



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

คุณลักษณะและผลของสารสกัดผลหม่อนต่อการเจริญเติบโต
และการเปลี่ยนแปลงไปเป็นกระดูก
ของเซลล์ต้นกำเนิดไขกระดูกหนูนอกร่างกาย

โดย

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. โศรดา กนกพานนท์ และคณะ

มิถุนายน 2555

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

คุณลักษณะและผลของสารสกัดผลหม่อนต่อการเจริญเติบโต
และ การเปลี่ยนแปลงไปเป็นกระดูกของเซลล์ต้นกำเนิดไข
กระดูกหุหนอกร่างกาย

คณะผู้วิจัย

1. ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. โศรดา กนกพานนท์
ภาควิชาวิศวกรรมเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
2. รองศาสตราจารย์ ดร. พรอนงค์ อร่ามวิทย์
ภาควิชาเภสัชกรรมปฏิบัติ คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.)
(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกว.ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

แบบสรุปโครงการวิจัย

สัญญาเลขที่ RDG5420046

ชื่อโครงการ คุณลักษณะและผลของสารสกัดผลหม่อนต่อการเจริญเติบโต และการเปลี่ยนแปลงไปเป็นกระดูกของเซลล์ต้นกำเนิดไขกระดูกหนูนอกร่างกาย

หัวหน้าโครงการ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. โสรดา กนกพานนท์

หน่วยงาน ภาควิชาวิศวกรรมเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

โทรศัพท์ 0-2218-6861 โทรสาร 0-2218-6877 e-mail: soradakanok@yahoo.com

ความสำคัญ/ความเป็นมา

ในประเทศไทยเริ่มมีการใช้ประโยชน์จากเซลล์ต้นกำเนิดจากเลือด และไขกระดูกเพื่อการรักษาได้ แต่หนึ่งในปัญหาสำคัญที่ต้องการการศึกษาคือ การขยายจำนวนให้เพียงพอแก่การใช้งานเนื่องจากมีปริมาณจำกัดและการควบคุมการเปลี่ยนแปลง (differentiation) ให้เป็นเซลล์หรือมีการซ่อมแซมเนื้อเยื่อที่ต้องการ ในระดับการวิจัยมีรายงานการใช้เซลล์ต้นกำเนิดที่สกัดจากไขกระดูกของหนู (bone marrow derived mesenchymal stem cells, MSC) จำนวนมากเนื่องจากมีแหล่งบริจาคที่จำกัดและข้อมูลที่ได้สามารถเทียบเคียงได้กับเซลล์ต้นกำเนิดของมนุษย์ การควบคุมการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ต้นกำเนิดไปเป็นเซลล์กระดูก (osteoblast) ซึ่งจะสร้างเนื้อเยื่อกระดูกต่อไปในปัจจุบันมีรายงานการใช้เทคนิคต่างๆ ได้แก่ 1) การใช้สารเคมีในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่เรียกว่า osteogenic medium, การใช้หมู่ทางเคมีบนโครงเลี้ยงเซลล์สามมิติ, ลำดับเปปไทด์ของกรดอะมิโน RGD 2) การใช้สารเร่งประเภท cytokines และ bone growth factors 3) การปรับปรุงสิ่งแวดล้อมทางกายภาพ เช่น การใช้แรงกด แรงเฉือน การสัมผัสเทอมนิ่ง หรือใช้ลักษณะพื้นผิวเฉพาะ เช่น ขนาด ความเป็นระเบียบ ความขรุขระ อย่างไรก็ตามการรายงานผลการกระตุ้นโดยใช้สมุนไพรหรือสารสกัดจากผักผลไม้ในธรรมชาติยังมีน้อย จากรายงานวิจัยด้าน cell และ tissue engineering หลายฉบับ รวมทั้งจากประสบการณ์ของคณะผู้วิจัยได้ทำการทดสอบการเปลี่ยนแปลงไปเป็นกระดูกของ MSC จากหนูแรทพันธุ์สีดำพบว่า สารเคมีที่มีฤทธิ์กระตุ้นการเปลี่ยนแปลงไปเป็นกระดูกมักจะลดอัตราการเจริญเติบโตของเซลล์หรือหากใช้ปริมาณมากอาจทำให้เกิด apoptosis คณะผู้วิจัยจึงมีความสนใจที่จะศึกษาว่าสารสกัดหม่อนที่มีองค์ประกอบของแอนโทไซยานินสูง มีผลต่ออัตราการเจริญเติบโต และ differentiation ของ MSC

หรือไม่ โดยจะมีการศึกษาลักษณะสมบัติของสารสกัดหม่อนจากแหล่งที่ต่างกัน 2 แหล่งในประเทศไทย ความคงตัวของแอนโทไซยานิน ในสารสกัดที่อุณหภูมิสูง ความเป็นพิษต่อเซลล์และผลของสารสกัดผลหม่อนต่อการเจริญเติบโตและการเปลี่ยนแปลงไปเป็นกระดูก (bone) โดยใช้เซลล์ MSC จากหนูเป็นเซลล์ต้นแบบ

วัตถุประสงค์ของโครงการ

- 1) เพื่อศึกษาลักษณะสมบัติของผลหม่อนสกัดสดและแบบผงแห้งรวมทั้งปริมาณสารแอนโทไซยานิน กิจกรรมการต่อต้านอนุมูลอิสระ (antioxidation) และความคงตัว
- 2) เพื่อศึกษาระดับความเป็นพิษต่อเซลล์และผลของสารสกัดผลหม่อนต่อการเจริญเติบโต (proliferation) และการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์กระดูก (osteogenesis) ของเซลล์ต้นกำเนิดไขกระดูก (bone marrow derived mesenchymal stem cells) ของหนูแรทพันธุ์วิสตา (Wistar rat) นอกร่างกาย

ผลการวิจัย

การศึกษาลักษณะสมบัติของสารสกัดผลหม่อนสดและผงผลหม่อนสกัด จากแหล่งปลูก 2 แหล่งคือ จังหวัดเพชรบูรณ์และจังหวัดนครราชสีมา พบว่าน้ำหนักแห้งในผลหม่อนจากนครราชสีมามีร้อยละ 22.17 สูงกว่าเพชรบูรณ์ซึ่งมีร้อยละ 14.27 ปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำทั้งหมดในหม่อนสดของนครราชสีมาสูงกว่าแหล่งเพชรบูรณ์เนื่องจากมีน้ำที่เป็นองค์ประกอบน้อยกว่า ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ของสารสกัดผงผลหม่อนจากทั้งสองแหล่งสูงกว่าสารสกัดหม่อนสดอย่างมีนัยสำคัญ ปริมาณกรดที่ไทเทรตได้ของสารสกัดผลหม่อนสดสูงกว่าสารสกัดผงผลหม่อนในทั้งสองแหล่ง ค่าพีเอชของสารสกัดเป็นกรดอ่อนประมาณ 3.67- 4.31 สีของสารสกัดผลหม่อนจากนครราชสีมามีสีโทนน้ำเงินมากกว่าเพชรบูรณ์ และพบปริมาณแอนโทไซยานินสูงกว่าคือ 9.96 ± 0.32 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง และ 14.35 ± 0.43 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้งของสารสกัดหม่อนสดและผงผลหม่อนสกัดตามลำดับ ส่วนผลหม่อนจากเพชรบูรณ์ซึ่งมีแอนโทไซยานินเป็นองค์ประกอบ 8.67 ± 0.63 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง และในสารสกัดผงผลหม่อนสกัด 12.14 ± 0.77 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง อย่างไรก็ตามสารสกัดผงผลหม่อนที่ได้จากนครราชสีมา

มีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระต่ำกว่าจากเพชรบูรณ์อย่างมีนัยสำคัญ โดยดูจากค่า IC_{50} ที่สูงกว่า (ประมาณร้อยละ 18)

ความคงตัวของแอนโทไซยานินในสารสกัดผลหม่อนจากเพชรบูรณ์ที่เก็บรักษาไว้โดยจำกัดแสงและออกซิเจน ขึ้นอยู่กับอุณหภูมิและเวลาในการเก็บรักษา แอนโทไซยานินในหม่อนสกัดสลายตัวสูงขึ้นเมื่ออุณหภูมิและเวลาในการเก็บรักษาสูงขึ้น ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส แอนโทไซยานินในสารสกัดผลหม่อนมีความคงตัวมากที่สุดแต่หากเก็บรักษาที่ 70 และ 100 องศาเซลเซียสแอนโทไซยานินในหม่อนสกัดทั้งสองชนิดเสื่อมสลายเท่าๆ กันคือ เหลือเพียงร้อยละ 45 และร้อยละ 5 ตามลำดับ (หากเก็บรักษาเป็นเวลา 10 ชั่วโมง) อย่างไรก็ตามอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียสสารสกัดผลหม่อนมีความคงตัวสูงกว่าสารสกัดผลหม่อนสดเล็กน้อย โดยหากเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมินี้ 10 ชั่วโมง ปริมาณแอนโทไซยานินในสารสกัดผลหม่อนเหลืออยู่ร้อยละ 84.70 และในสารสกัดผลหม่อนสดคงเหลือร้อยละ 72.23 นอกจากนี้กระบวนการฆ่าเชื้อยังมีผลต่อการสลายตัวของสารแอนโทไซยานิน การฆ่าเชื้อแบบพาสเจอร์ไรส์แบบ LTLT (อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสนาน 30 นาที) มีผลให้มีปริมาณแอนโทไซยานินในสารสกัดผลหม่อนสดเหลืออยู่ร้อยละ 80.92 และในสารสกัดผลหม่อนสดเหลืออยู่ร้อยละ 85.84 สำหรับการฆ่าเชื้อแบบสเตอริไรส์ (อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียสนาน 20 นาที) ปริมาณแอนโทไซยานินในสารสกัดผลหม่อนสดคงเหลือเพียงร้อยละ 62.14 และในสารสกัดผลหม่อนร้อยละ 64.76 เท่านั้น ส่วนการฆ่าเชื้อแบบพาสเจอร์ไรส์แบบ HTST (อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียสนาน 15 วินาที) มีผลให้แอนโทไซยานินการสลายน้อยกว่าร้อยละ 15 การทำแห้งแข็งของผลหม่อนสดไม่มีผลเพิ่มความคงตัวให้แก่สารแอนโทไซยานินในสารสกัดผลหม่อน หากเก็บรักษาสารสกัดในสภาวะเร่งแบบ freeze thaw cycle (ที่ -20 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 46 ชั่วโมงและที่อุณหภูมิ 26 ± 2 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 นาที และที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 90 นาทีจำนวน 4 รอบ) ไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงปริมาณแอนโทไซยานินอย่างมีนัยสำคัญ

ในการทดลองเพาะเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดไขกระดูกจากหนูแรทพันธุ์สัตว์ที่ผสมสารไซยานิดิน-3-กลูโคไซด์บริสุทธิ์ (C3G) ในอาหารเลี้ยงเซลล์ปกติที่ความเข้มข้น 50-100 ไมโครโมลลาร์ พบว่าไม่เป็นพิษกับเซลล์และมีผลให้การเจริญเติบโตของเซลล์เพิ่มขึ้นจากอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ 26.22×10^{-3} ต่อชั่วโมง เป็น 32.73×10^{-3} ต่อชั่วโมง ตามลำดับ แต่ถ้าใช้อาหาร

เลี้ยงเซลล์ที่ผสมสารสกัดผลหม่อนความเข้มข้น 2.5-5.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ ทำให้การเจริญเติบโตของเซลล์เข้าสู่ stationary phase เร็วขึ้น และความหนาแน่นของเซลล์ลดลงประมาณ 2 เท่า โดยมีอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของเซลล์ในช่วง 15.35×10^{-3} และ 14.94×10^{-3} ต่อชั่วโมงตามลำดับ เมื่อศึกษาผลของการเปลี่ยนแปลงไปเป็นกระดูกของเซลล์ต้นกำเนิดจากไขกระดูกที่มีการเติม C3G และสารสกัดผลหม่อนในอาหารเลี้ยงเซลล์ปกติ พบว่า C3G ปริมาณ 50-100 ไมโครโมลลาร์ สามารถกระตุ้นกิจกรรมของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส (ALP) ในเซลล์ซึ่งเป็นสัญญาณเริ่มต้นของการเปลี่ยนแปลงเป็นเซลล์กระดูก และเพิ่มการสะสมของแคลเซียมให้สูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเช่นกัน อย่างไรก็ตามการเลี้ยงเซลล์ที่ใช้อาหารผสมสารสกัดผลหม่อนปริมาณ 2.5-5.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งประกอบด้วย C3G ปริมาณเดิม มีผลลดกิจกรรมของเอนไซม์ ALP และการสะสมของแคลเซียมที่เซลล์สร้างขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ การทดลองนี้แสดงให้เห็นศักยภาพการบริโภคหม่อนสกัดเป็นอาหารเสริมหรือการใช้งานสารสกัดแอนโธไซยานินบริสุทธิ์จากผลหม่อนด้านการแพทย์

การนำผลการวิจัยไปใช้ประโยชน์

- มีการจัดสัมมนาเผยแพร่ให้ผู้ประกอบการการค้าด้านหม่อนสกัดในงานสัมมนาพิเศษเรื่อง Mulberry: The Functional Fruit ในวันที่ 16 กรกฎาคม 2555 ณ ห้อง 209 อาคาร 3 คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

หน่วยงานที่นำผลวิจัยไปใช้ประโยชน์และใช้ประโยชน์ด้านไหน

- แจ้งให้ผู้ประกอบการค้าหม่อนสกัดทราบ เพื่อเป็นข้อมูลเสริมในการผลิตหม่อนสกัดขายให้ผู้บริโภค

การประชุมสัมพันธ์

เผยแพร่ผลงานทางวิชาการ

- Chiang Mai International Conference on Biomaterials & Application 2011 ในวันที่ 9-10 สิงหาคม 2554 หัวข้อ "Stability of anthocyanins from mulberry extracts in alginate microspheres at high temperature" (Poster presentation)

- The 4th AUN/SEED-Net Regional Conference on Biotechnology: EMERGING BIOTECHNOLOGY FOR GREEN ENGINEERING ในวันที่ 26-27 มกราคม 2555 หัวข้อ "Anthocyanin contents and antioxidant activity of mulberry fruit extracts: the effect of freeze drying and absorption on alginate beads" (Oral presentation)

งานที่ได้ตีพิมพ์

- 1) R. Yamdech, P. Aramwit and S. Kanokpanont,. Stability of Anthocyanin from Mulberry Extracts in Alginate Microspheres at High Temperature. Advanced Materials Research 506 (2012): 587-590.
- 2) กำลังเตรียมบทความเพื่อส่งตีพิมพ์วารสารนานาชาติ เรื่อง The effect of Anthocyanin and mulberry extracts on osteogenic differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells

บทคัดย่อ

การศึกษาลักษณะสมบัติของสารสกัดผลหม่อนสดและผงผลหม่อนสกัด จากแหล่งปลูก 2 แหล่งคือ จังหวัดเพชรบูรณ์ และจังหวัดนครราชสีมา พบว่าผลหม่อนจากนครราชสีมามีค่าร้อยละของน้ำหนักแห้งสูงกว่า เพชรบูรณ์ 1.5 เท่า และปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำทั้งหมดในสารสกัดผลหม่อนสดของนครราชสีมามีค่าบรีกซ์ ร้อยละ 15.9 สูงกว่าแหล่งเพชรบูรณ์ซึ่งเท่ากับร้อยละ 9.98 ปริมาณกรดที่ไทเทรตได้ของสารสกัดผลหม่อนสดสูงกว่าสารสกัดผงผลหม่อน แต่ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ของสารสกัดผงผลหม่อนสูงกว่าสารสกัดหม่อนสดอย่างมีนัยสำคัญ ค่าพีเอชเป็นกรดอ่อนประมาณ 3.67- 4.31 สีของสารสกัดผลหม่อนจากนครราชสีมามีสีโทนน้ำเงินมากกว่าเพชรบูรณ์ และมีปริมาณแอนโทไซยานินสูงกว่าคือที่ 12.37 ± 0.75 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง อีกทั้งมีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระมากกว่า โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.23 ± 0.01 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ผลการศึกษาความคงตัวของแอนโทไซยานินในสารสกัดผลหม่อนจากจังหวัดเพชรบูรณ์พบว่าแอนโทไซยานินในสารสกัดหม่อนมีความคงตัวมากที่สุดที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส แต่ที่อุณหภูมิ 70 และ 100 องศาเซลเซียส (เวลา 10 ชั่วโมง) แอนโทไซยานินเกิดการเสื่อมสลาย โดยเหลืออยู่ประมาณร้อยละ 45 และร้อยละ 5 ตามลำดับ นอกจากนี้เมื่อผ่านกระบวนการฆ่าเชื้อแบบพาสเจอร์ไรส์และแบบ LTLT ปริมาณแอนโทไซยานินในสารสกัดผลหม่อนสดสกัดและผงผลหม่อนเหลืออยู่ร้อยละ 80.92 และร้อยละ 85.84 ตามลำดับ แต่การฆ่าเชื้อแบบสเตอริไรส์ทำให้ปริมาณแอนโทไซยานินคงเหลือเพียงร้อยละ 22.14 (สารสกัดผลหม่อนสด) และร้อยละ 24.76 (สารสกัดผงผลหม่อน) เท่านั้น อีกทั้งความคงตัวในสภาวะเร่งแบบ freeze thaw cycle ยังไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงปริมาณแอนโทไซยานินอย่างมีนัยสำคัญ ผลการศึกษาการเจริญเติบโตของเซลล์ต้นกำเนิดไขกระดูกที่แยกจากหนูวิสตัดาร์ พบว่าการเลี้ยงเซลล์ที่ผสมแอนโทไซยานินบริสุทธิ์ในรูปแบบสารไซยานิดิน-3-กลูโคไซด์ (C3G) ปริมาณ 50 และ 100 ไมโครโมลลาร์ มีผลเพิ่มเจริญเติบโตของเซลล์ให้เพิ่มสูงขึ้นโดยอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของเซลล์เท่ากับ 26.22×10^{-3} ต่อชั่วโมง และ 32.73×10^{-3} ต่อชั่วโมง ตามลำดับ แต่การเลี้ยงเซลล์ที่ใช้อาหารผสมสารสกัดผลหม่อนในปริมาณที่มีแอนโทไซยานินเท่าๆกัน กลับลดอัตราการเจริญเติบโตของเซลล์ประมาณ 2 เท่า ผลการศึกษากการเปลี่ยนแปลงไปเป็นกระดูกของเซลล์ต้นกำเนิดจากไขกระดูกยังพบว่า C3G ในปริมาณดังกล่าวสามารถเพิ่มกิจกรรมเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส (ALP) และการสะสมแคลเซียมของเซลล์ให้สูงขึ้น แต่การใช้สารสกัดจากผลหม่อนในปริมาณที่มีแอนโทไซยานินเท่าๆกันกลับมีผลในการลดกิจกรรมของเอนไซม์ ALP และการสะสมของแคลเซียมอย่างมีนัยสำคัญ การศึกษานี้แสดงให้เห็นความสำคัญของอุณหภูมิต่อความคงตัวของสารแอนโทไซยานิน และศักยภาพของผลหม่อนที่มีปริมาณแอนโทไซยานินสูงที่จะนำมาสกัดสารสำคัญเพื่อการแพทย์ได้

Abstracts

Water based-fresh mulberry fruit extracts and mulberry fruit freeze dried extracts from two cultivation areas in Thailand, Phetchabun and Nakhonratchasima province, was characterized. Mulberry fruits from Nakhonratchasima (NK) had 1.5X higher total solid weight than those from Phetchabun (PB). Total soluble solid (% Brix) of fresh mulberry fruit extracts from NK (15.90% Brix) were higher than the extracts from PB (9.98% Brix). Tritratable acidities of fresh mulberry fruit extracts from both areas were higher than from the freeze dried extracts. However the reducing sugar of fresh fruit extracts were significantly lower than from the freeze dried extracts. The extracts had pHs in the range of 3.67-4.31. The NK fresh fruit extracts had higher blue color and higher anthocyanin contents than those of the PB. The anthocyanins contents were highest at 12.37 ± 0.75 mg/gDW with free radical scavenging activities (IC_{50}) of 0.23 ± 0.01 mg/ml. Anthocyanins in the PB extracts were stable after storage at 4°C for 10 hrs., but were degraded to 45% if they were stored at 70°C, and to 5% at 100°C for the same period of time. After LTLT pasteurization process, anthocyanin contents of the extracts were at 80.92% (fresh fruit extracts), and 85.84% (freeze dried extracts). Sterilization of the extracts reduced anthocyanin contents to 22-24%. Anthocyanin contents after storages at four freeze-thaw cycles of fresh or freeze-dried extracts were not significantly different. The effect of anthocyanin (cyanindin-3-glucoside, C3G) on rat's bone marrow derived-mesenchymal stem cells (MSCs) was investigated *in vitro*. Specific growth rate of MSCs culture with growth media mixed with C3G at 50 and 100 micromoles were increased to at $26.22 \times 10^{-3} \text{ h}^{-1}$ and $32.73 \times 10^{-3} \text{ h}^{-1}$, respectively. However, the cell growth reduced by 2 folds if the freeze-dried PB extracts were used at the same anthocyanin contents. C3G was found to enhance alkaline phosphatase (ALP) activities and calcium deposition of MSCs, while using the mulberry extract reduce these signs of osteogenic differentiation at the same conditions. These results show impacts of process temperatures on anthocyanins in mulberry extracts. The fruit has potential as functional fruits due to its high anthocyanin contents. We are the first to reveal potential of anthocyanin as an osteogenic substance.

สารบัญ

	หน้า
แบบสรุปรูปโครงการวิจัย	ก
บทคัดย่อภาษาไทย	ช
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ช
สารบัญ	ณ
สารบัญรูปภาพ	ฎ
สารบัญตาราง	ฒ
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ที่มาและความสำคัญ	1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย	2
1.3 ขอบเขตงานวิจัย	3
บทที่ 2 ทฤษฎีที่เกี่ยวข้อง	4
2.1 หม่อน	4
2.2 แอนโทไซยานิน	6
2.3 ความคงตัวของแอนโทไซยานิน	11
2.4 ฤทธิ์ของแอนโทไซยานินต่อเซลล์	16
2.5 Mesenchymal stem cells	16
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย	20
3.1 วัสดุและสารเคมี	20
3.2 อุปกรณ์	21
3.3 แผนผังการดำเนินงาน	23
3.4 ขั้นตอนการดำเนินงานวิจัย	24
3.4.1 การเตรียมสารสกัดผลหม่อน	24
3.4.2 การศึกษาลักษณะทางกายภาพของหม่อนสกัด	26
3.4.3 การศึกษาความคงตัวในสารสกัดผลหม่อน	30
3.4.4 การเตรียมเซลล์ต้นกำเนิดไขกระดูก	31
3.4.5 การศึกษาผลของสารสกัดผลหม่อนต่อการเจริญเติบโตของเซลล์	31

3.4.6 การศึกษาผลของสารสกัดผลหม่อนต่อการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์กระดูก	33
3.4.8 ปัญหาทางจริยธรรมในการทดลอง	36
3.4.9 การใช้สถิติในการวางแผนและวิเคราะห์ผลการทดลอง	36
บทที่ 4 ผลการทดลองและวิเคราะห์ผลการทดลอง	37
4.1 ลักษณะสมบัติของสารสกัดผลหม่อน	37
4.1.1 ลักษณะทางกายภาพของสารสกัดผลหม่อนสดและผงผลหม่อน	38
4.1.2 ลักษณะทางเคมีของสารสกัดผลหม่อนสดและผงผลหม่อน	41
4.2 ศึกษาความคงตัวของสารแอนโทไซยานินในสารสกัดผลหม่อน	51
4.2.1 ผลของอุณหภูมิที่มีต่อความคงตัวของสารสกัดผลหม่อน	51
4.2.2 ผลของสภาวะการฆ่าเชื้อที่มีต่อความคงตัวของสารสกัดผลหม่อน	54
4.2.3 ผลของสภาวะเร่งแบบ freeze thaw cycle ที่มีต่อความคงตัวของสารสกัดผลหม่อน	55
4.3 ศึกษาความเป็นพิษของแอนโทไซยานินและสารสกัดหม่อนต่อเซลล์ต้นกำเนิดไขกระดูกและผลของสารสกัดผลหม่อนต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ต้นกำเนิดไขกระดูกของหนูวิสต้าในระดับห้องปฏิบัติการ	57
4.4 ศึกษาผลของแอนโทไซยานินและสารสกัดหม่อนต่อการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์กระดูกของเซลล์ต้นกำเนิดไขกระดูกของหนูวิสต้าในระดับห้องปฏิบัติการ	65
บทที่ 5 สรุป	71
เอกสารอ้างอิง	75
ภาคผนวก	79
ภาคผนวก ก กราฟมาตรฐานของสารไซยานินดิน-3-กลูโคไซด์ ด้วยเครื่อง High Performance Liquid Chromatography (HPLC)	80
ภาคผนวก ข High Performance Liquid Chromatography (HPLC) ของสารไซยานินดิน-3-กลูโคไซด์	81
ภาคผนวก ค High Performance Liquid Chromatography (HPLC) ของสารสกัดผลหม่อนสดแหล่งปลูกจังหวัดเพชรบูรณ์	82
ภาคผนวก ง High Performance Liquid Chromatography (HPLC) ของสารสกัดผงผลหม่อนแหล่งปลูกจังหวัดเพชรบูรณ์	83

ภาคผนวก จ High Performance Liquid Chromatography (HPLC) ของสารสกัดผล หม่อนสดแหล่งปลูกนครราชสีมา	84
ภาคผนวก ฉ High Performance Liquid Chromatography (HPLC) ของสารสกัดผงผล หม่อนแหล่งปลูกจังหวัดนครราชสีมา	85
ภาคผนวก ช กราฟมาตรฐานของการวัดจำนวนเซลล์ต้นกำเนิดไขกระดูก	86
ภาคผนวก ซ กราฟการเจริญเติบโตของเซลล์ต้นกำเนิด (MSC)	87
ภาคผนวก ฌ.ตารางเปรียบเทียบแผนงาน	88

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
2.1	สมบัติทางเคมีของผลหม่อนที่ปลูกในประเทศไทย	5
2.2	ส่วนประกอบทางเคมีของผลหม่อนสุกสีด้าของพันธุ์ต่างๆ	6
2.3	ชนิด หมู่ฟังก์ชัน และลักษณะสีของแอนโทไซยานิน	7
2.4	ปริมาณแอนโทไซยานินในผลหม่อนสกัดด้วยเอทานอล	8
4.1	สมบัติทางกายภาพของผลหม่อนสด	38
4.2	สมบัติทางกายภาพของสารสกัดหม่อน	39
4.3	สี ระบบ L^* , a^* และ b^* ของสารสกัดผลหม่อน	41
4.4	สรุปสมบัติทางเคมีของสารสกัดผลหม่อน	50
4.5	อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของเซลล์ (growth rate, μ), เวลาการแบ่งตัวที่วิคูณ คือระยะเวลาที่เซลล์เพิ่มจำนวนขึ้นเป็น 2 เท่า (population doubling time, PDT) และความหนาแน่นของจำนวนเซลล์สูงสุด (maximum density) ที่เวลาต่างๆ (t_{max})	60
4.6	แสดงการเปรียบเทียบการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์กระดูกของเซลล์ต้นกำเนิดจากไขกระดูกของหนูวิสต้าที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิดต่างๆ	70

สารบัญญภาพ

ภาพที่		หน้า
2.1	ลักษณะทางกายภาพของผลหม่อน	5
2.2	โครงสร้างทั่วไปของแอนโทไซยานิน	7
2.3	โครงสร้างแอนโทไซยานินทั่วไปที่พบในผลหม่อน	8
2.4	กราฟ HPLC-PAD ที่ 520 นาโนเมตร (a) สารสกัดของผลหม่อนที่ผ่านกระบวนการทำให้บริสุทธิ์แล้ว (b) สารสกัดของผลหม่อนที่ผ่านกระบวนการทำให้บริสุทธิ์ หลังจากไฮโดรไลซิสด้วยกรด	10
2.5	กราฟ HPLC ของผลหม่อนสกัดสายพันธุ์ กำแพงแสน-เอ็มบี-42-1(ผลหม่อนที่สุกเต็มที่) ที่ 520 นาโนเมตร	11
2.6	โครงสร้างของแอนโทไซยานินที่เสื่อมสลายจากการเปลี่ยนแปลงของค่าพีเอช	13
2.7	การเสื่อมสลายของมอลนอเมอริกแอนโทไซยานินในน้ำลูกหม่อนที่อุณหภูมิต่างกัน (ที่พีเอช 2.5)	14
2.8	ปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมด (A) และค่าความเข้มข้นที่สามารถต้านอนุมูลอิสระ DPPH 50% (IC ₅₀ , B) ของน้ำผลหม่อนสีม่วงหลังจากเก็บไว้ในสภาวะที่อุณหภูมิต่างกัน	15
2.9	ขั้นตอนการ differentiation ในระดับห้องปฏิบัติการ	18
2.10	แผนผังการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์กระดูกของเซลล์ต้นกำเนิดไขกระดูก	18
2.11	จุลศาสตร์ของการเจริญเติบโตของเซลล์ต้นกำเนิดจากไขกระดูกหนูพันธุ์สีดำ	19
3.1	แผนผังสรุปการดำเนินการทั้งโครงการ	23
3.2	ขั้นตอนการสกัดสารสกัดผลหม่อนสดและผงผลหม่อนที่ใช้ในการวิจัยนี้	25
3.3	High-performance liquid chromatography DAD chromatogram ของแอนโทไซยานินที่สกัดจาก wide mulberry	28
4.1	ลักษณะทั่วไปของผลหม่อนสายพันธุ์เชียงใหม่จากแหล่งปลูกจังหวัดเพชรบูรณ์ และนครราชสีมา	37
4.2	ปริมาณกรดที่ไทเทรตได้ของสารสกัดผลหม่อนสดและผงผลหม่อนสกัดจากแหล่งจังหวัดเพชรบูรณ์ และนครราชสีมา	42
4.3	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ของสารสกัดผลหม่อนสดและผงผลหม่อนสกัดจากแหล่งจังหวัดเพชรบูรณ์ และนครราชสีมา	43

4.4	ปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมดของสารสกัดผลหม่อนสดและผงผลหม่อนสกัดจากแหล่งปลูกจังหวัดเพชรบูรณ์ และนครราชสีมา	44
4.5	ตัวอย่างผลการวิเคราะห์ปริมาณแอนโทไซยานินด้วย High Performance Liquid Chromatography (HPLC) ของสารสกัดผลหม่อนสดจากเพชรบูรณ์ และนครราชสีมา	46
4.6	เปรียบเทียบเทคนิควิเคราะห์หาปริมาณแอนโทไซยานินของวิธี pH differential method กับ วิธี HPLC method ซึ่งใช้สารละลายไซยานิดิน-3-กลูโคไซด์ ในน้ำปราศจากไอออน ในการเปรียบเทียบ	48
4.7	ค่า half maximal inhibitory concentration หรือ IC_{50} ของสารสกัดผลหม่อนสดและผงผลหม่อนสกัดจากแหล่งปลูกจังหวัดเพชรบูรณ์และนครราชสีมา	49
4.8	การเปลี่ยนแปลงของสารแอนโทไซยานินในสารสกัดผลหม่อนสด (a) และผงผลหม่อนสกัด (b) จากแหล่งปลูกจังหวัดเพชรบูรณ์ ที่อุณหภูมิ 4, 40, 70 และ 100 องศาเซลเซียส ที่เวลาต่างๆ	52
4.9	การเปลี่ยนแปลงของสารแอนโทไซยานินในสารสกัดผลหม่อนสดและผงผลหม่อนสกัดจากแหล่งปลูกจังหวัดเพชรบูรณ์ ที่อุณหภูมิ 4, 40, 70 และ 100 องศาเซลเซียส ที่เวลา 10 ชั่วโมง	53
4.10	การเปลี่ยนแปลงปริมาณแอนโทไซยานินของสารสกัดผลหม่อนสดและผงผลหม่อนสกัดที่ได้จากแหล่งปลูกเพชรบูรณ์ ในสภาวะไม่ผ่านกระบวนการฆ่าเชื้อ, สภาวะฆ่าเชื้อแบบพาสเจอร์ไรส์ (HTST), สภาวะฆ่าเชื้อแบบพาสเจอร์ไรส์ (LTLT) และสภาวะฆ่าเชื้อแบบสเตอริไลส์	55
4.11	การเปลี่ยนแปลงปริมาณแอนโทไซยานินของสารสกัดผลหม่อนสดและผงผลหม่อนสกัดที่ไม่ผ่านกระบวนการฆ่าเชื้อ จากแหล่งปลูกเพชรบูรณ์ ในสภาวะเร่งแบบ freeze thaw cycle	56
4.12	การเจริญเติบโตของเซลล์ต้นกำเนิด (MSC) ที่เลี้ยงในอาหาร Normal Medium (NM), ไซยานิดิน-3-กลูโคไซด์ความเข้มข้น 50 μ M (C3G50), 100 μ M (C3G100), สารสกัดผลหม่อนความเข้มข้น 0.25 mg/ μ l (M50), 0.5 mg/ μ l (M100) และซิงค์อะซิเตรตความเข้มข้น 20 ppm (ZN)	59
4.13	รูปร่างของเซลล์ต้นกำเนิด (MSC) ถ่ายได้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 20x ที่เลี้ยงในอาหาร Normal Medium (NM), ไซยานิดิน-3-กลูโคไซด์ความเข้มข้น 50 μ M (C3G50), 100 μ M (C3G100) และ ซิงค์อะซิเตรตความเข้มข้น 20	61

- ppm (ZN) ที่ระยะเวลา 6, 24 และ 48 ชั่วโมง
- 4.14 รูปร่างของเซลล์ต้นกำเนิด (MSC) ถ่ายได้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 20x ที่ 62
 เลี้ยงในอาหาร Normal Medium (NM), ไชยานิดิน-3-กลูโคไซด์ความเข้มข้น
 50 μM (C3G50), 100 μM (C3G100) และ ซิงค์อะซิเตรตความเข้มข้น 20
 ppm (ZN) ที่ระยะเวลา 72, 120 และ 168 ชั่วโมง
- 4.15 รูปร่างของเซลล์ต้นกำเนิด (MSC) ถ่ายได้กล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 20x ที่ 63
 เลี้ยงในอาหาร Normal Medium (NM), สารสกัดผงผลหม่อนความเข้มข้น
 0.25 mg/ μl (M50), 0.5 mg/ μl (M100) และ ซิงค์อะซิเตรตความเข้มข้น 20
 ppm (ZN) ที่ระยะเวลา 6, 24 และ 48 ชั่วโมง
- 4.16 รูปร่างของเซลล์ต้นกำเนิด (MSC) ถ่ายได้กล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 20x ที่ 64
 เลี้ยงในอาหาร Normal Medium (NM), สารสกัดผงผลหม่อนความเข้มข้น
 0.25 mg/ μl (M50), 0.5 mg/ μl (M100) และ ซิงค์อะซิเตรตความเข้มข้น 20
 ppm (ZN) ที่ระยะเวลา 72, 120 และ 168 ชั่วโมง
- 4.17 กราฟแสดงจำนวนของเซลล์ต้นกำเนิดไขกระดูก (a) กิจกรรมของเอนไซม์ 67
 alkaline phosphatase (ALP) (b) และปริมาณแคลเซียมที่สร้าง (c) ที่เลี้ยงใน
 อาหาร Normal Medium (NM) เป็น negative control, อาหาร Normal
 Medium ที่มีปริมาณไชยานิดิน-3-กลูโคไซด์ความเข้มข้น 50 μM (C3G50),
 100 μM (C3G100) และอาหาร Osteogenic Medium เป็น positive control
- 4.18 กราฟแสดงจำนวนของเซลล์ต้นกำเนิดไขกระดูก (a) กิจกรรมของเอนไซม์ 68
 alkaline phosphatase (ALP) (b) และปริมาณแคลเซียมที่สร้าง (c) ที่เลี้ยงใน
 อาหาร Normal Medium (NM) เป็น negative control, สารสกัดผงผลหม่อน
 ความเข้มข้น 0.25 mg/ μl (M50), 0.5 mg/ μl (M100) และอาหาร Osteogenic
 Medium เป็น positive control

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ที่มาและความสำคัญ

ผลหม่อน (*Morus alba* L.) ทั่วไป มีสารประกอบฟีนอลิกเป็นองค์ประกอบในปริมาณสูง โดยเฉพาะสารกลุ่มแอนโทไซยานิน (anthocyanin) สารนี้มีคุณสมบัติสำคัญคือเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ต้านการอักเสบ ช่วยพัฒนาพัฒนาการเรียนรู้และความจำ ลดความเสี่ยงต่อโรคหัวใจ และหลอดเลือด และมีรายงานว่าสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตและเคลื่อนที่ของเซลล์มะเร็งชนิดบางชนิดได้ คณะผู้วิจัยมีความสนใจที่จะศึกษาคุณลักษณะทางเคมีกายภาพของผลหม่อนสกัดสด (crude extract) และผงผลหม่อนสกัด (freeze dried) รวมทั้งปริมาณสารแอนโทไซยานินและกิจกรรมการต่อต้านอนุมูลอิสระ จากอย่างน้อย 2 แหล่งผลิตในประเทศ รวมทั้งประเมินความคงตัวที่อุณหภูมิสูง และที่สภาวะต่างๆ ได้แก่สภาวะการทำปฏิกิริยาและสภาวะเร่ง นอกจากนี้ในประเทศไทยมีการใช้เซลล์ต้นกำเนิดจากเลือดและไขกระดูกเพื่อการรักษาได้ ซึ่งคณะผู้วิจัยมีความชำนาญในการแยกเซลล์ได้ง่าย ไม่มีปัญหาในด้านจริยธรรมการทดลอง และใช้เป็นเซลล์ต้นแบบเพื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ต้นกำเนิดชนิดเดียวกันกับมนุษย์ได้ดี คณะผู้วิจัยจึงมีความสนใจที่จะศึกษาผลของสารสกัดผลหม่อนต่อการเจริญเติบโตและการเปลี่ยนแปลงไปเป็นกระดูก (bone) โดยใช้เซลล์ต้นกำเนิดไขกระดูกจากหนูเป็นเซลล์ต้นแบบ เนื่องจากหนึ่งในปัญหาสำคัญที่ต้องการการศึกษาคือ การขยายจำนวนให้เพียงพอแก่การใช้งานเนื่องจากมีปริมาณจำกัดและการควบคุมการเปลี่ยนแปลง (differentiation) ให้เป็นเซลล์หรือมีการซ่อมแซมเนื้อเยื่อที่ต้องการ ในระดับการวิจัยมีรายงานการใช้เซลล์ต้นกำเนิดที่สกัดจากไขกระดูกของหนู (bone marrow derived mesenchymal stem cells, MSC) จำนวนมากเนื่องจากมีแหล่งบริจาคที่จำกัดและข้อมูลที่ได้สามารถเทียบเคียงได้กับเซลล์ต้นกำเนิดของมนุษย์ การควบคุมการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ต้นกำเนิดไปเป็นเซลล์กระดูก (osteoblast) ซึ่งจะสร้างเนื้อเยื่อกระดูกต่อไปในปัจจุบันมีรายงานการใช้เทคนิคต่างๆ ได้แก่ 1) การใช้สารเคมีในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่เรียกว่า osteogenic medium, การใช้หมู่ทางเคมีบนโครงเลี้ยงเซลล์สามมิติ, ลำดับเปปไทด์ของกรดอะมิโน RGD 2) การใช้สารเร่งประเภท cytokines และ bone growth factors 3) การปรับปรุงสิ่งแวดล้อมทางกายภาพ เช่น การใช้แรงกด แรงเฉือน การสั่นสะเทือน รังสี หรือใช้ลักษณะพื้นผิวเฉพาะ เช่น ขนาดความเป็นระเบียบ ความขรุขระ อย่างไรก็ตามการรายงานผลการกระตุ้นโดยใช้สมุนไพรหรือสารสกัดจากผักผลไม้ในธรรมชาติยังมีน้อย นอกจากนี้ในการทดสอบการเปลี่ยนแปลงไปเป็นกระดูกของ MSC จากหนูแรทพันธุ์สีดำ พบว่าสารเคมีที่มีฤทธิ์กระตุ้นการเปลี่ยนแปลงไปเป็นกระดูกมักจะลดอัตราการเจริญเติบโตของเซลล์หรือหากใช้ปริมาณมากอาจทำให้เกิด apoptosis จากคุณสมบัติการยับยั้งการเจริญเติบโตมีส่วนกระตุ้นการเปลี่ยนแปลงเป็นเซลล์กระดูกได้ และมี

รายงานวิจัย พบว่า สาร quercetin ซึ่งเป็นสารในกลุ่มฟลาโวนอยด์ ซึ่งมีลักษณะโครงสร้างคล้าย แอนโทไซยานิน ซึ่งสารต้านอนุมูลอิสระชนิดหนึ่งมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโต และช่วยให้ การเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์กระดูกของเซลล์ human Mesencrymal Stem Cells (hMSC) โดย สร้างกิจกรรมอัลคาไลน์ฟอสฟาเตสสูงซึ่งร่วมกับการกระตุ้นของ estrogen receptor ที่เซลล์สร้าง ขึ้น [Kim และคณะ, 2006] นอกจากนี้ยังพบว่า สารฟลาโวนอยด์ที่สกัดจาก สมุนไพรจีน *Herba Epimedii* สามารถช่วยสนับสนุนการเปลี่ยนแปลงไปเป็นกระดูกของเซลล์ hMSC ได้แสดงจาก ปริมาณการแสดงออกของยีน mRNA ของ BMP-2, BMP-4, Runx2, β -catenin และ cyclinD1 ซึ่งเป็นตัวบ่งบอกในการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์กระดูก [Jin และคณะ, 2010] ทั้งนี้ยังไม่มีรายงาน การทดสอบเช่นนี้มาก่อน ผลที่ได้จากการทดสอบนี้จะให้ข้อมูลหรือทางเลือกในการไม่ใช้สารเคมีใน กระตุ้นการเจริญและการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ต้นกำเนิด ซึ่งจะเป็นผลดีในการรักษาหรือสร้าง เนื้อเยื่อกระดูกทดแทน อาจแสดงถึงความเป็นไปได้ในการใช้สารสกัดผลหม่อนเป็นอาหารเสริม สำหรับผู้ป่วยที่กระดูกหรือกระดูกอ่อนเสียหายและมีการใช้เซลล์ต้นกำเนิดในการรักษา

ข้อมูลที่ได้จากการวิจัยจะมีประโยชน์ในการส่งเสริมการบริโภคผลหม่อนโดยจะมีการ จัดการเผยแพร่ความรู้แก่ผู้สนใจและผู้ประกอบการในรูปแบบการสัมมนาและการเผยแพร่ผลงานใน ที่ประชุมระดับนานาชาติ/บทความวิจัยระดับนานาชาติ ผลการวิจัยที่ได้อาจใช้เป็นพื้นฐานในการ ผลักดันให้มีการใช้งานสารสกัดผลหม่อนเป็นอาหารเสริมที่มีฤทธิ์ช่วยในการรักษาหรือส่งเสริมให้มี การใช้มีการสกัดแอนโทไซยานินจากหม่อนมาใช้งานด้านการแพทย์ที่มีการใช้เซลล์ต้นกำเนิดเพื่อ งานซ่อมแซมกระดูกต่อไปอย่างเป็นขั้นตอน

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1.2.1) เพื่อศึกษาคุณลักษณะของผลหม่อนสกัดสด และผงผลหม่อนสกัดรวมทั้งปริมาณสาร แอนโทไซยานิน กิจกรรมการต่อต้านอนุมูลอิสระ (antioxidation) และความคงตัว

1.2.2) เพื่อศึกษาระดับความเป็นพิษต่อเซลล์และผลของสารสกัดผลหม่อนต่อการเจริญเติบโต (proliferation) และการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์กระดูก (osteogenesis) ของเซลล์ต้นกำเนิด ไชกระดูก (bone marrow derived mesenchymal stem cells) ของหนูแรทพันธุ์วิสตา (wistar rat) นอก ร่างกาย

1.3 ขอบเขตงานวิจัย

1.3.1 วิเคราะห์ลักษณะสมบัติทางเคมีกายภาพ ของสารสกัดหม่อนแบบสดและแบบแห้ง (โดยใช้หม่อนสดแช่แข็งและหม่อนแห้ง)

- ค่าพีเอช, ร้อยละของของแข็ง, ปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้, ปริมาณกรดที่ไทเทรตได้, ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์

- สีด้วยระบบ L, a*, b* และ spectrophotometry

- ปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมด ในรูปของมิลลิกรัมของ cyanidin-3-glucoside ต่อ น้ำหนักหม่อน

- ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant activity) ด้วยวิธี DPPH แสดงค่า IC_{50}

1.3.2 ศึกษาความคงตัวของสารสำคัญในสารสกัดผลหม่อนอุณหภูมิต่างๆ ได้แก่ 4, 40, 70, 100 องศาเซลเซียส ความคงตัวในกระบวนการพาสเจอร์ไรส์ และสเตอริไรส์ และในสภาวะเร่ง

1.3.3 ศึกษาผลของสารสกัดผลหม่อนที่ความเข้มข้นต่างๆ ต่อการเจริญเติบโต (proliferation) และการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์กระดูก (osteogenesis) ของเซลล์ต้นกำเนิดไขกระดูก (bone marrow derived mesenchymal stem cells) ของหนูแรทพันธุ์วิสตา (wistar rat) นอกวางกายโดยประเมินการเจริญเติบโตของเซลล์ด้วยวิธี MTT assay และความสามารถของเซลล์ต้นกำเนิดในการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์กระดูกโดยวิเคราะห์สัญญาณการเปลี่ยนแปลงเป็นกระดูกได้แก่ กิจกรรมของเอนไซม์ alkaline phosphatase (ALP) และปริมาณแคลเซียมต่อจำนวนเซลล์

บทที่ 2 ทฤษฎีที่เกี่ยวข้อง

2.1 หม่อน (Mulberry)

หม่อนเป็นพืชอยู่ในวงศ์ Moraceae ซึ่งมีถิ่นกำเนิดในประเทศจีน ตระกูล *Morus* spp. มีถิ่นกำเนิดอยู่ในแถบเขตกึ่งหนาวจัดเป็นไม้ผลในกลุ่ม deciduous fruit plant หรือ ประเภท hard wood คือใบจะร่วงในฤดูใบไม้ร่วงและมีการพักตัวในฤดูหนาวพันธุ์หม่อนที่มีปลูกกันอยู่ทั่วโลกมีมากมายหลายพันธุ์ มีแหล่งกำเนิดกระจายกว้างขวางมากคือ ตั้งแต่เขตร้อน (tropical zone) เขตอบอุ่น (subtropical zone) เขตกึ่งหนาว (temperate zone) และเขตกึ่งหนาวเย็น (sub-arctic zone) ส่วนใหญ่เป็นการปลูกเพื่อนำใบไปเลี้ยงไหมแต่มีอีกหลายพันธุ์ที่นำไปใช้ประโยชน์ในด้านอื่นๆ เช่น การรับประทานผล การนำไปเป็นต้นไม้สำหรับบังลม ปลูกไว้เพื่อใช้สำหรับเป็นอาหารของนก การปลูกเป็นไม้ประดับบริเวณถนนหนทาง และบางพันธุ์ยังเป็นพืชพันธุ์ป่า มีการจำแนกพันธุ์หม่อนระดับ species เริ่มตั้งแต่ปี ค.ศ.1753 เมื่อ Linneaus ได้จำแนกพันธุ์หม่อนออกเป็น 5 species ได้แก่ *Morus alba* L., *Morus nigra* L., *Morus rubra* L., *Morus tartarica* L. และ *Morus indica* L. จนถึงปี ค.ศ.1917 Koidzumi ได้จำแนกพันธุ์หม่อนออกเป็น 24 species และ 1 subspecies ต่อมานักพฤกษศาสตร์ชาวญี่ปุ่นชื่อ Horita ได้จำแนกพันธุ์หม่อนออกเป็น 35 species [วสันต์ คุ้มภรณ์, 2553]

พันธุ์หม่อนที่ปลูกในประเทศไทย

พันธุ์หม่อน ตระกูล *Morus alba* L. ได้ปลูกในประเทศไทยเพื่อเก็บผลผลิตใบหม่อนมาใช้เป็นอาหารสำหรับเลี้ยงไหมให้ได้ดีขึ้นและเก็บผลผลิตผลหม่อน พื้นที่ส่วนใหญ่ที่ปลูกหม่อนคือภาคเหนือและภาคตะวันออกเฉียงเหนือ เช่น จังหวัดนครราชสีมา ขอนแก่น บุรีรัมย์ สุรินทร์ และเพชรบูรณ์ พันธุ์หม่อนที่มีการเพาะปลูกและปรับปรุงพันธุ์ เช่น พันธุ์เชียงใหม่ นครราชสีมา 60 บุรีรัมย์ 60 บุรีรัมย์ 51 ศรีสะเกษ 33 สกลนคร 72



รูปที่ 2.1 ลักษณะทางกายภาพของผลหม่อน [Qin และคณะ, 2010]

ตารางที่ 2.1 สมบัติทางเคมีของผลหม่อนที่ปลูกในประเทศไทย [www.moac.co.th]

ผลหม่อนสด	ผลห้าม	ผลสุก
ความชื้น (%)	87.00	83.50
ความหวาน (% brix)	10.05	13.10
ปริมาณกรด(% w/w as citric)	1.35	0.65

ผลหม่อนอบแห้ง	
โปรตีน (%)	12.81
ไขมัน (%)	4.94
คาร์โบไฮเดรต (%)	8.14
เส้นใย (%)	6.74
เถ้า (%)	0.06
ความชื้น (%)	16.56

ตารางที่ 2.2 ส่วนประกอบทางเคมีของผลหม่อนสุกสีดำของพันธุ์ต่างๆ

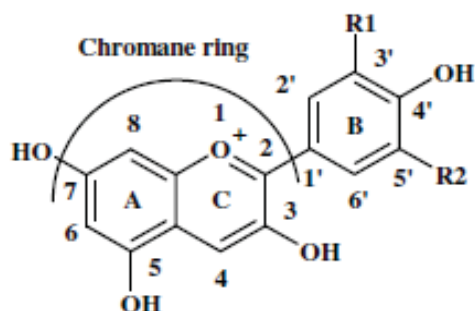
[วสันต์ นุ้ยภิรมย์, 2553]

พันธุ์หม่อน	โปรตีน (%)	คาร์โบไฮเดรต (%)	ไขมัน (%)	น้ำตาล (%)	ความเปรี้ยว (% w/v)	pH	ความชื้น (%)
นครราชสีมา 60 1/	1.56	ไม่มีข้อมูล	1.47	26.31	1.39	6.00	90.27
บุรีรัมย์ 60 1/	1.26	ไม่มีข้อมูล	1.31	21.81	1.51	5.90	90.15
เชียงใหม่ 2/	11.86	61.19	3.66	11.2	1.19	4.00	16.58

1/ วิเคราะห์ จากผลหม่อนสด 2/ วิเคราะห์ จากผลหม่อนอบแห้ง

2.2 แอนโทไซยานิน (Anthocyanins)

แอนโทไซยานินเป็นไกลโคไซด์ของแอนโทไซยานิดิน มีโครงสร้างเป็นเกลือฟลาโวลอยด์ในธรรมชาติมักพบในรูปไกลโคไซด์ซึ่งมีน้ำตาลมาเกาะที่ตำแหน่ง C-3 หรือ C-5 [www.drug.pharmacy.psu.ac.th] ได้แก่กลูโคส กาแลคโตส แรมโนส ไชโรส และอะราบินอส [Wang และ Gary, 2008] ซึ่งแอนโทไซยานิดินคือ โครงสร้างพื้นฐานของแอนโทไซยานินดังรูปที่ 2.2 ปัจจุบันนี้ได้พบแอนโทไซยานินมากกว่า 500 ชนิด ความหลากหลายของแอนโทไซยานินนั้น ขึ้นกับจำนวนของหมู่ไฮดรอกซิล และลักษณะ จำนวน ตำแหน่งของน้ำตาลที่มาเกาะ และจำนวนลักษณะของกรดอะลิฟาติก และอะโรมาติก ที่มาเกาะกับน้ำตาลโมเลกุลโดยชนิดของ แอนโทไซยานิดินที่พบมากที่สุดโดยทั่วไปมี 6 ชนิด คือ ไชยานิดิน (cyaniding) เดลฟินิดิน (delphinidin) พีลาร์โกนิน (pelargonidin) มัลวิดิดิน (malvidin) พีทูนิดิน (petunidin) และพีโอนิดิน (peonidin) ซึ่งมีสัดส่วนโดยประมาณในผักและผลไม้ดังนี้ ไชยานิดินร้อยละ 50, เดลฟินิดิน ร้อยละ 12, พีลาร์โกนินร้อยละ 12, พีโอนิดินร้อยละ 12, พีทูนิดินร้อยละ 7 และมัลวิดิดินร้อยละ 7 [Castaneda-Ovando และคณะ 2009] ตารางที่ 2.3 แสดง ชนิด หมู่ฟังก์ชัน และลักษณะสีของแอนโทไซยานิดิน

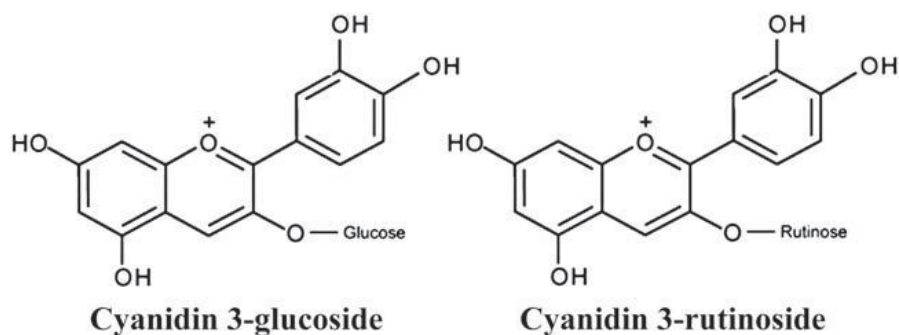


รูปที่ 2.2 โครงสร้างทั่วไปของแอนโทไซยานิน [Hosseinian และ Beta, 2008]

ตารางที่ 2.3 ชนิด หมู่ฟังก์ชัน และลักษณะสีของแอนโทไซยานิดิน [Hosseinian และ Beta, 2008]

ชื่อ	R ₁	R ₂	สี
Cyanidin (Cy)	OH	H	Red
Peonidin (Pn)	OCH ₃	H	Bluish-purple
Pelargonidin (Pg)	H	H	Orange-red
Malvidin (Mv)	OCH ₃	OCH ₃	Purple
Delphinidin (Dp)	OH	OH	Purple
Petunidin (Pt)	OCH ₃	OH	Purple

แอนโทไซยานินที่พบในผลหม่อน (mulberry fruit) ทั่วไปหลักๆ มี 2 ชนิด คือ ไซยานิดิน-3-กลูโคไซด์ (cyanidin-3-glucoside) และไซยานิดิน-3-รูทีโนไซด์ (cyanidin-3-rutinoside) [Bae และ Suh, 2007] (รูปที่ 2.3)



รูปที่ 2.3 โครงสร้างแอนโทไซยานินทั่วไปที่พบในผลหม่อน [Butt และคณะ, 2008]

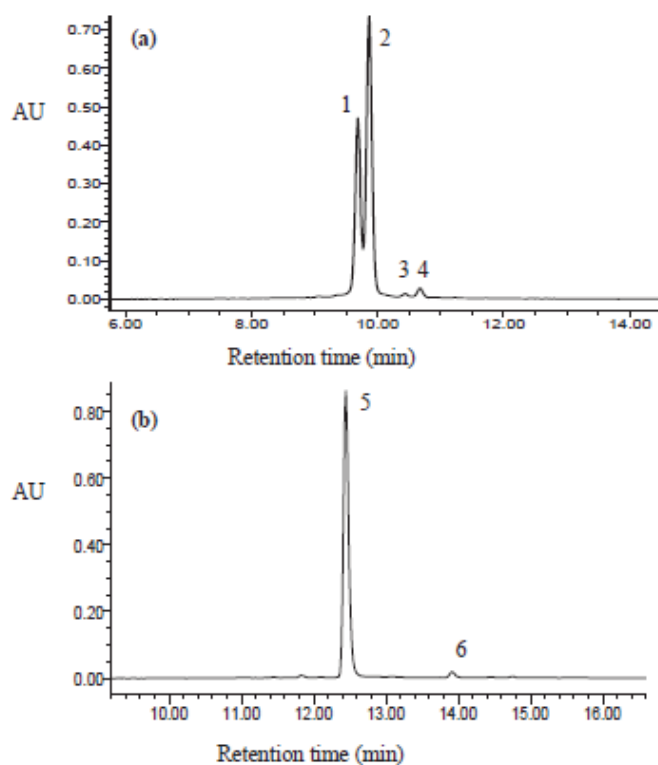
Bae และ Shu (2007) ได้วิเคราะห์หาปริมาณแอนโทไซยานินของผลหม่อน 5 สายพันธุ์คือ Pachungsiipyung, Whazosipmunja, Suwonnosang, Jasan และ Mocksang เป็นสายพันธุ์ที่ปลูกในเกาหลี ซึ่งอยู่ในสปีชีส์ *Morus alba* L. สกัดโดยนำผลหม่อนมา 50 กรัมปั่นจนเป็นเนื้อเดียวกันและสกัดด้วย 70% เอทานอลเป็นเวลา 4 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นกรองด้วยกระดาษกรองแล้วล้างด้วยเอทานอล 50 มิลลิลิตร และสกัดกากที่เหลือซ้ำอีกครั้ง แล้วนำสารสกัดที่ได้ทั้งหมดรวมกันแล้วผ่านกระบวนการระเหย ภายใต้สภาวะต่ำกว่าบรรยากาศที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เพื่อให้ได้สารสกัดแห้ง การวิเคราะห์แอนโทไซยานินโดยใช้ HPLC คอลัมน์ C18 ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ด้วยอัตราการไหล 1 มิลลิลิตร ต่อนาที วัดที่ความยาวคลื่น 530 นาโนเมตร ซึ่งมีการเปลี่ยนแปลงตัวทำละลาย B ในช่วง 20%-80% (1.5% กรดฟอสฟอริก, 20% กรดอะซิติก, 25% อะซิโตนไตรโซลละลายในน้ำ) ใน ตัวทำละลาย A คือ 1.5 %กรดฟอสฟอริก ละลายในน้ำพบแอนโทไซยานิน 2 ชนิดหลักคือ ไซยานิดิน-3-กลูโคไซด์ และไซยานิดิน-3-รูทีโนไซด์ ดังตารางที่ 2.4

ตารางที่ 2.4 ปริมาณแอนโทไซยานินในผลหม่อนสายพันธุ์ต่างๆ ที่ถูกสกัดด้วยเอทานอล [Bae และ Shu, 2007]

Mulberry fruit extract	TA ($\mu\text{g/g}$)	Cyanidin-3-glucoside ($\mu\text{g/g}$)	Cyanidin-3-rutinoside ($\mu\text{g/g}$)
M-1	1229.3 \pm 21.4 ^d	847.1 \pm 11.2 ^c	259.3 \pm 15.3 ^d
M-2	2057.3 \pm 18.5 ^a	1364.9 \pm 10.4 ^a	486.7 \pm 18.5 ^a
M-3	1599.3 \pm 21.0 ^c	1091.6 \pm 19.6 ^b	347.7 \pm 12.4 ^c
M-4	1664.1 \pm 11.9 ^b	1077.3 \pm 11.2 ^b	420.5 \pm 20.1 ^b
M-5	137.3 \pm 7.7 ^e	93.2 \pm 7.4 ^d	30.6 \pm 3.8 ^e

หมายเหตุ M-1: Pachungsiipyung, M-2: Whazosipmunja, M-3: Suwonnosang, M-4: Jasan, M-5: Mocksang

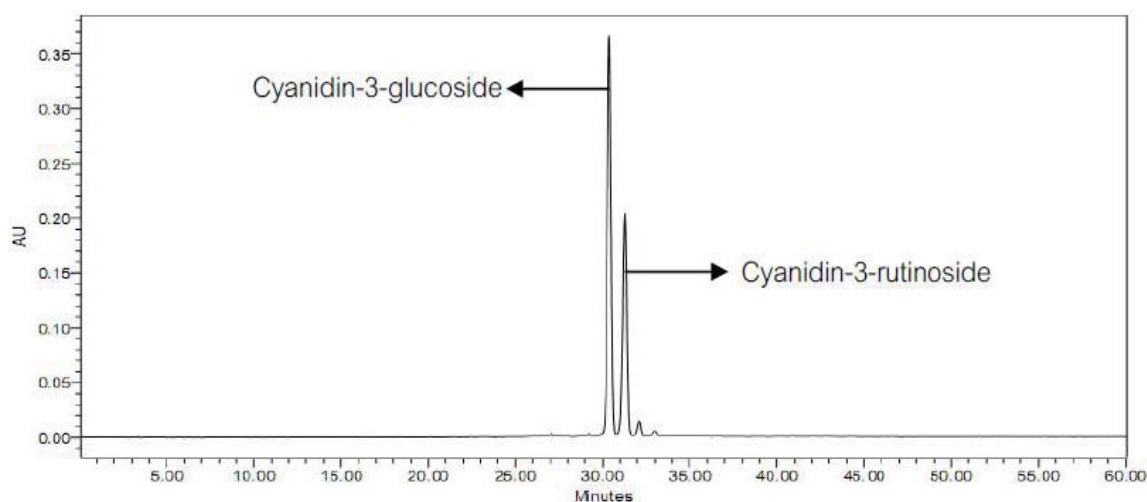
Qin และคณะ (2010) ได้ใช้ HPLC-PAD ในการวิเคราะห์หาปริมาณแอนโธไซยานินในผลหม่อนสกัดสปีชีส์ *Morus alba* L. สายพันธุ์ในประเทศจีนการสกัดทำโดยนำหม่อนสดที่ปั่นละเอียดด้วยเครื่องปั่นมา 100 กรัมผสมกับสารสกัด 500 มิลลิลิตร (เป็นสัดส่วน 1:5 (น้ำหนักต่อปริมาตร)) สารสกัดประกอบด้วย 95% เอทานอล ต่อ 0.1% กรดไฮโดรคลอริก (สัดส่วน 1:1) เก็บในที่มืดเป็นเวลา 4 ชั่วโมง จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 5000 รอบต่อนาทีที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 20 นาที แล้วแยกส่วนใส่มากกรองด้วยกระดาษกรอง การวิเคราะห์หาปริมาณแอนโธไซยานินด้วย HPLC-PAD นั้น โดยใช้แอนโธไซยานินที่ผ่านกระบวนการทำให้บริสุทธิ์ และผ่านการไฮโดรไลซิสด้วยกรดก่อนในการวิเคราะห์ที่ค่าการดูดกลืนแสง 520 นาโนเมตร คอลัมน์ C18 วัฏภาคเคลื่อนที่ (mobile phase) คือ A (0.1% กรดไตรฟลูออโรอะซิติก (TFA) ในน้ำ), B (0.1% กรดไตรฟลูออโรอะซิติกในอะซิโตนไตริล) การชะ (elution) เกิดที่เวลา 0–60 นาที: 0 นาที, 10% B; 0–2 นาที, 10% B; 2–35 นาที, 10–90% B; 35–40 นาที, 90–100% B; 40–60 นาที, 100% B อัตราการไหล 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที พบว่ามีแอนโธไซยานินต่างกัน 4 ชนิด เวลา 9.6 นาที พบพีคที่ 1 38% คือ ไชยานิดิน-3-กลูโคไซด์, เวลา 9.9 นาทีพบพีคที่ 2 60% คือ ไชยานิดิน-3-รูทีโนไซด์, พีคที่ 3 พบที่เวลา 10.4 นาที ประมาณ 0.5% และ พีคที่ 4 พบเวลา 10.7 นาที 1.5% คือ ฟิลาโรโกนิน-3-กลูโคไซด์ และฟิลาโรโกนิน-3-รูทีโนไซด์ตามลำดับ ดังรูปที่ 2.4 (a) จากนั้นเมื่อนำแอนโธไซยานินที่ผ่านกระบวนการทำให้บริสุทธิ์มาไฮโดรไลซิสด้วยกรดแล้ววิเคราะห์พบว่า จะแอนโธไซยานินในหม่อนสกัดจะเกิดอะไกลโคจีน 2 ชนิด คือ ไชยานิดิน กับ ฟิลาโรโกนิน ดังแสดงในพีคที่ 5 และ 6 ที่เวลา 12.5 และ 13.9 นาทีตามลำดับดังรูปที่ 2.4 (b) โดยที่จากแอนโธไซยานินจากพีคที่ 1 กับ 2 เมื่อถูกไฮโดรไลซิสจะได้เป็นพีค 5 และพีคที่ 3 กับ 4 เมื่อถูกไฮโดรไลซิสจะได้เป็นพีค 6



รูปที่ 2.4 กราฟ HPLC-PAD ที่ 520 นาโนเมตร (a) สารสกัดของผลหม่อนที่ผ่านกระบวนการทำให้บริสุทธิ์แล้ว (b) สารสกัดของผลหม่อนที่ผ่านกระบวนการทำให้บริสุทธิ์ หลังจากไฮโดรไลซิสด้วยกรด [Qin และคณะ, 2010]

มนต์วดี หุ่นเจริญ และศศิธร ตรงจิตภักดี (2553) ได้ตรวจสอบชนิดและปริมาณแอนโทไซยานินในผลหม่อนสายพันธุ์กำแพงแสน-เอ็มบี-42-1 แห่งสกัดโดยผลหม่อนแห้ง 1 กรัม ด้วยเมทานอล 50% ที่มีส่วนผสมของกรดไฮโดรคลอริก 0.01% ทำการสกัดซ้ำ 2 ครั้ง ปริมาตรสุดท้ายให้ได้ 25 มิลลิลิตรในการวิเคราะห์ชนิดแอนโทไซยานินใช้เทคนิค HPLC โดยใช้คอลัมน์ชนิด C18 (Symmetry, 4.6mm.x250mm.) (Water, Milford, MA, USA) โดยมีวัฏภาคเคลื่อนที่เป็นน้ำปราศจากไอออนและอะซิโตนไไตรล์ ที่มีส่วนผสมของ 0.1% กรดฟอสฟอริก ทั้ง 2 วัฏภาคเคลื่อนที่ และใช้ UV diode-array detector ตรวจวัดแอนโทไซยานินที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร พบว่าแอนโทไซยานินชนิดหลัก 2 ชนิดคือ ไชยานิดิน-3-กลูโคไซด์ และ ไชยานิดิน-3-รูทีโนไซด์ โดยมีปริมาณแอนโทไซยานินเท่ากับ 889.3 ± 36.9 และ 827.4 ± 31.3 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัมของหม่อน

แห้งตามลำดับ นอกจากนี้ยังได้หาปริมาณแอนโทยานินทั้งหมดด้วยวิธี pH-differential พบว่ามีปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมด 1843.6 ± 13.9 มิลลิกรัมของไซยานิดิน-3-กลูโคไซด์ต่อ 100 กรัมของหม่อนแห้งจากการตรวจสอบชนิดและปริมาณแอนโทไซยานินแสดงให้เห็นว่าผลรวมของปริมาณแอนโทไซยานินของ ไซยานิดิน-3-กลูโคไซด์ และไซยานิดิน-3-รูทีโนไซด์ จากเทคนิค HPLC ใกล้เคียงกับปริมาณแอนโทยานินทั้งหมดที่ตรวจสอบด้วยวิธี pH-differential



รูปที่ 2.5 กราฟ HPLC ของผลหม่อนสกัดสายพันธุ์ กำแพงแสน-เอ็มบี-42-1 (ผลหม่อนที่สูงเต็มที่) ที่ 520 นาโนเมตร [มนต์วดี หุ่นเจริญ และศศิธร ตรงจิตภักดี, 2553]

2.3 ความคงตัวของแอนโทไซยานิน (anthocyanin stability) [Castaneda-Ovando และคณะ, 2009]

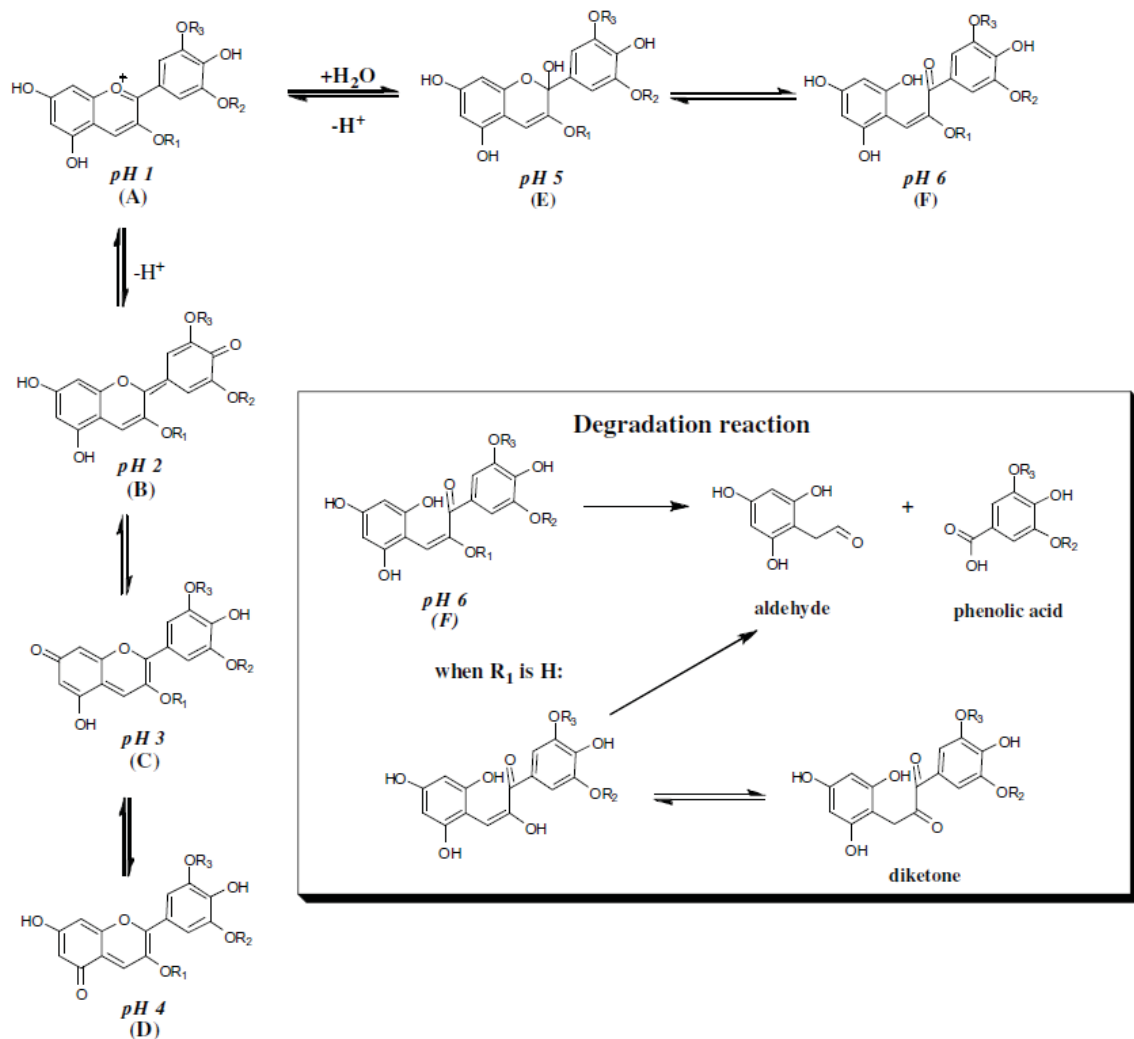
แอนโทไซยานิน เป็นสารที่มีความคงตัวต่ำและไม่ค่อยเสถียร เสื่อมสลาย (degradation) ได้ง่าย [Giusti และ Wrolstad, 2003] ความเสื่อมสลายของแอนโทไซยานินนั้นมีสาเหตุมาจากหลายปัจจัย เช่น พีเอช อุณหภูมิในการเก็บ โครงสร้างทางเคมี ความเข้มข้น แสง ออกซิเจน ตัวทำละลาย ไอออนโลหะ

ตัวทำละลายและความเข้มข้นของแอนโทไซยานิน

การใช้ตัวทำละลายในการสกัดแอนโทไซยานินที่ต่างกันมีผลทำให้สีของแอนโทไซยานินเกิดการเปลี่ยนแปลงเนื่องจากการเกิดเกลือฟลาวิเลียม (flavylium salts) ในสารละลายที่มีธรรมชาติที่ต่างกัน เช่น สารละลายอะซิโตนไตรต์ เอทานอล โพรพิลีนไกลคอล ไดโอเซน และ ทูบิวทาโนน ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของสีซึ่งก็ขึ้นกับทั้งตัวทำละลายที่ใช้และความเข้มข้นของเกลือฟลาวิเลียมในตัวทำละลายโพรติกเป็นตัวทำละลายที่มีหมู่ไฮดรอกซิลหรือเอมีน ซึ่งสีของเกลือฟลาวิเลียมแสดงเป็นสีแดง ในขณะที่ในตัวทำละลายอโพรติกจะแสดงเป็นสีเหลือง

พีเอช

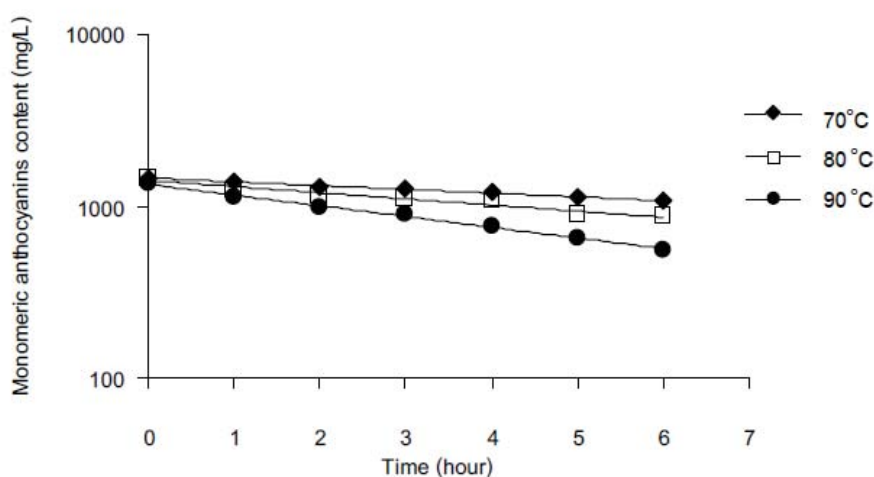
แอนโทไซยานินสามารถเกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างทางเคมีในสภาวะสารละลายตัวกลางที่มีค่าพีเอชต่างกันได้ดังรูปที่ 2.6 ที่ค่าพีเอชเท่ากับ 1 แอนโทไซยานินจะมีโครงสร้างอยู่ในรูปฟลาวิเลียมแคทไอออน (flavylium cation) ซึ่งมีสีแดงสามารถเปลี่ยนแปลงให้แอนโทไซยานินเกิดเป็นสีม่วงและแดงได้ค่าพีเอชที่ 2 ถึง 4 จะเกิดเป็นโครงสร้างของควินอยดอลบลู (quinoidal blue) มีสีฟ้าและค่าพีเอชที่ 5 กับ 6 โครงสร้างเปลี่ยนไปเป็นคาร์บินอลชูโดเบส (carbinol pseudobase) และแคลโคน (chalcones) ตามลำดับ ซึ่งเกิดการเปลี่ยนแปลงจนไม่ปรากฏสีหรือจะแสดงการให้สีค่อนข้างน้อยและที่พีเอชเท่ากับ 7 สารแอนโทไซยานินจะเกิดการสลายตัวจากรูปที่ 2.6 แสดงการเปลี่ยนแปลงของแอนโทไซยานินเมื่ออยู่ในสภาวะที่มีการเปลี่ยนแปลงค่าพีเอช จึงสรุปได้ว่าที่พีเอชระหว่าง 4 กับ 6 จะเกิดสมดุลของควินอยดอล, คาร์บินอล ร่วมกับฟลาวิเลียมแคทไอออน เมื่อพีเอชสูงขึ้นจนอยู่ในสภาวะที่เป็นกรดอ่อนหรือเป็นกลางปริมาณฟลาวิเลียมแคทไอออนจะเริ่มลดลงและเมื่อสภาวะที่เป็นกรดมากจะเกิดโครงสร้างที่เป็นฟลาวิเลียมแคทไอออนที่มีความคงตัวมากที่สุด ดังนั้นที่พีเอชเท่ากับ 1 เป็นสภาวะที่มีความคงตัวสูงสุด ซึ่งความคงตัวของแอนโทไซยานินหรือเรียกว่า อะไกลโคน (aglycones) มีอิทธิพลจากหมู่ที่มาแทนวงแหวน B และหมู่ไฮดรอกซิลกับเมทอกซิลที่มาเกาะกับโมเลกุลซึ่งทำให้ความคงตัวของอะไกลโคนลดลงในสภาวะที่เป็นกลาง ดังนั้น เพ็ลาร์โกนิน (pelargonidin) จึงเป็นแอนโทไซยานินที่มีความคงตัวมากที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับอนุพันธ์ของ อะไกลโคน โมโนไกลโคไซด์ ไดไกลโคไซด์ ลักษณะที่เกิดขึ้นนี้เนื่องจากโมเลกุลของน้ำตาลสามารถช่วยลดการเสื่อมสลายไปเป็นสารที่ไม่คงตัวของทั้งกรดฟีนอลิกและสารประกอบอัลดีไฮด์ ได้ปฏิกิริยาการเสื่อมสลายในรูปที่ 2.6



รูปที่ 2.6 โครงสร้างของแอนโทไซยานินที่เสื่อมสลายจากการเปลี่ยนแปลงของค่าพีเอช (A) ที่พีเอช 1 เกิดโครงสร้างฟลาโวลีเทียมแคทไอออน เป็นสีแดง, (B)-(D) พีเอช 2-4 เกิดโครงสร้างควิโนยดอลบูล เป็นสีฟ้า, (E)-(F) พีเอช 5-6 เกิดโครงสร้างคาร์บินอล ซูโดเบส และแคตไคนเป็นสีอ่อน [Castaneda-Ovando และคณะ, 2009]

อุณหภูมิ

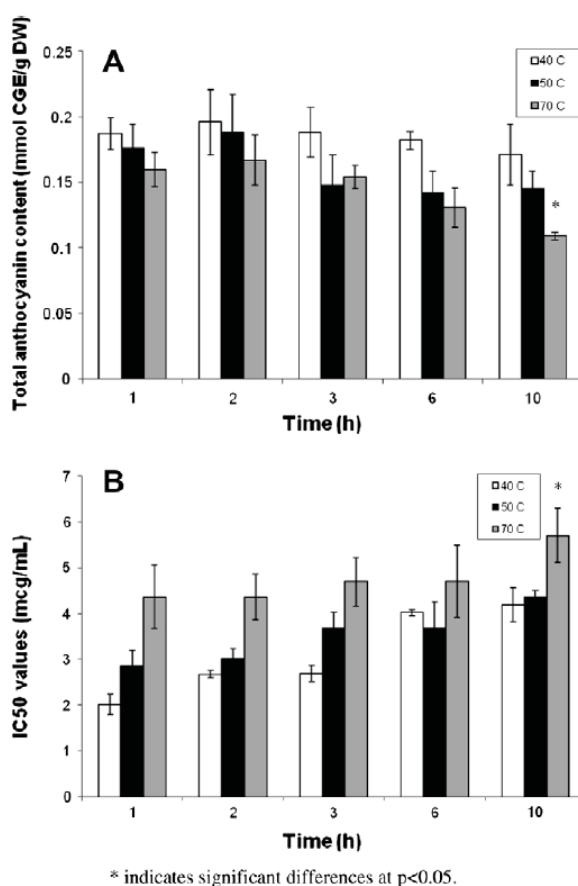
มนต์วีดี หุ่นเจริญ และศศิธร จันทนวางกูร (2551) ได้ศึกษาความคงตัวของแอนโทไซยานินต่ออุณหภูมิ 70-90 องศาเซลเซียส และที่ค่าพีเอช 2.5-8.0 ในน้ำลูกหม่อน พบว่าการเสื่อมสลายของแอนโทไซยานินเป็นไปตามอัตราการเกิดปฏิกิริยาอันดับหนึ่งเมื่อเทียบกับอุณหภูมิ สมการคือ $\ln(C_t/C_0) = -k \times t$ เมื่อ อุณหภูมิเพิ่มขึ้น ค่าคงที่อัตราการเกิดปฏิกิริยาอันดับที่หนึ่งของแอนโทไซยานินในน้ำลูกหม่อนมีค่าสูงขึ้น ซึ่งมีผลทำให้ค่าครึ่งชีวิต ($t_{1/2}$) ลดลง และค่าพีเอชที่มีผลต่อความคงตัวของแอนโทไซยานินพบว่าเมื่อค่าพีเอชเพิ่มขึ้น แอนโทไซยานินในน้ำลูกหม่อนมีความคงตัวลดลง ซึ่งคงตัวมากที่สุดที่ค่าพีเอชเท่ากับ 2.5 รองมา 4.0, 6.0 และ 8.0 ตามลำดับ และที่ค่าพีเอชที่ 2.5 นำไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 70, 80, 90 องศาเซลเซียส แอนโทไซยานินมีค่าครึ่งชีวิต ($t_{1/2}$) เท่ากับ 13.7, 8.4 และ 4.6 ชั่วโมง ตามลำดับ



รูปที่ 2.7 การเสื่อมสลายของมอนอเมอร์แอนโทไซยานิน ในน้ำลูกหม่อนที่อุณหภูมิต่างกัน (พีเอช 2.5) [มนต์วีดี และศศิธร, 2551]

Aramwit และคณะ (2010) ได้ศึกษาผลของอุณหภูมิ 40-70 องศาเซลเซียส และแสงฟลูออเรสเซนซ์ (220 V, 50 Hz และ 0.37 A) ต่อความคงตัวของแอนโทไซยานินในน้ำผลหม่อนสปีชีส์ *Morus alba* L. 3 สี คือ ม่วง ม่วงแดง และแดง พบว่าผลหม่อนสีม่วงจะมีปริมาณแอนโทไซยานินและการต้านอนุมูลอิสระ (IC_{50}) และประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระสูงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับผลหม่อนสีม่วงแดงและแดง และความคงตัวของอุณหภูมิพบว่าสารสกัด

หม่อนที่เก็บที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 ชั่วโมง และความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) แสดงจากค่า IC_{50} ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ นอกจากนี้ยังได้หาปริมาณน้ำตาล สารเบตาแคโรทีน กรดแอสคอบิก และสีของผลหม่อนทั้ง 3 สี เมื่อสารสกัดผลหม่อนได้รับแสงฟลูออเรสเซนซ์ 10 ชั่วโมงมีผลทำให้ปริมาณแอนโทไซยานิน และการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ และสารเบตาแคโรทีน กรดแอสคอบิก มีปริมาณที่ลดลง แสดงให้เห็นว่าทั้งอุณหภูมิและแสงมีผลทำให้ความคงตัวของสารแอนโทไซยานิน ลดต่ำลงได้



รูปที่ 2.8 ปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมด (A) และค่าความเข้มข้นที่สามารถต้านอนุมูลอิสระ DPPH 50% (IC_{50} , B) ของน้ำผลหม่อนสีม่วงหลังจากเก็บไว้ในสภาวะที่อุณหภูมิต่างกัน [Aramwit และคณะ, 2010]

2.4 ฤทธิ์ของแอนโธไซยานินต่อเซลล์

ในปี 2003 Kang และคณะได้พบว่าแอนโธไซยานินจาก Tart cherry มีฤทธิ์สามารถยับยั้งเซลล์มะเร็งลำไส้ได้ จากผลการทดลองแอนโธไซยานินและไซยานิดิน สามารถลดการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งลำไส้ชนิด HT 29 และ HCT 116 ได้ที่ค่า IC_{50} ของแอนโธไซยานิน และไซยานิดิน เท่ากับ 780 และ 63 ไมโครโมลลาร์ สำหรับการยับยั้งเซลล์ HT 29 และ 285 กับ 85 ไมโครโมลลาร์ สำหรับการยับยั้งเซลล์ HCT 116

งานวิจัยของ Shin และ คณะ (2005) ได้ศึกษาผลของแอนโธไซยานินในรูปอนุพันธ์ของอะไกลโคน 5 ชนิด ไซยานิดิน เดลฟินิดิน มัลวิดิน ฟิลาโรโกนิน และพีโอนิน ต่อการต้านการเกิดมะเร็ง และอนุพันธ์ไกลโคไซด์ 4 ชนิด ไซยานิดิน-3-กลูโคไซด์ มัลวิดิน-3-กลูโคไซด์ ฟิลาโรโกนิน-3-กลูโคไซด์และพีโอนิน-3-กลูโคไซด์ ที่มีผลต่อเซลล์และการชักนำให้เซลล์เกิดตาย (apoptosis) ในเซลล์ human gastric adenocarcinoma AGS พบว่ามัลวิดิน 100 และ 200 ไมโครโมลลาร์ มีผลทำให้การแสดงออกของสัญญาณการตาย คือ p38 kinase สูงขึ้นและสามารถยับยั้ง ERK activity ซึ่งเป็นกิจกรรมในการแบ่งเซลล์มะเร็ง

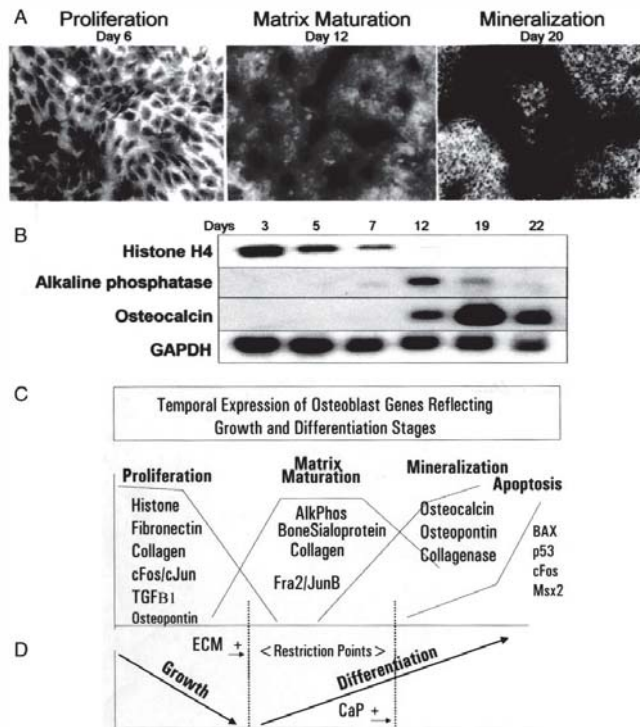
Netzel และคณะ (2007) ได้ศึกษาประสิทธิภาพของการต้านการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งและเมตาบอลิซึมของแอนโธไซยานินในหลอดดำ จากการทดลอง พบว่าแอนโธไซยานินที่ได้จากหลอดดำมีความสามารถในการต้านการเจริญเติบโตของเซลล์ HT-29 colorectal adenocarcinoma ที่ความเข้มข้น 0.5-1.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ HT-60 promyelocytic leukaemia ที่ความเข้มข้น 0.5-2.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และการศึกษาในเมตาบอลิซึมของแอนโธไซยานิน โดยแอนโธไซยานินจะมีโครงสร้างสองแบบคือ acylated และ nonacylated ซึ่งโครงสร้างแบบ acylated จะมีความคงตัวมากกว่า nonacylated จึงทำให้โครงสร้างที่เป็น nonacylated มีการนำกลับมากับปัสสาวะของคนมากกว่าโครงสร้างที่เป็น acylated ถึง 8 เท่า

2.5 Mesenchymal Stem Cells (MSCs)

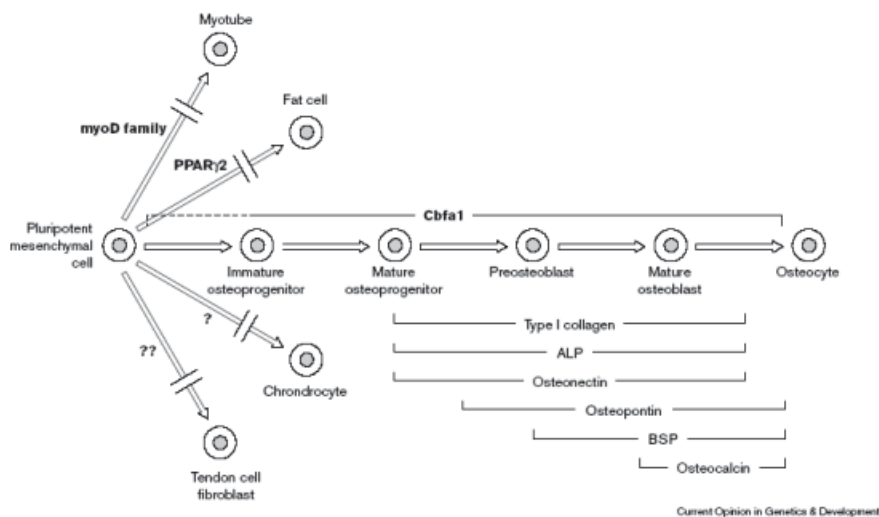
Mesenchymal stem cells คือ เซลล์ต้นกำเนิดจากเนื้อเยื่อชั้นกลาง (mesoderm) ที่สามารถเปลี่ยนแปลงรูปร่างเป็นเนื้อเยื่อชนิดต่างๆ ได้ เช่น กระดูก กระดูกอ่อน เนื้อเยื่อไขมัน เส้นเอ็นและกล้ามเนื้อ MSC สามารถแยกออกมาจากไขกระดูก เนื้อเยื่อไขมันและเลือดสายสะดือ (cord blood) เป็นต้น ในปี 1995 Lennon และคณะ แยก MSC จากไขกระดูกจาก Fisher F-344 rat อายุ 2-4 เดือน [Lennon และคณะ, 1995] เซลล์ MSC เมื่อนำมาเลี้ยงในจานเลี้ยงเซลล์ เซลล์ยึดเกาะบนจานเลี้ยงเซลล์และเริ่มเจริญเติบโตรวมกันเป็นกลุ่มหรือเรียกว่า fibroblastic-like cell

cluster (fibroblast colony forming units: CFU-F) [Sautier และคณะ, 1993] การควบคุมให้ MSC เปลี่ยนแปลงรูปร่างเป็นเนื้อเยื่อชนิดต่างๆ สามารถทำได้โดยการเติมสารอาหารต่างๆ เช่น growth factor หรืออาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีการเหนี่ยวนำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงรูปร่าง ของ MSC เป็นเนื้อเยื่อชนิดต่างๆ มีรายงานการวิจัยว่าอาหารเลี้ยงเซลล์ที่องค์ประกอบของสารจำพวก osteo-inductive agents เช่น β -glycerophosphate, glucocorticoids, sodium β -glycerophosphate, calcium hexose monophosphate และ dexamethasone [Kim และคณะ, 2005] มีผลดีต่อการเกิดกระดูก และกิจกรรมของ ALP เกิดขึ้นสูงสุดในช่วงสองสัปดาห์แรกของการเปลี่ยนไปเป็นเซลล์กระดูก [Kim และคณะ, 2005] นอกจากนี้ การตัดแปลงหรือปรับปรุงโครงสร้างเลี้ยงเซลล์ให้มีสมบัติเหมาะสมกับ MSC เช่น สมบัติทางเคมีของพื้นผิวโครงสร้างเลี้ยงเซลล์ ซึ่งสามารถควบคุมพฤติกรรมของเซลล์ การยึดเกาะ รูปร่างและการเปลี่ยนแปลงหน้าที่เป็นเซลล์ชนิดอื่นๆ โดยพื้นผิวของโครงสร้างเลี้ยงเซลล์ควรประกอบด้วยหมู่ methyl (-CH₃), hydroxyl (-OH), carboxyl (-COOH), amino (-NH₂) และ silane (-SH) ซึ่งหมู่เหล่านี้พบในระบบชีวภาพ

การเจริญเติบโตของเซลล์ต้นกำเนิดสามารถแบ่งได้เป็น 3 ขั้นตอน ดังรูปที่ 2.9 คือ ขั้นตอนแรก การเพิ่มจำนวน (proliferation) เป็นขั้นตอนของเซลล์เกิดการแบ่งตัวและขยายจำนวนอยู่ในระยะเวลาประมาณ 6 วัน ขั้นตอนที่สอง matrix maturation เซลล์จะเริ่มหยุดการแบ่งตัวทำให้มีอัตราการเจริญเติบโตลดลงและเริ่มสร้าง Extracellular Matrix (ECM) เกิดขึ้นภายใน 12 วัน เป็นขั้นตอนที่เซลล์เกิดการกลายชนิดของเซลล์ (differentiation) และขั้นตอนที่ 3 เซลล์เริ่มสร้างแร่ธาตุขึ้นเช่นถ้าเซลล์เกิดการเปลี่ยนแปลงไปเป็นกระดูกจะเริ่มสร้างแคลเซียมขึ้นมาในขั้นตอนนี้ใน 20 วัน การเปลี่ยนแปลงของเซลล์ต้นกำเนิดไปเป็นเซลล์กระดูกจะมีการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์ต่างๆ ตามขั้นตอนตามรูปที่ 2.10



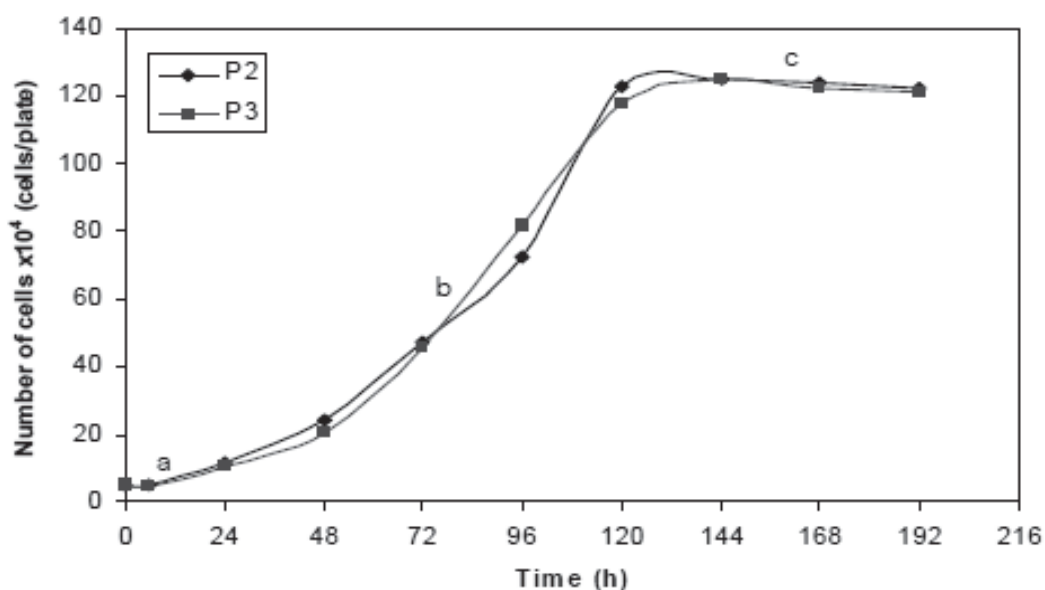
รูปที่ 2.9 ขั้นตอนการ differentiation ในระดับห้องปฏิบัติการ (A) การย้อมสีด้วย toluidine blue (ซ้าย), alkaline phosphatase (กลาง), von Kossa silver (ขวา) (B) แสดงปริมาณของ transcription factor ในช่วงเวลาต่างๆ (C) แสดงชนิดของ transcription factor ของแต่ละลำดับขั้น (D) แสดงการเจริญเติบโต (growth) และการกลายชนิดของเซลล์ (differentiation) [Lian and Stein, 2001]



รูปที่ 2.10 แผนผังการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์กระดูกของเซลล์ต้นกำเนิดไขกระดูก [Lian JB และ Stein GS, 2001]

งานวิจัยของณัฐพล วชิรโรจน์ (2552) ได้การพัฒนาเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพแบบไหลผ่านสำหรับงานวิศวกรรมเนื้อเยื่อที่ใช้เซลล์ต้นกำเนิดจากไขกระดูกหนูแรทพันธุ์วิสต้า โดยได้ศึกษาพบว่าเซลล์ต้นกำเนิด MSC ที่แยกจากไขกระดูกหนูแรทพันธุ์วิสตันั้น passage ที่ 2 และ 3 มีอัตราการแบ่งตัว 0.038 รุ่นต่อชั่วโมง เวลาในการแบ่งตัวเป็นทวีคูณเป็น 25.99 และ 26.33 ชั่วโมงตามลำดับ ได้แสดงจลศาสตร์ของการเจริญเติบโตดังรูปที่ 2.11

นอกจากนั้นได้มีการศึกษาการเปลี่ยนแปลงไปเป็นกระดูกของเซลล์ MSC บนจานเพาะเลี้ยงพอลิสไตรีน โดยมีการเปรียบเทียบเลี้ยงในอาหารปกติ (Normal Medium, NM) และอาหารที่ชักนำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์กระดูก (Osteogenic Medium, OM) ใน passage 2 และ 3 พบว่าเซลล์ที่เลี้ยงใน OM เหนี่ยวกิจกรรมของเอนไซม์ alkaline phosphatase (ALP) มากกว่าเซลล์เลี้ยงใน NM ทุกช่วงเวลา แต่เซลล์ที่เลี้ยงใน NM จะมีการเจริญเติบโตของเซลล์ได้ดีกว่าใน OM ซึ่งเอนไซม์ ALP ที่เซลล์สร้างขึ้นได้แสดงสัญญาณการเปลี่ยนเป็นกระดูกที่เกิดขึ้นในช่วงแรก



รูปที่ 2.11 จลศาสตร์ของการเจริญเติบโตของเซลล์ต้นกำเนิดจากไขกระดูกหนูแรทพันธุ์วิสต้า (Mesenchymal Stem Cells (MSC)) passage ที่ 2 และ 3 ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ α -MEM, 15% FBS ที่สภาวะอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส, 5% CO₂ บนจานเลี้ยงเซลล์พอลิสไตรีน พื้นที่ 2.8×10^4 มม². กราฟแสดง a คือ lag phase, b คือ exponential phase และ c คือ stationary phase

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 วัสดุและสารเคมี

1. ผลหม่อนสด แช่แข็ง -20 องศาเซลเซียส และผงผลหม่อนสกัด แห้งที่ 1 ไร่ก้านจูล จังหวัดเพชรบูรณ์ พันธุ์เซียงใหม่ (*Morus alba*), ช่วงการเก็บเกี่ยวเดือนธันวาคม 2553
2. สถาบันหม่อนไหมแห่งชาติเฉลิมพระเกียรติ สมเด็จพระนางเจ้าสิริกิติ์ พระบรมราชินีนาถ ศูนย์ด่านเกวียน จังหวัดนครราชสีมา มีเฉพาะหม่อนสด สายพันธุ์เซียงใหม่ (*Morus alba*) ช่วงการเก็บเกี่ยวเดือนมีนาคม 2554)
2. หนูแรทพันธุ์วิสต้า, เพศเมีย อายุ 3 สัปดาห์ (ศูนย์สัตว์ทดลอง มหาวิทยาลัยมหิดล)
3. Potassium chloride (KCl, Fluka, Germany)
4. Sodium acetate hydrated ($\text{CH}_3\text{CO}_2\text{Na}\cdot 3\text{H}_2\text{O}$, Ajax Finechem, Australia)
5. Cyanidin-3-O-glucoside chloride (Fujicco, Japan)
6. 1, 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH, Sigma-Aldrich, Germany)
7. Absolute ethanol (JT Baker, Malaysia)
8. Hydrochloric Acid (HCl, Qrec, Newland)
9. MEM/ALPHA minimum essential medium alpha modification (Cyclone, USA)
10. Fetal bovine serum (Hyclone, UK)
11. Penicillin-Streptomycin solution (Hyclone, USA)
12. Trypsin/EDTA 0.25% Trypsin (1X) solution (Hyclone, USA)
13. Phosphate buffer saline, PBS powder, (Cyclone, USA)
14. Sodium chloride (NaCl, Ajax Finechem, Australia)
15. Tri-sodium citrate ($\text{Na}_3\text{Citrate}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$, Merck, Germany)
16. Hoechst 33258 (bisBenzimide H33258, Sigma-Aldrich, Germany)
17. Sodium lauryl sulphate (SDS lysis buffer, Ajax Finechem, Australia)
18. Dimethyl sulfoxide for cell freezing (Cell culture tested DMSO, Sigma-Aldrich, Germany)
19. p-Nitrophenol standard solution (10 mM, Sigma-Aldrich, Germany)
20. p-Nitrophenyl phosphate liquid substrate (pNPP, Sigma-Aldrich, Germany)
21. Sodium hydroxide (Ajax Finechem, Australia)
22. Ascorbic acid for cell culture tested (Sigma, China)

23. β -glycerol phosphate disodium salt pentahydrate (Fluka, Germany)
24. Dexamethasone (Sigma, China)
25. O-cresolphthalein complex substrate (OCPC), ($C_{32}H_{12}N_2O_{12}$, Fluka, Japan)
26. Ethanolamine (C_2H_7NO , Sigma, Germany)
27. CO_2 gas
28. Trypan blue stain 0.4% (Gibco, USA)
29. Acetic acid (CH_3COOH , J.T.Baker, Thailand)
30. Calcium carbonate (CaO_3 , Fluka, Italy)
31. Dimethyl sulfoxide (DMSO) (Riedel-deHaen, USA)
32. Sodium hydrogen carbonate (Merck, Germany)
33. Buffer solution pH4.0 (Ajax Finechem, Australia)
34. Buffer solution pH7.0 (Ajax Finechem, Australia)

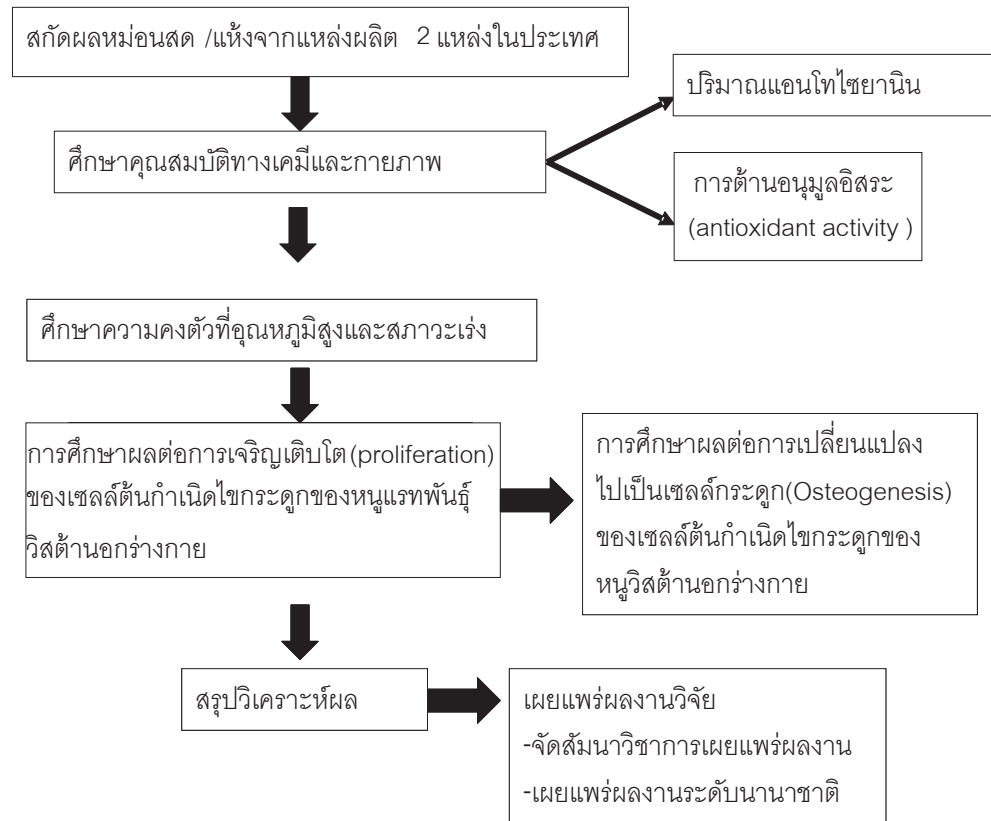
3.2 อุปกรณ์

1. Laminar Flow (Holten, EU)
2. CO_2 incubator (HEPA CLASS 100, USA)
3. Fluorescence microplate reader (Perkin elmer, 1420 multilabel counter, USA)
4. Micropipette (Pipetman P20, P200, P1000 and P5000, USA)
5. UV-VIS spectrophotometer (Thermo Spectronic, Genesys 10UV scanning, USA)
6. Microplate reader (UVM 340, ASYS, Australia)
7. Scanning Electron Microscope (JSM-5410LV, JEOL Ltd., Japan)
8. Centrifuge (Eppendorf 5810R, Germany)
9. $-40^\circ C$ freezer (Heto, PowerDry LL3000, USA)
10. Lyophilizer (Christ Loc-1m, Alpha 1-4, Germany)
11. Vacuum drying oven and pump (VD23, Binder, Germany)
12. 24-well and 96-well polystyrene tissue culture plates (Costar, USA)
13. Hemocytometer (Counting chamber, Boeco, Germany)
14. Autopipette (100-5,000 μl with tips (Eppendorf, Germany)
15. Stirrer (MSH-10, Daihan Scientific Ltd., WiseStir)

16. Refrigerator 4°C (PT203, Italy)
17. Autoclave (HVE-25/50, Hiclave)
18. Sputter coater (SCD 040, Balzer, Lichtenstein)
19. Centrifuge (Hettich universal 320R, Germany)
20. Waterbath (SUB6, Grant, England)
21. Peristaltic Pump (MCP V5.21 15M 726B-0773, Watson-Marlow, USA)
22. 1.5 ml sterilized vials (Corning USA)
23. Phase-contrast microscope (IX70, Olympus Optical CO., Japan)
24. 96-well black plate (Corning USA)
25. Vortex (Chemoscience, Thailand)

3.3 แผนผังการดำเนินงาน

แผนผังสรุปการดำเนินการทั้งโครงการเป็นไปดังรูปที่ 3.1 และมีรายละเอียดของขั้นตอนดังต่อไปนี้



รูปที่ 3.1 แผนผังสรุปการดำเนินการทั้งโครงการ

3.4 ขั้นตอนการดำเนินงานวิจัย

3.4.1 การเตรียมสารสกัดผลหม่อน

ผลหม่อนสดสายพันธุ์เชียงใหม่ 2 ชนิด ที่ได้จากแหล่งการปลูก 2 แหล่ง คือ ไร่กำนันจุล จังหวัดเพชรบูรณ์ และสถาบันหม่อนไหมแห่งชาติเฉลิมพระเกียรติ สมเด็จพระนางเจ้าสิริกิติ์ พระบรมราชินีนาถ ศูนย์ด่านเกวียน นครราชสีมา

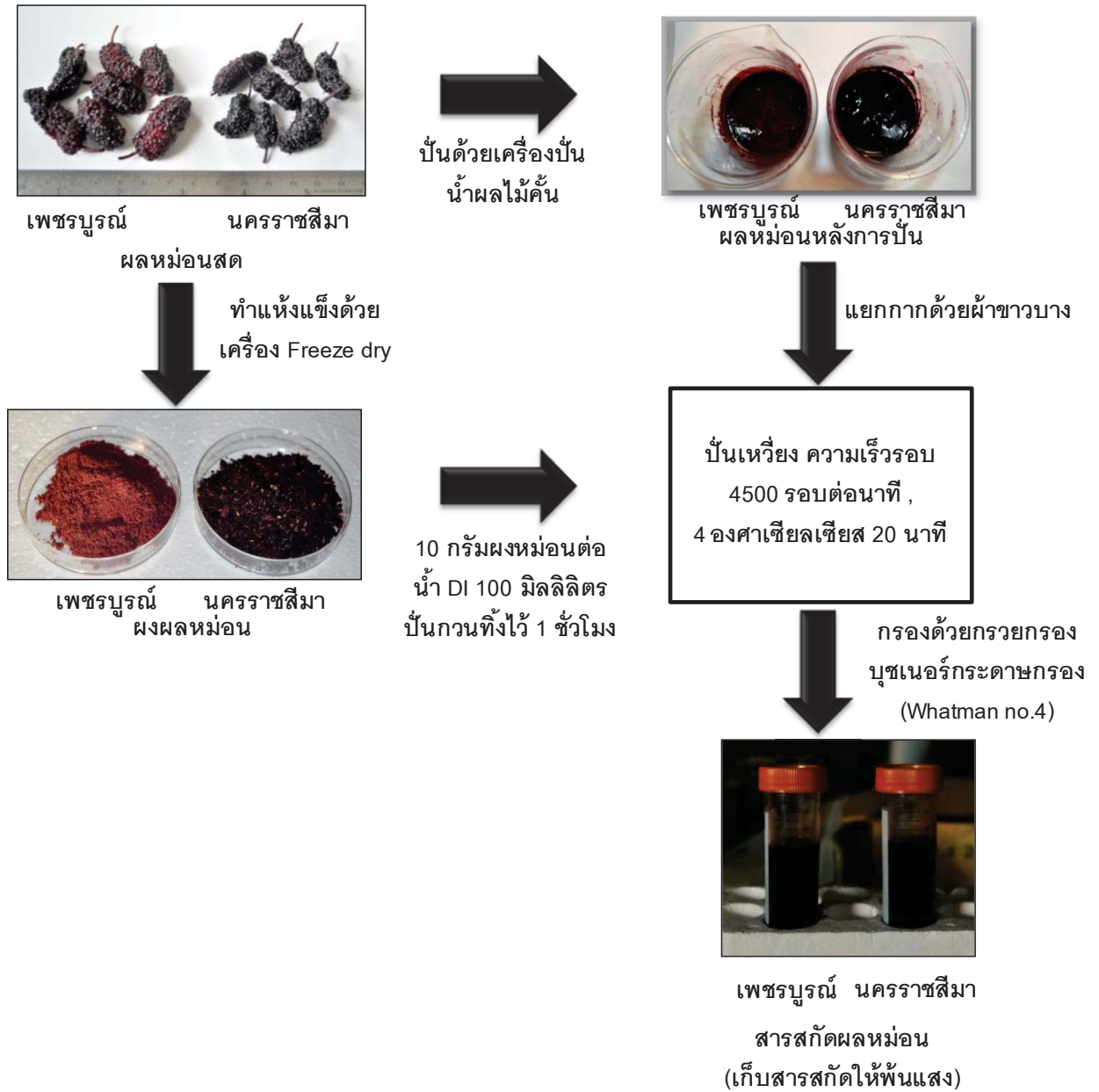
- น้ำคั้นผลหม่อนสด เตรียมการสกัดจากผลหม่อนทำได้โดยการนำผลหม่อนมาปั่นให้ละเอียดด้วยเครื่องปั่นน้ำผลไม้แล้วนำไปคั้นเพื่อแยกส่วนที่เป็นน้ำหม่อนออกจากกากผลหม่อนด้วยผ้าขาวบางและนำส่วนที่เป็นน้ำหม่อนมาแยกเอาส่วนใสอีกครั้งด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuged) ด้วยความเร็ว 4500 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที และกรองด้วยกระดาษกรอง (Whatmanno. 4) โดยใช้กรวยกรองบุชเนอร์ ซึ่งจะได้ลักษณะสารละลายเป็นสีม่วงเข้ม ดังรูปที่ 3.2

- ผงผลหม่อนสกัด จาก 2 แหล่ง คือ

1. ผลหม่อนที่ผ่านกระบวนการทำแห้งแข็ง (freeze dried) แล้วทำเป็นผงเพื่อการค้า จากไร่กำนันจุล จังหวัดเพชรบูรณ์

2. ผลหม่อน จากสถาบันหม่อนไหมแห่งชาติเฉลิมพระเกียรติ สมเด็จพระนางเจ้าสิริกิติ์ พระบรมราชินีนาถ ศูนย์ด่านเกวียน นครราชสีมา ซึ่งผู้วิจัยนำผลหม่อนสด มาแยกก้าน ใบ และสิ่งเจือปนออกก่อน แล้วนำไปแช่แข็งที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จากนั้นนำผลหม่อนที่ได้ผ่านกระบวนการทำแห้งแข็งแล้วนำบดละเอียดให้เป็นผงด้วยครกบดยา การสกัดผงผลหม่อนสกัดมีทำโดยละลายผงหม่อนด้วยอัตราส่วน 10 กรัมต่อ 100 มิลลิลิตรในน้ำปราศจากไอออน (deionized water, DI) และปั่นจนทิ้งไว้ประมาณ 1 ชั่วโมง จากนั้นนำไปแยกส่วนใสออกด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง ด้วยความเร็ว 4500 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 20 นาที และกรองด้วยกรวยกรองบุชเนอร์ ใช้กระดาษกรองอีกครั้ง ซึ่งจะได้สารละลายเป็นสีม่วงเข้ม ดังรูปที่ 3.2

การควบคุมคุณภาพ ทำโดยควบคุมการทดลองที่ใช้สารสกัดหม่อนทั้งหมดทำในที่มืดและหม่อนสกัดที่เตรียมทั้งสองวิธีนี้จะมีการใช้งานทันที ผลหม่อนสดที่รับมาจากไร่และผงผลหม่อนสกัดจะมีการเก็บไว้โดยการแช่แข็งที่ -20 องศาเซลเซียส ก่อนนำมาทดลอง และมีการทำการทดลองซ้ำอย่างน้อย 3 ซ้ำทุกการทดลอง



รูปที่ 3.2 ขั้นตอนการสกัดสารสกัดผลหม่นสดและผงผลหม่นที่ใช้ในการวิจัยนี้

3.4.2 การศึกษาลักษณะทางกายภาพของหม่อนสกัด

ก. ค่าพีเอช ด้วย pH meter (ยี่ห้อ mettle toledo)

ข. ร้อยละของของแข็ง (% solid weight) โดยนำผลหม่อนสดจากแหล่งปลูกทั้ง 2 แห่ง คือจังหวัดเพชรบูรณ์และนครราชสีมา โดยนำผลหม่อนไประเหิดเอาน้ำออกด้วยกระบวนการทำแห้งแข็ง (freeze dry) ซึ่งน้ำหนักของผลหม่อนสดก่อนการทำแห้งและหลังการทำแห้ง เพื่อหาปริมาณน้ำหนักของผลหม่อนแห้งและน้ำในผลหม่อนของผลหม่อนสดที่ระเหิดไปในกระบวนการทำแห้งแข็งก่อนที่จะนำไปทำเป็นผงผลหม่อนสกัดต่อไป

ค. ปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ทั้งหมด (Total Soluble Solid, TSS) ด้วยเครื่อง hand refractometer อ่านค่าเป็นองศาบริกซ์ ($^{\circ}$ Brix) ซึ่งเป็นอุปกรณ์ที่วัดค่าน้ำตาลในสารละลายโดยอาศัยหลักการหักเหของแสงซึ่งจะมีค่าเท่ากับความเข้มข้นของของแข็งที่ละลายน้ำได้ทั้งหมดในสารละลาย

ง. ปริมาณกรดที่ไทเทรตทั้งหมด ทำโดยให้สารสกัดทำปฏิกิริยากับต่างแก่ คือ โซเดียมไฮดรอกไซด์ (0.025 นอร์มัล) โดยนำน้ำสกัดที่กรองแล้วปริมาณ 1 มิลลิลิตร มาเจือจางด้วยน้ำปราศจากไอออน 40 มิลลิลิตร แล้วหยดฟีนอลทาลีน 1% ซึ่งใช้เป็นอินดิเคเตอร์ประมาณ 3-5 หยด แล้วนำไปไทเทรตด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.025 นอร์มัล จนกระทั่งค่าพีเอชของสารสกัดเท่ากับ 8.3 ซึ่งเป็นค่าพีเอชของจุดยุติของฟีนอลทาลีน (เนื่องจากสีของน้ำสกัดเป็นสีม่วงทำให้สังเกตการเปลี่ยนแปลงสีไม่ชัดเจน) แล้วคำนวณหาร้อยละของกรดซิตริกซึ่งเป็นกรดที่พบในผลหม่อน [Ercisli และ Orhan, 2007] ดังสมการที่ (3.1)

$$\% \text{Citric acid} = \frac{\text{ml NaOH} \times \text{N NaOH} \times \text{meq.wt of citric acid} \times 100}{\text{ml sample juice}} \dots\dots\dots (3.1)$$

โดย $\% \text{Citric acid} = \% \text{กรดซิตริก} (\% \text{น้ำหนักต่อปริมาตร})$

N NaOH = ความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (โมลต่อลิตร)

ml NaOH = ปริมาณของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ไทเทรต (มิลลิลิตร)

ml sample juice = ปริมาณสารสกัดที่ใช้ (มิลลิลิตร)

meq.wt of Citric acid = 0.064 [Ercisli และ Orhan, 2007]

จ. สี วัดด้วยเครื่องมือวัดสี colormeter (CE MINOLTA รุ่น CR-400, Japan) ในระบบ Hunter's scale ซึ่งจะวัดค่า L^* a^* b^* โดยที่ L^* แสดงค่าความสว่าง ซึ่งมีค่าเท่ากับ 0-100 L^* เท่ากับ 0 หมายถึง สีดำ และ L^* เท่ากับ 100 หมายถึง สีขาว โดยที่ความสว่างมากค่า L^* จะใกล้

100 แต่ถ้าความสว่างน้อย ค่าของ L^* ก็จะเข้าใกล้ 0 ค่า a^* และ b^* บอกทิศทางของสี เช่น $+a^*$ หมายถึงอยู่ในทิศของสีแดง $-a^*$ หมายถึงอยู่ในทิศของสีเขียว ถ้า a มีค่าเป็นบวกยิ่งค่ามาก แสดงว่าวัตถุมีสีแดงอยู่มาก แต่ถ้า a เป็นค่าลบ ยิ่งค่าติดลบมากแสดงว่าวัตถุมีสีเขียวมาก, $+b^*$ หมายถึงอยู่ในทิศของสีเหลือง และ $-b^*$ หมายถึงอยู่ในทิศของสีน้ำเงิน ถ้าค่า b ยิ่งค่าเป็นบวกมากแสดงว่าวัตถุจะมีสีเหลืองมาก แต่ถ้า b เป็นลบมากแสดงว่าวัตถุมีสีน้ำเงินมาก [Rommel และคณะ, 1990]

ฉ. ปริมาณสารแอนโทไซยานินทั้งหมดในสารสกัดผลหม่อน การวิเคราะห์หาปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมดในสารสกัดผลหม่อนด้วยวิธี pH-differential method ตามวิธีของ Durst และ Wrolstad (2005) ทำโดยเตรียมสารละลายโพแทสเซียมคลอไรด์บัฟเฟอร์ที่พีเอชเท่ากับ 1.0 (โพแทสเซียมคลอไรด์ 1.86 กรัมในน้ำปราศจากไอออน 980 มิลลิลิตร) วัดค่าพีเอชและปรับค่าด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้นจนได้พีเอช 1.0 และเตรียมสารละลายไซเดียมอะซิเตทบัฟเฟอร์ที่พีเอช 4.5 (ไซเดียมอะซิเตท 54.43 กรัมในน้ำปราศจากไอออน 960 มิลลิลิตร) วัดค่าพีเอชและปรับค่าด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้นจนได้พีเอชเท่ากับ 4.5 นำสารสกัดจากผลหม่อนมาเจือจางด้วยบัฟเฟอร์ทั้งสองเป็น 100 เท่า จากนั้นวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 และ 700 นาโนเมตร โดยมีสารละลายเปรียบเทียบ (blank) ซึ่งใช้น้ำ DI แล้วคำนวณหาปริมาณแอนโทไซยานินจากสมการ (3.2) และ (3.3)

$$A = (A_{520} - A_{700})_{pH\ 1.0} - (A_{520} - A_{700})_{pH\ 4.5} \dots\dots\dots(3.2)$$

$$\text{ปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมด (มิลลิกรัมต่อลิตร)} = \frac{(A \times MW \times DF \times 1000)}{\epsilon \times l} \dots\dots\dots(3.3)$$

โดยที่ A_{520} = ค่าการดูดกลืนแสงที่ 520 นาโนเมตร

A_{700} = ค่าการดูดกลืนแสงที่ 700 นาโนเมตร

MW = มวลโมเลกุลของ cyanindin-3-glucoside = 449.2 กรัมต่อโมล

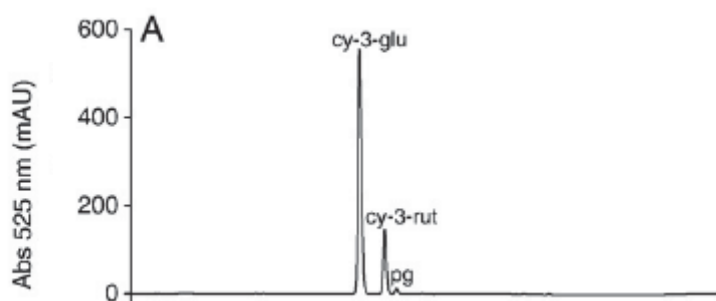
DF = dilution factor = 100

ϵ = molar absorptivity = 26,900

l = pathlength (cm)

การรายงานผล ปริมาณแอนโทไซยานิน มีหน่วยเป็น (น้ำหนักแอนโทไซยานินต่อน้ำหนักผลหม่อนแห้ง) วิธี pH-differential method นี้ทำเพื่อใช้ในงานวิจัยเป็นประจำเนื่องจากเป็นวิธีที่ง่าย รวดเร็ว และค่าใช้จ่ายไม่สูง โดยมีการเปรียบเทียบกับการวิเคราะห์ปริมาณแอนโทไซยานินที่

แม่นยำด้วย High Performance Liquid Chromatography (HPLC) โดยใช้คอลัมน์ C-18 ที่ อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส อัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที ค่าดูดกลืนแสง 530 นาโนเมตร และมีเฟสเคลื่อนที่คือ ตัวทำละลายชนิด A ประกอบด้วย 1.5% กรดฟอสฟอริก, 20% กรดอะซิติก, 25% อะซิโตนไตรไฮไดรอน และตัวทำละลายชนิด B คือ 1.5% กรดฟอสฟอริกในน้ำตามวิธีของ Bae และ Suh (2007) ใช้สารไซยานิดิน-3-กลูโคไซด์เป็นสารแอนโทไซยานินมาตรฐาน (Fujicco, ญี่ปุ่น, Code No.30637661) ซึ่งเป็นชนิดที่พบมากที่สุดในการสกัดหม่อน (รูปที่ 1.2) ตัวอย่างพืช ที่ปรากฏจากการวิเคราะห์แอนโทไซยานินในผลด้วยเครื่อง HPLC แสดงในรูปที่ 3.3 [Hassimotto และคณะ, 2008]



รูปที่ 3.3 High-performance liquid chromatography DAD chromatogram ของแอนโทไซยานินที่สกัดจาก wide mulberry (*Morus nigra* L.) (แสดงพีคของ cy-3-glu = cyanidin 3-glucoside, cy-3-rut = cyanidin 3-rutinoside, pg = pelargonidin derivate [Hassimotto และคณะ, 2008])

ซ. กิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant activity, IC_{50}) การวิเคราะห์กิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging assay ดัดแปลงตามวิธีของ Brand-William และคณะ (1995) เป็นการวิเคราะห์ความสามารถในด้านออกซิเดชัน ทำโดยเตรียมสารละลาย DPPH ซึ่งเป็นอนุมูลอิสระที่มีคุณสมบัติค่อนข้างเสถียรชนิดหนึ่งเมื่ออยู่ในรูปสารละลาย DPPH จะมีสีม่วง และสามารถดูดกลืนแสงได้ดีที่ความยาวคลื่น 518 นาโนเมตร โดย DPPH จะเกิดปฏิกิริยากับสารต้านอนุมูลอิสระที่ต้องการทดสอบ (AH) หรืออนุมูลอิสระ ($R\cdot$) ดังสมการที่ (3.4) และ (3.5) สารละลาย DPPH จะเปลี่ยนสีของสารละลายจากสีม่วงเป็นสีเหลือง ส่งผลให้ค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 518 นาโนเมตรลดลง



การทดลองทำโดยเตรียมสารละลาย DPPH ความเข้มข้น 0.08 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรในเอทานอลบริสุทธิ์ และเตรียมสารสกัดผลหม่อนโดยเจือจางเป็นลำดับเท่า (serial dilution) ความเข้มข้นละ 100 ไมโครลิตรจากนั้นเติมเอทานอล 100 ไมโครลิตรผสมให้เข้ากันด้วย vortex mixer แล้วเติมสารละลาย DPPH 50 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันและบ่มปฏิกิริยาทิ้งไว้ 30 นาที ในที่มีดที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 518 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง microplate reader และสารละลายที่ไม่ได้เติมสารละลาย DPPH เป็นสารละลายเปรียบเทียบ (blank) แล้วคำนวณหา antioxidant activity ในรูปของค่า half maximal inhibitory concentration หรือ IC₅₀ โดยสร้างกราฟระหว่าง % Inhibition DPPH กับความเข้มข้นของสารตัวอย่าง จากกราฟจะได้ค่าความเข้มข้นของสารตัวอย่างที่สามารถทำให้ความเข้มข้นของ DPPH ลดลง 50 เปอร์เซ็นต์ คือ ค่า IC₅₀ ตามสมการ (3.6)

$$\% \text{Inhibition DPPH} = \left(\frac{OD_{control} - OD_{sample}}{OD_{control}} \right) \times 100 \dots\dots\dots (3.6)$$

โดยที่ OD_{control} = ค่าการดูดกลืนแสงของตัวควบคุม

OD_{sample} = ค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่าง

การรายงานผลกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระมีหน่วยเป็นร้อยละโดยปริมาตรของสารสกัดถ้าค่า IC₅₀ มีค่าน้อยแสดงถึงประสิทธิภาพในการยับยั้งอนุมูลอิสระที่ดีที่สุดคือ ใช้ความเข้มข้นของตัวอย่างที่ความเข้มข้นต่ำก็สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระได้ 50% จากเริ่มต้น

ฉ. ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ด้วย วิธี Dinitrosalicylic Colorimetric Method (DNS method) ดัดแปลงตามวิธีของ Lorenz Miller (1959) วิธีการนี้ใช้ทดสอบหมู่คาร์บอนิล (carbonyl group, C=O) ในน้ำตาลรีดิวซ์ โดยสาร 3, 5 Dinitrosalicylic Acid (DNS) เป็นสารประกอบอะโรมาติกสามารถทำปฏิกิริยากับน้ำตาลรีดิวซ์ (reducing sugars) และทำให้เกิดเป็น 3-amino-5-nitrosalicylic acid ภายใต้สภาวะความเป็นด่าง ซึ่งสามารถดูดกลืนแสงได้ดีในช่วง 520-575 นาโนเมตร สามารถทำได้โดยเตรียมสารละลาย dinitrosalicylic acid 1% ดังนี้เตรียมสาร

DNS 1 กรัมละลายในน้ำกลั่น 25 มิลลิลิตร และเตรียมสาร NaOH 1.6 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 20 มิลลิลิตรจากนั้นเติมสารละลาย NaOH ลงในสารละลาย DNS ผสมให้เข้ากันแล้ว นำไปให้ความร้อนในอ่างควบคุมอุณหภูมิ จนกระทั่งสารละลายใสแล้วค่อยๆ เติม potassium sodium tartrate 30 กรัม ลงในสารละลายผสมที่ใสแล้วที่ละน้อยจนครบจากนั้นเติม sodium sulphite 0.05 กรัม และเติมน้ำกลั่นเพื่อปรับให้ปริมาตรสุดท้ายเป็น 100 มิลลิลิตร เก็บในขวดสีชาไว้ที่อุณหภูมิห้อง การทดลองใช้กลูโคสเป็นสารมาตรฐาน โดยเตรียม stock solution ของสารละลายกลูโคสในน้ำกลั่นความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร นำมาเจือจางให้ได้ความเข้มข้นตั้งแต่ 0-1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ขั้นตอนการทดสอบนำสารละลายตัวอย่าง (unknow) ที่ต้องการวิเคราะห์ปริมาณกลูโคส 500 ไมโครลิตรแล้วเติมสารละลาย DNS ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ในหลอดทดลองนำไปต้มในน้ำเดือดอุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 นาทีจากนั้นนำมาแช่ในอ่างน้ำเย็นทันทีจากนั้นเติมน้ำกลั่นปริมาตร 10 มิลลิลิตรลงในหลอดทดลองผสมสารให้เข้ากันจึงนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร ด้วยเครื่องวัดการดูดกลืนแสงโดยใช้น้ำกลั่นเป็น blank สารมาตรฐานทำเช่นเดียวกัน เขียนกราฟมาตรฐานระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ A_{520} (แกน Y) และความเข้มข้นของสารละลายกลูโคสมาตรฐาน (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) (แกน X) คำนวณความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์ ในสารละลายตัวอย่างเป็น มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรจากกราฟมาตรฐาน

3.4.3 การศึกษาความคงตัวในสารสกัดผลหม่อน

นำสารสกัดผลหม่อนไปให้ความร้อน ในสภาวะไม่มีแสงแบบต่างๆ ต่อไปนี้

ก. ที่อุณหภูมิ 4, 40, 70 และ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 ชั่วโมง

ข. ทำปฏิกิริยาตามมาตรฐานอุตสาหกรรมอาหารโดยการใช้ความร้อน 2 แบบคือ กระบวนการพาสเจอร์ไรส์ และการสเตอริไลส์ ได้แก่ พาสเจอร์ไรส์ แบบ LTLT (60 องศาเซลเซียส ใช้เวลา 30 นาที), พาสเจอร์ไรส์ แบบ HTST (อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เวลา 15 วินาที) และ สเตอริไลส์ (อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เวลา 20 นาที) [<http://www.fda.moph.go.th/>]

ค. สภาวะเร่ง แบบ freeze-thaw cycling โดยนำตัวอย่างไปแช่แข็งที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 46 ชั่วโมงจากนั้นนำมาละลายที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาทีแล้วนำไปไว้ในอ่างควบคุมอุณหภูมิที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1.5 ชั่วโมง ทำซ้ำจนครบ 4 รอบ [Regan และ Mulvihill, 2010]

น้ำสกัดผลหม่อนที่ผ่านกระบวนการเหล่านี้แล้วถูกนำมาวิเคราะห์หาปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมดด้วย วิธี pH differential ตามรายละเอียดในข้อ 3.4.2) ฉ.

3.4.4 การเตรียมเซลล์ต้นกำเนิดไขกระดูก (Mesenchymal Stem Cells, MSCs)

เซลล์ต้นกำเนิดไขกระดูกถูกสกัดจากกระดูกต้นขาหลังของหนูแรพพันธุ์วิสต์ต้า (เพศเมีย อายุ 3 สัปดาห์) ซึ่งได้จากศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล) ตามวิธีของ Ratanavaraporn J. และคณะ (2009) โดยผ่าเอากระดูกต้นขาหลังของหนูตั้งแต่บริเวณสะโพก เฉพาะเนื้อเยื่ออื่นออกให้สะอาดตัดที่ปลายทั้งสองข้างของกระดูกจะพบช่องไขกระดูก ใช้เข็มเบอร์ 26 ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ 1 มิลลิลิตร (alpha-modified eagle medium: α -MEM ที่มี 15 % FBS และ 50 U/ml penicillin streptomycin) ซะล้างผ่านช่องไขกระดูกลงหลอดขนาด 1 มิลลิลิตร ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วทำซ้ำหลายครั้งจนกระทั่งก้อนไขกระดูกหลุดออกหมด ทำสารแขวนลอยให้เป็นเนื้อเดียวกันโดยใช้เข็มฉีดพ่นหลายๆ ครั้ง จากนั้นดูดใส่จานเลี้ยงเซลล์ที่ใส่อาหาร 3 มิลลิลิตร ไว้เรียบร้อยแล้ว ทำการเพาะเซลล์ในสภาวะ 5 % CO₂ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ในวันที่ 4 หลังจากการเพาะเซลล์ เพื่อกำจัดเซลล์เม็ดเลือดที่ไม่เกาะจานเลี้ยงเซลล์ จากนั้นเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ทุก 3 วัน ในวันที่ 7-10 หลังการเพาะเซลล์ สามารถทำการแบ่งเซลล์ (subculture) ได้ โดยใช้สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 100 มิลลิโมลลาร์ (pH 7.4) ที่มี 0.25 % โดยมวล trypsin และ 0.02 % โดยมวล EDTA อบไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 นาที ขยายจำนวนเซลล์บนจานเพาะเลี้ยงเซลล์ชนิดพอลิสไตรีนเพาะเลี้ยงให้จำนวนเซลล์มีความหนาแน่นประมาณ ร้อยละ 90 (4 วัน) สำหรับการทดลองใช้เซลล์ใน passage ที่ 2-3 เท่านั้น เพื่อให้มั่นใจว่าเซลล์ไม่มีการเปลี่ยนแปลง

3.4.5 การศึกษาผลของสารสกัดผลหม่อนต่อการเจริญเติบโตของเซลล์

เพาะเซลล์ลงบนจานเพาะเลี้ยงให้มีจำนวนเซลล์ 2×10^4 เซลล์ต่อหลุมใน 24 well-plate เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ปกติ (Normal Medium, NM) ประกอบด้วย α -MEM, 15% FBS , 50 U/ml penicillin streptomycin ในตู้บ่ม 5% CO₂ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส โดยเติมสารมาตรฐาน ไซยานิดิน-3-กลูโคไซด์ (C3G) และสารสกัดจากผลหม่อนให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 1 % โดยปริมาตรของปริมาตรอาหารเลี้ยงเซลล์ทั้งหมดโดยเปลี่ยนอาหารทุกๆ 3 วัน(มีการเติมสารสกัดหม่อนเพิ่มเพื่อให้ความเข้มข้นคงที่เมื่อมีการเปลี่ยนอาหาร) ตรวจสอบการยึดเกาะของเซลล์ (attachment) ที่เวลา 6 ชั่วโมง และเจริญเติบโตของเซลล์ (proliferation) ที่เวลา 1, 2, 3, 5 และ 7 วัน กลุ่มการทดลองแบ่งเป็น 6 กลุ่มได้ดังนี้

กลุ่มที่	ตัวอย่าง ที่ใช้	สารสกัดหม่อน (mg/ml)	สารไซยานิดิน-3-กลูโคไซด์ (μ M)	หมายเหตุ
1	NM	-	-	อาหารเลี้ยงเซลล์ปกติ เพื่อเป็น positive control
2	C3G50	-	50	-
3	C3G100	-	100	-
4	M50	2.5	-	ความเข้มข้นเทียบเท่า C3G 50 ไมโครโมลลาร์
5	M100	5	-	ความเข้มข้นเทียบเท่า C3G 100 ไมโครโมลลาร์
6	Zn	-	-	เติม Zn acetate 20 ppm เพื่อ เป็น negative control

ก. จำนวนเซลล์ ด้วยวิธี MTT assay หรือ (3-(4, 5-Dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide) assay [Liu และคณะ, 2004] MTT มีโครงสร้างเป็นวงแหวนของเกลือ tetrazolium มีสีเหลือง โดยที่ MTT ที่ถูกละลายในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ไม่มี phenol red จะถูกเปลี่ยนเป็นผลึก formazan สีม่วงที่เนื่องจากการถูกทำลายวงแหวน tetrazolium ด้วยเอนไซม์ dehydrogenase จากไมโทคอนเดรียที่อยู่ในเซลล์ที่ยังมีชีวิตอยู่ผลึกสีม่วงที่เกิดขึ้น ภายในเซลล์ไม่สามารถแพร่ผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ได้แต่สามารถละลายได้โดยใช้ตัวทำละลายเช่น dimethyl sulfoxide (DMSO) สารละลายสีม่วงที่ได้จะถูกนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงในช่วงความยาวคลื่น 570 นาโนเมตรเพื่อหาปริมาณผลึก formazan ที่ถูกละลายออกมามีค่าแปรผันโดยตรง กับปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตอยู่ แสดงกราฟมาตรฐานในภาคผนวก ข และ คำนวณหาอัตราการเจริญเติบโตของเซลล์ (growth rate, μ) ดังสมการ (3.7) ถึง (3.12) และเวลาการแบ่งตัวทวีคูณคือระยะเวลาที่เซลล์เพิ่มจำนวนขึ้นเป็น 2 เท่า (Population Doubling Time, PDT) ดังสมการ (3.9), (3.11) และ (3.12) โดยการคำนวณทำในช่วง log phase (exponential growth phase) [Vunjak-Novakovic และคณะ, 2006] ดังนี้

$$\text{อัตราการเจริญเติบโตของเซลล์ } \mu \text{ (ต่อชั่วโมง)} \quad \mu = \frac{1}{x} \frac{dx}{dt} \dots\dots\dots (3.7)$$

$$\mu \int_{t_1}^{t_2} dt = \int_{x_1}^{x_2} \frac{1}{x} dx \dots\dots\dots (3.8)$$

$$\mu(t_2 - t_1) = \ln X_2 - \ln X_1 \dots\dots\dots (3.9)$$

$$\mu = \frac{\ln X_2 - \ln X_1}{(t_2 - t_1)} \dots\dots\dots (3.10)$$

โดย X_1 คือจำนวนเซลล์ที่เวลา t_1

X_2 คือจำนวนเซลล์ที่เวลา t_2

เวลาแบ่งตัวที่วัดได้ t (ชั่วโมง) โดยที่ $t = t_2 - t_1$ และ $X_2 = 2X_1$

$$\text{จากสมการ (3.9)} \quad \mu t = \ln(2X_1) - \ln X_1 \dots\dots\dots (3.11)$$

$$t = \frac{\ln 2}{\mu} \dots\dots\dots (3.12)$$

ข. รูปร่าง (morphology) ของเซลล์โดยการถ่ายภาพด้วยกล้องจุลทรรศน์ (ยี่ห้อ Nikon eclipse TS100) ศึกษาลักษณะรูปร่าง และการยึดเกาะของเซลล์ที่เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 6 ชั่วโมง, 1 วัน, 2 วัน, 3 วัน, 5 วัน และ 7 วัน

3.4.6 การศึกษาผลของสารสกัดผลหม่อนต่อการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์กระดูก

การศึกษาทำโดยการเพาะเซลล์ลงบนจานเพาะเลี้ยงให้มีจำนวนเซลล์ 2×10^4 เซลล์ต่อชาม² ใน 24 well-plate เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์คือ

1. Normal Medium (NM) : ประกอบด้วย α -MEM, 15% FBS , 50 U/ml penicillin streptomycin

2. Osteogenic Medium (OM) : ประกอบด้วย α -MEM, 10% FBS, 50 U/ml penicillin streptomycin, 50 μ g/ml, L-ascorbic, 10^{-6} M dexamethasone และ 1 M β -glycerophosphate

เพาะเลี้ยงเซลล์ในตู้บ่ม 5% CO₂ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสโดยเติมสารมาตรฐาน ไชยานินดีน-3- กลูโคไซด์ (C3G) และสารสกัดจากผลหม่อนให้มีความเข้มข้นเท่ากับร้อยละ 1 โดยปริมาตรของปริมาตรอาหารเลี้ยงเซลล์ทั้งหมดโดยเปลี่ยนอาหารทุกๆ 3 วัน เพาะเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 4 สัปดาห์ (มีการเติมสารสกัดหม่อนเพิ่มเพื่อให้มีความเข้มข้นคงที่เมื่อมีการเปลี่ยนอาหาร) ซึ่งสามารถแบ่งกลุ่มการทดลองเป็น 6 กลุ่มได้ดังนี้

กลุ่มที่	ตัวอย่าง	สารสกัดหม่อน (mg/ml)	สารไชนานินดีน-3-กลูโคไซด์ (μ M)	หมายเหตุ
1	NM	-	-	อาหารเลี้ยงเซลล์ปกติ เพื่อเป็น negative control
2	C3G50	-	50	-
3	C3G100	-	100	-
4	M50	2.5	-	ความเข้มข้นเทียบเท่า C3G 50 ไมโครโมลลาร์
5	M100	5	-	ความเข้มข้นเทียบเท่า C3G 100 ไมโครโมลลาร์
6	OM	-	-	อาหารเลี้ยงเซลล์ OM เพื่อเป็น positive control

การประมาณการเปลี่ยนแปลงไปเป็นกระดูกทำที่ 7, 14, 21 และ 28 วัน โดยวิเคราะห์สัญญาณการเปลี่ยนแปลงเป็นกระดูกด้วยวิธีต่อไปนี้

ก. กิจกรรมของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส (Alkaline Phosphatase, ALP) ซึ่งเป็น early marker ของการเปลี่ยนแปลงเป็นเซลล์กระดูก วิเคราะห์เอนไซม์ ALP ภายในเซลล์ ทำโดยทำให้เซลล์แตกโดยใช้ Sodium Dodecyl Sulfate (SDS) ด้วยการเติมสาร SDS lysis buffer 1 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้ววัดกิจกรรมของเอนไซม์ใน cell lysate นั้นด้วยสาร p-nitrophenyl phosphatase ซึ่งเป็นซับสเตรทของเอนไซม์โดยการเปิดสารมาตรฐานและสารตัวอย่างปริมาตร 20 ไมโครลิตรใส่ลงในภาควัฒนเลี้ยงเซลล์ขนาด 96 หลุม แล้วเติม p-nitrophenyl phosphatase 100 ไมโครลิตร บ่มไว้ที่ 37 องศาเซลเซียส 15 นาที หยุดปฏิกิริยาด้วย สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 0.02 นอร์มัลปริมาตร 80 ไมโครลิตร และใช้สาร

p-nitrophenol เจือจางในน้ำปราศจากไอออนความเข้มข้น 10, 5, 2.5, 1.25, 0.62, 0.31, 0.16 และ 0.08 มิลลิโมลลาร์เป็นสารมาตรฐานจากนั้นวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 405 นาโนเมตร [Takahashi Y. และคณะ, 2005] รายงานผล ALP/จำนวนเซลล์ ทุกๆ สัปดาห์ เป็นเวลา 4 สัปดาห์

ข. ปริมาณการสะสมแคลเซียม ซึ่งเป็น late marker ของการเปลี่ยนแปลงเป็นเซลล์กระดูก วิเคราะห์โดยการเติมกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 1 โมลลาร์ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงใน cell lysate ปริมาตร 100 ไมโครลิตร แล้วนำไปปฏิบัติที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมงเพื่อ กรดไฮโดรคลอริกจะช่วยย่อยแคลเซียมออกมา หลังจากนั้น ปิเปตสารตัวอย่างมา 10 ไมโครลิตร ใส่ในภาดเลี้ยงเซลล์ขนาด 48 หลุมเติมสารละลาย ethanolamine buffer ความเข้มข้น 0.88 โมลลาร์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร และ O-cresolphthalein complex substrate (OCPC) ความเข้มข้น 0.63 มิลลิโมลลาร์ในกรดไฮโดรคลอริกปริมาตร 100 ไมโครลิตร และใช้สารละลาย แคลเซียมคาร์บอเนตความเข้มข้น 1 โมลลาร์ในกรดไฮโดรคลอริก โดยมีปริมาณแคลเซียมความเข้มข้น 20, 10, 5, 2.5, 1.25, 0.62, 0.31 และ 0.16 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นสารมาตรฐาน แคลเซียมจะทำปฏิกิริยากับ OCPC ให้สารสีม่วง แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร [Takahashi และคณะ, 2005] รายงานผลปริมาณแคลเซียม/จำนวนเซลล์ ทุกๆ สัปดาห์เป็นเวลา 4 สัปดาห์

ค. จำนวนเซลล์ ด้วยวิธี DNA assay เป็นวิธีประมาณการเปลี่ยนแปลงของประชากรเซลล์ ด้วยการใส่สารเรืองแสงที่มีคุณสมบัติจับจำเพาะกับ DNA เช่น bisbenzidine (Hoechst) มีมวล โมเลกุลขนาด 533.88 และย้อมบริเวณเบส A-T ให้เรืองแสงได้ภายใต้แสงฟลูออเรสเซนซ์ ที่มีการ กระตุ้นด้วยความถี่ 340-380 nm และปลดปล่อยพลังงานแสงที่ 430-450 nm ทำได้โดยเตรียมสาร มาตรฐานโดยใช้เซลล์เจือจางด้วย SDS ให้มีความเข้มข้น 1.56×10^4 , 3.12×10^4 , 6.25×10^4 , 1.25×10^5 , 2.5×10^5 , 5×10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร และ cell lysate ของตัวอย่างบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมงจากนั้นนำ cell lysate ที่ได้เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส เพื่อให้เซลล์แตกและปล่อย DNA ออกมา การนำตัวอย่างไปวัดให้นำ cell lysate มาละลายที่ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสก่อน และเตรียมสารละลาย Hoechst 33258 ซึ่งเตรียมได้โดยนำ Hoechst 33258 ปริมาตร 20 มิลลิลิตร, น้ำปราศจากไอออน 19 มิลลิลิตร และ SSC 1 มิลลิลิตร ผสมรวมกัน จากนั้นปิเปตสารละลายของสารมาตรฐานและตัวอย่างที่นำไปวัดปริมาณ DNA ปริมาตร 100 ไมโครลิตรใส่ในภาดสีดำขนาด 96 หลุม แล้วเติมสารละลาย Hoechst 33258 ปริมาตร 100 ไมโครลิตร นำไปวัด fluorescence intensity ที่ 355 นาโนเมตร (excitation) และ 460 นาโนเมตร (emission) ด้วยเครื่องสเปกโตรฟลูออโรมิเตอร์ที่ [Takahashi Y. และคณะ 2005] แสดงกราฟมาตรฐานในภาคผนวก ข

3.4.8 ปัญหาทางจริยธรรมในการทดลอง

การทดสอบที่มีการใช้สิ่งมีชีวิตจะมีการเสนอแผนงานวิจัยและได้รับการอนุมัติจากคณะกรรมการจริยธรรมแห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยก่อนการดำเนินการ โดยผู้วิจัยได้ปฏิบัติตามข้อกำหนด มาตรฐานการดูแลและใช้สัตว์ทดลองแห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อย่างเคร่งครัด

3.4.9 การใช้สถิติในการวางแผนและวิเคราะห์ผลการทดลอง

ในงานวิจัยนี้เปรียบเทียบค่าความแตกต่างของข้อมูล โดยเก็บตัวอย่างแบบสุ่ม 3 ซ้ำนำมาหาค่าเฉลี่ย และค่าการเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Standard Deviation, SD) เพื่อศึกษาว่าค่าที่ได้มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญหรือไม่ โดยใช้การวิเคราะห์ทางสถิติแบบที (Anova) ด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์มินิแทบ (Minitab system for Windows version 14, USA) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($p\text{-value} < 0.05$)

บทที่ 4

ผลการทดลองและวิเคราะห์ผลการทดลอง

4.1 ลักษณะสมบัติของสารสกัดผลหม่อน

ผลหม่อนสายพันธุ์เชียงใหม่ (*Morus alba L.*) ที่นำมาใช้ในการศึกษานั้นมาจากแหล่งที่มาในประเทศไทยด้วยกัน 2 แหล่งคือ จากไร่ก้านจูล จังหวัดเพชรบูรณ์ และจากสถาบันหม่อนไหมแห่งชาติเฉลิมพระเกียรติ สมเด็จพระนางเจ้าสิริกิติ์พระบรมราชินีนาถ ศูนย์ด้านเกวียน จังหวัดนครราชสีมา ซึ่งมีลักษณะโดยทั่วไปดังรูปที่ 4.1



รูปที่ 4.1 ลักษณะทั่วไปของผลหม่อนสายพันธุ์เชียงใหม่จากแหล่งปลูกจังหวัด

(a) เพชรบูรณ์ (b) นครราชสีมา

ผลหม่อนจากแหล่งจังหวัดเพชรบูรณ์จะมีลักษณะผลที่ใหญ่ มีขนน้อย ส่วนผลหม่อนจากแหล่งจังหวัดนครราชสีมาจะมีผลที่เล็กกว่า และมีขนเยอะแต่ลักษณะโดยรวมคล้ายคลึงกันคือผลสีม่วงเข้ม ผิวขรุขระ แต่จากการศึกษาลักษณะทางกายภาพของผลหม่อนดังตารางที่ 4.1 พบว่าน้ำหนักเฉลี่ยต่อผลของผลหม่อนจากแหล่งจังหวัดเพชรบูรณ์เท่ากับ 2.53 ± 0.49 กรัม ซึ่งมีค่าสูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับผลหม่อนที่ปลูกในนครราชสีมาที่มีน้ำหนักเฉลี่ย 1.46 ± 0.51 กรัม ผลหม่อนจากไร่ก้านจูล จังหวัดเพชรบูรณ์นั้นได้มีการควบคุมและดูแลการผลิตผลหม่อนเป็นอย่างดีเพื่อให้ได้คุณภาพที่สูงในการจำหน่ายเชิงการค้า นอกจากผลหม่อนสดแล้วยังสามารถนำผลหม่อนไปผ่านกระบวนการทำแห้งแบบเยือกแข็ง (freeze dried) เพื่อง่ายต่อการเก็บรักษาและ

สามารถยืดอายุของผลหม่อนได้นานพบว่าผลหม่อนที่ผ่านกระบวนการทำแห้งแบบเยือกแข็งจาก เพชรบูรณ์มีร้อยละของน้ำหนักแห้งเท่ากับ 14.27 ± 0.35 และจากนครราชสีมาเท่ากับ 22.19 ± 0.17 ซึ่งแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าผลหม่อนที่ได้จากเพชรบูรณ์ มีปริมาณน้ำในผล หม่อนมากกว่าผลหม่อนจากนครราชสีมา คือมีปริมาณน้ำประมาณร้อยละ 85.8 ซึ่งผลหม่อนจาก นครราชสีมามีน้ำเป็นองค์ประกอบประมาณร้อยละ 78.8

ตาราง 4.1 สมบัติทางกายภาพของผลหม่อนสด

แหล่งของผลหม่อน	น้ำหนักเฉลี่ยต่อ ผล(กรัม)	น้ำหนักแห้งของผลหม่อน (ร้อยละโดยน้ำหนัก)	ปริมาณน้ำในผล (ร้อยละโดยน้ำหนัก)
สายพันธุ์เชียงใหม่			
เพชรบูรณ์ (<i>Morus alba</i>)	2.53 ± 0.49^a	14.27 ± 0.35^c	85.72 ± 0.35^e
นครราชสีมา (<i>Morus alba</i>)	1.46 ± 0.51^b	22.19 ± 0.17^d	77.82 ± 0.17^f

^{a-f} แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ของผลหม่อนแหล่งต่างๆ

เมื่อนำผลหม่อนสดจาก 2 แหล่งนำมาผ่านกระบวนการสกัดโดยการปั่นด้วยเครื่องปั่นน้ำผลไม้ และแยกกากได้ส่วนใสของสารสกัดผลหม่อนสด และผลหม่อนจากแต่ละแหล่งนำมาผ่าน กระบวนการทำแห้งแบบเยือกแข็ง แล้วนำมาสกัดด้วยน้ำปราศจากไอออน ได้เป็นสารสกัดผงผล หม่อนสกัดแล้วนำมาศึกษาคุณลักษณะของสารสกัดที่ได้ทั้งทางกายภาพและเคมี ดังนี้

4.1.1 ลักษณะทางกายภาพของสารสกัดผลหม่อนสดและผงผลหม่อน

ลักษณะทางกายภาพของสารสกัดหม่อนทั้งของสารสกัดผลหม่อนสดและผงผลหม่อน สกัดดังแสดงในตารางที่ 4.2 จะเห็นว่าสารสกัดหม่อนที่ได้มีค่าความหนาแน่นใกล้เคียงกับความ หนาแน่นของน้ำซึ่งมีค่าประมาณ 1.0 กรัมต่อมิลลิลิตร ค่าความหนาแน่นของสารสกัดหม่อนที่ได้ อยู่ในช่วง 0.971 ± 0.006 ถึง 1.012 ± 0.004 กรัมต่อมิลลิลิตร แสดงถึงความเป็นเนื้อเดียวกันของสาร สกัดที่สามารถสกัดสารสำคัญที่ละลายในน้ำได้เท่านั้น จากนั้นเมื่อพิจารณาค่าความเป็นกรด ต่าง หรือค่าพีเอช พบว่าสารสกัดหม่อนมีค่าเป็นกรดเล็กน้อยประมาณ 3.67 ถึง 4.31 เมื่อ

เปรียบเทียบระหว่างสารสกัดจากผลหม่อนสดกับผงผลหม่อนสด พบว่าสารสกัดที่ได้จากผงผลหม่อนสดละลายในน้ำปราศจากไอออนมีค่าพีเอชสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ คือ 3.67 ± 0.02 เป็น 4.04 ± 0.01 จากแหล่งจังหวัดเพชรบูรณ์ และพีเอชเท่ากับ 4.08 ± 0.02 เป็น 4.31 ± 0.01 สำหรับแหล่งจังหวัดนครราชสีมา นอกจากนี้ยังมีการหาค่าปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ทั้งหมดในสารสกัดผลหม่อนซึ่งแสดงค่าเป็น % Brix สารสกัดผลหม่อนสดจากแหล่งจังหวัดนครราชสีมาปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำทั้งหมดเท่ากับ 15.9 ± 0.08 % Brix และสารสกัดผลหม่อนสดจากแหล่งจังหวัดเพชรบูรณ์ซึ่งมีค่าเท่ากับ 9.98 ± 0.12 % Brix ผลหม่อนที่ได้จากแหล่งนครราชสีมาปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้สูงกว่าแหล่งจังหวัดเพชรบูรณ์ เนื่องจากผลหม่อนจังหวัดนครราชสีมาปริมาณน้ำเป็นองค์ประกอบต่ำกว่าผลหม่อนจากเพชรบูรณ์ และในสารสกัดผงผลหม่อนพบว่าผลหม่อนจากทั้ง 2 แหล่งมีค่าปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ สารสกัดผงผลหม่อนจากแหล่งจังหวัดเพชรบูรณ์เท่ากับ 7.68 ± 0.17 % Brix และ แหล่งนครราชสีมาเท่ากับ 7.70 ± 0.14 % Brix จากค่า % Brix ของผงผลหม่อนสดมีค่าใกล้เคียงกันเนื่องจากเกิดจากการเอาผงผลหม่อนปริมาณเท่ากันมาสกัดในน้ำในสัดส่วนที่เท่ากัน อีกทั้งค่าปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้สอดคล้องกับค่าร้อยละของน้ำหนักแห้งของสารสกัด สารสกัดผลหม่อนสดจากแหล่งเพชรบูรณ์มีค่าร้อยละของน้ำหนักแห้งเท่ากับ 11.19 ± 0.03 และนครราชสีมาร้อยละของน้ำหนักแห้งเท่ากับ 17.47 ± 0.03 สำหรับสารสกัดผงผลหม่อนพบว่าร้อยละของน้ำหนักแห้งเท่ากับ 6.59 ± 0.99 และ 7.48 ± 0.04 จากแหล่งเพชรบูรณ์และนครราชสีมาตามลำดับ

ตารางที่ 4.2 สมบัติทางกายภาพของสารสกัดหม่อน

ชนิดสารสกัด	แหล่งผลหม่อน	ความหนาแน่น (กรัมต่อมิลลิลิตร)	pH	Total soluble solids (% Brix)	ร้อยละของน้ำหนักแห้ง
ผลหม่อนสด	เพชรบูรณ์	$0.986 \pm 0.001^{a,b}$	3.67 ± 0.02^c	9.98 ± 0.12^f	11.19 ± 0.03^i
	นครราชสีมา	1.012 ± 0.004^b	4.08 ± 0.02^d	15.9 ± 0.08^g	17.47 ± 0.03^j
ผงผลหม่อน	เพชรบูรณ์	$0.988 \pm 0.016^{a,b}$	4.04 ± 0.01^c	7.68 ± 0.17^h	6.59 ± 0.99^k
	นครราชสีมา	0.971 ± 0.006^a	4.31 ± 0.01^e	7.70 ± 0.14^h	7.48 ± 0.0^k

^{a-k} แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ของสารสกัดผลหม่อนชนิดต่างๆ

การวัดสีของสารสกัดผลหม่อนทั้งสารสกัดผลหม่อนสดและผงผลหม่อนสกัด โดยใช้เครื่องมือ colorimeter รายงานผลเป็นค่า L^* , a^* และค่า b^* โดยค่า L^* แสดงค่าความสว่างถ้าใกล้ 100 แสดงว่าสว่างมาก ค่า a^* แสดงค่าสีแดงกับสีเขียวถ้าค่า a^* มีค่าเป็นบวกแสดงว่าวัตถุมีสีแดง และถ้าค่า a^* มีค่าเป็นลบแสดงว่าวัตถุมีสีเขียว ค่า b^* แสดงค่าสีเหลืองกับสีน้ำเงินถ้าค่า b^* มีค่าเป็นบวกแสดงว่าวัตถุมีสีเหลือง และถ้าค่า b^* มีค่าเป็นลบแสดงว่าวัตถุมีสีน้ำเงิน ดังตารางที่ 4.3 พบว่าสารสกัดหม่อนมีค่า L^* ต่ำกว่า 100 มากแสดงถึงสีของสารสกัดมีความสว่างต่ำเมื่อเทียบกับระหว่างสารสกัดผลหม่อนสดกับผงผลหม่อนสกัดพบว่าสารสกัดที่ได้จากผลหม่อนสดจะมีค่าความสว่างสูงกว่าเล็กน้อย แต่เมื่อเปรียบเทียบสารสกัดผลหม่อนสดจาก 2 แหล่งมีความสว่างไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อพิจารณา ค่า a^* ของสารสกัดผลหม่อนที่ได้มีค่าเป็นบวกแสดงถึงลักษณะสารสกัดค่อนข้างจะเป็นสีแดง ซึ่งสารสกัดหม่อนจากแหล่งเพชรบูรณ์มีสีแดงมากกว่า นครราชสีมา ในส่วนของค่า b^* ซึ่งมีค่าติดลบมากแสดงว่าสารสกัดที่ได้จะมีสีในโทนสีน้ำเงิน สารสกัดหม่อนสดมีสีน้ำเงินมากกว่าผงผลหม่อนสกัด และสารสกัดจากแหล่งนครราชสีมา มีสีน้ำเงินมากกว่าเพชรบูรณ์ จากงานวิจัยของ Aramwit และคณะ (2010) พบว่าสีของผลลูกหม่อนมีผลทำให้คุณลักษณะทางเคมีและกายภาพของหม่อนแตกต่างกัน รวมถึงปริมาณแอนโทไซยานินและฤทธิ์ของการต้านอนุมูลอิสระด้วย ดังนั้นในการนำผลหม่อนมาศึกษานั้น สีเป็นสิ่งสำคัญที่ใช้ในการควบคุมสมบัติทางเคมีและกายภาพได้จึงควรเก็บผลหม่อนที่สีลักษณะสีเดียวกัน ของในแต่ละสายพันธุ์เนื่องจากสีแสดงถึงการสุกของลูกหม่อน ดังนั้นสีเข้มกว่าของผลหม่อนนครราชสีมาแสดงว่าสุกมากกว่าเนื่องจากมีน้ำตาลมากกว่า และน้ำตาลเป็นสารตั้งต้นของสารแอนโทไซยานิน จากสีอาจกล่าวได้เบื้องต้นว่าปริมาณแอนโทไซยานินที่ได้จากหม่อนทั้ง 2 แหล่งแตกต่างกัน

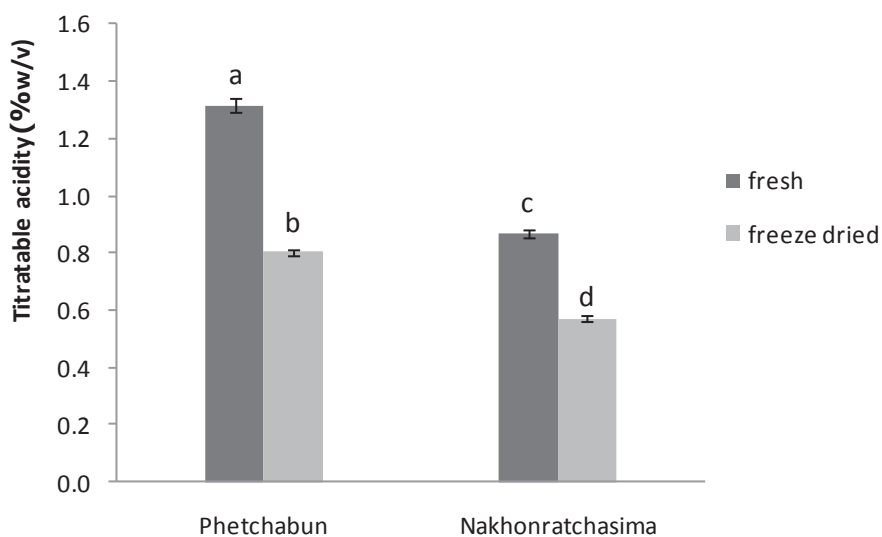
ตารางที่ 4.3 สี ระบบ L*, a* และ b* ของสารสกัดผลหม่อน

ชนิดสารสกัด	แหล่งผลหม่อน	สี		
		L* (ค่าความสว่าง)	a* (ค่าสีแดง)	b* (ค่าสีน้ำเงิน)
ผลหม่อนสด	เพชรบูรณ์	20.45±0.28 ^{b,c}	2.19±0.11 ^d	-2.17±0.07 ^e
	นครราชสีมา	20.83±0.27 ^b	2.00±0.11 ^d	-2.23±0.05 ^{e,g}
ผงผลหม่อน	เพชรบูรณ์	20.03±0.15 ^{a,c}	2.21±0.17 ^d	-2.20±0.06 ^e
	นครราชสีมา	19.80±0.20 ^a	2.07±0.11 ^d	-2.33±0.05 ^{f,g}

^{a-g} แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ของสารสกัดผลหม่อนชนิดต่างๆ

4.1.2 ลักษณะทางเคมีของสารสกัดผลหม่อนสดและผงผลหม่อน

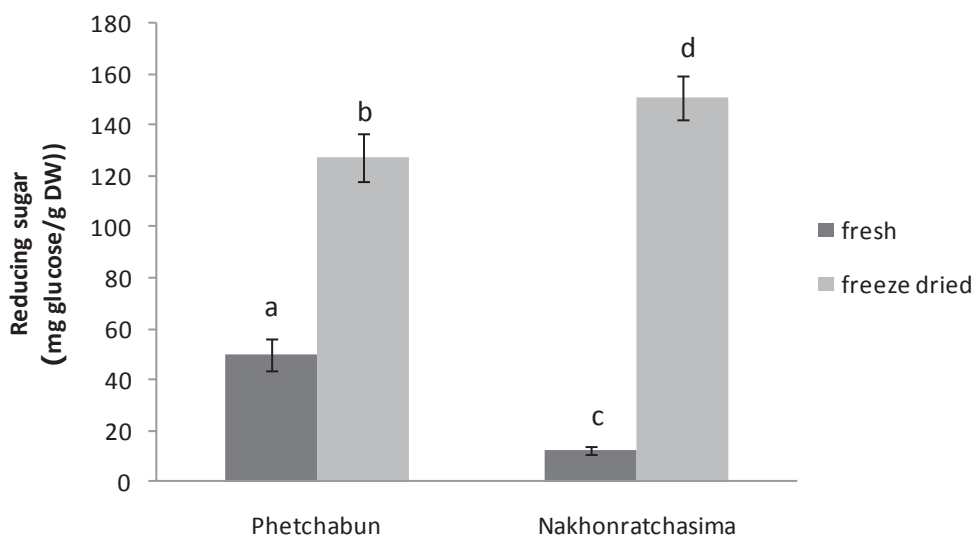
การศึกษาสมบัติทางเคมีของสารสกัดผลหม่อน ในที่นี้จะพิจารณาปริมาณกรดที่ไทเทรตได้ น้ำตาลรีดิวซ์ และสารสำคัญซึ่งเป็นสารสีที่สามารถละลายน้ำได้ พบปริมาณสูงในผลไม้สีเข้มทั่วไปคือ สารแอนโทไซยานินเป็นสารในกลุ่มโพลีฟีนอล มีสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระชนิดหนึ่ง อีกทั้งยังได้มีการศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหม่อน ดังรูปที่ 4.2 พบว่าในสารสกัดของผลหม่อนสดจะมีปริมาณกรดในน้ำผลหม่อนด้วยการไทเทรตหาปริมาณกรด ซึ่งในที่นี้คือกรดซิตริกปริมาณสูงกว่าในสารสกัดที่ได้จากผงผลหม่อนสกัดคือ จากแหล่งเพชรบูรณ์ มีร้อยละ 1.32 ± 0.02 และ 0.80 ± 0.01 โดยน้ำหนักต่อปริมาตรของสารสกัดหม่อนสดและสารสกัดผงผลหม่อนสกัดตามลำดับ และแหล่งนครราชสีมาปริมาณกรดที่ไทเทรตได้ร้อยละ 0.87 ± 0.02 และ 0.57 ± 0.01 โดยน้ำหนักต่อปริมาตรของสารสกัดหม่อนสดและผงผลหม่อนสกัดตามลำดับเช่นกัน สารสกัดผลหม่อนที่ได้จากแหล่งจังหวัดเพชรบูรณ์จะมีปริมาณกรดที่สูงกว่าจากแหล่งนครราชสีมาซึ่งปริมาณกรดที่ไทเทรตได้นี้สอดคล้องกับค่าพีเอชในตารางที่ 4.2 ปริมาณกรดที่ไทเทรตได้ในสารสกัดหม่อนสูงจะมีค่าพีเอชต่ำ



รูปที่ 4.2 ปริมาณกรดที่ไทเทรตได้ของสารสกัดผลหม่อนสดและผงผลหม่อนสกัดจากแหล่งจังหวัดเพชรบูรณ์ และนครราชสีมา โดยที่ a, b, c และ d แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

นอกจากนี้ยังได้มีการศึกษาปริมาณน้ำตาลในสารสกัดหม่อนซึ่ง Ozgen และคณะ (2009) ได้รายงานไว้ในผลหม่อนมีน้ำตาลชนิดหลักอยู่ 2 ชนิดคือ กลูโคสและฟรุคโตส ปริมาณร้อยละ 52 และ ร้อยละ 48 ตามลำดับ อีกร้อยละ 1 ที่พบน้อยมากคือน้ำตาลซูโครส จากน้ำตาลชนิดหลักที่พบในผลหม่อนทำให้ในงานวิจัยนี้ได้หาปริมาณน้ำตาลที่พบในสารสกัดซึ่งเป็นน้ำตาลรีดิวซ์ โดยใช้น้ำตาลกลูโคสเป็นสารมาตรฐาน ดังรูปที่ 4.3 สารสกัดผลหม่อนสดจากแหล่งจังหวัดเพชรบูรณ์ มีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ 50.13 ± 6.25 มิลลิกรัมกลูโคสต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ในขณะที่ผงผลหม่อนสกัดมีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ 127.26 ± 9.29 มิลลิกรัมกลูโคสต่อกรัมน้ำหนักแห้ง และแหล่งจังหวัดนครราชสีมา สารสกัดผลหม่อนสดมีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ 12.25 ± 1.22 มิลลิกรัมกลูโคสต่อกรัมน้ำหนักแห้ง และสารสกัดผงผลหม่อนแห้งเท่ากับ 150.55 ± 8.56 มิลลิกรัมกลูโคสต่อกรัมน้ำหนักแห้ง แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทุกกลุ่มสารสกัด โดยเฉพาะผงผลหม่อนสกัดที่มีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงกว่าสารสกัดผลหม่อนสดมากเนื่องจากการคำนวณคิดเทียบกับน้ำหนักเริ่มต้น สิ่งที่น่าสังเกตคือสารสกัดหม่อนที่มีค่าพีเอชสูงจะมีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงเช่นกัน อย่างไรก็ตามปริมาณ

น้ำตาลรีดิวซ์ที่ไม่สอดคล้องกับค่า % Brix เนื่องจาก % Brix ไม่ได้แสดงถึงปริมาณน้ำตาลเพียงอย่างเดียว

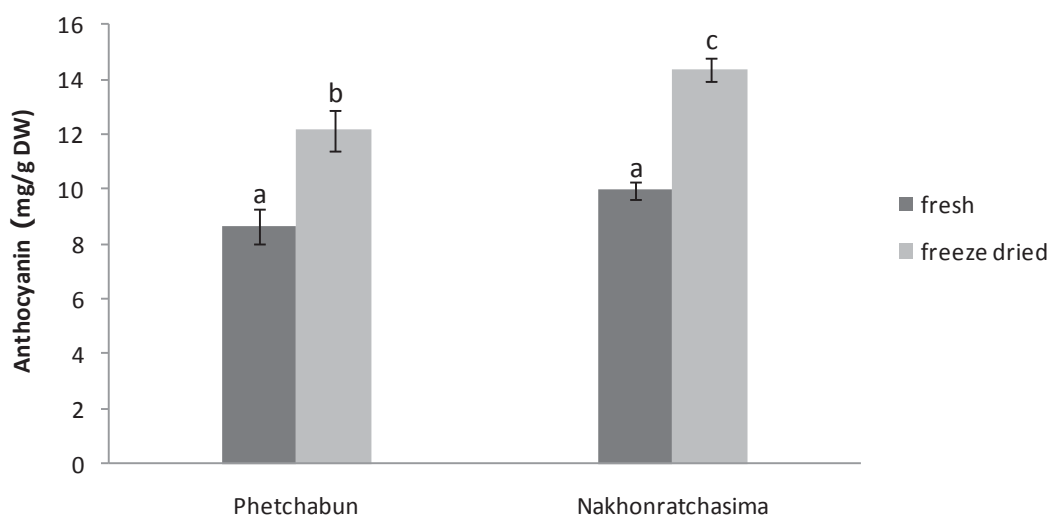


รูปที่ 4.3 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ของสารสกัดผลหม่อนสดและผงผลหม่อนสกัด จากแหล่งจังหวัดเพชรบูรณ์ และนครราชสีมา โดยที่ a, b, c และ d แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

เมื่อพิจารณาหาปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมดในสารสกัดผลหม่อนสดและผงผลหม่อนสกัดด้วยวิธี HPLC ดังรูปที่ 4.4 พบว่าสารสกัดผลหม่อนสดจากแหล่งเพชรบูรณ์มีปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมดเท่ากับ 8.67 ± 0.63 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้งและสารสกัดผงผลหม่อนสกัดเท่ากับ 12.14 ± 0.77 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้งและในสารสกัดหม่อนจากแหล่งนครราชสีมาปริมาณแอนโทไซยานิน 9.96 ± 0.32 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง และ 14.35 ± 0.43 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้งของสารสกัดหม่อนสดและผงผลหม่อนสกัดตามลำดับ จากงานวิจัยของมนต์วีดีและศศิธร (2551) สกัดผลหม่อนพันธุ์กำแพงแสน-เอ็มปี-42-1 ด้วยเมทานอลร้อยละ 50 ผสมกับกรดไฮโดรคลอริกร้อยละ 1 พบว่าสารสกัดหม่อนที่ได้มีปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมดเท่ากับ 18.43 มิลลิกรัมต่อกรัมหม่อนแห้ง มีปริมาณแอนโทไซยานินมากกว่าในงานวิจัยดังกล่าว เนื่องจาก

การใช้ตัวทำลายด้วยเมทานอลสามารถสกัดสารต้านอนุมูลอิสระได้สูงกว่าน้ำทำให้ได้สารประเภทฟีนอลิกที่สูงขึ้น [Arabshahi-Delouee และUrooj, 2007]

นอกจากนี้รายงานของ Aramwit และคณะ (2010) วิเคราะห์น้ำคั้นหมอนสดสายพันธุ์เซียงใหม่ (*Morus alba L.*) จากไร่กำนันจุล เพชรบูรณ์ พบว่าสีของผลหมอนมีผลต่อปริมาณแอนโทไซยานิน โดยผลหมอนสีแดงมีปริมาณแอนโทไซยานินเท่ากับ 13.48 มิลลิกรัมต่อกรัมหมอนแห้ง ผลหมอนสีม่วงแดง 44.92 มิลลิกรัมต่อกรัมหมอนแห้ง และผลหมอนสีม่วง 76.36 มิลลิกรัมต่อกรัมหมอนแห้ง สรุปว่าหมอนที่มีสีโทนม่วงจะมีปริมาณแอนโทไซยานินที่สูงกว่า จากงานวิจัยดังกล่าวมีความสอดคล้องกับงานวิจัยนี้คือ ค่า b^* ของสารสกัดผงผลหมอนมีค่าติดลบสูงกว่าสารสกัดผลหมอนสดและอีกทั้งสารสกัดทั้งสองชนิดจากแหล่งจังหวัดนครราชสีมา มีค่า b^* ติดลบสูงกว่าแหล่งจังหวัดเพชรบูรณ์ แสดงว่าสารสกัดผลหมอนจากแหล่งนครราชสีมา มีสีโทนน้ำเงินมากกว่าจากเพชรบูรณ์และมีปริมาณแอนโทไซยานินสูงกว่าประมาณร้อยละ 25

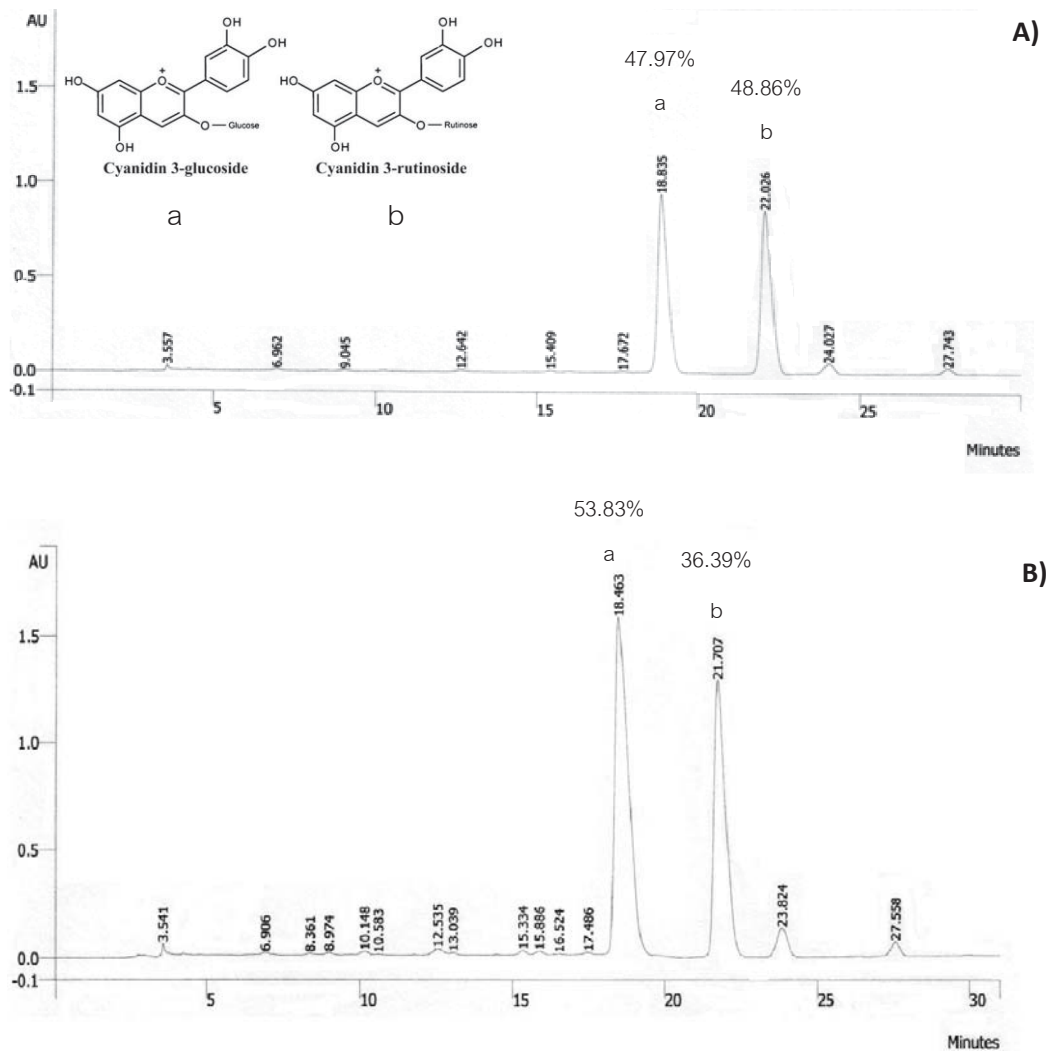


รูปที่ 4.4 ปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมดของสารสกัดผลหมอนสดและผงผลหมอนสกัดจากแหล่งปลูกจังหวัดเพชรบูรณ์ และนครราชสีมาโดยใช้วิธี HPLC โดยที่ a, b, c แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

เมื่อพิจารณาการทำแห้งแบบเยือกแข็งของผลหม่อนที่มีต่อปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมดพบว่าการทำแห้งแข็งของผลหม่อน ผ่านกระบวนการแช่แข็งที่อุณหภูมิต่ำกว่าประมาณ -20 องศาเซลเซียส แล้วนำไปทำแห้งภายใต้สุญญากาศ นำที่เกิดเป็นผลึกจะเกิดการระเหิดออกทำให้เกิดการสูญเสียน้ำไปทั้งหมด ค่าร้อยละของน้ำหนักแห้งของผลหม่อนสดจากเพชรบูรณ์เท่ากับร้อยละ 14.27 และผลหม่อนสดจากนครราชสีมาเท่ากับร้อยละ 22.19 ดังนั้นเกิดการสูญเสียน้ำไปร้อยละ 85.73 และร้อยละ 77.81 ตามลำดับ (ตารางที่ 4.1) พบว่า ผลหม่อนที่ผ่านกระบวนการทำแห้งแข็งแล้วนำมาสกัดสารสกัดผลหม่อนด้วยน้ำทำให้ปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมดต่อน้ำหนักแห้งของสารสกัดของผลหม่อนสกัดสูงกว่าสารสกัดจากผลหม่อนสดแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ แสดงให้เห็นว่ากระบวนการทำแห้งเป็นการระเหิดน้ำออกแต่สารสำคัญนั้นที่จริงมีอยู่ที่ผิวกับส่วนของเนื้อผลหม่อนมากกว่าซึ่งการสูญเสียน้ำในจำนวนหนึ่งแต่กลับทำให้สารแอนโทไซยานินที่ได้มีมากกว่าในปริมาณสูง Gonzalez-SanJose, M L (1992) รายงานว่าน้ำตาลซึ่งเป็นสารตั้งต้นของแอนโทไซยานินและสารประกอบฟีนอลหลายชนิดมีความเข้มข้นสูงที่บริเวณเปลือก (skin) ของผลองุ่นซึ่งมีสีแดงเข้มมากกว่าในน้ำคั้น ซึ่งในกรณีของผลหม่อนก็น่าจะเป็นไปในทำนองเดียวกันเนื่องจากในผลหม่อนสกัดมีปริมาณน้ำตาลรีดิวิสูงกว่าสารสกัดผลหม่อนสดมาก จึงมีผลทำให้ปริมาณแอนโทไซยานินในผลหม่อนสกัดซึ่งได้จากการทำแห้งแข็งหม่อนทั้งผลสูงกว่าในน้ำคั้นจากผลสดที่มีการแยกกากซึ่งมีเปลือกเป็นองค์ประกอบจำนวนมากออกมากจึงเป็นไปได้ว่าการบริโภคหม่อนทั้งผลหรือส่วนเปลือกจะได้รับแอนโทไซยานินมากกว่าการบริโภคสารสกัดที่ผ่านกระบวนการกรองเอากากออก

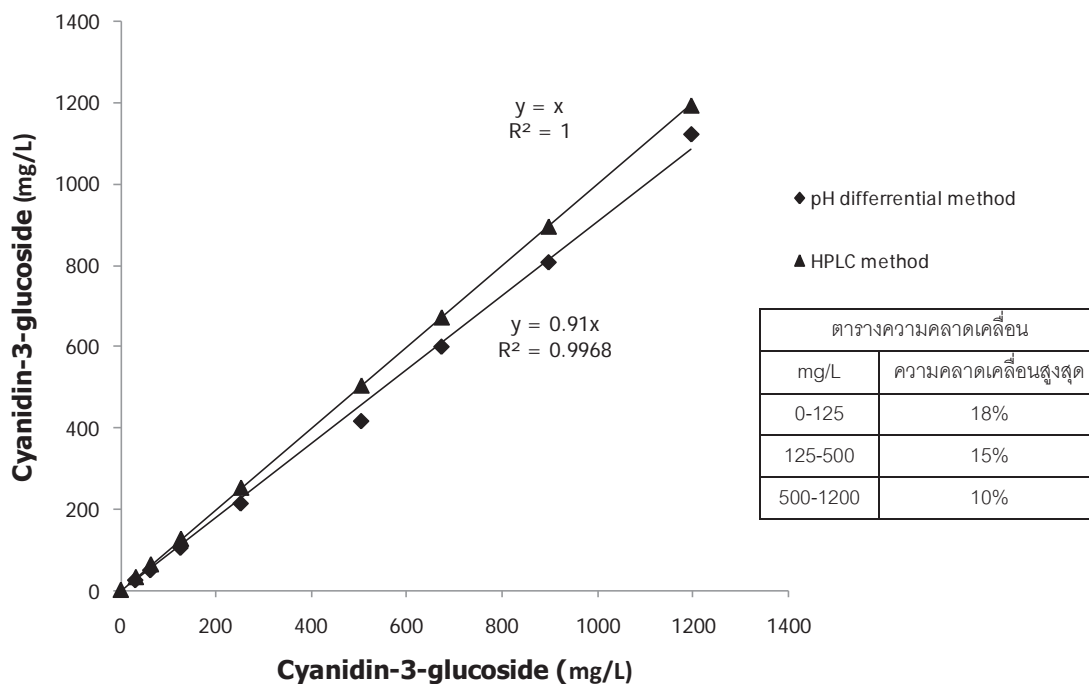
การวิเคราะห์ชนิดและปริมาณแอนโทไซยานินด้วยเทคนิค HPLC ได้ผลดังรูปที่ 4.5 แหล่งปลูกจังหวัดเพชรบูรณ์และนครราชสีมา พบว่าสารสกัดผลหม่อนมีสารแอนโทไซยานินหลัก 2 ชนิดคือ ไซยานิดิน-3-กลูโคไซด์ (cyanidin-3-glucoside) พบในพีคแรกและไซยานิดิน-3-รูทีโนไซด์ (cyanidin-3-rutinoside) ซึ่งพบในพีคที่สองที่เวลา 18.835 และ 22.026 นาที ของสารสกัดหม่อนสดจากแหล่งเพชรบูรณ์ มีปริมาณไซยานิดิน-3-กลูโคไซด์ร้อยละ 47.97 และไซยานิดิน-3-รูทีโนไซด์ร้อยละ 48.86 และที่เวลา 18.463 และ 21.707 นาที พบไซยานิดิน-3-กลูโคไซด์ร้อยละ 53.83% และไซยานิดิน-3-รูทีโนไซด์ร้อยละ 36.39 ของสารสกัดหม่อนสดจากแหล่งนครราชสีมา ตามลำดับ มีงานวิจัยที่ผ่านมารายงานการสกัดผลหม่อนพบว่าชนิดแอนโทไซยานินส่วนใหญ่ที่พบ

คือไซยานิดิน-3-กลูโคไซด์ และ รองมาคือ ไซยานิดิน-3-รูทีโนไซด์ [Qin และคณะ, 2010, Bae และ Shu, 2007, มนต์วีดี และศศิธร, 2553]



รูปที่ 4.5 ตัวอย่างผลการวิเคราะห์ปริมาณแอนโทไซยานิน ด้วย High Performance Liquid Chromatography (HPLC) ของสารสกัดผลหม่อนสดจาก A) เพชรบูรณ์ B) นครราชสีมา, ปริมาณตัวอย่างที่ใช้ 20 ไมโครลิตร ใช้คอลัมน์ C-18 อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส อัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที ค่าดูดกลืนแสง 530 นาโนเมตร วัฏภาคเคลื่อนที่คือตัวทำละลาย A 1.5% H_3PO_4 , 20% HOAc, 25% MeCN ในน้ำ และตัวทำละลาย B 1.5% H_3PO_4 ในน้ำ [มนต์วีดี และศศิธร, 2553] พบพีกหลักคือ a: ไซยานิดิน-3-กลูโคไซด์ ที่เวลาประมาณ 18 นาที, และพีก b: ไซยานิดิน-3-รูทีโนไซด์ ที่เวลาประมาณ 22 นาที

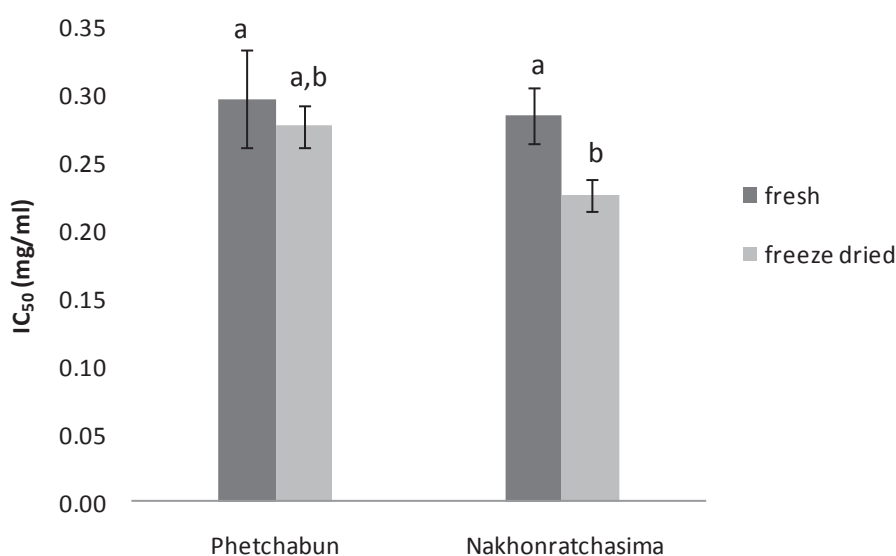
การหาปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมดจากวิธี pH-differential เป็นวิธีที่สะดวก รวดเร็ว และมีการนำไปใช้ในงานวิจัยต่างๆ จำนวนมาก ต่างจากเทคนิค HPLC ซึ่งเป็นวิธีที่มีค่าใช้จ่ายสูง ในการทดลองนี้จึงเลือกใช้วิธี pH-differential ในการหาปริมาณแอนโทไซยานินและนำ HPLC มาเปรียบเทียบค่าความคลาดเคลื่อนของวิธีดังกล่าวนี้ดังแสดงในรูปที่ 4.6 พบว่าในช่วงที่ปริมาณแอนโทไซยานินต่ำกว่า 125 มิลลิกรัมต่อลิตร วิธี pH-differential กับ HPLC มีค่าความคลาดเคลื่อนประมาณร้อยละ 18 แต่ช่วงปริมาณแอนโทไซยานิน 125-500 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าวิธี pH-differential กับ HPLC มีค่าความคลาดเคลื่อนต่างกันประมาณร้อยละ 15 และช่วงที่ปริมาณแอนโทไซยานินสูงกว่า 500 มิลลิกรัม ค่าความคลาดเคลื่อนประมาณร้อยละ 10 อาจมีสาเหตุมาจากทั้ง 2 วิธีมีการประมาณค่าที่ต่างกัน คือ HPLC ใช้ การประมาณค่าปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมดจากพื้นที่ใต้พีคของแอนโทไซยานินชนิดเดียวคือ ไซยานิดิน-3-กลูโคไซด์ ที่ใช้เป็นสารมาตรฐาน ในขณะที่ pH-differential เป็นการประมาณจากสูตรการคำนวณปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมดในสภาวะพีเอช 1.0 ที่แอนโทไซยานินคงตัวสูงสุด และพีเอช 4.5 แอนโทไซยานินเสื่อมสลายมากที่สุด [Durst และ Wrolstad, 2005] ซึ่งในสารสกัดผลหม่อนมีแอนโทไซยานินมากกว่าหนึ่งชนิด การวิเคราะห์ผลที่ใช้ในงานวิจัยนี้ศึกษาปริมาณแอนโทไซยานินในช่วงที่สูงกว่า 500 มิลลิกรัมต่อลิตรแต่การศึกษาความคงตัวที่อุณหภูมิต่างๆ ค่าจะอยู่ครอบคลุมทุกช่วงเนื่องจากแอนโทไซยานินมีการเสื่อมสลายไป อย่างไรก็ตามค่าที่วัดได้จากวิธี pH differential ที่ได้ถือว่ายู่ในเกณฑ์ยอมรับได้



รูปที่ 4.6 เปรียบเทียบเทคนิควิเคราะห์หาปริมาณแอนโทไซยานินของวิธี pH differential (◆) กับวิธี HPLC (▲) ซึ่งใช้สารละลายไซยานิดิน-3-กลูโคไซด์ ในน้ำปราศจากไอออนในการเปรียบเทียบ

ในการศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดน้ำหม่อนทำโดยพิจารณาจากค่า half maximal inhibitory concentration หรือ IC_{50} ซึ่งเป็นค่ามาตรฐานที่สามารถบอกประสิทธิภาพของ ความเข้มข้นของสารสกัดที่สามารถยับยั้งปฏิกิริยาของอนุมูลอิสระได้ครึ่งหนึ่ง ดังรูปที่ 4.7 พบว่า แหล่งจังหวัดเพชรบูรณ์ สารสกัดผลหม่อนสดมีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระที่ดีกว่าสารสกัดผงผลหม่อน พิจารณาจากปริมาณสารสกัดที่ใช้ในการยับยั้งอนุมูลอิสระ 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) จากค่า IC_{50} ความเข้มข้นที่น้อยกว่าคือ 0.28 ± 0.02 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ของสารสกัดผงผลหม่อน และ 0.30 ± 0.04 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรของสารสกัดผลหม่อนสด ซึ่งไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ แต่สำหรับสารสกัดจากแหล่งนครราชสีมาพบว่าฤทธิ์ในต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดผงผลหม่อนเท่ากับ 0.23 ± 0.01 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และสารสกัดผลหม่อนสด เท่ากับ 0.29 ± 0.02 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งสารสกัดผงผลหม่อนมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระสูงกว่าสารสกัดผลหม่อนสดอย่างมีนัยสำคัญ และเมื่อเปรียบเทียบกันระหว่าง 2 แหล่งที่มาพบว่าสาร

สกัดผลหมอนสดจากจังหวัดนครราชสีมาและเพชรบูรณ์มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ แต่สำหรับสารสกัดผลหมอน ค่า IC_{50} ของสารสกัดจากนครราชสีมาต่ำกว่าแหล่งจังหวัดเพชรบูรณ์ หมายถึงสารสกัดจากนครราชสีมามีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระสูงกว่าความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระนั้น นอกจากสารแอนโทไซยานินซึ่งเป็นเพียงหนึ่งในสารกลุ่มแอนติออกซิแดนซ์แล้วในสารสกัดอาจมีสารแอนติออกซิแดนซ์กลุ่มอื่นเช่น ฟลาโวนอยด์ โพลีฟีนอล ซึ่งประกอบด้วยสารสำคัญต่างๆ มากมาย จากงานวิจัยนี้พบว่าสารสกัดผลหมอนสกัดมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่สูงกว่าผลหมอนสดซึ่งพิจารณาต่อน้ำหนักแห้งของสารสกัด เพราะการสกัดหมอนแห้งสกัดโดยน้ำจึงสามารถสกัดสารสำคัญชนิดอื่นนอกจากแอนโทไซยานินที่สามารถละลายในน้ำได้มากกว่าแต่เนื่องจากสารสกัดหมอนสดได้จากการคั้นน้ำซึ่งอาจมีสารสำคัญตัวอื่นที่ละลายอยู่ในน้ำคั้นที่ต่ำกว่า



รูปที่ 4.7 ค่า half maximal inhibitory concentration หรือ IC_{50} ของสารสกัดผลหมอนสดและผลหมอนสกัดจากแหล่งปลูกจังหวัดเพชรบูรณ์และนครราชสีมา โดยที่ a, b, c แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

สรุปปริมาณกรด ปริมาณแอนโดรเจน และค่า IC₅₀ ของสารสกัดผลหมอนสดและผงผลหมอนสด จากทั้งสองแหล่งปลูกดังแสดงในตารางที่ 4.4

ตารางที่ 4.4 สรุปสมบัติทางเคมีของสารสกัดผลหมอน

ชนิดสารสกัด	จังหวัดแหล่งปลูก ผลหมอน	ปริมาณกรดที่เททรต (ร้อยละโดยน้ำหนักต่อปริมาตร)	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (มิลลิกรัมกลูโคสต่อ กรัม น้ำหนักแห้ง)	ปริมาณแอนโดรเจน (มิลลิกรัมต่อน้ำหนักแห้ง)	IC ₅₀ (มิลลิกรัมของสารสกัด หมอนต่อมิลลิตร)
ผลหมอนสด	เพชรบูรณ์	1.32±0.02 ^a	50.13±6.25 ^e	8.67±0.63 ⁱ	0.30±0.0 ^l
	นครราชสีมา	0.87±0.02 ^b	12.25±1.22 ^f	9.96±0.32 ^j	0.29±0.02 ^l
ผงผลหมอน	เพชรบูรณ์	0.80±0.01 ^c	127.26±9.29 ^g	12.14±0.77 ^j	0.28±0.02 ^m
	นครราชสีมา	0.57±0.01 ^d	150.55±8.56 ^h	14.35±0.43 ^k	0.23±0.01 ^m

^{a-m} แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p < 0.05)

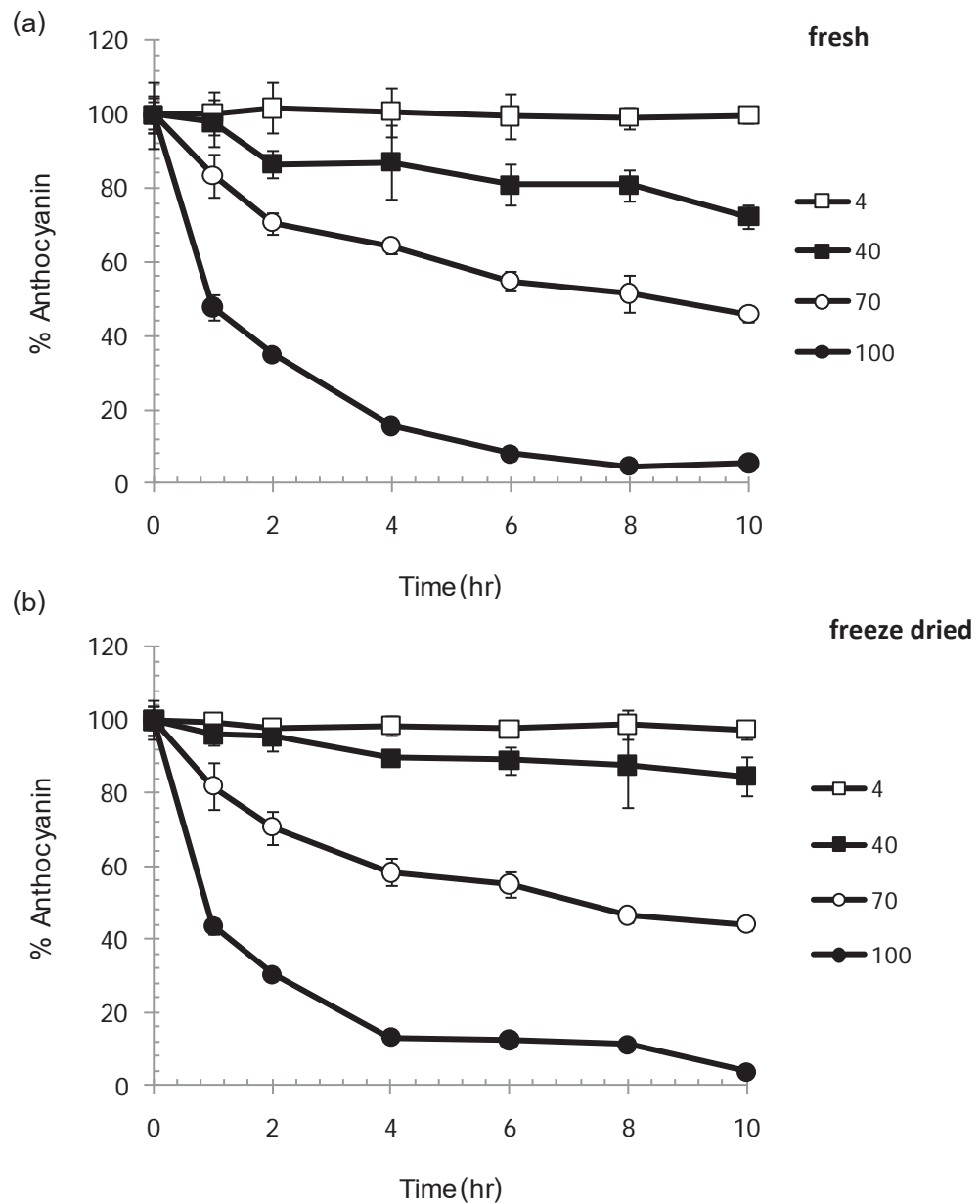
4.2 ศึกษาความคงตัวของสารแอนโทไซยานินในสารสกัดผลหม่อน

ในการศึกษาความคงตัวของสารแอนโทไซยานินในสารสกัดผลหม่อนได้เลือกสารสกัดผลหม่อนที่ได้จากแหล่งปลูกจังหวัดเพชรบูรณ์ เพียงแหล่งเดียวในการศึกษาเนื่องจากแหล่งผลิตเป็นไร่ที่มีมาตรฐานและการควบคุมคุณภาพของผลหม่อนที่ดีได้แก่ ขนาด อายุ และการหลีกเลี่ยงศัตรูพืช อีกทั้งผลหม่อนจากไร่ยังมีการผลิตที่สม่ำเสมอในจำนวนมากเพื่อใช้ในเชิงพาณิชย์อีกด้วย

4.2.1 ผลของอุณหภูมิที่มีต่อความคงตัวของสารสกัดผลหม่อน

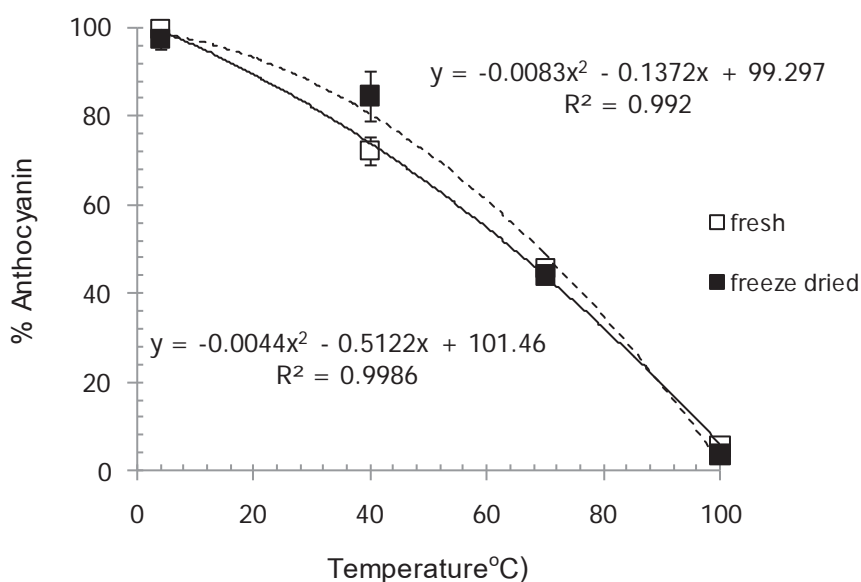
จากการศึกษาความคงตัวของสารแอนโทไซยานินในสารสกัดผลหม่อนต่ออุณหภูมิดังแสดงในรูปที่ 4.8 (a) และ รูปที่ 4.8 (b) พบว่าร้อยละของสารแอนโทไซยานินมีค่าต่ำลงเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นทั้งในสารสกัดผลหม่อนสดและผงผลหม่อนสกัด แสดงให้เห็นว่าสารแอนโทไซยานินมีการสลายตัวเพิ่มสูงขึ้น แอนโทไซยานินมีความคงตัวสูงสุดที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ของทั้งสารสกัดผลหม่อนสดและผงผลหม่อนสกัด แต่หม่อนสดมีแนวโน้มที่จะสลายตัวที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียสมากกว่าผงผลหม่อนสกัด อีกทั้งยังสามารถพบครึ่งชีวิตของการสลายตัวเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นเป็น 70 องศาเซลเซียสของหม่อนสดและผงผลหม่อนซึ่งเท่ากับ 7.14 ชั่วโมง และ 8.39 ชั่วโมง และอุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส ค่าครึ่งชีวิตเท่ากับ 0.89 และ 0.96 ชั่วโมงตามลำดับ ซึ่งให้ผลการทดลองที่สอดคล้องกับรายงานของ Kirca และ Cemeroglu (2003) พบว่าแอนโทไซยานินในน้ำของส้มสีเลือด (blood orange) เกิดการสลายตัวเพิ่มสูงขึ้นเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นที่ Brix ร้อยละ 11 ครึ่งชีวิต เท่ากับ 6.3, 3.6 และ 1.5 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 70, 80 และ 90 องศาเซลเซียส ตามลำดับ นอกจากนี้ในปี 2007 ยังมีรายงานว่าแอนโทไซยานินในน้ำของแบล็คเบอร์รี่สลายตัวมากขึ้นเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นเช่นกัน ที่อุณหภูมิ 60, 70, 80 และ 90 องศาเซลเซียสค่าครึ่งชีวิตเท่ากับ 16.7, 8.8, 4.7 และ 2.9 ชั่วโมงตามลำดับ [Wang และ Xu, 2007] การเปรียบเทียบการสลายตัวของสารแอนโทไซยานินที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียสของในผลหม่อนส้มสีเลือดและแบล็คเบอร์รี่มีค่าการสลายตัวที่แตกต่างกัน อาจจะเป็นเพราะชนิดของสารแอนโทไซยานินและองค์ประกอบทางเคมีที่มีความแตกต่างกันของผลไม้ที่ต่างชนิดกันซึ่งอาจมีผลต่อความคงตัวของสารแอนโทไซยานินได้ นอกจากนี้งานวิจัยของมนต์วีดี และศศิธร (2551) ยังได้รายงานผลของอุณหภูมิต่อความคงตัวของสารแอนโทไซยานินในน้ำลูกหม่อนพบว่า การสลายตัวสูงขึ้นเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นโดยอัตราการสลายตัวเกิดเป็นปฏิกิริยาอันดับหนึ่ง ความคงตัวของสารสกัดผล

หม่อน ค่าครึ่งชีวิตในน้ำลูกหม่อนเท่ากับ 12.3, 6.2 และ 4.0 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 70, 80 และ 90 องศาเซลเซียสตามลำดับ



รูปที่ 4.8 การเปลี่ยนแปลงของสารแอนโทไซยานินในสารสกัดสารสกัดผลหม่อนสด (a) และผงผลหม่อนสกัด (b) จากแหล่งปลูกจังหวัดเพชรบูรณ์ ที่อุณหภูมิ 4, 40, 70 และ 100 องศาเซลเซียส ที่เวลาต่างๆ

และอีกงานวิจัยของ Aramwit และคณะ (2010) พบว่าความคงตัวของแอนโทไซยานินใน น้ำคั้นของผลหม่อนจากไร่กำนันจุล จังหวัดเพชรบูรณ์ ที่อุณหภูมิ 40, 50 และ 70 องศาเซลเซียส ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียสเวลา 10 ชั่วโมง แอนโทไซยานินสลายตัวไป ประมาณร้อยละ 10 แม้ว่าในการศึกษาเป็นผลไม่ชนิดเดียวกันแต่ยังมีการสลายตัวที่ต่างกันอาจ เป็นเพราะสายพันธุ์ ลักษณะการเพาะปลูก แหล่งเพาะปลูก และฤดูการเก็บเกี่ยว ที่ทำให้สมบัติทาง กายภาพและเคมีต่างกัน มีผลต่อความคงตัวของสารแอนโทไซยานินได้ รูปที่ 4.9 แสดงกราฟ ความสัมพันธ์ของร้อยละของแอนโทไซยานินในสารผลหม่อนที่เก็บไว้เป็นเวลา 10 ชั่วโมง ที่ อุณหภูมิต่างๆ จะเห็นว่าการสลายตัวของแอนโทไซยานินสูงขึ้นตามอุณหภูมิที่เก็บรักษา แสดงเป็น สมการเชิงคณิตศาสตร์ชนิดพหุนามตัวแปรเดียว (polynomial equation) ดีกรี 2 ได้ว่า $y = -0.0044x^2 - 0.5122x + 101.46$ สำหรับสารสกัดผลหม่อนสด และ $y = -0.0083x^2 - 0.1372x + 99.297$ ความสัมพันธ์ดังกล่าวสามารถใช้ประมาณร้อยละของแอนโทไซยานินที่เหลืออยู่ ณ อุณหภูมิต่างๆ ได้

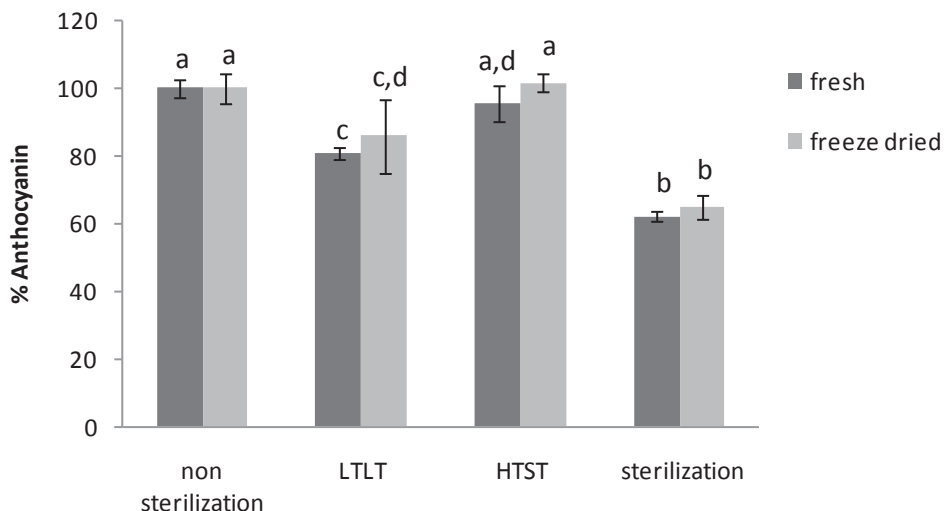


รูปที่ 4.9 การเปลี่ยนแปลงของสารแอนโทไซยานินในสารสกัดผลหม่อนสดและผงผลหม่อนสกัด จากแหล่งปลูกจังหวัดเพชรบูรณ์ ที่อุณหภูมิ 4, 40, 70 และ 100 องศาเซลเซียส ที่เวลา 10 ชั่วโมง

เมื่อพิจารณาเปรียบเทียบความคงตัวที่อุณหภูมิต่างๆ ระหว่างสารสกัดผลหม่อนสดและสารสกัดผงผลหม่อนสกัด พบว่ากระบวนการทำแห้งแข็งไม่มีผลทำให้แอนโทไซยานินคงตัวสูงขึ้น ไม่ว่าจะผ่านกระบวนการในอุณหภูมิต่างๆ ได้แก่ 4, 70 และ 100 องศาเซลเซียสโดยสารสกัดที่ผ่านการเก็บในแต่ละอุณหภูมินั้นจะมีร้อยละของปริมาณแอนโทไซยานินที่เหลืออยู่ใกล้เคียงกันโดยที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส สารสกัดผงผลหม่อนมีความคงตัวดีกว่าสารสกัดผลหม่อนสดเพียงเล็กน้อย

4.2.2 ผลของสภาวะการฆ่าเชื้อที่มีต่อความคงตัวของสารสกัดผลหม่อน

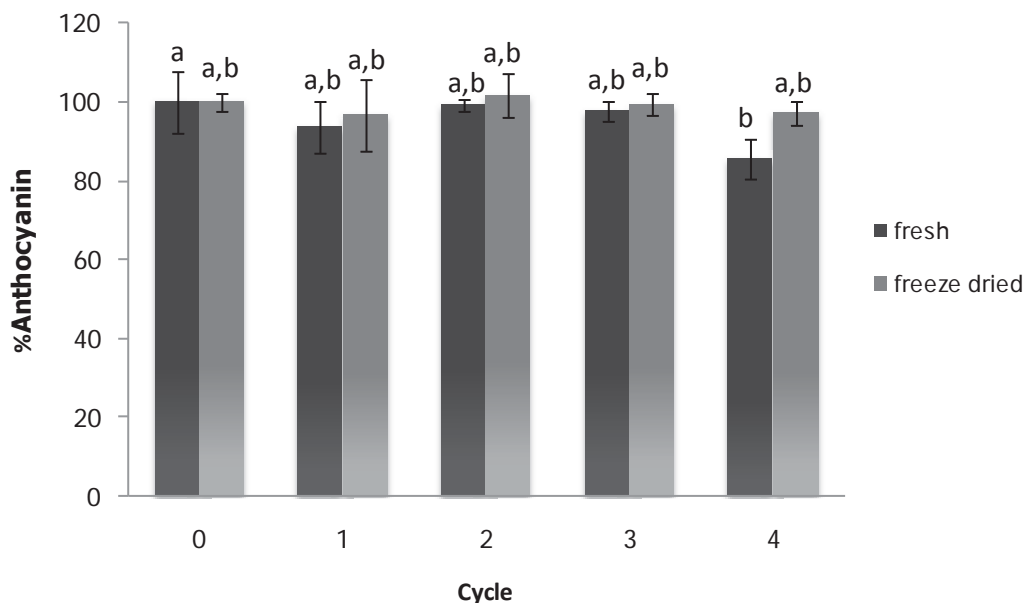
เมื่อนำสารสกัดผลหม่อนของทั้งผลหม่อนสดและผงผลหม่อนสกัดผ่านกระบวนการฆ่าเชื้อด้วยวิธีต่างๆ ดังรูปที่ 4.10 คือ พาสเจอร์ไรส์แบบ LTLT (60 องศาเซลเซียส ใช้เวลา 30 นาที), พาสเจอร์ไรส์ แบบ HTST (อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เวลา 15 วินาที) และ สเตอริไลส์ (อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เวลา 20 นาที) พบว่าการฆ่าเชื้อแบบ LTLT และแบบสเตอริไลส์ มีผลให้ปริมาณแอนโทไซยานินในสารสกัดหม่อนลดลงอย่างมีนัยสำคัญโดยลดลงเหลือร้อยละ 86 ของสารสกัดผงผลหม่อนสกัดและร้อยละ 81 ของสารสกัดหม่อนสดตามลำดับ และการฆ่าเชื้อแบบสเตอริไลส์ มีผลทำให้แอนโทไซยานินเสื่อมสลายมากที่สุด โดยมีแอนโทไซยานินในสารสกัดผงผลหม่อนสกัดเหลืออยู่เพียงร้อยละ 64 และในสารสกัดผลหม่อนสดเท่ากับร้อยละ 62 ซึ่งนอกจากอุณหภูมิที่มีผลเวลาก็มีส่วนสำคัญแม้ว่าการฆ่าเชื้อแบบพาสเจอร์ไรส์แบบ HTST ซึ่งใช้อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียสสูงกว่า 60 องศาเซลเซียส ที่เป็นการพาสเจอร์ไรส์แบบ LTLT แต่ใช้เวลาในการฆ่าเชื้อที่ต่ำกว่าเพียง 15 วินาทีเท่านั้น ทำให้พบว่าการใช้เวลาที่มากขึ้นมีผลต่อการสลายตัวของสารแอนโทไซยานินซึ่งก็มีผลควบคู่ไปกับการใช้อุณหภูมิที่สูง อีกทั้งเมื่อพิจารณาเปรียบเทียบสารสกัดของผลหม่อนสดกับผงผลหม่อนสกัดที่สภาวะเดียวกันก็ให้ผลเช่นเดียวกันกับข้างต้นคือสารสกัดจากผงผลหม่อนสกัดที่ผ่านกระบวนการทำแห้งไม่มีผลทำให้ความคงตัวของสารแอนโทไซยานินมีค่าสูงขึ้นได้เนื่องจากปริมาณแอนโทไซยานินที่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ



รูปที่ 4.10 การเปลี่ยนแปลงปริมาณแอนโทไซยานินของสารสกัดผลหม่อนสดและผงผลหม่อนสกัดที่ได้จากแหล่งปลูกเพชรบูรณ์ ในสภาวะไม่ผ่านกระบวนการฆ่าเชื้อ (non sterilization), สภาวะฆ่าเชื้อแบบพาสเจอร์ไรส์ 60 °C เวลา 30 นาที (LTLT), สภาวะฆ่าเชื้อแบบพาสเจอร์ไรส์ 70 °C เวลา 15 วินาที (HTST) และสภาวะฆ่าเชื้อแบบสเตอริไลส์ 121 °C เวลา 20 นาที (sterilization) (a-d แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ของทุกกลุ่มตัวอย่าง)

4.2.3 ผลของสภาวะเร่งแบบ freeze thaw cycle ที่มีต่อความคงตัวของสารสกัดผลหม่อน

ในการศึกษาสภาวะเร่งซึ่งเป็นการเร่งสารสกัดผลหม่อนให้เกิดการสูญเสียสภาพได้เร็วยิ่งขึ้นโดยการเร่งแบบ freeze thaw cycle มีการเปลี่ยนแปลงสภาวะในการเก็บสารโดยสลับกันระหว่างอุณหภูมิร้อนกับเย็น โดยนำสารสกัดผลหม่อนเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสเป็นระยะเวลา 46 ชั่วโมง นำออกมาด้วยความเย็นทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที แล้วนำไปแช่ในอ่างควบคุมอุณหภูมิที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียสเวลา 90 นาที นับเป็น 1 รอบ ทำจนครบ 4 รอบ [Regan และ Mulvihill, 2010] หำร้อยละแอนโทไซยานินที่คงอยู่เทียบกับที่เริ่มต้น ดังรูปที่ 4.11 พบว่า สภาวะแบบ freeze thaw cycle ไม่มีผลให้สารแอนโทไซยานินเกิดการเสื่อมสภาพได้เร็วยิ่งขึ้น ในรอบที่ 1 ถึงรอบที่ 4 ไม่มีการเปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของทั้งสารสกัดผลหม่อนสดและผงผลหม่อนสกัด อาจเป็นเพราะอุณหภูมิมีผลมากกว่าการเร่งสภาวะเนื่องจากสภาวะเร่งมีการใช้อุณหภูมิที่ -20, 40 และอุณหภูมิห้องในการแช่แข็งและละลายสลับกัน จากผลของอุณหภูมิที่มีต่อการเปลี่ยนแปลงของแอนโทไซยานินข้างต้นพบว่า อุณหภูมิสูงที่ 40 องศาเซลเซียส 90 นาทีจะพบว่าปริมาณแอนโทไซยานินไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ



รูปที่ 4.11 การเปลี่ยนแปลงปริมาณแอนโทไซยานินของสารสกัดผลหม่อนสดและผงผลหม่อนสกัดที่ไม่ผ่านกระบวนการฆ่าเชื้อ จากแหล่งปลูกเพชรบูรณ์ ในสภาวะเร่งแบบ freeze thaw cycle โดยแช่แข็งที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส 46 ชั่วโมง จากนั้นทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง (26 ± 2) เวลา 30 นาที และแช่ในอ่างควบคุมอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส 90 นาที เท่ากับ 1 cycle จนครบ 4 cycle โดยที่ a และ b แสดงความแตกต่างกัน อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

จากการศึกษาความคงตัวของแอนโทไซยานินในสภาวะอุณหภูมิต่างๆ สภาวะที่ผ่านการฆ่าเชื้อ และสภาวะเร่งแบบ freeze thaw cycle จะแสดงให้เห็นว่าสภาวะที่เหมาะสมในการนำไปใช้ในการเก็บรักษาสารสกัดผลหม่อนสดและผงผลหม่อนสกัดเพื่อให้ได้แอนโทไซยานินคงมีประสิทธิภาพสูงสุดคือ ควรเก็บสารสกัดหม่อนไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ให้ปราศจากการสัมผัสแสงและอากาศ แต่ถ้าจำเป็นต้องนำสารสกัดหม่อนไปผ่านกระบวนการที่ใช้ความร้อนสูงควรใช้เวลาสั้นเพื่อให้แอนโทไซยานินเสื่อมสลายน้อยที่สุด และการฆ่าเชื้อที่มีความเหมาะสมถ้าต้องการให้ได้รับแอนโทไซยานินที่มีความคงตัวสูงสุดควรผ่านการฆ่าเชื้อแบบพาสเจอร์ไรส์แบบ HTST อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 วินาที

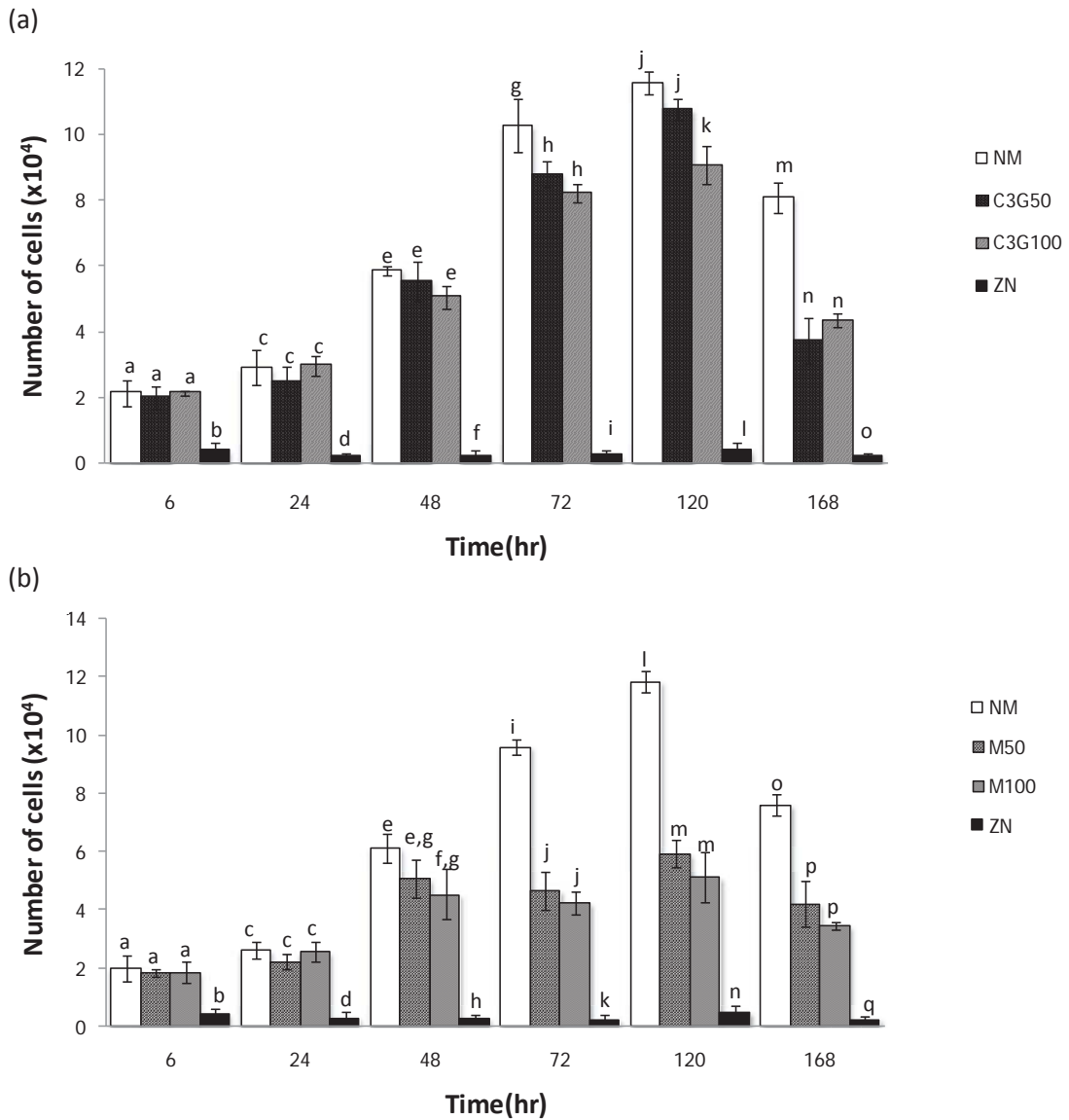
4.3 ศึกษาความเป็นพิษของแอนโธไซยานินและสารสกัดหม่อนต่อเซลล์ต้นกำเนิดไขกระดูกและผลของสารสกัดผลหม่อนต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ต้นกำเนิดไขกระดูกของหนูแรทพันธุ์วิสต้าในระดับห้องปฏิบัติการ

การศึกษาความเป็นพิษของแอนโธไซยานินและสารสกัดผลหม่อนต่อเซลล์ต้นกำเนิดไขกระดูกและผลต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ ดังแสดงในรูปที่ 4.12 (a) และตารางที่ 4.5 การเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดไขกระดูกที่ผสมสารไซยานิดิน-3-กลูโคไซด์ ในอาหารเลี้ยงเซลล์ปกติ C3G50 และ C3G100 ไม่เป็นพิษกับเซลล์และส่งเสริมการเจริญเติบโตของเซลล์ต้นกำเนิดไขกระดูกให้สูงขึ้นเห็นได้จากจำนวนเซลล์ที่เพิ่มสูงขึ้นตั้งแต่ 24 ชั่วโมงจนกระทั่งถึง 120 ชั่วโมง ในขณะที่การใช้ซิงค์อะซิเตรตซึ่งเป็นพิษกับเซลล์ตามมาตรฐานความปลอดภัย ISO 10993 part 5 ทำให้เซลล์ตาย ความเข้มข้น 20 ppm ตั้งแต่ 6 ชั่วโมงแรก การเพาะเลี้ยงเซลล์ระยะแรกจะมี lag phase ในช่วง 24 ชั่วโมงแรกเนื่องจากเซลล์มีการใช้พลังงานเพื่อปรับตัว เกาะติดพื้นผิว และสร้าง Extra cellular matrix (ECM) จะมีอัตราการเพิ่มจำนวนเซลล์ต่ำสุด และเริ่มมีการเพิ่มจำนวนเซลล์อย่างรวดเร็ว (log phase) การเลี้ยงเซลล์ในอาหารปกติ C3G50 และ C3G100 นี้มีระยะ log phase ในช่วง 24-72 ชั่วโมง แสดงดังรูปในภาคผนวก ข หากคำนวณอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของเซลล์เท่ากับ 26.22×10^{-3} ต่อชั่วโมง และ 32.73×10^{-3} ต่อชั่วโมงสำหรับการเลี้ยงใน C3G50 และ C3G100 ตามลำดับ การเจริญเติบโตของเซลล์ในอาหาร C3G100 สูงกว่าการเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ปกติ (NM) แสดงจากค่าอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของเซลล์ที่สูงกว่าและระยะเวลาที่เซลล์เพิ่มจำนวนขึ้นเป็น 2 เท่า (PDT) ที่ต่ำกว่า เซลล์ต้นกำเนิดไขกระดูกที่เลี้ยงใน NM มีอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของเซลล์ประมาณ $26.22-26.95 \times 10^{-3}$ ต่อชั่วโมง และอัตราการแบ่งตัวเป็น 2 เท่าประมาณ 25.74-26.33 ชั่วโมง จากรายงานการทดลองที่ผ่านมาของคณะผู้วิจัย เซลล์ต้นกำเนิดไขกระดูกที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ปกติใน passage 2-3 จะมีอัตราการแบ่งตัว 2 เท่าประมาณ 25.99-26.33 ชั่วโมง [Vachiraroj และคณะ, 2009] จะเห็นว่าจำนวนเซลล์มีปริมาณมากสูงสุดที่เวลา 120 ชั่วโมง คือประมาณ 150 เซลล์ต่อมิลลิเมตร² และหลังจากนั้นในเวลา 144 ชั่วโมง จำนวนเซลล์ลดลงอาจเป็นเพราะข้อจำกัดทางพื้นที่ของภาชนะเลี้ยงขนาด 24 หลุม มีพื้นที่ในการเพาะเลี้ยงเท่ากับ 200 มิลลิเมตร²ต่อหลุม ทำให้ความหนาแน่นของเซลล์สูงเกินจนไม่สามารถขยายจำนวนต่อไปได้ รูปร่างของเซลล์ต้นกำเนิดไขกระดูกที่เลี้ยงในอาหาร NM, C3G50 และ C3G100 ในแต่ละช่วงเวลา ที่เวลา 6 ชั่วโมง เซลล์เริ่มมีการยึดเกาะภาชนะเลี้ยงและจากนั้นมีการเพิ่มจำนวน จนประมาณ 72 ชั่วโมงจำนวนเซลล์มีความหนาแน่นมาก ในขณะที่ใช้ซิงค์อะซิเตรต ลักษณะของเซลล์เกาะบ้างเล็กน้อยแต่ไม่มีการแผ่ขยาย ดังรูปที่ 4.13 และ 4.14 และสามารถหาความหนาแน่นของเซลล์สูงสุดต่อมิลลิเมตร² ได้ดังนี้ ในอาหาร NM ความหนาแน่นของเซลล์

สูงสุดเท่ากับ 578.75 ± 17.97 เซลล์ต่อมิลลิเมตร², C3G50 เท่ากับ 538.75 ± 16.52 เซลล์ต่อมิลลิเมตร² และ C3G100 เท่ากับ 453.75 ± 29.55 เซลล์ต่อมิลลิเมตร²

นอกจากการเพาะเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดไขกระดูกในอาหารที่มีไซยานิดิน-3-กลูโคไซด์เป็นองค์ประกอบแล้ว ผู้วิจัยยังพบว่าในสารสกัดผลหม่อนมีสารไซยานิดิน-3-กลูโคไซด์อยู่เช่นกันจึงได้ทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดผลหม่อน M50 และ M100 มีความเข้มข้นของสารสกัดผลหม่อนเท่ากับ 2.5 และ 5.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิตรตามลำดับ โดยที่แต่ละความเข้มข้นคิดเป็นปริมาณไซยานิดิน-3-กลูโคไซด์เทียบเท่า 50 และ 100 ไมโครโมลลาร์ ดังรูปที่ 4.12(b) และตารางที่ 4.5 พบว่า การเจริญเติบโตของเซลล์ที่เลี้ยงในอาหาร M50 และ M100 มีระยะ log phase ที่สั้นลงซึ่งอยู่ในช่วง 24- 48 ชั่วโมง (ในภาคผนวก ข) และมีจำนวนเซลล์เพิ่มสูงขึ้นเล็กน้อย หลังจากนั้นการเจริญเติบโตของเซลล์เริ่มคงที่เข้าสู่ระยะ stationary phase ในช่วง 48-120 ชั่วโมง จะเห็นได้จากจำนวนเซลล์ไม่เปลี่ยนแปลงเมื่อเวลาผ่านไป ในระยะ log phase การเลี้ยงในอาหารปกติ M50 มีอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของเซลล์เท่ากับ 15.35×10^{-3} ต่อชั่วโมง และ M100 มีอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของเซลล์เท่ากับ 14.94×10^{-3} ต่อชั่วโมง และอัตราเพิ่มจำนวนของเซลล์เป็น 2 เท่าที่เลี้ยงในอาหาร M50 และ M100 เท่ากับ 45.17 ชั่วโมง และ 46.43 ชั่วโมงตามลำดับ ข้อจำกัดของพื้นที่ในการเพาะเลี้ยงเซลล์ที่เท่ากัน กลับพบว่าการเลี้ยงเซลล์ในอาหาร M50 และ M100 มีความหนาแน่นของเซลล์สูงสุดเพียง 296.67 ± 24.66 เซลล์ต่อมิลลิเมตร² และ 256.67 ± 42.52 เซลล์ต่อมิลลิเมตร² ซึ่งน้อยกว่าการเลี้ยงในอาหาร NM ประมาณ 2 เท่า และลักษณะรูปร่างของเซลล์ในรูปที่ 4.15 และ 4.16 ที่เลี้ยงในอาหาร M50 และ M100 เซลล์มีการยึดเกาะในระยะ 6 ชั่วโมงแรก หลังจากนั้นมีการแผ่ขยายและเพิ่มจำนวนเซลล์เล็กน้อย โดยจำนวนเซลล์ไม่มีความหนาแน่น การเลี้ยงเซลล์ในอาหาร M50 และ M100 มีผลให้การเจริญเติบโตของเซลล์เข้าสู่ stationary phase เร็วขึ้น ทำให้มีความหนาแน่นของเซลล์สูงสุดต่อพื้นที่ต่ำ แสดงว่าสารสกัดผลหม่อนที่ใช้ศึกษานี้มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ แม้ว่าความเข้มข้นของสารสกัดผลหม่อนจะมีปริมาณไซยานิดิน-3-กลูโคไซด์ เทียบเท่ากับการใช้สารไซยานิดิน-3-กลูโคไซด์มาตรฐานแต่พบว่าในสารสกัดหม่อนนั้นนอกจากจะมีแอนโทไซยานินแล้วยังมีองค์ประกอบอื่นในปริมาณสูงได้แก่ น้ำตาลรีดิวิซ์ 127.26 ± 9.29 มิลลิกรัมกลูโคสต่อกรัมน้ำหนักแห้งของสารสกัด ปริมาณกรดที่ไทเทรตได้ร้อยละ 0.80 ± 0.01 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร และสารประกอบพอลิฟีนอลอื่นๆ เคยมีรายงานว่าน้ำตาลกลูโคสปริมาณความเข้มข้น 49.5 มิลลิโมลลาร์ (8.92 มิลลิกรัมต่อมิลลิตร) มีผลยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ได้ เนื่องจากกลูโคสไปยับยั้งการทำงานของ ornithine decarboxylase (ODC) activity ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ใช้ในการสังเคราะห์ polyamine ในขั้นตอนการควบคุมปฏิกิริยา ซึ่ง polyamine นี้เป็นส่วนสำคัญในการกระตุ้นเจริญเติบโตและเปลี่ยนแปลงของเซลล์โดยทำให้โครงสร้าง DNA ที่ถูกสังเคราะห์มีความคงตัวมากยิ่งขึ้น [Terada และคณะ, 1988]

ซึ่งด้วยเหตุผลนี้ทำให้แอนโรไซยานินไม่สามารถออกฤทธิ์กระตุ้นการเจริญเติบโตของเซลล์ได้เต็มที่ที่สารสกัดผลหม่อนความเข้มข้นดังกล่าวเนื่องจากมีน้ำตาลเป็นองค์ประกอบอยู่เป็นจำนวนมาก



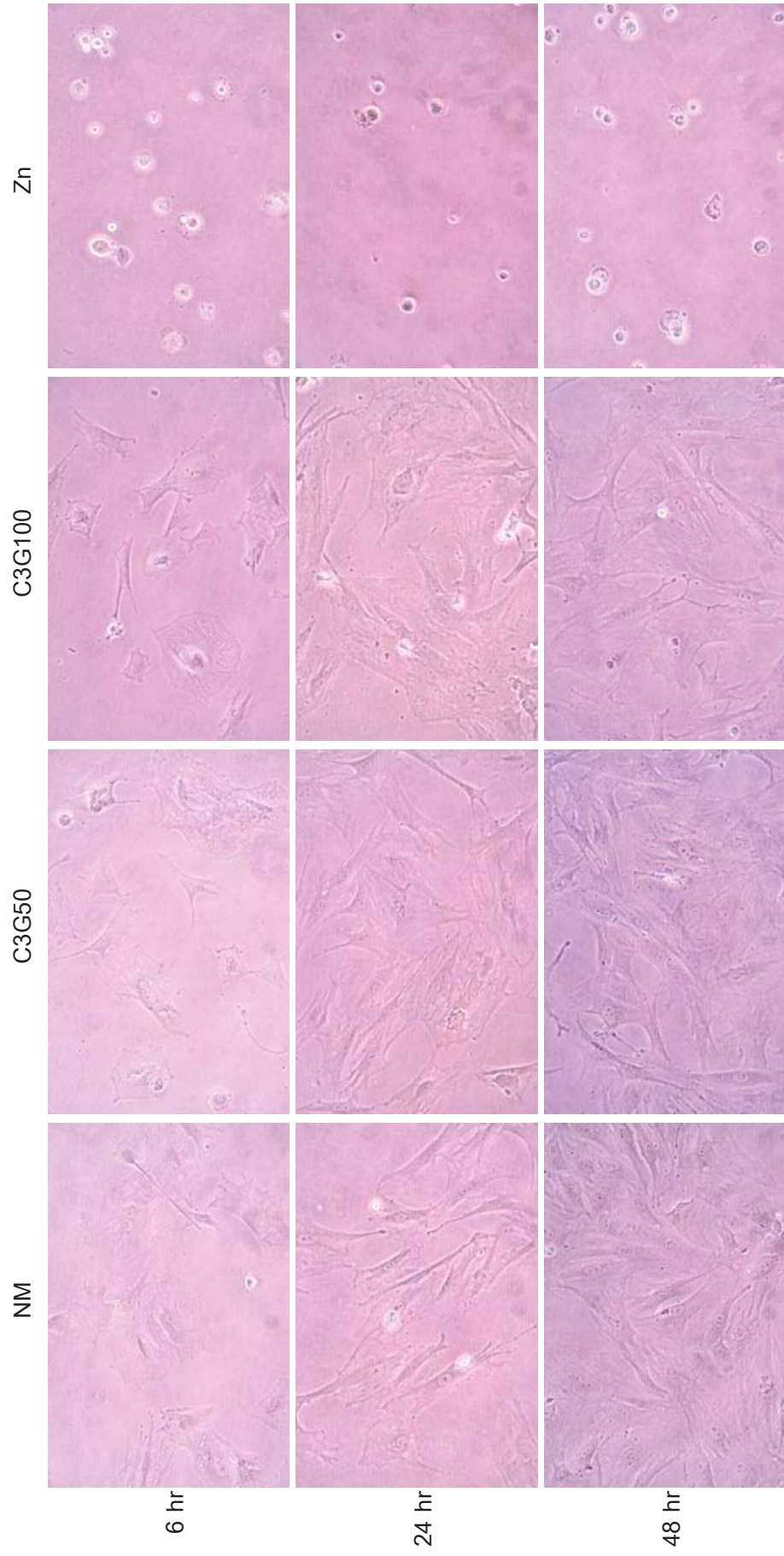
รูปที่ 4.12 การเจริญเติบโตของเซลล์ต้นกำเนิด (MSC) ที่เลี้ยงในอาหาร Normal Medium (NM), ไชยานิดิน-3-กลูโคไซด์ความเข้มข้น 50 μM (C3G50), 100 μM (C3G100), สารสกัดผลหม่อนความเข้มข้น 2.5 mg/ml (M50), 5.0 mg/ml (M100) และ ซิงค์อะซิเทตความเข้มข้น 20 ppm (ZN) บนภาตเลี้ยงเซลล์พอลิสไตรีนขนาด 24 หลุม ที่สภาวะอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส, 5% CO_2 ปริมาณเซลล์ที่ใช้ 2×10^4 /หลุม (a-q แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ในช่วงเวลาเดียวกันและในการทดสอบครั้งเดียวกัน)

ตารางที่ 4.5 อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของเซลล์ (growth rate, μ), เวลาการแบ่งตัวทวีคูณ คือระยะเวลาที่เซลล์เพิ่มจำนวนขึ้นเป็น 2 เท่า (population doubling time, PDT) และความหนาแน่นของจำนวนเซลล์สูงสุด (maximum density) ที่เวลา t_{\max}

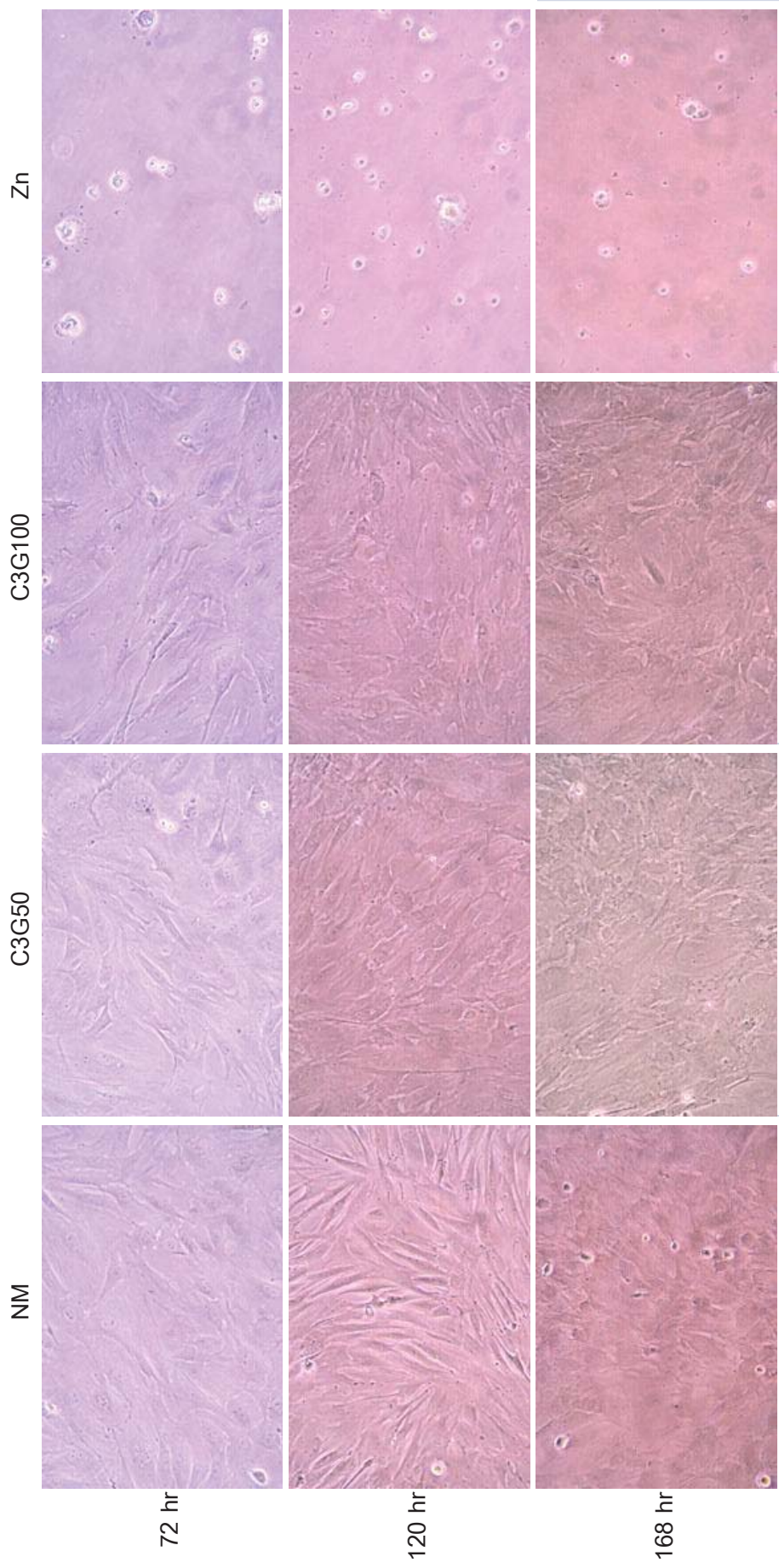
Sample	$\mu \times 10^{-3}$ (hr ⁻¹)	PDT (hr)	Maximum density (cells/mm. ²)	t_{\max} (hr)
NM ¹	26.34	26.33	578.75±17.97	120
C3G50 ¹	26.22	26.45	538.75±16.52	120
C3G100 ¹	21.27	32.61	453.75±29.55	120
Zn ¹	-268.24	Infinity	N/A	6
NM ²	26.95	25.74	591.67±18.93	120
M50 ²	15.35	45.17	296.67±24.66	120
M100 ²	14.94	46.43	256.67±24.66	120
Zn ²	-248.61	Infinity	N/A	6

¹รายงานผลจากรูปที่ 4.12(a)

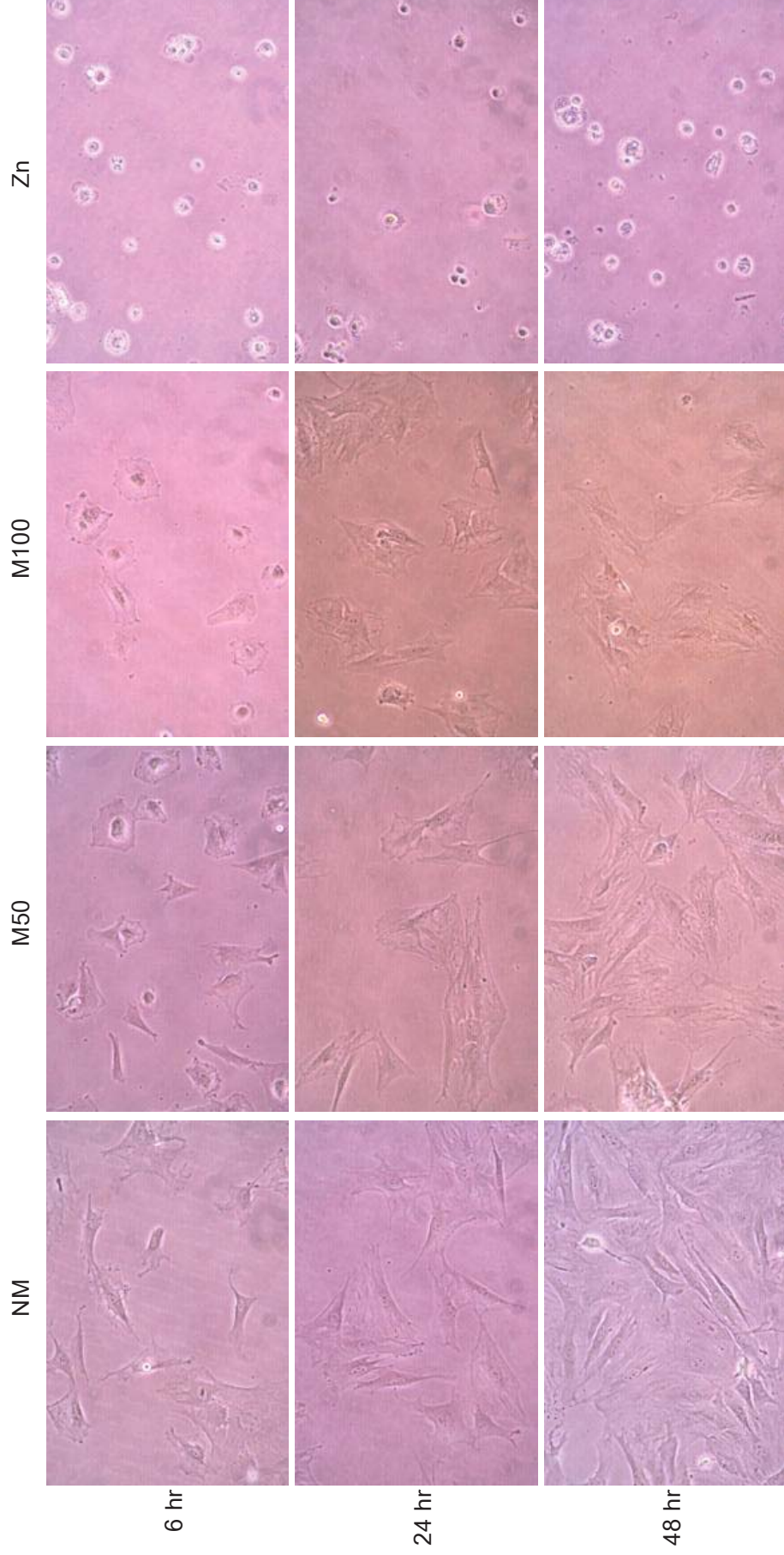
²รายงานผลจากรูปที่ 4.12(b)



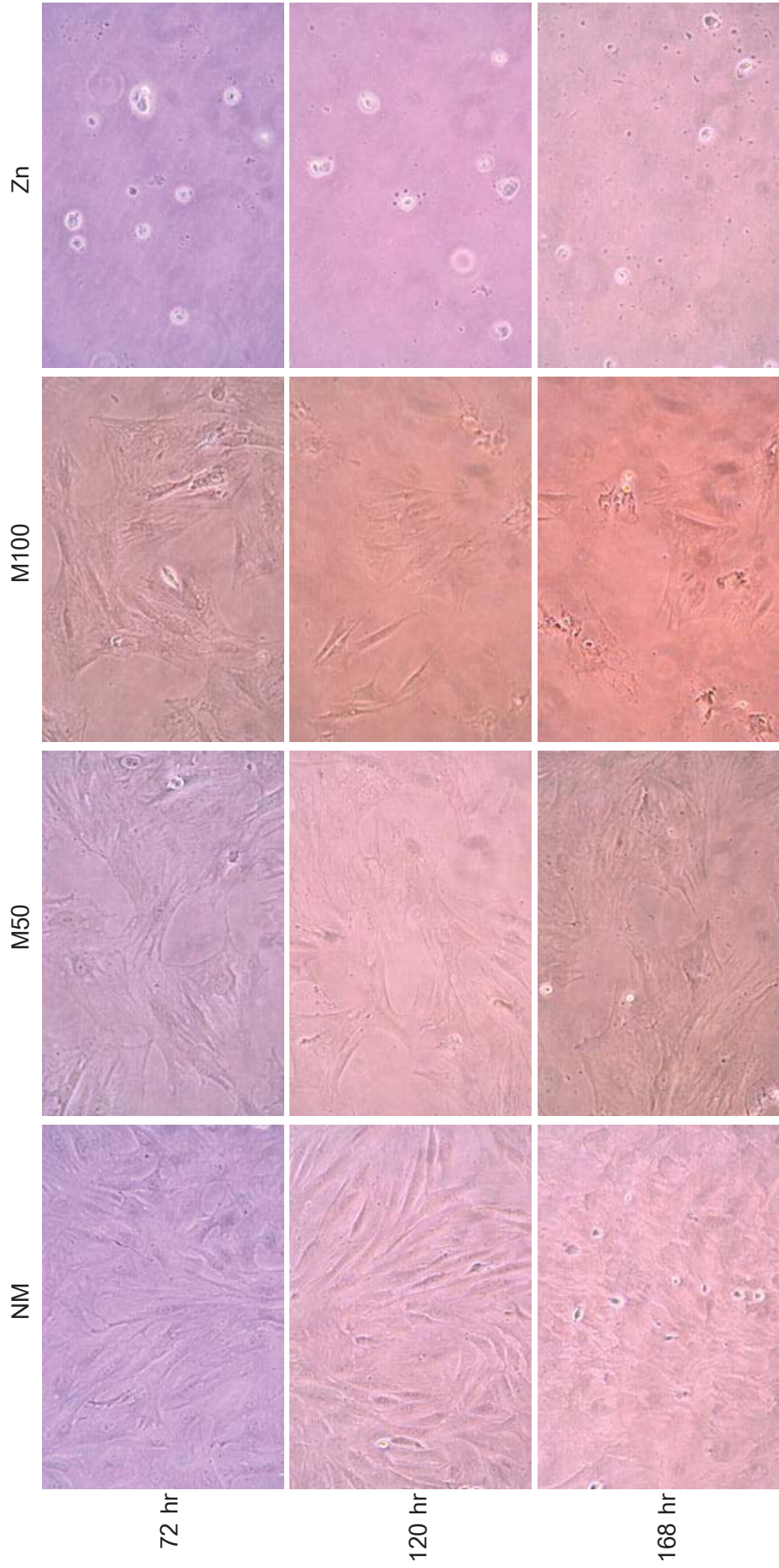
รูปที่ 4.13 รูปร่างของเซลล์ต้นกำเนิด (MSC) ถ่ายได้กล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 20x ที่เลี้ยงในอาหาร Normal Medium (NM), เซยานินดิน-3-กลูโคไซด์ความเข้มข้น 50 μM (C3G50), 100 μM (C3G100) และ ซิงค์อะซิเตรตความเข้มข้น 20 ppm (Zn) ที่สภาวะอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส, 5% CO_2 ปริมาณเซลล์ที่ใช้ 2×10^4 /หลุม ที่ระยะเวลา 6, 24 และ 48 ชั่วโมง



รูปที่ 4.14 รูปร่างของเซลล์ต้นกำเนิด (MSC) ถ่ายได้กล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 20x ที่เลี้ยงในอาหาร Normal Medium (NM), ไฮยานิดิน-3-กลูโคไซด์ความเข้มข้น 50 μM (C3G50), 100 μM (C3G100) และ ซิงค์อะซิเตตความเข้มข้น 20 ppm (ZN) ที่สภาวะอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส, 5% CO_2 ปริมาณเซลล์ที่ใช้ 2×10^4 /หลุม ที่ระยะเวลา 72, 120 และ 168 ชั่วโมง



รูปที่ 4.15 รูปร่างของเซลล์ต้นกำเนิด (MSC) ถ่ายได้กล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 20x ที่เลี้ยงในอาหาร Normal Medium (NM), สารสกัดผงผลหม่อน ความเข้มข้น 2.5 mg/ml (M50), 5.0 mg/ml (M100) และ ซิงค์อะซิเตตความเข้มข้น 20 ppm (Zn) ที่สภาวะอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส, 5% CO₂ ปริมาณเซลล์ที่ใช้ 2x10⁴/หลุม ที่ระยะเวลา 6, 24 และ 48 ชั่วโมง



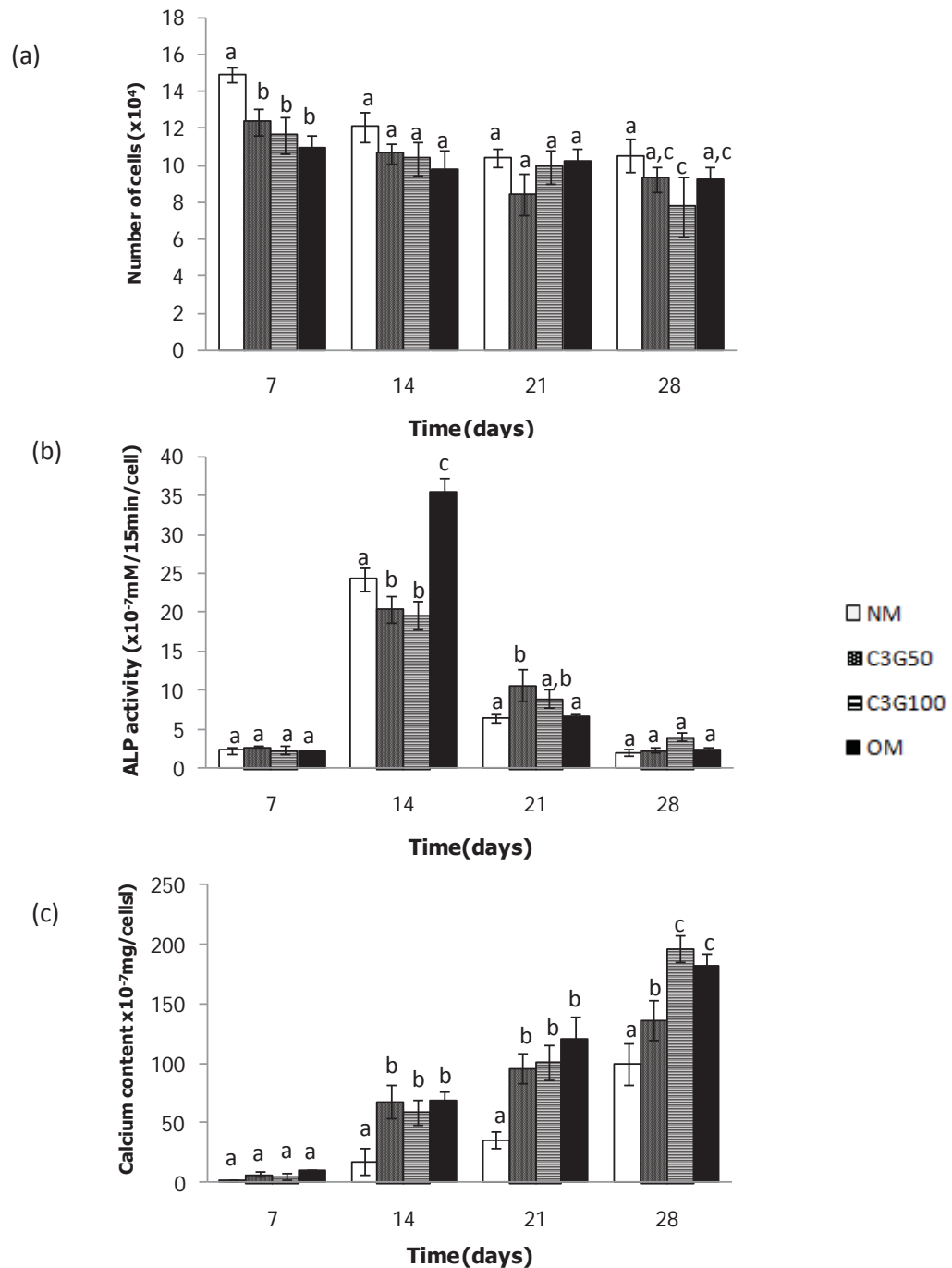
รูปที่ 4.16 รูปร่างของเซลล์ต้นกำเนิด (MSC) ถ่ายได้กล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 20x ที่เลี้ยงในอาหาร Normal Medium (NM), สารสกัดผงผลหม่อน ความเข้มข้น 2.5 mg/ml (M50), 5.0 mg/ml (M100) และ ซิงค์อะซิเตตความเข้มข้น 20 ppm (Zn) ที่สภาวะอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส, 5% CO₂ ปริมาณเซลล์ที่ใช้ 2x10⁴/หลอด ที่ระยะเวลา 72, 120 และ 168 ชั่วโมง

4.4 ศึกษาผลของแอนโธไซยานินและสารสกัดหม่อนต่อการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์กระดูกของเซลล์ต้นกำเนิดไขกระดูกของหนูแรทพันธุ์สัตว์ในระดัห้องปฏิบัติการ

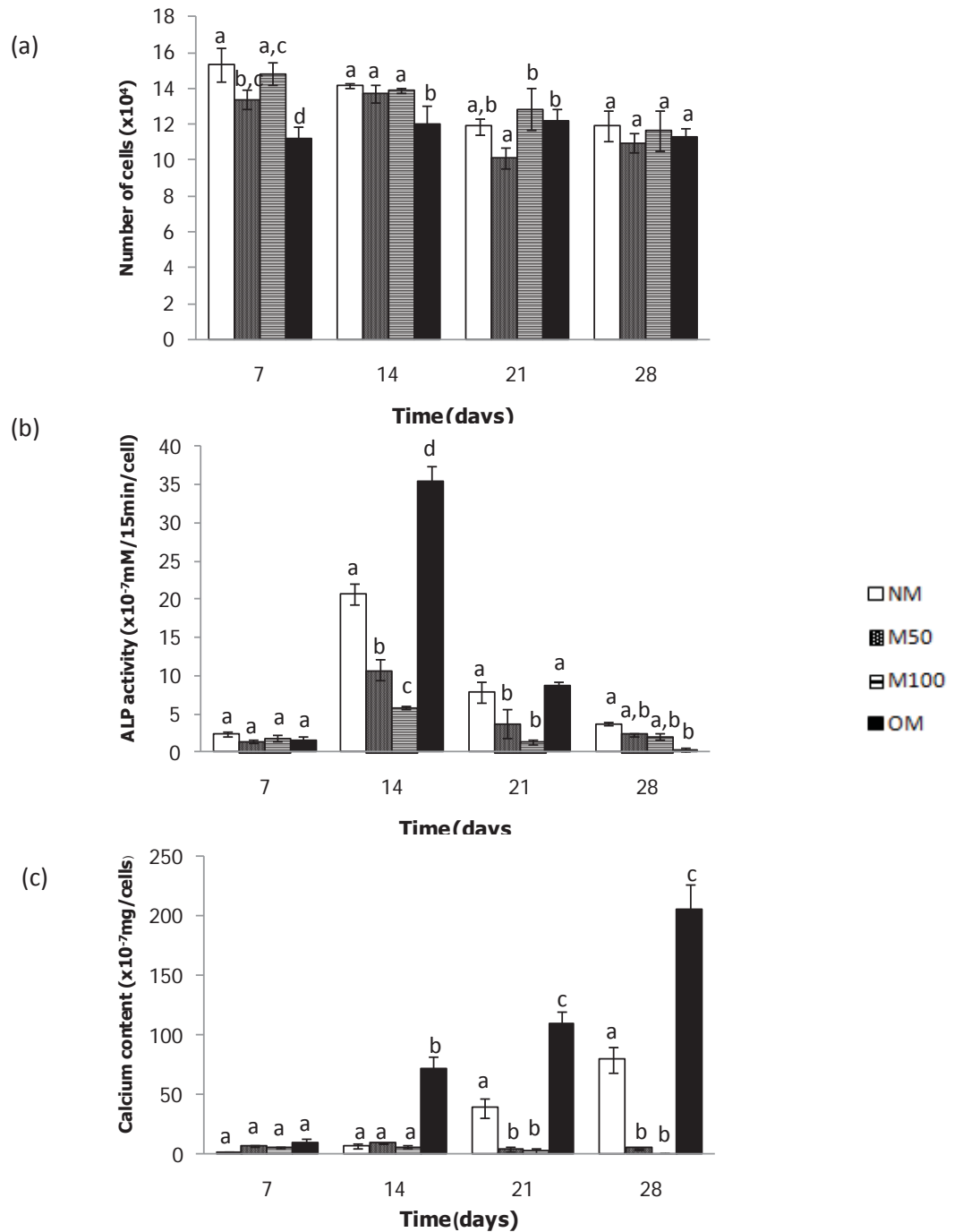
เมื่อศึกษาผลของการเปลี่ยนแปลงไปเป็นกระดูกของเซลล์ต้นกำเนิดจากไขกระดูกที่มีการเติมไซยานิดิน-3-กลูโคไซด์ และสารสกัดผงผลหม่อนในอาหารเลี้ยงเซลล์ปกติ โดยเฉพาะเลี้ยงเปรียบเทียบกับการใช้อาหาร Osteogenic Medium (OM) เป็นอาหารที่มี dexamethasone β -glycerophosphate และ ascorbic acid เป็นอาหารพื้นฐานสามารถช่วยกระตุ้นให้เซลล์เกิดการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์กระดูกได้ [Vater และคณะ, 2011] พบว่าไซยานิดิน-3-กลูโคไซด์ในอาหารเลี้ยงเซลล์ปกติที่มีความเข้มข้น 50 μ M (C3G50) และ 100 μ M (C3G100) มาทดสอบ ดังรูปที่ 4.17 (a) พบว่าการเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดไขกระดูกในอาหาร NM, C3G50, C3G100 และ OM จำนวนเซลล์ไม่เปลี่ยนแปลง โดยทั่วไปการเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดไขกระดูกในอาหาร NM ซึ่งทำหน้าที่เป็น growth media จำนวนเซลล์จะเพิ่มขึ้นตามลักษณะกลศาสตร์การเจริญเติบโตจนกว่าเซลล์จะเข้าสู่ stationary phase หรือเพิ่มจำนวนมากจนเต็มพื้นที่ ในขณะที่การใช้อาหาร OM จำนวนเซลล์มักจะเปลี่ยนแปลงน้อยกว่า เนื่องจากเซลล์มีการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์กระดูกทำให้การเจริญเติบโตของเซลล์ลดลง [Belmonte และคณะ 2005] โดยทั่วไปแล้วการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ต้นกำเนิดไปเป็นเซลล์กระดูก (osteoblasts) จะมีการเปลี่ยนแปลงจากเซลล์ต้นกำเนิดเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์ immature osteoprogenitor จากนั้นเปลี่ยนไปเป็น mature osteoprogenitor แล้วจึงเปลี่ยนเป็น preosteoblast จากนั้นจึงได้เปลี่ยนเป็นเซลล์ mature osteoblast แล้วจึงเปลี่ยนเป็นเซลล์กระดูกที่โตเต็มที่คือ osteocyte ในที่สุด [Lian JB. และ Stein GS., 2001] (รูปที่ 2.4) เซลล์ต้นกำเนิดจะมีการเจริญเติบโตสูงจนถึงช่วงเวลาหนึ่งการเจริญเติบโตจะลดลงและจะมีการสร้าง Extra Cellular Matrix (ECM) เพิ่มขึ้นเรื่อยๆ ในระยะนี้มีการหลั่งสารสำคัญคือ เอนไซม์แอลคาไลน์ฟอสฟาเตส (ALP) คอลลาเจน ชนิด I เป็นต้น ซึ่งเป็น early marker ในช่วงนี้ หลังจากกระบวนการสร้าง ECM ลดลง จะเกิดการสะสมแร่ธาตุเพิ่มขึ้นเพื่อให้กลายเป็นเซลล์กระดูกในระยะนี้จะมีการหลั่งสารสำคัญซึ่งเป็น late marker คือ ออกซิโอแคลซิน คอลลาจีเนส แคลเซียม [Komori T. และ Kishimoto T., 1998] ดังที่กล่าวมาแล้วในรูปที่ 2.4 ค่ากิจกรรม ALP ต่อเซลล์ รูปที่ 4.17 (b) ที่สร้างขึ้นในช่วงแรกของการเกิดการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์กระดูก ซึ่งเป็น early maker วัดได้สูงสุดในวันที่ 14 โดยที่การเลี้ยงเซลล์ในอาหาร C3G50 และ C3G100 มีผลทำให้กิจกรรม ALP ต่อเซลล์ลดลงเล็กน้อยอย่างมีนัยสำคัญ โดยปกติแล้วการเลี้ยงเซลล์ใน osteogenic medium จะทำให้กิจกรรมของเอนไซม์ ALP สูงสุดในสัปดาห์ที่ 2 [Porter และคณะ, 2004] แต่เมื่อพิจารณาปริมาณแคลเซียมสะสมที่เซลล์สร้างขึ้น รูปที่ 4.17 (c) นั้นกลับพบว่าการเลี้ยงในอาหาร C3G50 และ C3G100 เพิ่มการสะสมของแคลเซียมอย่างมี

นัยสำคัญเช่นกัน แสดงให้เห็นว่าเซลล์มีการสร้างแคลเซียมขึ้นมาเนื่องจากเซลล์ถูกกระตุ้นให้เกิดการเปลี่ยนแปลงไปเป็นกระดูก

สำหรับการศึกษาผลของการเปลี่ยนแปลงไปเป็นกระดูกของเซลล์ต้นกำเนิดจากไขกระดูกที่มีการใช้อาหาร M50 และ M100 ในการเลี้ยงเซลล์ ดังรูปที่ 4.18 (a) พบว่าจำนวนเซลล์ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญในแต่ละช่วงเวลา และกิจกรรม ALP ต่อเซลล์สูงสุดในช่วง 14 วันเช่นกัน โดยที่อาหารเลี้ยงเซลล์ M50 และ M100 มีผลในการลดกิจกรรมของเอนไซม์ ALP อย่างมีนัยสำคัญ (รูปที่ 4.18 (b)) อีกทั้งเมื่อพิจารณาการสะสมปริมาณแคลเซียมพบว่า M50 และ M100 ลดปริมาณการสะสมของแคลเซียม (รูปที่ 4.18 (c)) แสดงว่าสารสกัดผงหม่อนที่ใช้ในการศึกษาไม่ได้มีฤทธิ์ช่วยกระตุ้นให้เซลล์ต้นกำเนิดไขกระดูกให้การเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์กระดูก แต่สารไซยานิดิน-3-กลูโคไซด์ความเข้มข้น 50 และ 100 ไมโครโมลลาร์ มีฤทธิ์ในการช่วยกระตุ้นการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ต้นกำเนิดไขกระดูกหนูไปเป็นเซลล์กระดูกได้ ถึงอย่างไรก็ตามสารสกัดผงหม่อนมีศักยภาพที่จะนำไปใช้เป็นอาหารเสริมเพราะกลไกการดูดซึมของสารชนิดต่างๆ ไม่ว่าจะเป็นกลูโคส แอนโธไซยานิน และสารชนิดอื่นๆ มีการดูดซึมสารเพื่อนำไปใช้แตกต่างกัน เนื่องจากแอนโธไซยานินมีน้ำหนักโมเลกุลไม่สูงมากนักซึ่งอาจดูดซึมผ่านระบบการดูดซึมของร่างกายได้โดยไม่ต้องผ่านกระบวนการย่อย ในขณะที่น้ำตาลที่เป็นองค์ประกอบในผงหม่อนต้องได้รับการย่อยก่อนจึงถูกดูดซึม ดังนั้นแอนโธไซยานินที่อยู่ในสารสกัดผงหม่อนนั้น ร่างกายจึงสามารถดูดซึมนำไปใช้งานได้จึงอาจจะมีศักยภาพที่จะใช้งาน เพื่อเป็นประโยชน์กับงานด้านการแพทย์ที่มีการใช้เซลล์ต้นกำเนิดเพื่องานซ่อมแซมกระดูกต่อไป



รูปที่ 4.17 กราฟแสดงจำนวนของเซลล์ต้นกำเนิดไขกระดูก (a) กิจกรรมของเอนไซม์ alkaline phosphatase (ALP) (b) และปริมาณแคลเซียมที่สร้าง (c) ที่เลี้ยงในอาหาร Normal Medium (NM) เป็น negative control, อาหาร Normal Medium ที่มีปริมาณไซยานิดีน-3-กลูโคไซด์ความเข้มข้น 50 μM (C3G50), 100 μM (C3G100) และอาหาร Osteogenic Medium เป็น positive control บนถาดเลี้ยงเซลล์พอลิสไตรีนขนาด 24 หลุม ที่สภาวะอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส, 5% CO_2 ปริมาณเซลล์ที่ใช้ 2×10^4 /ชม² (a, b, c แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ในช่วงเวลาเดียวกัน)



รูปที่ 4.18 กราฟแสดงจำนวนของเซลล์ต้นกำเนิดไขกระดูก (a) กิจกรรมของเอนไซม์ alkaline phosphatase (ALP) (b) และปริมาณแคลเซียมที่สร้าง (c) ที่เลี้ยงในอาหาร Normal Medium (NM) เป็น negative control, สารสกัดผงผลหม่อนความเข้มข้น 0.25 mg/μl (M50), 0.5 mg/μl (M100) และอาหาร Osteogenic Medium เป็น positive control บนภาคเลี้ยงเซลล์พลิสไตรีนขนาด 24 หลุม ที่สภาวะอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส, 5% CO₂ ปริมาณเซลล์ที่ใช้ 2×10^4 /ชม² (a, b, c, d แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (p<0.05) ในช่วงเวลาเดียวกัน)

จนถึงปัจจุบันการศึกษาฤทธิ์ของแอนโธไซยานิน ส่วนมากจะการนำไปทดสอบกับเซลล์มะเร็งเนื่องจากสมบัติที่สำคัญคือ เป็นสารต้านอนุมูลอิสระ มีงานวิจัยมากมายพบว่าแอนโธไซยานินสามารถต้านการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง ได้แก่ เซลล์มะเร็งลำไส้ชนิด HT 29 และ HCT 116 [Kang และคณะ, 2003], เซลล์ human gastric adenocarcinoma AGS [Shin และคณะ, 2005], เซลล์ HT-29 colorectal adenocarcinoma และ HT-60 promyelocytic leukaemia [Netzel และคณะ, 2007] แต่มีใช้ว่าสารต้านอนุมูลอิสระจะต้านการเจริญเติบโตเท่านั้น สารบางชนิดถ้ามีการใช้ปริมาณที่เหมาะสมยังมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ได้ ในปี 2006 Kim และคณะ ได้พบว่า สาร quercetin ซึ่งเป็นสารในกลุ่มฟลาโวนอยด์ สารต้านอนุมูลอิสระชนิดหนึ่งมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโต และช่วยให้การเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์กระดูกของเซลล์ human Mesencrymal Stem Cells (hMSC) โดยสร้างกิจกรรมอัลคาไลน์ฟอสฟาเตส สูงขึ้นร่วมกับการกระตุ้นของ estrogen receptor ที่เซลล์สร้างขึ้น [Kim และคณะ, 2006] นอกจากนี้ สารสกัดขมิ้นชัน (curcumin) ที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมีรายงานว่าทำให้เกิด apoptosis ของเซลล์หลายชนิด มีผลลด differentiation ของเซลล์ไขมัน [Kim และคณะ, 2010] แต่กระตุ้นการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ mouse embryonal carcinoma PCC4 [Batth และคณะ, 2001]

และสรุปตารางเปรียบเทียบค่ากิจกรรม ALP และปริมาณแคลเซียมที่สร้างสะสมของเซลล์ที่เกิดการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์กระดูกได้ดังตารางที่ 4.6

ตารางที่ 4.6 แสดงการเปรียบเทียบการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์กระดูกของเซลล์ต้นกำเนิดจากไขกระดูกของหนูแรทพันธุ์วิสตาที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิดต่างๆ

ชนิดอาหาร		กิจกรรมของ ALP		ปริมาณแคลเซียมสะสม	
		($\times 10^{-7}$ mM/15min/cells) สูงสุดที่ 14 วัน	ร้อยละ สัมพันธ์เทียบกับ กับ NM	($\times 10^{-7}$ mg/cells) สูงสุดที่ 28 วัน	ร้อยละ สัมพันธ์เทียบกับ กับ NM
แอนโดไธซิน	NM ¹	24.35±1.50	100%	99.13±17.63	100%
	C3G50 ¹	20.47±1.74	84.06%	136.56±16.25	137.76%
	C3G100 ¹	19.64±1.82	80.66%	196.52±11.04	198.24%
	OM ¹	29.31±3.27	120.37%	182.22±10.44	183.82%
สารสกัดผงหม่อน	NM ²	20.71±1.33	100%	79.21±10.49	100%
	M50 ²	10.74±1.38	51.86%	4.41±0.70	5.57%
	M100 ²	5.87±0.22	28.34%	0.71±0.53	0.72%
	OM ²	35.39±1.98	170.88%	205.55±20.12	259.50%

¹ รายงานผลจากรูปที่ 4.17

² รายงานผลจากรูปที่ 4.18

บทที่ 5

บทสรุป

การศึกษาลักษณะสมบัติของสารสกัดผลหม่อนสดและผงผลหม่อนสกัด จากแหล่งปลูก 2 แหล่งคือ จังหวัดเพชรบูรณ์ และจังหวัดนครราชสีมา พบว่าร้อยละของน้ำหนักแห้งในผลหม่อนจาก นครราชสีมา มีค่าสูงกว่าเพชรบูรณ์ ร้อยละ 22.17 และร้อยละ 14.27 ตามลำดับ และปริมาณ ของแข็งที่ละลายน้ำทั้งหมดในหม่อนสดของนครราชสีมา มีค่าบrix ร้อยละ 15.9 สูงกว่าแหล่ง เพชรบูรณ์ซึ่งเท่ากับร้อยละ 9.98 เนื่องจากมีปริมาณน้ำที่เป็นองค์ประกอบน้อยกว่า สารสกัดหม่อน ผลที่ได้มีค่าความหนาแน่นใกล้เคียงกับน้ำ ปริมาณกรดที่ไทเทรตได้ของสารสกัดผลหม่อนสดสูง กว่าสารสกัดผงผลหม่อนของทั้งสองแหล่ง แต่ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ของสารสกัดผงผลหม่อนสูงกว่า สารสกัดหม่อนสดอย่างมีนัยสำคัญ ค่าพีเอชของสารสกัดทั้งสองแบบเป็นกรดอ่อนประมาณ 3.67- 4.31 แต่สีของสารสกัดผลหม่อนจากนครราชสีมา มีสีโทนน้ำเงินมากกว่าเพชรบูรณ์และพบปริมาณ แอนโทไซยานินสูงกว่าคือ 9.96 ± 0.32 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง และ 14.35 ± 0.43 มิลลิกรัมต่อ กรัมน้ำหนักแห้ง ของสารสกัดหม่อนสดและผงผลหม่อนสกัดตามลำดับ ส่วนในหม่อนจาก เพชรบูรณ์ซึ่งมีแอนโทไซยานินเป็นองค์ประกอบ 8.67 ± 0.63 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง และใน สารสกัดผงผลหม่อนสกัด 12.14 ± 0.77 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง การต้านอนุมูลอิสระของ หม่อนสกัดพบว่าสารสกัดผงผลหม่อน แหล่งนครราชสีมา มีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.23 ± 0.01 มิลลิกรัม ต่อมิลลิลิตร และสารสกัดผลหม่อนสดเท่ากับ 0.29 ± 0.02 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรแตกต่างกันอย่างมี นัยสำคัญ ซึ่งค่า IC_{50} ที่ต่ำกว่าแสดงถึงฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระที่สูงกว่า สำหรับสารสกัดผงผล หม่อนยังพบว่าแหล่งนครราชสีมา มีฤทธิ์ในต้านอนุมูลอิสระต่ำกว่าเพชรบูรณ์อย่างมีระดับ นัยสำคัญ แต่อย่างไรก็ตามผลหม่อนสายพันธุ์เดียวกันแต่คุณลักษณะสมบัติต่างกันมีปัจจัยจาก แหล่งปลูก ระยะเวลาการเก็บผลผลิต โดยเฉพาะระดับความสุกของผลที่มีผลทำให้สีของผลหม่อน แตกต่างกันซึ่งทำให้ปริมาณน้ำตาล เป็นสารตั้งต้นของแอนโทไซยานิน ซึ่งเป็นสารสำคัญในผล หม่อนต่างกันด้วย

ในการศึกษาความคงตัวของแอนโทไซยานินในสารสกัดผลหม่อนจากเพชรบูรณ์ในสภาวะ ปราศจากแสงและออกซิเจนพบว่าอุณหภูมิ เวลาในการเก็บรักษา และวิธีในการทำปอดเชื้อมีผล ต่อการเปลี่ยนแปลงของปริมาณแอนโทไซยานินในสารสกัด โดยมีการสลายตัวของแอนโทไซยานิน

สูงขึ้นเมื่ออุณหภูมิและเวลาในการเก็บรักษาสูงขึ้น ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสแอนโรไซยานินในสารสกัดผลหม่อนมีความคงตัวมากที่สุดแต่หากเก็บรักษาที่ 70 และ 100 องศาเซลเซียสแอนโรไซยานินในหม่อนสกัดทั้งสองชนิดเสื่อมสลายเท่าๆ กันคือ เหลืออยู่ร้อยละ 45 และร้อยละ 5 ตามลำดับ(หากเก็บรักษาเป็นเวลา 10 ชั่วโมง) อย่างไรก็ตามอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียสสารสกัดผลหม่อนมีความคงตัวสูงกว่าสารสกัดผลหม่อนสดเล็กน้อย โดยหากเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมินี้ 10 ชั่วโมงปริมาณแอนโรไซยานินในสารสกัดผลหม่อนเหลืออยู่ร้อยละ 84.70 และในสารสกัดผลหม่อนสดคงเหลือร้อยละ 72.23 นอกจากนี้กระบวนการฆ่าเชื้อยังมีผลต่อการสลายตัวของสารแอนโรไซยานิน การฆ่าเชื้อแบบพาสเจอร์ไรส์แบบ LTLT ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสนาน 30 นาทีที่มีผลให้มีปริมาณแอนโรไซยานินในสารสกัดผลหม่อนสดเหลืออยู่ร้อยละ 80.92 และในสารสกัดผลหม่อนเหลืออยู่ร้อยละ 85.84 สำหรับการฆ่าเชื้อแบบสเตอริไรส์ ปริมาณแอนโรไซยานินในสารสกัดผลหม่อนสดคงเหลือเพียงร้อยละ 62.14 และในสารสกัดผลหม่อนร้อยละ 64.76 เท่านั้น ส่วน การฆ่าเชื้อแบบพาสเจอร์ไรส์แบบ HTST อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียสนาน 15 วินาที มีผลให้แอนโรไซยานินการสลายตัวเล็กน้อย การทำแห้งแข็งของผลหม่อนสดไม่มีผลเพิ่มความคงตัวให้สารแอนโรไซยานินในสารสกัดผลหม่อน นอกจากนี้ในระบบ สภาวะเร่งแบบ freeze thaw cycle ที่สภาวะอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 46 ชั่วโมง และคายความเย็นที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที แล้วนำไปแช่ในอ่างควบคุมอุณหภูมิที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียสเวลาเป็นเวลา 90 นาทีจำนวน 4 รอบ ไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงปริมาณแอนโรไซยานินอย่างมีนัยสำคัญ แต่อย่างไรก็ตามสภาวะที่เหมาะสมในการเก็บสารสกัดผลหม่อนเพื่อให้มีปริมาณแอนโรไซยานินสูงควรเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส โดยปราศจากแสงและอากาศ แต่ถ้าต้องการให้สารสกัดหม่อนผ่านกระบวนการที่ใช้ความร้อนสูงควรใช้เวลาสั้นๆ ในกระบวนการจึงมีความเหมาะสม

ในการศึกษาความเป็นพิษของแอนโรไซยานินและสารสกัดผลหม่อนต่อเซลล์ต้นกำเนิดไขกระดูก และผลต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ พบว่าการเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดไขกระดูกที่ผสมสารไซยานิดิน-3-กลูโคไซด์ ในอาหารเลี้ยงเซลล์ปกติโดยมีไซยานิดิน-3-กลูโคไซด์ความเข้มข้น 50 ไมโครโมลลาร์ (C3G50) และ 100 ไมโครโมลลาร์ (C3G100) ไม่เป็นพิษกับเซลล์และมีผลต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ให้เพิ่มสูงขึ้น โดยอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของเซลล์เท่ากับ 26.22×10^{-3} ต่อชั่วโมง และ 32.73×10^{-3} ต่อชั่วโมง ตามลำดับ จำนวนเซลล์มีปริมาณมากสูงสุดที่เวลา 120 ชั่วโมง และหลังจากนั้นในเวลาที 144 ชั่วโมง จำนวนเซลล์ลดลงอาจเป็นเพราะข้อจำกัดทางพื้นที่ของถาดเพาะเลี้ยง ความหนาแน่นของเซลล์สูงสุดต่อมิลลิเมตร² ในอาหาร C3G50

เท่ากับ 538.75 ± 16.52 เซลล์ต่อมิลลิเมตร² และ C3G100 เท่ากับ 453.75 ± 29.55 เซลล์ต่อมิลลิเมตร² และพบว่าอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ผสมสารสกัดผลหม่อนความเข้มข้น 2.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (M50) และ 5.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (M100) มีผลให้การเจริญเติบโตของเซลล์การเข้าสู่ stationary phase เร็วขึ้น ในช่วง 48-120 ชั่วโมง ทำให้มีความหนาแน่นของเซลล์สูงสุดต่อพื้นที่ต่ำ แสดงว่า สารสกัดผลหม่อนที่ใช้ศึกษานี้ มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ เนื่องจากในสารสกัดหม่อนนอกจากจะมีแอนโทไซยานินแล้วยังมีองค์ประกอบอื่นหลายชนิด ได้แก่ น้ำตาลรีดิวิซ กรดซิตริก และของแข็งละลายน้ำได้ ซึ่งอาจมีผลยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ได้ M50 มีอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของเซลล์เท่ากับ 15.35×10^{-3} ต่อชั่วโมง และ M100 มีอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของเซลล์เท่ากับ 14.94×10^{-3} ต่อชั่วโมง และความหนาแน่นของเซลล์สูงสุดเพียง 296.67 ± 24.66 เซลล์ต่อมิลลิเมตร² และ 256.67 ± 42.52 เซลล์ต่อมิลลิเมตร² ซึ่งน้อยกว่าการเลี้ยงในอาหาร NM ประมาณ 2 เท่า

เมื่อศึกษาผลของการเปลี่ยนแปลงไปเป็นกระดูกของเซลล์ต้นกำเนิดจากไขกระดูกที่มีการเติม ไชยานิดิน-3-กลูโคไซด์ และสารสกัดผลหม่อนในอาหารเลี้ยงเซลล์ปกติ พบว่า ไชยานิดิน-3-กลูโคไซด์ C3G50 และ C3G100 ค่ากิจกรรม ALP ต่อเซลล์ที่สร้างขึ้นในช่วงแรกของการเกิดการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์กระดูก ซึ่งเป็น early maker วัดได้สูงสุดในวันที่ 14 แต่ลดลงเล็กน้อยเมื่อเทียบกับการเลี้ยงในอาหาร NM และ OM โดยที่ปริมาณแคลเซียมสะสมที่เซลล์สร้างขึ้นนั้นกลับเพิ่มการสะสมของแคลเซียมให้สูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเช่นกัน แสดงให้เห็นว่าเซลล์มีการสร้างแคลเซียมขึ้นมาเนื่องจากเซลล์ถูกกระตุ้นให้เกิดการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์กระดูก สำหรับการเลี้ยงเซลล์ที่ใช้อาหาร M50 และ M100 พบว่าจำนวนเซลล์ไม่เปลี่ยนแปลงในแต่ละช่วงเวลา และมีกิจกรรม ALP ต่อเซลล์สูงสุดในช่วง 14 วันเช่นกัน โดยที่ M50 และ M100 มีผลในการลดกิจกรรมของเอนไซม์ ALP อย่างมีนัยสำคัญ อีกทั้งเมื่อพิจารณาปริมาณแคลเซียมที่สะสม พบว่า M50 และ M100 มีผลลดปริมาณการสะสมของแคลเซียมที่เซลล์สร้างขึ้น แสดงว่าสารสกัดผลหม่อนที่ใช้ในการศึกษาไม่ได้มีฤทธิ์ช่วยกระตุ้นให้เซลล์ต้นกำเนิดไขกระดูกเกิดการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์กระดูก ในขณะที่สารแอนโทไซยานินบริสุทธิ์สามารถกระตุ้นการเปลี่ยนแปลงเป็นเซลล์กระดูกได้ที่มีความเข้มข้นดังกล่าว

ประโยชน์ที่ได้รับจากการศึกษา

1) ได้ข้อมูลทางเคมีกายภาพ และความคงตัวของสารสำคัญในสารสกัดผลหม่อนทั้งสารสกัดผลหม่อนสดและผงผลหม่อนสกัดจาก 2 แหล่งผลิตในประเทศไทยคือ เพชรบูรณ์และนครราชสีมา

2) ได้ผลทางชีววิทยาของสารสกัดผลหม่อน ด้านความเป็นพิษ และผลต่อการเจริญเติบโตและการเปลี่ยนแปลงเป็นเซลล์กระดูกของของเซลล์ต้นกำเนิดไขกระดูกของหนูแรทพันธุ์วิสตาในระดับห้องปฏิบัติการ เซลล์ต้นกำเนิดชนิดนี้ได้รับการยอมรับกันอย่างเป็นทางการว่าสามารถใช้เป็นต้นแบบของเซลล์ต้นกำเนิดไขกระดูกของสัตว์อื่นๆ รวมถึงมนุษย์ได้

3) ได้ผลงานวิจัยที่เป็นพื้นฐานสำหรับผู้วิจัยอื่นที่สนใจนำไปศึกษาต่อในระดับต่อไป และผู้ประกอบการที่มีความเกี่ยวข้องของด้านนี้นำไปพัฒนาใช้งานได้จริงในระดับการค้า

ข้อเสนอแนะ

- 1) ปรับปรุงวิธีการสกัดให้มีปริมาณแอนโธไซยานินให้ได้สูงกว่านี้ และสกัดซ้ำจากกากหม่อนที่เหลือที่ยังคงมีสีม่วงเข้มอยู่
- 2) การทดสอบสภาวะเร่งควรนำสารสกัดหม่อนที่ได้ไปผ่านกระบวนการฆ่าเชื้อในสภาวะที่เลือกก่อนนำมาทดสอบ
- 3) ในการทดสอบความเป็นพิษของเซลล์ควรจะนำสารสกัดหม่อนและแอนโธไซยานินไปทดสอบด้วยเซลล์ L929 ก่อนเนื่องจากเป็นเซลล์ที่ใช้ทดสอบตามสากล
- 4) ควรมีการออกแบบการทดลองในการศึกษาผลของการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์กระดูกของการเลี้ยงในไซยานิดิน-3-กลูโคไซด์ ในทางชีววิทยาเชิงลึกมากกว่านี้เพื่อให้ทราบถึงปัจจัยที่ทำให้สารนี้มีผลต่อเซลล์ อาทิ ปฏิกริยาหรือขั้นตอนใดในการเปลี่ยนแปลงของเซลล์กระดูก

เอกสารอ้างอิง

- มนต์วดี นุ่นเจริญ และศศิธร จันทนวางกูร .ผลของอุณหภูมิและความเป็นกรด-ด่างต่อความคงตัวของแอนโทไซยานินส์ของน้ำลูกหม่อน.การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 46 (2551):562-569.
- มนต์วดี นุ่นเจริญ และศศิธร จันทนวางกูร .ผลของระยะเวลาการเจริญเติบโตต่อแอนโทไซยานินส์และความสามารถต้านออกซิเดชันของผลหม่อนสายพันธุ์กำแพงแสน-เอ็มบี-42-1 การประชุมวิชาการ ครั้งที่ 47. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ (2553):161-168.
- วสันต์ น้อยภิรมย์. หม่อนรับประทานผลและการแปรรูป. สถาบันวิจัยหม่อนไหม กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. (2553).
- Arabshahi-Delouee, S., Urooj, A. Antioxidant properties of various solvent extracts of mulberry (*Morus indica* L.) leaves. *Food Chemistry* 102 (2007): 1233–1240.
- Aramwit, P., Bang, N., Srichana, T. The properties and stability of anthocyanins in mulberry fruits *Food Research International* 43 (2010): 1093–1097.
- Balvinder, K. Batth, Tripathi, R., Srinivas, U.K. Curcumin-induced differentiation of mouse embryonal carcinoma PCC4 cells. *Differentiation*. 68 (2001): 133-140.
- Bae, S.H., Suh, H.J. Antioxidant activities of five different mulberry cultivars in Korea. *LWT* 40 (2007): 955–962.
- Brand-Williams, W. Cuvelier, M.E. and Berset, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *J. Food Technol* 28 (1995): 25-30.
- Butt, M.S., Nazir, A., Sultan, M.T., Schroen., K. *Morus alba* L. nature's functional tonic. *Food Science & Technology* 19 (2008): 505-512.
- Belmonte, M.M., Lucarini, G., Virgili, L., Biagini, G., Detomaso, L., Favia, P., D' Agostino, R., Gristina, R., Gigante, A. and Bevilacqua, C. Mesenchymal stem cells on plasma-deposited acrylic acid coatings: An in vitro investigation to improve biomaterial performance in bone reconstruction. *Journal of Bioactive and Compatible Polymers* 20 (2005): 343-360.
- Castaneda-Ovando, A., Pacheco-Hernandez, M.D., Paez-Hernandez, M.E., Rodriguez, J.A. and Galan- Vidal, C.A. Chemical studies of anthocyanins. *Food Chemistry* 113 (2009): 859–871.

- Durst, R.W. and Wrolstad, R.E. Determination of total monomeric anthocyanin pigment content of fruit juices, beverages, natural colorants, and wines by the pH differential method. Collaborative Study 88 (2005): 1269-1278.
- Ercisli, S. Orhan, E. Chemical composition of white (*Morus alba*), red (*Morus rubra*) and black (*Morus nigra*) mulberry fruits Food Chemistry 103 (2007): 1380–1384.
- Gonzalez-SanJose, M L, Relationship between anthocyanins and sugars during the ripening of grape berries, Food Chemistry 43 (1992): 193-197.
- Hassimotto, N.M.A., Genovese, M.I., Lajolo, F.M. Absorption and metabolism of cyanidin-3-glucoside and cyanidin-3-rutinoside extracted from wild mulberry (*Morus nigra* L.) in rats. Nutrition Research 28 (2008): 198–207.
- Hosseini, F.S., Li, W., Beta, T. Measurement of anthocyanins and other phytochemicals in purple wheat . Food Chemistry 109 (2008): 916–924.
- Kang, S.Y., Seeram, N.P., Nair, M.G. and Bourquin, L.D. Tart cherry anthocyanins inhibit tumor development in ApcMin mice and reduce proliferation of human colon cancer cells .Cancer Letters 194 (2003): 13–19.
- Kim, H.J.; Kim, U.J.; Novakovic, G.V.; Min, B.H.; and Kaplan, D.L. Influence of Macroporous protein scaffolds on bone tissue engineering from bone marrow stem cells. Biomaterials 26 (2005): 4442-4452.
- Kim, Y.J., Bae, Y.C., Suh, K.T., Jung, J.S. Quercetin, a flavonoid, inhibits proliferation and increases osteogenic differentiation in human adipose stromal cells. Biochemical Pharmacology 72 (2006):1268 – 1278.
- Kim, C.Y., Le, T.T., Chen, C., Cheng, J.X., Kim, K.H. Curcumin inhibits adipocyte differentiation through modulation of mitotic clonal expansion, The Journal of Nutritional Biochemistry, In Press, Corrected Proof, Available online 28 December (2010).
- Kirca, A., Cemeroglu, B. Degradation kinetics of anthocyanins in blood orange juice and concentrate. Food Chemistry 81 (2003): 583–587.
- Komori, T. and Kishimoto, T. Cbfa1 in bone development. Curr Opin Genet Dev. (1998):494-499.

- Lian, J.B. and Stein, G.S. Osteoporosis (2 nd ed.). San Dieg: CA Academic (2001).
- Lennon, D.P., et al. A chemically defined medium supports in vitro proliferation and maintains the osteochondral potential of rat marrow-derived mesenchymal stem cell. Experimental Cell Research 219 (1995): 211-222.
- Netzel, M., Netzel, G., Kammerer, D.R., Schieber, A., Carle, R., Simons, L., Bitsch, I., Bitsch, R., Konczak, I. Cancer cell antiproliferation activity and metabolism of black carrot anthocyanins . Innovative Food Science and Emerging Technologies 8 (2007) :365–372.
- Porter, A. E., Taak, P., Hobbs, L.W., Coathup, M.J., Blunn, G.W. and Spectord, M. Bone bonding to hydroxyapatite and titanium surfaces on femoral stems retrieved from human subjects at autopsy. Biomaterials 25(2004): 5199–5208.
- Qin, C., Li, Y., Niu, W., Ding, Y., Zhang, R. and Shang , X. Analysis and Characterisation of Anthocyanins in Mulberry Fruit Food Sci. 28 (2010): 117-126.
- Rommel, A., Heatherbell, D.A., Wrolstad, R.E. Red raspberry juice and wine: Effect of processing and storage on anthocyanin pigment composition, colour and appearance. Journal of Food Science 55 (1990): 1011–1017.
- Shih, P.H., Yeh, C.T. and Yen, G.C. Effects of anthocyanidin on the inhibition of proliferation and induction of apoptosis in human gastric adenocarcinoma cells Food and Chemical Toxicology 43 (2005): 557–1566.
- Terada, M., Inaba, M., Yano, Y., Hasuma, T., Nishizawa, Y., Morii, H. and Otani, S. Growth-Inhibitory Effect of a High Glucose Concentration on Osteoblast-like Cells. Bone 22(1998) :17–23.
- Vachiraroj, N., Ratanavaraporn, J., Damrongsakkul, S., Pichyangkura, R., Banaprasert, T., Kanokpanont, S. A comparison of Thai silk fibroin-based and chitosan-based materials on in vitro biocompatibility for bone substitutes. International Journal of Biological Macromolecules 45 (2009): 470–477.
- Vater, C., Kasten, P., Stiehler, M. Culture media for the differentiation of mesenchymal stromal cells. Acta Biomaterialia 7 (2011): 463–477.
- www.drug.pharmacy.psu.ac.th (accessed December, 2010)

www.fda.moph.go.th/fda-net/html/product/food/ntfmoph/ntf267.html. (accessed
December, 2010)

www.moac.co.th

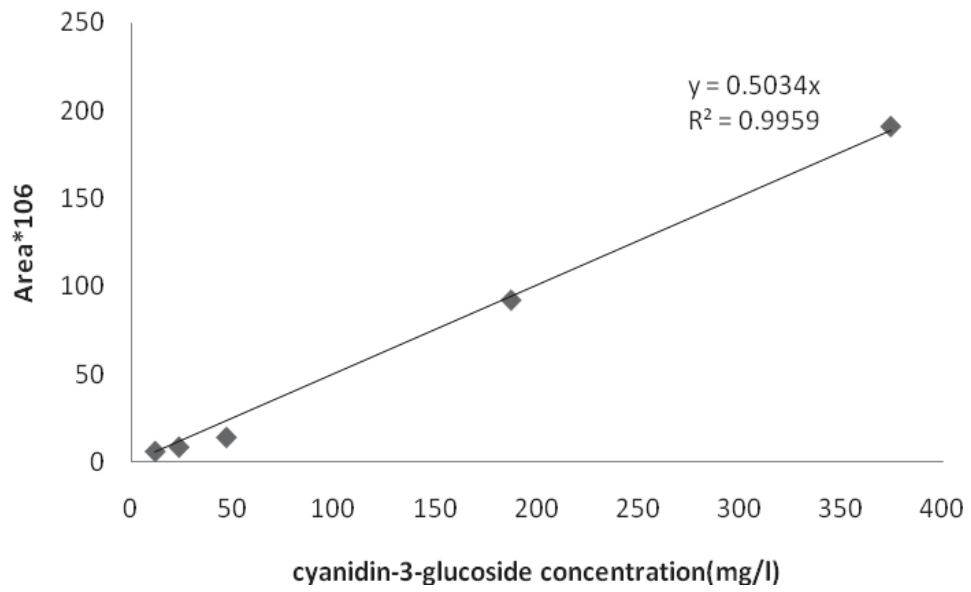
Wang, W.D., Xu, S.Y. Degradation kinetics of anthocyanins in blackberry juice and concentrate. Journal of Food Engineering 82 (2007): 271–275.

Wang, L.S. and Gary D.S. Anthocyanins and their role in cancer prevention. Cancer Letters 269 (2008): 281–290.

ภาคผนวก

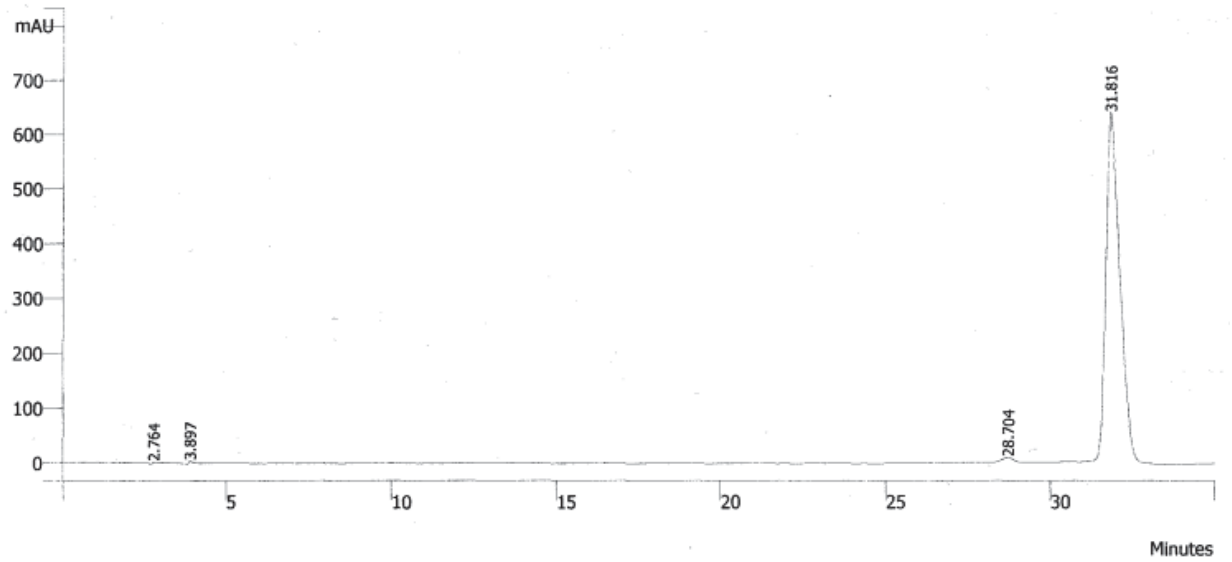
- ภาคผนวก ก : กราฟมาตรฐานของสารไซยานินดิน-3-กลูโคไซด์ ด้วยเครื่อง High Performance Liquid Chromatography (HPLC)
- ภาคผนวก ข : High Performance Liquid Chromatography (HPLC) ของสารไซยานินดิน -3-กลูโคไซด์
- ภาคผนวก ค : High Performance Liquid Chromatography (HPLC) ของสารสกัดผลหม่อนสดแหล่งปลูกจังหวัดเพชรบูรณ์
- ภาคผนวก ง : High Performance Liquid Chromatography (HPLC) ของสารสกัดผลหม่อนสดแหล่งปลูกจังหวัดเพชรบูรณ์
- ภาคผนวก จ : High Performance Liquid Chromatography (HPLC) ของสารสกัดผลหม่อนสดแหล่งปลูกนครราชสีมา
- ภาคผนวก ฉ : High Performance Liquid Chromatography (HPLC) ของสารสกัดผลหม่อนสดแหล่งปลูกจังหวัดนครราชสีมา
- ภาคผนวก ช : กราฟมาตรฐานของการวัดจำนวนเซลล์ต้นกำเนิดไขกระดูก
- ภาคผนวก ซ : กราฟการเจริญเติบโตของเซลล์ต้นกำเนิด (MSC)
- ภาคผนวก ฌ: ตารางเปรียบเทียบแผนงาน

ภาคผนวก ก.



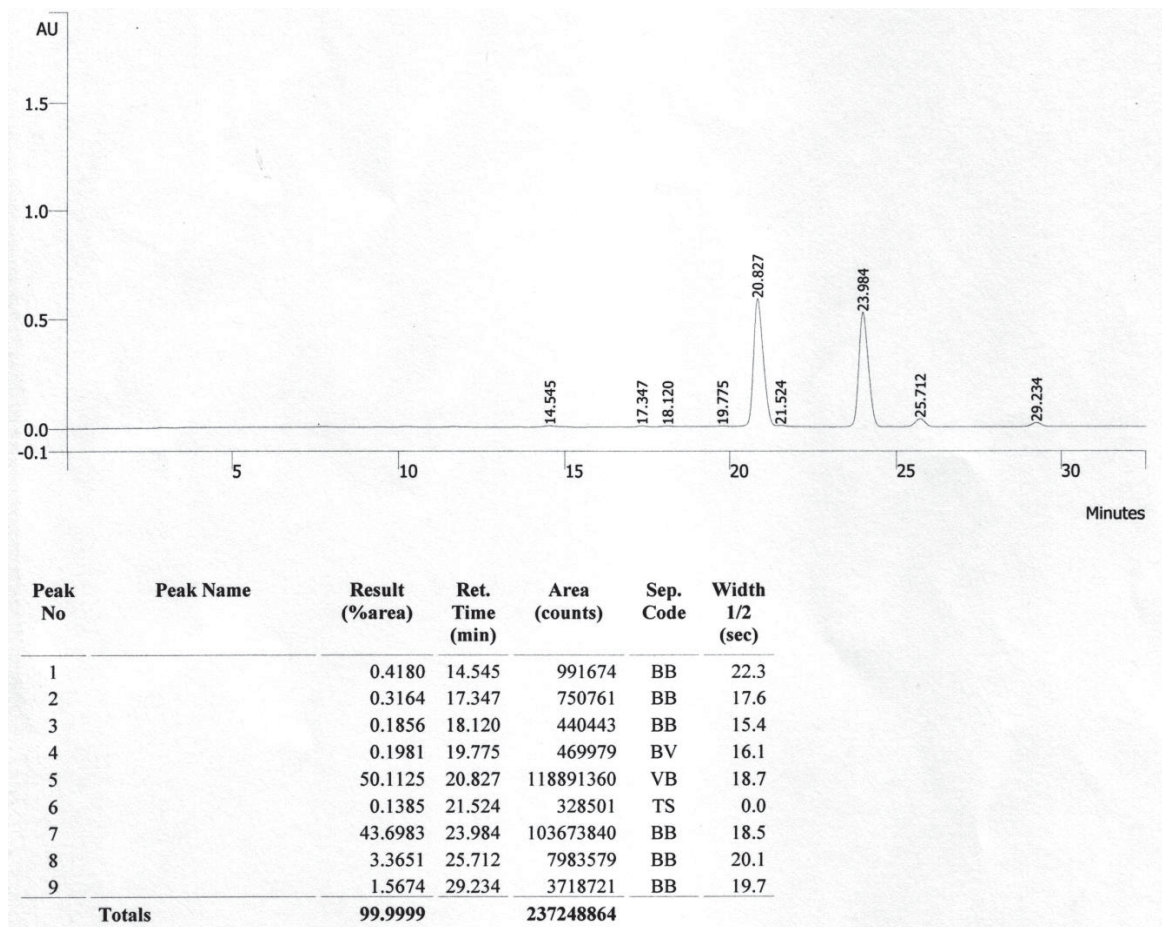
รูปที่ ก กราฟมาตรฐานของสารไซยานินดิน-3-กลูโคไซด์ ด้วยเครื่อง High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

ภาคผนวก ข.



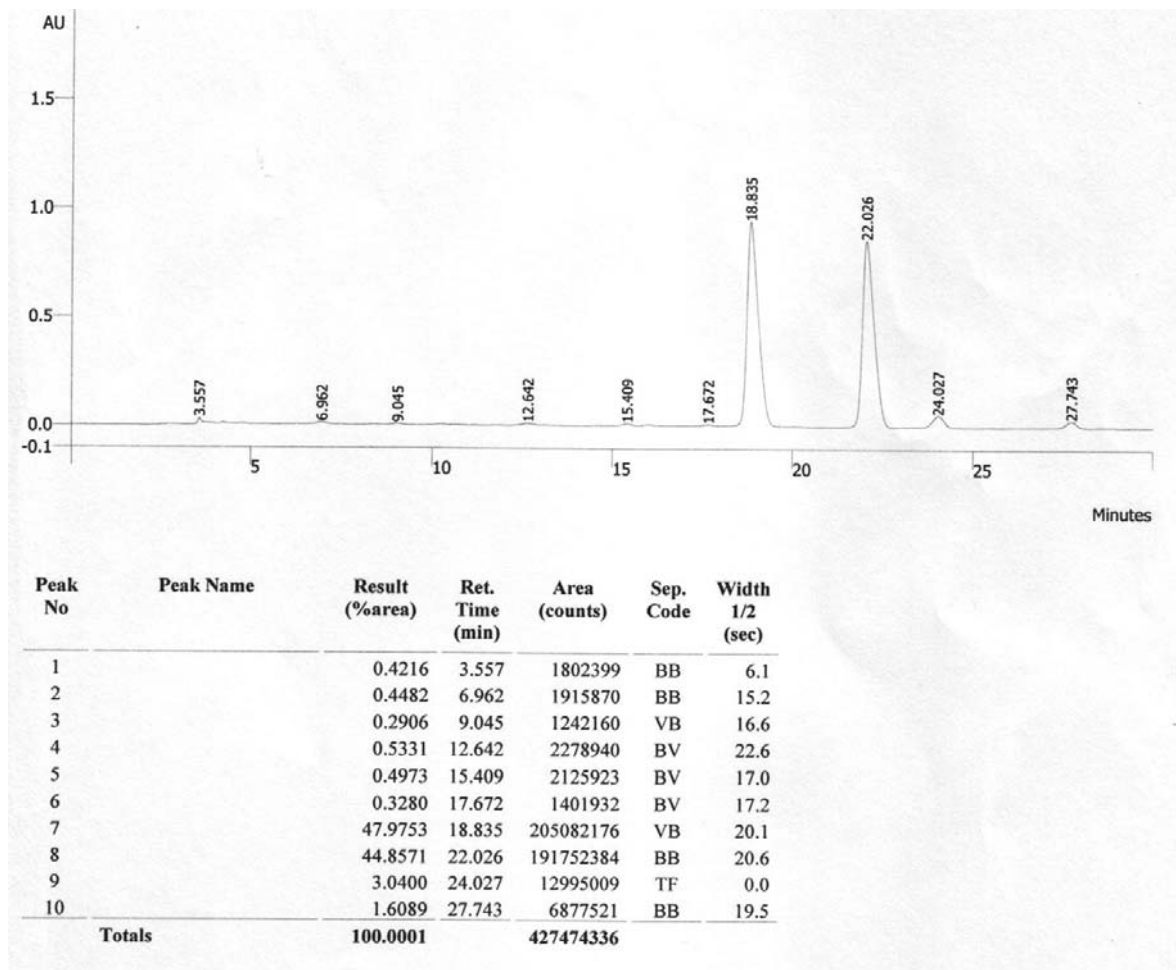
รูปที่ ข High Performance Liquid Chromatography (HPLC) ของสารไซยานิดิน -3-กลูโคไซด์
(สารแอนโธไซยานินมาตรฐาน)

ภาคผนวก ค.



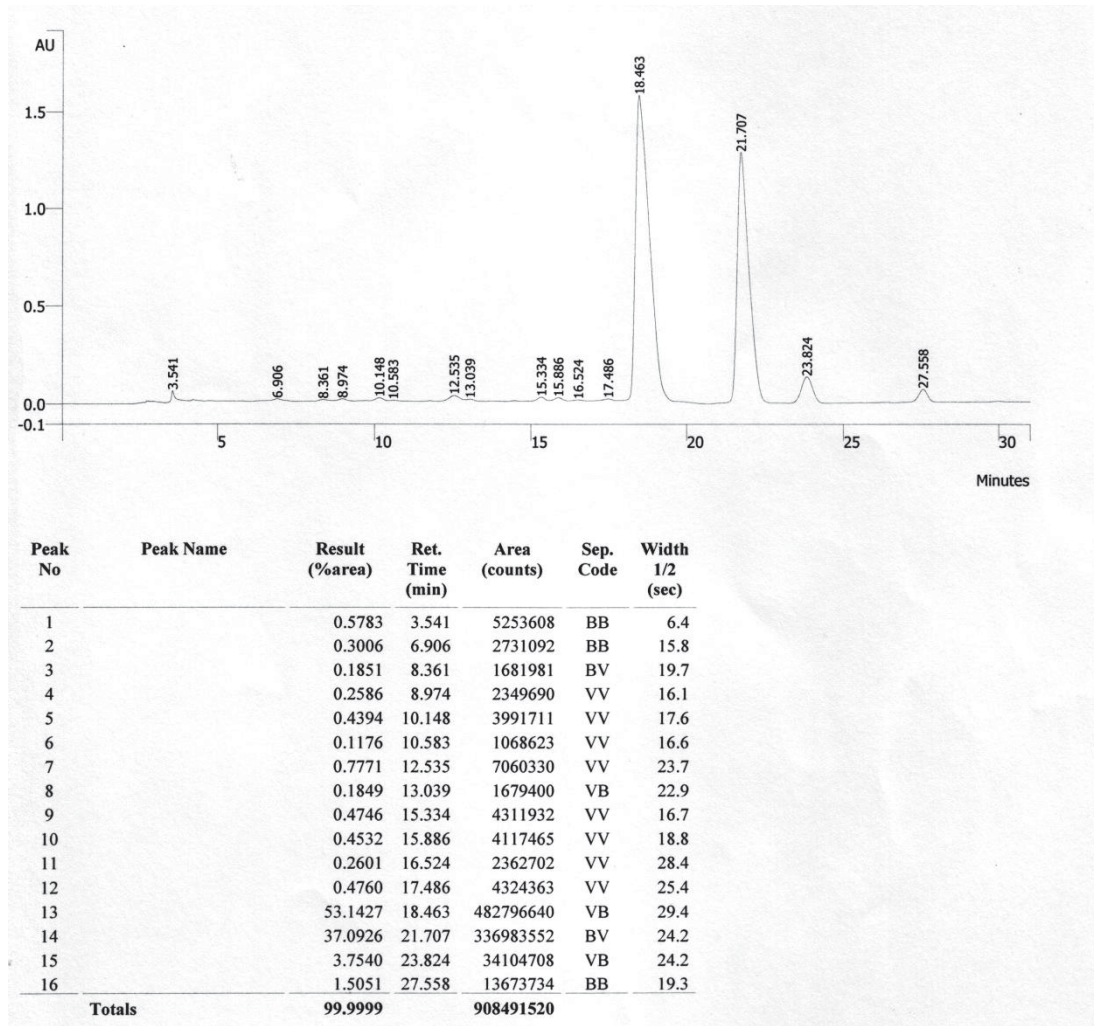
รูปที่ ค High Performance Liquid Chromatography (HPLC) ของสารสกัดผลหม่อนสดแห้ง
ปลูกจังหวัดเพชรบูรณ์

ภาคผนวก ง.



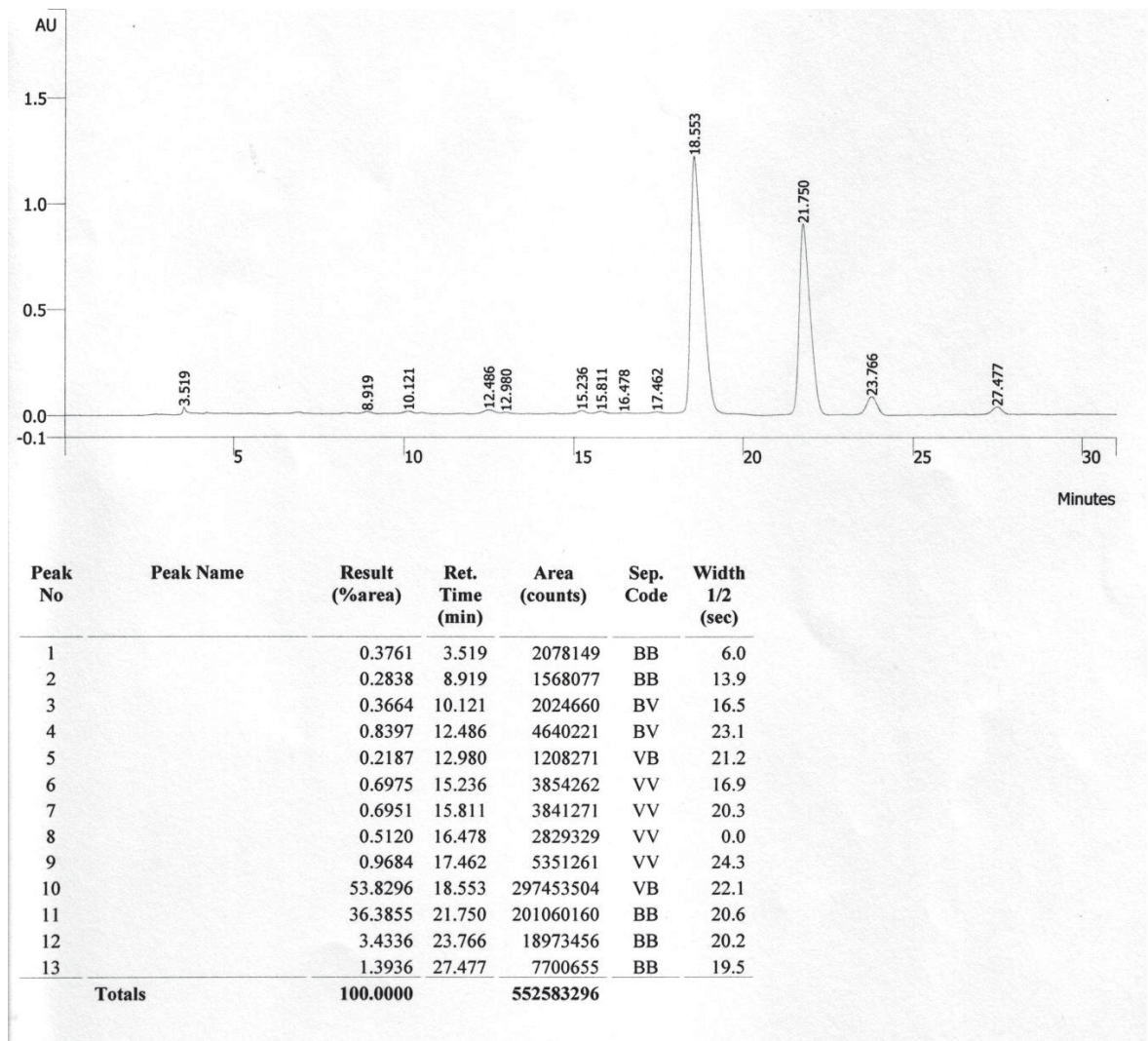
รูปที่ ง High Performance Liquid Chromatography (HPLC) ของสารสกัดผงผลหม่อนแห้ง
ปลูกจังหวัดเพชรบูรณ์

ภาคผนวก จ.



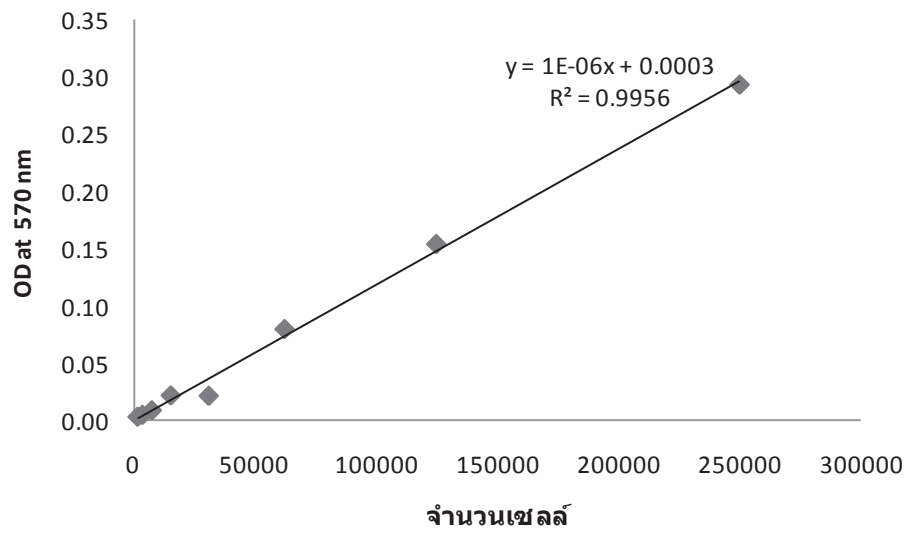
รูปที่ จ High Performance Liquid Chromatography (HPLC) ของสารสกัดผลหม่อนสดแห้ง
ปลูกนครราชสีมา

ภาคผนวก จ.

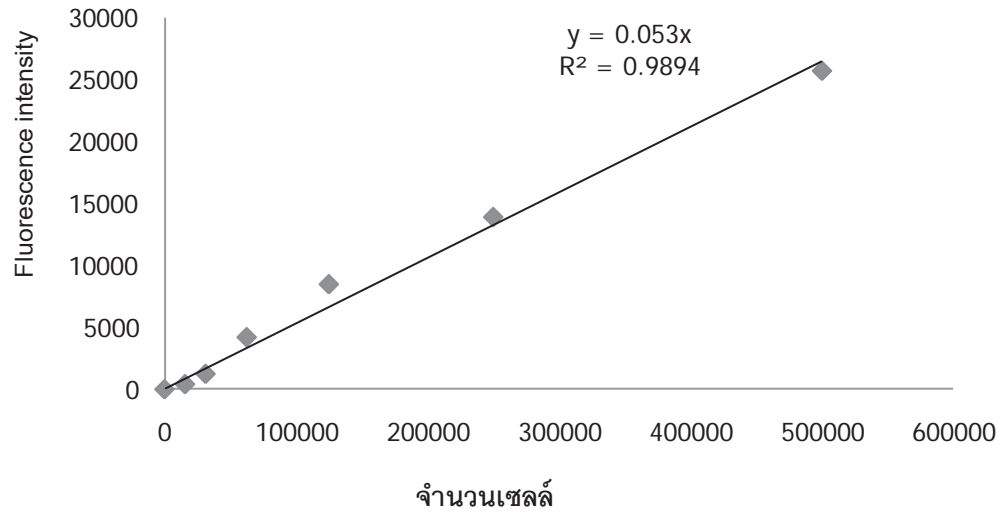


รูปที่ จ High Performance Liquid Chromatography (HPLC) ของสารสกัดผงผลหม่อนแห้ง
ปลูกจังหวัดนครราชสีมา

ภาคผนวก ซ.

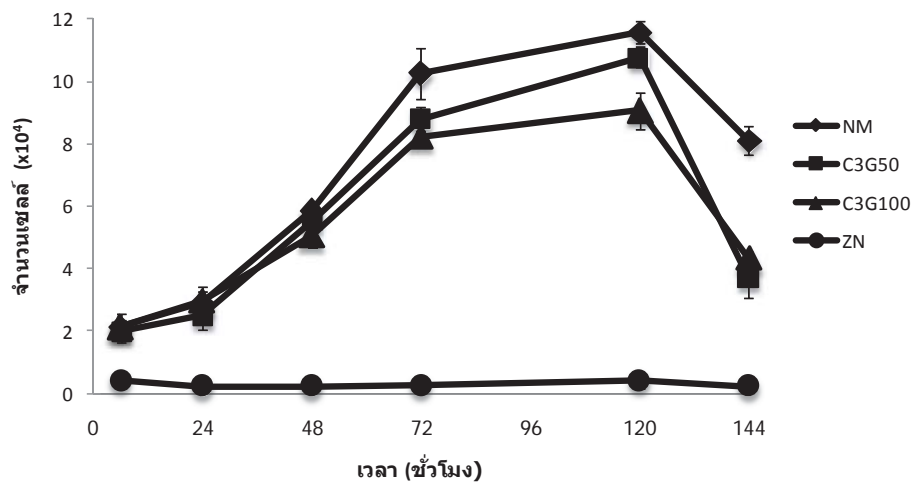


รูปที่ ซ-1 กราฟมาตรฐานของการวัดจำนวนเซลล์ต้นกำเนิดไขกระดูกโดยวิธี MTT

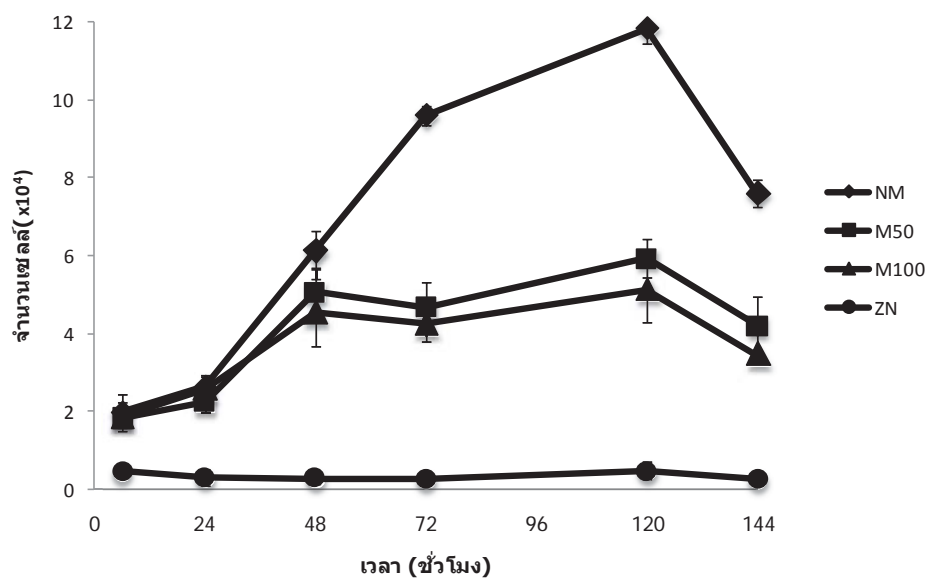


รูปที่ ซ-2 กราฟมาตรฐานของการวัดจำนวนเซลล์ต้นกำเนิดไขกระดูกโดยวิธี DNA

ภาคผนวก ซ.



รูปที่ ซ-1 การเจริญเติบโตของเซลล์ต้นกำเนิด (MSC) ที่เลี้ยงในอาหาร Normal Medium (NM), ไชยานิดิน-3-กลูโคไซด์ความเข้มข้น 50 μM (C3G50), 100 μM (C3G100) และซิงค์อะซิเตรต ความเข้มข้น 20 ppm (ZN)



รูปที่ ซ-2 การเจริญเติบโตของเซลล์ต้นกำเนิด (MSC) ที่เลี้ยงในอาหาร Normal Medium (NM), สารสกัดผงผลหม่อน ความเข้มข้น 0.25 mg/μl (M50), 0.5 mg/μl (M100) และซิงค์อะซิเตรต ความเข้มข้น 20 ppm (ZN)

ภาคผนวก ฉ.
ตารางเปรียบเทียบแผนงาน

1) Grant chart เปรียบเทียบกิจกรรมที่เสนอและกิจกรรมจริง

กิจกรรมที่เสนอ	กิจกรรมที่ทำจริง
1.ศึกษาคุณลักษณะของหม่อนสกัดสดและผงผลหม่อนสกัดรวมทั้งปริมาณสารแอนโธไซยานิน กิจกรรมการต่อต้านอนุมูลอิสระ	ตามที่น่าเสนอและมีการทดลองหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เพิ่มเพื่อให้การทดลองสมบูรณ์ยิ่งขึ้น
2.ศึกษาความคงตัวของสารสำคัญในสารสกัดผลหม่อนคุณภาพสูง 100-121 องศาเซลเซียส, สภาวะการฆ่าเชื้อ, สภาวะเร่ง	ตามที่น่าเสนอและมีการทำการทดลองเพิ่มที่อุณหภูมิ 4, 40 และ 70 องศาเซลเซียสเพื่อให้การทดลองสมบูรณ์ยิ่งขึ้น
3.ศึกษาความเป็นพิษของสารสกัดหม่อนและแอนโธไซยานินต่อเซลล์ต้นกำเนิดไขกระดูกและผลของสารสกัดหม่อนต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ต้นกำเนิดไขกระดูกของหนูแรทพันธุ์สีดำในระดับห้องปฏิบัติการ	ตามที่น่าเสนอ
4.ศึกษาผลของสารสกัดผลหม่อนต่อการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์กระดูกของเซลล์ต้นกำเนิดไขกระดูกของหนูแรทพันธุ์สีดำในระดับห้องปฏิบัติการ	ตามที่น่าเสนอ

2) ตารางเปรียบเทียบ output ที่เสนอ กับที่ได้จริง

Output		ในกรณีล่าช้า(ผลไม่สำเร็จไม่ถึง 100%)ระบุสาเหตุและการแก้ไข
กิจกรรมที่เสนอในโครงการหรือจากการปรับแผน	ผลสำเร็จ (100%)	
1.ได้คุณลักษณะของหม่อนสกัดสดและผงผลหม่อนสกัดรวมทั้งปริมาณสารแอนโธไซยานิน กิจกรรมการต่อต้านอนุมูลอิสระ	100%	-
2.ได้ผลความคงตัวของสารสำคัญในสารสกัดผลหม่อนอุณหภูมิสูง 4, 40, 70 องศาเซลเซียส , สภาวะการฆ่าเชื้อ, สภาวะแรง	100%	-
3.ได้ผลความเป็นพิษของสารสกัดหม่อนและแอนโธไซยานินต่อเซลล์ต้นกำเนิดไขกระดูกและผลของสารสกัดผลหม่อน ต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ต้นกำเนิดไขกระดูกของหนูแรทพันธุ์สัตว์ในระดับ ห้องปฏิบัติการ	100%	-
4.ได้ผลของสารสกัดผลหม่อนต่อการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์กระดูกของเซลล์ต้นกำเนิดไขกระดูกของหนูแรทพันธุ์สัตว์ในระดับ ห้องปฏิบัติการ	100%	-

Stability of Anthocyanin from Mulberry Extracts in Alginate Microspheres at High Temperature

R. Yamdech¹, P. Aramwit², S. Kanokpanont^{1,a,*}

¹ Department of Chemical Engineering, Faculty of Engineering

² Department of Pharmacy Practice, Faculty of Pharmaceutical,
Chulalongkorn University, Phaya Thai Road, Phatumwan, Bangkok, 10330, Thailand
^a sorada.k@chula.ac.th

Keywords: anthocyanins; alginate; mulberry, microspheres

Abstract. The aim of this study was to investigate stabilities of anthocyanins from mulberry fruits extracts in alginate microspheres. The total anthocyanins contents measured from water extracts of mulberry fruits (Chiangmai/Jul cultivars) were at 10.46±0.51 mg/g DW and 15.31±0.86 mg/g DW (Chiangmai/Korat cultivars). At high temperature the extracts lost their anthocyanin contents to 52%wt (at 100 °C for 5 hour) and 73%wt (at 121°C for 20 min). Alginate microspheres were prepared using external gelation methods. Sodium alginate solution (2.5%w/v) was sprayed into CaCl₂ solution (0.1M) through a nozzle at N₂ flow rates of 20 L/min. The average bead sizes were at 342.03±3.21µm. Anthocyanins loading on alginate microspheres were at 2.283±0.15 mg/g dry weight. At 80(10h), 100(5h) and 121°C(20min), Anthocyanins retention were at 91%wt, 82%wt and 89%wt, respectively. Adsorption of anthocyanins from mulberry fruit extracts on alginate microspheres resulted in a greater stability at high temperature than that of the free anthocyanins.

Introduction

Anthocyanins are the largest group of water soluble pigment found in variety of vegetables and fruits. Anthocyanins represent a source of important antioxidants. Mulberry fruit is rich in anthocyanins. The major anthocyanins identified in mulberry fruit extract are cyaniding 3-glucoside and cyaniding 3-rutinoside[1].

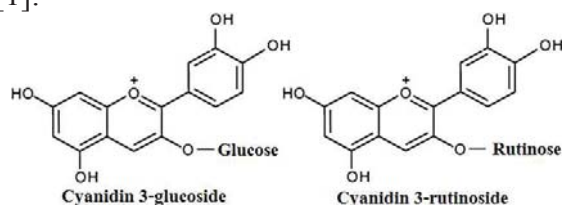


Figure 1. Structure of major anthocyanins found in mulberry fruits[2]

Anthocyanins in mulberry fruits can be considered for uses in cosmetics, nutraceutical and food industry. It has been reported that anthocyanins have potential good health effect such as anti-inflammatory, anti-cancer, anti-tyrosinase activity and its biological activities[3]. Aramwit et al. (2010) reported the effect of temperature on degradation of mulberry fruit extract at 70°C for 10 h which anthocyanins were significantly decreased to 70%wt[3]. The goal of this study was to enhance stability of anthocyanin we proposed the adsorption of mulberry fruit extracts on calcium alginate microspheres.

Alginate is one of the most widely used materials in the pharmaceutical and food industries since it is a non-toxic, biodegradable and biocompatible material. It is a natural polysaccharide found in brown algae. Its consists of linear copolymers of β-1,4- D-mannuronic acid (M-block) and α-1,4-L-guluronic acid (G-block) residues[4]. Alginate hydrogel can be formed upon a complexation with divalent cations such as Ca²⁺, Cd²⁺, Cu²⁺, Ba²⁺, Ni²⁺, Co²⁺, Fe²⁺, Zn²⁺ and Mn²⁺ [5]. The interaction with blocks of G monomers in alginate resulting in ionic bridges between different polymer chains so called “egg-box model”[6].

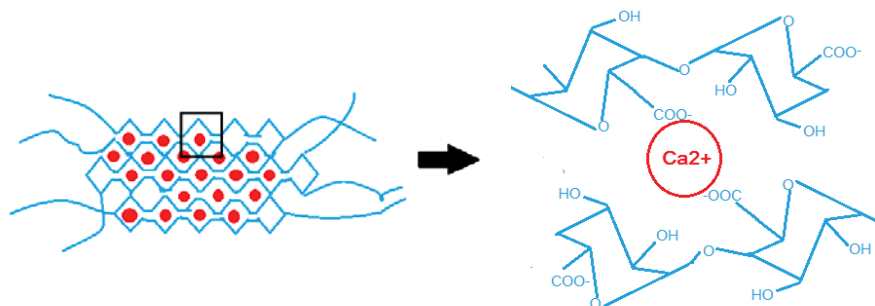


Figure 2. Structure of “egg-box model” of ionic interactions between Ca^{2+} and alginic acid.

In the present study, we aimed to investigate the effect of adsorption of mulberry extracts on calcium alginate microspheres. The microspheres were exposed to heat for extended time and their anthocyanins contents were evaluated in comparison to the free mulberries extract solution.

Experimental Procedure

Preparation of mulberry fruits extracts

Mulberry fruits powder (freeze dried, received from Chul Thai Agro-Industry Co, Ltd., Thailand) were dissolved in deionized (DI) water at 10%wt. The extracts were protected from lights at time of experiment. The extraction was centrifuged at 4000g for 20 min at 4°C and the supernatants were filtered through a filter paper

Preparation of alginate microspheres

Alginate solution (2.5 %w/v) was prepared from medium viscosity alginic acid (sodium salt, Sigma-Aldrich, USA). The solution was sprayed through two nozzles into a CaCl_2 (0.1M) bath. Nitrogen gas at flow rate 20 L/min were used to minimize oxidation. The calcium alginate beads were hardened for 30 minutes. The beads were oven dried at 60°C for 4 hours and were kept dried for the experiments. Dried alginate microspheres were adsorbed with mulberry fruit extracts solution at 4 °C for 2 hours then they were freeze dried for 48 hours.

Particle size analysis

Particle size of the obtained microspheres was determined using Mastersizer 2000 (Malvern Instruments Ltd., UK). The alginate microspheres were suspended in deionization water. The solution was suspended by ultrasonic for 5 min and stirred at 1,750 rpm during the particle size analysis.

Morphological analysis

Alginate particles have been observed by scanning electron microscope (SEM, JSM-5410LV, Japan) to examine shape and surface of oven dried alginate microspheres. Mulberry fruit extracts adsorbed on alginate microspheres have been observed by optical microscopy (Nikon elipse, TS100, Japan)

Anthocyanin contents

Total anthocyanins content was evaluated using the pH-differential method[7]. The mulberry fruits extract was dissolved in potassium chloride buffer, pH 1.0 (0.025 M), and sodium acetate buffer, pH 4.5 (0.4 M). The absorbance was measured using spectrophotometry at 520 and 700 nm. The absorbance (A) of the diluted sample was then calculated as follows:

$$A = (A_{520} - A_{700})_{\text{pH}1.0} - (A_{520} - A_{700})_{\text{pH}4.5} \quad (1)$$

Total anthocyanins were calculated as cyanidin-3-glucoside according to the following equation:

$$\text{Total anthocyanins (mg/L)} = A \times \text{MW} \times \text{DF} \times 1000 / (\epsilon \times l) \quad (2)$$

Where MW = 449.2 g/mol for cyanidin-3-glucoside; DF = dilution factor; l = pathlength in cm; ϵ = 26,900 molar extinction coefficient in L/mol/cm; 1000 = conversion from gram to milligram.

Stability of anthocyanins

The stability of anthocyanins from mulberry fruit extract solution and the adsorbed extraction on alginate microspheres was evaluated at 80, 100 and 121°C. The samples were placed in oven and were rapidly cooled on ice bath. Anthocyanin content was evaluated using pH-differential method mentioned above.

Result and Analysis

Size and Morphology: Average sizes and size distribution of alginate microspheres were at $342.03 \pm 3.21 \mu\text{m}$. Fig 3. shows the shape and surface morphology of alginate microspheres after oven dried at 60°C about 4 h. The wet alginate microsphere had spherical shape, however they shrunk due to oven drying before adsorption of mulberry extracts. Fig 3.(c), After adsorption of mulberry extract, the beads were swelled in DI water. Adhesion of the extract was tight. The beads were could be at 10,000 rpm and were lost only little of its color.

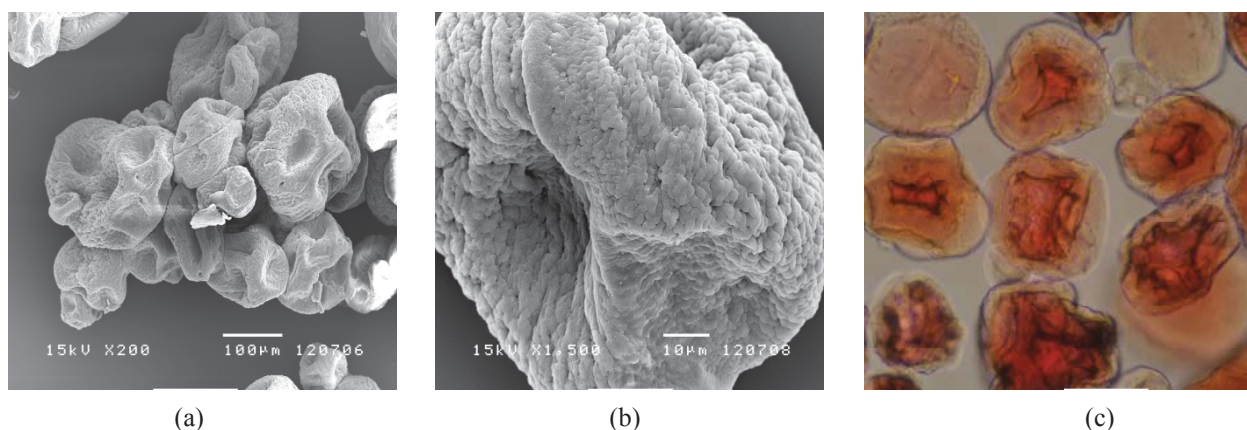


Figure 3. SEM images of alginate microspheres after oven dried at 60°C of (a) and (b), mulberry fruit extracts adsorbed on alginate microspheres after freeze dried, observed under a light microscope (c).

Stability of anthocyanins: The total anthocyanins contents measured from water extracts of mulberry fruits were at $10.46 \pm 0.51 \text{ mg/g DW}$ (Chiangmai/Jul cultivars). and $15.31 \pm 0.86 \text{ mg/g DW}$ (Chiangmai/Koraj cultivars). The conditions used for stability study were selected according to food processes and sterilization. In fruit extract solution at 80 and 100°C, anthocyanins retention was at 68%wt and 75%wt, respectively (Fig 4.(a) and(b)). Increasing time of heat exposure increased degradation of anthocyanins. At 121°C (20 min), anthocyanins significantly decreased to 73%wt in (Fig 4.(c)). The original anthocyanins loading on alginate microspheres were at $2.283 \pm 0.15 \text{ mg/g}$ dried microspheres. For the fruit extracts adsorbed on alginate microspheres, anthocyanins content were not significantly different from that of the original contents. Degradation of the free anthocyanin solutions were higher to compared those adsorbed on alginate beads. However, at 121°C, anthocyanin level not significantly different to the free anthocyanin solutions. This indicated the time of heat exposure had significant effect on anthocyanin degradation. These results show high temperature affected greatly stability on anthocyanin in the fruit extracts and adsorption on calcium alginate microspheres could enhance stability of the anthocyanin contents.

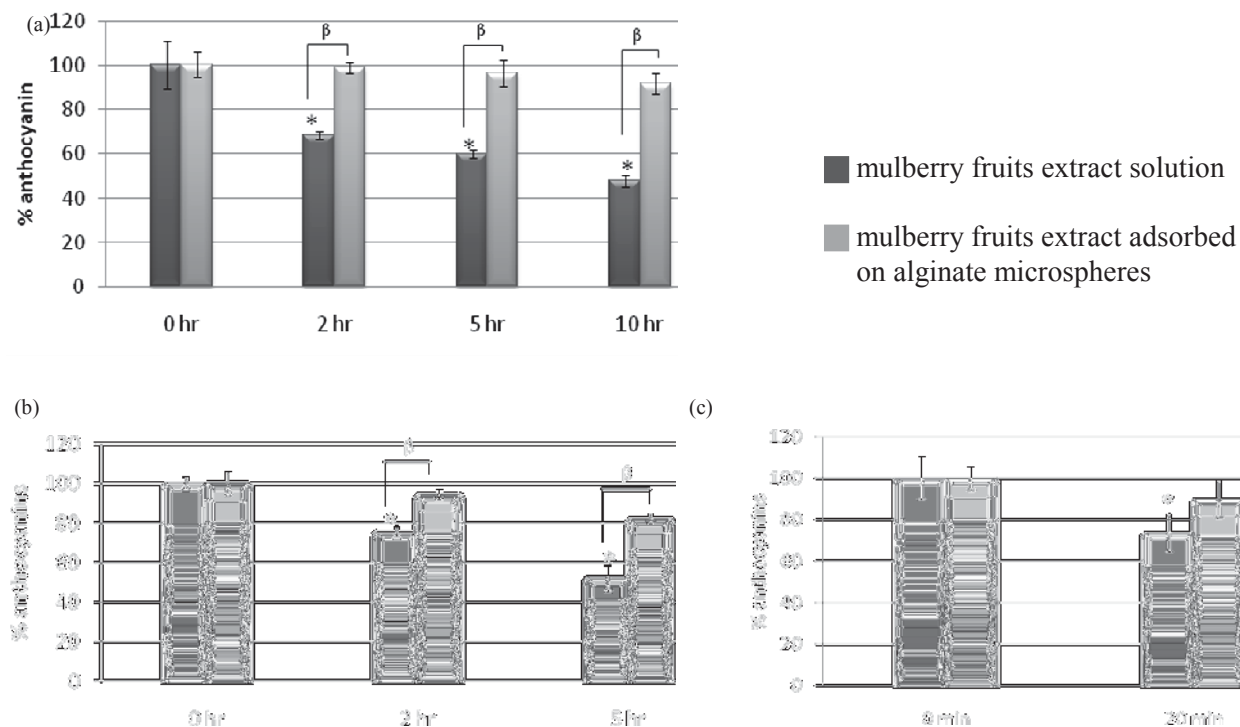


Figure 4. Stability of anthocyanins in mulberry fruit extracts in different time at 80°C (a), 100°C (b) and 121°C (c) (*represents the significant difference relative to time=0 (p<0.05), β represents the significant difference between the free and the adsorbed anthocyanins (p<0.05))

Conclusion

We fabricated dried calcium alginate microspheres using external gelation method and proposed to use them to enhance stability of anthocyanins in mulberry fruit extracts. The results showed adsorption of mulberry fruit extracts on alginate microspheres were effective and could enhance stability of anthocyanins at high temperature. This result showed potential for application of calcium alginate in preventing anthocyanin degradation in food industries or for any processes involved in high temperature exposure.

Acknowledgements

This work was supported financially in parts by Stimulus Package 2 (SP2) of Ministry of Education under the theme of Green Engineering for Green Society and Chulalongkorn University Centenary Academic (The Biomedical Engineering Development project)

References

- [1] X.M. Liu, G.S. Xiao, W.D. Chen, Y.J. Xu, J.J. Wu. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* 5(2004):326–331.
- [2] M.S. Butt, A. Nazir, M.T. Sultan, K. Schroen. *Food Science & Technology* 19 (2008): 505–512.
- [3] P. Aramwit, N. Bang, T. Srichana. *Food Research International* 43 (2010):1093–1097.
- [4] E.S. Chan, B.B. Lee, P. Ravindra, D. Poncelet. *Journal of Colloid and Interface Science* 388(2009):63–72.
- [5] N. Mofidi, M. Aghai-Moghadam, M.N. *Process Biochemistry* 35 (2000): 885–888
- [6] L.D. Jeanie, G.D. Robert, J. M. David. *Biomaterials* 25(2004): 3187–3199.
- [7] R.W. Durst, R.E. Wrolstad. *Collaborative Study* 88 (2005):1269–1278.

Biomaterials and Applications

10.4028/www.scientific.net/AMR.506

Stability of Anthocyanin from Mulberry Extracts in Alginate Microspheres at High Temperature

10.4028/www.scientific.net/AMR.506.587

งานสัมมนาพิเศษ

เรื่อง Mulberry: The functional fruit

จัดโดย ภาควิชาวิศวกรรมเคมี ร่วมกับ หลักสูตรสาขาวิศวกรรมชีวเวช
คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วัน จันทร์ ที่ 16 กรกฎาคม 2555 เวลา 13.00 – 15.00 น.

ณ ห้อง 209 อาคาร 3 คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

หัวข้อสัมมนา

1. ลักษณะสมบัติของผลหม่อนสกัดจากแหล่งปลูกจังหวัดเพชรบูรณ์ และนครราชสีมา
(ผู้บรรยาย : รศ.ดร. ภญ. พรอนงค์ อร่ามวิทย์ คณะเภสัชศาสตร์)
2. ผลของ Anthocyanin และผลหม่อนสกัด ที่มีต่อการเจริญ และการเปลี่ยนแปลงไปเป็นกระดูก
ของเซลล์ต้นกำเนิดไขกระดูกของหนู Wistar
(ผู้บรรยาย : ผศ.ดร. โสรดา กนกพานนท์ คณะวิศวกรรมศาสตร์)
3. ความคงตัวของ Anthocyanin ในผลหม่อนสกัดที่อุณหภูมิสูง และใน Alginate microspheres
(ผู้บรรยาย : คุณ รุ่งนภา เข้มเดช นิสิตปริญญาโท คณะวิศวกรรมศาสตร์)

วัตถุประสงค์การจัดสัมมนา

1. เพื่อเผยแพร่ความรู้ด้านประโยชน์ของสารสกัดผลหม่อนและผงผลหม่อนสกัดจาก 2 แหล่งใน
ประเทศไทย
2. เพื่อเผยแพร่ให้ผู้ประกอบการการค้าด้านหม่อนสกัดได้ทราบ

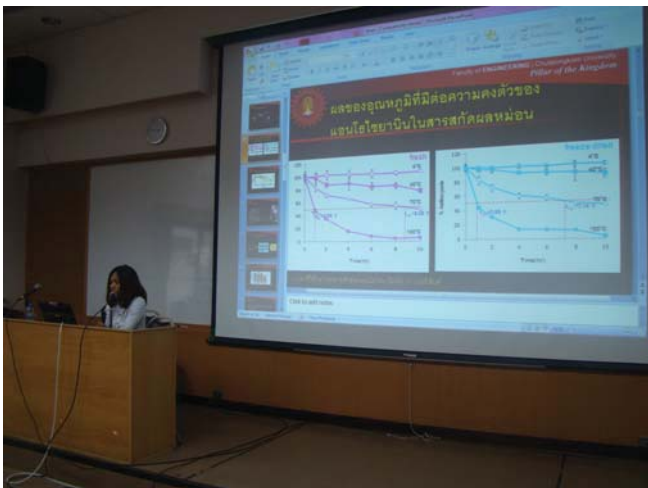
จำนวนผู้เข้าฟังสัมมนา 15 คน

ผู้เข้าฟังการสัมมนาในครั้งนี้ประกอบด้วยภาครัฐและเอกชน อันได้แก่ อาจารย์และนิสิตปริญญาโทและเอก จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เจ้าหน้าที่และนักวิชาการของกรมหม่อนไหม ผู้จัดการบริษัท จุลไหมไทยจำกัด ตัวแทนของบริษัทเบอร์รี่เฮาส์คลินิก เป็นต้น

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. นักวิจัย ผู้มีความรู้เฉพาะด้าน และผู้ประกอบการ ได้แลกเปลี่ยนความรู้ทางด้านหม่อน
2. เพื่อเป็นข้อมูลส่งเสริมในการผลิตหม่อนสกัดขายสู่ผู้บริโภคได้

ภาพกิจกรรม





ลักษณะสมบัติของผลหมอนศักดิ์จากแหล่ง ปลูกจังหวัดเพชรบูรณ์ และนครราชสีมา

รองศาสตราจารย์.ดร. ภาณุ. พรอนงค์ อรัณวิทย์
ภาควิชาเภสัชกรรมปฏิบัติ คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์
มหาวิทยาลัย

วันจันทร์ ที่ 16 กรกฎาคม 2555

ณ ห้อง 209 อาคาร 3 คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

หม่อนที่ปลูกในประเทศไทย

พันธุ์หม่อนที่เพาะปลูกในประเทศไทย เป็นตระกูล *Morus alba L.* ซึ่งส่วนมากปลูกเพื่อเก็บผลผลิตไปหม่อนเป็นอาหารสำหรับเลี้ยงหนอนไหมเพื่อผลิตรังไหม แต่ปัจจุบันมีความสนใจปลูกหม่อนเพื่อผลิตผลเป็นปริมาณสูง ซึ่งในประเทศไทยมีสายพันธุ์หม่อนหลายชนิดได้แก่

- พันธุ์เซียงใหม่
- พันธุ์นครราชสีมา 60
- พันธุ์บุรีรัมย์ 51
- พันธุ์ศรีสะเกษ 33
- พันธุ์สุพรรณนคร 72



ปัจจุบันกรมหม่อนไหมได้ส่งเสริมให้ปลูกหม่อนเพื่อใช้ไปและผลนำไปผลิตเป็นผลิตภัณฑ์เพื่อสุขภาพ มีมูลค่าประมาณ 400 ล้านบาท ทำให้การปลูกหม่อนผลสดพันธุ์เซียงใหม่ทำให้ผลสดสูงสุดในปีปัจจุบันประมาณ 1,000 กิโลกรัมต่อไร่ต่อปี

การนำไปใช้ของผลหม่อน

- อุตสาหกรรมการหมักอาหารและเครื่องดื่ม
- อาหารเสริม
- เครื่องสำอาง



วัตถุประสงค์

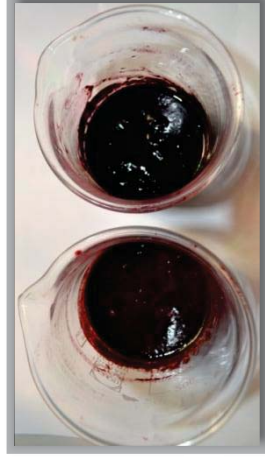
เพื่อศึกษาคุณลักษณะของผลหม่อนสกัดสด และผงผลหม่อนสกัด
รวมทั้งปริมาณสาร แอนโทไซยานิน กิจกรรมการต่อต้านอนุมูล
อิสระ (antioxidation) และความคงตัว

การเตรียมสกัดหม่อนสดและผงผลหม่อนสกัด



เพชรบูรณ์ นครราชสีมา
ผลหม่อนสด

ทำแห้งแข็งด้วย
เครื่อง Freeze dry



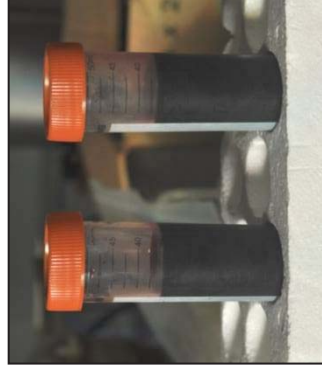
แยกกากด้วย
ผ้าขาวบาง



ปั่นหยาบ ความเร็วรอบ
4500 รอบต่อนาที ,
4 องศาเซลเซียส 20 นาที



10 กรัมผงหม่อนต่อ
น้ำ DI 100 มิลลิลิตร
ปั่นจนทิ้งไว้ 1 ชั่วโมง



สารสกัดผลหม่อน
(เก็บสารสกัดให้พ้นแสง)

กรองด้วยกรวยกรอง
บุชเนอริกระดาษกรอง
(Whatman no.4)

ลักษณะสมบัติทางกายภาพของสารสกัดหม่อน

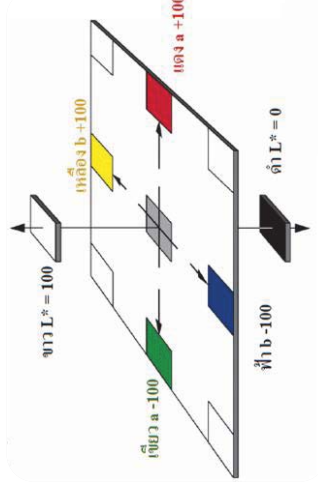
- ร้อยละผลได้ของผลหม่อนอบแห้ง

$$\% Yield = \frac{(w_1 - w_2)}{w_1} \times 100$$

เมื่อ w_1 น้ำหนักหม่อนสด

w_2 น้ำหนักหม่อนสดหลังการทำแห้ง

- สี ระบบ $L^*a^*b^*$



เครื่องวัดสี (Colormeter)

- ค่าความเป็นกรด ต่าง(pH)



pH meter

- Total soluble solids, TSS



Refractometer

ลักษณะสมบัติทางกายภาพของผลหม่อนสด



เพชรบูรณ์

นครราชสีมา

แหล่งของผลหม่อน สายพันธุ์เชียงใหม่	น้ำหนักเฉลี่ยต่อผล (กรัม)	น้ำหนักแห้งของผลหม่อน (ร้อยละโดยน้ำหนัก)	ปริมาณน้ำในผล (ร้อยละโดยน้ำหนัก)
เพชรบูรณ์ (Morus alba)	2.53±0.49 ^a	14.27±0.35 ^c	85.72±0.35 ^e
นครราชสีมา (ไม่ระบุ)	1.46±0.51 ^b	22.19±0.17 ^d	77.82±0.17 ^f

^{a-f} แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P < 0.05) ของผลหม่อนแหล่งต่างๆ

ผลลักษณะสมบัติทางกายภาพของสารสกัดหม่อน

ชนิดสารสกัด	แหล่งผลหม่อน	ความหนาแน่น (g/ml)	pH	TSS (% Brix)	ร้อยละของ น้ำหนักแห้ง
ผลหม่อนสด	เพชรบูรณ์	0.986±0.001 ^{a,b}	3.67±0.02 ^c	9.98±0.12 ^f	11.19±0.03 ⁱ
	นครราชสีมา	1.012±0.004 ^b	4.08±0.02 ^d	15.9±0.08 ^g	17.47±0.03 ^j
ผงผลหม่อน	เพชรบูรณ์	0.988±0.016 ^{a,b}	4.04±0.01 ^c	7.68±0.17 ^h	6.59±0.99 ^k
	นครราชสีมา	0.971±0.006 ^a	4.31±0.01 ^e	7.70±0.14 ^h	7.48±0.0 ^k

a-k แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ของสารสกัดผลหม่อนชนิดต่างๆ

ผลลักษณะสมบัติทางกายภาพของสารสกัดหม่อน

สี ระบบ L*, a* และ b* ของสารสกัดผลหม่อน

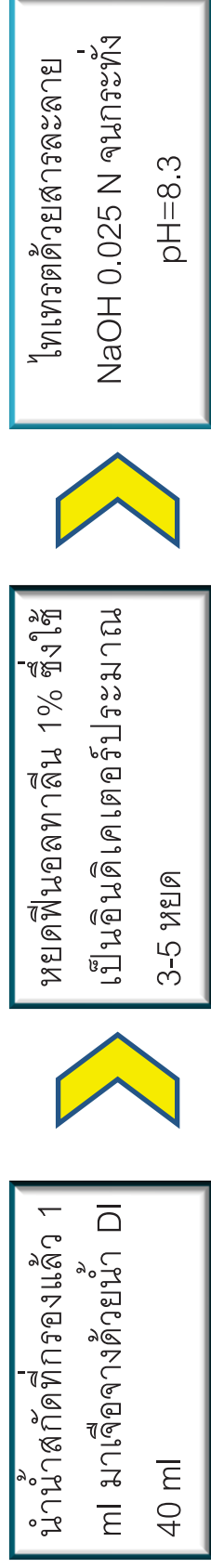
ชนิดสารสกัด	แหล่งผลหม่อน	สี		
		L* (ค่าความสว่าง)	a* (ค่าสีแดง)	b* (ค่าสีน้ำเงิน)
ผลหม่อนสด	เพชรบูรณ์	20.45±0.28 ^{b,c}	2.19±0.11 ^d	-2.17±0.07 ^e
	นครราชสีมา	20.83±0.27 ^b	2.00±0.11 ^d	-2.23±0.05 ^{e,g}
ผงผลหม่อน	เพชรบูรณ์	20.03±0.15 ^{a,c}	2.21±0.17 ^d	-2.20±0.06 ^e
	นครราชสีมา	19.80±0.20 ^a	2.07±0.11 ^d	-2.33±0.05 ^{f,g}

a-g แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) ของสารสกัดผลหม่อนชนิดต่างๆ

ลักษณะสมบัติทางเคมีของสารสกัดหม่อน

- ปริมาณกรดที่ไทเทรตได้ (Titration acidity)
- น้ำตาลรีดิวซ์ (Reducing sugar)
- ปริมาณแอนโทไซยานิน (Anthocyanin contents)
- ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidation activity, IC₅₀)

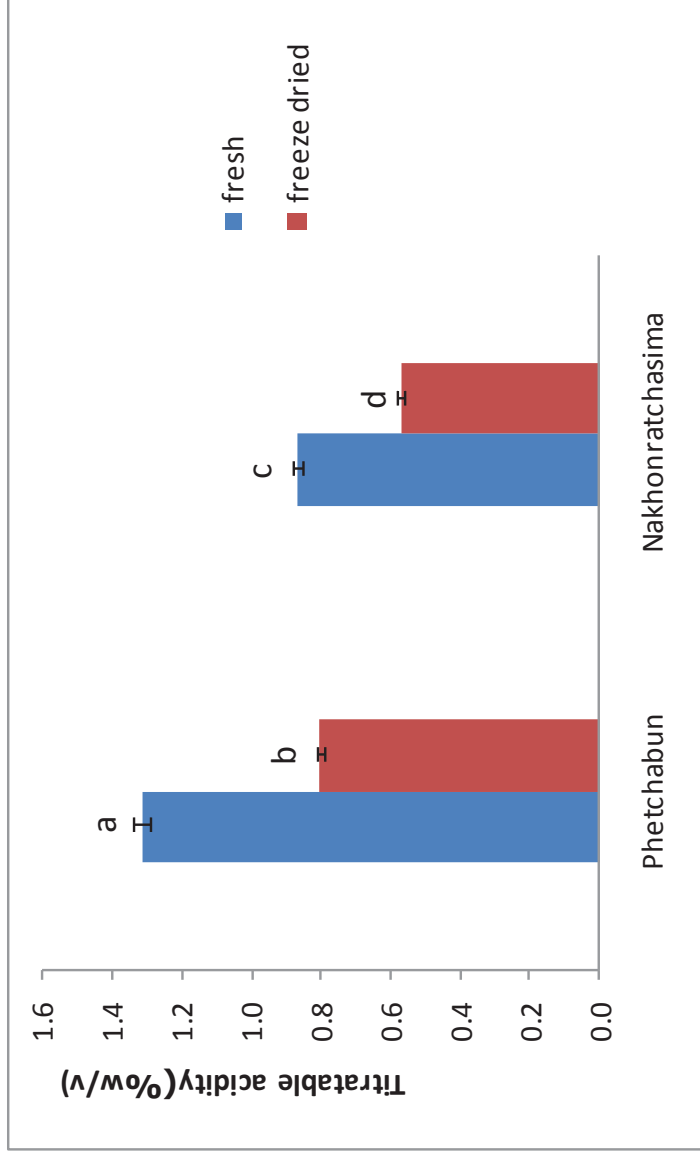
การหาปริมาณกรดที่ไทเทรตได้



$$\% \text{Citric acid} = \frac{\text{ml NaOH} \times \text{N NaOH} \times \text{meq.wt of citric acid} \times 100}{\text{ml sample juice}}$$

- โดย %Citric acid = %กรดซิตริก (%น้ำหนักต่อปริมาตร)
N NaOH = ความเข้มข้นของสารละลายไฮเดียมไฮดรอกไซด์ (โมลต่อลิตร)
ml NaOH = ปริมาณของสารละลายไฮเดียมไฮดรอกไซด์ที่ไทเทรต (มิลลิลิตร)
ml sample juice = ปริมาณสารสกัดที่ใช้ (มิลลิลิตร)
meq.wt of Citric acid = 0.064 [Ercisli และ Orhan, 2007]

ผลหม่อนสดและแห้งจากเพชรบูรณ์ซึ่งมีสีแดงมากกว่ามีปริมาณกรดที่ ไทเทรตได้สูงกว่าจากนครราชสีมาอย่างมีนัยสำคัญ



โดยที่ a, b, c และ d แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

การหาค่าน้ำตาลรีดิวซ์

วิธี Dinitrosalicylic Colorimetric Method (DNS method) ดัดแปลงตามวิธีของ Lorenz Miller (1959)

เตรียม 1%DNS(DNS 1g/25ml DI water + NaOH 1.6g/20ml DIwater



เติม Potassium Sodium Tartrate 30 g Sodium Sulphite 0.05 g และ
ปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 100 มิลลิลิตร ด้วย DI



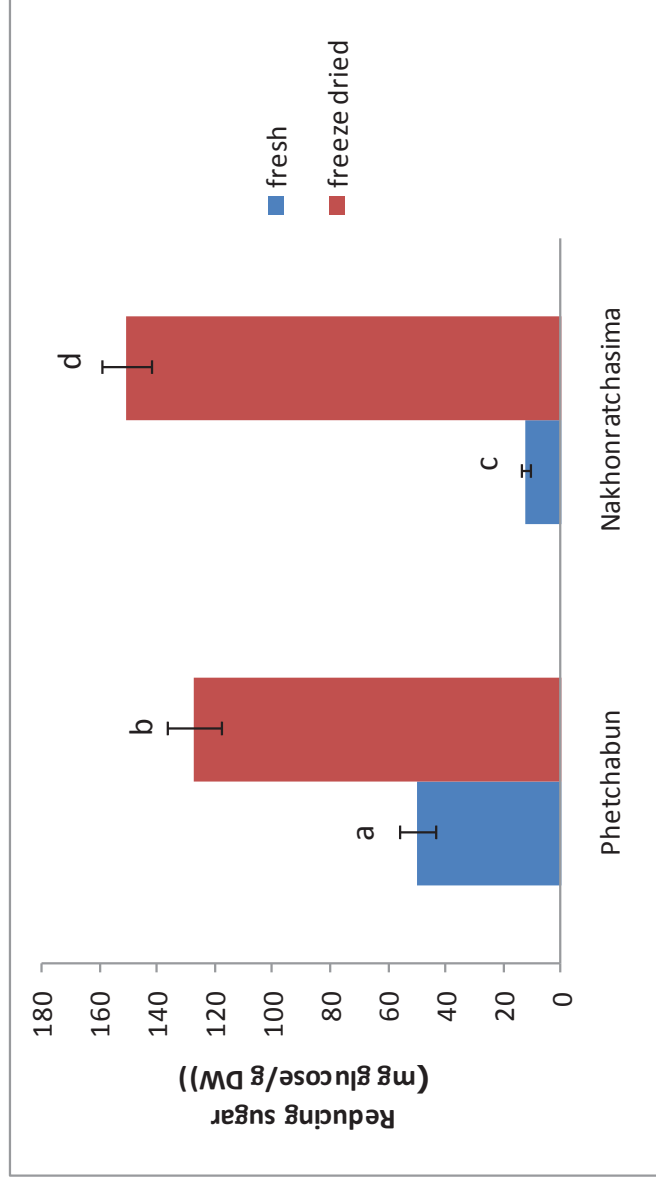
การทดสอบนำสารละลายตัวอย่าง 500 ul แล้วเติมสารละลาย DNS
ปริมาตร 1 ml นำไปต้มในน้ำเดือดอุณหภูมิ 100°C เป็นเวลา 5 นาที จากนั้น
นำมาแช่ในอ่างน้ำเย็นทันที จากนั้นเติมน้ำ DI ปริมาตร 10ml

กลูโคสเป็น
สารละลาย
มาตรฐาน



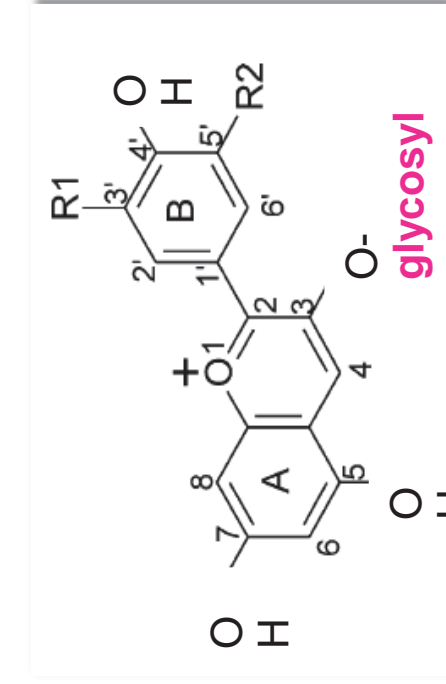
วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 nm

ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในผลหม่อนสดจากเพชรบูรณ์สูงกว่าแต่ในผลหม่อนแห้งซึ่งจากนครราชสีมาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงกว่า



โดยที่ a, b, c และ d แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

แอนโทไซยานิน

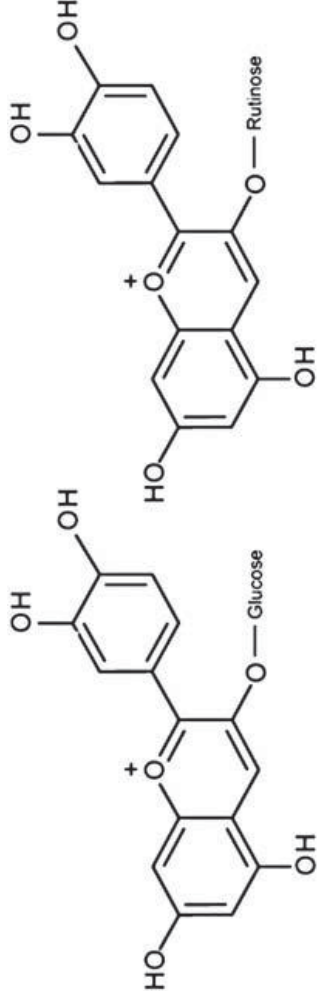


ชนิดที่พบมากที่สุดโดยทั่วไป

- cyanidin (Cy) 50%
- pelargonidin (Pg) 12%
- peonidin (Pn) 12%
- delphinidin (Dp) 12%
- malvidin (Mv) 7%
- petunidin (Pt) 7%

ชื่อ	R ₁	R ₂
Delphinidin	OH	OH
Petunidin	OCH ₃	H
Cyanidin	OH	H
Pelargonodin	H	H
Peonidin	OCH ₃	H
Malvidin	OCH ₃	OCH ₃

แอนโทไซยานินในผลหม่อน



Cyanidin 3-glucoside

Cyanidin 3-rutinoside

ประโยชน์ที่ได้รับจากผลหม่อน

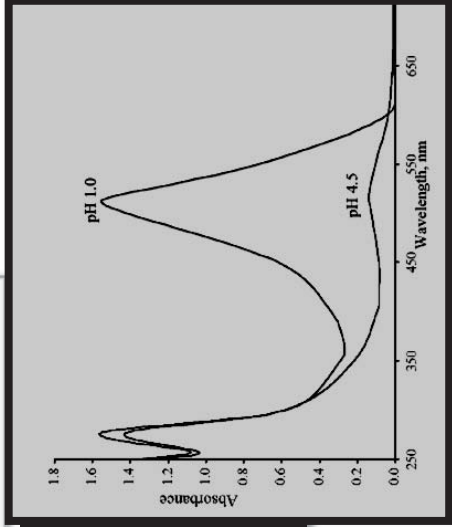
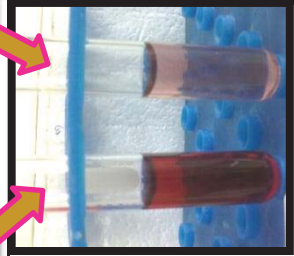
- สารต้านอนุมูลอิสระ
- มีฤทธิ์ต้านการอักเสบ [Lietti และคณะ, 1976]
- ลดความเสี่ยงต่อโรคหัวใจและหลอดเลือด
- สามารถยับยั้งการเกิดมะเร็ง [Morse และStoner, 1993]
- สามารถลดระดับโคเลสเตอรอลในเลือด[Yang และคณะ, 2010]
- ช่วยป้องกันการเกิดโรค Alzheimer [Shih และคณะ, 2010]
- มีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส [Aramwit และคณะ, 2010]

การวิเคราะห์ปริมาณแอนโทไซยานิน

โพแทสเซียมคลอไรด์
บัฟเฟอร์ (pH1.0)

โซเดียมอะซิเตท
บัฟเฟอร์ (pH4.5)

เตรียมสารสกัด
หมั่นคนและแช่แข็ง



วัดค่า OD ที่ 520 และ 700 nm
โดยเครื่อง UV spectrophotometer

$$\text{ปริมาณแอนโทไซยานิน (mg/L)} = A \times MW \times DF \times 10^3 \times \epsilon \times 1$$

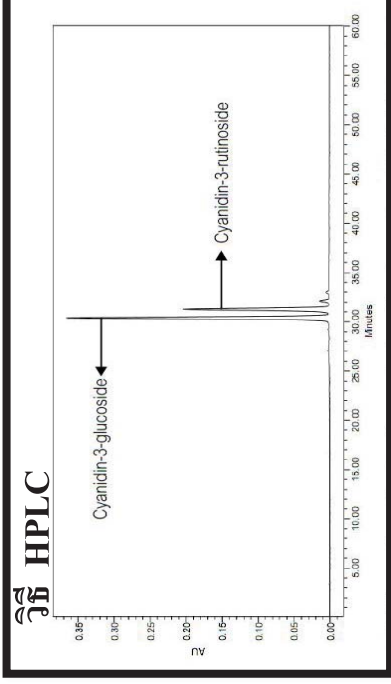
โดย $A = (A_{520nm} - A_{700nm}) \text{pH}1 - (A_{520nm} - A_{700nm}) \text{pH}4.5$

MW=449.2 g/mol cyanidin-3-glucoside

DF= dilution factor =1000

ϵ = 26,900 molar absorptivity ($L \times \text{mol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ for cyanidin-3-glucoside)

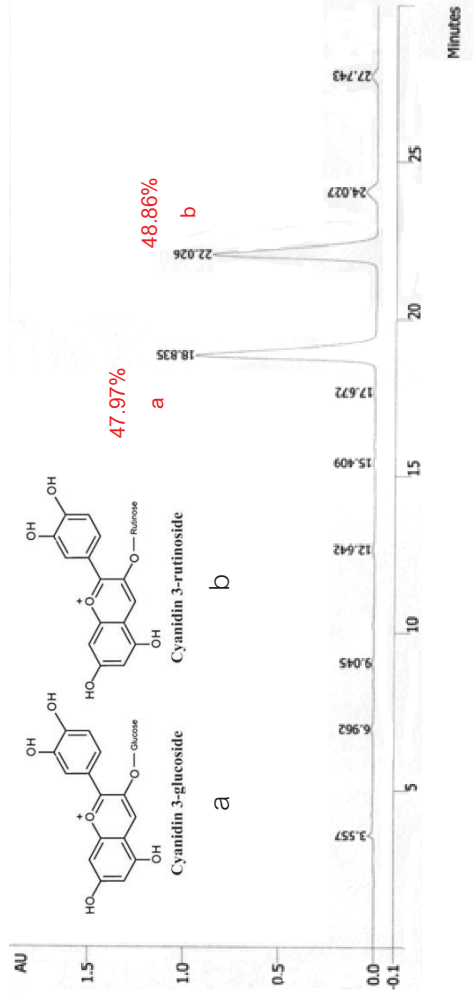
1 = path length in cm



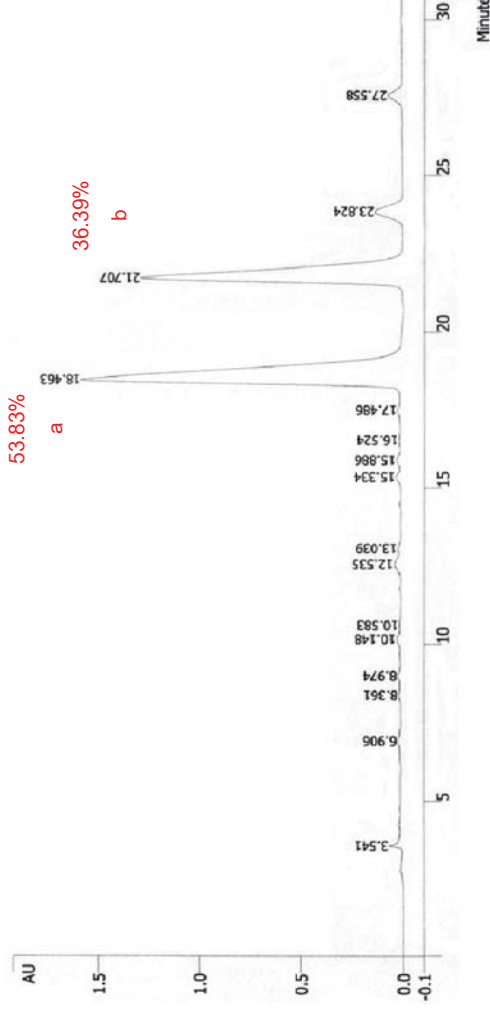
HPLC : C-18 , 40 °C, 1 ml/min , OD= 530 นาโนเมตร ซึ่งมีตัวทำละลาย B 20%-80% (1.5% กรดฟอสฟอริก, 20% กรดอะซิติก, 25% อะซิโตไนโตรลละลายในน้ำ) ใน ตัวทำละลาย A คือ 1.5% กรดฟอสฟอริกละลายในน้ำ ตามวิธีของ Bae และ Suh (2007) ใช้ Cyanidin-3-glucoside เป็นสารมาตรฐาน

วิเคราะห์ชนิดของแอนโธไซยานินในหม้อมันด้วย HPLC

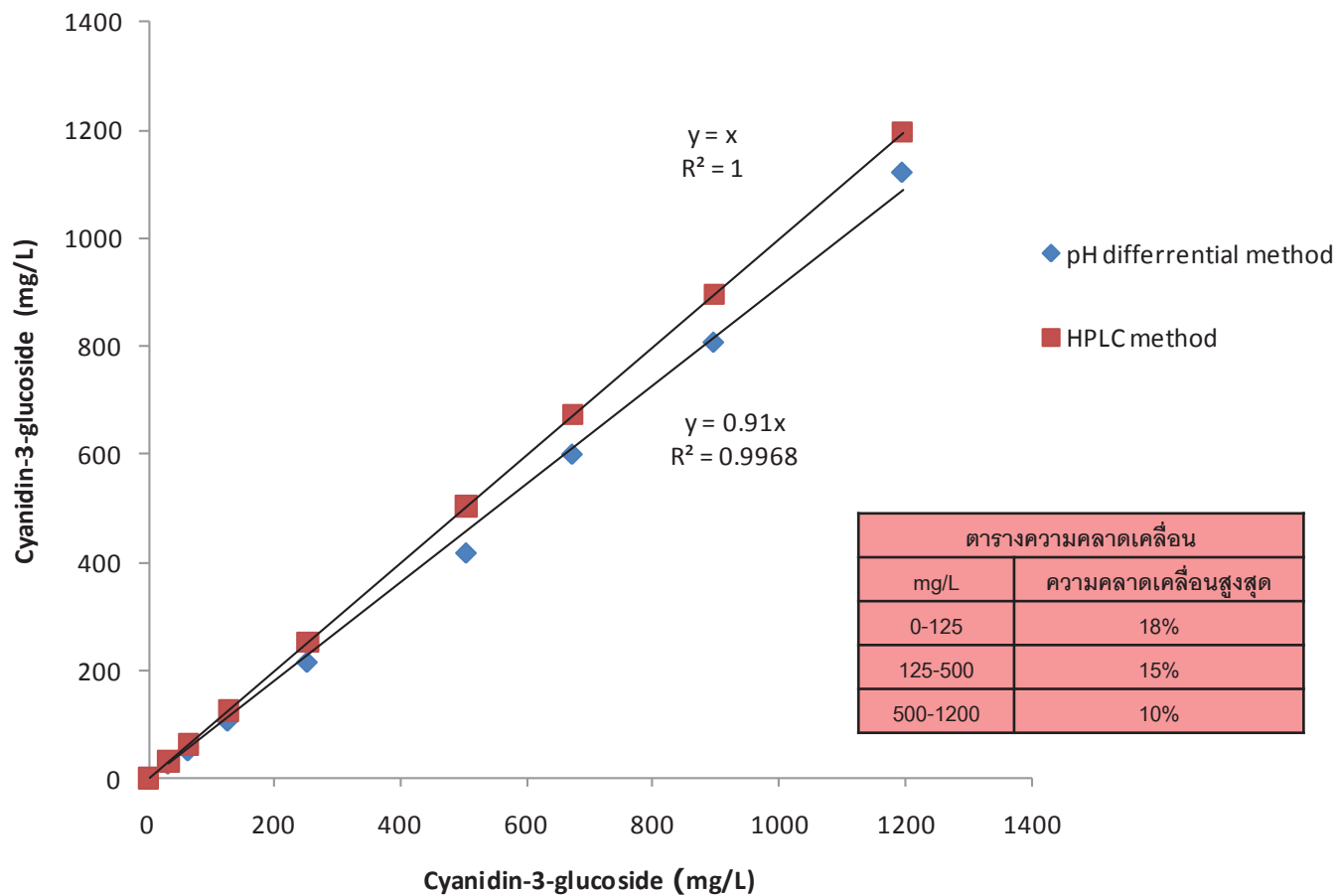
เพชราบูรณ์



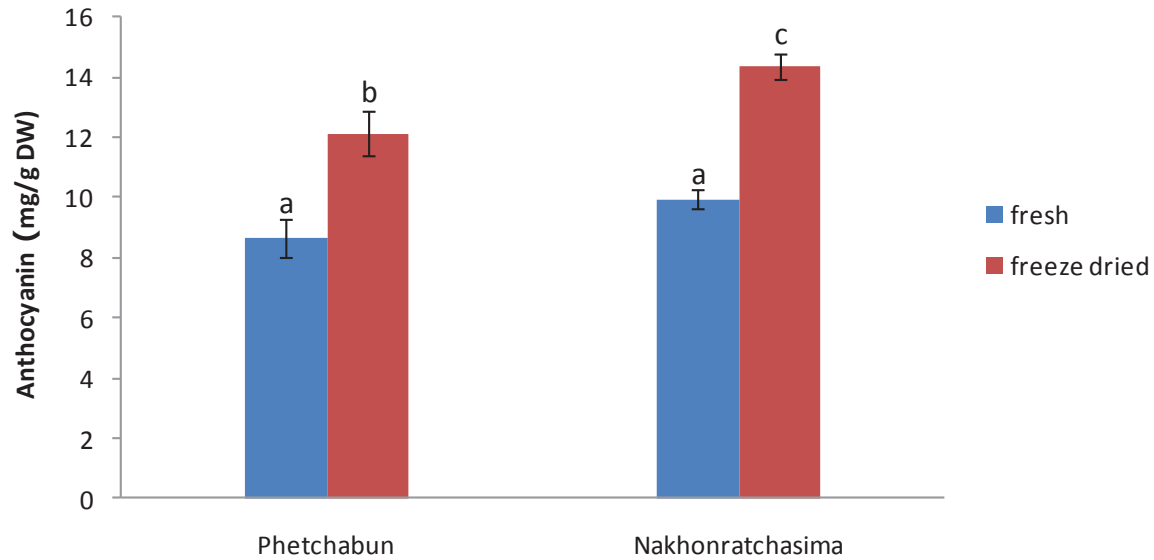
นครราชสีมา



เปรียบเทียบการวิเคราะห์แอนโธไซยานินด้วยวิธี HPLC และ pH differential



ปริมาณแอนโธไซยานินในหม่อน

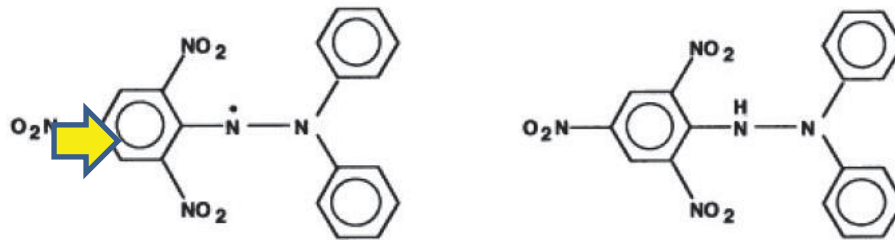
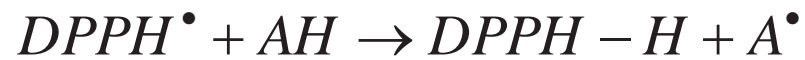


โดยที่ a, b, และ c แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

ผงผลหม่อนสกัดมีปริมาณแอนโธไซยานินสูงกว่าสารสกัดผลหม่อนสดทั้งจากเพชรบูรณ์และนครราชสีมา แต่ปริมาณแอนโธไซยานินจากแหล่งนครราชสีมาสูงกว่าเพชรบูรณ์ ซึ่งสอดคล้องกับสีและปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์

ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

หาฤทธิ์ในการยับยั้ง อนุมูลอิสระ 1, 1-Diphenyl -2-picrylhydrazyl (DPPH) ซึ่งมีความคงตัว ,ดูดกลืนแสงที่ 518 nm



IC₅₀ คือ ความเข้มข้นของสารสกัดที่มีฤทธิ์ยับยั้ง อนุมูลอิสระ DPPH ลดลง 50%

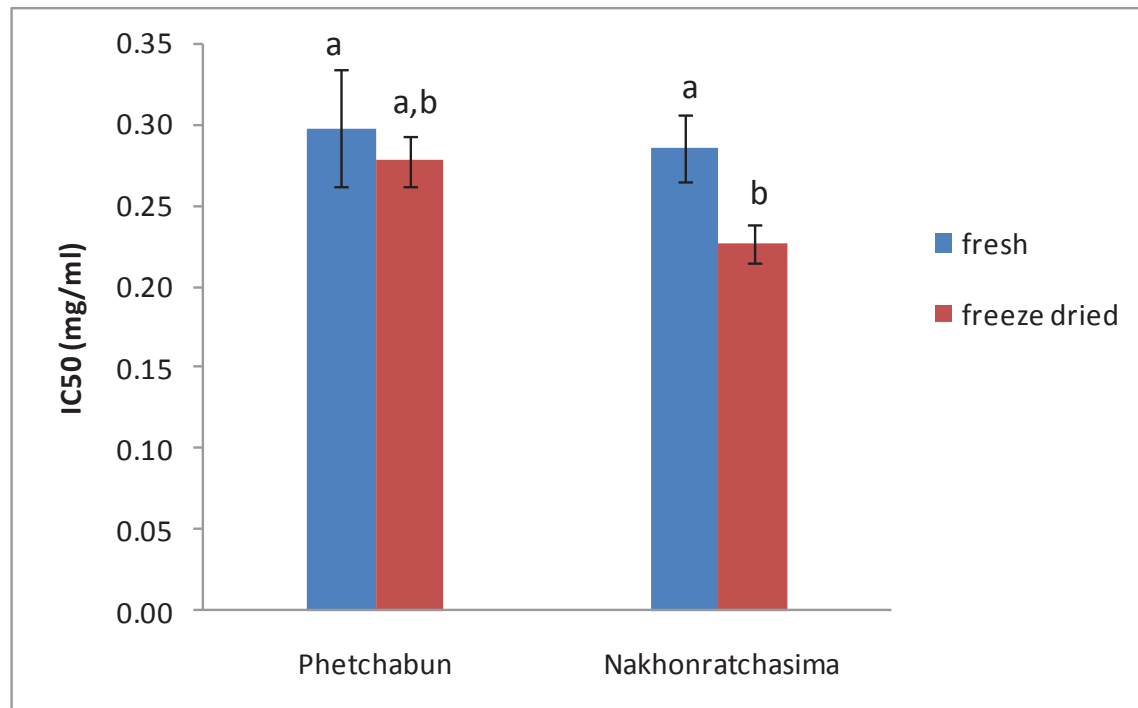
ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

วิธี DPPH assay (ดัดแปลงวิธีของ Brand-William และคณะ ,1995)



สร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่าง
% Inhibition DPPH กับความ
เข้มข้นของสารตัวอย่าง ลาก
กราฟตัดแกนได้ค่า IC_{50}

ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (IC₅₀)



โดยที่ a และ b แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

สารสกัดผลหม่อนจากนครราชสีมามีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระสูงกว่าเพชรบูรณ์พิจารณาจากค่า IC₅₀ ที่ต่ำกว่า และสารสกัดผลหม่อนมีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระสูงกว่าสารสกัดผลหม่อนสด

สรุป

- การเลือกระยะเวลาสุกของผลหม่อนมีความสำคัญต่อสมบัติต่างๆของหม่อนได้แก่ ค่าพีเอช ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ปริมาณแอนโทไซยานิน
- ผลหม่อนที่มีสีเข้มกว่าเนื่องจากมีระยะเวลาสุกมากกว่าทำให้มีปริมาณแอนโทไซยานินสูงกว่า
- ปริมาณน้ำตาลสูงมีผลทำให้ได้ปริมาณแอนโทไซยานินสูงเนื่องจากน้ำตาลเป็นสารตั้งต้นการเกิดแอนโทไซยานิน
- ปริมาณแอนโทไซยานินเป็นส่วนหนึ่งในการส่งเสริมฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระซึ่งสารประกอบอื่น เช่นสารกลุ่มโพลีฟีนอล มีส่วนช่วยส่งเสริมการต้านอนุมูลอิสระเช่นกัน

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

- ทราบถึงประโยชน์และคุณสมบัติของผลหม่อนและแอนโทไซยานินในหม่อน
- ช่วยส่งเสริมการเพาะปลูกและการผลิตผลหม่อนในประเทศไทย
- สามารถนำข้อมูลที่ได้ไปพัฒนาการบริโภคหม่อนเพื่อให้ได้ประโยชน์สูงสุด ในการแปรรูปและการนำไปใช้ของหม่อนในงานด้านต่างๆ

Acknowledgement

- งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนเงินทุนวิจัยจากสนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย(สกว.)โครงการการเพิ่มมูลค่าสมุนไพรครบวงจร



การสัมมนาพิเศษเพื่อเผยแพร่ความรู้

Mulberry: The Functional Fruit



ผลของแอนโธไซยานินและผลหม่อนสกัด ที่มีต่อ
การเจริญเติบโต และการเปลี่ยนแปลงไปเป็นกระดูก
ของเซลล์ต้นกำเนิดไขกระดูกของหนูแรท พันธุ์วิสต้า

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. โสธิดา กนกพานนท์

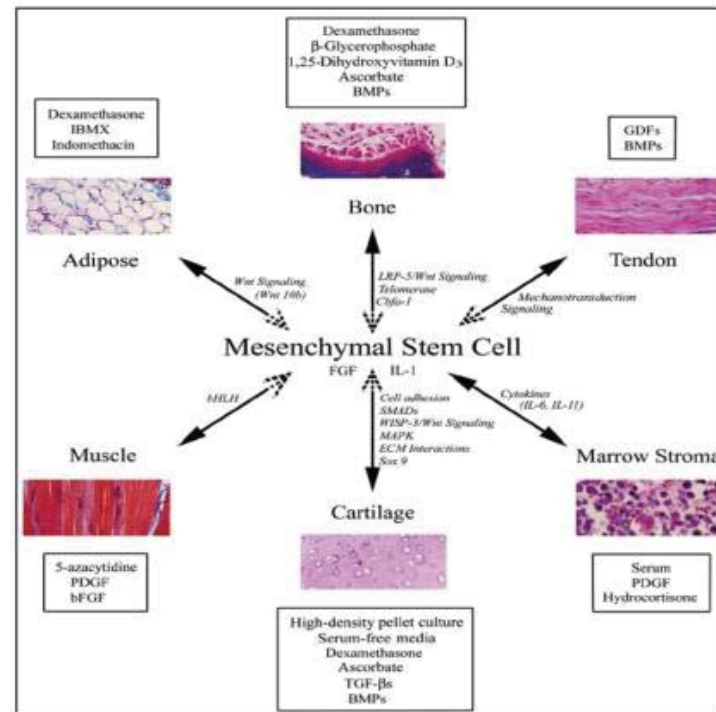
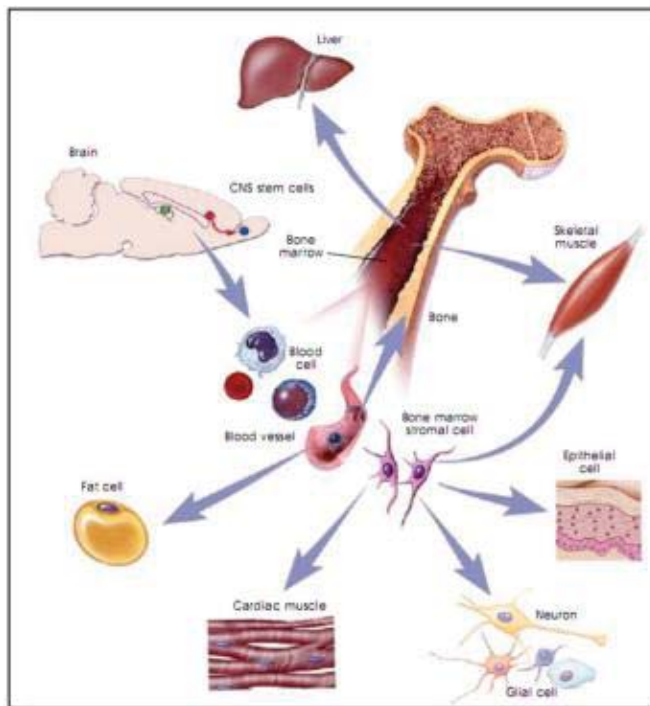
ภาควิชา วิศวกรรมเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วัน จันทร์ ที่ 16 กรกฎาคม 2555

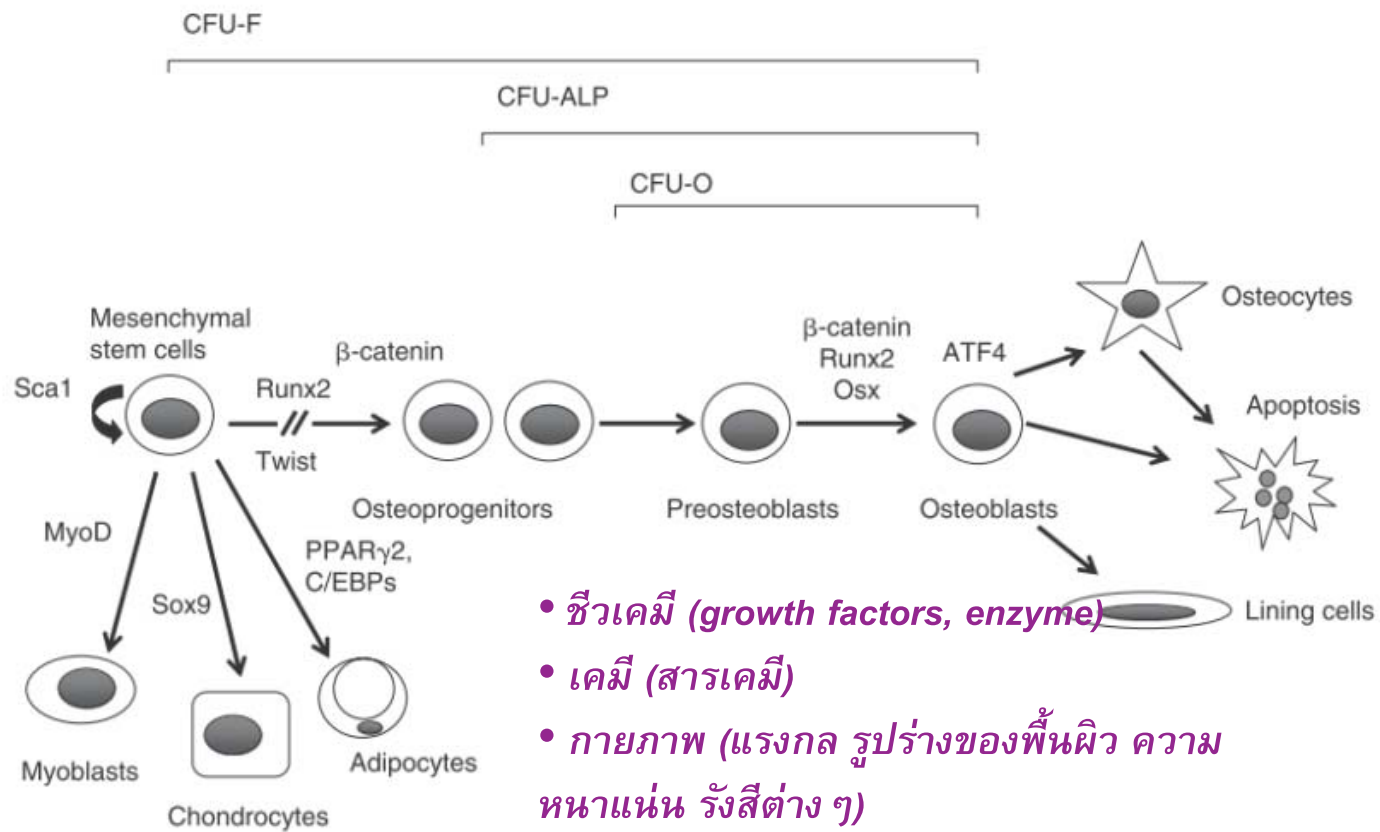
ณ ห้อง 209 อาคาร 3 คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เซลล์ต้นกำเนิดไขกระดูก (Mesenchymal stem cell, MSC)

MSC สกัดได้จากไขกระดูก สามารถเปลี่ยนแปลงเป็นเนื้อเยื่อชนิดต่างๆ ที่ทำงานได้ เช่น กระดูก กระดูกอ่อน เนื้อเยื่อไขมัน เส้นเอ็น และกล้ามเนื้อ สกัดได้จริงจากผู้ใหญ่ จึงมีศักยภาพในการใช้งานทางการแพทย์สูง



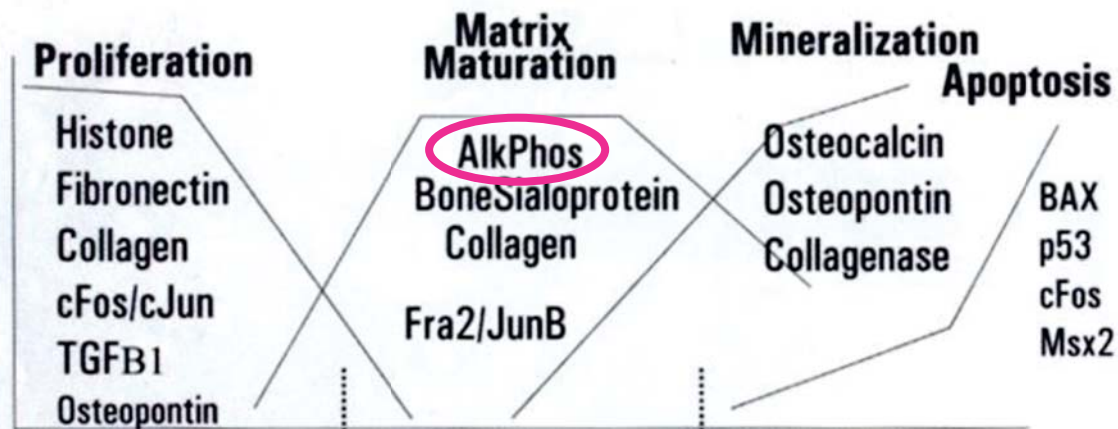
การเปลี่ยนแปลงของ MSC กระตุ้นได้จากปัจจัยภายนอก



การเปลี่ยนแปลงของ MSC ไปเป็นเซลล์กระดูก (Osteoblast)

C

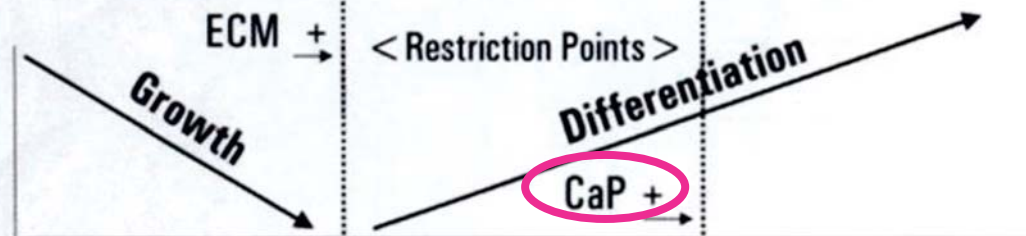
Temporal Expression of Osteoblast Genes Reflecting Growth and Differentiation Stages



สัญญาณการเปลี่ยนแปลง เป็นกระดูกที่วัดในงาหน้า

- กิจกรรมของเอนไซม์ Alkaline phosphatase สูง (early marker)
- เซลล์มีการหลั่งแร่ธาตุแคลเซียมออกมาสะสมภายนอก (late marker)

D



การกระตุ้นเซลล์ต้นกำเนิดให้เป็นกระดูก

- การใช้สารเคมีในอาหารเลี้ยงเซลล์
- การใช้หมู่ทางเคมีบนโครงเลี้ยงเซลล์สามมิติ , ลำดับเปปไทด์ RGD
- การใช้สารเร่ง ประเภท Cytokines , Growth factors
- การปรับปรุงสิ่งแวดล้อมทางกายภาพ เช่น การใช้แรงกด แรงเฉือน การสั่นสะเทือน รังสี
- การใช้ลักษณะพื้นผิวเฉพาะ เช่น ขนาด ความเป็นระเบียบ ความขรุขระ



การใช้สารเคมีในการกระตุ้นการสร้างเซลล์กระดูก

- Dexamethasone (dex) : 10pM-1μM 28 วัน
- Beta-glycerophosphate (β -GP)
- Ascorbic acid : 50-500 μM
- Vitamin D3
- Growth factor-beta (TGF- β)
- Bone morphogenetic proteins (BMPs)

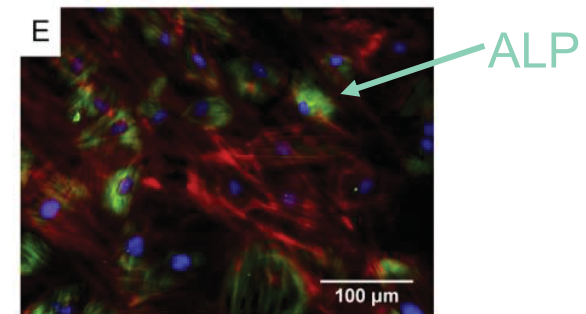
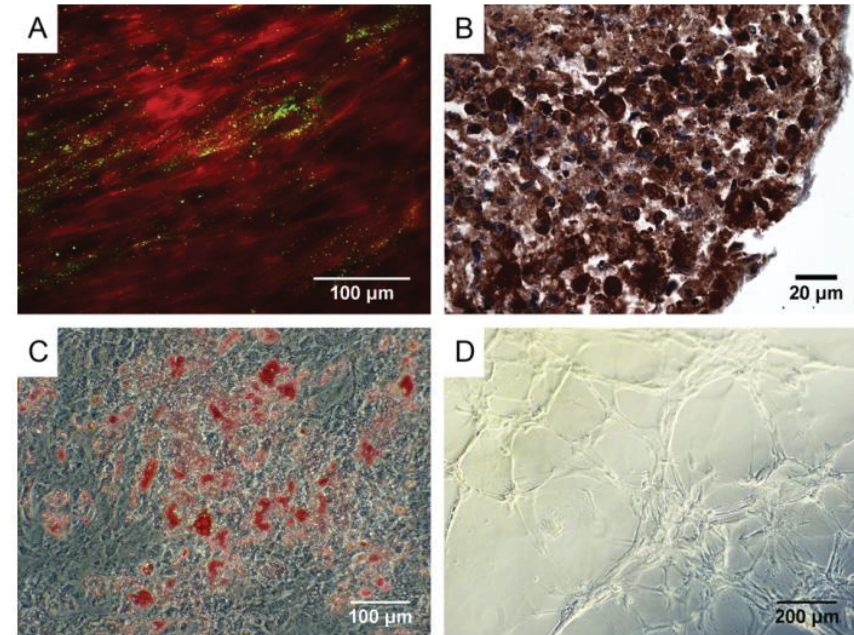


Table 1

Representative protocols used for in vitro osteogenic differentiation of MSCs (asc, ascorbic acid; bFGF, basic fibroblast growth factor; BMP, bone morphogenetic protein; dex, dexamethasone; FCS, fetal calf serum; ITS, insulin-transferrin-selenious acid; TGF- β , transforming growth factor-beta; vitD3, vitamin D3; β -GP, beta-glycerophosphate; BM, bone marrow; UCB, umbilical cord blood; UCWJ, umbilical cord Wharton's jelly).

Reference	FCS	dex	asc	β -GP	Other	Cell source
Oswald et al. [5]	10%	100 nM	200 μM	10 mM	-	Human BM
Jørgensen et al. [59]	10%	100 nM	-	-	vitD3 (1 nM) BMP-2 (100 ng ml ⁻¹)	Human BM
Friedman et al. [262]	-	100 nM	25 μg ml ⁻¹	5 mM	ITS (1%) bFGF (25 ng ml ⁻¹) FGF-8/FGF-10 (50 ng ml ⁻¹) TGF- β (200 pM) BMP-2/4/6/7/14 (20 nM)	Human BM
Stiehler et al. [263]	10%	100 nM	290 nM	5 mM	vitD3 (10 nM)	Human BM
Hildebrandt et al. [55]	-	10 nM 100 nM	300 μM	5 mM	BMP-2 (100 nM)	Human UCB
Pytlík et al. [73]	10%	100 nM	500 μM	10 mM	-	Human BM
Song et al. [42]	10%	100 nM	50 μM	10 mM	-	Human BM
Chen et al. [66]	10%	100 nM	200 μM	10 mM	-	Human BM/UCWJ

วัตถุประสงค์ของการทดลอง

- 1) เพื่อศึกษาระดับความเป็นพิษ ของสารสกัดผลหม่อน ที่มีต่อเซลล์ต้นกำเนิดไขกระดูก (bone marrow derived mesenchymal stem cells, MSC) ของหนูวิสตา (Wistar rat)
- 2) เพื่อศึกษาผลต่อการเจริญเติบโต (proliferation) และการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์กระดูก (osteogenesis) ของสารสกัดผลหม่อน ที่มีต่อเซลล์ MSC

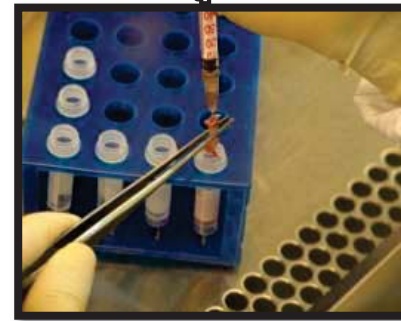
****ศึกษาในระดับห้องทดลอง นอกร่างกาย*

การแยกและเพาะเลี้ยง MSC เพื่องานวิจัย

การสกัดแยกเซลล์ต้นกำเนิด MSCs จากกระดูกต้นขาหลังของ หนูวิสต้า



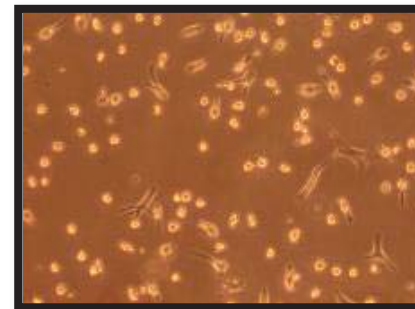
การผ่าเอากระดูกต้นขาหลังหนู



การสกัดแยกเซลล์ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์



ทำการเพาะเซลล์ในสภาวะ 5 % CO₂
อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7-14 วัน



เพาะเลี้ยงในจานเลี้ยงเซลล์

Ref: Takahashi, Y., Yamamoto, M. and Tabata, Y. Osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells in biodegradable sponges composed of gelatin and β -tricalcium phosphate, Biomaterials 26, (2005), 3587-3596.

สารสกัดผลหม่อนต่อการเจริญเติบโตของเซลล์



เพาะเซลล์ 2×10^4 เซลล์ต่อ well
ใน อาหารเลี้ยงเซลล์ปกติ (NM)



ในตู้บ่ม 5% CO₂
อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส



วัดจำนวนเซลล์
ด้วย MTT assay

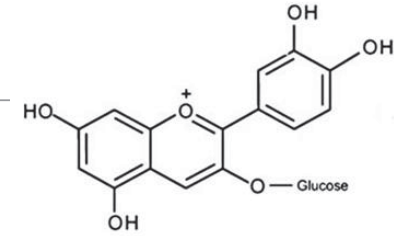
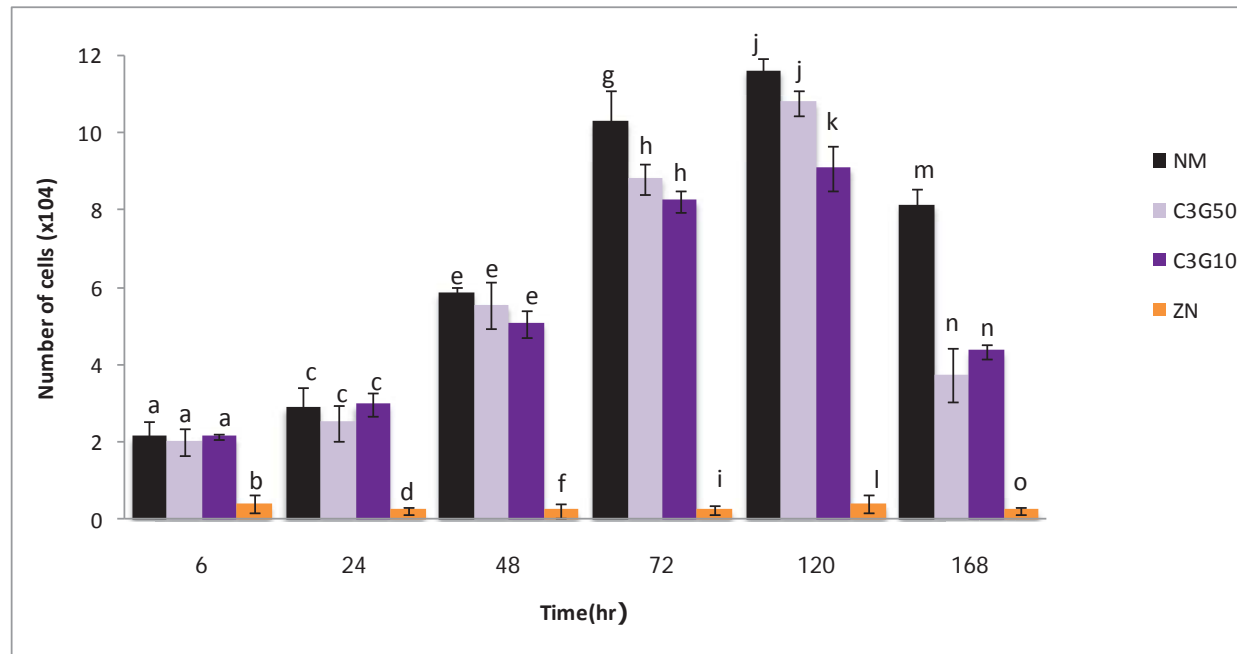
ตรวจสอบการยึดเกาะของเซลล์ ที่
เวลา 6 ชั่วโมง และเจริญเติบโตของ
เซลล์ ที่เวลา 1, 2, 3, 5 และ 7 วัน



คำนวณหา Growth
rate หรือ ระยะเวลา
ที่เซลล์เพิ่มจำนวน
ขึ้นเป็น 2 เท่า (PDT)

กลุ่มที่	ตัวย่อ	สารสกัดหม่อน(mg/ml)	สารไซยานิดิน-3-กลูโคไซด์ (μM)	หมายเหตุ
1	NM	-	-	อาหารเลี้ยงเซลล์ปกติ (กลุ่มควบคุม)
2	C3G50	-	50	ใส่แอนโทไซยานิน 50 ไมโครโมลลาร์
3	C3G100	-	100	ใส่แอนโทไซยานิน 100 ไมโครโมลลาร์
4	M50	2.5	-	ความเข้มข้นเทียบเท่า C3G 50 ไมโครโมลลาร์
5	M100	5	-	ความเข้มข้นเทียบเท่า C3G 100 ไมโครโมลลาร์
6	Zn	-	-	Zn acetate 20 ppm ระดับที่เป็นพิษต่อเซลล์

การทดสอบความเป็นพิษของ C3G ต่อ เซลล์ต้นกำเนิดไขกระดูก



Cyanidin 3-glucoside

**C3G:แอนโทไซยานินรูปที่มี
มากในสารสกัดผลหม่อน**

NM= อาหารเลี้ยงเซลล์ปกติ

C3G50= C3G @ 50 μ M

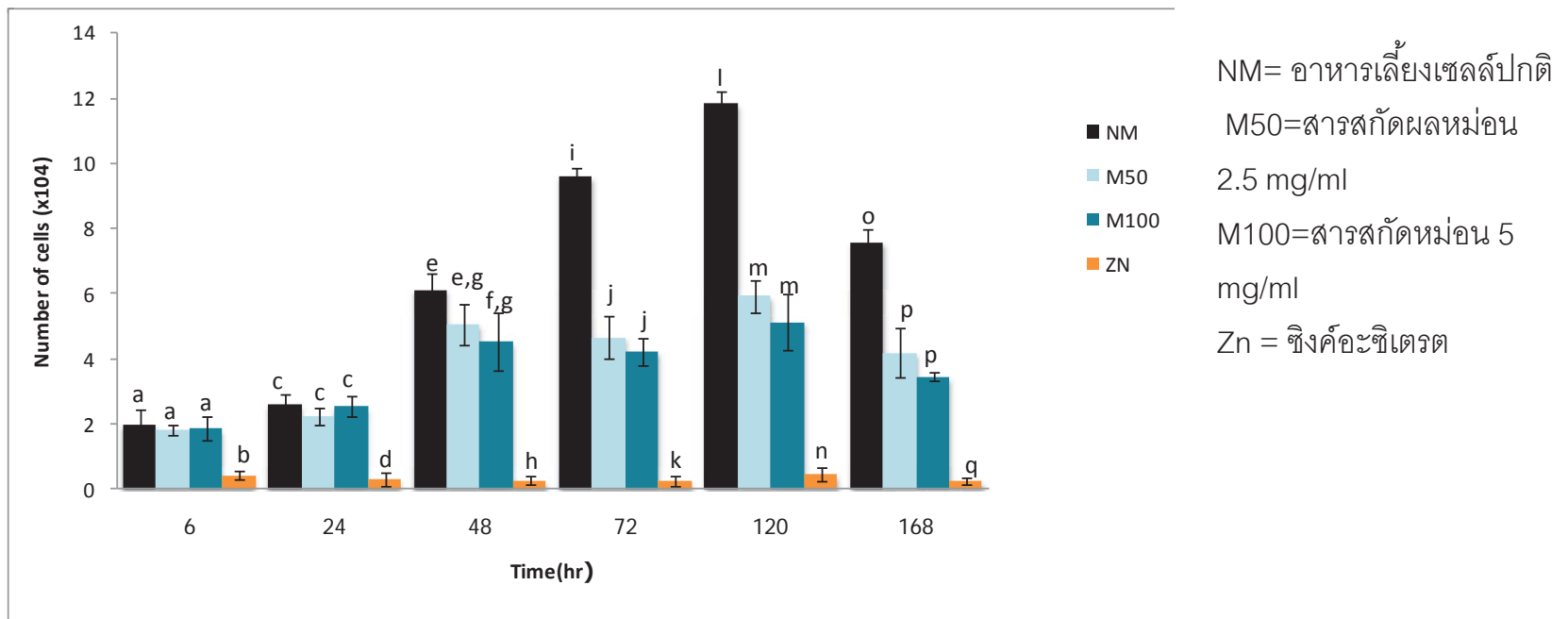
C3G100= C3G @ 100 μ M

Zn= ซิงค์อะซิเตรต

a-q แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ในช่วงเวลาเดียวกันและในการทดสอบครั้งเดียวกัน

- C3G ความเข้มข้น 50 และ 100 μ M ไม่เป็นพิษกับเซลล์และส่งเสริมการเจริญเติบโตของ MSC
- ที่ 168 ชั่วโมงจำนวนเซลล์ลดลงเนื่องจากข้อจำกัดของพื้นที่ในการเพาะเลี้ยง

การทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดผลหม่อน ต่อเซลล์ต้นกำเนิดไขกระดูก



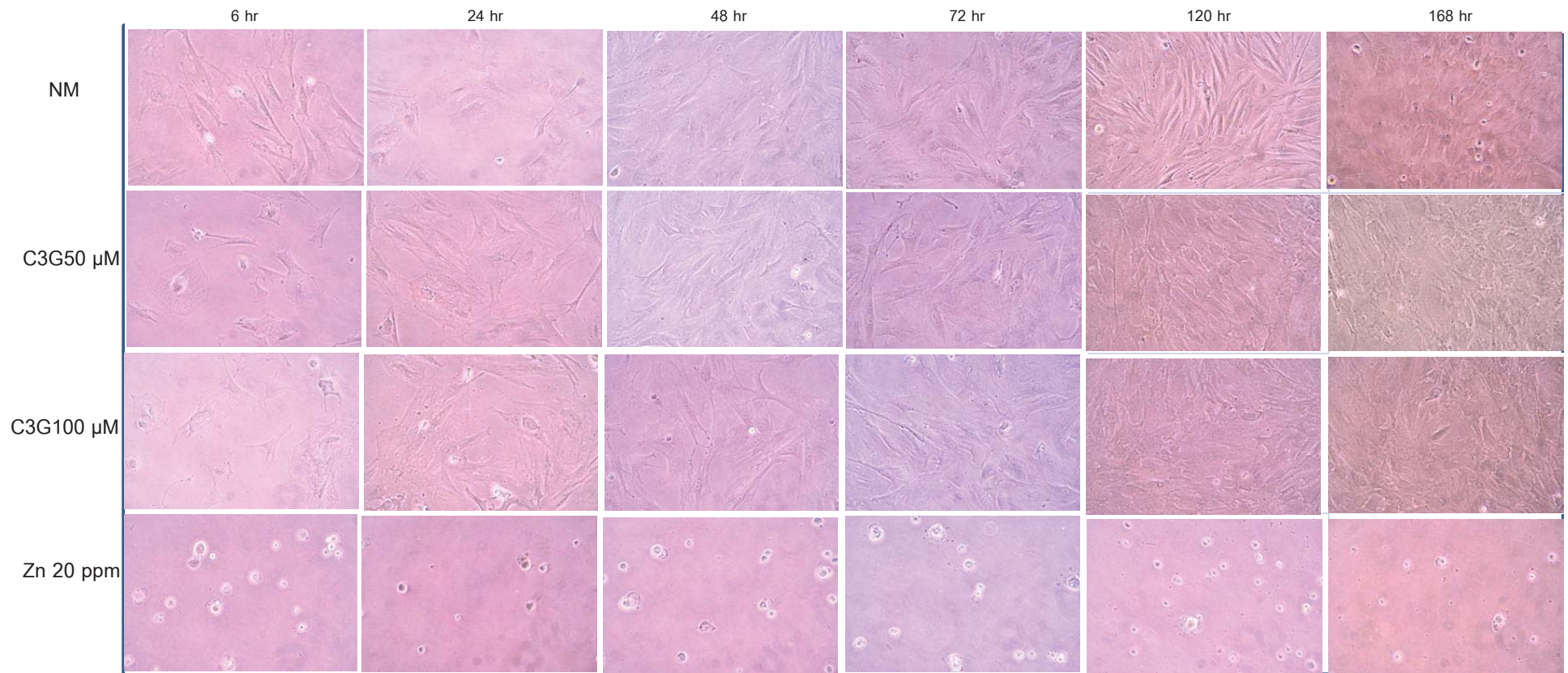
a-q แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ในช่วงเวลาเดียวกันและในการทดสอบครั้งเดียวกัน

- สกัดหม่อนความเข้มข้น 2.5 และ 5 mg/ml มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของ MSC
- คาดว่าเกิดจากการที่สารสกัดหม่อนมีปริมาณน้ำตาลสูง และมีความเป็นกรด ทำให้ไม่ควรนำมาเลี้ยงเซลล์โดยตรง
- หากต้องการใช้ประโยชน์จากสารสกัดหม่อนเพื่อให้มีผลต่อ MSC ควรนำมาสกัดเอาแอนโธไซยานินบริสุทธิ์ หรือมีการแยกน้ำตาลและกรดออก ให้สารที่นำมาใช้เลี้ยงเซลล์มีค่า พีเอช 7.4 และออสโมลาริตี 290-310 mOS

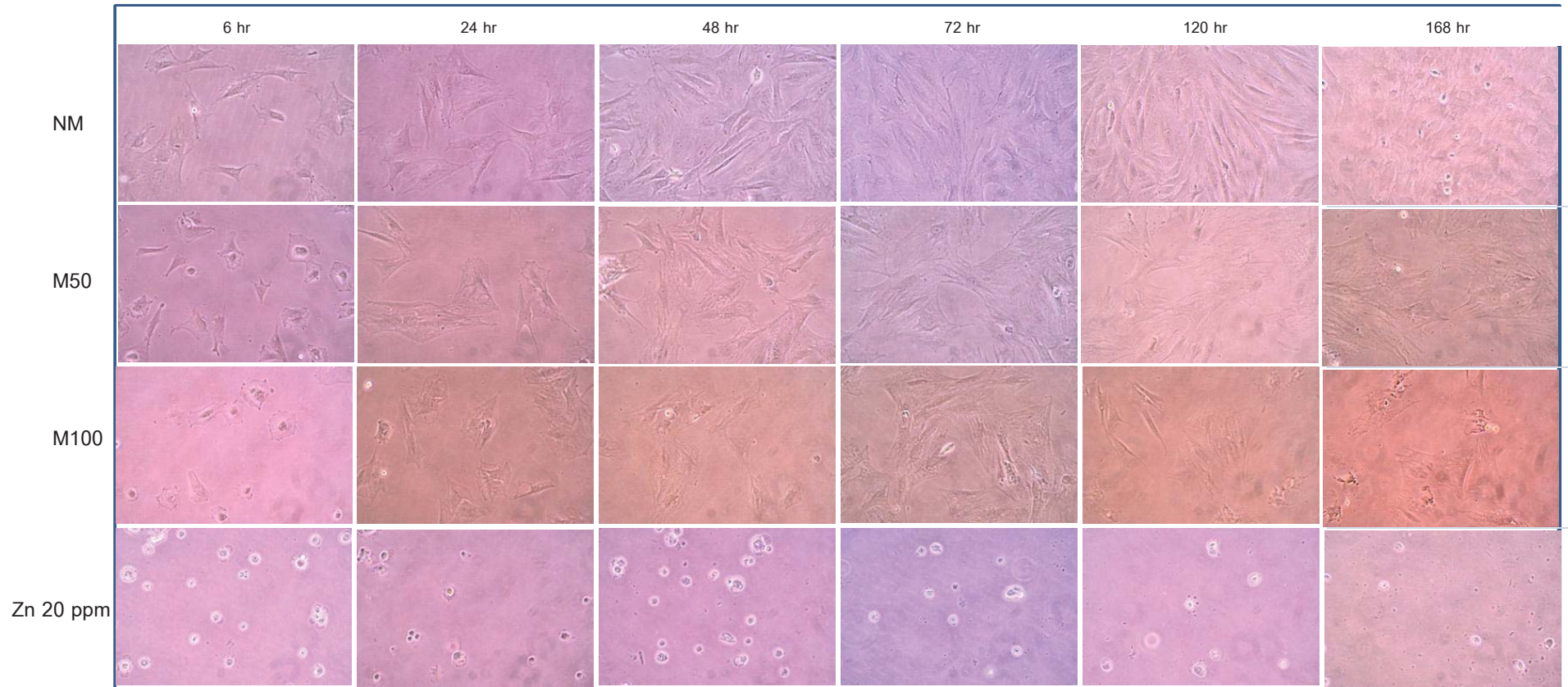
ผลการประเมิน อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของเซลล์ (μ) , เวลาการแบ่งตัวทวีคูณ (PDT) และ ความหนาแน่นของจำนวนเซลล์สูงสุด ที่เวลา t_{\max}

Sample	$\mu \times 10^{-3} \text{ (hr}^{-1}\text{)}$	PDT (hr)	Maximum density (cells/mm. ²)	t_{\max} (hr)
NM ¹	26.34	26.33	578.75±17.97	120
C3G50 ¹	26.22	26.45	538.75±16.52	120
C3G100 ¹	21.27	32.61	453.75±29.55	120
Zn ¹	-268.24	Infinity	N/A	6
NM ²	26.95	25.74	591.67±18.93	120
M50 ²	15.35	45.17	296.67±24.66	120
M100 ²	14.94	46.43	256.67±24.66	120
Zn ²	-248.61	Infinity	N/A	6

ลักษณะของเซลล์ต้นกำเนิดไขกระดูกที่เจริญเติบโตในอาหารเลี้ยงเซลล์ C3G



ลักษณะของเซลล์ต้นกำเนิดไขกระดูกที่เจริญเติบโตในอาหารเลี้ยงเซลล์ C3G



สารสกัดผลหม่อนต่อการเปลี่ยนแปลง ไปเป็นเซลล์กระดูก



-กิจกรรมของเอนไซม์
อัลคาไรล์ฟอสฟาเตส (ALP)
-ปริมาณการสร้างแคลเซียม

การเพาะเซลล์ 2×10^4 เซลล์ต่อ cm^2 เลี้ยงใน
อาหารเลี้ยงเซลล์ปกติ (NM) และอาหารเลี้ยง
เซลล์ที่กระตุ้นการเปลี่ยนแปลงเป็นกระดูก (OM)

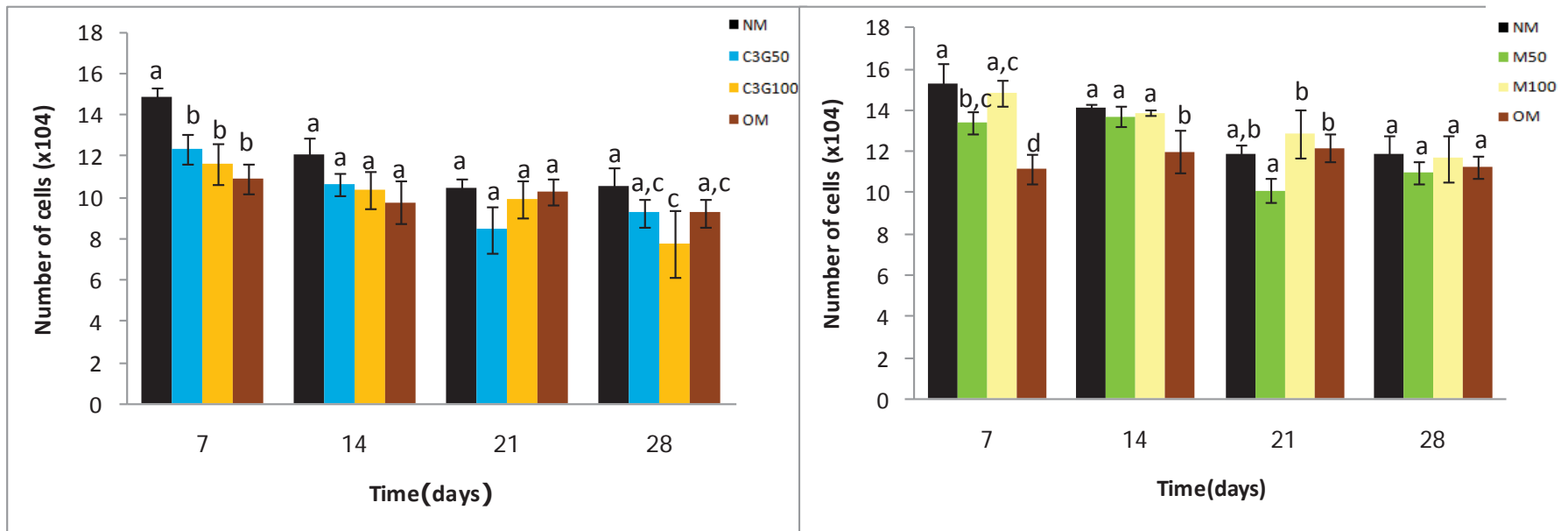
ในตู้บ่ม 5% CO_2
อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

เพาะเลี้ยงเซลล์ต่อไปเป็นเวลา
4 สัปดาห์เก็บตัวอย่างทุกๆ
สัปดาห์

กลุ่มที่	ตัวย่อ	สารสกัดหม่อน(mg/ml)	สารไซยานิดิน-3-กลูโคไซด์ (μM)	หมายเหตุ
1	NM	-	-	อาหารเลี้ยงเซลล์ปกติ เพื่อเป็น negative control
2	C3G50	-	50	-
3	C3G100	-	100	-
4	M50	2.5	-	ความเข้มข้นเทียบเท่า C3G 50 ไมโครโมลลาร์
5	M100	5	-	ความเข้มข้นเทียบเท่า C3G 100 ไมโครโมลลาร์
6	OM	-	-	อาหารเลี้ยงเซลล์ Osteogenic เพื่อเป็น positive control

OM (Osteogenic medium) = อาหารเลี้ยง MSC ที่ใช้ในการกระตุ้นการเปลี่ยนแปลงเป็นกระดูกตามมาตรฐานสากล

ผลการเปลี่ยนแปลงจำนวนเซลล์



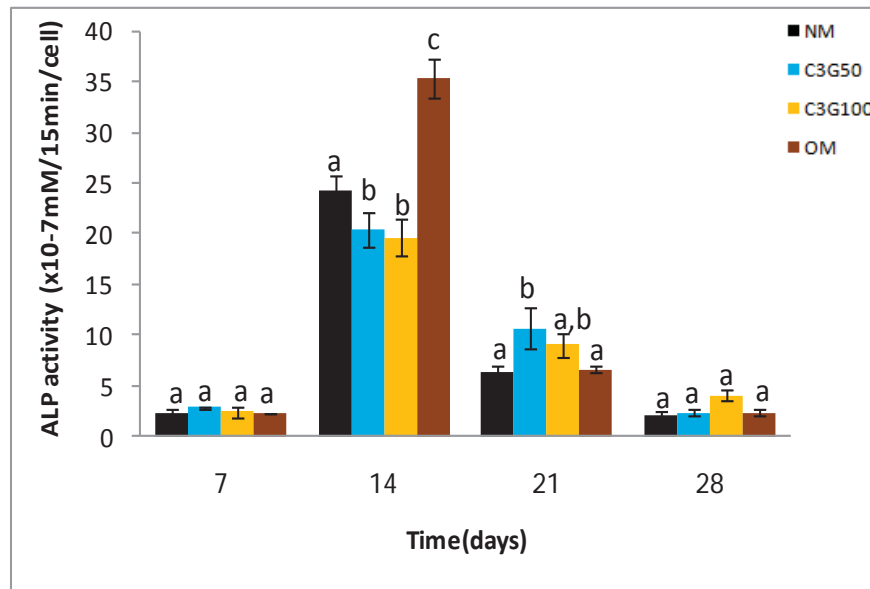
ไชยานิดิน-3-กลูโคไซด์ (C3G)

สารสกัดหม่อน (M)

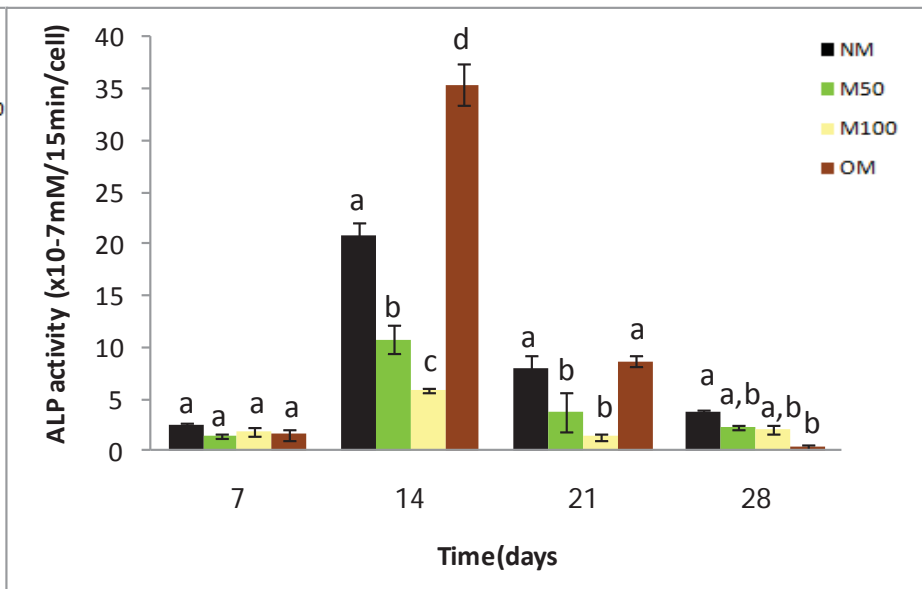
a, b, c แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ในช่วงเวลาเดียวกัน

NM= อาหารเลี้ยงเซลล์ปกติ , C3G50=ไชยานิดิน-3-กลูโคไซด์ (แอนโทไซยานินมาตรฐาน)ความเข้มข้น $50 \mu M$,
 C3G100=ไชยานิดิน-3-กลูโคไซด์ ความเข้มข้น $100 \mu M$, M50=สารสกัดผลหม่อนความเข้มข้น 2.5 mg/ml ,
 M100=สารสกัดผลหม่อนความเข้มข้น 5 mg/ml OM = อาหารเลี้ยงเซลล์ Osteogenic

ผลกิจกรรมของเอนไซม์ Alkaline Phosphatase



ไซยานิดิน-3-กลูโคไซด์ (C3G)

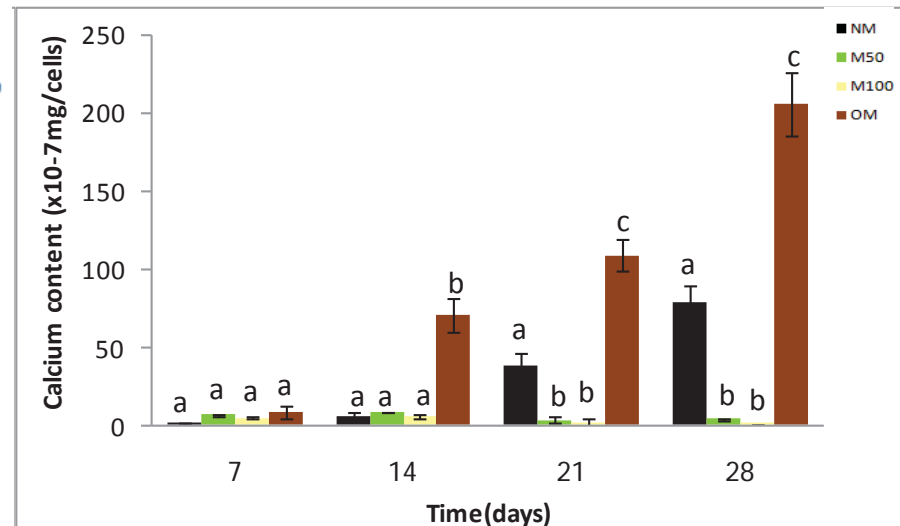
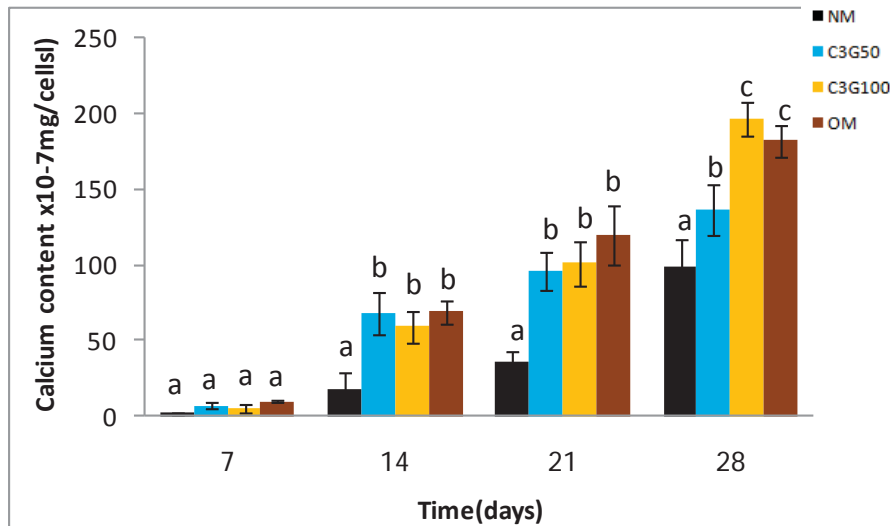


สารสกัดหม่อน (M)

a, b, c แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ในช่วงเวลาเดียวกัน

NM= อาหารเลี้ยงเซลล์ปกติ , C3G50=ไซยานิดิน-3-กลูโคไซด์ (แอนโทไซยานินมาตรฐาน)ความเข้มข้น 50 μ M, C3G100=ไซยานิดิน-3-กลูโคไซด์ ความเข้มข้น 100 μ M , M50=สารสกัดผลหม่อนความเข้มข้น 2.5 mg/ml , M100=สารสกัดผลหม่อนความเข้มข้น 5 mg/ml OM = อาหารเลี้ยงเซลล์ Osteogenic

ปริมาณแคลเซียมที่เซลล์หลั่งออกมาสะสม



ไซยานิดิน-3-กลูโคไซด์ (C3G)

สารสกัดหม่อน (M)

a, b, c แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ในช่วงเวลาเดียวกัน

NM= อาหารเลี้ยงเซลล์ปกติ , C3G50=ไซยานิดิน-3-กลูโคไซด์ (แอนโทไซยานินมาตรฐาน)ความเข้มข้น 50 μ M, C3G100=ไซยานิดิน-3-กลูโคไซด์ ความเข้มข้น 100 μ M , M50=สารสกัดผลหม่อนความเข้มข้น 2.5 mg/ml , M100=สารสกัดผลหม่อนความเข้มข้น 5 mg/ml OM = อาหารเลี้ยงเซลล์ Osteogenic

แสดงการเปรียบเทียบการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์กระดูกของเซลล์ต้นกำเนิด
จาก ไชกระดูกของหนูวิสต้าที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิดต่างๆ

ชนิดอาหาร		กิจกรรมของ ALP		ปริมาณแคลเซียมสะสม	
		(x10 ⁻⁷ mM/15min/cells) สูงสุดที่ 14 วัน	ร้อยละสัมพันธ์ เทียบกับ NM	(x10 ⁻⁷ mg/cells) สูงสุด ที่ 28 วัน	ร้อยละสัมพันธ์เทียบ กับ NM
แอนโดไซยานิน	NM ¹	24.35±1.50	100%	99.13±17.63	100%
	C3G50 ¹	20.47±1.74	84.06%	136.56±16.25	137.76%
	C3G100 ¹	19.64±1.82	80.66%	196.52±11.04	198.24%
	OM ¹	29.31±3.27	120.37%	182.22±10.44	183.82%
สารสกัดผงหม่อน	NM ²	20.71±1.33	100%	79.21±10.49	100%
	M50 ²	10.74±1.38	51.86%	4.41±0.70	5.57%
	M100 ²	5.87±0.22	28.34%	0.71±0.53	0.72%
	OM ²	35.39±1.98	170.88%	205.55±20.12	259.50%

สรุป

- สารสกัดหม่อนมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ต้นกำเนิดไขกระดูก ในขณะที่ไซยานิดิน-3-กลูโคไซด์ซึ่งเป็นแอนโทไซยานินที่พบมากที่สุดที่หม่อนไม่เป็นพิษและช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของเซลล์
- สารสกัดหม่อนไม่มีฤทธิ์ช่วยกระตุ้นการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ต้นกำเนิดไขกระดูกให้เป็นเซลล์กระดูกได้ในขณะที่ไซยานิดิน-3-กลูโคไซด์บริสุทธิ์สามารถกระตุ้นการเปลี่ยนแปลงเป็นเซลล์กระดูกได้ได้ที่มีความเข้มข้น 50 และ 100 ไมโครโมลลาร์ ทั้งนี้อาจเกิดจากปฏิกิริยาของสารเจือปนอื่นๆในสารสกัด อย่างไรก็ตามสารต่างๆเหล่านี้ น่าจะถูกดูดซึมในร่างกายอย่างไม่ผลต่อกันและกัน จึงจำเป็นต้องมีการศึกษาเพิ่มขึ้นในร่างกายต่อไปก่อนการส่งเสริมให้ใช้งานจริง

ประโยชน์ที่ได้รับจากการทดลอง

- ได้ข้อมูลฤทธิ์ของสารสกัดหม่อนและแอนโธไซยานินต่อการเจริญเติบโตและการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์กระดูกของเซลล์ต้นกำเนิดไขกระดูก
- สามารถนำสารแอนโธไซยานินไปพัฒนาใช้เป็นสารช่วยกระตุ้นเซลล์ต้นกำเนิดให้เป็นเซลล์กระดูกซึ่งเป็นสารที่มีอยู่ในสารสกัดธรรมชาติแทนการใช้สารเคมีและสารสังเคราะห์
- ได้ข้อมูลเบื้องต้นในการพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหารเสริม และยาที่มีฤทธิ์ช่วยส่งเสริมการซ่อมแซมกระดูก

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนเงินทุนวิจัย และอุปกรณ์การวิจัยจากสนับสนุน
โดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย(สกว.)โครงการการเพิ่มมูลค่า
สมุนไพรครบวงจร โครงการพัฒนาวิศวกรรมชีวเวช จุฬาฯ 100 ปี และ
โครงการไทยเข้มแข็ง (SP2)

