บทที่ 3

ผลการทดลอง

3.1 การสกัดสารฟูคอยแดนจากสาหร่ายข้าวเหนียว

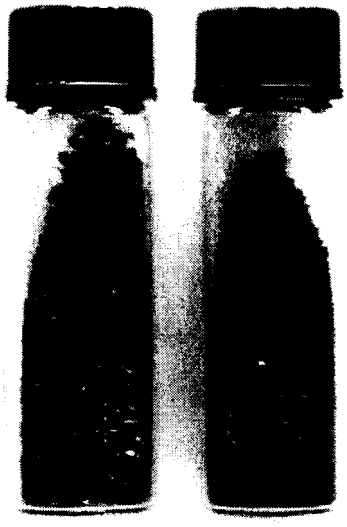
3.1.1 ผลการสกัดสารฟูคอยแดนจากสาหร่ายข้าวเหนียว

ในการสกัดสารฟูคอยแดนโดยใช้สาหร่ายข้าวเหนียว แสดงดังรูปที่ 15 ที่ผ่านการล้างทำความสะอาด ตากแห้ง และบดเป็นผง จำนวน 100 g สกัดด้วย 0.1 M HCl ที่อุณหภูมิ 95 ^{o}C เป็นเวลา 12 ชั่วโมง กรองสารละลายที่ได้และนำมาทำการสกัดต่ออีก 2 ครั้ง โดยการสกัดครั้งที่ 1, 2 และ 3 แทนด้วยสัญลักษณ์ F1, F2 และ F3 ตามลำดับ แสดงดังตารางที่ 7 สารสกัดที่ได้ภายหลังจากกระบวนการทำแห้งมีลักษณะเป็นผลึกสีน้ำตาลค่อนข้างเหนียว แสดงดังรูปที่ 16 เมื่อชั่งหาน้ำหนักแห้งของสารสกัด พบว่าตัวอย่างที่ 1 ได้น้ำหนักแห้งของสารสกัด F1, F2, F3 เท่ากับ 8.12 g, 5.69 g, 2.12 g การสกัดในตัวอย่างที่ 2 ได้น้ำหนักแห้งของสารสกัด F1, F2, F3 เท่ากับ 9.53 g, 3.44 g, 1.69 g และการสกัดในตัวอย่าง 3 ได้น้ำหนักแห้งของสารสกัด F1, F2, F3 เท่ากับ 8.17 g, 4.40 g และ 2.80 g ตามลำดับ จากการสกัดดังกล่าวได้น้ำหนักแห้งของสารสกัดทั้งหมดในตัวอย่างที่ 1, 2 และ 3 เท่ากับ 15.93 g, 14.66 g และ 15.37 g ตามลำดับ ซึ่งจากการสกัดสาหร่ายจำนวน 100 g 3 ครั้ง ได้ค่าเฉลี่ยน้ำหนักแห้งของสารสกัดทั้งหมด 15.32 ± 0.64 g และพบว่าในการสกัดครั้งแรก (F1) จะได้น้ำหนักแห้งของสารสกัดสูงสุด โดยมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 8.61 ± 0.80 g หลังจากสกัดซ้ำครั้งที่ 2 (F2) เมื่อเปรียบเทียบน้ำหนักแห้งที่ได้กับการสกัดครั้งแรก จะมีน้ำหนักของสารสกัดลดลง 47.62 % โดยมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 4.51 ± 1.13 g และการสกัดซ้ำครั้งที่ 3 มีค่าเฉลี่ยของน้ำหนักสารสกัดเท่ากับ 2.20 ± 0.56 g ซึ่งได้ปริมาณของสารสกัดลดลง 51.22 % เมื่อเทียบกับการสกัดครั้งที่ 2 และ 74.45 % เมื่อเทียบกับการสกัดครั้งแรก

ตารางที่ 7 การสกัดสารฟูคอยแดนจากสาหร่ายข้าวเหนียว

ตัวอย่างที่ (100 g)	น้ำหนักแห้งของสารสกัดหยาบที่ได้ (g) F1	F2	F3	น้ำหนักแห้งสารสกัดทั้งหมด(g)
1	8.12	5.69	2.12	15.93
2	9.53	3.44	1.69	14.66
3	8.17	4.40	2.80	15.37
ค่าเฉลี่ย ± SD	8.61 ± 0.80	4.51 ± 1.13	2.20 ± 0.56	15.32 ± 0.64

รูปที่ 15 สาหร่ายข้าวเหนียวที่ใช้ในการสกัดสารฟูคอยแดน



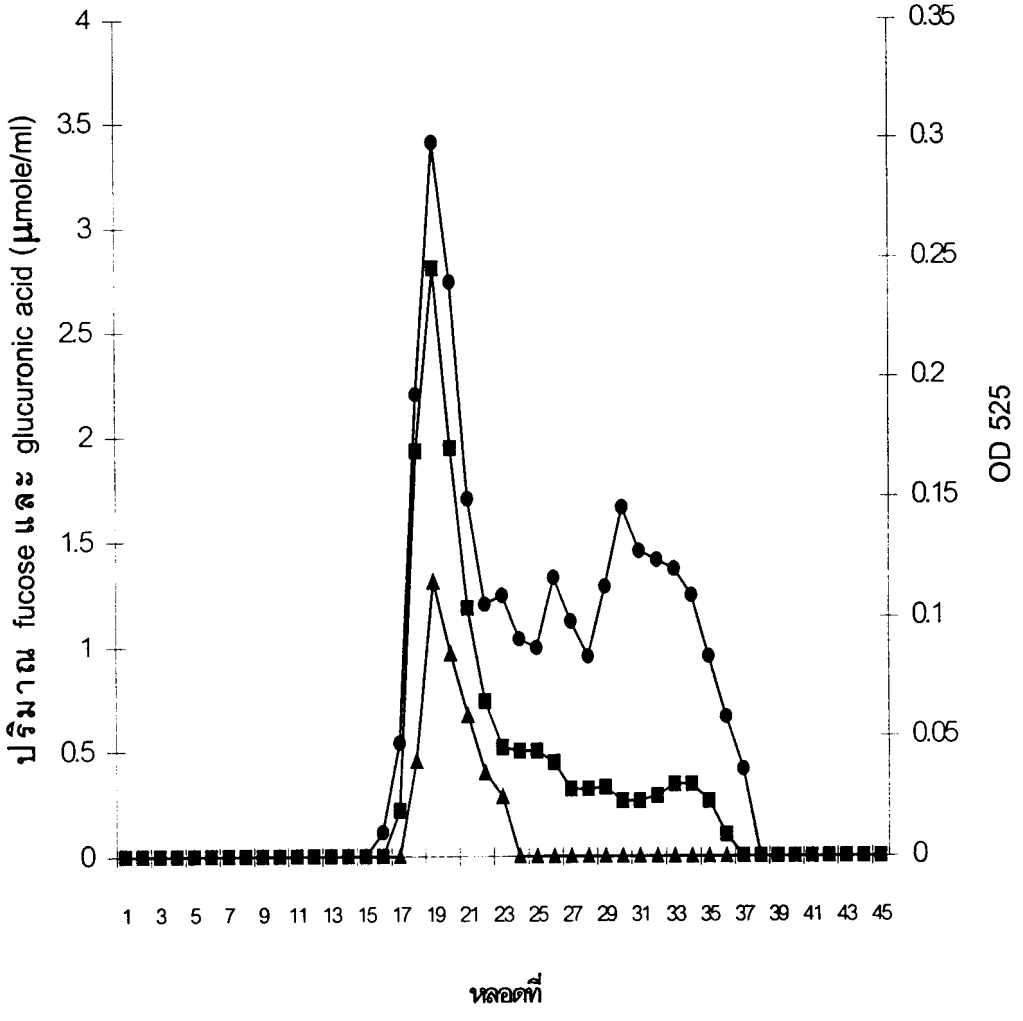
รูปที่ 16 ลักษณะของสารสกัดหยาบฟูคอยแดนที่สกัดจากสาหร่ายข้าวเหนียว

3.1.2 **การหาปริมาณน้ำตาล** fucose **และฟูคอยแดนจากสาหร่ายข้าวเหนียว**

จากการสกัดสารฟูคอยแดนจากสาหร่ายข้าวเหนียว 100 g ได้น้ำหนักแห้งของสารสกัดหยาบทั้งหมด 15.32 ± 0.64 g เมื่อนำสารสกัดหยาบที่ได้จำนวน 0.1 g มาหาปริมาณน้ำตาล fucose โดยวิธี cysteine-sulfuric acid นำมาเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน L-fucose (ภาคผนวก ข) พบว่ามีปริมาณน้ำตาล fucose ต่อน้ำหนักสารสกัดหยาบ 1 g เท่ากับ 0.11 ± 0.01 g หลังจากคำนวณหาปริมาณฟูคอยแดนโดยคูณด้วย 1.75 เท่าของปริมาณ fucose ที่ได้ในหน่วย μg/ml จะมีปริมาณฟูคอยแดนต่อน้ำหนักแห้งของสารสกัดหยาบ 1 g เท่ากับ 0.19 ± 0.01 g คิดเป็น 18.67 ± 1.53 % ซึ่งปริมาณฟูคอยแดนทั้งหมดที่ได้จากสาหร่ายแห้ง 100 g เท่ากับ 1.29 ± 0.18 g ดังตารางที่ 8

3.2 การทำบริสุทธิ์สารฟูคอยแดนด้วยวิธี gel filtration chromatography

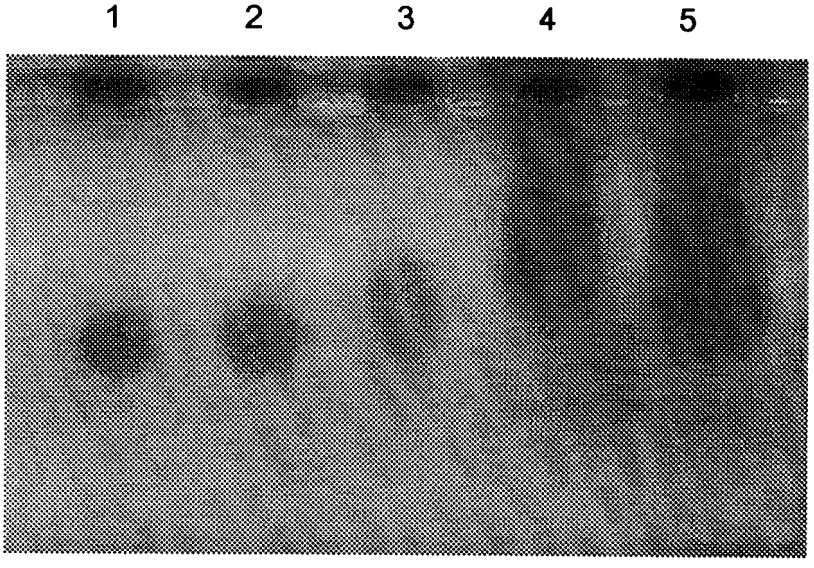
สารสกัดหยาบฟูคอยแดนน้ำหนัก 500 mg ที่มีความเข้มข้นของฟูคอยแดน 100 mg/ml นำมาทำบริสุทธิ์ด้วย sephadex G-50 (ขนาดคอลัมน์ 1 x 60 cm) โดยวิธี gel filtration chromatography ทำการชะด้วย 0.5 M NaCl ใน 50 mM sodium acetate ด้วยอัตราการไหล 5 ml/hr เก็บสารละลายหลอดละ 2 ml นำสารละลายที่ได้ในแต่ละหลอด มาหาปริมาณน้ำตาล fucose รวมทั้งปริมาณ glucuronic acid โดยวิธี carbazole reaction และคุณสมบัติในการย้อมติดสีของฟูคอยแดน (metachromatic property) โดยหมู่ sulfate ที่อยู่บนโมเลกุลของฟูคอยแดนจะเข้าทำปฏิกิริยากับ 1,9 dimethylmethylene blue chloride เกิดเป็น sulfate polysaccharide-dimethylene blue complex ให้สีน้ำเงิน-ม่วง (Farndale *et al*., 1986) จากผลการทดลองดังกล่าว พบว่าปริมาณน้ำตาล fucose เริ่มสูงขึ้นในหลอดที่ 17 จนสูงสุดในหลอดที่ 19 และเริ่มลดลงจนถึงหลอดที่ 22 หลังจากนั้นจะมีปริมาณน้ำตาล fucose ต่ำลงค่อนข้างคงที่จนถึงหลอดที่ 38 ซึ่งสอดคล้องกับปริมาณ glucuronic acid ที่พบในหลอดที่ 17 ถึง 22 และพบ peak ของ glucuronic acid อีกช่วงหนึ่งในระหว่างหลอดที่ 26-33 ส่วนคุณสมบัติในการย้อมติดสีของสารจะพบในหลอดที่ 18 จนถึง 22 ซึ่งอยู่ในช่วงเดียวกับหลอดที่พบ fucose และ glucuronic acid ดังนั้นจึงเลือกสารละลายในหลอดที่ 17-22 (แสดงดังรูปที่ 17) มาทำการศึกษาต่อโดยนำมากำจัดเกลือออกโดยการ dialysis ด้วยน้ำกลั่น หลังจากทำแห้งแล้วพบว่าได้น้ำหนักแห้งของสาร 350 mg มีปริมาณฟูคอยแดนทั้งหมด 72 mg ปริมาณสารที่ได้ภายหลังการแยกผ่านคอลัมน์คิดเป็น 72 % จากสารเริ่มต้น



รูปที่ 17 การทำบริสุทธิ์สารฟูคอยแดนด้วยวิธี gel filtration chromatography โดยใช้ sephadex G-50 (ขนาดคอลัมน์ 1x60 cm) ที่ชะด้วย 0.5 M NaCl ใน 50 mM sodium acetate ด้วยอัตราการไหล 5 ml/hr เก็บหลอดละ 2 ml (Zierer *et al.*,2000) เพื่อวิเคราะห์ปริมาณ fucose (µmole/ml —■—), glucuronic acid (µmole/ml —●—) และคุณสมบัติในการย้อมติดสี dimethylmethylene blue (OD 525 —▲—)

3.4 การแยกคาร์โบไฮเดรตโดยวิธี Agarose gel electrophoresis

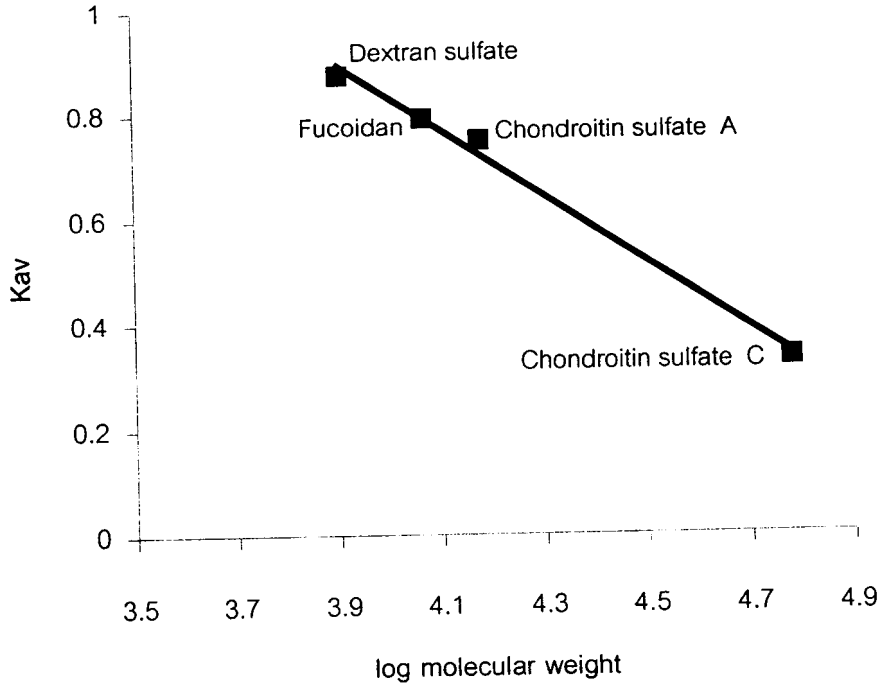
สารสกัดหยาบฟูคอยแดนและสารฟูคอยแดนกึ่งบริสุทธิ์ ที่มีปริมาณฟูคอยแดน 10 mg แยกบน 1 % agarose gel ใน 0.05 M 1,3 diaminopropane/acetate buffer (pH 9.0) ความต่างศักย์ 70 volt เป็นเวลา 1.5 ชั่วโมง โดยใช้ Dextran sulfate ขนาดโมเลกุล 8,000 Da, Chondroitin sulfate A ขนาด 15,000 Da และ Chondroitin sulfate C ขนาด 60,000 Da เป็นสารมาตรฐาน พบว่าทั้งสารสกัดหยาบฟูคอยแดนและสารฟูคอยแดนกึ่งบริสุทธิ์ เป็นสารในกลุ่มคาร์โบไฮเดรต เนื่องจากสามารถย้อมติดได้ด้วยสี PAS (Periodic acid leucofuchsin) ดังรูปที่ 18 และเมื่อพิจารณาการแยกคาร์โบไฮเดรตในสารมาตรฐาน พบว่าไม่สามารถแยกได้ตามน้ำหนักโมเลกุล เนื่องจาก agarose gel electrophoresis ขึ้นอยู่กับประจุต่อน้ำหนักโมเลกุลของรฐาน Dextran sulfate, Chondroitin sulfate A และ Chondroitin ารในกลุ่ม sulfate polysaccharide มีประจุลบจาก sulfate ภายใน ทำให้การแยกสารมาตรฐานไม่ได้ขึ้นกับน้ำหนักโมเลกุลเพียงอย่างเดียว รถหาน้ำหนักโมเลกุลของสารฟูคอยแดนเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน agarose gel electrophoresis ได้ การหาน้ำหนักโมเลกุลของสารฟู gel filtration chromatography แทนการศึกษาด้วยวิธีดังกล่าว



รูปที่ 18 การแยกคาร์โบไฮเดรตของสารฟูคอยแดน บน 1% agarose gel; แถวที่ 1 สารมาตรฐาน Chondroitin sulfate C ขนาดโมเลกุล 60,000 Da, แถวที่ 2 สารมาตรฐาน Chondroitin sulfate A ขนาด 15,000 Da, แถวที่ 3 สารมาตรฐาน Dextran sulfate ขนาด 8,000 kDa, แถวที่ 4 สารสกัดหยาบฟูคอยแดน, แถวที่ 5 สารฟูคอยแดนกึ่งบริสุทธิ์

3.4 การหาน้ำหนักโมเลกุลของสารฟูคอยแดนโดยวิธี gel filtration chromatography

สารสกัดหยาบฟูคอยแดนความเข้มข้น 10 mg/ml ที่แยกด้วย sephadex G-200 โดยวิธี gel filtration chromatography ด้วยคอลัมน์ขนาด 1x100 cm ทำการชะด้วย 0.5 M NaCl ใน 50 mM sodium acetate ด้วยอัตราการไหล 5ml/hr เก็บสารละลายหลอดละ 2 ml และใช้ Dextran sulfate ขนาด 8,000 Da, Chondroitin sulfate A ขนาด 15,000 Da และ Chondroitin sulfate C ขนาด 60,000 Da เป็นสารมาตรฐาน พบว่าปริมาตรชะของสารมาตรฐาน *Dextran sulfate*, *Chondroitin sulfate* A และ Chondroitin sulfate C เท่ากับ 76, 70 และ 50 ml โดยมีปริมาตรนอกเม็ดเจล (void volume :V_0) เท่ากับ 34 ml และปริมาตรของเจลที่อยู่ในคอลัมน์ทั้งหมด (total volumn : V_t) เท่ากับ 82 ml เมื่อคำนวณค่า Kav ของสารฟูคอยแดนที่มีปริมาตรชะเท่ากับ 72 ml เปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน ดังรูปที่ 19 พบว่าสารฟูคอยแดนมีน้ำหนักโมเลกุล เท่ากับ 11,640 Da



รูปที่ 19 น้ำหนักโมเลกุลของสารฟูคอยแดนที่แยกด้วย sephadex G-200 ขนาดคอลัมน์ 1x 100 cm โดยวิธี gel filtration chromatography โดยใช้ Dextran sulfate ขนาด 8,000 Da, Chondroitin sulfate A ขนาด 15,000 Da และ Chondroitin sulfate C ขนาด 60,000 Da เป็นสารมาตรฐาน

3.5 การศึกษาองค์ประกอบของสารฟูคอยแดน

จากการศึกษาองค์ประกอบของน้ำตาล fucose และ glucuronic acid รวมทั้งปริมาณ sulfate ในสารฟูคอยแดนกึ่งบริสุทธิ์กับสารสกัดหยาบฟูคอยแดนที่ทำการสกัดซ้ำ 2 ครั้ง (F1 และ F2) โดยไม่นำสารสกัดหยาบในการสกัดซ้ำครั้งที่ 3 มาเปรียบเทียบด้วยเนื่องจากมีปริมาณน้ำตาลที่เป็นองค์ประกอบค่อนข้างต่ำ จากการศึกษาพบว่าสารฟูคอยแดนกึ่งบริสุทธิ์มีปริมาณน้ำตาล fucose สูงกว่าในสารสกัดหยาบ ปริมาณ fucose ในสารกึ่งบริสุทธิ์เท่ากับ 15.35 ± 0.92 g และค่าเฉลี่ยในสารสกัดหยาบเท่ากับ 4.98 ± 0.31 g ของสารสกัดหยาบ และมีปริมาณ glucuronic acid สูงกว่าในสารสกัดหยาบเล็กน้อย โดยปริมาณ glucuronic acid ในสารกึ่งบริสุทธิ์เท่ากับ 65 ± 7.07 g และค่าเฉลี่ยของปริมาณ glucuronic acid ในสารสกัดหยาบ เท่ากับ 62.5 ± 19.09 g ของสารสกัดหยาบ แต่มีปริมาณ sulfate ในสารกึ่งบริสุทธิ์น้อยกว่าในสารสกัดหยาบ โดยมีปริมาณ sulfate ในสารกึ่งบริสุทธิ์เท่ากับ 13.44 ± 4.29 % ของ fucose และค่าเฉลี่ยในสารสกัดหยาบเท่ากับ 28.74 ± 8.91 % ของ fucose จากผลการทดลองดังกล่าวพบว่าภายหลังจากการทำบริสุทธิ์สารฟูคอยแดนจะมีปริมาณน้ำตาลที่เป็นองค์ประกอบหลักมากขึ้น โดยมีปริมาณโปรตีนที่ปนเปื้อนน้อยลง เมื่อเปรียบเทียบกับสารสกัดหยาบ ดังตารางที่ 9

ตารางที่ 9 องค์ประกอบของสารสกัดหยาบฟูคอยแดน (F1,F2) และสารฟูคอยแดนกึ่งบริสุทธิ์ (P)

	Fucose (g / 100 g) n=2	Glucuronic acid (g/ 100 g) n=2	Protein (µg / 100 g) n=2	% SO_4 / fucose n=2
F1	4.85 ± 0.21	68.50 ± 28.99	9.95 ±0.63	28.02 ± 10.97
F2	5.10 ± 0.42	56.50 ± 9.19	14.00 ± 0.00	29.46 ± 6.85
$\bar{X}$	4.98 ± 0.31	62.5 ± 19.09	11.98 ± 0.31	28.74 ± 8.91
P	15.35 ±0.92	65.00 ± 7.07	8.30 ± 1.84	13.44 ± 4.29

3.6 การทดสอบคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย

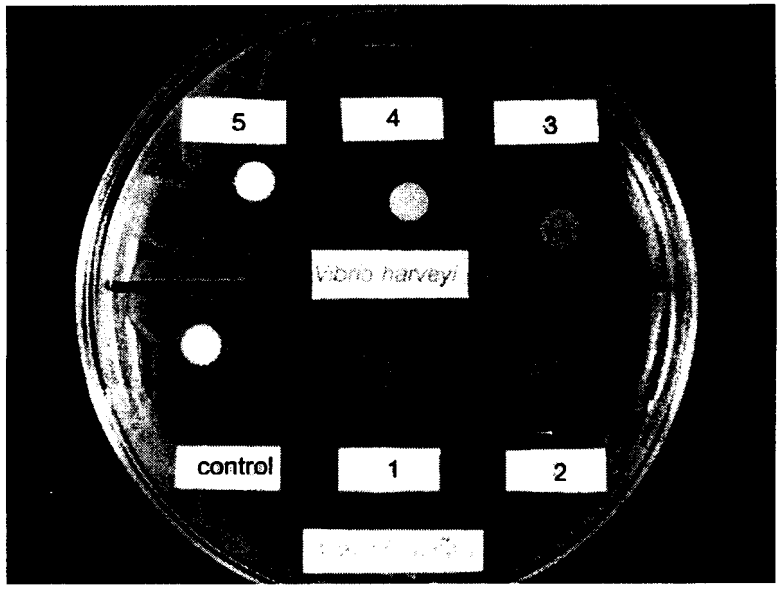
3.6.1 การทดสอบผลของสารฟูคอยแดนต่อการต้านการเจริญของเชื้อแบคทีเรียโดยวิธี agar plate sensitivity method

จากการศึกษาผลของสารสกัดหยาบฟูคอยแดนและสารฟูคอยแดนกึ่งบริสุทธิ์ต่อความสามารถในการต้านการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย 3 ชนิดคือ *V. harveyi*, *E. coli* และ *S. aureus* โดยวิธี agar plate sensitivity method โดยใช้สารสกัดหยาบฟูคอยแดนที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ คือ 90, 45, 22.5, 11.25 และ 5.62 mg/ml พบว่าสารสกัดหยาบฟูคอยแดนสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียได้สองชนิดคือ *V. harveyi* และ *E. coli* โดยสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย *V. harveyi* ได้ที่ระดับความเข้มข้น 90, 45, 22.5 และ 11.25 mg/ml ซึ่งมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใส (clear zone) รอบแผ่นดิสก์ (ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของแผ่นดิสก์ = 0.6 cm.) เท่ากับ 1.35, 1.25, 1.1 และ 0.8 cm ตามลำดับ ส่วนความเข้มข้นที่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย *E. coli* คือ 90, 45 และ 22.5 mg/ml โดยมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใสรอบแผ่นดิสก์เท่ากับ 1.3, 1.1 และ 1.0 cm ตามลำดับ ดังตารางที่ 10 ในขณะที่สารฟูคอยแดนกึ่งบริสุทธิ์ สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียได้เพียงชนิดเดียว คือ *V. harveyi* ซึ่งยับยั้งได้ที่ระดับความเข้มข้น 95 mg/ml โดยมีขนาดวงใสของการยับยั้งเท่ากับ 0.95 cm ลักษณะของวงใสรอบแผ่นดิสก์ในยับยั้งแบคทีเรียของสารสกัดหยาบฟูคอยแดนและสารฟูคอยแดนกึ่งบริสุทธิ์ แสดงดังรูปที่ 20 และ 21

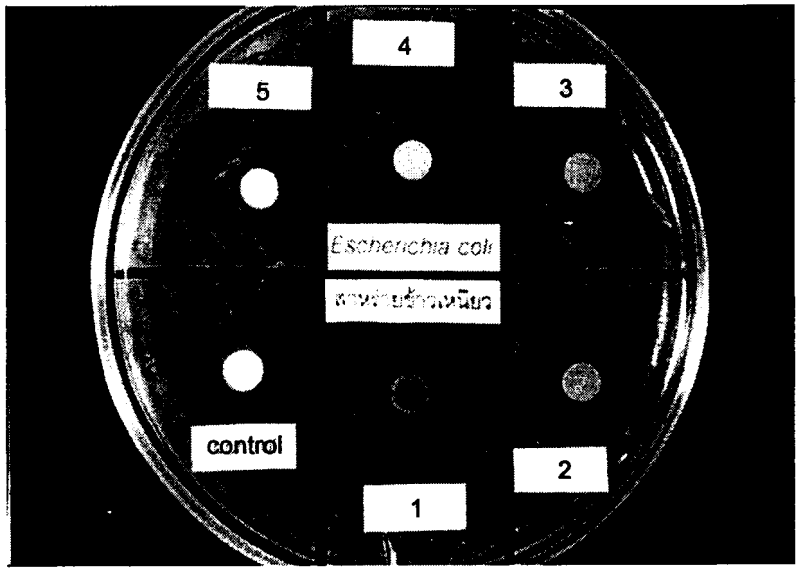
ตารางที่ 10 ผลการยับยั้งแบคทีเรียของสารสกัดหยาบฟูคอยแดน

เชื้อที่ใช้ทดสอบ	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใสรอบแผ่นดิสก์ (cm)				
	90 mg/ml	45 mg/ml	22.5 mg/ml	11.25 mg/ml	5.62 mg/ml
V. harveyi	1.35	1.25	1.10	0.80	-
E. coli	1.30	1.10	1.00	-	-
S. aureus	-	-	-	-	-

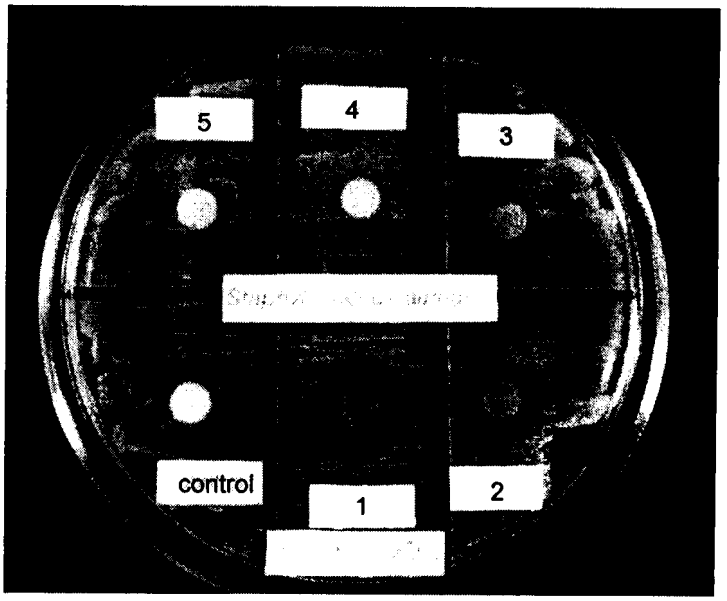
- หมายถึง ไม่ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย


5
4
3
Vibrio harveyi
control
1
2

A

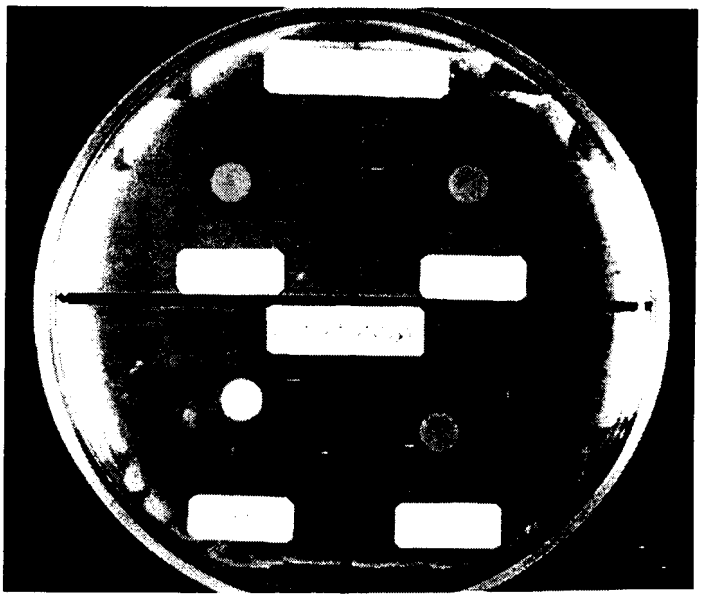

4
5
3
Escherichia coli
control
2
1

B



C

รูปที่ 20 ลักษณะวงใสของการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย *V. harveyi* (A) , *E. coli* (B) โดยไม่พบการยับยั้งใน *S. aureus* (C) ซึ่งใช้สารสกัดหยาบฟูคอยแดนความเข้มข้น 90 mg/ml (1), 45 mg/ml (2), 22.5 mg/ml (3),11.25 mg/ml (4) และ 5.62 mg/ml (5)



รูปที่ 21 ลักษณะวงใสของการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย *V. harveyi* โดยใช้สารฟูคอยแดนกึ่งบริสุทธิ์ ความเข้มข้น 95 mg/ml

3.6.2 **การหาค่า** MIC (Minimum inhibitory concentration) **และค่า** MBC (minimum bactericidal concentration) **ของสารสกัดหยาบฟูคอยแดนต่อการต้านการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย**

การศึกษาค่า MIC ของสารสกัดหยาบฟูคอยแดนความเข้มข้น 40, 20, 10, 5, 2.5, 1.25 และ 0.62 mg/ml ต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *V. harveyi* และ *E. coli* หลังจากบ่มเป็นเวลา 24 ชั่งโมง แล้วสังเกตความขุ่นของเชื้อในแต่ละความเข้มข้นพบว่า ที่ระดับความเข้มข้น 40, 20 และ 10 mg/ml สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *V. harveyi* และ *E. coli* ได้ ดังตารางที่ 11 ซึ่งมีค่า MIC ต่อเชื้อ *V. harveyi* และ *E. coli* เท่ากับ 20 และ 10 mg/ml ตามลำดับ ดังรูปที่ 22 เมื่อนำสารละลายในหลอดที่ใสไปเกลี่ยบนอาหาร Nutrient agar เพื่อหาค่า MBC พบว่ามีค่า MBC ต่อเชื้อ *V. harveyi* และ *E. coli* เท่ากับ 40 และ 20 mg/ml ตามลำดับ ดังรูปที่ 23 และ 24

ตารางที่ 11 ค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดหยาบฟูคอยแดนในการยับยั้ง (MIC) และทำลาย (MBC) เชื้อแบคทีเรีย

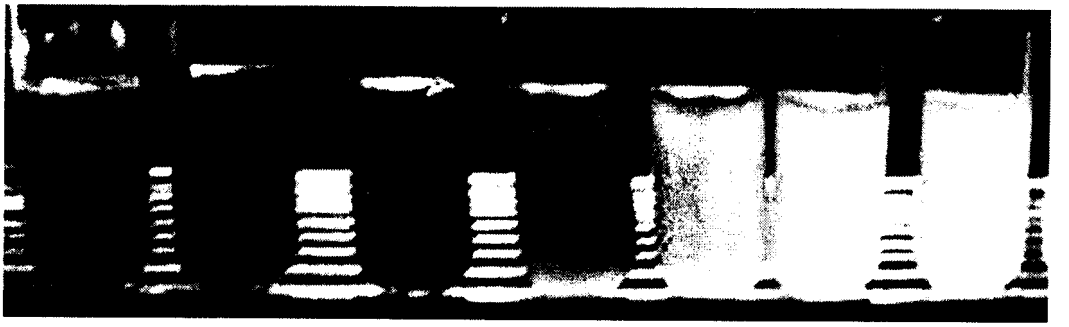
การทดสอบ	ชนิดของแบคทีเรีย	ความเข้มข้นของสารสกัดหยาบฟูคอยแดน (mg/ml)						
		40	20	10	5	2.5	1.25	0.62
MIC	*V. harveyi*	+	+	-	-	-	-	-
	E. coli	+	+	+	-	-	-	-
MBC	*V. harveyi*	+	-	-	-	-	-	-
	E. coli	+	+	-	-	-	-	-

+ หมายถึง ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย

- หมายถึง ไม่ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย

1 2 3 4 5 6 7

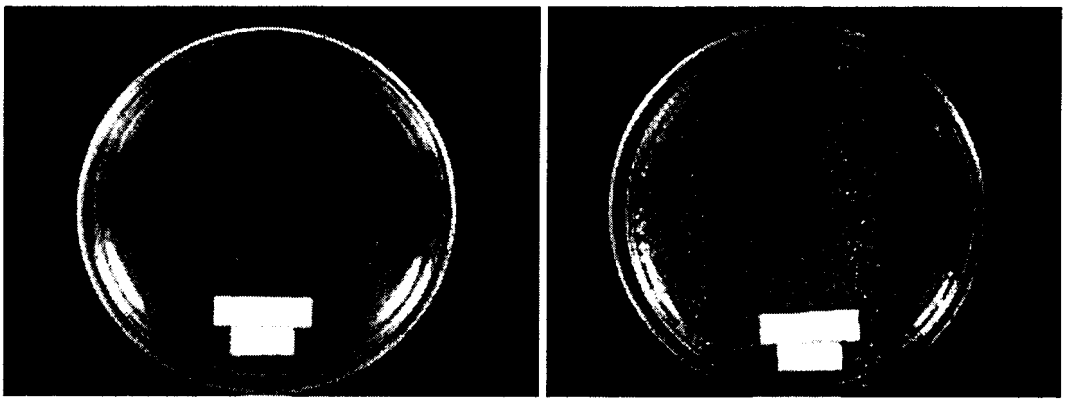
A



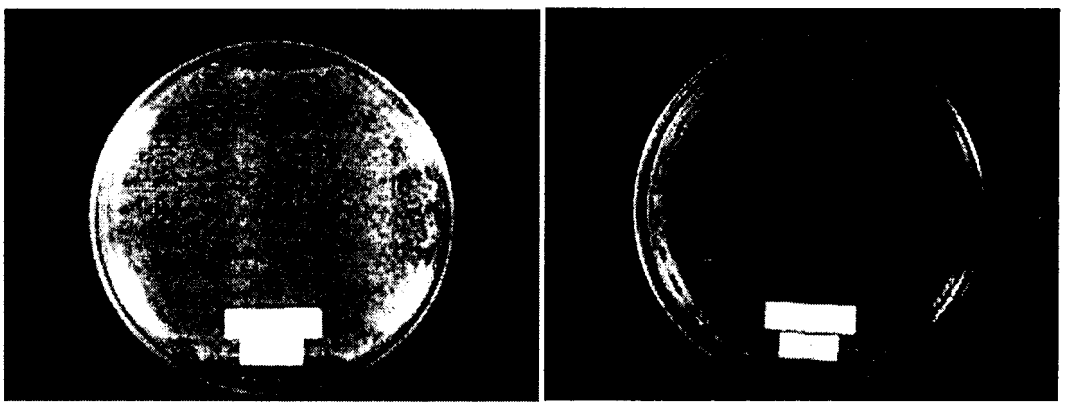
1 2 3 4 5 6 7

B

รูปที่ 22 ค่า MIC ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *V. harveyi* (A) และ *E. coli* (B) ของสารสกัดหยาบฟูคอยแดนที่ระดับความเข้มข้น 40 mg/ml (1), 20 mg/ml (2), 10 mg/ml (3), 5 mg/ml (4), 2.5 mg/ml (5), 1.25 mg/ml (6) และ 0.62 mg/ml (7)

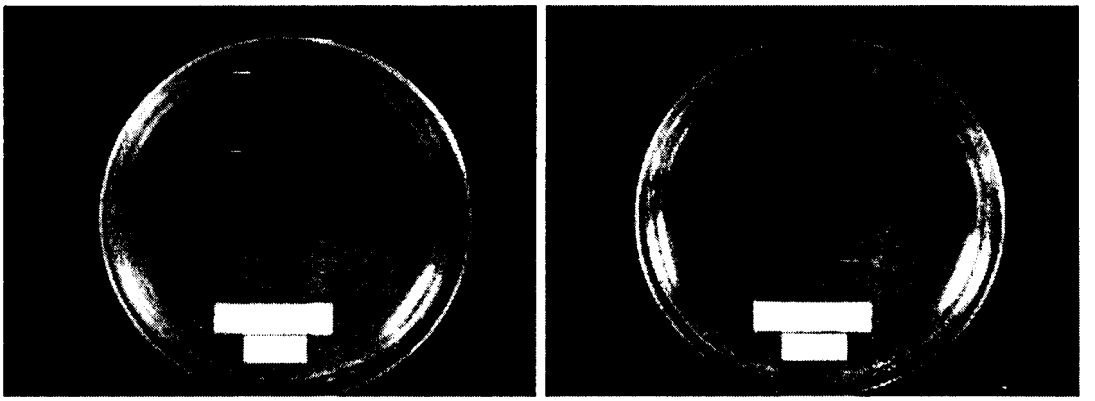


1 2

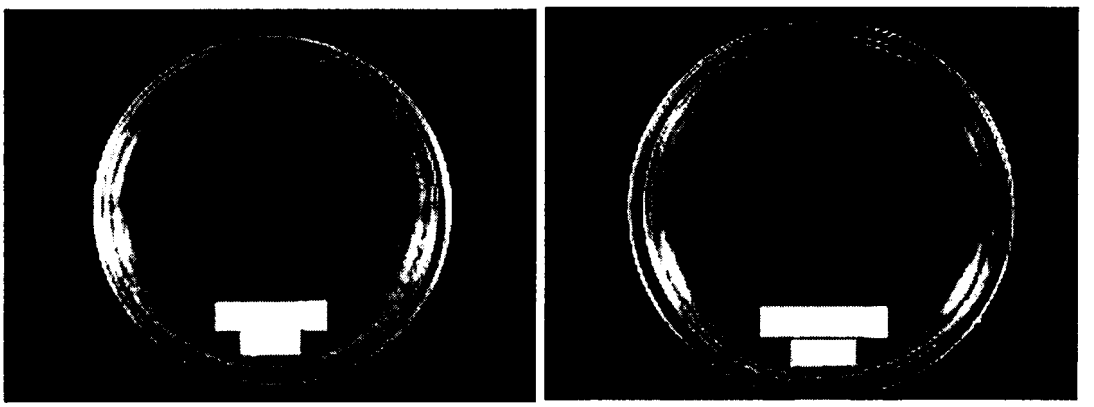


3 4

รูปที่ 23 ค่า MBC ในการทำลายเชื้อแบคทีเรีย *V. harveyi* ของสารสกัดหยาบฟูคอยแดนที่ระดับความเข้มข้น 40 mg/ml (1), 20 mg/ml (2), 10 mg/ml (3), และ 0 mg/ml ซึ่งเป็นกลุ่มควบคุม (4)



1 2



3 4

รูปที่ 24 ค่า MBC ในการทำลายเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* ของสารสกัดหยาบฟูคอยแดนที่ระดับความเข้มข้น 40 mg/ml (1), 20 mg/ml (2), 10 mg/ml (3) และ 0 mg/ml ซึ่งเป็นกลุ่มควบคุม (4)

3.7 การทดสอบคุณสมบัติต้านการแข็งตัวของเลือด

การศึกษาคุณสมบัติในการต้านการแข็งตัวของเลือด ทดสอบจากค่า Activated partial thromboplastin time (APTT) โดยใช้พลาสมาจากเลือดคนปกติมาทดสอบกับสารฟูคอยแดนที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ พบว่าระยะเวลาการแข็งตัวของเลือด (clotting time) ของสารสกัดหยาบฟูคอยแดนที่ระดับความเข้มข้น 100, 200, 250 และ 300 µg/ml เท่ากับ 2.10, 4.25, 5.68 และ 7.56 นาที โดยระยะเวลาการแข็งตัวของเลือดในกลุ่มควบคุมที่ไม่ให้สารสกัดหยาบฟูคอยแดนเท่ากับ 1.50 นาที เมื่อนำไปหาค่า APTT โดยเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน Heparin พบว่าสารสกัดหยาบฟูคอยแดนสามารถต้านการแข็งตัวของเลือดได้ดีกว่าสารฟูคอยแดนกึ่งบริสุทธิ์ โดยสามารถต้านการแข็งตัวของเลือดได้ตั้งแต่ระดับความเข้ม 100 - 300 µg/ml ซึ่งมีค่า APTT ที่ระดับความเข้มข้น 300,250, 200 และ100 µg/ml เท่ากับ 4.87 IU/mg, 4.39 IU/mg, 4.10 IU/mg และ 4.00 IU/mg ตามลำดับ ในขณะที่สารฟูคอยแดนกึ่งบริสุทธิ์สามารถต้านการแข็งตัวของเลือดได้ที่ระดับความเข้มข้นเดียว คือ 1000 µg/ml โดยมีค่า APTT เท่ากับ 0.58 IU/mg จากผลการทดลองพบว่าสารสกัดหยาบฟูคอยแดนสามารถต้านการแข็งตัวของเลือดได้สูงกว่าสารฟูคอยแดนกึ่งบริสุทธิ์ 7.7 เท่า โดยมีค่า APTT เฉลี่ยเท่ากับ 4.47 ± 0.44 ดังตารางที่ 12

ตารางที่ 12 การต้านการแข็งตัวของเลือดของสารฟูคอยแดน

ฟูคอยแดน (µg/ml)	ฟูคอยแดน (mg)	ระยะเวลาการแข็งตัวของเลือด (นาที)	APTT (IU)	APTT (IU/mg)
P 1000	0.05	3.00	0.03	0.58
C 0	0	1.50	0.01	0
C 100	0.005	2.10	0.02	4.00
C 200	0.01	4.25	0.04	4.11
C 250	0.0125	5.68	0.06	4.39
C 300	0.015	7.56	0.07	4.87
			ค่าเฉลี่ย	4.47
			± SD	± 0.44

P หมายถึง สารฟูคอยแดนกึ่งบริสุทธิ์ความเข้มข้น 1000 µg/ml

C หมายถึง สารสกัดหยาบฟูคอยแดนความเข้มข้น 0 µg/ml (กลุ่มควบคุม),
100 µg/ml, 200 µg/ml, 250 µg/ml และ 300 µg/ml

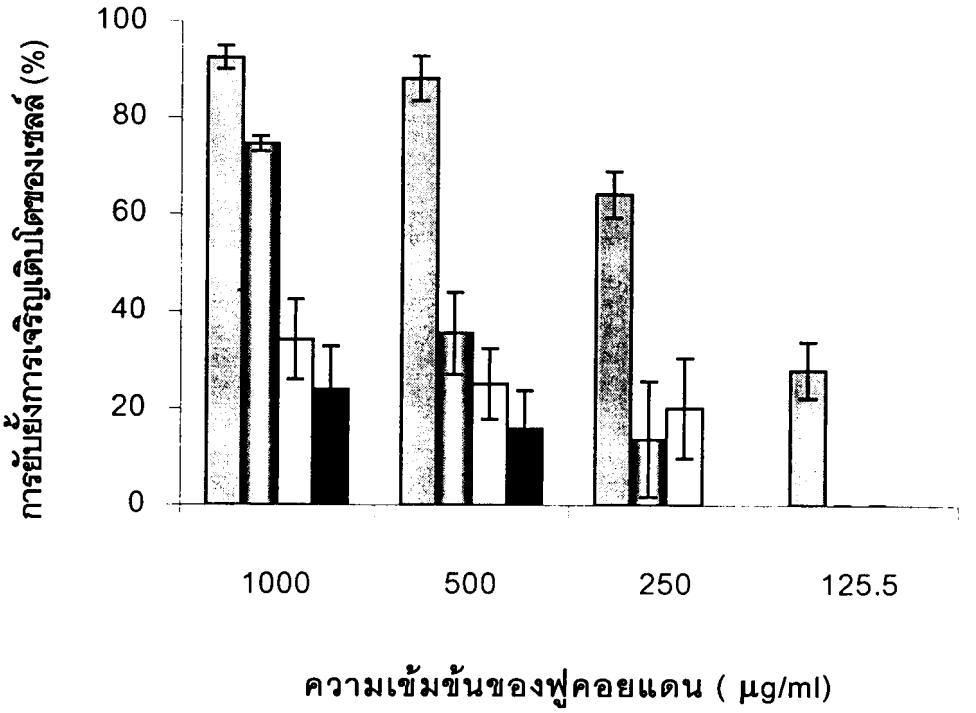
3.7 การทดสอบคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง

จากการนำสารสกัดหยาบฟูคอยแดนและสารฟูคอยแดนกึ่งบริสุทธิ์ ความเข้มข้น 1000, 500, 250 และ 125 μg/ml มาทดสอบคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง KB cell เปรียบเทียบกับเซลล์ไฟโบรบลาสต์ซึ่งเป็นเซลล์ปกติ โดยวิธี MTT assay พบว่าสารสกัดหยาบฟูคอยแดนที่ระดับความเข้มข้น 1000, 500, 250 และ 125 μg/ml สามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งได้ 92.57±2.36 %, 88.18±4.61 %, 64.18± 4.76 % และ 27.98±5.79 %ตามลำดับ ในขณะที่สามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ได้ 74.56±1.53 %, 35.55±8.36 %, 13.77±11.94 % และ 0 % ตามลำดับ ส่วนสารฟูคอยแดนกึ่งบริสุทธิ์สามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งได้ที่ระดับความเข้มข้นของฟูคอยแดน 1000, 500 และ 250 μg/ml โดยมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเท่ากับ 34.24±8.235 %, 25.15±7.27 % และ 20.17±10.34 % ตามลำดับ และสามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ได้ 23.96±8.92 %, 15.83±7.98 % และ 0 % ตามลำดับ ดังรูปที่ 25 จากผลการทดลองดังกล่าวพบว่าที่ระดับความเข้มข้น 125 μg/ml ของสารสกัดหยาบฟูคอยแดน และที่ระดับความเข้มข้น 250 μg/ml ของสารฟูคอยแดนกึ่งบริสุทธิ์ เป็นระดับความเข้มข้นที่สามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งโดยไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ไฟโบรบลาสต์ ซึ่งลักษณะของเซลล์มะเร็งที่ได้รับสารฟูคอยแดนกึ่งบริสุทธิ์ความเข้มข้น 250 μg/ml แสดงดังรูปที่ 26 จากรูปพบว่าเซลล์มะเร็งที่ได้รับสารฟูคอยแดน (รูป 26 A) จะไม่สามารถเจริญเติบโตได้ โดยสังเกตจากจำนวนเซลล์ที่เกาะอยู่กับขวดเลี้ยงเซลล์ จะมีจำนวนน้อยกว่ากลุ่มควบคุมที่ไม่ให้สาร (รูป 26 B) โดยระดับความเข้มข้นดังกล่าวไม่ส่งผลต่อการเจริญของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ ซึ่งจากรูปที่ 27 เซลล์ไฟโบรบลาสต์ที่ได้รับสารฟูคอยแดนมีลักษณะและจำนวนเซลล์ไม่แตกต่างกันกับกลุ่มควบคุมซึ่งเป็นเซลล์ปกติที่ไม่ได้รับสาร แสดงว่าสารฟูคอยแดนจากสาหร่ายข้าวเหนียวมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งชนิดนี้ได้ โดยสารสกัดหยาบฟูคอยแดนสามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งได้สูงกว่าสารฟูคอยแดนกึ่งบริสุทธิ์ ซึ่งมีค่าความเข้มข้นที่ทำให้การเจริญของเซลล์มะเร็งลดลงครึ่งหนึ่ง (IC_{50}) ของสารสกัด

หยาบฟูคอยแดนและสารฟูคอยแดนกึ่งบริสุทธิ์ เท่ากับ 106.14 μg/ml และ 919.6 μg/ml ตามลำดับ

3.9 การศึกษากระบวนการ apoptosis ต่อเซลล์มะเร็ง

การศึกษากระบวนการ apoptosis ใช้เซลล์มะเร็งจำนวน 2×10^6 cell/ml ที่ให้สารฟูคอยแดนกึ่งบริสุทธิ์ความเข้มข้น 250 μg/ml โดยให้เซลล์มะเร็งที่ไม่ได้รับสารเป็นกลุ่มควบคุม หลังจากบ่มที่ 37 $^{\circ}$ C, 5 % CO_2 เป็นเวลา 48 ชั่งโมง จึงนำเซลล์มะเร็งมาศึกษาการเกิด apoptosis ด้วยวิธี TUNEL assay (TdT-mediated dUTP Nick-End Labeling assay) โดยย่อยเซลล์มะเร็งจากขวดเลี้ยงเซลล์ด้วยเอนไซม์ทริปซิน แล้วนำมาตรึงบนสไลด์เพื่อทำ TUNEL assay โดยใช้ DeadEnd™ Colorimetric TUNEL system (Promega, USA) หลังจากนับจำนวนเซลล์ที่เกิด apoptosis ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ โดยสังเกตนิวเคลียสของเซลล์ที่เกิด apoptosis จะมีสีน้ำตาลเข้มดังรูปที่ 28 พบว่าสารฟูคอยแดนสามารถยับยั้งเซลล์มะเร็งได้โดยกระตุ้นกระบวนการ apoptosis ได้ 50.77 ± 3.23 % ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % ($p<0.05$, โดยวิธี One-Way Analysis of Variance :ANOVA และ Least Significant Difference: LSD ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 ด้วยโปรแกรม SPSS 10.0 for Windows) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่เกิด apoptosis 28.33 ± 1.96 %



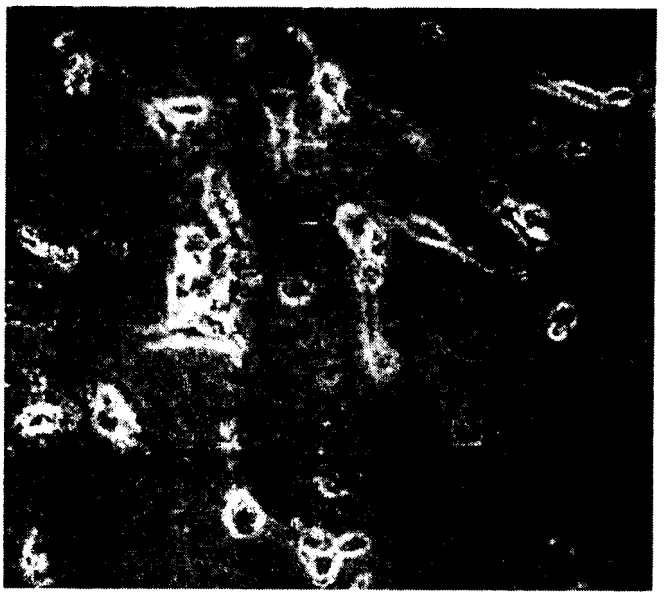
รูปที่ 25 เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งและเซลล์ไฟโบรบลาสต์ของสารสกัดหยาบฟูคอยแดนและสารฟูคอยแดนกึ่งบริสุทธิ์ ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ

□ การยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งของสารสกัดหยาบฟูคอยแดน

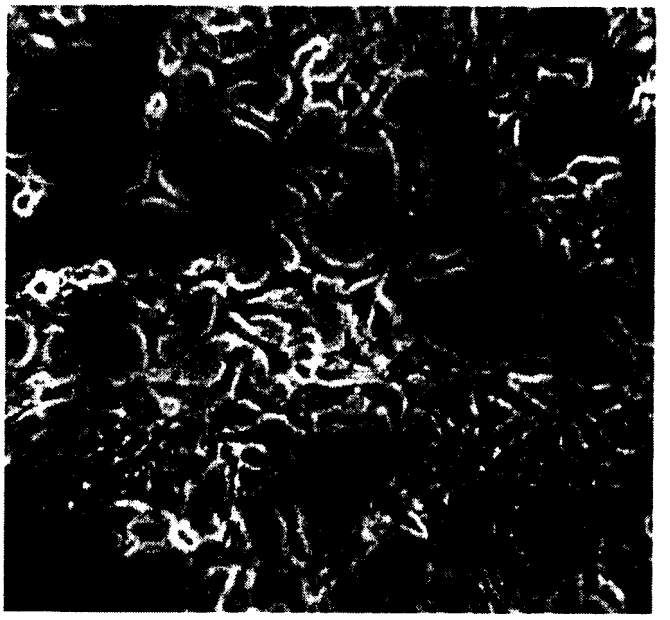
▣ การยับยั้งการเจริญของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ของสารสกัดหยาบฟูคอยแดน

□ การยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งของสารฟูคอยแดนกึ่งบริสุทธิ์

■ การยับยั้งการเจริญของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ของสารฟูคอยแดนกึ่งบริสุทธิ์

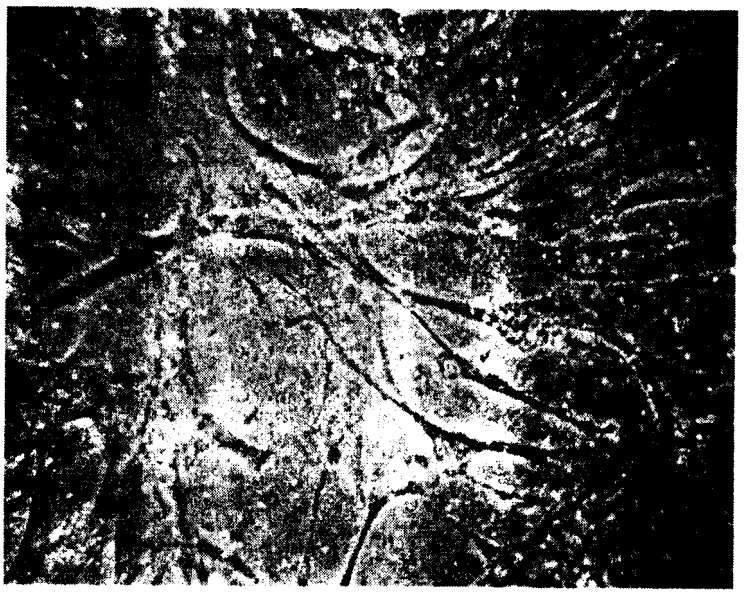


A

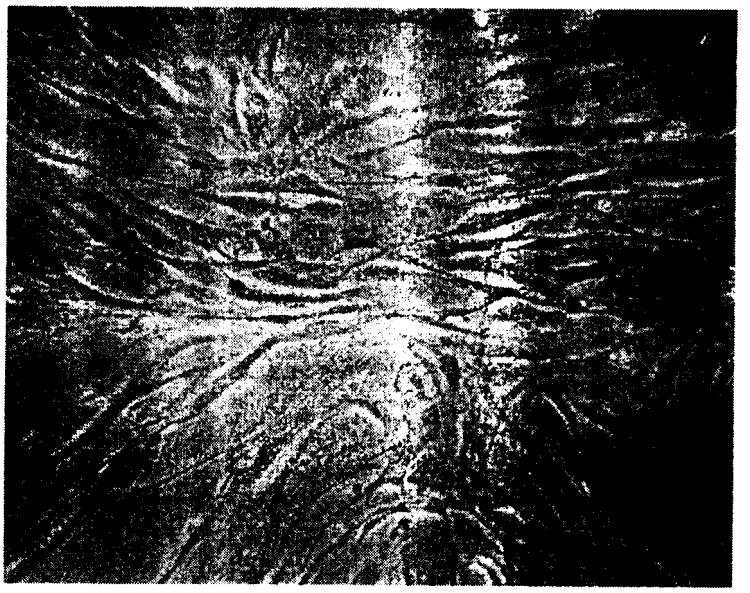


B

รูปที่ 26 ลักษณะของเซลล์มะเร็ง ที่ได้รับสารฟูคอยแดนกึ่งบริสุทธิ์ความเข้มข้น 250 µg/ml (A) เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับสารทดสอบ (B) (กำลังขยาย 100 เท่า)

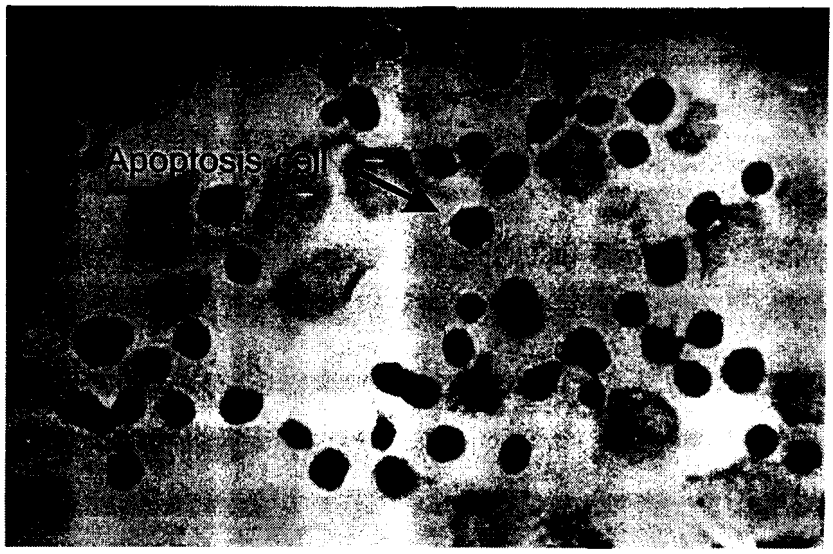


A

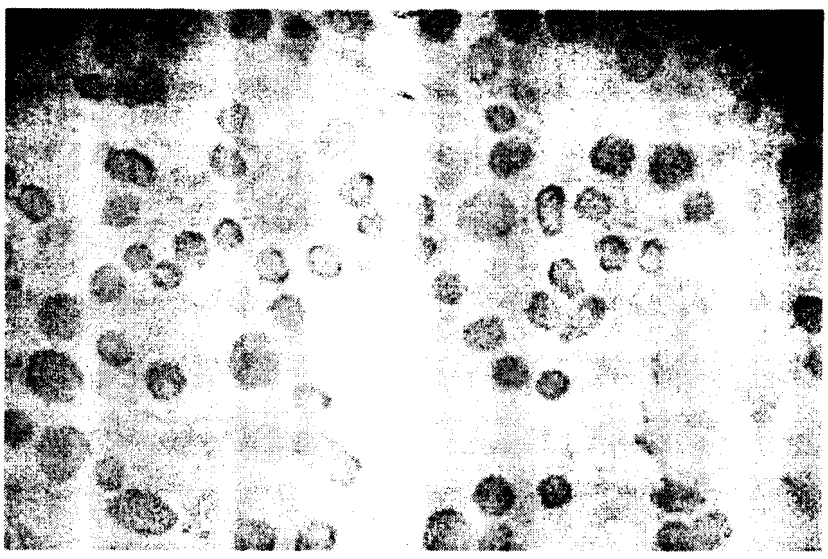


B

รูปที่ 27 ลักษณะของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ที่ได้รับสารฟูคอยแดนกึ่งบริสุทธิ์ความเข้มข้น 250 µg/ml (A) เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับสารทดสอบ (B) (กำลังขยาย 100 เท่า)



A



B

รูปที่ 28 ลักษณะของนิวเคลียสที่ย้อมติดสีน้ำตาลเข้มของเซลล์มะเร็งที่เกิด apoptosis จากการให้สารฟูคอยแดนกึ่งบริสุทธิ์ความเข้มข้น 250 µg/ml (A) เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับสารทดสอบ (B) (กำลังขยาย 100 เท่า)