องค์ประกอบทางเคมีและฤทธิ์ในการต้านมะเร็งของหอยเป๋าฮื้อสดและหอยเป๋าฮื้อแปรรูป

Chemical Composition and Anticancer Activity of Raw and Processed Abalone

โดย

นายชัชชลิต อู่สวรรณ์

ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายงานนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2558

เรื่อง องค์ประกอบทางเคมีและฤทธิ์ในการต้านมะเร็งของหอยเป๋าฮื้อสดและหอยเป๋าฮื้อแปรรูป
โดย นายชัชชลิต อู่สุวรรณ์
ได้รับอนุมัติให้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

คณะกรรมการสอบโครงการ

..... ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ณรงค์ ประไพรักษ์สิทธิ์)

..... อาจารย์ที่ปรึกษา
(รองศาตราจารย์ ดร. นาตยา งามโรจนวณิชย์)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
(รองศาตราจารย์ ดร. นงนุช เหมืองสิน)

..... กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ขนิษฐา พุดหอม)

รายงานฉบับนี้ได้รับความเห็นชอบและอนุมัติโดยหัวหน้าภาควิชาเคมี

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

วันที่ 12 เดือน พ.ค. พ.ศ. 2559

คุณภาพของการเขียนรายงานเล่มนี้อยู่ในระดับ ☐ ดีมาก ☑ ดี ☐ พอใช้

ชื่อโครงการ องค์ประกอบทางเคมีและฤทธิ์ในการต้านมะเร็งของหอยเป๋าฮื้อสดและหอยเป๋าฮื้อแปรรูป

ชื่อนิสิตในโครงการ นายชัชชลิต อู่สวรรณ์ เลขประจำตัว 5533068023

ชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา รองศาสตราจารย์ ดร.นาตยา งามโรจนวณิชย์

ชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม รองศาสตราจารย์ ดร.นงนุช เหมืองสิน

ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปีการศึกษา 2558

บทคัดย่อ

หอยเป๋าฮื้อเป็นสัตว์ทะเลชนิดหนึ่งที่มีคุณค่าทางโภชนาการสูง ทั้งโปรตีนสูง แคลอรี่ต่ำ มีกรดไขมันจำเป็นหลายชนิดปริมาณสูง อุดมไปด้วยแร่ธาตุต่างๆที่สำคัญต่อร่างกาย นอกจากนี้ในงานวิจัยที่ผ่านมายังพบว่าหอยเป๋าฮื้อยังมีฤทธิ์ในการต้านมะเร็ง โดยเปปไทด์ AP1 ที่สกัดได้จากหอยเป๋าฮื้อจะไปช่วยยับยั้งการเจริญเติบโตและการเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็ง ในงานวิจัยนี้ผู้วิจัยได้ทำการศึกษาการกำจัดน้ำออก (dehydration) และการคืนน้ำ (rehydration) ของหอยเป๋าฮื้อสดและหอยเป๋าฮื้อแปรรูปโดยวิธีการทำแห้งเยือกแข็งแบบสูญญากาศ (freeze dried) พบว่า หอยเป๋าฮื้อสดและหอยเป๋าฮื้อแปรรูปที่ทำแห้งแล้วสามารถคืนน้ำได้ใกล้เคียงหอยเป๋าฮื้อสดและหอยเป๋าฮื้อแปรรูปก่อนทำแห้งโดยมี % rehydration สูงสุดถึง 99.69% ต่อมาได้ทำการหาองค์ประกอบทางเคมีของหอยเป๋าฮื้อสดและหอยเป๋าฮื้อแปรรูปโดยทำตามวิธีมาตรฐาน AOAC และหาธาตุเหล็ก สังกะสี และ ซีลิเนียมโดยใช้เทคนิค ICP-OES ทำให้ทราบได้ว่าหอยเป๋าฮื้อมีโปรตีนสูงถึงร้อยละ 19.2 ไขมันต่ำที่ร้อยละ 1.1 คาร์โบไฮเดรตที่ร้อยละ 2.5 โดยน้ำหนัก และมีปริมาณแร่ธาตุที่สูงโดยมีปริมาณธาตุเหล็ก 2.9 มิลลิกรัม ปริมาณสังกะสี 0.9 มิลลิกรัม ปริมาณซีลิเนียม 37.2 ไมโครกรัม จากน้ำหนัก 100 กรัม จากนั้นนำหอยเป๋าฮื้อสดและหอยเป๋าฮื้อแปรรูปไปทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งโดยวิธี MTT พบว่า ชั้นน้ำและชั้นน้ำมันจากหอยเป๋าฮื้อตุ๋นสมุนไพรมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตต่อเซลล์มะเร็งกระเพาะอาหาร (KATO-III) ได้ดีกว่าเซลล์มะเร็งชนิดอื่นๆโดยมีค่าความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง (IC_{50}) เป็น 121.324 ppm และ 58.557 ppm สำหรับชั้นน้ำและชั้นน้ำมันตามลำดับ

คำสำคัญ : หอยเป๋าฮื้อ, การคืนน้ำ, องค์ประกอบทางเคมี, ทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง

Title Chemical Composition and Anticancer Activity of Raw and Processed Abalone

Student name Mr.Chatchalit Usuwan ID 5533068023

Advisor Associate Professor Dr. Nattaya Ngamrojanavanich

Co-advisor Associate Professor Dr. Nongnuj Muangsin

Department of Chemistry, Faculty of Science, Chulalongkorn University. Academic year 2015

Abstract

Abalone is a marine species that are highly nutritious, such as high in protein, low in calorie, high in essential fatty acids and rich in minerals essential to the body. In addition, the research found that the abalone displayed anti-cancer activity. Peptide AP1 extracted from abalone can inhibit the growth and proliferation of cancer cells. In this study, the researchers have studied of dehydration and rehydration of raw and processed abalone by freeze dried method. It was found that freeze dried raw and processed abalone can rehydrate close to raw and processed abalone before freeze dried and maximum value was up to 99.69% rehydration percentage. Next, to determine the chemical composition of raw and processed abalone by following the standard method of AOAC and measure iron, zinc and selenium using ICP-OES. The results showed that abalone is high in protein up to 19.2 percent, low fat of 1.1 percent and carbohydrate of 2.5 percent and also high in minerals content of iron 2.9 mg, zinc 0.9 mg and selenium 37.2 μg of weight 100 grams. Then the cytotoxicity to cancer cells was evaluated using MTT assays. The results showed that the water and the organic phases from herb-braised abalone were effective in inhibiting the growth of gastric cancer cells (KATO-III) than other types of cancer cells with IC_{50} values of 121.324 ppm and 58.557 ppm respectively.

Keywords : Abalone, Rehydration, Chemical composition, cytotoxicity to cancer cells

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยฉบับนี้สำเร็จได้ด้วยความเมตตา ให้ความอนุเคราะห์อย่างดียิ่งของ รองศาสตราจารย์ ดร.นาตยา งามโรจนวณิชย์ อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการและ รองศาสตราจารย์ ดร.นงนุช เหมืองสิน อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการร่วม ที่เอื้อเฟื้อสถานที่และสารเคมีที่ ใช้ ในงานวิจัย อาจารย์ได้ ให้ความรู้ คำ อธิบายด้วยความ เข้า ใจ เสียสละเวลา ในการ ให้ความช่วยเหลือตลอดการทำงานวิจัย คอย ให้คำแนะนำ ตรวจทาน และแก้ ไขข้อบกพร่อง ต่างๆ ด้วยความ ใส่ ใจ ตลอดจนช่วยแก้ ไขรายงานฉบับนี้จนเสร็จ สมบูรณ์ ผู้วิจัยจึงขอขอบพระคุณเป็นอย่างสูง

ขอขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ณรงค์ ประไพรักษ์สิทธิ์ และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ขนิษฐา พุดหอม ที่สละเวลา ให้เกียรติมาเป็นกรรมการสอบการวิจัยครั้งนี้

ขอขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วัลภา เอื้องไมตรีภิรมย์ ที่สละเวลามาทำหน้าที่เป็นผู้ประสานงานรายวิชา 2302499 senior project

ขอขอบพระคุณคณาจารย์ทุกท่านที่ได้กรุณาถ่ายทอดความรู้ ประสบการณ์ และเทคนิคปฏิบัติการ อันเป็นพื้นฐานสำคัญ ในการทำงานวิจัย ขอขอบคุณภาควิชาเคมีที่สนับสนุนเครื่องมือและดำเนินงานด้าน ทุนสนับสนุนสำหรับงานวิจัย รวมถึงบุคลากรที่อำนวยความสะดวกทุกท่าน

ขอขอบคุณนายศักดิ์ชัย หลักสี และนางสาวอุฬาริกา ลือสกุล นิสิตปริญญาเอก ในกลุ่มวิจัยของ รองศาสตราจารย์ ดร.นาตยา งามโรจนวณิชย์ และ รองศาสตราจารย์ ดร.นงนุช เหมืองสิน ที่ ให้คำ ปรึกษาขณะทำงานและช่วยเหลือ ในการ ใช้เครื่องมือทดสอบฤทธิ์ ในการต้านมะเร็ง ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ที่ มีส่วนช่วย ในการ ใช้เครื่องมือต่างๆ ทุกท่าน และ ขอขอบคุณนิสิตท่านอื่นที่ได้เคย ให้ความช่วยเหลือ ในงานวิจัยนี้ ผู้วิจัยขอระลึกถึงความกรุณาของทุกท่านที่กล่าวมาข้างต้นไว้ ณ ที่นี้

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อ ค

Abstract ง

กิตติกรรมประกาศ จ

สารบัญ ฉ

สารบัญรูปภาพ ซ

สารบัญตาราง ญ

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ ฏ

บทที่ 1 บทนำ 1

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา 1

1.2 ทฤษฎีและความรู้ที่เกี่ยวข้อง 2

1.3 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย 11

1.3 ประโยชน์ที่ได้รับจากงานวิจัย 11

บทที่ 2 การทดลอง 12

2.1 สารเคมี 12

2.2 วัตถุดิบ 12

2.3 เครื่องมือและอุปกรณ์ 13

2.4 วิธีการทดลอง 13

2.4.1 การเตรียมหอยเป๋าฮื้อตุ๋นสมุนไพร 13

2.4.2 การเตรียมหอยเป๋าฮื้อต้มสุก 14

2.4.3 การทำแห้งเยือกแข็งหอยเป๋าฮื้อเพื่อดูการกำจัดน้ำออกและการคืนน้ำ 14

2.4.4 การหาปริมาณองค์ประกอบทางเคมีของหอยเป๋าฮื้อสดและหอยเป๋าฮื้อแปรรูป 15

2.4.5 การหาปริมาณ เหล็ก สังกะสี และซีลิเนียม ในหอยเป๋าฮื้อสดและหอยเป๋าฮื้อแปรรูป 20

ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

หน้า

2.4.6 การหาปริมาณ curcumin ในหอยเป๋าฮื้อตุ๋นสมุนไพร 23

2.4.7 การศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งโดยวิธี MTT 24

บทที่ 3 ผลการทดลอง วิจารณ์ผลการทดลอง 26

3.1 การทำแห้งเยือกแข็งหอยเป๋าฮื้อเพื่อดูการกำจัดน้ำออกและการคืนน้ำ 26

3.2 การหาปริมาณองค์ประกอบทางเคมีของหอยเป๋าฮื้อสดและหอยเป๋าฮื้อแปรรูป 29

3.3 การหาปริมาณ เหล็ก สังกะสี และซีลิเนียม ในหอยเป๋าฮื้อสดและหอยเป๋าฮื้อแปรรูป 31

3.4 การหาปริมาณ curcumin ในหอยเป๋าฮื้อตุ๋นสมุนไพร 34

3.5 ศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งโดยวิธี MTT 36

บทที่ 4 สรุปผลการทดลอง 41

เอกสารอ้างอิง 43

ภาคผนวก 45

ภาคผนวก ก 46

ภาคผนวก ข 49

ประวัติผู้วิจัย 52

ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญรูปภาพ

รูปที่ หน้า

1.1 ลักษณะของหอยเป๋าฮื้อ 2
1.2 ส่วนประกอบของเครื่อง UV-VIS Spectrophotometer 4
1.3 ส่วนประกอบของเครื่อง Inductively Couple Plasma-Optical Emission Spectrophotometer 6
1.4 ส่วนประกอบของ Plasma Torch 7
1.5 การเปลี่ยน MTT ไปเป็น formazan product 9
1.6 ส่วนประกอบของเครื่อง Freeze dryer 10
3.1 ลักษณะของหอยเป๋าฮื้อสด หอยเป๋าฮื้อต้มสุกและหอยเป๋าฮื้อตุ๋นสมุนไพรก่อนฟรีซดราย 26
3.2 ลักษณะของหอยเป๋าฮื้อสด หอยเป๋าฮื้อต้มสุกและหอยเป๋าฮื้อตุ๋นสมุนไพรหลังฟรีซดราย 27
3.3 ลักษณะของหอยเป๋าฮื้อสด หอยเป๋าฮื้อต้มสุกและหอยเป๋าฮื้อตุ๋นสมุนไพรหลังคืนน้ำ 27
3.4 กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างเหล็กที่ความเข้มข้นต่างๆกับค่าสัดส่วนความเข้มของสัญญาณ 31
3.5 กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างสังกะสีที่ความเข้มข้นต่างๆกับค่าสัดส่วนความเข้มของสัญญาณ 32
3.6 กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างซีลิเนียมที่ความเข้มข้นต่างๆกับค่าสัดส่วนความเข้มของสัญญาณ 32
3.7 กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างเคอร์คูมินที่ความเข้มข้นต่างๆกับค่าการดูดกลืนแสง 35
3.8 กราฟแท่งแสดงความสัมพันธ์ระหว่างหอยเป๋าฮื้อสด หอยเป๋าฮื้อต้มสุก หอยเป๋าฮื้อตุ๋นสมุนไพร ชั้นน้ำ และชั้นน้ำมันจากการตุ๋นที่ความเข้มข้นต่างๆกับเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดชีวิตของเซลล์มะเร็งกระเพาะอาหาร (KATO-III) 36
3.9 กราฟแท่งแสดงความสัมพันธ์ระหว่างหอยเป๋าฮื้อสด หอยเป๋าฮื้อต้มสุก หอยเป๋าฮื้อตุ๋นสมุนไพร ชั้นน้ำ และชั้นน้ำมันจากการตุ๋นที่ความเข้มข้นต่างๆกับเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดชีวิตของเซลล์มะเร็งตับ (HEP-G2) 37
3.10 กราฟแท่งแสดงความสัมพันธ์ระหว่างหอยเป๋าฮื้อสด หอยเป๋าฮื้อต้มสุก หอยเป๋าฮื้อตุ๋นสมุนไพร ชั้นน้ำ และชั้นน้ำมันจากการตุ๋นที่ความเข้มข้นต่างๆกับเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดชีวิตของเซลล์มะเร็งเต้านม (BT474) 37
3.11 กราฟแท่งแสดงความสัมพันธ์ระหว่างหอยเป๋าฮื้อสด หอยเป๋าฮื้อต้มสุก หอยเป๋าฮื้อตุ๋นสมุนไพร ชั้นน้ำ และชั้นน้ำมันจากการตุ๋นที่ความเข้มข้นต่างๆกับเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดชีวิตของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ (SW620) 38

หน้า

3.12 กราฟแท่งแสดงความสัมพันธ์ระหว่างหอยเป๋าฮื้อสด หอยเป๋าฮื้อต้มสุก หอยเป๋าฮื้อตุ๋น สมุนไพรชั้นน้ำ และชั้นน้ำมันจากการตุ๋นที่ความเข้มข้นต่างๆกับเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดชีวิตของเซลล์มะเร็งปอด (A549) 38

3.13 กราฟแท่งแสดงความสัมพันธ์ระหว่างหอยเป๋าฮื้อสด หอยเป๋าฮื้อต้มสุก หอยเป๋าฮื้อตุ๋น สมุนไพร ชั้นน้ำ และชั้นน้ำมันจากการตุ๋นที่ความเข้มข้นต่างๆกับเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดชีวิตของเซลล์มะเร็งปอด (Chago) 39

3.14 กราฟแท่งแสดงความสัมพันธ์ระหว่างหอยเป๋าฮื้อสด หอยเป๋าฮื้อต้มสุก หอยเป๋าฮื้อตุ๋น สมุนไพร ชั้นน้ำ และชั้นน้ำมันจากการตุ๋นที่ความเข้มข้นต่างๆกับเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดชีวิตของเซลล์มะเร็งเยื่อบุช่องปาก (KB) 39

ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

2.1 แสดงการเตรียมสารละลายมาตรฐาน selenium ที่ความเข้มข้นต่างๆ 21

2.2 แสดงการเตรียมสารละลายมาตรฐาน zinc ที่ความเข้มข้นต่างๆ 21

2.3 แสดงการเตรียมสารละลายมาตรฐาน iron(III) ที่ความเข้มข้นต่างๆ 22

2.4 แสดงการเตรียมสารละลายมาตรฐาน curcumin ที่ความเข้มข้นต่างๆ 23

3.1 แสดงน้ำหนัก, % dehydration และ % rehydration ของหอยเป๋าฮื้อ 28

3.2 แสดงปริมาณองค์ประกอบทางเคมีของหอยเป๋าฮื้อสด หอยเป๋าฮื้อต้มสุกและหอยเป๋าฮื้อตุ๋นสมุนไพร 29

3.3 แสดงปริมาณของเหล็ก สังกะสี และซีลิเนียม ในหอยเป๋าฮื้อสด หอยเป๋าฮื้อต้มสุกและหอยเป๋าฮื้อตุ๋นสมุนไพร 33

4.1 แสดงปริมาณองค์ประกอบทางเคมีของหอยเป๋าฮื้อสดและหอยเป๋าฮื้อแปรรูป 41

ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

ICP-OES	=	Inductively Couple Plasma-Optical Emission Spectroscopy
AE	=	Atomic Emission
AA	=	Atomic Absorption
MTT	=	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
DMSO	=	Dimethyl sulfoxide
NaOH	=	Sodium hydroxide
HCl	=	Hydrochloric acid
HNO_3	=	Nitric acid
OD	=	optical density
Pa	=	pascal
N	=	normality
M	=	molarity
IC_{50}	=	half maximal inhibitory concentration
mL	=	milliliters
µL	=	microliters
µg	=	microgram
mg	=	milligram
g	=	gram
˚C	=	degree Celsius
ppm	=	parts per million
% w	=	percentage by weight

ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและมูลเหตุจูงใจในการเสนอโครงการ

หอยเป๋าฮื้อเป็นสัตว์ทะเลชนิดหนึ่งที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจที่ถือว่าค่อนข้างหายากและมีราคาแพง ซึ่งในปัจจุบันได้มีการเพาะเลี้ยงหอยเป๋าฮื้อมากขึ้นเพื่อให้เพียงพอต่อความต้องการของตลาด เพราะคนนิยมรับประทานกันมากขึ้น ซึ่งเดิมหอยเป๋าฮื้อจัดเป็นอาหารชั้นสูงตามวัฒนธรรมจีน เนื่องจากหอยเป๋าฮื้อมีคุณค่าทางโภชนาการสูง ทั้งโปรตีนสูง แคลอรี่ต่ำ มีกรดไขมันจำเป็นและกรดอะมิโนหลายชนิด[1] อุดมไปด้วยแร่ธาตุต่างๆที่สำคัญต่อร่างกายทั้งเหล็ก สังกะสี และซีลิเนียม โดยหอยเป๋าฮื้อสามารถนำไปประกอบได้หลากหลายรูปแบบ นอกจากนี้สารสกัดจากหอยเป๋าฮื้อยังมีการนำไปใช้เป็นส่วนผสมในผลิตภัณฑ์บำรุงผิวชั้นสูง และเปลือกหอยเป๋าฮื้อยังสามารถนำไปทำเป็นเครื่องประดับได้อีกด้วย

องค์ประกอบทางเคมีของหอยเป๋าฮื้อนั้นจะประกอบไปด้วย โปรตีน คาร์โบไฮเดรต ไขมัน ความชื้น และเถ้า ซึ่งจะเป็นส่วนของสารอนินทรีย์ต่างๆ โดยการหาองค์ประกอบทางเคมีของหอยเป๋าฮื้อนั้นสามารถทำได้ตามวิธีมาตรฐาน AOAC[2] ซึ่งมีงานวิจัยที่ผ่านมาคือ Tanikawa E.[3] และคณะ ได้ทำการทดลองโดยนำเนื้อหอยเป๋าฮื้อสดไปย่อยและทดสอบโดยใช้เทคนิค Paper Chromatography เพื่อตรวจหาชนิดของกรดอะมิโนในเนื้อหอยเป๋าฮื้อสด และนำไปตรวจหาจำนวนเปอร์เซ็นต์ของสารประกอบไนโตรเจนเพื่อหาจำนวนโปรตีนโดยใช้วิธี Van Slyke ซึ่งพบว่าในเนื้อหอยเป๋าฮื้อนั้นมีกรดอะมิโนกว่า 15 ชนิด และยังมีโปรตีนในปริมาณที่สูงด้วย นอกจากนี้ Conte F.[4] และคณะได้ทำการทดลองหาปริมาณของธาตุต่างๆ ในเนื้อหอยเป๋าฮื้อสด โดยนำเนื้อหอย[5] ไปย่อยและทดสอบโดยใช้เทคนิค Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry (ICP-MS)[6] พบว่าหอยเป๋าฮื้อมีแร่ธาตุที่จำเป็นต่อร่างกาย[7] อยู่หลายธาตุ เช่น สังกะสี ซีลิเนียม ทองแดง แมงกานีส และโดยเฉพาะเหล็ก ซึ่งมีปริมาณที่สูง

นอกจากจะมีคุณค่าทางโภชนาการสูงแล้วหอยเป๋าฮื้อยังมีฤทธิ์ในการต้านออกซิเดชั่น[8] และต้านมะเร็ง[9] อีกด้วย ซึ่งมีงานวิจัยที่เกี่ยวข้องคือ Kim C. W. และคณะ[10] ได้ทำการทดลองโดยนำเปปไทด์ AP1 ที่สกัดได้จากหอยเป๋าฮื้อมาทดสอบฤทธิ์ในการต้านมะเร็งโดยใช้วิธี MTT[11] ทดสอบกับเซลล์ AGS และ MKN-28 ซึ่งเป็นเซลล์มะเร็งกระเพาะอาหาร พบว่าเปปไทด์ AP1 ในหอยเป๋าฮื้อ มีฤทธิ์ในการต้านมะเร็งได้ โดยเปปไทด์ AP1 จะไปช่วยยับยั้งการเจริญเติบโตและการเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็ง

ดังนั้นในงานวิจัยนี้สนใจที่จะศึกษาการการกำจัดน้ำออก (Dehydration) และการคืนน้ำ (Rehydration) ของหอยเป๋าฮื้อสดและหอยเป๋าฮื้อแปรรูปโดยวิธีฟรีซดราย หาปริมาณองค์ประกอบของหอยเป๋าฮื้อโดยตรวจวัด ash โดยใช้วิธี Dry-ashing ตรวจวัดโปรตีนโดยใช้วิธี Kjeldahl โดยใช้ค่า conversion factor เป็น 6.25 ตรวจวัดไขมันโดยใช้วิธีสกัดด้วย petroleum ether ตรวจวัดคาร์โบไฮเดรตโดยใช้วิธีการคำนวณจากสูตรการหาปริมาณคาร์โบไฮเดรตซึ่งเป็นวิธีมาตรฐานในการวิเคราะห์อาหาร ตรวจวัดความชื้นโดยวิธีวิเคราะห์ความชื้นด้วยการอบแห้ง และตรวจวัดปริมาณของแร่ธาตุสังกะสี เหล็ก และซีลิเนียม โดยใช้เทคนิค Inductively Couple Plasma-Optical Emission Spectroscopy (ICP-OES) และทดสอบฤทธิ์ในการต้านมะเร็งของหอยเป๋าฮื้อโดยใช้วิธี MTT โดยจะเพิ่มเติมในส่วนของหอยเป๋าฮื้อแปรรูป ซึ่งก็คือหอยเป๋าฮื้อต้มสุก และหอยเป๋าฮื้อตุ๋นสมุนไพรนอกเหนือจากหอยเป๋าฮื้อสดซึ่งมีในงานวิจัยก่อนหน้า

1.2 ทฤษฎีและความรู้ที่เกี่ยวข้อง

1.2.1 ลักษณะโดยทั่วไปของหอยเป๋าฮื้อ

รูปที่ 1.1 ลักษณะของหอยเป๋าฮื้อ

หอยเป๋าฮื้อ

ชื่อสามัญ : Abalone

ชื่ออื่นๆ : หอยร้อยรู, หอยโข่งทะเล

ชื่อวิทยาศาสตร์ : *Haliotis asinina*

Phylum :	Mollusca
Class :	Gastropoda
Subclass :	Psedobranchia
Order :	Archaeogastropoda
Family :	Haliotididae
Genus :	Haliotis
Species :	Diversicolor

หอยเป๋าฮื้อ เป็นหอยทะเลประเภทฝาเดียว จัดอยู่ในกลุ่ม Gastropoda บริเวณเปลือกมีรูเปิดเรียงกันหลายรู เพื่อการดำรงชีวิต เช่น การหายใจ การสืบพันธุ์ เคลื่อนที่ด้วยกล้ามเนื้อที่แข็งแรง หอยเป๋าฮื้อที่พบในธรรมชาติมีประมาณ 75 ชนิด และมีจำนวนไม่ถึง 22 ชนิดที่มีการเพาะเลี้ยงได้ ส่วนใหญ่จะเป็นหอยที่จับจากธรรมชาติ หอยเป๋าฮื้อจะมีลักษณะสัณฐานเปลือกแบน ยาวรี คล้าย แผ่นจาน มีสีของเปลือกตามขอบ และจะเปลี่ยนสีได้ตามการอนุบาลและชนิดของอาหารที่ให้

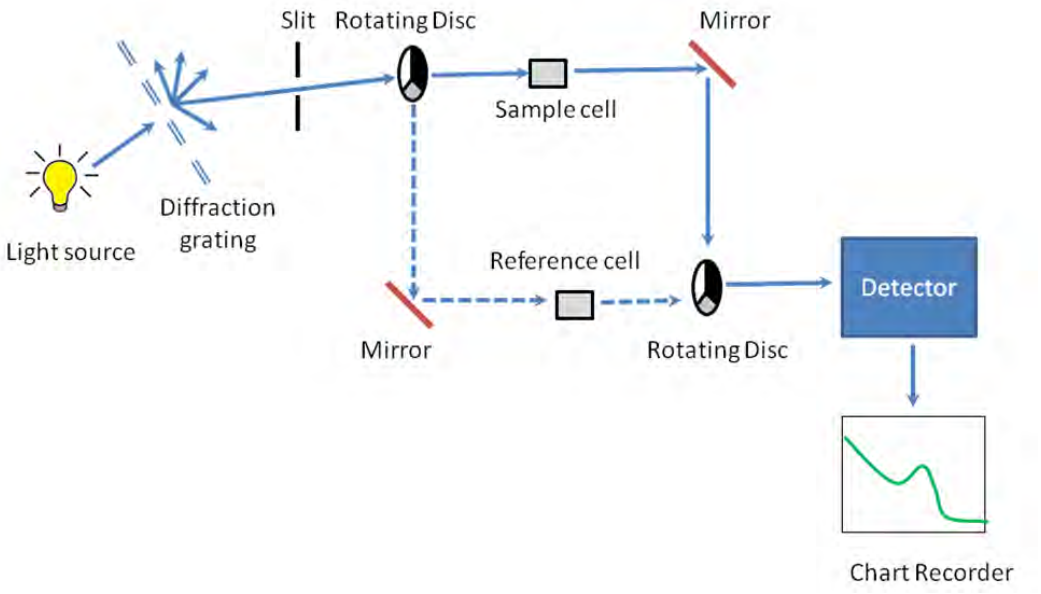
หอยเป๋าฮื้อเป็นสัตว์กินพืชจำพวกสาหร่ายชนิดต่างๆ และมักออกหากินอาหารในเวลากลางคืน โดยมากจะอาศัยตามแนวหินหรือแนวปะการัง โดยจะต้องมีระดับความเค็มของน้ำทะเลคงที่ หอยชนิดนี้มีเพศแยก การผสมพันธุ์ของหอยชนิดนี้จะเป็นแบบภายนอก หรือ External fertilization โดยปกติเพศผู้และเพศเมียจะปล่อยน้ำเชื้อและไข่ ออกมาผสมกันในน้ำทะเล เมื่อไข่ที่ได้รับการผสมจะพัฒนาเป็นตัวอ่อนที่มีขนาดเล็กและสามารถว่ายน้ำได้ จากนั้นก็จะลงเกาะและพัฒนาเป็นระยะ Larvae และจะมีสาย Velum พัดโบกอาหาร โดยเฉพาะสาหร่ายขนาดเล็กเข้าสู่ปาก และใช้แผง Radula ในการขูดกินอาหารที่มีขนาดใหญ่ จากนั้นก็จะเจริญเป็นตัวเต็มวัยต่อไป

หอยเป๋าฮื้อจัดว่าเป็นหอยที่มีราคาแพง และมีความต้องการทางตลาดสูงมากทั้งในและต่างประเทศ ด้วยคุณค่าทางโภชนาการของตัวหอยเป๋าฮื้อเองที่มีโปรตีนสูง อุดมไปด้วยกรดอะมิโนที่จำเป็นต่อร่างกายมากถึง 17 ชนิด ได้แก่ Tryptophan Threonine Isoleucine Leucine Lysine Methionine Phenylalanine Tyrosine Valine Arginine Histidine Alanine Aspartic acid Glutamic acid Glycine Proline และ Serine นอกจากนี้ยังมีวิตามินและแร่ธาตุต่างๆที่หลากหลาย รวมถึงยังมีปริมาณคอเลสเตอรอลที่ต่ำมาก มีปริมาณคอลลาเจนที่มีคุณภาพสูงที่คงลักษณะ 3 สายและสามารถกระตุ้นให้เกิดการสร้าง Fibroblast cell บนพื้นผิวได้ และจากการศึกษาในปัจจุบันยังพบไกลโคซามิโนไกลแคน (Glycosaminoglycans : GAGs) จัดเป็นโพลิแซคคาไรด์ที่เป็นองค์ประกอบที่สำคัญของสารประกอบพื้นฐานของเนื้อเยื่อเกี่ยวพันภายในร่างกายของมนุษย์และสัตว์

1.2.2 เทคนิค UV-VIS Spectroscopy

เทคนิค UV-VIS Spectroscopy เป็นเทคนิคที่ใช้ในการตรวจวัดปริมาณแสงและค่า intensity ในช่วงรังสียูวีและช่วงแสงขาว โดย UV-VIS Spectrophotometer เป็นเครื่องมือที่ใช้ในการตรวจวัดปริมาณแสงและค่า intensity ในช่วงรังสียูวีและช่วงแสงขาวที่ทะลุผ่านหรือถูกดูดกลืนโดยตัวอย่างที่วางอยู่ในเครื่องมือ โดยที่ความยาวคลื่นแสงจะมีความสัมพันธ์กับปริมาณและชนิดของสารที่อยู่ในตัวอย่าง ซึ่งส่วนใหญ่จะเป็นสารอินทรีย์ สารประกอบเชิงซ้อนและสารอนินทรีย์ที่สามารถดูดกลืนแสงในช่วงความยาวคลื่นเหล่านี้ได้

คุณสมบัติในการดูดกลืนแสงของสารเมื่อโมเลกุลของตัวอย่างถูกฉายด้วยแสงที่มีพลังงานเหมาะสมจะทำให้อิเล็กตรอนภายในอะตอมเกิดการดูดกลืนแสงแล้วเปลี่ยนสถานะไปอยู่ในชั้นที่มีระดับพลังงานสูงกว่าเมื่อทำการวัดปริมาณของแสงที่ผ่านหรือสะท้อนมาจากตัวอย่างเทียบกับแสงจากแหล่งกำเนิดที่ความยาวคลื่นค่าต่างๆตามกฎของ Beer-Lambert ค่าการดูดกลืนแสง (absorbance) ของสารจะแปรผันกับจำนวนโมเลกุลที่มีการดูดกลืนแสง ดังนั้นจึงสามารถใช้เทคนิคนี้ในระบุชนิดและปริมาณของสารต่างๆที่มีอยู่ในตัวอย่างได้



รูปที่ 1.2 ส่วนประกอบของเครื่อง UV-VIS Spectrophotometer

ส่วนประกอบของเครื่อง UV-VIS Spectrophotometer

1. **แหล่งกำเนิดแสง**

แหล่งกำเนิดแสง ในเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์จะต้อง ให้รังสี ในช่วงความยาวคลื่นที่ต้องการ อย่างต่อเนื่องและคงที่ตลอดเวลา รวมทั้งมีความเข้มแสงที่มากพอด้วย หลอดกำเนิดแสง มีหลายชนิด ตามความยาวคลื่นแสงที่เปล่งออกมา ซึ่งต้องเลือก ใช้ ให้ถูกต้องเหมาะสมกับของเหลวที่นำมาวัดค่าดูดกลืนแสง ตัวอย่างแหล่งกำเนิดแสง ช่วง UV ใช้หลอด deuterium lamp ให้ความยาวคลื่นอยู่ ในช่วง 160-380 nm ชนิดของสเปกโทรสโกปี UV molecular absorption และช่วง visible ใช้หลอด Tungsten/halogen ให้ความยาวคลื่น ในช่วง 240-2,500 nm ชนิดของสเปกโทรสโกปีเป็นแบบ UV/visible/near-IR molecular absorption

2. **Monochromator**

ส่วนประกอบนี้เป็นส่วนที่ ใช้ควบคุมแสงโดยจะทำ ให้แสงที่ออกมาจากต้นกำเนิดแสง ให้เป็นแสงโมโนโครเมติก ซึ่งเป็นแถบแสงแคบๆ หรือมีความยาวคลื่นเดียว ตัวอย่างโมโนโครเมเตอร์ เช่น ฟิลเตอร์ (กระจกสี) ปริซึม (prism) หรือ เกรตติ้ง (grating)

3. **เซลล์ที่ใช้บรรจุสารละลายตัวอย่าง**

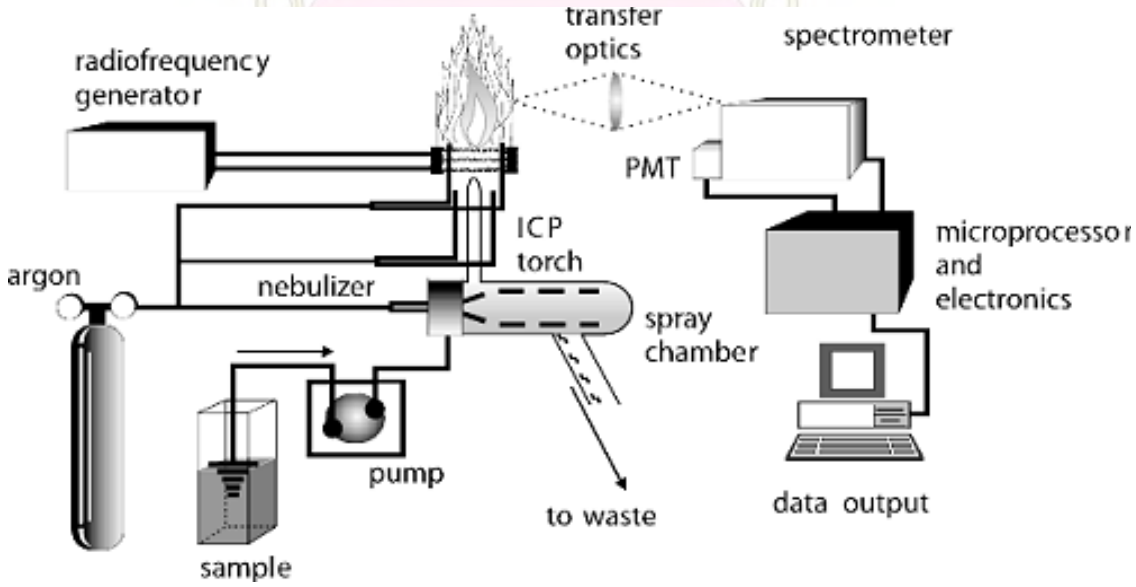
เซลล์ที่ ใส่สารตัวอย่าง (cell sample) บางครั้งอาจเรียกว่า คิวเวทท์ (cuvette) รูปแบบที่ ใช้กันทั่วไปได้แก่เซลล์ที่ทำด้วยแก้วธรรมดา จะใช้ได้เฉพาะช่วงวิสิเบิล เพราะเนื้อแก้วธรรมดาดูดกลืนแสง ในช่วงยูวีได้ และเซลล์ที่ทำด้วยซิลิกา และควอร์ตซ์ (quartz) ใช้ได้ทั้งช่วงยูวีและวิสิเบิล

4. **Detector**

ทำหน้าที่ ในการวัดความเข้มของรังสีที่ถูกดูดกลืนโดยการแปลงพลังงานคลื่นรังสีเป็นพลังงานไฟฟ้าเครื่องตรวจจับสัญญาณที่ดีต้องมีสภาพไวสูง คือแม้ปริมาณแสงจะเปลี่ยนไปเล็กน้อย ก็สามารถตรวจจับสัญญาณความแตกต่างได้ เครื่องวัดแสงที่ยังนิยมกันอยู่ ในปัจจุบัน คือ หลอดโฟโตมัลติพลายเออร์ (photomultiplier tube, PMT) และเครื่องวัดแสงชนิดซิลิกอนไดโอด (silicon diode detector)

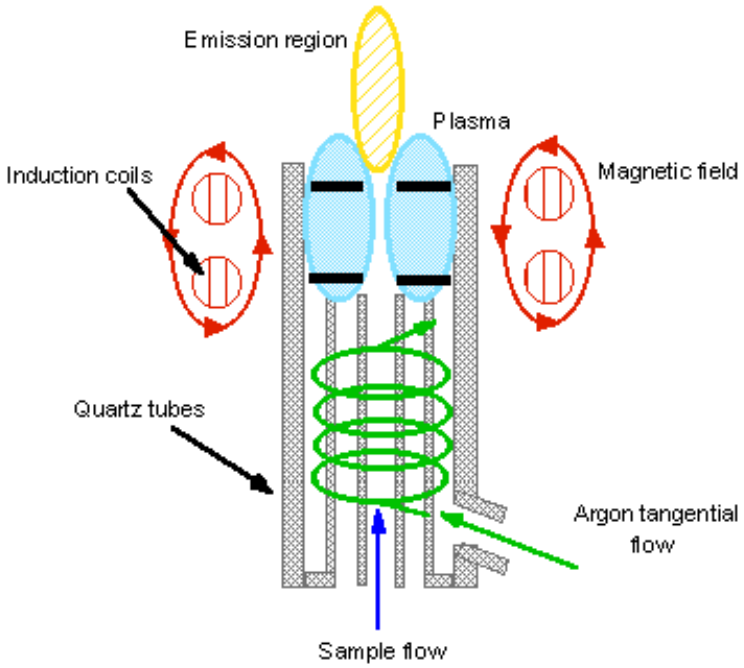
1.2.3 เทคนิค Inductively Couple Plasma-Optical Emission Spectroscopy (ICP-OES)

เทคนิค Inductively Couple Plasma-Optical Emission Spectroscopy (ICP-OES) เป็นเทคนิคที่สามารถวัดสเปคตรัมแสงในช่วงทั้งความยาวคลื่นที่ตามองเห็นและช่วงอุลตร้าไวโอเลต (Visible and Ultraviolet Region) โดยใช้หลักการอะตอมมิคอิมิสชัน (Atomic Emission , AE) คือ อะตอมของธาตุแต่ละธาตุประกอบด้วยนิวเคลียร์ เป็นศูนย์กลางโดยมีอิเลคตรอนอยู่โดยรอบ ถ้ามีการให้พลังงานถ่ายเทเข้าสู่อะตอมจำนวนมาก เช่น การให้พลังงานความร้อน หรือคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้าพลังงานสูง พลังงานเหล่านี้จะกระตุ้นให้อิเลคตรอนในอะตอมเปลี่ยนสภาพจากที่เคยอยู่ในสภาวะพื้น (Ground State) เข้าสู่ช่วงระดับพลังงานสูง (Excited State) กระบวนการนี้เรียกว่า Atomic Absorption (AA) อย่างไรก็ตามอิเลคตรอนไม่สามารถอยู่ในระดับสภาวะพลังงานสูงได้นาน ดังนั้นอิเลคตรอนจะคายพลังงานออกมาเพื่อกลับเข้าสู่สภาวะพื้น หรือกลับเข้าสู่สภาวะพลังงานกระตุ้นระดับต่ำกว่า ขบวนการนี้เรียกว่า (Atomic Emission , AE) ซึ่งจะเกิดขึ้นเร็วมาก ใช้เวลาประมาณหนึ่งในร้อยล้านวินาที พลังงานที่คายออกมาจะเป็นรังสีคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้าในช่วงสเปกตรัมต่างๆ โดยธาตุที่ถูกกระตุ้นแต่ละชนิดจะปล่อยสเปคตรัมที่มีความยาวคลื่นเฉพาะของแต่ละธาตุออกมา ความเข้มของสเปกตรัมจะแปรผันตามจำนวนอะตอมที่ดูดพลังงานเข้าไป



รูปที่ 1.3 ส่วนประกอบของเครื่อง Inductively Couple Plasma-Optical Emission Spectrophotometer

สำหรับ Inductively Coupled Plasma เป็นกระบวนการอย่างหนึ่งที่นำมาใช้สำหรับทำคบพลาสมา (Plasma Torch) ที่มีความร้อนสูงมากกว่าอุณหภูมิของเปลวไฟปกติทั่วไป โดยอยู่ในช่วงประมาณ 7,000 – 10,000 เคลวิน จึงสามารถทำให้ธาตุต่างๆ แตกตัว เป็นอะตอมเกิดการเปลี่ยนจากระดับพลังงานต่ำเป็นระดับพลังงานสูง (Excitation) และเกิดการแตกตัวเป็นไอออน (Ionization) ของอะตอมโลหะได้เป็นอย่างดี



รูปที่ 1.4 ส่วนประกอบของ Plasma Torch

ส่วน พลาสมา (Plasma) หมายถึง อะตอมหรือโมเลกุลของก๊าซที่เกิดการแตกตัวเป็นไอออนบวก และอิเลคตรอน ซึ่งการแตกตัวนี้อาจแตกตัวหมดหรือแตกตัวเพียงบางส่วนก็ได้ ดังนั้นโดยทั่วไปแล้วพลาสมาก๊าซจึงประกอบด้วยโมเลกุล อะตอม อะตอมสถานะกระตุ้น ไอออนบวก และอิเลคตรอน

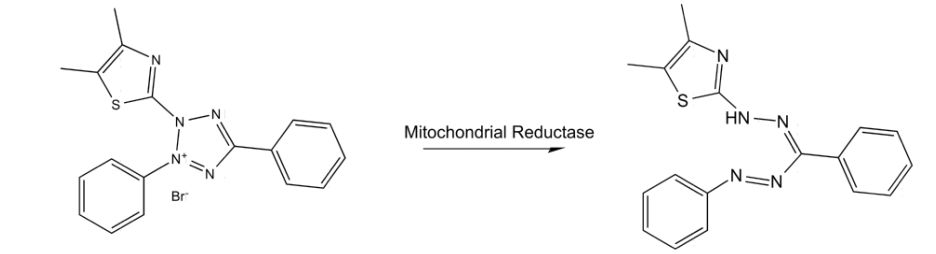
1.2.4 การทดสอบความสามารถในการมีชีวิตของเซลล์ (Cell Viability Assays)

เป็นการทดสอบความสามารถในการมีชีวิตของเซลล์หลังจากเหนี่ยวนำให้เกิด reactive oxygen species (ROS) ขึ้นในเซลล์โดยนับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต (viable cell) และเซลล์ที่ตาย (dead cell) หรือทดสอบจากการทำงานของไมโทคอนเดรีย และคำนวณเซลล์ที่มีชีวิตเป็นร้อยละของความสามารถในการมีชีวิตของเซลล์ (% cell viability) วิธีที่นิยมทดสอบ คือ MTT

วิธี MTT

หลักการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์โดยวิธี MTT คือการวัดจำนวนเซลล์ที่ยังมีชีวิตอยู่โดยวัดจาก mitochondrial succinic dehydrogenase activity ซึ่งเซลล์ที่มีชีวิตจะมี mitochondrial function ในเซลล์ Krebs cycle ที่เกิดใน mitochondria เป็น metabolic pathway ที่สำคัญในการสังเคราะห์ adenosine triphosphate จากคาร์โบไฮเดรต โปรตีน และไขมัน โดยขั้นตอนต้น คือการเปลี่ยนจาก succinate ไปเป็น fumarate โดย succinicdehydrogenase (SDH) ส่วน FAD เป็นตัวที่ทำให้ปฏิกิริยา reduction สมบูรณ์โดยผ่าน $FADH_2$ และ $FADH_2$ สามารถเปลี่ยน tetrazolium salt ไปเป็น formazan ที่มีสีม่วงน้ำเงินและตกตะกอนใน mitochondria โดยการทดสอบนี้ต้องการ disodium succinate เป็นสารตั้งต้น เมื่อปฏิกิริยาสมบูรณ์จะเกิดการเปลี่ยนจากสีเหลืองไปเป็นสีม่วงน้ำเงิน และระดับของการเปลี่ยนสีเป็นสัดส่วนโดยตรงกับ enzymatic reduction ของ tetrazolium salt ผลึกของ formazan สามารถละลายใน dimethylsulfoxide (DMSO) ก่อนที่จะนำไปอ่านค่า optical density (OD) ที่ความยาวคลื่น 540 nm ค่าที่อ่าน ได้จะบอก mitochondrial activity และเซลล์ที่มีชีวิต โดยสามารถคำนวณ % cell viability ได้จากสมการ

$$\% \text{ cell viability} = \frac{\text{ค่า absorbance ของเซลล์ที่ได้รับยา}}{\text{ค่า absorbance ของเซลล์ที่ไม่ได้รับยา}} \times 100$$



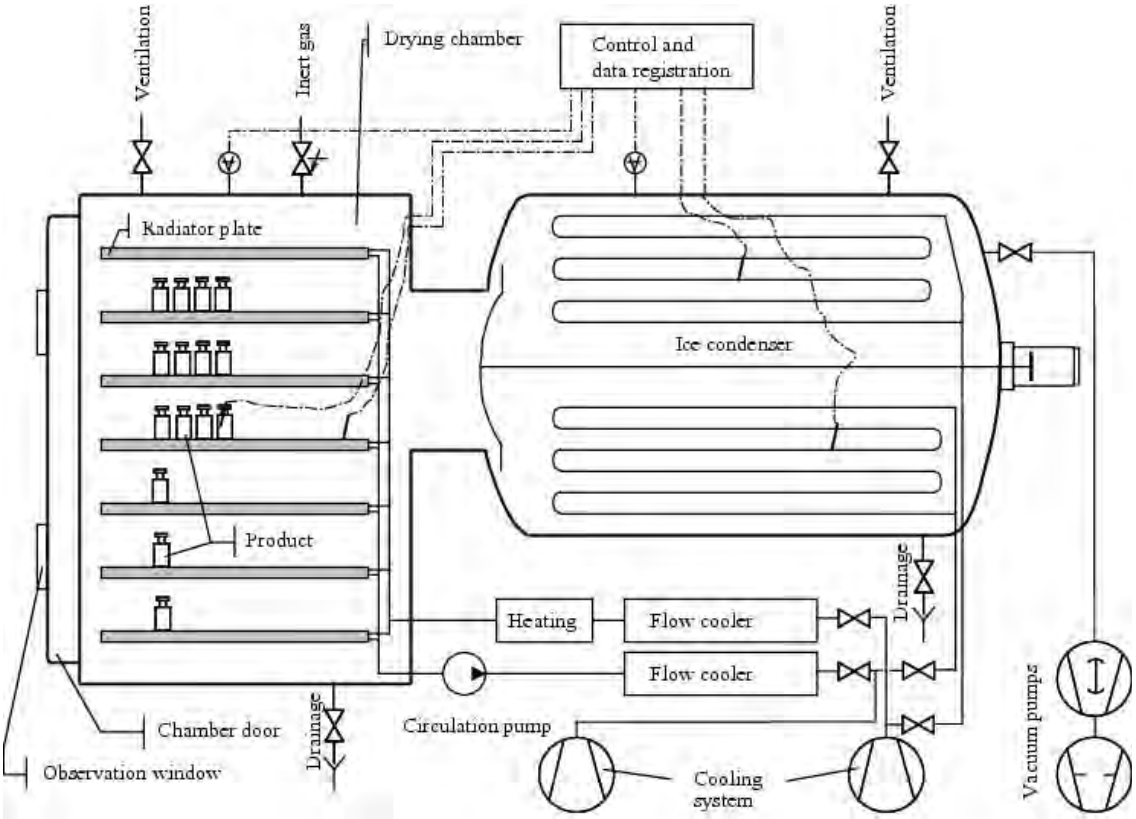
รูปที่ 1.5 การเปลี่ยน MTT ไปเป็น formazan

1.2.5 การทำแห้งเยือกแข็งแบบสูญญากาศ (Freeze Dried)

การทำแห้งเยือกแข็งแบบสูญญากาศ (Freeze dried) เป็นการทำแห้ง (dehydration) ด้วยการแช่เยือกแข็ง (freezing) ทำให้น้ำเปลี่ยนสถานะเป็นผลึกน้ำแข็งก่อน แล้วจึงลดความดันเพื่อให้ผลึกน้ำแข็งระเหิด (sublimation) เป็นไอ ด้วยการลดความดันให้ต่ำกว่าบรรยากาศปกติ ขณะควบคุมให้อุณหภูมิต่ำ โดยสามารถคำนวณ % dehydration และ % rehydration ได้จากสมการ

$$\% \text{ dehydration} = \frac{\text{น้ำหนักก่อนทำแห้งเยือกแข็ง} - \text{น้ำหนักหลังทำแห้งเยือกแข็ง}}{\text{น้ำหนักก่อนทำแห้งเยือกแข็ง}} \times 100$$

$$\% \text{ rehydration} = \frac{\text{น้ำหนักหลังคืนน้ำ}}{\text{น้ำหนักก่อนทำแห้งเยือกแข็ง}} \times 100$$



รูปที่ 1.6 ส่วนประกอบของเครื่อง Freeze dryer

ขั้นตอนการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง

1.การแช่เยือกแข็ง (freezing)

เป็นการลดอุณหภูมิของอาหารให้ต่ำกว่าจุดเยือกแข็ง (freezing point) เพื่อให้เกิดผลึกน้ำแข็ง (ice crystal formation) อัตราเร็วของการแช่เยือกแข็ง (freezing rate) ควรเป็นการแช่เยือกแข็งแบบเร็ว เพื่อให้เกิดผลึกและผลึกที่เกิดขึ้นจะมีขนาดเล็ก การแช่เยือกแข็งแบบเร็ว ที่นิยมใช้กันมีหลายวิธี เช่น การแช่เยือกแข็งแบบใช้ลมเย็นเป่า (air blast freezing) การแช่เยือกแข็งแบบไครโอเจน (cryogenic freezing) และการแช่เยือกแข็งแบบจุ่มในของเหลวเย็นจัด (immersion freezing) เป็นต้น

2. การทำแห้งขั้นต้น (primary drying)

เป็นการลดปริมาณน้ำ (dehydration) โดยการระเหิด น้ำแข็ง ให้เป็นไอโดยการลดความดันบรรยากาศ เพื่อให้ผลึกน้ำแข็งที่อยู่ภายในเกิดการระเหิดเป็นไอ ออกไปจากผิวหน้าของผลิตภัณฑ์ การระเหิดของผลึกน้ำแข็งจึงเกิดขึ้นได้อย่างสมบูรณ์ การระเหิดของชั้นน้ำแข็ง (ice layer) จะเริ่มจากชั้นน้ำแข็งบริเวณผิวหน้าของผลิตภัณฑ์ ระเหิดไปเป็นไอ ทำให้บริเวณนี้กลายเป็นชั้นแห้ง (dry layer) จากนั้นเป็นการระเหิดของชั้นน้ำแข็งที่อยู่ภายในผลิตภัณฑ์ ระเหิดผ่านชั้นแห้ง ออกไปสู่ผิวหน้าของผลิตภัณฑ์ ระยะเวลาการระเหิด ขึ้นอยู่กับ ขนาด รูปร่าง และโครงสร้างของผลิตภัณฑ์แต่ละชนิด

3. การทำแห้งขั้นที่สอง (secondary drying)

เมื่อการทำแห้งขั้นต้นเสร็จสมบูรณ์ น้ำแข็งจะละลายไปหมด จะมีความชื้นที่หลงเหลืออยู่ จึงต้องมีการทำแห้งด้วยการเพิ่มอุณหภูมิให้สูงขึ้นเพื่อดึงเอาความชื้นที่เหลืออยู่ออก

1.3 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1.3.1 ศึกษาการกำจัดน้ำออกและการคืนน้ำของหอยเป๋าฮื้อสดและหอยเป๋าฮื้อแปรรูปโดยวิธีการทำแห้งเยือกแข็ง

1.3.2 ตรวจวัดองค์ประกอบทางเคมีของหอยเป๋าฮื้อสดและหอยเป๋าฮื้อแปรรูป

1.3.3 ทดสอบฤทธิ์ในการต้านมะเร็งของหอยเป๋าฮื้อสดและหอยเป๋าฮื้อแปรรูป

1.4 ประโยชน์ที่ได้รับจากงานวิจัย

1.4.1 ทราบการ Dehydrate และ Rehydrate ของหอยเป๋าฮื้อสดและหอยเป๋าฮื้อแปรรูป

1.4.2 ทราบองค์ประกอบทางเคมีของหอยเป๋าฮื้อสดและหอยเป๋าฮื้อแปรรูป

1.4.3 ทราบฤทธิ์ในการต้านมะเร็งของหอยเป๋าฮื้อสดและหอยเป๋าฮื้อแปรรูป

บทที่ 2

การทดลอง

2.1 สารเคมี

1. Curcumin
2. Hydrochloric acid บริษัท Merck จำกัด
3. Nitric acid บริษัท Merck จำกัด
4. Dimethyl sulfoxide บริษัท RCI cabscan จำกัด
5. Selenium standard for ICP-OES บริษัท Merck จำกัด
6. Zinc standard for ICP-OES บริษัท Merck จำกัด
7. Iron(III) standard for ICP-OES บริษัท Merck จำกัด
8. Hydrogen peroxide
9. Sodium hydroxide บริษัท Carlo Erba จำกัด
10. Potassium hydrogen phthalate (KHP) บริษัท Carlo Erba จำกัด
11. Bromocresol green
12. Methyl red
13. Phenolphthalein
14. Boric acid บริษัท Carlo Erba จำกัด
15. Petroleum ether บริษัท RCI cabscan จำกัด

2.2 วัตถุดิบ

1. หอยเป๋าฮื้อสด ได้รับความอนุเคราะห์จากรองศาสตราจารย์ ดร.นงนุช เหมืองสิน โดยนำมาจากสถาบันวิจัยทรัพยากรทางน้ำ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เกาะสีชัง
2. ขมิ้นชัน จากห้างสรรพสินค้าเทสโก้ โลตัส
3. ขิงสด จากห้างสรรพสินค้าเทสโก้ โลตัส
4. กระชาย จากห้างสรรพสินค้าเทสโก้ โลตัส
5. น้ำมันปาล์ม ยี่ห้อหยก จากห้างสรรพสินค้าเทสโก้ โลตัส

2.3 เครื่องมือและอุปกรณ์

1. Freeze dryer จาก Labconco รุ่น Freezone 6
2. ICP-OES จาก Thermo scientific รุ่น iCAP 6000 series
3. Microtiter plate reader จาก Biotek รุ่น Powerwave XS2
4. UV-Vis Spectrophotometer Agilent 8543 UV-Visible spectroscopy system
5. High vacuum rotary evaporator จาก Buchi รุ่น Rotavapor R-210 ที่ประกอบกับอ่างน้ำร้อนจาก Buchi รุ่น B-491 โดยใช้ปั๊มจาก Daikawa รุ่น 2VP-250L
6. เครื่องย่อย จาก Tecator รุ่น 2020
7. เครื่องกลั่น จาก Kjeltec รุ่น 1026

2.4 วิธีการทดลอง

2.4.1 การเตรียมหอยเป๋าฮื้อตุ๋นสมุนไพร

ชั่งขิงสดหั่นละเอียด 100 กรัม ขมิ้นชันหั่นละเอียด 100 กรัม และหัวกระชายสดหั่นละเอียด กรัม เติมลงในหม้อตุ๋นที่มีน้ำปราศจากไอออนอยู่ 500 มิลลิลิตร นำไปให้ความร้อนบน hot plate เมื่อน้ำเดือดจึงใส่หอยเป๋าฮื้อสด 150 กรัม ต้มต่อไปเป็นเวลา 30 นาที หลังจากนั้นลดอุณหภูมิลงให้เหลือ 80 องศาเซลเซียส และเติมน้ำมันปาล์ม 400 มิลลิลิตร ตุ๋นไว้เป็นเวลา 2 วัน โดยคอยคนสม่ำเสมอ ตักฟองที่เกิดขึ้นทิ้ง และเติมน้ำมันพืชทดแทนบางส่วนที่อาจมีการระเหยไป จากนั้นแยกตัวหอยเป๋าฮื้อออกจากน้ำที่ตุ๋น นำน้ำตุ๋นไปกรองกากออกโดยใช้ผ้าขาวบาง และนำไปแยกชั้นน้ำมันออกจากชั้นน้ำโดยโดยเทน้ำตุ๋นที่กรองกากออกแล้วใส่กรวยแยก ทิ้งไว้ข้ามคืนเพื่อให้ชั้นน้ำแยกชั้นออกจากชั้นน้ำมัน จากนั้นแยกชั้นน้ำมันออกแล้วเก็บไว้ในขวดสีชา ส่วนชั้นน้ำนำไประเหยน้ำออกโดยใช้เครื่อง rotary evaporator จนชั้นน้ำกลายเป็น crude แห้งปราศจากน้ำ จะได้หอยเป๋าฮื้อตุ๋นสมุนไพร crude ของชั้นน้ำ และชั้นน้ำมันที่จะใช้ทำการทดลองต่อไป

2.4.2 การเตรียมหอยเป๋าฮื้อต้มสุก

ชั่งหอยเป๋าฮื้อสด 150 กรัม เติมลงในหม้อที่มีน้ำปราศจากไอออนอยู่ 500 มิลลิลิตร นำไปให้ความร้อนบน hot plate จนน้ำเดือด หลังจากนั้นลดอุณหภูมิลงให้เหลือ 80 องศาเซลเซียส แล้วต้มต่อไปเป็นเวลา 2 ชั่วโมง จะได้หอยเป๋าฮื้อต้มสุกที่จะใช้ทำการทดลองต่อไป

2.4.3 การทำแห้งเยือกแข็งหอยเป๋าฮื้อเพื่อดูการกำจัดน้ำออก (Dehydration) และการคืนน้ำ (Rehydration)

<u>1. การเตรียมตัวอย่าง</u>

- นำหอยเป๋าฮื้อสด หอยเป๋าฮื้อต้มสุกและหอยเป๋าฮื้อตุ๋นสมุนไพร มาชั่งน้ำหนักที่แน่นอน จากนั้นนำหอยเป๋าฮื้อสด หอยเป๋าฮื้อต้มสุกและหอยเป๋าฮื้อตุ๋นสมุนไพรที่ชั่งน้ำหนักแล้วไปแช่แข็งที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ทิ้งไว้ข้ามคืนจนตัวอย่างเป็นน้ำแข็งเพื่อที่จะนำไปเข้าเครื่องทำแห้งเยือกแข็งต่อไป

<u>2. การ Freeze dried ตัวอย่าง</u>

- นำหอยเป๋าฮื้อสด หอยเป๋าฮื้อต้มสุกและหอยเป๋าฮื้อตุ๋นสมุนไพรที่แช่แข็งแล้วไปเข้าเครื่องทำแห้งเยือกแข็งโดยคอยเติมน้ำแข็งแห้งเป็นระยะ
- ชั่งน้ำหนักหอยเป๋าฮื้อสด หอยเป๋าฮื้อต้มสุกและหอยเป๋าฮื้อตุ๋นสมุนไพรหลังจากทำแห้งเยือกแข็งทุกๆ 6 ชั่วโมง จนน้ำหนักของหอยเป๋าฮื้อสด หอยเป๋าฮื้อต้มสุกและหอยเป๋าฮื้อตุ๋นสมุนไพรคงที่แล้วจึงนำออกจากเครื่องทำแห้งเยือกแข็ง
- ชั่งน้ำหนักหอยเป๋าฮื้อสด หอยเป๋าฮื้อต้มสุกและหอยเป๋าฮื้อตุ๋นสมุนไพรหลังจากการทำแห้งเยือกแข็งเสร็จสิ้น

<u>3. การสังเกตการคืนน้ำ (Rehydration) ของตัวอย่าง</u>

- นำหอยเป๋าฮื้อสด หอยเป๋าฮื้อต้มสุกและหอยเป๋าฮื้อตุ๋นสมุนไพรที่ทำแห้งเยือกแข็งแล้วมาแช่ลงในบีกเกอร์ที่มีน้ำปราศจากไอออนอยู่ 50 มิลลิลิตร เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นนำหอยเป๋าฮื้อสด หอยเป๋าฮื้อต้มสุกและหอยเป๋าฮื้อตุ๋นสมุนไพรที่ rehydrate แล้ว มาชั่งน้ำหนัก และหาค่า % dehydration และ % rehydration โดยสามารถคำนวณได้จากสมการ

$$\% \text{ dehydration} = \frac{\text{น้ำหนักก่อนทำแห้งเยือกแข็ง} - \text{น้ำหนักหลังทำแห้งเยือกแข็ง}}{\text{น้ำหนักก่อนทำแห้งเยือกแข็ง}} \times 100$$

$$\% \text{ rehydration} = \frac{\text{น้ำหนักหลังคืนน้ำ}}{\text{น้ำหนักก่อนทำแห้งเยือกแข็ง}} \times 100$$

2.4.4 การหาปริมาณองค์ประกอบทางเคมีของหอยเป๋าฮื้อสดและหอยเป๋าฮื้อแปรรูป

1. การหาปริมาณความชื้น (Moisture) ในตัวอย่าง

- อบถ้วยอลูมิเนียมในตู้อบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส จนน้ำหนักคงที่ทำให้เย็นใน desiccator นำมาชั่งน้ำหนักที่แน่นอน
- ชั่งตัวอย่าง 3 กรัม ใส่ลงในถ้วยอลูมิเนียมที่อบแห้ง และบันทึกน้ำหนักที่แน่นอน
- นำถ้วยอลูมิเนียมที่บรรจุตัวอย่างเข้าอบที่อุณหภูมิ 105 ถึง 107 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 30 นาที นำเอามาใส่ใน desiccator ทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง
- นำไปชั่งน้ำหนักอบซ้ำครั้งละ 30 นาที จนได้น้ำหนักคงที่ซึ่งค่าที่ได้จะแตกต่างกันไม่เกิน 2 มิลลิกรัม จดน้ำหนักที่น้อยที่สุดของถ้วยอลูมิเนียมและน้ำหนักตัวอย่างหลังจากอบแห้งแล้วนำไปคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ความชื้นได้จากสมการ

$$\% \text{ Moisture} = \frac{\text{น้ำหนักที่หายไป (กรัม)} \times 100}{\text{น้ำหนักตัวอย่าง (กรัม)}}$$

2. การหาปริมาณเถ้า (Ash) ในตัวอย่าง

- อบ crucible ที่อุณหภูมิประมาณ 105 องศาเซลเซียส จนน้ำหนักคงที่ ทำให้เย็นใน desiccator นำมาชั่งน้ำหนักที่แน่นอน
- ชั่งตัวอย่าง 3 กรัม ใส่ลงใน crucible ที่ทราบน้ำหนักที่แน่นอนแล้วนำไปเผาด้วยไฟอ่อนๆ จนหมดควัน
- นำไปเผาในเตาเผาไฟฟ้าที่อุณหภูมิ 550 องศาเซลเซียส จนกระทั่งได้เถ้าสีขาว
- นำออกมาใส่ใน desiccator ทิ้งไว้ให้เย็น แล้วนำมาชั่งน้ำหนักที่แน่นอน นำไปคำนวณหาเปอร์เซ็นต์เถ้าได้จากสมการ

$$\% \text{ Ash} = \frac{\text{น้ำหนักเถ้า (กรัม)}}{\text{น้ำหนักตัวอย่าง (กรัม)}} \times 100$$

3. การหาปริมาณโปรตีน (Protein) ในตัวอย่าง

1. การเตรียมสารละลาย

- สารละลายมาตรฐานโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.1 N 100 มิลลิลิตร

  ชั่งโซเดียมไฮดรอกไซด์ปริมาณ 0.4 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่นที่ต้มจนเดือดแล้วทิ้งให้เย็น ปรับปริมาตรให้เป็น 100 มิลลิลิตร

- สารละลายมาตรฐานโพแทสเซียมไฮโดรเจนพธาเลต (KHP) 0.5 M 20 มิลลิลิตร

  ชั่ง Potassium hydrogen phthalate ที่อบแห้งแล้ว ณ อุณหภูมิ 103 องศาเซลเซียส ประมาณ 4 ชั่วโมง ปริมาณ 0.2042 กรัม ใส่ในขวดรูปกรวย ละลายด้วยน้ำกลั่น 20 มิลลิลิตร

- สารละลายมาตรฐานกรดไฮโดรคลอริก 0.1 N 100 มิลลิลิตร

  ปิเปตกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 0.83 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 100 มิลลิลิตร

- สารละลายกรดบอริกความเข้มข้น 4%

  ชั่งกรดบอริกปริมาณ 4 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่นร้อน และปรับปริมาตรให้เป็น 100 มิลลิลิตร

2. **การหาความเข้มข้นที่แน่นอนของสารละลายมาตรฐานโซเดียมไฮดรอกไซด์**

- นำสารละลายมาตรฐานโพแทสเซียมไฮโดรเจนพธาเลตที่เตรียมไว้มาเติมฟีนอล์ฟธาลีน 2 – 3 หยด นำไปไทเทรตกับสารละลายมาตรฐานโซเดียมไฮดรอกไซด์ 25 มิลลิลิตร จนกระทั่งสารละลายที่ไม่มีสีเปลี่ยนเป็นสารละลายสีชมพูอ่อน บันทึกปริมาตรสารละลายมาตรฐานโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ใช้และนำไปคำนวณหาความเข้มข้นที่แน่นอนของสารละลายมาตรฐานโซเดียมไฮดรอกไซด์

3. **การหาความเข้มข้นที่แน่นอนของสารละลายมาตรฐานกรดไฮโดรคลอริก**

- ปิเปตสารละลายมาตรฐานกรดไฮโดรคลอริก 10.00 มิลลิลิตรใส่ขวดรูปกรวย เติมฟีนอล์ฟธาลีน 2 – 3 หยด นำไปไทเทรตกับสารละลายมาตรฐานโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ทราบความเข้มข้นแล้ว บันทึกปริมาตรสารละลายมาตรฐานกรดไฮโดรคลอริกที่ใช้และนำไปคำนวณหาความเข้มข้นที่แน่นอนของสารละลายมาตรฐานกรดไฮโดรคลอริก

4. **การย่อยตัวอย่าง**

- ชั่งตัวอย่าง 1 กรัม ใส่ลงในหลอดสำหรับย่อย (digestion tube) หรือ ในกรณีที่เป็นตัวอย่างมีความชื้นสูงจะชั่งลงบนกระดาษกรองที่ปราศจากไนโตรเจน พับกระดาษใส่ลงในหลอดย่อยเพื่อทำเป็น blank
- เติม Kjeldahl catalyst 2 เม็ด และเติมกรดซัลฟูริกเข้มข้นลงไป 13 – 15 มิลลิลิตร ขึ้นกับปริมาณตัวอย่างที่ใช้ปล่อยให้ทำปฏิกิริยาจนไม่รุนแรง และเติม H_2O_2 36 % (v/v) 1 มิลลิลิตร
- ตั้งหลอดย่อยใน stand ปิด heat shield สวม exhaust manifold ลงบนส่วนบนของหลอดย่อย
- ตั้ง stand หลอดย่อย และ exhaust ลงบนเครื่องย่อยที่ตั้งอุณหภูมิไว้ ที่ 420 องศาเซลเซียส เพื่อความปลอดภัยควรทำการย่อยภายในตู้ดูดควัน เปิดเครื่องดูดไอกรด (scruber) และย่อยเป็นเวลา 5 นาที และลดวาวล์เพื่อลด อัตราการไหลไอกรดลงประมาณ 3 ระดับ ทำการย่อยจนตัวอย่างใส ใช้เวลาประมาณ 30 – 45 นาที
- ยก stand พร้อมหลอดย่อยตัวอย่างออก ปล่อยให้เย็นเพื่อรอนำไปกลั่น

5. การกลั่น

- นำ flask ซึ่งบรรจุกรดบอริกความเข้มข้น 4% ปริมาณ 25 มิลลิลิตรไปเติม mix indicator (Bromocresol green + Methyl red)จำนวน 4 หยด ตั้งไว้บน platform ของเครื่องกลั่นและยก platform ขึ้นให้ปลายแท่งแก้วจุ่มอยู่ใต้กรดบอริก
- ใส่หลอดตัวอย่างที่ผ่านการย่อยแล้วเข้ากับเครื่องกลั่น ปิด safety door เครื่องกลั่นจะเริ่มทำงาน
- นำไปกลั่นเป็นเวลา 3 - 4 นาที เมื่อกลั่นเสร็จนำ flask และหลอดย่อยออกจากเครื่องกลั่น
- นำ flask กรดบอริก ที่ดักจับแก๊สแอมโมเนียที่ถูกกลั่นออก ไปไทเทรตหาไนโตรเจนด้วยสารละลายมาตรฐานกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 0.1N โดยที่จุดยุติสีของสารละลายจะเปลี่ยนจากสีเขียวใสเป็นสีชมพูอ่อน นำไปคำนวณหาเปอร์เซ็นต์โปรตีนได้จากสมการ

$$\% \text{ Protein} = \frac{14.01 \times (V_1 - V_2) \times N \times CF}{\text{น้ำหนักตัวอย่าง (กรัม)} \times 10}$$

เมื่อ 14.01 คือ มวลโมเลกุลของไนโตรเจน

V_1 คือ ปริมาตรสารละลายกรดไฮโดรคลอริกที่ใช้ไทเทรตตัวอย่าง

V_2 คือ ปริมาตรสารละลายกรดไฮโดรคลอริกที่ใช้ไทเทรต blank

N คือ ความเข้มข้นของสารละลายกรดไฮโดรคลอริก ในหน่วยนอร์มัล (N)

CF คือ ค่า Conversion Factor ของการเปลี่ยนไนโตรเจนเป็นโปรตีน ซึ่งในอาหารมีค่าเป็น 6.25

4. การหาปริมาณไขมัน (Fat) ในตัวอย่าง

- นำตัวอย่างที่หาความชื้นแล้ว ประมาณ 3 กรัม ใส่บนกระดาษกรองและห่อมิดชิด
- นำตัวอย่างที่ห่ออยู่ในกระดาษกรอง ใส่ลงใน Thimble
- นำ Thimble ใส่ใน Extraction Unit of Soxhlet แล้วนำ Extraction cup ไปอบแล้วชั่งน้ำหนักที่แน่นอน
- เติมปิโตรเลียมอีเทอร์ลงในขวดกลั่นที่ทราบน้ำหนักที่แน่นอนประมาณ 150 มิลลิลิตรประกอบเครื่อง Soxhlet เข้าด้วยกัน
- ให้ความร้อนทำการสกัดไขมันจากตัวอย่างนานประมาณ 3 – 4 ชั่งโมง โดยปรับความร้อนให้หยดของสารทำละลายกลั่นจาก condenser มีอัตรา 150 หยดต่อนาที
- กลั่นเอาปิโตรเลียมอีเทอร์ออกจากไขมัน นำขวดกลั่นและไขมันไปอบที่อุณหภูมิ 80 – 90 องศาเซลเซียส นาน 30 นาทีแล้วชั่งน้ำหนัก
- อบซ้ำนานครั้งละ 30 นาที และชั่งน้ำหนักจนได้น้ำหนักคงที่ นำไปคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ไขมันได้จากสมการ

$$\% \text{ Fat} = \frac{\text{น้ำหนักถ้วย+ไขมัน (กรัม)} - \text{น้ำหนักถ้วย (กรัม)} \times 100}{\text{น้ำหนักตัวอย่าง (กรัม)}}$$

4. การหาปริมาณคาร์โบไฮเดรต (Charbohydrate) ในตัวอย่าง

การวิเคราะห์หาคาร์โบไฮเดรตที่ย่อยได้ง่าย (Nitrogen free extract, NFE) สามารถทำได้โดยการคำนวณจากสมการ

$$\% \text{ NFE} = 100 - (\%\text{Moisture} + \%\text{Ash} + \%\text{Protein} + \%\text{Fat} + \%\text{Fiber})$$

เมื่อ % NFE คือ เปอร์เซ็นต์คาร์โบไฮเดรทที่ย่อยได้ง่าย

%Moisture คือ เปอร์เซ็นต์ความชื้น

%Ash คือ เปอร์เซ็นต์เถ้า

%Protein คือ เปอร์เซ็นต์โปรตีน

%Fat คือ เปอร์เซ็นต์ไขมัน

%Fiber คือ เปอร์เซ็นต์ไฟเบอร์

โดยสามารถหาเปอร์เซ็นต์ไฟเบอร์ได้โดย

- นำตัวอย่างที่สกัดไขมันออกถ่ายลง ใน beaker ขนาด 600 มิลลิลิตร
- ตวงสารละลายกรดซัลฟูริก 1.25% ประมาณ 200 มิลลิลิตร นำเข้าเครื่องย่อย เมื่อสารเดือดปรับความร้อนลง (reflux) จับเวลา 30 นาที
- เมื่อครบเวลา ถ่ายตัวอย่างลง ใส่ผ้ากรอง ล้างด้วยน้ำร้อน ประมาณ 1 ลิตร แล้วถ่ายตัวอย่างลง ในบีกเกอร์ตามเดิม
- ตวงสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 1.25% ที่อุ่นไว้ประมาณ 200 มิลลิลิตร นำเข้าเครื่องย่อย เมื่อสารเดือดปรับความร้อนลง (reflux) จับเวลา 30 นาที
- เมื่อครบเวลาถ่ายตัวอย่างลง ใส่ crucible และล้างตัวอย่างด้วยน้ำร้อนจนหมดด่าง จะใช้น้ำร้อน ประมาณ 1,500 มิลลิลิตร
- นำ crucible ที่มีเยื่อ ใยไปอบจนแห้งที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส นาน 16-18 ชั่วโมง จากนั้นนำ crucible ออกมา ใส่โถดูดความชื้น ปล่อย ให้เย็นจากนั้นชั่งน้ำหนัก จดบันทึก
- นำ crucible ที่ชั่งน้ำหนักแล้วเข้า ในเตาเผาที่อุณหภูมิ 550 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง จากนั้นเปิดฝาเตาเผา รอ ให้ crucible มีอุณหภูมิลดลงประมาณ 150-200 องศาเซลเซียส แล้วนำไป ใส่โถดูดความชื้น ปล่อย ให้เย็นแล้วชั่งน้ำหนัก crucible จดบันทึก นำไปคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ไฟเบอร์ได้จากสมการ

$$\% \text{ Fiber} = \frac{(\text{น้ำหนัก crucible + น้ำหนักตัวอย่างหลังอบ}) - (\text{น้ำหนัก crucible + น้ำหนักตัวอย่างหลังเผา}) \times 100}{\text{น้ำหนักตัวอย่าง}}$$

2.4.5 การหาปริมาณเหล็ก สังกะสี และซีลิเนียม ในหอยเป๋าฮื้อสดและหอยเป๋าฮื้อแปรรูป

1. การเตรียมสารละลายมาตรฐาน selenium ที่ความเข้มข้นต่างๆ

- เตรียมสารละลายมาตรฐาน selenium ความเข้มข้น 20 ppm 25 มิลลิลิตร โดยปิเปตจาก Selenium standard for ICP-OES ความเข้มข้น 1000 ppm มา 0.5 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรเป็น 25 มิลลิลิตรด้วยน้ำ Milli-Q
- เตรียมสารละลายมาตรฐาน selenium ความเข้มข้น 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, และ 1.0 ppm ปริมาตร 25 มิลลิลิตร โดยเจือจางจากสารละลายมาตรฐาน selenium ความเข้มข้น 20 ppm และปรับปริมาตรเป็น 25 มิลลิลิตรด้วยน้ำ Milli-Q ดังแสดง ในตารางที่ 2.1

ตารางที่ 2.1 แสดงการเตรียมสารละลายมาตรฐาน selenium ที่ความเข้มข้นต่างๆ

ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน selenium (ppm)	ปริมาตรของสารละลายมาตรฐาน selenium (mL)
0.2	0.25
0.4	0.50
0.6	0.75
0.8	1.00
1.0	1.25

2. การเตรียมสารละลายมาตรฐาน zinc ที่ความเข้มข้นต่างๆ

- เตรียมสารละลายมาตรฐาน zinc ความเข้มข้น 200 ppm 25 มิลลิลิตร โดยปิเปตจาก zinc standard for ICP-OES ความเข้มข้น 1000 ppm มา 5 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรเป็น 25 มิลลิลิตรด้วยน้ำ Milli-Q
- เตรียมสารละลายมาตรฐาน zinc ความเข้มข้น 2, 4, 6, 8, และ 10 ppm ปริมาตร 25 มิลลิลิตร โดยเจือจางจากสารละลายมาตรฐาน zinc ความเข้มข้น 20 ppm และปรับปริมาตรเป็น 25 มิลลิลิตรด้วยน้ำ Milli-Q

ตารางที่ 2.2 แสดงการเตรียมสารละลายมาตรฐาน zinc ที่ความเข้มข้นต่างๆ

ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน zinc (ppm)	ปริมาตรของสารละลายมาตรฐาน zinc (mL)
2	0.25
4	0.50
6	0.75
8	1.00
10	1.25

3. การเตรียมสารละลายมาตรฐาน iron(III) ที่ความเข้มข้นต่างๆ

- เตรียมสารละลายมาตรฐาน iron(III) ความเข้มข้น 10, 20, 30, 40, และ 50 ppm ปริมาตร 25 มิลลิลิตร โดยเจือจางจากสารละลายมาตรฐาน iron(III) standard for ICP-OES ความเข้มข้น 1000 ppm และปรับปริมาตรเป็น 25 มิลลิลิตรด้วยน้ำ Milli-Q

ตารางที่ 2.3 แสดงการเตรียมสารละลายมาตรฐาน iron(III) ที่ความเข้มข้นต่างๆ

ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน iron(III) (ppm)	ปริมาตรของสารละลายมาตรฐาน iron(III) (mL)
10	0.25
20	0.50
30	0.75
40	1.00
50	1.25

4. การเตรียมสารละลายตัวอย่าง

- ชั่งหอยเป๋าฮื้อสด หอยเป๋าฮื้อสดทำแห้งเยือกแข็ง หอยเป๋าฮื้อต้มสุกและหอยเป๋าฮื้อตุ๋นสมุนไพรอย่างละ 1 กรัม นำไปย่อยด้วยกรดไนตริกเข้มข้น 6 M 8 มิลลิลิตร และ 10% hydrogen peroixde 2 มิลลิลิตร เมื่อย่อยเสร็จสมบรูณ์กรองสารละลายด้วยกระดาษกรองและปรับปริมาตรเป็น 25 มิลลิลิตรด้วยน้ำ Milli-Q

5. การหาปริมาณเหล็ก สังกะสี และซีลิเนียม ในหอยเป๋าฮื้อสดและหอยเป๋าฮื้อแปรรูปโดยใช้เทคนิค ICP-OES

- นำสารละลายมาตรฐาน Selenium, Zinc และ iron(III) มาตรวจวัดด้วยเครื่อง ICP-OES โดยเริ่มตรวจวัดจากความเข้มข้นต่ำไปความเข้มข้นสูงเพื่อนำไปทำกราฟมาตรฐาน
- นำสารละลายตัวอย่างมาตรวจวัดความเข้มข้นของ Fe Zn และ Se
- ทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้งเพื่อหาค่าเฉลี่ย

2.4.6 การหาปริมาณ curcumin ในหอยเป๋าฮื้อตุ๋นสมุนไพร

1. การเตรียมสารละลายมาตรฐาน curcumin ที่ความเข้มข้นต่างๆ

- เตรียมสารละลายมาตรฐาน curcumin ความเข้มข้น 100 ppm 10 มิลลิลิตร โดยชั่ง curcumin 1 มิลลิกรัม ละลาย ใน DMSO ปริมาตร 10 มิลลิลิตร
- เตรียมสารละลายมาตรฐาน curcumin ความเข้มข้น 1, 2, 3, 4 และ 5 ppm ปริมาตร 10 มิลลิลิตร โดยเจือจางจากสารละลายมาตรฐาน curcumin ความเข้มข้น 100 ppm และปรับปริมาตรเป็น 10 มิลลิลิตรด้วย DMSO

ตารางที่ 2.4 แสดงการเตรียมสารละลายมาตรฐาน curcumin ที่ความเข้มข้นต่างๆ

ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน curcumin (ppm)	ปริมาตรของสารละลายมาตรฐาน curcumin (mL)
1	0.1
2	0.2
3	0.3
4	0.4
5	0.5

2. การเตรียมสารละลายตัวอย่าง

- ปิเปตชั้นน้ำมันที่ได้จากการตุ๋นมา 50 ไมโครลิตร ละลายและปรับปริมาตรเป็น 10 มิลลิลิตร ด้วย DMSO

3. การหาปริมาณ curcumin โดยใช้เทคนิค UV-Vis spectrophotometry

- นำสารละลายมาตรฐาน curcumin ความเข้มข้น 5 ppm ปิเปตมา ใส่คิวเวต 2.5 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปวัดด้วยเครื่อง UV-Vis spectrophotometer โดยทำการแสกนหาความยาวคลื่นที่เหมาะสม ในการตรวจวัดโดย ใช้ DMSO เป็น blank เมื่อได้ค่าความยาวคลื่นที่เหมาะสม ในการตรวจวัดแล้ว นำสารละลายมาตรฐาน curcumin มาตรวจวัดวัดค่า absorbance โดยเริ่มตรวจวัดจากความเข้มข้นต่ำไปความเข้มข้นสูง จากนั้นนำสารละลายตัวอย่างมาตรวจวัดค่า absorbance
- ทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้งเพื่อหาค่าเฉลี่ย

2.4.7 การศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งโดยวิธี MTT

เตรียมเซลล์ 7 ชนิด คือ เซลล์มะเร็งเต้านม (BT474) เซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ (SW620) เซลล์มะเร็งเยื่อบุช่องปาก (KB) เซลล์มะเร็งปอด (A549) เซลล์มะเร็งตับ (HepG2) เซลล์มะเร็งปอด (CHAGO) และเซลล์มะเร็งกระเพาะอาหาร (KATO-III) โดยนำอาหารเลี้ยงเซลล์เก่าในขวดเพาะเลี้ยงเซลล์ออกก่อนโดยใช้ปิเปตดูด เติมเอนไซม์ trypsin ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในแต่ละเซลล์ รอเป็นเวลาประมาณ 5 นาทีหรือจนเซลล์เริ่มหลุดออกจากพื้นผิวของขวด และดูดเอาเอนไซม์ trypsin ออก แล้วเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ลงไปประมาณ 5 มิลลิลิตร ดูดสารขึ้นลงหลายๆครั้งเพื่อให้เซลล์เดี่ยวๆกระจายตัวอยู่อาหารเลี้ยงเชื้อและดูดใส่หลอดปราศจากเชื้อ

นับจำนวนเซลล์ โดยปิเปตมาประมาณ 10 ไมโครลิตร ใส่ hemacytometer แล้วนับจำนวนเซลล์ด้วยกล้องจุลทรรศน์ โดยปริมาณเซลล์ทั้งหมดได้มาจากการคำนวณโดยสูตรดังนี้

ปริมาณเซลล์ทั้งหมด (เซลล์/มิลลิลิตร) = ปริมาณเซลล์เฉลี่ยที่นับได้ × dilution factor × 10^4

จากนั้นเจือจางเซลล์ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ให้มีจำนวนเซลล์เท่ากับ 5,000 เซลล์/มิลลิลิตร ให้ได้ 20 มิลลิลิตร ต่อ plate จากนั้นปิเปตอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเซลล์เดี่ยวกระจายอยู่ 200 ไมโครลิตร ลง 96 well-plate และบ่มที่อุณหภูมิ 37 ˚C 5% คาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2) เป็นเวลา 1 วัน

เตรียมสารละลายของหอยเป๋าฮื้อสด หอยเป๋าฮื้อต้ม หอยเป๋าฮื้อตุ๋นสมุนไพร ชั้นน้ำจากการตุ๋นและชั้นน้ำมันจากการตุ๋นที่ความเข้มข้น 1 ×10^5 ppm โดยชั่งสารละลายหนัก 1 กรัมแล้วนำไปละลายในปริมาตร 10 มิลลิลิตร จากนั้นเจือจางให้มีความเข้มข้น 5 ×10^4, 1 ×10^4, 5 ×10^3, 5 ×10^3 ppm ตามลำดับ โดยการเตรียมสารละลายของหอยเป๋าฮื้อสด หอยเป๋าฮื้อต้ม และหอยเป๋าฮื้อตุ๋นสมุนไพรทำได้โดยนำตัวหอยเป๋าฮื้อที่ฟรีซดรายแล้วไปย่อยด้วยกรดไนตริกความเข้มข้น 6 M ส่วนการเตรียมสารละลายของชั้นน้ำจากการตุ๋นและชั้นน้ำมันจากการตุ๋นทำได้โดยนำ crude ของชั้นน้ำที่ได้หลังจากนำไประเหยน้ำออก และชั้นน้ำมันที่แยกได้ไปละลายใน DMSO หลังจากนั้นปิเปตแต่ละความเข้มข้นปริมาตร 2 ไมโครลิตร ลง 96 well-plate บ่มที่อุณหภูมิ 37 ˚C 5% คาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2) เป็นเวลา 3 วัน

ปิเปต MTT ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ลง ในทุกหลุม เคาะเบาๆ เพื่อ ให้กระจายทั่วเท่ากันภาย ในหลุม และบ่มที่อุณหภูมิ 37 ˚C 5% คาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2) เป็น เวลา 4 ชั่วโมง จะเกิดผลึกสีม่วงของ formazan ที่ก้นหลุม ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์และ MTT ออกจากหลุม จากนั้นเติม DMSO ปริมาตร 150 ไมโครลิตร ลง ในแต่ละหลุมเพื่อละลายผลึก formazan ได้เป็น สารละลายสีม่วงที่ความเข้มต่างๆกัน เคาะเบาๆ ให้ผลึกละลาย ให้หมด จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืน แสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Microtiter plate

ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 3

ผลการทดลองและอภิปรายผลการทดลอง

3.1 การทำแห้งเยือกแข็งหอยเป๋าฮื้อเพื่อดูการกำจัดน้ำออก (Dehydration) และการคืนน้ำ (Rehydration)

เมื่อนำหอยเป๋าฮื้อสด หอยเป๋าฮื้อต้มสุกและหอยเป๋าฮื้อตุ๋นสมุนไพร มาชั่งน้ำหนักที่แน่นอนก่อนนำไปทำแห้งเยือกแข็ง เมื่อดูลักษณะของหอยเป๋าฮื้อสด หอยเป๋าฮื้อต้มสุกและหอยเป๋าฮื้อตุ๋นสมุนไพร พบว่า หอยเป๋าฮื้อสด หอยเป๋าฮื้อต้มสุกและหอยเป๋าฮื้อตุ๋นสมุนไพรยังคงมีลักษณะที่ฉ่ำน้ำตามปกติของตัวหอยที่มีน้ำเป็นองค์ประกอบในร่างกาย ดังรูปที่ 3.1 และเมื่อทดลองจับดูพบว่าตัวของหอยเป๋าฮื้อมีลักษณะนิ่มและยืดหยุ่น

(a) (b) (c)

รูปที่ 3.1 (a) ลักษณะของหอยเป๋าฮื้อสดก่อนทำแห้งเยือกแข็ง
(b) ลักษณะของหอยเป๋าฮื้อต้มสุกก่อนทำแห้งเยือกแข็ง
(c) ลักษณะของหอยเป๋าฮื้อตุ๋นสมุนไพรก่อนทำแห้งเยือกแข็ง

จากนั้นนำหอยเป๋าฮื้อสด หอยเป๋าฮื้อต้มสุกและหอยเป๋าฮื้อตุ๋นสมุนไพรไปทำแห้งเยือกแข็ง แล้วนำมาชั่งน้ำหนักหลังทำแห้งเยือกแข็ง เมื่อดูลักษณะของหอยเป๋าฮื้อสด หอยเป๋าฮื้อต้มสุกและหอยเป๋าฮื้อตุ๋นสมุนไพรหลังฟรีซดราย พบว่า หอยเป๋าฮื้อสด หอยเป๋าฮื้อต้มสุกและหอยเป๋าฮื้อตุ๋นสมุนไพรมีลักษณะที่แห้ง มีความชื้นน้อยมากเมื่อเทียบกับก่อนฟรีซดราย ดังรูปที่ 3.2 และเมื่อทดลองจับดูพบว่าตัวของหอยเป๋าฮื้อมีลักษณะที่เหนียวและแข็ง ทั้งนี้เนื่องมาจากการทำแห้งเยือกแข็งเป็นการทำแห้งด้วยการแช่เยือกแข็ง ทำให้น้ำเปลี่ยนสถานะเป็นผลึกน้ำแข็งก่อน แล้วจึงลดความดันเพื่อให้ผลึกน้ำแข็งระเหิดเป็นไอ จึงสามารถกำจัดโมเลกุลของน้ำในตัวอย่างได้

(a) (b) (c)

รูปที่ 3.2 (a) ลักษณะของหอยเป๋าฮื้อสดหลังทำแห้งเยือกแข็ง

(b) ลักษณะของหอยเป๋าฮื้อต้มสุกหลังทำแห้งเยือกแข็ง

(c) ลักษณะของหอยเป๋าฮื้อตุ๋นสมุนไพรหลังทำแห้งเยือกแข็ง

หลังจากนั้นนำหอยเป๋าฮื้อสด หอยเป๋าฮื้อต้มสุกและหอยเป๋าฮื้อตุ๋นสมุนไพรที่ทำแห้งเยือกแข็งแล้วไปทำการคืนน้ำโดยแช่ลงในบีกเกอร์ที่มีน้ำปราศจากไอออนอยู่ 50 มิลลิลิตร เป็นเวลา 20 นาที เมื่อดูลักษณะของหอยเป๋าฮื้อสด หอยเป๋าฮื้อต้มสุกและหอยเป๋าฮื้อตุ๋นสมุนไพรหลังคืนน้ำ พบว่า หอยเป๋าฮื้อสด หอยเป๋าฮื้อต้มสุกและหอยเป๋าฮื้อตุ๋นสมุนไพรมีลักษณะที่ที่ฉ่ำน้ำ เมื่อทดลองจับดูพบว่าตัวของหอยเป๋าฮื้อมีลักษณะนิ่ม และยืดหยุ่น และมีลักษณะใกล้เคียงอยเป๋าฮื้อสด หอยเป๋าฮื้อต้มสุกและหอยเป๋าฮื้อตุ๋นสมุนไพรก่อนทำแห้งเยือกแข็งมาก ดังรูปที่ 3.3

(a) (b) (c)

รูปที่ 3.3 (a) ลักษณะของหอยเป๋าฮื้อสดหลังคืนน้ำ

(b) ลักษณะของหอยเป๋าฮื้อต้มสุกหลังคืนน้ำ

(c) ลักษณะของหอยเป๋าฮื้อตุ๋นสมุนไพรหลังคืนน้ำ

จากนั้นนำหอยเป๋าฮื้อสด หอยเป๋าฮื้อต้มสุกและหอยเป๋าฮื้อตุ๋นสมุนไพรที่คืนน้ำแล้ว มาชั่งน้ำหนัก พบว่า ได้ผลการทดลองดังตารางที่ 3.1

ตารางที่ 3.1 แสดงน้ำหนัก, % dehydration และ % rehydration ของหอยเป๋าฮื้อ

ตัวอย่าง	น้ำหนักก่อนฟรีซดราย (g)	น้ำหนักหลังฟรีซดราย (g)	น้ำหนักหลัง คืนน้ำ (g)	% dehydration	% rehydration
หอยเป๋าฮื้อสด	1.3587 ± 0.0004	0.6025 ± 0.0006	1.3545 ± 0.0004	55.66	99.69
หอยเป๋าฮื้อต้มสุก	2.2325 ± 0.0007	1.0027 ± 0.0003	2.2235 ± 0.0004	55.09	99.60
หอยเป๋าฮื้อตุ๋นสมุนไพร	2.4378 ± 0.0006	1.0860 ± 0.0004	2.4163 ± 0.0006	55.45	99.12

จากตารางที่ 3.1 สามารถคำนวณ % dehydration ของหอยเป๋าฮื้อสดได้เป็น 55.66% โดยน้ำหนัก ซึ่งโดยปกติแล้วในหอยเป๋าฮื้อสดจะมีน้ำเป็นส่วนประกอบในร่างกายอยู่ประมาณ 75% โดยน้ำหนัก เมื่อนำไปเทียบกับค่า % dehydration ของหอยเป๋าฮื้อสดที่หาได้แล้วนำมาคำนวณ พบว่า การทำแห้งเยือกแข็งสามารถกำจัดน้ำในหอยเป๋าฮื้อได้สูงถึง 74.08% เทียบกับน้ำหนักของน้ำในตัวหอยเป๋าฮื้อสด และเมื่อพิจารณา % rehydration ของหอยเป๋าฮื้อสด หอยเป๋าฮื้อต้มสุกและหอยเป๋าฮื้อตุ๋นสมุนไพร พบว่า มีค่าสูงเกือบ 100% แสดงให้เห็นว่าหอยเป๋าฮื้อที่ทำแห้งเยือกแข็งแล้วสามารถคืนน้ำแล้วคืนรูปได้ใกล้เคียงกับหอยเป๋าฮื้อก่อนทำแห้งเยือกแข็งโดยที่น้ำหนักเปลี่ยนไปเพียงเล็กน้อยเท่านั้น อีกทั้งลักษณะภายนอกยังไม่เปลี่ยนไปจากก่อนทำแห้งเยือกแข็ง ดังนั้นการทำแห้งเยือกแข็งจึงถือว่าเป็นวิธีการถนอมอาหารที่ดีวิธีหนึ่ง นอกจากจะคืนรูปได้ใกล้เคียงสภาพเดิมแล้ว การทำแห้งเยือกแข็งยังคงรักษาคุณค่าของอาหารเนื่องจากไม่ได้ใช้ความร้อนทำให้สารอาหารต่างๆไม่สูญสลายไป

3.2 การหาปริมาณองค์ประกอบทางเคมีของหอยเป๋าฮื้อสดและหอยเป๋าฮื้อแปรรูป

เมื่อนำหอยเป๋าฮื้อสด หอยเป๋าฮื้อต้มสุกและหอยเป๋าฮื้อตุ๋นสมุนไพรมาหาปริมาณองค์ประกอบทางเคมีโดยโดยตรวจวัด ash โดยใช้วิธี Dry-ashing ตรวจวัดโปรตีนโดยใช้วิธี Kjeldahl โดยใช้ค่า conversion factor เป็น 6.25 ตรวจวัดไขมันโดยใช้วิธีสกัดด้วย petroleum ether ตรวจวัดคาร์โบไฮเดรตโดยใช้วิธีการคำนวณจากสูตรการหาปริมาณคาร์โบไฮเดรตซึ่งเป็นวิธีมาตรฐานในการวิเคราะห์อาหาร และตรวจวัดความชื้นโดยวิธีวิเคราะห์ความชื้นด้วยการอบแห้งแล้วได้ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 3.2

ตารางที่ 3.2 แสดงปริมาณองค์ประกอบทางเคมีของหอยเป๋าฮื้อสด หอยเป๋าฮื้อต้มสุกและหอยเป๋าฮื้อตุ๋นสมุนไพร

ตัวอย่าง	โปรตีน (g/100g)	เถ้า (g/100g)	ความชื้น (g/100g)	ไขมัน (g/100g)	คาร์โบไฮเดรต (g/100g)
หอยเป๋าฮื้อสด	19.2	1.8	78.9	1.1	2.5
หอยเป๋าฮื้อต้มสุก	15.7	0.8	77.9	1.1	1.0
หอยเป๋าฮื้อตุ๋นสมุนไพร	13.6	1.1	73.0	8.9	3.4
หอยเป๋าฮื้อสด (ทำแห้งเยือกแข็ง)	17.7	1.6	28.1	1.0	2.1
หอยเป๋าฮื้อสด (อ้างอิง)	17.1	1.6	74.6	0.8	6.0

จากตารางที่ 3.2 เมื่อเปรียบเทียบปริมาณโปรตีนที่หาได้ของหอยเป๋าฮื้อสด หอยเป๋าฮื้อต้มสุกและหอยเป๋าฮื้อตุ๋นสมุนไพร พบว่า ในหอยเป๋าฮื้อสดมีปริมาณโปรตีนสูงกว่าหอยเป๋าฮื้อต้มสุกและหอยเป๋าฮื้อตุ๋นสมุนไพร ทั้งนี้เป็นเพราะว่าการให้ความร้อนกับโปรตีนนานๆจะทำให้โปรตีนเกิดการเสียสภาพธรรมชาติ (denaturation) ซึ่งถ้าให้ความร้อนเป็นเวลานานๆจะทำให้โปรตีนไมโอโกบิลที่มีอยู่ในเนื้อสัตว์เสียสภาพและปลดปล่อยหมู่ซัลฟ์ไฮดริล (-SH) ออกจากโมเลกุลของกรดอะมิโนจำพวกซิสเตอีน (cystein) ทำให้โปรตีนถูกทำลายไปซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองเนื่องจากหอยเป๋าฮื้อต้มสุกและหอยหอยเป๋าฮื้อตุ๋นสมุนไพรถูกให้ความร้อนเป็นเวลานานจึงมีปริมาณโปรตีนที่น้อยกว่าหอยเป๋าฮื้อสด

เมื่อเปรียบเทียบปริมาณเถ้าที่หาได้ของหอยเป๋าฮื้อสด หอยเป๋าฮื้อต้มสุกและหอยเป๋าฮื้อตุ๋นสมุนไพร พบว่า ในหอยเป๋าฮื้อสดมีปริมาณเถ้าสูงกว่าหอยเป๋าฮื้อต้มสุกและหอยเป๋าฮื้อตุ๋นสมุนไพร ทั้งนี้เป็นเพราะว่าการให้ความร้อนกับตัวอย่างนั้นจะทำให้เกิดการสูญเสียแร่ธาตุ (demineralisation) บางส่วนออกไปจากตัวหอยเป๋าฮื้อไปอยู่ในชั้นน้ำที่ต้มหรือตุ๋น ทำให้ปริมาณเถ้าที่วัดได้มีปริมาณน้อยกว่าเถ้าของหอยเป๋าฮื้อสด ดังนั้นแสดงว่าผลการทดลองนี้มีความสอดคล้อง

เมื่อเปรียบเทียบปริมาณความชื้นที่หาได้ของหอยเป๋าฮื้อสด หอยเป๋าฮื้อต้มสุกและหอยเป๋าฮื้อตุ๋นสมุนไพร พบว่า ในหอยเป๋าฮื้อสดมีปริมาณความชื้นใกล้เคียงกับหอยเป๋าฮื้อต้มสุกแต่สูงกว่าหอยเป๋าฮื้อตุ๋นสมุนไพร ทั้งนี้เป็นเพราะว่าการตุ๋นซึ่งเป็นการให้ความร้อนในเวลาที่ยาวนานจะทำให้หอยเป๋าฮื้อสูญเสียน้ำบางส่วนออกไป ในขณะเดียวกันซึ่งน้ำมันที่ใช้ในการตุ๋นสามารถเข้ามาแทนที่น้ำในตัวหอยเป๋าฮื้อได้บางส่วน ทำให้หอยเป๋าฮื้อตุ๋นสมุนไพรมีปริมาณความชื้นที่ต่ำกว่าหอยเป๋าฮื้อสดและหอยเป๋าฮื้อต้มสุก

เมื่อเปรียบเทียบปริมาณไขมันที่หาได้ของหอยเป๋าฮื้อสด หอยเป๋าฮื้อต้มสุกและหอยเป๋าฮื้อตุ๋นสมุนไพร พบว่า ในหอยเป๋าฮื้อสดมีปริมาณไขมันใกล้เคียงกับหอยเป๋าฮื้อต้มสุกแต่ต่ำกว่าหอยเป๋าฮื้อตุ๋นสมุนไพรมาก ทั้งนี้เนื่องมาจากในการตุ๋นหอยเป๋าฮื้อตุ๋นสมุนไพรนั้นมีส่วนผสมของน้ำที่ใช้ตุ๋นเป็นน้ำมันปาล์มในปริมาณที่ค่อนข้างสูง เมื่อตุ๋นไปเรื่อยๆทำให้น้ำมันเข้ามาแทนที่น้ำในตัวหอยเป๋าฮื้อที่สูญเสียไป ดังนั้นแสดงว่าผลการทดลองนี้มีความสอดคล้อง

เมื่อเปรียบเทียบปริมาณคาร์โบไฮเดรตที่หาได้ของหอยเป๋าฮื้อสด หอยเป๋าฮื้อต้มสุกและหอยเป๋าฮื้อตุ๋นสมุนไพร พบว่า ในหอยเป๋าฮื้อสดมีปริมาณคาร์โบไฮเดรตสูงกว่ากับหอยเป๋าฮื้อต้มสุกแต่ต่ำกว่าหอยเป๋าฮื้อตุ๋นสมุนไพร ทั้งนี้เนื่องมาจากในการตุ๋นหอยเป๋าฮื้อตุ๋นสมุนไพรนั้นมีส่วนผสมของสมุนไพรเป็นขมิ้นชัน ขิง และกระชาย ซึ่งสมุนไพรเหล่านี้มีส่วนประกอบเป็นคาร์โบไฮเดรตที่อยู่ในรูปของน้ำตาล ดังนั้นเมื่อตุ๋นไปเรื่อยๆทำให้น้ำตาลสามารถเข้ามาอยู่ในตัวหอยเป๋าฮื้อได้ ทำให้หอยเป๋าฮื้อตุ๋นสมุนไพรมีปริมาณคาร์โบไฮเดรตสูงกว่าหอยเป๋าฮื้อสดและหอยเป๋าฮื้อต้มสุก

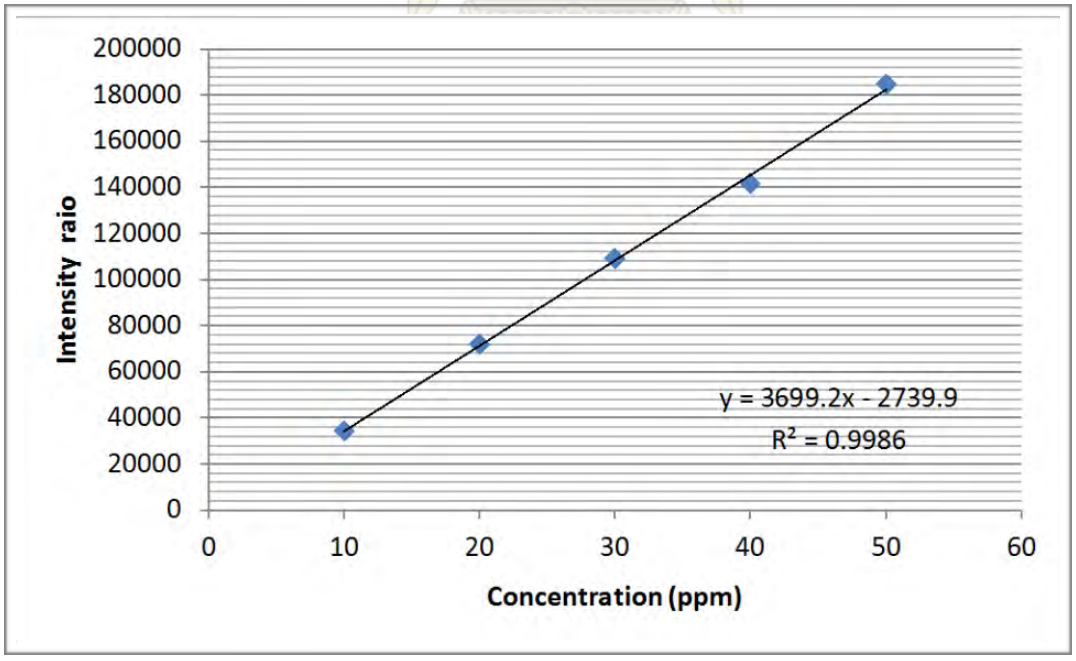
เมื่อเปรียบเทียบปริมาณปริมาณองค์ประกอบทางเคมีของหอยเป๋าฮื้อสดกับหอยเป๋าฮื้อสดทำแห้งเยือกแข็งพบว่าหอยเป๋าฮื้อสดที่ทำแห้งเยือกแข็งแล้วมีปริมาณองค์ประกอบทางเคมีน้อยกว่าเพียงเล็กน้อย ยกเว้นความชื้นซึ่งมีน้อยกว่ามาก ทั้งนี้เนื่องจากการทำแห้งเยือกแข็งเป็นการขจัดน้ำออกจากอาหารโดยไม่ทำให้ตัวอย่างสูญเสียคุณค่าทางโภชนาการ ดังนั้นแสดงว่าผลการทดลองนี้มีความสอดคล้อง

เมื่อเปรียบเทียบปริมาณปริมาณองค์ประกอบทางเคมีที่หาได้ของหอยเป๋าฮื้อสดกับค่าอ้างอิง พบว่ามีค่าค่อนข้างใกล้เคียงกันกันแต่ก็มีความคลาดเคลื่อนเกิดขึ้น ทั้งนี้เนื่องจากข้อมูลอ้างอิงเป็นข้อมูลของหอยเป๋าฮื้อหลายสายพันธุ์มาเฉลี่ยกัน ทำให้ค่าไม่ตรงกับสายพันธุ์ที่เลือกมาทำการทดลอง อีกทั้งปริมาณองค์ประกอบทางเคมีของหอยเป๋าฮื้อยังขึ้นอยู่กับปัจจัยอื่นๆอีก เช่น อาหาร และสภาพแวดล้อม เป็นต้น

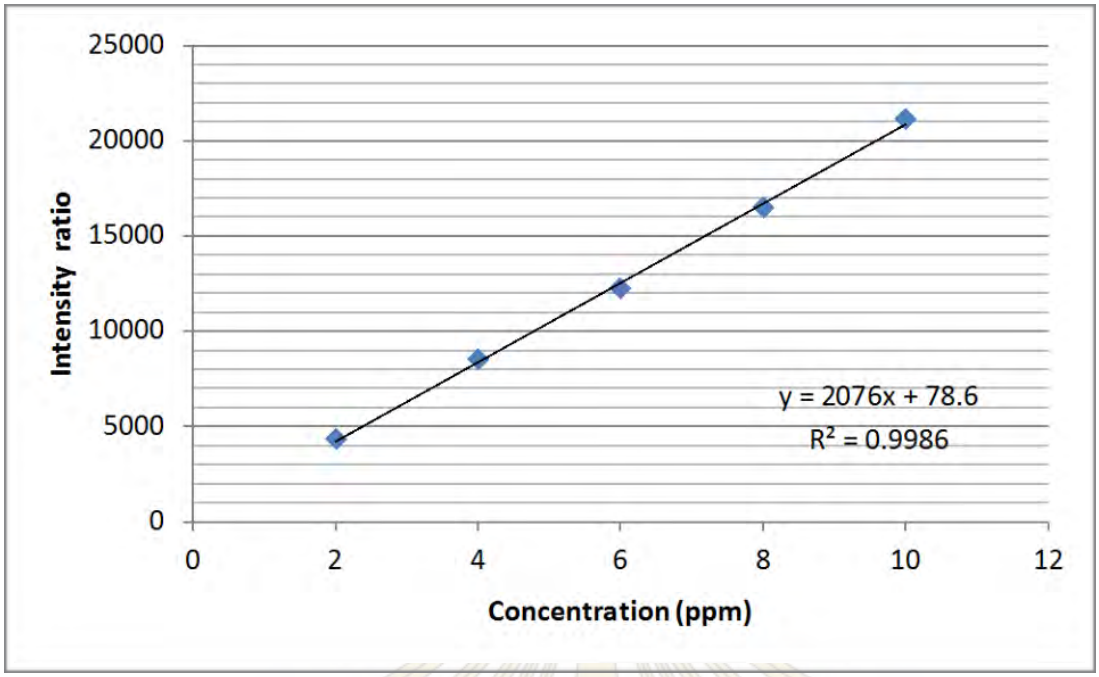
3.3 การหาปริมาณ เหล็ก สังกะสี และซีลิเนียม ในหอยเป๋าฮื้อสดและหอยเป๋าฮื้อแปรรูป

ในการทดลองนี้ผู้ทดลองสนใจที่จะทำการทดลองที่จะหาปริมาณเหล็ก สังกะสี และซีลิเนียม ซึ่งเป็นแร่ธาตุที่เป็น micronutrients ซึ่งจำเป็นต่อร่างกายถึงแม้จะปริมาณน้อยแต่หากขาดธาตุเหล่านี้ก็จะทำให้เกิดความผิดปกติต่อร่างกายได้ หอยเป๋าฮื้อเป็นหอยชนิดหนึ่งที่มีปริมาณเหล็ก สังกะสี และซีลิเนียม ที่ค่อนข้างสูงเมื่อเทียบกับหอยชนิดอื่น ดังนั้นในการทดลองนี้จึงอยากจะหาปริมาณของเหล็ก สังกะสี และซีลิเนียมที่อยู่ในหอยเป๋าฮื้อสด หอยเป๋าฮื้อต้มสุกและหอยเป๋าฮื้อตุ๋นสมุนไพรว่ามีปริมาณเท่าใด

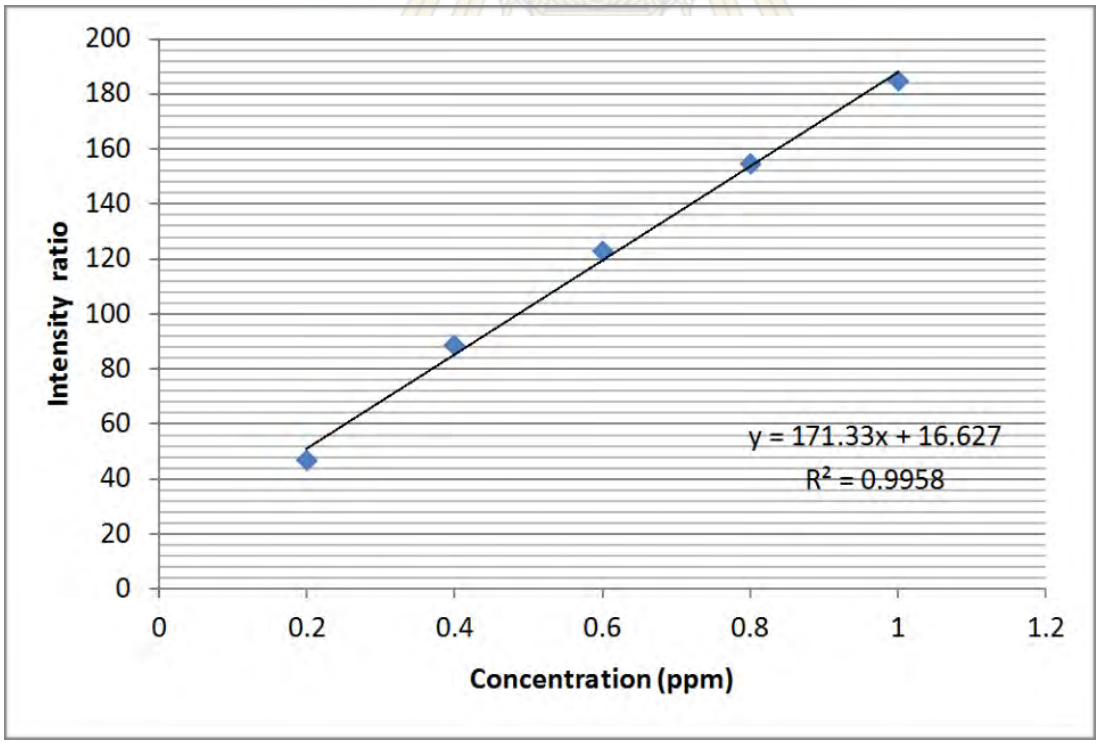
การหาปริมาณเหล็ก สังกะสี และซีลิเนียมสามารถทำได้โดยการสร้างกราฟมาตรฐานของความเข้มข้นของเหล็ก สังกะสี และซีลิเนียมกับค่าสัดส่วนความเข้มของสัญญาณ (intensity ratio) ที่ตรวจวัดได้จากเครื่อง ICP-OES โดยผู้ทดลองได้ทำการเตรียมสารละลายมาตรฐาน selenium ความเข้มข้น 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, และ 1.0 ppm สารละลายมาตรฐาน zinc ความเข้มข้น 2, 4, 6, 8, และ 10 ppm และสารละลายมาตรฐาน iron(III)_ความเข้มข้น 10, 20, 30, 40, และ 50 ppm และนำไปตรวจวัดด้วยเทคนิค ICP-OES เพื่อนำไปทำกราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นของเหล็ก สังกะสี และซีลิเนียมกับค่าสัดส่วนความเข้มของสัญญาณ ได้กราฟมาตรฐานเป็นดังนี้



รูปที่ 3.4 กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างเหล็กที่ความเข้มข้นต่างๆกับค่าสัดส่วนความเข้มของสัญญาณ



รูปที่ 3.5 กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างสังกะสีที่ความเข้มข้นต่างๆกับค่าสัดส่วนความเข้มของสัญญาณ



รูปที่ 3.6 กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างซีลิเนียมที่ความเข้มข้นต่างๆกับค่าสัดส่วนความเข้มของสัญญาณ

ต่อมานำหอยเป๋าฮื้อสด หอยเป๋าฮื้อต้มสุกและหอยเป๋าฮื้อตุ๋นสมุนไพรที่นำไปย่อย กรอง และปรับปริมาตรแล้วมาวัดหาค่าสัดส่วนความเข้มของสัญญาณของเหล็ก สังกะสี และซีลิเนียม เพื่อนำไปคำนวณหาค่าความเข้มข้นของของเหล็ก สังกะสี และซีลิเนียมในหอยเป๋าฮื้อสด หอยเป๋าฮื้อต้มสุกและหอยเป๋าฮื้อตุ๋นสมุนไพร ได้ค่าความเข้มข้นออกมาดังตารางที่ 3.3

ตารางที่ 3.3 แสดงปริมาณของเหล็ก สังกะสี และซีลิเนียมในหอยเป๋าฮื้อสด หอยเป๋าฮื้อต้มสุกและหอยเป๋าฮื้อตุ๋นสมุนไพร

ตัวอย่าง	Fe (mg/100g)	Zn (mg/100g)	Se (µg/100g)
หอยเป๋าฮื้อสด	2.9	0.9	37.2
หอยเป๋าฮื้อต้มสุก	2.6	0.4	29.4
หอยเป๋าฮื้อตุ๋นสมุนไพร	2.4	0.3	28.7
หอยเป๋าฮื้อสด (ฟรีซดราย)	2.6	0.6	31.3
หอยเป๋าฮื้อสด (อ้างอิง)	3.2	0.8	44.8

เมื่อพิจารณาค่าความเข้มข้นของของเหล็ก สังกะสี และซีลิเนียมในหอยเป๋าฮื้อสดที่วัดได้เปรียบเทียบกับค่าอ้างอิงพบว่ามีความคลาดเคลื่อนเกิดขึ้น โดยนำไปคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ความคลาดเคลื่อนได้เป็น % $error_{Fe}$ มีค่าเท่ากับ 9.4% , % $error_{Zn}$ มีค่าเท่ากับ 12.5 % และ % $error_{Se}$ มีค่าเท่ากับ 16.9 % ซึ่งสาเหตุของความคลาดเคลื่อนนั้นอาจเกิดได้จากหลายสาเหตุทั้งเกิดจากผู้ทดลองและความคลาดเคลื่อนยินยอมของอุปกรณ์ที่ใช้ สาเหตุหลักของความคลาดเคลื่อนนั้นผู้ทดลองคาดว่าอาจเกิดจากการใช้เครื่อง ICP-OES เนื่องจากเครื่อง ICP-OES เป็นของส่วนรวมและมีการใช้งานในการวิเคราะห์ธาตุโลหะแบบ multielements ทำให้มีอะตอมของธาตุบางชนิดตกค้างอยู่ในเครื่องกลายเป็นสัญญาณรบกวนการวิเคราะห์

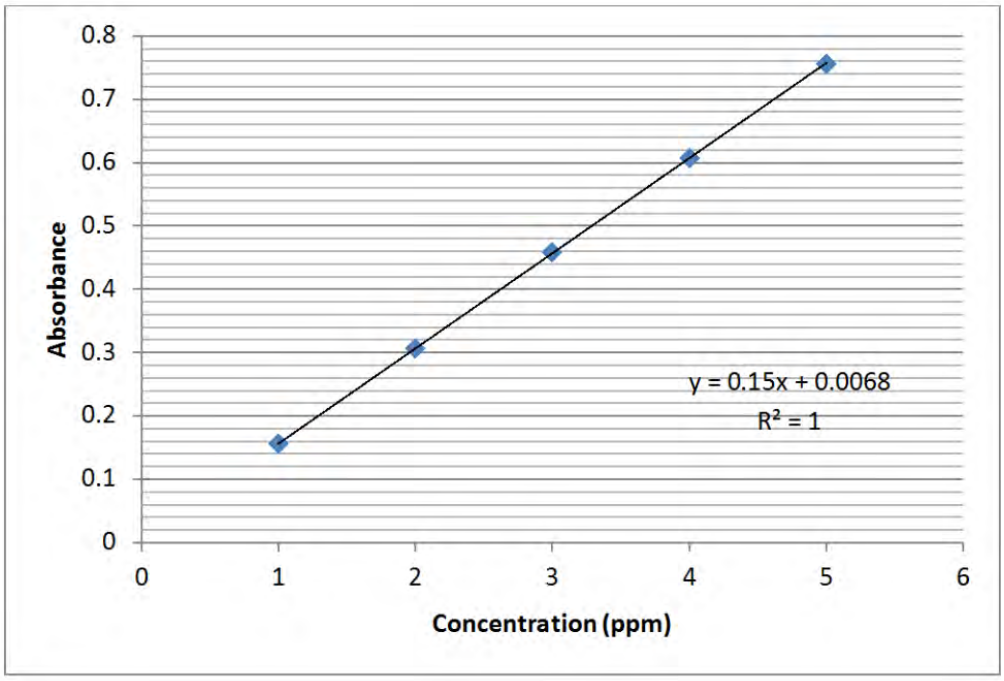
เมื่อพิจารณาค่าความเข้มข้นของของเหล็ก สังกะสี และซีลิเนียมในหอยเป๋าฮื้อต้มสุกและหอยเป๋าฮื้อตุ๋นสมุนไพรที่วัดได้เทียบกับหอยเป๋าฮื้อสดที่วัดได้ พบว่าค่าความเข้มข้นของของเหล็ก สังกะสี และซีลิเนียมในหอยเป๋าฮื้อต้มสุกและหอยเป๋าฮื้อตุ๋นสมุนไพรมีค่าน้อยกว่าค่าความเข้มข้นในหอยเป๋าฮื้อสด ทั้งนี้เป็นเพราะว่าหอยเป๋าฮื้อต้มสุกและหอยเป๋าฮื้อตุ๋นสมุนไพรได้ผ่านกระบวนการให้ความร้อนมา ซึ่งการให้ความร้อนกับตัวอย่างนั้นจะทำให้เกิดการสูญเสียแร่ธาตุ (demineralisation)บางส่วนออกไปจากตัวหอยเป๋าฮื้อไปอยู่ในชั้นน้ำที่ต้มหรือตุ๋น ซึ่งผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับผลการทดลองก่อนหน้าโดยดู

จากปริมาณเถ้าที่ตรวจวัดได้ ซึ่งเถ้า (Ash) คือ ส่วนของสารอนินทรีย์ (inorganic) ที่อยู่ในตัวหอยเป๋าฮื้อ ซึ่งได้แก่แร่ธาตุต่าง ๆ เมื่อนำตัวอย่างไปเผาที่อุณหภูมิ 550-600 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง ส่วนที่เป็นสารอินทรีย์จะถูกเผาไหม้หมดไป เหลืออยู่แต่ส่วนของสารอนินทรีย์ เมื่อพิจารณาปริมาณเถ้าที่ตรวจวัดได้ พบว่าปริมาณเถ้าของหอยเป๋าฮื้อต้มสุกและหอยเป๋าฮื้อตุ๋นสมุนไพรมีค่าน้อยกว่าปริมาณเถ้าของหอยเป๋าฮื้อสดเช่นกัน ส่วนความเข้มข้นของของเหล็ก สังกะสี และซีลิเนียมในหอยเป๋าฮื้อสดที่ฟรีซ ดรายแล้วมีค่าน้อยกว่าค่าความเข้มข้นในหอยเป๋าฮื้อสดแต่มากกว่าหอยเป๋าฮื้อต้มสุกและหอยเป๋าฮื้อตุ๋นสมุนไพร แสดงว่าการฟรีซดรายเป็นการแปรรูปอาหารที่สามารถรักษาคุณค่าทางโภชนาการได้ดีกว่าการต้มหรือตุ๋นเนื่องจากการฟรีซดรายไม่ได้ใช้ความร้อนจึงทำให้สูญเสียสารอาหารน้อยกว่าการต้มหรือตุ๋น

3.4 การหาปริมาณ curcumin ในหอยเป๋าฮื้อตุ๋นสมุนไพร

curcumin เป็นสารสีเหลืองสกัดจากขมิ้นชัน (*Curcuma longa* Linn.) ซึ่งเคอร์คูมินมีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่ดี จึงนำมาใช้ประโยชน์ทั้งทางด้านยา อาหาร และเครื่องสำอาง ได้มีการวิจัยทั้งในคนและสัตว์ทดลองพบว่า เคอร์คูมินมีฤทธิ์ต้านการอักเสบ ฤทธิ์บำรุงรักษาตับ ช่วยป้องกันมะเร็งหลายชนิดโดยออกฤทธิ์ที่เอนไซม์ ระยะหนึ่งและสอง (Phase I, II carcinogen-metabolizing enzymes) ในการทำงานก่อมะเร็งของสารเหนี่ยวนำมะเร็ง นอกจากนี้ยังมีฤทธิ์ในการลดระดับโคเลสเตอรอล และฤทธิ์ในการป้องกันสมองเสื่อมด้วย ดังนั้นในการทดลองนี้ผู้ทดลองจึงอยากจะหาปริมาณของ curcumin ที่อยู่ในชั้นน้ำมันของหอยเป๋าฮื้อตุ๋นสมุนไพรว่ามี curcumin อยู่จริงหรือไม่และมีปริมาณเท่าใด

การหาปริมาณเคอร์คูมินสามารถทำได้โดยการสร้างกราฟมาตรฐานของ curcumin รูปที่ 3.7 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ curcumin (ppm) กับค่าการดูดกลืนแสง (absorbance) ที่ความยาวคลื่น 425 นาโนเมตร โดยเตรียมสารละลายมาตรฐาน curcumin ที่ความเข้มข้น 1, 2, 3, 4, และ 5 ppm



รูปที่ 3.7 กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง curcumin **ที่ความเข้มข้นต่างๆกับค่าการดูดกลืนแสง**

ในการทดลองนี้ผู้ทดลองได้ทำการทดลองโดยนำสารละลายมาตรฐาน curcumin ที่ความเข้มข้น 5 ppm มาแสกนหาค่าความยาวคลื่นที่ให้ค่าการดูดกลืนแสงสูงที่สุด พบว่าค่าความยาวคลื่นที่ให้ค่าการดูดกลืนแสงสูงที่สุดคือ 425 นาโนเมตร ดังนั้นจึงทำกราฟมาตรฐานที่ค่าความยาวคลื่นนี้

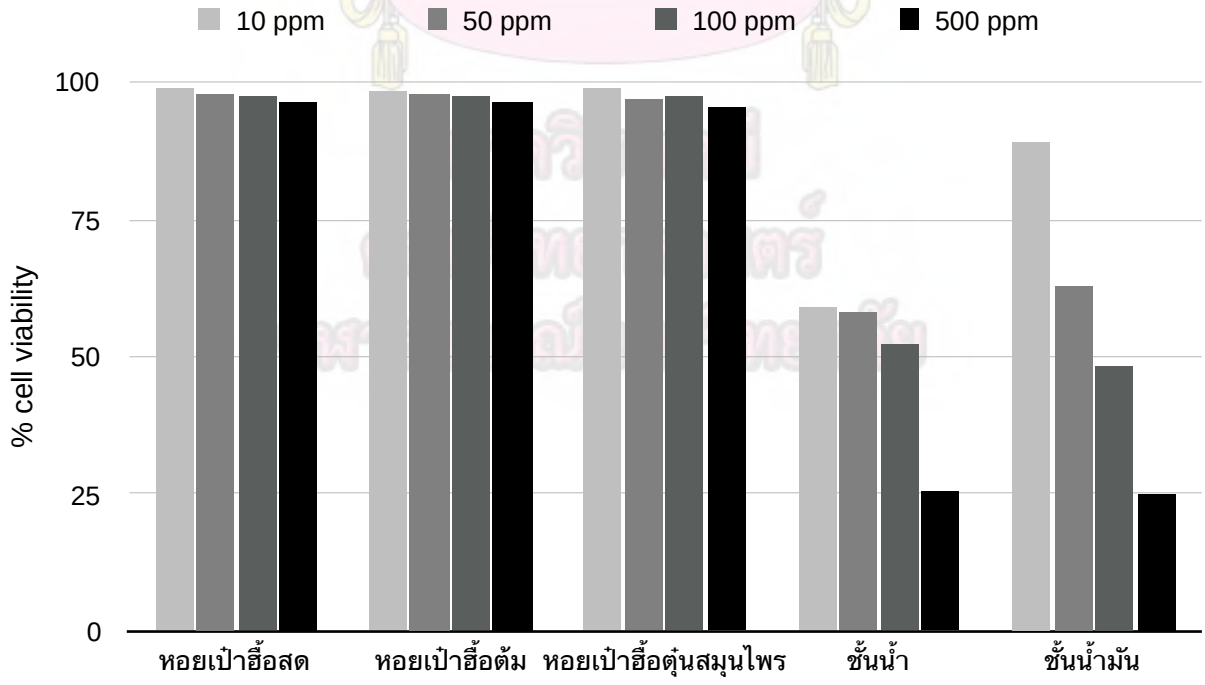
จากกราฟมาตรฐานของเคอร์คูมินได้สมการเส้นตรง $y = 0.15x + 0.0068$ มีค่า $R^2 = 1$ ต่อมานำชั้นน้ำมันที่ได้จากการตุ๋นมาวัดค่าการดูดกลืนแสงโดยปิเปตชั้นน้ำมันที่ได้จากการตุ๋นมา 50 ไมโครลิตร ละลายและปรับปริมาตรเป็น 10 มิลลิลิตรด้วย DMSO ได้เป็นสารละลายสีเหลืองใสแล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง พบว่าได้ค่าการดูดกลืนแสงเป็น 0.540 ซึ่งอยู่ในช่วงของกราฟมาตรฐาน เมื่อนำมาคิดค่าความเข้มข้นได้ค่าออกมาเป็น 3.55 ppm ต่อสารตัวอย่าง 2.5 มิลลิลิตร ดังนั้นสามารถกล่าวได้ว่าชั้นน้ำมันที่ได้จากการตุ๋นมีเคอร์คูมินอยู่จริงโดยมีความเข้มข้น 3.55 ppm ต่อสารตัวอย่าง 2.5 มิลลิลิตร

3.5 ศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งโดยวิธี MTT

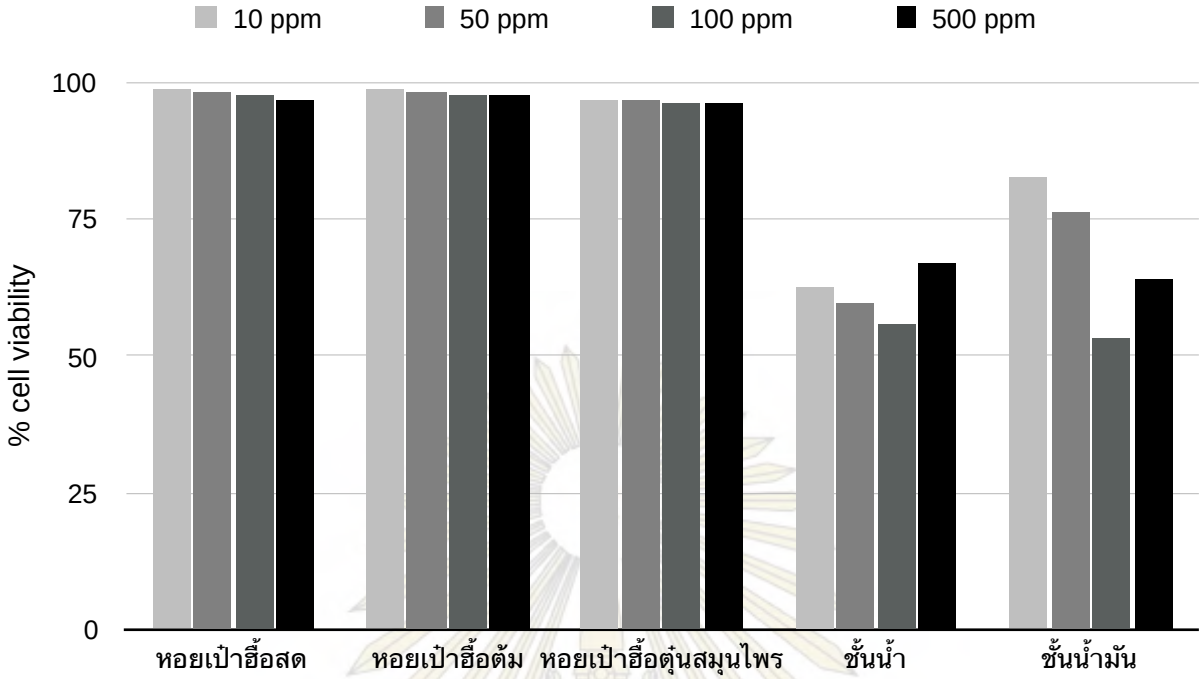
การศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง ใช้วิธี MTT เพื่อแสดงผลเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของเซลล์เมื่อเซลล์ได้รับสารตัวอย่าง และสามารถบอกความเป็นพิษของสารตัวอย่างด้วยค่า IC_{50} (half maximal inhibitory concentration) หมายถึง ค่าความเข้มข้นของสารที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ได้ 50% ซึ่งวิธีนี้จะอาศัยลักษณะเฉพาะของเซลล์ที่มีชีวิต คือเซลล์ที่มีชีวิตสามารถใช้เอนไซม์ succinate dehydrogenase ไปรีดิวซ์ MTT ซึ่งเป็นสารที่มีสีเหลือง ให้เปลี่ยนเป็น formazan ซึ่งมีลักษณะเป็นผลึกสีม่วงทำให้มีความสามารถในการดูดกลืนแสงที่ช่วงความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร ดังนั้นจึงกล่าวได้ว่าค่าการดูดกลืนแสงแปรผันตรงกับปริมาณเซลล์ที่มีชีวิต และสามารถคำนวณเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของเซลล์ได้จากสูตร

$$\% \text{ cell viability} = \frac{\text{treated cells}}{\text{untreated cells}} \times 100$$

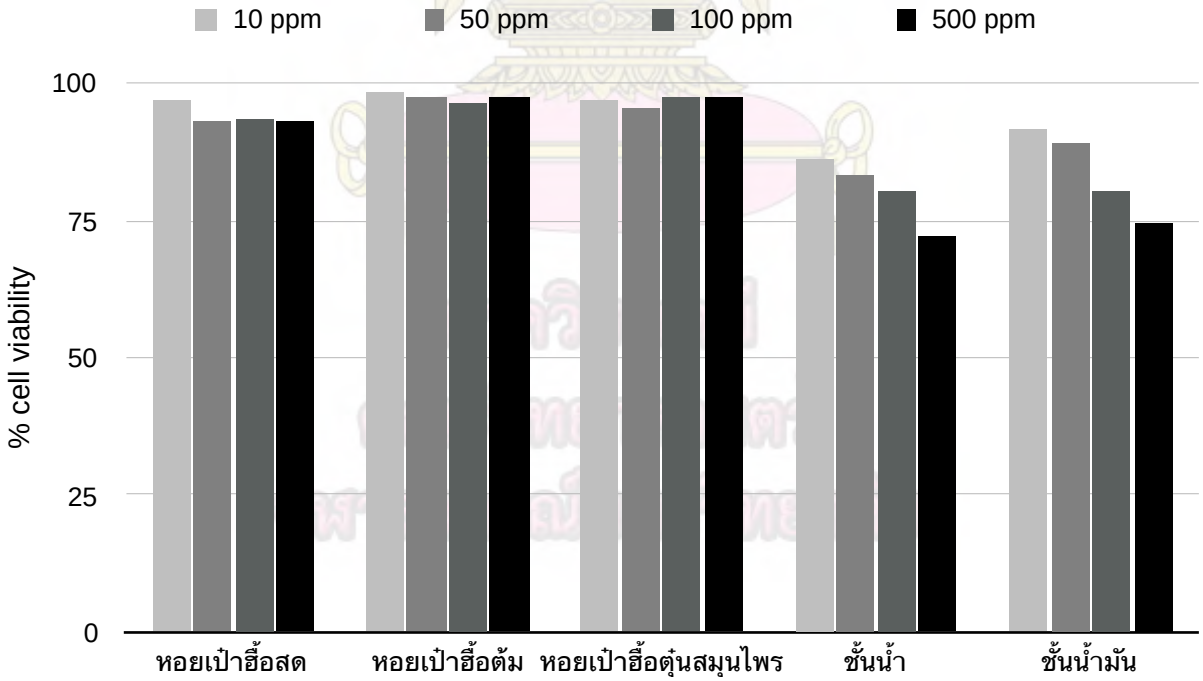
จากการทดลอง นำหอยเป๋าฮื้อสด หอยเป๋าฮื้อต้มสุก หอยเป๋าฮื้อตุ๋นสมุนไพร ชั้นน้ำ และชั้นน้ำมันจากการตุ๋นที่ความเข้มข้นต่างๆ ไปทดสอบกับเซลล์ 7 ชนิด คือ เซลล์มะเร็งเต้านม (BT474) เซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ (SW620) เซลล์มะเร็งเยื่อบุช่องปาก (KB) เซลล์มะเร็งปอด (A549) เซลล์มะเร็งตับ (HepG2) เซลล์มะเร็งปอด (CHAGO) และเซลล์มะเร็งกระเพาะอาหาร (KATO-III) พบว่า ได้ผลการทดลองดังที่กราฟแสดง



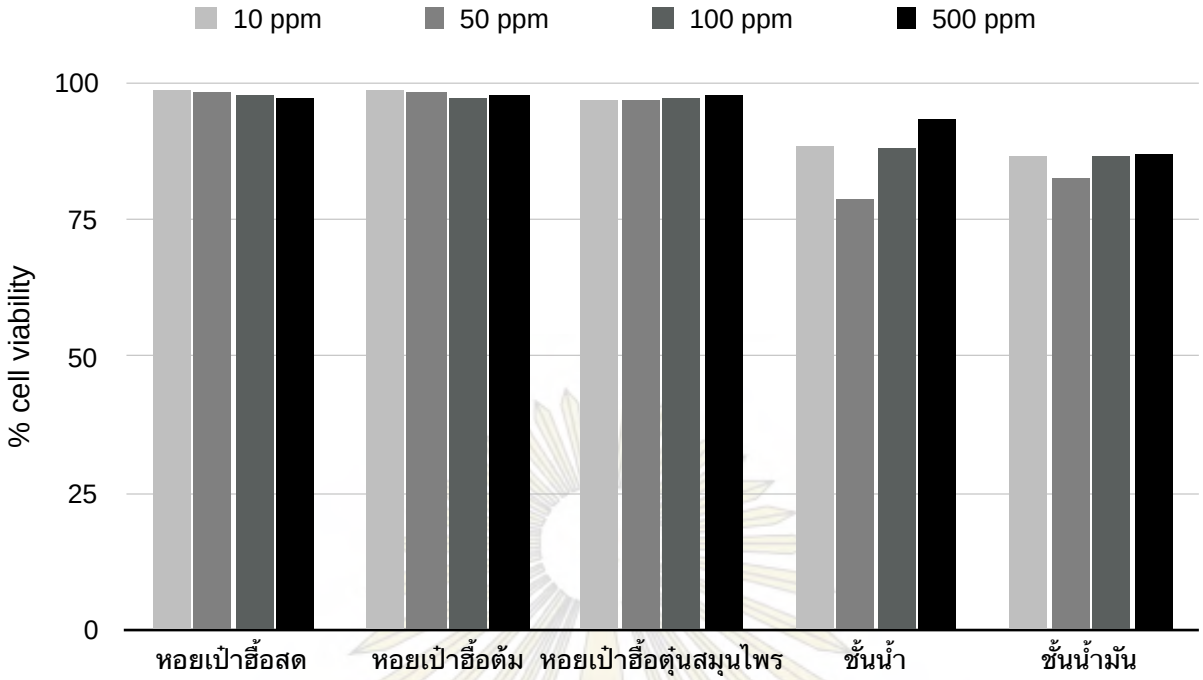
รูปที่ 3.8 กราฟแท่งแสดงความสัมพันธ์ระหว่างหอยเป๋าฮื้อสด หอยเป๋าฮื้อต้มสุก หอยเป๋าฮื้อตุ๋นสมุนไพร ชั้นน้ำ และชั้นน้ำมันจากการตุ๋นที่ความเข้มข้นต่างๆกับเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดชีวิตของเซลล์มะเร็งกระเพาะอาหาร (KATO-III)



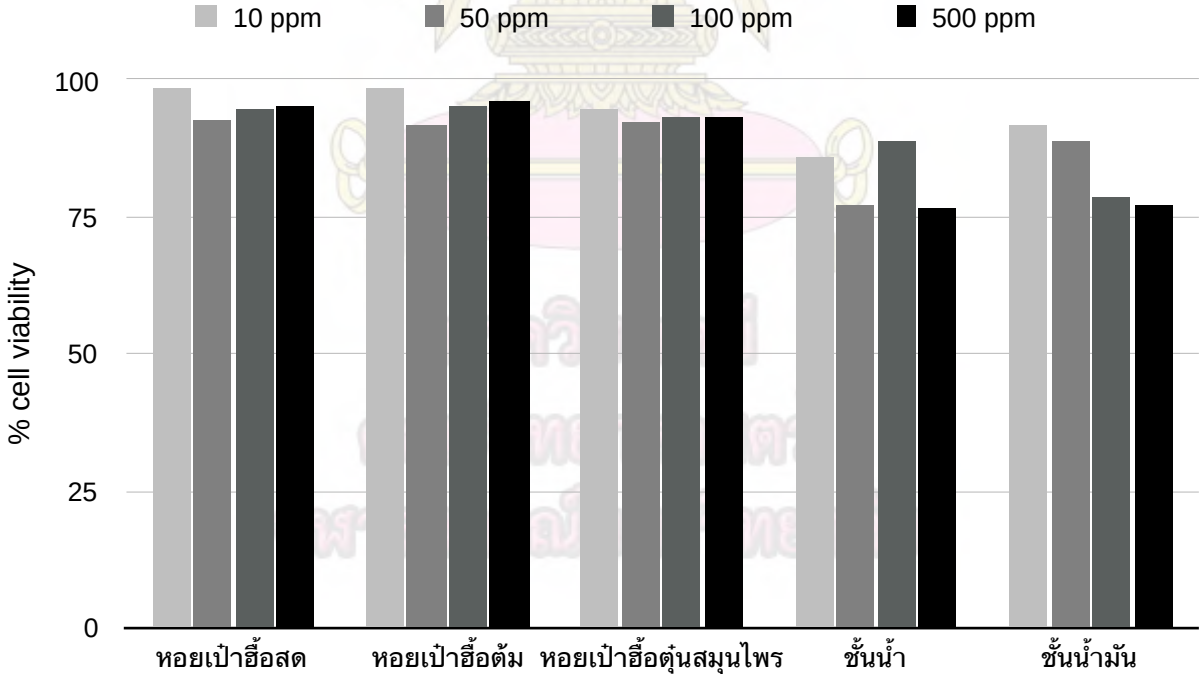
รูปที่ 3.9 กราฟแท่งแสดงความสัมพันธ์ระหว่างหอยเป๋าฮื้อสด หอยเป๋าฮื้อต้มสุก หอยเป๋าฮื้อตุ๋นสมุนไพร ชั้นน้ำ และชั้นน้ำมันจากการตุ๋นที่ความเข้มข้นต่างๆกับเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดชีวิตของเซลล์มะเร็งตับ (HEP-G2)



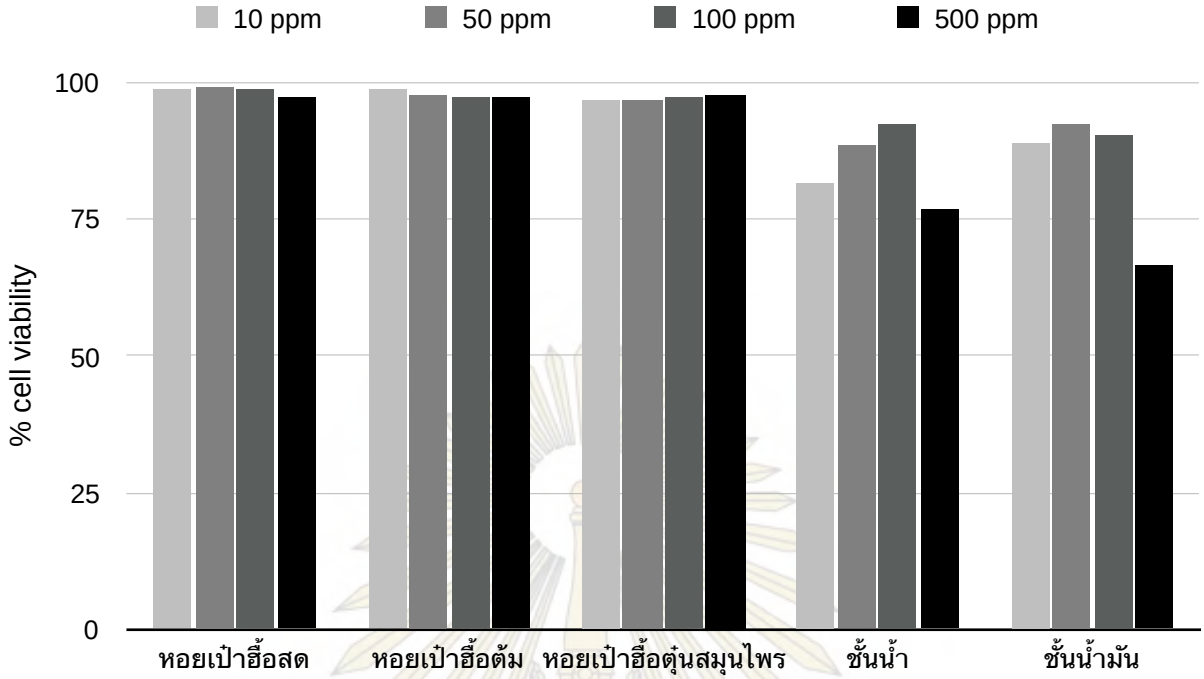
รูปที่ 3.10 กราฟแท่งแสดงความสัมพันธ์ระหว่างหอยเป๋าฮื้อสด หอยเป๋าฮื้อต้มสุก หอยเป๋าฮื้อตุ๋นสมุนไพร ชั้นน้ำ และชั้นน้ำมันจากการตุ๋นที่ความเข้มข้นต่างๆกับเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดชีวิตของเซลล์มะเร็งเต้านม (BT474)



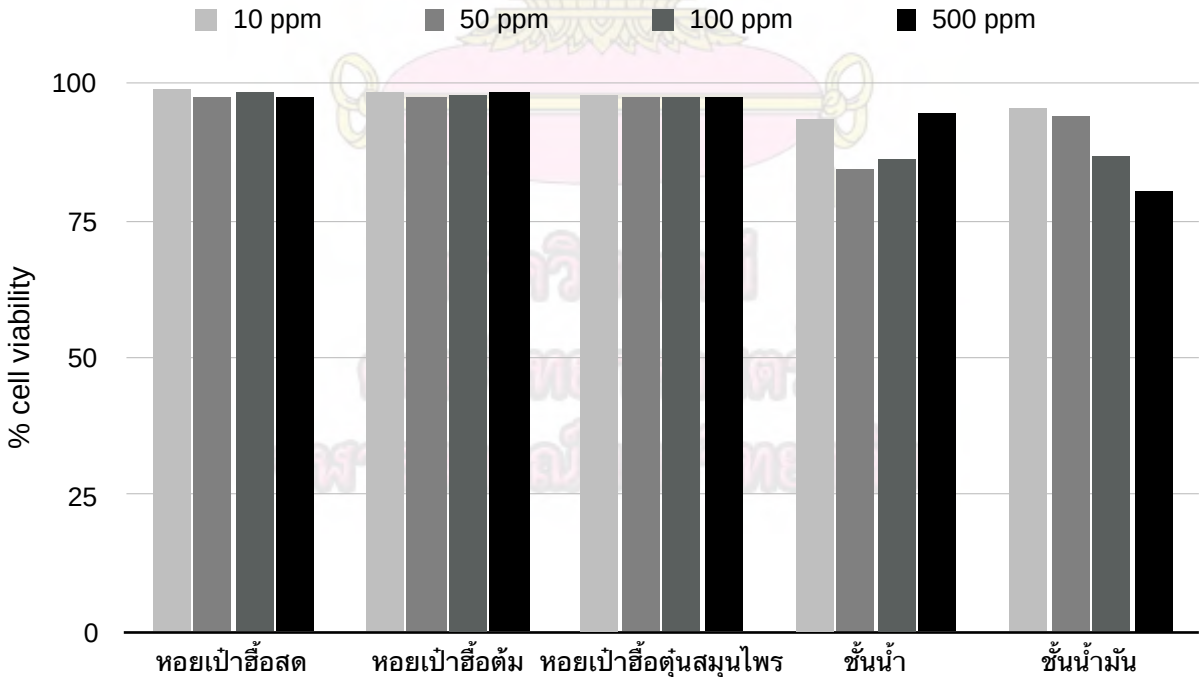
รูปที่ 3.11 กราฟแท่งแสดงความสัมพันธ์ระหว่างหอยเป๋าฮื้อสด หอยเป๋าฮื้อต้มสุก หอยเป๋าฮื้อตุ๋นสมุนไพร ชั้นน้ำ และชั้นน้ำมันจากการตุ๋นที่ความเข้มข้นต่างๆกับเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดชีวิตของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ (SW620)



รูปที่ 3.12 กราฟแท่งแสดงความสัมพันธ์ระหว่างหอยเป๋าฮื้อสด หอยเป๋าฮื้อต้มสุก หอยเป๋าฮื้อตุ๋นสมุนไพร ชั้นน้ำ และชั้นน้ำมันจากการตุ๋นที่ความเข้มข้นต่างๆกับเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดชีวิตของเซลล์มะเร็งปอด (A549)



รูปที่ 3.13 กราฟแท่งแสดงความสัมพันธ์ระหว่างหอยเป๋าฮื้อสด หอยเป๋าฮื้อต้มสุก หอยเป๋าฮื้อตุ๋นสมุนไพร ชั้นน้ำ และชั้นน้ำมันจากการตุ๋นที่ความเข้มข้นต่างๆกับเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดชีวิตของเซลล์มะเร็งปอด (Chago)



รูปที่ 3.14 กราฟแท่งแสดงความสัมพันธ์ระหว่างหอยเป๋าฮื้อสด หอยเป๋าฮื้อต้มสุก หอยเป๋าฮื้อตุ๋นสมุนไพร ชั้นน้ำ และชั้นน้ำมันจากการตุ๋นที่ความเข้มข้นต่างๆกับเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดชีวิตของเซลล์มะเร็งเยื่อบุช่องปาก (KB)

จากผลการทดลองสรุปได้ว่าชั้นน้ำและชั้นน้ำมันจากการตุ๋นหอยเป๋าฮื้อมีประสิทธิภาพ ในการยับยั้งการเจริญเติบโตต่อเซลล์มะเร็งกระเพาะอาหาร (KATO-III)ได้ดีกว่าเซลล์มะเร็งชนิดอื่นๆ ดังนั้น ในขั้นต่อมาจึงทดสอบเพื่อหาค่าความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง (IC_{50}) ได้ผลการทดลองดังนี้ ชั้นน้ำมีค่า IC_{50} เท่ากับ 21.324 ppm ส่วนชั้นน้ำมันมีค่า IC_{50} เท่ากับ 58.557 ppm ซึ่งมีค่าค่อนข้างสูง จึงต้อง ใช้ในความเข้มข้นสูงถึงจะเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง ดังนั้น ในการพัฒนาต่อยอดการทดลองควรจะใช้สมุนไพรที่เป็นส่วนผสมคือ ขิง ขมิ้นชัน และกระชาย ในปริมาณที่มากกว่านี้เพื่อ ให้ได้ชั้นน้ำและชั้นน้ำมันจากการตุ๋นหอยเป๋าฮื้อที่มีสารออกฤทธิ์ปริมาณสูงขึ้น

ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 4

สรุปผลการทดลอง

ในงานวิจัยนี้ผู้วิจัยได้ทำการศึกษาการกำจัดน้ำออก (Dehydration) และการคืนน้ำ (Rehydration) ของหอยเป๋าฮื้อสดและหอยเป๋าฮื้อแปรรูปโดยวิธีฟรีซดราย ตรวจวัดองค์ประกอบทางเคมีของหอยเป๋าฮื้อสดและหอยเป๋าฮื้อแปรรูปและทำการทดสอบฤทธิ์ในการต้านมะเร็งของหอยเป๋าฮื้อสดและหอยเป๋าฮื้อแปรรูป

จากผลการทดลองศึกษาการการกำจัดน้ำออกและการคืนน้ำของหอยเป๋าฮื้อสดและหอยเป๋าฮื้อแปรรูปโดยวิธีฟรีซดราย พบว่าหอยเป๋าฮื้อที่ฟรีซดรายแล้วสามารถคืนน้ำ แล้วคืนรูปได้ใกล้เคียงกับหอยเป๋าฮื้อก่อนฟรีซดรายโดยที่น้ำหนักเปลี่ยนไปเพียงเล็กน้อย อีกทั้งลักษณะภายนอกยังไม่เปลี่ยนไปจากก่อนฟรีซดราย โดยมีค่า % rehydration เป็น 99.69% 99.60% และ 99.12% สำหรับหอยเป๋าฮื้อสด หอยเป๋าฮื้อต้มสุกและหอยเป๋าฮื้อตุ๋นสมุนไพรตามลำดับ

จากผลการทดลองตรวจวัดองค์ประกอบทางเคมีของหอยเป๋าฮื้อสดและหอยเป๋าฮื้อแปรรูป พบว่าหอยเป๋าฮื้อมีองค์ประกอบทางเคมี คือสารอาหารและธาตุเหล็ก สังกะสี และซีลิเนียมในปริมาณที่ค่อนข้างสูง โดยได้ผลการตรวจวัดแสดงดังตารางที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 แสดงปริมาณองค์ประกอบทางเคมีของหอยเป๋าฮื้อสดและหอยเป๋าฮื้อแปรรูป

ตัวอย่าง	โปรตีน (g/ 100g)	เถ้า (g/ 100g)	ความชื้น (g/ 100g)	ไขมัน (g/ 100g)	คาร์โบไฮเดรต (g/100g)	Fe (mg/ 100g)	Zn (mg/ 100g)	Se (µg/ 100g)
หอยเป๋าฮื้อสด	19.2	1.8	78.9	1.1	2.5	2.9	0.9	37.2
หอยเป๋าฮื้อต้มสุก	15.7	0.8	77.9	1.1	1.0	2.7	0.4	29.4
หอยเป๋าฮื้อตุ๋นสมุนไพร	13.6	1.1	73.0	8.9	3.4	2.4	0.3	28.7
หอยเป๋าฮื้อสด (ฟรีซดราย)	17.7	1.6	28.1	1.0	2.1	2.6	0.6	31.3
หอยเป๋าฮื้อสด (อ้างอิง)	17.1	1.6	74.6	0.8	6.0	3.2	0.8	44.8

ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าหอยเป๋าฮื้อมีคุณค่าทางโภชนาการสูง เนื่องจากมีปริมาณโปรตีนสูง ไขมันต่ำและให้แคลอรี่ต่ำ อีกทั้งยังมีปริมาณแร่ธาตุที่จำเป็นต่อร่างกาย ในปริมาณที่ค่อนข้างสูง

จากผลการทดลองทดสอบฤทธิ์ในการต้านมะเร็งของหอยเป๋าฮื้อสดและหอยเป๋าฮื้อแปรรูป พบว่าหอยเป๋าฮื้อสดและหอยเป๋าฮื้อแปรรูปมีฤทธิ์ในการต้านมะเร็งที่ต่ำ เนื่องจากการทดลองนี้ผู้วิจัยไม่ได้ใช้สารสกัดเข้มข้นของหอยเป๋าฮื้อไปทดสอบฤทธิ์ในการต้านมะเร็ง แต่ใช้หอยเป๋าฮื้อที่นำไปย่อยแล้วไปทดสอบดังนั้นอาจเป็นไปได้ว่าสารที่มีฤทธิ์ในการต้านมะเร็งอาจถูกทำลายในขั้นตอนของการย่อย ส่วนฤทธิ์ในการต้านมะเร็งของชั้นน้ำ และชั้นน้ำมันจากการตุ๋นหอยเป๋าฮื้อตุ๋นสมุนไพรนั้นมีฤทธิ์ในการต้านเซลล์มะเร็งกระเพาะอาหาร (KATO-III)ได้ดีกว่าเซลล์มะเร็งชนิดอื่นๆ โดยชั้นน้ำมีค่า IC_{50} เท่ากับ 21.324 ppm ส่วนชั้นน้ำมันมีค่า IC_{50} เท่ากับ 58.557 ppm

แนวทางการทำวิจัยในอนาคต

จากงานวิจัยนี้ประสบความสำเร็จศึกษาการกำจัดน้ำออก (Dehydration) และการคืนน้ำ (Rehydration) ของหอยเป๋าฮื้อสดและหอยเป๋าฮื้อแปรรูปโดยวิธีฟรีซดราย และการตรวจวัดองค์ประกอบทางเคมีของหอยเป๋าฮื้อสดและหอยเป๋าฮื้อแปรรูป แต่ยังมีการทดลองในส่วนของการทดลองทดสอบฤทธิ์ในการต้านมะเร็งของหอยเป๋าฮื้อสดและหอยเป๋าฮื้อแปรรูปที่ยังได้ผลการทดลองไม่ค่อยดีเนื่องจากฤทธิ์ในการต้านมะเร็งของหอยเป๋าฮื้อสดและหอยเป๋าฮื้อแปรรูปยังมีค่าต่ำ ดังนั้นการทำวิจัยในอนาคตอาจปรับปรุงในขั้นตอนการทดลองทดสอบฤทธิ์ในการต้านมะเร็งโดยใช้วิธีสกัดสารต้านมะเร็งที่อยู่ในหอยเป๋าฮื้อแทนวิธีการย่อยเพื่อให้ได้ผลในทดสอบฤทธิ์ในการต้านมะเร็งที่ดีขึ้น

ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เอกสารอ้างอิง

1. Mai, K.; Mercer, J, P.; Donlon, J. Comparative studies on the nutrition of two species of abalone, Haliotis tuberculata L. and Haliotis discus hannai Ino. III. Response of abalone to various levels of dietary lipid . *Aquaculture*, **1995**, *134*, 65-80.

2. Siripatrawan, U.; Sanguandeekul, R.; Narakaew, V. An alternative freshness index method for modified atmosphere packaged abalone using an artificial neural network. *LWT - Food Science and Technology*. **2009**, *42*, 343-349.

3. Tanikawa, E.; Yamashita, J. Chemical Studies on the Meat of Abalone. *Bull. Fac. Fish. Hokkaido Univ***. 1961**, *12*, 210-238.

4. Conte, F.; Copat, C.; Longo, S.; Conti, G, O.; Grasso, A.; Arena, G.; Brundo, M, V.; Ferrante, M. First data on trace elements in Haliotis tuberculata (Linnaeus, 1758) from southern Italy: Safety issues. *Food and Chemical Toxicology***. 2015**, *81*, 143-150.

5. Minguez, L.; Halm-Lemeille, M.; Costil, K.; Bureau, R.; Lebel, J.; Serpentini, A. Assessment of cytotoxic and immunomodulatory properties of four antidepressants on primary cultures of abalone hemocytes (Haliotis tuberculata). *Aquatic Toxicology*. **2014**, *153*, 3–11.

6. Soovali, L.; Room, E, I.; Kutt, A. Uncertainty Sources in UV-Vis Spectrophotometric Measurement. *Accreditation and Quality Assurance*. **2006**, *11*, 246–255.

7. Fabris, G.; Turoczy, N. J.; Stagnitti, F. Trace metal concentrations in edible tissue of snapper, flathead, lobster, and abalone from coastal waters of Victoria, Australia. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. **2006**, *86*, 286–292.

8. Park, S. Y.; Je, J. Y.; Hwang, J. Y.; Ahn, C. B. Abalone Protein Hydrolysates: Preparation, Angiotensin I Converting Enzyme Inhibition and Cellular Antioxidant Activity. *Prev Nutr Food Sci*. **2015**, *6*, 176–182.

ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

9. Zhang, Z.; Teruya, K.; Yoshida, T.; Eto, H.; Shirahata, S. Fucoidan Extract Enhances the Anti-Cancer Activity of Chemotherapeutic Agents in MDA-MB-231 and MCF-7 Breast Cancer Cells. *Mar. Drugs*. **2012**, *11*, 81–98.

10. Kim, C. W.; Go, H. J.; Seo, J. K.; Park, N. G.; Kim, G. D. Anticancer Mechanism of AP1, Abalone Peptide by Cell Cycle Arrest in Human Gastric Cancer Cells. *Cancer Prev Res*. **2013**, *18*, 33-40.

11. Li, Y.; Huang, W.; Huang, S.; Du, J.; Huang, C. Screening of anti-cancer agent using zebrafish: comparison with the MTT assay. *Biochem Biophys Res Commun*. **2012**, *422*, 85–90.

ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก

ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ก

ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ผลการทดลองหาค่า Intensity ratio ของสารละลายมาตรฐาน Fe Zn และ Se ที่ความเข้มข้นต่างๆจากเครื่อง ICP-OES

ตารางที่ 1. แสดงค่าสัดส่วนความเข้มของสัญญาณของเหล็กที่ความเข้มข้นต่างๆ

ความเข้มข้น (ppm)	Intensity ratio
blank	125.6
10	34371
20	71769
30	109049
40	141546
50	184411

ตารางที่ 2. แสดงค่าสัดส่วนความเข้มของสัญญาณของสังกะสีที่ความเข้มข้นต่างๆ

ความเข้มข้น (ppm)	Intensity ratio
blank	60.01
2	4397
4	8566
6	12310
8	16520
10	21180

ตารางที่ 3. แสดงค่าสัดส่วนความเข้มของสัญญาณของซีลิเนียมที่ความเข้มข้นต่างๆ

ความเข้มข้น (ppm)	Intensity ratio
blank	1.154
0.2	47.77
0.4	89.51
0.6	123.9
0.8	155.7
1.0	185.8

ผลการทดลองหาค่าabsorbance ของสารละลายมาตรฐาน curcumin ที่ความเข้มข้นต่างๆ ที่ความยาวคลื่น 425 nm จากเครื่อง UV-VIS Spectrophotometer

ตารางที่ 4. แสดงค่า absorbance ของารละลายมาตรฐาน curcumin ที่ความเข้มข้นต่างๆ

ความเข้มข้น (ppm)	Absorbance
1	0.156
2	0.307
3	0.458
4	0.607
5	0.756

ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ข

ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ผลการทดลองชั่งน้ำหนักหอยเป๋าฮื้อสดและหอยเป๋าฮื้อแปรรูปเพื่อดูการกำจัดน้ำออกและการคืนน้ำ

ตารางที่ 1. แสดงน้ำหนักหอยเป๋าฮื้อสดและหอยเป๋าฮื้อแปรรูปก่อนทำแห้งเยือกแข็ง

ตัวอย่าง	ครั้งที่	น้ำหนัก (g)	น้ำหนักเฉลี่ย (g)	SD
หอยเป๋าฮื้อสด	1	1.3584	1.3587	0.0004
	2	1.3592		
	3	1.3586		
หอยเป๋าฮื้อต้ม	1	2.2318	2.2325	0.0007
	2	2.2326		
	3	2.2332		
หอยเป๋าฮื้อตุ๋นสมุนไพร	1	2.4377	2.4378	0.0006
	2	2.4385		
	3	2.4373		

ตารางที่ 2. แสดงน้ำหนักหอยเป๋าฮื้อสดและหอยเป๋าฮื้อแปรรูปหลังทำแห้งเยือกแข็ง

ตัวอย่าง	ครั้งที่	น้ำหนัก (g)	น้ำหนักเฉลี่ย (g)	SD
หอยเป๋าฮื้อสด	1	0.6020	0.6025	0.0006
	2	0.6031		
	3	0.6024		
หอยเป๋าฮื้อต้ม	1	1.0026	1.0027	0.0003
	2	1.0024		
	3	1.0031		
หอยเป๋าฮื้อตุ๋นสมุนไพร	1	1.0856	1.0860	0.0004
	2	1.0864		
	3	1.0861		

ตารางที่ 3. แสดงน้ำหนักหอยเป๋าฮื้อสดและหอยเป๋าฮื้อแปรรูปหลังคืนน้ำ

ตัวอย่าง	ครั้งที่	น้ำหนัก (g)	น้ำหนักเฉลี่ย (g)	SD
หอยเป๋าฮื้อสด	1	1.3542	1.3545	0.0004
	2	1.3549		
	3	1.3544		
หอยเป๋าฮื้อต้ม	1	2.2234	2.2235	0.0004
	2	2.2239		
	3	2.2232		
หอยเป๋าฮื้อตุ๋นสมุนไพร	1	2.4163	2.4163	0.0006
	2	2.4168		
	3	2.4157		

ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ประวัติผู้ทำวิจัย

นายชัชชลิต อู่สุวรรณ์ เกิดเมื่อวันที่ 19 มีนาคม พ.ศ. 2537 ที่จังหวัดระยอง สำเร็จการศึกษา ชั้นมัธยมศึกษาตอนปลาย สายสามัญ แผนกวิทยาศาสตร์ - คณิตศาสตร์ จากโรงเรียนระยองวิทยาคม จังหวัดระยอง เมื่อปีการศึกษา 2554 เข้าศึกษาต่อระดับปริญญาตรี หลักสูตร วิทยาศาสตรบัณฑิต ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อปีการศึกษา 2555 ที่อยู่ที่สามารถติดต่อได้หลังจากจบการศึกษาปริญญาตรี บ้านเลขที่ 2/1 ถนนราษฎร์บำรุง ตำบลเนินพระ อำเภอเมืองระยอง จังหวัดระยอง 21000 อีเมล : ko_iphone@hotmail.com

ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย