โครงการ

การเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์

ชื่อโครงการ การสกัดสารต้านอนุมูลอิสระ สารต้านมะเร็งและสารยับยั้งไลเปสตับอ่อนจากเห็ดฟาน (*Lactarius volemus*)

Extraction of antioxidant, anti-cancer and anti-pancreatic lipase agents from Hed Farn (*Lactarius volemus*)

ชื่อนิสิต นางสาวสุกัญญา นพภา เลขประจำตัว 5833098123

ภาควิชา เคมี

ปีการศึกษา 2561

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงงานทางวิชาการที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงงานทางวิชาการที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด
The abstract and full text of senior projects in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the senior project authors' files submitted through the faculty.

การสกัดสารต้านอนุมูลอิสระ สารต้านมะเร็งและสารยับยั้งไลเปสตับอ่อนจากเห็ดฟาน (*Lactarius volemus*)

Extraction of antioxidant, anti-cancer and anti-pancreatic lipase agents from Hed Farn (*Lactarius volemus*)

โดย

นางสาวสุกัญญา นพภา

รายงานนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต
ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2561

โครงการ การสกัดสารต้านอนุมูลอิสระ สารต้านมะเร็งและสารยับยั้งไลเปสตับอ่อนจากเห็ดฟาน (*Lactarius volemus*)

โดย นางสาวสุกัญญา นพภา

ได้รับอนุมัติให้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาเคมี ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

คณะกรรมการสอบโครงการ

.....ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วรินทร ชวศิริ)

.....อาจารย์ที่ปรึกษา
(รองศาสตราจารย์ ดร. สุรชัย พรภคกุล)

.....กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. ธรรมนูญ หนูจักร)

รายงานฉบับนี้ได้รับความเห็นชอบและอนุมัติโดยหัวหน้าภาควิชาเคมี

.....หัวหน้าภาควิชาเคมี
(รองศาสตราจารย์ ดร. วุฒิชัย พาราสุข)

วันที่ 24 เดือนพฤษภาคม พ.ศ. 2562

ชื่อโครงการ การสกัดสารต้านอนุมูลอิสระ สารต้านมะเร็งและสารยับยั้งไลเปสตับอ่อนจากเห็ดฟาน (*Lactarius volemus*)
ชื่อนิสิตในโครงการ นางสาวสุกัญญา นพภา เลขประจำตัว 5833098123
ชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา รองศาสตราจารย์ ดร. สุรชัย พรภคกุล
ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปีการศึกษา 2561

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาสารต้านอนุมูลอิสระ สารต้านมะเร็งและสารยับยั้งไลเปสตับอ่อนจากสารสกัดเห็ดฟาน (*Lactarius volemus*) โดยเห็ดฟานสดและแห้งถูกนำมาสกัดด้วยตัวทำละลายเฮกเซน ไดคลอโรมีเทน เมทานอลและน้ำกลั่น สารสกัดจากเห็ดฟานแห้งให้สัดส่วนของสารสกัดหยาบมากกว่าสารสกัดจากเห็ดฟานสด สารสกัดเห็ดฟานแห้งด้วยน้ำกลั่นให้สัดส่วนสารสกัดหยาบมากที่สุด คือ 2.41 เปอร์เซ็นต์ของมวลเห็ดฟานสด ผลการวิเคราะห์โครงสร้างสารประกอบด้วยเทคนิค ^{1}H-NMR, ^{13}C-NMR spectroscopy พบว่าสารสกัดด้วยตัวทำละลายเฮกเซนและไดคลอโรมีเทน มีโอลิโกไอโซพรีนและไขมันในรูปของไตรกลีเซอไรด์และกรดไขมันเป็นองค์ประกอบ ขณะที่สารสกัดด้วยเมทานอลและน้ำกลั่น มีแซ็กคาไรด์ เทอร์พีนอยด์ และสารประกอบฟีนอลิกเป็นองค์ประกอบ ผลการตรวจวัดปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมด้วยวิธี Folin-Ciocalteu reagent พบว่าสารสกัดเห็ดฟานแห้งและสดด้วยน้ำกลั่นมีสารประกอบฟีนอลิกเป็นองค์ประกอบมากที่สุดเท่ากับ 89 และ 65 มิลลิกรัมกรดแกลลิกโดยสมมูลต่อกรัมสารสกัดหยาบ ตามลำดับ ในการทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยการดักจับอนุมูลอิสระ 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) สารสกัดเห็ดฟานสดและแห้งด้วยน้ำกลั่นแสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเท่ากับ 8.8 และ 25.0 มิลลิกรัมโทรลอกซ์โดยสมมูลต่อกรัมสารสกัดหยาบ ตามลำดับ ผลการทดสอบการเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเต้านม (BT474), เซลล์มะเร็งปอด (Chago-K1), เซลล์มะเร็งตับ (Hep-G2), เซลล์มะเร็งกระเพาะอาหาร (KATO-III) และเซลล์มะเร็งลำไส้ (SW620) พบว่าสารสกัดเห็ดฟานแห้งด้วยเฮกเซนและไดคลอโรมีเทน แสดงความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งร้อยละ 50 (IC_{50}) ที่ความเข้มข้นต่ำกว่า 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สารสกัดเห็ดฟานแห้งด้วยเฮกเซนให้ผลการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งเต้านมได้ดีที่สุดที่ค่า IC_{50} เท่ากับ 54 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และมีฤทธิ์ยับยั้งไลเปสตับอ่อนได้ 39.7 เปอร์เซ็นต์ที่ความเข้มข้น 25 mg/mL สารสกัดหยาบของเห็ดฟานสดด้วยน้ำกลั่นให้ผลการยับยั้งไลเปสตับอ่อนดีที่สุดที่ 51.8 เปอร์เซ็นต์ ตรวจวัดปริมาณคาร์โบไฮเดรตรวมของสารสกัดเห็ดแห้งด้วยวิธี phenol-sulfuric acid ได้ 115.5 – 335.4 มิลลิกรัมกลูโคสโดยสมมูลต่อกรัมสารสกัดหยาบ

คำสำคัญ: เห็ดฟาน, สารต้านอนุมูลอิสระ, เซลล์มะเร็ง, ไลเปสตับอ่อน

Project title Extraction of antioxidant, anti-cancer and anti-pancreatic lipase agents from Hed Farn (*Lactarius volemus*)

Student Name Miss Sukanya Noppa Student ID 58330981623

Advisor Name Associate Professor Dr. Surachai Pornpakakul

Department of Chemistry, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Academic Year 2018

Abstract

The objective of this study was to investigate antioxidant, anticancer and anti-pancreatic lipase agents from *Lactarius volemus* or Farn mushroom. Fresh and dried mushroom were extracted with hexane, dichloromethane, methanol and distilled water. The dried mushroom extract gave higher percentage yield of the crude extract than did the fresh mushroom. Water extract resulted in the highest yield (2.41% w/w of fresh mushroom). On base of ^{1}H-NMR, ^{13}C-NMR analysis, hexane and dichloromethane extracts mainly contained oligoisoprene and lipid (triglyceride and fatty acid) while methanol and water extracts contained saccharide, terpenoids and phenolic compounds. Total phenolic contents determined by Folin-Ciocalteu method showed that water extracts of the dried and fresh mushroom comprised of the highest amounts of phenolic compounds with 89 and 65 mg of gallic acid equivalents per gram of the crude extract, respectively. The radical scavenging capacity (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl, DPPH, assay) of water extract from fresh and dried mushroom showed Trolox equivalent activity capacity with 8.8 and 25.0 mg Trolox/g crude extract, respectively. *In vitro* cytotoxicity against breast cancer cells (BT474), lung cancer cells (Chago-K1), liver cancer cell (Hep-G2), gastric cancer cell (KATO-III) and colon cancer cell (SW620) of hexane and dichloromethane extract of dry mushroom exhibited 50% inhibitory concentration (IC_{50}) lower than 100 µg/mL. The hexane extract of the dried mushroom showed the best cytotoxicity against breast cancer cells at IC_{50} values of 54 µg/mL and exhibited 39.7% inhibition of pancreatic lipase activity at 25 mg/mL. Water crude extract of fresh mushroom exhibited the pancreatic lipase activity with inhibition of 51.83% at 25 mg/mL. Total carbohydrates content of dried mushroom extract determined by phenol-sulfuric acid method were 115.45 – 335.35 mg of glucose equivalents per gram of the crude extract.

Keywords: *Lactarius volemus*, antioxidant, cancer cell, pancreatic lipase

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. สุรชัย พรภคกุล อาจารย์ที่ปรึกษางานวิจัยนี้เป็นอย่างสูง ที่ให้ความรู้ คำแนะนำ และความช่วยเหลือในการแก้ปัญหาต่าง ๆ ซึ่งเป็นประโยชน์ต่อการทำวิจัยนี้เป็นอย่างมาก ทำให้การทำวิจัยเสร็จสิ้นสมบูรณ์

ขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วรินทร ชวศิริ ที่ให้เกียรติเป็นประธานกรรมการ และรองศาสตราจารย์ ดร. ธรรมนูญ หนูจักร ที่ให้เกียรติเป็นกรรมการสอบโครงการนี้ ที่ได้ให้คำแนะนำที่เป็นประโยชน์ต่องานวิจัย รวมทั้งการแก้ไขปรับปรุงรูปเล่มงานวิจัยให้สมบูรณ์มากยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณคุณทรงจันทร์ ภู่ทอง เจ้าหน้าที่สถาบันเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ ที่ให้ความรู้เกี่ยวกับการเพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็ง ให้ความช่วยเหลือเกี่ยวกับการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็ง และขอขอบคุณนายพงศ์วิช นุกิจรังสรรค์ ที่ได้ให้ความรู้และความช่วยเหลือเกี่ยวกับการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและยับยั้งไลเปสตับอ่อน

สุดท้ายนี้ ขอขอบคุณพี่นิสิตระดับปริญญาโท นายวรพจน์ ฟักเพชร และพี่นิสิตระดับปริญญาเอก ได้แก่ นางสาวณัฐฐา รัตนปัญญา และนางสาวเตชิตา อินทรสุภา ที่ให้ความช่วยเหลือในด้านต่าง ๆ ตลอดระยะเวลาในการทำวิจัย รวมทั้งผู้ที่เกี่ยวข้องทุกท่านที่ทำให้งานวิจัยนี้สำเร็จไปได้ด้วยดี

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ค

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ง

กิตติกรรมประกาศ จ

สารบัญ ฉ

สารบัญตาราง ฌ

สารบัญรูป ญ

สัญลักษณ์และคำย่อ ฏ

บทที่ 1 บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา 1

1.2 เห็ดฟาน 2

1.3 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 4

1.4 หลักการและทฤษฎี

1.4.1 การสกัดด้วยตัวทำละลาย (Solvent extraction) 5

1.4.2 การแยกสารด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี 6

1.4.3 การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีด้วยเทคนิคนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโทรสโคปี 7

1.4.4 การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ

1.4.4.1 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical scavenging capacity assay (DPPH assay) 9

1.4.4.2 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง 9

1.4.4.3 การทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งไลเปสตับอ่อน (pNPP assay) 13

1.4.5 การวิเคราะห์ปริมาณองค์ประกอบ

1.4.5.1 การวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลรวม (Total phenolic compounds) ด้วยวิธี Folin-Ciocalteu reagent 14

1.4.5.2 การวิเคราะห์ปริมาณคาร์โบไฮเดรตรวม (Total carbohydrates) ด้วยวิธี phenol-sulfuric acid 14

1.5 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย 15

บทที่ 2 การทดลอง

2.1 วัตถุดิบ 16

2.2 เครื่องมือและอุปกรณ์

2.2.1 เครื่องมือและอุปกรณ์สำหรับการสกัด แยก และวิเคราะห์สาร 16

2.2.2 เครื่องมือและอุปกรณ์สำหรับทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพและวิเคราะห์ปริมาณสารองค์ประกอบ 16

2.3 สารเคมี

2.3.1 สารเคมีสำหรับสกัด แยก และวิเคราะห์สาร 17

2.3.2 สารเคมีสำหรับการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพและการวิเคราะห์ปริมาณองค์ประกอบ 17

2.4 วิธีการทดลอง

2.4.1 การสกัดเห็ดฟานด้วยตัวทำละลาย

2.4.1.1 การสกัดเห็ดฟานเพื่อเลือกประเภทเห็ดที่เหมาะสม 17

2.4.1.1.1 การสกัดเห็ดฟานสด 17

2.4.1.1.2 การสกัดเห็ดฟานอบแห้ง 19

2.4.1.2 การสกัดเห็ดฟานเพื่อแยกสารองค์ประกอบ 20

2.4.2 การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ

2.4.2.1 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical scavenging capacity (DPPH assay) 21

2.4.2.2 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง (MTT assay) 22

2.4.2.3 การทดสอบการยับยั้งไลเปสตับอ่อน (pNPP assay) 24

2.4.3 การวิเคราะห์กลุ่มสารองค์ประกอบ

2.4.3.1 การวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลรวม (Total phenolic compounds) ด้วยวิธี Folin-Ciocalteu reagent 25

2.4.3.2 การวิเคราะห์ปริมาณคาร์โบไฮเดรตรวม (Total carbohydrates) ด้วยวิธี phenol-sulfuric acid 26

2.4.4 การแยกสารองค์ประกอบเห็ดฟาน 28

บทที่ 3 ผลการทดลองและวิเคราะห์ผลการทดลอง

3.1 ลักษณะเห็ดที่มีต่อสารสกัด 29

3.2 การวิเคราะห์กลุ่มสารองค์ประกอบ

3.2.1 ผลการวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลรวม (Total phenolic compounds) ด้วยวิธี Folin-Ciocalteu reagent 32

3.2.2 ผลการวิเคราะห์ปริมาณคาร์โบไฮเดรตรวม (Total carbohydrates) ด้วยวิธี phenol-sulfuric acid 34

3.3 ผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ

3.3.1 ผลทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical scavenging capacity (DPPH assay) 35

3.3.2 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง 37

3.3.3 ผลการทดสอบการยับยั้งไลเปสตับอ่อน (pancreatic lipase) 38

3.4 การแยกสารองค์ประกอบเห็ดฟานด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี 35

บทที่ 4 สรุปผลการทดลอง

4.1 สรุปผลการทดลอง 41

4.2 การพัฒนางานวิจัยในอนาคต 42

เอกสารอ้างอิง 43

ภาคผนวก 46

ประวัติผู้วิจัย 61

สารบัญตาราง

ตารางที่ **หน้า**

1.1 ค่าคงที่ไดอิเล็กตริก จุดเดือดและความหนาแน่นของสารละลาย 6
1.2 สัญญาณเรโซแนนซ์ของตัวทำละลายดิวเทอเรียมบางชนิด 8
1.3 แสดงการเปรียบเทียบลักษณะของ necrosis กับ apoptosis 13
2.1 เซลล์ที่ใช้ทดสอบเป็น cell line จาก The American Type Culture Collection (ATCC) 22
3.1 แสดงลักษณะปรากฏ และร้อยละสารที่สกัดได้ (%yield extract) จากเห็ดฟานสด 29
3.2 แสดงลักษณะปรากฏ และร้อยละสารที่สกัดได้ (%yield extract) จากสารสกัดหยาบ เห็ดฟานสดด้วยเมทานอล (F_1) 29
3.3 แสดงลักษณะปรากฏและร้อยละสารที่สกัดได้ (%yield extract) จากเห็ดฟานแห้ง 30
3.4 แสดงลักษณะปรากฏและร้อยละสารที่สกัดได้ (%yield extract) จากเห็ดฟานแห้ง เพื่อแยกสารองค์ประกอบ 31
3.5 แสดงน้ำหนักสารแต่ละ fraction ของ D_{D2} ที่วิเคราะห์ด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี 32
3.6 แสดงปริมาณฟีนอลรวม (Total phenolic compounds) ของสารสกัดที่ความเข้มข้น 25 mg/mL 33
3.7 แสดงปริมาณคาร์โบไฮเดรตรวม (Total carbohydrates) ของสารสกัดเห็ดฟานแห้ง ที่ความเข้มข้น 200 µg/mL 34
3.8 แสดงค่า IC_{50}, %Inhibition และ Trolox equivalent antioxidant capacity ของสารสกัด จากเห็ดฟานสดและแห้งที่ความเข้มข้น 25 mg/mL 36
3.9 แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งของสารสกัดทั้ง 8 ชนิด (IC_{50}) 38
3.10 แสดงค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งไลเปสตับอ่อนของสารสกัดจากเห็ดฟานที่ความเข้มข้น 25 mg/mL 39

ภาคผนวก

A-1 แสดงค่าการดูดกลืนแสงและ % Inhibition ของสารละลายมาตรฐานโทรลอกซ์ ที่ความเข้มข้น 0.25, 0.20, 0.15, 0.10, 0.05, 0.025 และ 0 mg/mL 53
A-2 แสดงค่าการดูดกลืนแสงและ % Inhibition ของสารสกัดเห็ดฟานแห้งด้วยน้ำกลั่น (D_W) ที่ความเข้มข้น 10, 7.5, 5, 2.5 และ 1 mg/mL 55
A-3 แสดงค่าการดูดกลืนแสงและ Percentage of cell survival (PS) ของ D_W ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ 56
A-4 แสดงค่าการดูดกลืนแสงและความเข้มข้นของสารสกัดเห็ดฟานแห้ง 58

สารบัญรูป

รูปที่ **หน้า**

1.1 เห็ดฟาน 2
1.2 แสดงองค์ประกอบของเห็ดฟาน 3
1.3 แสดงโครงสร้าง volemitol 5
1.4 แสดงตำแหน่งเรโซแนนซ์ของโปรตอนชนิดต่าง ๆของสารอินทรีย์ 8
1.5 แสดงหลักการของการทดสอบความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH 9
1.6 แสดงการรีดิวซ์ MTT เป็น Formazan 10
1.7 แสดงการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของเซลล์แบบ apoptosis และ necrosis 10
1.8 แสดงปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของ *p*-nitrophenyl-palmitate (pNPP) 14
ภาคผนวก
A-1 ^{1}H-NMR spectrum ของสารสกัดเห็ดฟานแห้งด้วยเฮกเซน (D_{H2}) ใน $CDCl_3$ 47
A-2 ^{13}C-NMR spectrum ของสารสกัดเห็ดฟานแห้งด้วยเฮกเซน (D_{H2}) ใน $CDCl_3$ 48
A-3 ^{1}H-NMR spectrum ของสารสกัดเห็ดฟานแห้งด้วยด้วยไดคลอโรมีเทน (D_{D2}) ใน $CDCl_3$ 48
A-4 ^{1}H-NMR spectrum ของสารสกัดเห็ดฟานแห้งด้วยเมทานอล (D_{M2}) ใน D_2O 49
A-5 ^{1}H-NMR spectrum ของสารสกัดเห็ดฟานแห้งด้วยน้ำกลั่น (D_{W2}) ใน D_2O 49
A-6 ^{1}H-NMR spectrum ของ D_{D2} ที่แยกด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี ใน $CDCl_3$ fractionที่ 2 50
A-7 ^{1}H-NMR spectrum ของ D_{D2} ที่แยกด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี ใน $CDCl_3$ fractionที่ 4 50
A-8 ^{1}H-NMR spectrum ของ D_{D2} ที่แยกด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี ใน $CDCl_3$ fractionที่ 16 51
A-9 ^{1}H-NMR spectrum ของ D_{D2} ที่แยกด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี ใน $CDCl_3$ fractionที่ 18 51
A-10 ^{1}H-NMR spectrum ของ D_{D2} ที่แยกด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี ใน $CDCl_3$ fractionที่ 20 52
A-11 ^{1}H-NMR spectrum ของ D_{D2} ที่แยกด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี ใน $CDCl_3$ fractionที่ 21 52
A-12 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง %inhibition กับความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานโทรลอกซ์ 54
A-13 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างงเปอร์เซ็นการอยู่รอดของเซลล์มะเร็งปอด (% cell survival) เมื่อได้รับสารสกัดเห็ดฟานสดด้วยน้ำกลั่น (D_W) ที่ความเข้มข้น 500, 250, 125, 62.5 และ 31.25 µg/mL 57
A-14 แสดง standard curve ของสารละลายมาตรฐาน gallic acid 58
A-15 Standard curve ของสารละลายสารละลายมาตรฐาน D-glucose ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ 59

สัญลักษณ์และคำย่อ

mL	milliliter
µg	microgram
mg	milligram
g	gram
nm	nanometer
M	mol/dm^3
mM	milli mol/dm^3
MHz	megahertz
δ	chemical shift
J	coupling constant
s	singlet
d	doublet
t	triplet
m	multiplet
^{1}H NMR	Proton Nuclear Magnetic Resonance
^{13}C NMR	Carbon Nuclear Magnetic Resonance
TLC	Thin layer chromatography
IC_{50}	Half maximal inhibitory concentration
DMSO	Dimethyl sulfoxide
DPPH	2,2-diphenyl-1-picryl hydrazyl
MTT	3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide
Trolox	6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethyl-3,4-dihydro2H-1-benzopyran-2-carboxylic-acid
RPMI1640	อาหารเลี้ยงเซลล์
KATO-III	เซลล์มะเร็งกระเพาะอาหาร
BT474	เซลล์มะเร็งเต้านม
SW620	เซลล์มะเร็งลำไส้
Hep-G2	เซลล์มะเร็งตับ
Chago-K1	เซลล์มะเร็งปอด

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ปัจจุบันมีการเปลี่ยนแปลงในด้านต่าง ๆอย่างรวดเร็ว รวมทั้งด้านพฤติกรรมของผู้คน ซึ่งเป็นปัจจัยที่ก่อให้เกิดปัญหาด้านสิ่งแวดล้อมและสุขภาพ ความก้าวหน้าทางเทคโนโลยีทำให้ผู้คนใช้ชีวิตเร่งรีบ รับประทานอาหารที่มีคุณค่าทางโภชนาการต่ำ ขาดการออกกำลังกาย รวมทั้งเกิดความเครียด พฤติกรรมเหล่านี้เป็นปัจจัยเสี่ยงต่อการเกิดโรคหัวใจและหลอดเลือด โรคมะเร็ง และโรคเบาหวาน ซึ่งเป็นกลุ่มโรคไม่ติดต่อเรื้อรัง (Non-Communicable diseases) ที่เป็นสาเหตุการเสียชีวิตของประชากรโลกในปี พ.ศ.2559 ร้อยละ 71[1] ปัจจัยหนึ่งที่ก่อให้เกิดโรคเหล่านี้ คือ อนุมูลอิสระ (free radical) ซึ่งเกิดขึ้นตามธรรมชาติจากขบวนการเมแทบอลิซึมของร่างกาย หรืออาจได้รับมาจากสิ่งแวดล้อมที่เป็นพิษ อนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นสามารถทำลายองค์ประกอบภายในร่างกายได้ เช่น โปรตีน กรดไขมัน สารพันธุกรรมดีเอ็นเอ ทำให้มีความเสี่ยงในการเกิดโรคต่าง ๆเพิ่มขึ้น เช่น โรคหลอดเลือดหัวใจแข็งตัว โรคมะเร็ง เป็นต้น[2] สารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidants) จึงมีความสำคัญในการช่วยลดความเสี่ยงของการเกิดโรค แม้ร่างกายของมนุษย์สามารถผลิตเอนไซม์เพื่อต้านอนุมูลอิสระได้ แต่ไม่เพียงพอกับปริมาณอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นตลอดเวลา การได้รับสารต้านอนุมูลอิสระเพิ่มจากอาหารจึงช่วยป้องกันเซลล์ร่างกายได้มากขึ้น ประเทศไทยมีแนวโน้มจำนวนผู้ป่วยมะเร็งรายใหม่เพิ่มสูงขึ้นตั้งแต่ปี พ.ศ.2551 – 2560[3] นอกจากนี้ 1 ใน 10 ของคนไทยเกิดโรคอ้วนและมีแนวโน้มสูงขึ้นในปีพ.ศ.2534-2552[4] ซึ่งโรคอ้วนเกิดจากการรับประทานอาหารประเภทไขมันหรือคาร์โบไฮเดรตมากเกินไป ไขมันที่เข้าสู่ร่างกายจะถูกย่อยโดยกลุ่มของเอนไซม์ไลเปสจากตับอ่อนเป็นหลัก แล้วดูดซึมเพื่อนำไปใช้เป็นแหล่งพลังงานและสะสมในร่างกาย การยับยั้งไลเปสตับอ่อนจึงช่วยลดการย่อยอาหารประเภทไขมันและป้องกันการสะสมไขมันที่เกินความสมดุลของร่างกาย ทำให้ลดความเสี่ยงในการเกิดโรคอ้วนได้

เห็ดเป็นแหล่งของสารอาหารและสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ เช่น สารประกอบฟีนอล (phenolic compounds)[5] กรดแอสคอร์บิก (ascorbic acid) ซึ่งทำหน้าที่ต้านอนุมูลอิสระ[6] เห็ดมีไขมันต่ำ โปรตีนสูงเมื่อเทียบกับผัก เห็ดป่ามีคุณค่าทางโภชนาการมากกว่าเห็ดที่ปลูกเอง เนื่องจากมีสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพมากกว่า ได้แก่ สารในกลุ่ม antioxidants, phenolic และ flavonoids[7] ดังนั้น เห็ดป่าจึงเป็นแหล่งอาหารทางเลือกในการป้องกันร่างกายจากอนุมูลอิสระได้[8] เห็ดฟานเป็นเห็ดป่าที่รับประทานได้[9] มีชื่อวิทยาศาสตร์ คือ *Lactifluus volemus* หรือเดิมชื่อ *Lactarius volemus*[10] พบบริเวณซีกโลกเหนือ รวมทั้งสามารถพบได้ทั่วไปที่ตลาดในทวีปเอเชีย[11]

อย่างไรก็ตาม มีงานวิจัยที่ศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของเห็ดฟานไม่มากนัก ด้วยเหตุนี้จึงสนใจศึกษาองค์ประกอบทางเคมีและสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของเห็ดฟาน เช่น สารประกอบฟีนอล โดยทำการสกัดเห็ดฟานสดและแห้งด้วยตัวทำละลาย นำสารสกัดที่ได้ไปทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพในการต้านอนุมูลอิสระ การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง 5 ชนิด ได้แก่ เซลล์มะเร็งกระเพาะอาหาร, เซลล์มะเร็งเต้านม, เซลล์มะเร็งลำไส้, เซลล์มะเร็งตับและเซลล์มะเร็งปอด และทดสอบการยับยั้งไลเปสตับอ่อน วิเคราะห์กลุ่มสารที่เป็นองค์ประกอบโดยรวม ได้แก่ total phenolic compound และtotal carbohydrates รวมทั้งวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีด้วยเทคนิค ^{1}H-NMR, ^{13}C-NMR spectroscopy

1.2 เห็ดฟาน

รูปที่ 1.1 เห็ดฟาน

ชื่อวิทยาศาสตร์: *Lactifluus volemus*

ชื่ออาณาจักร: Fungi

ชื่อไฟลัม: Basidiomycota

ชื่อชั้น: Agaricomycetes

ชื่ออันดับ: Russulales

ชื่อวงศ์: Russulaceae

ชื่อสกุล: Lactifluus

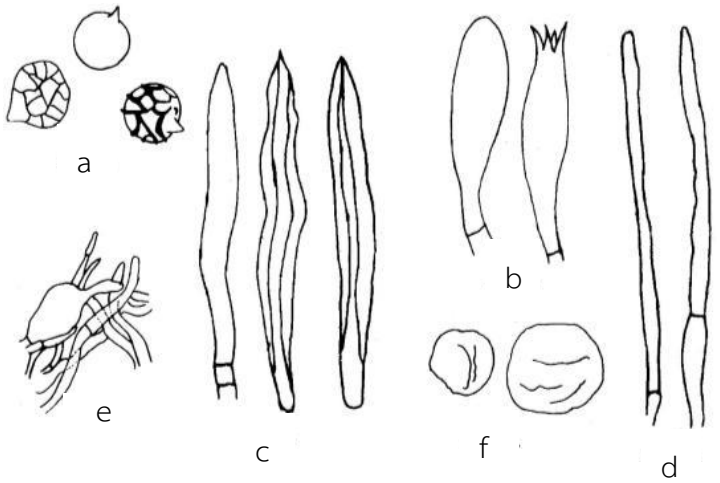
ชื่อสปีชีร์: *L. volemus*

ชื่ออื่นๆ: *Agaricus lactifluus*, *Agaricus volemus*, *Lactarius volemus*

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์[12]

หมวกเห็ดมีเส้นผ่าศูนย์กลางยาว 50-90 มิลลิเมตร นูนด้วยขอบที่มีลักษณะโค้งในระยะแรก หลังจากนั้นแบนและจุดศูนย์กลางบุ๋มลงไปเล็กน้อย มีสีส้มแดงและเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลแดงเจริญเติบโตเต็มที่ บริเวณ

ตรงกลางจะมีสีเข้มกว่าเมื่อเทียบกับขอบ หมวกเห็ดมีพื้นผิวนุ่มนวลและกลายเป็นเรียบเนียนตามอายุ เกิดรอยย่นบริเวณขอบ ครีบเห็ด (Lamellae) มีลักษณะเป็นครีบเล็กน้อย หนาแน่น สีแดงและเปลี่ยนเป็นสีเหลืองออกขาวเมื่อเจริญเติบโตเต็มที่ เมื่อโดนตัดน้ำนมสีขาวจะไหลซึมออกมา เกิดเป็นสีน้ำตาลช้ำ ก้านเห็ดยาว 30-60 มิลลิเมตร กว้าง 10-15 มิลลิเมตร อยู่บริเวณตรงกลาง ขนาดเล็กไปทางด้านฐานดอก มีสีเหมือนหมวกเห็ด ส่วนบนก้านดอกมีสีอ่อนกว่าส่วนล่าง เนื้อด้านในมีสีครีม สปอร์(Basidiopores) มีขนาด 7.5-9 × 7-8.5 ไมโครเมตร มีลักษณะเป็นทรงกลม ตาข่าย และมีติ่งสปอร์ (apiculus) ยื่นออกมา เบซิเดีย(Basidia) มีขนาด 35-60 × 10-12 ไมโครเมตร ผนังบาง แต่ละเบซิเดียประกอบด้วย 4 สปอร์ ซีสติเดีย (Cystidia) มี 2 ประเภท คือ pleuromacrocyatidia และ cheilocystidia เซลล์ผิวหมวก (Pileipellis) ประกอบด้วยเซลล์ที่ผิดปกติ ซึ่งเป็น lamprotrichoderm :ซีสติเดียที่อยู่บนผิวหมวก(Pileocystidia) มีขนาด 50-100 × 2.5-3.3 ไมโครเมตร มีลักษณะเป็นทรงกระบอกและกระจัดกระจาย ไม่เป็นระเบียบ เนื้อด้านในประกอบด้วย sphaerocytes ซึ่งมีขนาด 25-30 ไมโครเมตร ดังรูปที่ 1.2



รูปที่ 1.2 แสดงองค์ประกอบของเห็ดฟาน

(a. Spores, b. Basidia, c. Pleuromacrocystidia and Cheilocystidia, d. Pileocystidia, e. Pileipellis, f. Sphaerocytes)

ที่อยู่อาศัยและการกระจายพันธุ์[12]

มีลักษณะเป็นไมคอร์ไรซา (mycoorhiza) อยู่เดี่ยว ๆหรือเป็นกลุ่มเล็ก ๆ กระจัดกระจายใต้ *Abies pindrow* และ *Pinus wallichiana*

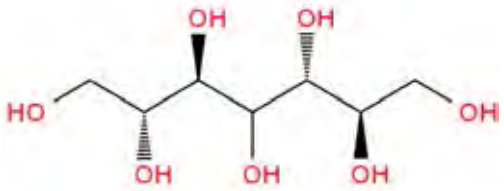
1.3 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ในปี 2011 Keleş และคณะ[13] ได้ศึกษาความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของเห็ดป่าทานได้จากทะเลดำด้านทิศตะวันออกที่ติดกับประเทศตุรกี ด้วยการทดสอบ ferric antioxidant reducing power (FRAP), scavenging activity on 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radicals และ total phenolic content พบว่า เห็ดฟานแห้งที่สกัดด้วยเมทานอล มีค่า Ascorbic acid น้อยกว่า 20 mg/kg, ค่า Total phenolics เท่ากับ 2,331.11 mg/kg, ค่า FRAP เท่ากับ 3,171.43 µmol/g, ค่า DPPH เท่ากับ 62.28% และค่า EC_{50} เท่ากับ 21.37 mg/mL โดยความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของพืชมีความสัมพันธ์กับปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดและกรดแอสคอร์บิค เนื่องจากปริมาณกรดแอสคอร์บิคมีความเข้มข้นน้อยมาก แสดงให้เห็นว่าสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดอาจแสดงคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระ นอกจากนี้การรับประทานสารประกอบโพลีฟีนอลมีผลยับยั้งการก่อกลายพันธุ์และการก่อมะเร็งในมนุษย์ได้ รวมทั้งเมื่อรับประทานอาหารที่มีสารประกอบฟีนอลิกในปริมาณสูงก็สามารถช่วยลดความเสี่ยงของโรคหัวใจได้เช่นกัน

ในปี 2014 Özyürek และคณะ[14] ศึกษาคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระ สารต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากไมโครเวฟของเห็ดป่าสามชนิดที่กินได้จากประเทศตุรกี พบว่า เห็ดฟานที่สกัดด้วยเมทานอลมีค่า Total phenolic content (TPC) เท่ากับ 230.2±2.6 µmol สมมูลโทรลอกซ์/g สารสกัด., total antioxidant capacity (TAC) เท่ากับ 74.1±1.3 µmol สมมูลโทรลอกซ์/g สารสกัด., free radical scavenging (FRS) activity (EC_{50}) เท่ากับ 4.6±0.2 mg/mL, Hydroxyl radical scavenging (HRS) activity (EC_{50}) เท่ากับ 7.1±0.4 mg/mL, hydrogen peroxide scavenging (HPS) activity (EC_{50}) เท่ากับ 7.5±0.4 mg/mL และ superoxide anion radical scavenging (SARS) activity (EC_{50}) เท่ากับ 7.2±0.6 mg/mL จากวิธีการทดสอบต่าง ๆข้างต้นแสดงให้เห็นว่าสารสกัดเมทานอลของเห็ดฟานมีคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระอย่างมีนัยสำคัญ เห็ดฟานเป็นแหล่งของสารต้านอนุมูลอิสระธรรมชาติและสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพสำหรับด้านโภชนาการ จากการวิเคราะห์พอลิฟีนอลของเห็ดฟานด้วยเทคนิค Ultraperformance liquid chromatography (UPLC) - electrospray ionization source (ESI)-MS/MS พบว่ามี Protocatechuic acid เท่ากับ 10.82 ± 0.51 µg/g เห็ดแห้ง, Rutin เท่ากับ 0.21 ± 0.014 µg/g เห็ดแห้ง, Hesperidin เท่ากับ 0.38 ± 0.023 µg/g เห็ดแห้ง, Rosmarinic acid เท่ากับ 0.82 ± 0.049 µg/g เห็ดแห้ง, Naringenin เท่ากับ 0.21 ± 0.011 µg/g เห็ดแห้ง, Apigenin เท่ากับ 0.14 ± 0.008 µg/g เห็ดแห้ง และไม่สามารถตรวจพบ Gallic acid, Vanillic acid, Syringic acid, Quercetin และ Kaempferol

ในปี 2014 Van de Putte[15] ได้ศึกษาความหลากหลายของ *Lactifluus volemus* ซึ่งเป็นเห็ดที่นิยมรับประทานในสหรัฐอเมริกาตะวันออกและเม็กซิโก รวมทั้งหลาย ๆประเทศในอาเซียนและยุโรป *Lactifluus*

volemus ประกอบด้วยสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพหลายชนิด เช่น กรดฟีนอลิก, วิตามินอี (tocopherols), วิตามินซี(ascorbic acid), แคโรทีนอยด์ และน้ำตาล นอกจากนี้ยังประกอบด้วยสเตอรอลชนิดที่มีออกซิเจนเป็นองค์ประกอบจำนวนมาก คือ volemitol ซึ่งเป็นน้ำตาลแอลกอฮอล์ที่มีคาร์บอนในโมเลกุล 7 ตัว ดังรูปที่ 1.3 *Lactifluus volemus* ยังประกอบด้วยพอลิไอโซพรีนซึ่งมีมวลโมเลกุลสูง มีหมู่ dimethylallyl, trans-isoprene จำนวนสองหน่วย, สายยาวของ cis-1,4 isoprene และหมู่ด้านปลายของ hydroxyl หรือ fatty acid ester



รูปที่1.3 แสดงโครงสร้าง volemitol

ที่มา: http://en.chembase.cn/substance-176258.html

ในปี 2014 Wang และคณะ[16] ได้ศึกษาองค์ประกอบทางเคมีและคุณค่าทางโภชนาการของเห็ดกินได้จากสาธารณรัฐประชาชนจีน พบว่า เห็ดฟานมีองค์ประกอบ ดังนี้ คาร์โบไฮเดรต 15.0% ของน้ำหนักเห็ดแห้ง, ใยอาหาร 40.0% ของน้ำหนักเห็ดแห้ง โปรตีนรวม 17.6% ของน้ำหนักเห็ดแห้ง, ไขมันรวม 6.7% ของน้ำหนักเห็ดแห้ง, และเถ้า 13.3% ของน้ำหนักเห็ดแห้ง รวมทั้งประกอบไปด้วยกรดอะมิโนจำเป็น คือ Lys เท่ากับ 500 mg/kg เห็ดแห้ง, Thr เท่ากับ 820 mg/kg เห็ดแห้ง, Val 990 mg/kg เห็ดแห้ง, Ile 1490 mg/kg เห็ดแห้ง, Leu 2060 mg/kg เห็ดแห้ง, Met 160 mg/kg เห็ดแห้ง, Try 150 mg/kg เห็ดแห้ง, Phe 750 mg/kg เห็ดแห้ง และ EAA 6920 mg/kg เห็ดแห้ง กรดอะมิโนไม่จำเป็นของเห็ดฟาน คือ Arg 880 mg/kg เห็ดแห้ง, Ala 1000 mg/kg เห็ดแห้ง,Tyr 350 mg/kg เห็ดแห้ง, Gly 820 mg/kg เห็ดแห้ง, Ser 720 mg/kg เห็ดแห้ง, Pro 240 mg/kg เห็ดแห้งHis 210 mg/kg เห็ดแห้ง, Asp 1410 mg/kg เห็ดแห้ง, Glu 3550 mg/kg เห็ดแห้ง, แสดงให้เห็นว่าเห็ดฟานมีคาร์โบไฮเดรต ใยอาหาร และโปรตีนรวมสูง ซึ่งให้พลังงาน ช่วยการทำงานของระบบทางเดินอาหาร ลดระดับน้ำตาลในเลือดและระดับคอเลสเตอรอล และให้คุณค่าทางโภชนาการสูง ตามลำดับ เห็ดฟานจึงเป็นที่นิยมนำมารับประทานในสาธารณรัฐประชาชนจีน

1.4 หลักการและทฤษฎี

1.4.1 การสกัดด้วยตัวทำละลาย (Solvent extraction)[17]

การสกัดด้วยตัวทำละลายใช้หลักการของการละลาย ซึ่งจำเป็นต้องทราบถึงความมีขั้ว(Polarity) ของทั้งตัวทำละลายและตัวถูกละลาย โดยตัวถูกละลายจะสามารถละลายในตัวทำละลายได้ก็ต่อเมื่อ ความมีขั้วของ

ตัวถูกละลายกับตัวทำละลายมีค่าใกล้เคียงกัน (Like dissolve Like) คือ ตัวถูกละลายที่มีขั้วจะละลายในตัวทำละลายที่มีขั้วเพราะแรงดึงดูดระหว่างโมเลกุลมีขั้วเป็นแรงไดโพล-ไดโพล (Dipole-Dipole) ในทางตรงข้าม ตัวถูกละลายที่ไม่มีขั้วจะละลายในตัวทำละลายที่ไม่มีขั้วเพราะแรงดึงดูดระหว่างโมเลกุลไม่มีขั้วเป็นแรงแวนเดอวาลส์ (van der Waals Force) เหมือนกัน ทั้งนี้ตัวทำละลายที่มีขั้วไม่เท่ากันจะมีความสามารถในการละลายตัวถูกละลายชนิดเดียวกันได้ต่างกัน ซึ่งความมีขั้วจะมีความสัมพันธ์กับค่าไดอิเล็กตริก (Dielectric constant) ของตัวทำละลาย กล่าวคือ ค่าคงที่ไดอิเล็กตริกที่อยู่ในช่วง 1-20, 20-50 และมากกว่า 50 บ่งชี้ว่าตัวทำละลายนั้นไม่มีขั้ว กึ่งมีขั้ว และมีขั้ว ตามลำดับ ฉะนั้นค่าไดอิเล็กตริกสามารถบ่งชี้ถึงความมีขั้วของตัวทำละลายได้ ดังตารางที่ 1.1

การเลือกใช้ตัวทำละลายให้เหมาะสม นอกจากจะสามารถละลายสารตัวอย่างที่ต้องการสกัดได้ดีแล้ว ยังต้องไม่ระเหยง่ายหรือยากจนเกินไป ไม่ทำปฏิกิริยากับสารที่ต้องการสกัด และไม่เป็นพิษ นอกจากการเลือกใช้ตัวทำละลายให้เหมาะสมแล้ว ยังมีปัจจัยอื่นที่เกี่ยวข้องกับการสกัด คือ ขนาดอนุภาคของตัวอย่างที่จะนำมาสกัด สัดส่วนตัวอย่างที่นำมาสกัดต่อปริมาณสารละลายที่ใช้ อุณหภูมิ และเวลาที่ใช้ในการสกัด

ตารางที่ 1.1 ค่าคงที่ไดอิเล็กตริก จุดเดือดและความหนาแน่นของสารละลาย

ตัวทำละลาย	Dielectric constant ที่อุณหภูมิต่าง ๆ	จุดเดือด (°C)	ความหนาแน่น (g/mL)
ตัวทำละลายไม่มีขั้ว (Non-Polar Solvent)			
Chloroform	4.8 (68° F)	61.2	1.489
Dichloromethane	9.1 (68° F)	39.6	1.327
Ethyl Acetate	6.0 (77° F)	77.1	0.902
Hexane	2.0 (-130° F)	68	0.655
ตัวทำละลายกึ่งมีขั้ว (Semi Polar Solvent)			
Acetone	20.7(77° F)	56.5	0.785
Dimethyl Sulfoxide	47.24 (68° F)	189	1.095
Methanol	33 (68° F)	64.7	0.791
ตัวทำละลายมีขั้ว (Polar Solvent)			
Water	80.10 (68° F)	100	0.998

1.4.2 การแยกสารด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี

โครมาโทกราฟีเป็นเทคนิคการแยกสารประกอบต่างชนิดกันออกจากกัน โดยอาศัยการกระจายตัวของสารระหว่างสองวัฏภาค (Phase) โดยวัฏภาคหนึ่งอยู่กับที่ เรียกว่า วัฏภาคคงที่ (stationary phase) ส่วน

อีกวัฏภาคหนึ่งเคลื่อนที่ เรียกว่า วัฏภาคเคลื่อนที่ (mobile phase) ถ้าวัฏภาคคงที่ถูกบรรจุอยู่ในคอลัมน์ เรียกว่า คอลัมน์โครมาโทกราฟี แต่ถ้าคงที่ถูกนำไปเคลือบบนแผ่นแก้วหรือแผ่นพลาสติก เรียกว่า thin-layer chromatography (TLC) วัฏภาคคงที่อาจเป็นของแข็งหรือของเหลวที่เกาะเป็นฟิล์มบาง ๆรอบอนุภาคยึด (solid support) ส่วนวัฏภาคเคลื่อนที่อาจเป็นของเหลวหรือก๊าซ

คอลัมน์โครมาโทกราฟี (Column Chromatography) คงที่ซึ่งเป็นตัวดูดซับจะถูกบรรจุในคอลัมน์ ส่วนวัฏภาคเคลื่อนที่เป็นตัวทำละลายที่จะพาสารเคลื่อนที่ผ่านตัวดูดซับ ถ้าสารที่เคลื่อนที่ผ่านตัวดูดซับมีหลายชนิดและมีสภาพขั้วแตกต่างกันจะถูกดูดซับในระดับของคอลัมน์ที่ต่างกัน สารที่ถูกดูดซับไว้แน่นและละลายในตัวทำละลายได้น้อยจะเคลื่อนที่ออกมาช้า ส่วนสารที่ถูกดูดซับไม่แน่น จะไหลผ่านวัฏภาคคงที่ในคอลัมน์ด้วยแรงดันหรือแรงโน้มถ่วงและจะเคลื่อนที่ออกมาก่อน ทั้งนี้ สามารถแบ่งเทคนิคทาง Column Chromatography ได้เป็นสองประเภท คือ

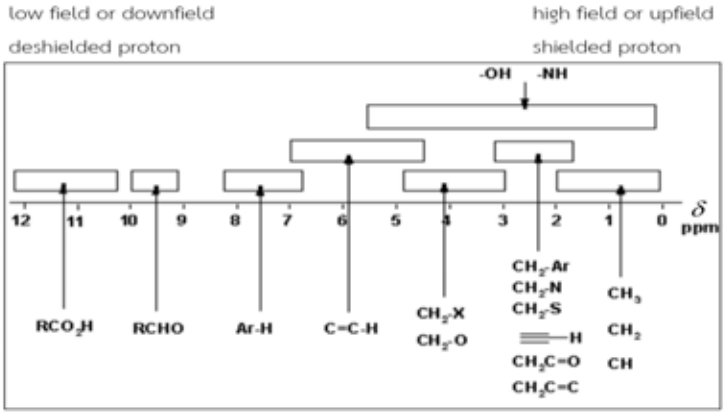
1) Gas Chromatography (GC) ใช้แก๊สเป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ เป็นเทคนิคที่สารที่ต้องการแยกจะถูกเปลี่ยนให้อยู่ในสถานะแก๊ส
2) Liquid Chromatography (LC) ใช้ของเหลวเป็นวัฏภาคเคลื่อนที่

1.4.3 การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีด้วยเทคนิคนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโทรสโกปี[19]

นิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโทรสโกปี (Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy) หรือ NMR เป็นเทคนิคที่เกี่ยวข่องกับการวัดระดับพลังงานที่แตกตงกันของนิวเคลียสที่อยูภายใตอิทธิพลของสนามแมเหล็ก ศึกษาเกี่ยวกับนิวเคลียสของธาตุที่มีสมบัติของแม่เหล็กรวมทั้งสภาวะข้างเคียงรอบนิวเคลียสของธาตุนั้น ๆ ใช้ในการศึกษาสูตรโครงสร้างของสาร

ลักษณะสเปกตรัม NMR ขึ้นอยู่กับโปรตอนภายในโมเลกุลที่ถูกล้อมรอบด้วยอิเล็กตรอนที่มีสภาพแวดล้อมที่แตกต่างกัน จะได้รับความเข้มสนามแม่เหล็กน้อยกว่าคามเข้มสนามแม่เหล็กภายนอกที่ให้เข้าไป อีกทั้งแต่ละโปรตอนยังได้รับความเข้มสนามแม่เหล็กไม่เท่ากันอีกด้วย คือ ถ้าอิเล็กตรอนมีความหนาแน่นมากจะกำบังโปรตอนมากยิ่งขึ้น ทำให้ต้องเพิ่มความเข้มของสนามแม่เหล็กภายนอกเข้าไปอีกเพื่อทำให้โปรตอนเกิดเรโซแนนซ์ที่ความถี่คลื่นวิทยุเท่าเดิม คือ โปรตอนที่ถูกกำบังยิ่งมาก ต้องเพิ่มสนามแม่เหล็กภายนนอกเพิ่มขึ้น โดยโปรตอนถูกกำบัง (shielded proton) จะเกิดสัญญาณเรโซแนนซ์ที่ความถี่หรือค่า Chemical shift น้อยลง แสดงว่าโปรตอนถูกกำบังมากขึ้น และความเข้มสนามแม่เหล็กเพิ่มมากขึ้น แสดงตำแหน่งเรโซแนนซ์ของโปรตอนชนิดต่าง ๆ ของสารอินทรีย์ ดังรูปที่ 1.4

เทคนิคนี้เป็นเทคนิคที่ไม่ทำลายสารตัวอย่าง ดังนั้นจึงสามารถนำสารตัวอย่างที่ทำการวิเคราะห์แล้วกลับมาใช้ใหม่ได้ สารตัวอย่างอาจอยู่ในรูปของแข็งหรือสารละลายก็ได้ โดยตัวทำละลายเป็น deuterated solvent เช่น $CDCl_3$, D_2O, DMSO-d_6, CD_3OD ขึ้นอยู่กับความมีขั้วของสารตัวอย่างแต่ละชนิด ดังตารางที่ 1.2



รูปที่ 1.4 แสดงตำแหน่งเรโซแนนซ์ของโปรตอนชนิดต่าง ๆของสารอินทรีย์

ที่มา: (The McGraw-Hill, 2000)

ตารางที่ 1.2 สัญญาณเรโซแนนซ์ของตัวทำละลายดิวเทอเรียมบางชนิด

ตัวทำละลาย	δ of ^{1}H (ppm จาก TMS) (multiplicity)	J_{HD} (Hz)	δ of ^{13}C (ppm จาก TMS) (multiplicity)	J_{CD} (Hz)	δ of HOD* (ppm จาก TMS)
Acetone-d_6	2.05 (5)	2.2	206.68 (1) 29.92(7)	0.9 19.4	2.8
Chloroform-d	7.24 (1)		77.23(3)	32.0	
Cyclohexane-d_{12}	1.38 (1)		26.43 (5)	19	0.8
Dimethyl sulfoxide-d_6	2.50 (5)	1.9	39.51 (7)	21.0	3.3
Ethanol-d_6	3.56 (1)		56.96 (5)	22	
	1.11(m)		17.31(7)	19	
Methanol-d_4	4.78 (1)				
	3.31(5)	1.7	49.15(7)	21.4	

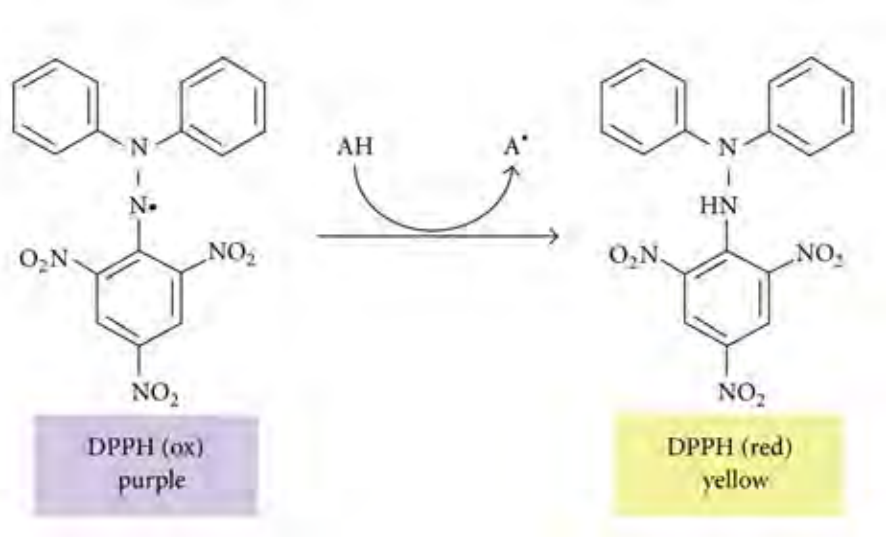
หมายเหตุ *สัญญาณเรโซแนนซ์พีกน้ำในตัวทำละลาย

ที่มา: (Cambridge Isotope Laboratories, 2017)

1.4.4 การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ

1.4.4.1 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical scavenging capacity assay (DPPH assay)[20]

เป็นวิธีที่นิยมใช้ในการวิเคราะห์สารต้านอนุมูลอิสระ มีการทดสอบความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) ซึ่งเป็นหนึ่งในอนุมูลอิสระอินทรีย์ที่มีความเสถียรและมีการดูดกลืนรังสี UV ได้สูงสุดที่ความยาวคลื่น 515 นาโนเมตร เมื่อสารต้านอนุมูลอิสระรับอิเล็กตรอน หรือไฮโดรเจนจากอนุมูลอิสระ DPPH สีของสารละลายจะเปลี่ยนจากสีม่วงเป็นสีเหลือง ดังรูปที่ 1.5 แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงเพื่อคำนวณหาปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระ โดยใช้ Trolox เป็นสารมาตรฐาน รายงานเป็นค่า IC_{50} คือ ความเข้มข้นของสารที่สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระได้ 50%



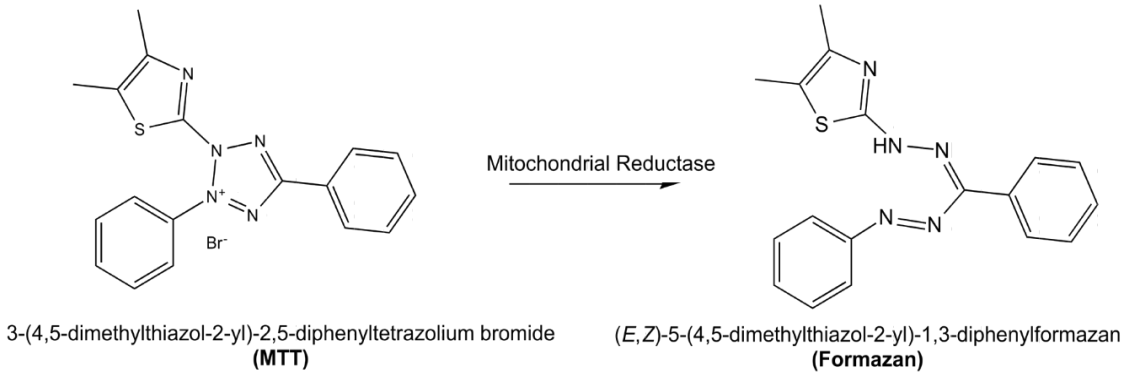
รูปที่ 1.5 แสดงหลักการของการทดสอบความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH

1.4.4.2 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง

MTT assay[21]

MTT assay เป็นวิธีการที่ใช้ศึกษาปริมาณวิเคราะห์ความอยู่รอดของเซลล์ หลักการ คือ เซลล์ที่มีชีวิตเท่านั้นที่จะสามารถเปลี่ยน tetrazolium salt MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5 diphenyltetrazolium bromide) ที่มีสีเหลือง เป็น formazan salt ด้วย succinate-tetrazolium reductase system ซึ่งพบในปฏิกิริยาลูกโซ่การหายใจในไมโทคอนเดรียของเซลล์ formazan salt นี้ไม่ละลายน้ำ ในการทดลองจึงใช้สารละลาย DMSO ทำให้เซลล์แตกแล้ว formazan ละลายออกมา เกิดเป็นสารละลายสีม่วง จากนั้นวัดค่าการ

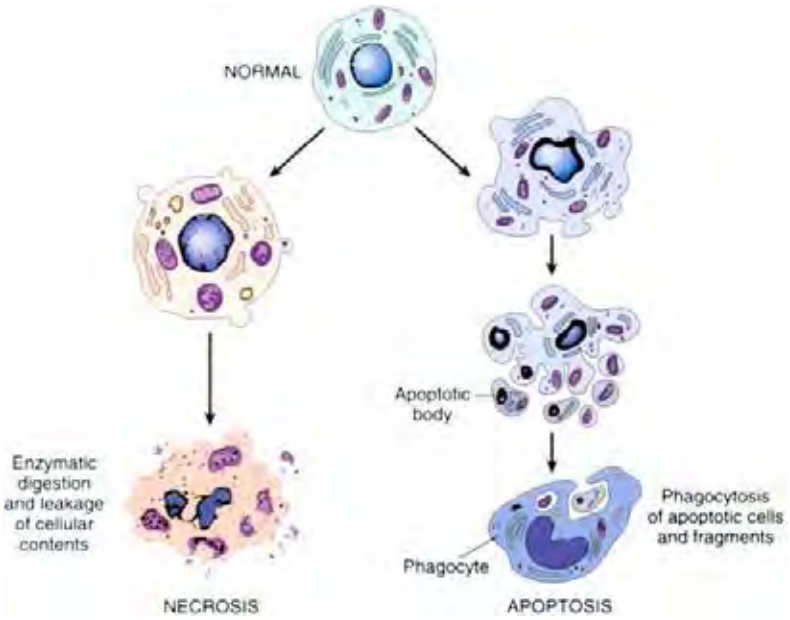
ดูดกลืนแสง โดยใช้ความยาวคลื่นที่สัมพันธ์กับสี formazan วิธีนี้มักทำในที่มืดเนื่องจากสารละลาย MTT มีความไวต่อแสง



รูปที่ 1.6 แสดงการรีดิวซ์ MTT เป็น Formazan[22]

การตายของเซลล์(Cell death)[23]

เมื่อการบาดเจ็บของเซลล์รุนแรงมากขึ้น ทำให้เซลล์เกิดการเปลี่ยนแปลงทั้งด้านชีวโมเลกุล โครงสร้างและหน้าที่ จนไม่สามารถซ่อมแซมได้ และเซลล์ตายในที่สุด การตายของเซลล์แบ่งตามลักษณะการเปลี่ยนแปลงทางโครงสร้าง กลไกการเกิดและบทบาทที่พบการเปลี่ยนแปลง เป็น Necrosis และ Apoptosis



รูปที่ 1.7 แสดงการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของเซลล์แบบ apoptosis และ necrosis

ที่มา: http://drrajivdesaimd.com/apoptosis-vs-necrosis-4/

1.การตายแบบ apoptosis

เป็นการตายของเซลล์เดี่ยว ๆ เมื่อหมดอายุขัยตามที่กำหนดไว้ ซึ่งเรียกว่า programmed cell death หรือเป็น suicide program ก็ได้ เมื่อเซลล์ถูกกำหนด หรือถูกสิ่งเร้าบางอย่างกระตุ้นทำให้เอนไซม์ต่าง ๆ ภายในเซลล์ถูกกระตุ้นตามลำดับ และย่อยสลายทั้ง Nuclear DNA และโปรตีนต่าง ๆ ทั้งที่อยู่ในนิวเคลียสและในเซลล์ สุดท้ายเซลล์จะแตกออกเป็นชิ้นส่วนเล็ก ๆ ที่เรียกว่า Apoptotic bodies ซึ่งมี cell membrane ล้อมรอบและ ภายใน Apoptotic bodies จะประกอบด้วยเศษนิวเคลียส และ organelles ต่าง ๆ หลังจากนั้นเซลล์ข้างเคียงและเซลล์ Macrophages จะเก็บ Apoptotic bodies เข้าไปทำลายโดยไม่มีปฏิกิริยาการอักเสบ ดังนั้น จึงเป็นที่ยอมรับถึงความแตกต่างทั้งสาเหตุ กลไกและพยาธิสภาพของ apoptosis และ necrosis ซึ่งสาเหตุการตายของเซลล์ อาจจะเป็นตามอายุขัยที่กำหนดไว้แล้ว โดยเฉพาะในช่วงเจริญเติบโตของทารกในครรภ์ ปัจจุบันพบว่าอาจจะเกี่ยวข้องกับ pathologic stimuli บางอย่างมากระทำ จะเริ่มจากที่ DNA ภายใน nucleus เสียสภาพไม่สามารถซ่อมแซมได้ เซลล์จะทำลายตนเองโดยเริ่มต้นจากการเปลี่ยนแปลงภายใน Nucleus ก่อน จากนั้นเซลล์จะแตกออกเป็นส่วนๆ โดยที่ไม่มีความผิดปกติของ membrane หลังจากนั้นส่วนของเซลล์ที่แตกเป็นส่วน ๆ นั้นจะถูกเก็บกินโดยเซลล์ข้างเคียงหรือ Macrophages เนื่องจากการตายของเซลล์แบบ apoptosis จะเริ่มต้นด้วยการเปลี่ยนแปลงที่นิวเคลียสก่อน โดย Chromatin จะติดสีเข้มและจับตัวเป็นกลุ่มก้อน (Clumps) ไปติดอยู่ที่ nuclear membrane ต่อมาทั้งตัวเซลล์และ nucleus จะยื่นโป่งออกโดยรอบ หลังจากนั้นเซลล์ก็แตกออกเป็นส่วนชิ้นส่วนเล็ก ๆ เรียก Apoptotic bodies ซึ่งจะถูกกิน หรือ Phagocytosis โดยเซลล์ข้างเคียงและเม็ดเลือดขาวพวก macrophages จนหมด โดยไม่เกิดปฏิกิริยาการอักเสบของร่างกาย ลักษณะที่เห็นจากกล้อง จุลทรรศน์ธรรมดา พบว่าเซลล์จะเหี่ยว (Cell Shrinkage) มี cytoplasm ที่แดงเข้ม นิวเคลียสติดสีโครมาตินสีน้ำเงินที่เข้ม ต่อมาจะเห็นลักษณะยื่นออกของทั้งผิวของนิวเคลียสและเซลล์ออกไปเป็นชิ้นส่วนเล็ก ๆ (Formation of Cytoplasmic Bleb and apoptotic bodies) โดยแต่ละส่วนจะมี cell membrane ล้อมรอบ และภายในก็มีทั้งเศษนิวเคลียสและ organelles เรียกว่า Apoptotic bodies และสุดท้ายเซลล์ macrophages หรือเซลล์ข้างเคียง จะกินส่วนดังกล่าวเข้าไปย่อยภายในเซลล์ เรียกว่า Phagocytosis of Apoptotic bodies

2. การตายแบบเฉพาะส่วน

การตายแบบเฉพาะส่วน หรือ necrosis การตายแบบนี้จะมีการหลั่งเอนไซม์พิเศษ คือ เริ่มจากการเปลี่ยนแปลงที่ membrane ของทั้งเซลล์และ organelles ภายในเซลล์ ทำให้ lysosomal enzyme ไหลออกจาก lysosome เข้าสู่ cytoplasm และย่อยสลายโปรตีนและส่วนต่าง ๆภายในเซลล์หรืออาจออกมายังภายนอกเซลล์ จึงทำให้เกิดการทำลายเซลล์ข้างเคียงด้วย เนื่องจากภายหลังที่เซลล์ตาย เซลล์ไม่สามารถรักษาสภาพของ cell membrane ดังนั้น ส่วนประกอบภายในเซลล์จะไหลสู่ภายนอกและกระตุ้นขบวนการอักเสบ

ตามมา ส่วนหนึ่งของเอนไซม์ที่ย่อยเซลล์นั้นจะมาจาก lysosome ของเซลล์ที่ตายเอง เรียกว่า Autolysis หรือจากเอนไซม์ที่หลั่งจากเซลล์อักเสบ เรียกว่า Heterolysis จากการศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์ธรรมดา พบว่า Cytoplasm ของเซลล์ตายแบบ necrosis จะแดงมากขึ้น เนื่องจากความผิดปกติของ RNA ใน Cytoplasm เอง และการที่สีย้อมชิ้นเนื้อชนิด Eosin ซึ่งเป็นสีแดงจับกับโปรตีนที่เสียสภาพใน Cytoplasm มากขึ้น นอกจากนั้นพบว่า Cytoplasm จะมีลักษณะติดสีแดงที่เนียนๆไม่เหมือนปกติ เนื่องจาก Glycogen ที่สะสมใน Cytoplasm หายไป และในระยะต่อมาอาจจะมีการสะสมของ Calcium salt ตามมาได้ สำหรับ Nucleus ก็จะพบการเปลี่ยนแปลง ได้ 3 แบบ คือ

Karyolysis เป็นการเปลี่ยนแปลงของนิวเคลียส โดยจะพบว่าสีน้ำเงินของนิวเคลียสจางลง และไม่คมชัด เนื่องจากปฏิกิริยาของเอนไซม์ endonuclease ต่อ Chromatin

Pyknosis คือ การเปลี่ยนแปลงที่นิวเคลียส โดยนิวเคลียสจะเหี่ยวและมีสีน้ำเงินเข้ม เนื่องจาก DNA รวมตัวเป็นก้อนสีน้ำเงินเข้ม (อาจจะพบในการตายของเซลล์แบบ apoptosis ได้เช่นกัน)

Karyorrhexis นิวเคลียสที่เหี่ยวและจับเป็นกลุ่มก้อนสีน้ำเงิน (Pyknosis) จะแตกออกเป็นส่วนเล็ก ๆ อย่างไรก็ตาม สุดท้ายอาจจะพบเซลล์ตายโดยที่ไม่เห็นส่วนของนิวเคลียส เนื่องจากนิวเคลียสของเซลล์ที่ตายจะแตกเป็นชิ้นส่วนเล็ก ๆ และสลายไปในที่สุด

ลักษณะการตายเฉพาะส่วนของเนื้อเยื่อแบ่งออกเป็น 5 รูปแบบเด่น ๆ ได้ดังนี้

1. Coagulative necrosis แม้ว่าเนื้อเยื่อตายแล้ว แต่ยังมีการคงสภาพหรือโครงร่างของเนื้อเยื่อที่ตายไว้ในระยะหนึ่ง เข้าใจว่าเกิดจากการเสียสภาพของโปรตีนรวมทั้งเอนไซม์ต่าง ๆภายในเซลล์เนื้อเยื่อไตส่วนที่ตายจะคงสภาพอยู่ เห็นขอบเขตแยกจากส่วนที่ไม่ตายได้ชัดและมีสีซีดกว่าเนื้อเยื่อข้างเคียง ผลการศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์ธรรมดา พบว่า มีการคงสภาพของโครงสร้างของเนื้อเยื่อไตทั้งส่วนที่เป็น Glomerulus และ tubules แต่ภายในเซลล์ที่ตายไม่เห็นนิวเคลียสแล้ว และ Cytoplasm มีสีชมพูแดงเข้มสม่ำเสมอ

2. Liquefactive necrosis ภายหลังที่เซลล์และเนื้อเยื่อตาย มีการย่อยสลายเซลล์และเนื้อเยื่อที่ตายโดยเอนไซม์ภายใน Lysosome ของเซลล์เอง เช่น กรณีเนื้อสมองตายจากการขาดเลือด และ/หรือมีการย่อยสลายโดยเอนไซม์จากเซลล์อักเสบในปฏิกิริยาการอักเสบ เช่น การอักเสบเป็นหนอง (Pus Formation หรือ Suppurative Inflammation) ดังนั้น ส่วนของเนื้อตายจะเปลี่ยนสภาพเป็นของเหลว

3. Fat necrosis เป็นผลจากการทำงานของเอนไซม์ไลเปสที่ย่อยเนื้อเยื่อไขมัน ลักษณะเนื้อตายเป็นสีเหลืองซีด อาจเห็นจุดขาวคล้ายชอล์ค ในกล้องจุลทรรศน์จะเห็นบริเวณเซลล์ไขมันที่ถูกเอนไซม์ย่อยเป็นปื้นสีชมพูอมม่วง ในขณะที่เซลล์ที่ตายแบบไม่มีเอนไซม์ย่อยจะเห็นเซลล์ไขมันเสื่อมปะปนกับฮิสติโอไซต์ (histiocyte) ในบางครั้งอาจพบปฏิกิริยาการเปลี่ยนเป็นสบู่ (saponification) ในเนื้อเยื่อได้ พบในตับอ่อนอักเสบเฉียบพลันและการตายของเนื้อเยื่อเต้านม

4. Caseous necrosis เป็นลักษณะการตายแบบ coagulation necrosis ที่จำเพาะต่อเชื้อไมโคแบคทีเรีย (mycobacteria) เช่น วัณโรค , เชื้อรา, และวัตถุแปลกปลอมบางชนิด บริเวณที่ตายจะออกสีเหลืองเหมือนเนย ไม่เป็นช่องว่าง มีขอบเขตเซลล์ไม่ชัด Cytoplasm สีชมพูปริมาณมาก เรียกว่า Epithelioid histiocytes และ Multinucleated giant cells ซึ่งเกิดจากเซลล์ Epithelioid histiocytes หลายๆเซลล์รวมตัวกันเป็นเซลล์ตัวโตที่มีหลายนิวเคลียส การรวมกลุ่มของเซลล์ดังกล่าวเรียกว่า Granuloma และพบการตายรูปแบบคล้ายกับCoagulative necrosis ตรงกลาง Granuloma จึงเรียกว่า Caseous necrosis อาจกล่าวได้ว่าเป็นการตายรูปแบบผสมระหว่าง coagulative และ liquefactive necrosis

5. Fibrinoid necrosis เป็นรูปแบบพิเศษของการตายของเนื้อเยื่อแบบ necrosis ที่หลอดเลือดส่วนใหญ่เกิดจากปฏิกิริยาภูมิคุ้มกันของร่างกายเอง และเมื่อมีการสะสมของ immune complex ที่ผนังของหลอดเลือด ดังนั้น ผนังของหลอดเลือดจะถูกแทนที่ด้วยปื้นสีชมพู ซึ่งเป็น immune complex และอาจพบ Fibrinoid necrosis ของ Arterioles ในผู้ป่วยความดันโลหิตสูงที่รุนแรงได้

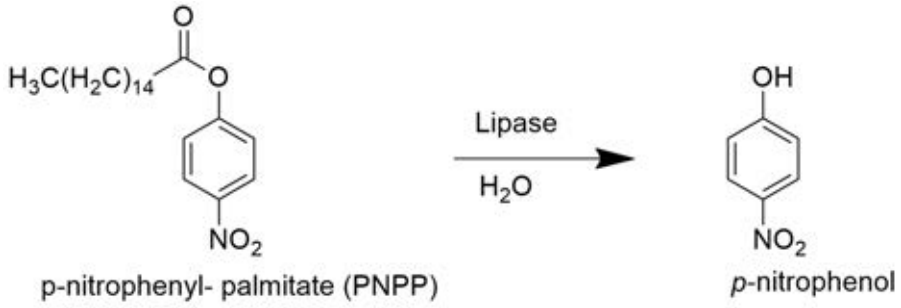
ตารางที่ 1.3 แสดงการเปรียบเทียบลักษณะของ necrosis กับ apoptosis

	necrosis	apoptosis
สิ่งที่กระตุ้น	Pathologic stimuli	Physiologic หรือPathologic stimuli
เกิดขึ้นกับ	Many cells	Single cells
พยาธิสภาพ	(1) Membrane disruption (2) Cytoplasmic eosinophilia (3) Nuclear change; Karyorrhexis => Karyolysis	(1) Chromatin condensation (2) Fragmentation of cells (3) Apoptotic bodies
การเปลี่ยนแปลงภายหลังเซลล์ตาย	เกิดปฏิกิริยาการอักเสบ (Inflammation)	มี Phagocytosis และ ไม่มีปฏิกิริยาการอักเสบ

1.4.4.3 การทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งไลเปสตับอ่อน (pNPP assay)[24,25]

ไลเปสตับอ่อน (pancreatic lipase) เป็นเอนไซม์ที่มีบทบาทสำคัญในการดูดซึมไขมันในอาหาร ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส (hydrolysis) ของไตรกลีเซอไรด์ให้เป็นมอโนกลีเซอไรด์ (monoglycerides) และกรดไขมันอิสระ (free fatty acid)

เป็นวิธีทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ไลเปส โดยใช้ reagent คือ p-nitrophenyl palmitate (pNPP) ซึ่งเป็นสารละลายใสไม่มีสี ทำหน้าที่เป็น substrate สามารถถูกไฮโดรไลซ์ไปเป็น p-nitrophenol ซึ่งมีสีเหลือง เมื่อ pNPP ทำปฏิกิริยากับไลเปสตับอ่อน ดังรูปที่ 1.8 แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 405 นาโนเมตร



รูปที่ 1.8 แสดงปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของ *p*-nitrophenyl-palmitate (pNPP)

1.4.5 การวิเคราะห์ปริมาณองค์ประกอบ

1.4.5.1 การวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลรวม (Total phenolic compounds) ด้วยวิธี Folin-Ciocalteu reagent[26]

วิธีนี้ทำได้ง่าย รวดเร็ว มีการใช้กันอย่างแพร่หลายในการหาปริมาณสารฟีนอลรวม โดยวิธีนี้อาศัยการถ่ายโอนอิเล็กตรอนในตัวกลางอัลคาไลน์จากสารประกอบฟีนอลิกไปยัง **Folin- Ciocalteu reagent** ซึ่งเป็นสารละลายผสม phosphomolybdic/phosphotungstic acid เกิดสารประกอบเชิงซ้อนที่มีสีน้ำเงิน ซึ่งสามารถตรวจวัดได้ด้วยเทคนิคสเปกโตรสโคปีที่ความยาวคลื่นที่ 765 นาโนเมตร แม้ว่าปฏิกิริยาการถ่ายโอนอิเล็กตรอนไม่ได้มีความเฉพาะเจาะจงสำหรับสารประกอบฟีนอลิก แต่กระบวนการสกัดสามารถขจัดกรดแอสคอร์บิคได้ประมาณ 85% และสารประกอบอื่น ๆ ที่อาจรบกวนการทดสอบ การทดสอบนี้ใช้หลอดไมโครเซ็นตริฟิวก์ (Microcentrifuge tube) และวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องอ่านเพลทแบบ 96 หลุม (96-well plate reader) ใช้กรดแกลลิคเป็นสารมาตรฐาน

1.4.5.2 การวิเคราะห์ปริมาณคาร์โบไฮเดรตรวม (Total carbohydrates) ด้วยวิธี phenol-sulfuric acid[27]

วิธีนี้เป็นวิธีที่ง่ายและรวดเร็วในการตรวจหาปริมาณคาร์โบไฮเดรตรวมในสารตัวอย่าง โดยจะตรวจวัดคาร์โบไฮเดรตทั้งหมด ซึ่งประกอบไปด้วย monosaccharides, disaccharides, oligosaccharides และ polysaccharides แม้ว่าวิธีจะตรวจหาคาร์โบไฮเดรตทั้งหมด แต่ความสามารถในการดูดกลืนแสงของสารแตกต่างกัน ดังนั้นผลจึงแสดงในรูปของคาร์โบไฮเดรตเพียง 1 ชนิด กรดซัลฟิวริกเข้มข้นจะทำให้

disaccharides, oligosaccharides และ polysaccharides แตกตัวเป็น monosaccharides โดยน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว ที่มีคาร์บอน 5 อะตอม จะถูกกำจัดน้ำออก (dehydrate) กลายเป็น Furfural ขณะที่น้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวที่มีคาร์บอน 6 อะตอม จะถูกกำจัดน้ำออก (dehydrate) กลายเป็น Hydroxymethyl furfural ซึ่งสารประกอบนี้จะทำปฏิกิริยากับฟีนอล เกิดสีเหลืองทอง ซึ่งสีที่เกิดปฏิกิริยานี้จะเสถียรอยู่เป็นเวลาหลายชั่วโมง ใช้กลูโคสเป็นสารละลายมาตรฐานสำหรับสารที่มีน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวที่มีคาร์บอน 6 อะตอม วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร

1.5 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อสกัดและแยกสารองค์ประกอบของเห็ดฟาน รวมทั้งทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารจากเห็ดฟาน ได้แก่ การต้านอนุมูลอิสระ การต้านมะเร็ง และการยับยั้งไลเปสตับอ่อน

บทที่ 2

การทดลอง

2.1 วัตถุดิบ

เห็ดฟานจากจังหวัดเชียงตุง รัฐชาน ประเทศสาธารณรัฐแห่งสหภาพเมียนมา รับตัวอย่างวันที่ 2 สิงหาคม พ.ศ. 2560 เก็บรักษาในตู้เย็นที่อุณหภูมิ -20 ºC

2.2 เครื่องมือและอุปกรณ์

2.2.1 เครื่องมือและอุปกรณ์สำหรับการสกัด แยก และวิเคราะห์สาร

1) กระดาษกรอง เบอร์1
2) หลอดคาปิลลารี่ (Capillary Tube)
3) แผ่น Thin layer chromatography (TLC)
4) เครื่องปั่น
5) NMR Tube และ ฝาปิดหลอด NMR
6) เครื่องชั่งทศนิยม 2 และ 4 ตำแหน่ง
7) เตาให้ความร้อนขนาด 2 L (Heating mantle)
8) เตาให้ความร้อน (Hotplate)
9) โถดูดความชื้น (desiccator)
10) ชุดกรองสุญญากาศ
11) โหลแก้วขนาด 5 L
12) เครื่องเขย่าสารโดยใช้ความถี่สูง (Ultrasonic sonicator)
13) เครื่องกลั่นระเหยแบบหมุนภายใต้สุญญากาศ (Rotary evaporator) (BUCHI rotavapor)
14) เครื่อง Nuclear Magnetic Resonance Spectrometer (Bruker Advance II 400 MHz spectrometer และ Varian model Mercury +400 spectrometer

2.2.2 เครื่องมือและอุปกรณ์สำหรับทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพและวิเคราะห์ปริมาณสารองค์ประกอบ

1) 96-well microtiter plate
2) Micro Tube ขนาด 1.5, 5 mL
3) ตู้เลี้ยงเซลล์ (Cell culture incubator)
4) ตู้ปลอดเชื้อ (Laminar Flow Clean Bench)

5) เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge)

6) กล้องจุลทรรศน์ (Binoculars)

7) เครื่อง Microplate Reader

8) Micropipette

2.3 สารเคมี

2.3.1 สารเคมีสำหรับสกัด แยก และวิเคราะห์สาร

สารเคมีที่ใช้ในการสกัดและแยกสารออกจาก crude ได้แก่ เฮกเซน (hexane), ไดคลอโรมีเทน (dichloromethane), เมทานอล (methanol) และน้ำกลั่น (DI water) ตัวทำละลายที่ใช้ในการวิเคราะห์เทคนิค NMR ได้แก่ Chloroform-D, Dimethyl sulfoxide d_6 (DMSO), methanol-D และ D_2O ใช้ Ceric Ammonium Molybdate, สารละลาย vanillin เป็น TLC stains สำหรับการแยกสารด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี (Column chromatography) ใช้ silica gel 60 (0.063-0.200 mm) เป็นวัฏภาคคงที่

2.3.2 สารเคมีสำหรับการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพและการวิเคราะห์ปริมาณองค์ประกอบ

ขั้นตอนการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ ใช้สารไดเมธิลซัลฟอกไซด์ (Dimethyl sulfoxide, DMSO) เป็นตัวทำละลาย Liquid and powder medium (RPMI1640) และ Fetal calf serum เป็นสารอาหารในการเลี้ยงเซลล์ MTT(3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide) เป็นสารทดสอบความอยู่รอดของเซลล์ DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) เป็นสารที่ใช้ศึกษาปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระ และ p-nitrophenyl palmitate (p-NPP) คือ สารตั้งต้นในการศึกษาการยับยั้งไลเปสตับอ่อน Trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethyl-3,4-dihydro-2H-1-benzopyran-2-carboxylic acid และ D-glucose เป็นสารมาตรฐานที่ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณสารองค์ประกอบ

2.4 วิธีการทดลอง

2.4.1 การสกัดเห็ดฟานด้วยตัวทำละลาย

2.4.1.1 การสกัดเห็ดฟานเพื่อเลือกประเภทเห็ดที่เหมาะสม

2.4.1.1.1 การสกัดเห็ดฟานสด

ก) การเตรียมเห็ดฟาน

นำเห็ดฟานที่แช่ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ -20 ºC ออกมาที่อุณหภูมิห้อง ทิ้งไว้ให้น้ำแข็งละลาย แยกเฉพาะส่วนเห็ด แล้วนำไปปั่นด้วยเครื่องปั่นให้เป็นชิ้นเล็ก ๆ

ข) การสกัดเห็ดฟานสดด้วยเมทานอล

1. นำเห็ดฟานที่ถูกปั่นเป็นชิ้นเล็ก ๆจำนวน 84.88 g มาแช่ด้วยเมทานอลจำนวน 200 mL ในบีกเกอร์ขนาด 500 mL ปิดด้วยอลูมิเนียมฟอยล์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

2. กรองเห็ดฟานด้วยเครื่องกรองสุญญากาศ โดยใช้กระดาษกรองเบอร์ 1

3. นำส่วนกากเห็ดฟานไปสกัดซ้ำด้วยเมทานอลอีก 2 ครั้ง แล้วนำส่วนสารละลายที่ได้จากการสกัดทั้ง 3 ครั้งไประเหยเมทานอลออกโดยใช้เครื่องกลั่นระเหยแบบหมุนภายใต้สุญญากาศ ได้สารสกัดหยาบเห็ดฟานสดด้วยเมทานอล **(F_1)** จำนวน 3.3641 g

ค) การสกัดเห็ดฟานสดด้วยน้ำกลั่น

1. นำส่วนกากเห็ดฟานที่เหลือจากการสกัดด้วยเมทานอลมาสกัดด้วยน้ำกลั่นต้มจำนวนครั้งละ 200 mL ในบีกเกอร์ขนาด 500 mL ปิดด้วยอลูมิเนียมฟอยล์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จำนวน 3 ครั้ง

2. นำส่วนสารละลายที่ได้จากการสกัดทั้ง 3 ครั้งไประเหยน้ำกลั่นออก โดยใช้เครื่องกลั่นระเหยแบบหมุนภายใต้สุญญากาศ ได้สารสกัดหยาบเห็ดฟานสดด้วยน้ำกลั่น **(F_2)** จำนวน 0.6729 g

3. นำส่วนกากเห็ดที่เหลือจากการสกัดใส่ในบีกเกอร์ขนาด 100 มิลลิลิตร ปิดด้วยพาราฟิล์ม แล้วนำไปเก็บในตู้เย็น

ง) การสกัดสารสกัดหยาบเห็ดฟานสดด้วยเมทานอล (F_1) ด้วยไดคลอโรมีเทน

1. นำสารสกัดหยาบเห็ดฟานสดด้วยเมทานอล (F_1) จำนวน 3.067 g ใส่ขวดก้นกลมขนาด 500 mL แยกด้วยไดคลอโรมีเทน จำนวน 200 mL โดยใช้เครื่องเขย่าสารความถี่สูง (Ultrasonic sonicator) เป็นเวลา 30 นาที แล้วแบ่งเฉพาะส่วนสารละลายลงในขวดก้นกลมอีกขวด

2. นำส่วนที่เหลือมาแยกซ้ำด้วยไดคลอโรมีเทนอีก 2 ครั้ง นำสารละลายที่ได้จากการแยกทั้งสามครั้งไประเหยไดคลอโรมีเทนออก โดยใช้เครื่องกลั่นระเหยแบบหมุนภายใต้สุญญากาศ ได้สารสกัดแยก F_1 ด้วยไดคลอโรมีเทน **(F_D)** จำนวน 1.2623 g

จ) การสกัดสารสกัดหยาบเห็ดฟานสดด้วยเมทานอล (F_1) ด้วยเมทานอล

1. นำสารสกัดหยาบเห็ดฟานสดด้วยเมทานอล (F_1) ที่ไม่ละลายในไดคลอโรมีเทนและเฮกเซนมาแยกต่อด้วยเมทานอล จำนวน 200 mL ในขวดก้นกลมขนาด 500 mL โดยใช้เครื่องเขย่าสารความถี่สูง (Ultrasonic sonicator) เป็นเวลา 30 นาที

2. นำสารละลายที่ได้ไประเหยเมทานอลออก โดยใช้เครื่องกลั่นระเหยแบบหมุนภายใต้สุญญากาศ ได้สารสกัดแยก F_1 ด้วยเมทานอล **(F_M)** จำนวน 1.7920 g

2.4.1.1.2 การสกัดเห็ดฟานแห้ง

ก) การเตรียมเห็ดฟานแห้ง

นำเห็ดฟานที่แช่ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ -20 °C ออกมาที่อุณหภูมิห้อง แล้วนำเห็ดฟานจำนวน 200.03 g ไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 60 °C ได้เห็ดฟานแห้งจำนวน 32.24 g แล้วนำไปปั่นด้วยเครื่องปั่นให้เป็นชิ้นเล็ก ๆ

ข) การสกัดเห็ดฟานแห้งด้วยเฮกเซน

1. นำเห็ดฟานแห้งที่ถูกปั่นเป็นชิ้นเล็ก ๆ จำนวน 13.68 g มาแช่ด้วยเฮกเซนจำนวน 200 mL ในบีกเกอร์ขนาด 500 mL ปิดด้วยอลูมิเนียมฟอยล์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

2. กรองเห็ดฟานแห้งด้วยเครื่องกรองสุญญากาศ โดยใช้กระดาษกรองเบอร์ 1

3. นำส่วนกากเห็ดฟานแห้งไปสกัดซ้ำด้วยเฮกเซน อีก 2 ครั้ง แล้วนำส่วนสารละลายที่ได้จากการสกัดทั้งสามครั้งไประเหยเฮกเซนออก โดยใช้เครื่องกลั่นระเหยแบบหมุนภายใต้สุญญากาศ ได้สารสกัดหยาบเห็ดฟานแห้งด้วยเฮกเซน (D_H) จำนวน 0.3760 g

ค) การสกัดเห็ดฟานแห้งด้วยไดคลอโรมีเทน

1. นำส่วนกากเห็ดฟานแห้งที่เหลือจากการสกัดด้วยเฮกเซน มาสกัดด้วยไดคลอโรมีเทน ครั้งละ 200 mL ในบีกเกอร์ขนาด 500 mL ปิดด้วยอลูมิเนียมฟอยล์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จำนวน 3 ครั้ง

2. นำส่วนสารละลายที่ได้จากการสกัดทั้ง 3 ครั้งไประเหยไดคลอโรมีเทนออก โดยใช้เครื่องกลั่นระเหยแบบหมุนภายใต้สุญญากาศ ได้สารสกัดหยาบเห็ดฟานแห้งด้วยไดคลอโรมีเทน (D_D) จำนวน 0.1415 g

ง) การสกัดเห็ดฟานแห้งด้วยเมทานอล

1. นำส่วนกากเห็ดฟานแห้งที่เหลือจากการสกัดด้วยไดคลอโรมีเทน มาสกัดด้วยเมทานอลครั้งละ 200 mL ในบีกเกอร์ขนาด 500 mL ปิดด้วยอลูมิเนียมฟอยล์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จำนวน 3 ครั้ง

2. นำส่วนสารละลายที่ได้จากการสกัดทั้งสามครั้งไประเหยเมทานอลออก โดยใช้เครื่องกลั่นระเหยแบบหมุนภายใต้สุญญากาศ ได้สารสกัดหยาบเห็ดฟานแห้งด้วยเมทานอล (D_M) จำนวน 1.8661 g

จ) การสกัดเห็ดฟานแห้งด้วยน้ำกลั่น

1. นำส่วนกากเห็ดฟานแห้งที่เหลือจากการสกัดด้วยเมทานอล มาสกัดด้วยน้ำกลั่นต้ม ครั้งละ 200 mL ในบีกเกอร์ขนาด 500 mL ปิดด้วยอลูมิเนียมฟอยล์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จำนวน 3 ครั้ง

2. นำส่วนสารละลายที่ได้จากการสกัดทั้ง 3 ครั้งไประเหยน้ำกลั่นออก โดยใช้เครื่องกลั่นระเหยแบบหมุนภายใต้สุญญากาศ ได้สารสกัดหยาบเห็ดฟานแห้งด้วยน้ำกลั่น (D_W) จำนวน 2.0457 g

3. นำส่วนกากเห็ดฟานแห้งที่เหลือจากการสกัดใส่ในบีกเกอร์ขนาด 100 mL ปิดด้วยพาราฟิล์ม แล้วนำไปเก็บในตู้เย็น

2.4.1.2 การสกัดเห็ดฟานเพื่อแยกสารองค์ประกอบ

2.4.1.2.1 การสกัดเห็ดฟานแห้ง

ก) การเตรียมเห็ดฟานแห้ง

นำเห็ดฟานที่แช่ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ -20 °C ออกมาที่อุณหภูมิห้อง แล้วนำเห็ดฟานจำนวน 2,000 g ไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 60 °C ได้เห็ดฟานแห้งจำนวน 266.57 g แล้วนำไปปั่นด้วยเครื่องปั่นให้เป็นชิ้นเล็ก ๆ

ข) การสกัดเห็ดฟานแห้งด้วยเฮกเซน

1. นำเห็ดฟานแห้งที่ถูกปั่นเป็นชิ้นเล็ก ๆจำนวน 260.00 g มาแช่ด้วยเฮกเซนจำนวน 2 L ในขวดโหลแก้วขนาด 5 L ปิดด้วยอลูมิเนียมฟอยล์และฝา เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

2. กรองเห็ดฟานแห้งด้วยเครื่องกรองสุญญากาศ โดยใช้กระดาษกรองเบอร์ 1

3. นำส่วนกากเห็ดฟานแห้งไปสกัดซ้ำด้วยเฮกเซนอีก 4 ครั้ง แล้วนำส่วนสารละลายที่ได้จากการสกัดทั้ง 5 ครั้งไประเหยเฮกเซนออก โดยใช้เครื่องกลั่นระเหยแบบหมุนภายใต้สุญญากาศ ได้สารสกัดหยาบเห็ดฟานแห้งด้วยเฮกเซน (D_{H2}) จำนวน 9.1153 g

ค) การสกัดเห็ดฟานแห้งด้วยไดคลอโรมีเทน

1. นำส่วนกากเห็ดฟานแห้งที่เหลือจากการสกัดด้วยเฮกเซน มาสกัดด้วยไดคลอโรมีเทน ครั้งละ 2 L ในขวดโหลแก้วขนาด 5 L ปิดด้วยอลูมิเนียมฟอยล์และฝา เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จำนวน 4 ครั้ง

2. นำส่วนสารละลายที่ได้จากการสกัดทั้ง 4 ครั้งไประเหยไดคลอโรมีเทนออก โดยใช้เครื่องกลั่นระเหยแบบหมุนภายใต้สุญญากาศ ได้สารสกัดหยาบเห็ดฟานแห้งด้วยไดคลอโรมีเทน (D_{D2}) จำนวน 2.7553 g

ง) การสกัดเห็ดฟานแห้งด้วยเมทานอล

1. นำส่วนกากเห็ดฟานแห้งที่เหลือจากการสกัดด้วยไดคลอโรมีเทน มาสกัดด้วยเมทานอล ครั้งละ 2 L ในขวดโหลแก้วขนาด 5 L ปิดด้วยอลูมิเนียมฟอยล์และฝา เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำซ้ำ 5 ครั้ง

2. นำส่วนสารละลายที่ได้จากการสกัดทั้ง 5 ครั้ง ไประเหยเมทานอลออกโดยใช้เครื่องกลั่นระเหยแบบหมุนภายใต้สุญญากาศ ได้สารสกัดหยาบเห็ดฟานแห้งด้วยเมทานอล (D_{M2}) จำนวน 17.8341 g

จ) การสกัดเห็ดฟานแห้งด้วยน้ำกลั่น

1. นำส่วนกากเห็ดฟานแห้งที่เหลือจากการสกัดด้วยเมทานอล มาสกัดด้วยน้ำกลั่นต้ม ครั้งละ 2 L ในขวดโหลแก้วขนาด 5 L ปิดด้วยอลูมิเนียมฟอยล์และฝา เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จำนวน 3 ครั้ง

2. นำส่วนสารละลายที่ได้จากการสกัดทั้ง 3 ครั้งไประเหยน้ำกลั่นออก โดยใช้เครื่องกลั่นระเหยแบบหมุนภายใต้สุญญากาศ (Rotary evaporator) ได้สารสกัดหยาบเห็ดฟานแห้งด้วยน้ำกลั่น (D_{W2}) จำนวน 62.2761 g

3. นำส่วนกากเห็ดฟานแห้งที่เหลือจากการสกัดใส่ในบีกเกอร์ขนาด 600 mL ปิดด้วยพาราฟิล์ม แล้วนำไปเก็บในตู้เย็น

2.1.2 การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ

2.1.2.1 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical scavenging capacity (DPPH assay)

1. เตรียมสารละลาย ดังต่อไปนี้

1) สารละลาย DPPH ความเข้มข้น 0.1 M โดยใช้ 95% เมทานอลเป็นตัวทำละลาย (เก็บในที่มืด)

2) สารละลายมาตรฐานโทรลอกซ์ (Trolox) เตรียมความเข้มข้นเริ่มต้น 10 mM แล้วเจือจางให้ได้ความเข้มข้น 1, 0.8, 0.6, 0.4, 0.2 และ 0.1 mM ตามลำดับ ใช้ 95% เมทานอลเป็นตัวทำละลาย

3) เตรียมตัวอย่างทดสอบที่ความเข้มข้น 25 mg/mL

2. ขั้นตอนการทดลอง

1) ปิเปตสารละลายตัวอย่างและสารมาตรฐานโทรลอกซ์ ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ปริมาตร 10 µL/well

2) ปิเปตสารละลาย DPPH ปริมาตร 190 µL/well ลงใน 96-well plate ที่มีสารละลายตัวอย่างและสารละลายมาตรฐานโทรลอกซ์

3) บ่มปฏิกิริยาทิ้งไว้ในที่มืด 30 นาที blank สำหรับเปรียบเทียบคือ ตัวทำละลายปฏิกิริยาที่ใช้เมทานอลแทนที่สารตัวอย่าง (ความเข้มข้น Trolox เท่ากับ 0 ในสารละลายมาตรฐาน ใช้เป็นตัวเปรียบเทียบทั้งหมด) แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 515 nm ด้วยเครื่อง Microtiter Plate Reader โดยใช้ blank เป็นเมทานอล

3. คำนวณและรายงานผล

1) สร้างกราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐานโทรลอกซ์ (Trolox) โดยกำหนดค่าความเข้มข้นเป็นแกน x และ % inhibition เป็นแกน y เพื่อหาค่า IC_{50} โดย % inhibition ได้จากการแทนค่าในสมการ (2.1)

$$\%\,\text{inhibition} = \frac{A_{control} - A_{sample}}{A_{control}} \times 100 \qquad (2.1)$$

เมื่อ $A_{control}$ = ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย DPPH เริ่มต้น

A_{sample} = ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย DPPH หลังทำปฏิริยากับสารตัวอย่าง

2.1.2.2 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง

ส่งสารตัวอย่างสารทดสอบที่สถาบันวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 2.1 เซลล์ที่ใช้ทดสอบเป็น cell line จาก The American Type Culture Collection (ATCC)

ชื่อในห้องปฏิบัติการ	ชื่อสามัญ	แหล่งที่มาของเซลล์
KATO-III	เซลล์มะเร็งกระเพาะอาหาร	Gastric carcinoma, Human
BT474	เซลล์มะเร็งเต้านม	Ductal carcinoma, breast, Human
SW620	เซลล์มะเร็งลำไส้	Lymph node metastasis, colon adenocarcinoma, Human
Hep-G2	เซลล์มะเร็งตับ	Liver hepatoblastoma, Human
Chago-K1	เซลล์มะเร็งปอด	Lung undifferentiated, Human

1. การเลี้ยงเซลล์

1) เลี้ยงเซลล์ใน tissue culture flask ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI1640 ที่ผสม fetal calf serum 5% จนกว่าเซลล์แต่ละชนิดมีจำนวนเพียงพอต่อการทดสอบ

2) เมื่อเซลล์ขยายทั่ว tissue culture flask ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์เก่าออก เติม 0.1% trypsin+0.01% EDTA ปริมาตร 0.5-1 mL ใช้เวลาบ่มประมาณ 2-5 นาที จนเซลล์หดตัว แล้วดูดสารละลายทิ้ง

3) เติมอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI1640 ที่ผสม fetal calf serum 5% 7 mL ลงใน tissue culture flask บ่มที่ 37 °C 5% CO_2

2. การเตรียมเซลล์สำหรับทดสอบ

1) ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์เก่าออกจาก tissue culture flask แล้วเติม 0.05% trypsin+0.01% EDTA ปริมาตร 0.5-1 mL ใช้เวลาบ่มประมาณ 2-5 นาที จนเซลล์หดตัว แล้วดูด trypsin ทิ้ง

2) เติมอาหารเลี้ยงเซลล์ใหม่ แล้วดูดสารละลายใส่ Centrifuge Tube Plastic ขนาด 1.5 mL นำไปเซนทริฟิวจ์เพื่อแยกเซลล์

3) นับเซลล์แล้วเตรียมเซลล์ 5×10^3 cell/200 µL/well สำหรับ SW620, Hep-G2 และ 1×10^4 cell/200 µL/well สำหรับ KATO-III, BT474 และ Chago-K1

3. การเตรียมสารละลายตัวอย่างที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

นำ F_1 ปริมาณ 23.2 mg, F_2 ปริมาณ 18.0 mg, F_D ปริมาณ 3,291.8 mg, F_M ปริมาณ 25.9 mg, D_H ปริมาณ 406 mg, D_D ปริมาณ 138.6 mg, D_M ปริมาณ 43 mg และ D_W ปริมาณ 21.1 mg มาละลายด้วย DMSO ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้าย 50 mg/mL

4) การเตรียมสารละลาย MTT

ชั่ง MTT และเจือจาง MTT ใน normal saline ให้มีความเข้มข้น 5 mg/mL (เก็บในขวดสีชาที่ 4 °C)

5) ขั้นตอนการทดสอบ

1. เติมอาหารเลี้ยงเซลล์ ปริมาตร 100 µL/well ลงใน 96 microplate จากนั้นเติมเซลล์แต่ละชนิด ปริมาตร 100 µL นำไปบ่มที่ 37 °C 5% CO_2 นาน 24 ชั่วโมง

2. เติมสารละลายตัวอย่าง ปริมาตร 2 µL/well ลงใน 96 microplate นำไปบ่ม 72 ชั่วโมง

3. เติม MTT 5 mg/mL ปริมาตร 10 µL/well บ่มนาน 4 ชั่วโมง

4. ดูดสารละลายทิ้ง แล้วเติม 100% DMSO ปริมาตร 150 µL/well นำไปเขย่าด้วย plate mixer จนสารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน

5. วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 nm ด้วยเครื่อง Microtiter Plate Reader

6. การคำนวณและรายงานผล

สร้างกราฟมาตรฐาน โดยกำหนดค่าความเข้มข้นของสารสกัดเป็นแกน x และเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์ (% cell survival เป็นแกน y เพื่อใช้คำนวณหาความเข้มข้นของสารสกัดที่ทำให้เซลล์รอด 50% หรือหาค่า IC_{50} (Inhibition concentration 50%) โดย % cell survival ได้จากการแทนค่าในสมการ (2.2)

$$\% \text{ cell survival} = \frac{A_{sample}}{A_{control}} \, x \, 100 \qquad (2.2)$$

เมื่อ A_{sample} = ค่าการดูดกลืนแสงของ MTT ในสารสกัด

$A_{control}$ = ค่าการดูดกลืนแสงของ MTT ในตัวทำละลาย DMSO

3.1.2.1 การทดสอบการยับยั้งไลเปสตับอ่อน (pancreatic lipase)

1) เตรียมสารละลาย ดังนี้

1. สารละลายบัฟเฟอร์ Tris-HCl ความเข้มข้น 0.061 M ที่ค่า pH เท่ากับ 8.5
2. *p*-nitrophenyl palmitate (*p*-NPP) ความเข้มข้น 0.01 mol/L ละลายในอะซีโตไนไตรล์ (Acetonitrile) เมื่อใช้สำหรับทดสอบให้เจือจางเป็นความเข้มข้น 6.66 µM ด้วยบัฟเฟอร์
3. ไลเปสตับอ่อน แบบ Porcine pancreatic lipase type II ความเข้มข้น 5 mg/mL โดย ชั่งเอนไซม์ 5 mg ละลายด้วยบัฟเฟอร์ ปริมาตร 1 mL
4. Orlistat ที่ละลายใน DMSO ความเข้มข้น 10 mg/mL
5. สารสกัดแต่ละชนิด ความเข้มข้น 25 mg/mL

2) ขั้นตอนการทดสอบ

1. เติมTris-HCl ปริมาตร 280 µL, สารสกัด ปริมาตร 32 µL และ *p*-NPP ความเข้มข้น 6.66 mM ปริมาตร 40 µL ลงใน 96 microplate (positive control คือ Orlistat และ Negative control คือ 95% เมทานอลสำหรับสารตัวอย่าง และ DMSO สำหรับ Orlistat) บ่มปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 5 นาที

2.เติมไลเปสตับอ่อน ความเข้มข้น 5 mg/mL ปริมาตร 48 µL และเติม ethanol ปริมาตร 600 µL สำหรับปฏิกิริยาเปรียบเทียบ บ่มปฏิกิริยาต่อที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 25 นาที

3. เติม ethanol ปริมาตร 600 µLเพื่อหยุดปฏิกิริยาทั้งหมด สำหรับปฏิกิริยาเปรียบเทียบเติมไลเปสตับอ่อน ความเข้มข้น 5 mg/mL ปริมาตร 48 µL เพื่อปรับปริมาตร
4. วัดค่าการดูดกลืนแสง ด้วยเครื่อง Microtitier plate reader ที่ความยาวคลื่น 405 nm แล้วคำนวณเปอร์เซ็นการยับยั้ง (% inhibitor) โดยแทนค่าในสมการ (2.3)

$$\% \text{ inhibitor} = \frac{(A-B) - (C-D)}{(C-D)} \, x \, 100 \qquad (2.3)$$

เมื่อ A = ค่าการดูดกลืนแสงของตัวควบคุมลบ (สารตัวอย่าง)
B = ค่าการดูดกลืนแสงของตัวเปรียบเทียบของตัวควบคุมลบ (95% ethanol)
C = าการดูดกลืนแสงงของสารตัวอย่างหรือสารควบคุมบวก (Orlistat)
D = ค่าการดูดกลืนแสงของตัวเปรียบเทียบของสารตัวอย่างหรือสารควบคุมบวก

5.นำค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งจากความเข้มข้นต่าง ๆของสารสกัด มาหาค่าความเข้มข้นยับยั้งที่ 50% (IC_{50}) ต่อไป

3.1.3 การวิเคราะห์กลุ่มสารองค์ประกอบ

3.1.3.1 การวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลรวม (Total phenolic compounds) ด้วยวิธี Folin-Ciocalteu reagent

1) เตรียมสารละลาย ดังนี้

1. เตรียมสารละลายของสารสกัดแต่ละชนิด ที่ความเข้มข้น 25 mg/mL
2. เตรียมสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิคที่ความเข้มข้น 1, 0.8, 0.6, 0.4, 0.2 และ 0.1 mM
3. เตรียมสารละลาย Folin-Ciocatteu reagent เจือจางในอัตราส่วน 1:10 (v/v) โดยใช้น้ำกลั่น
4. เตรียมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3) 7.5% (v/v)

2) ขั้นตอนการทดสอบ

1. ปิเปตสารละลายตัวอย่างและสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิค ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ปริมาตร 20 µL ลงใน 96-well plates
2. ปิเปตสารละลาย Folin-Ciocatteu reagent ปริมาตร 100 µL ลงใน 96-well plates ที่มีสารละลาย ตัวอย่างและสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิค
3. ปิเปตสารละลายโซเดียมคาร์บอเนตความเข้มข้น 7.5% (v/v) ปริมาตร 80 µL ลงใน 96-

well plates ทิ้งไว้ที่มืดเป็นเวลา 30 นาที

4. นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 nm ด้วยเครื่อง Microtiter Plate Reader โดยใช้ Blank ของสารละลายตัวอย่างเป็นเมทานอลปริมาตร 200 µL, Blank ของสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิคเป็นน้ำกลั่นและ Control เป็นสารละลาย Folin-Ciocatteu reagent ปริมาตร 100 µLและสารละลายโซเดียม คาร์บอเนตความเข้มข้น 7.5% (v/v) ปริมาตร 80 µL
5. นำค่าความเข้มข้นและค่าดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิคมาสร้างกราฟมาตรฐาน

3.) การคำนวณและรายงานผล

1. สร้างกราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิคโดยกำหนดค่าความเข้มข้นเป็นแกน x และค่า การดูดกลืนแสง เป็นแกน y
2. รายงานผลในรูป mg of gallic acid equivalents (GAE) / (g) extract ซึ่งได้จากการแทนค่าในสมการ (2.4)

$$\text{mg of Gallic acid equivalents /g of extract} = \frac{C_{\text{Gallic acid}}\,(\text{mg/mL}) \times \text{DF} \times V_{\text{solvent}}(\text{mL})}{M_{\text{extract}}(\text{g})} \qquad (2.4)$$

เมื่อ $C_{\text{Gallic acid}}$ = ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิค จากการนำค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายตัวอย่างไปเทียบกับกราฟของสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิค (mg/mL)

DF (Dilution factor) = ค่าจากการเจือจางสารละลายตัวอย่าง

V_{solvent} = ปริมาณของตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัด (mL)

M_{extract} = น้ำหนักของสารสกัด (g)

3.1.3.2 การวิเคราะห์ปริมาณคาร์โบไฮเดรตรวม (Total carbohydrates) ด้วยวิธี phenol-sulfuric acid [28,29]

1) การเตรียมสารละลายตัวอย่าง

นำ crude D_{H2}, D_{D2}, D_{M2}, D_{W2} ชนิดละ 1 mg ใส่ในขวดกำหนดปริมาตร ขนาด 5 mL แล้วปรับปริมาตรด้วย DMSO ได้ความเข้มข้นเป็น 200 µg/mL

2) การเตรียมสารละลายมาตรฐานกลูโคส (D-glucose) ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

ชั่งกลูโคส (D-glucose) 0.0020 g ลงในขวดกำหนดปริมาตร 5 mL ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น แล้วเจือจาง 2 เท่า ให้ได้สารละลายมาตรฐานกลูโคส (D-glucose) ทั้งหมดเป็น 400, 200, 100, 50, 25 และ 12.5 µg/mL

3) การเตรียมสารละลายฟีนอล 5% ในน้ำ

ชั่งฟีนอล หนัก 1.2500 g ลงในขวดกำหนดปริมาตรขนาด 25 mL ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น

4) ขั้นตอนการทดลอง

1. ปิเปิตสารละลายตัวอย่าง, blank (DMSO) และสารละลายมาตรฐานกลูโคสที่เตรียมไว้ปริมาตร 1.5 mL ใส่ในหลอดทดลอง
2. เติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้นลงในแต่ละหลอดทดลองอย่างรวดเร็ว ปริมาตร 4.5 mL
3. เติม 5% ฟีนอลในน้ำ ปริมาตร 0.9 mL ทันที แล้วเขย่าสารละลายให้เข้ากัน นำไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 90 °C ด้วยอ่างควบคุมอุณหภูมิ (water bath) เป็นเวลา 5 นาที
4. ทำให้เย็นลงที่อุณหภูมิห้อง แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง UV-Vis spectroscopy

5) การคำนวณและรายงานผล

1. สร้างกราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐานกลูโคส (D-glucose) โดยกำหนดค่าความเข้มข้นเป็นแกน x และค่าดูดกลืนแสงเป็นแกน y

2. รายงานผลในรูป mg of glucose equivalents / g of the crude ซึ่งได้จากการแทนค่าในสมการ (2.5)

$$\text{(mg) glucose equivalents/ (g) crude} = \frac{C_{Glucose} \times DF \times V_{solvent}}{M_{extract}} \qquad (2.5)$$

เมื่อ $C_{Glucose}$ = ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานกลูโคส จากการนำค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายตัวอย่างไปเทียบกับกราฟของสารละลายมาตรฐานกลูโคส (mg/mL)

DF (Dilution factor) = ค่าจากการเจือจางสารละลายตัวอย่าง

$V_{solvent}$ = ปริมาณของตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัด (mL)

$M_{extract}$ = น้ำหนักของสารสกัด (g)

3.1.4 การแยกสารองค์ประกอบเห็ดฟาน

นำสารสกัดหยาบเห็ดฟานแห้งด้วยไดคลอโรมีเทน (D_{D2}) น้ำหนัก 2.6813 g เคลือบลงบน silica gel 60 น้ำหนัก 25.1750 g ใช้ silica gel 60 น้ำหนัก 350 g เป็นวัฏภาคคงที่ โดยใส่สารสกัดที่เคลือบบนซิลิกาข้างต้นไว้ด้านบนคอลัมน์ จากนั้นชะด้วยการเพิ่มสภาพขั้วตัวทำละลายจากเฮกเซน, เฮกเซน-ไดคลอโรมีเทน, ไดคลอโรมีเทน, ไดคลอโรมีเทน-เมทานอล, เมทานอล เก็บสารจากการชะ 50 mL ในแต่ละส่วนแยก จากนั้นรวมส่วนแยกที่คล้ายคลึงกันจากการวิเคราะห์ด้วย TLC เข้าด้วยกัน รวบ fraction ได้ทั้งหมด 23 fractions นำไประเหยตัวทำละลาย ชั่งน้ำหนัก แล้วนำ fraction ที่สนใจไปพิสูจน์เอกลักษณ์ด้วยเทคนิค ^{1}H-NMR ต่อไป

บทที่ 3

ผลการทดลองและวิเคราะห์ผลการทดลอง

3.1 ผลของลักษณะเห็ดที่มีต่อสารสกัด

ลักษณะเห็ดฟานที่ทำการศึกษามี 2 ลักษณะ คือ เห็ดสดและเห็ดแห้ง สกัดเห็ดฟานสดด้วยเมทานอลและน้ำกลั่น ตามลำดับ ในอัตราส่วนเห็ดต่อตัวทำละลาย เท่ากับ 17:40 ได้ร้อยละปริมาณสารที่สกัดได้จากเห็ดฟานสดทั้งหมด 4.75% ดังตารางที่ 3.1 นำสารสกัดหยาบเห็ดฟานสดด้วยเมทานอล (F_1) มาสกัดเพื่อแยกสารต่อด้วยไดคลอโรมีเทนและเมทานอล ตามลำดับ พบว่าสารสกัดแยกด้วยเมทานอล (F_M) มีร้อยละปริมาณสารที่สกัดแยกได้มากที่สุด เท่ากับ 58.41% ดังตารางที่ 3.2 ซึ่งสอดคล้องกับสภาพขั้วของตัวทำละลาย เนื่องจากเป็นการแยกสารที่สกัดด้วยเมทานอล สารสกัดหยาบโดยส่วนใหญ่เป็นสารที่มีขั้ว จึงควรมีค่าร้อยละปริมาณสารที่สกัดแยกได้สูง

ตารางที่ 3.1 แสดงลักษณะปรากฏและร้อยละสารที่สกัดได้ (%yield extract) จากเห็ดฟานสด

สารสกัดเห็ดฟานสด	ลักษณะสารสกัด	ร้อยละสารที่สกัดได้ (% yield extract)
สารสกัดหยาบเห็ดฟานสดด้วยเมทานอล (F_1)	ของแข็งสีน้ำตาลเข้ม มีกลิ่นเหม็น	3.96
สารสกัดหยาบเห็ดฟานสดด้วยน้ำกลั่น (F_2)	ของแข็งสีดำ มีกลิ่นเหม็น	0.79
รวม		4.75

ตารางที่ 3.2 แสดงลักษณะปรากฏและร้อยละสารที่สกัดแยกได้ (%yield extract) จากสารสกัดหยาบเห็ดฟานสดด้วยเมทานอล (F_1)

สารสกัดแยก F_1	ลักษณะสารสกัดแยก	ร้อยละสารที่สกัดแยกได้ (% yield extract)
สารสกัดแยก F_1 ด้วยไดคลอโรมีเทน (F_D)	ของเหลวหนืดมาก สีน้ำตาล มีกลิ่นเหม็น	41.11
สารสกัดแยก F_1 ด้วยเมทานอล (F_M)	ของแข็งสีดำ มีกลิ่นเหม็น	58.41
รวม		99.52

การศึกษาส่วนต่อไป คือ การนำเห็ดฟานสด น้ำหนัก 84.88 g ไปอบจนแห้ง ได้เห็ดฟานแห้ง 13.68 g แล้วนำมาสกัดด้วยตัวทำละลายจากขั้วต่ำไปสูง คือ เฮกเซน, ไดคลอโรมีเทน, เมทานอล และน้ำกลั่น ตามลำดับ พบว่า สารสกัดหยาบที่ได้จากการสกัดด้วยเฮกเซนและไดคลอโรมีเทน มีลักษณะเป็นของเหลวหนืดมาก สีน้ำตาลอ่อนและมีกลิ่นเหม็น สารสกัดหยาบจากตัวทำละลายเมทานอลและน้ำ มีลักษณะเป็นของแข็ง สีน้ำตาลเข้มและดำ ตามลำดับ โดยร้อยละปริมาณสารที่สกัดได้มีแนวโน้มเพิ่มมากขึ้น เมื่อตัวทำละลายมีสภาพขั้วสูงขึ้น ดังนี้ D_H (0.44%), D_D (0.17%), D_M (2.20%) และ D_W (2.41%) แสดงให้เห็นว่าสารองค์ประกอบส่วนใหญ่ในเห็ดฟานแห้งเป็นสารที่มีสภาพขั้วสูง แสดงดังตารางที่ 3.3

จากการสกัดเห็ดฟานทั้ง 2 แบบ คือ การสกัดจากเห็ดฟานสดและแห้ง พบว่าร้อยละสารที่สกัดได้ทั้งหมดจากเห็ดฟานสด (4.75%) น้อยกว่าร้อยละสารที่สกัดได้ทั้งหมดจากเห็ดฟานแห้ง (5.22%) เนื่องจากเห็ดฟานสดมีความชื้นมากถึง 84% ความสามารถในการละลายของสารองค์ประกอบในตัวทำละลายที่มีขั้วอาจมีข้อจำกัด สารองค์ประกอบบางชนิดจึงไม่สามารถละลายออกมาได้หมด ทำให้ร้อยละปริมาณสารที่สกัดได้ทั้งหมดจากเห็ดฟานสดจึงมีค่าน้อยกว่าเห็ดฟานแห้ง

ตารางที่ 3.3 แสดงลักษณะปรากฏและร้อยละสารที่สกัดได้ (%yield extract) จากเห็ดฟานแห้ง

สารสกัดเห็ดฟานแห้ง	ลักษณะสารสกัด	ร้อยละสารที่สกัดได้ (% yield extract)
สารสกัดหยาบเห็ดฟานแห้งด้วยเฮกเซน (D_H)	ของเหลวหนืดมากสีน้ำตาลอ่อน มีกลิ่นเหม็น	0.44
สารสกัดหยาบเห็ดฟานแห้งด้วยไดคลอโรมีเทน (D_D)	ของเหลวหนืดมากสีน้ำตาลอ่อน มีกลิ่นเหม็น	0.17
สารสกัดหยาบเห็ดฟานแห้งด้วยเมทานอล (D_M)	ของแข็งสีน้ำตาลเข้ม	2.20
สารสกัดหยาบเห็ดฟานแห้งด้วยน้ำกลั่น (D_W)	ของแข็งสีดำ มีกลิ่นเหม็น	2.41
รวม		5.22

จากตารางที่ 3.4 แสดงลักษณะ น้ำหนักของสารสกัดหยาบเห็ดฟานแห้งปริมาณมากขึ้นที่สกัดด้วยตัวทำละลายจากสภาพขั้วต่ำไปสูง คือ เฮกเซน, ไดคลอโรมีเทน, เมทานอล และน้ำกลั่น เช่นเดียวกับสารสกัดหยาบจากเห็ดฟานแห้งที่แสดงดังตารางที่ 3.3 โดยใช้เห็ดฟานแห้ง 260.00 g เพื่อนำสารสกัดหยาบที่ได้ไปแยกสารองค์ประกอบทางเคมี พบว่าเมื่อใช้ตัวทำละลายเฮกเซนและไดคลอโรมีเทน ทำให้ได้สกัดสารที่มีลักษณะเป็นของเหลวหนืดมาก สีน้ำตาลเหลือง และมีกลิ่นเหม็นหืน ตัวทำละลายเมทานอลและน้ำให้สารสกัดหยาบที่มีกลิ่น

เหม็น เป็นของแข็งสีน้ำตาลและสีดำ ตามลำดับ ซึ่งมีลักษณะและแนวโน้มร้อยละสารที่สกัดได้เพิ่มสูงขึ้นจากตัวทำละลายที่มีสภาพขั้วต่ำไปขั้วที่สูงขึ้น เช่นเดียวกับสารสกัดหยาบจากเห็ดฟานแห้ง ที่แสดงดังตารางที่ 3.3 ทั้งนี้สารสกัดหยาบจากเห็ดฟานแห้งด้วยน้ำกลั่น (D_{W2}) แสดงปริมาณสารที่สกัดได้มากถึง 23.95% จึงช่วยยืนยันได้ว่าสารองค์ประกอบในเห็ดฟานแห้งเป็นสารที่มีสภาพขั้วสูงเป็นส่วนใหญ่ เนื่องจากให้ค่าร้อยละปริมาณสารที่สกัดได้ในตัวทำละลายที่มีสภาพขั้วสูงได้มากที่สุด

จากการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของเห็ดฟานจากสารสกัดหยาบ ได้แก่ D_{H2}, D_{D2}, D_{M2} และ D_{w2} ด้วย ^{1}H-NMR , ^{13}C-NMR spectroscopy พบว่าสารสกัดหยาบเห็ดฟานแห้งด้วยเฮกเซน (D_{H2}) และไดคลอโรมีเทน (D_{D2}) มีโอลิโกไอโซพรีน และไขมันในรูปไตรกลีเซอไรด์และกรดไขมันเป็นองค์ประกอบ (รูปที่ A-1, A-2, A-3) สารสกัดหยาบเห็ดฟานแห้งด้วยเมทานอล (D_{M2}) และน้ำกลั่น (D_{W2}) ประกอบด้วยแซ็กคาไรด์ เทอร์พีนอยด์และสารประกอบฟีนอลิก (รูปที่ A-4, A-5)

จากการนำสารสกัดหยาบเห็ดฟานแห้งด้วยไดคลอโรมีเทน (D_{D2}) มาแยกสารองค์ประกอบด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี โดยเพิ่มความมีขั้วของเฟสเคลื่อนที่ที่อัตราส่วนต่าง ๆ ด้วยเฮกเซน, เฮกเซน-ไดคลอโรมีเทน, ไดคลอโรมีเทน, ไดคลอโรมีเทน-เมทานอล และเมทานอล ตามลำดับ และวิเคราะห์ด้วย ^{1}H-NMR พบว่าแต่ละ fraction มีโอลิโกไอโซพรีนอยู่ในปริมาณมาก (รูปที่ A-6, A-7, A-8, A-9, A-10, A-11) แสดงให้เห็นว่าโอลิโกไอโซพรีนที่มีในสารสกัดหยาบเห็ดฟานแห้งด้วยไดคลอโรมีเทน (D_{D2}) มีขนาดแตกต่างกัน เนื่องจากสามารถละลายและแยกออกจากกันในตัวทำละลายที่มีสภาพขั้วแตกต่างกัน ซึ่งปรากฏบน ^{1}NMR spectrum ของ fraction ต่าง ๆ นอกจากนี้พบพีคของสารชนิดอื่น แต่ไม่สามารถยืนยันโครงสร้างได้อย่างชัดเจน เนื่องจากแต่ละ fraction ที่นำมาศึกษายังคงมีสารองค์ประกอบจำนวนหลายชนิด ลักษณะพีคของสารบางตัวอาจถูกบดบังจึงไม่สามารถวิเคราะห์ได้อย่างถูกต้อง ควรนำแต่ละ fraction ไปแยกสารบริสุทธิ์เพื่อยืนยันชนิดของสารต่อไป โดยตารางที่ 3.5 แสดงน้ำหนักของสารแต่ละ fraction ที่ได้จากการแยกสารองค์ประกอบของ (D_{D2}) ด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี

ตารางที่ 3.4 แสดงลักษณะปรากฏและร้อยละสารที่สกัดได้ (%yield extract) จากเห็ดฟานแห้งเพื่อแยกสารองค์ประกอบ

สารสกัดเห็ดฟานแห้ง	**ลักษณะสารสกัด**	**ร้อยละปริมาณสารที่สกัดได้ (% yield extract)**
สารสกัดหยาบเห็ดฟานแห้งด้วยเฮกเซน (D_{H2})	ของเหลวหนืดมากสีน้ำตาลเหลือง กลิ่นเหม็นหืน	3.51
สารสกัดหยาบเห็ดฟานแห้งด้วยไดคลอโรมีเทน (D_{D2})	ของเหลวหนืดมากสีน้ำตาลเหลือง กลิ่นเหม็นหืน	1.06
สารสกัดหยาบเห็ดฟานแห้งด้วยเมทานอล (D_{M2})	ของแข็งสีน้ำตาลเข้ม กลิ่นเหม็น	6.86
สารสกัดหยาบเห็ดฟานแห้งด้วยน้ำกลั่น (D_{W2})	ของแข็งสีดำ กลิ่นเหม็น	23.95
รวม		35.38

ตารางที่ 3.5 แสดงน้ำหนักสารแต่ละ fraction ของ D_{D2} ที่วิเคราะห์ด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี

Fraction	**น้ำหนักสาร (mg)**	**Fraction**	**น้ำหนักสาร (mg)**
1	200.6	13	101.9
2	78.2	14	218.6
3	204.9	15	37.7
4	137.9	16	67.5
5	30.3	17	48.0
6	28.9	18	43.3
7	13.8	19	31.4
8	16.9	20	94.2
9	46.3	21	79.3
10	140.7	22	193.8
11	275.7	23	172.3
12	47.0	**รวม**	**2,309.2**

3.2 การวิเคราะห์กลุ่มสารองค์ประกอบ

3.2.1 การวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลรวม (Total phenolic compounds) ด้วยวิธี Folin-Ciocalteu reagent

เมื่อนำสารสกัดหยาบจากเห็ดฟานสดและแห้ง จำนวน 12 ชนิด ได้แก่ F_1, F_2, F_D, F_W, D_H, D_D, D_M, D_W, D_{H2}, D_{D2}, D_{M2} และ D_{W2} มาวิเคราะห์หาปริมาณฟีนอลรวม พบว่าสามารถเรียงปริมาณฟีนอลรวมจากมากไปน้อย ได้ดังนี้ D_W, F_2, F_1, D_{W2}, F_M, D_H, D_M, D_D, D_{M2} , F_D, D_{D2}, D_{H2} ตามลำดับ เมื่อแยกพิจารณาสารสกัดในกลุ่มเห็ดสด (F_1, F_2, F_D, F_W) และเห็ดแห้ง (D_H, D_D, D_M, D_W, D_{H2}, D_{D2}, D_{M2}, D_{W2}) พบว่าสารสกัดหยาบเห็ดฟานสดและแห้งด้วยน้ำกลั่น (F_2, D_W, D_{W2}) ให้ปริมาณฟีนอลรวมสูงที่สุด อยู่ในช่วง 56.5±0.2 – 88.8±2.7 mg กรดแกลลิคโดยสมมูล/g สารสกัด และสารสกัดจากตัวทำละลายที่มีสภาพขั้วสูงขึ้นให้ปริมาณฟีนอลรวมสูงขึ้น

ตารางที่ 3.6 แสดงปริมาณฟีนอลรวม (Total phenolic compounds) ของสารสกัดที่ความเข้มข้น 25 mg/mL

สารสกัด	**mg กรดแกลลิคโดยสมมูล/g สารสกัด** (mg of gallic acid equivalents (GAE) / g crude extracts)
F_1	57.9 ± 0.1
F_2	65.1 ± 1.7
F_D	4.2 ± 0.3
F_M	49.0 ± 1.4
D_H	47.7 ± 0.4
D_D	21.9 ± 0.4
D_M	30.6 ± 0.8
D_W	88.8 ± 2.7
D_{H2}	1.4 ± 0.2
D_{D2}	4.2 ± 0.2
D_{M2}	7.7 ± 0.2
D_{W2}	56.5 ± 0.2

หมายเหตุ

F_1 คือ สารสกัดหยาบเห็ดฟานสดด้วยเมทานอล F_2 คือ สารสกัดหยาบเห็ดฟานสดด้วยน้ำกลั่น

F_D คือ สารสกัดแยก F_1 ด้วยไดคลอโรมีเทน F_M คือ สารสกัดแยก F_1 ด้วยเมทานอล

D_H คือ สารสกัดหยาบเห็ดฟานแห้งด้วยเฮกเซน D_D คือ สารสกัดหยาบเห็ดฟานแห้งด้วยไดคลอโรมีเทน

D_M คือ สารสกัดหยาบเห็ดฟานแห้งด้วยเมทานอล D_W คือ สารสกัดหยาบเห็ดฟานแห้งด้วยน้ำกลั่น

D_{H2} คือ สารสกัดหยาบเห็ดฟานแห้งด้วยเฮกเซนเพื่อแยกสารองค์ประกอบ

D_{D2} คือ สารสกัดหยาบเห็ดฟานแห้งด้วยไดคลอโรมีเทนเพื่อแยกสารองค์ประกอบ

D_{M2} คือ สารสกัดหยาบเห็ดฟานแห้งด้วยเมทานอลเพื่อแยกสารองค์ประกอบ

D_{W2} คือ สารสกัดหยาบเห็ดฟานแห้งด้วยน้ำกลั่นเพื่อแยกสารองค์ประกอบ

3.2.2 ผลการวิเคราะห์ปริมาณคาร์โบไฮเดรตรวม (Total carbohydrates) ด้วยวิธี phenol sulfuric acid

เมื่อนำสารสกัดหยาบจากเห็ดฟานแห้ง จำนวน 4 ชนิด ได้แก่ D_{H2}, D_{D2}, D_{M2}, D_{W2} มาวิเคราะห์ปริมาณคาร์โบไฮเดรตรวม พบว่า D_{M2} มีปริมาณคาร์โบไฮเดรตรวมมากที่สุด คือ 335.4 mg กลูโคสโดยสมมูล/g สารสกัด สามารถเรียงลำดับสารสกัดหยาบที่มีปริมาณคาร์โบไฮเดรตรวมจากมากไปน้อย ได้ดังนี้ D_{M2}(335.4), D_{H2}(172.8), D_{D2}(163.2) และ D_{W2}(115.5) ตามลำดับ ดังตารางที่ 3.7 ซึ่งจะเห็นว่าปริมาณคาร์โบไฮเดรตรวมในสารสกัดหยาบทั้ง 4 ชนิดมีค่าใกล้เคียงกัน อาจเนื่องมาจากคาร์โบไฮเดรตในสารสกัดหยาบนี้มีสารทั้งที่มีสภาพขั้วสูงและต่ำ จึงสามารถละลายได้ในตัวทำละลายทั้ง 4 ชนิด แต่สามารถละลายได้ดีที่สุดในเมทานอล (D_{M2}) เนื่องจากเมทานอลมีความเป็นขั้วสูงแต่ยังน้อยกว่าน้ำ แสดงคาร์โบไฮเดรตในสารสกัดเห็ดฟานนั้นมีทั้งแบบมีขั้วมากและน้อย

ตารางที่ 3.7 แสดงปริมาณคาร์โบไฮเดรตรวม (Total carbohydrates) ของสารสกัดเห็ดฟานแห้งที่ความเข้มข้น 200 µg/mL

สารสกัด	**mg กลูโคสโดยสมมูล/g สารสกัด** (mg of glucose equivalents / g crude extracts)
D_{H2}	172.8
D_{D2}	163.2
D_{M2}	335.4
D_{W2}	115.5

หมายเหตุ D_{H2} คือ สารสกัดหยาบเห็ดฟานแห้งด้วยเฮกเซนเพื่อแยกสารองค์ประกอบ

D_{D2} คือ สารสกัดหยาบเห็ดฟานแห้งด้วยไดคลอโรมีเทนเพื่อแยกสารองค์ประกอบ

D_{M2} คือ สารสกัดหยาบเห็ดฟานแห้งด้วยเมทานอลเพื่อแยกสารองค์ประกอบ

D_{W2} คือ สารสกัดหยาบเห็ดฟานแห้งด้วยน้ำกลั่นเพื่อแยกสารองค์ประกอบ

3.3 ผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ

3.3.1 ผลทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical scavenging capacity (DPPH assay)

เมื่อนำสารสกัดจากเห็ดฟานสดและแห้งทั้งหมด ประกอบด้วย F_1, F_2, F_D, F_W, D_H, D_D, D_M, D_W, D_{H2}, D_{D2}, D_{M2} และ D_{W2} มาทดสอบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 3.8 พิจารณา %Inhibition ของสารสกัดที่ความเข้มข้น 2 mg/mLของ D_{W2} และ D_W พบว่ามีค่า %Inhibition เท่ากับ 44.5 และ 24.4 ตามลำดับ ซึ่ง D_{W2} และ D_W ไม่สามารถทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ความเข้มข้น 25 mg/mL เนื่องจากค่าการดูดกลืนแสงไม่อยู่ในช่วงของกราฟมาตรฐาน สำหรับความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดที่ความเข้มข้น 25 mg/mL พบว่า F_M, F_2 และ F_1 มีค่า %Inhibition เท่ากับ 82.7, 82.0 และ 78.3 ตามลำดับ ขณะที่สารสกัดที่ไม่สามารถหาค่า IC_{50} ที่ความเข้มข้นของสารสกัดน้อยกว่าหรือเท่ากับ 25 mg/mL ได้ แสดงค่า % Inhibition ไม่เกิน 33 % แสดงดังตารางที่ 3.8 จากข้อมูลข้างต้น สารสกัดหยาบด้วยน้ำกลั่น D_{W2} และ D_W มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระได้ดีที่สุด ซึ่ง D_{W2} และ D_W เป็นสารสกัดหยาบด้วยน้ำกลั่นจากเห็ดฟานแห้งทั้ง 2 ชนิด แตกต่างกันที่ปริมาณสารที่นำมาใช้ในการสกัด แสดงให้เห็นว่าเห็ดฟานแห้งที่สกัดด้วยน้ำกลั่นมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระได้ดีที่สุด ดังนั้น สารต้านอนุมูลอิสระจึงเป็นสารที่มีขั้วสูง เนื่องจากสามารถละลายในตัวทำละลายที่มีขั้วสูง คือ น้ำกลั่นได้ดี ซึ่งยังสอดคล้องกับปริมาณฟีนอลรวมที่เป็นสารต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบเห็ดสดและเห็ดแห้งด้วยน้ำกลั่น (F_2, D_W และ D_{W2}) ที่มีค่า mg กรดแกลลิคโดยสมมูล/g สารสกัด ในปริมาณสูง จากนั้นคำนวณค่า IC_{50} ของสารสกัดหยาบ พบว่า มีเพียงสารสกัดหยาบ F_1, F_2, F_M, D_W และ D_{W2} ที่สามารถคำนวณหาค่า IC_{50} ได้ โดย D_{W2} มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระได้ดีที่สุด มีค่า IC_{50} เท่ากับ 1.9 ± 0.1 mg/mL และD_W แสดงความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระได้รองลงมา มีค่า IC_{50} เท่ากับ 5.8 ± 0.1 mg/mL จากการเปรียบเทียบฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดกับสารมาตรฐานโทรลอกซ์ที่ความเข้มข้น 25 mg/mL แล้วรายงานในรูป mg โทรลอกซ์โดยสมมูล/g สารสกัด (Trolox equivalent antioxidant capacity) ได้ผลดังตารางที่ 3.8 ซึ่งค่า IC_{50} ของสารสกัดหยาบมีความสัมพันธ์กับค่า Trolox equivalent antioxidant capacity กล่าวคือ สารที่ให้ค่า IC_{50} ต่ำ แสดงถึง ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระที่สูง นั่นคือ มีสารต้านอนุมูลอิสระในปริมาณมาก ค่า Trolox equivalent antioxidant capacity จึงมีค่าสูง

ตารางที่ 3.8 แสดงค่า IC_{50} , %Inhibition และ Trolox equivalent antioxidant capacity ของสารสกัดจากเห็ดฟานสดและแห้ง ที่ความเข้มข้น 25 mg/mL

สารสกัด	%Inhibition ที่ 25 mg/mL	IC_{50} (mg/mL)	Trolox equivalent antioxidant capacity mg โทรลอกซ์โดยสมมูล/g สารสกัด (mg of Trolox equivalents / g of sample)
F_1	78.3 ± 1.0	10.5 ± 1.0	8.3 ± 0.1
F_2	82.0 ± 0.1	9.1 ± 0.1	8.8 ± 0.1
F_D	19.9 ± 2.0	N/A	1.6 ± 0.2
F_M	82.7 ± 1.2	13.7 ± 0.6	8.8 ± 0.2
D_H	21.2 ± 0.5	N/A	1.8 ± 0.1
D_D	18.4 ± 2.0	N/A	1.4 ± 0.2
D_M	29.1 ± 0.03	N/A	2.7 ± 0.004
D_W	24.4 ± 0.8*	5.8 ± 0.1	25.0 ± 0.1
D_{H2}	12.3 ± 1.3	N/A	0.7 ± 0.2
D_{D2}	10.8 ± 1.4	N/A	0.5 ± 0.2
D_{M2}	32.6 ± 2.2	N/A	3.2 ± 0.3
D_{w2}	44.5 ± 1.7*	1.9 ± 0.1	79.2 ± 0.7

หมายเหตุ

* แสดงถึง การคำนวณที่ความเข้มข้น 2 mg/mL

N/A หมายถึง ไม่สามารถหาค่าได้ที่ความเข้มข้นที่กำหนด

IC_{50} คือ ความเข้มข้นต่ำที่สุดของสารตัวอย่างที่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ร้อยละ 50

F_1 คือ สารสกัดหยาบเห็ดฟานสดด้วยเมทานอล F_2 คือ สารสกัดหยาบเห็ดฟานสดด้วยน้ำกลั่น

F_D คือ สารสกัดแยก F_1 ด้วยไดคลอโรมีเทน F_M คือ สารสกัดแยก F_1 ด้วยเมทานอล

D_H คือ สารสกัดหยาบเห็ดฟานแห้งด้วยเฮกเซน D_D คือ สารสกัดหยาบเห็ดฟานแห้งด้วยไดคลอโรมีเทน

D_M คือ สารสกัดหยาบเห็ดฟานแห้งด้วยเมทานอล D_W คือ สารสกัดหยาบเห็ดฟานแห้งด้วยน้ำกลั่น

D_{H2} คือ สารสกัดหยาบเห็ดฟานแห้งด้วยเฮกเซนเพื่อแยกสารองค์ประกอบ

D_{D2} คือ สารสกัดหยาบเห็ดฟานแห้งด้วยไดคลอโรมีเทนเพื่อแยกสารองค์ประกอบ

D_{M2} คือ สารสกัดหยาบเห็ดฟานแห้งด้วยเมทานอลเพื่อแยกสารองค์ประกอบ

D_{W2} คือ สารสกัดหยาบเห็ดฟานแห้งด้วยน้ำกลั่นเพื่อแยกสารองค์ประกอบ

3.3.2 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง

จากการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งของสารสกัดหยาบทั้ง 8 ชนิด ได้แก่ F_1, F_2, F_D, F_M, D_H, D_D, D_M, D_W ที่ความเข้มข้นของสารสกัดหยาบเท่ากับ 500, 250, 125, 62.5 และ 31.25 µg/mL ทดสอบความเป็นพิษกับเซลล์มะเร็งจำนวน 5 ชนิด ได้แก่ เซลล์มะเร็งเต้านม (BT474), เซลล์มะเร็งปอด (Chago-K1), เซลล์มะเร็งตับ (Hep-G2), เซลล์มะเร็งกระเพาะอาหาร (KATO-III) และเซลล์มะเร็งลำไส้ (SW620) แล้วแสดงผลเป็นค่าความเข้มข้นต่ำที่สุดของสารที่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ร้อยละ 50 หรือ ความเข้มข้นของสารที่ทำให้เซลล์มีการรอด 50% (IC_{50}) หากมีค่าน้อย แสดงถึงการมีฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งได้ดี แสดงผลดังตารางที่ 3.9

พิจารณา F_1 พบว่า แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งทั้ง 5 ชนิดต่ำ มีค่า IC_{50} มากกว่า 500 µg/mL ต่อเซลล์มะเร็งเต้านม (BT474), เซลล์มะเร็งปอด (Chago-K1), เซลล์มะเร็งตับ (Hep-G2) และเซลล์มะเร็งกระเพาะอาหาร (KATO-III) โดยมีฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งลำไส้ (SW620) ได้ดีที่สุด ค่า IC_{50} เท่ากับ 250 µg/mL

พิจารณา F_2, F_D, F_M พบว่า แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งทั้ง 5 ชนิดต่ำ มีค่า IC_{50} มากกว่า 500 µg/mL

พิจารณา D_H พบว่า แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งทั้ง 5 ชนิดที่ค่า IC_{50} น้อยกว่า 100 µg/mLโดยแสดงความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเต้านม (BT474) ได้ดีที่สุด มีค่า IC_{50} เท่ากับ 54 µg/mL และแสดงความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งตับ (Hep-G2) เซลล์มะเร็งลำไส้ (SW620) เซลล์มะเร็งปอด (Chago-K1) และเซลล์มะเร็งกระเพาะอาหาร (KATO-III) ได้ลดลง ตามลำดับ

พิจารณา D_D พบว่า แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งที่ค่า IC_{50} น้อยกว่า 100 µg/mL ต่อเซลล์มะเร็งเต้านม (BT474), เซลล์มะเร็งปอด (Chago-K1), เซลล์มะเร็งตับ (Hep-G2) และเซลล์มะเร็งลำไส้ (SW620) มีค่า IC_{50} เท่ากับ 125 µg/mL ต่อเซลล์มะเร็งกระเพาะอาหาร โดย D_D แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งลำไส้ (SW620) ได้ดีที่สุด มีค่า IC_{50} เท่ากับ 62.5 µg/mL

พิจารณา D_M พบว่า แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งตับ (Hep-G2) ได้ดีที่สุด มีค่า IC_{50} เท่ากับ 324 µg/mL และแสดงความเป็นพิษลดลงต่อเซลล์มะเร็งปอด (Chago-K1), เซลล์มะเร็งลำไส้ (SW620), เซลล์มะเร็งเต้านม (BT474) และเซลล์มะเร็งกระเพาะอาหาร (KATO-III) ตามลำดับ โดยเซลล์มะเร็งกระเพาะอาหาร (KATO-III) มีค่า IC_{50} มากกว่า 500 µg/mL

พิจารณา D_W พบว่า แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งตับ (Hep-G2) ได้ดีที่สุด มีค่า IC_{50} เท่ากับ 427 µg/mL และมีค่า IC_{50} มากกว่า 500 µg/mL ต่อเซลล์มะเร็งเต้านม (BT474), เซลล์มะเร็งกระเพาะอาหาร (KATO-III) และเซลล์มะเร็งลำไส้ (SW620)

จากสารสกัดทั้ง 8 ชนิด จะเห็นได้ว่าสารสกัดหยาบเห็ดฟานแห้งด้วยเฮกเซน (D_H) และสารสกัดหยาบเห็ดฟานแห้งด้วยไดคลอโรมีเทน (D_D) แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งที่ทดสอบทั้ง 5 ชนิดได้ดีที่สุด มีค่า IC_{50} น้อยกว่าหรือเท่ากับ 125 µg/mL

ตารางที่ 3.9 แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งของสารสกัดทั้ง 8 ชนิด (IC_{50})

cell line / สาร	IC_{50} (µg/mL)				
	BT474	**Chago-K1**	**Hep-G2**	**KATO-III**	**SW620**
F_1	>500	>500	>500	>500	250
F_2	>500	>500	>500	>500	>500
F_D	>500	>500	>500	>500	>500
F_M	>500	>500	>500	>500	>500
D_H	54	91	68	97	74
D_D	90	88	66	125	62.5
D_M	410	391	324	>500	407
D_W	>500	460	427	>500	>500

หมายเหตุ

F_1 คือ สารสกัดหยาบเห็ดฟานสดด้วยเมทานอล F_2 คือ สารสกัดหยาบเห็ดฟานสดด้วยน้ำกลั่น

F_D คือ สารสกัดแยก F_1 ด้วยไดคลอโรมีเทน F_M คือ สารสกัดแยก F_1 ด้วยเมทานอล

D_H คือ สารสกัดหยาบเห็ดฟานแห้งด้วยเฮกเซน D_D คือ สารสกัดหยาบเห็ดฟานแห้งด้วยไดคลอโรมีเทน

D_M คือ สารสกัดหยาบเห็ดฟานแห้งด้วยเมทานอล D_W คือ สารสกัดหยาบเห็ดฟานแห้งด้วยน้ำกลั่น

BT474 คือ เซลล์มะเร็งเต้านม Chago-K1 คือ เซลล์มะเร็งปอด

Hep-G2 คือ เซลล์มะเร็งตับ KATO-III คือ เซลล์มะเร็งกระเพาะอาหาร

SW620 คือ เซลล์มะเร็งลำไส้

IC_{50} คือ ค่าความเข้มข้นต่ำที่สุดของสารที่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ร้อยละ 50

3.3.3 ผลการทดสอบการยับยั้งไลเปสตับอ่อน (pancreatic lipase)

เมื่อนำสารสกัดจากเห็ดฟานสดและแห้งทั้งหมด 12 ชนิด ประกอบด้วย F_1, F_2, F_D, F_W, D_H, D_D, D_M, D_W, D_{H2}, D_{D2}, D_{M2} และ D_{W2} มาทดสอบความสามารถในการยับยั้งไลเปสตับอ่อน ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 3.10 พบว่า มีสารสกัดเพียง 2 ชนิดที่มีฤทธิ์ยับยั้งไลเปสตับอ่อนที่ความเข้มข้น 25 mg/mL คือ F_2 แสดงค่าเปอร์เซ็นต์ในการยับยั้งไลเปสตับอ่อน เท่ากับ 51.8 ± 9.4 % และ D_H แสดงค่าเปอร์เซ็นต์ในการยับยั้งไลเปสตับอ่อน เท่ากับ 39.7 ± 6.7 % สารสกัดชนิดอื่น ๆ ให้ค่าการดูดกลืนแสงมาก เนื่องจากไม่มีสารที่สามารถยับยั้งการทำงานของไลเปสตับอ่อนได้ ทำให้ไลเปสตับอ่อนยังคงสามารถไฮโดรไลซิส p-nitrophenyl palmitate (pNPP) ซึ่งเป็นสารละลายใสไม่มีสี เป็น p-nitrophenol ซึ่งมีสีเหลืองได้ นอกจากนี้ผลการทดสอบยังยั้งไลเปสตับอ่อนไม่สอดคล้องกับปริมาณฟีนอลรวมของสารสกัดที่ได้รายงานไปก่อนหน้านี้ ดังตารางที่ 3.6 ซึ่งสารประกอบฟีนอลิกสามารถยับยั้งการทำงานของไลเปสตับอ่อนได้ พิจารณาสาร F_M , D_W ,D_{W2} ซึ่งมีปริมาณ mg กรดแกลลิคโดยสมมูล/g สารสกัด ในปริมาณที่สูงกว่า F_2 และ D_H แต่ไม่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งไลเปสตับอ่อนที่ความเข้มข้น 25 mg/mL อาจเป็นเพราะสารสกัดหยาบ F_2 และ D_H มีสารองค์ประกอบชนิดอื่นที่สามารถยับยั้งไลเปสตับอ่อนได้

ตารางที่ 3.10 การยับยั้งไลเปสตับอ่อนของสารสกัดจากเห็ดฟานที่ความเข้มข้น 25 mg/mL

สารสกัด	เปอร์เซ็นต์การยับยั้งไลเปสตับอ่อน
F_1	N/A
F_2	51.8 ± 9.4
F_D	N/A
F_M	N/A
D_H	39.7 ± 6.7
D_D	N/A
D_M	N/A
D_W	N/A
D_{H2}	N/A
D_{D2}	N/A
D_{M2}	N/A
D_{W2}	N/A

หมายเหตุ

N/A หมายถึง ไม่สามารถหาค่าได้

F_1 คือ สารสกัดหยาบเห็ดฟานสดด้วยเมทานอล F_2 คือ สารสกัดหยาบเห็ดฟานสดด้วยน้ำกลั่น

F_D คือ สารสกัดแยก F_1 ด้วยไดคลอโรมีเทน F_M คือ สารสกัดแยก F_1 ด้วยเมทานอล

D_H คือ สารสกัดหยาบเห็ดฟานแห้งด้วยเฮกเซน D_D คือ สารสกัดหยาบเห็ดฟานแห้งด้วยไดคลอโรมีเทน

D_M คือ สารสกัดหยาบเห็ดฟานแห้งด้วยเมทานอล D_W คือ สารสกัดหยาบเห็ดฟานแห้งด้วยน้ำกลั่น

D_{H2} คือ สารสกัดหยาบเห็ดฟานแห้งด้วยเฮกเซนเพื่อแยกสารองค์ประกอบ

D_{D2} คือ สารสกัดหยาบเห็ดฟานแห้งด้วยไดคลอโรมีเทนเพื่อแยกสารองค์ประกอบ

D_{M2} คือ สารสกัดหยาบเห็ดฟานแห้งด้วยเมทานอลเพื่อแยกสารองค์ประกอบ

D_{W2} คือ สารสกัดหยาบเห็ดฟานแห้งด้วยน้ำกลั่นเพื่อแยกสารองค์ประกอบ

บทที่ 4

สรุปผลการทดลอง

4.1 สรุปผลการทดลอง

งานวิจัยนี้สกัดเห็ดฟาน 2 แบบ คือ การสกัดสารจากเห็ดฟานสดและการสกัดจากเห็ดฟานแห้ง พบว่าความชื้นในเห็ดมีผลทำให้สารองค์ประกอบบางชนิดในเห็ดฟานไม่สามารถสกัดออกมาได้ดีมากนัก ทำให้การสกัดเห็ดฟานแห้งให้ร้อยละสารที่สกัดได้ทั้งหมดมากกว่าการสกัดด้วยเห็ดฟานสด โดยตัวทำละลายที่มีสภาพขั้วสูงสามารถสกัดสารองค์ประกอบในเห็ดฟานได้ปริมาณมากกว่าตัวทำละลายที่มีสภาพขั้วต่ำ จากการวิเคราะห์ด้วย ^{1}H-NMR และ ^{13}C-NMR พบว่าสารสกัดหยาบเห็ดฟานแห้งด้วยเฮกเซน (D_{H2}) และไดคลอโรมีเทน (D_{D2}) มีโอลิโกไอโซพรีน และไขมันในรูปไตรกลีเซอไรด์และกรดไขมันเป็นองค์ประกอบ สารสกัดหยาบเห็ดฟานแห้งด้วยเมทานอล (D_{M2}) และน้ำกลั่น (D_{W2}) ประกอบด้วยแซ็กคาไรด์ เทอร์พีนอยด์และสารประกอบฟีนอลิก จากการแยกสารองค์ประกอบของสารสกัดหยาบเห็ดฟานแห้งด้วยไดคลอโรมีเทน (D_{D2}) ด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟีและวิเคราะห์ด้วย ^{1}H-NMR พบว่าสารสกัดหยาบเห็ดฟานแห้งด้วยไดคลอโรมีเทน (D_{D2}) มีองค์ประกอบหลักเป็นโอลิโกไอโซพรีนที่มีขนาดแตกต่างกันและมีสารอื่น ๆ ซึ่งมีปริมาณน้อยปะปนด้วย จากการทดสอบการออกฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดที่ได้ พบว่า เห็ดฟานแห้งมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเซลล์มะเร็งได้ดีกว่าเห็ดฟานสด โดยสารสกัดจากเห็ดฟานแห้งด้วยเฮกเซนและไดคลอโรมีเทนสามารถยับยั้งเซลล์มะเร็งได้ดี มีค่า IC_{50} ในช่วง 54-125 µg/mL สามารถยับยั้งเซลล์มะเร็งเต้านมและเซลล์มะเร็งตับได้ดีที่สุด ตามลำดับ แต่สารสกัดจากเห็ดฟานสดมีประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระได้ดีว่าสารสกัดจากเห็ดฟานแห้ง โดยสารสกัดจากตัวทำละลายที่มีสภาพขั้วสูงกว่า มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระได้ดีกว่า ซึ่งสอดคล้องกับปริมาณฟีนอลรวม คือ สารสกัดจากเห็ดฟานสดมีปริมาณฟีนอลรวมสูงกว่าสารสกัดจากเห็ดฟานแห้งและตัวทำละลายที่มีสภาพขั้วสูงกว่ามีปริมาณฟีนอลรวมมากกว่า ซึ่งสารสกัดหยาบจากเห็ดฟานสดด้วยน้ำกลั่น (F_2) มี % inhibition ที่ 25 mg/mL มากถึง 82.0 ± 0.1% แสดงค่า mg โทรลอกซ์โดยสมมูล/g สารสกัด เท่ากับ 8.8 ± 0.1 และมีปริมาณฟีนอลรวมสูง เท่ากับ 65.1 ± 1.7 mg กรดแกลลิคโดยสมมูล/g สารสกัด ทั้งนี้สารสกัดเห็ดฟานสดและแห้งส่วนใหญ่ไม่มีฤทธิ์ยับยั้งไลเปสตับอ่อนที่ความเข้มข้นน้อยกว่าและเท่ากับ 25 mg/mL จากการวิเคราะห์สารสกัดจากเห็ดฟานแห้ง พบว่า แสดงปริมาณคาร์โบไฮเดรตรวมในช่วง 115-335 mg กลูโคสโดยสมมูล/g สารสกัด โดยมีปริมาณคาร์โบไฮเดรตรวมสูงที่สุดในตัวทำละลายเมทานอล

4.2 การพัฒนางานวิจัยในอนาคต

เนื่องจากงานวิจัยชิ้นนี้ เป็นการศึกษากลุ่มสารในสารสกัดเห็ดฟานสดและแห้งที่แสดงความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ ต้านมะเร็งและยับยั้งไลเปสตับอ่อน ในอนาคตควรจะแยกสารบริสุทธิ์ของสารสกัดแต่ละชนิด เพื่อนำไปทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ เพื่อระบุสารบริสุทธิ์จากเห็ดฟานที่สามารถต้านอนุมูลอิสระ ต้านมะเร็งและยับยั้งไลเปสตับอ่อนได้

เอกสารอ้างอิง

1. World health Organization. *World health statistics 2018: monitoring health for the SDGs, sustainable development goals;* Luxembourg, 2018.
2. คณะกรรมการแผ่นพับเพื่อการประชาสัมพันธ์ คณะเวชศาสตร์เขตร้อน มหาวิทยาลัยมหิดล และ กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข, แอนติออกซิแดนท์ วิตามิน, โรงพยาบาลเวชศาสตร์เขตร้อน, 2546.
3. สงบ เสริมนา, เนตรทิพย์ ทิพย์บุตร, ปิยมณฑ์ เชาว์จตุพัฒน์, เจนจิรา แก้วยศ และ กรรณิการ์ บุญรอดสำราญ, ทะเบียนมะเร็งระดับโรงพยาบาล พ.ศ. 2560, บริษัท พรทรัพย์การพิมพ์ จำกัด, กรุงเทพฯ, 2561.
4. คณะทำงานสุขภาพคนไทย, สุขภาพคนไทย 2557: ชุมชนท้องถิ่นจัดการตนเอง สู่การปฏิรูปประเทศจากฐานราก, บริษัท อมรินทร์พริ้นติ้งแอนด์พับลิชชิ่ง จำกัด(มหาชน), กรุงเทพ, 2557.
5. Heleno, S.A.; Barros, L.; Martins, A.; Morales, P.; Fernández-Ruiz, V.; Glamoclija, J.; Sokovic, M.; Ferreira, I. C.F.R. Nutritional value, bioactive compounds, antimicrobial activity and bioaccessibility studies with wild edible mushrooms. LWT - *Food Science and Technology*, **2015**, *63*, 799-806.
6. Barros, L.; Ferreira, M.; Queirós, B.; Ferreira, I. C.F.R.; Baptista, P. Total phenols, ascorbic acid, b-carotene and lycopene in Portuguese wild edible mushrooms and their antioxidant activities. *Food Chemistry*, **2007**, *103*, 413-419.
7. Srikram, A.; Supapvanich, S. Proximate compositions and bioactive compounds of edible wild and cultivated mushrooms from Northeast Thailand. *Agriculture and Natural Resources*, **2016**, *50*, 432-436.
8. Sánchez, C. Reactive oxygen species and antioxidant properties from mushrooms. *Synthetic and Systems Biotechnology*, **2017**, *2*, 13-22.
9. Joshi, S.; Vishwakarma, M. P.; Mahar, R.; Bhatt, R. P. Medicinally important and edible species of genus *Lactarius* from Garhwal Himalaya, India. *Mycosphere*, **2013**, *4*, 714-720.
10. LACTIFLUUS VOLEMUS https://foragerchef.com/lactarius-volemus/ (accessed January 8, 2019)
11. Van de Putte, K.; Nuytinck, J.; Stubbe, D.; Le, H. T.; Verbeken, A. Lactarius volemus sensu lato (Russulales) from northern Thailand: morphological and phylogenetic species concepts explored. *Fungal Diversity*, **2010**, *45*, 99-130.

12. Khan, J.; Sher, H. *Lactifluus volemus*: An addition to the fungi of Pakistan. *International Journal of Agriculture and Biology,* **2016**, *18*, 1095-1097.
13. Keleş, A.; Koca, İ.; Gençcelep, H. Antioxidant properties of wild edible mushrooms. *Journal of Food Processing & Technology*, **2011**, *2*, 130.
14. Özyürek, M.; Bener, M.; Güçlü, K.; Apak, R. Antioxidant/antiradical properties of microwave-assisted extracts of three wild edible mushrooms. *Food Chemistry*, **2014**, *157*, 323–331.
15. Van de Putte, K. Hidden diversity exposed: a case of *Lactifluus volemus* sensu lato. Ph.D. Thesis, The Ghent University, June 2012.
16. Wang, X.; Zhang, J.; Wu, L.; Zhao, Y.; Li, T.; Li, J.; Wang, Y; Liu, H. A mini-review of chemical composition and nutritional value of edible wild-grown mushroom from China. *Food Chemistry*, **2014**, *151*, 279-285.
17. วิภาวรรณ นีละพงษ์, บุษบา ผลโยธิน และ วันเช็ง สิทธิกิจโยธิน, "การสกัดสาระสำคัญจากสมุนไพรไทย: การสกัดด้วยไอน้ำและการสกัดด้วยตัวทำละลาย," *วารสารวิชาการพระจอมเกล้าพระนครเหนือ,* **2561**, *28*(4), 901-910.
18. ธนวิทย์ โพธิ์ศรี, นิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์ สเปกโทรสโคปี," *Materials Characterization*, **2540**
19. Huang, D.; Ou, B.; Prior, R. L. The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays. *Journal of A GricultураL and Food Chemistry,* **2005**, *53*, 1841-1856.
20. Hydroxycinnamic Acid Antioxidants: An Electrochemical Overview. https://www.hindawi.com/journals/bmri/2013/251754/ (accessed February 17, 2019)
21. Mosmann, T. rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, **1983**, *65(*1-2), 55–63.
22. Evie, H. Cytotoxicity of Platinum Anticancer Drugs in Mammalian Cell Lines of Metastatic Cancer. *Honors College Capstone Experience/Thesis Projects*, **2017**, 676.
23. จุลินทร์ สำราญ (*2556*). พยาธิวิทยาของเซลล์และเนื้อเยื่อ (Cellular Pathology) (รายงานการวิจัย), มหาวิทยาลัยนเรศวร.
24. Slanc, P.; Doljak, B.; Mlinarič, A.; Štrukelj, B. Screening of wood damaging fungi and Macrofungi for inhibitors of panancreatic Lipase. *Phytotherapy Research*, **2004**, *18*, 758-762.

25. Lewis, D. R.; Liu, D. J. Direct Measurement of Lipase Inhibition by Orlistat Using a Dissolution Linked in vitro Assay. *Clinical Pharmacology & Biopharmaceutics*, **2012**, *1*(3), 1-3.

26. Ainsworth, A. E.; Gillespie, M. K. Estimation of total phenolic content and other oxidation substrates in plant tissues using Folin–Ciocalteu reagent. *Natural Publishing group,* **2007,** *2*(4), 875-877.

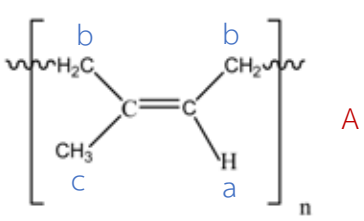
27. Nielsen, S. S. *Food Analysis Laboratory Manual;* Springer Science+Business Media: New York, 1970; pp 47-53.

28. Masuko, T.; Minami, A.; Iwasaki, N.; Majima, T.; Nishimura S.; Lee, C. Y. Carbohydrate analysis by a phenol–sulfuric acid method in microplate format. *Analytical Biochemistry 339*, **2005**, 69-72.

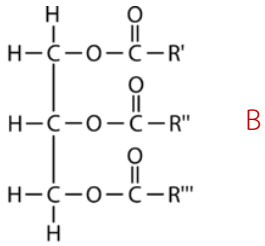
29. Sawangwan, T.; Wansanit W.; Pattani, L.; Noysang, C. Study of prebiotic properties from edible mushroom extraction. *Agriculture and Natural Resources,* **2018**, *52,*519-524.

ภาคผนวก

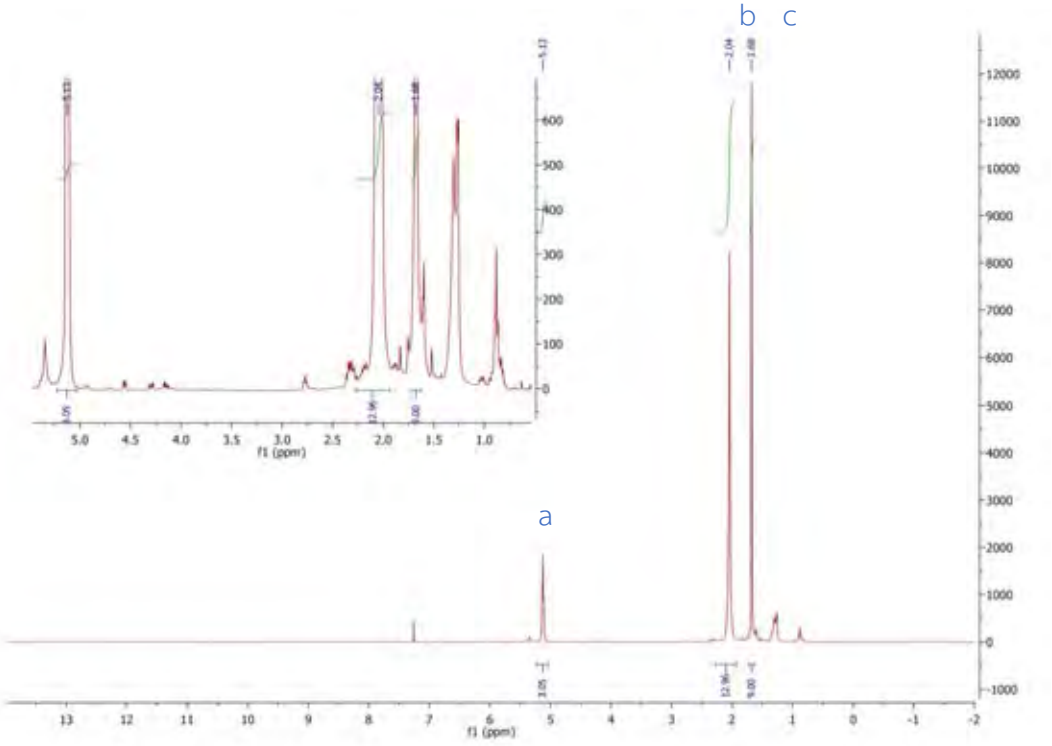
1.การสกัดเห็ดฟาน



A



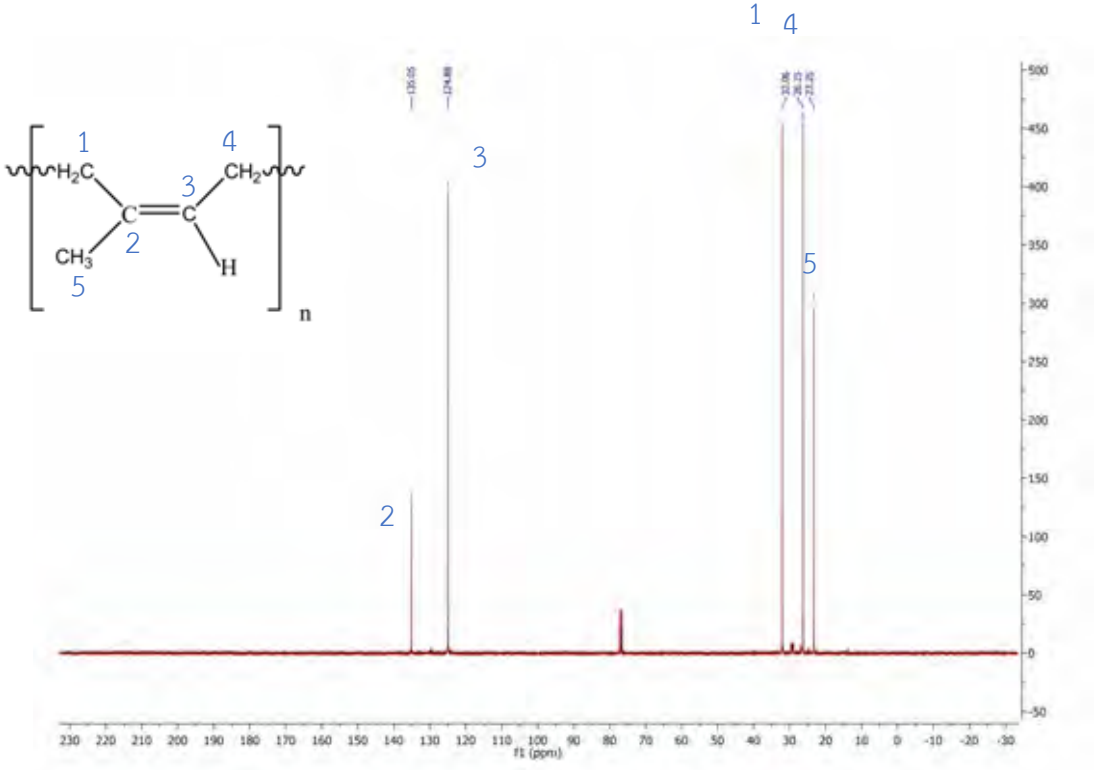
B



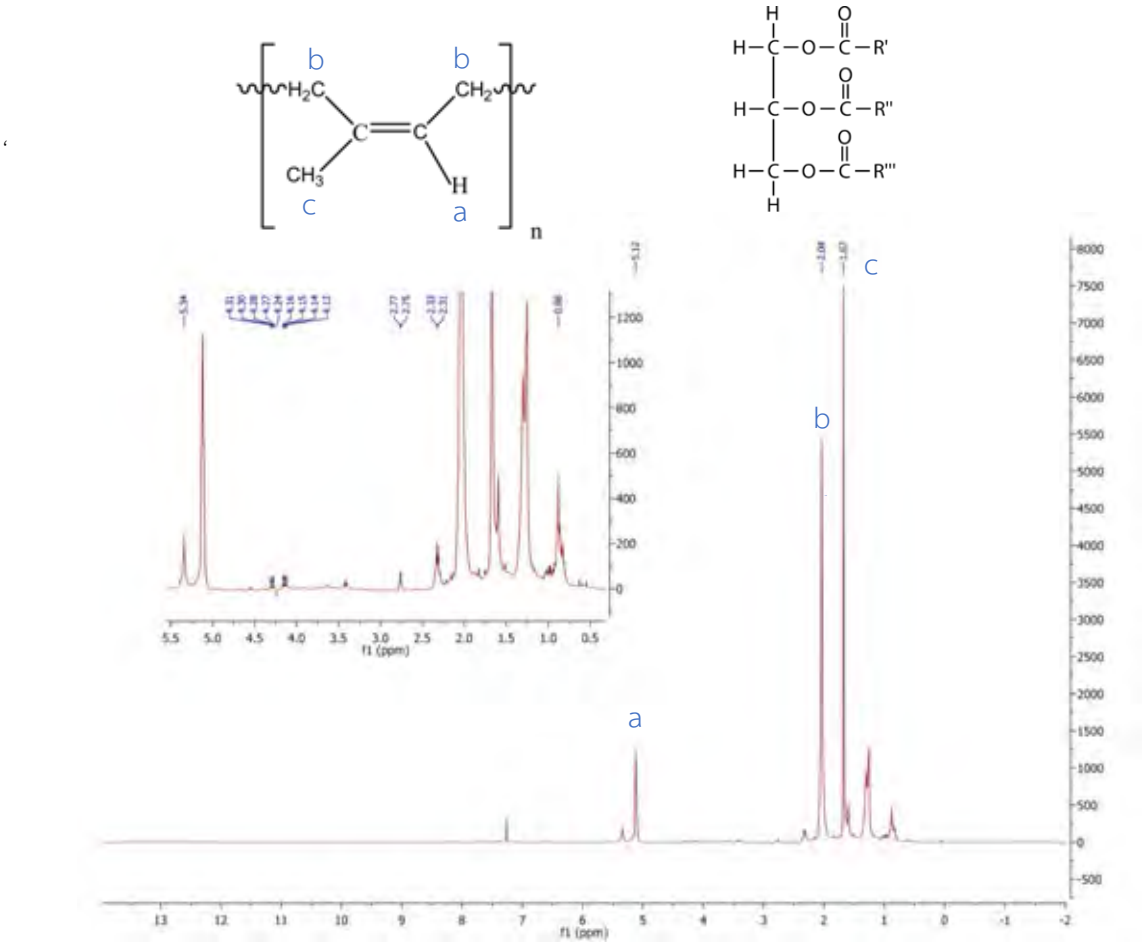
รูปที่ A-1 ^{1}H-NMR spectrum ของสารสกัดหยาบเห็ดฟานแห้งด้วยเฮกเซน (D_{H2}) ใน $CDCl_3$

จะเห็นได้ว่า สัญญาณที่ 1.68, 2.04, 5.13 ppm เป็นโปรตอนบนโครงสร้างของโอลิโกไอโซพรีนที่ตำแหน่ง a,b และ c ดังภาพ โดยโครงสร้าง A เป็นโครงสร้างของโอลิโกไอโซพรีน

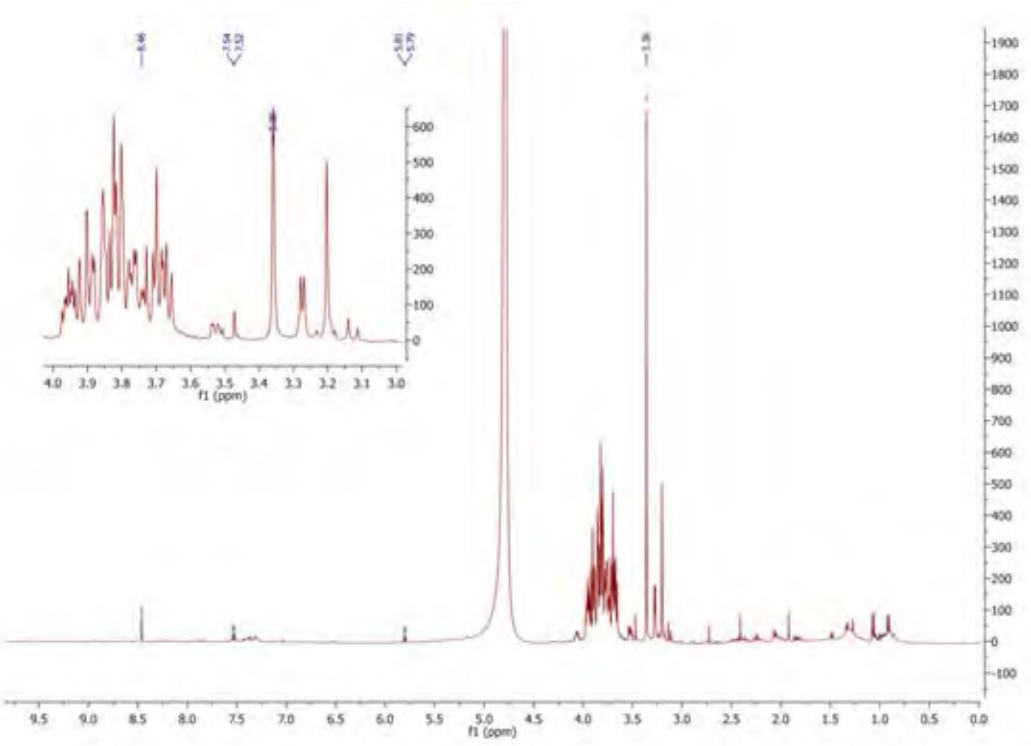
จะเห็นได้ว่า มีสัญญาณโปรตอนของไตรกลีเซอไรด์ (B) ซึ่งมีลักษณะเป็นพีคที่เล็ก ซึ่งได้ขยาย spectrum แสดงสัญญาณโปรตอนของไตรกลีเซอไรด์ ดังรูป spectrum ด้านซ้าย โดยโครงสร้าง B เป็นโครงสร้างของไตรกลีเซอไรด์



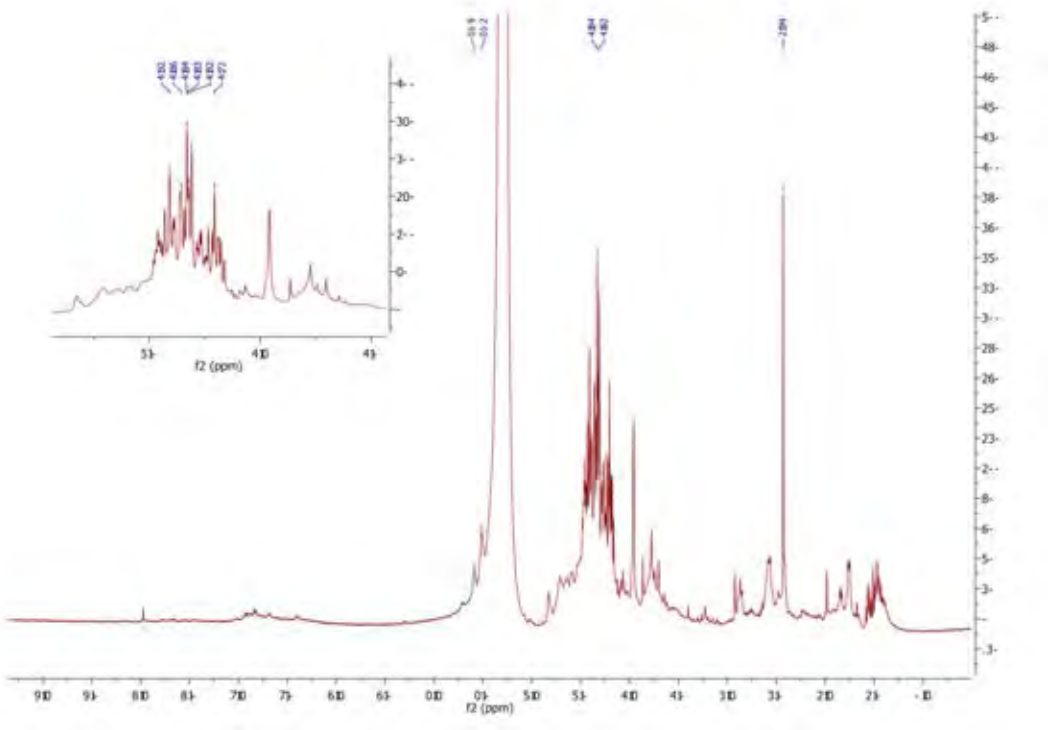
รูปที่ A-2 ^{13}C-NMR spectrum ของสารสกัดหยาบเห็ดฟานแห้งด้วยเฮกเซน (D_{H2}) ใน $CDCl_3$



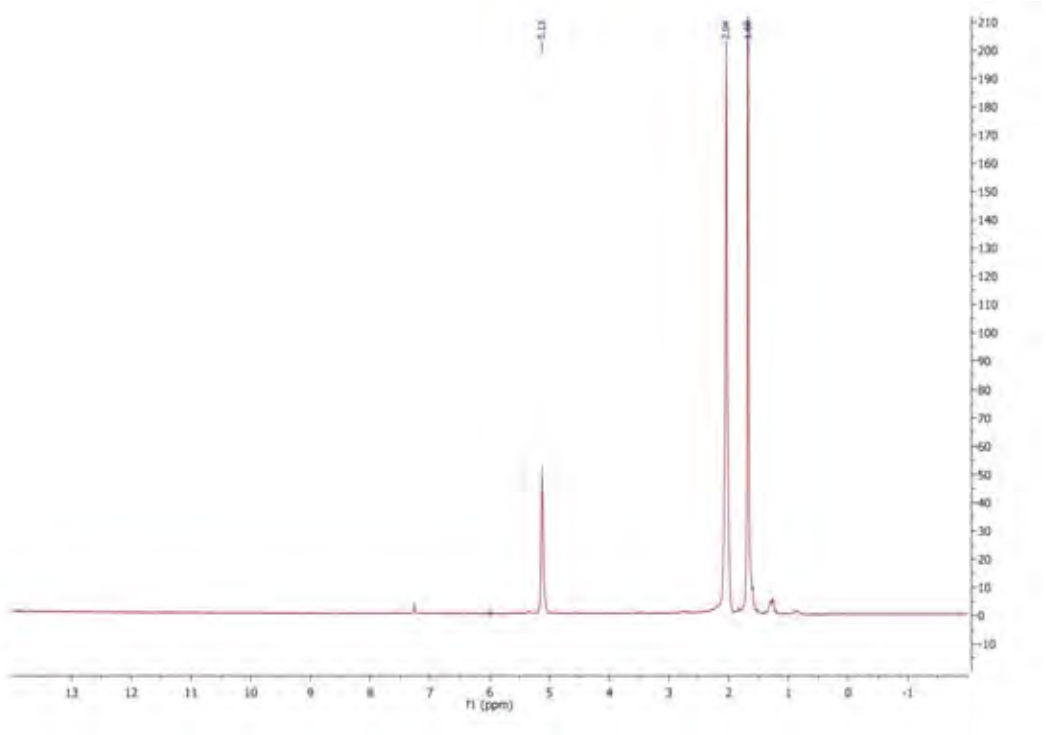
รูปที่ A-3 ^{1}H-NMR spectrum ของสารสกัดหยาบเห็ดฟานแห้งด้วยไดคลอโรมีเทน (D_{D2}) ใน $CDCl_3$



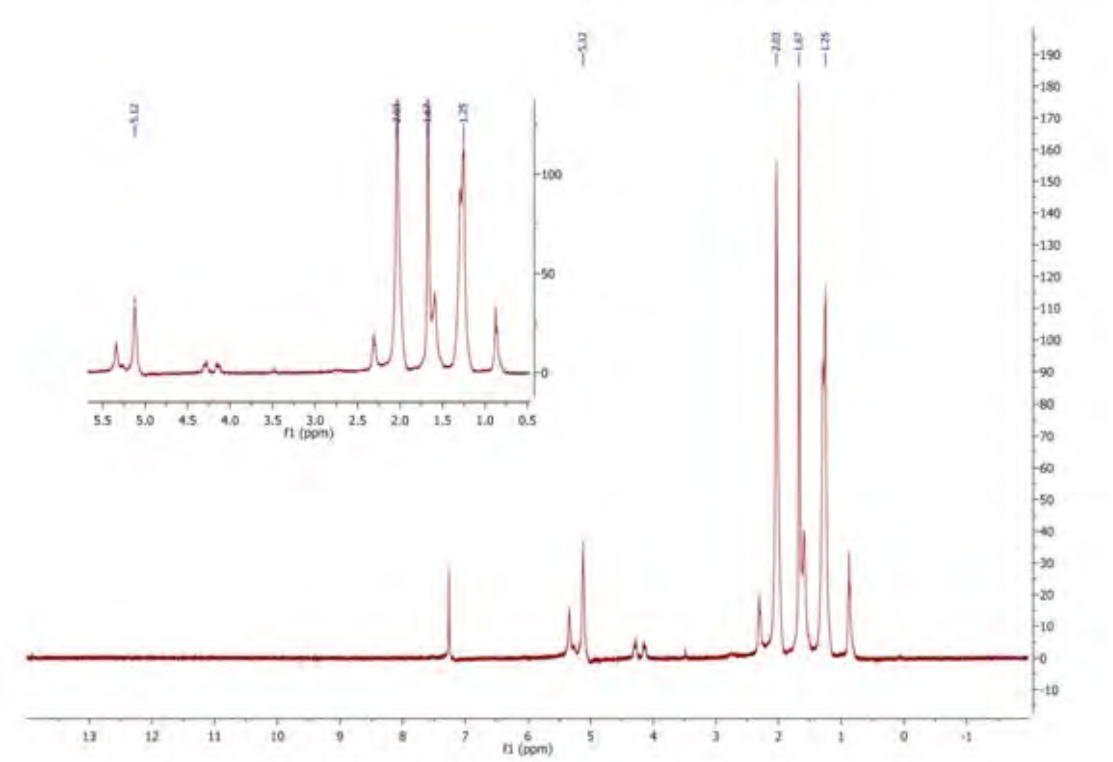
รูปที่ A-4 ^{1}H-NMR spectrum ของสารสกัดหยาบเห็ดฟานแห้งด้วยเมทานอล (D_{M2}) ใน D_2O



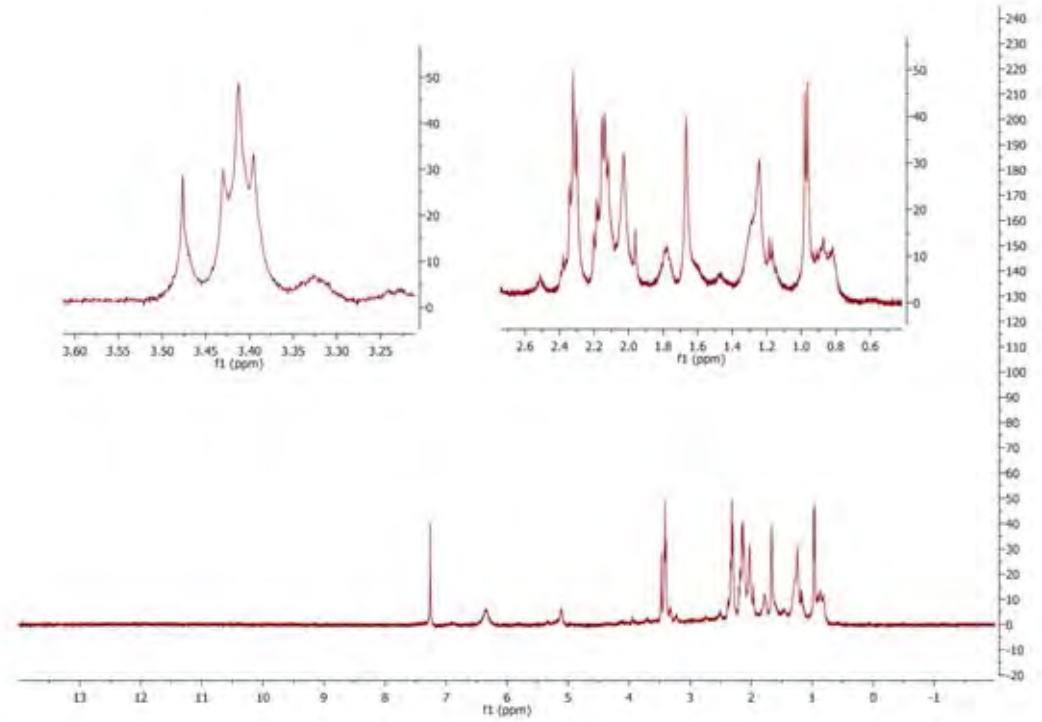
รูปที่ A-5 ^{1}H-NMR spectrum ของสารสกัดหยาบเห็ดฟานแห้งด้วยน้ำกลั่น (D_{W2}) ใน D_2O



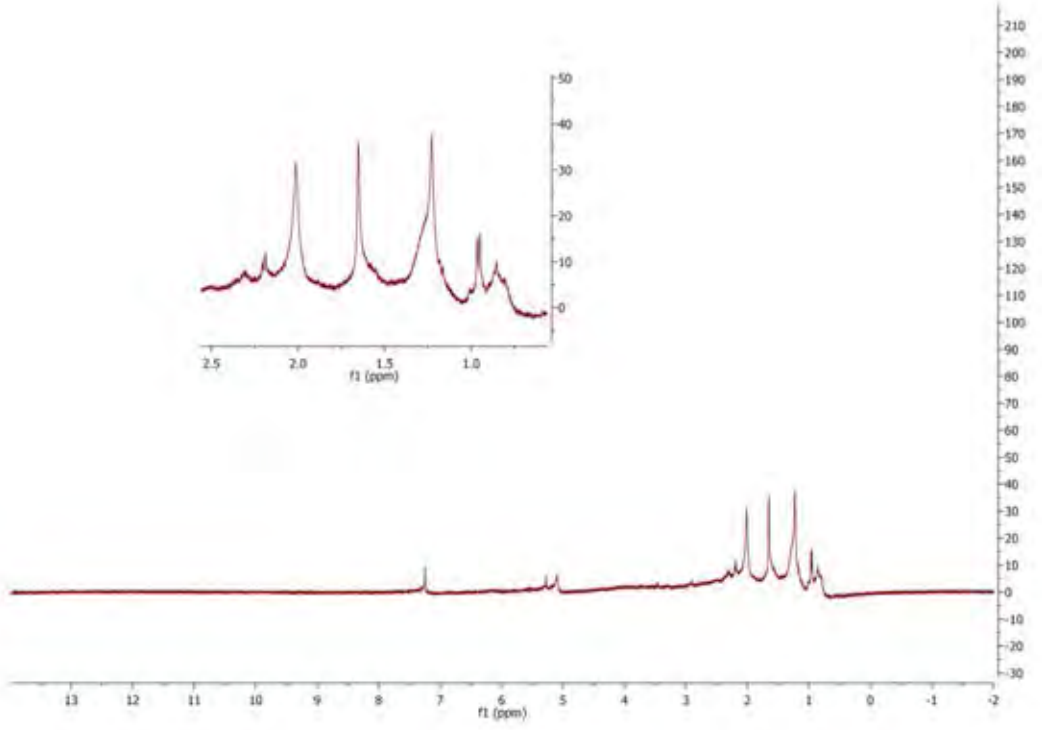
รูปที่ A-6 ^{1}H-NMR spectrum ของ D_{D2} ที่แยกด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี ใน $CDCl_3$ fractionที่ 2



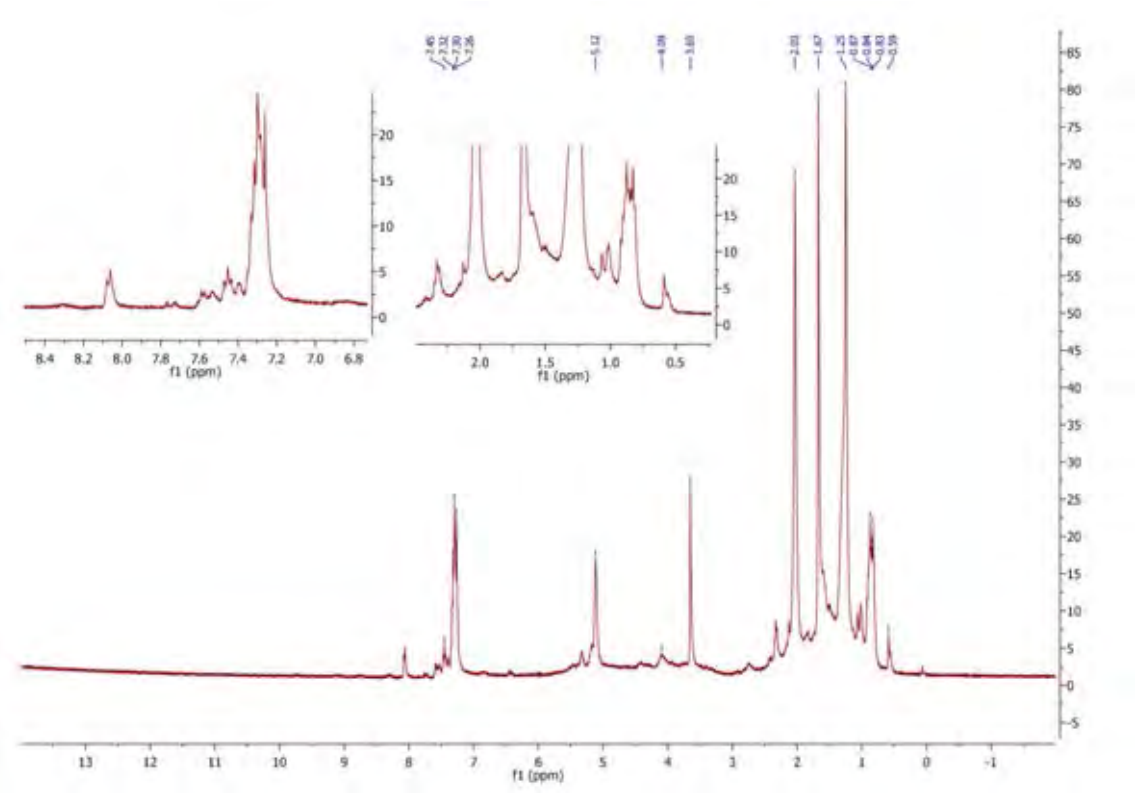
รูปที่ A-7 ^{1}H-NMR spectrum ของ D_{D2} ที่แยกด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี ใน $CDCl_3$ fractionที่ 4



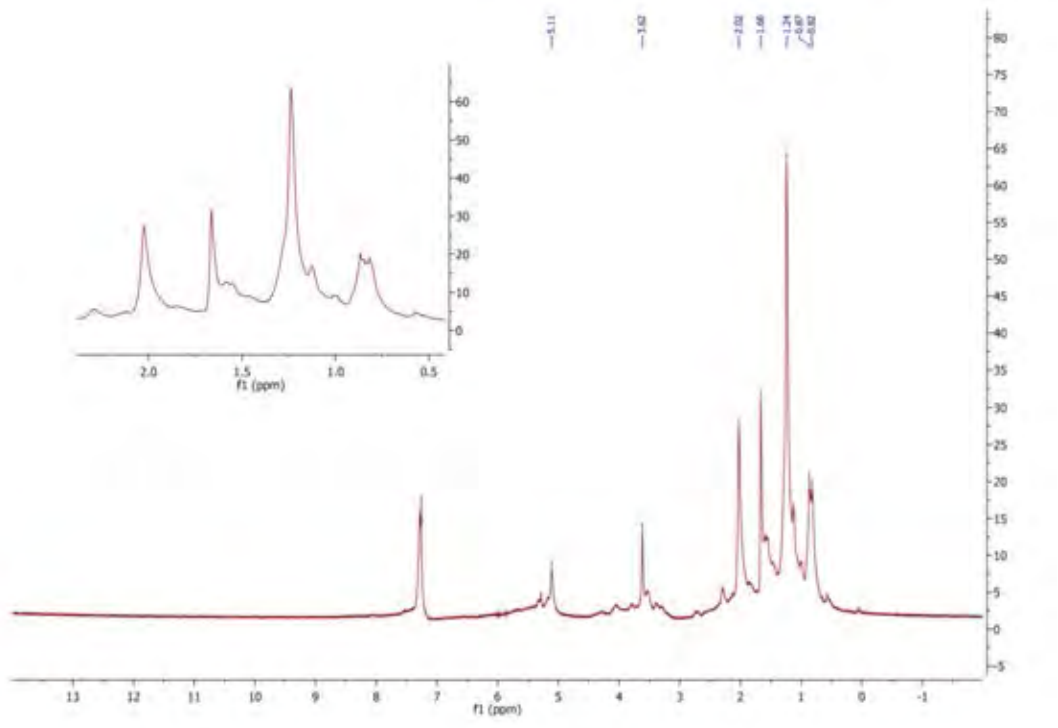
รูปที่ A-8 ^{1}H-NMR spectrum ของ D_{D2} ที่แยกด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี ใน $CDCl_3$ fractionที่ 16



รูปที่ A-9 ^{1}H-NMR spectrum ของ D_{D2} ที่แยกด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี ใน $CDCl_3$ fractionที่ 18



รูปที่ A-10 ^{1}H-NMR spectrum ของ D_{D2} ที่แยกด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี ใน $CDCl_3$ fractionที่ 20



รูปที่ A-11 ^{1}H-NMR spectrum ของ D_{D2} ที่แยกด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี ใน $CDCl_3$ fractionที่ 21

2.การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ

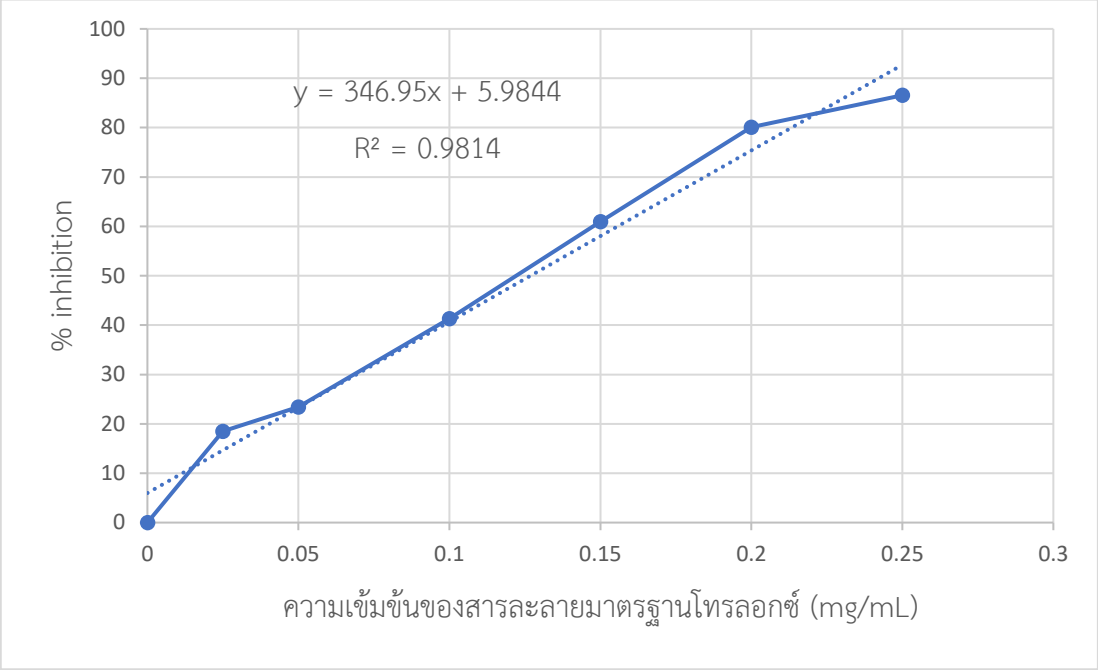
2.1 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical scavenging capacity (DPPH assay)

ตัวอย่างการคำนวณค่า % Inhibition, IC_{50} และ Trolox equivalent ของสารสกัดหยาบเห็ดฟานแห้งด้วยน้ำกลั่น (D_w) ที่ความเข้มข้น 10 mg/mL แสดงดังนี้

ตารางที่ A-1 แสดงค่าการดูดกลืนแสงและ % Inhibition ของสารละลายมาตรฐานโทรลอกซ์ ที่ความเข้มข้น 0.25, 0.20, 0.15, 0.10, 0.05, 0.025 และ 0 mg/mL

ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานโทรลอกซ์ (mg/mL)	0	0.025	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25
ค่าการดูดกลืนแสงที่ 515 nm	0.871	0.643	0.600	0.513	0.336	0.102	0.087
	0.806	0.689	0.648	0.473	0.311	0.21	0.158
	0.792	0.681	0.643	0.463	0.317	0.18	0.087
ค่าเฉลี่ยค่าดูดกลืนแสง	0.823	0.671	0.630	0.483	0.321	0.164	0.111
$\frac{\mathbf{Acontrol - Asample}}{\mathbf{Acontrol}}$	0	0.18469	0.23410	0.41312	0.60956	0.80073	0.86553
% inhibition	0	18.469	23.410	41.312	60.956	80.073	86.553

Plot กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง % inhibition และความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานโทรลอกซ์ แล้วคำนวณหาค่า IC_{50} ของสารละลายมาตรฐานโทรลอกซ์ ดังนี้



รูปที่ A-12 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง %inhibition กับความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานโทรลอกซ์

หา IC_{50} ได้จากสมการ $y = 346.95x + 5.9844$

เมื่อ y คือ %inhibition

x คือ ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานโทรลอกซ์ (mg/mL)

โดยแทนค่า $y = 50$ ลงในสมการ

จะได้ $$x = \frac{(50-5.9844)}{346.95}$$

$x = 0.12686$

ดังนั้น IC_{50} ของสารละลายมาตรฐานโทรลอกซ์ (Trolox) คือ 0.12686 mg/mL

ตารางที่ A-2 แสดงค่าการดูดกลืนแสงและ % Inhibition ของสารสกัดหยาบเห็ดฟานแห้งด้วยน้ำกลั่น D_W ที่ความเข้มข้น 10, 7.5, 5, 2.5 และ 1 mg/mL

D_W									
ความเข้มข้นของสาร (mg/mL)	10		7.5		5		2.5		1
ค่าดูดกลืนแสงของสารที่ 515 nm (A_{sample})	0.399		0.491		0.552		0.634		0.73
	0.324		0.478		0.554		0.658		0.721
	0.367		0.429		0.511		0.607		0.732
ค่าดูดกลืนแสงของ blank ที่ 515 nm (A_{blank})	0.164		0.199		0.2		0.164		0.13
$A_{sample} - A_{blank}$	0.235		0.292		0.352		0.470		0.600
	0.160		0.279		0.354		0.494		0.591
	0.203		0.230		0.311		0.443		0.602
$(A_{[0]}-A)/A_{[0]}$ ($A_0 = 0.701$)	0.665		0.583		0.498		0.330		0.144
	0.772		0.602		0.495		0.295		0.157
	0.710		0.672		0.556		0.368		0.141
$(A_{[0]}-A)/A_{[0]}*100$	66.476		58.345		49.786		32.953		14.408
	77.175		60.200		49.501		29.529		15.692
	71.041		67.190		55.635		36.805		14.123
% inhibition mean	71.564		61.912		51.641		33.096		14.741
Standard curve calculation	0.174	Trolox equivalent (10 mg/mL)		17.435	IC_{50} (Graph calculation)			4.921	
	0.205			20.519				4.840	
	0.188			18.751				4.255	
Final value	18.902 ± 1.263				Final IC_{50}		4.672 ± 0.297		

2.2 การทดสอบการเป็นพิษต่อเซลล์

ตัวอย่างการคำนวณความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งปอด (Chaga-K1) ของสารสกัดหยาบเห็ดแห้งด้วยน้ำกลั่น (D_W)

ตารางที่ A-3 แสดงค่าการดูดกลืนแสงและ Percent of cell survival (PS) ของ D_W ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

สาร	**ความเข้มข้นของ D_W (µg/mL)**	**Chago-K1 (A_{540} nm)**					
		ครั้งที่ 1	**ครั้งที่ 2**	**ครั้งที่ 3**	**ครั้งที่ 4**	**เฉลี่ย**	**PS**
D_W	500	0.220	0.156	0.174	0.161	0.177	45
	250	0.318	0.253	0.257	0.281	0.277	71
	125	0.283	0.288	0.327	0.304	0.301	77
	62.5	0.293	0.293	0.334	0.335	0.314	80
	31.25	0.355	0.328	0.337	0.336	0.339	87
Control		0.344	0.389	0.703	0.167		
	DMSO	0.377	0.371	0.373	0.403	0.391	100
		0.692	0.736	0.705	0.645		
	media	0.766	0.722	0.763	0.735	0.720	

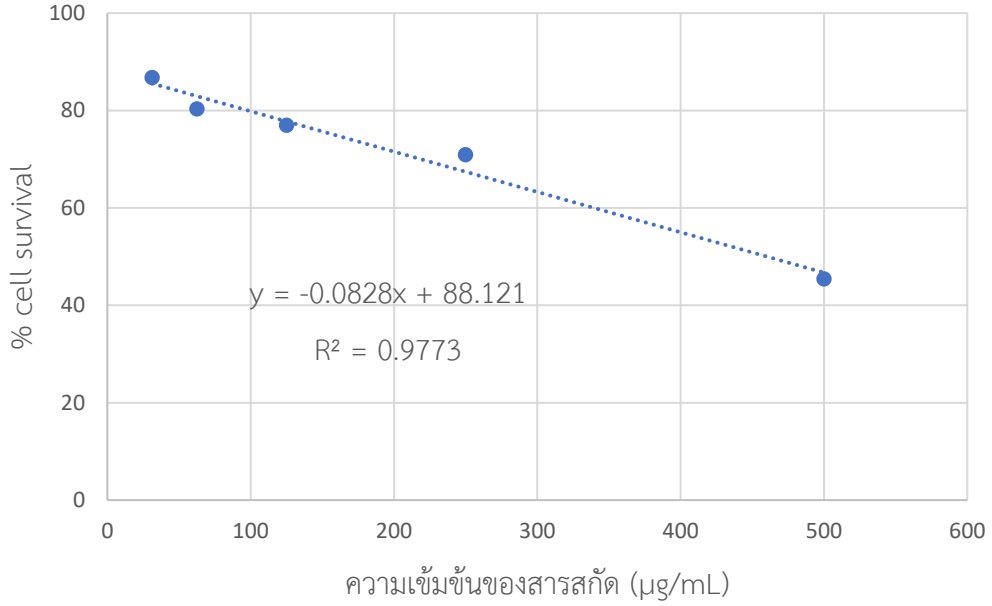
หมายเหตุ

Chaga-K1 คือ เซลล์มะเร็งปอด

D_W คือ สารสกัดหยาบเห็ดแห้งด้วยน้ำกลั่น

PS คือ Percent of cell survival

จากนั้น plot กราฟระหว่างความเข้มข้นของสารสกัดและค่าเปอร์เซ็นต์การรอดของเซลล์ แล้วคำนวณความเข้มข้นต่ำที่สุดของสารสกัดหยาบเห็ดฟานแห้งด้วยน้ำกลั่น (D_W) ที่เป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งปอด (Chaga-K1) ร้อยละ 50 หรือค่า IC_{50} ดังนี้



รูปที่ A-13 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างงเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของเซลล์มะเร็งปอด (% cell survival) เมื่อได้รับสารสกัดเห็ดฟานแห้งด้วยน้ำกลั่น D_W ที่ความเข้มข้น 500, 250, 125, 62.5 และ 31.25 µg/mL

จากกราฟ สมการที่ได้ คือ y = -0.0828x + 88.121

เมื่อ y คือ เปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของเซลล์มะเร็งปอด (Chaga-K1)

x คือ ความเข้มข้นของสารสกัดหยาบเห็ดฟานแห้งด้วยน้ำกลั่น (µg/mL)

แทนค่า y = 50 ลงในสมการ

จะได้ 50 = -0.0828x + 88.121

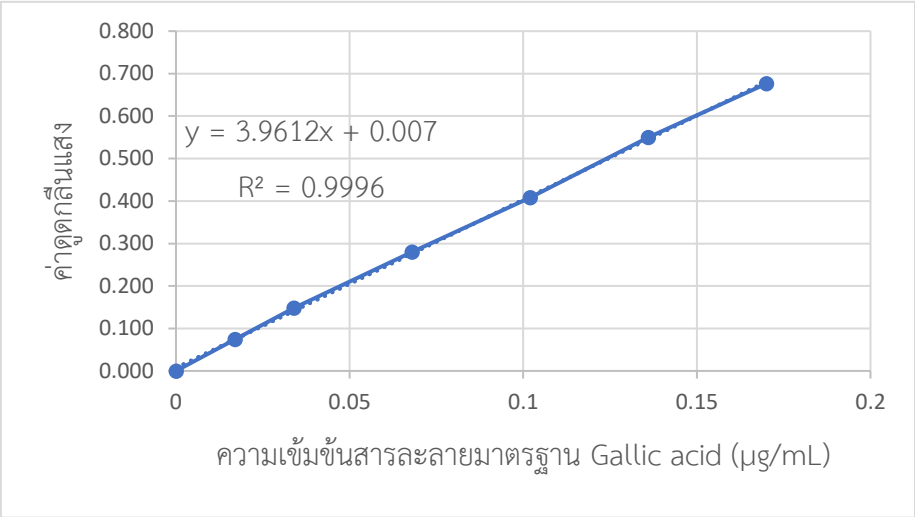
$$x = \frac{\mathbf{50-88.121}}{\mathbf{-0.0828}}$$

x = 460

ดังนั้น ความเข้มข้นต่ำที่สุดของสารสกัดหยาบเห็ดฟานแห้งด้วยน้ำกลั่น D_W ที่เป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งปอด (Chaga-K1) ร้อยละ 50 หรือ ค่า IC_{50} เท่ากับ 460 µg/mL

3.การวิเคราะห์กลุ่มสารองค์ประกอบ

3.1 การหาปริมาณฟีนอลรวม (Total phenolic compound)



รูปที่ A-14 แสดงstandard curve ของสารละลายมาตรฐาน Gallic acid

3.2 การหาปริมาณคาร์โบไฮเดรตรวม (Total carbohydrate)

ตัวอย่างการคำนวณหาปริมาณคาร์โบไฮเดรตรวม (Total carbohydrate) ของสารสกัดเห็ดฟานแห้งด้วยไดคลอโรมีเทน (D_{D2})

ตารางที่ A-4 แสดงค่าการดูดกลืนแสงและความเข้มข้นของสารสกัดเห็ดฟานแห้ง

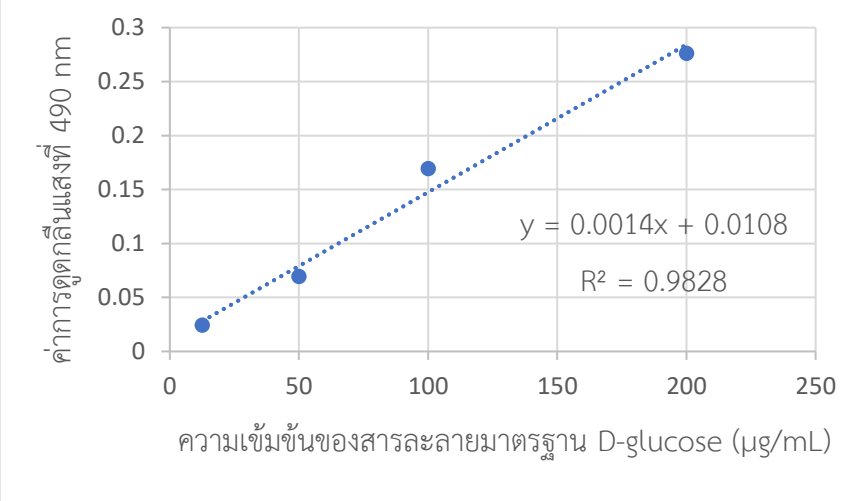
สาร	**ความเข้มข้น(µg/mL)**	**ค่าดูดกลืนแสงที่ 490 nm**
D-glucose	400	0.79153
	200	0.32236
	100	0.21552
	50	0.11559
	25	0.21424
	12.25	0.070588
D_{H2}	200	0.13349
D_{D2}	200	0.13080
D_{M2}	200	0.17901
D_{W2}	200	0.11744
control(H_2O)		0.046310
Control(DMSO)		0.074310

1.หาค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดหยาบเห็ดฟานแห้งด้วยไดคลอโรมีเทน (D_{D2})

$$A_{true} = A_{sample} - A_{control}$$

$$= 0.13080 - 0.074310$$

$$= 0.05649$$



รูปที่ A-15 Standard curve ของสารละลายสารละลายมาตรฐาน D-glucose ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ (µg/mL)

2.หาความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานกลูโคส (D-glucose)

จากกราฟ มีสมการ คือ $y = 0.0014x + 0.0108$

เมื่อ x คือ ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานกลูโคส (D-glucose) (µg/ml)

y คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารตัวอย่าง

แทน $y = 0.05649$ ลงในสมการ

จะได้ $0.05649 = 0.0014x + 0.0108$

$$x = \frac{0.05649 - 0.0108}{0.0014}$$

$$x = 32.64$$

ดังนั้น ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานกลูโคส (D-glucose) คือ 32.64 µg/mL หรือ 0.03264 mg/mL

3.หาปริมาณคาร์โบไฮเดรตรวม (Total carbohydrate) ในรูป mg of glucose equivalents / g crude ดังนี้

$$\text{mg of glucose equivalents / (g) extract} = \frac{\text{CGlucose (mg/mL)} \times \text{DF} \times \text{VSolvent(mL))}}{\text{MExtract (g)}}$$

เมื่อ $C_{Glucose}$ = ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานกลูโคส (Glucose)

DF (Dilution factor) = ค่าจากการเจือจางสารละลายตัวอย่าง

$V_{Solvent}$ = ปริมาตรของตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัด (mL)

$M_{Extract}$ = น้ำหนักของสารสกัด (g)

แทนค่า $C_{Glucose}$ = 0.03264 mg/mL จะได้

$$\text{mg of glucose equivalents / (g) extract} = \frac{\mathbf{CGlucose\ (mg/mL) \times DF\ \times VSolvent(mL))}}{\mathbf{MExtract\ (g)}}$$

$$= \frac{\mathbf{0.03264\ mg/mL \times 1 \times 10\ mL}}{\mathbf{0.002g}}$$

= 163.20 mg of glucose equivalents / gram of the D_{D2}

ดังนั้น ปริมาณคาร์โบไฮเดรตรวม (Total carbohydrate) เท่ากับ 163.20 mg กลูโคสโดยสมมูล/g สารสกัด

ประวัติผู้วิจัย

นางสาวสุกัญญา นพภา เกิดเมื่อวันที่ 7 เดือนสิงหาคม พ.ศ.2538 ที่จังหวัดสุราษฎร์ธานี สำเร็จการศึกษาชั้นมัธยมศึกษาตอนปลายจากโรงเรียนสุราษฎร์พิทยา จังหวัดสุราษฎร์ธานี เมื่อปีการศึกษา 2556 เข้าศึกษาต่อในหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อปีการศึกษา 2558 ที่อยู่ที่สามารถติดต่อได้ บ้านเลขที่ 37/8 หมู่ที่ 1 ตำบลพะแสง อำเภอบ้านตาขุน จังหวัดสุราษฎร์ธานี รหัสไปรษณีย์ 84230 อีเมล sukanyanp@hotmail.com