การผลิตโลชั่นที่มีส่วนผสมของสารสกัดจากเห็ดถั่งเช่าหิมะ

Production of Lotion from *Isaria tenuipes* Extracts

ปวีนา กัลยาประสิทธิ์
สุพิชฌา บุญอินทร์

โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2560

การผลิตโลชั่นที่มีส่วนผสมของสารสกัดจากเห็ดถั่งเช่าหิมะ

Production of Lotion from *Isaria tenuipes* Extracts

ปวีนา กัลยาประสิทธิ์
สุพิชฌา บุญอินทร์

โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2560

Production of Lotion from *Isaria tenuipes* Extracts

Paweena Kanlayaprasit

Suphitcha Bun-in

A SPECIAL PROJECT SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT

OF THE REQUIRMENT FOR THE DEGREE OF BACHELOR OF SCIENCE

IN BIOTECHNOLOGY FACULTY OF SCIENCE

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

ACADEMIC YEAR 2017

หัวข้อโครงงานพิเศษ	การผลิตโลชั่นที่มีส่วนผสมของสารสกัดจากเห็ดถั่งเช่าหิมะ Production of Lotion from *Isaria tenuipes* Extracts
ชื่อนักศึกษา	นางสาวปวีนา กัลยาประสิทธิ์ รหัสนักศึกษา 57050725 นางสาวสุพิชฌา บุญอินทร์ รหัสนักศึกษา 57050774
ปริญญา	วิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)
ภาควิชา	ชีววิทยา
ปีการศึกษา	2560
อาจารย์ที่ปรึกษา	รศ.อารี ฤทธิบูรณ์

คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.) อนุมัติให้โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ) ประจำปีการศึกษา 2560

คณะกรรมการสอบ	ลายมือชื่อ
รศ.ดร.มาริสา จาตุพรพิพัฒน์ ประธานกรรมการ	
ดร.สุทธิจิต ศรีวัชรกุล กรรมการ	
รศ.อารี ฤทธิบูรณ์ กรรมการและอาจารย์ที่ปรึกษา	

ลิขสิทธิ์ของคณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

หัวข้อโครงงานพิเศษ	การผลิตโลชั่นที่มีส่วนผสมของสารสกัดจากเห็ดถั่งเช่าหิมะ Production of Lotion from *Isaria tenuipes* Extracts
ชื่อนักศึกษา	นางสาวปวีนา กัลยาประสิทธิ์ รหัสนักศึกษา 57050725 นางสาวสุพิชฌา บุญอินทร์ รหัสนักศึกษา 57050774
ปริญญา	วิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)
ภาควิชา	ชีววิทยา
ปีการศึกษา	2560
อาจารย์ที่ปรึกษา	รศ.อารี ฤทธิบูรณ์

บทคัดย่อ

จากการศึกษาการเพาะเลี้ยงเห็ดถั่งเช่าหิมะ (*Isaria tenuipes*) ในสภาวะอาหารแข็งโดยใช้อาหาร PDA (Potato dextrose agar) เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อ มีธัญพืช ได้แก่ ข้าวลืมผัว และข้าวไรซ์เบอร์รี่ เป็นแหล่งคาร์บอน ส่วนแหล่งไนโตรเจนที่ใช้ในการสังเคราะห์เอนไซม์และโปรตีน ได้แก่ เปปโตน ยีสต์สกัด หนอน และไข่ไก่ พบว่าอาหารสูตรที่มีไข่เป็นองค์ประกอบ มีผลทำให้เห็ดถั่งเช่าหิมะเจริญเติบโตได้ดีกว่าอาหารสูตรปกติที่ไม่มีไข่เป็นองค์ประกอบ ในขั้นตอนการเก็บเกี่ยวผลิตภัณฑ์ต้องนำเห็ดไปอบให้ความชื้นลดลง จนมีค่าความชื้นเหลือไม่เกินร้อยละ 10 นำไปสกัดเพื่อให้ได้สารพอลิแซคคาไรด์ด้วยวิธีการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10000 รอบต่อนาที แล้วจึงนำไปวิเคราะห์กิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระ DPPH โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องไมโครเพลทรีดเดอร์ที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร จากนั้นคำนวณหาค่าความเข้มข้นของสารต้านอนุมูลอิสระที่สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH ได้ครึ่งหนึ่ง (IC_{50}) พบว่าค่า IC_{50} ที่ได้มีค่าเท่ากับ 1.04 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร การหาปริมาณคาร์โบไฮเดรตจะใช้วิธีแอนโทรนซัลฟิวริก โดยมีน้ำตาลกลูโคสเป็นสารละลายมาตรฐาน พบว่ามีปริมาณคาร์โบไฮเดรต 0.934 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร เมื่อทำการวิเคราะห์แล้วพบว่าเห็ดถั่งเช่าหิมะมีสารต้านอนุมูลอิสระงานวิจัยนี้จึงนำสารสกัดจากเห็ดถั่งเช่าหิมะไปเป็นส่วนผสมของโลชั่น พบว่าโลชั่น มีค่าพีเอชอยู่ที่ 6.36 เมื่อตรวจสอบคุณลักษณะทางจุลชีววิทยาเบื้องต้น พบว่าไม่มีการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ก่อโรค และเมื่อตรวจสอบคุณลักษณะทางกายภาพพบว่าเมื่อทำการ freeze and thaw เนื้อของโลชั่นไม่มีการเปลี่ยนแปลง และเมื่อนำไปทดสอบความพึงพอใจต่อผลิตภัณฑ์พบว่า ด้านความหนืด การซึมเข้าสู่ผิว และการยอมรับโดยรวม มีค่าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และด้านความชุ่มชื้น การแพ้มีค่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

คำสำคัญ : ถั่งเช่าหิมะ สารต้านอนุมูลอิสระ โลชั่น

Title	Production of Lotion from *Isaria tenuipes* Extracts
Students	Miss Paweena Kanlayaprasit Student ID 57050725
	Miss Suphitcha Bun-in Student ID 57050774
Degree	Bachelor of Science (Biotechnology)
Department	Biology
Faculty	Science
University	King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang (KMITL)
Academic Year	2017
Advisor	Assoc. Prof. Aree Rittiboon

Abstract

The study is involved with *Isaria tenuipes* culture in a solid state by using PDA (Potato dextrose agar) as the medium. Luempua purple sticky rice and riceberry act as a carbon source. Peptone, yeast extracts, silkworms and egg act as a nitrogen source to synthesize enzymes and proteins. The medium with egg as nitrogen source is induced the growth of this fungi more than the other medium. In process of harvesting products, the fungi have to be dried in vacuum dryer reducing the percentage of moisture less than 10%. Then, the dried products use for extraction of polysaccharides by centrifugal at 10000 rcf and analyze DPPH free radical scavenging activity by using microplate reader, the absorbance was read at wavelength 517 nm. The half maximal inhibitory concentration (IC_{50}) is 1.04 mg/ml. The anthrone-sulfuric acid colorimetric assay is a method to measure quantity of carbohydrates using glucose as a standard solution, found that there are 0.934 mg/ml of carbohydrates in this fungi. This study takes the advantage of *Isaria tenuipes* extracts to be one of a composition for making lotion. Using five times freeze and thaw cycle to test the stability of lotion in field of biological, physical and chemical. It appears that the average pH value of lotion is around 6.36 without contamination and change of texture. Finally, evaluation satisfaction of lotion from 30 people. In the experiment, the viscosity, absorption and acceptation are significantly different statistically, but the refreshment and allergy are not significantly different statistically.

Keywords : *Isaria tenuipes,* antioxidant, lotion

กิตติกรรมประกาศ

โครงงานพิเศษนี้จัดขึ้นตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ ซึ่งได้สำเร็จด้วยความอนุเคราะห์และการช่วยเหลือจากผู้มีอุปการคุณหลายท่าน

ขอขอบพระคุณ รศ.อารี ฤทธิบูรณ์ อาจารย์ที่ปรึกษาโครงงานพิเศษที่ได้ให้คำปรึกษา คำแนะนำต่างๆ เกี่ยวกับการทำงาน การตรวจทาน ตลอดจนชี้แนะข้อบกพร่องต่างๆที่เกิดขึ้น พร้อมทั้งช่วยชี้แนวทางในการแก้ไขปัญหา แก่คณะผู้จัดทำ เพื่อให้งานวิจัยในครั้งสำเร็จลุล่วงไปด้วยดี ขอขอบพระคุณ รศ.ดร.มาริสา จาตุพรพิพัฒน์ ประธานกรรมการสอบโครงงานพิเศษ และดร.สุทธิจิต ศรีวัชรกุล กรรมการสอบโครงงานพิเศษ ที่สละเวลาในการตรวจสอบ แก้ไขและให้คำแนะนำในการแก้ไขข้อบกพร่องต่างๆ แก่โครงงานพิเศษฉบับนี้ ให้เสร็จสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณ อาจารย์ทุกท่านที่ได้อบรมสั่งสอนและถ่ายทอดความรู้ต่างๆ ที่ทำให้โครงงานพิเศษครั้งนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี ตลอดจน บุคลากร และพี่นักวิทยาศาสตร์ประจำภาควิชาชีววิทยาทุกท่าน ที่ให้ความอนุเคราะห์เครื่องมือ และอุปกรณ์ทางวิทยาศาสตร์ต่างๆ สำหรับการทำโครงงานพิเศษในครั้งนี้

คณะผู้จัดทำหวังเป็นอย่างยิ่งว่าโครงงานพิเศษฉบับนี้ จะเป็นประโยชน์อย่างยิ่งต่อผู้ที่สนใจไม่มากก็น้อย หากมีข้อผิดพลาดประการใด ทางคณะผู้จัดทำต้องขออภัยมา ณ ที่นี้ด้วย

ปวีนา กัลยาประสิทธิ์

สุพิชฌา บุญอินทร์

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... ข
กิตติกรรมประกาศ ..... ค
สารบัญ ..... ง
สารบัญตาราง ..... ช
สารบัญรูป ..... ฌ
บทที่ 1 บทนำ 1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญปัญหา 1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย 2
1.3 ขอบเขตของงานวิจัย 2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ 2
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 3
2.1 เห็ดถั่งเช่า 3
2.1.1 ต้นกำเนิดเห็ดถั่งเช่า 3
2.1.2 ประเภทของเห็ดถั่งเช่า 3
2.1.3 สารสำคัญที่พบได้ในถั่งเช่า 4
2.1.4 ประโยชน์โดยรวมของเห็ดถั่งเช่า 4
2.2 ถั่งเช่าหิมะ (Isaria tenuipes) 5
2.3 พอลิแซคคาไรด์ (Polysaccharides) 6
2.3.1 พอลิแซคคาไรด์สะสม (Storage polysaccharides) 6
2.3.2 พอลิแซคคาไรด์โครงสร้าง (Structural polysaccharides) 6
2.4 อนุมูลอิสระ (free radicals) 6
2.5 ปฏิกิริยาการเกิดอนุมูลอิสระ 7
2.5.1 Initiation step 7
2.5.2 Propagation step 7
2.5.3 Termination step 7
2.6 สารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) 8
2.6.1 Primary antioxidant 9
2.6.2 Oxygen scavenger 9

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

2.6.3 Secondary antioxidant 9
2.6.4 Enzymic antioxidant 9
2.6.5 Chelating agent หรือ sequestrant 9
2.7 การวิเคราะห์หาความสามารถรวมในการต้านออกซิเดชัน
(Total Antioxidant Capacity, TAC) 9
2.7.1 การวิเคราะห์จากการส่งผ่านอะตอมไฮโดรเจน
(Hydrogen atom transfer, HAT) 9
2.7.2 การวิเคราะห์จากการส่งผ่านอิเลคตรอนเดี่ยว
(Electron transfer, ET หรือ SET) 9
2.8 ข้อดีและข้อเสียของการใช้วิธี DPPH 10
2.9 เครื่องไมโครเพลท รีดเดอร์ (Microplate readers) 10
2.10 มาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมผลิตภัณฑ์ทาบำรุงผิว เลขที่ มอก. 478-2555 .. 11
2.11 เชื้อจุลินทรีย์ต้องห้าม ในมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมผลิตภัณฑ์ทาบำรุงผิว
เลขที่ มอก. 478-2555 11
2.11.1 *Pseudomonas aeruginosa* 11
2.11.2 *staphylococcus aureus* 12
2.11.3 *candida albicans* 13
2.11.4 *crostridium spp* 14
2.12 ค่าความเข้มข้นของสารที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งที่ร้อยละ 50 (IC_{50}) 14
2.13 สารที่ใช้เป็นส่วนผสมของโลชั่นทาผิว 14
2.13.1 ไดคาพริลิล อีเธอร์ (Dicaprylyl ether) 14
2.13.2 ดีเอ็มดีเอ็ม ไฮแดนโทอิน (DMDM hydantoin) 15
2.13.3 ไมเนอรัล ออย (Mineral oil) 15
2.13.4 โพรพิลีน ไกลคอล (Propylene glycol) 15
2.13.5 โซเดียมพอลิอะคริเลท (Sodium polyacrylate) 15
2.13.6 โซเดียม สเตียโรอิล กลูตาเมท (Sodium stearoyl glutamate) 15
2.14 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 15
บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย 17
3.1 อุปกรณ์ 17

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

3.2 สารเคมี 18
3.3 การเตรียมหัวเชื้อเริ่มต้น 18
3.3.1 การเตรียมหัวเชื้อในอาหารแข็งหรือตัวหนอน 18
3.3.2 การเตรียมหัวเชื้อในอาหารแข็ง PDA 19
3.3.3 การเตรียมหัวเชื้อในอาหารเหลว PDB เสริม 19
3.3.4 การเตรียมหัวเชื้อในอาหารแข็งธัญพืช 19
3.4 การเก็บผลิตภัณฑ์ 19
3.5 การสกัดสารพอลิแซคคาไรด์ 19
3.6 การทำโลชั่นทาผิว 20
3.7 การวิเคราะห์ผล 20
3.7.1 การวิเคราะห์การกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH 20
3.7.2 การวิเคราะห์ปริมาณคาร์โบไฮเดรตด้วยวิธีแอนโทรน (Anthrone method) 21
3.7.3 การทดสอบคุณลักษณะทั่วไปของโลชั่น 21
3.7.3.1 คุณลักษณะทางจุลชีววิทยาเบื้องต้น 21
3.7.3.2 คุณลักษณะทางกายภาพและเคมี 21
3.7.4 การวิเคราะห์ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ 22
บทที่ 4 ผลการวิจัยและการอภิปรายผล 23
4.1 ผลของความชื้นของเห็ดถั่งเช่าหิมะ 23
4.2 ผลการวิเคราะห์กิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระ DPPH 23
4.3 ผลการวิเคราะห์ปริมาณคาร์โบไฮเดรตด้วยวิธีแอนโทรน 24
4.4 ผลการทดสอบคุณลักษณะของโลชั่น 25
4.4.1 คุณลักษณะทางด้านจุลชีววิทยาเบื้องต้น 25
4.4.2 คุณลักษณะทางด้านกายภาพและเคมี 25
4.5 ผลการวิเคราะห์ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ จากการประเมินความพึงพอใจของผู้ใช้ 30 คน ที่มีต่อผลิตภัณฑ์โลชั่น 25
4.5.1 การวิเคราะห์ค่าความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้านต่างๆ ต่อผลิตภัณฑ์ 25
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ 27
5.1 สรุปผลการวิจัย 27

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

5.2 ข้อเสนอแนะ 27
เอกสารอ้างอิง 29
ภาคผนวก 32
ภาคผนวก ก 33
ภาคผนวก ข 36
ภาคผนวก ค 42

สารบัญตาราง

ตารางที่ **หน้า**

4.1 ตารางแสดงค่าเฉลี่ยด้านต่างๆต่อผลิตภัณฑ์ 3 สูตร 26

1ข การเจือจางสารละลายกลูโคสมาตรฐาน ด้วยน้ำกลั่นให้ได้ความเข้มข้น 0-100 ไมโครลิตร.... 36

2ข แบบประเมินความพึงพอใจต่อผลิตภัณฑ์โลชั่นจากสารสกัดของเห็ดถั่งเช่าหิมะ..... 40

1ค ตารางเปรียบเทียบผลการประเมินความพึงพอใจต่อความหนืดของผลิตภัณฑ์ 3 ตัวอย่าง จากผู้ทดสอบจำนวน 30 คน..... 43

2ค ตารางเปรียบเทียบผลการประเมินความพึงพอใจต่อการซึมเข้าสู่ผิวของผลิตภัณฑ์ 3 ตัวอย่าง จากผู้ทดสอบจำนวน 30 คน..... 45

3ค ตารางเปรียบเทียบผลการประเมินความพึงพอใจต่อความชุ่มชื้นของผลิตภัณฑ์ 3 ตัวอย่าง จากผู้ทดสอบจำนวน 30 คน..... 46

4ค ตารางเปรียบเทียบผลการประเมินความพึงพอใจต่อการแพ้ของผลิตภัณฑ์ 3 ตัวอย่าง จากผู้ทดสอบจำนวน 30 คน..... 47

5ค ตารางเปรียบเทียบผลการประเมินความพึงพอใจต่อการยอมรับโดยรวมของผลิตภัณฑ์ 3 ตัวอย่าง จากผู้ทดสอบจำนวน 30 คน..... 48

สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
2.1 ถั่งเช่าหิมะ	5
2.2 สมการการเกิดปฏิกิริยา หลังจากการเติมสารต้านอนุมูลอิสระ	10
2.3 เครื่องไมโครเพลท รีดเดอร์	11
2.4 *Pseudomonas aeruginosa*	12
2.5 *Staphylococcus aureus*	12
2.6 *Candida albicans*	13
2.7 *Crostridium spp*	14
4.1 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างร้อยละของการยับยั้งอนุมูลอิสระ และความเข้มข้นของสารสกัดจากเห็ดถั่งเช่าหิมะ (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)	23
4.2 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 620 นาโนเมตร และความเข้มข้นของสารละลายกลูโคสมาตรฐาน (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)	24
1ข อธิบายการเติมสารลงในไมโครเพลท ชนิด 96 หลุม	39
1ค ตัวอย่างกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างร้อยละการยับยั้งและความเข้มข้นสารสกัด	42

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญปัญหา

การเพาะเลี้ยงเห็ดถั่งเช่าหิมะสามารถเพาะเลี้ยงได้ทั้งในอาหารแข็งและอาหารเหลว แต่ในงานวิจัยนี้จะเลือกเพาะเลี้ยงในอาหารแข็ง เนื่องจากสามารถให้ผลผลิตและสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพสูงกว่าการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว และนิยมเพาะเลี้ยงโดยใช้หนอนไหม เนื่องจากการเพาะเลี้ยงเห็ดถั่งเช่าหิมะใช้เวลานานและต้นทุนในการผลิตสูง จึงมีการคิดค้นเพื่อลดต้นทุนการผลิต เช่น ใช้วัตถุดิบที่หาง่ายในท้องถิ่นและราคาถูก โดยการเพาะเลี้ยงเห็ดถั่งเช่าหิมะประกอบด้วยการนำหัวเชื้อเริ่มต้นที่ได้จากหนอนและอาหารเหลวใส่ในอาหารเพาะเลี้ยงที่มีธัญพืช จากนั้นทำการเพาะเลี้ยงในที่มืดจนเส้นใยเจริญเต็มอาหารและนำไปเลี้ยงต่อในที่มีแสง ที่อุณหภูมิ 18-20 องศาเซลเซียส เพื่อกระตุ้นการรวมตัวของเส้นใยและการเกิดดอกเห็ด อาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงจะประกอบด้วยธัญพืช ซึ่งเป็นแหล่งคาร์บอนเพื่อสร้างพลังงาน วิตามินบี 1 วิตามินบี 2 แหล่งไนโตรเจน ได้แก่ เปปโตน ยีสต์สกัด หนอน เพื่อใช้ในการสังเคราะห์เอนไซม์และโปรตีน ซึ่งเป็นผลให้ได้ผลผลิตและสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ เช่น พอลิแซคคาไรด์ สารคอร์ไดเซปิน และซุปเปอร์รอกไซด์ ดิสมิวเทส (superoxide dismutase) ในปริมาณที่สูง เพื่อหาฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ

ถั่งเช่าหิมะ หรือถั่งเช่าเกาหลี (ชื่อวิทยาศาสตร์ *Isaria tenuipes*) มีสรรพคุณลดฝ้า ทำให้หน้าขาว ลดคลอเรสเตอรอล ไขมัน น้ำตาลในเลือด ชาวเกาหลีนิยมบริโภคเพื่อป้องกันโรคมะเร็ง เห็ดถั่งเช่าเป็นราแมลงในกลุ่ม Ascomycetes ที่มีฤทธิ์ทางยา ประกอบด้วยสารสำคัญ เช่น พอลิแซคคาไรด์ (เบต้า-กลูแคน) คอร์ไดเซปิน กรดคอร์ไดเซปิก อะดีโนซีน กรดอะมิโน วิตามิน และแร่ธาตุหลายชนิด ในที่นี้จะยกตัวอย่างสรรพคุณของสาระสำคัญในถั่งเช่า ได้แก่พอลิแซคคาไรด์ (เบต้า-กลูแคน) ช่วยต้านอนุมูลอิสระ เพิ่มภูมิคุ้มกัน ลดระดับน้ำตาลในเลือด ลดการโตของเนื้องอกและเซลล์มะเร็ง ยืดอายุและชะลอความเสื่อมของเซลล์ คอร์ไดเซปินมีฤทธิ์บำรุงไต เพิ่มประสิทธิภาพการไหลเวียนของโลหิต ต้านเชื้อแบคทีเรียก่อโรค กรดคอร์ไดเซปิกช่วยเพิ่มเมแทบอริซึมของร่างกาย ป้องกันเลือดออกในสมอง ลิ่มเลือด โรคหัวใจ ขาดเลือด หอบหืด และอะดีโนซีน ช่วยต้านการแข็งตัวของเลือด ต้านลิ่มเลือด ในช่วง 10 กว่าปีที่ผ่านมา ในประเทศเกาหลีเห็ดถั่งเช่าหิมะนิยมบริโภคเพื่อเป็นอาหารทางด้านสุขภาพ และนำมาใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมเครื่องสำอาง

ในปัจจุบันอุตสาหกรรมเครื่องสำอางเป็นที่นิยมอย่างแพร่หลาย เนื่องจากผู้คนในยุคปัจจุบันทั้งเพศชาย เพศหญิง และเพศที่สามในทุก ๆ ช่วงวัย โดยเฉพาะในวัยหนุ่มสาวต่างให้ความสนใจและใส่ใจเกี่ยวกับเรื่องสุขภาพ ความงาม และผิวพรรณรวมทั้งการดูแลตัวเองมากขึ้น ในงานวิจัยนี้จึงมุ่งเน้นไปที่การพัฒนาตำรับโลชั่นจากเห็ดถั่งเช่าหิมะ ซึ่งมีสรรพคุณและสารสำคัญทางชีวภาพ

หลากหลายชนิด ที่เหมาะสมในการนำไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมเครื่องสำอาง เช่น พอลิแซคคาไรด์ ซึ่งมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1) เพื่อทำการสกัดสารพอลิแซคคาไรด์ จากเห็ดถั่งเช่าหิมะ
2) เพื่อวิเคราะห์สารต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH)
3) เพื่อผลิตโลชั่นทาผิวที่มีส่วนผสมของสารสกัดจากเห็ดถั่งเช่าหิมะ
4) เพื่อทดสอบการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ในผลิตภัณฑ์โลชั่น

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

1) ทำการสกัดพอลิแซคคาไรด์จากเห็ดถั่งเช่าหิมะ ที่ผ่านการอบแห้งจนมีความชื้นไม่เกินร้อยละ 10 โดยดัดแปลงจากวิธีของ Sapan (2015)

2) ทำการวิเคราะห์สารต้านอนุมูลอิสระ โดยใช้วิธี DPPH ที่ความเข้มข้นของตัวอย่าง 0.5, 1, 1.5, 2 และ 2.5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ใช้เอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 95 เป็นตัวควบคุม และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร ด้วยเครื่องไมโครเพลทรีดเดอร์

3) ผลิตโลชั่นทาผิวโดยแบ่งเฟสในการผลิต เป็น 2 เฟส คือ เฟสน้ำซึ่งเป็นองค์ประกอบหลัก และเฟสน้ำมัน โดยมีสารสำคัญคือ โพรพิลีน ไกลคอล (propylene glycol) ไดคาพริลิล อีเธอร์ (dicarprylyl ether) และ โซเดียม พอลิอะคริเลท (sodium polyacrylate)

4) ทดสอบการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ในโลชั่นเบื้องต้น โดยทำการทดสอบด้วยวิธีการ pour plate กับอาหารเลี้ยงเชื้อ Potato Dextrose Agar (PDA) ซึ่งเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อรา และอาหาร Trypticase Soy Agar (TSA) ซึ่งเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1) ทำให้สกัดสารพอลิแซคคาไรด์ ซึ่งเป็นสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สำคัญและทางเภสัชวิทยา เช่น ช่วยปกป้องเซลล์ประสาทจากอนุมูลอิสระ

2) ทำให้ทราบองค์ประกอบ ขั้นตอนการดำเนินการผลิตโลชั่นทาผิว และการทดสอบการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์

3) สามารถนำคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมยา เครื่องสำอาง และเทคโนโลยีอาหาร

บทที่ 2
ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 เห็ดถั่งเช่า

2.1.1 ต้นกำเนิดเห็ดถั่งเช่า

เห็ดถั่งเช่า หรือ ตังถั่งเช่า เป็นสมุนไพรจีน แบ่งออกเป็น 2 ส่วน ส่วนแรกคือส่วนที่เป็นเห็ด กับอีกส่วนหนึ่งคือส่วนที่เป็นหนอน หนอนที่ให้กำเนิดตังถั่งเช่านั้น คือหนอนผีเสื้อที่อาศัยอยู่แถบที่ราบสูงของทิเบต โดยหนอนชนิดนี้จะได้รับหรือกินเชื้อราถั่งเช่าเมื่ออยู่ใต้ดิน และจะถูกสปอร์ของเห็ดราในสกุล *Ophiocordyceps* อาศัยเป็นปรสิตและเติบโตสร้างเส้นใยออกมาทางส่วนหัวของตัวหนอน ทำให้มีหน่อหญ้าที่เป็นส่วนผสมระหว่างหนอนและเชื้อราถั่งเช่าแตกขึ้นมา มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Ophiocordyceps sinensis* ถั่งเช่าเป็น 1 ใน 3 ของสมุนไพรที่ดีที่สุดของประเทศจีน รวมถึงโสมและเขากวางอ่อน และได้มีการบันทึกในตำราแพทย์จีนโบราณมาตั้งแต่ ค.ศ.1757 ซึ่งตามต้นกำเนิดธรรมชาติของเห็ดถั่งเช่านั้น จะพบได้บนที่ราบสูงของประเทศจีน รวมถึงเนปาล อินเดีย

2.1.2 ประเภทของเห็ดถั่งเช่า แบ่งได้เป็น 4 ประเภท

2.1.2.1 ถั่งเช่าทิเบต (*Cordyceps sinensis*)

เป็นต้นตำรับของเห็ดถั่งเช่า เกิดจากหนอนผีเสื้อบนที่ราบสูงจากทิเบตที่กล่าวไปข้างต้น ซึ่งสรรพคุณของ ถั่งเช่าทิเบต ได้รับการยอมรับมาก แต่การเพาะเลี้ยงเพื่อให้ได้เห็ดสมุนไพรตังถั่งเช่าทิเบตนั้นค่อนข้างยุ่งยากและซับซ้อน

2.1.2.2 ถั่งเช่าสีทอง (*Cordyceps militaris*)

เห็ดถั่งเช่าสีทองมีปริมาณสารอาหารมากกว่าเห็ดถั่งเช่าสายพันธ์ทิเบต เนื่องจากเห็ดถั่งเช่าทิเบตนั้น เกิดขึ้นได้ตามธรรมชาติ และด้วยความที่เกิดขึ้นจากธรรมชาติทำให้คุณภาพของเห็ดถั่งเช่าทิเบตไม่แน่นอน เพราะแต่ละพื้นที่ ภูมิภาค ที่เกิดเห็ดถั่งเช่าทิเบตนั้นแตกต่างกัน จึงมีความอุดมสมบูรณ์ที่ต่างกัน ไม่เหมือนกับสายพันธุ์ของเห็ดถั่งเช่าสีทอง ที่เกิดขึ้นจากการเพาะเลี้ยงที่มีการควบคุมปัจจัยการเจริญเติบโต จึงทำให้เห็ดถั่งเช่าสีทองมีสารอาหารมากกว่า

2.1.2.3 ถั่งเช่าหิมะ หรือ ถั่งเช่าเกาหลี (*Isaria tenuipes*)

เห็ดถั่งเช่าหิมะมีสรรพคุณที่ดีมาก ในการนำมาแปรรูปเพื่อพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ใหม่ๆ แต่ยากต่อการนำมาใช้เป็นวัตถุดิบสำหรับผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง เพราะมีกลิ่นที่ไม่พึงประสงค์ จึงมีการพัฒนาเทคโนโลยีในการกำจัดกลิ่น ทำให้สามารถนำมาใช้เป็นส่วนผสมในเครื่องสำอางได้ ช่วยทำให้ผิวขาวกระจ่างใส และทำให้ผิวหน้าตึงกระชับ

2.1.2.4 ถั่งเช่าจักจั่น หรือ ว่านจักจั่น (*Isaria sinclairii*)

เห็ดถั่งเช่าจักจั่นในจีนเรียกว่า ซังเฮ่า (Chan-hua) เกิดขึ้นบนจักจั่นที่มีเชื้อรา *Isaria sinclairii* (เดิมใช้ *Paecilomyces cicadae*) เข้าไปเจริญในลำตัว ที่ประเทศเกาหลีจะใช้เห็ดถั่งเช่าจักจั่น (ทั้งดอกและตัวแมลง) ในการรักษาผู้ป่วยโรคมะเร็ง โรคเบาหวาน

2.1.3 สารสำคัญที่พบได้ในถั่งเช่า

เช่น โมโนแซคคาไรด์ ไดแซคคาไรด์ โพลีแซคคาไรด์ (เบต้า-กลูแคน) กาแล็กโตส อะดีโนซีน คอร์ไดเซปิน กรดคอร์ไดเซปิก แมนนิทอล กรดอะมิโน โปรตีน ไขมันสเตอรอล วิตามิน แร่ธาตุ

2.1.3.1 กรดคอร์ไดเซปิก

ช่วยเพิ่มเมตาบอลิซึมของร่างกาย ช่วยในระบบเผาผลาญ ทำให้ร่างกายแข็งแรง ช่วยฟื้นฟูร่างกายเมื่อมีอาการเจ็บป่วย ป้องกันเลือดออกในสมอง ละลายลิ่มเลือด และช่วยบรรเทาอาการหอบหืด

2.1.3.2 คอร์ไดเซปิน

ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการไหลเวียนเลือด บำรุงไต ต้านเชื้อแบคทีเรีย

2.1.3.3 ไขมันสเตอรอล

ลดอาการอักเสบ ลดอาการปวดต่างๆ ปรับความเครียดของสภาวะในร่างกาย และฟื้นฟูร่างกายให้แข็งแรง

2.1.3.4 พอลิแซคคาไรด์

มีสารต้านอนุมูลอิสระ ช่วยลดระดับน้ำตาลในเลือด มีความน่าจะเป็นในการลดการโตของเนื้องอก ช่วยชะลอความเสื่อมของเซลล์ ลดไตรกลีเซอไรด์ และลดคอเลสเตอรอล

2.1.3.4 ซุปเปอร์รอกไซด์ ดิสมิวเทส

มีสารต้านอนุมูลอิสระ และช่วยในเรื่องชะลอความชรา ช่วยรักษาโรคมะเร็ง โรคเบาหวาน โรคหัวใจ โรคทางสมอง เช่น อัลไซเมอร์

2.1.3.5 อะดีโนซีน

ต้านการแข็งตัวของเลือด นั่นคือสลายลิ่มเลือด หรือต้านการเกิดลิ่มเลือด ควบคุมการเต้นของหัวใจให้ทำงานเป็นปกติ

2.1.4 ประโยชน์โดยรวมของเห็ดถั่งเช่า

ถั่งเช่านั้นจะมีรสหวาน กลิ่นหอม ช่วยต่อต้านการเกิดเนื้องอกโดยตรง บำรุงโรคปอด บำรุงไตและตับ เพิ่มความสมบูรณ์ให้แก่เซลล์แก้และลดอาการเหนื่อยล้าของร่างกาย และสามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการทำงานของเซลล์ในร่างกาย เพิ่มประสิทธิภาพการทำงานของหัวใจ โดยถั่งเช่าจะชะลอต่อการขาดออกซิเจนของหัวใจ แก้อาการใจสั่น หัวใจเต้นเร็ว

และปรับอัตราการเต้นของหัวใจให้เหมาะสม บำรุงระบบทางเดินหายใจ โดยถั่งเช่าสามารถขยายหลอดลม แก้ไอ ละลายเสมหะ และลดอาการเส้นเลือดแข็งและเส้นเลือดตีบตัน และในทางเครื่องสำอาง ถั่งเช่า สามารถบำรุงผิวพรรณ ชะลอความแก่ และเพิ่มความกระจ่างใส ให้แก่ผิวพรรณได้ และช่วยบำรุงสมรรถภาพทางเพศ

2.2 ถั่งเช่าหิมะ (*Isaria tenuipes*)

ถั่งเช่าหิมะ หรือถั่งเช่าเกาหลี มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ คือ *Isaria tenuipes* หรืออาจเป็นที่รู้จักกันในชื่อ *Paecilomyces tenuipes* เป็นราปรสิตที่เติบโตบนหนอน หรือดักแด้ผีเสื้อ (Lepidoptera) ดังรูปที่ 2.1 ราชนิดนี้จัดอยู่ในซับไฟลัม แอสโคไมโคตินา (Ascomycotina) เป็นที่นิยมในประเทศจีน เกาหลี และญี่ปุ่น ในการนำไปใช้เป็นยารักษาโรคตามแบบฉบับของแพทย์แผนจีน (Kumar และคณะ, 2010)

การเพาะเห็ดถั่งเช่าหิมะ เป็นการเพาะด้วยหนอนไหม ปัจจุบันมีอุตสาหกรรมเพาะถั่งเช่าหิมะเพื่อเป็นอาหารเสริมสุขภาพ และมีการเปลี่ยนอุตสาหกรรมผลิตเส้นใยไปผลิตเห็ดถั่งเช่าหิมะ โดยพ่นเชื้อราให้กับหนอนไหมในช่วงที่กำลังลอกคราบ เชื้อราจะเข้าเจริญในตัวหนอนไหม และเจริญเต็มที่ตอนที่หนอนไหมเปลี่ยนเป็นดักแด้ ดักแด้จะตายลงพอดี จากนั้นทำการตัดเอาดักแด้ออกจากรังไหม นำไปเรียงในถาดเพาะ ซึ่งรองพื้นด้วยกระดาษ หรือแผ่นโฟมบางๆ นำถาดไปเรียงบนชั้นเพาะ ให้แสงและความชื้น เชื้อราก็จะงอกเป็นดอกเห็ดขึ้นมา จากนั้นจะนำดักแด้ที่มีดอกเห็ดขึ้นไปอบให้แห้ง นำไปบดเป็นผง ใช้ประกอบอาหารต่างๆ เช่น เครื่องปรุงรสทั่วไป หรือบรรจุแคปซูลเป็นอาหารเสริมสุขภาพ ราคาขายกิโลกรัมละประมาณ 3-7 หมื่นบาท

รูปที่ 2.1 ถั่งเช่าหิมะ

ที่มา : http://www.indianamushrooms.com/paecilomyces_tenuipes_3.JPG

2.3 พอลิแซคคาไรด์ (polysaccharides)

เป็นคาร์โบไฮเดรตที่ประกอบด้วยโมเลกุลของมอนอแซคคาไรด์ (monosaccharides) มากกว่า 10 โมเลกุล ต่อกันเป็นสายยาว เชื่อมกันด้วยพันธะไกลโคซิดิก (glycosidics bond) โดยโมเลกุลของมอนอแซคคาไรด์ที่มาเชื่อมต่อกันอาจจะเป็นชนิดเดียวกัน หรือต่างกันก็ได้ พอลิแซคคาไรด์ที่เกิดจากการเชื่อมต่อกันของมอนอแซคคาไรด์ชนิดเดียวกัน จะเรียกว่า โฮโมพอลิแซคคาไรด์ (homopolysaccharide) ส่วนพอลิแซคคาไรด์ที่เกิดจากการเชื่อมต่อกันของมอนอแซคคาไรด์ต่างชนิดกัน จะเรียกว่า เฮเทอโรพอลิแซคคาไรด์ (heteropolysaccharide)

2.3.1 พอลิแซคคาไรด์สะสม (storage polysaccharides)

ทำหน้าที่สะสมอาหาร ตัวอย่างพอลิแซคคาไรด์สะสม เช่น แป้ง (starch) เป็นพอลิเมอร์ของกลูโคส ซึ่งประกอบไปด้วยส่วนผสมของอะไมโลส ร้อยละ 15-20 และอะไมโลเพกติน ร้อยละ 80-85 แป้งไม่ละลาย ในน้ำ แต่จะย่อยได้โดยการทำลายพันธะไกลโคซิดิกชนิดอัลฟ่า (alpha-linkage) ในมนุษย์และสัตว์จะมีเอนไซม์ อะไมเลส เพื่อช่วยในการย่อย

ไกลโคเจน (glycogen) พบได้ในสัตว์ บริเวณตับและกล้ามเนื้อ ไกลโคเจนมีลักษณะโครงสร้างคล้ายกับแป้ง แต่มีแขนงที่แผ่ขยายและหนาแน่นมากกว่าแป้ง ไม่ละลายในน้ำ เมื่อผสมกับสารละลายไอโอดีนจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลแดง นอกจากนี้ไกลโคเจนยังมีบทบาทสำคัญในวัฏจักรกลูโคส (glucose cycle)

2.3.2 พอลิแซคคาไรด์โครงสร้าง (structural polysaccharides)

ทำหน้าที่เป็นโครงสร้างของพืชและสัตว์ ตัวอย่างพอลิแซคคาไรด์โครงสร้าง เช่น เซลลูโลส (cellulose) เป็นส่วนประกอบโครงสร้างของพืช เกิดจากการต่อกันของพอลิเมอร์ที่มีหน่วยกลูโคสซ้ำๆกัน ต่อกันเป็นสายยาว ด้วยแรงยึดเหนี่ยวชนิดเบต้าในมนุษย์และสัตว์ส่วนใหญ่ไม่มีเอนไซม์ที่สามารถย่อยเซลลูโลสได้

ไคติน (chitin) เป็นส่วนประกอบของโครงสร้างสัตว์หลายชนิด พบมากในเปลือกของสัตว์ที่ไม่มีกระดูกสันหลัง หรือสัตว์ที่มีระบบโครงกระดูกภายนอก (exoskeleton) ไคตินสามารถทำลายได้โดยใช้เอนไซม์ไคติเนส (chitinase) ที่หลั่งออกมาจากจุลินทรีย์บางชนิด เช่น แบคทีเรีย และรา หรือสร้างได้จากพืชบางชนิด

2.4 อนุมูลอิสระ (free radicals)

อนุมูลอิสระ คือ โมเลกุลหรืออะตอมที่ไม่เสถียรเนื่องจากขาดอิเล็กตรอน โดยปกติในร่างกายของมนุษย์จะมีโมเลกุลหรืออะตอมที่มีอิเล็กตรอนอยู่เป็นจำนวนคู่ ในกรณีที่ร่างกายมีการสูญเสียอิเล็กตรอนจากการถูกอนุมูลอิสระแย่งจับ จะทำให้โมเลกุลของเซลล์ในร่างกายไม่เสถียร ขาดความสมดุล ซึ่งส่งผลทำให้เซลล์ร่างกายเสียหายได้ อนุมูลอิสระจะเข้าไปทำลายเซลล์

เมื่อร่างกายไม่สามารถผลิตหรือได้รับสารต้านอนุมูลอิสระเพียงพอที่จะไปยับยั้ง หรือไปจับอนุมูลอิสระได้ภายในเซลล์ของร่างกาย ผลคือทำให้เซลล์เกิดความเสียหายและนำไปสู่การเกิดโรคต่างๆ เช่น โรคมะเร็ง หัวใจและหลอดเลือด แก่ก่อนวัย ต้อกระจก และโรคอื่นๆ เช่น อนุมูลอิสระไปทำลายผนังหลอดเลือดแดง และเมื่อมีไขมันไปสะสมอยู่ในบริเวณหลอดเลือดแดงที่ถูกทำลาย จะทำให้เกิดโรคหัวใจและหลอดเลือดในที่สุด แต่ถ้าเราได้รับสารต้านอนุมูลอิสระเพียงพอ สารต้านอนุมูลอิสระเข้าไปป้องกันหรือแย่งที่จับกับอนุมูลอิสระ และนำอนุมูลอิสระเหล่านั้นไปทิ้งนอกเซลล์ ทำให้เซลล์ไม่ถูกทำลาย

ร่างกายจึงมีกลไกในการกำจัดอนุมูลอิสระ 2 วิธี แบบแรกคือการใช้เอนไซม์ที่ร่างกายสร้างขึ้นเพื่อจับกับอนุมูลอิสระ เช่น เอนไซม์ ซุปเปอรอกไซด์ ดิสมิวเทส (superoxide dismutase หรือ SOD) เอนไซม์คะตะเลส กลูตาไธโอน เพอรอกซิเดส (catalase glutathione peroxidaes) แต่ร่างกายมักสร้างได้ไม่เพียงพอ เซลล์จึงเกิดการบาดเจ็บขึ้น และเมื่อมีอายุมากขึ้นการสร้างสารต้านอนุมูลอิสระจะลดลง ในขณะที่อัตราการเกิดอนุมูลอิสระยังเท่าเดิม ผลที่ตามมาคือทำให้เกิดโรคต่างๆมากมาย และอีกวิธีคือการรับสารต้านอนุมูลอิสระจากอาหาร เช่น วิตามินอี เบตาแคโรทีน แอนโทไซยานิดิน (anthrocyanidin) สารประกอบโฟลีฟีนอลต่างๆ เช่น แทนนิน แคทซิชิน เป็นต้น

2.5 ปฏิกิริยาการเกิดอนุมูลอิสระ

ปฏิกิริยาการเกิดอนุมูลอิสระจัดเป็นปฏิกิริยาลูกโซ่ (Free radical chain reaction) ซึ่งมีกลไกในการเกิดปฏิกิริยา 3 ขั้นตอน คือ

2.5.1 Initiation step

ปฏิกิริยากิริยาการเกิดอนุมูลอิสระในเซลล์ มักเกิดขึ้นจากปฏิกิริยา การสลายพันธะด้วยน้ำ (Hydrolysis) แสง (Photolysis) รังสี (Radiolysis) หรือปฏิกิริยารีดอกซ์ (Redox reaction) นอกจากนี้ยังมีเอนไซม์อื่นๆ อีกหลายชนิดที่ทำให้เกิดอนุมูลอิสระขึ้นในเซลล์รวมถึงโมเลกุลที่มีความไวสูงในการทำปฏิกิริยา เช่น nitric oxide (NO) และ singlet oxygen ($^1O_2$) ซึ่งหมายถึงออกซิเจนในสถานะที่ถูกกระตุ้น (Excited state) สิ่งเหล่านี้ล้วนทำให้เกิดขั้นตอนอินนิทิเอชันของปฏิกิริยาการเกิดอนุมูลอิสระ ดังเช่นสมการที่ 1

$$RH \longrightarrow R^{\bullet} \qquad \text{สมการ1}$$

2.5.2 Propagation step

อนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นในขั้นตอนอินนิทิเอชัน จะดำเนินปฏิกิริยาต่อไปในขั้นตอนพรอพาเกชัน โดยเกิดปฏิกิริยาขึ้น 2 ทาง คือ โดยการดึงเอาอะตอมไฮโดรเจนจาก

โมเลกุลข้างเคียง หรือโดยการทำปฏิกิริยากับโมเลกุลออกซิเจนที่อยู่ในสถานะ ground state ทำให้ได้ อนุมูลอิสระตัวใหม่ ดังสมการที่2–4

$RH + R^{1\bullet} \rightleftharpoons R^{\bullet} + R^{1}H$ สมการ2

$R^{\bullet} + {}^{3}O_2 \rightleftharpoons ROO^{\bullet}$ สมการ3

$ROO^{\bullet} + RH \rightleftharpoons ROOH + R^{\bullet}$ สมการ4

2.5.3 Termination step

ขั้นตอนนี้เป็นขั้นตอนที่อนุมูลอิสระที่เกิดขึ้น 2 อนุมูลมารวมกันได้เป็นสารที่มีความเสถียรจึงเป็นการหยุดปฏิกิริยาลูกโซ่ของการเกิดอนุมูลอิสระ ดังสมการที่5 และ 6

$ROO^{\bullet} + ROO^{\bullet} \rightleftharpoons ROOR + O_2$ สมการ5

$ROO\bullet + R\bullet \rightleftharpoons ROOR$ สมการ6

2.6 สารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant)

สารต้านอนุมูลอิสระ คือ สารประกอบที่สามารถป้องกัน หรือชะลอการเกิดกระบวนการออกซิเดชั่น กระบวนการออกซิเดชั่นมีได้หลายรูปแบบ เช่น กระบวนการออกซิเดชั่นที่ทำให้เหล็กกลายเป็นสนิม ทำให้แอปเปิลเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล หรือทำให้น้ำมันพืชเหม็นหืน กระบวนการออกซิเดชั่นที่เกิดในร่างกาย เช่น การย่อยสลายโปรตีนและไขมันจากอาหารที่กินเข้าไป มลพิษทางอากาศ การหายใจ ควันบุหรี่ รังสียูวี ล้วนทำให้เกิดอนุมูลอิสระขึ้นในร่างกาย ซึ่งสร้างความเสียหายต่อร่างกายได้ ในความเป็นจริงไม่มีสารประกอบสารใดสารหนึ่งสามารถป้องกันการเกิดออกซิเดชั่นได้ทั้งหมดแต่ละกลไกอาจต้องใช้สารต้านอนุมูลอิสระที่แตกต่างกันในการหยุดกระบวนการออกซิเดชั่น ในอีกทางหนึ่ง กระบวนการออกซิเดชั่นเป็นกระบวนการที่สำคัญต่อร่างกาย เช่น เราใช้ออกซิเจนจากอากาศที่หายใจเข้าไปไปเผาผลาญอาหารที่ร่างกายได้รับให้เป็นพลังงานสำหรับการทำงานของเซลล์ต่างๆ แต่ก็ทำให้เกิดอนุมูลอิสระเป็นผลพลอยได้ อนุมูลอิสระต่างๆ ที่เกิดขึ้นจะทำปฏิกิริยากับโมเลกุลที่สำคัญในร่างกาย เช่น ไขมัน โปรตีน ดีเอ็นเอ ทำให้เกิดความเสียหายต่อโมเลกุลดังกล่าว ตัวอย่างเช่น เมื่ออนุมูลอิสระทำปฏิกิริยากับแอลดีแอล (LDL : Low-density lipoprotein) ซึ่งเป็นโคเลสเตอรอลที่ไม่ดี ทำให้เกิดออกซิไดซ์แอลดีแอล (oxidized LDL) ซึ่งมีหลักฐานยืนยันว่าออกซิไดซ์แอลดีแอลเป็นสาเหตุของการเกิดภาวะหลอดเลือดแดงแข็ง ทำให้เกิดการอุดตันของหลอดเลือดและเป็นสาเหตุทำให้เกิดโรคหัวใจ สารต้านอนุมูลอิสระมีทั้งที่เป็นสารจากธรรมชาติ เช่น กรดอะมิโน กรดแอสคอบิก แคโรทีนอยด์ ฟลาโวนอยด์ แทนนิน โทโคฟีรอล เป็นต้น โดยทั่วไปสารต้านอนุมูลอิสระแบ่งเป็น 5 ประเภทใหญ่ๆ ดังนี้

2.6.1 Primary antioxidant

สารในกลุ่มนี้สวนใหญ่ได้แก่ สารประกอบฟีนอลิค (Phenolic compounds) ทำหน้าที่หยุดปฏิกิริยาลูกโซ่ของการเกิดอนุมูลอิสระในปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมัน นอกจากนี้ยังรวมถึงสารโทโคฟีรอลธรรมชาติและสังเคราะห์ (Natural and synthetic tocopherol) alkyl gallate BHA BHT TBHQ และอื่นๆซึ่งสารในกลุ่มดังกล่าวทาหน้าที่เป็นตัวให้อิเล็กตรอน

2.6.2 Oxygen scavenger

สารในกลุ่มนี้ได้แก่ กรดแอสคอร์บิค หรือวิตามินซีเป็นต้น สารในกลุ่มนี้จะเข้าทำปฏิกิริยากับออกซิเจน จึงเป็นการช่วยกำจัดออกซิเจนในระบบปิดได้

2.6.3 Secondary antioxidant

สารในกลุ่มนี้ได้แก่ dilauryl thiopropionate และ thiopropionic acid ทำหน้าที่สลายโมเลกุลของ lipid hydroperoxide ให้เป็นสารที่มีความเสถียร

2.6.4 Enzymic antioxidant

สารในกลุ่มนี้ได้แก่ เอนไซม์ต่างๆ ซึ่งแบ่งเป็น primary antioxidant enzyme และ auxiliary antioxidant enzyme สารในกลุ่มนี้ทำหน้าที่กำจัดออกซิเจนหรืออนุพันธ์ของออกซิเจน โดยเฉพาะไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2)

2.6.5 Chelating agent หรือ sequestrant

สารในกลุ่มนี้ เช่น กรดซิตริก กรดอะมิโน เป็นต้น สารในกลุ่มนี้ทำหน้าที่ไปจับกับ ไอออนของโลหะ เช่น เหล็ก และทองแดง ซึ่งไอออนเหล่านี้เป็นไอออนที่ส่งเสริมและเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมัน ทำให้เกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนที่เสถียร

2.7 การวิเคราะห์หาความสามารถรวมในการต้านออกซิเดชัน (Total Antioxidant Capacity, TAC)

การวิเคราะห์หาความสามารถรวมในการต้านออกซิเดชัน มีหลายวิธี ได้แก่

2.7.1 การวิเคราะห์จากการส่งผ่านอะตอมไฮโดรเจน (Hydrogen atom transfer, HAT)

เช่น วิธี Oxygen radical absorbance capacity assay (ORAC) และวิธี Total radical – trapping antioxidant parameter (TRAP)

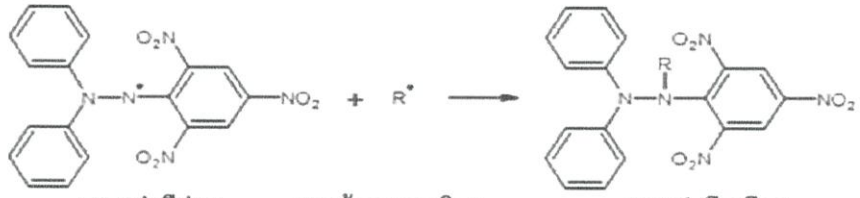
2.7.2 การวิเคราะห์จากการส่งผ่านอิเลคตรอนเดี่ยว (Electron transfer, ET หรือ SET)

เช่น วิธี Diphenyl – 1 – picrylhydrazyl assay (DPPH)

วิธี The ferric reducing ability of plasma assay (FRAP)

วิธี Trolox Equivalent Antioxidant Capacity (TEAC)

โดยในงานวิจัยนี้จะใช้วิธี DPPH โดยอนุมูล DPPH• เป็นอนุมูลไนโตรเจนที่คงตัว มีสีม่วงอยู่ในรูปอนุมูลอยู่แล้ว โดยไม่ต้องทำปฏิกิริยาเพื่อให้เกิดอนุมูล การวิเคราะห์เป็นการวัดความสามารถในการรีดิวซ์ การวัดทำโดยใช้เครื่องไมโครเพลทวัดการเปลี่ยนแปลงของสีเมื่อเติมสารต้านอนุมูลลงไป โดยวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร ดังรูป



รูปที่ 2.2 สมการการเกิดปฏิกิริยา หลังจากการเติมสารต้านอนุมูล

2.8 ข้อดีและข้อเสียของการใช้วิธี DPPH

ข้อดี คือ ง่าย ใช้เครื่องมือสามัญที่มีทั่วไป นิยมใช้เป็นวิธีเบื้องต้น ในการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลของสารต้านอนุมูลจากธรรมชาติ ยกเว้นสารกลุ่มแคโรตินอยด์ที่มีการดูดกลืนแสงในย่านเดียวกัน

ข้อเสีย ของวิธีนี้คือ อนุมูล DPPH• มีความคงตัวไม่ไวต่อปฏิกิริยาเหมือนอนุมูลที่เกิดในเซลล์หรือร่างกาย ดังนั้นวิธีนี้จึงไม่สามารถแยกแยะจัดอันดับอนุมูลที่มีความไวสูงได้ นอกจากนี้โครงสร้างทางเคมีของ DPPH• ที่แสดงจะเห็นว่าอิเลคตรอนเดี่ยวของอนุมูลอิสระจะถูก บดบังด้วยวงเบนซีน 3 วง และหมู่ไนโตร ทำให้สารต้านอนุมูลที่มีฤทธิ์แรงแต่มีขนาดใหญ่บางสารไม่สามารถเข้าไปทำปฏิกิริยาขจัดอนุมูลหรือเกิดปฏิกิริยาช้ากว่าความเป็นจริง ทั้งๆที่สารต้านอนุมูลนั้นมีฤทธิ์ดีในการขจัดอนุมูลเปอร์ออกซี นอกจากนี้สารรีดิวซ์สามารถทำให้สี DPPH• จางลงได้อีกด้วย

2.9 เครื่องไมโครเพลท รีดเดอร์ (Microplate readers)

เพลทรีดเดอร์ หรือเป็นที่รู้จักกันในนาม ไมโครเพลท รีดเดอร์ หรือไมโครเพลท โฟโตมิเตอร์ (Microplate photometers) เป็นเครื่องมือที่ใช้ตรวจสอบในทางชีววิทยา เคมี หรือทางกายภาพ แสดงดังรูปที่ 2.3 ที่จะใส่ตัวอย่างลงในไมโครไตเตอร์เพลท (Microtiter plates) เป็นที่นิยมใช้ในงานวิจัย การค้นคว้าเกี่ยวกับยา การวิเคราะห์ผลทางชีววิทยา การควบคุมคุณภาพ และกระบวนการต่างๆในอุตสาหกรรมยา และเทคโนโลยีชีวภาพ ไมโครไตเตอร์เพลทที่นิยมนำมาใช้

กับเครื่องไมโครเพลท รีดเดอร์มากที่สุดคือ ไมโครไตเตอร์เพลท แบบ 96 หลุม โดยปริมาตรรวมของสารที่ใส่จะอยู่ระหว่าง 100-200 ไมโครลิตรต่อหลุม

รูปที่ 2.3 เครื่องไมโครเพลท รีดเดอร์
ที่มา: https://www.researchgate.net/publication/236629173

2.10 มาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมผลิตภัณฑ์ทาบำรุงผิว เลขที่ มอก. 478-2555

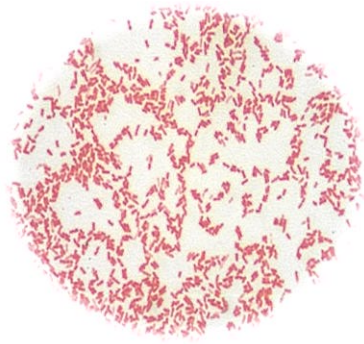
ตามประกาศกระทรวงอุตสาหกรรมว่าด้วยเรื่อง การกำหนดมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมผลิตภัณฑ์ทาบำรุงผิว เลขที่ มอก. 478-2555 ซึ่งเป็นมาตรฐานอุตสาหกรรมที่ครอบคลุมเฉพาะผลิตภัณฑ์ทาบำรุงผิวที่อยู่ในรูปครีม โลชั่น น้ำมัน เจล และโฟม มีรายละเอียดดังนี้

คุณลักษณะทางจุลชีววิทยา กล่าวไว้ว่า จำนวนรวมของแบคทีเรีย ยีสต์ และรา ที่เจริญโดยใช้อากาศ (aerobic plate count) ต้องมีไม่เกิน 1000 โคโลนีต่อลูกบาศก์เซนติเมตร และต้องไม่ตรวจพบจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรค ได้แก่ *Pseudomonas aeruginosa, Staphylococcus aureus, Candida albicans* และ *Clostridium spp.*

คุณลักษณะทางเคมี กล่าวไว้ว่า ผลิตภัณฑ์บำรุงผิวต้องไม่แยกตัวเป็นชั้น สี กลิ่น ค่าความเป็นกรด-ด่าง และความหนืด ต้องไม่ต่างจากตัวอย่างสำหรับการเปรียบเทียบเกินร้อยละ ± 10 ซึ่งค่าความเป็นกรด-ด่างที่เป็นที่ยอมรับตามมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม คือ 3.5-7.5 ถ้าเป็นผลิตภัณฑ์ที่เป็นเนื้อเดียวกัน ต้องไม่มีการแยกชั้นและตกตะกอน หรือต้องมีลักษณะเฉพาะของผลิตภัณฑ์นั้น ปราศจากสิ่งแปลกปลอม และเมื่อทาบนผิวต้องกระจายตัวได้ง่าย เนียนอยู่กับผิว เช็ดออกได้ง่ายเมื่อต้องการ ต้องไม่มีส่วนประกอบของตะกั่ว สารหนู ปรอท และแบเรียมที่ละลายได้

2.11 เชื้อจุลินทรีย์ต้องห้าม ในมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมผลิตภัณฑ์ทาบำรุงผิว เลขที่ มอก. 478-2555

2.11.1 *Pseudomonas aeruginosa*



รูปที่ 2.4 *Pseudomonas aeruginosa*

ที่มา : https://www.news-medical.net/whitepaper/20150526/Type-IV-pili-influence-swarming-of-Pseudomonas-aeruginosa-an-overview.aspx

การจำแนกชั้นทางวิทยาศาสตร์

อาณาจักร : Bacteria

สกุล : *Pseudomanas*

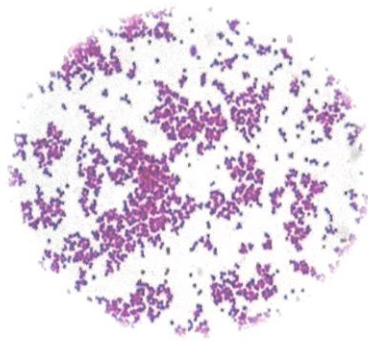
สปีชีส์ : *Pseudomanas aeruginosa*

ลักษณะ : เป็นแบคทีเรียแกรมลบ มีรูปร่างแท่ง aerobic สามารถเคลื่อนที่ได้โดย flagellum 1 เส้นที่ติดอยู่ตรงหัว

สิ่งแวดล้อมที่พบได้ : ดิน น้ำ ขยะ ในพืช และในระบบทางเดินอาหารได้ ทางเดินของมนุษย์และสัตว์ ในน้ำเน่าเสีย

การก่อโรค : การติดเชื้อในกระแสเลือด ภาวะปอดติดเชื้อ การติดเชื้อในทางเดินปัสสาวะและการติดเชื้อบริเวณแผลผ่าตัด

2.11.2 *Staphylococcus aureus*



รูปที่ 2.5 *Staphylococcus aureus*

ที่มา : http://newlook.indyconsumers.org/main/index.php/information/news-articles/health-news/145-2014-05-12-04-28-38

การจำแนกชั้นทางวิทยาศาสตร์

อาณาจักร : Bacteria

สกุล : *Staphylococcus*

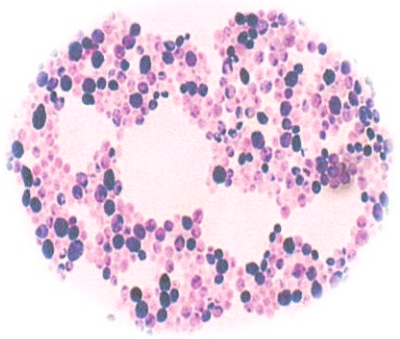
สปีชีส์ : *Staphylococcus aureus*

ลักษณะ : เป็นแบคทีเรียแกรมบวก มีรูปร่างเป็นทรงกลม อยู่รวมกันเป็นพวงคล้ายพวงองุ่น ไม่สร้างสปอร์ ไม่เคลื่อนไหว เจริญได้ในที่มีอากาศและไม่มีอากาศ แต่เจริญได้ดีกว่าในสภาวะที่มีอากาศ

สิ่งแวดล้อมที่พบได้ : ในคนและสัตว์เลือดอุ่น โดยเฉพาะในคนที่มีผิวหนัง ผิดปกติเช่น เป็นฝี แผลผ่าตัด แผลอักเสบ และโพรงจมูก

การก่อโรค : โรคอาหารเป็นพิษ ท้องร่วง คลื่นไส้ อาเจียน วิงเวียน เป็นตะคริวในช่องท้อง และอ่อนเพลีย

2.11.3 *Candida albicans*



รูปที่ 2.6 *Candida albicans*

ที่มา : https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Candida_albicans_(248_35).jpg

การจำแนกชั้นทางวิทยาศาสตร์

อาณาจักร : Fungi

สกุล : *Candida*

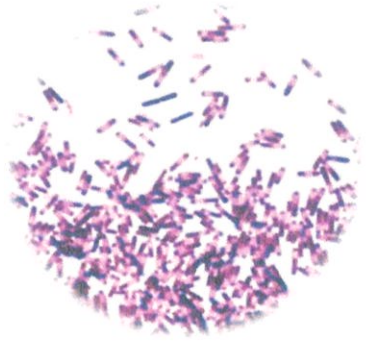
สปีชีส์ : *Candida albicans*

ลักษณะ : เป็นแบคทีเรียแกรมบวก เป็นเชื้อราชนิดยีสต์ มีรูปร่างเป็นทรงกลม หรือรูปไข่

สิ่งแวดล้อมที่พบได้ : ในปาก ในระบบทางเดินอาหาร ในช่องคลอดของผู้หญิง และบนผิวหนัง

การก่อโรค : โรคที่ผิวหนัง และเยื่อบุต่างๆ โรคเชื้อราในช่องคลอด

2.11.4 *Crostridium spp*



รูปที่ 2.7 *Crostridium spp*

ที่มา : https://eclectickle.wordpress.com/2011/07/19/what%E2%80%99s-in-a-name-sometimes-everything/

การจำแนกชั้นทางวิทยาศาสตร์

อาณาจักร : Bacteria

สกุล : *Clostridiaceae*

สปีชีส์ : *Clostridium*

ลักษณะ : แบคทีเรียแกรมบวก มีรูปร่างเป็นท่อน สร้างสปอร์และไม่ต้องการอากาศ

สิ่งแวดล้อมที่พบได้ : พบได้ในอาหารที่มีความเป็นกรดต่ำ

การก่อโรค : ก่อให้เกิดโรคที่ไม่รุนแรงในคน

2.12 ค่าความเข้มข้นของสารที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งที่ร้อยละ 50 (IC_{50})

ค่าความเข้มข้นของสารที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้ง หรือ Inhibitory concentration (IC) นิยมวัดที่ร้อยละ 50 (IC_{50}) เนื่องจากเป็นค่ามัธยฐานของข้อมูล และสามารถแปลผลได้ง่าย IC_{50} ใช้ในการอธิบายถึงความเข้มข้นของตัวยับยั้ง ที่สามารถส่งผลในการยับยั้งปฏิกิริยาได้ครึ่งหนึ่ง หรือคิดเป็นร้อยละ 50 ถ้าค่า IC_{50} ของสารต้าน หรือตัวยับยั้งมีค่าน้อย แสดงว่ามีประสิทธิภาพมาก

2.13 สารที่ใช้เป็นส่วนผสมของโลชั่นทาผิวในงานวิจัย

2.13.1 ไดคาพริลิล อีเธอร์ (Dicaprylyl ether)

มีชื่อทางการค้าคือ ซีทิอัล โออี (Cetiol OE) เป็นสารช่วยเพิ่มความนุ่มลื่นให้กับสินค้าประเภทครีมทาผิว มีลักษณะใส ไม่มีสี มีความเป็นขั้วต่ำ ซึ่งจะแตกต่างจากสารที่ช่วยเพิ่มความนุ่มลื่นอื่น คือ สารชนิดนี้จะให้ความรู้สึกที่แห้งและไม่มัน เมื่อสัมผัส อาจเป็นที่รู้จักกันในอีกชื่อหนึ่ง คือ ไดออกทิล อีเธอร์ (Dioctyl ether)

2.13.2 ดีเอ็มดีเอ็ม ไฮแดนโทอิน (DMDM hydantoin)

เป็นฟอร์มัลดีไฮด์ (Formaldehyde) มักใช้เป็นสารกันบูดแทนที่จะใช้พาราเบน เนื่องจากพาราเบนมีราคาถูกกว่า และสามารถก่อให้เกิดอันตรายต่อร่างกายได้มากกว่าเช่นกัน อย่างไรก็ตาม สารประเภทฟอร์มัลดีไฮด์ก็สามารถก่อให้เกิดการระคายเคืองในบางบริเวณ เช่น ตา จมูก และลำคอ ได้ จึงมีการกำหนดให้ใช้ได้ในปริมาณที่เหมาะสม

2.13.3 ไมเนอรัล ออย (Mineral oil)

เป็นน้ำมัน หรือสารไฮโดรคาร์บอนชนิดหนึ่งที่ได้จากกระบวนการสกัดปิโตรเลียม มักนำมาใช้ในผลิตภัณฑ์เกี่ยวกับผิวหนัง เมื่อทาลงบนผิวจะเหมือนเป็นแผ่นฟิล์มเคลือบผิว ช่วยป้องกันการสูญเสียน้ำ หรือเพิ่มความชุ่มชื้นให้กับผิว ลักษณะใส ไม่มีสี และไม่มีกลิ่นหืน ไม่หมดอายุ แต่ข้อเสียของน้ำมันชนิดนี้ คือ เมื่อทาลงบนผิว ผิวจะเหมือนถูกเคลือบปิดด้วยแผ่นฟิล์ม ทำให้การขับถ่ายของเสียออกจากร่างกายเป็นไปได้ยากกว่าปกติ เนื่องจากมีการปิดกั้นการถ่ายเท ของน้ำและอากศภายในและภายนอกชั้นผิว

2.13.4 โพรพิลีน ไกลคอล (Propylene glycol)

ช่วยเพิ่มความหล่อลื่น ทำให้เนื้อครีม หรือเนื้อเจลมีความลื่น น่าใช้ มักใช้เป็นตัวทำละลาย เนื่องจากโพรพิลีน ไกลคอล สามารถละลายได้ทั้งในน้ำและแอลกอฮอล์ ช่วยเพิ่มความคงตัวของเนื้อครีม เมื่อมีการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิ

2.13.5 โซเดียมพอลิอะคริเลท (Sodium polyacrylate)

มีคุณสมบัติในการดูดซับน้ำได้มากกว่าน้ำหนักของมันเอง จึงมักใช้เป็นตัวประสาน (Emulsifier) และสารสร้างความหนืดในผลิตภัณฑ์ทาผิว

2.13.6 โซเดียม สเตียโรอิล กลูตาเมท (Sodium stearoyl glutamate)

เป็นสารอีกชนิดหนึ่งที่ทำหน้าที่เป็นตัวประสานระหว่างเฟสน้ำและเฟสน้ำมัน ช่วยสร้างเนื้อครีมให้มีความหนืด มีความอ่อนโยนต่อผิว ช่วยในการบำรุงผิว และไม่ก่อให้เกิดอันตราย

2.14 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Hong In-Pyo และคณะ, 2009 ทำการศึกษาว่าถั่งเช่าเป็นที่รู้จักกันในนามปรสิตของแมลง ฟรุตติ้งบอดี้ของเห็ดชนิดนี้มักจะเจริญเติบโตบนตัวหนอน หรือดักแด้ผีเสื้อ ซึ่งเกิดจากการติดเชื้อของราที่ก่อโรคที่เรียกว่า คอร์ดิเซป (Cordyceps) มีงานวิจัยพบว่า เห็ดถั่งเช่าหิมะ หรือถั่งเช่าเกาหลี (*Paecilomyces tenuipes*) มีความสามารถในการต่อต้านมะเร็ง เมื่อทำการทดสอบโดยเพาะเลี้ยงในหลอดทดลอง พบว่าเห็ดชนิดนี้สามารถสร้างความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งได้อย่างมีนัยสำคัญ และเนื่องจากความต้องการเห็ดถั่งเช่ามีเพิ่มมากขึ้น แต่ปริมาณของฟรุตติ้งบอดี้ที่มีไม่เพียงพอ นักวิทยาศาสตร์ในประเทศเกาหลี จึงคิดค้นและพัฒนาวิธีการเพาะเลี้ยงเห็ดถั่งเช่าสายพันธุ์ต่างๆ โดยใช้หนอนไหมเป็นตัวตั้งต้นในการเจริญเติบโตของเห็ด ในงานวิจัยนี้จะทำการวิเคราะห์ปริมาณ

และองค์ประกอบทางเคมีที่มีอยู่ในเห็ดถั่งเช่าสายพันธุ์หลักในประเทศเกาหลี พบว่า ฟรุตติ้งบอดี้ของเห็ดถั่งเช่าที่ทำการเพาะเลี้ยงโดยใช้หนอนไหม มีองค์ประกอบทางเคมี ได้แก่ น้ำตาลที่สามารถละลายได้ (soluble sugar) กรดอะมิโน และกรดไขมัน โดยน้ำตาลที่พบในเห็ดถั่งเช่า ได้แก่ กลีเซอรอล กลูโคส ซูโครส และแมนนิทอล

Sapan, 2015 ทำการศึกว่าเอกโซพอลิแซคคาไรด์ สกัดโดยการปั่นเหวี่ยงเส้นใยชีวมวลที่ 10,000 x g เป็นเวลา 12 นาที จากนั้นนำส่วนใสที่ได้มาผสมกับเอทานอลบริสุทธิ์ ที่มีปริมาตรเป็นสามเท่าของส่วนใส และทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นทำการแยกตะกอนโดยการหมุนเหวี่ยงที่ 8000 x g เป็นเวลา 12 นาที ล้างตะกอนของเอกโซพอลิแซคคาไรด์ด้วยน้ำบริสุทธิ์และทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งเพื่อการวิเคราะห์เชิงปริมาณ

สำหรับอินตราพอลิแซคคาไรด์ ทำการสกัดเส้นใยชีวมวลด้วยน้ำเดือดเป็นเวลา 1 ชั่วโมง และทำการกรองผ่านกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 ของเหลวที่ผ่านการกรองให้ตกตะกอนโดยใช้เอทานอลบริสุทธิ์ และทิ้งไว้ค้างคืน ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ตะกอนของพอลิแซคคาไรด์ที่ได้ นำไปหมุนเหวี่ยงที่ 8000 x g เป็นเวลา 10 นาที ทำการล้างตะกอนอินตราพอลิแซคคาไรด์ ด้วยน้ำบริสุทธิ์และต่อมาทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง เพื่อวิเคราะห์เชิงปริมาณ

โอภา วัชระคุปต์ และ คณะ, 2549 ศึกษาการวัดฤทธิ์ต้านออกซิเดชั่นโดย DPPH เป็นวิธีที่ง่าย และใช้กันอย่างทั่วไปในการฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจากสารสกัดจากธรรมชาติ วิธี DPPH เป็นการวัดความสามารถของสารในการรีดิวซ์อนุมูลอิสระ DPPH' (2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl) ซึ่งเป็นอนุมูลอิสระมีธาตุไนโตรเจนขาดอิเล็กตรอน มีสีม่วง มีค่าการดูดกลืนแสงที่ 517 นาโนเมตร เมื่อสารต้านออกซิเดชันให้อิเล็กตรอนแก่อนุมูลอิสระ DPPH' ทำให้สารนี้เจือจางลงจนเป็นสีเหลืองอ่อน และค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ก็จะลดลงอีกด้วย

Sapan, 2015 ศึกษาการกำจัดอนุมูลอิสระของ DPPH วิธีนี้ทำได้โดยนำสารละลาย DPPH (200 ไมโครโมลาร์) ที่ความเข้มข้นต่างกัน (2-10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) เติมลงในตัวอย่างที่ละลายในเอทานอล 0.05 มิลลิลิตร เติมเอทานอล ในจำนวนที่เท่ากันในชุดควบคุม ใช้กรดแอสคอร์บิก (วิตามินซี) เป็นตัวควบคุม อ่านค่าการดูดกลืนแสงหลังจากบ่มทิ้งไว้เป็นเวลา 20 นาที ที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร ร้อยละการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH จะคำนวณได้โดยใช้สูตร A_0-A_P / A_0 x 100 โดยที่ A_0 เป็นค่าการดูดกลืนของสารที่เป็นตัวควบคุม และ A_P เป็นค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่าง

บทที่ 3
วิธีดำเนินงานวิจัย

3.1 อุปกรณ์

3.1.1 หม้อนึ่งความดัน

3.1.2 เครื่องอบสุญญากาศ

3.1.3 ตู้ปลอดเชื้อ

3.1.4 เครื่องหมุนเหวี่ยง

3.1.5 ตู้อบลมร้อน

3.1.6 เครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิ

3.1.7 เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง

3.1.8 อ่างน้ำร้อน

3.1.9 เครื่องกวนสารให้ความร้อน

3.1.10 แท่งแม่เหล็กกวนสาร

3.1.11 ช้อนตักสาร

3.1.12 บีกเกอร์ ขนาด 250 และ 500 มิลลิลิตร

3.1.13 ขวดโหลแก้ว ขนาด 16 ออนซ์

3.1.14 ออโต้ปิเปต ขนาด 1000-5000 ไมโครลิตร

3.1.15 มีดผ่าตัด

3.1.16 เข็มเขี่ยเชื้อ

3.1.17 ค็อกบอเรอร์

3.1.18 ฟอร์เซพ

3.1.19 ฟลาสก์ ขนาด 250 มิลลิลิตร

3.1.20 หลอดเซนตริฟิวจ์

3.1.21 ขวดแบน

3.1.22 จานเพาะเชื้อ

3.1.23 ขวดดูแรน

3.1.24 ตะเกียงแอลกอฮอล์

3.1.25 แท่งแก้วคนสาร

3.1.26 กระบอกตวง

3.1.27 เขียง

3.1.28 มีด

3.1.29 หม้อ

3.1.30 เตาแก๊ส

3.1.31 ตะแกรงใส่หลอดทดลอง

3.1.32 ไมโครเพลทลีดเดอร์

3.1.33 สเปกโตรโฟโตมิเตอร์

3.1.34 หลอดทดลอง

3.1.35 ปิเปต

3.1.36 จุกยาง

3.1.37 โกร่งบดยา

3.1.38 กระดาษกรอง เซลลูโลสอะซิเตรท

3.1.39 สำลี

3.2 สารเคมี

3.2.1 โซเดียมพอลิอะคริเลท

3.2.2 ไดคาพริลิล อีเธอร์

3.2.3 ไมเนอรัล ออย 70

3.2.4 โพรพิลีน ไกลคอล

3.2.5 ดีเอ็มดีเอ็ม ไฮแดนโทอิน

3.2.6 โซเดียม สเตียโรอิล กลูตาเมท

3.2.7 ไฮโดรเจนเปอร์รอกไซด์

3.2.8 สารสกัดจากยีสต์

3.2.9 กลูโคส

3.2.10 เปปโตน

3.2.11 เอทานอลร้อยละ 95

3.2.12 สารละลายกลูโคสมาตรฐาน

3.2.13 สารละลายแอนโทรน

3.2.14 สารละลายดีพีพีเอช

3.3 การเตรียมหัวเชื้อเริ่มต้น

3.3.1 การเตรียมหัวเชื้อในอาหารแข็งหรือตัวหนอน

นำหัวเชื้อเริ่มต้นหรือหัวเชื้อเหลวใส่ลงในหนอนเพื่อทำการเพาะเลี้ยง โดยเตรียมขวดโหลแก้วขนาด 16 ออนซ์ ใส่ตัวหนอน 30 กรัม ที่ผ่านการอบ 2-3 ชั่วโมง และนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ

ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที จากนั้นใส่หัวเชื้อเหลวลงไป ปริมาตร 5 มิลลิลิตร แล้วนำไปเพาะเลี้ยงในที่มืด ที่อุณหภูมิ 18-20 องศาเซลเซียส จนเส้นใยเจริญเต็มอาหาร และนำไปเลี้ยงต่อในที่มีแสง เพื่อชักนำการเกิดเป็นฟรุตติ้งบอดี้ และนำฟรุตติ้งบอดี้ที่ได้ไปเพาะเลี้ยงในอาหาร Potato Dextrose Agar (PDA)

3.3.2 การเตรียมหัวเชื้อในอาหารแข็ง PDA

นำฟรุตติ้งบอดี้ที่ได้มาทำการฆ่าเชื้อด้วยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) ความเข้มข้นร้อยละ 3 เป็นเวลา 5 นาที แล้วล้างด้วยน้ำเปล่าที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว จากนั้นตัดเป็นชิ้นเล็กๆ ความยาวประมาน 1 เซนติเมตร และวางลงบนอาหารแข็ง PDA (ทำในตู้ปลอดเชื้อ) จากนั้นนำไปเพาะเลี้ยงในที่มืด ที่อุณหภูมิ 18 องศาเซลเซียส

3.3.3 การเตรียมหัวเชื้อในอาหารเหลว PDB เสริม

นำหัวเชื้อเริ่มต้นจากอาหารแข็ง PDA มาค็อก จำนวนทั้งหมด 4 ค็อก มาเลี้ยงในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ซึ่งมี PDB เสริม อยู่ 100 มิลลิลิตร (ทำในตู้ปลอดเชื้อ) ทำการเพาะเลี้ยงในที่มืด ในเครื่องบ่มแบบเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 - 4 วัน เพื่อนำมาใช้เป็นหัวเชื้อในครั้งต่อไป

3.3.4 การเตรียมหัวเชื้อในอาหารแข็งธัญพืช

นำ PDB เสริม ปริมาตร 64.5 มิลลิลิตร ส่วนประกอบแสดงดังในภาคผนวก ก ผสมกับธัญพืช 40 กรัม (ข้าวไรซ์เบอร์รี่ 20 กรัม : ข้าวลืมผัว 20 กรัม) และนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที รอจนข้าวในโหลเย็น จากนั้นใส่หัวเชื้ออาหารเหลวที่เตรียมไว้ ปริมาตร 5 มิลลิลิตร แล้วนำไปเพาะเลี้ยงในที่มืด ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จนเส้นใยเจริญเต็มอาหารและนำไปเลี้ยงต่อในที่มีแสง

3.4 การเก็บผลิตภัณฑ์

หลังจากเส้นใยเจริญเต็มอาหารและนำไปเลี้ยงต่อในที่มีแสง เมื่อผ่านไปประมาณ 14 วัน จะทำการฉีดฮอร์โมน และเลี้ยงต่อไปจนสามารถเก็บดอกได้ (ประมาณ 9 วัน) และนำไปอบในเครื่องทำแห้งแบบสุญญากาศ เป็นเวลา 30 ชั่วโมง ทำการบันทึกน้ำหนักเซลล์แห้ง และทำการบดให้เป็นผงด้วยโกร่งบดยา

3.5 การสกัดสารพอลิแซคคาไรด์

การสกัดพอลิแซคคาไรด์สกัดทำได้โดยดัดแปลงจากวิธีของ Sapan Kumar Charma (2015) นำเห็ดที่อบจนมีความชื้นเหลือไม่เกินร้อยละ 10 บดในโกร่งให้เป็นผงละเอียด จากนั้นชั่งตัวอย่างมา 0.4 กรัม เติมน้ำ 8 มิลลิลิตร นำไปต้มที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส

เป็นเวลา 20 นาที จากนั้น ทำการเก็บส่วนใส และเติมเอทานอล ความเข้มข้นร้อยละ 95 ปริมาตร 4 เท่าจากส่วนใสที่ได้จากการ ปั่นเหวี่ยง และทิ้งให้ตกตะกอนที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงอีกครั้งที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที นำตะกอนที่ได้ไปเป่าให้แห้งด้วยไนโตรเจน จากนั้นนำไปอบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที และหาน้ำหนักตะกอนที่ได้ จากนั้นนำมาเติมน้ำเพื่อละลายตะกอน ให้ได้ความเข้มข้นที่ต้องการ

3.6 การทำโลชั่นทาผิว

ในการทำโลชั่นทาผิวจะแบ่งส่วนผสมออกเป็น 2 เฟส คือเฟสน้ำมันและเฟสน้ำ ขั้นตอนแรกทำได้โดยผสมส่วนผสมในเฟสน้ำมัน ซึ่งได้แก่ โซเดียมพอลิอะคริเลท (sodium polyacrylate) ไดคาพริลิล อีเธอร์ (dicaprylyl ether) โพรพิลีนไกลคอล (propylene glycol) และ ไมเนอรัลออยล์ (mineral oil 70) โดยส่วนผสมนี้สามารถใช้น้ำมันจากธรรมชาติชนิดอื่นได้ เช่น น้ำมันมะพร้าว หลังจากนั้นกวนส่วนผสมทั้งหมดที่อุณหภูมิปกติ จนเป็นเนื้อเดียวกัน ขั้นตอนต่อมา นำส่วนผสมในเฟสน้ำ ซึ่งได้แก่ น้ำกลั่น ซึ่งเป็นส่วนประกอบหลักในการทำโลชั่น ดีเอ็มดีเอ็ม ไฮแดนโทอิน (DMDM hydantoin) และโซเดียม สเตียโรอิล กลูตาเมท (sodium stearoyl glutamate) กวนที่อุณหภูมิปกติให้เข้ากันจนเป็นเนื้อเดียวกัน หลังจากนั้น นำส่วนผสมในขั้นตอนแรกซึ่งเป็นเฟสน้ำมัน และส่วนผสมในขั้นตอนที่สอง ซึ่งเป็นเฟสน้ำ มารวมกันแล้วกวนให้เข้ากันจนเป็นเนื้อเดียวกันที่อุณหภูมิห้อง หรืออาจกวนภายใต้อุณหภูมิร้อนเล็กน้อย เพื่อประหยัดเวลาในการทำให้เนื้อโลชั่นมีความหนืดมากขึ้น ขั้นตอนสุดท้ายเติมน้ำมันหอมระเหย สีผสมตามที่ต้องการ และสารสกัดจากเห็ดถั่งเช่าหิมะ โดยทำการแปรผันสารสกัดจากเห็ดถั่งเช่าหิมะ ที่ปริมาณ 300, 400 และ 500 กรัม โดยส่วนประกอบแสดงดังภาคผนวกที่ 5ข

3.7 การวิเคราะห์ผล

3.7.1 การวิเคราะห์การกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH

การกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH วัดตามวิธีมาตรฐาน (Vamanu E,2012) สำหรับวิธีนี้ใช้สารละลาย DPPH ความเข้มข้น 200 ไมโครโมลาร์ และตัวอย่างที่ความเข้มข้นต่างกัน (0.5, 1, 1.5, 2 และ 2.5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) โดยจะแบ่งสารออกเป็น 4 ชุด ชุดที่ 1 คือ ตัวอย่างที่ความเข้มข้นต่างๆ และสารละลาย DPPH ชุดที่ 2 คือ ตัวอย่างที่ความเข้มข้นต่างๆ และแบลงก์ (เอทานอลความเข้มร้อยละ 95) ชุดที่ 3 คือ ตัวควบคุม (เอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 95 และสารละลาย DPPH) และชุดที่ 4 คือ แบลงก์ (เอทานอลความเข้มร้อยละ 95) และตัวควบคุม (สารละลาย DPPH) ตั้งทิ้งไว้ในที่มืด 20 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร

3.7.2 การวิเคราะห์ปริมาณคาร์โบไฮเดรตด้วยวิธีแอนโทรน (Anthrone method)

เตรียมสารละลายแอนโทรน โดยการชั่งสารแอนโทรน 0.1 กรัม ละลายในกรดซัลฟิวริก (H_2SO_4) ความเข้มข้นร้อยละ 98 ปริมาตร 100 มิลลิลิตร จากนั้นเตรียมสารที่จะนำมาทดสอบ โดยแบ่งสารออกเป็น 3 ชุด ชุดที่ 1 คือ ตัวอย่าง ซึ่งเป็นตะกอนที่ได้จากการสกัดแล้วนำไปเติมน้ำ เพื่อละลายตะกอน ชุดที่ 2 แบลงก์ คือ น้ำกลั่น และชุดที่ 3 คือ สารละลายกลูโคสมาตรฐาน สารชุดที่ 1 เติมตัวอย่างสารสกัดลงในหลอดทดลอง 1 มิลลิลิตร ชุดที่ 2 เติมน้ำกลั่นลงในหลอดทดลอง 1 มิลลิลิตร และสารชุดที่ 3 เติมสารละลายกลูโคสมาตรฐานปริมาตร 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 และ 1 มิลลิลิตร ลงในแต่ละหลอดทดลอง จากนั้นปรับปริมาตรในแต่ละหลอดให้เป็น 1 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น แล้วเติมสารละลายแอนโทรน ปริมาตร 4 มิลลิลิตร ลงในทุกหลอดทดลอง ขณะเติมสารแอนโทรนต้องทำในกระบะน้ำแข็ง แล้วนำไปตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำมาบ่มในน้ำเดือด เป็นเวลา 10 นาที แล้วตั้งทิ้งไว้ให้เย็นลงที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 20 นาที จึงนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 620 นาโนเมตร

3.7.3 การทดสอบคุณลักษณะทั่วไปของโลชั่น

3.7.3.1 คุณลักษณะทางจุลชีววิทยาเบื้องต้น

จำนวนแบคทีเรีย ยีสต์ และราที่เจริญโดยใช้อากาศ (aerobic plate count) ต้องไม่เกิน 10^3 โคโลนีต่อกรัม หรือโคโลนีต่อลูกบาศก์เซนติเมตร ทำได้โดยการนำตัวอย่างโลชั่นปริมาณ 10 กรัม ใส่ลงในอาหาร Trypticase Soy Broth (TSB) ปริมาตร 90 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน จากนั้นทำการ pour plate โดยปิเปตสารละลายตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในอาหาร Potato Dextrose Agar (PDA) ซึ่งเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อรา และอาหาร Trypticase Soy Agar (TSA) ซึ่งเป็นอาหารเลี้ยงแบคทีเรีย นำไปบ่มเป็นเวลา 3 วัน แล้วนำมาตรวจผล

3.7.3.2 คุณลักษณะทางกายภาพและเคมี

ต้องไม่แยกชั้นหรือตกตะกอน หรือต้องมีลักษณะเฉพาะของผลิตภัณฑ์นั้น ผลิตภัณฑ์จะต้องปราศจากสิ่งแปลกปลอม และเมื่อทาบนผิวต้องกระจายตัวได้ง่าย เนียนอยู่กับผิว เช็ดออกได้ง่ายเมื่อต้องการ

เตรียมตัวอย่างโลชั่นเป็น 3 ชุด ได้แก่ ชุดตัวอย่างที่เก็บที่อุณหภูมิ 4-8 องศาเซลเซียส ชุดตัวอย่างที่เก็บในตู้บ่ม 45±2 องศาเซลเซียส และชุดตัวอย่างที่อุณหภูมิห้อง อุณหภูมิ 25±1 องศาเซลเซียสจากนั้นทำการวัดค่าพีเอช เมื่อเวลาผ่านไป 12 ชั่วโมง นำชุดตัวอย่างที่สภาวะต่างๆมาทำการวัดค่าพีเอชและความหนืดอีกครั้ง จำนวน 5 รอบ เพื่อเปรียบเทียบกับค่าพีเอช และความหนืดเริ่มต้น ซึ่งค่าที่ได้ไม่ควรต่างกันมาก ค่าพีเอชที่เป็นที่ยอมรับได้ตามมาตรฐานอุตสาหกรรม คือ 3.5-7.5 จากนั้นทำการประเมินความพึงพอใจของผู้ใช้ โดยการทดสอบแบบ 9 - point hedonic scale โดยหมายเลข 1-9 หมายถึง ไม่ชอบมากที่สุด

ไม่ชอบมาก ไม่ชอบปานกลาง เฉยๆ ชอบเล็กน้อย ชอบปานกลาง ชอบมาก และชอบมากที่สุด ตามลำดับ โดยการทดสอบการทาโลชั่นที่แขน เพื่อดูความหนืด ความชุ่มชื้น การซึมเข้าสู่ผิว การแพ้เบื้องต้น และการยอมรับโดยรวมของผู้ทดสอบอย่างน้อย 30 คน

3.7.4 การวิเคราะห์ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ทำการทดลองโดยวางแผนการทดลองแบบจำแนกทางเดียว One – Way ANOVA โดยทำการทดลอง 30 ซ้ำ และทำการทดสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ย โดยวิธี Duncan New Multiple Range Test และวิเคราะห์ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยใช้โปรแกรม Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) (ดังภาคผนวกที่ ค)

บทที่ 4

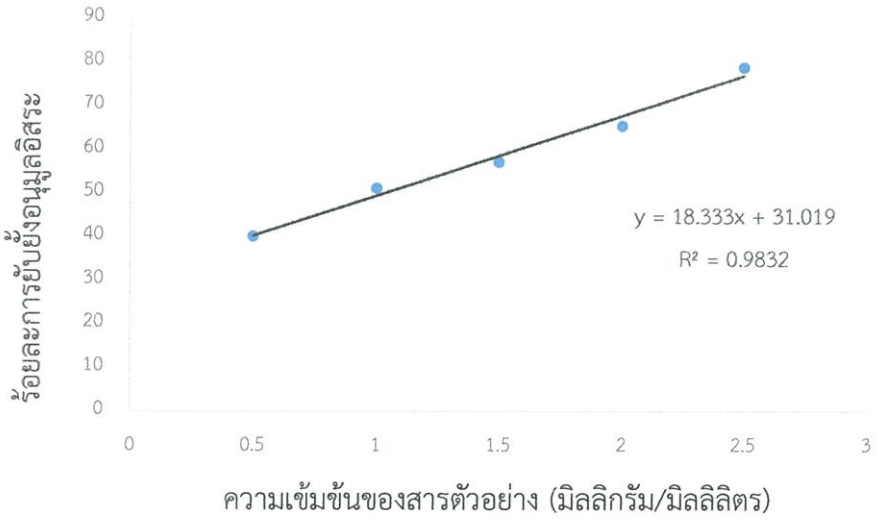
ผลการวิจัยและการอภิปรายผล

4.1 ผลของความชื้นของเห็ดถั่งเช่าหิมะ

ทำการเก็บเกี่ยวผลผลิตเห็ดถั่งเช่าหิมะที่ผ่านการฉีดฮอร์โมนและเจริญเติบโตเต็มที่แล้ว โดยตัดบริเวณเส้นใยที่เจริญอยู่บนฐานธัญพืช นำไปอบเพื่อลดความชื้นและบด พบว่าหากความชื้นมีมากเกินไปจะทำให้บดได้ยาก ไม่เป็นผงละเอียด และนำไปทำการวิเคราะห์ในขั้นตอนอื่นลำบาก ในงานวิจัยนี้ความชื้นสุดท้ายที่เหลืออยู่หลังอบ คือร้อยละ 8.17

4.2 ผลการวิเคราะห์กิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระ DPPH

ในการวิเคราะห์การยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH โดยใช้ตัวอย่างเป็นสารสกัดจากเห็ดถั่งเช่าหิมะที่ความเข้มข้น 0.5, 1, 1.5, 2 และ 2.5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร แล้วนำไปพลอตกราฟเพื่อหาค่าความเข้มข้นของสารต้านอนุมูลอิสระที่สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH ได้ครึ่งหนึ่ง (The half maximal inhibitory concentration; IC_{50})

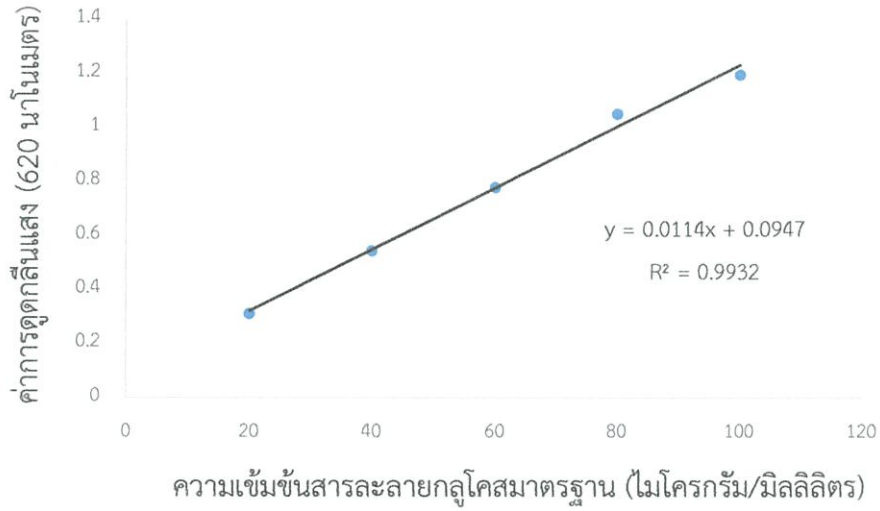


รูปที่ 4.1 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างร้อยละของการยับยั้งอนุมูลอิสระ และความเข้มข้นของสารสกัดจากเห็ดถั่งเช่าหิมะ (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)

จากผลการทดลอง เมื่อคำนวณหาค่า IC_{50} จากกราฟความสัมพันธ์ระหว่างร้อยละของการยับยั้งอนุมูลอิสระ และความเข้มข้นของสารสกัดจากเห็ดถั่งเช่าหิมะที่ความเข้มข้นต่างๆ พบว่าค่าความเข้มข้นที่สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH ได้ครึ่งหนึ่ง เท่ากับ 1.04 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ซึ่งมี

ค่ามากกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับงานวิจัยของ (สุกัลญา, 2558) พบว่าจากการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของสารสกัดจากดอกเห็ดถั่งเช่าสีทอง เมื่อใช้ข้าวไรซ์เบอร์รี่ เป็นอาหารแข็งธัญพืชที่สกัดโดยการระเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่อง ระเหยสารแบบหมุน (rotary evaporator) มีค่าเฉลี่ย IC_{50} เท่ากับ 0.58 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร เนื่องจากการสกัดด้วยเครื่องระเหยสารแบบหมุน มีหลักการทำงาน โดยกลั่นเพื่อแยกตัวทำละลายที่ผสมอยู่ออกจากสารที่ต้องการ จึงอาจทำให้สูญเสียสารสำคัญทางชีวภาพไปในระหว่างการสกัด

4.3 ผลการวิเคราะห์ปริมาณคาร์โบไฮเดรตด้วยวิธีแอนโทรน



รูปที่ 4.2 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 620 นาโนเมตร และความเข้มข้นของสารละลายกลูโคสมาตรฐาน (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)

จากการทดลองวิเคราะห์หาปริมาณคาร์โบไฮเดรตด้วยวิธีแอนโทรนซัลฟิวริก โดยใช้น้ำตาลกลูโคสเป็นสารมาตรฐานในการสร้างกราฟมาตรฐาน และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 620 นาโนเมตร โดยมีน้ำกลั่นเป็นแบลงก์ และเจือจางสารสกัดเห็ดที่ระดับความเจือจาง 10, 50, 100 และ 500 เท่า พบว่าระดับความเจือจางที่มีค่าการดูดกลืนแสงอยู่ในช่วง 0.2-0.8 คือระดับความเจือจาง 50 เท่า แล้วนำไปคำนวณหาปริมาณคาร์โบไฮเดรตที่มีอยู่ โดยนำค่าการดูดกลืนแสง คูณกับระดับความเจือจาง แล้วหารด้วยค่าความชันของกราฟมาตรฐาน พบว่าสารสกัดเห็ดถั่งเช่าหิมะมีปริมาณคาร์โบไฮเดรต 0.934 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ซึ่งมีค่ามากกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับงานวิจัยของ (Sapan, 2015) ที่ทำการศึกษาการสกัดพอลิแซคคาไรด์ที่มีในเห็ดถั่งเช่าหิมะ พบว่า ผลของปริมาตรอาหารเพาะเลี้ยงที่ 150 มิลลิลิตร ความเร็วรอบในการเขย่า 150 รอบต่อนาที เวลาบ่ม 6 วัน และอุณหภูมิ 22 องศาเซลเซียส ได้ปริมาณพอลิแซคคาไรด์สูงสุดอยู่ที่ 0.523, 0.452, 0.518 และ 0.402 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ เนื่องจากสภาวะต่างๆในการเพาะเลี้ยงมีผลต่อการผลิตปริมาณพอลิแซคคาไรด์สูงสุด

4.4 ผลการทดสอบคุณลักษณะของโลชั่น

4.4.1 คุณลักษณะทางด้านจุลชีววิทยาเบื้องต้น

ผลการทดสอบคุณลักษณะทางด้านจุลชีววิทยา เมื่อทำการทดสอบด้วยเทคนิค pour plate ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA (Potato dextrose agar) ซึ่งเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อรา และอาหาร TSA (Trypticase soy agar) ซึ่งเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย และยีสต์ แล้วนำไปบ่มเป็นเวลา 3 วัน พบว่าไม่มีการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค

4.4.2 คุณลักษณะทางด้านกายภาพและเคมี

ผลการทดสอบคุณลักษณะทางกายภาพของโลชั่น เมื่อทำการทดสอบ freeze and thaw ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง จำนวน 5 รอบ แล้วพบว่ากลิ่น สี และความเป็นเนื้อเดียวกันของโลชั่นไม่มีการเปลี่ยนแปลง ส่วนคุณลักษณะทางเคมีของโลชั่นเมื่อทำการทดสอบ freeze and thaw เป็นเวลา 12 ชั่วโมง จำนวน 5 รอบ พบว่าค่าพีเอชเฉลี่ย เท่ากับ 6.36 ซึ่งเป็นค่าที่ยอมรับได้

4.5 ผลการวิเคราะห์ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ จากการประเมินความพึงพอใจของผู้ใช้ 30 คน ที่มีต่อผลิตภัณฑ์โลชั่น

ทำการวิเคราะห์หาความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยใช้ Statistical Package for the Social Sciences (SPSS)

4.5.1 การวิเคราะห์ค่าความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้านต่างๆต่อผลิตภัณฑ์

เมื่อทำการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยความพึงพอใจของผู้ใช้ 30 คนที่มีต่อผลิตภัณฑ์โลชั่น 3 สูตร ในด้านความหนืด การซึมเข้าสู่ผิว ความชุ่มชื้น การแพ้ และการยอมรับโดยรวม พบว่าความพึงพอใจด้านความหนืด การซึมเข้าสู่ผิว และการยอมรับโดยรวม มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ส่วนความพึงพอใจด้านความชุ่มชื้น และการแพ้ ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยตัวอย่างสูตรที่ 3 ได้รับความพึงพอใจมากที่สุด และมีค่าเฉลี่ยด้านการยอมรับโดยรวม 7.93 ดังตารางที่ 4.1 เนื่องจากสูตรที่ 1 และ2 มีน้ำเป็นองค์ประกอบมากกว่าสูตรที่ 3 เมื่อทาลงบนผิวพบว่ามีความเหลวและซึมเข้าสู่ผิวได้ยาก

ตารางที่ 4.1 ตารางแสดงค่าเฉลี่ยด้านต่างๆต่อผลิตภัณฑ์ 3 สูตร

สูตร	ประเด็นการประเมิน				
	ความหนืด	การซึมเข้าสู่ผิว	ความชุ่มชื้น	การแพ้	การยอมรับโดยรวม
1	4.83^{c}	4.33^{c}	7.00^{a}	8.50^{a}	5.87^{c}
2	6.13^{b}	5.00^{b}	7.30^{a}	8.50^{a}	6.83^{b}
3	7.23^{a}	7.37^{a}	7.33^{a}	8.60^{a}	7.93^{a}

หมายเหตุ : ตัวอักษรที่แตกต่างกันหมายถึงมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

บทที่ 5
สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

ในการศึกษาการเพาะเลี้ยงเห็ดถั่งเช่าหิมะโดยใช้สภาวะอาหารแข็ง พบว่าความชื้นสุดท้ายที่เหลืออยู่หลังอบ คือร้อยละ 8.17 และในขั้นตอนการวิเคราะห์กิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระ DPPH โดยใช้สารสกัดเห็ดถั่งเช่าหิมะเป็นตัวอย่าง ที่ความเข้มข้น 0.5, 1, 1.5, 2, และ 2.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยนำค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้มาพลอตกราฟเพื่อหาค่าความเข้มข้นของสารต้านอนุมูลอิสระที่ สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH ได้ร้อยละ 50 พบว่า ค่าความเข้มข้นที่สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH ได้ครึ่งหนึ่ง มีค่าเท่ากับ 1.04 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และในการศึกษาการหาปริมาณคาร์โบไฮเดรตด้วยวิธีแอนโทรน โดยเจือจางสารสกัดเห็ดที่ระดับความเจือจาง 10, 50, 100 และ 500 เท่า พบว่าระดับความเจือจางที่มีค่าการดูดกลืนแสงอยู่ในช่วง 0.2-0.8 คือระดับความเจือจาง 50 เท่า เมื่อนำไปคำนวณหาปริมาณคาร์โบไฮเดรตที่มีอยู่ โดยเทียบกับกราฟกลูโคสมาตรฐาน พบว่ามีปริมาณคาร์โบไฮเดรต 0.934 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร จากนั้นเมื่อได้ผลิตภัณฑ์โลชั่นแล้วจะนำไปตรวจสอบคุณลักษณะทางด้านจุลชีววิทยาเบื้องต้น พบว่าไม่มีการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ก่อโรค และเมื่อทดสอบทางด้านกายภาพและเคมี ด้วยวิธี freeze and thaw ครบทั้ง 5 รอบ พบว่า กลิ่น สี และเนื้อของโลชั่นไม่มีการเปลี่ยนแปลง ค่าพีเอชเฉลี่ยอยู่ที่ 6.36 ซึ่งเป็นค่าที่ยอมรับได้ และเมื่อทำการประเมินความพึงพอใจของผู้ใช้ 30 คน ที่มีต่อผลิตภัณฑ์โลชั่น พบว่า ความพึงพอใจต่อด้านความหนืด การซึมเข้าสู่ผิว และการยอมรับโดยรวม มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และความพึงพอใจด้านความชุ่มชื้น การแพ้ ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยตัวอย่างสูตรที่ 3 ได้รับความพึงพอใจมากที่สุด และมีค่าเฉลี่ยด้านการยอมรับโดยรวม 7.93

5.2 ข้อเสนอแนะ

ในการเพาะเลี้ยงเห็ดถั่งเช่าหิมะในสภาวะอาหารแข็ง เพื่อนำผลผลิตไปทำผลิตภัณฑ์ พบว่าสูตรอาหารที่ใช้ไข่ไก่เป็นแหล่งไนโตรเจน ให้ผลผลิตที่ดีและใช้เวลาในการเพาะเลี้ยงน้อยกว่าสูตรอาหารที่ไม่ใช้ไข่เป็นแหล่งไนโตรเจน ดังนั้นจึงควรใช้ไข่เป็นแหล่งไนโตรเจนแทนเปปโตนและยีสต์สกัด เนื่องจากสามารถหาซื้อได้ง่ายและเป็นผลผลิตทางการเกษตร ซึ่งจะช่วยลดต้นทุนในการเพาะเลี้ยงลงได้ ทั้งนี้ยังควรมีการศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับสภาวะในการเพาะเลี้ยงอื่นๆเพื่อเพิ่มผลผลิตและลดระยะเวลาในการผลิต ซึ่งเป็นผลให้ได้สารสำคัญทางชีวภาพในปริมาณสูงขึ้น

นอกจากนี้ผลงานวิจัยนี้ยังพบว่าในเห็ดถั่งเช่าหิมะ มีสารต้านอนุมูลอิสระอยู่ด้วย จึงเล็งเห็นว่าควรนำไปพัฒนาเพื่อทำผลิตภัณฑ์ ซึ่งงานวิจัยนี้นำไปเป็นส่วนผสมในการผลิตโลชั่น เพื่อชะลอการ

เกิดกระบวนการออกซิเดชั่น ซึ่งกระบวนการออกซิเดชั่นจะสร้างความเสียหายต่อร่างกาย อนุมูลอิสระจะเข้าไปทำลายเซลล์ เมื่อร่างกายไม่สามารถผลิตหรือได้รับสารต้านอนุมูลอิสระเพียงพอที่จะไปยับยั้งหรือไปจับอนุมูลอิสระได้ภายในเซลล์ของร่างกาย ผลคือทำให้เซลล์เกิดความเสียหายและนำไปสู่การเกิดโรคต่างๆ และในถั่งเช่าหิมะ ยังมีสารสำคัญตัวอื่นๆ เช่น กรดคอไดซิปิก คอไดซิปิน อะดีโนซีน ซึ่งเป็นประโยชน์ต่อร่างกาย จึงเหมาะสมที่จะนำไปใช้ประโยชน์ในด้านต่างๆ เช่น นำไปพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์เพื่อการบริโภคเพื่อเป็นอาหารทางด้านสุขภาพ เป็นยารักษาโรค และนำมาใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมเครื่องสำอาง ทั้งนี้ควรมีการศึกษาเกี่ยวกับองค์ประกอบอื่นๆในเห็ดถั่งเช่าหิมะที่ยังไม่พบในงานวิจัยเพิ่มเติม เพื่อหาสารสำคัญในการนำไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมด้านอื่นๆ หรือนำไปเป็นแนวทางในด้านวิชาการต่อไป

เอกสารอ้างอิง

กระทรวงอุตสาหกรรม. 2546. ประกาศกระทรวงอุตสาหกรรม. ฉบับที่ 4470. กรุงเทพฯ.

ดอเล๊าะ ดาลี. 2542. ชีววิทยาจุลินทรีย์. พิมพ์ครั้งที่ 1. ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏยะลา. ยะลา.

พิมพ์เพ็ญ พรเฉลิมพงศ์. 2553. **พอลิแซคคาไรด์** [ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก : http://www.foodnetworksolution.com/wiki/word/1101/polysaccharide (5 มีนาคม 2561)

พรพรรณ ภูมิรัตน์, วิทวัส ตันหยง, นัฏฐเนศวร์ ลับเลิศลบ. 2552. เชื้อราทางการแพทย์. พิมพ์ครั้งที่ 2. คณะเวชศาสตร์เขตร้อนมหาวิทยาลัยมหิดล. กรุงเทพฯ.

มนัส ไพฑูรย์เจริญลาภ. 2553. การวางแผนการทดลองทางชีววิทยา. สาขาวิชาสถิติ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง. กรุงเทพฯ.

วิทยา กดุมภะ. 2555. เบต้ากลูแคน. พิมพ์ครั้งที่ 2. สำนักพิมพ์เพชรประกาย. กรุงเทพฯ.

นิธิยา รัตนาปนนท์. 2553. ***Staphylococcus aureus*** [ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก : http://www.foodnetworksolution.com/wiki/word/1197/staphylococcus-aureus (28 พฤษภาคม2561)

เย็นจิตร เตชะดำรงสิน. 2557. วารสารการแพทย์แผนไทยและการแพทย์ทางเลือก. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรมการแพทย์แผนไทยและการแพทย์ทางเลือก. กรุงเทพฯ.

รัชนี คงคาฉุยฉาย และริญ เจริญศิริ. 2559. **อนุมูลอิสระ** [ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก : http://dna.kps.ku.ac.th/index.php/article-rice-rsc-rgdu/36-free-radicle-antioxidant-anthrocyanidin (5 มีนาคม 2561)

วิชัย โชควิวัฒน และคณะ. 2551. ตำรับยาจีนที่ใช้บ่อยในประเทศไทย เล่ม 3. พิมพ์ครั้งที่ 1. สำนักงานกิจการโรงพิมพ์องค์การทหารผ่านศึกในพระบรมราชูปถัมภ์. กรุงเทพฯ.

ศรีวัฒนา คงจิตรสมบูรณ์. 2548. **สารต้านอนุมูลอิสระ** [ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก :

https://www.doctor.or.th/article/detail/1346 (5 มีนาคม 2561)

สุกัลญา หลีแจ้ และคณะ. 2558. ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดเห็ดถั่งเช่าสีทองที่เพาะเลี้ยงบนข้าวไรซ์เบอรี่และข้าวหอมมะลิ. พิมพ์ครั้งที่ 1. วิทยาลัยการแพทย์แผนตะวันออก มหาวิทยาลัยรังสิต. กรุงเทพฯ.

อารี ฤทธิบูรณ์. 2559. ปฏิบัติการเทคโนโลยีของเอนไซม์. พิมพ์ครั้งที่ 3. โครงการตำราคณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง. กรุงเทพฯ.

โอภา วัชระคุปต์. 2549. สารต้านอนุมูลอิสระ. พิมพ์ครั้งที่ 1. พี เอส พริ้นท์. กรุงเทพฯ.

Alberto L, Anelis Q, Meily S, Elias NR, Jose C and Julio CS 2008. Rapid and sensitive anthrone-sulfuric acid assay in microplate format to quantify carbohydrate in biopharmaceutical products: Method development and validation, Biological 36: 134-141.

Cairui Lu, Haoyu Li, Cong Li, Bang Chen and Yehua Shen 2018. Chemical composition and radical scavenging activity of *Amygdalus pedunculata* Pall leaves' essential oil, Food and Chemical Toxicology. 7: 1-6.

Dejian H and Boxin O 2005. The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 53: 1841-1856.

Fang QH and Zhong JJ 2002. Submerged fermentation of higher fungus *Ganoderma lucidum* for production of valuable bioactive metabolites-anoderic acid and polysaccharide, Biochemical Engineering Journal. 10: 61-65.

Hong IP, Nam SH, Sung GB, Lee KG, Cho SM, Seok SJ, Hyeon Hur, Lee MW and Guo SX 2009. Chemical composition of main Cordyceps species in Korea, International Journal Industrial. 18: 13-17.

Kumar Sapkota, Moon SM, Choi BS, Seung Kim, Kim YS and Kim SJ 2011.

Enchancement of IL-18 expression by *Paecilomyces tenuipes,* Mycoscience. 52: 260-267.

Sapan Kumar Sharma. 2015. Optimized extraction and antioxidant activities of polysaccharide from two entomogenous fungi, Bioanalysis and Biomedicine Journal. 1: 180-186.

Vamanu E. 2012. Biological activities of the polysaccharides produced in submerged culture of two edible *Pleurotus ostreatus* mushrooms, Journal Biomedical Biotechnology. 76: 709-717

Wasser S. 2002. Medicinal mushrooms as a soure of antitumor and immunomodulating polysaccharides. Applied Microbiology and Biotechnology 60: 258-274

Yelda Hangun-Balkir and Megan L. McKenny. 2012. Determination of antioxidant activities of berries and resveratrol, Green Chemistry Letters and Reviews. 5: 147-153.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก
การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

ภาคผนวก 1ก การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร Potato dextrose agar (PDA) เตรียมปริมาตร 1000 มิลลิลิตร

สูตรที่ 1 (ไม่ใส่ไข่)

น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร
มันฝรั่ง	200	กรัม
ข้าวโพดอ่อน	50	กรัม
กลูโคส	10	กรัม
ยีสต์สกัด	5	กรัม
เปปโตน	5	กรัม
วุ้นบริสุทธิ์	20	กรัม

หั่นมันฝรั่งให้มีลักษณะเป็นลูกเต๋าขนาดประมาน 1 ลูกบาศก์เซนติเมตร และหั่นข้าวโพดอ่อนให้มีลักษณะเป็นแว่นบางๆ จากนั้นต้มน้ำจนเดือด เมื่อน้ำเดือดใส่มันฝรั่งและข้าวโพดอ่อนที่เตรียมไว้ลงไป และต้มเป็นเวลา 20 นาที เมื่อครบกำหนด นำมากรองผ่านผ้าขาวบาง และทำการปรับปริมาตรโดยเติมน้ำกลั่นจนครบ 1000 มิลลิลิตร เติมกลูโคส ยีสต์ เปปโตน และวุ้นบริสุทธิ์ และคนจนละลายเป็นเนื้อเดียวกัน นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

สูตรที่ 2 (ใส่ไข่)

น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร
มันฝรั่ง	200	กรัม
ข้าวโพดอ่อน	50	กรัม
กลูโคส	10	กรัม
ไข่ไก่	65	กรัม
วุ้นบริสุทธิ์	20	กรัม

ต้มมันฝรั่งและข้าวโพดเป็นเวลา 20 นาที เมื่อครบกำหนด นำมากรองผ่านผ้าขาวบาง และทำการปรับปริมาตรโดยเติมน้ำกลั่นจนครบ 1000 มิลลิลิตร เติมกลูโคส ไข่ไก่ และผงวุ้นบริสุทธิ์ คนจนละลายเป็นเนื้อเดียวกัน นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

ภาคผนวก 2ก การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร potato dextrose broth (PDB) เตรียมปริมาตร 1000 มิลลิลิตร

สูตรที่ 1 (ไม่ใส่ไข่)

น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร
มันฝรั่ง	200	กรัม
ข้าวโพดอ่อน	50	กรัม
กลูโคส	10	กรัม
ยีสต์สกัด	5	กรัม
เปปโตน	5	กรัม

ต้มมันฝรั่งและข้าวโพดเป็นเวลา 20 นาที เมื่อครบกำหนด นำมากรองผ่านผ้าขาวบาง และทำการปรับปริมาตรโดยเติมน้ำกลั่นจนครบ 1000 มิลลิลิตร เติมกลูโคส ยีสต์ เปปโตน และคนจนละลายเป็นเนื้อเดียวกัน นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

สูตรที่ 2 (ใส่ไข่)

น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร
มันฝรั่ง	200	กรัม
ข้าวโพดอ่อน	50	กรัม
กลูโคส	10	กรัม
ไข่ไก่	65	กรัม

ต้มมันฝรั่งและข้าวโพดเป็นเวลา 20 นาที เมื่อครบกำหนด นำมากรองผ่านผ้าขาวบาง และทำการปรับปริมาตรโดยเติมน้ำกลั่นจนครบ 1000 มิลลิลิตร เติมกลูโคส และไข่ คนจนละลายเป็นเนื้อเดียวกัน นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

สูตรที่ 3 เสริม (ไม่ใส่ไข่)

น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร
มันฝรั่ง	200	กรัม
ข้าวโพดอ่อน	50	กรัม
กลูโคส	20	กรัม
ยีสต์สกัด	5	กรัม
เปปโตน	5	กรัม

ต้มมันฝรั่งและข้าวโพดเป็นเวลา 20 นาที เมื่อครบกำหนด นำมากรองผ่านผ้าขาวบาง และทำการปรับปริมาตรโดยเติมน้ำกลั่นจนครบ 1000 มิลลิลิตร เติมกลูโคส ยีสต์ และเปปโตน คนจนละลายเป็นเนื้อเดียวกัน นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

สูตรที่ 4 เสริม (ใส่ไข่)

น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร
มันฝรั่ง	200	กรัม
ข้าวโพดอ่อน	50	กรัม
กลูโคส	20	กรัม
ไข่ไก่	65	กรัม

ต้มมันฝรั่งและข้าวโพดเป็นเวลา 20 นาที เมื่อครบกำหนด นำมากรองผ่านผ้าขาวบาง และทำการปรับปริมาตรโดยเติมน้ำกลั่นจนครบ 1000 มิลลิลิตร เติมกลูโคส ยีสต์ และเปปโตน คนจนละลายเป็นเนื้อเดียวกัน นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

ภาคผนวก ข

การเตรียมสารและการวิเคราะห์

ภาคผนวก 1ข การเตรียมสารละลายกลูโคสมาตรฐาน (standard glucose solution)

ในการทดลองหาปริมาณคาร์โบไฮเดรตด้วยวิธีแอนโทรน จะต้องเตรียมสารละลายกลูโคสมาตรฐาน โดยสต็อกของสารละลายกลูโคสมาตรฐาน (stock standard solution) จะเตรียมได้โดยชั่งกลูโคส ปริมาณ 100 มิลลิกรัม (คิดเป็น 0.1 กรัม) ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 100 มิลลิลิตร จะได้เป็นสต็อกสารละลายกลูโคสที่ความเข้มข้น 1000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร จากนั้นทำการเจือจางสต็อกสารละลาย เพื่อให้ได้ความเข้มข้นของสารละลายที่พร้อมใช้งาน (working standard solution) โดยปิเปตจากสต็อกสารละลายมา 10 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น ให้มีปริมาตรสุดท้ายเป็น 100 มิลลิลิตร ความเข้มข้นสุดท้ายของสารละลายที่พร้อมใช้งานคือ 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

คำนวณ $C_1V_1 = C_2V_2$

เมื่อ C_1 คือ ความเข้มข้นเริ่มต้นของสารละลาย

V_1 คือ ปริมาตรเริ่มต้นของสารละลาย

C_2 คือ ความเข้มข้นสุดท้ายของสารละลาย

V_2 คือ ปริมาตรสุดท้ายของสารละลาย

แทนค่า (1000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) (10 มิลลิลิตร) = C_2 (100 มิลลิลิตร)

(10000 ไมโครกรัม)/(100 มิลลิลิตร) = C_2

C_2 = 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

C_2 = 0.1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร

ตารางภาคผนวกที่ 1ข การเจือจางสารละลายกลูโคสมาตรฐาน ด้วยน้ำกลั่นให้ได้ความเข้มข้น 20-100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

หลอดที่	สารละลายกลูโคส (มิลลิลิตร)	น้ำกลั่น (มิลลิลิตร)	สารละลายกลูโคสมาตรฐาน (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)
1	0.2	0.8	20
2	0.4	0.6	40
3	0.6	0.4	60
4	0.8	0.2	80
5	1	0	100

ภาคผนวก 2ข การเตรียมสารละลาย DPPH

ต้องการเตรียมสารละลาย DPPH ที่ความเข้มข้น 200 ไมโครโมลาร์ ปริมาตร 50 มิลลิลิตร

คำนวณ $g / MW = CV / 1000$

เมื่อ g คือ มวลของสาร (กรัม)

MW คือ มวลโมเลกุลของสาร

C คือ ความเข้มข้นของสารที่ต้องการเตรียม

V คือ ปริมาตรของสาร

แทนค่า $g / 394.32 = (200 \times 10^{-6}$ โมลาร์) (50 มล.) / 1000

$g = 0.0039$ กรัม

ภาคผนวก 3ข การเจือจางสารสกัดจากเห็ดถั่งเช่าหิมะ

หลังจากนำตะกอนของเห็ดถั่งเช่าหิมะไปอบและชั่งน้ำหนักตะกอนแล้ว จะต้องเติมน้ำกลั่นลงไปเพื่อละลายตะกอนให้เป็นสารสกัดเห็ด

ตัวอย่างการคำนวณ : ชั่งน้ำหนักตะกอนได้ 0.024 กรัม จะเติมน้ำกลั่นลงไปอีก 2.4 มิลลิลิตร จะคำนวณหาความเข้มข้นของสารสกัดเห็ด ในหน่วย มิลลิกรัม/มิลลิลิตร

สารสกัดปริมาตร	2.4	มิลลิลิตร	มีปริมาณเห็ด	24	มิลลิกรัม
สารสกัดปริมาตร	1	มิลลิลิตร	มีปริมาณเห็ด	10	มิลลิกรัม

เพราะฉะนั้น ความเข้มข้นเริ่มต้นของสารสกัดเห็ดถั่งเช่าหิมะ คือ 10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ในการทดลองวิเคราะห์การกำจัดสารอนุมูลอิสระ จะต้องทำการเจือจางสารสกัดเห็ดให้มีความเข้มข้น 0.5, 1, 1.5, 2 และ 2.5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร

คำนวณ $C_1V_1 = C_2V_2$

ตัวอย่างการคำนวณ : ต้องการเตรียมสารสกัดเห็ดให้มีความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ปริมาตร 300 ไมโครลิตร จากตัวอย่างเห็ดที่มีความเข้มข้นเริ่มต้น 10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร

แทนค่า $(10$ มก./มล.$) V_1 = (0.5$ มก./มล.$) (0.3$ มล.$)$

$V_1 = 0.015$ มล.

เพราะฉะนั้น จะต้องปิเปตสารสกัดเห็ด 0.015 มิลลิลิตร หรือ 15 ไมโครลิตร จากนั้นเติมน้ำกลั่นอีก 285 ไมโครลิตร จะได้สารสกัดเห็ดที่มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 0.5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร

ปริมาตร 300 ไมโครลิตร จากนั้นจะนำไปทำการทดสอบในขั้นตอนต่อไป คือการวิเคราะห์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH

ภาคผนวก 4ข การเตรียมสารสกัดจากเห็ดถั่งเช่าหิมะเพื่อใส่ในโลชั่น

ในองค์ประกอบโลชั่นจะมีการแปรผันปริมาณสารสกัดเห็ดถั่งเช่าหิมะ เป็น 300, 400 และ 500 กรัม ต่อการผลิตโลชั่น 10 กิโลกรัม ดังนั้นเมื่อมีการผลิตโลชั่นในแต่ละครั้งจะต้องคำนวณปริมาณสารสกัดเห็ด เพื่อใส่ลงไปในโลชั่นแทนที่ปริมาณส่วนที่เป็นน้ำ

ตัวอย่างการคำนวณ : ต้องการเตรียมโลชั่น 500 กรัม

การผลิตโลชั่น	10000	กรัม	ต้องใส่สารสกัดเห็ด	300	กรัม
การผลิตโลชั่น	500	กรัม	ต้องใส่สารสกัดเห็ด	15	กรัม

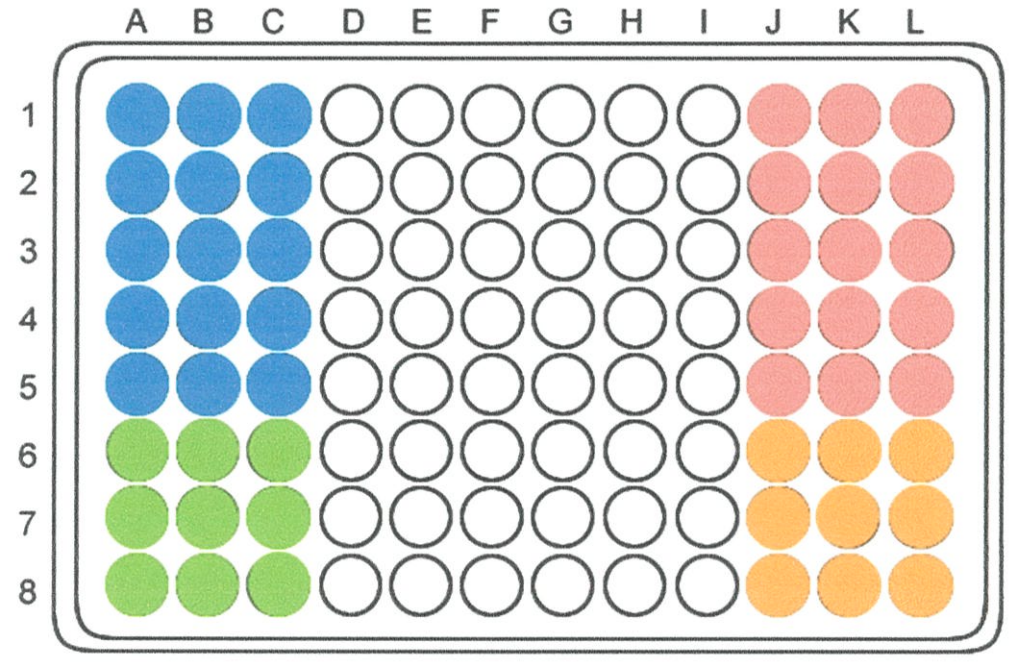
ภาคผนวก 5ข การเตรียมโลชั่น

ส่วนผสมของโลชั่นทาผิว (ผลิตได้ 10 กิโลกรัม)

Sodium polyacrylate	80	กรัม
Dicaprylyl ether	300	กรัม
Mineral oil 70	400	กรัม
Propylene glycol	400	กรัม
DMDM hydantoin	60	กรัม
น้ำกลั่น	8,710	กรัม
Sodium stearoyl glutamate	20	กรัม
น้ำหอมหรือน้ำมันหอมระเหย	30	กรัม
สีผสม	ตามที่ต้องการ	
สารสกัดจากเห็ดถั่งเช่าหิมะ ***		

*** ทำการแปรผันสารสกัดจากเห็ดถั่งเช่าหิมะ ปริมาณ 300, 400 และ 500 กรัม โดยปริมาณสารสกัดจากเห็ดถั่งเช่าหิมะ จะใส่ทดแทนปริมาณน้ำที่มีอยู่ในสูตร

ภาคผนวก 6ข การเติมสารลงในไมโครเพลท



รูปที่ 1ข อธิบายการเติมสารลงในไมโครเพลท ชนิด 96 หลุม

ชุดที่ 1 อัตราส่วนของความเข้มข้นของตัวอย่างเห็ดถั่งเช่าหิมะ ที่ความเข้มข้นต่างๆ และสารละลาย DPPH (40:160 ไมโครลิตร)

1) ตัวอย่างความเข้มข้น 0.5 มก./มล. หลุม A1-A3
2) ตัวอย่างความเข้มข้น 1 มก./มล. หลุม B1-B3
3) ตัวอย่างความเข้มข้น 1.5 มก./มล. หลุม C1-C3
4) ตัวอย่างความเข้มข้น 2 มก./มล. หลุม D1-D3
5) ตัวอย่างความเข้มข้น 2.5 มก./มล. หลุม E1-E3

ชุดที่ 2 อัตราส่วนของความเข้มข้นของตัวอย่างเห็ดถั่งเช่าหิมะ ที่ความเข้มข้นต่างๆ และแบลงก์ (เอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 95) (40:160 ไมโครลิตร)

1) ตัวอย่างความเข้มข้น 0.5 มก./มล. หลุม A10-A12
2) ตัวอย่างความเข้มข้น 1 มก./มล. หลุม B10-B12
3) ตัวอย่างความเข้มข้น 1.5 มก./มล. หลุม C10-C12
4) ตัวอย่างความเข้มข้น 2 มก./มล. หลุม D10-D12
5) ตัวอย่างความเข้มข้น 2.5 มก./มล. หลุม E10-E12

ชุดที่ 3 อัตราส่วนตัวควบคุม (เอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 95 และสารละลาย DPPH 190:10 ไมโครลิตร)

หลุม F1-F3 , G1-G3 และ H1-H3

ชุดที่ 4 อัตราส่วนแบลงก์ (เอทานอลความเข้มร้อยละ 95) และตัวควบคุม (สารละลาย DPPH) (100:100 ไมโครลิตร)

หลุม F10-F12 , G10-G12 และ H10-H12

ภาคผนวก 7ข แบบประเมินความพึงพอใจ

ตารางภาคผนวกที่ 2ข แบบประเมินความพึงพอใจต่อผลิตภัณฑ์โลชั่นจากสารสกัดของเห็ดถั่งเช่าหิมะ

คำชี้แจง ให้ผู้ทดสอบประเมินตัวอย่างจำนวน 3 ตัวอย่างดังต่อไปนี้ โดยการเติมหมายเลขลงบนช่องที่กำหนดตามระดับความชอบหรือไม่ชอบที่มีต่อตัวอย่างนั้นๆ

เกณฑ์การประเมิน

9 = ชอบมากที่สุด

8 = ชอบมาก

7 = ชอบปานกลาง

6 = ชอบเล็กน้อย

5 = เฉย ๆ

4 = ไม่ชอบเล็กน้อย

3 = ไม่ชอบปานกลาง

2 = ไม่ชอบมาก

1 = ไม่ชอบมากที่สุด

ประเด็นประเมิน	โลชั่นจากสารสกัดของเห็ดถั่งเช่า		
	สูตรที่ 1	สูตรที่ 2	สูตรที่ 3
1.ความหนืด			
2.ความชุ่มชื้น			
3.การซึมเข้าสู่ผิว			
4.การแพ้			
5.การยอมรับโดยรวม			

ภาคผนวก ค

ข้อมูลผลการทดลองและการคำนวณทางสถิติ

ภาคผนวก 1ค การคำนวณปริมาณความชื้น

หลังจากเก็บตัวอย่างเห็ดถั่งเช่าหิมะแล้ว จะต้องนำไปอบให้แห้ง จนมีความชื้นไม่เกินร้อยละ 10 ซึ่งคำนวณได้จากสูตร

$$\text{ปริมาณความชื้น} = \frac{\text{น้ำหนักตัวอย่างหลังอบ-น้ำหนักตัวอย่างก่อนอบ}}{\text{น้ำหนักตัวอย่างก่อนอบ (กรัม)}} \times 100$$

ภาคผนวก 2ค การคำนวณร้อยละของการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH (%)

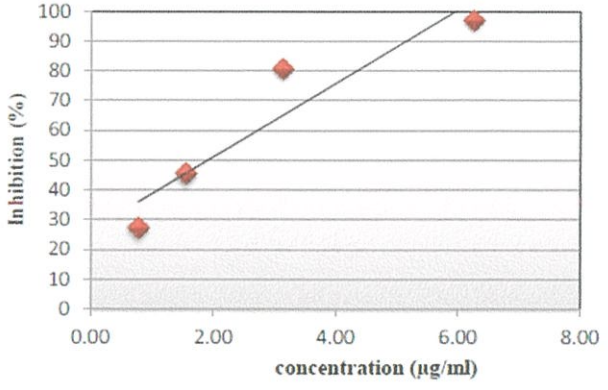
$$\text{การยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH (\%)} = A_0\text{-}A_P \,/\, A_0 \times 100$$

โดยที่ A_0 เป็นค่าการดูดกลืนของสารที่เป็นตัวควบคุม

A_P เป็นค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่าง

ภาคผนวก 3ค การคำนวณค่าความเข้มข้นของสารที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งปฏิกิริยาได้ครึ่งหนึ่ง (IC_{50})

นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้จากกิจกรรมการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH มาคำนวณหาร้อยละของการยับยั้งอนุมูลอิสระ ตามสูตรข้างต้น และนำร้อยละของการยับยั้งอนุมูลอิสระไปพลอตกราฟ โดยให้แกนแนวตั้ง (y) เป็นค่าร้อยละการยับยั้งอนุมูลอิสระ และแกนแนวนอน (x) เป็นค่าความเข้มข้นของสารสกัด (มก./มล.) แล้วคำนวณหาแนวโน้มสมการ เพื่อให้ได้สมการเส้นตรง y = mx + c



รูปที่ 1ค ตัวอย่างกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างร้อยละการยับยั้งและความเข้มข้นสารสกัด

เมื่อได้สมการเส้นตรงแล้ว จะแทนค่า y ในสมการเป็น 50 ซึ่งหมายถึง ความสามารถที่สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระได้ครึ่งหนึ่ง แล้วคำนวณหาค่า x ซึ่งเป็นค่าความเข้มข้นสารสกัด (มก./มล.)

สมการเส้นตรง $y = mx + c$

โดยที่ y คือ ร้อยละการยับยั้งอนุมูลอิสระ

m คือ ความชันของกราฟ

x คือ ความเข้มข้นสารสกัด (มก./มล.)

c คือ จุดตัดแกน y

ภาคผนวก 4ค การคำนวณปริมาณคาร์โบไฮเดรตด้วยวิธีแอนโทรน

การคำนวณปริมาณคาร์โบไฮเดรตนั้นคำนวณได้จาก การนำค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างที่ความยาวคลื่น 620 นาโนเมตร คูณกับระดับความเจือจาง แล้วหารด้วยความชันของกราฟมาตรฐานที่ได้จากการวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายกลูโคสมาตรฐาน ความเข้มข้น 20, 40, 60, 80 และ 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ซึ่งจากการทดลอง ได้ค่าความชันของกราฟมาตรฐานเท่ากับ 0.0114

คำนวณ ปริมาณคาร์โบไฮเดรต (กรัม/ลิตร) $= \dfrac{\text{ค่าการดูดกลืนแสง x ระดับความเจือจาง}}{\text{ความชันของกราฟมาตรฐาน}}$

แทนค่า ปริมาณคาร์โบไฮเดรต $= \dfrac{0.213 \times 50}{0.0114}$

ปริมาณคาร์โบไฮเดรต = 934.21 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

= 0.0009 กรัม/ลิตร

ภาคผนวก 5ค ผลการประเมินความพึงพอใจต่อผลิตภัณฑ์โลชั่นจากสารสกัดของเห็ดถั่งเช่าหิมะ

ตารางภาคผนวกที่ 1ค ตารางเปรียบเทียบผลการประเมินความพึงพอใจต่อความหนืดของผลิตภัณฑ์ 3 ตัวอย่าง จากผู้ทดสอบจำนวน 30 คน

ผู้ทดสอบ	ความหนืด		
	สูตรที่ 1	สูตรที่ 2	สูตรที่ 3
1	4	6	8
2	4	5	6
3	4	7	7

(ต่อ)

4	5	5	7
5	6	6	8
6	7	5	7
7	4	7	8
8	5	7	6
9	5	6	7
10	3	7	7
11	6	6	8
12	7	6	6
13	6	7	7
14	6	7	8
15	4	6	7
16	5	5	7
17	4	6	8
18	5	4	6
19	6	6	7
20	4	5	8
21	4	8	7
22	4	7	8
23	4	6	7
24	5	6	8
25	6	6	7
26	5	7	8
27	4	5	8
28	4	7	6
29	5	8	7
30	4	5	8
ค่าเฉลี่ย	4.83	6.13	7.23
ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน	1.02	0.97	0.73

ตารางภาคผนวกที่ 2ค ตารางเปรียบเทียบผลการประเมินความพึงพอใจต่อการซึมเข้าสู่ผิวของผลิตภัณฑ์ 3 ตัวอย่าง จากผู้ทดสอบจำนวน 30 คน

ผู้ทดสอบ	การซึมเข้าสู่ผิว		
	สูตรที่ 1	สูตรที่ 2	สูตรที่ 3
1	3	5	7
2	4	5	8
3	4	6	8
4	3	4	7
5	3	4	8
6	5	6	7
7	5	5	8
8	4	4	7
9	6	7	7
10	4	4	8
11	4	4	8
12	5	5	6
13	4	6	8
14	5	5	7
15	5	5	8
16	4	4	6
17	5	5	7
18	3	5	8
19	5	4	7
20	4	5	7
21	5	4	8
22	4	5	7
23	6	5	7
24	4	5	7
25	5	6	8
26	4	6	7
27	3	7	7

(ต่อ)

28	5	6	7
29	5	4	8
30	4	4	8
ค่าเฉลี่ย	4.33	5	7.37
ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน	0.84	0.91	0.61

ตารางภาคผนวกที่ 3ค ตารางเปรียบเทียบผลการประเมินความพึงพอใจต่อความชุ่มชื้นของผลิตภัณฑ์ 3 ตัวอย่าง จากผู้ทดสอบจำนวน 30 คน

ผู้ทดสอบ	ความชุ่มชื้น		
	สูตรที่ 1	สูตรที่ 2	สูตรที่ 3
1	5	7	5
2	6	7	6
3	6	8	8
4	8	8	7
5	6	7	7
6	5	8	9
7	8	6	8
8	9	8	6
9	7	7	8
10	6	5	7
11	7	8	8
12	7	8	7
13	8	9	8
14	6	9	7
15	8	7	9
16	5	6	5
17	6	8	7
18	7	8	8
19	8	6	9

(ต่อ)

20	8	7	7
21	6	7	9
22	7	8	7
23	8	5	8
24	7	8	7
25	6	7	7
26	9	8	8
27	8	6	6
28	7	9	8
29	8	8	7
30	8	7	6
ค่าเฉลี่ย	7	7.33	7.3
ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน	1.14	1.06	1.09

ตารางภาคผนวกที่ 4ค ตารางเปรียบเทียบผลการประเมินความพึงพอใจต่อการแพ้ของผลิตภัณฑ์ 3 ตัวอย่าง จากผู้ทดสอบจำนวน 30 คน

ผู้ทดสอบ	การแพ้		
	สูตรที่ 1	สูตรที่ 2	สูตรที่ 3
1	8	8	8
2	8	9	9
3	8	8	9
4	9	9	9
5	9	9	9
6	8	9	8
7	9	8	9
8	9	8	9
9	8	9	8
10	8	8	8
11	8	9	9

(ต่อ)

12	9	9	9
13	9	9	8
14	8	8	9
15	9	8	8
16	8	9	9
17	8	8	9
18	9	9	8
19	9	9	9
20	9	8	8
21	8	8	9
22	9	8	8
23	9	9	9
24	8	8	9
25	8	9	9
26	9	9	8
27	9	8	8
28	9	8	9
29	8	9	8
30	8	8	9
ค่าเฉลี่ย	8.5	8.5	8.6
ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน	0.51	0.51	0.50

ตารางภาคผนวกที่ 5ค ตารางเปรียบเทียบผลการประเมินความพึงพอใจต่อการยอมรับโดยรวมของผลิตภัณฑ์ 3 ตัวอย่าง จากผู้ทดสอบจำนวน 30 คน

ผู้ทดสอบ	การยอมรับโดยรวม		
	สูตรที่ 1	สูตรที่ 2	สูตรที่ 3
1	6	6	7
2	5	7	8
3	7	7	8

(ต่อ)

4	8	6	9
5	5	7	7
6	6	8	8
7	5	7	7
8	5	6	8
9	6	7	9
10	6	7	9
11	4	8	8
12	5	6	8
13	7	7	9
14	6	7	7
15	5	8	9
16	7	6	8
17	5	6	8
18	5	7	7
19	8	6	8
20	6	7	9
21	6	8	8
22	6	7	8
23	6	7	9
24	5	7	8
25	7	8	7
26	6	6	7
27	4	7	7
28	6	7	8
29	6	6	7
30	7	6	8
ค่าเฉลี่ย	5.87	6.83	7.93
ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน	1.01	0.70	0.74

ภาคผนวก 6ค ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้านความหนืดต่อผลิตภัณฑ์ ที่ได้จากแบบประเมินความพึงพอใจ เมื่อนำไปวิเคราะห์ค่าความแตกต่างโดยวิธีการคำนวณทางสถิติ

Oneway

Descriptives

ความหนืด

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
1	30	4.83	1.020	.186	4.45	5.21	3	7
2	30	6.13	.973	.178	5.77	6.50	4	8
3	30	7.23	.728	.133	6.96	7.51	6	8
Total	90	6.07	1.339	.141	5.79	6.35	3	8

ANOVA

ความหนืด

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	86.600	2	43.300	51.604	.000
Within Groups	73.000	87	.839		
Total	159.600	89			

Post Hoc Tests

Homogeneous Subsets

ความหนืด

Duncan[a]

สูตร	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
1	30	4.83		
2	30		6.13	
3	30			7.23
Sig.		1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 30.000.

ภาคผนวก 7ค ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้านการซึมเข้าสู่ผิวต่อผลิตภัณฑ์ ที่ได้จากแบบประเมินความพึงพอใจ เมื่อนำไปวิเคราะห์ค่าความแตกต่างโดยวิธีการคำนวณทางสถิติ

Oneway

Descriptives

การซึมเข้าสู่ผิว

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
1	30	4.33	.844	.154	4.02	4.65	3	6
2	30	5.00	.910	.166	4.66	5.34	4	7
3	30	7.37	.615	.112	7.14	7.60	6	8
Total	90	5.57	1.529	.161	5.25	5.89	3	8

ANOVA

การซึมเข้าสู่ผิว

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	152.467	2	76.233	119.214	.000
Within Groups	55.633	87	.639		
Total	208.100	89			

Post Hoc Tests

Homogeneous Subsets

การซึมเข้าสู่ผิว

Duncan[a]

สูตร	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
1	30	4.33		
2	30		5.00	
3	30			7.37
Sig.		1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 30.000.

ภาคผนวก 8ค ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้านความชุ่มชื้นต่อผลิตภัณฑ์ ที่ได้จากแบบประเมินความพึงพอใจ เมื่อนำไปวิเคราะห์ค่าความแตกต่างโดยวิธีการคำนวณทางสถิติ

Oneway

Descriptives

ความชุ่มชื้น

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
1	30	7.00	1.145	.209	6.57	7.43	5	9
2	30	7.33	1.061	.194	6.94	7.73	5	9
3	30	7.30	1.088	.199	6.89	7.71	5	9
Total	90	7.21	1.096	.116	6.98	7.44	5	9

ANOVA

ความชุ่มชื้น

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	2.022	2	1.011	.838	.436
Within Groups	104.967	87	1.207		
Total	106.989	89			

Post Hoc Tests

Homogeneous Subsets

ความชุ่มชื้น

Duncan[a]

สูตร	N	Subset for alpha = 0.05
		1
1	30	7.00
3	30	7.30
2	30	7.33
Sig.		.273

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 30.000.

ภาคผนวก 9ค ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้านการแพ้ต่อผลิตภัณฑ์ ที่ได้จากแบบประเมินความพึงพอใจ เมื่อนำไปวิเคราะห์ค่าความแตกต่างโดยวิธีการคำนวณทางสถิติ

Oneway

Descriptives

การแพ้

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
1	30	8.50	.509	.093	8.31	8.69	8	9
2	30	8.50	.509	.093	8.31	8.69	8	9
3	30	8.60	.498	.091	8.41	8.79	8	9
Total	90	8.53	.502	.053	8.43	8.64	8	9

ANOVA

การแพ้

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.200	2	.100	.392	.677
Within Groups	22.200	87	.255		
Total	22.400	89			

Post Hoc Tests

Homogeneous Subsets

การแพ้

Duncan[a]

สูตร	N	Subset for alpha = 0.05
		1
1	30	8.50
2	30	8.50
3	30	8.60
Sig.		.475

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 30.000.

ภาคผนวก 10ค ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้านการยอมรับโดยรวมต่อผลิตภัณฑ์ ที่ได้จากแบบประเมินความพึงพอใจ เมื่อนำไปวิเคราะห์ค่าความแตกต่างโดยวิธีการคำนวณทางสถิติ

Oneway

Descriptives

การยอมรับโดยรวม

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
1	30	5.87	1.008	.184	5.49	6.24	4	8
2	30	6.83	.699	.128	6.57	7.09	6	8
3	30	7.93	.740	.135	7.66	8.21	7	9
Total	90	6.88	1.179	.124	6.63	7.12	4	9

ANOVA

การยอมรับโดยรวม

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	64.156	2	32.078	46.904	.000
Within Groups	59.500	87	.684		
Total	123.656	89			

Post Hoc Tests

Homogeneous Subsets

การยอมรับโดยรวม

Duncan[a]

สูตร	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
1	30	5.87		
2	30		6.83	
3	30			7.93
Sig.		1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 30.000.

งานทะเบียนคณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

คำรับรองเล่มโครงงานพิเศษ

วันที่ 27 เดือน มิถุนายน พ.ศ 2561

ข้าพเจ้า นางสาว ปวีนา กัลยาประสิทธิ์ รหัสประจำตัว 57050725

นางสาว สุพิชฌา บุญอินทร์ รหัสประจำตัว 57050774

นักศึกษาหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ ภาควิชา ชีววิทยา

ขอรับรองว่าโครงงานพิเศษ เรื่อง

ชื่อภาษาไทย การผลิตโลชั่นที่มีส่วนผสมของสารสกัดจากเห็ดถั่งเช่าหิมะ

ชื่อภาษาอังกฤษ Production of Lotion from *Isaria tenuipes* Extracts

ปีการศึกษา 2560

เป็นผลงานวิจัยที่มิได้คัดลอกหรือละเมิดลิขสิทธิ์ของผู้อื่นและได้ผ่านการตรวจสอบความซ้ำซ้อนเรียบร้อยแล้ว และได้แนบเอกสารการตรวจสอบการลอกเลียนงานวรรณกรรมที่ตรวจสอบจากเล่มโครงงานพิเศษฉบับสมบูรณ์แล้ว

โปรแกรมอักขราวิสุทธิ์.....2.08.....%

ลงชื่อ...ปวีนา กัลยาประสิทธิ์... ลงชื่อ...สุพิชฌา บุญอินทร์...

(น.ส.ปวีนา กัลยาประสิทธิ์) (น.ส.สุพิชฌา บุญอินทร์)

นักศึกษา นักศึกษา

ข้าพเจ้า รศ.อารี ฤทธิบูรณ์ อาจารย์ที่ปรึกษาโครงงานพิเศษ ได้ตรวจสอบโครงงานพิเศษของนักศึกษาข้างต้นแล้ว ขอรับรองว่าเป็นผลงานวิจัยของนักศึกษาจริงและมีเนื้อหาสมบูรณ์ จึงลงชื่อไว้เป็นหลักฐาน

ลงชื่อ.....

อาจารย์ที่ปรึกษา