



การพัฒนาวิธีโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงเพื่อศึกษาอิทธิพลของกรดโฟลิกต่อปริมาณการ
ผลิตคอร์ไดเซปินและอะดีโนซีนในเห็ดถั่งเช่าสีทอง

DEVELOPMENT OF HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHIC METHOD
FOR THE STUDY OF INFLUENCE OF FOLIC ACID ON CORDYCEPIN AND ADENOSINE
PRODUCTION IN *CORDYCEPS MILITARIS*

นุชนาฏ ตุ่มท่าไม้

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

2562

การพัฒนาวิธีโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงเพื่อศึกษาอิทธิพลของกรดฟอสฟอริกต่อปริมาณการ
ผลิตคอร์ไดเซปินและอะดีโนซีนในเห็ดถั่งเช่าสีทอง



ปริญญานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ
ปีการศึกษา 2562
ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

DEVELOPMENT OF HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHIC METHOD
FOR THE STUDY OF INFLUENCE OF FOLIC ACID ON CORDYCEPIN AND ADENOSINE
PRODUCTION IN *CORDYCEPS MILITARIS*



NUTCHANARD TUMTAMAI

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of MASTER OF SCIENCE

(Chemistry)

Faculty of Science, Srinakharinwirot University

2019

Copyright of Srinakharinwirot University

ปริญญานิพนธ์

เรื่อง

การพัฒนาวิธีโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงเพื่อศึกษาอิทธิพลของกรดฟอสฟอริกต่อปริมาณการผลิต
คอรีโดเซปินและอะดีโนซีนในเห็ดถึงเช่าสี่ทอง

ของ

นุชนาฏ ตุ่มท่าไม้

ได้รับอนุมัติจากบัณฑิตวิทยาลัยให้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเคมี

ของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

(รองศาสตราจารย์ นายแพทย์ฉัตรชัย เอกปัญญาสกุล)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

คณะกรรมการสอบปากเปล่าปริญญานิพนธ์

ที่ปรึกษาหลัก

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปิยะดา จิตรตั้งประเสริฐ)

ประธาน

(รองศาสตราจารย์ ดร. เกสัชกรหญิงชุติมา
เพชรกระจ่าง)

ที่ปรึกษาร่วม

(ดร.ศิริขวัญ พลประทีป)

กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร.สิริธร สโมสร)

ชื่อเรื่อง	การพัฒนาวิธีโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงเพื่อศึกษาอิทธิพลของกรดโฟลิกต่อการปริมาณการผลิตคอร์โดเซปินและอะดีโนซีนในเห็ดถั่งเช่าสีทอง
ผู้วิจัย	นุชนาฏ คุ้มท่าไม้
ปริญญา	วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต
ปีการศึกษา	2562
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ปิยะดา จิตรตั้งประเสริฐ
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	ดร. ศิริขวัญ พลประทีป

ในงานวิจัยนี้ได้ทำการศึกษากิจกรรมของกรดโฟลิกที่ส่งผลต่อการผลิตคอร์โดเซปินและอะดีโนซีนในเห็ดถั่งเช่าสีทอง (*Cordyceps militaris*) ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงที่พัฒนาขึ้น โดยศึกษาการเติมกรดโฟลิกที่แตกต่างกันในช่วงในระดับความเข้มข้น 0-50 มิลลิกรัมต่อลิตร ลงในอาหารเพาะเลี้ยงเพื่อศึกษาปริมาณการผลิตคอร์โดเซปินและอะดีโนซีนโดยนำดอกเห็ดที่เพาะเลี้ยงในสภาวะต่าง ๆ มาทำให้แห้ง และสกัดแบบการใช้คลื่นอัลตราซาวด์ (UAE) ในสภาวะที่เหมาะสมที่มีน้ำเป็นตัวทำละลายเป็นเวลา 30 นาทีที่อุณหภูมิห้อง เพื่อแยกคอร์โดเซปินและอะดีโนซีนออกจากเห็ดถั่งเช่าสีทอง จากนั้นนำสารสกัดมาวิเคราะห์ด้วยคอลัมน์ C18 (4.6 x 150 mm, i.d.) ที่มีสารละลายเอทานอลเข้มข้นร้อยละ 8 โดยปริมาตร เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ และการตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร ผลการทดลองพบว่าสามารถแยกคอร์โดเซปิน และอะดีโนซีนได้พร้อมกันภายในเวลา 9.00 นาทีที่อัตราการไหล 1.20 มิลลิเมตรต่อวินาที โดยวิธีที่พัฒนาขึ้นให้ค่าความเป็นเส้นตรงของคอร์โดเซปินและอะดีโนซีนในช่วงความเข้มข้น 0.02-200 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยมีค่าสัมประสิทธิ์เชิงเส้นที่ดี ($R^2 > 0.999$) มีความเที่ยงของวิธีในรูปของค่าความเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (RSD) น้อยกว่า 2.0% ค่าความเข้มข้นต่ำสุดของการตรวจวัด และค่าความเข้มข้นต่ำสุดของการวิเคราะห์ปริมาณของสารออกฤทธิ์ทั้ง 2 ชนิด เท่ากับ 5 และ 20 นาโนกรัมต่อลิตร ตามลำดับ และมีค่าร้อยละการคืนกลับของคอร์โดเซปิน และอะดีโนซีน อยู่ในช่วง 82.04-104.51% และ 100.91-104.28% ตามลำดับ สำหรับการประยุกต์วิธีที่พัฒนาขึ้นนี้ในการตรวจวิเคราะห์คอร์โดเซปิน และอะดีโนซีนแบบพร้อมกันในตัวอย่างเห็ดถั่งเช่าสีทองที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่มีการเติมกรดโฟลิกความเข้มข้นต่าง ๆ พบว่าการเติมกรดโฟลิกลงไปในการเพาะเลี้ยงช่วยเพิ่มปริมาณการผลิตคอร์โดเซปินอย่างมีนัยสำคัญ อย่างไรก็ตามกรดโฟลิกไม่ได้มีผลอย่างมีนัยสำคัญต่อการผลิตปริมาณอะดีโนซีนในเห็ดถั่งเช่าสีทอง จากผลการทดลองพบว่าเห็ดถั่งเช่าสีทองที่ทำการเพาะเลี้ยงในอาหารที่เติมกรดโฟลิกความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ลงไปทำให้มีปริมาณการผลิตคอร์โดเซปินมากที่สุดในสัปดาห์ที่ 13 หลังกระตุ้นแสง โดยปริมาณคอร์โดเซปินเท่ากับ 2220.27 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม

คำสำคัญ : คอร์โดเซปิน, อะดีโนซีน, เห็ดถั่งเช่าสีทอง, โครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง

Title	DEVELOPMENT OF HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHIC METHOD FOR THE STUDY OF INFLUENCE OF FOLIC ACID ON CORDYCEPIN AND ADENOSINE PRODUCTION IN <i>CORDYCEPS MILITARIS</i>
Author	NUTCHANARD TUMTAMAI
Degree	MASTER OF SCIENCE
Academic Year	2019
Thesis Advisor	Assistant Professor Dr. Piyada Jittangprasert
Co Advisor	Dr. Sirikwan Ponprateep

In this research, the effects of folic acid on cordycepin and adenosine production in *Cordyceps militaris* were studied using the developed high-performance liquid chromatographic method. The different concentrations of folic acid in the range of 0-50 mg/L were added into the culture media to evaluate their effects on cordycepin and adenosine production. The fruiting bodies were dried and extracted using ultrasound-assisted extraction (UAE) method for extraction of both cordycepin and adenosine produced by *Cordyceps militaris*. The optimal conditions were achieved using water as an extraction solvent for 30 minutes at room temperature. The chromatographic separation was performed on C18 column (4.6 x 150 mm, 5 μ m) using 8% ethanol solution as a mobile phase with an UV detection at 260 nm. The results showed that both compounds were separated in 9.0 min at flow rate of 1.20 ml/min. The linear calibration curves were obtained over the concentration range of 0.02-200 mg/L for both cordycepin and adenosine with high correlation coefficients ($R^2 > 0.999$). The precision was measured in terms of relative standard deviation (RSD) values. The RSDs of the method were less than 2.5%. The limit of detection and limit of quantitation of cordycepin and adenosine were 5 and 20 ng/L, respectively. The percentage recoveries of cordycepin and adenosine were obtained in the range of 82.04-104.51% and 100.91-104.28%, respectively. The developed method was successfully applied for the separation of cordycepin and adenosine in *Cordyceps militaris* cultured in various folic acid conditions. The results showed that culture media with added folic acid significantly increased the production of cordycepin. However, folic acid was not significantly affected for adenosine production in *Cordyceps militaris*. It was found that *Cordyceps militaris* cultured in media with 0.1 mg/L of folic acid and provided the highest amount of cordycepin in the 13 weeks after stimulating by light. The amount of cordycepin was 2220.27 mg/100 g.

Keyword : High-performance liquid chromatography, Cordycepin, Adenosine, Folic acid, *Cordyceps militaris*

กิตติกรรมประกาศ

ปริญญานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี เพราะผู้วิจัยได้รับความกรุณาร้อยอย่างยิ่งจากผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ปิยะดา จิตรตั้งประเสริฐ และ ดร. ศิริขวัญ พลประทีป อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก และอาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ท่านได้เสียสละอันมีค่าเพื่อให้คำปรึกษาและแนะนำในการดำเนินงานวิจัยทุกขั้นตอน ตลอดจนแก้ไขข้อบกพร่องสิ่งต่าง ๆ อย่างดียิ่ง อีกทั้งทำให้ผู้วิจัยได้รับประสบการณ์ในการทำงานวิจัย ได้รับความรู้และเห็นคุณค่าของงานวิจัย พร้อมทั้งยังเป็นแบบอย่างของอาจารย์ที่ทุ่มเทให้กับศิษย์ในงานด้านการวิจัยและพัฒนาอย่างไม่เหน็ดเหนื่อย ผู้วิจัยรู้สึกซาบซึ้งและขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ โอกาสนี้

ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. เกสัชกรหญิง ชุติมา เพชรกระจำง อาจารย์จากภาควิชาเกสัชเคมี คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล และ รองศาสตราจารย์ ดร. สิริธร สโมสร ที่ให้ความกรุณาเป็นประธานและกรรมการในการสอบปากเปล่าปริญญานิพนธ์ครั้งนี้และให้คำแนะนำเพื่อให้ปริญญานิพนธ์มีความสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณ เงินรายได้มหาวิทยาลัยประจำปีงบประมาณ 2561 (078/2562) ที่ให้ทุนสนับสนุนการทำปริญญานิพนธ์ในครั้งนี้ และขอขอบคุณภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒที่คอยให้การสนับสนุนทางด้านอุปกรณ์ เครื่องมือ และสถานที่ ตลอดจนเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการเคมีที่คอยให้ความช่วยเหลือแก่ผู้วิจัยตลอดการศึกษาและการทำวิจัย ผู้วิจัยรู้สึกซาบซึ้งในความกรุณาและขอขอบคุณทุก ๆ ท่านไว้ ณ โอกาสนี้

ขอขอบคุณ คุณหยุด แซ่มประเสริฐ ฟาร์มลุงหยุด จังหวัดสระบุรี ที่ให้ความร่วมมือ และให้คำแนะนำในการเพาะเลี้ยงเห็ดถึงเช่าสีทองในการทำวิจัยครั้งนี้

ขอขอบคุณครอบครัว เพื่อนๆ พี่ๆ และน้อง ๆ วิทยาศาสตร์มหบัณฑิต ภาควิชาเคมี มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ที่เป็นกำลังใจและคอยช่วยเหลือมาโดยตลอด

คุณค่าของปริญญานิพนธ์ฉบับนี้ ขอมอบเป็นเครื่องบูชาพระคุณต่อครอบครัวของผู้วิจัย ผู้วิจัยขอน้อมรำลึกถึงพระคุณบิดา มารดา และญาติสนิททุกท่านที่มอบความรัก กำลังใจ และความเอาใจใส่ และสนับสนุนในทุก ๆ ด้าน ทำให้ผู้วิจัยประสบความสำเร็จในครั้งนี้

นุชนาฏ ตุ่มท่าไม้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ	ช
สารบัญตาราง.....	ณ
สารบัญรูปภาพ	ญ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
ภูมิหลัง	1
ความมุ่งหมายของการวิจัย.....	3
ความสำคัญของการวิจัย	3
ขอบเขตการวิจัย	3
ขั้นตอนการดำเนินงาน	4
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	5
เห็ดถั่งเช่าสีทอง	5
สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในเห็ดถั่งเช่าสีทอง	7
คอร์ไดเซปิน (Cordycepin).....	8
อะดีโนซีน (Adenosine)	9
กรดโฟลิก	10
งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	11
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย.....	16
เครื่องมือ อุปกรณ์ และสารเคมีที่ใช้ในการวิจัย	16

วิธีดำเนินการวิจัย.....	18
การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของวิธีการสกัดแบบการใช้คลื่นอัลตราซาวด์สำหรับการสกัด สารออกฤทธิ์คอร์โคโรไดเซปินและอะดีโนซีนจากเห็ดถั่งเช่าสีทอง.....	18
การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของวิธีวิเคราะห์ปริมาณคอร์โคโรไดเซปิน และอะดีโนซีนแบบ พร้อมกัน โดยใช้เทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง	19
การศึกษาประสิทธิภาพของวิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้น.....	21
การศึกษาการเพาะเลี้ยงเห็ดถั่งเช่าสีทองในอาหารเพาะเลี้ยงที่มีการเติม กรดโฟลิก.....	22
การประยุกต์ใช้วิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นสำหรับตรวจวิเคราะห์ปริมาณ คอร์โคโรไดเซปิน และอะ ดีโนซีนที่สกัดได้จากเห็ดถั่งเช่าสีทอง	24
บทที่ 4 ผลการทดลอง.....	25
การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของวิธีการสกัดแบบการใช้คลื่นอัลตราซาวด์สำหรับการสกัดสาร ออกฤทธิ์คอร์โคโรไดเซปินและอะดีโนซีนจากเห็ดถั่งเช่าสีทอง	25
การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของวิธีวิเคราะห์ปริมาณคอร์โคโรไดเซปินและอะดีโนซีนแบบพร้อมกัน โดยใช้เทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง	29
การศึกษาประสิทธิภาพของวิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้น.....	37
การศึกษาการเพาะเลี้ยงเห็ดถั่งเช่าสีทองในอาหารเพาะเลี้ยงที่มีการเติมกรดโฟลิก	39
การประยุกต์ใช้วิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นสำหรับตรวจวิเคราะห์ปริมาณคอร์โคโรไดเซปินและ อะ ดีโนซีนที่สกัดได้จากเห็ดถั่งเช่าสีทอง	41
บทที่ 5 สรุปผล อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ	46
บรรณานุกรม	49
ประวัติผู้เขียน.....	53

สารบัญตาราง

	หน้า
ตาราง 1 ผลการศึกษาช่วงความเป็นเส้นตรง	37
ตาราง 2 ผลการศึกษาความเที่ยงของวิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้น	38
ตาราง 3 ผลการศึกษาค่าร้อยละการคืนกลับ	39
ตาราง 4 ปริมาณอะดีโนซีนในเห็ดถั่งเช่าที่เพาะเลี้ยงด้วยอาหารที่มีการเติมกรดโฟลิกความเข้มข้น ต่าง ๆ ในช่วงเวลาการเก็บเกี่ยวสัปดาห์ที่ 9-14 หลังกระตุ้นด้วยแสง	41
ตาราง 5 ปริมาณคอร์ไดเซปินในเห็ดถั่งเช่าที่เพาะเลี้ยงด้วยอาหารที่มีการเติมกรดโฟลิกความ เข้มข้นต่าง ๆ ในช่วงเวลาการเก็บเกี่ยวสัปดาห์ที่ 9-14 หลังกระตุ้นด้วยแสง	42



สารบัญรูปภาพ

	หน้า
ภาพประกอบ 1 วงจรชีวิตของเห็ดถั่งเช่า	6
ภาพประกอบ 2 <i>Cordyceps militaris</i>	7
ภาพประกอบ 3 โครงสร้างคอร์โดเซปิน	8
ภาพประกอบ 4 โครงสร้างอะดีโนซีน	9
ภาพประกอบ 5 โครงสร้างกรดโฟลิก	10
ภาพประกอบ 6 เมแทบอลิซึมของกรดโฟลิก	11
ภาพประกอบ 7 กราฟแสดงสัญญาณพื้นที่ได้ฟิคของคอร์โดเซปินและอะดีโนซีนที่วิเคราะห์ได้หลังการสกัดด้วยตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ	26
ภาพประกอบ 8 กราฟแสดงสัญญาณพื้นที่ได้ฟิคของคอร์โดเซปินและอะดีโนซีนที่วิเคราะห์ได้หลังการสกัดด้วยน้ำในช่วงปริมาตร 10-20 มิลลิลิตร	27
ภาพประกอบ 9 กราฟแสดงสัญญาณพื้นที่ได้ฟิคของคอร์โดเซปินและอะดีโนซีนที่วิเคราะห์ได้หลังการสกัดด้วยน้ำปริมาตร 10.00 มิลลิลิตร ในช่วงระยะเวลา 15-90 นาที	28
ภาพประกอบ 10 กราฟแสดงสัญญาณพื้นที่ได้ฟิคของคอร์โดเซปินและอะดีโนซีนที่วิเคราะห์ได้หลังการสกัดด้วยน้ำที่จำนวนครั้งต่าง ๆ ของการสกัด	29
ภาพประกอบ 11 สเปกตรัมการดูดกลืนแสงของคอร์โดเซปินและอะดีโนซีน	30
ภาพประกอบ 12 โคมาโทแกรมของสารสกัดเห็ดถั่งเช่าสีทอง เมื่อใช้สารละลายเมทานอลเข้มข้น (ก) ร้อยละ 17 (ข) ร้อยละ 18 (ค) ร้อยละ 19 โดยปริมาตร เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่	31
ภาพประกอบ 13 โคมาโทแกรมของสารสกัดเห็ดถั่งเช่าสีทอง เมื่อใช้สารละลายอะซิโตนไตรคลอโร เอ็มแซน (ก) ร้อยละ 7 (ข) ร้อยละ 8 (ค) ร้อยละ 9 เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่	32
ภาพประกอบ 14 โคมาโทแกรมของสารสกัดเห็ดถั่งเช่าสีทอง เมื่อใช้สารละลายเอทานอลเข้มข้น (ก) ร้อยละ 8 (ข) ร้อยละ 9 (ค) ร้อยละ 10 เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่	33

ภาพประกอบ 15 โครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานอะดีโนซีนและคอร์โดเซปิน โดยใช้ สารละลายเอทานอลเข้มข้นร้อยละ 8 โดยปริมาตร เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ที่อัตราการไหล 1.20 มิลลิลิตรต่อนาที.....	35
ภาพประกอบ 16 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการไหลของวัฏภาคเคลื่อนที่ และเวลาของ การคงอยู่ของคอร์โดเซปิน และอะดีโนซีนเมื่อใช้สารละลายเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 8 โดย ปริมาตร เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่.....	36
ภาพประกอบ 17 การเจริญเติบโตของเห็ดถั่งเช่าสีทองที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่มีปริมาณ กรดฟอลิกแตกต่างกันในช่วงเวลา (ก) บ่มในที่มืดสัปดาห์ที่ 3 (การเจริญเส้นใย) และกระตุ้นด้วย แสง (ข) สัปดาห์ที่ 1 และ (ค) สัปดาห์ที่ 9 (การเจริญของดอก)	40
ภาพประกอบ 18 กราฟแสดงปริมาณอะดีโนซีนในเห็ดถั่งเช่าที่เพาะเลี้ยงด้วยอาหารที่มีการเติม กรดฟอลิกความเข้มข้นต่าง ๆ ในช่วงเวลาการเก็บเกี่ยวสัปดาห์ที่ 9-14 หลังกระตุ้นด้วยแสง	43
ภาพประกอบ 19 กราฟแสดงปริมาณคอร์โดเซปินในเห็ดถั่งเช่าที่เพาะเลี้ยงด้วยอาหารที่มีการเติม กรดฟอลิกความเข้มข้นต่าง ๆ ในช่วงเวลาการเก็บเกี่ยวสัปดาห์ที่ 9-14 หลังกระตุ้นด้วยแสง	43
ภาพประกอบ 20 เส้นทางการสังเคราะห์คอร์โดเซปินและอะดีโนซีนในเห็ดถั่งเช่า	44
ภาพประกอบ 21 ตัวอย่างโครมาโทแกรมของตัวอย่างเห็ดถั่งเช่าที่เพาะเลี้ยงด้วยอาหารที่เติม กรดฟอลิกความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร.....	45

บทที่ 1

บทนำ

ภูมิหลัง

เห็ดถั่งเช่า หรือ ตังถั่งเช่า แปลเป็นไทยว่า ถูหนุนาวเป็นหนอน ถูร้อนเป็นหญ้า หรือที่เรียกกันว่า หญ้าหนอน เป็นเห็ดในตระกูล *Cordyceps* เป็นเห็ดสมุนไพรที่ได้จากแมลงหรือจากรากินแมลงที่พบมากกว่า 500 สายพันธุ์ (Zheng et al., 2011) พันธุ์ที่ได้รับความนิยมและมีชื่อเสียงได้แก่ ถั่งเช่าทิเบต (*Cordyceps sinensis*) ถั่งเช่าหิมะ (*Paecilomyces tenuiprs* หรือ *Isaria japonica*) ถั่งเช่าจ๊กจั่น (*Paecilomyces cicadae* หรือ *Isaria sinclairii*) และ ถั่งเช่าสีทอง (*C. militaris*) ซึ่งเป็นเห็ดที่สามารถพบได้ที่ทุ่งหญ้าบนเทือกเขาหิมาลัยที่ความสูงประมาณ 4,200 – 4,600 เมตรเหนือจากระดับน้ำทะเล (ภัทระ ฉลาดแพทย์, 2554) ในบริเวณที่มีอุณหภูมิ 10 - 28 องศาเซลเซียส เห็ดถั่งเช่าจัดว่าเป็นผลิตภัณฑ์ธรรมชาติที่เป็นประโยชน์นำมาใช้เป็นยา รักษาโรคและอาหารบำรุงร่างกายของคนพื้นบ้านในแถบเอเชียตะวันออกเฉียงมาตั้งแต่อดีตกาล (Zhao et al., 2014) ในประเทศไทยเห็ดถั่งเช่าสีทองได้รับความนิยมอย่างมากและมีการเพาะเลี้ยงมากกว่า 10 ปี มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่หลากหลาย เช่น ช่วยปรับสมดุลต่าง ๆ ในร่างกายให้เป็นปกติ กระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน เป็นยาชูกำลังและส่งเสริมให้มีชีวิตยืนยาว โดยในเห็ดถั่งเช่าสีทองนั้นมีสารออกฤทธิ์สำคัญที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่น่าสนใจทางเภสัชวิทยาและมีปริมาณมาก คือ คอริโดเซปิน (Cordycepin) มีคุณสมบัติทางการแพทย์ในการช่วยเพิ่มประสิทธิภาพของระบบไหลเวียนเลือด ช่วยให้อุดสามารถนำเอาออกซิเจนไปใช้อย่างมีประสิทธิภาพ ช่วยด้านอนุมูลอิสระ กระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน เพิ่มประสิทธิภาพทางเพศ มีฤทธิ์ด้านการแพร่กระจายของมะเร็ง (Yoon, Park, & Park, 2018) และยับยั้งเซลล์มะเร็ง (Jin et al., 2018; Lei et al., 2018; Nakamura, Shinozuka, & Yoshikawa, 2015; Rao, Chou, & Tzeng, 2006; Tuli et al., 2013) เป็นต้น นอกจากนี้ในเห็ดถั่งเช่าสีทองยังพบอะดีโนซีน (Adenosine) ซึ่งเป็นสารออกฤทธิ์สำคัญที่มีปริมาณรองลงมาจากคอริโดเซปิน โดยอะดีโนซีนมีคุณสมบัติช่วยในการขยายตัวของหลอดเลือด ทำให้การไหลเวียนของเลือดเพิ่มขึ้น (Li, Guan, & Li, 2015) และยังใช้เพื่อรักษาอาการหัวใจเต้นผิดจังหวะ นอกจากนี้ยังมีการรายงานว่าอะดีโนซีนยังถูกใช้เป็นส่วนประกอบในเครื่องสำอางในกลุ่มผลิตภัณฑ์ลดเลือนริ้วรอย (Abella, 2006) และอะดีโนซีนอาจช่วยในการรักษาโรคอ้วน เนื่องจากอะดีโนซีนมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ (adipogenesis) และมีความไวต่ออินซูลิน (Pardo et al., 2017; Wang et al., 2012) นอกจากนี้ในเห็ดถั่งเช่าสีทองยังมีสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพอื่น ๆ ที่เป็นประโยชน์ต่อร่างกายอีกมากมาย โดยพบว่าสามารถพบ

สารสำคัญเหล่านี้ได้ทั้งในเส้นใยเห็ด (mycelium) และดอกเห็ด (fruiting body) ของเห็ดถั่งเช่าสีทอง สำหรับการเจริญเติบโต และปริมาณของสารออกฤทธิ์ที่พบในเห็ดถั่งเช่าสีทองนั้นจะมีความสัมพันธ์กับสภาวะการเพาะเลี้ยง โดยมีความเข้มแสง ปริมาณออกซิเจน อุณหภูมิ ความชื้น ระยะเวลา และอาหารเพาะเลี้ยงเป็นปัจจัยสำคัญ (Tapingkae, Yachai, & Tapingkae, 2018) โดยรายงานวิจัยพบว่ากรดโฟลิก (folic acid) เป็นอีกหนึ่งปัจจัยที่ส่งผลต่อการเจริญเติบโตของเห็ดถั่งเช่า และปริมาณการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ เนื่องจากกรดโฟลิกมีบทบาทสำคัญในปฏิกิริยาที่เกี่ยวข้องกับการขนย้ายคาร์บอนอะตอมในกระบวนการสร้างสารพิวรีน (purine) ซึ่งเป็นสารสำคัญในการเจริญเติบโตของสิ่งมีชีวิตเพื่อใช้ในการสังเคราะห์กรดนิวคลีอิกและโปรตีนในกระบวนการสังเคราะห์สารพันธุกรรม (DNA) โดยเห็ด ถั่งเช่าสีทองที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่มีการเติมกรดโฟลิกจะมีการเจริญเติบโตเร็วกว่าเห็ดถั่งเช่าที่เพาะเลี้ยงด้วยอาหารที่ไม่ได้เติมกรดโฟลิก (Dong & Yao, 2005; Wen et al., 2014) อย่างไรก็ตามยังไม่มีรายงานวิจัยที่ศึกษาผลของความเข้มข้นของกรดโฟลิกที่เติมในอาหารเพาะเลี้ยงเห็ดถั่งเช่าสีทอง และช่วงเวลาในการเก็บเกี่ยวเห็ดที่มีต่อปริมาณการผลิตคอร์ไดเซปินและอะดีโนซีนในเห็ดถั่งเช่าสีทอง

สำหรับเทคนิคที่มีการรายงานเพื่อใช้ตรวจวิเคราะห์คอร์ไดเซปินและอะดีโนซีนแบบพร้อมกันที่นิยมใช้ ได้แก่ เทคนิคแคปิลลารีอิเล็กโตรโฟรีซิส (Capillary Electrophoresis; CE) และเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (High Performance Liquid Chromatography; HPLC) โดยเทคนิค CE แม้จะใช้ระยะเวลาในการตรวจวิเคราะห์สารทั้งสองชนิดในระยะเวลาอันรวดเร็ว แต่ยังคงมีปัญหาเรื่องของความไวในการตรวจวิเคราะห์ค่อนข้างต่ำ เครื่องมือมีขนาดใหญ่ ราคาแพง ต้องอาศัยความชำนาญในการใช้เครื่องมือเป็นอย่างมาก (Ling et al., 2002; Yang et al., 2009) ส่วนเทคนิค HPLC จัดเป็นเทคนิคการแยกมาตรฐาน และได้รับความนิยมในการนำมาใช้ตรวจวิเคราะห์คอร์ไดเซปินและอะดีโนซีน เนื่องจากเป็นเทคนิคที่มีความถูกต้อง และมีประสิทธิภาพในการตรวจวิเคราะห์ สามารถตรวจวิเคราะห์สารตัวอย่างได้หลากหลาย อย่างไรก็ตามจากรายงานวิจัยที่ผ่านมาพบว่าการนำเทคนิค HPLC มาใช้ในการตรวจวิเคราะห์สารสำคัญในเห็ดถั่งเช่าสีทองยังคงมีข้อจำกัดหลายด้าน เช่น การใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ในปริมาณมากเป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ (Qian & Li, 2017; Yang & Li, 2008) การใช้ระยะเวลาในการตรวจวิเคราะห์ที่ค่อนข้างนาน (มากกว่า 10 นาที) (Fan et al., 2006; Xie et al., 2010; Yang et al., 2009) นอกจากนี้ในขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างยังใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ในปริมาณมาก และใช้เวลาในการเตรียมตัวอย่างค่อนข้างนานเช่นกัน (Fan et al., 2006; Guo et al., 2006; Huang et al., 2009; Xie et al., 2010)

ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีความสนใจที่พัฒนาวิธีการวิเคราะห์คอร์ไดเซปินและอะดีโนซีนแบบพร้อมกันโดยใช้เทคนิค HPLC ร่วมกับวิธีการสกัดแบบการใช้คลื่นอัลตราซาวด์ (ultrasound-assisted extraction) สำหรับประยุกต์ใช้ในการวิเคราะห์สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพทั้ง 2 ชนิดในเห็ดถั่งเช่าสีทองที่ทำการเพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการในสูตรอาหารที่มีการเติมกรดฟอลิกเพื่อศึกษาผลของความเข้มข้นของกรดฟอลิกที่มีต่อปริมาณการผลิตคอร์ไดเซปินและอะดีโนซีน ในช่วงระยะเวลาการเก็บเกี่ยวต่าง ๆ โดยเน้นพัฒนาวิธีการวิเคราะห์ที่รวดเร็ว สะดวก และมีประสิทธิภาพ ความถูกต้อง และความแม่นยำสูง และเป็นวิธีที่เป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อมมากขึ้น อีกทั้งยังได้ข้อมูลการเพาะเลี้ยงเห็ดถั่งเช่าสีทองที่สำคัญ และเป็นประโยชน์ต่อเกษตรกรผู้เพาะเลี้ยงเห็ดถั่งเช่าสีทองเพื่อใช้ในการกำหนดราคาดอกเห็ด และเป็นการพัฒนาคุณภาพของเห็ดถั่งเช่าสีทองให้ได้ตามมาตรฐานของสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยาอีกด้วย

ความมุ่งหมายของการวิจัย

1. พัฒนาริธีวิเคราะห์โดยใช้เทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงแบบรวดเร็วและมีประสิทธิภาพสูงสำหรับการวิเคราะห์ปริมาณคอร์ไดเซปินและอะดีโนซีนแบบพร้อมกัน
2. ประยุกต์ใช้วิธีที่พัฒนาขึ้นสำหรับวิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญทั้ง 2 ชนิดในตัวอย่างเห็ดถั่งเช่าสีทอง
3. ศึกษาอิทธิพลของกรดฟอลิกในอาหารเพาะเลี้ยงที่มีผลต่อการผลิตปริมาณสารออกฤทธิ์คอร์ไดเซปินและอะดีโนซีนในเห็ดถั่งเช่าสีทอง

ความสำคัญของการวิจัย

1. ได้วิธีการวิเคราะห์ปริมาณคอร์ไดเซปินและอะดีโนซีนแบบพร้อมกัน โดยใช้เทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงที่มีความรวดเร็ว มีประสิทธิภาพสูง เป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม และสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการวิเคราะห์ตัวอย่างเห็ดถั่งเช่าสีทองได้จริง
2. ได้ข้อมูลเกี่ยวกับความเข้มข้นของกรดฟอลิกและระยะเวลาในการเก็บเกี่ยวที่มีผลต่อการผลิตปริมาณสารสำคัญทั้ง 2 ชนิดในเห็ดถั่งเช่าสีทอง

ขอบเขตการวิจัย

1. ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของวิธีการสกัดแบบการใช้คลื่นอัลตราซาวด์สำหรับการสกัดสาร ออกฤทธิ์คอร์ไดเซปินและอะดีโนซีนจากเห็ดถั่งเช่าสีทอง
2. ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของวิธีวิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญทั้ง 2 ชนิดแบบพร้อมกันโดยใช้เทคนิค HPLC

3. ศึกษาประสิทธิภาพของวิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้น

4. ศึกษาการเพาะเลี้ยงเห็ดถั่งเช่าสีทองในอาหารเพาะเลี้ยงที่มีการเติมกรดโฟลิก ความเข้มข้นต่าง ๆ

5. ประยุกต์ใช้วิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นสำหรับตรวจวิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญทั้ง 2 ชนิด ที่สกัดได้จากเห็ดถั่งเช่าสีทองที่ทำการเพาะเลี้ยง

ขั้นตอนการดำเนินงาน

1. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของวิธีการสกัดแบบการใช้คลื่นอัลตราซาวด์สำหรับการสกัดปริมาณคอร์ไดเซปินและอะดีโนซีนในเห็ดถั่งเช่าสีทอง

1.1 ชนิดของตัวทำละลาย

1.2 ปริมาตรของตัวทำละลาย

1.3 เวลาที่ใช้

1.4 จำนวนครั้งของการสกัด

2. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของวิธีวิเคราะห์ปริมาณคอร์ไดเซปินและอะดีโนซีนแบบ พร้อมกัน โดยใช้เทคนิค HPLC

2.1 ชนิด และอัตราส่วนของวัฏภาคเคลื่อนที่

2.2 อัตราการไหลของวัฏภาคเคลื่อนที่

3. การศึกษาประสิทธิภาพของวิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้น

3.1 ช่วงความเป็นเส้นตรง

3.2 ค่าขีดจำกัดต่ำสุดของการตรวจวัดและค่าขีดจำกัดต่ำสุดของการวิเคราะห์ ปริมาณ

3.3 ความเที่ยงของวิธีการวิเคราะห์

3.4 ร้อยละการคืนกลับ

4. การศึกษาการเพาะเลี้ยงเห็ดถั่งเช่าสีทองที่มีการเติมกรดโฟลิกในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ ในระดับความเข้มข้นต่าง ๆ และเก็บเกี่ยวในช่วงเวลาต่าง ๆ ต่อปริมาณการผลิตคอร์ไดเซปินและ อะดีโนซีนในเห็ด

5. การประยุกต์ใช้วิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นสำหรับตรวจวิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญทั้ง 2 ชนิดที่สกัดได้จากเห็ดถั่งเช่าสีทองที่เลี้ยงด้วยอาหารที่มีการเติมกรดโฟลิกที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ และเก็บเกี่ยวในช่วงเวลาต่าง ๆ

บทที่ 2

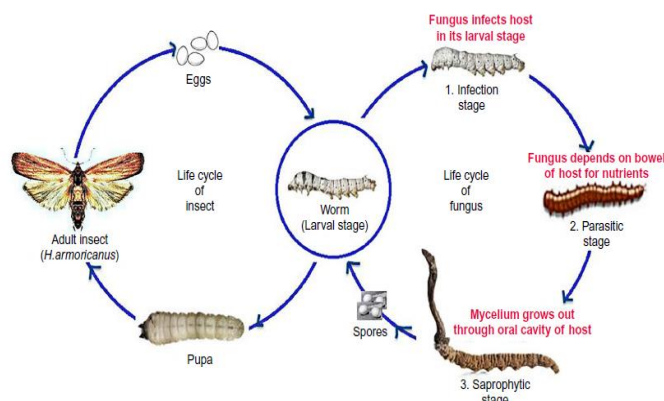
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ในงานวิจัยครั้งนี้ผู้วิจัยได้ทำการศึกษาค้นคว้าเอกสารที่เกี่ยวข้องและนำเสนอตามหัวข้อต่อไปนี้

1. เห็ดถั่งเช่าสีทอง
2. สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในเห็ดถั่งเช่าสีทอง
3. กรดโฟลิก
4. งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

เห็ดถั่งเช่าสีทอง

เห็ดถั่งเช่า หรือ ตั่งถั่งเช่า แปลเป็นไทยว่า ฤดูหนาวเป็นหนอน ฤดูร้อนเป็นเห็ด หรือที่เรียกกันว่า เห็ดหนอน จัดอยู่ในกลุ่มแอสโคไมซีต (*Ascomycetes*) ตระกูล *Cordyceps* เป็นเห็ดสมุนไพรที่ได้จากแมลง หรือจากรากินแมลงที่พบมากกว่า 500 สายพันธุ์ (Zheng et al., 2011) เห็ดชนิดนี้สามารถพบได้ที่ทุ่งหญ้าบนเทือกเขาหิมาลัยที่ความสูงประมาณ 4,200 – 4,600 เมตรเหนือระดับน้ำทะเล (ภัทระ ฉลาดแพทย์, 2554) บริเวณที่มีอุณหภูมิ 10 - 28 °C ในประเทศไทยมีรายงานว่าพบเชื้อราสกุล *Cordyceps* มากถึง 80 ชนิด ในแมลงเจ้าบ้านมากมายหลายชนิด เช่น มด ผีเสื้อ ต่อ แตน แมงมุม เพลี้ย ดั้ว แมลงปอ ผีเสื้อ และหนอน เป็นต้น เมื่อแมลงได้รับสปอร์ของเชื้อรา *Cordyceps* สปอร์จะสร้างสาร lipolytic ซึ่งไปทำปฏิกิริยากับไขมันบนผิวลำตัวของแมลงเจ้าบ้านแล้วกระตุ้นให้เกิดการงอกของสปอร์ หลังจากนั้นจะเริ่มมีการสร้างเส้นใยและจะผลิตเอนไซม์ไคตินเพื่อสลายไคตินที่ผิวของแมลงเจ้าบ้าน จากนั้นเส้นใยจะสร้าง germ tube เพื่อที่จะแทงทะลุผิวของแมลงเจ้าบ้านเข้าไป และแตกกิ่งก้านกระจายไปทั่วร่างของแมลงและใช้แมลงเจ้าบ้านเป็นแหล่งอาหารเพื่อการเจริญเติบโต และใช้ในการสืบพันธุ์ต่อไป (ภาพประกอบ 1) (นิลาวัลย์ สุระป้อง & ประไพรัตน์ สีพลไกร, 2561)



ภาพประกอบ 1 วงจรชีวิตของเห็ดถั่งเช่า

ที่มา: Pal, & Misra. (2018). *Cordyceps* sp.: The Precious Mushroom for High-Altitude Maladies Management of High Altitude Pathophysiology (pp. 93-114).

ชนิดเห็ดถั่งเช่าที่เป็นที่นิยมและมีชื่อเสียง ได้แก่ เห็ดถั่งเช่าทิเบต (*C. sinensis*) เห็ดถั่งเช่าหิมะ (*P. tenuiprs* หรือ *I. japonica*) เห็ดถั่งเช่าจ๊กจั่น (*P. cicadae* หรือ *I. sinclairii*) และเห็ดถั่งเช่าสีทอง (*C. militaris*) สำหรับในประเทศไทยเห็ดถั่งเช่าสีทอง (*C. militaris*) (ภาพประกอบ 2) ได้รับความนิยมอย่างมาก และมีการเพาะเลี้ยงมานานกว่า 10 ปี โดยเห็ดถั่งเช่าสีทองสามารถเพาะเลี้ยงทั้งในส่วนของเส้นใยเห็ดและดอกเห็ด ซึ่งมีลักษณะเป็นรูปทรงกระบอกสีส้มหรือเหลืองเจริญเติบโตด้วยการใช้แมลงได้หลายชนิด ส่วนใหญ่เกิดในตัวหนอน และดักแด้ผีเสื้อ (*Lepidopteran*) นอกจากนี้ยังพบในตัวด้วง (*Coleopteran*) เช่น ในต่อแตน (*Hymenopteran*) และในแมลงวัน (*Dipteran*) (ธัญญา ทะพิงค์แก, มงคล ยะไชย, & ทะพิงค์แก, 2561)



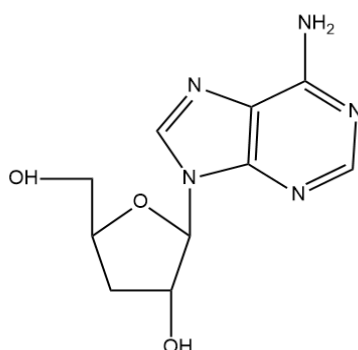
ภาพประกอบ 2 *Cordyceps militaris*

ที่มา : Das, S. K., Masuda, M., Sakurai, A., & Sakakibara, M. (2010). Medicinal uses of the mushroom *Cordyceps militaris*: current state and prospects. *Fitoterapia*, 81(8), 961-968.

สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในเห็ดถั่งเช่าสีทอง

มีรายงานวิจัยพบว่าเห็ดถั่งเช่าสีทองนี้มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่หลากหลาย ได้แก่ เสริมสมรรถภาพ ทางเพศ ด้านการอักเสบ ยับยั้งอนุมูลอิสระหรือชะลอความชรา ช่วยระบบภูมิคุ้มกัน มีฤทธิ์ทำลายหรือยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลชีพ เช่น ไวรัส เชื้อรา เชื้อปรสิต เป็นต้น มีสรรพคุณลดไขมันในเส้นเลือด ลดอาการเหนื่อยล้า ป้องกันเซลล์ประสาท และป้องกันการเสื่อมสภาพของตับ ไต และปอดอีกด้วย (Das et al., 2010) โดยสารออกฤทธิ์สำคัญทางชีวภาพในเห็ดถั่งเช่ามีหลายชนิด ได้แก่ คอร์ไดเซปิน อะดีโนซีน พอลิแซ็กคาไรด์ (polysaccharides) เออร์โกสเตอรอล (ergosterol) และแมนนิทอล (mannitol) เป็นต้น นอกจากนี้ยังประกอบด้วยสารประเภทอื่นๆ เช่น โปรตีน วิตามินอี วิตามินเค และวิตามินบี เป็นต้น (นพมาศ สุนทรเจริญนนท์ & ธิดารัตน์ จันทร์ดอน, 2555) โดยสารออกฤทธิ์สำคัญหลักที่มีปริมาณมาก คือ คอร์ไดเซปินและอะดีโนซีน ซึ่งสามารถพบสารเหล่านี้ในเห็ดถั่งเช่าได้ทั้งส่วนเส้นใยเห็ด และดอกเห็ด (Hur, 2008)

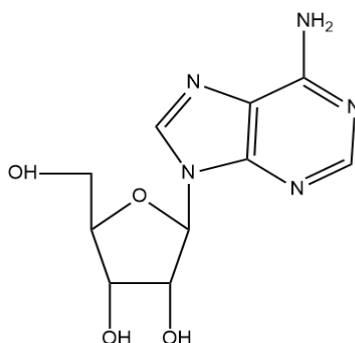
คอร์ไดเซปิน (Cordycepin)



ภาพประกอบ 3 โครงสร้างคอร์ไดเซปิน

คอร์ไดเซปิน หรือ 3'-deoxyadenosine โครงสร้างดังแสดงในภาพประกอบ 3 เป็นนิวคลีโอไซด์อนุพันธ์ของอะดีโนซีนที่ประกอบด้วยอะดีนีนที่เป็นอนุพันธ์ของพิวรีนกับน้ำตาล 5 เหลี่ยมเป็นองค์ประกอบ มีฤทธิ์ทางการแพทย์ช่วยในการเพิ่มประสิทธิภาพในระบบการไหลเวียนเลือด ช่วยให้ปอดสามารถนำเอาออกซิเจนไปใช้ได้อย่างมีประสิทธิภาพ ช่วยต้านอนุมูลอิสระ กระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน เพิ่มประสิทธิภาพทางเพศ มีฤทธิ์ต้านมะเร็ง และต้านการแพร่กระจายของมะเร็ง (Yoon, Park, & Park, 2018) นอกจากนี้ยังมีฤทธิ์ในการต้านการอักเสบ และต้านเชื้อแบคทีเรียก่อโรคอีกด้วย (Das et al., 2010; นิลาวัลย์ สุระบ้อง & ประไพรัตน์ สีพลไกร, 2561) มีงานวิจัยมากมายรายงานการใช้สารคอร์ไดเซปินสำหรับยับยั้งเซลล์มะเร็ง (Jin et al., 2018; Lin et al., 2018; Nakamura, Shinozuka, & Yoshikawa, 2015; Rao, Chou, & Tzeng, 2006; Tuli et al., 2013) นอกจากนี้มีงานวิจัยรายงานว่าคอร์ไดเซปินสามารถยับยั้ง Lipopolysaccharides (LPS) ซึ่งทำให้เกิดภาวะการอักเสบไขสันหลังจากการได้รับบาดเจ็บของถุงลมปอด (Lei et al., 2018) และคอร์ไดเซปินช่วยในการกระตุ้นฮอร์โมนเพศชายใน Leydig cells ของหนูเพศผู้ (Chen et al., 2017) อีกด้วย

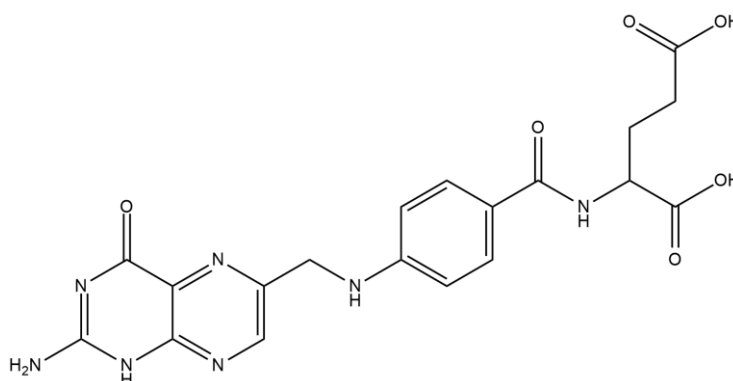
อะดีโนซีน (Adenosine)



ภาพประกอบ 4 โครงสร้างอะดีโนซีน

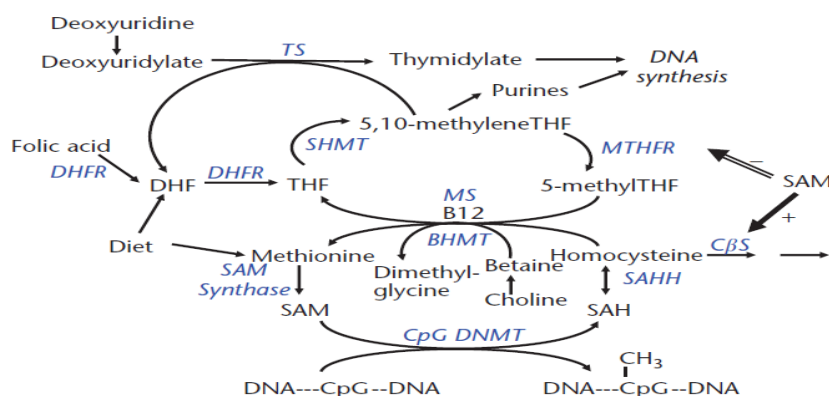
อะดีโน (ภาพประกอบ 4) เป็นนิวคลีโอไซด์ที่มีโครงสร้างคล้ายกับคอรีโดเซป็น อะดีโนซีนเป็นตัวส่งสัญญาณที่มีผลต่อเซลล์เนื้อเยื่อและระบบอวัยวะต่าง ๆ ผ่านทางเซลล์รับส่ง สัญญาณทั้งภายในเซลล์และนอกเซลล์ (Yoon, Park, & Park, 2018) มีบทบาทในการควบคุม สารสื่อประสาทหลายชนิดในระบบประสาทส่วนกลาง (CNS) นอกจากนี้อะดีโนซีนมีฤทธิ์ช่วยในการขยายตัวของหลอดเลือด ทำให้การไหลเวียนของเลือดเพิ่มขึ้น (Li, Guan, & Li, 2015) และยัง ใช้รักษาอาการหัวใจเต้นผิดจังหวะ มีรายงานวิจัยพบว่าอะดีโนซีนอาจช่วยในการรักษาโรคอ้วนได้ เนื่องจากอะดีโนซีนมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ (adipogenesis) และมีความไวต่ออินซูลิน (Pardo et al., 2017; Wang et al., 2012) นอกจากนี้อะดีโนซีนยังถูกใช้เป็นส่วนประกอบใน เครื่องสำอาง เพื่อช่วยลดเลือนริ้วรอย (Gnad et al., 2020) และช่วยเพิ่มสัดส่วนระหว่างไขมัน และไขมันบางมากขึ้น (Iwabuchi et al., 2016)

กรดโฟลิก



ภาพประกอบ 5 โครงสร้างกรดโฟลิก

กรดโฟลิก หรือ วิตามิน B9 โครงสร้างดังภาพประกอบ 5 เป็นวิตามินที่ได้จากการสังเคราะห์สามารถพบได้ในผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร สำหรับวิตามิน B9 ที่พบตามธรรมชาตินั้นจะอยู่ในรูป โฟเลต วิตามิน B9 เป็นวิตามินที่สามารถละลายได้ในน้ำ พบได้ในผักใบเขียว เช่น บล๊อคโคลี่ และกะหล่ำ นอกจากนี้ยังพบในหน่อไม้ฝรั่ง ส้ม มะเขือเทศ กัลฉ่าย ถั่ว ยีสต์ เห็ด ตับ และไตของวัวกรดโฟลิกทำหน้าที่หลักที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการทางชีวภาพที่สำคัญมากมาย รวมถึงในปฏิกิริยาที่เกี่ยวข้องกับการขนย้ายคาร์บอนอะตอมในกระบวนการสร้างสารพิวรีน (purine) ที่เป็นองค์ประกอบในโครงสร้างของคอรีโดเซป็น และอะดีโนซีน โดยกรดโฟลิกจะถูกเปลี่ยนไปเป็น dihydrofolate (DHF) โดยเอนไซม์ dihydrofolate reductase (DHFR) และเปลี่ยนต่อไปเป็น tetrahydrofolate (THF) หลังจากนั้นเอนไซม์ serine hydroxymethyltransferase (SHMT) จะเปลี่ยน THF เป็น 5,10-methylenetetrahydrofolate และ 10-formyltetrahydrofolate ด้วยเอนไซม์ mitochondrial formyltetrahydrofolate synthetase (mMTHFC) (Warzyszynska & Kim, 2014) ซึ่งจะถูกใช้ในกระบวนการสร้างพิวรีน (purine) ในการสังเคราะห์กรดนิวคลีอิกและโปรตีน ซึ่งเป็นส่วนประกอบของสารพันธุกรรม (Bailey, 2010) ดังภาพประกอบ 6



ภาพประกอบ 6 เมแทบอลิซึมของกรดโฟลิก

ที่มา : Warzyszynska, & Kim. (2014). Folate in Human Health and Disease.

ดังนั้นกรดโฟลิกจึงน่าจะเป็นปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อการเจริญเติบโตและการผลิตสารออกฤทธิ์สำคัญของเห็ดถั่งเช่า โดยมีงานวิจัยรายงานว่าเห็ดถั่งเช่าที่มีการเติมกรดโฟลิกลงไป ในอาหารเพาะเลี้ยงจะมีน้ำหนักของเส้นใยเห็ด (Dong & Yao, 2005) และน้ำหนักของดอกเห็ด (Wen et al., 2014) ถั่งเช่าสีทองมากกว่าการเพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงที่ไม่ได้เติมกรดโฟลิก

งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ในปี ค.ศ. 2003 ฮวง และคณะ (Huang, 2003) ได้พัฒนาวิธีการวิเคราะห์หาอะดีนีน, ไฮโพแซนทีน, อะดีโนซีน และคอร์โดเซป็นใน *C. sinensis* และ *C. militaris* ด้วยการใช้ น้ำเป็น ตัวทำละลายในการสกัดด้วยวิธีการสกัดแบบการใช้คลื่นอัลตราซาวด์เป็นเวลา 2 ชม. แล้วนำมา วิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC โดยใช้คอลัมน์ชนิด C18 (150 x 2.0 mm, 5 μm) และใช้สารละลาย ผสมระหว่างน้ำ เมทานอล และกรดฟอร์มิกในอัตราส่วน 85:14:1 โดยปริมาตรเป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ ที่อัตราการไหล 0.2 ml/min พบว่าวิธีนี้ใช้เวลาในการวิเคราะห์อะดีโนซีน และคอร์โดเซป็นอยู่ที่ 4.86 และ 6.12 นาที ตามลำดับ มีค่าร้อยละการคืนกลับเท่ากับ 101.7 และ 97.5 เมื่อสร้างกราฟ มาตรฐานให้ค่าความเป็นเส้นตรงเท่ากับ 0.5-128.5 และ 0.5-131.5 μg/ml สำหรับการ วิเคราะห์อะดีโนซีนและคอร์โดเซป็น ตามลำดับ

ในปี ค.ศ. 2006 ฟาน และคณะ (Fan et al., 2006) ได้พัฒนาวิธีการตรวจนิ่วคลิไฮโซไต์ใน เห็ดถั่งเช่าจากธรรมชาติ และเห็ดถั่งเช่าที่ถูกเพาะเลี้ยง โดยใช้วิธีการสกัดแบบของไหลความดันสูง (pressurized liquid extraction, PLE) โดยใช้เมทานอลเป็นตัวทำละลายในการสกัดที่ความดัน

1.034 x 10⁴ KPa อุณหภูมิ 160 °C และวิเคราะห์ด้วยเทคนิคเทคนิค HPLC ด้วยคอลัมน์ชนิด C18 (150 x 4.6 mm, 3.5 µm) ใช้วัฏภาคเคลื่อนที่เป็นเมทานอลและสารละลายแอมโมเนียมอะซิเตต ความเข้มข้น 5 mM ในระบบเกรเดียนท์ที่อัตราการไหล 0.5 ml/min ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร พบว่าสามารถตรวจพบสารประกอบได้ทั้งหมด 43 ชนิด แต่สามารถระบุชนิดได้เพียง 16 ชนิด ในการตรวจวัดอะดีโนซีนและคอร์โดเซปินมีเวลาการคงอยู่เท่ากับ 25.2 และ 28.2 นาที ตามลำดับ มีค่าขีดจำกัดต่ำสุดของการตรวจวัดอยู่ที่ 1.72 และ 1.16 ng/ml ตามลำดับ

ในปีเดียวกัน โกว และคณะ (Guo et al., 2006) ได้พัฒนาวิธีการระบุและตรวจวิเคราะห์ นิโคลิโอไซด์ ใน *C. sinensis* ด้วยเทคนิค HPLC มีการเตรียมตัวอย่างโดยใช้น้ำเป็นตัวทำละลาย ในการสกัดแบบใช้คลื่นอัลตราซาวด์เป็นเวลา 2 ชม. แล้วนำมาวิเคราะห์ด้วยคอลัมน์ชนิด C18 (150 x 2.0 mm, 5 µm) ใช้ สารละลายแอมโมเนียมอะซิเตตความเข้มข้น 40 mM (pH 5.2) และ เมทานอลในระบบเกรเดียนท์ ที่อัตราการไหล 0.2 ml/min พบว่าใช้เวลาในการวิเคราะห์อะดีโนซีน และคอร์โดเซปินประมาณ 14 และ 18 นาที ตามลำดับ มีค่าขีดจำกัดต่ำสุดของการตรวจวัดของ สารทั้ง 2 ชนิด เท่ากับ 0.1 µg/ml มีช่วงความเป็นเส้นตรงอยู่ที่ 0.6-113.5 และ 0.5-109.5 µg/ml ตามลำดับ

ในปี ค.ศ. 2008 หยาง และ ลี (Yang & Li, 2008) ได้ศึกษาผลกระทบของวิธีการเตรียมตัวอย่างในการหาปริมาณนิโคลิโอไซด์ใน *Cordyceps* จากธรรมชาติและจากการเพาะเลี้ยง โดยเตรียมตัวอย่างด้วยการสกัดด้วยตัวทำละลาย 3 ชนิด คือ น้ำที่อุณหภูมิห้อง น้ำร้อน (95-100 องศาเซลเซียส) และเมทานอล แล้วนำมาวิเคราะห์ด้วย HPLC ใช้สารละลาย ไตรเอทิลามีนและเมทานอลเป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ในระบบเกรเดียนท์ ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร จากผลการสกัดพบว่าเมื่อใช้เมทานอลสามารถสกัดสารได้ในปริมาณน้อยมาก ในขณะที่เมื่อใช้น้ำร้อนในการสกัดในช่วงเวลา 0.5-8 ชั่วโมง ให้ปริมาณสารไม่แตกต่างกันทุกช่วงเวลา แต่เมื่อใช้น้ำที่อุณหภูมิห้องในการสกัดในช่วงเวลา 1-30 ชั่วโมง พบว่าปริมาณของคอร์โดเซปินคงที่ในทุกช่วงเวลา ส่วนอะดีโนซีนมีปริมาณเพิ่มขึ้นเมื่อเวลานานขึ้น จะเห็นว่าการเตรียมตัวอย่างนั้น ส่งผลต่อปริมาณของอะดีโนซีนและคอร์โดเซปินในเห็ดถึงเข้า โดยการใช้น้ำที่อุณหภูมิห้องสามารถสกัดอะดีโนซีนได้ปริมาณมากกว่าการใช้น้ำร้อนและเมทานอลในการสกัดคอร์โดเซปินในตัวทำละลายทั้ง 3 ชนิด ให้ปริมาณไม่แตกต่างกัน ค่าขีดจำกัดต่ำสุดของการวิเคราะห์ปริมาณ อะดีโนซีนและคอร์โดเซปินเท่ากับ 0.19 และ 0.28 µg/ml มีช่วงความเป็นเส้นตรงเท่ากับ 15.42-246.72 และ 27.30-518.80 µg/ml ตามลำดับ

ในปีเดียวกัน อิเคดะ และคณะ (Ikeda et al., 2008) ได้พัฒนาวิธีการตรวจวิเคราะห์นิวคลีโอไซด์ใน *Cordyceps* ด้วยเทคนิค HPLC มีการเตรียมตัวอย่างโดยใช้น้ำเป็นตัวทำละลายในการสกัดด้วยวิธีการสกัดแบบใช้คลื่นอัลตราซาวด์เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วนำมาวิเคราะห์ด้วยคอลัมน์ชนิด C18 (250 × 4.6 mm, 5 µm) ใช้สารละลายผสมระหว่างอะซิโตนไนโตรเจนและน้ำในอัตราส่วน 5:95 โดยปริมาตร เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ที่อัตราการไหล 1.0 ml/min ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร พบว่าใช้เวลาในการวิเคราะห์ของอะดีโนซีนและคอร์ไดเซปินประมาณ 16 และ 22 นาที มีค่าขีดจำกัดต่ำสุดของการตรวจวัด เท่ากับ 12.6 และ 16.0 ng/ml มีค่าร้อยละการคืนกลับ เท่ากับ 96.9 และ 85.6 ตามลำดับ และมีช่วงความเป็นเส้นตรงอยู่ที่ 0.030-150 µg/ml

ในปี ค.ศ. 2009 ฮวง และคณะ (Huang et al., 2009) ได้ทำการวิเคราะห์อะดีโนซีนและคอร์ไดเซปินทั้งในส่วนดอกเห็ด และเส้นใยเห็ดของ *Cordyceps spp.* ด้วยเทคนิค HPLC โดยใช้สารละลายเมทานอลเข้มข้นร้อยละ 50 โดยปริมาตร เป็นตัวทำละลายในการเตรียมตัวอย่าง แล้วนำมาวิเคราะห์ด้วยคอลัมน์ชนิด C18 (250 × 4.6 mm, 5 µm) ใช้วัฏภาคเคลื่อนที่ที่เป็นสารละลายผสมระหว่างน้ำกับเมทานอลในอัตราส่วน 92:8 โดยปริมาตร ที่อัตราการไหล 1.0 ml/min ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร พบว่าปริมาณของอะดีโนซีนและคอร์ไดเซปินในดอกเห็ดมากกว่าเส้นใยเห็ดและปริมาณของสารทั้ง 2 ชนิดในดอกเห็ดของ *C. militaris* มากกว่า *C. sinensis* โดยใช้เวลาในการวิเคราะห์ประมาณ 9 และ 11 นาที มีค่าขีดจำกัดต่ำสุดของการตรวจวัดของอะดีโนซีนและคอร์ไดเซปิน เท่ากับ 0.3 และ 0.25 µg/ml ตามลำดับ ช่วงความเป็นเส้นตรงอยู่ที่ 2.50-120 และ 2.85-130 µg/ml ตามลำดับ

ในปี ค.ศ. 2010 เซีย และคณะ (Xie et al., 2010) ได้พัฒนาวิธีการตรวจวิเคราะห์นิวคลีโอไซด์หลักใน *C. sinensis* ด้วยโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง โดยใช้คอลัมน์ชนิด C18 (150 × 2.0 mm, 5 µm) ใช้สารละลายแอมโมเนียมอะซิเตตความเข้มข้น 40 mM (pH 5.2) และเมทานอลเป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ในระบบเกรเดียนท์ ที่อัตราการไหล 0.2 ml/min ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร เตรียมตัวอย่างด้วยการใช้น้ำเป็นตัวทำละลายในการสกัดด้วยวิธีการสกัดแบบใช้คลื่นอัลตราซาวด์เป็นเวลา 2 ชั่วโมง พบว่าใช้เวลาในการวิเคราะห์ของอะดีโนซีนและคอร์ไดเซปินประมาณ 14 และ 15 นาที มีค่าขีดจำกัดต่ำสุดของการตรวจวัดของสารทั้ง 2 ชนิด เท่ากับ 0.1 µg/ml ช่วงความเป็นเส้นตรงของอะดีโนซีนเท่ากับ 0.6-114.0 µg/ml และคอร์ไดเซปินเท่ากับ 0.5-107.5 µg/ml

ในปี ค.ศ. 2014 หลิว และคณะ (Liu, Huang, & Zhou, 2014) ได้ทำการศึกษาองค์ประกอบในเส้นใยเห็ด และดอกเห็ดของ *C. militaris* ด้วยเทคนิค HPLC โดยมีการเตรียมตัวอย่างด้วยการใช้น้ำเป็นตัวทำละลายในการสกัดแบบใช้คลื่นอัลตราซาวด์เป็นเวลา 50 นาที ที่อุณหภูมิ 60 °C แล้วทำการวิเคราะห์ด้วยคอลัมน์ชนิด C18 (250 × 4.6 mm, 5 µm) ใช้วัฏภาคเคลื่อนที่เป็นเมทานอลและน้ำในอัตราส่วน 15:85 โดยปริมาตร ที่อัตราการไหล 1.0 ml/min ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร พบว่าปริมาณของอะดีโนซีนในเส้นใยเห็ดมีมากกว่าในดอกเห็ด ส่วนคอร์ไดเซปินในดอกเห็ดมีปริมาณมากกว่าในเส้นใยเห็ด

ในปี ค.ศ. 2015 ลี และคณะ (Li, Guan, & Li, 2015) ได้ทำการศึกษาผลกระทบของอะดีโนซีนและคอร์ไดเซปิน เมื่อนำเห็ดถึงเข้าสู่ท้องผ่านการปรุงอาหาร การเตรียมตัวอย่างทำได้โดยใช้น้ำเป็นตัวทำละลายในการสกัดด้วยวิธีการสกัดแบบใช้คลื่นอัลตราซาวด์เป็นเวลา 45 นาที แล้วใช้เทคนิค HPLC วิเคราะห์ด้วยคอลัมน์ชนิด C18 (150 × 4.6 mm, 5 µm) ใช้วัฏภาคเคลื่อนที่เป็นสารละลายผสมระหว่างเมทานอลและน้ำอัตราส่วน 16 : 84 โดยปริมาตร และทำการตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร พบว่าเมื่อเพิ่มอุณหภูมิในการสกัดในช่วง 20-80 องศาเซลเซียส ปริมาณอะดีโนซีนจะลดลง ในขณะที่คอร์ไดเซปินมีปริมาณคงที่ ดังนั้นในขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างจึงใช้อุณหภูมิที่ 20-40 องศาเซลเซียส ในการสกัดวิธีนี้ได้ร้อยละการคืนกลับของอะดีโนซีนและคอร์ไดเซปินอยู่ที่ 113% และ 108% ตามลำดับ เมื่อนำเห็ดถึงเข้าสู่ท้องมาทิ้งในช่วงเวลา 0-140 นาที พบว่าปริมาณคอร์ไดเซปินมีค่าไม่เปลี่ยนแปลง แต่ปริมาณอะดีโนซีนมีค่าลดลงตั้งแต่ช่วงเวลา 20 นาทีเป็นต้นไป

ในปี ค.ศ. 2017 เจียน และ ลี (Qian & Li, 2017) ได้พัฒนาวิธีการวิเคราะห์โมเลกุลขนาดใหญ่ (macromolecule) และโมเลกุลขนาดเล็ก (micromolecule) แบบพร้อมกันในเห็ดถึงเข้าสู่ด้วยเทคนิค HPLC แบบมัลติคอลัมน์ โดยเตรียมตัวอย่างด้วยการสกัดด้วยน้ำร้อนอุณหภูมิ 100 °C เป็นเวลา 30 นาที และทำการแยกวิเคราะห์ต่อกันด้วย 3 คอลัมน์ โดยคอลัมน์แรกเป็นคอลัมน์ชนิดแยกขนาด (30 × 4.6 mm, 5 µm) เพื่อแยกโมเลกุลขนาดใหญ่และขนาดเล็กออกจากกัน จากนั้นใช้คอลัมน์ที่สอง ซึ่งเป็นคอลัมน์ชนิดแยกขนาด (300 × 7.8 mm, 10 µm) เพื่อใช้แยกโมเลกุลขนาดใหญ่และใช้คอลัมน์ชนิด C18 (250 × 4.6 mm, 5 µm) สำหรับวิเคราะห์สารโมเลกุลขนาดเล็ก โดยใช้วัฏภาคเคลื่อนที่เป็นสารละลายแอมโมเนียมอะซิเตตที่ความเข้มข้น 5 mM กับอะซิโตนไตรลิในระบบเกรเดียนท์ ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร พบว่าวิธีนี้สามารถวิเคราะห์อะดีโนซีน

และคอร์ไดเซป็นออกมาที่เวลา 78 และ 81 นาที และใช้เวลาในการตรวจวัดสารทั้งหมดนานถึง 90 นาที คณะผู้วิจัยเสนอแนะให้มีการพัฒนาคอลัมน์ให้สั้นลง เพื่อลดเวลาในการวิเคราะห์

ในปีเดียวกัน เชียง และคณะ (Chiang et al., 2017) ได้ศึกษาผลกระทบของการใช้ light-emitting diode (LED) ที่มีความยาวคลื่นแตกต่างกัน และการใช้ LED แบบรวมหลายความยาวคลื่นที่ส่งผลต่อการเพาะเลี้ยงเห็ดถั่งเช่า มีการเตรียมตัวอย่างโดยใช้น้ำกลั่นเป็นตัวทำละลายในการสกัดด้วยวิธีการสกัดแบบใช้คลื่นอัลตราซาวด์เป็นเวลา 2 ชม. ในการสกัดอะดีโนซีน แมนนิทอล และคอร์ไดเซป็นออกจากอาหารเพาะเลี้ยง แล้วทำการตรวจวัดด้วยเทคนิค HPLC โดยใช้คอลัมน์ชนิด C18 ใช้วัฏภาคเคลื่อนที่เป็นสารละลายโมโนโพแทสเซียมฟอสเฟตความเข้มข้น 0.02 โมลาร์ กับเมทานอลในอัตราส่วน 85:15 โดยปริมาตร และตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร พบว่าหากใช้ LED ความยาวคลื่นแตกต่างกัน ปริมาณของคอร์ไดเซป็นจะมากที่สุดเมื่ออยู่ภายใต้แสงสีเขียว และปริมาณอะดีโนซีนจะมากที่สุดเมื่ออยู่ภายใต้แสงสีฟ้า ในขณะที่เมื่อใช้ LED ที่รวมหลายความยาวคลื่น ปริมาณของ อะดีโนซีนและคอร์ไดเซป็นจะมากที่สุดเมื่ออยู่ภายใต้แสงสีแดง และฟ้าในอัตราส่วน 3R:3B สารทั้ง 2 ชนิดมีช่วงความเป็นเส้นตรงอยู่ที่ 10-100 กรัมต่อมิลลิลิตร

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

ในการวิจัยนี้ ผู้วิจัยได้ดำเนินการตามขั้นตอนดังนี้

1. เครื่องมือ อุปกรณ์ และสารเคมีที่ใช้ในการวิจัย

1.1 เครื่องมือ และอุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย

1.2 สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย

1.3 อุปกรณ์และวัตถุดิบที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเห็ด

2. วิธีดำเนินการวิจัย

2.1 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของวิธีการสกัดแบบการใช้คลื่นอัลตราซาวด์ สำหรับการสกัดสารคอร์ไดเซปินและอะดีโนซีนจากเห็ดถั่งเช่าสีทอง

2.2 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของวิธีวิเคราะห์ปริมาณคอร์ไดเซปินและอะดีโนซีนแบบพร้อมกัน โดยใช้เทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง

2.3 การศึกษาประสิทธิภาพของวิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้น

2.4 การศึกษาการเพาะเลี้ยงเห็ดถั่งเช่าสีทองในอาหารเพาะเลี้ยงที่มีการเติมกรดฟอลิก

2.5 การประยุกต์ใช้วิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นสำหรับตรวจวิเคราะห์ปริมาณคอร์ไดเซปินและอะดีโนซีนที่สกัดได้จากเห็ดถั่งเช่าสีทอง

เครื่องมือ อุปกรณ์ และสารเคมีที่ใช้ในการวิจัย

1.1 เครื่องมือ และอุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย

- เครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง และตัวตรวจวัดชนิดไดโอดแอเรย์ (Diode array) พร้อมด้วย sample loop ขนาด 20 ไมโครลิตร รุ่น LC-20AD จากบริษัท Shimadzu

- เครื่องผลิตน้ำปราศจากไอออน รุ่น Labostar จากบริษัท Siemens

- เครื่องชั่งอย่างละเอียด 4 ตำแหน่ง รุ่น PA224C จากบริษัท OHAUS

- เครื่องอัลตราโซนิก (Ultrasonic) ความถี่ 50 กิโลเฮิรซ์ รุ่น D2 จากบริษัท GT SONIC

- เครื่องหมุนเหวี่ยง (Centrifuge) ความเร็วรอบ 5000 รอบต่อนาที รุ่น FRONTIER™5706 จากบริษัท OHAUS

- คอลัมน์ชนิด C18 (VertiSep™ GES C18, 150 × 4.6 mm i.d., 5 μm) และการัด
คอลัมน์ชนิด C18 (Security Guard Column, 3.0 × 4.0 mm i.d., 5 μm) จากบริษัท
Phenomenex

- เข็มฉีดยาสารตัวอย่าง ขนาด 100 ไมโครลิตร จากบริษัท Exmire Microsyringe
- อุปกรณ์กรองสารตัวอย่าง ชนิดไนลอน ขนาด 0.22 ไมครอน จากบริษัท Lubitech
- ชุดกรองวัฏภาคเคลื่อนที่ จากบริษัท Kimble Chase
- แผ่นกรองวัฏภาคเคลื่อนที่ ชนิดไนลอน ขนาด 0.45 ไมครอน จากบริษัท
Phenomenex

- หม้อน้ำแช่แข็ง รุ่น GI54TW จากบริษัท Zealwa

1.2 สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย

- เมทานอล (HPLC grade) จากบริษัท Merck
- เอทานอล (AR grade) จากบริษัท QRëC
- อะซิโตนไตรล์ (HPLC grade) จากบริษัท Burdick & Jackson
- สารมาตรฐานคอร์โดเซป็น จากบริษัท Sigma aldrich
- สารมาตรฐานอะดีโนซีน จากบริษัท Sigma aldrich

1.3 อุปกรณ์และวัสดุที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเห็ด

- ตะเกียงแอลกอฮอล์
- สารละลายแอลกอฮอล์เข้มข้นร้อยละ 70 โดยปริมาตร
- หัวเชื้อเห็ดถึงเชื้อสืทอง จาก คุณหยุด แซ่มประเสริฐ ฟาร์มลุงหยุด จ.สระบุรี
- ขวดแก้วสำหรับเพาะเลี้ยงเห็ดถึงเชื้อสืทอง
- มันฝรั่ง
- ข้าวโพดอ่อน
- กลูโคส จากบริษัท Ajax Finechem
- ยีสต์สกัด จากบริษัท HIMEDIA
- เปปไทน์ จากบริษัท BD Biosciences
- โซเดียมไฮดรอกไซด์ จากบริษัท Ajax Finechem
- กรดฟอสฟอริก จากบริษัท Gold Biotechnology
- ข้าวสังข์หยด จากบริษัท ข้าวพื้นเมืองภาคใต้ จำกัด
- หน่อหนม

วิธีดำเนินการวิจัย

การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของวิธีการสกัดแบบการใช้คลื่นอัลตราซาวด์สำหรับการสกัดสารออกฤทธิ์คอร์โคโรไดเซปินและอะดีโนซีนจากเห็ดถั่งเช่าสีทอง

2.1.1 ชนิดตัวทำละลาย

ตัวทำละลายที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ ได้แก่ น้ำ (อุณหภูมิห้อง), น้ำร้อน (อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส), สารละลายเอทานอลเข้มข้นร้อยละ 10, 20, 30 และ 40 โดยปริมาตร และทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง

2.1.1.1 นำเห็ดมาบดให้เป็นผงละเอียด แล้วชั่งน้ำหนัก 0.2000 กรัม ใส่บีกเกอร์ เติมตัวทำละลายที่ศึกษาปริมาตร 10.00 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน ปิดบีกเกอร์ด้วยอลูมิเนียมฟอยล์

2.1.1.2 นำตัวอย่างไปวางในเครื่อง ultrasonic เป็นเวลา 30 นาที

2.1.1.3 นำตัวอย่างไปเข้าเครื่อง centrifuge เป็นเวลา 20 นาที

2.1.1.4 ทำการแยกเอาสารละลายส่วนใสที่ได้จากการสกัดใส่บีกเกอร์ จากนั้นทำการสกัดซ้ำอีก 2 ครั้ง

2.1.1.5 ปิ่ตสารละลายสกัดเห็ดถั่งเช่าสีทองปริมาตร 15.00 มิลลิลิตร ใส่ขวดปรับปริมาตรและทำการเติมน้ำกลั่นจนครบ 50 มิลลิลิตร เพื่อทำการวิเคราะห์ต่อไป

2.1.2 ปริมาตรของตัวทำละลาย

ปริมาตรของตัวทำละลายที่ทำการศึกษาในงานวิจัยครั้งนี้ ได้แก่ 10.00, 15.00 และ 20.00 มิลลิลิตร โดยทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง

2.1.2.1 นำเห็ดมาบดให้เป็นผงละเอียด แล้วชั่งน้ำหนัก 0.2000 กรัม ใส่บีกเกอร์ เติมน้ำกลั่นในช่วงปริมาตรที่ศึกษา เขย่าให้เข้ากัน ปิดบีกเกอร์ด้วยอลูมิเนียมฟอยล์

2.1.2.2 นำตัวอย่างไปวางในเครื่อง ultrasonic เป็นเวลา 30 นาที

2.1.2.3 นำตัวอย่างไปเข้าเครื่อง centrifuge เป็นเวลา 20 นาที

2.1.2.4 ทำการแยกเอาสารละลายส่วนใสที่ได้จากการสกัดใส่บีกเกอร์ จากนั้นทำการสกัดซ้ำอีก 2 ครั้ง

2.1.2.5 เจือจางสารละลายสกัดเห็ดถั่งเช่าสีทอง 3 เท่า ด้วยน้ำกลั่น เพื่อทำการวิเคราะห์ต่อไป

2.1.3 ระยะเวลาในการสกัด

ระยะเวลาในการสกัดที่ทำการศึกษาในงานวิจัยครั้งนี้ ได้แก่ 15, 30, 45, 60, 75 และ 90 นาที โดยทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง

2.1.3.1 นำเห็ดมาบดให้เป็นผงละเอียด แล้วชั่งน้ำหนักมา 0.2000 กรัม ใส่ ปีกเกอร์ เติมน้ำกลั่นปริมาตร 10.00 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน ปิดปีกเกอร์ด้วยอลูมิเนียมฟอยล์

2.1.3.2 นำตัวอย่างไปวางในเครื่อง ultrasonic ตามช่วงเวลาที่ทำการศึกษา

2.1.3.3 นำตัวอย่างไปเข้าเครื่อง centrifuge เป็นเวลา 20 นาที

2.1.3.4 ทำการแยกเอาสารละลายส่วนใสที่ได้จากการสกัดใส่ปีกเกอร์ จากนั้นทำการสกัดซ้ำอีก 2 ครั้ง

2.1.3.5 บีบเอาน้ำที่สกัดได้ทั้งหมดใส่ขวดปริมาตร 15.00 มิลลิลิตร ใส่ขวดปรับปริมาตร และทำการเติมน้ำกลั่นจนครบ 50 มิลลิลิตร เพื่อทำการวิเคราะห์ต่อไป

2.1.4 จำนวนครั้งในการสกัด

จำนวนครั้งการสกัดในการศึกษาครั้งนี้ ได้แก่ 1-4 ครั้ง โดยทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง

2.1.4.1 นำเห็ดมาบดให้เป็นผงละเอียด แล้วชั่งน้ำหนัก 0.2000 กรัม ใส่ ปีกเกอร์ เติมน้ำกลั่นปริมาตร 10.00 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน ปิดปีกเกอร์ด้วยอลูมิเนียมฟอยล์

2.1.4.2 นำตัวอย่างไปวางในเครื่อง ultrasonic เป็นเวลา 30 นาที

2.1.4.3 นำตัวอย่างไปเข้าเครื่อง centrifuge เป็นเวลา 20 นาที

2.1.4.4 ทำการแยกเอาสารละลายส่วนใสที่ได้จากการสกัดใส่ปีกเกอร์ จากนั้นทำการสกัดซ้ำตามจำนวนครั้งที่ทำการศึกษา

2.1.4.5 บีบเอาน้ำที่สกัดได้ทั้งหมดใส่ขวดปริมาตร 7.50 มิลลิลิตร ใส่ขวดปรับปริมาตร และทำการเติมน้ำกลั่นจำนวน 25.00 มิลลิลิตร เพื่อทำการวิเคราะห์ต่อไป

การศึกษาสภาพที่เหมาะสมของวิธีวิเคราะห์ปริมาณคอร์ไดเซปิน และอะดีโนซีนแบบพร้อมกัน โดยใช้เทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง

2.2.1 ความยาวคลื่นที่ใช้ในการตรวจวัด

2.2.1.1 เตรียมสารละลายมาตรฐานคอร์ไดเซปินและอะดีโนซีนที่มีความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อลิตรโดยใช้น้ำปราศจากไอออนเป็นตัวทำละลาย

2.2.1.2 ตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงในช่วงความยาวคลื่น 200-700 นาโนเมตร ของสารละลายมาตรฐานในข้อ 2.2.1.1 ด้วยเครื่อง UV-Visible spectrometer และบันทึกสเปกตรัม

2.2.1.3 เลือกความยาวคลื่นที่มีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุด ($\lambda_{\max}$) เพื่อนำมาใช้ในการวิเคราะห์สารสกัด 2 ชนิดแบบพร้อมกัน

2.2.2 ชนิด และองค์ประกอบของวัสดุภาคเคลื่อนที่

2.2.2.1 เตรียมสารละลายมาตรฐานผสมข้อ 2.2.1.1

2.2.2.2 ศึกษาการใช้สารละลายตัวทำละลายอินทรีย์ชนิดต่าง ๆ เป็นวัสดุภาคเคลื่อนที่ ดังนี้

- สารละลายเมทานอลความเข้มข้นร้อยละ 17, ร้อยละ 18 และร้อยละ 19 โดยปริมาตร

- สารละลายอะซีโตนไตรคลอไรด์ความเข้มข้นร้อยละ 7, ร้อยละ 8 และร้อยละ 9 โดยปริมาตร

- สารละลายเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 8, ร้อยละ 9 และร้อยละ 10 โดยปริมาตร

โดยใช้วัสดุภาคคงที่คือ คอลัมน์ชนิด C18 (4.6 x 150 mm i.d., 5 μ m) ที่อัตราการไหล 1.20 มิลลิลิตรต่อนาที และตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร

2.2.2.3 บันทึกโครมาโทแกรมที่ได้จากการใช้วัสดุภาคเคลื่อนที่แต่ละองค์ประกอบ เปรียบเทียบผลการแยกที่ได้ในแต่ละสภาวะ แล้วเลือกชนิดและองค์ประกอบของวัสดุภาคเคลื่อนที่ที่สามารถแยกคอร์ไดเซปินและอะดีโนซีนแบบพร้อมกันได้อย่างสมบูรณ์

2.2.3 อัตราการไหลของวัสดุภาคเคลื่อนที่

2.2.3.1 เตรียมสารละลายมาตรฐานผสมข้อ 2.2.1.1

2.2.3.2 ทำการแยกสารมาตรฐานผสมทั้ง 2 ชนิด ที่อัตราการไหลในช่วง 1.00-1.50 มิลลิลิตรต่อนาที โดยใช้วัสดุภาคคงที่ คือ คอลัมน์ชนิด C18 วัสดุภาคเคลื่อนที่ คือ สารละลายเอทานอลเข้มข้นร้อยละ 8 โดยปริมาตร และตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร

2.2.3.3 บันทึกโครมาโทแกรมที่แต่ละอัตราการไหล และเลือกอัตราการไหลที่สามารถวิเคราะห์ผลได้เร็วที่สุดโดยยังคงประสิทธิภาพการแยกที่ดี

การศึกษาประสิทธิภาพของวิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้น

2.3.1 ช่วงความเป็นเส้นตรง

2.3.1.1 เตรียมสารละลายมาตรฐานผสมคอร์ไดเซปินและอะดีโนซีนในช่วงความเข้มข้น 0.02-200 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยใช้น้ำปราศจากไอออนเป็นตัวทำละลาย

2.3.1.2 นำสารละลายมาตรฐานผสมในช่วงความเข้มข้นที่ศึกษา มาทำการแยกในสถานะที่เหมาะสมที่ได้จากข้อ 2.2 พร้อมบันทึกโครมาโทแกรม โดยทำการฉีดซ้ำความเข้มข้นละ 3 ครั้ง

2.3.1.3 สร้างกราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นและสัญญาณพื้นที่ใต้พีคของสารมาตรฐานแต่ละชนิด

2.3.2 ค่าขีดจำกัดต่ำสุดของการตรวจวัด (LOD) และค่าขีดจำกัดต่ำสุดของ วิเคราะห์ ปริมาณ (LOQ)

2.3.2.1 เตรียมสารละลายคอร์ไดเซปินและอะดีโนซีนที่ความเข้มข้น 1000 มิลลิกรัมต่อลิตร แล้วนำมาเจือจางในขวดวัดปริมาตรโดยใช้น้ำปราศจากไอออนเป็นตัวทำละลาย

2.3.2.2 นำสารละลายข้อ 2.3.2.1 มาทดลองฉีดที่ความเข้มข้นต่าง ๆ พร้อมบันทึกโครมาโทแกรมโดยฉีดซ้ำความเข้มข้นละ 3 ครั้ง ทำการวิเคราะห์จนได้ความเข้มข้นที่มีสัดส่วนของสัญญาณความสูงต่อสัญญาณรบกวน (noise) เท่ากับ 3 และ 10 ซึ่งเป็นค่าขีดจำกัดต่ำสุดของการตรวจวัด และค่าขีดจำกัดต่ำสุดของการวิเคราะห์ปริมาณ ตามลำดับ

2.3.3 ความเที่ยงของวิธีวิเคราะห์

2.3.3.1 ความเที่ยงภายในวันเดียวกัน (intraday precision)

2.3.3.1.1 เตรียมสารละลายมาตรฐานผสมของคอร์ไดเซปินและอะดีโนซีนที่ 3 ความเข้มข้น คือ ความเข้มข้น 0.20, 5.0 และ 100 มิลลิกรัมต่อลิตร

2.3.3.1.2 ฉีดสารมาตรฐานผสมที่แต่ละความเข้มข้น พร้อมบันทึกโครมาโทแกรม ทำการวิเคราะห์ซ้ำ 5 ครั้ง

2.3.3.1.3 คำนวณค่าร้อยละความเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD) ของสัญญาณพื้นที่ใต้พีคและเวลาของการคงอยู่ (retention time; R_t) ของสารมาตรฐานแต่ละชนิด

2.3.3.2 ความเที่ยงระหว่างวัน (interday precision)

2.3.3.2.1 เตรียมสารละลายตามข้อ 2.3.3.1.1 แล้วฉีดสารมาตรฐานพร้อมบันทึกโครมาโทแกรม เป็นระยะเวลา 3 วัน โดยเตรียมสารละลายมาตรฐานใหม่ทุกวัน

2.3.3.2.2 คำนวณค่าร้อยละความเปื่อยเน่ามาตรฐานสัมพัทธ์ของสัญญาณพื้นที่ได้ฟีดและเวลาของการคงอยู่ในระยะเวลา 3 วัน

2.3.4 ร้อยละของการคืนกลับ

2.3.4.1 นำตัวอย่างเห็ดถึงเข้าสีทองมาบดให้เป็นผงละเอียดแล้วชั่งน้ำหนัก 0.2000 กรัม ใส่ในปิเก็ตเตอร์ เติมน้ำละลายมาตรฐานผสมคอร์ไดเซปินและอะดีโนซีนที่ทราบความเข้มข้นที่แน่นอน

2.3.4.2 นำตัวอย่างมาทำการสกัดโดยใช้วิธีการสกัดที่ได้จากข้อ 2.1 จากนั้นนำสารสกัดมากรองผ่านแผ่นกรอง

2.3.4.3 ฉีดสารสกัดที่ได้ โดยใช้สภาวะที่ได้จากข้อ 2.2 พร้อมบันทึกโครมาโทแกรมและสัญญาณพื้นที่ได้ฟีด ทำการวิเคราะห์ซ้ำ 3 ครั้ง

2.3.4.4 คำนวณความเข้มข้นของสารทั้ง 2 ชนิด ที่เติมในตัวอย่างโดยเทียบกับกราฟมาตรฐานในวันเดียวกัน และคำนวณค่าร้อยละของการคืนกลับ

การศึกษาการเพาะเลี้ยงเห็ดถึงเข้าสีทองในอาหารเพาะเลี้ยงที่มีการเติมกรดฟอลิก

2.4.1 การเตรียมอาหารเพาะเลี้ยงเห็ดถึงเข้าสีทอง

2.4.1.1 ล้างมันฝรั่งและข้าวโพดอ่อนให้สะอาด จากนั้นปอกเปลือกมันฝรั่งและหั่นเป็นทรงลูกเต๋าน้ำหนัก 200 กรัม และหั่นข้าวโพดอ่อนตามยาวน้ำหนัก 50 กรัม

2.4.1.2 ต้มมันฝรั่งและข้าวโพดอ่อนในน้ำกลั่น ปริมาตร 1.2 ลิตร เริ่มจับเวลาเมื่อน้ำเดือด ใช้เวลาในการต้ม 20 นาที

2.4.1.3 เติมนอนไมใหม่ที่ปั่นแล้วน้ำหนัก 100 กรัม ยีสต์สกัดน้ำหนัก 5 กรัม เปปไทน์น้ำหนัก 5 กรัม และกลูโคสน้ำหนัก 20 กรัม ลงไปในหม้อต้มขณะเดือด

2.4.1.4 คนให้เข้ากัน และต้มต่อไปอีกเป็นเวลา 10 นาที จากนั้นกรองเฉพาะส่วนของเหลวนำมาใช้

2.4.1.5 ชั่งข้าวสังข์หยดหนัก 30 กรัม ใส่ขวดสำหรับเพาะเลี้ยงเห็ด จากนั้นเติมของเหลวที่ได้จากข้อ 2.1.1.4 ลงไปปริมาตร 55 มิลลิลิตร เตรียมขวดอาหารเพาะเลี้ยงซ้ำอีก 5 ชุด การทดลอง

2.4.1.6 เตรียมสารละลายกรดฟอลิกที่ความเข้มข้น 10, 100, 1000 และ 5000 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยใช้โพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ เป็นตัวทำละลาย

จากนั้นเติมลงในขวดอาหารเพาะเลี้ยงข้อ 2.4.1.5 ปริมาตร 10.00 มิลลิลิตร โดยทำการแบ่งการทดลองออกเป็น 6 กลุ่ม กลุ่มละ 20 ขวด โดยกลุ่มที่ 1 - กลุ่มที่ 5 เตรียมอาหารเพาะเลี้ยงที่มีความเข้มข้นของกรดฟอสฟอริกเท่ากับ 0, 0.1, 1, 10 และ 50 มิลลิกรัมต่อลิตร และกลุ่มที่ 6 เป็นกลุ่มควบคุมที่ไม่มีการเติมกรดฟอสฟอริกและโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ในอาหารเพาะเลี้ยง

2.4.1.7 ปิดฝาขวดที่ทำการเจาะรูและปิดด้วยผ้าก๊อตแล้วให้สนิท

2.4.1.8 นำขวดทั้งหมดหนึ่งฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งฆ่าเชื้อแรงดันสูงที่ความดัน 20 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ที่อุณหภูมิ 121 °C เป็นเวลา 30 นาที

2.4.1.9 นำขวดออกจากหม้อนึ่งความดัน เก็บไว้ในที่มืด พร้อมใช้ในขั้นตอนการลงเชื้อเห็ดถึงเชื้อสืบทอดต่อไป

2.4.2 การลงเชื้อและบ่มเชื้อเห็ดถึงเชื้อสืบทอด

2.4.2.1 สเปรย์สารละลายเอทานอลร้อยละ 70 โดยปริมาตร ในตู้เขี่ยเชื้อและอุปกรณ์ที่เกี่ยวข้อง ทิ้งไว้ให้แห้ง จากนั้นเปิดหลอดยวี่เพื่อฆ่าเชื้อนาน 30 นาที

2.4.2.2 เขย่าขวดหัวเชื้อเห็ดก่อนนำมาใช้ และฉีกปากขวดหัวเชื้อทุกครั้ง จากนั้นหยอดหัวเชื้อเห็ดถึงเชื้อสืบทอดปริมาตร 3 มิลลิลิตร ลงในขวดเพาะเลี้ยงที่เตรียมไว้ โดยทำในตู้เขี่ยเชื้อ

2.4.2.3 ทำการบ่มเชื้อ แบ่งเป็น 2 ระยะ คือ

- ระยะการเจริญของเส้นใย ทำการบ่มขวดเพาะเลี้ยงในที่มืด อุณหภูมิ 17-21 °C เป็นเวลา 4 สัปดาห์

- ระยะการเจริญเติบโตของดอก นำขวดที่มีเส้นใยของเชื้อเห็ดมากระตุ้นให้เกิดดอก โดยการให้แสงฟลูออเรสเซนต์ที่มีความเข้มแสง 200-1000 ลักซ์ ที่อุณหภูมิ 17-21 °C เป็นเวลา 14 สัปดาห์

2.4.3 การเก็บเกี่ยวผลผลิต

ในงานวิจัยนี้ทำการเก็บเกี่ยวดอกเห็ดถึงเชื้อสืบทอดในสัปดาห์ที่ 9, 10, 11, 12, 13 และ 14 ตามลำดับ หลังกระตุ้นด้วยแสงในระยะการเจริญเติบโตของดอก

2.4.3.1 เมื่อถึงระยะเวลาที่กำหนด สเปรย์สารละลายเอทานอลร้อยละ 70 โดยปริมาตร ฆ่าเชื้อบริเวณที่จะทำการเก็บเกี่ยว และอุปกรณ์ที่เกี่ยวข้องและเช็ดให้แห้ง

2.4.3.2 เปิดฝาขวด ใช้ปากคีบคีบก้อนเห็ดถึงเชื้อสืบทอดออกมาวางเรียงในถาดที่ละก้านโดยคีบก้อนเห็ดถึงเชื้อสืบทอดให้ถึงโคนต้นหรือให้อยู่ในสภาพสมบูรณ์มากที่สุด

2.4.3.3 ทำการอบแห้งถึงเข้าสู่ห้องที่อุณหภูมิ 60 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

2.4.3.4 เก็บแห้งถึงเข้าสู่ห้องที่ผ่านการอบแล้วไว้ในช่องสุญญากาศ และเก็บไว้ในตู้เย็นจนกว่าจะนำมาวิเคราะห์ด้วยเทคนิคที่พัฒนาขึ้น

การประยุกต์ใช้วิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นสำหรับตรวจวิเคราะห์ปริมาณ คอรีโดเซปิน และอะติโนซินที่สกัดได้จากแห้งถึงเข้าสู่ห้อง

ในการทดลองนี้จะนำตัวอย่างแห้งถึงเข้าสู่ห้องทั้งหมด 6 กลุ่มการทดลองที่เลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงที่มีการเติมกรดฟอสฟอริกที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ (หัวข้อ 2.4) มาทำการสกัดแบบวิธีที่ใช้คลื่นอัลตราซาวด์ในสภาวะที่เหมาะสม และนำสารสกัดที่ได้มาตรวจวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC ที่พัฒนาขึ้น โดยมีขั้นตอนการทดลองดังนี้

2.5.1 นำเห็ดมาบดให้เป็นผงละเอียด แล้วชั่งน้ำหนัก 0.2000 กรัม ใส่ปิกเกอร์เติมน้ำกลั่นปริมาตร 10.00 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน ปิดปิกเกอร์ด้วยอลูมิเนียมฟอยล์

2.5.2 นำตัวอย่างไปวางในเครื่อง ultrasonic เป็นเวลา 30 นาที

2.5.3 นำตัวอย่างไปเข้าเครื่อง centrifuge เป็นเวลา 20 นาที

2.5.4 ทำการแยกเอาสารละลายส่วนใสที่ได้จากการสกัดใส่ปิกเกอร์ จากนั้นทำการสกัดอีก 2 ครั้ง

2.5.5 นำตัวอย่างสารสกัดแห้งถึงเข้าสู่ห้องมากรองผ่านแผ่นกรอง

2.5.6 ฉีดสารตัวอย่างโดยใช้วิธีที่พัฒนาขึ้น (หัวข้อ 2.2) พร้อมบันทึกโครมาโทแกรม และสัญญาณพื้นที่ใต้พีค โดยทำการวิเคราะห์ซ้ำตัวอย่างละ 3 ครั้ง เพื่อทำการวิเคราะห์ปริมาณสารทั้ง 2 ชนิด ในตัวอย่างแต่ละตัวอย่างจากกราฟมาตรฐาน

บทที่ 4

ผลการทดลอง

งานวิจัยนี้ได้พัฒนาวิธีวิเคราะห์ปริมาณคอร์โดเซปินและอะดีโนซีนแบบพร้อมกันในเห็ดถึงเชื้อสืทองและศึกษาอิทธิพลของกรดฟอสฟอริกในอาหารเพาะเลี้ยงต่อปริมาณการผลิตคอร์โดเซปินและอะดีโนซีนในเห็ดถึงเชื้อสืทอง โดยขอเสนอผลการวิจัยดังหัวข้อต่อไปนี้

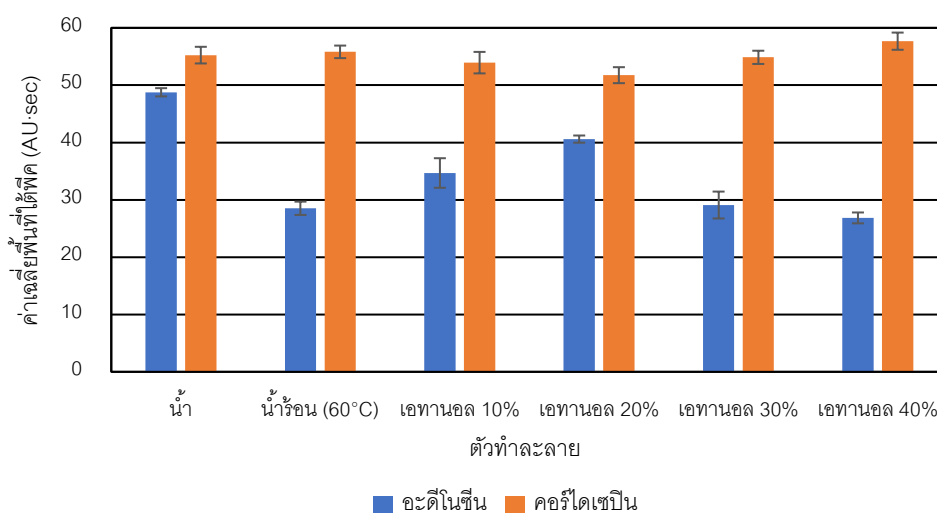
1. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของวิธีการสกัดแบบการใช้คลื่นอัลตราซาวด์สำหรับการสกัดสารออกฤทธิ์คอร์โดเซปินและอะดีโนซีนจากเห็ดถึงเชื้อสืทอง
2. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของวิธีวิเคราะห์ปริมาณคอร์โดเซปินและอะดีโนซีนแบบพร้อมกัน โดยใช้เทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง
3. การศึกษาประสิทธิภาพของวิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้น
4. การศึกษาการเพาะเลี้ยงเห็ดถึงเชื้อสืทองในอาหารเพาะเลี้ยงที่มีการเติมกรดฟอสฟอริก
5. การประยุกต์ใช้วิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นสำหรับตรวจวิเคราะห์ปริมาณคอร์โดเซปินและอะดีโนซีนที่สกัดได้จากเห็ดถึงเชื้อสืทอง

การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของวิธีการสกัดแบบการใช้คลื่นอัลตราซาวด์สำหรับการสกัดสารออกฤทธิ์คอร์โดเซปินและอะดีโนซีนจากเห็ดถึงเชื้อสืทอง

1.1 ชนิดของตัวทำละลาย

ในงานวิจัยนี้สนใจศึกษาตัวทำละลาย 2 ประเภท ได้แก่ น้ำ และเอทานอล เนื่องจากมีสภาพขั้วใกล้เคียงกับคอร์โดเซปินและอะดีโนซีน ซึ่งเป็นสารที่ต้องการสกัดออกจากเห็ดถึงเชื้อสืทอง และยังเป็นตัวทำละลายที่เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม โดยทำการศึกษาตัวทำละลายจำนวน 6 ชนิด ได้แก่ น้ำ, น้ำร้อน (อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส) และสารละลายเอทานอลเข้มข้นร้อยละ 10-40 โดยปริมาตร ผลการทดลองแสดงดังในภาพประกอบ 7 พบว่าเมื่อใช้น้ำเป็นตัวทำละลายในการสกัดให้ค่าเฉลี่ยสัญญาณพื้นที่ใต้พีคของอะดีโนซีนมากที่สุด เนื่องจากอะดีโนซีนเป็นสารที่มีขั้วสามารถละลายตัวได้ง่ายเมื่อโดนความร้อน จึงทำให้ปริมาณอะดีโนซีนที่สกัดได้เมื่อใช้น้ำร้อนและสารละลายเอทานอลมีปริมาณต่ำกว่าการใช้น้ำที่อุณหภูมิห้องเป็นตัวทำละลายในการสกัด ในขณะที่ค่าเฉลี่ยสัญญาณพื้นที่ใต้พีคของคอร์โดเซปินมีค่าใกล้เคียงกันในทุกตัวทำละลาย ($p > 0.05$) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยก่อนหน้านี้ที่รายงานว่า การใช้น้ำที่อุณหภูมิห้องจะสามารถสกัดอะดีโนซีนได้ในปริมาณมากที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับการใช้น้ำร้อน

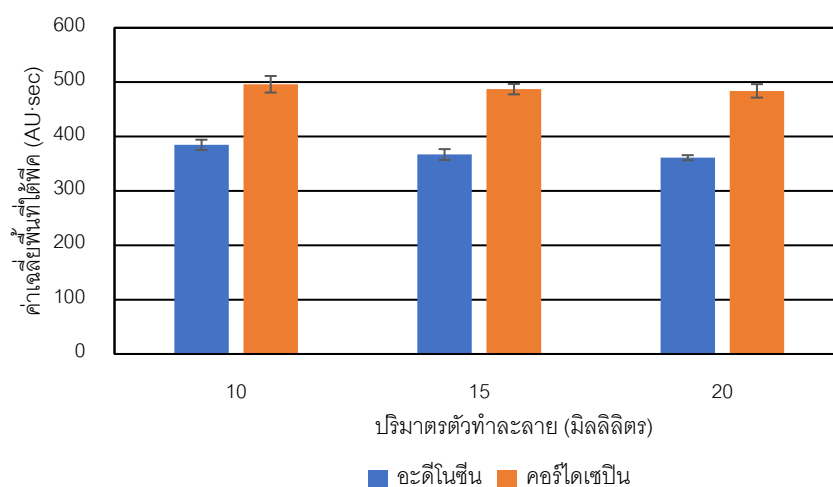
และเมทานอล ในขณะที่ตัวทำละลายทั้ง 3 ชนิดนี้ไม่ส่งผลต่อปริมาณการสกัดคอร์ไดเซบิน (Yang & Li, 2008) ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงเลือกใช้น้ำที่อุณหภูมิห้องเป็นตัวทำละลายที่เหมาะสมในการสกัดสารสำคัญทั้ง 2 ชนิด ออกจากเห็ดถั่งเช่าสีทองแบบพร้อมกัน



ภาพประกอบ 7 กราฟแสดงสัญญาณพื้นที่ใต้พีคของคอร์ไดเซบินและอะดีโนซีนที่วิเคราะห์ได้หลังการสกัดด้วยตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ

2.2 ปริมาตรของตัวทำละลาย

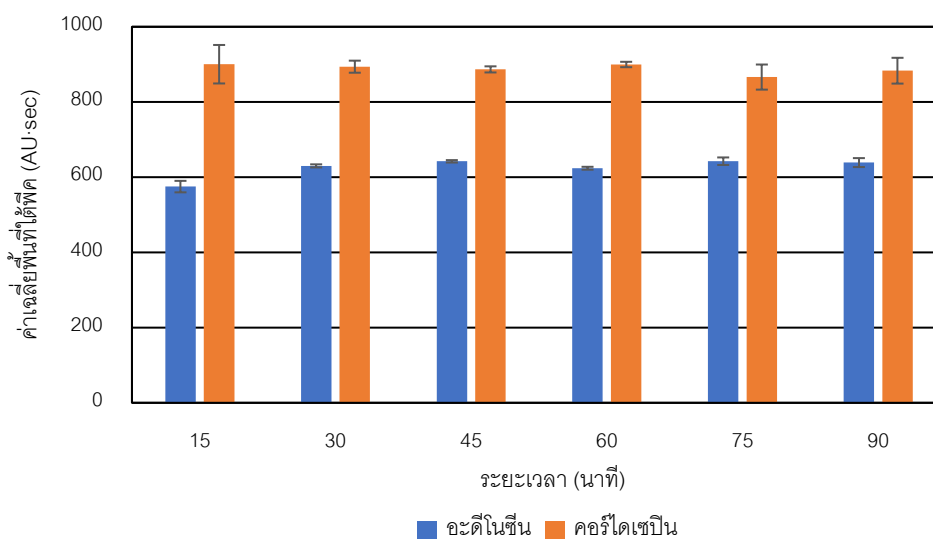
เมื่อทำการศึกษปริมาตรของน้ำ ซึ่งใช้เป็นตัวทำละลายที่ 10.00-20.00 มิลลิลิตร ดังแสดงในภาพประกอบ 8 พบว่าเมื่อใช้น้ำปริมาตร 10.00 มิลลิลิตร เป็นตัวทำละลายให้ปริมาณการสกัดอะดีโนซีนมากที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับอีก 2 สภาวะ ในขณะที่ปริมาณคอร์ไดเซบินที่สกัดได้มีค่าไม่แตกต่างกันในทุกสภาวะ ($p > 0.05$) ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงเลือกใช้ปริมาตรของตัวทำละลาย 10.00 มิลลิลิตร เป็นปริมาตรที่เหมาะสมในการสกัดสารทั้ง 2 ชนิด ในเห็ดถั่งเช่าสีทอง ซึ่งเป็นการลดปริมาณการใช้ตัวทำละลายอีกด้วย



ภาพประกอบ 8 กราฟแสดงสัญญาณพื้นที่ได้ฟิคของคอร์โดเซป็นและอะดีโนซีนที่วิเคราะห์ได้หลังการสกัดด้วยน้ำในช่วงปริมาตร 10-20 มิลลิเมตร

2.3 ระยะเวลาในการสกัด

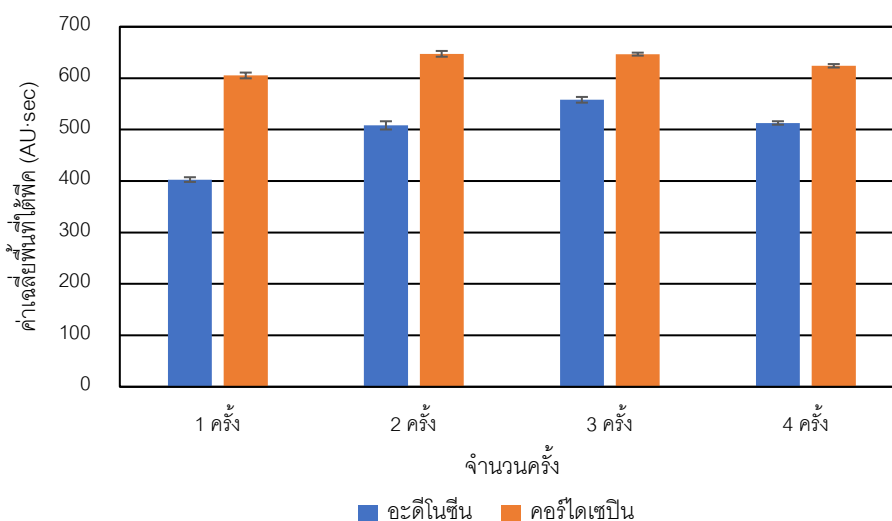
ในงานวิจัยนี้ทำการศึกษาระยะเวลาของการสกัดในช่วง 15-90 นาที เมื่อใช้น้ำปริมาตร 10.00 มิลลิเมตร เป็นตัวทำละลายในการสกัดได้ผลดังแสดงในภาพประกอบ 9 พบว่าเมื่อเพิ่มระยะเวลาการสกัดจาก 15 นาทีเป็น 30 นาที ทำให้สามารถสกัดปริมาณอะดีโนซีนเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) และเมื่อเพิ่มระยะเวลามากขึ้น (45-90 นาที) พบว่าปริมาณอะดีโนซีนที่สกัดได้มีค่าเพิ่มขึ้นไม่แตกต่างกัน ($p > 0.05$) ในขณะที่การสกัดคอร์โดเซป็นในช่วงระยะเวลา 15-90 นาที พบว่าปริมาณที่สกัดได้มีค่าไม่แตกต่างกัน ($p > 0.05$) ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงเลือกใช้ระยะเวลาในการสกัด 30 นาที ซึ่งเป็นระยะเวลาที่ให้ปริมาณการสกัดอะดีโนซีนและคอร์โดเซป็นเหมาะสม เป็นการช่วยลดระยะเวลาในการเตรียมตัวอย่างและลดความร้อนที่เกิดขึ้นจากการใช้คลื่นอัลตราซาวด์ในขบวนการสกัด เพื่อป้องกันการสลายตัวของอะดีโนซีนในระหว่างการสกัด อีกทั้งระยะเวลา 30 นาที ยังคงให้ผลการวิเคราะห์เป็นที่น่าสนใจ ($RSD = 3.63\%$)



ภาพประกอบ 9 กราฟแสดงสัญญาณพื้นที่ใต้พีคของคอร์โดเซปินและอะดีโนซีนที่วิเคราะห์ได้หลังการสกัดด้วยน้ำปริมาตร 10.00 มิลลิลิตร ในช่วงระยะเวลา 15-90 นาที

2.4 จำนวนครั้งในการสกัด

ผลการศึกษาจำนวนครั้งในการสกัดทั้งหมด 1-4 ครั้ง เมื่อใช้น้ำปริมาตร 10.00 มิลลิลิตร เป็นตัวทำละลายในการสกัด และใช้ระยะเวลา 30 นาที ในการสกัดแต่ละครั้ง แสดงดังภาพประกอบ 10พบว่าเมื่อเพิ่มจำนวนครั้งของการสกัดในช่วง 1-3 ครั้ง ส่งผลให้ประสิทธิภาพของการสกัดเพิ่มขึ้น โดยปริมาณอะดีโนซีนที่สกัดได้มีปริมาณเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) แต่การเพิ่มจำนวนการสกัดเป็น 4 ครั้ง พบว่าปริมาณที่สกัดได้มีค่าลดลง ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากการสลายตัวของอะดีโนซีนบางส่วนในระหว่างขบวนการสกัด ในขณะที่ปริมาณคอร์โดเซปินที่สกัดได้มีค่าเพิ่มขึ้นสูงที่สุดในช่วงจำนวนการสกัด 2-3 ครั้ง ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงเลือกใช้การสกัดซ้ำจำนวน 3 ครั้ง เป็นสภาวะสำหรับการสกัดสารออกฤทธิ์ทั้ง 2 ชนิด



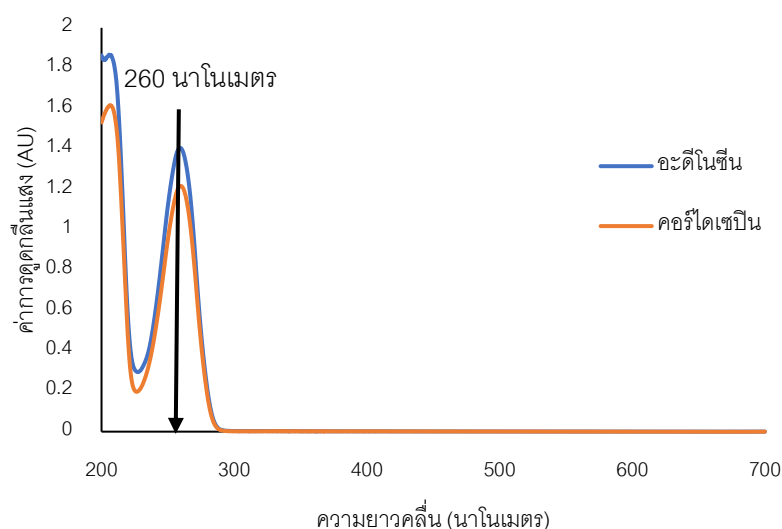
ภาพประกอบ 10 กราฟแสดงสัญญาณพื้นที่ใต้พีคของคอโรโดเซป็นและอะดีโนซีนที่วิเคราะห์ได้ หลังการสกัดด้วยน้ำที่จำนวนครั้งต่าง ๆ ของการสกัด

จากการศึกษาภาวะในการสกัดคอโรโดเซป็นและอะดีโนซีนในตัวอย่างเห็ดถึงเข้าสู่ห้องด้วยวิธีการสกัดแบบใช้คลื่นอัลตราซาวด์ พบว่าตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดคอโรโดเซป็นและอะดีโนซีน คือ น้ำที่อุณหภูมิห้องปริมาตร 10.00 มิลลิลิตร และใช้เวลาในการสกัด 30 นาที โดยทำการสกัดซ้ำทั้งหมด 3 ครั้ง เป็นสภาวะที่เหมาะสมที่สุดในสกัดสารทั้ง 2 ชนิด แบบพร้อมกัน

การศึกษสภาวะที่เหมาะสมของวิธีวิเคราะห์ปริมาณคอโรโดเซป็นและอะดีโนซีนแบบพร้อมกัน โดยใช้เทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง

2.1 ความยาวคลื่นที่ใช้ในการตรวจวัด

จากการทดลองเมื่อนำสารละลายมาตรฐานคอโรโดเซป็นและอะดีโนซีนมาวิเคราะห์ด้วยเทคนิคยูวี-วิสิเบิลสเปกโทรสโกปีในช่วงความยาวคลื่น 200-700 นาโนเมตร เพื่อหาความยาวคลื่นที่เหมาะสมในการตรวจวัด ผลการทดลองแสดงดังภาพประกอบ 11 พบว่าอะดีโนซีนและคอโรโดเซป็นมีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่น 259 และ 260 นาโนเมตร ตามลำดับ และเนื่องจากที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร ค่าการดูดกลืนแสงของอะดีโนซีนมีค่าใกล้เคียงกับ λ_{max} ดังนั้นผู้วิจัยจึงเลือกใช้ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร เพียงความยาวคลื่นเดียว สำหรับการตรวจวัดสารทั้ง 2 ชนิด

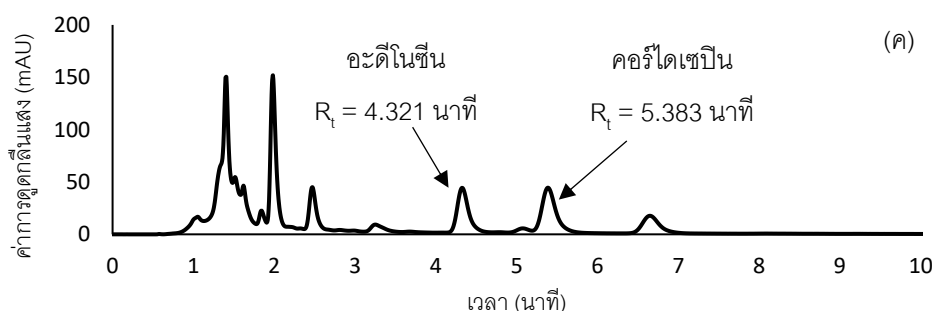
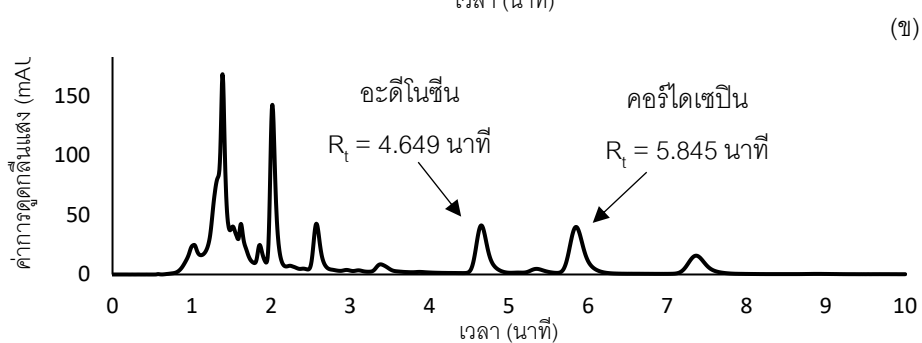
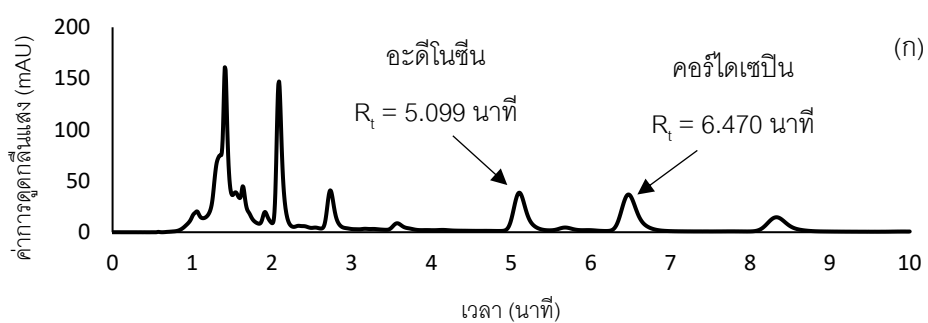


ภาพประกอบ 11 สเปกตรัมการดูดกลืนแสงของคอร์ไดเซปินและอะซีโนซีน

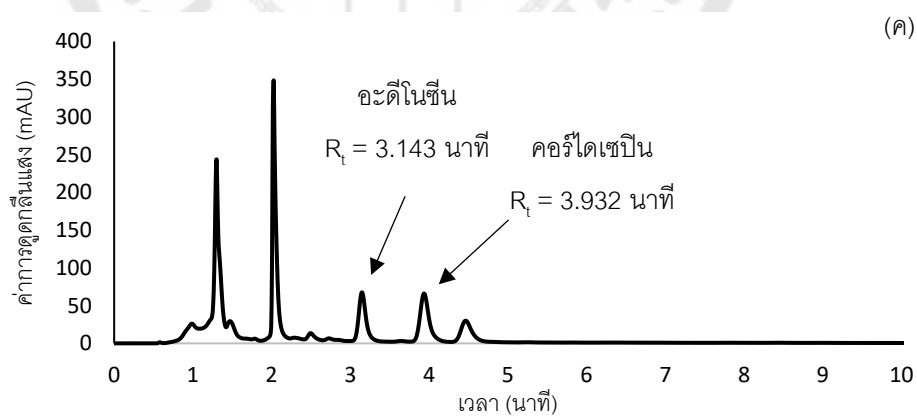
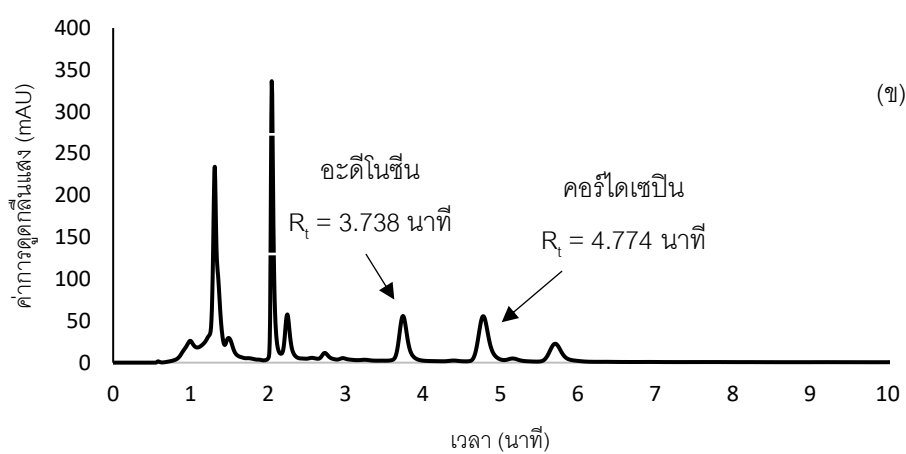
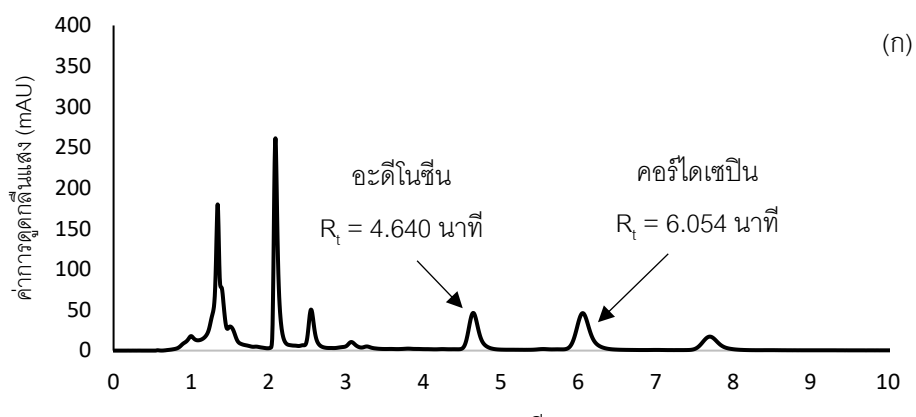
2.2 ชนิด และองค์ประกอบของวัสดุภาคเคลือบที่

ในงานวิจัยนี้ศึกษาชนิดตัวทำละลายอินทรีย์ที่นำมาใช้เป็นวัสดุภาคเคลือบทั้งหมด 3 ชนิด ได้แก่ เมทานอล อะซิโตน ไตรคลอโรเอทานอล สำหรับสารละลายเมทานอลได้ทำการศึกษาช่วงความเข้มข้นร้อยละ 17-19 โดยปริมาตร พบว่าการใช้สารละลายเมทานอลความเข้มข้นร้อยละ 19 โดยปริมาตร เป็นวัสดุภาคเคลือบที่ไม่สามารถแยกคอร์ไดเซปินออกจากสารรบกวนในตัวอย่างเห็นได้ชัด (ภาพประกอบ 12) เมื่อปรับลดความเข้มข้นเป็นร้อยละ 17-18 โดยปริมาตร พบว่าทั้ง 2 ความเข้มข้นสามารถแยกสารทั้ง 2 ชนิด ออกจากสารรบกวนได้อย่างสมบูรณ์ (ภาพประกอบ 12 (ก) และ (ข)) โดยเวลาการคงอยู่ (R_t) ของสารทั้ง 2 ชนิด มีค่าเพิ่มขึ้นเมื่อลดความเข้มข้นของสารละลายเมทานอล เนื่องจากความแรงของวัสดุภาคเคลือบที่ลดลง สำหรับการศึกษาการใช้สารละลายอะซิโตน ไตรคลอโรเอทานอล ในช่วงความเข้มข้นร้อยละ 7-9 โดยปริมาตร จากผลการทดลองในภาพประกอบ 13 จะเห็นว่าเมื่อใช้สารละลายอะซิโตน ไตรคลอโรเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 7 โดยปริมาตร เป็นวัสดุภาคเคลือบที่สามารถแยกสารทั้ง 2 ชนิด ออกจากสารรบกวนในตัวอย่างเห็นได้ชัด (ภาพประกอบ 13) ในขณะที่การปรับเพิ่มความเข้มข้นของสารละลายอะซิโตน ไตรคลอโรเอทานอลเป็นร้อยละ 8 และ 9 โดยปริมาตร ทำให้สารทั้ง 2 ชนิด ออกที่เวลาเร็วขึ้นตามความแรงของวัสดุภาคเคลือบที่เพิ่มขึ้น อย่างไรก็ตามทั้ง 2 สภาวะนี้ไม่สามารถแยกสารทั้ง 2 ชนิดออกจากสารรบกวนได้อย่างสมบูรณ์ สำหรับการศึกษาการใช้สารละลายเอทานอล

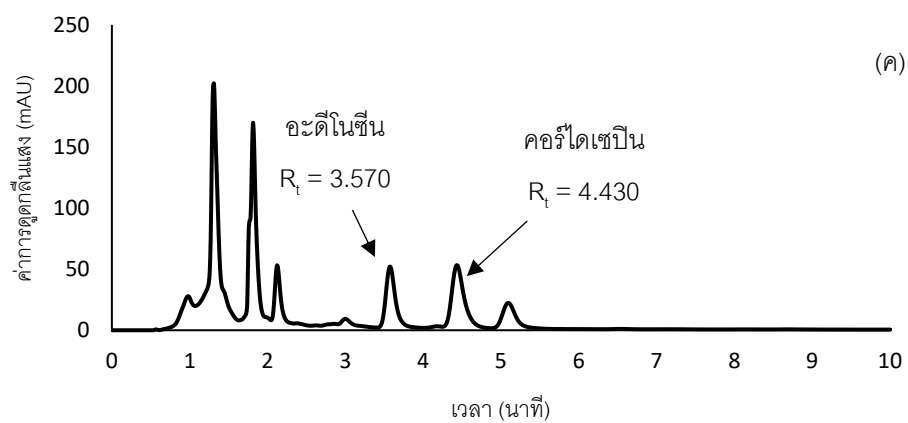
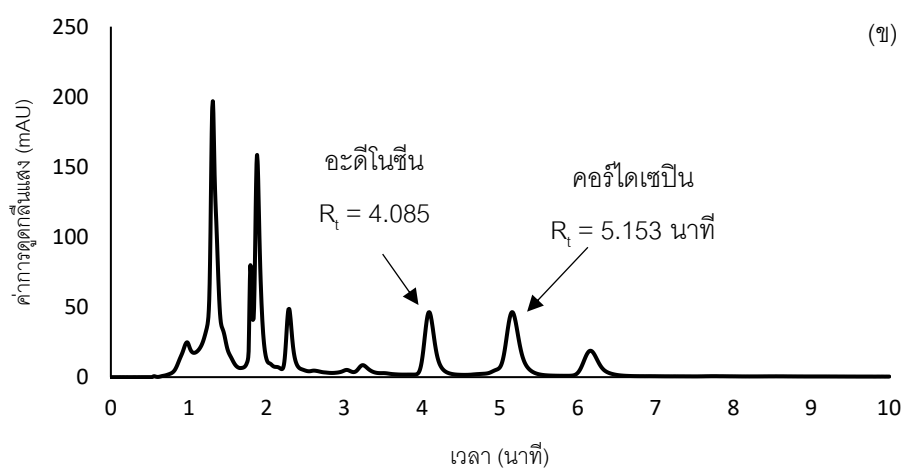
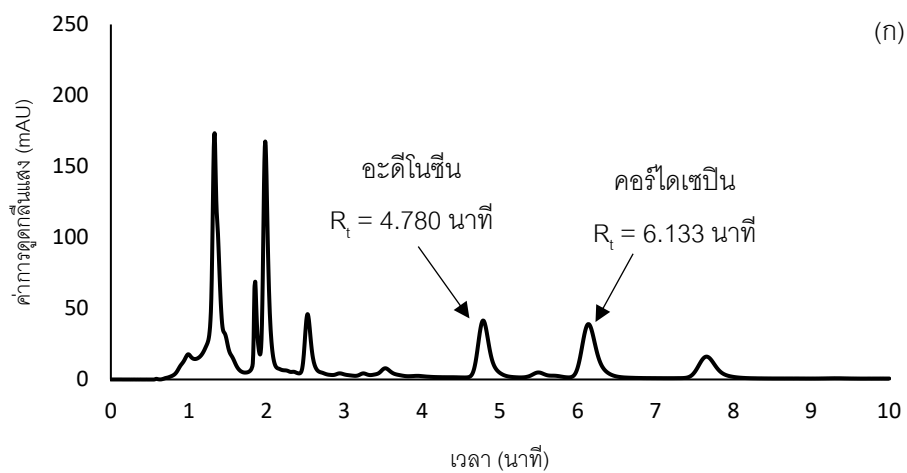
ความเข้มข้นร้อยละ 8-10 โดยปริมาตร เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ แสดงผลการทดลองในภาพประกอบ 14 ซึ่งให้ผลคล้ายกับการใช้สารละลายอะซิโตไนโตรล์ กล่าวคือ เมื่อความเข้มข้นของสารละลายเอทานอลเพิ่มขึ้น สารที่ต้องการออกมาได้เร็วขึ้นตามความแรงของวัฏภาคเคลื่อนที่ โดยที่ความเข้มข้นของสารละลายเอทานอลเท่ากับร้อยละ 8 โดยปริมาตรเป็นสภาวะที่สามารถแยก คอริโดเซปินและอะดีโนซีนออกจากสารรบกวนได้อย่างสมบูรณ์



ภาพประกอบ 12 โครมาโทแกรมของสารสกัดเห็ดถั่งเช่าสีทอง เมื่อใช้สารละลายเมทานอลเข้มข้น (ก) ร้อยละ 17 (ข) ร้อยละ 18 (ค) ร้อยละ 19 โดยปริมาตร เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่

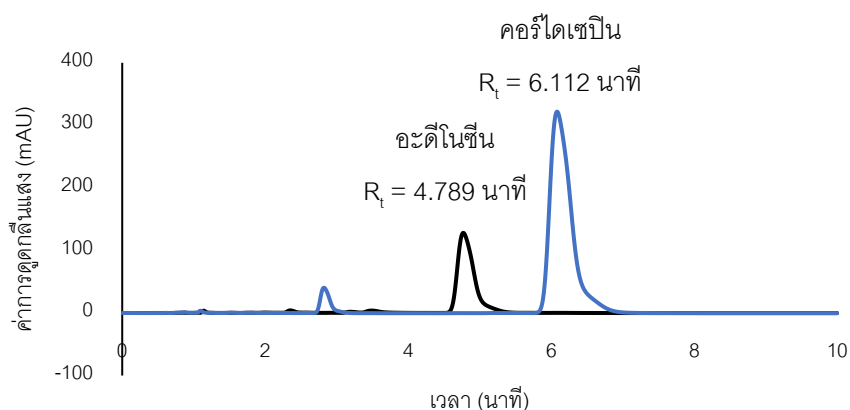


ภาพประกอบ 13 โครมาโทแกรมของสารสกัดเห็ดถังเช่าสีทอง เมื่อใช้สารละลายอะซิโตไนโตรล์
เข้มข้น (ก) ร้อยละ 7 (ข) ร้อยละ 8 (ค) ร้อยละ 9 เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่



ภาพประกอบ 14 โครมาโทแกรมของสารสกัดเห็ดถังเช่าสีทอง เมื่อใช้สารละลายเอทานอลเข้มข้น
(ก) ร้อยละ 8 (ข) ร้อยละ 9 (ค) ร้อยละ 10 เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่

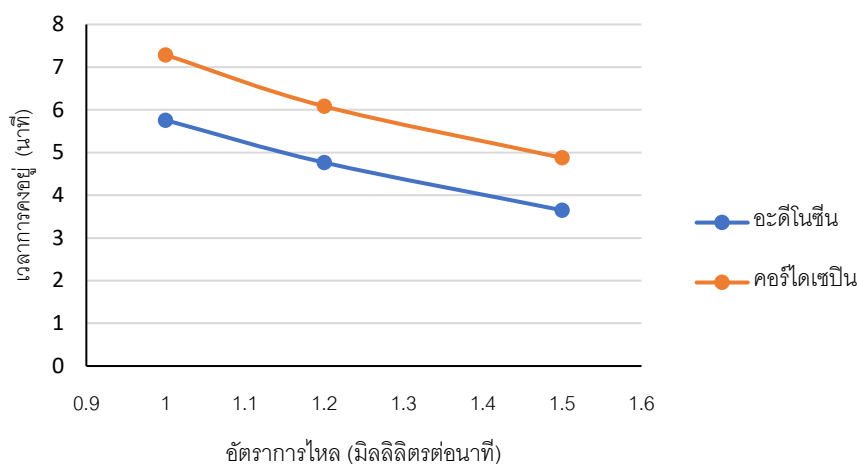
เมื่อเปรียบเทียบการใช้ตัวทำละลาย และองค์ประกอบของภูมิภาคเคลื่อนที่ชนิดต่างๆ โดยพิจารณาจากสภาวะที่ให้ประสิทธิภาพการแยกอะดีโนซีน และคอร์โดเซป็นออกจากสารรบกวนต่าง ๆ ในตัวอย่างสารสกัดเห็ดถึงเชื้อสืของได้อย่างสมบูรณ์ พบว่าเมื่อใช้สารละลายเมทานอลเข้มข้นร้อยละ 18 โดยปริมาตร, สารละลายอะซิโตนไตรล์เข้มข้นร้อยละ 7 โดยปริมาตร และสารละลายเอทานอลเข้มข้นร้อยละ 8 โดยปริมาตร ให้เวลาการคงอยู่ของอะดีโนซีนเท่ากับ 4.649, 4.640 และ 4.780 นาที ตามลำดับ และคอร์โดเซป็นเท่ากับ 5.845, 6.054 และ 6.133 นาที ตามลำดับ ซึ่งจะเห็นว่าเวลาที่ใช้ในการแยกสารทั้ง 2 ชนิดมีค่าใกล้เคียงกันในทุกสภาวะ แต่เมื่อพิจารณาความเข้มข้นของภูมิภาคเคลื่อนที่ทั้ง 3 ชนิด พบว่าสารละลายเมทานอลต้องใช้ความเข้มข้นมากที่สุด จึงทำให้มีปริมาณของตัวทำละลายอินทรีย์ในของเสียจากการวิเคราะห์มากกว่าตัวทำละลายอีก 2 ชนิด ในขณะที่การใช้สารละลายอะซิโตนไตรล์และสารละลายเอทานอลมีปริมาณของตัวทำละลายในของเสียจากการวิเคราะห์ไม่แตกต่างกันมาก อย่างไรก็ตามอะซิโตนไตรล์เป็นตัวทำละลายอินทรีย์ที่มีความเป็นพิษมากกว่าเอทานอล อีกทั้งยังมีค่าใช้จ่ายในการกำจัดของเสียที่มากกว่า ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงเลือกสารละลายเอทานอลที่มีความเข้มข้นร้อยละ 8 โดยปริมาตร เป็นภูมิภาคเคลื่อนที่สำหรับการวิเคราะห์ปริมาณคอร์โดเซป็นและอะดีโนซีน เนื่องจากให้ระยะเวลาในการวิเคราะห์เหมาะสม สามารถแยกสารที่สนใจออกจากสารรบกวนได้อย่างสมบูรณ์ อีกทั้งยังเป็นตัวทำละลายอินทรีย์ที่เป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อมอีกด้วย ภาพประกอบ 15 แสดงโครมาโทแกรมของสารมาตรฐานผสมระหว่างคอร์โดเซป็นและอะดีโนซีน เมื่อใช้สารละลายเอทานอลที่มีความเข้มข้นร้อยละ 8 โดยปริมาตร เป็นภูมิภาคเคลื่อนที่ จะเห็นว่าอะดีโนซีนมีเวลาการคงอยู่น้อยกว่าคอร์โดเซป็น เนื่องจากโครงสร้างของอะดีโนซีนมีหมู่ไฮดรอกซิลมากกว่าคอร์โดเซป็น 1 หมู่ ทำให้อะดีโนซีนมีขั้วมากกว่าคอร์โดเซป็น ส่งผลให้ความสามารถในการกระจายตัวของอะดีโนซีนใน C18 ที่ใช้เป็นภูมิภาคคงที่น้อยกว่าคอร์โดเซป็นที่มีขั้วต่ำกว่า จึงถูกแยกออกมาก่อน และมีเวลาการคงอยู่น้อยกว่าคอร์โดเซป็น



ภาพประกอบ 15 โครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานอะดีโนซีนและคอร์โดเซพีน โดยใช้สารละลายเอทานอลเข้มข้นร้อยละ 8 โดยปริมาตร เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ที่อัตราการไหล 1.20 มิลลิลิตรต่อนาที

2.3 อัตราการไหลของวัฏภาคเคลื่อนที่

จากการศึกษาอัตราการไหลของวัฏภาคเคลื่อนที่ในช่วง 1.00-1.50 มิลลิลิตรต่อนาที ในการตรวจวิเคราะห์คอร์โดเซพีนและอะดีโนซีนในตัวอย่างสารสกัดเห็ดถั่งชึ่ง โดยใช้วัฏภาคเคลื่อนที่ที่เป็นสารละลายเอทานอลที่ความเข้มข้นร้อยละ 8 โดยปริมาตร จากผลการศึกษาในภาพประกอบ 16 พบว่าเมื่อเพิ่มอัตราการไหลของวัฏภาคเคลื่อนที่ทำให้เวลาการคงอยู่ของสารทั้ง 2 ชนิด ในคอลัมน์มีค่าลดลง โดยในงานวิจัยนี้เลือกใช้อัตราการไหลที่ 1.20 มิลลิลิตรต่อนาที เนื่องจากเป็นสภาวะที่ยังสามารถแยกสารทั้ง 2 ชนิด ในตัวอย่างเห็ดถั่งชึ่งได้อย่างดี ใช้เวลาในการแยกไม่เกิน 9.00 นาที และยังเป็นการช่วยยืดอายุการใช้งานของคอลัมน์ เนื่องจากความดันย้อนกลับภายในคอลัมน์จะมีค่าสูงขึ้นตามอัตราการไหลที่เพิ่มขึ้น



ภาพประกอบ 16 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการไหลของวัฏภาคเคลื่อนที่ และเวลาของการคงอยู่ของคอรีโดเซปิน และอะดีโนซีนเมื่อใช้สารละลายเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 8 โดยปริมาตร เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่

จากการศึกษาสถานะในการตรวจวิเคราะห์ปริมาณคอรีโดเซปินและอะดีโนซีนในตัวอย่างสารสกัดเห็ดถั่งเช่าสีทองในระบบไอโซครีติกที่พัฒนาขึ้น พบว่าสถานะที่เหมาะสมสำหรับการตรวจวิเคราะห์สารทั้ง 2 ชนิด คือการใช้สารละลายเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 8 โดยปริมาตร เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ที่อัตราการไหล 1.20 มิลลิลิตรต่อนาที และตรวจวัดสารทั้ง 2 ชนิดที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร โดยภายใต้สภาวะดังกล่าวสามารถแยกอะดีโนซีน ($R_t = 4.789$ นาที) และคอรีโดเซปิน ($R_t = 6.112$ นาที) ในสารสกัดเห็ดถั่งเช่าสีทองออกจากสารรบกวนได้อย่างสมบูรณ์ โดยใช้เวลาในการวิเคราะห์ทั้งหมด 9.00 นาที ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับงานวิจัยอื่น ๆ พบว่าใช้เวลาในการสกัด และการตรวจวัดที่นานกว่า ดังนั้นจึงเห็นได้ว่าวิธีการสกัดและวิธีการตรวจวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นในงานวิจัยนี้ช่วยลดระยะเวลาให้สั้นลง แต่ยังคงมีประสิทธิภาพดี อีกทั้งยังใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ที่มีความเป็นพิษต่ำ ช่วยลดปริมาณการใช้ตัวทำละลายอินทรีย์อีกด้วย จึงเป็นวิธีการวิเคราะห์ที่เป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อมมากขึ้น

การศึกษาประสิทธิภาพของวิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้น

3.1 ช่วงความเป็นเส้นตรง

จากการศึกษาช่วงความเป็นเส้นตรงของการวิเคราะห์คอร์โดเซปินและอะดีโนซีน โดยทำการเตรียมสารละลายมาตรฐานผสมในช่วงความเข้มข้น 0.02-200 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่า กราฟมาตรฐานของสารทั้ง 2 ชนิด มีความเป็นเส้นตรงอยู่ในช่วงความเข้มข้นที่ศึกษา โดยมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (R^2) มากกว่า 0.999 ผลการทดลองดังแสดงในตาราง 1

ตาราง 1 ผลการศึกษาช่วงความเป็นเส้นตรง

สารที่วิเคราะห์	ช่วงความเป็นเส้นตรง (มิลลิกรัมต่อลิตร)	สมการเส้นตรง	ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (R^2)
คอร์โดเซปิน	0.02-200	$y = 61119x + 7620.3$	0.9999
อะดีโนซีน	0.02-200	$y = 62323x + 6600.9$	1

3.2 ค่าขีดจำกัดต่ำสุดของตรวจวัด (LOD) และค่าขีดจำกัดต่ำสุดของการวิเคราะห์ปริมาณ (LOQ)

ในงานวิจัยนี้ได้ทำการวิเคราะห์ LOD และ LOQ โดยเลือกจากความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานที่มีสัดส่วนสัญญาณของสารละลายมาตรฐานคอร์โดเซปินและอะดีโนซีนต่อสัญญาณรบกวนเท่ากับ 3 และ 10 ตามลำดับ ผลการทดลองพบว่าวิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นมีค่า LOD และ LOQ ของสารทั้ง 2 ชนิด เท่ากับ 5 และ 20 นาโนกรัมต่อลิตร ตามลำดับ

3.3 ความเที่ยงของวิธีวิเคราะห์

จากการศึกษาความเที่ยงของวิธีวิเคราะห์ทั้งความเที่ยงภายในวันเดียวกัน ซึ่งทำการวิเคราะห์ซ้ำจำนวน 5 ครั้ง และความเที่ยงระหว่างวัน ซึ่งทำการวิเคราะห์เป็นระยะเวลา 3 วัน ต่อเนื่องกัน โดยทำการวิเคราะห์ในสารละลายมาตรฐานผสมของคอร์โดเซปินและอะดีโนซีนที่ความเข้มข้น 0.20, 5.0 และ 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ผลการทดลองแสดงดังตาราง 2 ซึ่งพบค่าร้อยละความเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD) ของพื้นที่ใต้พีคของการวิเคราะห์ภายในวันเดียวกันอยู่ในช่วง 0.10-0.74 และการวิเคราะห์ระหว่างวันอยู่ในช่วง 0.41-2.36 สำหรับ %RSD ของเวลาของการคงอยู่ของสารทั้ง 2 ชนิดในการวิเคราะห์ภายในวันเดียวกันอยู่ในช่วง

0.16-0.24 และการวิเคราะห์ระหว่างวันอยู่ในช่วง 1.38-1.73 ซึ่งจะเห็นได้ว่าวิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นให้ค่าความเที่ยงของการวิเคราะห์เป็นที่น่าสนใจ โดยมีค่า %RSD ของพื้นที่ได้ฟีดและเวลาของการคงอยู่สำหรับการวิเคราะห์สารทั้ง 2 ชนิด ทั้งการวิเคราะห์ภายในวันเดียว และระหว่างวันน้อยกว่า 2.5%

ตาราง 2 ผลการศึกษาความเที่ยงของวิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้น

สารที่วิเคราะห์	ความเข้มข้น (มิลลิกรัมต่อลิตร)	%RSD ในวันเดียวกัน (n = 5)		%RSD ระหว่างวัน (n = 3)	
		พื้นที่ได้ฟีด	เวลาคงอยู่	พื้นที่ได้ฟีด	เวลาคงอยู่
คอร์โดเซป็น	0.20	0.74	0.22	2.36	1.73
	5.0	0.50	0.18	1.69	1.53
	100	0.27	0.16	0.41	1.47
อะดีโนซีน	0.20	0.67	0.24	0.75	1.64
	5.0	0.50	0.24	1.75	1.42
	100	0.10	0.20	0.45	1.38

3.4 ร้อยละการคืนกลับ

ในงานวิจัยนี้ได้ศึกษาค่าร้อยละของการคืนกลับ โดยการเติมสารละลายมาตรฐาน คอร์โดเซป็นและอะดีโนซีนให้มีความเข้มข้น 0.20, 5.0 และ 20 มิลลิกรัมต่อลิตร ในผงตัวอย่างเห็ดถึงเชื้อสืทอง จากนั้นนำตัวอย่างมาวิเคราะห์โดยใช้วิธีที่พัฒนาขึ้น ผลการทดลองแสดงดังตาราง 3 พบว่าวิธีที่พัฒนาขึ้นมีค่าร้อยละของการคืนกลับของคอร์โดเซป็นอยู่ในช่วงร้อยละ 82.04-117.52 และอะดีโนซีนอยู่ในช่วง 100.64-104.28 โดยการวิเคราะห์ในตัวอย่างทุกชนิดมีค่าร้อยละความเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์อยู่ในช่วงร้อยละ 0.11-1.83 แสดงว่าวิธีที่พัฒนาขึ้นสามารถใช้วิเคราะห์สารทั้ง 2 ชนิดในตัวอย่างเห็ดถึงเชื้อสืทองได้เป็นอย่างดี

ตาราง 3 ผลการศึกษาค่าร้อยละการคืนกลับ

สารที่วิเคราะห์	ความเข้มข้น (มิลลิกรัมต่อลิตร)	ร้อยละการคืนกลับ (%RSD)
คอร์ไดเซปิน	0.20	117.52(0.23)
	5.0	82.04(0.52)
	100	104.51(0.26)
อะดีโนซีน	0.20	100.91(1.83)
	5.0	100.64(0.86)
	100	104.28(0.11)

การศึกษาการเพาะเลี้ยงเห็ดถั่งเช่าสีทองในอาหารเพาะเลี้ยงที่มีการเติมกรดฟอลิก

ในการเพาะเลี้ยงเห็ดถั่งเช่าสีทองในงานวิจัยนี้มีการใช้อาหารเพาะเลี้ยงเหลวที่เตรียมจากมันฝรั่ง ซึ่งเป็นแหล่งของน้ำตาลผสมกับข้าวโพดอ่อน ซึ่งเป็นแหล่งของสารอาหารอื่น ๆ รวมถึง growth hormone และวิตามินชนิดต่าง ๆ และใช้อาหารเพาะเลี้ยงแข็งที่เตรียมจากข้าวสาลีหยาบ ซึ่งเป็นข้าวที่มีคุณค่าทางโภชนาการสูง มีสารอาหารสำคัญ เช่น ฟอสฟอรัส เหล็ก สังกะสี และวิตามินจำนวนมากที่จำเป็นในการเจริญเติบโตของเห็ดถั่งเช่า จากนั้นนำอาหารเพาะเลี้ยงที่เตรียมได้มาแบ่งเป็นทั้งหมด 6 กลุ่มการทดลอง โดยกลุ่มที่ 1-5 มีการเติมกรดฟอลิกความเข้มข้น 0, 0.1, 1, 10 และ 50 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ลงในอาหารเพาะเลี้ยง และกลุ่มที่ 6 เป็นกลุ่มอาหารเพาะเลี้ยงควบคุมที่ไม่มีการเติมกรดฟอลิก และสารละลายโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 0.1 โมลาร์ (ซึ่งใช้เป็นตัวทำละลายในการเตรียมสารละลายกรดฟอลิก) จากนั้นทำการเพาะเลี้ยงเห็ดถั่งเช่าสีทองในอาหารเพาะเลี้ยงทั้ง 6 กลุ่มที่อุณหภูมิ 17-21 องศาเซลเซียส เป็นเวลาทั้งหมด 18 สัปดาห์ โดยแบ่งเป็นระยะการเจริญของเส้นใยจำนวน 4 สัปดาห์ และช่วงการกระตุ้นด้วยแสงในระยะการเจริญเติบโตเป็นดอกเห็ดอีก 14 สัปดาห์ จากนั้นจึงทำการเก็บเกี่ยวเห็ดถั่งเช่าสีทองทั้งหมด 6 ครั้ง ในช่วงสัปดาห์ที่ 9-14 ของการกระตุ้นด้วยแสง ลักษณะการเจริญเติบโตของเห็ดถั่งเช่าสีทองทั้ง 6 กลุ่มการทดลองที่ระยะเวลาต่าง ๆ แสดงดังภาพประกอบ 17 พบว่าในช่วงการบ่มเชื้อในที่มืดเพื่อให้เกิดการเจริญของเส้นใยเห็ดในสัปดาห์ที่ 1 และ 2 อาหารเพาะเลี้ยงโดยส่วนใหญ่เริ่มเกิดเส้นใยสีขาวและมีการแผ่ขยายทั่วบริเวณด้านบนของอาหารเพาะเลี้ยง จากนั้นเส้นใยสีขาวจะเริ่มแผ่ขยายลงมาด้านล่างของอาหารในสัปดาห์ที่ 3 (ภาพประกอบ 17ก) และขยายทั่วทั้งอาหารเพาะเลี้ยงในสัปดาห์ที่ 4 สำหรับในช่วงการให้แสงเพื่อกระตุ้นให้เกิดการเจริญของดอกเห็ด พบว่าหลังจากกระตุ้นด้วยแสงเป็นระยะเวลา 1-3 สัปดาห์ เส้นใยสีขาวเริ่มเปลี่ยนเป็น

สีส้ม (ภาพประกอบ 17ข) จากนั้นเริ่มเกิดตุ่มดอกเห็ดงอกขึ้นมาในสัปดาห์ที่ 4 โดยมีจำนวน และความยาวของดอกเห็ดเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาการให้แสง เมื่อกระตุ้นด้วยแสงเป็นระยะเวลา 9 สัปดาห์ จะเห็นได้ว่าดอกเห็ดถึงเข้าสีทองส่วนใหญ่มีลักษณะฉอม และมีความยาวของดอกอยู่ในช่วง 2-3 เซนติเมตร โดยดอกเห็ดที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่มีการเติมกรดโฟลิกจะมีจำนวนมากกว่าที่เพาะเลี้ยงในอาหารกลุ่มควบคุม และที่ไม่เติมกรดโฟลิก (ภาพประกอบ 17ค) ต่อมาในช่วงสัปดาห์ที่ 10-12 หลังกระตุ้นด้วยแสง พบว่าดอกเห็ดมีความยาว และความสมบูรณ์ของดอกเพิ่มมากขึ้น และจำนวนดอกเห็ดเพิ่มมากขึ้น หลังจากสัปดาห์ที่ 12 พบว่าการเจริญเติบโตของดอกเห็ดถึงเข้าสีทองไม่มีการเปลี่ยนแปลงที่ชัดเจน นอกจากนี้ดอกเห็ด และอาหารเพาะเลี้ยงเริ่มมีลักษณะแห้ง อีกทั้งดอกเห็ดบางส่วนเปลี่ยนจากสีส้มเป็นสีขาว

(ก)



Folic acid (mg/L) Control 0 0.1 1 10 50

(ข)



Folic acid (mg/L) Control 0 0.1 1 10 50

(ค)



Folic acid (mg/L) Control 0 0.1 1 10 50

ภาพประกอบ 17 การเจริญเติบโตของเห็ดถึงเข้าสีทองที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่มีปริมาณกรดโฟลิกแตกต่างกันในช่วงเวลา (ก) ปมในที่มีสัปดาห์ที่ 3 (การเจริญเส้นใย) และกระตุ้นด้วยแสง (ข) สัปดาห์ที่ 1 และ (ค) สัปดาห์ที่ 9 (การเจริญของดอก)

การประยุกต์ใช้วิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นสำหรับตรวจวิเคราะห์ปริมาณคอร์โดเซปินและอะดีโนซีนที่สกัดได้จากเห็ดถั่งเช่าสีทอง

เมื่อนำวิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นมาประยุกต์ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณคอร์โดเซปินและอะดีโนซีนในตัวอย่างเห็ดถั่งเช่าสีทองที่เพาะเลี้ยงด้วยอาหารเพาะเลี้ยงกลุ่มควบคุม (ไม่มีการเติมกรดฟอลิก และโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 0.1 โมลาร์) และอาหารที่มีการเติมกรดฟอลิกที่ความเข้มข้น 0, 0.1, 1, 10, และ 50 มิลลิกรัมต่อลิตร ในระยะเวลาการเก็บเกี่ยวช่วงสัปดาห์ที่ 9-14 หลังกระตุ้นด้วยแสง ผลการทดลองแสดงดังตาราง 4 และภาพประกอบ 18 เมื่อเปรียบเทียบลักษณะอาหารเพาะเลี้ยง และระยะเวลาในการเก็บเกี่ยวต่าง ๆ พบว่าเห็ดถั่งเช่าที่เพาะเลี้ยงด้วยอาหารเพาะเลี้ยงควบคุม และอาหารที่มีการเติมกรดฟอลิกที่ความเข้มข้น 0, 0.1, 1, 10, และ 50 มิลลิกรัมต่อลิตร มีปริมาณอะดีโนซีนอยู่ในช่วง 197.00-237.72, 179.54-226.75, 178.96-230.51, 190.00-239.49, 188.67-244.15 และ 180.26-227.63 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม น้ำหนักแห้งตามลำดับ จะเห็นว่าอะดีโนซีนในเห็ดถั่งเช่าที่เพาะเลี้ยงด้วยอาหารเพาะเลี้ยงทั้ง 6 ชุดการทดลองโดยส่วนใหญ่มีแนวโน้มปริมาณเพิ่มขึ้นในช่วงสัปดาห์ที่ 9-11 หลังให้แสง และมีแนวโน้มลดลงเมื่อกระตุ้นด้วยแสง และเก็บเกี่ยวที่ระยะเวลานานกว่า 11 สัปดาห์ นอกจากนี้ปริมาณของอะดีโนซีนในเห็ดถั่งเช่าสีทองที่เลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงที่มีการเติมกรดฟอลิกเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมพบว่าปริมาณไม่แตกต่างกันมากนัก แสดงให้เห็นว่าการเติมกรดฟอลิกลงไปในอาหารเพาะเลี้ยงน่าจะไม่ได้มีส่วนช่วยในการผลิตสารออกฤทธิ์อะดีโนซีน

ตาราง 4 ปริมาณอะดีโนซีนในเห็ดถั่งเช่าที่เพาะเลี้ยงด้วยอาหารที่มีการเติมกรดฟอลิกความเข้มข้นต่าง ๆ ในช่วงเวลาการเก็บเกี่ยวสัปดาห์ที่ 9-14 หลังกระตุ้นด้วยแสง

อาหารเพาะเลี้ยง	ปริมาณอะดีโนซีน $\pm$ SD (มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม)					
	9*	10*	11*	12*	13*	14*
ควบคุม	197.00 $\pm$ 0.60	207.07 $\pm$ 3.67	230.13 $\pm$ 0.90	237.72 $\pm$ 0.35	210.20 $\pm$ 0.38	202.20 $\pm$ 0.90
กรดฟอลิก 0 มิลลิกรัมต่อลิตร	218.46 $\pm$ 1.62	223.01 $\pm$ 4.84	226.75 $\pm$ 2.72	218.72 $\pm$ 0.30	198.54 $\pm$ 2.55	179.54 $\pm$ 0.53
กรดฟอลิก 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร	228.68 $\pm$ 3.95	229.41 $\pm$ 5.50	221.20 $\pm$ 1.31	192.07 $\pm$ 0.05	178.96 $\pm$ 2.17	188.15 $\pm$ 0.67
กรดฟอลิก 1 มิลลิกรัมต่อลิตร	226.87 $\pm$ 4.15	237.86 $\pm$ 0.20	239.49 $\pm$ 0.92	216.75 $\pm$ 0.02	206.73 $\pm$ 0.37	190.00 $\pm$ 0.29
กรดฟอลิก 10 มิลลิกรัมต่อลิตร	215.18 $\pm$ 1.51	229.20 $\pm$ 5.14	244.15 $\pm$ 1.55	212.69 $\pm$ 0.54	190.8 $\pm$ 1.40	188.67 $\pm$ 0.67
กรดฟอลิก 50 มิลลิกรัมต่อลิตร	222.47 $\pm$ 1.43	224.51 $\pm$ 1.54	227.03 $\pm$ 0.22	227.63 $\pm$ 2.37	203.72 $\pm$ 0.10	180.26 $\pm$ 0.73

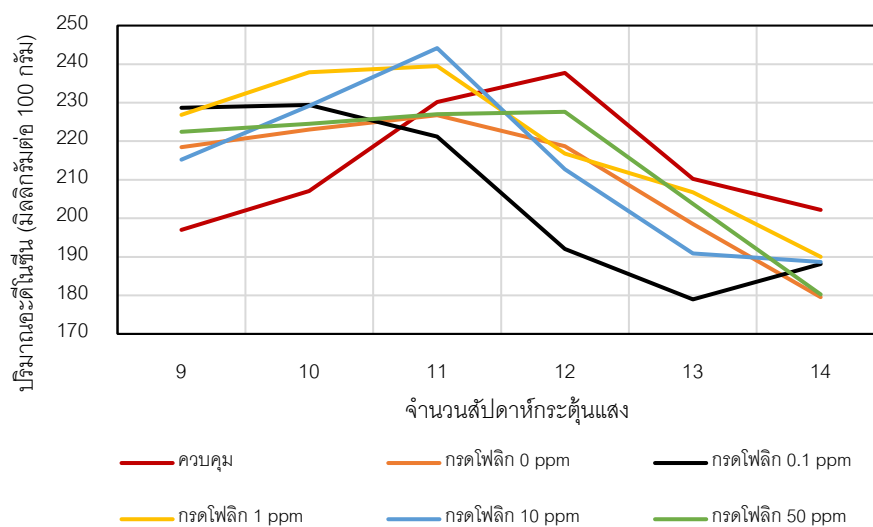
*จำนวนสัปดาห์หลังกระตุ้นแสง

ตาราง 5 และภาพประกอบ 19 แสดงปริมาณคอร์โดเซปินในเห็ดถั่งเช่าที่เพาะเลี้ยงด้วยอาหารเพาะเลี้ยงควบคุม และอาหารที่มีการเติมกรดโฟลิกที่ความเข้มข้น 0, 0.1, 1, 10, และ 50 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าปริมาณคอร์โดเซปินอยู่ในช่วง 804.20-1529.69, 685.06-1109.68, 919.48-2220.27, 761.22-1843.68, 784.68-1873.96 และ 794.29-1612.77 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัมน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบระยะเวลาการเก็บเกี่ยวที่แตกต่างกัน จะเห็นได้ว่าในกลุ่มการทดลองที่มีการเติมกรดโฟลิกในอาหารเพาะเลี้ยงจะมีปริมาณคอร์โดเซปินในเห็ดถั่งเช่าสีทองแนวโน้มเพิ่มขึ้นอย่างชัดเจนตามระยะเวลาการให้แสงในช่วงสัปดาห์ที่ 9-13 หลังจากสัปดาห์ที่ 13 พบว่าปริมาณไม่แตกต่างจากเดิมมากนัก และจะเห็นได้ว่าเห็ดถั่งเช่าที่เลี้ยงในอาหารที่มีการเติมกรดโฟลิกจะสามารถรอการเก็บเกี่ยวที่ระยะเวลานานกว่ากลุ่มควบคุม ซึ่งปริมาณคอร์โดเซปินแนวโน้มลดลงตั้งแต่สัปดาห์ที่ 11 เมื่อเปรียบเทียบปริมาณคอร์โดเซปินในอาหารเพาะเลี้ยงชนิดต่าง ๆ พบว่าเห็ดถั่งเช่าที่เพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงที่มีการเติมกรดโฟลิกให้ปริมาณคอร์โดเซปินมากกว่าในกลุ่มอาหารเพาะเลี้ยงควบคุม และอาหารเพาะเลี้ยงที่ไม่เติมกรดโฟลิก แสดงให้เห็นว่าการเติมกรดโฟลิกลงไปในการเพาะเลี้ยงสามารถช่วยเพิ่มการผลิตปริมาณคอร์โดเซปินในเห็ดถั่งเช่าสีทองได้ โดยเห็ดถั่งเช่าที่เพาะเลี้ยงด้วยอาหารที่เติมกรดโฟลิกความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร มีปริมาณคอร์โดเซปินมากที่สุด

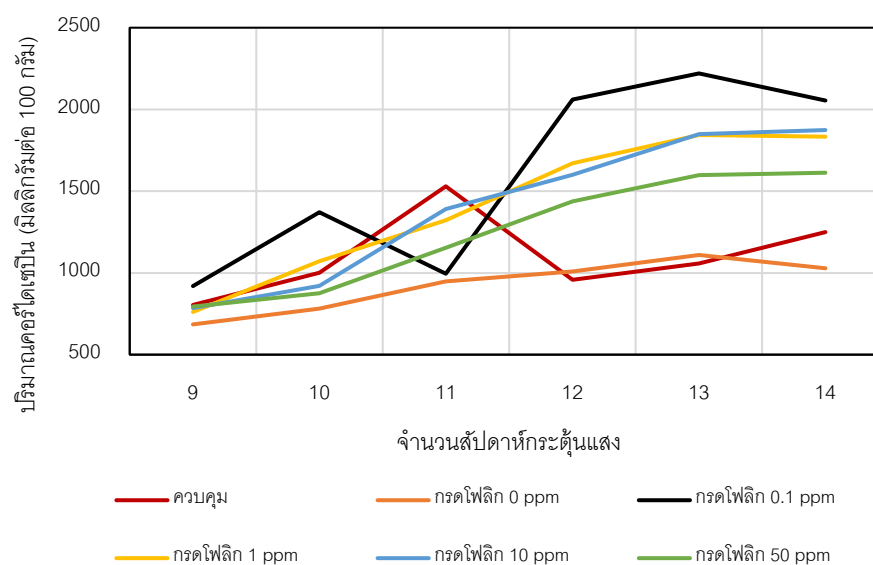
ตาราง 5 ปริมาณคอร์โดเซปินในเห็ดถั่งเช่าที่เพาะเลี้ยงด้วยอาหารที่มีการเติมกรดโฟลิกความเข้มข้นต่าง ๆ ในช่วงเวลาการเก็บเกี่ยวสัปดาห์ที่ 9-14 หลังกระตุ้นด้วยแสง

อาหารเพาะเลี้ยง	ปริมาณคอร์โดเซปิน $\pm$ SD (มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม)					
	9*	10*	11*	12*	13*	14
ควบคุม	804.20 $\pm$ 6.46	1000.19 $\pm$ 20.20	1529.69 $\pm$ 6.80	957.02 $\pm$ 6.26	1058.11 $\pm$ 6.48	1249.70 $\pm$ 25.23
กรดโฟลิก 0 มิลลิกรัมต่อลิตร	685.06 $\pm$ 9.77	780.7 $\pm$ 14.07	949.04 $\pm$ 2.39	1009.80 $\pm$ 18.08	1109.68 $\pm$ 23.40	1028.99 $\pm$ 13.62
กรดโฟลิก 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร	919.48 $\pm$ 1.78	1371.53 $\pm$ 1.40	994.88 $\pm$ 10.64	2061.06 $\pm$ 17.60	2220.27 $\pm$ 32.94	2054.63 $\pm$ 17.38
กรดโฟลิก 1 มิลลิกรัมต่อลิตร	761.22 $\pm$ 1.29	1071.70 $\pm$ 14.33	1321.38 $\pm$ 29.19	1671.11 $\pm$ 2.15	1843.68 $\pm$ 2.91	1832.57 $\pm$ 28.18
กรดโฟลิก 10 มิลลิกรัมต่อลิตร	784.68 $\pm$ 7.37	920.98 $\pm$ 13.37	1390.54 $\pm$ 9.07	1599.65 $\pm$ 6.79	1849.62 $\pm$ 31.81	1873.96 $\pm$ 7.70
กรดโฟลิก 50 มิลลิกรัมต่อลิตร	794.29 $\pm$ 4.52	876.15 $\pm$ 20.88	1153.71 $\pm$ 0.74	1437.31 $\pm$ 1.48	1597.75 $\pm$ 12.22	1612.77 $\pm$ 3.35

*จำนวนสัปดาห์หลังกระตุ้นแสง



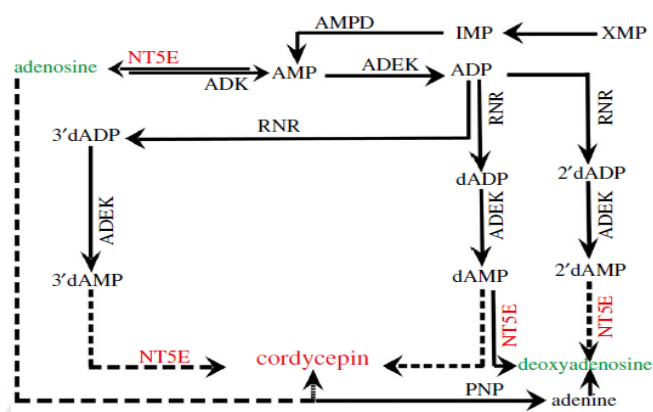
ภาพประกอบ 18 กราฟแสดงปริมาณอะดีโนซีนในเห็ดถั่งเช่าที่เพาะเลี้ยงด้วยอาหารที่มีการเติมกรดฟอลิกความเข้มข้นต่าง ๆ ในช่วงเวลาการเก็บเกี่ยวสัปดาห์ที่ 9-14 หลังกระตุ้นด้วยแสง



ภาพประกอบ 19 กราฟแสดงปริมาณคอโรไคเซปินในเห็ดถั่งเช่าที่เพาะเลี้ยงด้วยอาหารที่มีการเติมกรดฟอลิกความเข้มข้นต่าง ๆ ในช่วงเวลาการเก็บเกี่ยวสัปดาห์ที่ 9-14 หลังกระตุ้นด้วยแสง

จากภาพประกอบ 18 และ 19 จะเห็นว่าปริมาณของอะดีโนซีนมีแนวโน้มลดลงเมื่อระยะเวลาการเพาะเลี้ยงเพิ่มขึ้นหลังจากสัปดาห์ที่ 12 ในขณะที่คอโรไคเซปินมีปริมาณเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาการเพาะเลี้ยงในช่วงสัปดาห์ที่ 9-13 ทั้งนี้อาจมีสาเหตุมาจากอะดีโนซีนสามารถเปลี่ยน

กลับไปเป็นอะดีโนซีนโมโนฟอสเฟต (AMP) ซึ่งเป็นสารตั้งต้นในกระบวนการสังเคราะห์ของคอรีโดเซปินได้ (Kunhorm, Chaicharoenaudomrung, & Noisa, 2019; Liu et al., 2018) ดังภาพประกอบ 20



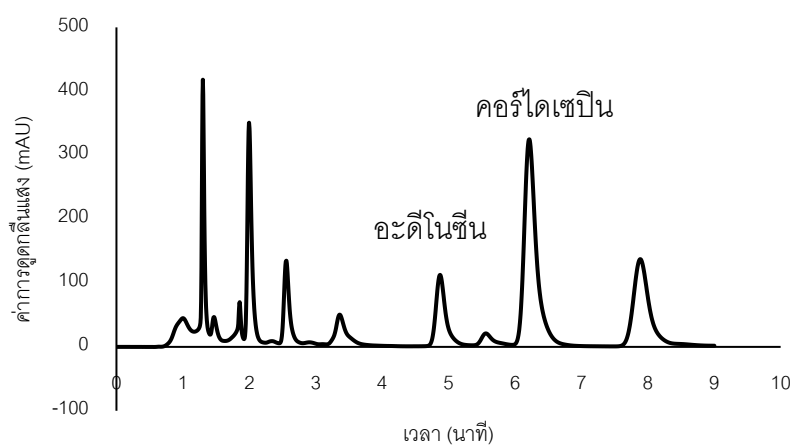
ภาพประกอบ 20 เส้นทางการสังเคราะห์คอรีโดเซปินและอะดีโนซีนในเห็ดถั่งเช่า

Figure 2. Liu, et al. (2018). Identification of cordycepin biosynthesis-related genes through de novo transcriptome assembly and analysis in *Cordyceps cicadae*. *R Soc Open Sci*, 5(12), 181247.

เมื่อเปรียบเทียบปริมาณคอร์โดเซปินและอะดีโนซีนในเห็ดถั่งเช่าสีทองที่เพาะเลี้ยงในงานวิจัยนี้ โดยใช้สูตรอาหารที่มีการเติมกรดฟอลิก 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร กับเห็ดถั่งเช่าสีทองที่เลี้ยงในฟาร์ม ซึ่งใช้สูตรอาหารเพาะเลี้ยงปกติ พบว่าปริมาณคอร์โดเซปินและอะดีโนซีนจากฟาร์มเท่ากับ 717.3 และ 21.5 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม ตามลำดับ ในขณะที่ในงานวิจัยนี้พบปริมาณสารทั้ง 2 ชนิดเท่ากับ 2220.27 และ 178.96 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม ตามลำดับ จะเห็นได้ว่าปริมาณสารทั้ง 2 ชนิดในเห็ดถั่งเช่าที่เพาะเลี้ยงด้วยสูตรอาหารที่พัฒนาขึ้นนี้มีค่ามากกว่าของฟาร์ม 3 เท่า สำหรับคอร์โดเซปิน และมากกว่า 8 เท่า สำหรับอะดีโนซีน ซึ่งสาเหตุความแตกต่างอาจมาจากสภาวะที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงและสูตรอาหารเพาะเลี้ยงที่แตกต่างกัน ซึ่งเป็นปัจจัยสำคัญในการเจริญเติบโตและการผลิตสารออกฤทธิ์สำคัญของเห็ดถั่งเช่าสีทอง

ตัวอย่างโครมาโทแกรมการวิเคราะห์ปริมาณสารออกฤทธิ์ทั้ง 2 ชนิด ในตัวอย่างเห็ด
 ถั่งเช่าสีทองที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่มีการเติมกรดฟอลิกเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร แสดงดัง
 ภาพประกอบ 21 จะเห็นได้ว่าวิธีที่พัฒนาขึ้นนี้สามารถวิเคราะห์คอร์ไดเซปินและอะดีโนซีนแบบ
 พร้อมกันในตัวอย่างเห็ดถั่งเช่าสีทองได้จริง โดยสามารถแยกออกจากสารรบกวนชนิดต่าง ๆ ที่มีอยู่

ในตัวอย่างเห็ดถั่งเช่าสีทองได้อย่างมีประสิทธิภาพ ให้ผลการวิเคราะห์เป็นที่น่าพอใจ และใช้เวลาในการวิเคราะห์น้อย



ภาพประกอบ 21 ตัวอย่างโครมาโทแกรมของตัวอย่างเห็ดถั่งเช่าที่เพาะเลี้ยงด้วยอาหารที่เติมกรดฟอสฟอริกความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร

บทที่ 5

สรุปผล อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

งานวิจัยนี้ได้พัฒนาวิธีการวิเคราะห์คอร์โคโรไดเซปิน และอะดีโนซีนแบบพร้อมกันโดยใช้เทคนิค HPLC ร่วมกับวิธีการสกัดแบบการใช้คลื่นอัลตราซาวด์ (ultrasound-assisted extraction) สำหรับประยุกต์ใช้ในการวิเคราะห์เห็ดถั่งเช่าสีทองที่ทำการเพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการในสูตรอาหารที่มีการเติมกรดฟอสฟอริกปริมาณต่าง ๆ เพื่อศึกษาผลของความเข้มข้นของกรดฟอสฟอริกที่มีต่อปริมาณการผลิตคอร์โคโรไดเซปินและอะดีโนซีน ในช่วงระยะเวลาการเก็บเกี่ยวต่าง ๆ โดยสามารถสรุปอภิปรายผลการวิจัยและข้อเสนอแนะดังนี้

จากการพัฒนาวิธีการวิเคราะห์คอร์โคโรไดเซปินและอะดีโนซีนในเห็ดถั่งเช่าสีทองด้วยเทคนิค HPLC ทำให้ได้วิธีการวิเคราะห์ที่สะดวก รวดเร็ว และเป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อมมากขึ้น เนื่องจากในขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างใช้วิธีการสกัดแบบการใช้คลื่นอัลตราซาวด์ โดยใช้น้ำปริมาตร 10.00 มิลลิลิตร เป็นตัวทำละลายและใช้เวลาในการสกัด 30 นาที ทำการสกัดซ้ำเป็นจำนวน 3 ครั้ง เมื่อทำการเปรียบเทียบวิธีและสถานะที่ใช้ในการเตรียมตัวอย่างเห็ดถั่งเช่าสีทองด้วยวิธีการสกัดแบบการใช้คลื่นอัลตราซาวด์กับงานวิจัยที่เคยรายงานก่อนหน้านี้ พบว่าในงานวิจัยนี้ใช้น้ำเป็นตัวทำละลาย ซึ่งเป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อมมากกว่าเมทานอล ซึ่งเป็นตัวทำละลายที่สามารถขับออกจากร่างกายได้ยาก (Huang et al., 2009) นอกจากนี้เมื่อเปรียบเทียบในด้านระยะเวลาในการสกัด จะเห็นได้ว่าในงานวิจัยนี้ใช้เวลาในการสกัดน้อยกว่าในงานวิจัยที่เคยรายงานไว้ (Chiang et al., 2017; Ikeda et al., 2008; Li, Guan, & Li, 2015) และเมื่อเปรียบเทียบในด้านของการตรวจวิเคราะห์สารออกฤทธิ์ทั้ง 2 ชนิด แบบพร้อมกันด้วยเทคนิค HPLC พบว่าในงานวิจัยนี้ใช้ตัวทำละลายอินทรีย์เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ในปริมาณน้อย และมีความเป็นพิษต่ำ ทำให้มีค่าใช้จ่ายในการกำจัดของเสียลดลง นอกจากนี้ยังมีความสะดวกมากกว่า เมื่อเปรียบเทียบกับงานวิจัยที่ใช้วัฏภาคเคลื่อนที่เป็นสารละลายบัฟเฟอร์ (Chiang et al., 2017; Xie et al., 2010) เนื่องจากสารละลายเอทานอลสามารถเตรียมได้ง่ายกว่าสารละลายบัฟเฟอร์ที่ต้องคำนึงถึงค่า pH ความเข้มข้น และอัตราส่วนผสมกับตัวทำละลายอินทรีย์ เพื่อป้องกันไม่ให้เกิดตะกอนของเกลือในตัวเครื่อง HPLC ในระหว่างทำการวิเคราะห์ โดยจากผลการวิจัยพบว่าเมื่อใช้คอลัมน์ C18 ขนาด 4.6 x 150 mm, i.d. โดยใช้สารละลายเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 8 โดยปริมาตร เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ที่อัตราการไหล 1.20 มิลลิลิตรต่อนาที และตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร

สามารถทำการแยกสารที่ต้องการออกจากสารรบกวนอื่น ๆ ในตัวอย่างสารสกัดเห็ดถึงเช่าสีทองได้อย่างสมบูรณ์ภายในเวลา 9.00 นาที โดยให้ประสิทธิภาพของวิธีวิเคราะห์ที่ดีมีค่าความเป็นเส้นตรง (R^2 มากกว่า 0.999) ในช่วงความเข้มข้น 0.02-200 มิลลิกรัมต่อลิตร มีความเที่ยงเป็นที่น่าพอใจทั้งภายในวันเดียวกันและระหว่างวัน โดยมีค่าร้อยละความเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ของพื้นที่ใต้พีคและเวลาการคงอยู่น้อยกว่า 2.50 ค่าขีดจำกัดต่ำสุดของการตรวจวัดของคอร์โดเซปินและอะดีโนซีนมีค่าเท่ากับ 5.0 นาโนกรัมต่อลิตร เมื่อใช้วิธีการเตรียมตัวอย่างด้วยวิธีการสกัดแบบการใช้คลื่นอัลตราซาวด์ที่พัฒนาขึ้น พบว่าให้ร้อยละการคืนกลับของคอร์โดเซปินอยู่ในช่วง 82.04-104.5 และอะดีโนซีนอยู่ในช่วง 100.91-104.28 เมื่อทำการเปรียบเทียบประสิทธิภาพของวิธีที่พัฒนาขึ้นกับงานวิจัยอื่น ๆ ที่เคยมีการรายงาน พบว่าวิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นในงานวิจัยนี้ให้ช่วงความเป็นเส้นตรงที่กว้างกว่า (Li, Guan, & Li, 2015; Xie et al., 2010) มีค่าขีดจำกัดต่ำสุดของการตรวจวัดต่ำกว่า (Chiang et al., 2017; Xie et al., 2010) และมีความเที่ยงที่ดีกว่า (Chiang et al., 2017; Fan et al., 2006; Ikeda et al., 2008)

สำหรับการศึกษาอิทธิพลของกรดโฟลิกในอาหารเพาะเลี้ยงต่อปริมาณการผลิตคอร์โดเซปิน และอะดีโนซีนในเห็ดถึงเช่าสีทอง พบว่าการเติมกรดโฟลิกที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ลงไปในอาหารเพาะเลี้ยงจะช่วยเพิ่มปริมาณการผลิตคอร์โดเซปินมากขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ แต่ไม่ได้ช่วยในการเพิ่มปริมาณการผลิตอะดีโนซีนมากนักเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม โดยปริมาณของคอร์โดเซปินมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาในการกระตุ้นแสงและมีปริมาณลดลงหลังจากกระตุ้นแสงสัปดาห์ที่ 13 ส่วนอะดีโนซีนมีปริมาณเพิ่มขึ้นในช่วง 9-11 สัปดาห์หลังกระตุ้นแสง และมีปริมาณลดลงเมื่อให้แสงนานกว่า 11 สัปดาห์ เมื่อทำการเปรียบเทียบปริมาณของกรดโฟลิกที่เติมลงไปในอาหารเพาะเลี้ยง พบว่าเห็ดถึงเช่าสีทองที่ทำการเพาะเลี้ยงในอาหารที่เติมกรดโฟลิกความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร มีปริมาณคอร์โดเซปินมากที่สุดเมื่อเทียบกับเห็ดที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่เติมกรดโฟลิกเข้มข้น 1-50 มิลลิกรัมต่อลิตร และมีปริมาณคอร์โดเซปินมากที่สุดในสัปดาห์ที่ 13 หลังกระตุ้นแสง ดังนั้นระยะเวลาที่ควรทำการเก็บเกี่ยวจึงเป็นระยะเวลาหลังกระตุ้นแสง 13 สัปดาห์ ถึงแม้ว่าในสัปดาห์ดังกล่าวอาจมีปริมาณอะดีโนซีนลดลงเล็กน้อย โดยมีปริมาณของคอร์โดเซปินเท่ากับ 2220.27 และอะดีโนซีนเท่ากับ 178.96 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม ผู้วิจัยคาดว่าหากนำวิธี การเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีการเติมกรดโฟลิกไปปรับใช้กับการเพาะเลี้ยงของฟาร์ม น่าจะให้ผลของปริมาณสารออกฤทธิ์ทั้ง 2 ชนิดไปในทิศทางเดียวกัน ทำให้เกษตรกรสามารถกำหนดราคาขายของเห็ดถึงเช่าสีทองได้สูงขึ้น และสามารถลดต้นทุนในการผลิตเครื่องดื่ม และผลิตภัณฑ์เสริมอาหารเห็ดถึงเช่าสีทอง เนื่องจากสามารถใช้เห็ดถึงเช่าในปริมาณที่ลดลง แต่ยังคง

ปริมาณของสารออกฤทธิ์ที่สำคัญไว้ จึงเป็นแนวทางในการเพิ่มรายได้จากการเพาะเลี้ยงเห็ดถั่งเช่าสีทองให้กับเกษตรกร ให้มากขึ้นได้

ดังนั้นจากความมุ่งหวังในงานวิจัยนี้ที่ต้องการศึกษาอิทธิพลของกรดโฟลิกต่อปริมาณการผลิตคอร์ไดเซปินและอะดีโนซีนในเห็ดถั่งเช่าสีทอง และพัฒนาวิธีการตรวจวิเคราะห์สารทั้ง 2 ชนิดดังกล่าว พบว่ากรดโฟลิกมีส่วนช่วยในการผลิตปริมาณคอร์ไดเซปิน และจากการเปรียบเทียบผลการวิจัยที่เคยรายงาน พบว่าวิธีที่พัฒนาขึ้นในงานวิจัยนี้สามารถทำได้สะดวก รวดเร็ว ประสิทธิภาพของวิธีการวิเคราะห์สูง และเป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อมอีกด้วย

ข้อเสนอแนะ

1. เนื่องจากสภาวะการเพาะเลี้ยง ได้แก่ อุณหภูมิ ความชื้น ปริมาณออกซิเจน และแสง เป็นปัจจัยสำคัญที่มีอิทธิพลต่อการเจริญเติบโตและการผลิตปริมาณสารออกฤทธิ์สำคัญในเห็ดถั่งเช่าสีทอง ดังนั้นถ้าสภาวะการเพาะเลี้ยงแตกต่างกัน อาจส่งผลให้ระยะเวลาการเก็บเกี่ยวที่เหมาะสมและปริมาณสารออกฤทธิ์อาจมีความแตกต่างกันบ้างเล็กน้อย
2. ในการศึกษาเกี่ยวกับอิทธิพลของกรดโฟลิกที่มีผลต่อเห็ดถั่งเช่าสีทอง ควรมีการตรวจวิเคราะห์ปริมาณกรดโฟลิกที่เหลืออยู่ในอาหารเพาะเลี้ยง เพื่อให้ได้ข้อมูลปริมาณของกรดโฟลิกที่แท้จริงที่ใช้ในการเจริญเติบโตของเห็ดถั่งเช่าสีทอง

บรรณานุกรม

- Abella, M. L. (2006). Evaluation of anti-wrinkle efficacy of adenosine containing products using the FOITS technique. *International Journal of Cosmetic Science*, 28, 447–451.
- Bailey, L. B. (2010). Folate in Health and Disease L. B. Bailey *Folate in Health and Disease* (pp. 50-53).
- Chen, Y.-C., et al. (2017). Functional study of *Cordyceps sinensis* and cordycepin in male reproduction: A review. *Journal of Food and Drug Analysis*, 25(1), 197-205.
- Chiang, S.-S., et al. (2017). Effect of light-emitting diodes on the production of cordycepin, mannitol and adenosine in solid-state fermented rice by *Cordyceps militaris*. *Journal of Food Composition and Analysis*, 60, 51-56.
- Das, S. K., et al. (2010). Medicinal uses of the mushroom *Cordyceps militaris*: current state and prospects. *Fitoterapia*, 81(8), 961-968.
- Dong, C. H., & Yao, Y. J. (2005). Nutritional requirements of mycelial growth of *Cordyceps sinensis* in submerged culture. *Journal of Applied Microbiology*, 99(3), 483-492.
- Fan, H., et al. (2006). Qualitative and quantitative determination of nucleosides, bases and their analogues in natural and cultured *Cordyceps* by pressurized liquid extraction and high performance liquid chromatography–electrospray ionization tandem mass spectrometry (HPLC–ESI–MS/MS). *Analytica Chimica Acta*, 567(2), 218-228.
- Gnad, T., et al. (2020). Adenosine/A2B Receptor Signaling Ameliorates the Effects of Aging and Counteracts Obesity. *Cell Metab*, 32(1), 56-70.
- Guo, F. Q., et al. (2006). Identification and determination of nucleosides in *Cordyceps sinensis* and its substitutes by high performance liquid chromatography with mass spectrometric detection. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 40(3), 623-630.
- Huang, L. (2003). Simultaneous separation and determination of active components in *Cordyceps sinensis* and *Cordyceps militaris* by LC/ESI-MS. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 33(5), 1155-1162.

- Huang, L., et al. (2009). Determination and analysis of cordycepin and adenosine in the products of *Cordyceps spp.* *African Journal of Microbiology Research*, 3(12), 957-961.
- Hur, H. (2008). Chemical Ingredients of *Cordyceps militaris*. *Mycobiology*, 36(4), 233-235.
- Ikeda, R., et al. (2008). Simple HPLC-UV determination of nucleosides and its application to the authentication of *Cordyceps* and its allies. *Biomed Chromatogr*, 22(6), 630-636.
- Iwabuchi, T., et al. (2016). Topical adenosine increases the proportion of thick hair in Caucasian men with androgenetic alopecia. *J Dermatol*, 43(5), 567-570.
- Jin, Y., et al. (2018). Anti-tumor and anti-metastatic roles of cordycepin, one bioactive compound of *Cordyceps militaris*. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 25(5), 991-995.
- Kunhorm, P., Chaicharoenaudomrung, N., & Noisa, P. (2019). Enrichment of cordycepin for cosmeceutical applications: culture systems and strategies. *Appl Microbiol Biotechnol*, 103(4), 1681-1691.
- Lei, J., et al. (2018). Cordycepin inhibits LPS-induced acute lung injury by inhibiting inflammation and oxidative stress. *European Journal of Pharmacology*, 818, 110-114.
- Li, J., Guan, M., & Li, Y. (2015). Effects of Cooking on the Contents of Adenosine and Cordycepin in *Cordyceps Militaris*. *Procedia Engineering*, 102, 485-491.
- Lin, L. T., et al. (2018). Optimal conditions for cordycepin production in surface liquid-cultured *Cordyceps militaris* treated with porcine liver extracts for suppression of oral cancer. *Journal of Food Drug Analysis*, 26(1), 135-144.
- Ling, J.-Y., et al. (2002). Measurement of Cordycepin and Adenosine in Stroma of *Cordyceps sp.* by Capillary Zone Electrophoresis (CZE). *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 94, 371-374.
- Liu, T., et al. (2018). Identification of cordycepin biosynthesis-related genes through de novo transcriptome assembly and analysis in *Cordyceps cicadae*. *R Soc Open Sci*, 5(12), 181247.

- Liu, X., Huang, K., & Zhou, J. (2014). Composition and Antitumor Activity of the Mycelia and Fruiting Bodies of *Cordyceps militaris*. *Journal of Food and Nutrition Research*, 2(2), 74-79.
- Nakamura, K., Shinozuka, K., & Yoshikawa, N. (2015). Anticancer and antimetastatic effects of cordycepin, an active component of *Cordyceps sinensis*. *Journal of Pharmacological Sciences*, 127(1), 53-56.
- Pardo, F., et al. (2017). Molecular implications of adenosine in obesity. *Molecular Aspects of Medicine*, 55, 90-101.
- Qian, Z., & Li, S. (2017). Analysis of *Cordyceps* by multi-column liquid chromatography. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 7(2), 202-207.
- Rao, Y. K., Chou, C.-H., & Tzeng, Y.-M. (2006). A simple and rapid method for identification and determination of cordycepin in *Cordyceps militaris* by capillary electrophoresis. *Analytica Chimica Acta*, 566(2), 253-258.
- Tapingkae, T., Yachai, M., & Tapingkae, W. (2018). Effect of Culture Periods on Yield and Cordycepin Production of *Cordyceps militaris*. *Agricultural Sci. J.*, 49, 129 – 113.
- Tuli, H. S., et al. (2013). Cordycepin: a bioactive metabolite with therapeutic potential. *Life Sciences*, 93(23), 863-869.
- Wang, Y., et al. (2012). Characterization of a new *Cordyceps cicadae* isolate and production of adenosine and cordycepin. *Brazilian Journal of Microbiology*, 449-455.
- Warzyszynska, J. E., & Kim, Y.-I. J. (2014). Folate in Human Health and Disease, 1-14.
https://www.researchgate.net/publication/291413621_Folate_in_Human_Health_and_Disease
- Wen, T.-c., et al. (2014). Optimization of Solid-state Fermentation for Fruiting Body Growth and Cordycepin Production by *Cordyceps militaris*. *Chiang Mai Journal of Science*, 41(4), 858-872.
- Xie, J.-W., et al. (2010). Analysis of the main nucleosides in *Cordyceps sinensis* by LC/ESI-MS. *Molecules*, 15(1), 305-314.
- Yang, F., et al. (2009). Determination of nucleosides and nucleobases in different species

- of *Cordyceps* by capillary electrophoresis–mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 50(3), 307-314.
- Yang, F. Q., & Li, S. P. (2008). Effects of sample preparation methods on the quantification of nucleosides in natural and cultured *Cordyceps*. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 48(1), 231-235.
- Yoon, S. Y., Park, S. J., & Park, Y. J. (2018). The Anticancer Properties of Cordycepin and Their Underlying Mechanisms. *International Journal of Molecular Sciences*, 1-11.
- Zhao, J., et al. (2014). Advanced development in chemical analysis of *Cordyceps*. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 87, 271-289.
- Zheng, P., et al. (2011). Genome sequence of the insect pathogenic fungus *Cordyceps militaris*, a valued traditional Chinese medicine. *Genome Biology*, 12(11), 116.
- ธัญญา ทะพิงค์แก, มงคล ยะไชย, & ทะพิงค์แก, ว. (2561). ผลของระยะเวลาการเพาะต่อผลผลิตและปริมาณสารคอร์ไดเซปินของเห็ดถั่งเช่าสีทอง. วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร, 49, 129 – 131.
- นพมาศ สุนทรเจริญนนท์, & ธิดารัตน์ จันทร์ดอน. (2555). “ถั่งเช่า” ช่วยเพิ่มสมรรถภาพ จริงหรือ? <https://www.pharmacy.mahidol.ac.th/knowledge/files/0153.pdf>
- นิลาวัลย์ สุระป๋อง, & ประไพรัตน์ สีสพลไกร. (2561). สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากเชื้อรา *Cordyceps* ที่เก็บในประเทศไทย. วารสารวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น, 46(2), 186-200.
- ภัทระ ฉลาดแพทย์. (2554). มหัศจรรย์เห็ด อาหารอายุวัฒนะและเป็นยาที่ทางการแพทย์ยอมรับ = *Medicinal mushrooms: เชื้อยงใหม่* : วิช.

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล	นุชนาฏ ตุ่มท่าไม้
วัน เดือน ปี เกิด	5 มีนาคม 2538
สถานที่เกิด	ราชบุรี
วุฒิการศึกษา	พ.ศ. 2555 มัธยมศึกษาตอนปลาย โรงเรียนเบญจมราชูทิศ ราชบุรี พ.ศ. 2559 ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิ โรฒ
ที่อยู่ปัจจุบัน	57/30 ถ.สุขใจ ต.ประจวบคีรีขันธ์ อ.เมืองประจวบคีรีขันธ์ จ. ประจวบคีรีขันธ์ 77000

