

บทที่ 5

ผลการทดลองและการอภิปรายผล

บทนี้แสดงถึงผลการทดลองของงานวิจัยนี้ ซึ่งได้จากการศึกษาการสกัดคอร์ติเซปินออกจากเห็ดถั่งเช่าสีทองโดยใช้การสกัดด้วยตัวทำละลาย โดยอาศัยข้อมูลอ้างอิงจากการคำนวณทางสถิติ โดยใช้โปรแกรม Minitab V.17 ซึ่งจะนำมาใช้ในการวิเคราะห์ผลของตัวแปรที่มีผลต่อการสกัดเทียบกับข้อมูลที่ได้จากสมการถดถอย โดยจะแสดงถึงสถานะที่เหมาะสมของการสกัด ผลของตัวแปรหลักที่มีต่อการสกัด และผลของอิทธิพลของแต่ละตัวแปรที่มีผลต่อการสกัด จากนั้นจะนำสถานะที่เหมาะสมของการสกัดมาทดสอบ

5.1 การวิเคราะห์ผลของตัวแปรต่างๆต่อการสกัดอิทธิเซปิน

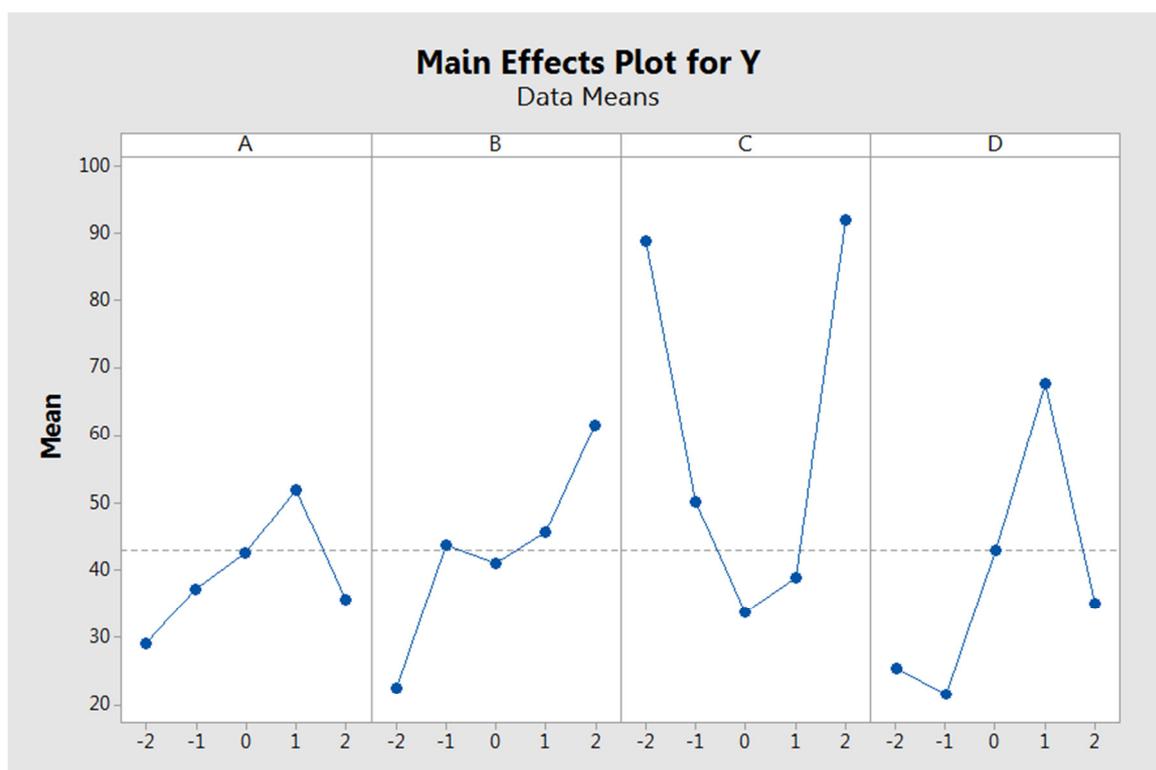
จากการทดลองเพื่อวิเคราะห์ค่าร้อยละการสกัดคอร์ติเซปินออกจากเห็ดถั่งเช่าสีทอง โดยกำหนดขอบเขตการทดลองและดำเนินการทดลองตามวิธีการออกแบบการทดลองแบบส่วนประสมกลาง (Central composite design) และนำผลการทดลองที่ได้ไปวิเคราะห์ทางสถิติ ผลของตัวแปรที่มีผลต่อการสกัดคอร์ติเซปินออกจากเห็ดถั่งเช่าสีทองโดยใช้การสกัดด้วยตัวทำละลายแสดงดังรูปที่ 5.1 โดยที่ A คืออุณหภูมิ B คืออัตราส่วนโดยปริมาตรของเอทานอลในตัวทำละลาย C คือ ปริมาตรตัวทำละลาย และ D คือความแตกต่างของตัวทำละลาย จะเห็นว่าเมื่อเพิ่มขึ้นอุณหภูมิจากระดับ (-2) คือ 35 องศาเซลเซียส ถึงระดับ (1) คือ 57 องศาเซลเซียส ร้อยละการสกัดจะเพิ่มขึ้นเนื่องจากที่อุณหภูมิสูง คอร์ติเซปินจะละลายในตัวทำละลายได้ดีขึ้น นอกจากการเพิ่มอุณหภูมิยังทำให้คอร์ติเซปินที่อยู่ในเซลล์ถั่งเช่านั้นหลุดออกมาได้ง่ายขึ้นอีกด้วย (Yuan and Siyi 2013) อย่างไรก็ตาม หากเพิ่มอุณหภูมิมากเกินไปจะทำให้เซลล์และเนื้อของถั่งเช่าถูกทำลายจนเกิดการขัดขวางไม่ให้คอร์ติเซปินละลายออกมาจากเนื้อถั่งเช่าได้ ส่งผลให้ความสามารถในการสกัดลดลง

เมื่อเพิ่มอัตราส่วนโดยปริมาตรระหว่างเอทานอลในน้ำ ร้อยละการสกัดก็จะมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเช่นกัน เนื่องจากเอทานอลทำให้ผนังเซลล์ของถั่งเช่าแตกออก คอร์ติเซปินจึงหลุดออกมาจากเซลล์ของถั่งเช่าได้ง่ายขึ้น (Calvo et al. 2007; Khiari et al. 2009)

ในส่วนของปริมาตรตัวทำละลายจะพบว่าปริมาตรของตัวทำละลายมีผลค่อนข้างน้อยต่อการสกัด

ในด้านความเป็นกรด-ด่างของตัวทำละลาย พบว่าร้อยละการสกัดมีจะมากที่สุดที่ค่าความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 9 นั้นแสดงว่าคอร์ติเซป็นมีความเสถียรมากที่สุดที่ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 9 เมื่อเพิ่มค่าความเป็นกรด-ด่างสูงกว่านั้น จะทำให้คอร์ติเซป็นเกิดการแตกตัวเป็นน้ำตาลและนิวคลีโอไอไซด์ (Chatvirasakul et al. 2016)

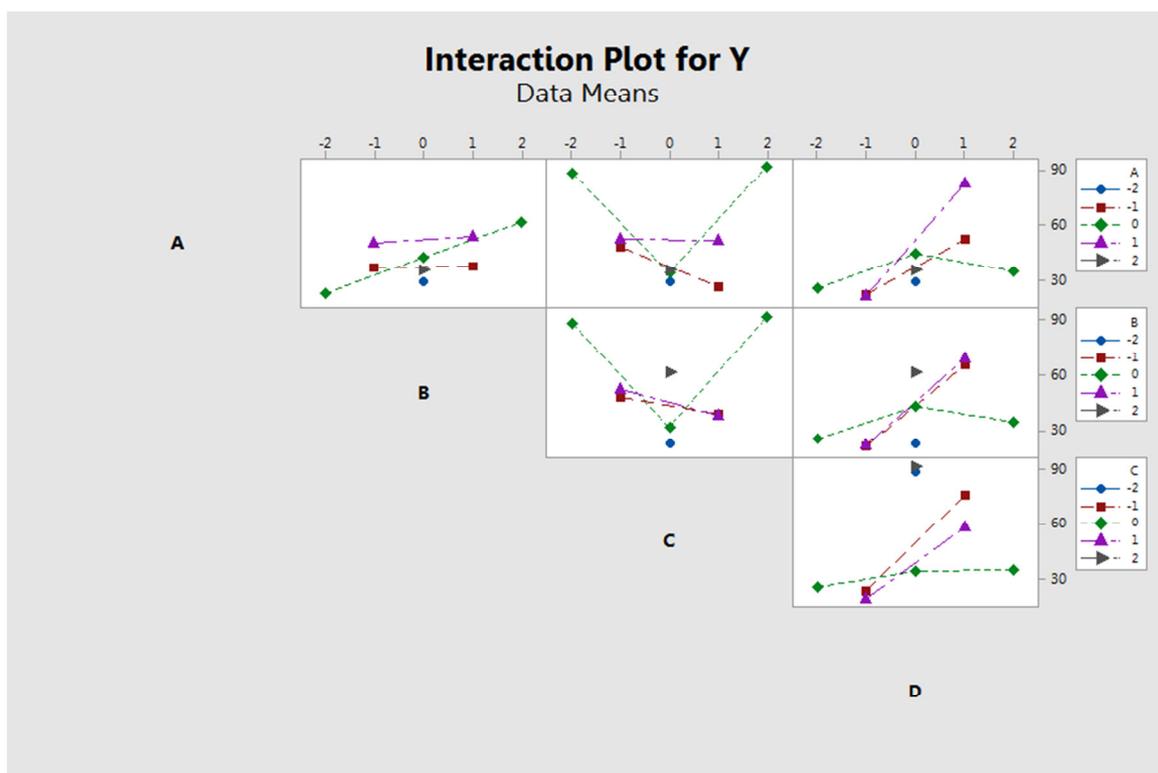
จากการใช้โปรแกรม Minitab ได้มีการแสดงผลของอิทธิภวระหว่างตัวแปรต่างๆดังแสดงในรูป 5.2



รูปที่ 5.1 ผลของตัวแปรหลักที่มีต่อการสกัดสารคอร์ติเซป็นออกจากเห็ดถั่งเช่าสีทอง โดย A คืออุณหภูมิ B คืออัตราส่วนโดยปริมาตรของเอทานอลในตัวทำละลาย C คือปริมาตรตัวทำละลาย และ D คือความเป็นกรด-ด่างของตัวทำละลาย

จากรูปที่ 5.2 แสดงความสัมพันธ์อิทธิภวของแต่ละตัวแปร พบว่าความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิ (A) กับอัตราส่วนโดยปริมาตรของเอทานอลในตัวทำละลาย (B) เมื่อที่อุณหภูมิ 35, 42, 57 และ 65 องศา

เซลเซียส ร้อยละการสกัดไม่เปลี่ยนแปลงเมื่ออัตราส่วนโดยปริมาตรของเอทานอลในตัวทำละลายมีค่าเพิ่มขึ้น แต่ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส พบว่าเมื่ออัตราส่วนโดยปริมาตรของเอทานอลในตัวทำละลายมีค่าเพิ่มขึ้นจะส่งผลให้ร้อยละการสกัดเพิ่มขึ้นด้วย



รูปที่ 5.2 ความสัมพันธ์อัตรากรียาของแต่ละตัวแปรที่ระดับต่างๆ

ความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิ (A) กับปริมาตรตัวทำละลาย (C) พบว่าที่อุณหภูมิ 42 และ 57 องศาเซลเซียสเมื่อเพิ่มปริมาตรของตัวทำละลายจะทำให้การสกัดมีแนวโน้มลดลง ที่อุณหภูมิ 35 จนถึง 65 องศาเซลเซียส ไม่ส่งผลต่อร้อยละการสกัด

ความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิ (A) กับค่าความเป็นกรด-ด่างของตัวทำละลาย (D) พบว่าเมื่ออุณหภูมิสูงการเพิ่มความเป็นกรด-ด่างของตัวทำละลายจะส่งผลต่อการสกัดมากกว่าที่อุณหภูมิต่ำ (และส่งผลในทางที่เพิ่มขึ้น)

ความสัมพันธ์ระหว่างอัตราส่วน โดยปริมาตรของเอทานอลในตัวทำละลาย (B) กับปริมาตรตัวทำละลาย (C) พบว่าที่อัตราส่วน โดยปริมาตรของเอทานอลในตัวทำละลายเท่ากับ 25:75 ร้อยละของการสกัดมีแนวโน้มลดลงเมื่อปริมาตรตัวทำละลายมีค่าเพิ่มสูงขึ้น ที่อัตราส่วน โดยปริมาตรของเอทานอลในตัวทำ

ละลายเท่ากับ 50 และปริมาตรตัวทำละลายเท่ากับ 50: 100 มิลลิลิตร ร้อยละการสกัดจะสูงที่สุด ที่อัตราส่วน โดยปริมาตรของเอทานอลในตัวทำละลายเท่ากับ 0: 100 และปริมาตรตัวทำละลายจะไม่ส่งผลต่อร้อยละการสกัด

ความสัมพันธ์ระหว่างอัตราส่วนโดยปริมาตรของเอทานอลในตัวทำละลาย (B) กับค่าความเป็นกรด-ด่างของตัวทำละลาย (D) พบว่าที่อัตราส่วนโดยปริมาตรของเอทานอลในตัวทำละลาย 25 และ 75 กับค่าความเป็นกรด-ด่างของตัวทำละลายที่เพิ่มขึ้นทำให้ร้อยละของการสกัดมีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้น ที่อัตราส่วนโดยปริมาตรของเอทานอลในตัวทำละลาย 50 กับค่าความเป็นกรด-ด่างของตัวทำละลายทำให้ร้อยละของการสกัดมีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นในช่วง 3-7 และลดลงในช่วง 7-11 เมื่ออัตราส่วนโดยปริมาตรของเอทานอลในตัวทำละลายเท่ากับ 0 และ 100 กับค่าความเป็นกรด-ด่างของตัวทำละลาย ไม่ส่งผลต่อร้อยละการสกัด

ตารางที่ 5.1 การวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) ของการสกัดคอร์ดิเซปปีนออกจากเห็ดถั่งเช่าสีทอง

Source Variable	Degree of freedom	Sum of square	Mean of square	F-value	P-value
Model	14	15002.2	1071.58	4.44	0.003
Linear	4	7599.2	1899.8	7.88	0.001
A	1	712.9	712.93	2.96	0.105
B	1	356.7	356.71	1.48	0.242
C	1	298	297.99	1.24	0.283
D	1	6231.6	6231.56	25.84	0.000
Square	4	5756.3	1439.08	5.97	0.004
A ²	1	15.4	15.35	0.06	0.804
B ²	1	81.3	81.29	0.34	0.570
C ²	1	5420.2	5420.15	22.48	0.000
D ²	1	45.2	45.18	0.19	0.671
Interaction	6	1646.7	274.45	1.14	0.385
AB	1	8.3	8.27	0.03	0.855
AC	1	469.2	469.22	1.95	0.182
AD	1	945.3	945.28	3.92	0.065
BC	1	26.8	26.79	0.11	0.743
BD	1	7.2	7.2	0.03	0.865
CD	1	189.9	189.93	0.79	0.388
Error	16	3858.3	241.14		
Total	30	18860.5			

ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาตรตัวทำละลาย (C) กับค่าความเป็นกรด-ด่างของตัวทำละลาย (D) พบว่าที่ปริมาตรตัวทำละลาย 75 และ 125 มิลลิลิตร กับค่าความเป็นกรด-ด่างของตัวทำละลายที่เพิ่มขึ้นจะทำให้ร้อยละของการสกัดมีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้น ที่ปริมาตรตัวทำละลาย 100 มิลลิลิตร กับค่าความเป็นกรด-ด่างของตัวทำละลายทำให้ร้อยละของการสกัดมีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นในช่วง 3-7 และลดลงในช่วง 7-11 เมื่อปริมาตรตัวทำละลายเท่ากับ 50 และ 150 มิลลิลิตร กับค่าความเป็นกรด-ด่างของตัวทำละลาย ไม่ส่งผลต่อร้อยละการสกัด

จากการวิเคราะห์ผลในส่วนของผลของตัวแปรหลักและความสัมพันธ์ของตัวแปรที่มีต่อการสกัด คอรัลเชปปีนออกจากเห็ดถั่งเช่าสีทองโดยใช้การสกัดด้วยตัวทำละลาย ทำให้สามารถทราบถึงแนวโน้มของตัวแปรต่างๆ ที่มีต่อการสกัด จากนั้นจะนำความสัมพันธ์ของแต่ละตัวแปรมาสร้างสมการถดถอย โดยใช้การคำนวณจากโปรแกรม Minitab เพื่อได้ค่าสัมประสิทธิ์ของแต่ละตัวแปร โดยกำหนดให้ค่า P-value และได้สมการถดถอยดังนี้

$$Y = 32.57 + 5.45 A + 3.86 B - 3.52 C + 16.11 D - 0.73 A*A + 1.69 B*B + 13.77 C*C - 1.26 D*D + 0.72 A*B + 5.42 A*C + 7.69 A*D - 1.29 B*C + 0.67 B*D - 3.45 C*D \quad (5.1)$$

โดยที่ Y คือ ร้อยละการสกัด

A คือ อุณหภูมิ

B คือ อัตราส่วนโดยปริมาตรของเอทานอลในตัวทำละลาย

C คือ ปริมาตรตัวทำละลาย

D คือ ค่าความเป็นกรด-ด่างของตัวทำละลาย

โดยที่ตัวแปรทั้งหมดต้องใส่ในรูปของค่ารหัส เช่น -1 0 1 เป็นต้น

จากการพิจารณาความสัมพันธ์ของตัวแปรต่างๆ ที่มีผลต่อการสกัดจากสมการถดถอย (Regression Equation) ซึ่งแต่ละตัวแปรจะมีค่า P-value ดังตารางที่ 5.1 ซึ่งจะเห็นได้ว่า ตัวแปรต่อไปนี้ อันได้แก่ อุณหภูมิ (A) อัตราส่วนโดยปริมาตรของเอทานอลในตัวทำละลาย (B) ปริมาตรตัวทำละลาย (C) ความเป็นกรด-ด่างของตัวทำละลาย (D) ความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิ (A) กับอัตราส่วนโดยปริมาตรของเอทานอลในตัวทำละลาย (B) ความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิ (A) กับปริมาตรตัวทำละลาย (C) ความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิ (A) กับความเป็นกรด-ด่างของตัวทำละลาย (D), ความสัมพันธ์ระหว่างอัตราส่วนโดยปริมาตรของเอทานอลในตัวทำละลาย (B) กับปริมาตรตัวทำละลาย (C), ความสัมพันธ์ระหว่างอัตราส่วนโดยปริมาตรของเอทานอลในตัวทำละลาย (B) กับความเป็นกรด-ด่างของตัวทำละลาย (D) และความสัมพันธ์ระหว่างปริมาตรตัว

ทำละลาย (C) กับความเป็นกรด-ด่างของตัวทำละลาย มีค่า P-value มากกว่า 0.05 ในทางสถิติหมายความว่าตัวแปรดังกล่าวไม่มีนัยสำคัญในความเชื่อมั่น 95% (Montgomery, 2013) หรือกล่าวได้ว่าตัวแปรเหล่านั้นส่งผลต่อการสกัดคอร์ติเซปีนออกจากเห็ดถั่งเช่าสีทองค่อนข้างน้อย เราจึงตัดตัวแปรเหล่านี้ออกจากสมการถดถอยในสมการที่ (5.1) ที่ได้มาข้างต้น เมื่อเป็นเช่นนี้ สมการถดถอยสำหรับการสกัดคอร์ติเซปีนออกจากเห็ดถั่งเช่าสีทองโดยใช้การสกัดด้วยตัวทำละลาย จึงเป็นดังสมการที่ (5.2)

$$Y = 32.57 + 16.11 D + 13.77 C^2 \quad (5.2)$$

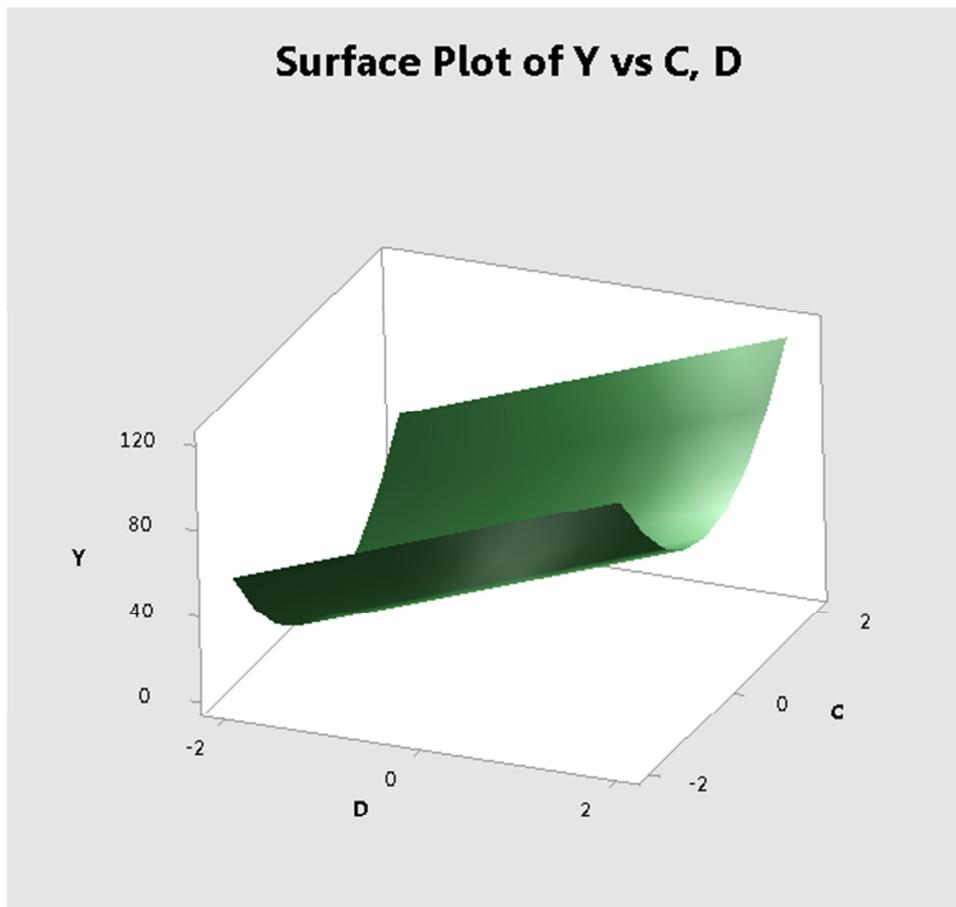
เมื่อ Y คือ ร้อยละการสกัด

C คือ ปริมาตรตัวทำละลาย

D คือ ความเป็นกรด-ด่างของตัวทำละลาย

โดยที่ตัวแปรทั้งหมดต้องใส่ในรูปของค่ารหัส เช่น -1 0 1 เป็นต้น

จากสมการที่ (5.2) แสดงให้เห็นว่าตัวแปรที่ส่งผลต่อการสกัดคอร์ติเซปีนออกจากเห็ดถั่งเช่าสีทองโดยใช้การสกัดด้วยตัวทำละลาย คือ ปริมาตรตัวทำละลาย (C) และความเป็นกรด-ด่างของตัวทำละลาย (D) จากนั้นผู้วิจัยจึงได้สร้างกราฟ โดยให้ตัวแปร C และ D เป็นตัวแปรต้น และตัวแปร Y เป็นตัวแปรตาม ซึ่งได้กราฟออกมาเป็นพื้นผิวตอบสนอง ดังรูป 5.3 และได้กราฟคอนทัวร์ (Contour) ดังรูป 5.4 ซึ่งจากการสังเกตด้วยตาจากทั้งสองกราฟ จะเห็นได้ว่าสภาวะที่ดีที่สุด คือ ที่ปริมาตรตัวทำละลายเท่ากับ (-2) และ (2) โดยในที่นี้สัญลักษณ์ (-2) จากการออกแบบการทดลองคือปริมาตรตัวทำละลายเท่ากับ 50 มิลลิลิตร และ (2) คือค่าตัวทำละลายเท่ากับ 150 มิลลิลิตร และค่าที่ดีที่สุดของความเป็นกรด-ด่างของตัวทำละลาย คือ (2) ซึ่งสัญลักษณ์ (2) จากการออกแบบการทดลองคือค่าความเป็นกรด-ด่างของตัวทำละลายเท่ากับ 11



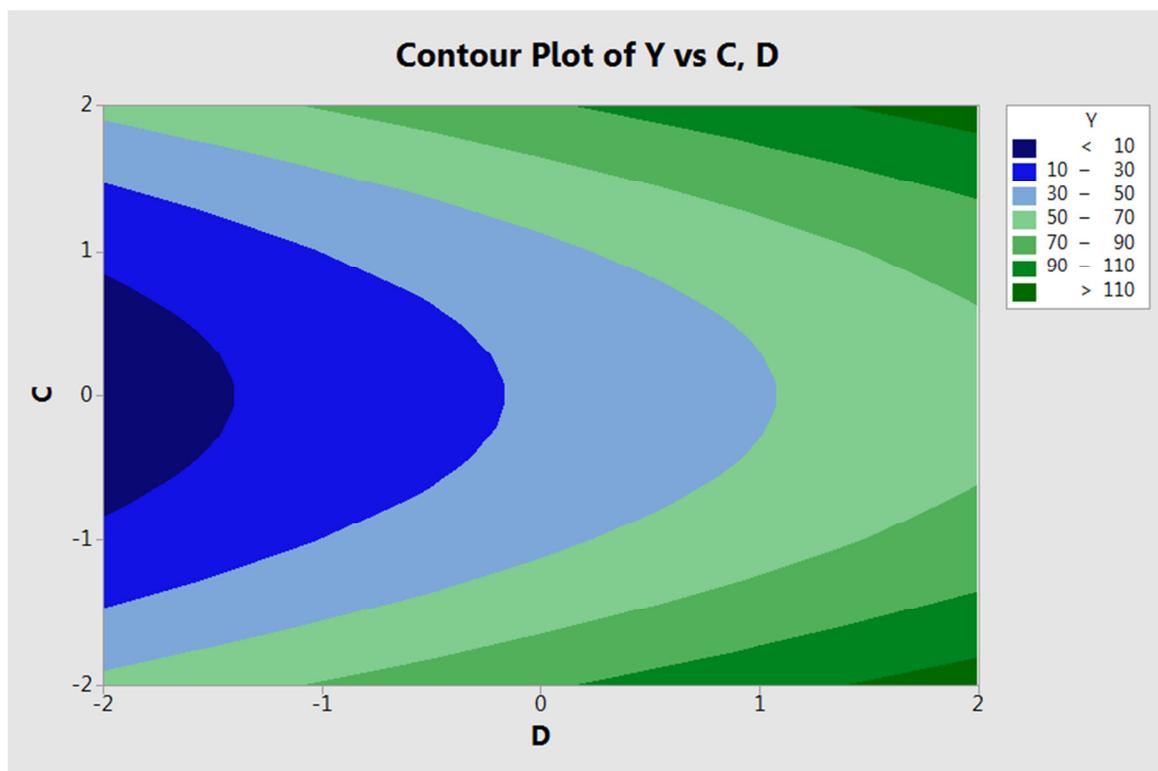
รูปที่ 5.3 ภาพสามมิติของผลตอบสนองแบบ โครงร่างพื้นผิว

เมื่อแทนลงในสมการ (2) จะทำให้ได้ร้อยละการสกัดดังนี้

$$Y = 32.57 + 16.11 (2) + 13.77 (-2)^2 \quad (5.3)$$

จะได้ $Y = 119.87 \%$

ดังนั้นจะเห็นได้ว่าค่าเหมาะสมที่ทำให้ได้ร้อยละการสกัดมากที่สุด คือ ปริมาตรตัวทำละลายเท่ากับ 50 มิลลิลิตร และค่าความเป็นกรด-ด่างของตัวทำละลาย เท่ากับ 11 ทำให้ได้ค่าร้อยละการสกัด เท่ากับ 119 โดยการสร้างกราฟเพื่อทำการ Optimization สมการสามารถทำได้อีกหนึ่งวิธี คือการสร้างภาพ Contour Plot ของผลตอบสนองแบบ โครงร่างพื้นผิวดังรูปที่ 5.4 โดยจะได้ผลเช่นเดียวกับรูปที่ 5.3



รูปที่ 5.4 Contour Plot ของผลตอบแทนแบบโครงสร้างพื้นผิว

5.2 การทดสอบสมการทำนายผล

เมื่อเราได้ค่าที่เหมาะสมที่ทำให้ได้ร้อยละการสกัดมากที่สุด จึงได้มีการทดสอบสมการที่ได้กับการทดลอง โดยใช้ปริมาตรตัวทำละลาย ค่าความเป็นกรด-ด่างของตัวทำละลายเป็นค่าที่เหมาะสมที่ได้จากการ Optimization โดยทำการเปลี่ยนปริมาณถังเช่าที่ใช้ในการทดลอง ซึ่งจะแสดงดังตารางที่ 5.2

ตารางที่ 5.2 ขอบเขตการทดลองสำหรับการทดสอบสมการ

จำนวนการทดลอง	อุณหภูมิ	อัตราส่วนโดยปริมาตรของเอทานอลในตัวทำละลาย	ปริมาตรตัวทำละลาย	ความเป็นกรด-ด่างตัวทำละลาย	ปริมาณถังเช่า	ร้อยละการสกัด
1	50	50%	50	11	5	62.78
2	65	50%	50	11	5	87.93
3	50	75%	50	11	5	63.13

จากตารางที่ 5.2 จะเห็นว่าที่การทดลองที่ 1 และการทดลองที่ 3 ซึ่งเป็นการเพิ่มขึ้นของอัตราส่วน โดยปริมาตรของเอทานอลในตัวทำละลาย และค่าอุณหภูมิ ปริมาตรตัวละลาย ความเป็นกรด-ด่างของตัวทำละลายเท่ากัน พบว่าค่าร้อยละการสกัดที่ได้มีค่าใกล้เคียงกัน คือ 62.78% และ 63.13% และเมื่อเปรียบเทียบการทดลองที่ 1 และการทดลองที่ 2 เพื่อเปรียบเทียบการเพิ่มขึ้นของอุณหภูมิ โดยตัวแปรอื่นคงที่ พบว่าเมื่อที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ร้อยละการสกัดเท่ากับ 62.78% และที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส ร้อยละการสกัดเท่ากับ 89.73% จึงสรุปได้ว่าเมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้นทำให้ร้อยละการสกัดเพิ่มขึ้นด้วย แสดงให้เห็นว่าที่ความเป็นกรด-ด่างมีค่าสูง อุณหภูมิจะส่งผลต่อร้อยละการสกัด

5.3 ความบริสุทธิ์ของคอร์ดิเซปินที่สกัดได้

ในหีดั่งเช่นนั้นนอกจากคอร์เซปิน ยังประกอบด้วยสารเคมีอื่นอีกมากมาย เช่น อะดีโนซีน เพปไทด์ โพลีแซคคาไรด์ เป็นต้น โดยอะดีโนซีน เป็นสารเคมีในหีดั่งเซาที่มีปริมาณพอๆ กับคอร์ดิเซปิน ดังนั้นจึงทำการศึกษาว่าการสกัดนั้นมีสารอื่นติดมามากน้อยเพียงใด โดยวิเคราะห์ได้จากร้อยละความบริสุทธิ์ของคอร์ดิเซปินที่ได้ จากการทดลองเมื่อพิจารณาเทียบกับสารอะดีโนซีน (ภาคผนวก ข) พบว่าการทดลองที่ 11, 20 และ 21 ร้อยละความบริสุทธิ์ของคอร์ดิเซปินสูงถึง 100 ยกตัวอย่าง เช่น การทดลองที่ 20 คือที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส อัตราส่วนโดยปริมาตรระหว่างเอทานอลในตัวทำละลาย 100 : 0 ปริมาตรตัวทำละลาย 100 มิลลิลิตร และความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7 จะได้คอร์ดิเซปินที่มีความบริสุทธิ์มากที่สุด