



ใบรับรองวิทยานิพนธ์
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (วิทยาศาสตร์การอาหาร)

ปริญญา

วิทยาศาสตร์การอาหาร

วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร

สาขา

ภาควิชา

เรื่อง เมลาโทนินในใบหม่อนและชาใบหม่อน: อิทธิพลของสายพันธุ์ อายุใบและ
กระบวนการผลิตชา

Melatonin in Mulberry Leaves and Mulberry Leaf Tea: Effect of Cutivars, Leaf Ages and
Tea Processing

นามผู้วิจัย นางสาวพิชญา โพธิ์นุช

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(อาจารย์ศศิธร ตรงจิตภักดี, Ph.D.)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์วรรณี จิระภาคย์กุล, Ph.D.)

หัวหน้าภาควิชา

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ธนะบุญย์ สัจจอนันตกุล, Ph.D.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

(รองศาสตราจารย์กัญญา ชีระกุล, D.Agr.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ เดือน พ.ศ.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

เมลาโทนินในใบหม่อนและชาใบหม่อน: อิทธิพลของสายพันธุ์ อายุใบ

และกระบวนการผลิตชา

Melatonin in Mulberry Leaves and Mulberry Leaf Tea: Effect of Cultivars, Leaf Ages
and Tea Processing

โดย

นางสาวพิชญ์ โปธิ์นุช

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (วิทยาศาสตร์การอาหาร)

พ.ศ. 2553

พิชญา โพธิ์นุช 2553: เมลาโทนินในใบหม่อนและชาใบหม่อน: อิทธิพลของสายพันธุ์ อายุใบ และกระบวนการผลิตฯ ปริญาวิทยาสตรมหาบัณฑิต (วิทยาศาสตร์การอาหาร) สาขา วิทยาศาสตร์การอาหาร ภาควิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร อาจารย์ที่ปรึกษา วิทยานิพนธ์หลัก: อาจารย์ศศิธร ตรงจิตภักดี, Ph.D. 106 หน้า

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาปริมาณเมลาโทนินในใบหม่อนและชาใบหม่อนด้วย เครื่องโครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงร่วมกับเครื่องตรวจวัดฟลูออเรสเซนซ์ (HPLC-FLD) โดย ทำการศึกษาวิธีการเตรียมการตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์ปริมาณเมลาโทนินในพืช 2 วิธี ได้แก่ วิธีที่ใช้เทคนิค ultrasonic ร่วมกับ solid phase extraction (วิธี ultrasonic/SPE) และวิธีที่ใช้เทคนิค homogenization ร่วมกับ liquid-liquid extraction (วิธี homogenization/LLE) จากนั้นตรวจสอบปริมาณเมลาโทนินใน ใบหม่อนสายพันธุ์กำแพงแสน-เอ็มบี-42-1 (KPS-MB-42-1) เปรียบเทียบกับผลหม่อนสายพันธุ์เดียวกัน และพืชที่มีสรรพคุณช่วยให้นอนหลับ 5 ชนิด (ใบขี้เหล็ก ใบชุมเห็ดเทศ ดอกสะเดา ผลยอและผลดีปลี) นอกจากนี้ยังได้ศึกษาอิทธิพลของสายพันธุ์ (บุรีรัมย์ 60 สกลนครและคุณไพล) และอายุใบ (ยอดอ่อน ใบอ่อนและใบแก่) ต่อปริมาณเมลาโทนินในใบหม่อน รวมทั้งศึกษาผลของกระบวนการผลิตฯ ได้แก่ กระบวนการผลิตชาเขียวและชาดำ ต่อปริมาณเมลาโทนินในใบหม่อน ผลการทดลองพบว่าการเตรียม ตัวอย่างด้วยวิธี ultrasonic/SPE มีค่า recovery rate มากกว่าวิธี homogenization/LLE ($p \leq 0.05$) โดยวิธี ultrasonic/SPE มีค่า recovery rate มากกว่า 70% ขณะที่วิธี homogenization/LLE มีค่า recovery rate น้อย กว่า 40% เมื่อตรวจปริมาณเมลาโทนินในใบหม่อนเปรียบเทียบกับผลหม่อนและพืชชนิดอื่น พบ เมลาโทนินในใบและผลหม่อนเท่านั้น โดยพบว่าใบหม่อนมีปริมาณเมลาโทนินเท่ากับ 416.9 นาโนกรัม ต่อกรัมน้ำหนักแห้งซึ่งมากกว่าผลหม่อน (81.2 นาโนกรัมต่อมิลลิกรัม) ($p \leq 0.05$) ขณะที่ไม่พบ เมลาโทนินในพืชชนิดอื่น นอกจากนี้ยังพบว่าสายพันธุ์และอายุใบมีอิทธิพลต่อปริมาณเมลาโทนินในใบ หม่อน โดยใบหม่อนสายพันธุ์บุรีรัมย์ 60 มีปริมาณเมลาโทนินเฉลี่ยมากที่สุด (295.9 นาโนกรัมต่อกรัม น้ำหนักแห้ง) ($p \leq 0.05$) ตามด้วยสายพันธุ์สกลนคร (106.5 นาโนกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง) และสายพันธุ์ คุณไพล (43.1 นาโนกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง) โดยที่ยอดอ่อนของทุกสายพันธุ์มีปริมาณเมลาโทนินมาก ที่สุด ($p \leq 0.05$) รองลงมาคือ ใบอ่อนและใบแก่ กระบวนการผลิตชาที่มีผลต่อความคงตัวของเมลาโทนิน ในใบหม่อน โดยพบว่าเกิดการสูญเสียของเมลาโทนินในชาเขียวใบหม่อนและชาดำใบหม่อนประมาณ 87% เมื่อเปรียบเทียบกับใบหม่อนสด โดยปริมาณเมลาโทนินที่พบในชาเขียวใบหม่อนและชาดำ ใบหม่อนไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p > 0.05$)

Pitchaya Pothinuch 2010: Melatonin in Mulberry Leaves and Mulberry Leaf Tea: Effect of Cultivars, Leaf Ages and Tea Processing. Master of Science (Food Science), Major Field: Food Science, Department of Food Science and Technology. Thesis Advisor: Mrs. Sasitorn Tongchitpakdee, Ph.D. 106 pages.

The objective of this study was to determine melatonin content in mulberry leaves and mulberry leaf tea using high performance liquid chromatography combined with fluorescence detector (HPLC-FLD). The preparation procedures for melatonin analysis in plant including ultrasonic technique in combination with solid phase extraction (ultrasonic/SPE procedure) and homogenization in combination with liquid-liquid extraction (homogenization/LLE procedure) were investigated. Melatonin content in mulberry leaves cv. KPS-MB-42-1 was compared with its fruits as well as five plants which can alleviate sleep disorders (siamese senna leaves, acapulo leaves, margosa flowers, long pepper fruits and noni fruits). The effects of cultivars (cv. Buriram 60, Sakonnakhon and Khunphai) and leaf ages (tip of leaves, young leaves and old leaves) on melatonin content in mulberry leaves were studied. In addition, the effect of tea processing including green and black tea processes on melatonin content in mulberry leaf tea was also studied. The results showed that the ultrasonic/SPE procedure had higher recovery rate than the homogenization/LLE procedure. The recovery rate of ultrasonic/SPE procedure was more than 70%, while the recovery rate of homogenization/LLE procedures were less than 40%. Melatonin was only found in mulberry leaves and fruits. Mulberry leaves contained higher melatonin level (416.9 ng/g dry weight) than its fruits (81.2 ng/g dry weight) ($p \leq 0.05$), whereas it could not be detected in other plants. Furthermore, the cultivars and leaf ages affected on melatonin content in mulberry leaves. The highest average melatonin level was found in cv. Buriram 60 (295.9 ng/g dry weight) followed by Sakonnakhon (106.5 ng/g dry weight) and Khunphai (43.1 ng/g dry weight) ($p \leq 0.05$). The tip of leaves in all cultivar had the highest melatonin content, while the old leaves had the lowest content ($p \leq 0.05$). Tea processing including green tea and black tea affected on melatonin stability. The melatonin contents in mulberry leaf green and black tea decreased approximately 87 %, when compared to that of the fresh leaves. There were no significant differences between the melatonin contents of the mulberry leaf green and black tea ($p > 0.05$).

Student's signature

Thesis Advisor's signature

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอกราบขอบคุณอาจารย์ศศิธร ตรงจิตภักดี อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลักและผู้ช่วยศาสตราจารย์วรรณี จิรภาคย์กุล อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์รอง ที่ได้ให้คำปรึกษาในเรื่องการเรียน การค้นคว้างานวิจัยรวมทั้งช่วยตรวจสอบแก้ไขวิทยานิพนธ์จนกระทั่งเสร็จสมบูรณ์ และขอกราบขอบคุณรองศาสตราจารย์วรรณวิบูลย์ กาญจนกฤษร ประธานการสอบปากเปล่าขั้นสุดท้าย และรองศาสตราจารย์ทนง ภัครษ์พันธุ์ ผู้ทรงคุณวุฒิภายนอกที่ได้ให้คำแนะนำในการแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้มีความสมบูรณ์มากขึ้น

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่จากศูนย์หม่อนไหมเฉลิมพระเกียรติ จังหวัดสระบุรีและพี่ๆ จากภาควิชาพืชสวน คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสนที่ให้ความอนุเคราะห์ใบหม่อน คุณมนต์วีดี หุ่นเจริญที่ให้ความอนุเคราะห์ผลหม่อนและผู้ให้อนุเคราะห์สมุนไพรอื่นๆ ที่ใช้ในงานวิจัยนี้พร้อมทั้งความช่วยเหลือในด้านต่างๆ

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ของคณะอุตสาหกรรมเกษตรทุกท่านที่ให้การช่วยเหลือเพื่อให้งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี พร้อมทั้งขอบคุณพี่ๆ น้องๆ และเพื่อนทุกคนสำหรับกำลังใจและความช่วยเหลือในด้านต่างๆ

สุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณคุณพ่อ คุณแม่ คุณสัณห์กิจ ปัญญาวัฒนานนท์และญาติทุกคนที่ได้มอบความรัก กำลังใจ คำปรึกษาและคอยสนับสนุนในทุกเรื่องเพื่อให้การเรียนและงานวิจัยในระดับปริญญาโทครั้งนี้สัมฤทธิ์ผลไปได้ด้วยดี

พิชญา โปธิษฐ
พฤษภาคม 2553

สารบัญ

	หน้า
สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(4)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	3
การตรวจเอกสาร	4
อุปกรณ์และวิธีการ	37
อุปกรณ์	37
วิธีการ	39
ผลและวิจารณ์	46
สรุปและข้อเสนอแนะ	62
สรุป	62
ข้อเสนอแนะ	63
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	64
ภาคผนวก	81
ภาคผนวก ก ตัวอย่างใบหม่อน	82
ภาคผนวก ข พืชที่มีสรรพคุณช่วยให้นอนหลับ	85
ภาคผนวก ค ภาพแสดงกระบวนการผลิตชาใบหม่อน	88
ภาคผนวก ง วิธีการเตรียมสารละลายมาตรฐานเมลาโทนิน	92
ภาคผนวก จ การคำนวณค่า recovery rate และค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน ของวิธีการเตรียมตัวอย่าง	94
ภาคผนวก ฉ ตารางวิเคราะห์ทางสถิติ	98
ประวัติการศึกษาและการทำงาน	106

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	ผลของเมลาโทนินที่มีต่ออนุมูลอิสระและเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการต้านอนุมูลอิสระ	13
2	ค่า recovery rate และค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวนของวิธีการเตรียมตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์ปริมาณเมลาโทนินในผลมะเฟืองและผลหม่อน	47
3	ปริมาณเมลาโทนินในผลมะเฟืองและผลหม่อนที่ได้จากการเตรียมตัวอย่างที่แตกต่างกัน	49
4	ปริมาณเมลาโทนินในใบหม่อนและพืชที่มีสรรพคุณช่วยให้อ่อนหลับ	50
ตารางผนวกที่		
ก1	ความยาวและความชื้นของใบหม่อนแต่ละช่วงอายุใบของหม่อน 3 สายพันธุ์	83
ฉ1	ผลการวิเคราะห์ทางสถิติของการเปรียบเทียบค่า recovery rate ของวิธีการเตรียมตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์เมลาโทนินในผลมะเฟือง โดยวิธี Independent-sample t-test	99
ฉ2	ผลการวิเคราะห์ทางสถิติของการเปรียบเทียบค่า recovery rate ของวิธีการเตรียมตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์เมลาโทนินในผลหม่อน โดยวิธี Independent-sample t-test	100
ฉ3	ผลการวิเคราะห์ทางสถิติของการเปรียบเทียบปริมาณเมลาโทนินในใบหม่อนและผลหม่อนสายพันธุ์กำแพงแสน-เอ็มบี-42-1 โดยวิธี Independent-sample t-test	101
ฉ4	ผลการวิเคราะห์ทางสถิติของการศึกษาอิทธิพลของอายุใบต่อปริมาณเมลาโทนินในใบหม่อนสายพันธุ์บุรีรัมย์ 60 โดยวิธี One-way ANOVA	102
ฉ5	ผลการวิเคราะห์ทางสถิติของการศึกษาอิทธิพลของอายุใบต่อปริมาณเมลาโทนินในใบหม่อนสายพันธุ์สุกฉนวน โดยวิธี One-way ANOVA	103

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางผนวกที่		หน้า
ฉ6	ผลการวิเคราะห์ทางสถิติของการศึกษาอิทธิพลของอายุใบต่อปริมาณ เมลาโทนินในใบหม่อนสายพันธุ์คุณไพ โดยวิธี One-way ANOVA	104
ฉ7	ผลการวิเคราะห์ทางสถิติของการศึกษาผลของกระบวนการผลิตชาใบหม่อน ต่อปริมาณเมลาโทนินโดยวิธี One-way ANOVA	105

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	โครงสร้างทางเคมีของเมลาโทนิน	5
2	กระบวนการสังเคราะห์เมลาโทนินในสัตว์มีกระดูกสันหลัง	6
3	ปริมาณเมลาโทนินในกระแสเลือดของคนใน 24 ชั่วโมง	7
4	กระบวนการสังเคราะห์เมลาโทนินในพืช	8
5	การเปลี่ยนแปลงของปริมาณเมลาโทนินในกระแสเลือดของคนช่วงอายุต่างๆ	10
6	กลไกการทำงานและตัวรับของเมลาโทนิน	17
7	การสกัดสารด้วยเทคนิค ultrasonic	20
8	ขั้นตอนการใช้ SPE	23
9	กลไกการสลายตัวโดยแสงของเมลาโทนิน	27
10	การสลายตัวของเมลาโทนินที่เกี่ยวข้องกับเอนไซม์	28
11	ลักษณะปรากฏของหม่อนสายพันธุ์บุรีรัมย์ 60	32
12	ลักษณะปรากฏของหม่อนสายพันธุ์คุณไพ	32
13	ลักษณะปรากฏของหม่อนสายพันธุ์สกลนคร	33
14	ลักษณะปรากฏของหม่อนสายพันธุ์กำแพงแสน-เอ็มบี-42-1	34
15	โครมาโตแกรมของสารมาตรฐานเมลาโทนินความเข้มข้น 500 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร	46
16	โครมาโตแกรมของเมลาโทนินในใบหม่อนและผลหม่อนสายพันธุ์กำแพงแสน-เอ็มบี-42-1	51
17	โครมาโตแกรมของเมลาโทนินและพืชที่มีสรรพคุณช่วยให้อ่อนหลับ ได้แก่ ใบจี่เหล็ก ใบชุมเห็ดเทศ ดอกสะเดา ผลดีป्लीและผลยอ	52
18	ปริมาณเมลาโทนินในใบหม่อนช่วงอายุใบต่างๆ ของหม่อน 3 สายพันธุ์	54
19	โครมาโตแกรมของเมลาโทนินในใบหม่อนสายพันธุ์บุรีรัมย์ 60	56
20	โครมาโตแกรมของเมลาโทนินในใบหม่อนสายพันธุ์สกลนคร	57
21	โครมาโตแกรมของเมลาโทนินในใบหม่อนสายพันธุ์คุณไพ	58

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
22	ปริมาณเมลาโทนินในใบหม่อนและชาใบหม่อน	59
23	โครมาโตแกรมของเมลาโทนินในชาใบหม่อนและใบหม่อน	60
ภาพผนวกที่		
ก1	ยอดอ่อน ใบอ่อนและใบแก่ของหม่อนสายพันธุ์บุรีรัมย์ 60	83
ก2	ยอดอ่อน ใบอ่อนและใบแก่ของหม่อนสายพันธุ์สกลนคร	84
ก3	ยอดอ่อน ใบอ่อนและใบแก่ของหม่อนสายพันธุ์คุณไพ	84
ข1	จี่เหล็ก (<i>Cassia siamea</i> Lamk.)	86
ข2	ชุมเห็ดเทศ (<i>Cassia alata</i> L.)	86
ข3	ดีปลี (<i>Piper retrofractum</i>)	86
ข4	ดอกสะเดา (<i>Azadirachta indica</i> A.)	87
ข5	ผลยอ (<i>Morinda citrifolia</i> L.)	87
ข6	หม่อน (<i>Morus</i> spp.)	87
ค1	ยอดอ่อน ใบอ่อนและใบแก่ของหม่อนสายพันธุ์บุรีรัมย์ 60 สำหรับผลิตชาใบหม่อน	89
ค2	การตัดส่วนก้านและหั่นใบหม่อนให้มีขนาด 0.5 x 0.5 นิ้ว	89
ค3	การลวกใบหม่อนและแช่ใบหม่อนในน้ำเย็นทันทีหลังการลวกสำหรับการผลิตชาเขียวใบหม่อน	90
ค4	การคั่วเมล็ดใบหม่อนในกระทะด้วยไฟอ่อนสำหรับการผลิตชาเขียวใบหม่อน	90
ค5	การคั่วใบหม่อนในกระทะด้วยไฟอ่อนสำหรับการผลิตชาดำใบหม่อน	90
ค6	การอบใบหม่อนที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 20 นาทีสำหรับการผลิตชาเขียวใบหม่อนและ 40 นาทีสำหรับการผลิตชาดำใบหม่อน	91
ค7	ผลิตภัณฑ์ชาเขียวใบหม่อนและชาดำใบหม่อน	91
ง1	กราฟมาตรฐานของสารมาตรฐานเมลาโทนิน	93

เมลานินในใบหม่อนและชาใบหม่อน: อิทธิพลของสายพันธุ์ อายุใบ และกระบวนการผลิตชา

Melatonin in Mulberry Leaves and Mulberry Leaf Tea: Effect of Cultivars, Leaf Ages and Tea Processing

คำนำ

เมลานิน (*N*-acetyl-methoxytryptamine) เป็นฮอร์โมนชนิดหนึ่งในร่างกายที่มีบทบาทในการควบคุมและปรับเปลี่ยนการทำงานของระบบต่างๆ ให้อยู่ในสภาวะสมดุล เช่น ควบคุมจังหวะรอบวัน (circadian rhythm) และระบบสืบพันธุ์ นอกจากนี้ยังพบว่ามีความสัมพันธ์ในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่มีประสิทธิภาพสูงเมื่อเปรียบเทียบกับสารต้านอนุมูลอิสระทั่วไป เช่น วิตามินซี โทรลอกซ์ (trolox) กลูตาไทโอน NADH และ NADPH (Tan *et al.*, 2003) ร่างกายสามารถสังเคราะห์เมลานินได้จากกรดอะมิโนทริปโตเฟน แต่ปริมาณเมลานินในกระแสเลือดจะลดลงเมื่ออายุเพิ่มขึ้นซึ่งอาจสัมพันธ์กับการเกิดความชราภาพและความบกพร่องต่างๆ ของร่างกาย (ปิยะรัตน์, 2545) ดังนั้นการได้รับเมลานินจากการบริโภคอาหารโดยเฉพาะผักและผลไม้ที่เป็นแหล่งของเมลานินจะสามารถช่วยเพิ่มระดับเมลานินในกระแสเลือดได้และยังช่วยให้ความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระในกระแสเลือดเพิ่มสูงขึ้นด้วย (Reiter *et al.*, 2005)

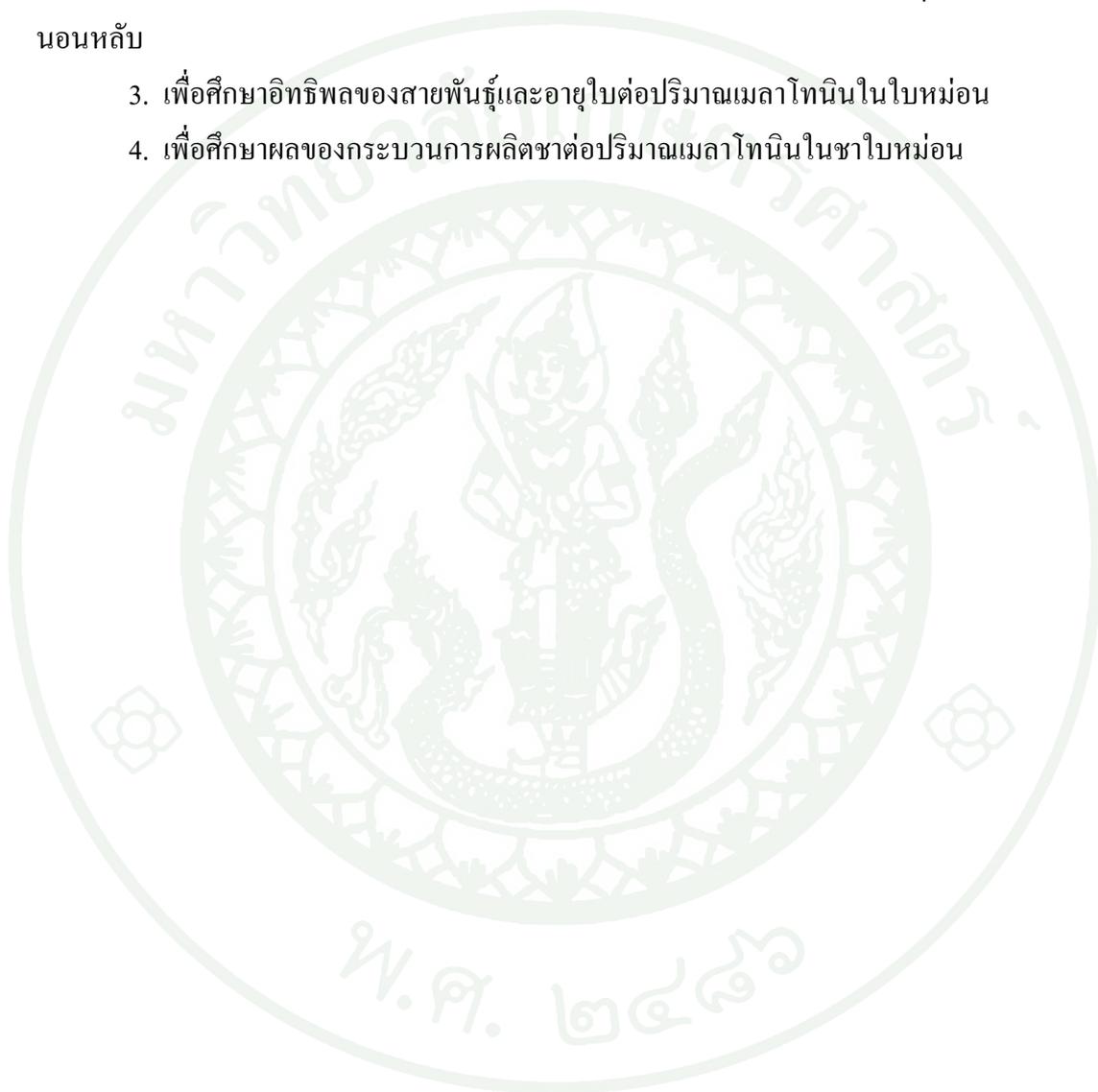
หม่อน (*Morus spp.*) เป็นพืชที่มีการเพาะปลูกในประเทศไทยอย่างแพร่หลาย เนื่องจากสภาพภูมิอากาศมีความเหมาะสมกับการเจริญเติบโต นอกจากนี้หม่อนยังเป็นพืชที่ให้ผลผลิตตลอดทั้งปี (ศิริพร, 2546) ส่วนใหญ่นิยมใช้ประโยชน์จากส่วนใบเพื่อนำไปเป็นอาหารของหนอนไหมสำหรับอุตสาหกรรมไหม เนื่องจากใบหม่อนประกอบด้วยสารอาหารที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตหลายชนิด โดยเฉพาะโปรตีน (ศิริพร, 2546; Machii, 1989; Srivastava *et al.*, 2006; Kandyliis *et al.*, 2009) ปัจจุบันมีงานวิจัยจำนวนมากมุ่งศึกษาสารสำคัญทางชีวภาพในใบหม่อน เช่น สารประกอบฟีนอลิก (Kim *et al.*, 1999; Enkhmaa *et al.*, 2005; Katsube *et al.*, 2006) ซึ่งจัดเป็นสารสำคัญทางชีวภาพที่มีผลต่อสุขภาพร่างกาย แต่อย่างไรก็ตามการใช้ประโยชน์จากใบหม่อนยังคงมีจำกัด จึงทำให้ผลตอบแทนที่ได้ไม่คุ้มค่ากับคุณประโยชน์ของใบหม่อน

งานวิจัยนี้ต้องการแสดงให้เห็นว่าไบหม่อนเป็นแหล่งสำคัญของเมลาโทนินที่พบในพืช โดยปริมาณเมลาโทนินที่พบในพืชนั้นอาจขึ้นกับปัจจัยต่างๆ ได้แก่ สายพันธุ์และอายุใบ เป็นต้น ดังนั้นการศึกษาถึงอิทธิพลของปัจจัยดังกล่าวจึงจำเป็นสำหรับการเลือกเก็บเกี่ยวไบหม่อนสำหรับการบริโภคและการแปรรูปเพื่อให้เกิดประโยชน์สูงสุด โดยที่การศึกษาดังกล่าวยังไม่เคยมีมาก่อนสำหรับชาไบหม่อนซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์จากไบหม่อนที่พบได้ทั่วไปอาจมีปัจจัยต่างๆ ในกระบวนการผลิตที่มีผลต่อความคงตัวของเมลาโทนิน โดยที่การศึกษาเรื่องความคงตัวของเมลาโทนินในอาหารยังคงมีค่อนข้างจำกัด

ดังนั้นการศึกษामেলাโทนินในไบหม่อนและชาไบหม่อนนี้น่าจะทำให้เกิดประโยชน์ในด้านเกษตรกรรมและอุตสาหกรรมอาหารและยา เนื่องจากข้อมูลเกี่ยวกับปริมาณเมลาโทนินที่ได้ อาจมีส่วนช่วยสนับสนุนการใช้ประโยชน์จากไบหม่อน ซึ่งเป็นการช่วยเพิ่มมูลค่าทางการตลาดให้แก่ไบหม่อน ทำให้เกษตรกรผู้เพาะปลูกมีรายได้เพิ่มขึ้นจึงเป็นการช่วยกระตุ้นเศรษฐกิจระดับรากหญ้าของประเทศ ขณะเดียวกันอาจทำให้เกิดทางเลือกใหม่ในการบริโภคสำหรับผู้บริโภคที่ใส่ใจสุขภาพ เนื่องจากการบริโภคไบหม่อนและผลิตภัณฑ์จากไบหม่อนจะทำให้ได้รับเมลาโทนิน ซึ่งอาจช่วยสร้างสมดุลให้แก่ร่างกายได้ นอกจากนี้งานวิจัยนี้ยังอาจช่วยให้ผู้ที่ต้องการแปรรูปไบหม่อนได้ตระหนักถึงผลของการแปรรูปที่มีต่อความคงตัวของเมลาโทนินได้อีกเช่นกัน ทั้งนี้เพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์จากไบหม่อนที่มีประโยชน์สูงสุด

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาวิธีการเตรียมตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์ปริมาณเมลาโทนินในพืชที่เหมาะสม
2. เพื่อศึกษาปริมาณเมลาโทนินในใบหม่อนเปรียบเทียบกับพืชที่มีสรรพคุณช่วยให้นอนหลับ
3. เพื่อศึกษาอิทธิพลของสายพันธุ์และอายุใบต่อปริมาณเมลาโทนินในใบหม่อน
4. เพื่อศึกษาผลของกระบวนการผลิตชาต่อปริมาณเมลาโทนินในชาใบหม่อน



การตรวจเอกสาร

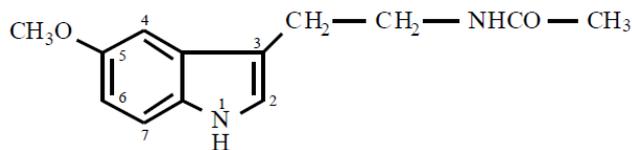
เมลาโทนิน

เมลาโทนินเป็นฮอร์โมนที่สร้างจากต่อมไพเนียลซึ่งเป็นต่อมไร้ท่อที่อยู่บริเวณด้านบนของสมองส่วนกลาง Lerner *et al.* (1958) ได้ค้นพบเมลาโทนินจากการนำต่อมไพเนียลของวัวมาสกัดและทดสอบกิจกรรมทางชีวภาพซึ่งพบว่าสารนี้สามารถทำให้สีผิวของกบจางลง อันเป็นผลจากการรวมกลุ่มของเม็ดสีเมลานินในเซลล์เมลานโนไซต์บนผิวหนัง นอกจากนี้ยังพบเมลาโทนินในอวัยวะอื่นๆ เช่น เรตินา อวัยวะในระบบทางเดินอาหารและเนื้อเยื่อชนิดต่างๆ (Pang and Allen, 1986; Heüther *et al.*, 1992) ปัจจุบันมีงานวิจัยรายงานว่าสามารถพบเมลาโทนินในสิ่งมีชีวิตหลายชนิด เช่น แบคทีเรีย รา เซลล์ยูคาริโอต สาหร่าย ฟีซ สัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังและสัตว์มีกระดูกสันหลัง (Vivien-Roels and Pévet, 1993; Balzer and Hardeland, 1996; Hardeland and Fuhrberg, 1996; Reiter *et al.*, 2001; Reiter and Tan, 2002)

1. คุณสมบัติและโครงสร้างทางเคมีของเมลาโทนิน

เมลาโทนินหรือ *N*-acetyl-5-methoxytryptamine หรือ *N*-[2-(5-Methoxy-1*H*-indol-3-yl)ethyl]acetamide มีสูตรโมเลกุล คือ $C_{13}H_{16}N_2O_2$ น้ำหนักโมเลกุล เท่ากับ 232.28 โดยสัดส่วนของ C H N และ O เท่ากับ 67.22 6.94 12.06 และ 13.78% ตามลำดับ ความสามารถของเมลาโทนินในการละลายน้ำและเอทานอลเท่ากับ 0.1 และ 8 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ลักษณะปรากฏเป็นผงสีเหลืองซีด มีจุดเดือดเท่ากับ 116-118 องศาเซลเซียสและมีค่าการดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเล็ตสูงสุดที่ความยาวคลื่น เท่ากับ 223 และ 278 นาโนเมตร (O' Neil *et al.*, 2006; Garcia-Parrilla *et al.*, 2009)

Lerner *et al.* (1959) ศึกษาลักษณะโครงสร้างทางเคมีของเมลาโทนินโดยวัดสเปกตรัมการดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเล็ตและวัดสเปกตรัมของการปล่อยแสงฟลูออเรสเซนซ์ ทั้งยังทำการทดสอบความสามารถในการฟอกสีผิวของกบ และเพื่อเป็นยืนยันความถูกต้องของโครงสร้างที่ได้จากการศึกษา คณะผู้วิจัยยังได้เปรียบเทียบคุณสมบัติกับเมลาโทนินที่ได้จากการสังเคราะห์ทางเคมี ซึ่งโครงสร้างทางเคมีของเมลาโทนินที่ได้แสดงดังภาพที่ 1



ภาพที่ 1 โครงสร้างทางเคมีของเมลาโทนิน

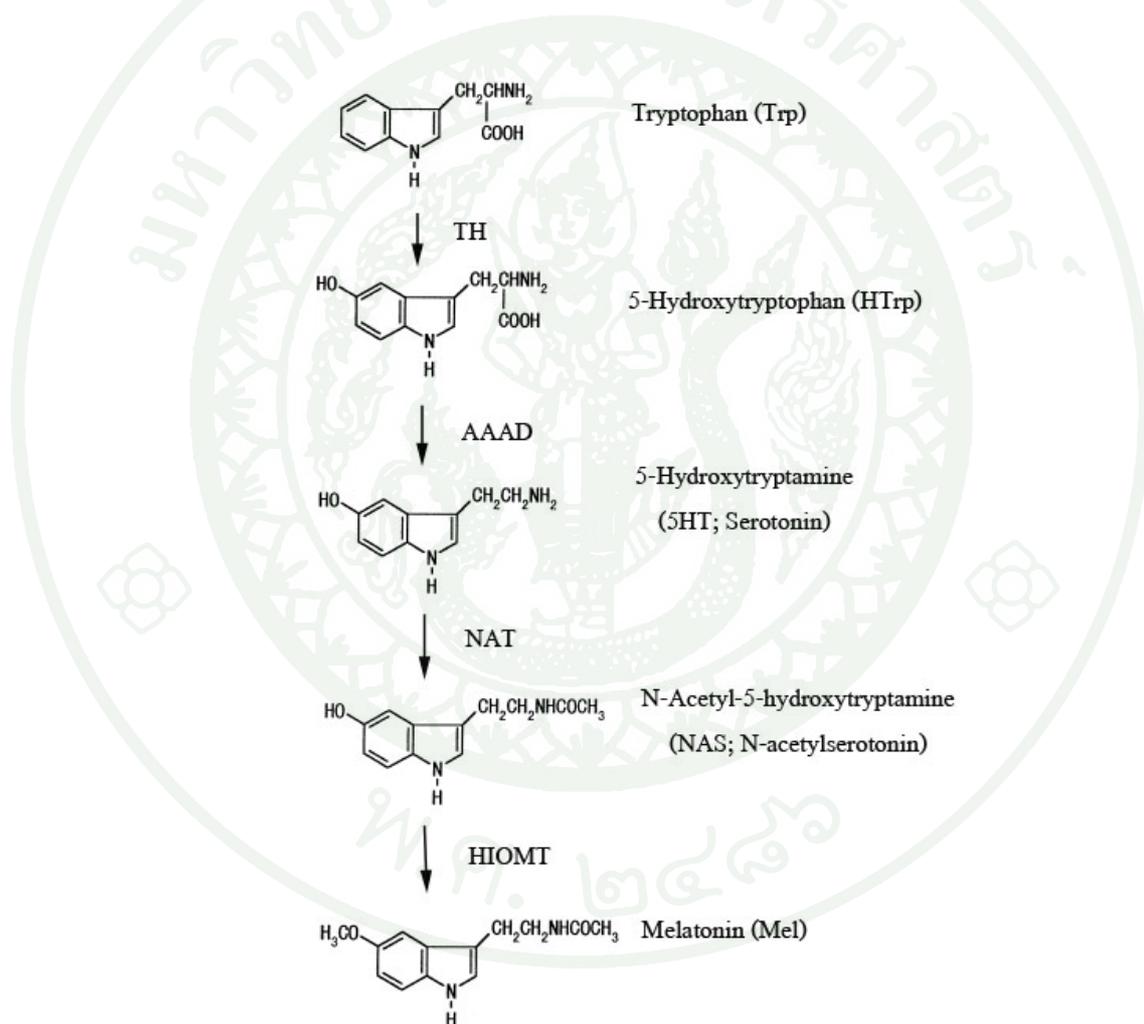
ที่มา: Tan *et al.* (2002)

เมลาโทนินเป็นสารประกอบกลุ่ม indoleamine โครงสร้างแบ่งออกเป็น 3 ส่วน ได้แก่ วงแหวน indole สายโซ่ amide ซึ่งอยู่ที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 3 ของวงแหวน indole และสายโซ่ methoxy ซึ่งอยู่ที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 5 โดยศูนย์กลางของการเกิดปฏิกิริยาระหว่างเมลาโทนินกับสารออกซิแดนต์คือ วงแหวน indole เนื่องจากมีความคงตัวในสภาวะเรโซแนนซ์สูงและมีพลังงานกระตุ้นต่ำ ถ้าในโครงสร้างส่วน indole ถูกแทนที่ด้วย benzofuran และ naphthalene จะทำให้ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระลดลง สำหรับสายโซ่ทั้งสองนั้นมีบทบาทในการกำจัด (scavenge) อนุมูลอิสระเช่นกัน นอกจากนี้ยังมีส่วนร่วมในการกำจัดกิจกรรม prooxidant ของเมลาโทนินด้วย โดยสายโซ่ amide มี N-C=O เป็นหมู่ฟังก์ชันซึ่งหมู่คาร์บอนิล (C=O) ของ N-C=O มีความสำคัญต่อการกำจัด second reactive species และในโตรเจนในโครงสร้าง N-C=O มีส่วนสำคัญในการเกิดโครงสร้างวงแหวน 5 เหลี่ยมเมื่อเกิดปฏิกิริยาระหว่างเมลาโทนินกับอนุมูลอิสระ สำหรับกลุ่ม methoxy จะช่วยป้องกันไม่ให้เมลาโทนินเป็น prooxidant ถ้าส่วน methoxy ของโครงสร้างถูกแทนที่ด้วยกลุ่มไฮดรอกซิล (OH) จะทำให้ความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระเพิ่มขึ้น แต่อย่างไรก็ตามการเปลี่ยนแปลงนี้จะทำให้คุณสมบัติการชอบไขมันหรือ lipophilicity ลดลง (Tan *et al.*, 2002)

Hardeland *et al.* (2006) กล่าวว่าเมลาโทนินมีลักษณะเป็น amphiphilic เนื่องจากโครงสร้างประกอบไปด้วยส่วนที่ชอบน้ำ (hydrophilic) และส่วนที่ชอบไขมัน (lipophilic) จึงทำให้โมเลกุลสามารถผ่านเข้าเซลล์ ช่องต่างๆ หรือของเหลวในร่างกายได้ดี

2. กระบวนการสังเคราะห์เมลาโทนิน

กรดอะมิโนทริปโตเฟน (tryptophan/Trp) เป็นสารตั้งต้นในกระบวนการสังเคราะห์เมลาโทนิน ร่างกายได้รับกรดอะมิโนทริปโตเฟนจากการบริโภคอาหารและถูกดูดซึมเข้าสู่กระแสเลือดไปยังเซลล์ไพเนียลโลไซต์ (pinealocyte) ซึ่งเป็นเซลล์ในต่อมไพเนียล ส่วนวิธีการเคลื่อนย้ายของกรดอะมิโนเข้าสู่เซลล์ยังคงไม่มีความชัดเจน (Harumi and Matsushima, 2000) กระบวนการสังเคราะห์เมลาโทนินในสัตว์มีกระดูกสันหลังแสดงดังภาพที่ 2

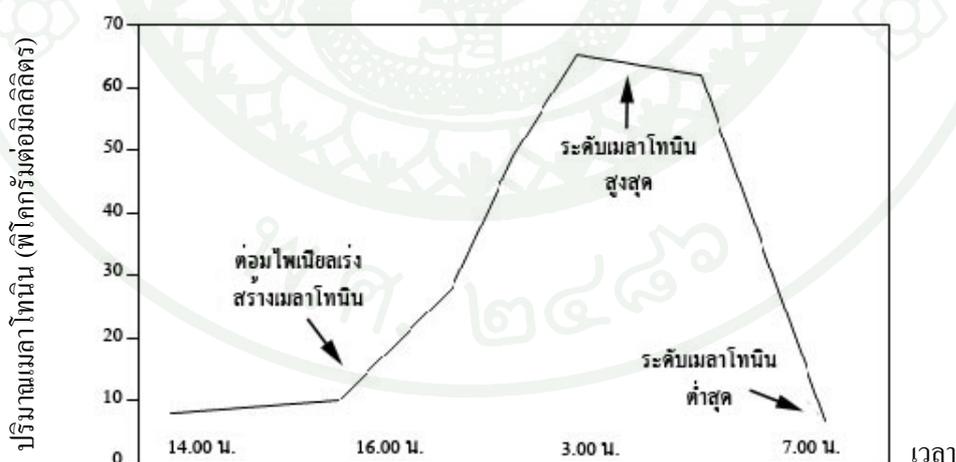


ภาพที่ 2 กระบวนการสังเคราะห์เมลาโทนินในสัตว์มีกระดูกสันหลัง

ที่มา: ดัดแปลงจาก Harumi and Matsushima (2000)

กรดอะมิโนทริปโตเฟนถูก hydroxylate เป็น 5-hydroxytryptophan (HTrp) โดยเอนไซม์ tryptophan hydroxylase (TH) และ HTrp ถูก decarboxylate ได้ซีโรโทนิน (serotonin/5HT) โดยมีเอนไซม์ aromatic L-amino acid decarboxylase (AAAD) เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา จากนั้น 5HT ถูก deaminate ได้เป็น N-acetylserotonin (NAS) โดยเอนไซม์ N-acetyltransferase (NAT หรือ SNAT) เอนไซม์ NAT มีบทบาทสำคัญในการควบคุมการสังเคราะห์เมลาโทนิน ขั้นตอนสุดท้ายเป็นการเปลี่ยน NAS เป็นเมลาโทนิน (Mel) โดยมีเอนไซม์ hydroxyindole-O-methyltransferase (HIOMT) เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา (Axelrod, 1974; Harumi and Matsushima, 2000) เมลาโทนินที่ได้จากกระบวนการสังเคราะห์จะหลั่งเข้าสู่กระแสเลือดและเดินทางไปยังเซลล์เป้าหมายและจะออกฤทธิ์โดยการจับกับตัวรับเมลาโทนิน (melatonin receptor) ตามบริเวณต่างๆ ของร่างกาย

Reiter (1991) ได้แสดงระดับเมลาโทนินในกระแสเลือดของคนที่ถูกสร้างขึ้นภายในเวลา 24 ชั่วโมงดังภาพที่ 3 ซึ่งแสดงให้เห็นว่าการสังเคราะห์เมลาโทนินเกิดขึ้นมากที่สุดในเวลากลางคืน โดยเริ่มสังเคราะห์ตั้งแต่เวลา 21.00 - 22.00 น. การสังเคราะห์จะเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ จนกระทั่งถึงเวลาประมาณ 2.00 - 4.00 น. โดยมีปริมาณมากที่สุดประมาณ 60-70 พิโคกรัม จากนั้นการสังเคราะห์จะลดลงเรื่อยๆ จนกระทั่งเวลา 7.00 - 9.00 น. จึงหยุดสร้าง โดยที่ปริมาณเมลาโทนินต่ำสุดเท่ากับ 10 พิโคกรัม

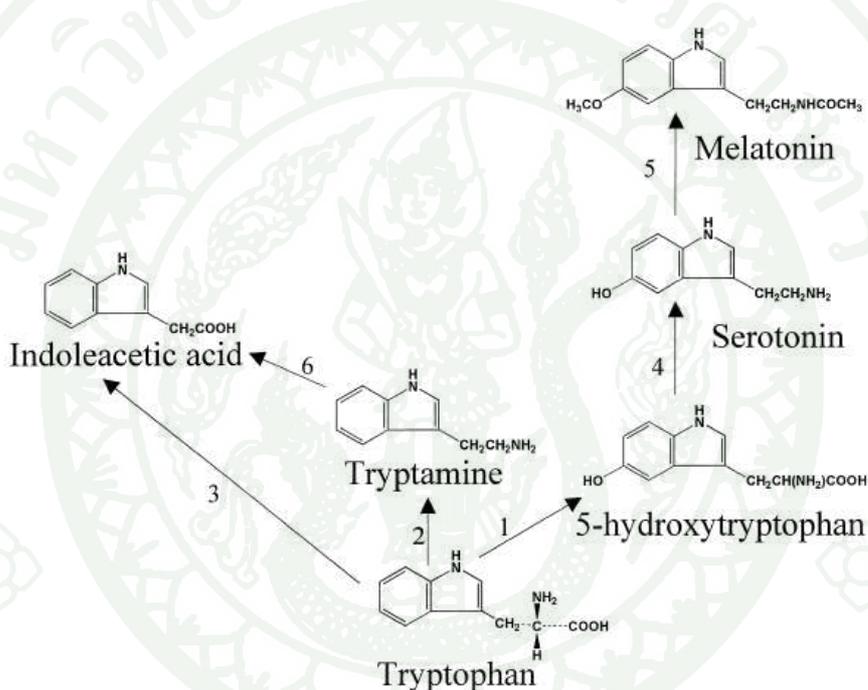


ภาพที่ 3 ปริมาณเมลาโทนินในกระแสเลือดของคนใน 24 ชั่วโมง

ที่มา: คัดแปลงจาก Reiter (1991)

Arendt (2000) รายงานว่าระดับเมลาโทนินที่พบในต่อมไพเนียลและกระแสเลือดของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมมีระดับขึ้นลงตามระยะเวลากลางวันและกลางคืนหรือจังหวะรอบวัน โดยเมลาโทนินมีปริมาณสูงในเวลากลางคืนแต่มีปริมาณต่ำในเวลากลางวัน

Karasek and Winczyk (2006) กล่าวว่า การสังเคราะห์เมลาโทนินเป็นไปตามจังหวะรอบวัน โดยการสังเคราะห์จะเกิดขึ้นประมาณ 80% ในเวลากลางคืน ซึ่งลักษณะดังกล่าวนี้เกิดขึ้นในสิ่งมีชีวิตในอาณาจักรสัตว์รวมทั้งคน อาณาจักรพืชและสิ่งมีชีวิตเซลล์เดียว



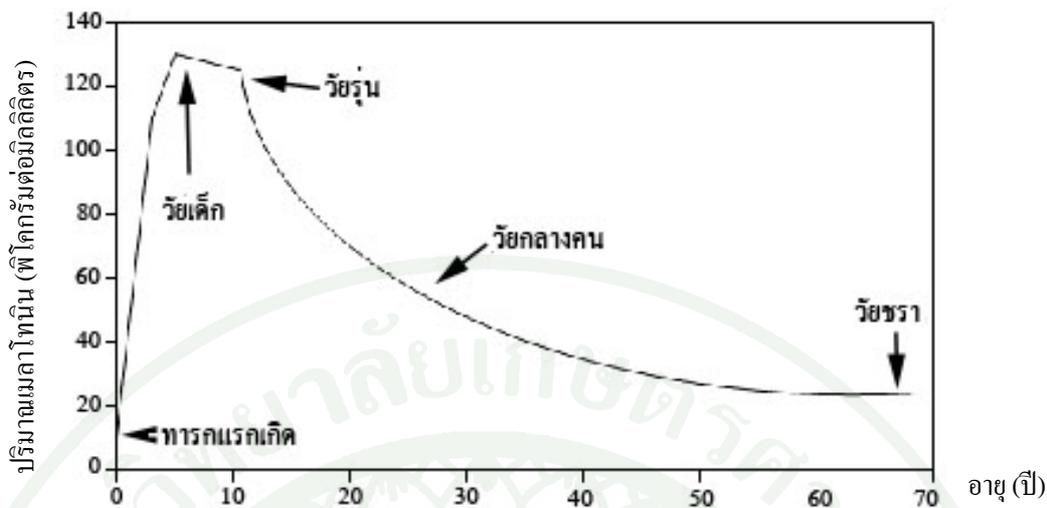
ภาพที่ 4 กระบวนการสังเคราะห์เมลาโทนินในพืช เอนไซม์ที่เกี่ยวข้อง ได้แก่ เอนไซม์ tryptophan 5-hydroxylase (1) เอนไซม์ tryptophan decarboxylase (2) เอนไซม์ L-tryptophan transaminase ร่วมกับเอนไซม์ decarboxylase (3) เอนไซม์ L-amino acid decarboxylase (4) เอนไซม์ serotonin *N*-acetyltransferase (5) และเอนไซม์ tryptamine deaminase (6)

ที่มา: Murch *et al.* (2000)

Murch *et al.* (2000) ได้ศึกษาการสังเคราะห์เมลาโทนินในต้นอ่อนของ St. John's Wort (*Hypericum perforatum* L.) ซึ่งเป็นพืชสมุนไพรที่ใช้ในการรักษาอาการป่วยที่เกี่ยวข้องกับระบบประสาท ผู้วิจัยได้ใช้คาร์บอน-14 ในการทำ radiolabel แก่กรดอะมิโนทริปโตเฟนที่ใช้เป็นส่วนผสมในอาหารเลี้ยงต้นอ่อน จากการทดลองพบว่าใน โครงสร้างของเมลาโทนินและซีโรโทนิน มีคาร์บอน-14 ที่มาจากกรดอะมิโนทริปโตเฟนซึ่งมาจากการทำ radiolabel นอกจากนี้ยังพบ คาร์บอน-14 ใน โครงสร้างของกรด indoleacetic (IAA) โดยกระบวนการสังเคราะห์เมลาโทนินที่เกิดในพืชแสดงดังภาพที่ 4 สำหรับแหล่งสะสมเมลาโทนินในพืชและการลำเลียงเมลาโทนินไปยัง ส่วนต่างๆ ของพืชยังคงขาดข้อมูลที่ใช้ในการสนับสนุน ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าเมลาโทนินที่สังเคราะห์ได้ อาจมีการลำเลียงไปยังส่วนต่างๆ ของพืชโดยใช้ระบบเดียวกับการลำเลียงน้ำและแร่ธาตุ

3. การเปลี่ยนแปลงของปริมาณเมลาโทนินในช่วงอายุต่างๆ

ปริมาณเมลาโทนินมีการเปลี่ยนแปลงไปตามช่วงอายุซึ่งแสดงดังภาพที่ 5 โดยในช่วงที่ทารกอยู่ในครรภ์จะได้รับเมลาโทนินจากมารดาผ่านทางรกจนกระทั่งหลังคลอดประมาณ 6 - 8 สัปดาห์ ทารกจะเริ่มสร้างเมลาโทนินได้เองแต่มีปริมาณต่ำมาก เมื่อทารกอายุประมาณ 21 - 24 สัปดาห์จะสามารถสร้างเมลาโทนินได้ในระดับที่สูงขึ้น เนื่องจากต่อมไพเนียลต้องใช้เวลาในการพัฒนาเต็มที่ประมาณ 3 เดือน หลังจากนั้นปริมาณเมลาโทนินจะสูงขึ้นและสูงที่สุดเมื่ออายุประมาณ 4 - 6 ปี จากนั้นปริมาณเมลาโทนินจะลดต่ำลง เมื่อเข้าสู่วัยเจริญพันธุ์ปริมาณเมลาโทนินจะลดลงอย่างรวดเร็วซึ่งเป็นการบอกว่าร่างกายพร้อมที่จะเข้าสู่วัยเจริญพันธุ์ และเมื่อเข้าสู่วัยกลางคนคืออายุประมาณ 35 - 40 ปี ปริมาณเมลาโทนินจะลดเหลือครึ่งหนึ่งของปริมาณที่พบในวัยเด็กและลดลงเรื่อยๆ จนกระทั่งมีอายุ 70 - 80 ปี นอกจากนี้ยังพบว่าเมื่ออายุเพิ่มขึ้นความแตกต่างระหว่างปริมาณเมลาโทนินในช่วงเวลากลางวันและกลางคืนมีแนวโน้มว่าลดลง (Reiter, 1986; Kennaway *et al.*, 1992; Karasek, 2004)



ภาพที่ 5 การเปลี่ยนแปลงของปริมาณเมลาโทนินในกระแสเลือดของคนช่วงอายุต่างๆ

ที่มา: คัดแปลงจาก Reiter (1986)

4. บทบาทของเมลาโทนิน

4.1 ในสัตว์

4.1.1 การนอนหลับ

Lerner and Case (1960) เป็นผู้วิจัยกลุ่มแรกที่พบบทบาทของเมลาโทนินต่อการนอนหลับโดยบังเอิญ โดยพบว่าทำให้เมลาโทนินแก่ผู้ป่วยเพื่อรักษาโรคผิวหนังมีผลข้างเคียงทำให้ผู้ป่วยเกิดอาการง่วงนอน หลังจากนั้นจึงมีการศึกษาบทบาทของเมลาโทนินต่อการนอนหลับในเวลาต่อมา Arendt *et al.* (1984) ได้ทำการทดสอบผลของเมลาโทนินต่ออาการเมาเวลาจากการเดินทางโดยเครื่องบิน (jet lag) พบว่าอาสาสมัครที่ได้รับเมลาโทนินไม่มีอาการเมาเวลาทุกคน ขณะที่อาสาสมัครที่ไม่ได้รับเมลาโทนินเกิดอาการดังกล่าวประมาณ 60% นอกจากนี้ Haimov *et al.* (1994) พบว่าผู้ป่วยสูงอายุที่มีอาการนอนไม่หลับ (insomnia) มีปริมาณเมลาโทนินต่ำกว่าผู้ป่วยสูงอายุที่ไม่มีอาการดังกล่าว โดยทำการวัดปริมาณ 6-sulfatoxymelatonin ในปัสสาวะซึ่งเป็นสารที่เกิดจากการสลายตัวของเมลาโทนิน หลังจากนั้นจึงได้มีการใช้เมลาโทนินเป็นยานอนหลับ โดย Hughes *et al.* (1998) ได้ทำการเปรียบเทียบเมลาโทนินกับยากลุ่ม benzodiazepine ที่มีชื่อว่า

temazepam ซึ่งเป็นยานอนหลับชนิดหนึ่ง โดยใช้กับอาสาสมัครที่มีสุขภาพแข็งแรง พบว่าทั้งเมลาโทนิและ temazepam สามารถทำให้อาสาสมัครนอนหลับเร็วขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มอาสาสมัครที่ได้รับยาหลอก ในปี ค.ศ. 2001 Siegrist *et al.* รายงานถึงการให้เมลาโทนิขนาด 3 มิลลิกรัมเป็นระยะเวลา 6 เดือนแก่ผู้สูงอายุที่มีอาการนอนไม่หลับ พบว่าเมลาโทนิสามารถช่วยเพิ่มคุณภาพการนอนหลับ โดยเพิ่มเวลาในการนอนหลับและลดเวลาก่อนการนอนหลับและจำนวนครั้งในการตื่นระหว่างการนอนหลับ รวมทั้งยังช่วยทำให้ความสามารถในการทำงานในวันรุ่งขึ้นดีขึ้นด้วย ดังนั้นเมลาโทนิจึงสามารถใช้เป็นยานอนหลับในผู้สูงอายุที่มีอาการนอนไม่หลับได้ นอกจากนี้ Buscemi *et al.* (2005) ยังรายงานว่าการใช้เมลาโทนิเพื่อรักษาอาการนอนไม่หลับ (sleep disorder) จะไม่มีประสิทธิภาพเมื่อใช้รักษาในระยะเวลาสั้น (ไม่เกิน 4 สัปดาห์) อย่างไรก็ตามการใช้เมลาโทนิในระยะเวลาสั้นสามารถช่วยรักษาอาการนอนหลับช้า (delayed sleep phase syndrome) และมีความปลอดภัยหากใช้รักษาภายในช่วงเวลาไม่เกิน 3 เดือน

4.1.2 การควบคุมระบบเจริญพันธุ์และการสืบพันธุ์

Hoffman and Reiter (1966) ทำการศึกษาผลของเมลาโทนิต่อระบบสืบพันธุ์ โดยนำหนูทดลองไปเลี้ยงในที่มืดและเย็นเป็นเวลา 2-3 สัปดาห์ พบว่าขนาดอวัยวะของหนูทดลองลดลงอย่างชัดเจน จากนั้นผู้วิจัยได้นำหนูทดลองมาตัดต่อมไพเนียลซึ่งเป็นอวัยวะหลักที่ผลิตเมลาโทนิ และนำหนูทดลองไปเลี้ยงไว้ในที่มืด เนื่องจากเมลาโทนิจากต่อมไพเนียลจะหลั่งออกมามากในเวลากลางคืนหรือเวลาที่ไม่มีแสงสว่าง เมื่อเวลาผ่านไป 2-3 สัปดาห์ พบว่าขนาดอวัยวะของหนูทดลองที่ถูกตัดต่อมไพเนียลออกยังคงเท่าเดิม จึงแสดงให้เห็นว่าเมลาโทนิมีผลต่ออวัยวะสืบพันธุ์ซึ่งอาจมีผลต่อการยับยั้งระบบสืบพันธุ์ (antigonadotropic agent) ได้ ในปี ค.ศ. 1990 Karasek *et al.* ได้ศึกษาผลของเมลาโทนิในผู้ชายและพบว่าผู้ชายที่มีจำนวนตัวสุงิ์น้อยกว่าปกติจะมีปริมาณเมลาโทนิและมีฮอร์โมนเพศสูง ดังนั้นการมีเมลาโทนิสูงอาจมีผลต่ออวัยวะและการเพิ่มของฮอร์โมนเพศ ขณะที่ Okatani and Sagara (1994) ได้ศึกษาบทบาทของเมลาโทนิต่อระบบสืบพันธุ์ของผู้หญิงพบว่าผู้หญิงที่มีความเครียดหรือมีฮอร์โมนเพศต่ำจะมีปริมาณเมลาโทนิสูงกว่าปกติและพบว่าผู้หญิงที่ไม่มีประจำเดือนจะมีปริมาณเมลาโทนิแปรผกผันกับปริมาณฮอร์โมนเอสโตรเจนซึ่งเป็นฮอร์โมนที่เกี่ยวข้องกับความพร้อมในการสืบพันธุ์ ดังนั้นจึงมีการนำเมลาโทนิมาประยุกต์เป็นยาคุมกำเนิดที่เรียกว่า B-oval ซึ่งเป็นยาคุมกำเนิดขนานแรกที่ไม่มีส่วนประกอบของฮอร์โมนเอสโตรเจนซึ่งเป็นฮอร์โมนที่ทำให้เกิดอาการปวดศีรษะและอาจเป็นสาเหตุของการเป็นโรคมะเร็ง โดยยาคุมกำเนิดดังกล่าวมีส่วนผสมของเมลาโทนิประมาณ 75 มิลลิกรัม และฮอร์โมน

โพรเจสเทอโรน 0.3 มิลลิกรัม (Cohen *et al.*, 1995) อย่างไรก็ตามในปี ค.ศ. 2002 Malpoux *et al.* รายงานถึงบทบาทของเมลาโทนินต่อระบบสืบพันธุ์ของแกะ โดยพบว่าเมลาโทนินสามารถกระตุ้นระบบสืบพันธุ์ได้ซึ่งรายงานฉบับนี้มีความแตกต่างจากงานวิจัยที่ผ่านมา ซึ่งอาจแสดงให้เห็นว่าบทบาทของเมลาโทนินต่อระบบสืบพันธุ์นั้นอาจขึ้นกับชนิดของสัตว์ สิ่งแวดล้อมที่สัตว์อาศัยอยู่ ช่วงเวลาที่ได้รับเมลาโทนินและอายุของสัตว์

4.1.3 ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ

อนุมูลอิสระ คือ อะตอม โมเลกุลหรือสารประกอบที่มีอิเล็กตรอนเดี่ยวอยู่ในออร์บิทัลวงนอกสุด มีความไวสูงในการเกิดปฏิกิริยากับ โมเลกุลอื่นๆ อนุมูลอิสระเป็นปัจจัยที่ทำให้เกิดโรคและทำให้โรคมีพัฒนาการอย่างรวดเร็วและมีความรุนแรงยิ่งขึ้น นอกจากนี้ยังเกี่ยวข้องกับกระบวนการอักเสบ ความเสียหายที่เกิดขึ้นเนื่องมาจากความไม่สมดุลของอนุมูลอิสระและสารต้านอนุมูลอิสระในร่างกาย ซึ่งสารต้านอนุมูลอิสระเป็นสารที่สามารถทำปฏิกิริยากับอนุมูลอิสระโดยตรงเพื่อกำจัดอนุมูลอิสระให้หมดไป หรือหยุดปฏิกิริยาถูกโซ่ไม่ให้เกิดต่อ (โอภา และคณะ, 2537)

ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของเมลาโทนินถูกค้นพบครั้งแรกในปี ค.ศ. 1993 โดย Tan *et al.* ซึ่งรายงานว่าเมลาโทนินมีความสามารถในการกำจัดอนุมูล hydroxyl (OH) หลังจากนั้นมียุทธศาสตร์หลายฉบับที่ยืนยันถึงความสามารถในการป้องกันความเสียหายจากอนุมูลอิสระต่างๆ ดังแสดงในตารางที่ 1 รวมทั้งความสามารถในการยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาเปอร์ออกซิเดชันของไขมัน (lipid peroxidation) (Longoni *et al.*, 1998; Gulcin *et al.*, 2002) นอกจากนี้เมลาโทนินยังช่วยกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการต้านอนุมูลอิสระ (antioxidative enzyme) ได้แก่ เอนไซม์ superoxide dismutase (SOD) ซึ่งทำหน้าที่เปลี่ยนอนุมูล superoxide (O_2^-) ไปเป็น hydrogenperoxide (H_2O_2) ซึ่งมีอันตรายน้อยลง สำหรับเอนไซม์ glutathione peroxidase ทำหน้าที่เปลี่ยน H_2O_2 เป็นน้ำ นอกจากนี้เมลาโทนินยังช่วยกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ glutathione reductase และเอนไซม์ catalase (Barlow-Walden *et al.*, 1995; Antolin *et al.*, 1996; Pablos *et al.*, 1998; Urata *et al.*, 1999) ในปี ค.ศ. 2006 Anisimov กล่าวว่าเมลาโทนินสามารถเพิ่มระดับกลูตาไทโอน (glutathione) ซึ่งเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่พบในเซลล์ โดยเมลาโทนินช่วยกระตุ้นเอนไซม์ gamma-glutamylcysteine synthase ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ควบคุมอัตราการสร้างกลูตาไทโอน และเมลาโทนินยังช่วยเพิ่มประสิทธิภาพของกระบวนการถ่ายโอน

อิเล็กตรอน โดยจะลดการสูญเสียอิเล็กตรอนและการเกิดอนุมูลอิสระ รวมทั้งยังช่วยลดการเกิด 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นเมื่อมีการทำลายดีเอ็นเอ

ตารางที่ 1 ผลของเมลาโทนินที่มีต่ออนุมูลอิสระและเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการต้านอนุมูลอิสระ

อนุมูลอิสระ/เอนไซม์	ผลที่เกิดขึ้น
กลุ่ม reactive oxygen species	
Hydroxyl radical ($\cdot\text{OH}$)	↓
Singlet oxygen (O_2)	↓
Hydrogen peroxide (H_2O_2)	↓
Nitric oxide (NO)	↓
Peroxyl radical ($\text{LOO}\cdot$)	↓
ONOO^-	↓
กลุ่มเอนไซม์ในระบบต้านการเกิดอนุมูลอิสระ	
Cu, Zn- superoxide dismutase (SOD)	↑
Catalase	↑
Glutathione peroxidase	↑
กลุ่ม prooxidant enzymes	
Nitric oxide synthase	↓

หมายเหตุ ↑ คือ กระตุ้นการทำงาน และ ↓ คือ ยับยั้งการเกิดหรือการทำงาน

ที่มา: คัดแปลงจาก Anisimov (2006)

Qi *et al.* (2001) เปรียบเทียบความสามารถของเมลาโทนินกับสารต้านอนุมูลอิสระชนิดอื่น เช่น วิตามินอีหรือ α -tocopherol และ ascorbate พบว่าเมลาโทนินมีประสิทธิภาพในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระสูงกว่าประมาณ 60-70 เท่า เนื่องจากเมลาโทนินมีคุณลักษณะ

hydrophilic และ lipophilic รวมอยู่ในโครงสร้างจึงสามารถผ่านเข้าออกเยื่อหุ้มระหว่างเซลล์ได้ง่าย สารตัวอื่น

Poeggeler *et al.* (2002) ได้ศึกษาคุณสมบัติของเมลาโทนินในการกำจัดอนุมูลอิสระ ได้แก่ อนุมูล $ABTS^+$ และ $\cdot OH$ โดยเปรียบเทียบกับสารที่มีโครงสร้างคล้ายกับเมลาโทนิน ได้แก่ tryptamine *N*-acetyltryptamine serotonin *N*-acetylserotonin และ 5-methoxytryptamine พบว่าสารที่มีกลุ่ม *O*-methyl และ *N*-acetyl อยู่ที่โครงสร้างโมเลกุลเช่นเดียวกับเมลาโทนินจะมีความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระมากกว่าสารที่ไม่มีกลุ่มดังกล่าวบนโครงสร้าง เนื่องจากกลุ่ม *O*-methyl มีความสำคัญในการป้องกันการเกิดสารตัวกลาง (intermediate) ในการเกิดอนุมูลอิสระที่มีออกซิเจนเป็นศูนย์กลาง (O-centered radical intermediates) และอาจช่วยลดอนุมูลอิสระที่มีคาร์บอนเป็นศูนย์กลาง (C-centered radicals) ขณะเดียวกันกลุ่ม *N*-acetyl ยังสามารถป้องกันการถูกทำลายจากเอนไซม์ monoamine oxidase

Tan *et al.* (2003) รายงานว่าเมลาโทนินมีรูปแบบ (profile) ในการกำจัดอนุมูลอิสระ 2,2'-azino-bis-2-ethylbenz-thiazoline-6-sulfonic acid ($ABTS^+$) แตกต่างจากสารต้านอนุมูลอิสระทั่วไป (กลูตาไทโอน วิตามินซี โทรอลอกซ์ NADH และ NADPH) โดยเมลาโทนินสามารถกำจัดอนุมูล $ABTS^+$ ได้ดี โมเลกุล ขณะที่สารต้านอนุมูลอิสระทั่วไปสามารถกำจัดอนุมูล $ABTS^+$ ได้เพียงหนึ่งโมเลกุลหรือน้อยกว่า นอกจากนี้เมลาโทนินยังมีคุณสมบัติในการออกฤทธิ์เสริม (synergistic effect) ร่วมกับสารต้านอนุมูลอิสระทั่วไป ได้แก่ โทรอลอกซ์และวิตามินซี

4.2 ในพืช

4.2.1 การควบคุมจังหวะรอบวันและปฏิกิริยาที่เกี่ยวข้องกับแสง

เมลาโทนินพบได้ในพืชหลายชนิดตั้งแต่สาหร่ายจนกระทั่งพืชชั้นสูง โดยพบว่าพืชมีปริมาณเมลาโทนินสูงในเวลากลางคืนแต่มีปริมาณต่ำในเวลากลางวันเหมือนกับที่พบในสัตว์ (Poeggeler *et al.*, 1991; Wolf *et al.*, 2001) ในทางตรงกันข้าม Tan *et al.* (2007) รายงานว่าเมลาโทนินอาจจะไม่ได้แสดงบทบาทเป็นสัญญาณทางเคมีของช่วงเวลากลางคืน (chemical signal of darkness) เหมือนที่พบในสัตว์ แต่อาจมีความเกี่ยวข้องกับกระบวนการสังเคราะห์แสงและการป้องกันพืชจากอันตรายที่เกิดจากแสงมากกว่า เนื่องจากเมลาโทนินใน water hyacinth (*Eichhornia*

crassipe) มีปริมาณสูงในช่วงหัวค่ำและสูงสุดในเวลา 20.00 น. ซึ่งอาจเกิดจากการสะสมหลังจากที่มีการสร้างในเวลากลางวัน

Balzer and Hardeland (1991) รายงานว่าเมลาโทนินและ 5-methoxytryptamine สามารถควบคุมการสร้างซิสต์ (ภาวะที่มีการห่อหุ้มอยู่ในถุง) ที่ควบคุมโดยช่วงระยะเวลาที่ได้รับแสง (photoperiodic controlled encystment) ใน *Gonyaulax polyedra* ซึ่งเป็นสาหร่ายเซลล์เดี่ยวนอกจากนี้ในปี ค.ศ 1996 Hardeland and Fuhrberg ยังพบว่าเมลาโทนินมีผลต่อจังหวะรอบวันของการเกิดแสง bioluminescence (circadian bioluminescence rhythm) ของสาหร่ายชนิดเดียวกันนี้

Hardeland (1994) กล่าวว่าทำให้เมลาโทนินแก่พืชน้ำ ได้แก่ *Spirodela polyrhiza* *Lemma minor* และ *Lemma trisulca* ไม่สามารถเหนี่ยวนำให้พืชออกดอกได้ ต่อมาในปี ค.ศ. 1997 Van Tassel ได้ศึกษาอิทธิพลของเมลาโทนินต่อการออกดอกของ *Pharbitis nil* ซึ่งเป็นพืชที่ออกดอกได้เมื่อมีระยะเวลาของกลางวันสั้นหรือเรียกว่า short day plant พบว่าเมลาโทนินไม่มีผลต่อการออกดอกของพืชชนิดนี้ เช่นเดียวกับ *Chenopodium murale* ซึ่งเป็นพืชที่ออกดอกได้เมื่อมีระยะเวลาของกลางวันยาวหรือ long day plant (Wolf, 2000) อย่างไรก็ตามเมลาโทนินมีผลในการชะลอการออกดอกของ *Arabidopsis thaliana* ซึ่งเป็น long day plant (Kolář, 2003)

4.2.2 ความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ

เมลาโทนินมีประสิทธิภาพสูงในการเป็นสารกำจัดหรือต้านอนุมูลอิสระที่เกิดในเนื้อเยื่อพืชซึ่งเกิดจากความเครียดในสิ่งแวดล้อม (environmental stress) นอกจากนี้ยังแสดงบทบาทเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นในช่วงการเจริญของผล โดยในปี ค.ศ. 1995 Dubble *et al.* รายงานว่าผลมะเขือเทศแก่มีปริมาณเมลาโทนินมากกว่าในผลอ่อนซึ่งน่าจะมีความเกี่ยวข้องกับการป้องกันอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นระหว่างการสุก และยังพบอีกว่ามะเขือเทศทั่วไป (*Lycopersicon esculentum* Mill) ซึ่งมีความสามารถในการต้านทานโอโซนสูงมีปริมาณเมลาโทนินมากกว่ามะเขือเทศป่า (*Lycopersicon pimpinellifolium* L. Mill) ถึง 5 เท่า และจากการที่เมลาโทนินมีคุณสมบัติ lipophilic และมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระจึงทำให้เมลาโทนินสามารถป้องกันการเกิดปฏิกิริยาเปอร์ออกซิเดชันของไขมันในเมล็ดซึ่งส่งผลต่อความอยู่รอดของเมล็ดพืช นอกจากนี้เมลาโทนินยังสามารถกระตุ้นให้เกิดห่วงโซ่การขนส่งของอิเล็กตรอนและลดการรั่วของอิเล็กตรอนภายในเมมเบรนของไมโทคอนเดรียซึ่งจะจำกัดการรวมตัวกับออกซิเจนที่จะกลายเป็น

อนุมูลอิสระต่อไป การสะสมของเมลานโทนินในเนื้อเยื่อสืบพันธุ์ เมล็ดและผลอาจช่วยป้องกันเนื้อเยื่อจากการทำลายด้วยปฏิกิริยาออกซิเดชันที่มีสาเหตุมาจากความแห้งแล้ง ความหนาวเย็น ความร้อน แสงอัลตราไวโอเล็ตและสารพิษจากสิ่งแวดล้อม (Murch and Saxena, 2002) ดังเช่น water hyacinth ซึ่งเป็นพืชที่มีเมลานโทนินในปริมาณสูงพบว่าพืชชนิดนี้มีความสามารถทนต่อสภาวะแวดล้อมที่เป็นพิษ (Tan *et al.*, 2007)

4.2.3 ควบคุมการเจริญและการพัฒนาของพืช

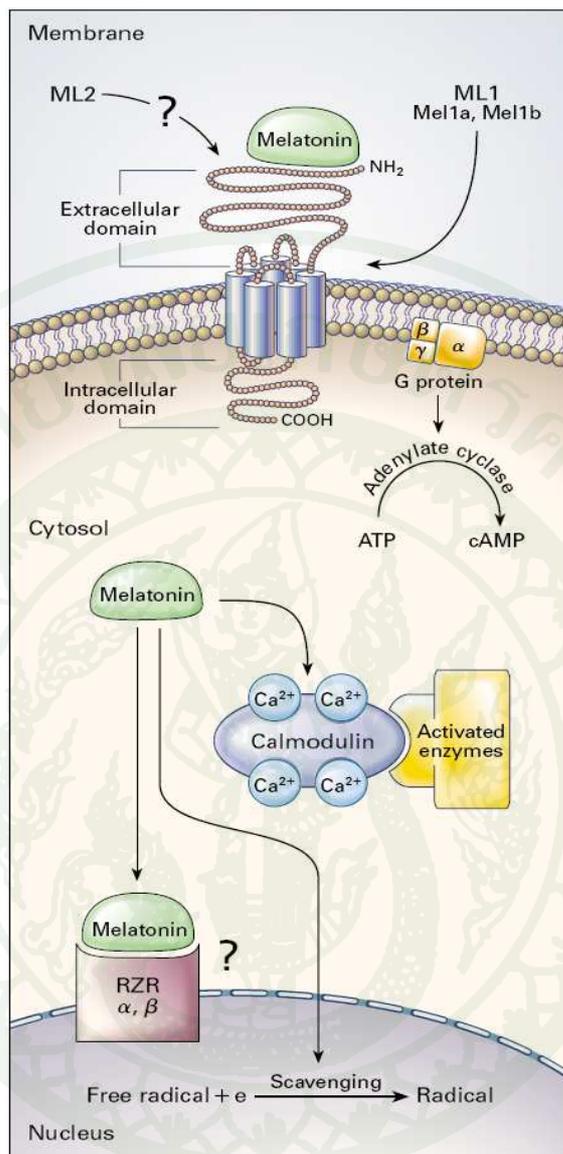
เมลานโทนินช่วยเพิ่ม birefringence และเพิ่มจำนวน mitotic spindle ในเซลล์ของเมล็ดลิลลี่ (lilly) (Jackson, 1969) และสามารถทำลาย mitosis ในเซลล์รากหัวหอม (Banerjee and Margulis, 1973) ต่อมาได้มีการทดลองกับ St. John's wort พบว่าเมลานโทนินมีส่วนควบคุมการเจริญเติบโต (Murch *et al.*, 2001)

การศึกษาการเกิดรากที่เหนียวนำโดยออกซิน (auxin) และการเกิดหน่อที่เหนียวนำโดยไซโตคินิน (cytokinin) ของต้น *Hypericum perforatum* L. พบว่าการเพิ่มของเมลานโทนินสามารถเหนียวนำให้รากเกิดการเจริญเติบโต ขณะที่ไซโรโทนินจะทำให้เกิดการสร้างหน่อ แต่อย่างไรก็ตามการเกิดรากจากการเหนียวนำของออกซินจะถูกยับยั้งเมื่อมีการขนส่งของตัวยับยั้งไซโรโทนินและเมลานโทนิน ส่วนการเกิดหน่อจากการเหนียวนำของไซโตคินินจะถูกกระตุ้นโดยตัวยับยั้งการเปลี่ยนไซโรโทนินไปเป็นเมลานโทนิน (Murch and Saxena, 2002)

นอกจากนี้ เมลานโทนินสามารถกระตุ้นการเจริญของลำต้นใต้ใบ (hypocotyl) ของต้น *Lupinus albus* เหมือนกับกรด indole-3-acetic (IAA) (Hernández-Ruiz *et al.*, 2004)

5. กลไกการทำงานของเมลานโทนินในระดับเซลล์

ปิยะรัตน์ (2545) กล่าวว่าเมลานโทนินที่สังเคราะห์ขึ้น จะไม่ได้เก็บไว้ภายในอวัยวะที่สร้างเท่านั้น แต่จะหลั่งเข้ากระแสเลือดหรือของเหลวในสมองและไขสันหลังเพื่อไปยังเซลล์เป้าหมายและออกฤทธิ์โดยจับกับตัวรับเมลานโทนิน (melatonin receptor) ซึ่งมีอยู่ตามบริเวณต่างๆ ของร่างกาย หลังจากนั้นเมลานโทนินเปลี่ยนเป็น 6-hydroxymelatonin conjugate และขับถ่ายออกจากร่างกายทางปัสสาวะ โดยกลไกการทำงานของเมลานโทนินแสดงดังภาพที่ 6



ภาพที่ 6 กลไกการทำงานและตัวรับของเมลาโทนิน (ATP คือ adenosine triphosphate
cAMP คือ cyclic adenosine monophosphate และ RZR คือ retinoid Z receptor)

ที่มา: Brzezinski, 1997

เมมเบรนของเซลล์มีบริเวณที่สามารถจับกับเมลาโทนิน 2 แห่ง คือบริเวณที่จับกับตัวรับเมลาโทนินชนิด ML1 ซึ่งมีความจำเพาะกับบริเวณเป้าหมายสูงและ ML2 ซึ่งมีความจำเพาะกับบริเวณเป้าหมายต่ำกว่า (Brzezinski, 1997)

ตัวรับ ML1 สามารถแบ่งย่อยได้ 2 ชนิด คือ Mel1a และ Mel1b การกระตุ้นการทำงานของตัวรับ ML1 จะเกิดขึ้นเมื่อมีการจับกับโปรตีน guanosine triphosphate (G-Protein) ซึ่งจะสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ adenylyate cyclase ที่บริเวณเซลล์เป้าหมาย โดยเอนไซม์ชนิดนี้ทำหน้าที่ในการเปลี่ยน ATP ไปเป็น cAMP ตัวรับ ML1 มีความเกี่ยวข้องกับการทำงานของเรตินา การควบคุมจังหวะรอบวันและการสืบพันธุ์ สำหรับตัวรับ ML2 เมื่อจับกับบริเวณเป้าหมายจะมีผลกระตุ้นการไฮโดรไลซิสของ phosphoinositide แต่อย่างไรก็ตามหน้าที่ของตัวรับชนิดนี้ยังคงไม่มีการพิสูจน์อย่างแน่ชัด (Brzezinski, 1997)

เมลาโท닌สามารถจับกับ calmodulin ซึ่งเป็นฮอร์โมนที่มีผลต่อการส่งสัญญาณที่เกี่ยวข้องกับไอออนแคลเซียมซึ่งอยู่ในไซโตพลาสซึมของเซลล์ โดยจะทำปฏิกิริยากับเอนไซม์เป้าหมาย เช่น adenylyate cyclase phosphodiesterase และโปรตีนโครงสร้าง (structural protein) (Brzezinski, 1997)

เมลาโท닌ยังมีลักษณะเป็นลิแกนด์สำหรับตัวรับในกลุ่ม nuclear retinoid Z (RZR) 2 ตัว คือ ตัวรับแอลฟา (α) และบีต้า (β) ซึ่งเกี่ยวข้องกับการส่งสัญญาณภายในนิวเคลียสโดยฮอร์โมน นอกเหนือจากกลไกการทำงานของเมลาโท닌โดยการอาศัยตัวรับแล้ว เมลาโท닌ยังสามารถแสดงบทบาทในการเป็นตัวกำจัดอนุมูลอิสระ โดยการให้อิเล็กตรอนแก่อนุมูลอิสระได้ (Brzezinski, 1997)

6. ผลข้างเคียงและพิษของเมลาโท닌

ผลของเมลาโท닌ที่มีต่อร่างกายขึ้นกับปริมาณและเวลาที่รับประทาน อายุและเพศของผู้รับประทาน โดยผลของการใช้เมลาโท닌ในระยะยาวและการเกิดปฏิกิริยาของเมลาโท닌ร่วมกับยาชนิดอื่นยังไม่ปรากฏแน่ชัด เมื่อทำการฉีดเมลาโท닌ให้แก่หนูทดลองในปริมาณ 800 มิลลิกรัม พบว่าไม่มีหนูทดลองตาย นอกจากนี้ได้มีการฉีดเมลาโท닌ปริมาณ 200 มิลลิกรัมให้แก่คน ก็ยังไม่พบว่ามีผลข้างเคียง มีเพียงแต่เกิดอาการง่วงนอนเท่านั้น จึงทำให้นักวิทยาศาสตร์ไม่สามารถหาค่า LD₅₀ ของเมลาโท닌ได้ ซึ่งค่า LD₅₀ คือปริมาณของสารที่เป็นพิษต่อร่างกายที่ทำให้สัตว์ทดลองจำนวนหนึ่งตายไปครึ่งหนึ่งของจำนวนทั้งหมด ซึ่งแสดงให้เห็นว่ายังไม่สามารถหาปริมาณของเมลาโท닌ที่ทำให้เกิดการเสียชีวิตได้ สำหรับผลข้างเคียงของเมลาโท닌ที่เกิดขึ้นในช่วงเริ่มต้นที่สังเกตเห็น คือ ทำให้เกิดอาการอ่อนเพลียเมื่อดึนนอนตอนเช้า ในบางคนอาจเกิดอาการฝันร้าย แต่

อย่างไรก็ตามอาการเหล่านี้จะหายไปได้เอง (ปิยะรัตน์, 2545; บรรเจิด, 2546; ปานสิริ, 2552; Nowak and Zawilska, 1998)

7. การเตรียมตัวอย่างและการวิเคราะห์เมลานิน

7.1 เทคนิคที่ใช้ในการสกัด (extraction technique)

7.1.1 เทคนิค ultrasonic

เทคนิค ultrasonic เป็นเทคนิคที่อาศัยคลื่นเสียง (ultrasound) ที่มีความถี่มากกว่า 20 kHz ในการทำให้เซลล์แตก โดยเทคนิคนี้จะทำให้โมเลกุลของของแข็ง ของเหลวและก๊าซเกิดการสั่น คลื่นเสียงจะเคลื่อนที่ไปรอบๆ สารและเกิดวงจรรขยายตัว (expansion) และบีบตัว (compression) ของโมเลกุลในสารตัวกลาง โดยการขยายตัวจะทำให้โมเลกุลแยกออกจากกัน ส่วนการบีบตัวจะทำให้โมเลกุลบีบตัวเข้าหากัน ซึ่งการเกิดลักษณะเช่นนี้จะทำให้เกิดฟองอากาศและฟองอากาศจะขยายขนาดใหญ่ขึ้นและแตกในที่สุด สำหรับการใส่คลื่นเสียงในการสกัดจะทำให้ผนังเซลล์ถูกทำลายและสารภายในก็จะถูกปล่อยออกมา เนื่องจากคลื่นเสียงสามารถทำให้รูที่ผนังเซลล์มีขนาดใหญ่ขึ้น เซลล์มีการพองตัวและเกิดการถ่ายโอนมวลสาร (mass transfer) หลังจากนั้นผนังเซลล์จะแตก ซึ่งการทำให้เซลล์แตกและการถ่ายโอนมวลสารที่เกิดขึ้นนั้นเป็นปัจจัยหลักที่ทำให้เทคนิค ultrasonic เป็นเทคนิคที่มีประสิทธิภาพ ปัจจัยที่ควบคุมการทำงานของคลื่นเสียงได้แก่ ความถี่ ความดัน อุณหภูมิและเวลาที่ใช้ในการสกัด เมื่อเปรียบเทียบกับเทคนิคการสกัดแบบดั้งเดิมพบว่าเทคนิคนี้สามารถทำได้ง่าย รวดเร็วและมีราคาถูก นอกจากนี้ยังสามารถสกัดหลายตัวอย่างได้ในหนึ่งครั้ง แต่อย่างไรก็ตามเทคนิคนี้มีข้อเสียคือ เกิดความร้อนในระหว่างการสกัดซึ่งอาจทำให้สารที่ไม่ทนความร้อนเกิดการสลายตัว ดังนั้นจึงจำเป็นต้องทำการหล่อเย็นและในระหว่างการใส่ทำงานจะเกิดเสียงดังรบกวน (Mason *et al.*, 1996; Huie, 2002; Luque-Garcia and Luque de Casto, 2003; Cseke *et al.*, 2006; Wang and Weller, 2006)



ภาพที่ 7 การสกัดสารด้วยเทคนิค ultrasonic

เทคนิค ultrasonic เป็นเทคนิคที่นิยมใช้ในการสกัดเพื่อวิเคราะห์ปริมาณเมลาโทนินในตัวอย่าง โดยในปี ค.ศ. 1996 Vitale *et al.* ได้ทำการวิเคราะห์ปริมาณเมลาโทนินในต่อมไพเนียลของหนูโดยใช้เทคนิค ultrasonic ร่วมในการเตรียมตัวอย่างเพื่อทำการสกัด ต่อมาในปี ค.ศ. 2003 Pucci *et al.* ใช้เทคนิค ultrasonic ได้วิเคราะห์เมลาโทนินในยาเม็ดที่ใช้สูตรการผลิตในเชิงการค้า Chen *et al.* (2003) และ Cao *et al.* (2006) ได้ทำการสกัดเมลาโทนินในเนื้อเยื่อพืชโดยใช้เทคนิคนี้ นอกจากนี้ในปี ค.ศ. 2008 Arnao and Hernández-Ruiz ได้ใช้เทคนิค ultrasonic ร่วมกับวิธีการสกัดตัวอย่างโดยตรง (direct-sample extraction) เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการสกัดเมลาโทนินในเมล็ดของ lupin (*Lupinus albus* L.) และ barley (*Hordeum vulgare* L.)

7.1.2 เทคนิค homogenization

เทคนิค homogenization เป็นเทคนิคที่อาศัยแรงเฉือนอย่างรุนแรงในการทำให้สารที่เป็นของแข็งหรือของเหลวมีขนาดเล็กลง และยังสามารถใช้ในการผสมสารให้เป็นเนื้อเดียวกัน นอกจากนี้ได้มีการนำเทคนิคนี้ไปใช้ในการสกัดสารต่างๆ โดยแรงกลที่ใช้จะทำให้เซลล์แตก สารภายในเซลล์จึงสามารถออกมาออกเซลล์ได้

เทคนิค homogenization เป็นอีกเทคนิคหนึ่งที่นิยมใช้ในการสกัดเพื่อวิเคราะห์ปริมาณเมลาโทนิน โดยในปี ค.ศ. 2000 Manchester *et al.* ได้ใช้เทคนิคนี้ในการสกัดเมลาโทนินในเมล็ดพืช และในปีเดียวกัน Hamase *et al.* ใช้เทคนิคนี้ในการสกัดเมลาโทนินในต่อมไพเนียลของหนูเพื่อทำการศึกษาจังหวะรอบวันของเมลาโทนินในหนู ต่อมา Burkhardt *et al.* (2001) และ Van Tassel *et al.* (2001) ได้ใช้เทคนิค homogenization ในการสกัดเมลาโทนินในเซอร์รี่เปรี้ยวและมะเขือเทศ ตามลำดับ

7.2 เทคนิคที่ใช้ในการทำให้บริสุทธิ์ขึ้น (clean-up technique)

7.2.1 เทคนิค liquid-liquid extraction (LLE)

เทคนิค LLE เป็นเทคนิคที่ใช้ในการเตรียมตัวอย่างที่อาศัยการแบ่งส่วน (partition) ของสารในของเหลว 2 ชนิดที่ไม่ละลายซึ่งกันและกัน โดยทั่วไปของเหลว 2 ชนิดจะเป็นน้ำและสารละลายอินทรีย์ โดยที่สารจะมีการเคลื่อนที่ไปยังชั้นน้ำหรือชั้นสารละลายอินทรีย์ก็ได้ ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับคุณสมบัติในการละลายหรือการกระจายของสาร (Mitra, 2003)

ปัจจัยของของเหลวที่มีผลต่อการกระจายของสาร ได้แก่ ชนิด น้ำหนักโมเลกุล ความเข้มข้นของเฟส ชนิดและความเข้มข้นของเกลือ ค่า pH และอุณหภูมิ (เพ็ญแข, 2541)

ข้อดีของเทคนิค LLE คือ ช่วยกำจัดสารปนเปื้อนอื่นออกไปจากระบบทำให้สารที่ต้องการมีความเข้มข้นขึ้น สามารถทำได้ที่อุณหภูมิห้องจึงลดการสูญเสียของสารที่ไม่ทนความร้อน แต่อย่างไรก็ตาม เทคนิคนี้ต้องใช้เวลาเนื่องจากต้องนำสารสกัดที่ได้ไปผ่านการระเหยสารละลายก่อนที่จะนำตัวอย่างไปทำการวิเคราะห์ และใช้สารละลายอินทรีย์ที่อันตรายปริมาณมากจึงเป็นผลเสียต่อสิ่งแวดล้อม นอกจากนี้ยังอาจเกิดอิมัลชันซึ่งจะเป็นอุปสรรคต่อการแยกชั้นของของเหลว (เพ็ญแข, 2541; Berrueta *et al.*, 1995)

เทคนิค LLE เป็นเทคนิคที่นิยมใช้ในการทำให้บริสุทธิ์ขึ้นเพื่อการวิเคราะห์ปริมาณเมลาโทนิน โดยความสำเร็จของเทคนิค LLE ปรากฏขึ้นในปี ค.ศ. 1970 โดย Miller and Maickel ที่ได้ใช้เทคนิคนี้เพื่อวิเคราะห์ปริมาณเมลาโทนิน ซีโรโทนิน *N*-acetylserotonin และ 5-methoxytryptamine ในต่อมไพเนียลของสุนัขและหนู ต่อมา Burkhardt *et al.* (2001) และ Reiter *et al.* (2005) ได้ใช้เทคนิคนี้ร่วมในการเตรียมตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์เมลาโทนินในเซอร์รีเปรียวและวอลนัท ตามลำดับ นอกจากนี้เทคนิคนี้ยังได้นำมาใช้ในการเตรียมตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์เมลาโทนินในน้ำมันมะกอกซึ่งเป็นตัวอย่างที่เป็นของเหลวอีกด้วย (De la Puerta *et al.*, 2007)

7.2.2 เทคนิค solid phase extraction (SPE)

เทคนิค SPE เป็นเทคนิคที่ใช้ในการเตรียมตัวอย่างที่มีพื้นฐานมาจากโครมาโตกราฟีของเหลว โดยอาศัยการดูดซับ (adsorption) และการแบ่งส่วน (partition) ของสารระหว่างเฟส 2 เฟส คือ เฟสของแข็งและเฟสของเหลว ความสามารถในการละลายของสารที่ทำการสกัดและการสร้างพันธะของหมู่ฟังก์ชันระหว่างสารที่ทำการสกัดกับตัวดูดซับ (adsorbent) มีผลต่อการแยก (fractionation) ของสารซึ่งจะทำให้สารสกัดที่ได้มีความบริสุทธิ์และมีความเข้มข้นสูงขึ้น กลไกที่เกิดขึ้นระหว่างตัวดูดซับกับสารที่ทำการสกัด ได้แก่ reverse phase (C_2 , C_8 และ C_{18}) ion-exchange และ size exclusion เป็นต้น ส่วนแรงระหว่างโมเลกุลที่เกิดขึ้นระหว่างสารที่ทำการสกัดและตัวดูดซับ เช่น แรง van der Waals พันธะไฮโดรเจนและแรง dipole-dipole เป็นต้น เทคนิคนี้มีประโยชน์สำหรับการวิเคราะห์สารที่มีปริมาณน้อยและอยู่ในเมทริกซ์ที่มีความซับซ้อน ตัวดูดซับของเทคนิค SPE จัดเป็นสิ่งสำคัญที่ควรคำนึงถึงเนื่องจากเป็นตัวควบคุมความจำเพาะ (selectivity) สัมพรรคภาพและความจุ (capacity) ของสารที่ทำการสกัด (Huie, 2002; Pavlovič *et al.*, 2007)

ขั้นตอนการใช้งาน SPE ประกอบด้วย 4 ขั้นตอน (ภาพที่ 8) ดังนี้

ก) Conditioning

กระตุ้นตัวดูดซับด้วยสารละลายอินทรีย์ที่เหมาะสมเพื่อทำให้บริเวณผิวหน้าของเฟสของแข็งพร้อมที่จะใช้งาน จากนั้นล้างสารละลายที่ใช้ในการกระตุ้นออกโดยนำสารละลายอีกชนิดที่มีองค์ประกอบคล้ายกับเมทริกซ์ของตัวอย่างมาผ่าน SPE

ข) Loading

ใส่ตัวอย่างลงใน SPE โดยสารในตัวอย่างจะเกาะค้าง (retain) อยู่กับตัวดูดซับ

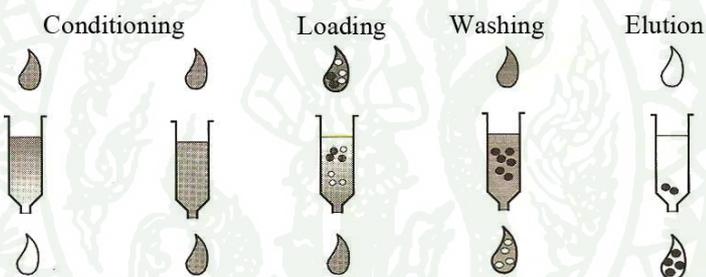
ก) Washing

ทำการล้างสารอื่นที่ไม่ต้องการ (interference compound) ออกโดยต้องใช้สารละลายที่ไม่สามารถชะสารที่สนใจได้

ง) Elution

ทำการชะสารที่สนใจด้วยสารละลายที่เหมาะสมเพื่อนำไปทำการวิเคราะห์

ต่อไป



ภาพที่ 8 ขั้นตอนการใช้ SPE

ที่มา: คัดแปลงจาก Rouessac and Rouessac (2000)

ข้อดีของเทคนิค SPE คือ มีค่า recovery rate สูง ลดปัญหาจากการเกิดอิมัลชัน ลดการใช้สารอินทรีย์และเวลาในการเตรียมตัวอย่าง แต่อย่างไรก็ตามการปัญหาที่มักพบเมื่อมีการใช้เทคนิคนี้ได้แก่ สารที่จะทำการวิเคราะห์มีความสามารถในการเกาะค้างในตัวดูดซับต่ำ ปริมาตรของสารที่ทำการสกัดมากเกินไปความสามารถในการเกาะค้างของตัวดูดซับ รวมทั้งในขั้นตอน washing ไม่สามารถล้างสารอื่นที่ไม่ต้องการได้อย่างเพียงพอ (Berrueta *et al.*, 1995)

เทคนิค SPE เป็นอีกเทคนิคหนึ่งที่น่าสนใจใช้ในการเตรียมตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์ปริมาณเมลาโทนินโดยใช้ C_{18} เป็นตัวดูดซับ ในปี ค.ศ. 1995 Laganá *et al.* ได้ทำการวิเคราะห์เมลาโทนินในเลือดซึ่งนอกจากจะใช้ SPE ที่มี C_{18} เป็นตัวดูดซับแล้วยังมีการใช้ SPE ที่มีดูดซับชนิด carbograph ซึ่งเป็นตัวดูดซับที่มีขั้ว พบว่า recovery rate ที่ได้เท่ากับ 88.9% ต่อมาในปี ค.ศ. 2003 Chen *et al.* ได้ใช้ SPE ร่วมในการเตรียมตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์ปริมาณเมลาโทนินในพืชพบว่า recovery rate ของ SPE ที่ใช้เท่ากับ 96% นอกจากนี้ Pape and Lüning (2006) ได้ใช้เทคนิค SPE ร่วมในการเตรียมตัวอย่างในขั้นตอนการทำบริสุทธิ์ (purification) เพื่อให้สารสกัดที่ได้มีความบริสุทธิ์มากขึ้น

7.3 เทคนิคที่ใช้ในการวิเคราะห์เมลาโทนิน

7.3.1 เทคนิค immunoassay

เทคนิค immunoassay เป็นเทคนิคเชิงชีวเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์สารในของเหลวชีวภาพ อาศัยการทำปฏิกิริยาระหว่างสารแอนติบอดีและแอนติเจน ในการวิเคราะห์ปริมาณเมลาโทนินนิยมใช้เทคนิค radioimmunoassay (RIA) และเทคนิค enzyme immunoassay (EIA)

เทคนิค RIA จะมีการเกิดปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดีโดยอาศัยการทำ radiolabel โดยจะเกิดการแย่งจับกับแอนติบอดีระหว่างแอนติเจนที่ต้องการและแอนติเจนที่ทำ radiolabel ในการวิเคราะห์เมลาโทนินได้เริ่มมีมาตั้งแต่ปี ค.ศ. 1975 โดย Arendt *et al.* โดยได้นำเมลาโทนินมาทำ radiolabel ด้วย ^3H หรือ ^{125}I จากนั้นนำมาทำปฏิกิริยากับแอนติบอดีต้านเมลาโทนิน เทคนิคนี้เป็นเทคนิคที่นิยมใช้กันมากเนื่องจากมีความไวสูงและไม่ต้องอาศัยเครื่องมือพิเศษ แต่อย่างไรก็ตาม Van Tassel *et al.* (2001) กล่าวว่า การใช้เทคนิค RIA ในการวิเคราะห์ปริมาณเมลาโทนินในมะเขือเทศ (*Lycopersicon esculentum*) และ Morning glory (*Pharbitis nil*) พบว่าให้ค่าการวิเคราะห์สูงกว่าการวิเคราะห์ด้วย GC-MS เนื่องจากเกิดปฏิกิริยาข้ามกลุ่ม (cross reaction) ของสารอื่นนอกเหนือจากเมลาโทนินกับแอนติบอดีทำให้ค่าที่ได้มากเกินไป (overestimation)

สำหรับเทคนิค EIA เป็นเทคนิคที่มีการนำแอนไอโซมที่ไม่ทำให้แอนติเจนและแอนติบอดีเสียสมบัติมาทำการเชื่อมกับแอนติบอดีหรือแอนติเจนแทนการทำ radiolabel ในเทคนิค

RIA สำหรับการวิเคราะห์เมลาโทนิน De la Puer *et al.* (2007) ได้นำเอาเทคนิคนี้มาใช้ในการวิเคราะห์เมลาโทนินในน้ำมันมะกอก

7.3.2 เทคนิคโครมาโตกราฟี (Chromatography)

เทคนิคโครมาโตกราฟีเป็นเทคนิคการแยกสารออกจากกันให้เป็นสารบริสุทธิ์ โดยอาศัยความสามารถในการละลายและการดูดซับของสารที่มีความแตกต่างกัน เทคนิคนี้สามารถวิเคราะห์เชิงคุณภาพและปริมาณของสารได้คือสามารถวิเคราะห์ชนิดและปริมาณของสารที่สนใจ โดยทั่วไปนิยมใช้เทคนิค HPLC และ GC ในการวิเคราะห์เมลาโทนิน

เทคนิค HPLC เป็นเทคนิคการแยกสารโดยอาศัยความแตกต่างของอัตราการเคลื่อนที่ของสารในเฟสคงที่ในคอลัมน์โดยมีเฟสเคลื่อนที่เป็นตัวพาไป โดยเฟสเคลื่อนที่ใน HPLC เป็นของเหลว เมื่อต่อเข้ากับเครื่องตรวจวัดจะสามารถตรวจวิเคราะห์สารได้ การวิเคราะห์เมลาโทนินนิยมใช้ระบบ reverse phase คือคอลัมน์จะบรรจุเฟสคงที่ที่ไม่มีขั้ว เช่น C_{18} และเฟสเคลื่อนที่จะเป็นสารละลายที่มีขั้ว การใช้เทคนิคนี้มีข้อดีคือไม่จำเป็นต้องมีการทำอนุพันธ์ (derivatization) ในปี ค.ศ. 1996 Vitale *et al.* รายงานว่าการใช้ HPLC ร่วมกับเครื่องตรวจวัดฟลูออเรสเซนซ์สามารถตรวจวัดเมลาโทนินในเซลล์ของต่อมไพเนียลที่ระดับ 3 พิโคกรัมต่อมิลลิกรัม สำหรับการวิเคราะห์เมลาโทนินในพืชได้ใช้ HPLC ร่วมกับเครื่องตรวจวัดฟลูออเรสเซนซ์ โดยใช้คอลัมน์ C_{18} และใช้สารละลายบัฟเฟอร์ฟอสเฟต pH 4.5 ร่วมกับเมทานอลเป็นเฟสเคลื่อนที่ (Chen *et al.*, 2003) ขณะที่ Reiter *et al.* (2005) ใช้สารละลายบัฟเฟอร์ฟอสเฟต pH 4.5 ร่วมกับอะซิโตไนไตรล์ นอกจากนี้ยังมีใช้ HPLC ร่วมกับเครื่องตรวจวัด mass spectrometry ในการวิเคราะห์เมลาโทนินเพื่อยืนยันผลการวิเคราะห์ (Chen *et al.*, 2003)

เทคนิค GC เป็นเทคนิคการแยกสารที่มีหลักการคล้ายกับเทคนิค HPLC แต่มีการใช้เฟสเคลื่อนที่ต่างกันคือใช้แก๊สเป็นเฟสเคลื่อนที่ ในการวิเคราะห์เมลาโทนินไม่ค่อยนิยมใช้เทคนิคนี้เนื่องจากจำเป็นต้องทำอนุพันธ์ก่อนการวิเคราะห์ (Van Tassel *et al.*, 2001)

ข้อดีของเทคนิคโครมาโตกราฟี คือ สามารถตรวจวัดเมลาโทนินในระดับต่ำได้ นอกจากนี้ยังสามารถวัดสารหลายชนิดที่อยู่กลุ่มเดียวกันพร้อมกันได้ ส่วนข้อเสีย คือ เครื่องมีมีราคาแพงและผู้วิจัยจำเป็นต้องมีความชำนาญในการใช้เครื่องมือ (ปิยะรัตน์, 2545)

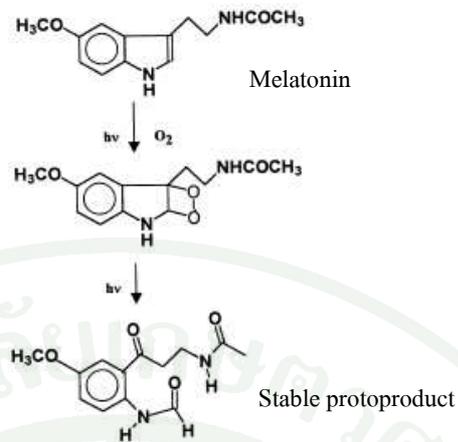
8. ปัจจัยที่มีผลต่อความคงตัวของเมลาทิน

8.1 อุณหภูมิ

การศึกษาเกี่ยวกับผลของอุณหภูมิต่อการสลายตัวของเมลาทินเริ่มมีในปี ค.ศ. 1995 โดย Cavallo and Hassan โดยนำเมลาทินที่ละลายในน้ำไปเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสในสภาวะปลอดเชื้อ พบว่าเมลาทินมีความคงตัวอย่างน้อย 6 เดือน ต่อมา Daya *et al.* (2001) รายงานว่าเมลาทินมีความคงตัวเมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง (20 องศาเซลเซียส) และ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลาอย่างน้อย 2 วัน อย่างไรก็ตามเมื่อเวลาผ่านไป 21 วัน ปริมาณเมลาทินลดลงแต่ไม่เกิน 30% เมื่อวิเคราะห์เมลาทินในใบ feverfew ที่ผ่านกระบวนการทำแห้งแบบลมร้อน (air-oven drying method) พบว่าเกิดการสูญเสียเมลาทินประมาณ 30% ในขณะที่เมื่อนำตัวอย่างมาผ่านการแห้งแบบเยือกแข็ง (freeze-drying method) เมลาทินจะเกิดการสูญเสียเพียง 15% (Murch *et al.*, 1997) นอกจากนี้ Zieliński *et al.* (2006) ยังพบว่าการใช้กระบวนการ hydrothermal ร่วมกับการปอกเปลือกและการบดกับตัวอย่าง buckwheat groats สามารถทำให้ปริมาณเมลาทินลดลงถึง 3 เท่า

8.2 แสง

แสงเป็นปัจจัยที่มีผลในการยับยั้งการสังเคราะห์และการหลั่งของเมลาทิน นอกจากนี้ยังพบว่าแสงมีผลต่อความคงตัวของเมลาทินทั้งทางตรงและทางอ้อม ผลทางตรงของแสงต่อความคงตัวของเมลาทินทำการศึกษาโดย Andrisano *et al.* (2000) ซึ่งรายงานว่าแสงอัลตราไวโอเล็ตสามารถทำให้เมลาทินเกิดการเสื่อมสลายเกิดเป็นสารใหม่ แสดงดังภาพที่ 9 ในขณะที่ช่วงกันแสงอัลตราไวโอเล็ตยังสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดอนุมูลอิสระในเนื้อเยื่อต่างๆ ในพืชได้ ซึ่งทำให้เมลาทินเกิดการสลายตัวไป เนื่องจากต้องทำหน้าที่ในการกำจัดอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นเพื่อเป็นการป้องกันความเสียหายที่เกิดขึ้นกับเซลล์ (Maharaj *et al.*, 2002) ซึ่งจัดเป็นการสลายตัวของเมลาทินโดยแสงทางอ้อม

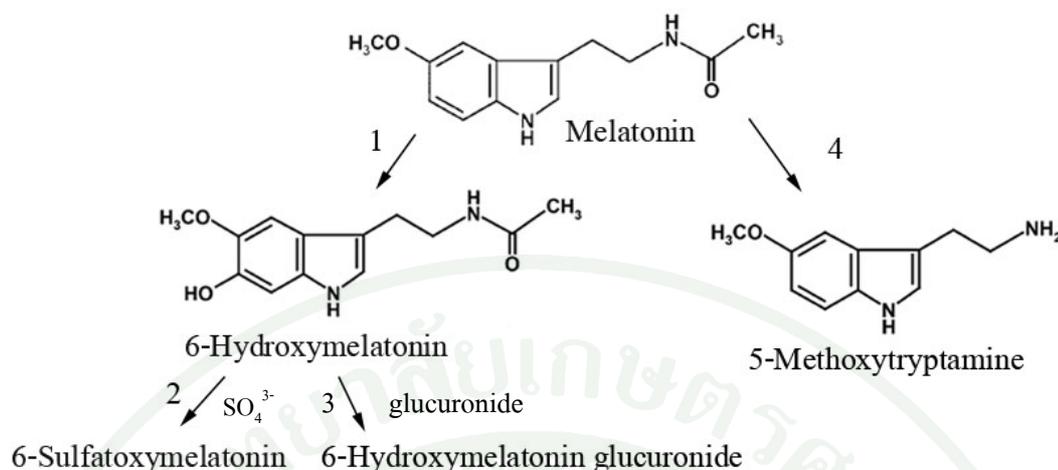


ภาพที่ 9 กลไกการสลายตัวโดยแสงของเมลาโทนิน

ที่มา: ดัดแปลงจาก Andrisano *et al.* (2000)

8.3 เอนไซม์

เมลาโทนินสามารถถูกทำให้สลายตัวได้โดยเอนไซม์หลายชนิดแสดงดังภาพที่ 10 ซึ่งมีความแตกต่างกันไปตามบริเวณที่เกิดการสลายตัว การสลายตัวของเมลาโทนินในร่างกายประมาณ 90% เกิดที่บริเวณตับ โดย Francis *et al.* (1987) รายงานว่าเมลาโทนินถูก hydroxylate โดยเอนไซม์ cytochrome P₄₅₀ monooxygenase (CYP) จากนั้นจะเกิดการเชื่อมพันธะ (conjugate) กับซัลเฟตและ glucuronide เกิดเป็น 6-sulfatoxymelatonin และ 6-hydroxymelatonin glucuronide ตามลำดับ สำหรับการสลายตัวของเมลาโทนินที่เกิดในต่อมไพเนียลและเรตินามีเอนไซม์ 2 ชนิดที่เกี่ยวข้องได้แก่ เอนไซม์ melatonin deacetylase และเอนไซม์ aryl acylamidase โดยทำหน้าที่ในการ deacetylate เมลาโทนินให้กลายเป็น 5-methoxytryptamine (Hardeland *et al.*, 1993)



ภาพที่ 10 การสลายตัวของเมลาโทนินที่เกี่ยวข้องกับเอนไซม์ โดยเอนไซม์ที่เกี่ยวข้อง ได้แก่ เอนไซม์ CYP (1) เอนไซม์ sulfotransferase ST1A3 (2) เอนไซม์ UDP-glucuronosyltransferase (3) และเอนไซม์กลุ่ม melatonin deacetylating (4)

ที่มา: คัดแปลงจาก Pandi-Perumal *et al.* (2006)

นอกจากนี้การสลายตัวของเมลาโทนินยังเกิดจากเอนไซม์ arylamineformamidase ซึ่งจะเปลี่ยนเมลาโทนินไปเป็น N^1 -acetyl- N^2 -formyl-5-methoxykynuramine (AFMK) โดยเกิดการ deformylate ขณะที่เอนไซม์ hemoperoxidase จะทำหน้าที่ในการเปลี่ยน AFMK ไปเป็น N^1 -acetyl-5-methoxykynuramine (AMK) (Hardeland *et al.*, 2006)

8.4 อนุมูลอิสระ

การเกิดอนุมูลอิสระจะนำไปสู่การสลายตัวของเมลาโทนิน เนื่องจากเมลาโทนินมีความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ ยกตัวอย่างเช่น เมลาโทนินสามารถจับตัวกับอนุมูลไฮดรอกซี (OH) กลายเป็น cyclic 3-hydroxymelatonin (c3OHM) ซึ่งสารชนิดนี้อาจเกิดการสลายตัวต่อไปกลายเป็น AFMK (Tan *et al.*, 1998; Hardeland, 2006) หรือเมลาโทนินอาจเกิดการสลายตัวเป็น AFMK ได้โดยตรง สารที่เกิดขึ้นจากการสลายตัวของเมลาโทนิน เช่น c3OHM AFMK และ AMK ล้วนเป็นสารที่มีความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระทั้งสิ้น จึงเป็นการส่งเสริมความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระและต้านการอักเสบให้แก่เมลาโทนิน (Tan *et al.*, 2002, 2003; Hardeland and Poeggeler, 2003; Hardeland *et al.*, 2006)

หม่อน

1. ลักษณะทั่วไป

หม่อนเป็นพืชที่อยู่ในวงศ์ Moraceae ตระกูล *Morus* spp. (วสันต์, 2546) หม่อนสามารถปรับตัวไปตามสภาพแวดล้อมได้ดี เจริญเติบโตได้ดีทั้งเขตอากาศต่ำกว่า 0 องศาเซลเซียสไปจนถึงเขตอากาศร้อน อุณหภูมิที่เหมาะสมกับการเจริญเติบโตของหม่อนอยู่ระหว่าง 25 – 30 องศาเซลเซียส แต่อย่างไรก็ตามการเจริญเติบโตของหม่อนแต่ละสายพันธุ์จะขึ้นกับสภาพแวดล้อมที่แตกต่างกัน (ศิริพร, 2546) ลักษณะทั่วไปของส่วนต่างๆ ของหม่อนมีดังนี้

1) ใบ

ใบหม่อนเป็นส่วนที่มีความสำคัญที่สุด เพราะสามารถนำไปเลี้ยงไหมได้ ส่วนของใบจะประกอบด้วยแผ่นใบ ก้านใบและหูใบ ขนาด รูปร่างและความหนาของใบจะแตกต่างกันไปตามสายพันธุ์ การจัดเรียงใบมีลักษณะเป็นใบเดี่ยวออกจากลำต้นมีการเรียงตัวแบบสลับกัน ความถี่ของใบจะขึ้นกับสายพันธุ์ ปริมาณน้ำในใบหม่อนมีอยู่ระหว่าง 64-83% โดยที่ปริมาณน้ำจะแตกต่างกันขึ้นกับอายุใบ สายพันธุ์ สภาพแวดล้อมและวิธีการตัดแต่งกิ่ง

2) ราก

หม่อนประกอบด้วยรากแก้ว รากแขนงและรากฝอย เมื่อใบสังเคราะห์แสงเสร็จจะส่งอาหารไปเก็บที่บริเวณราก ความลึกของรากขึ้นอยู่กับชนิดของดิน ระดับน้ำในดิน วิธีการตัดแต่งกิ่ง และสายพันธุ์

3) ลำต้นและกิ่ง

หม่อนเป็นพืชยืนต้น ลำต้นตั้งตรง สูงใหญ่มีกิ่งก้านมากมาย ขนาดของลำต้นจะโตตามอายุ สีของลำต้นขึ้นกับสายพันธุ์

4) ดอก ผลและเมล็ด

หม่อนจัดเป็นพืชพวก dioecious (ดอกตัวผู้และดอกตัวเมียอยู่คนละดอก) ดอกมีลักษณะการเรียงตัวแบบเป็นกลุ่ม หม่อนที่ปลูกในประเทศไทยมักออกดอกและให้ผลตอนปลายฤดูแล้ง หม่อนที่ได้รับการตัดแต่งกิ่งมักแตกตาข้างและออกดอกได้ทุกฤดูกาล เมื่อดอกตัวเมียได้รับการผสมพันธุ์จะเปลี่ยนแปลงเป็นผลซึ่งประกอบไปด้วยเมล็ดเล็กๆ จำนวนมาก

2. สภาพแวดล้อมที่มีผลต่อการเจริญเติบโต (ศิริพร, 2546)

หม่อนจะเจริญเติบโตได้ดีจำเป็นต้องอาศัยสภาพแวดล้อมที่เหมาะสม ได้แก่

1) แสงแดด

เป็นแหล่งพลังงานของหม่อนในกระบวนการสังเคราะห์แสง หม่อนควรปลูกในสถานที่ที่มีแสงเพียงพอและได้รับแสงประมาณ 9-12 ชั่วโมงต่อวัน ถ้าหม่อนได้รับแสงแดดเพียงพอจะช่วยให้สีของใบเข้มและมีคุณภาพดีขึ้น แต่ถ้าหม่อนขาดแสงแดดใบหม่อนจะมีปริมาณน้ำมากแต่จะมีธาตุอาหารต่ำ

2) อุณหภูมิ

หม่อนเจริญเติบโตได้ดีในที่มีอุณหภูมิระหว่าง 25-30 องศาเซลเซียส

3) น้ำ

เป็นส่วนสำคัญในการเจริญเติบโต เนื่องจากช่วยในการละลายธาตุอาหารและเคลื่อนย้ายอาหารไปยังส่วนต่างๆ นอกจากนี้ยังช่วยรักษาอุณหภูมิในลำต้นและความชื้นในเซลล์ให้คงที่

4) อากาศ

รากของหม่อนจะหายใจเพื่อรับก๊าซออกซิเจน ดังนั้นจึงควรมีการไถพรวนเพื่อช่วยลดการขาดออกซิเจน สำหรับก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์มีความจำเป็นอย่างยิ่งในช่วงที่ต้นหม่อนกำลังเจริญเติบโตเนื่องจากจะช่วยเพิ่มการสังเคราะห์แสง ส่วนหมอกควันและฝุ่นละอองในอากาศจะเป็นตัวขัดขวางการสังเคราะห์แสงและการหายใจ

5) ดิน

ดินที่เหมาะสมแก่การปลูกหม่อนควรมีหน้าดินลึกอย่างน้อย 50 เซนติเมตร มีอินทรีย์วัตถุสูง มีการระบายน้ำและอากาศถ่ายเทดี เป็นดินร่วนปนทราย อุ้มน้ำได้ดีและมีค่า pH อยู่ระหว่าง 6.5 – 7.0

3. สายพันธุ์

หม่อนที่ปลูกในประเทศไทยมีหลายสายพันธุ์ แต่ละสายพันธุ์มีลักษณะของลำต้น ใบและดอกแตกต่างกัน หม่อนที่มีคุณสมบัติดีจะประกอบไปด้วยลักษณะต่างๆ ดังนี้ สามารถเจริญเติบโตได้ดี มีผลตอบสนองต่อปุ๋ยสูง ลำต้นตั้งตรง กิ่งแข็งแรง มีกิ่งแขนงมาก เมื่อตัดแต่งกิ่งแล้วให้กิ่งแขนงที่เหมาะสม ปล้องถี่เพื่อจะให้ผลผลิตสูง ขนาดของใบพอเหมาะ โดยไม่หนาหรือบางเกินไป และต้านทานต่อโรคและแมลง (ศิริพร, 2546) ตัวอย่างสายพันธุ์หม่อนที่นิยมปลูก ได้แก่

1) บุรีรัมย์ 60 (บร. 60)

เป็นหม่อนลูกผสมระหว่างสายพันธุ์หม่อนจีนและสายพันธุ์หม่อนน้อย อัตราการออกโรคดี ให้ผลผลิตต่อไร่สูงประมาณ 4,327 กิโลกรัมต่อไร่ต่อปี การเจริญเติบโตดี มีความสามารถในการตอบสนองต่อปุ๋ยสูง สามารถปลูกได้ทุกสภาพพื้นที่ ลักษณะของใบไม่มีแฉก ขนาดใบใหญ่หนา อ่อนนุ่ม ไม่เหนียวง่าย มีพื้นที่ใบมาก (สุเทพ และ สฤณีพร, 2545)



ภาพที่ 11 ลักษณะปรากฏของหม่อนสายพันธุ์ริรมย์ 60

ที่มา: กอบกุล และคณะ (2552)

2) คุณไฟ

เป็นหม่อนพันธุ์พื้นเมืองที่ให้ดอกตัวเมีย ลำต้นไม่ค่อยมีกิ่งแขนง ลักษณะขอบใบเรียบ ใบค่อนข้างบางจึงเหยว่ง่าย ทนแล้ง ผลผลิตต่อไร่ 2,000 กิโลกรัมต่อไร่ต่อปี (สุเทพ และ กฤษดิพร, 2545)



ภาพที่ 12 ลักษณะปรากฏของหม่อนสายพันธุ์คุณไฟ

ที่มา: กอบกุล และคณะ (2552)

3) สกลนคร

เป็นหม่อนทริพลอยด์ ($2n = 3x = 42$) ซึ่งได้จากการผสมข้ามพันธุ์ระหว่างหม่อน
 เทตราพลอยด์ ($2n = 4x = 56$) และดิพลอยด์ ($2n = 2x = 28$) ในปี 2536 ได้มีการนำหม่อนสายพันธุ์
 คุณไพ ($2n = 2x = 28$) มาทำให้เป็นหม่อนเทตราพลอยด์เพศเมีย แล้วผสมพันธุ์กับหม่อนดิพลอยด์
 เพศผู้ ได้แก่ พันธุ์น้อย พันธุ์ Kosen และพันธุ์ลูน 40 ทำให้ได้หม่อนสายพันธุ์สกลนครที่มีลักษณะดี
 โดยมีลักษณะใบเป็นรูปไข่ค่อนข้างกว้าง ฐานใบเป็นรูปหัวใจ ผิวใบหยาบ ผลผลิตต่อไร่มากกว่า
 3,000 กิโลกรัม ทนทานโรคราน่าได้ดีกว่าสายพันธุ์ บร. 60 (สถาบันหม่อนไหมแห่งชาติเฉลิมพระ
 เกียรติ สมเด็จพระนางเจ้าสิริกิติ์ พระบรมราชินีนาถ, ม.ป.ป.)



ภาพที่ 13 ลักษณะปรากฏของหม่อนสายพันธุ์สกลนคร

ที่มา: กอบกุล และคณะ (2552)

4) กำแพงแสน-เอ็มบี-42-1

เป็นหม่อนกินผล ซึ่งนำต้นพันธุ์มาจากประเทศสาธารณรัฐประชาชนจีน และโครงการ
 การวิจัยเพื่อพัฒนาระบบการเกษตรในเขตชานเมืองใหญ่ ศูนย์วิจัยเพื่อพัฒนาระบบ
 เกษตรกรรม (DORAS Center) มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ได้นำหม่อนสายพันธุ์นี้มาทดลองปลูก
 ณ แปลงทดลอง 2 ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน
 จังหวัดนครปฐมเมื่อ ปี พ.ศ. 2542 ใบของหม่อนสายพันธุ์นี้มีลักษณะเป็นใบเดี่ยวหนาออกสลับ
 สีใบเขียวเข้ม รูปหัวใจขอบจักฟันเลื่อย ผิวใบสาก ขนาดใบกว้าง 8-14 เซนติเมตร ยาว 12-18
 เซนติเมตร ผลออกตามซอกใบ หม่อนสายพันธุ์นี้ไม่เพียงแต่บริโภคผลเท่านั้น ยังสามารถใช้

ประโยชน์จากใบโดยนำไปใช้เลี้ยงไหมได้ เนื่องจากใบหนา สามารถให้ผลผลิตได้ตลอดทั้งปี โดยผลผลิตเฉลี่ยเท่ากับ 1,760 กิโลกรัมต่อไร่ต่อปี (ปราโมทย์ และคณะ, 2552)



ภาพที่ 14 ลักษณะปรากฏของหม่อนสายพันธุ์กำแพงแสน-เอ็มบี-42-1

4. การเก็บเกี่ยวใบหม่อน

การเก็บเกี่ยวใบหม่อน สามารถทำได้หลังการตัดต่ำประมาณ 2-3 เดือน โดยการเก็บที่สมควรจะเป็นการเด็ดใบ เนื่องจากการใช้คนเก็บจะช่วยให้สามารถเลือกใบที่ไม่ติดโรคได้ จึงเป็นการคัดเลือกเบื้องต้น การเด็ดใบควรเด็ดจากใบล่างสู่ใบบน เว้นใบอ่อนส่วนยอดไว้ 4-5 ใบ ทิ้งไว้ประมาณ 1 เดือนจึงสามารถเก็บครั้งต่อไปได้ เวลาที่เหมาะสมในการเก็บใบหม่อน คือ เวลาเช้าและเวลาเย็น เพราะเป็นช่วงที่มีอุณหภูมิต่ำและควรเก็บในตะกร้าเพื่อให้มีอากาศถ่ายเทได้สะดวกเป็นการช่วยคงสภาพที่ดีในด้านรสชาติของใบหม่อน (ศิริพร, 2546)

5. ชาใบหม่อน

ใบหม่อนนอกจากจะปลูกเพื่อใช้ในการเลี้ยงไหมแล้ว ยังได้มีการนำมาผลิตเป็นชาใบหม่อนอีกด้วย และสำนักมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ [มกอช.] (2552) ได้ให้นิยามของชาใบหม่อนไว้ดังนี้ “ชาใบหม่อน คือ ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการนำใบหม่อนสดมาแปรรูปเป็นชิ้นแห้งหรือผงแห้งเพื่อใช้ดื่มหรือชงกับน้ำเป็นเครื่องดื่ม”

ชาใบหม่อนเป็นเครื่องดื่มที่ได้รับความนิยมในประเทศญี่ปุ่น เพราะเชื่อว่าเป็นเครื่องดื่มเพื่อสุขภาพที่ใช้เพื่อป้องกันและรักษาโรคในผู้สูงอายุ สำหรับในประเทศไทยเริ่มมีการผลิตชาใบหม่อน

อย่างจริงจังในปี พ.ศ. 2540 โดยผู้เชี่ยวชาญชาวญี่ปุ่นนำเครื่องจักรมาใช้ในการผลิตชาใบหม่อน (ศิริพร, 2546)

ประเภทของชาใบหม่อน (มกอช., 2552; กรมวิชาการเกษตร, ม.ป.ป.)

1) ชาเขียวใบหม่อน

ชาใบหม่อนที่ผลิตจากการนำใบหม่อนสดมาตัดหรือหั่นแล้วอบหรือหนึ่งด้วยไอน้ำหรือ ลวกด้วยน้ำร้อน ทำให้เย็น โดยการฟุ้งลม คั่วให้แห้งหรือคั่วจนวคให้ใบหม่อนช้ำแล้วอบด้วยลมร้อน ให้แห้ง ชาเขียวใบหม่อนมีลักษณะเป็นชาที่มีสีเขียวอ่อนหรือสีเขียวอ่อนปนน้ำตาล มีกลิ่นหอมใบไม้ คั่วเช่นเดียวกับชา แต่มีกลิ่นน้อยกว่า รสชาติหวานเล็กน้อย ฝาดน้อยกว่าชาจากใบชา ไม่มีรสขม

2) ชาดำใบหม่อน

ชาใบหม่อนที่ผลิตจากการนำใบหม่อนสดมาตัดหรือหั่น แล้วคั่วให้แห้งหรือคั่วจนวคให้ ใบหม่อนช้ำ แล้วอบด้วยลมร้อนแห้ง ชาดำใบหม่อนมีลักษณะเป็นชาที่มีสีเหลืองปนน้ำตาลหรือสี น้ำตาล มีกลิ่นหอมใบไม้คั่วเช่นเดียวกับชา แต่มีกลิ่นน้อยกว่า รสฝาดน้อยกว่าชาจากใบชา

6. สารอาหารและสารสำคัญในใบหม่อนและชาใบหม่อน

ใบหม่อนสามารถนำมาใช้ในการปรุงอาหารได้หลายประเภทเนื่องจากสามารถช่วยเพิ่ม รสชาติและคุณค่าทางโภชนาการให้กับอาหารได้ ในอดีตคนในแถบประเทศเกาหลี จีนและญี่ปุ่นได้ มีการนำใบหม่อนมาเป็นอาหารเสริมสุขภาพและใช้เป็นพืชสมุนไพรสืบทอดมาถึงปัจจุบัน ต่อมา งานวิจัยจำนวนมากได้ระบุถึงคุณค่าของสารสำคัญในใบหม่อน ดังเช่น Tsushida *et al.* (1987) พบว่าใบหม่อนมี gamma amino butyric acid (GABA) ซึ่งมีคุณสมบัติในการลดความดันใน เส้นเลือด นอกจากนี้ Kimura *et al.* (2004) รายงานว่าในใบหม่อนมีสาร deoxynojirimycin (DNJ) ซึ่งมีผลต่อการลดระดับน้ำตาลในเลือด และในปี ค.ศ. 2005 Zambakhidze *et al.* พบว่าในใบหม่อน มีไฟโตสเตอรอลที่ออกฤทธิ์ในการลดปริมาณคอเลสเตอรอลในเส้นเลือด จึงเหมาะกับผู้ป่วยโรค ความดันสูงและโรคเบาหวาน นอกจากนี้ในใบหม่อนยังมีสารประกอบโพลีฟีนอลหลายชนิด เช่น เควอซิทิน แคมเฟอรอลและรูติน (Kim *et al.*, 1999; Enkhmaa *et al.*, 2005; Katsube *et al.*, 2006)

และไบหม่อนและซาไบหม่อนยังประกอบไปด้วยสารอาหารและแร่ธาตุต่างๆ รวมทั้งมีกรดอะมิโน
จำเป็นหลายชนิด เช่น ลิวซีน เมไทโอนีน และทริปโตเฟน เป็นต้น นอกจากนี้ก็ยังมีวิตามินและแร่
ธาตุสูงอีกด้วย (Butt *et al.*, 2008)



อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. วัสดุดิบ

ใบหม่อนและผลหม่อนสายพันธุ์กำแพงแสน-เอ็มบี-42-1 (ภาพผนวกที่ ข6) ได้รับจากแปลงทดลองคณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม ใบหม่อนสายพันธุ์บุรีรัมย์ 60 สกลนครและคุณไพ ได้รับจากศูนย์หม่อนไหมเฉลิมพระเกียรติฯ จังหวัดสระบุรี สำหรับใบหม่อนทั้ง 3 สายพันธุ์นี้ได้ทำการเก็บเกี่ยวตามอายุใบแบ่งออกเป็น 3 กลุ่ม ได้แก่ ยอดอ่อน ใบอ่อนและใบแก่ สำหรับพืชที่มีสรรพคุณช่วยให้นอนหลับ ได้แก่ ใบชี้เหล็ก ใบชุมเห็ดเทศ ดอกสะเดา ผลคิปลี ผลยอและผลมะเฟือง (ภาพผนวกที่ ข1-5) ได้รับจากสวนสมุนไพร จังหวัดสระบุรี

2. สารเคมี

- 2.1 เมลาโทนิน (Melatonin; $C_{13}H_{16}N_2O_2$:TLC, Sigma-Aldrich, St. Louise, U.S.A.)
- 2.2 เมทานอล (Methanol; CH_3OH : HPLC grade, Mallinckrodt Baker Inc., U.S.A.)
- 2.3 อะซิโตนไนไตรล์ (Acetonitrile; CH_3CN : HPLC grade, Mallinckrodt Baker Inc., U.S.A.)
- 2.4 คลอโรฟอร์ม (Chloroform; $CHCl_3$; Analytical grade, Labscan Limited, Ireland)
- 2.5 ไดโซเดียมไฮโดรเจนออร์โธฟอสเฟตแอนไฮไดรอส (Disodium hydrogenorthophosphate anhydrous; Na_2HPO_4 : Analytical grade, Ajax Finechem, New Zealand)
- 2.6 โซเดียมไดไฮโดรเจนออร์โธฟอสเฟต (Sodium dihydrogenorthophosphate; $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$: Analytical grade, Ajax Finechem, New Zealand)
- 2.7 กรดออร์โธฟอสฟอริก 85% (Ortho-phosphoric acid 85%; H_3PO_4 85%: Analytical grade, Merck, Germany)
- 2.8 น้ำปราศจากไอออน (Deionized water; H_2O : ผลิตจากระบบ milli-Q, Millipore, U.S.A.)

3. อุปกรณ์และเครื่องมือในการวิเคราะห์

3.1 เครื่องปั่นเป็นเนื้อเดียวกัน (Homogenizer: Disperser T10 basic, IKA[®] - Werke GMBH & CO.KG, German)

3.2 เครื่องสั่นสะเทือนด้วยคลื่นเสียง (Ultrasonicator: Powersonic[™] ultrasonic cleaner, Chest ultrasonics, Malaysia)

3.3 เครื่องเหวี่ยงแยกตะกอน (Centrifuge: Sorvall RC 6+, Thermo Scientific, U.S.A.)

3.4 เครื่องระเหยสูญญากาศแบบพาราเลล (Parallel evaporator: Syncore, Buchi, Switzerland)

3.5 เครื่องผสมสารละลาย (Vortex mixer: genie II, Scientific industries, U.S.A.)

3.6 เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง (Balance 2 decimal: Model ED224S Series extend, Sartorius, Germany)

3.7 เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง (Balance 4 decimal: Model ED2202S-CW Series extend, Sartorius, Germany)

3.8 เครื่องวัดค่า pH (pH meter: Orion 2 star pH benchtop, Thermo scientific, U.S.A.)

3.9 เครื่องทำแห้งแบบเยือกแข็ง (Freeze dryer: Heto Model FD 2.5, Heto Lab Equipment A/S, Denmark)

3.10 Solid phase extraction C-18 200 มิลลิกรัม ขนาด 5 มิลลิลิตร (SPE C-18 200 mg 5 ml; sep-pak, Waters, U.S.A.)

3.11 เครื่องโครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (High performance liquid chromatography: Hewlett Packard 1100, Agilent Technologies, U.S.A)

3.12 คอลัมน์ C-18 ขนาดอนุภาค 5 ไมโครเมตร ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 4.6 มิลลิเมตร ยาว 250 มิลลิเมตร (C-18 column 5 μm x 4.6 mm x 250 mm: Symmetry[®], Waters, U.S.A.)

3.13 เครื่องตรวจวัดฟลูออเรสเซนซ์ (Fluorescence detector: Hewlett Packard 1046A, Agilent Technologies, U.S.A)

3.14 ตู้แช่เยือกแข็ง อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส (Freezer temperature -20 °C: SF-C995 (GYN), Sanyo, Thailand)

3.15 เครื่องกวนสารละลายด้วยแท่งแม่เหล็ก (Hot plate stirrer: Model HS-101, GEM, Thailand)

- 3.16 เครื่องปั่นผสม (Blender; Hitachi, Japan)
- 3.17 ปิเปต (Pipette; Gilson SAS, France)
- 3.18 ชุดเครื่องแก้วมาตรฐานสำหรับการวิเคราะห์ (Standard glassware)

วิธีการ

1. การเก็บตัวอย่างพืช

การศึกษานี้ทำการสุ่มตัวอย่างโดยใช้หลักความน่าจะเป็น ซึ่งหน่วยตัวอย่างในแต่ละหน่วยประชากรมีโอกาสถูกเลือกให้เข้าไปรวมอยู่ในตัวอย่างที่จะทำการศึกษา โดยทำการเก็บเกี่ยวใบหม่อนและผลหม่อนสายพันธุ์กำแพงแสน-เอ็มบี-42-1 จำนวน 1,080 ใบและ 188 ผลตามลำดับ สำหรับใบหม่อนสายพันธุ์ริรัมย์ 60 สกลนครและคุณไผ่ได้ทำการเก็บเกี่ยวโดยแบ่งเป็น 3 กลุ่มตามอายุใบ ได้แก่ ยอดอ่อนซึ่งเป็นใบที่ตำแหน่งที่ 1 ถึง 3 นับจากปลายยอด ใบอ่อนซึ่งเป็นใบที่ตำแหน่งที่ 4 ถึง 6 และใบแก่ซึ่งเป็นใบที่ตำแหน่งที่ 7 ถึง 10 โดยทำการเก็บเกี่ยวใบหม่อนแต่ละกลุ่มอายุใบของสายพันธุ์ริรัมย์ 60 สกลนครและคุณไผ่เท่ากับ 1,044 ใบ 1,044 ใบและ 1,170 ใบ ส่วนตัวอย่างพืชชนิดอื่นที่ได้ทำการศึกษา ได้แก่ ใบจีเหล็ก ใบชุมเห็ดเทศ ดอกสะเดา ผลขยอ ผลดีปลีและผลมะเฟืองได้ทำการเก็บเกี่ยวจำนวน 1,074 ใบ 937 ใบ 506 ดอก 143 ผล 101 ผลและ 10 ผลตามลำดับ ตัวอย่างพืชแต่ละชนิดจะทำการเก็บเกี่ยวในช่วงเวลา 7.00-9.00 น. หลังจากนั้นจะนำตัวอย่างพืชมาทำการเตรียมตัวอย่างทันที

2. การเตรียมตัวอย่างพืช

นำตัวอย่างพืชมาล้างด้วยน้ำสะอาด ผึ่งในที่ร่มจนแห้ง สำหรับตัวอย่างพืชบางชนิดได้แก่ ใบหม่อน ใบชุมเห็ดเทศ ดอกสะเดา ผลขยอและผลมะเฟืองต้องนำมาลดขนาดก่อน จากนั้นจึงนำไปจุ่มในไนโตรเจนเหลวทันที นำตัวอย่างพืชหลังการจุ่มไนโตรเจนเหลวมาทำแห้งด้วยเครื่องทำแห้งแบบเยือกแข็ง (Heto Model FD 2.5, Heto Lab Equipment A/S, Denmark) นำตัวอย่างแห้งไปทำการบดละเอียดและเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อนำตัวอย่างพืชไปทำการวิเคราะห์ปริมาณเมลาโทนิน ตัวอย่างพืชแต่ละชนิดใช้เวลาในการเตรียมตัวอย่างไม่เกิน 3 วัน

3. การศึกษาวิธีการเตรียมตัวอย่างที่เหมาะสมเพื่อวิเคราะห์ปริมาณเมลานินในพืช

การศึกษาวิธีการเตรียมตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์ปริมาณเมลานินในพืช ทำโดยเปรียบเทียบค่า recovery rate ของการเตรียมตัวอย่าง 2 วิธี ได้แก่ วิธี ultrasonic/SPE ซึ่งดัดแปลงมาจากวิธีของ Chen *et al.* (2003) และวิธี homogenization/LLE ซึ่งดัดแปลงมาจากวิธีของ Reiter *et al.* (2005) โดยวิธีการเตรียมตัวอย่างทั้ง 2 วิธีนี้เป็นวิธีที่นิยมใช้ในการวิเคราะห์เมลานินในพืช ตัวอย่างพืชที่ใช้ในการศึกษา คือ ผลมะเฟืองและผลหม่อน รายละเอียดของวิธีการเตรียมตัวอย่างทั้ง 2 วิธีแสดงดังนี้

3.1 วิธี ultrasonic/SPE

นำผงตัวอย่างพืชหลังการทำแห้งปริมาณ 2 กรัมใส่ในหลอดสำหรับเหวี่ยงแยก เดิมเมทานอลปริมาตร 13 มิลลิลิตรนำไปสกัดด้วยระบบ ultrasonic โดยเครื่องสั่นสะเทือนด้วยคลื่นเสียง (Powersonic™ ultrasonic cleaner, Chest ultrasonics, Malaysia) เป็นเวลา 30 นาทีและทำการควบคุมอุณหภูมิให้ต่ำด้วยน้ำแข็ง จากนั้นนำไปเหวี่ยงแยกด้วยเครื่องเหวี่ยงแยกตะกอน (Sorvall RC 6+, Thermo Scientific, U.S.A) ด้วยความเร็วรอบ 10,000 g ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที แยกเก็บส่วนของสารละลายใสและนำส่วนกากที่ได้ไปทำการสกัดอีกครั้งโดยทำการ เดิมเมทานอลปริมาตร 12 มิลลิลิตร จากนั้นนำสารละลายส่วนใสที่ได้จากการสกัดทั้งสองครั้งมาผสมกันแล้วนำไปทำการระเหยภายใต้ระบบสุญญากาศด้วยเครื่องระเหยแบบพาราเลล (Syncore, Buchi, Switzerland) จนแห้ง เติมสารละลายเมทานอลความเข้มข้น 5% ปริมาตร 2 มิลลิลิตรและเขย่าให้สารที่แห้งให้ละลายกลับในสารละลายอีกครั้ง นำสารละลายที่ได้ไปผ่าน solid phase extraction C-18 (SPE C-18: 200 mg 3 ml; sep-pak, Waters, U.S.A) ที่ผ่านการปรับสภาพให้พร้อมใช้งาน (conditioning) ด้วยเมทานอลปริมาตร 10 มิลลิลิตรและน้ำปราศจากไอออนปริมาตร 10 มิลลิลิตร ทำการล้าง (washing) สารขัดขวางด้วยสารละลายเมทานอลความเข้มข้น 5% ปริมาตร 10 มิลลิลิตรและทำการชะ (elution) เมลาโนนินออกด้วยสารละลายเมทานอลความเข้มข้น 80% ปริมาตร 5 มิลลิลิตร นำตัวอย่างที่ได้ไปวิเคราะห์ปริมาณเมลานินด้วยเครื่อง HPLC-FLD ทำการเตรียมตัวอย่าง 3 ซ้ำ

3.2 วิธี homogenization/LLE

นำผงตัวอย่างพืชหลังการทำแห้งปริมาณ 2 กรัมใส่ในหลอดสำหรับเหวี่ยงแยก เดิม เมทานอลปริมาตร 10 มิลลิลิตรนำไปสกัดด้วยเครื่องปั่นเป็นเนื้อเดียวกัน (Disperser T10 basic, IKA® - Werke GMBH & CO.KG, German) เป็นเวลา 2 นาที และทำการควบคุมอุณหภูมิให้ต่ำด้วย น้ำแข็ง ๕ ตัวอย่างที่ติดบริเวณปลายหัวปั่น (probe) ของเครื่องปั่นเป็นเนื้อเดียวกันด้วยเมทานอล ปริมาตร 3 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปเหวี่ยงแยกด้วยเครื่องเหวี่ยงแยกตะกอน (Sorvall RC 6+, Thermo Scientific, U.S.A) ด้วยความเร็วรอบ 10,000 g ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที แยก เก็บส่วนของสารละลายใสและนำส่วนกากที่ได้ไปทำการสกัดอีกครั้ง โดยทำการเติมเมทานอล ปริมาตร 10 มิลลิลิตร และ๕ตัวอย่างที่ติดบริเวณปลายหัวปั่น (probe) ของเครื่องปั่นเป็นเนื้อ เดียวกันด้วยเมทานอลปริมาตร 2 มิลลิลิตร จากนั้นนำสารละลายส่วนใสที่ได้จากการสกัดทั้งสอง ครั้งมาผสมกัน แล้วนำไปทำการระเหยภายใต้ระบบสุญญากาศด้วยเครื่องระเหยแบบพาราเลล (Syncore, Buchi, Switzerland) จนแห้ง เติมสารละลายบัฟเฟอร์ $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ความเข้มข้น 0.02 โมลาร์ pH 7.4 ปริมาตร 1 มิลลิลิตรและคลอโรฟอร์มปริมาตร 2 มิลลิลิตร เขย่าและตั้งทิ้งไว้ให้ เกิดการแยกชั้นประมาณ 30 นาที ที่ส่วนของสารละลายบัฟเฟอร์และเก็บส่วนของคลอโรฟอร์ม นำ สารละลายที่ได้ไปทำการระเหยภายใต้ระบบสุญญากาศจนแห้ง จากนั้นเติมสารละลายเฟสเคลื่อนที่ (อะซีโตน ไตรคลอโรเอทิลีนและสารละลายบัฟเฟอร์ $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{H}_3\text{PO}_4$ ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ pH 4.5 ใน อัตราส่วนเท่ากับ 15 ต่อ 85) ปริมาตร 2 มิลลิลิตรและเขย่าให้สารที่แห้งให้ละลายกลับในสารละลาย อีกครั้ง นำตัวอย่างที่ได้ไปวิเคราะห์ปริมาณเมลานินด้วยเครื่อง HPLC-FLD ทำการเตรียมตัวอย่าง 3 ซ้ำ

3.3 การตรวจสอบค่า recovery rate

การตรวจสอบค่า recovery rate ของวิธี ultrasonic/SPE สามารถทำได้โดยนำตัวอย่าง พืชที่ผ่านการทำแห้งปริมาณ 2 กรัมมาผ่านการเตรียมตัวอย่างด้วยวิธี ultrasonic/SPE นำสารสกัดที่ ได้ไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC-FLD ในขั้นตอนนี้จะทำให้ทราบความเข้มข้นของเมลานินใน ตัวอย่าง (C₀) จากนั้นนำตัวอย่างพืชที่ผ่านการทำแห้งปริมาณ 2 กรัมมาเติมเมทานอลปริมาตร 13 มิลลิลิตร เติมสารละลายมาตรฐานเมลานินความเข้มข้น 500 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตรปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร หลังจากนั้นนำไปผ่านการเตรียมตัวอย่างตามขั้นตอนในข้อ 3.1 นำสารสกัดที่ได้ไป วิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC-FLD เพื่อหาความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานเมลานินที่ได้จริง

หลังผ่านการเตรียมตัวอย่าง (C_1) สำหรับการตรวจสอบค่า recovery rate ของวิธี
homogenization/LLE ดำเนินการเช่นเดียวกับการตรวจสอบค่า recovery rate ของวิธี
ultrasonic/SPE

ความเข้มข้นสุดท้ายของสารละลายมาตรฐานเมลาโทนินหลังผ่านการเตรียมตัวอย่าง
(C_2) ด้วยวิธี ultrasonic/SPE และวิธี homogenization/LLE เท่ากับ 50 และ 125 นาโนกรัมต่อ
มิลลิลิตรตามลำดับ (การคำนวณค่า C_2 แสดงในภาคผนวก จ) นำค่าความเข้มข้นต่างๆ ที่ได้มา
คำนวณหาค่า recovery rate (%) ตามสูตรการคำนวณ ดังนี้

$$\text{Recovery rate} = (C_1 - C_2) / C_2 \times 100$$

โดยที่ C_1 คือ ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานเมลาโทนินที่ได้จริงหลังผ่านการเตรียม
ตัวอย่าง

C_2 คือ ความเข้มข้นของเมลาโทนินในตัวอย่างพืช

C_2 คือ ความเข้มข้นสุดท้ายของสารละลายมาตรฐานเมลาโทนินหลังผ่านการเตรียม
ตัวอย่าง เมื่อค่า recovery rate เท่ากับ 100%

ทำการเปรียบเทียบค่า recovery rate ของวิธีการเตรียมตัวอย่างทั้งสอง จากนั้นเลือกวิธีที่
มีค่า recovery rate สูงมาใช้ในการเตรียมตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์ปริมาณเมลาโทนินในการทดลอง
ต่อไป

4. การศึกษาปริมาณเมลาโทนินในใบหม่อนเปรียบเทียบกับพืชที่มีสรรพคุณช่วยให้นอนหลับ

นำผงตัวอย่างพืช ได้แก่ ใบหม่อนและผลหม่อนสายพันธุ์กำแพงแสน-เอ็มบี-42-1
ใบจีเห็ดถั่ง ใบบูมเห็ดเทศ ดอกสะเดา ผลขอมและผลคิปลี ที่ผ่านการทำแห้งปริมาณ 2 กรัมมาทำผ่าน
การเตรียมตัวอย่างวิธี ultrasonic/SPE (ข้อ 3.1) จากนั้นนำไปวิเคราะห์ปริมาณเมลาโทนินด้วยเครื่อง
HPLC-FLD รายงานผลปริมาณเมลาโทนินในหน่วยนาโนกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้งซึ่งคำนวณจากค่า
recovery rate เท่ากับ 74.8% โดยเป็นค่า recovery rate เฉลี่ยของวิธี ultrasonic/SPE ทำการเตรียม
ตัวอย่างในพืชแต่ละชนิดอย่างละ 3 ซ้ำ

5. การศึกษาอิทธิพลของสายพันธุ์และอายุใบต่อปริมาณเมลาโทนินในใบหม่อน

นำยอดอ่อน ใบอ่อนและใบแก่ของหม่อนสายพันธุ์บุรีรัมย์ สกลนครและคุณไพ (ภาพผนวกที่ ก1-3) ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่ให้ผลผลิตสูงและมีคุณภาพดี โดยใช้ตำแหน่งใบเป็นดัชนีในการคัดเลือกใบหม่อนตามอายุใบ (รายละเอียดที่เกี่ยวกับการเก็บเกี่ยวแสดงในข้อ 1) สำหรับข้อมูลเกี่ยวกับความยาวและความชื้นของใบหม่อนในช่วงอายุใบต่างๆ ของทั้งสามสายพันธุ์แสดงดังตารางผนวกที่ ก1

นำใบหม่อนไปทำการเตรียมตัวอย่างพืชตามข้อ 2 จากนั้นจึงนำใบหม่อนแห้งไปผ่านการเตรียมตัวอย่างวิธี ultrasonic/SPE (ข้อ 3.1) และวิเคราะห์ปริมาณเมลาโทนินด้วยเครื่อง HPLC-FLD รายงานผลปริมาณเมลาโทนินในหน่วยนาโนกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้งซึ่งคำนวณจากค่า recovery rate เท่ากับ 74.8% โดยเป็นค่า recovery rate เฉลี่ยของวิธี ultrasonic/SPE ทำการเตรียมตัวอย่าง 3 ซ้ำ

6. การศึกษาผลของการกระบวนการผลิตชาต่อปริมาณเมลาโทนินในชาใบหม่อน

การศึกษานี้เลือกใช้ใบหม่อนสายพันธุ์บุรีรัมย์ 60 มาใช้ในการผลิตชา โดยใช้ใบหม่อนทุกช่วงอายุใบ เนื่องจากในการผลิตชาใบหม่อนนิยมนำใบหม่อนทุกช่วงอายุใบมาทำการผลิต

การผลิตชาดำใบหม่อนสามารถทำได้โดยนำใบหม่อนมาล้างให้สะอาดและผึ่งในที่ร่มให้แห้ง ตัดส่วนก้านออกและหั่นใบหม่อนให้มีขนาดประมาณ 0.5 x 0.5 นิ้ว นำใบหม่อนไปคั่วและนวดในกระทะร้อนด้วยมือเป็นเวลา 30 นาทีและนำไปอบที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 40 นาที ขณะที่การผลิตชาเขียวใบหม่อนจะต้องนำใบหม่อนไปผ่านการลวกในน้ำร้อนเป็นเวลา 20 วินาทีหลังจากขั้นตอนการหั่นเพื่อป้องกันการเกิดสีน้ำตาลที่เกิดจากเอนไซม์ (enzymatic browning) จากนั้นนำมาคั่วและนวดในกระทะร้อนด้วยมือเป็นเวลา 30 นาทีและนำไปอบที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 20 นาที (ศิริพร, 2546) กระบวนการผลิตชาใบหม่อนแสดงดังภาคผนวกที่ ก โดยชาใบหม่อนที่ได้จะต้องมีความชื้นเท่ากับ 5 ± 2 %

นำชาใบหม่อนทั้งสองชนิดมาผ่านการเตรียมตัวอย่างด้วยวิธี ultrasonic/SPE (ข้อ 3.1) และนำไปวิเคราะห์ปริมาณเมลาโทนินด้วยเครื่อง HPLC-FLD รายงานผลปริมาณเมลาโทนินในหน่วยนาโนกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้งซึ่งคำนวณจากค่า recovery rate เท่ากับ 74.8% โดยเป็น

ค่า recovery rate เฉลี่ยของวิธี ultrasonic/SPE จากนั้นเปรียบเทียบกับปริมาณเมลาโทนินในใบหม่อนสด ทำการเตรียมตัวอย่าง 3 ซ้ำ

7. การวิเคราะห์ปริมาณเมลาโทนินด้วยเครื่องโครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงร่วมกับเครื่องตรวจวัดฟลูออเรสเซนซ์

การวิเคราะห์ปริมาณเมลาโทนินใช้เครื่องโครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (Hewlett Packard 1100, Agilent Technologies, U.S.A) ร่วมกับเครื่องตรวจวัดฟลูออเรสเซนซ์ (Hewlett Packard 1046A, Agilent Technologies, U.S.A) ที่ดัดแปลงมาจากวิธีของ Chen *et al.* (2003) โดยใช้ระบบ reverse phase ซึ่งประกอบด้วย HP 1100 series vacuum degasser HP 1100 series quaternary pump และ HP 1100 series autosample คอลัมน์ที่ใช้เป็นคอลัมน์ชนิด C-18 ซึ่งมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายในเท่ากับ 4.6 มิลลิเมตร ความยาวเท่ากับ 250 มิลลิเมตรและมีขนาดเม็ดคอนุภาคเท่ากับ 5 ไมโครเมตร (Symmetry[®], Waters, U.S.A) เฟสเคลื่อนที่ที่ใช้คือ อะซีโตไนโตรล์และสารละลายบัฟเฟอร์ $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{H}_3\text{PO}_4$ ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ pH 4.5 ในอัตราส่วน เท่ากับ 15 ต่อ 85 และมีอัตราการไหลเท่ากับ 1 มิลลิลิตร/นาที สำหรับการวิเคราะห์ด้วยเครื่องตรวจวัดฟลูออเรสเซนซ์ใช้ค่าความยาวคลื่นการกระตุ้น (excitation wavelength) และความยาวคลื่นการคาย (emission wavelength) เท่ากับ 248 และ 380 นาโนเมตรตามลำดับ ปริมาตรตัวอย่างที่ทำการฉีด (injection volume) เท่ากับ 20 ไมโครลิตร โดยฉีดตัวอย่างละ 3 ซ้ำ ประมวลผลที่ได้ด้วยโปรแกรม HP Chemstation (Agilent Technologies, U.S.A)

สำหรับการยืนยันผลการวิเคราะห์เมลาโทนินในพืชใช้วิธีการ spike โดยนำสารละลายมาตรฐานเมลาโทนินความเข้มข้น 500 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตรเติมลงในสารสกัดที่ได้จากพืชในอัตราส่วน 1 ต่อ 1 แล้วนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC-FLD

8. การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

การศึกษาวิธีการเตรียมตัวอย่างในการวิเคราะห์เมลาโทนินในพืช การศึกษาปริมาณเมลาโทนินในใบหม่อนเปรียบเทียบกับพืชที่มีสรรพคุณช่วยให้นอนหลับและการศึกษาอิทธิพลของกระบวนการผลิตชาต่อปริมาณเมลาโทนินในชาใบหม่อนใช้การวางแผนการทดลองแบบสุ่มอย่างสมบูรณ์ (Completely Randomized Design) สำหรับการศึกษอิทธิพลของสายพันธุ์และอายุใบต่อ

ปริมาณเมลานินในใบหม่อนใช้การวางแผนการทดลองแบบแฟคตอเรียล (Factorial Design) แสดงข้อมูลในรูปค่าเฉลี่ย \pm ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานและวิเคราะห์ข้อมูลที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 โดยวิเคราะห์ข้อมูลแบบ t-test เมื่อทำการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของปัจจัยที่มี 2 ระดับและวิเคราะห์ข้อมูลแบบ One-way Analysis of Variance (One-way ANOVA) เมื่อวิเคราะห์ความแปรปรวนของค่าเฉลี่ยของปัจจัยที่มี 3 ระดับ จากนั้นเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยใช้วิธี Least Significant Difference (LSD)

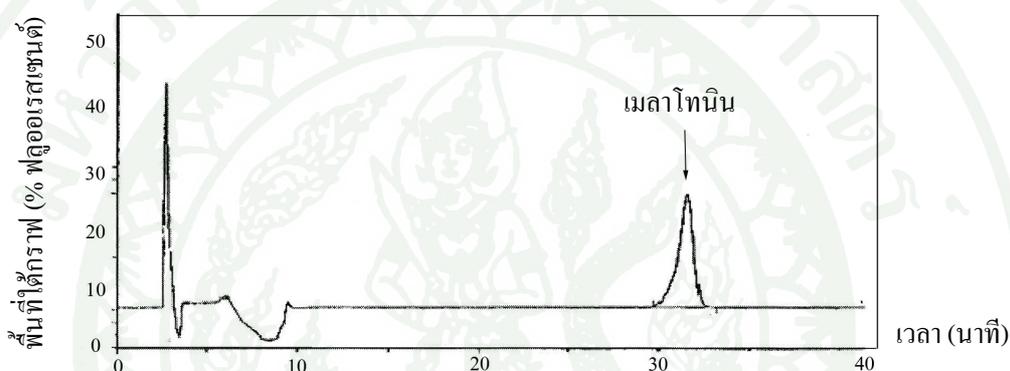
9. สถานที่ทำการวิจัย

ห้องปฏิบัติการภาควิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน กรุงเทพฯ

ผลและวิจารณ์

1. ผลการศึกษาวิธีการเตรียมตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์ปริมาณเมลานินในพืช

การวิเคราะห์เมลานินด้วยเครื่องโครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะภาพสูงร่วมกับเครื่องตรวจวัดฟลูออเรสเซนซ์ตามสภาวะที่ใช้ในการศึกษานี้ สารมาตรฐานเมลานินถูกชะออกมาที่เวลา 31.2 นาที โดยโครมาโตแกรมของเมลานินแสดงดังภาพที่ 15



ภาพที่ 15 โครมาโตแกรมของสารมาตรฐานเมลานินความเข้มข้น 500 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร

วิธีเตรียมตัวอย่างที่ทำการเปรียบเทียบในการทดลองนี้คือ วิธี ultrasonic/SPE และวิธี homogenization/LLE ซึ่งเป็นวิธีที่นิยมใช้ในการเตรียมตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์เมลานิน เมื่อทำการเปรียบเทียบค่า recovery rate ของวิธี ultrasonic/SPE และวิธี homogenization/LLE ในการวิเคราะห์หาปริมาณเมลานินในผลมะเฟืองและผลหม่อน พบว่า วิธี ultrasonic/SPE มีค่า recovery rate มากกว่าวิธี homogenization/LLE ทั้งการวิเคราะห์เมลานินในผลมะเฟืองและผลหม่อน (ตารางที่ 2) โดยวิธี ultrasonic/SPE มีค่า recovery rate มากกว่า 70% ในขณะที่วิธี homogenization/LLE มีค่า recovery rate ไม่เกิน 40% สำหรับค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวนของวิธี ultrasonic/SPE มีค่าต่ำกว่าวิธี homogenization/LLE ทั้งในผลมะเฟืองและผลหม่อน (ตารางที่ 2) รายละเอียดการคำนวณค่า recovery rate และค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวนแสดงในภาคผนวก จ

ตารางที่ 2 ค่า recovery rate และค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวนของวิธีการเตรียมตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์ปริมาณเมลานินในผลมะเฟืองและผลหม่อน

ตัวอย่างพืช	วิธีการเตรียมตัวอย่าง	ความเข้มข้นของ		recovery rate (%)	CV (%)
		สารมาตรฐานเมลานิน			
		C_a	$C_t - C_s$		
ผลมะเฟือง	ultrasonic/SPE	50	39.6 ± 1.0	79.2 ± 1.9^a	2.4
	homogenization/LLE	125	50.6 ± 4.4	40.5 ± 3.5^b	14.5
ผลหม่อน	ultrasonic/SPE	50	35.1 ± 3.8	70.4 ± 7.6^A	11.2
	homogenization/LLE	125	21.2 ± 4.0	16.9 ± 3.4^B	20.1

หมายเหตุ ข้อมูลแสดงค่าเฉลี่ยของผลการทดลอง 2 ซ้ำ

ตัวอักษร a-b ที่ต่างกันแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

ระหว่างคอลัมน์เดียวกันสำหรับตัวอย่างผลมะเฟือง และตัวอักษร A-B ที่ต่างกันแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) ระหว่างคอลัมน์เดียวกันสำหรับตัวอย่างผลหม่อน

C_a คือ ความเข้มข้นสุดท้ายของสารละลายมาตรฐานเมลานินหลังผ่านการเตรียมตัวอย่างเมื่อค่า recovery rate เท่ากับ 100% C_s คือ ความเข้มข้นของเมลานินในตัวอย่างพืชและ C_t คือ ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานเมลานินที่ได้จริงหลังผ่านการเตรียมตัวอย่าง

CV คือ ค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน

ค่า recovery rate ของการเตรียมตัวอย่างเป็นค่าที่แสดงให้เห็นว่าสารที่สนใจเกิดการสูญเสียไปในระหว่างการเตรียมตัวอย่างมากหรือน้อย (Pape and Lüning, 2006) จากผลการทดลองพบว่า วิธี homogenization/LLE มีค่า recovery rate น้อยกว่าวิธี ultrasonic/SPE แสดงว่าสารมาตรฐานเมลานินเกิดการสูญเสียในระหว่างการเตรียมตัวอย่างด้วยวิธี homogenization/LLE มากกว่าวิธี ultrasonic/SPE การสูญเสียของสารมาตรฐานเมลานินที่เกิดในระหว่างการเตรียมตัวอย่างด้วยวิธี homogenization/LLE อาจเกิดเนื่องจากการสูญเสียตัวอย่างพืชหลังจากการสกัดด้วยเทคนิค homogenization เนื่องจากพบว่าตัวอย่างพืชบางส่วนติดค้างอยู่ที่เครื่องมือบริเวณ

ปลายหัวปืน (probe) ปัญหาลักษณะนี้เกิดขึ้นกับการวิเคราะห์เมลลาโทนินในเมล็ดพืชเช่นกัน โดย Manchester *et al.* (2000) รายงานว่าเมลลาโทนินติดค้างอยู่กับเส้นใย (fiber) ของเมล็ดพืชที่เครื่องมือ จึงทำให้ได้ค่า recovery rate ต่ำคือ 20%

การสูญเสียของสารมาตรฐานเมลลาโทนินหลังผ่านการเตรียมตัวอย่างด้วยวิธี homogenization/LLE ยังอาจเกิดขึ้นในระหว่างขั้นตอนการใช้เทคนิค LLE ในการทำให้สารสกัดมีความบริสุทธิ์ขึ้น เนื่องจากโมเลกุลของเมลลาโทนินไม่สามารถเคลื่อนที่ไปยังชั้นคลอโรฟอร์มได้อย่างสมบูรณ์ โดยทั่วไปปริมาณเมลลาโทนินที่พบในพืชมีอยู่ที่ระดับพิโคกรัมถึงนาโนกรัม ซึ่งเมลลาโทนินในระดับที่ต่ำนี้จะมีความสามารถในการละลายได้ทั้งในน้ำและสารละลายที่มีความเป็นขั้วต่ำได้ อันเป็นผลมาจากคุณสมบัติ amphiphilic ของเมลลาโทนินคือมีทั้งส่วนที่มีขั้วและไม่มีขั้วในโมเลกุล (Posmyk and Janas, 2008) จึงทำให้โมเลกุลเมลลาโทนินบางส่วนสามารถสร้างพันธะกับโมเลกุลของน้ำและเคลื่อนที่ไปอยู่ในชั้นน้ำ ซึ่งในขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างชั้นน้ำจะถูกทิ้งไปและทำการเก็บแต่ส่วนของชั้นคลอโรฟอร์มเท่านั้น ผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับ Reiter *et al.* (2005) ซึ่งใช้เทคนิค LLE ในเตรียมตัวอย่างเพื่อการวิเคราะห์เมลลาโทนินในวอลนัท (*Juglan regia* L.) โดยค่า recovery rate ที่ได้มีค่าเท่ากับ 40% นอกจากนี้ Bonnefous and Boulieu (1990) ยังพบว่าเทคนิค SPE เป็นเทคนิคที่มีประสิทธิภาพมากกว่าเทคนิค LLE เมื่อทำการวิเคราะห์ diltiazem (ยาที่ใช้รักษาโรคความดันสูงและโรคไมเกรนชนิดหนึ่ง) และสารที่ได้จากการสลายตัว (metabolite) ของ diltiazem ในเลือด และในปี ค.ศ. 2007 Li *et al.* พบว่าการใช้เทคนิค SPE ในการวิเคราะห์ putulin ในน้ำแอปเปิ้ลเข้มข้นมีค่า recovery rate มากกว่าการใช้เทคนิค LLE และยังพบว่าค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน (coefficient variation) ของเทคนิค SPE มีค่าต่ำซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองที่ได้

ค่า recovery rate ของวิธีการเตรียมตัวอย่างทั้งสองวิธีของผลหมอนมีค่าต่ำกว่าผลมะเฟือง โดยเฉพาะอย่างยิ่งการเตรียมตัวอย่างด้วยวิธี homogenization/LLE (ตารางที่ 2) อาจเกิดเนื่องจากการที่สารสกัดจากผลหมอนมีสีแดงเข้ม จึงทำให้การแยกชั้นน้ำและชั้นคลอโรฟอร์มของสารสกัดจากผลหมอนทำได้ยากกว่าการแยกชั้นน้ำและชั้นคลอโรฟอร์มของสารสกัดจากผลมะเฟืองซึ่งมีสีเหลืองอ่อน การเกิดอิมัลชันระหว่างน้ำและคลอโรฟอร์มเมื่อใช้เทคนิค LLE อาจเป็นอีกหนึ่งสาเหตุที่ทำให้เกิดการสูญเสียของเมลลาโทนิน เนื่องจากทำให้ไม่สามารถแยกของเหลวทั้งสองชนิดออกจากกันได้ แต่อย่างไรก็ตามไม่พบปัญหาดังกล่าวนี้เมื่อใช้วิธี ultrasonic/SPE ในการเตรียมตัวอย่าง นอกจากนี้องค์ประกอบต่างๆ ของพืชแต่ละชนิดยังอาจเป็นปัจจัยที่ทำให้ค่า recovery rate ของผลมะเฟืองและผลหมอนแตกต่างกัน

การสูญเสียเมลานินระหว่างการเตรียมตัวอย่างอาจเกิดจากปฏิกิริยาออกซิเดชันโดยมีแสงเป็นตัวกระตุ้นหรือเกิดจากการเสื่อมสลายโดยอนุมูลอิสระเนื่องจากเมลานินมีความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระซึ่งอาจเกิดขึ้นในระหว่างการปั่นเป็นเนื้อเดียวและการสกัด หรือเมลานินอาจเกิดการระเหิดในขั้นตอนการทำแห้งภายใต้ระบบสูญญากาศ (Hardeland and Poeggeler, 2003; Van Tassel and O'Neill, 2001)

นอกจากนี้เมื่อทำการวิเคราะห์ปริมาณเมลานินในผลมะเฟือง พบว่าไม่สามารถตรวจวัดปริมาณเมลานินได้ทั้งจากการสกัดด้วยวิธี ultrasonic และวิธี homogenization ขณะที่เมื่อใช้วิธี ultrasonic ในการสกัดเมลานินในผลหม่อน พบว่าสามารถสกัดเมลานินในผลหม่อนได้ โดยมีปริมาณเท่ากับ 69.2 นาโนกรัมต่อน้ำหนักแห้ง แต่เมื่อทำการสกัดเมลานินในผลหม่อนด้วยวิธี homogenization พบว่าไม่สามารถตรวจวัดปริมาณของเมลานินที่ระดับ detection limit เท่ากับ 10 นาโนกรัมได้ (ตารางที่ 3) จึงเป็นการสนับสนุนว่าวิธี ultrasonic/SPE เป็นวิธีการเตรียมตัวอย่างที่ประสิทธิภาพในการสกัดเพื่อวิเคราะห์เมลานินในตัวอย่างพืชมากกว่าวิธี homogenization/LLE

ตารางที่ 3 ปริมาณเมลานินในผลมะเฟืองและผลหม่อนที่ได้จากการเตรียมตัวอย่างที่ต่างกัน

วิธีการเตรียมตัวอย่าง	ปริมาณเมลานิน (นาโนกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง)	
	ผลมะเฟือง	ผลหม่อน
Ultrasonic/SPE	n.d.	69.2 ± 4.1
Homogenization/LLE	n.d.	n.d.

หมายเหตุ ข้อมูลแสดงค่าเฉลี่ยของผลการทดลอง 3 ซ้ำ

n.d. หมายถึง ไม่สามารถตรวจวัดได้ที่ระดับ detection limit เท่ากับ 10 นาโนกรัม

ผลการทดลองที่ได้มีความสอดคล้องกับการทดลองของ Arnao *et al.* (2008) ซึ่งได้ใช้เทคนิค ultrasonic ร่วมในการเตรียมตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์เมลานินพบว่าสามารถเพิ่มค่า recovery rate ของการสกัดได้ นอกจากนี้เทคนิค ultrasonic ยังมีประสิทธิภาพดีเมื่อใช้ในการสกัดอนุพันธ์ของ isoflavone 4 ชนิด (daidzin glycitin genistin และ malonyl genistin) ในถั่วเหลือง (Rostagno *et al.*, 2003) และกรดคลอโรจีนิกใน *Eucommia ulmodies* Oliv. ซึ่งเป็นพืชสมุนไพรจีนชนิดหนึ่ง (Li *et al.*, 2005) ปัจจุบันจึงมีการใช้เทคนิคนี้ในการสกัดสารแทนการสกัดแบบดั้งเดิมที่

อาศัยความร้อนเป็นหลัก เช่น การต้ม การกลั่น ไหล (reflex) ซึ่งจะทำให้เกิดการสูญเสียของสารจากปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส ออกซิเดชันและไอออไนเซชันในระหว่างการสกัด

ดังนั้นจากผลที่ได้จากการทดลองนี้จึงเลือกวิธี ultrasonic/SPE เป็นวิธีการเตรียมตัวอย่างเพื่อใช้ในการวิเคราะห์เมลานินตัวอย่างพืชอื่นๆ ต่อไป

2. ผลการศึกษาปริมาณเมลานินในใบหม่อนเปรียบเทียบกับพืชที่มีสรรพคุณช่วยให้นอนหลับ

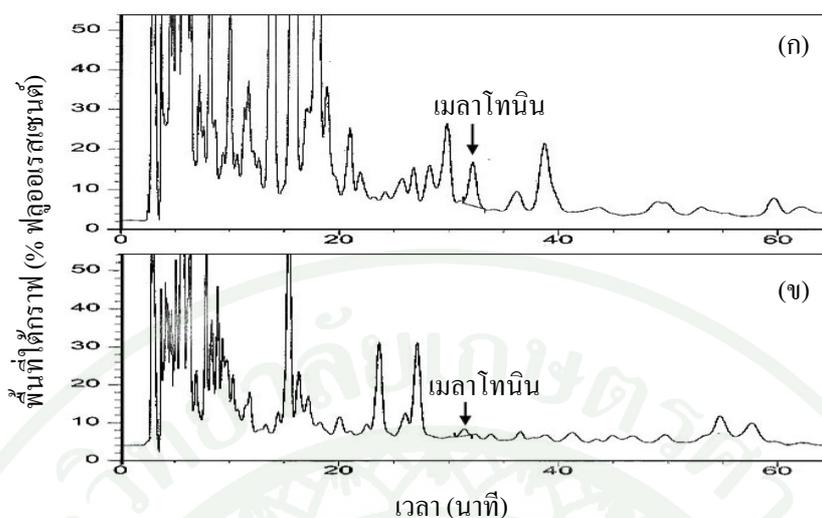
เมื่อวิเคราะห์ปริมาณเมลานินในใบหม่อนเปรียบเทียบกับผลหม่อนและพืชที่มีสรรพคุณช่วยให้นอนหลับ 5 ชนิด ได้แก่ ใบจี้เหล็ก ใบชุมเห็ดเทศ ดอกสะเดา ผลคิปลีและผลยอ พบว่าสามารถวิเคราะห์ปริมาณเมลานินในใบหม่อนและผลหม่อนได้เท่านั้น ขณะที่สมุนไพรไทยชนิดอื่นๆ ตรวจไม่พบเมลานินที่ระดับ detection limit เท่ากับ 10 นาโนกรัม (ตารางที่ 4) โครมาโตแกรมของเมลานินในใบหม่อนและผลหม่อนแสดงดังภาพที่ 16 และ โครมาโตแกรมของพืชที่มีสรรพคุณช่วยให้นอนหลับแสดงดังภาพที่ 17

ตารางที่ 4 ปริมาณเมลานินในใบหม่อนและพืชที่มีสรรพคุณช่วยให้นอนหลับ

ตัวอย่างพืช	ชื่อวิทยาศาสตร์	ส่วนของพืช	ปริมาณเมลานิน (นาโนกรัมต่อมิลลิกรัม)
หม่อน	<i>Morus spp.</i>	ใบ	416.9 ± 3.9 ^a
		ผล	82.1 ± 4.7 ^b
จี้เหล็ก	<i>Cassia siamea</i> Lamk.	ใบ	n.d.
ชุมเห็ดเทศ	<i>Cassia alata</i> L.	ใบ	n.d.
คิปลี	<i>Azadirachta indica</i> A.	ผล	n.d.
ยอ	<i>Morinda citrifolia</i> L.	ผล	n.d.
สะเดา	<i>Piper retrofractum</i>	ดอก	n.d.

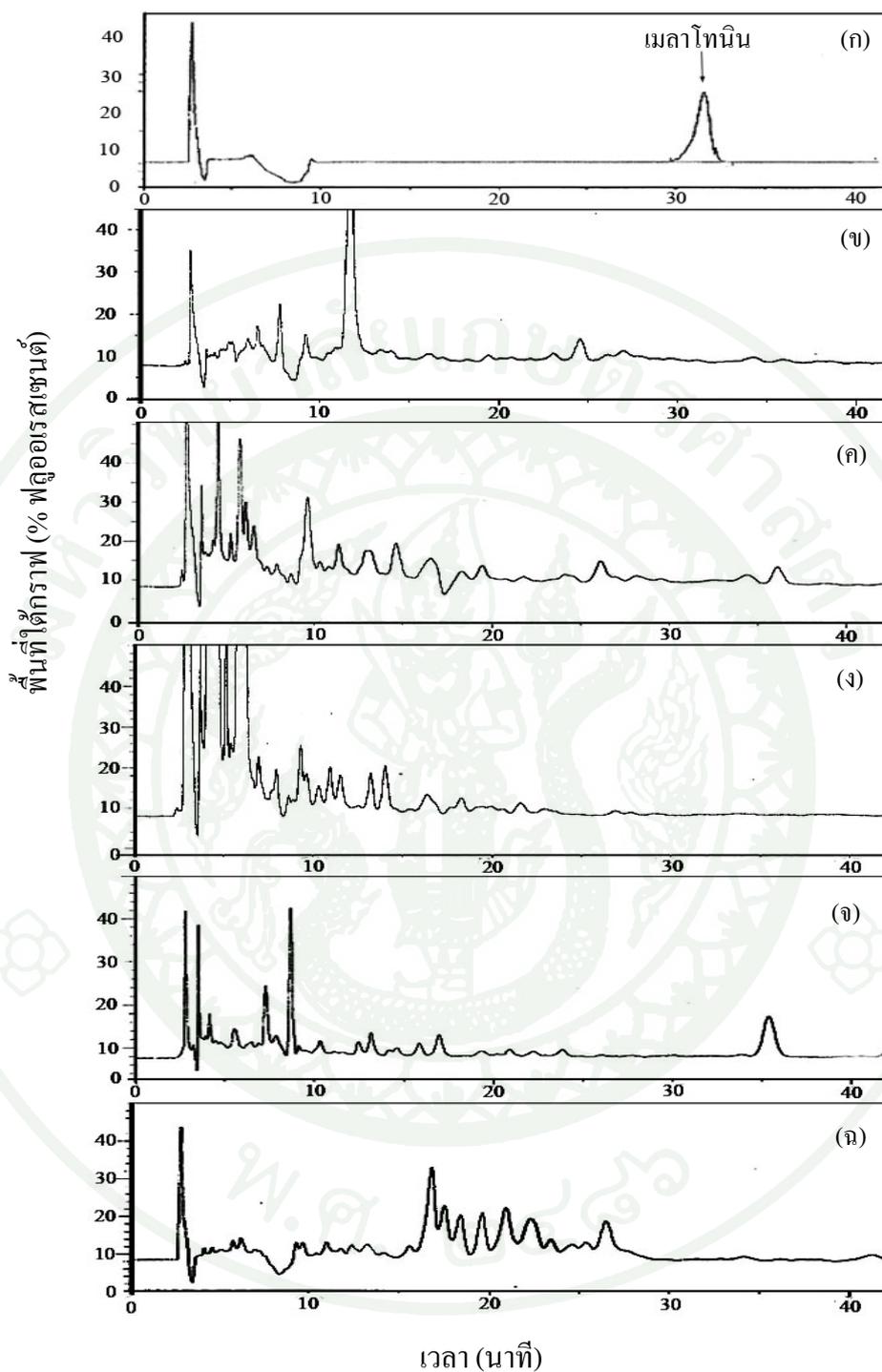
หมายเหตุ ข้อมูลแสดงค่าเฉลี่ยของผลการทดลอง 3 ซ้ำ ตัวอักษร (a-b) ที่ต่างกันแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) ระหว่างคอลัมน์เดียวกัน

n.d. หมายถึง ไม่สามารถตรวจวัดได้ที่ระดับ detection limit เท่ากับ 10 นาโนกรัม



ภาพที่ 16 โครมาโตแกรมของเมลลาโทนินในใบหม่อน (ก) และผลหม่อน (ข) สายพันธุ์
กำแพงแสน-เอ็มบี-42-1

จากผลการทดลองพบว่าใบหม่อนมีปริมาณเมลลาโทนินเท่ากับ 416.9 ± 3.9 นาโนกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้งซึ่งมากกว่าผลหม่อน (82.1 ± 4.7 นาโนกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง) ประมาณ 5 เท่า ($p \leq 0.05$) อาจเนื่องมาจากใบมีกรดอะมิโนทริปโตเฟนซึ่งเป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์เมลลาโทนินสูงกว่าผล โดยทั่วไปใบเป็นบริเวณแรกที่มีการสังเคราะห์โปรตีนในพืช หลังจากนั้นจะลำเลียงโปรตีนที่ได้ไปยังส่วนต่างๆ ของพืชโดยที่ปริมาณของโปรตีนจะลดลงเรื่อยๆ (Pirie, 1994) จึงเป็นไปได้ว่าปริมาณเมลลาโทนินที่พบในส่วนต่างๆ ของพืชอาจเกิดจากความแตกต่างของปริมาณสารตั้งต้นในสังเคราะห์ ผลการทดลองที่ได้นี้สอดคล้องกับ Okazaki and Ezura (2009) ซึ่งได้ทำการวิเคราะห์เมลลาโทนินในใบและผลมะเขือเทศ (*Solanum lycopersicum* L.) สายพันธุ์ Micro-Tum โดยพบว่าใบมีปริมาณเมลลาโทนินมากกว่าผล นอกจากนี้ยังพบเมลลาโทนินในปริมาณสูงในใบพืชหลายชนิด เช่น devil's trumpet (*Datura metal* L.) St. John's wort (*Hypericum perforatum* L.) และ purslane (*Portulaca oleracae* L.) (Baghurst and Coghill, 2006; Cao *et al.*, 2006; Simopoulos *et al.*, 2005) แต่อย่างไรก็ตาม Van Tassel *et al.* (2001) พบว่าใบมีปริมาณเมลลาโทนินต่ำเมื่อเปรียบเทียบกับรากและลำต้นของ Morning glory (*Pharbitis nil* Choisy) สายพันธุ์ Violet

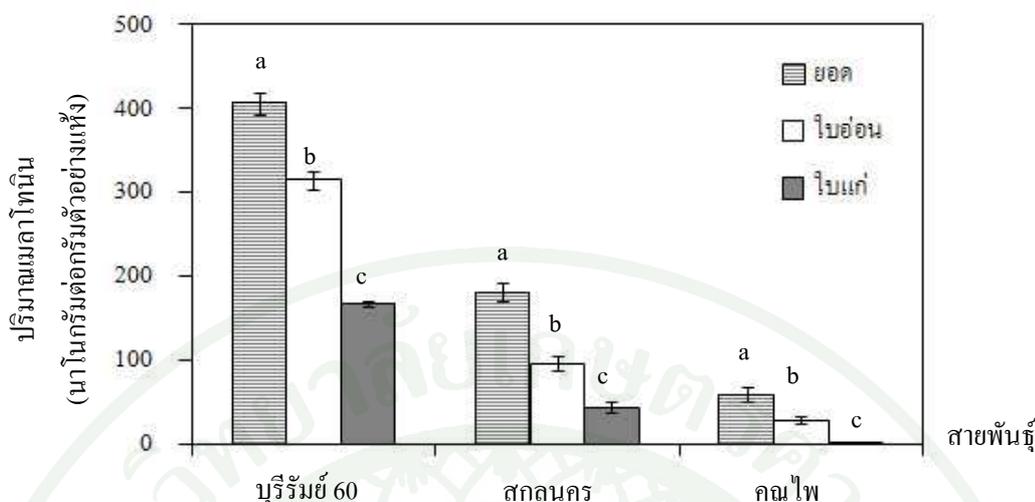


ภาพที่ 17 โครมาโตแกรมของเมลาโทนิน (ก) และพืชที่มีสรรพคุณช่วยให้นอนหลับ ได้แก่ ไบจีเหล็ก (ข) ไบชุมเห็ดเทศ (ค) ดอกสะเดา (ง) ผลดีปติ (จ) และผลขยอ (ฉ)

จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าใบหม่อนและผลหม่อนจัดเป็นแหล่งที่สำคัญของเมลาโทนิน เนื่องจากมีปริมาณเมลาโทนินสูงเมื่อเปรียบเทียบกับพืชชนิดอื่นๆ เช่น กล้วย สตรอเบอร์รี่ เชอร์รี่เปรี้ยว มะเขือเทศ สับปะรด แอปเปิ้ล แครอท และจิงซึ่งมีปริมาณเมลาโทนินเท่ากับ 1.6 12.4 13.5 32.2 36.2 47.6 55.3 และ 583.7 พิโคกรัมต่อกรัมตัวอย่าง ตามลำดับ (Dubbel *et al.*, 1995; Hattori *et al.*, 1995; Burkhardt *et al.*, 2001) แต่อย่างไรก็ตามปริมาณเมลาโทนินในใบหม่อนและผลหม่อนยังมีระดับต่ำกว่าพืชสมุนไพรบางชนิด เช่น feverfew (*Tanacetum parthenium*) สมุนไพรจีนบางชนิดและ St. John's Wort (Murch *et al.*, 1997; Chen *et al.*, 2003; Murch and Saxena, 2006) สำหรับการวิเคราะห์เมลาโทนินในใบหม่อนนั้นได้มีการรายงานครั้งแรกในปี ค.ศ. 2003 โดย Chen *et al.* ซึ่งพบว่าใบหม่อนมีปริมาณเมลาโทนินเท่ากับ 1,510 นาโนกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้งโดยปริมาณนี้มีระดับสูงกว่าปริมาณเมลาโทนินในใบหม่อนที่วิเคราะห์ได้จากการทดลองนี้ ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากอิทธิพลของสายพันธุ์ อายุใบ ปุ๋ย ภูมิอากาศและภูมิประเทศที่ทำการเพาะปลูกซึ่งทำให้ปริมาณเมลาโทนินที่ได้มีความแตกต่างกัน

3. ผลการศึกษาอิทธิพลของสายพันธุ์และอายุใบต่อปริมาณเมลาโทนินในใบหม่อน

การศึกษาอิทธิพลของสายพันธุ์และอายุใบต่อปริมาณเมลาโทนินในใบหม่อนได้ทำการคัดเลือกใบหม่อน 3 สายพันธุ์ ได้แก่ สายพันธุ์บุรีรัมย์ 60 สกลนครและคุณไพ ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่มีความสำคัญทางการค้า เนื่องจากเป็นสายพันธุ์ที่ให้ผลผลิตสูงและคุณภาพดี สายพันธุ์ดังกล่าวนิยมเพาะปลูกในภาคเหนือและภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย จากการทดลองพบว่าปริมาณเมลาโทนินที่พบในใบหม่อนมีปริมาณตั้งแต่ 27.4 ถึง 406.8 นาโนกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง เมื่อพิจารณาปริมาณเมลาโทนินในใบหม่อนแต่ละสายพันธุ์ พบว่า สายพันธุ์บุรีรัมย์ 60 มีปริมาณเมลาโทนินมากที่สุด ($p \leq 0.05$) โดยมีปริมาณตั้งแต่ 166.5 ถึง 406.8 นาโนกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง รองลงมาคือ สายพันธุ์สกลนคร โดยมีปริมาณตั้งแต่ 43.3 ถึง 180.6 นาโนกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง และสายพันธุ์คุณไพ โดยมีปริมาณตั้งแต่ 27.4 ถึง 58.8 นาโนกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ซึ่งแสดงดังภาพที่ 18



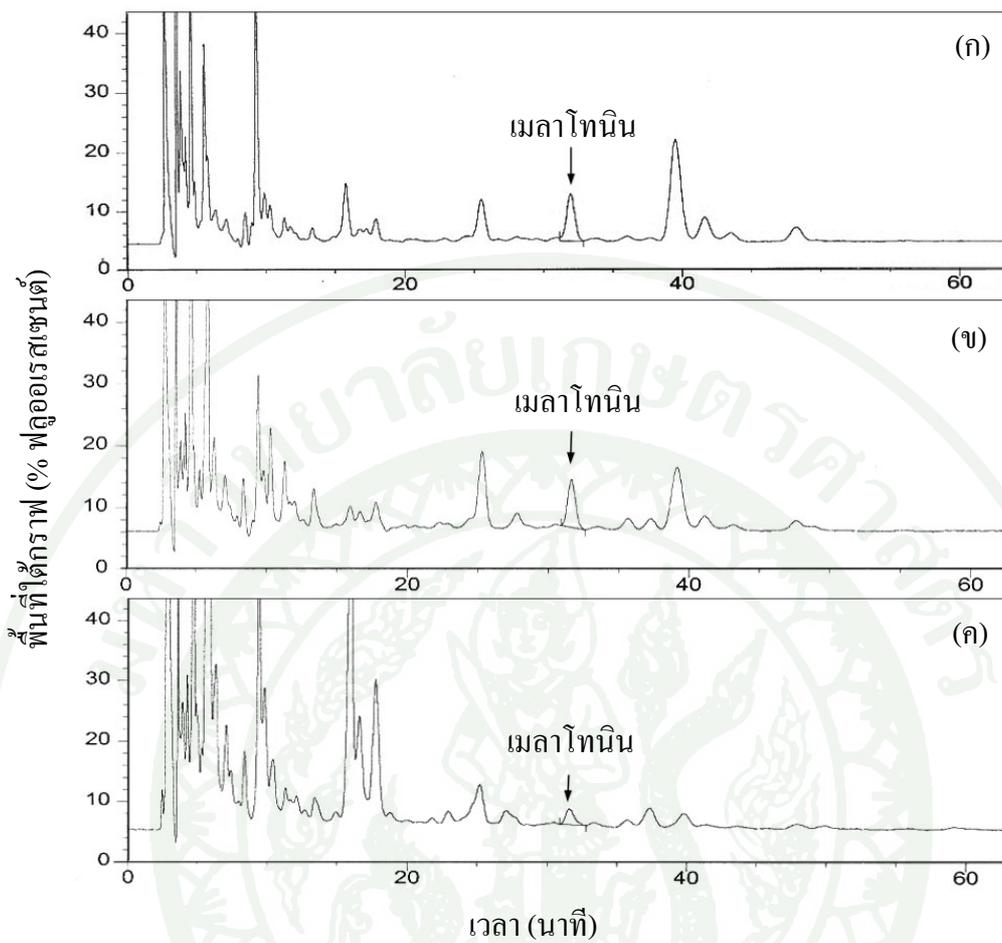
ภาพที่ 18 ปริมาณเมลาโทนินในไข่อ่อนช่วงอายุไข่ต่างๆ ของหม่อน 3 สายพันธุ์

หมายเหตุ ข้อมูลแสดงค่าเฉลี่ยของการทดลอง 3 ซ้ำ

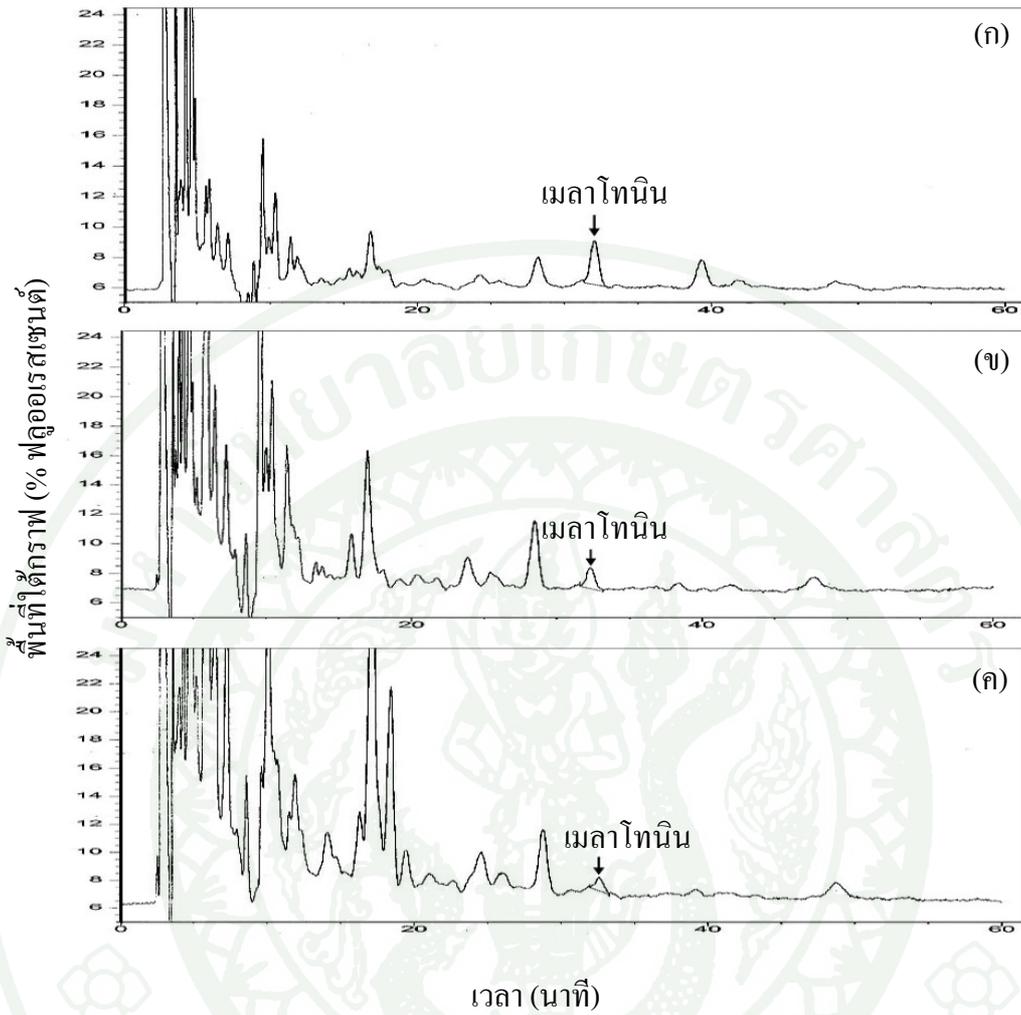
ตัวอักษร (a-c) แสดงความแตกต่างกันของปริมาณเมลาโทนินในแต่ละสายพันธุ์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยใช้วิธี LSD ค่า detection limit ของการวิเคราะห์เมลาโทนิน เท่ากับ 10 นาโนกรัม

โดยทั่วไปสายพันธุ์เป็นปัจจัยสำคัญที่ส่งผลต่อความแตกต่างของปริมาณสารสำคัญชนิดต่างๆ ในพืช ปัจจุบันมีการศึกษาอิทธิพลของสายพันธุ์ต่อปริมาณเมลาโทนินในพืชชนิดต่างๆ ยกตัวอย่างเช่น Dubbels *et al.* (1995) ได้ทำการวิเคราะห์เมลาโทนินในมะเขือเทศ พบว่าปริมาณเมลาโทนินในมะเขือเทศบ้าน (*Lycopersicon esculentum* Mill.) มีมากกว่ามะเขือเทศป่า (*Lycopersicon pimpinellifolium* (L.) Mill.) ประมาณ 5 เท่า ขณะที่ Van Tassel *et al.* (2001) ได้ทำการวิเคราะห์เมลาโทนินด้วยเครื่อง GC-MS และพบว่ามะเขือเทศสายพันธุ์ T5 และ Castlemart มีปริมาณเมลาโทนินแตกต่างกัน ในปีเดียวกัน Burkhardt *et al.* รายงานว่าสายพันธุ์มีผลต่อปริมาณเมลาโทนินในเชอร์รี่เปรี้ยว โดยสายพันธุ์ Montmorency มีปริมาณเมลาโทนินมากกว่าสายพันธุ์ Balaton ประมาณ 6 เท่า นอกจากนี้ยังพบว่าอุ้งนสายพันธุ์ Nebbiolo และ Croatina มีปริมาณเมลาโทนินสูง โดยมีปริมาณเท่ากับ 0.9 และ 0.8 นาโนกรัมต่อกรัมเนื้อเยื่อตามลำดับ ขณะที่สายพันธุ์ Cabernet Franc มีปริมาณเมลาโทนินต่ำที่สุด โดยมีปริมาณเท่ากับ 0.005 นาโนกรัมต่อกรัมเนื้อเยื่อ (Iriti *et al.*, 2006)

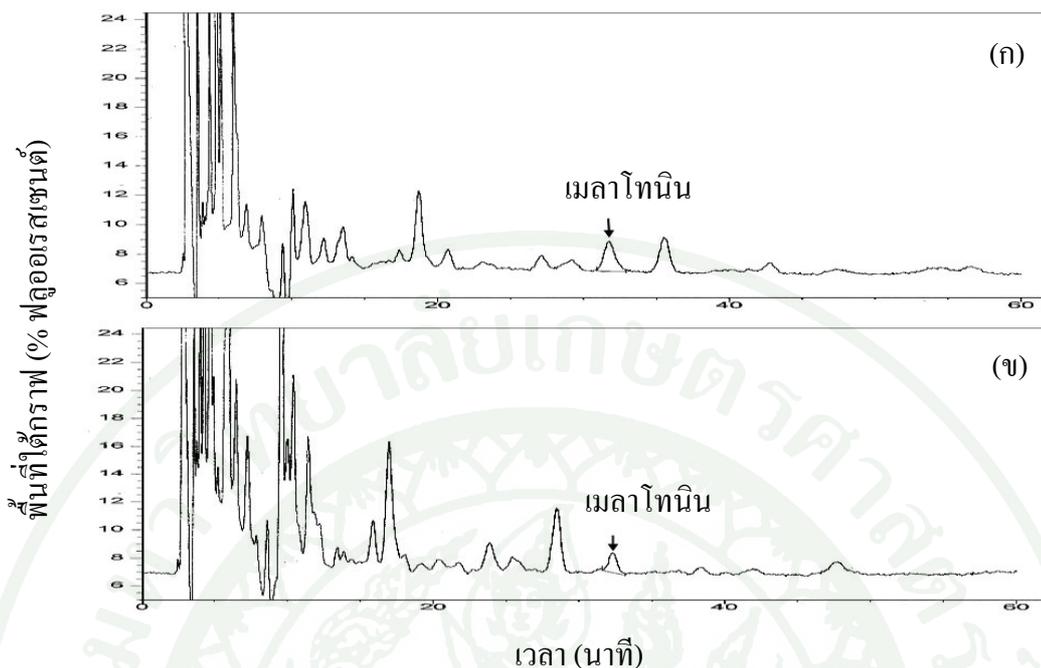
การศึกษาอิทธิพลของอายุใบต่อปริมาณเมลานินในใบหม่อน 3 สายพันธุ์พบว่าปริมาณเมลานินของทั้งสามสายพันธุ์มีแนวโน้มลดลงเมื่ออายุใบเพิ่มขึ้น โดยยอดอ่อนของใบหม่อนแต่ละสายพันธุ์มีปริมาณเมลานินมากที่สุด ($p \leq 0.05$) รองลงมาคือ ใบอ่อนและใบแก่ ตามลำดับ สำหรับใบแก่ของสายพันธุ์คุณไฟไม่สามารถตรวจพบเมลานินที่ระดับ detection limit ที่ 10 นาโนกรัม ซึ่งแสดงดังภาพที่ 18 ลักษณะของโครมาโตแกรมของเมลานินในใบหม่อนแต่ละช่วงอายุใบของหม่อนทั้ง 3 สายพันธุ์แสดงดังภาพที่ 19-21 งานวิจัยในปี ค.ศ. 2001 โดย Van Tassel *et al.* พบว่าต้นอ่อนมะเขือเทศอายุ 2 วันมีปริมาณเมลานินมากกว่าต้นอ่อนที่มีอายุมากกว่า นอกจากนี้ได้ทำการวิเคราะห์ปริมาณเมลานินในผลมะเขือเทศ โดยแบ่งระยะการสุกออกเป็น 4 ระยะ ดังนี้ mature green breaker turning pink light red และ mature red ผู้วิจัยพบว่ามะเขือเทศในระยะ mature green มีปริมาณเมลานินต่ำที่สุดในขณะที่ระยะ mature red มีปริมาณสูงที่สุดในขณะที่ Okazaki and Ezura (2009) ได้ทำการวิเคราะห์เมลานินในมะเขือเทศ สายพันธุ์ Micro-Tom พบว่าใบที่มีขนาดความยาว 20 มิลลิเมตรมีปริมาณเมลานินมากที่สุดและมีแนวโน้มลดลงเมื่อความยาวใบเพิ่มขึ้น ปริมาณเมลานินจะค่อนข้างคงที่เมื่อใบมีความยาวในช่วง 30-50 มิลลิเมตร ในขณะที่ปริมาณเมลานินในผลมะเขือเทศจะมีปริมาณลดลงเมื่อผลแก่ขึ้น ดังนั้นจึงแสดงให้เห็นว่าความแก่อ่อนของส่วนต่างๆ ของพืชมีผลต่อปริมาณเมลานิน ดังเช่นผลการทดลองนี้ที่แสดงให้เห็นว่าอายุใบมีผลต่อปริมาณเมลานินในใบหม่อน ทั้งนี้ปริมาณเมลานินที่แตกต่างกันในแต่ละช่วงอายุใบอาจเกี่ยวข้องกับปริมาณโปรตีนในพืช เนื่องจากโดยปกติใบอ่อนของหม่อนมีระดับโปรตีนสูงเมื่อเปรียบเทียบกับใบที่แก่กว่า (สมหญิง และคณะ, 2538; Shayo, 2000) นอกจากนี้ยังพบว่าใบหม่อนประกอบไปด้วยกรดอะมิโนหลายชนิดรวมทั้งกรดอะมิโนทริปโตเฟน (Coto, 1996) ซึ่งเป็นสารตั้งต้นในกระบวนการสังเคราะห์เมลานิน เหตุผลอีกประการหนึ่งอาจเกี่ยวข้องกับความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของเมลานิน โดยเมลานินอาจจะถูกใช้ในการกำจัดอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นระหว่างการสังเคราะห์แสงของพืช (Okazaki and Ezura, 2009) ซึ่งอัตราการสังเคราะห์แสงของพืชที่เกิดขึ้นในใบแก่จะมีอัตราสูงกว่าใบอ่อนเนื่องจากใบแก่มีปริมาณคลอโรฟิลล์สูง เมื่อใบแก่มีอัตราการสังเคราะห์แสงสูงจึงทำให้เกิดอนุมูลอิสระจำนวนมากและเมลานินในใบแก่ก็จะถูกใช้ไปเพื่อกำจัดอนุมูลอิสระเหล่านี้ จึงอาจเป็นสาเหตุที่ทำให้เมลานินในใบแก่มีปริมาณน้อยกว่าใบอ่อน



ภาพที่ 19 โครมาโตแกรมของเมลลาโทนินในไบบ่มอนสายพันธุ์รีรัมย์ 60
(ก: ยอดอ่อน ข: ไบบ่มอนและ ค: ไบบ่ม)



ภาพที่ 20 โครมาโตแกรมของเมลาโทนินในใบหม่อนสายพันธุ์สกุลนคร
(ก: ยอดอ่อน ข: ใบอ่อนและ ค: ใบแก่)



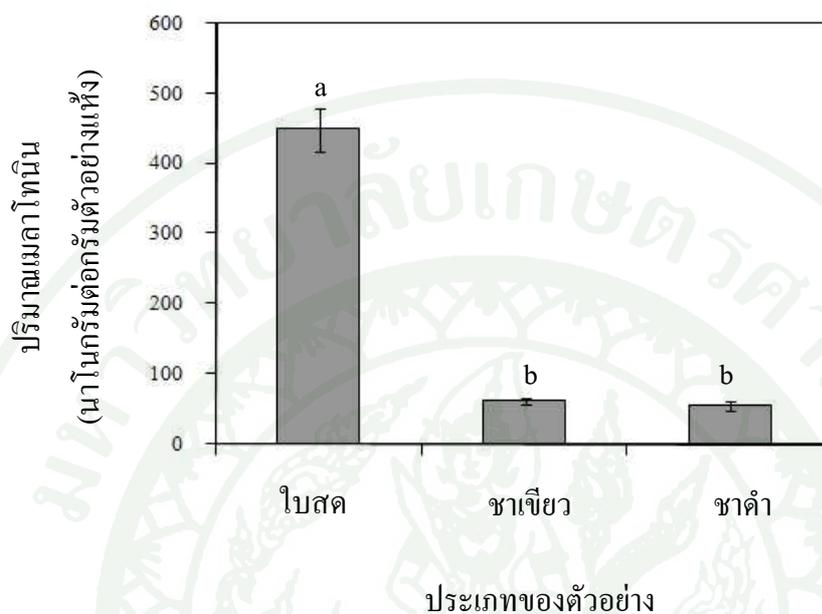
ภาพที่ 21 โครมาโตแกรมของเมลลาโทนินในใบหม่อนสายพันธุ์คุณไพ
(ก: ยอดอ่อนและข: ใบอ่อน)

4. ผลของกระบวนการผลิตต่อปริมาณเมลลาโทนินในชาใบหม่อน

การทดลองนี้ศึกษาผลของกระบวนการผลิตต่อปริมาณเมลลาโทนิน โดยได้เปรียบเทียบกระบวนการผลิต 2 ประเภท ได้แก่ กระบวนการผลิตชาเขียวใบหม่อนและชาดำใบหม่อน การผลิตชาใบหม่อนในการทดลองนี้เลือกใช้ใบหม่อนสายพันธุ์บุรีรัมย์ 60 เนื่องจากการใบหม่อนสายพันธุ์นี้มีปริมาณเมลลาโทนินสูงและเป็นสายพันธุ์ที่นิยมนำมาผลิตชาใบหม่อน

จากผลการทดลองพบว่าปริมาณเมลลาโทนินในชาเขียวใบหม่อนและชาดำใบหม่อนไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p > 0.05$) ถึงแม้ว่าการผลิตชาทั้งสองประเภทมีขั้นตอนการผลิตที่แตกต่างกัน โดยปริมาณเมลลาโทนินในชาเขียวใบหม่อนและชาดำใบหม่อนเท่ากับ 62.2 ± 4.8 และ 54.3 ± 6.4 นาโนกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ (ภาพที่ 22) เมื่อเปรียบเทียบปริมาณเมลลาโทนินในชาใบหม่อนทั้งสองประเภทกับปริมาณเมลลาโทนินในใบหม่อนสดซึ่งมีค่าเท่ากับ 448.5 ± 31.3 นาโนกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง พบว่าเปอร์เซ็นต์การสูญเสียของเมลลาโทนินในชาเขียวและชาดำ

ใบหม่อนมีค่าเท่ากับ 86.1 และ 87.9% ตามลำดับ โครมาโตแกรมของเมลาโทนินในชาใบหม่อน และใบหม่อนสดแสดงดังภาพที่ 23



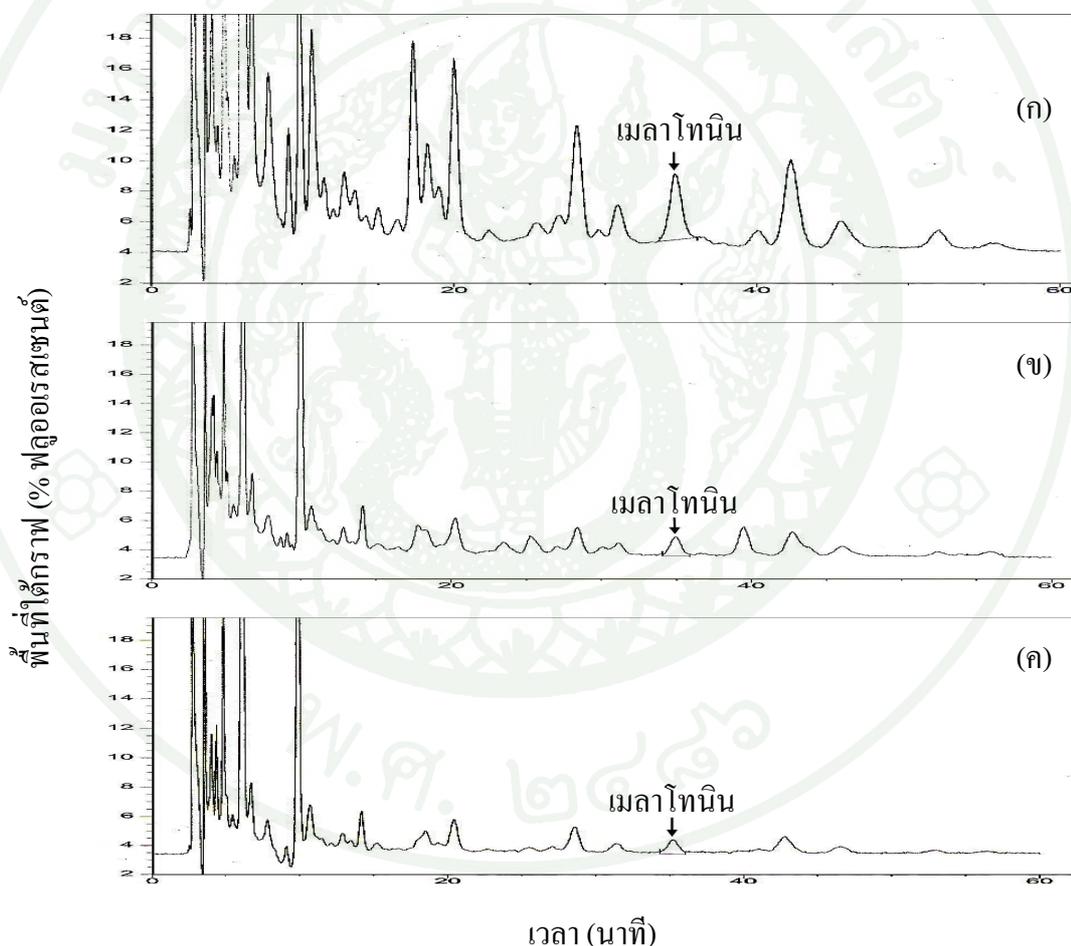
ภาพที่ 22 ปริมาณเมลาโทนินในใบหม่อนและชาใบหม่อน

หมายเหตุ ข้อมูลแสดงค่าเฉลี่ยของการทดลอง 3 ซ้ำ

ตัวอักษร (a-b) แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยใช้วิธี LSD

การผลิตชาเขียวใบหม่อนการสูญเสียของเมลาโทนินเกิดจากความร้อนที่ใช้ในระหว่างขั้นตอนการลวก การคั่วเมล็ดและการอบ โดยแต่ละขั้นตอนใช้เวลาเท่ากับ 20 วินาที 30 นาทีและ 20 นาที ตามลำดับ สำหรับการผลิตชาดำใบหม่อน การสูญเสียของเมลาโทนินเกิดขึ้นในระหว่างขั้นตอนการคั่วเมล็ดและการอบ โดยการคั่วเมล็ดใช้เวลา 30 นาทีเช่นเดียวกับการผลิตชาเขียวใบหม่อน แต่การอบใช้เวลา 40 นาทีซึ่งมากกว่าการอบชาเขียวใบหม่อน ขั้นตอนต่างๆ เหล่านี้ล้วนมีการใช้อุณหภูมิมากกว่า 100 องศาเซลเซียสทั้งสิ้น ผลการทดลองที่ได้นี้สอดคล้องกับ Murch *et al.* (1997) ซึ่งพบว่าความร้อนสามารถทำให้เกิดการสูญเสียของเมลาโทนินได้ โดยพบว่าการทำแห้งแบบลมร้อน (air-oven drying method) ทำให้เมลาโทนินในใบ feverfew (*Tanacetum parthenium* L.) เกิดการสูญเสียมากกว่าการทำแห้งแบบเยือกแห้ง (freeze-drying method) ถึง 15% โดย

เปอร์เซ็นต์การสูญเสียของเมลาโทนินในใบที่ผ่านการทำแห้งแบบลมร้อนและแบบเยือกแข็งมีค่าเท่ากับ 15 และ 30% ตามลำดับ นอกจากนี้ Zieliński *et al.* (2006) ยังพบว่าปริมาณเมลาโทนินในเมล็ด buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) ลดลงถึง 3 เท่าเมื่อผ่านกระบวนการ hydrothermal การปอกเปลือกและการบด และในปี ค.ศ. 2007 De la Puerta *et al.* พบว่าน้ำมันมะกอกที่ผ่านกระบวนการกลั่น (refined olive oil) มีปริมาณเมลาโทนินน้อยกว่าน้ำมันมะกอกบริสุทธิ์ (extra-virgin olive oil) โดยผู้วิจัยคาดว่ากระบวนการทางเคมีและการให้ความร้อนในระหว่างกระบวนการกลั่นมีผลต่อความคงตัวของเมลาโทนินในน้ำมันมะกอก จึงแสดงให้เห็นว่าความร้อนเป็นปัจจัยสำคัญที่ส่งผลต่อความคงตัวของเมลาโทนินในตัวอย่างชนิดต่างๆ



ภาพที่ 23 โครมาโตแกรมของเมลาโทนินในใบหม่อนและชาใบหม่อน
(ก: ใบหม่อนสด ข: ชาเขียวใบหม่อนและ ค: ชาดำใบหม่อน)

นอกจากนี้การสูญเสียของเมลานินในชาดำใบหม่อนยังอาจเกิดจากเอนไซม์ เนื่องจากในการผลิตชาดำใบหม่อนไม่มีขั้นตอนการลวกซึ่งเป็นการทำลายเอนไซม์ จึงทำให้เอนไซม์ในใบหม่อนยังสามารถทำงานได้ โดยเอนไซม์ภายในเซลล์ของใบหม่อนจะออกมาทำปฏิกิริยาหลังจากที่เซลล์เกิดการฉีกขาดในขั้นตอนการคั่วเมล็ดซึ่งเป็นการบดขยี้ใบหม่อน โดยทั่วไปเอนไซม์บางชนิดที่อยู่ในเซลล์พืชมีความสามารถในการทำลายสารชีวภาพที่พบในพืชได้เช่น เอนไซม์ polyphenol oxidase (PPO) โดยในปี ค.ศ. 1999 Jiménez and García-Carmona ได้รายงานว่ายเอนไซม์ PPO สามารถทำลาย quercetin ในเมล็ดถั่วได้และ Fang *et al.*(2007) ได้รายงานว่ายเอนไซม์ PPO สามารถทำลายแอนโทไซยานินใน bayberry (*Myrica rubra* Sieb. et Zucc.) ได้ แต่อย่างไรก็ตามการศึกษาผลของเอนไซม์ต่อความคงตัวของเมลานินในพืชนั้นยังคงไม่มีปรากฏแน่ชัด

สรุปและข้อเสนอแนะ

สรุป

1. วิธี ultrasonic/SPE เป็นวิธีการเตรียมตัวอย่างที่มีความเหมาะสมในการวิเคราะห์เมลาโทนินในพืช เนื่องจากเทคนิคที่ใช้ในการสกัดและการทำให้บริสุทธิ์ขึ้นของวิธีนี้มีประสิทธิภาพและมีความเหมาะสมต่อเมลาโทนินมากกว่าเทคนิคที่ใช้ในวิธี homogenization/ LLE ดังนั้นจึงทำให้ค่า recovery rate ของวิธี ultrasonic/SPE มีค่ามากกว่าวิธี homogenization/ LLE
2. ใบหม่อนเป็นแหล่งสำคัญของเมลาโทนิน โดยใบหม่อนมีปริมาณเมลาโทนินสูงกว่าผลหม่อนประมาณ 5 เท่า ในขณะที่ไม่พบเมลาโทนินในระดับที่ตรวจวัดได้ในพืชที่มีสรรพคุณช่วยให้นอนหลับทั้ง 5 ชนิด ได้แก่ ใบชี่เหล็ก ใบชุมเห็ดเทศ ดอกสะเดา ผลยอและผลคัสปี้ แสดงให้เห็นว่าชนิดและส่วนต่างๆ ของพืชเป็นปัจจัยที่ทำให้ปริมาณเมลาโทนินมีความแตกต่างกัน
3. สายพันธุ์และอายุใบส่งผลต่อความแตกต่างของปริมาณเมลาโทนินในใบหม่อน โดยใบหม่อนสายพันธุ์บุรีรัมย์ 60 มีปริมาณเมลาโทนินมากที่สุด รองลงมาคือ สายพันธุ์สกลนครและสายพันธุ์คุณไผ่ ตามลำดับ โดยปริมาณเมลาโทนินในทุกสายพันธุ์จะมีแนวโน้มลดลงเมื่อใบหม่อนมีอายุมากขึ้น
4. กระบวนการผลิตชามีผลต่อปริมาณเมลาโทนินในใบหม่อน โดยกระบวนการผลิตชาเขียวและชาดำใบหม่อนทำให้เกิดการสูญเสียของเมลาโทนินในใบหม่อนประมาณ 87% โดยปริมาณเมลาโทนินในชาเขียวและชาดำใบหม่อนมีค่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ

ข้อเสนอแนะ

ไบหม่อนเป็นแหล่งที่สำคัญของเมลาโทนินซึ่งเป็นสารที่มีบทบาทสำคัญในการรักษาสมดุลต่างๆ ในร่างกาย เช่น ควบคุมจังหวะรอบวัน ระบบสืบพันธุ์และยังมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระซึ่งเป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดโรคเรื้อรังหลายชนิด ดังนั้นการบริโภคไบหม่อนจึงอาจมีประโยชน์ต่อสุขภาพเป็นอย่างมาก แต่อย่างไรก็ตามการแปรรูปไบหม่อนเป็นผลิตภัณฑ์อาหารในปัจจุบันยังคงมีไม่มากนัก ดังนั้นหากมีการนำไบหม่อนไปแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์อาหาร อาหารเสริม หรือนำไปใช้เป็นส่วนผสมในการผลิตอาหารจะเป็นการเพิ่มคุณค่าให้แก่ผลิตภัณฑ์เหล่านั้น เพราะนอกจากร่างกายจะได้รับเมลาโทนินจากไบหม่อนแล้ว ยังได้รับสารอาหารต่างๆ เช่น โปรตีน คาร์โบไฮเดรต วิตามินและเกลือแร่รวมทั้งสารประกอบฟีนอลิกชนิดต่างๆ ดังนั้นไบหม่อนจึงเป็นทางเลือกใหม่ในการผลิตอาหารเพื่อสุขภาพ รวมทั้งยังเป็นการช่วยเพิ่มมูลค่าทางการตลาดให้แก่ไบหม่อนอีกด้วย สำหรับการแปรรูปไบหม่อนรวมทั้งการผลิตชาไบหม่อนควรเลือกใช้วิธีการและสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเพื่อที่ช่วยลดการสูญเสียของเมลาโทนินในไบหม่อนและสารสำคัญอื่นๆ นอกจากนี้ควรมีการศึกษาในเรื่องพิษวิทยาของเมลาโทนินและสารสำคัญอื่นๆ ที่พบในไบหม่อนเพื่อให้สามารถใช้ประโยชน์ได้อย่างเหมาะสมและปลอดภัย

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

กรมวิชาการเกษตร. ม.ป.ป. **ผลิตภัณฑ์แปรรูปจากไหมหม่อน ผลหม่อน รังไหม**. โรงพิมพ์ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย จำกัด, กรุงเทพฯ. (อัครสำเนา)

กอบกุล แสพนามวงษ์, นภดล พันธุ์กำเนิด, ธเนศ จันทน์เทศ, สุชาติ จุลพุด, จิรศักดิ์ เพ็ชรมีศรี, พรทิพย์ เพชรมนต์, เขาวภา สุกฤตยานนท์, สมชาย ลือมันคง, สุเทพ ขวัญเผือก, วิศิษฐ์ ไฟจันทร์, นคร มหายศนันท์, วัชรพงษ์ แก้วหอม, รุ่งรัตน์ อธิรัตน์, กานดา ฉัตรไชยศิริ และ วรณภา วีระภักดิ์. 2552. **เกษตรดีที่เหมาะสมสำหรับการเลี้ยงไหมระดับอุตสาหกรรม Good Agriculture Practice (GAP) for Industrial Sericulture**. ชุมนุมเกษตรกรรมการเกษตรแห่งประเทศไทย จำกัด, กรุงเทพฯ.

บรรเจิด ต้นติเวท และ ดวงจิตต์ สรรพศรี ต้นติเวท. 2546. **เมลาโทนินของข้าพเจ้า Melatonin and I**. ท. วัฒนาการพิมพ์ จำกัด, กรุงเทพฯ.

ปราโมทย์ สฤษดิ์นรินทร์, อุไรวรรณ นิลเพชร, อรกมล ไกรวงศ์ และ ภาวัต พึ่งขจร. 2552. **การผลิตหม่อนไหมครบวงจรเพื่อเกษตรยั่งยืน**. อุทยานเทคโนโลยี 60 ปี มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. แหล่งที่มา: http://www.rdi.ku.ac.th/Techno_ku60/res-26/index26.html, 3 กันยายน 2552.

ปานสิริ พันธุ์สุวรรณ. 2552. **ต่อมไพบีเนียล จากกายวิภาคศาสตร์สู่ชีววิทยาระดับโมเลกุล**. โรงพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพฯ.

ปิยะรัตน์ โกวิททรงศ์. 2545. **ต่อมไพบีเนียลและเมลาโทนิน**. โรงพิมพ์กรุงเทพ, กรุงเทพฯ.

เพ็ญแข วันไชยชนวงศ์. 2541. **เอกสารประกอบการเรียนวิชา 051521 เทคโนโลยีการแยกผลิตภัณฑ์ให้บริสุทธิ์ (Product Recovery Technology)**. ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ, กรุงเทพฯ. (อัครสำเนา)

วสันต์ นุ้ยภิรมย์. 2546. **หม่อนรับประทานผลและการแปรรูป**. กรมวิชาการเกษตร, กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, กรุงเทพฯ.

วีณา เชิดบุญชาติ. 2547. **ปลูกผักไทยได้ทั้งอาหารและยา**. พิมพ์ครั้งที่ 3. อมรินทร์พริ้นติ้งแอนด์พับลิชชิ่ง จำกัด, กรุงเทพฯ.

ศิริพร บุญชู. 2546. **ชาใบหม่อน**. กรมส่งเสริมการเกษตร, กระทรวงเกษตรศาสตร์และสหกรณ์, กรุงเทพฯ.

สถาบันหม่อนไหมแห่งชาติเฉลิมพระเกียรติสมเด็จพระนางเจ้าสิริกิติ์ พระบรมราชินีนาถ. ม.ป.ป. **หม่อนพันธุ์สกุลนคร**. สำนักงานปลัดกระทรวงเกษตรและสหกรณ์, กรุงเทพฯ. (เอกสารไม่ตีพิมพ์)

สมหญิง ชูประยูร, ศฤชดิพร ชูประยูร และ พรทิพย์ สุขนงสิงห์. 2538. **การปลูกหม่อนเลี้ยงไหม**. โรงพิมพ์ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย จำกัด, กรุงเทพฯ.

สำนักงานมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ. 2552. **มาตรฐานสินค้าเกษตร ชาใบหม่อน**. มกษ. 3000-2552.

สุเทพ ขวัญเฟือก และ ศฤชดิพร ชูประยูร. 2545. **การปลูกหม่อนเลี้ยงไหม**. พันธุ์ พับลิชชิ่ง, กรุงเทพฯ.

โอภา วัชรคุปต์, ปรีชา บุญจุง, จันทนา บุญยะรัตน์ และ มาลีรักษ์ อัดดีสินทอง. 2537. **สารต้านอนุมูลอิสระ Radical Scavenging Agents**. พิมพ์ครั้งที่ 1. พี.เอส.พริ้นส์, นนทบุรี.

Andrisano, V., C. Bertucci, A. Battaglia and V. Cavrini. 2000. Photostability of drugs: photodegradation of melatonin and its determination in commercial formulations. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. 23: 15-23.

- Anisimov, V.N. 2006. Melatonin as antioxidant, geroprotector and anticarcinogen. **Biochimica et Biophysica Acta.** 1757: 573-589.
- Antolin, I., C. Rodriguez, R.M. Sainz, J.C. Mayo, H. Uria, M.L. Kotler, M.J. Rodriguez-Colunga and D. Tolivia. 1996. Neurohormone melatonin prevents cell damage: effect on gene expression for antioxidant enzyme. **The FASEB Journal.** 10: 882-890.
- Arendt, J. 2000. Melatonin, circadian rhythm and sleep. **The New England Journal of Medicine.** 343: 1114-1116.
- _____, L. Paunier and P.C. Sizonenko. 1975. Melatonin radioimmunoassay. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism.** 40: 347-350.
- _____, M. Aldhous and V. Marks. 1984. Alleviation of jet lag by melatonin: preliminary results of controlled double blind trial. **British Medical Journal.** 292: 1170.
- Arnao, B. and J. Hernández-Ruiz. 2008. Assessment of different sample processing procedures applied to determination of melatonin in plants. **Phytochemical Analysis.** 20: 14-18.
- Axelrod, J. 1974. The pineal gland: a neurochemical transducer. **Science.** 174: 1341-1348.
- Baghurst, R. and R. Coghill. 2006. A study of melatonin in plant tissues and its dietary and health implications. **Bioelectromagnetics.** 405-412.
- Balzer, I. and R. Hardeland. 1991. Photoperiodism and effects of indoleamines in a unicellular alga, *Gonyaulax polydra*. **Science.** 253: 795-797.
- _____ and R. Herdeland. 1996. Melatonin in algae and higher plants – possible new roles as a phytohormone and antioxidant. **Botanica Acta.** 109: 180-183.

- Banerjee, S. and L. Margulis. 1973. Mitotic arrest by melatonin. **Experimental Cell Research**. 78: 314-318.
- Barlow-Walden, L.R., R.J. Reiter, M. Abe, M. Pablos, A. Menendez-Palaez, L.D. Chen and B. Poeggeler. 1995. Melatonin stimulates brain glutathione peroxidase activity. **Neurochemistry International**. 26: 497-502.
- Berrueta, L.A., B. Gallo and F. Vicenta. 1995. A review of solid phase extraction: Basic principles and new developments. **Chromatographia**. 40: 474-475.
- Bonnefous, J.L. and R. Boulieu. 1990. Comparaison of solid-phase extraction and liquid-liquid extraction method for liquid chromatographic determination of diltiazem and its metabolites in plasma. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**. 13: 3799-3807.
- Brezezinski, A. 1997. Melatonin in humans. **The New England Journal of Medicine**. 336: 186-195.
- Burkhardt, S., D.X. Tan, L.C. Manchester, R. Harderland and R.J. Reiter. 2001. Detection and quantification of the antioxidant melatonin in Montmorency and Balaton tart cherries (*Prunus cerasus*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 49: 4898-4902.
- Buscumi, N., B. Vandermeer, N. Hooton, R. Pandya, L. Tjosvold, L. Hartling, G. Baker, T.P. Klassen and S. Vohra. 2005. The efficacy and safety of exogenous melatonin for primary sleep disorders. **Journal of General Internal Medicine**. 20: 1151-1158.
- Butt, M. S., A. Nazir, M. T. Sultan and K. Schroe. 2008. *Morus alba* L. nature's functional tonic. **Trends in Food Science & Technology**. xx: 1-8.

- Cao, J., S.J. Murch, R. O'Brien and P.K. Saxena. 2006. Rapid method for accurate analysis of melatonin, serotonin and auxin in plant samples using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**. 1134: 333-337.
- Cavallo, A. and M. Hassan. 1995. Stability of melatonin in aqueous solution. **Journal of Pineal Research**. 18: 90-92.
- Chen, G., Y. Huo, D.X. Tan, Z. Liang, W. Zhang and Y. Zhang. 2003. Melatonin in Chinese herbs. **Life Science**. 73: 19-26.
- Cohen, M., R.A. Small and A. Brzezinski. 1995. Hypotheses: melatonin/steroid combination contraceptives will prevent breast cancer. **Breast Cancer Research and Treat.** 33: 257-264.
- Coto, O. M. 1996. Importancia Nutritiva de la Morera (*Morus alba*), pp. 291-327. In **Centro Nacional de Tecnología Agropecuaria y Forestal Ministerio de Agricultura y Ganadería**, El Salvador San Andrés.
- Cseke, L.J., W.N. Setzer, B. Vogler, A. Kirakosyan and P.B. Kaufman. 2006. Traditional, analytical, and preparative separations of natural products, pp. 263-317. In L.J. Cseke, J.A. Duke and H.L. Brielman, eds. **Natural Product from Plant**. CRC Press Taylor & Francis, New York.
- Daya, S., R.B. Walker, B.D. Glass and S. Anoopkumar-Dukie. 2001. The effect of variations in pH and temperature on stability of melatonin in aqueous solution. **Journal of Pineal Research**. 31: 155-158.
- De la Puerta, C., M.P. Carrascosa-Salmoral, P.P. García-Luna, P.J. Lardone, J.L. Herrera, R. Fernández-Montesinos, J.M. Guerrero and D. Pozo. 2007. Melatonin is a phytochemical in olive oil. **Food Chemistry**. 104: 609-612.

- Dubble, R., R.J. Reiter, E. Klenke, A. Goebel, E. Schnakenberg, C. Ehlers, H.W. Schiwara, and W. Schoot. 1995. Melatonin in edible plants indentified by radioimmunoassay and by high performance liquid chromatography-mass spectrometry. **Journal of Pineal Research**. 18: 28-31.
- Enkhmaa, B., K. Shiwaku, T. Katsube, K. Kitajima, E. Anuurad, M. Yamasaki and Y. Yamane. 2005. Mulberry (*Morus alba* L.) leaves and their major favonol quercetin 3-(6-malonylglucoside) attenuate atherosclerotic lesion development in LDL receptor-deficient mice. **Journal of Nutrition**. 135: 729-734.
- Fang, Z., M. Zhang, Y. Sun and J. Sun. 2007. Polyphenol oxidase from batberry (*Myrica rubra* Sieb. et Zucc.) and its role in anthocyanin degradation. **Food Chemistry**. 103: 268-273.
- Francis, P.L., A.M. Leone, I.M. Young, P. Stovell and R.E. Silman. 1987. Gas chromatographic-Mass spectrometric assay for 6-hydroxymelatonin sulfate and 6-hydromelatonin glucuronide in urine. **Clinical Chemistry**. 33: 453-457.
- Garcia-Parrilla, M.C., E. Cantos and A.M. Troncoso. 2009. Analysis of melatonin in foods. **Journal of Food Composition and Analysis**. 22: 177-183.
- Gulcin, I., M.E. Buyukokuroglu, M. Oktay and O.I. Kufrevioglu. 2002. On the in vitro antioxidative properties of melatonin. **Journal of Pineal Research**. 33: 167-171.
- Haimov, I., M. Laudon, N. Zisapel, M. Souroujon, D. Nof, A. Shlitner, P. Herer, O. Tzischinsky and P. Lavie. 1994. Sleep disorders and melatonin rhythm in elderly people. **BMJ Journal**. 309: 167.

Hamase, K., T. Tomita, A. Kiyomizu and K. Zaitso. 2000. Determination of pineal melatonin by precolumn derivatization reversed-phase high-performance liquid chromatography and its application to the study of circadian rhythm in rats and mice. **Analytical Biochemistry**. 279: 106-110.

Hardeland, R. 1994. Melatonin and 5-methoxytryptamine did not mediate short day effects in the Lemnacean species *Spirodela polyrhiza*, *Lemna minor* and *Lemna trisulca*, pp.136-137. In R. Harderland, ed. **Cell Biological Problems in Chronobiology**. Universitaet Goettingen, Goettingen, German.

_____, R. and B. Fuhrberg. 1996. Ubiquitous melatonin – presence and effects in unicells, plants and animals. **Trends in Comparative Biochemistry & Physiology**. 2: 25-45.

_____, and B. Poeggeler. 2003. Non-vertebrate melatonin. **Journal of Pineal Research**. 34: 233-241.

_____, R.J. Reiter, B. Poeggeler and D.X. Tan. 1993. The significance of the metabolism of the neurohormone melatonin: Antioxidative protection and formation of bioactive substances. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**. 17: 347-357.

_____, S.R. Pandi-Perumal and D.P. Cardinali. 2006. Melatonin. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**. 38: 313-316.

Harumi, T. and S. Matsushima. 2000. Separation and assay methods for melatonin and its precursors. **Journal of Chromagraphy B**. 747: 95-110.

Hattori, A., H. Migitaka, M. Ligo, M. Itho, K. Yamamoto, R. Ohtani-kaneko, M. Hara, T. Suzuki and R.J. Reiter. 1995. Identification of melatonin in plants and its effects on plasma melatonin level and binding to melatonin receptors in vertebrates. **Biochemistry and Molecular Biology International**. 35: 627-634.

- Hernández-Ruiz, J., A. Canao and M.B. Arnao. 2004. Melatonin: a growth stimulating compound present in lupin tissue. **Planta**. 220: 140-144.
- Heüther, G., B. Poeggeler and A. Reimer. 1992. Effect of tryptophan administration on circulating melatonin levels in chicks and rats: evidence for stimulation of melatonin synthesis and release in the gastrointestinal tract. **Life Science**. 51: 945-953.
- Hoffman, R.A. and R.J. Reiter. 1966. Responses of some endocrine organs of female hamsters to pinealectomy and light. **Life Science**. 5: 1147-1150.
- Hughes, R.T., R.L. Sack and A.J. Lewy. 1998. The role of melatonin and circadian phase in age-related sleep-maintenance insomnia: assessment in a clinical trial of melatonin replacement. **Sleep**. 21: 52-68.
- Huie, C.W. 2002. A review of modern sample-preparation techniques for the extraction and analysis of medicinal plants. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**. 373: 23-30.
- Iriti, M., M. Rossoni and F. Faoro. 2006. Melatonin content in grape: myth or panacea? **Journal of the Science of Food and Agriculture**. 86: 1432-1438.
- Jackson, W.T. 1969. Regulation of mitosis II. Interaction of isopropyl *N*-phenylcarbamate and melatonin. **Journal of Cell Science**. 5: 745-755.
- Jiménez, M. and F. García-Carmona. 1999. Oxidation of flavonol quercetin by polyphenol oxidase. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 47: 56-60.
- Kandyliis, K., I. Hadjigeorgiou and P. Harizanis. 2009. The nutritive value of mulberry leaves (*Morus alba*) as feed supplement for sheep. **Tropical Animal Health and Production**. 41: 17-24.

- Karasek, M. 2004. Melatonin, human aging and age-related diseases. **Experimental Gerontology**. 39: 1723-1729.
- _____ and K. Winczyk. 2006. Melatonin in humans. **Journal of Physiology and Pharmacology**. 57: 19-39.
- Karasek, M., M. Pawlikowski, B. Nowakowska-Jankiewicz, H. Kolodziej-Maciejewska, J. Zieleniewski, D. Cieslak and F. Leidenberger. 1990. Circadian variations in plasma melatonin, FSH, LH and prolactin and testosterone levels in infertile men. **Journal of Pineal Research**. 9: 149-157.
- Katsube, T., N. Imawaka, Y. Kawano, Y. Yamazaki, K. Shiwaku and Y. Yamane. 2006. Antioxidant flavonol glycosides in mulberry (*Morus alba* L.) leaves isolated based on LDL antioxidant activity. **Food Chemistry**. 97: 25-31.
- Kennaway, D.J., G.E. Stamp and F.C. Goble. 1992. Development of melatonin production in infants and the impact of prematurity. **Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**. 75: 367-369.
- Kim, S.Y., J.J. Gao, W. Lee, K.S. Ryu, K.R. Lee and Y.C. Kim. 1999. Antioxidative flavonoid from the leaves of *Morus alba*. **Archives of Pharmacal Research**. 22: 81-85.
- Kimura, T., K. Nakagawa, Y. Saito, K. Yamagishi, M. Suzuki, K. Yamaki, H. Shinmoto and T. Miyazawa. 2004. Determination of 1-deoxyjirimycin in mulberry leaves using hydrophilic interaction chromatography with evaporative light scattering detection. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 52: 1415-1418.
- Kolář, J. 2003. **Effect of Melatonin on Circadian Rhythms and Photoperiodism in Higher Plants**. Ph.D. Thesis, Charles University.

- Laganá, A., A. Marino, G. Fago, B. Pardo-Martinez and M. Bizzarri. 1995. Sensitive assay for melatonin in human serum by liquid chromatography. **Analytical Chimica Acta**. 316: 377-385.
- Laganá, A., R. Curini, G. D'Ascenzo, I.D. Leva, A. Faberi and E. Pastorini. 2003. Liquid chromatography/tandem mass spectrometry for the identification and determination of trichothecenes in maize. **Rapid Communication in Mass Spectrometry**. 17: 1037-1043.
- Lerner, A.B., J.D. Case and R.V. Heinzelmtan. 1959. Structure of Melatonin. **Journal of The American Chemical Society**. 81: 6084-6085
- _____, J.D. Case, Y. Takahashi, T.H. Lee and W. Mori. 1958. Isolation of melatonin, The pineal gland factor that lightens melanocyte. **Journal of The American Chemical Society**. 80: 2587.
- _____ and M.D. Case. 1960. Melatonin. **Federation Proceedings**. 19: 590-592.
- Li, H., B. Chen and S. Yao. 2005. Application of ultrasonic technique for extraction chlorogenic acid from *Eucommia ulmodies* Oliv. (*E. ulmodies*). **Ultrasonics Sonochemistry**. 12: 295-300.
- Li, J., R. Wu, Q. Hu and J. Wang. 2007. Solid-phase extraction and HPLC determination of patulin in apple juice concentrate. **Food Control**. 18: 530-534.
- Longoni, B., M.G. Salgo, W.A. Pryor and P.L. Marchiafava. 1998. Effect of melatonin on lipid peroxidation induced by oxygen radicals. **Life Science**. 62: 853-859.
- Luque-Garcia, J.L. and D. C. Luque. 2003. Ultrasound: A powerful tool for leaching. **Trends in Analytical Chemistry**. 22: 41-47.

- Machii, H., 1989. Varietal differences of nitrogen and amino acid contents in mulberry leaves. **Acta Sericologica et Entomologica**. 1: 51-61.
- Maharaj, D.S., S. Anoopkumar-Dukie, B.D. Glass, E.M. Antunes, B. Lack, R.B. Walker and S. Daya. 2002. The identification of UV degradants of melatonin and their ability to scavenge free radicals. **Journal of Pineal Research**. 32: 257-261.
- Malpoux, B., H. Tricoire, F. Mailliet, A. Daveau, M. Migaud, D.C. Skinner, J. Pelletier and P. Chemineau. 2002. Melatonin and seasonal reproduction: understanding the neuroendocrine mechanisms using the sheep as a model. **Reproduction Supplement**. 59: 167-179.
- Manchester, L.C., D.X. Tan, R.J. Reiter, W. Park, K. Monis and W. Qi. 2000. High levels of melatonin in the seeds of edible plants Possible function in germ tissue protection. **Life Science**. 67: 3023-3029.
- Mason, T., L. Paniwnyk and J.P. Lorimer. 1996. The uses of ultrasound in food technology. **Ultrasonics sonochemistry**. 3: 253-260.
- Miller, F.P. and R.P. Maickel. 1970. Fluorometric determination of indole derivative. **Life Science**. 9: 747-752.
- Mitra, S. 2003. **Sample Preparation Techniques in Analytical Chemistry**. John Wiley & Sons, Inc., New Jersey.
- Murch, S.J., B.S.S. Campbell and P.K. Saxena. 2001. The role of serotonin and melatonin in plant morphogenesis: regulation of auxin-induced root organogenesis in *in vitro* cultured explants of St. John's wort (*Hypericum perforatum* L.). **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**. 37: 786-793.

- Murch, S.J., C. B. Simmons and P.K. Saxena. 1997. Melatonin in feverfew and other medicinal plants. **Lancet**. 350: 1598-1599.
- Murch, S.J. and P.K. Saxena. 2002. Melatonin: A potential regulator of plant growth and development? **In Vitro Cellular and Developmental Biology**. 38: 531-536.
- _____ and P.K. Saxena. 2006. A melatonin-rich germplasma line of St John's wort (*Hypericum perforatum* L.). **Journal of Pineal Research**. 41: 284-287.
- _____, S. KrishnaRaj and P.K. Saxena. 2000. Tryptophan is a precursor for melatonin and serotonin biosynthesis in in vitro regenerated St. John's wort (*Hypericum perforatum* L. cv. Anthos) plants. **Plant Cell Reports**. 19: 698-704.
- Nowak, J.Z. and J.B. Zawilska. 1998. Melatonin and its physiological and therapeutic properties. **Pharmacy World & Science**. 20: 18-27.
- O'Neil, M.J., P.E. Heckelman, C.B. Koch, K.J. Roman, C.M. Kenny and M.R. D'Arecca. 2006. **The Merck Index an Encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals**. 14th ed. Merck & Co, Inc, New Jersey.
- Okatani, Y. and Y. Sagara. 1994. Amplification of nocturnal melatonin secretion in women with functional secondary amnorhea: relation to endogenous estrogen concentrations. **Clinical Endocrinology**. 41: 763-770.
- Okazaki, M., and H. Ezura. 2009. Profiling of melatonin in the model tomato (*Solanum lycopersicum* L.) cultivar Micro-Tum. **Journal of Pineal Research**. 46: 338- 343.

- Pablos, M.I., R.J. Reiter, G.G. Ortiz, J.M. Guerrero, M.T. Agapito, J.I. Chuang and E. Sewerynek. 1998. Rhythms of glutathione peroxidase and glutathione reductase in brain of chick and their inhibition by light. **Neurochemistry International**. 32: 69-75.
- Pandi-Perumal, S.R., V. Srinivasan, G.J.M. Maestroni, D.P. Cardinali, B. Poeggeler and R. Harderland. 2006. Melatonin nature's most versatile biological signal? **The FEBS Journal**. 273: 2813-2838.
- Pang, S.F. and A.E. Allen. 1986. Extra-pineal melatonin in retina: its regulation and physiological function. **Pineal Research Review**. 4: 55-96.
- Pape, C. and K. Lüning. 2006. Quantification of melatonin in phototrophic organisms. **Journal of Pineal Research**. 41: 157-165.
- Pavlović, D.M., S. Babić, A.J.M. Horvat and M. Kaštelan-Macan. 2007. Sample preparation in analysis of pharmaceuticals. **Trends in Analytical Chemistry**. 26: 1062-1075.
- Pirie, N.W. 1994. The bulk extraction and quality of leaf protein, pp. 1-22. In H.F. Linskens and J.F. Jackson, eds. **Modern Methods of Plant Analysis Volume 16 Vegetables and Vegetable Product**. Springer-Verlag, Berlin.
- Poeggeler, B., I. Balzer, R. Harderland and A. Lerchl. 1991. Pineal hormone melatonin oscillates also in the dinoflagellate *Gonyaulax polyedra*. **Naturwissenschaften**. 39: 399-408.
- _____, S. Thuermann, A. Dose, M. Schoenke, S. Burkhardt and R. Hardeland. 2002. Melatonin's unique radicals scavenging properties – roles of its functional substituents as revealed by a comparison with its structural analogs. **Journal of Pineal Research**. 33: 20-30.

- Posmyk, M.M. and K.M. Janas. 2008. Melatonin in plants. **Acta Physiologiae Plantarum**. 31: 1-11.
- Pucci, V., A. Ferranti, R. Mandrioli and M.A. Raggi. 2003. Determination of melatonin of melatonin in commercial preparations by micellar electrokinetic chromatography and spectrofluorometry. **Analytical Chimica Acta**. 488: 97-105.
- Qi, W., R.J. Reiter, D.X. Tan, L.C. Manchester, A.W. Siu and J.J. Garcia. 2001. Increase level of oxidatively damaged of DNA induced by Chromium (III) and H₂O₂ : protection by melatonin and related molecule. **Journal of Pineal Research**. 29: 54-61.
- Reiter, R.J. 1986. Normal patterns of melatonin leves in the pineal gland and body fluids of humans and experimental animals. **Journal of Neural Transmission Supplementum**. 21: 35-54.
- _____. 1991. Pineal melatonin: cell biology of its synthesis and of its physiological interactions. **Endocrine Reviews**. 12: 151-180.
- _____ and D.X. Tan. 2002. Melatonin: an antioxidant in edible plants. **Annals of the New York Academy of Sciences**. 957: 341-344.
- _____, D.X. Tan, S. Burkhardt and L.C. Manchester. 2001. Melatonin in plants. **Nutrition Reviews**. 59: 286-290.
- _____, L.C. Manchester, D.X. Tan. 2005. Melatonin in walnuts: Influence on levels of melatonin and total antioxidant capacity of blood. **Nutrition**. 21: 920-924.
- Rostagno, M.A., M. Palma and C.G. Barroso. 2003. Ultrasound-assisted extraction of soy isoflavones. **Journal of Chromatography A**. 1012: 119-128.

- Rouessac, F. and A. Rouessac. 2000. **Chemical Analysis Modern Instrumentation Methods and Techniques.** John Wiley & Sons, Ltd., West Sussex, England.
- Shayo, C. M. 2000. The potential of mulberry as feed for ruminants in central Tanzania, pp. 131-136. *In Proceedings of an electronic conference carried out between May and August 2000*, Viale delle Terme di Caracalla, Rome.
- Siegrist, C., C. Benedetti, A. Orlando, J.M. Beltran, L. Tuchscher, C.M. Nosedà, L.I. Brusco and D.P. Cardinali. 2001. Lack of Changes in serum prolactin, FSH, TSH and estradiol after melatonin treatment in doses that improve sleep and reduce benzodiazepine consumption in sleep-disturbed, middle-aged and elderly patients. **Journal of Pineal Research.** 30: 34-42.
- Simpoulos, A.P., D.X. Tan, L.C. Manchester and R. J. Reiter. 2005. Purlane: a plant source of omega-3 fatty acids and melatonin. **Journal of Pineal Research.** 39: 331-332.
- Srivastava, S., R. Kapoor, A. Thathota and R.P. Srivastava. 2006. Nutritional quality of leaves of some genotypes of mulberry (*Morus alba*). **International Journal of Food Sciences and Nutrition.** 57: 305-313.
- Tan, D.X., L.C. Manchester, P.D. Mascio, G.R. Martinez, F.M. Prado and R.J. Reiter. 2007. Novel rhythm of N¹-acetyl-N²-formyl-5-methoxykynuramine and its precursor melatonin in water hyacinth: importance for phytoremediation. **The FASEB Journal.** 21: 1724-1729.
- _____, L.C. Manchester, R.J. Reiter, B.F. Plummer, L.J. Hardies, S.T. Vijayalaxmi and A.M. Shepherd. 1998. A novel melatonin metabolite, cyclic 3-hydroxymelatonin: a biomarker of in vivo hydroxyl radical generation. **Biochemical and Biophysical Research Communications.** 253: 614-620.

Tan, D.X, L.D. Chen, B. Poeggeler, L.C. Manchester and R.J. Reiter. 1993. Melatonin: a potent endogenous hydroxyl radical scavenger. **Endocrine Journal**. 1: 57-60.

_____, R. Hardeland, L.C. Manchester, B. Poeggeler, S.L. Burillo, J.C. Mayo, R.M. Sainz and R.J. Reiter. 2003. Mechanistic and comparative studies of their interactions with the ABTS cation radical. **Journal of Pineal Research**. 34: 249-259.

_____, R.J. Reiter, L.C. Manchester, M.T. Yan, M. El-Sawi, R.M. Sains, J.C. Mayo, R. Kohen, M. Allegra and R. Hardeland. 2002. Chemical and physical properties and potential mechanisms: melatonin as a broad spectrum antioxidant and free radical scavenger. **Current Topic Medical chemistry**. 2: 181-197.

Tsushida, T., T. Murai, M. Omori and J. Okamoto. 1987. Production of a new type tea containing a high level of gamma-aminobutyric acid. **Nippon Nogeikagaku Kasishi**. 61:817-822.

Urata, Y., S. Honma, S. Goto, S. Todoroki, T. Iida, S. Cho, K. Honma and T. Kondo. 1999. Melatonin induces gamma-glutamylcysteine synthetase mediated by activator protein-1 in human vascular endothelial cells. **Free Radical Biology and Medicine**. 27: 833-847.

Van Tassel, D.L. 1997. **Identification and Quantification of Melatonin in Higher Plants**. Ph.D. Thesis, University of California.

_____ and S.D. O'Neill. 2001. Putative regulatory molecules in plants: evaluating melatonin. **Journal of Pineal Research**. 31: 1-7.

_____, N. Robert, A. Lewy and S. O'Neil. 2001. Melatonin in plant organs. **Journal of Pineal Research**. 31: 8-15.

- Vitale, A.A., C.C. Ferrari, H. Aldana and J.M. Affanni. 1996. Highly sensitive method for the determination of melatonin by normal-phase high-performance liquid chromatography with fluorometric detector. **Journal of Chromatography B.** 681: 381-384.
- Vivien-Roels, B. and P. Pévet. 1993. Melatonin: presence and formation in invertebrates. **Experientia.** 49: 642-647.
- Wang, L. and C.L. Weller. 2006. Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants. **Trends in Food Science & Technology.** 17: 300-312.
- Wolf, K. 2000. **Circadian Oscillations of Melatonin in *Chenopodium rudrum* plants – in Czech.** M.S. Thesis, Charles University.
- _____, J. Kolář, E. Writters, W. Dongen, H. Onckelen and I. Macháčková. 2001. Daily profile of melatonin levels in *Chenopodium rubrum* L. depend on photoperiod. **Journal of Plant Physiology.** 158: 1491-1493.
- Zambakhidze, N.E., K.V. Sulaberidze, V.V. Mzhavanadze and G. Ch. Tsiklauri. 2005. Sterols of mulberry leaves and small curl disease. **Applied Biochemistry and Microbiology.** 41: 404-406.
- Zieliński, H., A. Michalska, M.K. Piskula and H. Kozłowska. 2006. Antioxidants in thermally treated buckwheat groats. **Molecular Nutrition and Food Research.** 50: 824-832.



ภาคผนวก



ภาคผนวก ก
ตัวอย่างใบหม่อน

ตารางผนวกที่ ก1 ความยาวและความชื้นของใบหม่อนแต่ละช่วงอายุใบของหม่อน 3 สายพันธุ์

สายพันธุ์	อายุใบ	ความยาว (เซนติเมตร)	ความชื้น (%)
บุรีรัมย์ 60	ยอดอ่อน	11.5 ± 1.8 ^a	82.9 ± 0.5 ^b
	ใบอ่อน	18.5 ± 1.1 ^b	82.0 ± 0.9 ^b
	ใบแก่	21.6 ± 1.1 ^c	74.6 ± 0.2 ^a
สกลนคร	ยอดอ่อน	8.9 ± 2.2 ^a	81.2 ± 0.3 ^b
	ใบอ่อน	16.8 ± 2.4 ^b	78.2 ± 1.3 ^b
	ใบแก่	24.0 ± 1.4 ^c	71.9 ± 0.2 ^a
คุณไพ	ยอดอ่อน	8.8 ± 1.8 ^a	81.7 ± 0.1 ^b
	ใบอ่อน	14.3 ± 1.6 ^b	76.3 ± 3.2 ^b
	ใบแก่	18.2 ± 1.3 ^c	74.0 ± 0.4 ^a

หมายเหตุ สำหรับการหาความยาวเฉลี่ยของใบหม่อน n = 10

ข้อมูลแสดงค่าเฉลี่ยของการทดลอง 3 ซ้ำ

ตัวอักษร a-c แสดงความแตกต่างกันของแต่ละสายพันธุ์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

(p ≤ 0.05) เมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยใช้วิธี LSD



ภาพผนวกที่ ก1 ยอดอ่อน (ก) ใบอ่อน (ข) และใบแก่ (ค) ของหม่อนสายพันธุ์บุรีรัมย์ 60



(ก)

(ข)

(ค)

ภาพผนวกที่ ก2 ยอดอ่อน (ก) ใบอ่อน (ข) และใบแก่ (ค) ของหม่อนสายพันธุ์สกลนคร



(ก)

(ข)

(ค)

ภาพผนวกที่ ก3 ยอดอ่อน (ก) ใบอ่อน (ข) และใบแก่ (ค) ของหม่อนสายพันธุ์คุณไพ



ภาคผนวก ข
พืชที่มีสรรพคุณช่วยให้นอนหลับ

พืชที่มีสรรพคุณช่วยให้นอนหลับ (วิณา, 2547)



ภาพผนวกที่ ข1 ชีเหล็ก (*Cassia siamea* Lamk.)



ภาพผนวกที่ ข2 ชุมเห็ดเทศ (*Cassia alata* L.)



ภาพผนวกที่ ข3 ดีปลี (*Piper retrofractum*)



ภาพผนวกที่ ข4 ดอกสะเดา (*Azadirachta indica* A.)



ภาพผนวกที่ ข5 ผลยอ (*Morinda citrifolia* L.)



ภาพผนวกที่ ข6 หม่อน (*Morus* spp.)



ภาคผนวก ค
ภาพแสดงกระบวนการผลิตชาใบหม่อน



(ก)

(ข)

(ค)

ภาพผนวกที่ ค1 ยอดอ่อน (ก) ใบอ่อน (ข) และใบแก่ (ค) ของใบหม่อนสายพันธุ์ริรมย์ 60 สำหรับ
ผลิตชาใบหม่อน



ภาพผนวกที่ ค2 การตัดส่วนก้านและหั่นใบหม่อนให้มีขนาด 0.5 x 0.5 นิ้ว



(ก)

(ข)

ภาพผนวกที่ ค3 การลวกใบหม่อน (ก) และแช่ใบหม่อนในน้ำเย็นทันทีหลังการลวก (ข) สำหรับการผลิตชาเขียวใบหม่อน



ภาพผนวกที่ ค4 การคั่วเมล็ดใบหม่อนในกระทะด้วยไฟอ่อนสำหรับการผลิตชาเขียวใบหม่อน



ภาพผนวกที่ ค5 การคั่วเมล็ดใบหม่อนในกระทะด้วยไฟอ่อนสำหรับการผลิตชาดำใบหม่อน



ภาพผนวกที่ ๑๖ การอบใบหม่อนที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 20 นาทีสำหรับการผลิตชาเขียวใบหม่อนและ 40 นาทีสำหรับการผลิตชาดำใบหม่อน



(ก)

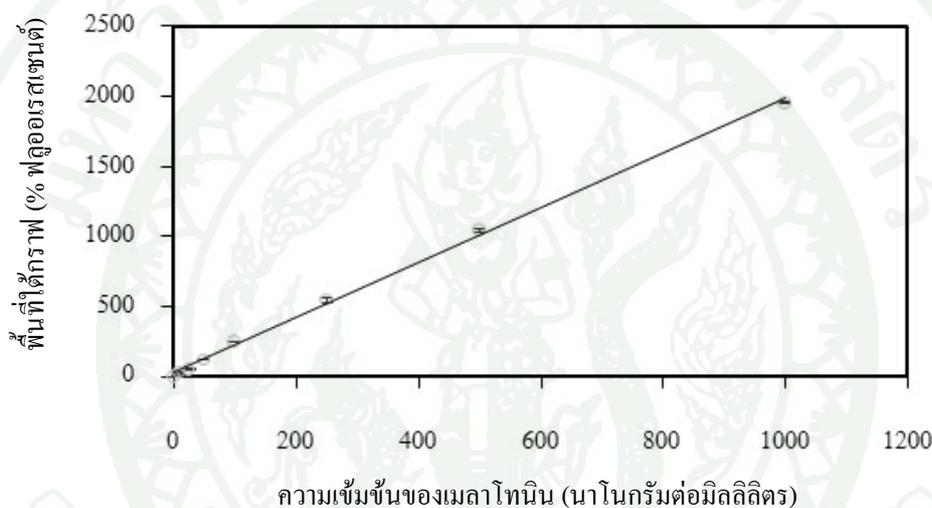
(ข)

ภาพผนวกที่ ๑๗ ผลิตรกัณฑ์ชาเขียวใบหม่อน (ก) และชาดำใบหม่อน (ข)



วิธีการเตรียมสารละลายมาตรฐานเมลานิน (Laganà *et al.*, 2003)

นำผงสารมาตรฐานเมลานินปริมาณ 10 มิลลิกรัมมาละลายในเมทานอล ปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิตร จะได้สารละลายมาตรฐานเมลานินความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิตร (stock solution) และทำการเตรียมสารละลายมาตรฐานเมลานินที่มีความเข้มข้นเท่ากับ 1000 500 250 100 50 20 และ 10 นาโนกรัมต่อมิลลิตรซึ่งจะต้องทำการเตรียมก่อนการวิเคราะห์ เก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส



ภาพผนวกที่ ๑1 กราฟมาตรฐานของสารมาตรฐานเมลานิน $y = 1.9645x + 28.081$ $R^2 = 0.99$



ภาคผนวก จ

การคำนวณค่า recovery rate และค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน
ของวิธีการเตรียมตัวอย่าง

การคำนวณค่า recovery rate ของวิธีการเตรียมตัวอย่าง

สูตรที่ใช้ในการคำนวณค่า recovery rate

$$\text{recovery rate} = (C_t - C_s) / C_a \times 100$$

ตัวอย่างการคำนวณค่า C_a ของวิธี ultrasonic/SPE

การคำนวณหาค่า C_a เพื่อใช้ในการคำนวณค่า recovery rate ของวิธีการเตรียมตัวอย่างที่ใช้ในการวิเคราะห์เมลาโทนิน สามารถคำนวณดังนี้

เนื่องจากการหาค่า recovery rate ของวิธีการเตรียมตัวอย่าง ต้องทำการเติมสารมาตรฐานเมลาโทนินความเข้มข้น 500 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตรลงในสารสกัดก่อนผ่านการเตรียมตัวอย่าง

ดังนั้น ปริมาณสารมาตรฐานเมลาโทนินในสารสกัด = 500 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร x 0.5 มิลลิลิตร
= 250 นาโนกรัม

ปริมาตรสุดท้ายของสารสกัดที่ได้หลังผ่านการเตรียมตัวอย่างเท่ากับ 5 มิลลิลิตร

ทำให้ ความเข้มข้นสุดท้ายของสารมาตรฐานเมลาโทนิน = 250 นาโนกรัม/5 มิลลิลิตร
= 50 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร

ดังนั้น ความเข้มข้นสุดท้ายของสารมาตรฐานเมลาโทนินหลังผ่านการเตรียมตัวอย่าง เมื่อค่า recovery rate เท่ากับ 100% หรือ C_a มีค่าเท่ากับ 50 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร

สำหรับการคำนวณค่า C_a ของวิธี homogenization/LLE ทำเช่นเดียวกับการคำนวณในวิธี ultrasonic/SPE แต่วิธี homogenization/LLE มีปริมาตรสุดท้ายของสารสกัดที่ได้หลังผ่านการเตรียมตัวอย่างเท่ากับ 2 มิลลิลิตร ดังนั้นจึงทำให้ค่า C_a ของวิธีการนี้เท่ากับ 125 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร

ตัวอย่างการคำนวณค่า recovery rate ของวิธี ultrasonic/SPE สำหรับผลมะเฟือง

สูตรการคำนวณ

$$\text{recovery rate} = (C_t - C_s)/C_a \times 100$$

ค่า C_t ของวิธี ultrasonic/SPE เท่ากับ 39.6 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร

ค่า C_a ของวิธี ultrasonic/SPE เท่ากับ 50 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร

ค่า C_s ของวิธี ultrasonic/SPE เท่ากับ 0 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร

แทนค่าต่างๆ ในสูตรการคำนวณค่า recovery rate ได้ดังนี้

$$\text{Recovery rate} = (39.6 - 0)/50 \times 100 = 79.2\%$$

ดังนั้น ค่า recovery rate ของวิธี ultrasonic/SPE มีค่าเท่ากับ 79.2%

ตัวอย่างการคำนวณค่า recovery rate ของวิธี ultrasonic/SPE สำหรับผลหม่อน

ค่า C_t ของวิธี ultrasonic/SPE เท่ากับ 72.9 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร

ค่า C_a ของวิธี ultrasonic/SPE เท่ากับ 50 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร

ค่า C_s ของวิธี ultrasonic/SPE เท่ากับ 37.7 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร

แทนค่าต่างๆ ในสูตรการคำนวณค่า recovery rate ได้ดังนี้

$$\text{Recovery rate} = (72.9 - 37.7)/50 \times 100 = 70.4\%$$

ดังนั้น ค่า recovery rate ของวิธี ultrasonic/SPE มีค่าเท่ากับ 70.4%

สำหรับการคำนวณค่า recovery rate ของวิธี homogenization/LLE สามารถคำนวณได้ในลักษณะเดียวกันนี้

การคำนวณค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน (Coefficient of Variance หรือ ค่า CV)

สูตรที่ใช้ในการคำนวณ

$$CV = \frac{SD}{\bar{X}} \times 100$$

เมื่อ SD คือ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานหรือ Standard Deviation
 \bar{X} คือ ค่าเฉลี่ย

ตัวอย่างการคำนวณค่า CV ของวิธี ultrasonic/SPE สำหรับผลมะเฟือง

SD ของวิธี ultrasonic/SPE เท่ากับ 1.9
 \bar{X} ของวิธี ultrasonic/SPE เท่ากับ 79.2

แทนค่าต่างๆ ในสูตรการคำนวณค่า CV ได้ดังนี้

$$CV = \frac{1.9}{79.2} \times 100 = 2.4 \%$$

ดังนั้น ค่า CV ของวิธี ultrasonic/SPE สำหรับผลมะเฟือง เท่ากับ 2.4%



ภาคผนวก จ
ตารางวิเคราะห์ทางสถิติ

ตารางผนวกที่ ๑1 ผลการวิเคราะห์ทางสถิติของการเปรียบเทียบค่า recovery rate ของวิธีการเตรียมตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์เมลาโทนินในผลมะเฟืองโดยวิธี Independent-sample t-test

Group Statistics					
	preparation method	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
recovery rate	ultrasonic/SPE	6	7.91646E1	2.131190	.753489
	homogenization/LLE	6	4.04565E1	3.299491	1.166546

Independent Samples Test			
		recovery rate	
		Equal variances assumed	Equal variances not assumed
Levene's Test for Equality of Variances	F	2.044	
	Sig.	.175	
t-test for Equality of Means	T	27.873	27.873
	Df	14	11.975
	Sig. (2-tailed)	.000	.000
	Mean Difference	38.708125	38.708125
	Std. Error Difference	1.388732	1.388732
	95% Confidence Interval of the Lower Difference	35.729591	35.681635
	Upper	41.686659	41.734615

ตารางผนวกที่ ๓2 ผลการวิเคราะห์ทางสถิติของการเปรียบเทียบค่า recovery rate ของวิธีการเตรียมตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์เมลานินในผลหม่อน โดยวิธี Independent-sample t-test

Group Statistics

	preparation method	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
recovery rate	ultrasonic/SPE	6	7.02853E1	8.615608	3.517307
	homogenization/LLE	6	1.69702E1	3.382035	1.380710

Independent Samples Test

		recovery rate	
		Equal variances assumed	Equal variances not assumed
Levene's Test for Equality of Variances	F	46.174	
	Sig.	.000	
t-test for Equality of Means	t	14.110	14.110
	df	10	6.505
	Sig. (2-tailed)	.000	.000
	Mean Difference	53.315167	53.315167
	Std. Error Difference	3.778599	3.778599
	95% Confidence Interval of the Difference	Lower Upper	44.895924 61.734410

ตารางผนวกที่ ๓ ผลการวิเคราะห์ทางสถิติของการเปรียบเทียบปริมาณเมลาโทนินในใบหม่อน และผลหม่อนสายพันธุ์ KPS-MB-42-1 โดยวิธี Independent-sample t-test

Group Statistics					
	plant sample	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
melatonin content (ng/g dry sample)	mulberry leaves	12	4.16930E2	3.944879	1.138788
	mulberry fruits	12	8.21496E1	4.729992	1.365431

Independent Samples Test				
		melatonin content (ng/g dry sample)		
		Equal variances assumed	Equal variances not assumed	
Levene's Test for Equality of Variances	F	.000		
	Sig.	.990		
t-test for Equality of Means	t	188.292	188.292	
	df	22	21.313	
	Sig. (2-tailed)	.000	.000	
	Mean Difference	334.780417	334.780417	
	Std. Error Difference	1.777988	1.777988	
	95% Confidence Interval of the Difference	Lower	331.093095	331.086192
		Upper	338.467738	338.474641

ตารางผนวกที่ ๓4 ผลการวิเคราะห์ทางสถิติของการศึกษาอิทธิพลของอายุใบต่อปริมาณของ
เมลานินในใบหม่อนสายพันธุ์วีรรมย์ 60 โดยวิธี One-way ANOVA

Discriptives

melatonin content (ng/g dry weight)

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error
tip of leaves	9	4.06811E2	13.277883	4.425961
young leaves	9	3.14458E2	10.819408	3.606469
old leaves	9	1.66528E2	8.266179	2.755393
Total	27	2.95932E2	101.401203	1.951467E1

ANOVA

melatonin content

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	264443.773	2	132221.886	1.097E3	.000
Within Groups	2893.532	24	120.564		
Total	267337.304	26			

Multiple Comparisons

LSD: Melatonin content

(I) leaf age	(J) leaf age	Mean Difference			95% Confidence Interval	
		(I-J)	Std. Error	Sig.	Lower Bound	Upper Bound
tip of leaves	young leaves	92.353111*	5.176095	.000	81.67018	103.03605
	old leaves	240.282556*	5.176095	.000	229.59962	250.96549
young leaves	tip of leaves	-92.353111*	5.176095	.000	-103.03605	-81.67018
	old leaves	147.929444*	5.176095	.000	137.24651	158.61238
old leaves	tip of leaves	-240.282556*	5.176095	.000	-250.96549	-229.59962
	young leaves	-147.929444*	5.176095	.000	-158.61238	-137.24651

หมายเหตุ * The mean difference is significant at the 0.05 level.

ตารางผนวกที่ ๕ ผลการวิเคราะห์ทางสถิติของการศึกษาอิทธิพลของอายุใบต่อปริมาณของ
เมลานินในใบหม่อนสายพันธุ์สกลนคร โดยวิธี One-way ANOVA

Descriptives

melatonin content (ng/g dry weight)

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error
tip of leaves	9	1.80648E2	10.843999	3.614666
young leaves	9	9.55630E1	8.278679	2.759560
old leaves	9	4.33187E1	4.271384	1.423795
Total	27	1.06510E2	58.217135	1.120389E1

ANOVA

melatonin content

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	86485.117	2	43242.558	634.758	.000
Within Groups	1634.988	24	68.125		
Total	88120.105	26			

Multiple Comparisons

LSD: melatonin content

(I) leaf age	(J) leaf age	Mean Difference			95% Confidence Interval	
		(I-J)	Std. Error	Sig.	Lower Bound	Upper Bound
tip of leaves	young leaves	85.085222*	3.890859	.000	77.05488	93.11556
	old leaves	137.329556*	3.890859	.000	129.29922	145.35989
young leaves	tip of leaves	-85.085222*	3.890859	.000	-93.11556	-77.05488
	old leaves	52.244333*	3.890859	.000	44.21400	60.27467
old leaves	tip of leaves	-137.329556*	3.890859	.000	-145.35989	-129.29922
	young leaves	-52.244333*	3.890859	.000	-60.27467	-44.21400

หมายเหตุ * The mean difference is significant at the 0.05 level.

ตารางผนวกที่ ๖ ผลการวิเคราะห์ทางสถิติของการศึกษาอิทธิพลอายุใบต่อปริมาณของเมลานิน
ในใบหม่อนสายพันธุ์คุณไพ โดยวิธี One-way ANOVA

Descriptives				
melatonin content (ng/g DW)				
	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error
tip of leaves	9	5.88069E1	3.833299	1.277766
young leaves	9	2.74409E1	6.226122	2.075374
old leaves	9	.00000	.000000	.000000
Total	27	2.87493E1	24.816950	4.776024

ANOVA					
melatonin content					
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	15585.236	2	7792.618	437.306	.000
Within Groups	427.670	24	17.820		
Total	16012.906	26			

Multiple Comparisons

LSD: melatonin content

(I) leaf age	(J) leaf age	Mean Difference			95% Confidence Interval	
		(I-J)	Std. Error	Sig.	Lower Bound	Upper Bound
tip of leaves	young leaves	31.366000*	1.989952	.000	27.25894	35.47306
	old leaves	58.806889*	1.989952	.000	54.69983	62.91395
young leaves	tip of leaves	-31.366000*	1.989952	.000	-35.47306	-27.25894
	old leaves	27.440889*	1.989952	.000	23.33383	31.54795
old leaves	tip of leaves	-58.806889*	1.989952	.000	-62.91395	-54.69983
	young leaves	-27.440889*	1.989952	.000	-31.54795	-23.33383

หมายเหตุ *. The mean difference is significant at the 0.05 level.

ตารางผนวกที่ ๗ ผลการวิเคราะห์ทางสถิติของการศึกษาผลของกระบวนการผลิตชาใบหม่อน
ต่อปริมาณของเมลาโทนิน โดยวิธี One-way ANOVA

Descriptives

melatonin content (ng/g DW)

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error
tip of leaves	18	4.48479E2	31.266650	7.369620
young leaves	18	6.22208E1	4.796885	1.130637
old leaves	18	5.43548E1	6.438076	1.517469
Total	54	1.88352E2	186.591165	2.539184E1

ANOVA

melatonin content

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	1827546.876	2	913773.438	2.631E3	.000
Within Groups	17715.060	51	347.354		
Total	1845261.936	53			

Multiple Comparisons

LSD: melatonin content

(I) sample type	(J) sample type	Mean Difference			95% Confidence Interval	
		(I-J)	Std. Error	Sig.	Lower Bound	Upper Bound
fresh leaves	green tea	386.258222*	6.212480	.000	373.78615	398.73030
	black tea	394.124167*	6.212480	.000	381.65209	406.59624
green tea	fresh leaves	-386.258222*	6.212480	.000	-398.73030	-373.78615
	black tea	7.865944	6.212480	.211	-4.60613	20.33802
black tea	fresh leaves	-394.124167*	6.212480	.000	-406.59624	-381.65209
	green tea	-7.865944	6.212480	.211	-20.33802	4.60613

หมายเหตุ * The mean difference is significant at the 0.05 level.

ประวัติการศึกษาและการทำงาน

ชื่อ-นามสกุล	นางสาวพิชญา โปธิษฐ
วัน เดือน ปี ที่เกิด	18 กันยายน 2526
สถานที่เกิด	อำเภอเมือง จังหวัดสระบุรี
ประวัติการศึกษา	วท.บ. (วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร) มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
ผลงานดีเด่นและรางวัลทางวิชาการ	งานวิจัยเรื่องการสกัดและวิเคราะห์เมลลาโทนินใน สมุนไพรไทย นำเสนอผลงานทางวิชาการภาคโปสเตอร์ ในการประชุมวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 48 (พ.ศ. 2553) งานวิจัยเรื่องการแก้ปัญหาการเกิดสีชมพูในน้ำมะพร้าว แช่เยือกแข็ง ได้รับรางวัลชมเชยในการประกวดโครงการ นวัตกรรมแห่งประเทศไทย ครั้งที่ 7 ปี สาขาวิทยาศาสตร์ (พ.ศ. 2550)
ทุนการศึกษาที่ได้รับ	ได้รับทุนการศึกษา จากภาควิชาวิทยาศาสตร์และ เทคโนโลยีการอาหาร คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ (พ.ศ. 2551)