



โครงการ

การเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์

ชื่อโครงการ การสกัดสารยับยั้งเอนไซม์ไลเปสและแอลฟาไกลูโคซิเดสจากเห็ดตับเต่า
Extraction of Pancreatic Lipase and α -Glucosidase Inhibitors from
Thaeogyroporus porementosus

ชื่อนิสิต นางสาวไพลิน ภูมิคอนสาร

ภาควิชา เคมี

ปีการศึกษา 2559

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การสกัดสารยับยั้งเอนไซม์ไลเปสและแอลฟาไกลูโคซิเดสจากเห็ดตับเต่า
Extraction of Pancreatic Lipase and α -Glucosidase Inhibitors from
Thaeogyroporus porentosus

โดย

นางสาวไพลิน ภูมิคอนสาร

รายงานนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์

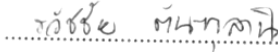
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย


ปีการศึกษา 2559


โครงการ การสกัดสารยับยั้งเอนไซม์ไลเปสและแอลฟาไกลูโคซิเดสจากเห็ดตับเต่า
 โดย นางสาวไพลิน ภูมิคอนสาร

ได้รับอนุมัติให้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาเคมี ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

คณะกรรมการสอบโครงการ

..... ประธานกรรมการ
 (ศาสตราจารย์ ดร. วัชชัย ตันฑุลานี)

..... อาจารย์ที่ปรึกษา
 (รองศาสตราจารย์ ดร.สุรชัย พรภาคกุล)

..... กรรมการ
 (รองศาสตราจารย์ ดร. ธรรมนุญ หนูจักร)

รายงานฉบับนี้ได้รับความเห็นชอบและอนุมัติโดยหัวหน้าภาควิชาเคมี

..... หัวหน้าภาควิชาเคมี
 (รองศาสตราจารย์ ดร.วุฒิชัย พาราสุข)
 วันที่ เดือนพฤษภาคม พ.ศ. 2560

คุณภาพของการเขียนรายงานเล่มนี้อยู่ในระดับ ดีมาก ดี พอใช้

ชื่อโครงการ การสกัดสารยับยั้งเอนไซม์ไลเปสและแอลฟาไกลูโคซิเดสจากเห็ดตับเต่า
ชื่อนิสิตในโครงการ นางสาวไพลิน ภูมิคอนสาร เลขประจำตัว 5633124623
ชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา รองศาสตราจารย์ ดร.สุรชัย พรภคกุล
ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปีการศึกษา 2559

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์ศึกษาฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไลเปสและแอลฟาไกลูโคซิเดสของสารสกัดเอทิลแอสซิเตตและสารสกัดเมทานอลจากเห็ดตับเต่า คือ และแยกสารออกฤทธิ์ดังกล่าวด้วยเทคนิคทางโครมาโทกราฟี สารสกัดเอทิลแอสซิเตตที่ความเข้มข้น 25 mg/mL มีค่าการยับยั้งเอนไซม์ไลเปส 78 % และที่ความเข้มข้น 1 mg/mL มีค่าการยับยั้งเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดส 20 % ส่วนสารสกัดเมทานอลที่ความเข้มข้น 25 mg/mL มีค่าการยับยั้งเอนไซม์ไลเปส 99 % และที่ความเข้มข้น 10 mg/mL มีค่าการยับยั้งเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดส 38 % นั่นคือ สารสกัดเมทานอลมีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไลเปสมากกว่าสารสกัดเอทิลแอสซิเตต แต่สารสกัดเอทิลแอสซิเตตมีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดสมากกว่าสารสกัดเมทานอล นอกจากนี้ได้นำสารสกัดทั้งสองมาทดสอบการเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งทั้ง 5 ชนิดและเซลล์ปกติ (fibroblast cell) พบว่าสารสกัดเอทิลแอสซิเตตมีฤทธิ์การยับยั้งเซลล์มะเร็งปอด (Chago-K1) และตับ (Hep-G2) โดยมีฤทธิ์การยับยั้งเซลล์มะเร็งปอด IC_{50} เท่ากับ 32 และ 40 $\mu\text{g/mL}$ ตามลำดับ และกากของส่วนสกัดหยาบเมทานอลมีฤทธิ์การยับยั้งเซลล์มะเร็งปอด IC_{50} เท่ากับ 79 $\mu\text{g/mL}$ การแยกสารบริสุทธิ์จากสกัดเอทิลแอสซิเตตโดยเทคนิคโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ (column chromatography) ไม่ประสบความสำเร็จ เนื่องจากความไม่คงสภาพของสารในขั้นตอนการแยก อย่างไรก็ตาม จาก $^1\text{H-NMR}$ spectroscopy บ่งชี้ว่าสารสกัดเอทิลแอสซิเตตประกอบด้วยสารในกลุ่มเทอร์พีนอยด์และสเตียรอยด์ (terpenoid and steroid compounds)

คำสำคัญ: เอนไซม์ไลเปส, เอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดส, เห็ดตับเต่า, เซลล์มะเร็ง

Project Title Extraction of Pancreatic Lipase and α -Glucosidase Inhibitors from
Thaegyroporus porentosus

Student Name Miss Pailin Phumkonsarn Student ID 5633124623

Advisor Name Surachai Pornpakakul, Ph.D.

Department of Chemistry, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Academic Year 2016

Abstract

The objectives of this study were to investigate the lipase and α -Glucosidase inhibitory activity of the ethyl acetate and methanol extracts from *Thaegyroporus porentosus*, and also isolate the bioactive compounds. The results showed that ethyl acetate extract at 25 and 1 mg/mL display lipase activity of 78% and α -Glucosidase inhibitory of 20% respectively, which methanol extracts at 25 and 10 mg/mL displayed an lipase inhibitory activity of 99 and α -Glucosidase inhibitory activity of 38 % respectively. The extract was examined of against 5 cancer cell line (Lung cancer cell (Chago-K1), Gastric cancer cell (KATO-III), Hepatic cancer cell (Hep-G2), Breast cancer cell (BT474), Intestine cancer cell (SW620) and Fibroblast cell (Wi-38)). In addition, the ethyl acetate extract exhibited cytotoxic activity against lung and hepatic cancer cells which its IC_{50} showed 32 and 40 μ g/mL and the methanol extract exhibited cytotoxic activity against lung cancer cells which its IC_{50} showed 79 μ g/mL. The ethyl acetate crude extract was thus isolated by column chromatography technique. Due to unstable bioactive compounds of the extract isolation process was unsuccessful. However, 1H -NMR data revealed that ethyl acetate extract compound of terpenoids and steroids.

Keywords: Lipase, α -glucosidase enzyme, *Thaegyroporus porentosus*, cancer cell

กิตติกรรมประกาศ

ในการทำงานวิจัยครั้งนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี เนื่องจากได้รับความช่วยเหลือจากหลายฝ่าย ผู้วิจัยขอขอบพระคุณ รศ.ดร.สุรัชย์ พรภคกุล ซึ่งเป็นที่ปรึกษาโครงการ ที่ให้คำปรึกษา แนะนำสิ่งต่างๆในการดำเนินการทดลองตลอดระยะเวลาการทำงานวิจัยนี้ และเป็นกำลังใจจนโครงการนี้สำเร็จ

ขอขอบพระคุณ ศ.ดร. ธวัชชัย ตันทุลานี และ รศ.ดร. ธรรมบุญ หนูจักร ที่ให้เกียรติเป็นกรรมการในการสอบและเสียสละเวลาในการตรวจสอบแก้ไขรายงานฉบับนี้ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณคณาจารย์ในภาควิชาเคมีทุกท่านที่ได้ประสิทธิ์ประสาทวิชาความรู้ให้แก่ข้าพเจ้า

ขอขอบพระคุณคุณทรงจันทร์ ภูทอง เจ้าหน้าที่สถาบันเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ ที่ช่วยให้ความรู้เกี่ยวกับการเพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็งและดำเนินการนำสารมาทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งชนิดต่างๆ

ขอขอบคุณนางสาวณัฐธา รัตนปัญญา นิสิตปริญญาเอกที่ให้ความเอื้อเฟื้อในการวิเคราะห์สารด้วย NMR Spectroscopy ให้คำแนะนำอื่นๆ ตลอดจนเป็นกำลังใจให้ผู้วิจัยเรื่อยมาจนการวิจัยสำเร็จ

ขอขอบคุณพี่ๆปริญญาเอก ปริญญาโทอื่นๆ เพื่อนๆภาคเคมีทุกคนที่คอยให้การช่วยเหลือในการทดลองและให้คำปรึกษาในการดำเนินการจัดทำเล่มรายงาน

และขอขอบพระคุณคุณพ่อ คุณแม่ และครอบครัวที่คอยเป็นกำลังใจ เป็นแรงผลักดันให้แก่ข้าพเจ้าได้ดำเนินการวิจัยนี้จนสำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี

สัญลักษณ์และคำย่อ

คำย่อ	ความหมาย
E	สารสกัดเห็ดตับเต่าด้วยเอทิลแอลกอฮอล์
M ₁	สารสกัดเห็ดตับเต่าที่สกัดด้วยเมทานอลแล้วตกตะกอนด้วยเอทิลแอลกอฮอล์ครั้งที่ 1
M ₂	สารสกัดเห็ดตับเต่าที่สกัดด้วยเมทานอลแล้วตกตะกอนด้วยเอทิลแอลกอฮอล์ครั้งที่ 2
M ₃	สารสกัดเห็ดตับเต่าที่สกัดด้วยเมทานอลแล้วตกตะกอนด้วยเอทิลแอลกอฮอล์ครั้งที่ 3
KATO-III	เซลล์มะเร็งกระเพาะอาหาร
BT474	เซลล์มะเร็งเต้านม
SW620	เซลล์มะเร็งลำไส้
Hep-G2	เซลล์มะเร็งตับ
Chago-K1	เซลล์มะเร็งปอด
Wi-38	เซลล์ปกติ
หลุม DMSO	หลุม negative control ที่ไม่เติม DMSO
C ⁺	ชุดควบคุมที่ไม่มีการเติมสารตัวอย่าง
PS	percentage survival (เปอร์เซ็นต์การอยู่รอด)

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ค
Abstract	ง
กิตติกรรมประกาศ	จ
สัญลักษณ์และคำย่อ	ฉ
สารบัญ	ช
สารบัญตาราง	ซ
สารบัญรูป	ฌ
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความเป็นมาและมูลเหตุจูงใจในการเสนอโครงการ	1
1.2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	8
1.3 วัตถุประสงค์งานวิจัย	8
บทที่ 2 วิธีการทดลอง	9
2.1 วัสดุดิบ	9
2.2 เครื่องมือและอุปกรณ์	9
2.3 สารเคมี	9
2.4 วิธีการทดลอง	10
บทที่ 3 ผลการทดลองและอภิปรายผลการทดลอง	15
บทที่ 4 สรุปผลการทดลอง	30
เอกสารอ้างอิง	31
ภาคผนวก	34
ประวัติผู้วิจัย	57

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1.1 แสดงการเปรียบเทียบลักษณะของ Necrosis กับ Apoptosis	7
3.2 แสดงผลการนำสารสกัดเห็ดตับเต่าด้วยเอทิลเอซิเตตและเมทานอลมาทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดสและเอนไซม์ไลเปส	16
3.3 แสดงผลการนำสารสกัดต่างๆจากเห็ดตับเต่ามาตรวจสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งทั้ง 5 ชนิดและเซลล์ปกติ (IC ₅₀)	18
3.4 แสดงน้ำหนัก fraction ของสารสกัดเอทิลเอซิเตตของเห็ดตับเต่าที่แยกโดยเทคนิคโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์	24
3.5 แสดงค่า chemical shife (δ) ที่ได้จาก ¹ H-NMR ของสาร	27
3.6 แสดงน้ำหนักของแถบสีต่างๆของส่วนสกัดเมทานอลที่แยกด้วย Preparative thin-layer chromatography (PLC)	29
ผ1 ร้อยละการอยู่รอดของเซลล์ (%cell curvival)	56

สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
1.1	2
1.1	เห็นดัดเต่า
1.2	4
1.2	การรีดิวิชั่น MTT เป็น Formazan
1.3	7
1.3	การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของเซลล์แบบ necrosis และ apoptosis
3.2.1	15
3.2.1	การ hydrolyze <i>p</i> -nitrophenyl- α -D-glucopyranoside (PNPG) เป็น <i>p</i> -nitrophenol
3.2.2	16
3.2.2	การ hydrolyze <i>p</i> -nitrophenylpalmitate (pNPP) เป็น <i>p</i> -nitrophenol
3.3	20
3.3	การนำสารสกัดด้วยเอทิลเอซิเตตของเห็ดดัดเต่ามาตรวจสอบการเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งมะเร็งปอด (Chago-K1)
3.4	21
3.4	การนำสารสกัดด้วยเอทิลเอซิเตตของเห็ดดัดเต่ามาตรวจสอบการเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งมะเร็งตับ (Hep-G2)
3.5	22
3.5	การนำสารสกัดด้วยเอทิลเอซิเตตของเห็ดดัดเต่ามาตรวจสอบการเป็นพิษต่อเซลล์กระเพาะอาหาร (KATO-III)
3.6	27
3.6	$^1\text{H-NMR}$ ของสารจาก fraction หมายเลข 31-98 ที่แยก 5-oxo-hexanoic acid ออกไป
3.7	28
3.7	$^1\text{H-NMR}$ ของสารส่วนสกัดหยาบเมทานอล
ผ1	40
ผ1	$^1\text{H-NMR}$ ของสาร β -D-(1 \rightarrow 3, 1 \rightarrow 6)-linked glucan ของ curdlan ซึ่งได้มาจากแบคทีเรีย
ผ2	41
ผ2	$^1\text{H-NMR}$ ของสาร Cassythicine ซึ่งเป็นสารประกอบ alkaloid
ผ3	41
ผ3	$^1\text{H-NMR}$ ของสาร glucan protein ของเห็ด <i>Polyporus dermatopus</i>
ผ4	42
ผ4	$^1\text{H-NMR}$ ของสาร <i>trans</i> -Resveratrol ใน $\text{D}_2\text{O}/\text{DMSO}$ ซึ่ง <i>trans</i> -Resveratrol เป็นสารประกอบ stilbene
ผ5	42
ผ5	$^1\text{H-NMR}$ ของสาร poly(carbonate-co-stilbene) 4 ใน CDCl_3
ผ6	43
ผ6	$^1\text{H-NMR}$ ของสาร 3,6-bis(3-bromopropoxy)-1-hydroxy-8-methyl-9H-xanthen-9-one ซึ่งเป็นสารประกอบ xantone
ผ7	44
ผ7	$^1\text{H-NMR}$ ของสาร 3,6-bis(3-bromopentoxy)-1-hydroxy-8-methyl-9H-xanthen-9-one ซึ่งเป็นสารประกอบ xantone

รูปที่	หน้า
ผ8	¹ H-NMR ของสาร gambogic acid ซึ่งเป็นสารประกอบ xantone 44
ผ9	¹ H-NMR ของสาร quercetin เป็นสารประกอบ flavonoid 45
ผ10	¹ H-NMR ของสาร anthocyanins 46
ผ11	¹ H-NMR ของสาร guaianolide ซึ่งเป็นสารประกอบ terpene 46
ผ12	¹ H-NMR ของสาร Leelamine (dehydroabietylamine) ซึ่งเป็นสารประกอบ terpene 47
ผ13	¹ H-NMR ของสาร beta-carotene สังเคราะห์ 47
ผ14	¹ H-NMR ของสาร lycopene 48
ผ15	¹ H-NMR ของสาร M ₁ 49
ผ16	¹ H-NMR ของสาร M ₂ 50
ผ17	¹ H-NMR ของสาร M ₃ 51
ผ18	¹ H-NMR ของสาร M ₄ 52
ผ19	¹ H-NMR ของสาร M ₅ 53
ผ20	¹ H-NMR ของสาร M ₆ 54
ผ21	¹ H-NMR ของสาร M ₇ 55
ผ22	¹ H-NMR ของสาร M ₈ 56

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและมูลเหตุจูงใจในการเสนอโครงการ

เนื่องจากในปัจจุบันนี้ ประชากรโลกมีภาวะน้ำตาลกลูโคสในเลือดสูงกว่าปกติ (hyperglycaemic) เพิ่มขึ้นในแต่ละปีทั้งในเด็กและผู้ใหญ่ ภาวะน้ำตาลในเลือดสูงกว่าปกตินี้เมื่อเกิดขึ้นแล้วจะทำให้มีแนวโน้มที่เกิดโรคอื่นๆได้มากมาย ซึ่งหากเป็นโรคนี้นี้มากจะก่อให้เกิดอันตรายต่อร่างกายจนสามารถเสียชีวิตได้ในที่สุด โรคเหล่านี้ เช่น โรคเบาหวาน โรคอ้วน ที่นำไปสู่โรคหัวใจ โรคเกี่ยวกับหลอดเลือด เป็นต้น โดยเฉพาะโรคเบาหวานนั้น มีการรายงานโดยศูนย์ควบคุมและป้องกันโรค (CDC) ว่าโรคเบาหวานเป็นสาเหตุอันดับที่ 7 ของความตายในสหรัฐอเมริกา และองค์การอนามัยโลกรายงานในปี ค.ศ. 2011 ว่า 2.2% ของผู้เสียชีวิตในโลกมาจากโรคเบาหวาน¹ ทั้งนี้ สาเหตุหนึ่งของการเกิดภาวะน้ำตาลในเลือดสูงมาจากการรับประทานอาหารประเภทไขมันหรือคาร์โบไฮเดรตมากเกินไป

กระบวนการร่างกายคนเรามีกระบวนการสลายอาหารประเภทไขมันและคาร์โบไฮเดรตคือ ไขมันที่ได้รับจากอาหารต่างๆ ที่รับประทานเข้าไปในร่างกายนั้นจะถูกย่อยด้วยเอนไซม์ไลเปส (lipase enzyme) ที่หลั่งจากตับอ่อนมาย่อยไขมันที่ลำไส้เล็กแล้วดูดซึมไปใช้เป็นพลังงาน ในส่วนไขมันที่มากเกินไปความต้องการจะถูกเก็บในเซลล์เก็บไขมันใต้ผิวหนังส่วนต่างๆ (adipose tissue) เพื่อใช้เป็นพลังงานสำรองในยามที่ร่างกายขาดแคลนพลังงาน ส่วนคาร์โบไฮเดรตนั้นจะถูกย่อยด้วยเอนไซม์อะไมเลส (amylase enzyme) ที่ปากด้วยเอนไซม์อะไมเลส (salivary amylase) ย่อยแบ่งให้เป็นคาร์โบไฮเดรตสายสั้น ถัดจากนั้นคาร์โบไฮเดรตสายสั้นจะถูกย่อยด้วยเอนไซม์อะไมเลสจากตับอ่อน (pancreatic α -amylase) กลายเป็นมอลโทส (maltose) และมอลโทไตรออส (maltotriose) จากนั้นเอนไซม์กลูโคซิเดส (glucosidase) จะย่อยโอลิโกแซคคาไรด์ (oligo-saccharides) ให้กลายเป็นกลูโคส (glucose) ที่ลำไส้เล็กแล้วดูดซึมไปยังอวัยวะต่างๆของร่างกายเพื่อใช้เป็นพลังงาน² ส่วนน้ำตาลกลูโคสที่เกินไปจะถูกฮอร์โมนอินซูลินเปลี่ยนเป็นไกลโคเจนเก็บไว้ที่ตับและกล้ามเนื้อ และถ้ายังมีเหลือก็จะสะสมไว้ในรูปของไขมันเก็บไว้ที่กล้ามเนื้อส่วนต่างๆของร่างกาย³ เพื่อใช้เป็นพลังงานสำรองเช่นกัน นั่นคือ ถ้าหากลดปริมาณเอนไซม์ไลเปสและเอนไซม์กลูโคซิเดส ได้จะทำให้ปริมาณน้ำตาลในลำไส้ถูกดูดซึมได้น้อยและช้าลง เกิดผลต่อระดับน้ำตาลในกระแสเลือดไม่เพิ่มขึ้นหรือเพิ่มได้แค่เพียงเล็กน้อย ตามลำดับ ส่งผลให้แนวโน้มการเกิดโรคภัยที่มีสาเหตุมาจากน้ำตาลในเลือดสูงนั้นลดน้อยลงด้วย⁴

จากการศึกษาทางวิจัยที่ผ่านมาพบว่า เห็ดหลายชนิดมีฤทธิ์ทางยาที่สามารถรักษาโรคหรืออาการของโรคหลายอย่าง เนื่องจากมีสารประกอบที่สามารถเพิ่มระบบภูมิคุ้มกันให้กับร่างกายได้ ทั้งนี้ในเห็ดมีสารออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้⁴ ได้แก่ สารประกอบฟีนอล (phenolic compounds)⁵, เทอร์ปีน (terpenes), น้ำตาลโมเลกุลใหญ่ (polysaccharides) และสเตียรอยด์ (steroids)⁶ การนำเห็ดไปใช้รักษาอาการต่างๆ เช่น มีการนำเห็ดไทยไป

ใช้รักษาภาวะน้ำตาลในเลือดสูง⁷ และยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส (anti-tyrosinase) การรับประทานเห็ดเพื่อลดปริมาณไขมันที่ทำให้โรคไขมันอุดตันที่กล้ามเนื้อหัวใจและหลอดเลือด⁸ จนถึงการใช้อย่างมีประสิทธิภาพสูงคือการนำเห็ดบางชนิดช่วยรักษามะเร็ง นอกจากนี้จากการศึกษาข้อมูลในแหล่งต่างๆพบรายงานทางเภสัชวิทยาว่าการรับประทานเห็ดไม่เพียงแต่ช่วยรักษาอาการหรือโรคต่างๆได้เท่านั้น แต่ยังสามารถรับประทานเป็นอาหารเสริมได้อีกด้วย กล่าวคือ มีฤทธิ์ยับยั้งระบบประสาทส่วนกลางโดยทำให้เกิดการผ่อนคลายของกล้ามเนื้อ และหลับได้ยาวนาน เพิ่มการไหลเวียนของเลือด ช่วยขับเสมหะ ช่วยจับสารเคมีที่เป็นพิษ และทำให้ผ่านลำไส้ได้อย่างรวดเร็ว ลดความเสี่ยงต่อการเกิดมะเร็งลำไส้ได้ด้วย⁹

ด้วยสรรพคุณต่างๆนี้ของเห็ดตับเต่ายังไม่มีการทำวิจัยศึกษาองค์ประกอบทางเคมีเห็ดตับเต่า ด้วยเหตุนี้งานวิจัยนี้จึงมุ่งสกัดสารจากเห็ดตับเต่าโดยมีวัตถุประสงค์การทำวิจัยคือ ศึกษาฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์ไลเปสและเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดสของสารสกัดจากเห็ดตับเต่า คือสารสกัดเอทิลแอลกอฮอล์และสารสกัดเมทานอลแล้วแยกสารที่สามารถยับยั้งเอนไซม์ดังกล่าวด้วยเทคนิคทางโครมาโทกราฟี จากนั้นได้ทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งด้วย ทั้งนี้เพื่อเป็นทางเลือกในการนำเห็ดตับเต่าบริโภคในทางเภสัชที่จะลดระดับน้ำตาลในเลือดอันทำให้เกิดโรคต่างๆได้ต่อไป

เห็ดตับเต่า



รูปที่ 1.1 เห็ดตับเต่า

ที่มา : <http://2.bp.blogspot.com>

- ชื่อวิทยาศาสตร์ : *Thaeogyroporus porentosus*
 ชื่อพ้อง : *Boletus edulis*
 ชื่อวงศ์ : Boletaceae
 ชื่อสามัญ : Bolete

ลักษณะทางเห็ดราวิทยา เห็ดดักเต่าเป็นเห็ดราอยู่ในกลุ่มเอคโตไมคอร์ไรซา (ectomycorrhiza) เอคโตไมคอร์ไรซาเป็นราชั้นสูงที่สามารถสร้างดอกเห็ดได้ดีตามรากพืช ซึ่งรากพืชต้องเป็นรากที่มีอายุน้อยหรือรากขนอ่อน ลักษณะของดอกเห็ดนั้นค่อนข้างใหญ่ หมวกเห็ดมนทรง กระทะคว่ำ ผิวมัน เนื้อแข็ง ดอกสีน้ำตาลเข้ม ด้านล่างหมวกมีสปอร์กลมเล็กๆ สีเหลือง ก้านหมวกอวบใหญ่ ยาว 4 - 8 ซม. เส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 3 - 4 ซม. โคนก้านหมวกโป่งเป็นกระเปาะ ขยายพันธุ์ด้วยสปอร์ เมื่อผ่าดูเนื้อในเห็ดถูกอากาศจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำเงินอมเขียว ในประเทศไทยนั้นพบได้ทั่วไปตามภาคเหนือ ภาคอีสาน และภาคใต้ ทางภาคเหนือเรียกว่า “เห็ดห้า” เนื่องจากมักเจอเห็ดดักเต่าอยู่ใต้ต้นหว้า(ต้นห้า) ทางภาคอีสานเรียกว่า “เห็ดผึ้ง” หรือ “เห็ดผึ้ง” เพราะเมื่อนำเห็ดดักเต่าไปประกอบอาหาร สีของน้ำแกงจะเหมือนสีน้ำผึ้ง

สรรพคุณ เห็ดดักเต่านี้ได้รับความสนใจในด้านสรรพคุณทางยาต่างๆมากมาย เช่น ใช้บำรุงหัวใจ บำรุงกำลัง บำรุงตับ บำรุงปอด กระจายโลหิต และดับพิษร้อนภายในร่างกาย อีกทั้งยังช่วยบำบัดอาการปวดหลัง ปวดข้อ ปวดเส้นเอ็นและกระดูก ป้องกันการชักกระตุก คนจีนใช้เป็นสมุนไพร แก้เคล็ดขัดยอก และปวดกระดูก นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าเห็ดดักเต่าสามารถลดอาการอาการระดูขาว หูดการเติบโตและต่อต้านเนื้อร้ายหรือเซลล์มะเร็งได้อีกด้วย^{10,11}

เอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดส (α -Glucosidase enzyme)

เอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดส เป็นเอนไซม์ที่พบที่ผนังลำไส้เล็ก ทำหน้าที่ย่อยคาร์โบไฮเดรตและโอลิโกแซคคาไรด์ (oligosaccharide) ให้เป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว (monosaccharide) หรือน้ำตาลกลูโคส ปัจจุบันมีการยับยั้งเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดสหลายวิธีเพื่อลดระดับน้ำตาลในเลือดและรักษาโรคเบาหวาน เช่น การใช้ยาอะคาร์โบส (acarbose) การใช้สมุนไพร เป็นต้น¹²

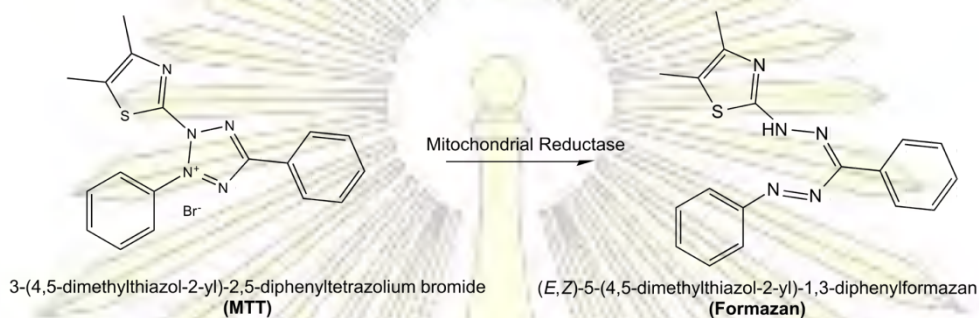
เอนไซม์ไลเปส (Lipase enzyme)

เอนไซม์ไลเปส หรือ triacylglycerol acylhydrolase เป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส (hydrolysis) ของไตรกลีเซอไรด์ให้เปลี่ยนเป็นกลีเซอรอลและไขมัน พบได้ทั่วไปในสิ่งมีชีวิตหลายชนิดทั้งคน สัตว์ปีก แบคทีเรีย ยีสต์และเชื้อรา¹³

MTT assay

MTT assay เป็นวิธีการที่ใช้เพื่อศึกษาปริมาณวิเคราะห์ความอยู่รอดของเซลล์ หลักการคือ เซลล์ที่มีชีวิตเท่านั้นจึงจะสามารถเปลี่ยน tetrazolium salt MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide) ซึ่งมีสีเหลืองเป็น formazan salt ด้วย succinate-tetrazolium reductase system

ซึ่งพบในปฏิกิริยาที่ใช้การหายใจในไมโทคอนเดรียของเซลล์ formazan salt นี้ไม่ละลายน้ำ แต่สามารถละลายได้ใน solubilized เช่น DMSO เกิดเป็นสารสีม่วง ในการทดลองจะใช้สารละลาย DMSO ทำให้เซลล์แตกแล้ว formazan ละลายออกมา จากนั้นวัดค่าการดูดกลืนแสง ใช้ความยาวคลื่นที่สัมพันธ์กับสี formazan การตรวจ MTT มักจะทำในที่มืดเนื่องจากสารละลาย MTT มีความไวต่อแสง^{14,15}



ที่มา : <https://en.wikipedia.org>.

รูปที่ 1.2 การรีดิวซ์ MTT เป็น Formazan

Cell Death¹⁶

Cell death เมื่อการบาดเจ็บของเซลล์รุนแรงมากขึ้น ทำให้เซลล์เปลี่ยนแปลงมากทั้งด้านชีวโมเลกุล โครงสร้างและหน้าที่ จนไม่สามารถซ่อมแซมได้ และเซลล์ตายในที่สุด การตายของเซลล์แบ่งตามลักษณะการเปลี่ยนแปลงทางโครงสร้าง กลไกการเกิด และบทบาทที่พบการเปลี่ยนแปลง เป็น Necrosis และ Apoptosis

1. การตายแบบ Apoptosis

เป็นการตายของเซลล์เดี่ยวๆ เมื่อหมดอายุขัยตามที่กำหนดไว้ ซึ่งเรียกว่า programmed cell death หรือ เป็น suicide program ก็ได้ เมื่อเซลล์ถูกกำหนด หรือถูกสิ่งเร้าบางอย่างกระตุ้นทำให้เอนไซม์ต่างๆภายในเซลล์ถูกกระตุ้น ตามลำดับ และย่อยสลายทั้ง Nuclear DNA และโปรตีนต่างๆทั้งที่อยู่ในนิวเคลียสและในเซลล์สุดท้ายเซลล์จะแตกออกเป็นชิ้นส่วนเล็กๆที่เรียกว่า Apoptotic bodies ซึ่งมี cell membrane ล้อมรอบและภายใน Apoptotic bodies จะประกอบด้วยเศษนิวเคลียส และ organelles ต่างๆ หลังจากนั้นเซลล์ข้างเคียงและเซลล์ Macrophages จะเก็บ Apoptotic bodies เข้าไปทำลายโดยไม่มีปฏิกิริยาการอักเสบ

ดังนั้นจึงเป็นที่ยอมรับถึงความแตกต่างทั้งสาเหตุ กลไก และพยาธิสภาพของ Apoptosis และ Necrosis ซึ่งสาเหตุการตายของเซลล์ อาจจะเป็นตามอายุขัยที่กำหนดไว้แล้ว โดยเฉพาะในช่วงเจริญเติบโตของทารกในครรภ์ ตามปกติ หรือปัจจุบันพบว่า อาจเกี่ยวข้องกับ pathologic stimuli บางอย่าง มากกระทำ จะเริ่มจากที่ DNA ภายใน nucleus เสียสภาพไม่สามารถซ่อมแซมได้ เซลล์จะทำลายตนเองโดยเริ่มต้นจากการเปลี่ยนแปลงภายใน

Nucleus ก่อน จากนั้นเซลล์จะแตกออกเป็นส่วนๆ โดยที่ไม่มีความผิดปกติของ membrane หลังจากนั้น ส่วนของเซลล์ที่แตกเป็นส่วนๆนั้นจะถูกเก็บกินโดยเซลล์ข้างเคียงหรือ Macrophages

เนื่องจากการตายของเซลล์แบบ Apoptosis จะเริ่มต้นด้วยการเปลี่ยนแปลงที่นิวเคลียสก่อน โดย Chromatin จะติดสีเข้มและจับตัวเป็นกลุ่มก้อน (Clumps) ไปติดอยู่ที่ nuclear membrane ต่อมาทั้งตัวเซลล์และ nucleus จะยื่นโป่ง ออกโดยรอบ หลังจากนั้นเซลล์ก็แตกออกเป็นชิ้นส่วนเล็กๆ เรียกว่า Apoptotic bodies และ Apoptotic bodies จะถูกกิน หรือ Phagocytosis โดยเซลล์ข้างเคียง และ เม็ดเลือดขาวพวก macrophages จนหมด โดยไม่เกิดปฏิกิริยาการอักเสบของร่างกาย ลักษณะที่เห็นจากกล้องจุลทรรศน์ธรรมดา พบว่าเซลล์จะเหี่ยว (Cell Shrinkage) มี cytoplasm ที่แดงเข้ม นิวเคลียสมีการติดสีโครมาตินสีน้ำเงินที่เข้ม ต่อมาจะเห็นลักษณะยื่นออกของทั้งผิวของนิวเคลียสและเซลล์ออกไปเป็นชิ้นส่วนเล็กๆ (Formation of Cytoplasmic Bleb and apoptotic bodies) โดยแต่ละส่วนจะมี cell membrane ล้อมรอบและภายในก็มีทั้ง เศษนิวเคลียสและ organelles เรียกว่า Apoptotic bodies และสุดท้ายเซลล์ macrophages หรือเซลล์ข้างเคียง จะกินส่วนดังกล่าวเข้าไปย่อยภายในเซลล์ เรียกว่า Phagocytosis of Apoptotic bodies

2. การตายแบบเฉพาะส่วน

การตายแบบเฉพาะส่วน หรือ Necrosis การตายแบบนี้จะมีการหลั่งเอนไซม์พิเศษ คือเริ่มจากเปลี่ยนแปลงที่ membrane ของทั้งเซลล์และ organelles ภายในเซลล์ ทำให้ lysosomal enzyme ไหลออกจาก lysosome เข้าสู่ cytoplasm และย่อยสลายโปรตีนและส่วนต่างๆภายในเซลล์ หรืออาจออกมายังภายนอกเซลล์จึงทำให้เกิดการทำลายเซลล์ข้างเคียงด้วย เนื่องจากภายหลังจากที่เซลล์ตาย เซลล์ไม่สามารถรักษาสภาพของ cell membrane ดังนั้นส่วนประกอบภายในเซลล์จะไหลสู่ภายนอกและกระตุ้นขบวนการอักเสบตามมา ส่วนหนึ่งของเอนไซม์ที่ย่อยเซลล์นั้นจะมาจาก lysosome ของเซลล์ที่ตายเอง เรียกว่า Autolysis หรือ จากเอนไซม์ที่หลั่งจากเซลล์อักเสบ เรียกว่า Heterolysis จากการศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์ธรรมดา พบว่า Cytoplasm ของ เซลล์ตาย แบบ Necrosis จะแดงมากขึ้น เนื่องจาก ความผิดปกติของ RNA ใน Cytoplasm เอง และ การที่สีย้อมขึ้นเนื้อชนิด Eosin ซึ่งเป็นสีแดงจับกับโปรตีนที่เสียสภาพใน Cytoplasm มากขึ้น นอกจากนั้นจะพบว่า Cytoplasm จะมีลักษณะติดสีแดงที่เนียนๆไม่ เหมือนปกติ เนื่องจาก Glycogen ที่สะสมใน Cytoplasm หายไปและในระยะต่อมา อาจจะมีการสะสมของ Calcium salt ตามมาได้

สำหรับ Nucleus ก็จะพบการเปลี่ยนแปลงได้ 3 แบบ คือ

- Karyolysis เป็นการเปลี่ยนแปลงของนิวเคลียสโดยจะพบว่าสีน้ำเงินของ นิวเคลียสจะจางลงและไม่คมชัด เนื่องจากปฏิกิริยาของเอนไซม์ endonuclease ต่อ Chromatin

- Pyknosis คือ การเปลี่ยนแปลงที่นิวเคลียสโดยนิวเคลียสจะเหี่ยวและมีสีน้ำเงินเข้ม เนื่องจาก

DNA รวมตัวเป็นก้อนสีน้ำเงินเข้ม (อาจจะพบในการตายของเซลล์แบบ Apoptosis ได้เช่นกัน)

- Karyorrhexis นิวเคลียสที่เหี่ยวและจับเป็นกลุ่มก้อนสีน้ำเงิน (Pyknosis) จะแตกออกเป็นส่วนเล็กๆ อย่างไรก็ตามสุดท้ายอาจจะพบเซลล์ตายโดยที่ไม่เห็นส่วนของนิวเคลียสเนื่องจากการนิวเคลียสของเซลล์ที่ตายจะแตกเป็นชิ้นส่วนเล็กๆและสลายไปในที่สุด

ลักษณะการตายเฉพาะส่วนของเนื้อเยื่อแบ่งออกเป็น 5 รูปแบบเด่นๆ ได้ดังนี้

1. Coagulative necrosis แม้ว่าเนื้อเยื่อตายแล้ว แต่ยังมีทรงสภาพหรือโครงร่างของเนื้อเยื่อที่ตายไว้ในระยะหนึ่ง เข้าใจว่า เกิดจากการเสียสภาพของโปรตีนรวมทั้งเอนไซม์ต่างๆภายในเซลล์เนื้อเยื่อ โตส่วนที่ตายจะคงสภาพอยู่ เห็นขอบเขตแยกจากส่วนที่ไม่ตายได้ชัดและมีสีซีดกว่า เนื้อเยื่อข้างเคียง และผลการศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์ธรรมดา พบว่า มีการคงสภาพ ของโครงสร้างของเนื้อเยื่อโต ทั้งส่วนที่เป็น Glomerulus และ tubules แต่ภายในเซลล์ที่ ตายไม่เห็นนิวเคลียสแล้ว และ Cytoplasm มีสีชมพู-แดงเข้มสม่ำเสมอ

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

3. Fat necrosis เป็นผลจากการทำงานของเอนไซม์ไลเปสย่อยเนื้อเยื่อไขมัน ลักษณะเนื้อตายเป็นสีเหลืองซีด อาจเห็นจุดขาวคล้ายซอล์ค ในกล้องจุลทรรศน์จะเห็นบริเวณเซลล์ไขมันที่ถูกเอนไซม์ย่อยเป็นปื้นสีชมพูอมม่วง ในขณะที่เซลล์ที่ตายแบบไม่มีเอนไซม์ย่อยจะเห็นเซลล์ไขมันเชื่อมปะปนกับฮิสติโอไซต์ (histiocyte) ในบางครั้งอาจพบปฏิกิริยาการเปลี่ยนเป็นสบู่ (saponification) ในเนื้อเยื่อได้พบในตับอ่อนอักเสบเฉียบพลันและการตายของเนื้อเยื่อเต้านม

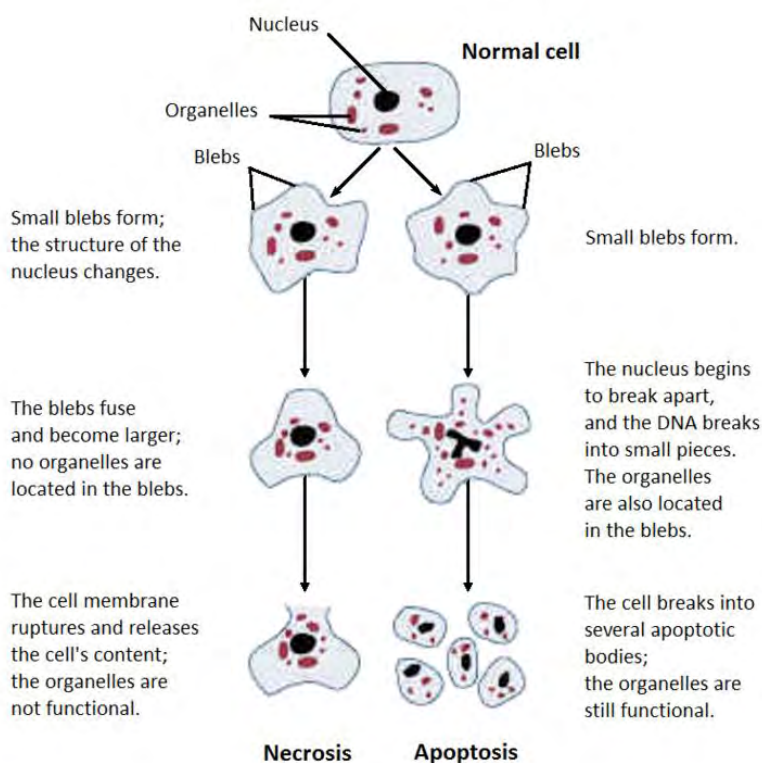
4. Caseous necrosis เป็นลักษณะการตายแบบ coagulation necrosis ที่จำเพาะต่อเชื้อไมโคแบคทีเรีย (mycobacteria) (เช่นวัณโรค) , เชื้อรา, และวัตถุแปลกปลอมบางชนิด บริเวณที่ตายจะออกสีเหลืองเหมือนเนย ไม่เป็นช่องว่าง มีขอบเขตเซลล์ไม่ชัด Cytoplasm สีชมพูปริมาณมาก เรียกว่า Epithelioid histiocytes และ Multinucleated giant cells (ซึ่งเกิดจากเซลล์ Epithelioid histiocytes หลากๆ เซลล์รวมตัวกันเป็นเซลล์ตัวโตที่มีหลายนิวเคลียส) การรวมกลุ่มของเซลล์ดังกล่าวเรียกว่า Granuloma และพบการตายรูปแบบคล้ายกับ Coagulative necrosis ตรงกลาง Granuloma จึงเรียกว่า Caseous Necrosis อาจกล่าวได้ว่าเป็นการตายรูปแบบผสมระหว่าง coagulative และ liquefactive necroses

5. Fibrinoid necrosis เป็นรูปแบบพิเศษของการตายของเนื้อเยื่อแบบ Necrosis ที่ หลอดเลือดส่วนใหญ่เกิดจากปฏิกิริยาภูมิคุ้มกันของร่างกายเอง และเมื่อมีการสะสมของ immune complex ที่ผนังของ

หลอดเลือด ดังนั้นผนังของ หลอดเลือดจะถูกแทนที่ด้วยชั้นสีชมพูซึ่งเป็น immune complex และอาจพบ Fibrinoid Necrosis ของ Arterioles ในผู้ป่วยความดันโลหิตสูงที่รุนแรงได้

ตารางที่ 1.1 แสดงการเปรียบเทียบลักษณะของ Necrosis กับ Apoptosis

	Necrosis	Apoptosis
สิ่งที่กระตุ้น	Pathologic stimuli	Physiologic or Pathologic stimuli
เกิดกับ	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
การเปลี่ยนแปลง ภายหลังเซลล์ตาย	เกิดปฏิกิริยาการอักเสบ (Inflammation)	มีแต่ Phagocytosis และ ไม่มี ปฏิกิริยาการอักเสบ



รูปที่ 1.3 การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของเซลล์แบบ necrosis และ apoptosis

ที่มา <https://en.wikipedia.org/wiki/Necrosis>

1.2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับเห็ดอื่น ๆ ที่มีฤทธิ์ทางเภสัชคล้ายกับเห็ดตับเต่าและอยู่ในวงศ์เดียวกับเห็ดตับเต่า (Boletaceae)

ขวัญตา เขียวรินทร์และคณะ¹⁷ ได้สกัดสารจากเห็ดป่า *Phlebopus portentosus* ด้วยตัวทำละลาย 4 ชนิด ได้แก่ ethanol, methanol, น้ำ และ 1% HCl ในน้ำ เพื่อเปรียบเทียบปริมาณ phenolic ในเห็ดทั้ง 4 ชนิดต่อการยับยั้งอนุมูลอิสระ ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส และการลดน้ำตาลในเลือด พบว่า *Phlebopus portentosus* ที่มีน้ำเป็นตัวทำละลายนั้นสามารถสกัดให้ phenolic มากกว่าตัวทำละลายอื่นๆ และสามารถยับยั้งอนุมูลอิสระได้มากกว่าการสกัดด้วยตัวทำละลายอื่นๆ

Michele Bovi และคณะ¹⁸ ได้สกัดแยกเลคตินจากเห็ดน้ำผึ้ง *Boletus edulis* เรียกเลคตินนี้ว่า B. edulis lectin หรือ BEL พบว่า BEL นี้ยับยั้งการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งที่ร้ายแรงหลายเซลล์และเชื่อมโยงกับ T-antigen disaccharide ของเซลล์มะเร็งเต้านมที่เฉพาะเจาะจง (Gal β 1-3GalNAc) นอกจากนี้ คณะวิจัยนี้ยังได้ศึกษาโครงสร้างของเลคตินของเห็ดน้ำผึ้ง (BEL) ด้วย

Yuntao และคณะ¹⁹ ได้ศึกษาองค์ประกอบทางเคมี 13 สารสำคัญของเห็ดจีนัส boletus 5 ชนิด ได้แก่ *Boletus aereus*, *Suillus bovinus*, *Suillellus luridus*, *Boletus edulis* และ *Boletus violaceo-fuscus* Chiu พบว่าองค์ประกอบทางเคมีของเห็ดเหล่านี้ต่างมีผลต่อการลดน้ำตาลในเลือดและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ นอกจากนี้ยังมีปริมาณโปรตีนและคาร์โบไฮเดรตสูงแต่มีไขมันต่ำ เห็ดทั้ง 5 ชนิดนี้มีคุณค่าทางโภชนาการต่างกัันนั้นมีผลมาจากปริมาณแร่ธาตุอาหารในดินต่างกัน

Aleksandra Novakovic และคณะ²⁰ ได้ศึกษาฤทธิ์การยับยั้งอนุมูลอิสระและฤทธิ์การยับยั้งเซลล์มะเร็งเต้านมของส่วนสกัดหยาบของหมวกและลำต้นเห็ดน้ำผึ้ง (*Boletus edulis*) ที่มีน้ำและเอทานอลเป็นตัวทำละลาย พบว่าสารสกัดจากหมวกเห็ดน้ำผึ้งที่มีน้ำเป็นตัวทำละลายนั้นมีฤทธิ์การยับยั้งอนุมูลอิสระสูงที่สุด แต่สารสกัดจากลำต้นของเห็ดน้ำผึ้งที่มีเอทานอลเป็นตัวทำละลายนั้นสามารถต้านมะเร็งเต้านมในมนุษย์ได้มากที่สุด โดยมีค่า IC₅₀ = 56 μ g/mL

1.3 วัตถุประสงค์งานวิจัย

1. เพื่อสกัดและแยกสารบริสุทธิ์จากเห็ดตับเต่าที่สามารถยับยั้งเอนไซม์ไลเปสและเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดสด้วยเทคนิคทางโครมาโทกราฟี
2. เพื่อทดสอบฤทธิ์ของสารบริสุทธิ์จากเห็ดตับเต่าในการยับยั้งเอนไซม์ไลเปสและเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดส

บทที่ 2

การทดลอง

2.1 วัตถุประสงค์

เห็นระดับเต่าจากจังหวัดลำปางหนัก 2.38 kg นำมาแช่เมทานอล 4 L เป็นเวลา 48 ชั่วโมง กรองสารสกัด และนำไประเหยตัวทำละลายออก ทำให้ได้ส่วนสกัดหยาบปริมาณ 20.0847 กรัม

2.2 เครื่องมือและอุปกรณ์

1. ปีกเกอร์ขนาด 50 mL, 100 mL, 150 mL, 250 mL, 500 mL
2. กระบอกตวงขนาด 10 mL, 50 mL, 100 mL
3. ขวดกั่นกลมขนาด 25 mL, 50 mL, 100 mL, 250 mL
4. กระดาษกรอง และ กรวยแก้ว
5. กระชอนหยาบ, แท่งแก้วคนสาร, หลอดหยด
6. ขวดเก็บ fraction
7. หลอดทดลอง
8. คอลัมน์สำหรับทำโครมาโทกราฟีขนาดต่างๆ
9. Thin Layer Chromatoplate (TLC)
10. Rotatory Vacuum Evaporator
11. เครื่องชั่งไฟฟ้า 2 และ 4 ตำแหน่ง
12. NMR Spectrometer
13. Sonicator
14. Microtiter Plate Reader
15. 96-well (8x12) microtiter plate
16. Micropipette ขนาด 200 μ L และ 1,000 μ L
17. NMR Tube และ ฝาปิดหลอด NMR
18. Suction flask , Buchner Funnel และ Ring Support
19. CO₂ Incubator
20. Tissue culture flask 25 cm³
21. Tissue culture plate 96 well

2.3 สารเคมี

1. Hexane
2. Ethyl acetate
3. Ethanol
4. Methanol
5. Dichloromethane
6. Chloroform
7. Deuterated solvents for NMR ได้แก่ Chloroform, Deuterium oxide , Methanol, Dimethyl Sulfoxide-d₆,
8. α -glucosidase enzyme (1 unit/mL)
9. *p*-nitrophenyl- α -D-galactopyranoside (PNPG)
10. *p*-nitrophenylpalmitate (pNPP)
11. Sodium Carbonate (Na₂CO₃)
12. Dimethyl sulfoxide (DMSO)
13. Phosphate Buffer pH 6.7
14. Silica gel
15. Liquid and powder medium (RPMI1640)
16. Fetal calf serum
17. Trypsin
18. 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide (MTT)
19. Normal saline
20. Ethylene diamine tetra-acetic acid (EDTA)

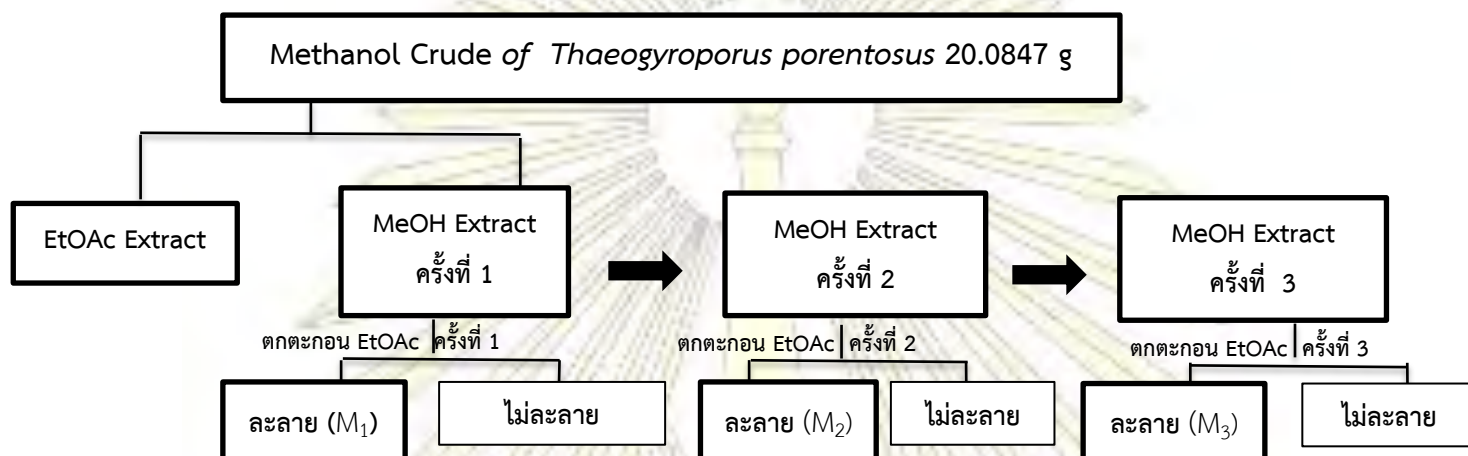
2.4 วิธีการทดลอง

2.4.1 การเตรียมสารสกัดของเห็ดตับเต่า

- 1) นำสารสกัดเห็ดตับเต่าที่สกัดด้วยเมทานอล มาสกัดต่อด้วยเอทิลแอลกอฮอล์และเมทานอลได้เป็นสารสกัดเห็ดตับเต่าเป็น 2 ส่วนคือ
 - I สารสกัดเอทิลแอลกอฮอล์
 - II สารสกัดเมทานอล

2) สารสกัดเมทานอล (II) มาละลายในเมทานอลแล้วนำส่วนที่ละลายที่ได้นั้นมาทำตกตะกอนด้วยเอทิล-แอซิเตตทำซ้ำเช่นนี้สามครั้ง ดังแผนภาพ

การตกตะกอนของสารสกัดให้ติดับเต่าด้วยเมทานอลโดยเอทิลแอซิเตต



3) นำ M_1 , M_2 และ M_3 ไปแยกหาสารบริสุทธิ์ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ต่อไป

2.4.2 การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดสและเอมไซม์ไลเปส

สารตัวอย่าง I สารสกัดเอทิลแอซิเตต 5.2 mg ละลายด้วย DMSO 1 mL

สารตัวอย่าง II สารสกัดเมทานอล 20.0 mg ละลายด้วย DMSO 1 mL

2.4.2.1 การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดส²⁰

1) เติมเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดส (α -glucosidase) 10 μ L และสารตัวอย่าง I ใน DMSO ปริมาตร 10 μ L ใน 96-well (8x12) microtiter plate (ใน control well จะไม่เติม sample และใน blank well จะไม่เติม α -glucosidase)

2) เติม potassium phosphate buffer (pH 6.8) 50 mM ปริมาตร 150 μ L แล้วบ่มทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 60 นาที

3) เริ่มปฏิกิริยาด้วยการเติมสารตั้งต้น *p*-nitrophenyl- α -D-glucopyranoside (PNPG) 1.0 mM ปริมาตร 30 μ L แล้วบ่มทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 30 นาที

4) เติม sodium carbonate (Na_2CO_3) ความเข้มข้น 1.0 M เพื่อหยุดปฏิกิริยา

- 5) วัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง Microtiter Plate Reader ที่ 405 nm
- 6) คำนวณ % inhibitor โดยใช้สูตร

$$\% \text{ inhibitor} = \left[\frac{(A-a)-(B-b)}{(A-a)} \times 100 \right]$$

โดย A และ B คือค่าการดูดกลืนแสงของน้ำและสารสกัดเห็ดตับเต่าที่มีเอนไซม์

a และ b คือค่าการดูดกลืนแสงของน้ำและสารสกัดเห็ดตับเต่าที่ไม่มีเอนไซม์

- 7) นำสารตัวอย่าง II มาทำการทดลองเช่นเดียวกับสารตัวอย่าง I ตามขั้นตอน 1) ถึง 6)

2.4.2.2 การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไลเปส²¹

- 1) เตรียมสารละลาย Tris hydrochloride (Tris-HCl) 0.061 M 500 mL โดยใช้ Tris HCl (MW= 121.149) 2.265 g
- 2) เติมน้ำ (Tris-HCl) 0.061 M pH 8.5 ปริมาตร 280 μ L และสารตัวอย่าง I ปริมาตร 10 μ L ใน 96-well (8x12) microtiter plate
- 3) เติมน้ำ DMSO 32 μ L แล้วเติมน้ำ p-nitrophenyl palmitate (pNPP) 6.66 mM ปริมาตร 40 μ L แล้วบ่มทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 37 $^{\circ}$ C นาน 5 นาที
- 4) เติมน้ำ absolute ethanol 600 μ L แล้วเติมน้ำ pancreatic lipase enzyme 5 mg/mL ปริมาตร 48 μ L แล้วบ่มทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 37 $^{\circ}$ C นาน 25 นาที (แต่ใน control well plate จะเติมน้ำ pancreatic lipase enzyme 5 mg/mL ปริมาตร 48 μ L ก่อนเติมน้ำ absolute ethanol 600 μ L)
- 5) วัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง Microtiter Plate Reader ที่ 405 nm
- 6) คำนวณ % inhibitor โดยใช้สูตร ดังสมการ 2.1
- 7) นำสารตัวอย่าง II มาทำการทดลองเช่นเดียวกับสารตัวอย่าง I ตามขั้นตอน 1) ถึง 6)

2.4.3 การทดสอบการเป็นพิษต่อเซลล์ (cytotoxicity assay)

ส่งตัวอย่างสารทดสอบที่สถาบันวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

1) การเตรียมเซลล์

เซลล์ที่ใช้เป็น cell line จาก American Type Culture Condition (ATCC) ได้แก่ เซลล์ดังต่อไปนี้

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
Wi-38	เซลล์ปกติ	Fibroblast, lung, Human

เลี้ยงเซลล์ใน tissue culture flask ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI1640 ที่ผสม fetal calf serum 5% บ่มที่ 37 °C 5% CO₂ ไร่ประมาณ 3 วัน (มีเซลล์ 2-4 x 10⁶ เซลล์/ขวด) จากนั้นดูดอาหารเลี้ยงเซลล์เก่าออก เติมน้ำ 0.05% trypsin+0.01% EDTA ปริมาตร 0.5-1 mL ใช้เวลาบ่มประมาณ 2-5 นาที จนเซลล์หลุด คูด trypsin ที่เติมอาหารเลี้ยงเซลล์ใหม่ เคาะให้เซลล์หลุด เจาจางให้เซลล์มีความเข้มข้น 2.5x10⁴ cell/mL เติมน้ำปริมาตร 100 µL ลงใน microtiter plate 96 well ที่มีอาหารเลี้ยงเซลล์อยู่ 100 µL/well (ปริมาณเซลล์ 2.5x10³ cell/well/200 µL)

2) การเตรียมสารที่ต้องการทดสอบเซลล์

สารตัวอย่างที่นำมาทดสอบนั้นมี 4 ชนิด ได้แก่

I กากที่เหลือจากการสกัดด้วยเมทานอล	หนัก 51.4 g
II สกัดด้วยเมทานอล	หนัก 44.3 g
III สารสกัดเห็ดตับเต่าด้วยเมทานอลตั้งต้น	หนัก 23.8 g
IV สารสกัดด้วย เอทิลแอลกอฮอล์	หนัก 5.20 g

เตรียมสารที่ต้องการทดสอบเข้มข้น 1 mg/mL ละลายใน ethanol หรือ DMSO โดยการหาค่า IC₅₀ เจาจางที่ความเข้มข้น 100, 10, 1, 0.1 และ 0.01 µg/mL

3) การเตรียมสารละลาย MTT

ชั่ง MTT เจาจาง MTT ใน normal saline ให้มีความเข้มข้น 5 mg/mL ละลายจนหมดไม่ให้เกิดตะกอน (เก็บไว้ในขวดสีชาที่ 4 °C สามารถเก็บไว้ได้ 1 เดือน)

4) ขั้นตอนการทดลอง

4.1) เลี้ยงเซลล์ 2.5×10^3 cell/well จากข้อ 1) บ่มไว้ที่ 37°C 5% CO_2 นาน 24 ชั่วโมง

4.2) เติมน้ำที่ ต้องการทดสอบ จากข้อ 2) ปริมาตร $2 \mu\text{L/well}$ (1:100 สารเจือจาง 100 เท่า) บ่มไว้ 72 ชั่วโมง (3 วัน)

4.3) เติมน้ำ MTT 5 mg/well จากข้อ 3) ปริมาตร $10 \mu\text{L/well}$ บ่มไว้ในตู้เซลล์นาน 4 ชั่วโมง ดูอาหารเลี้ยงเซลล์ทิ้ง (หลุม negative control ไม่เติม MTT)

4.4. เติมน้ำ 100% DMSO ปริมาตร $150 \mu\text{L/mL}$ เขย่าบน plate mixer นาน 2-3 นาที

4.5 วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 nm

5) การคำนวณ

$$\text{เปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์ (\% cell survival)} = \frac{\text{ค่าการดูดกลืนแสงหลุมที่ใส่สารทดสอบ}}{\text{ค่าการดูดกลืนแสงหลุมที่ไม่ใส่สารทดสอบ}} \times 100 \quad (2.2)$$

นำค่าเปอร์เซ็นต์การรอดของเซลล์มาสร้างกราฟเพื่อใช้คำนวณหาความเข้มข้นของสารที่ทำให้เซลล์มีการรอด 50% หรือหาค่า IC_{50} (Inhibit concentration 50%) โดยกำหนดให้แกน X เป็น log ของความเข้มข้นของสาร และแกน Y เป็น % cell survival

2.4.4 การแยกหาสารบริสุทธิ์ที่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ (cytotoxicity activity)

2.4.4.1 นำสารสกัดเอทิลเอซิติเตตของเห็ดดับเต้ามาแยกหาสารบริสุทธิ์ด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์

2.4.4.2 รวม fraction ที่มีองค์ประกอบทางเคมีคล้ายกันโดย TLC

2.4.4.3 พิสูจน์โครงสร้างของสารบริสุทธิ์ด้วยด้วยเทคนิค NMR spectroscopy

2.4.4.4 นำสารบริสุทธิ์ทดสอบการเป็นพิษต่อเซลล์ (cytotoxicity assay) ตามขั้นตอนข้อ 2.4.3

บทที่ 3

ผลการทดลองและอภิปรายผลการทดลอง

3.1 การเตรียมสารสกัดของเห็ดตับเต่า

จากการนำเห็ดตับเต่าที่แช่เมทานอล 20.0847 กรัม มาสกัดต่อเอทิลเอซิเตตและเมทานอลได้เป็นสารสกัดเห็ดตับเต่าเป็น 2 ส่วนคือ

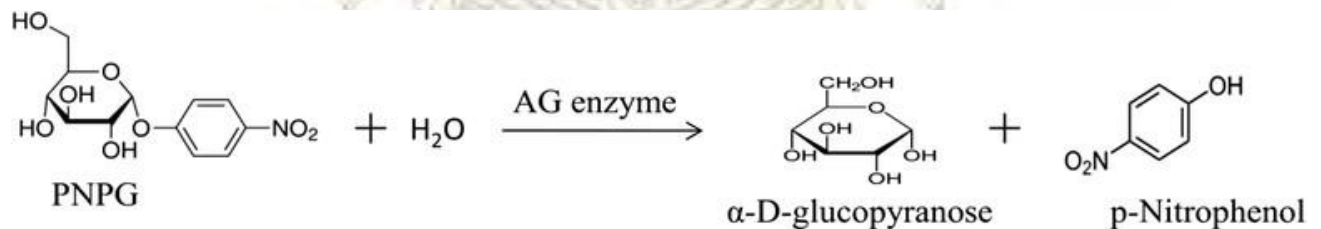
I สารสกัดเห็ดเอทิลเอซิเตตหนัก 0.4600 g

II สารสกัดเห็ดเมทานอล หนัก 10.7613 g

และเมื่อนำสารสกัดเมทานอล (II) มาละลายในเมทานอล แล้วนำส่วนที่ละลายที่ได้นั้นทำให้ตกตะกอนด้วยเอทิลเอซิเตต 3 ครั้ง ได้น้ำหนักของ M₁, M₂ และ M₃ เท่ากับ 1.9741, 0.8738 และ 1.5524 g แล้วนำมาแยกหาสารบริสุทธิ์ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ต่อไป

3.2 การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดสและเอนไซม์ไลเปส

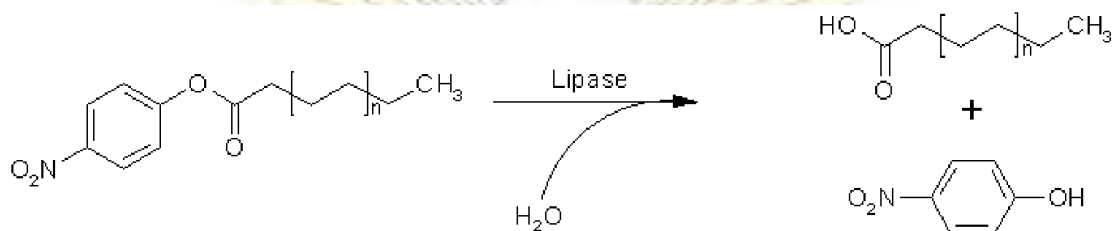
การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดสนี้ใช้ *p*-nitrophenyl- α -D-glucopyranoside (PNPG) เป็นสารตั้งต้น ซึ่ง PNPG เป็นสารละลายไม่มีสี เมื่อมีเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดสจะถูกไฮโดรไลซ์ไปเป็น *p*-nitrophenol ซึ่งเป็นสารละลายสีเหลือง และน้ำตาลกลูโคสซึ่งสามารถตรวจสอบผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นโดยใช้เทคนิค UV-Visible spectroscopy โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 405 nm ถ้าการทดลองให้ค่าการดูดกลืนแสงมาก แสดงว่าเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดสสามารถทำงานได้อย่างมีประสิทธิภาพ แต่ถ้าการทดลองให้ค่าการดูดกลืนแสงน้อยแสดงว่าเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดสไม่สามารถทำงานได้อย่างเป็นปกติ นั่นคือเอนไซม์ถูกยับยั้งการทำงานด้วยสารที่สกัดได้จากสารตัวอย่าง²²



รูปที่ 3.2.1 การ hydrolyze *p*-nitrophenyl- α -D-glucopyranoside (PNPG) เป็น *p*-nitrophenol

ที่มา : <https://www.google.co.th/search?q=-a-D-glucopyranoside>

ส่วนการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไลเปสนี้ใช้ *p*-nitrophenylpalmitate (pNPP) เป็นสารตั้งต้น ซึ่ง pNPP เป็นสารละลายไม่มีสี เมื่อมีเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดสจะถูกไฮโดรไลซ์ไปเป็น *p*-nitrophenol ซึ่งเป็นสารละลายสีเหลือง และน้ำตาลกลูโคสซึ่งสามารถตรวจสอบผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นโดยใช้เทคนิค UV-Visible spectroscopy โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 405 nm



รูปที่ 3.2.2 การ hydrolyze *p*-nitrophenylpalmitate (pNPP) เป็น *p*-nitrophenol

ที่มา <https://www.google.co.th/search?q=pnitrophenylpalmitate>

จากการนำสารสกัดเห็ดตับเต่าด้วยเอทิลแอลกอฮอล์และเมทานอลมาทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดสและเอนไซม์ไลเปส ได้ผลดังตารางที่ 3.2

ตารางที่ 3.2 แสดงผลการนำสารสกัดเห็ดตับเต่าด้วยเอทิลแอลกอฮอล์และเมทานอลมาทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดสและเอนไซม์ไลเปส

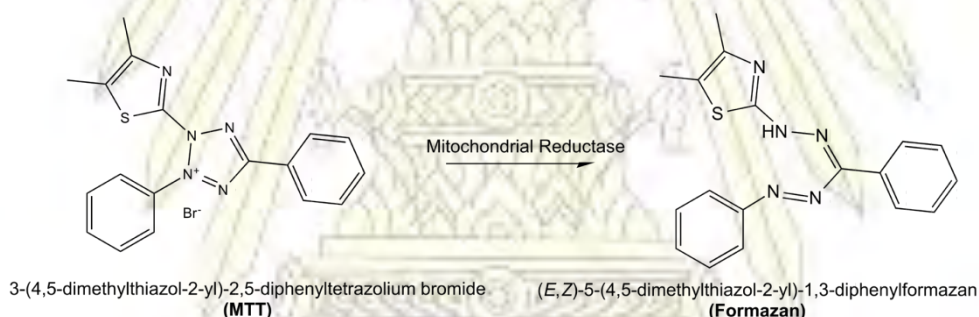
สารสกัดเห็ดตับเต่า	น้ำหนัก crude ที่นำมาทดสอบ	%การยับยั้งเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดส		%การยับยั้งเอนไซม์ไลเปส
		ความเข้มข้น 1 mg/mL	ความเข้มข้น 10 mg/mL	ความเข้มข้น 25 mg/mL
สารสกัดด้วยเอทิลแอลกอฮอล์	5.2 mg	20 %	-	78 %
สารสกัดด้วยเมทานอล	40.0 mg	-	38 %	99 %

จากตารางเห็นได้ว่าสารสกัดเห็ดตับเต่าด้วยเอทิลแอลกอฮอล์ 5.2 mg ที่ความเข้มข้น 1 mg/mL มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดสเท่ากับ 20 % และที่ความเข้มข้น 78 mg/mL มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเอนไซม์

ไลเปสเท่ากับ 78.01 % ส่วนสารสกัดเห็ดดับเต่าด้วยเมทานอล 40.0 mg ที่ความเข้มข้น 1 mg/mL ไม่มีฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดส แต่ที่ความเข้มข้น 10 mg/mL มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดสเท่ากับ 38 % และที่ความเข้มข้น 25 mg/mL มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเอนไซม์ไลเปสเท่ากับ 99 % เมื่อเปรียบเทียบความสามารถในการยับยั้งเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดสและเอนไซม์ไลเปสของสารสกัดทั้งสองแล้วได้ว่า สารสกัดเมทานอลมีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไลเปสมากกว่าสารสกัดเอทิลแอลกอฮอล์ แต่สารสกัดเอทิลแอลกอฮอล์มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดสมากกว่าสารสกัดเมทานอล

3.3 การตรวจสอบการเป็นพิษต่อเซลล์ (Cytotoxicity assay)

MTT assay เป็นวิธีการที่ใช้เพื่อศึกษาปริมาณวิเคราะห์ความอยู่รอดของเซลล์ หลักการคือ เซลล์ที่มีชีวิตเท่านั้นจึงจะสามารถเปลี่ยน tetrazolium salt MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide) ซึ่งมีสีเหลืองเป็น formazan salt ด้วย succinate-tetrazolium reductase system ซึ่งพบในปฏิกิริยาห่วงโซ่การหายใจในไมโทคอนเดรียของเซลล์ formazan salt นี้ไม่ละลายน้ำ แต่สามารถละลายได้ใน solubilized เช่น DMSO เกิดเป็นสารสีม่วง ในการทดลองจะใช้สารละลาย DMSO ทำให้เซลล์แตกแล้ว formazan ละลายออกมา จากนั้นวัดค่าการดูดกลืนแสง ใช้ความยาวคลื่นที่สัมพันธ์กับสี formazan การตรวจ MTT มักจะทำในที่มืดเนื่องจากสารละลาย MTT มีความไวต่อแสง



จากการนำสารตัวอย่าง 4 ชนิด ได้แก่ สารสกัดด้วยเมทานอลและกากที่เหลือ, สารสกัดเห็ดดับเต่าด้วยเมทานอลตั้งต้นและสารสกัดด้วยเอทิลแอลกอฮอล์มาตรวจสอบการเป็นพิษต่อเซลล์ (Cytotoxicity assay) ที่เข้มข้น 100, 10, 1, 0.1 และ 0.01 $\mu\text{g/mL}$ ละลายใน DMSO แล้วเติมสาร MTT 5 mg/mL ปริมาตร 10 $\mu\text{L/well}$ บ่มไว้ในตู้เซลล์นาน 4 ชั่วโมง แล้วเติม 100% DMSO ปริมาตร 150 $\mu\text{L/well}$ เพื่อทำให้เซลล์แตกและให้ formazan ละลายออกมา เขย่าบน plate mixer นาน 2-3 นาที แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 nm จากนั้นคำนวณการมีชีวิตรอดของเซลล์ (% cell survival) (ผลดังตาราง ผ1 ในภาคผนวก) และเมื่อนำเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดมาคำนวณหาความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งทั้ง 5 ชนิดและเซลล์ปกติ (IC_{50}) แล้วได้ผลดังตาราง 3.2

ตารางที่ 3.3 แสดงผลการนำสารสกัดต่างๆจากเห็ดตับเต่ามาตรวจสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งทั้ง 5 ชนิดและเซลล์ปกติ (IC₅₀)

สาร/Cell Lines	IC ₅₀ (µg/mL)					
	BT474	Chago-K1	Hep-G2	KATO-III	SW620	Wi-38
กากที่เหลือจากการสกัดด้วย เมทานอล	>100	79	> 100	> 100	> 100	> 100
สกัดด้วย เมทานอล	>100	>100	> 100	> 100	> 100	> 100
สารสกัดเห็ดตับเต่าด้วย เมทานอล ตั้งต้น	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100
สารสกัดด้วย ethyl acetate	>100	32	40	> 100	> 100	> 100

ตัวอย่าง การคำนวณหาค่า IC₅₀

สารสกัดด้วยเอทิลแอซิเตตที่เข้มข้น 100, 10, 1, 0.1 และ 0.01 µg/mL ละลายใน DMSO ในการเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งปอด (Chago-K1)

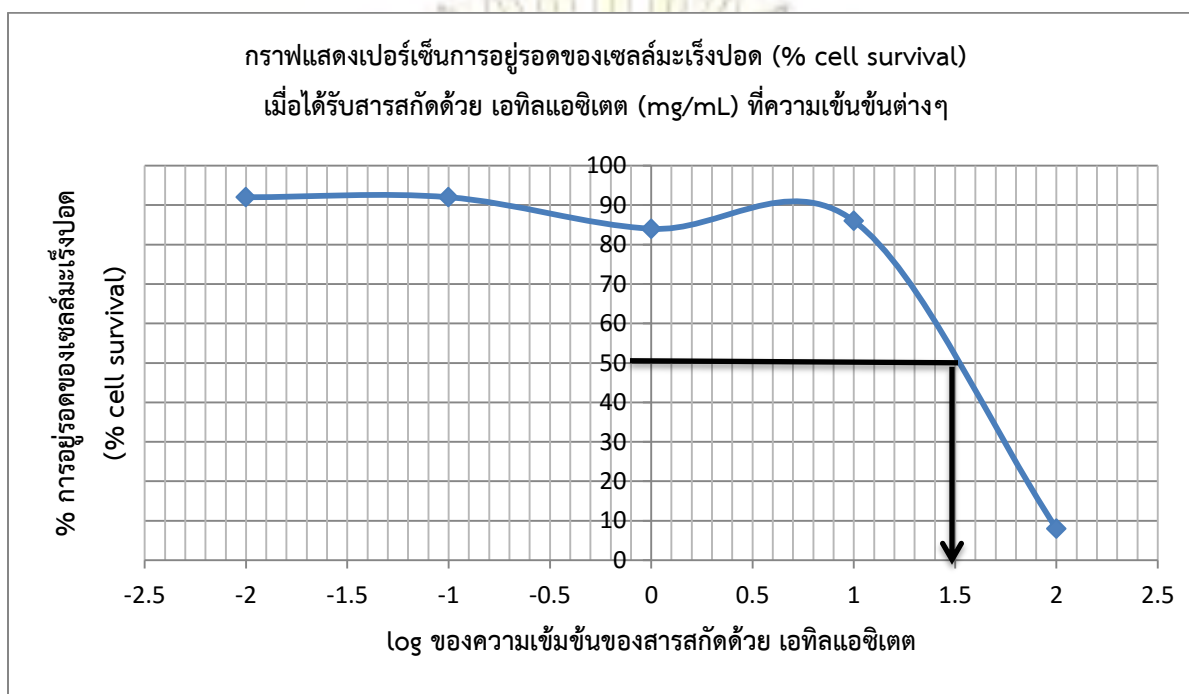
ความเข้มข้นของสารสกัดด้วยเอทิลแอซิเตต (µg/ml)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 nm ของเซลล์มะเร็งปอด (Chago-K1) หลังการเติม MTT					Percent of Survival
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ครั้งที่ 4	เฉลี่ย	
100	0.058	0.055	0.063	0.106	0.070±0.024	8
10	0.827	0.689	0.668	0.766	0.737±0.073	86
1	0.745	0.704	0.705	0.726	0.720±0.021	84
0.1	0.829	0.755	0.741	0.814	0.785±0.043	92
0.01	0.747	0.828	0.777	0.799	0.788±0.034	92
DMSO	1.079	0.707	0.803	0.838	0.857±0.158	100
C ⁺	1.187	1.214	1.159	1.169	1.182±0.024	

หลุม DMSO คือ หลุม negative control ที่ไม่เติม DMSO

C⁺ คือ ชุดควบคุมที่ไม่มีการเติมสารตัวอย่าง

PS คือ percentage of survival (เปอร์เซ็นต์การอยู่รอด)

นำค่าเปอร์เซ็นต์การรอดของเซลล์มาสร้างกราฟเพื่อใช้คำนวณหาความเข้มข้นต่ำที่สุดของสารสกัดด้วย เอทิลแอซิเตดที่เป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งปอด (Chago-K1) ร้อยละ 50 หรือหาค่า IC_{50} (Inhibit concentration 50%) ดังนี้



กราฟที่ 3.1 เปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของเซลล์มะเร็งปอด (% cell survival) เมื่อได้รับสารสกัดด้วย เอทิลแอซิเตด ($\mu\text{g/mL}$) ที่ความเข้มข้นต่างๆ

จากกราฟ สามารถคำนวณหาความเข้มข้นต่ำที่สุดของสารสกัดด้วยเอทิลแอซิเตดที่เป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งปอด (Chago-K1) ร้อยละ 50 หรือหาค่า IC_{50} โดยอาศัยสมการ

$$y = 10^x$$

เมื่อ y คือ % การอยู่รอดของเซลล์มะเร็งปอด

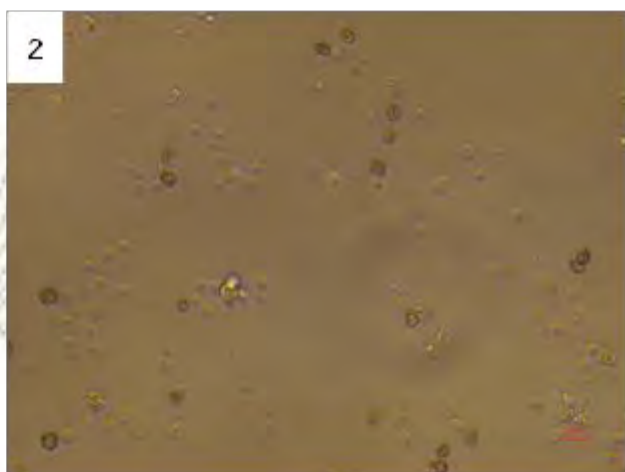
x คือ ค่า \log ของความเข้มข้นของสารสกัดด้วยเอทิลแอซิเตดที่มีเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของเซลล์มะเร็งปอดเท่ากับ 50

$$\begin{aligned} \text{แทนค่า} \quad y &= 10^{1.5} \\ &= 31.62 \\ &\approx 32 \end{aligned}$$

ดังนั้น ความเข้มข้นต่ำที่สุดของสารสกัดด้วยเอทิลแอซิเตดที่เป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งปอด (Chago-K1) ร้อยละ 50 คือ 32 $\mu\text{g/mL}$



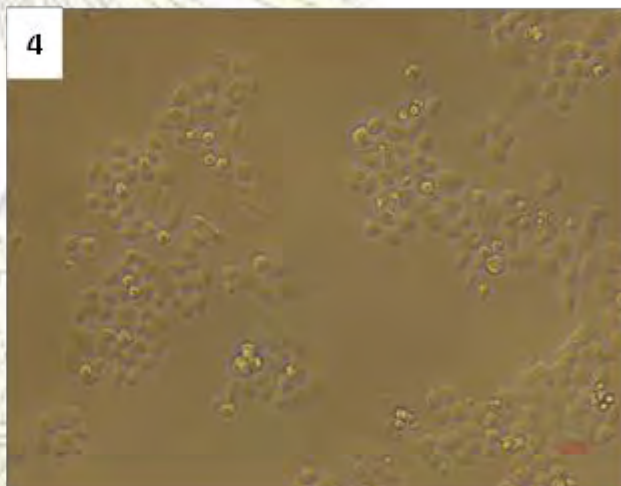
ความเข้มข้น 100 $\mu\text{g/mL}$
กำลังขยาย 10 เท่า



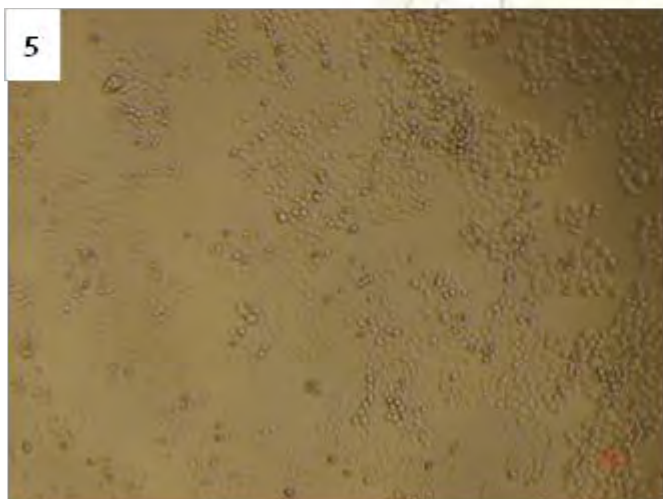
ความเข้มข้น 100 $\mu\text{g/mL}$
กำลังขยาย 20 เท่า



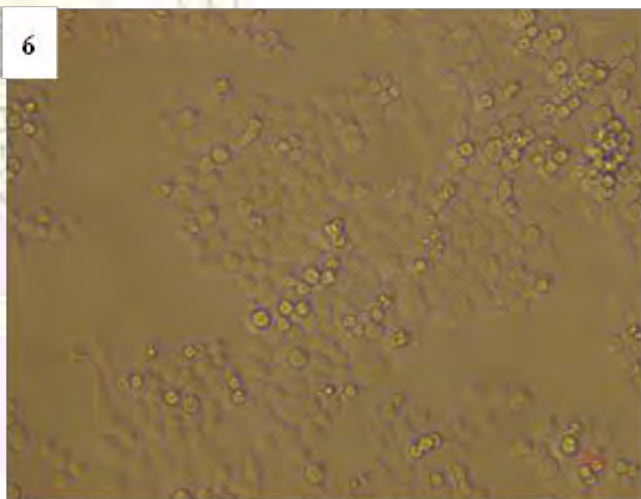
ความเข้มข้น 10 $\mu\text{g/mL}$
กำลังขยาย 10 เท่า



ความเข้มข้น 10 $\mu\text{g/mL}$
กำลังขยาย 20 เท่า



Control well : ไม่เติมสารตัวอย่าง
กำลังขยาย 10 เท่า



Control well : ไม่เติมสารตัวอย่าง
กำลังขยาย 20 เท่า

**รูปที่ 3.3 การนำสารสกัดด้วยเอทิลแอลกอฮอล์ของเห็ดคัสเต้งมาตรวจสอบการเป็นพิษ
ต่อเซลล์มะเร็งปอด (Chago-K1)**



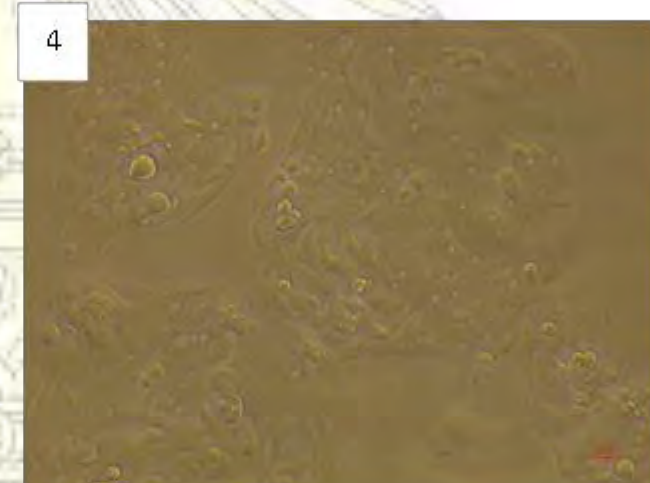
ความเข้มข้น 100 µg/mL
กำลังขยาย 10 เท่า



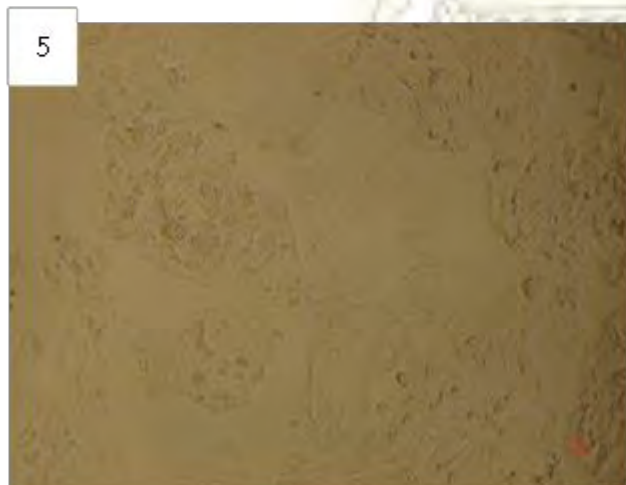
ความเข้มข้น 100 µg/mL
กำลังขยาย 20 เท่า



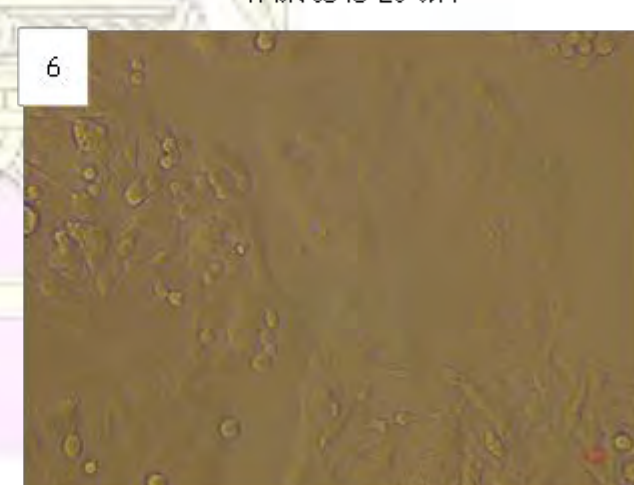
ความเข้มข้น 10 µg/mL
กำลังขยาย 10 เท่า



ความเข้มข้น 10 µg/mL
กำลังขยาย 20 เท่า

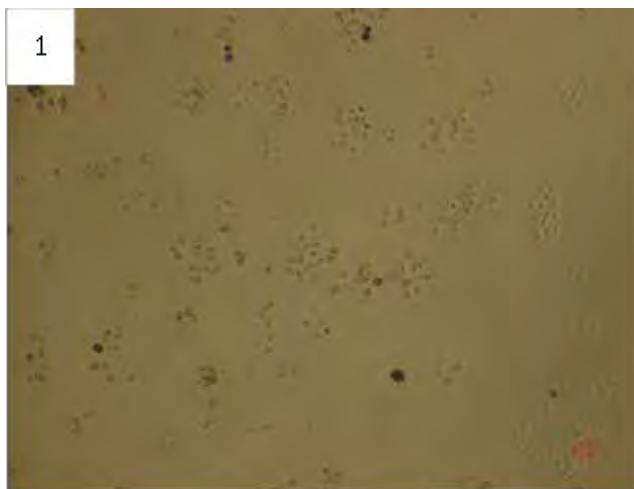


Control well : ไม่เติมสารตัวอย่าง
กำลังขยาย 10 เท่า



Control well : ไม่เติมสารตัวอย่าง
กำลังขยาย 20 เท่า

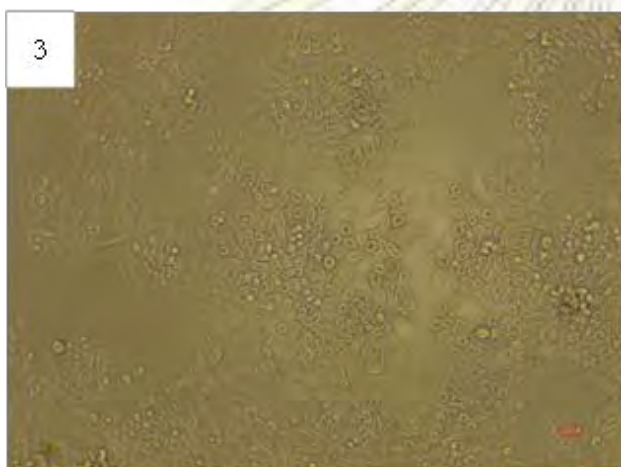
รูปที่ 3.4 การนำสารสกัดด้วยเอทิลแอลกอฮอล์ของเห็ดคืบเค่ามาตรวจสอบการเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งตับ (Hep-G2)



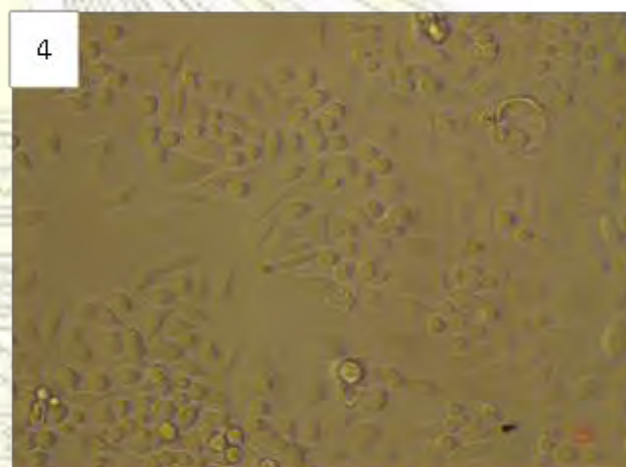
ความเข้มข้น 100 µg/mL
กำลังขยาย 10 เท่า



ความเข้มข้น 100 µg/mL
กำลังขยาย 20 เท่า



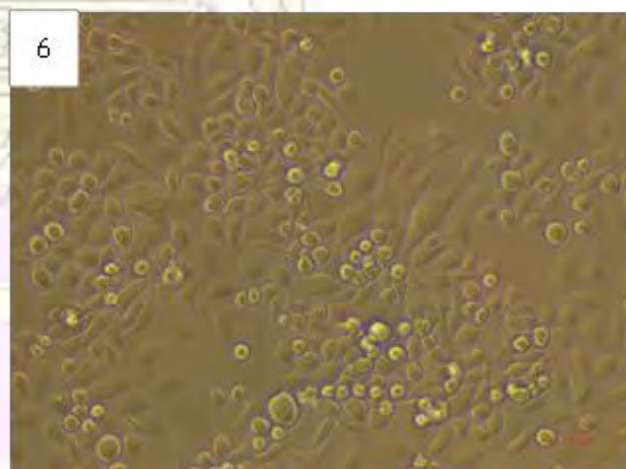
ความเข้มข้น 10 µg/mL
กำลังขยาย 10 เท่า



ความเข้มข้น 10 µg/mL
กำลังขยาย 20 เท่า



Control well : ไม่เติมสารตัวอย่าง
กำลังขยาย 10 เท่า



Control well : ไม่เติมสารตัวอย่าง
กำลังขยาย 20 เท่า

รูปที่ 3.5 การนำสารสกัดด้วยเอทิลแอลกอฮอล์ของเห็ดคืบเต่ามาตรวจสอบการเป็นพิษ
ต่อเซลล์มะเร็งกระเพาะอาหาร (KATO-III)

จากการใช้สารตัวอย่างคือ สารสกัดด้วยเมทานอลและกากที่เหลือ และสารสกัดเห็ดดับเต่าเมทานอลตั้งต้นมา ตรวจสอบการเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งทั้ง 5 ชนิดและเซลล์ปกติโดยแสดงค่าเป็นความเข้มข้นต่ำที่สุดของสารตัวอย่างที่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ได้ร้อยละ 50 (IC_{50}) พบว่าสารสกัดเมทานอลที่มีความเข้มข้น 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งปอด (Chago-K1) แสดงค่า IC_{50} เท่ากับ 79 $\mu\text{g}/\text{mL}$ และสารสกัดเอทิลอะซิเตดที่มีความเข้มข้น 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งปอดแสดงค่า IC_{50} เท่ากับ 32 $\mu\text{g}/\text{mL}$ นำเซลล์หลังการทดสอบมาส่องกล้องจุลทรรศน์ชนิดหัวกลับ (แสดงดังรูปที่ 3.3-1 ถึง 3.3-6) เมื่อเปรียบเทียบรูปที่ 3.3-6 คือหลุมของเซลล์มะเร็งปอดที่ไม่มีการเติมสารตัวอย่างกับรูปที่ 3.3-2 คือหลุมที่มีการเติมสารตัวอย่าง จากรูปที่ 3.3-2 พบว่า เซลล์ที่ตายมีของเหลว cytoplasm แห้งไป แต่ยังคงมีโครงร่างอยู่ ทำให้เห็นขอบเขตแยกจากส่วนที่ไม่ตายได้ชัด แต่นิวเคลียสจะฝ่อเหี่ยวและมีสีเข้ม ทั้งนี้เกิดจากร DNA รวมตัวเป็นก้อน และบางเซลล์มีนิวเคลียสที่เหี่ยวและแตกออกเป็นส่วนเล็กๆ ดังนั้นสามารถบอกได้ว่าการตายของเซลล์มะเร็งปอดเมื่อได้รับสารสกัดด้วยเอทิลอะซิเตดนั้นเป็นแบบ Coagulative necrosis ส่วนการสลายตัวของนิวเคลียสของเซลล์มะเร็งเป็นแบบ Pyknosis แล้วตามด้วยแบบ Karyorrhexis ในเวลาต่อมา

นอกจากนี้ การทดลองยังพบว่าสารสกัดด้วยเอทิลอะซิเตดที่มีความเข้มข้น 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งตับ (Hep-G2) แสดงค่า IC_{50} เท่ากับ 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ นำเซลล์หลังการทดสอบมาส่องกล้องจุลทรรศน์ชนิดหัวกลับ (แสดงดังรูปที่ 3.4-1 ถึง 3.4-6) เมื่อเปรียบเทียบรูปที่ 3.3-6 คือหลุมของเซลล์มะเร็งตับที่ไม่มีการเติมสารตัวอย่างกับรูปที่ 3.4-2 คือหลุมที่มีการเติมสารตัวอย่าง จากรูปที่ 3.4-2 พบว่า เซลล์ที่ตายมีการรวมกลุ่มกันและของเหลว cytoplasm แห้งไปมาก นิวเคลียสจะฝ่อเหี่ยวและมีสีเข้ม ซึ่งเมื่อเทียบกับเซลล์มะเร็งปอดที่ทดสอบด้วยสารตัวอย่างชนิดเดียวกันนั้น เซลล์มะเร็งตับมีการเหี่ยวของนิวเคลียสน้อยกว่า ดังนั้นสามารถบอกได้ว่าการตายของเซลล์มะเร็งตับเมื่อได้รับสารสกัดด้วยเอทิลอะซิเตดนั้นเป็นแบบ Apoptosis ส่วนการสลายตัวของนิวเคลียสของเซลล์มะเร็งเป็นแบบ Pyknosis

การนำสารสกัดเอทิลอะซิเตดมาตรวจสอบการเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งกระเพาะอาหาร พบว่าสารตัวอย่างดังกล่าวมีค่า IC_{50} สูงมาก รายงานเป็นค่าที่มากกว่า 100 mg/mL ซึ่งในทางชีววิทยานั้นสามารถกล่าวได้ว่า สารตัวอย่างดังกล่าวไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ เมื่อเปรียบเทียบสารสกัดเอทิลอะซิเตดที่มีความเข้มข้น 100 และ 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ นั้น (ดังภาพ 3.5-1 ถึง 3.5-4 ที่ขยาย 10 และ 20 เท่า ตามลำดับ) กับหลุมควบคุมที่ไม่มีการเติมสารตัวอย่าง (control well) (ภาพ 3.5-5 และ 3.5-6 ที่ขยาย 10 และ 20 เท่า ตามลำดับ) นั้นจะเห็นได้ว่าลักษณะเซลล์ไม่แตกต่างกัน กล่าวคือ เซลล์มีลักษณะบวมเต่ง ไม่สังเกตเห็นการฝ่อของเยื่อหุ้มเซลล์ นั่นคือสารสกัดเอทิลอะซิเตดที่มีความเข้มข้น 100 และ 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ไม่มีผลต่อการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งกระเพาะอาหาร ส่วนการนำสารสกัดด้วยเมทานอลและกากที่เหลือ สารสกัดเห็ดดับเต่าด้วยเมทานอลตั้งต้นมาตรวจสอบการเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งทั้ง 5 ชนิดและเซลล์ปกติ และการนำสารสกัดเอทิลอะซิเตดมาตรวจสอบการเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งลำไส้ เซลล์มะเร็งเต้านม และเซลล์ปกตินั้นก็ให้ผลเช่นเดียวกับการนำสารสกัดเอทิลอะซิเตดมาตรวจสอบการเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งกระเพาะอาหาร

3.4 การแยกหาสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ (cytotoxicity activity)

Part I ส่วนสกัด ethyl acetate

- เมื่อนำส่วนสกัดเอทิลแอซิเตตของเห็ดตับเต่าหนัก 0.4600 g มาทำการแยกโดยเทคนิคโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ได้ 177 fraction ดังตารางที่ 3.4

ดังตารางที่ 3.4 แสดงน้ำหนัก fraction ของสารสกัดเอทิลแอซิเตตของเห็ดตับเต่าที่แยกโดยเทคนิค โครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์

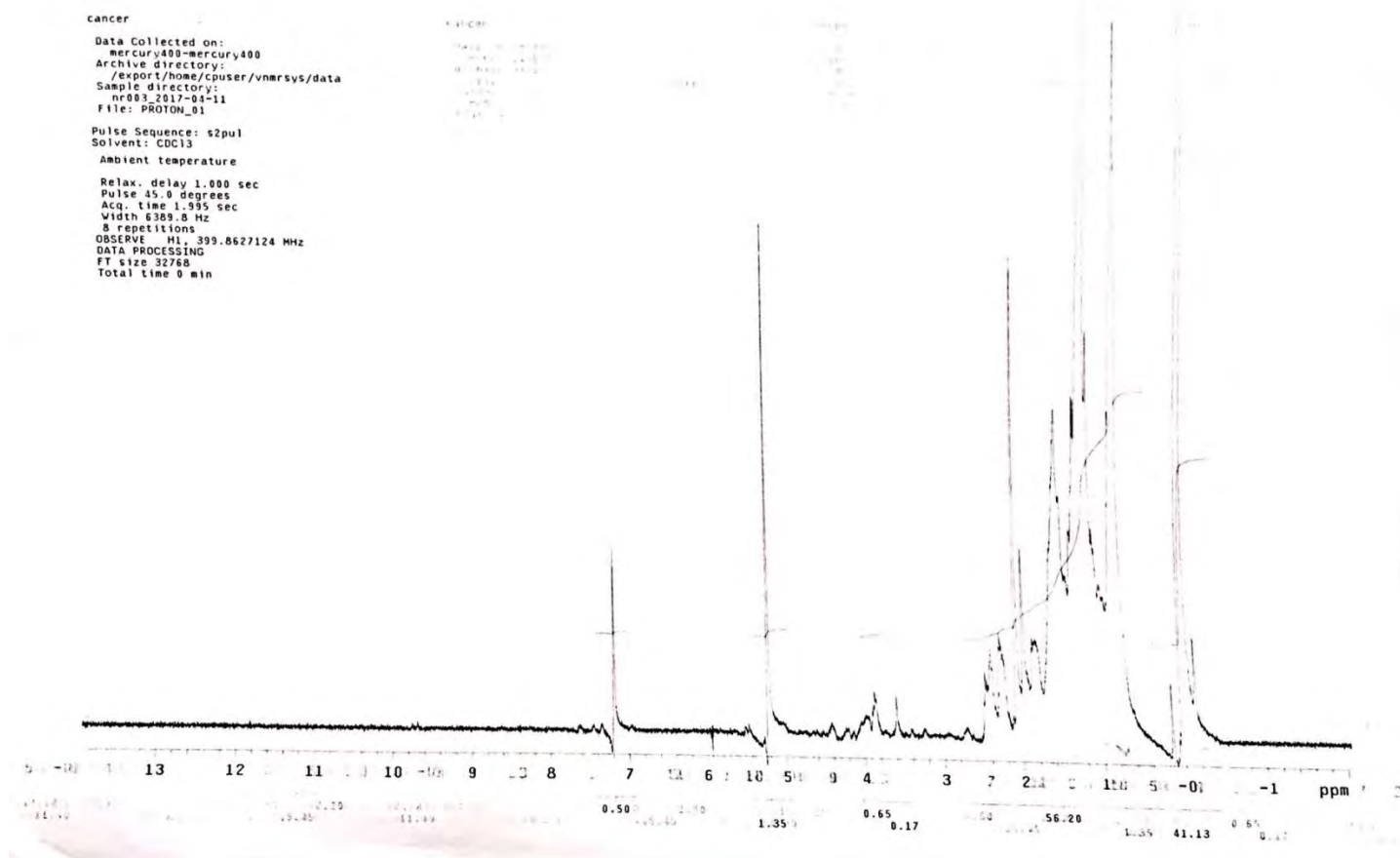
ภาคนิ่ง (stationary phase) คือ silica gel

Fraction ที่	น้ำหนัก (g)	Fraction ที่	น้ำหนัก (g)	Fraction ที่	น้ำหนัก (g)
1	0.0002	23	0.0005	45	0.0021
2	0.0009	24	0.0019	46	0.0017
3	0.0016	25	0.0002	47	0.0021
4	0.0023	26	0.0009	48	0.0008
5	0.0003	27	0.0016	49	0.0007
6	0.0004	28	0.0023	50	0.0000
7	0.0008	29	0.0003	51	0.0007
8	0.0003	30	0.0004	52	0.0007
9	0.0002	31	0.0008	53	0.0055
10	0.0002	32	0.0003	54	0.0005
11	0.0048	33	0.0018	55	0.0001
12	0.0045	34	0.0061	56	0.0006
13	0.0008	35	0.0026	57	0.0021
14	0.0019	36	0.0051	58	0.0019
15	0.0050	37	0.0013	59	0.0008
16	0.0053	38	0.0084	60	0.0007
17	0.0009	39	0.0017	61	0.0015
18	0.0027	40	0.0035	62	0.0009
19	0.0007	41	0.0021	63	0.0019
20	0.0073	42	0.0008	64	0.0087
21	0.0018	43	0.0022	65	0.0001
22	0.0023	44	0.0015	66	0.0011

67	0.0005	97	0.003	127	0.0001
68	0.0005	98	0.0017	128	0.0024
69	0.0001	99	0.0047	129	0.001
70	0.0005	100	0.0037	130	0.0019
71	0.0029	101	0.0009	131	0.0028
72	0.0024	102	0.0001	132	0.0015
73	0.0038	103	0.0004	133	0.0037
74	0.0050	104	0.0003	134	0.0030
75	0.0023	105	0.0033	135	0.0040
76	0.000	106	0.0008	136	0.0031
77	0.0009	107	0.0009	137	0.0006
78	0.003	108	0.0004	138	0.0054
79	0.0066	109	0.0002	139	0.0031
80	0.0034	110	0.0007	140	0.0008
81	0.0073	111	0.0004	141	0.0010
82	0.0001	112	0.0018	142	0.0013
83	0.0026	113	0.0028	143	0.0001
84	0.0022	114	0.0021	144	0.0096
85	0.0002	115	0.0034	145	0.0003
86	0.0064	116	0.0083	146	0.0005
87	0.0053	117	0.0042	147	0.0002
88	0.0040	118	0.0048	148	0.0004
89	0.0065	119	0.0021	149	0.0022
90	0.0078	120	0.0033	150	0.0005
91	0.000	121	0.0019	151	0.0009
92	0.0056	122	0.0084	152	0.0002
93	0.0072	123	0.0014	153	0.0068
94	0.0052	124	0.0009	154	0.0000
95	0.0033	125	0.0001	155	0.0003
96	0.0039	126	0.0018	156	0.0000

Fraction ที่	น้ำหนัก (g)	Fraction ที่	น้ำหนัก (g)	Fraction ที่	น้ำหนัก (g)
157	0.0003	164	0.000	171	0.0029
158	0.0007	165	0.0056	172	0.0012
159	0.0064	166	0.0087	173	0.0001
160	0.0000	167	0.0001	174	0.0054
161	0.0002	168	0.0016	175	0.0049
162	0.0030	169	0.0050	176	0.0052
163	0.0059	170	0.0037	177	0.0005



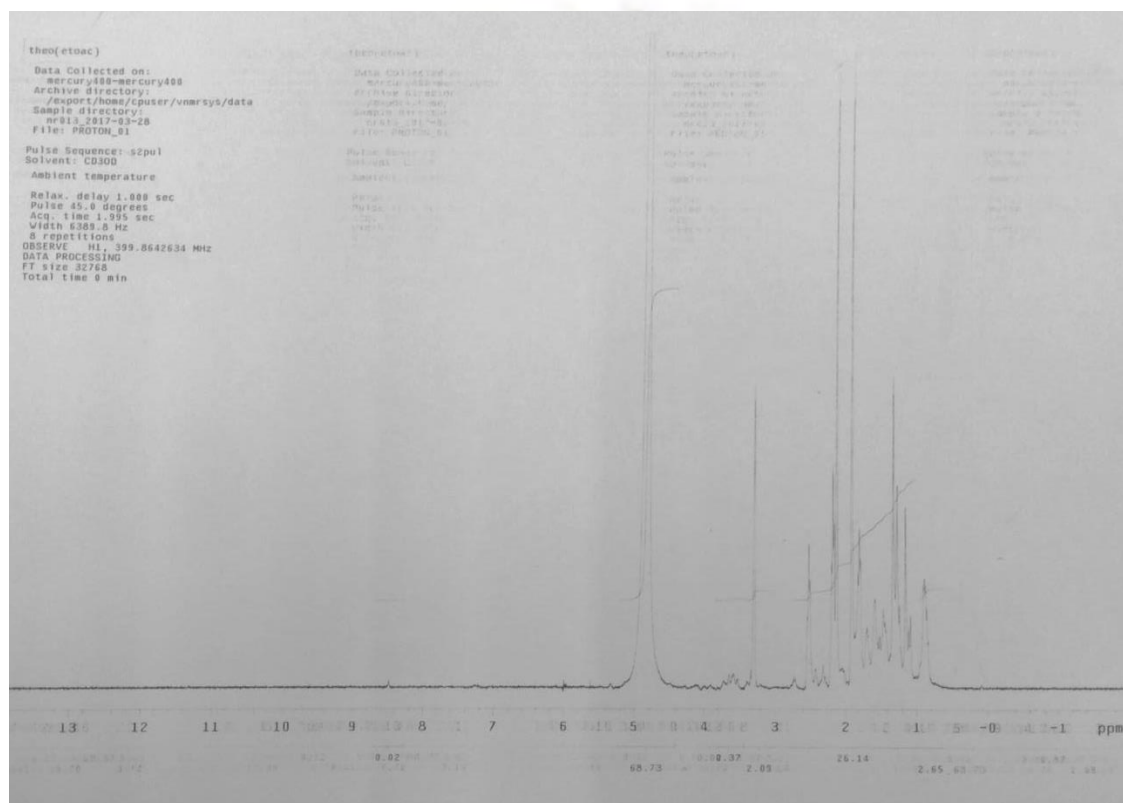


รูปที่ 3.6 $^1\text{H-NMR}$ ของสารจาก fraction หมายเลข 31-98

แสดงค่า chemical shife (δ) ที่ได้ดังนี้

ตารางที่ 3.6 แสดงค่า chemical shife (δ) ที่ได้จาก $^1\text{H-NMR}$ ของสาร

	ค่า chemical shife (δ) ของสาร
Aromatic	6.7-7.7
CH-O	3.5-4.5
CH ₃ -SP	≈ 2



จากการศึกษางานวิจัย พบว่าสารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในเห็ดอันเป็นเหตุก่อภาวะความผิดปกติอื่นจนการเกิดโรคมะเร็งนั้น ได้แก่ alkaloid compounds, terpenoid and steroid compounds, anthocyanin และ phenolic compounds เช่น stibene xantone flavonoid polysaccharide เป็นต้น สารดังกล่าวสามารถนำมาวิเคราะห์ $^1\text{H-NMR}$ ได้ตั้งรูป ผ1 ถึง 14 ในภาคผนวก ประกอบกับข้อมูลทาง $^1\text{H-NMR}$ ของสารที่แยกได้ดังแสดงดังตารางที่ 3.6 สามารถวิเคราะห์กลุ่มของสารที่มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งปอดและมะเร็งตับได้ว่าอาจจะเป็นสารในกลุ่มเทอร์พีนอยด์และสเตียรอยด์ (terpenoid and steroid compounds) จากนั้นนำสารหนัก 57.6 mg นี้ทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งทั้ง 5 ชนิดและเซลล์ปกติพบว่าสารประกอบนี้ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งและเซลล์ปกติ ซึ่งเป็นไปได้ว่าปริมาณสารที่ออกฤทธิ์นั้นมีน้อยเกินไปจึงทำให้สารประกอบ 57.6 mg นี้ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งและเซลล์ปกติ

Part II ส่วนสกัด Methanol หนัก 10.7613 g

เนื่องจากมีน้ำหนักมากพอสมควรจึงทดลองทำการแยกด้วยเทคนิค Preparative thin-layer chromatography (PLC)

ตารางที่ 3.6 แสดงน้ำหนักของแถบสีต่างๆของส่วนสกัดเมทานอลที่แยกด้วย Preparative thin-layer chromatography (PLC)

แถบที่	สัญลักษณ์	สีของแถบ	น้ำหนัก (g)
1	M ₁	น้ำเงินอ่อนๆ	0.0084
2	M ₂	น้ำเงิน	0.0054
3	M ₃	ม่วงแดง	0.0899
4	M ₄	ม่วง	0.0279
5	M ₅	น้ำหนึ่ก	0.0324
6	M ₆	เหลือง	0.0393
7	M ₇	ส้ม	0.0480
8	M ₈	เหลืองอ่อน	0.0718

จากนั้นดูดสารจากแผ่น TLC ละลายด้วย methanol ทำการระเหยออกแล้วหาคู่ประกอบสารด้วย ¹H-NMR แต่เนื่องจากระยะเวลาการทดลองจำกัด ทำให้ผู้วิจัยทำการทดลองไม่ทันการ

บทที่ 4

สรุปผลการทดลอง

จากการทดลองทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์ไลเปสและแอลฟาไกลูโคซิเดสของสารสกัดจากเห็ดตับเต่า พบว่าสารสกัดเมทานอลมีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไลเปสมากกว่าสารสกัดเอทิลอะซิเตต แต่สารสกัดเอทิลอะซิเตตมีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดสมากกว่าสารสกัดเมทานอล เมื่อนำสารสกัดทั้งสองมาทดสอบการเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งทั้ง 5 ชนิดและเซลล์ปกติ (fibroblast cell) พบว่าสารสกัดเอทิลอะซิเตตมีฤทธิ์การยับยั้งเซลล์มะเร็งปอด (Chago-K1) และตับ (Hep-G2) โดยมีฤทธิ์การยับยั้งเซลล์มะเร็งปอด IC_{50} เท่ากับ 32 และ 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ตามลำดับ และกากของส่วนสกัดเมทานอลมีฤทธิ์การยับยั้งเซลล์มะเร็งปอด IC_{50} เท่ากับ 79 $\mu\text{g}/\text{mL}$ การแยกสารบริสุทธิ์จากสกัดเอทิลอะซิเตตโดยเทคนิคโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ไม่ประสบความสำเร็จ เนื่องจากความไม่คงสภาพของสารในขั้นตอนแยก อย่างไรก็ตาม จาก $^1\text{H-NMR}$ Spectriscopy บ่งชี้ว่าสารสกัดเอทิลอะซิเตต ประกอบด้วยสารในกลุ่มเทอร์พินอยด์และสเตียรอยด์ (terpenoid and steoid compounds)

เอกสารอ้างอิง

1. Dilani, S.; Sylvie, R.; Kevin, H.; Ali B. Medicinal mushrooms in prevention and control of diabetes mellitus. *J. Fungal Divers.* **2012**, *56*, 1-29.
2. รุ่งฤดี ศรีสวัสดิ์ (2555). ผลของสารสกัดจากพืชสมุนไพรบางชนิดในเขตพื้นที่มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารีต่อการทำงานของเอนไซม์ไลเปส เอนไซม์อะไมเลส และเอนไซม์กลูโคซิเดส. (รายงานการวิจัย), มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี.
3. Superiteng (นามแฝง) (2011,มิถุนายน 1). คาร์โบไฮเดรต [เว็บไซต์]. สืบค้นจาก <http://www.vcharkarn.com/lesson/1046>.
4. Pinar, E.; Sedef, E. Inhibitory effect of chickpea and *Tribulus terrestris* on lipase, α -amylase and α -glucosidase. *Food Chem.* **2016**, *205*, 163-169.
5. Shaoling, L.; Lai Tsz, C.; Kalung, L.; Peter C.K., C. Anti-angiogenic effect of water extract from the fruiting body of *Agrocybe aegerita*. *J. Food Sci.* **2017**, *75*, 155-163.
6. Victor, C.; João, R. Speeding up the Extraction of Mushroom Polysaccharides. *Food Anal. Methods.* **2016**, *9*, 2429–2433.
7. Simon, H.; Katja, L.; Walter, V. Esterified sterols and their contribution to the total sterols in edible Mushrooms. *J. Food Comp. Anal.* **2016**, *54*, 48–54.
8. Chun-Han, S.; Min-Nan, L.; Lean-Teik, N. Effects of different extraction temperatures on the physicochemical properties of bioactive polysaccharides from *Grifola frondosa*. *Food Chem.* **2017**, *220*, 400–405.
9. Dina, R.; Ana, F.; Sérgio, S.; Manuela, A.; Marta, V.; João, C.; Artur, S.; Teresa, R.; Armando, D.; Ana, G. Chemical and structural characterization of *Pholiota nameko* extracts with biological properties. *Food Chem.* **2017**, *216*, 176–185.
10. Fon (นามแฝง) (2006, กรกฎาคม 1). เห็ดคุณค่าทางอาหาร [เว็บไซต์]. สืบค้นจาก <https://www.doctor.or.th/article/detail/1493>.
11. พิมพ์เพ็ญ พรเฉลิมพงศ์ และ นิธิยา รัตนาปนนท์. Bolete/เห็ดตับเต่า [เว็บไซต์]. สืบค้นจาก <http://www.foodnetworksolution.com/wiki/word/6827/bolete-เห็ดตับเต่า>.
12. พงศ์อมร บุณนาค, การใช้ยาลดระดับน้ำตาลในเลือดชนิดรับประทาน [เว็บไซต์]. สืบค้นจาก <related:med.mahidol.ac.th/med/sites/default/files/public/pdf/medicinebook1/Oral%20hypoglycemic%20drugs.pdf> alpha glucosidase คือ.

13. จีรวรรณ มลาไวย์, สายน้ำผึ้ง ฉายาพัฒน์ และปราณี พัฒนพิพิธไพศาล. การคัดเลือกไลเปส จากแบคทีเรียชอบอุณหภูมิสูงเพื่อการบำบัดน้ำเสียที่ปนเปื้อนไขมัน. *วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี*. 14(2) : 71-77 ; เมษายน-มิถุนายน 2555.
14. Tim Mosmann. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods*. **1983**, 65, 55-63.
15. ศศมล ผาสุข และประเสริฐ มีรัตน์ (2552) . ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเต้านมและเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ของสารสกัดหยาบฮว่านจือก. (รายงานการวิจัย), มหาวิทยาลัยบูรพา.
16. จุลินทร สำราญ (2556). พยาธิวิทยาของเซลล์และเนื้อเยื่อ (Cellular Pathology) (รายงานการวิจัย), มหาวิทยาลัยนเรศวร.
17. Khwanta, K.; Nakarin, S.; Jaturong, K.; Saisamorn L. Phenolic profile of various wild edible mushroom extracts from Thailand and their antioxidant properties, anti-tyrosinase and hyperglycaemic inhibitory activities. *J. Funct. Foods*. **2016**, 27, 352–364.
18. Michele, B.; Maria, C.; Stefano, C.; Saisamorn L.; Massimiliano, P.; Laurent C. ; Monica, G.; Hugo M. Structure of a lectin with antitumoral properties in king bolete (*Boletus edulis*) mushrooms. *Glycobiology*. **2011**, 21, 1000–1009.
19. Yuntao, L.; Di, Y.; Yuxian, Y.; Siqi Z.; Yiwen, L.; Qianqian, T.; Guoquan H.; Aiping, L.; Chaohui, F.; Cheng L.; Yujie, S.; Zhao, S.; Daiwen C. Nutritional composition of boletus mushrooms from Southwest China and their anti-hyperglycemic and antioxidant activities. *Food Chem*. **2016**, 211, 83-91.
20. Aleksandra, N.; Maja, K.; Sonja, K.; Tanja R.; Nebojsa I. Antioxidant and Antiproliferative Potential of Fruiting Bodies of the Wild-Growing King Bolete Mushroom, *Boletus edulis* (Agaricomycetes), from Western Serbia. *Int J Med Mushrooms*. **2017**, 19, 27-34.
21. Wang, Z.; Wang, J.; Luo, K.; L. α -Glucosidase inhibitory triterpenoids from the stem barks of *Uncaria laevigata*. *Fitoterapia*. **2013**, 90, 30-37.
22. Chanmee, W.; Chaicharoenpong, C.; Petsom, A. Lipase Inhibitor from Fruits of *Solanum stramonifolium* Jacq. *Food Nutr Sci*. **2013**, 4, 554-558.

23. Kim M.S.; Park J.Y.; Namkoong C.; Jang P.G.; Ryu J.W.; Song H.S.; Yun J.Y.; Namgoong I.S.; Ha J.; Park I.S.; Lee I.K.; Viollet B.; Youn J.H.; Lee H.K.; Lee K.U. Anti-obesity effects of alpha-lipoic acid mediated by suppression of hypothalamic AMP-activated protein kinase. *Nat. Med.* **2004**, *10*, 727–733.





ภาคผนวก

สาร	Conc. (µg/ml)	BT474 (A ₅₄₀)					PS	Conc. (µg/ml)	Chago-K1 (A ₅₄₀)					PS	Conc. (µg/ml)	Hep-G2 (A ₅₄₀)					PS
		1	2	3	4	เฉลี่ย			1	2	3	4	เฉลี่ย			1	2	3	4	เฉลี่ย	
M1	100	0.242	0.253	0.273	0.264	0.258	52	100	1.181	0.399	0.404	0.392	0.594	69	100	0.905	0.721	0.862	1.000	0.872	87
	10	0.222	0.271	0.319	0.461	0.318	64	10	0.963	0.500	0.607	0.720	0.697	81	10	0.723	0.741	0.717	1.127	0.827	83
	1	0.415	0.527	0.644	0.489	0.519	104	1	0.717	0.588	0.532	0.707	0.636	74	1	0.909	1.041	0.902	0.889	0.935	94
	0.1	0.423	0.540	0.368	0.543	0.468	94	0.1	0.718	0.447	0.647	0.655	0.617	72	0.1	0.984	0.804	0.978	1.116	0.970	97
	0.01	0.209	0.518	0.436	0.518	0.420	84	0.01	0.703	0.694	0.734	0.788	0.730	85	0.01	0.966	0.910	0.950	0.945	0.943	94
	DMSO	0.490	0.540	0.493	0.471	0.499	100	DMSO	1.079	0.707	0.803	0.838	0.857	100	DMSO	0.930	0.995	1.073	0.997	0.999	100
	C+	0.709	0.695	0.659	0.730	0.698		C+	1.187	1.214	1.159	1.169	1.182		C+	1.447	1.335	1.496	1.520	1.450	
สาร	Conc. (µg/ml)	KATO-III (A ₅₄₀)					PS	Conc. (µg/ml)	SW620 (A ₅₄₀)					PS	Conc. (µg/ml)	Wi-38 (A ₅₄₀)					PS
		1	2	3	4	เฉลี่ย			1	2	3	4	เฉลี่ย			1	2	3	4	เฉลี่ย	
M1	100	0.949	0.847	1.071	0.655	0.880	94	100	1.305	1.367	1.361	1.198	1.308	96	100	0.595	0.679	0.664	0.716	0.664	104
	10	0.716	0.829	0.603	0.715	0.716	77	10	1.253	1.237	1.330	1.103	1.231	91	10	0.705	0.688	0.737	0.695	0.706	117
	1	0.979	0.895	0.266	0.295	0.609	65	1	1.103	1.009	1.413	1.300	1.206	89	1	0.814	0.662	0.666	0.584	0.682	113
	0.1	0.750	0.907	0.945	0.897	0.875	94	0.1	1.405	1.389	1.290	1.323	1.352	100	0.1	0.760	0.628	0.627	0.602	0.654	108
	0.01	0.945	0.709	0.964	0.945	0.891	96	0.01	1.261	1.269	1.157	1.397	1.271	94	0.01	0.718	0.685	0.718	0.631	0.688	114

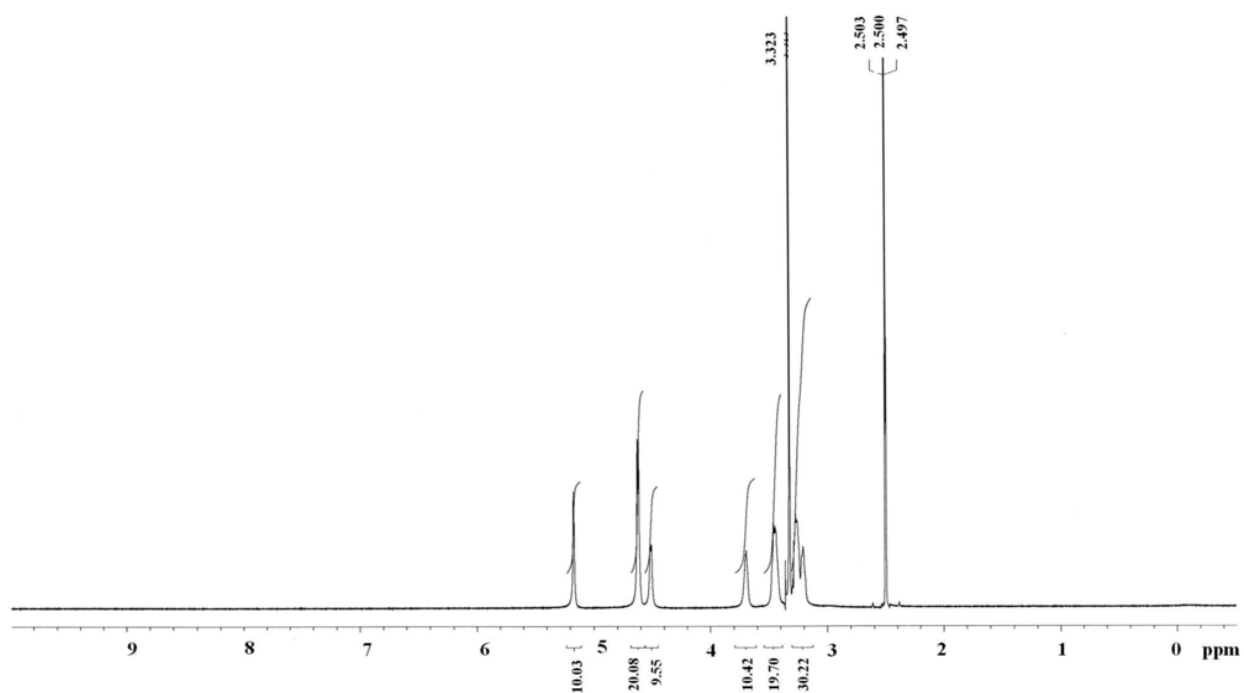
	DMSO	1.068	0.902	0.815	0.943	0.932	100	DMSO	1.520	1.315	1.368	1.219	1.356	100	DMSO	0.603	0.589	0.684	0.656	0.633	100
	C+	1.338	1.250	1.223	1.263	1.269		C+	1.427	1.322	1.295	1.438	1.371		C+	1.016	1.103	1.097	1.118	1.084	
ឥរិយ	Conc. ($\mu\text{g/ml}$)	BT474 (A_{540})					PS	Conc. ($\mu\text{g/ml}$)	Chago-K1 (A_{540})					PS	Conc. ($\mu\text{g/ml}$)	Hep-G2 (A_{540})					PS
		1	2	3	4	ផ្តល់			1	2	3	4	ផ្តល់			1	2	3	4	ផ្តល់	
M2	100	0.510	0.496	0.487	0.598	0.523	115	100	0.573	0.569	0.717	0.601	0.615	72	100	0.991	0.818	1.026	0.742	0.894	89
	10	0.286	0.633	0.500	0.500	0.480	96	10	0.730	0.620	0.704	0.676	0.682	80	10	0.986	0.830	1.146	1.135	1.024	86
	1	0.401	0.491	0.433	0.516	0.460	92	1	0.608	0.584	0.739	0.784	0.679	79	1	0.966	0.951	0.925	1.051	0.973	97
	0.1	0.395	0.559	0.522	0.588	0.516	113	0.1	0.735	0.644	0.772	0.805	0.739	86	0.1	0.940	1.055	1.025	0.990	1.003	94
	0.01	0.341	0.542	0.597	0.500	0.495	99	0.01	0.754	0.764	0.722	0.759	0.750	88	0.01	0.909	0.953	0.961	0.998	0.955	96
	DMSO	0.490	0.540	0.493	0.471	0.499	100	DMSO	1.079	0.707	0.803	0.838	0.857	100	DMSO	0.930	0.995	1.073	0.997	0.999	100
	C+	0.709	0.695	0.659	0.730	0.698		C+	1.187	1.214	1.159	1.169	1.182		C+	1.447	1.335	1.496	1.520	1.450	
ឥរិយ	Conc. ($\mu\text{g/ml}$)	KATO-III (A_{540})					PS	Conc. ($\mu\text{g/ml}$)	SW620 (A_{540})					PS	Conc. ($\mu\text{g/ml}$)	Wi-38 (A_{540})					PS
		1	2	3	4	ផ្តល់			1	2	3	4	ផ្តល់			1	2	3	4	ផ្តល់	
M2	100	0.852	0.637	0.631	0.728	0.712	76	100	1.415	1.301	1.404	1.355	1.369	92	100	0.694	0.694	0.669	0.725	0.696	115
	10	0.547	0.743	0.699	0.983	0.743	80	10	1.217	1.335	1.302	1.318	1.293	95	10	0.655	0.685	0.708	0.651	0.675	112
	1	1.203	0.749	0.760	0.769	0.870	93	1	1.391	1.321	1.369	1.320	1.350	100	1	0.653	0.697	0.612	0.599	0.640	106

	0.1	0.268	0.721	0.978	0.805	0.693	74	0.1	1.363	1.314	1.324	1.409	1.352	100	0.1	0.619	0.655	0.620	0.622	0.629	99
	0.01	0.698	0.842	0.806	0.754	0.775	83	0.01	1.338	1.217	1.260	1.325	1.285	97	0.01	0.579	0.644	0.629	0.596	0.612	97
	DMSO	1.068	0.902	0.815	0.943	0.932	100	DMSO	1.520	1.315	1.368	1.219	1.356	100	DMSO	0.603	0.589	0.684	0.656	0.633	100
	C+	1.338	1.250	1.223	1.263	1.269		C+	1.427	1.322	1.295	1.438	1.371		C+	1.016	1.103	1.097	1.118	1.084	
ឥរិ	Conc. (µg/ml)	BT474 (A₅₄₀)					PS	Conc. (µg/ml)	Chago-K1 (A₅₄₀)					PS	Conc. (µg/ml)	Hep-G2 (A₅₄₀)					PS
		1	2	3	4	ផ្តល់			1	2	3	4	ផ្តល់			1	2	3	4	ផ្តល់	
M3	100	0.491	0.401	0.375	0.224	0.373	75	100	0.434	0.449	0.648	0.548	0.520	61	100	0.835	0.899	0.952	0.865	0.888	89
	10	0.303	0.590	0.342	0.431	0.416	83	10	0.434	0.737	0.666	0.799	0.659	77	10	0.613	0.535	0.702	1.095	0.736	74
	1	0.630	0.492	0.572	0.386	0.520	114	1	0.841	0.859	0.822	0.756	0.819	96	1	1.103	1.009	1.123	1.044	1.070	95
	0.1	0.546	0.520	0.544	0.517	0.532	117	0.1	0.662	0.706	0.727	0.774	0.717	84	0.1	1.087	1.011	1.007	0.925	1.007	90
	0.01	0.539	0.560	0.578	0.490	0.542	119	0.01	0.793	0.774	0.768	0.645	0.745	87	0.01	1.008	1.082	0.966	0.729	0.946	95
	DMSO	0.490	0.540	0.493	0.471	0.499	100	DMSO	1.079	0.707	0.803	0.838	0.857	100	DMSO	0.930	0.995	1.073	0.997	0.999	100
	C+	0.709	0.695	0.659	0.730	0.698		C+	1.187	1.214	1.159	1.169	1.182		C+	1.447	1.335	1.496	1.520	1.450	
ឥរិ	Conc. (µg/ml)	KATO-III (A₅₄₀)					PS	Conc. (µg/ml)	SW620 (A₅₄₀)					PS	Conc. (µg/ml)	Wi-38 (A₅₄₀)					PS
		1	2	3	4	ផ្តល់			1	2	3	4	ផ្តល់			1	2	3	4	ផ្តល់	
	100	1.149	0.788	0.935	0.826	0.925	99	100	1.218	1.298	1.191	1.329	1.259	93	100	0.657	0.744	0.945	0.712	0.765	127

		1	2	3	4	เฉลี่ย			1	2	3	4	เฉลี่ย			1	2	3		เฉลี่ย	
	M4	100	0.557	0.689	0.561	0.794	0.650	70	100	0.838	0.894	1.015	1.058	0.951	70	100	0.311	0.337	0.468	0.430	0.386
10		1.035	1.021	0.849	1.004	0.977	134	10	1.233	1.310	1.277	1.203	1.256	93	10	0.726	0.650	0.584	0.432	0.598	94
1		0.957	0.857	0.977	0.908	0.925	99	1	1.264	1.281	1.219	1.232	1.249	92	1	0.582	0.609	0.624	0.656	0.618	98
0.1		0.859	0.862	0.977	0.999	0.924	99	0.1	1.313	1.239	1.057	1.379	1.247	92	0.1	0.677	0.713	0.679	0.706	0.694	115
0.01		0.826	0.841	0.878	0.974	0.880	94	0.01	1.306	1.268	1.351	1.315	1.310	97	0.01	0.610	0.686	0.689	0.645	0.658	109
DMSO		1.068	0.902	0.815	0.943	0.932	100	DMSO	1.520	1.315	1.368	1.219	1.356	100	DMSO	0.603	0.589	0.684	0.656	0.633	100
C+		1.338	1.250	1.223	1.263	1.269		C+	1.427	1.322	1.295	1.438	1.371		C+	1.016	1.103	1.097	1.118	1.084	

สารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในเห็ด

สารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในเห็ดอันเป็นเหตุก่อภาวะความผิดปกติอันจนการเกิดโรคมะเร็งนั้น ได้แก่ alkaloid compounds, terpenoid and steroid compounds, anthocyanin และ phenolic compounds เช่น stibene xantone flavonoid polysaccharide เป็นต้น สารดังกล่าวสามารถนำมาวิเคราะห์ $^1\text{H-NMR}$ ได้ดังนี้



รูปที่ ๗ $^1\text{H-NMR}$ ของสาร $\beta\text{-D-(1}\rightarrow\text{3, 1}\rightarrow\text{6)-linked glucan}$ ของ curdlan ซึ่งได้มาจากแบคทีเรีย
ที่มา <http://www.mdpi.com/1420-3049/19/1/22/htm>

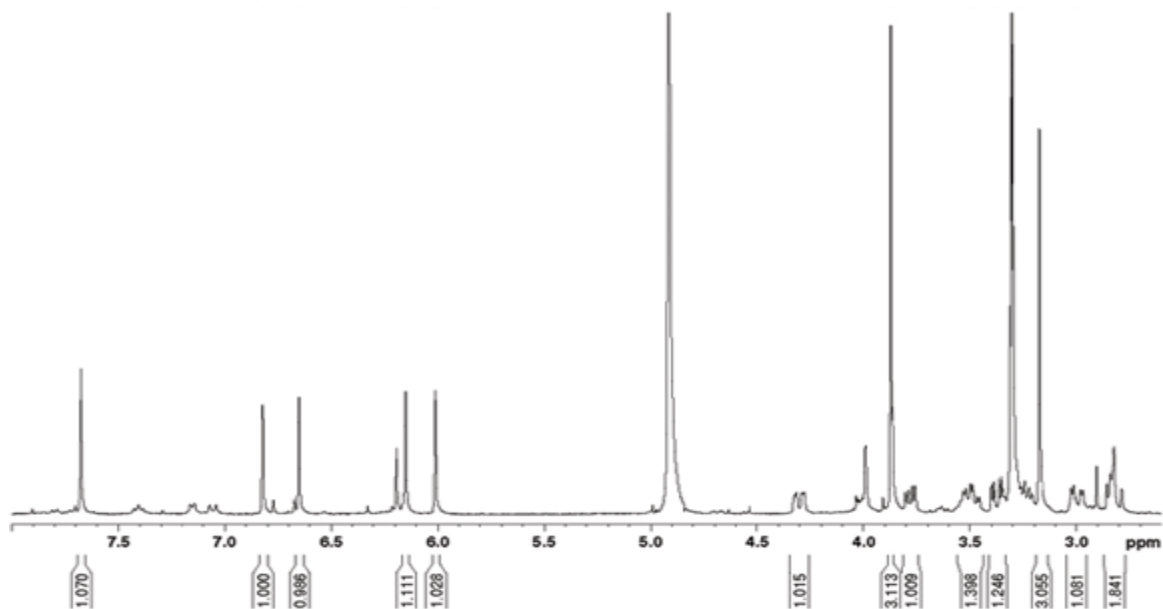
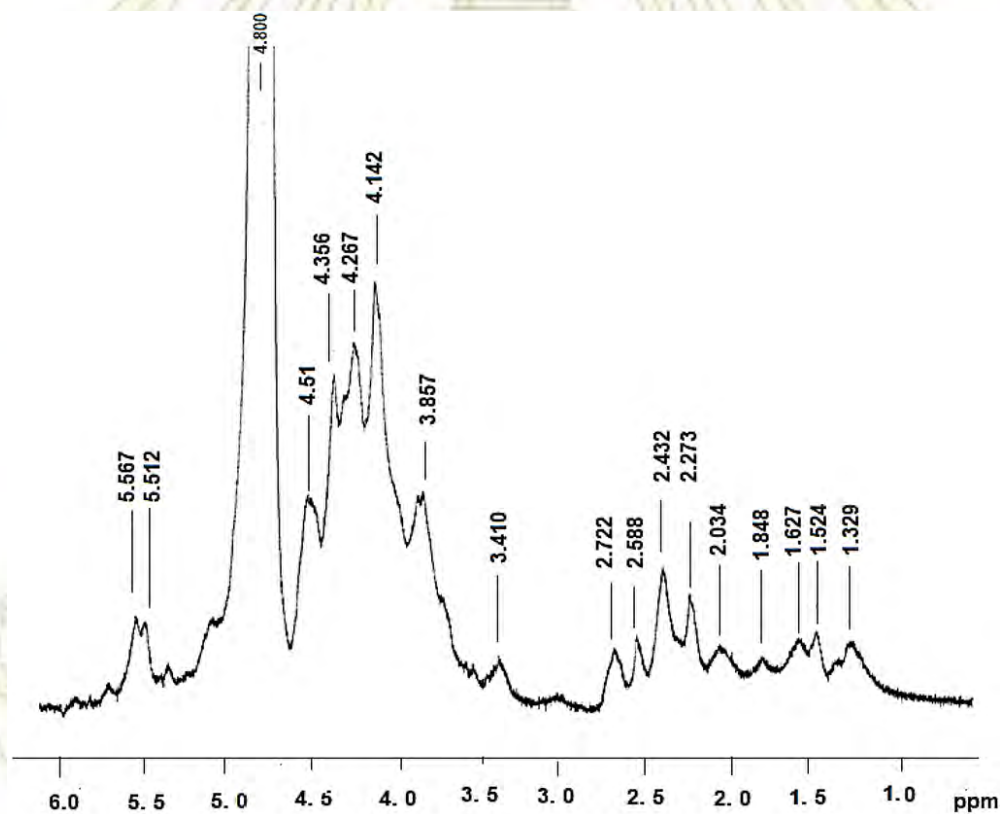


Figure S12. ^1H NMR spectrum of cassythicine in $\text{MeOD-}d_4$ at 400 MHz.

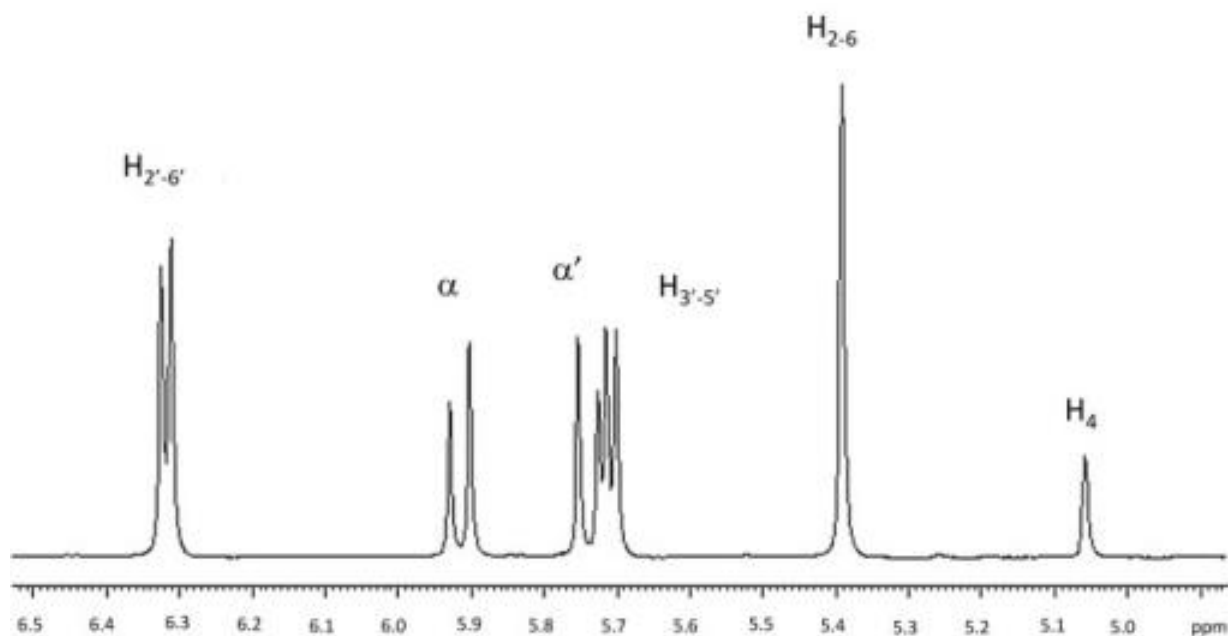
รูปที่ ๗2 ^1H -NMR ของสาร Cassythicine ซึ่งเป็นสารประกอบ alkaloid

ที่มา <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci>



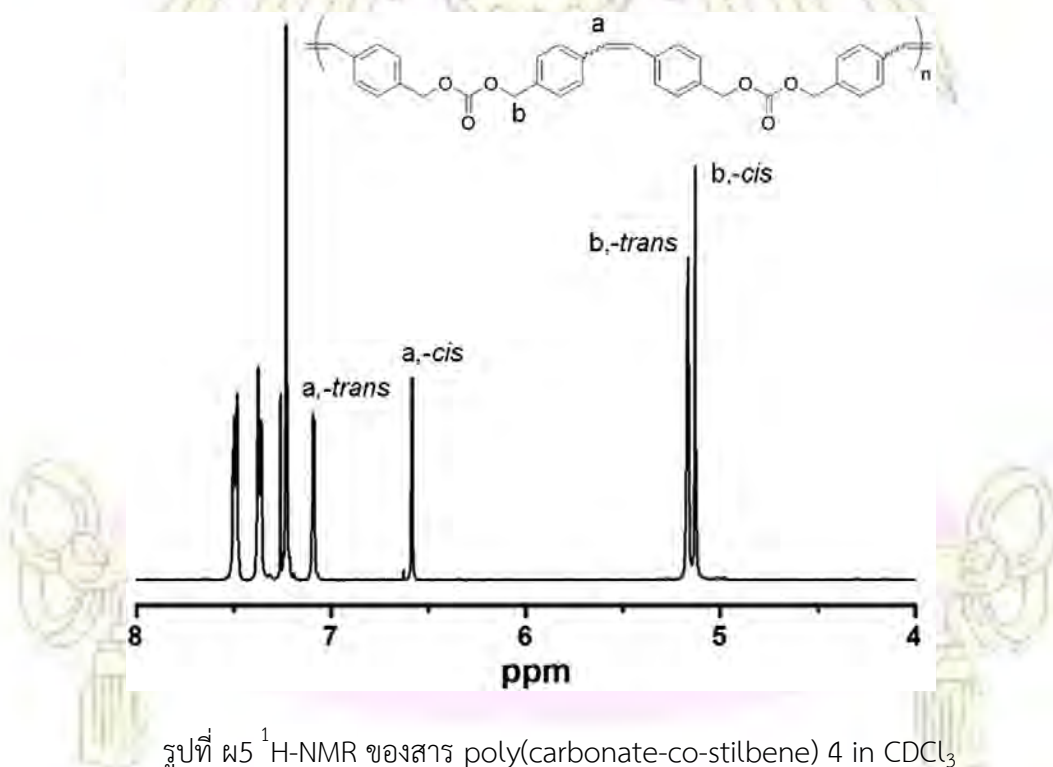
รูปที่ ๗3 ^1H -NMR ของสาร glucan protein ของเห็ด *Polyporus dermatopus*

ที่มา <http://www.mdpi.com/2076-3921/3/4/730/htm>



รูปที่ ๗4 $^1\text{H-NMR}$ ของสาร trans-Resveratrol in $\text{D}_2\text{O}/\text{DMSO}$ ซึ่ง trans-Resveratrol เป็นสารประกอบ stilbene

ที่มา <http://www.keywordsuggests.com/>



รูปที่ ๗5 $^1\text{H-NMR}$ ของสาร poly(carbonate-co-stilbene) 4 in CDCl_3

ที่มา <http://pubs.rsc.org/en/content/articlehtml/2014/ra/c3ra45055d>

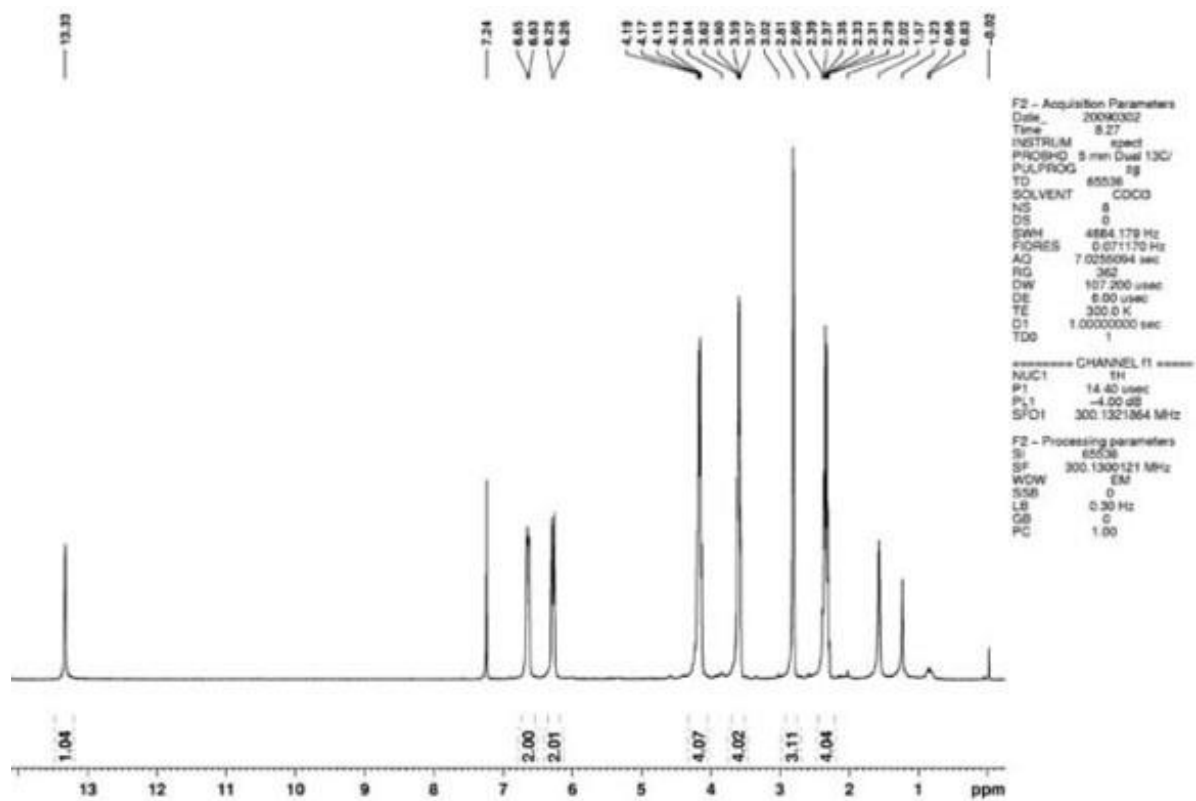


Figure 1S. ^1H NMR spectrum of (3), 300 MHz, CDCl_3 .

รูปที่ ๑๖ ^1H -NMR ของสาร 3,6-bis(3-bromopropoxy)-1-hydroxy-8-methyl-9H-xanthen-9-one
ซึ่งเป็นสารประกอบ xantone

ที่มา http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422011000600019

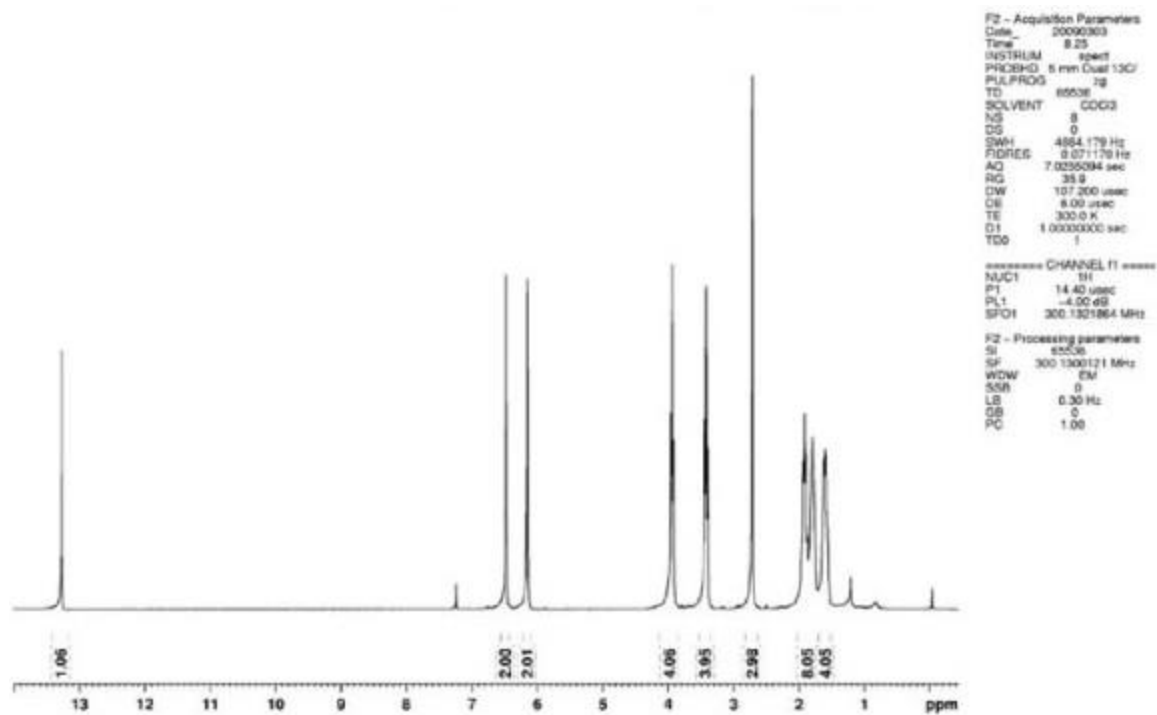
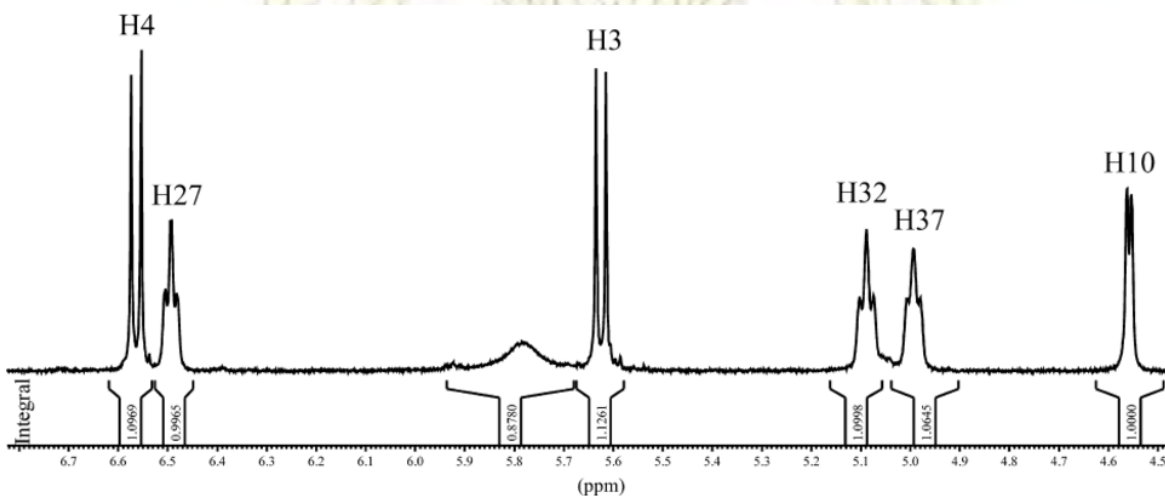


Figure 7S. ^1H NMR spectrum of (5), 300 MHz, CDCl_3

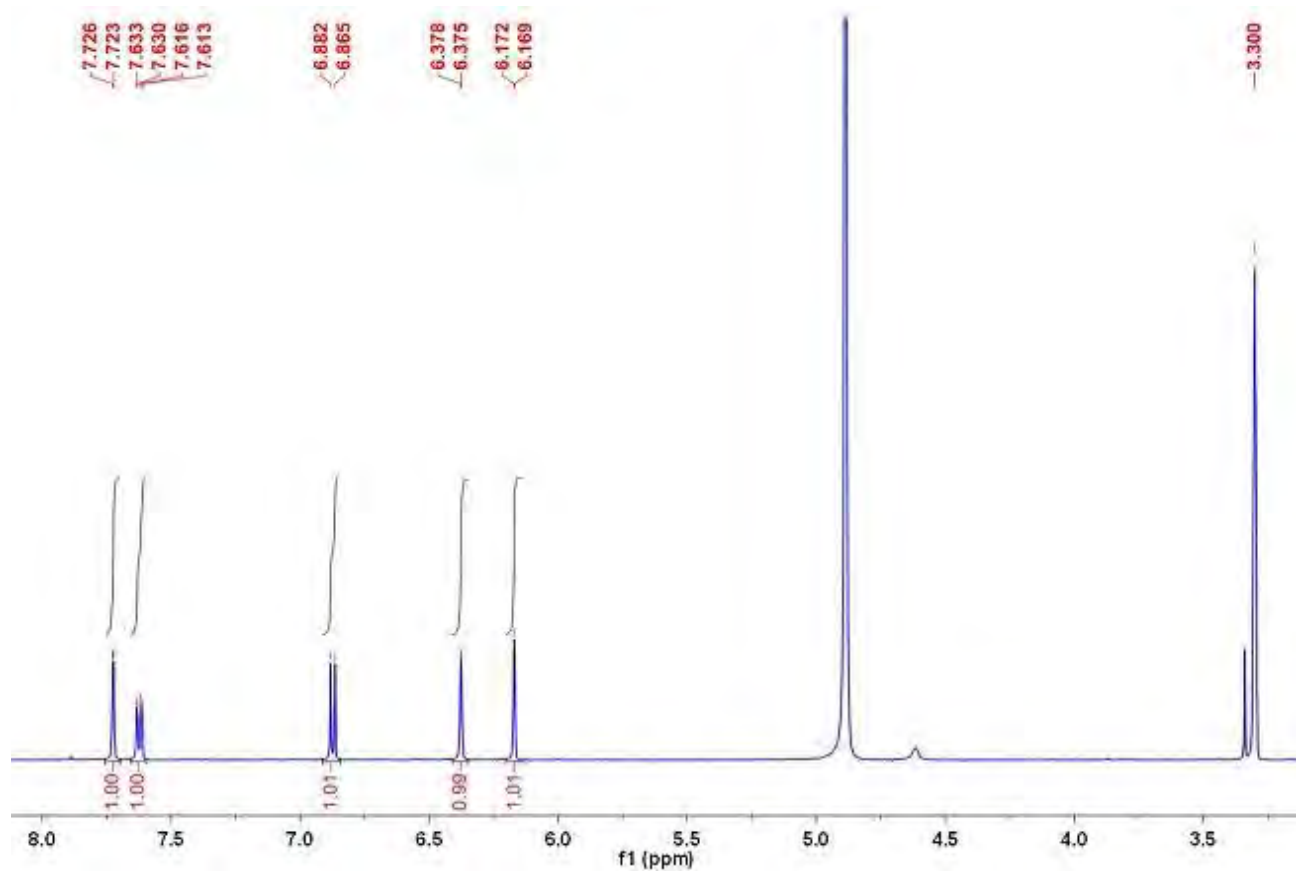
รูปที่ ๗7 ^1H -NMR ของสาร 3,6-bis(3-bromopentoxy)-1-hydroxy-8-methyl-9H-xanthen-9-one
ซึ่งเป็นสารประกอบ xantone

ที่มา http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422011000600019



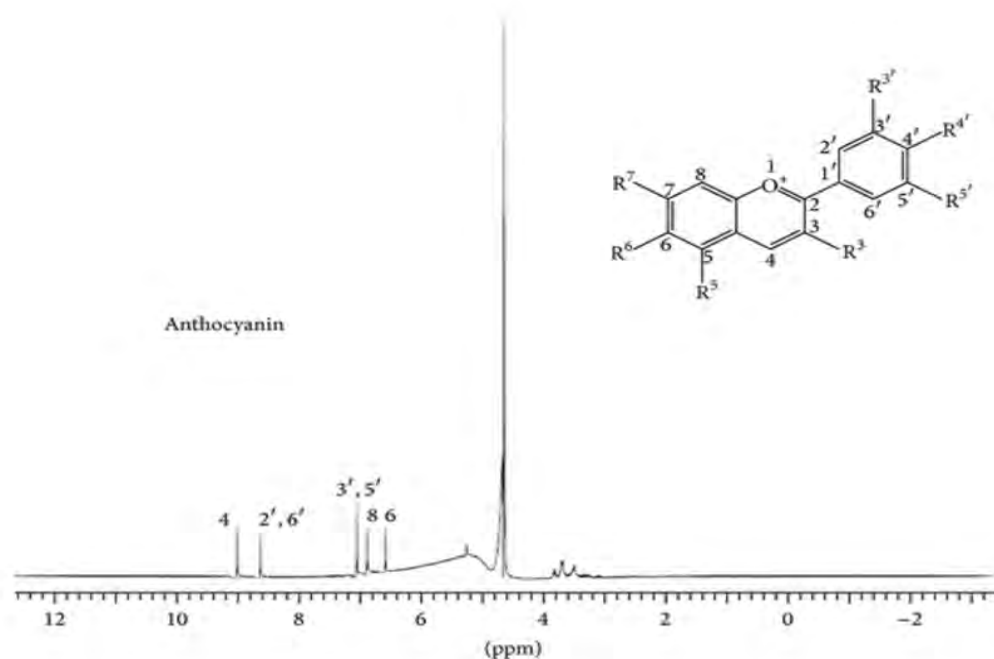
รูปที่ ๗8 ^1H -NMR ของสาร gambogic acid ซึ่งเป็นสารประกอบ xantone

ที่มา <https://www.researchgate.net/publication/41424172>



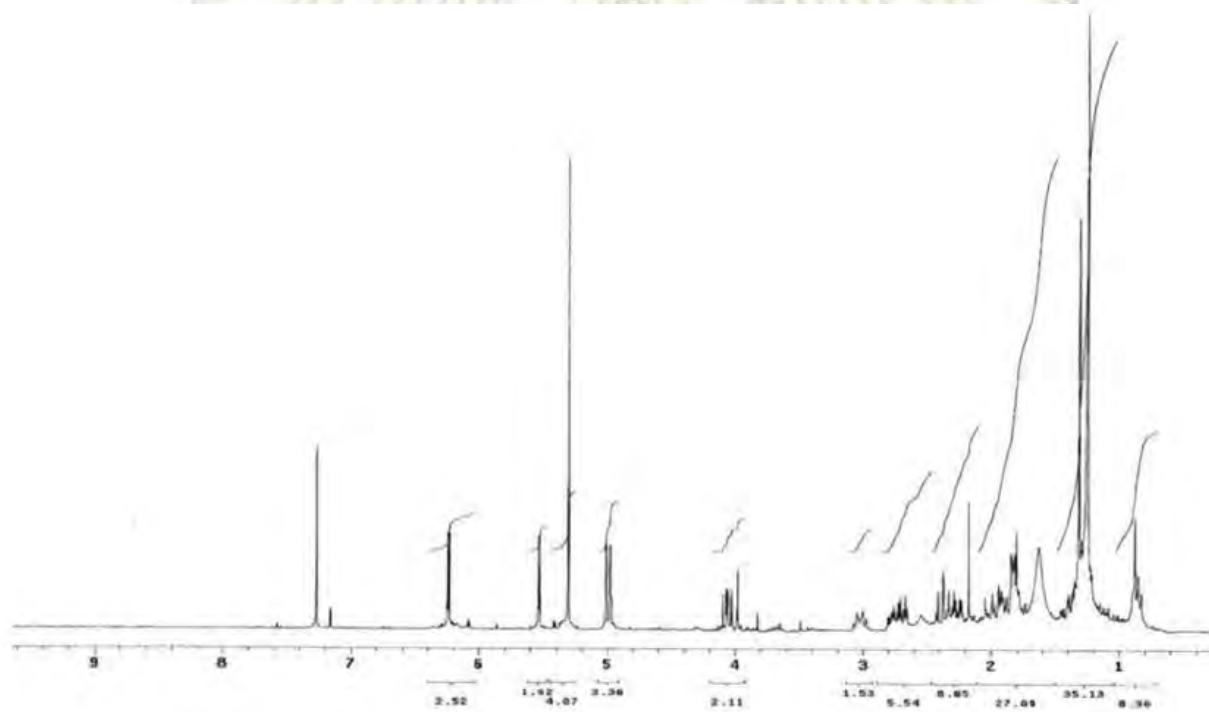
รูปที่ ๘9 ¹H-NMR ของสาร quercetin เป็นสารประกอบ flavonoid

ที่มา <http://www.wangfei.ac.cn/article/3/1/27>



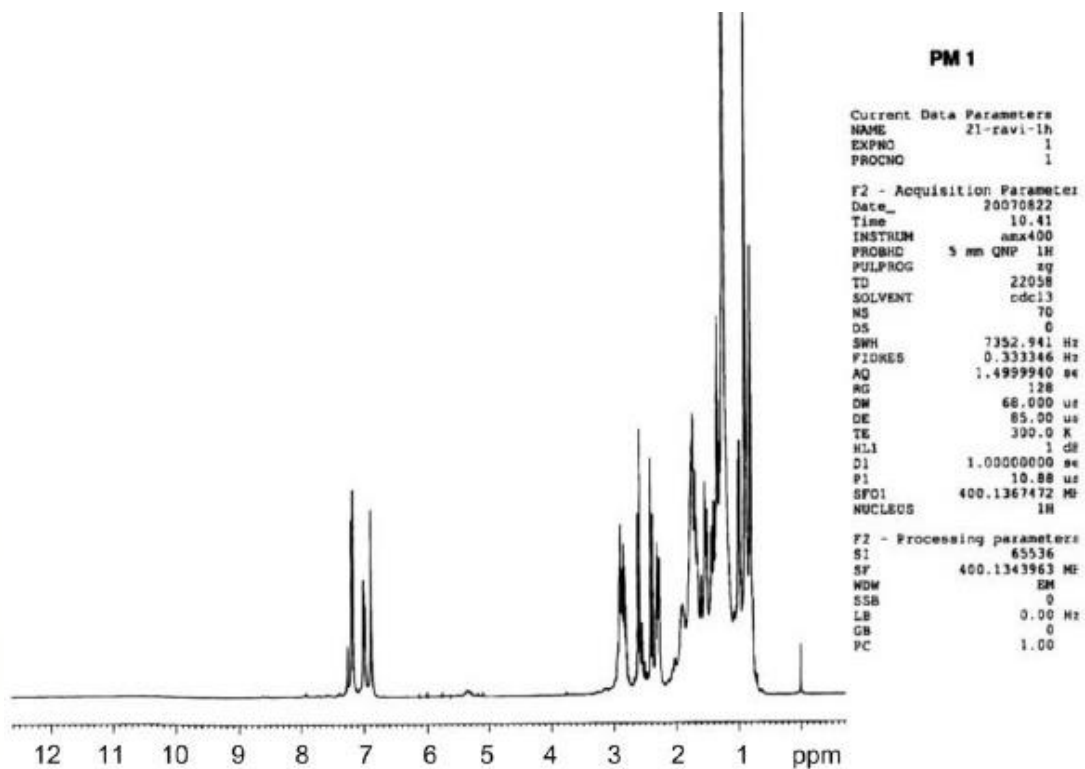
รูปที่ 10 $^1\text{H-NMR}$ ของสาร anthocyanins

ที่มา <https://www.researchgate.net/figure/261295328>



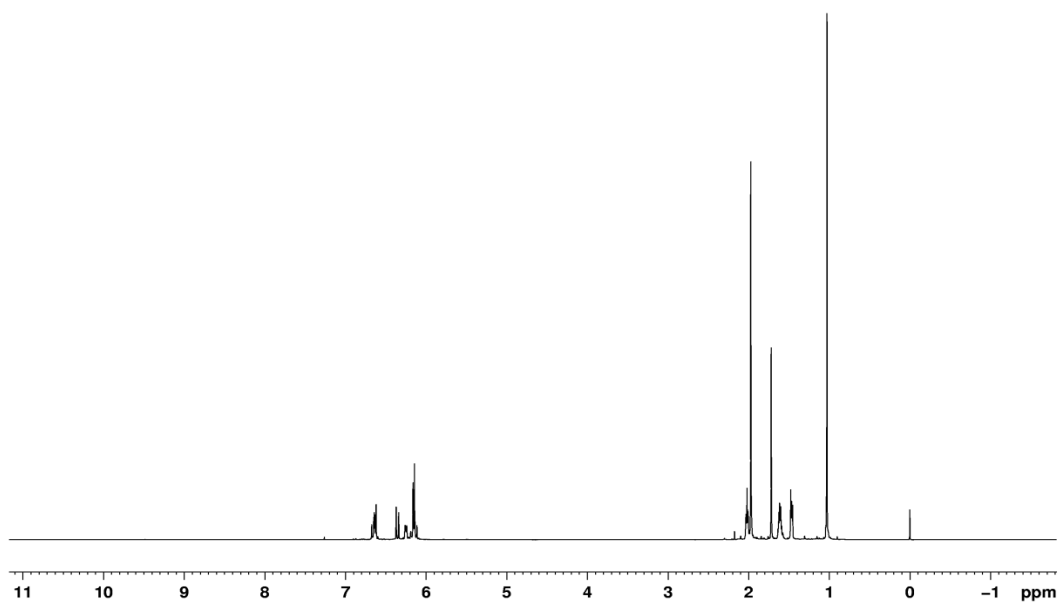
รูปที่ 11 $^1\text{H-NMR}$ ของสาร guaianolide ซึ่งเป็นสารประกอบ terpene

ที่มา <https://orgspectroscopyint.blogspot.com/2016/06/guaianolide.html>



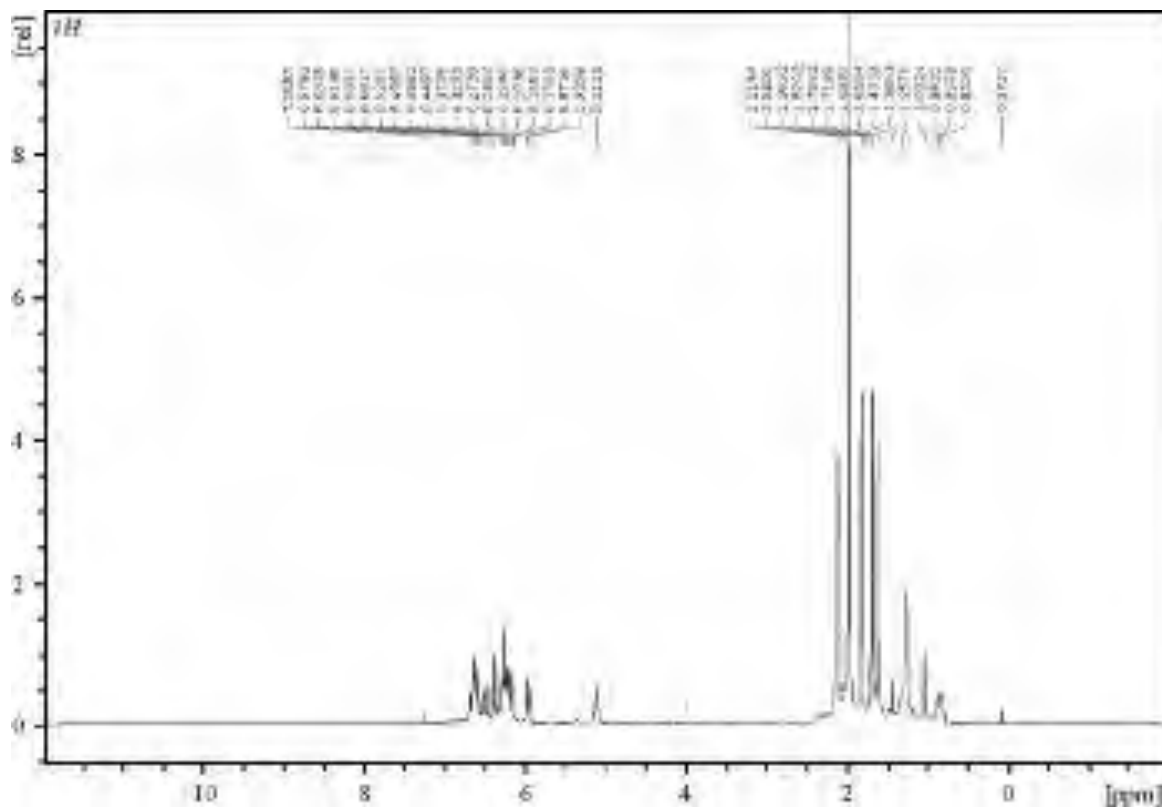
รูปที่ ๑๒ $^1\text{H-NMR}$ ของสาร Leelamine (dehydroabietylamine) ซึ่งเป็นสารประกอบ terpene

ที่มา <http://www.phcog.com/viewimage.asp?img=PhcogMag>



รูปที่ ๑๓ $^1\text{H-NMR}$ ของสาร beta-carotene สังเคราะห์

ที่มา http://www.bmrw.wisc.edu/metabolomics/mol_summary



รูปที่ ๑๑4 ¹H-NMR ของสาร lycopene

ที่มา <https://www.researchgate.net/figure/227583073>



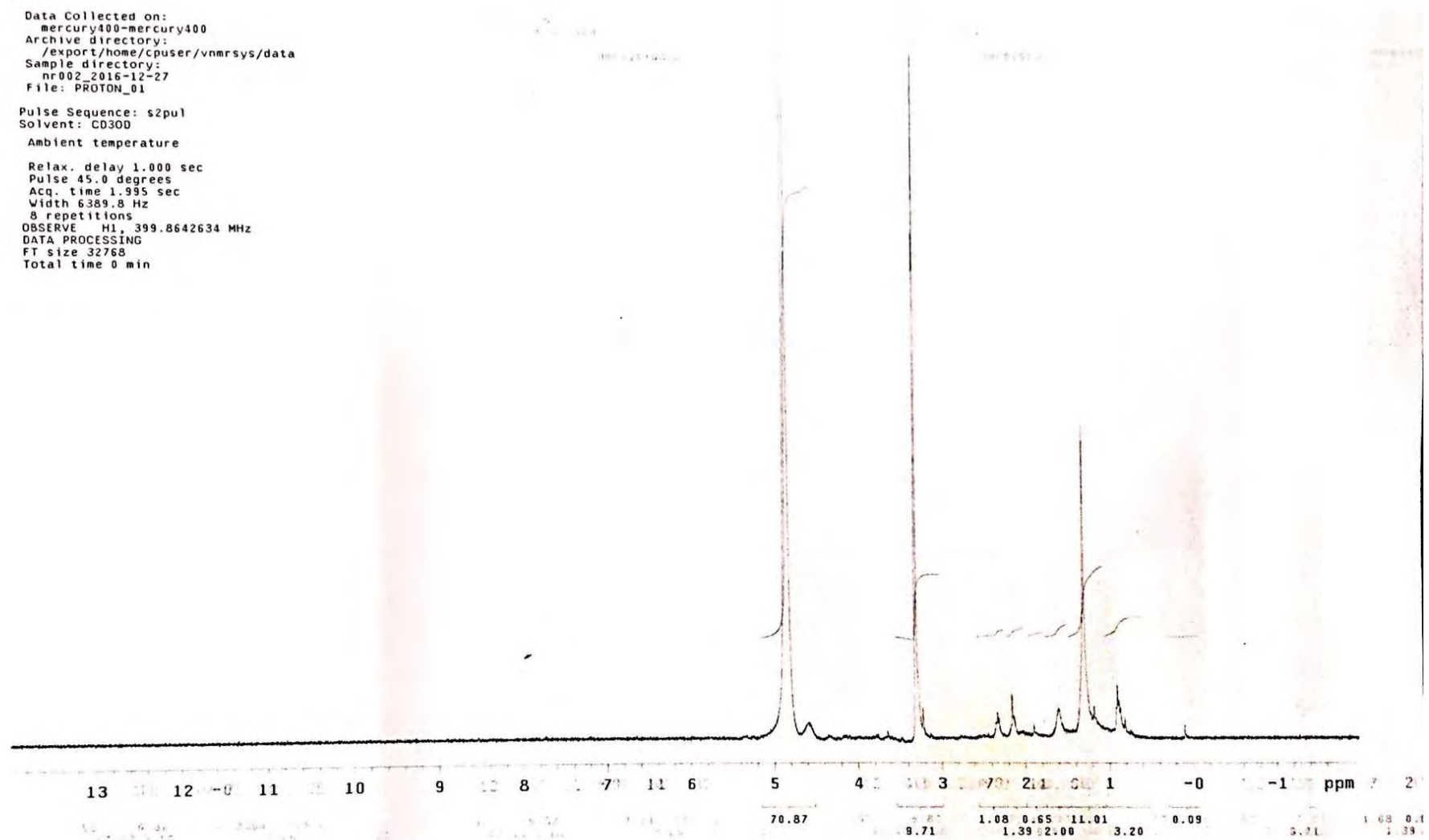
me1

Data Collected on:
 mercury400-mercury400
 Archive directory:
 /export/home/cpuser/vnmrsys/data
 Sample directory:
 nr002_2016-12-27
 File: PROTON_01

Pulse Sequence: s2pul
 Solvent: CD300

Ambient temperature

Relax. delay 1.000 sec
 Pulse 45.0 degrees
 Acq. time 1.935 sec
 Width 6389.8 Hz
 8 repetitions
 OBSERVE H1, 399.8642634 MHz
 DATA PROCESSING
 FT size 32768
 Total time 0 min



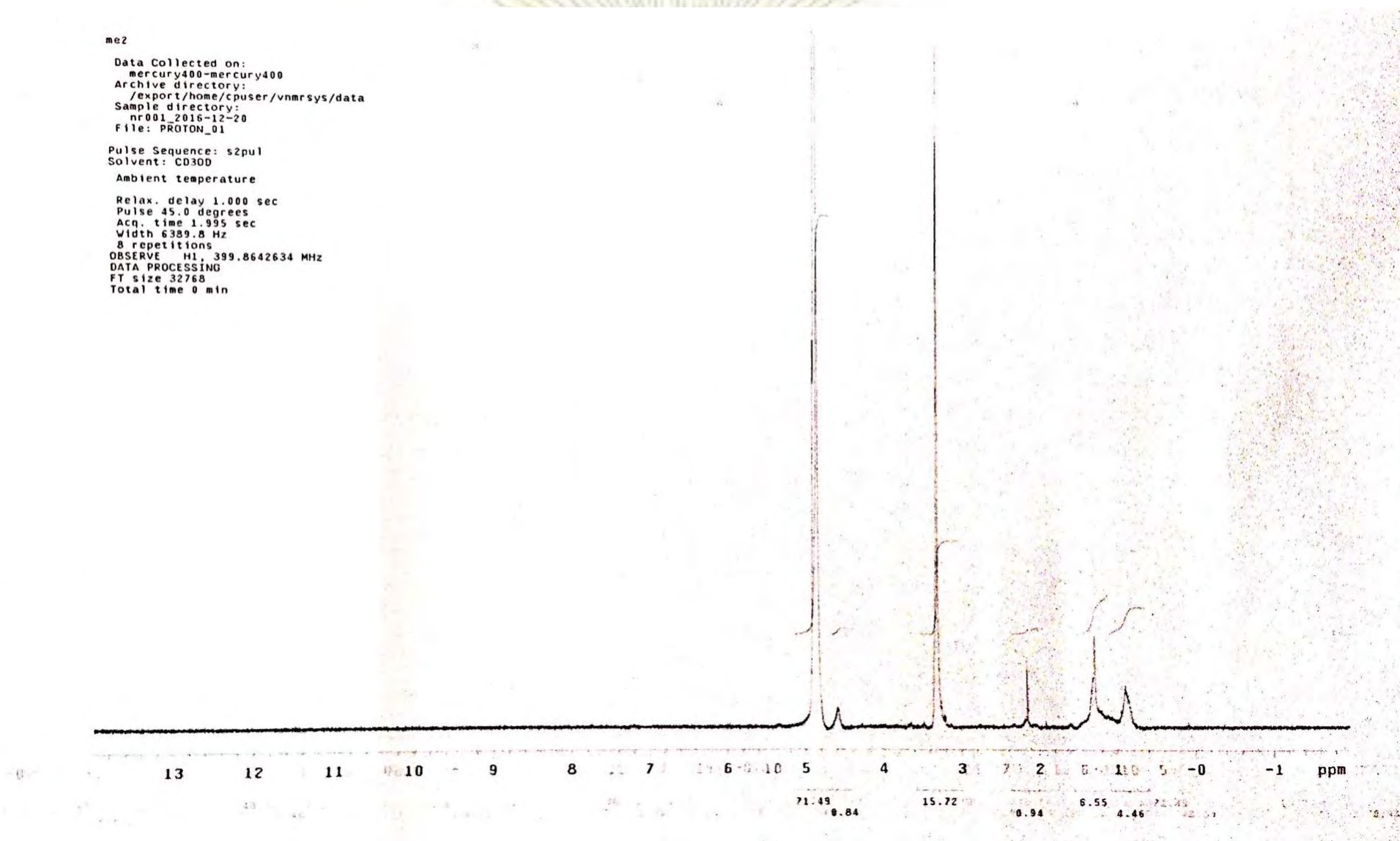
รูปที่ ๑๕ $^1\text{H-NMR}$ ของสาร M_1

me2

Data Collected on:
mercury400-mercury400
Archive directory:
/export/home/cpuser/vnmrsys/data
Sample directory:
nr001_2016-12-20
File: PROTON_01

Pulse Sequence: s2pul
Solvent: CD3OD
Ambient temperature

Relax. delay 1.000 sec
Pulse 45.0 degrees
Acq. time 1.995 sec
Width 6389.8 Hz
8 repetitions
OBSERVE H1, 399.8642634 MHz
DATA PROCESSING
FT size 32768
Total time 0 min



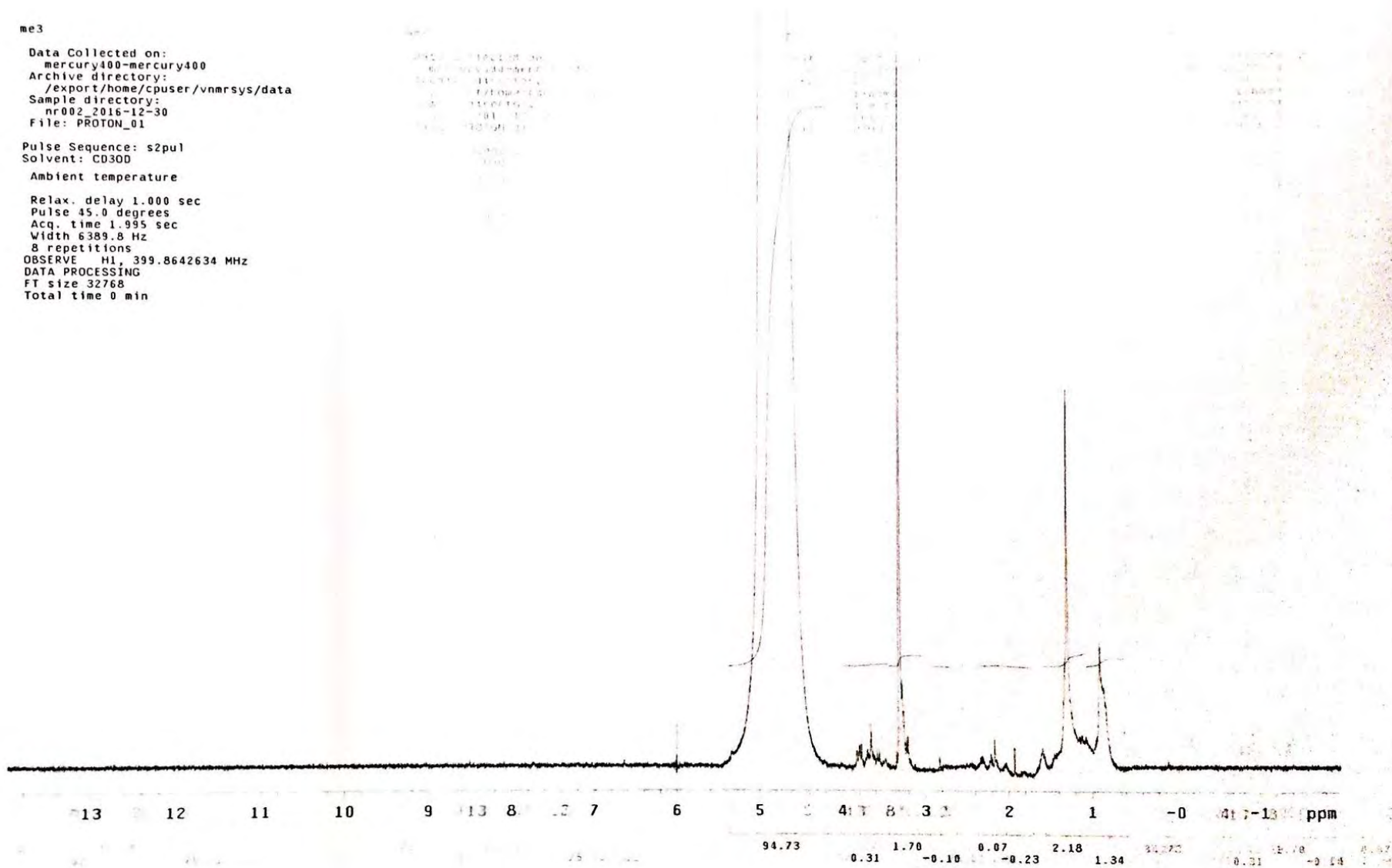
รูปที่ ๑๖ $^1\text{H-NMR}$ ของสาร M_2

me3

Data Collected on:
mercury400-mercury400
Archive directory:
/export/home/cpuser/vnmrsys/data
Sample directory:
nr002_2016-12-30
File: PROTON_01

Pulse Sequence: s2pul
Solvent: CD300
Ambient temperature

Relax. delay 1.000 sec
Pulse 45.0 degrees
Acq. time 1.995 sec
Width 6389.8 Hz
8 repetitions
OBSERVE H1, 399.8642634 MHz
DATA PROCESSING
FT size 32768
Total time 0 min



รูปที่ ๗17 $^1\text{H-NMR}$ ของสาร M_3

me4

Data Collected on:
 mercury400-mercury400
 Archive directory:
 /export/home/cpuser/vnmrsys/data
 Sample directory:
 nr003_2016-12-27
 File: PROTON_01

Pulse Sequence: s2pu1
 Solvent: CD300

Ambient temperature

Relax. delay 1.000 sec
 Pulse 45.0 degrees
 Acq. time 1.995 sec
 Width 6389.8 Hz
 8 repetitions
 OBSERVE H1, 399.8642634 MHz
 DATA PROCESSING
 FT size 32768
 Total time 0 min

me4

0.011
 2.011
 4.011
 6.011
 8.011
 10.011
 12.011

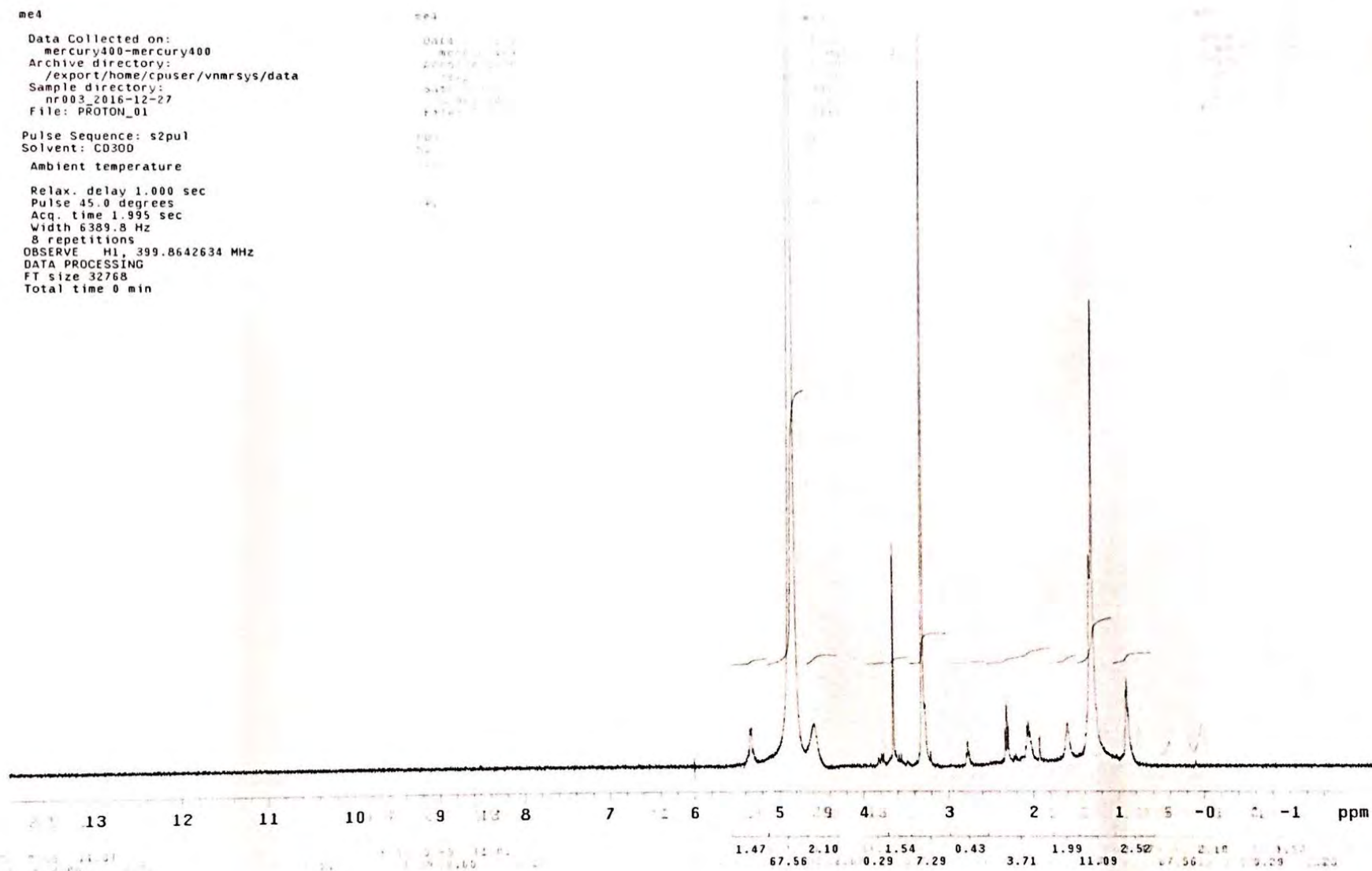
100

50

0

-50

-100



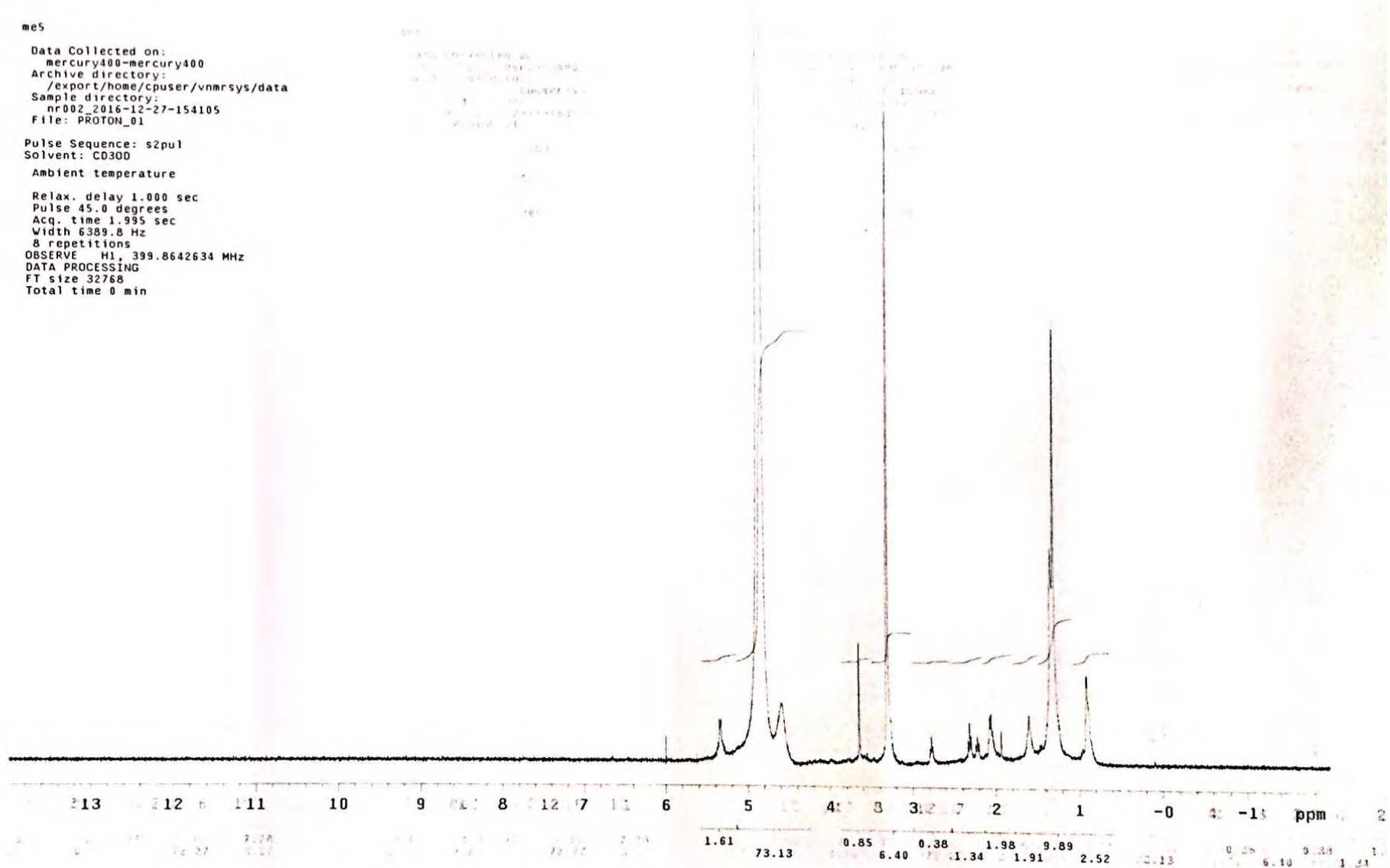
รูปที่ ๑8 $^1\text{H-NMR}$ ของสาร M_4

me5

Data Collected on:
mercury400-mercury400
Archive directory:
/export/home/cpuser/vnmrsys/data
Sample directory:
nr002_2016-12-27-154105
File: PROTON_01

Pulse Sequence: s2pul
Solvent: CD30D
Ambient temperature

Relax. delay 1.000 sec
Pulse 45.0 degrees
Acq. time 1.995 sec
Width 6389.8 Hz
8 repetitions
OBSERVE H1, 399.8642634 MHz
DATA PROCESSING
FT size 32768
Total time 0 min



รูปที่ 18 $^1\text{H-NMR}$ ของสาร M_5

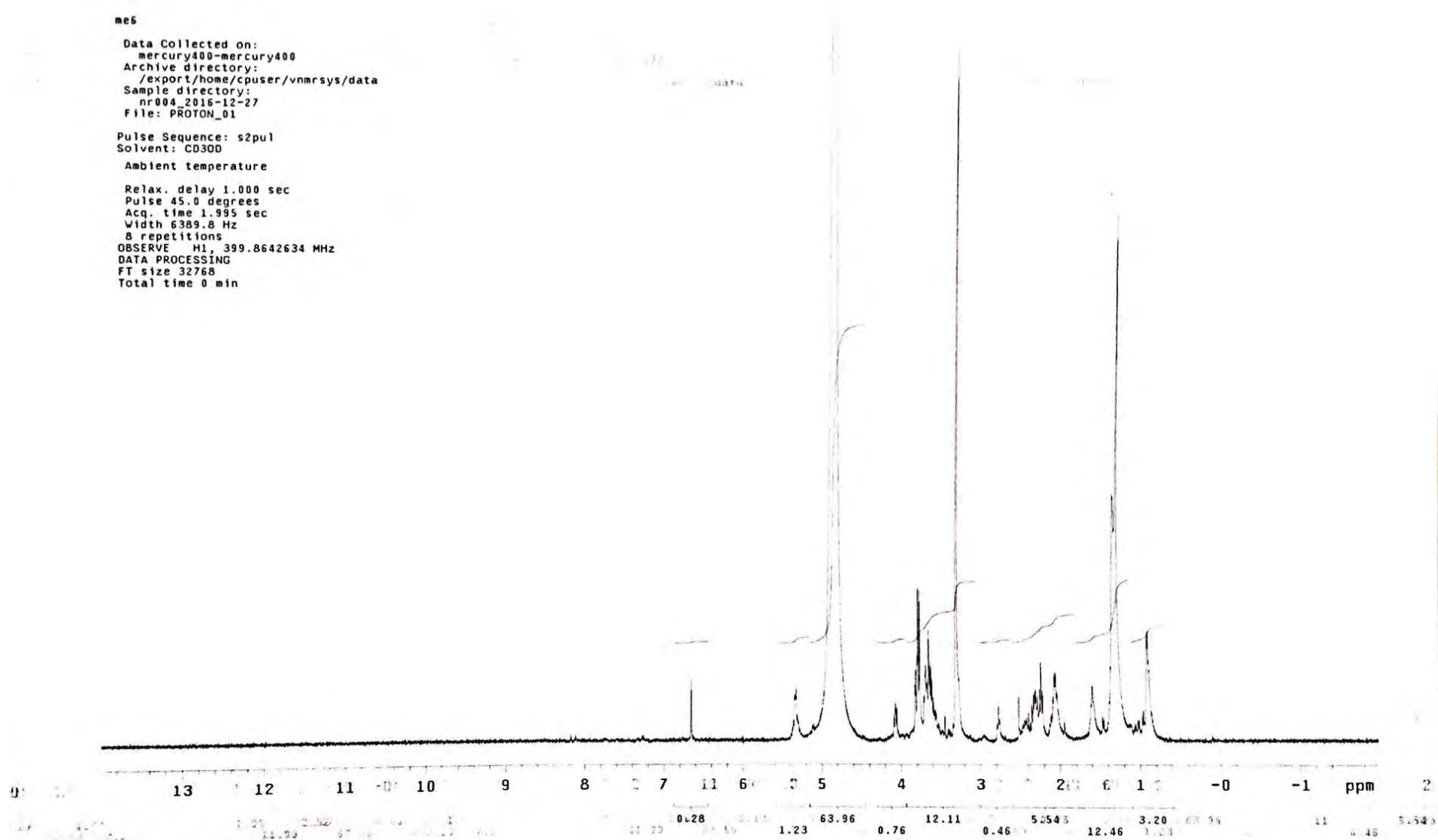
me6

Data Collected on:
 mercury400-mercury400
 Archive directory:
 /export/home/cpuser/vnmrsys/data
 Sample directory:
 nr004_2015-12-27
 File: PROTON_01

Pulse Sequence: s2pul
 Solvent: CD300

Ambient temperature

Relax. delay 1.000 sec
 Pulse 45.0 degrees
 Acq. time 1.995 sec
 Width 6389.8 Hz
 8 repetitions
 OBSERVE H1, 399.8642634 MHz
 DATA PROCESSING
 FT size 32768
 Total time 0 min



รูปที่ 19 $^1\text{H-NMR}$ ของสาร M_6

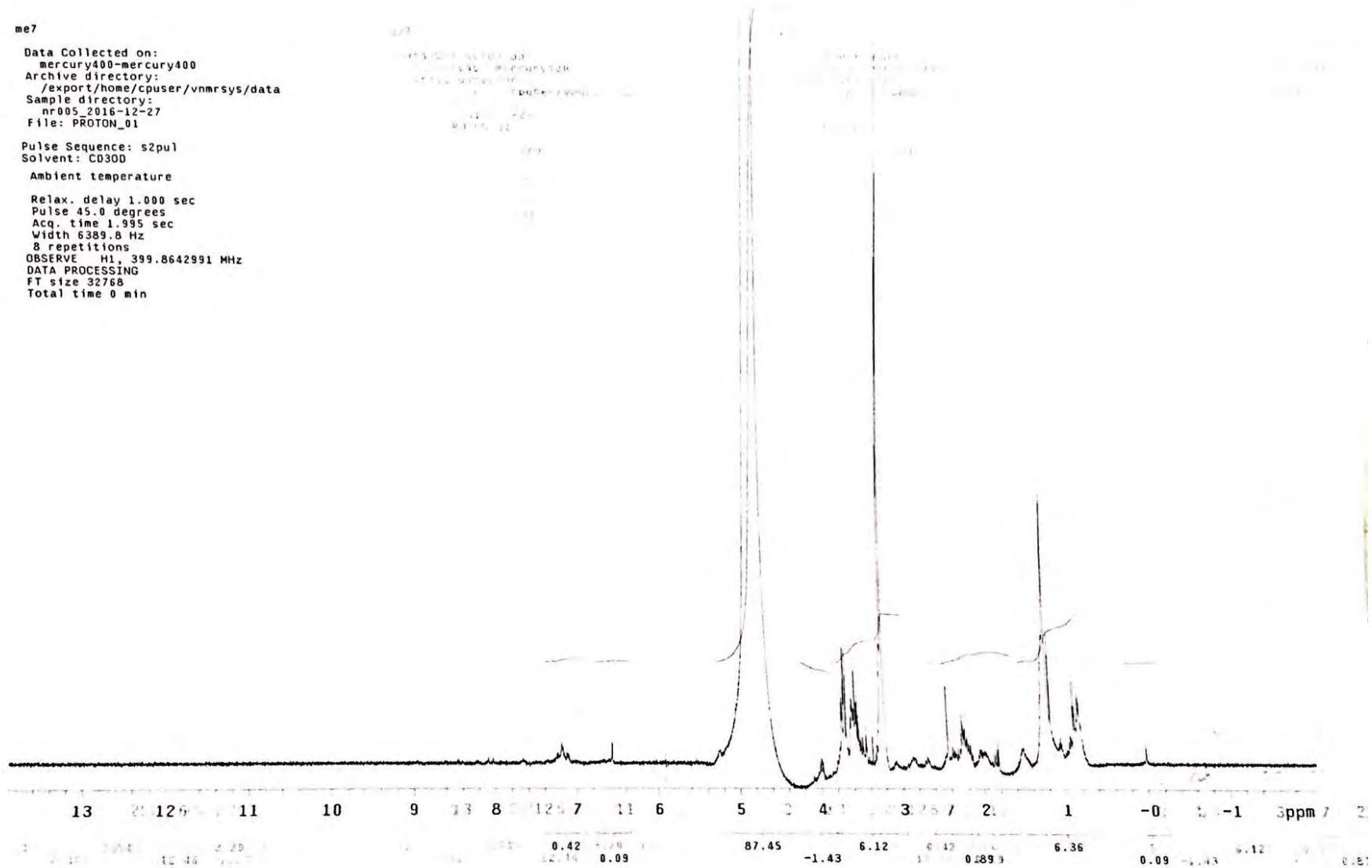
me7

Data Collected on:
 mercury400-mercury400
 Archive directory:
 /export/home/cpuser/vnmrsys/data
 Sample directory:
 nr005_2016-12-27
 File: PROTON_01

Pulse Sequence: s2pul
 Solvent: CD300

Ambient temperature

Relax. delay 1.000 sec
 Pulse 45.0 degrees
 Acq. time 1.995 sec
 Width 6389.8 Hz
 8 repetitions
 OBSERVE H1, 399.8642991 MHz
 DATA PROCESSING
 FT size 32768
 Total time 0 min



รูปที่ ๒๒0 $^1\text{H-NMR}$ ของสาร M_7

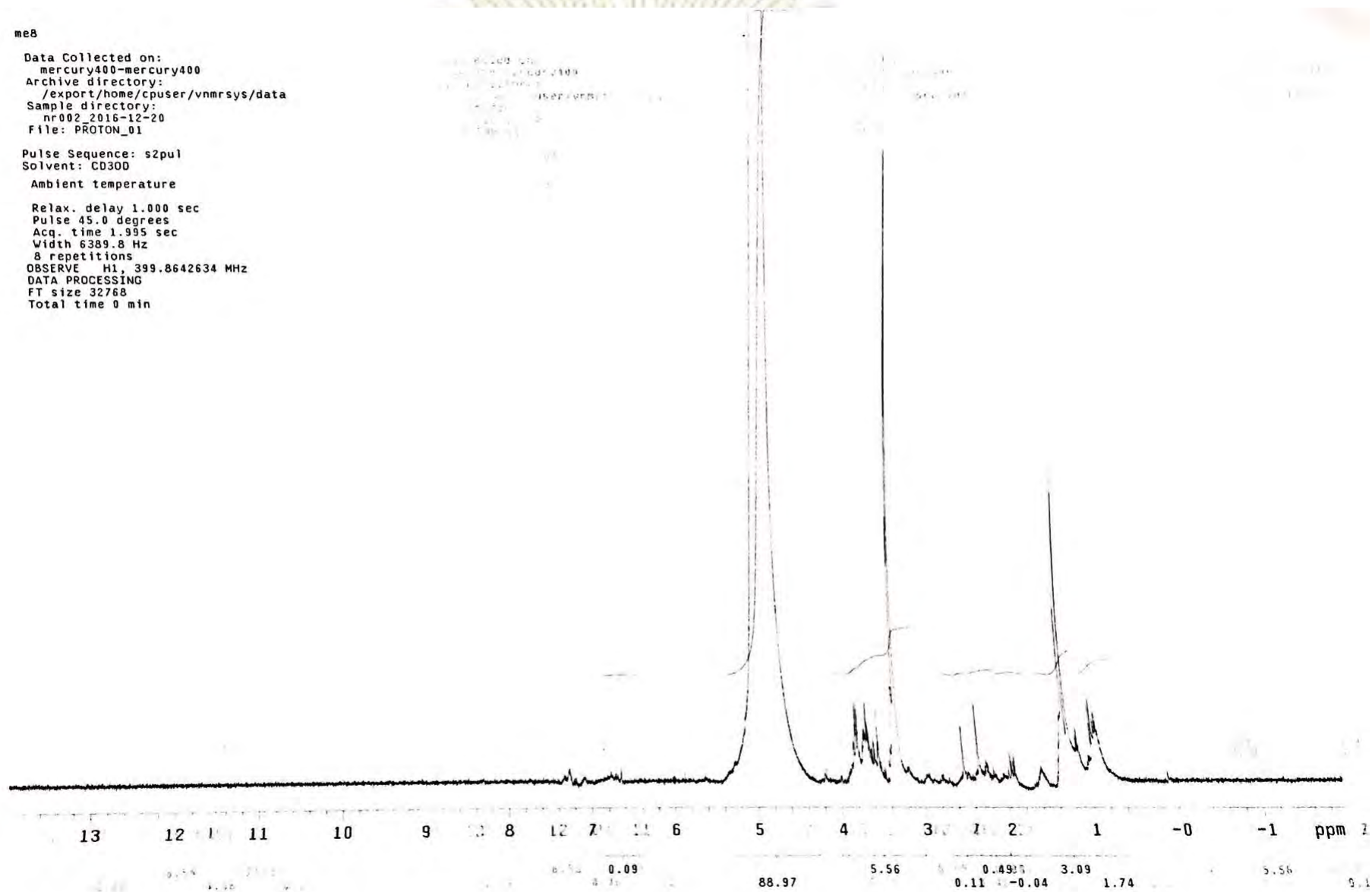
me8

Data Collected on:
mercury400-mercury400
Archive directory:
/export/home/cpuser/vnmrsys/data
Sample directory:
nr002_2016-12-20
File: PROTON_01

Pulse Sequence: s2pu1
Solvent: CD30D

Ambient temperature

Relax. delay 1.000 sec
Pulse 45.0 degrees
Acq. time 1.995 sec
Width 6389.8 Hz
8 repetitions
OBSERVE H1, 399.8642634 MHz
DATA PROCESSING
FT size 32768
Total time 0 min



รูปที่ ๗21 $^1\text{H-NMR}$ ของสาร M_8

ประวัติผู้วิจัย

นางสาวไพลิน ภูมิคอนสาร เกิดเมื่อวันที่ 15 พฤศจิกายน พ.ศ. 2537 ที่จังหวัดชัยภูมิ สำเร็จการศึกษาชั้นมัธยมศึกษาตอนปลายจากโรงเรียนชุมแพศึกษา จังหวัดขอนแก่น เมื่อปีการศึกษา 2555 เข้าศึกษาต่อในหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อปีการศึกษา 2556 ที่อยู่ที่สามารถติดต่อได้ บ้านเลขที่ 75 ตำบลทุ่งพระ อำเภอคอนสาร จังหวัดชัยภูมิ รหัสไปรษณีย์ 36180 อีเมล pailinna42@gmail.com

