บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

3.1. การเก็บตัวอย่างเห็ดกินได้

วัตถุดิบในการทดลองประกอบด้วยเห็ดป่ากินได้ 20 ชนิด รวบรวมจากตลาดสดเทศบาลวารินชำราบ ในจังหวัดอุบลราชธานี ในเดือนมิถุนายน – กรกฎาคม พ.ศ. 2553 โดยสรุปข้อมูลของเห็ดป่ากินได้แต่ละชนิดดังนี้

ตารางที่ 3.1 ข้อมูลเห็ดป่ากินได้ทั้ง 20 ชนิด ในจังหวัดอุบลราชธานี

ชื่อเห็ด	ชื่อวิทยาศาสตร์	ชื่อวงศ์
ผึ้งนกยูง	*Macrolepiota dolichaula* (Bedrk.& Br.) Pegler & Rayner	AGARICACEAE
ระโงกขาว	*Amanita princes* Coner et Bas.	AMANITACEAE
ระโงกแดง	*Amanita caesarea* (Fr.) Schw.	AMANITACEAE
เผาะฝ้าย	*Astraeus hygrometricus* (Pers.) Morgan.	ASTRACEAE
ผึ้งเหลือง	*Boletus colossus* Heim sp.	BOLETACEAE
ผึ้งแดง	*Aureoboletus thibetanus* (Pat.) Hongo and Nagasawa	BOLETACEAE
ผึ้งชาด	*Boletellus chrysenteroides* (Shell) Sing.	BOLETACEAE
ผึ้งขาลาย	*Boletellus ressellii* (Frost) Gilb.	BOLETACEAE
มันปู	*Cantharellus cibarius* Fr.	CANTHARELLACEAE
เผาะหนัง	*Geastrum saccatum* Fr.	GEASTRACEAE
ผึ้งข้าว	*Suillus tomentosus* sp.	GOMPHIDAICEAE
หำฟาน	*Alpova tappei* Fogel.	MELANOGASRACEAE
ไคล	*Rusula virescens* Fr.	RUSSULACEAE
ก่อใหญ่	*Russula mairei* Sing.	RUSSULACEAE
ถ่าน	*Russula densfolia* (Secr) Gill.	RUSSULACEAE
หน้าแหล่	*Russula cyanoxantha Schaeff ex.* Fr.	RUSSULACEAE
ปลวกข้าวดอ	*Termitomyces clypeatus* Heim sp.	TRICHOLOMATACEAE

ตารางที่ 3.1 ข้อมูลเห็ดป่ากินได้ทั้ง 20 ชนิด ในจังหวัดอุบลราชธานี (ต่อ)

ชื่อเห็ด	ชื่อวิทยาศาสตร์	ชื่อวงศ์
ปลวกตาบ	Termitomyces sp.	TRICHOLOMATACEAE
ปลวกแดง	Termitomyces grobuslus Heim et Grooss sp.	TRICHOLOMATACEAE
ตีนแรด	Tricholoma crassum Berk.	TRICHOLOMATACEAE

3.2. ขั้นตอนการเตรียมตัวอย่าง

3.2.1 นำทุกส่วนของเห็ดแต่ละชนิด จำนวน 20 ชนิด ที่พบในจังหวัดอุบลราชธานีมาสับอย่างละเอียด จากนั้นอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 40 - 45 °C ให้แห้งและนำไปบดให้ละเอียดโดยชั่งน้ำหนักมาชนิดละ 10 g

3.2.2 นำเห็ดแต่ละชนิดที่ชั่งแล้วมาแช่ด้วยตัวทำละลายเฮกเซนปริมาตร 100 mL เป็นเวลา 7 วัน

3.2.3 เมื่อครบ 7 วัน นำมากรอง แล้วนำไประเหยตัวทำละลายออก ด้วยเครื่อง Rotatory evaporator ให้เหลือประมาณ 5 mL เก็บไว้ใน vial ได้เป็นสารสกัดหยาบเฮกเซน (Hexane crude extract)

3.2.4 กากที่เหลือสกัดด้วยตัวทำละลายเอทิลอะซิเตตต่อ (ทดลองเหมือนข้อ 3.2.2 -3.2.3) ได้เป็นสารสกัดหยาบเอทิลอะซิเตต (Ethyl acetate crude extract)

3.2.5 กากที่เหลือจากการสกัดด้วยตัวทำละลายเอทิลอะซิเตต นำมาสกัดต่อด้วยเอทานอลต่อ (ทำการทดลองเหมือนข้อ 3.2.2 - 3.2.3) ได้เป็นสารสกัดหยาบเอทานอล (Ethanol crude extract)

3.2.6 นำสารสกัดหยาบเฮกเซน เอทิลอะซิเตต และเอทานอลไปแช่ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ-4°C ทำให้แห้งด้วยวิธี Freeze drying หรือนำไประเหยในตู้ดูดควัน

3.2.7 สารสกัดหยาบเฮกเซน เอทิลอะซิเตต และเอทานอลที่แห้งแล้วนำมาบันทึกน้ำหนัก

3.3. การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของสารสกัดหยาบจากเห็ดป่ากินได้จำนวน 20 ชนิด ในจังหวัดอุบลราชธานี เบื้องต้น โดยใช้วิธี DPPH Radical Scavenging Activity

3.3.1 เตรียมสารละลาย DPPH ความเข้มข้น 6.0 x 10^{-5} M

ชั่ง DPPH 0.0240 g ละลายด้วยสารละลายเมทานอล ปรับปริมาตร 1000 mL ใน volumetric flask เก็บไว้ไม่ให้โดนแสงโดยการใช้แผ่นอะลูมิเนียมฟอยด์หุ้มไว้

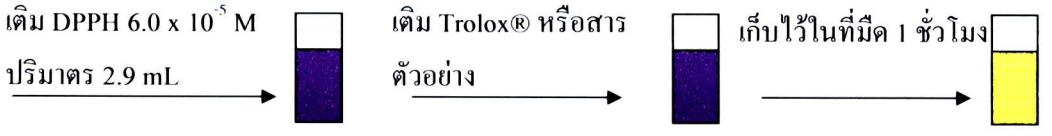
3.3.2 เตรียม Stock solution: Trolox® ความเข้มข้น 1000 ppm

ชั่ง Trolox® 0.0499 g ละลายด้วยเมทานอลปรับปริมาตร 50 mL ในขวดวัดปริมาตร เก็บไว้ไม่ให้โดนแสงโดยการใช้แผ่นอะลูมิเนียมฟอยด์หุ้มไว้

3.3.3 เตรียม Working standard solution: Trolox® ความเข้มข้น 200 150 100 และ 50 ppm

3.3.4 เตรียม Stock solution: ตัวอย่างสารสกัดหยาบแต่ละชนิด ความเข้มข้น 1000 ppm ชั่งตัวอย่างสารสกัดหยาบอย่างละ 1 mg ละลายด้วยเมทานอลปรับปริมาตร 1 mL ใน eppendorf tube เก็บไว้ไม่ให้โดนแสงโดยการใช้แผ่นอะลูมิเนียมฟอยด์หุ้มไว้

3.3.5 เตรียมสารละลายเพื่อทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของสารสกัดหยาบจากเห็ดป่ากินได้จำนวน 20 ชนิดในจังหวัดอุบลราชธานี เบื้องต้น โดยวิธี DPPH



ปิเปต DPPH 6 x 10^{-5} M ปริมาตร 2.90 mL ใน cuvette (glass) จากนั้นเติม 0.10 mL Trolox® หรือ สารตัวอย่างปริมาตร 0.10 mL เก็บไว้ในที่มืด 1 ชั่วโมง

ปิเปต DPPH 6 x 10^{-5} M ปริมาตร 2.90 mL ใน cuvette (glass) จากนั้นเติมเมทานอล ปริมาตร 0.10 mL เก็บไว้ในที่มืด 1 ชั่วโมง เพื่อเป็นตัวควบคุม

3.3.6 ปิเปตเมทานอล ปริมาตร 3.00 mL ใน cuvette (glass) เป็น blank มาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 nm โดยเทคนิค UV-Visible spectroscopy

3.3.7 นำ cuvette (glass) ที่ครบ 1 ชั่วโมง มาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 nm

3.3.8 สร้างกราฟมาตรฐานของ Trolox® ความเข้มข้น 200 150 100 และ 50 ppm โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 nm แล้วเขียนกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นต่างๆ ของสารละลายมาตรฐาน (แกน X) กับค่าการดูดกลืนแสงของสารมาตรฐาน (แกน Y) จะได้กราฟมาตรฐาน (standard curve)

3.3.9 คำนวณค่าเปอร์เซ็นต์การต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของสารสกัดหยาบเฮกเซน เอทิลอะซิเตต และเอทานอล จากสารตัวอย่างแต่ละชนิด

$$\%\ \text{DPPH Radical Scavenging Activity} = \left[\frac{(A_{control} - A_{std/sample})}{A_{control}} \right] 100$$

โดยที่

$A_{control}$ คือ ค่าการดูดกลืนแสงของ DPPH

A_{std} คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารมาตรฐาน

A_{sample} คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดหยาบเฮกเซน เอทิลอะซิเตต และเอทานอล จากสารตัวอย่างแต่ละชนิด

3.3.10 วัดค่าการดูดกลืนแสงซ้ำ 3 ครั้ง นำค่าเปอร์เซ็นต์การต้านอนุมูลอิสระ DPPH ที่ได้มาเฉลี่ย เพื่อนำไปเขียนกราฟต่อไป

3.3.11 เขียนกราฟเพื่อหาค่า

เขียนกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าเปอร์เซ็นต์การต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของสารสกัดหยาบเฮกเซน เอทิลอะซิเตต และเอทานอล จากสารตัวอย่างแต่ละชนิด (แกน Y) กับ ชนิดของสารตัวอย่าง (แกน X)

เปรียบเทียบค่าเปอร์เซ็นต์การต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของสารสกัดหยาบเฮกเซน เอทิลอะซิเตต และเอทานอล จากสารตัวอย่างแต่ละชนิด และคัดเลือกสารตัวอย่างที่มีค่าเปอร์เซ็นต์การต้านอนุมูลอิสระ DPPH มากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ เพื่อนำไปทำในขั้นตอนในขั้นต่อไป

3.4. การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ABTS ของสารสกัดหยาบจากเห็ดป่ากินได้จำนวน 20 ชนิด ในจังหวัดอุบลราชธานี โดยใช้วิธี ABTS Cation Radical Scavenging Activity

3.4.1 เตรียมสารละลาย ABTS

ชั่ง ABTS 0.0999 g (1000 ppm) และ $K_2S_2O_8$ 0.0201 g (200 ppm) ละลายสารทั้งสองด้วยน้ำกลั่นและปรับปริมาตรให้เป็น 100 mL ใน volumetric flask เก็บไว้ไม่ให้โดนแสงโดยการใช้แผ่นอะลูมิเนียมฟอยด์หุ้มไว้

3.4.2 เตรียม stock solution: Trolox® ความเข้มข้น 1000 ppm

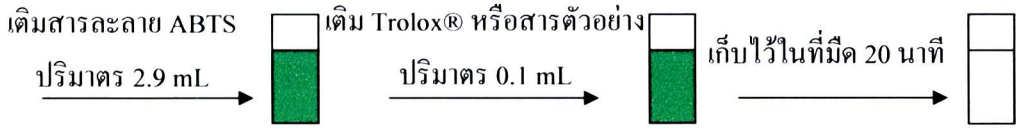
ชั่ง Trolox® 0.0499 g ละลายด้วยเมทานอล ปรับปริมาตร 50 mL ใน volumetric flask เก็บไว้ไม่ให้โดนแสงโดยการใช้แผ่นอะลูมิเนียมฟอยด์หุ้มไว้

3.4.3 เตรียม working standard solution: Trolox® ความเข้มข้น 200 150 100 และ50 ppm

3.4.4 เตรียม stock solution: ตัวอย่างสารสกัดหยาบแต่ละชนิด ความเข้มข้น 1000 ppm

ชั่งสารตัวอย่างสารสกัดหยาบอย่างละ 1 mg ละลายด้วยเมทานอล ปรับปริมาตร 1 mL ใน Eppendorf tube เก็บไว้ไม่ให้โดนแสงโดยการใช้แผ่นอะลูมิเนียมฟอยด์หุ้มไว้

3.4.5 เตรียมสารละลายเพื่อทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ABTS โดยวิธี ABTS assay



ปิเปตสารละลาย ABTS ปริมาตร 2.90 mL ใน cuvette (glass) จากนั้นเติม 0.10 mL Trolox® หรือ สารตัวอย่างปริมาตร 0.10 mL เก็บไว้ในที่มืด 20 นาที

ปิเปตสารละลาย ABTS ปริมาตร 2.90 mL ใน cuvette (glass) จากนั้นเติม 0.10 mL เมทานอล เก็บไว้ในที่มืด 20 นาที เพื่อเป็นตัวควบคุม

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ห้องสมุดงานวิจัย

ปิเปตเมทานอล ปริมาตร 3.00 mL ใน cuvette (glass) เป็น blank มาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 nm โดยเทคนิค UV-Visible spectroscopy

นำ cuvette (glass) ที่ครบ 20 นาที มาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 nm

3.4.6 เขียนกราฟมาตรฐานการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 nm ของ Trolox® ที่ความเข้มข้น 200 150 100 และ 50 ppm แล้วเขียนกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นต่างๆของสารละลายมาตรฐาน (แกน X) กับค่าการดูดกลืนแสงของสารมาตรฐาน (แกน Y)

3.4.7 คำนวณค่าเปอร์เซ็นต์การต้านอนุมูลอิสระ ABTS ของสารสกัดหยาบเฮกเซน เอทิลอะซิเตต และเอทานอล จากสารตัวอย่างแต่ละชนิดในหน่วยมิลลิกรัมของ Trolox®/กรัมของตัวอย่าง

$$\% \text{ ABTS Radical Cation Scavenging Activity} = \left[\frac{(A_{Control} - A_{std/sample})}{A_{Control}}\right] 100$$

$A_{Control}$ คือ ค่าการดูดกลืนแสงของ ABTS/เมทานอล

A_{std} คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารมาตรฐาน

A_{sample} คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดหยาบเฮกเซน เอทิลอะซิเตต และเอทานอลของสารตัวอย่าง

3.4.8 วัดค่าการดูดกลืนแสงซ้ำ 3 ครั้ง นำค่าเปอร์เซ็นต์การต้านอนุมูลอิสระ ABTS ที่ได้มาเฉลี่ย เพื่อนำไปเขียนกราฟต่อไป

3.4.9 เขียนกราฟเพื่อหาค่า

เขียนกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าเปอร์เซ็นต์การต้านอนุมูลอิสระ ABTS ของสารสกัดหยาบเฮกเซน เอทิลอะซิเตต และเอทานอลจากสารตัวอย่างแต่ละชนิด (แกน Y) กับ ชนิดของสารตัวอย่าง (แกน X)

เปรียบเทียบค่าเปอร์เซ็นต์การต้านอนุมูลอิสระ ABTS ของสารสกัดหยาบเฮกเซน เอทิลอะซิเตต และเอทานอล จากสารตัวอย่างแต่ละชนิด

3.5. การหาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจากสารสกัดหยาบจากเห็ดป่ากินได้จำนวน 20 ชนิด ในจังหวัอุบลราชธานี โดยวิธี Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP assay)

3.5.1 เตรียมสารละลายตัวอย่างสารสกัดหยาบแต่ละชนิด

ชั่งสารตัวอย่างสารสกัดหยาบแต่ละชนิดมา 5 mg ละลายด้วยน้ำ DI ปรับปริมาตร 1 mL ใน eppendorf tube

3.5.2 เตรียม Working FRAP reagent

เตรียม Working FRAP reagent โดยผสมสารละลายทั้ง 3 ชนิด ในอัตราส่วนผสม

ดังนี้ 300 mM Acetate buffer pH 3.6 : 10 mM TPTZ in 40 mM HCl : 20 mM $FeCl_3$. $6H_2O$ อัตราส่วน 10: 1: 1

เตรียม 300 mM Acetate buffer pH 3.6

ชั่ง Sodium acetate มา 0.1700 g ละลายด้วย Glacial acetic acid 1.60 mL แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตรสุดท้าย 100 mL

เตรียม 10 mM TPTZ in 40 mM HCl

ชั่ง TPTZ มา 0.0312 g ละลายด้วย 1M HCl 4.0 mL แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตรสุดท้าย 10 mL

เตรียม 20 mM $FeCl_3$. $6H_2O$

ชั่ง $FeCl_3$. $6H_2O$ มา 0.0540 g ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตรสุดท้าย 10 mL

3.5.3 เตรียม Standard L-ascorbic acid (MW = 176.1) ที่ความเข้มข้น 1000 500 250 100 และ 50 µM

3.5.4 ปิเปต Blank (น้ำกลั่น) sample และ L-ascorbic acid 1000 500 250 100 และ 50 µM ที่ความเข้มข้นต่างๆ 25 µL

3.5.5 เติม Working FRAP reagent 1000 µL

3.5.6 วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 593 nm

3.5.7 เขียนกราฟมาตรฐานของ L-ascorbic acid ความเข้มข้น 1000 500 250 100 และ50 µM โดยเขียนกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 593 nm (y-axis) กับความเข้มข้นต่างๆ ของสารมาตรฐาน (x-axis) จะได้กราฟมาตรฐาน

3.5.8 คำนวณค่า FRAP value โดยใช้สมการเส้นตรงของกราฟมาตรฐานคำนวณจากสูตร $y = ax + b$ แทนค่า y ด้วยค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดตัวอย่างแต่ละชนิด แล้วก็จะได้ค่า x ซึ่งก็คือค่า FRAP Value ของสารสกัดตัวอย่างแต่ละชนิด

3.6.การหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม (Total phenolic compound)

การเตรียมตัวอย่าง

3.6.1 เตรียม Folin-Ciocalteu reagent (1N)

ละลาย Folin-Ciocalteu reagent (2N) ในน้ำกลั่น ในอัตราส่วน 1: 1

3.6.2 เตรียม 20% Sodium acetate

ชั่ง Sodium carbonate 20 g ละลายในน้ำกลั่น 100 mL เขย่าให้ละลายจนเป็นเนื้อเดียวกัน

3.6.3 Standard Tannic acid

ชั่ง Tannic acid 25 mg ละลายในน้ำกลั่น 25 mL เป็น stock solution จากนั้นเจือจางด้วยน้ำให้ได้ความเข้มข้น 0.5 mg/mL

การวิเคราะห์

3.6.4 เตรียมสารละลายเพื่อทดสอบปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม (Total phenolic compound)

เตรียมสารละลายมาตรฐานกรดแทนนิก (Tannic acid) ที่ความเข้มข้น 0.50 mg/mL ปริมาตร 20 30 40 50 และ 60 µL ตามลำดับ ใส่ในหลอดทดลอง เติมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต (Sodium carbonate) 1250 µL Folin-Ciocalteu reagent 250 µL และเติมน้ำ จนครบปริมาตร 2.00 mL ในแต่ละหลอดทดลอง ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 40 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 725 nm จากนั้นนำค่าการดูดกลืนแสงมาเขียนกราฟกับปริมาณกรดแทนนิก (mg) (Tannic acid)

เตรียมสารละลายตัวอย่างจากสารสกัดแต่ละชนิด โดยการชั่งมา 5 mg ละลายในเมทานอล 1.00 mL โดยทำการวิเคราะห์เหมือนสารมาตรฐานกรดแทนนิก (Tannic acid) นำค่าการดูดกลืนแสงมาคำนวณค่าปริมาณกรดแทนนิก (Tannic acid) ในสารตัวอย่าง 1 g จากกราฟมาตรฐาน