



การสกัดเซราไมด์จากเห็ดกินได้ที่เพาะปลูกเชิงพาณิชย์



โดย

นางสาววรรณรัตน์ เจ็ยเจริญ

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเทคโนโลยีอาหาร แผน ก แบบ ก 2 ระดับปริญญาโทมหาบัณฑิต

ภาควิชาเทคโนโลยีอาหาร

มหาวิทยาลัยศิลปากร

ปีการศึกษา 2566

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยศิลปากร

การสกัดเซราไมด์จากเห็ดกินได้ที่เพาะปลูกเชิงพาณิชย์



โดย
นางสาววรรณรัตน์ เจ็ยเจริญ

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเทคโนโลยีอาหาร แผน ก แบบ ก 2 ระดับปริญญาโทมหาบัณฑิต

ภาควิชาเทคโนโลยีอาหาร

มหาวิทยาลัยศิลปากร

ปีการศึกษา 2566

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยศิลปากร

EXTRACTION OF CERAMIDE FROM COMMERCIALY GROWN EDIBLE
MUSHROOMS



By
MISS Wannarat JIRJAREAN

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for Master of Science FOOD TECHNOLOGY
Department of FOOD TECHNOLOGY
Silpakorn University
Academic Year 2023
Copyright of Silpakorn University

620920028 : เทคโนโลยีอาหาร แผน ก แบบ ก 2 ระดับปริญญาโทบัณฑิต

คำสำคัญ : เชราไมด์, กลูโคซิลเชราไมด์ที่ได้จากพืช, เห็ด, โครมาโตกราฟีแบบผิวบาง, โครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง

นางสาว วรรณรัตน์ เจ็ญเจริญ: การสกัดเชราไมด์จากเห็ดกินได้ที่เพาะปลูกเชิงพาณิชย์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก : รองศาสตราจารย์ ดร. ปราโมทย์ คุวิจิตรจากร

กลูโคซิลเชราไมด์จากพืชถูกนำมาใช้เป็นส่วนผสมฟังก์ชันของผลิตภัณฑ์เสริมอาหารและเครื่องสำอางเพื่อรักษาความชุ่มชื้นแก่ผิวหนัง งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อสกัดกลูโคซิลเชราไมด์จากเห็ดกินได้ที่มีการเพาะปลูกในประเทศ 4 ชนิด ได้แก่ เห็ดหูหนู (*Auricularia auricula-judae*), เห็ดฟาง (*Volvariella volvacea*), เห็ดนางฟ้า (*Pleurotus pulmonarius*) และ เห็ดนางรม (*Pleurotus ostreatus*) โดยสภาวะที่ใช้สำหรับการสกัด คือ การสกัดโดยใช้เอทานอล 95% อัตราส่วนตัวอย่างต่อตัวทำละลายเท่ากับ 1 ต่อ 10 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 240 นาที พบว่าปริมาณสารสกัดหยาบจากเห็ดฟางมีค่าสูงสุด (17.18 กรัมต่อ 100 กรัมเห็ดแห้ง) แต่สารสกัดหยาบจากเห็ดนางรมมีปริมาณกลูโคซิลเชราไมด์สูงสุด (2.18 กรัมต่อ 100 กรัมของสารสกัดหยาบ) เมื่อนำเห็ดนางรมแต่ละช่วงอายุ (1-2, 3-4 และ 5-6 วัน) มาสกัดพบว่าสารสกัดหยาบจากทุกช่วงอายุมีปริมาณของกลูโคซิลเชราไมด์ที่ไม่แตกต่างกัน จึงเลือกเห็ดนางรมที่มีอายุ 5-6 วัน ไปใช้ในการศึกษาต่อไป จากนั้นได้ศึกษากระบวนการเพิ่มความเข้มข้นกลูโคซิลเชราไมด์ในสารสกัด การใช้เฮกเซนในการตกตะกอนสารสกัดหยาบทำให้ความเข้มข้นของกลูโคซิลเชราไมด์เพิ่มขึ้นจาก 1682.85 ไปเป็น 2616.51 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัมของสารสกัดหยาบ ในการศึกษาผลของสัดส่วนปริมาณซิลิกาเจลที่ต่างกัน ได้แก่ 0.5, 1.0, 1.5 และ 2.0 กรัม ต่อการเพิ่มความเข้มข้นของกลูโคซิลเชราไมด์จากสารสกัดหยาบที่ละลายในเฮกเซน พบว่าปริมาณกลูโคซิลเชราไมด์ในสารสกัดที่สูงที่สุดได้หลังการกวนกับซิลิกาเจลของอัตราส่วนสารสกัดหยาบต่อซิลิกาเจล 1.0:0.5 โดยน้ำหนัก มีค่าเท่ากับ 2636.75 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัมของสารสกัดหยาบ และปริมาณกลูโคซิลเชราไมด์ในส่วนซิลิกาเจล (จากการสกัดด้วยเอทิลอะซิเตท) ที่สูงที่สุด ได้จากการใช้อัตราส่วนสารสกัดหยาบต่อซิลิกาเจล 1.0:2.0 โดยน้ำหนัก มีค่าเท่ากับ 3650.30 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัมของสารสกัดหยาบ งานวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่าเห็ดนางรมเป็นวัตถุดิบในการสกัดเชราไมด์ที่มีความเป็นไปได้เชิงอุตสาหกรรมและกระบวนการตกตะกอนด้วยเฮกเซนและการดูดซับ-คายดูดซับด้วยซิลิกาเจลสามารถเพิ่มความเข้มข้นของเชราไมด์ในสารสกัดได้

620920028 : Major FOOD TECHNOLOGY

Keyword : Ceramide, Glucosylceramide, Mushroom, TLC, HPLC

MISS Wannarat JIRJAREAN : Extraction of ceramide from commercially grown edible mushrooms Thesis advisor : Associate Professor Pramote Khuwijitjaru, Ph.D.

Plant-based glucosylceramides is used as functional ingredient in dietary supplements and cosmetics to maintain skin moisture. The objective of this research was to extract glucosylceramide from four 4 of commercial edible mushrooms cultivated in Thailand, namely jelly mushroom (*Auricularia auricula-judae*), straw mushroom (*Volvariella volvacea*), phoenix oyster mushroom (*Pleurotus pulmonarius*) and oyster mushroom (*P. ostreatus*). The extraction conditions were 95% ethanol, sample to solvent ratio of 1:10 (w/v), extraction temperature of 40 °C, and extraction time of 240 min. It was found that the highest crude extract yield was from straw mushroom (17.18 g/100 g of dried mushroom), whereas the highest concentration of glucosylceramide in crude extract was from oyster mushroom (2.18 g/100 g of crude extract). Extraction of oyster mushrooms at different growth stages (1-2, 3-4, and 5-6 days) were also investigated. It was found that the crude extracts from all growth stages contained similar amounts of glucosylceramide. Therefore, oyster mushrooms at 5-6 days were selected for further studies. Processes to increase glucosylceramide in extracts were investigated. Hexane precipitation effectively removed some components and increased the glucosylceramide concentration from 1682.85 to 2616.51 mg/100 g extract. Adsorption-desorption process using silica gel was used to further concentrate glucosylceramide in extract. It was found that the highest concentration of glucosylceramide in the extract (2636.75 mg/100 g extract) was obtained using a ratio of crude extract to silica gel of 1.0:0.5 (w/w). The highest concentration of glucosylceramide in silica gel (3650.30 mg/100 g of extract) (after extraction with ethyl acetate) was obtained using a ratio of crude extract to silica gel of 1.0:2.0 (w/w). In conclusion, this study showed that oyster mushroom has a potential for glucosylceramides extraction. In addition, hexane precipitation and adsorption-desorption using silica gel could increase the concentration of glucosylceramides in extract.



กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี เพราะได้รับความกรุณาจากรองศาสตราจารย์ ดร. ปราโมทย์ คุวิจิตรจากรุ ซึ่งเป็นอาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ที่ให้ความช่วยเหลือและคำแนะนำอันเป็นประโยชน์อย่างยิ่งต่อผู้วิจัย และอาจารย์ ดร.ขวัญใจ กลิ่นจงกล ที่กรุณาให้คำปรึกษา คำแนะนำและข้อเสนอแนะที่เป็นประโยชน์แก่ผู้วิจัย ส่งผลให้วิทยานิพนธ์เล่มนี้ถูกต้องและสมบูรณ์ยิ่งขึ้น ผู้วิจัยขอขอบพระคุณในความกรุณาของท่านเป็นอย่างสูง

ขอขอบพระคุณคณาจารย์ภาควิชาเทคโนโลยีอาหารที่ให้ความรู้ คำแนะนำและประสบการณ์อันมีค่าแก่ผู้วิจัย รวมถึงเจ้าหน้าที่สำนักงาน และเจ้าหน้าที่วิทยาศาสตร์ทุกคน ที่อำนวยความสะดวก เพื่อให้การดำเนินงานเป็นไปอย่างราบรื่น

ขอขอบพระคุณบิดา มารดา และครอบครัวที่คอยผลักดันให้ความช่วยเหลือและเป็นกำลังใจที่สำคัญยิ่งในทุกด้าน ขอขอบคุณพี่ๆ ในห้องแล็บ (พี่ก้อย พี่ไก่ พี่มู๋) ที่ให้ความช่วยเหลือและเกื้อกูลกันด้วยดีเสมอมา

วรรณรัตน์ เจ็ญเจริญ



สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ช
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ฉ
สารบัญรูปภาพ.....	ฉ
บทที่ 1	1
บทนำ.....	1
1.1 ความเป็นมาของปัญหา.....	1
1.2 วัตถุประสงค์.....	2
1.3 ขอบเขตการศึกษา.....	2
1.4 สมมุติฐานของงานวิจัย.....	2
บทที่ 2	3
เอกสารที่เกี่ยวข้องกับงานวิจัย.....	3
2.1 เซราไมด์.....	3
2.2 กระบวนการสร้างและสลายของสฟิงโกลิปิด.....	7
2.3 เซราไมด์จากพืช	10
2.4 เห็ด.....	13
2.5 กลูโคซิลเซราไมด์จากเห็ด.....	14
2.6 การสกัดกลูโคซิลเซราไมด์จากพืช.....	15
2.7 ทำบริสุทธิ์เซราไมด์จากพืช.....	18

2.8 วิธีการวิเคราะห์เซราไมด์	19
บทที่ 3	25
อุปกรณ์และวิธีการดำเนินงานวิจัย.....	25
3.1 วัสดุ อุปกรณ์ และ สารเคมี.....	25
3.2 การวิเคราะห์ปริมาณกลูโคซิลเซราไมด์ในเห็ดกินได้ชนิดต่าง ๆ.....	27
3.3 การวิเคราะห์ปริมาณกลูโคซิลเซราไมด์ในเห็ดนางรมที่มีอายุแตกต่างกัน	28
3.4 การศึกษาการเพิ่มความเข้มข้นของกลูโคซิลเซราไมด์จากสารสกัดเห็ดนางรมโดยการดูดซับ-คายดูดซับด้วยซิลิกาเจล.....	29
3.5 การศึกษาการใช้ซิลิกาเจลในสัดส่วนที่แตกต่างกันในการเพิ่มความเข้มข้นของกลูโคซิลเซราไมด์จากสารสกัดเห็ดนางรมด้วยการดูดซับ-คายดูดซับด้วยซิลิกาเจล.....	29
3.6 การวิเคราะห์ทางเคมี.....	30
3.7 การวิเคราะห์ทางสถิติ	31
บทที่ 4	32
ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง.....	32
4.1 ปริมาณความชื้นและลักษณะปรากฏของเห็ดทั้ง 4 ชนิด.....	32
4.2 ปริมาณผลผลิตของสารสกัดเห็ดและปริมาณกลูโคซิลเซราไมด์ของเห็ดทั้ง 4 ชนิด.....	34
4.3 ปริมาณกลุ่มสาร (Proximate analysis) และลักษณะปรากฏของเห็ดนางรม 3 ช่วงอายุ.....	39
4.4 ปริมาณผลผลิตสารสกัดเห็ดและปริมาณกลูโคซิลเซราไมด์ของเห็ดนางรม 3 ช่วงอายุ	41
4.5 การศึกษาการเพิ่มความเข้มข้นของกลูโคซิลเซราไมด์จากสารสกัดเห็ดนางรมโดยการดูดซับ-คายดูดซับด้วยซิลิกาเจล.....	45
4.6 การใช้ซิลิกาเจลในสัดส่วนที่แตกต่างกันในการเพิ่มความเข้มข้นของกลูโคซิลเซราไมด์จากสารสกัดเห็ดนางรมด้วยการดูดซับโดยใช้ซิลิกาเจล	47
บทที่ 5	53
สรุปผลการทดลอง.....	53
รายการอ้างอิง	54

ภาคผนวก ก.....	60
ภาคผนวก ข.....	69
ภาคผนวก ค.....	74
ประวัติผู้เขียน.....	84



สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 1 ปริมาณกลูโคซิลเซราไมด์ (ceramide monohexoside, CMH) ธัญพืช พืชหัว ผักและผลไม้.....	12
ตารางที่ 2 การตั้ง gradient ของเฟสเคลื่อนที่ในการวิเคราะห์เซราไมด์	21
ตารางที่ 3 ปริมาณความชื้นของเห็ดหูหนู เห็ดฟาง เห็ดนางฟ้า และเห็ดนางรม	32
ตารางที่ 4 ค่าปริมาณกลุ่มสารของเห็ดนางรมผงแห้งบดละเอียดจากเห็ดทั้ง 3 ช่วงอายุ	39
ตารางที่ 5 ปริมาณกลูโคซิลเซราไมด์ในสารสกัดที่ได้ในแต่ละขั้นตอน	52
ตารางที่ 6 สัดส่วนเฟสเคลื่อนที่ที่ใช้สำหรับกาวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC-ELSD.....	66



สารบัญรูปภาพ

	หน้า
<u>ภาพที่ 1</u> โครงสร้างพื้นฐานของเซราไมด์.....	3
<u>ภาพที่ 2</u> โครงสร้างของสายสฟิงกอยด์เบสของเซราไมด์ที่พบในมนุษย์	4
<u>ภาพที่ 3</u> สฟิงโกลิปิดและการสังเคราะห์ทางชีวภาพในผิวหนังมนุษย์.....	5
<u>ภาพที่ 4</u> การทำงานของผิวหนังปกติ (ซ้าย) และผิวหนังที่ขาดเซราไมด์ (ขวา).....	5
<u>ภาพที่ 5</u> เซราไมด์ประเภทต่าง ๆ ที่มีสายสฟิงกอยด์เบสที่แตกต่างกัน 4 ชนิด และ สายของกรดไขมันที่แตกต่างกัน 3 ชนิด ซึ่งความยาวสายโซ่ที่แตกต่างกันทำให้เซราไมด์แต่ละชนิดแตกต่างกัน	6
<u>ภาพที่ 6</u> กระบวนการสร้างและสลายของสฟิงโกลิปิด	9
<u>ภาพที่ 7</u> โครงสร้างของกลูโคซิลเซราไมด์	11
<u>ภาพที่ 8</u> เห็ด Tamogi	14
<u>ภาพที่ 9</u> โครงสร้างของกลูโคซิลเซราไมด์จากเห็ด Tamogi	15
<u>ภาพที่ 10</u> ผลการวิเคราะห์ TLC แสดงองค์ประกอบที่พบในสารสกัดจาก (ซ้ายไปขวา) จมูกข้าวโพด รำข้าว หัวบุก และรำข้าวสาลี.....	16
<u>ภาพที่ 11</u> ตัวอย่างผลิตภัณฑ์ที่ผสมเซราไมด์จากพืช.....	17
<u>ภาพที่ 12</u> โครมาโตแกรมจาก HPLC-ELSD ของสารสกัดจากเมล็ดถั่วเหลืองที่ผ่านการทำบริสุทธิ์ ด้วยคอลัมน์ซิลิกา.....	21
<u>ภาพที่ 13</u> แผ่น TLC แสดงการแยกเซราไมด์ (GlcCer), กรดไขมันโอเลอิกม โคลสเตอรอล (Chol) และสารไขมันอื่นๆ.....	23
<u>ภาพที่ 14</u> ตัวอย่างโครมาโตแกรมจากการวิเคราะห์ sphingomyelin ความเข้มข้น 1-2.5, 2-5.0, 3-10, 4-15, 5-20 µg/spot.....	24
<u>ภาพที่ 15</u> อุปกรณ์สำหรับการสกัดเซราไมด์ในห้องปฏิบัติการ	28
<u>ภาพที่ 16</u> ลักษณะปรากฏของเห็ดหูหนู เห็ดฟาง เห็ดนางฟ้า และเห็ดนางรม	33
<u>ภาพที่ 17</u> ผลผลิตของสารสกัดหยาบของเห็ดหูหนู เห็ดฟาง เห็ดนางฟ้า และเห็ดนางรม.....	34

ภาพที่ 18 ภาพถ่ายของแผ่น TLC สำหรับการวิเคราะห์กลูโคซิลเซราไมด์ในตัวอย่างสารสกัดหยาบจากเห็ด.....	35
ภาพที่ 19 โครมาโตแกรม (A) และกราฟมาตรฐานกลูโคซิลเซราไมด์ (B) ที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค TLC ร่วมกับการวิเคราะห์ภาพถ่าย	36
ภาพที่ 20 โครมาโตแกรมของสารมาตรฐานกลูโคซิลเซราไมด์ (GlcCer) และสารสกัดหยาบจากเห็ด 4 ชนิดที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค TLC ร่วมกับการวิเคราะห์ภาพถ่าย	37
ภาพที่ 21 ปริมาณกลูโคซิลเซราไมด์ในสารสกัดหยาบจากเห็ด 4 ชนิด ที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค TLC ร่วมกับการวิเคราะห์ภาพถ่าย	38
ภาพที่ 22 ลักษณะปรากฏของเห็ดนางรมทั้ง 3 ช่วงอายุ.....	40
ภาพที่ 23 ปริมาณผลผลิตสารสกัดหยาบของเห็ดนางรม 3 ช่วงอายุ.....	41
ภาพที่ 24 ภาพถ่ายของแผ่น TLC สำหรับการวิเคราะห์กลูโคซิลเซราไมด์ (GlcCer) ในตัวอย่างสารสกัดหยาบจากเห็ดนางรม	42
ภาพที่ 25 โครมาโตแกรมของสารสกัดหยาบจากเห็ดนางรม 3 ช่วงอายุ เทียบกับสารกลูโคซิลเซราไมด์มาตรฐาน (GlcCer) ที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค TLC ร่วมกับการวิเคราะห์ภาพถ่าย	43
ภาพที่ 26 ปริมาณกลูโคซิลเซราไมด์ในสารสกัดหยาบจากเห็ด 3 ช่วง ที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค TLC ร่วมกับการวิเคราะห์ภาพถ่าย	44
ภาพที่ 27 โครมาโตแกรมสารมาตรฐาน ตัวอย่าง เลซิทีน และกรดลิโนเลอิก ที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค TLC ร่วมกับการวิเคราะห์ภาพถ่าย	45
ภาพที่ 28 โครมาโตแกรมของและปริมาณกลูโคซิลเซราไมด์ชั้นของเหลวที่ได้จากการกวนรอบที่ 1 .	46
ภาพที่ 29 โครมาโตแกรมของสารสกัดหยาบเทียบกับสารมาตรฐานกลูโคซิลเซราไมด์ที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC-ELSD	48
ภาพที่ 30 ลักษณะปรากฏและโครมาโตแกรมของส่วนที่ละลายในเฮกเซน (1) และ ส่วนที่ไม่ละลายในเฮกเซน (2).....	49
ภาพที่ 31 ลักษณะปรากฏหลังการกวนและ HPLC-ELSD โครมาโตแกรม ของสารละลายหลังตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที และ HPLC-ELSD โครมาโตแกรมของสารสกัดที่ได้จากการกวนส่วนที่ละลายในเฮกเซนกับซิลิกาเจล ปริมาณ 0.5 (A), 1.0 (B), 1.5 (C), 2.0 (D) กรัม	50

ภาพที่ 32 ลักษณะของสารสกัดและ HPLC-ELSD โคโรมาโตแกรมของสารสกัดที่ได้จากสกัดชิลิกาเจลด้วยเครื่อง Soxhlet	51
ภาพที่ 34 เครื่อง HPLC-ELSD สำหรับวิเคราะห์ปริมาณกลูโคซิลเซราไมด์	67
ภาพที่ 35 กราฟมาตรฐานกลูโคซิลเซราไมด์จากการวิเคราะห์ด้วย HPLC-ELSD	67
ภาพที่ 36 ภาพถ่ายของแผ่น TLC สำหรับการวิเคราะห์กลูโคซิลเซราไมด์ในตัวอย่างสารสกัดจากเห็ด	71
ภาพที่ 37 โคโรมาโตแกรมของเลซิทินและกรดลิโนเลอิกที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วย HPLC-ELSD	72



บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาของปัญหา

เห็ดจัดเป็นอาหารประจำวันของมนุษย์ที่อุดมด้วยคุณค่าทางอาหาร วิตามิน และแร่ธาตุต่าง ๆ ที่จำเป็นสำหรับการเจริญเติบโตและเสริมสร้างความแข็งแรงของร่างกาย สามารถใช้ประโยชน์ในลักษณะ อาหาร ยารักษาโรคและอื่น ๆ ด้วยความหลากหลายของชนิดและคุณค่าทางโภชนาการที่สูงของเห็ด ส่งผลทำให้ความต้องการของตลาดมีแนวโน้มเพิ่มขึ้น โดยตลาดในประเทศที่มีสัดส่วนกว่าร้อยละ 95 ของการผลิตทั้งหมดหรือคิดเป็นมูลค่ากว่า 7,000 ล้านบาท หรือแม้แต่ตลาดส่งออกที่แม้ว่าจะมีเพียงร้อยละ 5 ของการผลิตทั้งหมดก็ตามแต่มูลค่าการส่งออกเห็ดสดและเห็ดแปรรูปของไทยมีแนวโน้มขยายตัวเพิ่มขึ้น แต่อายุการเก็บรักษาของเห็ดสั้นมาก เนื่องจากเห็ดสูญเสียน้ำได้รวดเร็ว และโครงสร้างที่ไม่แข็งแรง จึงเสื่อมเสียได้เร็วมากภายหลังการเก็บเกี่ยวเห็ดจากฟาร์มเพาะ และหากไม่มีการจัดการที่ดีหรือเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องเห็ดอาจเน่าเสียภายใน 24 ชั่วโมง จึงเป็นสาเหตุหลักที่ทำให้เห็ดที่เก็บเกี่ยวมาแล้วไม่สามารถขายได้ การแปรรูปเห็ดเป็นผลิตภัณฑ์อาหารต่าง ๆ เช่น เห็ดอบแห้ง เห็ดทอด เห็ดดอง เป็นการเพิ่มมูลค่าและทำให้สามารถเก็บรักษาเห็ดไว้ได้ยาวนานยิ่งขึ้น นอกจากนี้แนวทางในการเพิ่มมูลค่าของเห็ดอย่างหนึ่งที่เป็นไปได้คือการนำมาสกัดแยกสารที่มีมูลค่าสูง โดยงานวิจัยนี้ให้ความสนใจกับการสกัดสารเซราไมด์ (ceramides) ซึ่งเป็นสารกลุ่มไขมันที่มีมูลค่าสูง นิยมนำไปใช้เป็นส่วนผสมของผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร และเครื่องสำอาง โดยการศึกษาการสกัดเซราไมด์จากเห็ดเห็ดกินได้ที่เพาะปลูกเชิงพาณิชย์ในประเทศไทยยังไม่มีมีการรายงานมาก่อน งานวิจัยนี้สอดคล้องกับแนวทางการพัฒนาเศรษฐกิจแบบ BCG Model ของประเทศไทยโดยเฉพาะในด้านเศรษฐกิจชีวภาพ (Bioeconomy) ที่มุ่งสร้างมูลค่าเพิ่มของทรัพยากรชีวภาพของประเทศ

1.2 วัตถุประสงค์

- 1.2.1 เพื่อวิเคราะห์ปริมาณกลูโคซิลเซราไมด์ในเห็ดกินได้ 4 ชนิด ได้แก่ เห็ดหูหนู, เห็ดฟาง, เห็ดนางฟ้า และเห็ดนางรม
- 1.2.2 เพื่อวิเคราะห์ปริมาณกลูโคซิลเซราไมด์จากเห็ดนางรมที่เพาะปลูกเชิงพาณิชย์ในแต่ละช่วงของการเจริญ
- 1.2.3 เพื่อศึกษาประสิทธิภาพในการเพิ่มความเข้มข้นของกลูโคซิลเซราไมด์ในสารสกัดจากเห็ดนางรมด้วยการใช้เทคนิคการดูดซับและคายดูดซับด้วยซิลิกาเจล

1.3 ขอบเขตการศึกษา

การสกัดเซราไมด์จากเห็ดกินได้ที่เพาะปลูกเชิงพาณิชย์ด้วยเอทานอล 95% โดยเห็ดที่ใช้เป็นเห็ดที่เพาะปลูกในประเทศไทย รวมถึงการวิเคราะห์ปริมาณกลูโคซิลเซราไมด์ในสารสกัดจากเห็ดด้วยด้วยวิธี TLC รวมถึงการวิเคราะห์ภาพถ่ายด้วยโปรแกรม ImageJ และการใช้เครื่อง HPLC-ELSD

1.4 สมมุติฐานของงานวิจัย

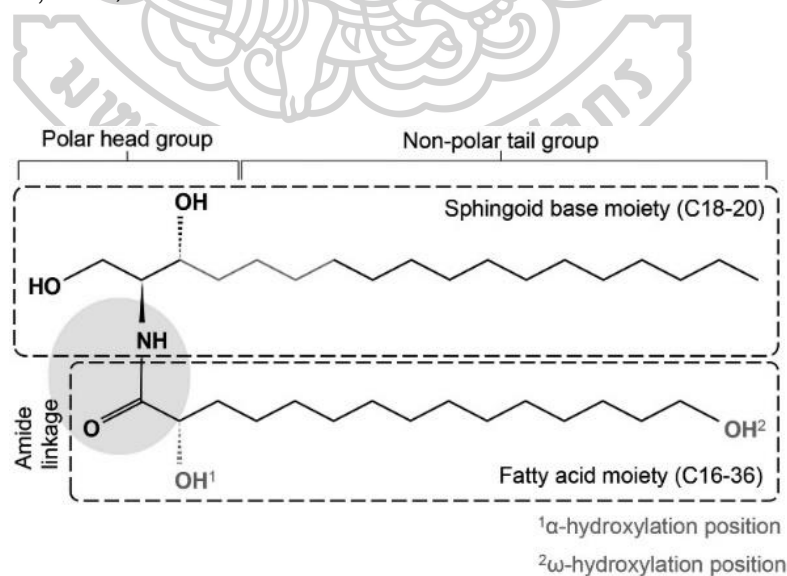
- 1.4.1 เห็ดชนิดที่ต่างกันจะมีปริมาณกลูโคซิลเซราไมด์ที่ไม่เท่ากัน
- 1.4.2 เห็ดที่มีช่วงอายุของการเจริญที่ต่างกันจะมีปริมาณกลูโคซิลเซราไมด์ที่ไม่เท่ากัน
- 1.4.3 การใช้วิธีตกตะกอนด้วยเฮกเซนและการดูดซับ-คายดูดซับด้วยซิลิกาเจลสามารถเพิ่มความเข้มข้นของกลูโคซิลเซราไมด์ในสารสกัดได้

บทที่ 2

เอกสารที่เกี่ยวข้องกับงานวิจัย

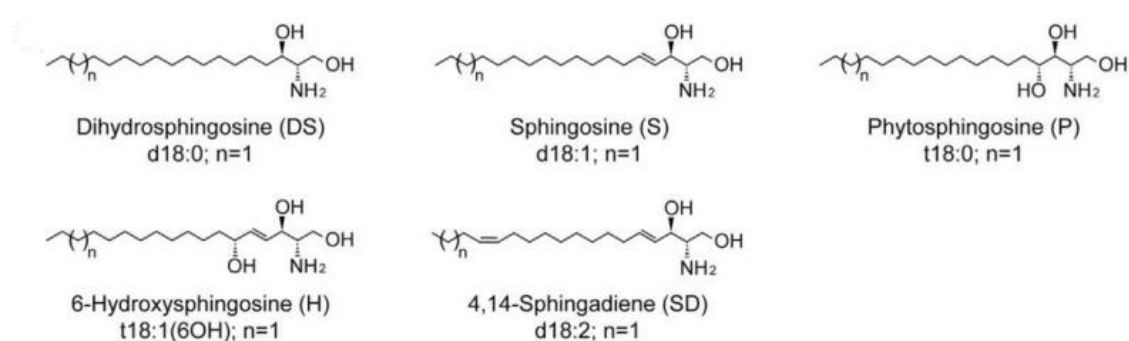
2.1 เซราไมด์

เซราไมด์ (ceramide) เป็นสารประเภทไขมันในกลุ่มของสฟิงโกลิปิด (sphingolipids) ซึ่งพบได้ทั่วไปในชั้นเยื่อหุ้มเซลล์ของสิ่งมีชีวิตทั้งในพืช สัตว์และจุลินทรีย์ โครงสร้างของเซราไมด์ประกอบด้วยสายโซ่ที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic) สองสาย คือ สฟิงกอยด์เบส (sphingoid base) เช่น สฟิงโกซีน (sphingosine) หรืออนุพันธ์อย่างใดอย่างหนึ่ง เชื่อมต่อกับกรดไขมันสายยาว (fatty acid: FAs) ด้วยพันธะเอไมด์ (ภาพที่ 1) โดยที่สายสฟิงกอยด์เบสมีหมู่ไฮดรอกซิล (hydroxyl groups) ที่ตำแหน่ง C1 และ C3 และ หมู่ของอะมิโนที่ตำแหน่ง C2 ส่วนสายของกรดไขมันสามารถแบ่งออกเป็น กรดไขมันสายสั้น, กรดไขมันสายกลาง, กรดไขมันสายยาว และ กรดไขมันสายยาวมาก (กรดไขมันที่มีคาร์บอน 22 หรือมากกว่า) ซึ่งขึ้นอยู่กับความยาวของโซ่คาร์บอน สายสฟิงกอยด์เบสในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมมีทั้งหมด 5 ชนิด คือ dihydrosphingosine, sphingosine, phytosphingosine, 6-hydroxysphingosine และ 4,14-sphingadiene โดยแต่ละชนิดมีความแตกต่างกันที่จำนวนและตำแหน่งของหมู่ไฮดรอกซิลและพันธะคู่ ดังแสดงในภาพที่ 2 (Suzuki, Ohno, & Kihara, 2022)



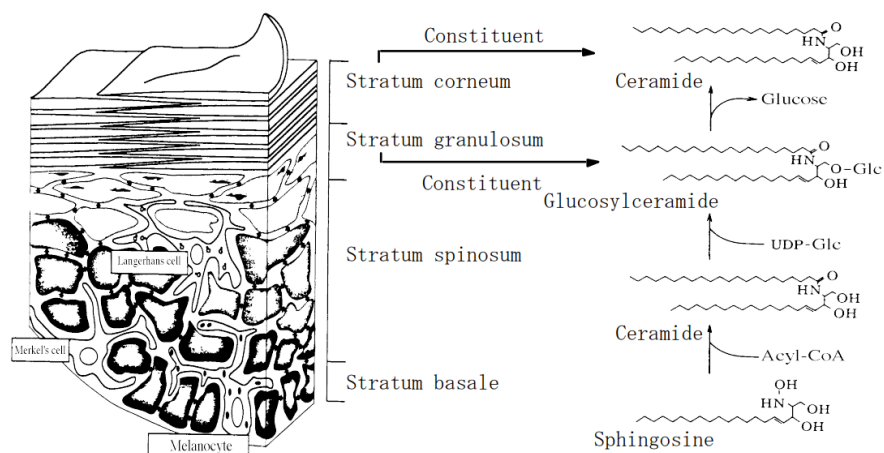
ภาพที่ 1 โครงสร้างพื้นฐานของเซราไมด์

ที่มา: Cha et al. (2016)



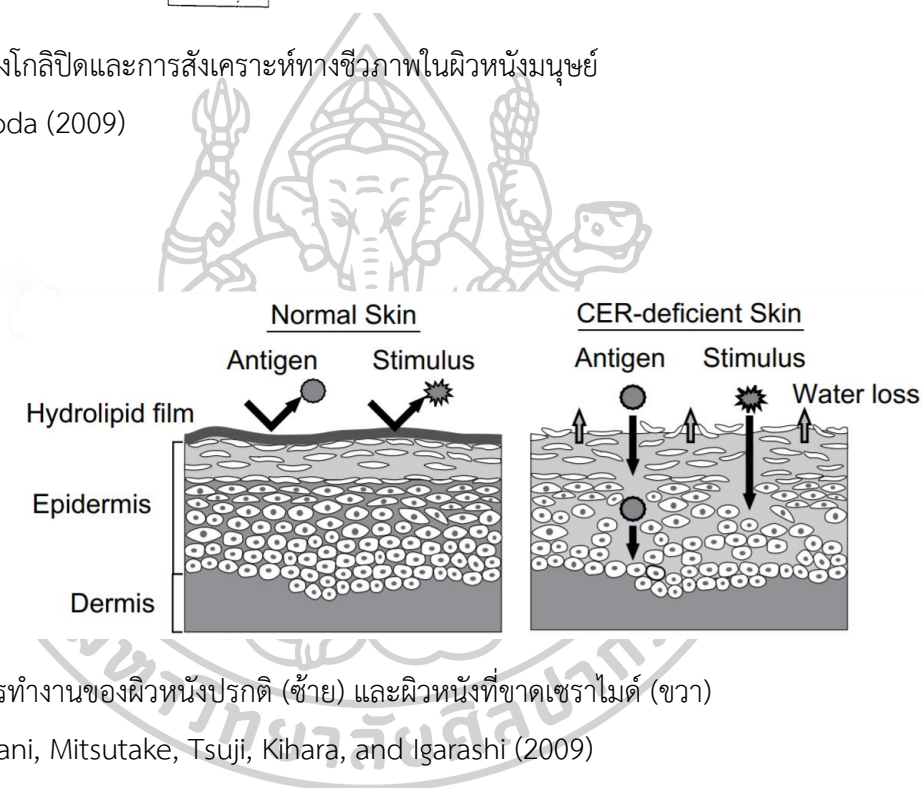
ภาพที่ 2 โครงสร้างของสายสฟิงกอยด์เบสของเซราไมด์ที่พบในมนุษย์
ที่มา: Suzuki et al. (2022)

เซราไมด์เป็นไขมันที่สำคัญและจำเป็นของชั้นผิวหนังของมนุษย์สำหรับทำหน้าที่เป็นเกราะป้องกันการซึมผ่านของผิวหนัง (skin barrier) ป้องกันการสูญเสียน้ำ การบุกรุกของเชื้อโรคจากภายนอก สารก่อภูมิแพ้ และสารเคมี ในผิวหนังของมนุษย์ประกอบด้วยหนังกำพร้า (ชั้นนอกสุดของผิวหนัง) โคเรียม (ผิวหนังชั้นกลาง) และเตลาใต้ผิวหนัง (เนื้อเยื่อใต้หนัง) ซึ่งในส่วนของหนังกำพร้าแบ่งออกเป็น 4 ชั้น ได้แก่ สตราตัมคอร์เนียม สตราตัมแกรนูโลซัม สตราตัมสปีโนซัม และสตราตัมบาเซล โดยเซราไมด์ถูกผลิตขึ้นผ่านทางสารสังเคราะห์ทางชีวภาพหลายทางในผิวหนังกำพร้าและสะสมอยู่ในชั้นสตราตัม คอร์เนียม (stratum corneum) โดยเป็นองค์ประกอบหลัก (40-60%) ของไขมันทั้งหมด (Shimoda, 2009) (ภาพที่ 3) ดังนั้นจึงมีการพบว่าหากการทำงานของเกราะป้องกันผิวหนังลดลงจะส่งผลให้เพิ่มความเสี่ยงหรือทำให้เกิดโรคติดต่อเชื้อทางผิวหนัง โรคผิวหนังบางประเภท เช่น โรคสะเก็ดเงิน (psoriasis), ผื่นภูมิแพ้ผิวหนัง (atopic dermatitis), โรคหนังเกล็ดปลา (ichthyosis) และการชราภาพของผิวหนังนั้นเกิดจากความผิดปกติของชั้นปกป้องของผิวหนังที่อาจมีสาเหตุมาจากการสูญเสียการป้องกันของแอนติเจน (ภาพที่ 4) และความแห้งของผิวหนังซึ่งสัมพันธ์กับระดับของเซราไมด์ที่ลดลง (Tessema, Gebre-Mariam, Lange, Dobner, & Neubert, 2017) นอกจากนี้ เซราไมด์ยังมีบทบาทพื้นฐานในกระบวนการทางชีววิทยา คือ เป็นตัวควบคุมที่สำคัญต่อการดื้อของอินซูลินในเนื้อเยื่อเมตาบอลิซึม สำหรับการรักษาโรคอ้วนและความผิดปกติที่เกี่ยวข้องกับโรคอ้วน เช่น เบาหวานชนิดที่ 2, หลอดเลือดแข็ง, มะเร็งบางชนิด และภาวะไขมันผิดปกติ (Turpin-Nolan & Brüning, 2020)



ภาพที่ 3 สฟิงโกลิปิดและการสังเคราะห์ทางชีวภาพในผิวหนังมนุษย์

ที่มา: Shimoda (2009)

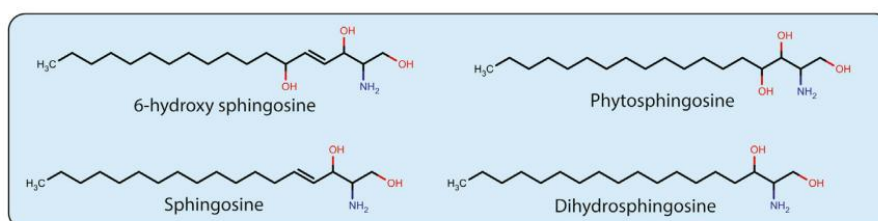
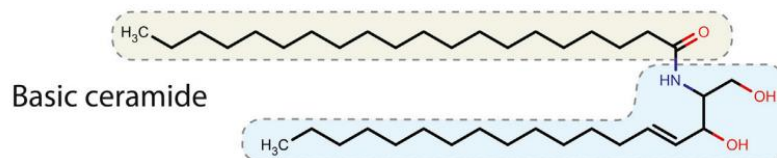
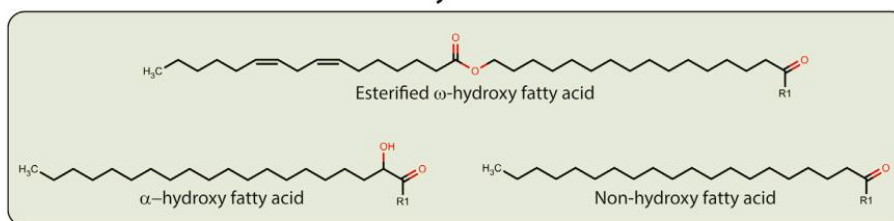


ภาพที่ 4 การทำงานของผิวหนังปกติ (ซ้าย) และผิวหนังที่ขาดเซราไมด์ (ขวา)

ที่มา: Mizutani, Mitsutake, Tsuji, Kihara, and Igarashi (2009)

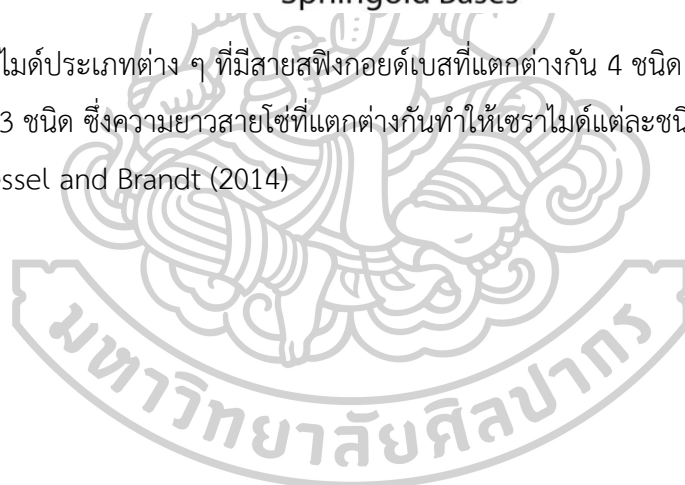
อย่างไรก็ตามองค์ประกอบของเซราไมด์ภายในชั้นสตราตัม คอร์เนียม ของมนุษย์นั้นมีความหลากหลายมาก และแตกต่างกันไปตามองค์ประกอบของหมู่ head group หรือการเกิดเอสเทอร์ฟิเคชัน (esterification) กับกรดไขมันชนิดที่ต่างกันไป โดยจากภาพที่ 5 แสดงสายสฟิงกอยด์เบสที่แตกต่างกัน 4 ชนิด และ สายของกรดไขมันที่แตกต่างกัน 3 ชนิด

Fatty Acids



Sphingoid Bases

ภาพที่ 5 เซราไมด์ประเภทต่าง ๆ ที่มีสายสฟิงกอยด์เบสที่แตกต่างกัน 4 ชนิด และ สายของกรดไขมันที่แตกต่างกัน 3 ชนิด ซึ่งความยาวสายโซ่ที่แตกต่างกันทำให้เซราไมด์แต่ละชนิดแตกต่างกัน
ที่มา: Meckfessel and Brandt (2014)



2.2 กระบวนการสร้างและสลายของสฟิงโกลิปิด

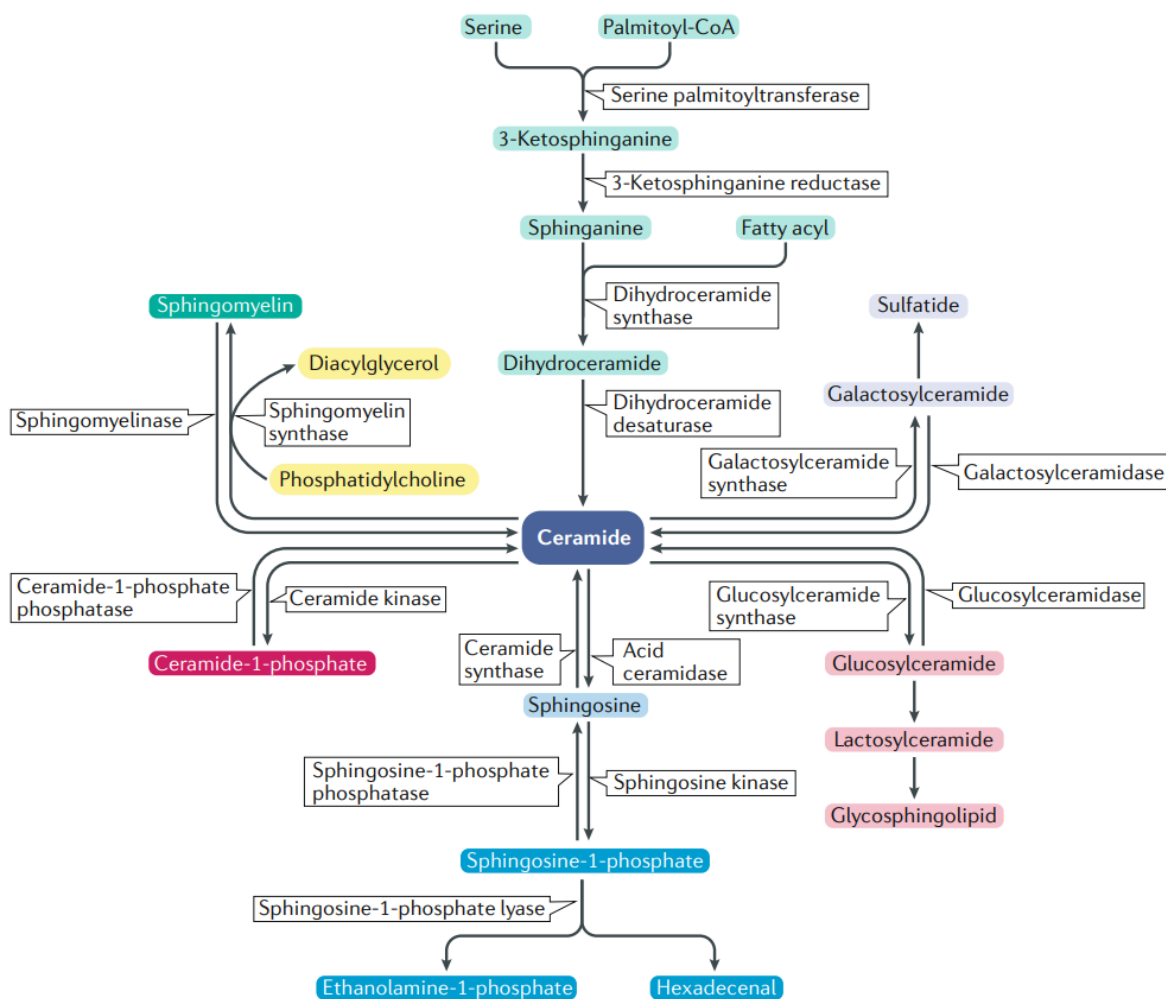
กระบวนการเมแทบอลิซึมและกระบวนการทางชีวเคมีส่วนใหญ่ของสฟิงโกลิปิดได้รับการศึกษาอย่างกว้างขวาง โดยที่กระบวนการเมแทบอลิซึมของสฟิงโกลิปิดเป็นกระบวนการของเซลล์ที่สำคัญ ซึ่งเป็นการแสดงถึงระบบที่มีการประสานงานกันและยังเชื่อมโยงกระบวนการต่างๆ เข้าด้วยกัน โดยที่มีเซราไมด์อยู่ในตำแหน่งศูนย์กลางของทั้งการสังเคราะห์ทางชีวภาพและแคทาบอลิซึม (Pralhada Rao et al., 2013) ลำดับปฏิกิริยาที่เกี่ยวข้องกับการก่อตัวของเซราไมด์และสฟิงโกลิปิดอื่น ๆ แสดงไว้ในภาพที่ 6 เซราไมด์ถูกผลิตขึ้นในเอนโดพลาสมิกเรติคูลัม (endoplasmic reticulum) ก่อนที่จะถูกส่งไปยังกอลจิคอมเพล็กซ์ (Golgi complex) ด้วยโปรตีนขนส่งเซราไมด์ (ceramide transport protein) หรือเวสิเคิลขนส่ง (vesicular transport) และสามารถแปลงเป็นสฟิงโกไมอีลินได้ (sphingomyelin) โดยกอลจิคอมเพล็กซ์ทำหน้าที่เป็นสารตั้งต้นสำหรับการผลิตสฟิงโกลิปิดเชิงซ้อน เช่น สฟิงโกไมอีลิน และ โกลโคสฟิงโกลิปิด แนวทางหลักของการสังเคราะห์เซราไมด์ คือ de novo pathway

de novo pathway เริ่มต้นด้วยการรวมตัวของซีรีน (serine) และ พาลมิตอยล์โคเอ็นไซม์เอ (palmitoyl coenzyme A) เร่งปฏิกิริยาโดยซีรีนพาลมิตอยล์ทรานสเฟอเรส (serine palmitoyltransferase) เพื่อสร้าง 3-คีโต-ไดไฮโดรสฟิงกันีน (3-keto-dihydrosphinganine) ต่อจากนั้น 3-คีโต-ไดไฮโดรสฟิงกันีน จะลดลงเพื่อสร้างสฟิงกันีน (sphinganine; d18:0) ซึ่งเป็นสฟิงกอยด์เบสที่ง่ายที่สุดที่พบในพืช (หรือ dihydrosphinganine) โดย 3-ketosphinganine reductase ในเชื้อราและพืชชั้นสูงสฟิงกันีนที่ก่อตัวขึ้นนี้จะถูกไฮดรอกซิเลต (hydroxylated) เป็นไฟโตสฟิงโกซีน (phytosphingosine) จากนั้นจึงถูกอะซิลเลต (acylated) เพื่อผลิตไฟโตเซราไมด์ (phytoceramide) ในขณะที่สฟิงกันีนในเซลล์สัตว์ จะถูกอะซิลเลตเป็นไดไฮโดรเซราไมด์ (dihydroceramide) ซึ่งต่อมาถูกทำให้อิ่มตัวจนกลายเป็นเซราไมด์ สฟิงกันีนและเอซิลของไขมันภายใต้การควบคุมของ dihydroceramide synthases (CerS) จากนั้นสังเคราะห์ ไดไฮโดรเซราไมด์ ซึ่งจะถูกลดขนาดโดย dihydroceramide desaturase เพื่อผลิตเซราไมด์ที่มีความยาวโซ่เอซิลต่างกัน

เซราไมด์ถือเป็นโมเลกุลที่เป็นศูนย์กลางของกระบวนการสร้างและสลายของสฟิงโกลิปิด และทำหน้าที่เป็นจุดแตกแขนงในวงจร มันทำหน้าที่เป็นสารตั้งต้นไม่ใช่แค่สำหรับสฟิงโกลิปิดที่ซับซ้อนเท่านั้น แต่ยังสำหรับการสร้างเซราไมด์-1-ฟอสเฟต (C1P) (สีชมพูเข้ม) และสฟิงโกซีนสามารถแปลงเป็นสฟิงโกซีน-1-ฟอสเฟต (S1P) ได้อีก (สีฟ้า)

นอกจากการสังเคราะห์ทางชีวภาพแบบ de novo pathway แล้ว เซราไมด์ยังสามารถสร้างขึ้นในเซลล์ผ่านการไฮโดรไลซิส (hydrolysis) ของสฟิงโกลิปิดที่ซับซ้อน กระบวนการไฮโดรไลติก (hydrolytic pathway) ควบคุมการสร้างของเซราไมด์จากสฟิงโกลิปิดที่ซับซ้อน เช่น จากไกลโคสฟิงโกลิปิด (glycosphingolipids) และสฟิงโกไมอีลิน ผ่านกระบวนการของไฮโดรเลส (hydrolases) และฟอสโฟไดเอสเตอเรส (phosphodiesterases) ที่จำเพาะ โดยการสร้างเซราไมด์ขึ้นใหม่จากสฟิงโกไมอีลินดำเนินการโดยเอ็นไซม์ที่จับกับเมมเบรนในพลาสมา (sphingomyelin phosphodiesterase) (สี่เขี้ยวเข็ม) การสร้างใหม่ของเซราไมด์จากไกลโคสฟิงโกลิปิดเชิงซ้อนสามารถควบคุมได้โดยการย่อยสลายแบบไลโซโซม (lysosomal) หรือไมโซโซโซม ในการย่อยสลายไลโซโซมทำให้เกิดกระบวนการแคแทบอลิซึมของไกลโคสฟิงโกลิปิด ซึ่งนำไปสู่การก่อตัวของกลูโคซิลเซราไมด์ (glucosylceramide) และกาแลคโตซิลเซราไมด์ (galactosylceramide) (สี่ขมพูอ่อน) (Hannun & Obeid, 2008; Michaelson, Napier, Molino, & Faure, 2016; Pralhada Rao et al., 2013; Turpin-Nolan & Brüning, 2020)





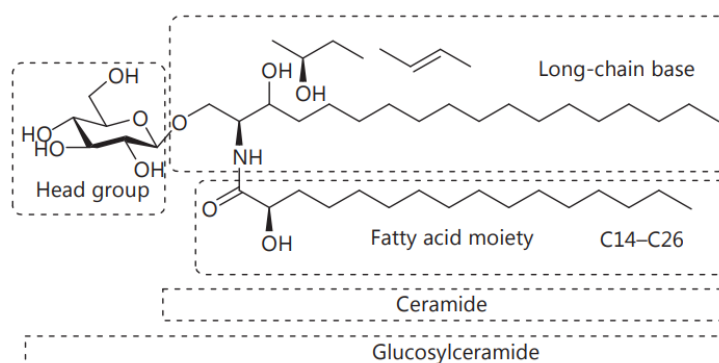
ภาพที่ 6 กระบวนการสร้างและสลายของสฟิงโกลิปิด

ที่มา: Turpin-Nolan and Brüning (2020)

2.3 เซราไมด์จากพืช

จากที่กล่าวข้างต้นหน้าที่ของเซราไมด์คือทำหน้าที่เป็นเกราะป้องกันผิวหนัง ซึ่งการลดลงของปริมาณเซราไมด์ส่งผลทำให้เกิดปัญหาทางผิวหนัง ซึ่งจากการทดลองในหนูที่มีการสร้างเซราไมด์บกพร่องพบว่าการแสดงของโรคสะเก็ดเงิน โดยคาดว่ากรทดแทนเซราไมด์ที่เหมือนกับเซราไมด์ในผิวหนังสามารถช่วยปรับความสมดุลและแก้ไข้ปัญหาของผิวหนัง (Reisberg, Arnold, Porzel, Neubert, & Dräger, 2017) แต่เดิมการสกัดเซราไมด์นิยมใช้การสกัดจากเซลล์ของสัตว์เพื่อใช้ในผลิตภัณฑ์เสริมอาหารหรือผลิตภัณฑ์บำรุงผิว แต่เนื่องจากความนิยมในสารสกัดจากสัตว์มีน้อยลง ทำให้หลังจากนั้นการผลิตเซราไมด์ที่ได้รับความนิยมอย่างมากและประสบความสำเร็จในทางการค้าคือ การสกัดเซราไมด์จากเซลล์พืช ซึ่งทำให้มีภาพลักษณ์ของการเป็นสารธรรมชาติ โดยเซราไมด์ที่พบในพืช (plant ceramides หรือ phyto-ceramides) มักอยู่ในรูปที่เซราไมด์เกาะติดกับโครงสร้างที่มีขั้ว (polar head group) ที่บริเวณ C1 ของสฟิงกอยด์เบสด้วยพันธะไกลโคซิดิก โดยสารประกอบเหล่านี้บางครั้งเรียกว่า cerebroside โดยหากโครงสร้างของเซราไมด์ต่อกับกลูโคส 1 โมเลกุลจะเรียกว่า กลูโคซิลเซราไมด์ (glucosylceramides) (ภาพที่ 7) ซึ่งโดยทั่วไปเซราไมด์ที่สกัดได้จากพืชมักจะอยู่ในรูปของกลูโคซิลเซราไมด์

ดังนั้นพืชอาจเป็นแหล่งทางเลือกที่เหมาะสมสำหรับการสกัดกลูโคซิลเซราไมด์ (Reisberg et al., 2017) และเมื่อเปรียบเทียบโครงสร้างของเซราไมด์จากพืชกับเซราไมด์ในผิวหนังจะพบว่ามีคล้ายคลึงกัน แต่มีความแตกต่างในเรื่องของความยาวสาย, รูปแบบของหมู่ OH บนสายสฟิงกอยด์เบส, ระดับความอิ่มตัวของสายสฟิงกอยด์เบส และสายกรดไขมัน ซึ่งกลูโคซิลเซราไมด์พบได้ตามธรรมชาติในธัญพืช หวี และพืชตระกูลถั่วหลายชนิด เช่น ข้าวสาลี ข้าว ข้าวโพด มันฝรั่ง มันเทศ ถั่วเหลือง และบุก (Tessema, Gebre-Mariam, Neubert, & Wohlrab, 2017)



ภาพที่ 7 โครงสร้างของกลูโคซิลเซราไมด์

ที่มา: Tessema, Gebre-Mariam, Lange, et al. (2017)

โดยทั่วไปพบว่าเซราไมด์จากพืชมีความหลากหลายมากกว่าในร่างกายของมนุษย์ และมีโครงสร้างที่คล้ายคลึงกับเซราไมด์ในผิวหนัง ดังนั้นผลิตภัณฑ์บำรุงผิวที่ผสมของเซราไมด์จากพืชจึงสามารถช่วยให้ความชุ่มชื้นและช่วยเพิ่มเกราะปกป้องผิวหนังได้ โดยมีการศึกษาพบว่าการได้รับเซราไมด์จากพืชด้วยการบริโภคหรือการทาทางผิวหนังช่วยกระตุ้นวงจรการสร้างไขมันในชั้นผิวหนังได้มากขึ้นหรือแม้แต่การเข้าไปแทนที่เซราไมด์ในผิวหนังที่สูญเสียไปในบางสภาวะของผิวหนังหรือในกรณีของการชราภาพ จากงานวิจัยของ Sugawara and Miyazawa (1999) ซึ่งได้วิเคราะห์ไขมันในส่วนต่างๆ จากตัวอย่าง พืช 48 ชนิดพบว่าค่าเฉลี่ยของเซราไมด์ (ในรูป ceramide monohexoside) มีค่า 10.1 mg/100 g Fresh weight basis (ตารางที่ 1)ในปัจจุบันยังมีความพยายามในการหาแหล่งของวัตถุดิบชนิดใหม่ ๆ สำหรับการสกัดเซราไมด์อย่างต่อเนื่องโดยเฉพาะแหล่งวัตถุดิบที่เป็นของเหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมเกษตรที่มีมูลค่าต่ำ ตัวอย่างเช่นการสกัดเซราไมด์จากวัตถุดิบที่เป็นของเหลือทิ้งในอุตสาหกรรมอาหารพบว่าเซราไมด์ในกากแอปเปิ้ล (apple pomace), จมูกข้าวสาลีและกากกาแฟสดมีปริมาณ 28.9 mg, 33.7 mg, และ 4.4 mg/ 100 g ตามลำดับ และเซราไมด์จากส่วนกากเนื้อ (pulp) และเปลือก (peel) ของส้ม Moro blood orange มีปริมาณ 140 และ 160 mg/ kg of orange ตามลำดับ

ตารางที่ 1 ปริมาณกลูโคซิลเซราไมด์ (ceramide monohexoside, CMH) ธัญพืช พืชหัว ผักและผลไม้

ตัวอย่าง	CMH	ตัวอย่าง	CMH
ธัญพืช		หัวและรากผัก	
- บาร์เลย์	14.4	- ผักเลียง	15.1
- ข้าวโพด	11.5	- รากไม้โกโบ	7.3
- ข้าว	2.5	- แครอต	1.4
- แป้งสาลี	21.0	- กลอยจีน (ฮวยข้าว)	6.2
พืชตระกูลถั่ว		- กระเทียม	5.9
- ถั่วอะซูกิ	30.3	- หัวไชเท้าญี่ปุ่น	3.4
- ถั่วเหลืองเม็ดดำ	22.2	- รากบัว	7.9
- ถั่วลันเตา	17.3	- มันฝรั่ง	3.1
- ถั่วแดง	15.8	- มันเทศ	14.1
- ถั่วเหลือง	8.0	- หัวผักกาด	5.8
ผักใบ		ผักผล	
- กะหล่ำปลี	10.0	- แตงกวา	15.9
- ผักกาดขาว	6.8	- มะเขือม่วง	14.3
- ต้นกระเทียม	6.4	- พริกพื้เมียนโต	14.8
- ผักกาดหอม	5.1	- ฟักทอง	4.6
- ผักชีฝรั่ง	4.4	- มะเขือเทศ	3.4
- ใบงาช้างม่อน	40.9	- แตงโม	1.4
- ผักโขม	13.9	ผลไม้	
ก้านผัก		- แอปเปิล	7.1
- หน่อไม้ฝรั่ง	14.5	- กล้วย	1.2
- บร็อคโคลี่	27.9	- องุ่น	7.9
- กะหล่ำดอก	18.2	- เกรปฟรุ้ต	8.9
- ขึ้นฉ่าย	2.0	- ลูกพลับญี่ปุ่น	3.8
- ต้นหอม	5.1	- กีวี	6.2
- หอมใหญ่	3.4	- เลมอน	7.3
		- ส้มซัทซูมา	4.9
		- แอปเปิ้ล	6.8
		- สตรอว์เบอร์รี่	3.4

*(mg/100g) Fresh weight basis (ข้าวบาร์เลย์ ข้าว แป้งสาลี ถั่วอะซูกิ ถั่วดำ ถั่วลันเตา ถั่วเหลือง มีหน่วยเป็น dry matter)

ที่มา: ดัดแปลงจาก Sugawara and Miyazawa (1999)

2.4 เห็ด

เห็ดอยู่ในอาณาจักรของเชื้อราและมักอาศัยอยู่ร่วมกันกับพืชชนิดอื่น ซึ่งส่วนใหญ่เป็นรากของต้นไม้บางชนิดซึ่งทั้งสองได้ประโยชน์จากความสัมพันธ์นี้ เห็ดถูกใช้เป็นอาหารตั้งแต่สมัยโบราณ และจัดเป็นอาหารประจำวันของมนุษย์ที่อุดมด้วยคุณค่าทางอาหารที่มีคุณค่าแคลอรีและไขมันต่ำ, มีกรดไขมันจำเป็น, โปรตีนจากพืช, แร่ธาตุและวิตามินสูง และจำเป็นสำหรับการเจริญเติบโตและเสริมสร้างความแข็งแรงของร่างกาย สามารถใช้ประโยชน์ในลักษณะเป็นพืช อาหาร ยารักษาโรคและอื่น ๆ (Marçal et al., 2021) รวมถึงเห็ดบางชนิดได้รับการรายงานว่าเป็นอาหารที่ใช้ประโยชน์ในการรักษาโรคซึ่งมีประโยชน์ในการป้องกันโรค เช่น ความดันโลหิตสูง, ไขมันในเลือดสูง, และมะเร็ง ลักษณะการทำงานเหล่านี้ส่วนใหญ่เป็นเพราะองค์ประกอบทางเคมี นอกจากนี้ เห็ดยังอุดมไปด้วยสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ เช่น สารประกอบฟีนอลิก โพลีคีไทด์ เทอร์ปีน ซาโปนิน เออร์โกสเตอรอล และสเตียรอยด์ ซึ่งในเห็ดสดมีน้ำในปริมาณสูง (80–94%) (Hanus, Shkrob, & Dembitsky, 2008) และเห็ดแห้งมีโปรตีนประมาณ 22% ซึ่งรวมถึงกรดอะมิโนที่จำเป็นส่วนใหญ่, ไขมันประมาณ 5% ส่วนใหญ่อยู่ในรูปของกรดไลโนเลอิก (กรดไขมันจำเป็นที่ไม่ได้สังเคราะห์ในร่างกายมนุษย์), ประมาณ 10% ถ้าเป็นแร่ธาตุ และคาร์โบไฮเดรตประมาณ 63% ส่วนใหญ่เป็นพอลิแซ็กคาไรด์ (Cheung, 2013)

ประเทศไทยเป็นประเทศเกษตรกรรมที่มีแหล่งเพาะเห็ดที่หลากหลาย นอกจากนี้จากเหนือจรดใต้ของประเทศไทยยังอุดมไปด้วยเห็ดป่าและเห็ดที่เพาะเลี้ยง ซึ่งเป็นส่วนประกอบหลักของอาหารไทยมากมาย (Wunjuntuk et al., 2022) ความหลากหลายชนิดและคุณค่าทางโภชนาการที่สูงของเห็ด ส่งผลให้ความต้องการของตลาดมีแนวโน้มเพิ่มขึ้น นอกจากนี้ในช่วง ปี ค.ศ. 2000 ถึง 2018 การผลิตเห็ดทั่วโลกเพิ่มขึ้นจาก 4,19 เป็น 8,99 ล้านตัน/ปี ปัจจุบันมีเห็ดมากกว่า 20 ชนิดที่ปลูกในเชิงพาณิชย์ อย่างไรก็ตามการจำหน่ายเห็ดสดในเชิงพาณิชย์มีความท้าทายที่สำคัญ เนื่องจากเป็นผลิตภัณฑ์อาหารที่เน่าเสียง่ายและมักจะสูญเสียคุณภาพทันทีหลังการเก็บเกี่ยว และเห็ดมีคุณสมบัติบางอย่างที่ส่งเสริมการย่อยสลายอย่างรวดเร็วของพวกมัน คือมีความชื้นสูง, pH เป็นกลาง, อัตราการหายใจสูง, ฤทธิ์ของเอนไซม์ในระดับสูง และการเจริญของจุลินทรีย์ การเสื่อมสภาพคุณภาพของเห็ดส่งผลให้เกิดการสูญเสียความชื้น รสชาติและสารอาหาร การเปลี่ยนสี การเปลี่ยนแปลงของเนื้อสัมผัส รวมถึงน้ำหนักของเห็ดลดลงส่งผลให้มูลค่าทางเศรษฐกิจลดลง (Marçal et al., 2021) จึงเป็นสาเหตุหลักที่ทำให้เห็ดที่เก็บเกี่ยวมาแล้วไม่สามารถขายได้ และทำให้มีเศษเหลือเป็นจำนวนมาก ซึ่งเศษเหลือเหล่านี้ไม่มีมูลค่าทางการตลาดและโดยทั่วไปนิยมนำไปใช้เป็นอาหารสัตว์ปีกหรือทำปุ๋ยหมักซึ่งมี

มูลค่าต่ำจึงต้องการเพิ่มมูลค่าของเห็ด โดยแนวทางในการเพิ่มมูลค่าอย่างหนึ่งที่เป็นไปได้สูง คือการสกัดสารที่มีมูลค่าสูง โดยสารที่มีความเป็นไปได้ในการสกัดเชิงพาณิชย์คือกลูโคซิลเซราไมด์

2.5 กลูโคซิลเซราไมด์จากเห็ด

กลูโคซิลเซราไมด์สามารถพบได้ในพืช เชื้อรา และสัตว์ แม้ว่าจะมีความแตกต่างที่ชัดเจนเกี่ยวกับโครงสร้างสฟิงกอยด์เบสของเซราไมด์ในสิ่งมีชีวิตเหล่านี้ กลูโคซิลเซราไมด์เป็นโมเลกุลที่สามารถพบมากในเห็ดเช่นกัน (Wen & Jing, 2022)

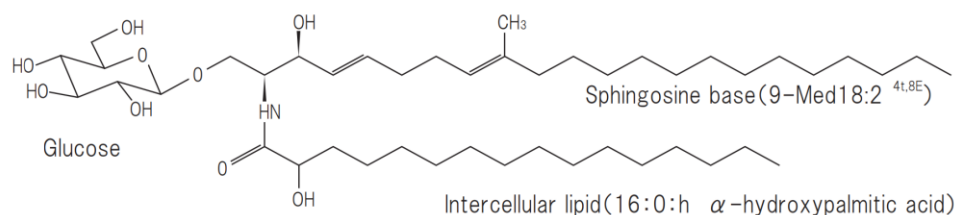
Meng et al. (2012) ศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดจากเห็ดนางรมสีทอง (*Pleurotus Citrinopileatus* Singer) สำหรับเครื่องสำอางสำหรับผิวหน้า โดยผลของการศึกษาแสดงให้เห็นว่าเห็ดนางรมสีทองมีฤทธิ์ต้านการสร้างเม็ดสี สารต้านอนุมูลอิสระ สารต้านจุลินทรีย์ และสารต่อต้านไฮยาลูโรนิก และจากการตรวจสอบองค์ประกอบที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพทำให้สามารถแยกสารต้านจุลินทรีย์ได้ คือ กลูโคซิลเซราไมด์

นอกจากนี้เซราไมด์จากเห็ดได้รับการศึกษาในเชิงวิชาการจากบริษัท North Life ประเทศญี่ปุ่น ซึ่งศึกษาการสกัดเซราไมด์จากเห็ด Tamogi (*Pleurotus cornucopiae* var. *citrinopileatus*) และพบว่ากลูโคซิลเซราไมด์จากเห็ด Tamogi มีโครงสร้างที่มีน้ำหนักโมเลกุลเป็น 727 g/mol (ภาพที่ 9)



ภาพที่ 8 เห็ด Tamogi

ที่มา: www.northlife.co.jp

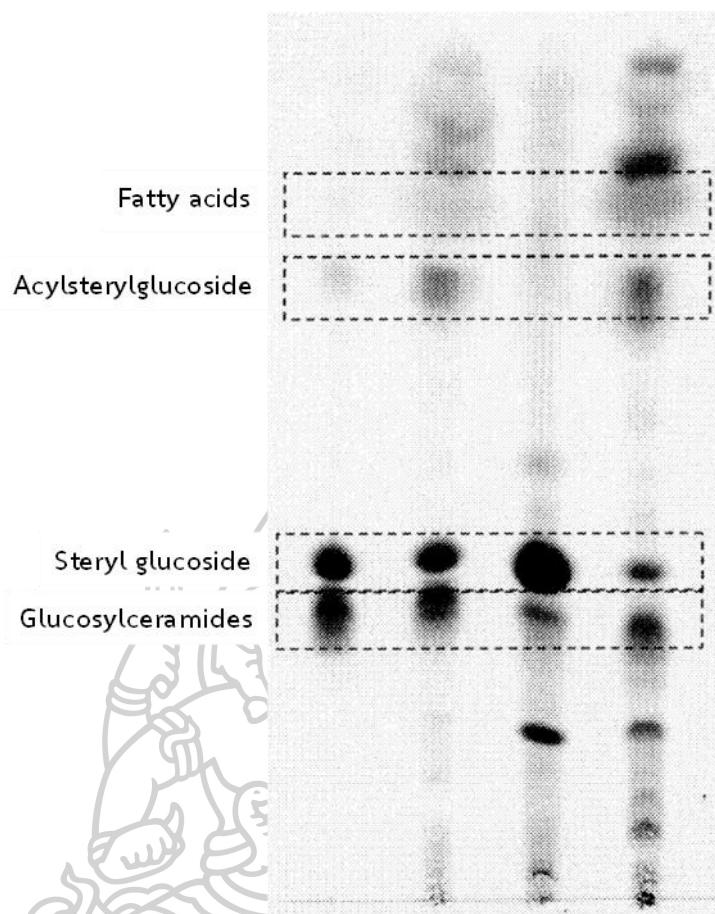


ภาพที่ 9 โครงสร้างของกลูโคซิลเซราไมด์จากเห็ด Tamogi

ที่มา: www.northlife.co.jp

2.6 การสกัดกลูโคซิลเซราไมด์จากพืช

การแยกองค์ประกอบของไขมันออกจากพืชนั้นเป็นขั้นตอนแรกในการวิเคราะห์ไขมันและเป็นขั้นตอนสำคัญในการกำจัดส่วนประกอบของไขมันทั้งหมดในพืชที่ใช้ในการวิเคราะห์ การเลือกตัวทำละลายที่เหมาะสมเป็นอีกขั้นตอนที่สำคัญในระหว่างการสกัดไขมัน (Mumtaz, Zubair, Khan, & Niaz, 2020) โดยทั่วไปแล้วการสกัดไขมันชนิดที่เป็นกลาง (neutral lipid) ที่เป็นไขมันสะสม เช่น ไตรกลีเซอไรด์นั้น นิยมใช้ตัวทำละลายที่ไม่มีขั้ว เช่น เฮกเซน ไดเอทิลอีเทอร์ หรือคลอโรฟอร์ม แต่หากเป็นไขมันที่อยู่ในส่วนเยื่อหุ้มเซลล์ซึ่งมักจะมีความเป็นขั้วสูงกว่ามักจะต้องใช้ตัวทำละลายที่มีความเป็นขั้วสูงขึ้น เช่น เอทานอล หรือเมทานอล เซราไมด์เป็นกลุ่มของไขมันที่มีความเป็นขั้วปานกลาง (medium polarity lipid) และวิธีการที่ใช้ในการสกัดไขมันจากพืชที่นิยมใช้โดยใช้ตัวทำละลายคือ คลอโรฟอร์มและเมทานอลในอัตราส่วน 2:1 v/v หรือที่เรียกว่า Folch's method (Folch, Lees, & Stanley, 1957) ซึ่งมีประสิทธิภาพมากในการแยกฟอสโฟลิปิดและไขมันที่เป็นกลางออกจากตัวอย่าง แต่เนื่องจากคลอโรฟอร์มส่งผลอันตรายต่อสุขภาพ ตัวอย่างเช่น dichloromethane/methanol จึงมีการศึกษาสารละลายอื่นมาใช้ในการสกัดแทนเซราไมด์และกลูโคซิลเซราไมด์จะมีองค์ประกอบอื่นที่ไม่ต้องการปนอยู่ เช่น ไตรกลีเซอไรด์ ไตรกลีเซอไรด์ โมโนกลีเซอไรด์ กรดไขมัน สเตอรอลกลูโคไซด์ (steryl glucoside) และ ฟอสโฟลิปิด (ภาพที่ 10) และเนื่องจากเซราไมด์เป็นกลุ่มของไขมันที่มีความเป็นขั้วปานกลางดังนั้นในการสกัดเซราไมด์ด้วยตัวทำละลายประเภทแอลกอฮอล์เป็นตัวทำละลายที่นิยม เนื่องจากแอลกอฮอล์จะมีความเป็นขั้วสูงซึ่งสามารถสกัดไขมันกลุ่มไตรกลีเซอไรด์ได้ต่ำจึงทำให้ลดการเจือปนของสารสกัดเซราไมด์ที่สกัดจากตัวอย่างได้มาก



ภาพที่ 10 ผลการวิเคราะห์ TLC แสดงองค์ประกอบที่พบในสารสกัดจาก (ข้าวไปขาว) จมูกข้าวโพด
รำข้าว หัวบุก และรำข้าวสาลี
ที่มา: Yunoki and Ohnishi (2011)

ปัจจุบันสามารถพบผลิตภัณฑ์ที่ใช้เซราไมด์เป็นองค์ประกอบโดยเฉพาะในรูปแบบของเครื่องสำอางบำรุงผิว และผลิตภัณฑ์เสริมอาหารที่วางขายในเชิงพาณิชย์ ดังตัวอย่างในภาพที่ 11



ผลิตภัณฑ์เสริมอาหารผสมเซราไมด์จากข้าวสาลี



ครีมให้ความชุ่มชื้นผสมเซราไมด์จากสับปะรด



ผลิตภัณฑ์เสริมอาหารผสมเซราไมด์จากหัวบุก



ครีมบำรุงผิวผสมเซราไมด์จากเห็ด



ช็อกโกแลตผสมเซราไมด์จากข้าวสาลี



ผลิตภัณฑ์เสริมอาหารผสมเซราไมด์จากพีช

ภาพที่ 11 ตัวอย่างผลิตภัณฑ์ที่ผสมเซราไมด์จากพืช

2.7 ทำบริสุทธิ์เฮราไมด์จากพืช

สารสกัดหยาบที่ได้มาจากการสกัดพืชด้วยตัวทำละลายโดยทั่วไปจะมีเฮราไมด์ผสมอยู่ในน้อยมากและยังมีองค์ประกอบอื่นที่ไม่ต้องการอยู่ด้วยในปริมาณมาก จึงต้องมีกระบวนการในการทำให้เฮราไมด์มีความบริสุทธิ์มากขึ้น ซึ่งกระบวนการในการทำให้บริสุทธิ์ไขมันที่สกัดได้จากพืชเพื่อให้มีปริมาณเฮราไมด์ที่สูงขึ้น สามารถใช้หลักการดังต่อไปนี้ (Work & Work, 1972)

(1) การแบ่งละลายในตัวทำละลาย (solvent partition) เทคนิคการแยกโดยใช้การแบ่งละลาย คือ การใช้ตัวทำละลายที่ผสมกันไม่ได้สองตัวในกรวยแยกเป็นหลัก และสารประกอบจะถูกกระจายในตัวทำละลายทั้งสองตัว โดยสารประกอบที่ต้องการจะสามารถละลายในตัวทำละลาย A หรือตัวทำละลาย B มากกว่ากัน วิธีนี้ค่อนข้างใช้งานง่ายและมีประสิทธิภาพสูงเป็นขั้นตอนแรกของการแยกสารประกอบออกจากสารสกัดหยาบของผลิตภัณฑ์ธรรมชาติในวงกว้าง โดยทั่วไปสารสกัดจากธรรมชาติ เช่น พืชจะถูกสกัดด้วยตัวทำละลายที่มีขี้ เช่น เฮกเซน ไดเอทิลอีเทอร์ คลอโรฟอร์ม เป็นต้น ตามด้วยตัวทำละลายที่มีขี้มากขึ้น เช่น เมทานอล หรือ เอทานอล ซึ่งขึ้นอยู่กับสารเคมีและลักษณะทางกายภาพของสารประกอบที่ต้องการ (Otsuka, 2008) เนื่องจากโครงสร้างในไขมันส่วนที่เป็นขี้ทำให้ไขมันกลุ่มไกลโคสฟิงโกลิพิด ซึ่งรวมถึงเฮราไมด์นั้นอยู่ในกลุ่มที่เป็นไขมันมีขี้ปานกลาง สามารถถูกแยกออกจากไขมันที่เป็นกลางได้ดีด้วยการใช้การแบ่งละลายในเอทานอล 87% กับตัวทำละลายที่ไม่มีขี้ อย่างเช่น เฮกเซน หรือ petroleum ether

(2) การแยกส่วนด้วยตัวทำละลาย (Solvent fractionation) เป็นวิธีที่ง่ายที่สุดและบางครั้งก็มีประสิทธิภาพมากที่สุดในการแยกกลุ่มของไขมันที่สนใจ วิธีการนี้ขึ้นอยู่กับความสามารถในการละลายที่แตกต่างกันของไขมันในตัวทำละลายอินทรีย์ การตกตะกอนของอะซิโตนใช้เพื่อแยกไขมันที่มีขี้ (ฟอสโฟลิพิดและไกลโคลิพิด) ออกจากไขมันที่เป็นกลางหรือไม่มีขี้ (ไตรกลีเซอไรด์ คอเลสเตอรอล เม็ดสีบางชนิด) Vandana, Karuna, Vijayalakshmi, and Prasad (2001) ทดลองการแยกเลซิดินจากถั่วเหลืองโดยใช้สารละลายอะซิโตนแบบเย็น และส่วนของอะซิโตนที่แยกออกมาได้นั้นเป็นส่วนหนึ่งของไขมันที่เป็นกลาง

(3) การดูดซับแบบถังกวน (stirred batch adsorption) การใช้ซิลิกาเจลในการดูดซับและคายดูดซับ (adsorption-desorption) แบบถังกวนเป็นอีก รูปแบบหนึ่งของการใช้ซิลิกาเจลโดยอาศัยคุณสมบัติ คือ ซิลิกาเจลเป็นเฟสคงที่ที่นิยมใช้กับคอลัมน์โครมาโตกราฟีซิลิกาเจลคืออนุภาคของซิลิกาไดออกไซด์ ในรูปที่เป็นอนุฐานที่มีรูพรุนโดยที่ผิวหน้าจะมีพันธะ Si-OH ซึ่งทำให้ซิลิกาเจลเป็น

ตัวดูดซับที่มีความเป็นขั้ว (polar) สูง ซิลิกาเจลที่ใช้ในงานโครมาโตกราฟีแบบคอลัมน์เป็นซิลิกาเจลที่มีขนาดเล็ก 70 – 230 mesh (63 – 200 μm) และ 230 – 400 mesh (40 – 63 μm) แม้ว่าโดยทั่วไปแล้วการใช้ซิลิกาเจลแบบดังกล่าวจะมีประสิทธิภาพต่ำกว่าการใช้คอลัมน์แต่อาจจะใช้เป็นกระบวนการขั้นต้นเพื่อกำจัดไขมันบางกลุ่มออกจากตัวอย่างได้เนื่องจากมีชั้นตอนที่มีความซับซ้อนน้อยกว่า Fabian, Gunawan, Kasim, Chiang, and Ju (2009) ได้ใช้การการดูดซับแบบดังกล่าวด้วยซิลิกาเจลในการแยกไขมันไม่มีขั้ว (non-polar lipid) ออกจากส่วนที่ได้จากการกลั่นเพื่อกำจัดกลิ่นของน้ำมันถั่วเหลือง (soybean oil deodorizer distillate) โดยใช้ซิลิกาเจลขนาด 60-200 μm กวนผสมกับตัวอย่างในตัวทำละลายเฮกเซน พบว่าสามารถแยกไขมันไม่มีขั้วโดยเฉพาะแยก fatty acid steryl esters ได้ 96.39% และแยก squalene ได้ 100% ดังนั้นการดูดซับด้วยซิลิกาเจลแบบดังกล่าวอาจเป็นวิธีหนึ่งในการกำจัดไขมันส่วนที่ไม่มีขั้วออกจากสารสกัดเฮราไมด์ได้แต่ยังไม่เคยมีรายงานมาก่อน

2.8 วิธีการวิเคราะห์เฮราไมด์

ไขมันจากพืชมีส่วนประกอบของไขมันประเภทต่าง ๆ อยู่อย่างซับซ้อนรวมถึงอนุพันธ์ของไขมัน ทำให้เทคนิคการวิเคราะห์เพียงวิธีเดียวจึงไม่เพียงพอที่จะแยกและระบุสารประกอบทั้งหมดที่มีอยู่ในไขมัน ซึ่งการวิเคราะห์เฮราไมด์จึงอาจจำเป็นต้องใช้ทั้งการวิเคราะห์เฮราไมด์รวมเชิงคุณภาพ/เชิงปริมาณ และการวิเคราะห์องค์ประกอบของเฮราไมด์ ดังนั้นเพื่อจุดประสงค์นี้จึงใช้เทคนิคในการวิเคราะห์ที่แตกต่างกัน เช่น โครมาโตกราฟีแบบผิวนาง (thin-layer chromatography) หรือ โครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (High-performance liquid chromatography) (Mumtaz et al., 2020)

2.9.1 การวิเคราะห์เฮราไมด์ด้วยโครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (High-performance liquid chromatography:HPLC)

HPLC ใช้กันอย่างแพร่หลายในการระบุและหาปริมาณของไขมันจากพืชได้อย่างแม่นยำ โดยอาศัยหลักการแยกสารประกอบที่สนใจที่ผสมอยู่ในตัวอย่าง ซึ่งจะเกิดขึ้น ระหว่าง 2 เฟส คือ เฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) กับ เฟสอยู่กับที่ (stationary phase หรือ column phase) ซึ่งสารจะถูกแยกออกมาในเวลาที่แตกต่างกันขึ้นอยู่กับความสามารถในการเข้ากันได้ดีของสารนั้นกับ mobile phase หรือ stationary phase สารประกอบตัวไหนที่สามารถเข้ากันได้ดีกับ mobile phase จะ

เคลื่อนที่ผ่าน column ได้เร็วกว่าสารนั้นก็จะถูกแยกออกมาก่อน ส่วนสารที่เข้ากันได้ไม่ดีกับ mobile phase แต่เข้ากันดีกับ stationary phase จะเคลื่อนที่ผ่าน column ได้ช้าจะถูกแยกออกมาทีหลัง โดยสารที่ถูกแยกออกมาจะผ่านเครื่องตรวจวัดสัญญาณ (detector) ออกมาในรูปแบบที่เรียกว่า โครมาโตแกรม (chromatogram)

การวิเคราะห์เซราไมด์เชิงปริมาณนิยมใช้การวิเคราะห์ด้วยโครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC) ซึ่งเครื่องตรวจวัดที่มีความแม่นยำที่สุดในการวิเคราะห์ส่วนผสมของไขมันที่ซับซ้อน คือ tandem mass spectrometry หรือ MS/MS แต่เนื่องจากเครื่อง tandem mass spectrometry มีค่าใช้จ่ายสูง HPLC-ELSD จึงถูกนำมาใช้กันอย่างแพร่หลายในการวิเคราะห์ไขมันและยังเป็นเครื่องมือที่สะดวกสำหรับการวิเคราะห์ไขมันเชิงปริมาณ (Wang, Wang, & Fehr, 2006) ซึ่งเครื่องตรวจวัดแบบ Evaporative Light Scattering Detector (ELSD) สามารถตรวจวัดสารกลุ่มไขมันได้หลากหลายและเป็นที่ยอมรับมากแบบหนึ่ง โดยคอลัมน์สำหรับการแยกองค์ประกอบต่างๆ นั้นสามารถใช้ได้ทั้งแบบ normal phase และ reversed phase

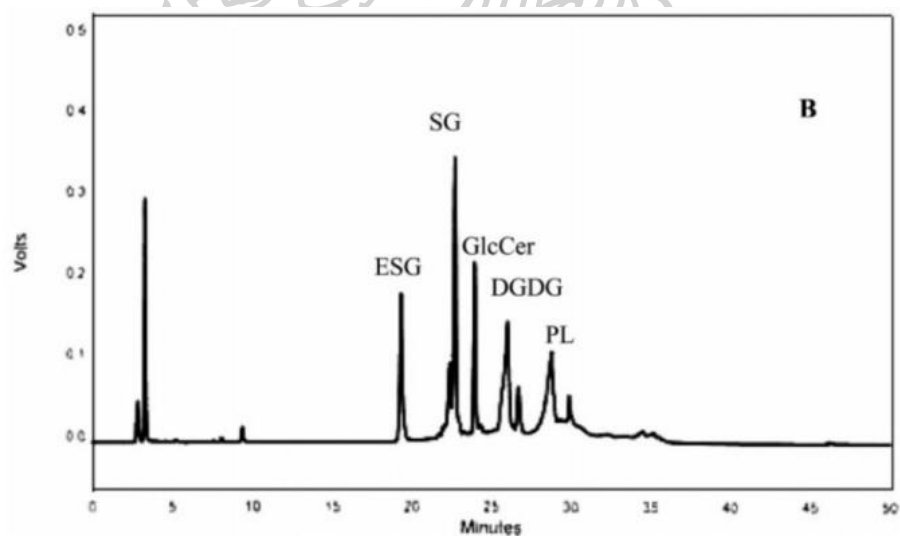
Wang et al. (2006) ใช้ HPLC-ELSD ในการวิเคราะห์กลูโคซิลเซราไมด์ (GlcCer) ในถั่วเหลืองโดยใช้คอลัมน์เป็น Chromegasphere Si 60 column ใช้เฟสเคลื่อนที่ 2 ชนิดเป็น methanol/methyl tert-butyl ether (75:25, v/v) และ hexane/tetrahydrofuran (99:1, v/v) แบบ gradient โดยเฟสเคลื่อนที่แบบ gradient แสดงในตารางที่ 2 และลักษณะของโครมาโตแกรมแสดงออกมามีภาพที่ 12 โดยพีกต่างๆ คือ ESG, esterified sterylglucoside; SG, sterylglucoside; GlcCer, glucosylceramide; MGDG, monogalactosyl diacylglycerol; DGDG, digalactosyl diacylglycerol

ตารางที่ 2 การตั้ง gradient ของเฟสเคลื่อนที่ในการวิเคราะห์เซราไมด์

time, min	composition of mobile phase ^a	
	A, %	B, %
0	94	6
2	94	6
6	91	9
21	89	11
22	88	12
30	88	12
38	0	100
48	0	100
49	94	6
59	94	6

^a A was hexane, and B was 2-propanol/ethyl acetate/88% formic acid (50:50:0.5, v/v). Mobile phase flow rate was 0.65 mL/min.

ที่มา: Wang et al. (2006)



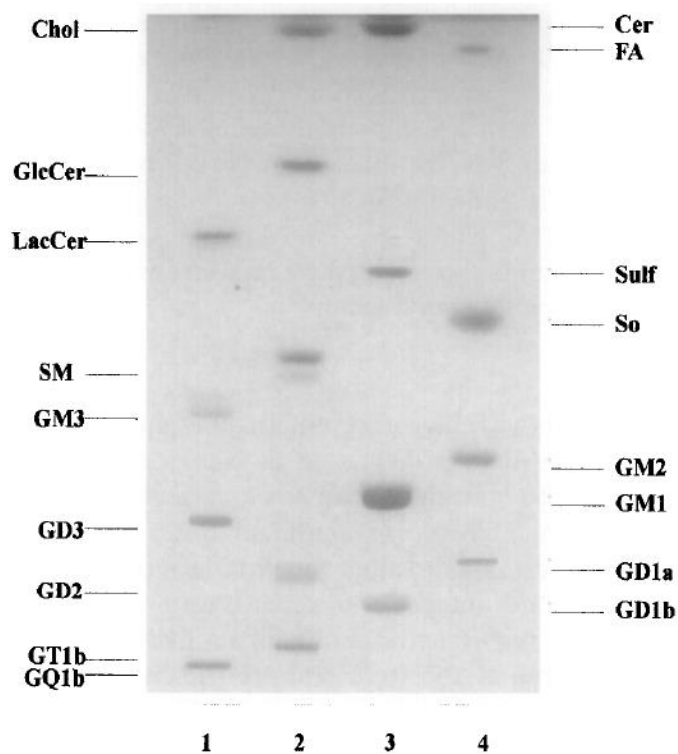
ภาพที่ 12 โครมาโตแกรมจาก HPLC-ELSD ของสารสกัดจากเมล็ดถั่วเหลืองที่ผ่านการทำบริสุทธิ์ ด้วยคอลัมน์ซิลิกา

ที่มา: Wang et al. (2006)

2.9.2 การวิเคราะห์เซราไมด์ด้วยโครมาโตกราฟีแบบผิบบาง (thin layer chromatography)

เทคนิคโครมาโตกราฟีแบบผิบบางเป็นเทคนิคโครมาโตกราฟีที่มีการใช้กันมาอย่างยาวนานในห้องปฏิบัติการเคมี Echten-Deckert (2000) ได้อธิบายรายละเอียดการตรวจสอบสฟิงโกลิพิดซึ่งรวมถึงเซราไมด์ด้วยเทคนิค TLC โดยใช้แผ่น TLC ชนิด silica gel 60 ที่ผ่านการทำแห้งโดยวางในโถดูดความชื้นภายใต้สุญญากาศข้ามคืนก่อนใช้ จากนั้นตัวอย่างประมาณไม่เกิน 50 μL จะถูกปล่อยให้บนแผ่น TLC เป็นแถบกว้าง 0.5-1 cm ด้วยหลอดคาปิลลารี สำหรับตัวทำละลายที่ใช้ในการแยกสารคือคลอโรฟอร์ม-เมทานอล-น้ำ (หรือสารละลายเกลือ) โดยในการวิเคราะห์ TLC จะต้องควบคุมขนาดของโถบรรจุตัวทำละลาย อุณหภูมิ และปิดโถให้สนิทและป้องกันการสิ้นระเหยระหว่างการวิเคราะห์ เนื่องจากจะส่งผลต่อการแยกของสาร ตัวทำละลายที่เตรียมใหม่จะถูกเติมลงในโถให้ได้ความสูงประมาณ 0.5-1 cm โดยก่อนการวางแผ่น TLC จะปล่อยให้ตัวทำละลายเกิดการสมดุลในโถประมาณ 60 นาที รวมถึงการใส่กระดาษกรองรอบโถเพื่อช่วยให้เกิดสมดุลของไอน้ำตัวทำละลาย หลังจากการแยกสารไขมันต่างๆ แล้วจึงทำการย้อมสี (staining) ไขมันซึ่งอาจทำได้โดยใช้ cupric sulfate ในสารละลายกรดฟอสฟอริก ฟันและนำไปอบแห้งที่ 150-180°C เป็นเวลา 15 นาที ตัวอย่างการแยกไขมันบนแผ่น TLC แสดงดังภาพที่ 13 เป็นการแยกโดยใช้ตัวทำละลายเป็น คลอโรฟอร์ม-เมทานอล-0.22% CaCl_2 (60:35:8 v/v/v) และย้อมด้วย cupric sulfate ในสารละลายกรดฟอสฟอริก





ภาพที่ 13 แผ่น TLC แสดงการแยกเซราไมด์ (GlcCer), กรดไขมันโอเลอิกม โคลสเตอรอล (Chol) และสารไขมันอื่นๆ

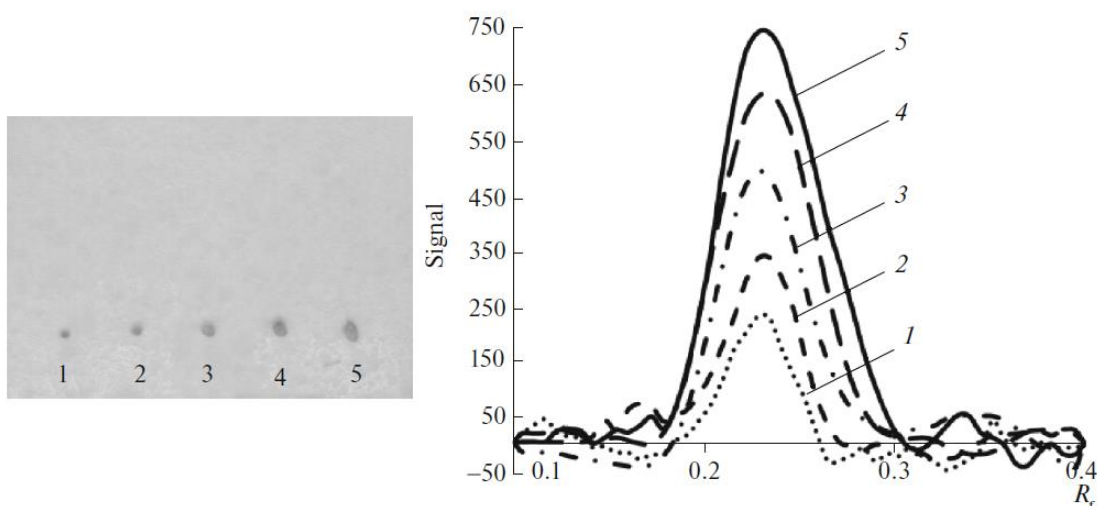
ที่มา: Yunoki and Ohnishi (2011)

ในการสกัดเซราไมด์จากลูกพีชของ Okayasu, Kobayashi, Kuroda, Yamakawa, and Niu (2016) ใช้สภาวะในการวิเคราะห์ TLC โดยสังเขปดังนี้ ละลายตัวอย่างสารสกัดด้วยคลอโรฟอร์ม-เมทานอล (2:1 v/v) ให้ได้ความเข้มข้น 20 mg/mL หรือละลายสารมาตรฐานให้ได้ 2 mg/mL แผ่น TLC ชนิด Silica Gel GF 250 μm 10 x 20 cm และใช้ตัวอย่าง 1 μL สำหรับตัวทำละลายเป็นคลอโรฟอร์ม-เมทานอล-กรดอะซีติก-น้ำ (20:3.5:2.3:0.7 v/v/v) หลังจากแยกสารแล้วจึงนำแผ่น TLC ออกมาวางจนแห้งใช้กรดซัลฟูริก 50% ฟ่น และนำไปให้ความร้อน 150°C เป็นเวลา 6 นาที และวิเคราะห์เชิงปริมาณด้วยเครื่อง Densitometer โดยเทียบกับสารมาตรฐานที่ใช้

2.9.3 การวิเคราะห์เซราไมด์ TLC เชงปริมาณด้วยการวิเคราะห์ภาพถ่าย

แม้ว่าโดยทั่วไป TLC เป็นเทคนิคโครมาโตกราฟีที่ใช้เพื่อวิเคราะห์เชิงคุณภาพว่ามีสารที่สนใจอยู่หรือไม่ หรือใช้ในการเตรียมสารบริสุทธิ์ที่ได้หลังจากการแยก แต่การวิเคราะห์เชิงปริมาณสามารถทำได้ด้วยการใช้เครื่อง Densitometer ซึ่งสามารถวัดปริมาณของสารที่แยกออกเป็นแถบต่างๆ ได้ด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นที่ต้องการ การวิเคราะห์ภาพถ่าย (image analysis) ถูกนำมาใช้ในการวิเคราะห์ TLC เชงปริมาณในกรณีที่ไม่มีเครื่อง Densitometer โดยการย้อมสีสารที่แยกบนแผ่น TLC แล้วใช้การถ่ายภาพและวัดความเข้มของแถบสีด้วยซอฟต์แวร์

Skowron, Zakrzewski, and Ciesielski (2016) ได้ศึกษาการวิเคราะห์ sphingomyelin ซึ่งเป็นสารในกลุ่มของฟอสโฟลิพิดด้วยการใช้ TLC ควบคู่กับการวิเคราะห์ภาพถ่ายหลังจากทำปฏิกิริยาให้เกิดสีด้วย molybdenum blue โดยนำแผ่น TLC มาสแกนด้วยเครื่องสแกนแบบสำนักงานทั่วไปและวิเคราะห์ภาพด้วยซอฟต์แวร์เฉพาะทาง TLSee เพื่อเปลี่ยนให้เป็นโครมาโตแกรม (ภาพที่ 14) ซึ่งพบว่าสามารถใช้พื้นที่ใต้พีก (peak area) ในการสร้างกราฟมาตรฐานที่มีค่า $R^2 = 0.9994$ และมีค่า limit of detection และ limit of quantification เป็น 0.5 และ 1.7 $\mu\text{g}/\text{spot}$ ตามลำดับ



ภาพที่ 14 ตัวอย่างโครมาโตแกรมจากการวิเคราะห์ sphingomyelin ความเข้มข้น 1-2.5, 2-5.0, 3-10, 4-15, 5-20 $\mu\text{g}/\text{spot}$

ที่มา: Skowron et al. (2016)

บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการดำเนินงานวิจัย

3.1 วัสดุ อุปกรณ์ และ สารเคมี

- 3.1.1. เห็ดสด 4 ชนิด ชื้อจากฟาร์มเห็ด อ.โพธาราม จ.ราชบุรี
 - เห็ดหูหนู (*Auricularia auricula-judae*)
 - เห็ดฟาง (*Volvariella volvacea*)
 - เห็ดนางฟ้า (*Pleurotus pulmonarius*)
 - เห็ดนางรม (*Pleurotus ostreatus*)
- 3.1.2. สารมาตรฐานกลูโคซิลเซราไมด์ (99%, Glucosylceramide from Rice, Nagara Science, Gifu, Japan)
- 3.1.3. เครื่องระเหยสารแบบหมุนภายใต้สุญญากาศ (RV10, IKA, Staufen, Germany)
- 3.1.4. เครื่องชั่งน้ำหนักทศนิยม 2 ตำแหน่ง (TP-3002, Denver Instrument, Göttingen, Germany)
- 3.1.5. เครื่องชั่งน้ำหนักทศนิยม 4 ตำแหน่ง (ED 224S, Sartorius, Göttingen, Germany)
- 3.1.6. เครื่องชั่งน้ำหนักทศนิยม 5 ตำแหน่ง (AP125WD, Shimadzu, Kyoto, Japan)
- 3.1.7. เครื่องบดตัวอย่างแห้ง (hammer mill) (PX-MFC 90D, Polymix®, Kinematica, Luzern, Switzerland)
- 3.1.8. ตู้อบลมร้อน (FD 115, Binder, Tuttlingen, Germany)
- 3.1.9. เครื่องอบแห้งแบบถาด
- 3.1.10. ชุดเครื่องมือสำหรับสกัดเซราไมด์ในห้องปฏิบัติการ ซึ่งประกอบด้วย
 - อ่างสแตนเลส
 - ขดลวดให้ความร้อนขนาด 1,600 วัตต์
 - เครื่องควบคุมอุณหภูมิ (Nanasiam Intertrade, Bangkok, Thailand)
 - เทอร์โมคัปเปิล ชนิด K
 - เครื่องกวนสารแบบใบกวน (RW 20 digital, IKA, Staufen, Germany)
 - ใบพัดกวนสาร (PTFE coated, Ø 8.5 cm of blade, M2 Scientifics, Holland, MI, USA)
 - ขวดกั้นกลม 3 คอ (5 L, Duran, Mainz, Germany)

- รีฟลักซ์คอนเดนเซอร์แบบแก้วไส้ตรงขนาดยาว 30 เซนติเมตร
 - เทอร์โมมิเตอร์แบบดิจิทัล (52 II, Fluke, Everett, WA, USA)
- 3.1.11. ชุดกรองสุญญากาศประกอบด้วย
- ขวดรูปแอปเปิ้ล (1,000 mL, Pyrex, Tewksbury, MA, USA)
 - กรวยกรอง
 - ปัมป์แรงดันสุญญากาศ
 - กระดาษกรอง (No.5, pore size $\sim 2 \mu\text{m}$, Whatman, Kent, UK)
- 3.1.12. เครื่องโฮโมจีไนเซอร์ (T 25D, IKA, Germany)
- 3.1.13. ultrasonic bath (275DAE, CREST, Malaysia)
- 3.1.14. เครื่องกวนแม่เหล็ก (magnetic stirrer) (Model 6 CH, Progress Technical, Pathum Thani, Thailand)
- 3.1.15. เครื่อง High performance liquid chromatography (HPLC) ประกอบด้วย
- Solvent delivery module (LC-20AD, Shimadzu, Kyoto, Japan)
 - System controller (CBM-20A, Shimadzu, Kyoto, Japan)
 - คอลัมน์ชนิด Normal phase (4.6 \times 250 mm, \varnothing 5 μm , Inertsil SIL-100A, GL sciences, Tokyo, Japan)
 - ELSD Detector (ELSD-LTII, Shimadzu, Kyoto, Japan)
- 3.1.16. เมทานอล (Merck, Darmstadt, Germany)
- 3.1.17. คลอโรฟอร์ม (99.8%, RCI Labscan, Bangkok, Thailand)
- 3.1.18. คอปเปอร์ซัลเฟต (Ajax Finechem, Auckland, New Zealand)
- 3.1.19. กรดฟอสฟอริก (85%, RCI Labscan, Bangkok, Thailand)
- 3.1.20. เฮกเซน (RCI Labscan, Bangkok, Thailand)
- 3.1.21. อะซิโตน (RCI Labscan, Bangkok, Thailand)
- 3.1.22. 95% เอทานอล (Liquor distillery organization, Chachoengsao, Thailand)
- 3.1.23. Microsyringe สำหรับ GC ขนาด (10 μL , Hamilton, Reno, NV, USA)
- 3.1.24. Microsyringe สำหรับ HPLC (100 μL , Hamilton, Reno, NV, USA)
- 3.1.25. TLC chamber

3.1.26. แผ่นซิลิกาเจลสำหรับ TLC (silica gel 60, glass support, 20 x 20 cm F254, 250 μm)

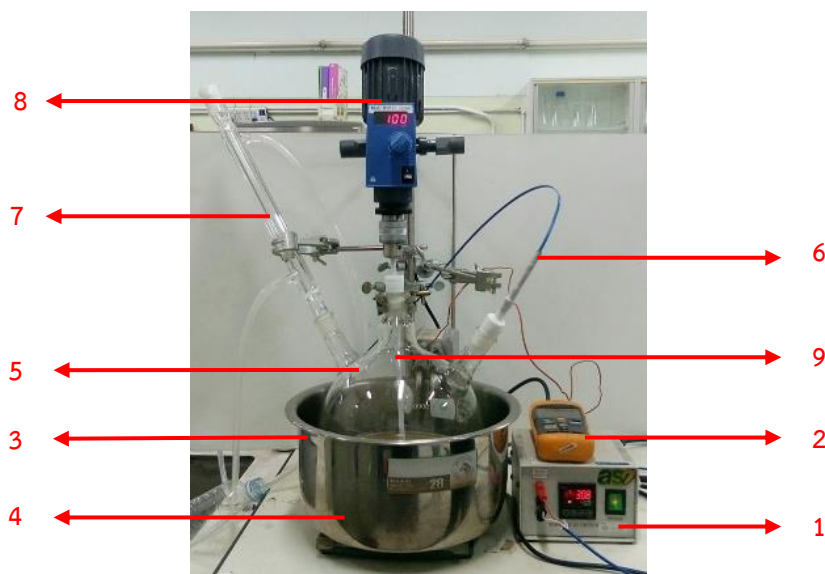
3.1.27. ซิลิกาเจล 60 (0.063-0.200 mm, Sigma-Aldrich, Canada)

3.2 การวิเคราะห์ปริมาณกลูโคซิลเซราไมด์ในเห็ดกินได้ชนิดต่าง ๆ

จัดซื้อเห็ดสดทั้ง 4 ชนิด (มีอายุอยู่ในช่วง 3-4 วัน เริ่มนับจากวันที่ก้อนเห็ดติดดอกเป็นวันที่ 1) ทั้งหมด 3 รอบ (3 ซ้ำ) รอบละ 2 กิโลกรัม เตรียมตัวอย่างเพื่อนำไปใช้สกัด โดยนำเห็ดสดมาล้างทำความสะอาดและตัดให้เป็นชิ้นเล็ก ๆ จากนั้นนำไปอบแห้งเพื่อลดความชื้นด้วยตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง (วิธีหาปริมาณความชื้นแสดงในภาคผนวก ก) แล้วนำมาบดละเอียดด้วยเครื่องบดตัวอย่างแห้ง (hammer mill) โดยใช้ตะแกรงขนาด 1 มิลลิเมตร และจัดเก็บเห็ดผงในถุงอะลูมิเนียมพอยล์ปิดสนิทใส่ไว้ในตู้ดูดความชื้นจนกว่านำมาใช้งาน

สกัดตัวอย่างเห็ดผงโดยใช้อัตราส่วนในการสกัดคือ 1 ส่วนตัวอย่าง ต่อ 95% เอทานอล 10 ส่วน โดยชั่งเห็ดผง 25 g ใส่ลงไปในขวดปริมาตรก้านกลม 3 คอ แล้วเติมเอทานอล 95% ลงไป 250 มิลลิลิตร สกัดโดยใช้ชุดเครื่องมือสำหรับสกัดเซราไมด์แบบรีฟลักซ์ในห้องปฏิบัติการตามภาพที่ 15 สกัดที่ 40 องศาเซลเซียส กวนตัวอย่างที่ 100 รอบต่อนาที เป็นเวลา 240 นาที ดัดแปลงมาจาก Kuwata et al. (2017) และ Khuwijitjaru and Klinchongkon (2021) เมื่อครบเวลานำมากรองแยกสารสกัดกับตัวอย่างเห็ดผงด้วยชุดกรองสุญญากาศโดยใช้กระดาษกรองเบอร์ 5 ทำให้ได้สารสกัดใสสีเหลือง จากนั้นนำสารสกัดที่ได้มาระเหยแห้งด้วยเครื่องระเหยสารแบบหมุนภายใต้สุญญากาศที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ความดันสุญญากาศ -720 มิลลิเมตรปรอท เป็นเวลาประมาณ 1 ชั่วโมง และเพื่อกำจัดตัวทำละลายที่ยังอาจหลงเหลืออยู่จึงนำสารสกัดหยาบมาอบแห้งด้วยเครื่องอบลมร้อนที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง แล้วชั่งน้ำหนักสารสกัดหยาบที่ได้เพื่อคำนวณหาปริมาณผลผลิตสารสกัดหยาบ (yield) โดยเทียบกับน้ำหนักแห้งของเห็ด (dry basis) ดังแสดงในสมการที่ 1 จากนั้นนำสารสกัดหยาบไปวิเคราะห์ปริมาณกลูโคซิลเซราไมด์ด้วยเทคนิค TLC

$$\text{ปริมาณผลผลิตสารสกัดหยาบ (g/100 g mushroom d.b.)} = \frac{\text{น้ำหนักสารสกัดหยาบหลังทำแห้ง (g)}}{\text{น้ำหนักแห้งของเห็ด (g)}} \times 100 \quad (1)$$



ภาพที่ 15 อุปกรณ์สำหรับการสกัดเซราไมด์ในห้องปฏิบัติการ

(1) เครื่องควบคุมอุณหภูมิ, (2) เทอร์มิเตอร์แบบดิจิทัล, (3) อ่างสเตนเลส, (4) ขดลวดให้ความร้อนขนาด 1,600 วัตต์ (อยู่ในอ่างสเตนเลส), (5) ขวดก้นกลม 3 คอ ขนาด 5 ลิตร, (6) เทอร์โมคัปเปิลชนิด K, (7) รีฟลักซ์คอนเดนเซอร์แบบแก้วไส้ตรงขนาดยาว 30 เซนติเมตร, (8) เครื่องกวนสารแบบใบกวน, (9) ใบพัดกวนสาร

3.3 การวิเคราะห์ปริมาณกลูโคซิลเซราไมด์ในเห็ดนางรมที่มีอายุแตกต่างกัน

จัดซื้อเห็ดนางรมสดทั้ง 3 ช่วงอายุ ได้แก่ อายุ 1-2 วัน, อายุ 3-4 วัน และ อายุ 5-6 วัน (ภาพช่วงอายุละ 3 รอบ (3 ซ้ำ) รอบละ 3 กิโลกรัม ในตารางที่ 7) สาเหตุที่เลือกสามช่วงอายุนี้เพราะว่าในช่วงอายุ 3-4 วันจะเป็นช่วงที่ทานกันทั่วไป จึงเลือกช่วงก่อนคืออายุที่ 1-2 (เพิ่งเจริญเติบโต) และช่วงหลังคืออายุ 5-6 (แก่เกินที่จะทาน) เตรียมตัวอย่างเพื่อนำไปใช้สกัด เช่นเดียวกับหัวข้อ 3.2 โดยนำเห็ดสดมาล้างทำความสะอาดและตัดให้เป็นชิ้นเล็กๆ จากนั้นนำไปอบแห้งเพื่อลดความชื้นด้วยตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำมาบดละเอียดด้วยเครื่องบดตัวอย่างแห้งโดยใช้ตะแกรงขนาด 1 มิลลิเมตร จากนั้นนำไปวิเคราะห์ปริมาณกลุ่มสารและจัดเก็บเห็ดผงในถุงอะลูมิเนียมฟอยล์ปิดสนิทใส่ไว้ในตู้ดูดความชื้นจนกว่านำมาใช้งาน

3.4 การศึกษาการเพิ่มความเข้มข้นของกลูโคซิลเซราไมด์จากสารสกัดหยาบเห็ดนางรมโดยการดูดซับ-คายดูดซับด้วยซิลิกาเจล

เตรียมตัวอย่างสารละลายสารสกัดหยาบเห็ดนางรมโดยใช้อัตราส่วนของสารสกัดหยาบ 1 ส่วน ต่อซิลิกาเจล 10 ส่วน โดยซึ่งสารสกัดหยาบ 0.1 กรัม ลงในขวดแก้วแบบฝาเกลียว ขนาด 10 มิลลิลิตร แล้วเติมซิลิกาเจล 1 กรัม และเติมตัวทำละลายผสมระหว่างเฮกเซนและอะซิโตน ลงไป 5 มิลลิลิตร โดยอัตราส่วนของเฮกเซนและอะซิโตน (v/v) เป็น 10:0, 9:1, 8:2, 7:3, 6:4, 5:5, 4:6, 3:7, 2:8, 1:9 และ 0:10 ใส่แท่งแม่เหล็กกวนสารลงในขวด จากนั้นกวนด้วยเครื่องกวนแม่เหล็ก เป็นเวลา 10 นาที ที่ความเร็ว 800 รอบต่อนาที (กวนขณะปิดฝาขวด) เมื่อครบเวลาดังที่ไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที เพื่อให้ซิลิกาเจลตกลงที่ด้านล่างของขวด จากนั้นดูดสารละลายด้านบนออก ต่อมาให้เติมตัวทำละลายผสมเดิมลงไป 5 มิลลิลิตร แล้วกวนเป็นเวลา 10 นาที เหมือนเดิม โดยในขั้นตอนนี้ทำซ้ำทั้งหมด 3 รอบ และในรอบที่ 4 ให้เติมสารละลายเอทานอลลงไป 10 มิลลิลิตร เพื่อชะสารที่ถูกดูดซับไว้ในซิลิกาเจล กวนเป็นเวลา 10 นาที ที่ความเร็ว 800 รอบต่อนาที จากนั้นนำสารละลายที่มีปริมาตรรวมในแต่ละขั้นตอนเท่ากับ 5 มิลลิลิตร ไปวิเคราะห์ปริมาณกลูโคซิลเซราไมด์ด้วยเทคนิค TLC โดยในแต่ละอัตราส่วนทำซ้ำทั้งหมด 3 ซ้ำ

3.5 การศึกษาการใช้ซิลิกาเจลในสัดส่วนที่แตกต่างกันในการเพิ่มความเข้มข้นของกลูโคซิลเซราไมด์จากสารสกัดหยาบเห็ดนางรมด้วยการดูดซับ-คายดูดซับด้วยซิลิกาเจล

เตรียมตัวอย่างสารละลายสารสกัดหยาบเห็ดโดยซึ่งสารสกัดหยาบ 0.5 กรัม ลงในขวดขนาด 10 มิลลิลิตร แล้วเติมสารละลายเฮกเซน 5 มิลลิลิตร นำไปผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง ultrasonic bath เป็นเวลา 5 นาที แยกส่วนที่สามารถละลายในสารละลายเฮกเซน (1) และส่วนที่ไม่สามารถละลายในเฮกเซน (2) ออกจากกัน โดยนำส่วน (1) มากวนโดยเติมซิลิกาเจลปริมาณต่าง ๆ กัน ได้แก่ 0.25, 0.5, 1.0 และ 1.5 กรัม กวนด้วยเครื่องกวนแม่เหล็ก เป็นเวลา 30 นาที ที่ความเร็ว 800 รอบต่อนาที (กวนขณะปิดฝาขวด) เมื่อครบเวลาดังที่ไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที เพื่อให้ซิลิกาเจลตกลงที่ด้านล่างของขวด จากนั้นดูดแยกสารละลายด้านบนออก และนำส่วนซิลิกาเจลไปสกัดด้วยเครื่อง Soxhlet โดยใช้สารละลายเอทิลอะซิเตท เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จะได้สารสกัดออกมา ในส่วนของ (2) นำไปละลายด้วยเมทานอลและผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง ultrasonic bath จากนั้นนำสารละลายที่ได้ไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิค TLC และหาปริมาณกลูโคซิลเซราไมด์เทคนิค HPLC-ELSD โดยในแต่ละอัตราส่วนทำซ้ำทั้งหมด 3 ซ้ำ

3.6 การวิเคราะห์ทางเคมี

3.5.1 การวิเคราะห์ปริมาณกลุ่มสาร (Proximate analysis) ดัดแปลงจาก AOAC
(รายละเอียดแสดงในภาคผนวก ก)

3.5.2 การวิเคราะห์ปริมาณกลูโคซิลเซราไมด์ด้วยเทคนิคโครมาโตกราฟีแบบชั้นบาง (TLC)
(Skowron et al., 2016)

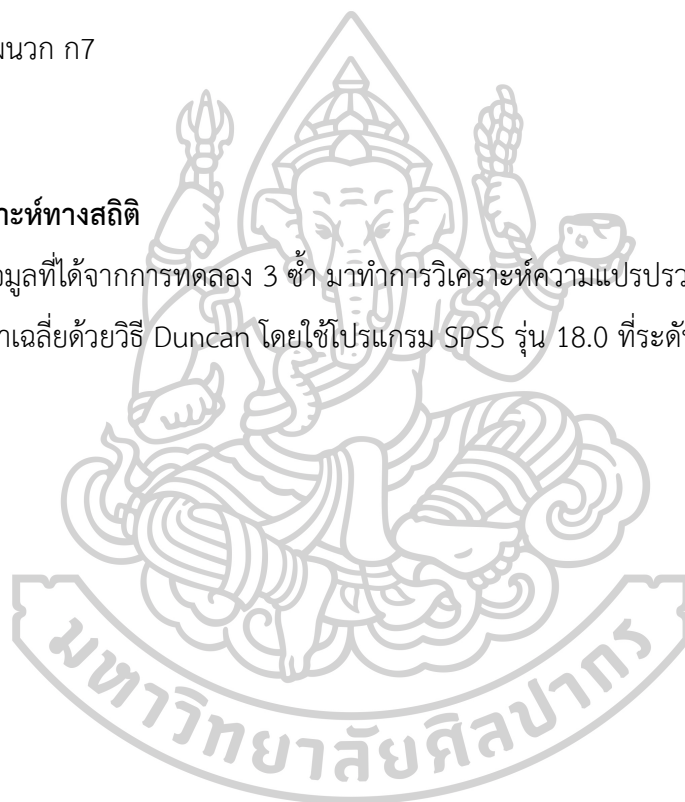
เตรียมสารละลายที่ต้องการวิเคราะห์โดยละลายสารสกัดหยาบในสารละลายผสมระหว่างคลอโรฟอร์ม:เมทานอล (2:1 v/v) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร และผสมให้เข้ากันโดยใช้เครื่องโฮโมจีไนเซอร์ (T 25D, IKA) ที่ความเร็ว 6000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที แล้วจึงใช้เข็มฉีดยาสำหรับ GC ดูดสารละลายปริมาตรรอบละ 2 ไมโครลิตร นำสารละลายที่ได้ฉีดให้เป็นเส้นตรงตามแนวระนาบบนแผ่น TLC เป็นเส้นตรงที่มีความยาวประมาณ 1 เซนติเมตร และรอจนแห้งแล้วฉีดซ้ำจนได้ 6 ไมโครลิตร จากนั้นนำแผ่น TLC วางลงใน TLC chamber (ขนาด 6×25×25 ซม.) ที่อิมมูบิลิตี้ด้วยสารละลายผสมระหว่างคลอโรฟอร์ม 85 มิลลิลิตรของ และเมทานอล 15 มิลลิลิตร ปิดฝา chamber ให้สนิท ปล่อยให้เกิดการแยกของสารตัวอย่าง โดยสารละลายเป็นตัวพาตัวอย่างไปบนแผ่น TLC เป็นระยะทาง 16 เซนติเมตร จากนั้นนำแผ่น TLC ออกมา (หลังจากผ่านไปประมาณ 1.30 ชั่วโมง) และปล่อยให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง สเปรย์สารละลายคอปเปอร์ซัลเฟตลงบนแผ่น TLC ให้ชุ่มทั้งแผ่น ปล่อยให้แผ่น TLC แห้งที่อุณหภูมิห้องประมาณ 1 ชั่วโมง จากนั้นนำไปอบด้วยตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 150 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จึงถ่ายภาพแผ่น TLC ด้วยกล้องดิจิทัล Fujifilm X-M1 และนำไปวิเคราะห์ภาพถ่ายหาปริมาณกลูโคซิลเซราไมด์ด้วยโปรแกรม ImageJ ดังรายละเอียดในภาคผนวก ก6

3.5.3 การวิเคราะห์ปริมาณกลูโคซิลเซราไมด์ด้วยเทคนิคโครมาโตกราฟีของเหลว ประสิทธิภาพสูง (HPLC-ELSD)

เตรียมสารละลายที่ต้องการวิเคราะห์โดยละลายตัวอย่างลงในสารละลายผสมระหว่าง
คลอโรฟอร์ม:เมทานอล (2:1 v/v) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร และผสมให้เข้ากันโดยใช้เครื่องโฮโม
จีไนเซอร์ที่ความเร็ว 6000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที กรองสารละลายผ่าน PTFE
syringe filter ขนาด 0.45 ไมโครเมตร แล้วฉีดตัวอย่างปริมาตร 20 ไมโครลิตรเข้าสู่เครื่อง
HPLC สภาวะที่ใช้วิเคราะห์เซราไมด์ในสารสกัดหยาบจากเห็ด แสดงรายละเอียดใน
ภาคผนวก ก7

3.7 การวิเคราะห์ทางสถิติ

นำข้อมูลที่ได้จากการทดลอง 3 ซ้ำ มาทำการวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) และ
เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan โดยใช้โปรแกรม SPSS รุ่น 18.0 ที่ระดับ $\alpha = 0.05$



บทที่ 4

ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง

4.1 ปริมาณความชื้นและลักษณะปรากฏของเห็ดทั้ง 4 ชนิด

ในการวิเคราะห์ปริมาณกลูซิโอสตราไมด์ของเห็ด 4 ชนิด ได้แก่ เห็ดหูหนู เห็ดฟาง เห็ดนางฟ้า และเห็ดนางรม เริ่มจากการเตรียมตัวอย่าง โดยการทำแห้งเห็ดสดที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ด้วยเครื่องอบแห้งแบบถาดเป็นเวลา 24 ชั่วโมง และบดเป็นผงละเอียด จากการหาปริมาณความชื้นของทั้งเห็ดสดและเห็ดอบแห้งบดละเอียด พบว่าตัวอย่างเห็ดสดมีค่าความชื้น อยู่ในช่วง 88 -94% w.b. และตัวอย่างเห็ดอบแห้งบดละเอียดมีปริมาณความชื้นอยู่ในช่วง 6 - 14% w.b. ดังตารางที่ 3

เห็ดส่วนใหญ่มีความชื้นสูงและเนื้อสัมผัสที่ละเอียดอ่อน จึงไม่สามารถเก็บไว้ได้นานกว่า 24 ชั่วโมง ในสภาวะแวดล้อมที่เป็นเขตร้อน เพราะในเห็ดสดมีความชื้นที่สูง ซึ่งปริมาณความชื้นในอาหารสูงมากเท่าไร ความชื้นในอาหารก็จะยิ่งลดลงเร็วขึ้นเท่านั้น เนื่องจากการทำงานของจุลินทรีย์และการคายน้ำของเห็ด จึงเป็นสาเหตุหลักที่ทำให้เห็ดเสื่อมเสียได้ง่าย และเห็ดสดจะแปรสภาพ เช่น เปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล เหี่ยวเฉา กลายเป็นของเหลว สูญเสียเนื้อสัมผัส กลิ่น รสชาติ ฯลฯ ทำให้ไม่สามารถขายได้ (Djamila, Iswahyono, & Bahariawan, 2020; Wakchaure, 2011)

ตารางที่ 3 ปริมาณความชื้นของเห็ดหูหนู เห็ดฟาง เห็ดนางฟ้า และเห็ดนางรม

ตัวอย่าง	ปริมาณความชื้น (% w.b.)	
	เห็ดสด	เห็ดผงแห้ง
เห็ดหูหนู	94.43 ± 0.24	7.13 ± 0.03
เห็ดฟาง	90.57 ± 0.04	14.14 ± 0.03
เห็ดนางฟ้า	88.63 ± 0.23	6.17 ± 0.01
เห็ดนางรม	88.65 ± 0.33	7.58 ± 0.03

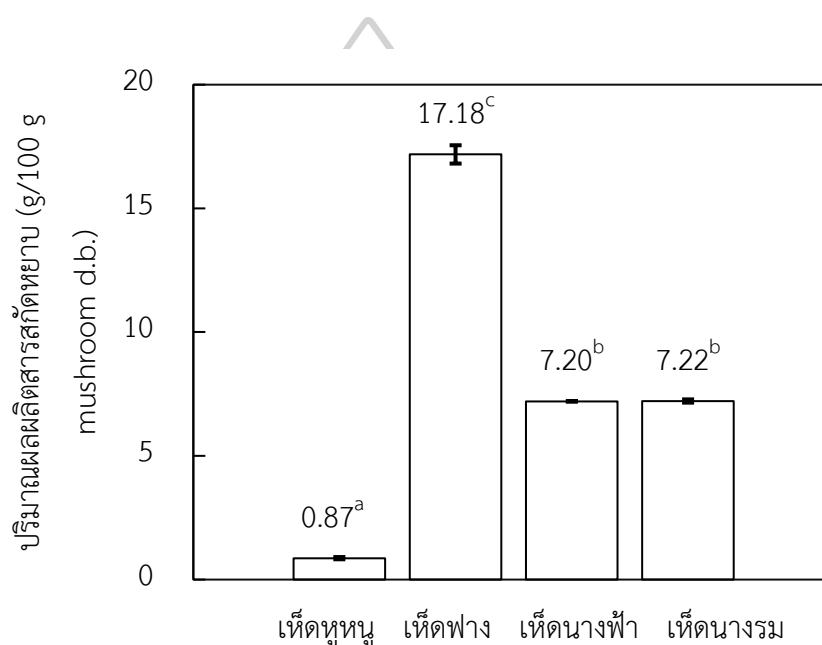
ลักษณะปรากฏของเห็ดสด เห็ดอบแห้งบดละเอียดและสารสกัดหยาบจากเห็ดทั้ง 4 ชนิด ดังภาพที่ 16 โดยลักษณะปรากฏของสารสกัดหยาบหลังจากนำไประเหยเพื่อกำจัดเอทานอลออกไปแล้วของเห็ดหูหนูเป็นของเหลวข้นสีน้ำตาลอ่อน มีปริมาณที่น้อยมาก ลักษณะสารสกัดหยาบจากเห็ดฟางมีลักษณะเป็นของเหลวข้นสีน้ำตาลแดงเข้ม ลักษณะสารสกัดหยาบจากเห็ดนางฟ้าและเห็ดนางรมมีลักษณะจับตัวเป็นก้อนของแข็งและมีสีเหลืองทอง



ภาพที่ 16 ลักษณะปรากฏของเห็ดหูหนู เห็ดฟาง เห็ดนางฟ้า และเห็ดนางรม

4.2 ปริมาณผลผลิตของสารสกัดหยาบและปริมาณกลูโคซิลเซราไมด์ของเห็ดทั้ง 4 ชนิด

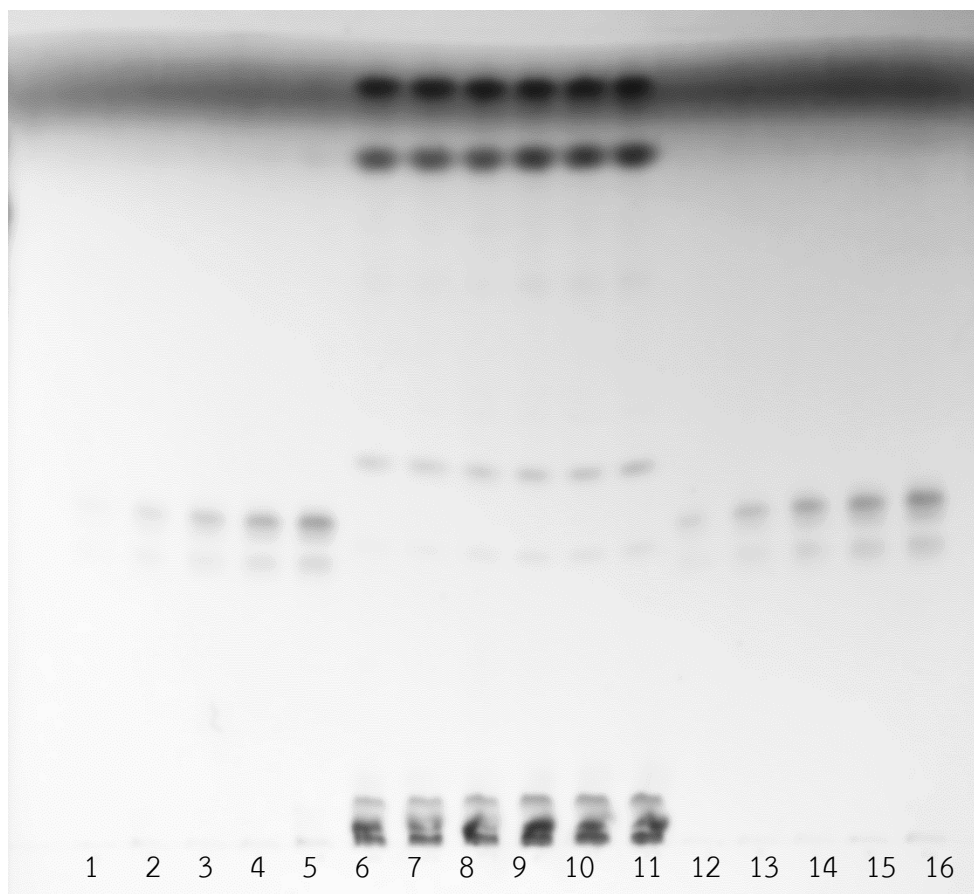
ผลการวิเคราะห์ปริมาณผลผลิตของสารสกัดหยาบจากการสกัดด้วย เอทานอล 95% ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 240 นาที (ภาพที่ 17) พบว่าเห็ดฟางให้ผลผลิตสารสกัดหยาบสูงสุดคือ 17.18 กรัมต่อ 100 กรัมเห็ดแห้ง ตามด้วยเห็ดนางฟ้าและเห็ดนางรมซึ่งมีมีผลผลิตของสารสกัดหยาบไม่แตกต่างกันคือประมาณ 7 กรัมต่อ 100 กรัมเห็ดแห้ง ในขณะที่เห็ดหูหนูให้ปริมาณผลผลิตสารสกัดหยาบต่ำสุดเพียง 0.87 กรัมต่อ 100 กรัมเห็ดแห้ง



ภาพที่ 17 ผลผลิตของสารสกัดหยาบของเห็ดหูหนู เห็ดฟาง เห็ดนางฟ้า และเห็ดนางรม ตัวอักษรกำกับที่แตกต่างกันหมายถึงค่าเฉลี่ยมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (Duncan, $\alpha = 0.05$)

จากนั้นนำสารสกัดหยาบที่ได้มาวิเคราะห์เพื่อหาปริมาณกลูโคซิลเซราไมด์ด้วยเทคนิค TLC ร่วมกับการวิเคราะห์ด้วยภาพถ่าย จากภาพที่ 18 ในแถบ 1 - 5 และ 12 - 16 เป็นสารกลูโคซิลเซราไมด์มาตรฐานปริมาณต่าง ๆ และแถบ 6 - 11 เป็นตัวอย่างสารสกัดหยาบจากเห็ด (จากภาพเป็นแถบของสารสกัดจากเห็ดนางฟ้าและเห็ดนางรม สารสกัดละ 3 ซ้ำ) จะเห็นว่าเมื่อแถบที่มีปริมาณของกลูโคซิลเซราไมด์มาตรฐานเพิ่มขึ้น ความเข้มของสีเทาก็จะมากขึ้นเช่นกัน ในตัวอย่างสารสกัดหยาบจากเห็ดพบแถบที่ตรงกับแถบของกลูโคซิลเซราไมด์ในทุกตัวอย่าง แม้ว่า จะมีความเข้มค่อนข้างต่ำ

นอกจากนี้ จะเห็นว่าในตัวอย่างเห็นได้ชัดยังปรากฏแถบหลายแถบขององค์ประกอบอื่นๆ อยู่ ซึ่งอาจได้แก่ สเตอรอลส์, กรดไขมัน, ไตรเอซิลกลีเซอรอล และ สเตอรอลเอสเทอร์ เป็นต้น (Tessema, Gebre-Mariam, Lange, et al., 2017)

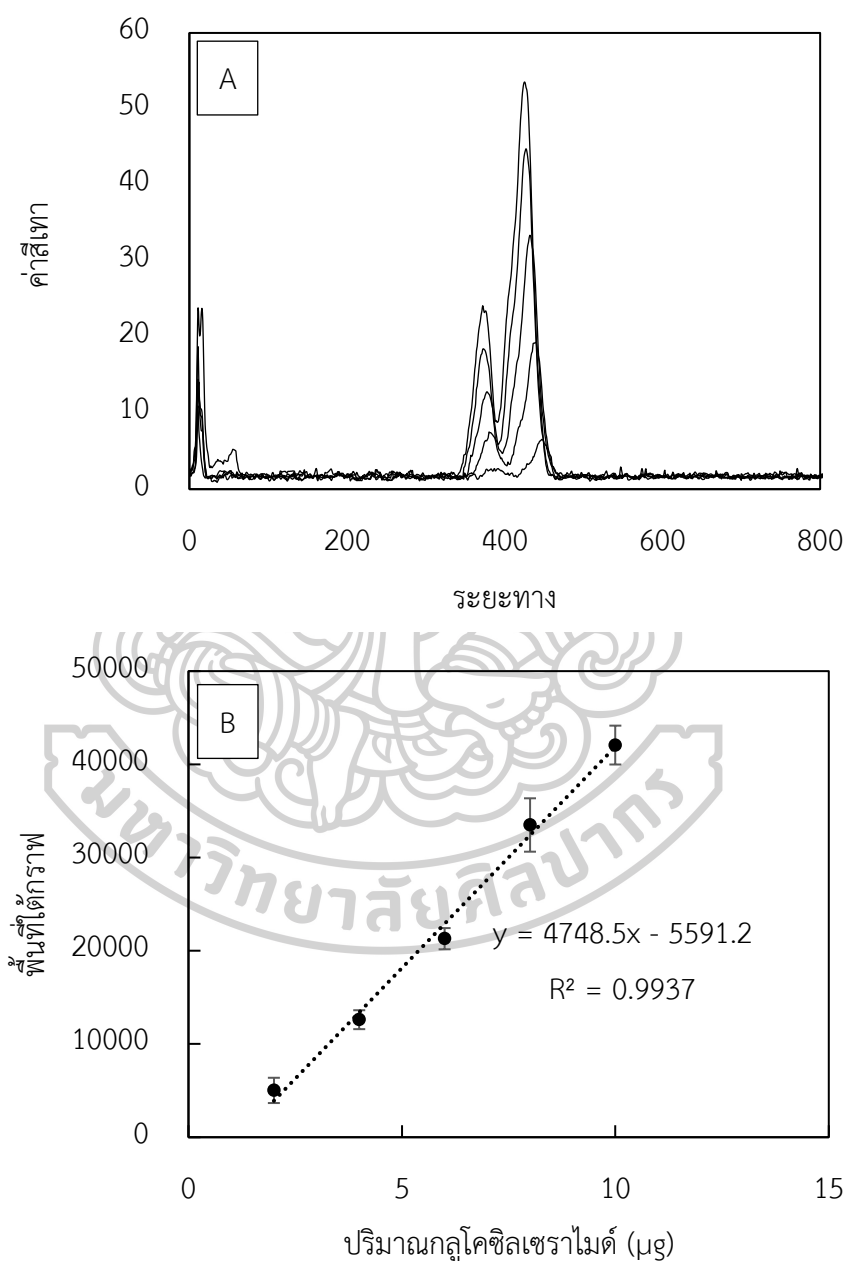


ภาพที่ 18 ภาพถ่ายของแผ่น TLC สำหรับการวิเคราะห์กลุ่มโคซิลเซราไมด์ในตัวอย่างสารสกัดหยาบจากเห็ด

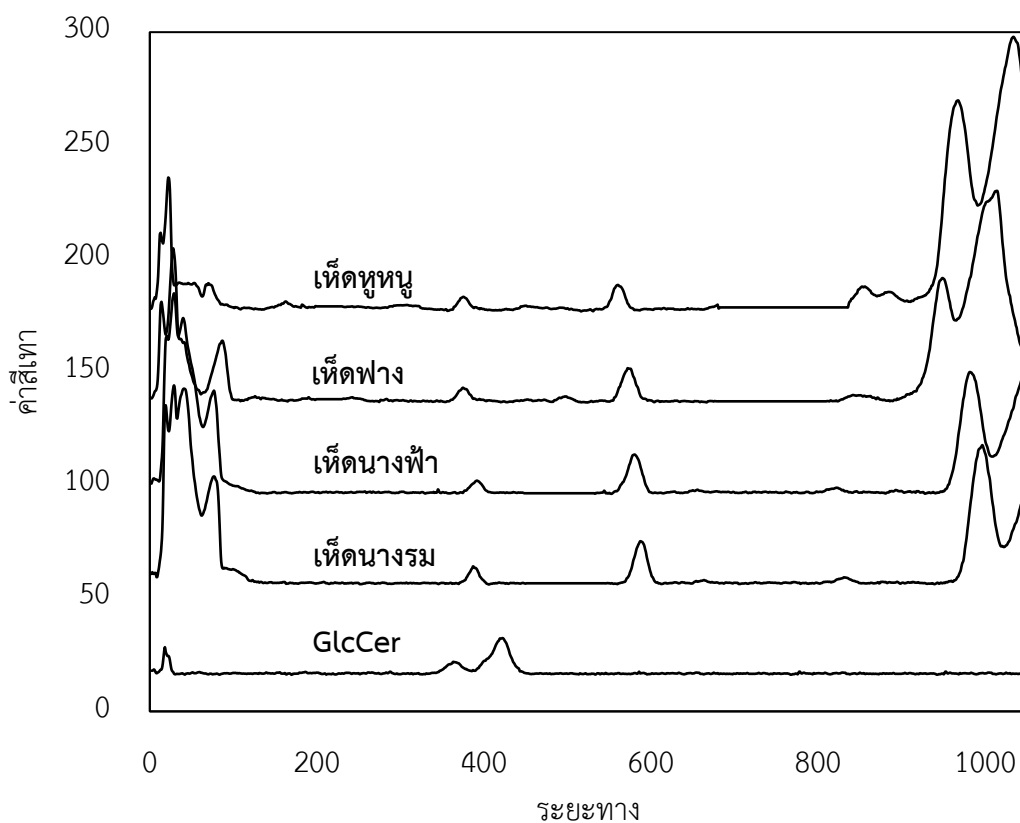
โดยที่หมายเลข 1 - 5 และ 12 - 16 เป็นกลุ่มโคซิลเซราไมด์มาตรฐานปริมาณ 2 - 10 μg ตามลำดับ และแถบ 6 - 11 เป็นตัวอย่างสารสกัดจากเห็ด

จากภาพที่ 19 แสดงโครมาโตแกรมและกราฟมาตรฐานที่ได้จากการวิเคราะห์จากแผ่น TLC ที่วิเคราะห์โดยใช้การวิเคราะห์ภาพถ่าย โดยภาพถ่ายสีถูกปรับให้เป็นสีเทาแบบ 8 bit (gray scale) เพื่อให้สะดวกในการวิเคราะห์ และทั้งสารมาตรฐานและตัวอย่างถูกนำไปสร้างเป็นโครมาโตแกรมที่ได้จากค่าความเข้มของสีในคราวเดียวกัน พื้นที่ใต้กราฟบริเวณที่ปรากฏสารมาตรฐานกลุ่มโคซิลเซราไมด์

ปริมาณต่าง ๆ ถูกพล็อตบนกราฟที่แสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณกลูโคซิลเซราไมด์ และพื้นที่ใต้กราฟ ซึ่งพบว่าสมการมาตรฐานที่ได้มีลักษณะเป็นเส้นตรง จากนั้นจึงนำพื้นที่ใต้กราฟของบริเวณที่ปรากฏแถบของกลูโคซิลเซราไมด์ในตัวอย่างสารสกัดหยาบจากเห็ด (ภาพที่ 19) ไปคำนวณหาความเข้มข้นของกลูโคซิลเซราไมด์โดยใช้สมการกราฟมาตรฐานดังกล่าว



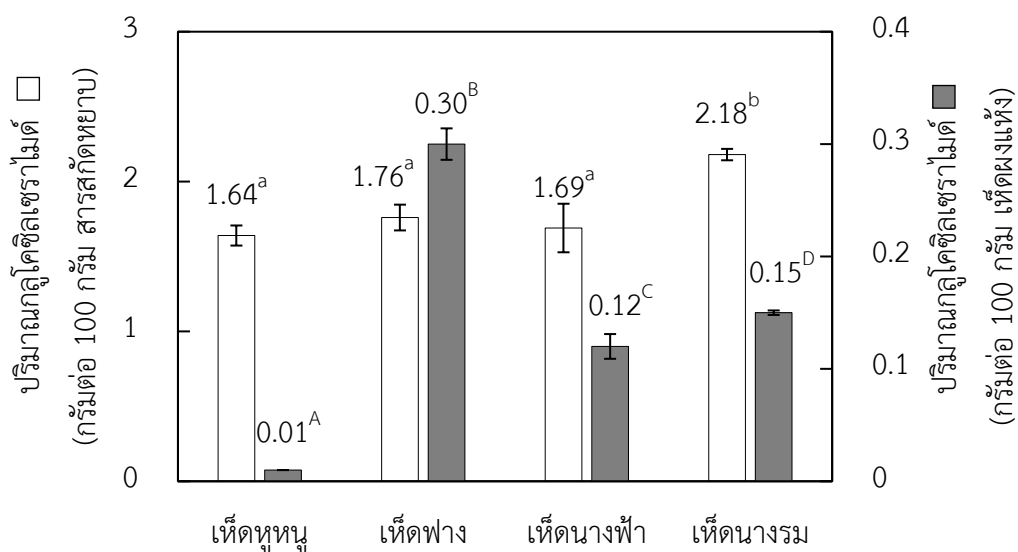
ภาพที่ 19 โครมาโตแกรม (A) และกราฟมาตรฐานกลูโคซิลเซราไมด์ (B) ที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค TLC ร่วมกับการวิเคราะห์ภาพถ่าย



ภาพที่ 20 โครมาโตแกรมของสารมาตรฐานกลูโคซิลเซราไมด์ (GlcCer) และสารสกัดหยาบจากเห็ด 4 ชนิดที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค TLC ร่วมกับการวิเคราะห์ภาพถ่าย

จากการวิเคราะห์หาปริมาณกลูโคซิลเซราไมด์ด้วยเทคนิค TLC ร่วมกับการวิเคราะห์ภาพถ่าย จะเห็นว่าลักษณะของพีคของสารมาตรฐานกลูโคซิลเซราไมด์ซึ่งเป็นกลูโคซิลเซราไมด์จากข้าวปรากฏเป็นสองพีคติดกัน ทั้งนี้มีรายงานว่ากลูโคซิลเซราไมด์สำคัญที่พบในข้าวประกอบด้วยกลูโคซิลเซราไมด์ 2 ชนิดที่มีสายสฟิงกอยด์เบสเป็น d18:2 และ t18:1 (cis และ trans isomers) (Sugawara et al., 2019) ปริมาณกลูโคซิลเซราไมด์ในสารสกัดหยาบจากเห็ดหูหนูมีปริมาณกลูโคซิลเซราไมด์เท่ากับ 1.64 กรัมต่อ 100 กรัมของสารสกัดหยาบ เห็ดฟางเท่ากับ 1.76 กรัมต่อ 100 กรัมของสารสกัดหยาบ เห็ดนางฟ้าเท่ากับ 1.69 กรัมต่อ 100 กรัมของสารสกัดหยาบ ซึ่งปริมาณกลูโคซิลเซราไมด์จากเห็ดทั้ง 3 ชนิดไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ในขณะที่สารสกัดหยาบจากเห็ดนางรมมีปริมาณกลูโคซิลเซราไมด์เท่ากับ 2.18 กรัมต่อ 100 กรัมของสารสกัดหยาบ ซึ่งสูงกว่าเห็ดชนิดอื่นอย่างมีนัยสำคัญ จะเห็นได้ว่าแม้ว่าปริมาณสารสกัดหยาบจากเห็ดฟางจะมีค่าสูงกว่าชนิดอื่น แต่สารสกัดหยาบจากเห็ดนางรมมีปริมาณกลูโคซิลเซราไมด์สูงที่สุด (ภาพที่ 21) แสดงให้เห็นว่าสารสกัดหยาบจากเห็ดฟางมีส่วนประกอบอื่น ๆ ปนอยู่ในปริมาณที่สูงกว่าเห็ดชนิดอื่นมาก จากการศึกษาของ Yan et al. (2020)

สกัดเห็ดเบอร์กันดีแห้งด้วยเอทานอล 80% ด้วยเครื่องอัลตราโซนิก แล้วนำไปทำโครมาโตกราฟีพบว่า ในตัวอย่างเห็ดพบสารประกอบอื่นๆที่สกัดได้ โดยเฉพาะสารประกอบในกลุ่มของลิพิด เช่น สเตอรอล และกลุ่มไขมันที่มีขี้วัวต่ำ เป็นต้น อย่างไรก็ตามเมื่อคำนวณปริมาณกลูโคซิลเซราไมด์ต่อเห็ดผงแห้ง 100 กรัม พบว่าในเห็ดทุกชนิดมีกลูโคซิลเซราไมด์ประมาณ 0.01 – 0.3 กรัม ดังภาพที่ 21 เมื่อเปรียบเทียบกับวัตถุดิบชนิดอื่นที่มีปริมาณกลูโคซิลเซราไมด์ เช่น ข้าวบาร์เลย์ 14.4, ข้าว 2.5, แป้งสาลี 21, ถั่วอะชิกิ 30.3, ถั่วดำ 22.2 และถั่วเหลือง 8 มิลลิกรัม/100 กรัมแห้ง (Sugawara & Miyazawa, 1999) ดังนั้นจากผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าเห็ดนางรมเป็นวัตถุดิบที่มีศักยภาพในการนำมาสกัดและนำมาศึกษาในกระบวนการต่อไป เนื่องจากเห็ดนางรมมีปริมาณกลูโคซิลเซราไมด์มากที่สุด และสารสกัดหยาบมีลักษณะเป็นของแข็งสีเหลืองทองซึ่งมีสีที่อ่อนและกว่าสารสกัดหยาบชนิดอื่น



ภาพที่ 21 ปริมาณกลูโคซิลเซราไมด์ในสารสกัดหยาบจากเห็ด 4 ชนิด ที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค TLC ร่วมกับการร่วมกับการวิเคราะห์ภาพถ่าย
ตัวอักษรกำกับที่แตกต่างกันหมายถึงค่าเฉลี่ยมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (Duncan, $\alpha = 0.05$)

4.3 ปริมาณกลุ่มสาร (Proximate analysis) และลักษณะปรากฏของเห็ดนางรม 3 ช่วงอายุ

ในการวิเคราะห์ปริมาณกลูซิลาไมด์ของเห็ดนางรมทั้ง 3 ช่วงอายุ (1-2 วัน, 3-4 วัน และ 5-6 วัน) เริ่มจากการเตรียมตัวอย่างเห็ดผงแห้งบดละเอียด จากนั้นจึงนำไปวิเคราะห์ปริมาณกลุ่มสาร พบว่าความชื้น (% w.b.) ของตัวอย่างเห็ดผงแห้งอยู่ในช่วง 7 - 8% ค่าโปรตีนอยู่ในช่วง 19 - 22% ปริมาณเถ้าอยู่ในช่วง 7 - 8% ส่วนค่าไขมันมีค่าอยู่ในช่วง 1.4 - 1.5% ดังแสดงในตารางที่ 4

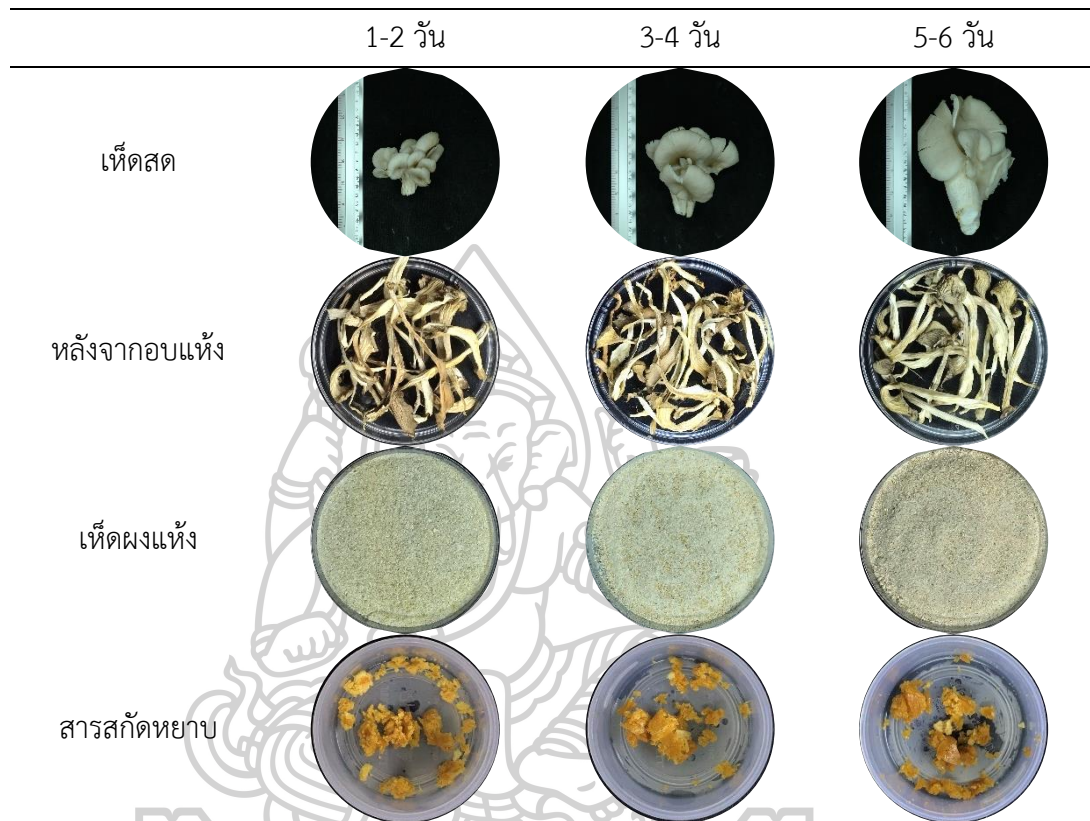
ตารางที่ 4 ค่าปริมาณกลุ่มสารของเห็ดนางรมผงแห้งบดละเอียดจากเห็ดทั้ง 3 ช่วงอายุ

	1-2 วัน	3-4 วัน	5-6 วัน
ความชื้น (%)	8.41 ± 2.82	8.02 ± 1.95	7.80 ± 1.41
โปรตีน (%)	22.99 ± 0.90	21.91 ± 0.70	19.00 ± 0.40
เถ้า (%)	8.08 ± 0.25	7.96 ± 0.05	7.44 ± 0.38
ไขมัน (%)	1.54 ± 0.22	1.49 ± 0.16	1.50 ± 0.14
คาร์โบไฮเดรต* (%)	58.98 ± 4.14	60.61 ± 1.66	64.26 ± 0.62

*คำนวณจาก คาร์โบไฮเดรต = 100 - (ความชื้น + โปรตีน + เถ้า + ไขมัน)

จากการวิเคราะห์ปริมาณกลุ่มสารในเห็ดนางรม แสดงให้เห็นว่าเห็ดมีความสำคัญมากในการเป็นอาหารของมนุษย์ โดยมีโปรตีนสูง และมีไขมันต่ำ โดยโปรตีนจากเห็ดประกอบด้วยกรดอะมิโนที่จำเป็นทั้ง 9 ชนิดที่มนุษย์ต้องการ (ไลซีน วาลีน ไอโซลิวซีน ลิวซีน ทรีโอนีน ทรีโตนแฟน เมทไทโอนีน ฟีนิลอะลานีน และฮีสติดีน) นอกจากนี้คาร์โบไฮเดรตยังเป็นองค์ประกอบหลักในเห็ดและส่วนใหญ่เป็นคาร์โบไฮเดรตที่ไม่สามารถย่อยได้ ได้แก่ โพลีแซ็กคาไรด์ที่ผนังเซลล์ เช่น ไคติน เบต้ากลูแคน และแมนแนน และโอลิโกแซ็กคาไรด์ (Cheung, 2013; Kumar, 2015)

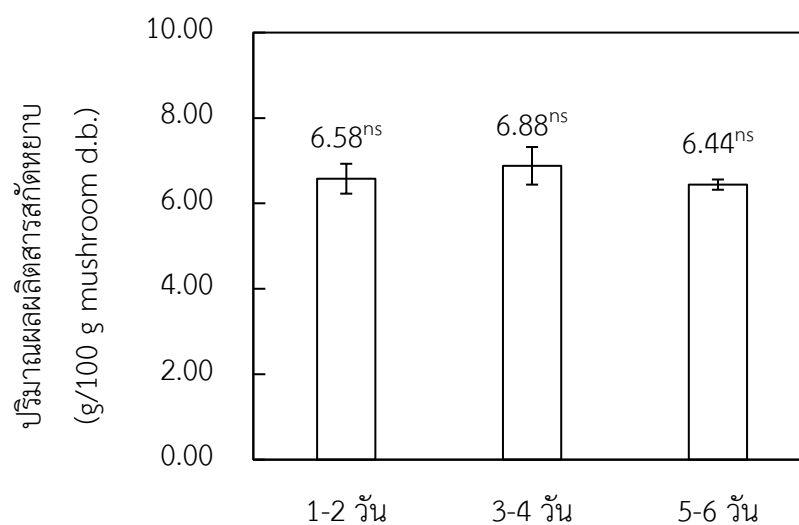
ลักษณะปรากฏของเห็ดนางรมสด เห็ดหลังอบแห้ง เห็ดผงแห้ง และสารสกัดหยาบ พบว่ามีความคล้ายคลึงกันในทุกช่วงอายุ ดังภาพที่ 22



ภาพที่ 22 ลักษณะปรากฏของเห็ดนางรมทั้ง 3 ช่วงอายุ

4.4 ปริมาณผลผลิตสารสกัดหยาบและปริมาณกลูโคซิลเซราไมด์ของเห็ดนางรม 3 ช่วงอายุ

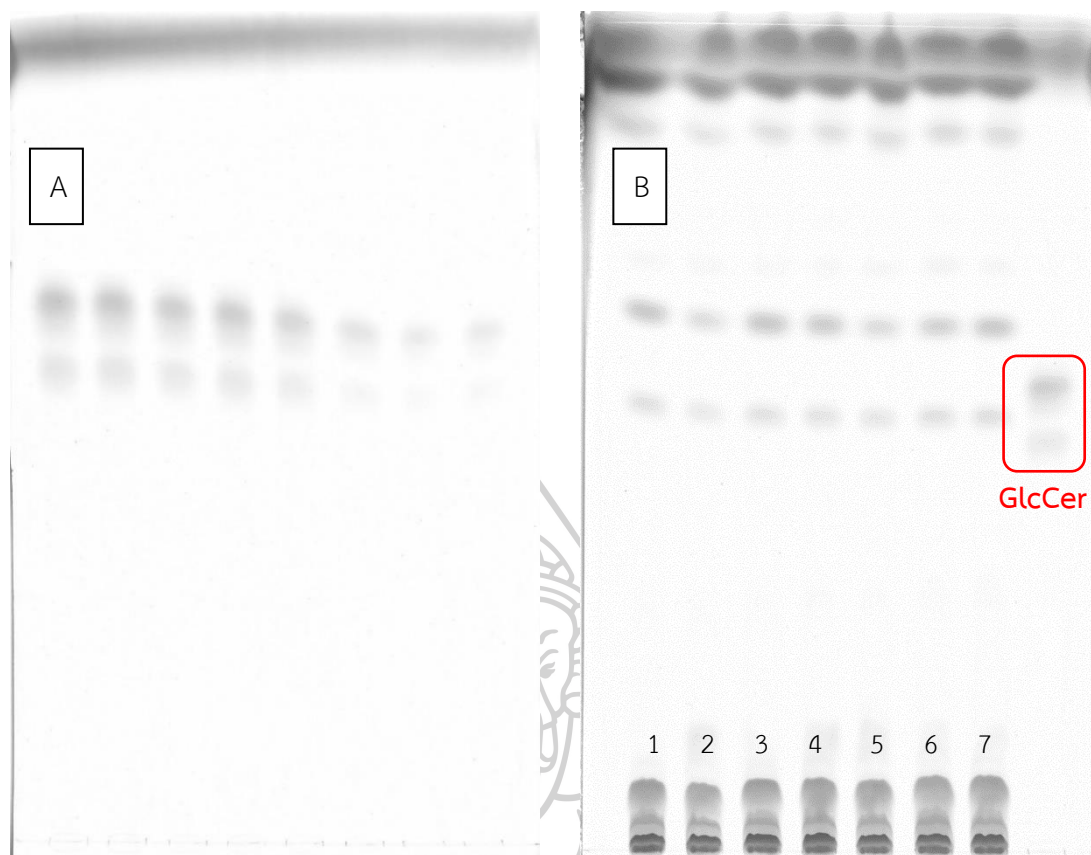
ผลการวิเคราะห์ปริมาณผลผลิตสารสกัดหยาบจากการสกัดด้วย 95% เอทานอล พบว่าผลผลิตสารสกัดหยาบในแต่ละระยะไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ โดยมีปริมาณในช่วง 6.44 – 6.88 กรัมต่อ 100 กรัมเห็ดแห้ง แต่ดังแสดงในภาพที่ 23



ภาพที่ 23 ปริมาณผลผลิตสารสกัดหยาบของเห็ดนางรม 3 ช่วงอายุ

^{ns}ค่าเฉลี่ยไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (Duncan, $\alpha = 0.05$)

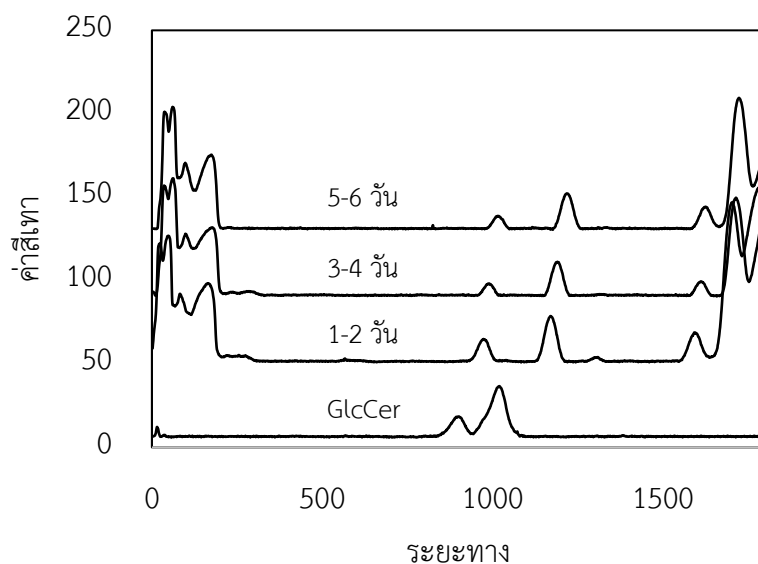
จากนั้นนำสารสกัดหยาบที่ได้มาวิเคราะห์เพื่อหาปริมาณกลูโคซิลเซราไมด์ด้วยเทคนิค TLC ร่วมกับการวิเคราะห์ภาพถ่าย ดังแสดงในภาพที่ 24



ภาพที่ 24 ภาพถ่ายของแผ่น TLC สำหรับการวิเคราะห์กลูโคซิลเซราไมด์ (GlcCer) ในตัวอย่างสารสกัดหยาบจากเห็ดนางรม

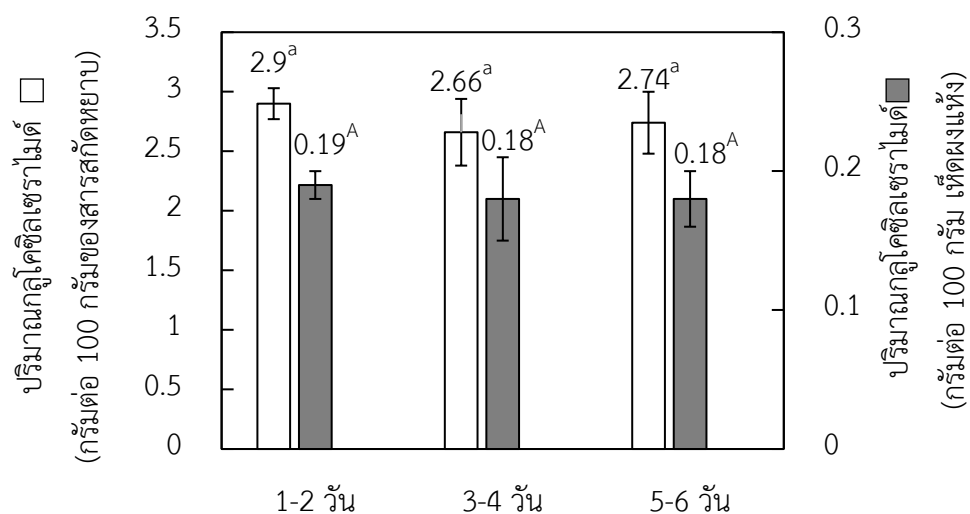
โดยภาพ A คือ กลูโคซิลเซราไมด์มาตรฐาน และภาพ B คือ สารสกัดหยาบจากเห็ด โดยแถบที่ 1 คือ สารสกัดจากเห็ดอายุ 1-2 วัน, แถบที่ 2-4 คือ สารสกัดจากเห็ดอายุ 3-4 วัน และ แถบที่ 5-7 คือ สารสกัดจากเห็ดอายุ 5-6 วัน

ภาพที่ 25 แสดงโครมาโตแกรมที่ได้จากการวิเคราะห์สารสกัดหยาบจากเห็ดนางรมทั้ง 3 ช่วงอายุเทียบกับสารมาตรฐานกลูโคซิลเซราไมด์



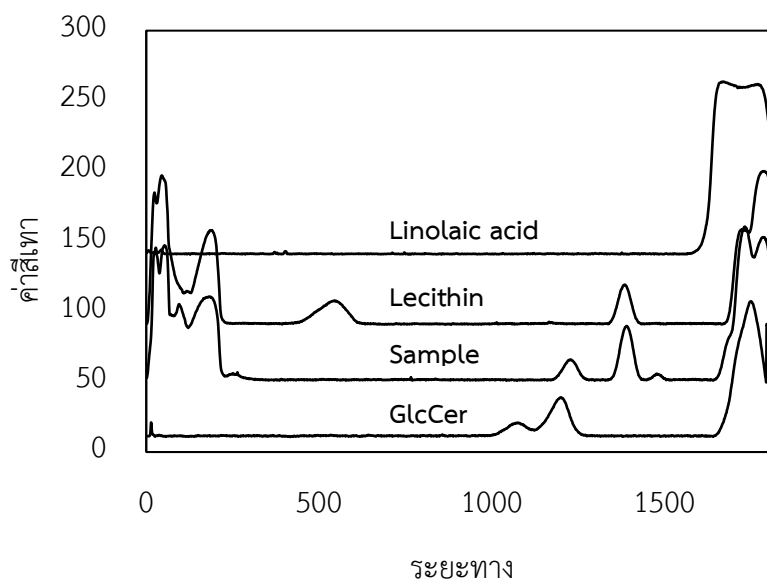
ภาพที่ 25 โครมาโตแกรมของสารสกัดหยาบจากเห็ดนางรม 3 ช่วงอายุ เทียบกับสารกลูโคซิลเซราไมด์มาตรฐาน (GlcCer) ที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค TLC ร่วมกับการวิเคราะห์ภาพถ่าย

การวิเคราะห์หาปริมาณกลูโคซิลเซราไมด์ในสารสกัดหยาบด้วยเทคนิค TLC ร่วมกับการวิเคราะห์ภาพถ่าย พบว่าปริมาณกลูโคซิลเซราไมด์ในแต่ละระยะไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ โดยมีปริมาณในช่วง 2.6 – 2.9 กรัมต่อ 100 กรัมของสารสกัดหยาบ และเมื่อพิจารณาถึงปริมาณกลูโคซิลเซราไมด์ต่อเห็ดผงแห้ง 100 กรัม พบว่ามีกลูโคซิลเซราไมด์ 0.18 – 0.19 กรัม ดังภาพที่ 26 ดังนั้นจะสังเกตได้ว่าการศึกษาแต่ละช่วงอายุของเห็ดนางรมไม่มีผลต่อปริมาณกลูโคซิลเซราไมด์



ภาพที่ 26 ปริมาณกลูโคซิลเซราไมด์ในสารสกัดหยาบจากเห็ด 3 ช่วง ที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค TLC ร่วมกับการร่วมกับการวิเคราะห์ภาพถ่ายตัวอักษรกำกับที่แตกต่างกันหมายถึงค่าเฉลี่ยมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (Duncan, $\alpha = 0.05$)

จากโครมาโตแกรมของเห็ดนางรมที่ภาพที่ 25 จะเห็นว่า มีพีคทั้งก่อนและหลังพีคของกลูโคซิลเซราไมด์ปรากฏอยู่ และจากการทดสอบด้วยเทคนิค TLC พบว่าองค์ประกอบอื่นๆ ที่แยกได้นั้น อาจเป็นสารในกลุ่มของฟอสโฟลิพิด (โดยเทียบกับเลซิทีน) และ กลุ่มไขมันไม่มีขั้วหรือขั้วต่ำมาก (โดยเทียบกับกรดลิโนเลอิก) ดังแสดงในภาพที่ 27

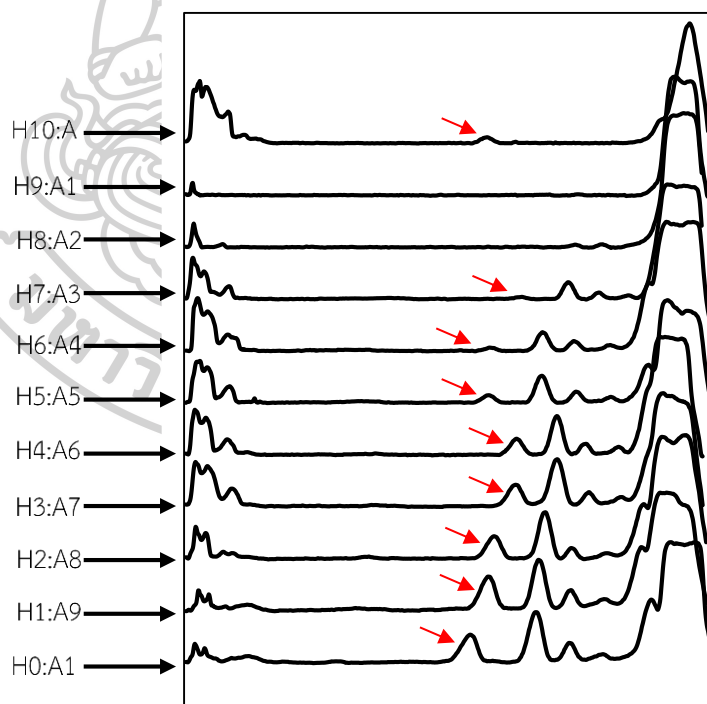


ภาพที่ 27 โครมาโตแกรมสารมาตรฐาน ตัวอย่าง เลซิทีน และกรดลิโนเลอิก ที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค TLC ร่วมกับการวิเคราะห์ภาพถ่าย

4.5 การศึกษาการเพิ่มความเข้มข้นของกลูโคซิลเซราไมด์จากสารสกัดหยาบเห็ดนางรมโดยการดูดซับ-คายดูดซับด้วยซิลิกาเจล

การใช้ซิลิกาเจลในการดูดซับและคายดูดซับ (adsorption-desorption) แบบถังกวน (stirred batch adsorption) เป็นอีกรูปแบบหนึ่งของการใช้ซิลิกาเจลโดยอาศัยคุณสมบัติเป็นตัวดูดซับที่มีความเป็นขั้วสูง แม้ว่าโดยทั่วไปแล้วการใช้ซิลิกาเจลแบบถังกวนจะมีประสิทธิภาพต่ำกว่าการใช้คอลัมน์แต่อาจจะใช้เป็นกระบวนการขั้นต้นเพื่อกำจัดไขมันบางกลุ่มออกจากตัวอย่างได้เนื่องจากมีขั้นตอนที่มีความซับซ้อนน้อยกว่า ในการทดลองนี้จึงดำเนินการโดยอาศัยความสามารถในการละลายของสารสกัดหยาบในตัวทำละลายที่แตกต่างกัน สารสกัดหยาบถูกนำมากำจัดองค์ประกอบที่ไม่ต้องการโดยการกวนผสมกับซิลิกาเจลในตัวทำละลายผสมระหว่างเฮกเซนและอะซิโตนในอัตราส่วนที่แตกต่างกัน หลังจากที่ตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 10 นาที ในแต่ละขั้นตอนจะมีส่วนชั้นด้านบนเป็นส่วนของเหลว และด้านล่างของขวดเป็นส่วนของซิลิกาเจล โดยส่วนของของเหลวจะถูกนำไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิค TLC พบว่าจากการกวนรอบแรกในตัวทำละลายทุกอัตราส่วนนั้น พบว่าเริ่มแรกเมื่อใช้ตัวทำละลายเฮกเซนสารทุกอย่างในสารสกัดหยาบจะถูกดูดซับโดยซิลิกาเจลได้ดี เนื่องจากเฮกเซนมีความเป็นขั้วต่ำจึงมีเพียงแค่ว่าสารที่มีขั้วต่ำและกลูโคซิลเซราไมด์ละลายไปเพียงบางส่วนเท่านั้น และเมื่ออัตราส่วนของอะซิโตนเพิ่มขึ้น (ความเป็นขั้วสูงขึ้น) ปริมาณของกลูโคซิลเซราไมด์ในส่วน

สารละลายจะเพิ่มขึ้น ดังแสดงในภาพที่ 28 แต่จะเห็นว่าถึงแม้ปริมาณกลูโคซิลเซราไมด์เพิ่มขึ้นส่วนของสารอื่นๆก็เพิ่มขึ้นเช่นเดียวกัน ซึ่งหมายความว่าซิลิกาเจลดูดซับได้แย่งลง เนื่องจากความเป็นขั้วของตัวทำละลายสูงกว่าความเป็นขั้วของซิลิกาเจลทำให้สารละลายนั้นไม่ถูกดูดซับไปในซิลิกาเจล ลักษณะของโครมาโตแกรมจากการวิเคราะห์ที่มีบ่อยครั้งที่โดยระยะทางที่ปรากฏพีคของเซราไมด์ที่ไม่ตรงกัน อย่างไรก็ตามในขั้นตอนของการวิเคราะห์ได้มีวิเคราะห์สารมาตรฐานเทียบในทุกครั้ง ดังนั้นจะเห็นได้ว่าลักษณะของการเพิ่มความเข้มข้นของกลูโคซิลเซราไมด์โดยการดูดซับแบบถ่วงจะมีประสิทธิภาพต่ำกว่าการใช้คอลัมน์โครมาโตกราฟี แต่มักถูกใช้เป็นกระบวนการขั้นต้นเพื่อกำจัดไขมันบางกลุ่มออกจากตัวอย่างได้ เนื่องจากมีขั้นตอนที่มีความซับซ้อนน้อยกว่า ดังนั้นในการทดลองการเพิ่มความเข้มข้นของกลูโคซิลเซราไมด์จากสารสกัดหยาบเห็ดนางรมโดยการดูดซับ-คายดูดซับด้วยซิลิกาเจลด้วยตัวทำละลายผสมระหว่างเฮกเซนและอะซิโตนนี้ยังไม่มีประสิทธิภาพมากพอสำหรับการเพิ่มความเข้มข้นของกลูโคซิลเซราไมด์ ซึ่งอาจจะมีสาเหตุมาจากสภาวะที่ทดลอง เช่น การเลือกใช้ตัวทำละลาย อัตราส่วนของตัวทำละลาย และปริมาณของซิลิกาเจลและตัวทำละลาย

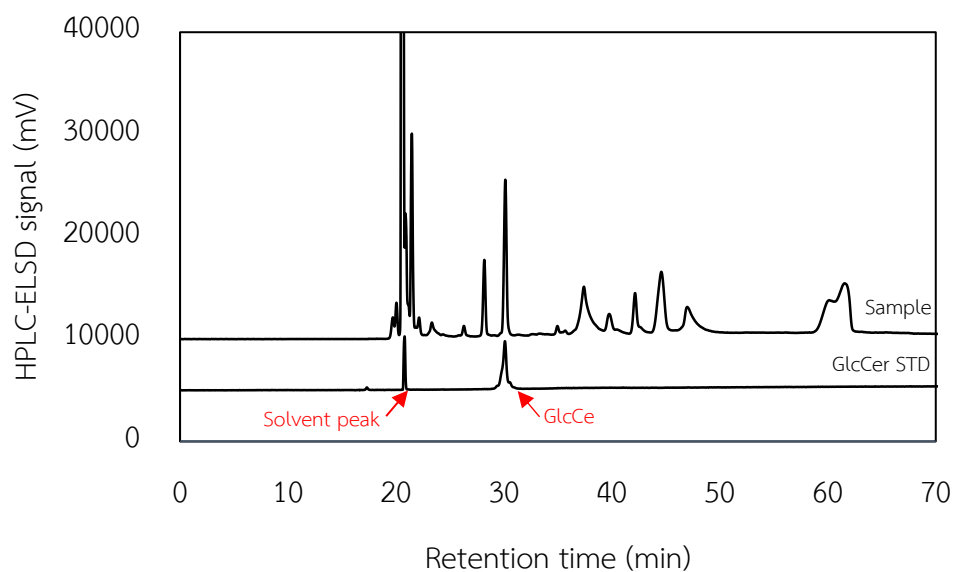


ภาพที่ 28 โครมาโตแกรมของและปริมาณกลูโคซิลเซราไมด์ขึ้นของเหลวที่ได้จากการกวนรอบที่ 1 ของสารละลายผสมทุกอัตราส่วน ที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค TLC (H=Hexanes, A=Acetone) (ตำแหน่งลูกศรสีแดงในภาพ คือ กลูโคซิลเซราไมด์)

4.6 การใช้ซิลิกาเจลในสัดส่วนที่ต่างกันในการเพิ่มความเข้มข้นของกลูโคซิลเซราไมด์จากสารสกัดหยาบด้วยการดูดซับโดยใช้ซิลิกาเจล

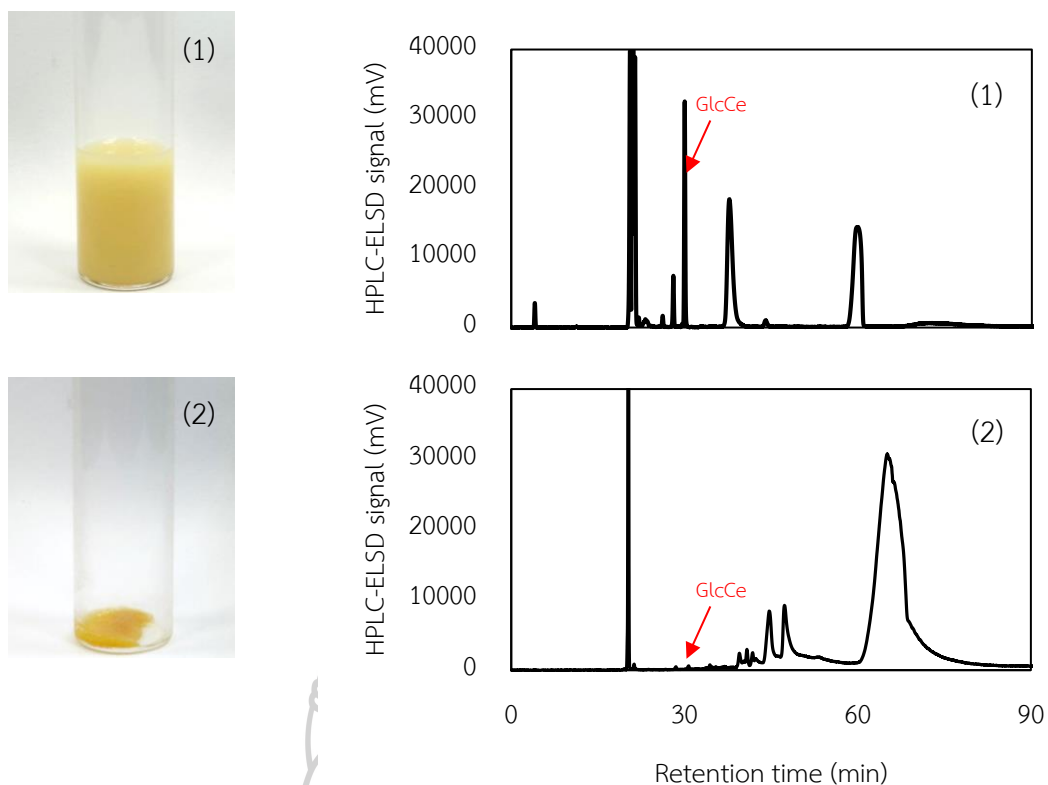
สำหรับการศึกษาการเพิ่มความเข้มข้นของเซราไมด์ในสารสกัดหยาบจากเห็ดนางรมด้วยซิลิกาเจลในอัตราส่วนที่ต่างกัน เริ่มจากการตกตะกอนสารโดยใช้เฮกเซนโดยนำสารสกัดหยาบมาละลายในตัวทำละลายเฮกเซนเพื่อตกตะกอน (โดยที่ยังไม่ผสมซิลิกาเจล) ซึ่งทำให้สามารถแยกองค์ประกอบออกเป็น 2 ส่วน คือ ส่วนที่สามารถละลายในเฮกเซน (เรียกว่าส่วนที่ 1) และส่วนที่ไม่สามารถละลายในเฮกเซน (เรียกว่าส่วนที่ 2) ดังภาพที่ 30 จากนั้นจะใช้ส่วนสารละลาย (1) มาควบพร้อมกับซิลิกาเจล ปริมาณ 0.5, 1.0, 1.5 และ 2.0 กรัม ดังภาพที่ 31 จากนั้นดูดแยกสารละลายด้านบนออกจนหมด และนำส่วนของซิลิกาเจลนำไปสกัดด้วยเครื่อง Soxhlet โดยใช้เอทิลอะซิเตทเป็นเวลา 1 ชั่วโมง จะได้สารสกัดออกมา (เรียกว่าส่วนที่ 3) ดังภาพที่ 32 จากนั้นนำสารสกัดในแต่ละส่วนไปวิเคราะห์องค์ประกอบด้วยเทคนิค HPLC-ELSD

ภาพที่ 29 แสดงโครมาโตแกรมที่ได้จากการวิเคราะห์สารสกัดหยาบจากเห็ดนางรมเปรียบเทียบกับสารมาตรฐานกลูโคซิลเซราไมด์ด้วยเทคนิค HPLC-ELSD โดยจะเห็นว่าสภาวะในการวิเคราะห์นี้สามารถแยกกลูโคซิลเซราไมด์ออกจากองค์ประกอบอื่นได้อย่างดี โดยปรากฏพีคของกลูโคซิลเซราไมด์ที่เวลา 31-32 นาที นั่นคือองค์ประกอบที่มีความเป็นขั้วน้อยกว่ากลูโคซิลเซราไมด์จะมีค่า retention time น้อยกว่า 30 นาที ในขณะที่สารที่มีขั้วมากกว่ากลูโคซิลเซราไมด์ จะมีค่า retention time มากกว่า 33 นาที



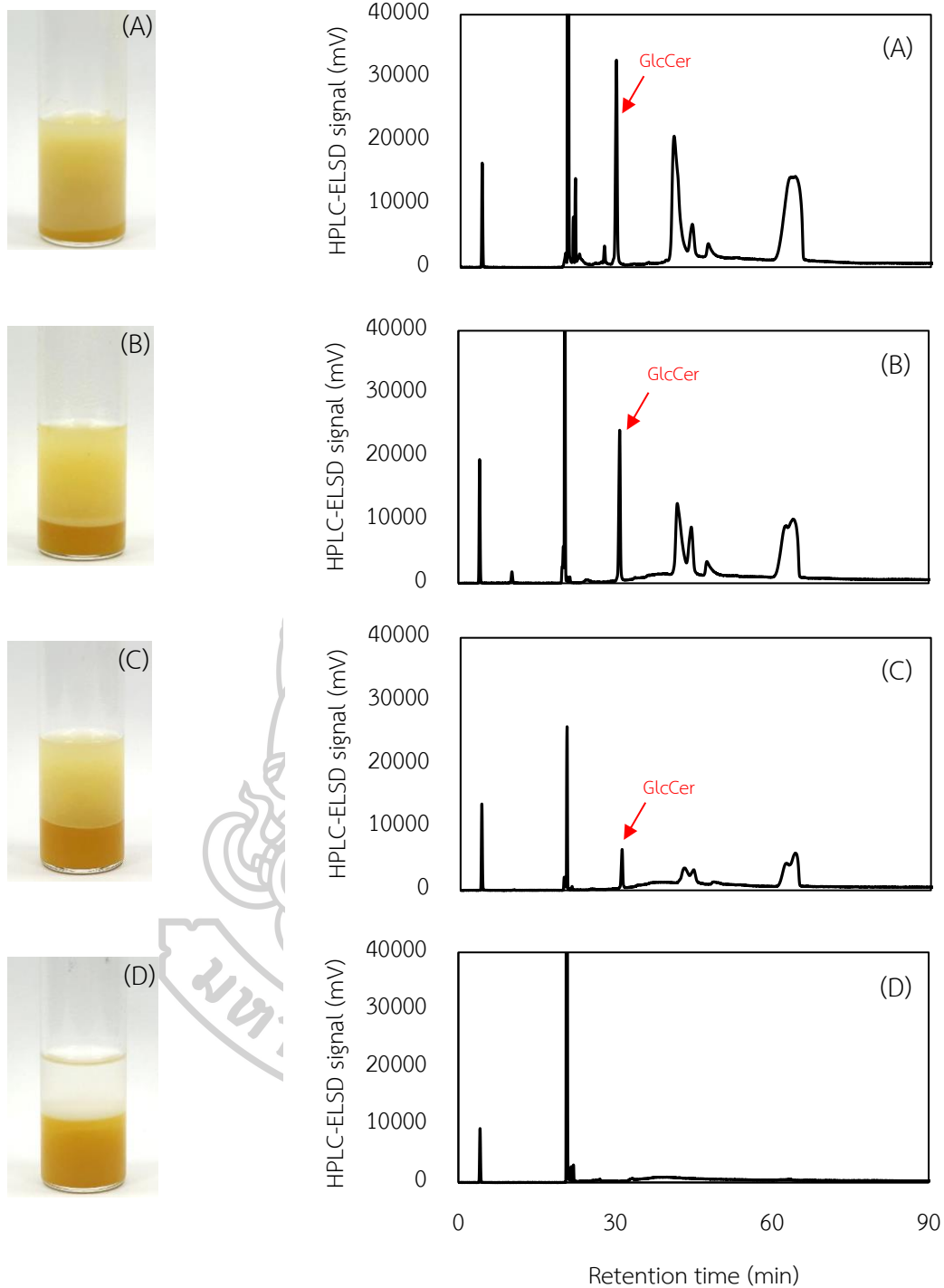
ภาพที่ 29 โครมาโตแกรมของสารสกัดหยาบเทียบกับสารมาตรฐานกลูโคซิลเซราไมด์ที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC-ELSD

เมื่อนำสารสกัดหยาบจากเห็ดนางรมซึ่งมีเข้มข้นของกลูโคซิลเซราไมด์ 1682.85 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัมของสารสกัดหยาบ (หรือ 1.68%) มาละลายในเฮกเซนแล้วพบว่ามียอดประกอบบางส่วนที่ไม่สามารถละลายได้และตกตะกอนลงมา จึงได้ทำการแยกส่วนออกเป็น 2 ส่วน ซึ่งจากโครมาโตแกรมที่ได้จากการวิเคราะห์ส่วนที่ไม่ละลายในเฮกเซนนั้นพบส่วนประกอบที่มีขั้วสูงกว่ากลูโคซิลเซราไมด์อยู่เป็นจำนวนมาก และมีความเข้มข้นของกลูโคซิลเซราไมด์ที่ต่ำมากคือ 83.99 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัมของสารสกัดหยาบ ของส่วนที่ได้จากส่วนที่ไม่ละลายในเฮกเซน (หรือ 0.08%) ในขณะที่ส่วนที่ละลายในสารละลายเฮกเซนมีความเข้มข้นของกลูโคซิลเซราไมด์เพิ่มขึ้นเป็น 2616.51 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัมของสารสกัดหยาบ ของส่วนที่ได้จากส่วนที่ละลายในเฮกเซน (หรือ 2.62%)



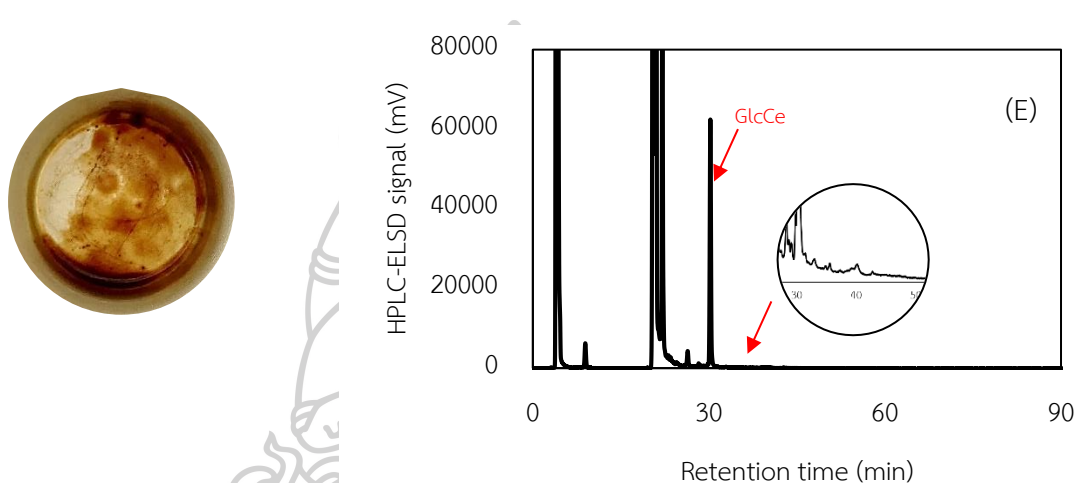
ภาพที่ 30 ลักษณะปรากฏและโครมาโตแกรมของส่วนที่ละลายในเฮกเซน (1) และ ส่วนที่ไม่ละลายในเฮกเซน (2)

จากนั้นนำสารละลายของส่วนที่ละลายในเฮกเซนที่มีความเข้มข้นของกลูโคซิลเซราไมด์ 2.62% มาเป็นตัวอย่างตั้งต้นในขั้นตอนต่อไป โดยจะใช้เทคนิคการดูดซับ-คายดูดซับด้วยซิลิกาเจลตามวิธีการทดลองที่อธิบายตามข้างต้น คือ นำไปกวนกับซิลิกาเจล 0.5, 1.0, 1.5 และ 2.0 กรัม เป็นเวลา 10 นาที ซึ่งลักษณะปรากฏหลังการกวนและ HPLC-ELSD โครมาโตแกรม แสดงในภาพที่ 31 ซึ่งจะสังเกตเห็นว่าเมื่อเพิ่มอัตราส่วนของซิลิกาเจลส่วนของสารละลายจะมีความใสเพิ่มมากขึ้น เมื่อนำส่วนสารละลายไปวิเคราะห์ด้วย HPLC-ELSD พบว่าเมื่อเพิ่มปริมาณของซิลิกาเจลจะทำให้ความเข้มข้นของกลูโคซิลเซราไมด์และส่วนประกอบอื่น ๆ ลดลง โดยการใช้ซิลิกาเจล 2.0 กรัม (ภาพที่ 31D) พบว่าในส่วนสารละลายไม่มีกลูโคซิลเซราไมด์หลงเหลืออยู่เลย แสดงให้เห็นว่าซิลิกาเจลดูดซับสารไปทั้งหมด



ภาพที่ 31 ลักษณะปรากฏหลังการกวนและ HPLC-ELSD โครมาโตแกรม ของสารละลายหลังตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที และ HPLC-ELSD โครมาโตแกรมของสารสกัดที่ได้จากการกวนส่วนที่ละลายในเฮกเซนกับซิลิกาเจล ปริมาณ 0.5 (A), 1.0 (B), 1.5 (C), 2.0 (D) กรัม

เมื่อนำส่วนซิลิกาเจลไปสกัดด้วยด้วยเครื่อง Soxhlet โดยใช้สารละลายเอทิลอะซิเตท ซึ่งมีความเป็นขั้วสูงกว่าเฮกเซน แล้วนำมาวิเคราะห์ด้วย HPLC-ELSD ได้โครมาโตแกรมดังแสดงในภาพที่ 32 พบว่าสัญญาณพีคที่ปรากฏในช่วงเวลาที่ 33 นาที เป็นต้นไป ลดน้อยลงมากเมื่อเทียบกับส่วนที่ละลายในเฮกเซน (ภาพที่30(1)) ซึ่งจะเป็นพีคของสารที่มีความเป็นขั้วมากกว่ากลูโคซิลเซราไมด์ ซึ่งสารที่มีความเป็นขั้วมากกว่าเซราไมด์นั้นถูกแยกไปในขั้นตอนแรกที่ตกตะกอนสารโดยใช้เฮกเซน



ภาพที่ 32 ลักษณะของสารสกัดและ HPLC-ELSD โครมาโตแกรมของสารสกัดที่ได้จากสกัดซิลิกาเจลด้วยเครื่อง Soxhlet

การวิเคราะห์หาปริมาณกลูโคซิลเซราไมด์ของสารสกัด พบว่าปริมาณกลูโคซิลเซราไมด์ในสารสกัดที่ได้หลังการกวนกับซิลิกาเจล 0.5 กรัม เท่ากับ 2636.75 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัมของสารสกัดหยาบ (หรือ 2.6%) ซึ่งเป็นปริมาณที่มากที่สุดในส่วนของสารสกัดที่ได้ และปริมาณกลูโคซิลเซราไมด์ในซิลิกาเจล 2.0 กรัม ที่นำไปสกัดด้วยเครื่อง soxhlet เท่ากับ 3650.30 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัมของสารสกัดหยาบ (หรือ 3.6%) เป็นปริมาณที่มากที่สุดในส่วนของซิลิกาเจล

ตารางที่ 5 ปริมาณกลูโคซิลเซราไมด์ในสารสกัดที่ได้ในแต่ละขั้นตอน

ปริมาณของซิลิกาเจล (กรัม)		ปริมาณกลูโคซิลเซราไมด์ (mg/100 g extract d.b.)
ส่วนสารละลายหลังกวน	0.5	2636.75 ± 209.25
กับซิลิกาเจล	1.0	1089.40 ± 78.07
	1.5	756.57 ± 89.78
	2.0	0
	ส่วนซิลิกาเจลที่นำไปสกัด	0.5
ด้วย Soxhlet	1.0	1929.40 ± 152.82
	1.5	2988.78 ± 134.38
	2.0	3650.30 ± 187.22



บทที่ 5

สรุปผลการทดลอง

จากการสกัดแห้งทั้ง 4 ชนิดด้วย 95% เอทานอล พบกลูโคซิลเซราไมด์ในสารสกัดหยาบจากการสกัดแห้งได้ที่มีการเพาะปลูกในประเทศ ทั้ง 4 ชนิด คือ เห็ดหูหนู เห็ดฟาง เห็ดนางฟ้า และเห็ดนางรม โดยสารสกัดหยาบของเห็ดนางรมมีปริมาณกลูโคซิลเซราไมด์สูงสุด 2.18 g/100g crude extract d.b. จึงเลือกเห็ดนางรมเป็นวัตถุดิบที่มีศักยภาพในการนำมาสกัดและศึกษากระบวนการเพิ่มความบริสุทธิ์ของกลูโคซิลเซราไมด์ต่อไป จากการศึกษาช่วงอายุของเห็ดนางรมพบว่าอายุของเห็ดนางรมไม่มีผลต่อปริมาณของกลูโคซิลเซราไมด์ ในขั้นตอนการใช้เฮกเซนในการตกตะกอนสารสกัดหยาบทำให้ความเข้มข้นของกลูโคซิลเซราไมด์เพิ่มขึ้นจาก 1682.85 ไปเป็น 2616.51 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัมของสารสกัดหยาบ ในการศึกษาผลของสัดส่วนปริมาณซิลิกาเจลที่แตกต่างกัน ได้แก่ 0.5, 1.0, 1.5 และ 2.0 กรัม ต่อการเพิ่มความเข้มข้นของกลูโคซิลเซราไมด์จากสารสกัดหยาบที่ละลายในเฮกเซน พบว่าปริมาณกลูโคซิลเซราไมด์ในสารสกัดสูงสุดได้หลังการกวนกับซิลิกาเจลของอัตราส่วนสารสกัดหยาบต่อซิลิกาเจล 1.0:0.5 โดยน้ำหนัก มีค่าเท่ากับ 2636.75 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัมของสารสกัดหยาบ และปริมาณกลูโคซิลเซราไมด์ในส่วนซิลิกาเจลสูงสุดได้จากการใช้อัตราส่วนสารสกัดหยาบต่อซิลิกาเจล 1.0:2.0 โดยน้ำหนัก มีค่าเท่ากับ 3650.30 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัมของสารสกัดหยาบ งานวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่าเห็ดนางรมเป็นวัตถุดิบในการสกัดเซราไมด์ที่มีความเป็นไปได้เชิงอุตสาหกรรมและกระบวนการตกตะกอนด้วยเฮกเซนและการดูดซับ-คายดูดซับด้วยซิลิกาเจลสามารถเพิ่มความเข้มข้นของเซราไมด์ในสารสกัดได้ และเพื่อในการศึกษาการเพิ่มความเข้มข้นของกลูโคซิลเซราไมด์ในขั้นตอนไปการใช้โครมาโตกราฟีแบบคอลัมน์เป็นวิธีที่แนะนำสำหรับการแยกองค์ประกอบที่ต้องการเนื่องจากเป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพสูง และเป็นวิธีที่นิยมใช้ในเชิงอุตสาหกรรม

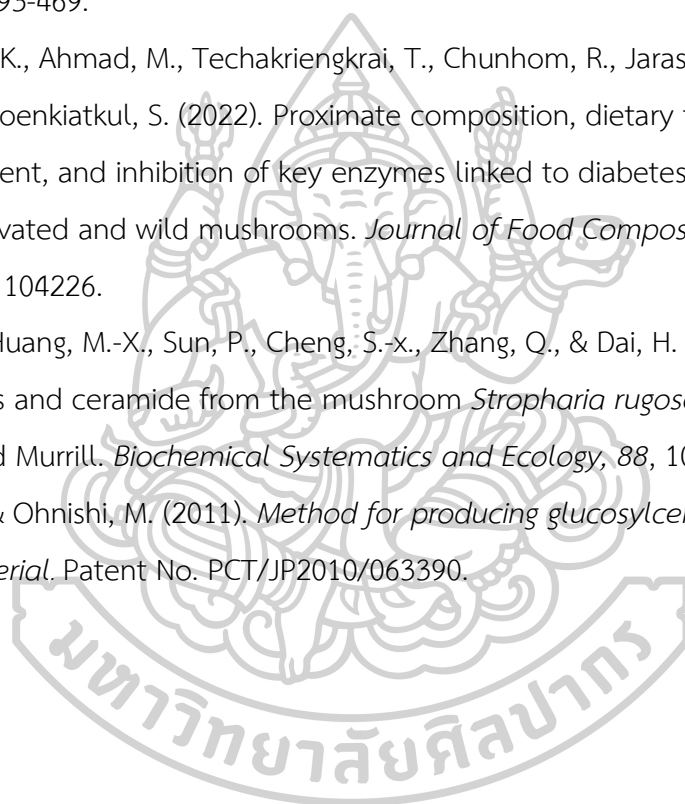
รายการอ้างอิง

- Cha, H. J., He, C., Zhao, H., Dong, Y., An, I.-S., & An, S. (2016). Intercellular and intracellular functions of ceramides and their metabolites in skin. *International Journal of Molecular Medicine*, 38(1), 16-22.
- Cheung, P. C. K. (2013). Mini-review on edible mushrooms as source of dietary fiber: Preparation and health benefits. *Food Science and Human Wellness*, 2(3), 162-166.
- Djamila, S., Iswahyono, & Bahariawan, A. (2020). Physical and chemical characteristics of oyster mushrooms flour (*Pleurotus ostreatus*) using rotary vacuum dryer type batch. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 411(1), 012007.
- Echten-Deckert, G. (2000). Sphingolipid extraction and analysis by thin-layer chromatography. *Methods in enzymology*, 312, 64-79.
- Fabian, C., Gunawan, S., Kasim, N., Chiang, C.-L., & Ju, Y.-H. (2009). Separation of nonpolar lipid from soybean oil deodorizer distillate by stirred batch-wise silica gel adsorption-desorption. *Separation Science and Technology*, 44, 1621-1637.
- Folch, J., Lees, M., & Stanley, G. H. S. (1957). A Simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *Journal of Biological Chemistry*, 226(1), 497-509.
- Hannun, Y. A., & Obeid, L. M. (2008). Principles of bioactive lipid signalling: lessons from sphingolipids. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 9(2), 139-150.
- Hanus, L., Shkrob, I., & Dembitsky, V. (2008). Lipids and fatty acids of wild edible mushrooms of the genus *Boletus*. *Journal of Food Lipids*, 15, 370-383.
- Khuwjitjaru, P., & Klinchongkon, K. (2021). Development of industrial extraction and purification processes for ceramides from pineapple by-product. *Research Report for NRCT*, 105 p.
- Kumar, K. (2015). Role of edible mushrooms as functional foods-A review. *South Asian Journal of Food Technology and Environment*, 1(2394-5168), 5454-6445.
- Kuwata, T., Hashimoto, T., Ohto, N., Kuwahara, H., Lee, J. W., Bamba, T., & Mizuno, M. (2017). A metabolite of dietary glucosylceramide from pineapples improves the

- skin barrier function in hairless mice. *Journal of Functional Foods*, 30, 228-236.
- Marçal, S., Sousa, A. S., Taofiq, O., Antunes, F., Morais, A. M. M. B., Freitas, A. C., Pintado, M. (2021). Impact of postharvest preservation methods on nutritional value and bioactive properties of mushrooms. *Trends in Food Science & Technology*, 110, 418-431.
- Meckfessel, M. H., & Brandt, S. (2014). The structure, function, and importance of ceramides in skin and their use as therapeutic agents in skin-care products. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 71(1), 177-184.
- Meng, T.-X., Zhang, C.-F., Miyamoto, I., Ishikawa, H., Shimizu, K., Ohga, S., & Kondo, R. (2012). A glucosylceramide with antimicrobial activity from the edible mushroom *Pleurotus citrinopileatus*. *Journal of Wood Science*, 58.
- Michaelson, L. V., Napier, J. A., Molino, D., & Faure, J.-D. (2016). Plant sphingolipids: their importance in cellular organization and adaptation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1861(9, Part B), 1329-1335.
- Mizutani, Y., Mitsutake, S., Tsuji, K., Kihara, A., & Igarashi, Y. (2009). Ceramide biosynthesis in keratinocyte and its role in skin function. *Biochimie*, 91(6), 784-790.
- Mumtaz, F., Zubair, M., Khan, F., & Niaz, K. (2020). Chapter 22 - analysis of plants lipids. In A. Sanches Silva, S. F. Nabavi, M. Saeedi, & S. M. Nabavi (Eds.), *Recent Advances in Natural Products Analysis*, 677-705.
- Okayasu, M., Kobayashi, Y., Kuroda, K., Yamakawa, J., & Niu, K. (2016). Effects of peach (*prunus persica*)-derived glucosylceramide on the human skin. *Immunology, Endocrine & Metabolic Agents in Medicinal Chemistry*, 17.
- Otsuka, H. (2008). Purification by solvent extraction using partition coefficient. *Natural Products Isolation*, 269-273.
- Pralhada Rao, R., Vaidyanathan, N., Rengasamy, M., Mammen Oommen, A., Somaiya, N., & Jagannath, M. R. (2013). Sphingolipid metabolic pathway: an overview of major roles played in human diseases. *Journal of Lipids*, 2013, 178910.
- Reisberg, M., Arnold, N., Porzel, A., Neubert, R. H. H., & Dräger, B. (2017). Production of rare phyto-ceramides from abundant food plant residues. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 65(8), 1507-1517.
- Shimoda, H. (2009). Chapter 16 - natural products supporting the extracellular matrix:

- rice ceramide and other plant extracts for skin health. *Nutritional Cosmetics*, 319-334.
- Skowron, M., Zakrzewski, R., & Ciesielski, W. (2016). Application of thin-layer chromatography image analysis technique in quantitative determination of sphingomyelin. *Journal of Analytical Chemistry*, 71, 808-813.
- Sugawara, T., Aida, K., Duan, J., Tomonaga, N., Manabe, Y., & Hirata, T. (2019). Analysis of chemical structures of glucosylceramides from rice and other foodstuffs. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*, 65(Supplement), S228-s230.
- Sugawara, T., & Miyazawa, T. (1999). Separation and determination of glycolipids from edible plant sources by high-performance liquid chromatography and evaporative light-scattering detection. *Lipids*, 34(11), 1231-1237.
- Suzuki, M., Ohno, Y., & Kihara, A. (2022). Whole picture of human stratum corneum ceramides, including the chain-length diversity of long-chain bases. *Journal of Lipid Research*, 63(7), 100235.
- Tessema, E. N., Gebre-Mariam, T., Lange, S., Dobner, B., & Neubert, R. H. H. (2017). Potential application of oat-derived ceramides in improving skin barrier function: part 1. isolation and structural characterization. *Journal of Chromatography B*, 1065-1066, 87-95.
- Tessema, E. N., Gebre-Mariam, T., Neubert, R. H. H., & Wohlrab, J. (2017). Potential applications of phyto-derived ceramides in improving epidermal barrier function. *Skin Pharmacol Physiol*, 30(3), 115-138.
- Turpin-Nolan, S. M., & Brüning, J. C. (2020). The role of ceramides in metabolic disorders: when size and localization matters. *Nature Reviews Endocrinology*, 16(4), 224-233.
- Vandana, V., Karuna, M. S. L., Vijayalakshmi, P., & Prasad, R. B. N. (2001). A simple method to enrich phospholipid content in commercial soybean lecithin. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 78(5), 555-556.
- Wakchaure, G. C. (2011). Postharvest handling of fresh mushrooms. In m. Singh, B. Vijay, S. Kamal, & G. C. Wakchaure (Eds.), *In Mushrooms : Cultivation, Marketing and Consumption*, 197-206.
- Wang, L., Wang, T., & Fehr, W. R. (2006). HPLC quantification of sphingolipids in

- soybeans with modified palmitate content. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(20), 7422-7428.
- Wen, X.-Y., & Jing, P. (2022). Dietary cerebrosides in seven edible mushrooms: One step detection, quantification, and Si-SPE assisted isolation. *Journal of Food Composition and Analysis*, 108, 104452.
- Work, T. S., & Work, E. (1972). Chapter 5 separation of lipid mixtures. In T. S. Work & E. Work (Eds.), *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology* (Vol. 3), 393-469.
- Wunjuntuk, K., Ahmad, M., Techakriengkrai, T., Chunhom, R., Jaraspermsuk, E., Chaisri, A., Charoenkiatkul, S. (2022). Proximate composition, dietary fibre, beta-glucan content, and inhibition of key enzymes linked to diabetes and obesity in cultivated and wild mushrooms. *Journal of Food Composition and Analysis*, 105, 104226.
- Yan, Q.-X., Huang, M.-X., Sun, P., Cheng, S.-x., Zhang, Q., & Dai, H. (2020). Steroids, fatty acids and ceramide from the mushroom *Stropharia rugosoannulata* Farlow apud Merrill. *Biochemical Systematics and Ecology*, 88, 103963.
- Yunoki, K., & Ohnishi, M. (2011). *Method for producing glucosylceramide-containing material*. Patent No. PCT/JP2010/063390.





ภาคผนวก



ภาคผนวก ก

ภาคผนวก ก
วิธีการวิเคราะห์

ก 1 การวิเคราะห์ปริมาณความชื้น (ดัดแปลงจาก AOAC, 2000)

- 1.1. อบภาชนะสำหรับหาความชื้นด้วยตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส นำออกจากตู้อบไปใส่ในโถดูดความชื้น ปล่อยให้วัจนกระทั่งอุณหภูมิของภาชนะลดลงแล้วชั่งน้ำหนัก
- 1.2. ทำเช่นเดียวกับข้อ 1.1 จนได้ผลต่างของน้ำหนักที่ซึ่งไม่เกิน 3 มิลลิกรัม
- 1.3. ชั่งตัวอย่างที่ต้องการหาความชื้นให้ได้น้ำหนักแน่นอน 3-5 กรัม ใส่ลงในภาชนะหาความชื้นที่ทราบน้ำหนักแน่นอน
- 1.4. นำไปอบในตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง แล้วนำออกมาใส่ในโถดูดความชื้น ปล่อยให้วัจนกระทั่งอุณหภูมิของภาชนะลดลงแล้วชั่งน้ำหนัก อบซ้ำจนได้ผลต่างของน้ำหนักที่ซึ่งไม่เกิน 3 มิลลิกรัม
- 1.5. คำนวณหาปริมาณความชื้นจากสูตร

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

ก 2 การวิเคราะห์ปริมาณไขมัน (ดัดแปลงจาก AOAC, 2000)

- 2.1. ชั่งตัวอย่าง 3-5 กรัม ใส่บนกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 และห่อมิดชิด นำใส่ลงในทิมเบิล (thimble)
- 2.2. นำถ้วยเปล่าอบที่ 105 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง นำออกจากตู้อบไปใส่ในโถดูดความชื้น ปล่อยให้วัจนกระทั่งอุณหภูมิของภาชนะลดลงแล้วชั่งน้ำหนัก
- 2.3. นำการวอร์มเครื่องสกัด โดยเปิดสวิทซ์ที่เครื่องจ่ายความร้อนซึ่งตั้งอุณหภูมิ 130 องศาเซลเซียส และรอจนได้อุณหภูมิตามที่กำหนด ขณะเดียวกันเปิดเครื่องทำความเย็นซึ่งตั้งอุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส นำทิมเบิลที่มีตัวอย่างติดกับ thimble adaptor
- 2.4. เติมหุ่นทำลายเอทิล อะซิเตท ลงในถ้วยที่ทราบน้ำหนักแน่นอนปริมาตร 50 มิลลิลิตร วางลงใน cup holder แล้วนำเข้าเครื่องสกัด
- 2.5. กดล็อคคานของเครื่องสกัด ตั้งเวลาในแต่ละขั้นตอนโดยเวลาในการต้มตัวอย่าง 1 ชั่วโมง, rinsing 2 ชั่วโมง และ recovery 20 นาที

- 2.6. เมื่อครบเวลานำถ้วยออกจากเครื่อง และนำไปประเหยที่ตู้ดูดความชื้นเป็นเวลา 20 นาที แล้วนำไปอบแห้งด้วยตู้อบลมร้อนที่ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำออกจากตู้อบไปใส่ในโถดูดความชื้น ปล่อยให้เย็นจนกระทั่งอุณหภูมิของภาชนะลดลงแล้วชั่งน้ำหนัก
- 2.7. คำนวณหาปริมาณไขมันจากสูตร

$$\text{ร้อยละของไขมัน} = \frac{\text{น้ำหนักไขมัน (กรัม)}}{\text{น้ำหนักตัวอย่างเริ่มต้น (กรัม)}} \times 100$$

ก 3 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน (ดัดแปลงจาก AOAC, 2000)

- 3.1. ชั่งตัวอย่าง 1 กรัม ใส่ลงใน Kjeldahl flask เติมคอปเปอร์ซัลเฟต 0.1 กรัม, โซเดียมซัลเฟต 2 กรัม, กรดซัลฟูริกเข้มข้น 25 มิลลิลิตร และใส่ antibumping chip 2 เม็ด
- 3.2. ตั้งอุณหภูมิของเครื่องย่อยไว้ที่ 180 องศาเซลเซียส เมื่อถึงอุณหภูมิตามกำหนดให้ทิ้งไว้เป็นระยะเวลานาน 20 นาที แล้วจึงเปลี่ยนอุณหภูมิเป็น 380 องศาเซลเซียส จับเวลา 2 ชั่วโมง หรือจนกว่าสารละลายจะเป็นสีใส และทิ้งให้สารละลายเย็น
- 3.3. ติดตั้งเครื่องมือกลั่นให้ปลายของ condenser จุ่มลงในสารละลาย 4% กรดบอริก ปริมาตร 25 มิลลิลิตร และหมุดเมทิลเรดลงไป 2 หยด
- 3.4. เติมสารละลาย 50% โซเดียมไฮดรอกไซด์ ปริมาตร 50-70 มิลลิลิตรลงใน Kjeldahl flask โดยขั้นตอนนี้โซเดียมไฮดรอกไซด์ถูกเติมโดยเครื่องกลั่น
- 3.5. เก็บสารละลายที่กลั่นได้ จากนั้นนำไปไตเตรตด้วยสารละลายมาตรฐาน 0.1N กรดไฮโดรคลอริก จนได้จุดยุติเป็นสีชมพูอ่อน
- 3.6. คำนวณร้อยละของไนโตรเจนในตัวอย่างโดยใช้ conversion factor เท่ากับ 6.25 และหาร้อยละปริมาณโปรตีนจากสูตร (ร้อยละของโปรตีน = ร้อยละของโปรตีน × 6.25)

$$\text{ร้อยละของไนโตรเจน} = \frac{[(\text{มิลลิลิตร HCl} - \text{มิลลิลิตร Blank}) \times \text{Normality of HCl} \times 14.007 \times 100]}{\text{น้ำหนักตัวอย่าง (มิลลิกรัม)}}$$

*ใช้น้ำกลั่นเป็น Blank ชั่งน้ำหนักให้ใกล้เคียงกับตัวอย่าง และสารละลายมาตรฐานไฮโดรคลอริกต้องเทียบมาตรฐานกับสารละลาย 0.1N มาตรฐานโซเดียมไฮดรอกไซด์ โดยมีฟีนอล์ฟทาลีนเป็นอินดิเคเตอร์

ก 4 การวิเคราะห์ปริมาณเถ้า (ดัดแปลงจาก AOAC, 2000)

- 4.1. เเผาถ้วยกระเบื้องในเตาเผาที่อุณหภูมิ 550 องศาเซลเซียส นาน 3 ชั่วโมง นำออกจากเตาเผาไปใส่ในโถดูดความชื้น ปล่อยให้ถึงวัจนกระทั่งอุณหภูมิของภาชนะลดลงแล้วชั่งน้ำหนัก
- 4.2. ทำเช่นเดียวกับข้อ 4.1 จนได้ผลต่างของน้ำหนักที่ชั่งไม่เกิน 3 มิลลิกรัม
- 4.3. ชั่งตัวอย่าง 2 กรัม ลงในถ้วยกระเบื้อง แล้วนำไปเผาบนเตาแก๊สจนหมดควัน
- 4.4. นำไปเผาที่เตาเผาที่อุณหภูมิ 550 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง แล้วนำออกจากเตาเผาไปใส่ในโถดูดความชื้น ปล่อยให้ถึงวัจนกระทั่งอุณหภูมิของภาชนะลดลงแล้วชั่งน้ำหนัก
- 4.5. คำนวณหาปริมาณเถ้าจากสูตร

$$\text{ร้อยละของเถ้า} = \frac{\text{น้ำหนักส่วนที่เหลือจากการเผา (กรัม)}}{\text{น้ำหนักตัวอย่างเริ่มต้น (กรัม)}} \times 100$$

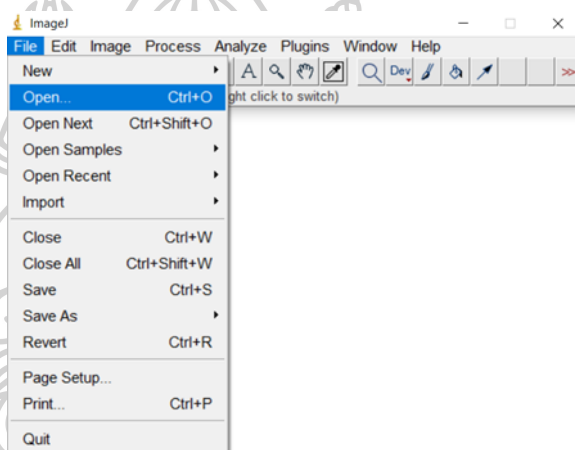
ก 5 การตรวจหาเซราไมด์ด้วยเทคนิค TLC

- 5.1. ชั่งสารสกัดหยาบปริมาณ 0.2 กรัม ละลายในสารละลายผสมระหว่างคลอโรฟอร์ม:เมทานอล (2:1) 4.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันโดยใช้เครื่องโฮโมจีไนเซอร์ที่ความเร็ว 6000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที
- 5.2. นำสารละลายที่ได้ขีดให้เป็นเส้นตรงตามแนวระนาบลงบนแผ่น TLC ด้วยเข็มฉีดยาสำหรับ GC โดยดูจุดสารละลายที่เตรียมไว้แล้ว 2 ไมโครลิตร (เส้นตรงที่มีความยาวประมาณ 1 เซนติเมตร ตามแนวระนาบ และห่างจากขอบแผ่น TLC ขึ้นมา 2 เซนติเมตร) ทิ้งตัวอย่างที่หยดให้แห้ง จากนั้นหยดสารละลายอีก 2 ไมโครลิตร ซ้ำตรงตำแหน่งเดิมและรอให้แห้ง ทำเช่นนี้อีก 2 ครั้ง ดังนั้นปริมาตรรวมของสารละลายที่หยดลงบนแผ่น TLC ทั้งหมดคือ 8 ไมโครลิตร
- 5.3. นำแผ่น TLC วางลงใน TLC chamber (ขนาด 6×25×25) ที่อิมมัวไปด้วยสารละลายผสมระหว่าง 85 มิลลิลิตรของคลอโรฟอร์ม และ 15 มิลลิลิตรของเมทานอล (เตรียมโดยผสมสารละลายดังกล่าวลงใน TLC chamber ปิดฝา TLC chamber ให้สนิท แล้วตั้งทิ้งไว้ประมาณ 1 ชั่วโมง ก่อนทำการทดลอง)
- 5.4. ปิดฝา chamber ให้สนิท ปล่อยให้เกิดการแยกของสารตัวอย่าง โดยสารละลายเป็นตัวพาตัวอย่างไปบนแผ่น TLC เป็นระยะทาง 16 เซนติเมตร จากนั้นนำแผ่น TLC ออกมา (หลังจากผ่านไปประมาณ 1.30 ชั่วโมง) และปล่อยให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง

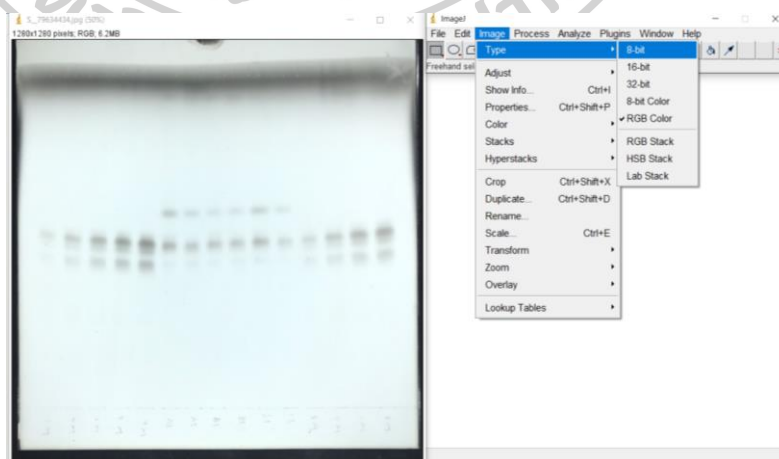
- 5.5. สเปรย์สารละลายคอปเปอร์ซัลเฟต (ประกอบไปด้วย 10% w/v คอปเปอร์ซัลเฟต, 5% w/v เมทานอล และ 8% w/v กรดฟอสฟอริก ที่ละลายในน้ำกลั่น) ลงบนแผ่น TLC ให้ชุ่มทั้งแผ่น
- 5.6. ปลอ่ยให้แผ่น TLC แห้งที่อุณหภูมิห้องประมาณ 1 ชั่วโมง จากนั้นนำไปเผาด้วยตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 150 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที
- 5.7. ถ่ายภาพแผ่น TLC และนำไปวิเคราะห์หาปริมาณกลูโคซิลเซราไมด์ด้วยโปรแกรม ImageJ

ก 6 วิเคราะห์หาปริมาณกลูโคซิลเซราไมด์ด้วยโปรแกรม ImageJ

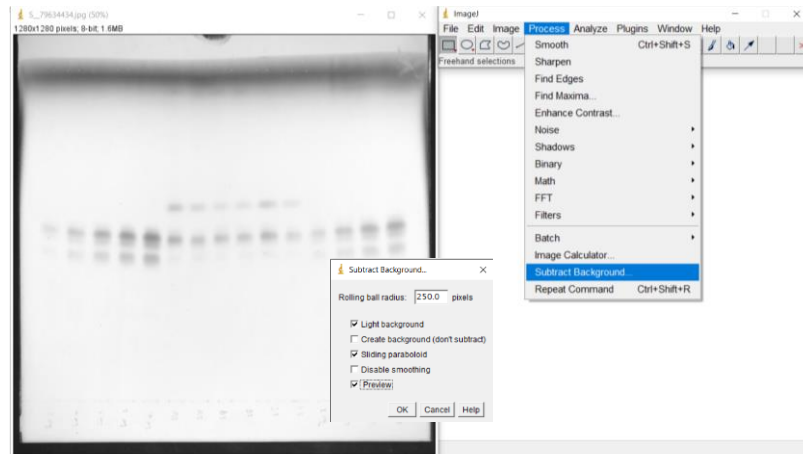
- 6.1. เปิดโปรแกรม ImageJ และเลือกไฟล์รูปภาพของแผ่น TLC ที่ต้องการวิเคราะห์



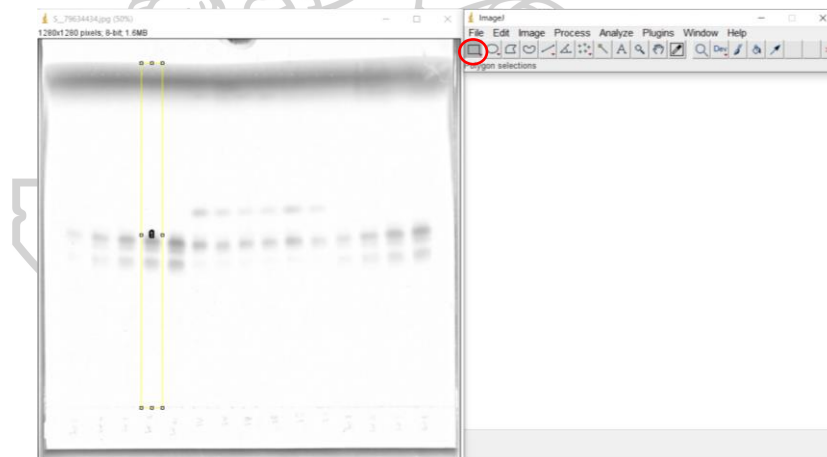
- 6.2. ไปที่เมนู image แล้วเลือก type และ select 8 bit



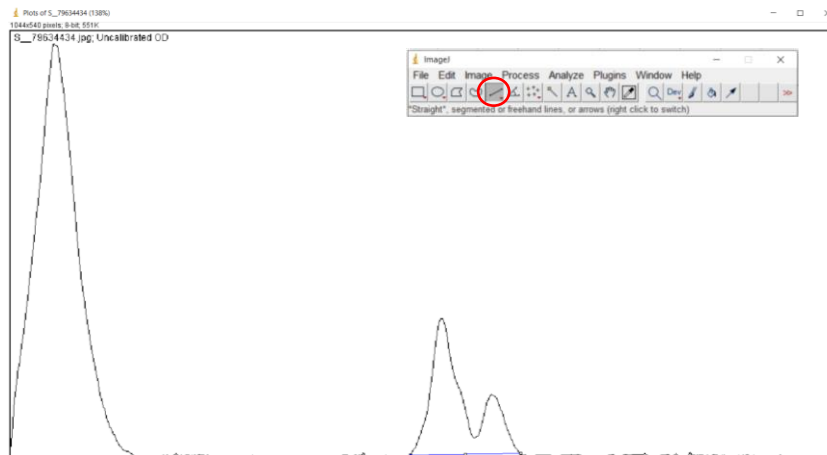
- 6.3. ปรับภาพให้พื้นหลังสว่างขึ้น หากต้องการปรับเส้นฐานของโครมาโตแกรมให้เข้าใกล้ 0 ให้ไปที่เมนู Process เลือก subtract background เลือก rolling ball radius = 250 pixels + light background + sliding paraboloid + preview และกดตกลง



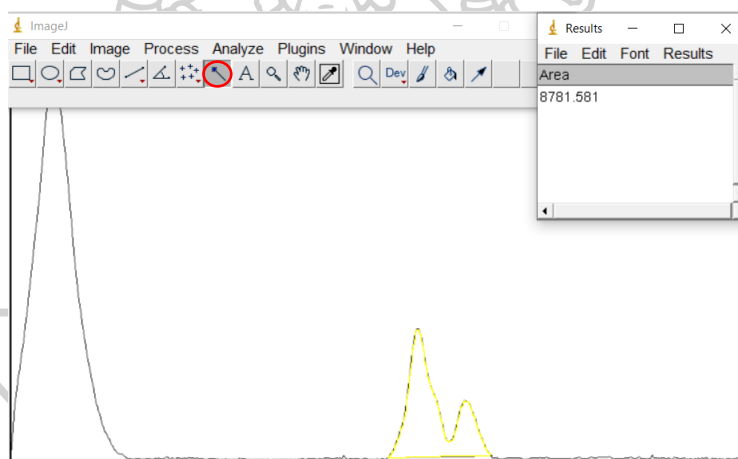
- 6.4. เลือกใช้เครื่องมือ rectangle tool แล้วเลือกแถวของตัวอย่างที่คุณต้องการคำนวณพื้นที่ จากนั้นกด ctrl+1



- 6.5. คำนวณพื้นที่ใต้กราฟโดยกด $ctrl+3$ โปรแกรมจะแสดงโครมาโตแกรมตัวอย่างแล้วเลือกเครื่องมือ straight tool และวาดเส้นตรงใต้จุดสูงสุดของตัวอย่างที่คุณต้องการหาพื้นที่



- 6.6. เลือกเครื่องมือ wand tool แล้วคลิกบริเวณที่คุณต้องการหาพื้นที่



- 6.7. สำหรับค่าพื้นที่ของมาตรฐานกลูโคซิลเซราไมด์ในแต่ละความเข้มข้นจะแสดงบนกราฟที่แสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณกลูโคซิลเซราไมด์ (แกน x) และพื้นที่ใต้กราฟ (แกน y) ซึ่งจะได้สมการมาตรฐาน จากนั้น พื้นที่ของตัวอย่างจะถูกคำนวณและเปรียบเทียบโดยใช้สมการมาตรฐานของกลูโคซิลเซราไมด์

ก 7 วิเคราะห์ปริมาณเฮราไมด์ด้วยเทคนิค HPLC-ELSD

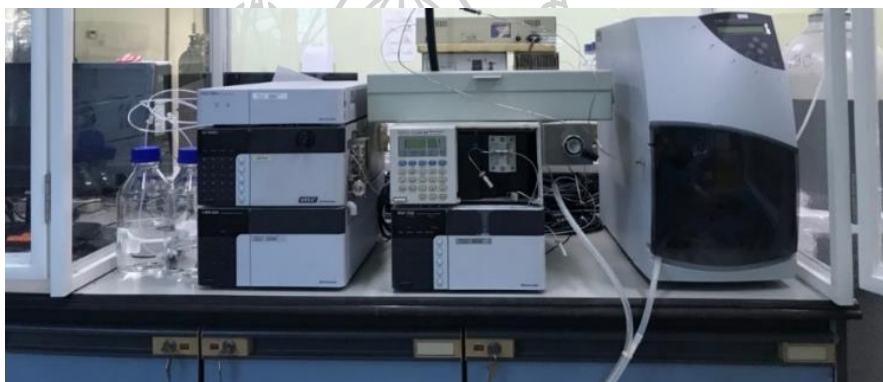
- 7.1. เตรียมสารละลายสารสกัดหยาบจากเห็ดโดยชั่งสารสกัดหยาบ 0.1 กรัม ลงในหลอดทดลองขนาด 25 × 150 มิลลิเมตร ละลายในสารละลายผสมระหว่างคลอโรฟอร์ม:เมทานอล (2:1) 5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันโดยใช้เครื่องโฮโมจีไนเซอร์ที่ความเร็ว 6000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที
- 7.2. กรองสารละลายผ่าน PTFE syringe filter ขนาด 0.45 ไมโครเมตร แล้วฉีดตัวอย่างปริมาตร 20 ไมโครลิตรเข้าสู่เครื่อง HPLC ซึ่งแสดงในภาพที่ 35
- 7.3. สภาวะที่ใช้วิเคราะห์เฮราไมด์ในสารสกัดหยาบจากเห็ดด้วยเทคนิค HPLC-ELSD แสดงดังต่อไปนี้
- ชนิดคอลัมน์ normal phase : Inertsil, SIL-100A 5um, 4.6 × 250 mm (Pralhada Rao et al.)
 - อุณหภูมิคอลัมน์และเครื่องตรวจวัด 40 องศาเซลเซียส
 - อัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ 0.8 mL/min
 - อัตราการไหลของแก๊สไนโตรเจน 2.45 L/min
 - ความดันขณะเปิดแก๊สไนโตรเจนเข้าสู่ดีเทคเตอร์ 50 kPa
 - การตั้งค่าขยายสัญญาณ 1 เท่า
 - การเก็บสัญญาณตัวอย่าง (Filter) 10 s

ตารางที่ 6 สัดส่วนเฟสเคลื่อนที่ที่ใช้สำหรับกาวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC-ELSD

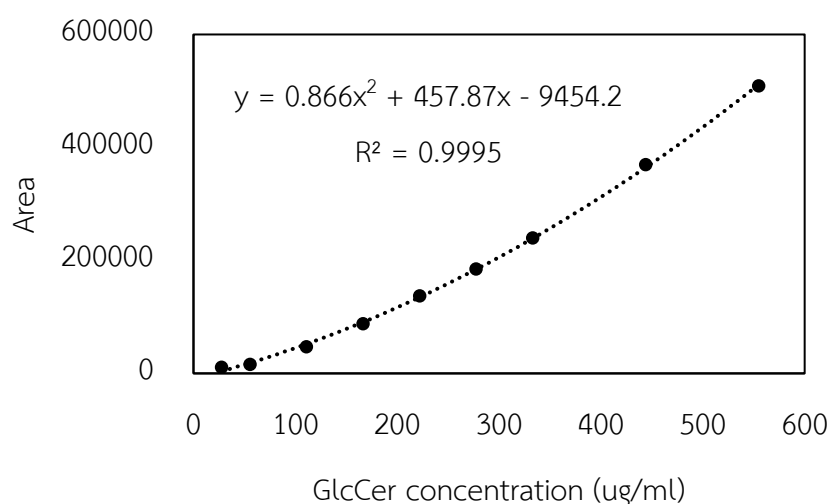
เวลา	% เฮกเซน	% คลอโรฟอร์ม	% เมทานอล
0.01	100	0	0
30.00	65	20	15
80.00	40	40	20
85.00	40	40	20
90.00	100	0	0

- 7.4. นำพื้นที่ใต้กราฟจากพีคที่ปรากฏในโครมาโตแกรมที่มีตำแหน่ง retention time ตรงกับสารมาตรฐานเซราไมด์มาคำนวณหาปริมาณเซราไมด์โดยเทียบจากสมการของกราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นของสารมาตรฐานเซราไมด์กับพื้นที่ใต้กราฟ ดังแสดงในภาพที่ 36
- 7.5. คำนวณความเข้มข้นของเซราไมด์ในสารสกัดหยาบ (g/100 g Crude extract d.b.) จากสูตร

$$\text{ความเข้มข้นของเซราไมด์} = \frac{\text{ปริมาณเซราไมด์ (กรัม)}}{\text{น้ำหนักตัวแห้งของสารสกัดหยาบ (กรัม)}} \times 100$$



ภาพที่ 33 เครื่อง HPLC-ELSD สำหรับวิเคราะห์ปริมาณกลูโคซิลเซราไมด์



ภาพที่ 34 กราฟมาตรฐานกลูโคซิลเซราไมด์จากการวิเคราะห์ด้วย HPLC-ELSD

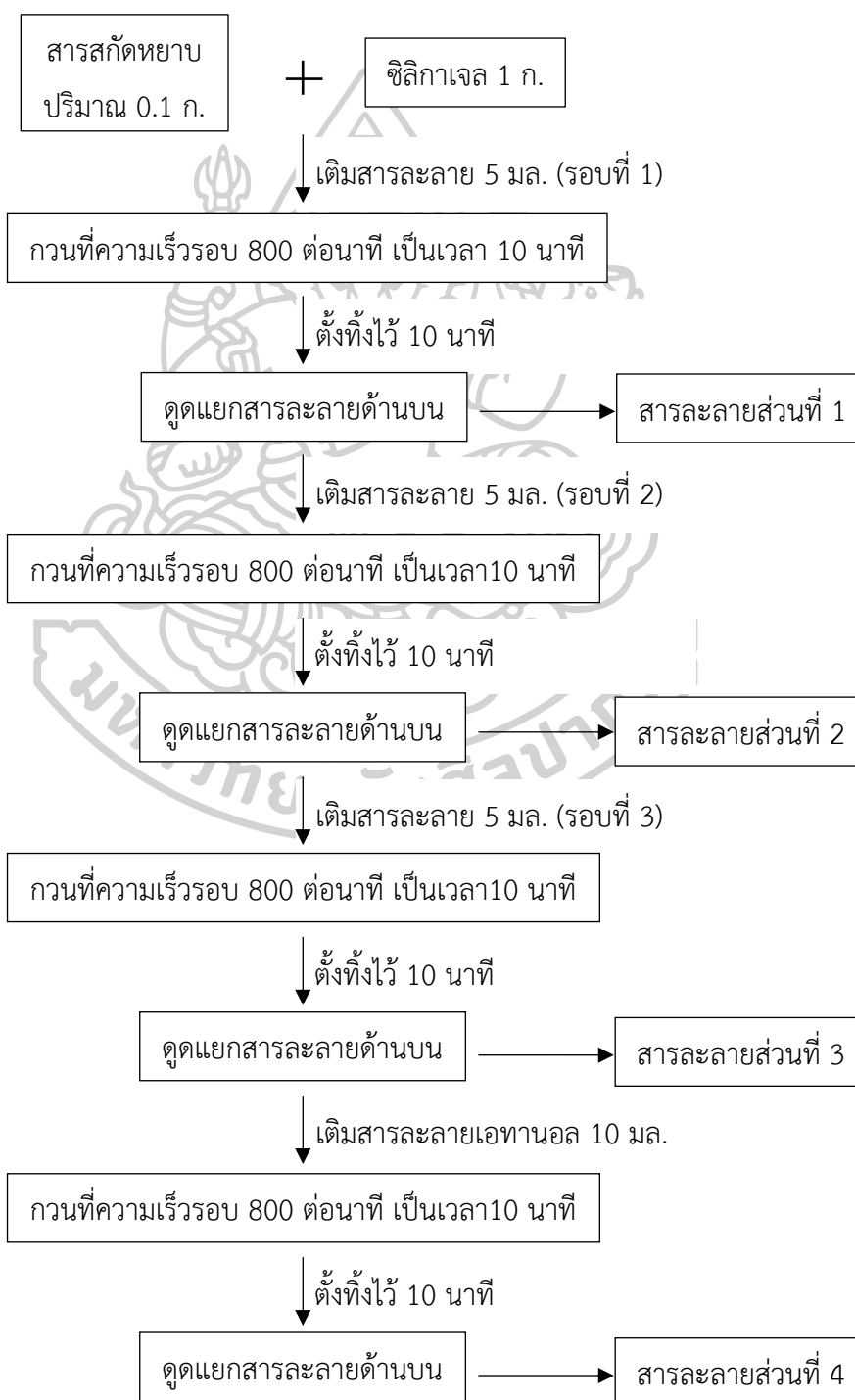


ภาคผนวก ข

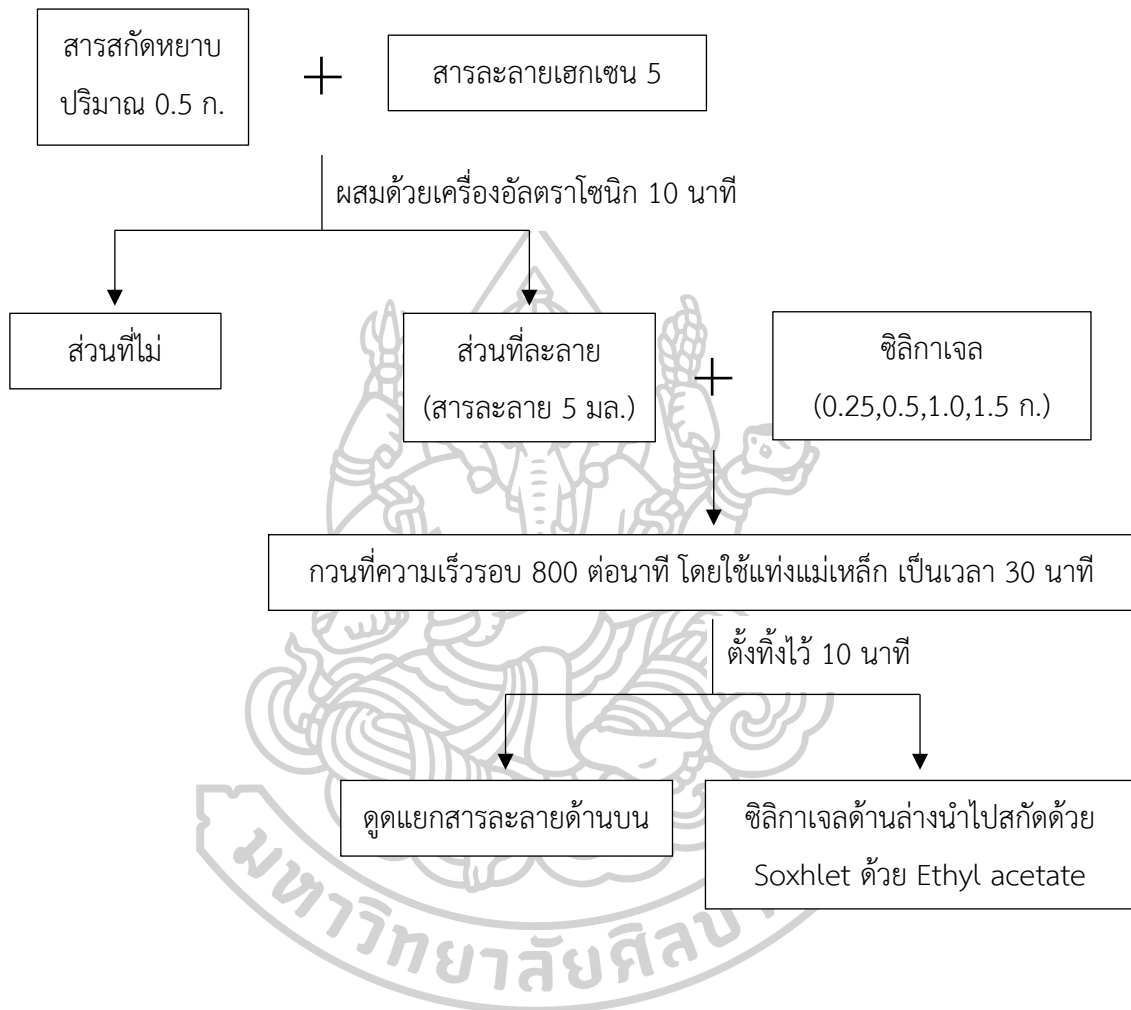
ภาคผนวก ข

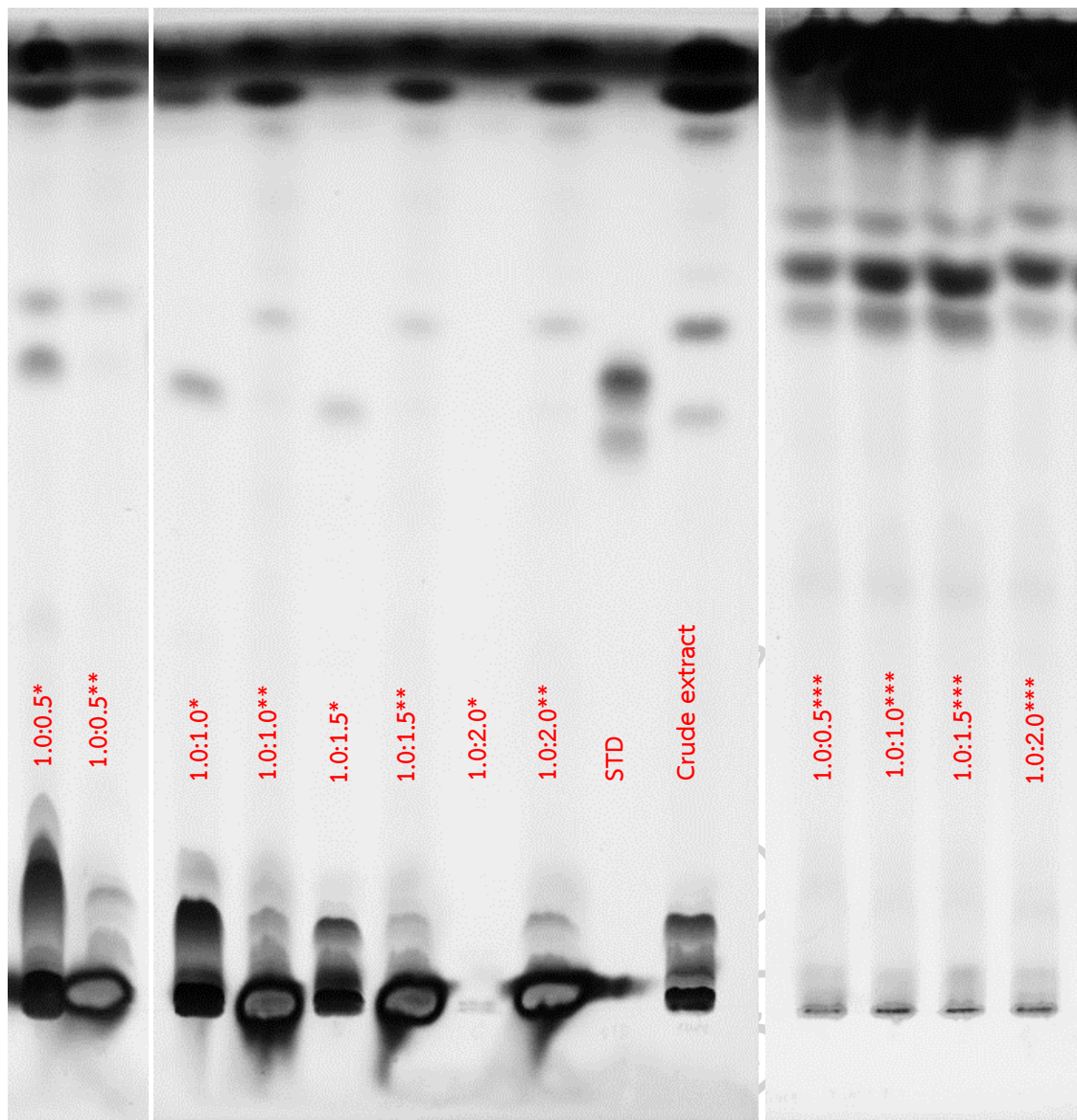
รายละเอียดวิธีการทดลองและผลการทดลอง

- วิเคราะห์การแยกส่วนของสารสกัดหยาบจากเห็ดนางรม (5-6 วัน) ด้วยซิลิกาเจลโดยใช้สารละลาย เฮกเซนและอะซิโตนในอัตราส่วนที่แตกต่างกัน

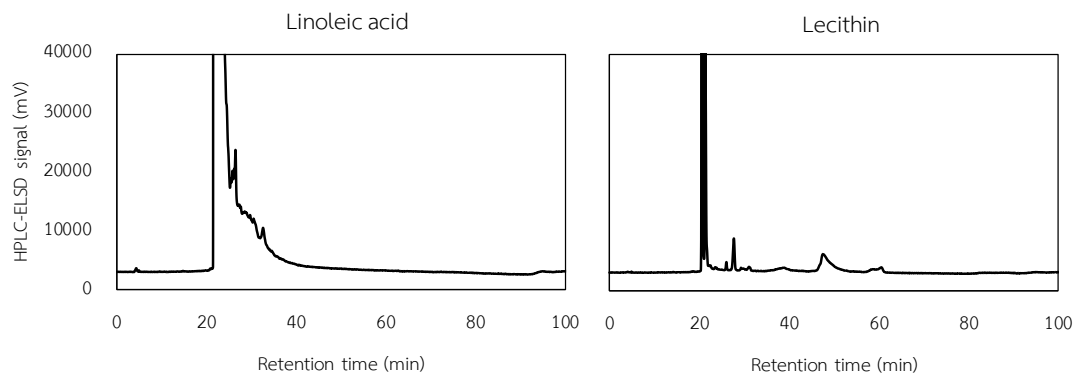


2. วิเคราะห์การแยกส่วนของสารสกัดหยาบจากเห็ดนางรม (5-6 วัน) ด้วยซิลิกาเจลโดยใช้สารละลายเฮกเซน





ภาพที่ 35 ภาพถ่ายของแผ่น TLC สำหรับการวิเคราะห์กลุ่มโคซิลเซราไมด์ในตัวอย่างสารสกัดจากเห็ด (* = ส่วนที่ได้จากการนำสารละลาย (1) มากรองด้วยซิลิกาเจล, ** = ส่วนที่ไม่สามารถละลายในสารละลายเฮกเซน, *** = ส่วนที่ได้จากนำซิลิกาเจลไปสกัดด้วยเครื่อง Soxhlet)



ภาพที่ 36 โครมาโตแกรมของเลซิทินและกรดลิโนเลอิกที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วย HPLC-ELSD





ภาคผนวก ค
การวิเคราะห์ทางสถิติ

นำข้อมูลที่ได้จากหารทดลองมาวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA, Analysis of Variance) โดโนโปรแกรม SPSS (Statistics Package for the Social Science) รุ่น SPSS 18.0 for Windows ในการวิเคราะห์ผลที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan

ANOVA

ปริมาณสารสกัดหยาบของเห็ดหูหนู เห็ดฟาง เห็ดนางฟ้า และเห็ดนางรม

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	409.206	3	136.402	2532.475	.000
Within Groups	.431	8	.054		
Total	409.636	11			

Duncan^a

Type	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
เห็ดหูหนู	3	.8651		
เห็ดนางฟ้า	3		7.2025	
เห็ดนางรม	3		7.2164	
เห็ดฟาง	3			17.1814
Sig.		1.000	.944	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

ANOVA

ปริมาณกลูโคซิลเซราไมด์ในสารสกัดหยาบจากเห็ด 4 ชนิด

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
GlcCER content (g/100g crude extract)	Between Groups	.515	3	.172	15.949	.002
	Within Groups	.075	7	.011		
	Total	.590	10			
GlcCER content (g/100g dry mushroom)	Between Groups	.108	3	.036	342.449	.000
	Within Groups	.001	7	.000		
	Total	.109	10			

Duncan^a

GlcCER content (g/100g crude)

		Subset for alpha = 0.05	
Type	N	1	2
เห็ดหูหนู	3	1.6356	
เห็ดนางฟ้า	3	1.6919	
เห็ดฟาง	3	1.7614	
เห็ดนางรม	3		2.1803
Sig.		.220	1.00

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

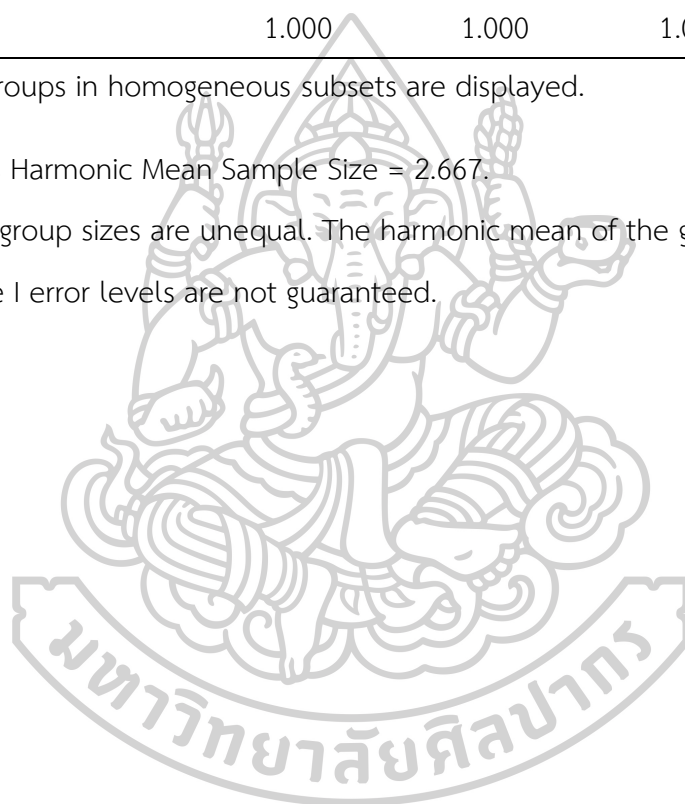
- Uses Harmonic Mean Sample Size = 2.667.
- The group sizes are unequal. The harmonic mean of the group sizes is used. Type I error levels are not guaranteed.

GlcCER content (g/100g dry mushroom)

Type	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
เห็ดหูหนู	3	0.014			
เห็ดนางฟ้า	3		.1218		
เห็ดนางรม	3			.1574	
เห็ดฟาง	3				.3026
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

- Uses Harmonic Mean Sample Size = 2.667.
- The group sizes are unequal. The harmonic mean of the group sizes is used. Type I error levels are not guaranteed.



ANOVA

ค่าองค์ประกอบทางเคมีโดยประมาณของเห็ดนางรมทั้ง 3 ช่วงอายุ

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Moisture content (fresh mushroom)	Between Groups	.374	2	.187	1.014	.418
	Within Groups	1.107	6	.184		
	Total	1.480	8			
Moisture content (dry mushroom)	Between Groups	.021	2	.010	.113	.895
	Within Groups	.551	6	.092		
	Total	.752	8			
Protein content	Between Groups	25.659	2	12.829	25.738	.001
	Within Groups	2.991	6	.498		
	Total	28.650	8			
Ash content	Between Groups	.684	2	.342	4.895	.055
	Within Groups	.419	6	.070		
	Total	1.104	8			
Lipid content	Between Groups	.005	2	.003	.055	.947
	Within Groups	.279	6	.046		
	Total	.284	8			

Duncan^a

Moisture content (fresh mushroom)

Type	N	Subset for alpha = 0.05
		1
3-4 day	3	90.8200
1-2 day	3	91.1333
5-6 day	3	91.2133
Sig.		.223

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

- a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

Moisture content (dry mushroom)

Type	N	Subset for alpha = 0.05
		1
1-2 day	3	6.7800
5-6 day	3	6.8800
3-4 day	3	6.8833
Sig.		.700

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

- a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

Protein content

Type	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
5-6 day	3	19.0033	
3-4 day	3		21.9233
1-2 day	3		23.0000
Sig.		1.000	.111

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

- a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

Ash content

Type	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
5-6 day	3	7.4433	
3-4 day	3	7.9633	7.9633
1-2 day	3		8.0767
Sig.		.053	.618

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

- a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

Lipid content

Type	N	Subset for alpha = 0.05
		1
3-4 day	3	1.4867
5-6 day	3	1.5033
1-2 day	3	1.5433
Sig.		.765

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

- a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

ปริมาณสารสกัดหยาบของเห็ดนางรมทั้ง 3 ช่วงอายุ

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.307	2	.154	1.379	.322
Within Groups	.668	6	.111		
Total	.975	8			

Duncan^a

Type	N	Subset for alpha = 0.05
		1
5-6 day	3	6.4367
1-2 day	3	6.5800
3-4 day	3	6.8800
Sig.		.167

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

- a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000

ANOVA

ปริมาณกลูโคซิลเซราไมด์ในสารสกัดหยาบจากเห็ดนางรมทั้ง 3 ช่วงอายุ

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
GlcCER content (g/100g crude extract)	Between Groups	.089	2	.045	.830	.481
	Within Groups	.322	6	.054		
	Total	.411	8			
GlcCER content (g/100g dry mushroom)	Between Groups	.000	2	.000	.316	.741
	Within Groups	.003	6	.000		
	Total	.003	8			

Duncan^a

GlcCER content (g/100g crude)

Subset for alpha = 0.05		
Type	N	1
5-6 day	3	2.6567
1-2 day	3	2.7400
3-4 day	3	2.8967
Sig.		

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

GlcCER content (g/1g dry mushroom)

Type	N	Subset for alpha = 0.05
		1
5-6 day	3	.1767
1-2 day	3	.1833
3-4 day	3	.1900
Sig.		.471

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

- a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

ANOVA

ปริมาณกลูโคซิลเซราไมด์ในสารสกัดเหยาบ (กรัม) ต่อซิลิกาเจล (กรัม) ในอัตราส่วนต่างๆ

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Solvent	Between Groups	11065852.33	3	3688617.444	254.192	.000
	Within Groups	116089.333	8	14511.167		
	Total	11181941.67	11			
Silica gel	Between Groups	7671678.333	3	2557226.111	128.560	.000
	Within Groups	159130.667	8	19891.333		
	Total	7830809.000	11			

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

- a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

Duncan^a

Solvent

Type	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
1.0:2.0	3	.00			
1.0:1.5	3		756.67		
1.0:1.0	3			1089.67	
1.0:0.5	3				2637.00
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

Silica gel

Type	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
1.0:0.5	3	1673.33		
1.0:1.0	3	1929.33		
1.0:1.5	3		2688.67	
1.0:2.0	3			2650.67
Sig.		.057	1.000	1.000

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล	วรรณรัตน์ เจียเจริญ
วัน เดือน ปี เกิด	1 ตุลาคม 2539
สถานที่เกิด	นครปฐม
วุฒิการศึกษา	พ.ศ.2561 สำเร็จการศึกษาปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยี อาหาร คณะวิศวกรรมศาสตร์และเทคโนโลยีอุตสาหกรรม มหาวิทยาลัย ศิลปากร พ.ศ. 2562 ศึกษาต่อในระดับปริญญาโท สาขาวิชาเทคโนโลยี อาหาร คณะวิศวกรรมศาสตร์และเทคโนโลยีอุตสาหกรรม มหาวิทยาลัย ศิลปากร
ที่อยู่ปัจจุบัน	560 ถนน 25 มกรา ต.บ่อพลับ อ.เมือง จ.นครปฐม 73000
ผลงานตีพิมพ์	วันที่ 25 มิถุนายน พ.ศ.2564 ได้เข้าร่วมนำเสนอผลงานวิจัย/งานสร้างสรรค์ ในโครงการประชุมวิชาการบัณฑิตศึกษาระดับชาติ ครั้งที่ 11 เรื่องวิจัยและ นวัตกรรมเพื่อเตรียมความพร้อมรับการเปลี่ยนแปลง ในหัวข้อ "การ สกัดกลูโคซิลเซราไมด์จากเห็ดกินได้"

