

ฤทธิ์ปรับภูมิคุ้มกันของสารสกัดจากเห็ดนางฟ้าภูฐาน เห็ดเป่าฮื้อ และเห็ดหูหนูในหลอดทดลอง



บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR) เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของวิทยานิพนธ์ ที่ส่งผ่านทางบัณฑิตวิทยาลัย

The abstract and full text of theses from the academic year 2011 in Chulalongkorn University Intellectual Repository (CUIR) are the thesis authors' files submitted through the University Graduate School.

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ระดับโมเลกุลทางจุลชีววิทยาทางการแพทย์และวิทยาภูมิคุ้มกัน ภาควิชาเวชศาสตร์ การธนาคารเลือดและจุลชีววิทยาคลินิก คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปีการศึกษา 2558  
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

IN VITRO IMMUNOMODULATORY ACTIVITY OF *Pleurotus sajor-  
caju*, *Pleurotus abalonus* AND *Auricularia auricula-judae*

Miss Sumolrat Panthong



A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements  
for the Degree of Master of Science Program in Molecular Science of Medical  
Microbiology and Immunology  
Department of Transfusion Medicine and Clinical Microbiology  
Faculty of Allied Health Sciences  
Chulalongkorn University  
Academic Year 2015  
Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	ฤทธิ์ปรับภูมิคุ้มกันของสารสกัดจากเห็ดนางฟ้าภูฐาน เห็ด เป่าฮื้อ และเห็ดหูหนูในหลอดทดลอง
โดย	นางสาวสมลรัตน์ ปานทอง
สาขาวิชา	วิทยาศาสตร์ระดับโมเลกุลทางจุลชีววิทยาทางการแพทย์ และวิทยาภูมิคุ้มกัน
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ศิริพร ชื้อชวาลกุล

---

คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้หัวข้อวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่ง  
ของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

.....คณบดีคณะสหเวชศาสตร์  
(รองศาสตราจารย์ ดร.ประวิตร เจนวนรรัตนกุล)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ  
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.पालนี อัมรานนท์)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก  
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ศิริพร ชื้อชวาลกุล)

.....กรรมการ  
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เทวิน เทนคำเนาวิ)

.....กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย  
(ดร. เกสัชกรหญิงวีรญา อรุโณทยานันท์)

สมรัตน์ ปานทอง : ฤทธิ์ปรับภูมิคุ้มกันของสารสกัดจากเห็ดนางฟ้าภูฐาน เห็ดเป่าฮื้อ และเห็ดหูหนูในหลอดทดลอง (IN VITRO IMMUNOMODULATORY ACTIVITY OF *Pleurotus sajor-caju*, *Pleurotus abalonus* AND *Auricularia auricula-judae*) อ.ที่ปริกษานิตยสารเภสัชกรรม: ผศ. ดร.ศิริพร ชื้อชวลกุล, 206 หน้า.

ประเทศไทยมีการบริโภคและเพาะเห็ดเป็นจำนวนมาก ผู้วิจัยสนใจศึกษาเห็ดที่รับประทานได้ที่เป็นที่นิยม 3 ชนิด ได้แก่ เห็ดหูหนู (AA) เห็ดเป่าฮื้อ (PA) และเห็ดนางฟ้าภูฐาน (PS) โดยนำส่วนดอกเห็ดมาสกัดด้วยเอทานอลโดย soxhlet extraction หรือน้ำที่อุณหภูมิ 4, 22, 50 และ 100 องศาเซลเซียสด้วย maceration technique ทำการตรวจวัดปริมาณฟีนอลและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี Folin-Ciocalteu's method และ Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) assay พบว่าสารสกัดเอทานอลและน้ำจากเห็ดทั้ง 3 ชนิดมีสารฟีนอลและมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่แตกต่างกัน และทำการตรวจวิเคราะห์องค์ประกอบของสารสกัดเห็ดด้วยเทคนิค UPLC-HRMS ซึ่งไม่เคยมีการตรวจวิเคราะห์องค์ประกอบในเห็ดด้วยวิธีนี้มาก่อน และพบว่าสารสกัดเอทานอล AA, PS และ PA ยับยั้งการเจริญของ U937 ได้ดี ( $IC_{50}$  0.28±0.04, 0.45±0.01 และ 0.49±0.001 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) เมื่อทดสอบด้วย MTS/MTT โดย AA ที่ 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรเป็นพิษต่อเซลล์คิดเป็น 50% เมื่อตรวจวัดด้วย LDH assay ผู้วิจัยคาดว่ากรดกลูตามิกซึ่งพบเฉพาะใน AA และเป็นกรดอะมิโนที่มีฤทธิ์ต้านมะเร็งน่าจะเป็นสารออกฤทธิ์ที่สำคัญใน AA ที่ยับยั้งการเจริญของ U937 จากงานวิจัยนี้พบว่าสารสกัดเห็ดหูหนู AA50 มีฟีนอลสูงสุดและมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระดีที่สุดในเห็ดที่สกัดด้วยน้ำ และ AA22, AA50 และ AA4 ยับยั้งการเจริญของ U937 ได้ดีกว่า AA100 ( $IC_{50}$  0.04±0.02 0.06±0.01 0.07±0.01 และ 1.56±0.19 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) โดย AA4, AA22 และ AA50 เป็นพิษต่อเซลล์ในขณะที่ AA100 ยับยั้งการเจริญของเซลล์ U937 ได้น้อยและไม่เป็นพิษต่อเซลล์แม้ทดสอบที่ความเข้มข้นสูง ทั้งนี้ตรวจพบกรดกลูตามิกได้ในทุกสารสกัดเห็ดหูหนูแต่ไม่ได้ทำการตรวจวัดปริมาณซึ่งอาจมีแตกต่างกันในแต่ละสารสกัด อีกทั้งการสกัดด้วยอุณหภูมิสูงอาจส่งผลต่อการออกฤทธิ์ของ AA100 ได้ ส่วนสารสกัดด้วยน้ำของเห็ดเป่าฮื้อมีฟีนอลแตกต่างกันขึ้นอยู่กับอุณหภูมิ แต่ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระไม่แปรผันตามปริมาณฟีนอล พบว่า PA50, PA22 และ PA4 ยับยั้งการเจริญของ U937 ได้ ( $IC_{50}$  0.65±0.32, 1.24±0.41 และ 1.89±0.06 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ในขณะที่ PA100 ไม่ยับยั้งการเจริญของ U937 จากการวิเคราะห์องค์ประกอบด้วย UPLC-HRMS พบกรดกลูตามิกใน PA4, PA22 และ PA50 ส่วน PA100 ที่ไม่ยับยั้งการเจริญของเซลล์ U937 นั้น ไม่พบว่ามีกรดกลูตามิก อุณหภูมิที่ใช้ในการสกัดเห็ดเป่าฮื้ออาจมีผลต่อการออกฤทธิ์ของสารสำคัญที่พบใน PA100 ทำให้ไม่ยับยั้งการเจริญของเซลล์ เช่นเดียวกับสารสกัดเห็ดนางฟ้าภูฐานที่สกัดด้วยน้ำก็ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของ U937 หากแต่กระตุ้นการเจริญของเซลล์ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยสารสกัดเห็ดนางฟ้าภูฐาน PS100 และ PS50 มีปริมาณฟีนอลใกล้เคียงกันและมีปริมาณฟีนอลสูงที่สุดเมื่อเทียบกับ PS4 และ PS22 จากผลการศึกษาพบว่า PS50 มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุด โดยมีค่าสูงเป็น 3 เท่าของ PS100 ซึ่งให้เห็นว่าปริมาณฟีนอลใน PS ไม่มีความสัมพันธ์กับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ทั้งนี้จากผลการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค UPLC-HRMS พบว่าใน PS50 ประกอบด้วยสาร 43 ชนิด ที่ไม่สามารถระบุชื่อ อาจเป็นไปได้ว่าฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของ PS50 ที่สูงกว่า PS100 อาจเป็นผลเนื่องมาจากสารต่างๆ เหล่านี้ ผู้วิจัยพบว่า PS22, PS50, PS100 และ PA100 เหนียวน้ำให้ U937 เกิดการเปลี่ยนแปลงรูปร่างเมื่อศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ จากการตรวจวัดด้วย sandwich ELISA พบว่าสารสกัดเห็ดนางฟ้าภูฐานทั้ง 3 ชนิดไม่กระตุ้นการหลั่ง TNF- $\alpha$  ของ U937 แต่เมื่อนำสารสกัดเห็ดมาทดสอบร่วมกับ PMA กลับพบว่ามีการทำงานเสริมฤทธิ์กันส่งผลให้เซลล์หลั่ง TNF- $\alpha$  เพิ่มขึ้นได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับการกระตุ้นด้วย PMA เพียงอย่างเดียว การศึกษาทั่วโลกการออกฤทธิ์ของสารในระดับโมเลกุลจะช่วยให้นักวิจัยเข้าใจ และสามารถนำเห็ดทั้งสามชนิดไปพัฒนาและประยุกต์เพื่อการใช้งาน อันจะเป็นประโยชน์แก่ผู้บริโภคในเชิงสุขภาพต่อไปได้

ภาควิชา เวชศาสตร์การธนาคารเลือดและจุลชีววิทยาคลินิก ลายมือชื่อนิสิต .....

สาขาวิชา วิทยาศาสตร์ระดับโมเลกุลทางจุลชีววิทยาทาง ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาหลัก .....

การแพทย์และวิทยาภูมิคุ้มกัน

ปีการศึกษา 2558

# # 5676661337 : MAJOR MOLECULAR SCIENCE OF MEDICAL MICROBIOLOGY AND IMMUNOLOGY

KEYWORDS:ฤทธิ์ปรับภูมิคุ้มกัน เห็ดนางฟ้าภูฐาน เห็ดเป๋าฮื้อ เห็ดหูหนู IMMUNOMODULATORY ACTIVITY PLEUROTUS SAJOR-CAJU PLEUROTUS ABALONUS AURICULARIA AURICULA-JUDAE

SUMOLRAT PANTHONG: IN VITRO IMMUNOMODULATORY ACTIVITY OF *Pleurotus sajor-caju*, *Pleurotus abalonus* AND *Auricularia auricula-judae*. ADVISOR: ASST. PROF. SIRIPORN CHUCHAWANKUL, Ph.D., 206 pp.

Consumption and cultivation of mushroom in Thailand are very popular. We are interested in 3 edible mushroom strains, including *Pleurotus sajor-caju* (PS), *Pleurotus abalonus* (PA) and *Auricularia auricula-judae* (AA). All mushrooms were extracted in a Soxhlet extraction with ethanol and marceration in water under 4, 22, 50 and 100 C. Total phenolic contents and antioxidant activity were detected *in vitro* using Folin-Ciocalteu's method and Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) assay, respectively. We displayed varied concentration of phenolic contents and antioxidant activity from all extractions. Antiproliferative effect of AA, PS and PA against U937 were determined by MTT/MTS assay. Ethanol extracts of all mushrooms were found to inhibit U937 proliferation ( $IC_{50}$  of  $0.28\pm 0.04$ ,  $0.45\pm 0.01$  and  $0.49\pm 0.001$  mg/ml). AA at 0.5 mg/ml induced 50% cytotoxicity detected by LDH assay. We hypothesized that glutamic acid, known as anticancer agent, which is only found in AA might be responsible for antiproliferative activity against U937. Water extract from AA50 contained highest level of phenolic content and antioxidant activity compared with others. Moreover, AA22, AA50 and AA4 inhibited U937 proliferation with  $IC_{50}$  of  $0.04\pm 0.02$ ,  $0.06\pm 0.01$   $0.07\pm 0.01$  and  $1.56\pm 0.19$  mg/ml, respectively. Furthermore, AA4, AA22 and AA50 were found to be toxic, whereas AA100 at high concentration which was found not to be toxic to U937 explicated less efficiency to inhibit the proliferation. Varied amount of glutamic acid and temperature used for extraction may affect AA's activities. We reported that various PA extracted with water displayed different amount of phenolic contents and antioxidation activity. PA50, PA22 and PA4 inhibited U937 proliferation ( $IC_{50}$  of  $0.65\pm 0.32$ ,  $1.24\pm 0.41$  and  $1.89\pm 0.06$  mg/ml, respectively), while PA100 had no effect on U937. We also found glutamic acid in these 3 extracts expecting that it might induce the inhibitory activity on the cells. There was no glutamic acid in PA100 as predicted and high temperature may affect key compounds responsible for the inhibition. Finally, similar to PA100, all PS extracts could not inhibit U937 but significantly induce cell differentiation. PS100 and PS50 possessed the highest amount of phenolic content compared to PS4 and PS22. However, we found that PS50 has antioxidant activity 3 time higher that of PS100. Additionally, with limitation of UPLC-HRMS, there are 43 unidentified compounds found in PS50 that might be responsible for its antioxidation effect. Besides, PS22, PS50, PS100 and PA100 induced U937 differentiation visible under microscope. Sandwich ELISA determined that TNF-alpha secreted from U937 was not found after PS treatments, but when applied together, PMA and PS extracts induced significantly higher amount of TNF-alpha compared to PMA treatment alone. In conclusion, understanding the molecular mechanism underlying the mushroom extracts properties will be beneficial for both development and application of usages in the future.

Department: Transfusion Medicine and Clinical  
Microbiology

Student's Signature .....  
Advisor's Signature .....

Field of Study: Molecular Science of Medical  
Microbiology and Immunology

Academic Year: 2015

## กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์เล่มนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดีด้วยความกรุณาของ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ศิริพร ชื้อชวาลกุล อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก ที่ให้คำแนะนำ คำปรึกษา ความช่วยเหลือ และข้อเสนอแนะต่างๆ ที่เกี่ยวข้องและเป็นประโยชน์ในการทำวิทยานิพนธ์ครั้งนี้

ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ปalani อัมรานนท์ ประธานกรรมการ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. เทวิน เทนคำเนาวิ คณะกรรมการ และ ดร. เกสัชกรหญิง วรัญญา อรุโณทยานันท์ คณะกรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย ผู้เข้าร่วมการสอบป้องกันวิทยานิพนธ์ และให้คำแนะนำ ข้อเสนอแนะและแนวทางการปรับปรุงแก้ไขวิทยานิพนธ์เล่มนี้

ขอขอบพระคุณ ดร. นภัสวรรณ บุญสาธิต และพี่ๆ เพื่อนๆ น้องๆ ที่ศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพทางการแพทย์ สถาบันชีววิทยาศาสตร์ทางการแพทย์ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข ที่ให้ความอนุเคราะห์และความช่วยเหลือเอื้อเฟื้อสถานที่ในการทำวิจัย เครื่องมือวิทยาศาสตร์ และคำแนะนำรวมถึงข้อเสนอแนะต่างๆ ที่เป็นประโยชน์และช่วยให้การทำวิจัยครั้งนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. วาริน แสงกิติโกมล ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อรรถกร ปาละสุวรรณ ดร. อาทิตยา โรจนโสโรช และพี่ๆ เพื่อนๆ น้องๆ ที่คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้ความช่วยเหลือในการสอนวิธีการใช้เครื่องมือวิทยาศาสตร์และให้ความรู้รวมถึงคำแนะนำที่เกี่ยวข้องกับเทคนิคต่างๆ ซึ่งเป็นประโยชน์และช่วยในการทำวิจัยได้เป็นอย่างมาก

ได้รับการสนับสนุนทุนการวิจัยจาก ทุน 90 ปี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช (รหัสทุน GCUGR1125582045M) และทุนวิจัยคลัสเตอร์สังคมผู้สูงวัย (รหัสทุน CU-56-522-AS) และได้รับการสนับสนุนทุนอุดหนุนการศึกษาจากทุนอุดหนุนค่าเล่าเรียนจากบัณฑิตวิทยาลัย รวมถึงทุนผู้ช่วยสอนจากคณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สุดท้ายนี้ต้องขอขอบคุณ ครอบครัว และเพื่อนๆ ทุกคนที่ให้ความช่วยเหลือ คำแนะนำ และเป็นกำลังใจให้การทำวิทยานิพนธ์ในครั้งนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

## สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ฎ
สารบัญรูป.....	ฐ
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ .....	ด
บทที่ 1 บทนำและหลักการ .....	1
1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย.....	1
1.2 คำถามของงานวิจัย .....	3
1.3 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย .....	3
1.4 สมมติฐาน .....	3
1.5 กรอบแนวคิดงานวิจัย.....	4
1.6 คำสำคัญ.....	4
1.7 ขอบเขตงานวิจัย .....	5
1.8 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย.....	5
1.9 สถานที่ทำการศึกษวิจัย .....	5
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง .....	6
2.1 ระบบภูมิคุ้มกัน .....	6
2.2 เซลล์ในระบบภูมิคุ้มกัน .....	10
2.2.1 เซลล์โมโนไซต์ (monocyte) .....	11
2.2.2 เซลล์แมคโครฟาจ (macrophage).....	12

2.3	อนุมูลอิสระกับระบบภูมิคุ้มกัน .....	14
2.4	เซลล์เพาะเลี้ยง U937 .....	16
2.5	ไซโตไคน์ tumor necrosis factor-alpha (TNF- $\alpha$ ) .....	19
2.6	เห็ด (Mushroom) .....	20
2.6.1	ฤทธิ์ปรับภูมิคุ้มกันและยับยั้งเซลล์มะเร็งของสารสกัดจากเห็ด .....	21
2.6.2	เห็ดนางฟ้าภูฐาน .....	24
2.6.3	เห็ดเป๋าฮื้อ .....	29
2.6.4	เห็ดหูหนู .....	31
บทที่ 3	วิธีดำเนินการวิจัย .....	34
3.1	สารเคมีและอุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย .....	34
3.1.1	สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย .....	34
3.1.2	วัสดุและอุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย .....	34
3.2	เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย .....	35
3.3	วิธีดำเนินการวิจัย .....	36
3.3.1	การเตรียมเห็ดนางฟ้าภูฐาน เห็ดเป๋าฮื้อ และเห็ดหูหนูเพื่อนำไปใช้ในการสกัด .....	36
3.3.2	การสกัดสารจากเห็ดนางฟ้าภูฐาน เห็ดเป๋าฮื้อ และเห็ดหูหนูด้วยน้ำ (61) .....	37
3.3.3	การสกัดสารจากเห็ดนางฟ้าภูฐาน, เห็ดเป๋าฮื้อ และเห็ดหูหนูด้วยตัวทำละลายเอทานอล .....	38
3.3.4	การเพาะเลี้ยงเซลล์ U937 .....	39
3.3.5	การศึกษาผลของสารสกัดจากเห็ดนางฟ้าภูฐาน, เห็ดเป๋าฮื้อ และเห็ดหูหนูต่อการเจริญของเซลล์ U937 ด้วยเทคนิค MTS/MTT .....	41
3.3.6	การตรวจวัดความเป็นพิษของสารสกัดจากเห็ดต่อเซลล์ไมโนไซต์ U937 โดยการตรวจวัด Lactate dehydrogenase (LDH) activity .....	46



3.3.7 การตรวจวัดฤทธิ์ปรับภูมิคุ้มกันของสารสกัดจากเห็ดต่อการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลล์ U937.....	48
3.3.8 การตรวจวัดฤทธิ์ของสารสกัดจากเห็ดต่อเซลล์ U937 ในการสร้างไซโตไคน์ TNF- $\alpha$ ด้วยเทคนิค sandwich ELISA .....	50
3.3.9 การตรวจวัดปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดเห็ด ..	52
3.3.10 การวิเคราะห์องค์ประกอบของสารสกัดเห็ดด้วยเทคนิค Ultra-high performance liquid chromatography-high resolution mass spectroscopy (UPLC-HRMS).....	53
3.3.11 การวิเคราะห์ข้อมูลและสถิติที่ใช้ในการศึกษา .....	54
บทที่ 4 ผลการทดลอง.....	55
4.1 ผลการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดเอทานอลจากเห็ดนางฟ้าภูฐาน เห็ดเป่าฮื้อ และเห็ดหูหนู ...	55
4.1.1 การตรวจวัดปริมาณสารฟีนอลและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัด .....	56
4.1.2 การศึกษาผลของสารสกัดที่มีต่อการเจริญและแบ่งตัวของเซลล์ U937 .....	57
4.1.3 ผลการศึกษาความเป็นพิษของสารสกัดเห็ดทั้ง 3 ชนิดต่อเซลล์ U937 .....	59
4.1.4 ผลการวิเคราะห์สารองค์ประกอบในสารสกัดชั้นเอทานอลจากเห็ดนางฟ้าภูฐาน เห็ดเป่าฮื้อ และเห็ดหูหนู ด้วยเทคนิค UPLC-HRMS .....	60
4.2 ผลการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดชั้นน้ำของเห็ดหูหนู .....	63
4.2.1 การตรวจวัดปริมาณสารฟีนอลและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดเห็ดหูหนู .....	64
4.2.2 การศึกษาผลของสารสกัดเห็ดหูหนูต่อการเจริญและแบ่งตัวของเซลล์ U937 .....	64
4.2.3 ผลการศึกษาความเป็นพิษของสารสกัดเห็ดหูหนูต่อเซลล์ U937 .....	67
4.2.4 ผลการวิเคราะห์สารองค์ประกอบในสารสกัดเห็ดหูหนูด้วยเทคนิค UPLC-HRMS .....	68
4.3 ผลการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดชั้นน้ำของเห็ดเป่าฮื้อ .....	70
4.3.1 การตรวจวัดปริมาณสารฟีนอลและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดเห็ดเป่าฮื้อ .....	71
4.3.2 การศึกษาผลของสารสกัดเห็ดเป่าฮื้อต่อการเจริญและแบ่งตัวของเซลล์ U937 .....	72

4.3.3 ผลการศึกษาความเป็นพิษของสารสกัดจากเห็ดเป่าฮื้อต่อเซลล์ U937 .....	74
4.3.4 ผลของสารสกัดจากเห็ดเป่าฮื้อที่มีต่อการเหนี่ยวนำเซลล์ U937 ให้เกิดการเจริญ และเปลี่ยนแปลงรูปร่าง.....	75
4.3.5 ผลการวิเคราะห์สารองค์ประกอบในสารสกัดเห็ดเป่าฮื้อด้วยเทคนิค UPLC-HRMS....	78
4.4 ผลการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดชั้นน้ำของเห็ดนางฟ้าภูฐาน.....	80
4.4.1 การตรวจวัดปริมาณสารฟีนอลและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดเห็ดนางฟ้าภู ฐาน.....	81
4.4.2 การศึกษาผลของสารสกัดเห็ดนางฟ้าภูฐานที่มีต่อการเจริญและแบ่งตัวของเซลล์ U937 .....	82
4.4.3 ผลของสารสกัดเห็ดนางฟ้าภูฐานที่มีต่อการเหนี่ยวนำเซลล์ U937 ให้เกิดการเจริญ และเปลี่ยนแปลงรูปร่าง.....	83
4.4.4 ผลของสารสกัดเห็ดนางฟ้าภูฐานต่อการหลั่งไซโตไคน์ TNF- $\alpha$ ของเซลล์ U937 ด้วยเทคนิค sandwich ELISA .....	89
4.4.5 ผลการวิเคราะห์สารองค์ประกอบในสารสกัดเห็ดนางฟ้าภูฐานด้วยเทคนิค UPLC- HRMS.....	91
บทที่ 5 อภิปรายผลการทดลองและสรุปผลการวิจัย .....	94
5.1 ผลการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดเอทานอลจากเห็ดนางฟ้าภูฐาน เห็ดเป่าฮื้อ และเห็ดหูหนู... 94	
5.2 ผลการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดชั้นน้ำของเห็ดหูหนู .....	97
5.3 ผลการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดชั้นน้ำของเห็ดเป่าฮื้อ .....	100
5.4 ผลการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดชั้นน้ำของเห็ดนางฟ้าภูฐาน.....	102
รายการอ้างอิง .....	106
ภาคผนวก.....	120
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์ .....	206

## สารบัญตาราง

เรื่อง	หน้า
ตารางที่ 1	สรุปการศึกษาสารสกัดจากเห็ดนางฟ้าภูฐานเกี่ยวกับฤทธิ์ต่างๆ จากงานวิจัยที่ผ่านมา..... 26
ตารางที่ 2	สรุปการศึกษาสารสกัดจากเห็ดเป่าฮื้อเกี่ยวกับฤทธิ์ต่างๆ จากงานวิจัยที่ผ่านมา ..... 30
ตารางที่ 3	สรุปการศึกษาสารสกัดจากเห็ดหูหนูเกี่ยวกับฤทธิ์ต่างๆ จากงานวิจัยที่ผ่านมา..... 32
ตารางที่ 4	ลักษณะทางกายภาพและ yields (%w/w) ของสารสกัดจากเห็ดนางฟ้าภูฐาน เห็ดเป่าฮื้อ และเห็ดหูหนู ที่สกัดด้วยตัวเอทานอล ..... 55
ตารางที่ 5	ค่าความเข้มข้นของสารสกัดจากเห็ดหูหนู เห็ดนางฟ้าภูฐาน เห็ดเป่าฮื้อ และ camptothecin ที่สามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์ได้ที่ร้อยละ 50..... 59
ตารางที่ 6	สารในกลุ่มของฟีนอลและฟลาโวนอยด์ซึ่งพบในองค์ประกอบของสารสกัดชั้นเอทานอลจากเห็ดนางฟ้าภูฐาน (PS), เห็ดเป่าฮื้อ (PA) และเห็ดหูหนู (AA)..... 61
ตารางที่ 7	สารในกลุ่มนิวคลีโอไซด์ซึ่งพบในองค์ประกอบของสารสกัดชั้นเอทานอลจากดอกเห็ดนางฟ้าภูฐาน (PS), เห็ดเป่าฮื้อ (PA) และเห็ดหูหนู (AA) ..... 61
ตารางที่ 8	กรดอะมิโนที่พบในองค์ประกอบของสารสกัดชั้นเอทานอลจากเห็ดนางฟ้าภูฐาน (PS), เห็ดเป่าฮื้อ (PA) และเห็ดหูหนู (AA)..... 62
ตารางที่ 9	ลักษณะทางกายภาพและ yields(%w/w) ของสารสกัดจากเห็ดหูหนูที่สกัดด้วยน้ำที่อุณหภูมิต่างๆ..... 63
ตารางที่ 10	ค่าความเข้มข้นของสารสกัดจากดอกเห็ดหูหนูและ camptothecin ที่สามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์ได้ที่ร้อยละ 50..... 66
ตารางที่ 11	สารในกลุ่มของฟีนอลและฟลาโวนอยด์ซึ่งพบในองค์ประกอบของสารสกัดเห็ดหูหนู .... 69
ตารางที่ 12	สารในกลุ่มนิวคลีโอไซด์ซึ่งพบในองค์ประกอบของสารสกัดเห็ดหูหนู..... 69
ตารางที่ 13	กรดอะมิโนที่พบในองค์ประกอบของสารสกัดเห็ดหูหนู (AA4, AA22, AA50 และ AA100)..... 70
ตารางที่ 14	ลักษณะทางกายภาพและ yields (%w/w) ของสารสกัดจากเห็ดเป่าฮื้อที่สกัดด้วยน้ำที่อุณหภูมิต่างๆ ..... 71

ตารางที่ 15	ค่าความเข้มข้นของสารสกัดจากดอกเห็ดเป่าฮื้อและ camptothecin ที่สามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์ได้ที่ร้อยละ 50.....	74
ตารางที่ 16	สารในกลุ่มของฟีนอลซึ่งพบในองค์ประกอบของสารสกัดจากเห็ดเป่าฮื้อ (PA4, PA22, PA50 และ PA100).....	78
ตารางที่ 17	สารในกลุ่มนิวคลีโอไซด์ซึ่งพบในองค์ประกอบของสารสกัดเห็ดเป่าฮื้อ (PA4, PA22, PA50 และ PA100).....	79
ตารางที่ 18	กรดอะมิโนที่พบในองค์ประกอบของสารสกัดเห็ดเป่าฮื้อ (PA4, PA22, PA50 และ PA100).....	79
ตารางที่ 19	ลักษณะทางกายภาพและ yields (%w/w) ของสารสกัดจากเห็ดนางฟ้าภูฐานที่สกัดด้วยน้ำที่อุณหภูมิต่างๆ.....	80
ตารางที่ 20	สารในกลุ่มของฟีนอลซึ่งพบในองค์ประกอบของสารสกัดจากเห็ดนางฟ้าภูฐาน (PS4, PS22, PS50, PS100).....	92
ตารางที่ 21	สารในกลุ่มของนิวคลีโอไซด์ซึ่งพบในองค์ประกอบของสารสกัดจากเห็ดนางฟ้าภูฐาน (PS4, PS22, PS50, PS100).....	92
ตารางที่ 22	กรดอะมิโนที่พบในองค์ประกอบของสารสกัดจากเห็ดนางฟ้าภูฐาน (PS4, PS22, PS50, PS100).....	93

## สารบัญรูป

เรื่อง	หน้า
รูปที่ 1 กลไกการทำงานที่มีความเกี่ยวข้องกันของระบบภูมิคุ้มกันที่มีมาแต่กำเนิดและระบบภูมิคุ้มกันที่ได้รับมาภายหลังจากที่มีเชื้อโรคหรือสิ่งแปลกปลอมเข้าสู่ภายในร่างกาย .....	7
รูปที่ 2 การทำงานของเซลล์ชนิดต่างๆ ในระบบภูมิคุ้มกันต่อการตอบสนองกับเซลล์มะเร็ง .....	9
รูปที่ 3 เซลล์ชนิดต่างๆ ที่มีความสำคัญในระบบภูมิคุ้มกันที่มีมาแต่กำเนิดและระบบภูมิคุ้มกันที่ได้รับมาภายหลัง .....	10
รูปที่ 4 สรุปรูปหน้าที่และความสำคัญของเซลล์โมโนไซต์ .....	11
รูปที่ 5 การเปลี่ยนแปลงของเซลล์แมคโครฟาจในเนื้อเยื่อเมื่อถูกกระตุ้นในกระบวนการอักเสบ....	13
รูปที่ 6 ผลของอนุมูลอิสระต่อการทำงานของระบบต่างๆ ภายในร่างกาย .....	15
รูปที่ 7 ลักษณะรูปร่างของเซลล์เพาะเลี้ยงชนิด U937.....	16
รูปที่ 8 กลไกการกระตุ้นเซลล์ U937 ด้วยสาร PMA ส่งผลให้เกิดการสร้างไซโตไคน์ TNF- $\alpha$ .....	18
รูปที่ 9 กลไกการกระตุ้นเซลล์ U937 ด้วยสาร Phorbol ester และส่งผลให้เซลล์เกิดการเปลี่ยนแปลงรูปร่าง และเกิดการตายแบบอะพอพโทซิส .....	19
รูปที่ 10 การกระตุ้นเซลล์ให้เกิดกระบวนการอักเสบผ่านการทำงานของกลไก classical และ alternative pathway .....	20
รูปที่ 11 ลักษณะของดอกเห็ดนางฟ้าภูฐาน <i>P. sajor-caju</i> .....	25
รูปที่ 12 ลักษณะของดอกเห็ดเป่าฮื้อ <i>P. abalonus</i> .....	29
รูปที่ 13 ลักษณะของดอกเห็ดหูหนู <i>A. auricula-judae</i> .....	31
รูปที่ 14 ลักษณะดอกสดของเห็ดนางฟ้าภูฐาน เห็ดเป่าฮื้อ และเห็ดหูหนูที่ซื้อจากฟาร์มเพาะเห็ด เพื่อนำมาใช้ในการสกัดสารด้วยน้ำและเอทานอล .....	36
รูปที่ 15 ลักษณะของดอกเห็ดนางฟ้าภูฐาน เห็ดเป่าฮื้อ และเห็ดหูหนูที่ตากแห้งและบดเป็นผงละเอียด .....	37
รูปที่ 16 การสกัดสารจากดอกเห็ดนางฟ้าภูฐาน, ดอกเห็ดเป่าฮื้อ และดอกเห็ดหูหนูด้วยเครื่องสกัดแบบต่อเนื่อง .....	38

รูปที่ 17	ลักษณะสีของสารละลายที่ได้จากการสกัดสารจากเห็ดนางฟ้าภูฐาน เห็ดเป่าฮื้อ และเห็ดหูหนูด้วยเครื่องสกัดแบบต่อเนื่อง.....	39
รูปที่ 18	ลักษณะเซลล์โมโนไซต์ U937 ที่ทำการเพาะเลี้ยงเพื่อนำมาใช้ในการทดลอง ถ่ายภาพด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิดส่องกลับ (inverted microscope) ที่กำลังขยายเท่ากับ 400 เท่า.....	40
รูปที่ 19	การทำปฏิกิริยาของสาร MTT เมื่อถูกรีดิวซ์ให้เป็นสารฟอร์มazan.....	42
รูปที่ 20	การทำปฏิกิริยาของสาร MTS ในการเกิดสารฟอร์มazan (85).....	43
รูปที่ 21	ลักษณะสีของอาหารเลี้ยงเซลล์เมื่อเติมสาร MTS ก่อนและหลังการเกิดปฏิกิริยาระหว่างสาร MTS กับเซลล์ที่มีชีวิต.....	44
รูปที่ 22	ลักษณะสีของอาหารเลี้ยงเซลล์ที่เปลี่ยนแปลงหลังการละลายสารฟอร์มazanออกจากตัวเซลล์ที่มีชีวิตเมื่อทำการทดสอบด้วยสาร MTT.....	45
รูปที่ 23	กลไกการเกิดปฏิกิริยาของน้ำยาที่ใช้ในการทดสอบหาปริมาณ LDH activity.....	47
รูปที่ 24	ลักษณะเซลล์โมโนไซต์ U937 ที่เกิดการเปลี่ยนแปลงเมื่อได้รับสาร PMA เซลล์โมโนไซต์ U937 ปกติก่อนได้รับสาร PMA เซลล์โมโนไซต์ U937 ที่เกิดการเจริญไปเป็นเซลล์แมคโครฟาจ.....	49
รูปที่ 25	ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นเมื่อทำการตรวจวัดฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยเทคนิค Trolox equivalent antioxidant capacity assay.....	53
รูปที่ 26	ลักษณะสีของสารสกัดเอทานอลจากเห็ดนางฟ้าภูฐาน เห็ดเป่าฮื้อ และเห็ดหูหนู.....	56
รูปที่ 27	กราฟแสดงปริมาณสารฟีนอลและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่พบในสารสกัดเอทานอลของเห็ดนางฟ้าภูฐาน (PS) เห็ดเป่าฮื้อ (PA) และเห็ดหูหนู (AA).....	56
รูปที่ 28	กราฟแสดงเปอร์เซ็นต์เซลล์ U937 ที่มีชีวิตรอดเมื่อทำการทดสอบกับสารสกัดจากเห็ดทั้ง 3 ชนิดและ camptothecin ที่ความเข้มข้นต่างๆ เมื่อทดสอบเป็นเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง ด้วยเทคนิค MTS/MTT.....	57
รูปที่ 29	กราฟแสดงค่าความเป็นพิษของสารสกัดชั้นเอทานอลต่อเซลล์ U937 เมื่อทำการทดสอบที่ความเข้มข้น 0-0.5 mg/ml เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยการตรวจวัดปริมาณ LDH activity.....	60
รูปที่ 30	ลักษณะสีของสารสกัดชั้นน้ำที่ได้จากเห็ดหูหนู.....	63

รูปที่ 31	กราฟแสดงปริมาณสารฟีนอลและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่พบในสารสกัดเห็ดหูหนู	64
รูปที่ 32	กราฟแสดงปริมาณเซลล์โมโนไซต์ U937 ที่มีชีวิตรอดเมื่อทำการทดสอบกับสารสกัดเห็ดหูหนูด้วยน้ำที่สกัดด้วยอุณหภูมิ 4, 22, 50 และ 100 องศาเซลเซียส เมื่อทดสอบด้วยความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง ด้วยเทคนิค MTT	66
รูปที่ 33	กราฟแสดงค่าความเป็นพิษของสารสกัดชั้นน้ำจากเห็ดหูหนูต่อเซลล์ U937 เมื่อทำการทดสอบที่ความเข้มข้น 0-2.5 mg/ml เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ด้วยการตรวจวัดปริมาณ LDH activity	68
รูปที่ 34	ลักษณะสีของสารสกัดชั้นน้ำที่ได้จากเห็ดเป่าฮื้อ	71
รูปที่ 35	กราฟแสดงปริมาณสารฟีนอลและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่พบในสารสกัดเห็ดเป่าฮื้อ	72
รูปที่ 36	กราฟแสดงปริมาณเซลล์ U937 ที่มีชีวิตรอดเมื่อทำการทดสอบกับสารสกัดที่ความเข้มข้นต่างๆ เป็นระยะเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง ด้วยเทคนิค MTS	73
รูปที่ 37	กราฟแสดงค่าความเป็นพิษของสารสกัดจากเห็ดเป่าฮื้อต่อเซลล์ U937 เมื่อทำการทดสอบที่ความเข้มข้น 0-2.5 mg/ml เป็นเวลา 24 ชั่วโมงด้วยการตรวจวัดปริมาณ LDH activity	75
รูปที่ 38	ผลของสารสกัด PA100 ที่ความเข้มข้น 0.125, 0.25 และ 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ที่มีต่อการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลล์ U937 เปรียบเทียบกับเซลล์ในกลุ่มควบคุมที่การทดสอบเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิดส่องกลับ	77
รูปที่ 39	ลักษณะสีของสารสกัดชั้นน้ำที่ได้จากเห็ดนางฟ้าภูฐาน	80
รูปที่ 40	กราฟแสดงปริมาณสารฟีนอลและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่พบในสารสกัดเห็ดนางฟ้าภูฐาน	81
รูปที่ 41	กราฟแสดงปริมาณเซลล์ U937 ที่มีชีวิตรอดเมื่อทำการทดสอบกับสารสกัดเห็ดนางฟ้าภูฐาน ที่ความเข้มข้นต่างๆ เป็นระยะเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง ด้วยเทคนิค MTS	82
รูปที่ 42	ผลของสารสกัด PS4 ที่ความเข้มข้น 0.125, 0.25 และ 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ที่มีต่อการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลล์ U937 เปรียบเทียบกับเซลล์ในกลุ่มควบคุมที่การทดสอบเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิดส่องกลับ	85

รูปที่ 43 ผลของสารสกัด PS22 ที่ความเข้มข้น 0.125, 0.25 และ 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ที่มีต่อการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลล์ U937 เปรียบเทียบกับเซลล์ในกลุ่มควบคุมที่การทดสอบเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิดส่องกลับ..... 86

รูปที่ 44 ผลของสารสกัด PS50 ที่ความเข้มข้น 0.125, 0.25 และ 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ที่มีต่อการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลล์ U937 เปรียบเทียบกับเซลล์ในกลุ่มควบคุมที่การทดสอบเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิดส่องกลับ..... 87

รูปที่ 45 ผลของสารสกัด PS100 ที่ความเข้มข้น 0.125, 0.25 และ 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ที่มีต่อการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลล์ U937 เปรียบเทียบกับเซลล์ในกลุ่มควบคุมที่การทดสอบเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิดส่องกลับ..... 88

รูปที่ 46 ผลการทดสอบฤทธิ์ปรับภูมิคุ้มกันต่อการสร้างไซโตไคน์ TNF- $\alpha$  ในสารสกัด PS22, PS50 และ PS100 ที่ความเข้มข้น 0.125, 0.25 และ 0.5 mg/ml ทดสอบเป็นเวลา 24 ชั่วโมง..... 90

รูปที่ 47 กลไกการกระตุ้นเซลล์ U937 ด้วยสารสกัด PS22, PS50 และ PS100 เปรียบเทียบกับการกระตุ้นด้วยสาร PMA..... 104



## คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
TNF- $\alpha$	Tumor necrosis factors-alpha
LPS	Lipopolysaccharide
IL-2	Interleukin-2
IL-1 $\beta$	Interleukin-1 beta
$\beta$ -glucan	Beta-glucan
IC50	The half maximal inhibitory concentration
$\mu$ M	Micromolar/ไมโครโมลต่อลิตร
$\mu$ g/ml	Microgram per milliliter/ ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร
mg/ml	Milligram per milliliter / มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร
RPMI-1640	Roswell Park Memorial Institute-1640
%	Percentage/ร้อยละ
cm <sup>2</sup>	Square centrimeter/ตารางเซนติเมตร
ml	Millilitre/มิลลิลิตร
$\mu$ m	Micrometer/ไมโครเมตร
CO <sub>2</sub>	Carbondioxide/แก๊สคาร์บอนไดออกไซด์
°C	Celsius/องศาเซลเซียส
%w/w	Percent weight by weight
pH	Potential of hydrogen ion
x g	times gravity
ANOVA	Analysis of variance
SPSS	Statistical Package for the Social Sciences

# บทที่ 1

## บทนำและหลักการ

### 1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย

ระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายเป็นกลไกที่ช่วยในการป้องกันและกำจัดเชื้อโรคหรือสิ่งแปลกปลอมที่จะก่อให้เกิดอันตรายต่อร่างกาย ซึ่งแบ่งออกเป็น 2 ระบบได้แก่ ระบบภูมิคุ้มกันที่มีมาแต่กำเนิด (innate immune response) และระบบภูมิคุ้มกันที่ร่างกายสร้างขึ้นภายหลังได้รับการกระตุ้นจากสิ่งแปลกปลอมต่างๆ (adaptive immune response) โดยระบบภูมิคุ้มกันที่มีมาแต่กำเนิดจะเป็นระบบภูมิคุ้มกันชนิดแรกที่มีส่วนในการช่วยป้องกันและกำจัดสิ่งแปลกปลอมจากภายนอกในร่างกาย เซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันที่มีบทบาทและหน้าที่ในการกำจัดสิ่งแปลกปลอมและเป็นเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันที่มีมาแต่กำเนิด ได้แก่ เซลล์ในกลุ่มของฟาโกไซต์ (phagocytic cells) เช่น เซลล์โมโนไซต์ (monocytes) เซลล์แมคโครฟาจ (macrophages) และเซลล์นิวโทรฟิล (neutrophils) โดยเซลล์เหล่านี้จะทำหน้าที่จับกินสิ่งแปลกปลอมที่เข้ามาภายในร่างกาย ในขณะที่การกำจัดเชื้อโรคหรือสิ่งแปลกปลอมของเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันอีกชนิดหนึ่งคือ adaptive immune response จะไม่เข้าทำลายเชื้อโดยตรง แต่จะเข้าทำลายเชื้อโรคหรือสิ่งแปลกปลอมเมื่อได้รับสัญญาณจากเซลล์ที่ทำหน้าที่นำเสนอแอนติเจนของสิ่งแปลกปลอมที่เข้ามาภายในร่างกายผ่านทางผิวเซลล์ ทำให้ระบบภูมิคุ้มกันชนิดนี้เกิดกระบวนการจดจำแอนติเจนของเชื้อโรคหรือสิ่งแปลกปลอมชนิดนั้นๆ ไว้ และหากร่างกายได้รับสิ่งแปลกปลอมเหล่านี้ซ้ำอีกครั้ง ก็จะเกิดการสร้างแอนติบอดีและกระบวนการในกำจัดสิ่งแปลกปลอมได้เร็วมากขึ้นกว่าการได้รับเชื้อโรคหรือสิ่งแปลกปลอมนี้ในครั้งแรก (1) ซึ่งหากระบบภูมิคุ้มกันในร่างกายมีความบกพร่อง ตัวอย่างเช่น เกิดการติดเชื้อไวรัสบางชนิดในร่างกายที่ส่งผลให้การทำงานของระบบภูมิคุ้มกันมีความบกพร่องไป ร่างกายก็จะเกิดการติดเชื้อหรือเป็นโรคต่างๆ ได้ง่าย (2) นอกจากนี้การทำงานของระบบภูมิคุ้มกันที่ไม่มีประสิทธิภาพดีพอก็อาจส่งผลให้เซลล์แปลกปลอมที่เกิดขึ้นในร่างกายสามารถพัฒนาเป็นเซลล์มะเร็งต่อไปได้ (3) การรักษาโรคติดต่อหรือโรคมะเร็งในปัจจุบันจึงได้มีการพัฒนารักษาโรคที่ช่วยกระตุ้นการทำงานของเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันโดยการกระตุ้นให้เซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันเกิดกระบวนการหลั่งไซโตไคน์ชนิดต่างๆ ออกมา ซึ่งไซโตไคน์เหล่านี้จะไปกระตุ้นการทำงานของเซลล์ชนิดอื่นๆ เพื่อให้กำจัดเชื้อโรคหรือเซลล์

แปลกปลอมต่อไป (4) ถึงแม้ว่าผลการรักษาของยาเหล่านี้จะมีประสิทธิภาพที่ดี แต่มีงานวิจัยบางส่วนที่รายงานถึงผลเสียของการหลังไซโตไคน์บางชนิดที่มากเกินไปซึ่งอาจก่อให้เกิดการกระตุ้นการเจริญของเซลล์เนื้องอกหรือเซลล์มะเร็งในร่างกายได้ (5)

ดังนั้นในปัจจุบันจึงได้มีการศึกษาวิจัยจำนวนมากเพื่อหาสารออกฤทธิ์จากธรรมชาติที่สามารถกระตุ้นการทำงานของเซลล์ต่างๆ ในระบบภูมิคุ้มกัน เพื่อนำไปพัฒนารักษาโรคหรืออาหารเสริมที่มีประสิทธิภาพในการรักษาและมีผลข้างเคียงต่อผู้ป่วยน้อย นอกจากนี้สมุนไพรหลายชนิดจะได้รับความสนใจในการนำมาศึกษาเกี่ยวกับฤทธิ์ปรับภูมิคุ้มกันแล้วนั้น เห็ดหลายชนิดก็ได้รับความสนใจในการนำมาศึกษาเช่นเดียวกัน ตัวอย่างของเห็ดที่เคยมีผู้นำมาศึกษาฤทธิ์ปรับภูมิคุ้มกัน เช่น เห็ดนางฟ้าภูฐาน (6, 7) เห็ดนางรม (8) เห็ดฟาง (9, 10) และเห็ดเผาะ (9, 11, 12) เป็นต้น

จากงานวิจัยที่กล่าวมาข้างต้น ส่งผลให้ผู้วิจัยสนใจศึกษาฤทธิ์ปรับภูมิคุ้มกันในเห็ดที่นิยมรับประทานและสามารถเพาะได้ในประเทศไทย โดยเลือกทำการศึกษาสารสกัดจากเห็ด 3 ชนิด คือ เห็ดนางฟ้าภูฐาน เห็ดเป่าฮื้อ และเห็ดหูหนู ในส่วนของรายงานการศึกษาวิจัยฤทธิ์ปรับภูมิคุ้มกันของเห็ดชนิดต่างๆ ในเซลล์เม็ดเลือดขาวของมนุษย์หรือเซลล์เพาะเลี้ยงนั้นยังมีค่อนข้างน้อย งานวิจัยชิ้นนี้จึงทำการตรวจวัดฤทธิ์ของสารสกัดจากเห็ดทั้ง 3 ชนิดดังที่ได้กล่าวมา โดยจะทำการทดสอบในเซลล์เพาะเลี้ยง U937 ซึ่งเป็นเซลล์เม็ดเลือดขาวมนุษย์ชนิดโมโนไซต์/แมคโครฟาจ ซึ่งมีบทบาทสำคัญในระบบภูมิคุ้มกัน โดยผลการวิจัยและข้อมูลที่ได้จะเป็นประโยชน์ในการนำไปใช้พัฒนาหรืออาหารเสริมจากเห็ดที่จะช่วยในการทำงานของเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกัน ซึ่งอาจช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการทำงานของเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันให้สามารถกำจัดเชื้อโรค สิ่งแปลกปลอม หรือเซลล์แปลกปลอมในร่างกายได้ดียิ่งขึ้น นอกจากนี้ยังเป็นการช่วยเพิ่มมูลค่าของเห็ดให้กับเกษตรกรในประเทศไทยได้อีกทางหนึ่งด้วย

## 1.2 คำถามของงานวิจัย

1.2.1 สารสกัดจากเห็ดนางฟ้าภูฐาน เห็ดเป่าฮื้อ และเห็ดหูหนู มีผลต่อการเจริญของเซลล์เพาะเลี้ยงชนิด U937 ซึ่งเป็นเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดโมโนไซต์/แมคโครฟาจหรือไม่

1.2.2 สารสกัดจากเห็ดนางฟ้าภูฐาน เห็ดเป่าฮื้อ และเห็ดหูหนู มีฤทธิ์ปรับภูมิคุ้มกันเกี่ยวกับการหลั่งไซโตไคน์ชนิดต่างๆ จากเซลล์เพาะเลี้ยงชนิด U937 ซึ่งเป็นเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดโมโนไซต์/แมคโครฟาจหรือไม่

## 1.3 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

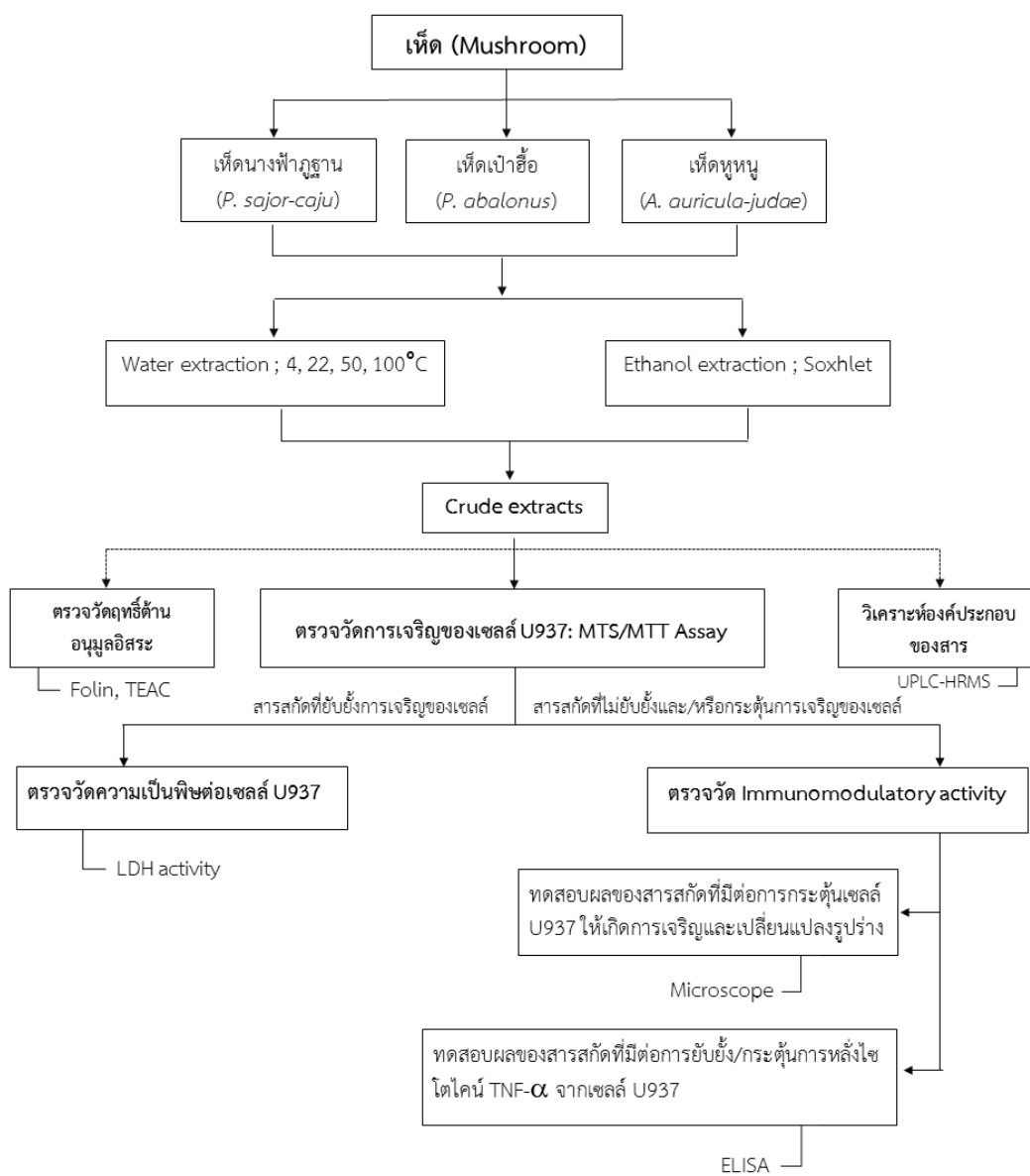
1.3.1 เพื่อศึกษาผลของสารสกัดจากเห็ดนางฟ้าภูฐาน เห็ดเป่าฮื้อ และเห็ดหูหนู ต่อการเจริญของเซลล์เพาะเลี้ยงชนิด U937

1.3.2 เพื่อศึกษาฤทธิ์ปรับภูมิคุ้มกันของสารสกัดจากเห็ดนางฟ้าภูฐาน เห็ดเป่าฮื้อ และเห็ดหูหนู ที่มีผลต่อการหลั่งไซโตไคน์ชนิดต่างๆ ของเซลล์เพาะเลี้ยงชนิด U937

## 1.4 สมมติฐาน

สารสกัดจากเห็ดนางฟ้าภูฐาน เห็ดเป่าฮื้อ และเห็ดหูหนู มีฤทธิ์ปรับภูมิคุ้มกันที่เกี่ยวข้องกับการหลั่งไซโตไคน์ชนิดต่างๆ จากเซลล์เม็ดเลือดขาวได้

## 1.5 กรอบแนวคิดงานวิจัย



## 1.6 คำสำคัญ

ฤทธิ์ปรับภูมิคุ้มกัน

เห็ดนางฟ้าภูฐาน

เห็ดเป๋าฮื้อ

เห็ดหูหนู

immunomodulatory activity

*Pleurotus sajor-caju*

*Pleurotus abalonus*

*Auricularia auricula-judae*

## 1.7 ขอบเขตงานวิจัย

งานวิจัยนี้ทำการศึกษาสารสกัดจากเห็ด 3 ชนิด ได้แก่ เห็ดนางฟ้าภูฐาน เห็ดเป่าฮื้อ และเห็ดหูหนู โดยใช้ตัวทำละลาย 2 ชนิด ได้แก่ น้ำ (ที่อุณหภูมิ 4, 22, 50 และ 100 องศาเซลเซียส) และเอทานอล จากนั้นทำการทดสอบผลของสารสกัดจากเห็ดทั้ง 3 ชนิด ที่มีต่อการเจริญของเซลล์เพาะเลี้ยงโมโนไซต์ U937

1.7.1 หากสารสกัดจากเห็ดที่นำมาทดสอบมีผลยับยั้งการเจริญของเซลล์ U937 จะนำมาทำการตรวจวัดความเป็นพิษต่อเซลล์ด้วยการวัดปริมาณเอนไซม์ lactate dehydrogenase ที่หลั่งออกมาจากเซลล์

1.7.2 หากสารสกัดจากเห็ดที่นำมาทดสอบไม่ยับยั้งการเจริญของเซลล์ และ/หรืออาจกระตุ้นให้เซลล์มีการเจริญและแบ่งตัวเพิ่มมากขึ้น จะนำสารสกัดนั้นมาทำการศึกษาฤทธิ์ปรับภูมิคุ้มกันที่เกี่ยวกับการกระตุ้นให้เซลล์เกิดการเปลี่ยนแปลงรูปร่าง และตรวจวัดผลของสารสกัดเห็ดต่อการหลั่งไซโตไคน์จากเซลล์ U937

## 1.8 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย

1.8.1 ทราบข้อมูลเกี่ยวกับฤทธิ์ของสารสกัดจากเห็ดนางฟ้าภูฐาน เห็ดเป่าฮื้อ และเห็ดหูหนูต่อการเจริญของเซลล์โมโนไซต์ U937

1.8.2 ทราบข้อมูลเกี่ยวกับฤทธิ์ปรับภูมิคุ้มกันเกี่ยวกับการหลั่งไซโตไคน์จากเซลล์โมโนไซต์ของสารสกัดจากเห็ด

1.8.3 สามารถนำองค์ความรู้ที่ได้ไปใช้ในงานวิจัยเกี่ยวกับการพัฒนารักษาโรคหรืออาหารเสริมต่างๆ จากเห็ดได้

## 1.9 สถานที่ทำการศึกษาวิจัย

1.9.1 คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

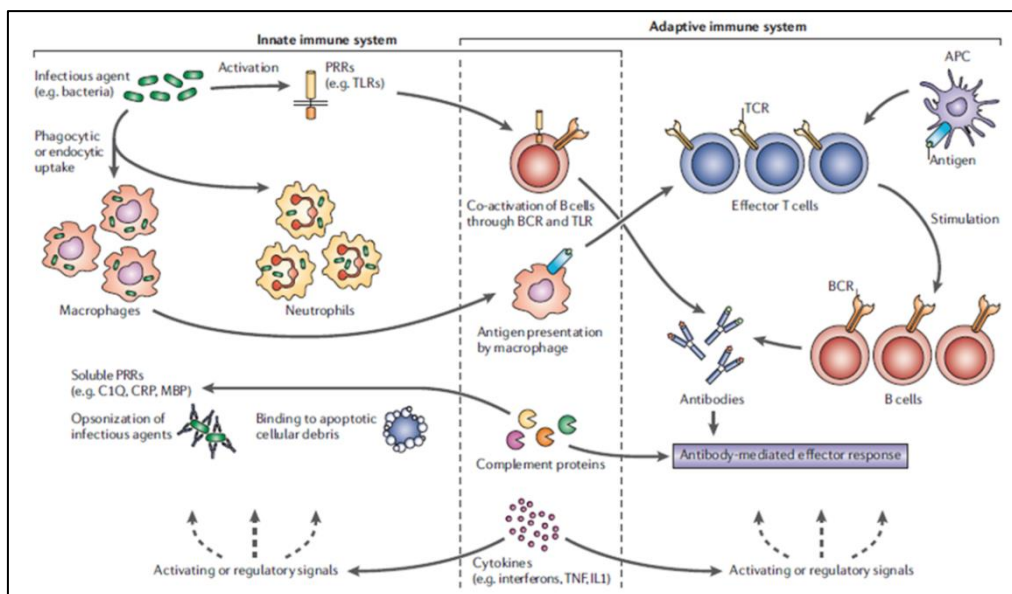
1.9.2 ศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพทางการแพทย์ สถาบันชีววิทยาศาสตร์ทางการแพทย์ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

## บทที่ 2

### เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

#### 2.1 ระบบภูมิคุ้มกัน

เมื่อร่างกายได้รับสิ่งแปลกปลอมหรือเกิดเซลล์แปลกปลอมขึ้นในร่างกาย ระบบภูมิคุ้มกันภายในร่างกายซึ่งถือได้ว่าเป็นกลไกที่มีอยู่ตามธรรมชาติจะทำหน้าที่ในการกำจัดเซลล์หรือสิ่งแปลกปลอมเหล่านั้นออกไปจากร่างกายเพื่อเป็นการป้องกันไม่ให้สิ่งแปลกปลอมเหล่านั้นมาก่อให้เกิดอันตรายในร่างกาย โดยระบบภูมิคุ้มกันสามารถแบ่งออกได้เป็น 2 ชนิด คือ ระบบภูมิคุ้มกันที่มีมาแต่กำเนิด (innate immune response) เซลล์ที่มีบทบาทสำคัญได้แก่ เซลล์แมคโครฟาจ เซลล์โมโนไซต์ เซลล์นิวโทรฟิล เซลล์ NK (Natural killer cell, NK cells) และเซลล์เดนไดรติก (dendritic cell) เซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันเหล่านี้จะมีการตอบสนองต่อเชื้อโรคหรือสิ่งแปลกปลอมที่เข้ามาในร่างกายได้อย่างรวดเร็ว ระบบภูมิคุ้มกันอีกชนิดหนึ่งที่มีบทบาทสำคัญเช่นกันคือ ระบบภูมิคุ้มกันที่ร่างกายสร้างขึ้นภายหลังได้รับการกระตุ้นจากสิ่งแปลกปลอมต่างๆ (adaptive immune response) เซลล์ที่มีบทบาทสำคัญได้แก่ เซลล์ลิมโฟไซต์ชนิดบีและชนิดที (B lymphocytes และ T lymphocyte) ซึ่งระบบภูมิคุ้มกันชนิดนี้มีความจำเพาะต่อเชื้อโรคหรือสิ่งแปลกปลอมสูง แต่จะตอบสนองต่อเชื้อโรคหรือสิ่งแปลกปลอมที่เข้ามาในร่างกายได้ช้ากว่าเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันที่มีมาแต่กำเนิด (13) เมื่อร่างกายได้รับสิ่งแปลกปลอมหรือเชื้อโรคเข้าสู่ภายในร่างกาย ระบบภูมิคุ้มกันทั้ง 2 ระบบนี้จะทำงานร่วมกันเพื่อช่วยให้การกำจัดสิ่งแปลกปลอมต่างๆ มีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น ดังกลไกการทำงานในรูปที่ 1



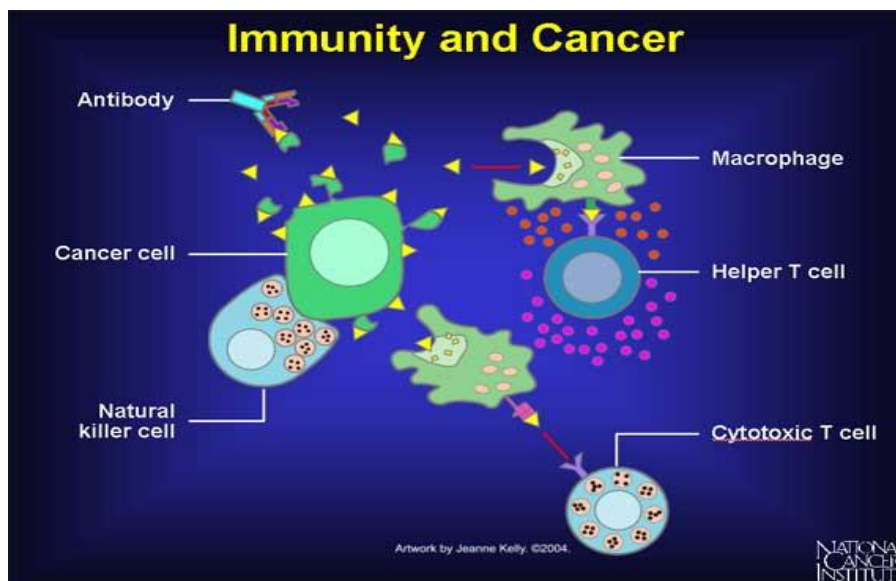
รูปที่ 1 กลไกการทำงานที่มีความเกี่ยวข้องกันของระบบภูมิคุ้มกันที่มีมาแต่กำเนิดและระบบภูมิคุ้มกันที่ได้รับมา ภายหลังจากที่มีเชื้อโรคหรือสิ่งแปลกปลอมเข้าสู่ภายในร่างกาย (14)

เมื่อเชื้อโรคหรือสิ่งแปลกปลอมเข้าสู่ภายในร่างกาย เซลล์ชนิดต่างๆ ในระบบภูมิคุ้มกันที่มีมาแต่กำเนิด เช่น เซลล์แมคโครฟาจ เซลล์นิวโทรฟิล ฯลฯ ซึ่งเป็นเซลล์ในกลุ่มของฟาโกไซต์จะเข้ามาทำลายเชื้อโรคหรือสิ่งแปลกปลอมที่เข้ามาด้วยการจับกิน ขณะเดียวกันเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันจะถูกกระตุ้นได้จากชิ้นส่วนของเชื้อโรคที่มีความจำเพาะแตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับชนิดของเชื้อโรคนั้นๆ หรือที่เรียกว่า pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) จะเข้าจับกับส่วนของ pattern-recognition receptors (PRRs) ที่อยู่บริเวณผิวของเซลล์ ทำให้ไปกระตุ้นการทำงานของเซลล์ต่างๆ รวมถึงเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันที่ได้รับมาภายหลัง เช่น เซลล์ลิมโฟไซต์ชนิดบี (B cells) ทำให้เกิดการผลิตแอนติบอดีที่จำเพาะต่อเชื้อโรคชนิดนั้นๆ ออกมา นอกจากการกระตุ้นผ่านทาง การทำปฏิกิริยาของ PAMPs และ PRRs แล้ว เซลล์แมคโครฟาจที่ทำหน้าที่ในการกำจัดเชื้อโรคด้วยวิธีการจับกินยังทำหน้าที่เป็นเซลล์ที่นำเสนอแอนติเจน (antigen presenting cells) เซลล์แมคโครฟาจที่จับกินเชื้อโรคจะย่อยแอนติเจนของเชื้อโรคชนิดนั้นๆ และนำเสนอชิ้นส่วนของแอนติเจนออกมาบนผิวเซลล์ และกระตุ้นการทำงานของเซลล์ลิมโฟไซต์ชนิดที (T cells) ทั้งสองชนิดคือ helper T cells ให้กระตุ้นการทำงานของเซลล์ลิมโฟไซต์ชนิดบี และยังกระตุ้น cytotoxic T cells ให้เข้ามาช่วยกำจัดทำลายเชื้อโรคหรือสิ่งแปลกปลอมเหล่านั้นด้วย (14)



นอกจากระบบภูมิคุ้มกันจะช่วยในการกำจัดเชื้อโรคแล้ว หากภายในร่างกายเกิดเซลล์มะเร็ง แปรกลปลอมขึ้นระบบภูมิคุ้มกันทั้ง 2 ระบบจะทำงานร่วมกันเพื่อช่วยในการกำจัดเซลล์มะเร็ง แปรกลปลอมดังแสดงในภาพที่ 2 ระบบภูมิคุ้มกันส่วนแรกที่ทำหน้าที่ในการกำจัดเซลล์มะเร็งที่เกิดขึ้น คือ ระบบภูมิคุ้มกันที่มีมาตั้งแต่กำเนิด เซลล์ที่มีบทบาทในการกำจัดเซลล์มะเร็งคือ เซลล์ NK และ เซลล์แมคโครฟาจ โดยเมื่อระบบภูมิคุ้มกันรับรู้แอนติเจนบนผิวของเซลล์มะเร็ง เซลล์ NK และเซลล์แมคโครฟาจจะเริ่มเข้าทำลายเซลล์มะเร็ง เซลล์ NK จะทำลายเซลล์มะเร็งโดยการหลั่งสารต่างๆ จาก แกรนูโลเข้าไปทำลายเซลล์มะเร็ง ทำให้เซลล์มะเร็งเกิดการตายแบบอะพอพโทซิส (apoptosis) ได้นอกจากการเข้าทำลายเซลล์มะเร็งโดยตรงแล้ว หากเซลล์ NK ได้รับการกระตุ้นจากไซโตไคน์ชนิด interleukine 2 (IL-2) ก็จะพัฒนาไปเป็นเซลล์ชนิด lymphokine activated killer cells (LAK cell) และมีประสิทธิภาพในการกำจัดเซลล์มะเร็งได้ดีขึ้น (13, 15)

ในขณะที่เซลล์แมคโครฟาจซึ่งเป็นเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันที่มีมาตั้งแต่กำเนิดเช่นเดียวกับ เซลล์ NK จะเข้าทำลายเซลล์มะเร็งได้โดยตรงโดยการหลั่งเอนไซม์ไลโซไซม์ (lysozyme), reactive oxygen intermediates และไนตริกออกไซด์ เพื่อเข้าทำลายเซลล์มะเร็ง ขณะเดียวกันหาก เซลล์แมคโครฟาจได้รับการกระตุ้นจากไซโตไคน์ Interferon gamma (IFN- $\gamma$ ) ที่หลั่งออกมาจาก เซลล์ลิมโฟไซต์ชนิดที ก็ส่งผลให้การกำจัดเซลล์มะเร็งมีประสิทธิภาพที่ดีขึ้นและสามารถผลิตสารที่มีชื่อว่า Tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) ออกมาจากเซลล์แมคโครฟาจได้ ซึ่ง TNF- $\alpha$  นี้จะสามารถเข้าทำลายเซลล์มะเร็งได้โดยตรง (13, 15, 16) เซลล์แมคโครฟาจนอกจากจะสามารถเข้าทำลายเซลล์มะเร็งได้โดยตรงแล้ว ยังทำหน้าที่ในการนำเสนอแอนติเจน (antigen presenting cells) ของเซลล์มะเร็งที่เซลล์แมคโครฟาจจับกินเข้าไปออกมาที่บริเวณผิวเซลล์ เพื่อให้เซลล์ลิมโฟไซต์ชนิดทีรับรู้ถึงแอนติเจนของเซลล์มะเร็งนั้นๆ แต่เซลล์ที่มีหน้าที่ในการนำเสนอแอนติเจน นอกจากเซลล์แมคโครฟาจแล้วยังมีเซลล์ชนิดอื่นๆ อีกเช่น เซลล์เดนไดรติก



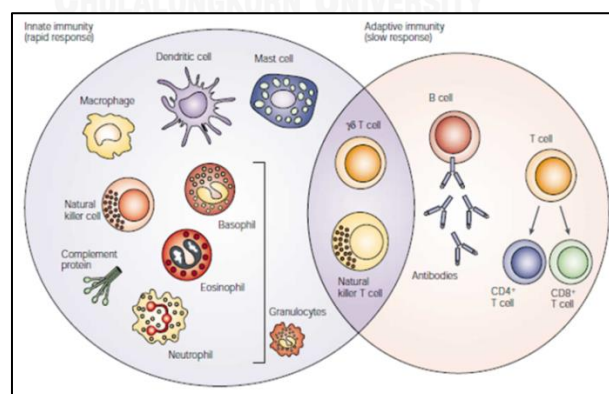
รูปที่ 2 การทำงานของเซลล์ชนิดต่างๆ ในระบบภูมิคุ้มกันต่อการตอบสนองกับเซลล์มะเร็ง (17)

เมื่อเซลล์ลิมโฟไซต์ชนิดที่ทั้งสองชนิดคือ helper T cells และ cytotoxic T cells รับรู้ถึงแอนติเจนของเซลล์มะเร็งแล้วจะเกิดกระบวนการต่างๆ ที่ช่วยในการกำจัดเซลล์มะเร็งแปลกปลอม สำหรับ cytotoxic T cells เมื่อรับรู้ถึงแอนติเจนของเซลล์มะเร็งที่ถูกนำเสนอ ก็จะเข้าทำลายเซลล์มะเร็งได้โดยตรงโดยการหลั่งสารต่างๆ เช่น แกรนไซม์ เพอฟอริน ฯลฯ จากแกรนูลที่อยู่ภายในเซลล์ออกมาสู่เซลล์มะเร็ง ทำให้เซลล์มะเร็งตายเนื่องจากเกิดกระบวนการอะพอโทซิส แต่สำหรับ helper T cells จะไม่สามารถเข้าทำลายเซลล์มะเร็งได้โดยตรงเหมือนกับ cytotoxic T cells โดยเมื่อ helper T cells รับรู้แอนติเจนของเซลล์มะเร็งจากการนำเสนอของเซลล์ที่ทำหน้าที่แล้ว ก็จะผลิตไซโตไคน์ชนิดต่างๆ หรือส่งสัญญาณไปกระตุ้นให้เซลล์ลิมโฟไซต์ผลิตแอนติบอดีที่จำเพาะต่อโรคมะเร็งชนิดนั้นๆ ออกมา เมื่อแอนติบอดีเข้าจับกับเซลล์มะเร็งก็จะช่วยดึงดูดให้เซลล์ฟาโกไซตต่างๆ เข้ามาจับกินเซลล์มะเร็งเหล่านั้นได้ นอกจากนี้ไซโตไคน์ชนิดต่างๆ ที่ถูกผลิตขึ้นจากการทำงานของ helper T cells ยังช่วยกระตุ้นการทำงานของเซลล์ชนิดอื่นๆ ในระบบภูมิคุ้มกันอีก เช่น เมื่อ cytotoxic T cells ได้รับการกระตุ้นจากไซโตไคน์  $TNF-\alpha$  และ  $IFN-\gamma$  จะทำให้มีประสิทธิภาพในการทำลายเซลล์มะเร็งได้ดีขึ้น หรือในกรณีของเซลล์ NK เมื่อได้รับการกระตุ้นจากไซโตไคน์ชนิด IL-2 ก็จะทำให้เซลล์เกิดการพัฒนาไปเป็น LAK cells (lymphokines activated killer cells) ที่สามารถเข้าทำลายเซลล์มะเร็งได้อย่างมีประสิทธิภาพมากขึ้น (13, 15, 16) ระบบภูมิคุ้มกันจึงเป็นสิ่งที่สำคัญมาก

ต่อร่างกายเพราะเป็นสิ่งที่ช่วยปกป้องและกำจัดเชื้อโรค สิ่งแปลกปลอมที่จะก่อให้เกิดอันตรายต่อร่างกาย โดยเฉพาะระบบภูมิคุ้มกันที่มีมาแต่กำเนิด เพราะเป็นระบบภูมิคุ้มกันที่สามารถเข้ากำจัดและทำลายเชื้อโรคหรือสิ่งแปลกปลอมต่างๆ ที่ภายนอกที่เข้ามาสู่ร่างกายได้รวดเร็วมากกว่าระบบภูมิคุ้มกันที่ได้รับมาภายหลัง ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงสนใจที่จะทำการศึกษาฤทธิ์ปรับภูมิคุ้มกันของเซลล์โมโนไซต์ ซึ่งเป็นเซลล์ชนิดหนึ่งในระบบภูมิคุ้มกันที่มีมาแต่กำเนิด โดยในระบบภูมิคุ้มกันชนิดนี้จะมีเซลล์ที่ทำหน้าที่ต่างๆ อยู่หลายชนิด ซึ่งเซลล์แต่ละชนิดในระบบภูมิคุ้มกันที่มีมาแต่กำเนิดก็จะมีรูปร่างและบทบาทหน้าที่แตกต่างกันออกไป

## 2.2 เซลล์ในระบบภูมิคุ้มกัน

ระบบภูมิคุ้มกันภายในร่างกายจะมีเซลล์ที่มีความสำคัญและทำหน้าที่หลากหลายแตกต่างกันไป โดยในระบบภูมิคุ้มกันที่มีมาแต่กำเนิดจะมีเซลล์ที่มีความสำคัญซึ่งจะทำหน้าที่ช่วยกำจัดทำลายเชื้อโรคหลายชนิดด้วยกันดังรูปที่ 3 ได้แก่ เซลล์มาสต์ (mast cells) เซลล์แมคโครฟาจ เซลล์เดนไดรติก เซลล์ NK และ เซลล์เม็ดเลือดขาวจำพวกแกรนูโลไซต์ เช่น เบโซฟิล ฮีโอซิโนฟิล และนิวโทรฟิล ในขณะที่เดียวกันระบบภูมิคุ้มกันที่ได้รับมาในภายหลังถึงแม้ว่าจะจะเป็นระบบภูมิคุ้มกันที่ตอบสนองได้ช้ากว่าระบบภูมิคุ้มกันที่มีมาแต่กำเนิด แต่จะมีความจำเพาะต่อเชื้อโรคหรือสิ่งแปลกปลอมสูงกว่าระบบภูมิคุ้มกันชนิดแรก โดยเซลล์ที่มีบทบาทสำคัญในระบบภูมิคุ้มกันชนิดนี้ ได้แก่ เซลล์ลิมโฟไซต์ชนิดบี และชนิดที (18)

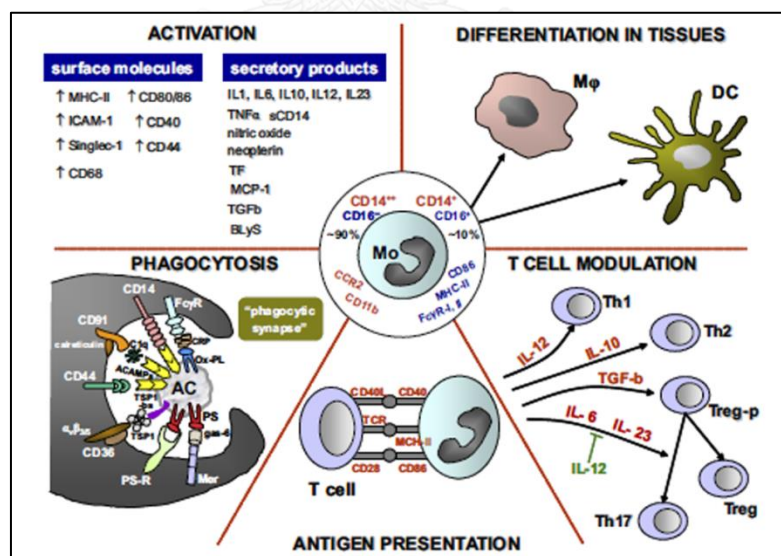


รูปที่ 3 เซลล์ชนิดต่างๆ ที่มีความสำคัญในระบบภูมิคุ้มกันที่มีมาแต่กำเนิดและระบบภูมิคุ้มกันที่ได้รับมาภายหลัง (18)

โดยในงานวิจัยนี้จะศึกษาผลการทำงานของสารที่สนใจในเซลล์โมโนไซต์/แมคโครฟาจ ซึ่งเป็นเซลล์ชนิดหนึ่งที่มีความสำคัญในระบบภูมิคุ้มกันที่มีมาแต่กำเนิด โดยเซลล์ชนิดนี้จะมีรายละเอียดและหน้าที่การทำงานดังนี้

### 2.2.1 เซลล์โมโนไซต์ (monocyte)

เซลล์โมโนไซต์เป็นเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันที่มีมาแต่กำเนิด จัดเป็นเซลล์ในกลุ่มของโมโนนิวเคลียร์ฟาโกไซต์ (mononuclear phagocytes) ซึ่งเป็นเซลล์เม็ดเลือดขาวที่พบอยู่ทั่วไปในกระแสเลือด ลักษณะเซลล์จะมีรูปร่างกลม นิวเคลียสมีลักษณะเป็นรูปไข่หรือเกือบวงอยู่บริเวณด้านใดด้านหนึ่งของเซลล์ นอกจากนั้นไนไซโทพลาสซึมของเซลล์โมโนไซต์จะมีแกรนูลเล็กๆ อยู่มากมาย ซึ่งภายในแกรนูลเหล่านี้จะมีสารสำคัญและเอนไซม์หลายชนิดที่ช่วยในการกำจัดเชื้อโรคหรือสิ่งแปลกปลอมได้ เซลล์โมโนไซต์จะอยู่ในกระแสเลือดเป็นระยะเวลาสั้นๆ จากนั้นเซลล์ชนิดนี้จะเคลื่อนที่เข้าสู่เนื้อเยื่อต่างๆ และเกิดการพัฒนาเจริญไปเป็นเซลล์แมคโครฟาจได้ (13) เซลล์โมโนไซต์นี้ นอกจากจะสามารถช่วยกำจัดสิ่งแปลกปลอมได้ด้วยการจับกินหรือฟาโกไซโทซิสแล้ว ยังทำหน้าที่เป็นเซลล์ที่นำเสนอแอนติเจนของเชื้อโรคหรือสิ่งแปลกปลอม และยังมีบทบาทสำคัญในการเกิดกระบวนการอักเสบอีกด้วย (19)



รูปที่ 4 สรุปหน้าที่และความสำคัญของเซลล์โมโนไซต์ (19)

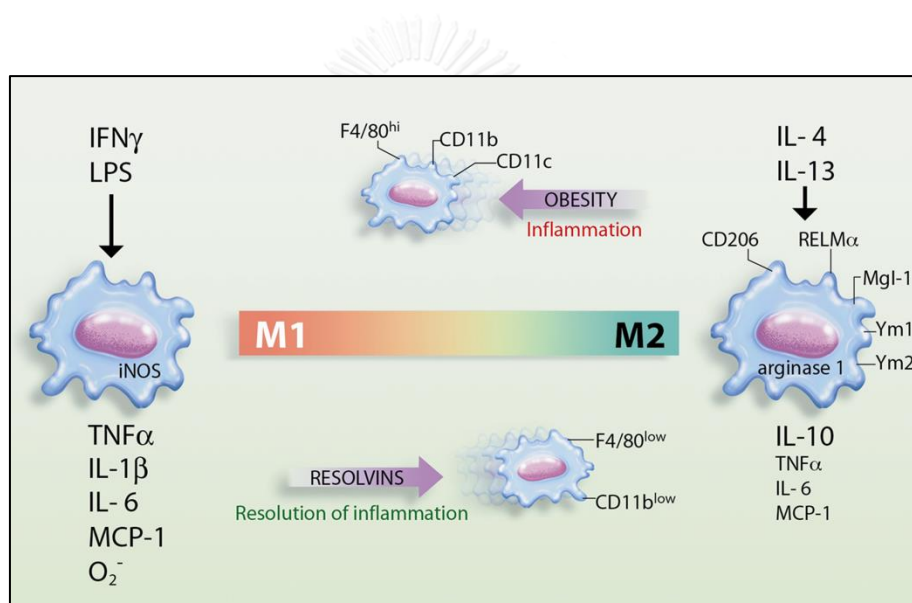
จากรูปที่ 4 เซลล์โมโนไซต์จะสามารถแบ่งกลุ่มตามชนิดของโปรตีนที่พบบนผิวเซลล์ได้ 2 กลุ่มย่อย คือ เซลล์โมโนไซต์ชนิดที่พบโปรตีน CD14 บนผิวเซลล์ และเซลล์โมโนไซต์ชนิดที่พบโปรตีน CD16 บนผิวเซลล์ โดยโปรตีน CD14 จะเป็นโปรตีนที่มีความจำเพาะกับไลโปโพลีแซคคาไรด์ ซึ่งเป็นแอนติเจนสำคัญที่พบในเซลล์แบคทีเรีย ส่วนโปรตีน CD16 จะเป็นส่วนของ Fc receptor III ซึ่งเซลล์โมโนไซต์ที่พบส่วนใหญ่จะเป็นชนิดที่มีโปรตีน CD14 เซลล์โมโนไซต์ในกลุ่มนี้จะไม่พบ CD16 บนผิวเซลล์ ( $CD14^{2+}/CD16^{-}$ ) และจะพบการแสดงออกของโปรตีน CCR2 และ CD11b บนผิวเซลล์ ด้วย แต่สำหรับเซลล์โมโนไซต์กลุ่มที่พบโปรตีน CD16 บนผิวเซลล์ มักจะพบว่าไม่มีโปรตีน CD14 อยู่บนผิวเซลล์ด้วยเสมอแต่จะมีอยู่ปริมาณน้อย ( $CD14^{+}/CD16^{+}$ ) ซึ่งเมื่อร่างกายเกิดกระบวนการอักเสบเนื่องจากการติดเชื้อ เซลล์โมโนไซต์ในกลุ่มนี้จะมีการสร้างไซโตไคน์ชนิด TNF- $\alpha$  ซึ่งเป็นไซโตไคน์ในกลุ่มของ pro-inflammatory ออกมาในปริมาณสูง

เมื่อเซลล์โมโนไซต์ได้รับการกระตุ้นจะทำให้เกิดการแสดงออกของโปรตีนชนิดต่างๆ ทำให้เซลล์มีการเปลี่ยนแปลงคุณลักษณะ และมีหน้าที่ที่เปลี่ยนแปลงไป เช่น เกิดการเคลื่อนที่ไปยังบริเวณที่ติดเชื้อ (chemotaxis) เมื่อโปรตีนชนิด CCR2 (chemokine receptor 2) หรือ MCP-1 (monocyte chemoattractant protein 1) ที่อยู่บนผิวเซลล์เพิ่มสูงขึ้น เกิดการยึดเกาะกับพื้นผิวต่างๆ (adhesion) เมื่อโปรตีน ICAM-1 (intracellular adhesion molecule 1) บนผิวเซลล์เพิ่มปริมาณสูง แต่หากมีการหลั่งของโปรตีน TF (tissue factor) จะมีผลทำให้เซลล์เกิดการจับตัวกันได้ (coagulation) นอกจากการเปลี่ยนแปลงที่กล่าวมานี้ ผลของการเพิ่มขึ้นของโปรตีนชนิดต่างๆ บนผิวเซลล์ยังส่งผลให้เซลล์โมโนไซต์สามารถจับกินเชื้อโรค หรือเกิดการพัฒนาไปเป็นเซลล์ชนิดอื่นๆ เช่น แมคโครฟาจหรือเซลล์เดนไดรติกได้ (19)

### 2.2.2 เซลล์แมคโครฟาจ (macrophage)

เป็นเซลล์ที่พัฒนาจากเซลล์โมโนไซต์ โดยจะมีขนาดและรูปร่างที่ใหญ่กว่าเซลล์โมโนไซต์ เซลล์แมคโครฟาจสามารถกำจัดเชื้อโรคหรือสิ่งแปลกปลอมได้ด้วยการจับกินหรือฟาโกไซโทซิส นอกจากนี้ยังทำหน้าที่ในการนำเสนอแอนติเจนของเชื้อโรคที่จับกินเข้าไปออกมาบริเวณผิวเซลล์ทำให้เกิดการกระตุ้นการทำงานของเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันชนิดต่างๆ เพื่อช่วยในการกำจัดสิ่งแปลกปลอมได้ด้วย เซลล์แมคโครฟาจสามารถแบ่งได้เป็น 2 กลุ่ม ได้แก่ เซลล์แมคโครฟาจชนิดที่อยู่ประจำที่บริเวณใดบริเวณหนึ่งของเนื้อเยื่อภายในร่างกาย หรือเรียกว่า fix macrophage ซึ่งเซลล์

แมคโครฟาจในกลุ่มนี้จะมีรูปร่างคล้ายกระสวยหรือดาว และเซลล์แมคโครฟาจแบบชนิดที่สามารถเคลื่อนที่ไปตามบริเวณต่างๆ ได้ จะเรียกว่า wandering macrophage ซึ่งเซลล์แมคโครฟาจกลุ่มนี้ จะมีความสามารถในการจับกินเชื้อโรคหรือสิ่งแปลกปลอมได้ดีกว่า fix macrophage (13, 20) นอกจากหน้าที่ดังที่กล่าวมาแล้ว เซลล์แมคโครฟาจยังมีบทบาทสำคัญในกระบวนการอักเสบ โดยพบว่าเมื่อเกิดกระบวนการอักเสบและเชื้อโรคหรือสิ่งแปลกปลอมจากภายนอกร่างกายเข้ามาภายในร่างกายผ่านทางบาดแผล เซลล์แมคโครฟาจจะเกิดการเปลี่ยนแปลงฟีโนไทป์ โดยสามารถเกิดการเปลี่ยนแปลงได้ 2 แบบ คือเกิดการเปลี่ยนแปลงเป็นเซลล์แมคโครฟาจชนิด M1 หรือเป็นเซลล์แมคโครฟาจชนิด M2 ดังรูปที่ 5



รูปที่ 5 การเปลี่ยนแปลงของเซลล์แมคโครฟาจในเนื้อเยื่อเมื่อถูกกระตุ้นในกระบวนการอักเสบ (21)

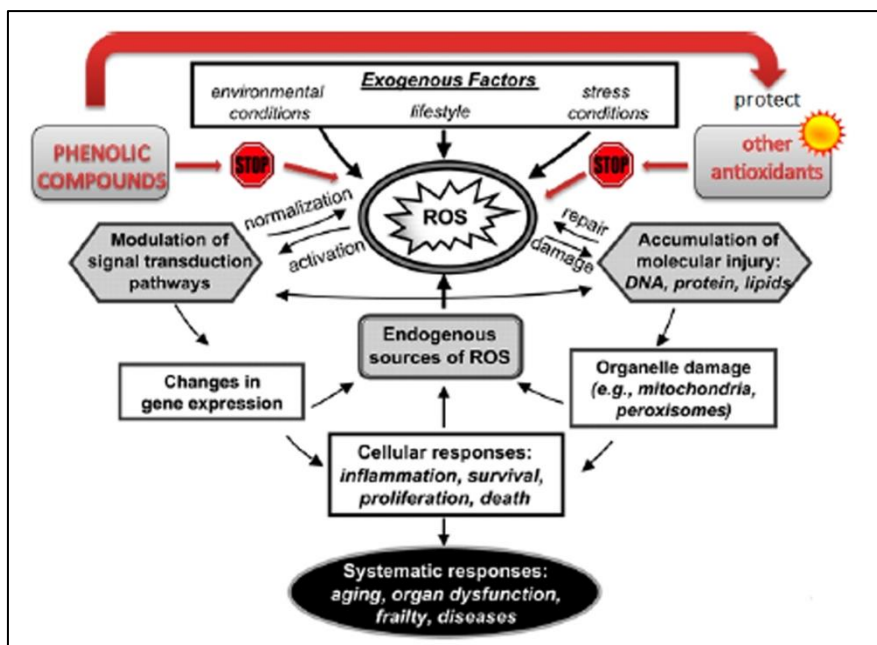
เมื่อเกิดบาดแผลหรือการบาดเจ็บบริเวณผิวหนังหรือภายนอกร่างกายเชื้อโรคที่ผ่านเข้ามาทางบาดแผล จะกระตุ้นให้เกิดกระบวนการอักเสบตามธรรมชาติ และเซลล์แมคโครฟาจจะถูกกระตุ้นให้พัฒนาไปเป็นเซลล์แมคโครฟาจชนิด M1 หรือ classically activated macrophage ซึ่งจะพบโปรตีน F4/80, CD11b และ CD11c บนผิวของเซลล์แมคโครฟาจชนิด M1 นี้ เซลล์ชนิดนี้สามารถถูกกระตุ้นการทำงานได้จากอินเตอร์เฟอรอนแกมมา หรือ ไลโปโพลีแซคคาไรด์ ทำให้เซลล์สามารถหลั่งไซโตไคน์และคีโมไคน์ชนิดต่างๆ โดยเฉพาะไซโตไคน์ในกลุ่มของ pro-inflammatory ออกมาได้หลายชนิด เช่น tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interleukine-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ),

interleukine-6 (IL-6), monocyte chemotactic peptide-1 (MCP-1) และ superoxide anion ( $O_2^-$ )

ในทางตรงกันข้ามเซลล์แมคโครฟาจจะถูกเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์แมคโครฟาจชนิด M2 หรือ alternatively activated macrophage เมื่อต้องการให้เซลล์เกิดการสร้างสรรค์ต่างๆ ที่มีผลในการยับยั้งกระบวนการอักเสบ เซลล์แมคโครฟาจชนิด M2 นี้ จะพบโปรตีนบนผิวเซลล์ชนิดสร้างไซโตไคน์ชนิด F4/80 และ CD11b ได้ในปริมาณน้อย เมื่อเซลล์แมคโครฟาจชนิด M2 ถูกกระตุ้นจาก interleukine-4 หรือ interleukine-13 เซลล์จะสร้างไซโตไคน์ชนิด IL-10 ออกมาได้ในปริมาณที่สูง ซึ่งไซโตไคน์ชนิดนี้จะมีผลไปยับยั้งกระบวนการอักเสบ โดยจะทำให้การสร้างไซโตไคน์ชนิด  $TNF-\alpha$ , IL-6 และ MCP-1 มีปริมาณที่ลดลง (21)

### 2.3 อนุมูลอิสระกับระบบภูมิคุ้มกัน

อนุมูลอิสระเป็นสารประกอบที่มีออกซิเจนในโมเลกุล สารนี้เกิดขึ้นจากกระบวนการเมแทบอลิซึมของสิ่งมีชีวิตทั่วไป อนุมูลอิสระจึงมีชื่อเรียกอีกอย่างหนึ่งว่า reactive oxygen species หรือ ROS ซึ่งสารประกอบที่จัดอยู่ในกลุ่มของ ROS มีอยู่ด้วยกันหลายชนิด เช่น ซูเปอร์ออกไซด์ (superoxide) ออกซิเจน ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (hydrogenperoxide) และไฮดรอกซิลเรดิคัล (hydroxyl radical) (22)



รูปที่ 6 ผลของอนุมูลอิสระต่อการทำงานของระบบต่างๆ ภายในร่างกาย (23)

ดังรูปที่ 6 อนุมูลอิสระหรือ ROS เกิดได้จากหลายปัจจัย เช่น สภาพแวดล้อม ความเครียด หรือปัจจัยภายนอกต่างๆ ที่มาจากการดำรงชีวิตประจำวัน ซึ่งอนุมูลอิสระจะชักนำให้เซลล์เกิดภาวะเครียดออกซิเดชัน (oxidative stress) ทำให้โครงสร้างต่างๆ ภายในเซลล์ เช่น ชั้นไขมันหรือโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบในเยื่อหุ้มเซลล์ หรือดีเอ็นเอเกิดความเสียหายเนื่องมาจากภาวะเครียดที่เกิดขึ้น นอกจากนี้ยังส่งผลต่อการส่งสัญญาณในกระบวนการต่างๆ ของเซลล์ทำให้การแสดงออกของยีนเปลี่ยนแปลงไป และอาจชักนำให้เซลล์เกิดกระบวนการอักเสบ การเจริญของเซลล์เพิ่มขึ้นหรือลดลง และอาจส่งผลต่อการตายของเซลล์ด้วย (23) ซึ่งหากอนุมูลอิสระก่อให้เกิดความเสียหายต่างๆ เหล่านี้กับเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกัน ก็จะมีผลกระทบต่อกลไกการกำจัดเชื้อโรคของร่างกายเป็นอย่างมาก เช่น หากเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันเกิดความชราเร็วขึ้นนอกจากจะส่งผลให้เซลล์ตายได้เร็วแล้วยังส่งผลทำให้ประสิทธิภาพในการกำจัดเชื้อโรคของเซลล์ลดลงอีกด้วย โดยปกติร่างกายจะสามารถกำจัดอนุมูลอิสระได้บางส่วน แต่หากอนุมูลอิสระเกิดขึ้นมากเกินไปร่างกายก็จะไม่สามารถกำจัดได้ทัน ดังนั้นจึงจำเป็นที่จะต้องได้รับสารต่างๆ ที่ช่วยในการกำจัดหรือลดทอนฤทธิ์ของอนุมูลอิสระ (24) ตัวอย่างของสารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้แก่ วิตามินซี (24) สารฟีนอล (23) และโพลีฟีนอล (25) ซึ่งสารต้านอนุมูลอิสระเหล่านี้นอกจากจะช่วยกำจัดอนุมูลอิสระที่จะก่อให้เกิดอันตรายกับเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกัน

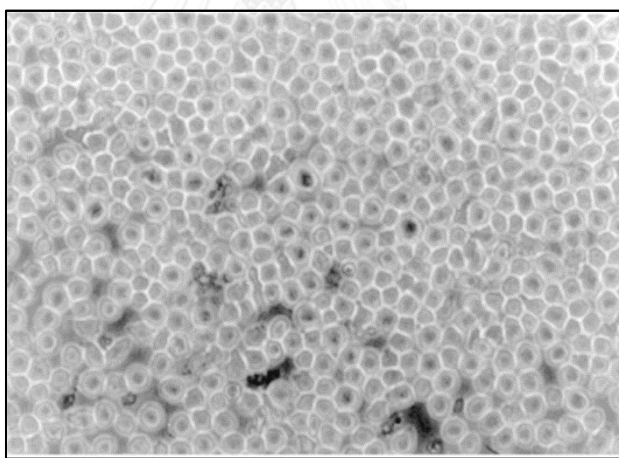


แล้ว ยังมีส่วนช่วยกระตุ้นการแบ่งตัวและการทำงานของเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกัน กระตุ้นการตอบสนองต่อเชื้อโรค และกระตุ้นการผลิตไซโตไคน์จากเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันบางชนิดได้ด้วย (24)

#### 2.4 เซลล์เพาะเลี้ยง U937

ในการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับเซลล์โมโนไซต์ พบว่ามีเซลล์เพาะเลี้ยงของมนุษย์หลายชนิดที่ถูกนำมาใช้ในการศึกษาอย่างแพร่หลาย ตัวอย่างเช่น เซลล์ HL-60 (Human promyelocytic leukemia cells), THP-1 (human leukemia monocytic cell line) และ U937 (human leukemia monocytic cell line) (26, 27) ในงานวิจัยนี้ได้ทำการศึกษาเซลล์เพาะเลี้ยงชนิด U937

เซลล์ U937 เป็นเซลล์โมโนไซต์ที่ได้มาจากมนุษย์ คัดเลือกมาจากผู้ป่วยโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด histiocytic lymphoma และได้รับการพัฒนาต่อมาจนกลายเป็นเซลล์ที่สามารถเพาะเลี้ยงในหลอดทดลองเพื่อนำมาใช้ในการศึกษาวิจัยด้านต่างๆ (26) ลักษณะของเซลล์ U937 จะเป็นเซลล์แขวนลอย (suspension cell) ดังรูปที่ 7

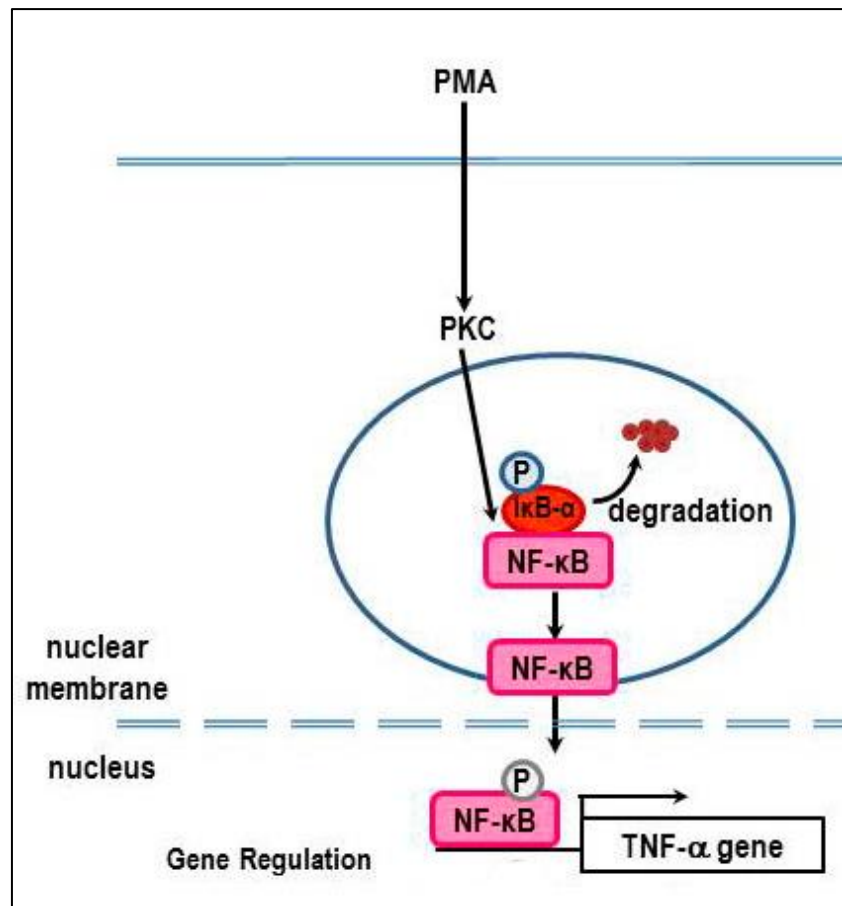


รูปที่ 7 ลักษณะรูปร่างของเซลล์เพาะเลี้ยงชนิด U937 (28)

มีการนำ U937 มาใช้เป็นในการศึกษาวิจัยหลายด้าน เช่น ใช้ในการศึกษาฤทธิ์ทางด้านเซลล์มะเร็ง โดยใช้เป็นโมเดลของเซลล์มะเร็งเลือดขาว ซึ่งมีการศึกษาวิจัยหลายชิ้นที่นำเซลล์ชนิดนี้มาทำการทดสอบกับสารสกัดหรือสารที่สนใจ โดยทำการศึกษาถึงฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว (29) นอกจากนี้ยังมีการนำ U937 มาใช้เป็นโมเดลของเซลล์ mononuclear phagocyte เพื่อศึกษาถึงการทำงานและการหลั่งไซโตไคน์ชนิดต่างๆ (30) โดยในการศึกษาฤทธิ์ปรับภูมิคุ้มกันใน U937 นิยมทำการศึกษาฤทธิ์ในการปรับภูมิคุ้มกันที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการอักเสบ โดยทำการตรวจวัดปริมาณไซโตไคน์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการอักเสบ หรือ pro-inflammatory เช่น IL-

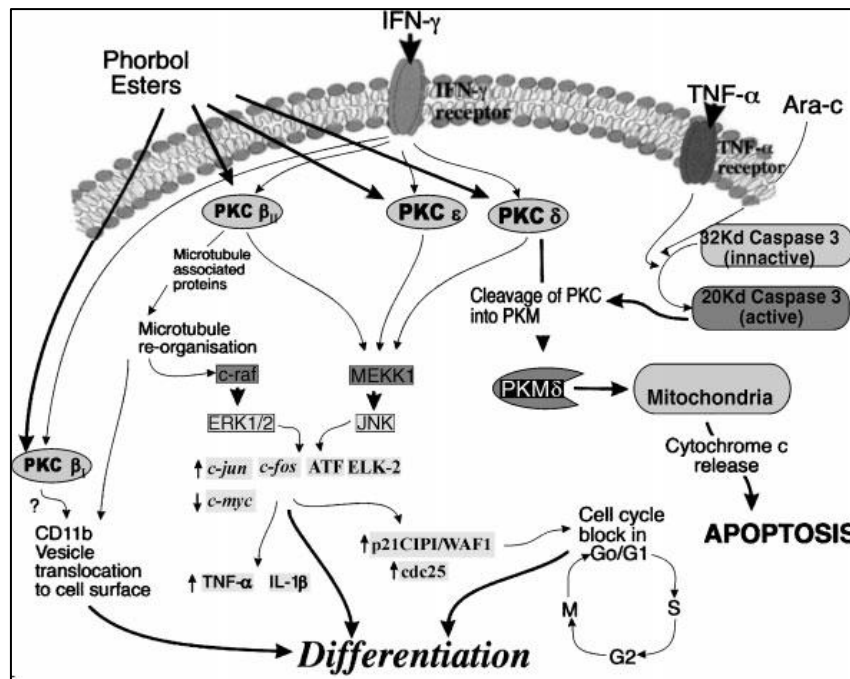
1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6 และ IL-8 (30, 31) นอกจากนี้ยังมีการเหนี่ยวนำให้เซลล์ U937 เจริญและพัฒนาการไปเป็นเซลล์แมคโครฟาจได้โดยการใช้สารกระตุ้นบางชนิด เช่น phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA) มาเหนี่ยวนำกลไกของเซลล์ และทำให้เซลล์เกิดการเจริญและพัฒนาคุณสมบัติต่อไป ดังแสดงในรูปที่ 8 เมื่อเซลล์โมโนไซต์ U937 ได้รับสาร PMA เข้าสู่ภายในเซลล์ จะเกิดการกระตุ้นการทำงานของ protein kinase C (PKC) ให้เกิดการย่อยทำลายโปรตีน inhibitor kappa B alpha (IkB- $\alpha$ ) ซึ่งในภาวะปกติจะจับอยู่กับส่วนของโปรตีน nuclear factor kappa B (NF $\kappa$ B) เพื่อยับยั้งไม่ให้โปรตีน NF $\kappa$ B เกิดการเคลื่อนย้ายเข้าสู่นิวเคลียส แต่เมื่อโปรตีน IkB- $\alpha$  ถูกทำลายจากการทำงานของ PKC จะทำให้โปรตีน NF $\kappa$ B เกิดการเคลื่อนที่เข้าสู่นิวเคลียสและส่งผลให้ยีนควบคุมการผลิตไซโตไคน์ชนิดต่างๆ เช่น TNF- $\alpha$  สามารถเกิดการแสดงออกออกมาเป็นโปรตีน ทำให้เซลล์ที่ถูกกระตุ้นจากสาร PMA สามารถสร้างไซโตไคน์ชนิด TNF- $\alpha$  ออกมาได้ (32)

นอกจากนี้ PKC ที่ถูกกระตุ้นโดยสาร PMA จะส่งผลให้เซลล์สร้างโปรตีนช่วยยึดเกาะ (cell adhesion molecule) ในกลุ่มของ  $\beta_2$  integrins เช่น CD11a, CD11c, CD18 และ CD11b เซลล์จึงสามารถยึดเกาะที่พื้นผิวภาชนะเพาะเลี้ยงได้ ส่งผลให้เซลล์เกิดการเปลี่ยนแปลงฟิโนไทป์และเกิดการแสดงออกของโปรตีนบนผิวเซลล์โดยเฉพาะโปรตีนชนิด CD11b ที่เพิ่มสูงขึ้น ทำให้เซลล์มีการเจริญไปเป็นเซลล์แมคโครฟาจได้ (33, 34)



รูปที่ 8 กลไกการกระตุ้นเซลล์ U937 ด้วยสาร PMA ส่งผลให้เกิดการสร้างไซโตไคน์ TNF- $\alpha$  (32)

กลไกการกระตุ้นกลุ่มของ PKC ด้วย PMA ส่งผลให้เซลล์โมโนไซต์ U937 เกิดการเจริญและเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์แมคโครฟาจ ทั้งนี้เซลล์บางส่วนจะเกิดการตายแบบอะพอพโทซิสด้วย แสดงดังรูปที่ 9 เมื่อสาร PMA กระตุ้น PKC $\beta$ II จะมีผลให้โปรตีนชนิด CD11b เคลื่อนย้ายออกไปสู่บริเวณผิวเซลล์ และเริ่มเกิดการแสดงออกของยีนที่มีผลให้วัฏจักรของเซลล์อยู่ในภาวะหยุดนิ่ง จากนั้นจะเกิดการเปลี่ยนแปลงพีโนไทป์ของเซลล์เพื่อพัฒนาไปเป็นเซลล์แมคโครฟาจ สำหรับ PKC $\epsilon$  มีหน้าที่ควบคุมการแสดงออกของยีนที่ยับยั้งการเกิดอะพอพโทซิสทำให้มีเพียงบางเซลล์เท่านั้นที่เมื่อได้รับสาร PMA แล้วจะเกิดการเหนี่ยวนำให้เซลล์ตายแบบอะพอพโทซิสได้ PKC $\delta$  นอกจากจะมีหน้าที่ควบคุมการเกิดการเปลี่ยนแปลงชนิดของเซลล์หลังได้รับการกระตุ้นจากสาร PMA แล้วโครงสร้างจะเกิดการเปลี่ยนแปลงไปเป็น PKM และเคลื่อนย้ายเข้าสู่ไมโทคอนเดรียชักนำให้เกิดการสร้างไซโทโครมซีขึ้นภายในเซลล์ มีผลกระตุ้นให้เซลล์เกิดอะพอพโทซิส (35)



รูปที่ 9 กลไกการกระตุ้นเซลล์ U937 ด้วยสาร Phorbol ester และส่งผลให้เซลล์เกิดการเปลี่ยนแปลงรูปร่าง

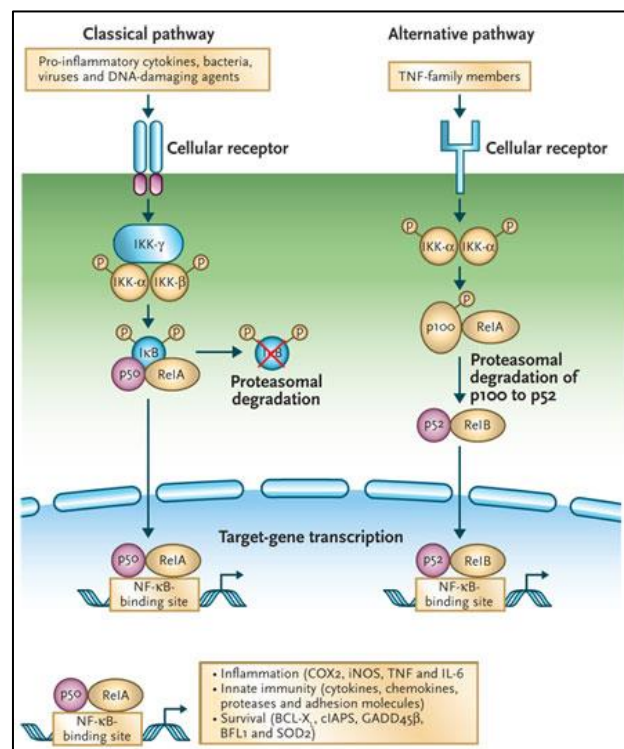
และเกิดการตายแบบอะพอพโทซิส (35) (Phorbol ester คือ 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate

(TPA) หรือเรียกอีกชื่อหนึ่งว่า phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA))

## 2.5 ไซโตไคน์ tumor necrosis factor-alpha (TNF- $\alpha$ )

TNF- $\alpha$  เป็นไซโตไคน์ที่มีบทบาทและหน้าที่ที่สำคัญหลายอย่าง เช่น มีผลต่อการเกิดอะพอพโทซิสของเซลล์ การทำงานของระบบภูมิคุ้มกัน และมีบทบาทสำคัญในกระบวนการอักเสบ (36) TNF- $\alpha$  ถูกสร้างจากเซลล์หลายชนิด เช่น เซลล์แมคโครฟาจที่ได้รับการกระตุ้น เซลล์ NK และเซลล์ลิมโฟไซต์ชนิดที (37) นอกจากหน้าที่ต่างๆ ดังที่ได้กล่าวมาแล้ว TNF- $\alpha$  ยังเป็นไซโตไคน์ในกลุ่ม Pro-inflammatory cytokines ที่พบในกระบวนการอักเสบ (19) เมื่อเซลล์ได้รับการกระตุ้นจากแบคทีเรีย ไวรัส หรือสารกระตุ้นต่างๆ ที่มาจากภายนอกเซลล์ผ่านตัวรับที่อยู่บนผิวเซลล์ จะส่งสัญญาณไปยังเซลล์ผ่านกลไก classical pathway และทำให้เกิดกระบวนการอักเสบขึ้น โดยโปรตีน inhibitor kappa B (I $\kappa$ B) ที่คอยยับยั้งการทำงานของ transcription factor ที่สำคัญในกระบวนการอักเสบ นั่นคือ NF- $\kappa$ B จะถูกทำลาย ทำให้โปรตีน NF- $\kappa$ B เข้าสู่นิวเคลียสและเกิดกระบวนการ transcription และ translation ทำให้เซลล์สามารถสร้างไซโตไคน์ชนิดต่างๆ ในกระบวนการอักเสบออกมาได้ เช่น TNF- $\alpha$ , IL-6 ฯลฯ จากนั้น TNF- $\alpha$  และไซโตไคน์ในกลุ่มของ Pro-inflammatory cytokines ที่ถูกสร้างขึ้นจะสามารถกระตุ้นการทำงานของ NF- $\kappa$ B ผ่านทาง classical pathway ต่อ

ได้ และ TNF- $\alpha$  ยังสามารถกระตุ้นการทำงานของ NF- $\kappa$ B ชนิด p52-RelB ผ่านทางกลไก alternative pathway ทำให้เซลล์มีการหลั่งไซโตไคน์และโปรตีนต่างๆ ออกมาในปริมาณที่เพิ่มสูงขึ้น ดังกลไกในรูปที่ 10 (38) นอกจากนี้ TNF- $\alpha$  จะช่วยกระตุ้นให้เกิดการสร้างไซโตไคน์และโปรตีนชนิดต่างๆ ที่มีผลกระตุ้นกระบวนการอักเสบแล้ว ในขณะที่เดียวกัน TNF- $\alpha$  สามารถชักนำให้เกิดอะพอพโทซิสของเซลล์มะเร็งได้ ดังนั้นจึงมีผู้ทำการศึกษาฤทธิ์ของ TNF- $\alpha$  ในการรักษาผู้ป่วยโรคมะเร็ง และพบว่าการใช้ยารักษามะเร็งร่วมกับ TNF- $\alpha$  จะช่วยให้การรักษามีประสิทธิภาพที่ดีขึ้น (36)



รูปที่ 10 การกระตุ้นเซลล์ให้เกิดกระบวนการอักเสบผ่านการดำเนินงานของกลไก classical และ alternative pathway (38)

## 2.6 เห็ด (Mushroom)

เห็ดเป็นเชื้อราขนาดใหญ่ จัดอยู่ในกลุ่มของอาณาจักรโปรติสตา มนุษย์นิยมนำเห็ดมาบริโภค เนื่องจากมีรสชาติที่ดี และมีคุณค่าทางโภชนาการสูง เนื่องจากประกอบไปด้วย โปรตีน คาร์โบไฮเดรต ไขมัน วิตามิน เกลือแร่ ฯลฯ ทำให้การเพาะเห็ดเพื่อจำหน่ายเป็นอาชีพที่ได้รับความนิยมมากขึ้น (39) นอกจากนี้การนำเห็ดมาบริโภคแล้วนั้น ในปัจจุบันได้มีผู้ทำการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับสารออกฤทธิ์จากเห็ด

ชนิดต่างๆ เป็นจำนวนมาก จากงานวิจัยที่ผ่านมาพบว่าสารสกัดจากเห็ดหลายชนิดนอกจากจะมีฤทธิ์ต่อการทำงานของเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันแล้วยังมีฤทธิ์ช่วยยับยั้งเซลล์มะเร็งได้อีกด้วย (9, 10, 12, 40-42) โดยองค์ประกอบสำคัญในเห็ดที่มีผู้ให้ความสนใจในการนำมาศึกษามีอยู่ด้วยกันหลายชนิด องค์ประกอบสำคัญที่นิยมนำมาศึกษา คือ พอลิแซ็กคาไรด์ (polysaccharide) (43-45) โดยเฉพาะเบต้ากลูแคน ( $\beta$ -glucan) (7, 46, 47) นอกจากนี้ส่วนของโปรตีนที่สกัดได้จากเห็ดจัดเป็นองค์ประกอบอีกชนิดหนึ่งที่มีผู้ให้ความสนใจเช่นกัน โดยพบว่าโปรตีนจากเห็ดหลายชนิดมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งและกระตุ้นการแบ่งตัวของเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันได้ดี (10, 48, 49) และในเห็ดบางชนิดยังมีสารออกฤทธิ์ที่เป็นโปรตีนจับอยู่กับพอลิแซ็กคาไรด์ หรือเรียกว่า โปรตีโอไกลแคน (proteoglycan) ซึ่งได้รับความสนใจในการนำมาศึกษาฤทธิ์ปรับภูมิคุ้มกันเช่นกัน (50, 51)

นอกจากนี้ เห็ดอีกหลายชนิด เช่น เห็ดตะไคล (สกุล *Russula sp.*) ซึ่งเป็นเห็ดพื้นบ้านที่พบในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย มีการนำเห็ดชนิดนี้มาทำการศึกษาฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ (52) ซึ่งสารต้านอนุมูลอิสระนอกจากจะช่วยในการทำลายอนุมูลอิสระที่เป็นสาเหตุทำให้เซลล์เกิดความเสียหายได้แล้วนั้น สารต้านอนุมูลอิสระยังช่วยกระตุ้นการทำงานของเซลล์ชนิดต่างๆ ในระบบภูมิคุ้มกันได้ เช่น กระตุ้นการทำงานของเซลล์ลิมโฟไซต์ทั้งชนิดที (T lymphocytes) และชนิดบี (B lymphocytes) ในการกำจัดสิ่งแปลกปลอมต่างๆ และยังช่วยกระตุ้นการหลั่งไซโตไคน์ชนิด TNF- $\alpha$  ของเซลล์แมคโครฟาจได้อีกด้วย (53) จากองค์ประกอบที่หลากหลายซึ่งพบในเห็ด ส่งผลให้นักวิจัยสนใจศึกษาฤทธิ์ปรับภูมิคุ้มกันของสารสกัดจากเห็ดชนิดต่างๆ และฤทธิ์ในการยับยั้งเซลล์มะเร็งเป็นจำนวนมาก

#### 2.6.1 ฤทธิ์ปรับภูมิคุ้มกันและยับยั้งเซลล์มะเร็งของสารสกัดจากเห็ด

ในปัจจุบันนักวิจัยสนใจศึกษาสารออกฤทธิ์จากเห็ดเป็นจำนวนมาก เห็ดที่นิยมและรู้จักกันเป็นอย่างดีเนื่องจากมีสรรพคุณทางยา คือ เห็ดหลินจือ (*Ganoderma lucidum*) มีนักวิจัยสนใจนำสารสกัดจากเห็ดหลินจือมาศึกษาฤทธิ์ปรับภูมิคุ้มกันและฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งอย่างแพร่หลาย จากผลการวิจัยพบว่าสารสกัดจากเห็ดหลินจือมีฤทธิ์ปรับภูมิคุ้มกันโดยกระตุ้นการหลั่งไซโตไคน์และกระตุ้นการทำงานของเซลล์หลายชนิดในระบบภูมิคุ้มกัน เช่น เซลล์ NK, เซลล์แมคโครฟาจ และเซลล์ลิมโฟไซต์ ส่งผลให้การเจริญของเซลล์มะเร็งในร่างกายของสัตว์ทดลองที่ได้รับสารสกัดจากเห็ดหลินจือลดลงได้ (54) และยังพบว่าสารสกัดเบต้ากลูแคน ( $\beta$ -glucan) ที่สกัดได้จากเห็ดหลินจือมีฤทธิ์

ปรับภูมิคุ้มกันที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบคือ ช่วยยับยั้งอาการอักเสบ โดยเมื่อทำการทดสอบกับเซลล์เพาะเลี้ยงชนิด RAW 264.7 (murine macrophage) ซึ่งเป็นเซลล์แมคโครฟาจของหนูที่นิยมนำมาใช้ในการศึกษาฤทธิ์ปรับภูมิคุ้มกันที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ พบว่าสารเบต้ากลูแคนที่สกัดได้จากเห็ดหลินจือสามารถช่วยยับยั้งการหลั่งไนตริกออกไซด์ (NO) และไซโตไคน์ TNF- $\alpha$  จากเซลล์ RAW 264.7 ที่ถูกกระตุ้นด้วยไลโปโพลีแซ็กคาไรด์ได้ (47) นอกจากนี้ฤทธิ์ในการปรับภูมิคุ้มกันแล้วสารสกัดจากเห็ดหลินจือยังมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งหลายชนิดได้ดี เช่น เซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด HeLa, เซลล์มะเร็งปอดชนิด A549 และ เซลล์มะเร็งเต้านมชนิด MCF-7 (44, 55) ทั้งนี้ยังมีเห็ดชนิดอื่นๆ ที่ได้รับความสนใจในการนำมาศึกษาฤทธิ์ปรับภูมิคุ้มกันและฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งอย่างแพร่หลาย ตัวอย่างเช่น เห็ดนางรม (*Pleurotus ostreatus*) เห็ดฟาง (*Volvariella volvacea*) และเห็ดเข็มทอง (*Flammulina velutipes*)

ในงานวิจัยของ Sarangi และคณะ (2006) พบว่าสารโปรตีนโกลแคนที่สกัดได้จากเห็ดนางรมมีฤทธิ์กระตุ้นการทำงานของเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกัน เช่น เซลล์แมคโครฟาจ โดยเมื่อตรวจวัดปริมาณไนตริกออกไซด์ที่เซลล์แมคโครฟาจสร้างออกมาเมื่อเซลล์มีการทำงาน พบว่าเซลล์แมคโครฟาจที่ได้รับสารโปรตีนโกลแคนจะสร้างไนตริกออกไซด์ออกมาในปริมาณที่เพิ่มสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และเมื่อทดสอบผลของสารโปรตีนโกลแคนต่อการทำงานของเซลล์ NK พบว่าเซลล์ NK สามารถทำลายเซลล์เป้าหมายได้ดีขึ้นเมื่อได้รับสารโปรตีนโกลแคน (50) และเมื่อนำสารโปรตีนโกลแคนจากเห็ดนางรมไปทำการทดสอบกับเซลล์จากต่อมไทมัส (thymocytes) และเซลล์ม้าม (splenocytes) พบว่าสารโปรตีนโกลแคนจากเห็ดนางรมจะช่วยกระตุ้นการแบ่งตัวของเซลล์ทั้งสองชนิดนี้ได้ (51) นอกจากนี้ Jedinak และคณะ (2011) ยังพบว่าสารสกัดชั้นน้ำของเห็ดนางรมมีฤทธิ์ปรับภูมิคุ้มกันที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ โดยช่วยยับยั้งการสร้างไซโตไคน์ชนิด TNF- $\alpha$ , IL-6 และ IL-12 จากเซลล์แมคโครฟาจของหนูชนิด RAW264.7 ที่ได้รับการกระตุ้นด้วยไลโปโพลีแซ็กคาไรด์ (56) นอกจากนี้ฤทธิ์ที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันดังที่ได้กล่าวมาแล้วนั้น สารสกัดเห็ดนางรมสามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งได้หลายชนิด ตัวอย่างเช่น เซลล์มะเร็งเต้านมชนิด MCF-7 และ MDA-MB-231, เซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ชนิด HT-29 และ HCT-116 (57) เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด THP-1 (40) และเซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด HeLa (45)

นอกจากการนำเห็ดนางรมมาศึกษาแล้ว เห็ดฟางเป็นเห็ดอีกชนิดหนึ่งที่เป็นที่รู้จักและนักวิจัยจำนวนมากสนใจศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดจากเห็ดฟางเช่นกัน จากงานวิจัยของ Maiti และคณะ

(2008) พบว่าโปรตีนที่สกัดได้จากเห็ดฟางมีฤทธิ์ปรับภูมิคุ้มกันโดยช่วยกระตุ้นการแบ่งตัวของเซลล์ไซโตไคน์, เซลล์จากต่อมไทมัส และเซลล์มะเร็งที่แยกได้จากหนูทดลอง และยังช่วยกระตุ้นการทำงานของเซลล์ NK โดยจะมีผลทำให้เซลล์ NK สามารถทำลายเซลล์เป้าหมายได้เพิ่มขึ้น นอกจากนี้ยังได้ทำการศึกษาฤทธิ์ยับยั้งการเจริญและแบ่งตัวของเซลล์มะเร็งซึ่งพบว่าโปรตีนที่ได้จากเห็ดฟางมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด Dalton's lymphoma และเซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด HeLa ได้ (9) ซึ่ง Jeurink และคณะ (2008) ได้ทำการศึกษาในเซลล์เม็ดเลือดขาวจากมนุษย์โดยนำโปรตีนที่สกัดได้จากเห็ดฟางไปทดสอบกับเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดโมโนนิวเคลียร์จากมนุษย์ (Human peripheral blood mononuclear cells, Human PBMCs) พบว่าโปรตีนที่สกัดได้จากเห็ดฟางกระตุ้นการผลิตไซโตไคน์ชนิด IL-4 จากเซลล์เม็ดเลือดขาวให้เพิ่มขึ้นได้สูงกว่าเห็ดชนิดอื่น ๆ ที่นำมาทดสอบได้แก่ เห็ดกระดุมบราซิล (*Agaricus blazei*) เห็ดถั่วฝรั่ง (*Coprinus comatus*) เห็ดเข็มทอง (*Flammulina velutipes*) เห็ดหลินจือ (*Ganoderma lucidum*) และ เห็ดไมตาเกะ (*Grifola frondosa*) (10)

เห็ดรับประทานได้อีกชนิดหนึ่งที่มีผู้นำไปศึกษาคือเห็ดเข็มทอง โดย Leung และคณะ (1997) ได้ทำการศึกษาฤทธิ์ปรับภูมิคุ้มกันของสารเบต้ากลูแคนที่สกัดได้จากเห็ดเข็มทอง ทั้งในหลอดทดลอง (in vitro) และในสัตว์ทดลอง (in vivo) พบว่าสารเบต้ากลูแคนจะไม่มีผลกระตุ้นให้เซลล์ลิมโฟไซต์จากม้ามของหนูทดลองเกิดการเจริญและแบ่งตัวเมื่อทำการศึกษาในหลอดทดลอง แต่เมื่อนำสารเบต้ากลูแคนฉีดเข้าช่องท้องหนูทดลองและทำการตรวจวัดการเจริญของเซลล์ลิมโฟไซต์พบว่าในหนูทดลองที่ได้รับสารเบต้ากลูแคน เซลล์ลิมโฟไซต์ที่แยกได้จะมีการเจริญและแบ่งตัวมากกว่าในหนูที่ไม่ได้รับสารสกัด สอดคล้องกับการศึกษาฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งซึ่งพบว่าเมื่อทำการศึกษาในหลอดทดลองสารเบต้ากลูแคนจะไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งซาร์โคมาชนิด 180 (sarcoma 180) ได้ แต่เมื่อให้สารเบต้ากลูแคนกับหนูที่ได้รับการปลูกถ่ายเซลล์มะเร็งชนิดนี้พบว่าหนูที่ได้รับสารสกัดจะมีขนาดของก้อนเซลล์มะเร็งในร่างกายที่ลดลงได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับหนูที่ไม่ได้รับสารสกัด (43) นอกจากการศึกษาในเซลล์สัตว์ทดลอง Wang และคณะ (2004) ยังได้ทำการศึกษาโปรตีนที่สกัดได้จากเห็ดเข็มทองในเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดโมโนนิวเคลียร์จากมนุษย์ พบว่าโปรตีนจากเห็ดเข็มทองจะช่วยกระตุ้นการแบ่งตัวของเซลล์เม็ดเลือดขาวที่นำมาทดสอบ และยังช่วยกระตุ้นการสร้างโปรตีน intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) บน



ผิวของเซลล์ลิโพอไซด์ชนิดที่เพิ่มสูงขึ้น ส่งผลให้เซลล์มีการสร้างไซโตไคน์ชนิดอินเตอร์เฟอรอนแกมมาให้เพิ่มสูงขึ้นได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (58)

จากงานวิจัยในเห็ดที่ผ่านมา พบว่าการศึกษาฤทธิ์ปรับภูมิคุ้มกันด้านการอักเสบส่วนใหญ่จะทำการศึกษาในเซลล์แมคโครฟาจที่ได้จากหนู (6, 7, 46) ผู้วิจัยจึงได้สนใจศึกษาฤทธิ์ปรับภูมิคุ้มกันที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบในเซลล์เพาะเลี้ยงจากมนุษย์ (U937) ซึ่งเป็นเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดโมโนไซต์/แมคโครฟาจ โดยจะทำการศึกษารสชาติที่ได้จากเห็ดรับประทานได้ 3 ชนิด ได้แก่ เห็ดนางฟ้าภูฐาน (*Pleurotus sajor-caju*) เห็ดเป่าฮื้อ (*Pleurotus abalonus*) และเห็ดหูหนู (*Auricularia auricula-judae*)

### 2.6.2 เห็ดนางฟ้าภูฐาน

เห็ดนางฟ้าภูฐานหรือเห็ดแขก เป็นเห็ดที่มีผู้นำเข้าสายพันธุ์มาจากประเทศภูฐาน และมาเผยแพร่ให้กับนักเพาะเห็ดในประเทศไทย มีชื่อวิทยาศาสตร์คือ *Pleurotus sajor-caju* จัดอยู่ในตระกูลเดียวกับเห็ดนางรมและเห็ดเป่าฮื้อ ลักษณะของเห็ดนางฟ้าภูฐานจะมีหมวกดอกสีขาวนวลไปจนถึงสีน้ำตาล ก้านดอกจะยึดติดกับตรงกลางหรือด้านข้างของหมวกดอกเป็นเนื้อเดียวกัน ครีบมีสีขาวยาวตลอดทั้งหมวกดอก (39, 59) โดยลักษณะของเห็ดชนิดนี้จะมีความคล้ายคลึงกับเห็ดนางรมมากแต่สีของดอกเห็ดนางฟ้าภูฐานจะมีสีคล้ำกว่าดอกเห็ดนางรม (60) แต่เมื่อนำมาเปรียบเทียบกับดอกเห็ดเป่าฮื้อสีของดอกเห็ดนางฟ้าภูฐานจะมีลักษณะที่จางกว่า (59)



รูปที่ 11 ลักษณะของดอกเห็ดนางฟ้าภูฐาน *P. sajor-caju*

จากการศึกษาวิจัยต่างๆ ที่ผ่านมามีพบการศึกษาเกี่ยวกับฤทธิ์ต่างๆ ของสาร  
องค์ประกอบที่พบในเห็ดนางฟ้าภูฐาน ดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 สรุปการศึกษาสารสกัดจากเห็ดนางฟ้าภูฐานเกี่ยวกับฤทธิ์ต่างๆ จากงานวิจัยที่ผ่านมา

สารที่นำมาศึกษา	ผลการศึกษา	อ้างอิง
<b>ฤทธิ์ปรับภูมิคุ้มกัน</b>		
$\beta$ -glucan	ทำการทดสอบกับ murine macrophage (Raw264.7) พบว่าสารสกัดไม่เป็นพิษกับเซลล์ และช่วยกระตุ้นให้เซลล์หลั่งไนโตริกออกไซด์, TNF- $\alpha$ และ IL-1 $\beta$	(46)
$\alpha$ -glucan protein complex	ทำการทดสอบกับ murine macrophage (J774A.1) พบว่าสารสกัดไม่เป็นพิษกับเซลล์ และเมื่อเปรียบเทียบผลของสารสกัดกับไลโปโพลีแซ็กคาไรด์ เซลล์ที่บ่มกับสารสกัดจะมีการสร้างไนโตริกออกไซด์ต่ำกว่าการกระตุ้นจากไลโปโพลีแซ็กคาไรด์ แต่จะสร้าง TNF- $\alpha$ ได้สูงกว่าการกระตุ้นด้วยไลโปโพลีแซ็กคาไรด์	(6)
$\beta$ -(1,3)-(1,6)-glucan	ทำการทดสอบสารสกัดเบต้ากลูแคนเปรียบเทียบกับ crude carbohydrate กับเซลล์ murine macrophage (J774A.1) พบว่าสารสกัดกระตุ้นให้เซลล์ผลิตไนโตริกออกไซด์และ TNF- $\alpha$ ได้มากกว่าการใช้ crude carbohydrate	(7)
<b>ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ</b>		
สารสกัดชั้นน้ำ จากการสกัดที่อุณหภูมิ 4, 22 และ 50°C	<p><b>4°C crude extract:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- polyphenol(mg% catechin)=35.22<math>\pm</math>0.28</li> <li>- DPPH (IC50%) = 10.38<math>\pm</math>0.19</li> <li>- SOD activity (IC50%) = 4.30<math>\pm</math>0.33</li> <li>- CAT-like activity (nmolH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/min) = 3.19<math>\pm</math>0.80</li> </ul> <p><b>22°C crude extract:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- polyphenol(mg% catechin)=34.85<math>\pm</math>0.40</li> <li>- DPPH (IC50%) = 9.68<math>\pm</math>0.15</li> <li>- SOD activity (IC50%) = 4.38<math>\pm</math>0.66</li> <li>- CAT-like activity (nmolH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/min) = 3.75<math>\pm</math>0.01</li> </ul> <p><b>50°C crude extract:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- polyphenol(mg% catechin)=35.98<math>\pm</math>0.14</li> <li>- DPPH (IC50%) = 9.01<math>\pm</math>0.14</li> <li>- SOD activity (IC50%) = 6.76<math>\pm</math>0.39</li> <li>- CAT-like activity (nmolH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/min) = 3.56<math>\pm</math>0.27</li> </ul>	(61)
สารสกัดชั้นน้ำ	ทำการทดสอบด้วยฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยเทคนิคต่างๆ ได้ผลดังนี้ <ul style="list-style-type: none"> <li>- <math>\beta</math>-carotene bleaching assay = 91.02%</li> <li>- reducing capacity = 35.06 <math>\mu</math>mol</li> <li>- antioxidant capacity = 29.45 mM Trolox/g of fresh mushroom</li> <li>- inhibition of LPO = 0.16 mM TEP/g of fresh mushroom</li> </ul>	(62)

ตารางที่ 1 สรุปการศึกษาสารสกัดจากเห็ดนางฟ้าภูฐานเกี่ยวกับฤทธิ์ต่างๆ จากงานวิจัยที่ผ่านมา (ต่อ)

สารที่นำมาศึกษา	ผลการศึกษา	อ้างอิง
<b>ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ</b>		
Cold water extract and hot water extract	<p><b>Cold water extract:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- DPPH radical at crude extract 50-500 ug/ml = 9.6-96.8%</li> <li>- <math>\beta</math>-carotene bleaching assay at 0.5mg/ml=15.17±0.8722%</li> <li>- Reducing power at 1 mg/ml = 0.6275</li> <li>- Total antioxidant activity by phosphomolybdenum assay (mg Glutathione E/g extract) = 90.5±3.2526</li> <li>- Total phenolics content (mg GAE/g extract) = 30.61±0.0212</li> </ul> <p><b>Hot water extract:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- DPPH radical at crude extract 50-500 ug/ml=9.28-80.65%</li> <li>- <math>\beta</math>-carotene bleaching assay at 0.5mg/ml=21.31±0.2645%</li> <li>- Reducing power at 1 mg/ml = 0.1295</li> <li>- Total antioxidant activity by phosphomolybdenum assay (mg Glutathione E/g extract) = 26.5±1.8384</li> <li>- Total phenolics content (mg GAE/g extract) = 14.36±0.0275</li> </ul>	(63)
Methanolic extract	<p>Total phenols (mg Tannic acid/g extract) = 52.2±1.64</p> <p>Ascorbic acid (mg/g extract) = 8.3±0.73</p> <p>Free radical scavenging property DPPH (%) = 88.0±0.68</p>	(64)
	<p>Total phenols (mg/g of extract) = 22.7±1.32</p> <p><b>IC<sub>50</sub> values (for various antioxidant assays)</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>-DPPH scavenging activity = 1.75±0.060</li> <li>-Reducing power = 8.5±0.88</li> <li>-Chelation with ferrous ions = 9.3±0.27</li> <li>-FRAP = 11.1±0.79</li> <li>-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> scavenging activity = 1.7±0.07</li> <li>-Superoxide scavenging activity = 12.4±2.0</li> </ul>	(65)

ตารางที่1 สรุปการศึกษาสารสกัดจากเห็ดนางฟ้าภูฐานเกี่ยวกับฤทธิ์ต่างๆ จากงานวิจัยที่ผ่านมา (ต่อ)

สารที่นำมาศึกษา	ผลการศึกษา	อ้างอิง
ฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง		
polysaccharide	สามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง sarcoma180 ในหนูทดลองที่ได้รับการปลูกถ่ายเซลล์มะเร็ง	(66)
Aqueous extract จากการสกัดที่อุณหภูมิ 4, 22 และ 50°C	นำสารสกัดมาทดสอบกับเซลล์มะเร็ง Hep2 และ HeLa ด้วย MTT assay พบว่าสารสกัดที่ใช้ในการทดสอบมีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง 2 ชนิดนี้ โดยมีค่า IC <sub>50</sub> (%) ดังนี้ 4°C crude extract: Hep2=0.23±0.08, HeLa=0.31±0.01 22°C crude extract: Hep2=0.64±0.02, HeLa=0.25±0.02 50°C crude extract: Hep2=1.17±0.03, HeLa=1.21±0.01	(61)
Protein-containing polysaccharide	ช่วยยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง sarcoma180 ในหนูทดลองที่ได้รับการปลูกถ่ายเซลล์มะเร็ง โดยการตรวจวัดจากขนาดของก้อนเซลล์มะเร็ง, ระยะเวลาการมีชีวิต และอัตราการตายของหนู	(67)

DPPH คือ การวิเคราะห์ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารที่สนใจโดยใช้สาร 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl, polyphenol (mg% catechin) คือการหาปริมาณสารโพลีฟีนอลที่พบในสารที่สนใจโดยใช้คาเทชินเป็นสารมาตรฐานในการเปรียบเทียบปริมาณ, SOD activity คือ การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ซูเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเทสในการกำจัดอนุมูลอิสระ, CAT-like activity (catalase like activity) คือการวิเคราะห์ความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระของสารที่สนใจเปรียบเทียบกับกิจกรรมของเอนไซม์คะตาเลส,  $\mu\text{mol}$  คือ ไมโครโมล,  $\beta$ -carotene bleaching assay คือการตรวจวัดกิจกรรมต้านอนุมูลอิสระด้วยการวัดปริมาณการฟอกสีเบต้าแคโรทีน, reducing capacity คือความสามารถในการรีดิวซ์สารต้านอนุมูลอิสระของสาร, Trolox คือ การตรวจวัดฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยเทคนิค Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) assay, inhibition of LPO (lipid peroxidation) คือ การตรวจวัดความสามารถของสารที่สนใจในการยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชันของลิพิด, TEP คือ 1,1,3,3-tetraethoxypropane, GAE (gallic acid equivalent) คือการตรวจวัดปริมาณสารโพลีฟีนอลในตัวอย่างโดยใช้กรดแกลลิกเป็นสารมาตรฐานในการเปรียบเทียบ, FRAP (ferric reducing antioxidant power assay) คือเทคนิคที่ใช้ในการตรวจวัดฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> scavenging activity คือ การตรวจวัดฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระชนิดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์, Superoxide scavenging activity คือ การตรวจวัดฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระชนิดซูเปอร์ออกไซด์, IC<sub>50</sub> (The half maximal inhibitory concentration) คือความเข้มข้นของสารสกัดที่สามารถออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์ได้ร้อยละ 50

### 2.6.3 เห็ดเป่าฮื้อ

เห็ดเป่าฮื้อ เห็ดโข่งทะเล หรือ abalone mushroom มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Pleurotus abalonus* เห็ดชนิดนี้อยู่ในกลุ่มเดียวกับเห็ดนางรมและเห็ดนางฟ้าภูฐาน ลักษณะของหมวกดอกเห็ดเป่าฮื้อจะมีขนาดใหญ่สีขาวยาวไปจนถึงสีเทา หมวกเห็ดจะมีลักษณะเป็นรูปพัดขอบของหมวกดอกจะม้วนงอลงเล็กน้อย ครีบมีสีขาวหรือสีครีมยาวไปตลอดทั้งหมวกดอก ก้านดอกมีลักษณะอวบและมีขนาดใหญ่ สีเทาดำ ก้านดอกของเห็ดเป่าฮื้อจะไม่อยู่บริเวณกึ่งกลางดอก แต่จะยึดติดกับบริเวณด้านข้างของหมวกดอก (39, 68)



รูปที่ 12 ลักษณะของดอกเห็ดเป่าฮื้อ *P. abalonus*

สำหรับสารสกัดจากเห็ดเป่าฮื้อพบการศึกษาที่ผ่านมาในรายงานวิจัยหลายฉบับ ซึ่งผลการศึกษาจากรายงานวิจัยต่างๆ แสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 สรุปการศึกษาสารสกัดจากเห็ดเป่าฮื้อเกี่ยวกับฤทธิ์ต่างๆ จากงานวิจัยที่ผ่านมา

สารที่นำมาศึกษา	ผลการศึกษา	อ้างอิง
<b>ฤทธิ์ปรับภูมิคุ้มกัน</b>		
	ยังไม่พบการศึกษาเกี่ยวกับฤทธิ์ปรับภูมิคุ้มกันในเห็ดเป่าฮื้อ	
<b>ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ</b>		
Polysaccharide	สารสกัดความเข้มข้น 1.67 $\mu\text{M}$ : Inhibition of DPPH radicals (%) = $77.4 \pm 1.6$ Inhibition of hydroxyl radicals (%) = $71.1 \pm 2.3$ สารสกัดความเข้มข้น 0.835 $\mu\text{M}$ : Inhibition of DPPH radicals (%) = $58.8 \pm 2.1$ Inhibition of hydroxyl radicals (%) = $40.7 \pm 1.5$ สารสกัดความเข้มข้น 0.418 $\mu\text{M}$ : Inhibition of DPPH radicals (%) = $25.5 \pm 1.4$ Inhibition of hydroxyl radicals (%) = $27.8 \pm 1.6$	(69)
<b>ฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง</b>		
Polysaccharide	นำสารที่สกัดได้มาทำการทดสอบกับเซลล์มะเร็ง MCF-7 ด้วยเทคนิค MTT พบว่าสารที่นำมาทดสอบสามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งได้โดยมีค่า $\text{IC}_{50} = 193 \text{ ug/ml}$ และเมื่อตรวจวัดการหลั่งเอนไซม์ LDH จากเซลล์ MCF-7 พบว่าสารสกัดมีผลทำให้เซลล์ตาย	(70)
Polysaccharide-peptide complex	นำสารสกัดที่ได้มาทดสอบกับเซลล์มะเร็งชนิด MCF-7 และ HepG2 พบว่าสารสกัดสามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งทั้ง 2 ชนิดได้โดยมีค่า $\text{IC}_{50}$ เท่ากับ 14 $\mu\text{M}$ (MCF-7) และ 24 $\mu\text{M}$ (HepG2)	(71)

Inhibition of hydroxyl radicals คือการตรวจวัดฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระชนิดไฮดรอกซิล, LDH (lactate dehydrogenase) คือเอนไซม์แลคเตททีไฮโดรจีเนส,  $\mu\text{M}$  คือไมโครโมลต่อลิตร

#### 2.6.4 เห็ดหูหนู

เห็ดหูหนู เห็ดหูหนูดำ หรือ Jew's ear mushroom มีชื่อทางวิทยาศาสตร์คือ *Auricularia auricula-judae* เห็ดชนิดนี้เป็นที่รู้จักกันดีและนิยมนำมาประกอบอาหารกันอย่างแพร่หลาย ลักษณะของเห็ดหูหนูจะมีส่วนของดอกที่มีลักษณะมันเงาเป็นแผ่นวุ้นคล้ายส่วนใบหูของหนู โดยสีของดอกจะมีสีน้ำตาลปนดำ สีน้ำตาลปนแดง สีน้ำตาลอ่อน หรือสีขาววนล้นขึ้นอยู่กับชนิดของเห็ด และส่วนของดอกจะมีรอยหยักหรือมีลักษณะเป็นคลื่น ก้านดอกจะสั้นมากหรืออาจไม่มีเลย (39)



รูปที่ 13 ลักษณะของดอกเห็ดหูหนู *A. auricula-judae* (72)

ในประเทศไทยพบเห็ดหูหนูอยู่ 3 สายพันธุ์ ได้แก่ เห็ดหูหนูธรรมดา หรือ *A. auricula-judae* เป็นเห็ดหูหนูที่พบได้ทั่วไปในประเทศไทยและมักนำมาบริโภค ชนิดที่สองคือเห็ดหูช้าง หรือ *A. polytricha* เห็ดหูหนูชนิดนี้จะมีขนาดใหญ่กว่าเห็ดหูหนูทั่วไป 2-3 เท่า และชนิดที่สามคือเห็ดหูหนูขาว หรือ *Tremella furiformis Berk.*(73) โดยการศึกษาวิจัยต่างๆ ที่ผ่านมามีบทความการศึกษากลับเกี่ยวกับสารสกัดชนิดต่างๆ จากเห็ดหูหนู โดยพบว่ามียุทธิต่างๆ ดังสรุปในตารางที่ 3



ตารางที่ 3 สรุปการศึกษาสารสกัดจากเห็ดหูหนูเกี่ยวกับฤทธิ์ต่างๆ จากงานวิจัยที่ผ่านมา

สารที่นำมาศึกษา	ผลการศึกษา	อ้างอิง
ฤทธิ์ปรับภูมิคุ้มกัน		
สารสกัดจากตัวทำละลายชนิดต่างๆ	ทำการสกัดสารจากดอกเห็ดหูหนูด้วยตัวทำละลายชนิดต่างๆ จากนั้นนำมาศึกษาฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์แมคโครฟาจากหนู (P388D1) ด้วยเทคนิค MTT ผล $IC_{50}$ ของสารสกัดต่างๆ มีค่าดังนี้ เอทิลอะซิเตท (Ethylacetate) = 143.80 ug/ml บิวทานอล (Butanol) = 94.62 ug/ml ไดคลอโรมีเทน (Dichloromethane) = 38.32 ug/ml เอทานอล (Ethanol) = 44.03 ug/ml น้ำ = 28.19 ug/ml	(74)
สารสกัดชั้นไดคลอโรมีเทน	ทำการทดสอบกับเซลล์ RAW264.7 โดยการกระตุ้นเซลล์ให้เกิดกระบวนการอักเสบด้วยไลโปโพลีแซ็กคาไรด์แล้วจึงใส่สารสกัด พบว่าสารสกัดช่วยยับยั้งการสร้างไนตริกออกไซด์, IL-1 $\beta$ และ TNF- $\alpha$ แต่จะไม่สามารถยับยั้งการสร้าง IL-6 ได้โดยดูจากการแสดงออกของ mRNA ของไซโตไคน์แต่ละชนิด	(75)
ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ		
โพลีแซ็กคาไรด์	ทำการผสมโพลีแซ็กคาไรด์ที่สกัดได้จากเห็ดหูหนู กับขมปังและนำไปทำการทดสอบหา DPPH free radical-scavenging activity พบว่า เมื่อทดสอบโพลีแซ็กคาไรด์จากเห็ดหูหนูพบว่ามีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเพิ่มสูงขึ้นตามระดับความเข้มข้น และเมื่อผสมโพลีแซ็กคาไรด์นี้กับขมปังจะส่งผลให้ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของขมปังเพิ่มสูงขึ้นเช่นเดียวกัน	(76)
โพลีแซ็กคาไรด์จากการสกัดด้วยน้ำ และต่าง	<b>ABTS<sup>+</sup> Radical-scavenging Activity (<math>\mu</math>M TE/g):</b> สารสกัดชั้นน้ำ = $14.16 \pm 0.29$ สารสกัดชั้นต่าง = $4.00 \pm 0.03$ <b>OH<sup>•</sup> Scavenging Assay (mg VCE/g):</b> สารสกัดชั้นน้ำ = $59.71 \pm 0.70$ สารสกัดชั้นต่าง = $27.93 \pm 0.55$ <b>Inhibition of Lipid Peroxidation (mg VCE/g)</b> สารสกัดชั้นน้ำ = $4.00 \pm 0.13$ สารสกัดชั้นต่าง = $2.63 \pm 0.15$	(77)
เมลานิน	ทำการสกัดเมลานินจากดอกเห็ดหูหนูและนำมาทำการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ดังนี้ Chelating Fe <sup>2+</sup> ability ( $IC_{50}$ ) = $0.38 \pm 0.04$ Scavenging DPPH radical = $0.18 \pm 0.03$ Scavenging superoxide radical = $0.59 \pm 0.04$	(78)

ตารางที่ 3 สรุปการศึกษาสารสกัดจากเห็ดหูหนูเกี่ยวกับฤทธิ์ต่างๆ จากงานวิจัยที่ผ่านมา (ต่อ)

สารที่นำมาศึกษา	ผลการศึกษา	อ้างอิง
ฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง		
เบต้ากลูแคนที่ละลายน้ำได้	<p>นำเบต้ากลูแคนมาทำการทดสอบกับเซลล์มะเร็ง Acinar cell carcinoma ด้วยเทคนิค MTT เมื่อเปรียบเทียบกับสารในกลุ่มควบคุม คือ 5-fluorouracil ผลการยับยั้งเซลล์มะเร็ง (inhibition ratio) เป็นดังนี้</p> <p>เบต้ากลูแคนความเข้มข้น 5 ug/ml = 23.5%, 50 ug/ml=34.1%</p> <p>5-fluorouracil = 40.4% และสารสกัดจะชักนำให้เซลล์มะเร็งเกิดอะพอโทซิส</p> <p>และได้นำสารสกัดมาทำการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งในหนูที่ได้รับการปลูกถ่ายเซลล์มะเร็ง sarcoma180 จากนั้นวัดการยับยั้ง (ร้อยละ)และน้ำหนักก้อนเนื้อออก ผลเป็นดังนี้</p> <p>ปริมาณเบต้ากลูแคน 5 mg/kg= 16.4%/0.68g,</p> <p>ปริมาณเบต้ากลูแคน 20 mg/kg= 39.1%/0.49g,</p> <p>ปริมาณเบต้ากลูแคน 40 mg/kg=37.7%/0.51g และ 5-fluorouracil=0.81 g</p>	(79)
สารสกัดจากตัวทำละลายชนิดต่างๆ	<p>ทำการสกัดสารจากดอกเห็ดหูหนูด้วยตัวทำละลายชนิดต่างๆ จากนั้นนำมาศึกษาฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง sarcoma 180 ด้วยเทคนิค MTT ผล IC<sub>50</sub> ของสารสกัดต่างๆ มีค่าดังนี้</p> <p>เอทิลอะซิเตท (Ethylacetate) = 108.90 ug/ml, บิวทานอล (Butanol) = 134.10 ug/ml, ไดคลอโรมีเทน (Dichloromethane) = 94.20 ug/ml, เอทานอล (Ethanol) = 133 ug/ml, น้ำ = 102.30 ug/ml</p> <p>จากนั้นเลือกเฉพาะสารสกัดชั้นไดคลอโรมีเทนมาทำการทดสอบกับหนูที่ได้รับการปลูกถ่ายเซลล์มะเร็ง sarcoma 180 พบว่าหนูที่ได้รับสารสกัดจะมีขนาดก้อนเนื้อออกที่ลดลง โดยมีค่าการยับยั้งเท่ากับร้อยละ 42.62</p>	(74)
โพลีแซ็กคาไรด์จากการสกัดด้วยน้ำและต่าง	<p>ทำการทดสอบกับเซลล์มะเร็งปากมดลูก HeLa โดยมีการยับยั้ง(ร้อยละ) เท่ากับสารสกัดชั้นน้ำ = <math>9.85 \pm 2.46</math> , สารสกัดชั้นต่าง = <math>21.44 \pm 1.29</math></p> <p>ทำการทดสอบกับเซลล์มะเร็งตับ HepG2 โดยมีการยับยั้ง(ร้อยละ) เท่ากับสารสกัดชั้นน้ำ = <math>19.45 \pm 2.42</math>, สารสกัดชั้นต่าง = <math>18.44 \pm 3.81</math></p>	(77)

ABTS+ radical-scavenging activity คือการวิเคราะห์ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารที่สนใจโดยใช้สาร 2, 2'-azinobis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid), OH<sup>-</sup> Scavenging assay คือการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระชนิดไฮดรอกซิล, VCE คือ vitamin C equivalent, Chelating Fe<sup>2+</sup> ability คือการวิเคราะห์ความสามารถของสารที่สนใจในการจับกับอนุมูลอิสระชนิดเฟอร์ริกไอออน

### บทที่ 3

#### วิธีดำเนินการวิจัย

#### 3.1 สารเคมีและอุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย

##### 3.1.1 สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย

CellTiter 96 Aqueous one solution	Promega, สหรัฐอเมริกา
Cytotoxicity detection kit (LDH)	Roche applied science, เยอรมนี
Dimethyl sulfoxide (DMSO)	Merck, เยอรมนี
Ethanol absolute	Merck, เยอรมนี
Fetal bovine serum	Hyclone, สหรัฐอเมริกา
Lipopolysaccharide	Sigma aldrich, สหรัฐอเมริกา
Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA)	Abcam, อังกฤษ
RPMI-1640 medium (with L-glutamine)	Hyclone, สหรัฐอเมริกา
Sterile water for injection	ไทยนครพัฒนาจำกัด, ไทย
Trypan blue solution (0.4%)	Sigma aldrich, สหรัฐอเมริกา
3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT)	Biobasic, แคนาดา
Endogen human TNF- $\alpha$ ELISA kit	Pierce Biotechnology Inc., สหรัฐอเมริกา

##### 3.1.2 วัสดุและอุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย

Cell culture flask T25, T75 (25, 75 cm <sup>2</sup> )	Corning Inc., สหรัฐอเมริกา
Centrifuge tube (15, 50 ml)	Corning Inc., สหรัฐอเมริกา
Cryovial tube 2.0 ml	Corning Inc., สหรัฐอเมริกา
Disposable serological pipette (5, 10 ml)	Corning Inc., สหรัฐอเมริกา

Glassware	Pyrex, สหรัฐอเมริกา
Microcentrifuge tube (1.5 ml)	Corning Inc., สหรัฐอเมริกา
Pipette tips (200, 1000 $\mu$ l)	Corning Inc., สหรัฐอเมริกา
Reagent reservoir 50 ml	Corning Inc., สหรัฐอเมริกา
Syringe filters (0.2, 0.45 $\mu$ m)	Sartorius, เยอรมนี
96 well cell culture plate flat bottom with lid	Nunc, เดนมาร์ก
24 well cell culture plate flat bottom with lid	Nunc, เดนมาร์ก

### 3.2 เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย

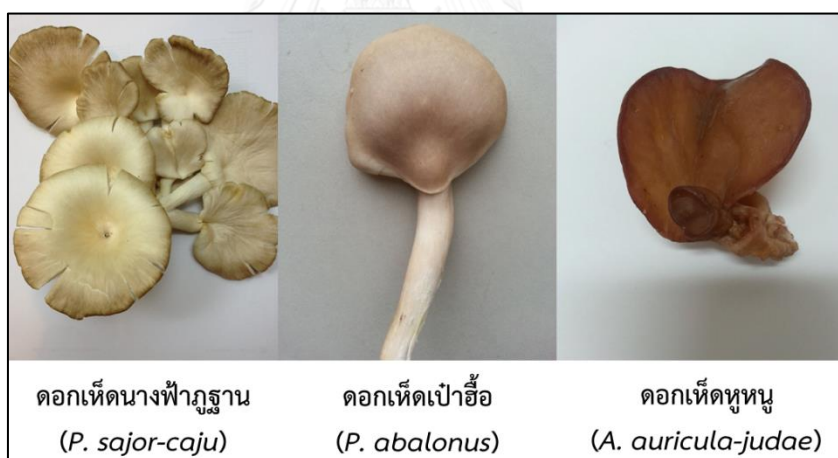
Analytical balances	Sartorius, เยอรมนี
Autopipette	Biohit, เยอรมนี
Biological safety cabinet	NuAire, สหรัฐอเมริกา
Centrifuge	Eppendorf, เยอรมนี
CO <sub>2</sub> incubator	Binder, เยอรมนี
Hemocytometer	Boeco, เยอรมนี
Inverted microscope	Nikon, ญี่ปุ่น
Liquid nitrogen tank	Taylor-Wharton, สหรัฐอเมริกา
Lyophilizer	Lyophilization systems inc., สหรัฐอเมริกา
Microplate Reader	Biotek, สหรัฐอเมริกา
Multichannel pipette	Socorex, สวิสเซอร์แลนด์
Vortex mixer	Velp scientifica, อิตาลี
Water bath	Nuve, ตุรกี

4°C Refrigerator	Sharp, ญี่ปุ่น
-20°C Freezer	Sanyo, ญี่ปุ่น
-80°C Ultra deep freezer	Thermo scientific, สหรัฐอเมริกา

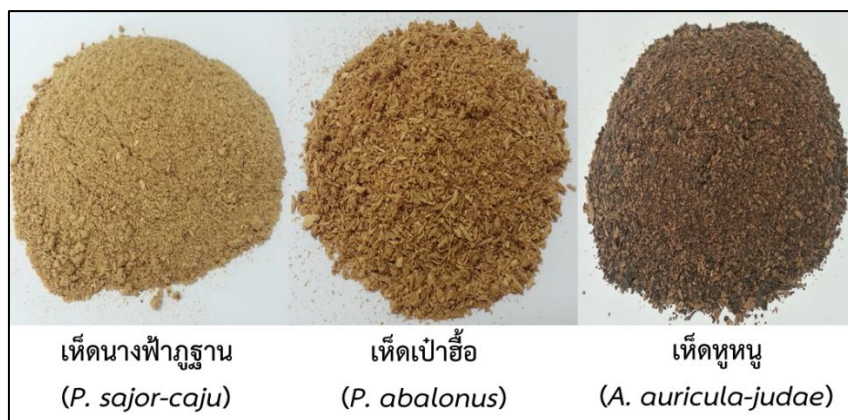
### 3.3 วิธีดำเนินการวิจัย

#### 3.3.1 การเตรียมเห็ดนางฟ้าภูฐาน เห็ดเป๋าฮื้อ และเห็ดหูหนูเพื่อนำไปใช้ในการสกัด

ซื้อเห็ดนางฟ้าภูฐานจากฟาร์มเห็ดชินฟาร์ม จังหวัดกรุงเทพมหานคร จำนวน 15 กิโลกรัม สำหรับเห็ดเป๋าฮื้อและเห็ดหูหนูซื้อจากฟาร์มเห็ดสุขใจ จังหวัดนนทบุรี จำนวน 15 และ 10 กิโลกรัม ตามลำดับ นำมาล้างด้วยน้ำสะอาดและนำไปตากแห้งจากนั้นทำการชั่งน้ำหนักแห้งที่ได้แล้ว จึงนำเห็ดตากแห้งแต่ละชนิดมาบดให้ละเอียดเป็นผง ทำการบรรจุใส่ถุงปิดสนิทและเก็บไว้ในที่แห้ง



รูปที่ 14 ลักษณะดอกสดของเห็ดนางฟ้าภูฐาน เห็ดเป๋าฮื้อ และเห็ดหูหนูที่ซื้อจากฟาร์มเห็ดเพื่อนำมาใช้ในการสกัดสารด้วยน้ำและเอทานอล



รูปที่ 15 ลักษณะของดอกเห็ดนางฟ้าภูฐาน เห็ดเป่าฮื้อ และเห็ดหูหนูที่ตากแห้งและบดเป็นผงละเอียด

### 3.3.2 การสกัดสารจากเห็ดนางฟ้าภูฐาน เห็ดเป่าฮื้อ และเห็ดหูหนูด้วยน้ำ (61)

นำผงเห็ดที่บดละเอียดน้ำหนัก 100 กรัม ผสมกับน้ำ sterile water ที่มีอุณหภูมิที่ต้องการใช้ในการสกัดปริมาตร 500 มิลลิลิตร (อัตราส่วนของเห็ดต่อน้ำเท่ากับ 1 ต่อ 5) และนำไปสกัดที่อุณหภูมิต่างๆ ตามที่ต้องการ (4, 22, 50 และ 100 องศาเซลเซียส) โดยการบ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath) เป็นระยะเวลา 1 ชั่วโมง และทำการคนสารสกัดทุกๆ 15 นาที เมื่อครบ 1 ชั่วโมง ทำการกรองเอาเฉพาะส่วนน้ำออกมาด้วยผ้าขาวบาง จากนั้นทำการสกัดซ้ำอีกจำนวน 2 ครั้ง และเก็บรวบรวมสารละลายที่ได้จากการสกัด นำไปปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 20 นาที จากนั้นเก็บรวบรวมเฉพาะส่วนใสเพื่อนำมากรองด้วยกระดาษกรอง และนำสารสกัดที่ได้ไประเหยน้ำออกด้วยเครื่อง lyophilizer แล้วจึงเก็บรวบรวมสารสกัดของเห็ดที่ได้มาทำการชั่งน้ำหนักและคำนวณหา yield crude extract (%) ทำการเก็บรักษา crude extract ไว้ในถุงฟอยล์ที่มีการปิดผนึก และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส

$$\text{Yield (\%)} = \frac{\text{น้ำหนักของ crude extract ที่ได้จากการสกัด}}{\text{น้ำหนักของผงเห็ดที่นำไปใช้ในการสกัด}} \times 100$$

### 3.3.3 การสกัดสารจากเห็ดนางฟ้าภูฐาน, เห็ดเป่าฮื้อ และเห็ดหูหนูด้วยตัวทำละลายเอทานอล

นอล

ทำการชั่งน้ำหนักผงเห็ดจำนวน 40 กรัม ใส่ลงใน cellulose thimble จากนั้นนำ cellulose thimble ที่เตรียมไว้ใส่ในเครื่องสกัดแบบต่อเนื่อง soxhlet เตรียมเอทานอลปริมาตร 400 มิลลิลิตร ใส่ลงในภาชนะสำหรับใส่สารละลายของเครื่องมือ และทำการสกัดแบบต่อเนื่องด้วยเครื่อง soxhlet เป็นระยะเวลาประมาณ 14 ชั่วโมง แล้วจึงเก็บเอาส่วนของสารละลายที่ได้จากการสกัดไปทำการระเหยเอาตัวทำละลายออกด้วยเครื่อง evaporation และทำการระเหยส่วนน้ำออกให้แห้งอีกครั้งด้วยเครื่อง lyophilizer เก็บรวบรวมสารสกัดของเห็ดแต่ละชนิดที่ได้จากการสกัดมาทำการชั่งน้ำหนักและคำนวณหา yield crude extract (%w/w) เก็บรักษา crude extract ไว้ในถุงพอยล์ที่มีการปิดผนึก และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส

$$\text{Yield (\%)} = \frac{\text{น้ำหนักของ crude extract ที่ได้จากการสกัด}}{\text{น้ำหนักของผงเห็ดที่นำไปใช้ในการสกัด}} \times 100$$



รูปที่ 16 การสกัดสารจากดอกเห็ดนางฟ้าภูฐาน, ดอกเห็ดเป่าฮื้อ และดอกเห็ดหูหนูด้วยเครื่องสกัดแบบต่อเนื่อง



รูปที่ 17 ลักษณะสีของสารละลายที่ได้จากการสกัดสารจากเห็ดนางฟ้าภูฐาน (คอลัมน์ซ้ายมือ), เห็ดเป่าฮื้อ (คอลัมน์กลาง) และเห็ดหูหนู (คอลัมน์ขวามือ) ด้วยเครื่องสกัดแบบต่อเนื่อง

### 3.3.4 การเพาะเลี้ยงเซลล์ U937

#### หลักการ

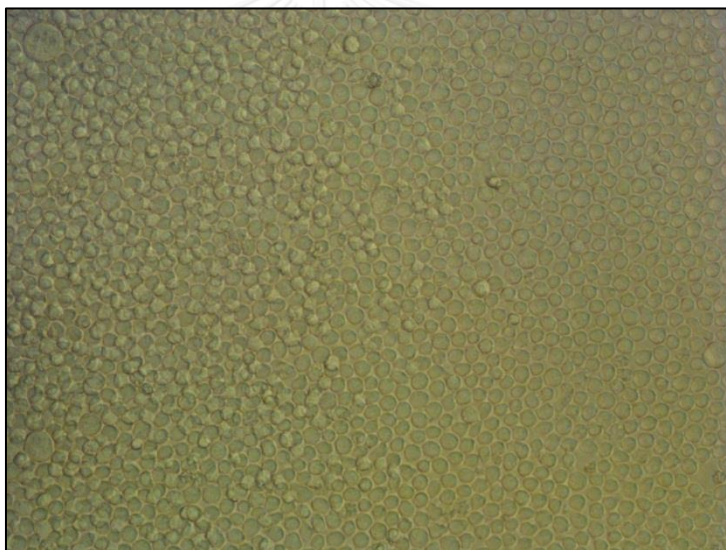
เซลล์ U937 เป็นเซลล์โมโนไซต์ของมนุษย์ (human cell lines) ที่คัดเลือกมาจากผู้ป่วยโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด histiocytic lymphoma และถูกพัฒนาต่อมาจนกลายเป็นเซลล์ที่สามารถเพาะเลี้ยงในหลอดทดลองเพื่อนำมาใช้ในการศึกษาวิจัยด้านต่างๆ ได้ (26) ลักษณะของเซลล์ U937 จะเป็นเซลล์แขวนลอย (suspension cell) เซลล์ชนิดนี้ถูกนำมาใช้ในการศึกษาวิจัยหลายด้าน เช่น ใช้เป็นเซลล์โมโนไซต์เพื่อศึกษาฤทธิ์ปรับภูมิคุ้มกันที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ (31, 80) หรืออาจทำการกระตุ้นเซลล์ U937 ด้วยสารกระตุ้นเพื่อให้เซลล์เกิดการเจริญและพัฒนาไปเป็นเซลล์แมคโครฟาจแล้วนำไปทำการศึกษาฤทธิ์ปรับภูมิคุ้มกันต่างๆ โดยเฉพาะที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ (81) นอกจากนี้เซลล์ U937 ยังถูกนำไปใช้ในการศึกษาวิจัยทางด้านโรคมะเร็งอีกด้วย (82)

ในการศึกษาวิจัยนี้เลือกใช้เซลล์ U937 เพื่อศึกษาผลของสารสกัดจากเห็ดทั้ง 3 ชนิด ต่อการเจริญของเซลล์และศึกษาฤทธิ์ปรับภูมิคุ้มกันของสารสกัดต่อพัฒนาการและการสร้างไซโตไคน์ของเซลล์



### วิธีการทดลอง (81)

นำเซลล์ U937 ที่แช่แข็งและเก็บรักษาไว้ในไนโตรเจนเหลว ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จากนั้นดูดใส่ในอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI-1640 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ปั่นล้างเซลล์ด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 1,000 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 5 นาที ทำการดูดส่วนใสทิ้งและละลายตะกอนเซลล์ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI-1640 ที่มีการเติม fetal bovine serum (FBS) ที่ความเข้มข้น 10% ปริมาตร 10 มิลลิลิตร นำเซลล์ที่เตรียมไว้ใส่ลงใน T-flask ขนาด 25 ตารางเซนติเมตร (cm<sup>2</sup>) และนำไปเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในตู้บ่มชนิด CO<sub>2</sub> incubator ที่มีแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ปริมาณ 5% โดยทำการ passage เซลล์ทุกๆ 2-3 วัน



รูปที่ 18 ลักษณะเซลล์โมโนไซต์ U937 ที่ทำการเพาะเลี้ยงเพื่อนำมาใช้ในการทดลอง ถ่ายภาพด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิดส่องกลับ (inverted microscope) ที่กำลังขยายเท่ากับ 400 เท่า

3.3.5 การศึกษาผลของสารสกัดจากเห็ดนางฟ้าภูฐาน, เห็ดเป่าฮื้อ และเห็ดหูหนูต่อการเจริญของเซลล์ U937 ด้วยเทคนิค MTS/MTT

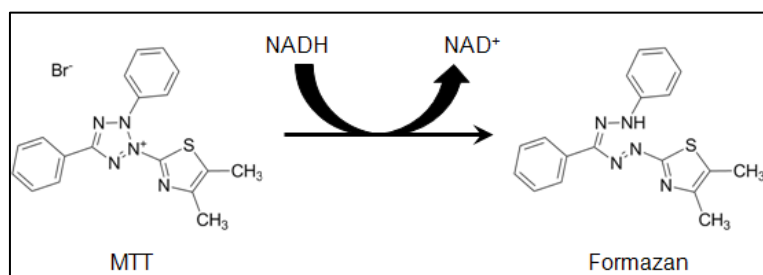
#### หลักการ

เซลล์โมโนไซต์เป็นเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดหนึ่งที่มีบทบาทในระบบภูมิคุ้มกัน โดยเซลล์โมโนไซต์สามารถทำการกำจัดจุลินทรีย์หรือสิ่งแปลกปลอมที่เข้าสู่ร่างกายได้โดยวิธีการจับกิน (13) และเซลล์โมโนไซต์เมื่อได้รับการกระตุ้นจากเชื้อโรคสิ่งแปลกปลอม หรือจากความเสียหายบาดเจ็บของเนื้อเยื่อภายในร่างกาย ก็จะเกิดการพัฒนาต่อไปเป็นเซลล์แมคโครฟาจได้ (83) เซลล์แมคโครฟาจจะมีขนาดใหญ่กว่าเซลล์โมโนไซต์ และมีประสิทธิภาพในการกำจัดสิ่งแปลกปลอมที่เข้ามาสู่ภายในร่างกายด้วยวิธีการจับกินได้ดีกว่าเซลล์โมโนไซต์ นอกจากนี้เซลล์แมคโครฟาจยังเป็นเซลล์ที่มีบทบาทสำคัญอย่างมากในระบบภูมิคุ้มกันที่มีมาตั้งแต่กำเนิด เช่น ช่วยในการเข้ากำจัดหรือทำลายสิ่งแปลกปลอมที่เข้ามาภายในร่างกาย, ช่วยเพิ่มการสร้างเอนไซม์ สารเคมี และไซโตไคน์ชนิดต่างๆ เพื่อกระตุ้นการทำงานของเซลล์ชนิดอื่นๆ ในระบบภูมิคุ้มกัน และยังช่วยในการนำเสนอแอนติเจนต่อเซลล์ลิมโฟไซต์ชนิดที่อีกด้วย (13) ดังนั้นหากสารสกัดที่นำมาทดสอบสามารถกระตุ้นการแบ่งตัวของเซลล์โมโนไซต์ซึ่งเป็นเซลล์ชนิดหนึ่งในระบบภูมิคุ้มกันให้เพิ่มขึ้นได้ ก็อาจช่วยเพิ่มการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันให้มีประสิทธิภาพที่ดีขึ้น (84)

เทคนิคการตรวจวัดเซลล์ที่มีชีวิตมีอยู่หลายเทคนิค ผู้วิจัยจึงเลือกใช้การตรวจวัดกิจกรรมเมตาบอลิซึม (metabolic activity) ของเซลล์ซึ่งเป็นการตรวจวัดโดยอ้อม เหมาะสมต่อการตรวจกรองปริมาณมาก เนื่องจากเทคนิคส่วนใหญ่จะทำการตรวจวัดผลจากการทำปฏิกิริยาของสารทดสอบกับเซลล์ที่มีชีวิตด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง ทำให้สามารถทำการทดสอบไปพร้อมกันได้เป็นจำนวนมาก หนึ่งในนั้นคือเทคนิคการตรวจวัดด้วยหลักการทำปฏิกิริยาของสารเตตราโซเลียม (tetrazolium) โดยสารเตตราโซเลียม ที่ใช้ในการตรวจวัดเซลล์ที่มีชีวิตมีอยู่หลายชนิดด้วยกัน ได้แก่ MTT, MTS, XTT และ WST-1 ในงานวิจัยนี้จะเลือกใช้สารประกอบจากเตตราโซเลียม ชนิด MTT และ MTS เพื่อนำมาใช้ในการตรวจวัดเซลล์ที่มีชีวิต

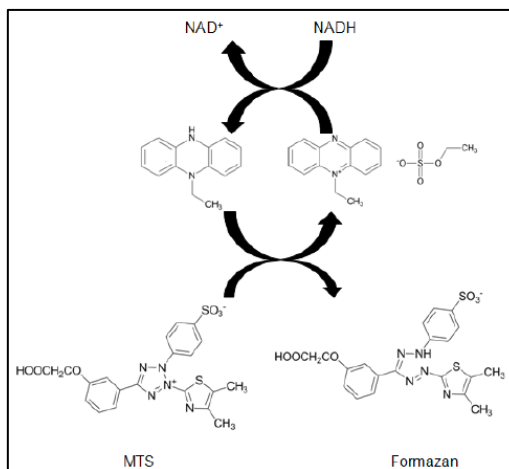
MTT หรือ (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) tetrazolium reduction assay เป็นการตรวจวัดเซลล์ที่มีชีวิตด้วยสารประกอบของเตตราโซเลียม โดยคุณสมบัติของ MTT จะมีประจุที่เป็นบวกทำให้สามารถซึมผ่านเข้าไปภายในเซลล์ที่มีชีวิตได้ ซึ่งในเซลล์ที่มีชีวิตจะเกิดกระบวนการเมตาบอลิซึมและสามารถรีดิวซ์สารเตตราโซเลียม ตามกลไกในรูปที่

19 ให้เกิดเป็นฟอร์มาซาน (formazan) ซึ่งจะมีลักษณะเป็นผลึกอยู่ภายในเซลล์ ในการตรวจวัดจะทำการละลายฟอร์มาซานออกมาจากภายในเซลล์และวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายที่ได้ โดยค่าการดูดกลืนแสงจะมีค่าแปรผันตามปริมาณเซลล์มีชีวิต



รูปที่ 19 การทำปฏิกิริยาของสาร MTT เมื่อถูกรีดิวซ์ให้เป็นสารฟอร์มาซาน (85)

MTS หรือ (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium) เป็นสารประกอบที่มีสารเตตราโซเลียมเป็นองค์ประกอบ มีประจุเป็นลบจึงไม่สามารถซึมผ่านผนังเซลล์เข้าไปในตัวเซลล์ได้ ดังนั้นปฏิกิริยาของสาร MTS จึงเกิดขึ้นภายนอกตัวเซลล์ โดยจะมีการเติมสารตัวกลางบางชนิดเช่น phenazine methyl sulfate (PMS) หรือ phenazine ethyl sulfate (PES) ที่สามารถผ่านเข้าไปในตัวเซลล์และช่วยในการรับอิเล็กตรอนจากภายในเซลล์ออกมาสู่ภายนอก ทำให้เกิดการรีดิวซ์สารเตตราโซเลียมและเกิดเป็นสารฟอร์มาซานที่มีสีม่วงขึ้นทันทีโดยไม่ต้องผ่านขั้นตอนของการละลายสารฟอร์มาซานออกมาจากภายในเซลล์ เหมือนกับสาร MTT ดังนั้นหากในการทดสอบมีเซลล์ที่มีชีวิตอยู่เป็นจำนวนมากสีของสารละลายที่เกิดขึ้นก็จะมีสีที่เข้ม ทำให้ได้ค่าการดูดกลืนแสงที่สูง ในทางตรงกันข้ามหากในการทดสอบมีเซลล์ที่มีชีวิตจำนวนน้อยสีของสารละลายที่เกิดขึ้นก็จะมีสีอ่อนทำให้ได้ค่าการดูดกลืนแสงที่ต่ำ ดังกลไกในรูปที่ 20 (85)



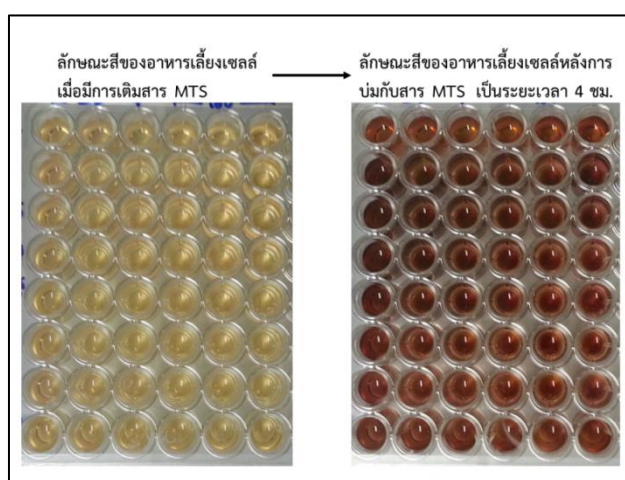
รูปที่ 20 การทำปฏิกิริยาของสาร MTS ในการเกิดสารฟอร์มazan (85)

วิธีการทดลอง (61, 79)

ทำการทดสอบใน 96 well flat bottom cell culture plate โดยการเตรียมเซลล์ U937 จำนวน 5,000 เซลล์ต่อ 1 หลุมปริมาตรต่อหลุมเท่ากับ 100 ไมโครลิตร อาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเซลล์คือ RPMI-1640 ที่มีสารเติม 10% FBS เตรียมสารสกัดที่ต้องการใช้ในการทดสอบให้มีความเข้มข้นของสารสกัดตามต้องการอยู่ในช่วง 0-2.5 mg/ml ด้วย RPMI-1640 (สารสกัดเอทานอลจากเห็ดทั้ง 3 ชนิด, สารสกัดชั้นน้ำของเห็ดนางฟ้าภูฐานทั้ง 4 สารสกัด และสารสกัดชั้นน้ำของเห็ดหูหนูที่สกัดด้วยอุณหภูมิตั้ง 4, 22 และ 50 องศาเซลเซียส จะทำการทดสอบที่ความเข้มข้นสุดท้ายในหลุมทดสอบเท่ากับ 0, 0.008, 0.016, 0.031, 0.063, 0.125, 0.25 และ 0.5 mg/ml สำหรับสารสกัดชั้นน้ำของเห็ดเป่าฮื้อทั้ง 4 สารสกัด และสารสกัดชั้นน้ำของเห็ดหูหนูที่สกัดด้วยอุณหภูมิตั้ง 100 องศาเซลเซียสจะทำการทดสอบที่ความเข้มข้นสุดท้ายในหลุมทดสอบเท่ากับ 0, 0.008, 0.016, 0.031, 0.063, 0.125, 0.25, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 และ 2.5 mg/ml) ทำการเติมสารสกัดที่เตรียมไว้ปริมาตร 100 ไมโครลิตรลงไปเซลล์ U937 และเติมอาหาร RPMI-1640 ลงไปในเซลล์กลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับสารสกัด (negative control) เพาะเลี้ยงเซลล์กับสารสกัดที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในตู้บ่มชนิด CO<sub>2</sub> incubator ที่มีแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ปริมาณ 5% โดยทำการตรวจวัดผลของสารสกัดที่มีต่อการเจริญของเซลล์ U937 เมื่อทำการเลี้ยงที่ระยะเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมงด้วย MTS หรือ MTT

วิธีการตรวจวัดปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตด้วยเทคนิค MTS หรือ MTT (85)

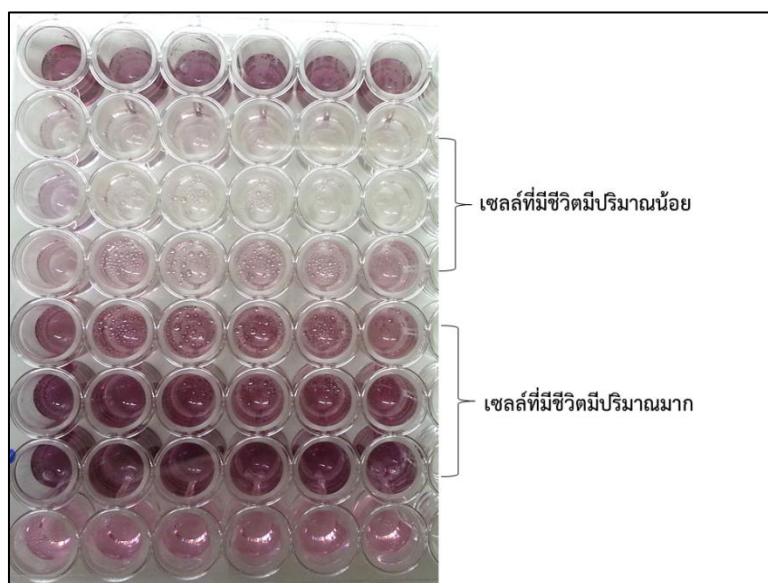
การตรวจวัดปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตด้วยเทคนิค MTS ทำโดยเติมสาร MTS ปริมาตร 20 ไมโครลิตรต่อหลุม จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในตู้บ่มชนิด CO<sub>2</sub> incubator ที่มีแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ปริมาณ 5% เป็นระยะเวลา 4 ชั่วโมง เมื่อครบระยะเวลานำเซลล์ทำการปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกส่วนของตัวเซลล์ออกจากน้ำเลี้ยงเซลล์โดยใช้เครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 1,500 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 5 นาที แล้วจึงทำการดูเฉพาะส่วนของน้ำเลี้ยงเซลล์ออกมาเพื่อนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง microplate reader ที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร



รูปที่ 21 ลักษณะสีของอาหารเลี้ยงเซลล์เมื่อเติมสาร MTS ก่อนและหลังการเกิดปฏิกิริยาระหว่างสาร MTS กับเซลล์ที่มีชีวิต

สำหรับการตรวจวัดปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตด้วยเทคนิค MTT ทำการเตรียมสาร MTT ละลายใน phosphate buffer saline (PBS) pH 7.4 ที่ความเข้มข้น 5 mg/ml จากนั้นทำไปกรองด้วยกระดาษกรองขนาด 0.2 ไมโครเมตร และแบ่งเก็บในหลอดปริมาตร 1 มิลลิลิตรต่อหลอด ทำการเก็บรักษาสาร MTT ที่เตรียมได้ไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เมื่อทดสอบเซลล์ครบเวลาแล้วจะทำการเติมสาร MTT ปริมาตร 20 ไมโครลิตรต่อหลุม จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในตู้บ่มชนิด CO<sub>2</sub> incubator ที่มีแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ปริมาณ 5% เป็นระยะเวลา 4 ชั่วโมง เมื่อครบระยะเวลาทำการปั่นเหวี่ยงจานเพาะเลี้ยงเซลล์เพื่อแยกส่วนของตัวเซลล์ออกจากน้ำเลี้ยงเซลล์โดยใช้เครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 1,500 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 5 นาที แล้วจึงทำการดูเฉพาะส่วนของน้ำเลี้ยงเซลล์และเติมสารไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (dimethylsulfoxide, DMSO) ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อหลุม เพื่อละลายสารฟอร์มazanที่อยู่ภายในตัวเซลล์ออกมา จากนั้นทำการปั่นเหวี่ยง

เพื่อแยกส่วนของตัวเซลล์ออกจากน้ำเลี้ยงเซลล์โดยใช้เครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 1,500 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 5 นาที และดูเฉพาะส่วนของสารละลายออกมาทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วย เครื่อง microplate reader ที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร



รูปที่ 22 ลักษณะสีของอาหารเลี้ยงเซลล์ที่เปลี่ยนแปลงหลังการละลายสารฟอร์มาซานออกจากตัวเซลล์ที่มีชีวิต เมื่อทำการทดสอบด้วยสาร MTT

ในการรายงานผลจะทำการคำนวณค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้จาก 2 เทคนิคนี้ เป็นค่า cell viability (% of control) ตามสูตร

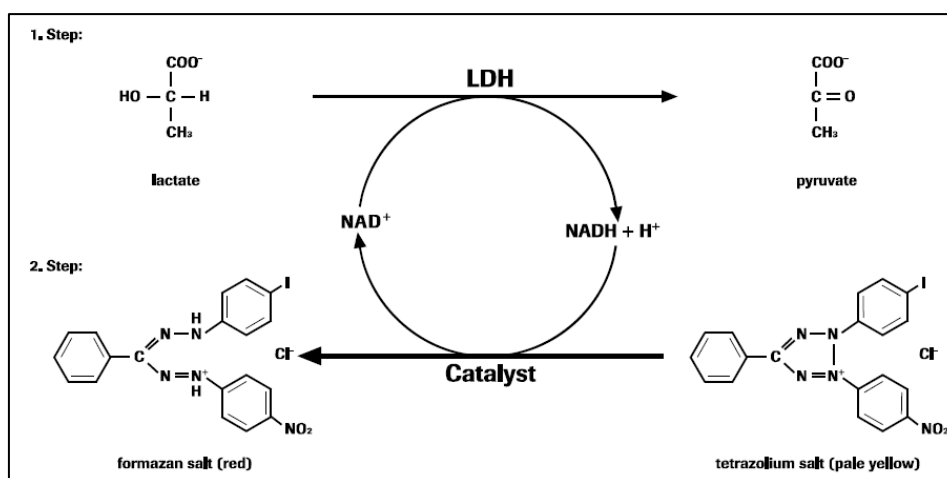
$$\text{Cell viability (\% of control)} = \frac{\text{Absorbance sample}}{\text{Absorbance control}} \times 100$$

ในการทดสอบขั้นตอนนี้เป็นการศึกษาผลของสารสกัดจากเห็ดทั้ง 3 ชนิด ที่มีต่อการเจริญของเซลล์ U937 โดยหากสารสกัดจากเห็ดที่นำมาทดสอบมีผลยับยั้งการเจริญของเซลล์ U937 จึงจะนำมาทำการตรวจวัดความเป็นพิษต่อเซลล์ด้วยการวัดกิจกรรมของเอนไซม์ lactate dehydrogenase ที่หลั่งออกมาจากเซลล์ ในทางตรงกันข้าม หากสารสกัดจากเห็ดที่นำมาทดสอบไม่ยับยั้งการเจริญของเซลล์ และ/หรืออาจกระตุ้นให้เซลล์มีการเจริญและแบ่งตัวเพิ่มมากขึ้น จะนำสารสกัดนั้นมาทำการศึกษาฤทธิ์ปรับภูมิคุ้มกันที่เกี่ยวกับการต้านอาการอักเสบในเซลล์แมคโครฟาจต่อไป

3.3.6 การตรวจวัดความเป็นพิษของสารสกัดจากเห็ดต่อเซลล์โมโนไซต์ U937 โดยการตรวจวัด Lactate dehydrogenase (LDH) activity

#### หลักการ

ในสภาวะปกติ LDH จะอยู่ภายในไซโทพลาซึมของเซลล์ จะหลั่งออกมาภายนอกเซลล์ หากเซลล์ตายหรือเยื่อหุ้มเซลล์เกิดความเสียหาย การตรวจวัดปริมาณ LDH activity ที่อยู่ในอาหารเลี้ยงเซลล์ภายหลังการทดสอบสามารถบ่งชี้สภาวะของเซลล์ได้ หากสารที่นำมาทำการทดสอบมีความเป็นพิษต่อเซลล์จะส่งผลทำให้เซลล์ตาย และเมื่อตรวจวัดปริมาณ LDH activity ก็จะมีพบเอนไซม์ในปริมาณสูง (86) โดยในการตรวจวัดปริมาณ LDH activity จะทำการตรวจวัดโดยใช้ชุดน้ำยาสำเร็จรูป Cytotoxic detection kit (LDH) ของบริษัทโรช ไลฟ์ ซายน์ (Roche life science) กลไกการเกิดปฏิกิริยาของน้ำยาดังรูปที่ 23 ซึ่งหากในน้ำเลี้ยงเซลล์มี LDH จะเกิดการออกซิไดซ์ lactate ที่อยู่ในน้ำยาทดสอบให้เปลี่ยนเป็น pyruvate ซึ่งในกระบวนการออกซิไดซ์จะทำให้  $\text{NAD}^+$  ถูกรีดิวซ์ไปเป็น  $\text{NADH}/\text{H}^+$  จากนั้นตัวเร่งปฏิกิริยาที่อยู่ในน้ำยาทดสอบจะรับเอาประจุ  $\text{H}/\text{H}^+$  จาก  $\text{NADH}/\text{H}^+$  ไปรีดิวซ์สาร tetrazolium ที่มีลักษณะสีเหลืองในน้ำยาทดสอบให้เกิดเป็นสารฟอร์มาซานที่มีสีแดง จากนั้นจึงทำการตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงต่อไป (87)



รูปที่ 23 กลไกการเกิดปฏิกิริยาของน้ำยาที่ใช้ในการทดสอบหาปริมาณ LDH activity (87)

#### วิธีการทดลอง (87)

ทำการทดสอบใน 96 well flat bottom cell culture plate โดยการเตรียมเซลล์ U937 จำนวน 5,000 เซลล์ต่อ 1 หลุม ปริมาตรต่อหลุมเท่ากับ 100 ไมโครลิตร เพราะเลี้ยงเซลล์ใน RPMI-1640 ที่มีการเติม FBS ที่ความเข้มข้น 10% เจือจางสารสกัดที่ต้องการใช้ในการทดสอบด้วยอาหาร RPMI-1640 ให้มีความเข้มข้นของสารสกัดเท่ากับที่ใช้ในการทดสอบผลของสารสกัดที่มีต่อการเจริญของเซลล์ U937 ดังรายละเอียดในข้อ 3.3.5 จากนั้นเติมสารสกัดปริมาตร 100 ไมโครลิตร ต่อหลุมลงไปในเซลล์ U937 ที่เตรียมไว้ และเติมอาหาร RPMI-1640 ลงไปในเซลล์กลุ่มควบคุมทั้ง 2 กลุ่มคือกลุ่มที่ไม่ได้รับสารสกัด (low control) และกลุ่มที่ได้รับการเติมสาร triton X-100 (high control) จากนั้นทำการเพาะเลี้ยงเซลล์กับสารสกัดที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในตู้บ่มชนิด CO<sub>2</sub> incubator ที่มีแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ปริมาณ 5% เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง สำหรับเซลล์ในกลุ่มควบคุมที่เป็น positive control ทำการบ่มเป็นระยะเวลา 23 ชั่วโมง 15 นาที จากนั้นเติมสารละลาย 2% triton X-100 ที่ละลายในอาหาร RPMI-1640 ลงไป 100 ไมโครลิตรต่อ 1 หลุม และนำไปบ่มต่อเป็นระยะเวลา 45 นาที

เมื่อบ่มเซลล์ครบระยะเวลา นำเซลล์ไปทำการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 250x g เป็นระยะเวลา 10 นาที จากนั้นดูดส่วนของสารละลายในหลุมทดสอบออกมาปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อหลุม เพื่อนำมาตรวจวัดปริมาณ LDH activity โดยใช้สารทดสอบในชุด Cytotoxic detection kit



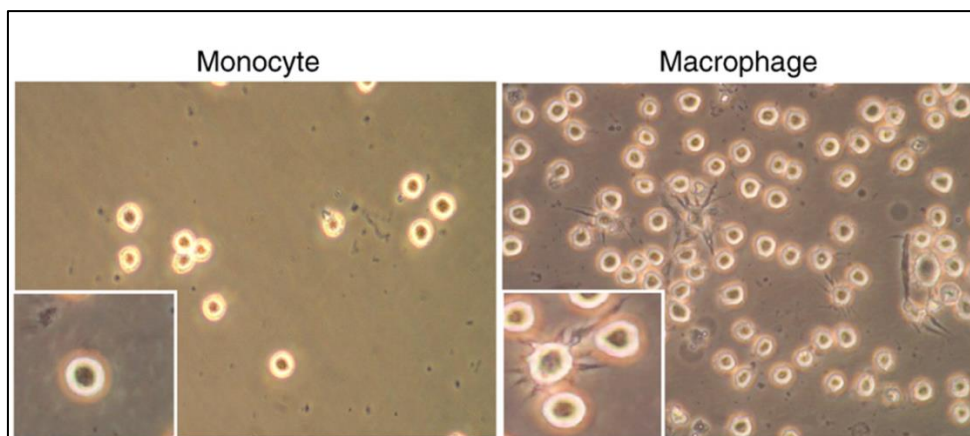
(LDH) และทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร คำนวณหาค่า Cytotoxicity (%) ตามสูตร

$$\text{Cytotoxicity (\%)} = \frac{\text{Experiment value} - \text{Low control}}{\text{High control} - \text{Low control}} \times 100$$

3.3.7 การตรวจวัดฤทธิ์ปรับภูมิคุ้มกันของสารสกัดจากเห็ดต่อการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของ เซลล์ U937

#### หลักการ

เซลล์แมคโครฟาจเป็นเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันที่พัฒนามาจากเซลล์โมโนไซต์ที่ได้รับการกระตุ้น โดยจะมีประสิทธิภาพในการกำจัดสิ่งแปลกปลอมที่เข้ามาสู่ภายในร่างกายด้วยวิธีการจับกินได้ดีกว่าเซลล์โมโนไซต์ นอกจากนี้เซลล์แมคโครฟาจยังเป็นเซลล์ที่มีบทบาทสำคัญอย่างมากในระบบภูมิคุ้มกันที่มีมาตั้งแต่กำเนิด (innate immunity) เช่น ช่วยในการเข้ากำจัดหรือทำลายสิ่งแปลกปลอมที่เข้ามาภายในร่างกาย, ช่วยเพิ่มการสร้างเอนไซม์ สารเคมี และไซโตไคน์ชนิดต่างๆ เพื่อกระตุ้นการทำงานของเซลล์ชนิดอื่นๆ ในระบบภูมิคุ้มกัน และยังช่วยในการนำเสนอแอนติเจนต่อ T lymphocyte อีกด้วย (13) โดยในการทดลองจะทำการเปรียบเทียบผลการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของ เซลล์ U937 เมื่อได้รับสารสกัดเห็ดเปรียบเทียบกับ การเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลล์ U937 ในกลุ่มควบคุมที่ได้รับการเติมสาร Phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA) ซึ่งสาร PMA ที่ให้กับเซลล์โมโนไซต์จะไปกระตุ้นการทำงานของโปรตีน protein kinase C (PKC) ส่งผลให้เซลล์มีการสร้างโปรตีนช่วยยึดเกาะ (cell adhesion molecule) ในกลุ่มของ  $\beta_2$  integrins เช่น CD11a, CD11c, CD18 และ CD11b เซลล์จึงสามารถยึดเกาะที่พื้นผิวภาชนะเพาะเลี้ยงได้ นอกจากนั้นจะทำให้เซลล์เกิดการเปลี่ยนแปลงฟิโนไทป์และเกิดการแสดงออกของโปรตีนบนผิวเซลล์โดยเฉพาะชนิด CD11b ที่เพิ่มสูงขึ้น ทำให้เซลล์มีการเจริญไปเป็นเซลล์แมคโครฟาจได้ โดยลักษณะของเซลล์โมโนไซต์ U937 ก่อนและหลังการเปลี่ยนแปลงเมื่อได้รับสารกระตุ้น PMA ดังแสดงในรูปที่ 24 (33, 34)



รูปที่ 24 ลักษณะเซลล์โมโนไซต์ U937 ที่เกิดการเปลี่ยนแปลงเมื่อได้รับสาร PMA (ซ้าย) เซลล์โมโนไซต์ U937 ปกติก่อนได้รับสาร PMA (ขวา) เซลล์โมโนไซต์ U937 ที่เกิดการเจริญไปเป็นเซลล์แมคโครฟาจ (34)

สารสกัดเห็ดที่นำมาทดสอบคือสารสกัดเห็ดที่ไม่ยับยั้ง และ/หรือกระตุ้นการเจริญของ U937 โดยในการศึกษาผลของสารสกัดเห็ดต่อการเจริญและเปลี่ยนแปลงรูปร่างของ U937 จะทำการวิเคราะห์ผลโดยดูการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลล์ผ่านกล้องจุลทรรศน์ชนิดหัวกลับ (Inverted microscope)

#### วิธีการทดลอง (31)

เตรียมเซลล์โมโนไซต์ U937 จำนวน  $5 \times 10^5$  เซลล์ ปริมาตรเท่ากับ 500 ไมโครลิตรต่อ 1 หลุม เตรียมลงใน 12 well flat bottom cell culture plate โดยใช้อาหาร RPMI-1640 ที่มีสารเติม FBS ที่ความเข้มข้น 10% จากนั้นทำการเจือจางสารสกัดเห็ดให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 1, 0.5 และ 0.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิตร ด้วยอาหาร RPMI-1640 และเติมสารสกัดเห็ดลงใน U937 ที่เตรียมไว้ ปริมาตร 500 ไมโครลิตรต่อหลุม (ความเข้มข้นสุดท้ายของสารสกัดเห็ดในหลุมทดสอบจะเท่ากับ 0.5, 0.25 และ 0.125 มิลลิกรัมต่อมิลลิตร) ในเซลล์กลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับสารสกัด (negative control) จะทำการเติมอาหาร RPMI-1640 ที่ปราศจากการเติม FBS ปริมาตร 500 ไมโครลิตรต่อหลุม และในเซลล์กลุ่มควบคุม (positive control) จะเติม PMA ที่ความเข้มข้น 2 ไมโครโมลาร์ ปริมาตร 500 ไมโครลิตรต่อหลุม (ความเข้มข้นสุดท้ายของสารในหลุมทดสอบจะเท่ากับ 1 ไมโครโมลาร์) จากนั้นทำการบ่มเซลล์ที่เตรียมไว้เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในตู้บ่มชนิด CO<sub>2</sub> incubator ที่มีแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ปริมาณ 5%

เมื่อครบระยะเวลาตามที่กำหนดทำการถ่ายรูปรูปร่างที่ผลการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลล์ก่อนทำการล้างเซลล์ที่ไม่ยึดเกาะออก โดยทำการดูดเอาอาหารเลี้ยงเซลล์ออก และล้างด้วย phosphate buffer saline (PBS) pH 7.4 ปริมาตร 1,000 ไมโครลิตรต่อหลุม จำนวน 1 ครั้ง จากนั้นทำการดูผลภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิดส่องกลับ โดยดูลักษณะรูปร่างของเซลล์ การเกาะกลุ่มของเซลล์ และการยึดเกาะกับพื้นผิวภาชนะเพาะเลี้ยง บันทึกรูปร่างของเซลล์ก่อนและหลังถูกล้างด้วย PBS เปรียบเทียบการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ที่ได้รับสารสกัดกับเซลล์ในกลุ่มควบคุม

3.3.8 การตรวจวัดฤทธิ์ของสารสกัดจากเห็ดต่อเซลล์ U937 ในการสร้างไซโตไคน์ TNF- $\alpha$  ด้วยเทคนิค sandwich ELISA

#### หลักการ

ในเซลล์โมโนไซต์ที่ได้รับการกระตุ้นจะทำให้เกิดการสร้างไซโตไคน์ชนิดต่างๆ ออกมาได้หลายชนิด ตัวอย่างเช่น TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  และ IL-6 ซึ่งไซโตไคน์เหล่านี้ส่วนใหญ่จะเป็นไซโตไคน์ในกลุ่มของ Pro-inflammatory cytokines ที่มีบทบาทสำคัญในการเกิดกระบวนการอักเสบ (19) และมีหน้าที่อื่นๆ ที่มีความสำคัญ ตัวอย่างเช่น TNF- $\alpha$  นอกจากจะช่วยกระตุ้นให้เกิดการสร้างไซโตไคน์และโปรตีนชนิดต่างๆ ที่มีผลกระตุ้นกระบวนการอักเสบแล้ว ในขณะเดียวกัน TNF- $\alpha$  สามารถชักนำให้เกิดอะพอพโทซิสของเซลล์มะเร็งได้ ดังนั้นจึงมีผู้ทำการศึกษาฤทธิ์ของ TNF- $\alpha$  ในการรักษาผู้ป่วยโรคมะเร็ง และพบว่าการให้ยารักษามะเร็งร่วมกับ TNF- $\alpha$  จะช่วยให้การรักษามีประสิทธิภาพที่ดีขึ้น (36) โดยในการทดลองนี้ผู้วิจัยทำการศึกษามูลของสารสกัดจากเห็ดต่อการสร้างไซโตไคน์ TNF- $\alpha$  ด้วยเทคนิค ELISA

#### วิธีการทดลอง (88)

##### 3.3.8.1 การศึกษามูลของสารสกัดที่มีต่อการสร้างไซโตไคน์ TNF- $\alpha$ จากเซลล์ U937

เตรียมเซลล์ U937 จำนวน  $1 \times 10^6$  เซลล์ต่อหลุม ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ลงใน 12 well flat bottom cell culture plate โดยใช้อาหาร RPMI-1640 ที่มีการเติม FBS ที่ความเข้มข้น 10% จากนั้นทำการเจือจางสารสกัดให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 1, 0.5 และ 0.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ด้วยอาหาร RPMI-1640 และเติมสารสกัดที่เตรียมได้ลงในเซลล์ U937 ที่เตรียมไว้ ปริมาตร 500 ไมโครลิตรต่อหลุม (ความเข้มข้นสุดท้ายของสารสกัดในหลุมทดสอบจะเท่ากับ 0.5, 0.25 และ 0.125 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ในเซลล์กลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับสารสกัด (negative control)

จะทำการเติมอาหาร RPMI-1640 ที่ปราศจากการเติม FBS ปริมาตร 500 ไมโครลิตรต่อหลุม และ เซลล์กลุ่มควบคุมที่ได้รับสารกระตุ้น PMA จะทำการเติมสาร PMA ที่ความเข้มข้น 2 ไมโครโมลาร์ ปริมาตร 500 ไมโครลิตรต่อหลุม โดยทำการเจือจางด้วยอาหาร RPMI-1640 ที่ปราศจากการเติม FBS (ความเข้มข้นสุดท้ายของสารในหลุมทดสอบจะเท่ากับ 1 ไมโครโมลาร์) ให้มีความจากนั้นบ่ม เซลล์ที่เตรียมไว้เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในตู้บ่มชนิด CO<sub>2</sub> incubator ที่มีแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ปริมาณ 5% เมื่อครบระยะเวลาทำการปั่นแยกตัวเซลล์ออกจากส่วนของ น้ำเลี้ยงเซลล์ และนำเอา น้ำเลี้ยงเซลล์ที่เก็บได้มาวัดปริมาณไซโตไคน์ที่สนใจด้วยชุดตรวจวัดปริมาณ ไซโตไคน์ชนิด TNF- $\alpha$  ด้วยเทคนิค ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay)

### 3.3.8.2 การศึกษาผลการทำงานร่วมกันของสารสกัดและสาร PMA ที่มีต่อการสร้าง ไซโตไคน์ TNF- $\alpha$ จากเซลล์ U937

เตรียมเซลล์ U937 จำนวน  $1 \times 10^6$  เซลล์ต่อหลุม ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ลงใน 12 well flat bottom cell culture plate โดยใช้อาหาร RPMI-1640 ที่มีการเติม FBS ที่ ความเข้มข้น 10% จากนั้นทำการเจือจางสารสกัดให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 2, 1 และ 0.5 มิลลิกรัมต่อ มิลลิตร ด้วยอาหาร RPMI-1640 และเติมสารสกัดที่เตรียมได้ลงในเซลล์ U937 ที่เตรียมไว้ปริมาตร 250 ไมโครลิตรต่อหลุม (ความเข้มข้นสุดท้ายของสารสกัดในหลุมทดสอบจะเท่ากับ 0.5, 0.25 และ 0.125 มิลลิกรัมต่อมิลลิตร) ในเซลล์กลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับสารสกัด (negative control) และเซลล์ กลุ่มควบคุมที่ได้รับสารกระตุ้น PMA จะทำการเติมอาหาร RPMI-1640 ที่ปราศจากการเติม FBS ปริมาตร 250 ไมโครลิตรต่อหลุม จากนั้นทำการบ่มเซลล์ที่เตรียมไว้เป็นระยะเวลา 4 ชั่วโมง ที่ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในตู้บ่มชนิด CO<sub>2</sub> incubator ที่มีแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ปริมาณ 5%

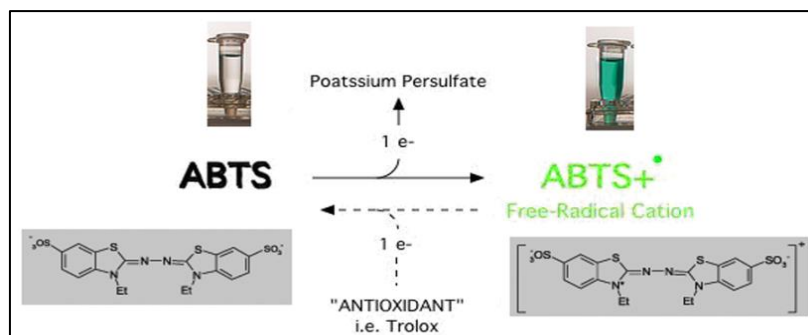
เมื่อครบระยะเวลาตามที่ต้องการ จะทำการเติม PMA ที่ความเข้มข้น 4 ไมโครโมลาร์ ปริมาตร 250 ไมโครลิตรต่อหลุม (ความเข้มข้นสุดท้ายของสารในหลุมทดสอบจะเท่ากับ 1 ไมโครโมลาร์) ลงในหลุมของเซลล์ที่เตรียมไว้ทุกหลุม ยกเว้นในหลุมที่เป็นกลุ่มควบคุมซึ่งจะไม่ได้รับ สารสกัดหรือสารกระตุ้นใดๆ จะทำการเติมอาหาร RPMI-1640 ปริมาตร 250 ไมโครลิตรต่อหลุม จากนั้นบ่มเซลล์ที่เตรียมไว้เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในตู้บ่มชนิด CO<sub>2</sub> incubator ที่มีแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ปริมาณ 5% เมื่อครบระยะเวลาทำการปั่นแยกตัวเซลล์ออก จากส่วนของน้ำเลี้ยงเซลล์ และนำเอา น้ำเลี้ยงเซลล์ที่เก็บได้มาวัดปริมาณไซโตไคน์ที่สนใจด้วยชุด ตรวจวัดปริมาณไซโตไคน์ด้วยเทคนิค ELISA

### 3.3.9 การตรวจวัดปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดเห็ด

ตรวจวัดปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดเห็ดจากการสกัดด้วยเอทานอลและน้ำที่อุณหภูมิต่างๆ กัน โดยตรวจวัดด้วย Folin-Ciocalteu's method และตรวจวัดฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยเทคนิค Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) assay

สำหรับเทคนิคการตรวจวิเคราะห์แบบ Folin-Ciocalteu's method เป็นเทคนิคที่ใช้ในการตรวจวัดปริมาณของสารในกลุ่มฟีนอลที่มีในตัวอย่าง หากในตัวอย่างมีสารฟีนอลก็จะเกิดกระบวนการรีดิวส์สารทดสอบให้เปลี่ยนสีจากสีเหลืองไปเป็นสีน้ำเงิน ซึ่งปฏิกิริยาจะเกิดขึ้นโดยสาร Folin-Ciocalteu ซึ่งใช้ในการทดสอบจะทำการเคลื่อนย้ายอิเล็กตรอนในโมเลกุลของสารฟีนอลออกมา และทำให้เกิดปฏิกิริยาจับกันอยู่ในรูปสารประกอบของ phosphomolybdic และ phosphotungstic acid ซึ่งสารประกอบดังกล่าวนี้จะมีสีน้ำเงิน จากนั้นทำการเปรียบเทียบปริมาณสารฟีนอลที่พบในตัวอย่างกับสารมาตรฐานคือกรดแกลลิก โดยจะรายงานผลในหน่วยของ gallic acid equivalent (GAE) (89)

การตรวจวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วย Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) assay จะเป็นการตรวจหาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยดูจากสีของสารทดสอบที่เปลี่ยนแปลงไป โดยสาร 2,2'-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS+) จะทำปฏิกิริยากับ Potassium persulfate ทำให้เกิดเป็นสารละลายเขียว แต่เมื่อมีสารต้านอนุมูลอิสระที่สามารถให้ electron transfer reaction ได้ สีของสารละลายก็จะเปลี่ยนกลับมาเป็นสีแดง ทำให้สีเขียวที่เกิดขึ้นจางลง และสีที่จางลงจะเป็นสัดส่วนกับปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระที่เพิ่มขึ้น ดังปฏิกิริยาในรูปที่ 25 โดยในการรายงานผลจะรายงานในหน่วยของ Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) (90)



รูปที่ 25 ปฏิกริยาที่เกิดขึ้นเมื่อทำการตรวจวัดฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยเทคนิค Trolox equivalent antioxidant capacity assay (90)

3.3.10 การวิเคราะห์องค์ประกอบของสารสกัดเห็ดด้วยเทคนิค Ultra-high performance liquid chromatography-high resolution mass spectroscopy (UPLC-HRMS)

เตรียมสารสกัดเห็ดด้วยน้ำและเอทานอลจากดอกเห็ดนางฟ้าภูฐาน, ดอกเห็ดเป๋าฮื้อ และดอกเห็ดหูหนู นำส่งเพื่อทำการวิเคราะห์องค์ประกอบของสารสกัดเห็ดที่สถาบัน Indian Institute of Chemical Technology (IICT) ณ ประเทศอินเดีย ทำการตรวจหาองค์ประกอบด้วยเทคนิค UPLC-HRMS ด้วยเครื่อง Q-TOF B.05.01 (B5125.1) รุ่น 6200 series TOF/6500 series จากนั้นนำผลที่ได้จากการตรวจวิเคราะห์มาทำการจัดหมวดหมู่ชนิดของสารที่พบในสารสกัดเห็ด โดยใช้ข้อมูลของสารเคมีจากฐานข้อมูลออนไลน์ ได้แก่ The Metabolomics Workbench, Pubchem และ The Human Metabolome Database (HMDB)

Ultra performance liquid chromatography หรือ UPLC พัฒนามาจากเทคนิค high performance liquid chromatography (HPLC) โดยการใช้เทคนิค UPLC ในการตรวจวิเคราะห์จะช่วยลดระยะเวลาในการตรวจวิเคราะห์ และความละเอียดในการตรวจวิเคราะห์จะสูงกว่าการใช้เทคนิค HPLC แบบเดิม เนื่องจากองค์ประกอบของอนุภาคในส่วนของ stationary phase จะมีขนาดที่เล็กกว่า 2 ไมโครเมตร ซึ่งอนุภาคในส่วนของ stationary phase ของ HPLC จะมีขนาดอยู่ที่ประมาณ 3-5 ไมโครเมตร จากอนุภาคของ stationary phase ที่มีขนาดเล็กลง ดังนั้นจึงมีผลให้อัตราการไหลและแรงดันมีค่าสูง ส่วนประกอบหลักๆ ของ UPLC จะประกอบด้วย 3 ส่วน ได้แก่ ส่วนที่ใช้ในการฉีดตัวอย่างเข้าเครื่อง (sample injection), ส่วนของคอลัมน์ และส่วนที่ทำหน้าที่ตรวจวิเคราะห์ (detector) (91) โดยเทคนิคที่ใช้วิเคราะห์สารในงานวิจัยนี้คือ UPLC-HRMS ซึ่งจะมีลักษณะคล้ายกับเทคนิค UPLC ดังที่กล่าวมา แต่จะเพิ่มส่วนของ mass spectrometry เข้ามาช่วย

ในการวิเคราะห์สาร ซึ่งจะให้ได้ผลการวิเคราะห์ที่มีความไว (sensitivity) ที่สูงขึ้น ซึ่งในงานวิจัยที่ต้องมีการวิเคราะห์องค์ประกอบของสารที่สนใจ ก็พบว่ามีการนำเทคนิคนี้ไปใช้ในการวิเคราะห์อย่างแพร่หลาย (92)

### 3.3.11 การวิเคราะห์ข้อมูลและสถิติที่ใช้ในการศึกษา

ข้อมูลที่แสดงผลที่ได้จากการทดลองจะแสดงเป็นค่าเฉลี่ย  $\pm$  ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (mean  $\pm$  S.D.) และการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติจะทำการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียว (one-way ANOVA) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ( $p < 0.05$ )



## บทที่ 4

### ผลการทดลอง

จากการทดสอบผลของสารสกัดน้ำและเอทานอลจากเห็ดนางฟ้าภูฐาน เห็ดเป่าฮื้อ และเห็ดหูหนูต่อการเจริญของเซลล์ U937 พบว่าสารสกัดทั้งหมดมีผลต่อการเจริญและแบ่งตัวของเซลล์ U937 แตกต่างกันไป ผลการทดลองมีรายละเอียด ดังนี้

#### 4.1 ผลการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดเอทานอลจากเห็ดนางฟ้าภูฐาน เห็ดเป่าฮื้อ และเห็ดหูหนู

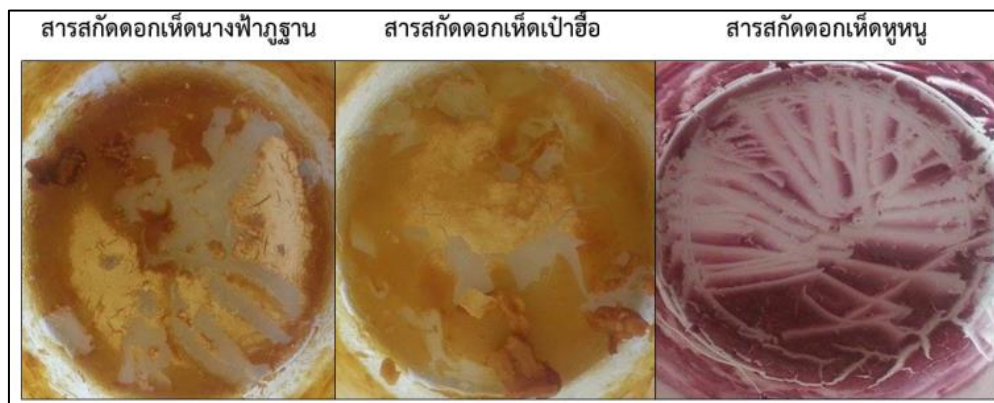
จากการสกัดเห็ดนางฟ้าภูฐาน (*P. sajor-caju*) เห็ดเป่าฮื้อ (*P. abalonus*) และเห็ดหูหนู (*A. auricula-judae*) ด้วยสารละลายเอทานอล พบว่าเห็ดเป่าฮื้อจะให้สารสกัดชั้นเอทานอลออกมาในปริมาณสูงสุด คิดเป็นร้อยละ 6.395 ของน้ำหนักดอกเห็ดแห้ง รองลงมาคือเห็ดนางฟ้าภูฐานและเห็ดหูหนู โดยมีปริมาณสารที่สกัดได้คิดเป็นร้อยละ 3.698 และ 2.405 ของน้ำหนักดอกเห็ดแห้งตามลำดับ โดยผลของสารสกัดที่ได้ดังแสดงในตารางที่ 4

ตารางที่ 4 ลักษณะทางกายภาพและ yields (%w/w) ของสารสกัดจากเห็ดนางฟ้าภูฐาน เห็ดเป่าฮื้อ และเห็ดหูหนู ที่สกัดด้วยด้วยเอทานอล

ชนิดของเห็ด	ลักษณะของสารสกัด	Yield (%w/w)
<i>P. abalonus</i>	ลักษณะเหนียว สีเหลือง	6.395
<i>P. sajor-caju</i>	ลักษณะเหนียว สีเหลืองเข้ม	3.698
<i>A. auricula-judae</i>	ลักษณะเหนียว สีชมพูเข้ม	2.405

ซึ่งสารสกัดชั้นเอทานอลจากดอกเห็ดแต่ละชนิดจะมีสีที่แตกต่างกันไปตามชนิดของเห็ดที่นำมาใช้ โดยสีของสารสกัดที่ได้ ดังแสดงในรูปที่ 26



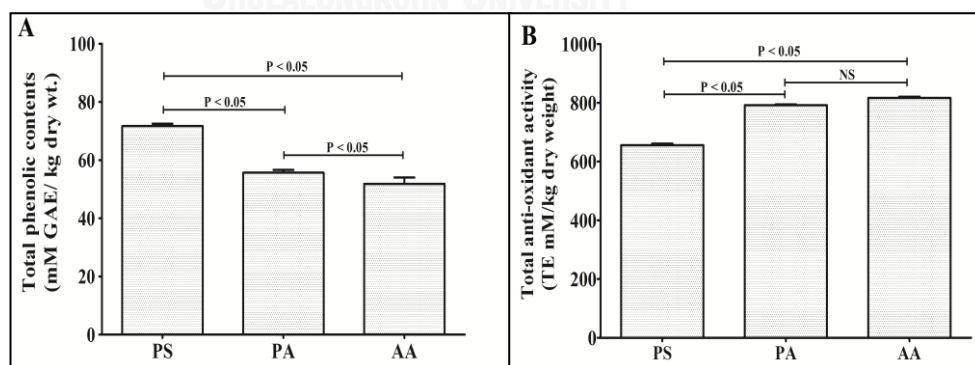


รูปที่ 26 ลักษณะสีของสารสกัดเอทานอลจากเห็ดนางฟ้าภูฐาน เห็ดเป่าฮือ และเห็ดหูหนู

หลังจากนั้น นำสารสกัดเอทานอลที่ได้จากเห็ดทั้ง 3 ชนิดนี้มาทำการศึกษาฤทธิ์ด้านต่างๆ พบว่าผลที่ได้เป็นดังนี้

#### 4.1.1 การตรวจวัดปริมาณสารฟีนอลและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัด

จากการตรวจวัดปริมาณสารฟีนอลและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดเอทานอลจากเห็ดทั้ง 3 ชนิด ผลที่ได้ดังแสดงในรูปที่ 27A สารฟีนอลที่พบในสารสกัดเอทานอลจากเห็ดนางฟ้าภูฐานจะมีปริมาณสูงที่สุดคิดเป็น  $71.77 \pm 0.83$  GAE mM/kg dried weight สารสกัดเอทานอลที่มีปริมาณของสารฟีนอลรองลงมาได้แก่ เห็ดเป่าฮือ และในเห็ดหูหนูจะพบสารฟีนอลน้อยที่สุด โดยปริมาณสารฟีนอลที่พบคิดเป็น  $55.70 \pm 0.93$  และ  $51.83 \pm 2.19$  ตามลำดับ



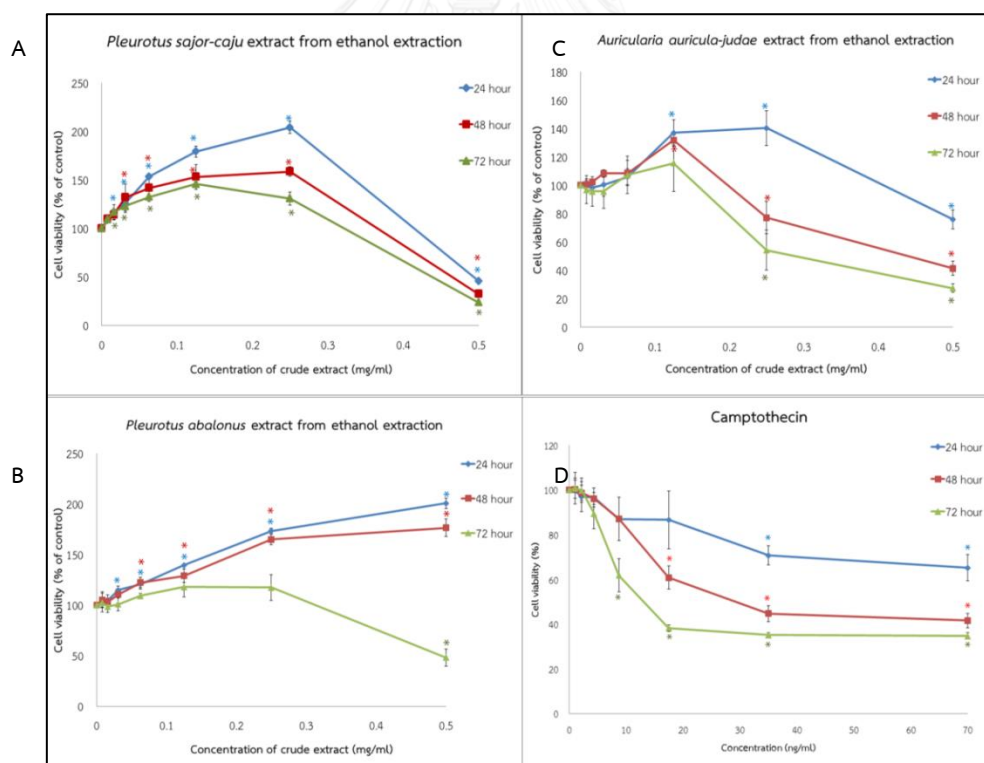
รูปที่ 27 กราฟแสดงปริมาณสารฟีนอล (A) และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (B) ที่พบในสารสกัดเอทานอลของเห็ด

นางฟ้าภูฐาน (PS), เห็ดเป่าฮือ (PA) และเห็ดหูหนู (AA) (ข้อมูลที่แสดงเป็น ค่าเฉลี่ย  $\pm$  ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของข้อมูลที่ได้จากการทดลอง โดยทุกการทดลองจะทำซ้ำจำนวน 3 ครั้ง ระดับนัยสำคัญ  $p < 0.05$ . NS หมายถึงไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติทางสถิติ GAE หมายถึง ปริมาณของกรดแกลลิก (gallic acid equivalent) และ TE หมายถึง ปริมาณของโทรล็อกที่ใช้ในการออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (trolox equivalent)

และจากการตรวจวัดฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดทั้ง 3 ชนิดนี้ พบว่า สารสกัดที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุดได้แก่ สารสกัดเอทานอลจากเห็ดหูหนู และสารสกัดเอทานอลจากเห็ดเป่าฮื้อ โดยจะมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระคิดเป็น  $816.75 \pm 3.95$  และ  $792.25 \pm 2.41$  TE mM/kg dried weight ตามลำดับ สำหรับสารสกัดจากดอกเห็ดนางฟ้าภูฐานจะมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระน้อยที่สุด คิดเป็น  $655.92 \pm 5.25$  TE mM/kg dried weight ดังผลแสดงในรูปที่ 27B

#### 4.1.2 การศึกษาผลของสารสกัดที่มีต่อการเจริญและแบ่งตัวของเซลล์ U937

จากการศึกษาผลของสารสกัดขึ้นเอทานอลของเห็ดทั้ง 3 ชนิด ต่อการเจริญของเซลล์ U937 ด้วยเทคนิค MTS/MTT เปรียบเทียบกับยาที่ใช้ในการรักษาโรคมะเร็ง camptothecin เมื่อทดสอบเป็นเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง พบว่าสารสกัดขึ้นเอทานอลของเห็ดทั้ง 3 ชนิด มีผลต่อการเจริญของเซลล์ U937 แตกต่างกันขึ้นกับชนิดของสาร ความเข้มข้นและเวลาในการทดสอบ โดยผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 28



รูปที่ 28 กราฟแสดงเปอร์เซ็นต์เซลล์ U937 ที่มีชีวิตรอดเมื่อทำการทดสอบกับสารสกัดจากเห็ดทั้ง 3 ชนิดและ camptothecin ที่ความเข้มข้นต่างๆ เมื่อทดสอบเป็นเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง ด้วยเทคนิค MTS/MTT (ทำการทดสอบในแต่ละตัวอย่างซ้ำ 3 ครั้ง จำนวน 3 ครั้งการทดลอง: \* คือ  $p < 0.05$ )

จากรูป 28A เมื่อทดสอบเป็นเวลา 24 ชั่วโมง สารสกัดเอทานอลจากเห็ดนางฟ้าภูฐาน ที่ความเข้มข้นต่ำคือเท่ากับ 0.16-0.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จะช่วยกระตุ้นให้เซลล์ U937 มีการเจริญและแบ่งตัวที่เพิ่มสูงขึ้นได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่เมื่อความเข้มข้นเพิ่มสูงขึ้นเป็น 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จะมีผลทำให้จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตลดลงได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตจะลดลงมากกว่าร้อยละ 50 เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ในกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับสารสกัด และเมื่อระยะเวลาในการทดสอบเพิ่มสูงขึ้นเซลล์ U937 ที่ได้รับสารสกัดจะมีจำนวนลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

และเมื่อทำการทดสอบสารสกัดเอทานอลจากเห็ดเป่าฮื้อกับเซลล์ U937 ที่เวลา 24 ชั่วโมง ความเข้มข้นของสารสกัดเท่ากับ 0.031-0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และที่เวลา 48 ชั่วโมง ความเข้มข้นของสารสกัดเท่ากับ 0.063-0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จะมีผลกระตุ้นให้เซลล์ U937 มีการเจริญและแบ่งตัวเพิ่มมากขึ้นเมื่อความเข้มข้นของสารสกัดเพิ่มสูงขึ้นได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในทางตรงกันข้ามเมื่อทำการทดสอบสารสกัดเอทานอลจากเห็ดเป่าฮื้อที่ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ที่เวลา 72 ชั่วโมง จะส่งผลให้เซลล์ U937 ที่มีชีวิตมีจำนวนที่ลดลงได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ในกลุ่มควบคุม แต่เมื่อใช้สารสกัดที่ความเข้มข้น 0.008-0.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าจะไม่มีผลต่อการเจริญและแบ่งตัวของเซลล์ U937 ดังผลแสดงในรูปที่ 28B

จากผลการทดสอบสารสกัดเอทานอลของเห็ดหูหนูแดงแสดงในรูปที่ 28C พบว่าจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตจะมีการเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อทดสอบสารสกัดเห็ดหูหนูเป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง ที่ความเข้มข้น 0.125-0.25 และ 0.125 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ จะส่งผลให้เซลล์ที่มีชีวิตมีจำนวนที่เพิ่มขึ้นได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเช่นเดียวกัน แต่เมื่อใช้สารสกัดที่ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ทดสอบเป็นเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง พบว่าจะมีผลทำให้เซลล์ที่มีชีวิตมีจำนวนที่ลดลงได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ในกลุ่มควบคุม ซึ่งหากใช้สารสกัดที่ความเข้มข้นต่ำคือ 0.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรจะมีผลทำให้จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตลดลงได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อทำการทดสอบเป็นเวลาตั้งแต่ 48 ชั่วโมงขึ้นไป

และเมื่อทำการทดสอบผลการเจริญและแบ่งตัวเมื่อใช้สารกลุ่มควบคุมคือยา Camptothecin พบว่ายาที่ใช้ในการทดสอบที่ความเข้มข้นต่ำคือระดับนาโนกรัมต่อมิลลิลิตร จะมีผล

ทำให้จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตลดลงได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อความเข้มข้นของยาที่ทดสอบและระยะเวลาทดสอบเพิ่มสูงขึ้น ดังผลการทดลองแสดงในรูปที่ 28D

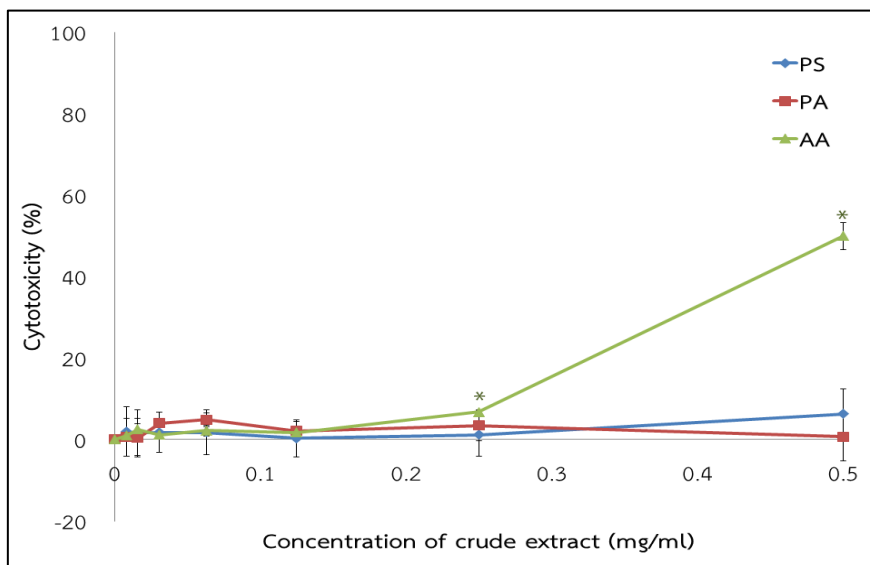
จากผลการทดลองในรูปที่ 28 จึงได้ทำการคำนวณหาค่าความเข้มข้นของสารสกัดจากเห็ดทั้ง 3 ชนิด และยา camptothecin ที่สามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์ได้ที่ร้อยละ 50 ( $IC_{50}$ ) ค่าที่ได้ดังแสดงในตารางที่ 5 โดยจากการคำนวณค่า  $IC_{50}$  จากการทดสอบเป็นเวลา 72 ชั่วโมง พบว่าค่า  $IC_{50}$  ของยา camptothecin คิดเป็น  $11.45 \pm 2.12$  นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร และค่า  $IC_{50}$  ของสารสกัดเอทานอลจากเห็ดหูหนูคิดเป็น  $0.28 \pm 0.04$  มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งต่ำกว่าค่า  $IC_{50}$  ของสารสกัดเอทานอลจากเห็ดนางฟ้าและเห็ดเป่าฮื้อโดยคิดเป็น  $0.45 \pm 0.01$  มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ  $0.49 \pm 0.001$  มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

ตารางที่ 5 ค่าความเข้มข้นของสารสกัดจากเห็ดหูหนู เห็ดนางฟ้าภูฐาน เห็ดเป่าฮื้อ และ camptothecin ที่สามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์ได้ที่ร้อยละ 50 (50% Inhibitory concentration :  $IC_{50}$ )

ชนิดของเห็ด	$IC_{50}$
Camptothecin	$11.45 \pm 2.12$ ng/ml
เห็ดเป่าฮื้อ ( <i>P. abalonus</i> )	$0.49 \pm 0.001$ mg/ml
เห็ดนางฟ้าภูฐาน ( <i>P. sajor-caju</i> )	$0.45 \pm 0.01$ mg/ml
เห็ดหูหนู ( <i>A. auricula-judae</i> )	$0.28 \pm 0.04$ mg/ml

#### 4.1.3 ผลการศึกษาความเป็นพิษของสารสกัดเห็ดทั้ง 3 ชนิดต่อเซลล์ U937

จากผลการศึกษาความเป็นพิษของสารสกัดเอทานอลจากเห็ดนางฟ้าภูฐาน เห็ดเป่าฮื้อ และเห็ดหูหนู พบว่าสารสกัดชั้นเอทานอลของเห็ดนางฟ้าภูฐาน และเห็ดเป่าฮื้อ ไม่เป็นพิษต่อเซลล์เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ในกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับสารสกัด แต่สารสกัดชั้นเอทานอลของดอกเห็ดหูหนูที่มีความเข้มข้น 0.25 และ 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีความเป็นพิษต่อเซลล์ U937 คิดเป็นร้อยละ  $6.74 \pm 0.63$  และร้อยละ  $49.95 \pm 3.28$  ตามลำดับ ผลดังแสดงในรูปที่ 29



รูปที่ 29 กราฟแสดงค่าความเป็นพิษของสารสกัดชั้นเอทานอลต่อเซลล์ U937 เมื่อทำการทดสอบที่ความ

เข้มข้น 0-0.5 mg/ml เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยการตรวจวัดปริมาณ LDH activity (PS คือ สารสกัดจากเห็ดนางฟ้าภูฐาน, PA คือ สารสกัดจากเห็ดเป่าฮื้อ และ AA สารสกัดจากเห็ดหูหนูทำการทดสอบในแต่ละตัวอย่างซ้ำ 3 ครั้ง จำนวน 3 ครั้งการทดลอง: \* คือ  $p < 0.05$ )

#### 4.1.4 ผลการวิเคราะห์สารองค์ประกอบในสารสกัดชั้นเอทานอลจากเห็ดนางฟ้าภูฐาน เห็ดเป่าฮื้อ และเห็ดหูหนู ด้วยเทคนิค UPLC-HRMS

จากผลการตรวจวัดปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระในกลุ่มของฟีนอล ด้วยเทคนิค Folin-Ciocalteu's method พบว่าสารสกัดเห็ดทั้ง 3 ชนิด มีฟีนอลเป็นองค์ประกอบในปริมาณที่แตกต่างกัน ดังแสดงในรูปที่ 27 และเมื่อทำการตรวจวิเคราะห์ metabolic profile ของสารสกัดเห็ดทั้ง 3 ชนิดด้วยเทคนิค UPLC-HRMS ผลการตรวจวิเคราะห์และภาพ chromatogram พบว่าสารสกัดเห็ดทั้งหมดมีองค์ประกอบต่างๆ มากมายหลายชนิด ได้แก่ ฟีนอล ฟลาโวนอยด์ กรดฟีนิลไพรูวิก ฟีนิลโพรพานอยด์ สารในกลุ่มของเฮเทอโรไซคลิก สารอินทรีย์ คาร์โบไฮเดรต น้ำตาล กรดอะมิโน นิวคลีโอไทด์ นิวคลีโอไซด์ สารในกลุ่มเบนซีน กรดไขมัน สเตียรอยด์ สเตียรอลิพิด และสารมีขั้วชนิดอื่นๆ ดังแสดงในภาคผนวก ค. ในที่นี้ขอยกตัวอย่างสารองค์ประกอบในกลุ่มของฟีนอล ฟลาโวนอยด์และนิวคลีโอไซด์ ดังแสดงในตารางที่ 6 และ 7 ตามลำดับ

ตารางที่ 6 สารในกลุ่มของฟีนอลและฟลาโวนอยด์ซึ่งพบในองค์ประกอบของสารสกัดชั้นเอทานอลจากเห็ดนางฟ้าภูฐาน (PS), เห็ดเป่าฮื้อ (PA) และเห็ดหูหนู (AA)

No.	RT (min)	Formula	[M - H] <sup>-</sup> (m/z)		Metabolite	Mushroom
			Observed	Theoretical		
Phenol and derivatives						
1	1.324	C <sub>9</sub> H <sub>13</sub> N O <sub>3</sub>	183.0906	183.0895	Normetanephrine	AA
2	11.421	C <sub>13</sub> H <sub>11</sub> N O <sub>3</sub>	229.0745	229.2313	Fenamisal	AA
3	13.667, 8.209, 13.756	C <sub>18</sub> H <sub>29</sub> N O <sub>3</sub>	307.2134	307.2147	Betaxolol	PS, PA
4	18.121	C <sub>8</sub> H <sub>10</sub> O <sub>2</sub>	138.0698	138.1638	4-Hydroxyphenylethanol	PS
Phenol ether						
5	8.129	C <sub>18</sub> H <sub>29</sub> N O <sub>3</sub>	307.2133	307.4277	4-Hydroxyphenbutolol	PS
Flavonoids						
6	0.708	C <sub>21</sub> H <sub>24</sub> O <sub>10</sub>	436.1324	436.1370	Phloridzin	PA

ตารางที่ 7 สารในกลุ่มนิวคลีโอไซด์ซึ่งพบในองค์ประกอบของสารสกัดชั้นเอทานอลจากดอกเห็ดนางฟ้าภูฐาน (PS), เห็ดเป่าฮื้อ (PA) และเห็ดหูหนู (AA)

No.	RT (min)	Formula	[M - H] <sup>-</sup> (m/z)		Metabolite	Mushroom
			Observed	Theoretical		
Nucleoside						
1	2.914, 3.089	C <sub>11</sub> H <sub>15</sub> N <sub>5</sub> O <sub>3</sub> S	297.0881	297.0896	5'-Methylthioadenosine	PSE
2	0.677	C <sub>10</sub> H <sub>13</sub> N <sub>5</sub> O <sub>3</sub>	251.1016	251.1018	Deoxyadenosine	PSE
3	0.581, 0.697	C <sub>12</sub> H <sub>13</sub> N <sub>5</sub> O <sub>3</sub>	275.1023	275.1018	Ethenodeoxyadenosine	AAE

นอกจากสารทั้ง 2 กลุ่มดังกล่าวมา ในการตรวจวิเคราะห์ metabolic profile ด้วยเทคนิค UPLC-HRMS พบว่าสารสกัดจากเห็ดทั้ง 3 จะประกอบไปด้วยกรดอะมิโนทั้งชนิดจำเป็นและไม่จำเป็นต่อร่างกาย ดังแสดงในตารางที่ 8 โดยพบว่ามีกรดอะมิโนจำนวน 11 ชนิดได้แก่ alanine, arginine, asparagine, cysteine, glycine, isoleucine, lysine, phenylalanine, proline, tryptophan และ tyrosine จะพบได้ในสารสกัดจากเห็ดทั้ง 3 ชนิดนี้ และจะพบกรดอะมิโนชนิด

methionine, threonine and glutamic acid เฉพาะในสารสกัดจากเห็ดหูหนู และพบกรดอะมิโนชนิด serine เฉพาะในสารสกัดจากเห็ดเป่าฮื้อ

ตารางที่ 8 กรดอะมิโนที่พบในองค์ประกอบของสารสกัดชั้นเอทานอลจากเห็ดนางฟ้าภูฐาน (PS), เห็ดเป่าฮื้อ (PA) และเห็ดหูหนู (AA)

Amino acid	Mushroom species	
	Found	Not found
Alanine	PS, PA, AA	-
Arginine	PS, PA, AA	-
Asparagine	PS, PA, AA	-
Aspartic acid	PS, AA	PA
Cysteine	PS, PA, AA	-
Glutamic acid (Glu)	AA	PS, PA
Glutamine (Gln)	PA, AA	PS
Glycine	PS, PA, AA	-
Histidine	-	PS, PA, AA
Isoleucine	PS, PA, AA	-
Leucine	PS, PA	AA
Lysine	PS, PA, AA	-
Methionine	AA	PS, PA
Phenylalanine	PS, PA, AA	-
Proline	PS, PA, AA	-
Serine	PA	PS, AA
Threonine	AA	PS, PA
Tryptophan	PS, PA, AA	-
Tyrosine	PS, PA, AA	-
Valine	PA, AA	PS

\* กรดอะมิโนจำเป็น (Essential amino acids)

#### 4.2 ผลการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดชั้นน้ำของเห็ดหูหนู

จากผลการสกัดเห็ดหูหนูด้วยน้ำที่อุณหภูมิ 4 (AA4), 22 (AA22), 50 (AA50) และ 100 (AA100) องศาเซลเซียส พบว่าสารสกัดเห็ดหูหนูที่สกัดได้ปริมาณสูงสุดคือ AA4 โดยมีปริมาณที่ได้คิดเป็น 6.392 (%w/w) รองลงมาได้แก่สารสกัด AA22, AA50 และ AA100 โดยปริมาณสารสกัดที่ได้คิดเป็น 3.866, 2.844 และ 2.146 (%w/w) ตามลำดับ ดังผลแสดงในตารางที่ 9 นอกจากนี้สารสกัดเห็ดหูหนูที่ได้จากการใช้อุณหภูมิในการสกัดที่แตกต่างกัน มีสีที่แตกต่างกัน ดังแสดงในรูปที่ 30

ตารางที่ 9 ลักษณะทางกายภาพและ yields(%w/w) ของสารสกัดจากเห็ดหูหนูที่สกัดด้วยน้ำที่อุณหภูมิต่างๆ

ชื่อเห็ด	รหัสของสารสกัด	อุณหภูมิที่ใช้ในการสกัด	ลักษณะของสารสกัดที่ได้	Yield (%w/w)
เห็ดหูหนู ( <i>A. auricula-judae</i> )	AA4	4°C	เส้นใย สีน้ำตาลอ่อน	6.392
	AA22	22°C	เส้นใย สีน้ำตาลอ่อน	3.866
	AA50	50°C	เส้นใยสีน้ำตาลเทา	2.844
	AA100	100°C	เส้นใยสีขาวปนน้ำตาลอ่อน	2.146

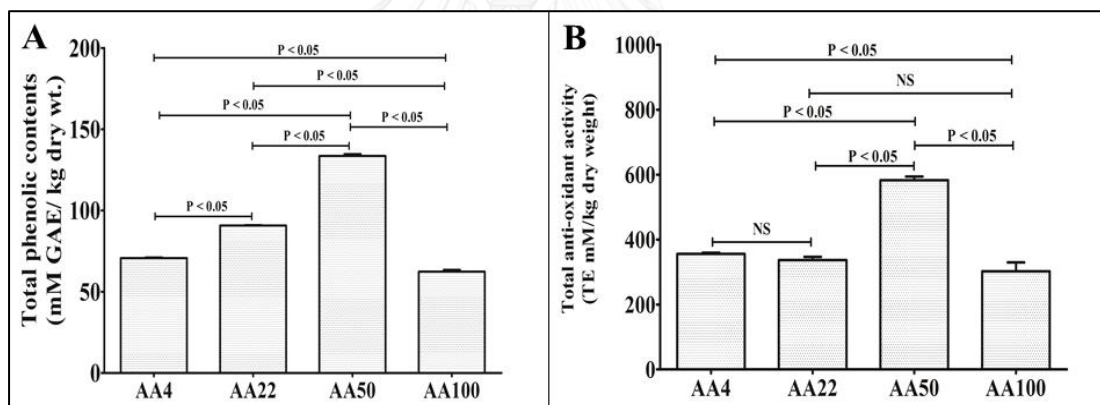


รูปที่ 30 ลักษณะสีของสารสกัดชั้นน้ำที่ได้จากเห็ดหูหนู



#### 4.2.1 การตรวจวัดปริมาณสารฟีนอลและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดเห็ดหูหนู

จากการตรวจวัดปริมาณสารฟีนอลจากสารสกัดชั้นน้ำของเห็ดหูหนู พบว่า สารสกัด AA50 มีสารฟีนอลและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในปริมาณสูงที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับสารสกัดจากอุณหภูมิอื่นๆ ดังแสดงในรูปที่ 31 สารสกัด AA50 มีสารฟีนอลคิดเป็น  $133.55 \pm 1.11$  GAE mM/kg dried weight และมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ คิดเป็น  $583.33 \pm 10.85$  TE mM/kg dried weight สำหรับสารสกัด AA22 จะพบสารฟีนอลในปริมาณที่ต่ำกว่าสารสกัด AA50 รองลงมาได้แก่สารสกัด AA4 และ AA100 โดยพบสารฟีนอลคิดเป็น  $90.75 \pm 0.24$ ,  $70.71 \pm 0.41$  และ  $62.37 \pm 1.05$  GAE mM/kg dried weight ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 31A และสารสกัดที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงรองจาก AA50 คือ สารสกัด AA4, AA22 และ AA100 โดยฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระคิดเป็น  $355.79 \pm 3.94$ ,  $337.08 \pm 9.85$  และ  $302.60 \pm 27.11$  TE mM/kg dried weight ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 31B



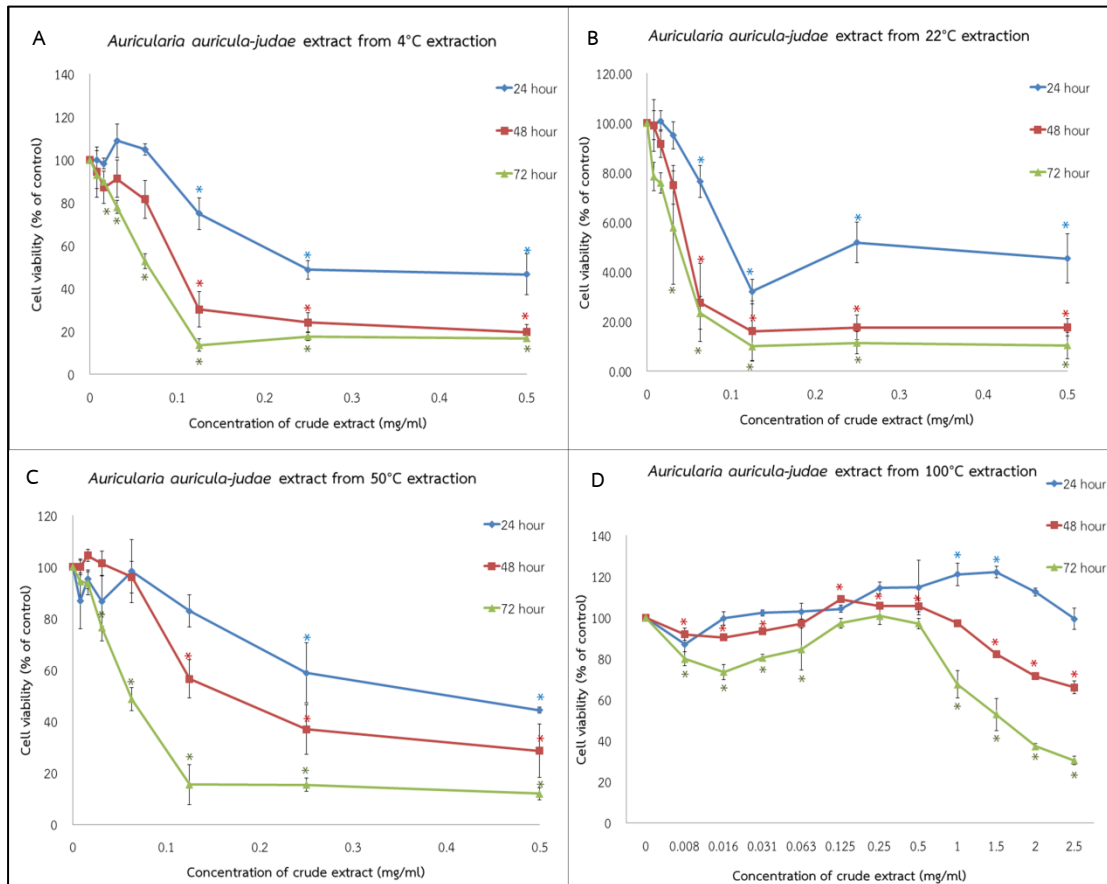
รูปที่ 31 กราฟแสดงปริมาณสารฟีนอล (A) และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (B) ที่พบในสารสกัดเห็ดหูหนู (ข้อมูลที่แสดงเป็น ค่าเฉลี่ย±ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน ของข้อมูลที่ได้จากการทดลอง โดยทุกการทดลองจะทำซ้ำจำนวน 3 ครั้ง ระดับนัยสำคัญ  $p < 0.05$ . NS หมายถึงไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติทางสถิติ GAE หมายถึง ปริมาณของกรดแกลลิก (gallic acid equivalent) และ TE หมายถึง ปริมาณของโทรล็อกที่ใช้ในการออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (trolox equivalent))

#### 4.2.2 การศึกษาผลของสารสกัดเห็ดหูหนูต่อการเจริญและแบ่งตัวของเซลล์ U937

จากการศึกษาผลของสารสกัดเห็ดหูหนูต่อการเจริญและแบ่งตัวของ U937 ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 31A, 31B และ 31C สารสกัดทั้ง 3 สาร ได้แก่ AA4, AA22 และ AA50 ที่ความเข้มข้น 0.125-0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จะยับยั้งการเจริญของเซลล์ U937 เมื่อทดสอบเป็น

เวลา 72 ชั่วโมง โดยมีจำนวนของเซลล์ที่มีชีวิตลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ในกลุ่มควบคุม โดยปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตที่พบอยู่ในช่วงร้อยละ 13-18, ร้อยละ 9-12 และ ร้อยละ 12-16 ตามลำดับ โดยสารสกัด AA4, AA22 และ AA50 มีค่า  $IC_{50}$  ของแต่ละสารสกัดคิดเป็น  $0.066 \pm 0.005$ ,  $0.041 \pm 0.015$  และ  $0.061 \pm 0.007$  มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ดังข้อมูลที่แสดงในตารางที่ 10

สำหรับสารสกัด AA100 ดังผลแสดงในรูป 32D ที่ความเข้มข้น 0.008-0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จะยับยั้งการเจริญของเซลล์ U937 ได้ไม่คงที่ โดยที่ความเข้มข้นสารสกัดสูงสุดคือ 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ที่การทดสอบเป็นเวลา 72 ชั่วโมง จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ในกลุ่มควบคุมคิดเป็นร้อยละ  $97.14 \pm 2.47$  ซึ่งการออกฤทธิ์ของสารสกัดที่มีต่อเซลล์น่าจะอยู่ที่ระดับความเข้มข้นสูง จึงได้ทำการเพิ่มความเข้มข้นของสารสกัด AA100 เป็น 1-2.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ที่การทดสอบเป็นเวลา 72 ชั่วโมง พบว่าสารสกัดจะมีผลยับยั้งการเจริญของเซลล์ U937 ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ คือคิดเป็นประมาณร้อยละ 30-70 โดยที่ความเข้มข้น 2.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จะยับยั้งการเจริญของเซลล์ได้สูงสุดคือประมาณร้อยละ 70 โดยจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตคิดเป็นร้อยละ  $30.26 \pm 2.08$  เมื่อเปรียบเทียบกับจำนวนเซลล์ในกลุ่มควบคุม โดยค่า  $IC_{50}$  ของสารสกัด AA100 คิดเป็น  $1.560 \pm 0.194$  มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ดังข้อมูลที่แสดงในตารางที่ 10



รูปที่ 32 กราฟแสดงปริมาณเซลล์โมโนไซต์ U937 ที่มีชีวิตรอดเมื่อทำการทดสอบกับสารสกัดเห็ดหูหนูด้วยน้ำที่สกัดด้วยอุณหภูมิ 4, 22, 50 และ 100 องศาเซลเซียส เมื่อทดสอบด้วยความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง ด้วยเทคนิค MTT (ทำการทดสอบในแต่ละตัวอย่างซ้ำ 3 ครั้ง จำนวน 3 ครั้งการทดลอง: \* คือ  $p < 0.05$ )

ตารางที่ 10 ค่าความเข้มข้นของสารสกัดจากดอกเห็ดหูหนูและ camptothecin ที่สามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์ได้ที่ร้อยละ 50 ( $IC_{50}$ )

ชนิดของสารสกัด	$IC_{50}$
AA22	0.041±0.015 mg/ml
AA50	0.061±0.007 mg/ml
AA4	0.066±0.005 mg/ml
AA100	1.560±0.194 mg/ml
Camptothecin	11.45 ± 2.12 ng/ml

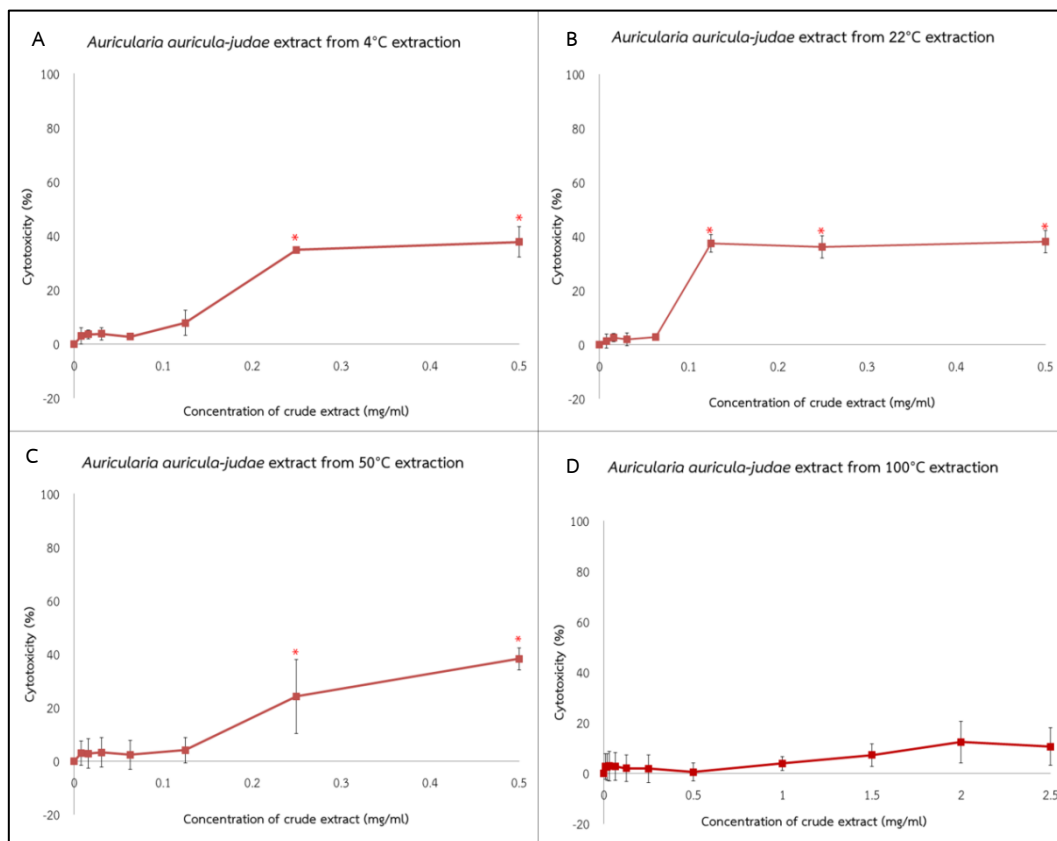
#### 4.2.3 ผลการศึกษาความเป็นพิษของสารสกัดเห็ดหูหนูต่อเซลล์ U937

ผู้วิจัยทำการตรวจวัด LDH activity ภายหลังจากทดสอบสารสกัดเห็ดหูหนู AA4, AA22, AA50 และ AA100 โดยทดสอบกับเซลล์ U937 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ผลการทดลองแสดงในรูปที่ 33 พบว่าสารสกัดทั้ง 3 ชนิด ได้แก่ AA4, AA22 และ AA50 จะให้ผลการทดลองในแนวทางเดียวกันคือสารสกัดมีความเป็นพิษต่อเซลล์ โดยสารสกัด AA4 ที่ความเข้มข้น 0.25-0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จะทำให้เซลล์เกิดการตายได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ในกลุ่มควบคุม โดยสารสกัดจะมีความเป็นพิษต่อเซลล์คิดเป็นร้อยละ  $34.84 \pm 0.59$  และ  $37.76 \pm 5.69$  ตามลำดับ ดังผลในรูปที่ 33A

จากผลการตรวจวัด LDH activity ภายหลังจากทดสอบสารสกัด AA22 ในรูปที่ 33B พบว่าเมื่อใช้สารสกัดที่ความเข้มข้นต่ำคือ 0.008-0.063 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จะไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ แต่เมื่อความเข้มข้นของสารสกัดเพิ่มสูงขึ้นเป็น 0.125-0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จะมีผลทำให้เซลล์เกิดการตายได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ในกลุ่มควบคุม โดยสารสกัดจะมีความเป็นพิษต่อเซลล์เท่ากับร้อยละ  $37.45 \pm 3.21$ ,  $36.11 \pm 4.16$  และ  $38.09 \pm 4.12$  ตามลำดับ

และจากรูปที่ 33C พบว่าสารสกัด AA50 ที่ความเข้มข้น 0.25-0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จะทำให้เซลล์เกิดการตายได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ในกลุ่มควบคุม โดยสารสกัดจะมีความเป็นพิษต่อเซลล์เท่ากับร้อยละ  $24.18 \pm 13.80$  และ  $38.29 \pm 4.10$  ตามลำดับ

ในทางตรงกันข้ามสารสกัด AA100 จะไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ในกลุ่มควบคุม ดังผลการทดลองในรูปที่ 33D แสดงให้เห็นว่าสารสกัด AA100 จะยับยั้งการเจริญของเซลล์ได้ไม่ดีแม้จะมีการเพิ่มความเข้มข้นของสารสกัดและจะไม่เป็นพิษกับเซลล์



รูปที่ 33 กราฟแสดงค่าความเป็นพิษของสารสกัดเข้มข้นน้ำจากเห็ดหูหนูต่อเซลล์ U937 เมื่อทำการทดสอบที่ความเข้มข้น 0-2.5 mg/ml เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ด้วยการตรวจวัดปริมาณ LDH activity (AA4 อุณหภูมิที่ใช้สกัดเท่ากับ 4°C, AA22 อุณหภูมิที่ใช้สกัดเท่ากับ 22°C, AA50 อุณหภูมิที่ใช้สกัดเท่ากับ 50°C และ AA100 อุณหภูมิที่ใช้สกัดเท่ากับ 100°C (ทำการทดสอบในแต่ละตัวอย่างซ้ำ 3 ครั้ง จำนวน 3 ครั้งการทดลอง: \* คือ  $p < 0.05$ )

CHULALONGKORN UNIVERSITY

#### 4.2.4 ผลการวิเคราะห์สารองค์ประกอบในสารสกัดเห็ดหูหนูด้วยเทคนิค UPLC-HRMS

จากผลการตรวจวัดปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระในกลุ่มของฟีนอล ด้วยเทคนิค Folin-Ciocalteu's method พบว่าสารสกัดเห็ดหูหนูทั้ง 4 ชนิด มีฟีนอลเป็นองค์ประกอบในปริมาณที่แตกต่างกัน ดังแสดงในรูปที่ 31 และเมื่อทำการตรวจวิเคราะห์ metabolic profile ของสารสกัดเห็ดหูหนูด้วยเทคนิค UPLC-HRMS ผลการตรวจวิเคราะห์และภาพ chromatogram พบว่าสารสกัดทั้งหมดมีองค์ประกอบต่างๆ มากมายหลายชนิด ได้แก่ ฟีนอล ฟลาโวนอยด์ ฟีนิลโพรพานอยด์ สารในกลุ่มของเฮเทอร์ไซคลิก สารอินทรีย์ คาร์โบไฮเดรต น้ำตาล กรดอะมิโน นิวคลีโอไทด์ นิวคลีโอไซด์ สารในกลุ่มเบนซีน กรดไขมัน สเตียรอยด์ อัลคาลอยด์ สเตียรอลลิปิด และสารมีขั้วชนิดอื่นๆ ดังแสดงในภาคผนวก ค. และในที่นี้ขอยกตัวอย่างองค์ประกอบในกลุ่มของฟีนอล ฟลาโวนอยด์ นิวคลีโอไซด์

และกรดอะมิโน ดังแสดงในตารางที่ 11, 12 และ 13 ตามลำดับ โดยจะพบองค์ประกอบที่เป็นฟีนอลได้ในสารสกัดทั้ง 4 ชนิด แต่สำหรับฟลาโวนอยด์จะพบได้เฉพาะในสารสกัด AA4 และนิวคลีโอไซด์จะพบได้เฉพาะในสารสกัด AA100 เท่านั้น

และในสารสกัดจากเห็ดหูหนูทั้ง 4 ชนิด จะประกอบไปด้วยกรดอะมิโนทั้งชนิดจำเป็นและไม่จำเป็นต่อร่างกาย ดังแสดงในตารางที่ 13 โดยพบว่ากรดอะมิโนจำนวน 13 ชนิดได้แก่ alanine, arginine, asparagine, aspartic acid, cysteine, glutamic acid, glutamine, glycine, isoleucine, leucine, lysine, proline และ valine จะพบได้ในสารสกัดจากเห็ดหูหนูทั้ง 4 ชนิดนี้

ตารางที่ 11 สารในกลุ่มของฟีนอลและฟลาโวนอยด์ซึ่งพบในองค์ประกอบของสารสกัดเห็ดหูหนู (AA4, AA22, AA50 และ AA100)

No.	RT (min)	Formula	[M - H] <sup>-</sup> (m/z)		Metabolite	Mushroom
			Observed	Theoretical		
Phenol and derivatives						
1	1.207	C8 H11 N O	137.085	137.0841	Tyramine	AA4
2	18.293, 18.334	C8 H10 O2	138.07	138.1638	4-Hydroxyphenylethanol	AA22, AA100
3	15.466, 21.544	C6 H6 O3	126.03	126.1100	Hydroxyhydroquinone	AA50, AA100
Phenol ether						
4	2.545	C14 H18 N4 O3	290.14	290.1379	Trimethoprim	AA4
Flavonoids						
5	9.018	C23 H20 O6	392.12	392.1260	Dehydrorotenone	AA4

ตารางที่ 12 สารในกลุ่มนิวคลีโอไซด์ซึ่งพบในองค์ประกอบของสารสกัดเห็ดหูหนู (AA4, AA22, AA50 และ AA100)

No.	RT (min)	Formula	[M - H] <sup>-</sup> (m/z)		Metabolite	Mushroom
			Observed	Theoretical		
Nucleoside						
1	0.605	C12 H13 N5 O3	275.10	275.1018	Ethenodeoxyadenosine	AA100

ตารางที่ 13 กรดอะมิโนที่พบในองค์ประกอบของสารสกัดเห็ดหูหนู (AA4, AA22, AA50 และ AA100)

Amino acid	Mushroom species	
	Found	Not found
Alanine	AA4, AA22, AA50, AA100	-
Arginine	AA4, AA22, AA50, AA100	-
Asparagine	AA4, AA22, AA50, AA100	-
Aspartic acid	AA4, AA22, AA50, AA100	-
Cysteine	AA4, AA22, AA50, AA100	-
Glutamic acid (Glu)	AA4, AA22, AA50, AA100	-
Glutamine (Gln)	AA4, AA22, AA50, AA100	-
Glycine	AA4, AA22, AA50, AA100	-
Histidine	AA4, AA50, AA100	AA22
Isoleucine	AA4, AA22, AA50, AA100	-
Leucine	AA4, AA22, AA50, AA100	-
Lysine	AA4, AA22, AA50, AA100	-
Methionine	AA4, AA50, AA100	AA22
Phenylalanine	AA4, AA22, AA50	AA100
Proline	AA4, AA22, AA50, AA100	-
Serine	AA4, AA50	AA22, AA100
Threonine	AA4, AA50, AA100	AA22
Tryptophan	AA4, AA22, AA100	AA50
Tyrosine	AA4, AA22, AA50	AA100
Valine	AA4, AA22, AA50, AA100	-

\* กรดอะมิโนจำเป็น (Essential amino acids)

#### 4.3 ผลการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดชั้นน้ำของเห็ดเป่าฮื้อ

ผลการสกัดเห็ดเป่าฮื้อด้วยน้ำที่อุณหภูมิ 4 (PA4), 22 (PA22), 50 (PA50) และ 100 (PA100) องศาเซลเซียส พบว่าสารสกัด PA50 จะสกัดได้ในปริมาณสูงที่สุดคือ 29.898 (%w/w) รองลงมาคือ สารสกัด PA22, PA100 และ PA4 โดยปริมาณสารที่สกัดได้คิดเป็น 27.728, 26.703 และ 20.640 (%w/w) ตามลำดับ ดังผลแสดงในตารางที่ 14 และสารสกัดแต่ละชนิดจะมีสีและลักษณะที่แตกต่างกัน ดังแสดงในรูปที่ 34



รูปที่ 34 ลักษณะสีของสารสกัดชั้นน้ำที่ได้จากเห็ดเป่าฮื้อ

ตารางที่ 14 ลักษณะทางกายภาพและ yields (%w/w) ของสารสกัดจากเห็ดเป่าฮื้อที่สกัดด้วยน้ำที่อุณหภูมิต่างๆ

ชื่อเห็ด	รหัสของสารสกัด	อุณหภูมิที่ใช้ในการสกัด	ลักษณะของสารสกัดที่ได้	Yield (%w/w)
เห็ดเป่าฮื้อ ( <i>P. abalonus</i> )	PA50	50°C	ผงสีเทาดำ	29.898
	PA22	22°C	ผงสีเทาดำ สีค่อนข้างเข้ม	27.728
	PA100	100°C	ผงสีน้ำตาลเข้ม	26.703
	PA4	4°C	ผงสีเหลือง	20.640

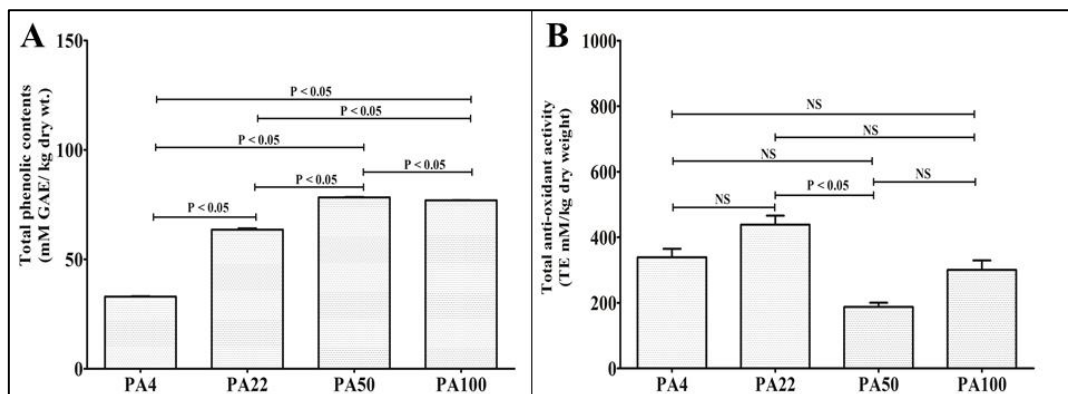
#### 4.3.1 การตรวจวัดปริมาณสารฟีนอลและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดเห็ดเป่าฮื้อ

จากการตรวจวัดปริมาณสารฟีนอลจากสารสกัดชั้นน้ำของเห็ดเป่าฮื้อ พบว่า สารสกัด PA50 มีสารฟีนอลในปริมาณสูงที่สุดคิดเป็น  $78.37 \pm 0.14$  GAE mM/kg dried weight รองลงมาคือสารสกัด PA100, PA22 และ PA4 ซึ่งจะพบสารฟีนอลคิดเป็น  $77.01 \pm 0.02$ ,  $63.61 \pm 0.56$  และ  $32.98 \pm 0.17$  GAE mM/kg dried weight ดังแสดงในรูปที่ 35A

ผลการตรวจวัดฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระพบว่าสารสกัด PA22 มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุดคิดเป็น  $438.53 \pm 27.39$  TE mM/kg dried weight รองลงมาคือสารสกัด PA4, PA100 และ



PA50 โดยฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระคิดเป็น  $339.05 \pm 25.81$ ,  $300.47 \pm 28.98$  และ  $187.29 \pm 13.16$  TE mM/kg dried weight ตามลำดับ ดังข้อมูลแสดงในรูปที่ 35B



รูปที่ 35 กราฟแสดงปริมาณสารฟีนอล (A) และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (B) ที่พบในสารสกัดเห็ดเป่าฮื้อ

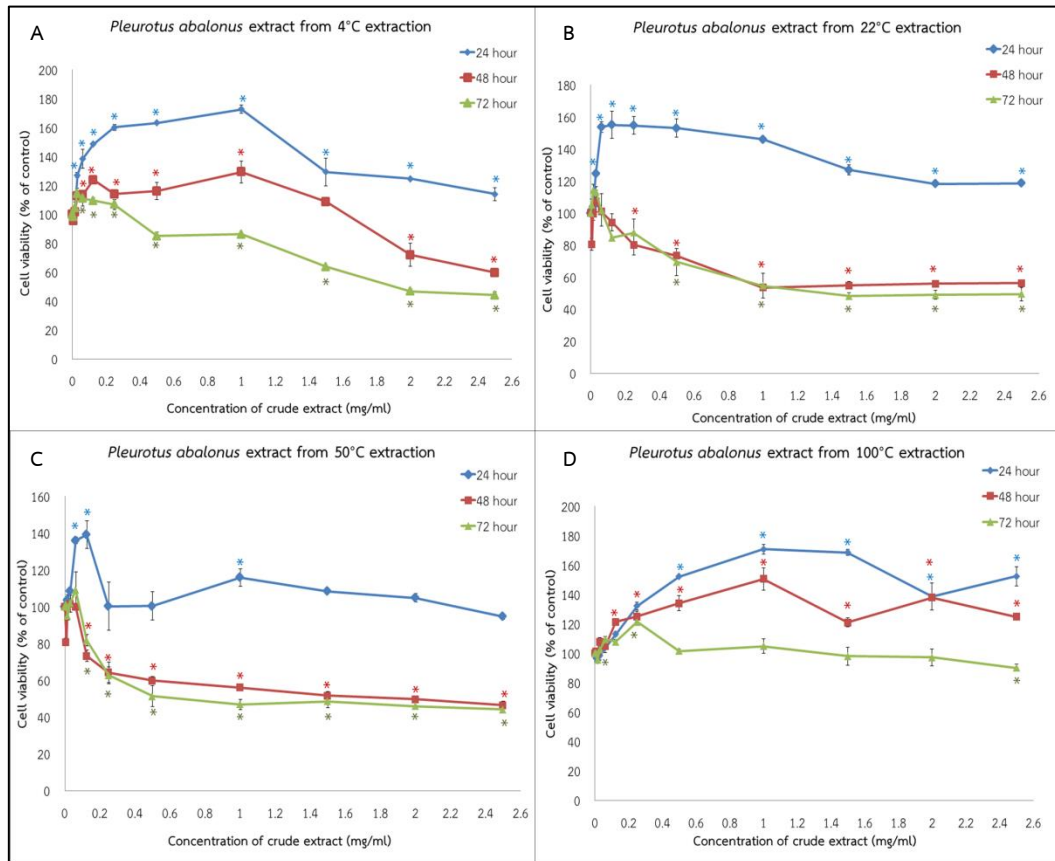
(ข้อมูลที่แสดงเป็น ค่าเฉลี่ย±ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน ของข้อมูลที่ได้จากการทดลอง โดยทุกการทดลองจะทำซ้ำจำนวน 3 ครั้ง ระดับนัยสำคัญ  $p < 0.05$ . NS หมายถึง ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติทางสถิติ GAE หมายถึง ปริมาณของกรดแกลลิก (gallic acid equivalent) และ TE หมายถึง ปริมาณของโทรลอกซ์ที่ใช้ในการออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (trolox equivalent))

#### 4.3.2 การศึกษาผลของสารสกัดเห็ดเป่าฮื้อต่อการเจริญและแบ่งตัวของเซลล์ U937

จากการศึกษาผลของสารสกัดเห็ดเป่าฮื้อ PA4, PA22 และ PA50 ที่ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ต่อการเจริญและแบ่งตัวของเซลล์ U937 ด้วยเทคนิค MTS ดังแสดงในรูป 36A, 36B และ 36C จากการทดสอบเป็นเวลา 72 ชั่วโมง พบว่าสารสกัดทั้ง 3 ชนิด ยับยั้งการเจริญของเซลล์ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยมีเปอร์เซ็นต์รอดชีวิตคิดเป็นร้อยละ 85, 69 และ 51 ตามลำดับ ผู้วิจัยได้ทดลองโดยทำการเพิ่มความเข้มข้นของสารสกัดสูงถึง 2.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งพบว่าสารสกัด PA4, PA22 และ PA50 ที่ความเข้มข้น 1-2.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ยับยั้งการเจริญของเซลล์ U937 ได้ดีขึ้น โดยมีจำนวนของเซลล์ที่มีชีวิตรอดคิดเป็นร้อยละ 44, 49 และ 44 ตามลำดับ ทั้งนี้ ค่า  $IC_{50}$  ของสารสกัดเห็ดเป่าฮื้อ PA4, PA22 และ PA50 คิดเป็น  $1.858 \pm 0.055$ ,  $1.235 \pm 0.405$  และ  $0.654 \pm 0.317$  มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ดังข้อมูลที่แสดงในตารางที่ 15

ในทางตรงกันข้ามสารสกัด PA100 ที่ความเข้มข้น 0.008-0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ไม่มีผลต่อการเจริญของ U937 และแม้จะเพิ่มความเข้มข้นถึง 2.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สารสกัด

PA100 ก็ไม่มีผลต่อการเจริญของเซลล์ โดยที่ความเข้มข้นสูงสุดที่ใช้ทดสอบเซลล์เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ส่งผลให้เซลล์ยังคงมีชีวิตรอด คิดเป็นร้อยละ  $90.23 \pm 2.50$  ดังผลแสดงในรูปที่ 36D



รูปที่ 36 กราฟแสดงปริมาณเซลล์ U937 ที่มีชีวิตรอดเมื่อทำการทดสอบกับสารสกัดที่ความเข้มข้นต่างๆ เป็นระยะเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง ด้วยเทคนิค MTS (ทำการทดสอบในแต่ละตัวอย่างซ้ำ 3 ครั้ง จำนวน 3 ครั้ง การทดลอง: \* คือ  $p < 0.05$ )

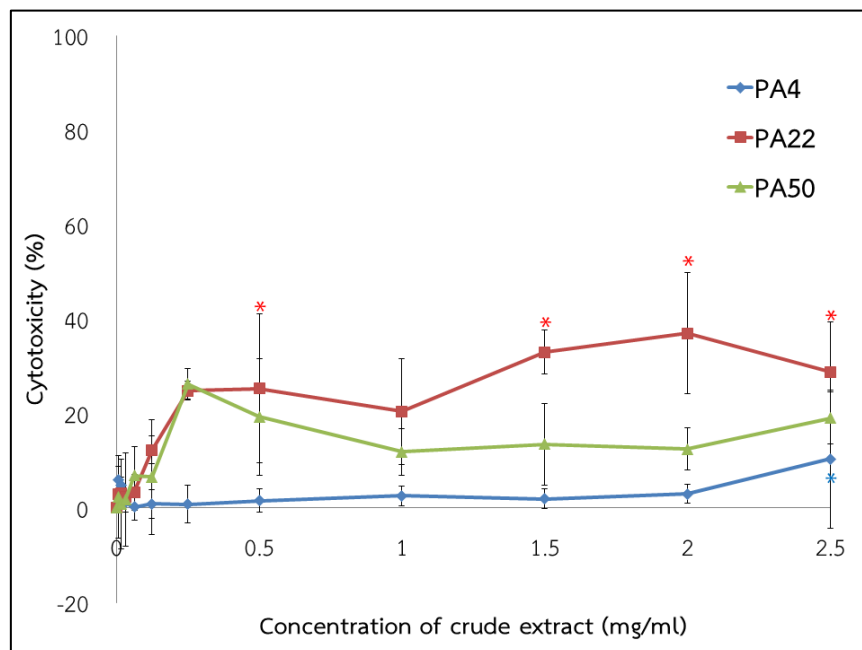
ตารางที่ 15 ค่าความเข้มข้นของสารสกัดจากดอกเห็ดเห็ดเป่าฮื้อและ camptothecin ที่สามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์ได้ที่ร้อยละ 50 ( $IC_{50}$ )

ชนิดของสารสกัด	$IC_{50}$
PA50	0.654±0.317 mg/ml
PA22	1.235±0.405 mg/ml
PA4	1.858±0.055 mg/ml
PA100	ND
Camptothecin	11.45 ± 2.12 ng/ml

ND หมายถึง no detection ไม่สามารถหาค่า  $IC_{50}$  ได้ เนื่องจากสารสกัดไม่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์

#### 4.3.3 ผลการศึกษาความเป็นพิษของสารสกัดจากเห็ดเป่าฮื้อต่อเซลล์ U937

ผู้วิจัยได้ทำการทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดเห็ดเป่าฮื้อ PA4, PA22 และ PA50 ยกเว้นสารสกัด PA100 เนื่องจากสารนี้ไม่มีผลต่อการเจริญของเซลล์ ผลการศึกษาความเป็นพิษของสารสกัดเห็ดเป่าฮื้อโดยการตรวจวัด LDH activity ดังแสดงในรูปที่ 37 พบว่าสารสกัด PA22 เป็นพิษต่อเซลล์มากกว่า PA4 และ PA50 โดยค่าความเป็นพิษต่อเซลล์ของ PA22 ที่ความเข้มข้น 1.5, 2.0 และ 2.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร คิดเป็นร้อยละ 32.97±4.64, 36.94±12.84 และ 28.82±10.54 ตามลำดับ



รูปที่ 37 กราฟแสดงค่าความเป็นพิษของสารสกัดจากเห็ดเป่าฮื้อต่อเซลล์ U937 เมื่อทำการทดสอบที่ความ

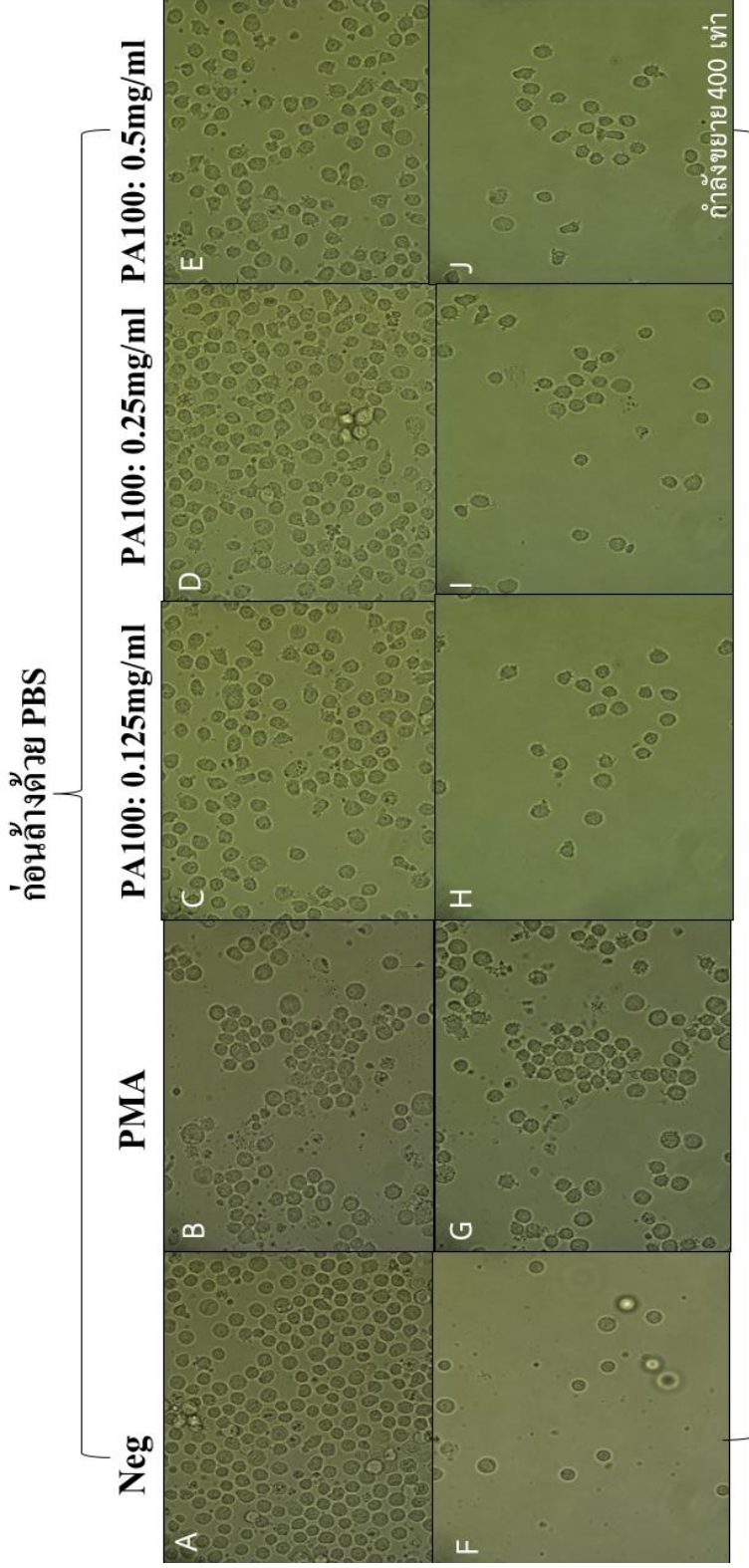
เข้มข้น 0-2.5 mg/ml เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ด้วยการตรวจวัดปริมาณ LDH activity (PA4 อุณหภูมิที่ใช้สกัดเท่ากับ 4°C, PA22 อุณหภูมิที่ใช้สกัดเท่ากับ 22°C และ PA50 อุณหภูมิที่ใช้สกัดเท่ากับ 50°C (ทำการทดสอบในแต่ละตัวอย่างซ้ำ 3 ครั้ง จำนวน 3 ครั้งการทดลอง: \* คือ  $p < 0.05$ ))

4.3.4 ผลของสารสกัดจากเห็ดเป่าฮื้อที่มีต่อการเหนี่ยวนำเซลล์ U937 ให้เกิดการเจริญและเปลี่ยนแปลงรูปร่าง

ผู้วิจัยจึงสนใจศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดเห็ดเป่าฮื้อ PA100 ในการเหนี่ยวนำให้เซลล์เกิดการเจริญและเปลี่ยนแปลงรูปร่าง จากโมโนไซต์เป็นแมคโครฟาจ โดยเปรียบเทียบลักษณะการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลล์ U937 ที่ได้รับสารสกัด PA100 กับกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับสารกระตุ้น PMA จากผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 38B เซลล์ U937 ที่ได้รับสาร PMA จะเกิดการเปลี่ยนแปลงรูปร่างและสามารถเกาะกับพื้นผิวภาชนะเพาะเลี้ยง โดยเซลล์จะเกาะกลุ่มกันเป็นกลุ่มๆ ซึ่งแตกต่างจากเซลล์กลุ่มควบคุม ดังรูปที่ 38A และเมื่อล้างเซลล์ด้วยบัฟเฟอร์ PBS พบว่า เซลล์กลุ่มที่ได้รับสารกระตุ้น PMA ดังรูปที่ 38G เซลล์ยังคงยึดเกาะกับพื้นผิวของภาชนะเพาะเลี้ยงอย่างเห็นได้ชัด จึงไม่หลุดออกไปในขั้นตอนของการล้าง ซึ่งมีความแตกต่างอย่างชัดเจนเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์กลุ่มควบคุม ในรูปที่ 38F ที่หลุดออกจากพื้นผิวของภาชนะเพาะเลี้ยงจำนวนมากภายหลังการล้าง

เมื่อทดสอบเซลล์ U937 กับสารสกัด PA100 ที่ความเข้มข้น 0.125, 0.25 และ 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าสารสกัด PA100 กระตุ้นให้เซลล์มีรูปร่างเปลี่ยนแปลงไปจากเดิม ดังรูปที่ 38C, 38D และ 38E โดยเซลล์บางส่วนเกิดการเปลี่ยนแปลงรูปร่างและสามารถยึดเกาะกับพื้นผิวของภาชนะเพาะเลี้ยงได้ หลังล้างเซลล์ ยังคงมีเซลล์บางส่วนที่สามารถเกาะกับพื้นผิวของภาชนะเพาะเลี้ยง โดยเมื่อเปรียบเทียบจำนวนเซลล์ที่เหลืออยู่หลังล้างเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่าในเซลล์กลุ่มที่ได้รับสารสกัด PA100 จะมีจำนวนเซลล์เหลืออยู่ในปริมาณที่น้อยกว่าเซลล์ในกลุ่มที่ได้รับสารกระตุ้น PMA และภายหลังการล้างเซลล์พบว่า ผลการทดสอบด้วยสารสกัด PA100 ที่ความเข้มข้น 0.125, 0.25 และ 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ไม่มีความแตกต่างกัน ดังผลที่แสดงในรูปที่ 38H, 38I และ 38J





รูปที่ 38 ผลของสารสกัด PA100 ที่ความเข้มข้น 0.125, 0.25 และ 0.5 มิลลิกรัมต่อเซลล์ลิธรา ที่มีต่อการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลล์ U937 เปรียบเทียบกับเซลล์ในกลุ่มควบคุมที่การทดลองเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิดส่องกลับ Neg : เซลล์กลุ่มควบคุมที่ไม่มีการเติมสารกระตุ้นใดๆ, PMA : เซลล์ในกลุ่มควบคุมที่ได้รับสารกระตุ้น PMA เพื่อให้เซลล์เกิดการพัฒนาและเปลี่ยนแปลงรูปร่าง

#### 4.3.5 ผลการวิเคราะห์สารองค์ประกอบในสารสกัดเห็ดเป่าฮื้อด้วยเทคนิค UPLC-HRMS

จากผลการตรวจวัดปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระในกลุ่มของฟีนอล ด้วยเทคนิค Folin-Ciocalteu's method พบว่าสารสกัดเห็ดเป่าฮื้อทั้ง 4 ชนิดมีฟีนอลเป็นองค์ประกอบในปริมาณที่แตกต่างกัน ดังแสดงในรูปที่ 35 และเมื่อทำการตรวจวิเคราะห์ metabolic profile ของสารสกัดเห็ดเป่าฮื้อด้วยเทคนิค UPLC-HRMS จากผลการตรวจวิเคราะห์และโครมาโทแกรม พบว่าสารสกัดทั้งหมดมีองค์ประกอบต่างๆ มากมายหลายชนิด ได้แก่ ฟีนอล ฟีนิลโพรพานอยด์ สารในกลุ่มของเฮเทอร์ไซคลิก สารอินทรีย์ คาร์โบไฮเดรต น้ำตาล กรดอะมิโน นิวคลีโอไซด์ นิวคลีโอไซด์ สารในกลุ่มเบนซีน กรดไขมัน สเตียรอยด์ สเตียรอลลิปิด และสารมีขั้วชนิดอื่นๆ ดังแสดงในภาคผนวก ค. และในที่นี้ขอยกตัวอย่างองค์ประกอบในกลุ่มของฟีนอล นิวคลีโอไซด์ และกรดอะมิโน ดังแสดงในตารางที่ 16, 17 และ 18 ตามลำดับ โดยจะพบองค์ประกอบที่เป็นฟีนอลได้ในสารสกัดทั้ง 4 ชนิด แต่ นิวคลีโอไซด์จะพบได้เฉพาะในสารสกัด PA4, PA50 และ PA100 เท่านั้น

และในสารสกัดจากเห็ดเป่าฮื้อทั้ง 4 ชนิด จะประกอบไปด้วยกรดอะมิโนทั้งชนิดจำเป็นและไม่จำเป็นต่อร่างกาย ดังแสดงในตารางที่ 18 โดยพบว่ากรดอะมิโนจำนวน 2 ชนิดได้แก่ arginine และ tryptophan จะพบได้ในสารสกัดจากเห็ดเป่าฮื้อทั้ง 4 ชนิดนี้ และในสารสกัด PA100 จะพบกรดอะมิโนเพียง 7 ชนิด นอกจาก arginine และ tryptophan ดังที่ได้กล่าวมาแล้ว จะพบ asparagine, aspartic acid, leucine, methionine และ serine

ตารางที่ 16 สารในกลุ่มของฟีนอลซึ่งพบในองค์ประกอบของสารสกัดจากเห็ดเป่าฮื้อ (PA4, PA22, PA50 และ PA100)

No.	RT (min)	Formula	[M - H] <sup>-</sup> (m/z)		Metabolite	Mushroom
			Observed	Theoretical		
Phenol and derivatives						
1	1.292, 1.33, 1.326,1.324	C <sub>9</sub> H <sub>13</sub> N O <sub>3</sub>	183.0887	183.0895	Normetanephrine	PA4,PA22, PA50
2	4.585, 0.49	C <sub>9</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub>	198.0521	198.0528	Syringic acid	PA100
3	18.189	C <sub>8</sub> H <sub>10</sub> O <sub>2</sub>	138.069	138.1638	4-Hydroxyphenylethanol	PA100
Phenol ether						
4	0.671	C <sub>14</sub> H <sub>16</sub> Cl N <sub>3</sub> O <sub>2</sub>	293.0934	293.0931	Triadimefon	PA22

ตารางที่ 17 สารในกลุ่มนิวคลีโอไซด์ซึ่งพบในองค์ประกอบของสารสกัดเห็ดเป่าฮื้อ (PA4, PA22, PA50 และ PA100)

No.	RT (min)	Formula	[M - H] <sup>-</sup> (m/z)		Metabolite	Mushroom
			Observed	Theoretical		
Nucleoside						
1	1.673, 2.009	C10 H13 N5 O5	283.0919	283.0917	Guanosine	PA4
2	1.033	C10 H12 N4 O6	284.0731	284.0757	Xanthosine	PA50
3	0.643	C10 H14 N5 O7 P	347.065	347.0631	Deoxyguanosine 5'-monophosphate (dGMP)	PA100
4	0.756	C10 H13 N5 O4	267.0961	267.0968	Deoxyguanosine	PA100

ตารางที่ 18 กรดอะมิโนที่พบในองค์ประกอบของสารสกัดเห็ดเป่าฮื้อ (PA4, PA22, PA50 และ PA100)

Amino acid	Mushroom species	
	Found	Not found
Alanine	PA4, PA22, PA50	PA100
Arginine	PA4, PA22, PA50, PA100	-
Asparagine	PA50, PA100	PA4, PA22
Aspartic acid	PA50, PA100	PA4, PA22
Cysteine	PA4, PA22, PA50	PA100
Glutamic acid (Glu)	PA4, PA22, PA50	PA100
Glutamine (Gln)	PA22, PA50	PA4, PA100
Glycine	PA4, PA22, PA50	PA100
Histidine	PA4, PA22, PA50	PA100
Isoleucine	PA50	PA4, PA22, PA100
Leucine	PA50, PA100	PA4, PA22
Lysine	PA4, PA22, PA50	PA100
Methionine	PA22, PA50, PA100	PA4
Phenylalanine	PA50	PA4, PA22, PA100
Proline	PA4, PA22, PA50	PA100
Serine	PA22, PA50, PA100	PA4
Threonine	PA4, PA22, PA50	PA100
Tryptophan	PA4, PA22, PA50, PA100	-
Tyrosine	PA22, PA50	PA4, PA100
Valine	PA4, PA22, PA50	PA100

\* กรดอะมิโนจำเป็น (Essential amino acids)



#### 4.4 ผลการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดชั้นน้ำของเห็ดนางฟ้าภูฐาน

ผลการสกัดเห็ดนางฟ้าภูฐานด้วยน้ำที่อุณหภูมิ 4 (PS4), 22 (PS22), 50 (PS50) และ 100 (PS100) องศาเซลเซียส พบว่าได้สารสกัด PS100 ในปริมาณสูงที่สุดคือ 20.717 (%w/w) รองลงมา ได้แก่ สารสกัด PS22, PS50 และ PS4 โดยปริมาณสารที่สกัดได้คิดเป็น 15.318, 13.979 และ 13.358 (%w/w) ตามลำดับ ดังผลแสดงในตารางที่ 19 และสารสกัดแต่ละชนิดจะมีสีและลักษณะที่แตกต่างกัน ดังแสดงในรูปที่ 39

ตารางที่ 19 ลักษณะทางกายภาพและ yields (%w/w) ของสารสกัดจากเห็ดนางฟ้าภูฐานที่สกัดด้วยน้ำที่อุณหภูมิต่างๆ

ชื่อเห็ด	รหัสของสารสกัด	อุณหภูมิที่ใช้ในการสกัด	ลักษณะของสารสกัดที่ได้	Yield (%w/w)
เห็ดนางฟ้าภูฐาน ( <i>P. sajor-caju</i> )	PS100	100°C	ผงสีน้ำตาลเข้ม	20.717
	PS22	22°C	ผงสีเหลืองปนน้ำตาล	15.318
	PS50	50°C	ผงสีเหลืองปนน้ำตาล	13.979
	PS4	4°C	ผงสีเหลืองเข้ม	13.358

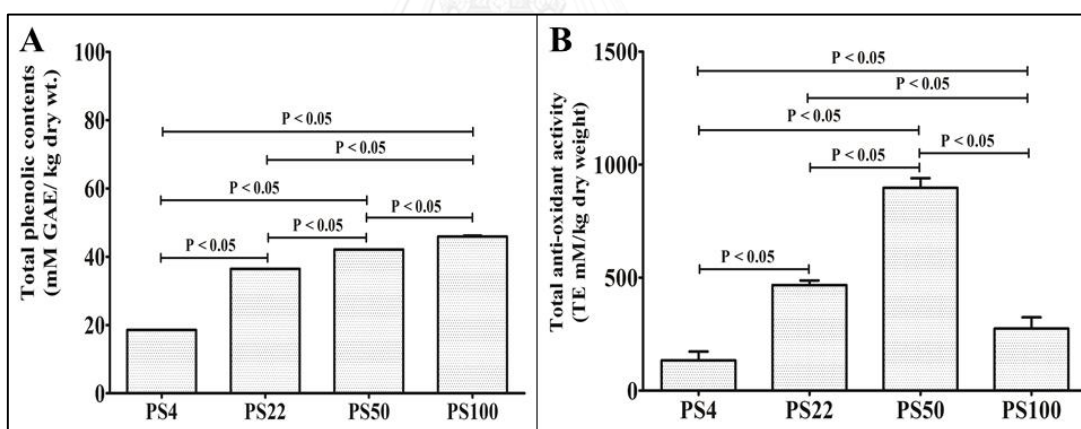


รูปที่ 39 ลักษณะสีของสารสกัดชั้นน้ำที่ได้จากเห็ดนางฟ้าภูฐาน

#### 4.4.1 การตรวจวัดปริมาณสารฟีนอลและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดเห็ดนางฟ้าภูฐาน

จากการตรวจวัดปริมาณสารฟีนอลจากสารสกัดชิ้นน้ำของเห็ดนางฟ้าภูฐาน พบว่า ในสารสกัด PS100 และ PS50 มีปริมาณฟีนอลสูงใกล้เคียงกัน คิดเป็น  $45.93 \pm 0.29$  และ  $42.10 \pm 0.01$  GAE mM/kg dried weight ตามลำดับ และสารสกัด PS22 มีปริมาณฟีนอลคิดเป็น  $36.47 \pm 0.02$  GAE mM/kg dried weight ส่วน PS4 มีปริมาณฟีนอลน้อยที่สุดคิดเป็น  $18.56 \pm 0.01$  GAE mM/kg dried weight ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 40A

ทั้งนี้ PS50 มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงมาก คิดเป็น  $897.41 \pm 42.84$  TE mM/kg dried weight มากกว่าสารสกัด PS22 ประมาณ 2 เท่า โดยสารสกัด PS22 , PS100 และ PS4 มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเพียง  $467.51 \pm 19.86$ ,  $274.92 \pm 49.79$  และ  $134.35 \pm 38.92$  TE mM/kg dried weight ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 40B

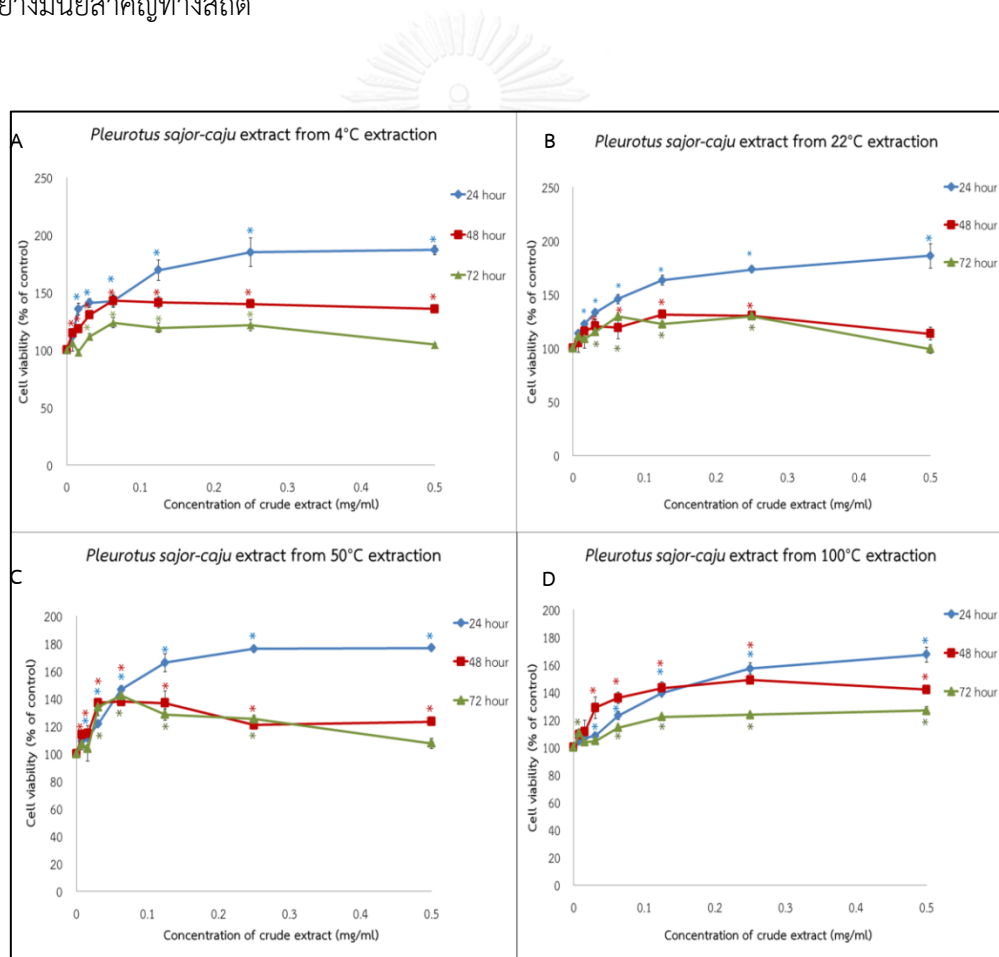


รูปที่ 40 กราฟแสดงปริมาณสารฟีนอล (A) และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (B) ที่พบในสารสกัดเห็ดนางฟ้าภูฐาน

(ข้อมูลที่แสดงเป็น ค่าเฉลี่ย±ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน ของข้อมูลที่ได้จากการทดลอง โดยทุกการทดลองจะทำซ้ำจำนวน 3 ครั้ง ระดับนัยสำคัญ  $p < 0.05$ . NS หมายถึงไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติทางสถิติ GAE หมายถึง ปริมาณของกรดแกลลิก (gallic acid equivalent) และ TE หมายถึง ปริมาณของโทรล็อกที่ใช้ในการออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (trolox equivalent))

#### 4.4.2 การศึกษาผลของสารสกัดเห็ดนางฟ้าภูฐานที่มีต่อการเจริญและแบ่งตัวของเซลล์ U937

จากการศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดเห็ดนางฟ้าภูฐานทั้ง 4 ชนิด ได้แก่ PS4, PS22, PS50 และ PS100 จากผลการทดลองแสดงในรูปแบบที่ 41A, 41B, 41C และ 41D พบว่าสารสกัดทั้งหมดให้ผลคล้ายคลึงกัน คือเมื่อทดสอบเป็นเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง สารสกัดที่ความเข้มข้น 0.063-0.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ไม่ยับยั้งการเจริญและแบ่งตัวของ U937 แต่สามารถกระตุ้นให้เซลล์ U937 มีการเจริญและแบ่งตัวเพิ่มขึ้นได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และที่ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร พบเฉพาะสารสกัด PS100 เท่านั้นที่ยังคงกระตุ้นการเจริญและแบ่งตัวของเซลล์ U937 ให้เพิ่มสูงขึ้นได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ



รูปที่ 41 กราฟแสดงปริมาณเซลล์ U937 ที่มีชีวิตรอดเมื่อทำการทดสอบกับสารสกัดเห็ดนางฟ้าภูฐาน ที่ความเข้มข้นต่างๆ เป็นระยะเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง ด้วยเทคนิค MTS (ทำการทดสอบในแต่ละตัวอย่างซ้ำ 3 ครั้ง จำนวน 3 ครั้งการทดลอง: \* คือ  $p < 0.05$ )

4.4.3 ผลของสารสกัดเห็ดนางฟ้าภูฐานที่มีต่อการเหนี่ยวนำเซลล์ U937 ให้เกิดการเจริญและเปลี่ยนแปลงรูปร่าง

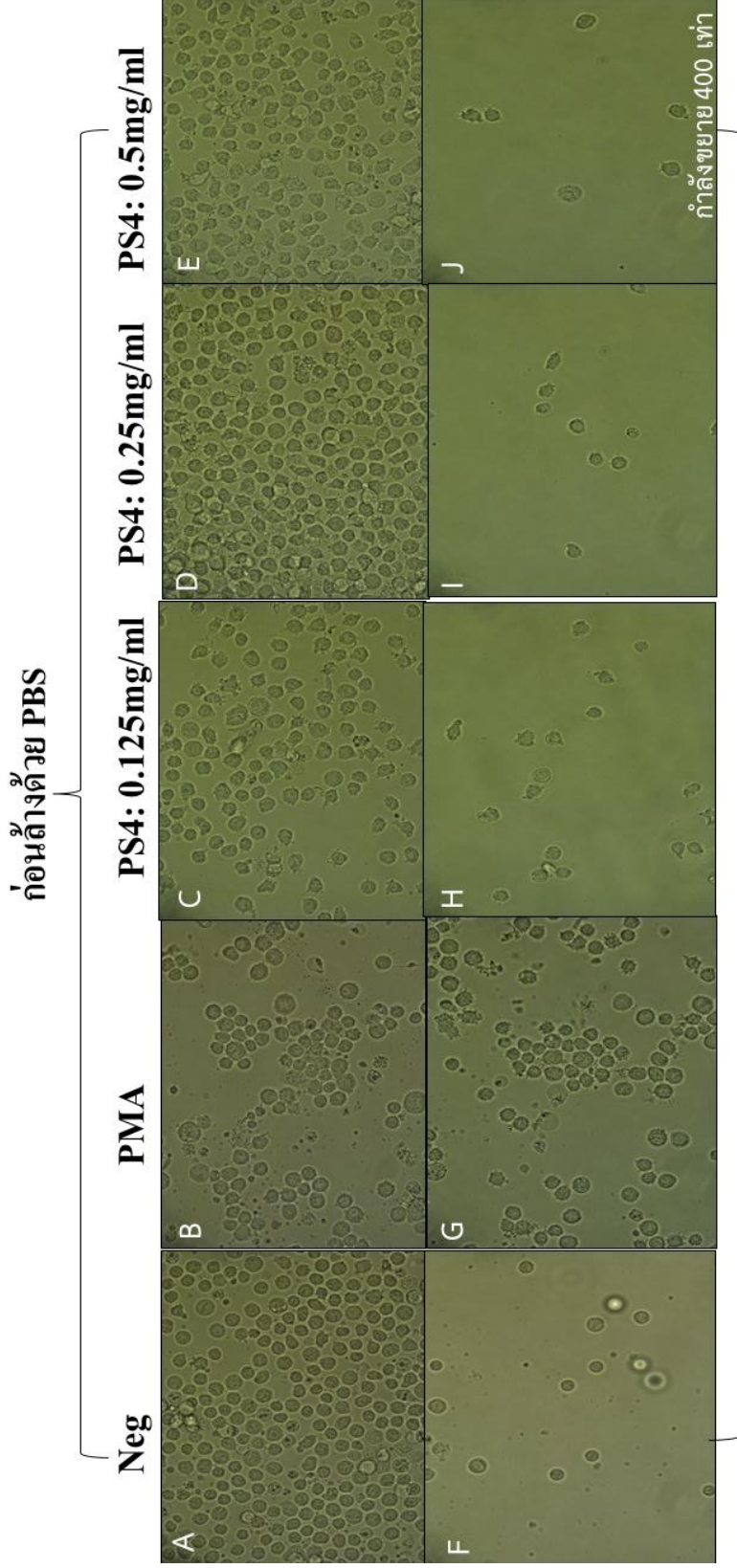
เนื่องจากสารสกัดเห็ดนางฟ้าภูฐานทั้ง 4 ชนิด ไม่ยับยั้งการเจริญของเซลล์ U937 และกระตุ้นการเจริญของเซลล์ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ผู้วิจัยจึงสนใจศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดเห็ดนางฟ้าภูฐานต่อการเหนี่ยวนำให้เซลล์เกิดการเจริญและเปลี่ยนแปลงรูปร่าง โดยเปรียบเทียบลักษณะรูปร่างของเซลล์ U937 ที่ได้รับสารสกัด PS กับกลุ่มควบคุม และกลุ่มที่ได้รับสารกระตุ้น PMA จากผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 42B, 43B, 44B และ 45B เซลล์ U937 ที่ได้รับสารกระตุ้น PMA จะเกิดการเปลี่ยนแปลงรูปร่างลักษณะและสามารถเกาะกับพื้นผิวของภาชนะเพาะเลี้ยงได้ โดยเซลล์จะเกาะกลุ่มกันเป็นกลุ่มๆ ซึ่งแตกต่างจากเซลล์ในกลุ่มควบคุม ดังรูปที่ 42A, 43A, 44A และ 45A ที่จะไม่พบการเกาะกลุ่มของเซลล์ นอกจากนี้จะเห็นได้อย่างชัดเจนว่าเมื่อล้างเซลล์ด้วยบัฟเฟอร์ PBS เซลล์กลุ่มควบคุมที่ได้รับสารกระตุ้น PMA สามารถเกาะกับพื้นผิวของภาชนะเพาะเลี้ยงได้ จึงไม่หลุดออกไปภายหลังการล้างเซลล์ ดังรูปที่ 42G, 43G, 44G และ 45G ซึ่งแตกต่างอย่างเห็นได้ชัดเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ในกลุ่มควบคุมดังรูปที่ 42F, 43F, 44F และ 45F ที่ไม่สามารถเกาะกับพื้นผิวของภาชนะเพาะเลี้ยง จึงทำให้เซลล์ถูกล้างออกไปเป็นจำนวนมาก

เมื่อนำสารสกัด PS4 และ PS22 ทดสอบกับเซลล์ U937 พบว่าสารสกัด PS4 และ PS22 กระตุ้นให้เซลล์มีรูปร่างเปลี่ยนแปลงไปจากเดิม ดังรูปที่ 42C, 42D, 42E, 43C, 43D และ 43E และหลังจากทำการล้างเซลล์แล้วพบว่า สารสกัด PS4 ไม่สามารถกระตุ้นให้เซลล์เกาะกับพื้นผิวของภาชนะเพาะเลี้ยงได้ จำนวนเซลล์ที่เหลืออยู่หลังล้างเซลล์มีจำนวนน้อยมากดังแสดงในรูปที่ 42H, 42I และ 42J ส่วนสารสกัด PS22 กระตุ้นเซลล์ให้สามารถเกาะกับพื้นผิวของภาชนะเพาะเลี้ยงได้เพียงเล็กน้อย ดังผลแสดงในรูป 43H, 43I และ 43J

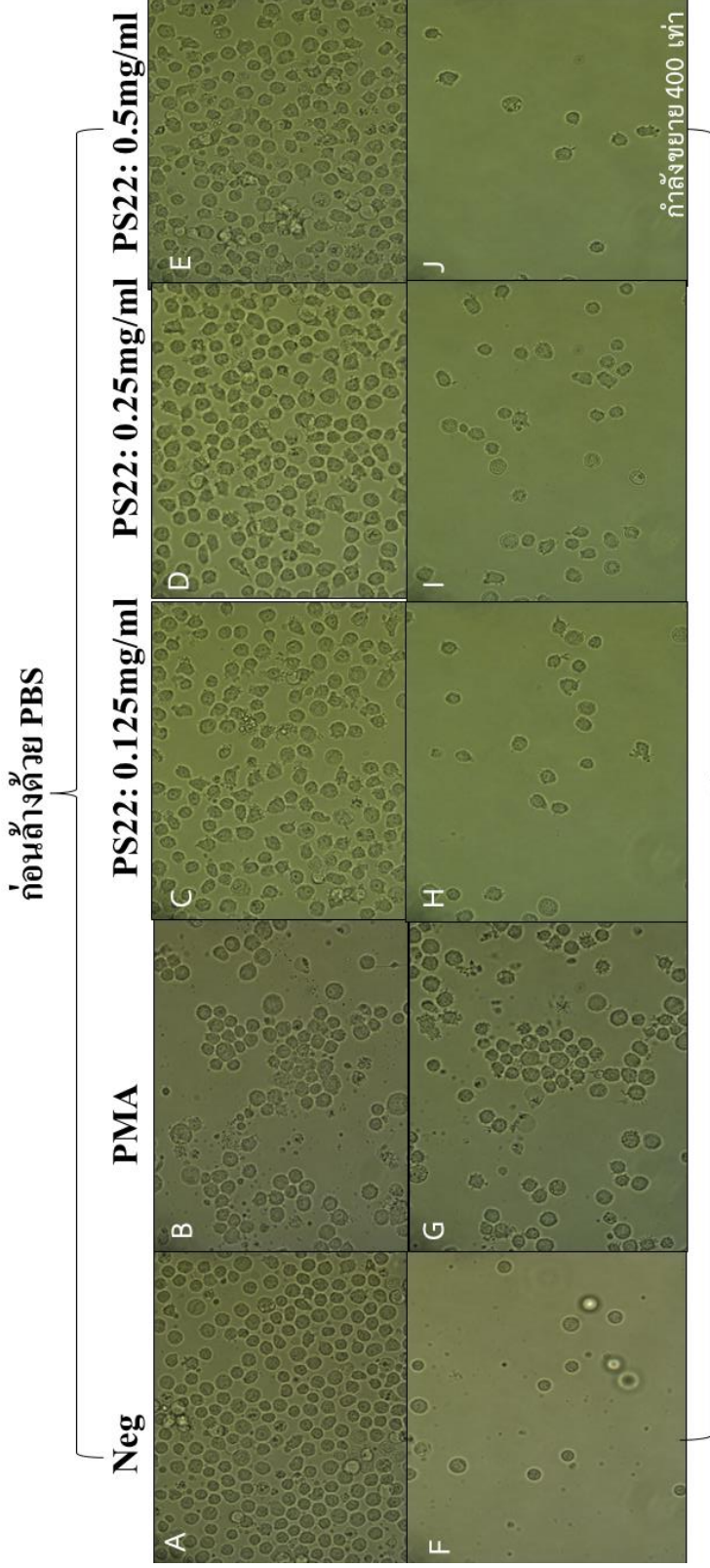
เมื่อทำการทดสอบสารสกัด PS50 กับเซลล์ U937 ดังรูปที่ 44 พบว่าสารสกัดมีผลทำให้รูปร่างเซลล์เปลี่ยนแปลงไปจากเดิม ดังรูปที่ 44C, 44D และ 44E นอกจากนี้ สารสกัด PS50 ยังสามารถเหนี่ยวนำให้เซลล์สามารถยึดเกาะกับพื้นผิวของภาชนะเพาะเลี้ยงได้ โดยจะพบเซลล์ที่สามารถเกาะกับพื้นผิวของภาชนะเพาะเลี้ยงได้ภายหลังการล้างเซลล์ดังรูปที่ 44H, 44I และ 44J แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารสกัด PS50 จำนวนเซลล์ที่สามารถเกาะกับพื้นผิวของภาชนะเพาะเลี้ยงได้จะมีจำนวนลดลง

เมื่อทำการทดสอบกับเซลล์ U937 กับสารสกัด PS100 พบว่าสารสกัดมีผลทำให้รูปร่างเซลล์เปลี่ยนแปลงไปจากเดิม ดังรูปที่ 45C, 45D และ 45E และสามารถเหนี่ยวนำให้เซลล์ยึดเกาะกับพื้นผิวของภาชนะเพาะเลี้ยงได้ โดยจะพบเซลล์ที่เกาะกับพื้นผิวของภาชนะเพาะเลี้ยงได้หลังล้างเซลล์ ดังรูปที่ 45H, 45I และ 45J และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารสกัด PS100 จาก 0.125 เป็น 0.25 และ 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จะเหนี่ยวนำให้จำนวนเซลล์ที่สามารถยึดเกาะกับพื้นผิวของภาชนะเพาะเลี้ยงได้เพิ่มสูงขึ้น



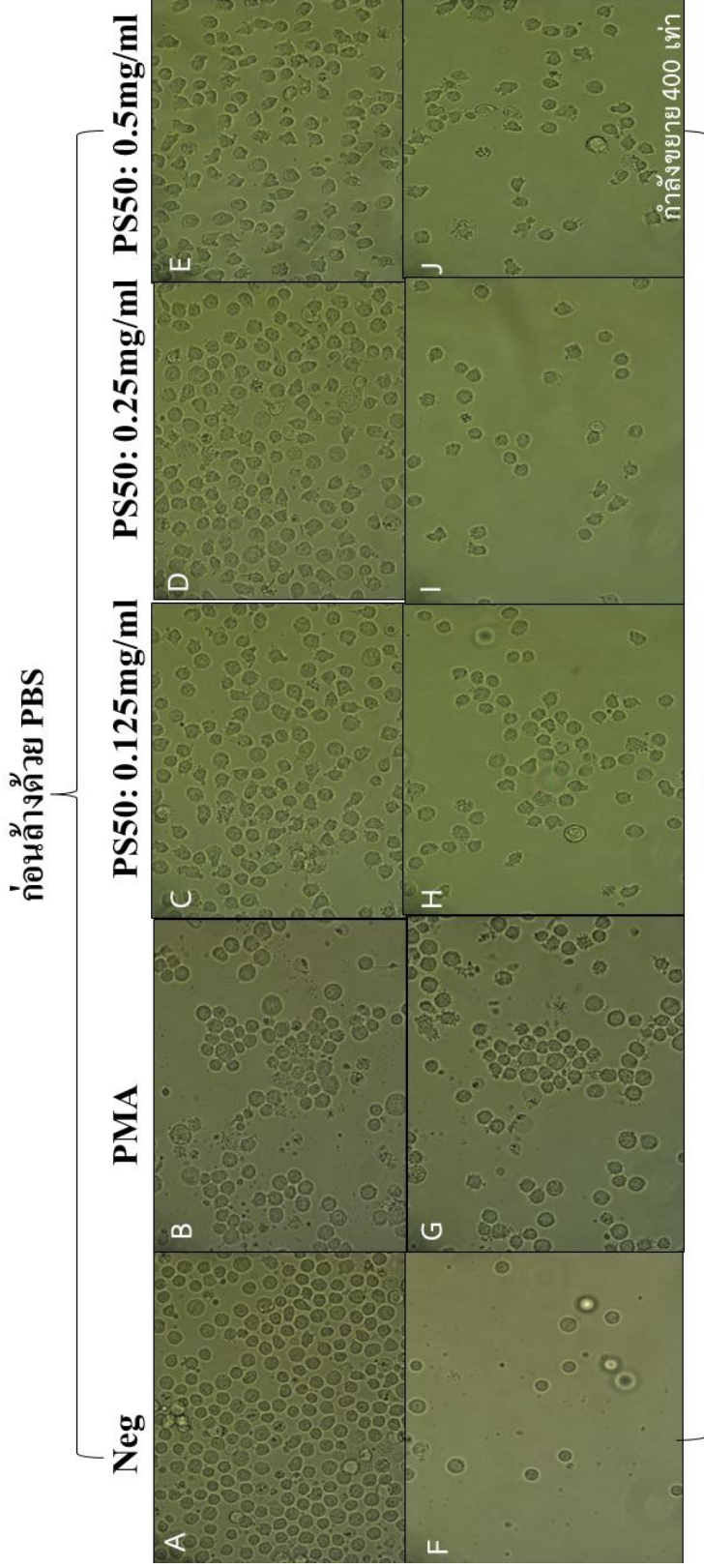


รูปที่ 42 ผลของสารสกัด PS4 ที่ความเข้มข้น 0.125, 0.25 และ 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิเมตร ที่มีต่อการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลล์ U937 เปรียบเทียบกับเซลล์ในกลุ่มควบคุมที่การทดสอบเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิดส่องกลับ Neg : เซลล์กลุ่มควบคุมที่ไม่มีการเติมสารกระตุ้นใดๆ, PMA : เซลล์ในกลุ่มควบคุมที่ได้รับสารกระตุ้น PMA เพื่อให้เซลล์เกิดการพัฒนาและเปลี่ยนแปลงรูปร่าง



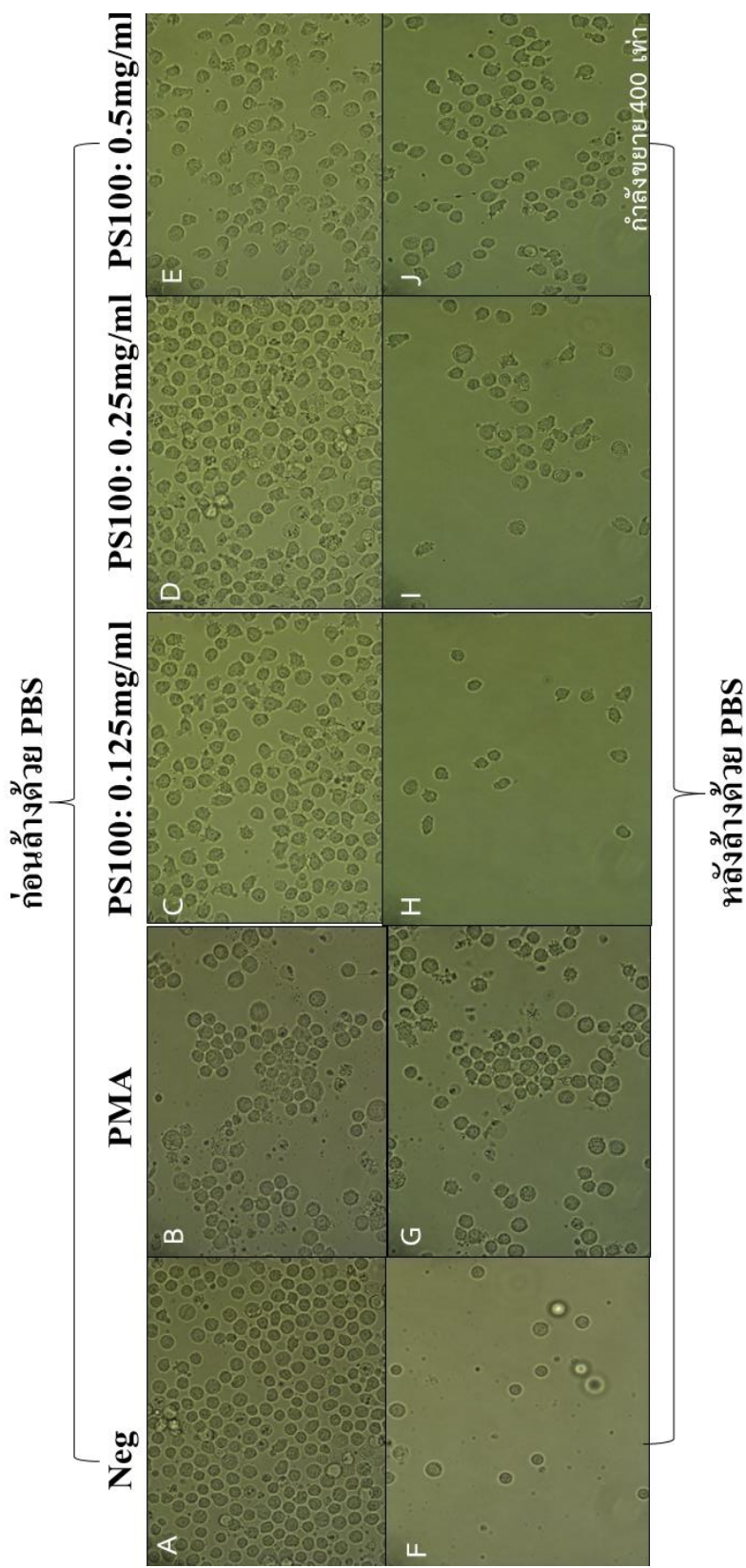
**หลังล้างด้วย PBS**

รูปที่ 43 ผลของสารสกัด PS22 ที่ความเข้มข้น 0.125, 0.25 และ 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ที่มีต่อการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลล์ U937 เปรียบเทียบกับเซลล์ในกลุ่มควบคุมที่การทดสอบเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิดส่องกลับ Neg : เซลล์กลุ่มควบคุมที่ไม่มีการเติมสารกระตุ้นใดๆ, PMA : เซลล์ในกลุ่มควบคุมที่ได้รับสารกระตุ้น PMA เพื่อให้เซลล์เกิดการพัฒนาและเปลี่ยนแปลงรูปร่าง



รูปที่ 44 ผลของสารสกัด PS50 ที่ความเข้มข้น 0.125, 0.25 และ 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิเมตร ที่มีต่อการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลล์ U937 เปรียบเทียบกับเซลล์ในกลุ่มควบคุมที่มีการทดสอบเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิดส่องกลับ Neg : เซลล์กลุ่มควบคุมที่ไม่มีการเติมสารกระตุ้นใดๆ, PMA : เซลล์ในกลุ่มควบคุมที่ได้รับสารกระตุ้น PMA เพื่อให้เซลล์เกิดการพัฒนาและเปลี่ยนแปลงรูปร่าง





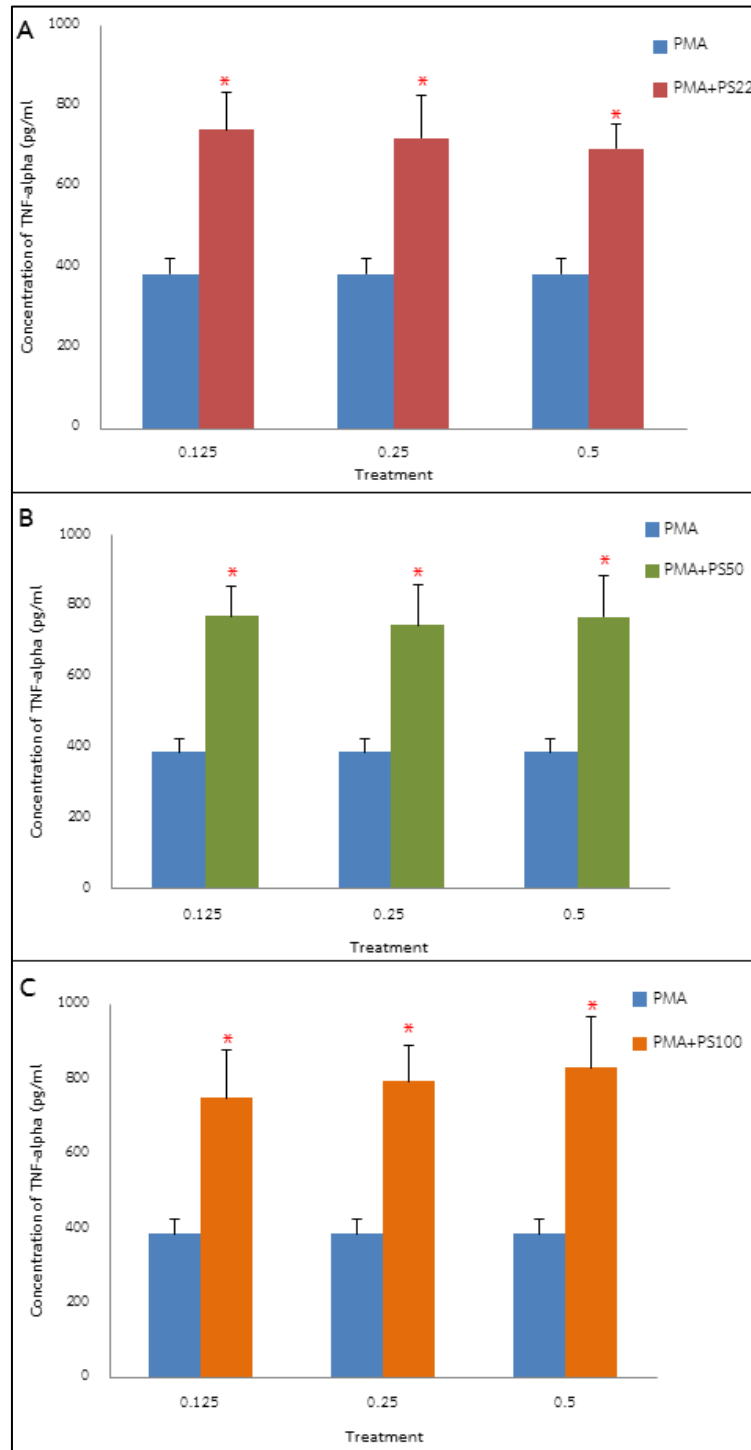
รูปที่ 45 ผลของสารสกัด PS100 ที่ความเข้มข้น 0.125, 0.25 และ 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ที่มีต่อการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลล์ U937 เปรียบเทียบกับเซลล์ในกลุ่มควบคุมที่การทดลองเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิดส่องกลับ Neg : เซลล์กลุ่มควบคุมที่ไม่มีการเติมสารกระตุ้นในใดๆ, PMA : เซลล์ในกลุ่มควบคุมที่ได้รับสารกระตุ้น PMA เพื่อให้เซลล์เกิดการพัฒนาและเปลี่ยนแปลงรูปร่าง

4.4.4 ผลของสารสกัดเห็ดนางฟ้าภูฐานต่อการหลั่งไซโตไคน์ TNF- $\alpha$  ของเซลล์ U937 ด้วยเทคนิค sandwich ELISA

ในการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดเห็ดนางฟ้าภูฐานต่อการหลั่งไซโตไคน์ของเซลล์ U937 ผู้วิจัยทำการศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดเห็ดนางฟ้าภูฐานทั้งหมด 3 ชนิด ได้แก่ PS22, PS50 และ PS100 โดยจะทำการตรวจปริมาณไซโตไคน์ TNF- $\alpha$  ด้วยเทคนิค sandwich ELISA

จากผลการตรวจวัดไซโตไคน์ พบว่าเซลล์ U937 ในสภาวะควบคุมไม่มีการสร้าง TNF- $\alpha$  แต่ในสภาวะที่มีการเติมสารกระตุ้น PMA ลงไปในหลุมทดสอบ พบว่าสาร PMA สามารถกระตุ้นให้เซลล์สร้าง TNF- $\alpha$  ได้คิดเป็น  $384.95 \pm 37.77$  พิโคกรัมต่อมิลลิลิตร และจากการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัด PS22, PS50 และ PS100 ที่ความเข้มข้น 0.125, 0.25 และ 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ต่อการสร้าง TNF- $\alpha$  ในเซลล์ U937 พบว่าสารสกัดทั้ง 3 ชนิดทุกความเข้มข้นที่ทำการทดสอบ ไม่มีฤทธิ์ในการกระตุ้นการหลั่ง TNF- $\alpha$  แต่เมื่อทดสอบสารสกัดเห็ดนางฟ้าภูฐานทั้ง 3 ชนิดร่วมกับสารกระตุ้น PMA พบว่าสารสกัดเห็ดนางฟ้าภูฐานและสารกระตุ้น PMA เสริมฤทธิ์กันส่งผลให้ U937 หลั่ง TNF- $\alpha$  ในปริมาณที่สูงขึ้นกว่าการกระตุ้นด้วย PMA เพียงอย่างเดียวได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ดังรูปที่ 46

จากผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 46A พบว่า สารสกัดเห็ดนางฟ้าภูฐาน PS22 ที่ความเข้มข้น 0.125, 0.25 และ 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จะออกฤทธิ์ในการทำงานร่วมกับ PMA โดยกระตุ้นให้เซลล์ U937 หลั่ง TNF- $\alpha$  ออกมาในปริมาณ  $743.62 \pm 91.80$ ,  $721.87 \pm 106.72$  และ  $695.95 \pm 61.21$  พิโคกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ สำหรับผลการทดสอบสารสกัด PS50 ที่ความเข้มข้น 0.125, 0.25 และ 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ดังแสดงในรูปที่ 46B พบว่าสารสกัดทำงานร่วมกับสาร PMA และกระตุ้นให้เซลล์ U937 หลั่งไซโตไคน์ออกมาในปริมาณ  $767.63 \pm 114.65$ ,  $745.25 \pm 113.42$  และ  $769.23 \pm 84.50$  พิโคกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และสารสกัด PS100 ที่ความเข้มข้น 0.125, 0.25 และ 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ดังผลแสดงในรูปที่ 46C สามารถทำงานร่วมกับสาร PMA และกระตุ้นให้เซลล์ U937 หลั่งไซโตไคน์ออกมาในปริมาณ  $748.43 \pm 129.99$ ,  $793.15 \pm 95.46$  และ  $828.80 \pm 135.34$  พิโคกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ



รูปที่ 46 ผลการทดสอบฤทธิ์ปรับภูมิคุ้มกันต่อการสร้างไซโตไคน์ TNF- $\alpha$  ในสารสกัด PS22, PS50 และ PS100 ที่ความเข้มข้น 0.125, 0.25 และ 0.5 mg/ml ทดสอบเป็นเวลา 24 ชั่วโมง : \* คือ  $p < 0.05$

#### 4.4.5 ผลการวิเคราะห์สารองค์ประกอบในสารสกัดเห็ดนางฟ้าภูฐานด้วยเทคนิค UPLC-HRMS

จากผลการตรวจวัดปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระในกลุ่มของฟีนอล ด้วยเทคนิค Folin-Ciocalteu's method พบว่าสารสกัดเห็ดนางฟ้าภูฐานทั้ง 4 ชนิด มีฟีนอลเป็นองค์ประกอบในปริมาณที่แตกต่างกัน ดังแสดงในรูปที่ 40 และเมื่อทำการตรวจวิเคราะห์ metabolic profile ของสารสกัดเห็ดนางฟ้าภูฐานด้วยเทคนิค UPLC-HRMS ผลการตรวจวิเคราะห์และภาพโครมาโทแกรม พบว่าสารสกัดทั้งหมดมีองค์ประกอบต่างๆ มากมายหลายชนิด ได้แก่ ฟีนอล ฟีนิลโพรพานอยด์ กรดฟีนิลไพรูวิก สารในกลุ่มของเฮเทอโรไซคลิก สารอินทรีย์ คาร์โบไฮเดรต น้ำตาล กรดอะมิโน นิวคลีโอไทด์ นิวคลีโอไซด์ สารในกลุ่มเบนซีน กรดไขมัน สเตียรอยด์ สเตียรอลลิปิด และสารมีขั้วชนิดอื่นๆ ดังแสดงในภาคผนวก ค. และในที่นี้ขอยกตัวอย่างองค์ประกอบในกลุ่มของฟีนอล นิวคลีโอไซด์ และกรดอะมิโน ดังแสดงในตารางที่ 20, 21 และ 22 ตามลำดับ โดยจะไม่พบฟีนอลเป็นองค์ประกอบในสารสกัด PS50 แต่จะพบนิวคลีโอไซด์ในสารสกัดเห็ดนางฟ้าภูฐานทั้ง 4 ชนิด

และในสารสกัดจากเห็ดนางฟ้าภูฐานทั้ง 4 ชนิด จะประกอบไปด้วยกรดอะมิโนทั้งชนิดจำเป็นและไม่จำเป็นต่อร่างกาย ดังแสดงในตารางที่ 22 โดยพบว่ากรดอะมิโนจำนวน 16 ชนิด ได้แก่ alanine, asparagine, aspartic acid, cysteine, glutamic acid, glutamine, glycine, histidine, isoleucine, leucine, lysine, phenylalanine, proline, serine, threonine และ tyrosine จะพบได้ในสารสกัดจากเห็ดนางฟ้าภูฐานทั้ง 4 ชนิดนี้ แต่จะไม่พบกรดอะมิโนชนิด tryptophan ในสารสกัดเห็ดนางฟ้าภูฐานทั้ง 4 ชนิด

ตารางที่ 20 สารในกลุ่มของฟีนอลซึ่งพบในองค์ประกอบของสารสกัดจากเห็ดนางฟ้าภูฐาน (PS4, PS22, PS50, PS100)

No.	RT (min)	Formula	[M - H] <sup>-</sup> (m/z)		Metabolite	Mushroom
			Observed	Theoretical		
Phenol and derivatives						
1	0.73, 0.749	C8 H11 N O2	153.0780	153.0790	Dopamine	PS4, PS22
2	0.731, 0.75, 0.754	C7 H8 O3	140.0468	140.1366	3-Methoxycatechol	PS4, PS22, PS100
3	1.292, 1.33, 1.341	C9 H13 N O3	183.0887	183.0895	Normetanephine	PS4, PS22, PS100
4	3.272	C7 H6 O5	170.0208	170.0215	Gallic acid	PS4
5	4.585	C9 H10 O5	198.0521	198.0528	Syringic acid	PS4
Phenol ether						
6	4.254, 3.324	C13 H16 N4 O3	276.1199	276.2911	3'-Hydroxytrimethoprim	PS4, PS100

ตารางที่ 21 สารในกลุ่มของนิวคลีโอไซด์ซึ่งพบในองค์ประกอบของสารสกัดจากเห็ดนางฟ้าภูฐาน (PS4, PS22, PS50, PS100)

No.	RT (min)	Formula	[M - H] <sup>-</sup> (m/z)		Metabolite	Mushroom
			Observed	Theoretical		
Nucleoside						
1	1.673, 2.009, 1.735, 2.092, 0.842	C10 H13 N5 O5	283.091	283.0917	Guanosine	PS4, PS22, PS100
2	2.113, 2.409	C14 H17 N5 O8	383.1058	383.3134	Succinoadenosine	PS4, PS50
3	0.545	C10 H13 N5 O3	251.1018	251.1018	Deoxyadenosine	PS22
4	1.051	C10 H12 N4 O6	284.0754	284.0757	Xanthosine	PS22
5	0.65	C10 H12 N5 O6 P	329.0496	329.0525	Adenosine 3',5'-cyclic monophosphate(cAMP)	PS50
6	0.642	C10 H14 N5 O7 P	347.0617	347.0631	Deoxyguanosine 5'-monophosphate (dGMP)	PS100
7	0.687	C10 H14 N5 O8 P	363.0566	363.2206	Guanidylic acid (guanosine monophosphate)	PS100
8	0.893	C14 H18 N5 O11 P	463.0723	463.0740	N6-(1,2-dicarboxyethyl)-AMP	PS100

ตารางที่ 22 กรดอะมิโนที่พบในองค์ประกอบของสารสกัดจากเห็ดนางฟ้าภูฐาน (PS4, PS22, PS50, PS100)

Amino acid	Mushroom species	
	Found	Not found
Alanine	PS4, PS22, PS50, PS100	-
Arginine	PS4,PS22, PS100	PS50
Asparagine	PS4, PS22, PS50, PS100	-
Aspartic acid	PS4, PS22, PS50, PS100	-
Cysteine	PS4, PS22, PS50, PS100	-
Glutamic acid (Glu)	PS4, PS22, PS50, PS100	-
Glutamine (Gln)	PS4, PS22, PS50, PS100	-
Glycine	PS4, PS22, PS50, PS100	-
Histidine	PS4, PS22, PS50, PS100	-
Isoleucine	PS4, PS22, PS50, PS100	-
Leucine	PS4, PS22, PS50, PS100	-
Lysine	PS4, PS22, PS50, PS100	-
Methionine	PS4,PS22,PS50	PS100
Phenylalanine	PS4, PS22, PS50, PS100	-
Proline	PS4, PS22, PS50, PS100	-
Serine	PS4, PS22, PS50, PS100	-
Threonine	PS4, PS22, PS50, PS100	-
Tryptophan	-	PS4, PS22, PS50, PS100
Tyrosine	PS4, PS22, PS50, PS100	-
Valine	PS4,PS22, PS100	PS50

\* กรดอะมิโนจำเป็น (Essential amino acids)

## บทที่ 5

### อภิปรายผลการทดลองและสรุปผลการวิจัย

#### 5.1 ผลการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดเอทานอลจากเห็ดนางฟ้าภูฐาน เห็ดเป่าฮื้อ และเห็ดหูหนู

จากการทดสอบหาปริมาณสารฟีนอลและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในสารสกัดเอทานอลของเห็ดนางฟ้าภูฐาน (PS), เห็ดเป่าฮื้อ (PA) และเห็ดหูหนู (AA) พบว่าฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ได้จากการทดสอบจะไม่ขึ้นอยู่กับปริมาณสารฟีนอลที่พบในสารสกัดจากเห็ดทั้ง 3 ชนิดนี้ ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าสารชนิดอื่นๆ ที่พบในองค์ประกอบของสารสกัด PS, PA และ AA สามารถออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้ จากการทดสอบพบว่าสารสกัด AA มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุด แต่เมื่อทำการเปรียบเทียบปริมาณสารฟีนอลที่พบในสารสกัดทั้ง 3 ชนิดนี้ พบว่าสารสกัด AA มีสารฟีนอลในปริมาณน้อยที่สุด ทั้งนี้ผู้วิจัยไม่ได้ทำการตรวจวัดปริมาณของฟลาโวนอยด์และสารประกอบอื่นๆ ในงานวิจัยนี้

จากข้อมูลองค์ประกอบของสารสกัดเอทานอลของเห็ด PS, PA และ AA ที่วิเคราะห์ด้วยเทคนิค UPLC-HRMS พบสารสำคัญซึ่งเคยมีผู้ทำการศึกษาวิจัยมาก่อนหน้านี้ ตัวอย่างเช่น ในองค์ประกอบของสารสกัด PA จะพบสารฟลาโวนอยด์ชนิด phloridzin ซึ่งจากการศึกษาของ Jeanelle และคณะ (2004) พบว่าสาร phloridzin ซึ่งเป็นสารสำคัญชนิดหนึ่งที่พบในองค์ประกอบของแอปเปิ้ลมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้ (93) นอกจากนี้ นักวิจัยพบว่าสารสกัด PA ที่สกัดโดยใช้เอทานอลด้วยเทคนิครีฟลักซ์และโครมาโทกราฟีจะประกอบด้วยสารสำคัญที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ 3 ชนิด ได้แก่ 9-beta-d-ribofuranosidoadenine, 5-deoxy-5-(methylthio) adenosine และ triterpenoid (94) แต่จากการตรวจวิเคราะห์ด้วยเทคนิค UPLC-HRMS กลับไม่พบสารทั้ง 3 ชนิดในสารสกัดเอทานอลของเห็ด PA จากงานวิจัยนี้ที่สกัดด้วย soxhlet extraction

สารที่น่าสนใจและพบเฉพาะในสารสกัด AA คือ swietenine ซึ่งพบในเมล็ดของพืช *Swietenia macrophylla* หรือมะฮอกกานีใบใหญ่ ซึ่งเป็นพืชชนิดหนึ่งที่พบในประเทศมาเลเซียโดยจะรู้จักในชื่อของ skyfruit จากงานวิจัยของ Dewanjee และคณะ (2009) พบว่า swietenine มีฤทธิ์ต้านการอักเสบ ต้านการกลายพันธุ์ และต้านมะเร็ง (95)

จากงานวิจัยชิ้นนี้พบว่า สารสกัด PS มีสาร 4-hydroxyphenylethanol หรือ tyrosol ซึ่งเป็นสารต้านอนุมูลอิสระชนิดหนึ่งพบได้ในน้ำมันมะกอก โดยมีผู้นำสารนี้มาทำการศึกษาฤทธิ์ต้าน

อนุมูลอิสระในเซลล์ตับ พบว่า tyrosol สามารถลดปริมาณอนุมูลอิสระและทำให้เซลล์ตับมีชีวิตรอดและป้องกันความเสียหายจากอนุมูลอิสระ (96) นอกจากนี้ มีรายงานการวิจัยที่ทำการศึกษาหัตถ์พื้นบ้านในประเทศกรีซจำนวน 5 ชนิด พบว่ามีสาร tyrosol เป็นองค์ประกอบ โดยสารชนิดนี้มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ช่วยลดทอนฤทธิ์ของอนุมูลอิสระ และมีความสามารถในการจับกับประจุของไอออนได้ (97)

นอกจากสารองค์ประกอบชนิดต่างๆ ที่มีความสำคัญต่อฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ยังพบว่าสารสกัด PS มีปริมาณสารฟีนอลและมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่แตกต่างจากงานวิจัยอื่นๆ ที่ผ่านมา โดย Kanagasabapathy และคณะ (2011) ได้ทำการตรวจวัดฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัด PS พบว่ามีปริมาณสารฟีนอลคิดเป็น  $9.48 \pm 0.85$  mg GAEs equiv/g และเมื่อนำไปตรวจวัดฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระพบว่ามีค่า  $16.55 \pm 3.09$   $\mu$ M Trolox equiv/g (62) ซึ่งจะมีปริมาณของฟีนอลและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่น้อยกว่าปริมาณที่พบในสารสกัด PS ของงานวิจัยนี้ ส่วนสารสกัดชั้นเมทานอลของเห็ดนางฟ้าภูฐานมีปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระชนิดต่างๆ คิดเป็นสารฟีนอลประมาณ  $0.69 \pm 0.10$  มิลลิกรัมต่อกรัม และสารฟลาโวนอยด์ประมาณ  $1.78 \pm 0.08$  มิลลิกรัมต่อกรัม (98) ซึ่งการสกัดด้วยตัวทำละลายที่แตกต่างกันก็จะมีผลให้ปริมาณของฟีนอลและฟลาโวนอยด์แตกต่างกันออกไป

จากผลการทดสอบฤทธิ์ต่อการเจริญของเซลล์ U937 พบว่าสารสกัด PS ที่ความเข้มข้นต่ำกระตุ้นเจริญของเซลล์ ในขณะที่สารสกัด PS ที่ความเข้มข้นสูงสามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์ได้ ฤทธิ์ของสารสกัด PS ขึ้นอยู่กับระยะเวลาในการทดสอบแต่ไม่ขึ้นอยู่กับความเข้มข้นที่เพิ่มขึ้น โดยมีรายงานว่าสารที่ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งที่มีมากกว่า 100 ชนิดนั้น เมื่อใช้ความเข้มข้นต่ำจะกระตุ้นให้เซลล์มะเร็งมีการเจริญที่เพิ่มสูงขึ้น แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นขึ้น สารจะมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งได้ภายใต้ปรากฏการณ์ที่เรียกว่า biphasic effect (99) จากผลการศึกษาในงานวิจัยนี้ พบว่าสารสกัด AA จะมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์ U937 ได้สูงที่สุด สอดคล้องกับผลการศึกษาวิจัยของ Reza และคณะ (2011) ที่พบว่าสารสกัดเอทานอลของเห็ดหูหนูที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง sarcoma 180 ได้ (74) ทั้งนี้ ในเห็ดจะประกอบด้วยสารหลายชนิด เช่น โพลีแซ็กคาไรด์ โปรตีน ไขมัน ไกลโคไซด์ ฟีนอล ฟลาโวนอยด์ แครโทินอยด์ สารอินทรีย์ ฯลฯ (100) โดยสารสำคัญที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งมีอยู่ด้วยกันหลายชนิด เช่น โพลีแซ็กคาไรด์ เบต้ากลูแคน และสารประกอบโปรตีน-โพลีแซ็กคาไรด์ (101) จากผล



การวิเคราะห์องค์ประกอบของสารสกัดพบว่ากรดอะมิโนเป็นองค์ประกอบหนึ่งที่น่าสนใจ คณะผู้วิจัยตรวจพบกรดอะมิโนชนิดเมไทโอนีน ทรีโอนีน และกรดกลูตามิคเฉพาะในสารสกัด AA เท่านั้น และพบกรดอะมิโนชนิดซีรีน เฉพาะในสารสกัด PA เท่านั้น ซึ่งกรดอะมิโนบางชนิดที่พบในสารสกัดชั้นเอทานอล ก็จะได้พบได้ในสารสกัดชั้นน้ำเช่นกัน ตัวอย่างเช่น กรดกลูตามิค ซึ่งเป็นกรดอะมิโนจำเป็นชนิดหนึ่งที่ได้พบได้ในเห็ดหลายสายพันธุ์ โดยจากผลการทดลองจะพบกรดอะมิโนชนิดนี้ได้พบในสารสกัดชั้นเอทานอลของเห็ดหูหนู และในสารสกัดชั้นน้ำของเห็ดนางฟ้าภูฐานและเห็ดเป๋าฮื้อ ซึ่งจากงานวิจัยของ Dutta และคณะ (2013) พบว่ากรดกลูตามิคมีฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งได้ (102) ดังนั้นการที่สารสกัด AA มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์ U937 ได้ดีที่สุดอาจเป็นเพราะฤทธิ์ของกรดกลูตามิคที่มีอยู่ในสารสกัด นอกจากนี้ ยังตรวจพบ ethenodeoxyadenosine ในสารสกัด AA ซึ่ง ethenodeoxyadenosine เป็นอนุพันธ์ของสารในกลุ่มของนิวคลีโอไซด์ชนิด deoxyadenosine ซึ่งสารประเภทนี้เป็นสารสำคัญที่พบในเห็ดถั่งเช่า ซึ่งมีสารออกฤทธิ์ที่มีประโยชน์ทางการแพทย์มากมายหลายชนิด สารออกฤทธิ์สำคัญที่มีผู้ให้ความสนใจกันอย่างแพร่หลายคือ คอร์โดเซปิน (cordycepin) หรือ 3'-deoxyadenosine ซึ่งจะมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ ยับยั้งการเจริญและการแพร่กระจายตัวของเซลล์มะเร็ง และยังมีฤทธิ์ในการปรับภูมิคุ้มกันด้วย (103) นอกจากนี้ Seto และคณะ (1985) พบว่าสาร deoxyadenosine มีความเป็นพิษต่อเซลล์ลิมโฟไซต์ค่อนข้างสูงเนื่องจากสามารถทำให้ดีเอ็นเอของเซลล์เกิดความเสียหาย และสามารถยับยั้งการสังเคราะห์อาร์เอ็นเอในเซลล์ได้ (104) ดังนั้นแม้ว่าจะไม่พบ สาร deoxyadenosine ในสารสกัด AA แต่อนุพันธ์ของสารดังกล่าวอาจมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์ เป็นผลให้สารสกัด AA สามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์ U937 ได้ดีที่สุด

ในงานวิจัยนี้ยังพบ betaxolol ซึ่งเป็นสารสำคัญชนิดหนึ่งในองค์ประกอบของสารสกัด PS และ PA จากงานวิจัยของ Yu และคณะ (2007) พบว่าสาร betaxolol มีคุณสมบัติเป็น  $\beta$ -adrenergic antagonists หรือ  $\beta$ -blockers ที่ช่วยยับยั้งการเกิด oxidative stress ในเซลล์ของหนูชนิด retinal ganglion cells (RGCs) (105) และสาร betaxolol ยังถูกพบปนเปื้อนในโสมอินเดียนหรือ *Withania somnifera* เมื่อทำการตรวจวัดด้วยเทคนิค mass multi-class multi-residue โดยใช้ high resolution mass spectrometry (106) นอกจากนี้ยังพบสาร betaxolol ได้ในสิ่งแวดล้อมทั่วไป และสารชนิดนี้ยังเป็นสารออกฤทธิ์ที่สำคัญซึ่งนำมาใช้อย่างแพร่หลายทางเภสัชกรรม (107) ซึ่งในสารสกัด PS และ PA ที่พบ betaxolol จะเป็นสารสกัดที่ได้จากเห็ดที่ซื้อจากฟาร์ม

ที่ต่างกัน และในสารสกัด PA ยังพบสาร dienestrol ซึ่งเป็น phenolic environmental estrogens (PEEs) ชนิดหนึ่ง จากผลการทดลองนี้จึงสันนิษฐานได้ว่าสารองค์ประกอบที่ตรวจพบส่วนหนึ่งอาจมาจากการปนเปื้อนจากสิ่งแวดล้อมได้

จากผลการศึกษาสารสกัดชั้นเอทานอลของเห็ดนางฟ้าภูฐาน เห็ดเป่าฮื้อ และเห็ดหูหนู พบว่าเห็ดทั้ง 3 ชนิดมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์ U937 โดยสารสกัดเห็ดหูหนูจะออกฤทธิ์ได้ดีที่สุด ดังนั้นการศึกษาวิจัยต่อเนื่องสามารถทำได้โดยการศึกษากลไกการออกฤทธิ์ของสารสกัด AA ในการยับยั้งการเจริญของ U937 การยับยั้งวัฏจักรเซลล์ รวมถึงการชักนำให้เซลล์เกิดการตายในแบบอะพอพโทซิส และศึกษาฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของสารสกัด AA ต่อเซลล์มะเร็งชนิดอื่นๆ เช่น ในงานวิจัยของ Reza และคณะ (2011) ได้ทำการศึกษาฤทธิ์ของสารสกัด AA ในเซลล์มะเร็งของหนูชนิด sarcoma 180 (74) นอกจากนี้ในองค์ประกอบของสารสกัดชั้นเอทานอลจากเห็ดทั้ง 3 ชนิด ยังพบสารสำคัญมากมายซึ่งหากสามารถสกัดออกมาให้เป็นสารบริสุทธิ์และนำไปศึกษาถึงกลไกการออกฤทธิ์ของสารสำคัญนั้นๆ ก็อาจทำให้สามารถพัฒนาเป็นยาที่ใช้ในทางการแพทย์ต่อไปได้

## 5.2 ผลการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดชั้นน้ำของเห็ดหูหนู

จากผลการศึกษาสารสกัดดอกเห็ดหูหนูด้วยน้ำที่อุณหภูมิ 4 (AA4), 22 (AA22), 50 (AA50) และ 100 (AA100) องศาเซลเซียส พบว่าสารสกัด AA50 มีปริมาณสารฟีนอลและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุด และเมื่อทำการวิเคราะห์องค์ประกอบของสารสกัด AA50 จะพบสารฟีนอลเพียง 1 ชนิดคือ hydroxyhydroquinone ซึ่งสารชนิดนี้พบได้ในกาแฟและเป็นสารโปรออกซิแดนซ์ชนิดหนึ่งที่สามารถก่อให้เกิดอนุมูลอิสระได้ (108) แต่ได้มีรายงานวิจัยเกี่ยวกับบอนุพันธ์ของสาร hydroxyhydroquinone เช่น 4-methoxyphenol, 4-dimethoxyphenol และ 3,4-diethoxyphenol ว่ามีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้ (109) และจากงานวิจัยของ Oke และคณะ (2011) ได้ทำการสกัดเห็ดหูหนูโดยใช้ตัวทำละลาย 2 ชนิดได้แก่ น้ำและเมทานอล ซึ่งพบว่าในสารสกัดชั้นน้ำจะพบสารต้านอนุมูลอิสระชนิดโพลีฟีนอล (polyphenol) ในปริมาณที่สูง แต่ในสารสกัดชั้นเมทานอลจะพบสารต้านอนุมูลอิสระชนิดแคโรทีนอยด์ (carotenoids) และกรดแอสคอร์บิก (ascorbic acid) เป็นส่วนใหญ่ และในเซลล์ไตของลูกหนูแฮมสเตอร์ (baby hamster kidneys, BHK 21) ที่ได้รับสารสกัดทั้งจากชั้นน้ำและชั้นเมทา

นอลจะมีจำนวนการตายของเซลล์เนื่องจากการเหนี่ยวนำของอนุโมลิสระที่ลดลงได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ในกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับสารสกัด (110)

จากงานวิจัยหลายชิ้น ตรวจพบสารออกฤทธิ์หลายชนิดในเห็ดหูหนู ตัวอย่างเช่น เบต้ากลูแคน (111) เมลานิน (78) และพอลิแซ็กคาไรด์ (77) เป็นต้น โดยจากงานวิจัยของ Xu และคณะ (2012) พบว่าในเห็ดหูหนูจะมีเบต้ากลูแคนชนิด  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3)-D-glucan ที่สามารถละลายได้ในน้ำและมีลักษณะที่เป็นเมือกคล้ายเจล ซึ่งสารเบต้ากลูแคนที่พบนี้จะมีประสิทธิภาพมากที่สุดเมื่ออยู่ในอุณหภูมิช่วง 5-65 องศาเซลเซียส (111) ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองที่ได้จากการศึกษาวิจัยในครั้งนี้ โดยสารสกัดชั้นน้ำที่ผู้วิจัยสกัดได้จากเห็ดหูหนูจะมีลักษณะเป็นเมือก และเมื่อทำการศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดในชั้นน้ำจากดอกเห็ดหูหนูจะพบว่าสารสกัดที่ได้จากการสกัดที่อุณหภูมิ 22, 50 และ 4 องศาเซลเซียสสามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์โมโนไซต์ U937 ได้ดีที่สุดเรียงตามลำดับ นอกจากนั้นในการศึกษาของ Ma และคณะ (2008) พบว่าในเห็ดหูหนูยังมีเบต้ากลูแคนที่สามารถละลายน้ำชนิด  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4)-glucan (112) ซึ่งเบต้ากลูแคนชนิดนี้มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งชนิด Acinar cell carcinoma (ACC) และเซลล์มะเร็งชนิด Sarcoma180 (79) แต่เมื่อทำการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค UPLC-HRMS จะไม่พบองค์ประกอบที่เป็นสารเบต้ากลูแคนดังที่กล่าวมา ซึ่งอาจเป็นเพราะขั้นตอนในการสกัดและเทคนิคที่ใช้ในการวิเคราะห์องค์ประกอบสารที่มีความแตกต่างกัน โดย Ma และคณะ (2008) ที่ได้ทำการสกัดส่วนของโพลีแซ็กคาไรด์ออกมาจากเห็ดหูหนู แล้วจึงนำสารสกัดที่ได้มาทำการสกัดส่วนของเบต้ากลูแคนต่อด้วยด้วยคลื่นเสียงอัลตราโซนิก (112)

จากที่ได้กล่าวไว้ในข้างต้นกรดกลูตามิกมีฤทธิ์ในการยับยั้งเซลล์มะเร็งได้ (102) นอกจากจะพบกรดกลูตามิกซึ่งเป็นกรดอะมิโนที่สำคัญซึ่งพบได้ในสารสกัดชั้นเอทานอลของเห็ดหูหนู ผู้วิจัยยังตรวจพบกรดกลูตามิกในสารสกัด AA4, AA22, AA50 และ AA100 ซึ่งอาจส่งผลให้สารสกัดจากเห็ดหูหนูด้วยน้ำทั้งหมดออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์ U937 ได้เช่นเดียวกัน และเมื่อวิเคราะห์สารสกัด AA100 พบว่ามีปริมาณสารฟีนอลและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ต่ำที่สุด และสารสกัดไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์แต่สามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์ U937 ได้ ซึ่งแตกต่างจากสารสกัด AA4, AA22 และ AA50 ที่จะมีความเป็นพิษต่อเซลล์และทำให้เซลล์มีจำนวนที่ลดลงได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งผลที่ได้ในงานวิจัยนี้ มีความสอดคล้องกับงานวิจัยของ Dai และคณะ (2010) ที่พบว่าการใช้อุณหภูมิใน

การสกัดสารที่สูงเกินไปจะทำให้ได้ปริมาณสารลดลง และอาจมีผลทำให้โครงสร้างของสารสำคัญเกิดความเสียหายและส่งผลต่อการออกฤทธิ์ได้ (113)

ในการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดเห็ดหูหนูต่อการเจริญของเซลล์ U937 จะใช้น้ำยา MTT ในการทดสอบ เนื่องจากสีของสารสกัดเห็ดหูหนูและน้ำยา MTS จะทำปฏิกิริยากัน ส่งผลให้ค่าที่ตรวจวัดได้ไม่สะท้อนฤทธิ์ของสาร ผู้วิจัยจึงทดสอบโดยใช้น้ำยา MTT ซึ่งสีของสารสกัดจะไม่มีผลต่อการทดสอบ เนื่องจากในการทดสอบด้วยน้ำยา MTT จะเน้นที่สีของสารฟอร์มาซานที่อยู่ภายในเซลล์หลังการละลายฟอร์มาซานออกมาจากตัวเซลล์ด้วยสาร DMSO ดังนั้นสีของสารสกัดที่เกิดขึ้นจึงไม่มีผลต่อการทดสอบด้วยเทคนิคนี้ แต่ทั้งนี้การใช้สาร MTS ในการทดสอบจะช่วยให้การตรวจวัดมีความรวดเร็ว ทำได้ง่าย ขั้นตอนไม่ยุ่งยากซับซ้อน ทำได้โดยการเติมน้ำยา MTS ลงในหลุมทดสอบโดยตรง และเมื่อครบระยะเวลา ดูดส่วนน้ำของสารละลายไปวัดค่าการดูดกลืนแสงได้ ซึ่งแตกต่างจากการใช้น้ำยา MTT ที่ต้องมีขั้นตอนของการละลายสารฟอร์มาซานออกจากตัวเซลล์ หากละลายสารฟอร์มาซานออกมาจากเซลล์ได้ไม่หมดก็จะส่งผลให้ค่าที่อ่านได้มีความคลาดเคลื่อนไปจากค่าที่แท้จริงได้ (85) ในการทดสอบสารสกัดชนิดอื่นๆ จึงยังคงใช้สาร MTS อย่างไรก็ตาม น้ำยาที่ใช้และการทดสอบทั้ง 2 อย่างนี้ มีข้อจำกัดคือ อาจมีสารบางอย่างในการทดสอบที่สามารถทำปฏิกิริยากับสาร MTT หรือ MTS ได้โดยตรง หรือสารบางอย่างในการทดสอบอาจมีผลต่อกิจกรรมของเอนไซม์ succinate dehydrogenase ทำให้ค่าที่วัดได้จากการใช้ 2 เทคนิคนี้คลาดเคลื่อนได้ นอกจากนี้หากเซลล์ที่ใช้ในการทดสอบไม่แข็งแรง และเซลล์มีการบาดเจ็บก็จะส่งผลให้ผลการทดสอบที่ได้จากเทคนิค MTT และ MTS นี้เกิดความคลาดเคลื่อนได้เช่นเดียวกัน (114)

สรุปได้ว่า สารสกัด AA50 มีปริมาณสารฟีนอลและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุด และเมื่อทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดเห็ดหูหนูต่อการเจริญของเซลล์ U937 พบว่าสารสกัด AA4, AA22 และ AA50 มีความเป็นพิษต่อเซลล์ U937 และมีผลทำให้จำนวนเซลล์ U937 ที่มีชีวิตลดลงได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ยกเว้นสารสกัด AA100 ซึ่งยับยั้งการเจริญของเซลล์ U937 ได้น้อยและไม่เป็นพิษต่อเซลล์ การสกัดด้วยอุณหภูมิสูงอาจส่งผลต่อการออกฤทธิ์ของสารสกัด AA100 การศึกษาในอนาคตทำได้โดยการตรวจสอบกลไกในการออกฤทธิ์ของสารสกัด AA4, AA22 และ AA50 องศาเซลเซียส นอกจากนี้ยังสามารถทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดเห็ดหูหนูต่อการเจริญของเซลล์มะเร็งชนิดอื่นๆ ต่อไป

### 5.3 ผลการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดชั้นน้ำของเห็ดเป่าฮื้อ

จากการวิจัยพบว่า สารสกัดด้วยน้ำของเห็ดเป่าฮื้อ PA50, PA100 และ PA22 มีปริมาณสารฟีนอลมากกว่า PA4 ประมาณ 2 เท่า แต่ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระของ PA50 กลับมีค่าต่ำที่สุดเมื่อเทียบกับสารสกัดเห็ดเป่าฮื้ออีก 3 ชนิด โดยสารในกลุ่มฟีนอลที่พบในสารสกัด PA50 ได้แก่ normetanephrine ซึ่งเป็นฮอร์โมนชนิดหนึ่งที่พบในปัสสาวะ (115) และจะพบได้ในสารสกัด PA4 และ PA22 เช่นกัน ซึ่งสาร normetanephrine ที่พบนี้จึงน่าจะมาจากการปนเปื้อนจากสิ่งแวดล้อมทั่วไป นอกจากนี้ในสารสกัดเห็ดเป่าฮื้อ PA22 ซึ่งมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุด ยังพบสาร triadimefon ซึ่งเป็นสารเคมีชนิดหนึ่งที่มีคุณสมบัติฆ่าเชื้อรา มักใช้เพื่อป้องกันโรคให้กับพืช (116) มีงานวิจัยทำการศึกษาดังฤทธิ์ของ triadimefon ในการต้านความชราของใบแตงกวาพบว่าสาร triadimefon มีความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระชนิด reactive oxygen species ( $O_2^-$  และ  $H_2O_2$ ) รวมถึงกระบวนการเกิด lipid peroxidation ในใบแตงกวาที่ได้รับสาร triadimefon ได้เป็นอย่างดี (117) ซึ่งในงานวิจัยนี้สาร triadimefon ที่พบในสารสกัด PA22 อาจมาจากการปนเปื้อนจากสิ่งแวดล้อมบริเวณแหล่งเพาะปลูกได้ และในสารสกัดเห็ดเป่าฮื้อ PA100 ยังพบสาร syringic acid ซึ่งพบได้ในสมุนไพร *Herba dendrobii* ของประเทศจีน (118) สารชนิดนี้เป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่เคยมีผู้นำไปทำการศึกษาวิจัยถึงผลในการยับยั้ง oxidative stress marker ในเซลล์ตับอ่อนของหนูที่ได้รับสารกระตุ้นจาก L-arginine พบว่าในหนูที่ได้รับสาร syringic acid จะช่วยลด oxidative stress marker ในตับอ่อนลงได้มากกว่าในหนูกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับสาร syringic acid (119) และสารนี้ยังมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญและแบ่งตัวของเซลล์มะเร็งปอดชนิด A549 ได้ (120)

จากผลการศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดต่อการเจริญของเซลล์ U937 พบว่า สารสกัดจากดอกเห็ดเป่าฮื้อ PA4, PA22 และ PA50 จะยับยั้งการเจริญของเซลล์ U937 ได้ โดยมีรายงานการวิจัย พบว่าสารพอลิแซ็กคาไรด์จากดอกเห็ดเป่าฮื้อมีฤทธิ์ยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็งเต้านม (MCF-7) โดยทำการทดสอบเป็นเวลา 48 ชั่วโมง มีค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ 193 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และจากการศึกษาพบว่าโพลีแซ็กคาไรด์จะทำให้เซลล์ MCF-7 เกิดการตายแบบอะพอพโทซิสด้วย (70) นอกจากนี้ Wang และคณะ (2011) ได้ทำการศึกษามูลของสารโพลีแซ็กคาไรด์จากดอกเห็ดเป่าฮื้อต่อการเจริญและแบ่งตัวของเซลล์ MCF-7 และเซลล์มะเร็งตับ (HepG2) พบว่าสารโพลีแซ็กคาไรด์ที่นำมาทดสอบมีฤทธิ์ช่วยยับยั้งการเจริญและแบ่งตัวของเซลล์ HepG2 ได้เพียงเล็กน้อย แต่ออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญ

และแบ่งตัวต่อเซลล์ MCF-7 ได้ดีกว่าโดยมีค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ 446.7 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (69) ส่วน Li และคณะ (2012) พบว่าสารประกอบโพลีแซ็คคาไรด์-เปปไทด์ ที่สกัดได้จากดอกเห็ดเห็ดเป่าชื่อสามารถยับยั้งการเจริญและแบ่งตัวของเซลล์ MCF-7 และเซลล์ HepG2 ได้โดยมีค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ 14 ไมโครโมลาร์ และ 24 ไมโครโมลาร์ ตามลำดับ (71) จากงานวิจัยชิ้นนี้ พบว่าสารสกัดชั้นน้ำของดอกเห็ดเห็ดเป่าชื่อ PA4, PA22 และ PA50 ออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์โมโนไซต์ U937 ได้เมื่อทำการทดสอบเป็นเวลา 48 ชั่วโมงเป็นต้นไป และเมื่อผู้วิจัยได้วิเคราะห์องค์ประกอบของสารสกัดชั้นน้ำของเห็ดเห็ดเป่าชื่อกลับไม่พบสารประกอบโพลีแซ็คคาไรด์ และโพลีแซ็คคาไรด์-เปปไทด์แต่อย่างใด หากแต่พบกรดกลูตามิกในสารสกัด PA4, PA22 และ PA50 ซึ่งอาจเป็นสารสำคัญที่ช่วยในการยับยั้งการเจริญของเซลล์ U937 ได้ ส่วนสารสกัด PA100 ที่ไม่ยับยั้งการเจริญของเซลล์ U937 นั้น ก็ตรวจไม่พบกรดกลูตามิกในองค์ประกอบ อีกทั้งอุณหภูมิที่ใช้ในการสกัดเห็ดเห็ดเป่าชื่ออาจมีผลต่อการออกฤทธิ์ของสารสำคัญที่พบในสารสกัด PA100 ทำให้ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์ U937 ได้ สอดคล้องกับงานวิจัยของ Finimundy และคณะ (2013) ที่ทำการศึกษาฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งตับชนิด Hep2 และเซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด HeLa ในสารสกัดเห็ดนางฟ้าภูฐานและเห็ดหอม (*Lentinula edodes*) ที่สกัดด้วยอุณหภูมิ 4,22 และ 50 องศาเซลเซียส พบว่าสารสกัดจากเห็ดทั้ง 2 ชนิดที่สกัดด้วยอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส จะมีฤทธิ์ต่ำที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับสารสกัดที่ได้จากการสกัดด้วยอุณหภูมิ 4 และ 22 องศาเซลเซียส (61)

จากผลการทดลองของสารสกัดชั้นน้ำจากเห็ดเห็ดเป่าชื่อพบว่าสารสกัด PA4 และ PA22 จะมีความเป็นพิษต่อเซลล์ U937 และมีผลทำให้จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตลดลงได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่สารสกัด PS50 สามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์ U937 ได้โดยไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ การศึกษาวิจัยต่อเนื่องในอนาคตสามารถทำได้โดยการศึกษากลไกการออกฤทธิ์ของสารสกัด PA4 และ PA22 ต่อการยับยั้ง U937 และศึกษาฤทธิ์ของสารในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งชนิดอื่นๆต่อไป ส่วนสารสกัด PA100 ถึงแม้จะไม่สามารถออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์ U937 ได้ แต่กลับพบว่า PA100 สามารถเหนี่ยวนำให้เซลล์เกิดการเจริญเปลี่ยนแปลงรูปร่างและคุณสมบัติได้ อีกทั้งงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับฤทธิ์ปรับภูมิคุ้มกันของเห็ดเห็ดเป่าชื่อยังมีอยู่น้อยมาก ดังนั้นสารสกัด PA100 จึงเป็นสารที่น่าสนใจที่จะนำไปศึกษาวิจัยฤทธิ์ปรับภูมิคุ้มกันต่อไป ยกตัวอย่างเช่น ฤทธิ์กระตุ้นการหลั่ง

ไซโตโคईนชนิดต่างๆ ฤทธิ์กระตุ้นการทำงานของเซลล์ชนิดต่างๆ ในระบบภูมิคุ้มกัน หรือฤทธิ์ยับยั้งการอักเสบ เป็นต้น

#### 5.4 ผลการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดชั้นน้ำของเห็ดนางฟ้าภูฐาน

จากการศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดเห็ดนางฟ้าภูฐานด้วยน้ำ พบว่าสารสกัดเห็ดนางฟ้าภูฐาน PS100 และ PS50 มีปริมาณสารในกลุ่มฟีนอลใกล้เคียงกันและมีปริมาณสูงที่สุดเมื่อเทียบกับสารสกัดอื่นเมื่อตรวจวัดด้วยวิธี Folin-Ciocalteu's method แต่เมื่อนำสารสกัดมาตรวจวัดฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระพบว่า สารสกัดที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุดคือสารสกัด PS50 คิดเป็น 3 เท่าของ PS100 เมื่อตรวจวัดด้วยวิธี Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) assay ซึ่งให้เห็นว่าปริมาณของสารฟีนอลที่ตรวจวัดได้ในสารสกัด PS ไม่มีความสัมพันธ์กับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ทั้งนี้จากผลการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค UPLC-HRMS พบว่าในสารสกัดเห็ดนางฟ้าภูฐาน PS50 ประกอบด้วยสาร 43 ชนิด ที่ไม่สามารถระบุชื่อได้ ดังแสดงในตารางที่ 50 ในภาคผนวก ค. ซึ่งเป็นข้อจำกัดของการตรวจวัดด้วยวิธีนี้อยู่ ดังนั้นอาจเป็นไปได้ว่าฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของ PS50 ที่สูงกว่า PS100 อาจเป็นผลเนื่องมาจากสารต่างๆ เหล่านี้ได้

ทั้งนี้ สารสกัดเห็ดนางฟ้าภูฐานที่มีปริมาณฟีนอลสูงที่สุดคือ PS100 รองลงมาคือ PS50, PS22 และ PS4 ตามลำดับ เมื่ออุณหภูมิในการสกัดเพิ่มสูงขึ้นจะทำให้ได้สารฟีนอลออกมาในปริมาณที่เพิ่มขึ้นตามไปด้วย แตกต่างกับผลจากงานวิจัยของ Finimundy และคณะ (2013) ที่ได้ทำการตรวจวัดปริมาณสารฟีนอลในสารสกัดชั้นน้ำของเห็ดนางฟ้าภูฐานที่สกัดด้วยอุณหภูมิ 4, 22 และ 50 องศาเซลเซียส พบว่าปริมาณของสารฟีนอลที่ได้จะไม่มีความเกี่ยวข้องกับอุณหภูมิที่ใช้ในการสกัด (61) และเมื่อผู้วิจัยทำการวิเคราะห์องค์ประกอบของสารสกัด PS4, PS22 และ PS100 จากการทดลองขึ้นนี้ พบว่ามีสารต้านอนุมูลอิสระในกลุ่มของฟีนอลอยู่หลายชนิด เช่น 3-Methoxycatechol ซึ่งจัดเป็นอนุพันธ์ของสาร catechol จากงานวิจัยของ Dela cruz และคณะ (2015) พบว่าสาร catechol มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยจะช่วยลดปัจจัยต่างๆ ที่มีผลต่อการเกิด oxidative stress ได้ (121) นอกจากสาร catechol แล้วในสารสกัด PS4 พบ gallic acid ซึ่งเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่สำคัญที่สามารถยับยั้งการเกิด lipid oxidation มีคุณสมบัติเป็น chelating agent และยังมีฤทธิ์ในการชักนำให้เซลล์เกิดกระบวนการอะพอพโทซิสได้ โดยพบว่าสาร gallic acid สามารถยับยั้งการ

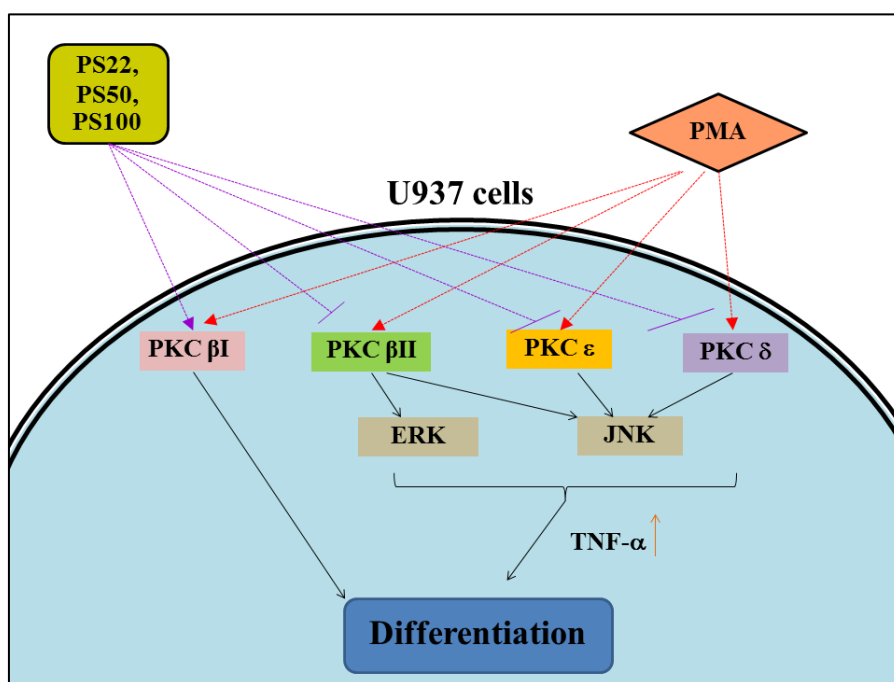
เจริญของเซลล์มะเร็งได้หลายชนิด เช่น มะเร็งเม็ดเลือดขาว HL-60 มะเร็งต่อมลูกหมาก (Human prostate cancer, DU145) และมะเร็งปอด (A549) (122) นอกจากนี้ ยังตรวจพบสาร syringic acid ในสารสกัดเห็ดนางฟ้า PS4 ซึ่ง syringic acid จัดเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่สามารถยับยั้ง oxidative stress marker ในเซลล์ตับอ่อนของหนูที่ได้รับสารกระตุ้น (119) และยังมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญและแบ่งตัวของเซลล์ A549 ได้ (120)

จากผลการศึกษาวิจัย พบว่าสารสกัดชั้นน้ำของเห็ดนางฟ้าภูฐานทั้ง 4 ชนิด กระตุ้นการเจริญของเซลล์ U937 และไม่เป็นพิษต่อเซลล์เมื่อตรวจวัด LDH activity ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Carbonero และคณะ (2012) ที่ได้ทำการศึกษาค้นคว้าของสารสกัดเบต้ากลูแคนจากดอกเห็ดนางฟ้าภูฐานต่อการเจริญของเซลล์แมคโครฟาจ (RAW264.7) พบว่าเบต้ากลูแคนไม่เป็นพิษต่อเซลล์เมื่อทำการตรวจวัดด้วยการย้อมสีคริสตัลไวโอเล็ต (Crystal violet assay) (46) และจากงานวิจัยของ Satitmanwivat และคณะ (2012) พบว่าสารประกอบโปรตีนและแอลฟาไกลูแคน ( $\alpha$ -glucan protein complex) จากดอกเห็ดนางฟ้าภูฐานไม่เป็นพิษต่อเซลล์ J774A.1 เมื่อตรวจวัดด้วยการย้อมสี alamar blue (6) หากแต่มีรายงานวิจัยที่พบว่าสารสกัดเห็ดนางฟ้าภูฐานมีฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็ง โดยพบว่าสารสกัดในชั้นน้ำของดอกเห็ดนางฟ้าภูฐานที่สกัดด้วยอุณหภูมิ 4, 22 และ 50 องศาเซลเซียส มีฤทธิ์ช่วยยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งปากมดลูก (HeLa) โดยมีค่า  $IC_{50}$  ร้อยละ  $0.31 \pm 0.01$ ,  $0.25 \pm 0.02$  และ  $1.21 \pm 0.01$  ตามลำดับ นอกจากนี้ยังสามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งตับ ได้ที่ค่า  $IC_{50}$  เท่ากับร้อยละ  $0.23 \pm 0.08$ ,  $0.64 \pm 0.02$  และ  $1.17 \pm 0.03$  ตามลำดับ (61)

จากการศึกษาการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลล์ U937 และฤทธิ์ปรับภูมิคุ้มกันของสารสกัดเห็ดนางฟ้าภูฐานต่อการสร้างไซโตไคน์ TNF- $\alpha$  พบว่าสารสกัดเห็ดนางฟ้าภูฐานที่ทำการทดสอบทั้ง 3 ชนิด ได้แก่ PS22, PS50 และ PS100 มีผลเหนี่ยวนำให้เซลล์เกิดการเปลี่ยนแปลงรูปร่างได้ แต่สารสกัดเห็ดทั้ง 3 ชนิดไม่มีฤทธิ์กระตุ้นการหลั่ง TNF- $\alpha$  แต่อย่างใด แต่เมื่อนำสารสกัดเห็ดนางฟ้าภูฐานทั้ง 3 ชนิดนี้มาทำการทดสอบร่วมกับสารกระตุ้น PMA พบว่าสารสกัดเห็ดนางฟ้าภูฐานและสารกระตุ้น PMA มีการทำงานเสริมฤทธิ์กันทำให้เกิดการหลั่งไซโตไคน์ TNF- $\alpha$  เพิ่มขึ้นได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับการกระตุ้นด้วย PMA เพียงอย่างเดียว ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของสิริกุลและคณะ (2011) ที่พบว่าสาร all-trans-retinoic acid (ATRA) กระตุ้นพัฒนาการและการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ U937 ได้ แต่ไม่สามารถกระตุ้นการหลั่ง TNF- $\alpha$  ได้ แต่กลับพบว่าเมื่อได้รับ



สาร PMA และ ATRA ร่วมกัน จะเกิดการเสริมฤทธิ์กันโดยกระตุ้นให้ U937 หลั่งไซโตไคน์ TNF- $\alpha$  ให้เพิ่มสูงขึ้นได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับการกระตุ้นด้วย PMA อย่างเดียว (123)



รูปที่ 47 กลไกการกระตุ้นเซลล์ U937 ด้วยสารสกัด PS22, PS50 และ PS100 เปรียบเทียบกับการกระตุ้นด้วยสาร PMA (ปรับปรุงจากงานวิจัยของ Hatton และคณะ (35))

การที่สารสกัดเห็ดนางฟ้าภูฐานไม่สามารถกระตุ้นให้เซลล์ U937 สร้างไซโตไคน์ TNF- $\alpha$  ได้โดยตรง อาจเป็นไปได้ว่าสารสกัดเห็ดนางฟ้าภูฐานสามารถกระตุ้นได้เฉพาะส่วนของ protein kinase C ชนิด  $\beta 1$  ดังกลไกในรูปที่ 46 ส่งผลให้เซลล์ U937 เกิดการเปลี่ยนแปลงรูปร่างและสามารถเกาะกับพื้นผิวภาชนะเพาะเลี้ยงได้โดยไม่มีการสร้างไซโตไคน์ TNF- $\alpha$  ออกมา แต่เมื่อทำการกระตุ้นเซลล์ U937 ด้วย PMA เซลล์จะเกิดการเปลี่ยนแปลงรูปร่างและคุณสมบัติและมีการหลั่ง TNF- $\alpha$  ไปพร้อมๆ กันได้และหลั่งในปริมาณที่มากกว่าการกระตุ้นด้วย PMA เพียงอย่างเดียว ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากเมื่อ PMA กระตุ้นการทำงานของ PKC อีก 3 ชนิด ใน U937 แล้วส่งผลบางอย่างต่อเซลล์ที่เอื้อให้สารสกัดเห็ดสามารถกระตุ้นเซลล์ผ่าน PKC ทั้ง 3 ชนิดได้ จึงเสริมฤทธิ์ให้มีการหลั่ง TNF- $\alpha$  เพิ่มมากขึ้น

การศึกษากฎในการกระตุ้นเซลล์ด้วยสารสกัดเห็ดร่วมกับ PMA ในเชิงลึกจะช่วยให้เข้าใจวิถี (pathway) การออกฤทธิ์ของสารสกัดเห็ดและสามารถนำสารสกัดเห็ดไปพัฒนาเพื่อการใช้งานได้อย่างถูกต้องตรงตามความต้องการต่อไป



รายการอ้างอิง



1. Goldsby et al. Immunology. Chapter 1: Overview of the immune system. 5 ed. 2002. 554 p.
2. Pantaleo G, Demarest JF, Schacker T, Vaccarezza M, Cohen OJ, Daucher M, et al. The qualitative nature of the primary immune response to HIV infection is a prognosticator of disease progression independent of the initial level of plasma viremia. Proceedings of the National Academy of Sciences. 1997;94(1):254-8.
3. Vesely MD, Kershaw MH, Schreiber RD, Smyth MJ. Natural innate and adaptive immunity to cancer. Annual review of immunology. 2011;29:235-71.
4. Miller RL, Gerster JF, Owens ML, Slade HB, Tomai Ma. Review Article Imiquimod applied topically: a novel immune response modifier and new class of drug. International Journal of Immunopharmacology. 1999;21(1):1-14.
5. Karin M, Greten FR. NF-kappaB: linking inflammation and immunity to cancer development and progression. Nat Rev Immunol. 2005;5(10):749-59.
6. Satitmanwivat S, Ratanakhanokchai K, Laohakunjit N, Pason P, Tachaapaikoon C, Kyu KL. Purification and partial characterization of an acidic alpha-glucan-protein complex from the fruiting body of *Pleurotus sajor-caju* and its effect on macrophage activation. Bioscience, biotechnology, and biochemistry. 2012;76(10):1884-90. ภาลงกรณัฒมหาวิทยาลัย
7. Satitmanwivat S, Ratanakhanokchai K, Laohakunjit N, Chao LK, Chen ST, Pason P, et al. Improved purity and immunostimulatory activity of beta-(1,3)(1,6)-glucan from *Pleurotus sajor-caju* using cell wall-degrading enzymes. Journal of agricultural and food chemistry. 2012;60(21):5423-30.
8. Shamtsyan M, Konusova V, Maksimova Y, Goloshchev A, Panchenko A, Simbirtsev A, et al. Immunomodulating and anti-tumor action of extracts of several mushrooms. Journal of Biotechnology. 2004;113(1-3):77-83.
9. Maiti S, Bhutia SK, Mallick SK, Kumar A, Khadgi N, Maiti TK. Antiproliferative and immunostimulatory protein fraction from edible mushrooms. Environmental Toxicology and Pharmacology. 2008;26(2):187-91.

10. Jeurink PV, Noguera CL, Savelkoul HF, Wichers HJ. Immunomodulatory capacity of fungal proteins on the cytokine production of human peripheral blood mononuclear cells. *Int Immunopharmacol.* 2008;8(8):1124-33.
11. Mallick SK, Maiti S, Bhutia SK, Maiti TK. Antitumor properties of a heteroglucan isolated from *Astraeus hygrometricus* on Dalton's lymphoma bearing mouse. *Food and Chemical Toxicology.* 2010;48(8-9):2115-21.
12. Mallick SK, Maiti S, Bhutia SK, Maiti TK. Activation of RAW 264.7 cells by *Astraeus hygrometricus*-derived heteroglucan through MAP kinase pathway. *Cell biology international.* 2011;35(6):617-21.
13. อรดี หาญวิวัฒน์วงศ์. วิทยานิพนธ์ระดับปริญญาโทและปริญญาเอก. กรุงเทพฯ: หจก.ภาพพิมพ์; 2551.
14. Gregersen PK, Behrens TW. Genetics of autoimmune diseases-disorders of immune homeostasis. *Nat Rev Genet.* 2006;7(12):917-28.
15. Abul K. Abbas et al. *Cellular and Molecular Immunology.* 6, editor. China: Elsevier Inc.; 2010.
16. จินตนา อาจสันเทียะ. จุลชีววิทยาและภูมิคุ้มกันวิทยาสำหรับพยาบาล. กรุงเทพฯ: หจก.บางกอกบลิ๊อค; 2552. 165-6 p.
17. National Cancer Institute. Understanding Cancer [updated 30 Sep 2009; cited 10 Aug 2014]. Available from: <http://cancer.gov/cancertopics/understandingcancer>.
18. Dranoff G. Cytokines in cancer pathogenesis and cancer therapy. *Nat Rev Cancer.* 2004;4(1):11-22.
19. Katsiari CG, Liossis S-NC, Sfrikakis PP. The Pathophysiologic Role of Monocytes and Macrophages in Systemic Lupus Erythematosus: A Reappraisal. *Seminars in Arthritis and Rheumatism.* 2010;39(6):491-503.
20. ประพันธ์ ภาณุภาคและคณะ. วิทยานิพนธ์ระดับปริญญาโท. กทม.: สำนักพิมพ์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย; 2527.
21. Clària J, González-Pérez A, López-Vicario C, Rius B, Titos E. New Insights into the Role of Macrophages in Adipose Tissue Inflammation and Fatty Liver Disease: Modulation by Endogenous Omega-3 Fatty Acid-derived Lipid Mediators. *Frontiers in Immunology.* 2011;2.

22. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MTD, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 2007;39(1):44-84.
23. Dzialo M, Mierziak J, Korzun U, Preisner M, Szopa J, Kulma A. The Potential of Plant Phenolics in Prevention and Therapy of Skin Disorders. *International journal of molecular sciences*. 2016;17(2):160.
24. Knight JA. Review: Free radicals, antioxidants, and the immune system. *Annals of clinical and laboratory science*. 2000;30(2):145-58.
25. Jacob JK, Hakimuddin F, Paliyath G, Fisher H. Antioxidant and antiproliferative activity of polyphenols in novel high-polyphenol grape lines. *Food Research International*. 2008;41(4):419-28.
26. Harris P, Ralph P. Human leukemic models of myelomonocytic development: a review of the HL-60 and U937 cell lines. *Journal of leukocyte biology*. 1985;37(4):407-22.
27. Daigneault M, Preston JA, Marriott HM, Whyte MKB, Dockrell DH. The Identification of Markers of Macrophage Differentiation in PMA-Stimulated THP-1 Cells and Monocyte-Derived Macrophages. *PLoS ONE*. 2010;5(1):e8668.
28. García A, Serrano A, Abril E, Jimenez P, Real LM, Cantón J, et al. Differential effect on U937 cell differentiation by targeting transcriptional factors implicated in tissue- or stage-specific induced integrin expression. *Experimental Hematology*. 1999;27(2):353-64.
29. Kim IW, Lee JH, Kwon YN, Yun EY, Nam SH, Ahn MY, et al. Anticancer activity of a synthetic peptide derived from harmoniasin, an antibacterial peptide from the ladybug *Harmonia axyridis*. *International journal of oncology*. 2013;43(2):622-8.
30. Garrelds IM, van Hal PT, Haakmat RC, Hoogsteden HC, Saxena PR, Zijlstra FJ. Time dependent production of cytokines and eicosanoids by human monocytic leukaemia U937 cells; effects of glucocorticosteroids. *Mediators of inflammation*. 1999;8(4-5):229-35.

31. Garcia JE, de Cabo MR, Rodriguez FM, Losada JP, Lopez AJ, Arellano JL. Effect of cyclosporin A on inflammatory cytokine production by U937 monocyte-like cells. *Mediators of inflammation*. 2000;9(3-4):169-74.
32. Lorton D, Bellinger DL. Molecular Mechanisms Underlying  $\beta$ -Adrenergic Receptor-Mediated Cross-Talk between Sympathetic Neurons and Immune Cells. *International journal of molecular sciences*. 2015;16(3):5635-65.
33. Otte A, Mandel K, Reinstrom G, Hass R. Abolished adherence alters signaling pathways in phorbol ester-induced human U937 cells. *Cell Communication and Signaling*. 2011;9(1):1-9.
34. Sintiprungrat K, Singhto N, Sinchaikul S, Chen S-T, Thongboonkerd V. Alterations in cellular proteome and secretome upon differentiation from monocyte to macrophage by treatment with phorbol myristate acetate: Insights into biological processes. *Journal of Proteomics*. 2010;73(3):602-18.
35. Hatton JP, Gaubert F, Cazenave JP, Schmitt D. Microgravity modifies protein kinase C isoform translocation in the human monocytic cell line U937 and human peripheral blood T-cells. *Journal of cellular biochemistry*. 2002;87(1):39-50.
36. Van Horssen R, Ten Hagen TL, Eggermont AM. TNF-alpha in cancer treatment: molecular insights, antitumor effects, and clinical utility. *The oncologist*. 2006;11(4):397-408.
37. Bemelmans MHA, van Tits LJH, Buurman WA. Tumor Necrosis Factor: Function, Release and Clearance. 1996;16(1):1-11.
38. Karin M. Cancer Research in Flames 2005 [cited 2005 5 December]. Available from: <http://www.the-scientist.com/?articles.view/articleNo/16871/title/Cancer-Research-in-Flames/>.
39. ชำนาญ พิทักษ์ทอง. เห็ดเศรษฐกิจ. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์เกษตรสยามบุ๊คส์ จำกัด; 2555.
40. Wu JY, Chen CH, Chang WH, Chung KT, Liu YW, Lu FJ, et al. Anti-Cancer Effects of Protein Extracts from *Calvatia lilacina*, *Pleurotus ostreatus* and *Volvariella volvacea*. *Evidence-based complementary and alternative medicine : eCAM*. 2011;2011:982368.

41. Müller CI, Kumagai T, O'Kelly J, Seeram NP, Heber D, Koeffler HP. *Ganoderma lucidum* causes apoptosis in leukemia, lymphoma and multiple myeloma cells. *Leukemia Research*. 2006;30(7):841-8.
42. Sliva D. *Ganoderma Lucidum* (Reishi) in Cancer Treatment. *Integrative Cancer Therapies*. 2003;2(4):358-64.
43. Leung MYK, Fung KP, Choy YM. The isolation and characterization of an immunomodulatory and anti-tumor polysaccharide preparation from *Flammulina velutipes*. *Immunopharmacology*. 1997;35(3):255-63.
44. Li N, Hu Y-L, He C-X, Hu C-J, Zhou J, Tang G-P, et al. Preparation, characterisation and anti-tumour activity of *Ganoderma lucidum* polysaccharide nanoparticles. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 2010;62(1):139-44.
45. Tong H, Xia F, Feng K, Sun G, Gao X, Sun L, et al. Structural characterization and in vitro antitumor activity of a novel polysaccharide isolated from the fruiting bodies of *Pleurotus ostreatus*. *Bioresource Technology*. 2009;100(4):1682-6.
46. Carbonero ER, Ruthes AC, Freitas CS, Utrilla P, Gálvez J, Silva EVd, et al. Chemical and biological properties of a highly branched  $\beta$ -glucan from edible mushroom *Pleurotus sajor-caju*. *Carbohydrate Polymers*. 2012;90(2):814-9.
47. Wang J, Yuan Y, Yue T. Immunostimulatory activities of  $\beta$ -d-glucan from *Ganoderma lucidum*. *Carbohydrate Polymers*. 2014;102(0):47-54.
48. Mariga AM, Yang WJ, Mugambi DK, Pei F, Zhao LY, Shao YN, et al. Antiproliferative and immunostimulatory activity of a protein from *Pleurotus eryngii*. *Journal of the science of food and agriculture*. 2014.
49. Ko JL, Hsu CI, Lin RH, Kao CL, Lin JY. A new fungal immunomodulatory protein, FIP-fve isolated from the edible mushroom, *Flammulina velutipes* and its complete amino acid sequence. *European journal of biochemistry / FEBS*. 1995;228(2):244-9.
50. Sarangi I, Ghosh D, Bhutia SK, Mallick SK, Maiti TK. Anti-tumor and immunomodulating effects of *Pleurotus ostreatus* mycelia-derived proteoglycans. *International Immunopharmacology*. 2006;6(8):1287-97.



51. Shah S, Ghosh D, Mallick SK, Sarangi I, Bhutia SK, Banerje I, et al. Immunomodulatory and Antitumor Activities of Water-Soluble Proteoglycan Isolated from the Fruiting Bodies of Culinary-Medicinal Oyster Mushroom *Pleurotus ostreatus* (Jacq.: Fr.) P. Kumm. (Agaricomycetidae). 2007;9(2):123-38.
52. Jaengklang C. JS, Sithisarn P., Klungsupya P. Determination on antioxidant capacity and TLC analysis of ten Thai *Russula* mushroom extracts. The international conference on herbal and traditional medicine. 2015.
53. Bendich A. Physiological Role of Antioxidants in the Immune System. Journal of Dairy Science.76(9):2789-94.
54. Wang PY, Zhu XL, Lin ZB. Antitumor and Immunomodulatory Effects of Polysaccharides from Broken-Spore of *Ganoderma lucidum*. Frontiers in pharmacology. 2012;3:135.
55. Wu G, Qian Z, Guo J, Hu D, Bao J, Xie J, et al. *Ganoderma lucidum* Extract Induces G1 Cell Cycle Arrest, and Apoptosis in Human Breast Cancer Cells. The American journal of Chinese medicine. 2012;40(03):631-42.
56. Jedinak A, Dudhgaonkar S, Wu Q-l, Simon J, Sliva D. Anti-inflammatory activity of edible oyster mushroom is mediated through the inhibition of NF-kappaB and AP-1 signaling. Nutrition Journal. 2011;10(1):52.
57. Jedinak A, Sliva D. *Pleurotus ostreatus* inhibits proliferation of human breast and colon cancer cells through p53-dependent as well as p53-independent pathway. International journal of oncology. 2008;33(6):1307-13.
58. Wang P-H, Hsu C-l, Tang S-C, Huang Y-L, Lin J-Y, Ko J-L. Fungal Immunomodulatory Protein from *Flammulina velutipes* Induces Interferon- $\gamma$  Production through p38 Mitogen-Activated Protein Kinase Signaling Pathway. Journal of agricultural and food chemistry. 2004;52(9):2721-5.
59. บุญส่ง วงศ์เกรียงไกร. เห็ดนางฟ้า. นนทบุรี: ชมรมนักเพาะเห็ดแห่งประเทศไทย; 2543.
60. บรรณ บุรณะชนบท. การเพาะเห็ดนางรม-นางฟ้า. นนทบุรี: สำนักพิมพ์ฐานเกษตรกรรม; 2547.

61. Finimundy TC, Gambato G, Fontana R, Camassola M, Salvador M, Moura S, et al. Aqueous extracts of *Lentinula edodes* and *Pleurotus sajor-caju* exhibit high antioxidant capability and promising in vitro antitumor activity. *Nutrition Research*. 2013;33(1):76-84.
62. Kanagasabapathy G, Malek SNA, Kuppusamy UR, Vikineswary S. Chemical Composition and Antioxidant Properties of Extracts of Fresh Fruiting Bodies of *Pleurotus sajor-caju* (Fr.) Singer. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2011;59(6):2618-26.
63. Deshmukh SD SM. Comparative study for antioxidant activity of cold and hot water extracts of *Pleurotus sajor-caju* and *Pleurotus florida*. *Innovative Pharmaceutical Sciences and Research*. 2014;2(4):894-909.
64. Gogavekar S, Rokade S, Ranveer R, Ghosh J, Kalyani D, Sahoo A. Important nutritional constituents, flavour components, antioxidant and antibacterial properties of *Pleurotus sajor-caju*. *J Food Sci Technol*. 2014;51(8):1483-91.
65. Babu D, Pandey M, Rao GN. Antioxidant and electrochemical properties of cultivated *Pleurotus* spp. and their sporeless/low sporing mutants. *J Food Sci Technol*. 2014;51(11):3317-24.
66. Assis IS, Chaves MB, Silveira ML, Gern RM, Wisbeck E, Junior AF, et al. Production of bioactive compounds with antitumor activity against sarcoma 180 by *Pleurotus sajor-caju*. *Journal of medicinal food*. 2013;16(11):1004-12.
67. Zhuang C, Mizuno T, Shimada A, Ito H, Suzuki C, Mayuzumi Y, et al. Antitumor protein-containing polysaccharides from a Chinese mushroom Fengweigu or Houbitake, *Pleurotus sajor-caju* (Fr.) Sings. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*. 1993;57(6):901-6.
68. ราชบัณฑิตยสถาน. เห็ดในประเทศไทย. นนทบุรี: ราชบัณฑิตยสถาน; 2550. 256 p.
69. Wang CR, Ng TB, Li L, Fang JC, Jiang Y, Wen TY, et al. Isolation of a polysaccharide with antiproliferative, hypoglycemic, antioxidant and HIV-1 reverse transcriptase inhibitory activities from the fruiting bodies of the abalone mushroom *Pleurotus abalonus*. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 2011;63(6):825-32.

70. Shi X, Zhao Y, Jiao Y, Shi T, Yang X. ROS-Dependent Mitochondria Molecular Mechanisms Underlying Antitumor Activity of *Pleurotus abalonus* Acidic Polysaccharides in Human Breast Cancer MCF-7 Cells. PLoS ONE. 2013;8(5):e64266.
71. Li N, Li L, Fang JC, Wong JH, Ng TB, Jiang Y, et al. Isolation and identification of a novel polysaccharide-peptide complex with antioxidant, anti-proliferative and hypoglycaemic activities from the abalone mushroom. Bioscience reports. 2012;32(3):221-8.
72. Nguyen QCT, and Dong TAD. Research on extracting protein and soluble fibre from edible mushroom *Auricularia auricula-judae*. 18th regional symposium on Chemical Engineering (RSCE 2011). 2011:1-7.
73. อนงค์ จันทร์ศรีกุล. เห็ดเมืองไทย. กรุงเทพฯ: โรงพิมพ์ไทยวัฒนาพานิช จำกัด; 2539. 161 p.
74. Reza A, Choi MJ, Damte D, Jo WS, Lee SJ, Lee JS, et al. Comparative Antitumor Activity of Different Solvent Fractions from an *Auricularia auricula-judae* Ethanol Extract in P388D1 and Sarcoma 180 Cells. Toxicological research. 2011;27(2):77-83.
75. Damte D, Reza MA, Lee SJ, Jo WS, Park SC. Anti-inflammatory Activity of Dichloromethane Extract of *Auricularia auricula-judae* in RAW264.7 Cells. Toxicological research. 2011;27(1):11-4.
76. Fan L, Zhang S, Yu L, Ma L. Evaluation of antioxidant property and quality of breads containing *Auricularia auricula* polysaccharide flour. Food Chemistry. 2007;101(3):1158-63.
77. Li X, Wang Z, Wang L, Walid E, Zhang H. In Vitro Antioxidant and Anti-Proliferation Activities of Polysaccharides from Various Extracts of Different Mushrooms. International journal of molecular sciences. 2012.
78. Zou Y, Hu W, Ma K, Tian M. Physicochemical properties and antioxidant activities of melanin and fractions from *Auricularia auricula* fruiting bodies. Food Sci Biotechnol. 2015;24(1):15-21.

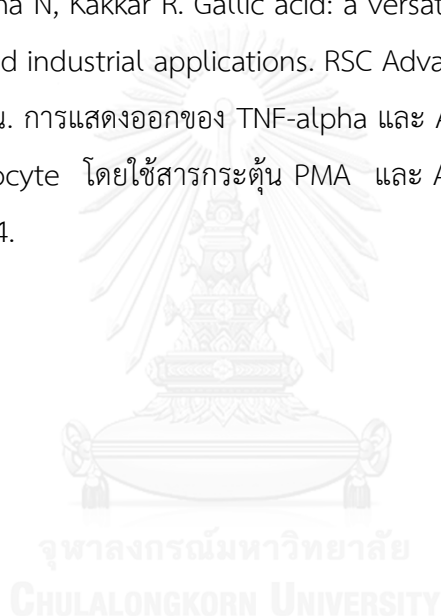
79. Ma Z, Wang J, Zhang L, Zhang Y, Ding K. Evaluation of water soluble  $\beta$ -d-glucan from *Auricularia auricular-judae* as potential anti-tumor agent. *Carbohydrate Polymers*. 2010;80(3):977-83.
80. Lee DCW, Yang CLH, Chik SCC, Li JCB, Rong J-h, Chan GCF, et al. Bioactivity-guided identification and cell signaling technology to delineate the immunomodulatory effects of *Panax ginseng* on human promonocytic U937 cells. *Journal of Translational Medicine*. 2009;7:34-.
81. Gannabathula S, Skinner MA, Rosendale D, Greenwood JM, Mutukumira AN, Steinhorn G, et al. Arabinogalactan proteins contribute to the immunostimulatory properties of New Zealand honeys. *Immunopharmacology and Immunotoxicology*. 2012;34(4):598-607.
82. Liu J-J, Huang T-S, Hsu M-L, Chen C-C, Lin W-S, Lu F-J, et al. Antitumor effects of the partially purified polysaccharides from *Antrodia camphorata* and the mechanism of its action. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 2004;201(2):186-93.
83. Lee HW, Choi HJ, Ha SJ, Lee KT, Kwon YG. Recruitment of monocytes/macrophages in different tumor microenvironments. *Biochimica et biophysica acta*. 2013;1835(2):170-9.
84. Langstein J, Michel J, Schwarz H. CD137 induces proliferation and endomitosis in monocytes. *Blood*. 1999;94(9):3161-8.
85. Riss TL, Moravec RA, Niles AL, Benink HA, Worzella TJ, Minor L. Cell Viability Assays. In: Sittampalam GS, Gal-Edd N, Arkin M, Auld D, Austin C, Bejcek B, et al., editors. *Assay Guidance Manual*. Bethesda (MD)2004.
86. Korzeniewski C, Callewaert DM. An enzyme-release assay for natural cytotoxicity. *Journal of Immunological Methods*. 1983;64(3):313-20.
87. Roche. Cytotoxicity detection kit (LDH). 2012.
88. Wang W, Alpert E. Downregulation of phorbol 12-myristate 13-acetate-induced tumor necrosis factor- $\alpha$  and interleukin-1 $\beta$  production and gene expression in human monocytic cells by human alpha-fetoprotein. *Hepatology*. 1995;22(3):921-8.

89. Ainsworth EA, Gillespie KM. Estimation of total phenolic content and other oxidation substrates in plant tissues using Folin-Ciocalteu reagent. *Nat Protocols*. 2007;2(4):875-7.
90. Aline Augusti Boligon MMMaMLA. Technical Evaluation of Antioxidant Activity. *Medicinal chemistry*. 2014;4(7):5.
91. T. Sunil Kumar Reddy GBaASK. ULTRA PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY: AN INTRODUCTION AND REVIEW. *International Journal of Pharmaceutical Research & Analysis*. 2012;2(1):24-31.
92. Zhou T, Wang M, Cheng H, Cui C, Su S, Xu P, et al. UPLC-HRMS based metabolomics reveals the sphingolipids with long fatty chains and olefinic bonds up-regulated in metabolic pathway for hypoxia preconditioning. *Chemico-Biological Interactions*. 2015;242:145-52.
93. Boyer J, Liu RH. Apple phytochemicals and their health benefits. *Nutrition Journal*. 2004;3:5-.
94. Zhang YN, Song M, Ng TB, Zhao L, Liu F. Purification and characterization of antioxidant components from the fruiting bodies of *Pleurotus abalonus* including 9-beta-d-ribofuranosidoadenine, 5'-deoxy-5'-(methylthio)adenosine, and a triterpenoid. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 2013;36(2):689-96.
95. Dewanjee S, Maiti A, Das AK, Mandal SC, Dey SP. Swietenine: A potential oral hypoglycemic from *Swietenia macrophylla* seed. *Fitoterapia*. 2009;80(4):249-51.
96. Seki T, Morimura S, Tabata S, Tang Y, Shigematsu T, Kida K. Antioxidant Activity of Vinegar Produced from Distilled Residues of the Japanese Liquor Shochu. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2008;56(10):3785-90.
97. Kalogeropoulos N, Yanni AE, Koutrotsios G, Aloupi M. Bioactive microconstituents and antioxidant properties of wild edible mushrooms from the island of Lesvos, Greece. *Food and Chemical Toxicology*. 2013;55:378-85.
98. Jeena GS PH, Prakash O, Chandra M, Kushwaha KPS. Study on in vitro antioxidant potential of some cultivated *Pleurotus* species (Oyster mushroom). *Natural products and resources*. 2014;5(1):56-61.

99. Calabrese EJ. Cancer biology and hormesis: human tumor cell lines commonly display hormetic (biphasic) dose responses. *Critical reviews in toxicology*. 2005;35(6):463-582.
100. Patel S, Goyal A. Recent developments in mushrooms as anti-cancer therapeutics: a review. *3 Biotech*. 2012;2(1):1-15.
101. Ooi VE, Liu F. Immunomodulation and anti-cancer activity of polysaccharide-protein complexes. *Current medicinal chemistry*. 2000;7(7):715-29.
102. Dutta S, Ray S, Nagarajan K. Glutamic acid as anticancer agent: An overview. *Saudi Pharmaceutical Journal*. 2013;21(4):337-43.
103. Ingalhalli RS, Patel KJ. Cordyceps militaris (L.: Fr.) Link "C An Important Medicinal Mushroom. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*. 2013.
104. Seto S, Carrera CJ, Kubota M, Wasson DB, Carson DA. Mechanism of deoxyadenosine and 2-chlorodeoxyadenosine toxicity to nondividing human lymphocytes. *Journal of Clinical Investigation*. 1985;75(2):377-83.
105. Yu Z-K, Chen Y-N, Aihara M, Mao W, Uchida S, Araie M. Effects of  $\beta$ -adrenergic receptor antagonists on oxidative stress in purified rat retinal ganglion cells. *Molecular Vision*. 2007;13:833-9.
106. Praveen KM. PJ, manoj P., Neha B, et al Rapid high resolution accurate mass multi-class multi-residue screening method for Ashwagandha (*Withania somnifera*) products 2013. Available from: [http://sciex.com/Documents/posters/AB%20SCIEX%20AOAC%202013\\_ashwagandha%20screening\\_Praveen%20Kumar.pdf](http://sciex.com/Documents/posters/AB%20SCIEX%20AOAC%202013_ashwagandha%20screening_Praveen%20Kumar.pdf).
107. Banjoko B. An Overview, Pharmacology and Therapeutics. *Environ Pharmacol*. 2014.
108. Hiramoto K, Li X, Makimoto M, Kato T, Kikugawa K. Identification of hydroxyhydroquinone in coffee as a generator of reactive oxygen species that break DNA single strands. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. 1998;419(1-3):43-51.
109. Thompson RB, Symon T. Some derivatives of hydroxyhydroquinone as antioxidants. *Journal of the American Oil Chemists Society*. 33(9):414-6.

110. Oke F, Aslim B. Protective effect of two edible mushrooms against oxidative cell damage and their phenolic composition. *Food Chemistry*. 2011;128(3):613-9.
111. Xu S, Xu X, Zhang L. Branching Structure and Chain Conformation of Water-Soluble Glucan Extracted from *Auricularia auricula-judae*. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2012;60(13):3498-506.
112. Ma Z, Wang J, Zhang L. Structure and chain conformation of  $\beta$ -glucan isolated from *Auricularia auricula-judae*. *Biopolymers*. 2008;89(7):614-22.
113. Dai J, Mumper RJ. Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules*. 2010;15(10):7313-52.
114. Wang P, Henning SM, Heber D. Limitations of MTT and MTS-based assays for measurement of antiproliferative activity of green tea polyphenols. *PLoS One*. 2010;5(4):e10202.
115. Eagle K. Toxicological effects of red wine, orange juice, and other dietary SULT1A inhibitors via excess catecholamines. *Food and Chemical Toxicology*. 2012;50(6):2243-9.
116. Jaleel CA, Gopi R, Alagu Lakshmanan GM, Panneerselvam R. Triadimefon induced changes in the antioxidant metabolism and ajmalicine production in *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. *Plant Science*. 2006;171(2):271-6.
117. Feng ZZ, Guo AH, Feng ZW. Delay of Senescence of Detached Cucumber Cotyledons by Triadimefon. *Biologia Plantarum*. 2003;46(4):571-5.
118. Wei X, Chen D, Yi Y, Qi H, Gao X, Fang H, et al. Syringic Acid Extracted from *Herba dendrobii* Prevents Diabetic Cataract Pathogenesis by Inhibiting Aldose Reductase Activity. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2012;2012:13.
119. Cikman O, Soylemez O, Ozkan OF, Kiraz HA, Sayar I, Ademoglu S, et al. Antioxidant Activity of Syringic Acid Prevents Oxidative Stress in L-arginine-Induced Acute Pancreatitis: An Experimental Study on Rats. *International Surgery*. 2015;100(5):891-6.

120. Gowri Karthik AV, Sukumaran Natarajapillai. Preliminary Study on Salubrious Effect of Syringic Acid on Apoptosis in Human Lung Carcinoma A549 Cells and Insilico Analysis Through Docking Studies. Asian Journal of pharmaceutical and clinical research. 2014;7(1):5.
121. De La Cruz JP, Ruiz-Moreno MI, Guerrero A, López-Villodres JA, Reyes JJ, Espartero JL, et al. Role of the catechol group in the antioxidant and neuroprotective effects of virgin olive oil components in rat brain. The Journal of Nutritional Biochemistry. 2015;26(5):549-55.
122. Badhani B, Sharma N, Kakkar R. Gallic acid: a versatile antioxidant with promising therapeutic and industrial applications. RSC Advances. 2015;5(35):27540-57.
123. สิริกุล ตั้งเคียงสิริสิน. การแสดงออกของ TNF-alpha และ ADRP ในกระบวนการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ monocyte โดยใช้สารกระตุ้น PMA และ ATRA. บทความวิจัยมหาวิทยาลัยศิลปากร. 2011:4.







ภาคผนวก

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
CHULALONGKORN UNIVERSITY

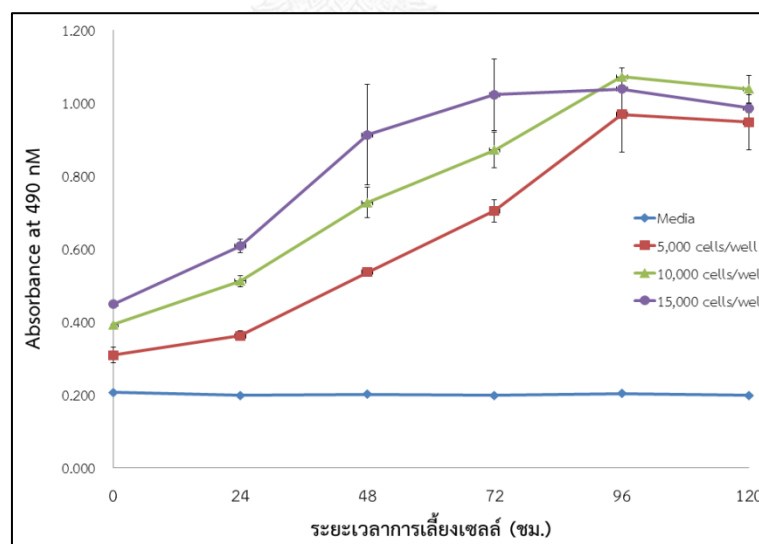
## ภาคผนวก ก.

## ผลของสารสกัดจากที่มีต่อเซลล์โมโนไซต์ U937

## 1. ผลการหาจำนวนเซลล์โมโนไซต์ U937 ที่เหมาะสมเพื่อนำมาใช้ในการทดลอง

ตารางที่ 1 ผลค่าการดูดกลืนแสงของเซลล์โมโนไซต์ U937 ที่จำนวนเซลล์และระยะเวลาการเพาะเลี้ยงแตกต่างกัน

ระยะเวลาเพาะเลี้ยง (ชม.)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 nM เมื่อทำการทดสอบด้วยเทคนิค MTS			
	Media	$5 \times 10^3$	$10 \times 10^3$	$15 \times 10^3$
0	0.207 ± 0.005	0.309 ± 0.021	0.393 ± 0.002	0.449 ± 0.002
24	0.199 ± 0.005	0.362 ± 0.014	0.512 ± 0.015	0.608 ± 0.018
48	0.202 ± 0.008	0.537 ± 0.004	0.727 ± 0.042	0.913 ± 0.138
72	0.198 ± 0.003	0.704 ± 0.031	0.871 ± 0.049	1.023 ± 0.098
96	0.204 ± 0.004	0.969 ± 0.103	1.072 ± 0.024	1.038 ± 0.010
120	0.198 ± 0.008	0.947 ± 0.076	1.038 ± 0.037	0.986 ± 0.013



รูปที่ 1 กราฟค่าการดูดกลืนแสงจากการทดสอบด้วย MTS ของเซลล์ที่มีปริมาณแตกต่างกันที่ระยะเวลา 0-120 ชั่วโมง

2. ผลการตรวจวัดสารสกัดชั้นเอทานอลและชั้นน้ำที่สกัดด้วยอุณหภูมิ 4, 22, 50 และ 100 องศาเซลเซียส จากดอกเห็ดนางฟ้าภูฐาน, เห็ดเป่าฮื้อ และเห็ดหูหนูที่มีต่อการเจริญของเซลล์โมโนไซต์ U937 เมื่อทำการบ่มที่ระยะเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง ด้วยเทคนิค MTT/MTS

ตารางที่ 2 ผลของสารสกัดจากดอกเห็ดนางฟ้าภูฐานในชั้นเอทานอลที่มีต่อเซลล์ U937 เมื่อทำการทดสอบด้วยเทคนิค MTS ที่ระยะเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง

ความเข้มข้น ของสารสกัด (mg/ml)	Cell viability (% of control)					
	24 ชั่วโมง		48 ชั่วโมง		72 ชั่วโมง	
	mean±S.D.	P value	mean±S.D.	P value	mean±S.D.	P value
0	100.00 ± 0.00	control	100.00 ± 0.00	control	100.00 ± 0.00	control
0.008	108.47 ± 2.96	0.225	110.06 ± 3.40	0.845	109.28 ± 3.86	0.280
0.016	116.82 ± 1.23	0.002	114.19 ± 5.19	0.526	116.80 ± 7.77	0.007
0.031	125.78 ± 6.20	0.000	131.89 ± 13.67	0.008	123.04 ± 6.53	0.000
0.063	153.43 ± 0.72	0.000	141.68 ± 14.07	0.001	132.66 ± 1.49	0.000
0.125	179.31 ± 5.80	0.000	153.21 ± 12.85	0.000	145.78 ± 2.52	0.000
0.250	204.21 ± 6.08	0.000	158.77 ± 5.08	0.000	130.95 ± 6.89	0.000
0.500	45.69 ± 2.74	0.000	32.50 ± 2.40	0.000	23.76 ± 2.43	0.000

ตารางที่ 3 ผลของสารสกัดจากดอกเห็ดเป่าอื้อในชั้นเอทานอลที่มีต่อเซลล์ U937 เมื่อทำการทดสอบด้วยเทคนิค MTS ที่ระยะเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง

ความเข้มข้น ของสารสกัด (mg/ml)	Cell viability (% of control)					
	24 ชั่วโมง		48 ชั่วโมง		72 ชั่วโมง	
	mean±S.D.	P value	mean±S.D.	P value	mean±S.D.	P value
0	100.00 ± 0.00	control	100.00 ± 0.00	control	100.00 ± 0.00	control
0.008	101.32 ± 3.22	0.999	105.26 ± 7.81	0.972	102.35 ± 9.21	1.000
0.016	105.07 ± 0.59	0.450	103.53 ± 6.61	0.997	98.55 ± 5.65	1.000
0.031	114.96 ± 1.49	0.000	110.72 ± 8.40	0.516	100.86 ± 6.32	1.000
0.063	120.81 ± 4.93	0.000	122.41 ± 5.06	0.013	109.25 ± 2.49	0.826
0.125	139.51 ± 0.92	0.000	129.10 ± 6.55	0.001	118.11 ± 9.89	0.157
0.250	173.59 ± 2.34	0.000	164.93 ± 5.34	0.000	117.59 ± 12.74	0.180
0.500	200.88 ± 5.08	0.000	176.48 ± 8.70	0.000	48.20 ± 8.45	0.000

ตารางที่ 4 ผลของสารสกัดจากดอกเห็ดหูหนูในชั้นเอทานอลที่มีต่อเซลล์ U937 เมื่อทำการทดสอบด้วยเทคนิค MTT ที่ระยะเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง

ความเข้มข้น ของสารสกัด (mg/ml)	Cell viability (% of control)					
	24 ชั่วโมง		48 ชั่วโมง		72 ชั่วโมง	
	mean±S.D.	P value	mean±S.D.	P value	mean±S.D.	P value
0	100.00 ± 0.00	control	100.00 ± 0.00	control	100.00 ± 0.00	control
0.008	101.13 ± 2.29	1.000	100.61 ± 3.93	1.000	96.83 ± 9.83	1.000
0.016	98.46 ± 2.47	1.000	102.39 ± 2.29	0.999	95.72 ± 10.30	1.000
0.031	100.36 ± 8.00	1.000	108.42 ± 2.63	0.650	95.69 ± 12.00	1.000
0.063	106.03 ± 5.50	0.957	108.67 ± 8.88	0.619	107.27 ± 13.25	0.994
0.125	137.09 ± 9.36	0.000	131.91 ± 3.59	0.000	115.72 ± 19.95	0.732
0.250	140.47 ± 12.26	0.000	77.16 ± 11.33	0.004	54.35 ± 14.08	0.004
0.500	76.05 ± 6.73	0.012	41.42 ± 5.06	0.000	27.47 ± 3.00	0.000

ตารางที่ 5 ผลของสารสกัดจากดอกเห็ดนางฟ้าภูฐานในชั้นน้ำที่สกัดด้วยอุณหภูมิตั้งที่ 4 องศาเซลเซียส (PS4) ที่มีต่อเซลล์ U937 เมื่อทำการทดสอบด้วยเทคนิค MTS ที่ระยะเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง

ความเข้มข้น ของสารสกัด (mg/ml)	Cell viability (% of control)					
	24 ชั่วโมง		48 ชั่วโมง		72 ชั่วโมง	
	mean±S.D.	P value	mean±S.D.	P value	mean±S.D.	P value
0	100.00 ± 0.00	control	100.00 ± 0.00	control	100.00 ± 0.00	control
0.008	111.74 ± 0.09	0.355	115.07 ± 1.23	0.000	106.38 ± 7.43	0.534
0.016	135.72 ± 5.14	0.000	118.39 ± 0.95	0.000	98.22 ± 2.37	0.999
0.031	141.24 ± 3.76	0.000	130.47 ± 0.32	0.000	111.72 ± 2.47	0.039
0.063	142.81 ± 5.41	0.000	142.86 ± 4.44	0.000	123.88 ± 4.39	0.000
0.125	169.48 ± 8.69	0.000	141.47 ± 4.95	0.000	119.43 ± 4.09	0.000
0.250	185.15 ± 12.45	0.000	140.19 ± 2.27	0.000	121.93 ± 4.86	0.000
0.500	186.99 ± 3.90	0.000	135.94 ± 1.66	0.000	104.79 ± 0.73	0.812

ตารางที่ 6 ผลของสารสกัดจากดอกเห็ดนางฟ้าภูฐานในชั้นน้ำที่สกัดด้วยอุณหภูมิตั้งที่ 22 องศาเซลเซียส (PS22) ที่มีต่อเซลล์ U937 เมื่อทำการทดสอบด้วยเทคนิค MTS ที่ระยะเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง

ความเข้มข้น ของสารสกัด (mg/ml)	Cell viability (% of control)					
	24 ชั่วโมง		48 ชั่วโมง		72 ชั่วโมง	
	mean±S.D.	P value	mean±S.D.	P value	mean±S.D.	P value
0	100.00 ± 0.00	control	100.00 ± 0.00	control	100.00 ± 0.00	control
0.008	113.65 ± 2.84	0.051	104.80 ± 8.47	0.967	110.88 ± 4.45	0.051
0.016	122.59 ± 1.34	0.001	115.77 ± 3.42	0.068	108.52 ± 8.72	0.190
0.031	133.13 ± 3.47	0.000	120.50 ± 6.45	0.010	115.17 ± 0.62	0.004
0.063	145.78 ± 4.18	0.000	119.12 ± 10.30	0.018	129.46 ± 0.58	0.000
0.125	163.33 ± 4.47	0.000	131.48 ± 2.51	0.000	122.38 ± 2.54	0.000
0.250	173.49 ± 0.39	0.000	130.46 ± 0.92	0.000	129.92 ± 0.64	0.000
0.500	186.16 ± 11.32	0.000	113.52 ± 6.05	0.156	99.21 ± 3.96	1.000

ตารางที่ 7 ผลของสารสกัดจากดอกเห็ดนางฟ้าภูฐานในชั้นน้ำที่สกัดด้วยอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส (PS50) ที่มีต่อเซลล์ U937 เมื่อทำการทดสอบด้วยเทคนิค MTS ที่ระยะเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง

ความเข้มข้น ของสารสกัด (mg/ml)	Cell viability (% of control)					
	24 ชั่วโมง		48 ชั่วโมง		72 ชั่วโมง	
	mean±S.D.	P value	mean±S.D.	P value	mean±S.D.	P value
0	100.00 ± 0.00	control	100.00 ± 0.00	control	100.00 ± 0.00	control
0.008	108.85 ± 2.13	0.084	113.76 ± 1.77	0.010	107.00 ± 4.18	0.639
0.016	112.24 ± 5.67	0.008	114.61 ± 5.65	0.006	103.71 ± 8.95	0.976
0.031	121.68 ± 0.29	0.000	136.95 ± 1.77	0.000	134.00 ± 6.07	0.000
0.063	146.57 ± 3.04	0.000	137.88 ± 2.65	0.000	142.16 ± 3.53	0.000
0.125	166.09 ± 6.65	0.000	136.75 ± 8.76	0.000	128.52 ± 4.19	0.000
0.250	176.27 ± 0.39	0.000	120.82 ± 0.54	0.000	125.30 ± 2.48	0.000
0.500	176.78 ± 1.55	0.000	123.39 ± 1.45	0.000	107.64 ± 3.80	0.542

ตารางที่ 8 ผลของสารสกัดจากดอกเห็ดนางฟ้าภูฐานในชั้นน้ำที่สกัดด้วยอุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส (PS100) ที่มีต่อเซลล์ U937 เมื่อทำการทดสอบด้วยเทคนิค MTS ที่ระยะเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง

ความเข้มข้น ของสารสกัด (mg/ml)	Cell viability (% of control)					
	24 ชั่วโมง		48 ชั่วโมง		72 ชั่วโมง	
	mean±S.D.	P value	mean±S.D.	P value	mean±S.D.	P value
0	100.00 ± 0.00	control	100.00 ± 0.00	control	100.00 ± 0.00	control
0.008	104.36 ± 0.70	0.584	109.07 ± 3.38	0.347	110.43 ± 2.82	0.000
0.016	106.66 ± 2.16	0.146	111.44 ± 8.06	0.135	103.88 ± 1.51	0.151
0.031	108.35 ± 2.00	0.039	128.81 ± 7.99	0.000	104.64 ± 0.59	0.056
0.063	123.02 ± 3.09	0.000	135.91 ± 4.08	0.000	114.40 ± 0.70	0.000
0.125	139.41 ± 0.58	0.000	143.12 ± 4.26	0.000	122.17 ± 1.49	0.000
0.250	157.26 ± 4.00	0.000	148.97 ± 0.31	0.000	123.74 ± 0.96	0.000
0.500	167.48 ± 5.47	0.000	141.87 ± 3.23	0.000	126.62 ± 2.85	0.000

ตารางที่ 9 ผลของสารสกัดจากดอกเห็ดเป่าอื้อในชั้นน้ำที่สกัดด้วยอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส (PA4) ที่มีต่อเซลล์ U937 เมื่อทำการทดสอบด้วยเทคนิค MTS ที่ระยะเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง

ความเข้มข้น ของสารสกัด (mg/ml)	Cell viability (% of control)					
	24 ชั่วโมง		48 ชั่วโมง		72 ชั่วโมง	
	mean±S.D.	P value	mean±S.D.	P value	mean±S.D.	P value
0	100.00 ± 0.00	control	100.00 ± 0.00	control	100.00 ± 0.00	control
0.008	98.55 ± 4.78	1.000	95.66 ± 1.76	0.949	98.55 ± 1.22	1.000
0.016	101.21 ± 3.42	1.000	101.73 ± 0.74	1.000	104.72 ± 3.99	0.613
0.031	127.13 ± 1.83	0.000	112.70 ± 0.87	0.015	114.18 ± 3.87	0.000
0.063	138.63 ± 6.51	0.000	113.66 ± 1.68	0.007	110.91 ± 5.05	0.002
0.125	148.56 ± 1.08	0.000	123.89 ± 0.73	0.000	109.46 ± 1.93	0.012
0.250	160.18 ± 2.05	0.000	114.02 ± 0.23	0.005	106.82 ± 3.43	0.150
0.500	163.22 ± 0.54	0.000	116.07 ± 5.96	0.001	85.00 ± 2.66	0.000
1.000	172.76 ± 2.96	0.000	129.31 ± 7.52	0.000	86.16 ± 0.45	0.000
1.500	129.35 ± 9.61	0.000	108.72 ± 1.41	0.223	63.78 ± 0.65	0.000
2.000	124.65 ± 0.57	0.000	71.94 ± 8.06	0.000	46.83 ± 1.91	0.000
2.500	114.03 ± 4.47	0.015	59.63 ± 1.47	0.000	44.24 ± 2.09	0.000

ตารางที่10 ผลของสารสกัดจากดอกเห็ดเป่าฮื้อในชั้นน้ำที่สกัดด้วยอุณหภูมิ 22 องศาเซลเซียส (PA22) ที่มีต่อเซลล์ U937 เมื่อทำการทดสอบด้วยเทคนิค MTS ที่ระยะเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง

ความเข้มข้น ของสารสกัด (mg/ml)	Cell viability (% of control)					
	24 ชั่วโมง		48 ชั่วโมง		72 ชั่วโมง	
	mean±S.D.	P value	mean±S.D.	P value	mean±S.D.	P value
0	100.00 ± 0.00	control	100.00 ± 0.00	control	100.00 ± 0.00	control
0.008	101.82 ± 1.19	1.000	80.44 ± 3.64	0.000	105.09 ± 3.66	0.991
0.016	104.03 ± 0.07	0.959	99.63 ± 3.94	1.000	114.44 ± 3.70	0.129
0.031	124.60 ± 0.28	0.000	107.49 ± 6.83	0.380	113.24 ± 3.18	0.208
0.063	153.68 ± 3.27	0.000	101.00 ± 1.26	1.000	101.98 ± 10.26	1.000
0.125	155.13 ± 8.33	0.000	94.15 ± 5.34	0.714	84.61 ± 0.82	0.085
0.250	154.76 ± 5.44	0.000	80.24 ± 6.31	0.000	87.72 ± 8.56	0.296
0.500	153.05 ± 5.79	0.000	73.37 ± 1.57	0.000	69.58 ± 8.49	0.000
1.000	146.03 ± 0.95	0.000	53.59 ± 1.21	0.000	54.70 ± 7.82	0.000
1.500	126.93 ± 3.14	0.000	54.90 ± 2.50	0.000	48.11 ± 2.26	0.000
2.000	118.24 ± 0.06	0.000	55.91 ± 1.51	0.000	48.93 ± 2.75	0.000
2.500	118.59 ± 1.01	0.000	56.20 ± 1.68	0.000	49.48 ± 4.16	0.000



ตารางที่ 11 ผลของสารสกัดจากดอกเห็ดเป่าฮื้อในชั้นน้ำที่สกัดด้วยอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส (PA50) ที่มีต่อเซลล์ U937 เมื่อทำการทดสอบด้วยเทคนิค MTS ที่ระยะเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง

ความเข้มข้นของสารสกัด (mg/ml)	Cell viability (% of control)					
	24 ชั่วโมง		48 ชั่วโมง		72 ชั่วโมง	
	mean±S.D.	P value	mean±S.D.	P value	mean±S.D.	P value
0	100.00 ± 0.00	control	100.00 ± 0.00	control	100.00 ± 0.00	control
0.008	99.30 ± 3.13	1.000	80.85 ± 2.25	0.000	101.28 ± 0.56	1.000
0.016	103.72 ± 2.18	0.999	100.00 ± 6.54	1.000	95.21 ± 2.27	0.933
0.031	108.37 ± 1.33	0.732	101.54 ± 4.63	1.000	102.02 ± 0.59	1.000
0.063	136.09 ± 1.76	0.000	99.93 ± 1.36	1.000	109.01 ± 9.84	0.250
0.125	139.13 ± 7.48	0.000	73.33 ± 2.99	0.000	81.75 ± 3.15	0.000
0.250	100.26 ± 13.15	1.000	64.28 ± 5.60	0.000	62.77 ± 4.64	0.000
0.500	100.46 ± 7.73	1.000	59.89 ± 2.01	0.000	51.37 ± 5.70	0.000
1.000	115.85 ± 4.73	0.045	56.03 ± 0.35	0.000	46.86 ± 2.82	0.000
1.500	108.38 ± 0.85	0.730	51.74 ± 2.17	0.000	48.58 ± 3.44	0.000
2.000	104.82 ± 2.30	0.991	49.63 ± 1.45	0.000	45.99 ± 0.45	0.000
2.500	94.64 ± 1.53	0.980	46.44 ± 2.17	0.000	44.13 ± 1.80	0.000

ตารางที่12 ผลของสารสกัดจากดอกเห็ดเป่าฮื้อในชั้นน้ำที่สกัดด้วยอุณหภูมิต่ำ 100 องศาเซลเซียส (PA100) ที่มีต่อเซลล์ U937 เมื่อทำการทดสอบด้วยเทคนิค MTS ที่ระยะเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง

ความเข้มข้น ของสารสกัด (mg/ml)	Cell viability (% of control)					
	24 ชั่วโมง		48 ชั่วโมง		72 ชั่วโมง	
	mean±S.D.	P value	mean±S.D.	P value	mean±S.D.	P value
0	100.00 ± 0.00	control	100.00 ± 0.00	control	100.00 ± 0.00	control
0.008	96.90 ± 2.73	1.000	101.31 ± 1.39	1.000	99.94 ± 1.35	1.000
0.016	95.28 ± 0.84	1.000	99.91 ± 1.83	1.000	95.58 ± 2.34	0.846
0.031	98.21 ± 2.53	1.000	107.93 ± 2.87	0.248	102.69 ± 2.23	0.995
0.063	103.94 ± 0.65	1.000	105.05 ± 4.62	0.817	109.54 ± 2.00	0.041
0.125	113.04 ± 1.54	0.998	121.39 ± 0.98	0.000	107.87 ± 1.73	0.154
0.250	132.17 ± 2.58	0.403	125.03 ± 3.54	0.000	121.39 ± 0.38	0.000
0.500	152.18 ± 0.25	0.024	134.11 ± 5.12	0.000	101.63 ± 1.28	1.000
1.000	170.90 ± 3.29	0.002	150.67 ± 7.60	0.000	104.90 ± 4.87	0.749
1.500	168.63 ± 2.13	0.000	120.93 ± 3.05	0.000	98.13 ± 6.07	1.000
2.000	138.60 ± 9.10	0.002	138.03 ± 0.62	0.000	97.21 ± 5.68	0.993
2.500	152.39 ± 6.37	0.001	124.96 ± 2.04	0.000	90.23 ± 2.50	0.034

ตารางที่13 ผลของสารสกัดจากดอกเห็ดหูหนูในชั้นน้ำที่สกัดด้วยอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส (AA4) ที่มีต่อเซลล์ U937 เมื่อทำการทดสอบด้วยเทคนิค MTT ที่ระยะเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง

ความเข้มข้น ของสารสกัด (mg/ml)	Cell viability (% of control)					
	24 ชั่วโมง		48 ชั่วโมง		72 ชั่วโมง	
	mean±S.D.	P value	mean±S.D.	P value	mean±S.D.	P value
0	100.00 ± 0.00	control	100.00 ± 0.00	control	100.00 ± 0.00	control
0.008	99.86 ± 4.35	1.000	94.27 ± 11.77	0.977	92.85 ± 6.33	0.155
0.016	98.28 ± 2.53	1.000	87.14 ± 7.61	0.454	89.70 ± 0.62	0.015
0.031	108.86 ± 7.78	0.556	91.18 ± 8.64	0.826	78.00 ± 3.13	0.000
0.063	104.81 ± 2.49	0.960	81.55 ± 8.74	0.113	52.78 ± 3.49	0.000
0.125	74.88 ± 7.47	0.001	30.17 ± 8.24	0.000	13.65 ± 2.80	0.000
0.250	48.69 ± 4.25	0.000	24.16 ± 4.53	0.000	17.56 ± 1.83	0.000
0.500	46.62 ± 9.45	0.000	19.64 ± 3.70	0.000	16.83 ± 1.76	0.000

ตารางที่14 ผลของสารสกัดจากดอกเห็ดหูหนูในชั้นน้ำที่สกัดด้วยอุณหภูมิ 22 องศาเซลเซียส (AA22) ที่มีต่อเซลล์ U937 เมื่อทำการทดสอบด้วยเทคนิค MTT ที่ระยะเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง

ความเข้มข้น ของสารสกัด (mg/ml)	Cell viability (% of control)					
	24 ชั่วโมง		48 ชั่วโมง		72 ชั่วโมง	
	mean±S.D.	P value	mean±S.D.	P value	mean±S.D.	P value
0	100.00 ± 0.00	control	100.00 ± 0.00	control	100.00 ± 0.00	control
0.008	99.11 ± 5.79	1.000	98.96 ± 10.46	1.000	78.40 ± 5.70	0.151
0.016	100.84 ± 4.17	1.000	91.67 ± 5.60	0.935	75.87 ± 4.04	0.085
0.031	95.06 ± 5.41	0.973	75.03 ± 7.79	0.051	57.83 ± 22.78	0.001
0.063	76.40 ± 6.41	0.005	27.67 ± 15.66	0.000	23.45 ± 6.59	0.000
0.125	32.06 ± 4.89	0.000	16.13 ± 12.12	0.000	9.99 ± 5.77	0.000
0.250	51.84 ± 8.20	0.000	17.62 ± 4.88	0.000	11.45 ± 4.38	0.000
0.500	45.42 ± 9.98	0.000	17.58 ± 3.51	0.000	10.37 ± 5.42	0.000

ตารางที่ 15 ผลของสารสกัดจากดอกเห็ดหูหนูในชั้นน้ำที่สกัดด้วยอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส (AA50) ที่มีต่อเซลล์ U937 เมื่อทำการทดสอบด้วยเทคนิค MTT ที่ระยะเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง

ความเข้มข้น ของสารสกัด (mg/ml)	Cell viability (% of control)					
	24 ชั่วโมง		48 ชั่วโมง		72 ชั่วโมง	
	mean±S.D.	P value	mean±S.D.	P value	mean±S.D.	P value
0	100.00 ± 0.00	control	100.00 ± 0.00	control	100.00 ± 0.00	control
0.008	86.81 ± 10.86	0.547	99.96 ± 3.06	1.000	94.41 ± 8.29	0.875
0.016	95.26 ± 3.59	0.996	104.52 ± 2.44	0.986	93.70 ± 4.56	0.797
0.031	86.73 ± 9.81	0.540	101.46 ± 4.76	1.000	76.50 ± 5.30	0.001
0.063	98.37 ± 12.33	1.000	96.10 ± 6.09	0.994	48.65 ± 4.48	0.000
0.125	82.94 ± 6.28	0.260	56.52 ± 7.45	0.000	15.45 ± 7.83	0.000
0.250	58.89 ± 11.65	0.000	36.93 ± 9.66	0.000	15.35 ± 2.60	0.000
0.500	44.42 ± 1.20	0.000	28.63 ± 10.41	0.000	11.92 ± 2.46	0.000

ตารางที่16 ผลของสารสกัดจากดอกเห็ดหูหนูในชั้นน้ำที่สกัดด้วยอุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส (AA100) ที่มีต่อเซลล์ U937 เมื่อทำการทดสอบด้วยเทคนิค MTT ที่ระยะเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง

ความเข้มข้น ของสารสกัด (mg/ml)	Cell viability (% of control)					
	24 ชั่วโมง		48 ชั่วโมง		72 ชั่วโมง	
	mean±S.D.	P value	mean±S.D.	P value	mean±S.D.	P value
0	100.00 ± 0.00	control	100.00 ± 0.00	control	100.00 ± 0.00	control
0.008	86.97 ± 7.96	0.186	91.87 ± 2.96	0.001	79.94 ± 3.40	0.001
0.016	99.63 ± 3.36	1.000	90.33 ± 0.91	0.000	73.44 ± 3.83	0.000
0.031	102.33 ± 1.53	1.000	93.53 ± 1.47	0.008	80.52 ± 1.70	0.002
0.063	102.99 ± 3.95	1.000	97.12 ± 2.30	0.711	84.62 ± 10.26	0.024
0.125	104.32 ± 1.71	0.997	109.06 ± 0.67	0.000	97.33 ± 2.35	1.000
0.250	114.48 ± 2.90	0.100	105.69 ± 1.36	0.028	100.89 ± 4.12	1.000
0.500	114.72 ± 13.35	0.089	105.66 ± 2.76	0.029	97.14 ± 2.47	1.000
1.000	121.09 ± 5.58	0.003	97.33 ± 1.08	0.794	67.47 ± 6.67	0.000
1.500	122.20 ± 2.86	0.002	82.25 ± 0.17	0.000	52.79 ± 7.77	0.000
2.000	112.49 ± 1.79	0.231	71.42 ± 1.14	0.000	37.23 ± 1.42	0.000
2.500	99.42 ± 5.24	1.000	65.95 ± 3.06	0.000	30.26 ± 2.08	0.000

ตารางที่17 ผลของยา camptothecin ที่มีต่อเซลล์ U937 เมื่อทำการทดสอบด้วยเทคนิค MTS ที่ระยะเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง

ความเข้มข้น ของสารสกัด (mg/ml)	Cell viability (% of control)					
	24 ชั่วโมง		48 ชั่วโมง		72 ชั่วโมง	
	mean±S.D.	P value	mean±S.D.	P value	mean±S.D.	P value
0	100.00 ± 0.00	control	100.00 ± 0.00	control	100.00 ± 0.00	control
1.09	99.53 ± 5.72	1.000	100.36 ± 3.97	1.000	100.82 ± 6.98	1.000
2.19	97.08 ± 6.73	0.999	98.69 ± 3.30	1.000	99.82 ± 5.44	1.000
4.38	96.61 ± 4.25	0.997	96.19 ± 2.73	0.970	89.43 ± 6.84	0.195
8.75	87.08 ± 0.55	0.256	87.10 ± 9.69	0.062	61.86 ± 7.36	0.000
17.5	86.66 ± 12.96	0.226	60.88 ± 5.29	0.000	38.29 ± 1.58	0.000
35.00	70.80 ± 4.22	0.001	44.77 ± 3.52	0.000	35.16 ± 1.13	0.000
70.00	65.26 ± 5.89	0.000	41.63 ± 3.16	0.000	34.75 ± 1.54	0.000

2. ผลการตรวจวัดความเป็นพิษต่อเซลล์โมโนไซต์ U937 ของสารสกัดชั้นเอทานอลและชั้นน้ำจากดอกเห็ดนางฟ้าภูฐาน, เห็ดเป่าฮื้อ และเห็ดหูหนู ด้วยการตรวจวัดปริมาณเอนไซม์ Lactate dehydrogenase (LDH) activity

ตารางที่ 19 ค่าความเป็นพิษของสารสกัดต่อเซลล์โมโนไซต์ U937 เมื่อทำการทดสอบกับสารสกัดชั้นเอทานอล

ของดอกเห็ดนางฟ้าภูฐาน (PSE) ด้วยการตรวจวัดปริมาณ LDH activity

ความเข้มข้นของสารสกัด (mg/ml)	Cytotoxicity (%)	
	mean±S.D.	P value
0.000	0.00 ± 0.00	ค่าที่ได้จากการทดสอบไม่มี ความแตกต่างทางสถิติเมื่อ เปรียบเทียบกับเซลล์ในกลุ่ม ควบคุม โดยค่า p value จากการ ทดสอบ ANOVA มีค่าเท่ากับ 0.668
0.008	1.96 ± 6.11	
0.016	1.64 ± 5.55	
0.031	1.74 ± 4.88	
0.063	1.73 ± 5.48	
0.125	0.33 ± 4.57	
0.250	1.12 ± 5.15	
0.500	6.25 ± 6.24	

ตารางที่ 20 ค่าความเป็นพิษของสารสกัดต่อเซลล์โมโนไซต์ U937 เมื่อทำการทดสอบกับสารสกัดชั้นน้ำที่  
 อุณหภูมิ 4, 22 และ 50 องศาเซลเซียสของดอกเห็ดเป่าฮื้อ (PA4, PA22 และ PA50) ด้วยการ  
 ตรวจวัดปริมาณ LDH activity

ความ เข้มข้นของ สารสกัด (mg/ml)	Cytotoxicity (%)					
	PA4		PA22		PA50	
	mean±S.D.	P value	mean±S.D.	P value	mean±S.D.	P value
0	0.00 ± 0.00	control	0.00 ± 0.00	control	0.00 ± 0.00	control
0.008	5.94 ± 2.88	0.392	2.94 ± 3.63	1.000	2.37 ± 8.73	0.994
0.016	4.74 ± 1.78	0.700	3.18 ± 1.28	1.000	0.79 ± 9.53	0.978
0.0031	1.19 ± 2.06	0.999	2.25 ± 0.92	1.000	1.68 ± 9.87	0.948
0.063	0.24 ± 2.83	0.999	3.33 ± 3.76	1.000	6.82 ± 6.20	0.976
0.125	0.84 ± 3.04	0.992	12.28 ± 2.90	0.747	6.56 ± 12.20	0.699
0.250	0.76 ± 3.97	0.993	24.84 ± 2.05	0.094	26.21 ± 3.19	0.055
0.500	1.54 ± 2.48	0.998	25.26 ± 15.78	0.025	19.32 ± 12.33	0.066
1.000	2.56 ± 2.06	0.993	20.38 ± 11.20	0.125	11.88 ± 4.94	0.604
1.500	1.95 ± 2.13	0.999	32.97 ± 4.64	0.002	13.46 ± 8.66	0.429
2.000	2.99 ± 2.05	0.978	36.94 ± 12.84	0.000	12.49 ± 4.50	0.535
2.500	10.33 ± 14.6	0.000	28.82 ± 10.54	0.007	18.98 ± 5.53	0.075



ตารางที่ 21 ค่าความเป็นพิษของสารสกัดต่อเซลล์โมโนไซต์ U937 เมื่อทำการทดสอบกับสารสกัดชั้นเอทานอลของดอกเห็ดเป่าฮื้อ (PAE) ด้วยการตรวจวัดปริมาณ LDH activity

ความเข้มข้นของสารสกัด (mg/ml)	Cytotoxicity (%)	
	mean±S.D.	P value
0.000	0.00 ± 0.00	ค่าที่ได้จากการทดสอบไม่มี ความแตกต่างทางสถิติเมื่อ เปรียบเทียบกับเซลล์ในกลุ่ม ควบคุม โดยค่า p value จากการ ทดสอบ ANOVA มีค่าเท่ากับ 0.456
0.008	0.58 ± 4.62	
0.016	0.44 ± 4.74	
0.031	3.97 ± 2.77	
0.063	4.85 ± 1.66	
0.125	2.09 ± 2.32	
0.250	3.40 ± 3.68	
0.500	0.70 ± 6.04	

ตารางที่ 22 ค่าความเป็นพิษของสารสกัดต่อเซลล์โมโนไซต์ U937 เมื่อทำการทดสอบกับสารสกัดชั้นน้ำที่อุณหภูมิ 4, 22, 50 องศาเซลเซียส และสารสกัดชั้นเอทานอลของดอกเห็ดหูหนู (AA4, AA22, AA50 และ AAE) ด้วยการตรวจวัดปริมาณ LDH activity

ความเข้มข้นของสารสกัด (mg/ml)	Cytotoxicity (%)							
	AA4		AA22		AA50		AAE	
	mean±S.D.	P value	mean±S.D.	P value	mean±S.D.	P value	mean±S.D.	P value
0	0.00 ± 0.00	control	0.00 ± 0.00	control	0.00 ± 0.00	control	0.00 ± 0.00	control
0.008	2.94 ± 3.04	0.858	1.30 ± 2.68	0.981	2.96 ± 4.59	1.000	1.01 ± 1.23	0.984
0.016	3.50 ± 1.66	0.841	2.52 ± 1.51	0.944	2.80 ± 5.55	0.992	2.51 ± 1.29	0.505
0.031	3.80 ± 2.27	0.783	1.98 ± 2.32	0.980	3.17 ± 5.52	0.994	1.17 ± 0.34	0.977
0.063	2.68 ± 0.34	0.952	2.72 ± 1.15	0.918	2.33 ± 5.43	0.992	2.18 ± 1.31	0.657
0.125	7.76 ± 4.68	0.097	37.45 ± 3.21	0.000	4.12 ± 4.75	0.989	1.68 ± 1.25	0.865
0.250	34.84 ± 0.59	0.000	36.11 ± 4.16	0.000	24.18 ± 13.8	0.005	6.74 ± 0.63	0.001
0.500	37.76 ± 5.69	0.000	38.09 ± 4.12	0.000	38.29 ± 4.10	0.000	49.95 ± 3.28	0.000

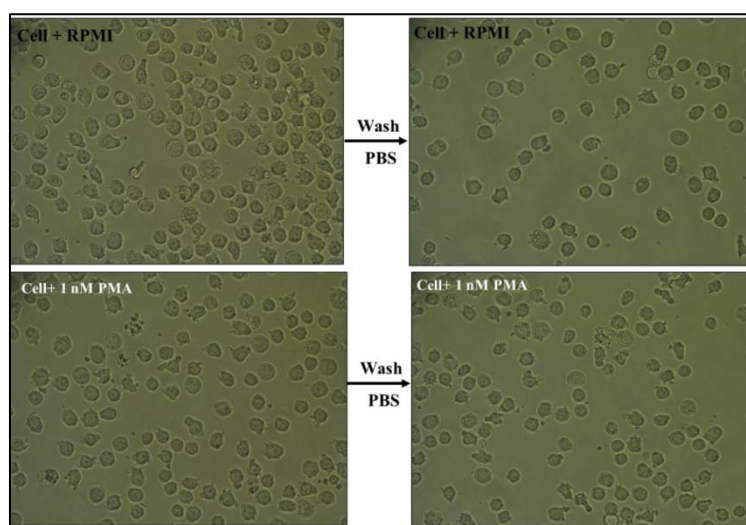
ตารางที่ 23 ค่าความเป็นพิษของสารสกัดต่อเซลล์โมโนไซต์ U937 เมื่อทำการทดสอบกับสารสกัดชั้นน้ำที่  
อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียสของดอกเห็ดหูหนู (AA100) ด้วยการตรวจวัดปริมาณ LDH activity

ความเข้มข้นของสารสกัด(mg/ml)	Cytotoxicity (%)		ค่าที่ได้จากการทดสอบ ไม่มีความแตกต่างทาง สถิติเมื่อเปรียบเทียบกับ เซลล์ในกลุ่มควบคุม โดยค่า p value จาก การทดสอบ ANOVA มี ค่าเท่ากับ 0.171
	mean±S.D.	P value	
0	0.00 ± 0.00		
0.008	86.97 ± 7.96		
0.016	99.63 ± 3.36		
0.0031	102.33 ± 1.53		
0.063	102.99 ± 3.95		
0.125	104.32 ± 1.71		
0.250	114.48 ± 2.90		
0.500	114.72 ± 13.35		
1.000	121.09 ± 5.58		
1.500	122.20 ± 2.86		
2.000	112.49 ± 1.79		
2.500	99.42 ± 5.24		

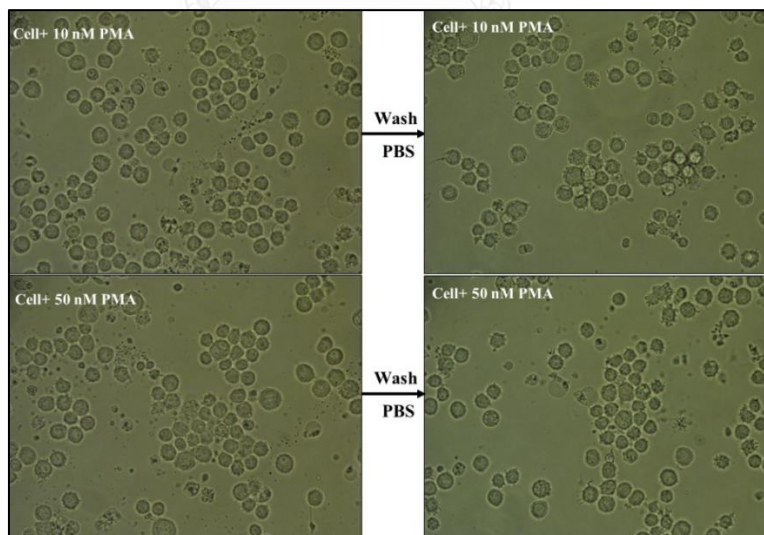
ภาคผนวก ข.

ผลการศึกษาฤทธิ์ปรับภูมิคุ้มกันของสารสกัดจากเห็ด

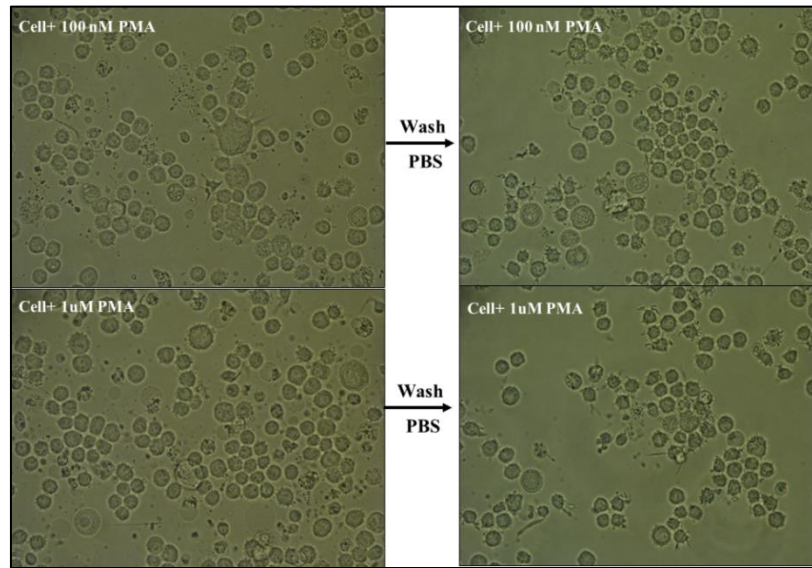
1. ผลการหาสถานะในการกระตุ้นเซลล์โมโนไซต์ U937 ให้เกิดการเปลี่ยนแปลงรูปร่างด้วยสาร PMA



รูปที่ 1 ลักษณะการเปลี่ยนแปลงของเซลล์กลุ่มควบคุม และกลุ่มที่ได้รับสาร PMA 1 นาโนโมลาร์



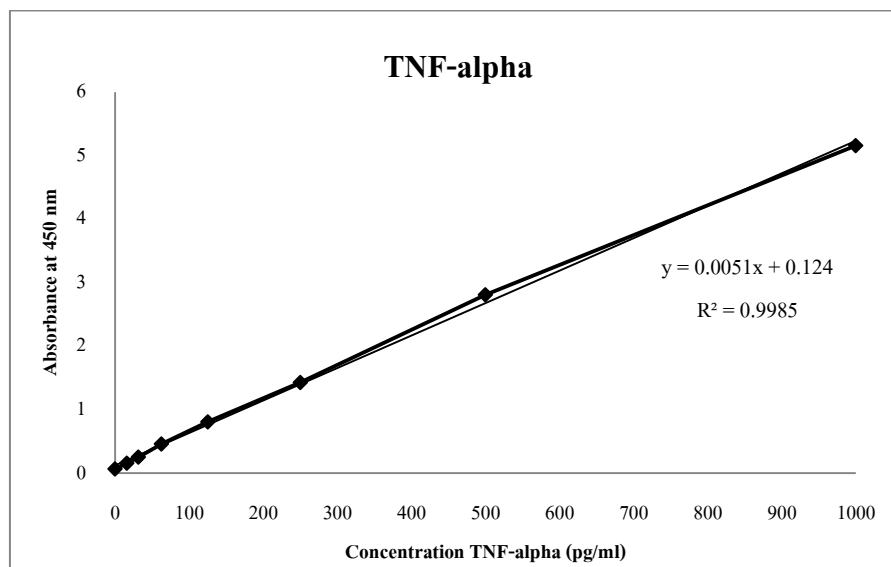
รูปที่ 2 ลักษณะการเปลี่ยนแปลงของเซลล์กลุ่มที่ได้รับสาร PMA 10 และ 50 นาโนโมลาร์



รูปที่ 3 ลักษณะการเปลี่ยนแปลงของเซลล์กลุ่มที่ได้รับสาร PMA 100 นาโนโมลาร์ และ 1 ไมโครโมลาร์

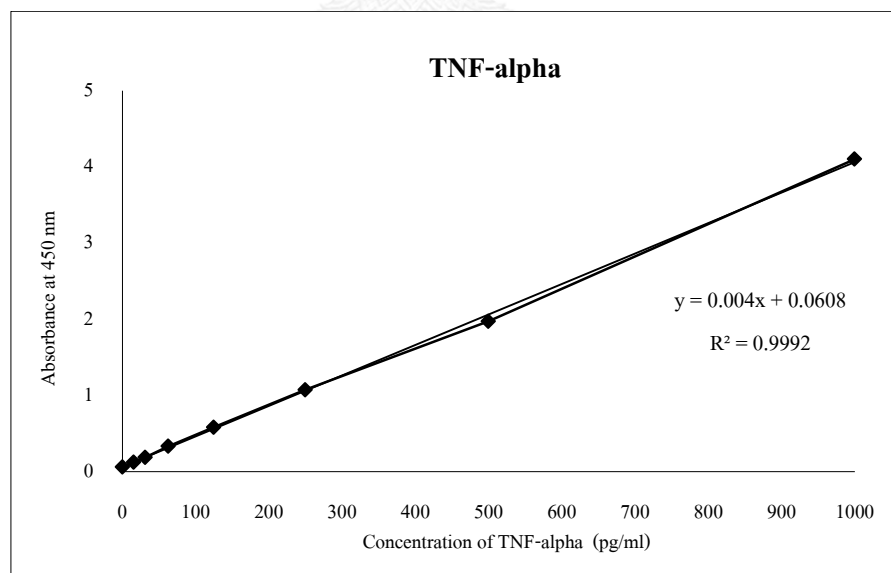
## 2. ผลการตรวจวัดไซโตไคน์ของสารสกัดชั้นน้ำจากเห็ดนางฟ้าภูฐาน

### 2.1 กราฟมาตรฐานของไซโตไคน์ชนิด TNF- $\alpha$ ในการตรวจวัดครั้งที่ 1



รูปที่ 4 กราฟมาตรฐานของไซโตไคน์ชนิด TNF- $\alpha$  ในการตรวจวัดปริมาณไซโตไคน์ครั้งที่ 1

### 2.2 กราฟมาตรฐานของไซโตไคน์ชนิด TNF- $\alpha$ ในการตรวจวัดครั้งที่ 2



รูปที่ 5 กราฟมาตรฐานของไซโตไคน์ชนิด TNF- $\alpha$  ในการตรวจวัดปริมาณไซโตไคน์ครั้งที่ 2

2.4 ผลการตรวจวัดปริมาณไซโตไคน์ TNF- $\alpha$  จากตัวอย่างสารสกัดชั้นน้ำของเห็ดนางฟ้าภูฐานที่ทำการทดสอบกับเซลล์ U937

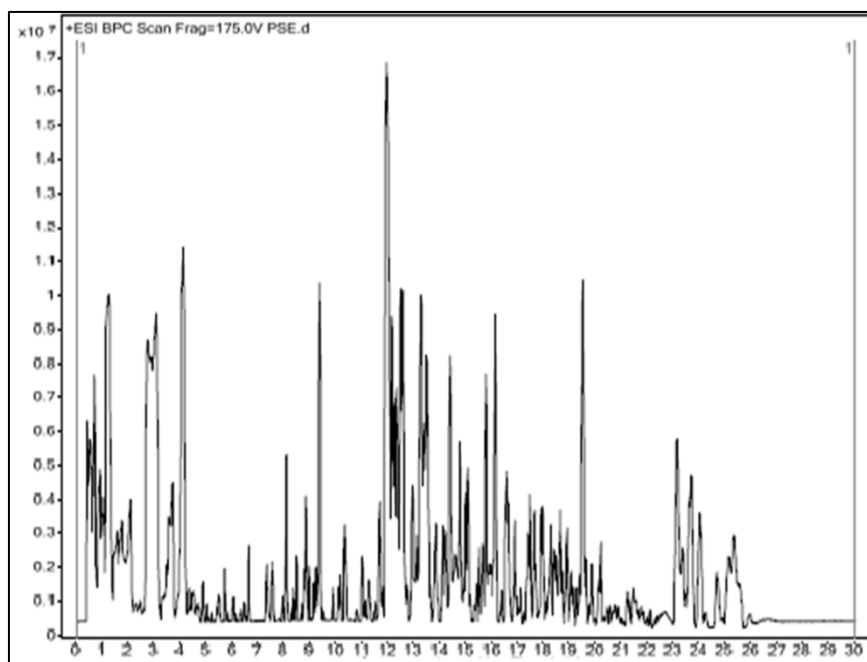
ตารางที่ 1 ปริมาณไซโตไคน์ TNF- $\alpha$  ที่ได้จากการทดสอบสารสกัดชั้นน้ำของเห็ดนางฟ้าภูฐาน (PS22, PS50 และ PS100) กับเซลล์ U937

ตัวอย่าง	TNF- $\alpha$ (pg/ml)		P value
	Mean	$\pm$ S.D.	
RPMI	1.35	$\pm$ 1.91	0.003
PMA	384.95	$\pm$ 37.77	control
PS22_0.5 mg/ml	0.00	$\pm$ 0.00	0.003
PS22_0.25 mg/ml	0.00	$\pm$ 0.00	0.003
PS22_0.125 mg/ml	0.00	$\pm$ 0.00	0.003
PS50_0.5 mg/ml	0.00	$\pm$ 0.00	0.003
PS50_0.25 mg/ml	0.00	$\pm$ 0.00	0.003
PS50_0.125 mg/ml	0.00	$\pm$ 0.00	0.003
PS100_0.5 mg/ml	0.00	$\pm$ 0.00	0.003
PS100_0.25 mg/ml	0.00	$\pm$ 0.00	0.003
PS100_0.125 mg/ml	0.00	$\pm$ 0.00	0.003
PS22_0.5+PMA	695.95	$\pm$ 61.21	0.027
PS22_0.25+PMA	721.87	$\pm$ 106.72	0.013
PS22_0.125+PMA	743.62	$\pm$ 91.80	0.007
PS50_0.5+PMA	767.63	$\pm$ 114.65	0.003
PS50_0.25+PMA	745.28	$\pm$ 113.42	0.006
PS50_0.125+PMA	769.23	$\pm$ 84.30	0.003
PS100_0.5+PMA	828.80	$\pm$ 135.34	0.001
PS100_0.25+PMA	793.15	$\pm$ 95.46	0.002
PS100_0.125+PMA	748.73	$\pm$ 129.99	0.006

## ภาคผนวก ค.

## ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบของสารสกัดด้วยเทคนิค UPLC-HRMS

## 1. องค์ประกอบของสารสกัดชั้นเอทานอลจากดอกเห็ดนางฟ้าภูฐาน (PSE)



รูปที่ 1 โครมาโทแกรมองค์ประกอบของสารเคมีที่พบในสารสกัดชั้นเอทานอลของเห็ดนางฟ้าภูฐาน

Table 1. Phenol, phenol ethers and derivatives in *P. sajor-caju* crude ethanol extracts

RT (min)	Formula	Mass	Proposed metabolite
Phenol and derivatives			
13.667	C <sub>18</sub> H <sub>29</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub>	307.21	Betaxolol
18.121	C <sub>8</sub> H <sub>10</sub> O <sub>2</sub>	138.07	4-Hydroxyphenylethanol
Phenol ether			
8.129	C <sub>18</sub> H <sub>29</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub>	307.21	4-Hydroxyphenbutolol

Table 2. Phenylpyruvic acid, phenylpropanoid and polyketides in *P. sajor-caju* crude ethanol extracts

RT (min)	Formula	Mass	Proposed metabolite
Phenylpyruvic acid and derivatives			
4.567	C <sub>9</sub> H <sub>8</sub> O <sub>4</sub>	180.04	3-(4-Hydroxyphenyl)pyruvic acid
Phenylpropanoid and polyketides			
9.929	C <sub>35</sub> H <sub>45</sub> N O <sub>10</sub>	639.31	Protorifamycin I
8.81	C <sub>28</sub> H <sub>47</sub> N O <sub>8</sub>	525.32	Pikromycin
3.687	C <sub>10</sub> H <sub>7</sub> N O <sub>3</sub>	189.04	alpha-Cyano-3-hydroxycinnamic acid

Table 3. Heterocyclic compounds in *P. sajor-caju* crude ethanol extracts

RT (min)	Formula	Mass	Proposed metabolite
0.81	C <sub>5</sub> H <sub>4</sub> N <sub>4</sub> O	136.04	Hypoxanthine
2.85	C <sub>8</sub> H <sub>7</sub> N	117.06	Indole
1.416	C <sub>15</sub> H <sub>18</sub> O <sub>7</sub>	310.10	Picrotin
3.355, 3.525	C <sub>16</sub> H <sub>18</sub> N <sub>2</sub>	238.14	Nomifensin
0.842, 0.91	C <sub>12</sub> H <sub>17</sub> N O <sub>3</sub>	223.12	Rimiterol
6.519	C <sub>19</sub> H <sub>19</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub>	337.14	Zolpidem Metabolite II
0.696	C <sub>5</sub> H <sub>7</sub> N O <sub>3</sub>	129.04	Pyrraline hydroxycarboxylic acid
0.927	C <sub>8</sub> H <sub>10</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	166.07	Nicotinamide, N-(2-hydroxyethyl)
3.08	C <sub>7</sub> H <sub>11</sub> N O <sub>3</sub>	157.07	Ethosuximide M7
4.498	C <sub>13</sub> H <sub>14</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	230.10	1,2-Dihydroxytacrine
4.587, 4.909	C <sub>11</sub> H <sub>18</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	242.13	N-Hydroxypentobarbital
6.077	C <sub>12</sub> H <sub>15</sub> N O <sub>4</sub>	237.10	Cotamine
7.988	C <sub>15</sub> H <sub>14</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	286.10	5-(3,4-Dihydroxy-1,5-cyclohexadien-1-yl)-5-phenylhydantoin
18.601	C <sub>15</sub> H <sub>23</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub> S	325.15	Amdinocillin



Table 4. Organic compounds, carbohydrate and sugar acid in *P. sajor-caju* crude ethanol extracts

RT (min)	Formula	Mass	Proposed metabolite
<b>Organic compounds</b>			
0.555	C5 H11 N O2	117.08	Isoamyl nitrite
0.805	C4 H6 O5	134.02	Malic acid
2.851	C11 H12 N2 O2	204.09	Ethotoin
17.942	C20 H22 O3	310.16	Avobenzene
8.89	C27 H53 N O4 S	487.37	(Z)-2-pentacos-16-enamidoethanesulfonic acid
<b>Carbohydrates</b>			
9.402	C21 H41 N7 O11	567.29	Dihydrodeoxystreptomycin
0.736, 3.555, 4.031	C9 H17 N O8	267.10	Neuraminic acid
<b>Sugar acids and derivatives</b>			
0.676	C4 H8 O5	136.04	DL-erythronic acid
0.475, 0.58	C12 H22 O11	342.11	Sucrose

Table 5. Amino acids, nucleotides and nucleoside in *P. sajor-caju* crude ethanol extracts

RT (min)	Formula	Mass	Proposed metabolite
<b>Amino acids</b>			
			Tryptophan
			Alanine
			Aspartic acid
			Asparagine
			Phenylalanine
			Glycine
			Cysteine
			Proline
			Arginine
			Lysine
			Isoleucine
			Leucine
			Tyrosine
0.462, 0.587	C5 H13 N O	103.10	2-Amino-3-methyl-1-butanol
0.74	C7 H15 N3 O2	173.12	Indospicine
1.484, 1.605	C9 H17 N O5	219.11	Pantothenic Acid

Table 5. Amino acids, nucleotides and nucleoside in *P. sajor-caju* crude ethanol extracts (ต่อ)

RT (min)	Formula	Mass	Proposed metabolite
<b>Amino acids</b>			
16.095	C <sub>20</sub> H <sub>35</sub> N O <sub>3</sub>	337.26	N-Linoleoylglycine
<b>Nucleotide</b>			
3.055	C <sub>5</sub> H <sub>5</sub> N <sub>5</sub>	135.05	Adenine
<b>Nucleoside</b>			
2.914, 3.089	C <sub>11</sub> H <sub>15</sub> N <sub>5</sub> O <sub>3</sub> S	297.09	5'-Methylthioadenosine
0.677	C <sub>10</sub> H <sub>13</sub> N <sub>5</sub> O <sub>3</sub>	251.10	Deoxyadenosine

Table 6. Benzenoids in *P. sajor-caju* crude ethanol extracts

RT (min)	Formula	Mass	Proposed metabolite
0.674	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> N O <sub>2</sub>	123.03	Nitrobenzene
1.264	C <sub>9</sub> H <sub>11</sub> N O <sub>2</sub>	165.08	Benzocaine
2.851	C <sub>8</sub> H <sub>11</sub> N	121.09	2,6-Xylidine
2.854	C <sub>11</sub> H <sub>9</sub> N O <sub>2</sub>	187.06	3-Amino-2-naphthoic acid
4.385	C <sub>19</sub> H <sub>21</sub> N O	279.17	10-Hydroxyprotriptyline
15.586, 19.544	C <sub>28</sub> H <sub>42</sub> O <sub>2</sub>	410.31	3,3',5,5'-Tetra-tert-butyl-4,4'-dihydroxybiphenyl
3.55, 3.641	C <sub>9</sub> H <sub>8</sub> O <sub>5</sub>	196.04	Haematommic acid



Table 7. Fatty acyls, prenol lipids and sphingolipids in *P. sajor-caju* crude ethanol extracts

RT (min)	Formula	Mass	Proposed metabolite
<b>Fatty acyls</b>			
13.25	C18 H36 O4	316.26	8,9-dihydroxy stearic acid
0.576	C7 H12 O3	144.08	3-Butyrl propionic acid
0.791	C6 H13 N O2	131.09	L-Norleucine
3.607, 3.731	C12 H18 O4	226.12	Tuberonic acid
3.424, 3.553, 4.03	C16 H24 O7	328.15	9,15-dioxo-11R-hydroxy-2,3,4,5-tetranor-prostan-1,20-dioic acid
4.142	C12 H20 O4	228.13	Traumatic acid
9.189	C23 H29 N O2	351.22	D-erythro-MAPP
4.19	C14 H28 O2	228.21	2-Methyl-tridecanoic acid
4.535	C8 H13 N O3	171.09	N-butanoyl-l-homoserine lactone
9.263, 10.138, 11.164	C18 H34 O5	330.24	9,12,13-Trihydroxy-10- octadecenoic acid
9.269	C18 H34 O5	330.24	11,12,13-trihydroxy-9-octadecenoic acid
9.336	C22 H39 N O5	397.28	PGF2alpha-EA
10.412	C20 H23 D7 O3	325.26	50oxo-E7E-d7
10.412	C15 H26 O	222.20	5,10-Pentadecadienal
11.547	C24 H44 O2	364.33	5,9-Tetracosadienoic acid
11.85, 12.379, 14.252	C18 H30 O2	278.22	Gorlic acid
11.85, 12.197, 12.38	C18 H34 O4	314.24	9,13-dihydroxy-11-octadecenoic acid
11.927	C22 H42 O4	370.32	Docosanedioic acid
11.992, 13.422, 16.58	C18 H37 N O2	299.28	N-(2-hydroxyethyl) palmitamide
12.195	C16 H32 O2	256.24	Isopalmitic acid
12.78	C19 H38 O3	314.28	2-hydroxy-nonadecanoic acid
12.991	C19 H36 O3	312.26	18-oxo-nonadecanoic acid
13.314	C24 H41 N O2	375.32	N-(1,1-dimethyl-2-hydroxy-ethyl) arachidonoyl amine
13.431, 13.946	C21 H40 O3	340.30	20-Oxo-heneicosanoic acid
13.534	C20 H40 O3	328.30	3-Hydroxy-eicosanoic acid
14.425	C20 H32 O3	320.23	5-Hydroxyeicosatetraenoic acid

Table 7. Fatty acyls, prenol lipids and sphingolipids in *P. sajor-caju* crude ethanol extracts (ต่อ)

RT (min)	Formula	Mass	Proposed metabolite
<b>Fatty acyls</b>			
14.814, 15.12	C18 H30 O3	294.22	13-OxoODE
15.699	C20 H36 O3	324.26	15(R)-HEDE
15.567, 15.701	C20 H38 O4	342.28	Eicosanedioic acid
15.71	C22 H39 N O4	381.29	5,6-DiHETrE-EA
16.672	C18 H33 N O	279.25	Linoleamide
16.728	C16 H30 O3	270.22	16-hydroxy-5-hexadecenoic acid
17.151	C20 H39 N O2	325.30	N-oleoylethanolamine
17.417	C22 H41 N O3	367.31	PGE2alpha dimethyl amine
17.513	C16 H30 O	238.23	7,11-Hexadecadien-1-ol
18.01	C20 H34 O	290.26	8-[3]-ladderane-1-octanol
18.442, 19.073, 24.053	C23 H46 O2	354.35	Tricosanoic acid
18.874	C18 H37 N O	283.29	Stearamide
20.173	C26 H46 O2	390.35	5,9,19-hexacosatrienoic acid
<b>Prenol lipids</b>			
4.241	C17 H26 O10	390.15	Loganin
12.411	C25 H36 O4	400.27	Ophiobolin A
13.932	C30 H44	404.35	4,4'-Diapo-zeta-carotene
15.555	C46 H64 O6	712.46	19'-Hexanoyloxyisomytilo xanthin
18.432, 18.521, 18.671, 18.773, 18.939	C41 H62 O	570.49	Dihydrospheridene/Methoxyneurosporene
<b>Sphingolipids</b>			
11.057, 11.321	C17 H37 N O2	287.28	C17 Sphinganine
11.999	C18 H39 N O3	317.29	Phytosphingosine
10.21	C18 H38 N O5 P	379.25	Sphingosine-1-phosphate
12.987	C18 H39 N O2	301.30	Dihydrosphingosine
13.337	C20 H41 N O3	343.31	Dihydroceramide C2
16.925	C20 H39 N O3	341.29	N-Acetylsphingosine
<b>Glycerolipids</b>			
24.726, 25.602	C36 H66 O5	578.49	1-(9Z-hexadecenoyl)-2-(9Z-heptadecenoyl)-sn-glycerol
25.358	C38 H64 O5	600.47	1-(9Z,12Z-heptadecadienoyl) -2-(9Z,12Z,15Z-octadecatrienoyl)-sn-glycerol

Table 8. Steroids and sterol lipids in *P. sajor-caju* crude ethanol extracts

RT (min)	Formula	Mass	Proposed metabolite
<b>Steroids</b>			
10.122	C41 H63 N O14	793.43	Protoveratrine A
12.52, 12.611	C23 H36 N2 O2	372.29	Finasteride
<b>Sterol lipids</b>			
8.527	C22 H32 O4	360.22	Pregn-4-ene-3,20-dione,6a,17-dihydroxy-6-methyl
15.205	C21 H34 O4	350.24	5a-Tetrahydrocorticosterone
19.05	C25 H38 O3	386.28	Testosterone isocaproate
5.54	C30 H44 O3	452.33	1alpha,25-dihydroxy-26,27-dimethyl-20,21,22,22,23,23-hexadehydro-24a-homovitamin D3 / 1alpha,25-dihy
8.89	C28 H45 Cl O3	464.30	11alpha-(chloromethyl)-1alpha,25-dihydroxyvitamin D3 / 11alpha-(chloromethyl)-1alpha,25-dihydroxycho
9.928	C32 H44 F6 O4	606.31	1,25-Dihydroxy-20S-21-(3-hydroxy-3-methylbutyl)-23-yne-26,27-hexafluorovitamin
11.295, 11.725, 15.967	C24 H40 O3	376.31	6beta-Hydroxy-5beta-cholan-24-oic Acid
11.791	C31 H50 O4	486.36	26,27-diethyl-1alpha,25-dihydroxy-20,21-methano-23-oxavitamin D3 / 26,27-diethyl-1alpha,25-dihydroxy
12.65	C28 H46 O2	414.36	22-Hydroxy Vitamin D4
12.652	C29 H50 O	414.38	Stigmast-25-en-3beta-o
12.703	C31 H44 O3	464.32	1alpha-hydroxy-22-[3-(1-hydroxy-1-methylethyl)phenyl]-23,24,25,26,27-pentanovitamin D3 / 1alpha-hyd
13.08	C28 H44 O2	412.34	24-epi-25-hydroxyvitamin D2 / 24-epi-25-hydroxyergocalciferol
13.169	C24 H38 O5	406.27	3alpha,7alpha-Dihydroxy-12-oxo-5alpha-cholan-24-oic Acid
13.882	C27 H44	368.35	3-Deoxyvitamin D3
16.015	C28 H41 F3 O2	466.30	(24RS)-28,28,28-trifluoro-25-hydroxyvitamin D2 / (24RS)-28,28,28-trifluoro-25-hydroxyergocalciferol
16.425	C26 H44 O3	404.33	1alpha,25-dihydroxy-19-norvitamin D3 / 1alpha,25-dihydroxy-19-norcholecalciferol
17.438, 17.448	C28 H42 O3	426.31	(22E,24E)-1alpha,25-dihydroxy-22,23,24,24a-tetrahydro-24a-homovitamin D3 / (22E,24E)-1alpha,25-dih
17.476	C26 H44 O4	420.32	1alpha,2alpha,25-trihydroxy-19-norvitamin D3 / 1alpha,2alpha,25-trihydroxy-19-norcholecalciferolchol
17.499, 19.174	C26 H42 O2	386.32	25-hydroxy-3-deoxy-2-oxavitamin D3 / 25-hydroxy-3-deoxy-2-oxacholecalciferol

Table 8. Steroids and sterol lipids in *P. sajor-caju* crude ethanol extracts (ต่อ)

RT (min)	Formula	Mass	Proposed metabolite
Sterol lipids			
18.225, 18.45, 20.153	C <sub>26</sub> H <sub>44</sub> O <sub>2</sub>	388.33	1beta,25-dihydroxy-3-deoxy-19-norvitamin D <sub>3</sub> / 1beta,25-dihydroxy-3-deoxy-19-norcholecalciferol
18.269	C <sub>27</sub> H <sub>38</sub> O <sub>3</sub>	410.28	24,25-epoxy-1alpha-hydroxy-22,22,23,23-tetrahydrovitamin D <sub>3</sub> /24,25-epoxy-1alpha-hydroxy-22,22,23
21.27	C <sub>24</sub> H <sub>38</sub> O <sub>4</sub>	390.27	3beta-Hydroxy-11-oxo-5beta-cholan-24-oic Acid

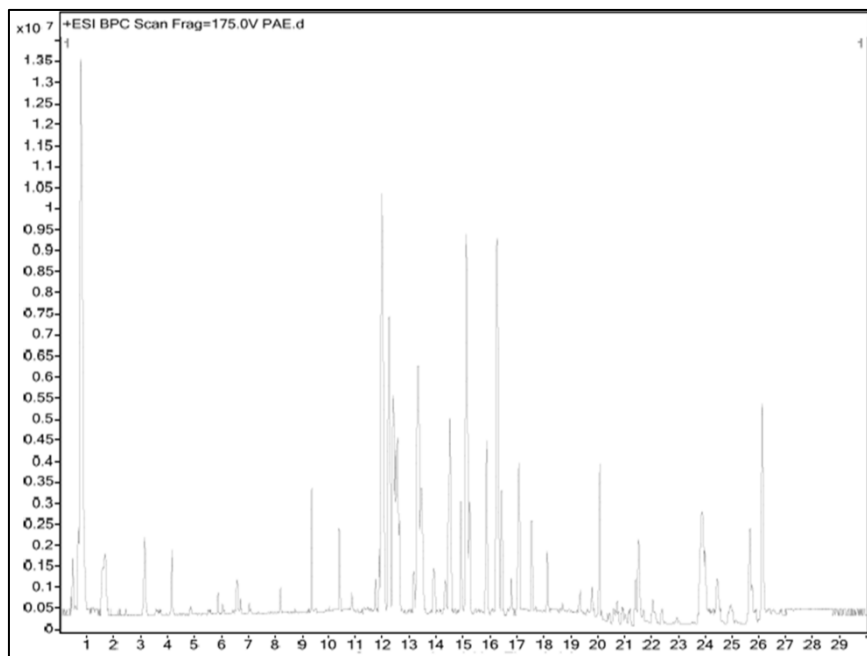
Table 9. Other chemical compounds identified in *P. sajor-caju* crude ethanol extracts

RT (min)	Formula	Mass	Proposed metabolite
Ketone			
14.441	C <sub>28</sub> H <sub>40</sub> O <sub>2</sub>	408.30	3,5,3',5'-Tetra-tert-butylidiphenone
Other polar compounds			
0.926, 1.14	C <sub>6</sub> H <sub>9</sub> N O <sub>3</sub>	143.06	N-Acrylylglycine methyl ester
10.371	C <sub>33</sub> H <sub>66</sub> N O <sub>8</sub> P	635.45	GPEn(13:0/15:0)[U]
12.198, 12.378	C <sub>34</sub> H <sub>67</sub> O <sub>10</sub> P	666.44	GPGro(14:0/14:0)[U]
13.432	C <sub>31</sub> H <sub>64</sub> N O <sub>10</sub> P	641.42	GPGro(12:0/13:0)
15.816	C <sub>20</sub> H <sub>37</sub> N O <sub>2</sub>	323.28	(9Z,12Z)-N-(2-hydroxyethyl)octadeca-9,12-dienamide

Table 10. Unidentified compounds *P. sajor-caju* crude ethanol extracts

Extract	Unidentified compounds
PS	70

## 2. องค์ประกอบของสารสกัดชั้นเอทานอลจากดอกเห็ดเป่าฮื้อ (PAE)



รูปที่ 2 โครมาโทแกรมองค์ประกอบของสารเคมีที่พบในสารสกัดชั้นเอทานอลของเห็ดเป่าฮื้อ

Table 11. Phenol and derivatives in *P. abalonus* crude ethanol extracts

RT (min)	Formula	Mass	Proposed metabolite
8.209, 13.756	C <sub>18</sub> H <sub>29</sub> N O <sub>3</sub>	307.21	Betaxolol

Table 12. Flavonoids, Phenylpropanoids and polyketides in *P. abalonus* crude ethanol extracts

RT (min)	Formula	Mass	Proposed metabolite
Flavonoids			
0.708	C <sub>21</sub> H <sub>24</sub> O <sub>10</sub>	436.13	Phloridzin
Phenylpropanoids and polyketides			
4.084	C <sub>18</sub> H <sub>18</sub> O <sub>2</sub>	266.13	Dienestrol

Table 13. Heterocyclic compounds in *P. abalonus* crude ethanol extracts

RT (min)	Formula	Mass	Proposed metabolite
0.581,0.712	C5 H7 N O3	129.04	Pyroglutamic acid
0.828	C16 H19 N3	253.15	Anabasamine
3.16	C11 H9 N O2	187.07	Indoleacrylic acid
3.161	C7 H11 N O3	157.07	Ethosuximide M7
6.586	C19 H19 N3 O3	337.14	Zolpidem Metabolite I
10.021	C36 H44 N4 O8	660.33	Coproporphyrin
10.397	C41 H42 N4 O8	718.31	Verteporfin

Table 14. Organic compounds, carbohydrate and sugar acid in *P. abalonus* crude ethanol extracts

RT (min)	Formula	Mass	Proposed metabolite
<b>Organic compounds</b>			
0.58	C6 H15 N O2	133.11	Bis(2-hydroxypropyl)amine
0.673	C6 H11 N3	125.09	N-Methylhistamine
0.686	C6 H5 N O2	123.03	Nitrobenzene
<b>Carbohydrates</b>			
0.794	C9 H17 N O8	267.09	Neuraminic acid
9.36	C21 H41 N7 O11	567.28	Dihydrodeoxystreptomycin
13.515	C14 H28 O6	292.20	B-Octylglucoside
<b>Sugar acids and derivatives</b>			
0.485	C6 H14 O6	182.08	Sorbitol
0.627	C6 H14 O6	182.06	Mannitol
7.047	C9 H14 N2 O13	358.05	1,3-Glycerol dinitrate glucuronide

Table 15. Amino acids and nucleotides in *P. abalonus* crude ethanol extracts

RT (min)	Formula	Mass	Proposed metabolite
<b>Amino acids and derivatives</b>			
			Glycine
			Valine
			Tyrosine
			Arginine
			Proline
			Alanine
			Serine
			Cysteine
			Tryptophan



Table 15. Amino acids and nucleotides in *P. abalonus* crude ethanol extracts (ต่อ)

RT (min)	Formula	Mass	Proposed metabolite
<b>Amino acids and derivatives</b>			
			Asparagine
			Isoleucine
			Leucine
			Glutamine
			Lysine
			Phenylalanine
23.891	C <sub>14</sub> H <sub>22</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	250.17	3-Hydroxylicocaine
0.734, 0.903	C <sub>8</sub> H <sub>13</sub> N O <sub>3</sub>	171.09	(3-Methylcrotonyl)glycine methyl ester
1.661	C <sub>9</sub> H <sub>17</sub> N O <sub>5</sub>	219.11	Pantothenic Acid
<b>Nucleotide</b>			
0.56, 0.79, 3.623, 3.735	C <sub>5</sub> H <sub>5</sub> N <sub>5</sub>	135.05	Adenine
0.733	C <sub>4</sub> H <sub>4</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	112.03	Uracil
0.94	C <sub>7</sub> H <sub>9</sub> N <sub>5</sub>	163.09	6-Dimethyl amino purine

Table 16. Benzenoids in *P. abalonus* crude ethanol extracts

RT (min)	Formula	Mass	Proposed metabolite
0.494	C <sub>15</sub> H <sub>18</sub> O <sub>10</sub>	358.09	Mebeverine metabolite (Veratric acid glucuronide)
0.532, 0.696	C <sub>22</sub> H <sub>22</sub> O <sub>9</sub>	430.12	Ketoprofen glucuronide
4.862	C <sub>10</sub> H <sub>13</sub> N O <sub>4</sub>	211.08	3-O-Methyl-L-DOPA
4.866	C <sub>9</sub> H <sub>11</sub> N O <sub>2</sub>	165.08	2-amino-4'-hydroxy-Propiophenone
4.866	C <sub>10</sub> H <sub>11</sub> N O <sub>3</sub>	193.08	2-Methylhippuric acid
7.388	C <sub>11</sub> H <sub>12</sub> O <sub>5</sub>	224.07	Haematommic acid, Ethyl ester
11.783	C <sub>11</sub> H <sub>15</sub> N O <sub>2</sub>	193.11	p-Butylaminobenzoic acid
15.525, 15.537	C <sub>16</sub> H <sub>22</sub> O <sub>4</sub>	278.15	Phthalic acid Mono-2-ethylhexyl Ester

Table 17. Fatty acyls, prenol lipids, sphingolipids and glycerolipids in *P. abalonus* crude ethanol extracts

RT (min)	Formula	Mass	Proposed metabolite
<b>Fatty acyls</b>			
4.164	C16 H24 O7	328.15	9,15-dioxo-11R-hydroxy-2,3,4,5-tetranor-prostan-1,20-dioic acid
6.068	C17 H28 O3	280.20	12-hydroxy-5,8,10-heptadecatrienoic acid
9.275	C20 H32 O5	352.22	PGD2
9.363	C22 H39 N O5	397.28	PGF2alpha-EA
9.918, 10.151, 11.196	C18 H34 O5	330.23	9S,12S,13S-trihydroxy-10E-octadecenoic acid
10.393	C20 H38 O4	342.28	Eicosanedioic acid
10.676	C13 H24 O3	228.17	10-keto tridecanoic acid
10.947	C18 H30 O5	326.21	2,3-dinor-11b-PGF2alpha
11.393	C34 H48 O13	664.31	Sarmentoside
11.561	C18 H28 O3	292.20	(-)-8-hydroxy-11E,17-octadecadien-9-ynoic acid
11.562	C18 H30 O4	310.21	12-hydroperoxy-9Z,13E,15-octadecatrienoic acid
11.586	C17 H26 O5	310.17	methyl 8-[2-(2-formyl-vinyl)-3-hydroxy-5-oxo-cyclopentyl]-octanoate
11.881, 12.237, 12.417, 15.894	C18 H34 O4	314.24	18-hydroxy-9R,10S-epoxy-stearic acid
11.884	C18 H30 O2	278.22	10,12,15-octadecatrienoic acid
11.994, 13.431, 18.195	C18 H35 N O	281.27	Oleamide
11.997, 16.687, 18.7	C18 H37 N O2	299.28	N-(2-hydroxyethyl) palmitamide
12.233, 12.423, 15.741	C18 H32 O3	296.27	12-hydroxy-10-octadecynoic acid
12.234,12.417,14.338,14.58, 15.72	C16 H32 O2	256.24	Isopalmitic acid
12.235, 12.415	C18 H34 O4	314.24	9,13-dihydroxy-11-octadecenoic acid
12.441	C19 H37 N O2	311.28	(±)13-Azaprostanoic acid
12.782	C29 H43 N O2	437.34	(+/-)N-(1-methyl-2-hydroxy-2-phenyl-ethyl) arachidonyl amine

Table 17. Fatty acyls, prenol lipids, sphingolipids and glycerolipids in *P. abalonus* crude ethanol extracts

(ต่อ)

RT (min)	Formula	Mass	Proposed metabolite
<b>Fatty acyls</b>			
13.293	C18 H36 O4	316.26	2,3-dihydroxy stearic acid
13.293	C18 H32 O2	280.24	12Z,15Z-octadecadienoic acid
13.955	C10 H18 O2	170.13	Citronellic acid
14.456	C26 H38 O5	430.28	17-phenyl-trinor-PGF2 $\alpha$ isopropyl ester
14.504, 17.082	C18 H34 O3	298.25	9R-hydroxy-10E-octadecenoic acid
14.922, 15.234, 15.444	C16 H30 O2	254.22	2-Hexyl-2-decenoic acid
14.926	C16 H32 O3	272.24	2-Hydroxyhexadecanoic acid
15.234,15.446, 15.451	C18 H30 O3	294.22	13-OxoODE
15.653, 15.791, 16.598	C20 H38 O4	342.27	Eicosanedioic acid
15.879	C21 H40 O3	340.31	20-Oxo-heneicosanoic acid
16.795	C18 H33 N O	279.25	Linoleamide
16.859	C16 H30 O3	270.22	16-hydroxy-5-hexadecenoic acid
17.064	C23 H38 F N O	363.30	N-(2-fluro-ethyl) 2-methyl-arachidonoyl amine
17.269	C20 H39 N O2	325.30	N-(2-hydroxyethyl)oleamide
18.461	C18 H36 O3	300.27	DL-10-hydroxy stearic acid
19.821	C23 H44 O4	384.32	Tricosanedioic acid
20.635, 20.717	C24 H41 N O	359.32	(-)-N-(1R-methyl-propyl) arachidonoyl amine
<b>Prenol lipids</b>			
11.104	C20 H28 O6	364.19	Gibberellin A44 diacid
12.323	C42 H58 O6	658.42	Fucoxanthin
15.011	C20 H28 O3	316.20	Totarol-19-carboxylic acid
17.558, 17.563	C22 H41 N O3	367.31	PGE2 $\alpha$ dimethyl amine

Table 17. Fatty acyls, prenol lipids, sphingolipids and glycerolipids in *P. abalonus* crude ethanol extracts

(ต่อ)

RT (min)	Formula	Mass	Proposed metabolite
<b>Sphingolipids</b>			
11.071, 11.324	C17 H37 N O2	287.28	C17 Sphinganine
11.995	C18 H39 N O3	317.29	Phytosphingosine
13.04, 16.262	C20 H41 N O3	343.31	Dihydroceramide C2
15.87, 18.614	C18 H39 N O2	301.30	Dihydrosphingosine
17.065	C20 H39 N O3	341.29	N-Acetylsphingosine
<b>Glycerolipids</b>			
16.793	C20 H40 O4	344.29	1-Heptadecanoyl-rac-glycerol
23.831, 23.994, 24.496	C36 H64 O5	576.47	1-(9Z-hexadecenoyl)-2-(9Z,12Z-heptadecadienoyl)-sn-glycerol
25.754	C36 H66 O5	578.49	1-(9Z-hexadecenoyl)-2-(9Z-heptadecenoyl)-sn-glycerol

Table 18. Steroids and sterol lipids in *P. abalonus* crude ethanol extracts

RT (min)	Formula	Mass	Proposed metabolite
<b>Steroids</b>			
7.072	C25 H32 O2	364.24	Quinestrol
18.135	C18 H24 O3	288.17	17-Epiestriol
19.769	C19 H32 O2	292.24	3b,17a-Dihydroxy-5a-androstane
22.061	C29 H35 N O2	429.27	Mifepristone (RU 486)
<b>Sterol lipids</b>			
5.879	C30 H44 O3	452.33	(17E)-1alpha,25-dihydroxy-26,27-dimethyl-17,20,22,22,23,23-hexadecahydro-24a-homovitamin D3 / (17E)-1a
7.078	C23 H36 O3	360.27	1alpha,23-dihydroxy-24,25,26,27-tetranorvitamin D3 / 1alpha,23-dihydroxy-24,25,26,27-tetranorcholeca
11.318	C24 H40 O3	376.31	6beta-Hydroxy-5beta-cholan-24-oic Acid
11.739	C31 H50 O4	486.36	26,27-diethyl-1alpha,25-dihydroxy-20,21-methano-23-oxavitamin D3 / 26,27-diethyl-1alpha,25-dihydroxy
11.748	C24 H40 O3	376.31	6beta-Hydroxy-5beta-cholan-24-oic Acid
12.624	C28 H46 O2	414.36	1alpha,25-dihydroxy-3alpha-methyl-3-deoxyvitamin D3 / 1alpha,25-dihydroxy-3alpha-methyl-3-deoxychole
12.671	C31 H44 O3	464.33	1alpha-hydroxy-22-[3-(1-hydroxy-1-methylethyl) phenyl]-23,24,25,26,27-pentanorvitamin D3 / 1alpha-hyd
12.696	C30 H44 O3	452.34	1alpha,25-dihydroxy-26,27-dimethyl-20,21,22,22,23,23-hexadecahydro-24a-homovitamin D3 / 1alpha,25-dihy

Table 18. Steroids and sterol lipids in *P. abalonus* crude ethanol extracts (ต่อ)

RT (min)	Formula	Mass	Proposed metabolite
<b>Sterol lipids</b>			
13.064	C28 H44 O2	412.34	24-epi-25-hydroxyvitamin D2/ 24-epi-25-hydroxy ergocalciferol
13.322	C27 H46	370.37	Cholest-5-ene
13.92, 17.997	C27 H44	368.35	3-Deoxyvitamin D3
14.121	C26 H43 N O3	417.33	1alpha,25-dihydroxy-23-azavitamin D3 / 1alpha,25-dihydroxy-23-azacholecalciferol
14.457,17.664	C26 H42 O2	386.31	25-hydroxy-3-deoxy-2-oxavitamin D3 / 25-hydroxy-3-deoxy-2-oxacholecalciferol
14.625	C26 H43 O5 P	466.29	1alpha-hydroxy-24-(dimethoxyphosphoryl)-25,26,27-trinorvitamin D3 / 1alpha-hydroxy-24-(dimethoxyphos)
15.075	C24 H38 O5	406.28	3alpha,7alpha-Dihydroxy-12-oxo-5alpha-cholan-24-oic Acid
15.127	C23 H40 O3	364.31	24-Nor-5beta-cholane-3alpha,7alpha,23-triol
15.127	C25 H38 O3	386.29	Testosterone isocaproate
15.141	C27 H46 O	386.35	5Alpha-cholest-8-en-3beta-ol
15.641, 19.791, 20.437, 20.605	C26 H44 O2	388.33	1beta,25-dihydroxy-3-deoxy-19-norvitamin D3 / 1beta,25-dihydroxy-3-deoxy-19-norcholecalciferol
16.076	C28 H44 O4	444.32	(24R)-1alpha,24,25-trihydroxyvitamin D2 / (24R)-1alpha,24,25-trihydroxyergocalciferol
17.722, 26.118	C28 H42 O	394.32	Ergosta-5,7,22,24(28)-tetraene-3beta-ol
18.473	C26 H46 O5	438.33	27-nor-5b-cholestane-3a,7a,12a,24,25-pentol
18.532	C24 H42 O4	394.31	5alpha-Cholane-3alpha, 7alpha,12alpha,24-tetrol
18.934	C28 H42 O4	442.31	(22S)-1alpha,22,25-trihydroxy-23,24-tetradehydro-24a-homo-20-epivitamin D3 / (22S)-1alpha,22,25-trih
18.936	C28 H42 O4	442.31	1alpha-hydroxy-18-(4-hydroxy-4-methyl-2-pentynyloxy)-23,24,25,26,27 -pentanorvitamin D3 / 1alpha-hydr
19.768	C26 H39 F3 O2	440.29	26,26,26-trifluoro-25-hydroxy-27-norvitamin D3 / 26,26,26-trifluoro-25-hydroxy-27-norcholecalciferol
19.983	C29 H46 F2 O3	480.34	24,24-difluoro-1alpha,25-dihydroxy-26,27-dimethyl vitamin D3 / 24,24-difluoro-1alpha,25-dihydroxy-26,
19.998	C26 H42 O3	402.31	1alpha,25-dihydroxy-24-norvitamin D3 / 1alpha,25-dihydroxy-24-norcholecalciferol
21.53, 21.532	C24 H38 O4	390.27	3beta-Hydroxy-11-oxo-5beta-cholan-24-oic Acid

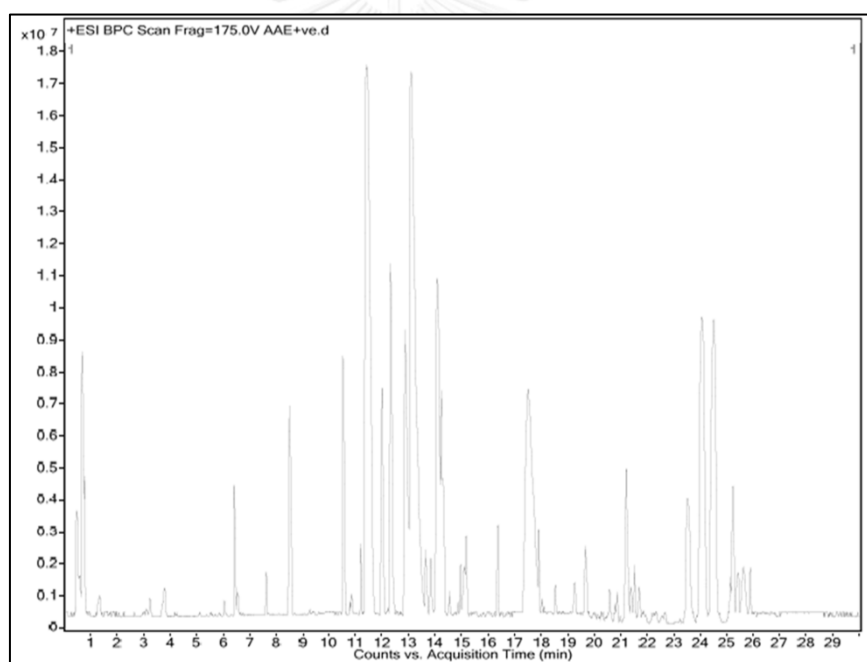
Table 19. Other chemical compounds identified in *P. abalonus* crude ethanol extracts

RT (min)	Formula	Mass	Proposed metabolite
0.557, 0.689	C7 H13 N O2	143.10	Triparanol
6.08	C29 H61 N O7 P	566.42	GPCho(O-18:0/3:0[U])
13.544	C31 H64 N O10 P	641.42	GPGro(12:0/13:0)
16.195	C22 H36 O3	348.27	Larixol acetate

Table 20. Unidentified compounds *P. abalonus* crude ethanol extracts

Extract	Unidentified compounds
PA	82

### 3. องค์ประกอบของสารสกัดชั้นเอทานอลจากดอกเห็ดหูหนู (AAE)



รูปที่ 3 โครมาโทแกรมองค์ประกอบของสารเคมีที่พบในสารสกัดชั้นเอทานอลของเห็ดหูหนู

Table 21. Phenol and derivatives in *A. auricula-judae* crude ethanol extracts

RT (min)	Formula	Mass	Proposed metabolite
1.324	C9 H13 N O3	183.09	Normetanephine
11.421	C13 H11 N O3	229.07	Fenamisal

Table 22. Terpenoids, porphyrins and phenylpropanoids and polyketides in *A. auricula-judae* crude ethanol extracts

RT (min)	Formula	Mass	Proposed metabolite
Terpenoids			
9.4	C <sub>32</sub> H <sub>40</sub> O <sub>9</sub>	568.27	Swietenine
Porphyrins			
11.415	C <sub>39</sub> H <sub>38</sub> N <sub>4</sub> O <sub>12</sub>	754.23	Heptacarboxylporphyrin III
Phenylpropanoids and polyketides			
11.421	C <sub>9</sub> H <sub>10</sub> F N O <sub>2</sub>	183.07	p-Fluorophenylalanine

Table 23. Heterocyclic compounds in *A. auricula-judae* crude ethanol extracts

RT (min)	Formula	Mass	Proposed metabolite
0.7	C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	140.06	1,4-Methylimidazoleacetic acid
3.12	C <sub>11</sub> H <sub>11</sub> N O <sub>3</sub>	205.08	Deschlorobenzoyl indomethacin
4.224	C <sub>13</sub> H <sub>19</sub> N <sub>5</sub>	245.16	Pinacidil
6.487	C <sub>13</sub> H <sub>20</sub> N <sub>4</sub> O <sub>3</sub>	280.15	Pentoxifylline alcohol
11.417	C <sub>12</sub> H <sub>15</sub> N O <sub>2</sub>	205.11	Normeperidinic acid
11.422	C <sub>16</sub> H <sub>14</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	298.09	5-(4-Hydroxy-3-methoxy phenyl)-5-phenylhydantoin
14.248	C <sub>22</sub> H <sub>25</sub> Cl N <sub>2</sub> O <sub>2</sub> S	416.13	Zuclopenthixol sulfoxide
18.044	C <sub>19</sub> H <sub>24</sub> N <sub>2</sub> O S	328.16	Methotrimeprazine

Table 24. Organic compounds, carbohydrate and sugar acid in *A. auricula-judae* crude ethanol extracts

RT (min)	Formula	Mass	Proposed metabolite
Organic compounds			
0.538	C <sub>7</sub> H <sub>16</sub> N O <sub>3</sub>	162.11	Carnitine
0.697	C <sub>6</sub> H <sub>7</sub> N O <sub>3</sub>	141.04	2-Aminomuconate 6-semialdehyde
0.817	C <sub>6</sub> H <sub>15</sub> N O <sub>3</sub>	149.11	Trolamine
1.331	C <sub>8</sub> H <sub>12</sub> N O	138.09	nn-Dimethylaniline-n-oxide
23.537	C <sub>27</sub> H <sub>42</sub> N O <sub>2</sub>	412.33	Benzethonium
Carbohydrates			
0.567	C <sub>9</sub> H <sub>17</sub> N O <sub>8</sub>	267.09	Neuraminic acid
Sugar acids and derivatives			
11.425	C <sub>27</sub> H <sub>45</sub> N <sub>5</sub> O <sub>19</sub>	743.29	Neu5Acalpha2-3Galbeta1-4GlcNAcbeta-5p

Table 25. Amino acids and nucleoside in *A. auricula-judae* crude ethanol extracts

RT (min)	Formula	Mass	Proposed metabolite
<b>Amino acids</b>			
0.548	C <sub>8</sub> H <sub>15</sub> N O <sub>3</sub>	173.11	Methyl N-( $\alpha$ -methylbutyryl) glycine
0.558	C <sub>5</sub> H <sub>12</sub> N O <sub>2</sub>	118.09	Betaine
0.771	C <sub>7</sub> H <sub>13</sub> N O <sub>3</sub>	147.05	O-Acetylserine
0.771	C <sub>7</sub> H <sub>13</sub> N O <sub>3</sub>	159.09	2-Methylbutyrylglycine
11.415	C <sub>9</sub> H <sub>12</sub> N O <sub>6</sub> P	261.04	O-Phospho-DL-Tyrosine
12.338	C <sub>9</sub> H <sub>18</sub> N O <sub>8</sub> P	299.08	D-4'-Phosphopantothenate
			Tyrosine
			Valine
			Glycine
			Glutamic acid
			Alanine
			Arginine
			Proline
			Phenylalanine
			Isoleucine
			Asparagine
			Tryptophan
			Aspartic acid
			Cysteine
			Tyrosine
			Threonine
			Methionine
			Lysine
			Glutamine
<b>Nucleoside</b>			
0.581, 0.697	C <sub>12</sub> H <sub>13</sub> N <sub>5</sub> O <sub>3</sub>	275.10	Ethenodeoxyadenosine



Table 26. Benzenoids in *A. auricula-judae* crude ethanol extracts

RT (min)	Formula	Mass	Proposed metabolite
0.487	C <sub>15</sub> H <sub>18</sub> O <sub>10</sub>	358.09	Mebeverine metabolite (Veratric acid glucuronide)
0.697	C <sub>9</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub>	198.05	4-Hydroxy-3-methoxymandelic acid
0.771	C <sub>13</sub> H <sub>19</sub> N O <sub>4</sub> S	285.10	Probenecid
6.438	C <sub>8</sub> H <sub>11</sub> N	121.09	Phenylethylamine
24.504	C <sub>28</sub> H <sub>42</sub> O <sub>2</sub>	410.31	3,3',5,5'-Tetra-tert-butyl-4,4'-dihydroxybiphenyl

Table 27. Lipids, fatty acyls, prenol lipids, sphingolipids and glycerolipids in *A. auricula-judae* crude ethanol extracts

RT (min)	Formula	Mass	Proposed metabolite
<b>Lipids</b>			
10.804	C <sub>8</sub> H <sub>14</sub> N O <sub>7</sub> P	267.05	1-alkenyl-2-acyl-glycero phosphoethanolamine
12.366	C <sub>26</sub> H <sub>48</sub> N O <sub>7</sub> P	517.31	Linolenoyl lysolecithin
<b>Fatty acyls</b>			
6.074	C <sub>17</sub> H <sub>30</sub> O <sub>4</sub>	298.21	8E-Heptadecenedioic acid
9.267	C <sub>20</sub> H <sub>34</sub> O <sub>6</sub>	370.24	20-Hydroxy-PGF <sub>2a</sub>
10.171	C <sub>18</sub> H <sub>36</sub> O <sub>6</sub>	348.25	Sativic acid
10.412	C <sub>22</sub> H <sub>42</sub> O <sub>2</sub>	338.32	2,4-Dimethyl-2-eicosenoic acid
11.209, 11.983	C <sub>19</sub> H <sub>32</sub> O <sub>3</sub>	308.23	Methyl 15,16-epoxy-9,12-octadecadienoate
12.227	C <sub>18</sub> H <sub>36</sub> O <sub>5</sub>	332.26	9R,10S,18-Trihydroxy-stearic acid
12.407	C <sub>19</sub> H <sub>38</sub> O <sub>3</sub>	314.28	19-Hydroxy-nonadecanoic acid
12.408	C <sub>18</sub> H <sub>36</sub> O <sub>5</sub>	332.25	Phloionolic acid
12.448	C <sub>19</sub> H <sub>37</sub> N O <sub>2</sub>	311.28	(±)13-Azaprostanoic acid
12.729	C <sub>18</sub> H <sub>34</sub> O <sub>5</sub>	330.24	9S,12S,13S-Trihydroxy-10E-octadecenoic acid
13.278	C <sub>20</sub> H <sub>28</sub> D <sub>4</sub> O <sub>5</sub>	356.25	13,14-dihydro-15-keto-PGD <sub>2</sub> -d <sub>4</sub>
14.306, 14.529	C <sub>16</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>	256.24	13-methyl-pentadecanoic acid
14.748, 14.865	C <sub>18</sub> H <sub>32</sub> O <sub>4</sub>	312.23	9-hydroxy-12-oxo-10-octadecenoic acid

Table 27. Lipids, fatty acyls, prenol lipids, sphingolipids and glycerolipids in *A. auricula-judae* crude ethanol extracts (ต่อ)

RT (min)	Formula	Mass	Proposed metabolite
<b>Fatty acyls</b>			
14.752	C18 H30 O3	294.22	13-OxoODE
14.974, 15.175	C18 H30 O3	294.22	2R-hydroxy-9Z,12Z,15Z-octadecatrienoic acid
15.823	C18 H34 O4	314.24	18-hydroxy-9R,10S-epoxy-stearic acid
16.552	C17 H32 O3	284.23	9-Keto heptadecylic acid
16.79	C16 H32 O4	288.23	10,16-Dihydroxy-palmitic acid
17.403	C19 H32 O4	324.23	Avocadynone acetate
17.676	C26 H46 O2	390.35	5Z,9Z,19Z-hexacosatrienoic acid
18.109	C18 H37 N O2	299.28	N-(2-hydroxyethyl) palmitamide
18.644	C26 H44 F N O	405.34	(+/-)N-(2-fluro-ethyl)-2,16-dimethyl-5Z,8Z,11Z,14Z-docosatetraenoyl amine
20.593	C26 H46 O2	390.35	5Z,9Z,19Z-hexacosatrienoic acid
<b>Prenol lipids</b>			
0.485	C19 H20 O7	360.12	Elephantopin
11.83	C15 H28 O7 P2	382.13	Farnesyl pyrophosphate
12.887	C35 H46 O2	498.35	Neurosporaxanthin
15.558	C46 H66 O7	730.47	19'-Hexanoyloxyfucoxanthinol
18.662	C31 H48 O2	452.37	Vitamin K1 hydroquinone
19.686	C19 H34 O3	310.25	Methoprene (S)
<b>Sphingolipids</b>			
12.011	C18 H39 N O3	317.29	Phytosphingosine
13.336	C20 H41 N O3	343.30	Dihydroceramide C2
19.629	C18 H39 N O2	301.30	Dihydrosphingosine
20.855	C34 H68 N O6 P	617.47	CerP(d18:1/16:0)
25.43	C42 H79 N O9	741.57	GlcAbeta-Cer(d18:1/18:0)
25.883	C34 H70 N O6 P	619.51	CerP(d18:0/16:0)
<b>Glycerolipids</b>			
20.643, 20.86, 23.65, 24.096	C36 H64 O5	576.47	1-(9Z-hexadecenoyl)-2-(9Z,12Z-heptadecadienoyl)-sn-glycerol
25.23, 25.891	C38 H64 O5	600.46	1-(9Z,12Z-heptadecadienoyl) -2-(9Z,12Z,15Z-octadecatrienoyl)-sn-glycerol
25.244	C36 H66 O5	578.49	1-(9Z-hexadecenoyl)-2-(9Z-heptadecenoyl)-sn-glycerol

Table 28. Steroids and sterol lipids in *A. auricula-judae* crude ethanol extracts

RT (min)	Formula	Mass	Proposed metabolite
<b>Steroids</b>			
12.463	C19 H30 O3	306.22	Oxandrolone
17.053	C19 H30 O2	290.22	Androsterone
<b>Sterol lipids</b>			
5.878	C30 H46 O4	470.34	(22R)-1 $\alpha$ ,22,25-trihydroxy-26,27-dimethyl-23,24-tetradecahydro-24a-homo-20-epivitamin D3 / (22R)-1a
16.046	C28 H41 F3 O2	466.30	(24RS)-28,28,28-trifluoro-25-hydroxyvitamin D2 / (24RS)-28,28,28-trifluoro-25-hydroxyergocalciferol
16.36, 19.59	C26 H44 O3	404.33	1 $\alpha$ ,25-dihydroxy-19-norvitamin D3 / 1 $\alpha$ ,25-dihydroxy-19-norcholecalciferol
16.432	C26 H44 O3	404.33	2-Nor-1,3-seco-1 $\alpha$ ,25-dihydroxyvitamin D3
16.707	C26 H44 O4	420.32	3 $\alpha$ ,7 $\alpha$ ,12 $\alpha$ -trihydroxy-27-nor-5 $\beta$ -cholestan-24-one
17.534	C28 H44 O	396.33	5-Dehydroepisterol
17.536	C26 H46 O5	438.33	27-nor-5 $\beta$ -cholestane-3 $\alpha$ ,7 $\alpha$ ,12 $\alpha$ ,24,25-pentol
17.909, 19.297	C28 H42 O3	426.31	25-Hydroxy-1 $\beta$ -hydroxymethyl-23,23,24,24-tetradecahydro-3-epivitamin D3 / 25-hydroxy-1 $\beta$ -hydroxyme
18.116	C26 H43 N O4	433.32	Lithocholic acid glycine conjugate
18.408, 18.7, 19.794	C28 H40 O3	424.30	(22E,24E,26E)-1 $\alpha$ ,26b-dihydroxy-22,23,24,25,26,26 ahexadecahydro-26a,26b-dihomo-27-norvitamin D3 /
18.826	C28 H44 O5	460.32	(24R)-1 $\alpha$ ,24,25,26-tetrahydroxyvitamin D2 / (24R)-1 $\alpha$ ,24,25,26-tetrahydroxyergocalciferol
19.261, 21.223, 24.069, 25.139, 25.629	C28 H42 O	394.32	Ergosta-5,7,22,24(28)-tetraene-3 $\beta$ -ol
19.673	C26 H44 O2	388.33	1 $\alpha$ ,25-dihydroxy-3-deoxy-19-norvitamin D3 / 1 $\alpha$ ,25-dihydroxy-3-deoxy-19-norcholecalciferol
19.684	C26 H39 F3 O2	440.29	26,26,26-trifluoro-25-hydroxy-27-norvitamin D3 / 26,26,26-trifluoro-25-hydroxy-27-norcholecalciferol
20.305	C28 H44 O3	428.33	5(E)-1 $\beta$ ,25-dihydroxyvitamin D2 / 1 $\beta$ ,25-dihydroxyergo calciferol
21.395	C24 H40 O5	408.28	3 $\beta$ ,6 $\alpha$ ,7 $\alpha$ -Trihydroxy-5 $\beta$ -cholan-24-oic Acid
22.667	C26 H44 O2	388.33	1 $\beta$ ,25-dihydroxy-3-deoxy-19-norvitamin D3 / 1 $\beta$ ,25-dihydroxy-3-deoxy-19-norcholecalciferol

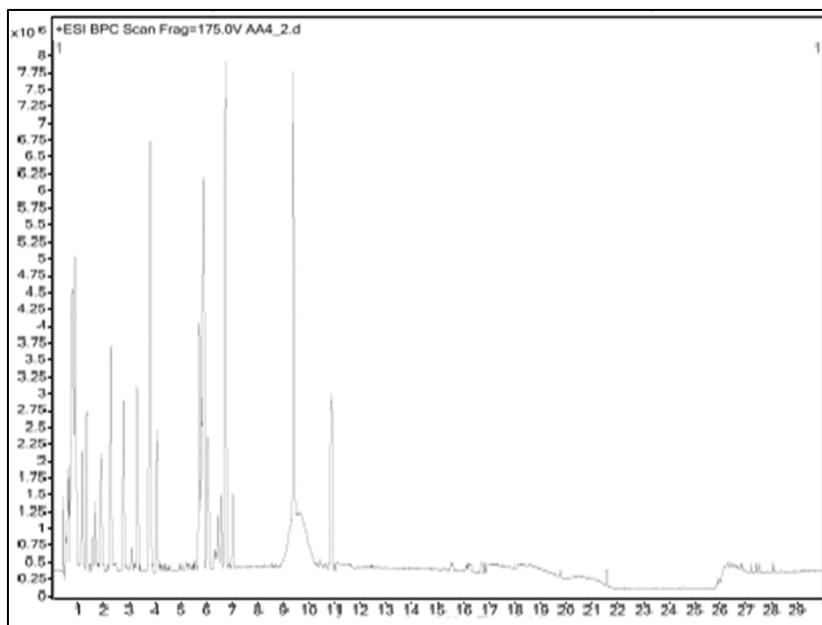
Table 29. Other chemical compounds identified in *A. auricula-judae* crude ethanol extracts

RT (min)	Formula	Mass	Proposed metabolite
<b>Lignans</b>			
19.183	C <sub>22</sub> H <sub>22</sub> O <sub>8</sub>	414.13	Podophyllotoxin (Podophyllum)
<b>Other polar compounds</b>			
6.433	C <sub>10</sub> H <sub>15</sub> N O <sub>2</sub>	181.11	2-(Benzylmethylamino)-ethanol N-oxide
11.408	C <sub>18</sub> H <sub>18</sub> O <sub>4</sub>	298.12	2-Furanpropanoic acid, tetrahydro-4-(1-naphthalenylmethyl)-5-oxo
11.414	C <sub>19</sub> H <sub>20</sub> O <sub>10</sub>	408.10	3-( $\alpha$ -Naphthoxy) lactic acid glucuronide
11.708	C <sub>18</sub> H <sub>35</sub> N O <sub>2</sub>	297.26	(Z)-N-(2-hydroxyethyl) hexadec-7-enamide
12.145	C <sub>26</sub> H <sub>51</sub> N O <sub>8</sub> P	536.33	GPCho(16:1(9Z)/2:0)
13.11	C <sub>28</sub> H <sub>49</sub> N O <sub>7</sub> P	542.33	GPCho(20:5(5Z,8Z,11Z,14Z,17Z)/0:0)
13.128	C <sub>26</sub> H <sub>53</sub> N O <sub>8</sub> P	538.35	GPCho(16:0/2:0[U])
13.969	C <sub>23</sub> H <sub>46</sub> N O <sub>7</sub> P	479.30	GPEn(18:1(9Z)/0:0)
15.472	C <sub>16</sub> H <sub>24</sub> O <sub>5</sub>	296.16	Lactone of PGF-MUM
18.273	C <sub>23</sub> H <sub>45</sub> O <sub>8</sub> P	480.28	GPA(10:0/10:0)[U]
21.517	C <sub>22</sub> H <sub>45</sub> N O <sub>2</sub>	355.34	N-(2-hydroxyethyl) icosanamide
21.705	C <sub>23</sub> H <sub>38</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	390.29	DL-PDMP

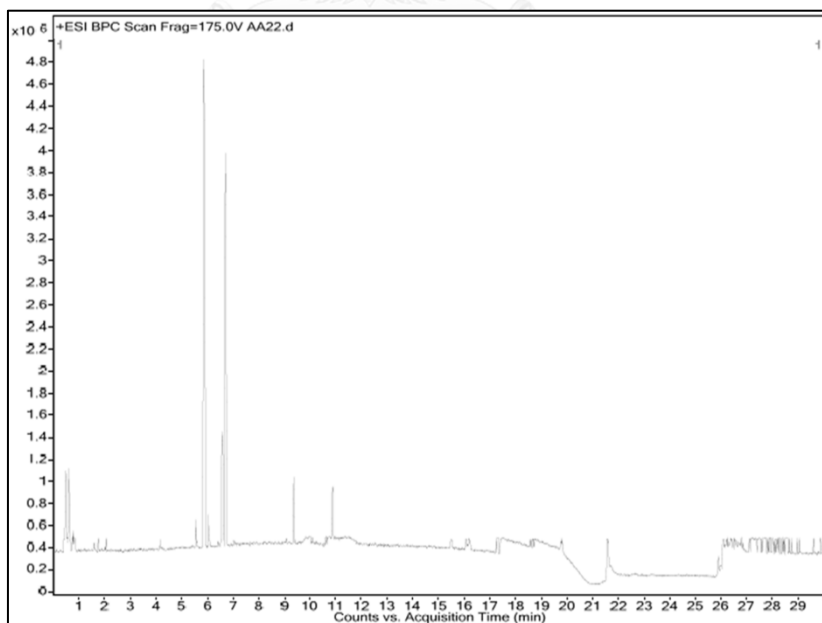
Table 30. Unidentified compounds in *A. auricula-judae* crude ethanol extracts

Extract	Unidentified compounds
AA	44

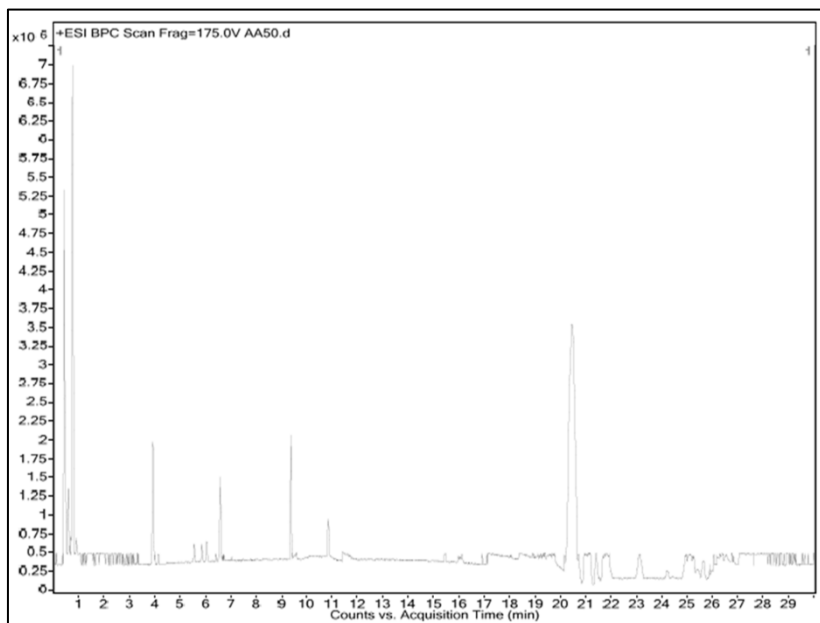
4. องค์ประกอบของสารสกัดชั้นน้ำจากดอกเห็ดหูหนู (AA4, AA22, AA50 และ AA100)



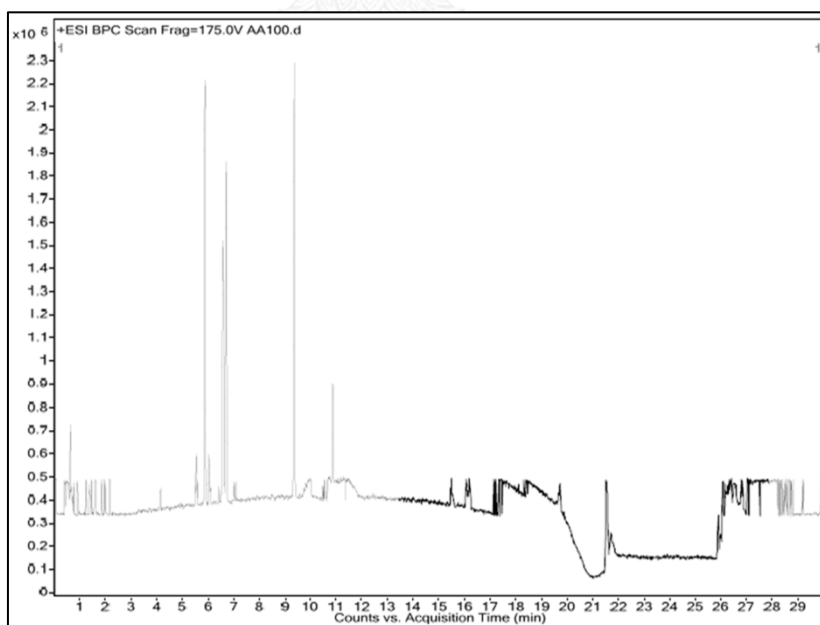
รูปที่ 4 โครมาโทแกรมองค์ประกอบของสารเคมีที่พบในสารสกัดชั้นน้ำของเห็ดหูหนู  
ที่สกัดด้วยอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส



รูปที่ 5 โครมาโทแกรมองค์ประกอบของสารเคมีที่พบในสารสกัดชั้นน้ำของเห็ดหูหนู  
ที่สกัดด้วยอุณหภูมิ 22 องศาเซลเซียส



รูปที่ 6 โครมาโทแกรมองค์ประกอบของสารเคมีที่พบในสารสกัดชั้นน้ำของเห็ดหูหนู  
ที่สกัดด้วยอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส



รูปที่ 7 โครมาโทแกรมองค์ประกอบของสารเคมีที่พบในสารสกัดชั้นน้ำของเห็ดหูหนู  
ที่สกัดด้วยอุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส

Table 31. Phenol, phenol ethers and derivatives in *A. auricula-judae* crude extracts

RT (min)	Formula	Mass	Proposed metabolite	Extract
<b>Phenol and derivatives</b>				
1.207	C <sub>8</sub> H <sub>11</sub> N O	137.085	Tyramine	AA4
18.293, 18.334	C <sub>8</sub> H <sub>10</sub> O <sub>2</sub>	138.07	4-Hydroxyphenylethanol	AA22, AA100
15.466, 21.544	C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub>	126.03	Hydroxyhydroquinone	AA50, AA100
<b>Phenol ethers</b>				
2.545	C <sub>14</sub> H <sub>18</sub> N <sub>4</sub> O <sub>3</sub>	290.14	Trimethoprim	AA4

Table 32. Phenylpropanoids, polyketides and flavonoids in *A. auricula-judae* crude extracts

RT (min)	Formula	Mass	Proposed metabolite	Extract
<b>Phenylpropanoids and polyketides</b>				
9.908, 9.93	C <sub>35</sub> H <sub>45</sub> N O <sub>10</sub>	639.31	Protorifamycin I	AA4, AA100
3.83, 4.145, 4.165	C <sub>18</sub> H <sub>18</sub> O <sub>2</sub>	266.13	Dienestrol	AA22, AA50,AA100
7.044, 7.049	C <sub>19</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>	336.06	Dicumarol	AA22, AA100
<b>Flavonoids</b>				
9.018	C <sub>23</sub> H <sub>20</sub> O <sub>6</sub>	392.12	Dehydrorotenone	AA4

Table 33. Heterocyclic compounds in *A. auricula-judae* crude extracts

RT(min)	Formula	Mass	Proposed metabolite	Extract
0.59, 0.597, 0.625	C17 H17 N3 O	279.13	Desmethyldansetron	AA4, AA22, AA50
0.642	C9 H15 N5 O	209.13	Minoxidil	AA4
0.645, 0.655	C6 H6 N2 O2	138.04	Acipimox(5-methylpyrazine -2-carboxylic acid)	AA4, AA100
0.689, 0.696	C4 H6 N2 O	98.05	Dimethylimidazole	AA4, AA100
0.69, 0.691	C10 H16 N2 O3	212.12	Butabarbital	AA4, AA50
0.536, 0.702, 0.709, 0.71, 0.711	C5 H7 N O3	129.04	Pyroglutamic acid	AA4,AA22,AA50 ,AA100
0.722, 1.486, 1.758	C9 H18 N6	210.16	Altretamine	AA4, AA50
0.724, 1.394, 2.161	C12 H15 N5 O3	277.11	Queuine	AA4
0.791, 0.801, 0.958	C17 H19 N O	253.15	Nefopam	AA4, AA50, AA100
0.808, 0.947	C16 H19 N3	253.16	Anabasamine	AA4, AA22
1.207, 1.783	C10 H12 N2 O	176.09	Serotonin	AA4
1.21, 3.408, 4.085, 4.192	C16 H20 N2 S	272.13	N-Despropylpergolide	AA4, AA50, AA100
1.575, 1.614	C12 H12 N2 O2	216.09	Desethyletomidate	AA4, AA22
1.61	C11 H18 N2 O4	242.12	Hydroxyamobarbital	AA4
1.913	C13 H19 N5 O	261.16	Pinacidil-N-Oxide	AA4



Table 33. Heterocyclic compounds in *A. auricula-judae* crude extracts (ต่อ)

RT(min)	Formula	Mass	Proposed metabolite	Extract
2.091, 3.369, 3.372	C <sub>24</sub> H <sub>28</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	392.21	Ketodoxapram	AA4, AA50
3.106	C <sub>11</sub> H <sub>9</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	187.06	Indoleacrylic acid	AA4
3.732	C <sub>18</sub> H <sub>19</sub> N <sub>2</sub> S	281.12	Northiadene	AA4
4.091, 4.139	C <sub>12</sub> H <sub>22</sub> N <sub>5</sub> O <sub>3</sub>	284.17	Oxtriphyllyne	AA4, AA100
4.093, 4.146	C <sub>14</sub> H <sub>16</sub> N <sub>4</sub> O <sub>3</sub>	288.12	Piromidic acid	AA4, AA100
4.25	C <sub>13</sub> H <sub>19</sub> N <sub>5</sub>	245.16	Pinacidil	AA4
5.21	C <sub>17</sub> H <sub>20</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub> S	300.13	Promazine sulfoxide	AA4
6.473, 6.585, 6.592, 6.593, 6.594	C <sub>19</sub> H <sub>19</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub>	337.14	Zolpidem metabolite I	AA4,AA22,AA50 ,AA100
9.285	C <sub>22</sub> H <sub>28</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	352.22	2-Pyrrolidinone, 1-ethyl-4-[2-[(2-hydroxyethyl) amino]ethyl]-3,3-diphenyl-(7Cl, 8Cl,9Cl)	AA4
6.899	C <sub>9</sub> H <sub>15</sub> N <sub>4</sub> O <sub>8</sub> P	338.07	1-(5'-Phosphoribosyl)-5-amino-4-imidazole carboxamide	AA4
0.43, 0.439, 26.297, 26.285, 26.289	C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> N <sub>4</sub> O <sub>2</sub>	164.04	Lumazine	AA22, AA50, AA100
0.538	C <sub>17</sub> H <sub>15</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub>	309.11	3-Hydroxy-7-acetylamino nitrazepam	AA22
0.474	C <sub>12</sub> H <sub>17</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub> S	223.10	Tiletamine	AA22
0.666, 0.672	C <sub>12</sub> H <sub>15</sub> N <sub>3</sub> O <sub>5</sub> S	313.07	Albendazole (II)	AA22, AA50, AA100
0.677	C <sub>20</sub> H <sub>26</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	358.19	Hydroquinine-10,11- dihydroxy	AA22
0.542	C <sub>9</sub> H <sub>15</sub> N <sub>5</sub> O <sub>3</sub>	241.12	Sapropterin	AA22
0.467	C <sub>14</sub> H <sub>21</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub> S	295.14	Sumatriptan	AA22
0.475, 0.476	C <sub>16</sub> H <sub>24</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	292.17	Carteolol	AA22, AA100
0.666	C <sub>10</sub> H <sub>9</sub> N <sub>5</sub> O	215.08	Kinetin	AA22, AA100

Table 33. Heterocyclic compounds in *A. auricula-judae* crude extracts (ต่อ)

RT(min)	Formula	Mass	Proposed metabolite	Extract
0.676	C20 H20 N2 O3	336.15	Cyclopiazonic acid	AA22
0.971	C24 H26 N2 O5	422.18	Carvedilol(p-Hydroxy)	AA22
0.458	C16 H20 N2 O2	272.16	Ergoline-8-methanol, 10- methoxy- (8b)	AA22
0.445	C19 H26 N2 S	314.18	Pergolide	AA50
0.52, 0.525	C9 H15 N5 O2	225.13	4'-Hydroxyminoxidil	AA50, AA100
0.598	C6 H8 N2 O4	172.05	Hydantoin-5-propionic acid	AA50
0.656, 0.657	C6 H6 N2 O	122.05	Niacinamide	AA50, AA100
0.659, 0.67, 0.878	C5 H4 N4 O	136.04	Hypoxanthine	AA50, AA100
1.982	C11 H18 N2 O4	242.12	Hydroxypentobarbital	AA50
3.268, 3.313	C9 H11 N O2	165.08	2-amino-4-hydroxy-propiofenone	AA50, AA100
0.652	C16 H18 O4	274.12	Heteropeucenin methyl ether	AA50
0.529	C18 H16 N2 O3	308.12	Tyrphostin B44 (-)	AA100
0.588	C16 H17 N O	239.14	N-Desmethylnefopam	AA100
0.649	C16 H20 N4 O3 S	348.12	Torasemide	AA100
26.289	C6 H4 O5	156.01	Furan 2,5-dicarboxylic acid	AA100

Table 34. Organic compounds, carbohydrate and sugar acid in *A. auricula-judae* crude extracts

RT(min)	Formula	Mass	Proposed metabolite	Extract
Organic compounds				
0.599	C8 H18 N O2	160.14	Methacholine	AA4
0.61	C8 H19 N O	145.14	Heptaminol	AA4
0.653	C7 H17 N	115.14	Tuaminoheptane	AA4
2.284	C17 H21 N O7 S	383.10	Fenoterol sulfate	AA4
2.787	C8 H15 N O2	157.11	Tranexamic acid	AA4
4.449, 4.5, 4.506, 4.526	C23 H25 N	315.20	Fendiline	AA4, AA22 , AA50,AA100
4.748	C22 H30 O4	358.22	Cafestol acetate	AA4

Table 34. Organic compounds, carbohydrate and sugar acid in *A. auricula-judae* crude extracts (ต่อ)

RT(min)	Formula	Mass	Proposed metabolite	Extract
<b>Organic compounds</b>				
5.151, 11.586, 11.587, 11.607	C14 H24 N2 O7	332.16	Spectinomycin	AA4, AA22, AA100
18.057, 18.131, 18.169, 18.194	C20 H22 O3	310.16	Avobenzone	AA4, AA22, AA50, AA100
0.438, 0.447, 26.288, 26.287	C6 H4 O6	172.00	Tetroquinone	AA22, AA50, AA100
0.507, 0.511, 0.516	C7 H16 N O3	162.12	Carnitine	AA22, AA50, AA100
0.513	C10 H18 Cl N3 O2	247.11	Semustine	AA22
0.529, 0.544	C10 H15 N3 O5	257.10	Benserazide	AA22, AA50
2.036	C13 H19 N5 O	261.16	Pinacidil-N-Oxide	AA22
0.49	C6 H15 N O3	149.10	Trolamine	AA50
0.54	C5 H15 N O4 P	184.07	Phosphorylcholine	AA100
0.655	C7 H10 O4	158.06	4,6-Dioxoheptanoic acid	AA100
<b>Carbohydrates</b>				
0.684	C8 H15 N O6	221.09	N-Acetyl-beta-D-mannosamine	AA4
0.755, 0.773, 0.789	C9 H17 N O8	267.09	Neuraminic acid	AA4, AA50, AA100
9.366, 9.369, 9.378, 9.399	C21 H41 N7 O11	567.28	Dihydrodeoxystreptomycin	AA4, AA22, AA50, AA100
7.023, 7.041	C9 H14 N2 O13	358.05	1,3-Glycerol dinitrate glucuronide	AA4, AA50

Table 34. Organic compounds, carbohydrate and sugar acid in *A. auricula-judae* crude extracts (ต่อ)

RT(min)	Formula	Mass	Proposed metabolite	Extract
<b>Carbohydrates</b>				
0.525, 0.664, 0.667, 0.806	C9 H17 N O7	251.10	Muramic acid	AA22, AA50, AA100
0.53	C14 H17 N O8	327.09	p-Acetamidophenyl glucuronide	AA22
0.773	C9 H17 N O8	267.10	N-Acetyl- $\beta$ -neuraminic acid	AA50
0.701	C6 H8 O7	192.03	2,3-Dioxogulonic acid	AA50
<b>Sugar acids</b>				
0.657, 0.935	C4 H8 O5	136.04	DL-Erythronic acid	AA4
0.699	C8 H14 O8	238.07	2-Keto-3-deoxyoctonate	AA4
0.494	C6 H14 O6	182.08	Mannitol	AA22
9.084	C19 H20 O9	392.10	$\beta$ -D-Glucopyranuronic acid, 1-(6-methoxy-2-naphthaleneacetate)	AA22
0.513	C15 H18 O10	358.09	Ketoprofen glucuronide	AA50
0.521	C12 H22 O11	342.11	Sucrose	AA50, AA100

Table 35. Amino acids, nucleotides and nucleoside in *A. auricula-judae* crude extracts

RT(min)	Formula	Mass	Proposed metabolite	Extract
<b>Amino acids</b>				
			Cysteine	AA4, AA22, AA50, AA100
			Lysine	AA4, AA22, AA50, AA100
			Phenylalanine	AA4, AA22, AA50
			Aspartic acid	AA4, AA22, AA50, AA100
			Asparagine	AA4, AA22, AA50, AA100
			Glutamine	AA4, AA22, AA50, AA100
			Serine	AA4, AA50
			Valine	AA4, AA22, AA50, AA100
			Alanine	AA4, AA22, AA50, AA100
			Proline	AA4, AA22, AA50, AA100
			Threonine	AA4, AA50, AA100
			Arginine	AA4, AA22, AA50, AA100
			Methionine	AA4, AA50, AA100
			Glycine	AA4, AA22, AA50, AA100
			Isoleucine	AA4, AA22, AA50, AA100

Table 35. Amino acids, nucleotides and nucleoside in *A. auricula-judae* crude extracts (ต่อ)

RT(min)	Formula	Mass	Proposed metabolite	Extract
<b>Amino acids</b>				
			Leucine	AA4, AA22, AA50, AA100
			Glutamic acid	AA4, AA22, AA50, AA100
			Histidine	AA4, AA50, AA100
			Tyrosine	AA4, AA22, AA50
			Tryptophan	AA4, AA22, AA100
0.613	C5 H11 N3 O2	145.08	4-[(diaminomethylidene)amino]butanoic acid	AA4
0.774, 0.775, 0.582	C4 H9 N O4	135.05	4-Hydroxy-L-threonine	AA4, AA50, AA100
1.173	C11 H15 N O7 S	305.05	L-Tyrosine-3-methoxy-a-methyl-hydrogen sulfate	AA4
1.687	C9 H17 N O5	219.11	Pantothenic acid	AA4
0.788, 2.174	C11 H20 N2 O6	276.13	Saccharopine	AA4, AA50
4.583	C11 H20 N2 O3	228.15	1-L-Leucyl-L-Proline	AA4
8.202, 8.204	C15 H20 N2 O4 S	324.11	N-Formylmethionyl phenylalanine	AA4, AA100
0.464, 0.478	C7 H15 N3 O2 S	205.09	5-Methyl-L-Thiocitrulline	AA22, AA50
0.641	C8 H16 N2 O6 S	268.07	Homolanthionine	AA50
0.552	C5 H9 N O4	147.05	O-Acetylserine	AA100
0.787	C7 H13 N O3	159.09	2-Methylbutyryltylglycine	AA100
11.133	C13 H17 N O4	251.11	Acetyl tyrosine ethyl ester	AA100
<b>Nucleotides</b>				
0.594, 0.595, 0.891, 0.902	C5 H5 N5 O	151.05	Guanine	AA4, AA100
0.665	C5 H7 N3 O	125.06	5-Methylcytosine	AA4
1.174	C6 H7 N5 O	165.06	1-Methylguanine	AA4
0.546	C4 H5 N3 O	111.04	Cytosine	AA22
0.581	C5 H5 N5	135.05	Adenine	AA50
0.719	C4 H4 N2 O2	112.03	Uracil	AA50
<b>Nucleoside</b>				
0.605	C12 H13 N5 O3	275.10	Ethenodeoxyadenosine	AA100

Table 36. Benzenoids in *A. auricula-judae* crude extracts

RT(min)	Formula	Mass	Proposed metabolite	Extract
1.342	C11 H12 N4 O2 S	264.07	Sulfamerazine	AA4
1.933	C8 H11 N	121.09	N-Ethylaniline	AA4
2.207	C12 H16 Cl N O3	257.09	Meclofenoxate	AA4
1.98, 2.44	C14 H19 N O4	265.13	Anisomycin	AA4, AA50
3.588	C24 H26 N2 O5	422.19	4-[[5-[[[(cyclopentyloxy) carbonyl]amino]-1-methyl -1H-indol-3-yl]methyl]-3-methoxy-benzoic acid	AA4
3.799,3.94, 3.962	C8 H11 N	121.09	Phenylethylamine	AA4, AA50, AA100
4.193	C14 H17 F3 N2 O3	318.12	Fluvoxamine acid	AA4
4.543, 4.576	C20 H36 N2 O3 S	384.24	Ibutilide	AA4, AA50
4.719, 4.781, 4.784, 4.792, 6.751	C21 H35 N O	317.27	Amorolfine	AA4, AA22, AA50, AA100
1.344, 3.268, 5.063	C9 H11 N O2	165.08	2-amino-4'-hydroxy-propiofenone	AA4, AA50
5.311, 5.316	C12 H18 N2 O3 S	270.10	Tolbutamide	AA4, AA100
6.066	C16 H26 N2 O3	294.19	Proparacaine	AA4
6.455	C8 H15 N O	141.12	Tropine	AA4
15.457, 15.467, 15.511, 15.513, 15.523, 15.543, 15.547	C16 H22 O4	278.15	Phthalic acid mono-2-ethylhexyl ester	AA4, AA22, AA50, AA100

Table 36. Benzenoids in *A. auricula-judae* crude extracts (ต่อ)

RT(min)	Formula	Mass	Proposed metabolite	Extract
0.804, 0.914, 1.355, 1.396	C7 H13 N O2	143.09	Triparanol	AA4, AA50, AA100
0.52	C21 H16	268.13	3-Methylcholanthrene	AA22
0.544, 0.656, 0.645	C6 H5 N O2	123.03	Nitrobenzene	AA22, AA50
0.656	C22 H22 O9	430.12	Ketoprofen glucuronide	AA50
0.688	C9 H13 N	135.10	Dextroamphetamine	AA50
1.972	C15 H22 Cl N O2	283.13	Metolachlor	AA50
0.666	C17 H20 F6 N2 O3	414.14	Flecainide	AA50
0.534	C15 H15 N O3	257.11	Tolmetin	AA100
6.07	C16 H26 N2 O3	294.19	Proparacaine	AA100

Table 37. Lipids, fatty acyls, prenol lipids and glycerolipids in *A. auricula-judae* crude extracts

RT(min)	Formula	Mass	Proposed metabolite	Extract
<b>Lipids</b>				
0.709, 0.954	C15 H22 O5	282.14	Artemisinin	AA4
<b>Fatty acyls</b>				
0.691, 0.916	C15 H22 O	218.16	6,8,10,12-Pentadecatetraenal	AA4
0.979	C12 H24 N O5	262.16	3-Hydroxyisovaleryl carnitine	AA4
1.057, 1.173	C10 H19 N O2 S2	249.08	S-acetyldihydroipoamide	AA4
1.529	C12 H20 O2	196.15	3-Dodecynoic acid	AA4
1.732	C13 H22 O2	210.16	3-Tridecynoic acid	AA4
2.978, 3.476, 3.691	C16 H26 O3	266.18	Tetranor-12(R)-HETE	AA4
3.233	C14 H24 O	208.18	5,8-Tetradecadienal	AA4
6.066	C17 H28 O3	280.20	12-Hydroxy-5,8,10- heptadecatrienoic acid	AA4
10.388, 10.393, 10.399, 10.416	C20 H38 O4	342.28	Eicosanedioic acid	AA4,AA22,AA50,AA100
10.337	C22 H41 N O3	367.32	PGE2 alpha dimethyl amine	AA4
10.403	C21 H42 O3	342.31	14-Hydroxy-heneicosanoic acid	AA4

Table 37. Lipids, fatty acyls, prenol lipids and glycerolipids in *A. auricula-judae* crude extracts (ต่อ)

RT(min)	Formula	Mass	Proposed metabolite	Extract
<b>Fatty acyls</b>				
11.568, 11.587, 11.592, 11.606	C17 H26 O5	310.18	Methyl 8-[2-(2-formyl-vinyl)-3-hydroxy-5-oxo-cyclopentyl]-octanoate	AA4,AA22,AA50,A A100
11.89, 11.892	C22 H42 O4	370.31	Docosanedioic acid	AA4, AA100
12.423	C18 H34 O4	314.24	18-Hydroxy-9R,10S-epoxy-stearic acid	AA4
12.425, 12.43	C14 H29 N O2	243.22	2-amino-tetradecanoic acid	AA4, AA100
15.496, 15.522, 15.548	C10 H14 O3	182.09	5-Oxo-7-decynoic acid	AA4, AA22, AA100
0.616	C7 H16 N O2	146.12	4-Trimethylammonio butanoic acid	AA4
6.457	C19 H36 O4	328.25	Avocadene acetate	AA4
0.55	C16 H26 O7	330.16	Tetranor-PGFM	AA50
25.087	C16 H32 O2	256.24	Isopalmitic acid	AA50
0.79	C7 H10 O3	142.06	7-Hydroxy-5-heptynoic acid	AA100
0.79	C6 H8 O	96.06	Sorbaldehyde	AA100
11.587	C10 H18 O3	186.12	9-hydroxy-2E-decenoic acid	AA100
<b>Prenol lipids</b>				
5.755	C20 H24 O10	424.14	Ginkgolide B	AA4
10.542	C15 H22 O10	362.12	Catalpol	AA4
0.443	C24 H34 O11	498.21	Iridodial glucoside tetraacetate	AA50
25.089	C41 H56 O2	580.43	Vitamin K2	AA50
<b>Glycerolipids</b>				
19.095, 23.087, 24.22	C36 H68 O5	580.52	1-(9Z-hexadecenoyl)-2-heptadecanoyl-sn-glycerol	AA50
21.119	C36 H66 O5	578.49	1-(9Z-hexadecenoyl)-2-(9Z-heptadecenoyl)-sn-glycerol	AA50
21.806	C35 H63 D5 O5	573.52	1,3-Dihexadecanoyl-2-hydroxy-sn-glycerol-d5	AA50



Table 38. Steroids, alkaloids and sterol lipids in *A. auricula-judae* crude extracts

RT(min)	Formula	Mass	Proposed metabolite	Extract
<b>Steroids</b>				
7.259	C <sub>26</sub> H <sub>43</sub> N O <sub>7</sub> S	513.27	Sulfolithocholyglycine	AA4
10.085	C <sub>41</sub> H <sub>63</sub> N O <sub>14</sub>	793.43	Protoveratrine A	AA4
5.075	C <sub>20</sub> H <sub>24</sub> O <sub>5</sub> S	376.13	Ethynylestradiol 3-sulfate	AA4
0.827	C <sub>22</sub> H <sub>29</sub> Cl O <sub>5</sub>	408.17	Beclomethasone	AA22
6.717, 6.747	C <sub>21</sub> H <sub>32</sub> N <sub>2</sub> O	328.25	17-Epistanozolol	AA4, AA22
6.713, 6.723	C <sub>21</sub> H <sub>32</sub> N <sub>2</sub> O	328.25	Stanozolol	AA22, AA100
<b>Alkaloids</b>				
4.098	C <sub>15</sub> H <sub>20</sub> N <sub>2</sub> O	244.16	Thermopsine	AA4
5.143, 5.159	C <sub>21</sub> H <sub>25</sub> N O <sub>4</sub>	355.18	Tetrahydropalmatine	AA4, AA100
0.633	C <sub>6</sub> H <sub>9</sub> N O <sub>2</sub>	127.06	Guvacine	AA22
0.779	C <sub>23</sub> H <sub>26</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	394.19	Brucine	AA50
<b>Sterol lipids</b>				
4.616	C <sub>19</sub> H <sub>24</sub> O <sub>3</sub>	300.17	1,3,5(10)-Estratrien-17-one-3,7,8-triol	AA4
5.754, 5.876, 5.878, 5.879	C <sub>32</sub> H <sub>42</sub> O <sub>3</sub>	474.31	1 $\alpha$ -hydroxy-23-[3-(1-hydroxy-1-methylethyl) phenyl]-22,22,23,23-tetrahydro-24,25,26,27-tetranorv	AA4,AA22,AA50,AA100
5.563, 5.879, 5.881, 5.887	C <sub>30</sub> H <sub>44</sub> O <sub>3</sub>	452.33	(17E)-1 $\alpha$ ,25-dihydroxy-26,27-dimethyl-17,20,22,22,23,23-hexadecahydro-24 $\alpha$ -homovitamin D <sub>3</sub> / (17E)-1 $\alpha$	AA4, AA50, AA100
21.416, 21.42, 21.543, 21.545, 21.579, 21.598	C <sub>24</sub> H <sub>38</sub> O <sub>4</sub>	390.27	3 $\beta$ -Hydroxy-11-oxo-5 $\beta$ -cholan-24-oic acid	AA4,AA22,AA50,AA100

Table 38. Steroids, alkaloids and sterol lipids in *A. auricula-judae* crude extracts (ต่อ)

RT(min)	Formula	Mass	Proposed metabolite	Extract
<b>Sterol lipids</b>				
5.727, 5.873, 5.881, 5.885	C30 H42 O7	514.30	Cucurbitacin I	AA4, AA22, AA100
6.064	C32 H51 N O12	641.34	$\beta$ -D-Glucopyranosi duronic acid,(3a,5b,7a, 12a)- 24-[(carboxymethyl) amino]-1,12-dihydroxy-24- oxocholan	AA4
5.555, 5.562, 5.875	C30 H44 O3	452.33	1 $\alpha$ ,25-dihydroxy-26,27-dimethyl-20,21,22 ,23,23-hexadehydro-24a- homovitamin D3 / 1 $\alpha$ ,25- dihy	AA22, AA100
5.56, 5.88, 5.872	C27 H34 F6 O3	520.24	26,26,26,27,27,27-hexafluoro 1 $\alpha$ ,25- dihydroxy- 23,23,24,24-tetradehydrovitamin D3 / 26,26,26,27,27	AA22, AA100
21.602	C24 H38 O4	390.28	3 $\alpha$ -Hydroxy-12-oxo-5 $\beta$ -cholan-24-oic acid	AA22
4.138, 4.146	C18 H18 O2	266.13	3-hydroxy-estra-1,3,5 (10),6,8 pentaen-17-one	AA50, AA100
25.644	C28 H46 O4	446.3352	1 $\alpha$ ,25-dihydroxy-26,27-dimethyl-20,21- didehydro-23- oxavitamin D3 / 1 $\alpha$ ,25- dihydroxy -26,27-dime	AA50
5.222	C30 H46 O4	470.3404	(22S)-1 $\alpha$ ,22,25-trihydroxy-26,27-dimethyl- 23,23,24,24-tetradehydro- 24a-homovitamin D3 / (22S)- 1 $\alpha$	AA100
5.557	C29 H50 O2	430.3799	toxisterol_3 B1/ (5E)-(10R)- 10-ethoxy-10,19- dihydrovitamin D3 / (5E)- (10R)-10-ethoxy-10,19- dihydroch	AA100
9.335	C19 H24 O6 S	380.1363	2-Methoxyestrone 3-sulfate	AA100

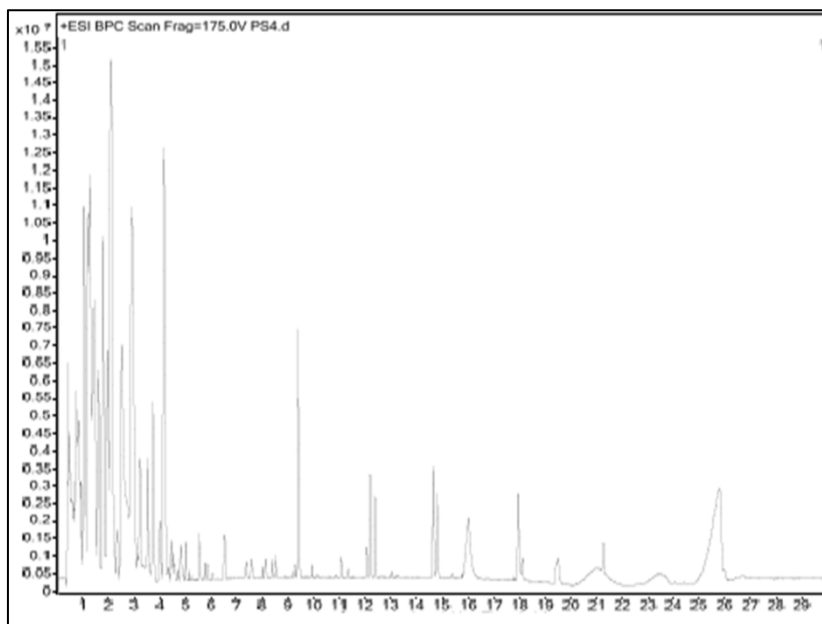
Table 39. Other chemical compounds identified in *A. auricula-judae* crude extracts

RT(min)	Formula	Mass	Proposed metabolite	Extract
<b>Enzyme inhibitor</b>				
0.527	C17 H15 N O3	281.11	Indoprofen	AA22
<b>Antiviral drug</b>				
0.614	C10 H15 N5 O3	253.12	Penciclovir	AA4, AA22, AA50
<b>Nonsteroidal anti-inflammatory drug</b>				
0.655	C15 H13 N3 O5 S	347.06	p-Hydroxy piroxicam	AA22
<b>Other polar compounds</b>				
1.036, 1.216, 3.397	C16 H24 O5	296.1577	Lactone of PGF-MUM	AA4
1.036, 1.216, 3.397	C16 H24 O5	296.16	3 alpha-Hydroxy-4,4-bisnor-8,11,13-podocarpatriene	AA4
1.512	C15 H24 O3	252.17	Punctaporin B	AA4
4.093	C12 H16 N4 O2	248.12	8-Cyclopentyltheophylline E	AA4
4.41	C14 H20 N2 O3	264.14	2H-Indol-2-one, 1,3-dihydro-4-[2-hydroxy-3-[(1-methylethyl)amino] propoxy]	AA4
4.554, 5.044, 6.062, 6.071	C17 H28 O3	280.20	Senecrassidiol- 6-acetate	AA4, AA22, AA100
5.434, 5.555, 5.558, 5.559, 5.74, 5.877, 5.88, 5.879 , 5.892	C30 H38 O8	526.25	Khayasin C	AA4,AA22,AA50,AA100
5.434	C11 H17 N O4	227.11	Hydroxyphenoxyethylaminohydroxypropanol	AA4
6.066, 6.073, 6.082	C29 H61 N O7 P	566.42	GPCho(O-18:0/3:0[U])	AA4,AA22,AA50,AA100
0.469	C12 H25 N O8 P	342.13	GPCho(2:0/2:0[S])	AA22
13.346	C20 H18 Cl2 O7	440.03	Leoidin dimethyl ether	AA100

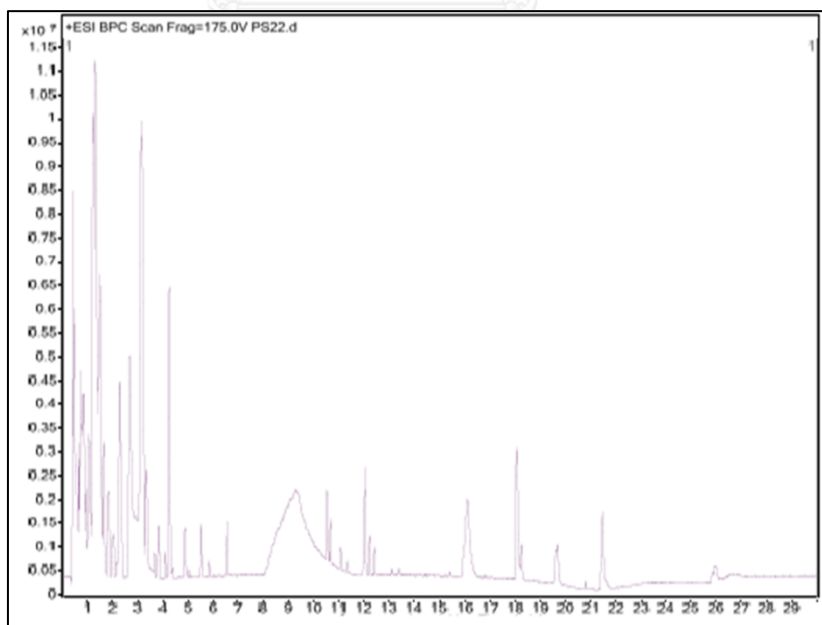
Table 40. Unidentified compounds in *A. auricula-judae* crude extracts

Extract	Unidentified compounds
AA4	43
AA22	23
AA50	30
AA100	44

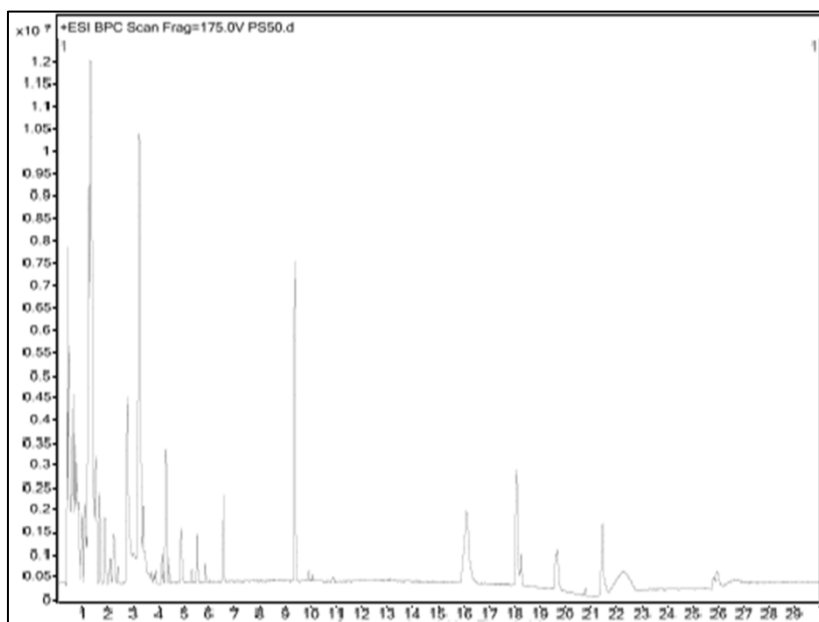
5. องค์ประกอบของสารสกัดชั้นน้ำจากดอกเห็ดนางฟ้าภูฐาน (PS4, PS22, PS50 และ PS100)



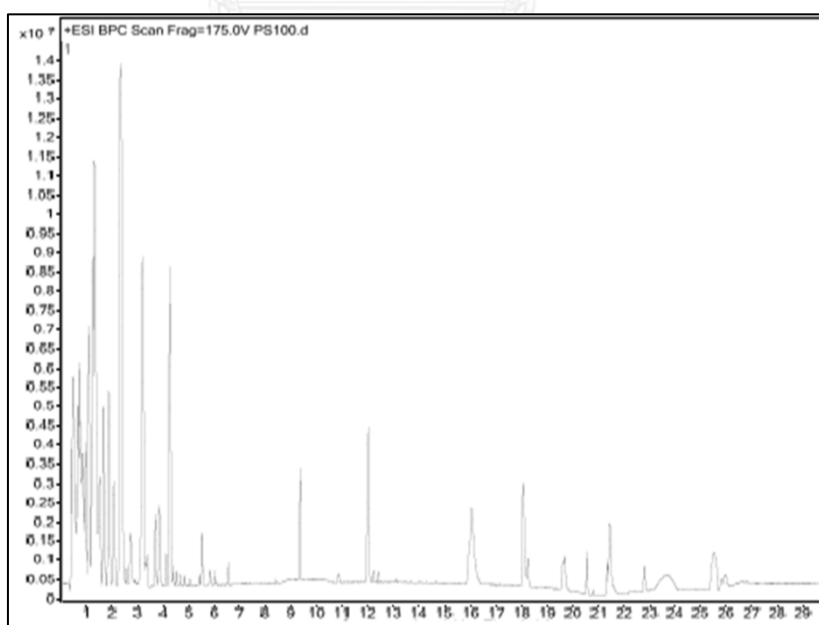
รูปที่ 8 โครมาโทแกรมองค์ประกอบของสารเคมีที่พบในสารสกัดชั้นน้ำของเห็ดนางฟ้าภูฐาน  
ที่สกัดด้วยอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส



รูปที่ 9 โครมาโทแกรมองค์ประกอบของสารเคมีที่พบในสารสกัดชั้นน้ำของเห็ดนางฟ้าภูฐาน  
ที่สกัดด้วยอุณหภูมิ 22 องศาเซลเซียส



รูปที่ 10 โครมาโทแกรมองค์ประกอบของสารเคมีที่พบในสารสกัดชั้นน้ำของเห็ดนางฟ้าภูฐาน  
ที่สกัดด้วยอุณหภูมิต่ำ 50 องศาเซลเซียส



รูปที่ 11 โครมาโทแกรมองค์ประกอบของสารเคมีที่พบในสารสกัดชั้นน้ำของเห็ดนางฟ้าภูฐาน  
ที่สกัดด้วยอุณหภูมิต่ำ 100 องศาเซลเซียส

Table 41. Phenol, phenol ethers and derivatives in *P. sajor-caju* crude extracts

RT(min)	Formula	Mass	Proposed metabolite	Extract
<b>Phenol</b>				
0.73, 0.749	C8 H11 N O2	153.078	Dopamine	PS4, PS22
0.731, 0.75, 0.754	C7 H8 O3	140.0468	3-Methoxycatechol	PS4, PS22, PS100
1.292, 1.33, 1.341	C9 H13 N O3	183.0887	Normetanephrine	PS4, PS22, PS100
3.272	C7 H6 O5	170.0208	Gallic acid	PS4
4.585	C9 H10 O5	198.0521	Syringic acid	PS4
<b>Phenol ether</b>				
4.254, 3.324	C13 H16 N4 O3	276.1199	3'-Hydroxytrimethoprim	PS4,PS100

Table 42. Phenylpropanoids and polyketides in *P. sajor-caju* crude extracts

RT(min)	Formula	Mass	Proposed metabolite	Extract
1.608	C10 H14 N2 O4	226.0945	Carbidopa	PS50
4.844, 4.887, 4.354, 4.899	C20 H28 N2 O8	424.1824	beta-D-Glucopyranosiduronic acid, 2-(1H-indol-4-yloxy)-1-[[[(1-methylethyl) amino] methyl]ethyl	PS4, PS22, PS50
5.763	C11 H15 N O4	225.1	L-4-Hydroxy-3-methoxy-a-methylphenylalanine	PS4
9.935, 9.902	C35 H45 N O10	639.3071	Protorifamycin I	PS4,PS50
18.127, 18.252	C10 H10 O3	178.0621	4-Methoxycinnamic acid	PS4, PS22
0.757	C9 H8 O3	164.0464	p-Coumaric acid	PS50

Table 43. Heterocyclic compounds in *P. sajor-caju* crude extracts

RT(min)	Formula	Mass	Proposed metabolite	Extract
0.636, 0.551, 0.67, 0.603, 0.599	C17 H17 N3 O	279.1306	Desmethyldansetron	PS4, PS22, PS50, PS100
0.663, 0.672, 0.651	C10 H9 N5 O	215.0812	Kinetin	PS4, PS22,PS100
0.706, 0.804, 0.854, 1.072	C10 H19 N5 O	225.1589	Prometon	PS4, PS22, PS100
0.706, 0.724	C14 H19 N5 O4	321.1437	Famciclovir	PS4,PS22
0.938, 0.959, 0.971	C8 H12 N2 O3	184.0838	Barbital	PS4, PS22,PS100
0.731, 0.749, 0.754	C9 H11 N O3	181.0729	4-Hydroxy-4-(3-pyridyl)-butanoic acid	PS4, PS22, PS100
0.819, 1.21, 1.281, 0.655, 1.306, 0.655, 1.292	C5 H4 N4 O	136.038	Hypoxanthine	PS4, PS22, PS50, PS100
1, 0.7, 1.046, 0.692, 1.061	C5 H4 N4 O2	152.0327	Xanthine	PS4, PS22, PS50, PS100
0.989	C18 H21 N O	267.1669	4-Piperidinemethanol, a,a-diphenyl	PS4
1.222	C19 H19 N O S	309.1198	Ketotifen	PS4
4.031, 4.179, 4.114, 4.262, 4.295, 4.132, 4.277	C13 H19 N5	245.1617	Pinacidil	PS4, PS22, PS50, PS100
1.673, 1.712, 1.739	C9 H18 N6	210.1593	Altretamine	PS4, PS22, PS100
2.205, 2.243, 0.683, 2.284	C10 H16 N2 O3	212.1155	Butabarbital	PS4, PS22, PS50, PS100
2.931, 3.165	C9 H9 N O2	163.0625	4-(3-Pyridyl)-3-butenoic acid	PS4,PS22
2.932, 3.165, 3.206	C10 H12 N2 O	176.0941	Serotonin	PS4, PS22, PS100

Table 43. Heterocyclic compounds in *P. sajor-caju* crude extracts (ต่อ)

RT(min)	Formula	Mass	Proposed metabolite	Extract
2.931, 4.247, 3.165, 4.391, 3.206	C10 H11 N O	161.0832	Indole-3-ethanol	PS4, PS22, PS100
4.582, 4.693	C12 H17 N3 O4 S	299.0995	Imipenem	PS4,PS100
4.582, 4.692	C12 H15 N5 O3	277.1184	Queueine	PS4,PS100
2.935, 3.167, 3.207	C11 H11 N O3	205.0728	Deschlorobenzoyl Indomethacin	PS4, PS22, PS100
5.158	C18 H20 F N3 O4	361.1422	N-Acetylnorfloxacin	PS4
6.077	C12 H15 N O4	237.0997	Cotarnine	PS4
6.527, 6.555, 6.56	C19 H19 N3 O3	337.1421	Zolpidem Metabolite I	PS4, PS22, PS50
4.544, 4.647, 4.657	C13 H19 N5 O	261.1586	Pinacidil-N-Oxide	PS4, PS22, PS100
19.482, 19.663, 19.686	C22 H45 N O2	355.3429	N-(2-hydroxyethyl)icosanamide	PS4, PS22, PS100
0.422	C18 H22 N2 O	282.1768	2-Hydroxydesmethylimipramine	PS22
6.72	C18 H20 N2 O7	376.1255	3,5-Pyridinedicarboxylic acid,1,4-dihydro-2,6-dimethyl-4-(3nitrophenyl)-, 2-hydroxyethyl methyles	PS22
8.048	C15 H14 N2 O4	286.0964	5-(3,4-Dihydroxy-1,5-cyclohexadien-1-yl)-5-phenylhydantoin	PS22
0.423	C18 H20 N2	264.1672	Mianserin	PS50
0.62	C6 H6 N2 O2	138.0428	Urocanic acid	PS50
0.486	C15 H24 O	220.1779	Dihydrocaryophyllen-5-one	PS50
0.62	C16 H18 O4	274.1155	Heteropeucenin, methylether	PS50
0.627	C6 H5 N O2	123.0314	Isonicotinic acid	PS50
0.659	C12 H15 N3 O5 S	313.0773	Albendazole (II)	PS50



Table 43. Heterocyclic compounds in *P. sajor-caju* crude extracts (ต่อ)

RT(min)	Formula	Mass	Proposed metabolite	Extract
0.756, 0.869	C18 H19 N3 O	293.146	Ondansetron	PS50
0.696	C5 H7 N O3	129.0419	Pyroglutamic acid	PS50
3.26	C8 H7 N	117.0571	Indole	PS50
0.974	C8 H10 N2 O2	166.0737	Nicotinamide, N-(2-hydroxyethyl)	PS50
1.478	C8 H12 N2 O2	168.0891	Pyridoxamine	PS50
3.17	C10 H9 N O3	191.0577	Desmethyldeschlorobenzoyl Indomethacin	PS50
3.26	C9 H7 N O	145.0522	Isoquinoline N-oxide	PS50
3.261, 4.434	C5 H9 N3 O2	143.0728	Cyclocreatine	PS50
3.415	C10 H17 N3 O2 S	243.1098	Biotin amide	PS50
3.261	C11 H9 N O2	187.0625	Indoleacrylic acid	PS50
3.746	C16 H18 N2	238.142	Nomifensin	PS50
4.433	C12 H12 N2 O2	216.0894	Desethyletomidate	PS50
0.575, 0.75	C5 H7 N5 O	153.0688	4,6-Diamino-5-formamidopyrimidine	PS100
0.678	C17 H15 N3 O3	309.1097	3-Hydroxy-7-acetylamino nitrazepam	PS100
0.73	C14 H20 N2 O2	248.1471	Pindolol	PS100
0.731	C9 H11 N5 O2	221.0917	2-Deoxysepiapterin	PS100
2.698	C11 H11 N O4	221.0687	5-Carboxymethoxy-3,4-dihydrocarbostyrl	PS100
3.116	C12 H10 N2 O5	262.0613	Cinoxacin	PS100
6.551	C19 H19 N3 O3	337.1425	Zolpidem Metabolite II	PS100

Table 44. Organic compounds, carbohydrates and sugar acids in *P. sajor-caju* crude extracts

RT(min)	Formula	Mass	Proposed metabolite	Extract
<b>Organic compounds</b>				
0.508, 0.487, 0.809, 0.499	C5 H14 N O	104.107	Choline	PS4, PS22, PS100
0.57, 0.571, 0.55	C7 H16 N O3	162.1122	Carnitine	PS4, PS22, PS100
0.807, 0.811, 0.816	C6 H15 N O3	149.1044	Trolamine	PS4, PS22, PS100
0.577, 0.657, 0.672, 0.633	C6 H7 N O3	141.0418	2-Aminomuconate 6-semialdehyde	PS4, PS22, PS100
0.691, 0.706, 0.698	C14 H21 N3 O10 S	423.0927	S-(1,2-Dicarboxyethyl)Glutathione	PS4, PS22, PS100
1.136, 1.175	C7 H10 O7	206.0415	Homoisocitrate	PS4,PS22
4.595, 4.677	C10 H18 Cl N3 O2	247.1073	Semustine	PS4,PS22
1.294, 5.761, 1.332, 1.343, 5.832	C8 H12 N O	138.0912	nn-Dimethylaniline-n-oxide	PS4, PS22, PS100
0.676	C8 H18 N O2	160.1308	Methacholine	PS22
0.543	C5 H11 N O2	117.0782	Isoamyl nitrite	PS50
18.082	C20 H22 O3	310.1557	Avobenzone	PS50
3.205	C9 H9 N O2	163.0629	p-Acetaminobenzaldehyde	PS100
<b>Carbohydrate</b>				
0.565, 0.66, 0.676, 0.64	C10 H13 N5	203.1185	Isopentenyladenine	PS4, PS22, PS100
1.928, 2.037	C6 H13 N O5	179.0799	Glucosamine	PS4,PS22
10.148	C18 H36 O6	348.2492	Dodecyl glucoside	PS4

Table 44. Organic compounds, carbohydrates and sugar acids in *P. sajor-caju* crude extracts (ต่อ)

RT(min)	Formula	Mass	Proposed metabolite	Extract
<b>Carbohydrate</b>				
17.976, 18.055, 18.052	C <sub>23</sub> H <sub>45</sub> N <sub>5</sub> O <sub>14</sub>	615.2824	Paromomycin	PS4, PS22, PS100
9.407, 9.378, 9.368, 9.369	C <sub>21</sub> H <sub>41</sub> N <sub>7</sub> O <sub>11</sub>	567.2865	Dihydrodeoxystreptomycin	PS4, PS22, PS50, PS100
0.578	C <sub>9</sub> H <sub>17</sub> N O <sub>7</sub>	251.0996	Muramic acid	PS22
0.682	C <sub>11</sub> H <sub>19</sub> N O <sub>9</sub>	309.1058	N-Acetyl-b-neuraminic acid	PS22
0.751	C <sub>9</sub> H <sub>17</sub> N O <sub>8</sub>	267.0956	Neuraminic acid	PS100
<b>Sugar acids</b>				
0.529, 0.519	C <sub>15</sub> H <sub>18</sub> O <sub>10</sub>	358.0879	Mebeverine metabolite (Veratric acid glucuronide)	PS4, PS100
0.662, 0.673, 0.858, 0.844	C <sub>4</sub> H <sub>8</sub> O <sub>5</sub>	136.0377	DL-erythronic acid	PS4, PS22, PS100
2.932	C <sub>5</sub> H <sub>10</sub> O <sub>4</sub>	134.0608	Deoxyribose	PS4

Table 45. Amino acids, nucleotides and nucleoside in *P. sajor-caju* crude extracts

RT(min)	Formula	Mass	Proposed metabolite	Extract
<b>Amino acids, peptides and protein</b>				
			Alanine	PS4, PS22, PS50, PS100
			Arginine	PS4, PS22, PS100
			Asparagine	PS4, PS22, PS50, PS100
			Aspartic acid	PS4, PS22, PS50, PS100
			Cysteine	PS4, PS22, PS50, PS100
			Glutamine	PS4, PS22, PS50, PS100
			Glutamic acid	PS4, PS22, PS50, PS100
			Glycine	PS4, PS22, PS50, PS100
			Histidine	PS4, PS22, PS50, PS100
			Isoleucine	PS4, PS22, PS50, PS100
			Leucine	PS4, PS22, PS50, PS100
			Lysine	PS4, PS22, PS50, PS100

Table 45. Amino acids, nucleotides and nucleoside in *P. sajor-caju* crude extracts (ต่อ)

RT(min)	Formula	Mass	Proposed metabolite	Extract
<b>Amino acids</b>				
			Methionine	PS4,PS22,PS50
			Phenylalanine	PS4, PS22, PS50, PS100
			Proline	PS4, PS22, PS50, PS100
			Serine	PS4, PS22, PS50, PS100
			Threonine	PS4, PS22, PS50, PS100
			Tyrosine	PS4, PS22, PS50, PS100
			Valine	PS4,PS22, PS100
0.634, 0.67, 0.604	C5 H11 N3 O2	145.0847	4-Guanidinobutanoate	PS4,PS22,PS100
0.563, 0.566, 0.552	C5 H12 N O2	118.086	Betaine	PS4,PS22,PS100
0.669, 0.662	C11 H20 N2 O6	276.1308	Saccharopine	PS4,PS100
0.694, 0.702, 0.522, 0.696	C5 H9 N O4	147.0524	O-Acetylserine	PS4, PS22, PS50, PS100
0.737, 0.752, 0.755	C7 H15 N3 O2	173.1155	Indospicine	PS4, PS22, PS50, PS100
0.954, 0.966, 1.281, 0.974	C6 H11 N O4	161.068	L-2-Aminoadipic acid	PS4, PS22, PS100
1.171, 2.849, 3.058, 1.223, 3.118	C10 H11 N O4	209.0678	Hydroxyphenylacetyl glycine	PS4, PS22, PS100
1.621, 1.659, 1.704, 1.688, 1.689	C9 H17 N O5	219.1096	Pantothenic Acid	PS4, PS22, PS50, PS100
3.541, 3.691, 3.712	C14 H22 N2 O	234.1703	Lidocaine	PS4, PS22, PS100
0.696, 0.685	C6 H13 N3 O3	175.0947	Citrulline	PS22, PS100
2.704, 2.74	C16 H22 N6 O4	362.1692	Thyrotropin releasing hormone	PS22, PS100
11.044	C11 H18 N4 O4	270.1331	2-[3-Carboxy-3-(methylammonio)propyl]-L-histidine	PS22
0.491	C5 H13 N O	103.0992	2-Amino-3-methyl-1-butanol	PS50

Table 45. Amino acids, nucleotides and nucleoside in *P. sajor-caju* crude extracts (ต่อ)

RT(min)	Formula	Mass	Proposed metabolite	Extract
<b>Amino acids</b>				
0.6	C5 H11 N3 O2	145.0846	4-(diaminomethylideneamino) butanoic acid	PS50
0.638	C9 H17 N O4	203.1163	L-Glutamic acid n-butyl ester	PS50
2.308	C10 H14 N2 O2	194.1049	3-Hydroxy-N-glycyl-2,6-xylydine (3-Hydroxyglycineoxylidide)	PS50
2.959, 4.979	C11 H20 N2 O5	260.1363	Gamma-Glu-Leu	PS50,PS100
5.305	C14 H13 N O2	227.0938	alpha-Aminodiphenylacetic acid	PS50
11.037, 11.039	C13 H17 N O4	251.1152	Acetyl tyrosine ethyl ester	PS50,PS100
3.838	C9 H8 O5	196.0365	Haematommic acid	PS100
<b>Nucleotide</b>				
1.161, 0.899, 1.214, 1.257, 0.662, 0.837, 1.238	C5 H5 N5 O	151.0493	Guanine	PS4, PS22, PS50, PS100
1.049, 1.129	C6 H7 N5 O	165.0645	1-Methylguanine	PS4,PS100
<b>Nucleoside</b>				
1.673, 2.009, 1.735, 2.092, 0.842	C10 H13 N5 O5	283.091	Guanosine	PS4, PS22, PS100
2.113, 2.409	C14 H17 N5 O8	383.1058	Succinoadenosine	PS4,PS50
0.545	C10 H13 N5 O3	251.1018	Deoxyadenosine	PS22
1.051	C10 H12 N4 O6	284.0754	Xanthosine	PS22
0.65	C10 H12 N5 O6 P	329.0496	Adenosine 3',5'-cyclic monophosphate (cAMP)	PS50
0.642	C10 H14 N5 O7 P	347.0617	Deoxyguanosine 5'-monophosphate (dGMP)	PS100
0.687	C10 H14 N5 O8 P	363.0566	Guanidylic acid (guanosine monophosphate)	PS100
0.893	C14 H18 N5 O11 P	463.0723	N6-(1,2-dicarboxyethyl)-AMP	PS100

Table 46. Benzenoids in *P. sajor-caju* crude extracts

RT(min)	Formula	Mass	Proposed metabolite	Extract
2.026, 3.947	C9 H11 N O4	197.0691	Levodopa	PS4,PS100
0.731, 0.749, 0.754	C9 H10 O4	182.0571	3-Hydroxy-4-methoxyphenylacetic acid	PS4, PS22, PS100
1.076	C15 H21 N3 O4 S	339.1248	N-oxide gliclazide	PS4
1.29, 1.329, 1.34	C8 H8 O	120.0569	Acetophenone	PS4,PS22, PS100
1.221, 1.467, 1.243, 1.513	C15 H19 N O6	309.1199	Tranlycypromine glucuronide	PS4, PS22, PS50, PS100
2.932, 3.165, 3.207	C8 H9 N O	135.0675	Acetanilide	PS4, PS22, PS100
2.932, 3.165	C9 H8 O	132.0571	1-Indanone	PS4,PS22
2.933, 3.165, 3.208	C9 H11 N O	149.0835	2-Aminopropiophenone	PS4, PS22, PS100
2.933, 3.165, 3.207	C11 H9 N O2	187.0626	3-Amino-2-naphthoic acid	PS4, PS22, PS100
4.51	C20 H36 N2 O3 S	384.247	Ibutilide	PS4
2.934, 3.166, 3.206	C11 H14 N2 O3	222.0994	4-Aminohippurate	PS4, PS22, PS100
3.816	C9 H11 N O4	197.0684	L-DOPA	PS4
3.234	C8 H10 O3	154.0623	2,6-Dihydroxy-4-Methoxytoluene	PS4
3.721, 3.856, 3.877	C10 H9 N O4	207.0524	4-(2-Aminophenyl)-2,4-dioxobutanoic acid	PS4, PS22, PS100
4.732, 4.837	C10 H13 N O4	211.0841	3-O-Methyl-L-DOPA	PS4, PS100

Table 46. Benzenoids in *P. sajor-caju* crude extracts (ต่อ)

RT(min)	Formula	Mass	Proposed metabolite	Extract
8.532	C <sub>24</sub> H <sub>30</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	378.2347	Doxapram	PS4
1.355	C <sub>22</sub> H <sub>30</sub> N <sub>6</sub> O <sub>4</sub> S	474.206	Sildenafil	PS22
3.833	C <sub>15</sub> H <sub>13</sub> N O <sub>3</sub>	255.0867	Ketorolac	PS22
4.357	C <sub>9</sub> H <sub>8</sub> O <sub>4</sub>	180.0417	Acetylsalicylic acid (aspirin)	PS22
11.728	C <sub>11</sub> H <sub>17</sub> N O <sub>3</sub>	211.1201	Metaproterenol	PS22
0.651	C <sub>19</sub> H <sub>20</sub> N <sub>8</sub> O <sub>5</sub>	440.1458	Aminopterin	PS50
0.651	C <sub>15</sub> H <sub>15</sub> N O <sub>2</sub> S	273.0839	Modafinil	PS50
0.713	C <sub>19</sub> H <sub>16</sub> F N O <sub>3</sub>	325.1149	Citalopram (propionic acid derivative)	PS50
0.756	C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>2</sub>	122.0364	Benzoic acid	PS50
1.35	C <sub>9</sub> H <sub>11</sub> N O <sub>2</sub>	165.0781	2-amino-4'-hydroxy-Propiophenone	PS50
15.464	C <sub>16</sub> H <sub>22</sub> O <sub>4</sub>	278.1506	Phthalic acid Mono-2-ethylhexyl Ester	PS50
1.147	C <sub>15</sub> H <sub>21</sub> N <sub>3</sub> O <sub>4</sub> S	339.1247	Cyclopenta[c]pyrrole, benzenesulfonamide deriv.	PS100
1.223	C <sub>11</sub> H <sub>14</sub> N <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	254.0895	2-Hydroxyfelbamate	PS100
4.719	C <sub>9</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub>	198.0526	4-Hydroxy-3-methoxymandelic acid	PS100

Table 47. Lipids acids and fatty acids in *P. sajor-caju* crude extracts

RT(min)	Formula	Mass	Proposed metabolite	Extract
0.493, 0.482, 0.489	C <sub>13</sub> H <sub>26</sub> O	198.1958	Tridecanal	PS4,PS22,PS100
0.688, 0.914,	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub> O <sub>2</sub>	236.1748	3,7-Epoxycaryophyllan-6-one	PS4,PS100
0.893, 0.895, 0.895	C <sub>10</sub> H <sub>20</sub> N O <sub>4</sub>	218.1381	Propionyl-L-carnitine	PS4,PS22,PS100
1, 1.801, 1.984, 1.892, 2.087	C <sub>11</sub> H <sub>22</sub> N O <sub>4</sub>	232.1522	Butyryl-L-carnitine	PS4,PS22,PS100
3.602, 3.751, 0.941, 3.849, 0.949, 3.87	C <sub>12</sub> H <sub>24</sub> N O <sub>5</sub>	262.1642	3-Hydroxyisovaleryl carnitine	PS4,PS22,PS100

Table 47. Lipids acids and fatty acids in *P. sajor-caju* crude extracts (ต่อ)

RT(min)	Formula	Mass	Proposed metabolite	Extract
1.222, 1.244, 1.496, 1.26	C12 H19 N O4	241.1327	N-(3-oxo-octanoyl)-homoserine lactone	PS4,PS22,PS100
1.878, 1.929, 1.96	C8 H10 O	122.0725	2,4,6-Octatrienal	PS4,PS22,PS100
2.933, 3.165	C7 H12 O4	160.0754	Pimelic acid	PS4,PS22
4.254, 4.333, 4.34	C17 H26 O10	390.1504	Loganin	PS4,PS22,PS100
12.207, 12.391, 12.22, 12.402, 12.219, 12.4	C18 H36 O5	332.2544	Phloionolic acid	PS4,PS22,PS100
17.951, 14.713, 18.081, 18.079	C20 H24 O4	328.1658	Croctetin	PS4,PS22,PS100
5.023, 5.07	C16 H24 O10	376.1364	Loganic acid	PS4,PS22
9.314, 0.68	C15 H24 O5	284.1614	Dihydroartemisinin	PS4,PS100
5.268	C13 H26 N O4	260.1848	O-Hexanoyl-R-carnitine	PS4
8.129	C18 H31 N O4	325.2237	10-nitro,9Z,12Z-octadecadienoic acid	PS4
9.173	C15 H22 O4	266.1509	5-(4-hydroxy-2,5-dimethylphenoxy)-2,2-dimethyl-Pentanoic acid (Gemfibrozil M1)	PS4
11.075, 11.341, 11.081, 11.34	C17 H37 N O2	287.2811	C17 Sphinganine	PS4,PS22
11.517	C18 H30 O4	310.2133	13(S)-HpOTrE (gamma)	PS4
12.069, 10.665, 12.033, 12.016	C18 H39 N O3	317.2913	Phytosphingosine	PS4,PS22,PS100



Table 47. Lipids acids and fatty acids in *P. sajor-caju* crude extracts (ต่อ)

RT(min)	Formula	Mass	Proposed metabolite	Extract
12.207, 12.39, 14.662, 12.22	C16 H32 O2	256.2412	13-methyl-pentadecanoic acid	PS4,PS22
13.261	C18 H36 O4	316.2602	8,9-dihydroxy stearic acid	PS4
14.809, 12.402, 12.219, 12.399	C18 H32 O3	296.2341	12-hydroxy-10-octadecynoic acid	PS4,PS22,PS100
15.777	C19 H38 O4	330.2754	1-Hexadecanoyl-sn-glycerol	PS4
17.799	C19 H34 O4	326.244	8-methoxy-13-hydroxy-9,11-octadecadienoic acid	PS4
10.552, 17.641	C16 H35 N O2	273.2655	C16 Sphinganine	PS22
10.762	C22 H44 F N O	357.3457	N-(2-fluro-ethyl)-eicosanoyl amine	PS22
15.398	C18 H32 O4	312.2288	9-hydroxy-12-oxo-10-octadecenoic acid	PS22
18.15	C18 H37 N O2	299.2807	N-(2-hydroxyethyl) palmitamide	PS22
0.574, 0.583	C8 H17 N O2	159.1253	DL-2-Aminooctanoic acid	PS50,PS100
0.663	C19 H24 O6	348.1517	Gibberellin A29	PS50
1.001	C10 H18 N2 O3	214.1308	Dethiobiotin	PS50
3.261	C7 H10 O3	142.065	7-hydroxy-5-heptynoic acid	PS50
12.397	C18 H34 O4	314.244	9,13-dihydroxy-11-octadecenoic acid	PS50
0.927	C6 H7 N O4	157.0372	Aminomuconic acid	PS100
3.206	C7 H10 O	110.0735	2,4-heptadienal	PS100
15.855	C20 H39 N O3	341.2914	N-Acetylsphingosine	PS22

Table 48. Steroids and sterol lipids in *P. sajor-caju* crude extracts

RT(min)	Formula	Mass	Proposed metabolite	Extract
<b>Steroid and derivative</b>				
1.501	C21 H29 N O2	327.2231	Levonorgestrel oxime	PS4
1.621	C25 H31 F O8	478.2036	Triamcinolone Diacetate	PS4
1.719	C22 H30 F O8 P	472.1679	Dexamethasone phosphate	PS4
10.13	C41 H63 N O14	793.4296	Protoveratrine A	PS4
21.262, 21.475, 21.457	C24 H40 O5	408.2852	3beta,6alpha,7alpha-Trihydroxy-5beta-cholan-24-oic Acid	PS4,PS22,PS100
25.117, 25.861, 25.811	C29 H46 F2 O2	464.3476	24,24-Difluoro-25-hydroxy-26,27-dimethylvitamin D3	PS4,PS22,PS100
13.383	C29 H46 O	410.36	Calysterol	PS22
<b>Sterol lipids</b>				
0.71, 0.729, 0.715, 0.707	C15 H21 N O8	343.1253	b-D-Glucopyranosiduronic acid	PS4, PS22, PS50, PS100
5.556, 5.877, 5.54, 5.536	C30 H46 O4	470.3444	(22R)-1alpha,22,25-trihydroxy-26,27-dimethyl-23,24-tetradecahydro-24a-homo-20-epivitamin D3 / (22R)-1a	PS4,PS22,PS100
5.863	C30 H46 O4	470.3443	(22S)-1alpha,25-dihydroxy-22-methoxy-26,27-dimethyl-23,24-tetradecahydro-20-epivitamin D3 / (22S)-1alp	PS22,PS100
5.253	C24 H31 O9	463.1933	16alpha,17beta-Estriol 17-(beta-D-glucuronide)	PS50
5.539, 5.86	C30 H44 O3	452.334	1alpha,25-dihydroxy-26,27-dimethyl-20,21,22,22,23,23-hexadecahydro-24a-homovitamin D3 / 1alpha,25-dihy	PS50
21.456	C24 H38 O4	390.275	3beta-Hydroxy-11-oxo-5beta-cholan-24-oic Acid	PS50
25.825	C28 H46 O4	446.3374	1alpha,25-dihydroxy-26,27-dimethyl-20,21-didehydro-23-oxavitamin D3 / 1alpha,25-dihydroxy-26,27-dime	PS50
25.521	C28 H42 O	394.3217	Ergosta-5,7,22,24(28)-tetraene-3beta-ol	PS100

Table 49. Other chemical compounds identified in *P. sajor-caju* crude extracts

RT(min)	Formula	Mass	Proposed metabolite	Extract
<b>Amines</b>				
4.248, 4.39, 4.406	C <sub>12</sub> H <sub>14</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	234.0994	p-Hydroxyprimidone	PS4, PS22, PS100
<b>Alcohols</b>				
4.353	C <sub>12</sub> H <sub>24</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	260.1746	Carisoprodol	PS4
4.358	C <sub>16</sub> H <sub>18</sub> O <sub>9</sub>	354.0939	Chlorogenic acid	PS22
<b>Alkaloids and derivative</b>				
1.05	C <sub>23</sub> H <sub>28</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	396.2053	Quinine ethyl carbonate	PS22
1.179	C <sub>16</sub> H <sub>21</sub> N O <sub>4</sub> S	323.1189	Morphinan-3-ol, hydrogen sulfate	PS22
0.553	C <sub>8</sub> H <sub>13</sub> N O <sub>2</sub>	155.0929	Arecoline	PS50
<b>Terpenoids</b>				
9.407, 9.377, 9.369	C <sub>32</sub> H <sub>40</sub> O <sub>9</sub>	568.2704	Swietenine	PS4,PS22,PS100
<b>Ketones</b>				
15.393, 15.468	C <sub>8</sub> H <sub>6</sub> O <sub>4</sub>	166.026	Benzoquinoneacetic acid	PS4,PS22
<b>Nonsteroidal anti-inflammatory drug</b>				
0.561	C <sub>15</sub> H <sub>13</sub> N <sub>3</sub> O <sub>5</sub> S	347.0601	p-Hydroxy Piroxicam	PS4
<b>Other polar compound</b>				
4.133	C <sub>24</sub> H <sub>30</sub> F <sub>2</sub> O <sub>6</sub>	452.2009	6,9-difluoro-11-hydroxy-16-methyl-3-oxo-17-(1-oxopropoxy)-(6b,11b,16b,17a)-Androsta-1,4-diene-17-c	PS4
4.398	C <sub>18</sub> H <sub>23</sub> N <sub>3</sub> O	297.1784	(S)-Monodes(isopropyl)disopyramide	PS4
7.377, 7.587	C <sub>26</sub> H <sub>52</sub> N O <sub>8</sub> P	537.3437	GPEtn(10:0/11:0)[U]	PS4
14.662, 14.662, 14.809, 14.809	C <sub>19</sub> H <sub>36</sub> O <sub>4</sub>	328.2595	Avocadene acetate	PS4
8.012, 8.034	C <sub>33</sub> H <sub>55</sub> N <sub>5</sub> O <sub>23</sub>	889.3247	Neu5Acalpha2-3Galbeta1-4[Fucalalpha1-3]GlcNAcbeta-Sp	PS4,PS100

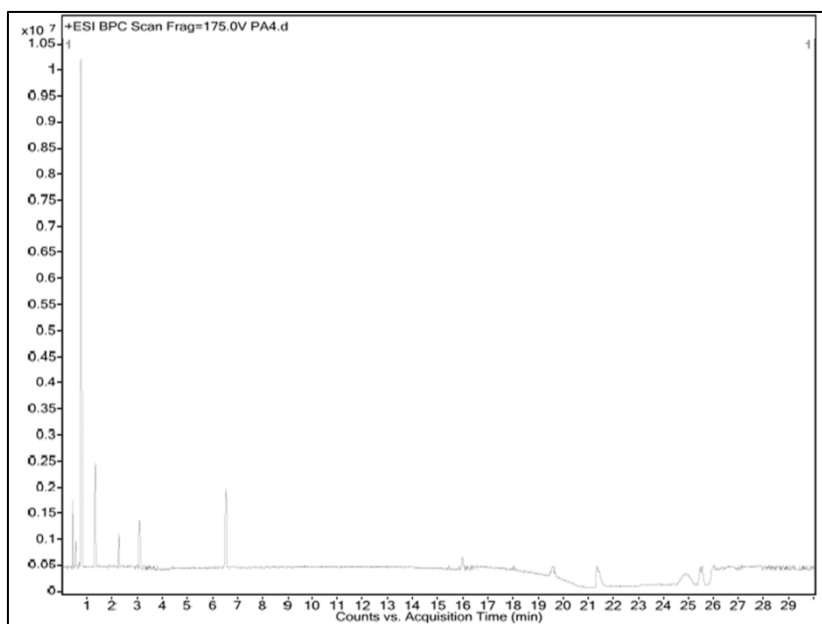
Table 49. Other chemical compounds identified in *P. sajor-caju* crude extracts (ต่อ)

RT(min)	Formula	Mass	Proposed metabolite	Extract
Other polar compound				
8.896	C <sub>28</sub> H <sub>51</sub> N <sub>1</sub> O <sub>7</sub> P	544.3387	GPCho(20:4(5Z,8Z,11Z,14Z)/0:0[U])	PS4
15.386, 15.461	C <sub>16</sub> H <sub>24</sub> O <sub>5</sub>	296.161	Lactone of PGF-MUM	PS4,PS22
16.813, 16.814, 16.811	C <sub>27</sub> H <sub>35</sub> N <sub>5</sub> O <sub>8</sub>	557.2386	DMG-MINO	PS22,PS50,PS100
6.057, 6.05	C <sub>29</sub> H <sub>61</sub> N <sub>1</sub> O <sub>7</sub> P	566.425	GPCho(O-18:0/3:0[U])	PS22,PS100
12.279	C <sub>24</sub> H <sub>32</sub> O <sub>7</sub>	432.2127	6b,11b,16a,17a,21-Pentahydroxypregna-1,4-diene-3,20-dione 16,17-acetonide	PS22
16.752	C <sub>18</sub> H <sub>35</sub> N <sub>1</sub> O <sub>2</sub>	297.2657	(Z)-N-(2-hydroxyethyl)hexadec-7-enamide	PS22
0.976	C <sub>6</sub> H <sub>9</sub> N <sub>1</sub> O <sub>3</sub>	143.0578	N-Acrylylglycine methyl ester	PS50
22.802	C <sub>42</sub> H <sub>83</sub> O <sub>10</sub> P	778.5603	GPGro(18:0/18:0)[U]	PS100

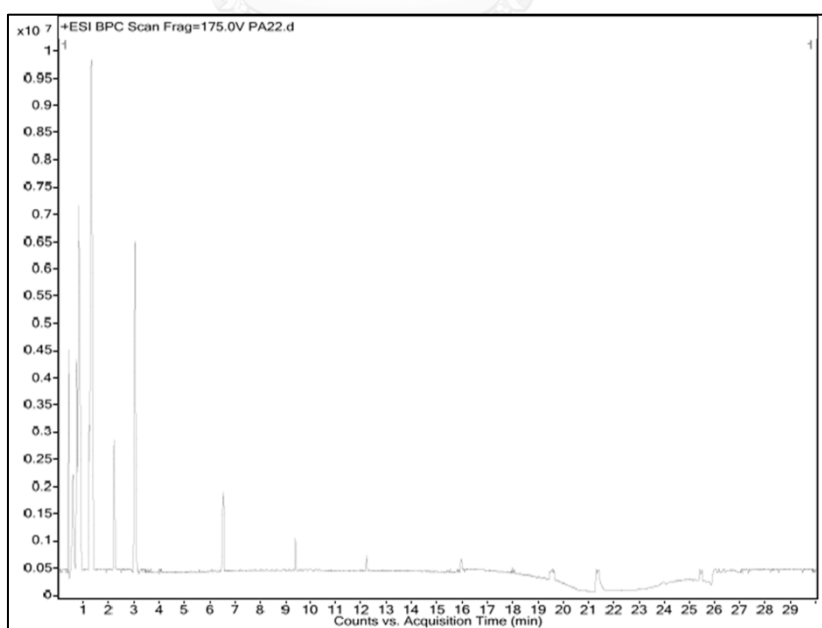
Table 50. Unidentified compounds in *P. sajor-caju* crude extracts

Extract	Unidentified compounds
PS4	15
PS22	10
PS50	43
PS100	15

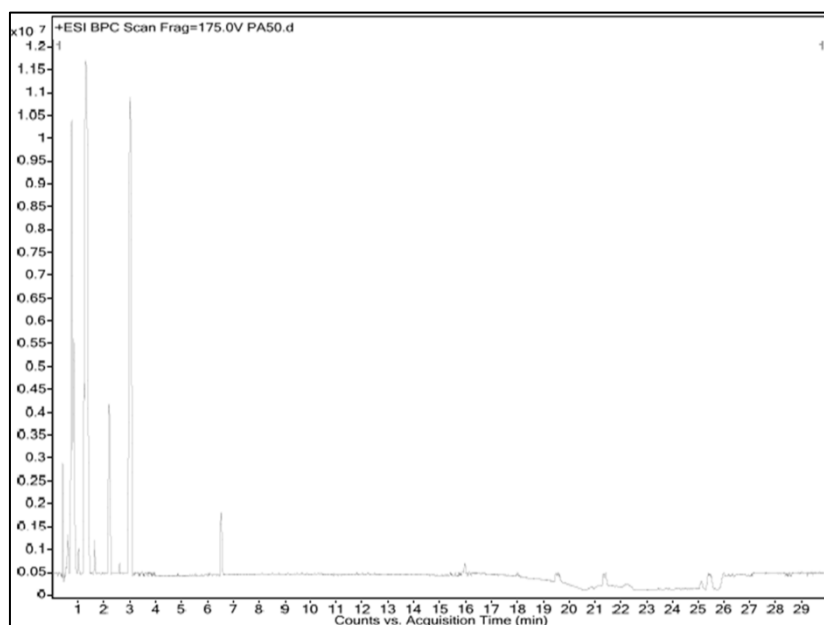
6. องค์ประกอบของสารสกัดชั้นน้ำจากดอกเห็ดเป่าฮือ (PA4, PA22, PA50 และ PA100)



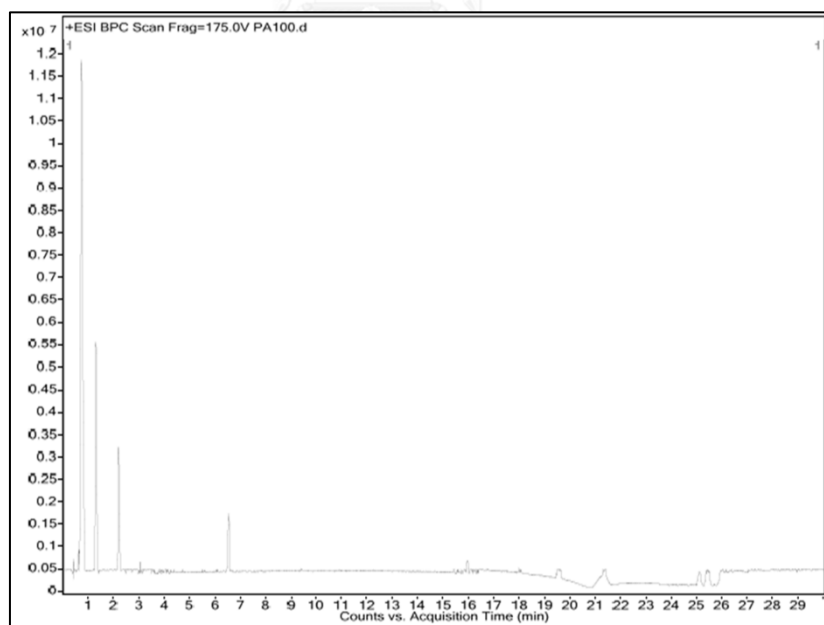
รูปที่ 12 โครมาโทแกรมองค์ประกอบของสารเคมีที่พบในสารสกัดชั้นน้ำของเห็ดเป่าฮือ  
ที่สกัดด้วยอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส



รูปที่ 13 โครมาโทแกรมองค์ประกอบของสารเคมีที่พบในสารสกัดชั้นน้ำของเห็ดเป่าฮือ  
ที่สกัดด้วยอุณหภูมิ 22 องศาเซลเซียส



รูปที่ 14 โครมาโทแกรมองค์ประกอบของสารเคมีที่พบในสารสกัดชั้นน้ำของเห็ดเป่าฮื้อ  
ที่สกัดด้วยอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส



รูปที่ 15 โครมาโทแกรมองค์ประกอบของสารเคมีที่พบในสารสกัดชั้นน้ำของเห็ดเป่าฮื้อ  
ที่สกัดด้วยอุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส

Table 51. Phenol, phenol ethers and derivatives in *P. abalonus* crude extracts

RT(min)	Formula	Mass	Proposed metabolite	Extract
<b>Phenol</b>				
1.292, 1.326, 1.324	C <sub>9</sub> H <sub>13</sub> N O <sub>3</sub>	183.0887	Normetanephrine	PA4,PA22, PA50
0.49	C <sub>9</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub>	198.0507	Syringic acid	PA100
18.189	C <sub>8</sub> H <sub>10</sub> O <sub>2</sub>	138.069	4-Hydroxyphenylethanol	PA100
<b>Phenol ether</b>				
0.671	C <sub>14</sub> H <sub>16</sub> Cl N <sub>3</sub> O <sub>2</sub>	293.0934	Triadimefon	PA22

Table 52. Phenylpropanoids and polyketides, phenylethylamine and phenylbutylamine in *P. abalonus* crude extracts

RT(min)	Formula	Mass	Proposed metabolite	Extract
<b>Phenylpropanoids and polyketides</b>				
0.595, 0.598	C <sub>16</sub> H <sub>18</sub> O <sub>5</sub>	290.118	5-O-Methylvisamminol	PA22,PA50
3.018	C <sub>9</sub> H <sub>8</sub> O	132.0578	Cinnamaldehyde	PA50
<b>Phenylethylamine</b>				
1.329, 1.327	C <sub>8</sub> H <sub>11</sub> N O	137.0847	Tyramine	PA22, PA50
<b>Phenylbutylamine</b>				
0.711	C <sub>19</sub> H <sub>16</sub> F N O <sub>3</sub>	325.1133	Citalopram	PA50

Table 53. Heterocyclic compounds in *P. abalonus* crude extracts

RT(min)	Formula	Mass	Proposed metabolite	Extract
0.636	C <sub>17</sub> H <sub>17</sub> N <sub>3</sub> O	279.1306	Desmethyldansetron	PA4
0.819,1.21,0.662, 0.847, 1.257,0.849	C <sub>5</sub> H <sub>4</sub> N <sub>4</sub> O	136.038	Hypoxanthine	PA4, PA22, PA50
0.636	C <sub>17</sub> H <sub>17</sub> N <sub>3</sub> O	279.1306	Ondansetron	PA4
6.546,6.547	C <sub>19</sub> H <sub>19</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub>	337.1406	Zolpidem Metabolite II	PA22,PA50
2.935,3.055,3.019	C <sub>11</sub> H <sub>11</sub> N O <sub>3</sub>	205.0728	Deschlorobenzoyl Indomethacin	PA4, PA22, PA50

Table 53. Heterocyclic compounds in *P. abalonus* crude extracts (ต่อ)

RT(min)	Formula	Mass	Proposed metabolite	Extract
12.404	C <sub>22</sub> H <sub>28</sub> N <sub>2</sub> O	336.2247	Fentanyl	PA4,PA50
15.427, 15.422, 15.435	C <sub>17</sub> H <sub>20</sub> N <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	300.1315	Promazine sulfoxide	PA22, PA50, PA100
0.589	C <sub>5</sub> H <sub>7</sub> N <sub>5</sub> O	153.0647	4,6-Diamino-5-formamidopyrimidine	PA22
0.629	C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	156.0532	4-Imidazolone-5-propionic acid	PA22
1.257, 1.249	C <sub>19</sub> H <sub>19</sub> N <sub>3</sub> O <sub>5</sub>	309.1193	Ketotifen	PA22,PA50
3.056	C <sub>9</sub> H <sub>9</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	163.0629	4-(3-Pyridyl)-3-butenic acid	PA22
3.057, 3.017	C <sub>10</sub> H <sub>11</sub> N <sub>3</sub> O	161.0868	Indole-3-ethanol	PA22,PA50
12.462	C <sub>22</sub> H <sub>28</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	352.2196	2-Pyrrolidinone, 1-ethyl-4-[2-[(2-hydroxyethyl)amino]ethyl]-3,3-diphenyl-(7C,8C,9C)	PA22
19.593	C <sub>22</sub> H <sub>45</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	355.3437	N-(2-hydroxyethyl) icosanamide	PA22
0.929	C <sub>11</sub> H <sub>11</sub> N <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	221.0674	5-Carboxymethoxy-3,4-dihydrocarbostyrl	PA50
0.945, 0.803, 0.937	C <sub>16</sub> H <sub>19</sub> N <sub>3</sub>	253.1562	Anabasamine	PA50,PA100
3.02, 3.056	C <sub>11</sub> H <sub>9</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub>	187.0639	Indoleacrylic acid	PA50,PA100
10.458	C <sub>22</sub> H <sub>25</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	400.1382	Zuclopenthixol	PA50
0.558	C <sub>9</sub> H <sub>15</sub> N <sub>5</sub> O <sub>2</sub>	225.1214	4'-Hydroxyminoxidil	PA100
0.6	C <sub>16</sub> H <sub>17</sub> N <sub>3</sub> O	239.1364	N-Desmethylnefopam	PA100
0.628	C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	138.0422	Acipimox (5-methylpyrazine-2-carboxylic acid)	PA100
0.635	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub>	123.0331	Isonicotinic acid	PA100
0.663	C <sub>12</sub> H <sub>15</sub> N <sub>3</sub> O <sub>5</sub> S	313.0752	Albendazole (II)	PA100
0.695	C <sub>5</sub> H <sub>7</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub>	129.0417	Pyroglutamic acid	PA100
6.547	C <sub>19</sub> H <sub>19</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub>	337.1403	Zolpidem Metabolite I	PA100



Table 54. Organic compounds, carbohydrates and sugar acids in *P. abalonus* crude extracts

RT(min)	Formula	Mass	Proposed metabolite	Extract
<b>Organic compounds</b>				
4.595	C10 H18 Cl N3 O2	247.1073	Semustine	PA4
0.577, 0.657, 0.614	C6 H7 N O3	141.0421	2-Aminomuconate 6-semialdehyde	PA4,PA50
0.807, 0.823, 0.826	C6 H15 N O3	149.1044	Trolamine	PA4, PA22, PA50
2.23, 2.208	C17 H21 N O7 S	383.1055	Fenoterol sulfate	PA22,PA50
0.444	C5 H13 N3 O	131.1064	N-Carbamoylputrescine	PPA22
0.703, 0.699, 0.698	C14 H21 N3 O10 S	423.0913	S-(1,2-Dicarboxyethyl)glutathione	PA22, PA50, PA100
0.665	C18 H26 N2 O4 S	366.1602	Glibornuride	PA50
3.023	C9 H9 N O2	163.06	p-Acetaminobenzaldehyde	PA50
<b>Carbohydrate</b>				
0.752	C9 H17 N O8	267.0952	Neuraminic acid	PA22
9.407, 9.414	C21 H41 N7 O11	567.2865	Dihydrodeoxystreptomycin	PA4,PA100
0.783, 0.653	C9 H17 N O7	251.1002	Muramic acid	PA50,PA100
<b>Sugar acids</b>				
0.846	C9 H16 O9	268.0799	3-Deoxy-D-glycero-D-galacto-2-nonulosonic acid	PA22
0.515	C15 H18 O10	358.0855	Mebeverine metabolite (Veratric acid glucuronide)	PA100
0.531	C6 H14 O6	182.0775	Mannitol	PA100

Table 55. Amino acids, nucleotides and nucleoside in *P. abalonus* crude extracts

RT(min)	Formula	Mass	Proposed metabolite	Extract
Amino acids, peptides and protein				
			Alanine	PA4, PA22, PA50
			Arginine	PA4, PA22, PA50, PA100
			Asparagine	PA50, PA100
			Aspartic acid	PA50, PA100
			Cysteine	PA4, PA22, PA50
			Glutamine	PA22, PA50
			Glutamic acid	PA4, PA22, PA50
			Glycine	PA4, PA22, PA50
			Histidine	PA4, PA22, PA50
			Isoleucine	PA50
			Leucine	PA50, PA100
			Lysine	PA4, PA22, PA50
			Methionine	PA22, PA50, PA100
			Phenylalanine	PA50
			Proline	PA4, PA22, PA50
			Serine	PA22, PA50, PA100
			Threonine	PA4, PA22, PA50
			Tyrosine	PA22, PA50
			Tryptophan	PA4, PA22, PA50, PA100
			Valine	PA4, PA22, PA50
0.694	C <sub>5</sub> H <sub>9</sub> N O <sub>4</sub>	147.0524	O-Acetylserine	PA4
0.752	C <sub>4</sub> H <sub>9</sub> N O <sub>4</sub>	135.0534	4-Hydroxy-L-threonine	PA50
1.621,1.621, 1.673, 1.659, 1.661	C <sub>9</sub> H <sub>17</sub> N O <sub>5</sub>	219.1099	Pantothenic acid	PA4, PA22, PA50, PA100
0.802, 0.805	C <sub>9</sub> H <sub>9</sub> N O <sub>5</sub>	211.0466	3-Hydroxyphenylglycine	PA22,PA50
0.548	C <sub>18</sub> H <sub>19</sub> N <sub>5</sub> O <sub>2</sub>	337.1575	Desmethylpirenzepine	PA100
0.6	C <sub>5</sub> H <sub>11</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub>	145.0849	4-(diaminomethylideneamino)butanoic acid	PA100

Table 55. Amino acids, nucleotides and nucleoside in *P. abalonus* crude extracts (ต่อ)

RT(min)	Formula	Mass	Proposed metabolite	Extract
<b>Nucleotide</b>				
0.833	C5 H5 N5 O	151.0491	Guanine	PA100
0.707, 0.705	C4 H4 N2 O2	112.0281	Uracil	PA22,PA50
0.592, 0.752	C5 H5 N5	135.0548	Adenine	PA100
<b>Nucleoside</b>				
1.673,2.009	C10 H13 N5 O5	283.0919	Guanosine	PA4
1.033	C10 H12 N4 O6	284.0731	Xanthosine	PA50
0.643	C10 H14 N5 O7 P	347.065	Deoxyguanosine 5'-monophosphate (dGMP)	PA100
0.756	C10 H13 N5 O4	267.0961	Deoxyguanosine	PA100

Table 56. Benzenoids in *P. abalonus* crude extracts

RT(min)	Formula	Mass	Proposed metabolite	Extract
2.934	C11 H14 N2 O3	222.0994	4-aminohippurate	PA4, PA22, PA50
15.44, 15.428	C8 H6 O4	166.0257	Terephthalic acid	PA22,PA50
3.06, 3.017	C8 H9 N O	135.0706	N-Acetylarlyamine	PA22,PA50
0.68	C11 H15 N O5	241.0938	Methocarbamol	PA50
0.711	C19 H16 F N O3	325.1133	Citalopram (propionic acid derivative)	PA50
0.755	C13 H19 N O4 S	285.1046	Probenecid	PA50
3.018	C9 H11 N O	149.0844	2-Aminopropiophenone	PA50
8.988	C18 H24 O8 S2	432.0941	Estradiol disulfate	PA50
0.677	C9 H13 N	135.102	Dextroamphetamine	PA100
15.443	C6 H6 O3	126.0328	Hydroxyhydroquinone	PA100
15.447	C16 H22 O4	278.1518	Phthalic acid Mono-2-ethylhexyl Ester	PA100

Table 57. Lipids acids and fatty acids in *P. abalonus* crude extracts

RT(min)	Formula	Mass	Proposed metabolite	Extract
12.223	C20 H34 O5	354.2376	PGH1	PA50
14.809, 12.228, 14.275, 14.273	C18 H32 O3	296.2341	12-hydroxy-10-octadecynoic acid	PA4, PA22, PA50
12.461	C18 H32 O4	312.2272	9-hydroxy-12-oxo-10-octadecenoic acid	PA50
12.465	C20 H32 O5	352.2227	PGD2	PA50
			PGD2-d4	PA4
18.184, 18.188	C10 H10 O3	178.0617	8S-hydroxy-2-Decene-4,6-dienoic acid	PA22,PA50
0.512, 11.542	C17 H26 O5	310.1826	Methyl 8-[2-(2-formyl-vinyl)-3-hydroxy-5-oxo-cyclopentyl]-octanoate	PA22,PA100
0.899	C23 H33 Cl O6	440.1974	Punaglandin 8	PA22
13.28	C20 H28 D4 O5	356.2507	13,14-Dihydro-15-keto-PGD2-d4	PA22
21.364	C26 H38 O5	430.2702	17-Phenyl-trinor-PGF2alpha isopropyl ester	PA22
0.437, 0.561	C15 H22 O5	282.1502	Artemisinin	PA50
0.713	C21 H29 Cl O5	396.1713	10,11-epoxy-chlorovulone I	PA50
0.909	C22 H30 O8	422.1891	Valtratum	PA50
3.018	C7 H12 O4	160.0754	Pimelic acid	PA50
12.05, 12.049	C18 H39 N O3	317.2927	Phytosphingosine	PA50,PA100
12.232, 12.41	C18 H34 O4	314.2468	18-hydroxy-9R,10S-epoxy-stearic acid	PA100



Table 58. Steroids and sterol lipids in *P. abalonus* crude extracts

RT(min)	Formula	Mass	Proposed metabolite	Extract
<b>Steroid and derivative</b>				
0.657, 0.779, 0.788	C <sub>22</sub> H <sub>29</sub> Cl O <sub>5</sub>	408.1719	Beclomethasone	PA22,PA50
<b>Sterol lipids</b>				
0.71, 0.716	C <sub>15</sub> H <sub>21</sub> N O <sub>8</sub>	343.1253	b-D-Glucopyranosiduronic acid	PA4, PA22
5.556, 5.877, 5.881,5.884	C <sub>30</sub> H <sub>46</sub> O	470.3441	(22R)-1 $\alpha$ ,22,25-trihydroxy-26,27-dimethyl-23,24-tetradecahydro-24a-homo-20-epivitamin D <sub>3</sub> / (22R)-1a	PA4, PA22, PA50
21.262,21.383, 21.357	C <sub>24</sub> H <sub>40</sub> O <sub>5</sub>	408.2852	3 $\beta$ ,6 $\alpha$ ,7 $\alpha$ -Trihydroxy-5 $\beta$ -cholan-24-oic Acid	PA4,PA22,PA50
25.456,25.443	C <sub>30</sub> H <sub>44</sub> O <sub>4</sub>	468.3187	1 $\alpha$ ,25-dihydroxy-11-(3-hydroxy-1-propynyl)-9,11-didehydrovitamin D <sub>3</sub> / 1 $\alpha$ ,25-dihydroxy-11-(3-h	PA22,PA50
12.225	C <sub>24</sub> H <sub>34</sub> O <sub>2</sub>	354.2608	5 $\beta$ -Chola-3,8(14),11-trien-24-oic Acid	PA22
25.119	C <sub>28</sub> H <sub>42</sub> O	394.3195	Ergosta-5,7,22,24(28)-tetraene-3 $\beta$ -ol	PA50
5.882	C <sub>30</sub> H <sub>44</sub> O <sub>3</sub>	452.3318	(17E)-1 $\alpha$ ,25-dihydroxy-26,27-dimethyl-17,20,22,22, 23,23-hexadecahydro-24a-homovitamin D <sub>3</sub> / (17E)-1a	PA100
21.36	C <sub>24</sub> H <sub>38</sub> O <sub>4</sub>	390.2792	3 $\alpha$ -Hydroxy-12-oxo-5 $\beta$ -cholan-24-oic Acid	PA100
25.445	C <sub>28</sub> H <sub>46</sub> O <sub>4</sub>	446.3359	1 $\alpha$ ,25-dihydroxy-26,27-dimethyl-20,21-didehydro-23-oxavitamin D <sub>3</sub> / 1 $\alpha$ ,25-dihydroxy-26,27-dime	PA100

Table 59. Other chemical compounds identified in *P. abalonus* crude extracts

RT(min)	Formula	Mass	Proposed metabolite	Extract
<b>Alkaloids</b>				
0.702	C <sub>22</sub> H <sub>25</sub> N O <sub>9</sub>	447.157	Normorphine 6-glucuronide	PA22
9.412	C <sub>33</sub> H <sub>39</sub> N <sub>5</sub> O <sub>5</sub>	585.2965	8',10'-Dihydroxydihydroergotamine	PA22
0.771	C <sub>23</sub> H <sub>26</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	394.1914	Brucine	PA50
0.612	C <sub>17</sub> H <sub>19</sub> N O <sub>3</sub>	285.1408	Norcodeine	PA100
<b>Other polar compounds</b>				
15.386, 15.441, 15.434	C <sub>16</sub> H <sub>24</sub> O <sub>5</sub>	296.161	Lactone of PGF-MUM	PA4, PA22, PA50
2.643	C <sub>19</sub> H <sub>28</sub> O <sub>6</sub> S	384.1521	19-hydroxy-17-oxoandrost-5-en-3-beta-yl sulfate	PA22
1.319	C <sub>7</sub> H <sub>13</sub> N O <sub>2</sub>	143.0954	Triparanol	PA100

Table 60. Unidentified compounds in *P. abalonus* crude extracts

Extract	Unidentified compounds
PA4	19
PA22	20
PA50	21
PA100	12

### ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวสุมลรัตน์ ปานทอง เกิด ณ จังหวัดกรุงเทพมหานคร เมื่อวันที่ 10 มีนาคม พ.ศ. 2528 สำเร็จการศึกษาดุษฎีปริญญาตรี วิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ จากสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ในปีการศึกษา 2549 และทำงานในตำแหน่ง นักวิทยาศาสตร์การแพทย์ ที่ศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพทางการแพทย์ สถาบันชีววิทยาศาสตร์ทางการแพทย์ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุขตั้งแต่ปีพ.ศ. 2550 จนถึงปัจจุบัน ผลงานวิจัยที่ผ่านมาคือเป็นผู้ร่วมวิจัยในวารสารทางวิชาการเรื่อง “A human monoclonal antibody derived from a vaccinated volunteer recognizes heterosubtypically a novel epitope on the hemagglutinin globular head of H1 and H9 influenza A viruses” โดยได้รับการตีพิมพ์ในวารสาร Biochemical and Biophysical Research Communications ในปีพ.ศ. 2557

