ปัญหาพิเศษ

การศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบพอลิแซ็กคาไรด์จากเส้นใยของเชื้อเห็ดตับเต่า

Study on Antioxidant Activity of Crude Polysaccharides from Mycelia of *Boletus colossus Heim.*

นางสาวพรพิมล กิจวิชา

โครงการจัดตั้งภาควิชาเคมี คณะศิลปศาสตร์และวิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
พ.ศ. 2558

ตัวอย่างตัวเล่มปัญหาพิเศษ *(ดัดแปลงจากเนื้อหาจริง)*

ใบรับรองปัญหาพิเศษ

โครงการจัดตั้งสายวิชาเคมี คณะศิลปศาสตร์และวิทยาศาสตร์

มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยาศาสตรบัณฑิต

ปริญญา

เคมี	โครงการจัดตั้งภาควิชาเคมี
สาขา	**ภาควิชา**

เรื่อง การศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบพอลิแซ็กคาไรด์จากเส้นใยของเชื้อเห็ดตับเต่า

Study on Antioxidant Activity of Crude Polysaccharides from Mycelia of *Boletus colossus Heim.*

นามผู้วิจัย นางสาวพรพิมล กิจวิชา

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

ประธานกรรมการ .....

(อาจารย์วันเพ็ญ เหล่าศรีไพบูลย์, Ph.D.)

กรรมการ .....

(อาจารย์นงพงา จรัสโสภณ, ปร.ด.)

โครงการจัดตั้งสายวิชาเคมี คณะศิลปศาสตร์และวิทยาศาสตร์

มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

.....

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ฐิติยา แซ่ปัง, Ph.D.)

ประธานคณะกรรมการดำเนินงานโครงการจัดตั้งสายวิชาเคมี

วันที่.....เดือน.....พ.ศ.....

ตัวอย่างตัวเล่มปัญหาพิเศษ *(ดัดแปลงจากเนื้อหาจริง)*

ปัญหาพิเศษ

เรื่อง

การศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบพอลิแซ็กคาไรด์จากเส้นใยของเชื้อเห็ดตับเต่า

Study on Antioxidant Activity of Crude Polysaccharides from Mycelia of *Boletus colossus Heim.*

โดย

นางสาวพรพิมล กิจวิชา

เสนอ

โครงการจัดตั้งสายวิชาเคมีคณะศิลปศาสตร์และวิทยาศาสตร์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาบัตรวิทยาศาสตรบัณฑิต (เคมี)
พ.ศ. 2558

ตัวอย่างตัวเล่มปัญหาพิเศษ *(ดัดแปลงจากเนื้อหาจริง)*

พรพิมล กิจวิชา 2558: การศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบพอลิแซ็กคาไรด์จากเส้นใยของเชื้อเห็ดตับเต่าปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (เคมี) โครงการจัดตั้ง ภาควิชาเคมี ประธานกรรมการที่ปรึกษา: อาจารย์วันเพ็ญ เหล่าศรีไพบูลย์, Ph.D. 56 หน้า

สรุปเนื้อหาของปัญหาพิเศษ ว่าทำอะไร มีจุดประสงค์อะไร ด้วยวิธีอะไร ได้ผลอย่างไร ใน 1 ย่อหน้า (ไม่ควรมีรูป ตาราง หรือการอ้างอิง)

การศึกษาสารสกัดหยาบจากเส้นใยเชื้อเห็ดตับเต่าเพื่อใช้เป็นสารต้านอนุมูลอิสระ โดยสกัดเส้นใยเชื้อเห็ดตับเต่าด้วยโดยการสกัดเย็นด้วยวิธีการหมักและการสกัดร้อนด้วยวิธีการกลั่นแบบไหลกลับจากนั้นนำมาตกตะกอนพอลิแซ็กคาไรด์ด้วย 95% เอทานอล สารสกัดที่ได้แยกได้เป็น 4 ประเภท คือ พอลิแซ็กคาไรด์สกัดเย็น น้ำสกัดเย็น พอลิแซ็กคาไรด์สกัดร้อน และน้ำสกัดร้อน จากนั้นทดสอบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH radical scavenging capacity และวิธี Reducing power ผลการทดสอบพบว่าจากน้ำสกัดร้อนมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระได้ดีที่สุด (IC_{50} = 85.59 μg/mL) และมีความสามารถในการเป็นตัวรีดิวซ์ได้ดีที่สุด จากการวิเคราะห์โครงสร้างสารโดยวิธีฟูเรียร์ทรานฟอร์มอินฟราเรดสเปกโทรสโกปี พบว่า สารสกัดทั้ง 4 ส่วน เป็นสารประกอบพอลิแซ็กคาไรด์ ที่มีทั้ง α-configuration และ β-configuration ซึ่งจากผลการทดลองนี้สรุปได้ว่าสารสกัดจากเส้นใยเชื้อเห็ดตับเต่ามีศักยภาพในการใช้เป็นสารต้านอนุมูลอิสระจากธรรมชาติได้

---------- ---------- ------/------/------

ลายมือชื่อนิสิต ลายมือชื่อประธานกรรมการ

Pornpimol Kitwicha 2015: Study on Antioxidant Activity of Crude Polysaccharides from Mycelia of Boletus colossus Heim., Bachelor of Science (Chemistry), Department of Chemistry. Special Problem Advisor: Ms. Wanpen Laosripaiboon, Ph.D. 56 p.

This study was to investigate the inhibitory effect of crude extracts from *Boletus colossus* Heim. on antioxidant activity. The mycelia of *Boletus colossus* Heim. was extracted with deionized water. Two methods of extractions: cold extraction by maceration and hot extraction by reflux were carried out. Polysaccharides were precipitated from the aqueous solution by 95% ethanol. There were four fractions of crude extracts: cold water polysaccharide extract, cold water extract, hot water polysaccharide extract and hot water extract. DPPH radical scavenging capacity assay and the reducing power assay had been used to evaluate the antioxidant activities. Hot water extract showed the highest activity of DPPH inhibition (with IC_{50}85.59 μg/mL)and reducing power. Analysis of these extracts by FT-IR showed the spectra of polysaccharide compounds in α and β-configurations. Therefore, these results indicated that all crude extracts from *B. colossum* Heim. mycelia could potentially be used as natural antioxidants.

---------- ---------- ------/------/------

Student's signature Advisor's signature

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณอาจารย์วันเพ็ญ เหล่าศรีไพบูลย์ อาจารย์ที่ปรึกษาปัญหาพิเศษที่กรุณาให้ความรู้ คำแนะนำ คำปรึกษา ตลอดระยะเวลาในการทำปัญหาพิเศษครั้งนี้ และขอบพระคุณคณะกรรมการปัญหาพิเศษและคณาจารย์ทุกท่านที่ให้คำแนะนำในการแก้ไขรายงานปัญหาพิเศษ

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่โครงการจัดตั้งภาควิชาเคมี คณะศิลปศาสตร์และวิทยาศาสตร์ทุกท่านที่ให้ความช่วยเหลือในเรื่องของอุปกรณ์การทดลอง สารเคมี และเครื่องมือต่างๆ

ขอขอบคุณเพื่อนๆ ทุกท่านที่ให้ความช่วยเหลือ ให้คำปรึกษา และคอยเป็นกำลังใจให้ในการการทำปัญหาพิเศษ

ท้ายสุดขอขอบคุณบิดา มารดา ที่คอยให้กำลังใจ และช่วยเหลือสนับสนุนในการศึกษาเป็นอย่างดีตลอดมา

พรพิมล กิจวิชา

พฤษภาคม2558

สารบัญ

หน้า

สารบัญ	i
สารบัญตาราง	ii
สารบัญภาพ	iii
คำอธิบายสัญลักษณ์ คำย่อ และอักษรย่อที่ใช้	iv
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	3
การตรวจเอกสาร	4
งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	4
อุปกรณ์และวิธีการ	6
อุปกรณ์และสารเคมี	6
วิธีการ	7
สถานที่และระยะเวลาทำการวิจัย	9
ผลและวิจารณ์ผล	11
การสกัดสารจากเชื้อเห็ดตับเต่า	11
การหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด	18
สรุปและข้อเสนอแนะ	21
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	22
ภาคผนวก	23
ภาคผนวก ก) การเตรียมสารเคมี	24
ประวัติการศึกษา และการทำงาน	27

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 1 ส่วนต่างๆที่สกัดได้จากเห็ดตับเต่า 13

ตารางที่ 2 เปอร์เซนต์การยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH 15

ตารางที่ 3 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกในสารสกัดหยาบ 19

สารบัญภาพ

หน้า

ภาพที่ 1 เห็ดตับเต่าที่โตเต็มที่ 2

ภาพที่ 2 เปอร์เซนต์การยับยั้งอนุมูลอิสระ 16

ภาพที่ 3 กลไกการเกิดปฏิกิริยา 20

ภาพที่ 4 IR สเปกตรัมของสารสกัดหยาบ 20

คำอธิบายสัญลักษณ์ คำย่อ และอักษรย่อที่ใช้

UV	=	ultraviolet
VIS	=	visible
FTIR	=	Fourior Transform Infrared
PDA	=	potato dextrose agar
PDB	=	Potato dextrose broth
DPPH	=	2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl

การศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบพอลิแซ็กคาไรด์จากเส้นใยของเชื้อเห็ดตับเต่า

Study on Antioxidant Activity of Crude Polysaccharides from Mycelia of *Boletus colossus* Heim.

คำนำ

กล่าวถึงพื้นฐานความเป็นมา ปัญหาและเหตุผลที่ทำการวิจัยโดยเน้นความสำคัญของงานที่ทำ อธิบายวัตถุประสงค์และขอบเขตที่แน่นอน ทฤษฎีและแนวคิด ประโยชน์ที่จะได้จากการวิจัย ทั้งนี้ต้องไม่คัดลอกจากเนื้อหาของผู้อื่นแต่ให้เรียบเรียงเป็นภาษาของตนเอง

ตั้งแต่อดีตมนุษย์รับประทานเห็ดกันอย่างแพร่หลายในทุกชนชาติเนื่องจากรสชาติที่อร่อยและกลิ่นที่เป็นเอกลักษณ์ ทำให้มีการพัฒนาการเพาะเห็ดจนเกิดเป็นอุตสาหกรรมที่มีมูลค่าทางการตลาดสูง เห็ดที่เป็นที่นิยมและมีมูลค่าทางการตลาด เช่น เห็ดฟาง เห็ดนางฟ้า และ เห็ดหอม นอกจากจะนำมาใช้เป็นอาหารได้แล้ว เห็ดหลายชนิดยังมีคุณสมบัติในการรักษาโรค ซึ่งมาการนำไปใช้กันในหลายประเทศโดยเฉพาะแถบเอเชียตะวันออก เช่น ประเทศจีน ญี่ปุ่น เกาหลี และรัสเซียตะวันออก

การใช้เห็ดในทางยานั้นแต่โบราณใช้วิธีสกัดสารสำคัญในเห็ดด้วยน้ำร้อน ซึ่งต่อมาพบว่าสารสกัดเหล่านี้เป็นคาร์โบไฮเดรตพวกพอลิแซ็กคาไรด์ โดยพอลิแซ็กคาไรด์ที่พบมากที่สุดในดอกเห็ดคือเบต้ากลูแคน (β glucans) ต่อมาเมื่อนำพอลิแซ็กคาไรด์ที่เตรียมได้จากเห็ดเหล่านี้มาทดสอบคุณสมบัติทางยาแล้วพบว่ามีคุณสมบัติหลายอย่างที่สามารถนำมาใช้ในทางการแพทย์และเภสัชกรรมได้ เช่น คุณสมบัติช่วยต้านมะเร็งเนื้องอก ช่วยกระตุ้นภูมิคุ้มกัน ช่วยให้แผลประสานและลดการติดเชื้อ ช่วยลดน้ำตาลในเลือด เป็นต้น คุณสมบัติการต้านมะเร็งของกลูแคนจะออกฤทธิ์ได้ดีขึ้นเมื่อใช้ร่วมกับการใช้เคมีบำบัด (Chemotherapy) มีการค้นพบว่าเห็ดอย่างน้อย 700 ชนิด (species) จาก 182 สกุล (Genera) สามารถสร้างพอลิแซ็กคาไรด์ที่มีคุณสมบัติเป็นยาต้านมะเร็งได้

เห็ดตับเต่า (Bolete) เป็นเห็ดพื้นบ้านของไทยมีชื่อวิทยาศาสตร์คือ *Boletus colossus* Heim.อยู่ในวงศ์ Boletaceae ชื่อเรียกอื่นได้แก่ เห็ดห้า เห็ดผึ้ง เห็ดเผิ่ง หรือเห็ดผึ้งคราม หมวกเห็ดมีลักษณะโค้งนูนรูปกระทะคว่ำ เส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 15 เซนติเมตร มีขนละเอียด คล้ายกำมะหยี่สีน้ำตาลดำ เมื่อบานเต็มที่กลางหมวกเว้าเล็กน้อย ผิวสีน้ำตาลดำเมื่อถูกความชื้นจะลื่นมือ เนื้อสี

เหลืองอ่อนหนา เมื่อดอกเห็ดบานเต็มที่จะเปลี่ยนเป็นสีเหลืองอมเขียวหรือเหลืองอมน้ำตาล ก้านสีน้ำตาลดำใต้หมวกลงมาสีอ่อนกว่าเป็นสีน้ำตาลเหลืองอ่อนยาว 4-6 เซนติเมตร (ภาพที่ 1) ใช้รับประทานได้ เชื่อว่ามีสรรพคุณทางยาเช่น เป็นยาบำรุงหัวใจ บำรุงกำลัง บำรุงตับ บำรุงปอด กระจายโลหิต ดับพิษร้อนภายในร่างกายบำบัดอาการปวดหลัง ปวดข้อ ปวดเส้นเอ็นและกระดูก ป้องกันการชักกระตุก คนจีนใช้เป็นสมุนไพร แก้เคล็ดขัดยอก และปวดกระดูก

ภาพที่ 1 เห็ดตับเต่าที่โตเต็มที่

จากสรรพคุณของเห็ดที่กล่าวมาข้างต้น จึงทำให้ผู้วิจัยเกิดความสนใจที่จะสกัดสารพอลิแซ็กคาไรด์จากเชื้อเห็ดตับเต่า และนำมาทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ และศึกษาเกี่ยวกับคุณสมบัติของสารสกัดที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ

วัตถุประสงค์

จุดมุ่งหมายของการวิจัย มีขอบเขตที่แน่นอน (เช่นระบุแหล่งที่มา สายพันธุ์ หรือกระบวนการที่จำเพาะ) เขียนสั้น ๆ ให้ได้ใจความชัดเจน

1. เพื่อศึกษาคุณสมบัติของสารสกัดหยาบพอลิแซ็กคาไรด์จากเส้นใยเชื้อเห็ดตับเต่า
2. เพื่อทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบพอลิแซ็กคาไรด์จากเส้นใยเชื้อเห็ดตับเต่า

การตรวจเอกสาร

ทฤษฎีที่เกี่ยวข้องโดยตรง (หากต้องการใส่ข้อมูลความรู้ทั่วไป รายละเอียดเกี่ยวกับเทคนิควิธี หรือทฤษฎีพื้นฐาน ควรใส่ในส่วนของภาคผนวก) สรุปข้อมูลหรือผลงานที่มีผู้ทำมาแล้วเฉพาะส่วนที่มีความสำคัญต่องานวิจัยนี้ (ใช้เพื่ออ้างอิง) ควรอ่านเอกสารให้เข้าใจและเรียบเรียงขึ้นใหม่เป็นสำนวนของตัวเองที่กระชับ ถูกต้อง เข้าใจง่าย ไม่ลอกมา อย่านำบทคัดย่อมาใส่ การอ้างอิงควรอ้างอิงจากต้นฉบับหรืองานที่มีความแรกเริ่ม หากเป็นเนื้อหาที่แพร่หลายอยู่แล้วอาจอ้างอิงจากผู้เขียนที่ได้รับการยอมรับอย่างแพร่หลายในแวดวงนั้น

งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

จากการศึกษาสรรพคุณทางยาของเห็ดหิ้งเกือกม้า (*Phellinus rimosus*) ซึ่งอยู่ในวงศ์ Hymenochaetaceae ซึ่งมีการนำมาใช้เป็นส่วนผสมในตำรับยารักษามะเร็ง รักษาโรคเริม อาการปวดหู และอาการผื่นคันปวดร้อน โดยเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ต้านการก่อกลายพันธุ์ของสารสกัดจากเห็ดหิ้งเกือกม้าที่สกัดด้วยเอทานอลน้ำ และการสกัดด้วยสารละลายด่าง ทำการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี 2,2-Diphenyl-picrylhydrazyl radical assay (DPPH assay) และ Ferric reducing antioxidant power assay (FRAP assay) รวมถึงการศึกษาฤทธิ์ต้านการก่อกลายพันธุ์โดยวิธี Ames test ซึ่งทดสอบกับเชื้อแบคทีเรีย คือ *Salmonella typhimurium* strain TA98 และ TA100 สารสกัดที่ออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และฤทธิ์ต้านการก่อกลายพันธุ์ที่ดีที่สุด คือ สารสกัด *P.rimosus* โดยการสกัดด้วยเอทานอล (ชลดา 2555)

มีการรายงานว่าสารชิโซไฟแลน (Schizophyllan) ซึ่งเป็นส่วนหนึ่งของสารสกัดจากเห็ดแครงเป็นสารพอลิแซ็กคาไรด์ที่ไม่สามารถย่อยสลายโดยเอนไซม์ในกระเพาะอาหารได้ ดังนั้นจึงมีคุณสมบัติเป็นสารที่เรียกว่า probiotics เป็นอาหารของจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ในลำไส้ใหญ่ได้เป็นอย่างดี ช่วยให้ระบบการย่อยอาหารเป็นไปอย่างมีประสิทธิภาพ รวมทั้งยังลดความเสี่ยงการเกิดมะเร็งลำไส้อีกด้วยและยังช่วยลดคอเรสเตอรอลในเลือดอีกด้วย (Aida 2009)

Isabel และคณะ (2007) ได้รายงานการศึกษาคุณสมบัติสารต้านอนุมูลอิสระของเห็ดสนสีแดง (*Lactarius deliciosus*) และเห็ดฟางอิสราเอล (*Tricholomaportentosum*) โดยสกัดสารจากหมวกเห็ดและก้านดอกเห็ดด้วยเมทานอล เพื่อหาความสามารถในการรีดิวซ์และความสามารถยับยั้งอนุมูลอิสระโดยวิธีทดสอบทางเคมี และวัดปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดหาเพื่อประเมินผลต่อฤทธิ์ต้าน

อนุมูลอิสระของสารสกัดของเห็ดทั้งสอง และพบว่าเห็ดทั้งสองชนิดแสดงให้เห็นว่ามีศักยภาพของสารต้านอนุมูลอิสระ แต่เห็ดสนสีแดงจะมีฤทธิ์มากกว่าเห็ดฟางอิสราเอล

อัจฉราและจิรเวท (2552) ได้ศึกษาชนิดของน้ำตาลในดอกเห็ด โดยการสกัดพอลิแซ็กคาไรด์จากดอกเห็ดตีนแรด สกัดด้วยน้ำร้อนผสมเอทิลแอลกฮอล์ ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส และจำแนกชนิดของน้ำตาล ด้วยเครื่องโครมาโทกราฟฟีของเหลวสมรรถนะสูง ผลการสกัดและจำแนกพอลิแซ็กคาไรด์ของดอกเห็ดตีนแรด 7 สายพันธุ์ จากดอกเห็ดสด ได้น้ำตาลหลักเป็นทรีฮาโรส

อภิชาติและประกิตติ์สิน (2551) ได้ทำการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารประกอบเชิงซ้อนพอลิแซ็กคาไรด์-โปรตีน (polysaccharide-protein complex) ที่สกัดได้จากเส้นใยของเห็ดตับเต่าดำ (Phaeogyroporus portentosus) ซึ่งเป็นเห็ดที่นิยมบริโภคอย่างแพร่หลายในประเทศไทยเริ่มต้นด้วยการสกัดสารสกัดหยาบจากเส้นใยเห็ดด้วยน้ำร้อน และตกตะกอนด้วยเอทานอล ผลการทดลองยืนยันว่าสารประกอบเชิงซ้อนที่สกัดได้จากเห็ดตับเต่าดำเป็นแหล่งของสารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งที่มีศักยภาพในการพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ทางเภสัชกรรมได้

นฤมล (2557) ได้ศึกษาการนำเห็ดพื้นบ้านของไทยมาพัฒนาเป็นเวชสำอาง โดยทดสอบสารต้านอนุมูลอิสระในเห็ดกว่า 10 ชนิด พบว่าเห็ดแครงมีสารต้านอนุมูลอิสระมากกว่าเห็ดอื่นๆ และสามารถนำมาพัฒนาสูตรผลิตภัณฑ์บำรุงผิวจากเห็ดแครงซึ่งมีคุณสมบัติช่วยเพิ่มความชุ่มชื้นให้เซลล์ผิวหนังได้

รินฤดีและคณะ (2549) จากการทดลองสกัดพอลิแซ็กคาไรด์จากเห็ดกินได้มาใช้ทดสอบฤทธิ์ในการเป็นสารแอนติออกซิแดนท์และการกำจัดอนุมูลอิสระ โดยเป็นเห็ดพื้นบ้านในเมืองไทย 4 ชนิด และเห็ดยามาบูชิตาเกะ จากการศึกษาคุณสมบัติของพอลิแซ็กคาไรด์สกัดจากเห็ดทั้งหมด 5 ตัวอย่าง พบว่า เห็ดทุกชนิดมีสารที่มีฤทธิ์เป็นสารแอนติออกซิแดนท์และกำจัดอนุมูลอิสระในระดับที่ต่างกันออกไป โดยเห็ดยามาบูชิตาเกะ (Hericium erinaceus) มีประสิทธิ์ภาพสูงสุด รองลงมาคือ เห็ดขอนขาว (*L. polychrous*) เห็ดแครง (*S. commune BUB-1)* และเห็ดผึ้งหลวง *(Boletus* sp.) ตามลำดับ

อุปกรณ์และวิธีการ

เฉพาะที่จำเป็นและสำคัญต่องานวิจัย อุปกรณ์ในห้องปฏิบัติการทั่วไปไม่จำเป็นต้องระบุ ยกเว้นมีความจำเพาะ เช่น กระดาษกรองเบอร์ 34

อุปกรณ์และสารเคมี

อุปกรณ์และเครื่องมือ

1. เครื่อง UV-VIS spectrophotometer (T60 UV-Visible Spectrophotometer)
2. เครื่องระเหยแบบหมุน (Rotary Evaporator, Buchi, R-210, Switzerland)
3. เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge, Sorval, RC26Plus, USA)
4. เครื่องฟูเรียร์ทรานฟอร์มอินฟราเรดสเปกโทรมิเตอร์ (Fourier Transfrom Infrared Spectrometer, FTIR, PerkinElmer, UATR Two)
5. แผ่นให้ความร้อน (Hot plate Stirrer, Beurer, Germany)
6. เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง (Mettler Toledo, PG802-S)
7. เครื่องวัด pH (Sper Scientific, USA)
8. เครื่องทำแห้งแบบแช่แข็ง (Freeze Dryer, Snijders scientific type 2040)
9. ชุดกรองสุญญากาศ (Gast, DOA-P504-BN)

สารเคมี

1. เอทานอล 95% (95% ethanol, C_2H_5OH)
2. เมทานอล (Methanol, CH_3OH) (AR, QReC, New Zealand)
3. โซเดียมคลอไรด์ (Sodium chloride, NaCl) (Sigma-ALORICH, Switzerland)
4. กรดซัลฟูริก (Sulfuric acid) (Sigma-ALORICH, Switzerland)
5. โฟลินซิโอแคลทรูรีเอเจนต์ (folin-ciocalteu reagent) (Carlo erba, France)
6. 3.6 DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, C18H12N5O6) (Sigma-ALORICH, Switzerland)

ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา

เชื้อเห็ดตับเต่า (Boletus colossus Heim.) ได้รับความอนุเคราะห์จาก รศ.ดร. ประภาพร ตั้งกิจโชค ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตรกำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน

วิธีการ

วิธีดำเนินงานวิจัย การวางแผนการทดลอง อาจแบ่งเป็นหัวข้อแยกให้ชัดเจน

1. การเตรียมเชื้อเห็ดตับเต่า

นำเชื้อเห็ดตับเต่าเลี้ยงบนอาหารวุ้น PDA เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิเฉลี่ย 26-30 องศาเซลเซียส และเปลี่ยนถ่ายเชื้อทุก 1-2 เดือน เตรียมเชื้อเห็ดโดยย้ายเส้นใยบริสุทธิ์จากสต๊อกเชื้อที่เตรียมไว้ ลงบนอาหารเชื้อพีดีเอใหม่ในจานเลี้ยงเชื้อเพิ่มปริมาณเชื้อเห็ดบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลาประมาณ 28 วัน ใช้เครื่องมือเจาะจุกคอร์ก เจาะเส้นใยและอาหารเลี้ยงวุ้นบริเวณรอบนอกของโคโลนีให้เป็นชิ้นกลม สำหรับใช้ในการศึกษาต่อไป

2. การสกัดสารจากเชื้อเห็ดตับเต่า

นำสารละลายเชื้อเห็ดตับเต่าที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ PDB ปริมาตร 5 ลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลาประมาณ 60-70 วัน แยกเส้นใยและของเหลวออกจากกันโดยการกรองสุญญากาศ นำส่วนที่เป็นเส้นใยที่กรองได้ไปล้างน้ำสะอาด ผึ่งลมเย็น ทำให้แห้งโดยเครื่องทำแห้งแบบแช่แข็งบดให้ละเอียด เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำไปสกัดในขั้นต่อไป

2.1 การสกัดเย็นโดยวิธีการหมัก (Maceration) ดัดแปลงจากวิธีของ Ming-Chi และคณะ (2007) โดยนำเส้นใยเชื้อเห็ดตับเต่าบดแห้ง 10 กรัม สกัดด้วยน้ำปราศจากไอออน 1 ลิตร ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นกรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 4 เพื่อแยกกากและสารละลาย นำส่วนที่เป็นสารละลายไประเหยตัวทำละลายออกโดยเครื่องระเหยแบบหมุนจนเหลือปริมาตร 200 มิลลิลิตร จากนั้นนำสารละลายที่เข้มข้นมาตกตะกอนพอลิแซ็กคาไรด์ โดยการเติม 95% เอทานอล ปริมาตร 800 มิลลิลิตร (4 เท่า) ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำสารละลายไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ได้ตะกอนพอลิแซ็กคาไรด์และสารละลายใส นำส่วนตะกอนพอลิแซ็กคาไรด์ไปทำให้แห้งโดยใช้เครื่องทำให้แห้งแบบแช่แข็ง และส่วนสารละลายนำไประเหยตัวทำละลาย 95% เอทานอล ออกโดยเครื่องระเหยแบบหมุนและทำให้แห้งโดยใช้เครื่องทำให้แห้งแบบแช่แข็ง ได้สาร 2 ส่วน คือ พอลิแซ็กคาไรด์สกัดเย็นและน้ำสกัดเย็น

2.2 การสกัดร้อนโดยวิธีการกลั่นแบบไหลกลับ ดัดแปลงจากวิธีของ Ming-Chi et al. (2007) โดยนำเส้นใยเชื้อเห็ดตับเต่าบดแห้ง 10 กรัม สกัดด้วยน้ำปราศจากไอออน 1 ลิตร ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 ชั่วโมง จากนั้นกรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 4 เพื่อแยกกากและสารละลาย นำส่วนที่เป็นสารละลายไประเหยตัวทำละลายออกโดยเครื่องระเหยแบบหมุนจนเหลือปริมาตร 200 มิลลิลิตร จากนั้นนำสารละลายที่เข้มข้นมาตกตะกอนพอลิแซ็กคาไรด์ โดยการเติม 95% เอทานอล ปริมาตร 800 มิลลิลิตร (4 เท่า) ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำสารละลายไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ได้ตะกอนพอลิแซ็กคาไรด์และสารละลายใส นำส่วนตะกอนพอลิแซ็กคาไรด์ไปทำให้แห้งโดยใช้เครื่องทำให้แห้งแบบแช่แข็ง และส่วนสารละลายนำไประเหยตัวทำละลาย 95% เอทานอล ออกโดยเครื่องระเหยแบบหมุนและทำให้แห้งโดยใช้เครื่องทำให้แห้งแบบแช่แข็ง ได้สาร 2 ส่วน คือ พอลิแซ็กคาไรด์สกัดร้อนและน้ำสกัดร้อน

3. การทดสอบการต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH

3.1 DPPH radical scavenging capacity assay การทดสอบการต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH ทดสอบโดยดัดแปลงจากวิธีของ Maja *et al.* (2011) โดยนำสารละลาย DPPH ในเมทานอล ความเข้มข้น 0.2 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เติมในสารสกัดที่ได้ทั้ง 4 ส่วนที่ความเข้มข้นต่าง 25, 50, 100, 150, 200, 300 และ 400 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 2 มิลลิลิตร บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 514 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง UV-VIS Spectrophotometer เปรียบเทียบความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระโดยใช้สารมาตรฐานบิวทิลเลทเตดไฮดรอกซีโทลูอีน (BHT) ทำการทดลองตัวอย่างละ 3 ซ้ำ คำนวณหาเปอร์เซ็นต์การต้านอนุมูลอิสระจาก

3.2 ความสามารถในการเป็นตัวรีดิวซ์ (Reducing Power) การทดสอบการต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี Reducing Power ทดสอบโดยดัดแปลงจากวิธีของ Isabel และคณะ. (2007) นำสารสกัดที่ได้ทั้ง 4 ส่วนที่ความเข้มข้นต่าง 25, 50, 100, 150, 200, 300 และ 400 พีพีเอ็ม 2.5 มิลลิลิตร ผสมกับโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (ความเข้มข้น 200 มิลลิโมลาร์ พีเอช 6.6) ปริมาตร 2.5 มิลลิตร และ 1% โดยมวลต่อปริมาตร โพแทสเซียมเฟอร์ริคไซยาไนด์ ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร ทำการบ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที หลังจากนั้นเติม 10% โดยมวลต่อปริมาตร กรดไตรคลอโรอะซิติก ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร นำสารผสมปั่นเหวี่ยงที่ 650 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที นำสารละลายในชั้นบน 5 มิลลิลิตร เติมน้ำปราศจากไอออน 5 มิลลิลิตร และ 0.1% โดยมวลต่อปริมาตร เฟอร์ริคคลอไรด์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 700 นาโนเมตร โดยใช้บิวทิลเลทเตดไฮดรอกซีโทลูอีน (BHT) เป็นตัวควบคุมบวก (positive control) ความเข้มข้น 5, 10, 25, 50, 100, 150, 200, 300 และ 400 พีพีเอ็ม ทำการทดลองตัวอย่างละ 3 ซ้ำ คำนวณเปอร์เซ็นต์ความสามารถในการเป็นตัวรีดิวซ์โดยใช้สูตร

สถานที่และระยะเวลาทำการวิจัย

สถานที่

ห้องปฏิบัติการเคมี โครงการจัดตั้งภาควิชาเคมี คณะศิลปศาสตร์และวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม

ระยะเวลาในการทดลอง

ตั้งแต่เดือนพฤศจิกายน พ.ศ. 2557 – เดือนเมษายน พ.ศ. 2558

ผลและวิจารณ์ผล

ผลการทดลองคือข้อมูลที่ได้จากการวัดหรือศึกษาโดยตรง แสดงโดยใช้ ภาพ ตาราง กราฟ แผนผัง ประกอบคำอธิบาย
วิจารณ์ผลการทดลอง คือการนำข้อมูลมาวิเคราะห์ต่อ และเชื่อมโยงกับวัตถุประสงค์ อธิบายว่าผลที่ได้เป็นไปตามเป้าหมายหรือสมมติฐานหรือไม่ คล้ายหรือต่างจากงานอื่นอย่างไร เพราะอะไร โดยใช้ทฤษฎีหรือเหตุผลประกอบที่ชัดเจน และประโยชน์ที่ได้จากการทดลองนี้

ผลการทดลองในการศึกษานี้แบ่งออกเป็น 3 ส่วนได้แก่การสกัดสารจากเชื้อเห็นตับเต่า การวิเคราะห์สารที่ได้ การทดสอบสมบัติของสาร

การสกัดสารจากเชื้อเห็ดตับเต่า

เมื่อบ่มเชื้อเห็ดตับเต่าที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 63 วัน สารละลายใสสีเหลืองอ่อนจะเปลี่ยน เป็นสีน้ำตาลเข้มจนดำ เราสามารถแยกเส้นใยเชื้อเห็ดตับเต่าและของเหลวออกจากกันโดยการกรอง จะได้ของเหลวสีน้ำตาลเข้มและเส้นใยเชื้อเห็ดตับเต่า เมื่อสกัดส่วนที่เป็นเส้นใยเชื้อเห็ดตับเต่าบดแห้งด้วยตัวทำละลายน้ำปราศจากไอออน โดยการสกัด 2 วิธี ได้แก่การสกัดเย็นโดยวิธีการหมัก (Maceration) และสกัดร้อนวิธีการกลั่นแบบไหลกลับ (Reflux) โดยการสกัดเย็นโดยวิธีการหมัก (Maceration) ได้สารสกัดสารละลายสีน้ำตาลเข้ม เมื่อระเหยตัวทำละลายออกโดยเครื่องระเหยแบบหมุน นำสารละลายที่เข้มข้นมาตกตะกอนพอลิแซ็กคาไรด์ โดยการเติม 95% เอทานอล (4 เท่า) ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำสารละลายไปปั่นเหวี่ยง ได้สาร 2 ส่วน คือ พอลิแซ็กคาไรด์สกัดเย็นและน้ำสกัดเย็น ส่วนการสกัดร้อนโดยวิธีการกลั่นแบบไหลกลับ (Reflux) จะได้สารสกัดสารละลายสีน้ำตาลเข้ม ระเหยตัวทำละลายออกโดยเครื่องระเหยแบบหมุน นำสารละลายที่เข้มข้นมาตกตะกอนพอลิแซ็กคาไรด์ โดยการเติม 95% เอทานอล (4 เท่า) ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำสารละลายไปปั่นเหวี่ยง ได้สาร 2 ส่วน คือ พอลิแซ็กคาไรด์สกัดร้อนและน้ำสกัดร้อนโดยเปอร์เซนต์และสีของสารสกัดหยาบจากเส้นใยเชื้อเห็ดตับเต่าแสดงใน

ตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ส่วนต่างๆที่สกัดได้จากเห็ดตับเต่า

สารสกัดหยาบ	เปอร์เซ็นต์สารสกัดหยาบ	สีของสารละลาย
พอลิแซ็กคาไรด์สกัดร้อน	24.54	สีน้ำตาลอ่อน
น้ำสกัดร้อน	15.80	สีน้ำตาลอ่อน
พอลิแซ็กคาไรด์สกัดเย็น	20.19	สีน้ำตาลเข้ม
น้ำสกัดเย็น	19.22	สีน้ำตาลเข้ม

จากตารางที่ 1 พบว่า ได้สารสกัดที่มีลักษณะเป็นของแข็งสีน้ำตาลเข้ม จะได้สารสกัดทั้ง 4 ส่วน คือ พอลิแซ็กคาไรด์สกัดร้อนและน้ำสกัดร้อน และพอลิแซ็กคาไรด์และน้ำสกัดเย็น โดยพอลิแซ็กคาไรด์สกัดร้อนและน้ำสกัดร้อนมีเปอร์เซ็นต์สารสกัดหยาบเท่ากับ 24.54 และ 20.29 ตามลำดับ พอลิแซ็กคาไรด์สกัดเย็นและน้ำสกัดเย็นมีเปอร์เซ็นต์สารสกัดหยาบเท่ากับ 15.80 และ 19.22 ตามลำดับ จากนั้นนำไปละลายด้วยน้ำปราศจากไอออนเพื่อใช้ในการศึกษาต่อไป

การทดสอบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ

จากการทดสอบความสามารถของสารสกัดทั้ง 4 ส่วนที่ความเข้มข้นต่างๆ โดยวิธี DPPH ซึ่ง DPPH เป็นเรดิคัล (radical) โดยปกติจะมีสีม่วง เมื่อ DPPH ทำปฏิกิริยากับสารที่มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ สีม่วงของ DPPH จะกลายเป็นสีเหลือง โดยจะวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 514 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง UV-Vis spectrometer และใช้บิวทิเลเตดไฮดรอกซีโทลูอีน (BHT) เป็นตัวควบคุมบวกพบว่าได้ผลดังแสดงใน

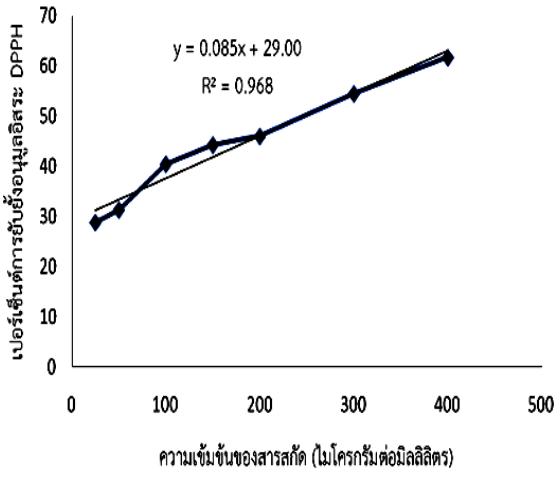
ตารางที่ 2

ตารางที่ 2 เปอร์เซนต์การยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH

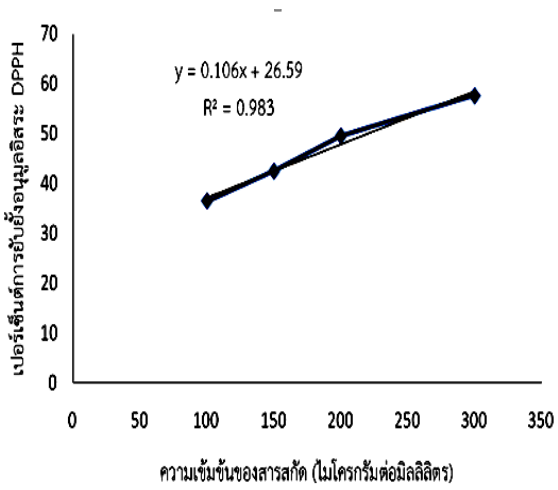
ความเข้มข้น	เปอร์เซ็นต์การยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH				
(μg/mL)	พอลิแซ็กคาไรด์สกัดร้อน	น้ำสกัดร้อน	พอลิแซ็กคาไรด์สกัดเย็น	น้ำสกัดเย็น	BHT
25	28.84±3.83	17.99±2.35	24.03±1.05	14.45±1.57	89.03±0.36
50	33.28±4.58	31.35±0.51	27.51±1.29	25.24±0.58	91.55±0.36
100	40.49±1.60	59.11±2.15	36.45±0.71	49.22±0.68	92.03±0.10
150	44.32±3.20	82.61±2.56	42.43±0.92	68.17±2.53	91.25±0.10
200	46.03±1.38	87.60±1.43	49.55±0.91	77.30±0.54	89.25±1.16
300	54.51±0.18	87.88±0.34	57.65±0.37	90.36±1.01	90.18±0.09
400	61.76±0.96	88.15±0.67	61.65±1.58	90.64±3.93	90.08±0.16

จาก

ตารางที่ 2 พบว่าสารสกัดทั้ง 4 ส่วนที่ความเข้มข้น 25, 50, 100, 150, 200, 300 และ400 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ให้ผลการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH ได้ดี พอลิแซ็กคาไรด์สกัดร้อนความเข้มข้น 400 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งอนุมูลอิสระสูงที่สุดเท่ากับ 61.76 และเปอร์เซ็นต์การยับยั้งอนุมูลอิสระต่ำที่สุดที่ความเข้มข้น 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เท่ากับ 28.84 น้ำสกัดร้อนความเข้มข้น 400 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งอนุมูลอิสระสูงที่สุดเท่ากับ 88.15 และเปอร์เซ็นต์การยับยั้งอนุมูลอิสระต่ำที่สุดที่ความเข้มข้น 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เท่ากับ 17.99 พอลิแซ็กคาไรด์สกัดเย็นความเข้มข้น 400 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งอนุมูลอิสระสูงที่สุดเท่ากับ 61.65 และเปอร์เซ็นต์การยับยั้งอนุมูลอิสระต่ำที่สุดที่ความเข้มข้น 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เท่ากับ 24.03 น้ำสกัดเย็นความเข้มข้น 400 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรจากข้อมูลตารางที่ 2 นำค่ามาพล๊อตกราฟระหว่างเปอร์เซ็นต์การต้านอนุมูลอิสระกับความเข้มข้นของสารสกัดทั้ง 4 ส่วนเพื่อหาค่า IC_{50}พบว่าได้ผลดังภาพที่ 2



(ก)



(ข)

ภาพที่ 2 เปอร์เซนต์การยับยั้งอนุมูลอิสระ

ความสามารถในการเป็นตัวรีดิวซ์ (Reducing power assay)

การทดสอบความสามารถในการเป็นตัวรีดิวซ์ ของสารสกัดทั้ง 4 ส่วนที่ความเข้มข้นต่างๆ โดยวิธี Reducing power ซึ่งเป็นการศึกษาความสามารถในการรีดิวซ์ หรือให้อิเล็กตรอนของสารสกัดแก่สารอนุมูลอิสระแล้วทำให้เปลี่ยนเป็นสารที่คงตัว โดยวัดปฏิกิริยารีดักชั่นของ $Fe^{3+}(CN^{-})_6$ ไปเป็น $Fe^{2+}(CN^{-})_6$ ซึ่งถ้าสารสกัดมีความสามารถในการรีดิวซ์ได้มากจะทำให้สารละลายเป็นสีน้ำเงินเข้มขึ้น ซึ่งจะแสดงถึงความสามารถในการต้านออกซิเดชั่นที่ดี โดยจะวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น

700 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง UV-Vis spectrometer โดยใช้บิวทิเลเตดไฮดรอกซีโทลูอีน (BHT) เป็นสารละลายมาตรฐานเปรียบเทียบโดยทำการทดลองตัวอย่างละ 3 ซ้ำ และคำนวณเปอร์เซ็นต์ความสามารถในการเป็นตัวรีดิวซ์ของสารสกัดทั้ง 4 ส่วน ซึ่งได้ผลดังแสดงใน

ตารางที่ 3

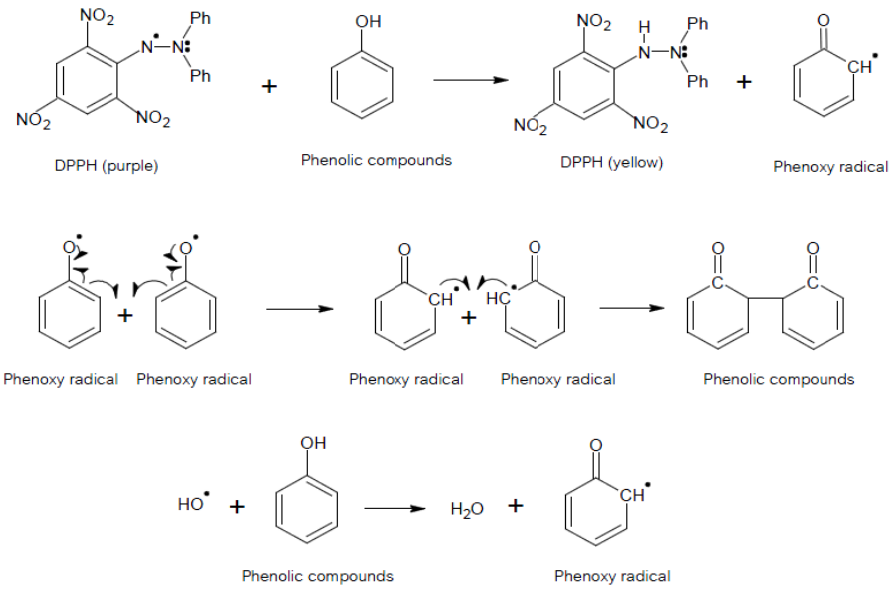
การหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด

การหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (ภาพที่ 3) โดยนำสารสกัดทั้ง 4 ส่วนมาทดสอบกับ 10% Folin-Ciocalteu's Phenol reagent ใช้กรดแกลลิกความเข้มข้น 5, 10, 25, 50, 100, 150 และ200 พีพีเอ็ม เป็นสารมาตรฐาน นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 725 นาโนเมตร

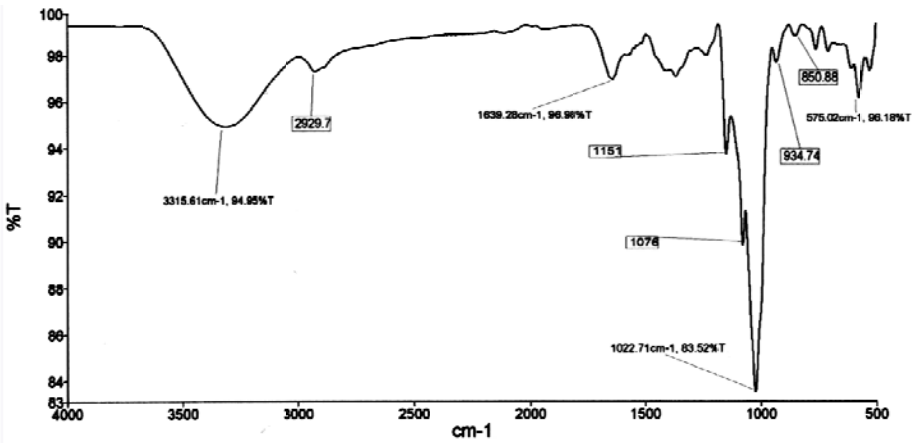
ตารางที่ 3 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกในสารสกัดหยาบ

สารสกัดหยาบ	**ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (mg กรดแกลลิก/g สารสกัดหยาบ)**
พอลิแซ็กคาไรด์สกัดร้อน	21.03±0.96
น้ำสกัดร้อน	69.66±1.47
พอลิแซ็กคาไรด์สกัดเย็น	47.28±2.80
น้ำสกัดเย็น	62.30±1.91

จากสเปกตรัมอินฟราเรดสเปกโทสโกปีของสารสกัดซึ่งแสดงในภาพที่ 4 พบว่าสเปกตรัมสารสกัดทั้ง 4 ส่วนให้ผลการทดลองที่มีแนวโน้มในทางดียวกัน คือ พบหมู่ฟังก์ชันที่1000-1200 cm^{-1} (pyranose ring), 3200-3400 cm^{-1} (O-H stretching), 2927-2929 cm^{-1}(C-Hstretching), 1654 และ 1560 cm^{-1}(protein), 844 cm^{-1} (α-configuration) และ 891 cm^{-1} (β-configuration) สเปกตรัมที่ศึกษาสามารถระบุได้ว่าเป็นทั้ง α-configuration และ β-configurationซึ่งสเปกตรัมที่ได้สอดคล้องกับงานวิจัยของ Zuofa *et al*. (2013)ที่ได้ทำการศึกษาพบหมู่ฟังก์ชันที่ 3300-3500cm^{-1} (O-H stretching), 2927-2930 cm^{-1}(C-Hstretching), 1640 cm^{-1}(เอไมด์ของ C=O), 1485-1350 cm^{-1}(–CH (C-CH_2)), 1000-1200 cm^{-1}(pyranose ring) 850 cm^{-1}(α-configuration),1080 cm^{-1} (β-configuration) และ 350-600 cm^{-1}โครงร่างหลักของวงไพราโนส



ภาพที่ 3 กลไกการเกิดปฏิกิริยา



ภาพที่ 4 IR สเปกตรัมของสารสกัดหยาบ

จากการศึกษาพบว่าสารสกัดหยาบเชื้อเห็ดตับเต่าสามารถต้านอนุมูลอิสระได้ดี ซึ่งสนับสนุนผลการวิจัยก่อนหน้านี้ และมีความเป็นไปได้ในการพัฒนาเพื่อนำไปใช้ในเชิงการค้า ซึ่งจำเป็นจะต้องมีการศึกษาค้นคว้าเพิ่มเติมในรายละเอียดต่อไป

สรุปและข้อเสนอแนะ

สรุปสาระสำคัญของการทดลองและผลที่ได้ ปัญหาและจุดอ่อน ประโยชน์ของงานนี้ และข้อเสนอแนะสำหรับการวิจัยในขั้นต่อไป

จากการสกัดสารออกฤทธิ์จากสารสกัดหยาบเชื้อเห็ดตับเต่าโดยน้ำปราศจากไอออน ในอัตราส่วน 10:1 (กรัมต่อลิตร) ตกตะกอนพอลิแซ็กคาไรด์ด้วยตัวทำละลาย 95% เอทานอล โดยการสกัด 2 วิธี การสกัดเย็นโดยวิธีการหมัก และการสกัดร้อนโดยวิธีสกัดแบบไหลกลับ พบว่าได้สารสกัดที่มีลักษณะเป็นของแข็งสีน้ำตาลเข้ม จะได้สารสกัดทั้ง 4 ส่วน พอลิแซ็กคาไรด์สกัดร้อนได้เปอร์เซ็นต์ของสารสกัดหยาบสูงที่สุดเท่ากับ 24.54 และ พอลิแซ็กคาไรด์สกัดเย็นได้เปอร์เซ็นต์สารสกัดหยาบต่ำที่สุดเท่ากับ 15.80

การทดสอบการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH ที่ความเข้มข้น 25, 50, 100, 150, 200, 300 และ 400 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าเปอร์เซ็นต์การต้านอนุมูลอิสระมีแนวโน้มสูงขึ้นเมื่อความเข้มข้นของสารสกัดสูงขึ้นและน้ำสกัดร้อนสามารถยับยั้งอนุมูลอิสระได้ดีที่สุดที่ความเข้มข้น 400 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีค่าเท่ากับ 88.15±0.67%

จากการศึกษาพบว่าสารสกัดหยาบเชื้อเห็ดตับเต่า สามารถต้านอนุมูลอิสระได้ ซึ่งน่าจะเป็นประโยชน์สูงมากถือเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่น่าสนใจ และสามารถนำเชื้อเห็ดตับเต่าไปศึกษาค้นคว้าในขั้นสูงต่อไป

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

หนังสือ: ผู้แต่ง. ปีที่พิมพ์.**ชื่อหนังสือ.** ครั้งที่พิมพ์ (ถ้ามี). สำนักพิมพ์, สถานที่พิมพ์

รายงานการประชุม สัมนา: ผู้เขียน. ปีที่พิมพ์. ชื่อเรื่อง, หน้าที่พิมพ์. ใน ชื่อบรรณาธิการ (ถ้ามี). **ชื่อการประชุม ครั้งที่**. สำนักพิมพ์หรือหน่วยงานที่จัดการประชุม, สถานที่พิมพ์

วิทยานิพนธ์ : ผู้เขียน. ปีที่พิมพ์. **ชื่อวิทยานิพนธ์.** ระดับวิทยานิพนธ์, ชื่อมหาวิทยาลัย

บทความในวารสาร: ผู้เขียน. ปีที่พิมพ์. ชื่อบทความ. **ชื่อวารสาร** ปีที่ (ฉบับที่): หน้า.

ข้อมูลจากเว็บไซต์: ผู้เขียน. ปีที่พิมพ์. **ชื่อเรื่อง.** ชื่อหัวของเว็บไซต์. แหล่งที่มา: วันที่สืบค้นข้อมูล

การอ้างอิงในตัวเล่มสำหรับวารสารไทย (บุหรัน 2556) และ (ชลดา, พรพรรณ and เมธิน 2555) กรณีที่เป็นวารสารภาษาต่างประเทศ (Aida, Shuhaimi, Yazid and Maaruf 2009) และ (Ming-Chi 2007)

การอ้างอิง (บางส่วน)

ชลดา จัดประกอบ, พรพรรณ เหล่าวชิระสุวรรณ และเมธิน ผดุงกิจ. 2555. ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ต้านการก่อกลายพันธุ์ของสารสกัดเห็ดหิ้งเกือกม้า. วารสารเภสัชศาสตร์อีสาน 10 (5): 175-179.

บุหรัน พันธุ์สวรรค์. 2556. อนุมูลอิสระ สารต้านอนุมูลอิสระและการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ. วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 21 (3): 275-286.

Aida, F. M. N. A., M. Shuhaimi, M. Yazid, and A. G. Maaruf. 2009. Mushroom as a potential source of probiotics: a review. **Trend in Food Science &Technology** 20: 567-575.

Ming-Chi, T., T. Song, P. Shih, and G. Yen. 2007. Antioxidant properties of water-soluble polysaccharides from *Antrodia cinnamomeain* submerged culture. **Food chemistry** 104: 1115-1122.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก) การเตรียมสารเคมี

สารละลาย BHT ความเข้มข้น 1,000 ppm

เตรียมสารละลาย BHT ที่ความเข้มข้นเดียวกับเห็ดตับเต่า โดยชั่ง BHT 0.0100 กรัม มาละลายในน้ำปราศจากไอออน 10 มิลลิลิตร จะได้ BHT ความเข้มข้น 1,000 พีพีเอ็ม

สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ เข้มข้น 200 mM pH 6.6 ปริมาตร 250 mL

เตรียมได้จากไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (Na_2HPO_4) มวลโมเลกุลเท่ากับ 141.96 กรัม/โมล และ โซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (NaH_2PO_4) มวลโมเลกุลเท่ากับ 120 กรัม/โมล

ภาคผนวก ข) อนุมูลอิสระและสารต้านอนุมูลอิสระ

อนุมูลอิสระ

อนุมูลอิสระ (Free radicals) คือโมเลกุลหรือไอออนที่มีอิเล็กตรอนโดดเดี่ยว พบได้ทั้งในสิ่งแวดล้อม ในสิ่งมีชีวิต โดยเฉพาะอย่างยิ่งกระบวนการเมตาบอลิซึม (metabolism) ในเซลล์ โมเลกุลของออกซิเจนที่กลายเป็นอนุมูลอิสระจะมีความว่องไวในการเข้าทำปฏิกิริยามาก และสามารถดึงอิเล็กตรอนจากโมเลกุลอื่นมาแทนที่อิเล็กตรอนที่ขาดหายไปเพื่อให้ตัวเองเกิดความสมดุลหรือเสถียร ซึ่งปฏิกิริยานี้จะเกิดขึ้นอย่างต่อเนื่องเป็นปฏิกิริยาลูกโซ่ในเซลล์ อนุมูลอิสะที่สำคัญ ได้แก่ oxygen radical, superoxide radical, hydroxyl radical, hydrogen peroxide, transition metals, carbonate radical (CO_3•), nitrate radical (NO_3•), methyl radical (CH_3•), superoxide radical (O_2•), peroxy radical (ROO•), reactive oxygen species (ROS) เป็นต้น

อนุมูลอิสระสามารถทำลายชีวโมเลกุลทุกประเภททั้งในเซลล์และส่วนประกอบของเซลล์สิ่งมีชีวิต เช่น ลิพิด โปรตีน เอนไซม์ ดีเอ็นเอ อาร์เอ็นเอ เซลล์เมนเบรน ซึ่งเป็นสาเหตุให้เซลล์ตาย การเกิดการกลายพันธุ์ของดีเอ็นเอในเซลล์ และก่อให้เกิดโรคต่างๆ ได้แก่ โรคชรา โรคมะเร็ง โรคหัวใจขาดเลือด โรคความจำเสื่อม โรคข้ออักเสบ โรคภูมิแพ้ อนุมูลอิสระนอกจากจะเกิดภายในสิ่งมีชีวิตแล้วยังเกิดจากปัจจัยภายนอก ได้แก่ การได้รับเชื้อโรคเกี่ยวกับภูมิคุ้มกัน จากรังสี จากมลภาวะ เช่น ควันบุหรี่ และแก๊สจากท่อไอเสีย จากอาหารที่ไหม้เกรียม หรือ จากยาบางชนิด เช่น โดโซรูบิซิน (doxorubicin) เพนนิซิลลามิน (penicillamine) พาราเซตามอล (paracetamol) เป็นต้น ซึ่งโมเลกุลที่มีความสามารถที่จะกำจัดอนุมูลอิสระและป้องกันโรคที่เกิดได้เรียกว่า สารต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant) สารอาหารและแร่ธาตุต่างๆ ที่สำคัญที่เป็นสารต้านอนุมูลอิสระ เช่น วิตามินซี

สารต้านอนุมูลอิสระ

สารต้านอนุมูลอิสระถือว่ามีความสำคัญต่อกระบวนการออกซิไดซ์อนุมูลอิสระ หรือสามารถยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชัน โดยในสิ่งมีชีวิตจะมีระบบการป้องกันการทำลายเซลล์และเนื้อเยื่อจากอนุมูลอิสระ ประกอบด้วยสารต้านอนุมูลอิสระมากมายหลายชนิดที่ทำหน้าที่แตกต่างกันไป ซึ่งมีทั้งที่เป็นเอนไซม์และไม่เป็นเอนไซม์ สารประกอบที่ละลายในน้ำและสารประกอบที่ละลายในไขมัน โดยสารต้านอนุมูลอิสระเหล่านี้มีกลไกการทำงานต้านอนุมูลอิสระด้วยกันหลายแบบ เช่น ดักจับอนุมูลอิสระ (radical scavenging) การยับยั้งการทำงานของออกซิเจนที่ขาดอิเล็กตรอน (singlet oxygen quenching) จับกับโลหะที่สามารถเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันได้ (metal cheation) หยุดปฏิกิริยาการ

สร้างอนุมูลอิสระ (chain-breaking) เสริมฤทธิ์ (synergism) และยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ (enzyme inhibition) ที่เร่งปฏิกิริยาอนุมูลอิสระ เป็นต้น

ประวัติการศึกษา และการทำงาน

ชื่อ-นามสกุล

วันเดือนปีเกิด

สถานที่เกิด

ประวัติการศึกษา

ระดับประถมศึกษา	โรงเรียน (จังหวัด)
ระดับมัธยมศึกษาตอนต้น	โรงเรียน (จังหวัด)
ระดับมัธยมศึกษาตอนปลาย	โรงเรียน (จังหวัด)

ผลงานดีเด่นและรางวัลทางวิชาการ 1.

ทุนการศึกษาที่ได้รับ 1.