

ผลิตภัณฑ์ผงถั่งเช่าหิมะบรรจุแคปซูล
Product of *Isaria tenuipes* capsules



โครงการพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ปีการศึกษา 2561

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Product of *Isaria tenuipes* capsules



A SPECIAL PROJECT SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF
THE REQUIREMENT FOR THE DEGREE OF BACHELOR OF SCIENCE
(BIOTECHNOLOGY)

DEPARTMENT OF BIOLOGY, FACULTY OF SCIENCE

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับภาควิชาชีววิทยาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ACADEMIC YEAR 2018

หัวข้อโครงการพิเศษ

ผลิตภัณฑ์ผงถึงเช่าหิมะบรรจุแคปซูล

Product of *Isaria tenuipes* capsules

ชื่อนักศึกษา

นายเกษมสันต์ โพธิ์มาก รหัสนักศึกษา 58050715

นางสาวเกสรดา มั่งทอง รหัสนักศึกษา 58050716

นางสาวญาดา วรโศคนันท์ รหัสนักศึกษา 58050741

นางสาวไพลิน อนุชิตไพลิน รหัสนักศึกษา 58050797

ปริญญา

วิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)

ภาควิชา

ชีววิทยา

ปีการศึกษา

2561

อาจารย์ที่ปรึกษา

รศ.อารี ฤทธิบูรณ์

คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.) อนุมัติให้
โครงการพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)
ประจำปีการศึกษา 2561

คณะกรรมการสอบ	ลายมือชื่อ
รศ.ดร.มารีสา จาตุพรพิพัฒน์ ประธานกรรมการ	
ดร.กานต์ วงศาริยะ กรรมการ	
รศ.อารี ฤทธิบูรณ์ กรรมการและอาจารย์ที่ปรึกษา	

ลิขสิทธิ์ของคณะวิทยาศาสตร์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับกรใช้ภายในเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงการพิเศษ	ผลิตภัณฑ์ผงถั่งเช่าหิมะบรรจุแคปซูล	
ชื่อนักศึกษา	นายเกษมสันต์ โพธิ์มาก	รหัสนักศึกษา 58050715
	นางสาวเกสรดา มั่งทอง	รหัสนักศึกษา 58050716
	นางสาวญาดา วรโณคานันท์	รหัสนักศึกษา 58050741
	นางสาวไพลิน อนุชิตไพลิน	รหัสนักศึกษา 58050797
ปริญญา	วิทยาศาสตร์บัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)	
ภาควิชา	ชีววิทยา	
คณะ	วิทยาศาสตร์	
มหาวิทยาลัย	สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.)	
ปีการศึกษา	2561	
อาจารย์ที่ปรึกษา	รศ.อารี ฤทธิบุญณ์	

บทคัดย่อ

ถั่งเช่าหิมะหรือ *Isaria tenuipes* เป็นเชื้อราในดักแด้ไหม (*Bombyx Linnacus*) ซึ่งถือว่าเป็นหนึ่งในอาหารบำรุงกำลังและสมุนไพรที่มีสารออกฤทธิ์ที่สำคัญทางชีวภาพของถั่งเช่าหิมะ ได้แก่ คอร์โดเซปิน กรดคอร์โดเซบิก อะดีโนซีน โปรตีน สเตอรอล พอลิแซ็กคาไรด์และเบต้ากลูแคน (บีต้า 1,3 และ บีต้า 1,6 ดี - กลูแคน) ที่มีประสิทธิภาพในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันในร่างกาย จุดประสงค์ของงานวิจัยนี้เพื่อทำการทดสอบความคงตัวของผลิตภัณฑ์ในสภาวะการเก็บรักษาและระยะต่างๆ ในช่วงเวลาที่ศึกษาคือ 0 1 2 และ 3 เดือน อุณหภูมิที่เก็บรักษาคือ อุณหภูมิ 4 25 และ 37 องศาเซลเซียส โดยการวางแผนการทดลองแบบแฟกทอเรียล พิจารณาผลการวิเคราะห์ด้วยวิธีการหาปริมาณสารสำคัญ อะดีโนซีน คอร์โดเซปิน พอลิแซ็กคาไรด์ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH คือ เดือน 1 อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เดือนที่ 1 อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เดือนที่ 3 อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เดือนที่ 2 อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เดือน 1 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ตามลำดับ ดังนั้นจึงควรศึกษาการเก็บรักษาสารสำคัญและกลไกการออกฤทธิ์ในการพัฒนาเป็นสารออกฤทธิ์ทางยาต่อไป

คำสำคัญ: ถั่งเช่าหิมะ คอร์โดเซปิน อะดีโนซีน พอลิแซ็กคาไรด์ ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ

Title	Product of <i>Isaria tenuipes</i> powder in capsules	
Students	Mr. Kasemsan Phomak	Student ID 58050715
	Miss Ketsara Mangthong	Student ID 58050716
	Miss Yada Woraphokanunt	Student ID 58050741
	Miss Phailin Anuchitphailin	Student ID 58050797
Degree	Bachelor of Science (Biotechnology)	
Department	Biology	
Faculty	Science	
University	King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang (KMITL)	
Academic Year	2018	
Advisor	Assoc. Prof. Aree Rittiboon	

Abstract

Isaria tenuipes is a fungus that grows on silk worm pupae (*Bombyx Linnacus*). It is considered to be one of nourishing herbs that has important biological active ingredients such as cordycepin, cordycepic acid, adenosine, protein, sterols, polysaccharides and β -Glucans (Beta 1,3 and beta 1,6D - Glucan). The polysaccharides and β -Glucans are effective at stimulating the immune system in the body. The purpose of this study was to test the stability of *Isaria tenuipes* in capsule form. The time periods studied were 0, 1, 2 and 3 months; the storage temperatures were 4, 25 and 37 degrees Celsius. The experimental design was a factorial design. The initial amount of adenosine at 10.61 mg/g went down after one month of storage at 25 degrees Celsius to 8.91 mg/g. The initial amount of cordycepin at 1.04 mg/g went down after one month of storage at 25 degrees Celsius to 1.039 mg/g. The antioxidant activity of the polysaccharides was determined as ABTS and DPPH equivalents. The initial ABTS equivalent antioxidant activity at 0.72 mg/ml went down after having been stored for two months at 25 degrees Celsius to 0.35mg/ml. The initial DPPH equivalent antioxidant activity at 0.60 mg/ml went down after having been stored for one months at 37 degrees Celsius to 0.44 mg/ml. The mechanism of deterioration needs to be further investigated.

Keywords: *Isaria tenuipes*, cordycepin, adenosine, polysaccharides, antioxidant activity

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

โครงการพิเศษนี้จัดทำขึ้นตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ สถาบันเทคโนโลยีเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ซึ่งสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี เนื่องจากความกรุณาและความร่วมมือของทุกๆ ท่าน ขอขอบพระคุณ รศ.อารี ฤทธิบุรณ์ อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการพิเศษที่ได้ให้คำปรึกษา คำแนะนำ พร้อมทั้งชี้แนะข้อบกพร่องและชี้แนะแนวทางการแก้ไขปัญหาแก่คณะผู้จัดทำ ขอขอบพระคุณ รศ.ดร.มาริสสา จาตุพรพิพัฒน์ ประธานกรรมการสอบโครงการพิเศษและ ดร.กานต์ วงศาริยะ กรรมการสอบโครงการพิเศษ ที่ได้ให้คำแนะนำและแก้ไขตรวจสอบข้อบกพร่องต่างๆ ของโครงการพิเศษฉบับนี้ให้มีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณอาจารย์ทุกท่านที่ได้อบรมสั่งสอนความรู้ต่างๆ ที่ทำให้โครงการพิเศษครั้งนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดีตลอดจนบุคลากรและเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการประจำภาควิชาชีววิทยาทุกท่าน ที่ให้ความอนุเคราะห์เครื่องมืออุปกรณ์วิทยาศาสตร์ ให้ความช่วยเหลือและอำนวยความสะดวกในการทำโครงการพิเศษในครั้งนี้ ซึ่งโครงการพิเศษฉบับนี้สำเร็จได้ด้วยดีด้วยความอนุเคราะห์จากผู้มีอุปการคุณทุกท่าน

ขอขอบพระคุณ บิดา-มารดา ที่ได้ได้รับการศึกษา ตลอดจนคอยเลี้ยงดูและอบรมสั่งสอนและเป็นกำลังใจ เป็นแรงผลักดันในการทำโครงการพิเศษให้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี รวมถึงเพื่อนๆ และบุคคลอื่นๆ ที่ไม่ได้กล่าวมา คณะผู้จัดทำขอขอบคุณเป็นอย่างสูงมา ณ โอกาสนี้

คณะผู้จัดทำหวังเป็นอย่างยิ่งว่าโครงการพิเศษฉบับนี้จะเป็นประโยชน์ต่อบุคคลที่สนใจไม่มากนักน้อย หากมีข้อผิดพลาดประการใดทางคณะผู้จัดทำต้องขออภัยมา ณ ที่นี้

เกษมสันต์	โพธิ์มาก
เกสร	มั่งทอง
ญาดา	วรโภาคานันท์
ไพลิน	อนุชิตไพลิน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	ข
กิตติกรรมประกาศ.....	ค
สารบัญ.....	ง
สารบัญตาราง.....	ช
สารบัญรูป.....	ฉ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญ.....	1
1.2 วัตถุประสงค์.....	2
1.3 ขอบเขต.....	2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	2
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	3
2.1 เชื้อรา.....	3
2.1.1 ลักษณะทั่วไป.....	3
2.1.2 ความสำคัญของเชื้อรา.....	3
2.2 ถังเช่า.....	3
2.2.1 ลักษณะทั่วไป.....	3
2.2.2 ส่วนประกอบของถังเช่า.....	4
2.2.3 ประโยชน์ในทางการแพทย์.....	4
2.2.4 ประเภทของถังเช่า.....	5
2.3 ถังเช่าหิมะ.....	5
2.3.1 อนุกรมวิธาน.....	6
2.3.2 ลักษณะทั่วไป.....	6
2.3.3 ลักษณะทางสัณฐานวิทยา.....	6
2.3.4 สรรพคุณและสารสำคัญ.....	6
2.3.4.1 พอลิแซ็กคาไรด์.....	6
2.3.4.2 คอร์โดเซปิน.....	7
2.3.4.3 อะดีโนซีน.....	8
2.3.5 การเพาะเลี้ยงถังเช่าหิมะ.....	8
2.4 แหล่งสารอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงถังเช่า.....	9
2.4.1 ข้าวพันธุไรซ์เบอร์รี่.....	9
2.4.2 สรรพคุณและประโยชน์ของข้าวไรซ์เบอร์รี่.....	9
2.4.3 ข้าวพันธุไรซ์เบอร์รี่.....	9
2.4.4 สรรพคุณและประโยชน์ของข้าวไรซ์เบอร์รี่.....	9
2.5 แคปซูลบรรจุ.....	9

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์ การขอยืมเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้拿去เป็นเชิงพาณิชย์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น ผู้พิมพ์พิมพ์เห็นแต่ต้นแบบสิ่งเนื้อหาและตั้งอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.5.1 ความคงตัวของยาบรรจุแคปซูล.....	9
2.5.2 ปัจจัยที่มีผลต่อความคงตัวของเภสัชภัณฑ์.....	10
2.5.3 แนวทางการทดสอบความคงตัวของเภสัชภัณฑ์.....	10
2.5.4 ความไม่คงตัวทางกายภาพของเภสัชภัณฑ์และการป้องกันผลกระทบที่เกิดขึ้น	10
2.6 การวิเคราะห์สารสำคัญในถังเช่า.....	10
2.6.1 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH).....	10
2.6.2 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี 3-ethylbenzthiazoline-6- sulphonicacid (ABTS).....	11
2.6.3 การวิเคราะห์ปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ด้วยวิธีแอนโทรน.....	12
2.7 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	13
บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีการทดลอง.....	15
3.1 วัสดุและอุปกรณ์.....	15
3.1.1 เชื้อ.....	15
3.1.2 สารเคมี.....	15
3.1.3 อุปกรณ์เครื่องมือ.....	15
3.2 ขั้นตอนในการดำเนินงาน.....	16
3.2.1 การเตรียมหัวเชื้อเริ่มต้น.....	16
3.2.2 การเตรียมหัวเชื้อในอาหารแข็ง PDA เสริม.....	16
3.2.3 การเตรียมหัวเชื้อในอาหารเหลว PDB เสริม.....	16
3.2.4 การเตรียมหัวเชื้อในอาหารแข็งในข้าวไรซ์เบอร์รี่.....	16
3.2.5 การเก็บเกี่ยว.....	17
3.3 การศึกษาอุณหภูมิและเวลาการเก็บรักษา โดยทำการแปรผันปัจจัย.....	17
3.4 การวิเคราะห์ผลการศึกษาศาสตร์สำคัญในถังเช่าหิมะ.....	17
3.4.1 การวิเคราะห์ปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากฟรุตติ่งบอดี้ถังเช่าหิมะ..	17
3.4.2 การวิเคราะห์ปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ด้วยวิธีแอนโทรน.....	17
3.4.3 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี 3-ethylbenzthiazoline-6- sulphonicacid (ABTS).....	17
3.4.4 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH).....	18
3.5 การวิเคราะห์ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ.....	18
บทที่ 4 ผลการทดลองและวิจารณ์.....	19
4.1 ผลการศึกษาการเพาะเลี้ยงถังเช่าหิมะ.....	19
4.2 ผลการศึกษาการวิเคราะห์สารสำคัญในถังเช่าหิมะ.....	21
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ.....	25

5.1 สรุปผลการวิจัย.....	25
5.2 ข้อเสนอแนะ.....	25
เอกสารอ้างอิง.....	26
ภาคผนวก.....	34
ภาคผนวก ก อาหารเลี้ยงเชื้อ.....	35
ภาคผนวก ข การเตรียมสารและการวิเคราะห์.....	37
ภาคผนวก ค ข้อมูลผลการทดลองและการคำนวณทางสถิติ.....	42



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
4.1 ปริมาณสารสารอะดีโนซีนของถั่งเช่าหิมะ เมื่อทำการทดสอบด้วยเครื่อง HPLC โดยระยะเวลาการเก็บรักษาและอุณหภูมิที่แตกต่างกัน.....	22
4.2 ปริมาณสารคอร์ไดเซปินของถั่งเช่าหิมะ เมื่อทำการทดสอบด้วยด้วยเครื่อง HPLC โดยระยะเวลาการเก็บรักษาและอุณหภูมิที่แตกต่างกัน.....	22
4.3 ปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ เมื่อทำการทดสอบด้วยวิธีแอนโทรน โดยระยะเวลาการเก็บรักษาและอุณหภูมิที่แตกต่างกัน.....	23
4.4 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS ของผลิตภัณฑ์ผงถั่งเช่าหิมะบรรจุแคปซูล โดยระยะเวลาการเก็บรักษาและอุณหภูมิที่แตกต่างกัน.....	24
4.5 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH ของผลิตภัณฑ์ผงถั่งเช่าหิมะบรรจุแคปซูล โดยระยะเวลาการเก็บรักษาและอุณหภูมิที่แตกต่างกัน.....	24
1ก องค์ประกอบของสูตรอาหาร Potato dextrose agar (PDA) เสริม (กรัม/ลิตร).....	34
2ก องค์ประกอบของสูตรอาหารเหลว Potato dextrose broth (PDB) เสริม (กรัม/ลิตร).....	34
3ก องค์ประกอบของสูตรอาหารเหลว Potato dextrose broth (PDB) เสริม สำหรับใส่ในข้าวไรซ์เบอร์รี่(กรัม/ลิตร).....	35
1ข การเจือจางสารละลายกลูโคสมาตรฐานด้วยน้ำกลั่นให้ได้ความเข้มข้น 0-100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากสารละลายเริ่มต้น ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร.....	36
1ค ปริมาณสารสำคัญของสารพอลิแซ็กคาไรด์ ที่เวลา เริ่มต้น, 1, 2, และ 3 เดือน อุณหภูมิ เริ่มต้น, 4, 25 และ 37 องศาเซลเซียส โดยใช้วิธีแอนโทรน.....	41
2ค ปริมาณสารสำคัญของสารอะดีโนซีน ที่เวลา เริ่มต้น, 1, 2, และ 3 เดือน อุณหภูมิ เริ่มต้น, 4, 25 และ 37 องศาเซลเซียส โดยใช้วิธีการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC.....	41
3ค ปริมาณสารสำคัญของสารคอร์ไดเซปิน ที่เวลา เริ่มต้น, 1, 2, และ 3 เดือน อุณหภูมิ เริ่มต้น, 4, 25 และ 37 องศาเซลเซียส โดยใช้วิธีการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC.....	42
4ค ปริมาณสารสำคัญในการออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ที่เวลา เริ่มต้น, 1, 2, และ 3 เดือน อุณหภูมิ เริ่มต้น, 4, 25 และ 37 องศาเซลเซียส.....	42
5ค ปริมาณสารสำคัญในการออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ABTS ที่เวลา เริ่มต้น, 1, 2, และ 3 เดือน อุณหภูมิ เริ่มต้น, 4, 25 และ 37 องศาเซลเซียส.....	42
6ค แสดงการวิเคราะห์ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) ของค่าเฉลี่ยปริมาณสารสำคัญของสารพอลิแซ็กคาไรด์ที่เวลาเริ่มต้น 1, 2, และ 3 เดือน อุณหภูมิเริ่มต้น 4, 25 และ 37 องศาเซลเซียส โดยใช้วิธีแอนโทรน.....	43
7ค ปริมาณสารสำคัญในการออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ABTS ที่เวลา เริ่มต้น, 1, 2, และ 3 เดือน อุณหภูมิ เริ่มต้น, 4, 25 และ 37 องศาเซลเซียส.....	44
8ค แสดงการวิเคราะห์ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) ของค่าเฉลี่ยปริมาณสารสำคัญในการออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ABTS ที่เวลา เริ่มต้น, 1, 2, และ 3 เดือนอุณหภูมิ	

ไม่ว่ากรรมใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เริ่มต้น 4, 25 และ 37 องศาเซลเซียส..... 44

9ค ปริมาณสารสำคัญในการออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ที่เวลา เริ่มต้น, 1, 2, และ 3 เดือน อุณหภูมิ เริ่มต้น, 4, 25 และ 37 องศาเซลเซียส..... 45

10ค แสดงการวิเคราะห์ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) ของค่าเฉลี่ยปริมาณสารสำคัญในการออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ที่เวลา เริ่มต้น, 1, 2, และ 3 เดือน อุณหภูมิ เริ่มต้น, 4, 25 และ 37 องศาเซลเซียส..... 45



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
2.1 โครงสร้างทางเคมีของคอร์โคเซปิน.....	7
2.2 โครงสร้างทางเคมีของอะดีโนซีน.....	8
2.3 โครงสร้างของ 2,2'-Azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6- sulfonic acid) diammonium salt.....	12
4.1 ลักษณะเส้นใยถั่วงาหิมะที่เจริญบนอาหารแข็ง PDA.....	19
4.2 ลักษณะเส้นใยถั่วงาหิมะที่เจริญในอาหารเหลว PDB เสริม.....	19
4.3 ลักษณะของถั่วงาหิมะบนอาหารเลี้ยงเชื้อสภาวะแข็งที่มีข้าวไรซ์เบอร์รี่เป็นแหล่งคาร์บอนและเสริมด้วยอาหารเหลว PDB เสริมเป็นระยะเวลา 30 วัน.....	20
4.4 ลักษณะความยาวของถั่วงาหิมะ เป็นระยะเวลา 30 วัน.....	20
4.5 ลักษณะของถั่วงาหิมะที่ผ่านการอบแห้งแบบสุญญากาศ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 ชั่วโมง.....	20
4.6 เครื่องอัดแคปซูลยาแบบไม้ ขนาด 100 แคปซูล เบอร์ 0.....	21
4.7 ลักษณะของผงถั่วงาที่ผ่านการบดและบรรจุอยู่ในแคปซูลที่ทำจากสำปะหลัง.....	21
1ข กราฟมาตรฐานของสารละลายกลูโคสที่ความเข้มข้น 20, 40, 60, 80 และ 100 มิลลิกรัมต่อ มิลลิลิตร ที่ค่าการดูดกลืนแสง 620 นาโนเมตร.....	37
2ข กราฟมาตรฐานของสารอะดีโนซีนที่ความเข้มข้น 20, 40, 60, 80 และ 100 ไมโครกรัมต่อ มิลลิลิตร ที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร.....	38
3ข กราฟมาตรฐานของสารคอโคเซปินที่ความเข้มข้น 20, 40, 60, 80 และ 100 ไมโครกรัมต่อ มิลลิลิตร ที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร.....	38

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญ

ถั่งเช่าหิมะหรือ *Isaria tenuipes* (ชื่อเดิม *Paecilomyces tenuipes*) เป็นเชื้อราในดักแด้ไหม (*Bombyx Linnacus*) เช่นเดียวกับ *Cordyceps* ในประเทศจีนถือว่าเป็นหนึ่งในอาหารบำรุงกำลัง และสมุนไพรที่มีค่าที่สุดในประเทศจีนและในประเทศเพื่อนบ้าน ราเหล่านี้ได้รับสารอาหารและเจริญขึ้นภายในตัวแมลงในฤดูใบไม้ร่วงและส่วนฟรุติติงบอดี้ของเชื้อราจะยื่นออกมาจากลำตัวของหนอนในฤดูร้อน (Halpern, 1999) ตามการแพทย์แผนจีน เชื้อราเหล่านี้ได้มีการนำมาใช้เป็นยาสำหรับโรคมะเร็งปากมดลูก มะเร็งเต้านม มะเร็งเม็ดเลือดขาว (Jian และคณะ, 2007) วัณโรค โรคหอบหืด โรคภูมิแพ้ และความผิดปกติของต่อมไร้ท่อ (Jones, 1997; Zhu และคณะ, 1998a; Zhu และคณะ, 1998b) แม้จะมีการใช้ในการรักษาอย่างกว้างขวาง แต่ก็เป็นที่รู้จักกันเพียงเล็กน้อยเกี่ยวกับสารประกอบที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพจาก *P. tenuipes* เนื่องจากหาได้ยาก แต่ขณะนี้สามารถใช้ได้ในปริมาณมากเนื่องจากความสำเร็จของการเพาะเลี้ยงขึ้นเอง (Han และคณะ, 2004)

สารสำคัญที่มีผลทางชีวภาพ ได้แก่ คอร์โคไดเซปินและกรดคอร์โคไดเซปิก ซึ่งช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการทำงานของร่างกาย อะดีโนซีน โพรตีน สเตอรอล พอลิแซ็กคาไรด์ชนิดเบต้ากลูแคน (ปีต้า 1,3 และ ปีต้า 1,6 ดี – กลูแคน) ที่มีฤทธิ์ในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันโรคในร่างกาย ลดน้ำตาลในเลือดและยังเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ ที่ช่วยชะลอความเสื่อมของเซลล์ต่างๆ (Lin และคณะ, 2012) ได้อย่างมีประสิทธิภาพสารแลนตีแนน ที่ช่วยกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน (Lee และคณะ, 2011) ชะลอการแพร่ของเซลล์มะเร็ง (Bhandari และคณะ, 2010) มีนิวคลีโอไซด์ มากกว่า 10 ชนิดที่เกี่ยวข้องกับกลไกการทำงานของระบบประสาทส่วนกลาง จึงทำให้มีการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับการนำถั่งเช่าหิมะไปใช้ประโยชน์ในรูปแบบต่างๆ เช่น ผลิตภัณฑ์เสริมอาหารในรูปแบบแคปซูล (ธัญญา และคณะ, 2016)

ข้อดีของการบรรจุถั่งเช่าหิมะลงในแคปซูล คือยาแคปซูลเป็นรูปแบบยาที่มีตัวยาคือของแข็งหรือของเหลวบรรจุอยู่ภายในเปลือกหุ้มที่ลื่นทำให้ง่ายต่อการกลืน โดยทั่วไปมี 2 ประเภท คือ แคปซูลชนิดเปลือกแข็ง (Hard Gelatin Capsules) และแคปซูลชนิดเปลือกนิ่ม (Soft Gelatin Capsules) โดยสาเหตุที่ต้องนำมาใส่แคปซูล เพื่อกลบรสชาติหรือกลิ่นของยาที่แรง เพื่อให้มีการปลดปล่อยตัวยาที่ละน้อยแบบต่อเนื่องยาวนาน นอกจากนี้ยาบางชนิดถูกทำลายได้ง่ายจากกรดในกระเพาะอาหาร จึงมีการเคลือบสารบางอย่างเพื่อป้องกันยาถูกทำลาย หรือมีการเคลือบบนเม็ดยาแล้วบรรจุในแคปซูลหรือเคลือบบนเปลือกแคปซูลเลยก็ได้เช่นกัน (ปริญาและจุฬาภา, 2016)

การเก็บรักษายาแคปซูลเพื่อไม่ให้สูญเสียประสิทธิภาพในการออกฤทธิ์ ควรต้องคำนึงถึงความคงตัวของผลิตภัณฑ์ยา เริ่มตั้งแต่ขบวนการผลิตจนถึงสภาวะเก็บรักษา ความคงตัวของตัวยาสำคัญ ความคงสภาพทางจุลชีววิทยา ความคงสภาพทางพิษวิทยา ความคงสภาพทางการรักษา และคุณสมบัติทางเภสัชกรรมอื่นด้วย เช่น สีของเม็ดยา ความแข็งของเม็ดยา การละลายของยา ดังนั้นการตรวจสอบความคงตัวของยาจึงต้องตรวจสอบคุณสมบัติอื่นๆ ของยาอีกด้วย เช่น เวลาในการเก็บรักษา และอุณหภูมิที่ใช้ในการเก็บรักษา (ชนินดา, 2015)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่จัดทำขึ้นเพื่อใช้ในการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการพิเศษ

1. เพื่อผลิตผลิตภัณฑ์ผงถั่งเช่าหิมะบรรจุแคปซูล
2. เพื่อวิเคราะห์ปริมาณสารอะดีโนซีน คอร์โดเซปิน พอลิแซ็กคาไรด์ และฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของถั่งเช่าหิมะ
3. เพื่อทดสอบความคงตัวและการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์

1.3 ขอบเขต

1. ผลิตผงถั่งเช่าหิมะบรรจุแคปซูล โดยนำฟรุตติ้งบอดีที่แห้งที่ผ่านการทำแห้งแล้วมาบดละเอียดและบรรจุลงในแคปซูล
2. วิเคราะห์ปริมาณสารอะดีโนซีนและคอร์โดเซปินซึ่งเป็นสารสำคัญในถั่งเช่าหิมะ
3. วิเคราะห์ปริมาณสารพอลิแซ็กคาไรด์ ในถั่งเช่าหิมะ โดยใช้การวิเคราะห์ด้วยวิธีแอนโทรน
4. ทดสอบฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระของถั่งเช่าหิมะโดยใช้วิธี 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) และ วิธี 3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid (ABTS)
5. ทดสอบความคงตัวและการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ในสภาวะต่างๆ

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. เพื่อผลิตผลิตภัณฑ์ผงถั่งเช่าหิมะบรรจุแคปซูล ให้เป็นผลิตภัณฑ์เสริมอาหารเพื่อสุขภาพ
2. สามารถนำสารสำคัญและฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระของถั่งเช่าหิมะไปประยุกต์ใช้กับผลิตภัณฑ์อื่นๆ ในอุตสาหกรรมยา เครื่องสำอาง และเทคโนโลยีอาหาร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2

ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ในทางการเกษตรเห็ดจัดเป็นอาหารประเภทผักชนิดหนึ่ง แต่ในทางวิทยาศาสตร์นั้น เห็ดจัดเป็นราชนิดหนึ่ง เห็ดมีคุณค่าทางโภชนาการค่อนข้างสูง เนื่องจากมีโปรตีนจากใยอาหารสูง ปราศจากไขมัน ปริมาณน้ำตาลและเกลือค่อนข้างต่ำ รวมทั้งยังอุดมไปด้วยวิตามินหลายชนิด รวมทั้งวิตามินบีรวม และสารไนอาซิน ซึ่งช่วยควบคุมระบบย่อยอาหาร นอกจากนี้ยังมีโหนดชนิดในเห็ดทำหน้าที่ช่วยกระตุ้นประสาทการรับรู้รสอาหารของลิ้นให้ไวกว่าปกติ ดังนั้นเห็ดจึงจัดเป็นอาหารเพื่อสุขภาพของมนุษย์มีคุณสมบัติเป็นยาป้องกันและรักษาโรค นอกจากนี้เห็ดบางชนิดยังสามารถนำมาเป็นส่วนประกอบในเครื่องสำอางเพื่อความงามด้วยตัวอย่างประโยชน์ของเห็ดทางการแพทย์

2.1 เชื้อรา

2.1.1 ลักษณะทั่วไป

จุลินทรีย์ที่มีนิวเคลียสแบบยูคาริโอต ไม่มีรงควัตถุในการสังเคราะห์แสง เซลล์มีทั้งชนิดเส้นใย และเซลล์เดี่ยว ส่วนใหญ่มีการสร้างหน่วยสืบพันธุ์ที่มีลักษณะเป็นผงเล็กๆ ที่เรียกว่า “สปอร์ (spore)” ซึ่งเป็นผลมาจากการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศและ/หรือแบบไม่อาศัยเพศ สำหรับการกินอาหาร จะใช้วิธีส่งน้ำย่อยไปย่อยสารอาหารนอกเซลล์แล้วดูดกลับคืน ซึ่งเป็นลักษณะสำคัญประการหนึ่งในการแยกเชื้อราไว้เป็นอีกอาณาจักรหนึ่ง คือ “อาณาจักรฟังไจ (Kingdom of Fungi)” (ธัญญา, 2555)

2.1.2 ความสำคัญของเชื้อรา

เชื้อรากับมนุษย์นั้นนับว่ามีความเกี่ยวพันกันอย่างมาก ในบางครั้งก่อให้เกิดเหตุการณ์บันทึกในประวัติศาสตร์ที่สำคัญอย่างมาก เช่น เกิดการขาดแคลนอาหารอย่างหนักในประเทศไอร์แลนด์ราวปี ค.ศ.1845 อันเนื่องมาจากการระบาดของอย่างรุนแรงของเชื้อราที่ทำให้เกิดโรคไหม้กับมันฝรั่ง (potato blight) อย่างไรก็ตาม มนุษย์ก็ได้นำเชื้อรามาใช้ประโยชน์มานานนับศตวรรษเช่นกัน เช่น นำมาใช้เป็นอาหาร ผลิตภัณฑ์ สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ เป็นต้น (ธัญญา, 2555)

2.2 ถังเช่า

2.2.1 ลักษณะทั่วไป

ถังเช่าจัดเป็นเห็ดทางการแพทย์ที่มีระบบการเจริญเติบโตที่แตกต่างจากเห็ดชนิดอื่นๆ เนื่องจากเห็ดชนิดนี้จะต้องอาศัยตัวอ่อนของแมลงในการเจริญเติบโต ซึ่งตามธรรมชาติจะพบว่าเห็ดชนิดนี้จะเจริญเติบโตจากตัวอ่อนของผีเสื้อกลางคืนที่อยู่บนเทือกเขาหิมาลัย ซึ่งมีความสูงประมาณ 4,200-4,600 เมตรเหนือจากระดับน้ำทะเล จึงนับว่าหายากมากพอสมควร และด้วยที่มีมันดูดแร่ธาตุจากหนอนมาทำให้มีชื่อเรียกอีกอย่างว่า “หญ้าหนอน”

ซึ่งถังเช่านี้เป็นสิ่งมีชีวิตจำพวกราที่เส้นใยมารวมตัวกันเกิดเป็นโครงสร้างขนาดใหญ่ เรียกว่า “ฟรุตติงบอดี้” มองเห็นได้ด้วยตาเปล่า โดยราที่ไปเจริญเติบโตในแมลง อาศัยอยู่ร่วมกับแมลง การค้าไม่ว่าหรืออาจทำให้แมลงตายโดยสร้างเส้นใยและโครงสร้างสืบพันธุ์ไหลออกมาภายนอกและแพร่พันธุ์ไปใช้

อาศัยในแมลงตัวใหม่ (นุกูล, 2551) ในขณะที่เจริญเติบโตในแมลงนั้นจะอยู่ในรูปเซลล์ยีสต์ เรียกว่า Yeast-Lik Symbionts (YLS) และสามารถเปลี่ยนรูปร่างเป็นลักษณะเส้นใยได้ แต่ในขณะที่อยู่ในรูป YLS แมลงต้องมีชีวิต เนื่องจากเป็นปัจจัยสำคัญในการเจริญของ YLS คือสารอินทรีย์และแหล่งไนโตรเจนจากแมลง ซึ่ง YLS มีความจำเพาะต่อชนิดของแมลงที่อาศัย (Suh และคณะ, 2001; ธีัญญา, 2559)

2.2.2 ส่วนประกอบของถั่งเช่า

ถั่งเช่าอุดมไปด้วยสารสำคัญหลายชนิดที่มีผลทางชีวภาพ เช่น โมโนแซ็กคาไรด์ ไคแซ็กคาไรด์ พอลิแซ็กคาไรด์ชนิดเบต้ากลูแคน แมนนิทอล กาแล็กโทส อะดีโนซีน คอร์โดเซปิน กรดคอร์โดเซปิก กรดอะมิโน โพรตีน สเตอรอล วิตามิน และแร่ธาตุหลายชนิด เช่น โพแทสเซียม โซเดียม แคลเซียม แมกนีเซียม เหล็ก คอปเปอร์ แมงกานีส สังกะสี ฟอสฟอรัส ซีลีเนียม เป็นต้น (Bhandari และคณะ, 2010; ธีัญญา และคณะ, 2556)

2.2.3 ประโยชน์ในทางการแพทย์

ถั่งเช่าประกอบไปด้วยพอลิแซ็กคาไรด์ชนิดเบต้ากลูแคน (บีต้า 1,3 และ บีต้า 1,6 ดี – กลูแคน) ช่วยต้านอนุมูลอิสระ (Li และคณะ, 2006) เพิ่มภูมิคุ้มกัน (Wu และคณะ, 2012) ต้านการเกิดเนื้องอกและเซลล์มะเร็ง (Wasser, 2002) มีฤทธิ์ยับยั้งการอักเสบและส่งเสริมระบบภูมิคุ้มกันในหนูทดลอง (Yu และคณะ, 2004) สารคอร์โดเซปิน และกรดคอร์โดเซปิกในถั่งเช่าช่วยเพิ่มพลังงานภายในร่างกาย (Dai และคณะ, 2001) นอกจากนี้ยังมีกรดอะมิโนจำเป็น สารอะดีโนซีน ไตรฟอสเฟต นิวคลีโอไซด์ ไซโคลสปอรีน และกรดกลูตามิก ถั่งเช่าสามารถนำมาใช้ในการป้องกันและรักษาโรคต่างๆ เช่น ในขบวนการหายใจ ช่วยทำให้ปอด นำออกซิเจนไปใช้อย่างมีประสิทธิภาพ รักษาโรคหอบหืด วัณโรค โรคหลอดเลือดอักเสบเรื้อรัง โรคไต โรคหัวใจ รวมถึงโรกระบบไหลเวียนโลหิต ความดันโลหิตสูง ภาวะเม็ดเลือดขาวต่ำกว่าปกติ โรคนอนไม่หลับ อ่อนล้า ความเครียด ระบบประสาท โรคตับอักเสบเฉียบพลันและเรื้อรัง เพิ่มภูมิคุ้มกัน เพิ่มความแข็งแรงของร่างกายให้ต้านทานแบคทีเรียและไวรัส (Ng และ Wang, 2005) ต่อด้านการเกิดเนื้องอก (Yalin และคณะ, 2005) แก่ความผิดปกติทางเพศทั้งชายและหญิง (Lim และคณะ, 2012)

อย่างไรก็ตาม ถั่งเช่าสดในธรรมชาติจะมีปริมาณนิวคลีโอไซด์น้อยกว่าแบบแห้งและแปรรูปแล้ว นอกจากนี้เส้นใยของถั่งเช่าที่มาจากเพาะเลี้ยงมีปริมาณนิวคลีโอไซด์สูง โดยถั่งเช่าได้จากธรรมชาตินั้น ความชื้นและความร้อนมีผลต่อการเพิ่มขึ้นของปริมาณนิวคลีโอไซด์ แต่ถั่งเช่าที่ได้จากการเพาะเลี้ยงนั้น ความชื้นและความร้อนไม่มีผลต่อเส้นใย โดยปกติการวัดคุณภาพของถั่งเช่าจะวัดจากคุณภาพของอะดีโนซีน แต่ที่จริงแล้วคุณภาพของถั่งเช่าขึ้นอยู่กับนิวคลีโอไซด์ โดยเฉพาะอย่างยิ่ง อะดีโนซีน อินโนซีน และคอร์โดเซปิน

สารสำคัญในถั่งเช่าทำให้ร่างกายมีประสิทธิภาพในการนำออกซิเจนไปใช้ได้เพิ่มขึ้นกว่าร้อยละ 40 สรรพคุณนี้จึงมีประโยชน์กับนักกีฬาขณะแข่งขัน ที่จำเป็นต้องใช้ออกซิเจนปริมาณมากกว่าปกติ ทำให้พลังงานเพิ่มขึ้นและเหนื่อยช้าลง และผู้มีปัญหาเกี่ยวกับปอด เช่น มะเร็งปอด ปอดเป็นจุดจากเชื้อราหรือแบคทีเรีย หรือปอดถูกทำลายจากมลพิษ หรือจากการสูบบุหรี่จัด ปอดจะ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไม่สามารถนำเอาออกซิเจนไปใช้ได้อย่างมีประสิทธิภาพ ถึงจะช่วยบรรเทาอาการเหล่านี้ได้ (ภัทรและ วชิระ, 2555; รัญญา, 2559)

2.2.4 ประเภทของถั่งเช่า

ถั่งเช่ามีอยู่หลายสายพันธุ์ ในประเทศไทยเห็นถั่งเช่าที่ได้รับความนิยมอยู่ 4 สายพันธุ์

2.2.4.1 ถั่งเช่าทิเบต (*Ophiocordyceps sinensis* หรือชื่อเดิม *Cordyceps sinensis*)

ถั่งเช่าทิเบต หรือถั่งเช่าแท้ จัดว่ามีชื่อเสียงและมีค่ามากที่สุดในการบรรเทาโรคแมลงสกุลถั่งเช่า ถั่งเช่าชนิดนี้จะเจริญเติบโตจากตัวอ่อนของผีเสื้อกลางคืนที่อยู่บนเหือกเขาที่มัลย์ที่มีความสูงกว่า 3,500 เมตรจากระดับน้ำทะเลเท่านั้น ชาวเอเชียนิยมรับประทานเป็นยาสมุนไพรเป็นระยะเวลากว่าพันปี เชื่อว่ามีสรรพคุณช่วยเสริมสร้างร่างกาย ใช้เป็นยารักษาโรคได้หลากหลาย โดยสรรพคุณของถั่งเช่าถูกพบโดยบังเอิญ มีการบันทึกอยู่ในตำรับยาแผนโบราณของชาวทิเบต ในสมัยราชวงศ์ของจีน ถั่งเช่าจัดเป็นของล้ำค่า มีเพียงจักรพรรดิและเชื้อพระวงศ์ของจีนเท่านั้นที่ใช้ได้ (Holliday และ Cleaver, 2008)

2.2.4.2 ถั่งเช่าสีทอง (*Cordyceps militaris*)

ถั่งเช่าสีทอง เป็นเห็ดปรสิตที่ขึ้นได้ในแมลงหลากหลายชนิด ส่วนใหญ่เกิดในหนอน และดักแด้ผีเสื้อ นอกจากนี้ยังพบในตัว ต่อแตน และในแมลงวัน ถั่งเช่าสีทองสามารถเพาะได้โดยให้ตัวหนอน ดักแด้ หรืออาหารสังเคราะห์ มีรายงานยืนยันว่า ถั่งเช่าสีทองมีคุณสมบัติเทียบเท่าถั่งเช่าทิเบต (Das และคณะ, 2010) และอีกหลายฉบับรายงานว่าถั่งเช่าสีทองมีสารคอร์โดเซปินและอะดีโนซีนสูงกว่าถั่งเช่าทิเบต

2.2.4.3 ถั่งเช่าหิมะ (*Isaria tenuipes*)

ถั่งเช่าหิมะ หรือถั่งเช่าเกาหลี ถูกใช้เป็นยาสมุนไพรรักษาโรคต่างๆ และเป็นยาบำรุงในประเทศจีน ญี่ปุ่น และเกาหลีมาตั้งแต่สมัยโบราณ (Takano และคณะ, 2005) ในถั่งเช่าหิมะมีสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพหลายชนิด สามารถเสริมภูมิคุ้มกันและป้องกันการเกิดโรคต่างๆ ยับยั้งและป้องกันการเกิดเซลล์มะเร็ง (Shim และคณะ, 2000; Hong และคณะ, 2007; Sapkota และคณะ, 2011; รัญญา, 2555)

2.2.4.4 ถั่งเช่าจ๊กจั่น (*Isaria sinclairii*)

ถั่งเช่าจ๊กจั่นจะเกิดขึ้นบนจ๊กจั่นที่มีเชื้อรา *Isaria sinclairii* เข้าไปเจริญในลำตัว ทำให้จ๊กจั่นตายแล้วอกเป็นฟรุตติงบอดีที่เห็น ฟรุตติงบอดีมีสีขาว ในตำราจีนระบุว่าถั่งเช่าจ๊กจั่นมีฤทธิ์เป็นยาเย็น มีรสหวาน ใช้รักษาอาการบวมของตา ตาอักเสบ อาการขุ่นมัวในแก้วตาที่มีสาเหตุจากแบคทีเรีย รา หรือไวรัส มีสารต้านอนุมูลอิสระ และใช้ในการรักษาผู้ป่วยโรคมะเร็ง (Xu และคณะ, 2001; Chen และคณะ, 1993; Wang และคณะ, 2004; Cheng และคณะ, 2009; Ahn และคณะ, 2008; Shen และคณะ, 2007; รัญญา, 2559)

2.3 ถั่งเช่าหิมะ

2.3.1 อนุกรมวิธาน

Kingdom Fungi
Phylum Ascomycota

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์สำหรับการเรียนเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมีเหตุดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Subphylum Ascomycotina

Class Pyrenomycetes

Order Hypocreales

Family Clavicipitaceae

Genus *Cordyceps (Isaria)*

Species *tenuipes*

ที่มา : ดัดแปลงจาก ัญญา (2555)

2.3.2 ลักษณะโดยทั่วไป

ลักษณะของถ้ำเข้าหิมะสดจะมีสีเหลือง หรือเหลืองอมเขียว แต่ถ้าเป็นตัวอย่างเก่า ก้านชูจะมีสีน้ำตาลหรือสีเหลืองอมน้ำตาล ส่วนปลายเป็นสปอร์สีขาว (อภิญญา, 2545) จัดเป็นเห็ดทางการแพทย์ที่สำคัญ ตามธรรมชาติจะอาศัยตัวอ่อนของแมลง หรือดักแด้ในการเจริญเติบโต

2.3.3 ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

เนื้อเยื่อภายในฟรุตติงบอดีจะสด ไม่แห้งแข็ง คล้ายเนื้อสัตว์และมีสีส่วนใหญ่เป็นสีส้มและเหลือง ข้างในโครงสร้างยกเว้นส่วนผนังคือ เซนทรัม จะมีเนื้อเยื่อส่วนฐานที่แอสคัส (สปอร์ที่มีการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ ซึ่งสปอร์จะถูกสร้างขึ้นภายในถุง) งอกขึ้นในแนวตั้งพร้อมกับเส้นใยที่เป็นหมัน เรียกว่า พาราไฟซิส จะสลายตัวไปเมื่อแอสคัสโตในการสืบพันธุ์เป็นแบบไม่อาศัยเพศ (นุกูล, 2551)

2.3.4 สรรพคุณและสารสำคัญ

ในถ้ำเข้าหิมะมีสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพหลายชนิด

2.3.4.1 พอลิแซ็กคาไรด์

พอลิแซ็กคาไรด์เป็นพอลิเมอร์ที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงหรือโคพอลิเมอร์ของ โมโนแซ็กคาไรด์ที่รวมเข้าด้วยกันผ่านพันธะไกลโคซิดิก พอลิแซ็กคาไรด์เป็นตัวแทนของกลุ่มพอลิเมอร์ที่มีความสำคัญอย่างยิ่งต่อมนุษย์ทางด้านคุณค่าทางโภชนาการและประโยชน์ทางอุตสาหกรรม สิ่งมีชีวิตหลายชนิดบนโลกต้องอาศัยพืชสีเขียวที่สังเคราะห์แสงเพื่อการผลิตเซลลูโลสและแป้งซึ่งเป็นสารอาหารที่สำคัญ ทุกวันนี้เซลลูโลสและแป้งได้มีการนำมาใช้อย่างกว้างขวางในผลิตภัณฑ์อาหารเพื่อการค้าและพอลิแซ็กคาไรด์อื่น ๆ เช่น อัลจิเนต วุ้น คาราจีแนน เพคติน และแซนแทนกัมยังใช้เป็นสารเพิ่มความข้น ส่วนใหญ่พอลิแซ็กคาไรด์เหล่านี้ใช้ในการดัดแปลงผลิตภัณฑ์อาหาร ซึ่งไม่ได้ถูกดัดแปลงทางเคมี แต่ใช้ในรูปแบบที่บริสุทธิ์ (Partain, 2000)

เบต้ากลูแคนในธรรมชาติมีพอลิแซ็กคาไรด์เป็นองค์ประกอบ เช่น ัญพืช สาหร่าย ผนังเซลล์จุลินทรีย์ เชื้อรา และยีสต์

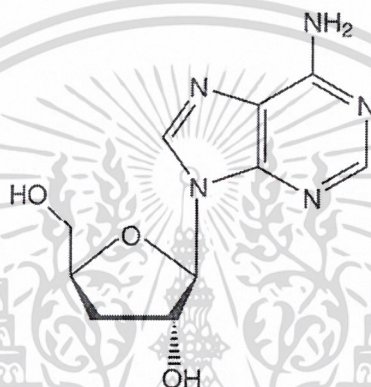
เบต้ากลูแคนชนิดบีต้า 1,3 และ 1,6-ดี-กลูแคน มีฤทธิ์ในเรื่องการต้านมะเร็ง และด้านการอักเสบจากความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของเบต้ากลูแคน ซึ่งสารต้านอนุมูลอิสระเป็นสารประกอบที่ช่วยกำจัดและยับยั้งการก่อตัวของสารออกซิไดซ์ที่มีปฏิกิริยาสูงที่ไม่มีคู่อิเล็กตรอน (reactive oxygen species ; ROS) โดยการเสริมสารต้านอนุมูลอิสระหรืออาหารเสริมสารต้านอนุมูล

อิสระสามารถช่วยลดความเสียหายจากการออกซิเดชันภายในร่างกายมนุษย์ (Giese และคณะ, 2015)

ในถั่งเช่าหิมะพอลิแซ็กคาไรด์ (เบต้ากลูแคน) ช่วยต้านการเกิดเนื้องอกและเซลล์มะเร็ง มีฤทธิ์ยับยั้งการอักเสบและส่งเสริมระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย (ฉัญญา, 2555)

2.3.4.2 คอร์โดเซปิน

คอร์โดเซปินเป็นอนุพันธ์ของอะดีนีนนิวคลีโอไซด์และสูตรทางเคมี คือ $C_{10}H_{13}N_5O_3$ ที่มีน้ำหนักโมเลกุล 251.24 ดาลตัน (รูปที่ 2.1) โครงสร้างของคอร์โดเซปิน ประกอบด้วยโมเลกุลอะดีนีนนิวคลีโอไซด์ซึ่งติดอยู่ระหว่างน้ำตาลไรโบสผ่านพันธะ β -N9-glycosidic (Tuli และคณะ, 2013)



รูปที่ 2.1 โครงสร้างทางเคมีของคอร์โดเซปินหรือ 3'-ดีออกซีอะดีโนซีน เป็นอนุพันธ์ของนิวคลีโอไซด์อะดีนีนที่สกัดจาก *Cordyceps* spp.

ที่มา : Chaicharoenaudomrung และคณะ (2018)

คอร์โดเซปินเป็นสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สำคัญที่พบในเชื้อราแมลง *Cordyceps* spp. จัดเป็นสารต้านมะเร็งที่มีศักยภาพที่สำคัญ (Tuli และคณะ, 2013) หน้าที่ทางชีวภาพของคอร์โดเซปินเพื่อต้านการเกิดเนื้องอกและต้านการอักเสบ (Kondrashov และคณะ, 2012; Nakamura และคณะ, 2006; Wang และคณะ, 2015) นอกจากนี้คอร์โดเซปิน ยังสามารถต้านมะเร็งได้อีกด้วย เช่น ต้านการแพร่กระจายเซลล์มะเร็ง กระบวนการตายของเซลล์ (apoptosis) และกระบวนการกลืนกินตัวเองของเซลล์ (autophagy) (Choi และคณะ, 2011; Li และคณะ, 2015; Tao และคณะ, 2016)

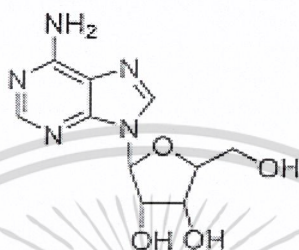
ในถั่งเช่าหิมะคอร์โดเซปินช่วยเพิ่มพลังงานภายในร่างกาย เสริมสร้างความแข็งแรงให้กับนักกีฬา ใช้ในการป้องกันและรักษาโรค เช่น โรคหอบหืด วัณโรค โรคหลอดเลือดอักเสบเรื้อรัง โรคไต โรคหัวใจ ความดันโลหิตสูง โรคทางระบบประสาท ยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียและไวรัส ต้านการเกิดเนื้องอก แก้ไขภาวะเสื่อมสมรรถภาพทางเพศทั้งชายและหญิง (ฉัญญา, 2555)

2.3.4.3. อะดีโนซีน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับอะดีโนซีนเป็นนิวคลีโอไซด์ที่พบได้ในธรรมชาติทั่วไป ซึ่งมีส่วนร่วมในการค้าไม่ว่ากลไกการควบคุมทางสรีรวิทยาและพยาธิสรีรวิทยาที่หลากหลาย เมื่ออะดีโนซีนส่งสัญญาณผ่านตัวรับไปใช้

เมมเบรน สามารถแบ่งได้ 4 ประเภท ได้แก่ A1, A2, A2b และ A3 ซึ่งสามารถปรับการแพร่กระจายของเซลล์ ความแตกต่าง และการตายของเซลล์ (Zhang และคณะ, 2016)

อะดีโนซีนในถั่วงาเป็นสารออกฤทธิ์ที่สำคัญอีกตัวหนึ่งที่รองจากสารคอร์โดเซปินในถั่วงา ซึ่งมีคุณสมบัติกระตุ้นการจับออกซิเจนในกระแสเลือด ช่วยเรื่องระบบหายใจ โรคหอบหืด และภูมิแพ้ รวมถึงอะดีโนซีนยังช่วยในการสลายลิ่มเลือด ไม่ให้เกิดการแข็งตัว เพิ่มการไหลเวียนของโลหิตให้ดีขึ้น และควบคุมการเต้นของหัวใจให้ทำงานเป็นปกติ



adenosine

รูปที่ 2.2 โครงสร้างทางเคมีของ Adenosine

ที่มา : Zhang และคณะ (2016)

ในปัจจุบันได้มีการใช้ถั่วงาในทางเวชภัณฑ์เครื่องสำอาง เนื่องจากถั่วงามีสารอะดีโนซีนที่เป็นอนุพันธ์ของนิวคลีโอไซด์ (Nucleoside) เป็นสารชนิดหนึ่งในกระบวนการทำงานของเซลล์ และเป็นตัวตั้งต้นที่ไปกระตุ้นการทำงานของดีเอ็นเอ ในการสร้างโปรตีนของเซลล์ผิว (Maconi และคณะ, 2002) จึงทำให้ผิวคงตัวและอ่อนเยาว์ และเสริมสร้างให้ผิวขาวกระจ่างใส และทำให้ผิวหน้ากระชับตึง (Sun Biotech Co. Ltd, 2012) และลดเลือนริ้วรอยได้อย่างมีประสิทธิภาพ (ธัญญา, 2555)

2.3.5 การเพาะเลี้ยงถั่วงาทิมะ

ถั่วงาจะผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพมากหรือน้อย ขึ้นกับปัจจัยหลายประการ ได้แก่ วิธีการเพาะเลี้ยง ส่วนประกอบอาหารเพาะเลี้ยง ความเป็นกรด-ด่าง อุณหภูมิ แสง เป็นต้น

การเพาะถั่วงานั้น สามารถทำได้ทั้งบนตัวหนอน หรือบนอาหารสังเคราะห์ อันดับแรกสิ่งที่จะต้องมียาคือเชื้อเห็ด หากเชื้อเห็ดดี จะทำให้ผลผลิตมีคุณภาพ จากนั้นทำการขยายเชื้อเห็ดบนวุ้นอาหาร potato dextrose agar (PDA) เมื่อเกิดเชื้อขึ้นบนอาหารแข็งแล้วจึงนำลงอาหารเหลว เมื่อได้เชื้อปริมาณที่ต้องการจึงนำไปเพาะบนตัวหนอน หรือเพาะบนอาหารสังเคราะห์ได้

สำหรับอาหารที่ใช้เพาะถั่วงา โดยทั่วไปส่วนประกอบหลักในอาหารเพาะถั่วงา มีดังนี้

1. แหล่งคาร์บอน ได้แก่ เมล็ดธัญพืช น้ำตาล แป้ง
2. แหล่งไนโตรเจน ได้แก่ ยีสต์สกัด เปปโตน ดักแด้ มันฝรั่งสกัด

2.4 แหล่งสารอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงถั่วงา

2.4.1 ข้าวพันธุ์ไรซ์เบอร์รี่

ข้าวไรซ์เบอร์รี่เป็นพันธุ์ระหว่างข้าวเจ้าหอมนิลกับข้าวขาวดอกมะลิ 105 จึงไม่เป็นสีดำ แต่มีลักษณะเป็นสีแดงแบบลูกเบอร์รี่ที่สุกแล้ว รูปร่างเมล็ดเรียวยาวเมื่อสุกจะเป็นสีม่วงเข้ม ข้าว

ไรซ์เบอร์รี่นั้นมีความสมบัติที่โดดเด่น คือการต้านอนุมูลอิสระ โดยจากการศึกษาพบว่าข้าวยังมีสีม่วงเข้มมากเท่าใด ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระยิ่งมากขึ้นเท่านั้น โดยมีค่าอยู่ระหว่าง 35.3-214.7 ไมโครโมลต่อกรัม

2.4.2 สรรพคุณและประโยชน์ของข้าวไรซ์เบอร์รี่

ข้าวไรซ์เบอร์รี่โดยเฉพาะส่วนที่เป็นรำข้าวประกอบด้วยสารต้านอนุมูลอิสระและสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สำคัญอื่น ๆ เช่น แอนโทไซยานิน วิตามินอีคอมเพล็กซ์ เบต้าแคโรทีน แกมมาออริซานอล และกรดฟอลิก(โฟเลต) ซึ่งมีฤทธิ์ต้านมะเร็ง (Leardkamolkarn และคณะ, 2011; Min และคณะ, 2011)

Prangthip และคณะ (2013) รายงานว่าผลิตภัณฑ์เสริมอาหารที่มีรำข้าวเป็นส่วนประกอบหลักมีคุณสมบัติในการปรับปรุงระดับน้ำตาลในเลือดสูงและเพื่อแก้ไขภาวะไขมันในเลือดสูง นอกจากนี้การเสริมรำข้าวไรซ์เบอร์รี่ยังสามารถลดความเครียดจากสารอนุมูลอิสระและการอักเสบ (Wiriawattana และคณะ, 2018)

2.5 แคปซูลบรรจุ

แคปซูล เป็นยาประเภทของแข็งชนิดหนึ่ง ซึ่งมีตัวยาบรรจุอยู่ในเปลือกแคปซูล ซึ่งมีข้อดีเมื่อเปรียบเทียบกับยาเม็ด คือการผลิตแคปซูลมีขั้นตอนที่น้อยกว่า ลดการใช้เครื่องมือ ลดความเสี่ยงของการปนเปื้อนระหว่างการผลิต ช่วยลดความเสี่ยงต่อปัญหาความคงตัวของยาและสามารถแก้ปัญหาการสลายและกลิ่นที่ไม่พึงประสงค์ของยาได้ (ธวัชชัย, 2548)

เนื่องจากถั่งเช่าหิมะ มีกลิ่นที่ไม่พึงประสงค์ทำให้บริโภคได้ยาก การนำถั่งเช่าหิมะมาบรรจุแคปซูล ทำให้สามารถบริโภคง่ายขึ้น

2.5.1 ความคงตัวของยาบรรจุแคปซูล

เพื่อให้คุณสมบัติทางชีวภาพ ทางเคมี และทางกายภาพอยู่ในเกณฑ์ที่กำหนดตลอดระยะเวลาในการเก็บรักษาจึงจำเป็นต้องศึกษาความคงตัวของยาบรรจุแคปซูล ทราบอายุการจัดเก็บรักษาของยา และวันหมดอายุของยาควรปรากฏอยู่บนภาชนะสำหรับใส่ยา

เภสัชภัณฑ์ที่คงตัวจนถึงวันหมดอายุจะมีลักษณะดังนี้

2.5.1.1 ตัวยาสสำคัญเสื่อมสลายไปไม่เกินร้อยละ 5 ภายใน 2 ปี

2.5.1.2 ตัวยาสสำคัญเสื่อมสลายไปไม่เกินร้อยละ 10 ตลอดอายุการจัดเก็บรักษา

2.5.1.3 หากระบุวันหมดอายุเป็น เดือน ปี ให้ถือว่าวันหมดอายุคือวันสุดท้ายของเดือนนั้น (ศศิประภา, 2561)

2.5.2 ปัจจัยที่มีผลต่อความคงตัวของเภสัชภัณฑ์

2.5.2.1 ปัจจัยจากสิ่งแวดล้อม ได้แก่ อุณหภูมิ แสง ความชื้น ก๊าซออกซิเจน ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ เป็นต้น

2.5.2.2 ปัจจัยจากรูปแบบเภสัชภัณฑ์ ได้แก่ ขนาดอนุภาคของยา โดยเฉพาะในระบบยาอิมัลชัน ยาแขวนตะกอน และความเป็นกรด-ด่าง (pH) ส่วนประกอบของระบบตัวทำละลาย (เช่น ความมีขี้ของตัวทำละลาย) ความเข้ากันได้ของประจุบวกและประจุลบ ค่าความแรงไอออนของ

สารละลาย บรรจุภัณฑ์ที่ต้องสัมผัสกับยาโดยตรง สารเคมีที่มีการเติมลงไปในการจับกันระหว่างโมเลกุลและการแพร่ของตัวยาสำคัญและสารช่วยในตำรับ

2.5.2.3 การปนเปื้อนของเชื้อจุลชีพ

2.5.2.4 การปนเปื้อนโลหะหนัก

2.5.2.5 การรั่วซึมของภาชนะบรรจุ

อุณหภูมิในการเก็บรักษาในแต่ละชนิดนั้นไม่เหมือนกัน ยาบางชนิดจำเป็นต้องเก็บในที่อุณหภูมิต่ำ เนื่องจากยาคอนดิชันนั้นจะไวต่ออุณหภูมิ ทำให้ยาละลายตัวเร็ว และทำให้อายุของยานั้นสั้นลง ในขณะที่ยาบางชนิดอาจต้องเก็บในที่อุณหภูมิปกติ หากเก็บในที่อุณหภูมิต่ำอาจทำให้ยาเสียสภาพได้ (ศศิประภา, 2561)

2.5.3 แนวทางการทดสอบความคงตัวของเภสัชภัณฑ์

2.5.3.1 สภาวะเร่ง (Accelerated storage condition) เป็นการศึกษาเพื่อที่จะเร่งปฏิบัติการการสลายตัวหรือการเปลี่ยนแปลงทางเคมีหรือทางกายภาพของยา โดยการเก็บตัวอย่างที่ทดสอบในสภาวะที่รุนแรงมากกว่าความเป็นจริง วัตถุประสงค์ในการที่จะหาตัวแปรทางจลนพลศาสตร์ (Kinetics) เพื่อที่จะคาดการณ์ระยะเวลาการสิ้นอายุของยา โดยประมาณและจะทำการศึกษาความคงตัวของอุณหภูมิ 40 ± 2 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ร้อยละ 75 ± 5 ช่วงเวลาการศึกษาความคงตัวตามขนาดการผลิต หากขนาดการผลิตเล็กหรือระดับห้องปฏิบัติการ ช่วงเวลาการศึกษาความคงตัวจะอยู่ที่ 0, 1, 3 และ 6 เดือน หากขนาดการผลิตในระดับทดลองผลิตหรือในระดับผลิตจริง ช่วงเวลาการศึกษาความคงตัวจะอยู่ที่ 0, 3 และ 6 เดือน

2.5.3.2 สภาวะการเก็บรักษาจริง (Real time storage condition) เป็นการศึกษาความคงตัวเพื่อที่จะยืนยันถึงคุณภาพของผลิตภัณฑ์ตลอดระยะเวลาที่นำออกจำหน่าย จะทำการศึกษาความคงตัวของอุณหภูมิ 30 ± 2 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ร้อยละ 75 ± 5 ช่วงเวลาของการศึกษาความคงตัวจะแบ่งเป็น 0, 3, 6, 9, 12, 18 และ 24 เดือน และทุกปีจนกว่าจะเกินวันสิ้นอายุ (ศศิประภา, 2561)

2.5.4 ความไม่คงตัวทางกายภาพของเภสัชภัณฑ์และการป้องกันผลกระทบที่เกิดขึ้น

ในกรณียาแคปซูล ความไม่คงตัวทางกายภาพ จะเกิดการเปลี่ยนแปลงของลักษณะภายนอก คือ ความยืดหยุ่น ความแข็ง ความนิ่มของเปลือกแคปซูล ซึ่งจะส่งผลต่ออัตราการปลดปล่อยของยาที่เปลี่ยนแปลงไป ดังนั้นเปลือกแคปซูลจึงจำเป็นต้องได้คุณภาพที่เหมาะสมสำหรับยานั้นๆ (ศศิประภา, 2561)

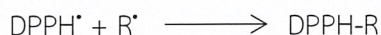
2.6 การวิเคราะห์สารสำคัญในถังเช่าหิมะ

2.6.1 วิธี 2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) (บุหรัน, 2556)

DPPH คืออนุมูลอิสระที่มีความเสถียร (stable free radical) เป็นสารที่นิยมนำไปใช้เป็นตัวชี้วัดความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารที่สนใจ ใช้หลักการของ DPPH ในรูปของอนุมูลอิสระที่อยู่ในสารละลายซึ่งมีสีม่วงเข้มและดูดกลืนคลื่นแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร มีการสูญเสียอิเล็กตรอนอิสระให้กับสารต้านอนุมูลอิสระหรือสารสกัดจากสมุนไพรที่เป็นตัวรับอิเล็กตรอน จะเกิดการเปลี่ยนแปลงไปอยู่ในรูปออกซิไดซ์ (DPPH) ซึ่งการลดลงของอนุมูลอิสระการคำนวณค่าดังกล่าวจะสังเกตได้จากการจางลงของสีม่วงในสารละลาย สามารถวัดการค่าการดูดกลืนคลื่นแสงที่ใช้

ลดลงที่ความยาวคลื่นที่ 517 นาโนเมตร เป็นตัวชี้วัดของปฏิกิริยาที่เกิดขึ้น หรือก็คือการลดลงของ DPPH ที่มีผลมาจากสารต้านอนุมูลอิสระ

DPPH^{*} จะเกิดปฏิกิริยากับ antioxidant (AH) หรือกับ radical species (R^{*})



วิธีการ

เมื่อ DPPH ทำปฏิกิริยากับสารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ สีของสารละลายสีม่วงจะเปลี่ยนเป็นสีเหลือง โดยเปรียบเทียบกับสารต้านอนุมูลอิสระที่ใช้เป็นมาตรฐานคือ Butylated hydroxytoluene (BHT) ถ้าตัวอย่างมีความสามารถในการต้านออกซิเดชันได้สูง ความเข้มของสารละลายสีม่วงจะลดลง ค่าที่ได้สามารถแสดงได้หลายรูปแบบ ได้แก่ ร้อยละของการยับยั้งอนุมูลอิสระ (% radical scavenging activity) ค่าความเข้มข้นของสารสกัดที่สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระได้ร้อยละ 50 จากปริมาณอนุมูลอิสระเริ่มต้น (IC₅₀)

การแสดงผล

การศึกษาความสามารถในการต้านออกซิเดชัน ในสารตัวอย่างจะรายงานเป็นค่าความเข้มข้นของสารสกัดที่สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระได้ร้อยละ 50 จากปริมาณอนุมูลอิสระเริ่มต้น (IC₅₀) โดยสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างร้อยละการยับยั้ง DPPH กับความเข้มข้นของสารตัวอย่างเพื่อหาค่า IC₅₀

$$\% \text{ inhibition DPPH}^* = [(\text{Abs}_{\text{control}} - \text{Abs}_{\text{sample}}) / \text{Abs}_{\text{control}}] \times 100$$

โดย Abs_{control} คือ ค่าการดูดกลืนแสงของตัวควบคุม

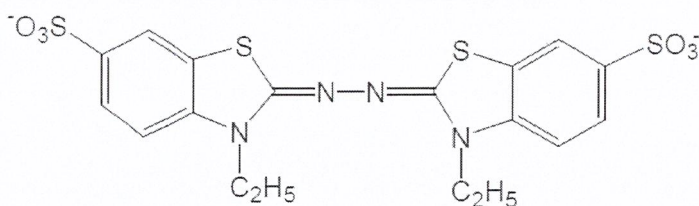
Abs_{sample} คือ ค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่าง

2.6.2 วิธี 3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonicacid (ABTS) (บุหรัน, 2556)

ABTS เป็นวิธีการวิเคราะห์ความสามารถในการต้านออกซิเดชัน (antioxidant capacity) ซึ่งใช้ reagent คือ 2, 2'-Azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt เป็น stable radical ใน aqueous solution

ABTS เป็นอนุมูลอิสระที่มีประจุเป็นบวก ในสารละลายจะมีสีเขียวเข้ม และมีค่าการดูดกลืนแสงความยาวคลื่นสูงสุดหลายค่า ได้แก่ 415 645 734 และ 815 นาโนเมตร แต่ทั่วไปแล้วจะนิยมใช้ความยาวคลื่นที่ 415 และ 743 นาโนเมตรในการติดตามปฏิกิริยา โดยในการลดลงของการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นดังกล่าว จะใช้เป็นตัวชี้วัดปฏิกิริยาที่เกิดขึ้น (สีเขียวของสารละลายจางลง) ในการเตรียมอนุมูลอิสระของ ABTS เพื่อใช้ทดสอบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ จะมีขั้นตอนที่ยุงยากกว่าของ DPPH นั่นคือต้องนำ ABTS ไปบ่มกับ โพแทสเซียมเปอร์ซัลเฟต ด้วยอัตราส่วน 1:1 (stoichiometry ratio) ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 12-16 ชั่วโมง เพื่อให้ได้อนุมูลอิสระที่เป็นประจุบวกของ ABTS ก่อนนำไปใช้ในการทดสอบปฏิกิริยาการต้านอนุมูลอิสระต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.3 โครงสร้างของ 2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt

ที่มา : Lee และคณะ (2005)

การทำให้เกิด ABTS cation radical ทำได้หลายวิธีดังนี้

2.6.2.1 ปฏิกริยาของเอนไซม์คือใช้เอนไซม์เร่งปฏิกริยาออกซิเดชันให้เกิด ABTS cation radical เช่น เพอร์ออกซิเดส ไมโอโกลบิน เป็นต้น

2.6.2.2 ปฏิกริยาของเคมี เช่น แมงกานีสไดออกไซด์ โพแทสเซียมเปอร์ซัลเฟต 2, 2'-azo-bis-(2-amidinopropane) (ABAP) เป็นต้น



สารต้านออกซิเดชัน (AH) จะทำปฏิกริยากับ ABTS^+ ดังนี้



ในการทดลองพบว่าความเข้มข้นของสารละลายสีเขียวลดลง โดยจะรายงานเป็นค่าความเข้มข้นของสารสกัดที่สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระได้ร้อยละ 50 จากปริมาณอนุมูลอิสระเริ่มต้น โดยสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างร้อยละการยับยั้ง ABTS กับความเข้มข้นของสารตัวอย่างเพื่อหาค่า IC_{50}

$$\% \text{ inhibition ABTS} = [(\text{Abs}_{\text{control}} - \text{Abs}_{\text{sample}}) / \text{Abs}_{\text{control}}] \times 100$$

โดย $\text{Abs}_{\text{control}}$ คือ ค่าการดูดกลืนแสงของตัวควบคุม

$\text{Abs}_{\text{sample}}$ คือ ค่าการดูดแสงของตัวอย่าง

2.6.3 การวิเคราะห์ปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ด้วยวิธีแอนโทรน

การวิเคราะห์ปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ด้วยวิธีแอนโทรน เป็นวิธีที่ใช้กันอย่างแพร่หลายในการตรวจหาปริมาณคาร์โบไฮเดรตซึ่งสามารถนำไปประยุกต์ใช้เป็นวิธีตรวจหาปริมาณน้ำตาลทั้งหมดในตัวอย่างได้ เนื่องจากคาร์โบไฮเดรตมีน้ำตาลเป็นส่วนประกอบ ซึ่งปกติจะใช้กลูโคสเป็นสารละลายมาตรฐาน โดยปริมาณน้ำตาลทั้งหมดจะแสดงออกมาในรูปแบบกลูโคส เมื่อน้ำตาลทำปฏิกริยากับกรดซัลฟิวริกในสารแอนโทรนและต้มจนกระทั่งปฏิกริยาเกิดสมบูรณ์ จะทำให้เกิดสารละลายสีเหลือง-เขียวผสมกัน วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 620 นาโนเมตร ความเข้มข้นของสีจะแปรผันโดยตรงกับปริมาณน้ำตาลในตัวอย่าง คำนวณหาปริมาณน้ำตาลในตัวอย่างได้จาก การวัดค่าการดูดกลืนแสงของน้ำตาลในตัวอย่างเทียบกับปริมาณน้ำตาลในสารละลายมาตรฐาน (Laurentin และ Edwards, 2003)

2.7 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Li และคณะ (2015) ได้ศึกษาการเปลี่ยนแปลงปริมาณของอะดีโนซีนและคอร์โคเซปินในถั่งเช่าสีทอง (*Cordyceps militaris*) ที่ผ่านกระบวนการปรุงเป็นอาหาร โดยใช้เครื่องแยกของเหลว

สมรรถนะสูง (High Performance Liquid Chromatography ; HPLC) โดยเฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) ประกอบไปด้วยเมทานอลและน้ำบริสุทธิ์สูง (Ultrapure water) ในอัตราส่วน 15:85 ที่มีอัตราการไหลเท่ากับ 1 มิลลิลิตรต่อนาที อุณหภูมิของคอลัมน์ 40 องศาเซลเซียส และใช้ปริมาณตัวอย่าง 10 ไมโครลิตร วัดที่ความยาวคลื่น 272 นาโนเมตร ผลการทดลองพบว่าปริมาณของอะดีโนซีนใน *Cordyceps militaris* ลดลงอย่างมากหลังผ่านความร้อน แต่ปริมาณของคอร์โดเซปินยังคงค่อนข้างคงที่ จากผลการทดลองนี้บ่งชี้ได้ว่าอะดีโนซีนมีความไม่เสถียรทางความร้อน หากนำ *Cordyceps militaris* ไปทำยาจีนโดยใช้วิธีการต้ม ความร้อนจะทำให้ฤทธิ์ทางยาลดลง

Gu และคณะ (2007) ได้ศึกษาเพื่อให้ได้สารสำคัญจาก *Cordyceps militaris* มาในปริมาณที่มากขึ้น (3'-ดีออกซีอะดีโนซีน อะดีโนซีน กัวโนซีน ซิสตีดิน ยูรีดิน อะดีนีน และ ยูราซิล) ซึ่งพบว่ามีปัจจัยหลายอย่าง เช่น แหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน ไอออนโลหะ และระยะเวลาการหมักอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวในขวดที่เขย่า จากการศึกษาการใช้ทั้งน้ำจากมันฝรั่งและกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าการผลิตนิวคลีโอไซด์และเบสส่วนใหญ่ทำได้ง่ายขึ้น และการใช้กลูโคสร้อยละ 2 เป็นระดับเริ่มต้นที่เหมาะสมที่สุด ส่วนผสมของยีสต์สกัดร้อยละ 0.3 และเปปโตเนอร้อยละ 0.3 เป็นแหล่งไนโตรเจนที่ดีที่สุด และการเสริมด้วยแมงกานีสไดออกไซด์ 0.1 มิลลิโมลต่อลิตร จะให้ผลของชีวมวลและการสังเคราะห์ชีวมวลของนิวคลีโอไซด์และเบสในไอออนโลหะที่ตรวจทั้งหมดสูงสุด เวลาเก็บเกี่ยวที่เหมาะสมที่สุดสำหรับ *Cordyceps militaris* พบว่าเป็นวันที่ 6 เนื่องจากการผลิต 3'-ดีออกซีอะดีโนซีน อะดีนีน และกัวโนซีน เริ่มเพิ่มความเร็วจากระยะการเติบโตแบบทวีคูณ ต่อมาจนถึงวันที่ 6 ในที่สุดภายใต้สภาวะการเลี้ยงที่เหมาะสม ปริมาณของ 3'-ดีออกซีอะดีโนซีน อะดีนีน กัวโนซีน ซิสตีดิน ยูรีดิน อะดีนีน และ ยูราซิล เพิ่มขึ้นเป็น 0.212 ± 0.014 มิลลิกรัมต่อกรัม 5.05 ± 0.31 มิลลิกรัมต่อกรัม 4.03 ± 0.30 มิลลิกรัมต่อกรัม 0.556 ± 0.029 มิลลิกรัมต่อกรัม 6.39 ± 0.33 มิลลิกรัมต่อกรัม 0.208 ± 0.016 มิลลิกรัมต่อกรัม และ 0.437 ± 0.027 มิลลิกรัมต่อกรัม ตามลำดับ

Masuda และคณะ (2006) ได้ทำการศึกษาวิธีการผลิตคอร์โดเซปินที่มีประสิทธิภาพสำหรับการใช้งานจริงโดยการเพิ่มประสิทธิภาพของอาหารเลี้ยงเชื้อของ *Cordyceps militaris* นอกจากนี้ยังทำการวิเคราะห์ปริมาณของคอร์โดเซปินและสารอื่น ๆ ที่เกี่ยวข้องกับกรดนิวคลีอิกทั้งในและนอกเส้นใยโดยการเลี้ยง *Cordyceps militaris* บนผิวหน้าของอาหาร ผลจากการศึกษานี้ได้ทำการหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Cordyceps militaris* เพื่อผลิตคอร์โดเซปิน ซึ่งคอร์โดเซปินส่วนใหญ่จะสังเคราะห์มาจาก *Cordyceps militaris* มีอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ สำหรับสภาวะของอาหารเลี้ยงเชื้อ ส่วนผสมของเปปโตเนและยีสต์สกัดซึ่งมีอัตราส่วนของยีสต์สกัดมากกว่าร้อยละ 75 นั้นเหมาะสม และอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนที่เหมาะสมคือ 2 : 1 โดยมวล เมื่อกลูโคสและส่วนผสมของเปปโตเน และยีสต์สกัด (เปปโตเน : ยีสต์สกัด เป็น 1 : 3) ถูกใช้เป็นแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนตามลำดับ ความเข้มข้นสูงสุดของคอร์โดเซปินที่พบได้ในการศึกษานี้เท่ากับ 640 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งสูงมากเมื่อเทียบกับรายงานก่อนหน้านี้

Xu และคณะ (2003) กล่าวว่าการศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อปรับสภาวะการเลี้ยงเชื้อด้วยอาหารเหลวให้เหมาะสมเพื่อผลิตมวลชีวภาพของเส้นใยและ exo-biopolymer ของถั่งเช่าหิมะ (*Paecilomyces tenuipes* C240) โดยใช้การออกแบบการทดลองเชิงสถิติ ในขั้นตอนแรกใช้วิธีการ

แบบปัจจัยเดียว ณ เวลาหนึ่งเพื่อตรวจสอบผลกระทบของตัวแปรขององค์ประกอบอาหาร (เช่น คาร์บอน ไนโตรเจน และแร่ธาตุ) และปัจจัยด้านสิ่งแวดล้อม (เช่น pH และอุณหภูมิ) ต่อการเจริญเติบโตของเส้นใยและ exo-biopolymer ต่อจากนั้นความเข้มข้นขององค์ประกอบในอาหารเลี้ยงเชื้อถูกปรับให้เหมาะสมโดยใช้วิธี orthogonal matrix จากการศึกษาครั้งนี้พบว่าแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมที่สุดคือกลูโคส แหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมสำหรับการเจริญเติบโตของเส้นใยของ *Paecilomyces tenuipes* C240 คือเปปโตนในเนื้อสัตว์และทรีปโทน แต่การผลิต exo-biopolymer จะได้ผลผลิตสูงสุดก็ต่อเมื่อใช้โพแทสเซียมไนเตรทเป็นแหล่งไนโตรเจน และสำหรับแร่ธาตุที่ให้ผลการเจริญเติบโตที่ดีที่สุดคือ ไดโพแทสเซียมฟอสเฟตและแมกนีเซียมซัลเฟต ส่วนค่า pH ที่เหมาะสมสำหรับการเจริญเติบโตคือ 6.0 และอุณหภูมิที่เหมาะสมคือ 28 องศาเซลเซียส

Chen และคณะ (1997) ได้กล่าวไว้ว่า *Cordyceps sinensis* ซึ่งเป็นยาจีนโบราณที่มีชื่อเสียงในการต้านเนื้องอก ต้านการเกิดออกซิเดชัน และกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน แต่อย่างไรก็ตามยังไม่มีการระบุถึงองค์ประกอบที่ออกฤทธิ์ทางยา จึงได้ทำการศึกษาพอลิแซ็กคาไรด์จาก *Cordyceps sinensis* ในการศึกษานี้จะทำการแยกส่วนพอลิแซ็กคาไรด์จากการสกัด *Cordyceps sinensis* ที่ตกตะกอนด้วย เอทานอล (กำหนดให้เป็น polysaccharide fraction of *Cordyceps sinensis* (PSCS)) โดยกระบวนการทำให้บริสุทธิ์ จากนั้นเราทำการรักษาเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด monocytic leukemic line U937 ด้วยพอลิแซ็กคาไรด์จาก *Cordyceps sinensis* เพียงอย่างเดียว หรือ conditioned medium จากเซลล์เม็ดเลือดขาวโมโนนิวเคลียร์แบบ PSCS ที่เปิดใช้งานแล้ว ผลการศึกษาของเราแสดงให้เห็นว่าพอลิแซ็กคาไรด์จาก *Cordyceps sinensis* สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด U937 และกระตุ้นให้กลายเป็น monocytes / macrophages ที่เจริญเต็มที่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3

วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.1 วัสดุและอุปกรณ์

3.1.1 เชื้อ

3.1.1.1 เชื้อ *Isaria tenuipes*

3.1.2 สารเคมี

3.1.2.1 กรดซัลฟิวริก ร้อยละ 98

3.1.2.2 เอทิลแอลกอฮอล์ ร้อยละ 95

3.1.2.3 เอทิลแอลกอฮอล์ ร้อยละ 98

3.1.2.4 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH)

3.1.2.5 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid) (ABTS)

3.1.2.6 โฟแทสเซียมเปอร์ซัลเฟต

3.1.2.7 สารแอนโทรน

3.1.2.8 น้ำตาลกลูโคส

3.1.2.9 เปปโตน

3.1.2.10 ยีสต์สกัด

3.1.3 อุปกรณ์เครื่องมือ

3.1.3.1 ตู้ปลอดเชื้อ (Laminar air flow) Boss Scientific Associate L.P. รุ่น ManHVB

3.1.3.2 เครื่องหมุนเหวี่ยง (Centrifuge) HERMLE Labartechnik GmbH รุ่น Z326k

3.1.3.3 เครื่องแยกของเหลวสารละลายสูง (HPLC) SHIMADZU รุ่น DGU-20A5R/LC-20AD/LPGE-20A/CBM-20ALite/RID-20A/SPD-M20A/SIT-20AHT/CTO-10ASVP

3.1.3.4 หม้อนึ่งฆ่าเชื้อความดันไอน้ำ (Autoclave) Hirayama รุ่น HV-50

3.1.3.5 ตู้อบลมร้อน (Hot air oven) memmert รุ่น UN 110

3.1.3.6 เครื่องทำแห้งแบบสุญญากาศ (Vacuum drier) Binder รุ่น VD53

3.1.3.7 เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) SHIMADZU รุ่น UV-1800

3.1.3.8 เครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิ (Incubator Shaker) PATCH รุ่น InL 400

3.1.3.9 หลอด Centrifuge

3.1.3.10 ขวดรูปชมพู่ ขนาด 250 มิลลิลิตร

3.1.3.11 ขวดโหลขนาด 16 ออนซ์ และ 32 ออนซ์

3.1.3.12 จานเพาะเชื้อ

3.1.3.13 Laboratory glass bottle

3.1.3.14 ตะเกียงแอลกอฮอล์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์ไว้สำหรับใช้ในการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.1.3 อุปกรณ์เครื่องมือ (ต่อ)

- 3.1.3.15 ซ้อนตักสาร
- 3.1.3.16 เข็มเขี่ยเชื้อ
- 3.1.3.17 แท่งแก้วคนสาร
- 3.1.3.18 กระจกบด
- 3.1.3.19 มีดผ่าตัด
- 3.1.3.20 ชุดกรองสุญญากาศ
- 3.1.3.21 ปากคีบสแตนเลส
- 3.1.3.22 ปีกเกอร์
- 3.1.3.23 อุปกรณ์เจาะจุกคอร์ก (Cork borer)

3.2 ขั้นตอนในการดำเนินงาน

3.2.1 การเตรียมหัวเชื้อเริ่มต้น

นำหัวเชื้อเริ่มต้นหรือหัวเชื้อเหลวใส่ลงในหม้อนึ่งเพื่อทำการเพาะเลี้ยง โดยเตรียมขวดโหลแก้วขนาด 16 ออนซ์ ใส่ตัวหมอน 30 กรัม ที่ผ่านการอบ 2-3 ชั่วโมง และนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที จากนั้นถ่ายเชื้อปริมาตร 5 มิลลิลิตรลงบนหมอนเลี้ยงในขวดแก้ว แล้วนำไปเพาะเลี้ยงในที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ความชื้นร้อยละ 85-90 ในที่มืด ทิ้งให้เส้นใยเจริญเต็มหมอน เป็นเวลา 12 วัน (คันสุนีย์และคณะ, 2560)

3.2.2 การเตรียมหัวเชื้อในอาหารแข็ง PDA เสริม

นำฟรุตติงบอดี้ที่ได้มาทำการฆ่าเชื้อด้วยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ความเข้มข้นร้อยละ 3 เป็นเวลา 3 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว จากนั้นตัดเป็นชิ้นเล็กๆ ความยาวประมาณ 1 เซนติเมตร และวางบนอาหารแข็ง PDA เสริม (องค์ประกอบของอาหารแข็ง PDA เสริม แสดงดังภาคผนวก 1ก) จากนั้นนำไปเลี้ยงในที่มืด ที่อุณหภูมิ 18 องศาเซลเซียส (คันสุนีย์และคณะ, 2560)

3.2.3 การเตรียมหัวเชื้อในอาหารเหลว PDB เสริม

นำหัวเชื้อเริ่มต้นจากอาหารแข็ง PDA มาเจาะโดยใช้ Cork Borer จำนวนทั้งหมด 4 ชิ้นเลี้ยงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ซึ่งมีอาหารเหลว PDB เสริม (องค์ประกอบของอาหารเหลว PDB เสริม แสดงดังภาคผนวก 2ก) อยู่ 105 มิลลิลิตร ทำการเพาะเลี้ยงในที่มืดในเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 179 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 96 ชั่วโมงเพื่อนำมาใช้เป็นหัวเชื้อในครั้งถัดไป (คันสุนีย์และคณะ, 2560)

3.2.4 การเตรียมหัวเชื้อในอาหารแข็งในข้าวไรซ์เบอร์รี่

นำอาหารเหลว PDB เสริมสำหรับใส่ในข้าวไรซ์เบอร์รี่ (องค์ประกอบของอาหารเหลว PDB เสริมสำหรับใส่ในข้าวไรซ์เบอร์รี่ แสดงดังภาคผนวก 3ก) ปริมาตร 60 มิลลิลิตร ผสมกับข้าวไรซ์เบอร์รี่ 40 กรัม และนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที จากนั้นถ่ายเชื้อปริมาตร 5 มิลลิลิตร แล้วนำไปเพาะเลี้ยงในที่มืดที่อุณหภูมิ 18 องศาเซลเซียส จนเส้นใยเจริญเต็มอาหารและ

นำไปเลี้ยงต่อในที่ที่มีแสงหลังจากเส้นใยเจริญเต็มอาหาร นำไปเลี้ยงต่อในที่ที่มีแสง เมื่อเวลาผ่านไปประมาณ 14 วัน จะทำการฉีดฮอร์โมน และนำไปเลี้ยงต่อไปจนสามารถเก็บฟรุตติ้งบอดีได้ ประมาณ 15 วัน (คันสนีย์และคณะ, 2560)

3.2.5 การเก็บเกี่ยว

ทำแห้งด้วยเครื่องอบแห้งแบบสุญญากาศ (vacuum oven) อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 ชั่วโมง ทำการบันทึกน้ำหนักแห้ง และนำไปบดให้เป็นผงละเอียดด้วยโกร่งบดยา เพื่อเก็บไว้ใช้ในการศึกษาขั้นต่อไป (คันสนีย์และคณะ, 2560)

3.3 การศึกษาอุณหภูมิและเวลาการเก็บรักษา โดยทำการแปรผันปัจจัย

การเก็บรักษาตัวอย่างที่ทดสอบในสภาวะที่รุนแรงซึ่งเป็นผลิตขนาดเล็กหรือในระดับห้องปฏิบัติการช่วงเวลาการศึกษาคือ 0, 1, 2 และ 3 เดือน (ดัดแปลงมาจาก ชนินดา, 2015) อุณหภูมิเกณฑ์เกณฑ์ทุกประเภทควรเก็บรักษาในสภาวะอุณหภูมิที่เหมาะสม โดยอุณหภูมิที่แนะนำสำหรับการเก็บรักษาเกณฑ์เกณฑ์มี 3 สภาวะได้แก่ อุณหภูมิห้อง (25 องศาเซลเซียส) อุณหภูมิที่เย็นจัด (4 องศาเซลเซียส) และอุณหภูมิที่อุ่น (37 องศาเซลเซียส) ขึ้นกับเกณฑ์เกณฑ์แต่ละชนิด (ดัดแปลงมาจาก ศศิประภา, 2018) เก็บตัวอย่างแคปซูลในภาชนะที่ปิดมิดชิด พันแสงแดด (ดัดแปลงจาก Chutvirasakul และคณะ, 2017)

3.4 การศึกษาสารสำคัญในถั่งเช่าหิมะ

3.4.1 การวิเคราะห์ปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากฟรุตติ้งบอดีแห้ง

นำไปวิเคราะห์ปริมาณอะดีโนซีนและคอร์โดเซปินด้วยเครื่องแยกของเหลวสมรรถนะสูง (high performance liquid chromatography) Waters 600 Controller ระบบฉีดสาร อัตโนมัตินแบบ Waters 717 Plus Autosampler ชนิดตัวตรวจวัด Waters 2996 Photodiode Array Detector ที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร สภาวะในการวิเคราะห์ปริมาณสาร ใช้เฟสเคลื่อนที่ในอัตราส่วนของเมทานอลต่อน้ำเท่ากับ 15:85 อัตราการไหลที่ 1 มิลลิลิตรต่อนาที ปริมาณสารที่ใช้ฉีดตัวอย่าง 10 ไมโครลิตร ใช้คอลัมน์ Phenomenex Luna C18 (2) ขนาด 2.60×150.00 มิลลิเมตร สารมาตรฐานอะดีโนซีนและคอร์โดเซปินของ Sigma-Aldrich (ดัดแปลงจาก รัฐพลและกิตติพล, 2018)

3.4.2 การวิเคราะห์ปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ด้วยวิธีแอนโทรน (Dreywood, 1946)

เติมสารตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร จากนั้นนำหลอดทิ้งไว้ที่น้ำแข็งรอจนเย็น เติมสาร แอนโทรน (การเตรียมสารแสดงดังภาคผนวก 1ข) 5 มิลลิลิตร ต่อจากนั้นนำไปแช่ที่อ่างน้ำเดือดเป็นเวลา 10 นาที หลังจากการให้ความร้อน ทำให้เย็นลงในอ่างน้ำแข็งอีกครั้ง วัดค่าดูดกลืนแสงที่ 620 นาโนเมตร โดยใช้เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง เทียบกับกราฟมาตรฐานกลูโคส (ดัดแปลงจาก Leyva และคณะ, 2008)

3.4.3 การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS

เอกสารนี้เป็นเอกสารหลวงในสํานักการชั่งนเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การเตรียมสารละลายเข้มข้น ABTS 7 มิลลิโมลลาร์ และโพแทสเซียมเปอร์ซัลเฟต 2.4 มิลลิโมลลาร์ (การเตรียมสารแสดงตั้งภาคผนวก 2ข) ผสมสารละลายทั้งสองในปริมาณที่เท่ากันและปล่อยให้ทำปฏิกิริยาเป็นเวลา 12-16 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง ในที่มืด เจือจางด้วยการผสมสารละลาย ABTS กับน้ำกลั่น ด้วยอัตราส่วนประมาณ 2 มิลลิลิตร ต่อ 50 มิลลิลิตร ตามลำดับ นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงให้มีค่าเท่ากับ 0.700 ± 0.02 ที่ 734 นาโนเมตร โดยใช้เครื่องอ่านปฏิกิริยาไมโครเพลท ใช้ตัวอย่าง 0.1 มิลลิลิตรลงไมโครเพลท 96 หลุม ทำปฏิกิริยากับสารละลาย ABTS 0.1 มิลลิลิตร เป็นเวลา 15 นาทีในที่มืด วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 734 นาโนเมตร โดยใช้เครื่องอ่านปฏิกิริยาไมโครเพลท (ดัดแปลงจาก Khan และคณะ, 2017)

$$\% \text{ Inhibition} = (A_{\text{blank}} - A_{\text{sample}}) / A_{\text{blank}} \times 100\%$$

โดย A_{blank} คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายที่ปราศจากตัวอย่าง

A_{sample} คือ ค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่าง

จากนั้นนำค่า % Inhibition มาทำเป็นกราฟเส้นโค้ง นำส่วนของเส้นตรงที่สุดมาทำกราฟเส้นตรงอีกครั้งเพื่อให้ได้สมการเส้นออกมา แล้วนำไปคำนวณด้วยสูตร $IC_{50} = 50/\text{สมการเส้นตรง}$

3.4.4 การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH

นำตัวอย่างที่ความเข้มข้นต่างๆมา 0.1 มิลลิลิตรลงไมโครเพลท 96 หลุม เติม DPPH (การเตรียมสารแสดงตั้งภาคผนวก 2ข) ที่ละลายด้วยเมทานอลปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ 30 นาทีในที่มืด วัดค่าดูดกลืนแสงที่ 517 นาโนเมตร (ดัดแปลงจาก Khan และคณะ, 2017)

$$\% \text{ Inhibition} = (A_{\text{blank}} - A_{\text{sample}}) / A_{\text{blank}} \times 100\%$$

โดย A_{blank} คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายที่ปราศจากตัวอย่าง

A_{sample} คือ ค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่าง

จากนั้นนำค่า % Inhibition มาทำเป็นกราฟเส้นโค้ง นำส่วนของเส้นตรงที่สุดมาทำกราฟเส้นตรงอีกครั้งเพื่อให้ได้สมการเส้นออกมา แล้วนำไปคำนวณด้วยสูตร $IC_{50} = 50/\text{สมการเส้นตรง}$

3.5 การวิเคราะห์ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

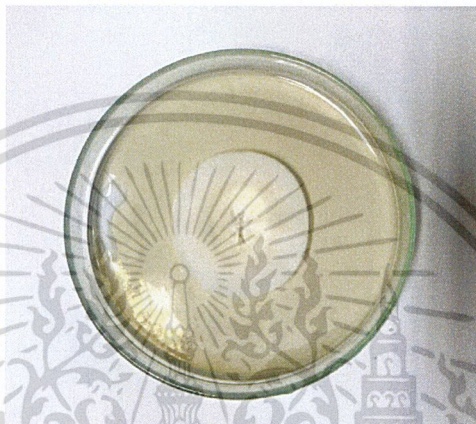
ทำการวางแผนการทดลองแบบ Factorial experiments ที่มีปัจจัยที่ศึกษา 2 ปัจจัย คือ อุณหภูมิและเวลาที่ใช้ในการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ ซึ่งนำมาวิเคราะห์ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์สำเร็จรูป Minitab ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 (แสดงตั้งภาคผนวก ค)

บทที่ 4

ผลการทดลองและวิจารณ์

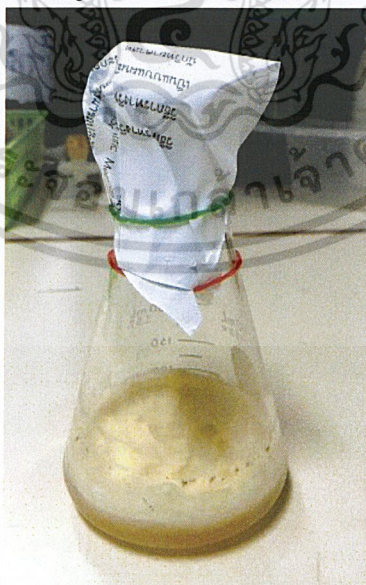
4.1 ผลการศึกษาการเพาะเลี้ยงถั่วงอกเห็ด

จากการศึกษาการเจริญเติบโตของหัวเชื้อเริ่มต้นและลักษณะเส้นใยของถั่วงอกเห็ดที่เจริญบนอาหารแข็ง PDA ดังแสดงในรูปที่ 4.1 พบว่าเมื่อทำการเพาะเลี้ยงในที่มืด ที่อุณหภูมิ 18 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 วัน พบว่ามีลักษณะเส้นใยสีขาว มีการแผ่กระจายเป็นวงกลมคล้ายก้อน สำหรับรอบชั้นส่วนของหัวเชื้อเริ่มต้น



รูปที่ 4.1 ลักษณะเส้นใยถั่วงอกเห็ดที่เจริญบนอาหารแข็ง PDA

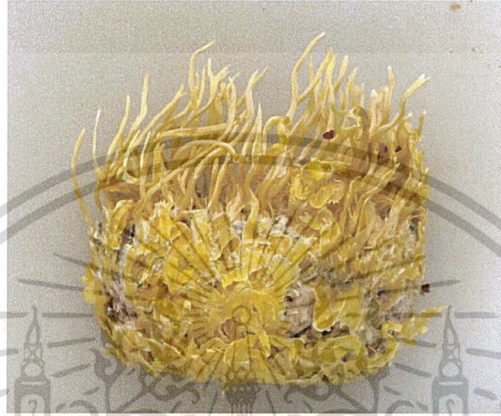
การศึกษาระยะการเจริญเติบโตของหัวเชื้อเริ่มต้นในอาหารเหลว PDB เสริมเป็นระยะเวลา 96 ชั่วโมง ที่ทำการเพาะเลี้ยงในที่มืดที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 179 รอบต่อนาที ดังแสดงใน รูปที่ 4.2 พบว่าอาหารเหลว PDB เสริมมีลักษณะที่ขุ่นขึ้น เนื่องจากเส้นใยของถั่วงอกเห็ดมีการเจริญเติบโตและเพิ่มปริมาณมากขึ้น



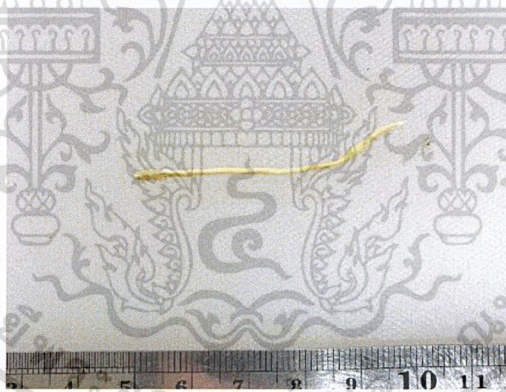
รูปที่ 4.2 ลักษณะเส้นใยถั่วงอกเห็ดที่เจริญในอาหารเหลว PDB เสริม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การศึกษาระยะเวลาการเจริญเติบโตของหัวเชื้อเริ่มต้นถั่งเช่าหิมะในอาหารเลี้ยงเชื้อสภาวะแห้งที่มีข้าวไรซ์เบอร์รี่เป็นแหล่งคาร์บอนและเสริมด้วยอาหารเหลว PDB เสริม ทำการเพาะเลี้ยงในที่มืดอุณหภูมิ 18 องศาเซลเซียสเป็นเวลาประมาณ 14 วัน ต่อมาพบว่าเมื่อนำมาเปิดฟรุติจิงบอดี้ในที่ที่มีแสงสว่างอุณหภูมิ 22-25 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5-7 วัน จะเกิดฟรุติจิงบอดี้เป็นลักษณะเส้นขึ้นมา จากนั้นเมื่อทำการเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลาประมาณ 14 วัน และเมื่อครบเวลาประมาณ 30 วัน ถั่งเช่าหิมะจะมีการเจริญเติบโตเต็มที่ ฟรุติจิงบอดี้ของเห็ดถั่งเช่าหิมะจะมีลักษณะสูงยาว สีเหลือง ดังแสดงใน รูปที่ 4.3 และความยาวที่เฉลี่ยได้อยู่ที่ 3-5 เซนติเมตร ดังแสดงในรูป 4.4



รูปที่ 4.3 ลักษณะของถั่งเช่าหิมะบนอาหารเลี้ยงเชื้อสภาวะแห้งที่มีข้าวไรซ์เบอร์รี่เป็นแหล่งคาร์บอนและเสริมด้วยอาหารเหลว PDB เสริมเป็นระยะเวลา 30 วัน



รูปที่ 4.4 ลักษณะความยาวของถั่งเช่าหิมะ เป็นระยะเวลา 30 วัน

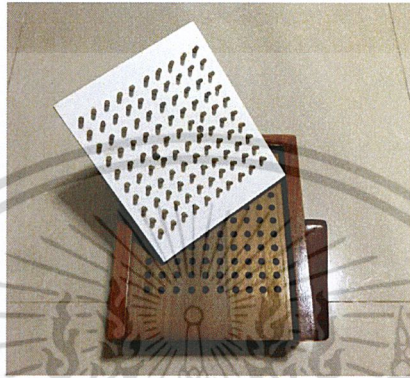


รูปที่ 4.5 ลักษณะของถั่งเช่าหิมะที่ผ่านการอบแห้งแบบสุญญากาศ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 ชั่วโมง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์เอาไว้ซึ่งวงเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่สามารถนำไปใช้ประโยชน์ด้านอื่นๆ
 หมายเหตุ: หากมีข้อผิดพลาดประการใดขออภัยเป็นอย่างสูงและต้องอภัยถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การศึกษาระยะการเจริญเติบโตของหัวเชื้อเริ่มต้นถึงเข้าหิมะในอาหารเลี้ยงเชื้อสภาวะแห้งที่มีข้าวไรซ์เบอร์รี่เป็นแหล่งคาร์บอนและเสริมด้วยอาหารเหลว PDB เสริม หลังจากเก็บเกี่ยวฟรุตติงบอดีที่เจริญเติบโตเต็มที่แล้ว ทำแห้งด้วยเครื่องอบแห้งแบบสุญญากาศ (vacuum oven) อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 ชั่วโมง ดังแสดงในรูป 4.5

การศึกษาปริมาณสารโดยทำการบดผงถึงเข้าจากฟรุตติงบอดีและบรรจุลงแคปซูลด้วยเครื่องอัดแคปซูลยาแบบไม้ ขนาด 100 แคปซูล เบอร์ 1 ดังแสดงในรูป 4.6 เมื่อบรรจุเสร็จแล้ว ดังแสดงในรูป 4.7



รูปที่ 4.6 เครื่องอัดแคปซูลยาแบบไม้ ขนาด 100 แคปซูล เบอร์ 1



รูปที่ 4.7 ลักษณะของผงถึงเข้าที่ผ่านการบดและบรรจุอยู่ในแคปซูลสีที่ทำจากสำปะหลัง

4.2 ผลการศึกษาการวิเคราะห์สารสำคัญในถึงเข้าหิมะ

4.2.1 ผลการศึกษาปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากฟรุตติงบอดีของถึงเข้าหิมะ

จากการศึกษาปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากฟรุตติงบอดีของถึงเข้าหิมะ พบว่าปริมาณของสารอะดีโนซีนของการวัดที่เดือน 0 เท่ากับ 10.608 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง และหลังจากทำการเก็บรักษาในเวลาและอุณหภูมิที่แตกต่างกัน เดือนที่ 1 ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส มีปริมาณสารอะดีโนซีนมากที่สุดเท่ากับ 8.910 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง มีการลดลงร้อยละ 16 ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ จากการรายงานพบว่าสอดคล้องกับการวิจัยของ Li และคณะ (2015) การให้ความร้อนกับถึงเข้าสีทองมีผลทำให้สารอะดีโนซีนนั้นไม่เสถียรเมื่อถูกทำให้ร้อน ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส การลดลงของสารอะดีโนซีนที่ผ่านกระบวนการให้ความร้อนทั้งหมดทำให้ปริมาณสารของอะดีโนซีนลดลงประมาณร้อยละ 70 - 75 ซึ่งมีสอดคล้องกับงานวิจัยของ เอกสารเป็นเอกสารทงสงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า Singpoonga และคณะ (2017) การเก็บรักษาเห็ดถึงเข้าสีทองในถุงพ้อยล์แบบซีลล๊อคที่อุณหภูมิ 5 °C ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

และ 30 องศาเซลเซียส พบว่าที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส ทำให้ปริมาณสารอะดีโนซีนเปลี่ยนแปลงน้อยที่สุด

ตารางที่ 4.1 ปริมาณสารสำคัญของสารอะดีโนซีน ที่เวลา 1, 2, และ 3 เดือน อุณหภูมิ 4, 25 และ 37 องศาเซลเซียส โดยใช้วิธีการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC

เวลา (เดือน)	ปริมาณสารอะดีโนซีนของถั่วงาหิมะ (มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง)		
	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)		
	4	25	37
1	4.168±0.184 ^{bc}	8.910±0.290 ^a	5.828±2.634 ^b
3	2.169±0.018 ^c	1.916±0.086 ^c	1.418±0.034 ^c

หมายเหตุ : ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแนวแถวและคอลัมน์ หมายถึงมีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

จากการศึกษาปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากพืชรดตั้งบอดี้ของถั่วงาหิมะ พบว่าปริมาณของสารคอร์โดเซปินของการวัดที่เดือน 0 เท่ากับ 1.044 กรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง และหลังจากทำการเก็บรักษาในเวลาและอุณหภูมิที่แตกต่างกัน เดือนที่ 1 อุณหภูมิที่ 25 องศาเซลเซียส มีปริมาณสารคอร์โดเซปินมากที่สุดเท่ากับ 1.039 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง มีการลดลงร้อยละ 0.415 ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ จากการรายงานพบว่าสอดคล้องกับการวิจัยของ Li และคณะ (2015) การให้ความร้อนกับถั่วงาหิมะมีผลเพียงเล็กน้อยต่อปริมาณสารของคอร์โดเซปิน ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส การลดลงของสารอะดีโนซีนที่ผ่านกระบวนการให้ความร้อนทั้งหมดทำให้ปริมาณสารของคอร์โดเซปินลดลงประมาณร้อยละ 3.1 ดังนั้นจึงไม่พบการลดลงของสารคอร์โดเซปินซึ่งมีความแตกต่างจากงานวิจัยของ Singpoonga และคณะ (2017) การเก็บรักษาหัตถ์ถั่วงาหิมะในถุงพอยล์แบบซิปล็อคที่อุณหภูมิ 5 และ 30 องศาเซลเซียส พบว่าที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส ทำให้ปริมาณสารอะดีโนซีนเปลี่ยนแปลงน้อยที่สุด

ตารางที่ 4.2 ปริมาณสารสำคัญของสารคอร์โดเซปิน ที่เวลา 1, 2, และ 3 เดือน อุณหภูมิ 4, 25 และ 37 องศาเซลเซียส โดยใช้วิธีการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC

เวลา (เดือน)	ปริมาณสารคอร์โดเซปินของถั่วงาหิมะ (มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง)		
	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)		
	4	25	37
1	0.498±0.032 ^{bc}	1.039±0.047 ^a	0.721±0.323 ^{ab}
3	0.330±0.111 ^{bc}	0.419±0.220 ^{bc}	0.229±0.007 ^c

หมายเหตุ : ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแนวแถวและคอลัมน์ หมายถึงมีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2.2 ผลการศึกษาปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ด้วยวิธีแอนโทรน

จากการศึกษาปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์จากฟรุตติ้งบอดีของถั่งเช่าหิมะ พบว่าปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ของการวัดที่เดือน 0 คือ 14.442 กรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง และหลังจากทำการเก็บรักษาในเวลาและอุณหภูมิที่แตกต่างกัน เดือน 3 ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสมีปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์สูงที่สุดซึ่งมีค่า เท่ากับ 16.440 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง มีสารเพิ่มขึ้นร้อยละ 12.153 ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับงานวิจัยของ Xu และคณะ (2006) โดยในถั่งเช่าหิมะสารสกัดพอลิแซ็กคาไรด์ที่พบซึ่งสารสูงถึง 21.06 กรัม ซึ่งมีความแตกต่างกับงานวิจัยของ สุขุมและคณะ (2559) การเก็บรักษาในระยะเวลา 3 เดือน อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส พบว่าปริมาณสารมีค่าคงตัวตลอดจนอายุการเก็บรักษา และงานวิจัยของสรวิศและคณะ (2013) พบว่าปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์หลังจากเก็บรักษาเป็นเวลา 12 เดือน อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส มีปริมาณสารลดลง ตารางที่ 4.3 ปริมาณสารสำคัญของสารพอลิแซ็กคาไรด์ ที่เวลา 1, 2, และ 3 เดือน อุณหภูมิ 4, 25 และ 37 องศาเซลเซียส โดยใช้วิธีแอนโทรน

เวลา (เดือน)	ปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ (มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง)		
	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)		
	4	25	37
1	13.262±1.069 ^d	12.309±0.217 ^e	13.340±0.649 ^d
2	15.696±1.148 ^b	13.079±1.783 ^d	13.342±1.341 ^d
3	16.440±1.562 ^a	11.864±2.250 ^e	14.590±0.489 ^c

หมายเหตุ : ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแนวแถวและคอลัมน์ หมายถึงมีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

4.2.3 ผลการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ABTS

จากการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS จากฟรุตติ้งบอดีของถั่งเช่าหิมะ พบว่าในการวัดที่เดือน 0 มีค่าการยับยั้งอนุมูลอิสระที่ร้อยละ 50 (IC₅₀) ได้ดีที่สุดเท่ากับ 0.721 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และหลังจากทำการเก็บรักษาในเวลาและอุณหภูมิที่แตกต่างกัน เดือนที่ 2 อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส มีค่า IC₅₀ ได้ดีที่สุดเท่ากับ 0.353 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีค่าการยับยั้งอนุมูลอิสระเพิ่มขึ้นร้อยละ 51.04 ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับงานวิจัยของ Sharma (2015) พบว่า สารสกัดส่วนสารพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตแล้วเก็บในเซลล์ (IPS) มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุด โดยมีค่า EC₅₀ เท่ากับ 3.11 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งแตกต่างกับงานวิจัยของวลัยภรณ์ (2560) กิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS ของส้มโอดัดแต่งเมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 และ 35 องศาเซลเซียส พบว่าเมื่อระยะเวลาการเก็บรักษานานขึ้นทำให้กิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระลดลง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.4 ปริมาณสารสำคัญในการออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ABTS ที่เวลา 1, 2, และ 3 เดือน อุณหภูมิ 4, 25 และ 37 องศาเซลเซียส

เวลา (เดือน)	ปริมาณค่า IC ₅₀ (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)		
	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)		
	4	25	37
1	0.592±0.026 ^{de}	0.600±0.008 ^{de}	0.540±0.015 ^{cd}
2	0.469±0.029 ^b	0.353±0.017 ^a	0.653±0.025 ^e
3	0.521±0.007 ^{bc}	0.576±0.014 ^{cd}	0.589±0.034 ^d

หมายเหตุ : ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแนวแถวและคอลัมน์ หมายถึงมีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

IC₅₀ หมายถึง ค่าการยับยั้งอนุมูลอิสระที่ร้อยละ 50

4.2.4 ผลการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH

จากการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH จากฟรุตติ้งบอดีของถั่งเช่าหิมะ พบว่าในการวัดที่เดือน 0 มีค่าการยับยั้งอนุมูลอิสระที่ร้อยละ 50 (IC₅₀) ได้ดีที่สุดเท่ากับ 0.603 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และหลังจากทำการเก็บรักษาในเวลาและอุณหภูมิที่แตกต่างกัน เดือนที่ 1 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส มีค่า IC₅₀ ได้ดีที่สุด คือ 0.440 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีค่าการยับยั้งอนุมูลอิสระเพิ่มขึ้นร้อยละ 27.03 ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับงานวิจัยของ Sharma (2015) พบว่าสารสกัดส่วนสารพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตแล้วเก็บในเซลล์ (IPS) มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH สูงที่สุดโดยมีค่า EC₅₀ เท่ากับ 2.71 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และเมื่อเปรียบเทียบกับงานวิจัยของ บัลกิสและคณะ (2560) การต้านอนุมูลอิสระจากสารสกัดใบมะรุุม ทดสอบความคงตัวในสภาวะเร่งและสภาวะที่ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 วัน มีค่าการยับยั้งอนุมูลอิสระที่มีความคงตัวที่ดีเมื่อเทียบกับตำรับควบคุมที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 วัน

ตารางที่ 4.5 ปริมาณสารสำคัญในการออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ที่เวลา 1, 2, และ 3 เดือน อุณหภูมิ 4, 25 และ 37 องศาเซลเซียส

เวลา (เดือน)	ปริมาณค่า IC ₅₀ (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)		
	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)		
	4	25	37
1	0.560±0.035 ^{bc}	0.529±0.021 ^{abc}	0.440±0.006 ^a
2	0.478±0.008 ^{ab}	0.471±0.004 ^{ab}	0.599±0.024 ^c
3	0.873±0.062 ^d	0.477±0.011 ^{ab}	1.146±0.091 ^e

หมายเหตุ : ตัวอักษรหลังตัวเลขแสดงถึงความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

IC₅₀ หมายถึง ค่าการยับยั้งอนุมูลอิสระที่ร้อยละ 50

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์หรือการเชิงพาณิชย์เพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

ในการศึกษาความคงตัว และการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ผงถั่งเช่าหิมะบรรจุแคปซูล โดยการวิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญซึ่งก็คือ อะดีโนซีน คอร์ไดเซปิน พอลิแซ็กคาไรด์ และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ จากการทดสอบเพื่อหาสารสำคัญด้วยเครื่อง HPLC พบว่าการเก็บรักษาสารอะดีโนซีนและสารอะดีโนซีนที่มีปริมาณมากที่สุด พบในเดือน 1 อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส จากการทดสอบเพื่อหาปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์โดยวิธีการทดสอบแบบแอนโทรน พบว่าเดือน 3 อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส มีปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์มากที่สุด จากการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS พบว่าเดือนที่ 2 อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส มีค่าการยับยั้งอนุมูลอิสระร้อยละ 50 ได้ดีที่สุด และด้วยวิธี DPPH พบว่าเดือนที่ 1 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส มีค่าการยับยั้งอนุมูลอิสระร้อยละ 50 ได้ดีที่สุด

5.2 ข้อเสนอแนะ

ในการเพาะเลี้ยงถั่งเช่าหิมะเพื่อศึกษาความคงตัวและการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ผงถั่งเช่าหิมะบรรจุแคปซูล พบว่าการเก็บรักษาในปัจจุบันที่แตกต่างกัน ไม่ควรทำการทดสอบที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเพราะว่าเนื่องจากมีความชื้นเข้ามาเกี่ยวข้องทำให้ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานที่ไม่คงที่ ควรทำการเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิห้องซึ่งเป็นสภาวะปกติของการเก็บรักษาแคปซูลโดยทั่วไปและสภาวะเร่งที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส (ราณี, 2557)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

- กิตติพัฒน์ ไสภิตธรรมคุณ และ ปานทิพย์ รัตนศิลป์กุลชาญ. 2560. การสกัดและวิธีวัดความสามารถ การต้านอนุมูลอิสระในพืชสมุนไพร. ว. วิทย. เทคโนโลยี. หัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ. 3(1): 86-94
- ชนินดา เพชรสังฆาต. 2015. การศึกษาความคงสภาพของผลิตภัณฑ์ยา. R&D Newsletter. 22(3): 22-25.
- ธัญญา เกณฑ์ขุนทด, ศุภทา ไชยพัฒน์ และเสาวรส กองศรี. 2016. การพัฒนาผลิตภัณฑ์เครื่องดื่ม จากเห็ดถั่งเช่าสีทอง. การประชุมวิชาการระดับชาติ มหาวิทยาลัยรังสิต. หน้า 460-467.
- ธัญญา ทะพิงค์แก. 2555. รู้จักกับเห็ดสกุลถั่งเช่า. เคหะการเกษตร. 36(4): 113-117.
- ธัญญา ทะพิงค์แก, มงคล ยะไชย และวรรณพร ทะพิงค์แก. 2556. รายงานวิจัยเรื่องผลของวิธี เพาะเลี้ยงต่อการผลิตสารคอร์ไดเซปินในเห็ดถั่งเช่าสีทอง. เชียงใหม่ : มหาวิทยาลัยราชภัฏ เชียงใหม่.
- ธัญญา ทะพิงค์แก. 2559. การเพาะถั่งเช่าเป็นอาชีพ. พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพฯ : มิตรเกษตรการตลาด และโฆษณา - อีพ ดีไซน์.
- ธวัชชัย แพชมัด. 2548. การควบคุมการปลดปล่อยยาจากแคปซูลด้วยระบบ polyelectrolyte complex ระหว่างโคโตแซนและพอลิเมอร์ที่มีประจุลบ. คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัย ศิลปากร:กรุงเทพฯ.
- นุกูล อินทร์สังขา. 2551. วิทยาเชื้อรา = Mycology. พิมพ์ครั้งที่ 1. สงขลา : โครงการส่งเสริมการ ผลิตเอกสารวิชาการ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยทักษิณ.
- บัลกีสมามะ, นูร์ซัน นิสัน, ศุภรัตน์ ดวนใหญ่ และสุชาติ มานอก. 2560. การพัฒนาผลิตภัณฑ์เครื่อง สาอางจากโสมที่พบในชุมชนศรีภูมิในพื้นที่ฝั่งธนบุรี. เกษศาสตร์อีสาน. 13(2): 80-89.
- บุหรัน พันธุ์สวรรค์. 2556. อนุมูลอิสระ สารต้านอนุมูลอิสระ และการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ. วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี. 21(3): 275-286.
- ปริญญา เพิ่มลาภ และจุฬาภา เรื่องวัฒนาโชค. 2016. ฉลาดใช้ยา. นิตยสารวาไรตี้เพื่อสุขภาพ @Rama. 27: 18.
- ปรียนันท์ บัวสด. 2549. การตรวจสอบความสามารถในการเป็นสารแอนติออกซิแดนซ์ของเครื่องดื่ม ชาโดยวิธีไฮคลิกโวลแทมเมตรี. วิทยานิพนธ์ปริญญาโทมหาบัณฑิต. มหาวิทยาลัยศิลปากร.
- พรรณี เต็นรุ่งเรือง. 2550. ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของเปลือกต้นวงศ์อบเชย (Lauraceae). รายงาน ผลงานวิจัยประจำปีพ.ศ. 2550. สำนักวิจัยการจัดการป่าไม้และผลิตผลป่าไม้. กรมป่าไม้. หน้า 19-26.
- ภัทระ ฉลาดแพทย์ และ วชิระ จิง. 2555. มหัศจรรย์เห็ด อาหารอายุวัฒนะและเป็นยาที่ทางการแพทย์ยอมรับ = Medicinal mushrooms. กรุงเทพฯ : ริช ฟับลิชซิง.
- รัฐพล ศรประเสริฐ และกิตติพล กลสิการ์. 2018. การเลี้ยงถั่งเช่าสีทอง (*Cordyceps militaris* (L.) Link) ด้วยไซโตบและไซสุกจากสัตว์ปีก. วารสารวิทยาศาสตร์ มข. 46(2): 248-255.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- ราณี หวังถวัลย์, ชัชวาล วัชรารเรืองวิทย์, วรพจน์ สุนทรสุข และประเวทย์ ต้อยเต็มวงศ์. 2557. การศึกษาดัชนีชี้วัดการเสื่อมเสียและการทำนายอายุการเก็บของข้าวแต่น้ำสมุนไพรอบเนย. วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร. 45(2): 693-696.
- วัลย์ภรณ์ โท้นพราหม์. 2560. การศึกษาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ และกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระใน ผลส้มโอสด ส้มโอตัดแต่ง และน้ำส้มโอพั่นที่ช่วยย่อย. วิทยานิพนธ์สาขาวิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีอาหารบัณฑิตวิทยาลัย. มหาวิทยาลัยนเรศวร.
- วสันต์ ชุณหวิจิตร. 2014. ข้าวไรซ์เบอร์รี่. ข่าวสารเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 60(2): 27-32.
- วิธีมาตรฐานสำหรับการวิเคราะห์ยาชีววัตถุ เล่ม 2. 2558. พิมพ์ครั้งที่ 1. นนทบุรี. สถาบันชีววัตถุ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข.
- ศันสนีย์ ภูประกิจ, มาริสา จาคุพรพิพัฒน์, ณัฐวุฒิ รุ่งจินตามัย และอารี ฤทธิบุรณ์. 2560. สภาพที่เหมาะสมของการเตรียมหัวเชื้อเริ่มต้นสำหรับกระบวนการเพาะเลี้ยงเชื้อเห็ดโดยใช้วิธีพื้นผิวดอกบนอง. นเรศวรวิจัย ครั้งที่ 13: วิจัยและนวัตกรรม ขับเคลื่อนเศรษฐกิจและสังคม. หน้า 411-420.
- ศศิประภา ชิดรัตตา. 2561. ความคงสภาพของยา (Drug stability). กรุงเทพฯ. คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยสยาม.
- สุขุม สุขเกษม, ฉศก สุนทรรัตน์ และแพรวพรรณ เครือมิ่งกร. 2559. การศึกษาระยะเวลาการเก็บรักษาที่มีต่อคุณภาพของอาหารผสมเสร็จหมัก. กลุ่มวิจัยและพัฒนาความมั่นคงด้านอาหาร สัตว์. 1-11.
- สรวิศ แจ่มจำรูญ, สุพัตรา เปี่ยมวาริ, ธัญรัตน์ กางสงคราม, รัตนศิริ จิวานนท์, จันทรา ปานขวัญ และจิตตา สาตร์เพ็ชร. (2013). การวิจัยและพัฒนาการจัดการหลังการเก็บเกี่ยวเพื่อลดการสูญเสียของพืชสมุนไพรที่มีฤทธิ์ปรับสมดุลร่างกาย. Thailand Institute of Scientific and Technological Research. 43-50.
- อภิญา วรงค์แก้ว. 2545. ความหลากหลายทางชีวภาพของเชื้อราที่ทำลายแมลงในเขตอุทยานแห่งชาติน้ำหนาว. ขอนแก่น : วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. มหาวิทยาลัยขอนแก่น.
- Ahn, M.Y., Heo, J.E., Ryu, J.H., Jeong, H., Ji, S.D., Park, H.C. and Sim, H.S. 2008. Antioxidation activity of N-hydroxyethyl adenosine from *Isaria sinclairii*. International Journal of Industrial Entomology. 17(2): 197-200.
- Bhandari, A.K., Negi, J.S., Bisht, V.K., Rana, C. S., Bharti, M.K. and Sing, N. 2010. Chemical constituent, inorganic element and properties of *Cordyceps militaris*. Nature and Science. 8(9): 253-256.
- Chaicharoenaudomrung, N., Jaroonwitchawan, T. and Noisa, P. 2018. Cordycepin induces apoptotic cell death of human brain cancer through the modulation of autophagy. Toxicology in Vitro. 46: 113-121.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Chen, Y.J., Shiao, M.S., Lee, S.S. and Wang, S.Y. 1997. Effect of *Cordyceps sinensis* on the proliferation and differentiation of human leukemic U937 cells. *Life Sciences*. 60(25): 2349-2359.
- Chen, Z.A., Liu, G.Y. and Hu, S.Y. 1993. Studies on cultivation of *Paecilomyces cicadae* and its pharmacological function. *Acta Mycologica Sinica*. 12(2): 138-144.
- Cheng, D., Pan, P., Zhu, Y., Zhou, F. and Chen, Y. 2009. The parasitic fungus *Paecilomyces cicadae* from the cicadae flower and its anti-hsv activity. *Asian Journal of Traditional Medicines*. 4(6): 214-219.
- Choi, S., Lim, M.H., Kim, K.M., Jeon, B.H., Song, W.O. and Kim, T.W. 2011. Cordycepin-induced apoptosis and autophagy in breast cancer cells are independent of the estrogen receptor. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 257(2): 165-173.
- Chutvirasakul, B. Jongmeesuk, W. Tirasomboonsiri, P. Sansandee, N. and Tadtong, S. 2017. Stability indicating method to determine bioactive nucleosides in crude drugs, extracts, and products from *Cordyceps sinensis* and *Cordyceps militaris*. *Thai Journal of Pharmaceutical Sciences*. 41(2): 52-60.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. 2012. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard. McFarland Turbidity Standard. pp. 52-52.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. 2012. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Test; Approved Standard. Inoculum Preparation for Disk Diffusion Tests. pp. 11-12.
- Dai, G.W., Bao, T.T., Xu, G.F., Cooper, R. and Zhu, G.X. 2001. CordyMax™ Cs-4 improves steady-state bioenergy status in mouse liver. *Journal of Alternative and Complementary Medicine*. 7(3): 231-240.
- Das, S.K., Masuda, M., Sakurai, A. and Sakakibara, M., 2010. Medicinal uses of the mushroom *Cordyceps militaris*: current state and prospects. *Fitoterapia*. 81(8): 961-968.
- Dreywood, R. (1946). Qualitative test for carbohydrate material. *Industrial and Engineering Chemistry, Analytical Edition* 18: 499.
- Giese, E.C., Gascon, J., Anzelmo, G., Barbosa, A. M., Cunha, M.A.A., and Dekker, R.F.H. 2015. Free-radical scavenging properties and antioxidant activities of botryosphaeran and some other β -D-glucans. *International Journal of Biological Macromolecules*. 72: 125-130.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Gu, Y.X., Wang, Z.S., Li, S.X. and Yuan, Q.S. 2007. Effect of multiple factors on accumulation of nucleosides and bases in *Cordyceps militaris*. *Food Chemistry*. 102(4): 1304-1309.
- Halpern, G.M. 1999. *Cordyceps*, China's healing mushroom. Avery Publishing Group, New York. pp. 7-14.
- Han, H.C., Lindequist, U., Hyun, J.W., Kim, Y.H., An, H.S., Lee, D.H. and Kim, H.W. 2004. Apoptosis induction by 4-b-acetoxyscirpenediol from *Paecilomyces tenuipes* in human leukaemia cell lines. *Pharmazie* 59(9): 42-49.
- Holliday, J.C. and Cleaver, M.P., 2008. Medicinal value of the caterpillar fungi species of the genus *Cordyceps* (Fr.) link (Ascomycetes). *International Journal of Medical Mushrooms*. 10(3): 219-234.
- Hong, I. P., Nam, S.H., Sung, G.B., Chung, I.M., Hur, H., Lee, M.W., Kim, M.K. and Guo, S.X. 2007. Chemical components of *Paecilomyces tenuipes* (Peck) Samson. *Mycobiology*. 35(4): 215-218.
- Jian, Y.W., Qiao, X.Z. and Po, H.L. Inhibitory effects of ethyl acetate extract of *Cordyceps sinensis* mycelium on various cancer cells in culture and B16 melanoma in C57BL/6 mice. *Phytomedicine*. 14(1): 43-49.
- Jones, K. 1997. *Cordyceps*, tonic food of ancient China. Sylvan Press, Seattle. 13-16.
- Khan, A., Jan, G., Khan, A., Jan, F. G., Bahadur, A and Danish, M. 2017. In Vitro Antioxidant and Antimicrobial Activities of *Ephedra gerardiana* (Root and Stem) Crude Extract and Fractions. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 1-6.
- Khana, A.A., Gani, A., Masoodi, F.A., Mushtaq, U. and Naik, A.S. 2007. Structural, rheological, antioxidant, and functional properties of β -glucan extracted from edible mushrooms *Agaricus bisporus*, *Pleurotus ostreatus* and *Coprinus atramentarius*. *Bioactive Carbohydrates and Dietary*. 11: 67-74.
- Kondrashov, A., Meijer, H.A., Barthelet-Barateig, A., Parker, H.N., Khurshid, A., Tessier, S., Sicard, M., Knox, A.J., Pang, L. and de Moor, C.H. 2012. Inhibition of polyadenylation reduces inflammatory gene induction. *Rna*. 18: 2236-2250.
- Laurentin, A. and Edwards, C.A. 2003. A microtiter modification of the anthrone-sulfuric acid colorimetric assay for glucose-based carbohydrates. *Analytical biochemistry*. 315: 143-145.
- Leardkamolkarn, V., Thongthep, W., Suttiarporn, P., Kongkachuichai, R., Wongpornchai, S., & Wanavijitr, A. 2011. Chemopreventive properties of the bran extracted from a newly-developed Thai rice: The Riceberry. *Food Chemistry*. 125(3): 978-985.

- Lee, Y.H., Yoon, J.Y. and Urs, V.G. 2005. Spectrophotometric determination of ferrate (Fe(VI)) in water by ABTS. *Water Research* 39: 1946-1953.
- Lee, J. and Hong, S. 2011. Immunostimulating activity of the polysaccharides isolated from *Cordyceps militaris*. *International Immunopharmacological*. 11(9): 1226-1233.
- Leyva, A. Quintana, A. Sa´nchez, M., Rodri´guez, E.N. Cremata, J. and Sa´nchez, J.C. 2008. Rapid and sensitive anthrone sulfuric acid assay in microplate format to quantify carbohydrate in biopharmaceutical products Method development and validation. *Biologicals*. 36: 134-141.
- Li, S.P., Yang, F.Q. and Tsim, K.W.K. 2006. Quality control of *Cordyceps sinensis*, a valued traditional Chinese medicine. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 41(5): 1571-1584.
- Li, J., Guan, M. and Li. Y. 2015. Effects of Cooking on the Contents of Adenosine and Cordycepin in *Cordyceps Militaris*. *Procedia Engineering*. 102: 485-491.
- Li, Y., Li, R., Zhu, S., Zhou, R., Wang, L., Du, J., Wang, Y., Zhou, B. and Mai, L. 2015. Cordycepin induces apoptosis and autophagy in human neuroblastoma SK-N-SH and BE (2)-M17 cells. *Oncology letters*. 9(6): 2541-2547.
- Lim, K., Lee, C.H. and Cheng, E. 2012. Optimization of solid state culture conditions for the production of adenosine, cordycepin, and d-mannitol in fruiting bodies of medicinal caterpillar fungus *Cordyceps militaris* (L.:Fr.) Link (Ascomycetes). *International Journal of Medicinal Mushrooms*. 14(2): 181-187.
- Lin R., Liu H., Wu S., Pang L., Jia. M., Fan. K., Jia, S. and Jia, L. 2012. Production and in vitro antioxidant activity of exopolysaccharide by a mutant, *Cordyceps militaris*. *International Journal Bio Macromolecular*. 51(1): 153-157.
- Maconi, A., Pastorin, G., DA ROS, T., Spalluto, G., GAO, Z.G., Jacobson, K.A., Baraldi, P.G., Cacciari, B., Varani, K., Moro, S. and Borea P.A. 2002. Synthesis, biological properties, and molecular modeling investigation of the first potent, selective, and water-soluble human A(3) adenosine receptor antagonist. *Journal of Medical Chemistry*. 45(17): 3579–3582.
- Masuda, M., Urabe, E., Sakurai, A. and Sakakibara. M. 2006. Production of cordycepin by surface culture using the medicinal mushroom *Cordyceps militaris*. *Enzyme and Microbial Technology*. 39(4): 641-646.
- Min, B., McClung A.M. and Chen M.H. 2011. Phytochemicals and antioxidant capacities in rice brans of different color. *Journal of Food Science*. 76(1): 117-126.
- Nakamura, K., Yoshikawa, N., Yamaguchi, Y., Kagota, S., Shinozaka, K. and Kunitomo, M.

เอกสารนี้เป็นเอกสารต้นฉบับที่จัดทำขึ้นเพื่อใช้ในการศึกษาวิจัย การค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

and lung carcinoma cells involves adenosine A3 receptor stimulation. *Anticancer Research*. 26(1): 43-47.

Ng, T.B. and Wang, H.X. 2005. Pharmacological actions of *Cordyceps*, a prized folk medicine. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 57(12): 1509-1519.

Partain, E.M. 2000. Industrially important polysaccharides. In *Applied Polymer Science: 21st Century*. Netherlands. Elsevier Science.

Prangthip, P., Surasiang, R., Charoensiri, R., Leardkamolkarn, V., Komindr, S., Yamborisut, U., Vanavichit, A. and Kongkachuichai, R. 2013. Amelioration of hyperglycemia, hyperlipidemia, oxidative stress and inflammation in streptozotocin-induced diabetic rats fed a high fat diet by rice berry supplement. *Journal of Functional Food*. 5(1): 195-203.

Sapkota, K., Moon, S.M. Choi, B.S., Kim, S., Kim, Y.S. and Kim, S.J. 2011. Enhancement of IL-18 expression by *Paecilomyces tenuipes*. *Mycoscience*. 52(4): 260-267.

Sharma, S.K. 2015. Optimized Extraction and Antioxidant Activities of Polysaccharides from Two Entomogenous Fungi. *Journal of Bioanalysis & Biomedicine*. 7: 180-187.

Shen, Y., Cai, M., Xia, W., Liu, J., Zhang, Q., Xie, H., Wang, C., Wang, X. and Zheng, S. 2007. FTY720, a synthetic compound from *Isaria sinclairii*, inhibits proliferation and induces apoptosis in pancreatic cancer cells. *Cancer Letters*. 254(2): 288-297.

Shim, J.S., Min, E.G., Chang, H.R., Lee, C.Y., Kim, S.S. and Han, Y.H. 2000. Cytotoxicity against human cancer cell lines by *Paecilomyces tenuipes* DGUM 32001. *Korean Journal of Microbiology*. 36: 312-315.

Singpoonga, N. Chajprasart, P and Sangon, B. 2007. Influence of Dried *Cordyceps militaris* Storage on Physical and Chemical Qualities Changes. *Agricultural Sci*. 48(3): 265-268.

Suh, S.O., Noda, H. and Blackwell, M. 2001. Insect symbiosis: derivation of yeast-like endosymbionts within an entomopathogenic filamentous lineage. *Molecular Biology and Evolution*. 18(6): 995-1000.

Sun Biotech Co. Ltd. 2012. *Skin lotion*. [Online]. Available: http://www.caatomy.com/ca/product/iframe/iframe_sk_atomy6.asp. (14 June 2019)

Takano, F., Yahagi, N., Yahagi, R., Takada, S., Yamaguchi, M., Shoda, S., Murase, T., Fushiya, S. and Ohta, T. 2005. The liquid culture filtrates of *Paecilomyces tenuipes* (Peck) Samson (= *Isaria japonica* Yasuda) and *Paecilomyces cicadae* (Miquel) Samson (= *Isaria sinclairii* (Berk.) Llod) regulate Th1 and Th2 Cytokine response in murine Peyer's patch cells *in vitro* and *ex vivo*. *International Immunopharmacology*. 5(5): 903-916.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่เผยแพร่เพื่อประโยชน์ทางการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Tao, X., Ning, Y., Zhao, X., Pan, T, 2016. The effects of cordycepin on the cell proliferation, migration and apoptosis in human lung cancer cell lines A549 and NCIH460. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 68(7): 901-911.
- Tsia, F.H., Kitamura, Y. and Kokawa, M. 2017. Liquid-core alginate hydrogel beads loaded with functional compounds of radish by-products by reverse spherification : Optimization by response surface methodology. *International Journal of Biological Macromolecules*. 96: 600–610.
- Tuli, H.S., Sharma, A.K., Sandhu, S.S., Kashyap, D., 2013. Cordycepin: a bioactive metabolite with therapeutic potential. *Life Sci*. 93(23): 863–869.
- Wang, M., Liu, S., Ouyang, N., Song, E., Lutz, J. and Heemann, U.W.E. 2004. Protective effects of FTY720 on chronic allograft nephropathy by reducing late lymphocytic infiltration. *Kidney International*. 66(3): 1248-1256.
- Wang, F., Yin, P., Lu, Y., Zhou, Z., Jiang, C., Liu, Y. and Yu, X. 2015. Cordycepin prevents oxidative stress-induced inhibition of osteogenesis. *Oncotarget*. 6(34): 35496-35508.
- Wasser, S.P. 2002. Medicinal mushrooms as source of antitumor and immunomodulating polysaccharides. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 60(3): 258-274.
- Wiriyawattana, P., Suwonsichon, S. and Suwonsichon, T. 2018. Effects of drum drying on physical and antioxidant properties of riceberry flour. *Agriculture and Natural Resources*. 52(5): 445-450.
- Wu, F., Yan, H., Ma, X., Jia, J., Zhang, G., Guo, X. and Gui, Z. 2012. Comparison of the structural characterization and biological activity of acidic polysaccharides from *Cordyceps militaris* cultured with different media. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 28(5): 2029-2038.
- Xu, T.S., Wang, H.J., Xu, Q.R., Hua, Z.Y. and Lin, C.C. 2001. Biological characteristics of *Platylomia pieli*. *Forest Research*. 14(4): 396-402.
- Xu, C.P., Kim, S.W., Hwang, H.J. and Yun, J.W. 2006. Production of exopolysaccharides by submerged culture of an entomopathogenic fungus, *Paecilomyces tenuipes* C240 in stirred-tank and airlift reactors. *Bioresource Technology*. 97(5): 770–777.
- Yalin, W., Ishurd, O., Cuirong, S. and Yuanjiang, P. 2005. Structure analysis and antitumor activity of (1→3)-beta-d-glucans (cordyglucans) from the mycelia of *Cordyceps sinensis*. *Planta Medica*. 71(4): 381-384.
- Yu, R., Song, L., Zhao, Y., Bin, W., Wang, L., Zhang, H., Wu, Y., Ye, W. and Yao, X. 2004. Isolation and biological properties of polysaccharide CPS-1 from cultured *Cordyceps militaris*. *Fitoterapia*. 75(5): 465-472.

- Zhang, Z., Tudi, T., Liu, Y., Zhou, S., Feng, N., Yang, Y., Tang, C., Tang, Q. and Zhang, J. 2016. Preparative isolation of cordycepin, N6-(2-hydroxyethyl)-adenosine and adenosine from *Cordyceps militaris* by macroporous resin and purification by recycling high-speed counter-current chromatography. *Journal of Chromatography B*. 1033: 218-225.
- Zhu, J.S., Halpern, G.M. and Jones, K. 1998. The scientific rediscovery of an ancient Chinese herbal medicine: *Cordyceps sinensis* Part I. *Journal of Alternative and Complement Medicine*. 4(3): 289-303.



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาคผนวก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก อาหารเลี้ยงเชื้อ

ภาคผนวก 1ก องค์ประกอบของสูตรอาหาร Potato dextrose agar (PDA) เสริม (กรัม/ลิตร)

ส่วนประกอบ	กรัม/ลิตร
มันฝรั่งปอกเปลือกและหั่น	200
ข้าวโพดอ่อน	50
น้ำตาลกลูโคส	10
ยีสต์สกัด	5
เปปโตน	5
วุ้นบริสุทธิ	20

หมายเหตุ ส่วนผสมในอัตราส่วน 1 ลิตร

ต้มมันฝรั่งและข้าวโพดอ่อนในน้ำกลั่นเดือดเป็นเวลา 20 นาที จากนั้นกรองเอาน้ำ เติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร 1000 มิลลิลิตร จากนั้นเติมน้ำตาลกลูโคส ยีสต์สกัด เปปโตน และผงวุ้น คนให้เข้ากัน นำเข้าไมโครเวฟเพื่อให้วุ้นละลาย คนให้ทุกส่วนเป็นเนื้อเดียวกันอีกครั้ง นำไปฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

ภาคผนวก 2ก องค์ประกอบของสูตรอาหารเหลว Potato dextrose broth (PDB) เสริม (กรัม/ลิตร)

ส่วนประกอบ	กรัม/ลิตร
มันฝรั่งปอกเปลือกและหั่น	200
ข้าวโพดอ่อน	50
น้ำตาลกลูโคส	20
ยีสต์สกัด	5
เปปโตน	5

หมายเหตุ ส่วนผสมในอัตราส่วน 1 ลิตร

ต้มมันฝรั่งและข้าวโพดอ่อนในน้ำกลั่นเดือดเป็นเวลา 20 นาที จากนั้นกรองเอาน้ำ เติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร 1000 มิลลิลิตร จากนั้นเติมน้ำตาลกลูโคส ยีสต์สกัด และเปปโตน คนให้เข้ากัน เทใส่ขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ปริมาตร 105 มิลลิลิตร นำไปฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก 3ก องค์ประกอบของ Potato dextrose broth (PDB) เสริม สำหรับใส่ในข้าวไรซ์เบอร์รี่ (กรัม/ลิตร)

ส่วนประกอบ	กรัม/ลิตร
มันฝรั่งปอกเปลือกและหั่น	200
ข้าวโพดอ่อน	50
น้ำตาลกลูโคส	20
ยีสต์สกัด	5
เปปโตน	5
หนอน	30

หมายเหตุ ส่วนผสมในอัตราส่วน 1 ลิตร

ต้มมันฝรั่งและข้าวโพดอ่อนในน้ำกลั่นเดือดเป็นเวลา 20 นาที จากนั้นกรองใช้เฉพาะส่วนของเหลว เติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร 1000 มิลลิลิตร เติมน้ำที่ได้จากการต้มมันฝรั่งและข้าวโพดอ่อนลงในหนอนเล็กน้อยเพื่อบดหนอน กรองเอาน้ำที่ได้จากหนอนเทรวมกับน้ำที่ได้จากการต้มมันฝรั่งและข้าวโพดอ่อน จากนั้นเติมน้ำตาลกลูโคส ยีสต์สกัด และเปปโตน คนให้เข้ากัน นำอาหารเหลว PDB เสริมใส่ในข้าวไรซ์เบอร์รี่ ปริมาตร 60 มิลลิลิตร ผสมกับข้าวไรซ์เบอร์รี่ 40 กรัม และนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข

การเตรียมสารและการวิเคราะห์

ภาคผนวก 1x การวิเคราะห์ปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ด้วยวิธีแอนโทรน

การเตรียมการสกัด

ซึ่งตัวอย่างแห้ง 0.2 กรัม ต่อน้ำกลั่น 4 มิลลิลิตร นำไปต้ม 80 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 2 ชั่วโมง นำไปปั่นเหวี่ยง 5,000 g จากนั้นเก็บส่วนใส (ทิ้งตะกอน) ผสมร้อยละ 95 เอทานอล ในอัตราส่วนของส่วนใสต่อเอทานอลเท่ากับ 1 : 4 ทิ้งให้ตกตะกอน 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นำมาปั่นเหวี่ยงอีกครั้งที่ความเร็วรอบ 10,000 g เก็บตะกอน นำมาเป่าด้วยแก๊สไนโตรเจนเพื่อให้ตัวอย่างแห้ง อบจนตะกอนแห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที หาค่าน้ำหนักตะกอนโดยที่ต้องอบหลอดก่อนนำไปปั่นเหวี่ยง

สารเคมี

1. กรดซัลฟิวริกร้อยละ 75 : เตรียมโดยใส่น้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร ลงในขวดปรับปริมาตรขนาด 500 มิลลิลิตร ใส่แท่งเหล็กวางในอ่างน้ำบนแท่นกวน (ทำในตู้ดูดควัน) ตวงกรดซัลฟิวริกเข้มข้น (ร้อยละ 95-97) ปริมาตร 390 มิลลิลิตร เติมลงในขวดปรับปริมาตรที่มีน้ำกลั่นอย่างช้าๆ และระมัดระวัง ปล่อยให้เย็นลงที่อุณหภูมิห้องแล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น ลงในขวดปรับปริมาตร

2. ชั่งสารแอนโทรน 0.5 กรัมลงในปิ๊กเกอร์ เติมเอทานอลบริสุทธิ์ 5 มิลลิลิตร คนให้พอลิละลายแล้วเทลงในขวดปรับปริมาตรขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีกรดซัลฟิวริกร้อยละ 75 จากนั้นกลั้วปิ๊กเกอร์ด้วยเอทานอลบริสุทธิ์ 5 มิลลิลิตร เทลงในขวดปรับปริมาตรอีกครั้ง และปรับปริมาตรด้วยกรดซัลฟิวริกร้อยละ 75 ใส่แท่งเหล็ก ปิดฝา แล้วห่อขวดด้วยฟลอยด์ (ห้ามโดนแสง) จากนั้นนำไปตั้งบนแท่นกวน เพื่อให้สารแอนโทรนละลายจนหมด

3. สารละลายกลูโคสมาตรฐาน เตรียมโดยชั่งกลูโคส 0.1 กรัมละลายในน้ำกลั่นปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 1000 มิลลิลิตร จะได้สารละลายกลูโคสเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นนำมาเจือจางให้ได้ความเข้มข้นตั้งแต่ 0-100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ดังนี้

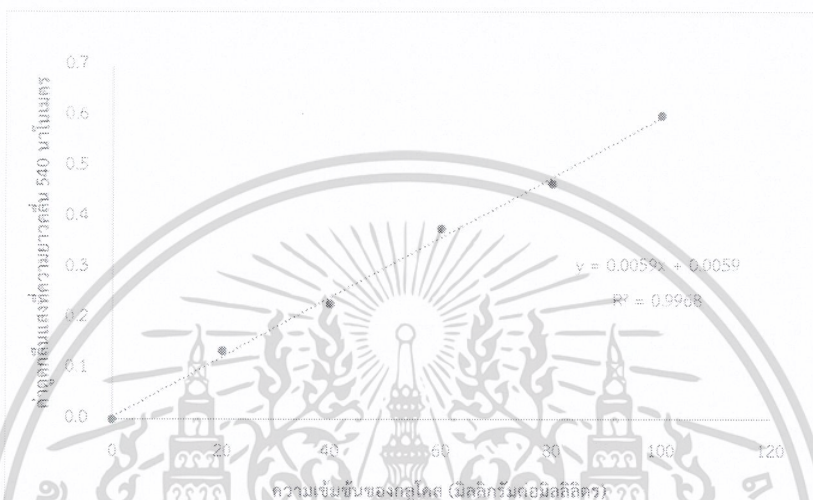
ตารางภาคผนวกที่ 1x การเจือจางสารละลายกลูโคสมาตรฐานด้วยน้ำกลั่นให้ได้ความเข้มข้น 0-100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากสารละลายเริ่มต้น ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

หลอดที่	สารละลายกลูโคส (มิลลิลิตร)	น้ำกลั่น (มิลลิลิตร)	สารละลายกลูโคสมาตรฐาน (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)
1	0	100	0
2	20	80	20
3	40	60	40
4	60	40	60
5	80	20	80

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งให้ตัดแปลงเนื้อหาและตัดอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสาร 100% ที่มีการนำไปใช้

การทดสอบ (Dreywood, 1946)

เติมสารตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร จากนั้นนำหลอดทิ้งไว้ที่น้ำแข็งรอจนเย็น เติมสารแอนโทรน 5 มิลลิลิตร ต่อจากนั้นนำไปแช่ที่อ่างน้ำเดือดเป็นเวลา 10 นาที หลังจากการให้ความร้อน ทำให้เย็นลงในอ่างน้ำแข็งอีกครั้ง วัดค่าดูดกลืนแสงที่ 620 นาโนเมตร โดยใช้เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง เทียบกับกราฟมาตรฐานกลูโคส (ดัดแปลงจาก Leyva และคณะ, 2008)



รูปภาพผนวกที่ 1 ข กราฟมาตรฐานของสารละลายกลูโคสที่ความเข้มข้น 20, 40, 60, 80 และ 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ที่ค่าการดูดกลืนแสง 620 นาโนเมตร

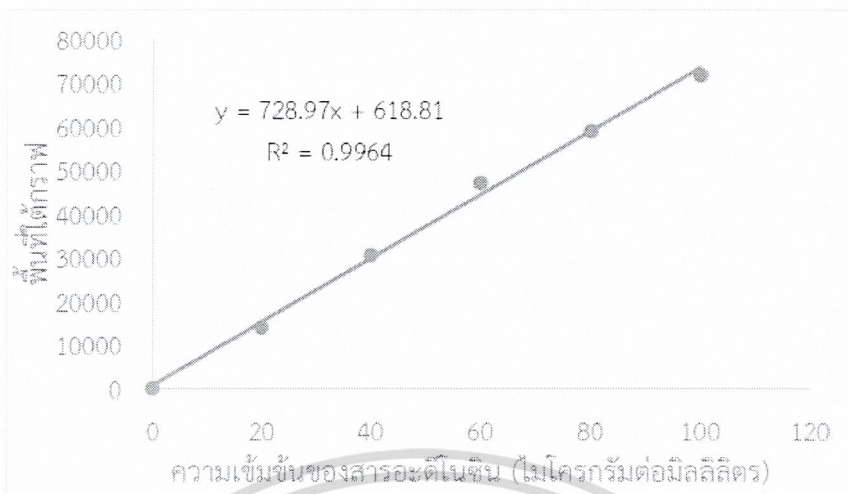
ภาคผนวก 2 ข การวิเคราะห์ปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากฟรุตติ้งบอดีเห็น การเตรียมการสกัด

นำตัวอย่างถึงเข้าหิมะแต่ละส่วนบดหยาบเป็นชิ้นเล็ก นำไปร่อนผ่านตะแกรงขนาด 200 ไมครอน ให้ได้เป็นผงขนาดตามที่ต้องการ

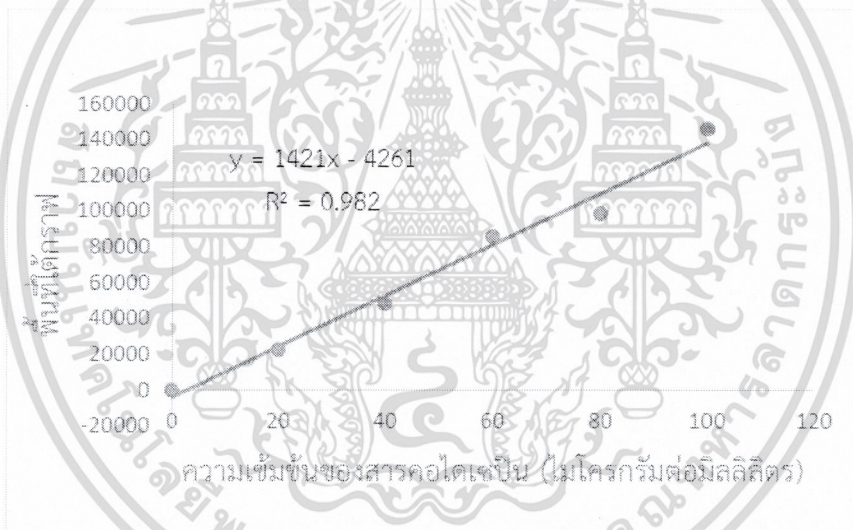
นำตัวอย่าง 0.20 กรัม และเติมน้ำกลั่น 2 มิลลิลิตร ลงในหลอดพร้อมฝาปิด นำไปสกัดด้วยอัลตราโซนิกเป็นเวลา 45 นาที ดูดสารละลาย 1 มิลลิลิตร กรองผ่านเมมเบรนที่มีรูพรุนขนาด 0.22 ไมครอนลงในขวดสำหรับทดสอบ HPLC (ดัดแปลงจาก Li และคณะ, 2015)

นำไปวิเคราะห์ปริมาณสารอะดีโนซีนและคอร์โดเซปินด้วยเครื่องแยกของเหลวสมรรถนะสูง (high performance liquid chromatography) Waters 600 Controller ระบบฉีดสาร อัตโนมัติน แบบ Waters 717 Plus Autosampler ชนิดตัวตรวจวัด Waters 2996 Photodiode Array Detector ที่ความยาวคลื่น 272 นาโนเมตร สภาวะในการวิเคราะห์ปริมาณสารใช้เฟสเคลื่อนที่ในอัตราส่วนของเมทานอลต่อน้ำเท่ากับ 15:85 อัตราการไหลที่ 1 มิลลิลิตรต่อนาที ปริมาณสารที่ใช้ฉีดตัวอย่าง 10 ไมโครลิตร ใช้คอลัมน์ Phenomenex Luna C18 (2) ขนาด 2.60×150.00 มิลลิเมตร สารมาตรฐานอะดีโนซีนและคอร์โดเซปินของ Sigma-Aldrich (ดัดแปลงจาก รัฐพลและกิตติพล.,

2018)
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปภาพผนวกที่ 2ข กราฟมาตรฐานของสารอะดีโนซีนที่ความเข้มข้น 20, 40, 60, 80 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร



รูปภาพผนวกที่ 3ข กราฟมาตรฐานของสารคอโคเตป็นที่ความเข้มข้น 20, 40, 60, 80 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร

1. การทดสอบ DPPH

การเตรียมการสกัด

ซึ่งตัวอย่างแห้ง 0.2 กรัม ต่อน้ำกลั่น 4 มิลลิลิตร นำไปต้ม 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง นำไปปั่นเหวี่ยง 5,000 g จากนั้นเก็บส่วนใส (ทิ้งตะกอน) ผสมร้อยละ 95 เอทานอล ในอัตราส่วนของส่วนใสต่อเอทานอลเท่ากับ 1 : 4 ทิ้งให้ตกตะกอน 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นำมาปั่นเหวี่ยงอีกครั้งที่ความเร็วรอบ 10,000 g เก็บตะกอน นำมาเป่าด้วยแก๊สไนโตรเจน เพื่อให้ตัวอย่างแห้ง อบจนตะกอนแห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที หาค่าน้ำหนักตะกอนโดยที่ต้องอบหลอดก่อนนำไปปั่นเหวี่ยง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่เผยแพร่โดยสำนักวิจัยและพัฒนาผลิตภัณฑ์จากพืชสมุนไพร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สมมติ ชั่งสารน้ำหนักตะกอนได้ 0.025 กรัม เติมน้ำกลั่นลงไป 2.5 มิลลิลิตร ถ้า 2.5 มิลลิลิตร มีปริมาณตะกอน 25 มิลลิกรัม ดังนั้น 1 มิลลิลิตร มีปริมาณตะกอน 10 มิลลิกรัม เพราะฉะนั้น ความเข้มข้นเริ่มต้น คือ 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นทำการเจือจาง แบบการเจือจางตัวอย่างเชื้อเริ่มต้น

สารเคมี (Singh และคณะ, 2018)

เตรียมสารละลาย DPPH ความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์ ชั่งสาร DPPH (MW = 394.32) 0.0039 กรัม ละลายในเอทานอลบริสุทธิ์ 100 มิลลิลิตร ในขวดปรับปริมาตร

การทดสอบ (ดัดแปลงจาก Khan et al., 2017)

นำตัวอย่างที่ความเข้มข้นต่างๆ 0.1 มิลลิลิตร หยดลงไมโครเพลทเติม DPPH ที่ละลายด้วย เอทานอลปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ 30 นาทีในที่มืด วัดค่าดูดกลืนแสงที่ 517 นาโนเมตร โดยใช้เครื่องอ่านปฏิกิริยาไมโครเพลท

$$\% \text{ Inhibition} = (A_{\text{blank}} - A_{\text{sample}}) / A_{\text{blank}} \times 100\%$$

โดย A_{blank} คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายที่ปราศจากตัวอย่าง

A_{sample} คือ ค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่าง

2. การทดสอบ ABTS

การเตรียมตัวอย่าง

ชั่งตัวอย่างแห้ง 0.2 กรัม ต่อน้ำกลั่น 4 มิลลิลิตร นำไปต้ม 80 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 2 ชั่วโมง นำไปปั่นเหวี่ยง 5,000 g จากนั้นเก็บส่วนใส (ทิ้งตะกอน) ผสมร้อยละ 95 เอทานอล ในอัตราส่วนของส่วนใสต่อเอทานอลเท่ากับ 1 : 4 ทิ้งให้ตกตะกอน 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นำมาปั่นเหวี่ยงอีกครั้งที่ความเร็วรอบ 10,000 g เก็บตะกอน นำมาเป่าด้วยแก๊สไนโตรเจนเพื่อทำให้ตัวอย่างแห้ง อบจนตะกอนแห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที หาค่าน้ำหนักตะกอนโดยที่ต้องอบหลอดก่อนนำไปปั่นเหวี่ยง

สมมติ ชั่งสารน้ำหนักตะกอนได้ 0.025 กรัม เติมน้ำกลั่นลงไป 2.5 มิลลิลิตร ถ้า 2.5 มิลลิลิตร มีปริมาณตะกอน 25 มิลลิกรัม ดังนั้น 1 มิลลิลิตร มีปริมาณตะกอน 10 มิลลิกรัม เพราะฉะนั้น ความเข้มข้นเริ่มต้น คือ 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นทำการเจือจาง แบบการเจือจางตัวอย่างเชื้อเริ่มต้น

สารเคมี (Singh และคณะ, 2018)

1. การเตรียมสารละลาย ABTS ความเข้มข้น 7 มิลลิโมล ชั่งสาร ABTS (MW = 514.62) 0.0384 กรัม ต่อ 10 มิลลิลิตร

2. การเตรียมสารละลายโพแทสเซียมเปอร์ซัลเฟต 2.4 มิลลิโมล ชั่งสารโพแทสเซียมเปอร์ซัลเฟต (MW = 0.6623) กรัมต่อ 10 มิลลิลิตร

3. ผสมสารละลายสองสโตกในปริมาณที่เท่ากันและปล่อยให้ทำปฏิกิริยาเป็นเวลา 12 - 16 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้องในที่มืด เจือจางด้วยการผสมสารละลาย ABTS กับน้ำกลั่น ด้วยอัตราส่วนการคำนวณว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ประมาณ 2 มิลลิลิตร ต่อ 50 มิลลิลิตร ตามลำดับ นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงให้มีค่าเท่ากับ 0.700 ± 0.02 ที่ 734 นาโนเมตร โดยใช้เครื่องอ่านปฏิกิริยาไมโครเพลท

การทดสอบ (ดัดแปลงจาก Khan และคณะ., 2017)

นำตัวอย่างที่ความเข้มข้นต่างๆ 0.1 มิลลิลิตร หยดลงไมโครเพลท เติมสารละลาย ABTS 0.1 มิลลิลิตร เป็นเวลา 15 นาที ในที่มีด วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 734 นาโนเมตร โดยใช้เครื่องอ่านปฏิกิริยาไมโครเพลท



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ค

ข้อมูลผลการทดลองและการคำนวณทางสถิติ

ตารางผนวกที่ 1ค ปริมาณสารสำคัญของสารอะดีโนซีน ที่เวลา เริ่มต้น, 1, 2, และ 3 เดือน อุณหภูมิ เริ่มต้น, 4, 25 และ 37 องศาเซลเซียส โดยใช้วิธีการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC

Time (m)	Temp (°C)	Mean (g/g)	Std. Deviation	N
เริ่มต้น	เริ่มต้น	10.60797198	0.823702301	3
1	4	4.1688	0.18481	3
1	25	8.9104	0.29065	3
1	37	5.8287	2.63401	3
3	4	2.1696	0.01879	3
3	25	1.9160	0.08695	3
3	37	1.4182	0.03424	3
total		35.0197	4.07315	21

หมายเหตุ : - หมายถึง ไม่มีการวิเคราะห์

ตารางผนวกที่ 2ค แสดงการวิเคราะห์ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) ของค่าเฉลี่ย ปริมาณสารสำคัญของสารอะดีโนซีน ที่เวลา เริ่มต้น, 1, 2, และ 3 เดือน อุณหภูมิ เริ่มต้น, 4, 25 และ 37 องศาเซลเซียส โดยใช้วิธีการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC

Time (Months)	Temp (°C)	N	Subset		
			1	2	3
1	25	3	8.91037		
1	37	3		5.82872	
1	4	3		4.16882	4.16882
3	4	3			2.16961
3	25	3			1.916
3	37	3			1.41825

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางผนวกที่ 3ค ปริมาณสารสำคัญของสารคอร์โดเซปิน ที่เวลา เริ่มต้น, 1, 2, และ 3 เดือน อุณหภูมิ เริ่มต้น, 4, 25 และ 37 องศาเซลเซียส โดยใช้วิธีการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC

Time (m)	Temp (°C)	Mean (g/g)	Std. Deviation	N
เริ่มต้น	เริ่มต้น	1.0447	0.50206	3
1	4	0.4983	0.03279	3
1	25	1.0396	0.04790	3
1	37	0.7217	0.32301	3
3	4	0.3302	0.11185	3
3	25	0.2539	0.22044	3
3	37	0.2292	0.00714	3
total		3.7619	1.24519	21

หมายเหตุ : - หมายถึง ไม่มีการวิเคราะห์

ตารางผนวกที่ 4ค แสดงการวิเคราะห์ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) ของค่าเฉลี่ย ปริมาณปริมาณสารสำคัญของสารคอร์โดเซปิน ที่เวลา เริ่มต้น, 1, 2, และ 3 เดือน อุณหภูมิ เริ่มต้น, 4, 25 และ 37 องศาเซลเซียส โดยใช้วิธีการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC

Time (Months)	Temp (°C)	N	Subset		
			1	2	3
1	25	3	1.03966		
1	37	3	0.72166	0.72166	
1	4	3		0.49827	0.49827
3	25	3		0.41964	0.41964
3	4	3		0.3302	0.3302
3	37	3			0.22917

ตารางผนวกที่ 5ค ปริมาณสารสำคัญของสารพอลิแซ็กคาไรด์ ที่เวลา เริ่มต้น, 1, 2, และ 3 เดือน

อุณหภูมิ เริ่มต้น, 4, 25 และ 37 องศาเซลเซียส โดยใช้วิธีแอนโตน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเบื้องต้นเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Time (m)	Temp (°C)	Mean (g/g)	Std. Deviation	N
เริ่มต้น	เริ่มต้น	14.1102	0.62956	3
1	4	13.2627	1.06993	3
1	25	12.3093	0.21744	3
1	37	13.3404	0.64968	3
2	4	15.6968	1.14827	3
2	25	13.0791	1.78310	3
2	37	13.3427	1.34183	3
3	4	16.4407	1.56206	3
3	25	11.8644	2.25069	3
3	37	14.5904	0.48928	3
Total		138.0367	11.14184	30

ตารางผนวกที่ 6c แสดงการวิเคราะห์ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) ของค่าเฉลี่ย ปริมาณสารสำคัญของสารพอลิแซ็กคาไรด์ ที่เวลา เริ่มต้น, 1, 2, และ 3 เดือน อุณหภูมิ เริ่มต้น, 4, 25 และ 37 องศาเซลเซียส โดยใช้วิธีแอนโทรอน

Time (Months)	Temp (°C)	N	Subset				
			1	2	3	4	5
3	4	3	16.4407				
2	4	3		15.6968			
3	37	3			14.5904		
2	37	3				13.3427	
1	37	3				13.3404	
1	4	3				13.2627	
2	25	3				13.0791	
1	25	3					12.3093
3	25	3					11.8644

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางผนวกที่ 7ค ปริมาณสารสำคัญในการออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ABTS ที่เวลา เริ่มต้น, 1, 2, และ 3 เดือน อุณหภูมิ เริ่มต้น, 4, 25 และ 37 องศาเซลเซียส

Time (m)	Temp (°C)	Mean (mg/ml)	Std. Deviation	N
เริ่มต้น	เริ่มต้น	0.7218	0.10770	3
1	4	0.5921	0.02646	3
1	25	0.6001	0.00832	3
1	37	0.5402	0.01532	3
2	4	0.4694	0.02979	3
2	25	0.3534	0.01763	3
2	37	0.6532	0.02574	3
3	4	0.5211	0.00759	3
3	25	0.5760	0.01433	3
3	37	0.5897	0.03475	3
Total		5.6169	0.28762	30

ตารางผนวกที่ 8ค แสดงการวิเคราะห์ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) ของค่าเฉลี่ย ปริมาณสารสำคัญในการออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ABTS ที่เวลา เริ่มต้น, 1, 2, และ 3 เดือน อุณหภูมิ เริ่มต้น, 4, 25 และ 37 องศาเซลเซียส

Time (Months)	Temp (°C)	N	Subset				
			1	2	3	4	5
1	37	3	0.299558				
2	25	3	0.353436				
2	4	3		0.469358			
3	37	3		0.52107	0.52107		
3	25	3			0.576007	0.576007	
3	4	3				0.589667	0.589667
1	4	3				0.592108	0.592108
1	25	3				0.600133	0.600133
2	37	3					0.653173

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางผนวกที่ 9ค ปริมาณสารสำคัญในการออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ที่เวลา เริ่มต้น, 1, 2, และ 3 เดือน อุณหภูมิ เริ่มต้น, 4, 25 และ 37 องศาเซลเซียส

Time (m)	Temp (°C)	Mean (mg/ml)	Std. Deviation	N
เริ่มต้น	เริ่มต้น	0.6032	0.04475	3
1	4	0.5602	0.03540	3
1	25	0.5298	0.02155	3
1	37	0.4401	0.00603	3
2	4	0.4786	0.00874	3
2	25	0.4713	0.00459	3
2	37	0.5999	0.02419	3
3	4	0.8792	0.06283	3
3	25	0.4776	0.01149	3
3	37	1.1460	0.09129	3
Total		6.1858	0.31086	30

ตารางผนวกที่ 10ค แสดงการวิเคราะห์ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) ของค่าเฉลี่ยปริมาณสารสำคัญในการออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ที่เวลา เริ่มต้น, 1, 2, และ 3 เดือน อุณหภูมิ เริ่มต้น, 4, 25 และ 37 องศาเซลเซียส

Time (Months)	Temp (°C)	N	Subset				
			1	2	3	4	5
1	37	3	0.44008				
2	25	3	0.47128	0.47128			
3	25	3	0.47757	0.47757			
2	4	3	0.47859	0.47859			
1	25	3	0.52982	0.52982	0.52982		
1	4	3		0.56023	0.56023		
2	37	3			0.59986		
3	4	3				0.87924	
3	37	3					1.146

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับครูใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติโดยโปรแกรม Minitab 18

1. เตรียมข้อมูลผลการทดลองที่ต้องการวิเคราะห์

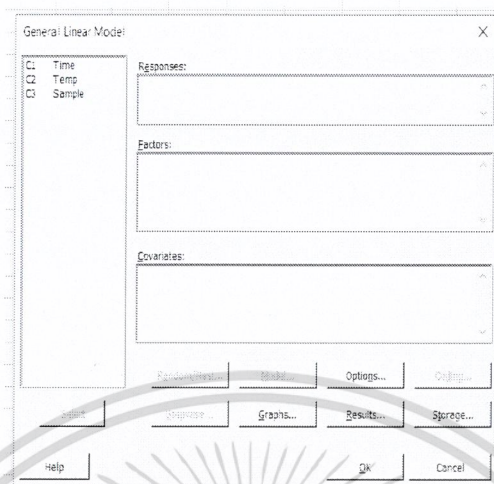
	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9	C10	C11	C12	C13	C14	C15
	Time	Temp	Sample												
1	0	0	11.5588												
2	0	0	10.1546												
3	0	0	10.1105												
4	1	4	3.9940												
5	1	4	4.3622												
6	1	4	4.1503												
7	1	25	8.6008												
8	1	25	9.1774												
9	1	25	8.9529												
10	1	37	8.8650												
11	1	37	4.1571												
12	1	37	4.4641												
13	3	4	2.1909												
14	3	4	2.1555												
15	3	4	2.1624												
16	3	25	2.0137												
17	3	25	1.8471												
18	3	25	1.8872												

2. เลือกคำสั่ง Stat → ANOVA → General Linear Model → Fit General Linear Model

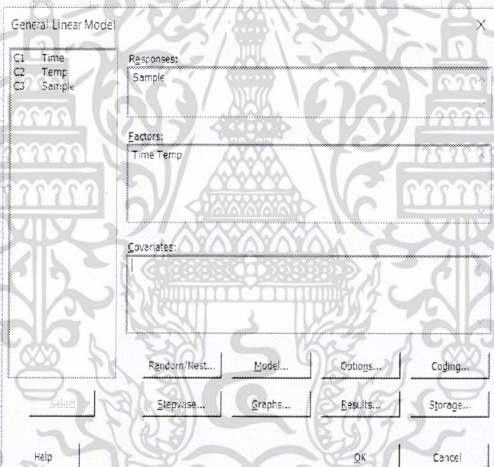
Fit General Linear Model
Model the relationship between one or more factors a response. Use to include random factors, covariate and a mix of crossed and nested factors.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

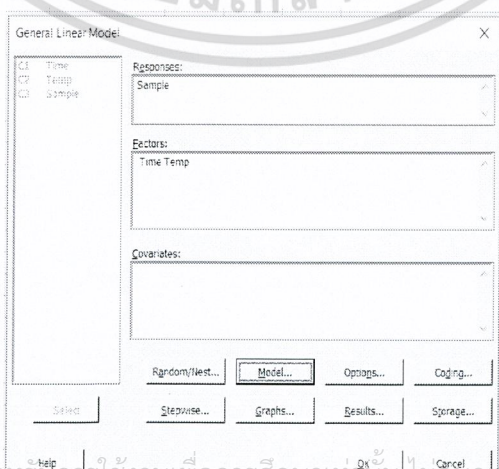
3. จะได้



4. เลือก Sample ใส่ในช่อง Responses ส่วน Time และ Temp ใส่ในช่อง Factors

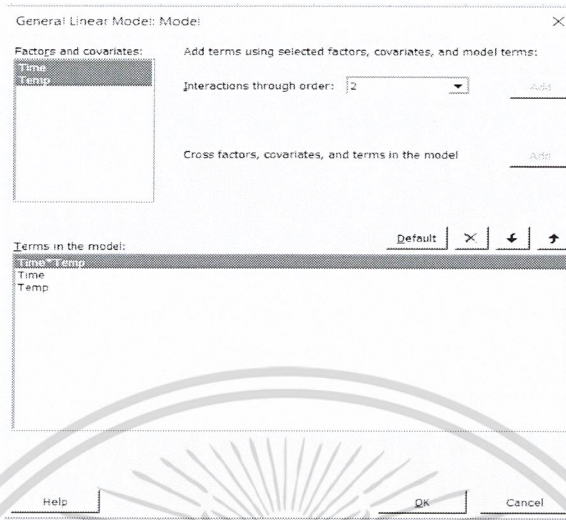


5. จากนั้นเลือกคำสั่ง Model จะได้



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับใช้ในงานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่ควรเผยแพร่ให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

6. จากนั้น เลือก Time และ Temp กดคำสั่ง Add → OK



7. จะได้ข้อมูลทางสถิติ

General Linear Model: Sample versus Time, Temp

The following terms cannot be estimated and were removed:
Time, Temp

Method

Factor coding: (-1, 0, 1)

Factor Information

Factor	Type	Levels	Values
Time	Fixed	3	0, 1, 3
Temp	Fixed	4	0, 4, 25, 37

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Time*Temp	6	235.41	39.234	35.46	0.000
Error	14	15.49	1.106		
Total	20	250.90			

Model Summary

S	R-sq	R-sq(Adj)	R-sq(pred)
1	0.5161	92.23%	91.18%

Coefficients

Term	Coef	SE Coef	T-Value	P-Value	VIF
Constant	2.761	0.921	2.99	0.000	
Time*Temp					
0 0	7.847	0.767	9.97	0.000	2.40
0 4	-0.817	0.749	-1.09	0.294	3.04
0 25	-5.305	0.749	-7.09	0.000	3.04
1 0	-10.026	0.841	-12.63	0.000	3.84
1 4	1.408	0.570	2.47	0.027	3.52
1 25	6.150	0.570	10.80	0.000	3.52

Regression Equation

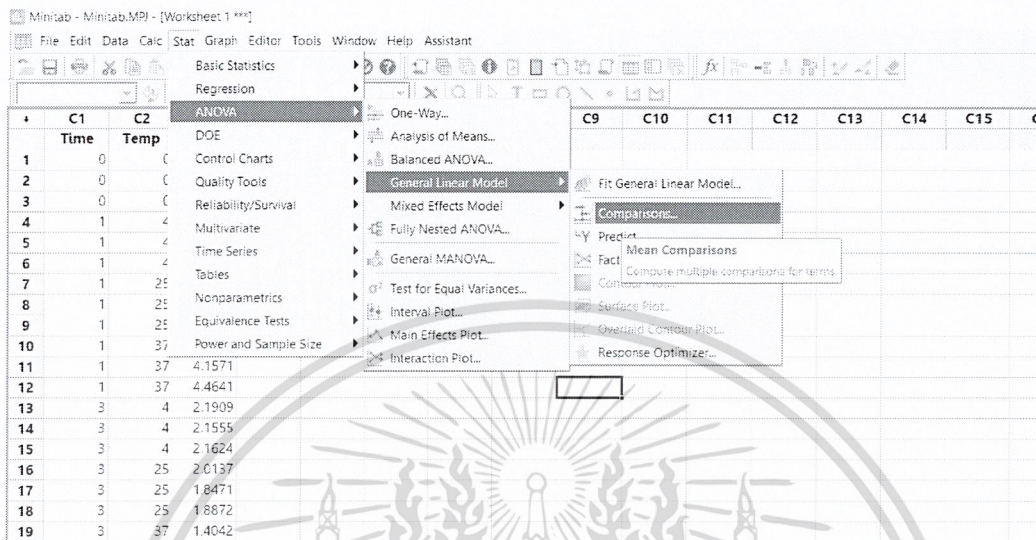
Sample = 2.761 + 7.847 Time*Temp_0_0 - 0.817 Time*Temp_0_4 - 5.305 Time*Temp_0_25 - 1.725 Time*Temp_0_37 - 10.026 Time*Temp_1_0 + 1.408 Time*Temp_1_4 + 6.150 Time*Temp_1_25 + 3.068 Time*Temp_1_37 + 2.772 Time*Temp_3_0 - 0.591 Time*Temp_3_4 - 0.845 Time*Temp_3_25 - 1.343 Time*Temp_3_37

Fits and Diagnostics for Unusual Observations

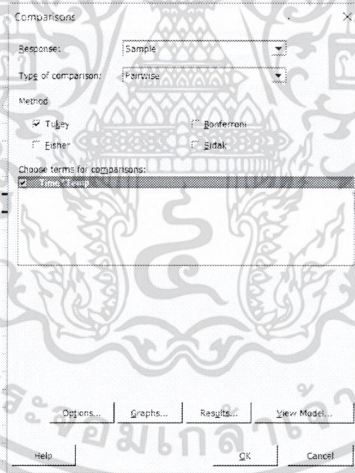
Obs	Sample	Fit	Resid	Std Resid	R
10	8.865	5.829	3.036	3.54	R

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

8. จากนั้นเลือกคำสั่ง Stat → ANOVA → General Linear Model → Comparisons



9. จะได้ เลือก Method → Tukey และเลือก Time*Temp จากนั้นเลือก OK



10. จากนั้นจะได้

Comparisons for Sample

Tukey Pairwise Comparisons: Time*Temp

Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

Time Temp	N	Mean	Grouping
0 0	3	10.6000	A
1 25	3	6.9104	A B
1 37	3	5.8207	B C
3 0	0	5.5902	A B C D
3 4	3	4.1600	C D E
3 4	3	2.1696	D E F
3 4	0	1.9438	D E F
3 25	3	1.9160	D E F
3 37	3	1.4182	D E F
0 37	0	1.0353	E F
0 25	0	-2.1441	F
0 37	0	-1.9649	F

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับใช้ในการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
 ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้