



โครงการ  
การเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์

ชื่อโครงการ	การสกัดสารต้านมะเร็ง สารยับยั้งไลเปสและแอลฟาไกลูโคซิเดสจาก เห็ดหลินจือเขากวาง Extraction of Anti-Cancer, Anti-pancreatic Lipase and Anti- $\alpha$ -Glucosidase Agents from Antler-Shaped Lingzhi ( <i>Ganoderma lucidum</i> )
ชื่อนิสิต	นางสาวนุสรรา ภูมิใจ
ภาควิชา	เคมี
ปีการศึกษา	2560

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การสกัดสารต้านมะเร็ง สารยับยั้งไลเปสและแอลฟาไกลูโคซิเดสจาก  
เห็ดหลินจือเขากวาง

Extraction of Anti-Cancer, Anti-pancreatic Lipase and  
Anti- $\alpha$ -Glucosidase Agents from Antler-Shaped Lingzhi  
(*Ganoderma lucidum*)


โดย  
นางสาวนุสรรา ภูมิใจ


รายงานนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร  
ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต  
ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
ปีการศึกษา 2560


โครงการ การสกัดสารต้านมะเร็ง สารยับยั้งไลเปสและแอลฟาไกลูโคซิเดสจากเห็ดหลินจือเขากวาง  
โดย นางสาวนุสรรา ภูมิใจ

ได้รับอนุมัติให้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาเคมี  
ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

คณะกรรมการสอบโครงการ

.....  ..... ประธานกรรมการ  
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วรินทร์ ชวศิริ)

.....  ..... อาจารย์ที่ปรึกษา  
(รองศาสตราจารย์ ดร.สุรัชย์ พรภคกุล)

.....  ..... กรรมการ  
(อาจารย์ ดร.มนพิชา ศรีสะอาด)

รายงานฉบับนี้ได้รับความเห็นชอบและอนุมัติโดยหัวหน้าภาควิชาเคมี

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

วันที่ ..... เดือนพฤษภาคม พ.ศ. 2561

คุณภาพของการเขียนรายงานเล่มนี้อยู่ในระดับ  ดีมาก  ดี  พอใช้

ชื่อโครงการ การสกัดสารต้านมะเร็ง สารยับยั้งไลเปสและแอลฟาไกลูโคซิเดสจาก  
เห็ดหลินจือเขากวาง

ชื่อนิสิตในโครงการ นางสาวนุสรรา ภูมิใจ เลขประจำตัว 5733119623

ชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา รองศาสตราจารย์ ดร.สุรัชย์ พรหมกุล

ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปีการศึกษา 2560

### บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์ศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพในการต้านมะเร็ง ยับยั้งไลเปสและแอลฟาไกลูโคซิเดสของสารสกัดจากเห็ดหลินจือเขากวาง โดยมีสารสกัดเห็ดหลินจือเขากวางทั้งหมด 3 แบบคือ สารสกัดเอทานอลโดยใช้ซอกเลต (S1) , สารสกัดเอทานอล (S2) และสารสกัดน้ำ (S3) จากวิเคราะห์กลุ่มสารที่เป็นองค์ประกอบ พบว่ามีพอลิแซ็กคาไรด์รวม 1.33 มิลลิกรัมกลูโคสโดยสมมูล/กรัมสารสกัดน้ำ และฟีนอลรวม 79.50 มิลลิกรัมกรดแกลลิกโดยสมมูล/กรัมสารสกัดเอทานอล S1 นอกจากนี้ทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยการดักจับอนุมูลอิสระ 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) แสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ เท่ากับ 29.23 มิลลิกรัมโทรลอกซ์โดยสมมูล/กรัมสารสกัดเอทานอล S1 จากนั้นนำสารสกัด S1 มาทำการสกัดแยกต่อด้วยเฮกเซน, ไดคลอโรมีเทนและเมทานอล ได้เป็นสารสกัด S1/H, S1/D และ S1/M โดยลำดับ แล้วนำสารสกัดแยกทั้งสามที่ความเข้มข้น 10 mg/mL มาทำการทดสอบทดสอบฤทธิ์ยับยั้งแอลฟาไกลูโคซิเดสและไลเปส พบว่าฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดสเท่ากับ 58%, 92 % และ 97% ตามลำดับ และสารสกัด S1/M เท่านั้นที่มีฤทธิ์ยับยั้งไลเปสด้วยค่าร้อยละการยับยั้ง 71 ในการนำสารสกัดทั้ง 6 ตัวอย่างทดสอบการเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งทั้ง 5 ชนิด ได้แก่ เซลล์มะเร็งกระเพาะอาหาร (KATO-III), เซลล์มะเร็งเต้านม (BT474), เซลล์มะเร็งลำไส้ (SW620), เซลล์มะเร็งตับ (Hep-G2), เซลล์มะเร็งปอด (Chago-K1) และเซลล์ปอดปกติ (Wi-38) พบว่าสารสกัด S1, S1/D และ S2 มีฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งทั้ง 5 ชนิดได้ดี โดยสารสกัดด้วยเอทานอล S1 มีฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งทั้ง 5 ชนิดได้ดีที่สุดในส่วนของสารสกัด S1/M มีฤทธิ์การยับยั้ง Hep-G2 ได้ดีที่สุดในด้วยค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ 44  $\mu\text{g/mL}$  และสารสกัด S3 มีฤทธิ์การยับยั้งจำเพาะ Chago-K1 ด้วยค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ 103  $\mu\text{g/mL}$  จากการวิเคราะห์องค์ประกอบของเห็ดหลินจือเขากวางในสารสกัด S1, S1/H, S1/D, S1/M และ S2 ด้วย  $^1\text{H-NMR}$  spectroscopy บ่งชี้ว่าสารสกัดที่มีฤทธิ์ต้านมะเร็งเหล่านี้ประกอบด้วยสารในกลุ่มไตรเทอร์พีน (triterpenoids)

คำสำคัญ: ไลเปส, แอลฟาไกลูโคซิเดส, เห็ดหลินจือเขากวาง, เซลล์มะเร็ง

Project Title                    Extraction of Anti-Cancer, Anti-pancreatic Lipase and  
Anti- $\alpha$ -Glucosidase Agents from Antler-Shaped Lingzhi  
(*Ganoderma lucidum*)

Student Name                    Miss Nusara Poomjai                    Student ID 5733119623

Advisor Name                    Associate Professor Surachai Pornpakakul, Ph.D.

Department of Chemistry, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Academic Year 2017

### Abstract

The objective of this study was to investigate anti-cancer, anti-pancreatic lipase and anti- $\alpha$ -glucosidase agents of the *Ganoderma lucidum* antler-shaped fruiting body. The mushroom were extracted with ethanol using soxhlet apparatus (S1) and by soaking in ethanol (S2) and hot water (S3). On basis of spectrophotometric estimation, total polysaccharide and total phenolic content of the antler-shaped fruiting body were 1.33 mg glucose equivalents/gram of the water crude extract (S3) and 79.50 mg gallic acid equivalents (GAE)/gram of the ethanol crude extract (S1), respectively. DPPH radical scavenging activity of the ethanol crude extract (S1) exhibited antioxidant activity with Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) value of 29.23 mg Trolox/gram of the ethanol crude extract (S1). Furthermore, the extract S1 was partitioned with hexane, dichloromethane and methanol to give S1/H, S1/D and S1/M extracts, respectively.  $\alpha$ -Glucosidase and lipase inhibitory activities of those extracts were examined and the hexane (S1/H), dichloromethane (S1/D) and methanol (S1/M) extracts at 10 mg/mL showed  $\alpha$ -glucosidase inhibition values of 58%, 92% and 97%, respectively and lipase inhibition values of 71% for the S1/M extract. Cytotoxicity of all extracts against gastric cancer cell (KATO-III), breast cancer cell (BT474), colon cancer cell (SW620), liver cancer cell (Hep-G2), lung cancer cell (Chago-K1) and fibroblast cell (Wi-38). It was found that the S1, S1/D and S2 extracts at 200  $\mu$ g/mL exhibited cytotoxicity against all cancer cell lines. The S1 extract exhibited cytotoxicity against KATO-III, BT474, SW620, Hep-G2 and Chago-K1 with  $IC_{50}$  values of 62, 66, 30, 65 and 76  $\mu$ g/mL, respectively. The S1/M and S3 extracts exhibited selectively against liver and lung cancer cell with values of  $IC_{50}$  44  $\mu$ g/mL and 103  $\mu$ g/mL, respectively.  $^1H$  NMR analysis of the *Ganoderma lucidum* antler-shaped fruiting body extracts revealed that the S1, S1/H, S1/D, S1/M and S2 extracts comprised of triterpenoids as major component.

Keywords: Lipase,  $\alpha$ -glucosidase, The Antler-shaped Fruiting Body of *Ganoderma lucidum*, cancer cell



## กิตติกรรมประกาศ

ในการทำโครงการวิจัยนี้ได้รับความอนุเคราะห์จากคณาจารย์ นิสิตคณะวิทยาศาสตร์ ภาควิชาเคมี และเจ้าหน้าที่หลายฝ่ายที่ได้ให้ความช่วยเหลือเป็นอย่างดี ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณอาจารย์ที่ปรึกษาโครงการ รองศาสตราจารย์ ดร.สุรัชย์ พรภักกุล ที่กรุณาให้ความรู้ คำปรึกษา และคำแนะนำที่เป็นประโยชน์ ต่อการศึกษาและงานวิจัย ตลอดจนช่วยชี้แนะแนวทางในการแก้ปัญหาต่างๆ ที่เกิดขึ้นใน ระหว่างการวิจัย รวมทั้งตรวจทานและแก้ไขการเขียนรายงานฉบับนี้จนเสร็จสมบูรณ์

ขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วรินทร์ ขวศิริ ที่ให้เกียรติเป็นประธาน กรรมการสอบ และอาจารย์ ดร.มนพิชา ศรีสะอาด ที่ให้เกียรติเป็นกรรมการสอบที่ได้ให้คำแนะนำ และคำวิจารณ์ที่เป็นประโยชน์ต่องานวิจัยนี้

ขอขอบพระคุณคุณทรงจันทร์ ภูทอง เจ้าหน้าที่สถาบันเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ ทั้งให้ความรู้เกี่ยวกับการเพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็ง ให้คำปรึกษาและช่วยเหลือเกี่ยวกับการทดสอบฤทธิ์ยับยั้ง เซลล์มะเร็งชนิดต่างๆ

ขอขอบพระคุณภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้ความสะดวก ด้าน สถานที่ทำงานวิจัยตลอดจนเครื่องมือ อุปกรณ์ และสารเคมีที่ใช้ในการวิจัย ทำให้งานวิจัยนี้สำเร็จ ลงได้

ขอขอบคุณที่นิสิตปริญญาโทและปริญญาเอก โดยเฉพาะ นางสาวณัฐฐา รัตนปัญญา ที่ให้ความช่วยเหลือในการใช้เครื่องมือและอุปกรณ์ต่างๆและกำลังใจและนายพงศวิช นุกิจรังสรรค์ ช่วยเหลือตลอด ระยะเวลาที่ทำการวิจัย

ขอบคุณฟาร์มเห็ดเห็ดหลินจือเขากวาง ต.พระนอน อ.นครหลวง จ.พระนครศรีอยุธยา ที่ให้การ สนับสนุนในการให้เห็ดหลินจือเขากวางมาทำโครงการวิจัยนี้

และสุดท้ายขอบคุณคุณพ่อคุณแม่ครอบครัวและเพื่อนๆ ที่ให้กำลังใจและให้คำปรึกษาต่างๆ

## สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ค
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ง
กิตติกรรมประกาศ	จ
สารบัญ	ฉ
สารบัญตาราง	ณ
สารบัญรูป	ญ
สารบัญภาคผนวก	ฎ
สารบัญแผนภาพ	ฐ
สัญลักษณ์และคำย่อ	ท
<b>บทที่ 1 บทนำ</b>	1
1.1 ความเป็นมาและมูลเหตุจูงใจในการเสนอโครงการ	1
1.2 ข้อมูลทางทางพฤกษศาสตร์ของเห็ดหลินจือแดง	2
1.3 ข้อมูลทางทางพฤกษศาสตร์ของเห็ดหลินจือเขากวาง	3
1.4 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	4
1.5 หลักการและทฤษฎี	6
1.5.1 การสกัดด้วยตัวทำละลาย (Solvent extraction)	6
1.5.2 การสกัดแบบซอกซ์เลต (Soxhlet extraction)	7
1.5.3 MTT assay	7
1.5.4 Cell death	8
1.5.5 การทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ไลเปส (Lipase enzyme)	11
1.5.6 การทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดส ( $\alpha$ -Glucosidase enzyme)	11
1.5.7 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical scavenging capacity (DPPH assay)	12
1.5.8 การวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลรวม (Total phenolic compounds) ด้วยวิธี Folin-Ciocalteu reagent	12
1.5.9 เครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (High Performance Liquid Chromatography, HPLC)	12
1.6 วัตถุประสงค์งานวิจัย	13
1.7 ประโยชน์คาดว่าจะได้รับ	13
<b>บทที่ 2 การทดลอง</b>	14
2.1 วัตถุประสงค์	14

2.1.1 การเตรียมเห็ดหลินจือเขากวางแห้ง	14
2.2 เครื่องมือและอุปกรณ์	14
2.3 สารเคมี	15
2.4 วิธีการทดลอง	16
2.4.1 การสกัดเห็ดหลินจือเขากวาง	16
2.4.1.1 การสกัดด้วยเอทานอลโดยใช้ซอกเลต	16
2.4.1.2 การสกัดด้วยเอทานอล	16
2.4.1.3 การสกัดด้วยน้ำ	17
2.4.1.4 การสกัดแยก	17
2.4.2 การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ	18
2.4.2.1 การทดสอบการเป็นพิษต่อเซลล์ (Cytotoxicity assay)	18
2.4.2.2 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical scavenging capacity (DPPH assay)	21
2.4.2.3 การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไลเปส	22
2.4.2.4 การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดส	23
2.4.3 การวิเคราะห์กลุ่มสารที่เป็นองค์ประกอบ	24
2.4.3.1 วิเคราะห์ปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ (Total Polysaccharides)	24
2.4.3.2 วิเคราะห์ปริมาณฟีนอลรวม (Total phenolic compounds) ด้วยวิธี Folin-Ciocalteu reagent	25
2.4.4 การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี	26
2.4.4.1 เครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (High Performance Liquid Chromatography, HPLC)	26
<b>บทที่ 3 ผลการทดลองและอภิปรายผลการทดลอง</b>	27
3.1 ผลการสกัดเห็ดหลินจือเขากวาง	27
3.2 ผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ	28
3.2.1 ผลการทดสอบการเป็นพิษต่อเซลล์ (Cytotoxicity assay)	28
3.2.2 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical scavenging capacity (DPPH assay)	31
3.2.3 ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งไลเปส	32
3.2.4 ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งแอลฟาไกลูโคซิเดส	33
3.3 ผลการวิเคราะห์กลุ่มสารที่เป็นองค์ประกอบ	33
3.3.1 ผลการวิเคราะห์ปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ (Total Polysaccharides)	33
3.3.2 ผลการวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลรวม (Total phenolic compounds) ด้วยวิธี Folin-Ciocalteu reagent	34



3.3 ผลการวิเคราะห์ห้องค์ประกอบทางเคมี	34
3.3.1 เครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (High Performance Liquid Chromatography, HPLC)	34
<b>บทที่ 4 สรุปผลการทดลอง</b>	35
เอกสารอ้างอิง	36
ภาคผนวก	39
ประวัติผู้วิจัย	64



## สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1.1 แสดงการเปรียบเทียบลักษณะของ Necrosis กับ Apoptosis	10
ตารางที่ 2.1 เซลล์ที่ใช้เป็น cell line จาก American Type Culture Condition (ATCC)	19
ตารางที่ 3.1 แสดงลักษณะ น้ำหนักและร้อยละปริมาณของสารที่สกัดได้ (%yield extract) ของสารสกัดจากเห็ดหลินจือเขากวาง	27
ตารางที่ 3.2 ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งทั้ง 5 ชนิด (IC <sub>50</sub> )	28
ตารางที่ 3.3 แสดงค่า %Inhibition และ ค่า IC <sub>50</sub> ของสารสกัดและ Trolox	32
ตารางที่ 3.4 แสดงค่าความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของตัวอย่างที่วิเคราะห์เทียบกับสารละลายมาตรฐานโทรลอกซ์ TEAC	32
ตารางที่ 3.5 แสดงค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดสของสารสกัดด้วยเฮกเซนและไดคลอโรมีเทนที่ความเข้มข้น 10 mg/mL	33
ตารางที่ 3.6 แสดงปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ (Total Polysaccharides)	34
ตารางที่ 3.7 แสดงปริมาณฟีนอลรวม (Total phenolic compounds)	34

## สารบัญรูป

	หน้า
รูปที่ 1.1 เห็นหลักฐานจืดแดง	2
รูปที่ 1.2 เห็นหลักฐานจืดเขากวาง	3
รูปที่ 1.3 เห็นหลักฐานจืดแดงและเห็นหลักฐานจืดเขากวาง	4
รูปที่ 1.4 โครงสร้างของสารประกอบไตรเทอร์พีนที่พบในเห็นหลักฐานจืดเขากวาง	5
รูปที่ 1.5 อุปกรณ์ในการสกัดแบบซอกท์เลต (Soxhlet extraction)	7
รูปที่ 1.6 แสดงการรีดิวซ์ MTT เป็น Formazan	7
รูปที่ 1.7 การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของเซลล์แบบ apoptosis และ necrosis	10
รูปที่ 1.8 ปฏิกิริยาไฮโดไลซ์ <i>p</i> -nitrophenyl- palmitate (PNPP)	11
รูปที่ 1.9 ปฏิกิริยาไฮโดไลซ์ <i>p</i> -nitrophenyl- $\alpha$ -D-glucopyranoside	11
รูปที่ 1.10 ความสามารถในการรับอิเล็กตรอนของอนุมูลอิสระ DPPH	12
รูปที่ 2.1 อุปกรณ์ในการสกัดแบบซอกท์เลต (Soxhlet extraction)	16
รูปที่ 3.1 สารสกัดด้วยเอทานอลโดยใช้ซอกเลต (S1) มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งลำไส้ (SW620)	29

## สารบัญภาคผนวก

	หน้า
แสดงการคำนวณร้อยละปริมาณสารที่สกัดได้ (%yield crude extract) ของสารสกัด	40
ตารางที่ ผ1 แสดงผลการนำสารสกัดด้วยเอทานอลโดยใช้ชอกเลต (S1) ชุดที่ 1 ที่ความเข้มข้น (เจือจาง 10 เท่า) 200, 20, 2, 0.2 0.02 และ 0.002 $\mu\text{g/mL}$ ละลายใน DMSO ในการเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งลำไส้ (SW620)	41
รูปที่ ผ1 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของเซลล์มะเร็งลำไส้ (% cell survival)	42
ตารางที่ ผ2 แสดงผลการนำสารสกัดด้วยเอทานอลโดยใช้ชอกเลต (S1) ชุดที่ 2 ที่ความเข้มข้น (เจือจาง 2 เท่า) 200, 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.125, 1.563 และ 0.78 $\mu\text{g/mL}$ ละลายใน DMSO ในการเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งลำไส้	43
รูปที่ ผ2 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของเซลล์มะเร็งลำไส้ (% cell survival) เมื่อได้รับสารสกัดด้วยเอทานอลโดยใช้ชอกเลต (S1) ที่ความเข้มข้น (เจือจาง 2 เท่า), 100, 50, 25 และ 12.5 $\mu\text{g/mL}$	44
การคำนวณ $\text{IC}_{50}$ ของสารละลายมาตรฐาน Trolox	45
รูปที่ ผ3 กราฟแสดงความสัมพันธ์ของสารละลายมาตรฐาน Trolox ระหว่างความเข้มข้น 40, 20, 10, 5, 2.5, 1.25 และ 0.625 $\mu\text{g/mL}$ และ ร้อยละการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH (%inhibition) ที่ความยาวคลื่น 517 nm	45
การคำนวณ $\text{IC}_{50}$ ของสารสกัดด้วยเอทานอลโดยใช้ชอกเลต (S1)	46
รูปที่ ผ4 กราฟแสดงความสัมพันธ์ของสารสกัดด้วยเอทานอลโดยใช้ชอกเลต (S1) ระหว่างความเข้มข้น 100, 50, 25 ,12.5 และ 6.25 mg/mL และ 0.625 mg/mL และ ร้อยละการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH (%inhibition)ที่ความยาวคลื่น 517 nm	46
การคำนวณความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของตัวอย่างที่วิเคราะห์เทียบกับสารละลายมาตรฐานโทรลอคซ์ (TEAC, Trolox Equivalents Antioxidant Capacity)	47
รูปที่ ผ5 กราฟแสดงความสัมพันธ์ของสารละลายมาตรฐาน Trolox ระหว่างความเข้มข้น 40, 20, 10, 5, 2.5, 1.25 และ 0.625 $\mu\text{g/mL}$ และค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 nm	47
การคำนวณผลการวิเคราะห์กลุ่มสารที่เป็นองค์ประกอบ	48
รูปที่ ผ6 กราฟแสดงความสัมพันธ์ของสารละลายมาตรฐาน D-glucose ระหว่างความเข้มข้น ( $\mu\text{g/ml}$ ) และค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 nm	49
รูปที่ ผ7 กราฟแสดงความสัมพันธ์ของสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิกที่ความเข้มข้นต่างๆ ดังนี้ 125, 100, 75, 50 และ 25 $\mu\text{g/mL}$ และค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 nm	51
รูปที่ ผ8 $^1\text{H-NMR}$ ของสารสกัดเอทานอลโดยใช้ชอกเลต (S1)	53
รูปที่ ผ9 $^1\text{H-NMR}$ ของสารสกัดด้วยเอทานอล (S2)	53
รูปที่ ผ10 $^1\text{H-NMR}$ ของสารสกัดแยกด้วยเฮกเซน (S1/H)	54



รูปที่ ผ11 1H-NMR ของสารสกัดแยกด้วยไดคลอโรมีเทน (S1/D)	54
รูปที่ ผ12 1H-NMR ของสารสกัดแยกด้วยเมทานอล (S1/M)	55
รูปที่ ผ13 โครมาโทแกรมจากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC ของสารสกัดแยกด้วยไดคลอโรมีเทน (S1/D)	55
รูปที่ ผ14 สารสกัดด้วยเอทานอลโดยใช้ซอกเลต (S1) มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเต้านม (BT474)	56
รูปที่ ผ15 สารสกัดด้วยเอทานอลโดยใช้ซอกเลต (S1) มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งปอด (Chago-K1)	57
รูปที่ ผ16 สารสกัดด้วยเอทานอลโดยใช้ซอกเลต (S1) มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งตับ (Hep-G2)	58
รูปที่ ผ17 สารสกัดด้วยเอทานอลโดยใช้ซอกเลต (S1) มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งกระเพาะอาหาร (KATO-III)	59
รูปที่ ผ18 สารสกัดด้วยเอทานอลโดยใช้ซอกเลต (S1) มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งลำไส้ (SW620)	60
ตารางที่ ผ1 แสดงการทำ TLC	61



แผนภาพที่ 1 การสกัดแยกของสารด้วยเอทานอลโดยใช้ซอกซ์เฮต โดยพิจารณาจากการทำ TLC

17



## สัญลักษณ์และคำย่อ

$^1\text{H}$ NMR	Proton nuclear magnetic resonance
TLC	Thin layer chromatography
IC <sub>50</sub>	Half maximal inhibitory concentration
TEAC	Trolox equivalent antioxidant capacity
mg	มิลลิกรัม
$\mu\text{g}$	ไมโครกรัม
mL	มิลลิลิตร
g	กรัม
mM	มิลลิโมลลาร์
nm	นาโนเมตร
$^{\circ}\text{C}$	องศาเซลเซียส
DMSO	Dimethyl sulfoxide
DPPH	2,2-diphenyl-1-picryl hydrazyl
MTT	3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide
Trolox	6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethyl-3,4-dihydro-2H-1-benzopyran-2-carboxylic-acid
RPMI1640	อาหารเลี้ยงเซลล์
KATO-III	เซลล์มะเร็งกระเพาะอาหาร
BT474	เซลล์มะเร็งเต้านม
SW620	เซลล์มะเร็งลำไส้
Hep-G2	เซลล์มะเร็งตับ
Chago-K1	เซลล์มะเร็งปอด
Wi-38	เซลล์ปอดปกติ



# บทที่ 1

## บทนำ

### 1.1 ความเป็นมาและมูลเหตุจูงใจในการเสนอโครงการ

ในปัจจุบันคนได้ให้ความสำคัญในเรื่องการดูแลสุขภาพร่างกายมากยิ่งขึ้น แต่ด้วยสังคมปัจจุบันมีการเปลี่ยนแปลงจากการทำเกษตรกรรมไปสู่การทำอุตสาหกรรม ซึ่งส่งผลให้การใช้ชีวิตของคนในสังคมนั้นเปลี่ยนแปลงไปด้วยในแง่การใช้แรงงานในการทำงานลดลงมาเป็นการใช้สมองคิดวิเคราะห์ในการทำงานมากขึ้นและการใช้ชีวิตอย่างเร่งรีบภายใต้ภาวะความกดดันทำให้เกิดความเครียด ขาดการออกกำลังกาย การบริโภคอาหารที่ได้สารอาหารแร่ธาตุที่จำเป็นและการพักผ่อนที่ไม่เพียงพอต่อความต้องการของร่างกาย จึงส่งผลให้การดูแลสุขภาพร่างกายไม่ได้ประสิทธิภาพ ทำให้เกิดโรคต่างๆได้ เช่น โรคหลอดเลือดหัวใจตีบ โรคหลอดเลือดสมอง ความดันโลหิตสูง โรคเบาหวานและโรคมะเร็ง เป็นต้น ด้วยเหตุนี้จึงนิยมนำพืชสมุนไพรมาใช้ในการป้องกันการเกิดโรคเหล่านี้ ไม่ว่าจะเป็นในรูปแบบการบริโภคเป็นอาหารทางเลือกหรือนำมาทำเป็นอาหารเสริมต่างๆ โดยที่เป็นที่ได้รับความนิยมคือเห็ด เนื่องจากในด้านโภชนาการนั้นเห็ดมีเส้นใย, วิตามิน, แร่ธาตุและโปรตีนที่สูง และไขมันต่ำ<sup>1</sup> นอกจากนี้เห็ดยังมีองค์ประกอบที่ให้ฤทธิ์ทางชีวภาพในการป้องกันความเสี่ยงในการเกิดโรคต่างๆ เช่น โรคหัวใจและหลอดเลือด, มะเร็ง, โรคเบาหวานและโรคอ้วน<sup>2</sup> และเห็ดที่ได้รับนิยามมาเป็นเวลานานในแถบประเทศจีน ญี่ปุ่น เกาหลีและแถบเอเชียตะวันออก คือเห็ดหลินจือซึ่งมีองค์ประกอบที่ให้ฤทธิ์ทางชีวภาพในการต้านมะเร็ง<sup>3</sup>, ลดระดับน้ำตาลในเลือด<sup>4</sup>, ลดความดันโลหิต<sup>5</sup> และยับยั้งการสังเคราะห์คอเลสเตอรอลได้<sup>6</sup>

เห็ดหลินจือ (Lingzhi) มีสายพันธุ์ที่ขึ้นอยู่กับธรรมชาติกว่า 100 ชนิด และสำหรับสายพันธุ์ที่นิยมคือเห็ดหลินจือแดง มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Ganoderma lucidum* ซึ่งมีลักษณะของดอกเห็ดที่เป็นแผ่น โดยในธรรมชาติอาจพบเห็ดหลินจือแดงที่มีความผิดปกติได้ เนื่องจากเห็ดหลินจือแดงเจริญเติบโตในสภาพแวดล้อมที่มีอากาศไม่เพียงพอ ส่งผลให้เห็ดหลินจือแดงมีลักษณะเป็นเขากวางเหมือนเขากวาง และเห็นดอกเห็ดได้ไม่ชัดเจน จึงเรียกว่าเห็ดหลินจือเขากวาง (The antler-shaped fruiting body of *Ganoderma lucidum*) ซึ่งในปัจจุบันสามารถเพาะเห็ดหลินจือเขากวางได้ แต่ยังมีข้อมูลฤทธิ์ทางชีวภาพของเห็ดหลินจือเขากวางที่ไม่มากนัก

จึงสนใจศึกษาองค์ประกอบทางเคมีและฤทธิ์ทางชีวภาพของเห็ดหลินจือเขากวาง โดยทำการสกัดเห็ดหลินจือเขากวางด้วยตัวทำละลาย (solvent extraction) และการสกัดแบบซ็อกเล็ต (soxhlet extraction) นำสารที่สกัดได้ไปทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพในการต้านเซลล์มะเร็ง 5 ชนิด ได้แก่ เซลล์มะเร็งกระเพาะอาหาร, เต้านม, ลำไส้, ตับและปอด ทดสอบการยับยั้งไลเปสและแอลฟาไกลูโคซิเดส ซึ่งแอลฟาไกลูโคซิเดสเป็นเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับระดับน้ำตาลในเลือด และวิเคราะห์กลุ่มสารที่เป็นองค์ประกอบโดยรวม ได้แก่ total carbohydrate และ total phenolic compound และวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีด้วยเทคนิค NMR และเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (high performance liquid chromatography, HPLC)



## 1.2 เห็ดหลินจือแดง



รูปที่ 1.1 เห็ดหลินจือแดง

ที่มา: <https://olympussenses.com/en/olympus-herbs/votana/votana-olympus/item/68-ganoderma-ganoderma-lucidum>

ชื่อวิทยาศาสตร์:	<i>Ganoderma lucidum</i>
ชื่อวงศ์:	Ganodermataceae
ชื่อสกุล:	Ganoderma
ชื่อสามัญ:	Lingzhi (ชื่อภาษาจีน), Reishi (ชื่อภาษาญี่ปุ่น), Yeongji (ภาษาเกาหลี), Linhchi (ภาษาเวียดนาม), Lingzhi หรือ Lingchih (ชื่อภาษาอังกฤษ)

### ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

ดอกเห็ดมีลักษณะแข็งคล้ายเนื้อไม้สีน้ำตาลเหลืองถึงน้ำตาลแดง ผิวมันเลื่อมรูปลักษณะเหมือนรูปไตหรือรูปครึ่งวงกลม มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 10-18 เซนติเมตร หนา 1-2 เซนติเมตร สปอร์เห็ดมีขนาดเล็กและละเอียด มีสีน้ำตาลเหลือง มีกลิ่นเฉพาะตัวและมีรสขม

### เขตกระจายพันธุ์และแหล่งที่อยู่<sup>7</sup>

พบในบริเวณเส้นศูนย์สูตรถึงเส้นขนานทั้งเหนือและใต้ประมาณ 10 องศา ระดับสูงตั้งแต่ระดับน้ำทะเลถึงสูงกว่าระดับน้ำทะเล 1,000 เมตร อุณหภูมิที่เหมาะสมระหว่าง 8-38 องศาเซลเซียส ถ้าอุณหภูมิต่ำกว่า 0 องศาเซลเซียส เส้นใยและดอกเห็ดยังมีชีวิตแต่ไม่สามารถเจริญเติบโตได้ เมื่ออากาศเริ่มกลับมาอุ่นขึ้น เส้นใยและดอกเห็ดยังสามารถเจริญเติบโตต่อไปได้ เนื่องจากเห็ดหลินจือไม่มีคลอโรฟิลล์ จึงไม่สามารถสร้างอาหารจากการสังเคราะห์แสงได้ แต่ใช้วิธีสร้างเอนไซม์ย่อยสลายเนื้อไม้เพื่อนำมาเป็นอาหารแทน โดยทั่วไปมักจะขึ้นบนต้นไม้ที่ตายแล้วที่มีความชื้นสูงหรือเกาะอยู่กับรากต้นไม้ในสกุล *Quercus*, *Fagus*, *Castanea* ฯลฯ และไม้ที่อยู่ในป่าเต็งรัง ในประเทศไทยพบเห็ดหลินจือขึ้นอยู่บนต้นไม้พวกคูน ก้ามปู ฝรั่ง ยางนา และยางพารา นอกจากนี้ในปัจจุบันเห็นหลินจือสามารถเพาะเลี้ยงได้ โดยใช้วัสดุที่ให้เห็ดหลินจือเกาะและเจริญเติบโตได้แก่ เปลือกเมล็ดพีช, ขี้เลื่อย, ไม้ซุงหรือเศษไม้ก๊อก เป็นต้น

## สรรพคุณ<sup>8</sup>

1. หยุดการเติบโตและต่อต้านเนื้องอกหรือเซลล์มะเร็ง
2. การเพิ่มประสิทธิภาพการทำงานของระบบภูมิคุ้มกัน และช่วยปรับสมดุลของระบบภูมิคุ้มกัน โดยกระตุ้นการสร้างไซโตไคน์ (Cytokine) ซึ่งเป็นสารโปรตีนขนาดเล็กที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกัน
3. การควบคุมระดับน้ำตาลในเลือดสำหรับผู้ป่วยโรคเบาหวานชนิดที่ 2 (Type 2 diabetes) เป็นเบาหวานที่พบเป็นส่วนใหญ่ เกิดจากการที่ตับอ่อนยังสามารถสร้างอินซูลินได้แต่ไม่เพียงพอต่อความต้องการของร่างกาย
4. มีสารต้านอนุมูลอิสระ มีส่วนช่วยในการป้องกันความเสียหายของเซลล์ที่เกิดจากปฏิกิริยาออกซิเดชันในร่างกาย ซึ่งช่วยลดความเสี่ยงในการเกิดการกลายพันธุ์ การเกิดมะเร็งและช่วยป้องกันเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันได้
5. ต้านเชื้อแบคทีเรียและฤทธิ์ต้านไวรัส เช่น บรรเทาอาการปวดแผลและช่วยรักษาแผลจากโรคงูสวัด ซึ่งเกิดจากติดเชื้อไวรัสชนิดเดียวกับไวรัสที่เป็นสาเหตุโรคอีสุกอีใส คือ ไวรัสวาริเซลลา ซอสเตอร์ (Varicella zoster virus) และโรคเริมซึ่งเกิดจากการติดเชื้อไวรัสเฮอร์ปีส์ ซิมเพล็กซ์ (Herpes simplex virus)

### 1.3 เห็ดหลินจือเขากวาง



รูปที่ 1.2 เห็ดหลินจือเขากวาง

ชื่อวิทยาศาสตร์:	<i>Ganoderma lucidum</i>
ชื่อวงศ์:	Ganodermataceae
ชื่อสกุล:	Ganoderma
ชื่อสามัญ:	The Antler-shaped Fruiting Body of <i>Ganoderma lucidum</i>

#### ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

เป็นเขากวางเหมือนเขากวางและเห็นดอกเห็ดได้ไม่ชัดเจน ซึ่งเกิดจากเห็ดหลินจือแดงที่มีความผิดปกติเนื่องจากเห็ดหลินจือแดงเจริญเติบโตในสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม โดยมีปัจจัยจากการที่ได้รับอากาศและแสงไม่เพียงพอ ส่งผลให้ส่วนดอกเจริญเติบโตได้ไม่ดีแต่ส่วนก้านเห็ดที่เจริญเติบโตได้ปกติ



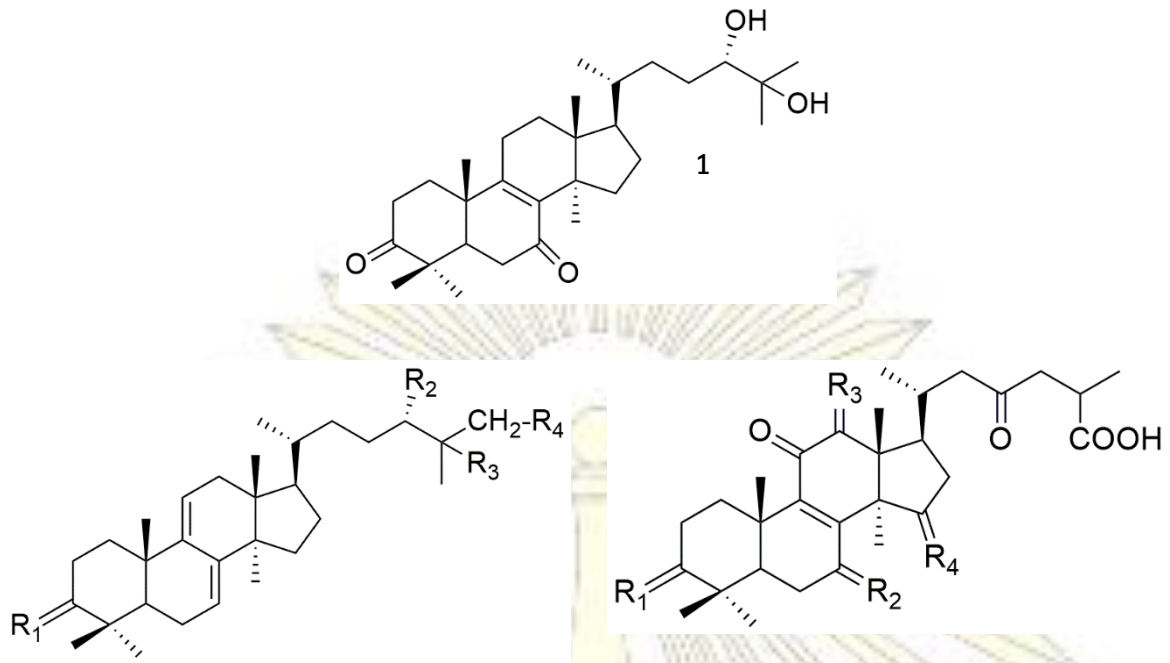


รูปที่ 1.3 เห็ดหลินจือแดงและเห็ดหลินจือเขากวาง

ที่มา: <https://www.istockphoto.com/th/photos/ganoderma-lucidum>

#### 1.4 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ในปี 2003 Min และคณะ<sup>9</sup> ได้สกัดแยกสารจากเห็ดหลินจือเขากวางที่เจริญเติบโตเต็มที่และระยะกำลังเจริญเติบโตโดยใช้คลอโรฟอร์มเป็นตัวทำละลาย แล้ววิเคราะห์สารประกอบไตรเทอร์พีน (Triterpene) ของสารสกัดโดยใช้เครื่องแก๊สโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (high performance liquid chromatography, HPLC) พบว่าปริมาณสารประกอบไตรเทอร์พีน (Triterpene) ของเห็ดหลินจือเขากวางที่เจริญเติบโตเต็มที่มีมากกว่าระยะกำลังเจริญเติบโต และสารประกอบไตรเทอร์พีนที่พบได้แก่ Lucidumol A (1), Ganoderiol A (2), Ganodermanontriol (3), Lucidumol B (4), Ganoderiol F (5), Ganodermanondiol (6), Ganoderic acid B (7), Ganoderic acid A (8), Ganoderic acid  $\alpha$  (9), Ganoderic acid C1 (10), Ganoderic acid H (11) และ Ganolucidic acid A (12) ดังรูปที่ 1.4 ซึ่งสารประกอบไตรเทอร์พีนนั้นเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งปอด จึงสามารถระบุได้ว่าเห็ดหลินจือเขากวางมีฤทธิ์ทางชีวภาพในการต้านมะเร็ง



	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>		R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>
2		OH	OH	OH	7			H <sub>2</sub>	O
3	O	OH	OH	OH	8	O		H <sub>2</sub>	
4		OH	OH	H	9		O		
5	O			H	10	O		H <sub>2</sub>	O
					11		O		O
					12	O	H <sub>2</sub>	H <sub>2</sub>	

รูปที่ 1.4 โครงสร้างของสารประกอบไตรเทอร์พีนที่พบในเห็ดหลินจือเขากวาง

ในปี 2005 Taniguchi และคณะ<sup>10</sup> ได้ทำการศึกษาเกี่ยวกับหนูลดลอง พบว่าสารในเห็ดหลินจือเขากวางสามารถลดระดับของไตรกลีเซอไรด์ (Triglycerides) ในเลือดได้ เมื่อมีระดับของไตรกลีเซอไรด์สูงขึ้น โดยเฉพาะอย่างยิ่งระดับของไตรกลีเซอไรด์สูงหลังรับประทานอาหาร ซึ่งมีความเป็นไปได้ว่าองค์ประกอบทางเคมีในเห็ดหลินจือเขากวางช่วยควบคุมการเกิดโรคหลอดเลือดหัวใจตีบได้

ในปี 2014 Kohguchi และคณะ<sup>11</sup> ได้ทำการศึกษาพบว่าเห็ดหลินจือเขากวางสามารถเพิ่มประสิทธิภาพการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันให้กับร่างกายได้ ซึ่งพบ  $\beta$ -D-glucan ที่มีส่วนช่วยเพิ่มการผลิต Interleukin 12 (IL-12) ในแมกโครเฟจ (macrophage) จึงส่งผลให้มีการกระตุ้นการผลิต IFN- $\gamma$  จาก T-cell ได้เพิ่มขึ้น โดย IFN- $\gamma$  เป็นตัวกระตุ้นการทำงานของแมกโครเฟจ ที่เป็นเซลล์ของระบบภูมิคุ้มกันที่เกิดขึ้นในการตอบสนองต่อการติดเชื้อ หรือการเกิดการเสียหายหรือตายไปของเซลล์ในร่างกาย ซึ่งทำให้ระบบภูมิคุ้มกัน



ทำงานมีประสิทธิภาพดียิ่งขึ้นได้ จึงเป็นตัวบ่งบอกได้ว่าเห็ดหลินจือเขากวางนั้น น่าจะเป็นอาหารเสริมที่มีประสิทธิภาพสำหรับการป้องกันโรคจากโรคมะเร็งและโรคติดเชื้อได้อีกด้วย

ในปี 2018 Sudheer และคณะ<sup>12</sup> ได้ศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของเห็ดหลินจือเขากวาง เมื่อกำหนดสภาพแวดล้อมในการเพาะเห็ดหลินจือเขากวางที่แตกต่างกัน โดยกำหนดปริมาณแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์และแสงที่แตกต่างกัน พบว่า ปริมาณฟีนอลรวม (Total phenolic compounds) ของเห็ดหลินจือเขากวางที่เพาะในที่มืด, ในที่มีแสง, ในที่มีมืดและมีปริมาณแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ 0.5% และในที่มีแสงและมีปริมาณแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ 0.5% มีค่าเป็น 74.43 mg GAE/ g crude, 59.87 mg GAE/ g crude, 44.82 mg GAE/ g crude และ 33.38 mg GAE/ g crude ตามลำดับ ปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ (Total Polysaccharides) ของเห็ดหลินจือเขากวางที่เพาะในที่มืด, ในที่มีแสง, ในที่มีมืดและมีปริมาณแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ 0.5% และในที่มีแสงและมีปริมาณแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ 1% มีค่าเป็น 0.544 mg glucose/ g crude, 0.045 mg glucose/ g crude, 0.392 mg glucose/ g crude และ 0.363 mg glucose/ g crude ตามลำดับ และผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical scavenging capacity (DPPH assay) ของเห็ดหลินจือเขากวางที่เพาะในที่มืด, ในที่มีแสง, ในที่มีมืดและมีปริมาณแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ 1% และในที่มีมืดและมีปริมาณแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ 2% มีค่าเป็น 38.12 mg Trolox/ g crude, 38.47 mg Trolox/ g crude และ 38.61 mg Trolox/ g crude ตามลำดับ

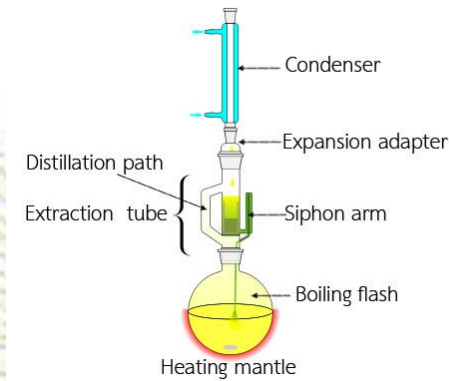
## 1.5 หลักการและทฤษฎี

### 1.5.1 การสกัดด้วยตัวทำละลาย (Solvent extraction)

การสกัดด้วยตัวทำละลายแบ่งได้ 2 แบบคือ

1. Liquid-liquid extraction เป็นการสกัดด้วยตัวทำละลาย โดยใช้ตัวทำละลายของเหลวชนิดหนึ่งสกัดตัวถูกละลายออกจากของเหลวอีกชนิดหนึ่ง
2. Solid-liquid extraction เป็นการสกัดด้วยตัวทำละลาย โดยใช้ตัวทำละลายของเหลวสกัดตัวถูกละลายออกจากของแข็ง ซึ่งการสกัดขึ้นอยู่กับความสามารถละลายของตัวถูกละลายในตัวสกัด โดยต้องใช้ตัวทำละลายที่เหมาะสม การสกัดจะต้องใช้เวลาหากถ้าตัวถูกละลายอยู่ในช่องของแข็ง จึงจำเป็นต้องบดของแข็งให้ละเอียดก่อนทำการสกัด

### 1.5.2 การสกัดแบบซอกท์เลต (Soxhlet extraction)



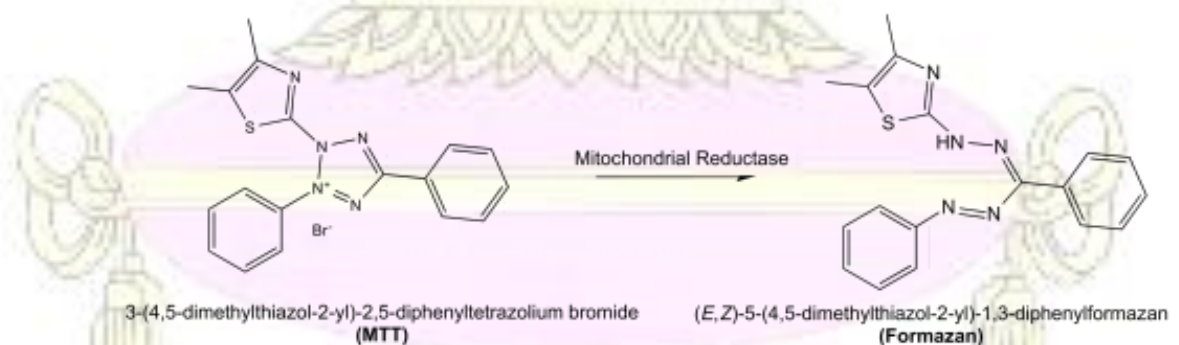
รูปที่ 1.5 อุปกรณ์ในการสกัดแบบซอกท์เลต (Soxhlet extraction)

ที่มา: [https://en.wikipedia.org/wiki/Soxhlet\\_extractor](https://en.wikipedia.org/wiki/Soxhlet_extractor)

หลักการของเครื่องมือซอกท์เลต (soxhlet extraction) สามารถทำการสกัดได้โดยตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดในขวดก้นกลมถูกกลั่นผ่าน Distillation path แล้วควบแน่นภายใน condenser เป็นของเหลว แล้วพาตัวทำละลายไหลกลับลงมายัง Extraction tube จนกระทั่งตัวทำละลายมีปริมาณถึงระดับของ Siphon arm ตัวทำละลายจะถูกดูดกลับลงสู่ขวดก้นกลมเหมือนเดิม ซึ่งตัวทำละลายจะถูกกลั่นแล้วควบแน่นกลับมาสกัดตัวถูกละลายเช่นนี้ต่อไปอย่างต่อเนื่องจนกระทั่งตัวถูกละลายถูกสกัดลงมาในขวดก้นกลมได้อย่างสมบูรณ์

### 1.5.3 MTT assay <sup>13</sup>

MTT assay เป็นวิธีการที่ใช้เพื่อศึกษาปริมาณวิเคราะห์ความอยู่รอดของเซลล์ หลักการคือเซลล์ที่มีชีวิต เท่านั้น จึงจะสามารถเปลี่ยน tetrazolium salt MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide) ซึ่งมีสีเหลืองเป็น formazan salt ด้วย succinate-tetrazolium reductase system ซึ่งพบในปฏิกิริยาห่วงโซ่การหายใจในไมโทคอนเดรียของเซลล์ formazan salt นี้ไม่ละลายน้ำ ในการทดลองจึงใช้สารละลาย DMSO ทำให้เซลล์แตกแล้ว formazan ละลายออกมา เกิดเป็นสารละลายสีม่วง จากนั้นวัดค่าการดูดกลืนแสง ใช้ความยาวคลื่นที่สัมพันธ์กับสี formazan การตรวจ MTT มักจะทำในที่มืด เนื่องจากสารละลาย MTT มีความไวต่อแสง



รูปที่ 1.6 แสดงการรีดิวซ์ MTT เป็น Formazan

ที่มา: [https://en.wikipedia.org/wiki/MTT\\_assay](https://en.wikipedia.org/wiki/MTT_assay)



### 1.5.4 Cell death <sup>14</sup>

Cell death เมื่อการบาดเจ็บของเซลล์รุนแรงมากขึ้น ทำให้เซลล์เปลี่ยนแปลงมากทั้งด้านชีวโมเลกุล โครงสร้างและหน้าที่จนไม่สามารถซ่อมแซมได้ และเซลล์ตายในที่สุด การตายของเซลล์แบ่งตามลักษณะการเปลี่ยนแปลงทางโครงสร้าง กลไกการเกิดและบทบาทที่พบการเปลี่ยนแปลง เป็น Necrosis และ Apoptosis

#### 1. การตายแบบ Apoptosis

เป็นการตายของเซลล์เดี่ยวๆ เมื่อหมดอายุขัยตามที่กำหนดไว้ ซึ่งเรียกว่า programmed cell death หรือเป็น suicide program ก็ได้ เมื่อเซลล์ถูกกำหนด หรือถูกสิ่งเร้าบางอย่างกระตุ้นทำให้เอนไซม์ต่าง ๆ ภายในเซลล์ถูกกระตุ้นตามลำดับ และย่อยสลายทั้ง Nuclear DNA และโปรตีนต่าง ๆ ทั้งที่อยู่ในนิวเคลียสและในเซลล์ สุดท้ายเซลล์จะแตกออกเป็นชิ้นส่วนเล็ก ๆ ที่เรียกว่า Apoptotic bodies ซึ่งมี cell membrane ล้อมรอบและ ภายใน Apoptotic bodies จะประกอบด้วยเศษนิวเคลียส และ organelles ต่างๆ หลังจากนั้น เซลล์ข้างเคียงและ เซลล์ Macrophages จะเก็บ Apoptotic bodies เข้าไปทำลายโดยไม่มีปฏิกิริยาการอักเสบ ดังนั้นจึงเป็นที่ยอมรับถึงความแตกต่างทั้งสาเหตุทั่วโลก และพยาธิสภาพของ Apoptosis และ Necrosis ซึ่งสาเหตุการตายของเซลล์ อาจจะเป็นตามอายุขัยที่กำหนดไว้แล้ว โดยเฉพาะในช่วงเจริญเติบโตของทารกในครรภ์ ตามปกติหรือปัจจุบันพบว่า อาจจะมีเกี่ยวข้องกับ pathologic stimuli บางอย่างมากจะทำให้เริ่มจากที่ DNA ภายใน nucleus เสียสภาพไม่สามารถซ่อมแซมได้ เซลล์จะทำลายตนเองโดยเริ่มต้นจากการเปลี่ยนแปลงภายใน Nucleus ก่อน จากนั้นเซลล์จะแตกออกเป็นชิ้นๆ โดยที่ไม่มีความผิดปกติของ membrane หลังจากนั้นส่วนของเซลล์ที่แตกเป็นชิ้น ๆ นั้นจะถูกเก็บกินโดยเซลล์ข้างเคียงหรือ Macrophages เนื่องจากการตายของเซลล์แบบ Apoptosis จะเริ่มต้นด้วยการเปลี่ยนแปลงที่นิวเคลียสก่อน โดย Chromatin จะติดสีเข้มและจับตัวเป็นกลุ่มก้อน (Clumps) ไปติดอยู่ที่ nuclear membrane ต่อมาทั้งตัวเซลล์และ nucleus จะย่นไปงอกโดยรอบ หลังจากนั้นเซลล์ก็แตกออกเป็นชิ้นส่วนเล็ก ๆ เรียก Apoptotic bodies และ Apoptotic bodies จะถูกกิน หรือ Phagocytosis โดยเซลล์ข้างเคียง และเม็ดเลือดขาวพวก macrophages จนหมด โดยไม่เกิดปฏิกิริยาการอักเสบของร่างกาย ลักษณะที่เห็นจากกล้องจุลทรรศน์ธรรมดา พบว่าเซลล์จะเหี่ยว (Cell Shrinkage) มี cytoplasm ที่แดงเข้ม นิวเคลียสมีการติดสีโครมาตินสีน้ำเงินที่เข้ม ต่อมาจะเห็นลักษณะยื่นออกของทั้งผิวของนิวเคลียสและเซลล์ออกไปเป็นชิ้นส่วนเล็กๆ (Formation of Cytoplasmic Bleb and apoptotic bodies) โดยแต่ละส่วนจะมี cell membrane ล้อมรอบและภายในก็มีทั้ง เศษนิวเคลียสและ organelles เรียกว่า Apoptotic bodies และสุดท้ายเซลล์ macrophages หรือเซลล์ข้างเคียง จะกินส่วนดังกล่าวเข้าไปย่อยภายในเซลล์ เรียกว่า Phagocytosis of Apoptotic bodies

#### 2. การตายแบบเฉพาะส่วน

การตายแบบเฉพาะส่วน หรือ Necrosis การตายแบบนี้จะมีการหลั่งเอนไซม์พิเศษ คือเริ่มจากการเปลี่ยนแปลงที่ membrane ของทั้งเซลล์และ organelles ภายในเซลล์ ทำให้ lysosomal enzyme ไหลออกจาก lysosome เข้าสู่ cytoplasm และย่อยสลายโปรตีนและส่วนต่างๆภายในเซลล์หรืออาจออกมาข้างนอก เซลล์จึงทำให้เกิดการทำลายเซลล์ข้างเคียงด้วย เนื่องจากภายหลังที่เซลล์ตาย เซลล์ไม่สามารถรักษาสภาพของ cell membrane ดังนั้นส่วนประกอบภายในเซลล์จะไหลสู่ภายนอกและกระตุ้นขบวนการอักเสบตามมา ส่วน



หนึ่งของเอนไซม์ที่ย่อยเซลล์นั้นจะมาจาก lysosome ของเซลล์ที่ตายเอง เรียกว่า Autolysis หรือ จากเอนไซม์ที่หลังจากเซลล์อักเสบ เรียกว่า Heterolysis จากการศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์ธรรมดา พบว่า Cytoplasm ของเซลล์ตายแบบ Necrosis จะแดงมากขึ้น เนื่องจากความผิดปกติของ RNA ใน Cytoplasm เอง และการที่สีย้อมขึ้นเนื้อชนิด Eosin ซึ่งเป็นสีแดงจับกับโปรตีนที่เสียสภาพใน Cytoplasm มากขึ้น นอกจากนั้นจะพบว่า Cytoplasm จะมีลักษณะติดสีแดงที่เนียนๆไม่เหมือนปกติ เนื่องจาก Glycogen ที่สะสมใน Cytoplasm หายไป และในระยะต่อมาอาจจะมีการสะสมของ Calcium salt ตามมาได้ สำหรับ Nucleus ก็จะมีการเปลี่ยนแปลงได้ 3 แบบ คือ

Karyolysis เป็นการเปลี่ยนแปลงของนิวเคลียสโดยจะพบว่าสีน้ำเงินของนิวเคลียสจะจางลง และไม่คมชัด เนื่องจากปฏิกิริยาของเอนไซม์ endonuclease ต่อ Chromatin

Pyknosis คือ การเปลี่ยนแปลงที่นิวเคลียสโดยนิวเคลียสจะเหี่ยวและมีสีน้ำเงินเข้ม เนื่องจาก DNA รวมตัวเป็นก้อนสีน้ำเงินเข้ม (อาจจะพบในการตายของเซลล์แบบ Apoptosis ได้เช่นกัน) -

Karyorrhexis นิวเคลียสที่เหี่ยวและจับเป็นกลุ่มก้อนสีน้ำเงิน (Pyknosis) จะแตกออกเป็นชิ้นเล็กๆ อย่งไรก็ตามสุดท้ายอาจพบเซลล์ตายโดยที่ไม่เห็นส่วนของนิวเคลียสเนื่องจากการนิวเคลียสของเซลล์ที่ตายจะแตกเป็นชิ้นส่วนเล็กๆและสลายไปในที่สุด

ลักษณะการตายเฉพาะส่วนของเนื้อเยื่อแบ่งออกเป็น 5 รูปแบบเด่นๆ ได้ดังนี้

1. Coagulative necrosis แม้ว่าเนื้อเยื่อตายแล้วแต่ยังมีการคงสภาพหรือโครงสร้างของเนื้อเยื่อที่ตายไว้ในระยะหนึ่งเข้าใจว่า เกิดจากการเสียสภาพของโปรตีนรวมทั้งเอนไซม์ต่างๆภายในเซลล์ เนื้อเยื่อไตส่วนที่ตายจะคงสภาพอยู่เห็นขอบเขตแยกจากส่วนที่ไม่ตายได้ชัดและมีสีซีดกว่าเนื้อเยื่อข้างเคียง และผลการศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์ธรรมดา พบว่า มีการคงสภาพของโครงสร้างของเนื้อเยื่อไต ทั้งส่วนที่เป็น Glomerulus และ tubules แต่ภายในเซลล์ที่ตายไม่เห็นนิวเคลียสแล้ว และ Cytoplasm มีสีชมพูแดงเข้มสม่ำเสมอ

2. Liquefactive necrosis ภายหลังที่เซลล์และเนื้อเยื่อตายมีการย่อยสลายเซลล์และเนื้อเยื่อที่ตายโดยเอนไซม์ภายใน Lysosome ของเซลล์เอง เช่น กรณีเนื้อสมองตายจากการขาดเลือด และ/หรือมีการย่อยสลายโดย เอนไซม์จากเซลล์อักเสบในปฏิกิริยาการอักเสบ เช่น การอักเสบเป็นหนอง (Pus Formation หรือ Suppurative Inflammation) ดังนั้นส่วนของเนื้อตายจะเปลี่ยนสภาพเป็นของเหลว

3. Fat necrosis เป็นผลจากการทำงานของเอนไซม์ไลเปสย่อยเนื้อเยื่อไขมัน ลักษณะเนื้อตายเป็นสีเหลืองซีด อาจเห็นจุดขาวคล้ายขอล์ค ในกล้องจุลทรรศน์จะเห็นบริเวณเซลล์ไขมันที่ถูกเอนไซม์ย่อยเป็นป็นสีชมพู อมม่วง ในขณะที่เซลล์ที่ตายแบบไม่มีเอนไซม์ย่อยจะเห็นเซลล์ไขมันเสื่อมปะปนกับฮิสติโอไซต์ (histiocyte) ในบางครั้งอาจพบปฏิกิริยาการเปลี่ยนเป็นสบู่ (saponification) ในเนื้อเยื่อได้พบในตับอ่อนอักเสบเฉียบพลันและการตายของเนื้อเยื่อเต้านม

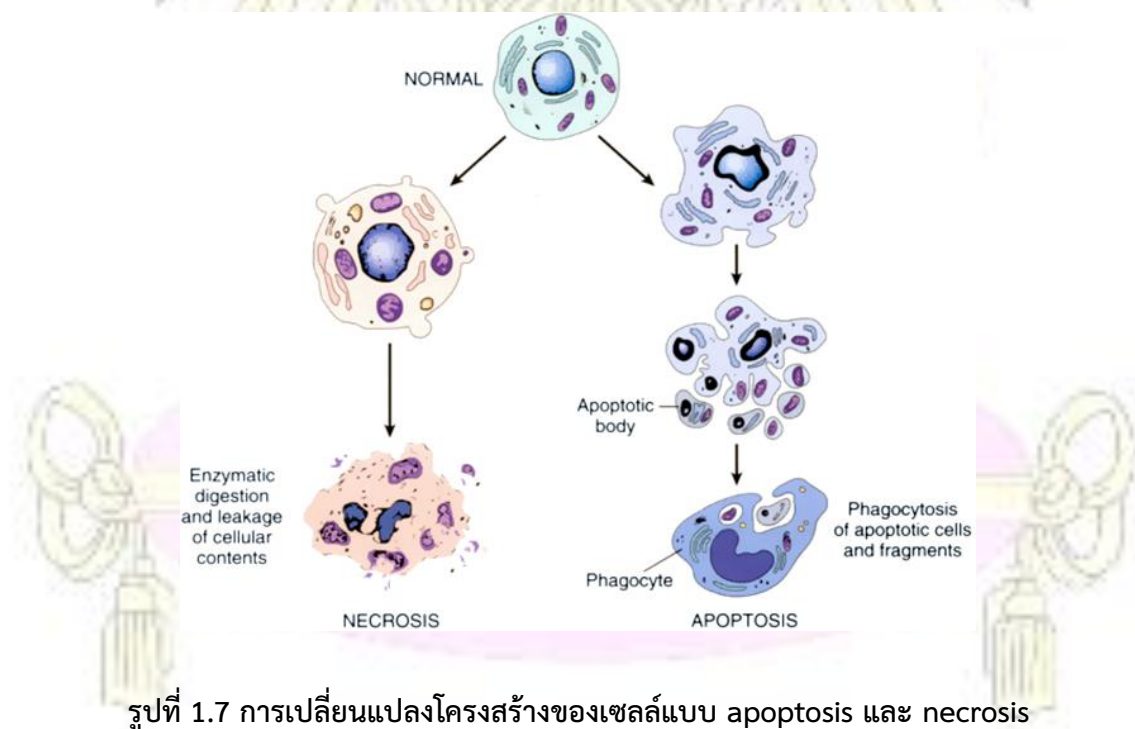
4. Caseous necrosis เป็นลักษณะการตายแบบ coagulation necrosis ที่จำเพาะต่อเชื้อไมโคแบคทีเรีย (mycobacteria) (เช่นวัณโรค) , เชื้อรา, และวัตถุแปลกปลอมบางชนิดบริเวณที่ตายจะออกสีเหลืองเหมือนเนย ไม่เป็นช่องว่างมีขอบเขตเซลล์ไม่ชัด Cytoplasm สีชมพูปริมาณมาก เรียกว่า Epithelioid histiocytes และ Multinucleated giant cells (ซึ่งเกิดจากเซลล์ Epithelioid histiocytes หลากๆ เซลล์รวมตัว กันเป็นเซลล์ตัวโตที่มีหลายนิวเคลียส) การรวมกลุ่มของเซลล์ดังกล่าวเรียกว่า Granuloma และพบการ

ตายรูปแบบคล้ายกับ Coagulative necrosis ตรงกลาง Granuloma จึงเรียกว่า Caseous Necrosis อาจกล่าวได้ว่า เป็นการตายรูปแบบผสมระหว่าง coagulative และ liquefactive necroses

5. Fibrinoid necrosis เป็นรูปแบบพิเศษของการตายของเนื้อเยื่อแบบ Necrosis ที่ หลอดเลือดส่วนใหญ่เกิดจากปฏิกิริยาภูมิคุ้มกันของร่างกายเอง และเมื่อมีการสะสมของ immune complex ที่ผนังของหลอดเลือด ดังนั้นผนังของ หลอดเลือดจะถูกแทนที่ด้วยป็นสีชมพูซึ่งเป็น immune complex และอาจพบ Fibrinoid Necrosis ของ Arterioles ในผู้ป่วยความดันโลหิตสูงที่รุนแรงได้

### ตารางที่ 1.1 แสดงการเปรียบเทียบลักษณะของ Necrosis กับ Apoptosis

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



รูปที่ 1.7 การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของเซลล์แบบ apoptosis และ necrosis

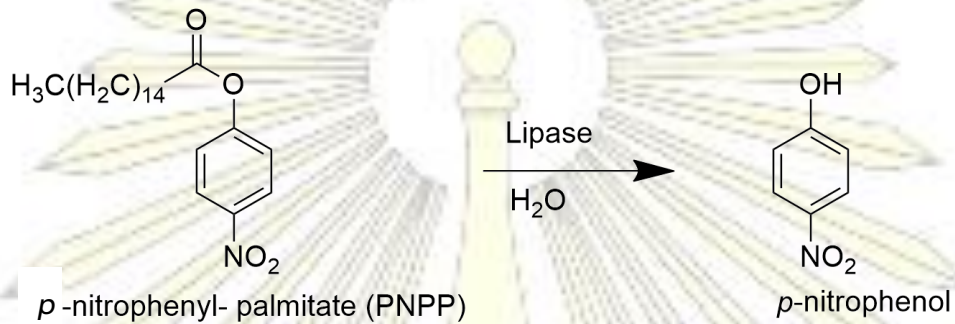
ที่มา: <http://drrajivdesaimd.com/apoptosis-vs-necrosis-4/>



### 1.5.5 การทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ไลเปส (Lipase enzyme) <sup>15</sup>

เอนไซม์ไลเปส หรือ triacylglycerol acylhydrolase เป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส (hydrolysis) ของไตรกลีเซอไรด์ให้เปลี่ยนเป็นกลีเซอรอลและไขมัน พบได้ทั่วไปในสิ่งมีชีวิตหลายชนิดทั้งคน สัตว์ พืช แบคทีเรีย ยีสต์และเชื้อรา

เป็นวิธีทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ไลเปส โดยใช้ reagent คือ *p*-nitrophenyl palmitate (PNPP) ซึ่งเป็นสารละลายใสไม่มีสีทำหน้าที่เป็น substrate ซึ่งสามารถถูกไฮโดรไลซ์ไปเป็น *p*-nitrophenol ซึ่งมีสีเหลือง เมื่อ PNPP ทำปฏิกิริยากับไลเปส ดังรูปที่ 1.8 วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 405 นาโนเมตร

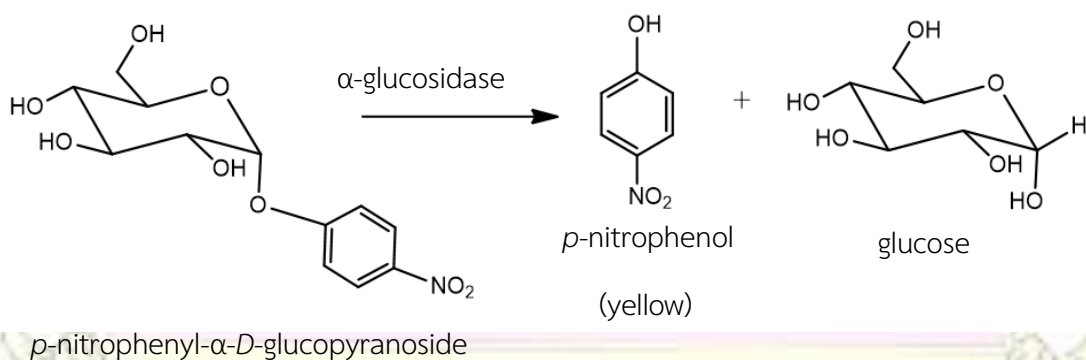


รูปที่ 1.8 ปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของ *p*-nitrophenyl- palmitate (PNPP)

### 1.5.6 การทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดส ( $\alpha$ -Glucosidase enzyme) <sup>16</sup>

เอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดส เป็นเอนไซม์ที่พบที่ผนังลำไส้เล็ก ทำหน้าที่ย่อยคาร์โบไฮเดรตและโอลิโกแซคคาไรด์ (oligosaccharide) ให้เป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว (monosaccharide) หรือน้ำตาลกลูโคส

เป็นวิธีวิเคราะห์ความสามารถในการยับยั้งเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดส โดยใช้ reagent คือ *p*-nitrophenyl- $\alpha$ -D-glucopyranoside (PNP-G) ซึ่งเป็นสารละลายใสไม่มีสีทำหน้าที่เป็น substrate ซึ่งสามารถถูกไฮโดรไลซ์ไปเป็น *p*-nitrophenol ซึ่งให้สีเหลือง และกลูโคส เมื่อ PNP-G ทำปฏิกิริยากับแอลฟาไกลูโคซิเดส ดังรูปที่ 1. วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 405 nm

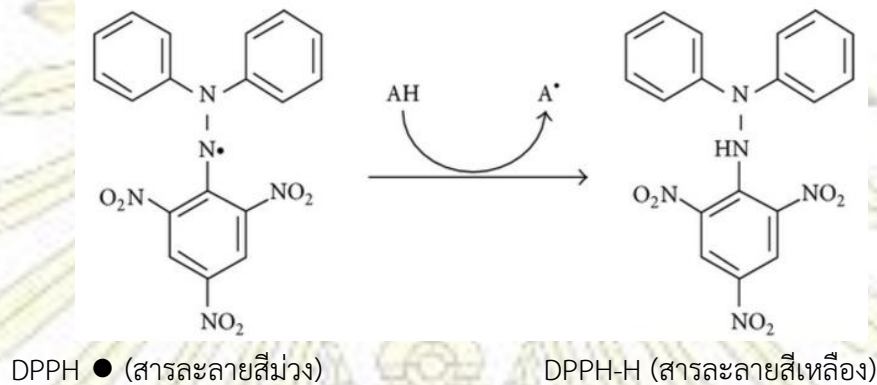


รูปที่ 1.9 ปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของ *p*-nitrophenyl- $\alpha$ -D-glucopyranoside



### 1.5.7 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical scavenging capacity (DPPH assay) <sup>17</sup>

เป็นวิธีวิเคราะห์ความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ โดยใช้ reagent คือ 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) ซึ่งเป็นวิธีที่ง่าย สะดวก และรวดเร็ว เมื่อสารที่ต้องการวิเคราะห์มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระจะสามารถรับอิเล็กตรอน หรือไฮโดรเจนจากอนุมูลอิสระ DPPH สีของสารละลายจะเปลี่ยนจากสีม่วงเป็นสีเหลือง วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 517 nm โดยเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระกับสารมาตรฐาน เช่น Trolox, BHT, ABTH



รูปที่ 1.10 ความสามารถในการรับอิเล็กตรอนของอนุมูลอิสระ DPPH

### 1.5.8 การวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลรวม (Total phenolic compounds) ด้วยวิธี Folin-Ciocalteu reagent <sup>18</sup>

สารประกอบฟีนอล (Phenolic compounds) มีสูตรโครงสร้างทางเคมีเป็นวงแหวนที่เป็นอนุพันธ์ของวงแหวนเบนซีน มีหมู่ไฮดรอกซิล (-OH group) อย่างน้อยหนึ่งหมู่

Folin-Ciocalteu reagent เป็นสารละลายผสมระหว่าง Phosphomolybdic acid และ Phosphotungstic acid โดยกลไกการทำงานของ Folin-Ciocalteu reagent คือการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันและรีดักชัน ซึ่งเกิดภายใต้สภาวะที่เป็นเบสด้วยการเติมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต ทำให้สารประกอบฟีนอลแตกตัวเป็นไอออนโดยจะถูกออกซิไดส์ด้วย Folin-Ciocalteu reagent ได้ง่ายกว่าฟีนอลในรูปกรด หลังจากเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันและรีดักชันแล้ว Phosphomolybdic acid และ Phosphotungstic acid จะถูกเปลี่ยนไปเป็นตะกอนแขวนลอยสีน้ำเงินเข้ม ซึ่งดูดกลืนแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่น 765 nm และมีปริมาณเป็นสัดส่วนสัมพันธ์กับสารประกอบฟีนอลที่เกิดปฏิกิริยารีดอกซ์กับตัวรีเอเจนต์ไป จึงใช้หาปริมาณฟีนอลรวมได้

### 1.5.9 เครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (High Performance Liquid Chromatography, HPLC)

เป็นเครื่องมือใช้สำหรับแยกสารประกอบที่ผสมอยู่ในตัวอย่าง โดยการแยกสารประกอบจะเกิดขึ้นระหว่างเฟส 2 เฟส คือ เฟสอยู่กับที่ (stationary phase) ที่อยู่ในคอลัมน์ (column) กับเฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) ซึ่งจะถูกละลายออกมาในเวลาที่แตกต่างกัน สารผสมที่อยู่ในตัวอย่างสามารถถูกแยกออกจากกันได้นั้น จะ

ขึ้นอยู่กับความสามารถในการเข้ากันได้ดีของสารนั้นกับเฟสที่เคลื่อนที่ หรือเฟสที่อยู่กับที่โดยสารประกอบตัว ไหนที่สามารถเข้ากันได้ดีกับเฟสที่เคลื่อนที่สารนั้นก็จะถูกแยกออกมาก่อน ส่วนสารที่เข้ากันได้ไม่ดีกับเฟสที่เคลื่อนที่ หรือเข้ากันได้ดีกับเฟสอยู่กับที่ก็จะถูกแยกออกมาทีหลัง โดยสารที่ถูกแยกออกมาได้นี้จะถูกตรวจวัด สัญญาณด้วยตัวตรวจวัดสัญญาณ (detector) และสัญญาณที่บันทึกได้จากตัวตรวจวัดจะมีลักษณะเป็นพีค ซึ่งจะเรียกว่าโครมาโทแกรม (chromatogram)

### 1.6 วัตถุประสงค์งานวิจัย

เพื่อแยกสารจากเห็ดหลินจือเขากวางที่ให้ฤทธิ์ทางชีวภาพ ได้แก่ ต้านมะเร็ง, ต้านอนุมูลอิสระ และ สารยับยั้งไลเปสและแอลฟาไกลูโคซิเดส

### 1.7 ประโยชน์คาดว่าจะได้รับ

ได้สารจากเห็ดหลินจือเขากวางที่ให้ฤทธิ์ทางชีวภาพ ได้แก่ ต้านมะเร็ง, ต้านอนุมูลอิสระ, สารยับยั้งไลเปสและแอลฟาไกลูโคซิเดส



## บทที่ 2

### การทดลอง

#### 2.1 วัตถุประสงค์

หาค่าความเข้มข้นของเชื้อไวรัสจากที่อยู่ที่อยู่ 100/1 ม.5 ต.พระนอน อ.นครหลวง จ.พระนครศรีอยุธยา

##### 2.1.1 การเตรียมหัดหลินจือเขากวางหั่ง

1. เพาะหัดหลินจือเขากวาง โดยควบคุมระบบการเพาะในที่มีอากาศน้อยและแสงน้อย
2. ใช้ระยะเวลาในการเจริญเติบโตประมาณ 75 วัน จึงทำการเก็บหัด
3. นำหัดหลินจือเขากวางไปนึ่งเพื่อกำจัดพวกไข่สัตว์ไข่แมลงและเชื้อโรค
4. ทำให้หัดหั่ง โดยการนำไปอบที่ 50-60 °C หรือนำไปตากแดดจนหั่ง

#### 2.2 เครื่องมือและอุปกรณ์

1. บีกเกอร์ขนาด 25, 50, 250, 500, 1,000 มิลลิลิตร
2. กระบอกตวง 10, 100 และ 500 มิลลิลิตร
3. ขวดกั้นกลมขนาด 50, 100, 250 และ 500 มิลลิลิตร
4. ขวดรูปชมพู่ขนาด 25, 50 และ 250 มิลลิลิตร
5. ขวดกำหนดปริมาตรขนาด 5, 10 และ 50 มิลลิลิตร
6. Micro Tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร
7. กรวยแก้ว
8. กระดาษนาฬิกา
9. หลอดคาปิลลารี (Capillary Tube)
10. แห้งแก้วคนสาร
11. หลอดหยด
12. กระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1
13. อะลูมิเนียมฟอยด์
14. เศษกระเบื้อง
15. Magnetic bar
16. Extraction Tube สำหรับ Soxhlet extractor
17. Condenser สำหรับ Soxhlet extractor
18. Thin layer chromatography (TLC)
19. 96-well (8×12) microtiter plate
20. Micropipette ขนาด 100 µL และ 1,000 µL
21. Tissue culture flask 25 cm<sup>3</sup>
22. Tissue culture plate 96 well



23. NMR Tube และ ฝาปิดหลอด NMR
24. ช้อนตักสาร (Spatula)
25. Parafilm
26. กระดาษกรองชา
27. เครื่องปั่น
28. Heating mantle
29. Hot plate
30. CO<sub>2</sub> Incubator
31. เครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุน (Rotary evaporator)
32. เครื่องชั่งไฟฟ้า 2 และ 4 ตำแหน่ง
33. Ultrasonic sonicator
34. เครื่อง Microtiter Plate Reader
35. เครื่อง Nuclear Magnetic Resonance Spectrometer (NMR)
36. เครื่อง High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

### 2.3 สารเคมี

1. เอทานอล (Ethanol)
2. เฮกเซน (Hexane)
3. ไดคลอโรมีเทน (Dichloromethane)
4. เมทานอล (Methanol)
5. ไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (Dimethyl sulfoxide, DMSO)
6. Deuterated solvents for NMR ได้แก่ Chloroform และ Dimethyl sulfoxide-D<sub>6</sub>
7. ทริปซิน (Trypsin)
8. Liquid and powder medium (RPMI1640)
9. Fetal calf serum
10. MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide)
11. Trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethyl-3,4-dihydro-2H-1-benzopyran-2-carboxylic acid)
12. DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl)
13.  $\alpha$ -glucosidas
14. Potassium phosphate buffer
15. *p*-nitrophenyl- $\alpha$ -D-glucopyranoside (PNPG)
16. Tris hydrochloride (Tris-HCl)
17. *p*-nitrophenyl palmitate (pNPP)

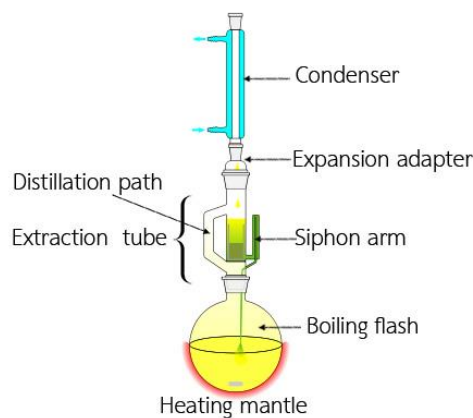
18. Pancreatic lipase enzyme
19. กลูโคส (D-glucose)
20. ฟีนอล (Phenol)
21. กรดซัลฟิวริกเข้มข้น (Concentrated sulfuric acid)
22. กรดแกลลิก (Gallic acid)
23. โซเดียมคาร์บอเนต (Sodium carbonate,  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ )
24. Folin-Ciocalteu reagent

## 2.4 วิธีทดลอง

### 2.4.1 การสกัดหัตถ์หินจือเขากวาง

#### 2.4.1.1 การสกัดด้วยเอทานอลโดยใช้ซอกเกต (S1)

1. นำหัตถ์หินจือเขากวางถูกปั่นเป็นชิ้นเล็กๆ หนัก 30.06 g ใส่ในถุงกรองชา แล้วนำไปบรรจุลงใน Extraction tube
2. ใส่เอทานอล 400 มิลลิลิตรและใส่เศษกระเบื้องลงในขวดก้นกลมขนาด 500 mL
3. ประกอบอุปกรณ์การสกัดด้วยซอกเกต (Soxhlet extraction) ดังรูปที่ 2.1
4. เปิดเตาให้ความร้อนแบบหลุม (Heating mantle) แล้วทำการสกัดเป็นเวลา 12 ชั่วโมง
5. รอให้สารละลายในขวดก้นกลมเย็นตัวลง แล้วนำสารละลายที่ได้ไประเหยตัวทำละลายออก โดยใช้เครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุน (Rotary evaporator) ได้เป็นสารสกัดหัตถ์หินจือเขากวางหนัก 2.3106 g



รูปที่ 2.1 อุปกรณ์ในการสกัดแบบซอกเกต (Soxhlet extraction)

ที่มา: [https://en.wikipedia.org/wiki/Soxhlet\\_extractor](https://en.wikipedia.org/wiki/Soxhlet_extractor)

#### 2.4.1.2 การสกัดด้วยเอทานอล (S2)

1. นำหัตถ์หินจือเขากวางหนัก 50.05 g ที่ถูกปั่นเป็นชิ้นเล็กๆ ด้วยเครื่องปั่น มาแช่ด้วยเอทานอล 500 mL ในบีกเกอร์ 1000 mL ปิดด้วยกระดาษอลูมิเนียมฟอยด์และฝา เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
2. กรองหัตถ์หินจือเขากวางด้วยกระดาษกรอง แล้วนำสารละลายที่ได้ไประเหยตัวทำละลายออก โดยใช้เครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุน (Rotary evaporator) ได้เป็นสารสกัดหัตถ์หินจือเขากวาง

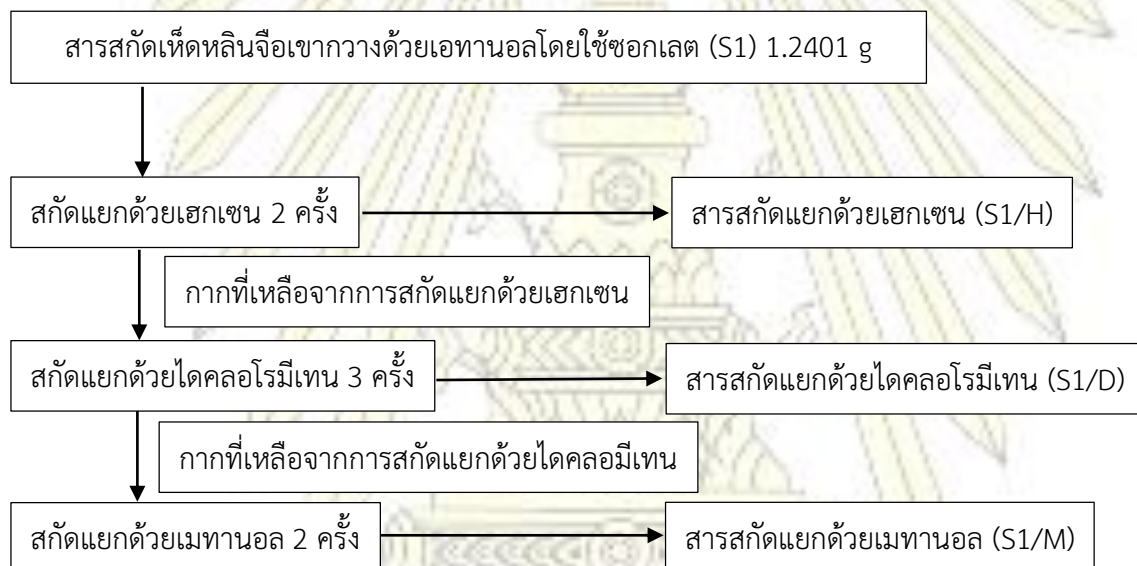
3. นำกากที่เหลือจือเขากวางไปทำการสกัดซ้ำอีกสองรอบโดยใช้เอทานอลเป็นตัวทำละลาย แล้วนำสารสกัดที่ได้จากการสกัดมารวมกัน ได้สารสกัดเห็ดหลินจือเขากวางหนัก 1.7413 g

#### 2.4.1.3 การสกัดด้วยน้ำ (S3)

1. ทำการสกัดสารตัวอย่างจากเห็ดหลินจือเขากวาง โดยใช้เห็ดแห้ง 1.5 g ลงในน้ำ 50 mL ที่ร้อนเป็นเวลา 2 ชั่วโมงและใช้ magnetic bar กวนสาร
2. กรองเห็ดหลินจือเขากวางด้วยกระดาษกรอง เก็บส่วนที่เป็นสารละลายไว้เป็นสารละลายจากการสกัดครั้งแรก แล้วนำส่วนที่เป็นตะกอนไปทำสกัดซ้ำเป็นครั้งที่สองด้วยน้ำร้อน 50 mL เป็นเวลา 6 ชั่วโมง
3. กรองเห็ดหลินจือเขากวางด้วยกระดาษกรอง เก็บส่วนที่เป็นสารละลายไว้เป็นสารละลายจากการสกัดครั้งที่สอง
4. รวมสารละลายที่ได้จากการสกัดเห็ดหลินจือเขากวางทั้งสองครั้งด้วยกัน แล้วนำไประเหยน้ำออกได้สารสกัดเห็ดหลินจือเขากวางหนัก 0.0802 g

#### 2.4.1.4 การสกัดแยก

เป็นการนำสารสกัดเห็ดหลินจือเขากวางด้วยเอทานอลโดยใช้ชอกเลต (S1) หนัก 1.2401 g มาทำการสกัดซ้ำดังแผนภาพต่อไปนี้



แผนภาพที่ 1 การสกัดแยกของสารด้วยเอทานอลโดยใช้ชอกเลต โดยพิจารณาจากการทำ TLC

1. นำสารสกัดด้วยเอทานอลโดยใช้ชอกเลตสกัดแยกด้วยเฮกเซนทั้งหมด 2 ครั้ง ครั้งละ 50 mL ลงในขวดก้นกลมที่มีสารสกัด
2. นำไปโซนิเคตเป็นเวลา 15 นาที แล้วรินเฉพาะสารละลายลงในขวดก้นกลม
3. นำสารละลายจากการสกัดแยกด้วยเฮกเซนทั้ง 2 ครั้งมารวมกัน แล้วระเหยตัวทำละลายออกโดยใช้เครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุน (Rotary evaporator) ได้เป็นสารสกัดแยกด้วยเฮกเซน (S1/H) 0.0828 g
4. นำการที่เหลืจากการสกัดแยกด้วยเฮกเซนสกัดแยกด้วยไดคลอโรมีเทนทั้งหมด 3 ครั้ง ครั้งละ 50 mL ลงในขวดก้นกลมที่มีสารสกัด



5. นำไปโซนิเคตเป็นเวลา 15 นาที แล้วรินเฉพาะสารละลายลงในขวดก้นกลม
6. นำสารละลายจากการสกัดแยกด้วยไดคลอโรมีเทนทั้ง 3 ครั้งมารวมกัน แล้วระเหยตัวทำละลายออกโดยใช้เครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุน (Rotary evaporator) ได้เป็นสารสกัดแยกด้วยไดคลอโรมีเทน (S1/D) 0.8246 g
7. นำกากที่เหลือจากการสกัดแยกด้วยไดคลอโรมีเทนสกัดด้วยเมทานอลทั้งหมด 2 ครั้ง ครั้งละ 50 mL ลงในขวดก้นกลมที่มีสารสกัด
8. นำไปโซนิเคตเป็นเวลา 15 นาที แล้วรินเฉพาะสารละลายลงในขวดก้นกลม
9. นำสารละลายจากการสกัดด้วยเมทานอลทั้ง 2 ครั้งมารวมกัน แล้วระเหยตัวทำละลายออกโดยใช้เครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุน (Rotary evaporator) ได้เป็นสารสกัดแยกด้วยเมทานอล (S1/M) 0.1651 g

## 2.4.2 การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ

### 2.4.2.1 การทดสอบการเป็นพิษต่อเซลล์ (Cytotoxicity assay)

ส่งตัวอย่างสารทดสอบที่สถาบันวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



## 1. การเลี้ยงเซลล์

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

ชื่อในห้องปฏิบัติการ	ชื่อสามัญ	แหล่งที่มาของเซลล์
KATO-III	เซลล์มะเร็งกระเพาะอาหาร	Gastric carcinoma, Human
BT474	เซลล์มะเร็งเต้านม	Ductal carcinoma, breast, Human
SW620	เซลล์มะเร็งลำไส้	Lymph node metastasis, colon adenocarcinoma, Human
Hep-G2	เซลล์มะเร็งตับ	Liver hepatoblastoma, Human
Chago-K1	เซลล์มะเร็งปอด	Lung undifferentiated, Human
Wi-38	เซลล์ปกติ	Fibroblast, lung, Human

1.1 เลี้ยงเซลล์ใน tissue culture flask ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI1640 ที่ผสม fetal calf serum 5%

1.2 ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์เก่าออก เติม 0.05% trypsin+0.01% EDTA ปริมาตร 0.5-1 mL ใช้เวลาบ่มประมาณ 2-5 นาที จนเซลล์หลุด แล้วดูด trypsin ที่

1.3 เติมอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI1640 ที่ผสม fetal calf serum 5% 7 mL ลงใน tissue culture flask บ่ม ที่ 37 °C 5% CO<sub>2</sub>

## 2. การเตรียมเซลล์

2.1 นำเซลล์ที่เลี้ยงใน tissue culture flask ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์เก่าออก เติม 0.05% trypsin+0.01% EDTA ปริมาตร 0.5-1 mL ใช้เวลาบ่มประมาณ 2-5 นาที จนเซลล์หลุด แล้วดูด trypsin ที่

2.2 เติมอาหารเลี้ยงเซลล์ใหม่ เคาะให้เซลล์หลุด เจือจางให้เซลล์มีความเข้มข้น  $2.5 \times 10^4$  cell/mL เติมเซลล์ ปริมาตร 100  $\mu$ L ลงใน 96-well Plates ที่มีอาหารเลี้ยงเซลล์อยู่ 100  $\mu$ L/well (ปริมาณเซลล์  $2.5 \times 10^3$  cell/well/200  $\mu$ L)

### 3. การเตรียมสารละลายตัวอย่างที่นำมาทดสอบ

#### ตารางที่ 2.2 การเตรียมสารละลายตัวอย่างที่ความเข้มข้นต่างๆ ละลายใน DMSO

สารสกัดจาก เห็ดหลินจือเขากวาง	น้ำหนักของสาร สกัด (g)	ความเข้มข้นของสารละลายตัวอย่าง ( $\mu\text{g/mL}$ )	
		200, 20, 2, 0.2 0.02 และ 0.002 $\mu\text{g/mL}$	200, 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.125, 1.563 และ 0.78 $\mu\text{g/mL}$
สารสกัดด้วยเอทานอลโดย ใช้ชอกเลต (S1)	14.4	/	/
สารสกัดแยกด้วยเฮกเซน (S1/H)	10.3	-	/
สารสกัดแยกด้วยไดคลอโร มีเทน (S1/D)	15.2	-	/
สารสกัดแยกด้วยเมทานอล (S1/M)	11.7	-	/
สารสกัดด้วยเอทานอล (S2)	10.4	-	/
สารสกัดด้วยน้ำ (S3)	10.2	-	/

หมายเหตุ – ไม่ได้ทำการเตรียมสารละลายตัวอย่าง เนื่องจากจำนวนเซลล์ไม่เพียงพอต่อการทดสอบ

### 4. การเตรียมสารละลาย MTT

ซึ่ง MTT และเจือจาง MTT ใน normal saline ให้มีความเข้มข้น 5 mg/mL ละลายจนหมดไม่ให้เกิดก้อน (เก็บไว้ในขวดสีชาที่ 4 °C สามารถเก็บไว้ได้ 1 เดือน)

### 5. ขั้นตอนการทดลอง

5.1 เลี้ยงเซลล์ 2.5x10<sup>3</sup> cell/well จากข้อ 2) บ่มไว้ที่ 37 °C 5% CO<sub>2</sub> นาน 24 ชั่วโมง

5.2 เติมสารที่ต้องการทดสอบ จากข้อ 3) ปริมาตร 2  $\mu\text{L/well}$  บ่มไว้ 72 ชั่วโมง (3 วัน)

5.3 เติม MTT 5 mg/well จากข้อ 4) ปริมาตร 10  $\mu\text{L/well}$  บ่มไว้ในตู้เซลล์นาน 4 ชั่วโมง ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ทิ้ง (กลุ่ม negative control ไม่เติม MTT)

5.4 เติม 100% DMSO ปริมาตร 150  $\mu\text{L}$  เขย่าบน plate mixer นาน 2-3 นาที

5.5 วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 nm ด้วยเครื่อง Microtiter Plate Reader

### 6. การคำนวณ



สร้างกราฟมาตรฐานของสารสกัด โดยกำหนดค่าความเข้มข้นเป็นแกน x และ % cell survival เป็นแกน y เพื่อใช้คำนวณหาความเข้มข้นของสารที่ทำให้เซลล์มีการรอด 50% หรือหาค่า IC<sub>50</sub> ( Inhibit concentration 50%) โดย % cell survival ได้จากการแทนค่าในสมการ (2.1)

$$\text{เปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์ (\% cell survival)} = \frac{A_{\text{Sample}}}{A_{\text{Control}}} \times 100 \quad (2.1)$$

เมื่อ  $A_{\text{Sample}}$  = ค่าดูดกลืนแสงของ MTT ในสารละลายตัวอย่าง

$A_{\text{Control}}$  = ค่าดูดกลืนแสงของ MTT ในตัวทำละลายที่ใช้ในการละลายสารตัวอย่าง ในที่นี้คือสารละลาย DMSO

#### 2.4.2.2 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical scavenging capacity (DPPH assay)<sup>19</sup>

##### 1. การเตรียมสารละลายตัวอย่าง

เตรียม stock ของสารละลายตัวอย่างที่ความเข้มข้น 200 mg/mL โดยชั่งสารสกัดด้วยเอทานอลโดยใช้ชอกเลต (S1) 0.1085 g ละลายด้วยเมทานอล 0.5425 mL แล้วเจือจาง (เจือจาง 2 เท่า) ได้ความเข้มข้นเป็น 100, 50, 25 ,12.5, 6.25 mg/mL และ 0.625 mg/mL สำหรับการหาความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของตัวอย่างที่วิเคราะห์เทียบกับสารละลายมาตรฐานโทรลอกซ์ TEAC (Trolox Equivalents Antioxidant Capacity; mg Trolox/g sample)

##### 2. การเตรียมสารละลายมาตรฐานโทรลอกซ์ (Trolox)

เตรียมสารละลายมาตรฐานโทรลอกซ์ (Trolox) ที่ความเข้มข้นต่างๆ ดังนี้ 40, 20, 10, 5, 2.5, 1.25 และ 0.625 µg/mL โดยชั่งโทรลอกซ์ (Trolox) 400 µg ลงในขวดกำหนดปริมาตร 10 mL โดยใช้เมทานอลเป็นตัวทำละลาย แล้วเจือจาง (เจือจาง 2 เท่า) สารละลายมาตรฐานโทรลอกซ์ (Trolox) เป็น 20, 10, 5, 2.5, 1.25 และ 0.625 µg/mL ตามลำดับ

##### 3. การเตรียมสารละลาย DPPH reagent ที่ความเข้มข้น 0.1 mM

เตรียมสารละลาย DPPH reagent ที่ความเข้มข้น 0.1 mM โดยชั่ง DPPH หนัก 0.0019 g ลงในขวดกำหนดปริมาตร 50 mL โดยใช้เมทานอลเป็นตัวทำละลาย

##### 4. ขั้นตอนการทดลอง

4.1 ปิเปตสารละลายตัวอย่างและสารละลายมาตรฐานโทรลอกซ์ (Trolox) ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ปริมาณ 50 µL/well ลงใน 96-well Plates

4.2 ปิเปตสารละลาย DPPH reagent ความเข้มข้น 0.1 µM 150 µL/well ลงใน 96-well plate ที่มีสารละลายตัวอย่างและสารละลายมาตรฐานโทรลอกซ์ (Trolox)

4.3 ตั้งทิ้งไว้ในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที แล้วนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Microtiter Plate Reader โดยใช้ Blank เป็นเมทานอล 200 µL/well และ Control เป็นเมทานอลปริมาณ 50 µL/well และสารละลาย DPPH reagent 150 µL/well

## 5. การคำนวณและรายงานผล

5.1 สร้างกราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐาน Trolox โดยกำหนดค่าความเข้มข้นเป็นแกน x และ % inhibition เป็นแกน y เพื่อหาค่า  $IC_{50}$  โดย % inhibition ได้จากการแทนค่าในสมการ (2.2)

$$\% \text{ inhibition} = \frac{A_{\text{Control}} - A_{\text{Sample}}}{A_{\text{Control}}} \times 100 \quad (2.2)$$

เมื่อ  $A_{\text{Control}}$  = ค่าดูดกลืนแสงของสารละลาย DPPH เริ่มต้น

$A_{\text{Sample}}$  = ค่าดูดกลืนแสงของสารละลาย DPPH ที่มีสารตัวอย่าง

5.2. สร้างกราฟมาตรฐานของสารละลายตัวอย่าง โดยกำหนดค่าความเข้มข้นเป็นแกน x และ % inhibition เป็นแกน y เพื่อหาค่า  $IC_{50}$  โดย % inhibition ได้จากการแทนค่าในสมการ (2.3)

5.3 รายงานผลในรูปความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของตัวอย่างที่วิเคราะห์เทียบกับสารละลายมาตรฐาน Trolox เรียกว่า TEAC (Trolox Equivalents Antioxidant Capacity; mg Trolox/ gram of the S1 extract ซึ่งได้จากการแทนค่าในสมการ (2.3)

$$\text{mg of Trolox equivalents / (g) extract} = \frac{C_{\text{Trolox}} (\text{mg/mL}) \times \text{DF} \times V_{\text{Solvent}} (\text{mL})}{M_{\text{Extract}} (\text{g})} \quad (2.3)$$

เมื่อ  $C_{\text{Trolox}}$  = ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน Trolox จากการนำค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายตัวอย่างไปเทียบกับกราฟของสารละลายมาตรฐาน Trolox (Trolox) (mg/mL)

DF (Dilution factor) = ค่าจากการเจือจางสารละลายตัวอย่าง

$V_{\text{Solvent}}$  = ปริมาตรของตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัด (mL)

$M_{\text{Extract}}$  = น้ำหนักของสารสกัด (g)

### 2.4.2.3 การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไลเปส<sup>20</sup>

1. เตรียมสารละลายตัวอย่างที่ความเข้มข้น 10 mg/mL

สารสกัดแยกด้วยเฮกเซน (S1/H) 10.9 mg ละลายด้วย DMSO ปริมาตร 1.09 mL

สารสกัดแยกด้วยไดคลอโรมีเทน (S1/D) 11.4 mg ละลายด้วย DMSO ปริมาตร 1.14 mL

สารสกัดแยกด้วยเมทานอล (S1/M) 10.5 mg ละลายด้วย DMSO ปริมาตร 1.05 mL

2. เตรียมสารละลาย Tris hydrochloride (Tris-HCl) ความเข้มข้น 0.061 M ปริมาตร 500 mL โดยชั่ง Tris HCl (MW= 121.149) 2.265 g

3. เติม (Tris-HCl) ความเข้มข้น 0.061 M pH 8.5 ปริมาตร 280  $\mu\text{L}$  และสารตัวอย่าง I ปริมาตร 10  $\mu\text{L}$  ใน 96-well (8x12) microtiter plate



4. เติม DMSO ปริมาตร 32  $\mu\text{L}$  แล้วเติม *p*-nitrophenyl palmitate (pNPP) ความเข้มข้น 6.66 mM ปริมาตร 40  $\mu\text{L}$  แล้วบ่มทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 37  $^{\circ}\text{C}$  เป็นเวลา 5 นาที
5. เติม absolute ethanol ปริมาตร 600  $\mu\text{L}$  แล้วเติม pancreatic lipase enzyme ความเข้มข้น 5 mg/mL ปริมาตร 48  $\mu\text{L}$  แล้วบ่มทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 25 นาที โดย control well plate เติม pancreatic lipase enzyme ความเข้มข้น 5 mg/mL ปริมาตร 48  $\mu\text{L}$  ก่อนเติม absolute ethanol 600  $\mu\text{L}$
6. วัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง Microtiter Plate Reader ที่ 405 nm และคำนวณ % inhibitor โดยแทนค่าในสมการ (2.4)

$$\% \text{ inhibitor} = \frac{(A-a)-(B-b)}{(A-a)} \times 100 \quad (2.4)$$

เมื่อ A และ B คือค่าการดูดกลืนแสงของน้ำและสารสกัดที่มีเอนไซม์  
a และ b คือค่าการดูดกลืนแสงของน้ำและสารสกัดที่ไม่มีเอนไซม์

#### 2.4.2.4 การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดส<sup>21</sup>

- เตรียมสารละลายตัวอย่างที่ความเข้มข้น 10 mg/mL  
 สารสกัดแยกด้วยเฮกเซน (S1/H) 10.9 mg ละลายด้วย DMSO ปริมาตร 1.09 mL  
 สารสกัดแยกด้วยไดคลอโรมีเทน (S1/D) 11.4 mg ละลายด้วย DMSO ปริมาตร 1.14 mL  
 สารสกัดแยกด้วยเมทานอล (S1/M) 10.5 mg ละลายด้วย DMSO ปริมาตร 1.05 mL
- เติมเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดส ( $\alpha$ -glucosidase) ปริมาตร 10  $\mu\text{L}$  และสารตัวอย่าง I ใน DMSO ปริมาตร 10  $\mu\text{L}$  ใน 96-well (8x12) microtiter plate โดย control well ไม่เติม sample และใน blank well ไม่เติม  $\alpha$ -glucosidase)
- เติม potassium phosphate buffer (pH 6.8) ความเข้มข้น 50 mM ปริมาตร 150  $\mu\text{L}$  แล้วบ่มทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 37  $^{\circ}\text{C}$  เป็นเวลา 60 นาที
- เริ่มปฏิกิริยาด้วยการเติมสารตั้งต้น *p*-nitrophenyl- $\alpha$ -D-glucopyranoside (PNPG) ความเข้มข้น 1.0 mM ปริมาตร 30  $\mu\text{L}$  แล้วบ่มทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 37  $^{\circ}\text{C}$  เป็นเวลา 30 นาที
- เติม sodium carbonate ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) ความเข้มข้น 1.0 M เพื่อหยุดปฏิกิริยา
- วัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง Microtiter Plate Reader ที่ 405 nm และคำนวณ % inhibitor โดยแทนค่าในสมการ (2.4)



## 2.4.3 การวิเคราะห์กลุ่มสารที่เป็นองค์ประกอบ

### 2.4.3.1 วิเคราะห์ปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ (Total Polysaccharides) <sup>22</sup>

#### 1. การเตรียมสารละลายตัวอย่าง

1.1 ทำการสกัดสารตัวอย่างจากเห็ดหลินจือเขากวาง โดยใช้เห็ดแห้ง 1.5 g สกัดด้วยน้ำร้อน 50 mL เป็นเวลา 2 ชั่วโมงและใช้ magnetic bar กวนสาร

1.2 กรองเห็ดหลินจือเขากวางด้วยกระดาษกรอง เก็บส่วนที่เป็นสารละลายไว้เป็นสารละลายจากการสกัดครั้งแรก แล้วนำส่วนที่เป็นตะกอนไปทำสกัดซ้ำเป็นครั้งที่สองด้วยน้ำร้อน 50 mL เป็นเวลา 6 ชั่วโมง

1.3 กรองเห็ดหลินจือเขากวางด้วยกระดาษกรอง เก็บส่วนที่เป็นสารละลายไว้เป็นสารละลายจากการสกัดครั้งที่สอง

1.4. รวมสารละลายที่ได้จากการสกัดเห็ดหลินจือเขากวางทั้งสองครั้งด้วยกัน แล้วนำไปประเหยน้ำออกได้สารสกัดด้วยน้ำ

1.5 นำสารสกัดไปทำการตกตะกอนด้วยการเติมเอทานอล 10 mL เป็นเวลา 24 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

1.6. กรองผ่านกระดาษกรองแล้วนำส่วนสารละลายไปทำการทดลอง โดยจะได้สารสกัดความเข้มข้น 150 mg/mL แล้วนำมาเจือจาง (เจือจาง 2 เท่า) ได้ความเข้มข้น 75 mg/mL

#### 2. เตรียมสารละลายมาตรฐานกลูโคส (D-glucose) ที่ความเข้มข้นต่างๆ

เตรียมสารละลายมาตรฐานกลูโคส (D-glucose) ที่ความเข้มข้น 200, 100, 50, 25, 12.5 และ 6.25  $\mu\text{g/mL}$  โดยชั่งกลูโคส (D-glucose) 0.0020 g ลงในขวดกำหนดปริมาตร 5 mL แล้วรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น แล้วเจือจาง (เจือจาง 2 เท่า) สารละลายมาตรฐานกลูโคส (D-glucose) เป็น 100, 50, 25, 12.5 และ 6.25  $\mu\text{g/mL}$  ตามลำดับ

#### 3. เตรียมสารละลายฟีนอล 5%

ชั่งฟีนอลหนัก 0.5000 g ลงในบีกเกอร์ขนาด 25 mL แล้วเติมเมทานอลลงไป 10 mL

#### 4. ขั้นตอนการทดลอง

4.1 ปิเปตสารละลายตัวอย่างและสารละลายมาตรฐานกลูโคส (D-glucose) 30  $\mu\text{L/well}$  ลงใน 96-well plate

4.2 ปิเปตสารละลายฟีนอล 5% 30  $\mu\text{L/well}$  และกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 150  $\mu\text{L/well}$  ลงใน 96-well plate

4.3 ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 nm ด้วยเครื่อง Microtiter Plate Reader

#### 5. การคำนวณและรายงานผล

5.1 สร้างกราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐานกลูโคส (D-glucose) โดยกำหนดค่าความเข้มข้นเป็นแกน x และ ค่าดูดกลืนแสง เป็นแกน y

5.2 รายงานผลในรูป mg of glucose equivalents / gram of the S3 extract ซึ่งได้จากการแทนค่าในสมการ (2.5)

$$\text{mg of glucose equivalents / (g) extract} = \frac{C_{\text{Glucose (mg/mL)}} \times DF \times V_{\text{Solvent (mL)}}}{M_{\text{Extract (g)}}} \quad (2.5)$$

เมื่อ  $C_{\text{Glucose}}$  = ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานกลูโคส (Glucose) จากการนำค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายตัวอย่างไปเทียบกับกราฟของสารละลายมาตรฐานกลูโคส (Glucose) (mg/mL)  
 DF (Dilution factor) = ค่าจากการเจือจางสารละลายตัวอย่าง  
 $V_{\text{Solvent}}$  = ปริมาณของตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัด (mL)  
 $M_{\text{Extract}}$  = น้ำหนักของสารสกัด (g)

#### 2.4.3.2 วิเคราะห์ปริมาณฟีนอลรวม (Total phenolic compounds) ด้วยวิธี Folin-Ciocalteu reagent <sup>23</sup>

1. เตรียมสารละลายตัวอย่างที่ความเข้มข้นต่างๆ  
 เตรียม stock ของสารละลายตัวอย่างที่ความเข้มข้น 200 mg/mL โดยชั่งสารสกัดด้วยเอทานอลโดยใช้ชอกเลต (S1) 0.2133 g ละลายด้วยเมทานอลปริมาตร 1.0665 mL แล้วเจือจางได้ความเข้มข้นเป็น 0.781 mg/mL
2. เตรียมสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิกที่ความเข้มข้นต่างๆ  
 เตรียมสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิกที่ความเข้มข้นต่างๆ ดังนี้ 125, 100, 75, 50 และ 25  $\mu\text{g/mL}$  โดยชั่งกรดแกลลิก 0.0050 g ลงในขวดกำหนดปริมาตร 10 mL ซึ่งเป็นความเข้มข้น 500  $\mu\text{g/mL}$  โดยใช้เมทานอลเป็นตัวทำละลาย แล้วเจือจางสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิกที่ 125, 100, 75, 50 และ 25 เป็น  $\mu\text{g/mL}$  ตามลำดับ
3. เตรียมสารละลาย Folin-Ciocalteu reagent เจือจางในอัตราส่วน 1:10 (v/v)  
 ตวงสารละลาย Folin-Ciocalteu reagent ปริมาตร 1 mL ลงในบีกเกอร์ แล้วเติมน้ำกลั่นลงไปปริมาตร 9 mL
4. เตรียมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนตความเข้มข้น (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) 7.5% (v/v)  
 ชั่งสารละลายโซเดียมคาร์บอเนตหนัก 7.5 g ลงในบีกเกอร์ 250 mL แล้วใส่น้ำกลั่นลงไป 100 mL
5. ขั้นตอนการทดลอง
  - 5.1 ปิเปตสารละลายตัวอย่างและสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิก ที่ความเข้มข้นต่างๆ ปริมาตร 20  $\mu\text{L}$  ลงใน 96-well plates
  - 5.2 ปิเปตสารละลาย Folin-Ciocalteu reagent ปริมาตร 100  $\mu\text{L}$  ลงใน 96-well plates ที่มีสารละลายตัวอย่างและสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิก
  - 5.3 ปิเปตสารละลายโซเดียมคาร์บอเนตความเข้มข้น 7.5% (v/v) ปริมาตร 80  $\mu\text{L}$  ลงใน 96-well plates ที่ทิ้งไว้ที่มีดเป็นเวลา 90 นาที
  - 5.4. นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 nm ด้วยเครื่อง Microtiter Plate Reader โดยใช้ Blank ของสารละลายตัวอย่าง เป็นเมทานอลปริมาตร 200  $\mu\text{L}$ , Blank ของสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิก เป็นน้ำกลั่นและ Control เป็นสารละลาย Folin-Ciocalteu reagent ปริมาตร 100  $\mu\text{L}$  และสารละลายโซเดียมคาร์บอเนตความเข้มข้น 7.5% (v/v) ปริมาตร 80  $\mu\text{L}$



5.5 นำค่าความเข้มข้นและค่าดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิกมาสร้างกราฟมาตรฐาน

6. การคำนวณและรายงานผล

5.1 สร้างกราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิกโดยกำหนดค่าความเข้มข้นเป็นแกน x และ ค่าการดูดกลืนแสง เป็นแกน y

6.1 รายงานผลในรูป mg of gallic acid equivalents (GAE) / (g) extract ซึ่งได้จากการแทนค่าในสมการ (2.6)

$$\text{mg of gallic acid equivalents / (g) extract} = \frac{C_{\text{Gallic acid (mg/mL)}} \times DF \times V_{\text{Solvent (mL)}}}{M_{\text{Extract (g)}}} \quad (2.6)$$

เมื่อ  $C_{\text{Gallic acid}}$  = ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิก จากการนำค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายตัวอย่างไปเทียบกับกราฟของสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิก (mg/mL)

DF (Dilution factor) = ค่าจากการเจือจางสารละลายตัวอย่าง

$V_{\text{Solvent}}$  = ปริมาณของตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัด (mL)

$M_{\text{Extract}}$  = น้ำหนักของสารสกัด (g)

#### 2.4.4 การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี

##### 2.4.4.1 เครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (High Performance Liquid Chromatography, HPLC)

1. เตรียมสารละลายตัวอย่างที่ใช้ในการวิเคราะห์

สารสกัดเข้าด้วยไดคลอโรมีเทน 10.4 mg ละลายด้วยเมทานอลปริมาตร 10.4 mL

2. ตั้งค่าสภาวะที่เหมาะสมของเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) โดยอ้างอิง Chen และคณะ<sup>24</sup>

คอลัมน์:  $C_{18}$  column (250 mm × 4.6 mm, 5  $\mu\text{m}$ )

อุณหภูมิคอลัมน์: 35 °C

เฟสเคลื่อนที่: 0.1% Aqueous acetic acid (v/v) และ Acetonitrile โดยปรับเปลี่ยน acetonitrile ดังนี้ 30–32% ที่ 0–40 นาที, 32–40% ที่ 40–60 นาที, 40% ที่ 60–65 นาที, 40–82% ที่ 65–70 นาทีและ 82–100% ที่ 70–85 นาที

ปริมาตรที่ฉีด: 10  $\mu\text{L}$

อัตราการไหล: 0.8 mL/min

ความยาวคลื่นของตัวตรวจวัด: 254 nm

3. นำสารละลายตัวอย่างทำการวิเคราะห์ตามสภาวะที่เหมาะสม แล้วนำ Chromatograms ของสารละลายตัวอย่างมาเทียบกับ Chromatograms ที่เป็น HPLC fingerprints



### บทที่ 3

#### ผลการทดลองและอภิปรายผลการทดลอง

##### 3.1 ผลการสกัดเห็ดหลินจือเขากวาง

สารสกัดเห็ดหลินจือเขากวางทั้งหมด 3 แบบ คือ สารสกัดด้วยเอทานอลโดยใช้ซอกเลต (S1), สารสกัดด้วยเอทานอล (S2) และสารสกัดด้วยน้ำ (S3) พบว่าสารสกัดด้วยเอทานอลโดยใช้ซอกเลต (S1) มีร้อยละปริมาณของสารสกัดที่ได้มากที่สุดเท่ากับ 7.70 จากนั้นนำสารสกัดด้วยเอทานอลโดยใช้ซอกเลต (S1) สกัดแยกด้วยเฮกเซน, ไดคลอโรมีเทนและเมทานอล พบว่าสารสกัดแยกด้วยเมทานอล (S1/M) มีร้อยละปริมาณของสารสกัดที่ได้มากที่สุดเท่ากับ 66.49 ดังตารางที่ 3.1 และจากการวิเคราะห์องค์ประกอบของเห็ดหลินจือเขากวางในสารสกัด S1, S1/H, S1/D, S1/M และ S2 ด้วย <sup>1</sup>H-NMR spectroscopy บ่งชี้ว่าสารสกัดที่เหล่านี้ประกอบด้วยสารในกลุ่มไตรเทอร์พีน (triterpenoids)

ตารางที่ 3.1 แสดงลักษณะ น้ำหนักและร้อยละปริมาณของสารที่สกัดได้ (%yield extract) ของสารสกัดจากเห็ดหลินจือเขากวาง

สารสกัดจากเห็ดหลินจือเขากวาง	ลักษณะของสารสกัด	น้ำหนักสารสกัด (กรัม)	ร้อยละปริมาณของสารที่สกัดได้ (%yield extract)
สารสกัดด้วยเอทานอลโดยใช้ซอกเลต (S1)	ของแข็ง สีน้ำตาลเข้ม	2.3160	7.70
สารสกัดแยกด้วยเฮกเซน (S1/H)	เหนียวไม่แข็ง สีน้ำตาลอ่อน	0.0828	6.68
สารสกัดแยกด้วยไดคลอโรมีเทน (S1/D)	ของแข็ง สีน้ำตาลเข้ม	0.8246	66.49
สารสกัดแยกด้วยเมทานอล (S1/M)	ของแข็งสีน้ำตาล	0.1651	13.31
สารสกัดด้วยเอทานอล (S2)	ของแข็ง สีน้ำตาลเข้ม	1.7413	3.48
สารสกัดด้วยน้ำ (S3)	ของแข็งเป็นแผ่น สีน้ำตาลเข้ม	0.0802	5.34

### 3.2 ผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ

#### 3.2.1 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ (Cytotoxicity assay)

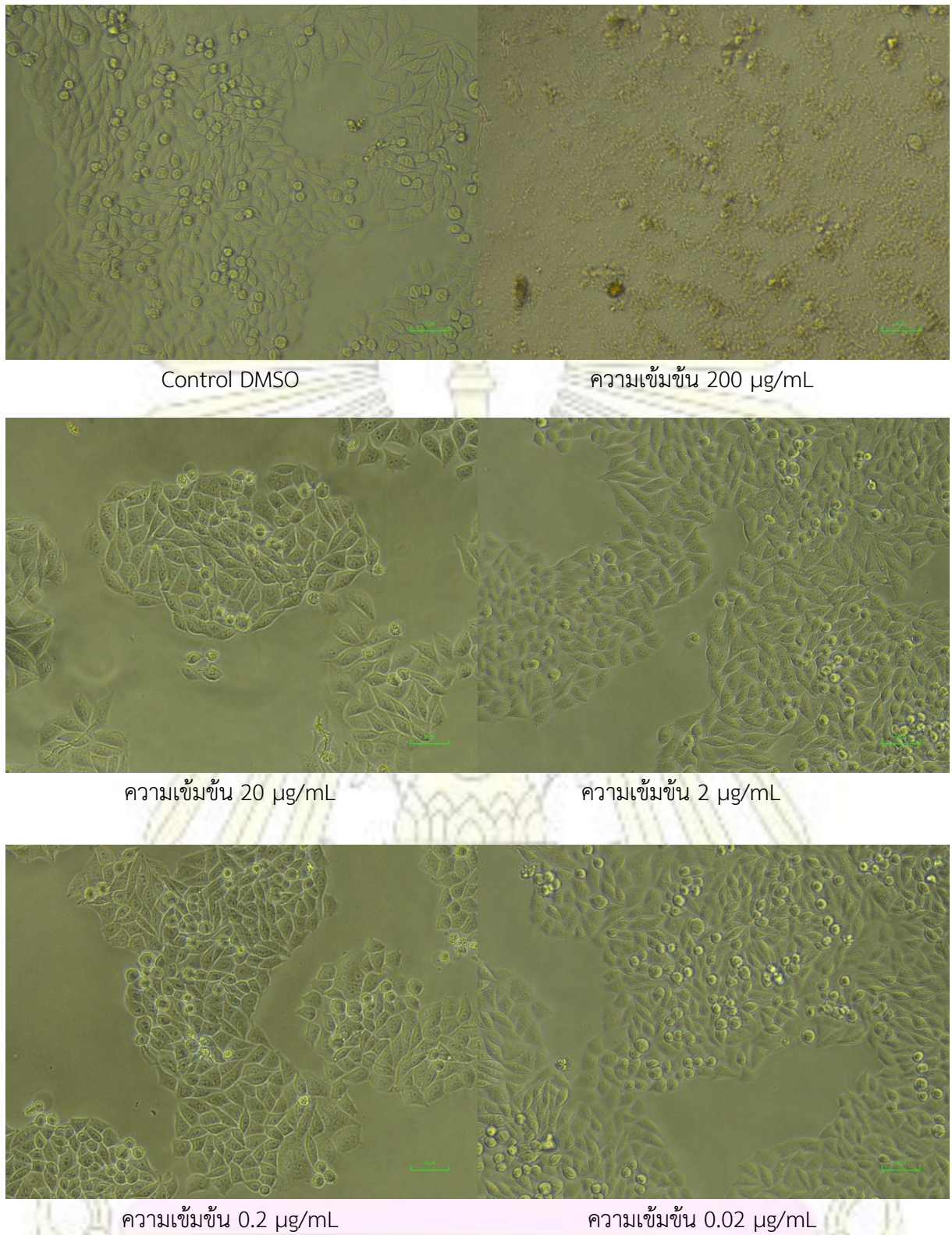
จากการนำสารตัวอย่าง 6 ชนิด ได้แก่ สารสกัดด้วยเอทานอลโดยใช้ซอกเลต (S1), สารสกัดแยกด้วยเฮกเซน (S1/H), สารสกัดแยกด้วยไดคลอโรมีเทน (S1/D), สารสกัดแยกด้วยเมทานอล (S1/M), สารสกัดแยกด้วยเอทานอล (S2) และสารสกัดด้วยน้ำ (S3) มาตรวจสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ (Cytotoxicity assay) ที่เตรียมสารละลายตัวอย่างที่ความเข้มข้นต่างๆ ละลายใน DMSO ดังตารางที่ แล้วเติมสาร MTT 5 mg/mL ปริมาตร 10  $\mu$ L/well บ่มไว้ในตู้เซลล์นาน 4 ชั่วโมง แล้วเติม 100% DMSO ปริมาตร 150  $\mu$ L/well เพื่อให้เซลล์แตกและให้ formazan ละลายออกมา เขย่าบน plate mixer นาน 2-3 นาที แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 nm จากนั้นคำนวณการมีชีวิตรอดของเซลล์ (% cell survival) และเมื่อนำเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดมาคำนวณหาความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งทั้ง 5 ชนิด ( $IC_{50}$ ) แล้วได้ผลดังตารางที่ 3.2

ตารางที่ 3.2 ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งทั้ง 5 ชนิด ( $IC_{50}$ )

สาร	Cell line	$IC_{50}$ ( $\mu$ g/mL)					
		KATO-III	BT474	SW620	Hep-G2	Chago-K1	Wi-38
สารสกัดด้วยเอทานอลโดยใช้ซอกเลต (S1)	ชุดที่ 1:	92	63	50	88	93	-
	ชุดที่ 2:	62	66	30	65	76	
สารสกัดแยกด้วยเฮกเซน (S1/H)		161	135	149	> 200	124	> 200
สารสกัดแยกด้วยคลอโรมีเทน (S1/D)		100	67	49	102	111	129
สารสกัดแยกด้วยเมทานอล (S1/M)		> 200	> 200	> 200	44	181	> 200
สารสกัดด้วยเอทานอล (S2)		133	126	121	132	157	164
สารสกัดด้วยน้ำ (S3)		> 200	> 200	> 200	> 200	103	> 200

หมายเหตุ - ไม่ได้ทำการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติ (Wi-38) เนื่องจากเซลล์ปกติเจริญเติบโตช้า ไม่เพียงพอต่อการทดสอบ





รูปที่ 3.1 สารสกัดด้วยเอทานอลโดยใช้ชอกเลต (S1) มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งลำไส้ (SW620)



จากการใช้สารตัวอย่างคือ สารสกัดด้วยเอทานอลโดยใช้ชอกเลต (S1), สารสกัดแยกด้วยเฮกเซน (S1/H), สารสกัดแยกด้วยไดคลอโรมีเทน (S1/D), สารสกัดแยกด้วยเมทานอล (S1/M), สารสกัดแยกด้วยเอทานอล (S2) และสารสกัดด้วยน้ำ (S3) มาทดสอบการเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งทั้ง 5 ชนิดและเซลล์ปกติ ยกเว้นสารสกัดด้วยเอทานอลโดยใช้ชอกเลต (S1) ไม่ได้ทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติ (Wi-38) เนื่องจากเซลล์ปกติเจริญเติบโตได้ช้า จึงมีจำนวนเซลล์ไม่เพียงพอต่อการทดสอบแล้วแสดงค่าเป็นความเข้มข้นต่ำที่สุดของสารตัวอย่างที่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ได้ร้อยละ 50 หรือ ความเข้มข้นของสารที่ทำให้เซลล์มีการรอด 50% ( $IC_{50}$ ) โดยถ้ามีค่าน้อยจะมีฤทธิ์การยับยั้งเซลล์มะเร็งได้ดี

จากการทดสอบพบว่าสารสกัดด้วยเอทานอลโดยใช้ชอกเลต (S1) มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง โดยมีฤทธิ์การยับยั้งเซลล์มะเร็งทั้ง 5 ชนิดได้ดี โดยเฉพาะอย่างยิ่งมีฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งลำไส้ (SW620) ได้ดีที่สุด แสดงค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ 30  $\mu\text{g/mL}$

สารสกัดแยกด้วยเฮกเซน (S1/H) พบว่ามีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง โดยมีฤทธิ์การยับยั้งเซลล์มะเร็งปอด (Chago-K1) ได้ดีที่สุด แสดงค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ 124  $\mu\text{g/mL}$  นอกจากนี้ยังมีค่า  $IC_{50}$  ของเซลล์มะเร็งตับ (Hep-G2) และเซลล์ปกติ (Wi-38) มากกว่า 200  $\mu\text{g/mL}$  ซึ่งในทางชีววิทยานั้นสามารถกล่าวได้ว่าสารตัวอย่างดังกล่าวไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ทั้งสองชนิด

สารสกัดแยกด้วยไดคลอโรมีเทน (S1/D) พบว่ามีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งทั้ง 5 ชนิดและเซลล์ปกติ โดยมีฤทธิ์การยับยั้งเซลล์มะเร็งลำไส้ (SW260) ได้ดีที่สุด แสดงค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ 49  $\mu\text{g/mL}$  และมีฤทธิ์การยับยั้งเซลล์มะเร็งเต้านมได้ดี (BT474) แสดงค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ 67  $\mu\text{g/mL}$  ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับสารสกัดด้วยเอทานอลโดยใช้ชอกเลต (S1) มีค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ 66  $\mu\text{g/mL}$  กล่าวคือซึ่งมีฤทธิ์การยับยั้งเซลล์มะเร็งเต้านม (BT474) ได้ดีเท่า ๆ กัน

สารสกัดแยกด้วยเมทานอล (S1/M) พบว่ามีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งตับ (Hep-G2) แสดงค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ 44  $\mu\text{g/mL}$  ซึ่งมีฤทธิ์การยับยั้งเซลล์มะเร็งตับ (Hep-G2) ได้ดีมากที่สุด และมีฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งปอด (Chago-K1) ได้ดี แสดงค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ 181  $\mu\text{g/mL}$  นอกจากนี้ยังมีค่า  $IC_{50}$  ของเซลล์มะเร็งกระเพาะอาหาร (KATO-III), เซลล์มะเร็งเต้านม (BT474), เซลล์มะเร็งลำไส้ (SW260) และเซลล์ปกติ (Wi-38) มากกว่า 200  $\mu\text{g/mL}$  ซึ่งในทางชีววิทยานั้นสามารถกล่าวได้ว่าสารตัวอย่างดังกล่าวไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งกระเพาะอาหาร (KATO-III), เซลล์มะเร็งเต้านม (BT474), เซลล์มะเร็งลำไส้ (SW260) และเซลล์ปกติ (Wi-38)

สารสกัดด้วยเอทานอล (S2) พบว่า มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง โดยมีฤทธิ์การยับยั้งเซลล์มะเร็งทั้ง 5 ชนิดได้ดี โดยเฉพาะอย่างยิ่งมีฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งลำไส้ (SW620) ได้ดีที่สุดแสดงค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ 121  $\mu\text{g/mL}$  ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับสารสกัดด้วยเอทานอลโดยใช้ชอกเลต (S1) โดยใช้ตัวทำละลายเดียวกันในการสกัดแต่ต่างกันที่วิธีการสกัด จะเห็นว่าทั้งสารสกัดด้วยเอทานอลโดยใช้ชอกเลต (S1) และสารสกัดด้วยเอทานอล (S2) มีฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งลำไส้ (SW620) ได้ดีที่สุดเหมือนกันและมีแนวโน้มในการยับยั้งเซลล์มะเร็งทั้ง 5 ชนิดใกล้เคียงกัน แต่สารสกัดด้วยเอทานอล (S2) แสดงค่า  $IC_{50}$  มากกว่าสารสกัดด้วยเอทานอลโดยใช้ชอกเลต (S1) นั้นเป็นผลมาจากจำนวนรอบในการสกัดสาร โดยที่การสกัดด้วยเอทานอลโดยใช้ชอกเลต (S1) มีจำนวนรอบการสกัดมากกว่าการสกัดด้วยเอทานอล (S2) ที่ทำการสกัดเพียงสามครั้ง จึงส่งผลต่อความเข้มข้นและปริมาณสารประกอบในการสกัด

สารสกัดด้วยน้ำ (S3) พบว่ามีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง โดยมีฤทธิ์การยับยั้งเซลล์มะเร็งปอด (Chago-K1) ได้ดีที่สุดใน แสดงค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ  $103 \mu\text{g/mL}$  และ มีค่า  $IC_{50}$  ของเซลล์มะเร็งอื่นๆ และเซลล์ปกติ มากกว่า  $200 \mu\text{g/mL}$  ซึ่งในทางชีววิทยานั้นสามารถกล่าวได้ว่า สารตัวอย่างดังกล่าวไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งอื่นๆ และเซลล์ปกติ จึงบอกได้ว่าสารสกัดด้วยน้ำ (S3) มีฤทธิ์การยับยั้งจำเพาะเซลล์มะเร็งปอด (Chago-K1)

จากรูปที่ 3.1 สารสกัดด้วยเอทานอลโดยใช้ซอกเลต (S1) ตรวจสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งลำไส้ (SW260) เมื่อเปรียบเทียบกับหลุมของเซลล์มะเร็งที่ไม่มีการเติมสารตัวอย่าง (Control DMSO) กับรูปหลุมที่ของเซลล์มะเร็งที่มีการเติมสารตัวอย่าง พบว่าเป็นแบบการตายแบบเฉพาะส่วน หรือ Necrosis การตายแบบนี้จะมีการหลั่งเอนไซม์พิเศษ สังเกตได้จากการเปลี่ยนแปลงที่เยื่อหุ้มเซลล์และ organelles ภายในเซลล์ ทำให้ lysosomal enzyme ไหลออก จาก lysosome เข้าสู่ cytoplasm โดยโปรตีนและส่วนต่างๆภายในเซลล์ถูกย่อยสลาย หรือออกมายังภายนอกเซลล์ และยังคงเห็นนิวเคลียสอยู่แต่มีลักษณะที่ฝ่อเหี่ยวและมีสีเข้ม

### 3.2.2 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical scavenging capacity (DPPH assay)

เมื่อนำสารสกัดเห็ดหลินจือเขากวางด้วยซอกเลต (Soxhlet extraction) โดยใช้เอทานอล ที่มีความเข้มข้น 200, 100, 50, 25, 12.5 และ  $6.25 \text{ mg/mL}$  มาทดสอบความสามารถในการต้านอนุมูล DPPH พบว่าสารสกัดมีความสามารถในการดักจับอนุมูลอิสระ DPPH ได้ มีค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ  $75.49 \mu\text{g/mL}$  ดังตารางที่ 3.3 และเมื่อเทียบฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดกับ Trolox รายงานในรูปแบบ Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) หรือ  $\text{mg of Trolox equivalents} / (\text{g}) \text{ sample}$  ซึ่งความเข้มข้นของสารสกัดมีผลต่อร้อยละการยับยั้งอนุมูลอิสระ หรือความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ กล่าวคือเมื่อสารสกัดมีความเข้มข้นมากขึ้นจะทำให้ร้อยละการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH เพิ่มขึ้น ดังตารางที่ 3.3



ตารางที่ 3.3 แสดงค่า %Inhibition และ ค่า IC<sub>50</sub> ของสารสกัดและ Trolox

สาร	ความเข้มข้น (µg/mL)	%Inhibition	IC <sub>50</sub> (µg/mL)
Trolox	40	87.88	18.81
	20	52.12	
	10	33.55	
	5	24.41	
	2.5	19.10	
	1.25	17.77	
	0.625	16.80	
สารสกัดด้วยเอทานอล โดยใช้ซอกเลต (S1)	ความเข้มข้น (mg/mL)	%Inhibition	IC <sub>50</sub> (mg/mL)
	100	63.23	75.49
	50	35.52	
	25	24.19	
	12.5	17.78	
	6.25	17.24	

ตารางที่ 3.4 แสดงค่าความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของตัวอย่างที่วิเคราะห์เทียบกับสารละลายมาตรฐาน Trolox TEAC (Trolox Equivalents Antioxidant Capacity)

ความเข้มข้นของสารสกัด ด้วยเอทานอลโดยใช้ซอกเลต (S1) (mg/mL)	ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของตัวอย่างที่วิเคราะห์เทียบกับสารละลายมาตรฐาน Trolox TEAC (Trolox Equivalents Antioxidant Capacity)	
	mg Trolox/g mushroom	mg Trolox/g crude extracts
0.625	2.25	29.23

### 3.2.3 ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งไลเปส

จากการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งไลเปสของสารสกัดแยกด้วยเฮกเซน (S1/H) และสารสกัดแยกด้วยไดคลอโรมีเทน (S1/D) และสารสกัดแยกด้วยเมทานอล (S1/M) ที่ความเข้มข้น 10 mg/mL พบว่าสารสกัดแยกด้วยเฮกเซน (S1/H) และสารสกัดแยกด้วยไดคลอโรมีเทน (S1/D) ไม่มีฤทธิ์ยับยั้งไลเปส โดยการทดลองให้ค่าการดูดกลืนแสงมาก เนื่องจากสารที่เป็นองค์ประกอบในสารสกัดซ้ำด้วยเฮกเซนและไดคลอโรมีเทนนั้นไม่สามารถยับยั้งการทำงานของไลเปสได้ ส่งผลให้ไลเปสยังคงสามารถไฮโดรไลซิส p-nitrophenyl palmitate (PNPP) ซึ่งเป็นสารละลายใสไม่มีสีเป็น p-nitrophenol ซึ่งมีสีเหลืองเกิดขึ้นได้ และสารสกัดแยกด้วยเมทานอล (S1/M)



มีฤทธิ์ยับยั้งไลเปสแสดงค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งแอลฟาไกลูโคซิเดสของสารสกัดที่ความเข้มข้น 10 mg/mL เท่ากับ 71%

### 3.2.4 ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งแอลฟาไกลูโคซิเดส

จากการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งแอลฟาไกลูโคซิเดสของสารสกัดแยกด้วยเฮกเซน (S1/H) สารสกัดแยกด้วย ไดคลอโรมีเทน (S1/D) และสารสกัดแยกด้วยเมทานอล (S1/M) ที่ความเข้มข้น 10 mg/mL แสดงดังตารางที่ 3.5 พบว่าสารสกัดแยกด้วยเฮกเซน (S1/H) มีเปอร์เซ็นต์ยับยั้งแอลฟาไกลูโคซิเดสเป็น 58% สารสกัดแยกด้วยไดคลอโรมีเทน (S1/D) มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งแอลฟาไกลูโคซิเดสเป็น 92% และสารสกัดแยกด้วยเมทานอล (S1/M) มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งแอลฟาไกลูโคซิเดสเป็น 97% ซึ่งสารสกัดแยกด้วยไดคลอโรมีเทน (S1/D) และสารสกัดแยกด้วยเมทานอล (S1/M) ถือว่ามีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งแอลฟาไกลูโคซิเดสที่สูง โดยการดูดกลืนแสงน้อย แสดงว่าเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดสไม่สามารถทำงานได้อย่างเป็นปกติ นั่นคือถูกยับยั้งการทำงานด้วยสารสกัด หลินจือเขากวางที่สกัดซ้ำ ซึ่งสารที่เป็นองค์ประกอบในสารสกัดซ้ำด้วยเฮกเซนและไดคลอโรมีเทนนั้นไปยับยั้ง แอลฟาไกลูโคซิเดสซึ่งส่งผลให้ p-nitrophenyl-alpha-D-glucopyranoside (PNPG) เป็นสารละลายใสไม่มีสี ซึ่งเป็นสารตั้งต้นถูกไฮโดรไลซิสโดยแอลฟาไกลูโคซิเดส เกิดเป็นผลิตภัณฑ์คือ p-nitrophenol ซึ่งเป็น สารละลายสีเหลืองได้ลดลง

ตารางที่ 3.5 แสดงค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดสของสารสกัดซ้ำด้วยเฮกเซนและไดคลอโรมีเทนที่ความเข้มข้น 10 mg/mL

สารสกัดเห็ดหลินจือเขากวาง	น้ำหนักสารสกัดที่นำมาทดสอบ (g)	เปอร์เซ็นต์การยับยั้งแอลฟาไกลูโคซิเดสของสารสกัดความเข้มข้น 10 mg/mL
สารสกัดแยกด้วยเฮกเซน (S1/H)	10.9	58%
สารสกัดแยกด้วยไดคลอโรมีเทน (S1/D)	11.4	92%
สารสกัดแยกด้วยเมทานอล (S1/M)	10.5	97%

### 3.3 ผลการวิเคราะห์กลุ่มสารที่เป็นองค์ประกอบ

#### 3.3.1 ผลการวิเคราะห์ปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ (Total Polysaccharides)

เมื่อนำสารสกัดที่สกัดด้วยน้ำแล้วสกัดซ้ำด้วยเอทานอล มาวิเคราะห์ปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ (Total Polysaccharides) พบว่ามีปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ (Total Polysaccharides) ดังตารางที่ 3.6

ตารางที่ 3.6 แสดงปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ (Total Polysaccharides)

ความเข้มข้นของสารสกัด ด้วยเอทานอลโดยใช้ซอกเลต (S1) (mg/mL)	ปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ (Total Polysaccharides)	
	mg of glucose equivalents / g mushroom	mg of glucose equivalents / g crude extracts
75	0.07	1.33

3.3.2 ผลการวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลรวม (Total phenolic compounds) ด้วยวิธี Folin-Ciocalteu reagent

เมื่อนำสารสกัดด้วยน้ำ (S3) มาวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลรวม (Total phenolic compounds) ด้วยวิธี Folin-Ciocalteu reagent พบว่ามีปริมาณฟีนอลรวม (Total phenolic compounds) ดังตารางที่ 3.7

ตารางที่ 3.7 แสดงปริมาณฟีนอลรวม (Total phenolic compounds)

ความเข้มข้นของสารสกัดด้วย น้ำ (S3) (mg/mL)	ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของตัวอย่างที่วิเคราะห์เทียบกับสารละลายมาตรฐานโทโรลออกซ์ TEAC (Trolox Equivalents Antioxidant Capacity)	
	mg of gallic acid equivalents (GAE) / g mushroom	mg of gallic acid equivalents (GAE) / g crude extracts
0.781	6.12	79.50

3.3 ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี

3.3.1 การวิเคราะห์ด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (High Performance Liquid Chromatography, HPLC)

จากโครมาโทแกรมรูปที่ ๑๓ ของสารสกัดเห็ดหลินจือขาววางที่สกัดซ้ำด้วยไดคลอโรมีเทน ไม่สามารถระบุองค์ประกอบทางเคมีได้ เนื่องจากข้อจำกัดด้านเครื่องมือจากการเลือกใช้คอลัมน์แบบ Analytical columns (150mm×4.6 mm, 5 μm) โดยที่ความยาวคอลัมน์ไม่ตรงตามที่กำหนด จึงทำการวิเคราะห์ <sup>1</sup>H-NMR ของสารสกัดซ้ำด้วยไดคลอโรมีเทน พบว่ามีประกอบสารในกลุ่มไตรเทอร์พีน (triterpene) เป็นองค์ประกอบหลัก



## บทที่ 4

### สรุปผลการทดลอง

จากการสกัดเห็ดหลินจือเขากวางทั้งหมด 3 แบบคือ สารสกัดเอทานอลโดยใช้ซอกเลต (S1) , สารสกัดเอทานอล (S2) และสารสกัดน้ำ (S3) พบว่าสารสกัดเอทานอล (S2) มีร้อยละปริมาณของสารที่สกัดได้ (%yield extract) เท่ากับ 3.48 สารสกัดน้ำ (S3) มีร้อยละปริมาณของสารที่สกัดได้ (%yield extract) แสดงค่าเท่ากับ 5.34 โดยมีพอลิแซ็กคาไรด์รวม 1.33 มิลลิกรัมกลูโคสโดยสมมูล/กรัมสารสกัดน้ำ และสารสกัดเอทานอล (S1) มีร้อยละปริมาณของสารที่สกัดได้ (%yield extract) มากที่สุดคือ 7.70 โดยมีนอลรวม 79.50 มิลลิกรัมกรดแกลลิกโดยสมมูล/กรัมสารสกัดเอทานอล S1 นอกจากนี้ทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยการดักจับอนุมูลอิสระ 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) แสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ เท่ากับ 29.23 มิลลิกรัมโทรลอคซ์โดยสมมูล/กรัมสารสกัดเอทานอล S1 จากนั้นนำสารสกัด S1 มาทำการสกัดแยกต่อด้วยเฮกเซน, ไดคลอโรมีเทนและเมทานอล ได้เป็นสารสกัด S1/H, S1/D และ S1/M โดยลำดับ แล้วนำสารสกัดแยกทั้งสามที่ความเข้มข้น 10 mg/mL มาทำการทดสอบทดสอบฤทธิ์ยับยั้งแอลฟาไกลูโคซิเดสและไลเปส พบว่าฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดสเท่ากับ 58%, 92 % และ 97% ตามลำดับ และสารสกัด S1/M เท่านั้นที่มีฤทธิ์ยับยั้งไลเปสด้วยค่าร้อยละการยับยั้ง 71 ในการนำสารสกัดทั้ง 6 ตัวอย่างทดสอบการเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งทั้ง 5 ชนิด ได้แก่ เซลล์มะเร็งกระเพาะอาหาร (KATO-III), เซลล์มะเร็งเต้านม (BT474), เซลล์มะเร็งลำไส้ (SW620), เซลล์มะเร็งตับ (Hep-G2), เซลล์มะเร็งปอด (Chago-K1) และเซลล์ปอดปกติ (Wi-38) พบว่าสารสกัด S1, S1/D และ S2 มีฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งทั้ง 5 ชนิดได้ดี โดยสารสกัดด้วยเอทานอล S1 มีฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งทั้ง 5 ชนิดได้ดีที่สุดในส่วนของสารสกัด S1/M มีฤทธิ์การยับยั้ง Hep-G2 ได้ดีที่สุดในด้วยค่า IC<sub>50</sub> เท่ากับ 44 µg/mL และสารสกัด S3 มีฤทธิ์การยับยั้งจำเพาะ Chago-K1 ด้วยค่า IC<sub>50</sub> เท่ากับ 103 µg/mL จากการวิเคราะห์องค์ประกอบของเห็ดหลินจือเขากวางในสารสกัด S1, S1/H, S1/D, S1/M และ S2 ด้วย <sup>1</sup>H-NMR spectroscopy บ่งชี้ว่าสารสกัดที่มีฤทธิ์ต้านมะเร็งเหล่านี้ประกอบด้วยสารในกลุ่มไตรเทอร์พีน (triterpenoids)



## เอกสารอ้างอิง

1. Cheung, P.C.K. The nutritional and health benefits of mushrooms. *Nutrition Bulletin* **2010**, *35*, 292–299.
2. Soković, M.; Glamočlija, J.; Ćirić, A.; Petrović, J.; Stojković, D. *Therapeutic Foods*, Academic Press: Cambridge, 2018; Vol. 8, pp 141.
3. Wang, Y. Y.; Khoo, K. H.; Chen, S. T.; Lin, C. C.; Wong, C. H.; Lin, C. H. Studies on the immunomodulating and antitumor activities of *Ganoderma lucidum* (Reishi) polysaccharides: Functional and proteomic analyses of a fucose-containing glycoprotein fraction responsible for the activities. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2002**, *10*, 1057–1062.
4. Kimura, Y.; Okuda, H.; Arichi, S. Effects of the extracts of *Ganoderma lucidum* on blood glucose level in rats. *Planta Medica* **1988**, *54*, 290–294.
5. Kabir, Y.; Kimura, S.; Tamura, T. Dietary effect of *Ganoderma lucidum* mushroom on blood pressure and lipid levels in spontaneously hypertensive rats (SHR). *Journal of Nutritional Science and Vitaminology* **1988**, *34*, 433–438.
6. Komada, Y.; Shimizu, M.; Sonoda, Y.; Sato, Y. Ganoderic acid and its derivatives as cholesterol synthesis inhibitors. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* **1989**, *37*, 531–533.
7. สาธิต ไทยทัตกุล. กรุงเทพฯ, การเพาะเห็ดหลินจือ; บริษัท ฟาร์มภัย จำกัด, 2538.
8. Benzie, I. F. F.; Wachtel-Galor, S. *Herbal Medicine: Biomolecular and Clinical Aspects*; CRC Press: Boca Raton, 2011.
9. Min, B.S.; Gao, J.J.; Lee, Y.H.; Nakamura, N.; Hattori, M. Chemical and biological evaluation of germinated and mature antler-shaped fruiting bodies of *Ganoderma lucidum*. *Natural Medicines* **2004**, *58*, 91-97.
10. Taniguchi, M.; Aga, M.; Hino, K., Inoue, S.-I.; Ishihara, T.; Iwaki, K.; Ikeda, M.; Kibata, M.; Kurimoto, M. Hypotriglyceridemic effect of the antler-shaped fruiting body of *Ganoderma lucidum* on the high-fat diet induced hyperlipidemia in Syrian hamsters. *Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi* **2005**, *52*, 135-139.
11. Kohguchi, M.; Kunikata, T.; Watanabe, H.; Kudo, N.; Shibuya, T.; Ishihara, T.; Iwaki, K.; Ikeda, M.; Fukuda, S.; Kurimoto, M. Immuno-potentiating effects of the antler-shaped fruiting body of *Ganoderma lucidum* (RokkakuReishi). *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* **2014**, *68*, 881-887.
12. Sudheer, S.; Taha, Z.; Manickam, S.; Ali, A.; Cheng, P. G. Development of antler-type fruiting bodies of *Ganoderma Lucidum* and determination of its biochemical properties. *Fungal Biology* **2018**, *122*(5), 293–301.

13. Mosmann, T. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods* **1983**, *65*(1-2), 55–63.
14. จุลินทรีย์ สํารานู (2556). พยาธิวิทยาของเซลล์และเนื้อเยื่อ (Cellular Pathology) (รายงานการวิจัย), มหาวิทยาลัยนเรศวร.
15. Slanc, P.; Doljak, B.; Mlinari?, A.; ?trukelj, B. Screening of wood damaging fungi and macrofungi for inhibitors of pancreatic lipase. *Phytotherapy Research* **2004**, *18*(9), 758–762.
16. Kim, Y.-M.; Wang, M.-H.; Rhee, H.-I. A Novel  $\alpha$ -glucosidase inhibitor from pine bark. *Carbohydrate Research* **2004**, *339*(3), 715–717.
17. Pisoschi, A. M.; Negulescu, G. P. Methods for total antioxidant activity determination: A review. *Biochemistry & Analytical Biochemistry* **2012**, *01*(01).
18. Pelagia Research Library – iMedpub <http://www.bing.com/cr?IG=612E24CC4D4049AF919BFA573101C1FF&CID=2DFF9B666974686D1047908768DB691C&rd=1&h=e3TWpizM-DA8wgfStqdC-z3T5ZitCXil-VYKdxJz7w&v=1&r=http://www.imedpub.com/articles/spectrophotometric-estimation-of-ferulic-acid-from-ferula-asafotida-by-folin--ciocalteus-reagent.pdf&p=DevEx.LB.1,5060.1> (accessed Apr 30, 2018).
19. Kim, D.-O.; Lee, K. W.; Lee, H. J.; Lee, C. Y. Vitamin C equivalent antioxidant capacity (VCEAC) of phenolic phytochemicals. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2002**, *50*(13), 3713–3717.
20. Chanmee, W.; Chaicharoenpong, C.; Petsom, A. Lipase inhibitor from fruits of *Solanum Stramonifolium* Jacq. *Food and Nutrition Sciences* **2013**, *04*(05), 554–558.
21. Wang, Z.-W.; Wang, J.-S.; Luo, J.; Kong, L.-Y.  $\alpha$ -Glucosidase inhibitory triterpenoids from the stem barks of *Uncaria Laevigata*. *Fitoterapia* **2013**, *90*, 30–37.
22. Heleno, S. A.; Barros, L.; Martins, A.; Queiroz, M. J. R.; Santos-Buelga, C.; Ferreira, I. C. Fruiting Body, Spores and in vitro produced mycelium of *Ganoderma Lucidum* from northeast portugal: A comparative study of the antioxidant potential of phenolic and polysaccharidic extracts. *Food Research International* **2012**, *46*(1), 135–140.
23. Yahia, E. M.; Gutiérrez-Orozco, F.; Moreno-Pérez, M. A. Identification of phenolic compounds by liquid chromatography-Mass spectrometry in seventeen species of wild mushrooms in central mexico and determination of their antioxidant activity and bioactive compounds. *Food Chemistry* **2017**, *226*, 14–22.
24. Chen, Y.; Yan, Y.; Xie, M.-Y.; Nie, S.-P.; Liu, W.; Gong, X.-F.; Wang, Y.-X. Development of a chromatographic fingerprint for the chloroform extracts of *Ganoderma Lucidum* by HPLC and LC–MS. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **2008**, *47*(3), 469–477.



ภาคผนวก



## 1 แสดงการคำนวณร้อยละปริมาณสารที่สกัดได้ (%yield crude extract) ของสารสกัด

### 1.1 ผลการสกัดด้วยเอทานอลโดยใช้ชอกเลต (S1)

จากการสกัดหัตถ์หลินจื่อเขากวาง 30.06 กรัม ด้วยเอทานอลโดยใช้ชอกเลตเป็นเวลา 12 ชั่วโมง ได้สารสกัดเอทานอลโดยใช้ชอกเลต (S1) มีลักษณะเป็นของแข็งสีน้ำตาลหนัก 2.3160 กรัม คิดเป็นร้อยละดังนี้

$$\begin{aligned} \text{ร้อยละปริมาณสารที่สกัดได้ ( \%yield crude extract)} &= \frac{\text{น้ำหนักของสารสกัดหัตถ์เขากวาง}}{\text{น้ำหนักแห้งของหัตถ์หลินจื่อเขากวาง}} \times 100 \\ &= \frac{2.3160}{30.06} \times 100 \\ &= 7.70\% \end{aligned}$$

### 1.2 สารสกัดแยกส่วนด้วยเฮกเซน (S1/H)

นำสารสกัดด้วยเอทานอลโดยใช้ชอกเลต 1.2401 กรัม มาสกัดแยกส่วนด้วยเฮกเซนทั้งหมด 2 ครั้ง โดยใช้ปริมาตรเฮกเซนครั้งละ 50 มิลลิลิตร พบว่าได้สารสกัดแยกส่วนด้วยเฮกเซน (S1/H) มีลักษณะเหนียวไม่แข็งสีน้ำตาลอ่อนหนัก 0.0828 กรัม คิดเป็นร้อยละดังนี้

$$\begin{aligned} \text{ร้อยละปริมาณสารที่สกัดได้ ( \%yield crude extract)} &= \frac{\text{น้ำหนักของสารสกัดหัตถ์เขากวาง}}{\text{น้ำหนักแห้งของหัตถ์หลินจื่อเขากวาง}} \times 100 \\ &= \frac{0.0828}{1.2401} \times 100 \\ &= 6.68\% \end{aligned}$$

### 1.3 สารสกัดแยกส่วนด้วยไดคลอโรมีเทน (S1/D)

กากที่เหลือจากการสกัดแยกด้วยเฮกเซนนำมาสกัดด้วยไดคลอโรมีเทนทั้งหมด 3 โดยใช้ปริมาตรไดคลอโรมีเทนครั้งละ 50 มิลลิลิตร พบว่าได้สารสกัดแยกส่วนด้วยไดคลอโรมีเทน (S1/D) มีลักษณะเป็นของแข็งสีน้ำตาลเข้มหนัก 0.8246 กรัม คิดเป็นร้อยละดังนี้

$$\begin{aligned} \text{ร้อยละปริมาณสารที่สกัดได้ ( \%yield crude extract)} &= \frac{\text{น้ำหนักของสารสกัดหัตถ์เขากวาง}}{\text{น้ำหนักแห้งของหัตถ์หลินจื่อเขากวาง}} \times 100 \\ &= \frac{0.8246}{1.2401} \times 100 \\ &= 66.49\% \end{aligned}$$

### 1.4 สารสกัดแยกส่วนด้วยเมทานอล (S1/M)

กากที่เหลือจากการสกัดแยกด้วยไดคลอโรมีเทนนำมาสกัดด้วยเมทานอลทั้งหมด 2 ครั้ง โดยใช้ปริมาตรเมทานอลครั้งละ 50 มิลลิลิตร พบว่าได้สารสกัดแยกส่วนด้วยเมทานอล (S1/M) มีลักษณะเป็นของแข็งสีน้ำตาลหนัก 0.1651 กรัม คิดเป็นร้อยละดังนี้

$$\begin{aligned} \text{ร้อยละปริมาณสารที่สกัดได้ ( \%yield crude extract)} &= \frac{\text{น้ำหนักของสารสกัดหัตถ์เขากวาง}}{\text{น้ำหนักแห้งของหัตถ์หลินจื่อเขากวาง}} \times 100 \\ &= \frac{0.1651}{1.2401} \times 100 \\ &= 13.31\% \end{aligned}$$

### 1.5 ผลการสกัดด้วยเอทานอล (S2)

จากการสกัดหัตถ์หลินจื่อเขากวาง 50.05 กรัม ด้วยเอทานอลทั้งหมด 3 ครั้ง โดยใช้ปริมาตรเอทานอล ครั้งละ 400 มิลลิลิตร พบว่าได้สารสกัดด้วยเอทานอล (S2) มีลักษณะเป็นของแข็งสีน้ำตาลเข้มหนัก 1.7413 กรัม

คิดเป็นร้อยละดังนี้

$$\begin{aligned} \text{ร้อยละปริมาณสารที่สกัดได้ ( \%yield crude extract)} &= \frac{\text{น้ำหนักของสารสกัดเห็ดเขากวาง}}{\text{น้ำหนักแห้งของเห็ดหลินจือเขากวาง}} \times 100 \\ &= \frac{1.7413}{50.05} \times 100 \\ &= 3.48\% \end{aligned}$$

### 1.6 ผลการสกัดด้วยน้ำ (S3)

จากการสกัดเห็ดหลินจือเขากวาง 1.5 กรัม ด้วยน้ำทั้งหมด 2 ครั้ง โดยใช้ปริมาตรน้ำครั้งละ 50 มิลลิลิตร ได้สารสกัดด้วยน้ำ (S3) มีลักษณะเป็นแผ่นของแข็งสีน้ำตาลเข้มหนัก 0.0802 กรัม คิดเป็นร้อยละดังนี้

$$\begin{aligned} \text{ร้อยละปริมาณสารที่สกัดได้ ( \%yield crude extract)} &= \frac{\text{น้ำหนักของสารสกัดเห็ดเขากวาง}}{\text{น้ำหนักแห้งของเห็ดหลินจือเขากวาง}} \times 100 \\ &= \frac{0.0802}{1.5} \times 100 \\ &= 5.34\% \end{aligned}$$

## 2. ผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ

### 2.1 ผลการทดสอบการเป็นพิษต่อเซลล์ (Cytotoxicity assay)

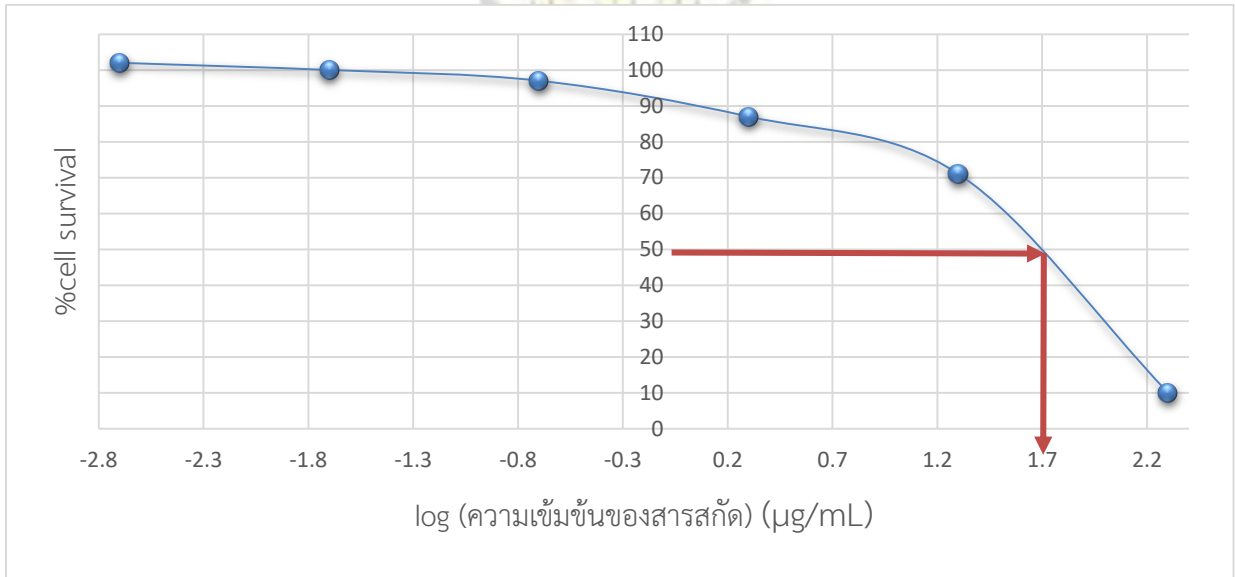
ตัวอย่างการคำนวณ

สารสกัดด้วยเอทานอลโดยใช้ชอกเลต (S1)

ตารางที่ ผ1 แสดงผลการนำสารสกัดด้วยเอทานอลโดยใช้ชอกเลต (S1) ชุดที่ 1 ที่ความเข้มข้น (เจือจาง 10 เท่า) 200, 20, 2, 0.2 0.02 และ 0.002 µg/mL ละลายใน DMSO ในการเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งลำไส้ (SW620)

ความเข้มข้นของสารสกัด (µg/mL)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 nm ของเซลล์มะเร็งลำไส้ (SW-620) หลังการเติม MTT					Percent of Survival
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ครั้งที่ 4	เฉลี่ย	
200	0.124	0.118	0.114	0.114	0.118	10
20	0.852	0.747	0.865	0.873	0.834	71
2	1.109	0.987	0.989	1.002	1.022	87
0.2	1.243	1.118	1.090	1.106	1.139	97
0.02	1.259	1.160	1.114	1.159	1.173	100
0.002	1.296	1.122	1.227	1.142	1.197	102
DMSO	1.321	1.265	1.153	1.162	1.174	100
	1.061	1.134	1.148	1.149		

แล้วนำค่าเปอร์เซ็นต์การรอดของเซลล์มาสร้างกราฟเพื่อใช้คำนวณหาความเข้มข้นต่ำที่สุดของสารสกัดด้วยเอทานอลโดยใช้ชอกเลต (S1) ที่เป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งลำไส้ (SW620) ร้อยละ 50 หรือหาค่า  $IC_{50}$  (Inhibit concentration 50%) ดังนี้



รูปที่ ผ1 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของเซลล์มะเร็งลำไส้ (% cell survival) เมื่อได้รับสารสกัดด้วยเอทานอลโดยใช้ชอกเลต (S1) ที่ความเข้มข้น (เจือจาง 10 เท่า) 200, 20, 2, 0.2 0.02 และ 0.002 µg/mL

จากกราฟสามารถคำนวณหาความเข้มข้นต่ำที่สุดของสารสกัดด้วยเอทานอลโดยใช้ชอกเลต (S1) ที่เป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งลำไส้ (SW620) ร้อยละ 50 หรือหาค่า  $IC_{50}$

โดยใช้สมการ

$$y = 10^x$$

เมื่อ

y คือ % การอยู่รอดของเซลล์มะเร็งลำไส้

x คือ ค่า log ของความเข้มข้นของสารสกัดด้วยเอทานอลโดยใช้ชอกเลต (S1) ที่มีเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของเซลล์มะเร็งลำไส้เท่ากับ 50

แทนค่า

$$x = 1.7 \quad \text{ลงในสมการ}$$

จะได้

$$y = 10^{1.7}$$

$$y = 50.12 \approx 50$$

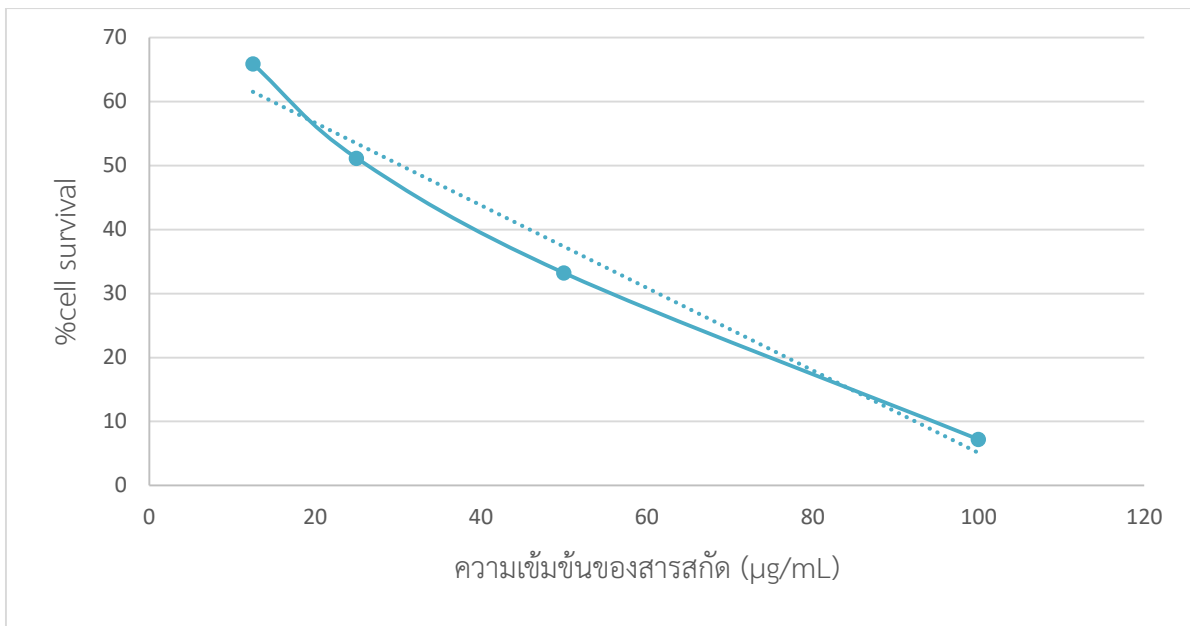
ดังนั้น ความเข้มข้นต่ำที่สุดของสารสกัดด้วยเอทานอลโดยใช้ชอกเลต (S1) ที่เป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งลำไส้ (SW620) ร้อยละ 50 คือ 50 µg/mL



ตารางที่ ผ2 แสดงผลการนำสารสกัดด้วยเอทานอลโดยใช้ชอกเลต (S1) ชุดที่ 2 ที่ความเข้มข้น (เจือจาง 2 เท่า) 200, 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.125, 1.563 และ 0.78  $\mu\text{g/mL}$  ละลายใน DMSO ในการเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งลำไส้

ความเข้มข้น ของสารสกัด ( $\mu\text{g/mL}$ )	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 nm ของเซลล์มะเร็งลำไส้ (SW-620) หลังการ เติม MTT					Percent of Survival
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ครั้งที่ 4	เฉลี่ย	
200	0.106	0.107	0.086	0.106	0.101	9
100	0.083	0.086	0.085	0.086	0.085	7
50	0.450	0.361	0.312	0.438	0.390	33
25	0.520	0.597	0.615	0.672	0.601	51
12.5	0.799	0.726	0.734	0.836	0.774	66
6.25	1.049	1.036	1.087	1.222	1.098	94
3.125	0.967	0.918	0.958	1.038	0.970	83
1.563	1.119	1.087	1.108	1.193	1.127	96
0.782	1.147	1.126	1.004	1.250	1.132	96
DMSO	1.321	1.265	1.153	1.162	1.174	100
	1.061	1.134	1.149	1.148		

แล้วนำค่าเปอร์เซ็นต์การรอดของเซลล์มาสร้างกราฟ โดยเลือกใช้ข้อมูลที่มีความเข้มข้น 100, 50, 25 และ 12.5  $\mu\text{g/mL}$  เนื่องจากให้กราฟที่เป็นเส้นตรง เพื่อใช้คำนวณหาความเข้มข้นต่ำที่สุดของสารสกัดด้วยเอทานอลโดยใช้ชอกเลต (S1) ที่เป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งลำไส้ (SW620) ร้อยละ 50 หรือหาค่า IC<sub>50</sub> (Inhibit concentration 50%) ดังนี้



รูปที่ ผ2 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของเซลล์มะเร็งลำไส้ (% cell survival) เมื่อได้รับสารสกัดด้วยเอทานอลโดยใช้ชอกเลต (S1) ที่ความเข้มข้น (เจือจาง 2 เท่า), 100, 50, 25 และ 12.5 µg/mL

จากกราฟสามารถคำนวณหาความเข้มข้นต่ำที่สุดของสารสกัดด้วยเอทานอลโดยใช้ชอกเลต (S1) ที่เป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งลำไส้ (SW620) ร้อยละ 50 หรือหาค่า  $IC_{50}$

โดยใช้สมการเส้นตรง  $y = -0.06449x + 69.604$  ( $R^2 = 0.9762$ )

เมื่อ  $y$  คือ % การอยู่รอดของเซลล์มะเร็งลำไส้

$x$  คือ ความเข้มข้นของสารสกัดด้วยเอทานอลโดยใช้ชอกเลต (S1) ที่มีเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของเซลล์มะเร็งลำไส้เท่ากับ 50

แทนค่า  $y = 50$  ลงในสมการ

จะได้  $50 = -0.06449x + 69.604$

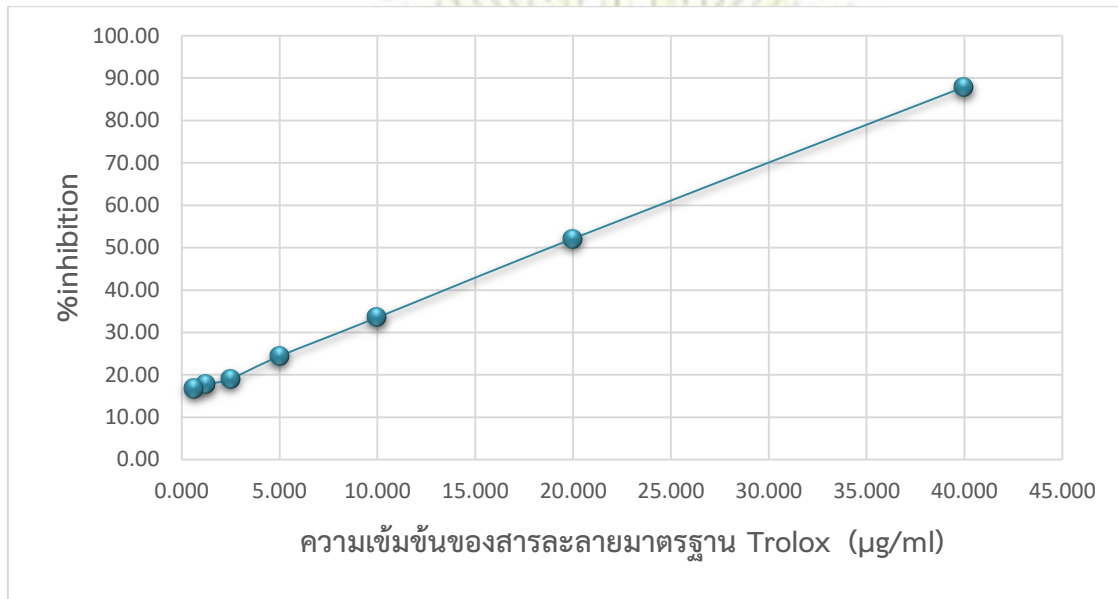
$$x = \frac{(50 - 69.604)}{-0.06449}$$

$$y = 30.40 \approx 30$$

ดังนั้น ความเข้มข้นต่ำที่สุดของสารสกัดด้วยเอทานอลโดยใช้ชอกเลต (S1) ที่เป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งลำไส้ (SW620) ร้อยละ 50 คือ 30 µg/mL

## 2.2 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical scavenging capacity (DPPH assay)

การคำนวณ  $IC_{50}$  ของสารละลายมาตรฐาน Trolox



รูปที่ ๗3 กราฟแสดงความสัมพันธ์ของสารละลายมาตรฐาน Trolox ระหว่างความเข้มข้น 40, 20, 10, 5, 2.5, 1.25 และ 0.625 µg/mL และ ร้อยละการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH (%inhibition) ที่ความยาวคลื่น 517 nm

หา  $IC_{50}$  ได้จากสมการ  $y = 0.0113x + 0.0952$  ( $R^2 = 0.9989$ )

เมื่อ

$y$  คือ %inhibition

$x$  คือ ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานโทรลอกซ์ (Trolox) (µg/ml)

โดยแทนค่า

$y = 50$  ลงในสมการ

จะได้

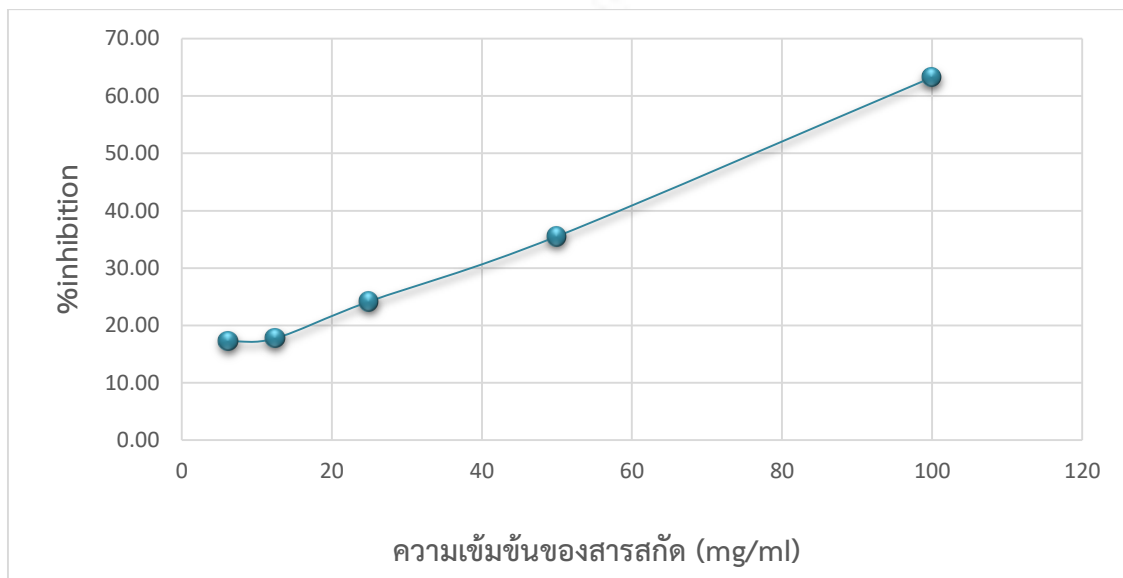
$$x = \frac{(50 - 0.0952)}{0.0113}$$

$$x = 18.81$$

ดังนั้น  $IC_{50}$  ของสารละลายมาตรฐานโทรลอกซ์ (Trolox) คือ 18.81 µg/mL



การคำนวณ  $IC_{50}$  ของสารสกัดด้วยเอทานอลโดยใช้ชอกเลต (S1)



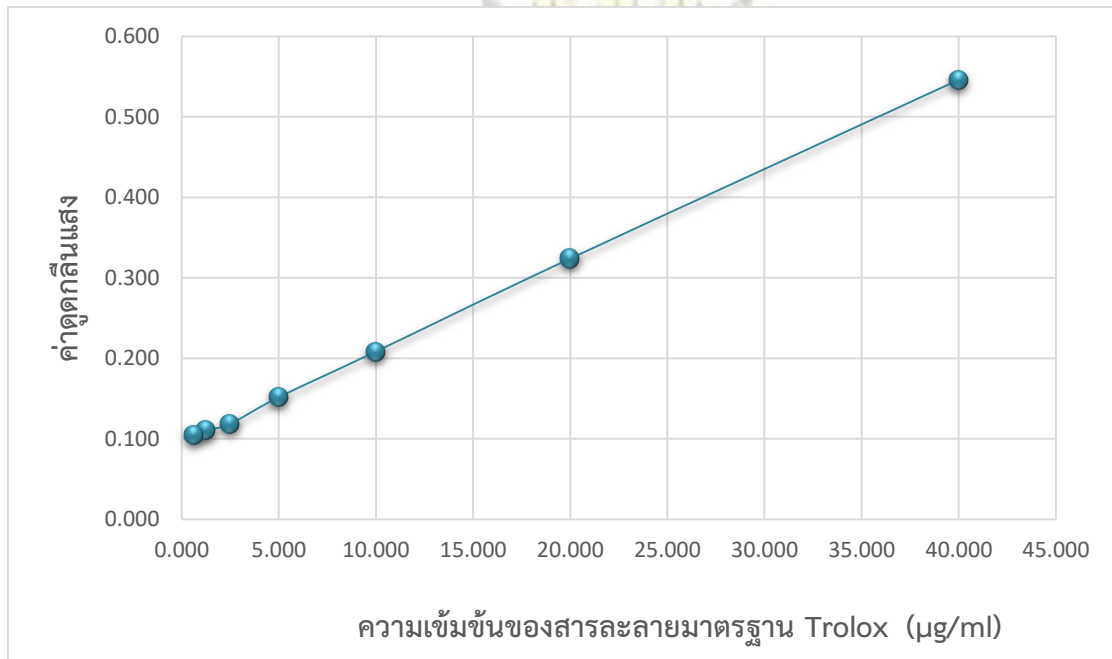
รูปที่ ๗4 กราฟแสดงความสัมพันธ์ของสารสกัดด้วยเอทานอลโดยใช้ชอกเลต (S1) ระหว่างความเข้มข้น 100, 50, 25, 12.5 และ 6.25 mg/mL และ 0.625 mg/mL และ ร้อยละการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH (%inhibition) ที่ความยาวคลื่น 517 nm

หา  $IC_{50}$  ได้จากสมการ  $y = 0.5011x + 12.173$  ( $R^2 = 0.9944$ )  
เมื่อ  $y$  คือ %inhibition  
 $x$  คือ ความเข้มข้นของสารสกัด (mg/mL)

โดยแทนค่า  $y = 50$  ลงในสมการ  
จะได้  $50 = 0.5011x + 12.173$   
 $x = \frac{(50 - 12.173)}{0.5011}$   
 $x = 75.49$

ดังนั้น  $IC_{50}$  ของสารสกัดด้วยเอทานอลโดยใช้ชอกเลต (S1) คือ 75.49 mg/mL

การคำนวณความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของตัวอย่างที่วิเคราะห์เทียบกับสารละลายมาตรฐาน Trolox (TEAC, Trolox Equivalents Antioxidant Capacity)



รูปที่ ๗5 กราฟแสดงความสัมพันธ์ของสารละลายมาตรฐาน Trolox ระหว่างความเข้มข้น 40, 20, 10, 5, 2.5, 1.25 และ 0.625 µg/mL และค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 nm

การคำนวณ

1. หาค่าดูดกลืนแสงของสารละลายตัวอย่าง

ความเข้มข้นของสารละลายตัวอย่างที่ใช้ในการทดสอบ 0.625 mg/mL

ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายตัวอย่างที่ความเข้มข้น 0.625 mg/mL

$$\begin{aligned}
 &= A_{\text{Control}} - A_{\text{Sample}} \\
 &= 0.621 - 0.314 \\
 &= 0.308
 \end{aligned}$$

2. หาความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน Trolox (Trolox)

จากสมการของกราฟแสดงความสัมพันธ์สารละลายมาตรฐาน Trolox (Trolox)

$$y = 0.0113x + 0.0952 \quad (R^2 = 0.9998)$$

เมื่อ

x คือ ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน Trolox (Trolox) (µg/ml)

y คือ ค่าการดูดกลืนแสง

แทนค่าดูดกลืนแสงของสารละลายตัวอย่างที่ความเข้มข้น 0.625 mg/mL คือ

$$y = 0.308 \text{ ลงในสมการ}$$

จะได้

$$0.308 = 0.0113x + 0.0952$$

$$x = \frac{(0.308 - 0.0952)}{0.0113}$$

$$x = 18.27$$

ดังนั้น ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน Trolox คือ 18.27  $\mu\text{g/mL}$   
หรือ 0.01827 mg/mL

3. หาความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของตัวอย่างที่วิเคราะห์เทียบกับสารละลายมาตรฐาน Trolox เรียกว่า TEAC (Trolox Equivalents Antioxidant Capacity; mg Trolox/ (g) extract) จากสมการ (2.3)

$$\text{mg of Trolox equivalents / (g) extract} = \frac{C_{\text{Trolox}} (\text{mg/mL}) \times DF \times V_{\text{Solvent}} (\text{mL})}{M_{\text{Extract}} (\text{g})}$$

เมื่อ  $C_{\text{Trolox}}$  = ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน Trolox จากการนำค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายตัวอย่างไปเทียบกับกราฟของสารละลายมาตรฐาน Trolox (Trolox) (mg/mL)

DF (Dilution factor) = ค่าจากการเจือจางสารละลายตัวอย่าง

$V_{\text{Solvent}}$  = ปริมาณของตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัด (mL)

$M_{\text{Extract}}$  = น้ำหนักของสารสกัด (g)

แทนค่า  $C_{\text{Trolox}} = 0.01827 \text{ mg/mL}$

$$DF (\text{Dilution factor}) = \frac{200 \text{ mg/mL}}{0.625 \text{ mg/mL}} = 320$$

ซึ่งหาได้จากการเจือจางความเข้มข้นจาก stock ของสารละลายตัวอย่างที่ความเข้มข้น 200 mg/mL เป็น 0.625 mg/mL

$V_{\text{Solvent}} = 0.05425 \text{ mL}$

$M_{\text{Extract}} = 0.1085 \text{ g}$

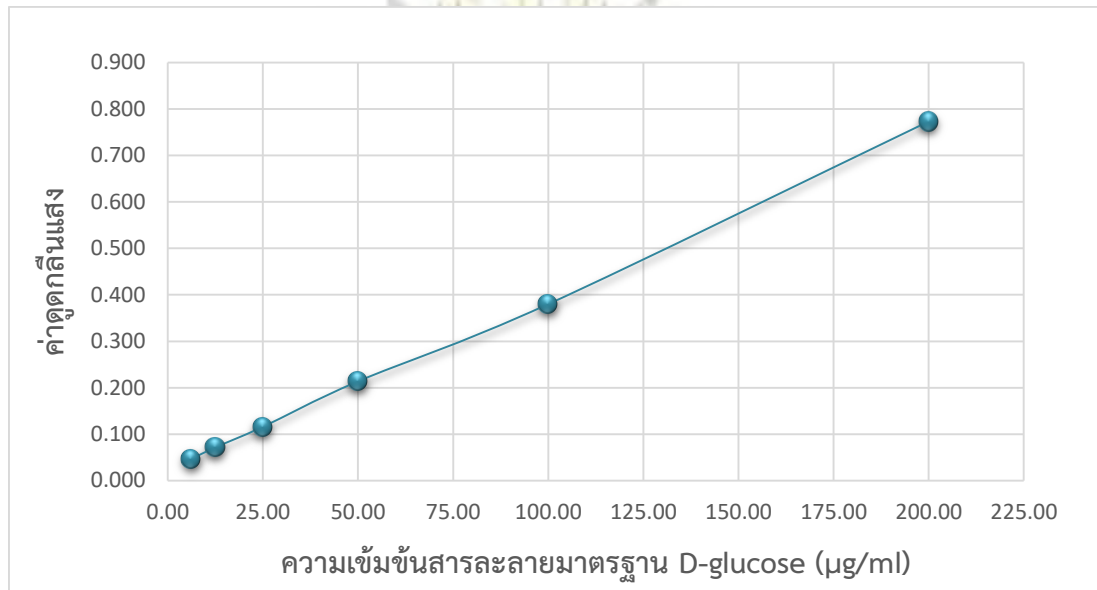
$$\begin{aligned} \text{mg of Trolox equivalents / (g) extract} &= \frac{0.01827 \frac{\text{mg}}{\text{mL}} \times 320 \times 0.05425 \text{ mL}}{0.1085 \text{ g}} \\ &= 29.23 \text{ mg of Trolox equivalents / gram of the} \\ &\quad \text{S1 extract} \end{aligned}$$

ดังนั้น ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของตัวอย่างที่วิเคราะห์เทียบกับสารละลายมาตรฐาน Trolox เท่ากับ 29.23 mg of Trolox equivalents / gram of the S1 extract



### 3. การคำนวณผลการวิเคราะห์กลุ่มสารที่เป็นองค์ประกอบ

#### 3.1 ผลการวิเคราะห์ปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ (Total Polysaccharides)



รูปที่ ๓6 กราฟแสดงความสัมพันธ์ของสารละลายมาตรฐาน D-glucose ระหว่างความเข้มข้น (µg/ml) และค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 nm

การคำนวณ

1. หาค่าดูดกลืนแสงของสารละลายตัวอย่าง

ความเข้มข้นของสารละลายตัวอย่างที่ใช้ในการทดสอบ 75 mg/mL

ค่าดูดกลืนแสงของสารละลายตัวอย่างที่ความเข้มข้น 75 mg/mL

$$\begin{aligned}
 &= A_{\text{Control}} - A_{\text{Sample}} \\
 &= 0.445 - 0.053 \\
 &= 0.329
 \end{aligned}$$

2. หาความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานกลูโคส (D-glucose)

จากสมการของกราฟแสดงความสัมพันธ์สารละลายมาตรฐานกลูโคส (D-glucose) ที่ความเข้มข้น 200, 100, 50, 25, 12.5 และ 6.25 µg/mL

$$y = 0.0037x + 0.0222 \quad (R^2 = 0.9992)$$

เมื่อ

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

y คือ ค่าการดูดกลืนแสง

แทนค่าดูดกลืนแสงของสารละลายตัวอย่างที่ความเข้มข้น 75 mg/mL คือ

$$y = 0.329 \text{ ลงในสมการ}$$

จะได้

$$0.329 = 0.0037x + 0.0222$$

$$x = \frac{(0.329 - 0.0222)}{0.0037}$$

$$x = 99.95$$

ดังนั้น ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานกลูโคส (D-glucose) คือ 99.95  $\mu\text{g/mL}$   
หรือ 0.09995 mg/mL

3. หาปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ (Total Polysaccharides) ในรูป mg of glucose equivalents / g crude ซึ่งได้จากการแทนค่าในสมการ (2.5)

$$\text{mg of glucose equivalents / (g) extract} = \frac{C_{\text{Glucose}} (\text{mg/mL}) \times DF \times V_{\text{Solvent}} (\text{mL})}{M_{\text{Extract}} (\text{g})}$$

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

DF (Dilution factor) = ค่าจากการเจือจางสารละลายตัวอย่าง

$V_{\text{Solvent}}$  = ปริมาตรของตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัด (mL)

$M_{\text{Extract}}$  = น้ำหนักของสารสกัด (g)

แทนค่า

$$C_{\text{Glucose}} = 0.09995 \text{ mg/mL}$$

$$DF (\text{Dilution factor}) = \frac{150 \text{ mg/mL}}{75 \text{ mg/mL}} = 2$$

ซึ่งหาได้จากสารสกัดความเข้มข้น 150 mg/mL นำมาเจือจาง (เจือจาง 2 เท่า) เป็นความเข้มข้น 75 mg/mL

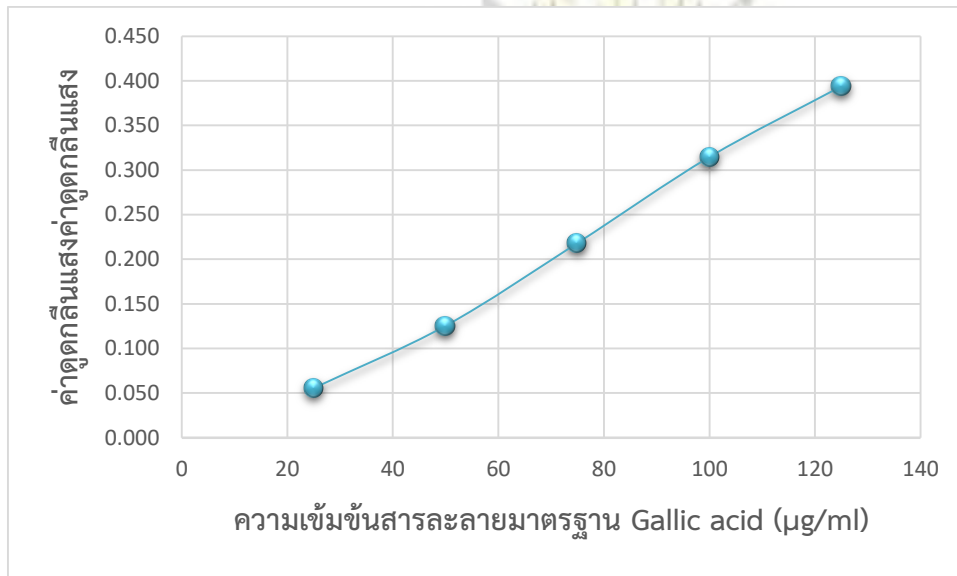
$$V_{\text{Solvent}} = 10 \text{ mL}$$

$$M_{\text{Extract}} = 0.0802 \text{ g}$$

$$\begin{aligned} \text{mg of glucose equivalents / (g) extract} &= \frac{C_{\text{Glucose}} (\text{mg/mL}) \times DF \times V_{\text{Solvent}} (\text{mL})}{M_{\text{Crude}} (\text{g})} \\ &= \frac{0.09995 \frac{\text{mg}}{\text{mL}} \times 2 \times 10 \text{ mL}}{0.0802 \text{ g}} \\ &= 24.92 \text{ mg of glucose equivalents / gram of} \\ &\quad \text{the S3 extract} \end{aligned}$$

ดังนั้น ปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ (Total Polysaccharides) ของเห็ดหลินจือเขากวาง 24.92 mg of glucose equivalents / gram of the S3 extract

### 3.2 ผลการวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลรวม (Total phenolic compounds) ด้วยวิธี Folin-Ciocalteu reagent



รูปที่ ๗7 กราฟแสดงความสัมพันธ์ของสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิกที่ความเข้มข้นต่างๆ ดังนี้ 125, 100, 75, 50 และ 25 µg/mL และค่าดูดกลืนแสงที่ความคลื่น 765 nm

การคำนวณ

1. หาค่าดูดกลืนแสงของสารละลายตัวอย่าง

ความเข้มข้นของสารละลายตัวอย่างที่ใช้ในการทดสอบ 0.781 mg/mL

ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายตัวอย่างที่ความเข้มข้น 0.781 mg/mL

$$\begin{aligned}
 &= A_{\text{Control}} - A_{\text{Sample}} \\
 &= 0.184 - 0.049 \\
 &= 0.179
 \end{aligned}$$

2. หาความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิก

จากสมการของกราฟแสดงความสัมพันธ์สารละลายมาตรฐานกรดแกลลิกที่ความเข้มข้น 125, 100, 75, 50 และ 25 µg/mL

$$y = 0.0035x + 0.0383 \quad (R^2 = 0.9974)$$

เมื่อ

x คือ ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิก (µg/ml)

y คือ ค่าการดูดกลืนแสง

แทนค่าดูดกลืนแสงของสารละลายตัวอย่างที่ความเข้มข้น 0.781 mg/mL คือ

$$y = 0.179 \text{ ลงในสมการ}$$

จะได้

$$0.179 = 0.0035x + 0.0383$$

$$x = \frac{(0.179 - 0.0383)}{0.0035}$$

$$x = 62.09$$



ดังนั้น ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิก คือ 62.09  $\mu\text{g/mL}$

หรือ 0.06209 mg/mL

3. หาปริมาณฟีนอลรวม (Total phenolic compounds) ในรูป mg of gallic acid equivalents / (g) extract ซึ่งได้จากการแทนค่าในสมการ (2.6)

$$\text{mg of gallic acid equivalents / (g) extract} = \frac{C_{\text{Gallic acid (mg/mL)}} \times DF \times V_{\text{Solvent (mL)}}}{M_{\text{Extract (g)}}$$

เมื่อ  $C_{\text{Gallic acid}}$  = ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิก จากการนำค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายตัวอย่างไปเทียบกับกราฟของสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิก

DF (Dilution factor) = ค่าจากการเจือจางสารละลายตัวอย่าง

$V_{\text{Solvent}}$  = ปริมาณของตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัด

$M_{\text{Extract}}$  = น้ำหนักของสารสกัด

แทนค่า  $C_{\text{Gallic acid}} = 0.06209 \text{ mg/mL}$

$$DF (\text{Dilution factor}) = \frac{200 \text{ mg/mL}}{0.781 \text{ mg/mL}} = 256$$

ซึ่งหาได้จากเจือจาง stock ของสารละลายตัวอย่างที่ความเข้มข้น 200 mg/mL

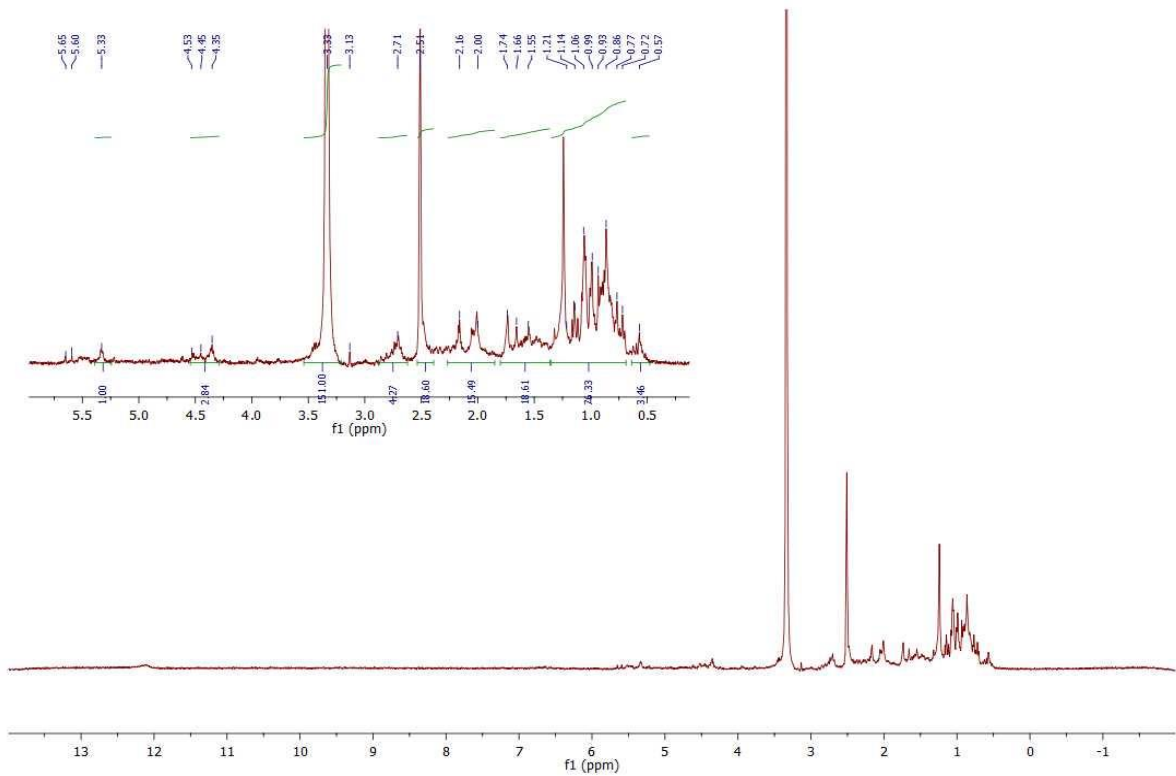
เป็น 0.781 mg/mL

$V_{\text{Solvent}} = 1.0665 \text{ mL}$

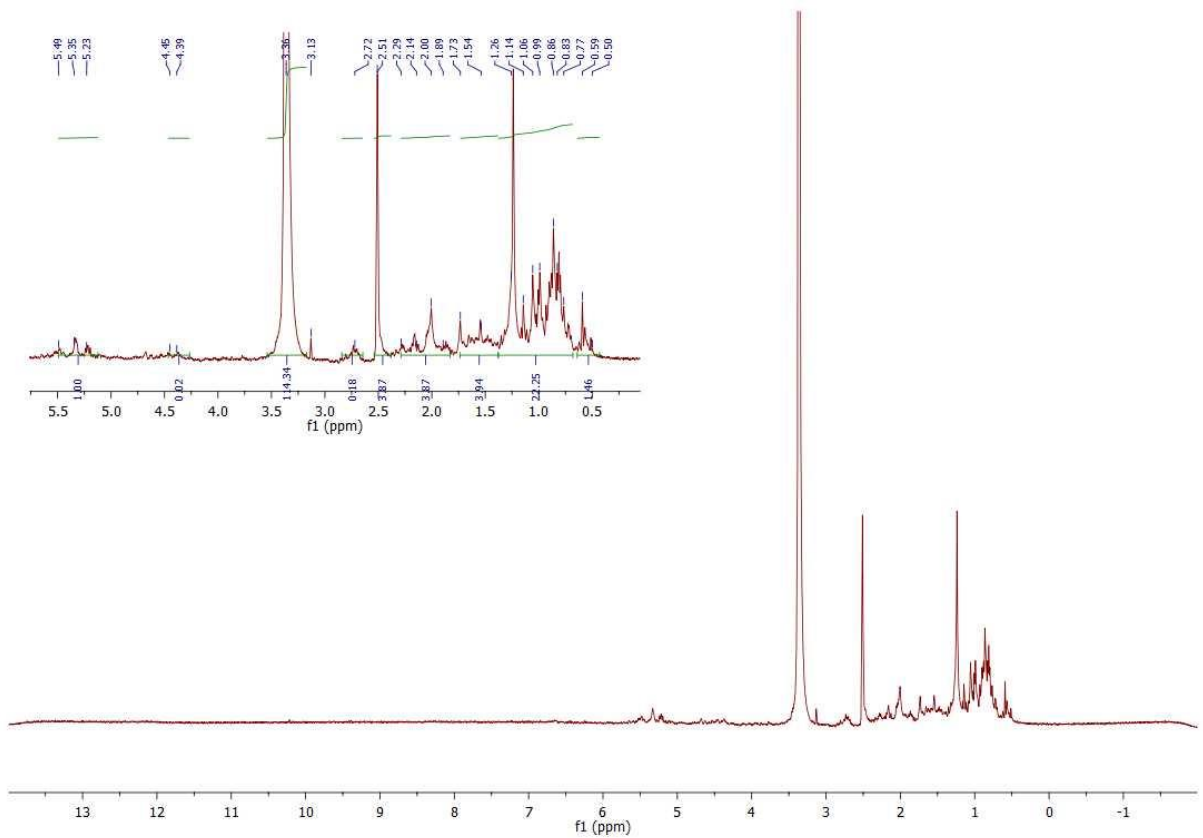
$M_{\text{Extract}} = 0.2133 \text{ g}$

$$\begin{aligned} \text{mg of gallic acid equivalents / (g) sample} &= \frac{C_{\text{Gallic acid (mg/mL)}} \times DF \times V_{\text{Solvent (mL)}}}{M_{\text{Sample (g)}}} \\ &= \frac{0.06209 \frac{\text{mg}}{\text{mL}} \times 256 \times 1.0665 \text{ mL}}{0.2133 \text{ g}} \\ &= 79.47 \text{ mg of gallic acid equivalents (GAE) /} \\ &\quad \text{gram of the S1 extract} \end{aligned}$$

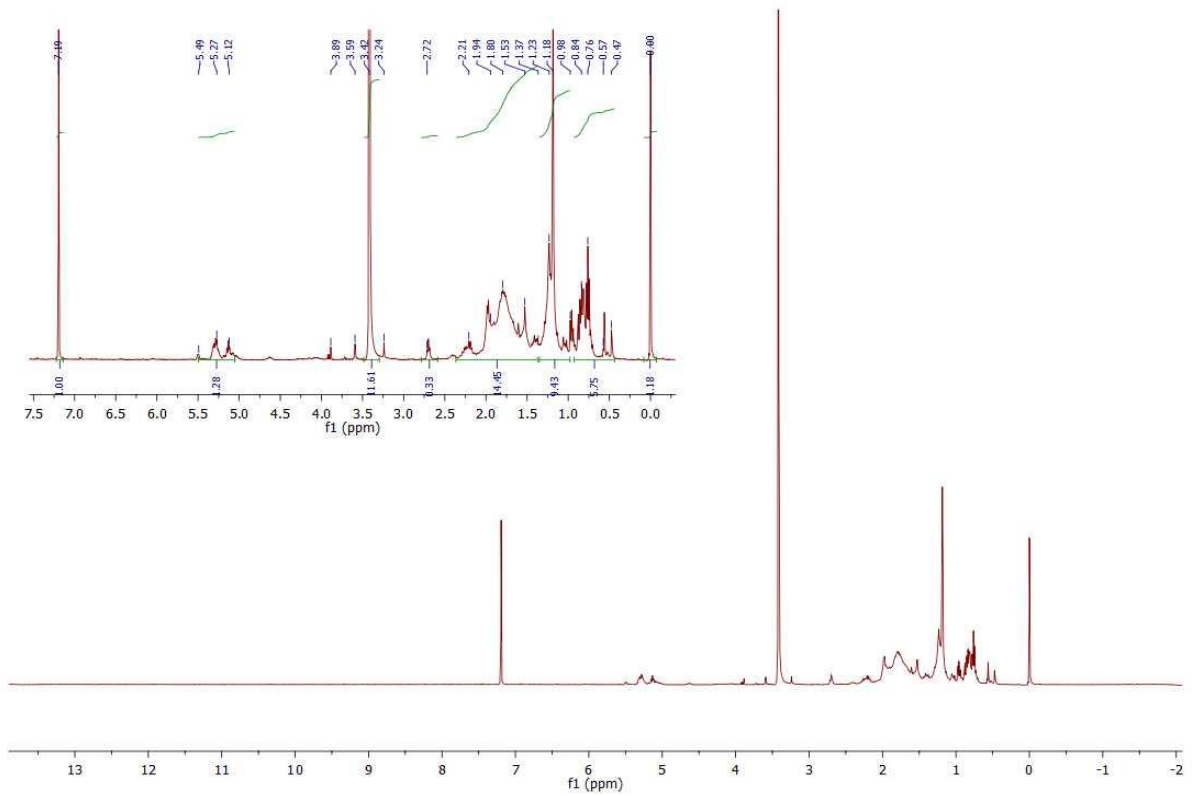
ดังนั้น ปริมาณฟีนอลรวม (Total phenolic compounds) ของเห็ดหลินจือเขากวาง 79.47 mg of gallic acid equivalents (GAE) / gram of the S1 extract



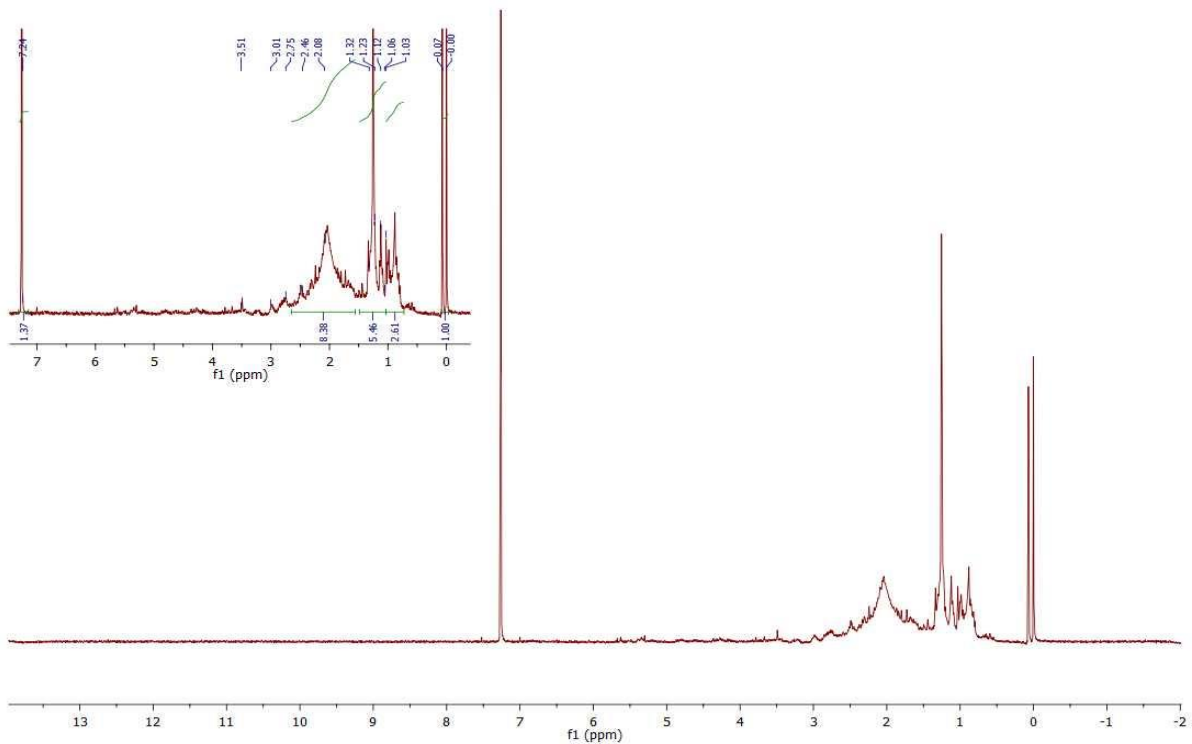
รูปที่ ๘  $^1\text{H-NMR}$  ของสารสกัดเอทานอลโดยใช้ซอกเกต (S1)



รูปที่ ๙  $^1\text{H-NMR}$  ของสารสกัดด้วยด้วยเอทานอล (S2)

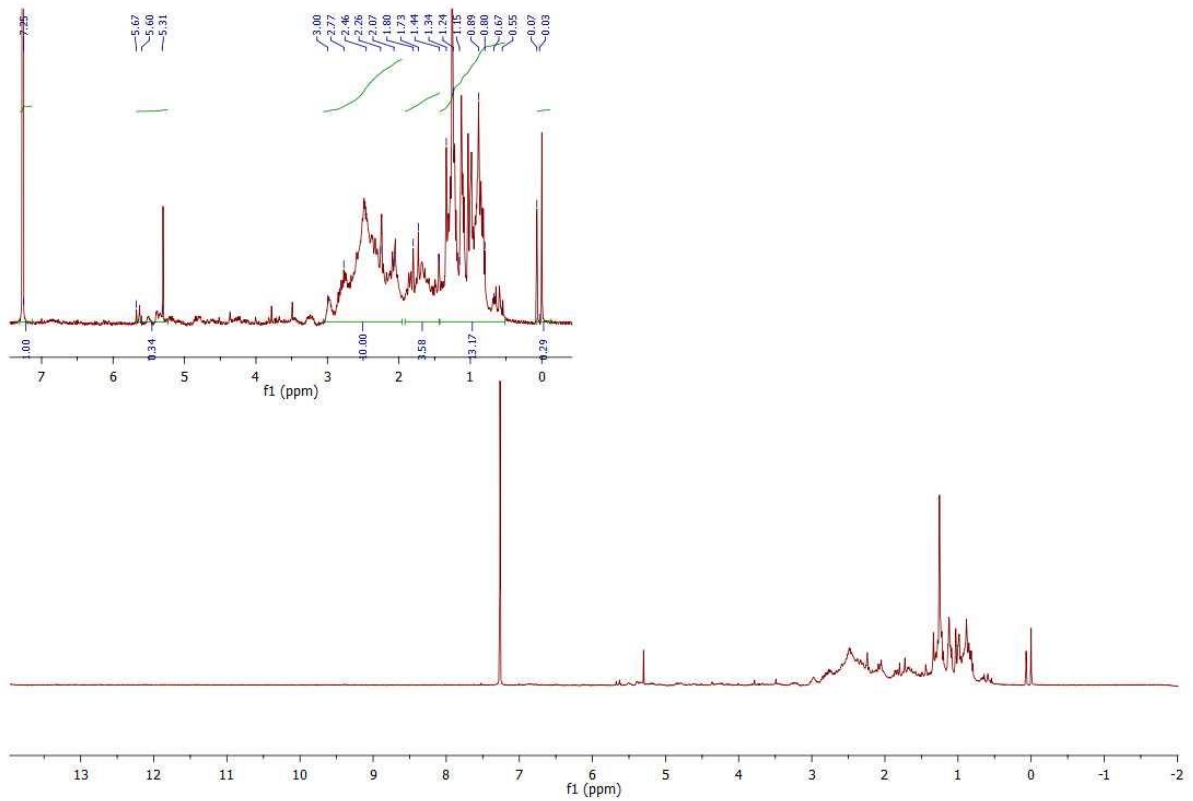


รูปที่ ๗10  $^1\text{H-NMR}$  ของสารสกัดแยกด้วยเฮกเซน (S1/H)

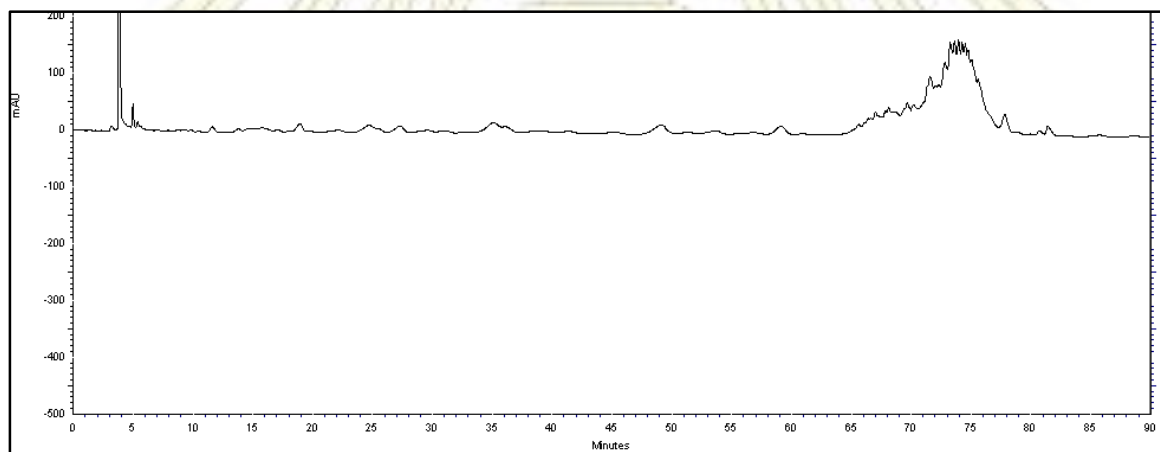


รูปที่ ๗11  $^1\text{H-NMR}$  ของสารสกัดแยกด้วยไดคลอโรมีเทน (S1/D)



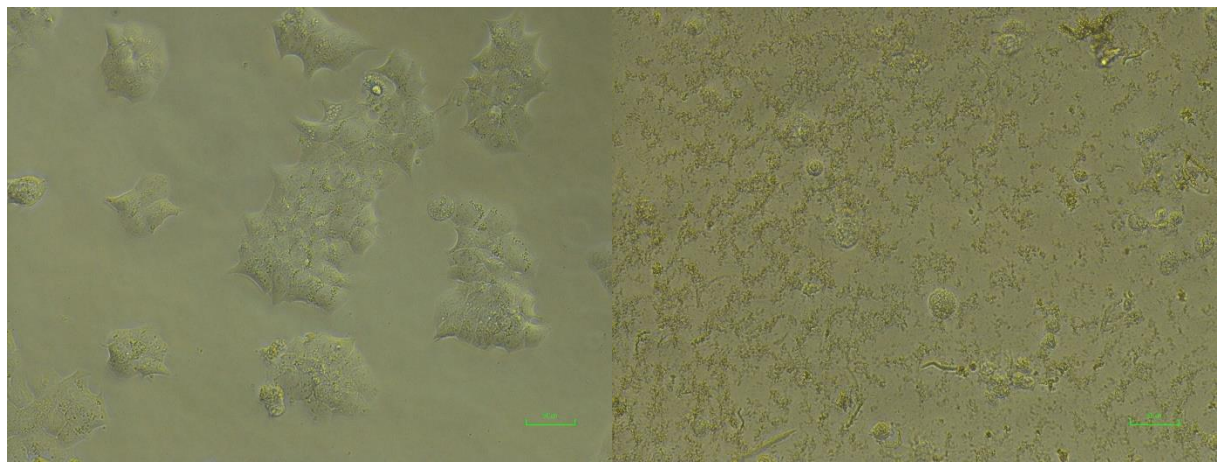


รูปที่ ผ12  $^1\text{H-NMR}$  ของสารสกัดแยกด้วยเมทานอล (S1/M)



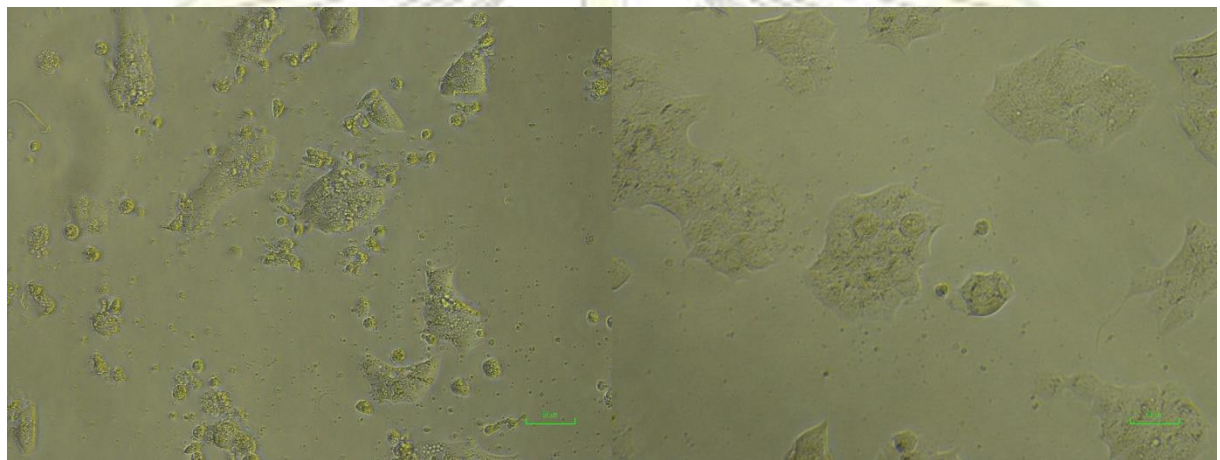
รูปที่ ผ13 โครมาโทแกรมจากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC ของสารสกัดแยกด้วยไดคลอโรมีเทน (S1/D)





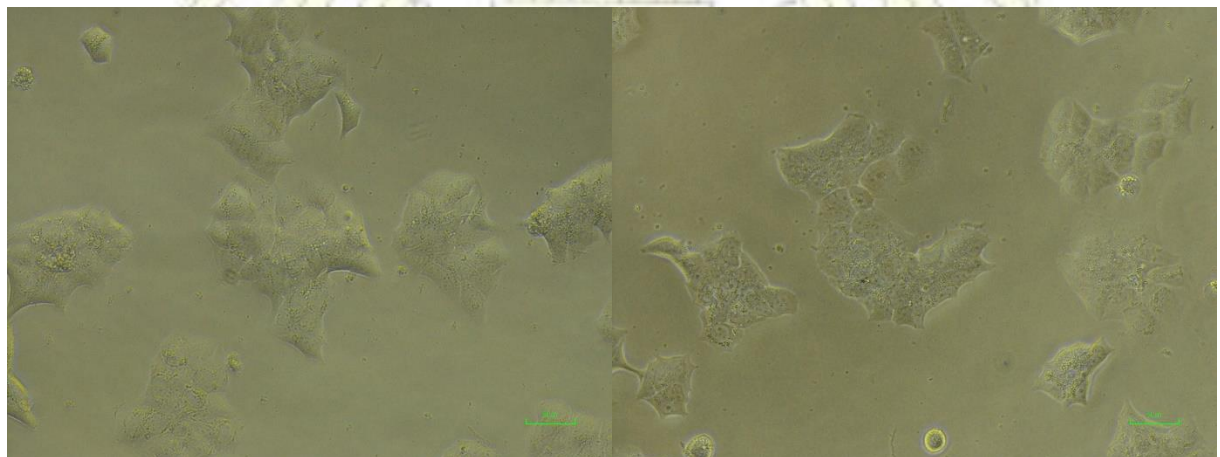
Control DMSO

ความเข้มข้น 200 µg/mL



ความเข้มข้น 20 µg/mL

ความเข้มข้น 2 µg/mL

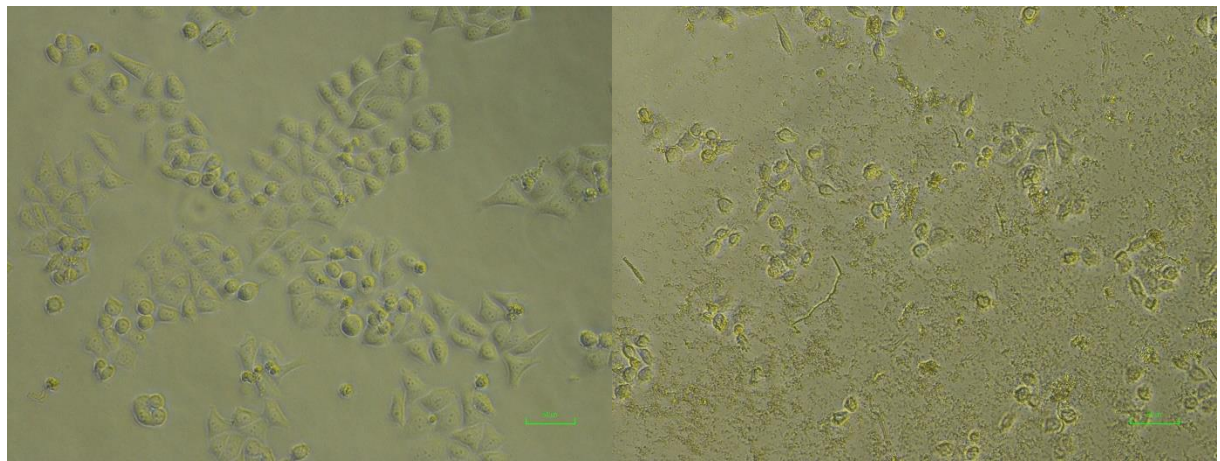


ความเข้มข้น 0.2 µg/mL

ความเข้มข้น 0.02 µg/mL

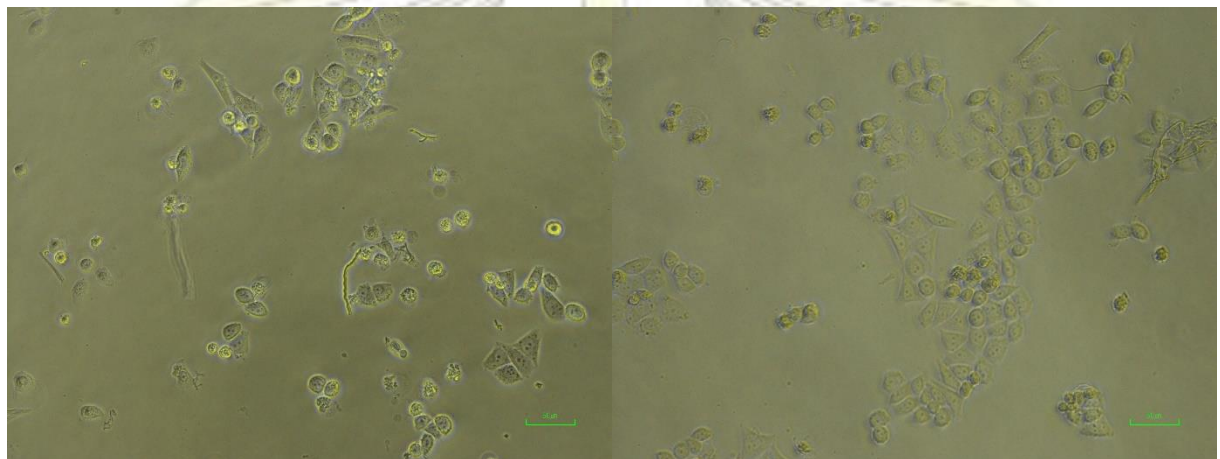
รูปที่ ๑๑ สารสกัดด้วยเอทานอลโดยใช้ชอกเลต (S1) มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเต้านม (BT474)





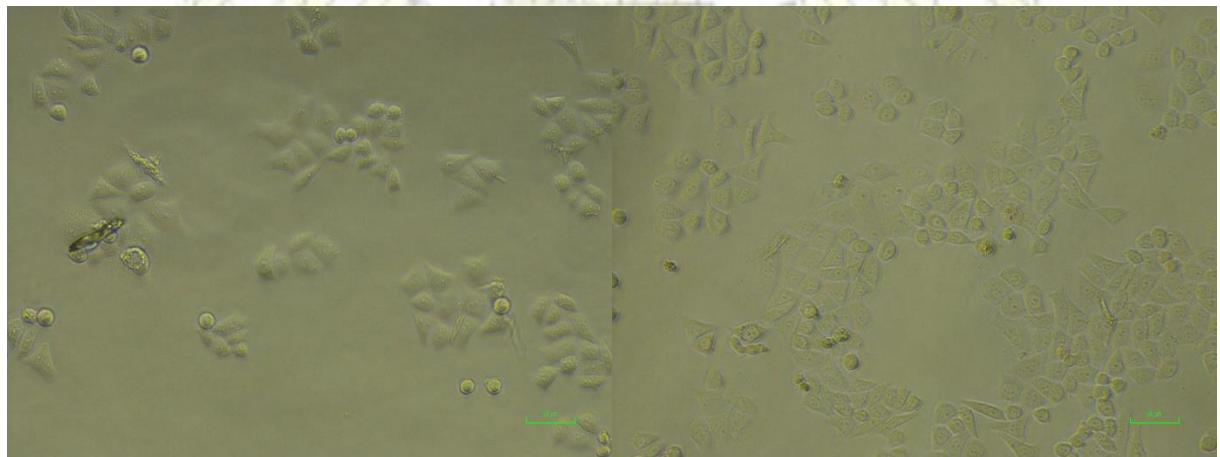
Control DMSO

ความเข้มข้น 200 µg/mL



ความเข้มข้น 20 µg/mL

ความเข้มข้น 2 µg/mL

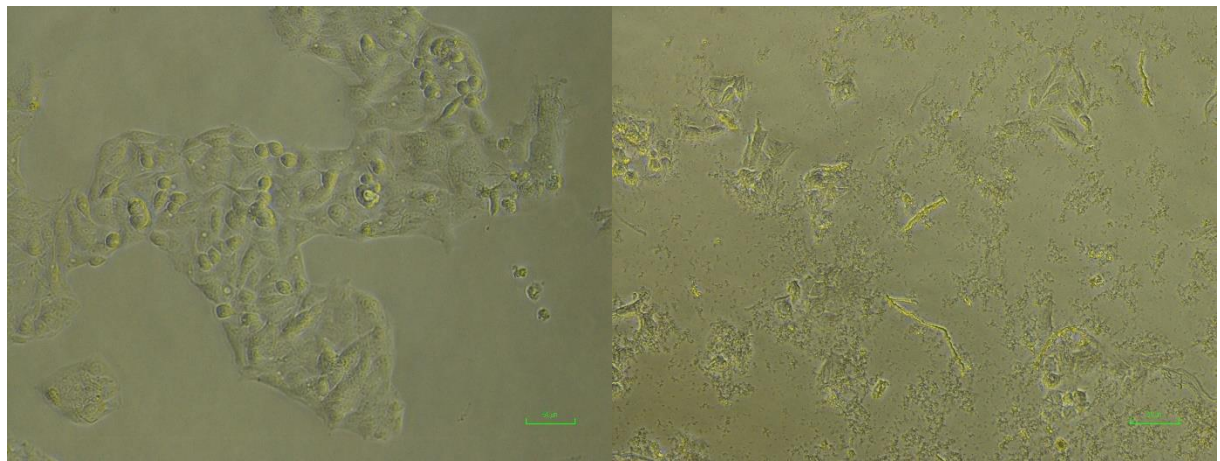


ความเข้มข้น 0.2 µg/mL

ความเข้มข้น 0.02 µg/mL

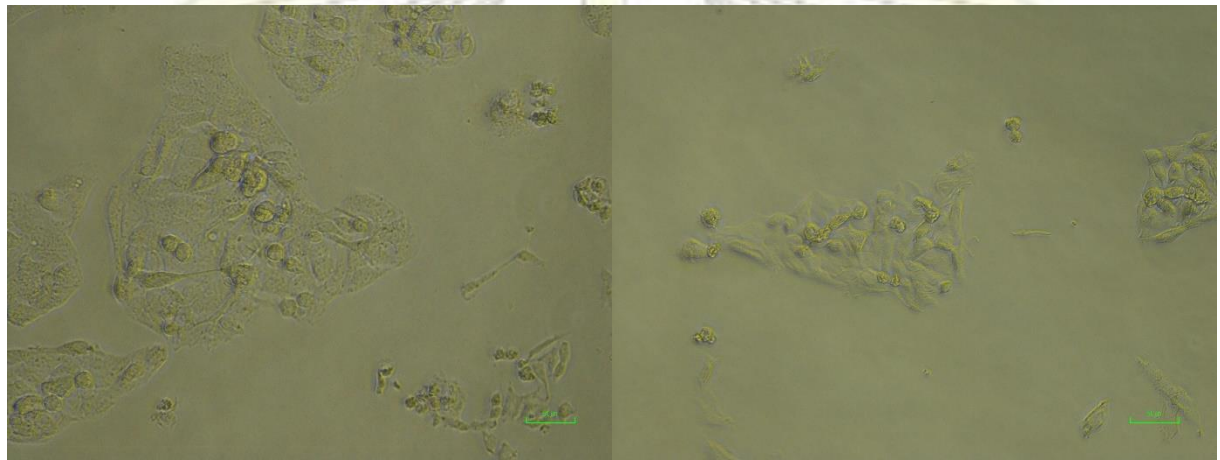
รูปที่ ๑๕ สารสกัดด้วยเอทานอลโดยใช้ชอกเลต (S1) มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งปอด (Chago-K1)





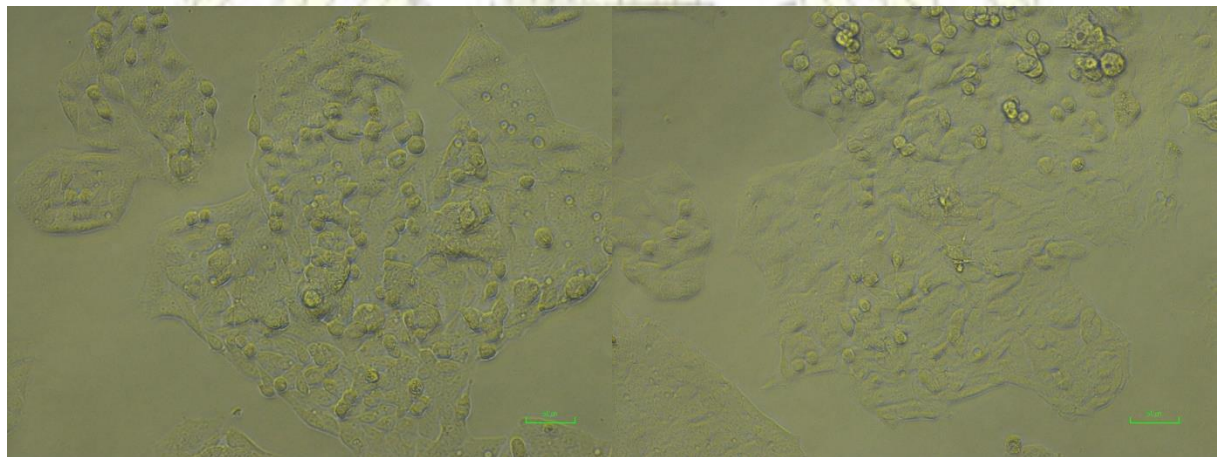
Control DMSO

ความเข้มข้น 200 µg/mL



ความเข้มข้น 20 µg/mL

ความเข้มข้น 2 µg/mL

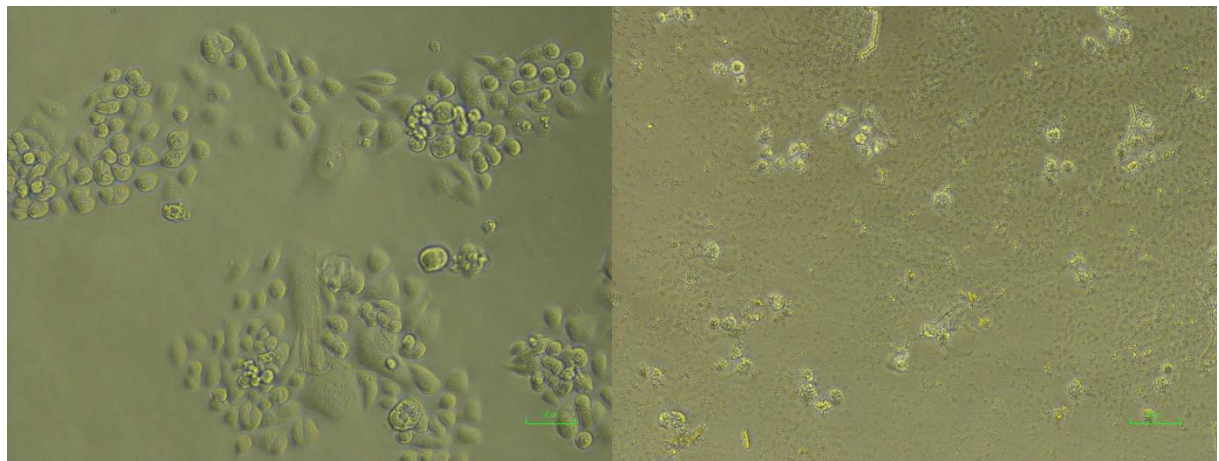


ความเข้มข้น 0.2 µg/mL

ความเข้มข้น 0.02 µg/mL

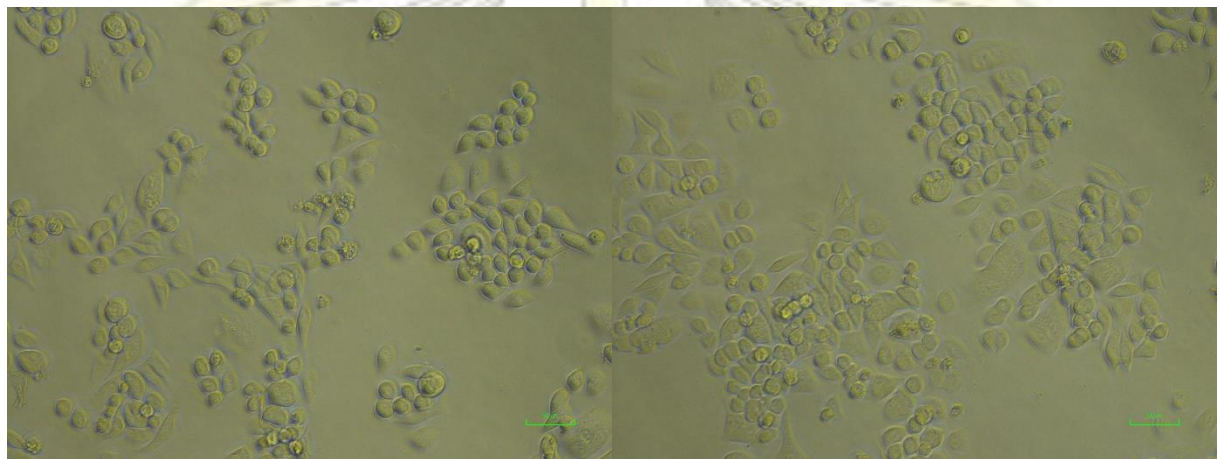
รูปที่ ๑๖ สารสกัดด้วยเอทานอลโดยใช้ชอกเลต (S1) มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งตับ (Hep-G2)





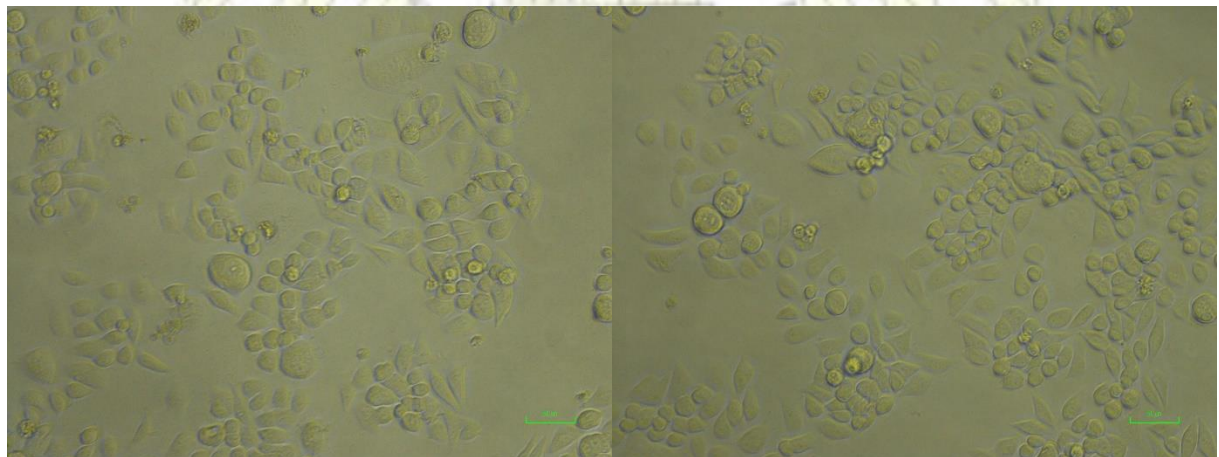
Control DMSO

ความเข้มข้น 200 µg/mL



ความเข้มข้น 20 µg/mL

ความเข้มข้น 2 µg/mL

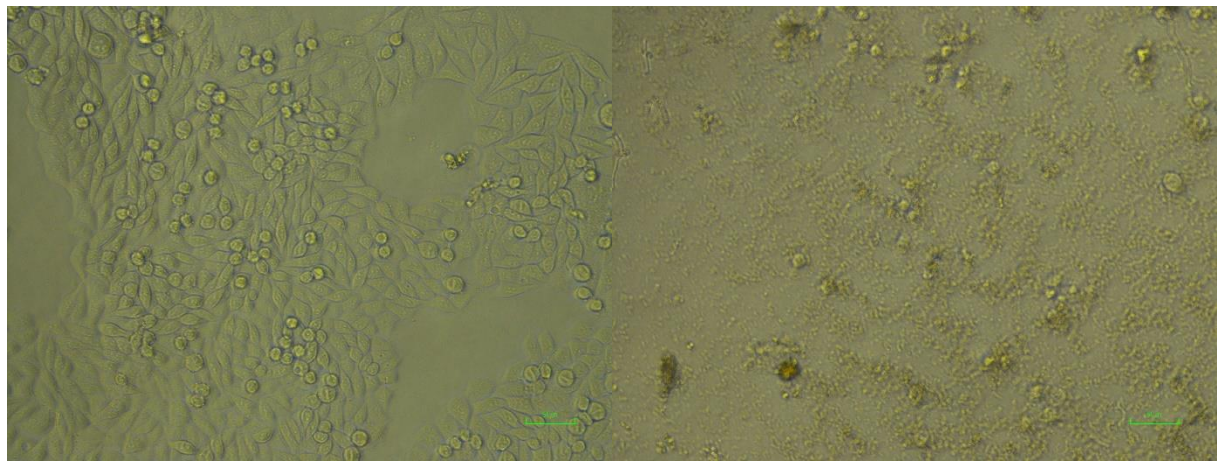


ความเข้มข้น 0.2 µg/mL

ความเข้มข้น 0.02 µg/mL

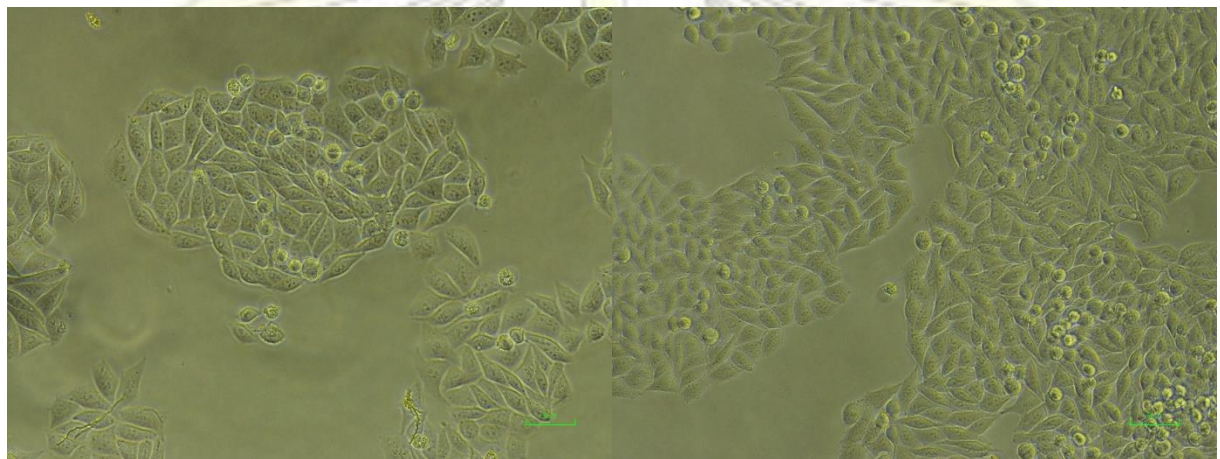
รูปที่ ๑๗ สารสกัดด้วยเอทานอลโดยใช้ชอกเลต (S1) มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งกระเพาะอาหาร (KATO-III)





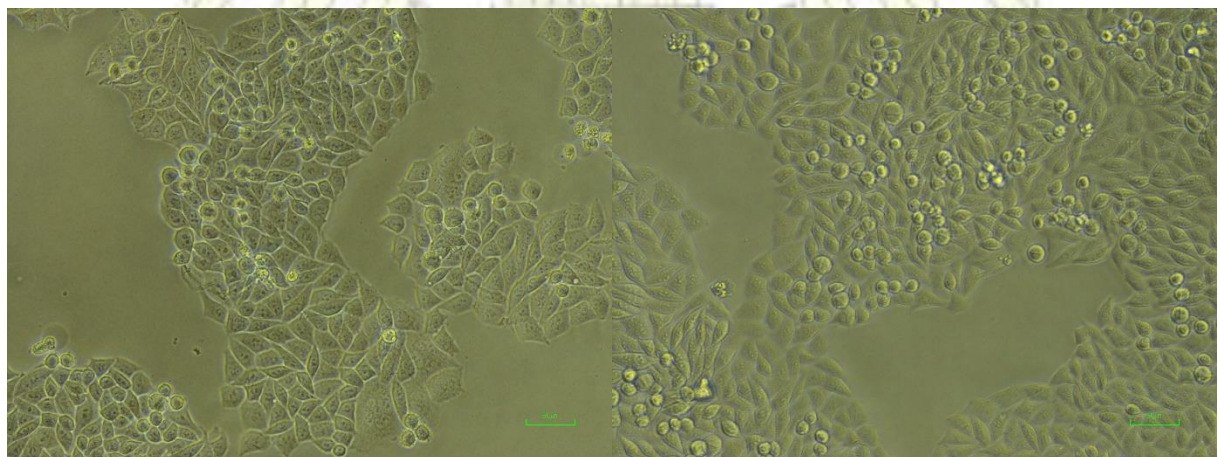
Control DMSO

ความเข้มข้น 200 µg/mL



ความเข้มข้น 20 µg/mL

ความเข้มข้น 2 µg/mL



ความเข้มข้น 0.2 µg/mL

ความเข้มข้น 0.02 µg/mL

รูปที่ ๑๘ สารสกัดด้วยเอทานอลโดยใช้ชอกเลต (S1) มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งลำไส้ (SW620)













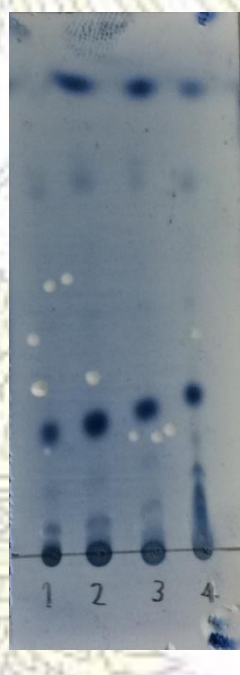
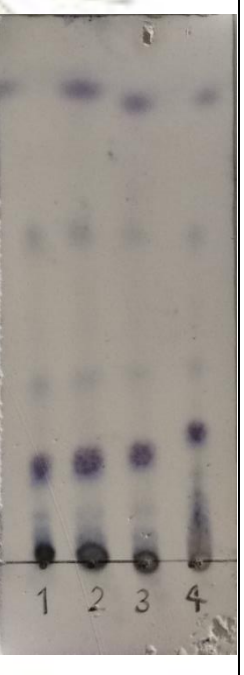
### ตารางที่ ผ3 แสดงการทำ TLC

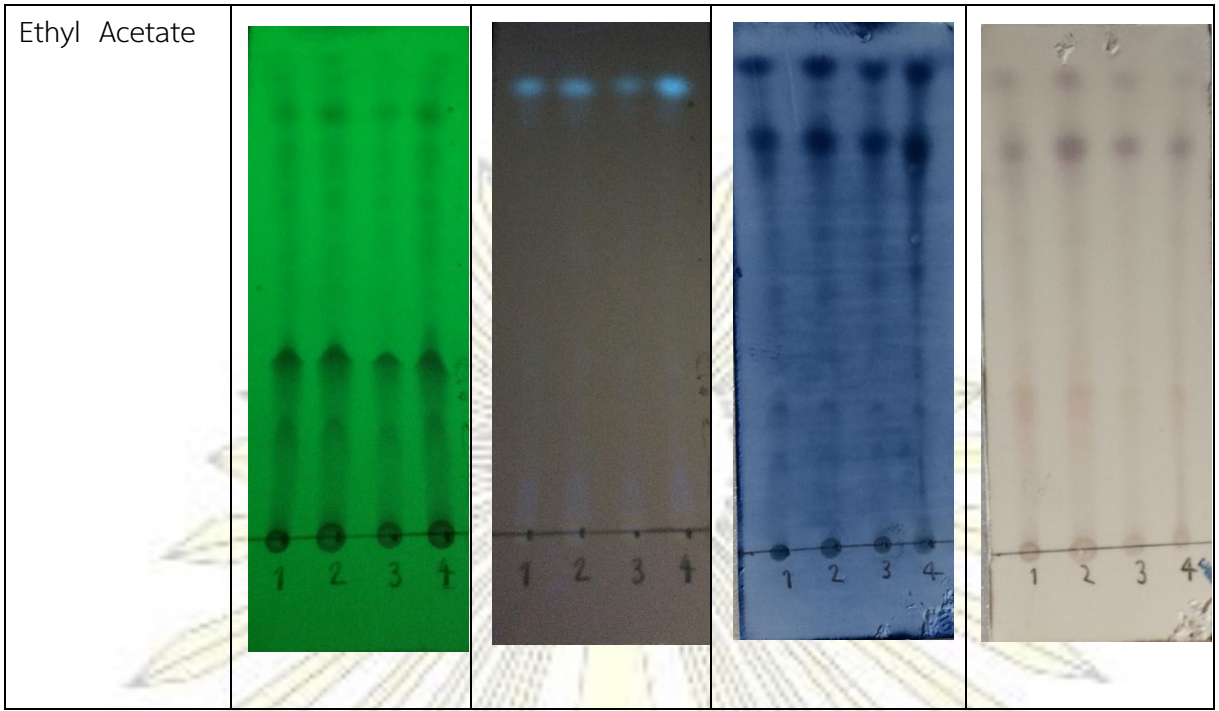
ตัวทำละลายที่ใช้ : Methanol

สารละลายตัวอย่าง :

- จุดที่ 1 : สารสกัดที่ได้จากการสกัดเห็ดหลินจือเขากวางด้วยวิธี solvent extraction ครั้งที่ 1
- จุดที่ 2 : สารสกัดที่ได้จากการสกัดเห็ดหลินจือเขากวางด้วยวิธี solvent extraction ครั้งที่ 2
- จุดที่ 3 : สารสกัดที่ได้จากการสกัดเห็ดหลินจือเขากวางด้วยวิธี solvent extraction ครั้งที่ 3
- จุดที่ 4 : สารสกัดที่ได้จากการสกัดเห็ดหลินจือเขากวางด้วยวิธี soxhlet

Mobile phase	254 nm	365 nm	Ceric Ammonium Molybdate	Vanillin
Methanol				

Acetone				
Dichloromethane				





## ประวัติผู้วิจัย

นางสาวนุสรุา ภูมิใจ เกิดเมื่อวันที่ 3 เดือนกันยายน พ.ศ. 2537 ที่จังหวัดกรุงเทพมหานคร สำเร็จการศึกษาชั้นมัธยมศึกษาตอนปลายจากโรงเรียนกาญจนาภิเษกวิทยาลัย นครปฐม (พระตำหนักสวนกุหลาบมัธยม) จังหวัดนครปฐม เมื่อ พ.ศ. 2557 เข้าศึกษาต่อในหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อปีการศึกษา 2560 ได้รับทุนอุดหนุนการศึกษาจากคณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่อยู่ที่สามารถติดต่อได้ บ้านเลขที่ 60/161 ตำบล/แขวง กระจุกมลิ้ม อำเภอ/เขต สามพราน จังหวัด นครปฐม รหัสไปรษณีย์ 73220 อีเมล Nusara.poomjai@gmail.com

