

องค์ประกอบทางเคมีของขี้หนอนไหมไทยสายพันธุ์เหลือง โคราชและฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัด



นางสาว ชนิกา โสมขันเงิน

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาเภสัชศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเภสัชเวท ภาควิชาเภสัชเวทและเภสัชพฤกษศาสตร์

คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2552

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



5 0 7 6 6 0 8 6 3 3

CHEMICAL CONSTITUENTS OF THAI SILKWORM
(*BOMBYX MORI* L.) STRAIN LUEANG KORAT EXCRETA AND ITS BIOACTIVITIES

Miss Chanida Somkhanngoen

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science in Pharmacy Program in Pharmacognosy
Department of Pharmacognosy and Pharmaceutical Botany

Faculty of Pharmaceutical Sciences

Chulalongkorn University

Academic Year 2009

Copyright of Chulalongkorn University

522126

ชนิดา โสมขันเงิน: องค์ประกอบทางเคมีของขี้หนอนไหมไทยสายพันธุ์เหลืองโคราชและและ
ฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัด. (CHEMICAL CONSTITUENTS OF THAI SILKWORM
(*BOMBYX MORI* L.) EXCRETA. STRAIN LUEANG KORAT AND ITS BIOACTIVITIES
FECES EXTRACTS) อ. ที่ปริกษาวิทยานิพนธ์หลัก : ผศ.ดร.สุชาดา สุขห่อง, อ. ที่ปริกษา
วิทยานิพนธ์ร่วม : ผศ.ดร.พรเพ็ญ วีระวัฒนกานนท์, 76 หน้า.

ปัจจุบันการเลี้ยงไหมในประเทศไทยได้พัฒนาขึ้นสู่ระดับอุตสาหกรรม กำลังการผลิตที่เพิ่ม
สูงขึ้นส่งผลให้ของเหลือทิ้งจากระบวนการผลิตมีจำนวนเพิ่มสูงขึ้น โดยเฉพาะขี้หนอนไหมซึ่งเป็น
ของเหลือทิ้งที่มีอยู่อย่างมากมาย การทดลองครั้งนี้จึงต้องการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของขี้หนอน
ไหมไทยสายพันธุ์เหลืองโคราชและฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัด

จากการทดลองสามารถแยกองค์ประกอบทางเคมี 3 ชนิด คือ SWF1 (7.5 mg, 10.84×10^{-3} % โดย
น้ำหนักขี้หนอนไหมแห้ง), SWF2 (15.9 mg, 23.06×10^{-3} % โดยน้ำหนักขี้หนอนไหมแห้ง) และ SWF3
(3.1mg, 4.50×10^{-3} % โดยน้ำหนักขี้หนอนไหมแห้ง) เมื่อพิสูจน์เอกลักษณ์พบว่าได้แก่สาร tritriacontanol
lupeol และ β -sitosterol ตามลำดับ ซึ่งเป็นรายงานการพบ tritriacontanol จากขี้หนอนไหมเป็นครั้งแรก
ในขณะที่ lupeol และ β -sitosterol เป็นสารที่พบอยู่ในใบหม่อนมาก่อนหน้านี้แล้ว การทดลองนี้จึง
นำไปสู่การใช้ประโยชน์จากขี้หนอนไหมในการเป็นสารแต่งสีที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระรวมทั้งการเป็น
แหล่งของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ

จากการประเมินสารสกัดขี้หนอนไหมในการใช้เป็นสารแต่งสีและความคงตัวของสีได้สภาวะเร่ง
พบว่าสารสกัดขี้หนอนไหมมีฤทธิ์แรงในการกำจัดอนุมูลอิสระและสามารถเข้ากันได้ดีกับ cold cream
USP XXI ซึ่งเป็นตัวแทนของเครื่องสำอางที่ใช้ในการทดลอง

ภาควิชาเภสัชเวทและเภสัชพฤกษศาสตร์ ลายมือชื่อนิสิต..... *Fun Som*
สาขาวิชา.....เภสัชเวท..... ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา..... *Fun*
ปีการศึกษา.....2552..... ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม..... *ml can*

5076608633 : MAJOR PHARMACOGNOSY

KEYWORDS: SILKWORM EXCRETA, *BOMBYX MORI* L., TRITRIACONTANOL, LUPEOL, β -SITOSTEROL

CHANIDA SOMKHANNGOEN: CHEMICAL CONSTITUENTS OF THAI SILKWORM (*BOMBYX MORI* L.) EXCRETA. STRAIN LUEANG KORAT AND ITS BIOACTIVITIES. THESIS ADVISOR : ASST. PROF.SUCHADA SUKRONG, Ph.D., THESIS COADVISOR : ASST. PROF.PORNPEN WERAWATGANONE, Ph.D., 76 pp.

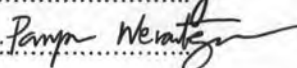
At the present, silkworm cultivation in Thailand expands to the industrial level. Higher production ability yields more waste products. In particularly, silkworm excreta are the abundant waste. In this study silkworm strain Lueng Korat excreta has been investigated for its chemical constituents and bioactivities.

Three valuable compounds were isolated including SWF1 (7.5 mg, $10.84 \times 10^{-3}\%$ based on dried weight of excreta), SWF2 (15.9 mg, $23.06 \times 10^{-3}\%$ based on dried weight of excreta) and SWF3 (3.1mg, $4.50 \times 10^{-3}\%$ based on dried weight of excreta) which were identified as tritriacontanol, lupeol and β -sitosterol, respectively. Tritriacontanol is reported for the first time in silkworm excreta and the latter two compounds were found in mulberry leaves in the previously. This investigation leads to alternative utilization of the silkworm excreta in the use of colorant that possess antioxidant activity as well as being a source for bioactive compounds.

Silkworm excreta extract was evaluate for the use as cosmetic colorant and its stability under stress condition. The results indicates that extract of silkworm excreta had high free radical scavenging activity and were compatible with Cold cream USPXXI which was the cosmetic model used in the experiment.

Department: Pharmacognosy and Pharmaceutical Botany..Student's signature: 

Field of study :Pharmacognosy.....Advisor's signature: 

Academic year : 2009..... Co-advisor's signature: 

Acknowledgements

The author would like to express her deepest gratitude to her thesis advisor Assistant Professor Dr. Suchada Sukrong of the Department of Pharmacognosy and Pharmaceutical Botany, for her kindness, caring, valuable advices and support throughout the course of this study.

The author also wishes to express her gratefulness to her co-advisor, Assistant Professor Pornpen Werawatganone of the department of Pharmaceutics and Industrial Pharmacy, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University, for her helpful advice and kindness.

The author wish to express her appreciation to Associate professor Surattana Amnuoypol and Assistant Professor Boonchoo Sritularak, for her and his kindness helps in interpretation of NMR data.

The author would like to thank to the members of her thesis committee for their useful advice.

The author would like to thank the Graduate School of Chulalongkorn University, Thailand Research Fund and Office of Small and Medium Enterprises Promotion for granting partial financial support to conduct this investigation.

The author would also like to thank Queen Sirikit Sericulture Center, Nakhon Ratchasima and Thai-China Flavor and Fragrance Co., Ltd. for providing sample used in the experiment.

Finally, the author wishes to express her gratitude to her family for their encouragement.

CONTENTS

	Page
ABSTRACT (Thai)	iv
ABSTRACT (English)	v
ACKNOWLEDGEMENT	vi
CONTENTS	vii
LIST OF TABLES	xi
LIST OF FIGURES	xii
LIST OF SCHEME	xiii
ABBREVIATIONS	xiv
CHAPTER	
I INTRODUCTION	1
II LITERATURE REVIEWS.....	3
2.1 Silkworm excreta and their traditional uses	3
2.2 Chemical constituents of silkworm excreta	3
2.3 Mulberry Leaves and their traditional uses	10
2.4 Chemical constituents of mulberry leaves.....	10
2.5 Antityrosinase and antioxidant.....	13
III CHEMICAL CONSTITUENTS OF SILKWORM EXCRETA.....	15
3.1 Introduction	15
3.2 Material and methods	15
3.2.1 Source of sample.....	15
3.2.2 General techniques	16
3.2.2.1 Analytical thin layer chromatography	16
3.2.2.2 Column chromatography	16
3.2.2.2.1 Vacuum column chromatography	16

3.2.2.2.2 Flash column chromatography.....	16
3.2.2.2.3 Gel filtration chromatography	17
3.2.2.2.4 High performance liquid chromatography	17
3.2.2.3 Spectroscopy	17
3.2.2.3.1 UV-visible spectroscopy.....	17
3.2.2.3.2 Proton and carbon-13 nuclear magnetic resonance (^1H and ^{13}C -NMR) spectroscopy	18
3.2.2.3.3 Mass spectrometry	18
3.2.2.3.4 Fourier transformed infrared spectroscopy (FT-IR)	18
3.2.2.4 Chemicals and solvents	18
3.2.3 Extraction of silkworm excreta.....	18
3.2.4 Isolation of chemical compounds.....	19
3.2.4.1 Isolation of SWF1	20
3.2.4.2 Isolation of SWF2.....	22
3.2.4.3 Isolation of SWF3.....	24
3.2.5 Physical and spectral data of isolated compounds.....	26
3.2.5.1 Compound SWF1	26
3.2.5.2 Compound SWF1	26
3.2.5.3 Compound SWF1	26
3.2.6 Bioactivity test of isolated compounds.....	27
3.2.6.1 Free radical scavenging activity	27
3.2.6.1.1 TLC screening assay	27
3.2.6.1.2 Free radical scavenging activity of isolated compounds.....	27

3.2.6.2 Tyrosinase inhibitory activity	28
3.3 Results and discussion	29
3.3.1 Isolation of chemical compounds.....	29
3.3.1.1 Isolation of SWF1	29
3.3.1.2 Isolation of SWF2.....	32
3.3.1.3 Isolation of SWF3.....	35
3.3.2 Bioactivity of chemical compounds	38
3.3.2.1 Free radical scavenging activity of compounds SWF1, SWF2, and SWF3	38
3.3.2.2 Tyrosinase inhibitory activity of compounds SWF1, SWF2, and SWF3.....	38
3.4 Conclusion ..	39
IV APPLICATION OF SILKWORM EXCRETA EXTRACT	40
4.1 Introduction .	40
4.2 Material and methods	40
4.2.1 Bioactivity test of crude silkworm excreta extract.....	40
4.2.1.1 Free radical scavenging activity of the crude extract	40
4.2.1.2 Tyrosinase inhibitory activity of the crude extract	41
4.2.2 Application of silkworm excreta extract in cosmetic.....	41
4.2.3 Heat stability of crude silkworm excreta extract	42
4.2.3.1 Heat stability of the crude extract in the solution.....	42
4.2.3.2 Heat stability of the crude extract in cosmetic model	42
4.3 Results and discussion	43
4.3.1 Bioactivity of silkworm excreta extract.....	43
4.3.1.1 Free radical scavenging activity	43

4.3.1.2 Tyrosinase inhibitory activity	44
4.3.2 Application of silkworm excreta extract in cosmetic.....	45
4.3.3 Heat stability of crude silkworm excreta extract	45
4.3.3.1 Heat stability of the crude extract in the solution.....	45
4.3.3.2 Heat stability of the crude extract in cosmetic model	46
4.4 Conclusion.....	47
V CONCLUSION.....	48
REFERENCES.....	50
APPENDIX.....	59
VITA.....	76

LIST OF TABLES

TABLE		Page
1	Chemical constituents in silkworm excreta.....	6
2	Chemical constituents in mulberry leaves	11
3	¹ H-NMR spectral data of SWF1.....	31
4	Proposed carbon assignment for SWF1	31
5	¹ H-NMR spectral data of SWF2 and lupeol	33
6	¹³ C-NMR spectral data of SWF2 and lupeol	34
7	¹ H-NMR spectral data of SWF3 and β -sitosterol	36
8	¹³ C-NMR spectral data of SWF3 and β -sitosterol	37
9	Percentage of DPPH reduction by isolated compounds from silkworm excreta	38
10	Percentage of tyrosinase inhibition by isolated compounds from silkworm excreta extract	39

LIST OF FIGURES

FIGURE		Page
1	Silkworm excreta	2
2	Silkworm larva in various growth stages.....	5
3	tritriacontanol.....	31
4	lupeol.....	33
5	β -sitosterol.....	36
6	% DPPH reduction and tyrosinase inhibition of crude acetone extract (800mg/ml) during heat treatment.....	44
7	Tyrosinase inhibitory activity of crude silkworm excreta extracts	45
8	% DPPH reduction and tyrosinase inhibition of crude acetone extract (800mg/ml) during heat treatment.	46
9	Cold cream colored by crude acetone extract	47
A	$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz) of SWF1 in deuterated chloroform.....	60
B	$^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz) of SWF1 in deuterated chloroform.....	61
C	IR spectrum of SWF1 (KBr disc).....	62
D	EIMS spectrum of SWF1	63
E	$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz) of SWF2 in deuterated chloroform.....	64
F	$^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz) of SWF2 in deuterated chloroform.....	65
G	$^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz) of SWF2 in deuterated chloroform (expand).....	66
H	EIMS spectrum of SWF2	67
I	$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz) of SWF3 in deuterated chloroform.....	68
J	$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz) of SWF3 in deuterated chloroform (expanded).....	69
K	$^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz) of SWF3 in deuterated chloroform.....	70
L	$^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz) of SWF3 in deuterated chloroform (expanded).....	71
M	DEPT spectrum (75 MHz) of SWF3 in deuterated chloroform.....	72
N	DEPT spectrum (75 MHz) of SWF3 in deuterated chloroform (expanded)..	73
O	IR spectrum of SWF3 (KBr disc)	74
P	EIMS spectrum of SWF3	75

LIST OF SCHEMES

Schemes	Page
1 Isolation of SWF1 (1-tritriacontanol) from crude acetone extract.....	21
2 Isolation of SWF2 (lupeol) from crude acetone extract.....	23
3 Isolation of SWF3 (β -sitosterol) from crude acetone extract.....	25

ABBREVIATIONS

α	= Alpha
β	= Beta
br	= Broad (for NMR spectra)
$^{\circ}\text{C}$	= Degree Celsius
CDCl_3	= Deuterated chloroform
CH_2Cl_2	= Dichloromethane
^{13}C NMR	= Carbon-13 Nuclear Magnetic Resonance
cm	= Centimeter
1-D	= One dimensional (for NMR spectra)
d	= Doublet (for NMR spectra)
dd	= Doublet of doublets (for NMR spectra)
δ	= Chemical shift
EIMS	= Electron Impact Mass Spectrometry
g	= Gram
GF	= Gel Filtration Chromatography
^1H -NMR	= Proton Nuclear Magnetic Resonance
HPLC	= High Pressure Liquid Chromatography
Hz	= Hertz
IR	= Infrared
IC_{50}	= Concentration showing 50% inhibition
J	= Coupling constant
Kg	= Kilogram
L	= Liter
μL	= microliter

λ_{\max}	= Wavelength at maximal absorption
m	= Multiplet (for NMR spectra)
MeOH	= Methanol
mg	= Milligram
μg	= Microgram
MHz	= Mega Hertz
ml	= Milliliter
m/z	= Mass to charge ratio
MS	= Mass spectrum
MW	= Molecular weight
nm	= Nanometer
NMR	= Nuclear Magnetic Resonance
ppm	= Part per million
s	= Singlet (for NMR spectra)
t	= Triplet (for NMR spectra)
TLC	= Thin Layer Chromatography
UV-VIS	= Ultraviolet and Visible spectrophotometry
VLC	= Vacuum Liquid Column Chromatography
ν_{\max}	= Wave number at maximal absorption