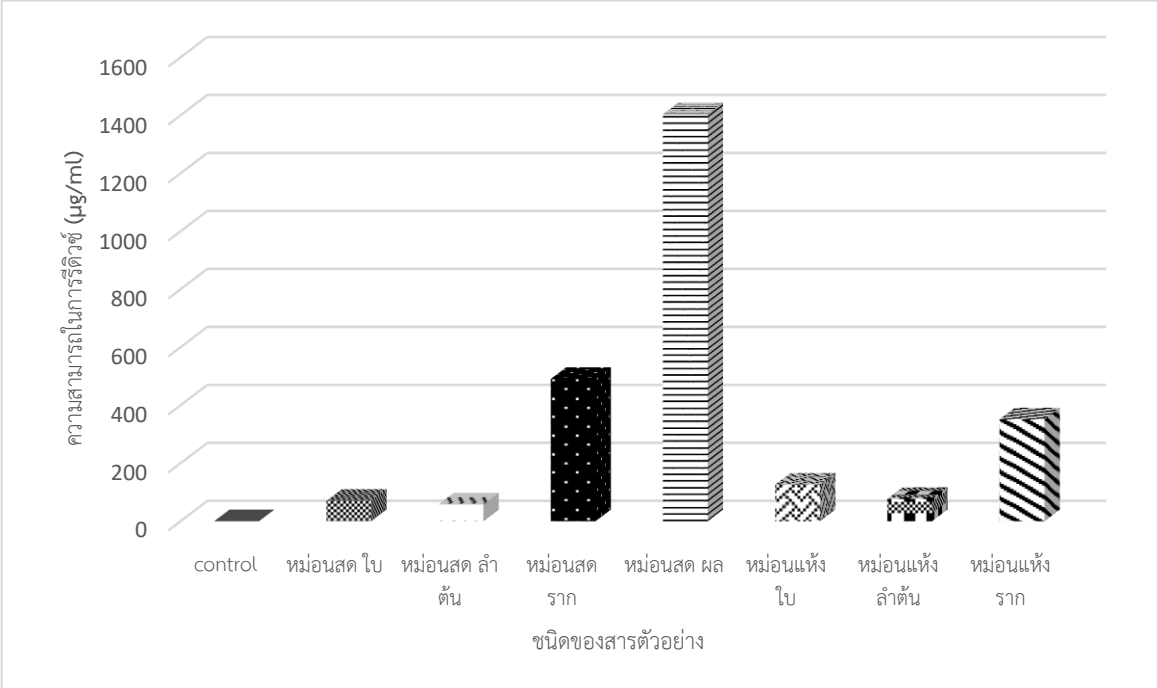


ภาพที่ 4-4.3 % inhibition ของหม่อนพันธุ์สกลนคร (สด/แห้ง) โดยวิธี DPPH radical scavenging assay

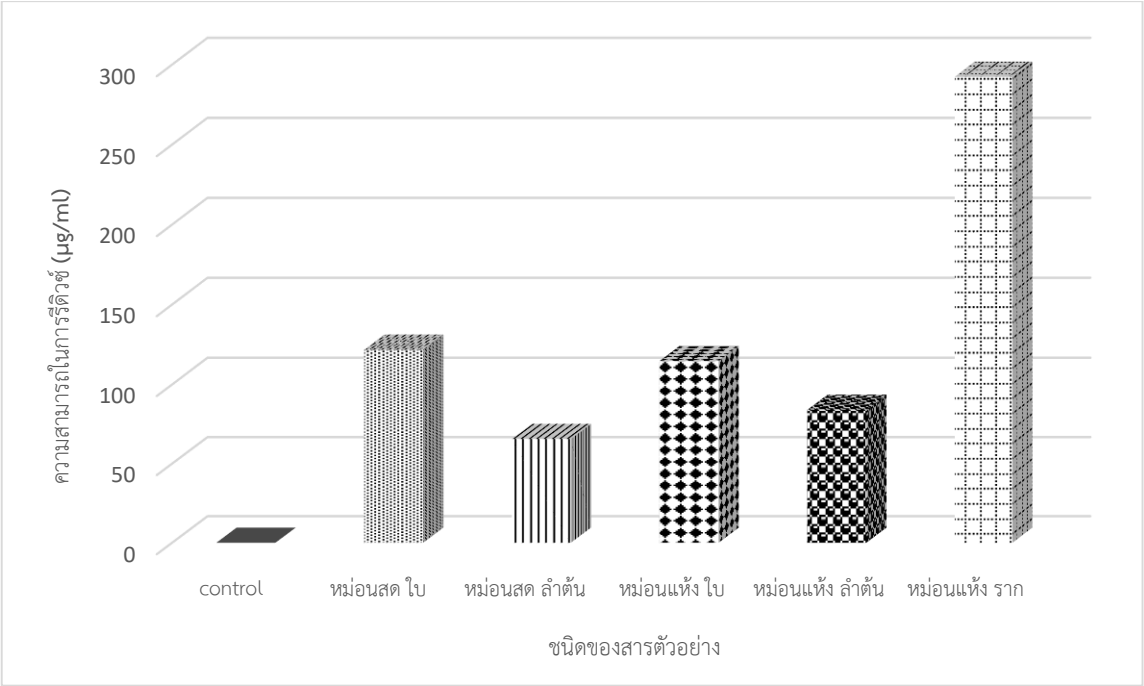


ภาพที่ 4-5.1 ความสามารถในการรีดิวซ์ของสารตัวอย่างกาวไหมชนิดต่างๆโดยวิธี reducing power

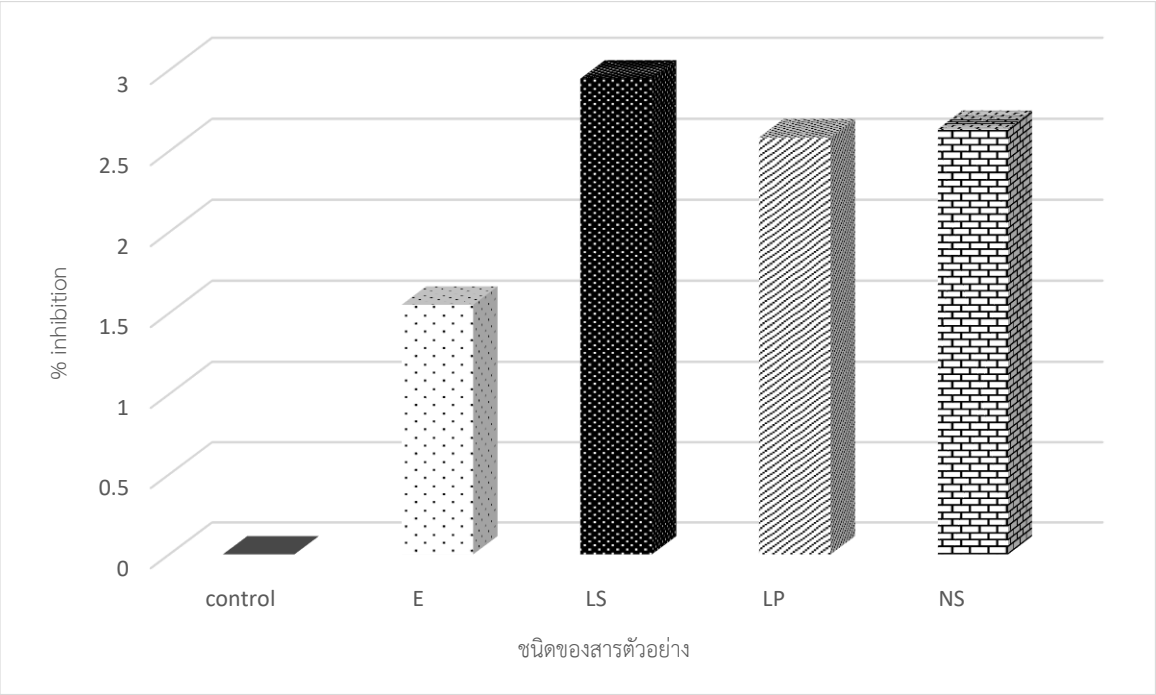
** หมายเหตุ E คือ อีรี่, LS คือ เหลืองสุรินทร์, LP คือ เหลืองไพโรจน์, NS คือ นางน้อยศรีษะเกษ



ภาพที่ 4-5.2 ความสามารถในการรีดิวซ์ของหม่อนพันธุ์นครราชสีมา 60 (สด/แห้ง) โดยวิธี reducing power

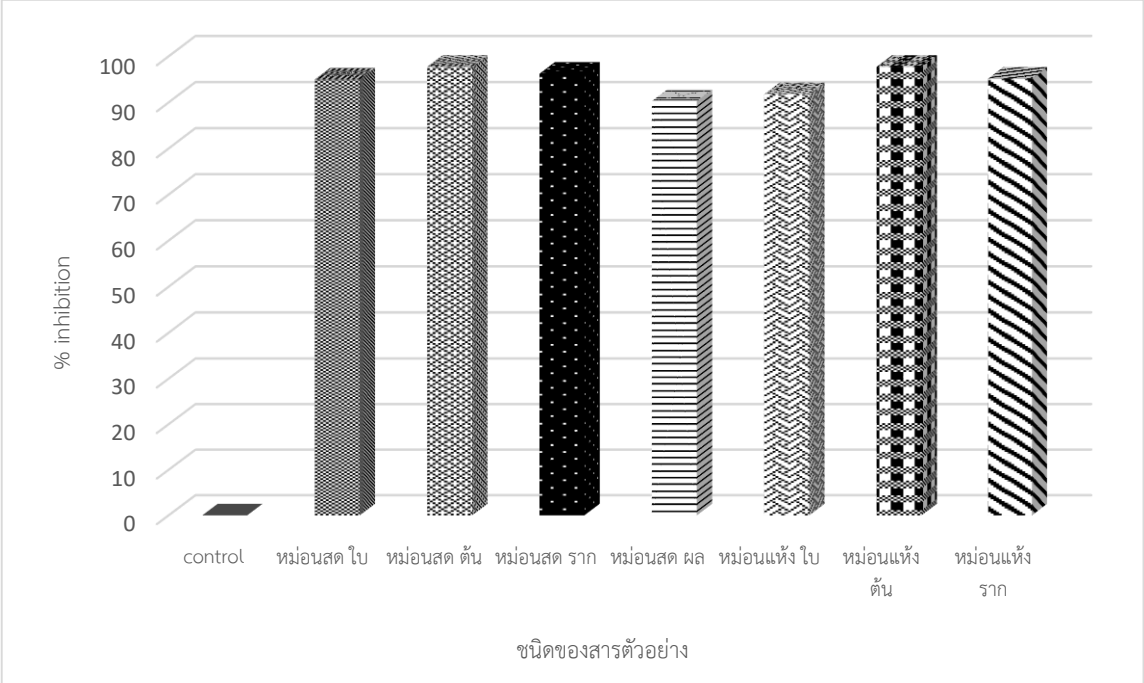


ภาพที่ 4-5.3 ความสามารถในการรีดิวซ์ของหม่อนพันธุ์สกลนคร (สด/แห้ง) โดยวิธี reducing power

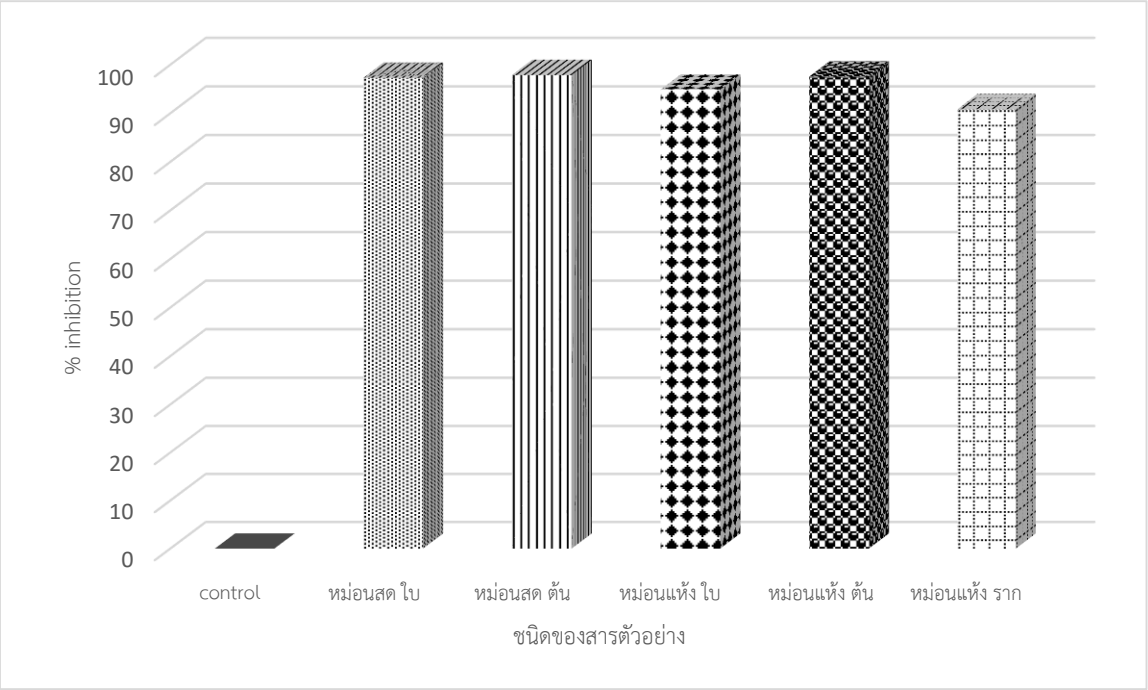


ภาพที่ 4-6.1 % inhibition ของสารตัวอย่างกาวไหมชนิดต่างๆโดยวิธี ABTS decolorization scavenging effect

** หมายเหตุ E คือ อีรี่, LS คือ เหลืองสุรินทร์, LP คือ เหลืองไพโรจน์, NS คือ นางน้อยศรีษะเกษ



ภาพที่ 4-6.2 % inhibition ของหม่อนพันธุ์นครราชสีมา 60 (สด/แห้ง) โดยวิธี ABTS decolorization scavenging effect



ภาพที่ 4-6.3 % inhibition ของหม่อนพันธุ์สกลนคร (สด/แห้ง) โดยวิธี ABTS decolorization scavenging effect

การวิเคราะห์ฤทธิ์ยับยั้งของเอนไซม์ไทโรซิเนสด้วยวิธี Modified Dopachrome

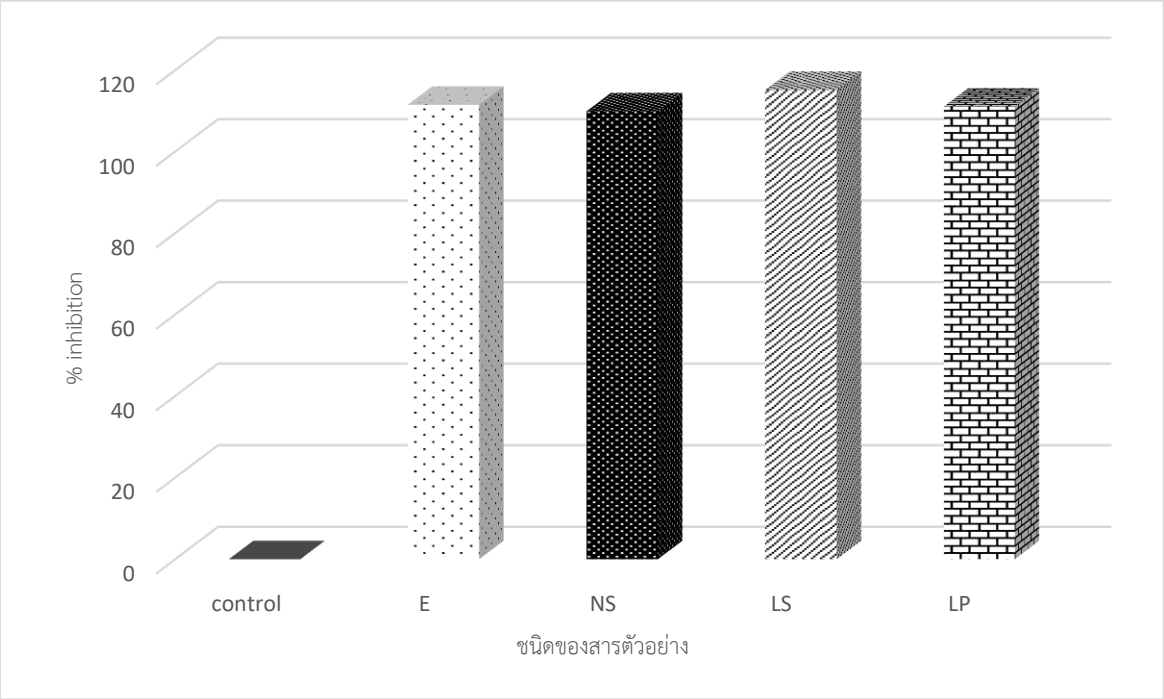
ตารางที่ 4-5 ฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส (เจือจาง 2 เท่า) สารตัวอย่างกาวไหมและหม่อน (สด/แห้ง) ชนิดต่างๆ

สารตัวอย่าง			% inhibition	ปริมาณวิตามินซี (µg/ml)	ปริมาณในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส (µg/ 1 g สารตัวอย่าง)
กาวไหม		E	111.450±0.003	352.258	9687.083
		NS	109.857±0.003	347.184	9894.751
		LS	115.109±0.013	363.910	10371.446
		LP	111.077±0.005	351.069	10180.987
หม่อนพันธุ์ นครราชสีมา 60	สด	ใบ	111.276±0.119	378.417	3405.753
		ต้น	182.738±0.080	579.289	2027.512
		ราก	202.526±0.066	642.310	1434.491
		ผล	84.468±0.086	266.328	204.185
	แห้ง	ใบ	94.400±0.047	297.957	4916.291
		ต้น	162.526±0.071	514.921	3861.910
		ราก	211.786±0.046	671.798	5374.386
หม่อนพันธุ์สกลนคร	สด	ใบ	176.291±0.098	558.758	5922.836
		ต้น	177.137±0.091	561.453	1403.633
	แห้ง	ใบ	97.038±0.106	306.360	5361.296
		ต้น	162.725±0.009	515.555	4124.444
		ราก	213.130±0.087	654.517	5236.138

** หมายเหตุ E คือ อีรี่, LS คือ เหลืองสุรินทร์, LP คือ เหลืองไพโรจน์, NS คือ นางน้อยศรีษะเกษ

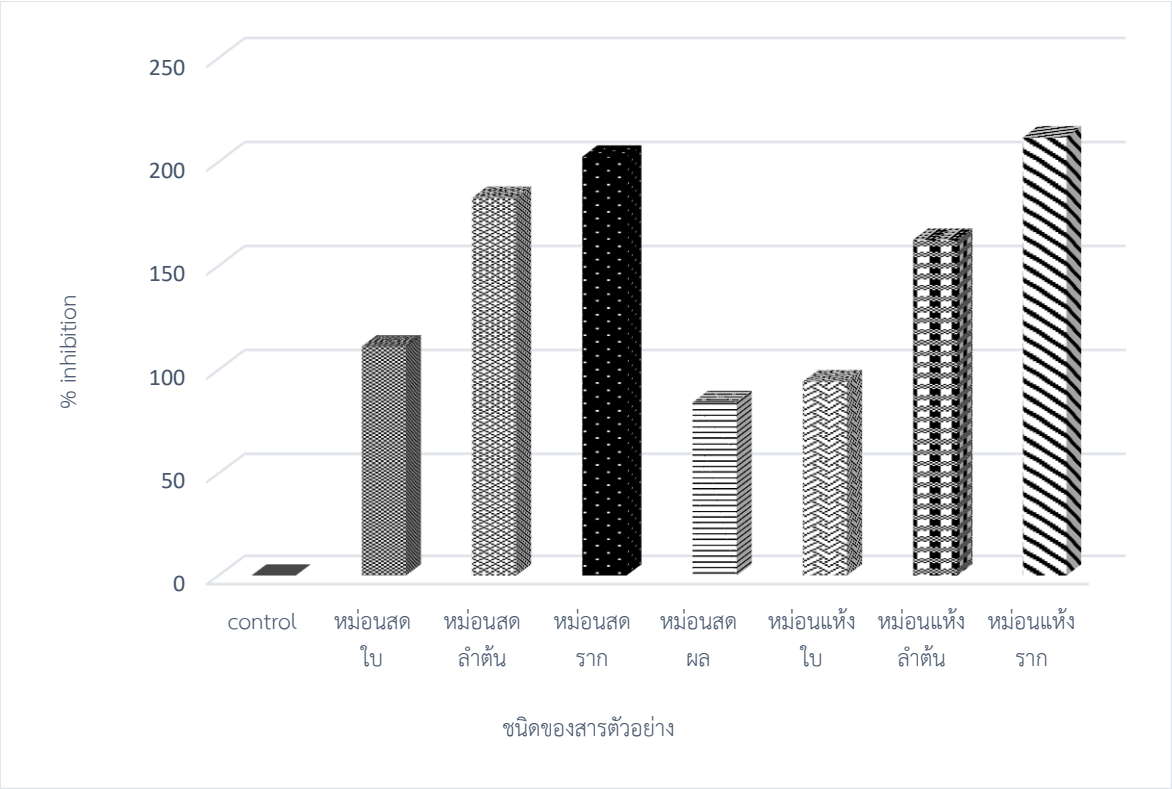
ผลจากการทดสอบความสามารถในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของตัวอย่างกาวไหมและหม่อนพันธุ์นครราชสีมา 60 และหม่อนพันธุ์สกลนคร ทั้งสดและแห้ง คำนวณได้จาก $y = 0.6289x + 0.8418$ มีค่า $R^2 = 0.9855$ แสดงดังตารางที่ 5 เทียบกับปริมาณวิตามินซี พบว่ากาวไหมมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส อยู่ระหว่าง 109.857 – 115.109 โดยกาวไหมเหลืองสุรินทร์มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง

เอนไซม์ไทโรซิเนสสูงที่สุดคือ 115.109 หม่อนพันธุ์นครราชสีมา 60 มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสอยู่ระหว่าง 84.468 - 211.786 โดยรากหม่อนแห้งและรากหม่อนสดมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสสูงสุดคือ 211.786 และ 202.526 ตามลำดับ และหม่อนพันธุ์สกลนครมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสอยู่ระหว่าง 97.038 – 213.185 โดยต้นและใบหม่อนสดมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสไม่แตกต่างกัน ส่วนรากหม่อนแห้งมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสสูงที่สูงที่สุดคือ 213.185 เมื่อคิดเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสต่อ 1 กรัมสารตัวอย่าง พบว่ากาวไหมเหลืองสุรินทร์มีปริมาณในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส มากที่สุดคือ 10371.45 ไมโครกรัม ในตัวอย่างหม่อนพันธุ์นครราชสีมา 60 พบว่ารากหม่อนแห้งและใบหม่อนสด มีปริมาณในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสมากที่สุดคือ 5374.386 และ 3405.753 ไมโครกรัม ตามลำดับ หม่อนพันธุ์สกลนครพบว่า ใบหม่อนสดและใบหม่อนแห้ง มีปริมาณในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสมากที่สุดคือ 5922.836 และ 5361.296 ไมโครกรัม ตามลำดับ

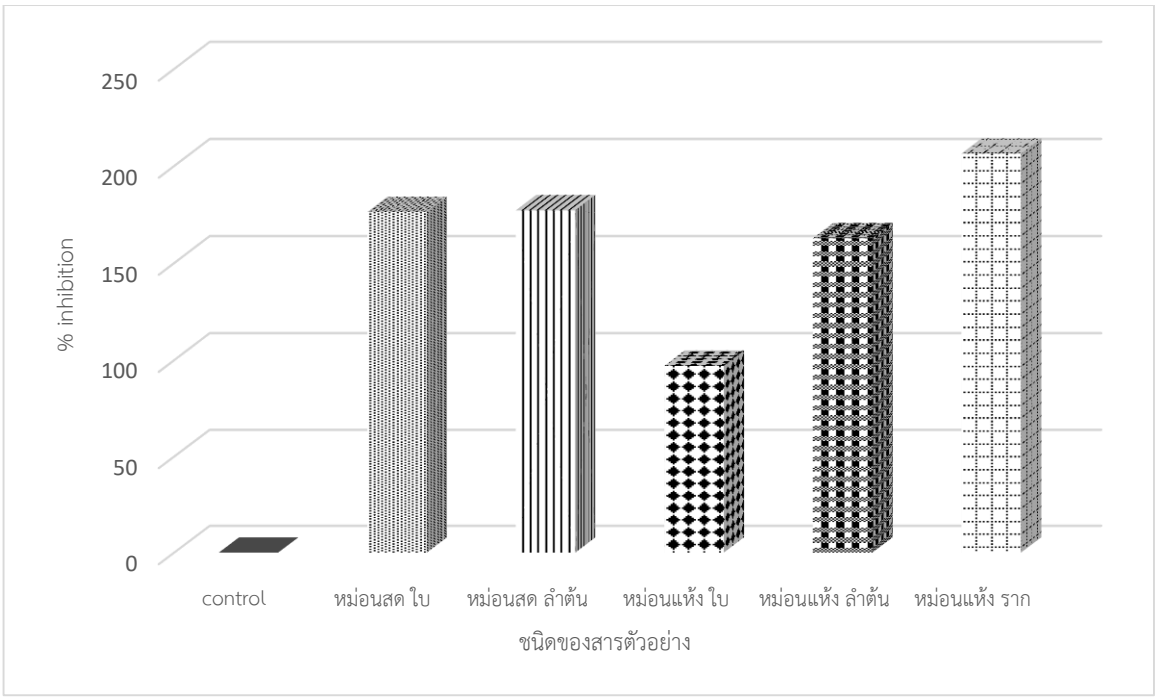


ภาพที่ 4-7.1 การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารตัวอย่างกาวไหม ชนิดต่างๆ

** หมายเหตุ E คือ อีรี่, LS คือ เหลืองสุรินทร์, LP คือ เหลืองไพโรจน์, NS คือ นางน้อยศรีษะเกษ



ภาพที่ 4-7.2 การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสของหม่อนพันธุ์นครราชสีมา 60 (สด/แห้ง)



ภาพที่ 4-7.3 การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสของหม่อนพันธุ์สกลนคร (สด/แห้ง)

บทที่ 4
ผลการทดลองและการวิเคราะห์ผลการทดลอง

การคำนวณหาปริมาณโปรตีนในสารตัวอย่างโดยวิธี Lowry assay

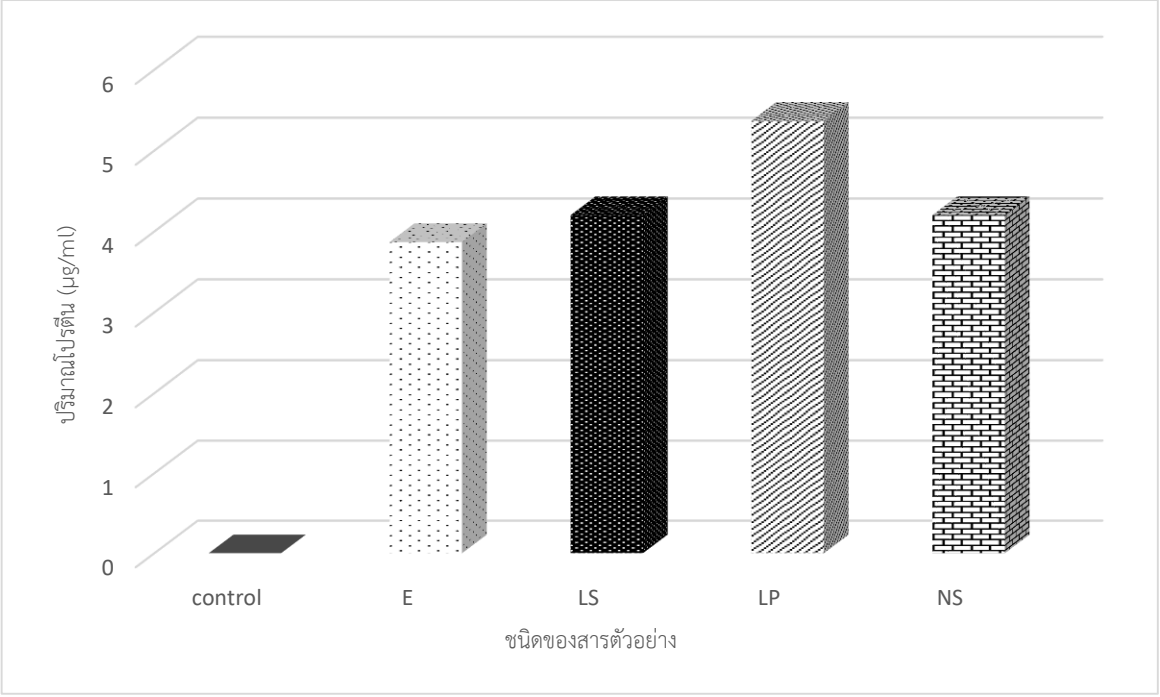
ตารางที่ 4-1 ปริมาณโปรตีนในสารตัวอย่างกาวไหมและหม่อน (สด/แห้ง) ชนิดต่างๆ

สารตัวอย่าง			ปริมาณโปรตีน (µg/ml)	ปริมาณโปรตีนทั้งหมด (µg)	ปริมาณโปรตีน (µg/g)
กาวไหม		E	3.867±0.001	212.667	106.333
		LS	4.200±0.001	239.400	119.700
		LP	5.367±0.004	305.900	152.950
		NS	4.200±0.001	243.600	121.800
หม่อนพันธุ์ นครราชสีมา 60	สด	ใบ	122.304±0.034	20166.030	1008.302
		ต้น	203.867±0.027	14270.678	713.534
		ราก	1075.400±0.031	144103.645	2401.727
		ผล	1374.067±0.045	316035.410	1053.451
	แห้ง	ใบ	133.700±0.013	22060.528	2206.053
		ต้น	169.034±0.014	12677.513	1267.751
		ราก	728.367±0.064	58269.347	5826.935
หม่อนพันธุ์สกลนคร	สด	ใบ	145.867±0.006	30923.733	1546.187
		ต้น	171.700±0.011	8585.000	429.250
	แห้ง	ใบ	129.533±0.003	22668.333	2266.833
		ต้น	156.367±0.008	12509.333	1250.933
		ราก	779.367±0.032	62349.333	6234.933

** หมายเหตุ E คือ อีรี่, LS คือ เหลืองสุรินทร์, LP คือ เหลืองไพโรจน์, NS คือ นางน้อยศรีษะเกษ

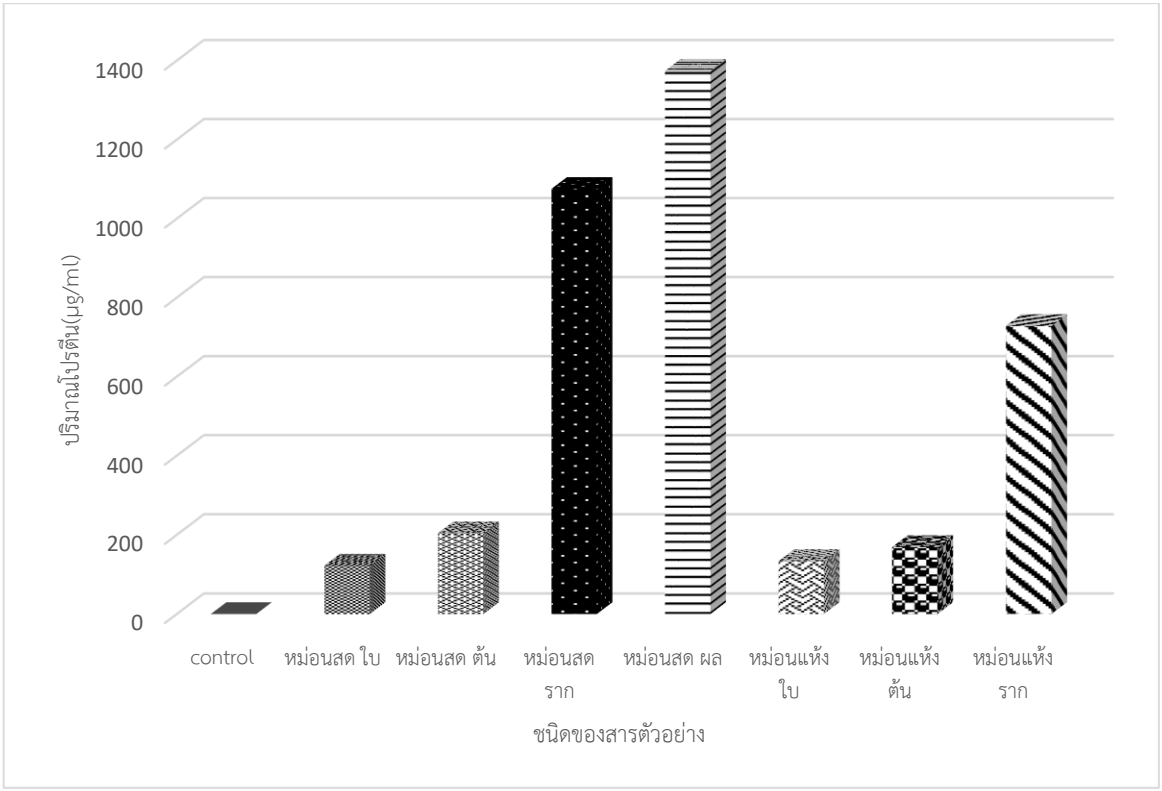
ผลการหาปริมาณโปรตีนของตัวอย่างกาวไหม และหม่อนพันธุ์นครราชสีมา 60 และพันธุ์สกลนคร ทั้งชนิดสดและแห้ง แสดงดังตารางที่ 4-1 พบว่าปริมาณโปรตีนทั้งหมดของกาวไหมมีปริมาณระหว่าง 212.667 – 305.900 ไมโครกรัม ปริมาณโปรตีนทั้งหมดของหม่อนพันธุ์นครราชสีมา 60 อยู่ระหว่าง 12617.513 ถึง 316035.410 ไมโครกรัม ปริมาณโปรตีนทั้งหมดของหม่อนพันธุ์สกลนครอยู่ระหว่าง

8585.000 – 30923.733 ไมโครกรัม โดยกาวไหมเหลืองไพโรจน์ให้ปริมาณโปรตีนทั้งหมดมากที่สุดคือ 305.900 ไมโครกรัม คิดเป็นปริมาณโปรตีนต่อ 1 กรัมตัวอย่างเท่ากับ 152.950 ไมโครกรัม ผลหม่อนสดนครราชสีมา 60 ให้ปริมาณโปรตีนทั้งหมดสูงที่สุดคือ 316035.410 ไมโครกรัม คิดเป็นปริมาณโปรตีนต่อ 1 กรัมตัวอย่างเท่ากับ 1053.451 ไมโครกรัม รากหม่อนสดนครราชสีมา 60 ให้ปริมาณโปรตีนทั้งหมด 144103.645 ไมโครกรัม แต่ให้ปริมาณโปรตีนต่อ 1 กรัมตัวอย่างมากที่สุด = 2401.727 ไมโครกรัม รากหม่อนแห้งนครราชสีมา 60 ให้ปริมาณโปรตีนทั้งหมดมากที่สุดคือ 58269.347 ไมโครกรัม คิดเป็นปริมาณโปรตีนต่อ 1 กรัมเท่ากับ 5826.935 ไมโครกรัม ใบหม่อนสดสกลนครให้ปริมาณโปรตีนทั้งหมดมากที่สุดคือ 30923.733 ไมโครกรัม คิดเป็นปริมาณต่อ 1 กรัมตัวอย่างเท่ากับ 1546.187 ไมโครกรัม รากหม่อนแห้งสกลนครให้ปริมาณโปรตีนทั้งหมดมากที่สุดคือ 62349.333 ไมโครกรัม คิดเป็นปริมาณโปรตีนต่อ 1 กรัมตัวอย่างเท่ากับ 62349.333 ไมโครกรัม ซึ่งรากหม่อนแห้งสกลนครให้ปริมาณโปรตีนต่อ 1 กรัมตัวอย่างมากที่สุดคือ 6234.933 ไมโครกรัม

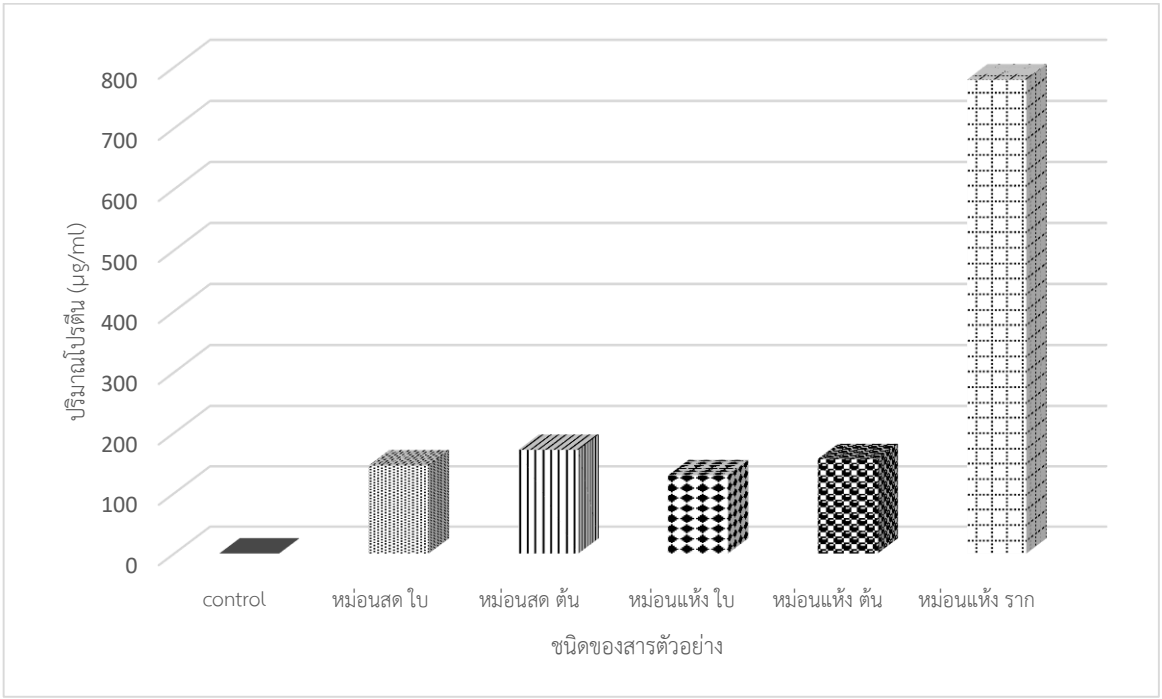


ภาพที่ 4-1.1 ปริมาณโปรตีนของสารตัวอย่างกาวไหม โดยวิธี Lowry assay

** หมายเหตุ E คือ อีรี่, LS คือ เหลืองสุรินทร์, LP คือ เหลืองไพโรจน์, NS คือ นางน้อยศรีษะเกษ



ภาพที่ 4-1.2 ปริมาณโปรตีนของหม่อนพันธุ์นครราชสีมา 60 (สด/แห้ง) โดยวิธี Lowry assay



ภาพที่ 4-1.3 ปริมาณโปรตีนหม่อนพันธุ์สกลนคร (สด/แห้ง) โดยวิธี Lowry assay

การวิเคราะห์หาปริมาณสารฟลาโวนอยด์

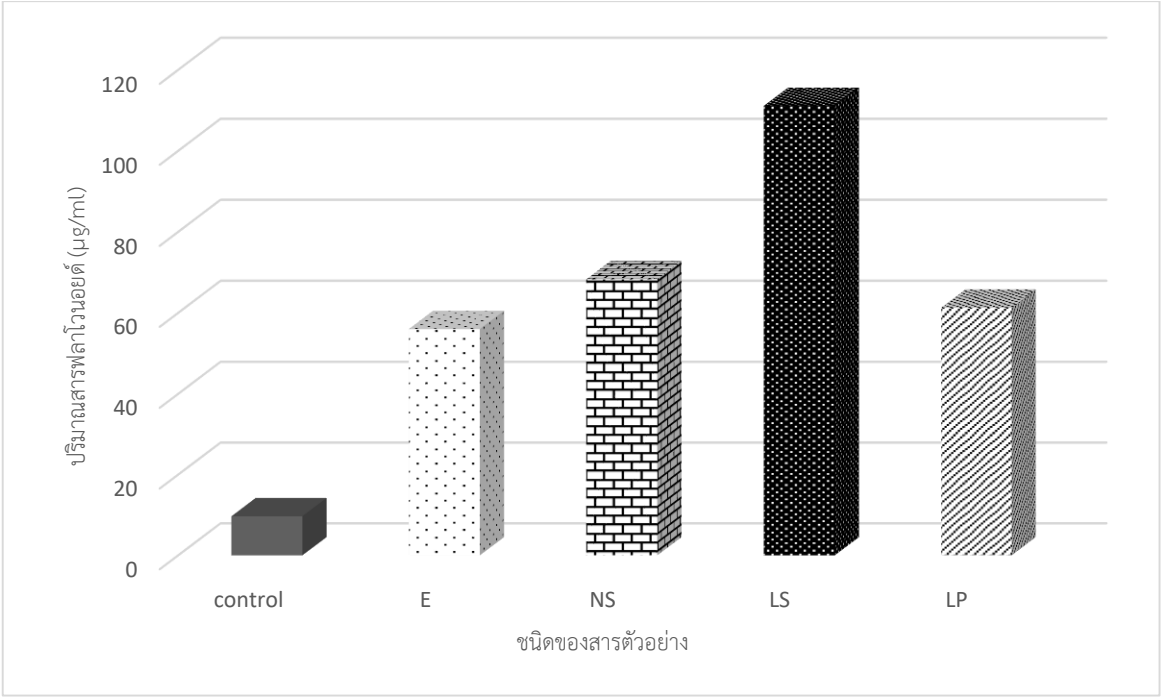
ตารางที่ 4-2 ปริมาณสารฟลาโวนอยด์ในสารตัวอย่างกาวไหมและหม่อน (สด/แห้ง) ชนิดต่างๆ

สารตัวอย่าง			ปริมาณกรดแกลลิก (µg/ml)	ปริมาณฟลาโวนอยด์ (µg/ 1 g สารตัวอย่าง)
กาวไหม		E	56.000±0.012	1540.00
		NS	68.281±0.004	1946.00
		LS	111.088±0.006	3166.00
		LP	61.263±0.011	1776.63
หม่อนพันธุ์ นครราชสีมา 60	สด	ใบ	2033.895±0.006	18305.05
		ต้น	1268.632±0.002	4440.21
		ราก	4405.474±0.037	9838.89
		ผล	1648.632±0.015	1263.95
	แห้ง	ใบ	2661.263±0.006	43910.84
		ต้น	989.684±0.006	7422.63
		ราก	3098.105±0.035	24784.84
หม่อนพันธุ์สกลนคร	สด	ใบ	1809.684±0.003	19182.65
		ต้น	1353.895±0.012	3384.74
	แห้ง	ใบ	2944.421±0.027	51527.37
		ต้น	1277.053±0.009	10216.42
		ราก	2761.263±0.033	22090.11

** หมายเหตุ E คือ อีรี่, LS คือ เหลืองสุรินทร์, LP คือ เหลืองไพโรจน์, NS คือ นางน้อยศรีษะเกษ

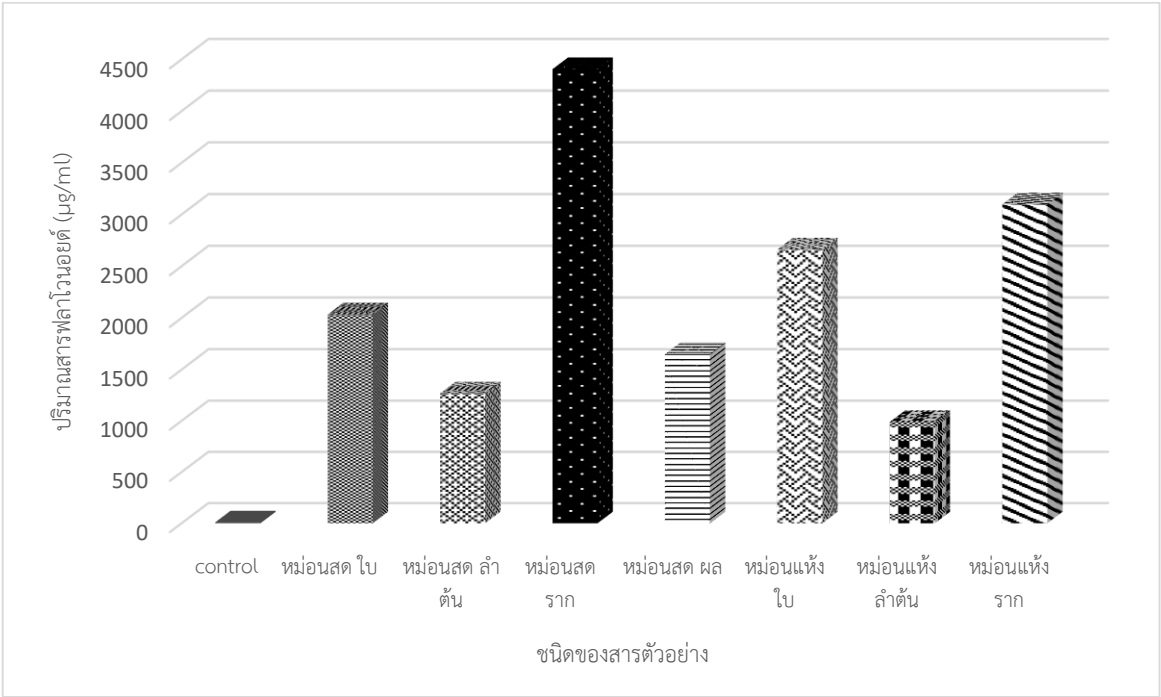
ผลการทดสอบหาปริมาณสารฟลาโวนอยด์ของตัวอย่างกาวไหมและใหมนครราชสีมา 60 และสกลนครทั้งสดและแห้งคำนวณได้จากสมการ $y = 0.0019x - 0.0044$ $R^2 = 0.9941$ เทียบกับปริมาณกรดแกลลิกพบว่ากาวไหมมีปริมาณฟลาโวนอยด์อยู่ระหว่าง 61.263 – 111.088 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยกาวไหมนางเหลืองไพโรจน์ มีปริมาณฟลาโวนอยด์มากที่สุดคือ 111.088 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร หม่อนพันธุ์

นครราชสีมา 60 มีปริมาณฟลาโวนอยด์อยู่ระหว่าง 989.684 – 4405.474 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยราก หม่อนสดมีปริมาณฟลาโวนอยด์มากที่สุดคือ 4405.474 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร หม่อนพันธุ์สกลนครมี ปริมาณฟลาโวนอยด์อยู่ระหว่าง 1277.053 – 2944.421 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยใบหม่อนแห้งมี ปริมาณฟลาโวนอยด์มากที่สุดคือ 2944.421 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อคิดปริมาณฟลาโวนอยด์ต่อ 1 กรัม ของสารตัวอย่าง พบว่ากาวไหมเหลืองไพโรจน์มีปริมาณฟลาโวนอยด์มากที่สุดคือ 3166.00 ไมโครกรัม ตัวอย่างใบหม่อนแห้งและใบหม่อนสด พันธุ์นครราชสีมา 60 มีปริมาณฟลาโวนอยด์มากที่สุดคือ 43910.84 และ 18305.05 ไมโครกรัม ตามลำดับ และตัวอย่างใบหม่อนแห้งและใบหม่อนสด พันธุ์สกลนครมีปริมาณ ฟลาโวนอยด์มากที่สุดคือ 51527.37 และ 19182.65 ไมโครกรัม ตามลำดับ

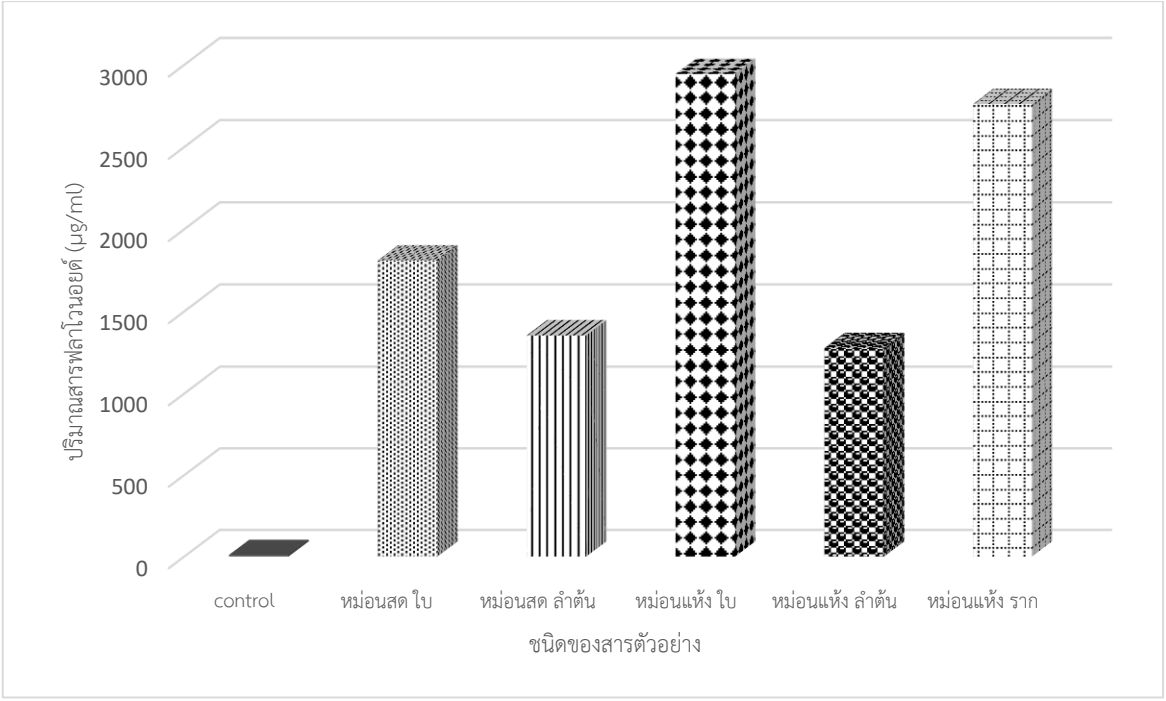


ภาพที่ 4-2.1 ปริมาณสารฟลาโวนอยด์รวมในสารตัวอย่างกาวไหมชนิดต่างๆ

** หมายเหตุ E คือ อีรี่, LS คือ เหลืองสุรินทร์, LP คือ เหลืองไพโรจน์, NS คือ นางน้อยศรีษะเกษ



ภาพที่ 4-2.2 ปริมาณสารฟลาโวนอยด์รวมในหม่อนพันธุ์นครราชสีมา 60 (สด/แห้ง)



ภาพที่ 4-2.3 ปริมาณสารฟลาโวนอยด์รวมในหม่อนพันธุ์สกลนคร (สด/แห้ง)

การวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกด้วยวิธี Folin-Ciocalteu method

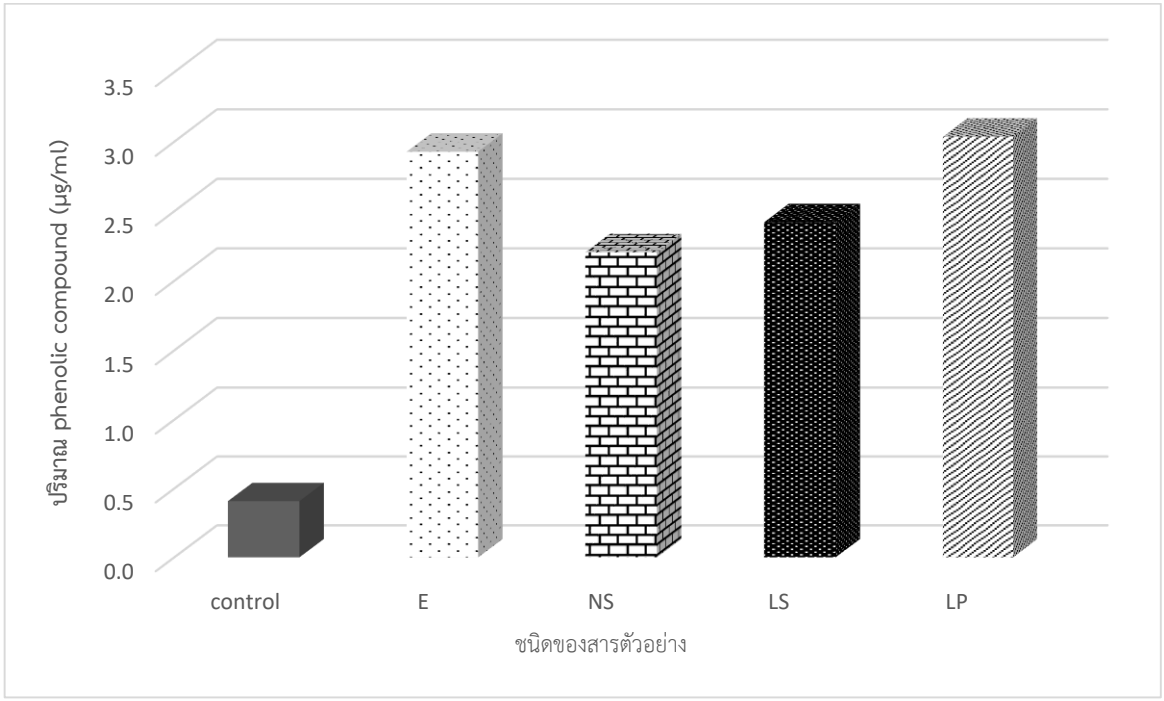
ตารางที่ 4-3 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกในสารตัวอย่างกาวไหมและหม่อน (สด/แห้ง) ชนิดต่างๆ

สารตัวอย่าง			ปริมาณกรดแกลลิก (µg/ml)	ปริมาณฟีนอลิก (µg/ 1 g สารตัวอย่าง)
กาวไหม		E	2.928±0.007	80.520
		NS	2.206±0.003	62.871
		LS	2.421±0.004	68.999
		LP	3.035±0.006	88.051
หม่อนพันธุ์ นครราชสีมา 60	สด	ใบ	160.492±0.071	1444.424
		ต้น	254.501±0.081	890.753
		ราก	419.939±0.166	937.863
		ผล	428.310±0.238	328.371
	แห้ง	ใบ	183.072±0.013	3020.691
		ต้น	277.773±0.003	2083.295
		ราก	444.977±0.113	3559.816
หม่อนพันธุ์สกลนคร	สด	ใบ	255.806±0.001	2711.548
		ต้น	272.704±0.056	681.759
	แห้ง	ใบ	204.270±0.051	3574.731
		ต้น	255.960±0.058	2047.680
		ราก	407.573±0.137	3260.584

** หมายเหตุ E คือ อีรี่, LS คือ เหลืองสุรินทร์, LP คือ เหลืองไพโรจน์, NS คือ นางน้อยศรีษะเกษ

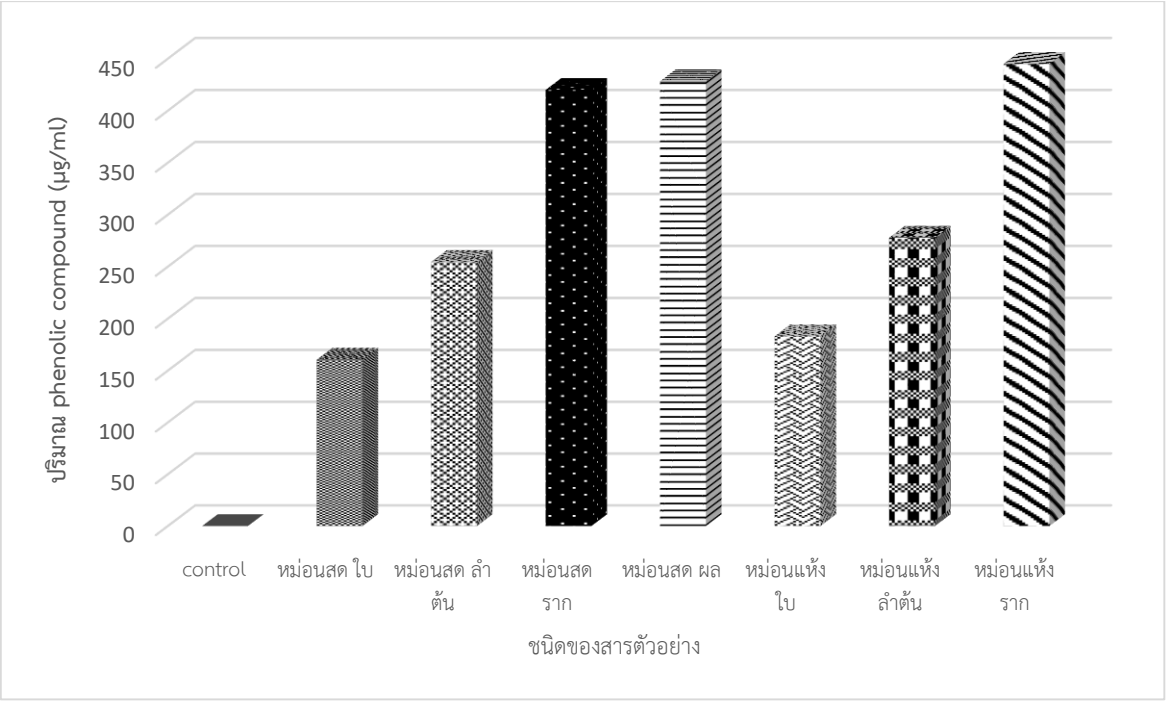
ผลจากการทดสอบหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกของตัวอย่างกาวไหมและหม่อนพันธุ์นครราชสีมา 60 และสกลนคร ทั้งสดและแห้ง คำนวณได้จาก $y = 0.0217x + 0.0028$ มีค่า $R^2 = 0.999$ แสดงดังตารางที่ 3 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมเทียบกับปริมาณกรดแกลลิก พบว่ากาวไหมมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิก อยู่ระหว่าง 2.206 - 3.035 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในกาวไหมเหลืองไพโรจน์มี

ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกมากที่สุดคือ 3.035 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร หม่อนพันธุ์นครราชสีมา 60 มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกอยู่ระหว่าง 160.492 – 444.977 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร รากแห้ง ผลสด และรากสดหม่อนนครราชสีมา 60 มีปริมาณฟีนอลิกมากที่สุดคือ 444.977, 428.310 และ 4119.939 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ หม่อนสกลนครมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกอยู่ระหว่าง 204.270 – 407.573 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร รากหม่อนแห้งและต้นหม่อนสดสกลนครมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกมากที่สุดคือ 407.573 และ 272.704 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ โดยหม่อนพันธุ์นครราชสีมา 60 มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกมากกว่าหมอนสกลนคร

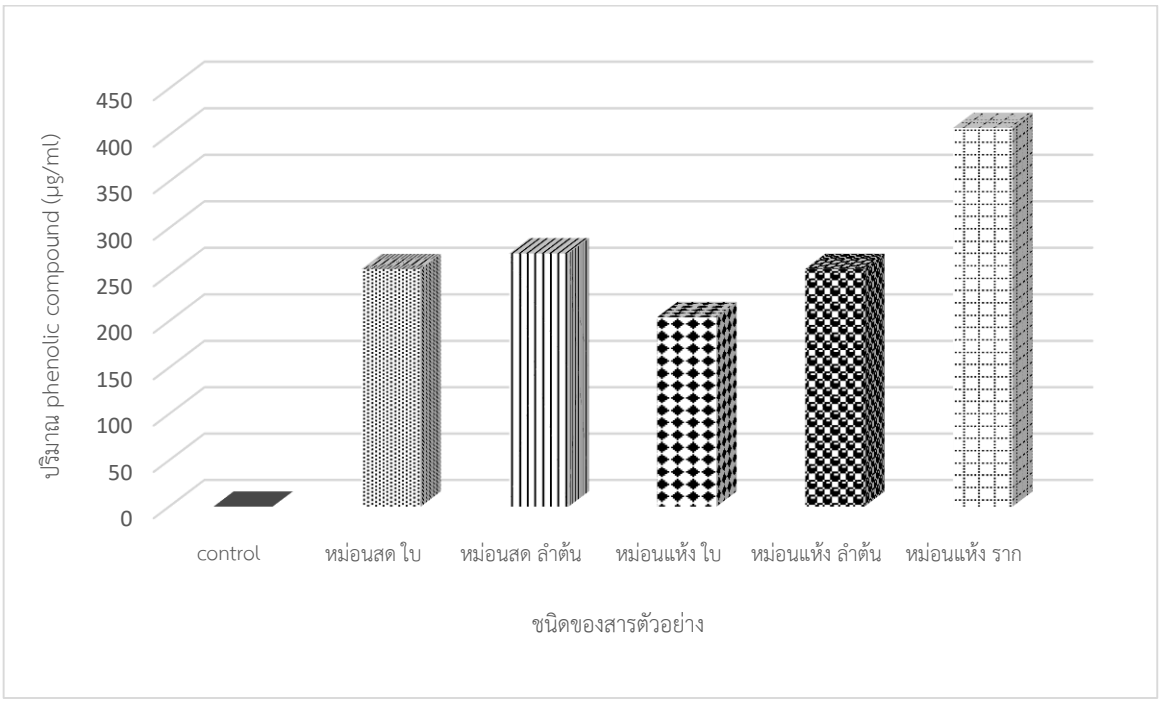


ภาพที่ 4-3.1 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกในสารตัวอย่างกาวไหมชนิดต่างๆ

** หมายเหตุ E คือ อีรี่, LS คือ เหลืองสุรินทร์, LP คือ เหลืองไพโรจน์, NS คือ นางน้อยศรีษะเกษ



ภาพที่ 4-3.2 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกในหม่อนพันธุ์นครราชสีมา 60 (สด/แห้ง)



ภาพที่ 4-3.3 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกในหม่อนสกลนคร (สด/แห้ง)

การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

ตารางที่ 4-4 ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH radical scavenging assay , reducing power , ABTS decolorization scavenging effect

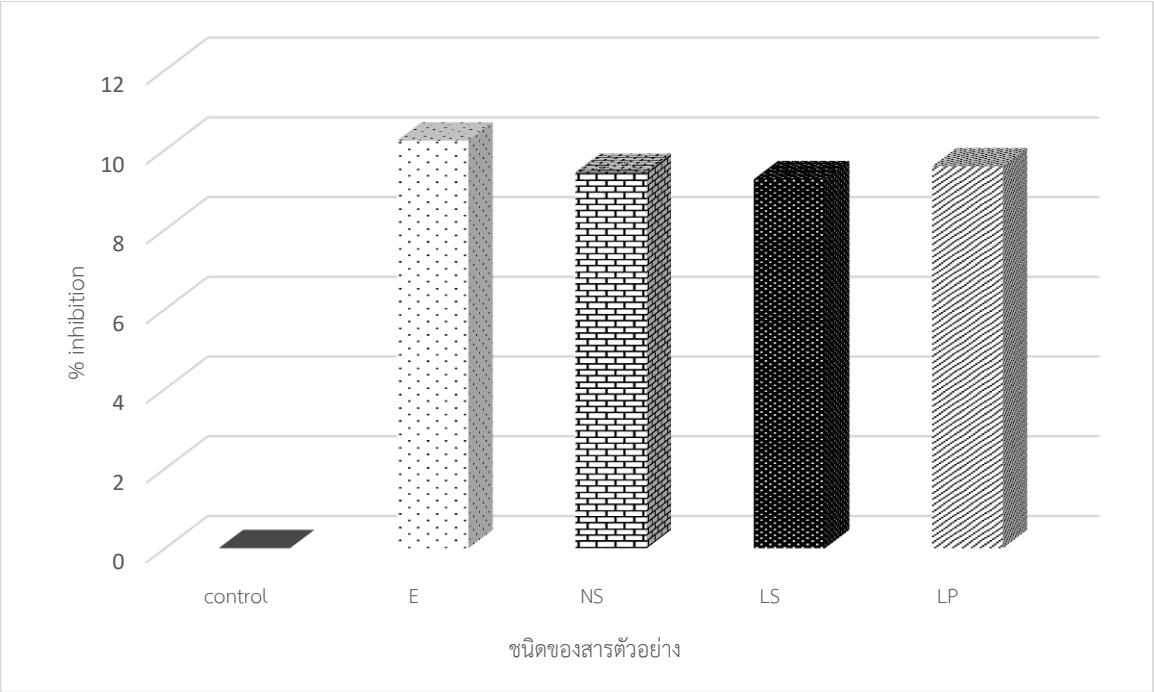
สารตัวอย่าง			ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ				
			DPPH		Reducing power	ABTS	
			% inhibition	ปริมาณวิตามินซี (µg/ml)	ความสามารถในการรีดิวซ์ (กรดแกลลิก) (µg/ml)	% inhibition	ปริมาณวิตามินซี (µg/ml)
กาวไหม		E	10.226±0.013	1.619	2.861±0.002	1.551±0.002	0.658
		NS	9.437±0.002	1.488	3.338±0.001	2.947±0.005	1.112
		LS	9.257±0.003	1.458	3.248±0.001	2.585±0.004	0.994
		LP	9.580±0.007	1.512	3.457±0.001	2.637±0.003	1.011
หม่อนพันธุ์นครราชสีมา 60	สด	ใบ	38.967±0.004	32.003	70.187±0.015	94.984±0.002	0.165
		ต้น	57.086±0.017	47.075	57.687±0.002	97.725±0.002	0.159
		ราก	92.752±0.001	76.742	490.518±0.011	96.225±0.001	0.162
		ผล	59.921±0.020	49.433	1403.482±0.008	90.279±0.001	0.175
	แห้ง	ใบ	31.288±0.005	25.616	126.020±0.018	91.779±0.002	0.172
		ต้น	56.225±0.023	46.359	76.556±0.025	97.725±0.002	0.159
		ราก	93.721±0.005	77.548	351.232±0.019	95.140±0.005	0.165
หม่อนพันธุ์สกลนคร	สด	ใบ	55.723±0.003	45.941	121.675±0.003	97.311±0.001	31.760
		ต้น	53.463±0.009	44.060	65.604±0.003	97.880±0.001	31.945
	แห้ง	ใบ	45.389±0.020	37.345	114.711±0.005	94.881±0.000	30.971
		ต้น	57.804±0.011	47.672	83.996±0.011	97.570±0.002	31.844
		ราก	92.860±0.004	76.831	292.304±0.011	90.848±0.004	29.661

** หมายเหตุ E คือ อีรี่, LS คือ เหลืองสุรินทร์, LP คือ เหลืองไพโรจน์, NS คือ นางน้อยศรีษะเกษ

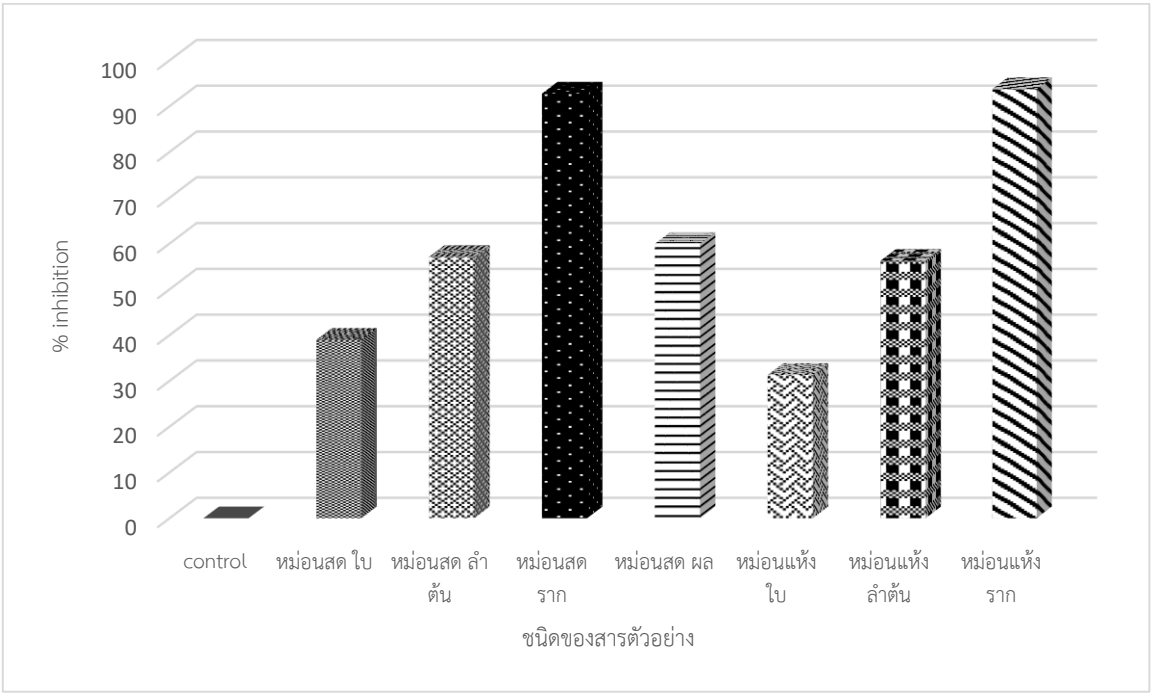
ผลการศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของกาวไหมและหม่อนพันธุ์นครราชสีมา 60 และพันธุ์สกลนครทั้งชนิดสดและแห้ง ด้วยการหาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH แสดงข้อมูลดังตารางที่ 2 พบว่ากาวไหมมีค่าความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระอยู่ระหว่าง 9.257 - 10.226 โดยกาวไหมอีรี่มีค่าความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระมากที่สุดคือ 10.226 หม่อนพันธุ์นครราชสีมา 60 มีค่าความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระอยู่ระหว่าง 31.288 ถึง 93.721 โดยรากของหม่อนนครราชสีมา 60 ทั้งแห้งและสด มีค่าความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระมากที่สุดคือ 93.721 และ 92.752 ตามลำดับ และหม่อนพันธุ์สกลนครมีค่าความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระอยู่ระหว่าง 53.463 – 92.860 โดยรากหม่อนแห้งและใบหม่อนสดมีค่าความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระมากที่สุดคือ 92.860 และ 55.723 ตามลำดับ

ผลการศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของกาวไหมและหม่อนพันธุ์นครราชสีมา 60 และพันธุ์สกลนครทั้งชนิดสดและแห้ง ด้วยการหาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี reducing power คำนวณได้จาก $y = 0.0112x + 0.0262$ มีค่า $R^2 = 0.9939$ แสดงข้อมูลดังตารางที่ 2 เทียบกับกรดแกลลิก พบว่ากาวไหมมีความสามารถในการรีดิวซ์อยู่ระหว่าง 2.861 – 3.457 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยกาวไหมเหลืองไพโรจน์มีความสามารถในการรีดิวซ์มากที่สุดคือ 3.457 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร หม่อนพันธุ์นครราชสีมา 60 มีความสามารถในการรีดิวซ์อยู่ระหว่าง 57.687 – 1403.482 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยผลหม่อนสดและรากหม่อนแห้งมีความสามารถในการรีดิวซ์มากที่สุดคือ 1403.482 และ 351.232 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และหม่อนพันธุ์สกลนครมีความสามารถในการรีดิวซ์อยู่ระหว่าง 65.604 – 292.304 ไมโครกรัม โดยรากหม่อนแห้งและใบหม่อนสดมีความสามารถในการรีดิวซ์มากที่สุดคือ 292.304 และ 121.675 ไมโครกรัม ตามลำดับ

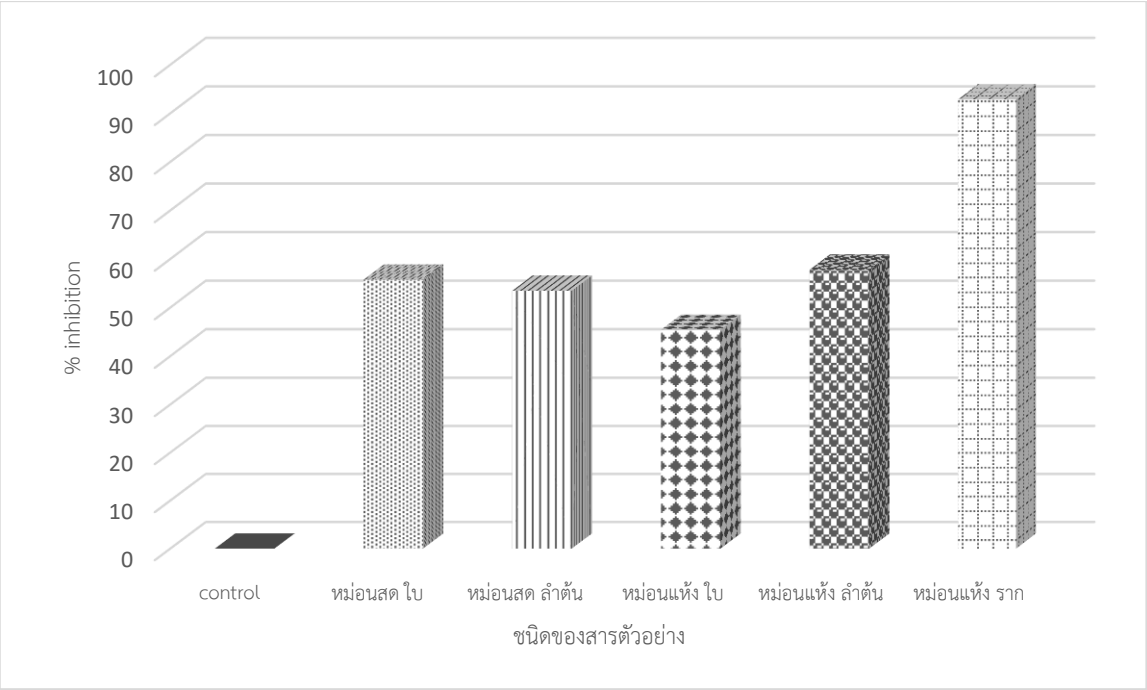
ผลการศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของกาวไหมและหม่อนพันธุ์นครราชสีมา 60 และพันธุ์สกลนครทั้งชนิดสดและแห้ง ด้วยการหาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS แสดงข้อมูลดังตารางที่ 2 พบว่ากาวไหมมีค่าความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระอยู่ระหว่าง 1.551 – 2.947 โดยกาวไหมนางน้อยศรีษะเกษมีค่าความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระมากที่สุดคือ 2.947 หม่อนพันธุ์นครราชสีมา 60 มีค่าความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระอยู่ระหว่าง 90.279 - 97.725 โดยต้นของหม่อนนครราชสีมา 60 ทั้งสดและแห้ง มีค่าความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระมากที่สุดคือ 97.725 และหม่อนพันธุ์สกลนครมีค่าความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระอยู่ระหว่าง 90.848 – 97.880 โดยต้นหม่อนสกลนครทั้งสดและแห้งมีค่าความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระมากที่สุดคือ 97.880 และ 97.570 ตามลำดับ ซึ่งทั้งหม่อนนครราชสีมา 60 และหม่อนสกลนครมีค่าความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระที่สูงไม่แตกต่างกัน



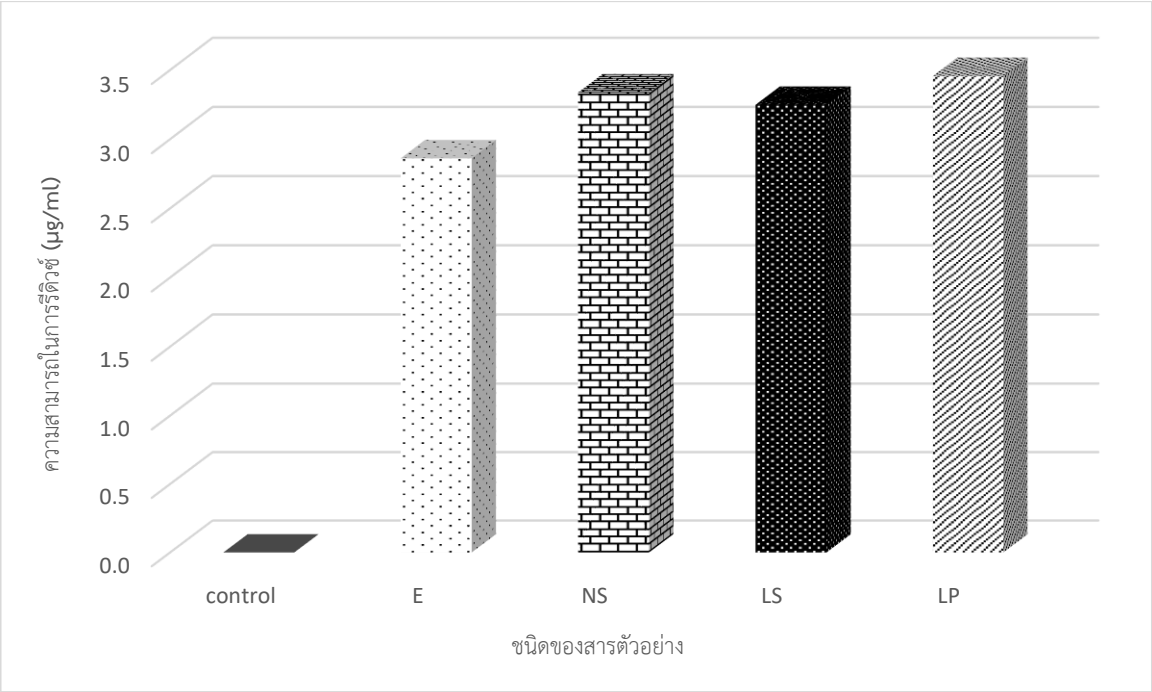
ภาพที่ 4-4.1 % inhibition ของสารตัวอย่างกาวไหม โดยวิธี DPPH radical scavenging assay
** หมายเหตุ E คือ อีรี่, LS คือ เหลืองสุรินทร์, LP คือ เหลืองไพโรจน์, NS คือ นางน้อยศรีษะเกษ



ภาพที่ 4-4.2 % inhibition ของสารตัวอย่างกาวไหมและหม่อนพันธุ์นครราชสีมา 60 (สด/แห้ง) โดยวิธี DPPH radical scavenging assay

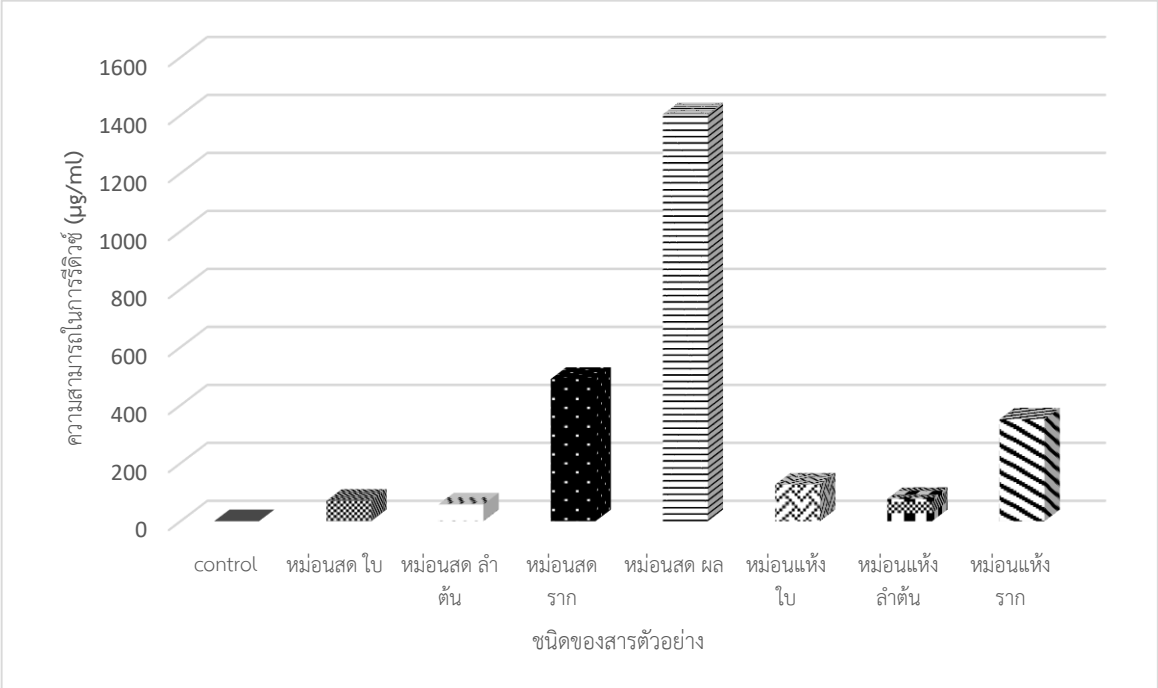


ภาพที่ 4-4.3 % inhibition ของหม่อนพันธุ์สกลนคร (สด/แห้ง) โดยวิธี DPPH radical scavenging assay

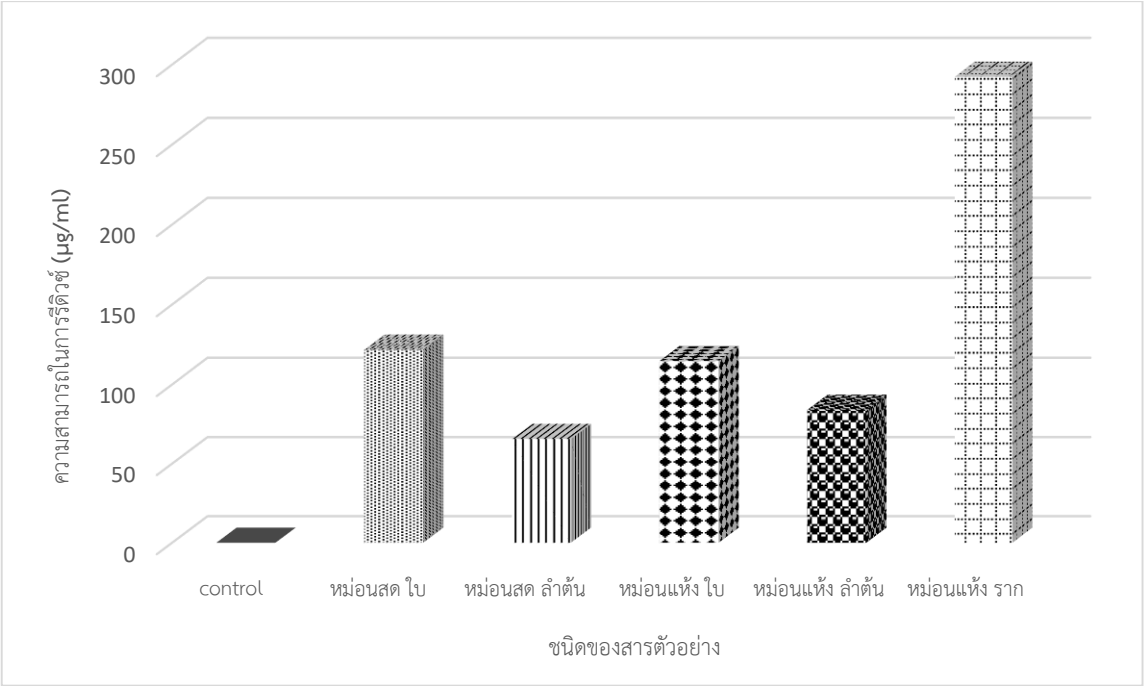


ภาพที่ 4-5.1 ความสามารถในการรีดิวซ์ของสารตัวอย่างกาวไหมชนิดต่างๆโดยวิธี reducing power

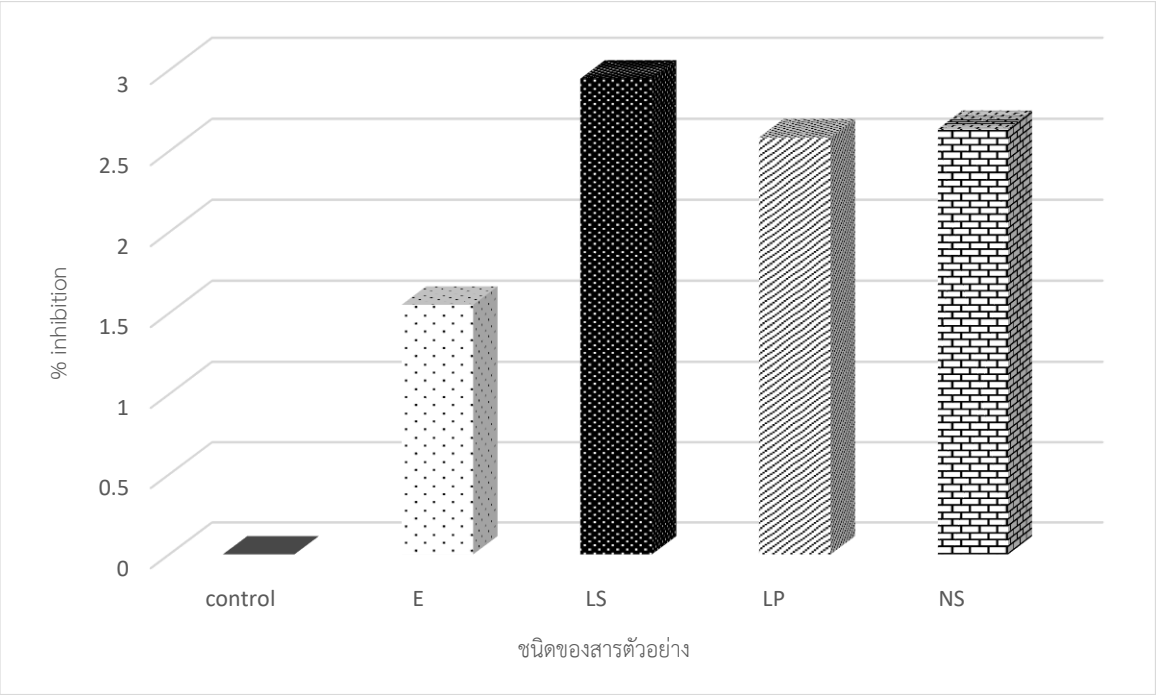
** หมายเหตุ E คือ อีรี่, LS คือ เหลืองสุรินทร์, LP คือ เหลืองไพโรจน์, NS คือ นางน้อยศรีษะเกษ



ภาพที่ 4-5.2 ความสามารถในการรีดิวซ์ของหม่อนพันธุ์นครราชสีมา 60 (สด/แห้ง) โดยวิธี reducing power

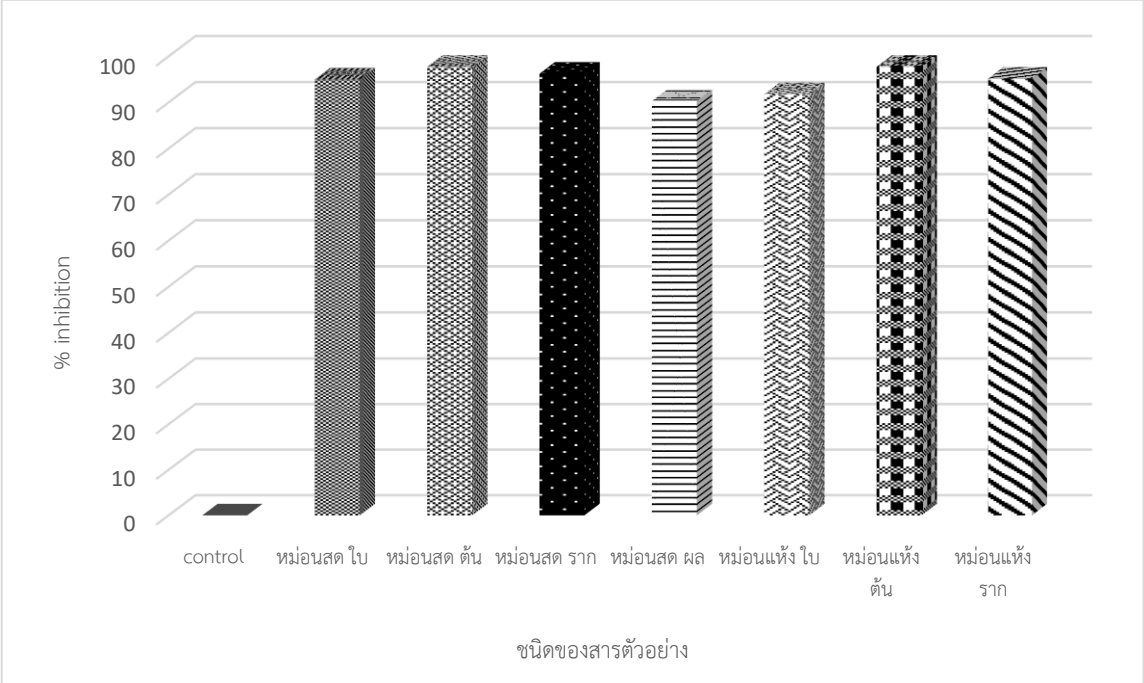


ภาพที่ 4-5.3 ความสามารถในการรีดิวซ์ของหม่อนพันธุ์สกลนคร (สด/แห้ง) โดยวิธี reducing power

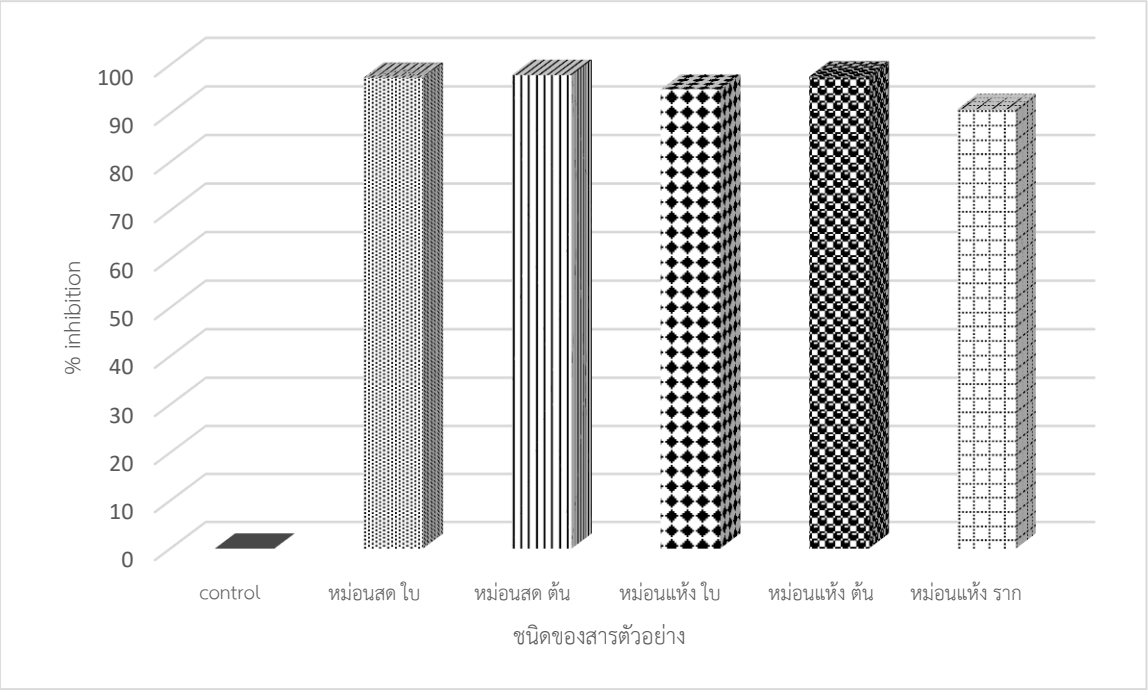


ภาพที่ 4-6.1 % inhibition ของสารตัวอย่างกาวไหมชนิดต่างๆโดยวิธี ABTS decolorization scavenging effect

** หมายเหตุ E คือ อีรี่, LS คือ เหลืองสุรินทร์, LP คือ เหลืองไพโรจน์, NS คือ นางน้อยศรีษะเกษ



ภาพที่ 4-6.2 % inhibition ของหม่อนพันธุ์นครราชสีมา 60 (สด/แห้ง) โดยวิธี ABTS decolorization scavenging effect



ภาพที่ 4-6.3 % inhibition ของหม่อนพันธุ์สกลนคร (สด/แห้ง) โดยวิธี ABTS decolorization scavenging effect

การวิเคราะห์ฤทธิ์ยับยั้งของเอนไซม์ไทโรซิเนสด้วยวิธี Modified Dopachrome

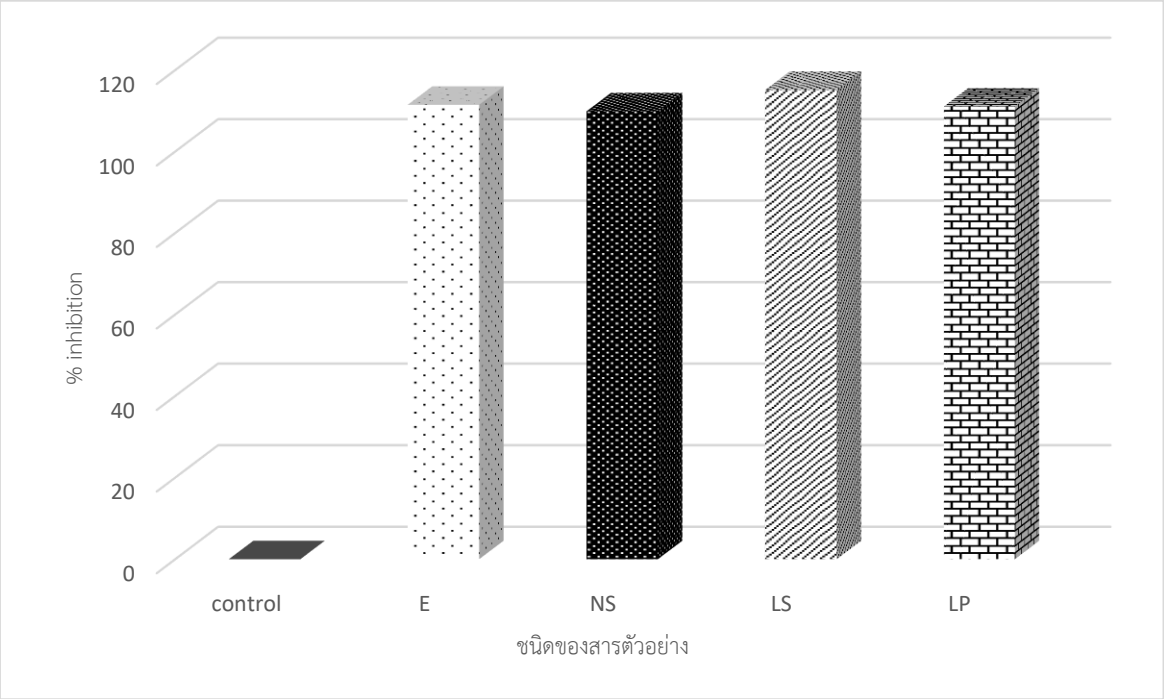
ตารางที่ 4-5 ฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส (เจือจาง 2 เท่า) สารตัวอย่างกาวไหมและหม่อน (สด/แห้ง) ชนิดต่างๆ

สารตัวอย่าง			% inhibition	ปริมาณวิตามินซี (µg/ml)	ปริมาณในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส (µg/ 1 g สารตัวอย่าง)
กาวไหม		E	111.450±0.003	352.258	9687.083
		NS	109.857±0.003	347.184	9894.751
		LS	115.109±0.013	363.910	10371.446
		LP	111.077±0.005	351.069	10180.987
หม่อนพันธุ์ นครราชสีมา 60	สด	ใบ	111.276±0.119	378.417	3405.753
		ต้น	182.738±0.080	579.289	2027.512
		ราก	202.526±0.066	642.310	1434.491
		ผล	84.468±0.086	266.328	204.185
	แห้ง	ใบ	94.400±0.047	297.957	4916.291
		ต้น	162.526±0.071	514.921	3861.910
		ราก	211.786±0.046	671.798	5374.386
หม่อนพันธุ์สกลนคร	สด	ใบ	176.291±0.098	558.758	5922.836
		ต้น	177.137±0.091	561.453	1403.633
	แห้ง	ใบ	97.038±0.106	306.360	5361.296
		ต้น	162.725±0.009	515.555	4124.444
		ราก	213.130±0.087	654.517	5236.138

** หมายเหตุ E คือ อีรี่, LS คือ เหลืองสุรินทร์, LP คือ เหลืองไพโรจน์, NS คือ นางน้อยศรีษะเกษ

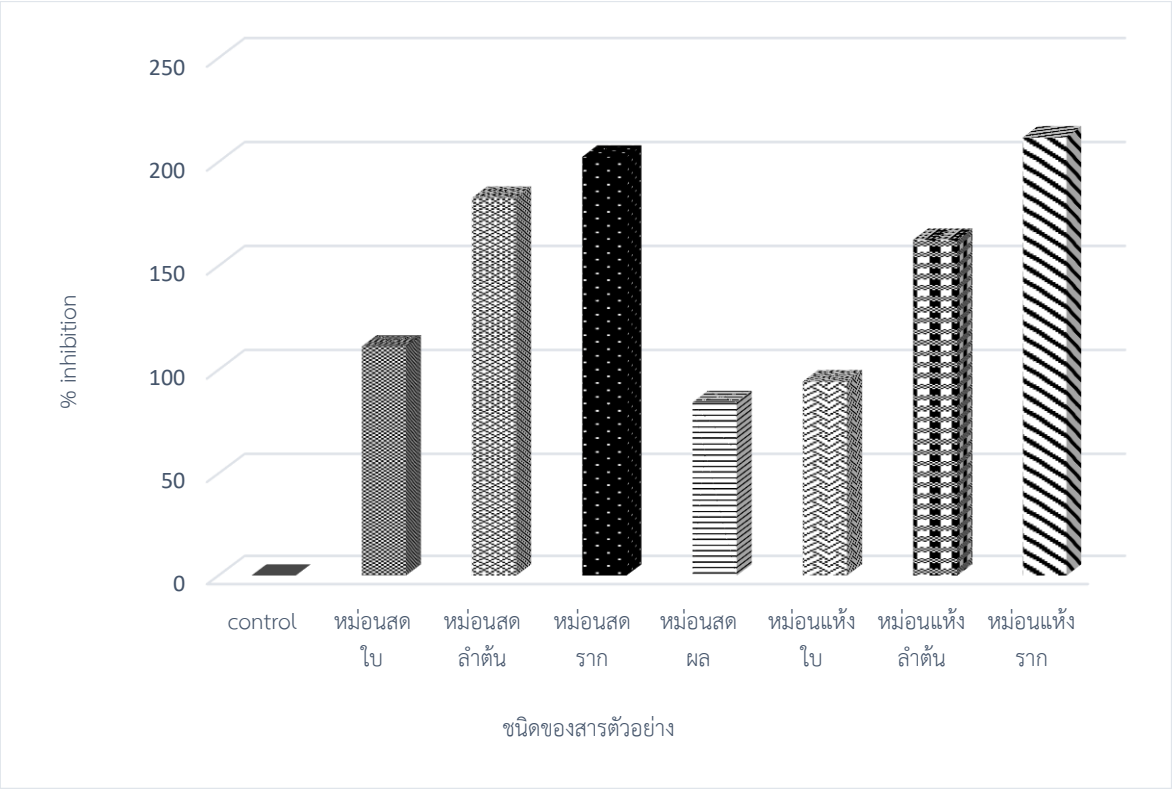
ผลจากการทดสอบความสามารถในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของตัวอย่างกาวไหมและหม่อนพันธุ์นครราชสีมา 60 และหม่อนพันธุ์สกลนคร ทั้งสดและแห้ง คำนวณได้จาก $y = 0.6289x + 0.8418$ มีค่า $R^2 = 0.9855$ แสดงดังตารางที่ 5 เทียบกับปริมาณวิตามินซี พบว่ากาวไหมมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส อยู่ระหว่าง 109.857 – 115.109 โดยกาวไหมเหลืองสุรินทร์มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง

เอนไซม์ไทโรซิเนสสูงที่สุดคือ 115.109 หม่อนพันธุ์นครราชสีมา 60 มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสอยู่ระหว่าง 84.468 - 211.786 โดยรากหม่อนแห้งและรากหม่อนสดมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสสูงสุดคือ 211.786 และ 202.526 ตามลำดับ และหม่อนพันธุ์สกลนครมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสอยู่ระหว่าง 97.038 – 213.185 โดยต้นและใบหม่อนสดมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสไม่แตกต่างกัน ส่วนรากหม่อนแห้งมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสสูงที่สูงที่สุดคือ 213.185 เมื่อคิดเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสต่อ 1 กรัมสารตัวอย่าง พบว่ากาวไหมเหลืองสุรินทร์มีปริมาณในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส มากที่สุดคือ 10371.45 ไมโครกรัม ในตัวอย่างหม่อนพันธุ์นครราชสีมา 60 พบว่ารากหม่อนแห้งและใบหม่อนสด มีปริมาณในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสมากที่สุดคือ 5374.386 และ 3405.753 ไมโครกรัม ตามลำดับ หม่อนพันธุ์สกลนครพบว่า ใบหม่อนสดและใบหม่อนแห้ง มีปริมาณในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสมากที่สุดคือ 5922.836 และ 5361.296 ไมโครกรัม ตามลำดับ

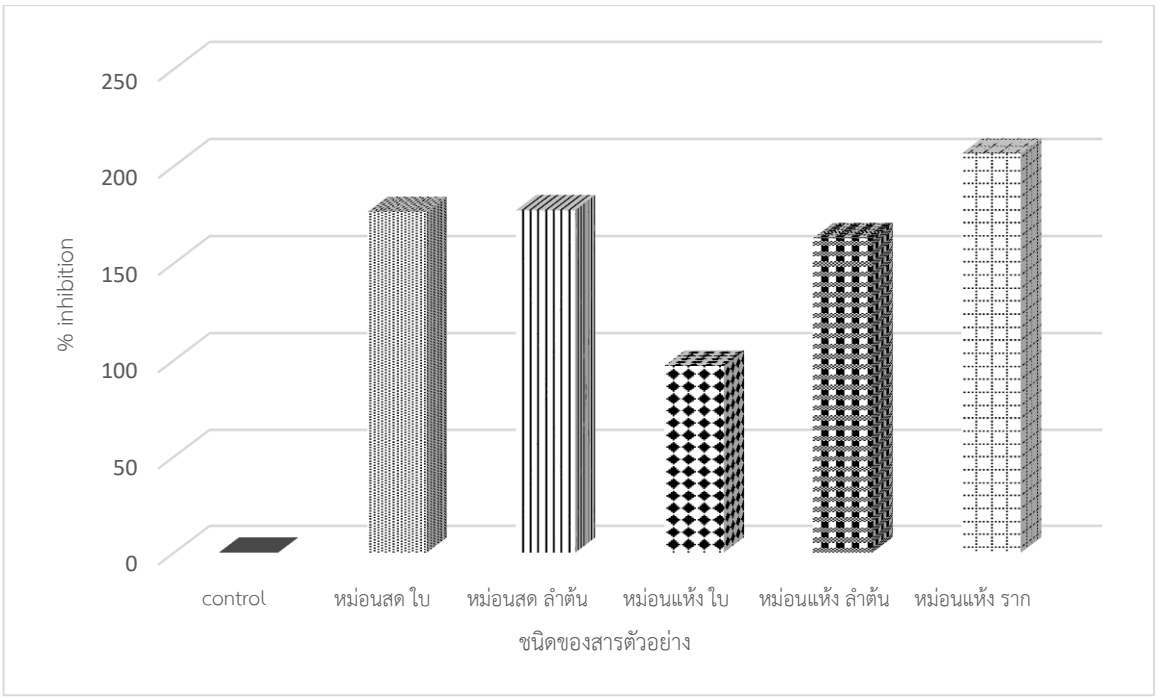


ภาพที่ 4-7.1 การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารตัวอย่างกาวไหม ชนิดต่างๆ

** หมายเหตุ E คือ อีรี่, LS คือ เหลืองสุรินทร์, LP คือ เหลืองไพโรจน์, NS คือ นางน้อยศรีษะเกษ



ภาพที่ 4-7.2 การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสของหม่อนพันธุ์นครราชสีมา 60 (สด/แห้ง)



ภาพที่ 4-7.3 การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสของหม่อนพันธุ์สกลนคร (สด/แห้ง)

บทที่ 5
สรุปและอภิปรายผลการทดลอง

การศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดกาวไหม 4 สายพันธุ์ คือ กาวไหมอีรี่ กาวไหมนางน้อยศรีษะเกษ กาวไหมเหลืองสุรินทร์ กาวไหมเหลืองไพโรจน์ และส่วนใบ ลำต้น และรากของหม่อน พันธุ์นครราชสีมา 60 ทั้งสดและแห้ง ที่ใช้ตัวอย่างสกัดด้วยตัวทำละลาย เอธานอล จากผลการทดลองพบว่า

การทดสอบฤทธิ์ต้านทานอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH ซึ่ง เป็นวิธีการวิเคราะห์ความสามารถในการเป็นสารต้านออกซิเดชัน และเป็นวิธีที่สะดวก รวดเร็ว ง่ายต่อการวิเคราะห์ ให้ความถูกต้องและแม่นยำสูงโดยใช้ 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl เป็นสารทดสอบ พบว่า สารสกัดในการวิจัยครั้งนี้ทุกชนิด สามารถแสดงฤทธิ์ตานอนุมูลอิสระ DPPH โดยสารสกัดกาวไหมชนิดกาวไหมเหลือง สุรินทร์(LS) มีค่า % inhibition (SC_{50}) สูงสุดเท่ากับ 9.257 mg/ml และใบหม่อนสดและแห้ง พันธุ์นครราชสีมา 60 ให้ค่า SC_{50} มากที่สุดคือ 38.967 mg/ml และ 31.288 mg/ml ตามลำดับ

การทดสอบหาปริมาณฟีนอลิกรวมของกาวไหมและหม่อนพันธุ์นครราชสีมา 60 ทั้งสดและแห้ง ซึ่งกาวไหมนางน้อยศรีษะเกษให้ปริมาณสารฟีนอลิกสูงสุดคือ 1.378 µg/ml และส่วนของรากทั้งสดและแห้งของหม่อนพันธุ์นครราชสีมา 60 ให้ปริมาณสารฟีนอลิกสูงสุดที่เท่ากันคือ 459.954 µg/ml เมื่อเปรียบเทียบกับสารมาตรฐานกรดแกลลิก และผลการทดสอบหาปริมาณสารฟลาโวนอยด์รวม พบว่า ในรากของหม่อนจะให้ปริมาณของสารที่มากที่สุด ซึ่งรากของหม่อนสดจะให้ปริมาณสารฟลาโวนอยด์มากถึง 4405.474 µg/ml

สารจำพวกฟนอล (phenolic compounds) เปนสารกลุมใหญที่พบมากเป็นองค์ประกอบในพืช ตัวอยางของสารกลุมนี้ไดแกสารจำพวกอนุพันธ์ของฟีนอลต่างๆ รวมไปถึงสารในกลุ่มฟลาโวนอยด์ที่เป็นอนุพันธ์ของ catechol ซึ่งโครงสรางหลักประกอบดวย aromatic ring แทนที่ดวย hydroxyl group โดยมากเปนสารที่มีขั้วละลายในตัวทำละลายจำพวก alcohol ไดดี และสามารถแสดงฤทธิ์ตานอนุมูลอิสระได้ เมื่อมีอนุมูลอิสระมาดึงอิเลกตรอนออกไปจากโมเลกุล แตในโครงสรางมีอิเลกตรอนหนาแนนใน π-orbital จึงสามารถเกิดการเคลื่อนยายอิเลกตรอนไปทั่วโครงสราง (delocalization) ทำใหโครงสรางเสถียรไมเกิดเปนอนุมูลอิสระตอไป

การทดสอบความสามารถในการให้อิเล็กตรอนด้วย FRAP assay ซึ่งเป็นการทดสอบความสามารถในการรีดิวซ์เฟอร์ริกของสารด้านออกซิเดชันพบว่า รากของหม่อนมีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันมากที่สุด โดยรากของหม่อนตัวอย่างสดมีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันมากถึง 490.518 µg/ml ซึ่งสอดคล้องกับผลการวิเคราะห์ปริมาณสารฟีนอลิกรวมและการทดสอบฤทธิ์ต้านทานอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH

จากการศึกษาความสัมพันธระหวางปริมาณสารฟนอลิกรวมกับฤทธิ์ตานอนุมูลอิสระของสารสกัดด้วยเอธานอล พบวามีความสัมพันธกันอยางมีนัยสำคัญโดย ฤทธิ์ตานอนุมูลอิสระ DPPH ของสารสกัดด้วยเอธานอล จะแปรผันตรงกับปริมาณสารฟนอลรวม เชน ในใบหม่อนสดและแห้ง พันธุ์นครราชสีมา 60 เป็นต้น

การศึกษาความสามารถในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส พบว่า กาวไหมเหลืองสุรินทร์ รากของหม่อน พันธุ์นครราชสีมา 60 ทั้งสดและแห้ง ให้ % tyrosinase inhibition สูงสุดคือ 115.109 µg/ml , 202.526 µg/ml และ 211.786 µg/ml ตามลำดับ

เอกสารอ้างอิง

กนกพร พลเยี่ยม, และสินีนาฏ ศิริ. (2556). การสกัดเซอริซินจากรังไหม *Bombyx mori* and *Samia cynthia ricini*. การประชุมหาดใหญ่วิชาการ ครั้งที่ 4, 43-51.

กล่าวขวัญ ศรีสุข, ปรีดาวรรณ สาลี, เยาวลักษณ์ เจริญสุข, และเอกรัฐ ศรีสุข. (2553). ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระและยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของส่วนสกัดจากเหง้าของว่านสาวหลง. วารสารพฤกษศาสตร์ไทย 2 (พิเศษ), 143 – 150.

กัลยาภรณ์ จันตรี. (2015). การตั้งตำรับสูตรเครื่องสำอางที่ทำให้ผิวขาวจากสารสกัดมะหาด. วารสารวิจัยมสดสาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 8(1), 5-23.

เกียรติชัย ดวงศรี. (2553). การใช้สารสกัดเซอริซินจากรังไหมเสีย. วิทยานิพนธ์วิศวกรรมศาสตรมหาบัณฑิต. คณะวิศวกรรมศาสตร์. มหาวิทยาลัยราชมงคลธัญบุรี.

จันทิมา ศรีสุข, ปรีดาวรรณ สาลี, เยาวลักษณ์ เจริญสุข และเอกรัฐ ศรีสุข. (2553). ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระและยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของส่วนสกัดจากเหง้าของว่านสาวหลง, วารสารพฤกษศาสตร์ไทย 2 (ฉบับพิเศษ), 143-150.

จินดาพร คงเดช. (2551). การผลิตสารยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส และสารต้านอนุมูลอิสระจากพืชเพื่อใช้ในการผลิตเครื่องสำอาง. วิทยานิพนธ์ วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี.

จันทิมา หอมกลบ, และคณะ. (2554). ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสและปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดเอทิลอะซีเตดจากผลมะขามป้อมจากแหล่งในประเทศไทย. การประชุมวิชาการมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 48, กรุงเทพฯ.

นิธิดา พลโคตร, และคณะ. (2552). การตรวจหาปริมาณฟลาโวนอยด์และปริมาณแคโรทีนในเกสรบัวหลวง. กรุงเทพฯ: สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ.

ปัญญตา ปัญญาทิพย์, และคณะ. (2556). การวิเคราะห์ปริมาณเมลาโทนินและการศึกษาฟทธิ์ทางเภสัชวิทยาของสารสกัดจากใบหม่อน. การประชุมวิชาการและนำเสนอผลงานระดับชาติ ครั้งที่ 5 คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคามม มหาสารคาม.

พรสุข จิตรเวช. (2548). ฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน ฤทธิ์ต้านคอลลาจิเนส และฤทธิ์ต้านไทโรซิเนสของสารสกัดมะขามป้อมที่ปลูกในประเทศไทยสำหรับใช้ในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท สาขาเทคโนโลยีเภสัชกรรม คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพฯ.

พรอนงค์ อร่ามวิทย์. (2553). คุณสมบัติทางกายภาพและชีวภาพของฟิล์มปิดแผลที่ผลิตจากโปรตีนกาวไหม. สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย.

พรอนงค์ อร่ามวิทย์. (2556). โปรตีนกาวไหมกับการประยุกต์ใช้ในทางการแพทย์. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ระวิวรรณ แก้วอมตวงศ์, และทรงพร จึงมั่นคง. (2549). ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH และปริมาณสารฟีนอลรวมของสารสกัดพืชสมุนไพรไทยบางชนิด. วารสารวิชาการ ม.อบ. ปีที่ 8(2), 76-88.

ศุทธินี ลีลาเหมรัตน์, และศศิธร ตรงจิตภักดี. (2554). องค์ประกอบทางเคมีและคุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระของกากลูกหม่อน. การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 49, 548-555.

สรัลรัตน์ พ่วงบริสุทธิ์, และคณะ. (2553). ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ การยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์ไทโรซิเนส สมบัติทางกายภาพและเคมีบางประการของผงโปรตีนไหมพันธุ์โนนฤาษีที่เตรียมโดยการสกัดวิธีต่างๆ. สถาบันค้นคว้าและพัฒนาผลิตผลทางการเกษตรและอุตสาหกรรมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

เสาวนีย์ กระสานติสุข, และหทัยชนก รุณรงค์. (2549). การพัฒนาตำรับโลชั่นบำรุงผิว. โครงการพิเศษปริญญาเภสัชศาสตรบัณฑิต, คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล.

สุดใจ นันตารัตน์, และจิรพรรณ บุญสูง. (2543). สารห้ามใช้ในผลิตภัณฑ์ทาสิวฝ้าในจังหวัดเชียงใหม่และลำพูน พ.ศ. 2542. วารสารอาหารและยา ปีที่ 7, 35 หน้า.

สุธิรา มณีฉาย, และประสบอร รินทอง. (2559). ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารสกัดเมทานอลจากดอกถั่วแระและดอกส้มป่อย. วารสารวิทยาศาสตร์ มข ปีที่ 44 (1), 142-145.

สุธาสินี ทัพพสารพงศ์. (2553). โครงการการศึกษาคุณสมบัติผงโปรตีนจากรังไหมเพื่อใช้เป็นวัตถุดิบในการเตรียมเครื่องสำอาง. รายงานฉบับสมบูรณ์, กรุงเทพ: สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย.

สุพัตรา บุตราช, และสุธาสินี ทัพพสารพงศ์. (2555). ศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระและการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของไหมเซริซินพันธ์ UBXUB5 โดยเปรียบเทียบกับไหมเซริซินที่มีจำหน่ายทางการค้า. การประชุมวิชาการและนำเสนอผลงานระดับชาติ ครั้งที่ 4“Pharmacy Profession in Harmony” คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น, 206-209.

มานิตา หาญพานิชเจริญ. (2547). สารทำให้ผิวขาว Skin whitening agents. วารสารบริการวิชาการ, 17 หน้า.

เอกสารวิชาการหม่อนไหม**.** (2553). การปลูกหม่อนเลี้ยงไหมม กรมส่งเสริมการเกษตร (online), Available:http://www.ku.ac.th/e-magazine/march45/agri/mai.html.

อุบลทิพย์ นิมมานนิตย์. (2552). การพัฒนาสารสกัดมะขามป้อมเพื่อใช้ในอุตสาหกรรมยา อาหาร และเครื่องสำอาง.การเผยแพร่ผลงานวิจัยด้ายการพัฒนาสมุนไพรสู่ระดับอุตสาหกรรม ครั้งที่ 2, สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ, กรุงเทพมหานคร, 79-91.

Dash, R., Ghosh, S. K. Kaplan, D. L. and Kundu, S. C. (2007). Purification and biochemical characterization of a 70-kDa sericin from tropical tasar silkworm, Antheraea mylitta. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 147, 129-134.

Dash, R., Acharya, C., Bindu, P. C. and Kundu, S. C. (2008). Antioxidant potential of silk protein sericin against hydrogen peroxide-induced oxidative stress in skin fibroblasts.*BMB reports,* 41(3), 236-241.

Dash, R., Mandal, M., Ghosh, S. and Kundu, S. (2008). Silk sericin protein of tropical tasar silkworm inhibits UVB-induced apoptosis in human skin keratinocytes. *Molecular and Cellular Biochemistry,* 311(1), 111-119.

Deori, M., Boruah, D.C., Devi, D. and Dev, R. (2013). Antioxidant and antigenotoxic effects of pupae of the muga silkworm *Antheraea assamensis*. *Journal of Food Bioscience*, *5*, 108-114.

Gregory, H., Altman, D., Caroline, J., Tara C., Rebecca, Horan, L., Jingsong, C., Helen L., John R. and David L.K. (2003). Silk-based biomaterials. *BiomaTERIALS*, 24, 401-416.

Jassim, K. N. and Asaree, O. J. (2010). Study of the antimicrobial activity of silk sericin from silkworm *Bombyx mori. Journal of Medical Sciences*, *23*(2), 130-133.

Jin-Hong, W., Zhang, W. and Shi-Ying, X. (2007). Preparation and characterization of sericin powder extracted from silk industry wastewater. *Food Chemistry*, 103(4), 1255-1262.

Khalid, N. J. and Omar, J. A. (2010). Study of the antimicrobial activity of silk sericin from silkworm *Bombyx mori*. Iraqi J. *Comm. Med,* 23 (2), 130-133.

Khwunakaphan, M. (2012). Inhibition of the enzyme tyrosinase of the extract from licorice vine Thailand. Individual Study, Master of Science, School of cosmetic Science. Mae Fah Luang University. Chang Rai.

Kim, Y.J. and Uyma, H. (2005). Tyrosinase inhibitors from natural and synthetic sources: structure, inhibition mechanism and perspective for the future. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 62, 1707-1723.

Kurioka, A., Kurioka, F. and Yamazaki, M. (2004). Characterization of sericin powder prepared from citric acid degraded sericin polypeptides of the silkworm Bombyx mori. *Bioscience Biotechnology Biochem*istry, 68, 774-780.

Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-685.

Manosroi, A., Boonpisuttnant, S., Winitchai, P. and Manosroi, J. (2007). Free radical scavenging activity of oil and sericin extracted from from Thai native variety Samrong (*Bombyx mori* Linn.), entrapped in noisome for cosmeceutical uses. The 33rd congress on science and technology of Thailand STT 33, Walailak University, Nakhon Si Thammarat.

Modasiya, R. P. M. K. (2011). Sericin: pharmaceutical applications. *International Journal of Research in Pharmaceutical and Biomedical Sciences*, 2(3), 913-917.

Paeratanakul, O. (2011). Skin whitening agents. The journal of the royal institute of Thailand 36(3), Jul-Sep, 1-23.

Pornanong, A. Nipaporn, B. and Teerapol, S. (2010). The properties and stability of anthocyanins in mulberry fruits. Food research international, 43, 1093-1097.

Sezai, E. and Emine, O. (2007). Chemical composition of white (*Morus alba*), red (*Morus rubra*) and black (*Morus nigra*) mulberry fruits. Food Chemistry, 103, 1380-1384.

Sung, N. Y., et al. (2011). Preparation and characterization of high-molecular-weight sericin by y irradiation. *Journal of Applied Polymer Science*, 120, 2034-2040.

Takechi, T., Wada, R., Fukuda, T., Harada, K. and Takamura, H. (2014). Antioxidant activites

of two sericin proteins extracted from cocoon of silkworm (*Bombyx mori*) measured by DPPH, chemiluminescence, ORAC and ESR methods. *Biomedical reports*. 2, 364-369.

Takuya, K. et al. (2006). Antioxidant flavonol glycosides in mulberry (*Morus alba* L.) leaves isolated based on LDL antioxidant activity. *Food Chemistry*. 97, 25-31.

Terada, S., Sasaki, M., Yanagihara, K. and Yamada, H. (2005). Preparation of silk protein sericin as mitogenic factor for better mammalian cell culture. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 100 (6), 667-671.

Yamada, A., Masutani, C., Iwai, S. and Hanaoka, F. (2000). Complementation of defective translation synthesis and UV light sensitivity in xeroderma pigmentosum variant cells by human and mouse DNA polymerase eta. *Nucleic Acids Research*, 28 (13), 2473-80.

Zhang, Y. Q., (2002). Applications of natural silk protein sericin. *Biomaterials Biotechnology Advance* 20: 91-100.

Zhang, Y. Q., Tao, M. L., Shen, W. D., Zhou, Y. Z., Ding, Y., Ma, Y. and Zhou, W. L. (2004). Immobilization of L-asparaginase on the microparticles of the natural silk sericin protein and its characters. *Biomaterials,* 25(17), 3751-3759.

Zhaorigetu, S., Yanaka, N., Sasak, i. M., Watanabe, H. and Kato, N. (2003). Inhibitory effects of silk protein, sericin on UVB-induced acute damage and tumor promotion by reducing oxidative stress in the skin of hairless mouse. *Journal of Photochemistry Photobiology B Biology,* 71, 11-17.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

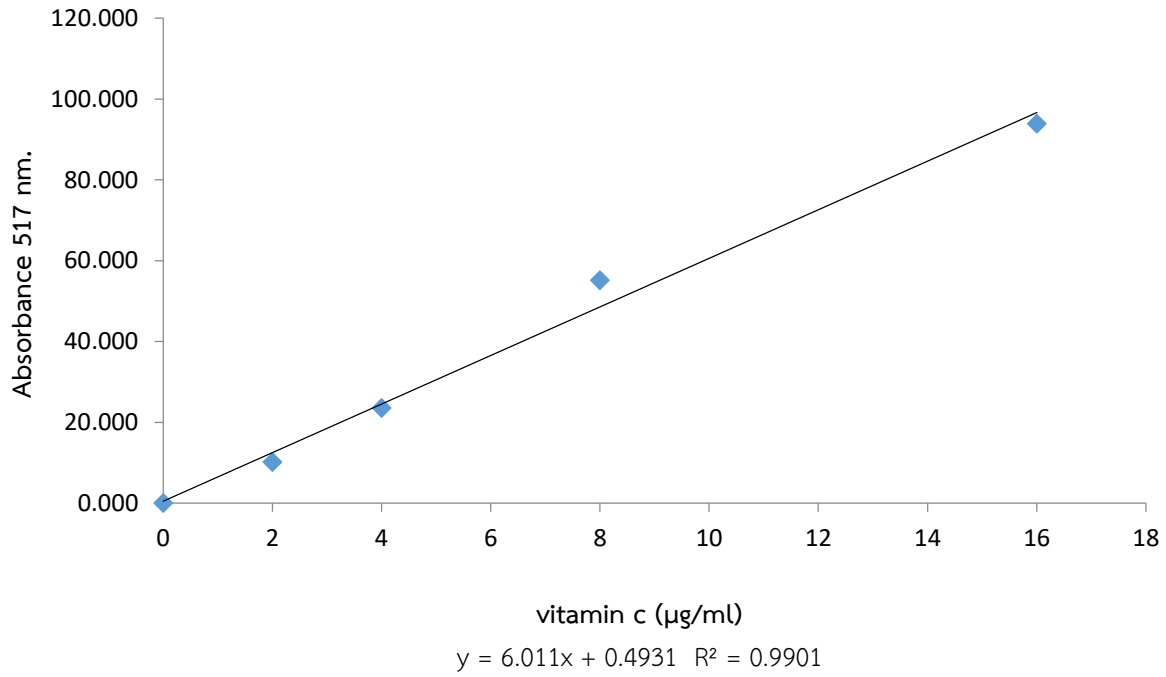
ตารางมาตรฐานของสารมาตรฐานที่ใช้เปรียบเทียบในปริมาณต่างๆ

การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH radical scavenging assay

คำนวณปริมาณของฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH radical scavenging assay ที่ความเข้มข้น 0 2 4 8 16 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร การเตรียมกราฟมาตรฐานวิตามินซี (Vitamin C , vit C) โดยชั่งสาร วิตามินซี 1 mg ผสมกับน้ำกลั่น 1 ml เก็บเป็น Stock ใส่สารละลายวิตามินซีที่ความเข้มข้น 0 2 4 8 16 ไมโครลิตร และเติมน้ำกลั่นให้มีปริมาตรครบ 0.5 มิลลิลิตรในหลอดทดลอง และเติมสารละลาย DPPH ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร บ่มในที่มืดเป็นเวลา 20 นาที และนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร โดยใช้เมทานอลเป็น blank และนำค่าที่ได้ไปวิเคราะห์จะได้กราฟมาตรฐานวิตามินซี

ตารางที่ 1 การสร้างกราฟมาตรฐานการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยใช้วิตามินซี (vitamin C)

Vitamin C (1 mg/mL) (µL)	Methanol (µL)	DPPH (µL)	OD 517	ความเข้มข้นสุดท้าย (µg/mL)
0	500	1500	0.887	0.000
2	498	1500	0.797	10.180
4	496	1500	0.679	23.516
8	492	1500	0.398	55.184
16	484	1500	0.054	93.914



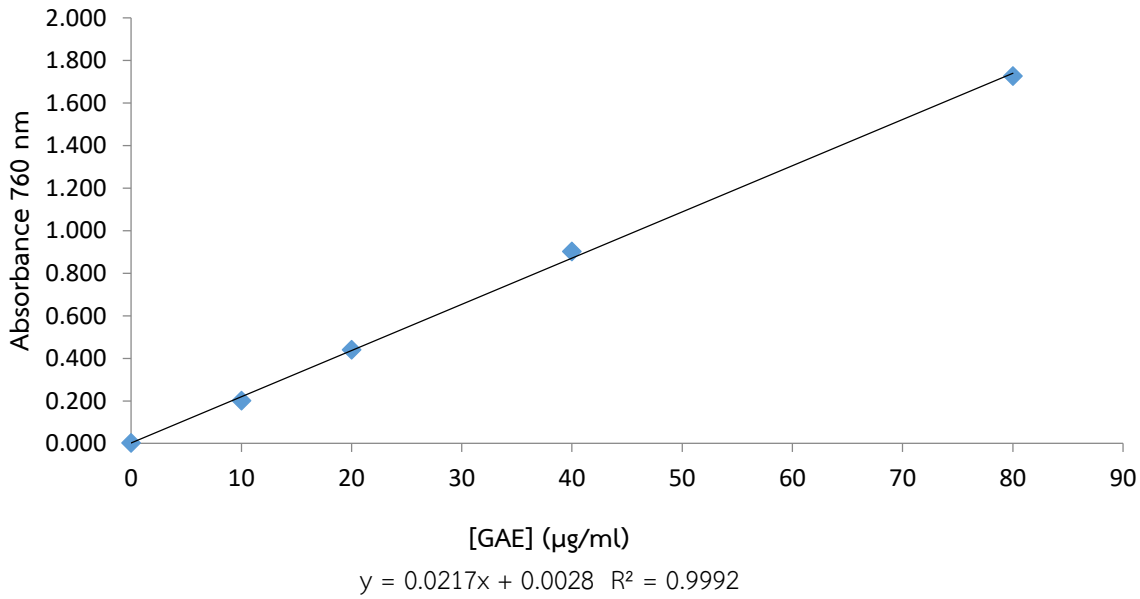
ภาพที่ 1 กราฟมาตรฐานของ vitamin c โดยวิธี DHHP scavenging assay

การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดด้วยวิธี Folin-Ciocalteu Colorimatric assay

คำนวณปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดด้วยวิธี Folin-Ciocalteu Colorimatric assay ที่ความเข้มข้น 0 10 20 40 80 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร การเตรียมกราฟมาตรฐานกรดแกลลิค (Gallic acid,mGAE) โดยชั่งสารกรดแกลลิค 1 mg ผสมกับน้ำกลั่น 1 ml เก็บเป็น Stock ใส่สารมาตรฐานกรดแกลลิค ความเข้มข้นตั้งแต่ 0 10 20 40 80 ไมโครลิตรและเติมน้ำกลั่นให้มีจนมีปริมาตร 0.5 มิลลิลิตรในหลอดทดลอง เติมสารละลาย Folin-Ciocalteu phenol reagent เข้มข้นร้อยละ 10 โดยปริมาตร ลงไป 2.5 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน5 นาที จากนั้นเติมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3) เข้มข้นร้อยละ 7.5 โดยมวลต่อปริมาตร ลงไป 2 มิลลิลิตร บ่มในที่มืดเป็นเวลา 30 นาทีนำมาวัดที่ค่าการดูดกลืนแสงที่ 760 นาโนเมตร โดยใช้น้ำกลั่น เป็น blank นำค่าที่ได้ไปวิเคราะห์จะได้กราฟมาตรฐานกรดแกลลิค

ตารางที่ 2 การสร้างกราฟมาตรฐานการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดโดยใช้ กรดแกลลิค (Gallic acid,GAE)

GAE (1mg/mL) (µL)	dH_2O (µL)	Folin Ciocalteu's phenol (µL)	7.5Na_2CO_3 (µL)	OD 760
0	500	2500	2000	0.002
10	490	2500	2000	0.201
20	480	2500	2000	0.440
40	460	2500	2000	0.902
80	420	2500	2000	1.727



ภาพที่ 2 กราฟมาตรฐานของ gallic acid โดยวิธี Folin-Ciocalteu Colorimatric assay

การวิเคราะห์ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสด้วยวิธี Dopachrome method

คำนวณปริมาณของฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสด้วยวิธี Dopachrome methodที่ความเข้มข้น 0 10 20 40 80 160 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร การเตรียมกราฟมาตรฐาน vitamin C โดยชั่งสาร vitamin C 1 mg ผสมกับน้ำกลั่น 1 ml เก็บเป็น Stock ใส่สารละลายที่ความเข้มข้น vitamin C 0 10 20 40 80 160 ไมโครลิตรและเติมน้ำกลั่นให้มี ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตรเติมสารละลายโพแทสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ pH 6.8 ผสมให้เข้ากันและผสมเอนไซม์ไทโรซิเนส ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร และบ่มในที่มืดเป็นเวลา 10 นาที หลังจากนั้นเติมสารละลาย L-dopa 0.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันและบ่นในที่มืดเป็นเวลา 10 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 475 นาโนเมตร โดยใช้น้ำกลั่นเป็น blank นำค่าที่ได้มานำไปวิเคราะห์จะได้กราฟมาตรฐานวิตามิน ซี คำนวณเป็น % Inhibition ดังสมการ (Momtaz et al., 2008)

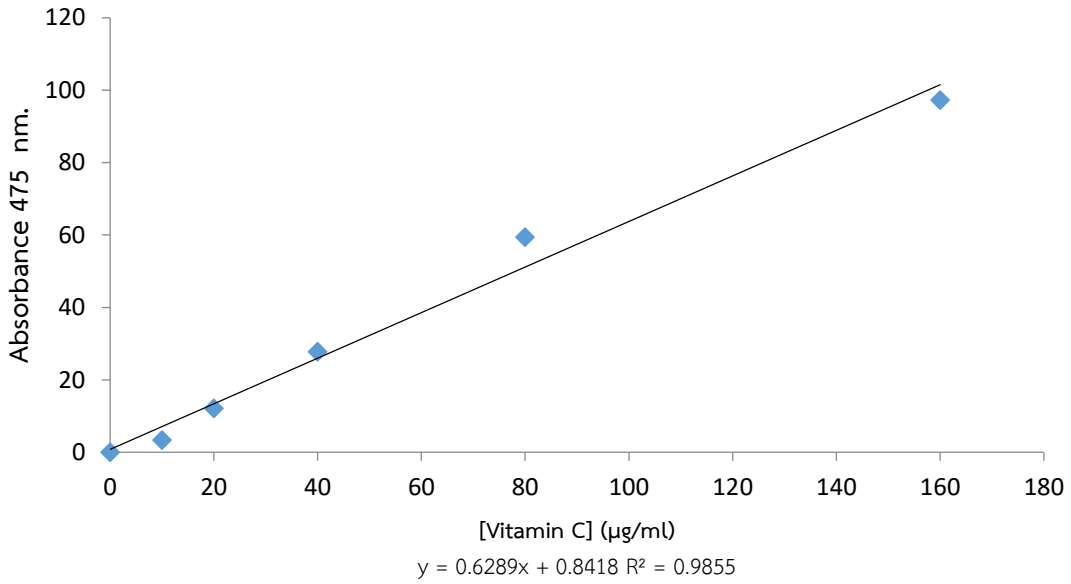
$$\%\ \text{Inhibition} = \frac{(\text{Absorbancecontrol} - \text{Absorbancesample}) \times 100}{\text{Absorbancecontrol}}$$

Absorbance ของ control คือ หลอดที่ไม่ได้ใส่สารทดสอบ

Absorbance ของ sample คือ หลอดที่ใส่สารทดสอบ

ตารางที่ 3 การสร้างกราฟมาตรฐานการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยใช้วิตามินซี (vitamin C)

Vitamin C (1mg/mL) (µL)	dH_2O (µL)	Buffer pH6.8 (µL)	Tyrosinase (µL)	L-dopa (µL)	OD 475	ความเข้มข้นสุดท้าย (µg/mL)
0	200	300	500	500	0.539	0
10	190	300	500	500	0.521	3.397
20	180	300	500	500	0.474	12.168
40	160	300	500	500	0.390	27.733
80	120	300	500	500	0.219	59.419
160	40	300	500	500	0.014	97.282



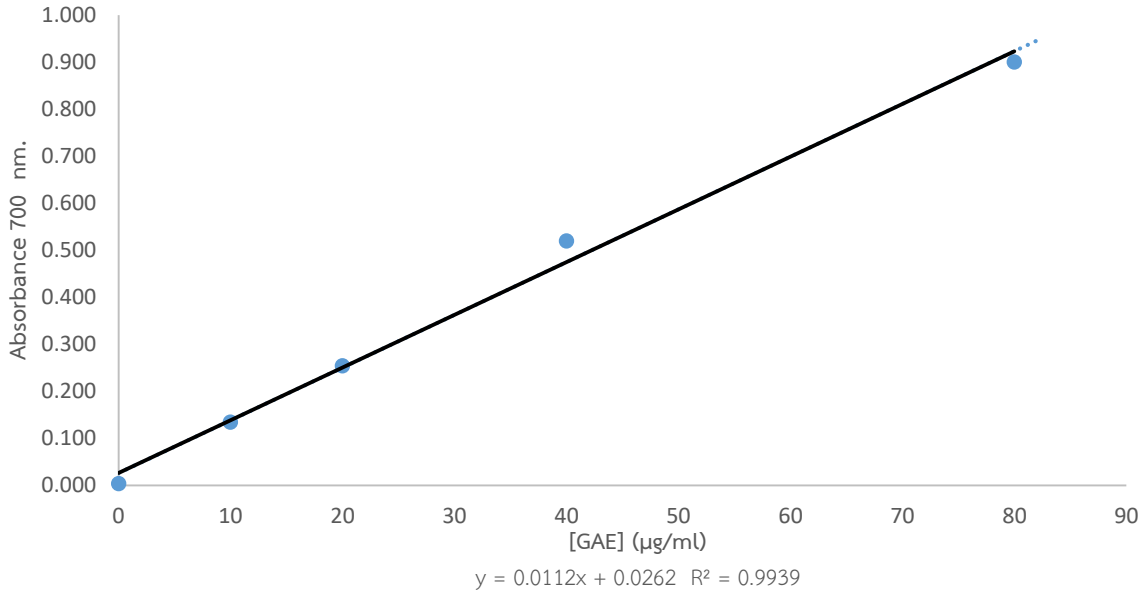
ภาพที่ 3 กราฟมาตรฐานของ Vitamin C โดยวิธี Dopachrome method

การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยใช้ FRAP assay หรือ Ferric reducing antioxidant power

คำนวณปริมาณของฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยใช้ FRAP ที่ความเข้มข้น 0 10 20 40 80 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร การเตรียมกราฟมาตรฐานกรดแกลลิคโดยการเตรียมสารละลายโดยชั่งสาร กรดแกลลิค 1 mg ผสมกับน้ำกลั่น 1 ml เก็บเป็น Stock ใส่สารมาตรฐานกรดแกลลิค ความเข้มข้นตั้งแต่ 0 10 20 40 80 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และเติมน้ำกลั่นให้มี ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลายฟอสเฟสบัฟเฟอร์ (phosphate buffer) เข้มข้น 0.2 มิลลิโมลาร์ pH 6.6 ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตรและสารละลายโพแทสเซียมเฟอริกไซยาไนด์ ($K_3Fe(CN)_6$) ความเข้มข้นร้อยละ 1 โดยมวลต่อปริมาตร ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันบ่มที่อุณหภูมิ 50°C เป็นเวลา 30 นาที เติมสารละลายกรดไตรคลอโรอะซิติก (CCl_3COOH) ความเข้มข้นร้อยละ 10 โดยมวลต่อปริมาตร ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3000 g เป็นเวลา 10 นาที จากนั้น ปิเปตสารละลายส่วนบน ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่น 2.5 มิลลิลิตร และเติมสารละลายเฟอร์ริกคลอไรด์($FeCl_3$) เข้มข้นร้อยละ 0.1 โดยมวลต่อปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 700 นาโนเมตร โดยใช้ น้ำกลั่น เป็น blank นำค่าที่ได้ไปวิเคราะห์จะได้กราฟมาตรฐานกรดแกลลิค

ตารางที่ ๔ การสร้างกราฟมาตรฐานการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยใช้ กรดแกลลิค (Gallic acid,GAE)

GAE (๑ mg/mL) (µL)	dH_2O (µL)	CCl_3COOH (µL)	dH๒O (µL)	$FeCl_3$ (µL)	OD ๗๐๐
๐	๑๐๐๐	๒๕๐๐	๒๕๐๐	๕๐๐	๐.๐๐๔
๑๐	๙๙๐	๒๕๐๐	๒๕๐๐	๕๐๐	๐.๑๓๕
๒๐	๙๘๐	๒๕๐๐	๒๕๐๐	๕๐๐	๐.๒๕๔
๔๐	๙๖๐	๒๕๐๐	๒๕๐๐	๕๐๐	๐.๕๒๐
๘๐	๙๒๐	๒๕๐๐	๒๕๐๐	๕๐๐	๐.๙๐๐



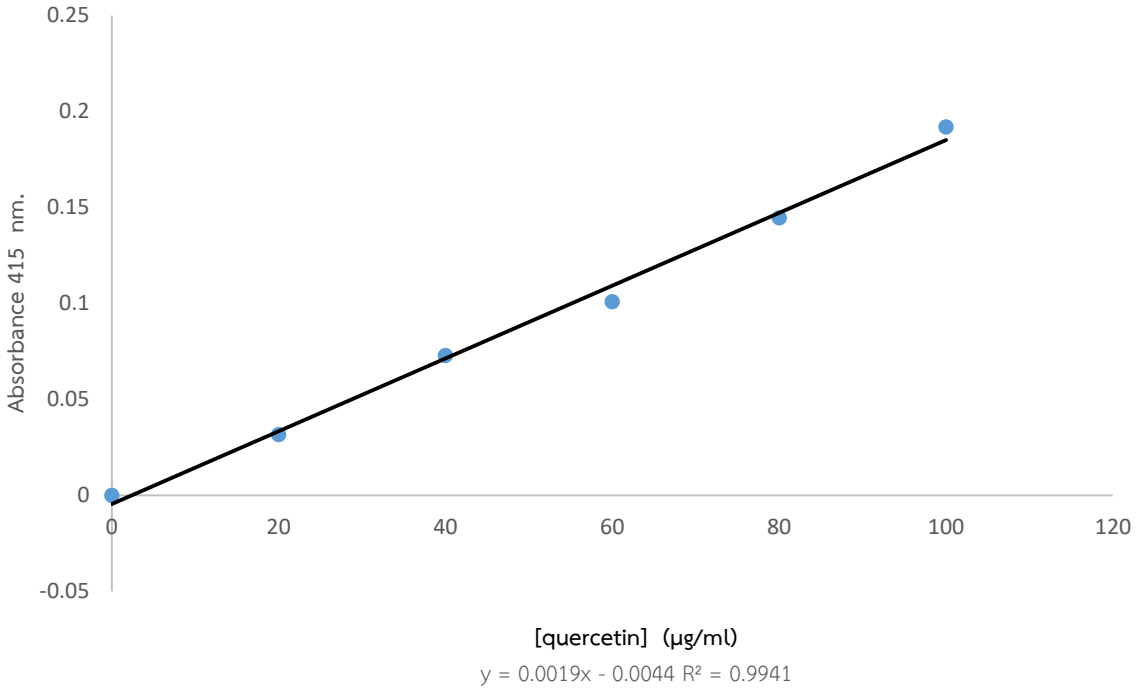
ภาพที่ 4 กราฟมาตรฐานของ gallic acid โดยวิธี FRAP assay

การวิเคราะห์หาปริมาณสารฟลาโวนอยด์โดยวิธี Aluminium chloride colorimetric assay

คำนวณปริมาณของสารฟลาโวนอยด์โดยวิธี Aluminium chloride colorimetric assay ที่ความเข้มข้น 0 20 40 60 80 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร การเตรียมกราฟมาตรฐาน เควอซิทิน (Quercetin)โดยการเตรียมสารละลายโดยชั่งสาร เควอซิทิน 1 mg ผสมกับน้ำกลั่น 1 ml เก็บเป็น Stock ใส่สารมาตรฐานเควอซิทิน ความเข้มข้นตั้งแต่ 0 20 40 60 80 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และเติมเมทานอลกลั่นให้มี ปริมาตร 2.0 มิลลิลิตรผสมสารละลายอะลูมิเนียมไตรคลอไรด์ ($AlCl_3$) ความเข้มข้นร้อยละ 10 โดยมวลต่อปริมาตร ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ผสมโพแทสเซียมอะซิเตท($C_2H_3KO_2$) ความเข้มข้น 1 โมลาร์ ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร และเติมน้ำกลั่น ปริมาตร 2.8 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน บ่มในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที นาที และนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 415 นาโนเมตรไปวิเคราะห์จะได้กราฟมาตรฐานเควอซิทิน โดยใช้เมทานอล เป็น blank

ตารางที่ 5 การสร้างกราฟมาตรฐานการวิเคราะห์หาปริมาณสารฟลาโวนอยด์โดยใช้ เควอซิทิน (Quercetin)

Quercetin (1 mg/mL) (µL)	Methanol (µL)	$AlCl_3$ (µL)	$C_2H_3KO_2$ (µL)	dH2O (µL)	OD 415
0	2000	100	100	2800	0
20	1980	100	100	2800	0.032
40	1960	100	100	2800	0.073
60	1940	100	100	2800	0.101
80	1920	100	100	2800	0.145
100	1900	100	100	2800	0.192



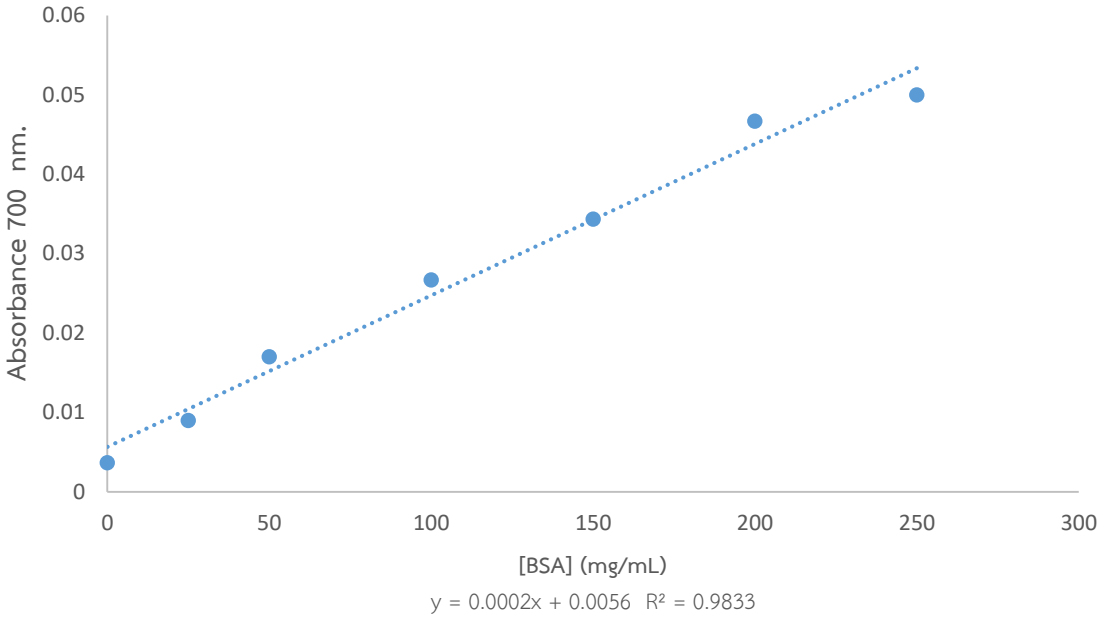
ภาพที่ 5 กราฟมาตรฐานของ Quercetin โดยวิธี Aluminium chloride colorimetric assay

การหาปริมาณโปรตีนโดยวิธี Lowry assay

การหาปริมาณโปรตีนเซริซินวัดปริมาณโปรตีนเซริซินที่สกัดด้วย Lowry assay คำนวณปริมาณหาของโปรตีนจากกราฟมาตรฐานที่ได้จากการวัดปริมาณโปรตีนมาตรฐาน Bovine serum albimin (BSA) ที่ความเข้มข้น 0 25 50 100 150 200 250 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร การเตรียมกราฟมาตรฐาน BSA โดยชั่ง BSA 1 mg ผสมกับน้ำกลั่น 1 ml เก็บเป็น Stock ใส่สารละลาย BSA 0 25 50 100 150 200 250 ไมโครลิตรและน้ำกลั่นให้มีปริมาตร 500 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน จากนั้นดึงออกมาหลอดละ 100 ไมโครลิตร และเติม Lowry reagent หลอดละ 3 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ทิ้งไว้ในที่มืด ที่อุณหภูมิห้อง 20 นาที จากนั้นเติม Folin phenol reagent หลอดละ 0.1 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ในที่มืด ที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาว 750 นาโนเมตร นำค่าที่ได้ไปวิเคราะห์จะได้กราฟมาตรฐานโปรตีน

ตารางที่ 6 การสร้างกราฟโปรตีนมาตรฐานโดยใช้ Bovine serum albimin (BSA)

BSA (1mg/mL) (µL)	dH_2O (µL)	Lowry reagent (µL)	Folin phenol reagent (µL)	OD 750
0	1000	3000	100	0.004
25	975	3000	100	0.009
50	950	3000	100	0.017
100	900	3000	100	0.027
150	850	3000	100	0.034
200	800	3000	100	0.047
250	750	3000	100	0.05



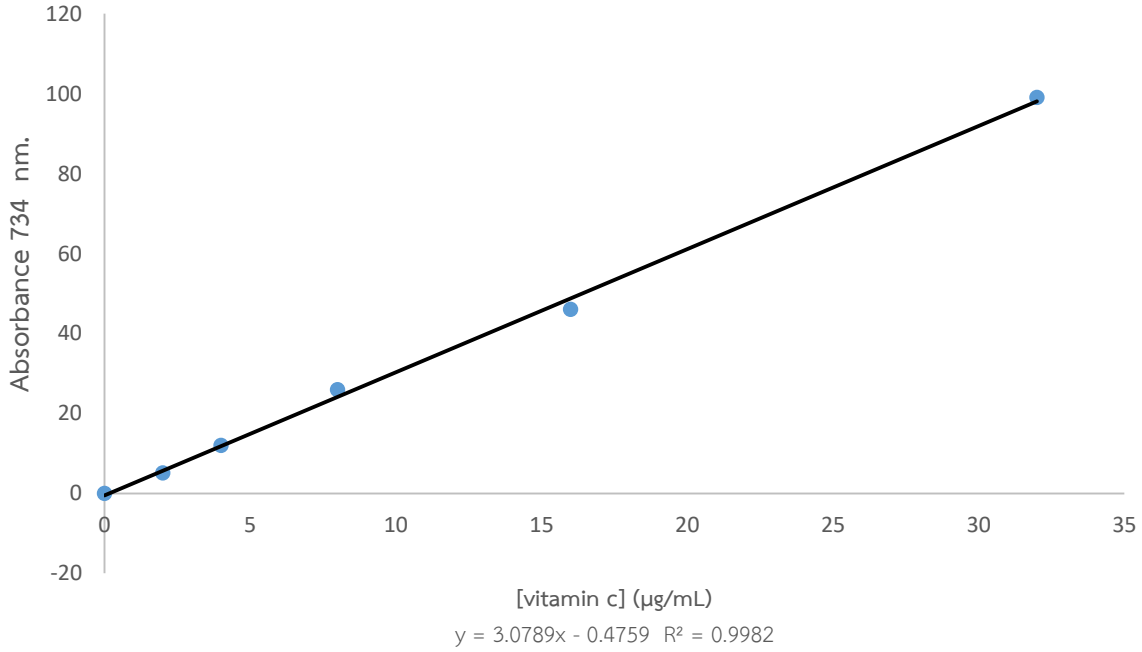
ภาพที่ 6 กราฟมาตรฐานของ Bovine serum albimin (BSA) โดยวิธี Lowry assay

การวิเคราะห์ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS decolorization scavenging effect

คำนวณปริมาณของฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS decolorization scavenging effect ที่ความเข้มข้น 0 2 4 80 16 32 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร การเตรียมกราฟมาตรฐานวิตามินซี โดยชั่งสารวิตามินซี 1 mg ผสมกับน้ำกลั่น 1 ml เก็บเป็น Stock ใส่สารละลายที่ความเข้มข้น vitamin C 0 2 4 80 16 32 ไมโครลิตรและเติมเมทานอลให้มี ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตรแล้วเติม ABTS 3 มิลลิลิตร บ่มในที่มืดที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร โดยใช้เมทานอลเป็น blank และนำค่าที่ได้ไปวิเคราะห์จะได้กราฟมาตรฐานวิตามินซี

ตารางที่ 7 การสร้างกราฟมาตรฐานการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยใช้วิตามินซี (Vitamin C)

vitamin c (1mg/mL) (µL)	Methanol (µL)	ABTS (µL)	OD 734	ความเข้มข้นสุดท้าย (µg/mL)
0	500	3000	0.646	0
2	498	3000	0.613	5.106
4	496	3000	0.569	12.017
8	492	3000	0.479	25.889
16	484	3000	0.349	46.003
32	468	3000	0.006	99.020



ภาพที่ 7 กราฟมาตรฐานของ vitamin c โดยวิธี ABTS decolorization scavenging effect