

คุณสมบัติและฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของไฮโดรเจลที่ผสมเซรีซินจากรังไหมพันธุ์ J108

Properties and Antioxidant activities of Hydrogel Containing Sericin

from J108 Cultivar

ธนาภา เลิศขันธ์ (Thanapha Lertchayantee)* ดร.สุธาสิณี ทัพพสารพงศ์ (Dr.Suthasinee Thapphasaraphong)¹**

ณัฐวดี กันพิพิธ (Nattawadee Kanpipith)***

(Received: July 31, 2019; Revised: September 18, 2019; Accepted: September 24, 2019)

บทคัดย่อ

งานวิจัยครั้งนี้เป็นการสกัดเซรีซินจากรังไหมพันธุ์ J108 แล้วหาปริมาณโปรตีนและหาขนาดโมเลกุลของโปรตีน และทำการประเมินคุณสมบัติทางเคมีและกายภาพของดาร์รับไฮโดรเจล ผลการทดลองพบว่าเซรีซินที่สกัดได้จากรังไหมพันธุ์ J108 และเซรีซินจากบริษัททางการค้ามีขนาดโมเลกุลในช่วงเดียวกันคือ 25-150 kDa ส่วนที่ปริมาณโปรตีนของเซรีซินจาก J108 มีค่าเท่ากับ 34.11 ± 1.07 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม ในขณะที่เซรีซินทางการค้ามีปริมาณโปรตีน 24.53 ± 0.52 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม จาก FT-IR ทำให้พบว่าเซรีซินจากสองแหล่งนี้มีตำแหน่งของบางพีคที่ต่างกันซึ่งบ่งชี้ว่ามีความแตกต่างของบางหมู่ฟังก์ชัน จากการศึกษาฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของดาร์รับไฮโดรเจลจากเซรีซินที่ได้จากรังไหมพันธุ์ J108 (HGJ) พบว่ามีค่า FRAP value, การยับยั้งอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH assay, ร้อยละการเชื่อมขวางและความหนืดที่สูงกว่าไฮโดรเจลจากเซรีซินทางการค้า (HGC) แต่มีการพองตัวต่ำกว่าไฮโดรเจลจากเซรีซินของบริษัททางการค้า ผลที่ได้ทำให้ทราบว่าโครงสร้างของเซรีซินมีผลต่อคุณสมบัติของไฮโดรเจล นอกจากนี้ควรต้องคำนึงถึงสายพันธุ์และวิธีการสกัดที่ต่างกันและความเข้มข้นของเซรีซินด้วย เพื่อจะได้เลือกเซรีซินที่เหมาะสมเพื่อนำมาเป็นองค์ประกอบสำหรับเตรียมไฮโดรเจลเพื่อให้ได้ไฮโดรเจลที่เหมาะสมมีคุณสมบัติตามที่ต้องการสำหรับพัฒนาต่อยอดเป็นผลิตภัณฑ์เวชสำอางต่อไป

ABSTRACT

In this study was to extract sericin from J108 silkworm and determine MW and protein content. The physicochemical properties of hydrogel were also investigated. The results were found that sericin extracted from J108 silkworm cultivar showed the same range of MW as sericin from commercial as 25-150 kDa. The protein content of sericin extracted from J108 was 34.11 ± 1.07 $\mu\text{g}/\text{mL}$ whereas commercial sericin was 24.53 ± 0.52 $\mu\text{g}/\text{mL}$. From FT-IR spectra, both sericin showed some different peak positions which told the different functional groups. To study antioxidant activities of sericin hydrogel, the hydrogel from sericin extracted from J108 silkworm cultivar (HGJ) showed higher antioxidant activities by FRAP assay and DPPH assay and provided higher crosslink reaction and viscosity than hydrogel from commercial sericin (HGC) but showed lower swelling property than HGC. The results revealed that structure of sericin effected to the formation and properties of hydrogel. Furthermore, the cultivars, extraction methods and sericin concentration also be considered for the suitable hydrogel properties for cosmetic products applications.

คำสำคัญ: เซรีซินไฮโดรเจล การเชื่อมขวาง การพองตัว

Keywords: Sericin hydrogel, Cross-linking, Swelling

¹Corresponding author: sutpit1@kku.ac.th

*นักศึกษาระดับปริญญาโท สาขาวิชาเภสัชเคมีและผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

**ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ภาควิชาเภสัชเคมี คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

***นักศึกษาระดับปริญญาตรี สาขาวิชาชีวเวชศาสตร์ บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยขอนแก่น

บทนำ

รังไหมเป็นวัสดุเหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมการทำผ้าไหม รังไหมมีองค์ประกอบหลักคือโปรตีนเซรีซิน จากงานวิจัยพบว่า โปรตีนเซรีซินมีฤทธิ์ทางชีวภาพที่เป็นประโยชน์ต่อสุขภาพมากมาย เช่น ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์กระตุ้นการสร้างคอลลาเจน ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส ฤทธิ์ต้านอักเสบ และฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรีย [1-5] จากคุณสมบัติดังกล่าว จึงได้มีการนำเซรีซินมาประยุกต์ใช้ในด้านต่าง ๆ เช่น วัสดุทางการแพทย์ หรือ เครื่องสำอาง [6] นอกจากนี้มีเซรีซินเป็นโปรตีนที่มีคุณสมบัติเป็นไฮโดรฟิลิก ซึ่งประกอบด้วยกรดอะมิโนที่มีขั้ว ได้แก่ Serine (ร้อยละ 32) รองลงมาคือ Aspartic acid (ร้อยละ 16.8) และ Glycine (ร้อยละ 8.8) ตามลำดับ [7]

ไฮโดรเจลเป็นพอลิเมอร์ที่มีลักษณะเป็นโครงข่าย 3 มิติเป็นไฮโดรฟิลิก มีความสามารถในการดูดซับน้ำได้ดี [8] เนื่องจากโครงสร้างของไฮโดรเจลเกิดจากการเชื่อมขวาง (crosslink) กันของหมู่ฟังก์ชันที่มีความชอบน้ำ เช่น หมู่ไฮดรอกซิล (-OH) หมู่คาร์บอกซิล (-COOH) และหมู่เอไมด์ (-NH₂) เป็นต้น [9] ซึ่งการเกิดโครงข่ายตาข่ายภายในไฮโดรเจลเกิดจากการเชื่อมโยงระหว่างพันธะหรือปฏิกิริยาเคมีของหมู่ฟังก์ชัน ทำให้เกิดโพลิเมอร์ที่มีรูพรุนภายในและสามารถดูดซับน้ำได้อย่างมีประสิทธิภาพ [10] เนื่องจากคุณสมบัติเหล่านี้จึงได้มีการพัฒนาไฮโดรเจลเพื่อใช้ประโยชน์ในทางการแพทย์และเวชสำอาง เช่น วัสดุปิดแผล คอนแทกเลนส์ ผลิตภัณฑ์รักษาผิว และผลิตภัณฑ์ลดเซลล์ลูไลซ์ เป็นต้น [11-15] จากคุณสมบัติดังกล่าวทำให้โปรตีนเซรีซินมีหมู่ฟังก์ชันที่มีความชอบน้ำเป็นองค์ประกอบจึงมีความเหมาะสมในการพัฒนาเป็นไฮโดรเจล โดยได้มีการเตรียมไฮโดรเจลจากเซรีซินเพื่อใช้เป็นวัสดุปิดแผล [16]

เจนิพินซึ่งเป็นสารสำคัญที่สกัดจากผลพุดจัน (*Gardenia jasminoides*) [17] พบว่ายังมีฤทธิ์ชีวภาพมากมาย เช่น ฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย ฤทธิ์ต้านมะเร็ง ปกป้องระบบประสาท [18] และฤทธิ์ต้านอักเสบ [19] และมีคุณสมบัติเป็นสารเชื่อมขวาง ดังนั้นเจนิพินจึงมีความเหมาะสมที่จะนำมาใช้เป็นสารเชื่อมขวางในรูปของไฮโดรเจล

ในปัจจุบันผู้คนต่างให้ความสนใจในการใช้สารสกัดจากธรรมชาติแทนการใช้สารเคมีเพื่อประโยชน์ต่อสุขภาพ ดังนั้นผู้วิจัยจึงมีความสนใจที่จะศึกษาสถานะในการเตรียมไฮโดรเจลและประเมินคุณสมบัติของไฮโดรเจลที่เตรียมขึ้นจากเซรีซิน และใช้สารเชื่อมขวางจากธรรมชาติคือ เจนิพิน เพื่อพัฒนาต่อยอดเป็นผลิตภัณฑ์เวชสำอางสำหรับใช้ภายนอก และเพื่อเป็นการเพิ่มมูลค่าของวัสดุเหลือทิ้งและเป็นการนำสารสกัดจากธรรมชาติมาเพื่อแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์เพื่อสุขภาพ เพื่อให้เกิดประโยชน์สูงสุด

วัตถุประสงค์การวิจัย

1. เพื่อศึกษาและเปรียบเทียบคุณสมบัติทางกายภาพ ได้แก่ การพองตัว ความหนืดและ pH ระหว่างไฮโดรเจลที่เตรียมจากเซรีซินของรังไหมสายพันธุ์ J108 กับเซรีซินของบริษัททางการค้า
2. เพื่อศึกษาและเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านออกซิเดชันระหว่างไฮโดรเจลที่เตรียมจากเซรีซินของรังไหมสายพันธุ์ J108 กับเซรีซินของบริษัททางการค้า

วิธีการวิจัย

1. ตัวอย่างรังไหม

รังไหมพันธุ์ J108 จาก ศูนย์หม่อนไหมเฉลิมพระเกียรติพระนางเจ้าสิริกิติ์ พระบรมราชินีนาถ ต.ในเมือง อ.เมือง จ.ขอนแก่น และเซรีซินจากบริษัททางการค้า (ได้รับความอนุเคราะห์จากบริษัททูลุไหมไทย)

2. การเตรียมสารสกัดเซรีซิน

การสกัดโปรตีนได้สกัดโดยใช้วิธีสกัดด้วยน้ำร้อนภายใต้ความดันสูง [20] โดยนำรังไหมสีขาวสายพันธุ์ J108 ไปทำความสะอาด และตัดให้เป็นรูปสี่เหลี่ยมมีขนาด 0.5 x 0.5 ตารางเซนติเมตร ชั่งน้ำหนักรังไหม 62 กรัม บรรจุลงในภาชนะ แล้วนำไปนึ่งในเครื่อง Autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที จากนั้นนำมากรองผ่านผ้าขาวบางที่สะอาด นำสารละลายที่กรองได้ทำให้แห้งแบบเยือกแข็ง (Freeze drying) นำสารสกัดเซรีซินที่สกัดได้ไปหาขนาดโมเลกุลด้วย SDS-PAGE [21] และหาปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Bradford assay [22]

3. การศึกษาระดับการเชื่อมขวาง (Degree of crosslink)

ในการศึกษาครั้งนี้จะใช้วิธี Ninhydrin assay คัดแปลงจาก Mi และคณะ [23] เตรียมสารละลาย 2 ชนิดได้แก่ สารละลาย A ประกอบด้วย Na_2HPO_4 0.067 โมลต่อลิตร และ KH_2PO_4 0.067 โมลต่อลิตร และสารละลาย B ประกอบด้วย SnCl_2 0.08 กรัม และ ninhydrin 2 กรัม ในตัวทำละลายเอทานอล จากนั้นทำการกรองสารละลายผ่านเมมเบรน 0.45 μm จากนั้นทำการปรับปริมาตร สารละลาย A และ B ให้ได้ 50 และ 30 มิลลิลิตร

โดยกลุ่มทดลองประกอบด้วย สารละลายเซรีซินที่มีความเข้มข้นร้อยละ 0.5, 1 และ 2 (400 μL) สารละลายเจนิพินที่มีความเข้มข้นร้อยละ 0.1 (6 μL) สารละลาย A และ B อย่างละ 150 μL ตามลำดับ ส่วนกลุ่มควบคุมประกอบด้วย สารละลายเซรีซินความเข้มข้นร้อยละ 0.5, 1 และ 2 (400 μL) สารละลาย A และ B อย่างละ 150 μL สารผสมทั้งสองกลุ่มนำไปต้มที่อุณหภูมิ 100°C เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 570 nm (OD_{570}) ที่เวลา 0.5, 12 และ 24 ชั่วโมง โดยทำการทดลองเป็นจำนวน 3 ซ้ำ ($n=3$) และคำนวณหาระดับการเชื่อมขวาง ดังสมการต่อไปนี้

$$\text{Degree of crosslink (\%)} = \frac{(\text{NH}_2)_{\text{nc}} - (\text{NH}_2)_{\text{c}}}{(\text{NH}_2)_{\text{nc}}} \times 100$$

โดย $(\text{NH}_2)_{\text{nc}}$ คือ ค่าดูดกลืนแสงของเซรีซิน $(\text{NH}_2)_{\text{c}}$ คือ ค่าดูดกลืนแสงของเซรีซินที่มีเจนิพิน

4. การเตรียมเซรีซินไฮโดรเจล

เตรียมสารละลาย (Stock solution) ของเซรีซิน โพลีไวนิลแอลกอฮอล์ (PVA) และเจนิพินที่มีความเข้มข้นร้อยละ 5, 10 และ 1 ตามลำดับ ผสมสารละลายเซรีซินกับ PVA และเจนิพินพร้อมทั้งปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายของสารละลายเซรีซินที่ร้อยละ 0.5, 1 และ 2 ส่วนสารละลาย PVA และเจนิพินให้มีความเข้มข้นสุดท้ายที่ร้อยละ 4 และ 0.1 ตามลำดับ และเขย่าให้เข้ากันและนำไปเก็บที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

5. การประเมินคุณสมบัติของไฮโดรเจล

5.1 การตรวจหาหมู่ฟังก์ชันด้วย Fourier Transform Infrared (FTIR) โดยนำไฮโดรเจลที่ทำแห้งเป็นแผ่นฟิล์มโดยการอบในตู้อบที่อุณหภูมิ 50°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำไปวัดการดูดกลืนรังสีอินฟราเรด

5.2 การศึกษาร้อยละการพองตัว (%Swelling) [24] โดยชั่งน้ำหนักตัวอย่างแห้ง (W_{dry}) แล้วนำตัวอย่างไปวางบนภาชนะ จากนั้นทำการหยดน้ำลงบนแผ่นตัวอย่างปริมาตร 2 μL ทิ้งไว้เป็นเวลา 4 ชั่วโมง จากนั้นนำตัวอย่างที่เปียกน้ำไปชั่งน้ำหนัก (W_{wet}) เพื่อหาน้ำหนักตัวอย่างที่พองตัวหลังจากการดูดน้ำ พร้อมคำนวณหาร้อยละการพองตัวตามสมการ โดยทำการทดลอง 3 ซ้ำ ($n=3$)

$$\text{Swelling ratio (\%)} = \frac{W_{\text{wet}} - W_{\text{dry}}}{W_{\text{dry}}} \times 100$$

โดย W_{wet} คือ น้ำหนักของเจลที่พองตัว และ W_{dry} คือ น้ำหนักแห้งของไฮโดรเจล

5.3 การวัดความหนืด โดยนำไฮโดรเจลในรูปของเหลวที่เตรียมได้ไปวัดความหนืดด้วยเครื่องวัดความหนืด (Brookefield DV-II rheometer, USA) โดยทำการวัดเป็นจำนวน 3 ซ้ำ ($n=3$)

6. การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

6.1 การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP assay (ดัดแปลงวิธีของ Benzie และคณะ [25])

ผสมสารละลาย FRAP reagent (150 μ L) กับสารมาตรฐาน 2 mM FeSO₄ (0.05-0.3 mM) และสารละลายตัวอย่าง (50 μ L) ลงใน 96-well plate บ่มในที่มืดที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 40 นาที แล้วนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 593 nm (OD₅₉₃) จากนั้นคำนวณหาค่า FRAP value (n=3) เทียบกับกราฟของสารมาตรฐาน

6.2 การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH assay (ดัดแปลงวิธีของ Brand-William และคณะ [26]) ผสมสารละลายตัวอย่าง (50 μ L) กับสาร DPPH (150 μ L) ใน 96-well plate ให้เข้ากัน จากนั้นบ่มในที่มืดที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที แล้วนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 nm (OD₅₁₇) จากนั้นคำนวณหาร้อยละการยับยั้งอนุมูลอิสระ (%Inhibition) จากสมการ (n=3) โดยใช้ Ascorbic acid เป็นกลุ่มควบคุมเชิงบวก

$$\% \text{ Inhibition} = \frac{\text{Abs}_{\text{control}} - \text{Abs}_{\text{sample}}}{\text{Abs}_{\text{control}}} \times 100$$

เมื่อ Abs_{sample} คือ ค่าดูดกลืนแสงของสารตัวอย่างผสมกับ DPPH ,

Abs_{control} คือ ค่าดูดกลืนแสงของ DPPH reagent ผสมกับตัวทำละลาย

7. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ทำการทดลองเป็นจำนวน 3 ซ้ำ และแสดงผลออกมาในค่าของ Mean \pm SD และใช้โปรแกรม SPSS version 19.0 (KKU software) วิเคราะห์ความแปรปรวน (One-way ANOVA) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% หรือ *p*-value < 0.05

ผลการวิจัย

1. การเตรียมสารสกัดเซริซินและหาปริมาณโปรตีน

จากการศึกษาพบว่า โปรตีนเซริซินที่ผ่านการสกัดมีลักษณะเป็นผงสีขาว ซึ่งแสดงในภาพที่ 1 ซึ่งมีผลผลิตเท่ากับร้อยละ 16.26 โดยน้ำหนัก จากการศึกษาขนาดโมเลกุลของเซริซินที่สกัดได้จากรังไหมพันธุ์ J108 และเซริซินจากบริษัททางการค้า มีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ระหว่าง 25 ถึง 150 kDa เช่นเดียวกัน โดยแสดงดังภาพที่ 2 จากงานวิจัยก่อนหน้านี้พบว่าน้ำหนักของโมเลกุลของโปรตีนจะขึ้นอยู่กับวิธีการสกัดด้วย [25] จากผลการวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนของเซริซินที่สกัดได้จากรังไหมพันธุ์ J108 มีปริมาณโปรตีนมากกว่า ผงเซริซินจากบริษัททางการค้า อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (*p*<0.05) โดยมีปริมาณโปรตีนจากรังไหมพันธุ์ J108 และจากทางการค้าที่มีความเข้มข้นเท่ากับ 34.11 \pm 1.07 และ 24.53 \pm 0.52 μ g/mL ตามลำดับ [27]

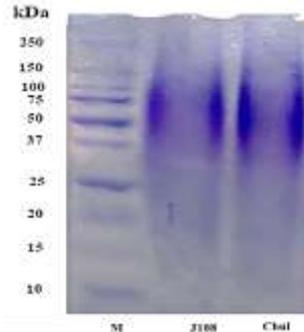
2. การเตรียมสารสกัดเซริซินและหาปริมาณโปรตีน

จากการศึกษาพบว่า โปรตีนเซริซินที่ผ่านการสกัดมีลักษณะเป็นผงสีขาว ซึ่งแสดงในภาพที่ 1 ซึ่งมีผลผลิตเท่ากับร้อยละ 16.26 โดยน้ำหนัก การสกัดโปรตีนด้วยน้ำร้อนบริสุทธิ์ภายใต้ความดันเป็นวิธีที่ทำได้ง่าย มีความปลอดภัยจากการตกค้างของสารเคมี และให้ปริมาณโปรตีนที่มีความบริสุทธิ์สูง [20] แสดงดังภาพที่ 1



ภาพที่ 1 ผลผลิตเซริซินจากรังไหมสายพันธุ์ J108 ที่สกัดด้วยน้ำภายใต้ความดันและผ่านการทำให้แห้งแบบเยือกแข็ง

จากการศึกษาขนาดโมเลกุลของเซรีซินที่สกัดได้จากรังไหมพันธุ์ J108 และเซรีซินจากบริษัททางการค้า มีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ระหว่าง 25 ถึง 150 kDa เช่นเดียวกัน โดยแสดงดังภาพที่ 2 จากงานวิจัยก่อนหน้านี้พบว่าน้ำหนักของโมเลกุลของโปรตีนจะขึ้นอยู่กับวิธีการสกัด[20]



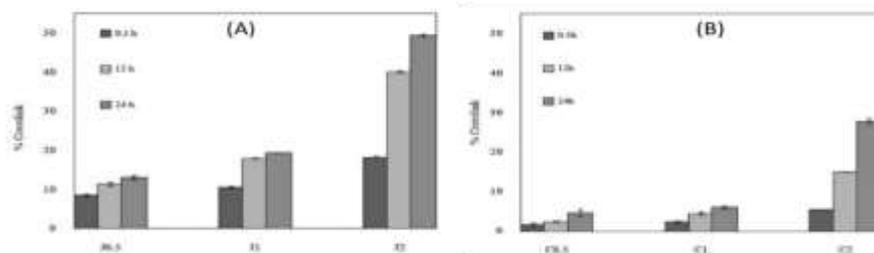
ภาพที่ 2 ขนาดโมเลกุลของเซรีซินพันธุ์ J108 (J108) และเซรีซินจากสายทางการค้า (Chul) (M คือ Protein marker)

3. การวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Bradford assay

จึงน่าจะทำให้เกิดไฮโดรเจลที่มีโครงร่างตาข่ายที่แข็งแรงมากกว่าผลการศึกษารั้งนี้มีความสอดคล้องกับ Yuan และคณะ [32] จากการวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนของเซรีซินที่สกัดได้จากรังไหมพันธุ์ J108 มีปริมาณโปรตีนมากกว่า ผงเซรีซินจากบริษัททางการค้า โดยมีปริมาณโปรตีนจากรังไหมพันธุ์ J108 และจากทางการค้าที่มีความเข้มข้นเท่ากับ 34.11 ± 1.07 และ 24.53 ± 0.52 $\mu\text{g/mL}$ ตามลำดับ [22]

4. การศึกษาระดับการเชื่อมขวาง (Degree of crosslink)

จากผลการศึกษาการเชื่อมขวาง ในเวลา 0.5 ถึง 24 ชั่วโมงพบว่าทุกตัวอย่างจะมีระดับการเชื่อมขวางที่เพิ่มขึ้นตามเวลา โดยแสดงดังภาพที่ 4 พบว่า เซรีซินจาก J108 ที่ความเข้มข้นร้อยละ 2 มีระดับการเชื่อมขวางสูงที่สุดเท่ากับร้อยละ 49.42 ± 0.37 ในขณะที่ เซรีซินจากบริษัททางการค้าที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.5 จะมีระดับการเชื่อมขวางที่ต่ำที่สุดเท่ากับร้อยละ 4.56 ± 0.03 ซึ่งระดับการเชื่อมขวางมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) จากการศึกษาพบว่า การเชื่อมขวางเกิดจากปฏิกิริยาระหว่างหมู่อะมิโนอิสระกับเงินิพิน เนื่องจากหมู่อะมิโนอิสระจะทำหน้าที่เป็นจุดเชื่อมโยงกับเงินิพินทำให้เกิดการเชื่อมโยงเป็นโครงข่ายภายในโพลิเมอร์ [23] ดังนั้นการมีปริมาณหมู่อะมิโนอิสระมากจึงส่งผลให้เกิดการเชื่อมขวางได้มาก ซึ่งผลการศึกษามีความสอดคล้องกับ Yuan และคณะ [27] ผลการทดลองที่ได้ทำให้ทราบว่า เซรีซินที่สกัดได้จากรังไหมพันธุ์ J108 มีหมู่อะมิโนที่เป็นอิสระที่สามารถเข้าไปทำปฏิกิริยาการเชื่อมขวางได้มากกว่า เซรีซินจากทางการค้าจึงน่าจะทำให้เกิดไฮโดรเจลที่มีโครงร่างตาข่ายที่แข็งแรงมากกว่านั่นเอง



ภาพที่ 3 แสดงร้อยละการเชื่อมขวางจากปฏิกิริยาเคมีของเซรีซินที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.5, 1 และ 2 ที่เชื่อมขวางกับเงินิพิน ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 โดย J คือ เซรีซินของรังไหมสายพันธุ์ J108 (A) และ C คือ เซรีซินของบริษัททางการค้า (B) เมื่อทำการศึกษา ณ เวลาต่าง ๆ คือ 0.5, 12 และ 24 ชั่วโมง ตามลำดับ

5. การเตรียมเซริซินไฮโดรเจล

จากผลการศึกษาพบว่า ไฮโดรเจลทุกตัวรับมีสีน้ำเงินเกิดขึ้นหลังผ่านกระบวนการเชื่อมขวาง โดยแสดงดังภาพที่ 5 เนื่องจากการทำปฏิกิริยาระหว่างเซริซินกับเจนิพินเกิดจากปฏิกิริยาเคมีระหว่างหมู่เอมีนปฐมภูมิกับคาร์บอนอะตอมตำแหน่งที่ 3 ของ เจนิพิน โดยอะตอมไนโตรเจนปฐมภูมิของเซริซินเข้าไปแทนที่อะตอมออกซิเจนในวง 6 เหลี่ยมของเจนิพิน จึงส่งผลให้เกิดพันธะเชื่อมกันเป็นสายโพลีเมอร์ทำให้มีการเปลี่ยนเป็นสีน้ำเงิน [28]



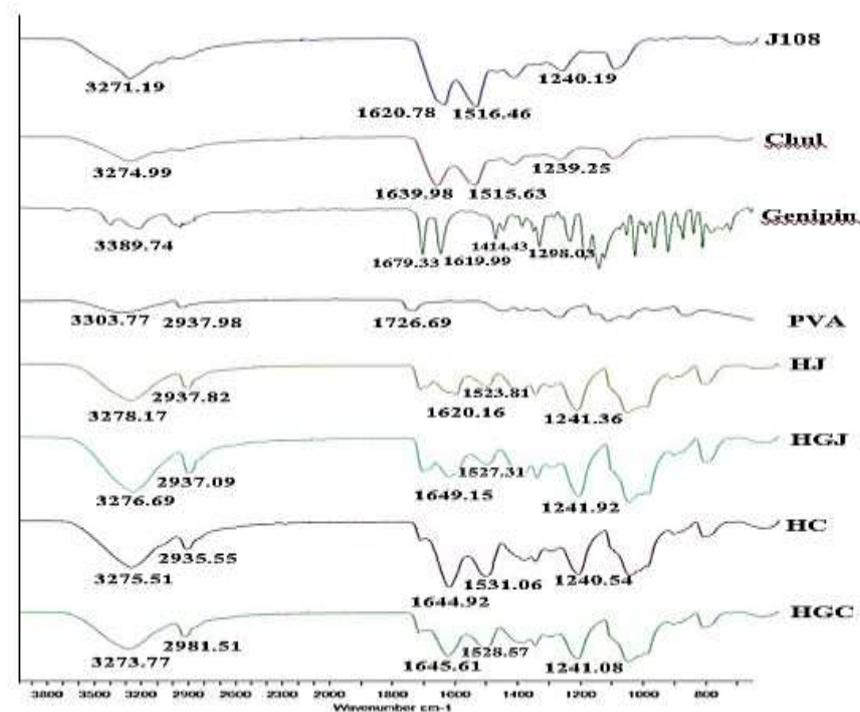
ภาพที่ 4 ลักษณะของไฮโดรเจลที่เตรียมจากตัวรับต่าง ๆ โดย A-C คือ ไฮโดรเจลที่เตรียมจากเซริซินของรังไหมพันธุ์ J108 ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.5 , 1 และ 2 ตามลำดับ และ D-F คือไฮโดรเจลที่เตรียมจากบริษัททางการค้าที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.5 , 1 และ 2 ตามลำดับ

6. การวิเคราะห์ตัวอย่างไฮโดรเจลด้วยเทคนิค Fourier Transform Infrared (FTIR)

ตารางที่ 1 แสดงแถบดูดกลืนรังสีอินฟราเรดของสารตัวอย่าง

ตัวอย่าง	Wavenumber (cm ⁻¹)							
	OH/NH	C-H	C=O/C-O	C=C	CH ₃	N-H	C-O-C	CH (Aromatic)
J108	3271.19		Amide I (1620.78) Amide II (1516.49)				Amide III (1240.19)	
Chul	3274.99		Amide I (1639.98) Amide II (1515.63)				Amide III (1239.25)	
PVA	3303.77	2937-2911.40	1726.99					
Genipin	3389.74		1679.33	1619.99	1441.43		1298.03	986.03
HJ	3278	2937.82-2915.84	Amide I (1644.92) Amide II (1523.61)				Amide III (1241.05)	
HC	3275.51	2935.55-2920.50	Amide I (1620.16) Amide II (1531.06)				Amide III (1240.54)	
HGJ	3276.69	2937.09	Amide I (1649.15) Amide II (1531.06)				Amide III (1241.92)	
HGC	3277	2920.77	Amide I (1649.97) Amide II (1527.31)				Amide III (1240.54)	

J108 คือ เซริซินจากรังไหมพันธุ์ J108, Chul คือ เซริซินจากจากบริษัททางการค้า, PVA คือ Polyvinyl alcohol
 HJ คือ ไฮโดรเจลที่เตรียมจากเซริซินของรังไหมสายพันธุ์ J108 โดยไม่มีการเชื่อมขวาง
 HC คือไฮโดรเจลที่เตรียมจากเซริซินของบริษัททางการค้าโดยไม่มีการเชื่อมขวาง
 HGJ คือ ไฮโดรเจลที่เตรียมจากเซริซินของรังไหมสายพันธุ์ J108 โดยมีการเชื่อมขวางคือ เจนิพิน
 HGC คือ ไฮโดรเจลที่เตรียมจากเซริซินของรังไหมจากบริษัททางการค้าโดยมีการเชื่อมขวางคือ เจนิพิน

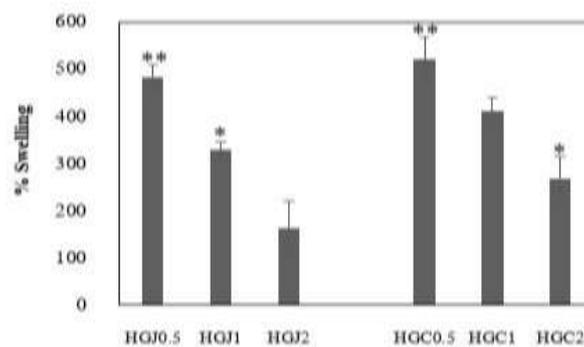


ภาพที่ 5 IR สเปกตรัมของเซริซินจากรังไหมสายพันธุ์ J108 (J108), เซริซินจากบริษัททางการค้า (Chul), เจนิพิน (Genipin), โพลีไวนิลแอลกอฮอล์ (PVA), ไฮโดรเจลที่เตรียมจาก เซริซินของรังไหมสายพันธุ์ J108 ที่ไม่มีเจนิพิน (HJ), ไฮโดรเจลที่เตรียมจากเซริซินของบริษัททางการค้าไม่มีเจนิพิน (HGJ), ไฮโดรเจลที่เตรียมจากเซริซินของรังไหมสายพันธุ์ J108 มีเจนิพิน (HC) และ ไฮโดรเจลที่เตรียมจากเซริซินของบริษัททางการค้ามีเจนิพิน (HGC)

ในการศึกษาคุณสมบัติทางเคมีของเซริซินด้วยวิธี FTIR พบว่า เซริซินที่มาจากทั้ง 2 แหล่งมีตำแหน่งของพีกดูดกลืนรังสีอินฟราเรดต่างกันดังแสดงในภาพที่ 5 และตารางที่ 1 ได้แก่ OH/NH stretching, C=O และ C-O stretching และ N-H bending โดยเซริซินจากรังไหมพันธุ์ J108 ปรากฏตำแหน่งของพีก ดังนี้ OH/NH (3271.19 cm^{-1}), C=O ของ amide I (1620.78 cm^{-1}), C-O ของ amide II (1516.49 cm^{-1}) และ N-H ของ amide III (1240.19 cm^{-1}) ขณะที่เซริซินของบริษัททางการค้า มี OH/NH (3274.99 cm^{-1}), C=O ของ amide I (1639.98 cm^{-1}), C-O ของ amide II (1515.63 cm^{-1}) และ N-H ของ amide III (1239.25 cm^{-1}) ซึ่งแสดงให้เห็นถึงโครงสร้างทางเคมีของเซริซินที่มาจาก 2 แหล่งที่แตกต่างกัน ดังนั้นจากผลดังกล่าวบ่งชี้ได้ว่า โครงสร้างและปริมาณของโปรตีนขึ้นอยู่กับกรรมวิธีการสกัดโปรตีน ซึ่งผลดังกล่าวมีความสอดคล้องกับ Hobanthad, 2018 [29]

นอกจากนี้ จากการศึกษาโครงสร้างทางเคมีจาก FTIR ของไฮโดรเจลพบว่า ไฮโดรเจลที่เตรียมจากเซริซิน 2 แหล่งมีลักษณะของตำแหน่งพีกที่ปรากฏแตกต่างกันโดยได้ศึกษาระหว่างก่อนและหลังการเติมเจนิพิน ซึ่ง สำหรับ HJ และ HC เป็นสำหรับที่ไม่มีเจนิพินมีตำแหน่งของพีกแตกต่างกัน 5 ตำแหน่ง คือ OH/NH, C-H stretching, C=O stretching, C-O stretching และ N-H bending โดย สำหรับ ไฮโดรเจลของเซริซินจาก J108 (HJ) ปรากฏตำแหน่งของพีกต่าง ๆ ดังนี้ OH/NH ที่ 3278 cm^{-1} , C-H stretching ที่ 2937.82 cm^{-1} , C=O stretching ของ amide I ที่ 1620.16 cm^{-1} , C-O stretching ของ amide II ที่ 1523.81 cm^{-1} และ N-H bending ของ amide III ที่ 1241.36 cm^{-1} ในขณะที่ไฮโดรเจลจากเซริซินของบริษัททางการค้า (HC) มี OH/NH ที่ 3275.51 cm^{-1} , C-H stretching ที่ 2935.55 cm^{-1} , C=O stretching ของ amide I ที่

1644.92 cm^{-1} , C-O stretching ของ amide II ที่ 1531.06 cm^{-1} และ N-H bending ของ amide III อยู่ที่ตำแหน่งที่ 1240.54 cm^{-1} ซึ่งแสดงว่าไฮโดรเจลที่เกิดจากเซรีซินที่มาจากทั้ง 2 แหล่งมีโครงสร้างต่างกัน นอกจากนี้เมื่อเตรียมไฮโดรเจลโดยมีการเติมเจนิพินพบว่า คำรับทั้ง 2 (HGJ และ HGC) มีตำแหน่งของ OH/NH, C-H stretching, C=O stretching, C-O stretching และ N-H bending ปรากฏในตำแหน่งของพีกที่แตกต่างกันด้วย ดังนี้ HGJ มี OH/NH (3276.69 cm^{-1}), C-H stretching (2937.09 cm^{-1}), C=O stretching ของ amide I (1649.15 cm^{-1}), C-O stretching ของ amide II (1527.31 cm^{-1}) และ N-H bending ของ amide III (1241.92 cm^{-1}) ในขณะที่ HGC มี OH/NH (3273.77 cm^{-1}), C-H stretching (2918.51 cm^{-1}), C=O stretching ของ amide I (1645.61 cm^{-1}), C-O stretching ของ amide II (1528.57 cm^{-1}) และ N-H bending ของ amide III (1241.08 cm^{-1}) ซึ่งจากผลดังกล่าวจะมีพีกสำคัญของไฮโดรเจลปรากฏในตำแหน่งที่แตกต่างกัน ได้แก่ OH/NH, C=O, C-O และ N-H นอกจากนี้เมื่อได้ทำการเปรียบเทียบระหว่างก่อนและหลังการใส่เจนิพินในคำรับพบว่า หลังจากที่ได้เจนิพินในคำรับจะเกิดการเปลี่ยนแปลงที่ตำแหน่ง C=O stretching ซึ่งคำรับที่เตรียมจากเซรีซินของรังไหม พันธุ์ J108 เกิดการเลื่อนตำแหน่งจาก 1620 ไปเป็น 1649.15 cm^{-1} เช่นเดียวกับคำรับที่เตรียมจากเซรีซินของบริษัททางการค้ามีการเลื่อนตำแหน่งจาก 1644.92 ไปเป็น 1645.61 cm^{-1} เนื่องจากเกิดปฏิกิริยาเคมีระหว่างหมู่ไฮดรอกซิลและเอสเทอร์ของเจนิพินกับหมู่อะมิโนของเซรีซิน [30] ทำให้กรดอะมิโนเกิดการสร้างพันธะใหม่ [31] จึงเกิดการเชื่อมขวางระหว่างกัน นอกจากนี้ที่ตำแหน่ง C=O stretching (1649.15 cm^{-1}) มีการซ้อนทับกับ amide I จึงสันนิษฐานได้ว่าการเปลี่ยนตำแหน่งดังกล่าวเกิดจากหมู่ C=O ของเซรีซินสร้างพันธะกับหมู่ OH ของเจนิพิน ส่งผลให้มีการเชื่อมขวางระหว่างกันและดูดพลังงานกักเก็บไว้ในตำแหน่งพันธะที่เชื่อมขวาง ซึ่งสังเกตได้จากการเปลี่ยนแปลงค่าพลังงานระหว่างก่อนและหลังการเติมสารเชื่อมขวาง โดยคำรับที่เตรียมจากรังไหมพันธุ์ J108 จะมีการดูดกลืนพลังงานสูงกว่าคำรับที่เตรียมจากบริษัททางการค้า จากผลการศึกษาดังกล่าวมีความสอดคล้องกับ Schiffman & Schauer (2007) [32] ที่รายงานว่า หลังเกิดกระบวนการเชื่อมขวางระหว่าง โกลโดซานกับกลูคัลลาลดีไฮด์พบว่า มีการเปลี่ยนแปลงตำแหน่งของ C=O stretching จาก 1620 ไปที่ 1660 cm^{-1} และมีการเกิดพีกใหม่ที่ตำแหน่ง 1650 cm^{-1} ซึ่งสามารถระบุได้ว่าเป็นพีก C=N ของอิมิน ขณะที่พีกของตำแหน่ง 1560 cm^{-1} มีการสูญหายเนื่องจากมีการหายไปอิมินอิสระ สันนิษฐานว่าอาจเกิดจากการเลื่อนตำแหน่งของอิมิน



ภาพที่ 6 เปรียบเทียบร้อยละการพองตัวของคำรับไฮโดรเจล โดยใช้เซรีซินที่ 3 คือ ความเข้มข้นร้อยละ 0.5, 1 และ 2 โดย HGJ คือ ไฮโดรเจลที่เตรียมจากเซรีซินจากรังไหมพันธุ์ J108 และ HGC คือไฮโดรเจลที่เตรียมจากเซรีซินของบริษัททางการค้า (p -value < 0.05)

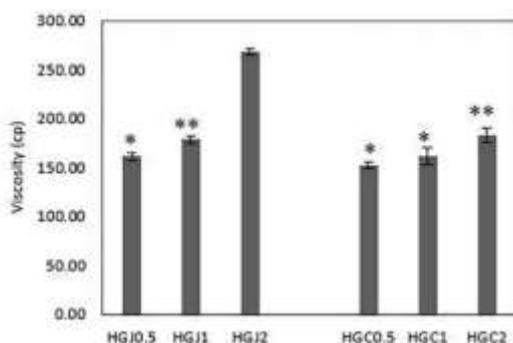
7. การศึกษาร้อยละการพองตัว (%Swelling)

จากการศึกษาพบว่า คำรับ HGC0.5 มีร้อยละการพองตัวสูงสุดเท่ากับร้อยละ 520.37 ± 46.87 ในขณะที่ HGJ2 มีการพองตัวต่ำสุดเท่ากับร้อยละ 162.14 ± 57.21 และเมื่อทำการเปรียบเทียบคำรับไฮโดรเจลที่เตรียมจากรังไหมจากรัง

ใหม่ทั้ง 2 แหล่ง พบว่า ตำรับที่เตรียมจากเซริซินของบริษัททางการค้ามีร้อยละการพองตัวสูงกว่าตำรับที่เตรียมจากเซริซินของรังไหมพันธุ์ J108 ดังแสดงในภาพที่ 6 จากการศึกษาพบว่า ไฮโดรเจลที่มีปริมาณของเซริซินน้อยหรือมีการเชื่อมขวางที่ต่ำจะมีการพองตัวที่สูง ในทางกลับกันตำรับที่มีปริมาณของเซริซินมากและมีการเชื่อมขวางที่สูงจะมีอัตราการพองตัวที่ต่ำ เนื่องจากหมู่อะมิโนและคาร์บอกซิลิกซึ่งมีคุณสมบัติไฮโดรฟิลิกถูกนำไปใช้ในปฏิกิริยาเชื่อมขวาง จึงส่งผลให้ความเป็นไฮโดรฟิลิกของวัสดุต่ำลง จึงมีการพองตัวได้น้อย [33] ซึ่งผลการศึกษามีความสอดคล้องกับ Mandal และคณะ [34]

8. การวัดความหนืดของตำรับไฮโดรเจล

ผลการศึกษาความหนืดของตำรับพบว่า HGJ2 มีความหนืดวัดได้สูงสุดเท่ากับ 268.67 ± 3.06 cP ในขณะที่ HGC0.5 มีความหนืดต่ำสุดเท่ากับ 152.00 ± 3.00 cP ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ดังแสดงในภาพที่ 7 จากการศึกษาพบว่าตำรับที่มีความเข้มข้นของเซริซินสูงจะมีความหนืดที่สูงเช่นกัน ซึ่งสันนิษฐานได้ว่าตำรับที่มีปริมาณเอมีนปฏิกิริยาสูง ส่งผลให้เกิดการเชื่อมขวางกับเจนิฟินได้มาก จึงส่งผลให้มีความหนืดสูง ในขณะที่ตำรับที่มีปริมาณเซริซินน้อยจะมีความหนืดที่ต่ำซึ่งผลการศึกษานี้มีความสอดคล้องกับรายงานของ Mi และคณะ [23] ได้ทำการพัฒนาไฮโดรเจลจากไคโตซานและเจนิฟิน พบว่าการเชื่อมขวางระหว่างไคโตซานกับเจนิฟินส่งผลให้ไคโตซานมีความหนืดเพิ่มมากขึ้น ดังนั้นความเข้มข้นของเซริซินมีผลต่อการเกิดการเชื่อมขวางและความหนืดของไฮโดรเจล



ภาพที่ 7 เปรียบเทียบความหนืดของตำรับ โดยใช้เซริซินที่ 3 ความเข้มข้นร้อยละ 0.5, 1 และ 2 ซึ่ง HGI คือ ไฮโดรเจลที่พัฒนาจากเซริซิน J108 และ HGC คือ ไฮโดรเจลที่พัฒนาจากเซริซินของบริษัททางการค้า (p -value < 0.05)

9. การคัดเลือกตำรับไฮโดรเจล

จากผลการศึกษาพบว่า ตำรับที่มีความเหมาะสมสำหรับการนำไปทดสอบฤทธิ์ ในขั้นตอนต่อไป คือ ตำรับที่เตรียมจากเซริซินที่สกัดจากรังไหมพันธุ์ J108 หรือ เซริซินจากบริษัททางการค้า ที่ความเข้มข้นร้อยละ 2 โดยมีการใช้สารเชื่อมขวางหรือเจนิฟินเป็นองค์ประกอบ เนื่องจากมีปริมาณโปรตีนสูง ซึ่งปริมาณของโปรตีนจึงมีผลต่ออัตราการเชื่อมขวางสูงส่งผลให้โครงสร้างภายในของไฮโดรเจลมีความหนาแน่นและความเสถียรภาพสูง [35] จึงมีความเหมาะสมในการนำมาพัฒนาตำรับ และศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพต่อไป

10. การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

10.1 การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP assay

จากผลการทดลองพบว่า ตำรับ HGJ2 มีปริมาณรีดิวซ์เหล็กมากกว่าตำรับ HGC2 อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) โดยมีค่าเท่ากับ 0.311 ± 0.019 และ 0.193 ± 0.010 mM Fe²⁺/g ตามลำดับ เช่นเดียวกับ เซริซินจากรังไหมพันธุ์ J108 (J108) มีปริมาณรีดิวซ์เหล็กมากกว่าเซริซินจากบริษัททางการค้า (Chul) อย่างมีนัยสำคัญ (p -value < 0.05) ซึ่งมีค่า FRAP Value

เท่ากับ 0.344 ± 0.00 และ 0.259 ± 0.013 mM Fe²⁺/g ตามลำดับ โดยแสดงในตารางที่ 2 พบว่าซิริชินจาก J108 มีความสามารถในการรีดิวซ์เหล็กไอออนใกล้เคียงกับกลุ่มควบคุมเชิงบวกคือ ascorbic acid และเมื่อทำการเปรียบเทียบตัวรับที่มีซิริชินกับตัวรับที่ไม่มีซิริชินพบว่า ตัวรับที่ไม่มีซิริชินมีค่า FRAP value ต่ำกว่าตัวรับที่ส่วนประกอบของซิริชิน จึงอนุมานได้ว่าตัวรับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในตัวรับเกิดจากการเสริมฤทธิ์ระหว่างซิริชินและเจนิฟิน เนื่องจากสารสกัดทั้งสองมีฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน [1,9,17-19]

10.2 การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH assay

ตารางที่ 2 แสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ของซิริชินและตัวรับไฮโดรเจลที่ใช้ซิริชินที่ความเข้มข้นร้อยละ 2

ตัวอย่าง	ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ	
	FRAP value (mM Fe ²⁺ /g)	% DPPH Inhibition
HGJ2	0.311±0.019	51.122±1.870
HGC2	0.193±0.010	45.103±1.618
Blank hydrogel	0.165±0.001	11.836±1.146
J108	0.344±0.000	67.209±1.100
Chul	0.259±0.013	22.687±3.208
Ascorbic acid (50 µg/mL)	0.366±0.005	44.092±2.179

HGJ2 คือ ไฮโดรเจลที่พัฒนาจากซิริชินจากรังไหมพันธุ์ J108 ความเข้มข้นร้อยละ 2 ,
HGC2 คือไฮโดรเจลที่พัฒนาจากซิริชินของบริษัททางการค้าความเข้มข้นร้อยละ 2
J108 คือ ซิริชินจากรังไหมพันธุ์ J108 และ Chul คือ ซิริชินจากบริษัททางการค้า
Blank hydrogel คือ ไฮโดรเจลที่ไม่มีส่วนผสมของซิริชิน

อภิปราย และสรุปผลการวิจัย

อภิปรายผลการวิจัย

จากผลการศึกษาพบว่า การเตรียม โปรตีนซิริชินด้วยวิธีแตกต่างกันส่งผลให้มีปริมาณ โปรตีนและโครงสร้างของโปรตีนแตกต่างกัน ซึ่งจะพบว่าซิริชินจากรังไหมพันธุ์ J108 และจากบริษัททางการค้ามีตำแหน่งฟิสิกคอลลอยด์อินฟราเรดต่างกัน ได้แก่ C=O stretching, C-O stretching, O-H stretching และ N-H bending จากผลดังกล่าวสามารถบ่งชี้ได้ว่าปริมาณโปรตีนและลักษณะโครงสร้างของโปรตีนขึ้นอยู่กับวิธีการเตรียม เมื่อนำซิริชินจาก 2 แหล่งมาเตรียมเป็นไฮโดรเจลโดยใช้เจนิฟินเป็นสารเชื่อมขวางพบว่า ไฮโดรเจลที่เตรียมจากรังไหมพันธุ์ J108 และซิริชินที่เตรียมจากบริษัททางการค้ามีโครงสร้างทางเคมีแตกต่างกัน หากสังเกตจากผล FTIR ทำให้ฟิสิกคอลลอยด์มีตำแหน่งที่แตกต่างกัน ดังนี้ O-H stretching, C-H stretching, amide I, amide II และ amide III และเมื่อได้ทำการเปรียบเทียบระหว่างตัวรับที่มีและไม่มีเจนิฟินพบว่า เกิดการเลื่อนที่ตำแหน่ง C=O stretching เนื่องจากการเกิดปฏิกิริยาเชื่อมขวาง [28] จึงเกิดการทำให้ปฏิกิริยาระหว่างเจนิฟินกับหมู่อะมิโน [31] ทำให้กรดอะมิโนเกิดการสร้างพันธะใหม่ [30] จากตำแหน่งที่ปรากฏของฟิสิกคอลลอยด์ต่างกันจึงเป็นตัวบ่งชี้ถึงการทำให้ปฏิกิริยาเชื่อมขวางระหว่างซิริชินกับเจนิฟินภายในตัวรับไฮโดรเจล นอกจากนี้การเชื่อมขวางภายในตัวรับยังส่งผลให้เกิดการคอลลอยด์พลังงานเก็บไว้ในตำแหน่งที่เชื่อมขวาง ซึ่งตัวรับที่เตรียมจากซิริชินพันธุ์ J108 มีพลังงานสูงกว่าตัวรับที่เตรียมจากซิริชินของบริษัททางการค้า ส่งผลให้ตัวรับที่เตรียมจากซิริชินพันธุ์ J108

มีโครงสร้างที่แข็งแรงและหนาแน่น และมีความหนืดสูง ทำให้มีรูพรุนขนาดเล็กสามารถดูดน้ำเข้าไปในตำรับได้น้อย ในขณะที่ตำรับที่เตรียมจากเซริซินของบริษัททางการค้ามีค่าดูดกลืนพลังงานที่ต่ำจึงมีการดูดกลืนพลังงานได้ต่ำ ส่งผลให้โครงสร้างมีความหนืดและความหนาแน่นต่ำ ทำให้เกิดรูพรุนที่มีขนาดกว้าง จึงสามารถดูดซึมน้ำเข้าไปภายใน จึงมีความสามารถในการพองตัวที่สูง ซึ่งการเชื่อมขวางที่เกิดขึ้นจะแปรผันตามปริมาณ โปรตีนเนื่องจาก หมู่อะมิโนอิสระภายในจะเป็นจุดเชื่อมโยงกับสารเชื่อมขวาง [23] จะพบว่าเซริซินของรังไหมพันธุ์ J108 ที่ความเข้มข้นร้อยละ 2 ทำให้มีค่าร้อยละการเชื่อมขวางสูงที่สุด เนื่องจากมีปริมาณ โปรตีนสูง และการเชื่อมขวางยังมีความสัมพันธ์กับความหนืดแต่มีผลตรงกันข้ามกับการพองตัวของไฮโดรเจล จากผลการศึกษาจะพบว่า ตำรับ HGJ2 เป็นตำรับที่มีความหนืดสูงที่สุดแต่มีอัตราการพองตัวต่ำที่สุด เนื่องจากการที่มีปริมาณเอมีนปฏิกิริยามากจะสามารถเกิดปฏิกิริยาเชื่อมขวางได้มากส่งผลให้โครงสร้างยึดกันได้ดีจึงมีความหนืดสูง ในขณะที่โครงสร้างที่แข็งแรงทำให้มีอัตราการพองตัวต่ำสุดเนื่องจากหมู่ฟังก์ชันที่มีคุณสมบัติชอบน้ำ เช่น อะมิโนหรือคาร์บอกซิลิกถูกนำไปใช้ในการเกิดปฏิกิริยาเชื่อมขวาง [33] และปฏิกิริยาเชื่อมขวางส่งผลให้โครงสร้างภายในไฮโดรเจลมีความหนาแน่นเพิ่มขึ้น ทำให้มีขนาดของรูพรุนภายในเจลที่เล็กลง จึงทำให้น้ำผ่านเข้ามาในตำรับได้น้อย [35] แต่ในทางตรงกันข้ามตำรับ HGC0.5 มีระดับการเชื่อมขวางต่ำจึงทำให้หมู่ฟังก์ชันที่ชอบน้ำภายในตำรับไม่ถูกนำไปใช้ในการสร้างพันธะกับเจนิฟิน และยังมี การเชื่อมขวางภายในที่ต่ำส่งผลให้โครงสร้างภายในมีความหนาแน่นต่ำและไม่เป็นระเบียบ จึงเกิดรูพรุนภายในไฮโดรเจลที่มีขนาดใหญ่ จึงทำให้น้ำสามารถผ่านเข้าไปข้างในเจลได้ จึงมีการพองตัวสูงซึ่งจะมีผลต่อความคงตัวของโครงสร้างลดลงไปด้วย ซึ่งจะนอกจากนี้ยังพบว่ากรรมวิธีการเตรียมมีผลต่อฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ซึ่งจากผลการศึกษาพบว่า การเตรียมโปรตีนด้วยวิธีต่างกันทำให้ได้ปริมาณ โปรตีนต่างกัน จึงส่งผลให้ได้เซริซินที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระแตกต่างกัน [37] ซึ่งจะเห็นได้ว่าเซริซินจากรังไหมพันธุ์ J108 มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงกว่าเซริซินของบริษัททางการค้า และเมื่อนำมาเตรียมเป็นไฮโดรเจลจะพบว่า ตำรับ HGJ2 จะมีความสามารถในการต้านออกซิเดชันสูงกว่าตำรับ HGC2 เช่นเดียวกับการศึกษาฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของสารสกัดเซริซินจากทั้ง 2 แหล่ง ซึ่งกล่าวได้ว่าวิธีการเตรียมโปรตีนมีผลต่อความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระของตำรับ นอกจากนี้ฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของตำรับอาจเกิดจากการเสริมฤทธิ์กันของสารสกัดในตำรับ คือเซริซินและเจนิฟิน เนื่องจากสารสกัดทั้ง 2 ชนิด มีคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระเช่นเดียวกัน [1,17] จากการศึกษาพบว่าตำรับไฮโดรเจลที่เตรียมจากเซริซินของรังไหมสายพันธุ์ J108 ที่ความเข้มข้นร้อยละ 2 และใช้สารเชื่อมขวางเจนิฟินเป็นตำรับที่มีความเหมาะสมที่จะนำไปพัฒนาต่อยอดเป็นผลิตภัณฑ์เวชสำอาง เนื่องจากมีโครงสร้างที่แข็งแรงและมีความหนืดที่สูงทำให้ก่อตัวเป็นเจลได้ดี และยังมีฤทธิ์ทางชีวภาพที่สูง นอกจากนี้เซริซินและเจนิฟินสารสกัดจากธรรมชาติซึ่งมีความปลอดภัยต่อร่างกายและยังเป็นการนำวัสดุเหลือทิ้งจากการทำเกษตรกรรมมาใช้ให้เกิดประโยชน์สูงสุด

สรุปผลการวิจัย

ในการเตรียมเซริซินไฮโดรเจลที่เหมาะสมควรต้องคำนึงปัจจัยต่าง ๆ ที่จะผลต่อการเกิดไฮโดรเจลได้แก่ สายพันธุ์ของรังไหม และวิธีการสกัดเซริซิน ซึ่งจะมีผลต่อหมู่ฟังก์ชันและโครงสร้างของเซริซิน และความเข้มข้นของเซริซินอีกด้วย เพื่อจะได้เลือกเซริซินที่เหมาะสมสำหรับการใช้เป็นองค์ประกอบในการเตรียมไฮโดรเจลเพื่อให้ได้ไฮโดรเจลที่เหมาะสมมีคุณสมบัติตามที่ต้องการและมีการประเมิน คุณสมบัติทางเคมี กายภาพ ในด้านต่าง ๆ ระดับการเชื่อมขวาง ความหนืดและอัตราการพองตัว รวมถึงฤทธิ์ชีวภาพ และความคงตัว สำหรับพัฒนาต่อยอดเป็นผลิตภัณฑ์เวชสำอางต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณคณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ที่ให้ทุนการสนับสนุนการทำวิทยานิพนธ์ ระดับบัณฑิตศึกษา คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ตลอดจนอนุเคราะห์เครื่องมือวิทยาศาสตร์และห้องปฏิบัติการจนทำให้งานวิจัยประสบความสำเร็จจลุล่วงไปด้วยดี ขอขอบพระคุณห้องปฏิบัติการกลางคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ที่ให้ความอนุเคราะห์เครื่องมือวิทยาศาสตร์ ขอขอบพระคุณศูนย์หม่อนไหมเฉลิมพระเกียรติพระนางเจ้าสิริกิติ์ พระบรมราชินีนาถ ต.ในเมือง อ.เมือง จ.ขอนแก่นที่ให้ความอนุเคราะห์รังไหมสายพันธุ์ J108

เอกสารอ้างอิง

1. Kumar JP, Mandal BB. Antioxidant potential of mulberry and non-mulberry sericin and its implications in biomedicine. *Free Radic Biol Med.* 2017; (108): 803-818.
2. Aramwit P, Angkasirisap W, Srichana T. The effect of silk sericin protein on collagen production and skin wound healing in rats. *KKU Res J.* 2009; 14(5): 460-470.
3. Manosroi A, Boonpisuttinant K, Winitchai S, Manosroi W, Manosroi, Manosroi J. Free radical scavenging and tyrosinase inhibition activity of oil and sericin extracted from Thai native silkworm (*Bombyx mori*). *Pharm Biol.* 2010; 48(8): 855-860.
4. Aramwit P, Towiwat P, Srichana T. Anti-inflammatory potential of silk sericin. *Nat Pro Comn.* 2013; 8(4): 501-504.
5. Senakoon W, Nuchadomrong S, Sirimungkararat S, Senawong T, Kitikoon P. Antibacterial action of eri (*Samia ricini*) sericin against *esterichia coli* and *staphylococcus aureus*. *As J Food Ag-Ind.* 2009; special issue: 222-228.
6. Chirani N, Yahia LH, Gritsch L, Motta FL, Chirani S, Faré S. History and Application of hydrogel. *J Bioned Sci.* 2015; 2:(13): 1-23
7. Cho KY, Moon JY, Lee YW, Lee KG, Yeo JH, Kweon HY, et al. Preparation of self-assembled silk sericin nanoparticles. *Int J Biol Macromol.* 2003; 32(1-2): 36-42
8. Mohite PB, Adhav SS. A hydrogel: Methods of preparation and application. *IJAP.* 2017; 6(3): 79-85.
9. Hennick WE, Nostrum CFV. Novel crosslinking methods to design hydrogel. *Adv Drug Deliv Rev.* 2002; 54(1): 13-16.
10. Tanun W, Sangsuwan S. Super Absorbent Polymer: Synthesis, Characterization, and Applications. *JSSE.* 2014; 16(2): 63-81.
11. Chuasinuan P, Techasakul S, Noeaiad P. Antibacterial hydrogel of Thyme Essential Oil-incorporated Gelatin/Silk sericin as wound dressing. *SWU Sci J.* 2017; 33(2): 1-15.
12. Shukla R, Kashaw SK, Jain AP, Lodhi S. Fabrication of Apigenin loaded gallan gum-chitosan hydrogels (GGCH-HGs) for effective diabetic wound healing. *Int J Bio Macromol.* 2016;(91): 1110-1119.
13. Hyon SH, Cha WI, Ikada Y, Kita M, Ogura Y, Honda Y. Poly (vinyl alcohol) hydrogels as soft contact lens material. *J Biomater Sci Polym Ed.* 1994; 5(5): 397-406.
14. Lee TW, Kim CH, Hwang SJ. Hydrogel patches containing Triclosan for acne treatment. *Eur J Pharm Biopharm.* 2003; 56(3): 407-412.
15. Parente ME, Andrade OA, Ares G, Russo F, Jiménez-Kairuz á. Bioadhesive hydrogels for cosmetic applications. *Int J Cosmet Sci.* 2015; 37(5): 511-518.



16. Aramwit P, Siritientong T, Kanokpanont S, Srichana T. Formulation and characterization of silk sericin-PVA scaffold crosslink with genipin, *Int J Biol Mocomol.* 2010; (47): 668-675.
17. Ramos-de-la-Peña AM, Renard CMGC, Montañez J, Reyes-Vega MdL, Contreras-Esquivel JC. A review through recovery, purification and identification of genipin. *Phytochem Rev.* 2014; 15(1): 37-49.
18. Winotapun W, Opanasopit P, Ngawhirunpat T. Oneenzyme catalyzed simultaneous plant cell disruption and conversion of released glycoside to aglycone combined with in situ product separation as green one-pot production of genipin from Gardenia fruit. *Enzym Microbial Technol.* 2013; 53: 92-96.
19. Wang QS, Xiang Y, Cui YL, Lin KM, Zhang XF. Dietary blue pigment derived from genipin, attenuate inflammatory by inhibiting LPS-induced iNOS and COX-2 expression via the NF- κ B inactivation. *PLOS ONE.* 2012; 7(3): e34122.
20. Aramwit P, Damrongsakkul S, Kanokpanont S, Srichana T. Properties and antityrosinase activity of sericin from various extraction methods. *Biotechnol App Biochem.* 2010; 55(2): 91-98.
21. Liliam KH, Laura IL, Alessandra C, Erica C, Welida F, Tatiane P, et al. Sericin from Bombyx mori cocoons. Part I: Extraction and physical-biological characterization for biopharmaceutical application. *Process Biochem.* 2017; (61): 163-177.
22. Bradford MM. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Chem.* 1976; (72): 248-254.
23. Mi FL, Sung HW, Shyu SS. Synthesis and Characterization of a Novel Chitosan-Based Network Prepared Using Naturally Occurring Crosslinker. *J Polym Sci A.* 2000; (38): 2804-2814.
24. Shi Y, Xiong D, Liu Y, Wang N, Zhao X. swelling mechanical and friction properties of PVA/PVP hydrogels after swelling in osmotic pressure solution. *Mater Sci Eng C.* 2016; (65): 172-180.
25. Benzie IFF, Strain JJ. The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a measure of "Antioxidant power": The FRAP Assay. *Anal Chem.* 1996; (239): 70-76.
26. Brand-William W, Cuvelier ME, Berset C. Use of Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity. *Lebensm-Wiss. u.-Technol.* 1995; (28): 25-30.
27. Yuan Y, Chesnutt BM, Utturkar G, Haggard WO, Yang Y, Ong JL, Bumgardner JD. The effect of cross-linking of chitosan microspheres with genipin on protein release. *Carbohydr Polym.* 2007; (68): 561-567.
28. Mu C, Zhang K, Lin W, Li D. Ring-opening polymerization of genipin and its long-range crosslinking effect on collagen hydrogel. *J Biomed Mater Res A.* 2013; 101(2): 385-393.
29. Hobanthad T. Extraction of sericin from Thai native silk (Nangsew) yarn using mulberry (cv. Buriram 60) leaves extracts as a greener solvent. *SNRU JST.* 2018; 10(3): 156-164.
30. Zhang W, Ren G, Xu H, Zhang J, Liu H, Mu S, Cai X, Wu T. Genipin-cross-linked chitosan hydrogel for the controlled release of tetracycline worth controlled release property, lower cytotoxicity, and long-term bioactivity. *J Polym Res.* 2016; 23(156): 1-9.
31. Klein MP, Hackenhaar CR, Lorenzoni ASG, Rodrigues RC, Costa TMH, Ninow JL, Hertz PF. Chitosan crosslinked with genipin s support matrix for application in food process: Support characterization and β -D galactosidase immobilization. *Carbohydr polym.* 2016; (137): 184-190.



32. Schiffman JD, Schauer CL. Cross-Linking Chitosan Nanofibers. *Biomacromolecule*. 2007; (8): 594-601.
33. Yan LP, Wang YJ, Ren L, Wu G, Caridade SG, Fan JB, Wang LU, Ji PH, Oliveira JM, Oliveira JT, Mano JF, Reis RL. Genipin-cross-linked collagen/chitosan biomimetic scaffolds for articular cartilage tissue engineering application. *J Biomed Mater Res A*. 2010; 95(2): 465-475.
34. Mandal BB, Priya AS, Kundu SC. Novel silk sericin/gelatin 3-D scaffolds and 2-D films: Fabrication and characterization for potential tissue engineering applications. *Acta Biomater*. 2009; (5): 3007-3020.
35. Nadzir MM, Mun LS, Juan CP. Characterization of Genipin-Crosslinked Gelatin Hydrogel Loaded with Curcumin. *JEAS*. 2017; 12(9): 2294-2298.
36. Prior RL, Wu X, Schaich K. Standardized Methods for the Determination of Antioxidant capacity and Phenolics in Food and Dietary Supplements. *J Agric Food Chem*. 2005; (53): 4290-4302.
37. Kumar JP, Mandal BB. Antioxidant potential of mulberry and non-mulberry silk sericin and its implications in biomedicine. *Free Radical Bio Med*. 2017; (108): 803-818.