บทที่ 4
ผลการทดลอง และอภิปรายผลการทดลอง

การศึกษาผลของซิตรินินในสารสกัดข้าวแดง ในการทำให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเพาะเลี้ยงที่มีต้นกำเนิดจากไตของตัวอ่อนของมนุษย์ (Human Embryonic Kidney cells : HEK293T) ได้แบ่งออกเป็น 4 การทดลอง คือ การทดลองตอนที่ 1 เป็นการเตรียมอาหารเลี้ยงเซลล์ และการนำเซลล์ HEK293T มาทำการเพาะเลี้ยง จนมีปริมาณเพิ่มมากขึ้น การทดลองตอนที่ 2 เป็นการทดสอบความเป็นพิษของ DMSO ต่อเซลล์ HEK293T ด้วยวิธีการ MTT bioassay เพื่อหาระดับของ DMSO ที่สามารถนำไปใช้ในการเตรียมสารละลายของสารสกัดข้าวแดง การทดลองตอนที่ 3 เป็นการทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดข้าวแดง ต่อเซลล์ HEK293T ด้วยวิธีการ MTT bioassay และการทดลองตอนที่ 4 เป็นการตรวจหาปริมาณซิตรินินในข้าวแดง ด้วยวิธีการ HPLC การทดลองแต่ละตอนได้ผลดังนี้

4.1 ผลการทดลองตอนที่ 1 การเพาะเลี้ยงเซลล์ HEK293T ให้มีปริมาณเพิ่มมากขึ้น

4.1.1 ผลการเตรียมอาหารสำหรับเพาะเลี้ยงเซลล์ HEK293T

อาหารเลี้ยงเซลล์แต่ละชนิดคือ Incomplete RPMI-1640, Complete RPMI-1640, และ Freezing medium จะต้องมีการทดสอบความปลอดจากเชื้อจุลชีพ (sterility test) โดยเฉพาะแบคทีเรียและเชื้อราก่อนที่จะนำอาหารเลี้ยงเซลล์แต่ละชนิดนี้ไปใช้งาน ในการนำเซลล์มาเพาะเลี้ยงหรือการทำ subculture ทุกครั้ง โดยทำตามขั้นตอนในข้อ จ.1-จ.3 ของหัวข้อ 3.6.1.1 ในบทที่ 3 เพื่อเป็นการตรวจสอบว่า อาหารเลี้ยงเซลล์มีความปลอดจากเชื้อจุลชีพ ก่อนนำไปใช้งานในครั้งต่อไป

ในการเตรียมอาหารเลี้ยงเซลล์เริ่มต้น คือ Incomplete RPMI-1640 น้ำที่ใช้คือน้ำปลอดอิออนต้องมีความบริสุทธิ์สูง และผ่านการกรองด้วยขบวนการ reverse osmosis หรือผ่านขบวนการกลั่น 2 ครั้ง การที่ต้องทำให้ Incomplete RPMI-1640 มีความปลอดจากเชื้อจุลชีพ โดยการกรองผ่านแผ่นเยื่อกรองที่มีขนาดรูกรอง 0.22 ไมครอน เพื่อเป็นการป้องกันไม่ให้องค์ประกอบในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่สลายตัวได้ง่ายจากการฆ่าเชื้อด้วยความร้อน เช่น กรดอะมิโนกลูตามีน และไบคาร์บอเนตถูกทำลาย ใน Incomplete RPMI-1640 มี phenol red เป็นองค์ประกอบที่ไวต่อการเปลี่ยนแปลงของค่า pH แม้เพียงเล็กน้อย ในตอนที่เริ่มเตรียม Incomplete RPMI-1640 มีสีส้ม เมื่อเติมโซเดียมไบคาร์บอเนตลงไป Incomplete RPMI-1640 จะเปลี่ยนเป็นสีแดงใส ซึ่งแสดงถึงการที่ค่า pH เพิ่มขึ้น การที่ต้องวัดและ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ปรับค่า pH ของ Incomplete RPMI-1640 ให้ได้ 7.4 เนื่องจากเป็นสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งเพาะเลี้ยง (Butler, 2004)

การเติมซีรั่มลงในอาหารเลี้ยงเซลล์เพื่อให้อาหารเลี้ยงเซลล์เป็น Complete medium มักใช้ที่ความเข้มข้น 10% โดยปริมาตร เป็นการสนับสนุนช่วยให้เซลล์มีการเจริญเติบโตที่ดี เนื่องจาก Fetal bovine serum มีปัจจัยที่ส่งเสริมการเจริญเติบโตของเซลล์ซึ่งเรียกว่า embryonic growth factors จึงใช้เป็นตัวกระตุ้นการเจริญของเซลล์เพาะเลี้ยงหลายชนิด โดยทั่วไปซีรั่มจำเป็นต้องใช้ในการทดสอบการแสดงคุณลักษณะในการเจริญของเซลล์ หรือใช้ในการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ (Freshney, 2000) การเติมยาปฏิชีวนะลงในอาหารเลี้ยงเซลล์ ก็เพื่อช่วยลดความเสี่ยงจากการปนเปื้อนของเชื้อจุลชีพ โดยความเข้มข้นของยาปฏิชีวนะที่ใช้ต้องไม่เป็นพิษต่อเซลล์ มีการใช้ยาปฏิชีวนะหลายชนิดร่วมกันเติมลงในอาหารเลี้ยงเซลล์ โดยมากจะใช้ Penicillin G ในขนาด 100 U/มิลลิลิตร ร่วมกับ Streptomycin ในขนาด 50 มิลลิกรัม/ลิตร ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก และเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ (Butler, 2004) อย่างไรก็ดีในการเตรียมอาหารเลี้ยงเซลล์ คือ Incomplete RPMI-1640 ในการทดลองนี้ ควรได้มีการเติมยายับยั้งการเจริญของเชื้อราและยีสต์ เช่น Amphotericin B ร่วมด้วย เพื่อช่วยป้องกันอาหารเลี้ยงเซลล์จากการปนเปื้อนของเชื้อราและยีสต์

ตามปกติอาหารที่ใช้ในการเลี้ยงเซลล์ HEK293T คือ Dulbecco's modification of Eagle's medium (DMEM) ที่มี Fetal Bovine serum อยู่ 10% แต่ในการทดสอบการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ HEK293T จากการให้สารเคมี หรือการนำยีนส์เข้าสู่เซลล์ (transfection) จะใช้อาหาร RPMI-1640 ที่มี Fetal Bovine serum อยู่ 10% ในการเลี้ยงเซลล์ (Butler, 2004) เนื่องจาก RPMI-1640 สามารถใช้เลี้ยงทั้งเซลล์ที่มีการเจริญเกาะกับพื้นผิว และเซลล์ที่มีการเจริญในสภาพแขวนลอย (suspension culture) ได้

4.1.2 ผลการนำเซลล์ HEK293T มาทำการเพาะเลี้ยงเพิ่มจำนวน

4.1.2.1 ผลการนำเซลล์ HEK293T จากสภาพแช่แข็ง มาทำการเพาะเลี้ยงในขวดเพาะเลี้ยงเซลล์

จากการนำเซลล์ HEK293T จากสภาพแช่แข็งมาทำการละลาย และถ่ายลงเลี้ยงในขวดเพาะเลี้ยงเซลล์ แล้วไปส่องตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิดหัวกลับ พบว่าเซลล์ HEK293T ส่วนใหญ่มีรูปร่างกลมขนาดเล็ก ซึ่งเป็นรูปร่างปกติของเซลล์ที่มีการเจริญ โดยการเกาะยึดกับพื้นผิวในระยะเริ่มต้น (Freshney, 2000) ลอยกระจายอยู่ทั่วไปใน Complete RPMI-1640 โดยมีเซลล์บางส่วนมีรูปร่างกลมแต่ขอบเซลล์มีรอยหยัก หรือเป็นเซลล์ที่มีรูปร่างบิดเบี้ยวลอยอยู่ด้วย ซึ่งเซลล์พวกนี้อาจถูกทำลายในขั้นตอนการละลายเซลล์แช่แข็ง จากนั้นนำขวดเพาะเลี้ยงเซลล์นี้เข้าบ่มในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ ตามปกติตู้เพาะเลี้ยงเซลล์จะตั้งอุณหภูมิไว้ที่ 37°C ซึ่งจะส่งผลให้เซลล์มีอัตราการเจริญสูงสุด ในสภาวะบรรยากาศของตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ ที่มีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5.0% จะช่วย

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

รักษาระบบบัฟเฟอร์ภายในอาหารเลี้ยงเซลล์ ให้มีค่า pH อยู่ในช่วงที่เหมาะสมต่อการเจริญของเซลล์ คือ 6.9-7.4 (Butler, 2004) ในการนำขวดเพาะเลี้ยงเซลล์เข้าบ่มในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ทุกครั้ง ต้องคลายเกลียวฝาของขวดเพาะเลี้ยงเซลล์ออกเล็กน้อย เพื่อให้มีการแลกเปลี่ยนก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ กับไอน้ำในบรรยากาศของตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ เพื่อรักษาระบบบัฟเฟอร์ในอาหารเลี้ยงเซลล์ และป้องกันการระเหยของน้ำในอาหารเลี้ยงเซลล์ไม่ให้มากเกินไป

จากการนำขวดเพาะเลี้ยงเซลล์ที่บ่มมานาน 24 ชั่วโมง มาตรวจดูการเจริญของเซลล์ HEK293T ด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิดหัวกลับ พบว่าเซลล์ HEK293T ส่วนใหญ่ประมาณ 80% ของเซลล์ทั้งหมด มีการเกาะยึดกับพื้นผิวของขวดเพาะเลี้ยงเซลล์แล้ว และกำลังมีการยื่นส่วนของเซลล์มาเชื่อมต่อกัน ทำให้เกิดกลุ่มเซลล์เป็นบริเวณเล็ก ๆ สามารถทำการเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ภายในขวดเพาะเลี้ยงเซลล์ได้ ตามปกติเซลล์ HEK293T เมื่อมีการเจริญจะเกาะกับพื้นผิวของขวดเพาะเลี้ยงเซลล์ สำหรับเซลล์ที่อ่อนแอ หรือเป็นเซลล์ที่ตายแล้ว จะลอยในอาหารเลี้ยงเซลล์ ไม่เกาะกับพื้นผิวของขวดเพาะเลี้ยงเซลล์ การที่ต้องเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ หลังจากที่นำเซลล์ HEK293T มาเพาะเลี้ยงได้ 24 ชั่วโมง เพราะหลังจากที่นำเซลล์ HEK293T จากสภาพแช่แข็งมาทำการเลี้ยง และได้ล้างเอา Freezing medium ออกไป แต่ก็อาจมี DMSO ซึ่งเป็นส่วนผสมใน Freezing medium ซึ่งช่วยป้องกันไม่ให้เซลล์แตกสลายในระหว่างการแช่แข็ง แต่ก็มีความเป็นพิษต่อเซลล์หลงเหลืออยู่บ้างเล็กน้อย หากปล่อยทิ้งไว้นานกว่า 24 ชั่วโมงจะทำให้เซลล์ HEK293T มีการเจริญช้า และมีการตายเพิ่มขึ้น หากเลี้ยงในอาหารเดิมต่อไป

4.1.2.2 ผลการแบ่งเซลล์ HEK293T มาเลี้ยงเพิ่มในขวดเพาะเลี้ยงเซลล์ หลังจากเพาะเลี้ยงมาได้นาน 96 ชั่วโมง

จากการนำขวดเพาะเลี้ยงเซลล์ที่ใช้เลี้ยงเซลล์ HEK293T ซึ่งบ่มมานาน 96 ชั่วโมง มาตรวจดูด้วยตาเปล่าพบว่า ลักษณะของอาหารเลี้ยงเซลล์คือ Complete RPMI-1640 ภายในขวดเพาะเลี้ยงเซลล์ เปลี่ยนจากสีชมพูเข้มในวันที่ทำการเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ มาเป็นสีเหลืองใส และมีแผ่นเซลล์สีขาวปกคลุมทั่วทั้งพื้นผิวของขวดเพาะเลี้ยงเซลล์ แสดงถึงสภาวะที่มีการเจริญของเซลล์มาก เซลล์มีการใช้สารอาหารต่าง ๆ จากอาหารเลี้ยงเซลล์ และขับของเสียจากขบวนการเมทาบอลิซึมออกมาในอาหารเลี้ยงเซลล์ (Butler, 2004) จากการสะสมของของเสียต่าง ๆ นี้เอง ทำให้ค่า pH ของอาหารเลี้ยงเซลล์ลดต่ำลง phenol red ซึ่งเป็นตัวบ่งชี้ในอาหารเลี้ยงเซลล์จึงเปลี่ยนเป็นสีเหลือง

จากผลการตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิดหัวกลับพบว่า เซลล์มีรูปร่างคล้ายกระสวยเกาะกลุ่มเรียงตัวกันหนาแน่น ในลักษณะเป็นชั้นเดียว (monolayer) โดยยังไม่มีการซ้อนทับกันเป็น 2 ชั้น จนเหลือพื้นที่ว่างสำหรับให้เซลล์มีการเจริญต่อไปได้น้อยมาก คิดเป็นการเจริญของเซลล์ HEK293T 90% (% confluence=90%) และมีเซลล์รูปร่างกลมขนาดเล็กลอยขึ้นมาในปริมาณ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

น้อยมาก หากใช้เวลาในการเพาะเลี้ยงเซลล์ HEK293T นานกว่านี้ เซลล์อาจมีการเจริญซ้อนทับกันเป็น 2 ชั้น เมื่อสารอาหารต่าง ๆ หมดไปแล้ว เซลล์ HEK293T จะค่อย ๆ ทยอยตายลง จนเห็นเซลล์ที่มีรูปร่างกลม หรือบิดเบี้ยวเกาะกันเป็นกลุ่มลอยอยู่ในอาหารเลี้ยงเซลล์ ความถี่ของการ subculture จึงควรพิจารณาตามอัตราการเจริญเติบโตของเซลล์แต่ละชนิด ที่แตกต่างกันออกไป (Cell culture technique, 2003)

ในการชะล้างเอาเซลล์ HEK293T ทั้งหมดออกจากพื้นผิวของขวดเพาะเลี้ยงเซลล์ จำเป็นจะต้องดูดเอาอาหารเลี้ยงเซลล์เดิมออกไปให้หมดก่อน เนื่องจากในอาหารเลี้ยงเซลล์มีโปรตีนต่าง ๆ เช่น ปัจจัยที่ช่วยในการเจริญเติบโต (growth factors) และอัลบูมินเป็นต้น ซึ่งโปรตีนเหล่านี้จะไปขัดขวางการทำงานของ EDTA ที่จะไปจับกับ Ca^{2+} ซึ่งเป็นองค์ประกอบของโมเลกุลที่ช่วยในการเกาะยึดระหว่างเซลล์กับเซลล์ และระหว่างเซลล์กับพื้นผิวที่เกาะยึดอยู่ (Freshney, 2000) ตามปกติจะใช้สารละลาย EDTA เพียงอย่างเดียว ในการชะล้างเซลล์ที่มีการเกาะยึดกับพื้นผิวอย่างไม่แข็งแรง (Butler, 2004) ในการเติมสารละลาย EDTA ใน Phosphate buffer saline ลงในขวดเพาะเลี้ยงเซลล์ เพื่อชะล้างเซลล์ออกจากพื้นผิวของขวดเพาะเลี้ยงเซลล์นั้น ไม่ควรให้เซลล์สัมผัสกับ EDTA นานเกินไป เนื่องจาก EDTA มีความเป็นพิษต่อเซลล์ และสามารถทำลายพื้นผิวในการเกาะยึดของเซลล์กับขวดเพาะเลี้ยงเซลล์ได้ (Cell culture technique, 2003)

การที่ต้องนำเซลล์ HEK293T มาทำการปั่นล้าง 2 ครั้งด้วย Incomplete RPMI-1640 ก็เพื่อทำให้มั่นใจว่า EDTA ที่ใช้ในการชะล้างเซลล์ ถูกกำจัดออกจากชั้นของเซลล์จนหมด โดยการใช้ความเร็วต่ำในการปั่นเหวี่ยงอยู่ในช่วง 150-200 g เป็นเวลา 5-10 นาที ก็เพียงในการทำให้เซลล์แยกตัวออกจากชั้นของอาหารเลี้ยงเซลล์ เนื่องจากการใช้ความเร็วสูงในการปั่นเหวี่ยง อาจทำลายเซลล์ได้ (Butler, 2004)

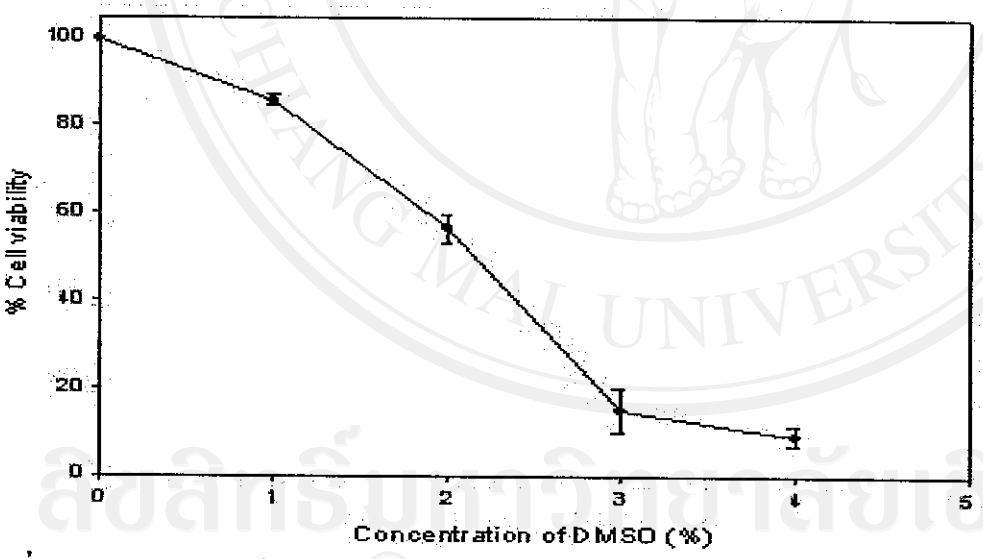
4.2 ผลการทดลองตอนที่ 2 การทดสอบความเป็นพิษของ DMSO ต่อเซลล์ HEK293T โดยวิธีการ MTT bioassay

ในงานวิจัยค้นคว้าแบบอิสระนี้ที่เลือกใช้วิธีการ MTT bioassay ในการวัดค่าเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอด (%cell viability) ของเซลล์ HEK293T เนื่องจากในการทดลองนี้มีการเตรียมเซลล์ HEK293T และการเติมสารละลายทดสอบลงในถาดทดสอบชนิด 96 หลุม ซึ่งสามารถสังเกตการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้น จากการเติมสารละลาย MTT ได้ด้วยตาเปล่า เนื่องจากปริมาณผลึก formazan ที่เกิดขึ้นภายในหลุมของถาดทดสอบ จะเป็นสัดส่วนโดยตรงกับปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตอยู่ในหลุมนั้น ๆ สามารถทำการทดสอบโดยวิธีการ MTT bioassay ได้พร้อมกันหลายตัวอย่าง (treatment) ซึ่งแต่ละตัวอย่างมีหลายซ้ำ ได้ในการทดลองเพียงครั้งเดียว และสามารถตรวจผลการทดสอบโดยวิธีการ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

MTT bioassay ได้ในเวลาไม่เกิน 4 ชั่วโมง (Freshney, 2000) การที่หลุมที่เป็น cell control และหลุมที่เติมสารละลาย DMSO เข้มข้น 1% ณ ความเข้มข้นสุดท้ายมีปริมาณผลึก formazan อยู่มาก แสดงว่าน่าจะมีเซลล์ HEK293T ที่มีชีวิตอยู่ในปริมาณมาก ส่วนหลุมที่เติมสารละลาย DMSO เข้มข้น 2, 3, และ 4% ณ ความเข้มข้นสุดท้าย มีปริมาณผลึก formazan น้อยลงไปตามลำดับ ก็อาจแสดงว่ามีปริมาณเซลล์ HEK293T ที่มีชีวิตน้อยลงตามลำดับด้วย

ในการทดลองนี้ที่เลือกใช้ค่า O.D. ที่ความยาวคลื่นแสงอัลตร้าไวโอเลตที่ 550 นาโนเมตร ในการเปรียบเทียบกับค่า O.D. ที่ความยาวคลื่นแสงอัลตร้าไวโอเลต 630 นาโนเมตรซึ่งเป็นค่า O.D. อ้างอิง ด้วยเครื่อง ELISA reader เนื่องจากค่า O.D. จากการดูดกลืนแสงอัลตร้าไวโอเลตที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร มีค่าใกล้เคียงกับค่า O.D. จากการดูดกลืนแสงอัลตร้าไวโอเลตที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร ซึ่งสัมพันธ์กับปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตอยู่ (Trivedi et al., 1990 อ้างใน Kitabatake N., et al., 1993) และควรรีบทำการวัดค่า O.D. ที่ความยาวคลื่นแสงอัลตร้าไวโอเลตที่ 540 หรือ 570 นาโนเมตร โดยทันที เนื่องจากผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการละลายผลึก formazan ด้วย DMSO ในแต่ละหลุมภายในถาดทดสอบไม่มีความเสถียร (Freshney, 2000)



ภาพที่ 4.2.1 แสดงค่าเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์ HEK293T จากการเติมสารละลาย DMSO เข้มข้น 1, 2, 3, และ 4% ณ ความเข้มข้นสุดท้ายใน Complete RPMI-1640

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 4.2.1 เปรียบเทียบค่าเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์ HEK293T จากการเติมสารละลาย DMSO เข้มข้น 1, 2, 3, และ 4% ณ ความเข้มข้นสุดท้ายใน Complete RPMI-1640

ความเข้มข้นสุดท้ายของ DMSO (%)	ค่าเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์ HEK293T (%)
0	$100^{a} \pm 0.000$
1	$86.0^{b} \pm 1.04$
2	$56.4^{c} \pm 3.41$
3	$14.9^{d} \pm 4.90$
4	$9.0^{e} \pm 2.22$

หมายเหตุ : 1). ค่าของข้อมูลแสดงเป็น ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

2). ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่กำกับค่าของข้อมูลในแนวตั้งที่แตกต่างกัน แสดงว่าเป็นค่าที่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$)

จากภาพที่ 4.2.1 และตารางที่ 4.2.1 พบว่าเมื่อความเข้มข้นของ DMSO เพิ่มขึ้น ค่าเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์ HEK293T มีแนวโน้มลดลงไปตามลำดับ โดยในการเติม Complete RPMI-1640 เพียงอย่างเดียว ค่าเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์ HEK293T คิดเป็น 100% เมื่อเติมสารละลาย DMSO เข้มข้น 1 และ 2% ณ ความเข้มข้นสุดท้าย ค่าเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์ HEK293T ลดลงไปอยู่ที่ 86.0 และ 56.4% ตามลำดับ เมื่อเติมสารละลาย DMSO ที่มีความเข้มข้นเพิ่มขึ้นเป็น 3% ณ ความเข้มข้นสุดท้าย ค่าเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์ HEK293T ลดลงอย่างรวดเร็วไปอยู่ที่ 14.9% ค่าเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์ HEK293T ลดลงจนมีค่าต่ำสุดอยู่ที่ 9.0% เมื่อเติมสารละลาย DMSO ที่มีความเข้มข้นเพิ่มขึ้นเป็น 4% ณ ความเข้มข้นสุดท้าย เมื่อพิจารณาจากค่าเฉลี่ยของเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์ HEK293T จากการเติมสารละลาย DMSO เข้มข้น 1, 2, 3, และ 4% ณ ความเข้มข้นสุดท้าย พบว่ามีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 จึงอาจกล่าวได้ว่า การเพิ่มความเข้มข้นของ DMSO ในอาหารเลี้ยงเซลล์คือ Complete RPMI-1640 จะทำให้มีการเกิดพิษต่อเซลล์ HEK293T เพิ่มสูงขึ้น และเซลล์ HEK293T มีการรอดชีวิตน้อยลง สามารถคำนวณหาค่าความเข้มข้นสุดท้ายของ DMSO ใน Complete RPMI-1640 ซึ่งทำให้เซลล์ HEK293T มีการรอดชีวิตอยู่ที่ 80% หรือทำให้เซลล์ HEK293T มีการตายไป 20% เท่ากับ $0.94 \pm 0.03\%$

การเลือกใช้ DMSO เป็นตัวทำละลายซิตรินินมาตรฐาน และสารสกัดข้าวแดงในงานวิจัยค้นคว้าแบบอิสระนี้ เพราะว่า DMSO เป็นตัวทำละลายอินทรีย์ที่มีความสามารถในการละลายสูงมาก โดยไม่ทำให้ตัวถูกละลายตกตะกอน แต่เนื่องจาก DMSO เองก็มีความเป็นพิษต่อเซลล์ จึงควรใช้ DMSO ในความเข้มข้นที่น้อยที่สุด ในการเตรียมสารละลายทดสอบ (กัลยาณี จิรศรีพงศ์พันธ์ และนวลอนงค์ จิระกาญจนกิจ, 2547) โดยอาจทำการเตรียมสารละลายทดสอบที่ความเข้มข้นสูง ๆ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

แล้วทำการเจือจางให้อยู่ในความเข้มข้นที่เหมาะสมด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ เมื่อต้องการทำการทดลอง (Freshney, 2000) โดยความเข้มข้นสุดท้ายของ DMSO ในสารละลายที่เตรียมขึ้น ควรต้องน้อยกว่า 0.5% จึงจะไม่ส่งผลเสียต่อเซลล์มากเกินไป (Lewis et al., 2000) แต่ในการทดลองนี้จะเลือกใช้ DMSO ที่ความเข้มข้นสุดท้าย 1% ในการเตรียมสารละลาย DMSO และสารละลายซิตรินินมาตรฐานใน Complete RPMI-1640 ซึ่งใช้เป็นตัวศึกษาเปรียบเทียบ กับสารละลายของสารสกัดข้าวแดงใน Complete RPMI-1640 เนื่องจากใช้ละลายสารสกัดข้าวแดงที่ความเข้มข้นสูงเท่าที่จะเป็นไปได้ และการเกิดพิษต่อเซลล์ยังอยู่ในช่วงที่ยอมรับได้ จะเห็นได้จากค่าเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์ HEK293T เมื่อเติมสารละลาย DMSO เข้มข้น 1% ณ ความเข้มข้นสุดท้าย มีความใกล้เคียงมากกับค่าเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของเซลล์ HEK293T เมื่อเติม Complete RPMI-1640 เพียงอย่างเดียว

4.3 ผลการทดลองตอนที่ 3 การทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดข้าวแดง ต่อเซลล์ HEK293T โดยวิธีการ MTT bioassay

4.3.1 ผลการเตรียมสารละลายของสารสกัดข้าวแดง, สารละลายของ DMSO, และสารละลายซิตรินินมาตรฐานใน Complete RPMI-1640 และการเติมสารละลายทดสอบดังกล่าวลงในถาดทดสอบชนิด 96 หลุม

ในการเตรียมสารละลายของสารสกัดข้าวแดงในการทดสอบนี้ ควรเตรียมสารละลายทดสอบในลักษณะเจือจางลงทีละ 2 เท่า เป็นลำดับที่เท่ากัน (serial dilution) (Butler, 2000) ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์จนได้ความเข้มข้น 5 อันดับ โดยมีความเข้มข้นสูงสุดเป็นความเข้มข้นที่ทำลายเซลล์ส่วนใหญ่ และความเข้มข้นต่ำสุดเป็นความเข้มข้นที่ไม่ทำลายเซลล์เลย(กัลยาณี จิรศรีพงศ์พันธ์ และนวลอนงค์ จิระกาญจนกิจ, 2547)

ความเข้มข้นที่สูงสุดของสารละลายของสารสกัดข้าวแดงที่ผลิตจาก*M. purpureus* ทุกสายพันธุ์ที่ทุกระยะหมักซึ่งมี DMSO เข้มข้น 2% ณ ความเข้มข้นสุดท้าย และสารละลายซิตรินินมาตรฐานเข้มข้น 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ณ ความเข้มข้นสุดท้าย คาดว่าเป็นความเข้มข้นสูงสุดของสารละลายทดสอบ ที่จะทำลายเซลล์ HEK293T ส่วนใหญ่ สำหรับความเข้มข้นต่ำสุดของสารละลายของสารสกัดข้าวแดงที่ผลิตจาก *M. purpureus* ทุกสายพันธุ์ ที่ทุกระยะหมักซึ่งมี DMSO เข้มข้น 1% ณ ความเข้มข้นสุดท้าย และสารละลายซิตรินินมาตรฐานเข้มข้น 3.125 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ณ ความเข้มข้นสุดท้าย คาดว่าเป็นความเข้มข้นต่ำสุดของสารละลายทดสอบ ที่จะไม่ทำลายเซลล์ HEK293T เลย สารละลายทดสอบที่จะไม่ใช้รายงานในผลการทดลองนี้คือ สารละลายของสารสกัดข้าวแดงที่ผลิตจาก *M. purpureus* ทุกสายพันธุ์ ที่ทุกระยะหมักซึ่งมี DMSO เข้มข้น 2% ณ ความเข้มข้นสุดท้าย เนื่องจากผลการทดลองตอนที่ 2 ในหัวข้อ 4.2 พบว่า สารละลาย

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

DMSO เข้มข้น 2% ณ ความเข้มข้นสุดท้าย ทำให้เกิดการตายของเซลล์ HEK293T โดยเฉลี่ยสูงมาก ถึง 56.409% เมื่อเทียบกับชุดทดสอบที่เป็น cell control ซึ่งถ้าใช้สารละลายของสารสกัดข้าวแดงซึ่งมี DMSO เข้มข้น 2% ณ ความเข้มข้นสุดท้าย อาจทำให้เห็นผลการตายของเซลล์ HEK293T จากการใช้สารสกัดข้าวแดงไม่ชัดเจน เนื่องจากเซลล์จะมีการตายจำนวนมาก โดยอาจเป็นผลโดยตรงจาก DMSO ดังนั้นในการทดลองตอนที่ 3 นี้จึงใช้สารละลายของสารสกัดข้าวแดงที่ผลิตจาก *M. purpureus* ทุกสายพันธุ์ ที่ทุกระยะหมักซึ่งมี DMSO เข้มข้น 2% ณ ความเข้มข้นสุดท้าย เป็นตัวเปรียบเทียบเท่านั้น

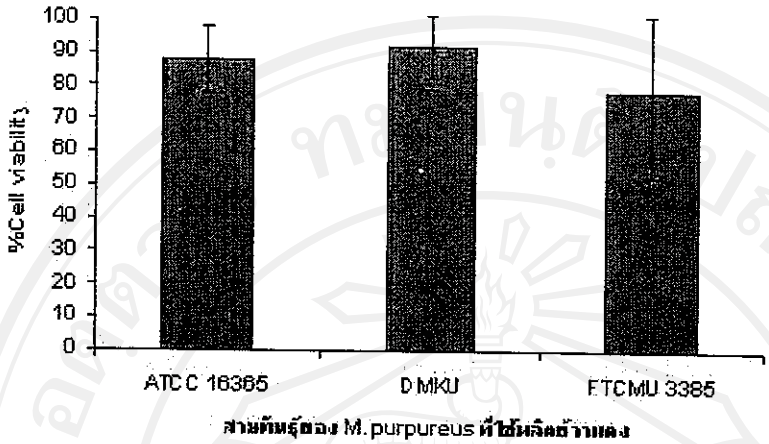
การบ่มถาดทดสอบชนิด 96 หลุมทั้ง 3 ถาดในข้อ ข 4. ของหัวข้อ 3.6.3.3 ในบทที่ 3 ใช้เวลา 72 ชั่วโมง เพราะว่า ซิตรินินที่อาจมีอยู่ในสารละลายของสารสกัดข้าวแดงใน Complete RPMI-1640 ทุกตัวอย่าง ทำให้เกิดพิษต่อเซลล์โดยการแทรกซึมผ่านเยื่อหุ้มเซลล์เข้าไปที่ไมโทคอนเดรีย แล้วยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการต่อต้านอนุมูลอิสระคือ เอนไซม์ glutathionereductase และเอนไซม์ transhydrogenase เป็นผลทำให้เกิดอนุมูลอิสระของออกซิเจน และ superoxide anion ในระบบการหายใจของเซลล์ แล้วทำให้เซลล์เกิดการตาย (Wijnands and Leusden, 2000) ซึ่งถือว่าเป็นการทำให้เกิดพิษต่อเซลล์ โดยมีผลต่อขบวนการเมทาบอลิซึมของเซลล์ มักออกฤทธิ์ในช่วงเวลามากกว่า 24 ชั่วโมง และระยะเวลา 72 ชั่วโมงนี้ จะทำให้เห็นผลของการเกิดพิษต่อเซลล์ HEK293T สูงที่สุด (Kitabatake et al., 1993 และ Liu et al., 2003)

4.3.2 การทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดข้าวแดง และสารละลายซิตรินินมาตรฐานต่อเซลล์ HEK293T โดยวิธีการ MTT bioassay

การที่ทุกหลุมที่เป็น cell control, vehicle control : DMSO 1%, และทุกหลุมที่เติมสารละลายของสารสกัดข้าวแดง หรือสารละลายซิตรินินมาตรฐานใน Complete RPMI-1640 ซึ่งมีความเข้มข้นต่ำมีผลึก formazan อยู่ในปริมาณสูง อาจเป็นเพราะว่าในทุกหลุมที่เติมสารละลายดังกล่าวนี้ มีเซลล์ HEK293T ที่มีชีวิตอยู่ในปริมาณสูง การที่หลุมที่เป็น vehicle control : DMSO 2% มีปริมาณผลึก formazan น้อยกว่า ก็แสดงว่ามีเซลล์ HEK293T ที่มีชีวิตอยู่ในระดับหนึ่ง แต่น่าจะมีปริมาณน้อยกว่าในหลุมที่เป็น vehicle control : DMSO 1% สำหรับหลุมที่เติมสารละลายของสารสกัดข้าวแดง หรือสารละลายซิตรินินมาตรฐานใน Complete RPMI-1640 ซึ่งมีความเข้มข้นสูง ๆ มีปริมาณผลึก formazan เกิดขึ้นน้อยมาก เป็นการแสดงว่าในหลุมที่เติมสารละลายดังกล่าว มีปริมาณเซลล์ HEK293T ที่มีชีวิตอยู่น้อยลงไปตามลำดับ ส่วนหลุมที่เติมสารละลายซิตรินินมาตรฐานเข้มข้น 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ไม่มีผลึก formazan เกิดขึ้นเลย แสดงว่ามีเซลล์ HEK293T ที่มีชีวิตอยู่น้อยมากหรือไม่มีเลย

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

4.3.2.1 ผลจากสายพันธุ์ของ *M. purpureus* ที่ใช้ในการผลิตข้าวแดง ต่อค่าเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์ HEK293T



ภาพที่ 4.3.1 แสดงค่าเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์ HEK293T จากการเติมสารละลายของสารสกัดข้าวแดงที่ผลิตจาก *M. purpureus* สายพันธุ์ ATCC 16365, DMKU, และ FTCMU 3385 ใน Complete RPMI-1640

ตารางที่ 4.3.1 เปรียบเทียบค่าเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์ HEK293T จากการเติมสารละลายของสารสกัดข้าวแดงที่ผลิตจาก *M. purpureus* สายพันธุ์ ATCC 16365, DMKU, และ FTCMU 3385 ใน Complete RPMI-1640

สายพันธุ์ของ *M. purpureus* ที่ใช้ผลิตข้าวแดง	ค่าเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์ HEK293T
ATCC 16365	$87.7^{c} \pm 10.30$
DMKU	$92.0^{a} \pm 9.50$
FTCMU 3385	$78.5^{b} \pm 26.11$

หมายเหตุ : 1). ค่าของข้อมูลแสดงเป็น ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน โดยพิจารณารวมจากทุกระยะหมักของข้าวแดงที่ผลิตจาก *M. purpureus* สายพันธุ์นั้น ๆ ซึ่งนำไปใช้เตรียมสารละลายของสารสกัดข้าวแดงทุกความเข้มข้น

2). ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่กำกับค่าของข้อมูลในแนวตั้งที่แตกต่างกัน แสดงว่าเป็นค่าที่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$)

จากภาพที่ 4.3.1 และตารางที่ 4.3.1 พบว่าค่าเฉลี่ยของเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์ HEK293T จากการเติมสารละลายของสารสกัดข้าวแดงที่ผลิตจาก *M.purpureus* ทั้ง 3 สายพันธุ์นี้ มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยสารละลายของสารสกัดข้าวแดงที่ผลิตจาก *M. purpureus* สายพันธุ์ DMKU ซึ่งพิจารณารวมจากทุกระยะหมักในการผลิตข้าวแดงที่

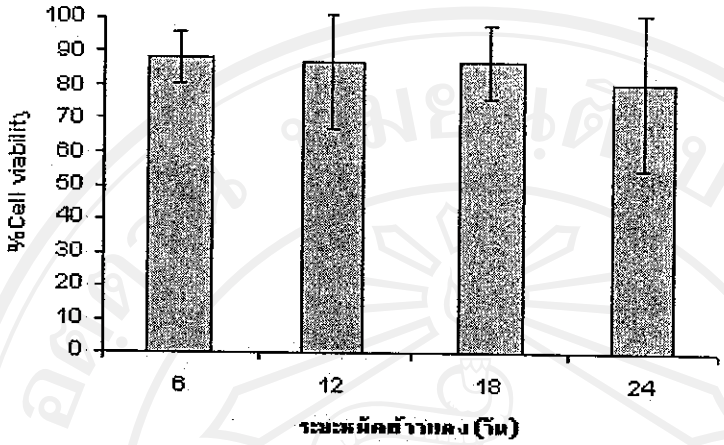
ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

นำไปใช้เตรียมสารละลายของสารสกัดข้าวแดงทุกความเข้มข้น ให้ค่าเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์ HEK293T สูงสุดอยู่ที่ 92.0% รองลงมาเป็นสารละลายของสารสกัดข้าวแดงที่ผลิตจาก*M. purpureus* สายพันธุ์ ATCC 16365 ส่วนสารละลายของสารสกัดข้าวแดงที่ผลิตจาก *M. purpureus* สายพันธุ์ FTCMU 3385 ให้ค่าเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์ HEK293T น้อยที่สุดอยู่ที่ 78.5% จึงอาจกล่าวได้ว่าสารละลายของสารสกัดข้าวแดงที่ผลิตจาก *M. purpureus* สายพันธุ์ FTCMU 3385 น่าจะมีปริมาณสารพิษที่เทียบเท่ากับซิตรินินสูงสุด รองลงมาเป็นสารละลายของสารสกัดข้าวแดงที่ผลิตจาก *M. purpureus* สายพันธุ์ ATCC 16365 และ DMKU ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองของจุลยุทธ บุญสร้างสม (2546) ที่ได้ตรวจหาปริมาณซิตรินินในตัวอย่างข้าวแดงที่ผลิตจาก*M. purpureus* ทั้ง 3 สายพันธุ์นี้ โดยวิธี ELISA และผลการตรวจหาปริมาณซิตรินินด้วยวิธีการ HPLC ในการทดลองตอนที่ 4 ดังแสดงไว้ในตารางที่ 4.4.4 แล้ว ซึ่งพบว่า *M. purpureus* สายพันธุ์ FTCMU 3385 ให้ปริมาณซิตรินินสูงสุด รองลงมาเป็นสายพันธุ์ ATCC 1365 และ DMKU ตามลำดับ

สำหรับค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์ HEK293T จากการเติมสารละลายของสารสกัดข้าวแดงที่ผลิตจาก *M. purpureus* ทั้ง 3 สายพันธุ์ ดังกล่าวมีค่าค่อนข้างสูง โดยเฉพาะสารละลายของสารสกัดข้าวแดงที่ผลิตจาก*M. purpureus* สายพันธุ์ FTCMU 3385 ซึ่งอาจเป็นผลมาจากความแปรปรวนของค่าเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์ HEK293T ในแต่ละซ้ำที่มีการเติมสารละลายของสารสกัดข้าวแดง จากหลายความเข้มข้น ณ ทุกระยะหมักของ *M. purpureus* สายพันธุ์เดียวกัน การเติมสารละลายของสารสกัดข้าวแดงที่ผลิตจาก *M. purpureus* สายพันธุ์เดียวกัน แต่ต่างระยะหมักกัน ก็มีปริมาณซิตรินินแตกต่างกันดังแสดงในผลการทดลองตอนที่ 4 หรือการเติมสารละลายของสารสกัดข้าวแดงที่ผลิตจาก*M. purpureus* สายพันธุ์และระยะหมักเดียวกัน แต่ต่างความเข้มข้นกัน ก็อาจส่งผลทำให้ค่าเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์ HEK293T มีความแตกต่างกัน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

4.3.3.2 ผลจากระยะเวลาที่ใช้ในการหมักข้าวแดง ต่อค่าเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์ HEK293T



ภาพที่ 4.3.2 แสดงค่าเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์ HEK293T จากการเติมสารละลายของสารสกัดข้าวแดงที่ระยะหมัก 6, 12, 18, และ 24 วันใน Complete RPMI-1640

ตารางที่ 4.3.2 เปรียบเทียบค่าเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์ HEK293T จากการเติมสารละลายของสารสกัดข้าวแดงที่ระยะหมัก 6, 12, 18, และ 24 วันใน Complete RPMI-1640

ระยะเวลาที่ใช้หมักข้าวแดง (วัน)	ค่าเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์ HEK293T
6	$88.5^{a} \pm 7.85$
12	$87.2^{b} \pm 19.87$
18	$87.1^{b} \pm 11.12$
24	$81.1^{c} \pm 26.40$

หมายเหตุ : 1). ค่าของข้อมูลแสดงเป็น ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน โดยพิจารณารวมจากทุกสายพันธุ์ของ *M. purpureus* ที่ใช้ผลิตข้าวแดง ซึ่งนำไปใช้เตรียมสารละลายของสารสกัดข้าวแดงทุกความเข้มข้น

2). ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่กำกับค่าของข้อมูลในแนวตั้งที่แตกต่างกัน แสดงว่าเป็นค่าที่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$)

จากภาพที่ 4.3.2 และตารางที่ 4.3.2 จะเห็นว่า ค่าเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์ HEK293T จากการเติมสารละลายของสารสกัดข้าวแดงทุกระยะหมัก ยกเว้นที่ระยะหมัก 12 และ 18 วัน มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยสารละลายของสารสกัดข้าวแดงที่ระยะหมัก 6 วัน ซึ่งพิจารณารวมจากทุกสายพันธุ์ของ *M. purpureus* ที่ใช้ผลิตข้าวแดง ซึ่งนำไปใช้เตรียมสารละลายของสารสกัดข้าวแดงทุกความเข้มข้น ให้ค่าเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์ HEK293T สูงสุดอยู่ที่ 88.5% รองลงมาเป็นสารละลายของสารสกัดข้าวแดงที่ระยะหมัก 12

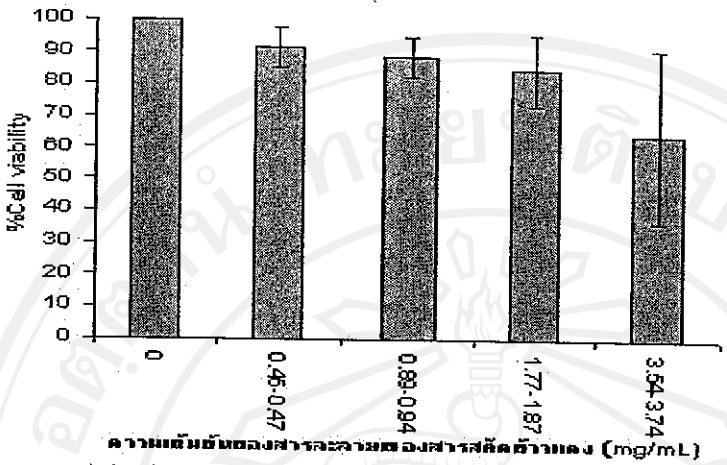
ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

และ 18 วันตามลำดับ โดยที่สารละลายของสารสกัดข้าวแดงทั้งสองระยะหมักนี้ ให้ค่าเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์ HEK293T ใกล้เคียงกันมาก ส่วนสารละลายของสารสกัดข้าวแดงที่ระยะหมัก 24 วัน ให้ค่าเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์ HEK293T ต่ำสุดอยู่ที่ 81.1% จึงอาจกล่าวได้ว่าสารละลายของสารสกัดข้าวแดงที่ระยะหมัก 24 วัน น่าจะมีปริมาณสารพิษที่เทียบเท่ากับซิตรินินสูงสุด รองลงมาเป็นสารละลายของสารสกัดข้าวแดงที่ระยะหมัก 18, 12, และ 6 วันตามลำดับ แต่ผลดังกล่าวนี้ไม่สอดคล้องกับผลการตรวจหาปริมาณซิตรินินด้วยวิธีการ HPLC ในการทดลองตอนที่ 4 ดังแสดงไว้ในตารางที่ 4.4.4 ซึ่งรายงานว่าข้าวแดงที่ระยะหมัก 6 วันให้ปริมาณซิตรินินสูงสุด รองลงมาคือข้าวแดงที่ระยะหมัก 18 และ 12 วันตามลำดับ ส่วนข้าวแดงที่ระยะหมัก 24 วันให้ปริมาณซิตรินินต่ำสุด

การที่ค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์ HEK293T จากการเติมสารละลายของสารสกัดข้าวแดงทั้ง 4 ระยะหมักนี้ โดยเฉพาะที่ระยะหมัก 12, 18, และ 24 วันมีค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสูงมาก อาจเป็นผลมาจากความแปรปรวนของค่าเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์ HEK293T ในแต่ละซ้ำที่มีการเติมสารละลายของสารสกัดข้าวแดง จากหลายความเข้มข้น ณ ระยะหมักเดียวกันของ *M. purpureus* ทั้ง 3 สายพันธุ์ โดยความแปรปรวนดังกล่าวอาจมีสาเหตุมาจากการเติมสารละลายของสารสกัดข้าวแดงในระยะหมักเดียวกัน แต่ผลิตจาก *M.purpureus* ต่างสายพันธุ์กันก็มีปริมาณซิตรินินแตกต่างกันดังแสดงในผลการทดลองตอนที่ 4 หรือการเติมสารละลายของสารสกัดข้าวแดงที่ผลิตจาก *M. purpureus* สายพันธุ์และระยะหมักเดียวกัน แต่ต่างความเข้มข้นกัน ก็อาจส่งผลทำให้ค่าเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์ HEK293T มีความแตกต่างกัน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

4.3.3.3 ผลจากความเข้มข้นของสารละลายของสารสกัดข้าวแดงใน Complete RPMI-1640 ต่อค่าเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์ HEK293T



ภาพที่ 4.3.3 แสดงค่าเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์ HEK293T จากการเติมสารละลายของสารสกัดข้าวแดง ที่มีความเข้มข้นอยู่ในช่วง 0, 0.45-0.47, 0.89-0.94, 1.77-1.87, และ 3.54-3.74 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร

ตารางที่ 4.3.3 เปรียบเทียบค่าเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์ HEK293T จากการเติมสารละลายของสารสกัดข้าวแดง ที่มีความเข้มข้นอยู่ในช่วง 0.45-0.47, 0.89-0.94, 1.77-1.87, และ 3.54-3.74 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร

ความเข้มข้นของสารละลายของสารสกัดข้าวแดง (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)	ค่าเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์ HEK293T
0.45-0.47	$91.3^{a} \pm 6.11$
0.89-0.94	$88.5^{b} \pm 6.22$
1.77-1.87	$84.1^{c} \pm 11.14$
3.54-3.74	$63.9^{d} \pm 27.09$

หมายเหตุ : 1). ค่าของข้อมูลแสดงเป็น ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน โดยพิจารณารวมจากทุกสายพันธุ์ของ *M.pruinosa* และทุกระยะหมักในการผลิตข้าวแดง ซึ่งนำไปใช้เตรียมสารละลายของสารสกัดข้าวแดง ณ ความเข้มข้นเดียวกัน

2). ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่กำกับค่าของข้อมูลในแนวตั้งที่แตกต่างกัน แสดงว่าเป็นค่าที่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$)

3). ความเข้มข้นของสารละลายของสารสกัดข้าวแดงที่อยู่ในช่วง 0.45-0.47, 0.89-0.94, 1.77-1.87, และ 3.54-3.74 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร มาจากข้าวแดงในปริมาณ 182.29, 364.59, 729.19, และ 1,458.39 ppm ตามลำดับ ซึ่งแสดงการคำนวณปริมาณข้าวแดงดังกล่าวนี้ไว้ในหัวข้อ 2. ของภาคผนวก ข. แล้ว

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

จากภาพที่ 4.3.3 และตารางที่ 4.3.3 จะเห็นว่า ค่าเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์ HEK293T จากการเติมสารละลายของสารสกัดข้าวแดงทุกความเข้มข้น มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยในสภาวะที่ไม่มีสารสกัดข้าวแดงเลย ให้ค่าเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์ HEK293T สูงสุดเท่ากับ 100% เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารละลายของสารสกัดข้าวแดง จากในช่วง 0.45-0.47 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร เป็น 0.89-0.94 และ 1.77-1.87 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ซึ่งมาจากข้าวแดงในปริมาณ 182.29, 364.59, และ 729.19 ppm ตามลำดับนั้น ค่าเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์ HEK293T ในแต่ละช่วงความเข้มข้นดังกล่าว ซึ่งพิจารณารวมจากทุกระยะหมักข้าวแดง ที่ผลิตจาก *M. purpureus* แต่ละสายพันธุ์ มีค่าลดลงตามช่วงความเข้มข้นดังกล่าวของสารละลายของสารสกัดข้าวแดง จนเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารละลายของสารสกัดข้าวแดงให้อยู่ในช่วง 3.54-3.74 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ซึ่งมาจากข้าวแดงในปริมาณ 1,458.39 ppm จะทำให้ค่าเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์ HEK293T ลดลงต่ำสุดมาอยู่ที่ 63.9% จึงอาจกล่าวได้ว่า เมื่อความเข้มข้นของสารละลายของสารสกัดข้าวแดงเพิ่มขึ้น จะมีโอกาสพบสารพิษที่เทียบเท่าซิตรินินมากขึ้น เนื่องจากมีการรอดชีวิตของเซลล์HEK293Tน้อยลง ซึ่งแนวโน้มการลดลงของค่าเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์ HEK293T จากการเพิ่มความเข้มข้นของสารละลายของสารสกัดข้าวแดงดังกล่าวนี้ มีความคล้ายคลึงกับแนวโน้มการลดลงของค่าเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์ชนิดเดียวกัน จากการเติมสารละลายซิตรินินมาตรฐานซึ่งมีความเข้มข้นเพิ่มขึ้นจาก 0 เป็น 3.125 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และจาก 6.25 ถึง 12.5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ในหัวข้อ 4.3.2.8 และมีความคล้ายคลึงกับแนวโน้มการลดลง ของค่าเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์ HEK293 จากการเติมสารละลายซิตรินินมาตรฐานที่มีความเข้มข้นตั้งแต่ 0-120 ไมโครโมลาร์ ใน Complete Minimum Essential medium (MEM) ซึ่งใช้ระยะเวลาในการบ่มนาน 24 ชั่วโมง ในงานวิจัยของ Liu et al., (2003)

จากค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์ HEK293T จากการเติมสารละลายของสารสกัดข้าวแดงในแต่ละช่วงความเข้มข้น โดยเฉพาะในช่วงความเข้มข้น 1.77-1.87 และ 3.54-3.74 มิลลิกรัม/มิลลิลิตรนั้น มีค่าสูงมาก ทั้งนี้อาจเกิดจากความแปรปรวนของค่าเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์ HEK293T ในแต่ละซ้ำของการเติมสารละลายของสารสกัดข้าวแดงที่ผลิตจาก *M. purpureus* ทั้ง 3 สายพันธุ์ที่ทุกระยะหมักซึ่งอยู่ในช่วงความเข้มข้นเดียวกัน มีปริมาณแตกต่างกัน จึงทำให้ค่าเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์ HEK293T มีความแตกต่างกันมากทั้งที่มีสารสกัดข้าวแดงเข้มข้นในช่วงเดียวกัน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

4.3.2.4 ผลของปฏิกิริยาสัมพันธ์ระหว่างสายพันธุ์ของ *M. purpureus* ที่ใช้ในการผลิตข้าวแดง และความเข้มข้นของสารละลายของสารสกัดข้าวแดง ต่อค่าเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์ HEK293T

ตารางที่ 4.3.4 เปรียบเทียบค่าเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์ HEK293T จากการเติมสารละลายของสารสกัดข้าวแดงที่ผลิตจาก *M. purpureus* สายพันธุ์ ATCC 16365, DMKU, และ FTCMU 3385 ใน Complete RPMI-1640 ซึ่งมีความเข้มข้นอยู่ในช่วง 0.45-0.47, 0.89-0.94, 1.77-1.89, และ 3.54-3.74 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร

สายพันธุ์ของ *M. purpureus* ที่ใช้ผลิตข้าวแดง	ความเข้มข้นของสารละลายของสารสกัดข้าวแดง (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)			
	0.45-0.47	0.89-0.94	1.77-1.87	3.54-3.74
ATCC 16365	$91.8^{bc} \pm 8.57$	$87.4^{d} \pm 4.33$	$85.6^{d} \pm 3.24$	$73.3^{f} \pm 6.79$
DMKU	$92.5^{b} \pm 3.90$	$90.7^{bc} \pm 7.46$	$92.3^{b} \pm 2.96$	$82.2^{e} \pm 16.18$
FTCMU 3385	$89.9^{c} \pm 5.45$	$87.1^{d} \pm 6.41$	$74.5^{f} \pm 14.61$	$39.5^{g} \pm 29.84$

หมายเหตุ : 1). ค่าของข้อมูลแสดงเป็น ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน โดยพิจารณารวมจากทุกระยะหมักของข้าวแดงที่ผลิตจาก *M. purpureus* แต่ละสายพันธุ์ ซึ่งนำไปใช้เตรียมสารละลายของสารสกัดข้าวแดง ทุกความเข้มข้นในช่วงดังกล่าว

2). ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่กำกับค่าของข้อมูลที่แตกต่างกัน แสดงว่าเป็นค่าที่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$)

3). ความเข้มข้นของสารละลายของสารสกัดข้าวแดงที่อยู่ในช่วง 0.45-0.47, 0.89-0.94, 1.77-1.87, และ 3.54-3.74 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร มาจากข้าวแดงในปริมาณ 182.29, 364.59, 729.19, และ 1,458.39 ppm ตามลำดับ

จากตารางที่ 4.3.4 จะเห็นว่าในสภาวะที่ไม่มีสารสกัดข้าวแดงเลย ให้ค่าเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์ HEK293T สูงสุดอยู่ที่ 100% เมื่อพิจารณาค่าเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์ HEK293T จากการเติมสารละลายของสารสกัดข้าวแดงที่ผลิตจาก *M. purpureus* สายพันธุ์ ATCC 16365 และ FTCMU 3385 ณ ความเข้มข้นต่าง ๆ โดยพิจารณารวมจากทุกระยะหมักข้าวแดง พบว่าสารละลายของสารสกัดข้าวแดงที่ผลิตจาก *M. purpureus* ทั้งสองสายพันธุ์นี้ ให้แนวโน้มการลดลงของค่าเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์ HEK293T คล้ายคลึงกัน เมื่อความเข้มข้นของสารละลายของสารสกัดข้าวแดงเพิ่มขึ้น จนถึงระดับสูงสุดในช่วง 3.54-3.74 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ซึ่งมาจากข้าวแดงในปริมาณ 1,458.39 ppm การเติมสารละลายของสารสกัดข้าวแดงที่ผลิตจาก *M. purpureus* สายพันธุ์ ATCC 16365 จะให้ค่าเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์ HEK293T อยู่ที่ 73.3% ซึ่งมากกว่าการเติมสารละลายของสารสกัดข้าวแดงที่ผลิตจาก *M. purpureus* สายพันธุ์ FTCMU 3385 ซึ่งอยู่ที่ 39.5% จึงอาจกล่าวได้ว่าเมื่อความเข้มข้นของสารละลายของสารสกัดข้าวแดงที่ผลิตจาก *M. purpureus*

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

สายพันธุ์ ATCC 16365 และ FTCMU 3385 เพิ่มขึ้น น่าจะมีโอกาสพบปริมาณสารพิษที่เทียบเท่ากับซิตรินิน ในสารละลายแต่ละความเข้มข้นสูงขึ้นตามลำดับ

สำหรับผลการเติมสารละลายของสารสกัดข้าวแดงที่ผลิตจาก *M. purpureus* สายพันธุ์ DMKU ณ ความเข้มข้นต่าง ๆ โดยพิจารณารวมจากทุกระยะหมักข้าวแดง พบว่า เมื่อความเข้มข้นของสารละลายของสารสกัดข้าวแดง อยู่ในช่วงตั้งแต่ 0.45-1.87 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ซึ่งมาจากข้าวแดงในปริมาณ 182.29-729.19 ppm ให้ค่าเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์ HEK293T อยู่ในช่วง 92.5-90.7% ซึ่งไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95% จนเมื่อความเข้มข้นของสารละลายของสารสกัดข้าวแดงอยู่ที่ระดับสูงสุดในช่วง 3.54-3.74 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ค่าเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์ HEK293T ก็จะลดลง มีค่าต่ำสุดเท่ากับ 82.2% เกี่ยวกับค่าเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์ HEK293T จากการเติมสารละลายของสารสกัดข้าวแดงที่ผลิตจาก *M. purpureus* สายพันธุ์ DMKU และ FTCMU 3385 ที่มีความเข้มข้นอยู่ในช่วง 3.54-3.74 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร และจาก *M. purpureus* สายพันธุ์ FTCMU 3385 ที่มีความเข้มข้นอยู่ในช่วง 1.77-1.87 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ซึ่งมีค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสูงมาก ทั้งนี้อาจเกิดจากความแปรปรวนของค่าเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์ HEK293T ในแต่ละซ้ำ ของการเติมสารละลายของสารสกัดข้าวแดงที่ผลิตจาก *M. purpureus* สายพันธุ์ดังกล่าว แต่ต่างระยะหมักและอยู่ในช่วงความเข้มข้นเดียวกันนี้ และข้าวแดงที่ผลิตจาก *M. purpureus* สายพันธุ์เดียวกัน แต่ต่างระยะหมักกันมีปริมาณซิตรินินต่างกัน จึงทำให้ค่าเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์ HEK293T ในแต่ละซ้ำ ของการเติมสารละลายของสารสกัดข้าวแดงดังกล่าวมีความแปรปรวนมาก

4.3.2.5 ผลของปฏิกิริยาสัมพันธ์ระหว่างสายพันธุ์ของ *M. purpureus* กับระยะเวลาที่ใช้ในการหมักข้าวแดง ต่อค่าเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์ HEK293T

ตารางที่ 4.3.5 เปรียบเทียบค่าเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์ HEK293T จากการเติมสารละลายของสารสกัดข้าวแดงที่ผลิตจาก *M. purpureus* สายพันธุ์ ATCC 16365, DMKU, และ FTCMU 3385 ที่ระยะหมัก 6, 12, 18, และ 24 วันใน Complete RPMI-1640

สายพันธุ์ของ *M. purpureus* ที่ใช้ผลิตข้าวแดง	ระยะเวลาที่ใช้ในการหมักข้าวแดง (วัน)			
	6	12	18	24
ATCC 16365	$86.4^{c} \pm 8.17$	$87.7^{de} \pm 9.68$	$87.2^{c} \pm 7.81$	$89.4^{c} \pm 14.46$
DMKU	$91.6^{b} \pm 6.18$	$95.3^{a} \pm 3.31$	$91.3^{bc} \pm 8.58$	$89.7^{bc} \pm 15.62$
FTCMU 3385	$87.4^{c} \pm 8.66$	$79.3^{g} \pm 30.52$	$84.0^{f} \pm 14.36$	$63.1^{h} \pm 36.29$

หมายเหตุ : 1). ค่าของข้อมูลแสดงเป็น ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน โดยพิจารณารวมจากทุกความเข้มข้นของสารละลายของสารสกัดข้าวแดงที่ผลิตจาก *M. purpureus* แต่ละสายพันธุ์ ในแต่ละระยะหมัก

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2). ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่กำกับค่าของข้อมูลที่แตกต่างกัน แสดงว่าเป็นค่าที่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$)

จากตารางที่ 4.3.5 พบว่า แนวโน้มการลดลง ของค่าเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์ HEK293T จากการเติมสารละลายของสารสกัดข้าวแดงที่ผลิตจาก *M. purpureus* สายพันธุ์ ATCC 16365, DMKU, และ FTCMU 3385 ทั้ง 4 ระยะหมัก โดยพิจารณารวมจากทุกความเข้มข้นของสารละลายของสารสกัดข้าวแดงในแต่ละระยะหมักของ *M. purpureus* แต่ละสายพันธุ์ไม่เหมือนกัน กล่าวคือ การเติมสารละลายของสารสกัดข้าวแดงที่ผลิตจาก *M. purpureus* สายพันธุ์ ATCC 16365 ที่ระยะหมัก 6 วัน ทำให้ค่าเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์ HEK293T อยู่ที่ 86.4% เมื่อเติมสารละลายของสารสกัดข้าวแดงชนิดเดียวกันที่ระยะหมัก 12 วัน ค่าเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์ HEK293T มีการเพิ่มขึ้นเล็กน้อย จนเมื่อเติมสารละลายของสารสกัดข้าวแดงชนิดเดียวกันนี้ที่ระยะหมัก 18 และ 24 วัน ค่าเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์ HEK293T กลับมีการลดลงเล็กน้อยแล้วเพิ่มขึ้น โดยที่ระยะหมัก 24 วัน ค่าเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์ HEK293T โดยเฉลี่ยอยู่ที่ 89.4% ซึ่งสอดคล้องกับผลการตรวจหาปริมาณซิตรินิน ในข้าวแดงที่ผลิตจาก *M. purpureus* สายพันธุ์ ATCC 16365 ที่ระยะหมัก 24 วัน ด้วยวิธีการ HPLC จากตารางที่ 4.4.4 ในผลการทดลองตอนที่ 4 ซึ่งได้ปริมาณซิตรินินเท่ากับ 4.6 มิลลิกรัม/กิโลกรัม

การเติมสารละลายของสารสกัดข้าวแดงที่ผลิตจาก*M. purpureus* สายพันธุ์ DMKU ที่ระยะหมัก 6 วัน ให้ค่าเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์ HEK293T อยู่ที่ 91.6% ซึ่งมากกว่าที่ระยะหมัก 6 วันของสารละลายของสารสกัดข้าวแดงที่ผลิตจาก *M. purpureus* สายพันธุ์ ATCC 16365 และ FTCMU 3385 เมื่อเติมสารละลายของสารสกัดข้าวแดงชนิดเดียวกันที่ระยะหมัก 12 วัน ค่าเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์ HEK293T มีการเพิ่มขึ้น การเติมสารละลายของสารสกัดข้าวแดงชนิดเดียวกันนี้ที่ระยะหมัก 18 และ 24 วัน ค่าเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์ HEK293T ก็จะลดลงต่ำสุดมาอยู่ที่ 89.7% โดยการที่ค่าเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์ HEK293T ที่เพิ่มขึ้นเมื่อเติมสารละลายของสารสกัดข้าวแดงที่ผลิตจาก *M. purpureus* สายพันธุ์ DMKU ที่ระยะหมัก 12 วัน สอดคล้องกับผลการตรวจหาปริมาณซิตรินินในข้าวแดง ที่ผลิตจาก*M.purpureus* สายพันธุ์ DMKU ที่ระยะหมักเดียวกันด้วยวิธีการ HPLC จากตารางที่ 4.4.4 ในผลการทดลองตอนที่ 4 ซึ่งได้ปริมาณซิตรินินเท่ากับ 1.88 มิลลิกรัม/กิโลกรัม

การเติมสารละลายของสารสกัดข้าวแดงที่ผลิตจาก *M. purpureus* สายพันธุ์ FTCMU 3385 ที่ระยะหมัก 6 วัน ให้ค่าเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์ HEK293T อยู่ที่ 87.4% ซึ่งใกล้เคียงกับที่ระยะหมัก 6 วันของสารละลายของสารสกัดข้าวแดงที่ผลิตจาก*M. purpureus* สายพันธุ์

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ATCC 16365 เมื่อเติมสารละลายของสารสกัดข้าวแดงชนิดเดียวกันที่ระยะหมัก 12 วัน ค่าเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์ HEK293T ลดลงมาอยู่ที่ 79.3% แล้วจะเพิ่มขึ้นอีกครั้งเมื่อเติมสารละลายของสารสกัดข้าวแดงชนิดเดียวกันนี้ที่ระยะหมัก 18 วัน จากนั้นจะลดลงมาถึงระดับต่ำสุดอยู่ที่ 63.1% เมื่อเติมสารละลายของสารสกัดข้าวแดงชนิดเดียวกันที่ระยะหมัก 24 วัน จะเห็นได้ว่าการเติมสารละลายของสารสกัดข้าวแดงที่ผลิตจาก *M. purpureus* ทั้ง 3 สายพันธุ์ดังกล่าวที่ระยะหมัก 6, 12, 18, และ 24 วัน ส่วนใหญ่ไม่สอดคล้องกับผลการตรวจหาปริมาณซิตรินินด้วยวิธีการ HPLC ในหัวข้อ 4.4.2 ของผลการทดลองตอนที่ 4 ทั้งนี้อาจเป็นผลเนื่องจาก มีอิทธิพลจากความเข้มข้นของสารละลายของสารสกัดข้าวแดงที่ผลิตจาก *M. purpureus* แต่ละสายพันธุ์ ที่แต่ละระยะหมักเข้ามาเกี่ยวข้องด้วย กล่าวคือจากผลในหัวข้อ 4.3.2.3 และ 4.3.2.4 ซึ่งเมื่อความเข้มข้นของสารละลายของสารสกัดข้าวแดงเพิ่มสูงขึ้น จะทำให้ค่าเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์ HEK293T น้อยลงตามลำดับ และมีโอกาสที่จะพบสารพิษที่เทียบเท่ากับซิตรินินในสารละลายของสารสกัดข้าวแดงมากขึ้น แต่จากการที่พบว่าสารละลายของสารสกัดข้าวแดงที่ผลิตจาก *M. purpureus* ทั้ง 3 สายพันธุ์ในบางระยะหมักเช่นที่ 12, 18, และ 24 วัน มีค่าเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์ HEK293T เพิ่มขึ้นและมีค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานมากกว่าที่ควรจะเป็น ซึ่งอาจเกิดจากความแปรปรวนของค่าเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์ HEK293T ภายในแต่ละซ้ำของ การเติมสารละลายของสารสกัดข้าวแดงที่ผลิตจาก *M. purpureus* สายพันธุ์ และที่ระยะหมักเดียวกัน ในทุกช่วงความเข้มข้น เช่นที่ความเข้มข้นสูงสุด และต่ำสุดของสารละลายของสารสกัดข้าวแดงชนิดเดียวกัน เป็นผลทำให้ค่าเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดโดยเฉลี่ยของเซลล์ HEK293T มีค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานกว้าง

4.3.2.6 ผลของปฏิกิริยาสัมพันธ์ระหว่างระยะเวลาที่ใช้ในการหมักข้าวแดง กับความเข้มข้นของสารละลายของสารสกัดข้าวแดงที่เตรียมขึ้น ต่อค่าเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์ HEK293T

ตารางที่ 4.3.6 เปรียบเทียบค่าเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์ HEK293T จากการเติมสารละลายของสารสกัดข้าวแดงที่ระยะหมัก 6, 12, 18, และ 24 วันใน Complete RPMI-1640 ที่มีความเข้มข้นอยู่ในช่วง 0.45-0.47, 0.89-0.94, 1.77-1.87, และ 3.54-3.74 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร

ระยะเวลาในการหมักข้าวแดง (วัน)	ความเข้มข้นของสารละลายของสารสกัดข้าวแดง (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)			
	0.45-0.47	0.89-0.94	1.77-1.87	3.54-3.74
6	$89.4^{c} \pm 3.38$	$89.0^{c} \pm 3.44$	$82.1^{ef} \pm 4.92$	$80.8^{ef} \pm 3.18$
12	$91.9^{b} \pm 5.14$	$91.3^{bc} \pm 4.74$	$90.1^{c} \pm 4.11$	$57.9^{h} \pm 33.44$
18	$89.8^{c} \pm 3.58$	$83.0^{e} \pm 4.92$	$85.2^{d} \pm 5.08$	$75.8^{g} \pm 14.99$
24	$93.6^{a} \pm 9.67$	$89.5^{c} \pm 8.41$	$79.9^{f} \pm 20.13$	$40.3^{i} \pm 28.19$

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

หมายเหตุ : 1). ค่าของข้อมูลแสดงเป็น ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน โดยพิจารณารวมจากทุกสายพันธุ์ของ*M.purpureus* ที่ใช้ผลิตข้าวแดงในแต่ละระยะหมัก ซึ่งนำมาเตรียมเป็นสารละลายของสารสกัดข้าวแดงแต่ละความเข้มข้นดังกล่าว

2). ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่กำกับค่าของข้อมูลที่แตกต่างกัน แสดงว่าเป็นค่าที่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$)

3). ความเข้มข้นของสารละลายของสารสกัดข้าวแดงที่อยู่ในช่วง 0.45-0.47, 0.89-0.94, 1.77-1.87, และ 3.54-3.74 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร มาจากข้าวแดงในปริมาณ 182.29, 364.59, 729.19, และ 1,458.39 ppm ตามลำดับ

จากตารางที่ 4.3.6 จะเห็นว่า เมื่อใช้ข้าวแดงที่มีระยะเวลาการหมักเพิ่มขึ้น ไม่ว่าจะเป็นข้าวแดงที่ผลิตจาก*M.purpureus* สายพันธุ์ใดก็ตาม ในการเตรียมสารละลายของสารสกัดข้าวแดงที่มีความเข้มข้นสูง ๆ จะทำให้ค่าเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์ HEK293T มีแนวโน้มลดลง กล่าวคือ ในสภาวะที่ไม่มีสารสกัดข้าวแดงเลย ให้ค่าเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์ HEK293T สูงสุดเท่ากับ 100% การใช้ข้าวแดงที่มีระยะหมัก 6, 12, 18, หรือ 24 วัน ในการเตรียมสารละลายของสารสกัดข้าวแดง ที่มีความเข้มข้นอยู่ในช่วง 0.45-0.47 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ซึ่งมาจากข้าวแดงในปริมาณ 182.29 ppm จะทำให้ค่าเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์ HEK293T ลดลงเท่ากับ 89.4, 91.9, 89.8, และ 93.6% ตามลำดับ จากนั้นเมื่อใช้ข้าวแดงทั้ง 4 ระยะหมักดังกล่าวในการเตรียมสารละลายของสกัดข้าวแดง ที่มีความเข้มข้นอยู่ในช่วง 0.89-0.94 และ 1.77-1.87 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ซึ่งมาจากข้าวแดงในปริมาณ 364.59 และ 729.19 ppm นั้น จะทำให้ค่าเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์ HEK293T มีแนวโน้มลดลงตามลำดับ แต่พบว่าสารละลายของสารสกัดข้าวแดงที่ระยะหมัก 18 วันซึ่งมีความเข้มข้นอยู่ในช่วง 1.77-1.87 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร กลับมีค่าเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์ HEK293T เพิ่มขึ้นเล็กน้อยมาอยู่ที่ 85.2% ก่อนที่จะลดลงมาอยู่ที่ 75.8% เมื่อเติมสารละลายของสารสกัดข้าวแดงที่ระยะหมักเดียวกันนี้ ซึ่งมีความเข้มข้นอยู่ในช่วง 3.54-3.74 มิลลิกรัม/มิลลิลิตรซึ่งมาจากข้าวแดงในปริมาณ 1,458.39 ppm สุดท้ายจากการใช้ข้าวแดงที่ระยะหมัก 6, 12, และ 24 วัน ในการเตรียมสารละลายของสารสกัดข้าวแดง ที่มีความเข้มข้นสูงสุดอยู่ในช่วง 3.54-3.74 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร จะทำให้ค่าเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์ HEK293T ลดลงต่ำสุดมาอยู่ที่ 80.8, 57.9, และ 40.3% ตามลำดับ จึงอาจกล่าวได้ว่าสารละลายของสารสกัดข้าวแดงในแต่ละระยะหมัก ซึ่งมีความเข้มข้นเพิ่มขึ้น มีโอกาสพบสารพิษที่เทียบเท่ากับซิตรินินเพิ่มขึ้นด้วย เนื่องจากเซลล์ HEK293T มีการรอดชีวิตลดลง

เมื่อพิจารณาที่ความเข้มข้นของสารละลายของสารสกัดข้าวแดงสูงสุดซึ่งอยู่ในช่วง 3.54-3.74 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร พบว่าสารละลายของสารสกัดข้าวแดงที่ระยะหมัก 6 วัน ให้ค่าเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์ HEK293T สูงสุด รองลงมาเป็นสารละลายของสารสกัดข้าวแดงที่ระยะหมัก 18 และ 12 วันตามลำดับ สำหรับสารละลายของสารสกัดข้าวแดงที่ระยะหมัก 24 วัน

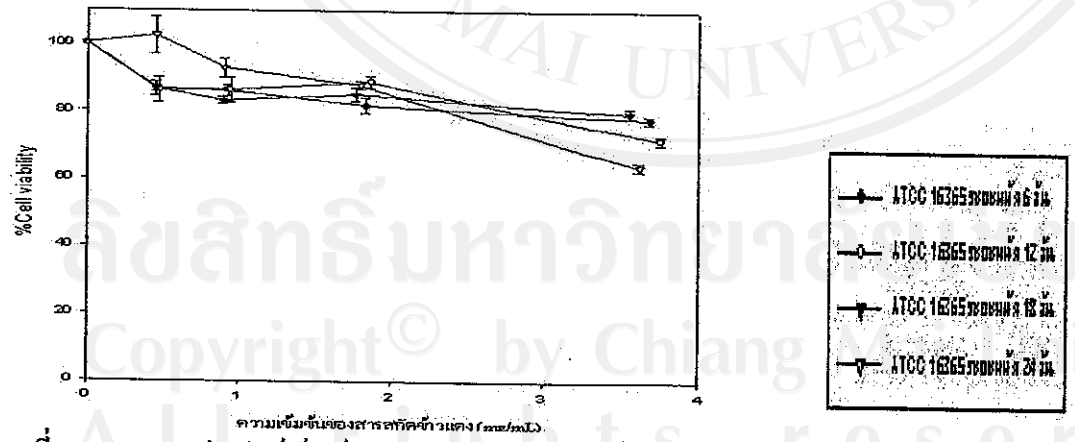
ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ให้ค่าเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์ HEK293T ต่ำที่สุด ซึ่งผลดังกล่าวนี้สอดคล้องกับผลจากระยะเวลาที่ใช้ในการหมักข้าวแดง ต่อค่าเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์ HEK293T ในหัวข้อ 4.3.2.2 เมื่อพิจารณาค่าเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์ HEK293T จากการเติมสารละลายของสารสกัดข้าวแดงที่ระยะหมัก 12 วันซึ่งมีความเข้มข้นอยู่ในช่วง 3.54-3.74 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ที่ระยะหมัก 18 วันซึ่งมีความเข้มข้นอยู่ในช่วง 3.54-3.74 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร และที่ระยะหมัก 24 วันซึ่งมีความเข้มข้นอยู่ในช่วง 1.77-1.87 และ 3.54-3.74 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร พบว่ามีค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสูงมาก ซึ่งอาจเกิดจากความแปรปรวนของค่าเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์ HEK293T เมื่อเติมสารละลายของสารสกัดข้าวแดงดังกล่าว โดยความแปรปรวนนี้อาจมีสาเหตุมาจากค่าเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์ HEK293T จากการเติมสารละลายของสารสกัดข้าวแดงที่ผลิตจาก *M. purpureus* แต่ละสายพันธุ์ ที่ระยะหมัก 12, 18, และ 24 วันในช่วงความเข้มข้น 0.89-0.94, 1.77-1.87, และ 3.54-3.74 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร มีความแตกต่างกันมาก

4.3.2.7 ผลของปฏิกิริยาสัมพันธ์ร่วมระหว่างสายพันธุ์ของ *M. purpureus* ที่ใช้ในการผลิตข้าวแดง ระยะเวลาที่ใช้ในการหมักข้าวแดง และความเข้มข้นของสารละลายของสารสกัดข้าวแดงต่อค่าเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์ HEK293T

ก. ผลของระยะเวลาหมักข้าวแดงใน *M. purpureus* แต่ละสายพันธุ์ ต่อความเป็นพิษกับเซลล์ HEK293T

ก 1. ผลของระยะเวลาหมักข้าวแดงใน *M. purpureus* สายพันธุ์ ATCC 16365 ต่อค่าเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์ HEK293T



ภาพที่ 4.3.4 แสดงค่าเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์ HEK293T จากการเติมสารละลายของสารสกัดข้าวแดงที่ผลิตจาก *M. purpureus* สายพันธุ์ ATCC 16365 ที่ระยะหมัก 6, 12, 18, และ 24 วันใน Complete RPMI-1640 ในช่วงความเข้มข้น 0.45-0.47, 0.89-0.94, 1.77-1.87, และ 3.54-3.74 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 4.3.7 เปรียบเทียบค่าเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์ HEK293T จากการเติมสารละลายของสารสกัดข้าวแดงที่ผลิตจาก *M. purpureus* สายพันธุ์ ATCC 16365 ที่ระยะหมัก 6, 12, 18, และ 24 วัน ใน Complete RPMI-1640

ระยะเวลาในการหมักข้าวแดง (วัน)	ความเข้มข้นของสารละลายของสารสกัดข้าวแดง (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)			
	0.45-0.47	0.89-0.94	1.77-1.87	3.54-3.74
6	$86.6^{i} \pm 0.90$	$86.1^{i} \pm 1.64$	$81.7^{m} \pm 2.31$	$77.7^{q} \pm 1.03$
12	$86.3^{i} \pm 3.70$	$86.2^{i} \pm 3.84$	$88.8^{d} \pm 1.71$	$71.6^{s} \pm 1.42$
18	$86.6^{i} \pm 2.13$	$83.1^{k} \pm 1.09$	$85.0^{j} \pm 1.90$	$79.6^{o} \pm 1.54$
24	$102.4^{a} \pm 5.46$	$92.8^{c} \pm 2.85$	$87.8^{f} \pm 1.11$	$63.9^{t} \pm 1.31$

หมายเหตุ : 1). ค่าของข้อมูลแสดงเป็น ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน โดยพิจารณารวมจากทุกซ้ำในแต่ละช่วงความเข้มข้นของสารละลายของสารสกัดข้าวแดงที่ผลิตจาก *M. purpureus* สายพันธุ์ ATCC16365 ที่ระยะหมัก6,12,18,และ24วัน

2). ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่กำกับค่าของข้อมูลที่แตกต่างกัน แสดงว่าเป็นค่าที่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$)

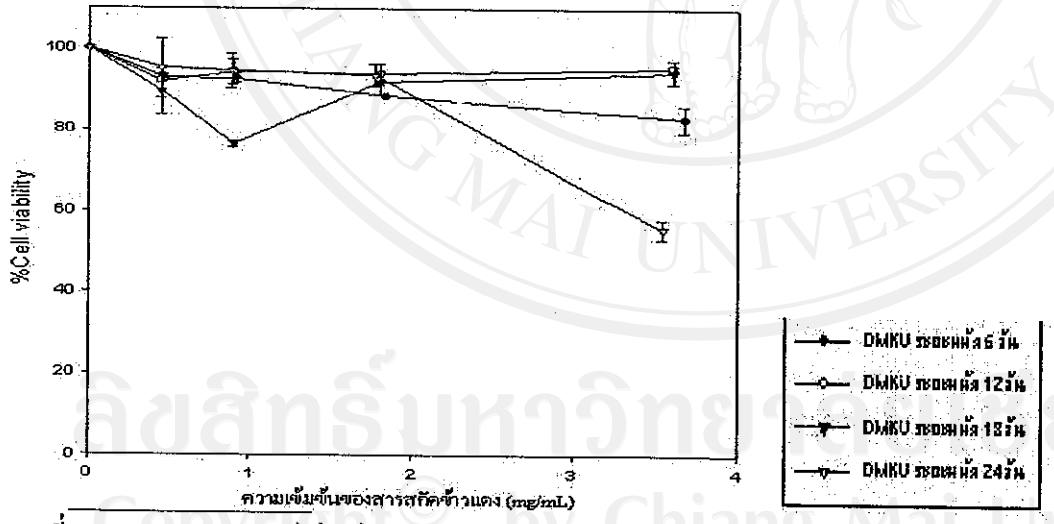
3). ความเข้มข้นของสารละลายของสารสกัดข้าวแดงที่อยู่ในช่วง 0.45-0.47, 0.89-0.94, 1.77-1.87, และ 3.54-3.74 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร มาจากข้าวแดงในปริมาณ 182.29, 364.59, 729.19, และ 1,458.39 ppm ตามลำดับ

จากภาพที่ 4.3.4 และตารางที่ 4.3.7 พบว่า ค่าเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์ HEK293T มีแนวโน้มลดลง เมื่อใช้ความเข้มข้นของสารละลายของสารสกัดข้าวแดงที่ผลิตจาก *M. purpureus* สายพันธุ์ ATCC 16365 เพิ่มขึ้น โดยไม่ขึ้นกับระยะเวลาที่ใช้ในการหมักข้าวแดง โดยในภาพที่ 4.3.4 จะเห็นได้ว่า เมื่อใช้ *M. purpureus* สายพันธุ์ ATCC 16365 ในการผลิตข้าวแดงที่ระยะหมัก 6 และ 18 วัน ทำให้ค่าเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์ HEK293T มีแนวโน้มลดลงใกล้เคียงกันมาก โดยมีการลดลงจนเกือบจะคงที่ ณ ความเข้มข้นสูงสุดของสารละลายของสารสกัดข้าวแดงซึ่งอยู่ในช่วง 3.54-3.74 มิลลิกรัม/มิลลิลิตรซึ่งมาจากข้าวแดงในปริมาณ 1,458.39 ppm โดยให้ค่าเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์ HEK293T เท่ากับ 77.7 และ 79.6% ตามลำดับ ที่ระยะหมัก 12 วัน มีแนวโน้มการลดลงของค่าเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์ HEK293T มากกว่าที่ระยะหมัก 6 และ 18 วัน โดย ณ ความเข้มข้นสูงสุดของสารละลายของสารสกัดข้าวแดงที่ระยะหมัก 12 วันนี้ มีค่าเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์ HEK293T เท่ากับ 71.6% สำหรับการเติมสารละลายของสารสกัดข้าวแดงที่ระยะหมัก 24 วัน มีแนวโน้มการลดลงของค่าเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์ HEK293T มากที่สุด โดย ณ ความเข้มข้นสูงสุดของสารละลายของสารสกัดข้าวแดงที่ระยะหมัก 24 วัน มีค่าเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์ HEK293T เท่ากับ 63.9%

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ในการเปรียบเทียบความเป็นพิษของข้าวแดง โดยคำนวณค่าเฉลี่ยความเข้มข้นของสารละลายของสารสกัดข้าวแดงที่ผลิตจาก *M. purpureus* สายพันธุ์ ATCC 16365 ที่ระยะหมัก 6, 12, 18, และ 24 วัน ซึ่งทำให้เซลล์ HEK293T มีการรอดชีวิต 80% หรือมีการตายไป 20% จากโปรแกรม ED50V1.0 ได้เท่ากับ 2.74 ± 0.27, 2.30 ± 0.28, 3.08 ± 0.46, และ 2.01 ± 0.19 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ ผลจากค่าความเข้มข้นดังกล่าวนี้ อาจบ่งชี้ได้ว่า ข้าวแดงที่ผลิตจาก *M. purpureus* สายพันธุ์ ATCC 16365 ที่ระยะหมัก 24 วัน ใช้สารสกัดน้อยกว่าข้าวแดงที่ระยะหมัก 6, 12, และ 18 วัน ในการทำให้เซลล์ HEK293T มีการรอดชีวิตอยู่ที่ 80% หรือมีการตายไป 20% ซึ่งก็แปลว่าในสารละลายของสารสกัดข้าวแดงที่ผลิตจาก *M. purpureus* สายพันธุ์ ATCC 16365 ที่ระยะหมัก 24 วัน น่าจะมีสารพิษที่เทียบเท่ากับซิตรินินในปริมาณสูงสุด รองลงมาเป็นสารละลายของสารสกัดข้าวแดงที่ระยะหมัก 12, 6, และ 18 วันตามลำดับ การที่เลือกใช้ค่าความเข้มข้นของสารละลายของสารสกัดข้าวแดง ซึ่งทำให้เซลล์ HEK293T มีการรอดชีวิตอยู่ที่ 80% หรือมีการตายไป 20% เนื่องจากค่าความเข้มข้นดังกล่าว สามารถใช้เปรียบเทียบค่าเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์ HEK293T ในสารละลายของสารสกัดข้าวแดงทุกตัวอย่างได้ครอบคลุมทั้งหมด

ก 2. ผลของระยะเวลาหมักข้าวแดงใน *M. purpureus* สายพันธุ์ DMKU ต่อค่าเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์ HEK293T



ภาพที่ 4.3.5 แสดงค่าเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์ HEK293T จากการเติมสารละลายของสารสกัดข้าวแดงที่ผลิตจาก *M. purpureus* สายพันธุ์ DMKU ที่ระยะหมัก 6, 12, 18, และ 24 วันใน Complete RPMI-1640 ในช่วงความเข้มข้น 0.45-0.47, 0.89-0.94, 1.77-1.87, และ 3.54-3.74 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 4.3.8 เปรียบเทียบค่าเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์ HEK293T จากการเติมสารละลายของสารสกัดข้าวแดงที่ผลิตจาก *M. purpureus* สายพันธุ์ DMKU ที่ระยะหมัก 6, 12, 18, และ 24 วัน ใน Complete RPMI-1640

ระยะเวลาในการหมักข้าวแดง (วัน)	ความเข้มข้นของสารละลายของสารสกัดข้าวแดง (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)			
	0.45-0.47	0.89-0.94	1.77-1.87	3.54-3.74
6	$93.0^{c} \pm 0.51$	$92.7^{c} \pm 1.17$	$88.5^{e} \pm 0.12$	$82.9^{k} \pm 3.38$
12	$92.1^{c} \pm 0.50$	$94.3^{bc} \pm 3.23$	$93.8^{c} \pm 2.58$	$95.4^{ab} \pm 0.78$
18	$89.4^{cd} \pm 5.54$	$76.6^{f} \pm 0.70$	$91.8^{c} \pm 2.89$	$94.4^{bc} \pm 2.89$
24	$95.2^{ab} \pm 7.40$	$94.6^{b} \pm 4.32$	$93.6^{c} \pm 2.79$	$55.7^{n} \pm 2.36$

หมายเหตุ : 1). ค่าของข้อมูลแสดงเป็น ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน โดยพิจารณารวมจากทุกซ้ำในแต่ละช่วงความเข้มข้นของสารละลายของสารสกัดข้าวแดงที่ผลิตจาก *M. purpureus* สายพันธุ์ DMKU ที่ระยะหมัก 6, 12, 18, และ 24 วัน

2). ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่กำกับค่าของข้อมูลที่แตกต่างกัน แสดงว่าเป็นค่าที่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$)

3). ความเข้มข้นของสารละลายของสารสกัดข้าวแดงที่อยู่ในช่วง 0.45-0.47, 0.89-0.94, 1.77-1.87, และ 3.54-3.74 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร มาจากข้าวแดงในปริมาณ 182.29, 364.59, 729.19, และ 1,458.39 ppm ตามลำดับ

จากภาพที่ 4.3.5 และตารางที่ 4.3.8 พบว่า ค่าเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์ HEK293T จากการเติมสารละลายของสารสกัดข้าวแดงที่ผลิตจาก*M. purpureus*สายพันธุ์ DMKU ไม่มีแนวโน้มในการลดลงอย่างชัดเจน เหมือนกับการเติมสารละลายของสารสกัดข้าวแดงที่ผลิตจาก *M. purpureus* สายพันธุ์ ATCC 16365 โดยเฉพาะการเติมสารละลายของสารสกัดข้าวแดงที่ผลิตจาก*M. purpureus* สายพันธุ์ DMKU ที่ระยะหมัก 18 วัน ซึ่งค่าเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์ HEK293T มีการลดลง ในช่วงความเข้มข้นของสารละลายของสารสกัดข้าวแดงเท่ากับ 0.45-0.94 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ซึ่งมาจากข้าวแดงในปริมาณ 182.29-364.59 ppm แล้วมีการเพิ่มขึ้นเมื่อเติมสารละลายของสารสกัดข้าวแดงที่มีความเข้มข้นในช่วง 1.77-1.87 มิลลิกรัม/มิลลิลิตรซึ่งมาจากข้าวแดงในปริมาณ 729.19 ppm และค่าเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์ HEK293T เท่ากับ 94.4% เมื่อความเข้มข้นของสารละลายของสารสกัดข้าวแดงอยู่ในช่วง 3.54-3.74 มิลลิกรัม/มิลลิลิตรซึ่งมาจากข้าวแดงในปริมาณ 1,458.39 ppm การเติมสารละลายของสารสกัดข้าวแดงที่ผลิตจาก*M. purpureus* สายพันธุ์ DMKU ที่ระยะหมัก 6 และ 24 วัน ให้แนวโน้มการลดลงของค่าเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์ HEK293T เมื่อความเข้มข้นของสารละลายของสารสกัดข้าวแดงเพิ่มขึ้น ชัดเจนมากกว่าการเติมสารละลายของสารสกัดข้าวแดงที่ระยะหมัก 12 และ 18 วัน กล่าวคือ ณ ความเข้มข้นสูงสุด

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ของสารละลายของสารสกัดข้าวแดงซึ่งอยู่ในช่วง 3.54-3.74 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ที่ระยะหมัก 6 และ 24 วัน มีค่าเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์ HEK293T ลดลงมาอยู่ที่ 82.9 และ 55.7% ตามลำดับ

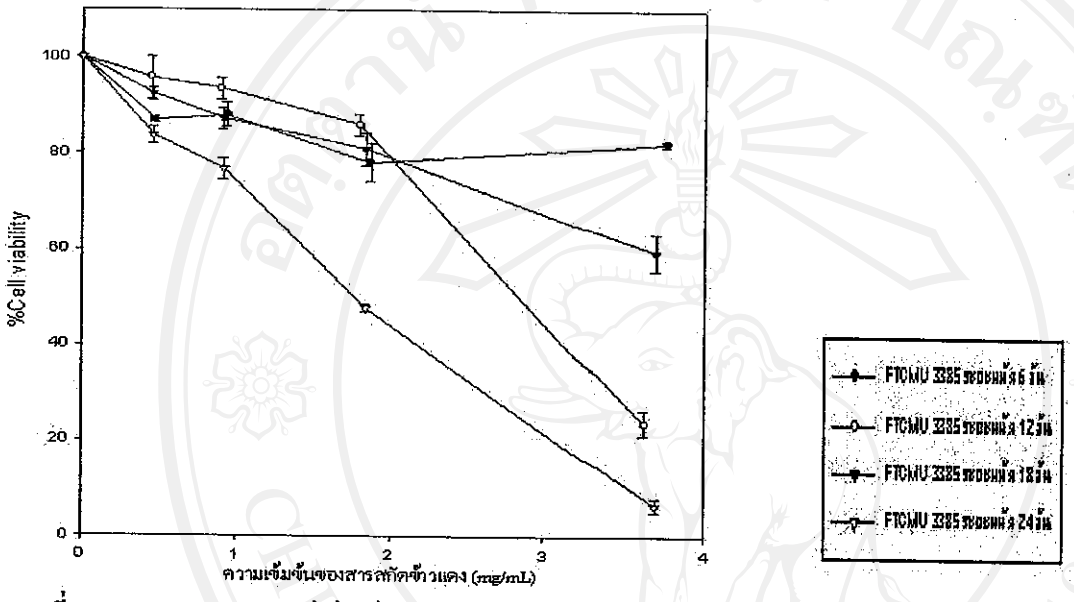
ส่วนการเติมสารละลายของสารสกัดข้าวแดงที่ระยะหมัก 12 วันนั้น พบว่า เมื่อความเข้มข้นของสารละลายของสารสกัดข้าวแดงเพิ่มขึ้น ค่าเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์ HEK293T มีการลดลง เมื่อเติมสารละลายของสารสกัดข้าวแดงที่มีความเข้มข้นต่ำ ๆ เมื่อเติมสารละลายของสารสกัดข้าวแดงที่มีความเข้มข้นสูงขึ้นซึ่งอยู่ในช่วง 0.89-0.94 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ค่าเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์ HEK293T ก็กลับเพิ่มขึ้นตามไปด้วย แล้วลดลงเพียงเล็กน้อยเมื่อเติมสารละลายของสารสกัดข้าวแดง ณ ความเข้มข้น 1.77-1.87 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ก่อนเพิ่มขึ้นอีกครั้ง เมื่อเติมสารละลายของสารสกัดข้าวแดงที่ความเข้มข้นสูงสุด ซึ่งได้ค่าเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์ HEK293T อยู่ที่ 95.4% ซึ่งสอดคล้องกับผลการตรวจวิเคราะห์ปริมาณซิตรินินในข้าวแดงที่ผลิตจาก*M. purpureus* สายพันธุ์ DMKU ที่ระยะหมัก 12 วัน ด้วยวิธีการ HPLC จากหัวข้อ 4.4.2 ในผลการทดลองตอนที่ 4 ได้ปริมาณซิตรินินเท่ากับ 1.88 มิลลิกรัม/กิโลกรัม ซึ่งค่อนข้างน้อยมาก จึงทำให้ค่าเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์ HEK293T จากการเติมสารละลายของสารสกัดข้าวแดงที่ระยะหมัก 12 วัน ณ ความเข้มข้นดังกล่าวสูงมาก เมื่อเปรียบเทียบค่าเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์ HEK293T จากการเติมสารละลายของสารสกัดข้าวแดงที่ผลิตจาก*M. purpureus* สายพันธุ์ DMKU ที่ระยะหมัก 6, 12, และ 18 วัน ณ ความเข้มข้นสูงสุดซึ่งอยู่ในช่วง 3.54-3.74 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร พบว่ามีค่าน้อยกว่าค่าเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์ HEK293T จากการเติมสารละลายของสารสกัดข้าวแดงที่ผลิตจาก*M. purpureus* สายพันธุ์ ATCC 16365 ที่ระยะหมักดังกล่าว ณ ช่วงความเข้มข้นเดียวกัน

ในการเปรียบเทียบความเป็นพิษของข้าวแดง โดยคำนวณค่าเฉลี่ยความเข้มข้นของสารละลายของสารสกัดข้าวแดงที่ผลิตจาก *M. purpureus* สายพันธุ์ DMKU ที่ระยะหมัก 6, 12, 18, และ 24 วัน ซึ่งทำให้เซลล์ HEK293T มีการรอดชีวิต 80% หรือมีการตายไป 20% จากโปรแกรม ED50V1.0 ได้เท่ากับ 4.26 ± 0.92, 41.51 ± 41.68, 16.03 ± 39.92, และ 3.23 ± 2.12 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ จากค่าความเข้มข้นดังกล่าวอาจบ่งชี้ได้ว่า ข้าวแดงที่ผลิตจาก*M.purpureus* สายพันธุ์ DMKU ที่ระยะหมัก 6, 12 และ 18 วัน เมื่อนำมาเตรียมเป็นสารสกัดและละลายใน Complete RPMI-1640 จะต้องใช้สารละลายที่เตรียมขึ้นในความเข้มข้นที่สูงมาก โดยเฉพาะที่ระยะหมัก 12 วัน ในการทำให้เซลล์ HEK293T มีการรอดชีวิตอยู่ที่ 80% หรือมีการตายไป 20% ซึ่งค่าความเข้มข้นดังกล่าวมากกว่า สารละลายของสารสกัดข้าวแดงที่ผลิตจาก *M. purpureus* สายพันธุ์ ATCC 16365 ที่ระยะหมักเดียวกันนี้ ในสารละลายของสารสกัดข้าวแดงที่ผลิตจาก*M. purpureus* สายพันธุ์ DMKU ที่ระยะหมัก 24 วัน น่าจะมีปริมาณสารพิษที่เทียบเท่ากับซิตรินินมากที่สุด รองลงมาเป็นสารละลายของ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

สารสกัดข้าวแดงที่ผลิตจาก *M. purpureus* สายพันธุ์เดียวกันนี้ที่ระยะหมัก 18 และ 6 วันตามลำดับ ส่วนสารละลายของสารสกัดข้าวแดงที่ผลิตจาก *M. purpureus* สายพันธุ์เดียวกัน ที่ระยะหมัก 12 วัน น่าจะมีปริมาณสารพิษที่เทียบเท่ากับซิตรินินต่ำสุด

ก 3. ผลของระยะเวลาหมักข้าวแดงใน *M. purpureus* สายพันธุ์ FTCMU 3385 ต่อค่าเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์ HEK293T



ภาพที่ 4.3.6 แสดงค่าเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์ HEK293T จากการเติมสารละลายของสารสกัดข้าวแดงที่ผลิตจาก *M. purpureus* สายพันธุ์ FTCMU 3385 ที่ระยะหมัก 6, 12, 18, และ 24 วัน ใน Complete RPMI-1640 ในช่วงความเข้มข้น 0.45-0.47, 0.89-0.94, 1.77-1.87, และ 3.54-3.74 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร

ตารางที่ 4.3.9 เปรียบเทียบค่าเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์ HEK293T จากการเติมสารละลายของสารสกัดข้าวแดงที่ผลิตจาก *M. purpureus* สายพันธุ์ FTCMU 3385 ที่ระยะหมัก 6, 12, 18, และ 24 วัน ใน Complete RPMI-1640

ระยะเวลาในการหมักข้าวแดง (วัน)	ความเข้มข้นของสารละลายของสารสกัดข้าวแดง (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)			
	0.45-0.47	0.89-0.94	1.77-1.87	3.54-3.74
6	$86.9^{h} \pm 0.58$	$88.0^{e} \pm 2.57$	$78.2^{p} \pm 3.90$	$82.2^{l} \pm 0.61$
12	$95.6^{ab} \pm 4.44$	$93.5^{c} \pm 2.28$	$85.9^{i} \pm 2.32$	$23.8^{w} \pm 2.70$
18	$92.2^{c} \pm 1.37$	$87.2^{g} \pm 2.16$	$80.9^{n} \pm 3.39$	$59.6^{u} \pm 3.90$
24	$83.7^{j} \pm 1.83$	$76.7^{r} \pm 2.12$	$47.7^{v} \pm 0.76$	$6.6^{x} \pm 1.58$

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

หมายเหตุ : 1). ค่าของข้อมูลแสดงเป็น ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน โดยพิจารณารวมจากทุกซ้ำในแต่ละช่วงความเข้มข้นของสารละลายของสารสกัดข้าวแดงที่ผลิตจาก *M. purpureus* สายพันธุ์ FTCMU 3385 ที่ระยะหมัก 6, 12, 18, และ 24 วัน ใน Complete RPMI-1640

2). ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่กำกับค่าของข้อมูลที่แตกต่างกัน แสดงว่าเป็นค่าที่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$)

3). ความเข้มข้นของสารละลายของสารสกัดข้าวแดงที่อยู่ในช่วง 0.45-0.47, 0.89-0.94, 1.77-1.87, และ 3.54-3.74 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร มาจากข้าวแดงในปริมาณ 182.29, 364.59, 729.19, และ 1,458.39 ppm ตามลำดับ

จากภาพที่ 4.3.6 และตารางที่ 4.3.9 พบว่าค่าเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์ HEK293T มีแนวโน้มลดลงมากอย่างเห็นได้ชัดเจน เมื่อเติมสารละลายของสารสกัดข้าวแดงที่ผลิตจาก *M. purpureus* สายพันธุ์ FTCMU 3385 ที่ระยะหมักสูงขึ้นและมีความเข้มข้นเพิ่มขึ้น โดยเมื่อเติมสารละลายของสารสกัดข้าวแดงที่ระยะหมัก 6, 12, 18, และ 24 วัน ค่าเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์ HEK293T ลดลงมากขึ้นตามลำดับ ณ ความเข้มข้นสูงสุดของสารละลายของสารสกัดข้าวแดงซึ่งอยู่ในช่วง 3.54-3.74 มิลลิกรัม/มิลลิลิตรซึ่งมาจากข้าวแดงในปริมาณ 1,458.39 ppm มีค่าเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์ HEK293T ที่ระยะหมัก 6, 12, 18, และ 24 วันลดลงมาอยู่ที่ 82.2%, 23.8%, 59.6%, และ 6.6% ตามลำดับ

ในการเปรียบเทียบความเป็นพิษของข้าวแดง โดยคำนวณค่าเฉลี่ยความเข้มข้นของสารละลายของสารสกัดข้าวแดงที่ผลิตจาก *M. purpureus* สายพันธุ์ FTCMU 3385 ที่ระยะหมัก 6, 12, 18, และ 24 วัน ซึ่งทำให้เซลล์ HEK293T มีการรอดชีวิตอยู่ที่ 80% หรือมีการตายไป 20% จากโปรแกรม ED50V1.0 ได้เท่ากับ 2.67 ± 1.06, 1.27 ± 0.13, 1.77 ± 0.21, และ 0.71 ± 0.04 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ จะเห็นได้ว่าข้าวแดงที่ผลิตจาก *M. purpureus* สายพันธุ์ FTCMU 3385 ที่ระยะหมัก 6 วัน จะใช้ความเข้มข้นของสารละลายมากที่สุด ในการทำให้เซลล์ HEK293T มีการรอดชีวิตอยู่ที่ 80% หรือมีการตายไป 20% รองลงมาเป็นข้าวแดงที่ระยะหมัก 18, 12, และ 24 วัน จึงอาจแปลผลได้ว่า ในสารละลายของสารสกัดข้าวแดงที่ผลิตจาก *M. purpureus* สายพันธุ์ FTCMU 3385 ที่ระยะหมัก 24 วันน่าจะมีสารพิษที่เทียบเท่ากับซิตรินินในปริมาณสูงสุด รองลงมาเป็นสารละลายของสารสกัดข้าวแดงที่ผลิตจาก *M. purpureus* สายพันธุ์เดียวกันนี้ ที่ระยะหมัก 12 และ 18 วันตามลำดับ ส่วนสารละลายของสารสกัดข้าวแดงที่ผลิตจาก *M. purpureus* สายพันธุ์เดียวกันที่ระยะหมัก 6 วัน น่าจะมีสารพิษที่เทียบเท่ากับซิตรินินในปริมาณน้อยที่สุด

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 4.3.10 เปรียบเทียบค่าเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์ HEK293T จากการเติมสารละลายของสารสกัดข้าวแดงที่ระยะเวลาหมัก 6, 12, 18, และ 24 วัน ซึ่งผลิตจาก *M. purpureus* ทั้ง 3 สายพันธุ์ใน Complete RPMI-1640

ระยะเวลาหมัก	สายพันธุ์ของ *M. purpureus*	ความเข้มข้นของสารละลายของสารสกัดข้าวแดง (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)			
		0.45-0.47	0.89-0.94	1.77-1.87	3.54-3.74
6	ATCC 16365	$86.6^{i} \pm 0.90$	$86.1^{i} \pm 1.64$	$81.7^{m} \pm 2.31$	$77.7^{q} \pm 1.03$
	DMKU	$93.0^{c} \pm 0.51$	$92.7^{c} \pm 1.17$	$88.5^{e} \pm 0.12$	$82.9^{k} \pm 3.38$
	FTCMU 3385	$86.9^{h} \pm 0.58$	$88.0^{e} \pm 2.57$	$78.2^{n} \pm 3.90$	$82.2^{j} \pm 0.61$
12	ATCC 16365	$86.3^{i} \pm 3.70$	$86.2^{i} \pm 3.84$	$88.8^{d} \pm 1.71$	$71.6^{s} \pm 1.42$
	DMKU	$92.1^{c} \pm 0.50$	$94.3^{bc} \pm 3.23$	$93.8^{c} \pm 2.58$	$95.4^{ab} \pm 0.78$
	FTCMU 3385	$95.6^{ab} \pm 4.44$	$93.5^{c} \pm 2.28$	$85.9^{i} \pm 2.32$	$23.8^{w} \pm 2.70$
18	ATCC 16365	$86.6^{i} \pm 2.13$	$83.1^{k} \pm 1.09$	$85.0^{i} \pm 1.90$	$79.6^{o} \pm 1.54$
	DMKU	$89.4^{cd} \pm 5.54$	$76.6^{r} \pm 0.70$	$91.8^{c} \pm 2.89$	$94.4^{bc} \pm 2.89$
	FTCMU3385	$92.2^{c} \pm 1.37$	$87.2^{g} \pm 2.16$	$80.9^{n} \pm 3.39$	$59.6^{u} \pm 3.90$
24	ATCC 16365	$102.4^{a} \pm 5.46$	$92.8^{c} \pm 2.85$	$87.8^{f} \pm 1.11$	$63.9^{t} \pm 1.31$
	DMKU	$95.2^{ab} \pm 7.40$	$94.6^{b} \pm 4.32$	$93.6^{c} \pm 2.79$	$55.7^{u} \pm 2.36$
	FTCMU 3385	$83.7^{j} \pm 1.83$	$76.7^{r} \pm 2.12$	$47.7^{v} \pm 0.76$	$6.6^{x} \pm 1.58$

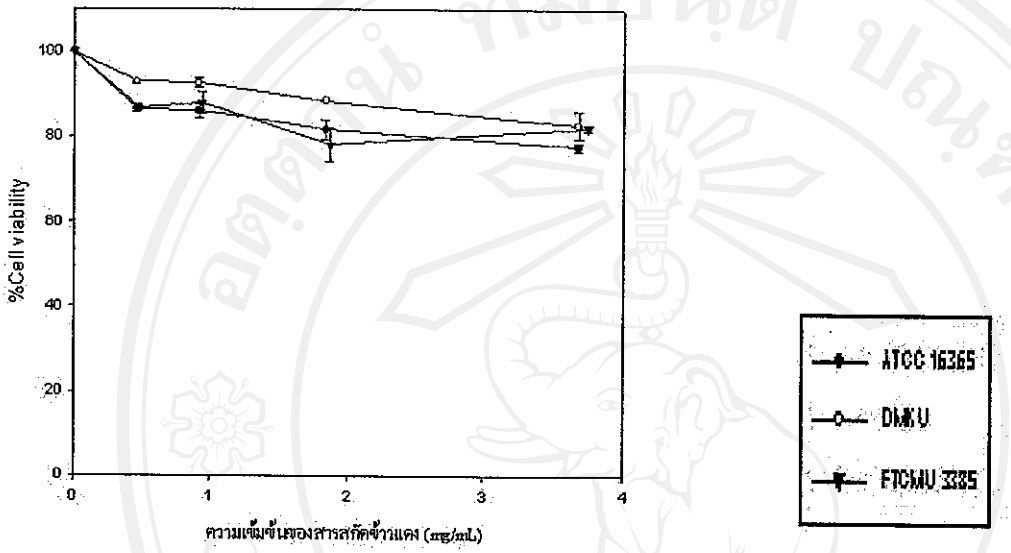
หมายเหตุ : 1). ค่าของข้อมูลแสดงเป็น ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน โดยพิจารณารวมจากทุกซ้ำในแต่ละช่วงความเข้มข้นของสารละลายของสารสกัดข้าวแดงที่ผลิตจาก *M. purpureus* สายพันธุ์ ATCC 16365, DMKU, และ FTCMU 3385 ที่ระยะหมัก 6, 12, 18, และ 24 วัน

2). ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่กำกับค่าของข้อมูลที่แตกต่างกัน แสดงว่าเป็นค่าที่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$)

3). ความเข้มข้นของสารละลายของสารสกัดข้าวแดงที่อยู่ในช่วง 0.45-0.47, 0.89-0.94, 1.77-1.87, และ 3.54-3.74 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร มาจากข้าวแดงในปริมาณ 182.29, 364.59, 729.19, และ 1,458.39 ppm ตามลำดับ

ข. ผลของสายพันธุ์ *M. purpureus* ในแต่ละระยะเวลาหมักข้าวแดง ต่อความเป็นพิษกับเซลล์ HEK293T

ข 1. ผลของสายพันธุ์ *M. purpureus* ในระยะเวลาหมักข้าวแดง 6 วัน ต่อค่าเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์ HEK293T



ภาพที่ 4.3.7 แสดงค่าเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์ HEK293T จากการเติมสารละลายของสารสกัดข้าวแดง ที่ผลิตจาก *M. purpureus* สายพันธุ์ ATCC 16365, DMKU, และ FTCMU 3385 ที่ระยะหมัก 6 วันใน Complete RPMI-1640 ซึ่งมีความเข้มข้นอยู่ในช่วง 0.45-0.47, 0.89-0.94, 1.77-1.87, และ 3.54-3.74 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร

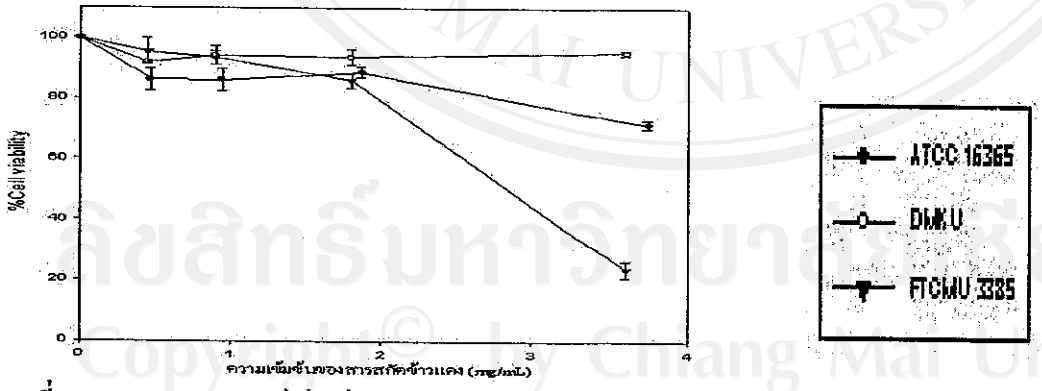
จากภาพที่ 4.3.7 และตารางที่ 4.3.10 จะเห็นได้ว่า แนวโน้มการลดลงของค่าเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์ HEK293T จากการเติมสารละลายของสารสกัดข้าวแดง ที่ผลิตจาก *M. purpureus* สายพันธุ์ ATCC 16365 ที่ระยะหมัก 6 วัน โดยพิจารณารวมจากทุกช่วงความเข้มข้นของสารละลาย ใกล้เคียงกับการเติมสารละลายของสารสกัดข้าวแดงที่ผลิตจาก *M. purpureus* สายพันธุ์ FTCMU 3385 ที่ระยะหมักเดียวกัน โดยค่าเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์ HEK293T มีการลดลง เมื่อความเข้มข้นของสารละลายของสารสกัดข้าวแดงเพิ่มขึ้น จนถึงช่วงความเข้มข้นสูงสุด 3.54-3.74 มิลลิกรัม/มิลลิลิตรซึ่งมาจากข้าวแดงในปริมาณ 1,458.39 ppm สารละลายของสารสกัดข้าวแดงที่ผลิตจาก *M. purpureus* สายพันธุ์ ATCC 16365 ให้ค่าเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์ HEK293T อยู่ที่ 77.7% ในขณะที่สารละลายของสารสกัดข้าวแดงที่ผลิตจาก *M. purpureus* สายพันธุ์ FTCMU 3385 ให้ค่าเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์ HEK293T อยู่ที่ 82.2% สำหรับการเติมสารละลายของสารสกัดข้าวแดงที่ผลิตจาก *M. purpureus* สายพันธุ์ DMKU ที่ระยะหมักเดียวกันนี้ โดยพิจารณา

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

รวมจากทุกช่วงความเข้มข้นของสารละลาย ให้แนวโน้มการลดลงของค่าเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์ HEK293T น้อยที่สุด โดย ณ ความเข้มข้นสูงสุดของสารละลายของสารสกัดข้าวแดงซึ่งอยู่ในช่วง 3.54-3.74 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร สารละลายของสารสกัดข้าวแดงที่ผลิตจาก *M. purpureus* สายพันธุ์ DMKU ให้ค่าเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์ HEK293T อยู่ที่ 82.9%

จากการพิจารณาค่าความเข้มข้นของสารละลายของสารสกัดข้าวแดงที่ผลิตจาก *M. purpureus* ทั้ง 3 สายพันธุ์ ที่ระยะหมัก 6 วัน ซึ่งทำให้เซลล์ HEK293T มีการรอดชีวิตอยู่ที่ 80% หรือมีการตายไป 20% พบว่า สารละลายของสารสกัดข้าวแดงที่ผลิตจาก *M. purpureus* สายพันธุ์ ATCC 16365 และ FTCMU 3385 มีค่าความเข้มข้นดังกล่าวใกล้เคียงกันคือ 2.74 ± 0.27 และ 2.67 ± 1.06 มิลลิกรัม/มิลลิลิตรตามลำดับ สำหรับสารละลายของสารสกัดข้าวแดงที่ผลิตจาก *M. purpureus* สายพันธุ์ DMKU ให้ค่าความเข้มข้นดังกล่าวสูงกว่าคือ 4.26 ± 0.92 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร จึงแปลผลได้ว่าในสารละลายของสารสกัดข้าวแดงที่ผลิตจาก *M. purpureus* สายพันธุ์ ATCC 16365 และ FTCMU 3385 ที่ระยะหมัก 6 วัน มีปริมาณสารพิษที่เทียบเท่ากับซิตรินินใกล้เคียงกัน ซึ่งมากกว่าในสารละลายของสารสกัดข้าวแดงที่ผลิตจาก *M. purpureus* สายพันธุ์ DMKU ที่ระยะหมักเดียวกันนี้ สำหรับค่าความเข้มข้นของสารละลายของสารสกัดข้าวแดง และสารละลายซิตรินินมาตรฐาน ซึ่งทำให้เซลล์ HEK293T มีการรอดชีวิตอยู่ที่ 80% หรือมีการตายไป 20% (Effective dose 80 : ED_{80} หรือ Inhibitory dose 20 : ID_{20}) ได้รายงานไว้แล้วในตารางที่ ง-1 และ ง-2 ของภาคผนวก ง.

ข 2. ผลของสายพันธุ์ *M. purpureus* ในระยะเวลาหมักข้าวแดง 12 วัน ต่อค่าเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์ HEK293T



ภาพที่ 4.3.8 แสดงค่าเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์ HEK293T จากการเติมสารละลายของสารสกัดข้าวแดงที่ผลิตจาก *M. purpureus* สายพันธุ์ ATCC 16365, DMKU, และ FTCMU 3385 ที่ระยะหมัก 12 วันใน Complete RPMI-1640 ซึ่งมีความเข้มข้นอยู่ในช่วง 0.45-0.47, 0.89-0.94, 1.77-1.87, และ 3.54-3.74 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร

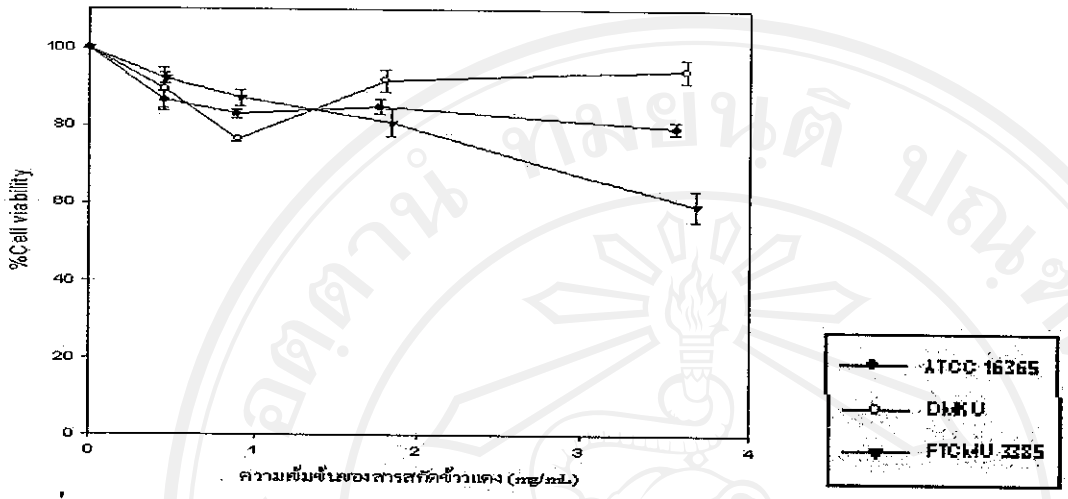
ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

จากภาพที่ 4.3.8 และตารางที่ 4.3.10 จะเห็นได้ว่า การเติมสารละลายของสารสกัดข้าวแดงที่ผลิตจาก *M. purpureus* สายพันธุ์ ATCC 16365 และ FTCMU 3385 ที่ระยะหมัก 12 วัน โดยพิจารณารวมจากทุกช่วงความเข้มข้นของสารละลาย ให้แนวโน้มการลดลงของค่าเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์HEK293Tคล้ายคลึงกัน กล่าวคือเมื่อความเข้มข้นของสารละลายของสารสกัดข้าวแดงเพิ่มขึ้นถึงช่วง 0.45-0.47 และ 0.89-0.94 มิลลิกรัม/มิลลิลิตรซึ่งมาจากข้าวแดงในปริมาณ 182.29 และ 364.59 ppm ตามลำดับ ค่าเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์ HEK293T จะลดลง เมื่อความเข้มข้นของสารละลายของสารสกัดข้าวแดงเพิ่มขึ้นจนถึงช่วง 1.77-1.87 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ซึ่งมาจากข้าวแดงในปริมาณ 729.19 ppm ค่าเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์ HEK293T จากการเติมสารละลายของสารสกัดข้าวแดงที่ผลิตจาก *M. purpureus* สายพันธุ์ ATCC 16365 กลับมีการเพิ่มขึ้นเล็กน้อย ส่วนการเติมสารละลายของสารสกัดข้าวแดงที่ผลิตจาก *M. purpureus* สายพันธุ์ FTCMU 3385 ให้ค่าเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์ลดลง สุดท้ายเมื่อความเข้มข้นของสารละลายของสารสกัดข้าวแดงเพิ่มขึ้นถึงระดับสูงสุดในช่วง 3.54-3.74 มิลลิกรัม/มิลลิลิตรซึ่งมาจากข้าวแดงในปริมาณ 1,458.39 ppm ค่าเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์HEK293Tก็จะลดลง โดยการเติมสารละลายของสารสกัดข้าวแดงที่ผลิตจาก *M. purpureus* สายพันธุ์ ATCC 16365 และ FTCMU 3385 ให้ค่าเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์ HEK293T ณ ความเข้มข้นสูงสุดนี้เท่ากับ 71.6 และ 23.8% ตามลำดับ สำหรับการเติมสารละลายของสารสกัดข้าวแดงที่ผลิตจาก *M. purpureus* สายพันธุ์ DMKU ที่ระยะหมัก 12 วัน ให้ค่าเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์ HEK293T ลดลงเมื่อความเข้มข้นของสารละลายของสารสกัดข้าวแดงเพิ่มขึ้นอยู่ในช่วง 0.45-0.47 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร แล้วเมื่อความเข้มข้นของสารละลายของสารสกัดข้าวแดงเพิ่มขึ้น จนอยู่ในช่วง 0.89-1.87 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ค่าเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์ HEK293T มีการเพิ่มขึ้นและค่อนข้างคงที่ จนเมื่อถึงความเข้มข้นสูงสุดซึ่งอยู่ในช่วง 3.54-3.74 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ค่าเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์ HEK293T เท่ากับ 95.4%

จากการพิจารณาค่าความเข้มข้นของสารละลายของสารสกัดข้าวแดงที่ผลิตจาก *M. purpureus* ทั้ง 3 สายพันธุ์ ที่ระยะหมัก 12 วัน ซึ่งทำให้เซลล์ HEK293T มีการรอดชีวิตอยู่ที่ 80% หรือมีการตายไป 20% พบว่า สารละลายของสารสกัดข้าวแดงที่ผลิตจาก *M. purpureus* สายพันธุ์ ATCC 16365, DMKU, และ FTCMU 3385 ให้ค่าความเข้มข้นดังกล่าวเท่ากับ 2.30 ± 0.28, 41.51 ± 41.68, และ 1.27 ± 0.13 มิลลิกรัม/มิลลิลิตรตามลำดับ จึงกล่าวได้ว่าในสารละลายของสารสกัดข้าวแดงที่ผลิตจาก*M. purpureus* สายพันธุ์ FTCMU 3385 ที่ระยะหมัก 12 วัน น่าจะมีปริมาณสารพิษที่เทียบเท่ากับซิตรินินสูงสุด รองลงมาเป็นสารละลายของสารสกัดข้าวแดงที่ผลิตจาก *M. purpureus* สายพันธุ์ ATCC 16365 และ DMKU ที่ระยะหมักเดียวกัน ตามลำดับ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ข 3. ผลของสายพันธุ์ *M. purpureus* ในระยะเวลาหมักข้าวแดง 18 วัน ต่อค่าเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์ HEK293T



ภาพที่ 4.3.9 แสดงค่าเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์ HEK293T จากการเติมสารละลายของสารสกัดข้าวแดงที่ผลิตจาก *M. purpureus* สายพันธุ์ ATCC 16365, DMKU, และ FTCMU 3385 ที่ระยะหมัก 18 วันใน Complete RPMI-1640 ซึ่งมีความเข้มข้นอยู่ในช่วง 0.45-0.47, 0.89-0.94, 1.77-1.87, และ 3.54-3.74 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร

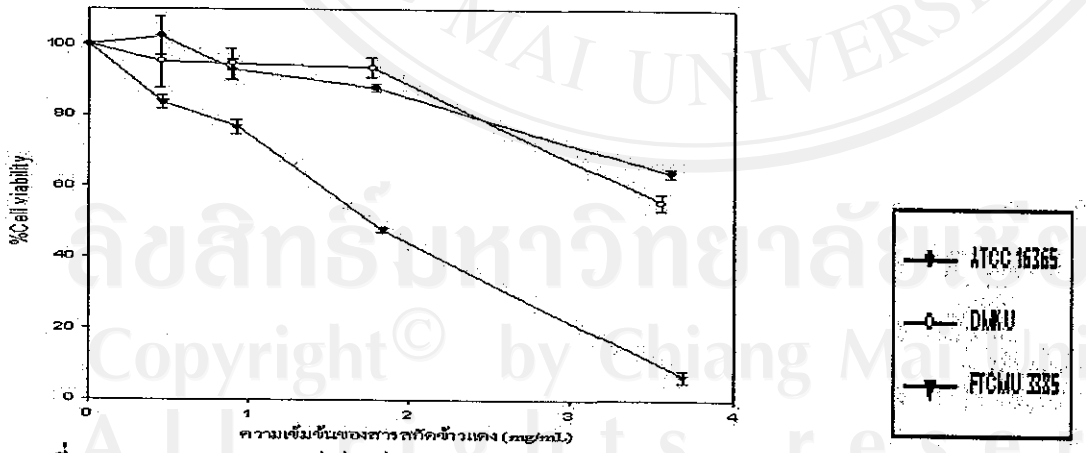
จากภาพที่ 4.3.9 และตารางที่ 4.3.10 จะเห็นได้ว่า การเติมสารละลายของสารสกัดข้าวแดงที่ผลิตจาก *M. purpureus* สายพันธุ์ ATCC 16365 และ FTCMU 3385 ที่ระยะหมัก 18 วัน ให้แนวโน้มการลดลงของค่าเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์ HEK293T คล้ายคลึงกัน คือ เมื่อความเข้มข้นของสารละลายของสารสกัดข้าวแดงเพิ่มขึ้น ค่าเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์ HEK293T ก็จะลดลงตามลำดับ โดยแนวโน้มการลดลงของค่าเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์ HEK293T จากการเติมสารละลายของสารสกัดข้าวแดงที่ผลิตจาก *M. purpureus* สายพันธุ์ ATCC 16365 มีการลดลงอย่างช้า ๆ จนเมื่อความเข้มข้นของสารละลายของสารสกัดข้าวแดงเพิ่มขึ้นสูงสุดอยู่ในช่วง 3.54-3.74 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ซึ่งมาจากข้าวแดงในปริมาณ 1,458.39 ppm ค่าเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์ HEK293T ลดลงต่ำสุดมาอยู่ที่ 79.6% ในขณะที่การเติมสารละลายของสารสกัดข้าวแดงที่ผลิตจาก *M. purpureus* สายพันธุ์ FTCMU 3385 ทำให้ค่าเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์ HEK293T มีการลดลงเร็วกว่า จนอยู่ที่ระดับต่ำสุดเท่ากับ 59.6% เมื่อความเข้มข้นของสารละลายของสารสกัดข้าวแดงเพิ่มขึ้นถึงระดับเดียวกันนี้ สำหรับการเติมสารละลายของสารสกัดข้าวแดงที่ผลิตจาก *M. purpureus* สายพันธุ์ DMKU ที่ระยะหมัก 18 วัน ให้แนวโน้มการลดลงของค่าเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์ HEK293T ไม่ชัดเจนเหมือนกับการเติมสารละลายของสารสกัดข้าวแดงที่ผลิตจาก *M. purpureus* สายพันธุ์ ATCC 16365 และ FTCMU 3385 ที่ระยะ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

หมักเดียวกัน โดยในช่วงความเข้มข้น 0.45-0.47 และ 0.89-0.94 มิลลิกรัม/มิลลิลิตรซึ่งมาจากข้าวแดงในปริมาณ 182.29 และ 364.59 ppm ตามลำดับ ค่าเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์ HEK293T มีการลดลงอย่างต่อเนื่องจนมีค่าต่ำสุดเท่ากับ 76.6% เมื่อความเข้มข้นของสารละลายของสารสกัดข้าวแดงเพิ่มขึ้นจนอยู่ในช่วง 1.77-1.87 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ค่าเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์ HEK293T กลับเพิ่มขึ้น จนเมื่อความเข้มข้นของสารละลายของสารสกัดข้าวแดงเพิ่มขึ้นถึงระดับสูงสุดในช่วง 3.54-3.74 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ค่าเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์ HEK293T จะอยู่ที่ 94.4%

เมื่อพิจารณาจากค่าความเข้มข้นของสารละลายของสารสกัดข้าวแดง ที่ผลิตจาก *M. purpureus* ทั้ง 3 สายพันธุ์ ที่ระยะหมัก 18 วัน ซึ่งทำให้เซลล์ HEK293T มีการรอดชีวิตอยู่ที่ 80% หรือมีการตายไป 20% พบว่า สารละลายของสารสกัดข้าวแดงที่ผลิตจาก *M. purpureus* สายพันธุ์ ATCC 16365, DMKU, และ FTCMU 3385 ให้ค่าความเข้มข้นดังกล่าวเท่ากับ 3.08 ± 0.46, 16.03 ± 39.92, และ 1.77 ± 0.21 มิลลิกรัม/มิลลิลิตรตามลำดับ ซึ่งอาจแปลผลได้ว่าในสารละลายของสารสกัดข้าวแดงที่ผลิตจาก *M. purpureus* สายพันธุ์ FTCMU 3385 ที่ระยะหมัก 18 วัน น่าจะมีสารพิษที่เทียบเท่ากับซิตรินินในปริมาณสูงสุด รองลงมาเป็นสารละลายของสารสกัดข้าวแดงที่ผลิตจาก *M. purpureus* สายพันธุ์ ATCC 16365 และ DMKU ที่ระยะหมักเดียวกันตามลำดับ

ข 4. ผลของสายพันธุ์ *M. purpureus* ในระยะเวลาหมักข้าวแดง 24 วัน ต่อค่าเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์ HEK293T



ภาพที่ 4.3.10 แสดงค่าเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์ HEK293T จากการเติมสารละลายของสารสกัดข้าวแดง ที่ผลิตจาก *M. purpureus* สายพันธุ์ ATCC 16365, DMKU, และ FTCMU 3385 ที่ระยะหมัก 24 วันใน Complete RPMI-1640 ซึ่งมีความเข้มข้นอยู่ในช่วง 0.45-0.47, 0.89-0.94, 1.77-1.87, และ 3.54-3.74 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร

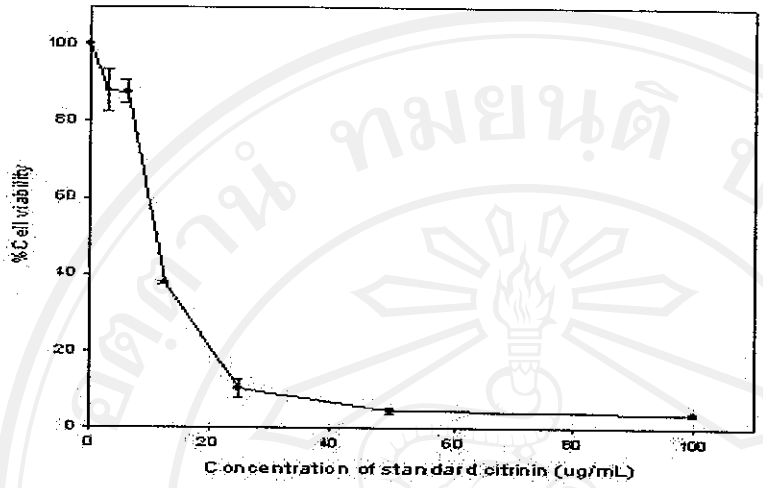
ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

จากภาพที่ 4.3.10 และตารางที่ 4.3.10 จะเห็นว่า การเติมสารละลายของสารสกัดข้าวแดงที่ผลิตจาก *M. purpureus* สายพันธุ์ ATCC 16365 และ DMKU ให้แนวโน้มการลดลงของค่าเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์ HEK293T เหมือนกัน กล่าวคือ ในช่วงความเข้มข้นของสารละลายของสารสกัดข้าวแดงตั้งแต่ 0, 0.45-0.47, และ 0.89-0.94 มิลลิกรัม/มิลลิลิตรซึ่งมาจากข้าวแดงในปริมาณ 0, 182.29, และ 364.59 ppm ตามลำดับ สารละลายของสารสกัดข้าวแดงที่ผลิตจาก *M. purpureus* ทั้ง 2 สายพันธุ์นี้ ให้การลดลงของค่าเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์ HEK293Tเป็นไปอย่างช้าๆ จนเมื่อถึงช่วงความเข้มข้น 1.77-1.87และ 3.54-3.74 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ซึ่งมาจากข้าวแดงในปริมาณ 729.19 และ 1,458.39 ppm ตามลำดับ ค่าเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์ HEK293T จากการเติมสารละลายของสารสกัดข้าวแดงที่ผลิตจาก *M. purpureus* ทั้ง 2 สายพันธุ์นี้ลดลงมากจนถึงระดับต่ำสุด โดยสารละลายของสารสกัดข้าวแดงที่ผลิตจาก*M.purpureus* สายพันธุ์ ATCC 16365 และ DMKU ที่ระยะหมัก 24 วัน ให้ค่าเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์ HEK293T ต่ำสุดเท่ากับ 63.9 และ 55.7% ตามลำดับ สำหรับการเติมสารละลายของสารสกัดข้าวแดงที่ผลิตจาก*M.purpureus* สายพันธุ์ FTCMU 3385 ที่ระยะหมัก 24 วันนั้น ให้แนวโน้มการลดลงของค่าเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์ HEK293T อย่างรวดเร็ว เมื่อความเข้มข้นของสารละลายของสารสกัดข้าวแดงเพิ่มขึ้น โดยในช่วงความเข้มข้นสูงสุดของสารละลายของสารสกัดข้าวแดงเท่ากับ 3.54-3.74 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ค่าเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์ HEK293T ลดลงมีค่าต่ำสุดอยู่ที่ 6.6%

จากการพิจารณาค่าความเข้มข้นของสารละลายของสารสกัดข้าวแดงที่ผลิตจาก *M. purpureus* ทั้ง 3 สายพันธุ์ ที่ระยะหมัก 24 วัน ซึ่งทำให้เซลล์ HEK293T มีการรอดชีวิตอยู่ที่ 80% หรือมีการตายไป 20% พบว่า สารละลายของสารสกัดข้าวแดงที่ผลิตจาก *M. purpureus* สายพันธุ์ ATCC 16365, DMKU, และ FTCMU 3385 ให้ค่าความเข้มข้นดังกล่าวเท่ากับ 2.01 ± 0.19, 3.23 ± 2.12, และ 0.71 ± 0.04 มิลลิกรัม/มิลลิลิตรตามลำดับ จึงอาจแปลผลได้ว่าในสารละลายของสารสกัดข้าวแดงที่ผลิตจาก *M. purpureus* สายพันธุ์ FTCMU 3385 ที่ระยะหมัก 24 วัน น่าจะมีสารพิษที่เทียบเท่ากับซิตรินินในปริมาณสูงสุด รองลงมาเป็นสารละลายของสารสกัดข้าวแดงที่ผลิตจาก *M. purpureus* สายพันธุ์ ATCC 16365 และ DMKU ที่ระยะหมักเดียวกันตามลำดับ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

4.3.2.8 ผลของสารละลายซิตรินินมาตรฐานใน Complete RPMI-1640 ณ ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อค่าเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์ HEK293T



ภาพที่ 4.3.11 แสดงค่าเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์ HEK293T จากการเติมสารละลายซิตรินินมาตรฐานใน Complete RPMI-1640 ณ ความเข้มข้นต่าง ๆ

ตารางที่ 4.3.11 เปรียบเทียบค่าเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์ HEK293T จากการเติมสารละลายซิตรินินมาตรฐานใน Complete RPMI-1640 ณ ความเข้มข้นต่าง ๆ

ความเข้มข้นสุดท้ายของซิตรินินมาตรฐาน (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)	ค่าเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์ HEK293T (%)
0	$100.00^{a} \pm 0.00$
3.125	$88.06^{b} \pm 5.41$
6.25	$87.71^{b} \pm 3.02$
12.5	$37.81^{c} \pm 0.52$
25.0	$10.19^{d} \pm 2.32$
50.0	$4.46^{e} \pm 0.73$
100.0	$3.57^{e} \pm 0.33$

หมายเหตุ : 1). ค่าของข้อมูลแสดงเป็น ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

2). ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่กำกับค่าของข้อมูลในแนวตั้งที่แตกต่างกัน แสดงว่าเป็นค่าที่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$)

จากภาพที่ 4.3.11 และตารางที่ 4.3.11 จะเห็นว่าเมื่อความเข้มข้นของสารละลายซิตรินินมาตรฐานเพิ่มขึ้น จะทำให้ค่าเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์ HEK293T มีแนวโน้มลดลงอย่างรวดเร็ว จนอยู่ที่ระดับต่ำสุดเท่ากับ 3.57% เมื่อความเข้มข้นของสารละลายซิตรินินมาตรฐานเพิ่มขึ้นอยู่ในระดับ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

สูงสุดที่ 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เมื่อเติมสารละลายซิตรินินมาตรฐานที่มีความเข้มข้น 3.125 และ 6.25 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร พบว่า ค่าเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์ HEK293T มีความใกล้เคียงกันมากโดยอยู่ที่ 88.06 และ 87.71% ตามลำดับ จากแนวโน้มการลดลงของค่าเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์ HEK293T เมื่อเติมสารละลายซิตรินินมาตรฐานที่มีความเข้มข้นเพิ่มขึ้นนี้ มีความคล้ายคลึงกับแนวโน้มการลดลงของค่าเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์ HEK293 จากการเติมสารละลายซิตรินินมาตรฐานใน Complete Minimum Essential medium (MEM) ซึ่งมีความเข้มข้นอยู่ในช่วง 20-120 ไมโครโมลาร์ หรือ 5-30 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร โดยใช้อุณหภูมิในการบ่ม 37°C นาน 72 ชั่วโมง ในการทดสอบด้วยวิธีการ MTT bioassay ในงานวิจัยของ Liu et al., (2003) สอดคล้องกับผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ Hela (คือ เซลล์มะเร็งปากช่องคลอดในมนุษย์) โดยใช้สารละลายซิตรินินใน Complete MEM ที่มีความเข้มข้น 25, 50, และ 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ซึ่งสารละลายซิตรินินทั้ง 3 ความเข้มข้นนี้ทำให้เซลล์ Hela มีการตายไป 73, 84, และ 90% ตามลำดับ ในงานวิจัยของ Hirota et al., (2002) และสอดคล้องกับค่าเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์ HL-60 (คือ เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวในมนุษย์ชนิด Promyelocytic) ที่มีการลดลงเมื่อเติมสารละลายซิตรินินมาตรฐานใน Complete RPMI-1640 ซึ่งมีความเข้มข้น 25, 50, 75, และ 100 ไมโครโมลาร์ หรือ 6.25, 12.5, 18.75, และ 25 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ในการทดสอบด้วยวิธีการ MTT bioassay ในงานวิจัยของ Yu et al., (2005) สำหรับค่าความเข้มข้นของสารละลายซิตรินินมาตรฐานในงานวิจัยค้นคว้าอิสระนี้ ซึ่งทำให้เซลล์ HEK293T มีการรอดชีวิตอยู่ที่ 80% หรือมีการตายไป 20% เท่ากับ 7.16 ± 0.52 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และที่ทำให้เซลล์ HEK293T มีการรอดชีวิตอยู่ที่ 50% เท่ากับ 25.31 ± 0.32 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

4.4 ผลการทดลองตอนที่ 4 การตรวจหาซิตรินินในสารสกัดจากข้าวแดงด้วยวิธีการ High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

4.4.1 ผลการเตรียมเฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) และสารละลายซิตรินินมาตรฐาน

เมื่อจะนำเฟสเคลื่อนที่ซึ่งเก็บไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4°C มาใช้งาน ควรนำมาตั้งไว้ ณ อุณหภูมิห้อง จนมีอุณหภูมิใกล้เคียงกับอุณหภูมิห้องก่อน เนื่องจากหากนำเฟสเคลื่อนที่ไปใช้เป็นตัวทำละลายในการเตรียมสารละลายซิตรินินมาตรฐาน ในขณะที่เฟสเคลื่อนที่มีอุณหภูมิต่ำเกินไป อาจมีผลทำให้ซิตรินินมาตรฐานมีการละลายได้อย่างไม่สมบูรณ์ หรือถ้านำเฟสเคลื่อนที่ซึ่งมีอุณหภูมิต่ำ ไปทำการฉีดเข้าระบบ HPLC ก็จะทำให้เกิดความแตกต่างของอุณหภูมิระหว่างเฟสเคลื่อนที่และสภาวะการทำงานของระบบ HPLC ในส่วนคอลัมน์ ทำให้ระบบ HPLC ต้องมีการปรับอุณหภูมิ และความเข้มของสัญญาณที่มาจากเฟสเคลื่อนที่นานขึ้น (Vazquez et al., 1996) กว่าจะทำ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ให้ความเข้มของสัญญาณจากเฟสเคลื่อนที่ นิ่งจนเป็นเส้นตรงคงที่ ที่ระดับ 0 mAU เป็นผลทำให้การตรวจวิเคราะห์หาปริมาณซิตรินินช้าลง

ในการตรวจวิเคราะห์หาปริมาณซิตรินินด้วยวิธีการ HPLC ส่วนใหญ่จะใช้วิธีการ Reverse phase chromatography ซึ่งใช้เฟสเคลื่อนที่ซึ่งเป็นกรด มักใช้กรดออร์โธฟอสฟอริกในการเตรียมเฟสเคลื่อนที่ โดยเฟสเคลื่อนที่ที่ได้นี้มีความน่าเชื่อถือสูง เกี่ยวกับค่า retention time และพื้นที่พีค (peak) ของซิตรินินที่ตรวจได้ และสามารถตรวจหาปริมาณซิตรินินที่น้อยมากถึง 2 นาโนกรัมได้ (Xu et al., 2006) การใช้ไอโซโพรพานอลเป็นส่วนผสมในเฟสเคลื่อนที่ จะทำให้ความคมชัด และความไวในการปรากฏของสัญญาณจากซิตรินินดีขึ้น และการที่มีอะซิโตไนไตรล์ในเฟสเคลื่อนที่จะทำให้ความไวในการปรากฏของสัญญาณจากซิตรินิน เพิ่มขึ้นเป็น2เท่าที่ความยาวคลื่นแสงอัลตร้าไวโอเลต 340 นาโนเมตร เมื่อเปรียบเทียบกับการใช้เมทานอล ในการใช้เฟสเคลื่อนที่ซึ่งประกอบด้วยกรดฟอสฟอริกเข้มข้น 0.25 นอร์มัล อะซิโตไนไตรล์ และไอโซโพรพานอลในอัตราส่วน 550 : 350 :100 มิลลิลิตร ตามลำดับ จะทำให้ปริมาณซิตรินิน ถูกแสดงเป็นพีคที่มีลักษณะแหลม และไม่มีการลดลงในด้านประสิทธิภาพของคอลัมน์ เมื่อทำการฉีดทุกวันเป็นเวลามากกว่า 2 สัปดาห์ (Phillips et al., 1980)

การเตรียมสารละลายซิตรินินมาตรฐานจะเริ่มที่ความเข้มข้น 1,000 และ100 ppm ในอะซิโตไนไตรล์ก่อน เนื่องจากซิตรินินสามารถละลายได้ดีในตัวทำละลายมีขั้วโดยเฉพาะอะซิโตไนไตรล์ (Phillips et al., 1980) เมื่อเตรียมสารละลายซิตรินินมาตรฐานในความเข้มข้นถัด ๆ มา จะใช้เฟสเคลื่อนที่เป็นตัวทำละลาย เนื่องจากในเฟสเคลื่อนที่มีอะซิโตไนไตรล์เป็นส่วนผสมอยู่ จึงสามารถนำสารละลายซิตรินินมาตรฐานเข้มข้น 100 ppm ในอะซิโตไนไตรล์ มาใช้เตรียมสารละลายซิตรินินมาตรฐานเข้มข้น 20, 1, 2, 3, 4, และ 5 ppm ในเฟสเคลื่อนที่ได้ ในการนำสารละลายซิตรินินมาตรฐานเข้มข้น 1, 2, 3, 4, และ 5 ppm ในเฟสเคลื่อนที่ มาบรรจุลงขวดไวเอิลเพื่อไปทำการฉีดเข้าระบบ HPLC ควรต้องนำสารละลายดังกล่าว มาตั้งไว้ ณ อุณหภูมิห้อง จนสารละลายซิตรินินมาตรฐานทุกความเข้มข้น มีอุณหภูมิใกล้เคียงกับอุณหภูมิห้องก่อน เพื่อป้องกันไม่ให้เกิดผลต่างของอุณหภูมิระหว่างสารละลายซิตรินินมาตรฐาน ณ ความเข้มข้นต่าง ๆ กับสภาวะการทำงานของระบบ HPLC ในส่วนคอลัมน์มากเกินไป (Vazquez et al., 1996)

4.4.2 ผลการตรวจหาซิตรินินในสารละลายจากข้าวแดงด้วยวิธีการ HPLC

ก่อนนำสารละลายของข้าวที่ใช้เป็นชุดทดสอบควบคุมทั้งสองชุดในเมทานอล (จากข้อ 3. ของหัวข้อ 3.6.4.3 ในบทที่ 3) และสารละลายข้าวแดงที่ผลิตจาก *M. purpureus* สายพันธุ์ ATCC 16365, DMKU, และ FTCMU 3385 ที่ระยะหมัก 6, 12, 18, และ 24 วันในเมทานอล จากข้อ 4. ของหัวข้อ 3.6.3.1 ในบทที่ 3 มาบรรจุลงขวดไวเอิลเพื่อนำไปฉีดเข้าระบบ HPLC ต่อไป ให้นำหลอด

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ทดลองที่บรรจุสารละลายข้าวทุกตัวอย่างในเมทานอลดังกล่าวนี้ มาตั้งไว้ ณ อุณหภูมิห้อง จนสารละลายในเมทานอลของข้าวทุกตัวอย่าง มีอุณหภูมิใกล้เคียงกับอุณหภูมิห้องก่อน จะช่วยทำให้เวลาของระบบ HPLC มีการปรับอุณหภูมิ และความเข้มของสัญญาณต่าง ๆ ที่มาจากสารละลายของข้าวทุกตัวอย่างในเมทานอลสั้นลง

การที่เลือกใช้แสงอัลตร้าไวโอเลตที่ความยาวคลื่น 340 นาโนเมตรในการตรวจปริมาณซิตรินินด้วยวิธีการ HPLC เพราะมีค่าใกล้เคียงกับแสงอัลตร้าไวโอเลตที่ความยาวคลื่น 335 นาโนเมตร ซึ่งซิตรินินมีการดูดซับแสงอัลตร้าไวโอเลตที่ความยาวคลื่นนี้สูงสุด เมื่อใช้เฟสเคลื่อนที่เป็นสารละลายผสมระหว่างกรดฟอสฟอริกเข้มข้น 0.25 นอร์มัล อะซิโตไนไตรล์ และไอโซโพรพานอล ในอัตราส่วน 550 : 350 :100 มิลลิลิตร ตามลำดับ ในช่วงแรกมีการฉีดเฟสเคลื่อนที่เข้าสู่ระบบ HPLC เพื่อให้ระบบ HPLC มีการปรับลักษณะความเข้มของสัญญาณจากเฟสเคลื่อนที่ ซึ่งปรากฏในโครมาโทแกรมให้นิ่งและเป็นเส้นตรงคงที่ที่ระดับ 0 mAU ซึ่งเป็นการทำ optimization

ในช่วงการทำ optimization นี้พบว่ามีพีคเกิดขึ้น 2-3 อันใน 6 ครั้งแรกที่ทำการฉีดเฟสเคลื่อนที่เข้าสู่คอลัมน์และส่วนที่ทำหน้าที่ตรวจหาซิตรินิน หลังจากนั้นในการฉีดเฟสเคลื่อนที่ครั้งต่อ ๆ มาพีคดังกล่าวจะลดลง จนมีลักษณะเกือบเป็นเส้นตรงในแนวราบ พีคที่ปรากฏขึ้นนี้อาจมาจากอะซิโตไนไตรล์ ซึ่งเป็นส่วนผสมในเฟสเคลื่อนที่ ซึ่งมีสภาพขั้วต่างจากกรดฟอสฟอริกและไอโซโพรพานอล (Phillips et al., 1980) การที่ใช้เวลาในการปรับลักษณะความเข้มของสัญญาณจากเฟสเคลื่อนที่ ซึ่งปรากฏในโครมาโทแกรม ให้นิ่งและเป็นเส้นตรงคงที่ที่ระดับ 0 mAU นานถึง 4 ชั่วโมงนั้น อาจมีสาเหตุมาจากการที่ระบบ HPLC ปรับความเข้มข้นของกรดฟอสฟอริก ให้ผสมเข้ากับส่วนที่เป็นตัวทำละลายอินทรีย์ (อะซิโตไนไตรล์) และส่วนที่เป็นตัวทำละลายที่เข้าได้กับน้ำ (ไอโซโพรพานอล) (Meister, 2004) จากการปรับส่วนผสมของเฟสเคลื่อนที่ดังกล่าวนี้ จะทำให้ค่า pH ของเฟสเคลื่อนที่โดยรวมลดลง แล้วจะส่งผลทำให้มีการคั่งค้างของซิตรินินภายในส่วนผสมที่เป็นกรดฟอสฟอริกของเฟสเคลื่อนที่น้อยลง

จากการฉีดสารละลายซิตรินินมาตรฐานเข้มข้น 1, 2, 3, 4, และ 5 ppm ในเฟสเคลื่อนที่ เข้าสู่คอลัมน์และ detector เพื่อให้ระบบ HPLC วิเคราะห์ปริมาณซิตรินินมาตรฐานในสารละลายแต่ละความเข้มข้น แล้วสร้างเป็นกราฟมาตรฐานออกมา ได้ผลการวิเคราะห์ปริมาณซิตรินินมาตรฐานแสดงไว้ในตารางที่ 4.4.1

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 4.4.1 ค่าความเข้มข้น พื้นที่ใต้กราฟ เวลา Retention time และปริมาณที่อ่านได้จากพีคของสารซิตรินินที่ใช้เป็นสารมาตรฐาน

ความเข้มข้น (ppm)	พื้นที่ใต้กราฟ (mAU x min)	retention time (นาที)	ปริมาณที่อ่านได้ (ppm)
1	0.124	1.274	0.844
2	0.269	1.271	1.832
3	0.428	1.272	2.914
4	0.595	1.269	4.052
5	0.759	1.269	5.170

หมายเหตุ : 1). สารซิตรินินที่ใช้เป็นสารมาตรฐานมาจาก *Penicillium citrinum* (Sigma Aldrich)

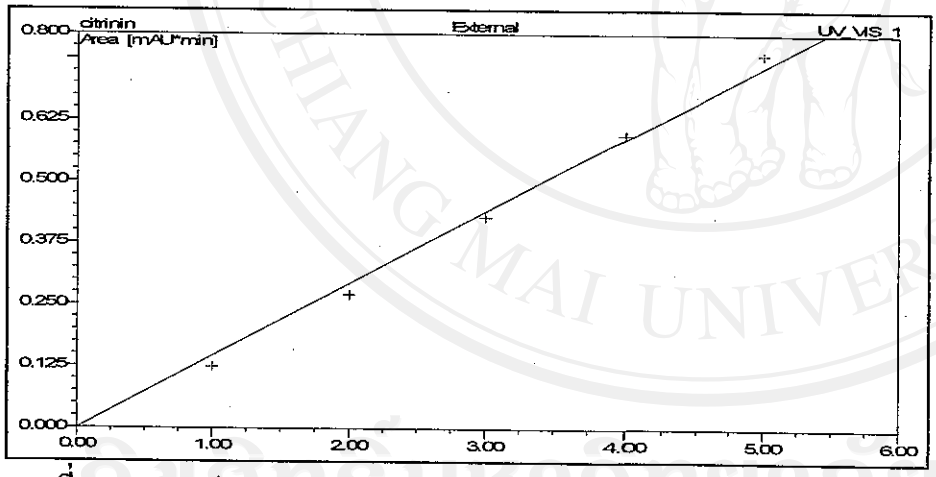
2). สารละลายเริ่มต้น (stock solution) เข้มข้น 20 ppm ในเฟสเคลื่อนที่

3). สารละลายใช้งานเท่ากับ 1, 2, 3, 4, และ 5 ppm ในเฟสเคลื่อนที่

สมการของกราฟมาตรฐาน คือ $Y = 0.1468X$ โดยมีค่า $R^2 = 0.995$

Y หมายถึง พื้นที่ใต้กราฟ

X หมายถึง ความเข้มข้นของสารซิตรินิน (ppm)



ภาพที่ 4.4.1 กราฟมาตรฐานของสารซิตรินิน

จากผลการวิเคราะห์ซิตรินินในตารางที่ 4.1.1 พบว่าการฉีดสารละลายซิตรินินมาตรฐานเข้มข้น 1, 2, 3, 4, และ 5 ppm ในเฟสเคลื่อนที่ อ่านปริมาณซิตรินินได้เท่ากับ 0.844, 1.832, 2.914, 4.052, และ 5.170 ppm ตามลำดับ ซึ่งพบว่าปริมาณซิตรินินที่อ่านได้ทุกค่า มีความใกล้เคียงกับความเข้มข้นที่แท้จริง โดยที่ปริมาณซิตรินินที่อ่านได้ของความเข้มข้น 1, 2, และ 3 ppm มีค่าต่ำกว่าความเข้มข้นจริงเล็กน้อย ส่วนปริมาณซิตรินินที่อ่านได้ของความเข้มข้น 4 และ 5 ppm มีค่าสูงกว่าความเข้มข้นจริงเล็กน้อย โดยปริมาณซิตรินินที่อ่านได้ของสารละลายซิตรินินมาตรฐานทุกความ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เข้มข้น มีค่า correction coefficient เท่ากับ 99.964% สำหรับค่า retention time ที่พีคของซิตรินินปรากฏขึ้นในผลการวิเคราะห์ของตารางที่ 4.1.1 มีค่าใกล้เคียงกันอยู่ที่ประมาณ 1.27 นาที เมื่อนำข้อมูลค่าความเข้มข้นของสารละลายซิตรินินมาตรฐาน กับค่าพื้นที่ของพีคซิตรินิน (= mAU x min) ที่อ่านได้ในแต่ละความเข้มข้น ไปสร้างกราฟ ก็จะได้กราฟมาตรฐานของสารซิตรินินดังปรากฏในภาพที่ 4.4.1

จากการฉีดสารละลายของข้าวทุกตัวอย่างในเมทานอล เข้าสู่คอลัมน์และ detector เพื่อให้ระบบ HPLC วิเคราะห์ปริมาณซิตรินินในสารละลายแต่ละอย่าง โดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของสารซิตรินินที่สร้างขึ้น ตั้งแต่การฉีดสารละลายของข้าวที่ใช้เป็นชุดทดสอบควบคุมในเมทานอล ตามด้วยสารละลายของข้าวที่ใช้เป็นชุดทดสอบควบคุมในเมทานอล ซึ่งมีซิตรินินมาตรฐานเข้มข้น 1.25 ppm จนถึงการฉีดสารละลายของข้าวแดงที่ผลิตจากเชื้อรา *M. purpureus* สายพันธุ์ ATCC 16365, DMKU, และ FTCMU 3385 ที่ระยะหมัก 6, 12, 18, และ 24 วันในเมทานอลตามลำดับ ซึ่งได้ผลการวิเคราะห์ปริมาณซิตรินิน แสดงไว้ในตารางที่ 4.4.2 และ 4.4.3

ตารางที่ 4.4.2 พื้นที่ใต้กราฟ และปริมาณซิตรินินที่อ่านได้จากพีคของซิตรินินในสารละลายของข้าวตัวอย่างต่าง ๆ

ตัวอย่างสารละลายของข้าวในเมทานอล	ระยะเวลาหมัก (วัน)	พื้นที่ใต้กราฟ (mAU x min)	ปริมาณซิตรินินที่อ่านได้ (ppm)
สารละลายของข้าวที่เป็นชุดทดสอบควบคุม	-	0	0
สารละลายของข้าวที่เป็นชุดทดสอบควบคุมซึ่งมีซิตรินินมาตรฐานเข้มข้น 1.25 ppm	-	0.162	1.102
สารละลายของข้าวแดงที่ผลิตจาก *M. purpureus* สายพันธุ์ ATCC 16365	6	0.211	1.438
	12	0.211	1.437
	18	0.284	1.937
	24	0.084	0.575
สารละลายของข้าวแดงที่ผลิตจาก *M. purpureus* สายพันธุ์ DMKU	6	0.255	1.735
	12	0.035	0.235
	18	0.081	0.554
	24	0.057	0.390
สารละลายของข้าวแดงที่ผลิตจาก *M. purpureus* สายพันธุ์ FTCMU 3385	6	0.363	2.472
	12	0.060	0.409
	18	0.346	2.356
	24	0.101	0.688

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 4.4.3 เปรียบเทียบค่าเวลา retention time ที่ปรากฏพีคของซิตรินิน (เป็นนาที) ของสารละลายจากข้าวแดงที่ผลิตจากเชื้อรา *M. purpureus* สายพันธุ์ ATCC 16365, DMKU, และ FTCMU 3385 ที่ระยะหมัก 6, 12, 18, และ 24 วันในเมทานอล

สายพันธุ์ของเชื้อรา *M. purpureus* ที่ใช้ในการหมักข้าวแดง	ระยะหมัก (วัน)				ค่าเฉลี่ยของเวลา (นาที) ตามสายพันธุ์
	6	12	18	24	
ATCC 16365	1.204	1.284	1.209	1.370	1.267 ± 0.008
DMKU	1.211	1.207	1.207	1.376	1.250 ± 0.08
FTCMU 3385	1.213	1.265	1.211	1.375	1.266 ±0.08
ค่าเฉลี่ยของเวลา (นาที) ตามระยะหมัก	1.209 ± 0.00	1.252 ± 0.04	1.209 ± 0.00	1.374 ± 0.00	

จากการเปรียบเทียบค่า retention time ที่ปรากฏพีคของซิตรินินในสารละลายข้าวแดงที่ผลิตจากเชื้อรา *M. purpureus* สายพันธุ์ ATCC 16365, DMKU, และ FTCMU 3385 ในเมทานอล ในตารางที่ 4.4.3 พบว่า ซิตรินินในสารละลายข้าวแดงที่ผลิตจากเชื้อรา *M. purpureus* ทุกสายพันธุ์ ในช่วงระยะหมัก 6, 12, และ 18 วัน ให้ค่า retention time ใกล้เคียงกัน คือ ค่า retention time เฉลี่ยที่ระยะหมัก 6, 12, และ 18 วัน ของทุกสายพันธุ์ เท่ากับ 1.209, 1.252 ± 0.04, และ 1.209 นาที ตามลำดับ ส่วนที่ระยะหมัก 24 วันของทุกสายพันธุ์ ให้ค่า retention time มากกว่าระยะหมักอื่น คือ เฉลี่ยอยู่ที่ 1.374 นาที การที่สารละลายข้าวแดงในระยะหมัก 24 วันให้ค่า retention time มากกว่าสารละลายข้าวแดงที่ระยะหมักอื่น อาจเป็นผลเนื่องมาจากสารละลายข้าวแดงที่ระยะหมัก 24 วัน ของทุกสายพันธุ์ให้ปริมาณซิตรินินน้อยลง และการที่ค่า retention time ที่ปรากฏพีคของซิตรินินในสารละลายข้าวแดงทุกระยะหมัก ของทุกสายพันธุ์มีลักษณะผันแปรเล็กน้อยนี้ เป็นเหตุการณ์ที่พบได้ทั่วไป เมื่อใช้วิธีการ Reverse phase HPLC ซึ่งตรวจหาปริมาณสารที่ต้องการจากการดูดกลืนแสงอัลตร้าไวโอเลต (Frisvad, 1987 อ้างใน Xu B-J., et al., 2006) เมื่อเปรียบเทียบค่า retention time เฉลี่ยของพีคของซิตรินิน ในสารละลายข้าวแดงที่ผลิตจากเชื้อรา *M. purpureus* ทั้ง 3 สายพันธุ์ ดังกล่าว โดยพิจารณารวมจากทุกระยะหมักในแต่ละสายพันธุ์ พบว่าให้ค่า retention time ใกล้เคียงกัน คือ พีคของซิตรินินในสารละลายข้าวแดงที่ผลิตจากเชื้อรา *M. purpureus* สายพันธุ์ ATCC 16365, DMKU, และ FTCMU 3385 ให้ค่า retention time เฉลี่ยเท่ากับ 1.267 ± 0.08, 1.250 ± 0.08, และ 1.266 ± 0.08 ตามลำดับ จากค่า retention time ที่ปรากฏพีคของซิตรินินในสารละลายข้าวแดงทั้ง 12 ตัวอย่าง เมื่อเปรียบเทียบกับค่า retention time ที่ปรากฏพีคของซิตรินินในสารละลายข้าวที่เป็นชุดทดสอบควบคุม ซึ่งมีซิตรินินมาตรฐานเข้มข้น 1.25 ppm ซึ่งอยู่ที่ 1.285 นาที ถือว่าสารละลายข้าวแดงที่ผลิตจาก

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เชื้อรา *M. purpureus* ทั้ง 3 สายพันธุ์ที่ระยะหมัก 6, 12, และ 18 วัน ให้ค่า retention time ใกล้เคียงกัน สำหรับสารละลายข้าวที่เป็นชุดทดสอบควบคุมธรรมดา ไม่ปรากฏพีคของซิตรินิน และไม่แสดงค่า retention time

จากการแสดงผลปริมาณซิตรินินที่อ่านได้ ในสารละลายข้าวแดงทั้ง 12 ตัวอย่างโดยวิธีการ HPLC ดังแสดงในตารางที่ 4.4.2 ให้ทำการคำนวณหาปริมาณซิตรินินทั้งหมดที่มีอยู่ในข้าวแดงแต่ละตัวอย่าง ดังแสดงในข้อ 3. ของภาคผนวก ช โดยผลการคำนวณปริมาณซิตรินิน (หน่วยเป็นมิลลิกรัม/กิโลกรัม) ในสารละลายข้าวแดงทุกตัวอย่าง แสดงไว้ในตารางที่ 4.4.4

ตารางที่ 4.4.4 เปรียบเทียบปริมาณซิตรินิน (หน่วยเป็น มิลลิกรัม / กิโลกรัม) ในสารละลายจากข้าวแดงที่ผลิตจากเชื้อรา *M. purpureus* สายพันธุ์ ATCC 16365, DMKU, และ FTCMU 3385 ที่ระยะหมัก 6, 12, 18, และ 24 วัน ในเมทานอล

สายพันธุ์ของเชื้อรา *M. purpureus* ที่ใช้ในการหมักข้าวแดง	ระยะหมัก (วัน)				ค่าเฉลี่ยของปริมาณซิตรินินตามสายพันธุ์
	6	12	18	24	
ATCC 16365	11.504	11.496	15.496	4.6	10.774 ± 4.53
DMKU	13.88	1.88	4.432	3.12	5.828 ± 5.47
FTCMU 3385	19.776	3.272	18.848	5.504	11.850 ± 8.67
ค่าเฉลี่ยของปริมาณซิตรินิน ตามระยะหมัก	15.053 ± 4.26	6.688 ± 6.80	12.925 ± 7.54	4.408 ± 1.20	

จากการเปรียบเทียบปริมาณซิตรินิน (หน่วยเป็น มิลลิกรัม/กิโลกรัม) ในสารละลายข้าวแดงที่ผลิตจากเชื้อรา *M. purpureus* สายพันธุ์ ATCC 16365, DMKU, และ FTCMU 3385 ที่ระยะหมัก 6, 12, 18, และ 24 วันในเมทานอล ดังปรากฏในตารางที่ 4.4.4 เมื่อพิจารณาปริมาณซิตรินินเฉลี่ยในสารละลายข้าวแดงที่ผลิตจากเชื้อรา *M. purpureus* ทุกสายพันธุ์ โดยพิจารณารวมจากทุกระยะหมักในแต่ละสายพันธุ์พบว่า สารละลายข้าวแดงที่ผลิตจากเชื้อรา *M. purpureus* สายพันธุ์ FTCMU 3385 ให้ปริมาณซิตรินินเฉลี่ยสูงสุดอยู่ที่ 11.850 ± 8.67 มิลลิกรัม/กิโลกรัม รองลงมาเป็นสารละลายข้าวแดงที่ผลิตจากเชื้อรา *M. purpureus* สายพันธุ์ ATCC 16365 และ DMKU ตามลำดับ โดยทั้งสองสายพันธุ์นี้ให้ปริมาณซิตรินินเฉลี่ยเท่ากับ 10.774 ± 4.53 และ 5.828 ± 5.47 มิลลิกรัม/กิโลกรัม ตามลำดับ เมื่อพิจารณาปริมาณซิตรินินเฉลี่ยในสารละลายข้าวแดงที่ผลิตจากเชื้อรา *M. purpureus* ทุกสายพันธุ์ในช่วงระยะหมัก 6, 12, 18, และ 24 วัน พบว่าปริมาณซิตรินินเฉลี่ยในแต่ละระยะหมักของทุกสายพันธุ์มีลักษณะขึ้นลงไม่แน่นอน โดยที่ระยะหมัก 6 วันให้ค่าปริมาณซิตรินินเฉลี่ยสูงสุดอยู่ที่ 15.053 ±

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

4.26 มิลลิกรัม/กิโลกรัม รองลงมาเป็นที่ระยะหมัก 18 และ 12 วันซึ่งให้ค่าปริมาณซิตรินินเฉลี่ยอยู่ที่ 12.925 ± 7.54 และ 6.688 ± 6.80 มิลลิกรัม/กิโลกรัมตามลำดับ ส่วนที่ระยะหมัก 24 วันให้ค่าปริมาณซิตรินินเฉลี่ยเท่ากับ 4.404 ± 1.20 มิลลิกรัม/กิโลกรัม จากปริมาณซิตรินินที่คำนวณได้ในสารละลายข้าวแดงในเมทานอลทั้ง 12 ตัวอย่าง เมื่อเปรียบเทียบกับปริมาณซิตรินินในสารละลายจากข้าวที่เป็นชุดทดสอบควบคุมในเมทานอล ซึ่งมีซิตรินินมาตรฐานเข้มข้น 1.25 ppm ซึ่งอ่านได้ 1.102 ppm พบว่าสารละลายข้าวแดงทั้ง 12 ตัวอย่างให้ปริมาณซิตรินินมากกว่า สำหรับสารละลายข้าวที่เป็นชุดทดสอบควบคุมธรรมดาในเมทานอล ปริมาณซิตรินินที่คำนวณได้เท่ากับ 0

จากสารละลายข้าวที่เป็นชุดทดสอบควบคุมในเมทานอล ซึ่งมีซิตรินินมาตรฐานเข้มข้น 1.25 ppm (จากการเติมสารละลายซิตรินินมาตรฐานเข้มข้น 100 ppm ในอะซิโตไนไตรล์) ทำการคำนวณหาค่าความถูกต้อง (Accuracy) ของปริมาณซิตรินินที่คำนวณได้ในสารละลายดังกล่าว ดังนี้

เติมสารละลายซิตรินินมาตรฐานเข้มข้น 100 ppm ในอะซิโตไนไตรล์ จำนวน 100 ไมโครลิตร ลงในสารละลายข้าวที่เป็นชุดทดสอบควบคุมซึ่งใช้เมทานอลจำนวน 7.9 มิลลิลิตร เป็นตัวทำละลาย (จากข้อ 1. ของหัวข้อ 3.6.4.3 ในบทที่ 3) รวมเป็นสารละลายข้าวที่เป็นชุดทดสอบควบคุมจำนวน 8 มิลลิลิตร (8,000 ไมโครลิตร)

คำนวณหาปริมาณซิตรินินที่ควรมีอยู่ในสารละลายข้าวที่เป็นชุดทดสอบควบคุมนี้ จากสูตร $N_1V_1 = N_2V_2$ โดยที่ N_1 คือปริมาณซิตรินินเริ่มต้น = 100 ppm, V_1 คือปริมาตรสารละลายซิตรินินมาตรฐานเข้มข้น 100 ppm ในอะซิโตไนไตรล์ที่ใช้ = 100 ไมโครลิตร, V_2 คือปริมาตรสารละลายข้าวที่เป็นชุดทดสอบควบคุมทั้งหมด = 8,000 ไมโครลิตร

ทำการแทนค่าได้ 100 ppm x 100 ไมโครลิตร = N_2 x 8,000 ไมโครลิตร N_2 = 1.25 ppm

ดังนั้นปริมาณซิตรินินมาตรฐานที่ควรมีอยู่ ในสารละลายข้าวที่เป็นชุดทดสอบควบคุมนี้ เท่ากับ 1.25 ppm

- ค่าเปอร์เซ็นต์ความถูกต้อง (Accuracy) = (ปริมาณซิตรินินมาตรฐานที่อ่านได้จากเครื่อง HPLC / ปริมาณซิตรินินมาตรฐานที่ควรมีอยู่ในสารละลายข้าวที่เป็นชุดทดสอบควบคุมนี้) x 100
- แทนค่าได้ (1.102 / 1.25) x 100 = 88.16%

ค่าเปอร์เซ็นต์ความถูกต้องของปริมาณซิตรินินที่คำนวณได้ เปรียบเทียบกับปริมาณซิตรินินที่มีอยู่จริง ควรอยู่ในช่วง 80-100% (Phillip et al., 1980) จึงถือว่าค่าเปอร์เซ็นต์ความถูกต้องของปริมาณซิตรินินในการทดลองนี้ยอมรับได้ และเป็นการแสดงว่าเมทานอลสามารถใช้สกัดซิตรินินออกมาได้ 88.16%

จากงานวิจัยของ Phillip et al., (1980) ซึ่งศึกษาหาปริมาณซิตรินินในตัวอย่างพลาสมาของหนูทดลอง โดยปรับความเป็นกรดด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 1 นอร์มัล แล้วนำไปสกัดด้วย

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เอธิลอะซิเตต 3 ครั้ง เป่าด้วยก๊าซไนโตรเจนจนแห้ง และละลายซ้ำด้วยอะซิโตไนไตรล์ ก่อนนำไปตรวจด้วยวิธีการ Reverse phase HPLC ซึ่งวัดปริมาณซิตรินินจากการดูดกลืนแสงอัลตร้าไวโอเลตที่ความยาวคลื่น 340 นาโนเมตร มีการใช้เฟสเคลื่อนที่ซึ่งเป็นสารละลายผสมระหว่าง กรดฟอสฟอริกเข้มข้น 0.25 นอร์มัล อะซิโตไนไตรล์ และไอโซโพรพานอลในอัตราส่วน 550 : 350 : 100 มิลลิลิตร เหมือนกับในงานวิจัยค้นคว้าอิสระนี้ พบว่าค่า retention time ที่ปรากฏพีคของซิตรินินในงานวิจัยของ Phillip และคณะเท่ากับ 4.28 ± 0.22 นาที ส่วนค่า retention time ที่ปรากฏพีคของซิตรินินในสารละลายข้าวที่เป็นชุดทดสอบควบคุม และในสารละลายข้าวแดงทุกตัวอย่างในเมทานอลของงานวิจัยค้นคว้าอิสระนี้มีค่าน้อยกว่า ที่เป็นเช่นนี้อาจเนื่องมาจากผลของเมทานอล ซึ่งเป็นตัวทำละลายในสารละลายข้าวที่เป็นชุดทดสอบควบคุม และในสารละลายข้าวแดง ไปลดค่า retention time ที่ปรากฏพีคของซิตรินิน เนื่องจากในงานวิจัยของ Philip และคณะได้ใช้เฟสเคลื่อนที่เปรียบเทียบซึ่งมีสภาพขั้วน้อยกว่า คือสารละลายผสมระหว่าง เมทานอล กรดฟอสฟอริกเข้มข้น 0.25 นอร์มัล และเอธิลอะซิเตต ในอัตราส่วน 550 : 350 : 100 มิลลิลิตร ได้ค่า retention time ที่ปรากฏพีคของซิตรินินเท่ากับ 2.47 ± 0.51 นาที

สำหรับลักษณะพีคของซิตรินินที่ปรากฏในสารละลายข้าวที่เป็นชุดทดสอบควบคุม และในสารละลายข้าวแดงทุกตัวอย่าง มีความแหลมและความคมชัดน้อยกว่าพีคของซิตรินินในตัวอย่างพลาสมาของหนูทดลองจากงานวิจัยของ Phillip และคณะ ทั้ง ๆ ที่ใช้สภาวะการทำงานของระบบ HPLC เหมือนกัน อาจเป็นเพราะว่าในสารละลายข้าวที่เป็นชุดทดสอบควบคุม และสารละลายข้าวแดงทุกตัวอย่างมีปริมาณซิตรินินน้อย จึงทำให้พีคที่ได้มีความเข้มของสัญญาณต่ำ และมีเมทานอลซึ่งเป็นตัวทำละลายในตัวอย่างทดสอบ เนื่องจากพบพีคขนาดใหญ่ที่มีความเข้มของสัญญาณสูงมาก ซึ่งพีคดังกล่าวอาจเป็นพีคของเมทานอลซึ่งมีค่า retention time อยู่ในช่วง 0.5-0.7 นาที ปรากฏขึ้นมาก่อนพีคของซิตรินินเพียงเล็กน้อย โดยในสารละลายข้าวแดงบางตัวอย่างมีพีคของซิตรินินที่มีความสูงต่ำมากอยู่ติดกับพีคของเมทานอล เมื่อเปรียบเทียบกับพีคขนาดใหญ่ที่คาดว่าเป็นของอะซิโตไนไตรล์ จากการตรวจสารละลายซิตรินินมาตรฐานที่มีความเข้มข้น 1-5 ppm อย่างไรก็ดีหากเปลี่ยนสารที่ใช้สกัดซิตรินินในข้าวที่เป็นชุดทดสอบควบคุม และข้าวแดงทุกตัวอย่าง จากเมทานอลมาเป็นอะซิโตไนไตรล์ หรือใช้สารสกัดซิตรินินที่เป็นสารละลายผสมระหว่างเอธิลอะซิเตต กับอะซิโตไนไตรล์ อาจจะทำให้พีคของซิตรินินที่ปรากฏมีความคมชัดดีขึ้น และแยกออกจากพีคของตัวทำละลายดีขึ้น

จากงานวิจัยของ Wild et al., (2002) ที่ได้ศึกษาหาปริมาณซิตรินินในข้าวแดงที่ผลิตจากเชื้อรา *M. purpureus* สายพันธุ์ DSM 1379 โดยวิธีการ Reverse phase HPLC ซึ่งวัดปริมาณซิตรินินจากการดูดกลืนแสงอัลตร้าไวโอเลตที่ความยาวคลื่น 390 นาโนเมตร โดยนำตัวอย่างข้าวแดงนี้จำนวน 0.1 กรัมไปสกัดด้วยตัวทำละลายผสมระหว่างกรดฟอสฟอริกเข้มข้น 0.25 โมลาร์ กับอะซิโตไนไตรล์

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ในอัตราส่วน 1 : 1 แล้วนำไปทำการปั่นเหวี่ยงเพื่อให้ได้สารสกัดที่ใสสำหรับทำการตรวจ HPLC มีการใช้เฟสเคลื่อนที่ 2 ชนิดร่วมกันในการปรับสภาวะการทำงานของระบบ HPLC ให้เหมาะสม ก่อนทำการฉีดตัวอย่างสารละลายข้าวแดง คือ กรดฟอสฟอริกเข้มข้น 0.25 โมลาร์ กับอะซิโตไนไตรล์ในอัตราส่วน 1 : 1 และอะซิโตไนไตรล์เพียงอย่างเดียว จากผลการวิเคราะห์พบว่าปรากฏพีคของซิตรินินที่เวลา 11.8 นาที และอ่านปริมาณซิตรินินได้เท่ากับ 0.19 มิลลิกรัม/กรัมของข้าวแดง พบว่าค่า retention time ของซิตรินินจากการทดลองนี้มากกว่าในงานวิจัยค้นคว้าอิสระนี้ซึ่งมีค่าอยู่ในช่วง 1.2-1.3 นาที ที่เป็นเช่นนี้อาจเนื่องจากผลของเมทานอล ซึ่งใช้เป็นตัวทำละลายในการสกัดซิตรินินจากตัวอย่างไปลดค่า retention time นอกจากนี้เฟสเคลื่อนที่ที่ใช้ในงานวิจัยของ Wild และคณะ ไม่มีไอโซโพรพานอลเป็นส่วนผสม จึงอาจทำให้ความไวในการปรากฏพีคของซิตรินินช้าลง ข้าวแดงทุกตัวอย่างในงานวิจัยค้นคว้าอิสระนี้ ให้ปริมาณซิตรินินที่คำนวณได้จากการตรวจด้วยวิธีการ HPLC จากตารางที่ 4.4.4 ต่ำกว่าในงานวิจัยของ Wild และคณะ

เมื่อเปรียบเทียบวิธีการสกัดซิตรินินในงานวิจัยของ Sabater-Vilar et al., (1999) กับวิธีการสกัดซิตรินินจากตัวอย่างข้าวแดงของงานวิจัยค้นคว้าอิสระนี้ ถือว่าแตกต่างกัน โดยในงานวิจัยของ Sabater-Vilar และคณะใช้สารละลายผสมระหว่างคลอโรฟอร์มกับเมทานอล ส่วนในงานวิจัยค้นคว้าอิสระนี้ใช้เมทานอลเป็นตัวทำละลายในการสกัดเพียงอย่างเดียว หลังการละลายด้วยสารละลายผสมระหว่างคลอโรฟอร์มกับเมทานอล ได้มีการระเหยแห้งเพื่อกำจัดตัวทำละลายออกไป ก่อนที่จะละลายกากแห้งที่เหลืออยู่ด้วยเฟสเคลื่อนที่ สารสกัดข้าวแดงในงานวิจัยของ Sabater-Vilar และคณะซึ่งได้มาโดยวิธีการสกัดแบบนี้ มีปริมาณซิตรินินอยู่ในช่วง 0.2-17.1 ppm ซึ่งใกล้เคียงกับสารละลายข้าวแดงในงานวิจัยค้นคว้าอิสระนี้ ซึ่งไม่ได้ผ่านการระเหยและละลายซ้ำด้วยเฟสเคลื่อนที่หรืออะซิโตไนไตรล์ นอกจากนี้สารสกัดข้าวแดงที่ได้ในงานวิจัยของ Sabater-Vilar และคณะซึ่งมีเฟสเคลื่อนที่คือ สารละลายผสมระหว่างน้ำอะซิโตไนไตรล์และไอโซโพรพานอลในอัตราส่วน 75:20:5 โดยปริมาตรเป็นตัวทำละลายสุดท้ายให้พีคของซิตรินินจากการตรวจด้วยวิธีการ Reverse phase HPLC ซึ่งใช้การเรืองแสงอัลตร้าไวโอเลตในการตรวจหาปริมาณซิตรินิน มีความคมชัดดีกว่าพีคของซิตรินินจากสารละลายข้าวแดงในงานวิจัยค้นคว้าอิสระนี้ ซึ่งมีเมทานอลเป็นตัวทำละลาย เนื่องจากในการทดลองนี้เมทานอลไม่ได้เป็นส่วนผสมในเฟสเคลื่อนที่ ซึ่งเป็นสารละลายผสมระหว่าง กรดฟอสฟอริกเข้มข้น 0.25 นอร์มัล อะซิโตไนไตรล์ และไอโซโพรพานอลในอัตราส่วน 55 : 35 : 10 โดยปริมาตร ประกอบกับสารละลายข้าวแดงแต่ละตัวอย่างมีซิตรินินในปริมาณต่ำ จึงอาจทำให้พีคของซิตรินินที่ได้ในการทดลองนี้มีความคมชัดต่ำ

เมื่อเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์ปริมาณซิตรินินในงานวิจัยของ Wang et al., (2005) กับปริมาณซิตรินินที่คำนวณได้จากสารสกัดข้าวแดง ที่ผลิตจากเชื้อรา *M. purpureus* สายพันธุ์ ATCC

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

16365, DMKU, และ FTCMU 3385 ที่ระยะหมัก 6, 12, 18, และ 24 วัน ในงานวิจัยค้นคว้าอิสระนี้ พบว่าปริมาณซิตรินินที่คำนวณได้จากสารสกัดข้าวแดงที่ผลิตจากเชื้อรา *M. purpureus* ในงานวิจัยค้นคว้าอิสระนี้มีค่าน้อยกว่า สาเหตุที่เป็นเช่นนี้อาจเป็นเพราะ เชื้อรา *M. purpureus* สายพันธุ์ต่าง ๆ ที่ใช้ในงานวิจัยของ Wang และคณะ ซึ่งได้แก่สายพันธุ์ IFO 4489, CBS 281.34, CBS 283.34, IFO 5965, CBS 302.78, IFO 44.85, IFO 4513, และ CBS 288.34 มีความสามารถในการผลิตซิตรินินได้สูงกว่า คือ ผลิตซิตรินินในอาหารเหลว YES อยู่ในช่วง 65-480 มิลลิกรัม/ลิตร อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในงานวิจัยของ Wang และคณะคือ อาหารเหลว YES มีความจำเพาะต่อการสร้างสารพิษจากเชื้อราได้ดีกว่าข้าว เนื่องจากมีสารสกัดจากยีสต์ และน้ำตาลซูโครสในปริมาณสูง ซึ่งกระตุ้นให้เชื้อรามีการเจริญและสร้างสารพิษได้ดีกว่าข้าว นอกจากนี้วิธีการเตรียมสารละลายทดสอบในงานวิจัยของ Wang และคณะ ไม่เหมือนกับวิธีการเตรียมสารสกัดข้าวแดงในการทดลองนี้ โดยที่ในงานวิจัยของ Wang และคณะใช้อาหารเลี้ยงเชื้อเป็นอาหารเหลว มีการปรับค่า pH ให้ได้ pH เท่ากับ 3 ผ่านการกรองด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 และกระดาษกรองที่มีขนาดรูกรอง 10 ไมครอนตามลำดับ กับการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 g นาน 30 นาที แล้วจึงนำของเหลวที่ได้ไปตรวจด้วยวิธีการ HPLC แบบที่ใช้การเรืองแสงอัลตร้าไวโอเลตในการตรวจหาปริมาณซิตรินิน โดยมีสภาวะการทำงานของระบบ HPLC ที่ใช้คือ ปริมาณการฉีดสารละลายเข้าสู่ระบบเท่ากับ 20 ไมโครลิตร ความยาวคลื่นแสงอัลตร้าไวโอเลตที่ใช้กระตุ้นอยู่ที่ 331 นาโนเมตร และที่ใช้ทำให้เกิดการแตกตัวเท่ากับ 500 นาโนเมตร เฟสเคลื่อนที่ที่ใช้เป็นสารละลายผสมระหว่างเมทานอล อะซิโตไนไตรล์ และน้ำในอัตราส่วน 3 : 3 : 4 โดยปริมาตร มีค่า pH 2.5 อัตราการไหลของสารละลายเข้าสู่ระบบ HPLC เท่ากับ 0.15 มิลลิลิตร/นาที

โดย Xu B-J., et al. (2006) ระบุว่าการตรวจหาซิตรินินด้วยวิธีการ HPLC แบบใช้การเรืองแสงอัลตร้าไวโอเลต มีความไวสูงกว่าวิธีการตรวจ HPLC ในงานวิจัยค้นคว้าอิสระนี้ซึ่งใช้การดูดกลืนแสงอัลตร้าไวโอเลต ในการตรวจหาปริมาณซิตรินิน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

4.5 วิจารณ์ผลการทดลองเกี่ยวกับความเข้มข้นสารละลายของสารสกัดข้าวแดงที่ผลิตจาก *M. purpureus* สายพันธุ์ ATCC 16365, DMKU, และ FTCMU 3385 ที่ระยะหมัก 6, 12, 18, และ 24 วัน ซึ่งทำให้เซลล์ HEK293T มีการรอดชีวิตอยู่ที่ 80% และปริมาณซิตรินินในข้าวแดงที่ผลิตจาก *M. purpureus* ทั้ง 3 สายพันธุ์นี้ ที่ระยะหมักเดียวกัน ซึ่งตรวจโดยวิธีการ HPLC ในหัวข้อ 4.4.2

จากแนวโน้มของค่าความเข้มข้นสารละลายของสารสกัดข้าวแดงที่ผลิตจาก *M. purpureus* สายพันธุ์ ATCC 16365, DMKU, และ FTCMU 3385 ที่ระยะหมัก 6, 12, 18, และ 24 วัน ซึ่งทำให้เซลล์ HEK293T มีการรอดชีวิตอยู่ที่ 80% หรือมีการตายไป 20% ซึ่งได้รายงานไว้ในหัวข้อ 4.3.2.7 และภาคผนวก ง กับแนวโน้มของปริมาณซิตรินินในข้าวแดงที่ผลิตจาก *M. purpureus* ทั้ง 3 สายพันธุ์ดังกล่าวที่ระยะหมักเดียวกัน ซึ่งวิเคราะห์จากการตรวจด้วยวิธีการ HPLC ในตารางที่ 4.4.2 และ 4.4.4 ของหัวข้อ 4.4 พบว่าข้าวแดงที่ผลิตจาก *M. purpureus* สายพันธุ์ DMKU ที่ระยะหมัก 6, 12, และ 18 วัน มีแนวโน้มของค่าความเข้มข้นของสารละลายของสารสกัดข้าวแดง ซึ่งทำให้เซลล์ HEK293T มีการรอดชีวิตอยู่ที่ 80% และแนวโน้มของปริมาณซิตรินินที่วิเคราะห์ได้สอดคล้องกัน โดยค่าความเข้มข้นของสารละลายของสารสกัดข้าวแดง ซึ่งทำให้เซลล์ HEK293T มีการรอดชีวิตอยู่ที่ 80% มีการเพิ่มขึ้นเมื่อระยะเวลาหมักข้าวแดง เพิ่มขึ้นจาก 6 วันเป็น 12 วัน แล้วลดลงเมื่อระยะหมักเป็น 18 วัน แสดงถึงการมีปริมาณสารพิษที่เทียบเท่ากับซิตรินินลดลง เมื่อระยะเวลาหมักข้าวแดงเป็น 12 วัน และมีปริมาณสารพิษนี้เพิ่มขึ้นที่ระยะหมัก 18 วัน ซึ่งตรงกับผลการตรวจวิเคราะห์ปริมาณซิตรินินด้วยวิธีการ HPLC ที่ระยะหมักทั้งสามนี้

สำหรับข้าวแดงที่ผลิตจาก *M. purpureus* สายพันธุ์ ATCC 16365 และ FTCMU 3385 ที่ระยะหมัก 6, 12, 18, และ 24 วัน และข้าวแดงที่ผลิตจาก *M. purpureus* สายพันธุ์ DMKU ที่ระยะหมัก 24 วัน มีแนวโน้มของค่าความเข้มข้นสารละลายของสารสกัดข้าวแดง ซึ่งทำให้เซลล์ HEK293T มีการรอดชีวิตอยู่ที่ 80% และแนวโน้มของปริมาณซิตรินินที่วิเคราะห์ได้ไม่สอดคล้องกัน โดยค่าความเข้มข้นสารละลายของสารสกัดข้าวแดงซึ่งทำให้เซลล์ HEK293T มีการรอดชีวิตอยู่ที่ 80% ในข้าวแดงที่ผลิตจาก *M. purpureus* สายพันธุ์ ATCC 16365 และ FTCMU 3385 ที่ระยะหมัก 6 วัน อยู่ที่ 2.74 และ 2.67 มิลลิกรัม/มิลลิลิตรตามลำดับ เมื่อระยะหมักข้าวแดงเพิ่มขึ้นเป็น 12 วัน ค่าความเข้มข้นดังกล่าวในข้าวแดงที่ผลิตจาก *M. purpureus* ทั้งสองสายพันธุ์นี้ก็จะลดลง ซึ่งแสดงความน่าจะเป็นของการมีสารพิษที่เทียบเท่ากับซิตรินินมากกว่าที่ระยะหมัก 6 วัน โดยข้าวแดงที่ผลิตจาก *M. purpureus* สายพันธุ์ FTCMU 3385 มีค่าความเข้มข้นนี้ต่ำกว่าข้าวแดงที่ผลิตจาก *M. purpureus* สายพันธุ์ ATCC 16365 เมื่อระยะหมักข้าวแดงเพิ่มขึ้นเป็น 18 วัน ค่าความเข้มข้นสารละลายของ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

สารสกัดข้าวแดงซึ่งทำให้เซลล์ HEK293T มีการรอดชีวิตอยู่ที่ 80% ในข้าวแดงที่ผลิตจาก *M. purpureus* ทั้งสองสายพันธุ์นี้ก็จะเพิ่มขึ้น ก่อนที่จะมีปริมาณลดลงถึงระดับต่ำสุด ที่ระยะหมักข้าวแดง 24 วัน โดยข้าวแดงที่ผลิตจาก *M. purpureus* สายพันธุ์ ATCC 16365 และ FTCMU 3385 ให้ค่าความเข้มข้นดังกล่าวเท่ากับ 2.01 และ 0.71 มิลลิกรัม/มิลลิลิตรตามลำดับ ซึ่งแสดงถึงความน่าจะเป็นที่จะมีสารพิษที่เทียบเท่ากับซิตรินินในปริมาณสูงมาก ในข้าวแดงที่ผลิตจาก *M. purpureus* ทั้งสองสายพันธุ์นี้ที่ใช้ระยะเวลาหมักนาน

สำหรับแนวโน้มของปริมาณซิตรินินซึ่งวิเคราะห์ด้วยวิธีการ HPLC ในข้าวแดงที่ผลิตจาก *M. purpureus* ทั้งสองสายพันธุ์นี้ ที่ระยะหมัก 6, 12, 18, และ 24 วันเป็นดังนี้ ที่ระยะหมัก 6 วัน ข้าวแดงที่ผลิตจาก *M. purpureus* สายพันธุ์ ATCC 16365 และ FTCMU 3385 ให้ปริมาณซิตรินินอยู่ที่ 11.504 และ 19.776 มิลลิกรัม/กิโลกรัมของข้าวแดงตามลำดับ เมื่อระยะหมักข้าวแดงเพิ่มขึ้นเป็น 12 วัน ข้าวแดงที่ผลิตจาก *M. purpureus* ทั้งสองสายพันธุ์นี้ จะให้ปริมาณซิตรินินลดลง โดยข้าวแดงที่ผลิตจาก *M. purpureus* สายพันธุ์ FTCMU 3385 มีปริมาณซิตรินินน้อยกว่าข้าวแดงที่ผลิตจาก *M. purpureus* สายพันธุ์ ATCC 16365 ซึ่งขัดแย้งกับค่าความเข้มข้นสารละลายของสารสกัดข้าวแดงซึ่งทำให้เซลล์ HEK293T มีการรอดชีวิตอยู่ที่ 80% ในข้าวแดงตัวอย่างเดียวกัน ซึ่งมีการลดลงที่ระยะหมักข้าวแดง 12 วัน แสดงความน่าจะเป็นที่จะมีสารพิษที่เทียบเท่ากับซิตรินินในปริมาณสูง เมื่อระยะหมักข้าวแดงเพิ่มขึ้นเป็น 18 วัน ข้าวแดงที่ผลิตจาก *M. purpureus* ทั้งสองสายพันธุ์นี้จะให้ปริมาณซิตรินินเพิ่มขึ้น แล้วมีการลดลงถึงระดับต่ำสุดที่ระยะหมัก 24 วัน โดยข้าวแดงที่ผลิตจาก *M. purpureus* สายพันธุ์ ATCC 16365 และ FTCMU 3385 ให้ปริมาณซิตรินินเท่ากับ 4.6 และ 5.504 มิลลิกรัม/กิโลกรัมของข้าวแดงตามลำดับ ซึ่งผลดังกล่าวขัดแย้งกับค่าความเข้มข้นสารละลายของสารสกัดข้าวแดง ซึ่งทำให้เซลล์ HEK293T มีการรอดชีวิตอยู่ที่ 80% ในข้าวแดงที่ผลิตจาก *M. purpureus* ทั้งสองสายพันธุ์นี้ที่ระยะหมัก 18 วัน ซึ่งค่าความเข้มข้นดังกล่าวมีการเพิ่มขึ้น แล้วมีการลดลงที่ระยะหมัก 24 วัน แสดงถึงการที่ข้าวแดงที่ผลิตจาก *M. purpureus* ทั้งสองสายพันธุ์นี้ ที่ระยะหมัก 18 วันมีปริมาณสารพิษที่เทียบเท่ากับซิตรินินน้อยกว่าที่ระยะหมัก 24 วัน

สำหรับข้าวแดงที่ผลิตจาก *M. purpureus* สายพันธุ์ DMKU ที่ระยะหมัก 24 วันให้ปริมาณซิตรินินเท่ากับ 3.12 มิลลิกรัม/กิโลกรัมของข้าวแดง ซึ่งมีการลดลงจากที่ระยะหมัก 18 วัน โดยผลดังกล่าวนี้ขัดแย้งกับ ค่าความเข้มข้นสารละลายของสารสกัดข้าวแดงซึ่งทำให้เซลล์ HEK293T มีการรอดชีวิตอยู่ที่ 80% ในข้าวแดงที่ผลิตจาก *M. purpureus* สายพันธุ์เดียวกัน ที่ระยะหมัก 18 และ 24 วันที่มีการลดลง แสดงถึงการมีปริมาณสารพิษที่เทียบเท่ากับซิตรินินเพิ่มขึ้น จากแนวโน้มการลดลงของค่าความเข้มข้นสารละลายของสารสกัดข้าวแดง ซึ่งทำให้เซลล์ HEK293T มีการรอดชีวิตอยู่ที่ 80% หรือการเพิ่มขึ้นของปริมาณสารพิษที่เทียบเท่ากับซิตรินินในข้าวแดงที่ผลิต

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

จาก *M. purpureus* สายพันธุ์ ATCC 16365 และ FTCMU 3385 ในช่วงระยะหมัก 6-12 วันนี้ คล้ายคลึงกับแนวโน้มการเพิ่มปริมาณซิตรินินในข้าวแดงที่ผลิตจาก *M. purpureus* สายพันธุ์ NTU 601 ในช่วงระยะหมัก 0-10 วัน ณ อุณหภูมิ 30°C จากการวิเคราะห์ด้วย Response Surface Model (RSM) ในงานวิจัยของ Wang et al., (2003) และสอดคล้องกับแนวโน้มการเพิ่มปริมาณซิตรินินในข้าวแดงที่ผลิตจาก *Monascus sp.* สายพันธุ์ M12-69 ในช่วงระยะหมัก 0-12 วัน ณ อุณหภูมิ 25°C ในงานวิจัยของ Chen and Hu (2005)

สำหรับแนวโน้มของค่าความเข้มข้นสารละลายของสารสกัดข้าวแดงซึ่งทำให้เซลล์ HEK293T มีการรอดชีวิตอยู่ที่ 80% ในข้าวแดงที่ผลิตจาก *M. purpureus* สายพันธุ์ ATCC 16365 และ FTCMU 3385 ในช่วงระยะหมัก 12-18 วันซึ่งมีการเพิ่มขึ้น หรือก็คือปริมาณสารพิษที่เทียบเท่ากับซิตรินินมีการลดลง ไม่เหมือนกับแนวโน้มของปริมาณซิตรินินในข้าวแดงที่ผลิตจาก *Monascus sp.* สายพันธุ์ M12-69 ในช่วงระยะหมัก 12-18 วัน ณ อุณหภูมิ 25°C ซึ่งมีการเพิ่มขึ้นของปริมาณซิตรินินในงานวิจัยของ Chen and Hu (2005) ก่อนจะมีการลดลงที่ระยะหมัก 20 วัน โดยแนวโน้มของปริมาณซิตรินินในข้าวแดงที่ผลิตจาก *Monascus sp.* สายพันธุ์ M12-69 ในช่วงระยะหมัก 12-18 วันและ 18-20 วัน ณ อุณหภูมิ 25°C นี้ สอดคล้องกับแนวโน้มของปริมาณซิตรินินในข้าวแดงที่ผลิตจาก *M. purpureus* สายพันธุ์ ATCC 16365 และ FTCMU 3385 ที่ระยะหมัก 12, 18, และ 24 วัน

การที่ค่าความเข้มข้นสารละลายของสารสกัดข้าวแดงซึ่งทำให้เซลล์ HEK293T มีการรอดชีวิตอยู่ที่ 80% ในข้าวแดงที่ผลิตจาก *M. purpureus* สายพันธุ์ ATCC 16365 และ FTCMU 3385 ที่ระยะหมัก 18 วัน และในข้าวแดงที่ผลิตจาก *M. purpureus* สายพันธุ์ DMKU ที่ระยะหมัก 12 วันมีปริมาณเพิ่มขึ้น แสดงถึงการลดลงของปริมาณสารพิษที่เทียบเท่ากับซิตรินิน และการที่ปริมาณซิตรินินที่วิเคราะห์ได้ในข้าวแดงที่ผลิตจาก *M. purpureus* ทั้ง 3 สายพันธุ์นี้ที่ระยะหมัก 24 วัน ด้วยวิธีการ HPLC มีปริมาณลดลงนั้น อาจเป็นอิทธิพลจากปริมาณความชื้นในข้าวแดงที่เพิ่มขึ้น เมื่อใช้ระยะเวลาในการหมักข้าวแดงนานขึ้น กล่าวคือปริมาณความชื้นในข้าวแดงที่ผลิตจากเชื้อรา *Monascus sp.* มีการเปลี่ยนแปลงตลอดในช่วงระยะการหมัก โดยในช่วงที่เชื้อรา *Monascus sp.* มีการเจริญ ปริมาณความชื้นในข้าวแดงมีแนวโน้มลดลง ถ้ามีการควบคุมความชื้นภายในตู้บ่มให้อยู่ในระดับที่เหมาะสมแล้ว จะพบว่าปริมาณความชื้นในข้าวแดงจะเพิ่มขึ้นในช่วงหลังจากที่เชื้อรา *Monascus sp.* มีการสังเคราะห์โมนาโคลินเค จากการหมักข้าวแดงโดยใช้ *M. purpureus* สายพันธุ์ 9901 ซึ่งพบว่าในช่วง 8 วันแรกของการหมักข้าวแดง มีอัตราการผลิตโมนาโคลินเคต่ำ แล้วในช่วงระยะหมักในวันที่ 8-20 มีอัตราการผลิตโมนาโคลินเคเพิ่มขึ้น (Xu et al., 2003) และจากผลการวิจัยของ Chen and Hu (2005) ซึ่งพบว่า เมื่อระยะเวลาในการหมักข้าวแดงที่ผลิตจาก *Monascus sp.* สายพันธุ์ M12-69 เพิ่มขึ้นจนถึงวันที่ 16-20 ปริมาณความชื้นในข้าวแดงจะเพิ่มขึ้นจาก 45% เป็น 85% ปริมาณ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

โมนาโคลินเคที่ได้จะมีการลดลง และมีการลดลงของปริมาณซิตรินินด้วย ทั้งนี้ควรได้มีการศึกษาถึงปริมาณความชื้นในข้าวแดงที่ผลิตจาก *M. purpureus* สายพันธุ์ ATCC 16365, DMKU, และ FTCMU 3385 เมื่อใช้ระยะเวลาในการหมักนานขึ้นต่อไป

การที่ข้าวแดงที่ผลิตจาก *M. purpureus* สายพันธุ์ ATCC 16365, DMKU, และ FTCMU 3385 ที่ระยะหมัก 24 วัน ให้ค่าความเข้มข้นสารละลายของสารสกัดข้าวแดงซึ่งทำให้เซลล์ HEK293T มีการรอดชีวิตอยู่ที่ 80% เท่ากับ 2.0, 3.23, และ 0.71 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร และข้าวแดงที่ผลิตจาก *M. purpureus* สายพันธุ์ FTCMU 3385 ที่ระยะหมัก 12 วันให้ค่าความเข้มข้นดังกล่าวเท่ากับ 1.27 มิลลิกรัม/มิลลิลิตรนั้น โดยข้าวแดงที่ผลิตจาก *M. purpureus* ทั้ง 3 สายพันธุ์ที่ระยะหมักดังกล่าวนี้ เมื่อนำไปเตรียมเป็นสารละลายของสารสกัดข้าวแดง จะให้ค่าความเข้มข้นของสารละลายของสารสกัดข้าวแดง ซึ่งทำให้เซลล์ HEK293T มีการรอดชีวิตอยู่ที่ 80% หรือมีการตายไป 20% ต่ำมาก เมื่อเปรียบเทียบกับค่าความเข้มข้นดังกล่าวของสารละลายของสารสกัดข้าวแดงที่ผลิตจาก *M. purpureus* สายพันธุ์เดียวกันที่ระยะหมัก 6 และ 18 วัน เป็นการแสดงว่าในข้าวแดงที่ผลิตจาก *M. purpureus* ทั้ง 3 สายพันธุ์นี้ที่ระยะหมัก 24 วัน และข้าวแดงที่ผลิตจาก *M. purpureus* สายพันธุ์ FTCMU 3385 ที่ระยะหมัก 12 วัน มีปริมาณสารพิษที่เทียบเท่ากับซิตรินินสูงมาก ซึ่งขัดแย้งกับผลการตรวจหาปริมาณซิตรินินในข้าวแดงที่ผลิตจาก *M. purpureus* ทั้ง 3 สายพันธุ์นี้ที่ระยะหมัก 24 วัน และข้าวแดงที่ผลิตจาก *M. purpureus* สายพันธุ์ FTCMU 3385 ที่ระยะหมัก 12 วัน ด้วยวิธีการ HPLC ซึ่งให้ปริมาณซิตรินินค่อนข้างต่ำ โดยต่ำกว่าข้าวแดงที่ผลิตจาก *M. purpureus* ทั้ง 3 สายพันธุ์นี้ที่ระยะหมัก 6 และ 18 วัน ทั้งนี้อาจเป็นไปได้ว่ามีปัจจัยที่ไม่สามารถระบุได้ในสารสกัดข้าวแดงตัวอย่างที่กล่าวมานี้นอกเหนือไปจากซิตรินิน ทำให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ HEK293T เพิ่มสูงขึ้น โดยที่ปริมาณซิตรินินในข้าวแดงตัวอย่างที่กล่าวมานี้ ซึ่งตรวจโดยวิธีการ HPLC ซึ่งแสดงในตารางที่ 4.4.4 ไม่มีผลสัมพันธ์โดยตรงกับการเกิดพิษต่อเซลล์ HEK293T โดยในงานวิจัยของ Liu et al., (2005) ที่ได้ศึกษาสารสกัดของข้าวแดงที่ละลายได้ในตัวทำละลายไม่มีขั้ว โดยใช้ตัวอย่างข้าวแดงที่สุ่มมาจากตลาด พบว่ามีสารสกัดข้าวแดง 1 ตัวอย่างซึ่งผ่านการตรวจด้วยวิธีการ HPLC แล้วว่ามีปริมาณซิตรินิน 1.1 นาโนกรัม/มิลลิลิตรของสารละลายของสารสกัดข้าวแดงทำให้เซลล์ HEK293 มีการรอดชีวิตอยู่ที่ 30% ในขณะที่สารละลายซิตรินินมาตรฐานที่มีความเข้มข้นสูงสุดในการทดสอบเท่ากับ 60 ไมโครโมลาร์ (หรือ 15 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) ให้ค่าเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์ HEK293 อยู่ที่ 50% เท่านั้น

ดังนั้นควรได้มีการศึกษาเพิ่มเติมในระดับเซลล์เพาะเลี้ยงถึงปฏิกิริยาสัมพันธ์ระหว่างซิตรินิน กับผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการหมักของเชื้อรา *Monascus sp.* ต่อไป

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved