

รายงานการวิจัย

เรื่อง (ภาษาไทย) การตรวจวิเคราะห์ปริมาณเมลาโทนินของสารสกัดจากใบ
หม่อนและการทดสอบฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา

เรื่อง (ภาษาอังกฤษ) Melatonin determination in *Morus spp*
extract and pharmacological activities

หัวหน้าโครงการ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุธาสินี ทัพพสารพงศ์
สังกัด สาขาเภสัชเคมี คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

ได้รับการสนับสนุนทุนวิจัย ประเภทอุดหนุนทั่วไป ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2555.

คำนำ

ในปัจจุบันพบว่าเมลาโทนินเป็นสารจากธรรมชาติที่ได้มีรายงานการวิจัยหลายฉบับได้ศึกษาฤทธิ์ของเมลาโทนินหลายประการได้แก่ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาหลายประการเช่น ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ต้านมะเร็ง การมีคุณสมบัติเป็นฮอร์โมน ที่ช่วยแก้อาการนอนไม่หลับ โดยปัจจุบันได้มีการผลิตเป็นยารักษาอาการนอนไม่หลับในผู้สูงอายุ ที่ทดแทนยานอนหลับอย่างดีเนื่องจากอาการข้างเคียงน้อยกว่า พบว่านอกจากเป็นสารที่พบในสัตว์แล้วยังพบเมลาโทนินพืชบางชนิดอีกด้วย ได้แก่ ใบหม่อน ซึ่งปลูกกันมากในประเทศไทย จึงเป็นที่น่าสนใจที่จะทำการศึกษาเพื่อเปรียบเทียบปริมาณเมลาโทนินจากใบหม่อนสายพันธุ์ต่างๆ พร้อมกับเปรียบเทียบผลการทดสอบฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาต่างๆ เพื่อเป็นแนวทางในการหาใบหม่อนพันธุ์ที่มีฤทธิ์ที่ดี หรือมีปริมาณเมลาโทนินที่สูง ซึ่งจะมีศักยภาพและนำไปพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์สุขภาพต่างๆ ได้ในอนาคต

โครงการวิจัยนี้จึงเป็นการศึกษาเพื่อหาปริมาณเมลาโทนินในสารสกัดใบหม่อน 19 พันธุ์ที่มีการปลูกอยู่ในประเทศไทย และยังทำการศึกษาเปรียบเทียบฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของสารสกัดใบหม่อนพันธุ์ต่างๆ อีกด้วย ได้แก่ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ต้านเอนไซม์ไทโรซิเนส และฤทธิ์ต้านอักเสบ

ผู้วิจัยหวังเป็นอย่างยิ่งว่างานวิจัยครั้งนี้จะช่วยให้ผู้ที่สนใจได้รับความรู้มากขึ้น และเป็นแนวทางในการนำไปต่อยอดงานวิจัยในลำดับต่อไป หากมีข้อผิดพลาดประการใด ผู้วิจัยต้องขออภัยไว้ ณ ที่นี้ด้วย

คณะผู้ทำวิจัย

30 กันยายน 2556

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้ทำวิจัยขอขอบคุณ ทุนอุดหนุนทั่วไปประจำปีงบประมาณ 2555 มหาวิทยาลัยขอนแก่น ที่ได้เห็นประโยชน์ของงานวิจัยชิ้นนี้และได้สนับสนุนงบประมาณสำหรับงานวิจัย และ ขอขอบคุณ นศภ. ปัญญาดา ปัญญาทิพย์ และ นศภ.ปิยะสุดา ไทสวนจิตร ที่มีส่วนร่วมในการทำวิจัยครั้งนี้จนสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอขอบคุณ คณะเภสัชศาสตร์ที่ได้เอื้อเฟื้อสถานที่ และเครื่องมือ ต่างๆ ในการทำวิจัย และขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ประจำห้องปฏิบัติการเภสัชเคมี ศูนย์เครื่องมือกลาง หน่วยปฏิบัติการวิจัยและบริการทางวิชาการ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่นทุกท่านที่ช่วยอำนวยความสะดวกต่างๆ ตลอดการดำเนินงานวิจัย

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาเพื่อเปรียบเทียบปริมาณเมลานินในใบหม่อน 19 สายพันธุ์ และเปรียบเทียบฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของสารสกัดจากใบหม่อนแต่ละสายพันธุ์ ได้แก่ ฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน ฤทธิ์ต้านเอนไซม์ไทโรซิเนส และฤทธิ์ต้านอักเสบโดยการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการสร้างไนตริกออกไซด์ จากการเตรียมตัวอย่างโดยการสกัดด้วยเมทานอล ส่วนหนึ่งนำไปทำให้บริสุทธิ์โดยการสกัดด้วยตัวดูดซับของแข็ง แล้วนำไปวิเคราะห์หาปริมาณเมลานิน ด้วย HPLC-FD สารสกัดหยาบอีกส่วนนำไปตรวจคัดกรองฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา ทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl radical scavenging assay (DPPH assay) และวิธี Ferric reducing antioxidant power (FRAP), ฤทธิ์ต้านเอนไซม์ไทโรซิเนส และ ฤทธิ์การยับยั้งการสร้างไนตริกออกไซด์ พบว่า สามารถหาปริมาณเมลานินได้จากใบหม่อนเพียง 12 สายพันธุ์เท่านั้น โดยพันธุ์ที่มีปริมาณเมลานินมากที่สุดคือ พันธุ์ไฟ (783 นาโนกรัมต่อกรัมของน้ำหนักแห้ง) ส่วนพันธุ์ที่มีเมลานินน้อยที่สุดคือ พันธุ์อินโดนีเซีย (83 นาโนกรัมต่อกรัมของน้ำหนักแห้ง) จากการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากใบหม่อน 19 พันธุ์ด้วยวิธี DPPH assay พบว่าสารสกัดใบหม่อนพันธุ์หมี มีฤทธิ์มากที่สุด มีค่า IC_{50} เท่ากับ 75.86 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และพันธุ์ที่มีฤทธิ์ต่ำที่สุดคือ พันธุ์อินโดนีเซีย มีค่า IC_{50} เท่ากับ 998.55 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อเปรียบเทียบค่า IC_{50} ของสารสกัดกับ กรดแอสคอร์บิก (4.25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) พบว่าสารสกัดใบหม่อน มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระต่ำกว่า กรดแอสคอร์บิก ส่วนการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากใบหม่อนด้วยวิธี FRAP assay ของสารสกัดใบหม่อนที่ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าค่า TEAC ของ สารสกัดใบหม่อนพันธุ์บุรีรัมย์ 60 มีฤทธิ์มากที่สุด (1.93 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) และพันธุ์ที่มีฤทธิ์น้อยที่สุด คือ พันธุ์ไผ่อบ (0.74 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) เมื่อทำการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารสกัดใบหม่อนที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่า พันธุ์ที่สามารถยับยั้งเอนไซม์ได้สูงที่สุด คือ พันธุ์ไผ่อบ (ค่า เพอร์เซ็นต์การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส เท่ากับ 36.02 และพันธุ์ที่สามารถยับยั้งเอนไซม์ได้ต่ำที่สุด คือ พันธุ์ Ryodai มีค่า เพอร์เซ็นต์การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสเท่ากับ 10.22 และจากการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการสร้างไนตริกออกไซด์ ของสารสกัดที่ความเข้มข้น 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่า พันธุ์ส้มใหญ่สามารถยับยั้งการสร้างไนตริกออกไซด์ได้มากที่สุด (เปอร์เซ็นต์การยับยั้งเท่ากับ 81.12) และพันธุ์โพธิ์ มีค่าการยับยั้งการสร้างไนตริกออกไซด์ได้ต่ำที่สุด (เปอร์เซ็นต์การยับยั้งเท่ากับ 46.77) สรุปได้ว่าใบหม่อนแต่ละสายพันธุ์มีเมลานินในปริมาณที่แตกต่างกัน และมีฤทธิ์ฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน ฤทธิ์ต้านเอนไซม์ไทโรซิเนส และฤทธิ์ยับยั้งการสร้างไนตริกออกไซด์ ที่แตกต่างกัน ซึ่งน่าจะได้มีการทำวิจัยเกี่ยวกับองค์ประกอบที่มีในใบหม่อนในแต่ละสายพันธุ์ที่น่าจะมีผลต่อฤทธิ์ต่างๆ ในอนาคตต่อไป เพื่อจะได้เป็นแนวทางนำใบหม่อนพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพสูงนั้นมาทำการพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ต่อไป

คำสำคัญ: ใบหม่อน, เมลานิน, ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ, ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส, ฤทธิ์ยับยั้งการสร้างไนตริกออกไซด์

Abstract

This research aim to compare the amount of melatonin in 19 mulberry species and to study the pharmacological effects of mulberry leaf extracts includes antioxidant, anti-tyrosinase and anti-inflammatory activity (nitric oxide inhibition activity). Mulberry leaves were extracted with methanol. Methanolic extract was purified with solid phase extraction (SPE) to determine the amount of melatonin with HPLC-FD. In addition, the methanolic extracts were screened pharmacological activities by 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl radical scavenging assay (DPPH assay), FRAB assay, anti-tyrosinase activity assay and nitric oxide inhibition. The result showed that we could determine melatonin from only 12 strains of mulberry leaf extracts. Fai strain showed the highest level of melatonin (783 ng/g dry weight) while Indonesia strain showed the lowest level. (83 ng/g dry weight). The antioxidant activity of mulberry leaf extracts, Mhee strain showed the highest IC_{50} (75.86 $\mu\text{g/ml}$) and the lowest was Indonesia strain (998.55 $\mu\text{g/ml}$) but the IC_{50} value of all extracts were lower than L-ascorbic acid (4.25 $\mu\text{g/ml}$). For FRAB assay, mulberry leaf extracts at concentration 10 $\mu\text{g/ml}$, Burirum 60 strain showed the highest TEAC value (1.93 $\mu\text{g/ml}$) and Phai Ubon strain showed the lowest TEAC value (0.74 $\mu\text{g/ml}$). In case of anti-tyrosinase activity study, Phai-Ubon strain showed the highest anti-tyrosinase activity (% Inhibition = 36.02) at concentration of 100 $\mu\text{g/ml}$ and the lowest activity was Ryodai strain (% Inhibition = 10.22). For nitric Oxide Inhibition activity using 20 $\mu\text{g/ml}$ of the extracts was found that Somyai strain showed the highest %inhibition (81.12%) while Pho strain showed the lowest (46.77%). We concluded that the different strains of mulberry leaves provide the variety results of melatonin level and some pharmacological activities. From these results, we should study more about constituents in mulberry extract which may provide the difference activities in various strains, in the near future. This research will provide more advantage for product development in order to get the high quality of herbal products.

Keywords: mulberry leaves, melatonin, antioxidant activity, anti-tyrosinase activity, nitric oxide inhibition activity

สารบัญเรื่อง

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
Abstract	ข
คำนำ	ค
กิตติกรรมประกาศ	ง
สารบัญ	จ
สารบัญตาราง	ฉ
สารบัญรูป	ช
บทนำ	1
วิธีดำเนินการวิจัย	3
ผลการวิจัย	9
อภิปรายและวิจารณ์ผลการวิจัย	25
สรุปผลการวิจัย	25
ปัญหาและข้อเสนอแนะ	26
บรรณานุกรม	27
ภาคผนวก	29

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1 ช่วงความเข้มข้นของสารสกัดแต่ละพันธุ์ที่ทำการทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน	6
ตารางที่ 2 ปริมาณสารต่างๆ ที่ใช้ในการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ	7
ตารางที่ 3 น้ำหนักใบหม่อนก่อนสกัด, น้ำหนักสารสกัดแห้ง และร้อยละของผลผลิต	8
ตารางที่ 4 น้ำหนักผงใบหม่อน ทั้ง 19 สายพันธุ์ที่นำมาใช้วิเคราะห์ ด้วย HPLC-FD	10
ตารางที่ 5 Retention time, Peak area และ Peak height ของสารมาตรฐานเมลานิน ที่ความเข้มข้นต่างๆ	11
ตารางที่ 6 ผลการวิเคราะห์หาปริมาณเมลานินในใบหม่อน	12
ตารางที่ 7 ปริมาณเมลานินในใบหม่อนแต่ละสายพันธุ์	15
ตารางที่ 8 ค่า IC_{50} ของใบหม่อนแต่ละพันธุ์ในการทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน	17
ตารางที่ 9 %Inhibition ที่ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ของพันธุ์ที่ไม่สามารถหาค่า IC_{50} ได้	18
ตารางที่ 10 ค่า FRAP value และ TEAC ของแต่ละพันธุ์	20
ตารางที่ 11 %Inhibition ที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระ	22
ตารางที่ 12 %Inhibition ที่ความเข้มข้น 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในการทดสอบฤทธิ์ต้านอักเสบ	23

สารบัญภาพ

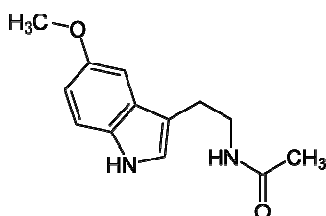
	หน้า
รูปที่ 1 โครงสร้างของเมลานิน	1
รูปที่ 2 โครมาโตแกรมของสารมาตรฐานเมลานิน	12
รูปที่ 3 กราฟมาตรฐานของการวิเคราะห์เมลานิน (Standard curve)	12
รูปที่ 4 ปริมาณเมลานินในสารสกัดใบหม่อนแต่ละสายพันธุ์	16
รูปที่ 5 กราฟความสัมพันธ์ระหว่าง %Inhibition กับความเข้มข้นของ L - Ascorbic acid	17
รูปที่ 6 กราฟเปรียบเทียบค่า IC ₅₀ ของใบหม่อนแต่ละพันธุ์ในการทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน	18
รูปที่ 7 กราฟเปรียบเทียบ %Inhibition ที่ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร	18
รูปที่ 8 กราฟมาตรฐานของสารละลาย Ferrous sulfate	19
รูปที่ 9 กราฟมาตรฐานของสารละลาย Trolox	19
รูปที่ 10 กราฟเปรียบเทียบ FRAP value ของแต่ละพันธุ์	21
รูปที่ 11 กราฟเปรียบเทียบ TEAC ของแต่ละพันธุ์	21
รูปที่ 12 กราฟความสัมพันธ์ระหว่าง %Inhibition กับความเข้มข้นของ kojic acid	22
รูปที่ 13 กราฟเปรียบเทียบ %Inhibition ที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรใน การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ	23
รูปที่ 14 กราฟเปรียบเทียบ %Inhibition ที่ความเข้มข้น 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรใน การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ	24

บทนำ

หม่อน (*Morus alba* L.) อยู่ในวงศ์ Moraceae เป็นพืชที่มีการปลูกกันอย่างแพร่หลายในประเทศไทย โดยเฉพาะในภาคเหนือและภาคตะวันออกเฉียงเหนือ มีการศึกษาพบว่าในใบหม่อนมีสารสำคัญหลายชนิด ได้แก่ รูติน (rutin) เควอซีติน (quercetin) ไอโซเควอซีติน (isoquercetin) และฟลาโวนอยด์ อื่นๆ (Zhi shen, Men gcheng, and Jianming, 1999) และพบว่าสารสกัดจากใบหม่อนมีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา ได้แก่ ฤทธิ์ต้านจุลชีพ, ฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน, ฤทธิ์ในการลดระดับน้ำตาลในเลือด, ฤทธิ์ต้านการอักเสบ, ฤทธิ์ต้านเอนไซม์ไทโรซิเนส (Butt et al., 2008) นอกจากนี้ยังมีการศึกษาพบเมลานินในใบหม่อนอีกด้วย (Chen et al., 2003)

โดยทั่วไปมักจะพบเมลานินในสัตว์ แต่ก็ยังสามารถพบได้ในส่วนต่างๆของพืชบางชนิด เช่น ใบ, และ เมล็ด (Chen G. et al., 2003) ในสัตว์เมลานินมีความสัมพันธ์ต่อการนอนหลับ ระบบภูมิคุ้มกัน ระบบหัวใจและหลอดเลือด และระบบสืบพันธุ์ (Arao, et al., 2007, Simonin, et al., 1999) นอกจากนี้เมลานิน ยังมีฤทธิ์เป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่สำคัญ (Tan et al., 2000 และ Tan et al., 2002)

ปัจจุบันได้มีการใช้เมลานินเป็นยารักษาอาการบางชนิดเช่น อาการนอนไม่หลับในผู้สูงอายุ ซึ่งจะมีความปลอดภัยกว่ายานอนหลับที่มีใช้กันอยู่ เมลานินจึงน่าจะเป็นสารจากธรรมชาติที่น่าจะนำมาใช้เป็นยาได้อย่างปลอดภัย ดังนั้นการตรวจวิเคราะห์หาปริมาณเมลานินในพืชชนิดต่างๆ จึงเป็นที่น่าสนใจเพื่อจะได้เป็นการหาแหล่งของเมลานินในธรรมชาติเพิ่มมากขึ้น แต่ในการวิเคราะห์ปริมาณเมลานินในพืชยังมีข้อจำกัดเนื่องจากปริมาณเมลานินที่มีอยู่ในพืชมีน้อยมาก วิธีที่ใช้ในการศึกษาหาปริมาณของเมลานินนั้นจึงควรมีความไวที่สูง นอกจากนี้ยังต้องคำนึงถึงวิธีการเตรียมตัวอย่าง ซึ่งอาจส่งผลต่อความคงตัวของเมลานินและความไวในการวิเคราะห์อีกด้วย



รูปที่ 1 โครงสร้างของเมลานิน

จากการศึกษาคุณสมบัติของเมลานิน (Parrilla et al., 2009) พบว่า เมลานินมีขนาดเล็ก มีมวลโมเลกุลเท่ากับ 232.28 มีความเป็น amphiphilicity ซึ่งส่งผลต่อการสกัดเมลานินออกจากตัวอย่าง มีค่าการละลายในน้ำเท่ากับ 0.1 mg/ml และในเอทานอลเท่ากับ 8 mg/ml มีความไวต่อแสง เมื่ออยู่ในรูปสารละลาย และสามารถเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันได้

นอกจากนี้ได้มีการศึกษาหาปริมาณเมลานินในพืชสมุนไพรจีน 108 ชนิด (Chen et al., 2003) โดยนำผงสมุนไพรมาสกัดด้วยเมทานอล โดยใช้เครื่องอัลตราโซนิก จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยง เก็บส่วนใสไปทำให้แห้งด้วยแก๊สไนโตรเจน แล้วนำไปแยกด้วยตัวดูดซับของแข็ง (Solid Phase Extraction, SPE) จากนั้นนำไปวิเคราะห์โดยใช้เครื่องโครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงร่วมกับเครื่องตรวจวัดฟลูออเรสเซนซ์ที่ต่อกับแมสสเปกโตรมิتری (HPLC-FD online with MS)

โดยใช้สภาวะในการวิเคราะห์ คือ

- คอลัมน์: คาร์บอน 18 คอลัมน์

- เฟสเคลื่อนที่: เมทานอล : สารละลายบัฟเฟอร์ $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{H}_3\text{PO}_4$ ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ ค่าความเป็นกรดต่างเท่ากับ 4.5 ในอัตราส่วน 40:60
- อัตราการไหล: 1 มิลลิลิตรต่อนาที
- เครื่องตรวจวัด: - เครื่องตรวจวัดฟลูออเรสเซนซ์ (ความยาวคลื่นการกระตุ้น (λ_{ex}) / ความยาวคลื่นการคาย (λ_{em}) = 280/348 นาโนเมตร)

- แมสสเปกโตรเมทรี

ผลการวิเคราะห์ พบว่าใบหม่อนมีปริมาณเมลานิน 1,510 นาโนกรัมต่อกรัมของน้ำหนักผงแห้ง มีขีดจำกัดการตรวจวัดด้วย HPLC-FD คือ 50 พีโคกรัม

นอกจากนี้ยังมีการศึกษาโดยเปรียบเทียบ วิธีการวิเคราะห์เมลานินเมื่อใช้วิธีการเตรียมตัวอย่างที่แตกต่างกัน (Pothinuch and Tongchitpakdee, 2011) คือ วิธีการสกัดด้วยเครื่องอุลตราโซนิกร่วมกับการแยกด้วยตัวดูดซับของแข็ง (Solid phase extraction, SPE) และการสกัดด้วยการโฮโมจีไนซ์ร่วมกับการสกัดของเหลวด้วยของเหลว liquid-liquid extraction) แล้วทำการวิเคราะห์ปริมาณเมลานินด้วย reversed phase HPLC-FD โดยมีเฟสเคลื่อนที่เป็นสารผสมระหว่าง อะซิโตนไตรล กับ สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ($\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{H}_3\text{PO}_4$) ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ ที่มีค่าความเป็นกรดต่างเท่ากับ 4.5 ในอัตราส่วน 15:85 ใช้ อัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ 1 มิลลิลิตรต่อนาที และ ทำการตรวจวัดด้วยเครื่องตรวจวัดฟลูออเรสเซนซ์ (ความยาวคลื่นการกระตุ้น (λ_{ex}) / ความยาวคลื่นการคาย (λ_{em}) = 280/348 นาโนเมตร)

พบว่าวิธีเตรียมตัวอย่างโดยการสกัดด้วยเครื่องอุลตราโซนิกร่วมกับการแยกด้วยตัวดูดซับของแข็ง ให้ผลของอัตราการกลับคืน (% recovery) ที่สูงกว่า (76%) เมื่อเปรียบเทียบกับวิธีเตรียมตัวอย่างโดยการสกัดด้วยการโฮโมจีไนซ์ร่วมกับการสกัดของเหลวด้วยของเหลว (12%)

นอกจากนี้ยังมีงานวิจัยที่เกี่ยวกับการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดจากหม่อน ซึ่งมีฤทธิ์ที่สำคัญต่างๆ ได้แก่ การทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของสารสกัดใบหม่อน (*Morus indica* L.) โดยวิธี iron (III) reducing capacity, total antioxidant capacity และ DPPH radical scavenging activity พบว่าสารสกัดใบหม่อน ด้วยเมทานอลมีปริมาณฟีนอลิกรวมและฤทธิ์ต้านออกซิเดชันสูงที่สุดเมื่อเทียบกับสารสกัดอะซิโตน และน้ำ (Arabshahi-Delouee and Urooj, 2007)

การศึกษาฤทธิ์ต้านเอนไซม์ไทโรซิเนสของหม่อน พบว่าสารสกัดเอทานอลของกิ่งและเปลือกรากของหม่อนที่ความเข้มข้น 0-60 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถยับยั้งเอนไซม์ได้ 0-78% และ 0-62% ตามลำดับ (Chang et al, 2011) นอกจากนี้พบว่า มัลเบอร์โรไซด์ เอฟ (mulberroside F) เป็นสารที่สกัดได้จากใบหม่อนสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ได้ดีกว่ากรดโคจิก (kojic acid) 4.5 เท่า (Lee et al, 2002)

ส่วนการศึกษาฤทธิ์ต้านอักเสบของใบหม่อน พบว่า สารสกัดเมทานอลความเข้มข้น 4-100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถยับยั้งการสร้างไนตริกออกไซด์ในเซลล์เพาะเลี้ยงมาโครฟาจ (RAW 264.7) ที่ถูกกระตุ้นให้เกิดการอักเสบด้วยไลโปโพลีแซคคาไรด์ (lipopolysaccharide) ได้ (Choi and Hwang, 2005)

แต่เนื่องจากยังไม่มีการศึกษาใดที่มีการเปรียบเทียบปริมาณเมลานิน และทดสอบฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาเปรียบเทียบกันในแต่ละสายพันธุ์ ดังนั้นในการศึกษาค้นคว้าครั้งนี้จึงทำการศึกษาเปรียบเทียบปริมาณเมลานินที่มีในใบหม่อนสายพันธุ์ต่างๆ จำนวน 19 สายพันธุ์ รวมทั้งทดสอบฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา ได้แก่ ฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน ฤทธิ์ต้านเอนไซม์ไทโรซิเนส และ ฤทธิ์ต้านอักเสบ

วิธีดำเนินการวิจัย

ตัวอย่าง ใบหม่อน 19 พันธุ์ ได้แก่ พันธุ์ชี้ไก่, พันธุ์ Ryodai, พันธุ์อินโดนีเซีย, พันธุ์นครราชสีมา 60, พันธุ์ฟิลิปปินส์, พันธุ์ไผ่อบล, พันธุ์บุรีรัมย์, พันธุ์ศรีสะเกษ, พันธุ์ไฟ, พันธุ์โพธิ์, พันธุ์คุณไพ, พันธุ์สีดา, พันธุ์ส้มใหญ่, พันธุ์หมี, พันธุ์แก้ว, พันธุ์เชียงใหม่, พันธุ์จาก, พันธุ์ญี่ปุ่น และ พันธุ์ศรีลังกา โดยใบหม่อนทุกพันธุ์ได้รับจากศูนย์นวัตกรรมไหม มหาวิทยาลัยมหาสารคาม

สารเคมีที่ใช้

1. Standard melatonin (Sigma-Aldrich, Inc.)
2. Methanol (RCI labscan)
3. L-Ascorbic acid (Sigma)
4. 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (Aldrich)
5. Ethanol (RCI Labscan)
6. 2,4,6-Tris(2-pyridyl)-1,3,5-triazine; TPTZ (Sigma-Aldrich)
7. Sodium acetate trihydrate (Ajax Finechem)
8. Trolox (Sigma-Aldrich)
9. Ferrous sulfate; FeSO_4 (Analytico)
10. Ferric chloride; $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (Ajax Finechem)
11. Kojic acid (Sigma)
12. Tyrosinase Mushroom 50KU (Sigma-Aldrich)
13. L-3, 4-dihydroxyphenylalanine (Sigma-Aldrich)
14. Sodium Dihydrogen Phosphate; $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Ajax Finechem)
15. Disodium hydrogen phosphate; $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Ajax Finechem)
16. Deionized water
17. เซลล์เพาะเลี้ยงมาโครฟาจ (RAW 264.7)
18. Dimethylsulfoxide; DMSO (Fisher Scientific)
19. Sulfanilamide (Sigma-Aldrich)
20. Naphthylethylenediamine (Sigma-Aldrich)
21. Phosphoric acid; H_3PO_4 (RCI Labscan)
22. 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide; MTT
23. อาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI-1640

เครื่องมือและอุปกรณ์หลักที่ใช้

1. เครื่อง HPLC-Fluorescence
 - Pump : Spectrasystem P 1500 (Thermoseparation)
 - Detector : Spectrasystem FL 2000 (Thermoseparation)
 - Integrator : Clarity (Water)

2. Rotary evaporator (Buchi)
3. Lyophilizer (EYELA)
4. Microplate reader (Model 680 microplate reader, Bio-RAD)
5. SPE cartridge (Strata C18-E 55 μ m)
6. Column : ACE 5 C18-PFP 250x4.6 mm id

การเตรียมตัวอย่างสารสกัดจากใบหม่อน เพื่อหาปริมาณเมลาโทนิน (ดัดแปลงจากChen et al., 2003 และ Pothinuch and Tongchitpakdee , 2011)

นำผงใบหม่อนแห้ง 2 กรัม มาสกัดด้วยเมทานอล 13 มิลลิลิตร โดยใช้เครื่องอัลตราโซนิก จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยง 4000 รอบต่อนาที 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เก็บส่วนใส จากนั้นนำส่วนที่เหลือไปสกัดซ้ำด้วยเมทานอล 12 มิลลิลิตร เก็บส่วนใสรวมกัน นำไปกรองด้วยกระดาษกรองขนาด 0.2 ไมโครเมตร ระเหยเมทานอลด้วยแก๊สไนโตรเจน เติมเมทานอลความเข้มข้น 5% 2 มิลลิลิตร จากนั้นนำสารละลายที่ได้ไปแยกด้วยตัวดูดซับของแข็ง (SPE) ที่ผ่านการกระตุ้นด้วยเมทานอล 10 มิลลิลิตร และน้ำ 10 มิลลิลิตร ซะล้างสารอื่นๆ ด้วยเมทานอลความเข้มข้น 5% 10 มิลลิลิตร และทำการชะเมลาโทนินด้วยเมทานอลความเข้มข้น 80% 5 มิลลิลิตร

การเตรียมตัวอย่างสารสกัดจากใบหม่อน เพื่อทดสอบฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา (ดัดแปลงจาก Arabshahi-Delouee และ Urooj, 2007)

นำผงใบหม่อน 20 กรัม มาแช่สกัดด้วยเมทานอล 70 มิลลิลิตร โดยแช่ทิ้งไว้ 1 คืน จากนั้นเก็บส่วนใส และนำส่วนใสที่ได้ไปกรองด้วยสำลี สกัดซ้ำอีก 2 ครั้ง เก็บส่วนใสที่ได้รวมกัน จากนั้นนำส่วนใสที่ได้ไปกรองอีกครั้ง นำไประเหยเอาตัวทำละลายออกด้วยเครื่อง Rotary evaporator ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส นำสารสกัดที่ได้ไปทำให้แห้งด้วยเครื่องระเหิดแห้งแบบเยือกแข็ง (Lyophilizer) เก็บสารสกัดที่ได้ที่อุณหภูมิ 8 องศาเซลเซียส

การวิเคราะห์ปริมาณเมลาโทนิน (ดัดแปลงจาก Chen et al., 2003 และ Pothinuch and Tongchitpakdee , 2011)

นำสารสกัดของใบหม่อนแต่ละสายพันธุ์ ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC-FD โดยสภาวะสำหรับ HPLC ที่ใช้ในการวิเคราะห์เมลาโทนิน ใช้ระบบ reverse phase ซึ่งประกอบด้วยคอลัมน์คาร์บอน 18 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 4.6 มิลลิเมตร ความยาว 250 มิลลิเมตร และขนาดเม็ดอนุภาค 5 ไมโครเมตร เชื่อมต่อกับเครื่อง HPLC ร่วมกับเครื่องตรวจวัดฟลูออเรสเซนซ์ เฟสเคลื่อนที่ที่ใช้คือ เมทานอลและสารละลายบัฟเฟอร์ $\text{Na}_2\text{HPO}_3/\text{H}_3\text{PO}_4$ ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ และมีค่าความเป็นกรดต่างเท่ากับ 4.5 ในอัตราส่วน 40:60 อัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ เท่ากับ 1 มิลลิลิตรต่อนาที

จากนั้นหาปริมาณเมลาโทนินที่มีในแต่ละตัวอย่างโดยคำนวณจากสมการที่ได้จากกราฟมาตรฐานของเมลาโทนิน

การทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชันโดยวิธี 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl radical scavenging capacity assay (DPPH assay) (ดัดแปลงจาก Arabshahi-Delouee และ Urooj, 2007)

การทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชันโดย DPPH assay สารตัวอย่างทำปฏิกิริยากับ 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical (DPPH.) ซึ่งเป็นอนุมูลอิสระเสถียร เมื่อ DPPH. ได้รับอิเล็กตรอนจะเปลี่ยนเป็น DPPH ทำให้สารละลายเปลี่ยนจากสีม่วงเป็นสีเหลือง โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร

นำสารตัวอย่างที่ต้องการทดสอบที่มีความเข้มข้นต่างๆ ปิเปตสารแต่ละความเข้มข้น ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงใน 96-well plate โดยแต่ละความเข้มข้นจะทำซ้ำ 4 ครั้ง สำหรับ blank จะใช้เอทานอล 200 ไมโครลิตร และ control จะใช้เอทานอล 100 ไมโครลิตร จากนั้นปิเปต 200 ไมโครโมลาร์ของสารละลาย DPPH ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงในแต่ละหลุม ยกเว้น blank เขย่าให้เข้ากัน เก็บให้พ้นแสง 30 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปคำนวณ %Inhibition ดังสมการ

$$\%Inhibition = [(Abs_{control} - Abs_{sample}) / Abs_{control}] \times 100$$

$Abs_{control}$ = ค่าการดูดกลืนแสงของ control

Abs_{sample} = ค่าการดูดกลืนแสงของสารตัวอย่างที่มีความเข้มข้นต่างๆ

จากนั้นสร้างกราฟระหว่าง %Inhibition กับ ความเข้มข้นของสารทดสอบ แล้วจึงคำนวณค่า IC_{50} จากสมการเส้นตรงของกราฟ โดยเปรียบเทียบค่า IC_{50} ของสารที่ทำการทดสอบกับ ค่า IC_{50} ของกรดแอสคอร์บิก (L-ascorbic acid)

ตารางที่ 1 ช่วงความเข้มข้นของสารสกัดแต่ละพันธุ์ที่ทำการทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน

พันธุ์	ช่วงความเข้มข้นที่ทำการทดสอบ ($\mu\text{g/ml}$)
1. ขี้ไก่	25 - 200
2. Ryodai	50 - 500
3. อินโดนีเซีย	200 - 1,200
4. นครราชสีมา 60	150 - 275
5. ฟิลิปปินส์	50 - 2,500
6. ฝั่อบล	10 - 150
7. บุรีรัมย์ 60	100 - 325
8. ศรีสะเกษ	10 - 150
9. ไฟ	25 - 150
10. โพธิ์	25 - 200
11. คุณไฟ	25 - 150
12. สีดา	25 - 150
13. ส้มใหญ่	50 - 300
14. หมี่	25 - 150
15. แก้ว	10 - 150
16. เชียงใหม่	25 - 150
17. จาก	50 - 175
18. ญี่ปุ่น	50 - 250
19. ศรีลังกา	100 - 225

การทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชันโดยวิธี Ferric reducing antioxidant power (FRAP) (ดัดแปลงจาก Iqbal et al, 2012)

เป็นการวัดความสามารถของสารต้านอนุมูลอิสระในการให้อิเล็กตรอนอิสระ โดยที่ ferric tripyridyltriazine (Fe^{3+} -TPTZ) complex จะถูกรีดิวซ์ด้วยสารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ที่สามารถให้อิเล็กตรอนได้ ทำให้เกิด Fe^{2+} -TPTZ complex ดังนั้นวิธีนี้ สามารถใช้วัด total reducing power ของสารต้านอนุมูลอิสระที่มีความสามารถในการถ่ายทอดอิเล็กตรอนให้ Fe^{3+} เปลี่ยนเป็น Fe^{2+} ได้ เทียบกับสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐานคือ Ferrous sulfate และ Trolox

การเตรียมสารละลาย FRAP reagent โดยผสม 300 mM acetate buffer (pH 3.6) กับ 20 mM Ferric chloride solution และ 10 mM 2,4,6-Tris(2-pyridyl)-1,3,5-triazine (TPTZ) solution ให้เข้ากัน ในอัตราส่วน 10:1:1 แล้วนำไปอุ่นที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ปิเปตสารละลาย FRAP reagent 150 ไมโครลิตร ลงใน 96-well plate จากนั้นเติมสารสกัดลงไป 50 ไมโครลิตร (ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 10 µg/ml) วัดค่าการดูดกลืนแสงในนาที่ที่ 5 ที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร เปรียบเทียบกับสารละลายมาตรฐาน Ferrous sulfate และ Trolox คำนวณหาปริมาณ FRAP value และ ค่า Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) จากกราฟมาตรฐานของ Ferrous sulfate และ Trolox

การทดสอบฤทธิ์ต้านเอนไซม์ไทโรซิเนส (ดัดแปลงจาก Chang et al, 2011)

การสร้างเมลานินต้องอาศัยการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสในการเปลี่ยนแอล-ไทโรซีน (L-tyrosine) ไปเป็นเมลานิน ซึ่งกลไกนี้เกิดผ่านสารมัธยันตร์ที่สำคัญ ได้แก่ แอล-โดปา (L-Dopa) และโดปาโครม (Dopachrome) ซึ่งสามารถติดตามการเปลี่ยนแปลงได้โดยการวัดการดูดกลืนแสงของ Dopachrome ที่เกิดขึ้น (สีน้ำตาล) ที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร ปิเปตสารต่างๆ ลงใน 96-well plate ดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ปริมาณสารต่างๆ ที่ใช้ในการทดสอบฤทธิ์ต้านเอนไซม์ไทโรซิเนส

Solution	Buffer (µl)	Ethanol (µl)	Sample (µl)	Tyrosinase (µl)	Total (µl)
A (Control)	140	20	-	20	180
B (Blank)	160	20	-	-	180
C (Sample)	140	-	20	20	180
D (Sample blank)	160	-	20	-	180

ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที จากนั้นเติมสารละลาย 0.85 ไมโครโมลาร์ L-DOPA 20 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 20 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาคำนวณ % Inhibition ดังสมการ

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

จากนั้นสร้างกราฟระหว่าง %Inhibition กับ ความเข้มข้นของสารทดสอบ แล้วจึงคำนวณค่า IC₅₀ จากสมการเส้นตรงของกราฟ โดยเปรียบเทียบค่า IC₅₀ ของสารที่ทำการทดสอบกับ ค่า IC₅₀ ของกรดโคจิก (kojic acid)

การทดสอบฤทธิ์ต้านอักเสบโดยวิธี Nitric oxide inhibition (ดัดแปลงจาก Choi and Hwang, 2005)

เมื่อเซลล์ถูกกระตุ้นให้เกิดการอักเสบ จะมีการสร้างสารสื่อกลางในการอักเสบขึ้น ซึ่งในการทดลองนี้จะวัดปริมาณไนตริกออกไซด์ที่เกิดขึ้น โดยทำปฏิกิริยากับ Griess reagent ได้สารละลายสีชมพู วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร

นำเซลล์เพาะเลี้ยงมาโครฟาจ (RAW264.7) ใส่ลงในจานเพาะเลี้ยงเซลล์แบบ 48 หลุม เมื่อจำนวนเซลล์มีมากพออาหารเพาะเลี้ยงเซลล์จะถูกเปลี่ยนเป็นชนิดที่ปราศจากซีรัม เติมสาร Lipopolysaccharide (LPS) ลงในอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เพื่อกระตุ้นให้เกิดกระบวนการอักเสบ โดย Lipopolysaccharide (LPS) จะใส่พร้อมกับสารสกัดใบหม่อนพันธุ์ต่างๆ ที่มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นนำไปเลี้ยงในตู้บ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นตรวจวัดการเปลี่ยนแปลงของไนตริกออกไซด์ในอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์ โดยปริมาณไนตริกออกไซด์จะตรวจวัดโดยใช้ Griess reagent เปรียบเทียบปริมาณของไนตริกออกไซด์ระหว่างกลุ่มทดลองและกลุ่มควบคุม

จากนั้นวิเคราะห์ความเป็นพิษของสารสกัดใบหม่อนพันธุ์ต่างๆ ด้วย MTT assay โดยการเติมสารละลาย MTT ลงในจานเพาะเลี้ยงเซลล์ และนำเข้าตู้บ่มเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นอาหารเลี้ยงเซลล์จะถูกดูดออก และใส่สารละลาย DMSO ผสมให้เข้ากัน นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม

ผลการวิจัย

การเตรียมตัวอย่างสารสกัดจากใบหม่อน

ตารางที่ 3 น้ำหนักใบหม่อนก่อนสกัด, น้ำหนักสารสกัดแห้ง และร้อยละของผลผลิต

พันธุ์	น้ำหนักผง ใบหม่อนแห้ง (g)	น้ำหนัก สารสกัดแห้ง (g)	%Yield
1. ชี้ไก่	19.98	2.5247	12.64
2. Ryodai	19.98	1.8441	9.23
3. อินโดนีเซีย	19.99	1.4862	7.43
4. นครราชสีมา 60	20.17	0.9814	4.87
5. ฟิลิปปีนส์	20.01	2.0018	10.00
6. ฝั่อบล	20.13	2.7242	13.53
7. บุรีรัมย์ 60	20.05	1.9959	9.95
8. ศรีสะเกษ	20.17	2.8879	14.32
9. ไฟ	20.15	2.6664	13.23
10. โพธิ์	20.02	2.7679	13.83
11. คุณไฟ	20.1	2.3377	11.63
12. สีดา	20.14	3.0800	15.29
13. ส้มใหญ่	20.02	2.6180	13.08
14. หมี่	20.04	2.6180	13.06
15. แก้ว	20.01	2.7215	13.60
16. เชียงใหม่	20.33	2.5710	12.65
17. จาก	20.07	2.4847	12.38
18. ญี่ปูน	20.03	2.3392	11.68
19. ศรีลังกา	20.04	2.4921	12.44

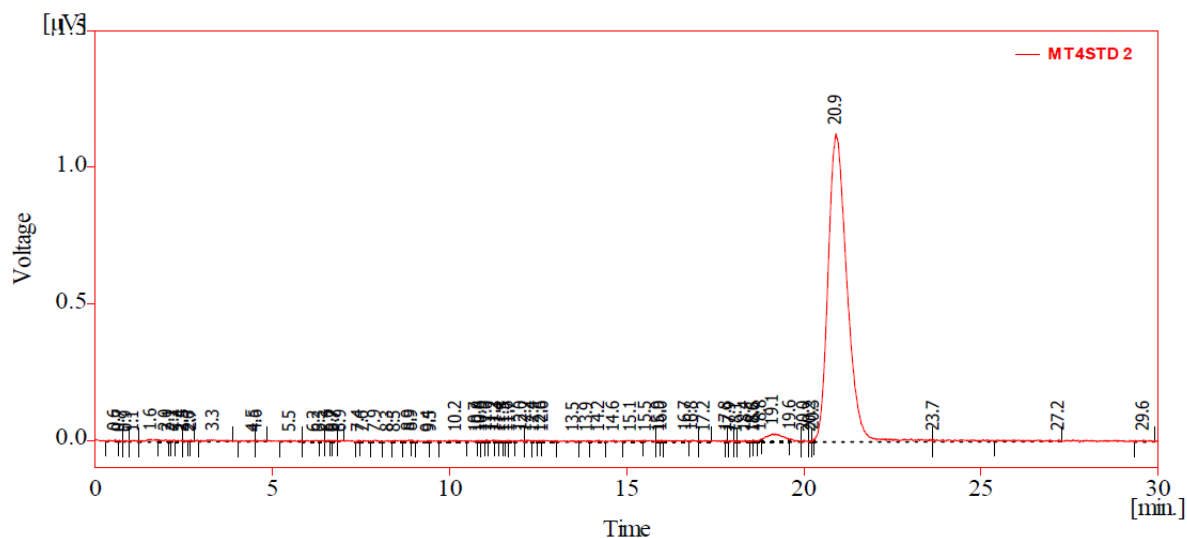
ผลการวิเคราะห์เมลานิน

ตารางที่ 4 น้ำหนักผงใบหม่อน ทั้ง 19 สายพันธุ์ที่นำมาใช้วิเคราะห์ ด้วย HPLC-FD

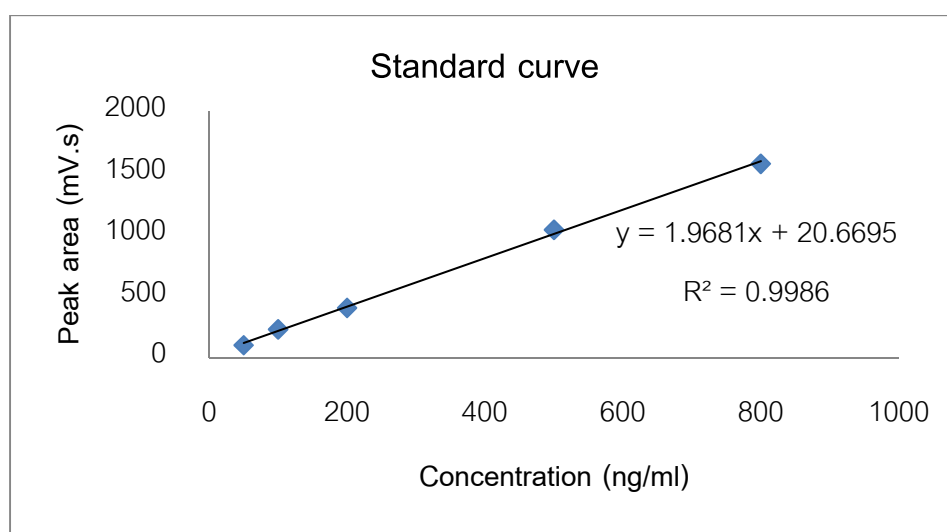
พันธุ์	น้ำหนักแห้งที่ชั่งได้ (g)
1. จี่ไก่	2.0032
2. Ryodai	2.0002
3. อินโดนีเซีย	2.0092
4. นครราชสีมา 60	2.0006
5. ฟิลิปปินส์	2.0006
6. ฝั่อุบล	2.0027
7. บุรีรัมย์ 60	2.0014
8. ศรีสะเกษ	2.0024
9. ไฟ	2.0006
10. โพธิ์	2.0057
11. คุณไฟ	2.0021
12. สีดา	2.0040
13. ส้มใหญ่	2.0042
14. หมี่	2.0030
15. แก้ว	2.0020
16. เชียงใหม่	2.0030
17. จาก	2.0037
18. ญี่ปูน	2.0010
19. ศรีลังกา	2.0000

ตารางที่ 5 Retention time และ Peak area ของสารมาตรฐานเมลาโทนินที่ความเข้มข้นต่างๆ

Concentration (ng/ml)	ครั้งที่	Retention time (min)	Mean (min)	SD	Peak area (mV.s)	Mean (mV.s)	SD
50	1	20.117	20.071	0.0530	102.380	101.257	2.2312
	2	20.083			98.687		
	3	20.013			102.703		
100	1	19.783	20.045	0.3895	226.890	230.193	8.7676
	2	19.860			240.132		
	3	20.493			223.556		
200	1	20.243	20.146	0.0850	407.835	404.627	3.6060
	2	20.113			400.724		
	3	20.083			405.321		
500	1	19.977	20.027	0.0481	1028.424	1038.931	39.1307
	2	20.030			1082.243		
	3	20.073			1006.127		
800	1	20.110	20.108	0.0068	1554.076	1575.713	31.1210
	2	20.113			1611.379		
	3	20.100			1561.684		



รูปที่ 2 โครมาโตแกรมของสารมาตรฐานเมลาโทนิน: Retention time ของเมลาโทนิน คือ 20.9 นาที
 สภาวะในการวิเคราะห์ HPLC-FD คือ Column-18, 250 x 4.6 mm id (5 μ m) เฟสเคลื่อนที่ คือ เมทานอล ต่อ 50 มิลลิโมลาร์ของฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 4.5 ในอัตราส่วน 40:60 อัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่เท่ากับ 1 มิลลิลิตรต่อนาที



รูปที่ 3 กราฟมาตรฐานของการวิเคราะห์เมลาโทนิน (Standard curve)

ตารางที่ 6 ผลการวิเคราะห์หาปริมาณเมลานินในใบหม่อน

พันธุ์	ครั้งที่	Retention time (min)	SD	Peak area (mV.s)	mean (mV.s)	SD
1. ชีไก่	1	19.540	1.2669	165.016	191.321	23.3720
	2	19.467		209.697		
	3	21.697		199.250		
2. Ryodai*	1	18.940	0.6272	165.190	152.922	17.3503
	2	18.053		140.653		
3. อินโดนีเซีย	1	18.787	0.0923	89.778	86.401	9.7915
	2	18.683		75.368		
	3	18.867		94.057		
4. นครราชสีมา 60	1	18.723	0.0605	235.927	227.533	7.3972
	2	18.650		224.705		
	3	18.603		221.967		
5. ฟิลิปปินส์*	1	18.773	0.0544	51.646	98.505	66.2679
	2	18.850		145.363		
6. ฝั่อุบล	1	19.620	0.1121	128.074	169.528	49.4512
	2	19.547		156.247		
	3	19.400		224.264		
7. บุรีรัมย์ 60	1	21.477	0.6933	549.562	543.179	26.5176
	2	21.630		565.922		
	3	20.360		514.052		
พันธุ์	ครั้งที่	Retention time (min)	SD	Peak area (mV.s)	mean (mV.s)	SD

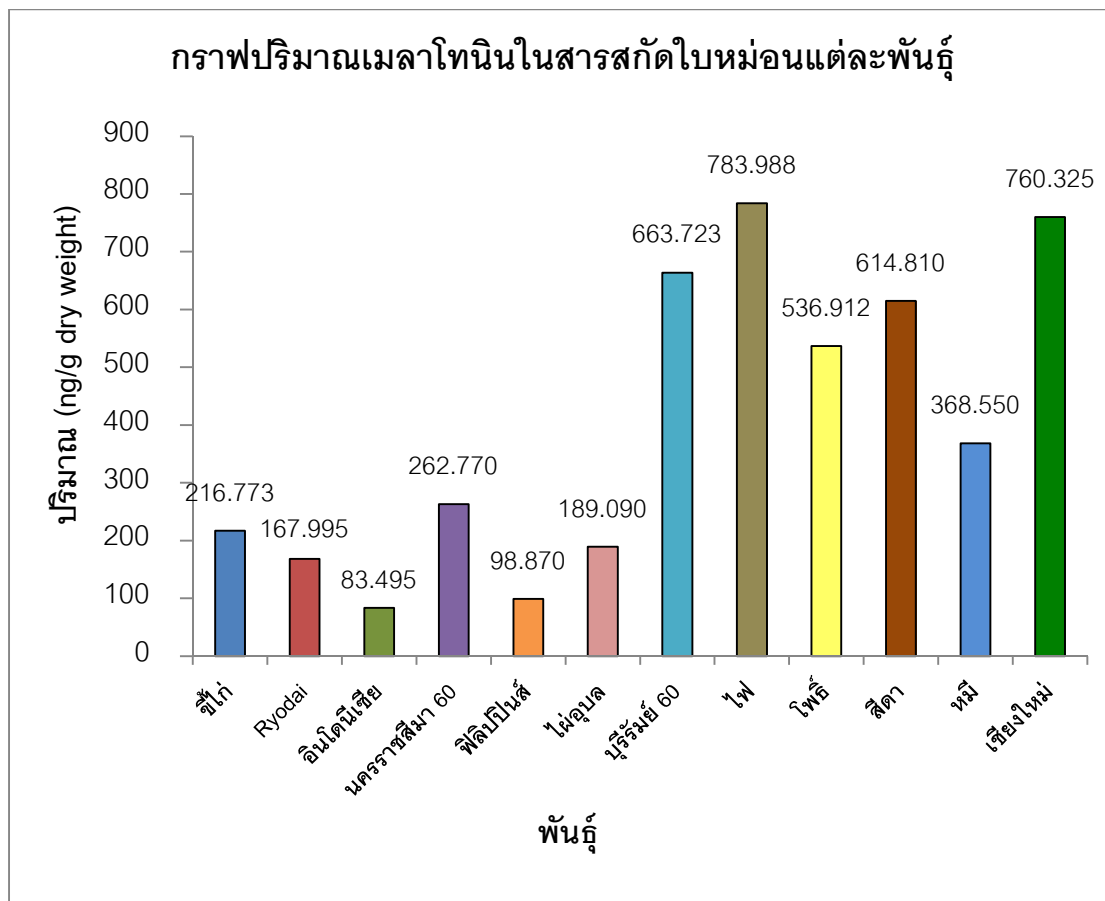
9. ไฟ	1	18.593	0.7996	618.124	637.855	22.3895
	2	19.923		633.254		
	3	20.027		662.188		
10. โพธิ์	1	20.673	0.5348	428.379	443.348	12.9934
	2	20.397		451.716		
	3	21.430		449.948		
12. สีด้า	1	20.977	0.6870	427.758	504.673	75.2973
	2	19.673		578.241		
	3	19.950		508.019		
14. หมี่	1	19.980	0.5131	312.301	310.807	2.5785
	2	19.130		312.291		
	3	19.057		307.830		
16. เชียงใหม่	1	18.690	0.8572	631.215	619.229	64.7530
	2	20.313		549.320		
	3	19.023		677.151		

(n=3, *n=2)

มีสารสกัดใบหม่อนเพียง 12 สายพันธุ์เท่านั้นที่สามารถหาปริมาณเมลาโทนินได้ พันธุ์ที่ไม่สามารถหาปริมาณเมลาโทนินได้คือ พันธุ์แก้ว ศรีสะเกษ เนื่องจากมีฟีดอื่นรบกวนบริเวณฟีดของเมลาโทนิน และพันธุ์ส้มใหญ่ ศรีลังกา จาก ญี่ปุ่น และคุณไฟ ไม่ปรากฏฟีดของเมลาโทนินในโครมาโทแกรม อาจเนื่องมาจากมีปริมาณเมลาโทนินอยู่น้อยเกินไป

ตารางที่ 7 ปริมาณเมลานินในใบหม่อนแต่ละพันธุ์

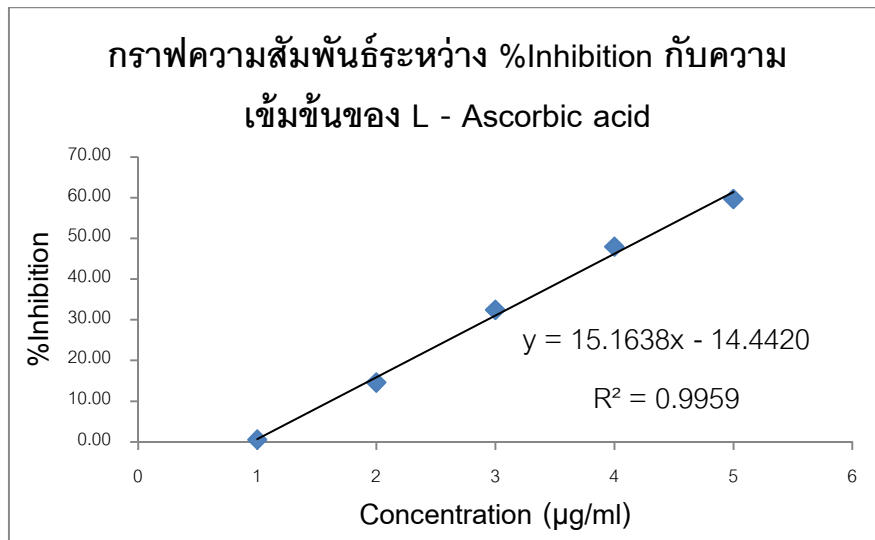
พันธุ์	ความเข้มข้นของเมลานิน (จากการคำนวณ)(ng/ml)	ปริมาณ (ng/g dry weight)
1. ชี้ไก่	86.709	216.773
2. Ryodai	67.198	167.995
3. อินโดนีเซีย	33.398	83.495
4. นครราชสีมา 60	105.108	262.770
5. ฟิลิปปินส์	39.548	98.870
6. ฝูอูบล	75.636	189.090
7. บุรีรัมย์ 60	265.489	663.723
9. ไฟ	313.595	783.988
10. โพธิ์	214.765	536.913
12. สีดา	245.924	614.810
14. หมี่	147.42	368.550
16. เชียงใหม่	304.13	760.325



รูปที่ 4 ปริมาณเมลานินในสารสกัดใบหม่อนแต่ละพันธุ์

ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชันโดยวิธี 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl radical scavenging capacity assay (DPPH assay)

จากการทดลองการทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชันโดยวิธี DPPH assay เมื่อนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปคำนวณ %Inhibition และสร้างกราฟระหว่าง %Inhibition กับความเข้มข้นของ L-ascorbic acid แล้วคำนวณค่า IC_{50} จากสมการเส้นตรงของกราฟพบว่าค่า IC_{50} ของ L-ascorbic acid เท่ากับ 4.25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร



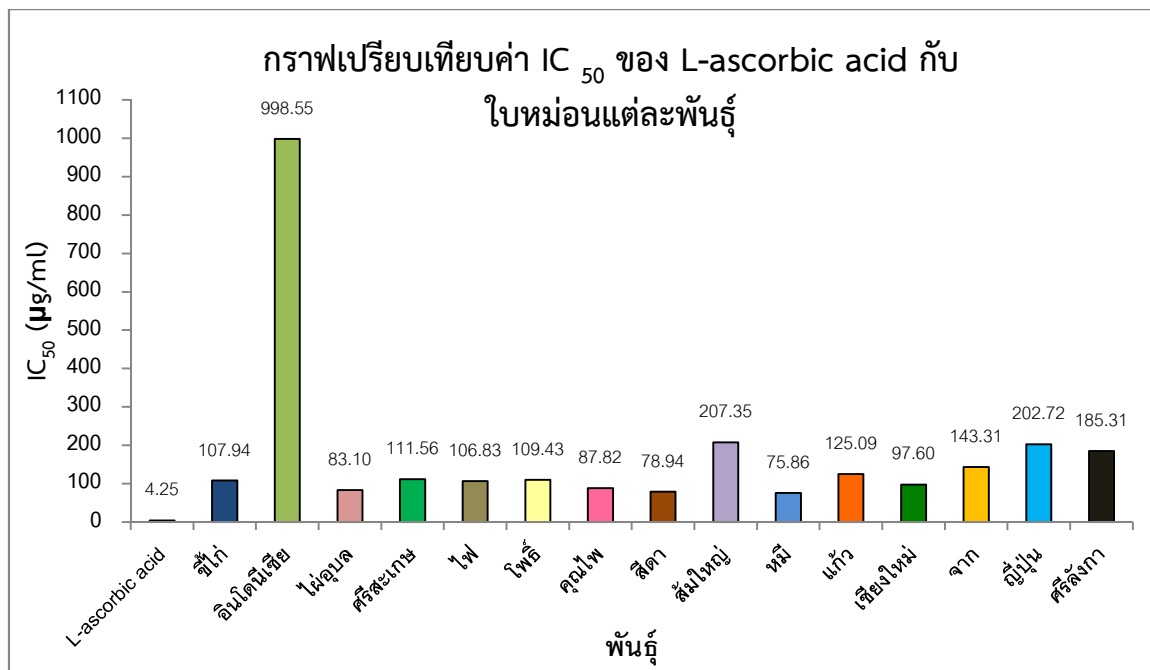
รูปที่ 5 กราฟความสัมพันธ์ระหว่าง %Inhibition กับความเข้มข้นของ L - Ascorbic acid

สำหรับค่า IC_{50} ของใบหม่อนแต่ละพันธุ์ เป็นดังตารางที่ 8 โดยพบว่า พันธุ์ Ryodai, นครราชสีมา 60, ฟิลิปปินส์ และ บุรีรัมย์ 60 ไม่สามารถหาค่า IC_{50} ได้ จึงแสดงผลด้วยค่า %Inhibition ที่ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ผลดังตารางที่ 9

ตารางที่ 8 ค่า IC_{50} ของใบหม่อนแต่ละพันธุ์ในการทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน (DPPH assay)

พันธุ์	IC_{50} (µg/ml)
1. ขี้ไก่	107.94
3. อินโดนีเซีย	998.55
6. ฝั่อบล	83.10
8. ศรีสะเกษ	111.56
9. ไฟ	106.83
10. โพธิ์	109.43
11. คุณไฟ	87.82
12. สีดา	78.94
13. ส้มใหญ่	207.35
14. หมี	75.86
15. แก้ว	125.09
16. เชียงใหม่	97.60
17. จาก	143.31
18. ญี่ปุ่น	202.72
19. ศรีลังกา	185.31

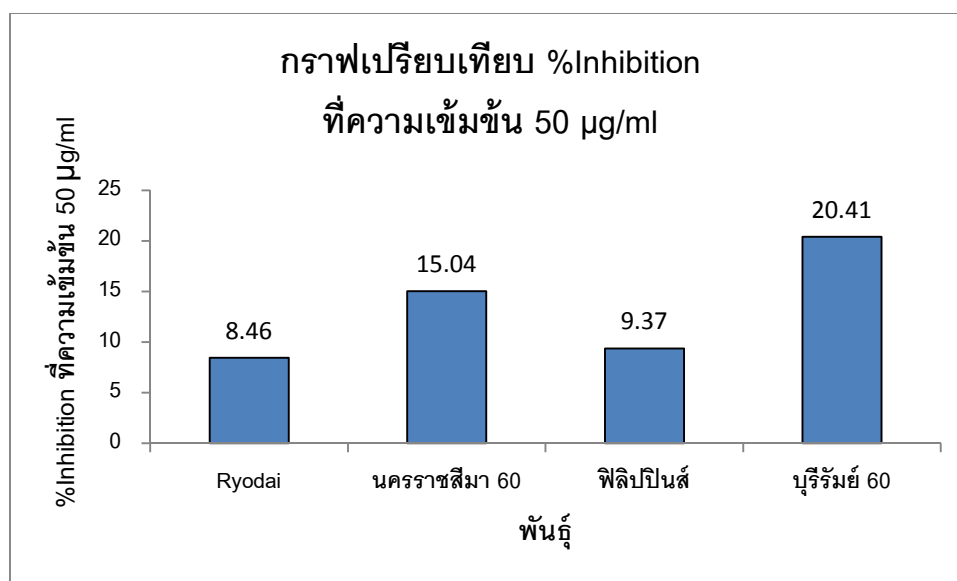
(n=4)



รูปที่ 6 กราฟเปรียบเทียบค่า IC_{50} ของใบหม่อนแต่ละพันธุ์ในการทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน ตารางที่ 9 %Inhibition ที่ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ของพันธุ์ที่ไม่สามารถหาค่า IC_{50} ได้

พันธุ์	%Inhibition ที่ความเข้มข้น 50 µg/ml
2. Ryodai	8.46
4. นครราชสีมา 60	15.04
5. ฟิลิปินส์	9.37
7. บุรีรัมย์ 60	20.41

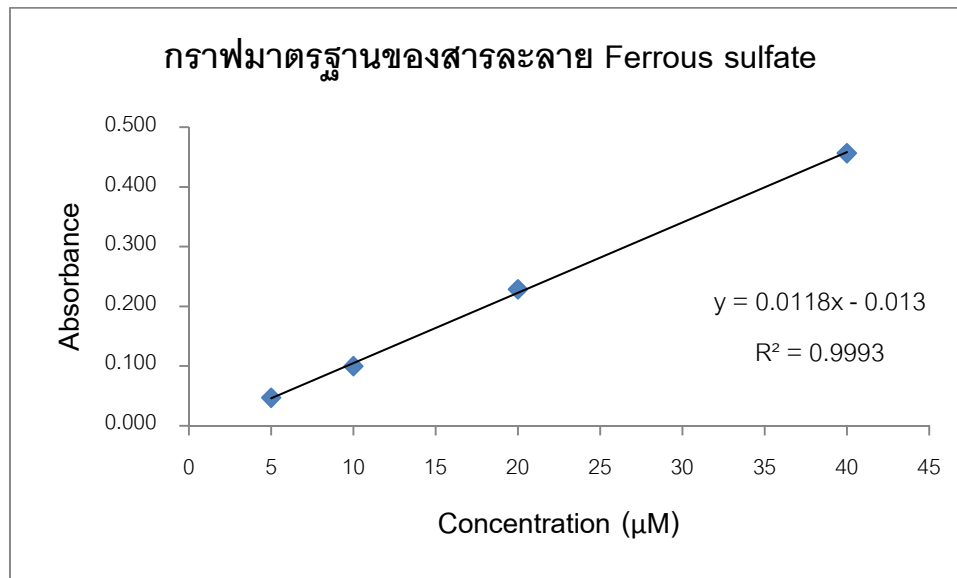
(n=4)



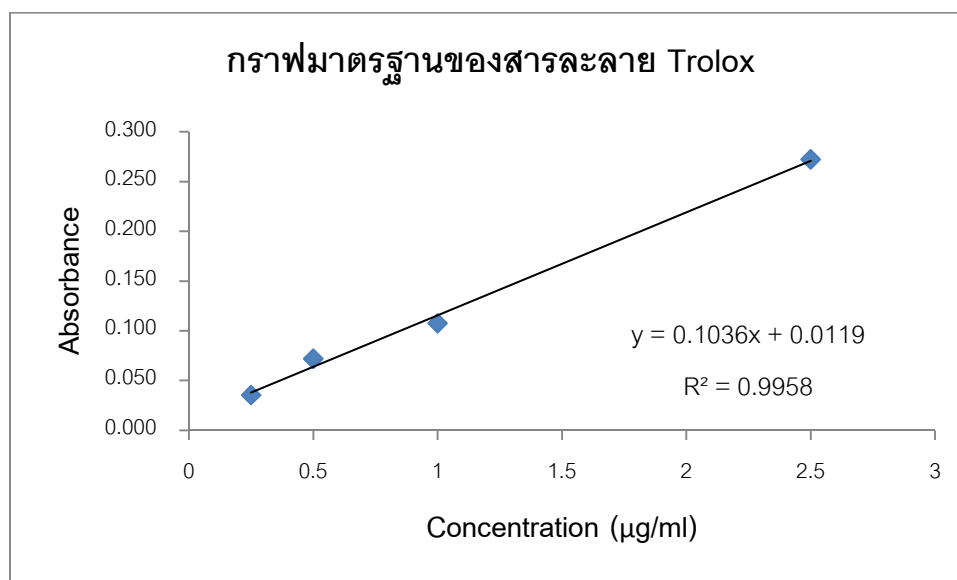
รูปที่ 7 กราฟเปรียบเทียบ %Inhibition ที่ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชันโดยวิธี Ferric reducing antioxidant power (FRAP)

จากการทดลองการทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชันโดยวิธี FRAP เมื่อนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาสร้างกราฟมาตรฐานของสารละลาย ferrous sulfate และ trolox จากนั้นนำค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดใบหม่อนแต่ละพันธุ์มาแทนในสมการจะได้ค่า FRAP value และ trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) ดังตารางที่ 10



รูปที่ 8 กราฟมาตรฐานของสารละลาย Ferrous sulfate

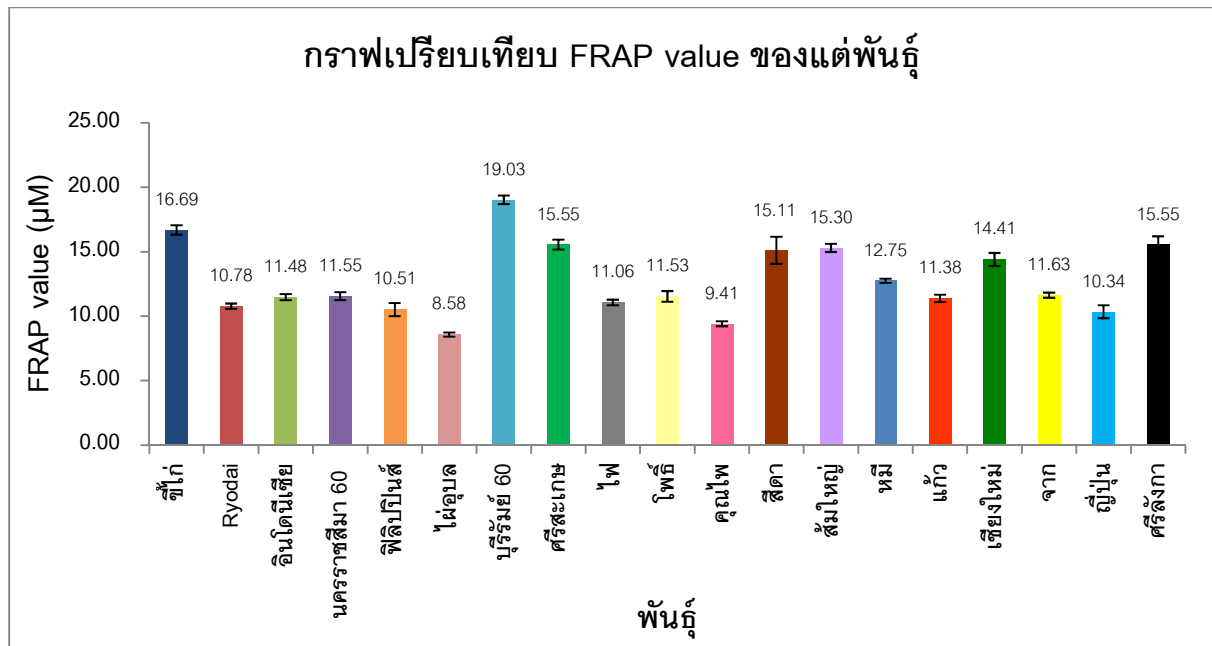


รูปที่ 9 กราฟมาตรฐานของสารละลาย Trolox

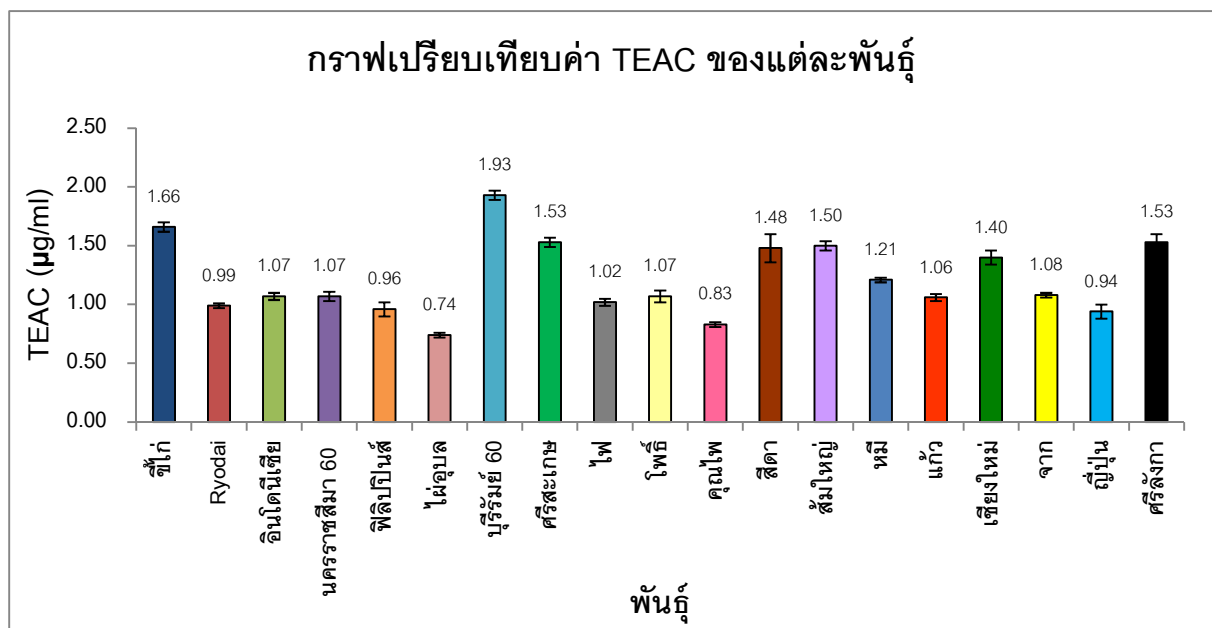
ตารางที่ 10 ค่า FRAP value และ TEAC ของแต่ละพันธุ์

พันธุ์	FRAP value (μM)	TEAC ($\mu\text{g/ml}$)
1. ชี้ไก่	16.69 $\pm$ 0.37	1.66 $\pm$ 0.04
2. Ryodai	10.78 $\pm$ 0.20	0.99 $\pm$ 0.02
3. อินโดนีเซีย	11.48 $\pm$ 0.23	1.07 $\pm$ 0.03
4. นครราชสีมา 60	11.55 $\pm$ 0.31	1.07 $\pm$ 0.04
5. ฟิลิปปินส์	10.51 $\pm$ 0.51	0.96 $\pm$ 0.06
6. ฝั่อบล	8.58 $\pm$ 0.16	0.74 $\pm$ 0.02
7. บุรีรัมย์ 60	19.03 $\pm$ 0.33	1.93 $\pm$ 0.04
8. ศรีสะเกษ	15.55 $\pm$ 0.39	1.53 $\pm$ 0.04
9. ไฟ	11.06 $\pm$ 0.22	1.02 $\pm$ 0.03
10. โพธิ์	11.53 $\pm$ 0.42	1.07 $\pm$ 0.05
11. คุณไผ	9.41 $\pm$ 0.19	0.83 $\pm$ 0.02
12. สีดา	15.11 $\pm$ 1.05	1.48 $\pm$ 0.12
13. ส้มใหญ่	15.30 $\pm$ 0.32	1.50 $\pm$ 0.04
14. หมี่	12.75 $\pm$ 0.16	1.21 $\pm$ 0.02
15. แก้ว	11.38 $\pm$ 0.28	1.06 $\pm$ 0.03
16. เชียงใหม่	14.41 $\pm$ 0.50	1.40 $\pm$ 0.06
17. จาก	11.63 $\pm$ 0.20	1.08 $\pm$ 0.02
18. ญี่ปุ่น	10.34 $\pm$ 0.50	0.94 $\pm$ 0.06
19. ศรีลังกา	15.55 $\pm$ 0.65	1.53 $\pm$ 0.07

(n=3)



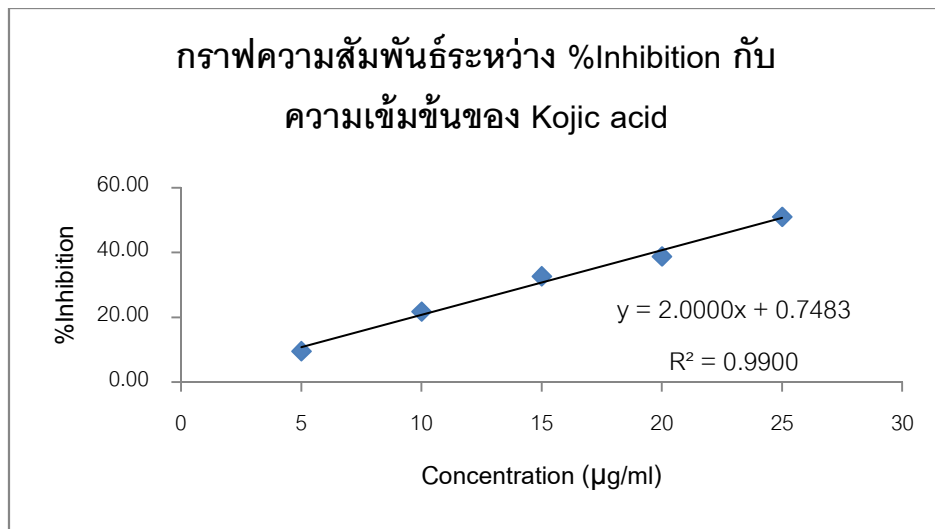
รูปที่ 10 กราฟเปรียบเทียบ FRAP value ของแต่ละพันธุ์



รูปที่ 11 กราฟเปรียบเทียบ TEAC ของไบหม่อน 19 พันธุ์

ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

เมื่อนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปคำนวณ %Inhibition และสร้างกราฟระหว่าง %Inhibition กับ ความเข้มข้นของ kojic acid แล้วคำนวณค่า IC_{50} จากสมการเส้นตรงของกราฟพบว่าค่า IC_{50} ของ kojic acid เท่ากับ 24.63 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร



รูปที่ 12 กราฟความสัมพันธ์ระหว่าง %Inhibition กับความเข้มข้นของ kojic acid

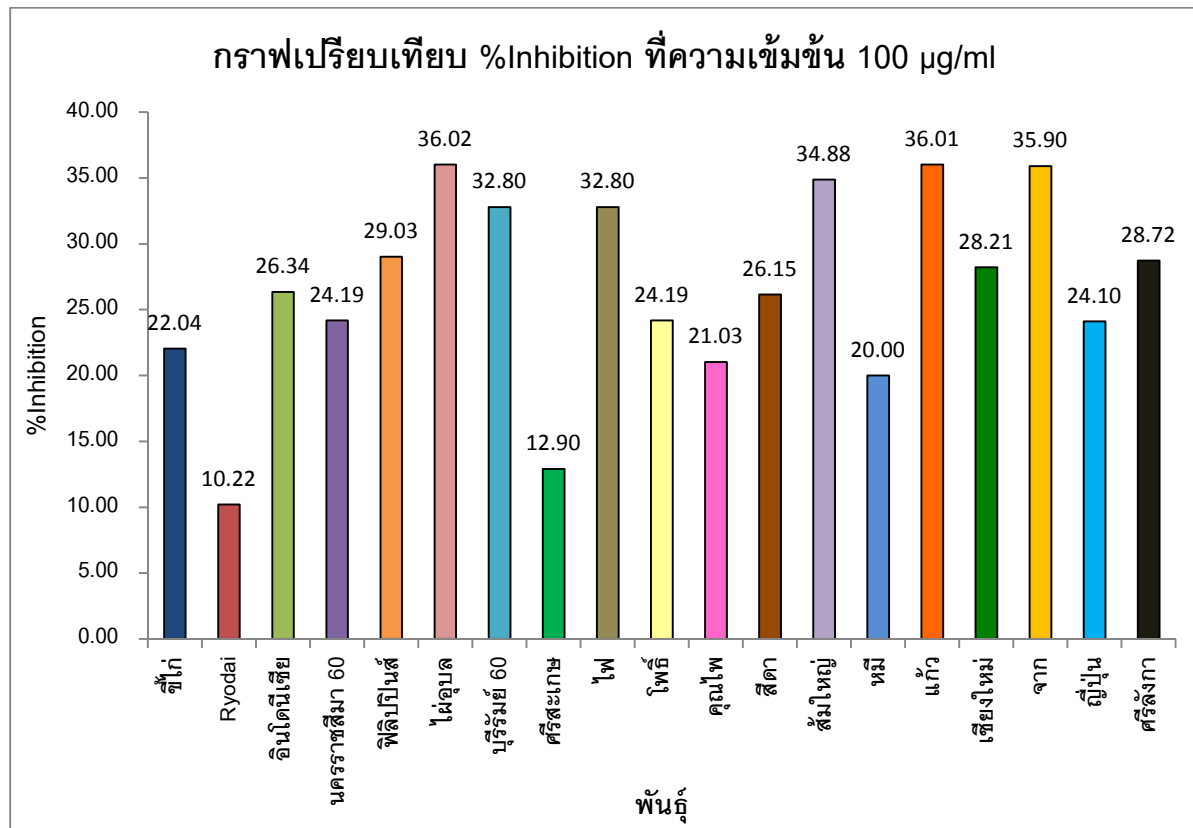
สำหรับค่า IC_{50} ของใบหม่อนแต่ละพันธุ์ พบว่าไม่สามารถหาค่า IC_{50} ได้ทั้ง 19 พันธุ์ จึงแสดงผลด้วยค่า %Inhibition ที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ผลดังตารางที่ 11

ตารางที่ 11 %Inhibition ที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรในการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

พันธุ์	%Inhibition ที่ความเข้มข้น 100 µg/ml
1. ขี้ไก่	22.04
2. Ryodai	10.22
3. อินโดนีเซีย	26.34
4. นครราชสีมา 60	24.19
5. ฟิลิปปินส์	29.03
6. ฝั่อบล	36.02
7. บุรีรัมย์ 60	32.80
8. ศรีสะเกษ	12.90
9. ไฟ	32.80
10. โพธิ์	24.19
11. คุณไผ่	21.03
12. สีดา	26.15
13. ส้มใหญ่	34.88
14. หมี่	20.00
15. แก้ว	36.01
16. เชียงใหม่	28.21
17. จาก	35.90

18. ญี่ปุ่น	24.10
19. ศรีลังกา	28.72

(n=3)



รูปที่ 13 กราฟเปรียบเทียบ %Inhibition ที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิตรในการทดสอบฤทธิ์ต้านเอนไซม์ไทโรซิเนส

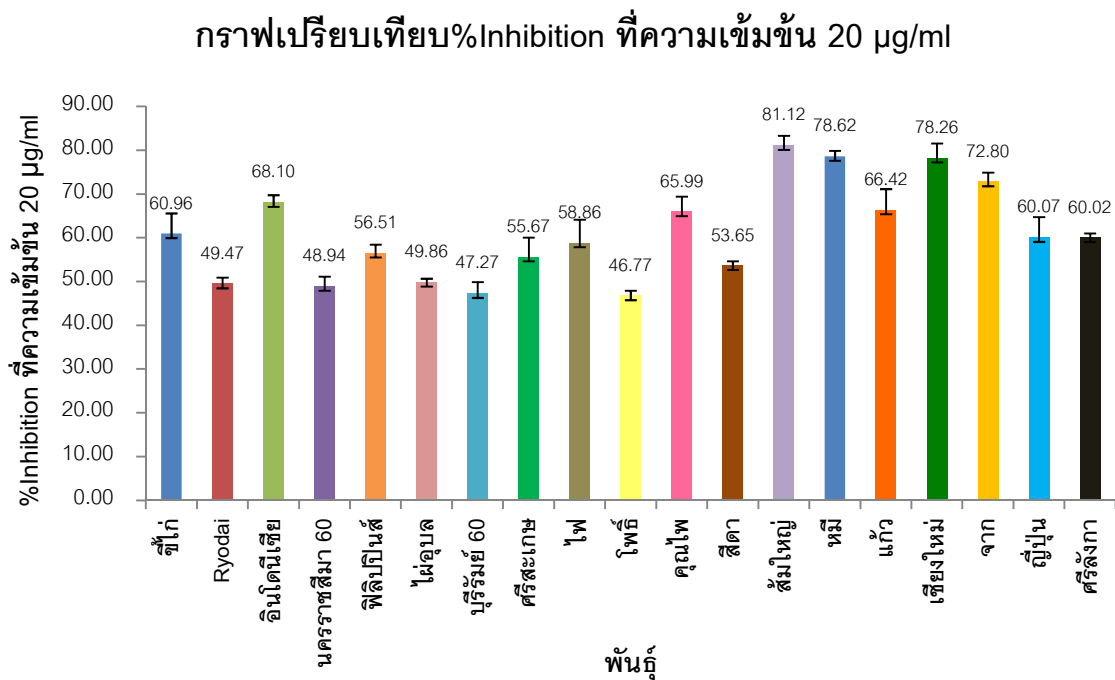
ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอักเสบโดยวิธี Nitric oxide inhibition

ตารางที่ 12 %Inhibition ที่ความเข้มข้น 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิตรในการทดสอบฤทธิ์ต้านอักเสบ

พันธุ์	%Inhibition ที่ความเข้มข้น 20 µg/ml	SD
1. ขี้ไก่	60.96	4.62
2. Ryodai	49.47	1.47
3. อินโดนีเซีย	68.10	1.65
4. นครราชสีมา 60	48.94	2.19
5. ฟิลิปปีนส์	56.51	1.96
6. ไผ่อบล	49.86	0.80
7. บุรีรัมย์ 60	47.27	2.60
8. ศรีสะเกษ	55.67	4.39

9. ไฟ	58.86	5.28
10. โพธิ์	46.77	1.14
11. คุณไผ่	65.99	3.43
12. สีด้า	53.65	1.02
13. ส้มใหญ่	81.12	2.22
14. หมี	78.62	1.29
15. แก้ว	66.42	4.73
16. เชียงใหม่	78.26	3.30
17. จาก	72.80	2.12
18. ญี่ปุ่น	60.07	4.68
19. ศรีลังกา	60.02	1.00

(n=3)



รูปที่ 14 กราฟเปรียบเทียบ%Inhibition ที่ความเข้มข้น 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรในการทดสอบฤทธิ์ต้านอักเสบ

อภิปรายและวิจารณ์ผลการวิจัย

จากการทดลองหาปริมาณเมลาโทนินในใบหม่อนสายพันธุ์ต่างๆ พบว่าพันธุ์ไฟ มีปริมาณเมลาโทนินมากที่สุด และพันธุ์ที่มีน้อยที่สุดคือ พันธุ์อินโดนีเซีย ส่วนพันธุ์แก้ว และศรีสะเกษ มีพิกคี่นรบกวนบริเวณพิกคี่ของเมลาโทนิน อาจเนื่องมาจากสภาวะของเพลเคลื่อนที่ที่ไม่เหมาะสม ทำให้สารไม่แยกออกจากกัน ส่วนพันธุ์ส้มใหญ่ ศรีลังกา จาก ญี่ปุ่น และคุณไพ ไม่ปรากฏพิกคี่ของเมลาโทนินในโครมาโทแกรม อาจเกิดจากในตัวอย่างมีปริมาณเมลาโทนินน้อยเกินไปจนไม่สามารถวัดได้ด้วย HPLC-FD หรืออาจเกิดจากขั้นตอนการเตรียมสารสกัดก่อนจะทำการวิเคราะห์ด้วย HPLC ในขั้นตอนการละลายสารก่อนทำการแยกด้วย ตัวดูดซับของแข็ง (SPE) พบว่าทั้ง 5 พันธุ์ จะมีลักษณะเป็นตะกอนที่ไม่ละลาย

จากการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากใบหม่อน 19 พันธุ์โดย DPPH assay พบว่าสารสกัดใบหม่อนพันธุ์หมี มีฤทธิ์มากที่สุด และพันธุ์ที่มีฤทธิ์น้อยที่สุด คือ พันธุ์อินโดนีเซีย เมื่อเปรียบเทียบค่า IC_{50} ของสารสกัดกับ L-ascorbic acid พบว่าสารสกัดใบหม่อนทั้ง 15 พันธุ์ มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระต่ำกว่า L-ascorbic acid นอกจากนี้พบว่า พันธุ์ Ryodai นครราชสีมา 60 ฟิลิปปินส์ และ บุรีรัมย์ 60 ไม่สามารถหาค่า IC_{50} ได้อาจเนื่องมาจากสีของสารสกัดที่มีสีเข้มมากจึงอาจรบกวนการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นที่ทำการทดลอง

จากการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากใบหม่อน 19 พันธุ์โดย FRAP assay พบว่าค่า TEAC ของ สารสกัดใบหม่อนพันธุ์บุรีรัมย์ 60 มีฤทธิ์มากที่สุด (1.93 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)และ พันธุ์ที่มีฤทธิ์น้อยที่สุด คือ พันธุ์ไผ่อบล (0.74 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) เนื่องจากการทดลองนี้ทดสอบที่ความเข้มข้นต่ำมาก ทำให้สีของสารสกัดไม่รบกวนการวิเคราะห์ จึงสามารถเปรียบเทียบฤทธิ์ของสารสกัดได้ทุกพันธุ์

จากการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสพบว่าสารสกัดใบหม่อนทั้ง 19 พันธุ์ไม่สามารถหาค่า IC_{50} อาจเนื่องมาจากสีของสารสกัดที่มีสีเข้มมากจึงอาจรบกวนการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นที่ทำการทดลอง จึงเปรียบเทียบการยับยั้งเอนไซม์ที่ความเข้มข้นเดียวกัน คือ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยพบว่าพันธุ์ที่สามารถยับยั้งเอนไซม์ได้สูงสุด คือ พันธุ์ไผ่อบล และพันธุ์ที่สามารถยับยั้งได้น้อยที่สุดคือ Ryodai

จากการทดสอบฤทธิ์ต้านอักเสบของสารสกัดที่ความเข้มข้น 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่า พันธุ์ส้มใหญ่สามารถยับยั้งการสร้างไนตริกออกไซด์ได้มากที่สุด และพันธุ์ที่สามารถยับยั้งได้น้อยที่สุดคือ โพธิ์

สรุปผลการวิจัย

จากการทดลอง พบว่าปริมาณเมลาโทนินในใบหม่อนสายพันธุ์ต่างๆ พันธุ์ไฟ มีปริมาณเมลาโทนินมากที่สุด และพันธุ์ที่มีน้อยที่สุดคือ พันธุ์อินโดนีเซีย การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากใบหม่อน 19 พันธุ์โดย DPPH assay พบว่าสารสกัดใบหม่อนพันธุ์หมี มีฤทธิ์มากที่สุด และพันธุ์ที่มีฤทธิ์ต่ำที่สุดคือ พันธุ์อินโดนีเซีย จากการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากใบหม่อน 19 พันธุ์โดย FRAP assay ที่ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าค่า TEAC ของ สารสกัดใบหม่อนพันธุ์บุรีรัมย์ 60 มีฤทธิ์มากที่สุด และ พันธุ์ที่มีฤทธิ์น้อยที่สุด คือ พันธุ์ไผ่อบล สำหรับฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส ที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่า พันธุ์ที่สามารถยับยั้งเอนไซม์ได้สูงที่สุด คือ พันธุ์ไผ่อบล และ พันธุ์ที่สามารถยับยั้งเอนไซม์ได้ต่ำที่สุด คือ พันธุ์ Ryodai และการทดสอบฤทธิ์ต้านอักเสบของสารสกัดโดยทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการสร้างไนตริกออกไซด์ ของสารสกัดใบหม่อนที่ความเข้มข้น 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่า พันธุ์ส้มใหญ่สามารถยับยั้งการสร้างไนตริกออกไซด์ได้มากที่สุด และ พันธุ์โพธิ์ ยับยั้งการสร้างไนตริกออกไซด์ได้ต่ำที่สุด

เห็นได้ว่าใบหม่อนแต่ละสายพันธุ์มีเมลาโท닌ในปริมาณที่แตกต่างกัน และมีฤทธิ์ฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และฤทธิ์ยับยั้งการสร้างไนตริกออกไซด์ ที่แตกต่างกัน อาจจะเป็นเพราะส่วนประกอบในสารสกัดแต่ละตัวที่ต่างกันไป ซึ่งน่าจะได้มีการทำวิจัยเกี่ยวกับองค์ประกอบที่มีในใบหม่อนในแต่ละสายพันธุ์ที่น่าจะมีผลต่อฤทธิ์ต่างๆ ในอนาคตต่อไปเพื่อจะได้เป็นแนวทางนำใบหม่อนพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพสูงนั้นมาทำการพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ต่อไป

ปัญหาและข้อเสนอแนะ

เนื่องจากในตอนแรกวางแผนทำการวิเคราะห์ปริมาณเมลาโท닌ในสารสกัดจากใบหม่อนด้วยวิธีแก๊สโครมาโตกราฟี แต่เนื่องจากเครื่องมือชำรุดต้องมีการซ่อมแซม และประกอบกับความล่าช้าในการสั่งซื้อสารเคมีและสารมาตรฐานสำหรับการเตรียมอนุพันธ์ของเมลาโท닌 จึงได้มีการทดลองหาสถานะในการวิเคราะห์ด้วย HPLC-FD และพบว่าสามารถหาปริมาณเมลาโท닌ได้ในระดับหนึ่ง จึงได้ดำเนินการวิเคราะห์ต่อไปด้วยวิธีนี้แทน ในการเตรียมตัวอย่างของสารสกัดใบหม่อนสายพันธุ์ต่างๆ พบว่า ได้สารสกัดที่มีความหนืดค่อนข้างมาก และมีสีเขียว ซึ่งอาจจะมีสารรบกวนในการวิเคราะห์หาปริมาณเมลาโท닌 สารสกัดใบหม่อน บางสายพันธุ์มีฟีดของสารอื่นรบกวนซึ่งปรากฏที่บริเวณใกล้เคียงกับฟีดของเมลาโท닌 ทำให้การหาพื้นที่ใต้กราฟทำได้ยาก อาจจะทำให้การแก้ไขโดยปรับสถานะที่ใช้ในการวิเคราะห์ เช่น ปรับสัดส่วนของเฟสเคลื่อนที่, ลดอัตราการไหล สำหรับบางสายพันธุ์ไม่ปรากฏฟีดของเมลาโท닌ในโครมาโทแกรม อาจเกิดจากในตัวอย่างมีปริมาณเมลาโทนินน้อยเกินไปจนไม่สามารถวัดได้ด้วย HPLC-FD อาจวิเคราะห์ด้วยวิธีอื่นที่มีความไวมากกว่านี้ เช่น LC-MS หรือ GC-MS

สำหรับการทดสอบฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา การสกัดสารจากใบหม่อนเป็นการสกัดหยาบ สารสกัดที่ได้จึงยังมีสีของใบหม่อนอยู่ ทำให้เมื่อนำไปทดสอบฤทธิ์ที่ความเข้มข้นสูง พบว่าสีของสารสกัดรบกวนการดูดกลืนแสง ดังนั้นจึงควรทำการกำจัดสีของสารสกัดออกก่อนที่จะนำไปทดสอบฤทธิ์ เช่น การแยกผ่านคอลัมน์โครมาโตกราฟีแล้วนำ บาง fraction มาทดสอบฤทธิ์อีกต่อไป

บรรณานุกรม

- Arabshahi-Delouee, S. and Urooj, A. Antioxidant properties of various solvent extracts of mulberry (*Morus indica* L.) leaves. *Food Chemistry*. 102: 1233–1240 (2007).
- Arnao, M.B. and Hernandez-Ruiz, J. Melatonin promotes adventitious- and lateral root regeneration in etiolated hypocotyls of *Lupinus albus* L. *Journal of Pineal Research*. 42: 147–152 (2007).
- Butt, M. S. et al. *Morus alba* L. nature's functional tonic. *Trends in Food Science & Technology*. 19: 505-512 (2008).
- Chang, L. W. et al. Antioxidant and antityrosinase activity of mulberry (*Morus alba* L.) twigs and root bark. *Food and Chemical Toxicology*. 49: 785–790 (2011).
- Chang, T. S. An Updated Review of Tyrosinase Inhibitors. *Int. J. Mol. Sci*. 10: 2440-2475 (2009).
- Chen G. et al. Melatonin in Chinese medicinal herbs. *Life Sciences*. 73 : 19–26 (2003).
- Choi, E. M. and Hwang, J. K. Effects of *Morus alba* leaf extract on the production of nitric oxide, prostaglandin E 2 and cytokines in RAW264.7 macrophages. *Fitoterapia*. 76: 608–613 (2005).
- Iqbal S. et al. Proximate Composition and Antioxidant Potential of Leaves from Three Varieties of Mulberry (*Morus* sp.): A Comparative Study. *International Journal of Molecular Sciences*. 13: 6651-6664 (2012).
- Lee, S. H. Mulberroside F Isolated from the Leaves of *Morus alba* Inhibits Melanin Biosynthesis. *Biol. Pharm. Bull*. 25: 1045-1048 (2002).
- Parrilla M.C.G., et al. Analysis of melatonin in foods. *Journal of Food Composition and Analysis*. 22: 177–183 (2009).
- Pothinuch P. and Tongchitpakdee S. Melatonin contents in mulberry (*Morus* spp.) leaves: Effects of sample preparation, cultivar, leaf age and tea processing. *Food Chemistry*. 128: 415-419 (2011).
- Simonin, G., Bru, L., Lelievre, E., Jeanniot, J.P., Bromet, N., Walther, B., Boursier-Neyret, C. Determination of melatonin in biological fluids in the presence of the melatonin agonist S 20098: comparison of immunological techniques and GC–MS methods. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 21: 591–601(1999).
- Tan, D.X., Manchester, L.C., Reiter, R.J., Qi, W., Karbownik, M., Calvo, J.R. Significance of melatonin in antioxidative defense system: reactions and products. *Biol. Signals Recept*. 9: 137–159 (2000).
- Tan, D.X., Reiter, R.J., Manchester, L.C., Yan, M.T., El-Sawi, M., Sainz, R.M., Mayo, J.C., Kohen, R., Allegra, M., Hardeland, R. Chemical and physical properties and potential mechanisms: melatonin as a broad spectrum antioxidant and free radical scavenger. *Curr. Topic Med. Chem*. 2: 181–197 (2002).

Zhishen, J., Mengcheng, T., and Jianming, W. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chemistry*. 64: 555–559 (1999).

ภาคผนวก

- วิธีการเตรียมสารต่างๆ ในการทดลอง

1. การเตรียมสารมาตรฐานเมลาโทนิน

1. เตรียม stock สารมาตรฐานเมลาโทนิน ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร
ชั่งสารมาตรฐานเมลาโทนิน 10 มิลลิกรัม ละลายด้วยเมทานอล 10 มิลลิลิตร ในขวดปรับปริมาตรขนาด 10 มิลลิลิตร
2. เตรียมสารมาตรฐานเมลาโทนินความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร
นำสารมาตรฐานเมลาโทนิน ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มา 50 ไมโครลิตร เจือจางด้วยเมทานอล 450 ไมโครลิตร
3. เตรียมสารมาตรฐานเมลาโทนินความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร
นำสารมาตรฐานเมลาโทนินความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มา 50 ไมโครลิตร เจือจางด้วยเมทานอล 450 ไมโครลิตร
4. เตรียมสารมาตรฐานเมลาโทนินความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร
นำสารมาตรฐานเมลาโทนินความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มา 200 ไมโครลิตร เจือจางด้วยเมทานอล 1800 ไมโครลิตร
5. เตรียมสารมาตรฐานเมลาโทนินความเข้มข้น 800 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร
นำสารมาตรฐานเมลาโทนินความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มา 800 ไมโครลิตร เจือจางด้วยเมทานอล 200 ไมโครลิตร
6. เตรียมสารมาตรฐานเมลาโทนินความเข้มข้น 500 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร
นำสารมาตรฐานเมลาโทนินความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มา 500 ไมโครลิตร เจือจางด้วยเมทานอล 500 ไมโครลิตร
7. เตรียมสารมาตรฐานเมลาโทนินความเข้มข้น 200 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร
นำสารมาตรฐานเมลาโทนินความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มา 200 ไมโครลิตร เจือจางด้วยเมทานอล 800 ไมโครลิตร
8. เตรียมสารมาตรฐานเมลาโทนินความเข้มข้น 100 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร
นำสารมาตรฐานเมลาโทนินความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มา 100 ไมโครลิตร เจือจางด้วยเมทานอล 900 ไมโครลิตร
9. เตรียมสารมาตรฐานเมลาโทนินความเข้มข้น 50 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร
นำสารมาตรฐานเมลาโทนินความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มา 50 ไมโครลิตร เจือจางด้วยเมทานอล 950 ไมโครลิตร

2. การเตรียมสารละลายบัฟเฟอร์ $\text{Na}_2\text{HPO}_3/\text{H}_3\text{PO}_4$ ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ pH 4.5

ชั่ง Na_2HPO_3 8.9 กรัม ละลายและปรับปริมาตรในขวดวัดปริมาตรขนาด 1000 มิลลิลิตร ด้วยน้ำปราศจากไอออน จากนั้นนำไปวัดค่าความเป็นกรดต่าง ด้วย pH meter และปรับให้มีค่า pH เท่ากับ 4.5

3. การเตรียมตัวอย่างที่ใช้ในการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

ชั่งตัวอย่างใบหม่อน 0.0050 กรัม ละลายด้วยเอทานอล 1 มิลลิลิตร นำไป sonicate นาน 15 นาที จะได้ stock solution ของตัวอย่าง เมื่อจะนำไปทดสอบฤทธิ์จึงนำมาเจือจางให้ได้ความเข้มข้นที่ต้องการ

4. การเตรียมสารละลาย DPPH ความเข้มข้น 200 ไมโครโมลาร์

ชั่ง DPPH 0.0039 กรัม ละลายและปรับปริมาตรในขวดวัดปริมาตรขนาด 50 มิลลิลิตร ด้วยเมทานอล

5. การเตรียมสารละลายมาตรฐาน Ferrous sulfate ความเข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์

ชั่ง Ferrous sulfate 0.0695 กรัม ละลายด้วย deionized water ปรับปริมาตรจนครบ 50 มิลลิลิตร

6. การเตรียมสารละลายมาตรฐาน Trolox ความเข้มข้น 1 mg/ml

ชั่ง Trolox 0.0250 กรัม ละลายด้วย ethanol ปรับปริมาตรจนครบ 25 มิลลิลิตร

7. การเตรียมสารละลาย FRAP reagent

- 300 mM Acetate buffer pH 3.6

ชั่ง sodium acetate trihydrate 3.1 กรัม ละลายด้วย glacial acetic acid 16 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วย deionized water จนครบ 1,000 มิลลิลิตร ในขวดปรับปริมาตร

- 20 mM Ferric chloride

ชั่ง $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.0270 กรัม ละลายด้วย deionized water ปรับปริมาตรจนครบ 5 มิลลิลิตร

- 10 mM 2,4,6-Tris(2-pyridyl)-1,3,5-triazine

ชั่ง TPTZ 0.0156 กรัม ละลายด้วย 40mM HCl 5 มิลลิลิตร

8. การเตรียมตัวอย่างที่ใช้ในการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

ชั่งตัวอย่างใบหม่อน 0.0100 กรัม ละลายด้วยเอทานอล 1 มิลลิลิตร นำไป sonicate นาน 15 นาที จะได้ stock solution ของตัวอย่าง เมื่อจะนำไปทดสอบฤทธิ์จึงนำมาเจือจางให้ได้ความเข้มข้นที่ต้องการ

9. การเตรียมสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ pH 6.8

ชั่ง Na_2HPO_4 1.78 กรัม และ NaH_2PO_4 1.56 กรัม ละลายและปรับปริมาตรในขวดวัดปริมาตรขนาด 1000 มิลลิลิตร ด้วยน้ำปราศจากไอออน จากนั้นนำไปวัดค่าความเป็นกรดต่าง ด้วย pH meter และปรับให้มีค่า pH เท่ากับ 6.8 ด้วยกรดฟอสฟอริก

10. การเตรียมสารละลาย L-Dopa ความเข้มข้น 0.85 ไมโครโมลาร์

ชั่ง L-Dopa 0.0040 กรัม ละลายและปรับปริมาตรในขวดวัดปริมาตรขนาด 25 มิลลิลิตร ด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ เก็บให้พ้นแสง

11. การเตรียมสารละลายเอนไซม์ไทโรซิเนส ความเข้มข้น 314.8 ยูนิตต่อมิลลิลิตร

ปิเปต Stock สารละลายเอนไซม์ไทโรซิเนส ปริมาตร 126 ไมโครลิตร ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 10 มิลลิลิตร เติมฟอสเฟตบัฟเฟอร์และปรับปริมาตร เก็บให้พ้นแสง

12. การเตรียมตัวอย่างที่ใช้ในการทดสอบฤทธิ์ต้านอักเสบ

ชั่งตัวอย่างไบโหม่อน 0.0020 กรัม ละลายด้วย 50% DMSO 1 มิลลิลิตร นำไป sonicate นาน 10 นาที จะได้สารละลายตัวอย่างความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เพื่อนำไปทดสอบฤทธิ์ต่อไป

13. การเตรียม Griess reagent

ชั่ง sulfanilamide 0.5 กรัม และ naphthylethylenediamine 0.05 กรัม ละลายและปรับปริมาตรในขวดวัดปริมาตรขนาด 50 มิลลิลิตร ด้วย 5% กรดฟอสฟอริก