ผลของการสกัดไขมันออกและอัลตราโซนิคต่อสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพและกิจกรรมการต้านออกซิเดชันของสารสกัดดอกเห็ดถั่งเช่าสีทอง
(Cordyceps militaris)

สุทธิดา สุทธิเลิศ

ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร
มหาวิทยาลัยแม่โจ้
พ.ศ. 2564

ผลของการสกัดไขมันออกและอัลตราโซนิคต่อสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพและ
กิจกรรมการต้านออกซิเดชันของสารสกัดดอกเห็ดถั่งเช่าสีทอง
(Cordyceps militaris)

สุทธิดา สุทธิเลิศ

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของความสมบูรณ์ของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร
สำนักบริหารและพัฒนาวิชาการ มหาวิทยาลัยแม่โจ้
พ.ศ. 2564

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยแม่โจ้

ผลของการสกัดไขมันออกและอัลตราโซนิคต่อสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพและ
กิจกรรมการต้านออกซิเดชันของสารสกัดดอกเห็ดถั่งเช่าสีทอง
(Cordyceps militaris)

สุทธิดา สุทธิเลิศ

วิทยานิพนธ์นี้ได้รับการพิจารณาอนุมัติให้เป็นส่วนหนึ่งของความสมบูรณ์ของการศึกษา
ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร

พิจารณาเห็นชอบโดย **อาจารย์ที่ปรึกษา**

อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก ....

(รองศาสตราจารย์ ดร.วิจิตรา แดงปรก)

วันที่..................เดือน..................พ.ศ. ....

อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ....

(รองศาสตราจารย์ ดร.วิวัฒน์ หวังเจริญ)

วันที่..................เดือน..................พ.ศ. ....

อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ....

(รองศาสตราจารย์ ดร.มงคล ถิรบุญยานนท์)

วันที่..................เดือน..................พ.ศ. ....

อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ....

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ธีระพล เสนพันธุ์)

วันที่..................เดือน..................พ.ศ. ....

ประธานอาจารย์ผู้รับผิดชอบหลักสูตร ....

(รองศาสตราจารย์ ดร.วิจิตรา แดงปรก)

วันที่..................เดือน..................พ.ศ. ....

สำนักบริหารและพัฒนาวิชาการรับรองแล้ว ....

(รองศาสตราจารย์ ดร.ญาณิน โอภาสพัฒนกิจ)
รองอธิการบดี ปฏิบัติการแทน
อธิการบดี มหาวิทยาลัยแม่โจ้

วันที่..................เดือน..................พ.ศ. ....

ชื่อเรื่อง	ผลของการสกัดไขมันออกและอัลตราโซนิคต่อสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ และ กิจกรรมการต้านออกซิเดชันของสารสกัดดอกเห็ดถั่งเช่าสีทอง *(Cordyceps militaris)*
ชื่อผู้เขียน	นางสาวสุทธิดา สุทธิเลิศ
ชื่อปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร
อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก	รองศาสตราจารย์ ดร.วิจิตรา แดงปรก

บทคัดย่อ

เห็ดถั่งเช่าสีทอง (*Cordyceps militaris*) เป็นเห็ดทางการแพทย์ชนิดหนึ่ง ประกอบด้วยสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพหลายชนิด รวมถึงสารต้านออกซิเดชันและสารยับยั้งการอักเสบ ช่วยทำให้ร่างกายแข็งแรงและมีอายุยืนยาว งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาวิธีการเตรียมสารสกัดจากเห็ดถั่งเช่าสีทอง วิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดและสมบัติต้านออกซิเดชันของสารสกัดที่ได้ โดยนำเห็ดถั่งเช่าสีทองที่ผ่านการทำแห้งด้วยตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมงมาทำการศึกษาคุณภาพทางเคมีและกายภาพ ได้แก่ ปริมาณคอร์ไดซิปินและอะดีโนซีน องค์ประกอบทางเคมี (ปริมาณความชื้น ไขมัน โปรตีน เถ้าและคาร์โบไฮเดรต) ค่ากิจกรรมของน้ำอิสระ และค่าสี (L* a* b*) หลังจากนั้นทำการเตรียมสารสกัดจากเห็ดถั่งเช่าสีทอง โดยศึกษาปัจจัย 2 ปัจจัย ได้แก่ วิธีการเตรียมตัวอย่าง (สกัดและไม่สกัดไขมันออก) และสภาวะในการสกัด (ใช้และไม่ใช้อัลตราซาวน์ช่วยสกัด) นำสารสกัดหยาบพอลิแซคคาไรด์ที่ได้ 4 ตัวอย่าง หาปริมาณผลผลิต วิเคราะห์ปริมาณคอร์ไดซิปินและอะดีโนซีน ปริมาณพอลิแซคคาไรด์, ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด, ความสามารถในการต้านออกซิเดชัน 6 วิธี ได้แก่ ความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระชนิด DPPH, ABTS, ซูเปอร์ออกไซด์, และไฮดรอกซิล ความสามารถในการจับกับอิออนของเฟอรัส และค่าความสามารถในการรีดิวซ์ วิเคราะห์ชนิดและปริมาณของสารประกอบฟีนอลิกด้วยเทคนิค HPLC พบว่าเห็ดถั่งเช่าสีทองที่ใช้ในการทดลองนี้มีปริมาณคอร์ไดซิปินและอะดีโนซีนเท่ากับ 7.1181 ± 0.1495 และ 0.4179 ± 0.0699 มิลลิกรัม/กรัม ตามลำดับ มีปริมาณความชื้น ไขมัน โปรตีน เถ้าและคาร์โบไฮเดรตร้อยละ 8.31 ± 0.23, 3.19 ± 0.25, 30.97 ± 0.30, 6.3 ± 0.17, และ 14.9 ± 0.35 ตามลำดับ ค่ากิจกรรมของน้ำอิสระ เท่ากับ 0.30 ± 0.05 และค่าสีมีค่า L* a* และ b* เท่ากับ 51.12 ± 0.07, 13.56 ± 0.15, และ 18.85 ± 0.07 ตามลำดับ เมื่อนำผงเห็ดถั่งเช่าสีทองมาสกัดภายใต้สภาวะในการสกัดที่แตกต่างกัน พบว่าตัวอย่างสารสกัดทั้ง 4 ตัวอย่างมีปริมาณผลผลิตไม่แตกต่างกัน ($p > 0.05$) โดยมีค่าอยู่ในช่วงร้อยละ 40.89 – 41.64 ตัวอย่างสารสกัดที่สกัดไขมันออก

และใช้อัลตราซาวน์ช่วยมีปริมาณพอลิแซคคาไรด์ ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดและความสามารถในการต้านออกซิเดชันทั้ง 6 วิธีสูงที่สุด ($p < 0.05$) นอกจากนี้ยังพบว่ามีปริมาณ Gallic acid, Protocatechuic acid, p-Hydroxybenzoic acid, และ p-Coumaric acid สูงที่สุดอีกด้วย ($p < 0.05$) โดยมีค่าเท่ากับ 0.128 ± 0.001, 0.078 ± 0.001, 0.042 ± 0.001, และ 0.110 ± 0.002 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ ดังนั้นสารสกัดจากเห็ดถั่งเช่าสีทองจึงมีศักยภาพที่ดีในการเป็นสารที่ช่วยส่งเสริมสุขภาพของผู้บริโภค

คำสำคัญ : สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ, เห็ดถั่งเช่าสีทอง, อัลตราซาวด์, พอลิแซคคาไรด์

Title	EFFECT OF DEFATTING AND ULTRASONICATION ON BIOACTIVE COMPOUNDS AND ANTIOXIDANT ACTIVITY OF *Cordyceps militaris* FRUITING BODY EXTRACTS.
Author	Miss Sutthida Sutthilert
Degree	Master of Science in Food Science and Technology
Advisory Committee Chairperson	Associate Professor Dr. Wichittra Daengprok

ABSTRACT

Cordyceps militaris is a medicinal mushroom, exhibiting many biological active compounds including antioxidant and antiinflammatory compounds which exert body health and longevity. Therefore, the objective of this research was to study the preparation of *Cordyceps militaris* extracts. Total phenolic content and antioxidant activity of the extracts were analyzed . *Cordyceps militaris* was dried in a hot air dryer at 60 °C for 24 h and analyzed chemical and physical qualities, including the amount of cordycepin and adenosine, chemical composition (moisture content, lipid, protein, ash and carbohydrate content), water activity and color value (L* a* b*). After that, extraction of *Cordyceps militaris* was performed. Two factors were studied, namely, sample preparation method. (defatted and not defatted) and extraction conditions (ultrasounded and not ultrasounded) Four samples of crude extracts were obtained for analysis of cordycepin and adenosine, polysaccharide content, total phenolic compound content, six antioxidative abilities including DPPH, ABTS, superoxide, and hydroxyl radical inhibition capacity, ferrous ions chelating and reducing ability. The phenolics profiles were also analyzed by HPLC technique. It was found that the *Cordyceps militaris* used in this experiment had 7.1181 ± 0.1495 and 0.4179 ± 0.0699 mg/g of cordycepin and adenosine content, respectively. The moisture, fat, protein, ash and carbohydrate content were 8.31 ± 0.23 %, 3.19 ± 0.25%, 30.97 ± 0.30%, 6.3 ± 0.17%, and 14.9± 0.35%, respectively. The water activity values

of 0.30±0.05, and the color values of L* a* and b* were 51.12 ± 0.07, 13.56 ± 0.15, and 18.85 ± 0.07, respectively. The *Cordyceps militaris* extracts under different extraction conditions showed no difference in yield ($p > 0.05$), with values ware in the range of 40.89 – 41.64 %. The defatted and ultrasound-assisted extracts had the highest total phenolic content and six antioxidant activities ($p < 0.05$). It was also found that gallic acid, protocatechuic acid, p-hydroxybenzoic acid, and p-coumaric acid content were the higkest with the values of 0.128 ± 0.001, 0.078 ± 0.001, 0.042 ± 0.001, and 0.110 ± 0.002 mg/ml, respectively. Therefore, *Cordyceps militaris* fruiting body extracts have great poteintial as a health promoting substance for consumert.

Keywords : Bioactive compounds, Cordyceps militaris, Ultrasound, Polysaccharides

MAEJO UNIVERSITY

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยฉบับนี้สำเร็จลงได้ด้วยดี เนื่องจากได้รับความกรุณาอย่างสูงจากรองศาสตราจารย์ ดร. วิจิตรา แดงปรก อาจารย์ที่ปรึกษางานวิจัย รองศาสตราจารย์ ดร. วิวัฒน์ หวังเจริญ รองศาสตราจารย์ ดร.มงคล ถิรบุญยานนท์ และ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ธีระพล เสนพันธุ์ ที่กรุณาให้คำแนะนำปรึกษา ตลอดจนปรับปรุงแก้ไขข้อบกพร่องต่าง ๆ ด้วยความเอาใจใส่อย่างดียิ่ง ผู้วิจัยตระหนักถึงความตั้งใจจริงและความทุ่มเทของอาจารย์และขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้

ขอขอบพระคุณบิดามารดา ที่สนับสนุนและให้กำลังใจจนงานวิจัยสำเร็จด้วยดี คุณค่าและประโยชน์อันพึงมีจากการศึกษาวิจัยนี้ ผู้วิจัยขอน้อมบูชาพระคุณบิดามารดาและบูรพาจารย์ทุกท่าน ที่ได้อบรมสั่งสอนวิชาความรู้และให้ความเมตตาแก่ผู้วิจัยมาโดยตลอด และเป็นกำลังใจสำคัญ ที่ทำให้การศึกษาวิจัยฉบับนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี

สุทธิดา สุทธิเลิศ

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ค
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	จ
กิตติกรรมประกาศ	ช
สารบัญ	ซ
สารบัญตาราง	ญ
สารบัญรูปภาพ	ฎ
บทที่ 1 บทนำ	1
ที่มาและความสำคัญของปัญหา	1
วัตถุประสงค์ของงานวิจัย	2
ผลงานหรือประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	2
บทที่ 2 การตรวจเอกสาร	3
2.1 เห็ดถั่งเช่าสีทอง	3
2.2 สารต้านออกซิเดชัน (antioxidant)	8
2.4 สารประกอบฟีนอลิก (phenolic compounds)	12
2.5 พอลิแซคคาไรด์	15
2.6 คลื่นอัลตราซาวด์หรือคลื่นอัลตราโซนิก (ultrasonic waves)	23
บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย	31
3.1 สายพันธุ์เห็ดถั่งเช่าสีทอง (*Cordyceps militaris*)	31
3.2 วัสดุอุปกรณ์และเครื่องมือ	31
3.3 สารเคมี	32
3.4 วิธีการทดลอง	33

บทที่ 4 ผลการวิจัยและวิจารณ์ 44
4.1 คุณภาพทางเคมีและกายภาพของเห็ดถั่งเช่าสีทองอบแห้ง 44
4.2 ปริมาณผลผลิตและคุณภาพของสารสกัด 45
บทที่ 5 สรุปผล 70
บรรณานุกรม 72
ภาคผนวก 79
ภาคผนวก ก 80
รูปภาพประกอบทำวิจัย 80
ภาคผนวก ข 85
กราฟมาตรฐานในการวิเคราะห์หาปริมาณพอลิแซคคาไรด์ ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกและความสามารถในการต้านออกซิเดชัน 85
ประวัติผู้วิจัย 93

MAEJO UNIVERSITY

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 1 ปริมาณคอร์ไดซิปินและอะดีโนซีนในส่วนต่างๆ ของเห็ดถั่งเช่าสีทองและเห็ดถั่งเช่าทิเบต 7

ตารางที่ 2 ปริมาณโปรตีนในสารสกัดพอลิแซคคาไรด์จากเห็ดชนิดต่างๆ ที่สกัดโดยวิธีที่แตกต่างกัน 21

ตารางที่ 3 คุณภาพทางเคมี กายภาพของผงเห็ดถั่งเช่าสีทอง... 45

ตารางที่ 4 ร้อยละของผลผลิตของสารสกัดจากเห็ดถั่งเช่าสีทอง 49

ตารางที่ 5 ปริมาณคอร์ไดซิปินและอะดีโนซีนของสารสกัดจากเห็ดถั่งเช่าสีทอง................................ 50

ตารางที่ 6 ปริมาณพอลิแซคคาไรด์ของสารสกัดจากเห็ดถั่งเช่าสีทอง... 52

ตารางที่ 7 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดจากเห็ดถั่งเช่าสีทอง 54

ตารางที่ 8 IC_{50} ของความสามารถในการจับกับ DPPH ของสารสกัดจากเห็ดถั่งเช่าสีทอง 57

ตารางที่ 9 IC_{50} ของความสามารถในการจับกับ $ABTS^{\bullet +}$ ของสารสกัดจากเห็ดถั่งเช่าสีทอง 58

ตารางที่ 10 IC_{50} ของความสามารถในการยับยั้งอนุมูลซูเปอร์ออกไซด์ของสารสกัดจากเห็ดถั่งเช่า สีทอง.. 60

ตารางที่ 11 IC_{50} ของความสามารถในการยับยั้งอนุมูลไฮดรอกซิลของสารสกัดจากเห็ดถั่งเช่าสีทอง 61

ตารางที่ 12 IC_{50} ของความสามารถในการจับกับอิออนของเฟอรัสของสารสกัดจากเห็ดถั่งเช่าสีทอง 63

ตารางที่ 13 ค่าความสามารถในการรีดิวซ์ของสารสกัดจากเห็ดถั่งเช่าสีทอง 65

ตารางที่ 14 ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด ปริมาณพอลิแซคคาไรด์ ปริมาณคอร์ไดซิปินและอะดีโนซีจากเห็ดถั่งเช่าสีทองกับความสามารถในการต้านออกซิเดชันจากเห็ดถั่งเช่าสีทอง 67

ตารางที่ 15 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกในเห็ดถั่งเช่าสีทอง... 69

สารบัญรูปภาพ

หน้า

ภาพที่ 1 ลักษณะของเห็ดถั่งเช่าสีทอง บริเวณดอกเห็ด (a) ส่วนดอกเห็ดที่พบในธรรมชาติ (b) ส่วนดอกเห็ดและโครงสร้างที่ใช้สร้างสปอร์ในธรรมชาติเมื่อส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์ใช้แสงแบบสเตอริโอที่กำลังขยาย 12 เท่า (c) ส่วนดอกเห็ดและโครงสร้างที่ใช้สร้างสปอร์จากการเพาะเลี้ยงเมื่อส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์ใช้แสงแบบสเตอริโอที่กำลังขยาย 12 เท่า (d)... 4

ภาพที่ 2 โครงสร้างของสารประกอบฟีนอลิกชนิดต่างๆ.. 13

ภาพที่ 3 โครงสร้างพื้นฐานของพอลิแซคคาไรด์จากเห็ด (เบต้า-ดี-กลูแคน; β – D - glucan)......... 16

ภาพที่ 4 โครงสร้างพอลิแซคคาไรด์ของผนังเซลล์พืช (เซลลูโลส, cellulose)................................ 17

ภาพที่ 5 โครงสร้างพอลิแซคคาไรด์ของสตาร์ชจากธัญพืช 17

ภาพที่ 6 การใช้ประโยชน์จากคลื่นความถี่อัลตราซาวด์ 24

ภาพที่ 7 อ่างอัลตราโซนิก (ultrasonic bath) 25

ภาพที่ 8 อ่างอัลตราโซนิกแบบคัพฮอร์น... 26

ภาพที่ 9 ระบบอัลตราโซนิกแบบโพรบ 27

ภาพที่ 10 ลักษณะของฮอร์น... 27

ภาพที่ 11 หลักการเกิดฟองอากาศในตัวกลางเนื่องจากคลื่นอัลตราซาวด์ 28

ภาพที่ 12 กระบวนการเตรียมสารสกัดจากเห็ดถั่งเช่าสีทอง 37

ภาพที่ 13 สารสกัด 4 ตัวอย่างของเห็ดถั่งเช่าสีทอง 47

บทที่ 1
บทนำ

ที่มาและความสำคัญของปัญหา

ปัจจุบันมีประชากรที่คำนึงถึงเรื่องสุขภาพเพิ่มมากขึ้น และมีความกังวลเกี่ยวกับผลข้างเคียงจากการใช้ยารักษาความเจ็บป่วย ดังนั้นการใช้สารประกอบจากธรรมชาติเพื่อป้องกันโรคและรักษาสุขภาพจึงมีการศึกษาเพิ่มมากขึ้น เห็ดถั่งเช่าสีทองเป็นอาหารทางธรรมชาติที่มีคุณค่าทางโภชนาการสูง มีประโยชน์ต่อสุขภาพ เป็นที่รู้จักกันทั่วไปทางด้านสมบัติการต้านออกซิเดชันที่มาจากกระบวนการเผาผลาญสารอาหารหรือกระบวนการเมตาบอลิซึมของเซลล์ (Queirós et al., 2009) และอนุมูลอิสระเหล่านี้เป็นสาเหตุทำให้เกิดโรคภัยหลายอย่างที่เกี่ยวข้องกับภาวะเครียดจากการออกซิเดชัน เช่น หลอดเลือดหัวใจตีบ เบาหวานและมะเร็ง เป็นต้น

การต้านออกซิเดชันด้วยการใช้อาหารหรือสารประกอบที่มีในธรรมชาติมีผลข้างเคียงน้อยมากต่อผู้ที่รับประทานเข้าไป พบว่าเห็ดเป็นแหล่งที่ดีของสารต้านออกซิเดชันหลายชนิด ซึ่งรวมถึงสารประกอบฟีนอลิก (phenolics) วิตามินซีและวิตามินดี (Liu et al., 2016) สารสกัดจากเห็ดถั่งเช่าสีทองสามารถใช้เป็นส่วนประกอบอาหารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพในสูตรอาหารต่าง ๆ มีงานทดลองจำนวนมากที่ศึกษาเกี่ยวกับศักยภาพการเป็นสมบัติการต้านออกซิเดชันของเห็ดถั่งเช่าสีทองของสารสกัดเอทานอล (Lin et al., 2012) จากงานวิจัยของ ธัญญา และคณะ (2557) ที่ได้วิเคราะห์องค์ประกอบของฐานเห็ดหรือวัสดุเพาะที่เหลือหลังจากเก็บดอกเห็ดออกไปแล้วพบว่ามียังคงมีปริมาณสารคอร์ไดซิปิน 3,285 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักแห้ง จะเห็นได้ว่าสารคอร์ไดซิปิน ซึ่งเป็นสารสำคัญ สามารถพบได้ทุกส่วนของเห็ดถั่งเช่าสีทอง และจากการศึกษาตัวทำละลายในการสกัดสารคอร์ไดซิปิน จากเห็ดถั่งเช่าสีทองพบว่าสามารถสกัดได้ปริมาณสูงด้วยเอทานอลและเมทานอล (Soltani et al., 2017) งานวิจัยนี้ได้สนใจที่จะศึกษาสภาวะการเตรียมสารสกัดด้วยน้ำร้อนจากเห็ดถั่งเช่าสีทองและสมบัติการต้านออกซิเดชันของสารสกัดที่ได้

วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1. เพื่อศึกษาวิธีการเตรียมสารสกัดจากเห็ดถั่งเช่าสีทอง
2. เพื่อวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดและศึกษาสมบัติการต้านออกซิเดชันของสารสกัดจากเห็ดถั่งเช่าสีทอง

ผลงานหรือประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. นักวิจัย นักวิชาการ อาจารย์และผู้ที่สนใจสามารถใช้เป็นแนวทางในการค้นคว้าและวิจัยต่อยอดเกี่ยวกับสารสกัดจากเห็ดถั่งเช่าสีทองได้
2. ผู้ประกอบการสามารถนำข้อมูลไปใช้เป็นตัวเลือกในการผลิต เพื่อให้ได้สารสารสกัดจากเห็ดถั่งเช่าสีทองที่มีความสามารถในการต้านออกซิเดชันสูง

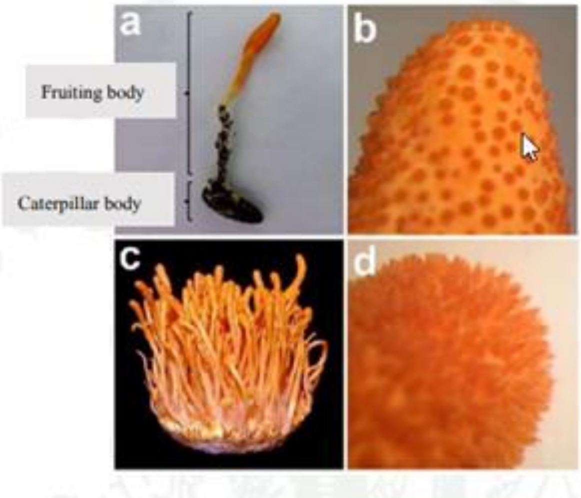
บทที่ 2
การตรวจเอกสาร

2.1 เห็ดถั่งเช่าสีทอง

เห็ดจัดเป็นราขนาดใหญ่ที่อยู่ในอาณาจักรเห็ดรา (Kingdom Fungi) อาณาจักรย่อยได้คารีเอ (Subkingdom Dikarya) ซึ่งประกอบด้วย 2 ไฟลัม (Phylum) ได้แก่ ไฟลัมบาสิดิโอไมโคตา (Phylum Basidiomycota) และไฟลัมแอสโคไมโคตา (Phylum Ascomycota) จัดจำแนกโดยอาศัยความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ (phylogeny) (Hibbett et al., 2007) จำนวนชนิดของเห็ดที่พบรายงาน และมีการตั้งชื่อตามหลักอนุกรมวิธานแล้วทั่วโลกประมาณ 15,000 ชนิด ในจำนวนนี้พบว่าเป็นเห็ดชนิดที่มีฤทธิ์ทางยาเพียง 650 ชนิด (Yan et al., 2014) เห็ดที่มีฤทธิ์ทางยา เห็ดเป็นยาหรือเห็ดทางการแพทย์ (medicinal mushroom) เข้ามามีบทบาทในการดูแลสุขภาพและรักษาโรคบางชนิดกับคนทั่วไป จึงทำให้อุตสาหกรรมเกี่ยวกับผลิตภัณฑ์จากเห็ดที่มีฤทธิ์ทางยาเติบโตอย่างมาก จากรายงานของ Global Business Intelligence (GBI) เมื่อปี ค.ศ. 2012 เกี่ยวกับการเติบโตทางเศรษฐกิจของธุรกิจผลิตภัณฑ์ดูแลสุขภาพจากสารพอลิแซคคาไรด์ที่สกัดได้จากเห็ดมีมูลค่ามากถึง 145.9 ล้านเหรียญสหรัฐและคาดว่าจะมีการเติบโตมากขึ้นร้อยละ 8.6 มีมูลค่ามากถึง 2,593 ล้านเหรียญสหรัฐในปี ค.ศ. 2017 (El Enshasy and Hatti-Kaul, 2013)

เห็ดถั่งเช่า (*Cordyceps spp.*) อยู่ใน Genus: Cordyceps Division: Ascomycota Class: Sordariomycetes Order: Hypocreales Family: Clavicipitacaeae (Kang *et al*., 2017) จัดเป็นเห็ดเมืองหนาว เป็นที่รู้จักมาตั้งแต่สองพันปีก่อนคริสตศักราช ชาวจีนเชื่อว่าเป็นยาอายุวัฒนะ มีสรรพคุณช่วยปรับสมดุลของร่างกาย เป็นสมุนไพรธาตุร้อน ในสมัยโบราณเห็ดถั่งเช่าถูกจำกัดการใช้เฉพาะจักรพรรดิ และเชื้อพระวงศ์ชั้นสูงของจีนเท่านั้น คนธรรมดาสามัญไม่มีสิทธิ์บริโภค เป็นของที่หายาก และมีค่าดั่งทอง ตำราการแพทย์ทิเบตมีการบันทึกไว้ว่า เห็ดถั่งเช่าถูกใช้เป็นยาชูกำลัง ใช้รักษาสารพัดโรค ปัจจุบันหลายๆ ประเทศได้ทำการศึกษา รวบรวมจำแนก เพาะเลี้ยง ปรับปรุงสายพันธุ์ และพัฒนาการผลิตถั่งเช่าเพื่อเป็นการค้า ใช้ในทางการแพทย์และอาหารเพื่อสุขภาพ เช่น จีน เกาหลี ญี่ปุ่น ไต้หวัน สหรัฐอเมริกา มาเลเซีย และสิงคโปร์ เป็นต้น เนื่องจากมีสารประกอบที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพจำนวนมาก ชนิดของเห็ดถั่งเช่าที่นิยมใช้บริโภคเพื่อเสริมสร้างสุขภาพ ได้แก่ เห็ดถั่งเช่าทิเบต (*Cordyceps sinensis*) และเห็ดถั่งเช่าสีทอง (*Cordyceps militaris*) อย่างไรก็ตามการเพาะเลี้ยงเห็ดถั่งเช่าทิเบตนั้นเพาะยาก มีเพียงในธรรมชาติและราคาแพง (Yu et al., 2006) ส่วนการเพาะเห็ดถั่งเช่าสีทองแม้มีปัจจัยข้อจำกัดทางด้านความจำเพาะของโฮสต์ อัตราการเจริญเติบโตช้า

พื้นที่สภาพแวดล้อม มีขนาดเล็ก ยากต่อการเก็บเกี่ยว ยากต่อการรักษาคุณภาพ จึงทำให้มีราคาแพงเช่นกัน แต่เมื่อเปรียบเทียบในแง่การเพาะเลี้ยง เห็ดถั่งเช่าสีทองสามารถเพาะเลี้ยงได้ง่ายกว่า ทำให้นิยมนำมาเพาะเพื่อให้เพียงพอต่อความต้องการเพื่อเป็นอาหารเสริมสุขภาพของมนุษย์ ซึ่งการเพาะเลี้ยงสามารถเพาะได้ในหลายรูปแบบเพื่อให้ได้ปริมาณที่มากเพียงพอกับความต้องการของตลาดและเพาะเลี้ยงได้ตลอดทั้งปีโดยแบ่งการเพาะเลี้ยงด้วยอาหารเหลวและอาหารแข็ง โดยการเพาะทั้งในอาหารเหลวและอาหารแข็งนั้นประกอบไปด้วยแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจน ทั้งนี้การเพาะบนอาหารแข็งให้ผลผลิตมาก แต่ต้องใช้ระยะเวลาในการเพาะนานหลายเดือนจนได้ส่วนดอกเห็ดที่สมบูรณ์ ซึ่งอาจมีผลต่อการควบคุมคุณภาพของผลิตภัณฑ์ในแง่ความสม่ำเสมอของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้ (Cui, 2015) นอกจากนี้การเพาะยังมีปัจจัยต่างๆ ที่ส่งผลต่อปริมาณคอร์ไดซิปิน เช่น อุณหภูมิ ระยะเวลาในการเพาะ ความเข้มแสง และปริมาณอากาศที่ควบคุมในระหว่างเพาะ เป็นต้น (Adnan et al., 2017) เห็ดถั่งเช่าสีทองที่ได้มาจากการเพาะเลี้ยงมีลักษณะที่คล้ายกันทั้งสีและรูปร่างเมื่อเทียบกับเห็ดถั่งเช่าสีทองในธรรมชาติ แต่ต่างกันที่ลักษณะของเห็ดถั่งเช่าสีทองในธรรมชาติมีโครงสร้างที่ใช้สร้างสปอร์ (perithecia) แหลมและหนาแน่นกว่าเมื่อขยายด้วยกล้องจุลทรรศน์ ดังแสดงดังภาพที่ 1 (Zhang and Liang, 2013)



ภาพที่ 1 ลักษณะของเห็ดถั่งเช่าสีทอง บริเวณดอกเห็ด (a) ส่วนดอกเห็ดที่พบในธรรมชาติ (b) ส่วนดอกเห็ดและโครงสร้างที่ใช้สร้างสปอร์ในธรรมชาติเมื่อส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์ใช้แสงแบบสเตอริโอที่กำลังขยาย 12 เท่า (c) ส่วนดอกเห็ดและโครงสร้างที่ใช้สร้างสปอร์จากการเพาะเลี้ยงเมื่อส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์ใช้แสงแบบสเตอริโอที่กำลังขยาย 12 เท่า (d)
ที่มา: Zhang and Liang (2013)

เห็ดถั่งเช่าสีทอง (*Cordyceps militaris*) อยู่ในกลุ่มของเห็ดที่เป็นยา มีประวัติการใช้งานทางการแพทย์แผนโบราณของจีนมาเป็นเวลายาวนานนับพันปี ในปัจจุบันเห็ดถั่งเช่าสีทองได้รับความนิยม เนื่องจากมีความแตกต่างจากเห็ดถั่งเช่าชนิดอื่นตรงที่สามารถเพาะเลี้ยงได้ง่าย สร้างสารคอร์ไดซิปิน และสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพอื่นๆ ได้แก่ อะดีโนซีน โปรตีน สเตอรอล พอลิแซคคาไรด์ และเบต้า-ดี-กลูแคน ได้สูงเท่าๆ กับที่พบในเห็ดถั่งเช่าทิเบต จึงทำให้มีการพัฒนาผลิตภัณฑ์จากเห็ดถั่งเช่าสีทองในรูปแบบต่าง ๆ กันอย่างแพร่หลายเพื่อใช้เป็นอาหารฟังก์ชัน ที่ได้รับความนิยมมาก โดยเฉพาะในเอเชีย ได้มีการนำเห็ดถั่งเช่าสีทองไปใช้ประโยชน์ในรูปแบบต่าง ๆ เช่น ผลิตภัณฑ์เสริมอาหารทั้งในแบบผง บรรจุแคปซูลและแบบเม็ด ผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มกึ่งสำเร็จรูปที่ผสมกับกาแฟ อีกทั้งยังมีการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับการนำส่วนของฐานเห็ดไปใช้เป็นส่วนผสมในอาหารสัตว์เพื่อลดการใช้ยาปฏิชีวนะ (Richert et al., 2018) จึงส่งผลให้เห็ดชนิดนี้มีความสำคัญทางเศรษฐกิจเป็นอย่างสูง

ส่วนองค์ประกอบที่เป็นสารอาหารที่พบในดอกเห็ดถั่งเช่าสีทองประกอบไปด้วยมีคาร์โบไฮเดรตร้อยละ 29.10 โปรตีนร้อยละ 59.80 และกรดอะมิโนทั้งหมด 57.39 มิลลิกรัม/กรัม และส่วนเส้นใย มีคาร์โบไฮเดรตร้อยละ 39.60 โปรตีนร้อยละ 39.50 และกรดอะมิโนทั้งหมด 24.98 มิลลิกรัม/กรัม กรดไขมันชนิดไม่อิ่มตัวร้อยละ 57.84 ได้แก่ กรดพาล์มิโทเลอิค (C16:1), กรดโอเลอิก (C18:1) และ กรดลิโนเลอิก (C18:2) และกรดไขมันชนิดอิ่มตัวร้อยละ 42.16 ได้แก่ กรดไมริสติก (C14:0), กรดเพนทาเดคาโนอิก (C15:0) ,กรดปาลมิติก (C16:0), กรดเฮปาโทเดคาโนอิก (C17:0)และกรดสเตียริก (C18:0) อีกทั้งแร่ธาตุต่างๆ เช่น แคลเซียม โพแทสเซียม แมกนีเซียม โซเดียม ฟอสฟอรัส ซีลีเนียม สังกะสี และซัลเฟอร์ เป็นต้น และวิตามิน เช่น วิตามินเอ บี 1 บี 2 บี 3 บี 12 ซี เค และอี เป็นต้น (Zhou et al., 2009; Zhang and Liang, 2013; Cui, 2015) จากประโยชน์และสรรพคุณที่หลากหลายจึงทำให้เห็ดถั่งเช่าสีทองเป็นที่ต้องการของตลาดการเตรียมตัวอย่างก่อนการสกัด ตัวอย่างเห็ดถั่งเช่าสีทองมักต้องผ่านกระบวนการทำแห้งและบดเป็นผงก่อนที่จะนำไปผ่านกระบวนการสกัดและศึกษาสมบัติทางด้านต่างๆ ต่อไป ปริมาณความชื้นและค่า water activity ของเห็ดถั่งเช่าสีทองที่ผ่านการทำแห้งแล้ว พบว่ามีค่าอยู่ในช่วงร้อยละ 3.26-3.56 และ 0.283-0.338 ตามลำดับ (Hur, 2008)

สารออกฤทธิ์ที่พบในเห็ดถั่งเช่าสีทอง มีฤทธิ์ทางชีวภาพหลายชนิด เช่น ฤทธิ์ต้านมะเร็ง (anti-cancer) ยับยั้งการสร้างเซลล์มะเร็ง (Ahn et al., 2000) ต้านการกระจายตัวของมะเร็ง (antimetastatic) (Nakamura et al., 2015) ยับยั้งการเจริญของมะเร็ง (inhibit cancer growth) (Park et al., 2017) ต้านไวรัส (anti-viral) ต้านเชื้อรา (ant-fungal) ต้านการอักเสบ (anti-inflammatory) (Jo et al., 2010) ต้านการมีน้ำตาลในเลือดสูง (anti-hyperglycemic) ต้านเนื้องอก (anti-tumor) และต้านจุลินทรีย์ (anti-microbial) (Shrestha et al., 2012; Tuli et al., 2013) คอร์ไดซีปินที่แยกได้จากเห็ดถั่งเช่าสีทอง มีศักยภาพสูงในการยับยั้งการเจริญของพืช (plant growth inhibitor) (Quy et al., 2019) พอลีแซคคาร์ไรด์ที่พบในเห็ดถั่งเช่าสีทอง มีฤทธิ์ต้านมะเร็ง ปรับสมดุลของภูมิคุ้มกัน และมีสมบัติการต้านอนุมูลอิสระ พอลีแซคคาร์ไรด์ที่แยกจากส่วนดอกเห็ดถั่งเช่าสีทองที่ได้จากการเพาะเลี้ยง ซึ่งส่วนใหญ่เป็นน้ำตาลแมนโนส (mannose) กลูโคส (glucose) และกาแลคโตส (galactose) มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ โดยสามารถกำจัดอนุมูลอิสระ ลดอนุมูลอิสระและจับกับไอออนของเหล็กได้ (Wu et al., 2011) สารสกัดจากเห็ดถั่งเช่าสีทองมีฤทธิ์ต้านการสร้างหลอดเลือด (anti-angiogenetic) ต้านการอักเสบ ต้านอนุมูลอิสระ (anti-oxidant) ต้านเนื้องอกป้องกันการทำลายดีเอนเอ (DNA) และเพิ่มประสิทธิภาพในการกำจัดและการยับยั้งการสร้างอนุมูลอิสระ สารสกัดเมทานอลถั่งเช่าสีทองมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ โดยยับยั้งกระบวนการออกซิเดชันของไขมัน ลดและกำจัดอนุมูลอิสระ ยับยั้งเซลล์ก่อมะเร็ง และยังมีคุณสมบัติในการต้านจุลินทรีย์ทั้งแบคทีเรียและรา (Dong et al., 2014; Reis et al., 2013) สารสกัดเมทานอลจากส่วนดอก มีฤทธิ์ในการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH สูงกว่าจากส่วนเส้นใย ขณะที่สารสกัดจากส่วนเส้นใย มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระโดยรวม และความสามารถในการจับและลดอนุมูลอิสระสูงกว่าจากส่วนดอกเห็ดถั่งเช่าสีทองมีสารออกฤทธิ์และฤทธิ์ทางชีวภาพคล้ายกับเห็ดถั่งเช่าธิเบต จึงมีการนำเห็ดถั่งเช่าสีทองมาใช้แทนเห็ดถั่งเช่าธิเบต (Wei et al., 2004) สารออกฤทธิ์จากเห็ดถั่งเช่าสีทอง ได้รับการตรวจสอบ และได้รับการยอมรับว่ามีคุณประโยชน์อย่างยิ่งต่อสุขภาพของมนุษย์ โดยเฉพาะคอร์ไดซิปิน

สารคอร์ไดซิปินในเห็ดถั่งเช่าสีทอง

คอร์ไดซิปินเป็นสารอนุพันธ์ของอะดีโนซีนชนิดนิวคลีโอไซด์ (3’-deoxyadenosine) และอะดีโนซีน นิยมใช้เป็นสารที่บ่งชี้คุณภาพด้านสรรพคุณทางยาของเห็ดถั่งเช่า โดยพบว่าคอร์ไดซิปินช่วยป้องกันมะเร็ง ป้องกันภาวะลิ่มเลือดอุดตัน (thrombosis) และช่วยต้านการอักเสบ (Kang *et al.*, 2017) มีงานวิจัยที่พบว่าปริมาณสารคอร์ไดซิปินและอะดีโนซีนในเห็ดถั่งเช่าสีทองมีความแตกต่างกันขึ้นอยู่กับปัจจัยต่างๆ ได้แก่ ความแข็งแรงของสายพันธุ์ วิธีการเพาะเลี้ยง สภาพแวดล้อม

ระยะเวลาที่ใช้เพาะเลี้ยง องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ pH การกวน แสง รวมไปถึงขั้นตอนการสกัดและการวิเคราะห์ (Aramwit et al., 2014) คอร์ไดซิปินมีค่าครึ่งชีวิตประมาณ 1 นาทีในร่างกายแล้วจะถูกย่อยสลายอย่างรวดเร็วโดยเอนไซม์อะดีโนซีนดีอะมิเนส ซึ่งเป็นข้อดีคือทำให้ไม่มีผลข้างเคียงที่ไม่พึงประสงค์ต่อร่างกาย (Kang *et al*., 2017)

มีงานทดลองที่พบว่าสารสำคัญพวกคอร์ไดซิปินและอะดีโนซีนในเห็ดถั่งเช่าสีทองมีมากกว่าในเห็ดถั่งเช่าทิเบตอีกด้วย (Huang *et al*., 2009) นอกจากนี้ยังมีข้อมูลว่าปริมาณคอร์ไดซิปินและอะดีโนซีนในส่วนดอกเห็ดจะมีมากกว่าส่วนเส้นใยเห็ด (Hur, 2008) ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ปริมาณคอร์ไดซิปินและอะดีโนซีนในส่วนต่างๆ ของเห็ดถั่งเช่าสีทองและเห็ดถั่งเช่าทิเบต

ตัวอย่าง	คอร์ไดซิปิน มิลลิกรัม/กรัม	อะดีโนซีน มิลลิกรัม/กรัม	รวม * มิลลิกรัม/กรัม	ที่มา
ดอกเห็ด ถั่งเช่าทิเบต	2.654 ± 0.02	2.450 ± 0.03	5.104	Huang *et al*. (2009)
เส้นใยเห็ด ถั่งเช่าทิเบต	0.904 ± 0.02	1.592 ± 0.03	2.496	
ดอกเห็ด ถั่งเช่าสีทอง	0.980 ± 0.01	1.643 ± 0.03	2.623	
ดอกเห็ด ถั่งเช่าสีทอง	9.7	1.8	11.5	Hur (2008)

จากงานวิจัยของ Wu *et al*. (2019) ศึกษาการทำแห้งเห็ดถั่งเช่าสีทองโดยวิธีการทำแห้งแบบอินฟราเรด (infrared drying) ที่อุณหภูมิต่างๆ ได้แก่ 40, 50, 60 และ 70 องศาเซลเซียส พบว่าการทำแห้งที่ 50, 60 และ 70 องศาเซลเซียสสามารถลดเวลาในการทำแห้งลงได้ร้อยละ 30, 40 และ 60 เมื่อเปรียบเทียบกับการทำแห้งที่ 40 องศาเซลเซียส นอกจากนี้ยังมีค่า water activity ต่ำกว่าด้วย ดังนั้นการทำแห้งที่อุณหภูมิสูงขึ้น เห็ดอบแห้งที่ได้จะเก็บได้นานขึ้น การทำแห้งที่ 40 องศาเซลเซียสจะได้เห็ดอบแห้งที่สามารถรักษาสีและสารประกอบที่ระเหยได้ดีกว่า การทำแห้งที่อุณหภูมิสูงขึ้นจะช่วยลดรสขมและรสขมที่ตกค้างในปากได้ดีกว่า ผู้วิจัยได้สรุปสภาวะที่เหมาะสมในการทำแห้งเห็ดถั่งเช่าสีทองคือที่ 60 องศาเซลเซียส ความเร็วลม 1 เมตรต่อวินาที ซึ่งเป็นสภาวะที่สามารถรักษาสารประกอบออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ได้แก่ อะดีโนซีน คอร์ไดซิปิน สารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด และสารอาหาร ได้แก่ ทองแดง เหล็ก สังกะสี มังกานีส ไว้ได้

2.2 สารต้านออกซิเดชัน (antioxidant)

สารต้านออกซิเดชันคือ โมเลกุลหนึ่งที่มีความสำคัญในการลดการทำงานของสารที่เกิดจากออกซิเจนที่ว่องไวต่อการเกิดปฏิกิริยา (reactive oxygen species; ROS) สารที่เกิดจากไนโตรเจนที่ว่องไวต่อการเกิดปฏิกิริยา (reactive nitrogen species; RNS) หรือทั้งสอง ในกระบวนการทำงานของอวัยวะต่างๆ ในร่างกาย สมบัติการต้านออกซิเดชันจะเข้าไปลดไม่ให้สารอนุมูลอิสระทำงาน โดยการกำจัดสารอนุมูลอิสระก่อนที่จะเข้าไปจับกับสารชีวโมเลกุล และป้องกันไม่ให้ออกซิเจนเกิด อนุมูลอิสระ (reactive species) ร่างกายจะได้รับสารต้านออกซิเดชันจากที่ต่างๆ ไม่ว่าจะเป็นสมบัติการต้านออกซิเดชันที่อยู่ภายในเนื้อเยื่อ เช่น เอนไซม์ และสมบัติการต้านออกซิเดชันที่ได้จากการรับประทานอาหารเข้าไป ซึ่งเชื่อว่าสามารถควบคุมการทำงานของสารที่เกิดจากออกซิเจนที่ว่องไวต่อการเกิดปฏิกิริยาได้ (Azzi et al., 2004) มีข้อมูลว่าการขาดสมดุลระหว่างสารต้านออกซิเดชันที่ได้รับเข้าและสารต้านออกซิเดชันร่างกายต้องการนั้น ส่งผลให้มนุษย์ป่วยเป็นโรคต่างๆ ได้ (Benzie, 2003)

สมบัติการต้านออกซิเดชันสามารถแบ่งออกได้เป็น 2 ประเภท คือ ชนิดที่เป็นเอนไซม์และชนิดที่ไม่เป็นเอนไซม์ สมบัติการต้านออกซิเดชันบางชนิดมาจากการผลิตขึ้นในเนื้อเยื่อ เช่น เอนไซม์ สารโมเลกุลเดี่ยว และเอนไซม์โคแฟคเตอร์ ในส่วนของสารต้านอนุมูลชนิดที่ไม่เป็นเอนไซม์นั้น อาจจะได้รับมาจากแหล่งอาหารต่างๆ ซึ่งโดยส่วนใหญ่ก็จะเป็นสารในกลุ่มพอลีฟีนอล (Liu, 2004)

2.2.1 สารต้านออกซิเดชันชนิดที่เป็นเอนไซม์

สารต้านออกซิเดชันชนิดที่เป็นเอนไซม์ ได้แก่ ซูเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเตส (superoxide dismutase; SOD), คาแทเลส(catalase ; CAT), กลูตะไธโอน เพอร์ร็อคซิเดส (glutathione peroxidase ; GPx)กลูตะไธโอนรีดัคเตส (glutathione reductase ; GRe), กลูตาไธโอน เอส ทรานสเฟอเรส (glutathione Stransferase ;GST) และ ฮีมออกซิเจนเอส 1 (heme oxygenase 1 ;HO-1)

SOD และ CAT มีความสามารถสูงในการเข้าทำปฏิกิริยากับ ROS โดยที่ SOD แบ่งถูกจะออกได้เป็น 3 ชนิดในร่างกาย ได้แก่ CuZn-SOD อยู่ในไซโตซอล, Mn-SOD อยู่ในไมโทคอนเดรีย และ SOD ที่อยู่ภายนอกเซลล์ SOD ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาไม่ให้ออกซิเจนเกิดซุปเปอร์ออกไซต์และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์และจะพบ SOD ได้มากในสิ่งมีชีวิตที่เป็นยูคาริโอต และโปรคาริโอต ส่วน CATจะพบได้มากมายในร่างกาย ซึ่งจะทำงานได้ดีในตับ เซลล์เม็ดเลือดแดงและปอด ตามลำดับ CAT

จะปกป้องเซลล์ด้วยการกระตุ้นไม่ให้ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เข้าไปเปลี่ยนออกซิเจนในโมเลกุล (Sunil and Ignacimuthu, 2011)

GPx และ GRe มีบทบาทสำคัญในกระบวนการย่อยสลาย ไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ และกระบวนการขับสารพิษของ metabolic peroxide และไฮโดรเปอร์ออกไซด์ที่เกิดขึ้นภายในสิ่งมีชีวิต ซึ่งจะร่วมมือกันผลิตกลูต้าไทโอนให้อยู่ในรูปรีดิวซ์ กลายเป็นสมบัติการต้านออกซิเดชันที่มีประสิทธิภาพ GST มีหน้าที่เป็นเหนี่ยวนำในกระบวนการขับสารพิษของสาร alkylating และสารออกซิไดซ์ GPx GRe และ GST ได้มีรายงานออกมาถึงความสามารถในการลดแอลกอฮอล์เมื่อทดสอบในหนูและจะมีประสิทธิภาพมาขึ้นเมื่อทดสอบร่วมกับสารประกอบฟีนอลิก ผลิตอนุมูลอิสระออกมา อย่างไรก็ตาม CAT ก็สามารถเป็นสารประกอบที่มีพิษได้ เช่น แอลกอฮอล์ กรดฟอร์มิค ฟอร์มาลดีไฮด์ และฟีนอลในปฏิกิริยาเปอร์ออกซิเดชัน โดยที่ CAT ที่เป็นสารประกอบที่มี พิษนี้จะพบได้ในไมโตคอนเดรีย ที่เป็นแหล่งผลิตและเป็นเป้าหมายหลักของ ROS การที่ไมโทคอนเดรียผลิต ROS และสารอนุมูลอิสระมากเกินไป ส่งผลให้ Mn-SOD แสดงออกมากขึ้น เมื่อเกิด oxidative stress มากจะทำให้ยีนเกิดการแสดงออกของ Mn-SOD เป็นกลไกในการป้องกันตัวเองทำให้เกิดการทำลายไมโทคอนเดรียได้น้อยลง (Eliza et al., 2010)

HO-1 มีความสำคัญในกระบวนการทำงานของอวัยวะต่างๆ ในร่างกาย อย่างเช่น การนำเอาเหล็กกลับมาใช้ใหม่ในช่วงที่มีการสร้างเซลล์เม็ดเลือดแดงและการตอบสนองต่อความเครียด เช่น ภาวะเลือดมีออกซิเจนน้อย HO-1 ก็มีส่วนร่วมในการต้านความเครียดของกระบวนการทำงานของอวัยวะต่างๆ ในร่างกายเช่นเดียวกัน รวมทั้งเป็นสมบัติการต้านออกซิเดชันและต้านการอักเสบ สารที่มีประโยชน์เหล่านี้คือ สารสื่อกลางที่เกิดจากการผลิตของ HO-1 และปรับปรุงให้เนื้อเยื่อของเซลล์ที่รอดตายและมีการพัฒนาให้มีความจำเพาะมากขึ้น (Morse et al., 2009) นักวิทยาศาสตร์ส่วนใหญ่ต่างมุ่งให้ความสำคัญไปความหลากหลายของผลผลิตที่เกิดจากการย่อยสลายและการเสื่อมสภาพโดย HO-1 ในฮีมโดยเฉพาะอย่างยิ่งคาร์บอนมอนอกไซด์ (carbon monoxide) และบิลิเวอร์ดิน (biliverdin) ที่จะแสดงออกในโมเลกุลบิลิเวอร์ดินถือเป็นสารที่มีความสามารถในการต้านการอักเสบและมีศักยภาพเป็นสมบัติการต้านออกซิเดชัน (Szabo et al., 2004)

2.2.2 สารต้านออกซิเดชันชนิดที่ไม่เป็นเอนไซม์

มนุษย์ไม่สามารถสร้างวิตามินซีขึ้นมาเองได้ ดังนั้นจึงได้รับจากการรับประทานอาหารเท่านั้น นอกเหนือจากวิตามินซีแล้วสมบัติการต้านออกซิเดชันชนิดอื่นๆ เช่น วิตามินอี แคโรทีนอยด์ และพอ

ลีฟีนอล ต่างก็ได้รับมาจากแหล่งภายนอกต่างๆ และเป็นสารหลักที่มีส่วนช่วยให้มนุษย์มีสุขภาพที่ดี มีการคาดคะเนไว้ว่าการเปลี่ยนแปลงการใช้ชีวิตประจำวัน รวมทั้งการปรับเปลี่ยนการรับประทานอาหารนั้น ส่งผลให้สมบัติการต้านออกซิเดชันเข้าไปกีดขวางการเกิดมะเร็งได้มากกว่า 2-3 ชนิดในมนุษย์ โดยสมมติแล้วการเกิดกลไกเพื่อป้องกันการเกิดโรค รวมทั้งการปรับปรุงเอนไซม์ให้ดีขึ้นในกระบวนการขับสารพิษและการยับยั้งไม่ให้เกิดการเข้าจับโมเลกุลโดยสมบัติการต้านออกซิเดชันที่ได้จากธรรมชาติ (Samaranayaka and Li-Chan, 2011)

2.3 การวิเคราะห์ความสามารถต้านออกซิเดชัน

2.3.1 DPPH radical scavenging assay

วิธีนี้ถูกใช้อย่างกว้างขวาง โดยเป็นการวิเคราะห์ความสามารถในการจับกับ/ยับยั้งอนุมูลอิสระชนิด DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) โมเลกุลของอนุมูลอิสระชนิด DPPH มีลักษณะเป็นอนุมูลอิสระที่มีความเสถียร ซึ่งมีลักษณะพิเศษคือ ละลายในเอทานอลจะมีสีม่วงและดูดกลืนแสงได้ที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร เมื่อสารละลาย DPPH เข้าทำปฏิกิริยากับสารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ จะให้ไฮโดรเจนอะตอมแก่อนุมูลอิสระและเปลี่ยนให้อยู่ในรูปรีดิวซ์ ทำให้จากสีม่วงของอนุมูลอิสระชนิด DPPH จะจางลง ดังนั้นการวิเคราะห์นี้จึงประเมินความสามารถของสารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสังเกตได้จากการเปลี่ยนแปลงของค่าการดูดกลืนแสงที่ลดลง นอกจากนี้วิธีนี้ยังเป็นวิธีที่ง่ายต่อการวิเคราะห์ รวดเร็วและมีราคาถูกเมื่อเทียบกับการวิเคราะห์อื่นๆ (Mishra et al., 2012)

2.3.2 ABTS radical scavenging assay หรือ TEAC assay

Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) คือ การตรวจวัดความสามารถในการยับยั้งของสมบัติการต้านอนุมูลอิสระจากค่าการดูกลืนแสงของ 2,2-azinobis (3 ethylbenzothiazoline-6sulphonate) radicals (ABTS) ABTS ละลายในเอทานอล และน้ำ มีค่าการดูดกลืนแสงสูงถึง 734 นาโนเมตร โดยการทดลองนี้วิเคราะห์ความสามารถรวมของสารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยการไม่มีสีของ ABTS radicals ซึ่งเกี่ยวข้องกับการสร้าง ABTS ให้มีโครงสร้างที่ทำให้มองเห็นเป็นสี จากการเกิดออกซิเดชันของ ABTS และ potassium –persulfate การวิเคราะห์นี้สามารถประยุกต์เข้าได้กับสารประกอบ lipophilic และ hydrophilic สารละลาย ABTS ที่เจือจางแล้ว จะทำการวิเคราะห์ได้หลังจากผ่านไป 120 นาที ที่มีการผสมเข้ากับสารสกัดที่ความเข้มข้นต่างๆ ในขั้นตอนแรก trolox เป็นแอนาลอกของวิตามินอีที่สามารถละลายน้ำได้โดยทั่วไปก็จะใช้ trolox ในการวัดเทียบค่า (Maisuthisakul et al., 2007)

2.3.3 superoxide radical scavenging assay

superoxide radical scavenging assay (Nakamura *et al*, 1998) อาศัยหลักการทำงานของเอนไซมแซนทีนออกซิเดส (xanthine oxidase) ในการทำให้ไฮโพแซนทีน (hypoxanthine) ให้เป็นแซนทีน (xanthine) และมีการปล่อยอนุมูลอิสระชนิดซุปเปอร์ออกไซด์ออกมา ซึ่งจะสามารถไปทำปฏิกิริยากับสาร nitro blue tetrazolium (NBT) ได้สีน้ำเงิน จะสามารถวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ช่วงความยาวคลื่นแสงที่ 560 นาโนเมตร

2.3.4 hydroxyl radical scavenging assay

hydroxyl radical scavenging assay (Schleriser *et al*., 2002) โดยอาศัยหลักการสร้างสารอนุมูลอิสระชนิดไฮดรอกซิลด้วยระบบที่ประกอบด้วยดีออกซิไรโบส (deoxyribose), เฟอร์ริกคลอไรด์ ($FeCl_3$), กรดแอสคอร์บิก (ascorbic acid), ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) และสารตัวอย่างที่เตรียมไว้ข้างต้น จากนั้นจะทำการตรวจวัดสารด้วย Thiobarbituric acid (TBA) ในสภาพกรดที่ได้จากการต้มที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส นาน 20 นาทีจะทำให้เกิดสีชมพูที่วัดการดูดกลืนแสงได้ที่ช่วงความยาวคลื่น 532 นาโนเมตร

2.3.5 ferric reducing antioxidant power assay

ferric reducing antioxidant power assay (Griffin and Bhagooli, 2004) เป็นเทคนิคที่ใช้วัดความสามารถรวมของสมบัติการต้านออกซิเดชันที่สามารถรีดิวซ์เหล็ก ferric ได้ โดยพื้นฐานของการวิเคราะห์นี้คือการเกิดปฏิกิริยารีดักชันของโครงสร้างเชิงซ้อนระหว่างเหล็กและ 2,4,6-Tris(2-pyridyl)-s-triazine (TPTZ) เกิดเป็นสารสีน้ำเงินเมื่ออยู่ในรูป ferrous ในสภาวะที่เป็นกรด ซึ่งไม่เกี่ยวข้องกับค่า pH ในร่างกาย ข้อดีของการทดลองนี้คือ ง่าย และไม่จำเป็นต้องใช้อุปกรณ์พิเศษ ซึ่งการเกิดปฏิกิริยารีดักชั่นนี้ สามารถวัดได้จากการเปลี่ยนแปลงของค่าการดูดกลืนแสงที่ 593 นาโนเมตร

2.3.6 Reducing power method.

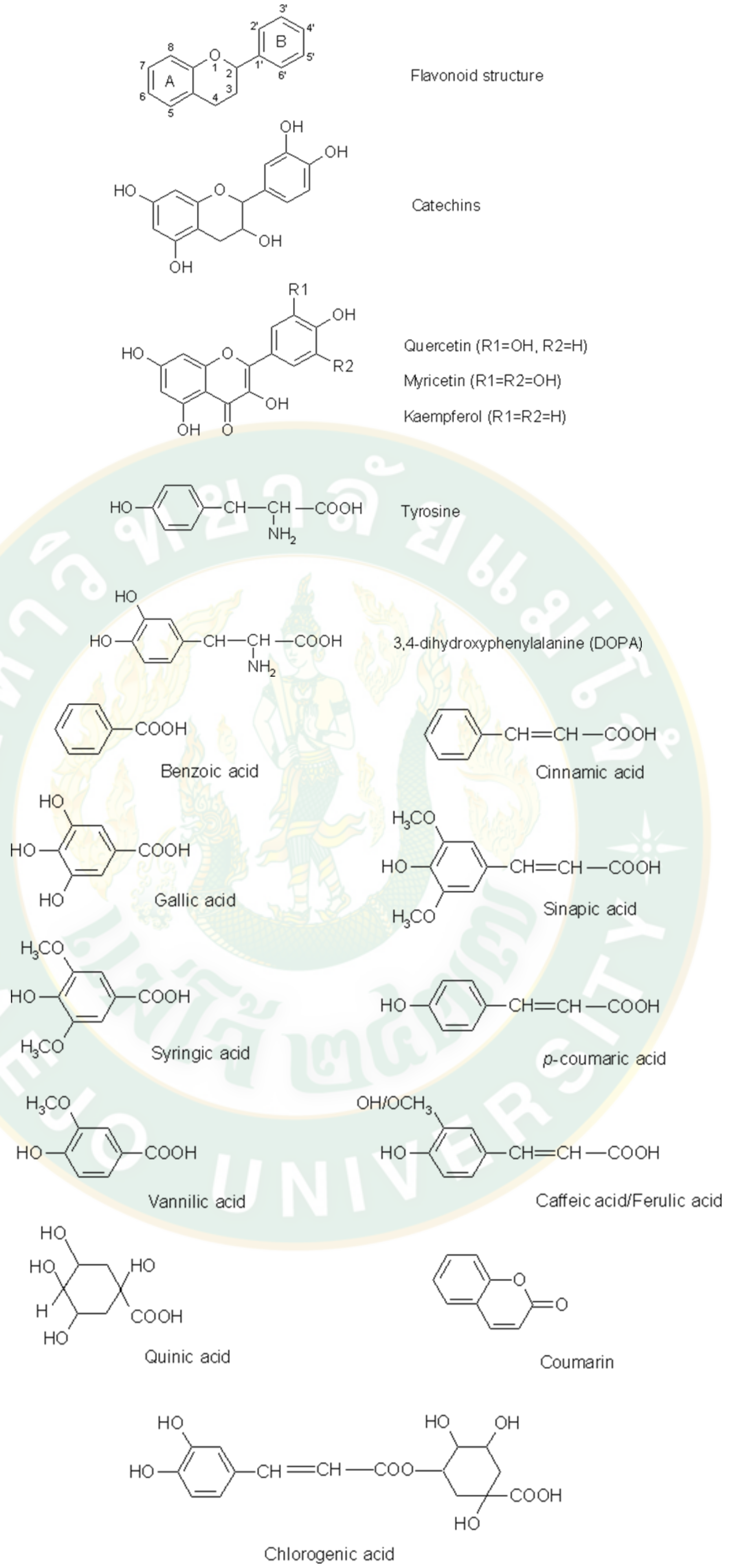
Reducing power method (Qingming *et al*., 2010)เป็นหลักการพื้นฐานของการเปลี่ยนแปลงค่าการดูดกลืนแสงของปฏิกิริยารวมของการเปลี่ยนรูปจาก Fe^{3+} ไปเป็น Fe^{2+} ในการทดลองนี้สมบัติการต้านอนุมูลอิสระจะอยู่มาตรฐานในรูปสารเชิงซ้อนที่มีสีกับ potassium ferricyanide, trichloro acetic acid และ ferric chlorideซึ่งจะวิเคราะห์ได้ที่ความยาวคลื่น 700

นาโนเมตร จะแสดงผลของสารรีดิวซ์ที่เข้าไปเปลี่ยน Fe^{3+}(ferric cyanide complex) เป็น Fe^{2+} (Perl's Prussian blue formation) ค่าการดูดกลืนแสงที่เปลี่ยนไปจะแสดงให้เห็นถึงความสามารถในการเป็นสารรีดิวซ์ของตัวอย่าง

2.4 สารประกอบฟีนอลิก (phenolic compounds)

สารประกอบฟีโนลิกเป็นกลุ่มสารทุติยภูมิที่พบได้ทั่วไปในผัก ผลไม้ไวน์ชา น้ำ มันมะกอก และช็อคโกแลตเป็นต้น สารประกอบฟีโนลิกส่วนใหญ่จะพบในรูปอนุพันธ์และหรือไอโซเมอร์ของฟลาโวนส์ไอโซฟลาโวนส์ ฟลาโวนอลส์คาร์ทิชิน และกรดฟีโนลิก สารเหล่านี้มีฤทธิ์หลายอย่างเช่น ต้านการเกิดสภาวะออกซิเดชัน ป้องกันการเกิดโรคมะเร็งต่างๆ เช่น มะเร็งเต้านม มะเร็งหลอดอาหารมะเร็งผิวหนัง มะเร็งลำ ไส้มะเร็งต่อมลูกหมาก และมะเร็ง ตับ (Losso et al., 2004) เป็นต้น สามารถนำมาใช้ประโยชน์ทางยา โดยเป็นสารประกอบที่มีฤทธิ์ต้านสารก่อมะเร็ง ต้านภาวะการอักเสบต่างๆ และช่วยปรับระบบภูมิคุ้มกัน สามารถกำ จัดอนุมูลอิสระและโครงสร้างมีความเสถียรสามารถป้องกันการเกิดออกซิเดชันของกรดลิโนเลอิก (linoleicacid)และ ไขมันที่ความหนาแน่นต่ำ (low-density lipoprotein ; LDL) ป้องกันเนื้อเยื่อและดีเอนเอจากการถูกทำ ลายด้วยปฏิกิริยาออกซิเดชัน

สารประกอบฟีนอลิกเป็นอนุพันธ์ของเบนซินที่มีหมู่ไฮดรอกซิลต่ออยู่เป็นหลัก และอาจมีหมู่แทนที่ต่างๆ แทนที่ในตำแหน่งออโท (Orto) เมตา (Meta) หรือพารา (Para) ได้อีก (Chrzanowski *et al*., 2007) สารประกอบฟีนอลิกพื้นฐานคือฟีนอล ประกอบไปด้วยวงแหวนเบนซิน 1 วง และหมู่ไฮดรอกซิล 1 หมู่ เป็นผลึกรูปเข็ม ไม่มีสี เมื่อโดนอากาศจะมีสีชมพูอ่อน ๆ สารประกอบฟีนอลิกละลายได้ในกลีเซอรอล คาร์บอนไดซัลไฟด์ แอลกอฮอล์ อีเธอร์และคลอโรฟอร์ม พบได้ในพืช ผักและผลไม้ทั่วไป ดังโครงสร้างทางเคมีของสารประกอบฟีนอลิกชนิดต่างๆ แสดงดังภาพที่ 2



ภาพที่ 2 โครงสร้างของสารประกอบฟีนอลิกชนิดต่างๆ

ที่มา Betti *et al.*,(1983)

MAEJO UNIVERSITY

สารประกอบฟีนอลิกอาจแบ่งออกได้เป็น 3 กลุ่มใหญ่ ๆ คือ (Hertog และ Katan, 1998; Newmark et al., 1996; Agarwal และ Mulkhtar, 1996)

(1) Simple Phenols/Phenolic Acid และอนุพันธ์เช่น กรดแกลลิก, กรดเอลลาจิก, กรดแทนนิก, วานิลลิน, แคทีคอล, รีซอร์ซินอล และ กรดซาลิไซลิก เป็นต้น สารกลุ่มนี้พบได้ใน ผลไม้หลายชนิด เช่น ราสเบอร์รี่ และแบลคเบอรี่

(2) เฟนนิลโพรพานอยด์ ได้แก่ สารประกอบฟีนอลิกที่ Aromatic Ring มี Three-Carbon Side Chain เกาะอยู่ แยกย่อยออกได้หลายกลุ่มได้แก่ กรดไฮดรอกซีซินนามิก กรดเฟรูลิก, กรดคาเฟอิก หรือ กรดคูมาริค, คูมาริน, อัมเบลลิเฟอโรน, สโคโปเลติน, เอสคูเลทิน หรือ ซอราเลน, ลิกแนน, ยูเจนอล หรือมริสทิซิน พบได้ใน แอปเปิ้ล แพร์และกาแฟ

(3) ฟลาโวนอยด์ เป็นกลุ่มสำคัญของสารประกอบฟีนอลิก ได้แก่สารที่มีสูตร โครงสร้างเป็น C-6C-3C แยกย่อยออกได้เป็นหลายกลุ่มได้แก่ แคทีชิน, โปรแอนโธไซยานิดินส์, แอนโทไซยานิน, Flavones, ฟลาโวนอยด์, ฟลาวาโนน และ ไอโซฟลาโวน คุณสมบัติที่ได้รับความสนใจอย่างมากในปัจจุบันของสารประกอบฟีนอลิกคือการเป็นสารต้านออกซิเดชัน และสารต้านการกลายพันธุ์ ซึ่งเกิดจากอนุมูลอิสระ และการใช้สารประกอบฟีนอลิกในการป้องกันโรคต่าง ๆ โดยเฉพาะโรคหัวใจขาดเลือด และมะเร็ง โดยสารประกอบฟีนอลิกจะทำหน้าที่กำจัดอนุมูลอิสระและอิออนของโลหะที่สามารถเร่งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมันและโมเลกุลอื่น ๆ ด้วยการให้อะตอมไฮโดรเจนแก่อนุมูลอิสระอย่างรวดเร็ว เมื่ออนุมูลอิสระเพอร์ออกซิล (peroxy radical; $ROO^{\bullet}$) alkoxy radical $RO^{\bullet}$ คือ free radicals, PPH คือ polyphenolic compound เมื่อสารประกอบฟีนอลให้อะตอมไฮโดรเจนแก่อนุมูลอิสระไปแล้ว อนุมูลอิสระของสาร ประกอบฟีนอลิกจะค่อนข้างมีเสถียรภาพ ดังนั้นจึงไม่ทำปฏิกิริยาอื่นต่อไป ยิ่งไปกว่านั้นอนุมูลอิสระของสาร ประกอบฟีนอลิกบางชนิดยังคงสามารถรวมตัวกับอนุมูลอิสระอื่นได้อีกด้วย จึงทำให้สารประกอบฟีนอลิกเหล่านั้นลดจำนวนอนุมูลอิสระลงได้ถึง 2 เท่า

2.4.1 การหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (determination of total phenolics)

หลักการการหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด คือ เป็นการวัดปริมาณความเข้มข้นของสารประกอบทั้งหมดที่มีหมู่ไฮดรอกซิลที่อยู่ในโมเลกุล โดยไม่คำนึงถึงน้ำหนักโมเลกุลของสารประกอบฟีนอลิกนั้นๆ ดังนั้นการวิเคราะห์โดยวิธีนี้จึงไม่มีการระบุชนิดและโครงสร้างของสารประกอบฟีนอลิกที่มีอยู่ในสารตัวอย่าง การวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกด้วยวิธีโฟลิน-ชิโอแคลตู

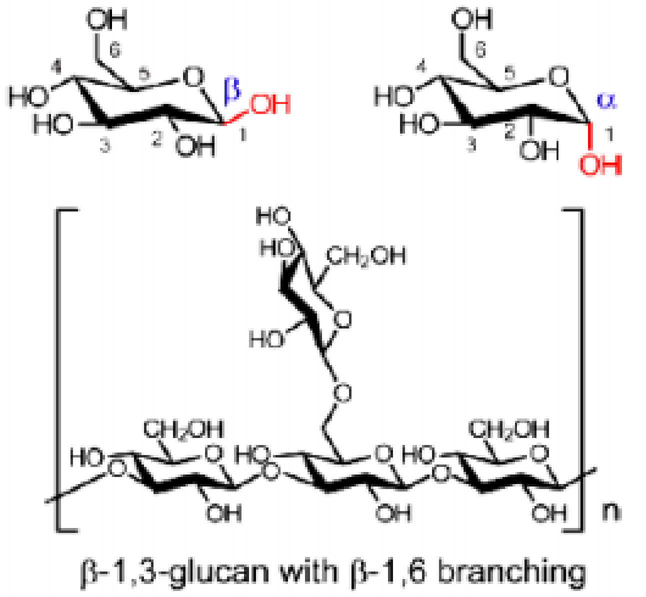
(Folin-Ciocalteu) โดยใช้การแตกตัวของสารประกอบฟีนอลิกเป็นโปรตอนและไอออนลบของฟีนอเลท ซึ่งไอออนลบจะไปรีดิวซ์สารละลายโฟลิน-ซิโอแคลตูได้เป็นสารละลายสีน้ำเงิน การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด จึงเป็นการวัดความสามารถของการรีดิวซ์ในลักษณะเดียวกับการวิเคราะห์สมบัติการต้านออกซิเดชัน การศึกษาส่วนใหญ่จึงพบความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงระหว่างฤทธิ์ต้านออกซิเดชันกับปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด อย่างไรก็ตาม ยังมีสารชนิดอื่นที่ไม่ใช่ฟีนอลิก เช่น น้ำตาลอะโรเมติกเอมีน กรดแอสคอร์บิก กรดอินทรีย์ และอื่น ๆ อีกมาก ที่สามารถรีดิวซ์สารละลายโฟลิน-ซิโอแคลตูได้สีน้ำเงินเช่นเดียวกัน โดยทั่วไปมักใช้กรดแกลลิก (gallic acid) เป็นสารมาตรฐานแล้วรายงานอยู่ในรูปของสมมูลของกรดแกลลิกในหน่วยของมิลลิกรัม/กรัมตัวอย่าง เนื่องจากกรดแกลลิกเป็นสารประกอบฟีนอลิกชนิดหนึ่ง ที่พบได้ทั่วไปในพืชเกือบทุกชนิด ได้แก่ ชา เบอรี่ เห็ด (Wei et al., 2004) อย่างไรก็ตามอาจมีการใช้สารประกอบฟีนอลิกชนิดอื่นเป็นสารมาตรฐานก็ได้ ตัวอย่างเช่น กรดแทนนิก กรดเฟอรูลิก

สำหรับชนิดของสารประกอบฟีนอลิกที่พบในเห็ดถั่งเช่าสีทอง ได้แก่ กรดแกลลิก กรดพาราไฮดรอกซีเบนโซอิก และกรดซินนามิก โดยพบในปริมาณ 0.02 และ 0.11 มิลลิกรัม/100 กรัม ตามลำดับ (Carneiro et al., 2013) เพื่อแยกและวิเคราะห์หาโครงสร้างของโมเลกลุ ต่อไป การศึกษาองค์ประกอบของสารสำคัญของสารสกัดจากพืชต่างๆ นิยมใช้สารประกอบกรดฟีนอลิก เป็นสารมาตรฐานเทียบภายในเพื่อประยุกต์ใช้กับ เทคนิค High Performance Liquid Chromatography (HPLC) โดยทั่วไปสามารถเลือกใช้สารมาตรฐานเช่น กรดไฮดรอกซีฟีนิลอะซิติก, กรดพีคูมาริก, กรดแกลลิก เป็นต้น(Oke and Aslim, 2011) ซึ่งทั้งหมดจัดเป็นสารอยู่ในกลุ่มของ อนุพันธ์ของกรดไฮดรอกซีเบนโซอิก และกรดแกลลิก จัดเป็นสารได้รับความนิยมในการใช้เป็นสารมาตรฐาน

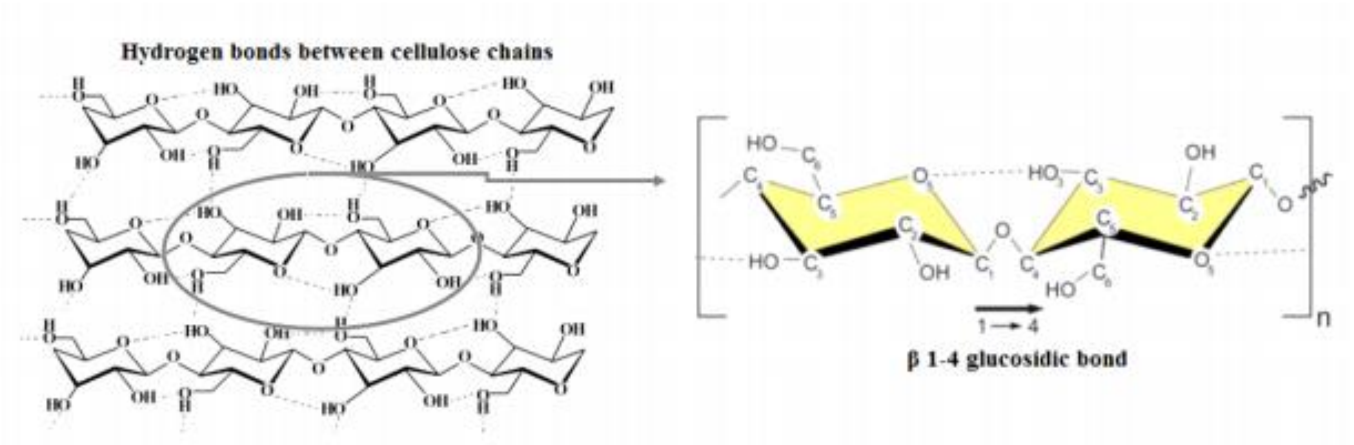
2.5 พอลิแซคคาไรด์

พอลิแซคคาไรด์เป็นคาร์โบไฮเดรตเชิงซ้อน ได้จากน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวต่อกันด้วยพันธะไกลโคซิดิก น้ำตาล โมเลกุลเดี่ยวมีหลายชนิด ได้แก่ กลูโคส ฟรุคโตส กาแลคโตส แมนโนส ไซโลส อะราบิโนสแต่องค์ประกอบส่วนใหญ่จะเป็นกลูโคส ตัวอย่างพอลิแซคคาไรด์ที่พบมีชื่อเรียกแตกต่างกัน เช่น สตาร์ช เป็นอาหารสะสมในเซลล์พืช ประเภทธัญพืช ไกลโคเจน เป็นอาหารสะสมในเซลล์สัตว์ เซลลูโลส เป็นโครงสร้างของผนังเซลล์พืช ไคตินเป็นโครงสร้างของผนังเซลล์ของเห็ดและสัตว์ในเปลือกหอย ปู กุ้งและแมลง เป็นต้น

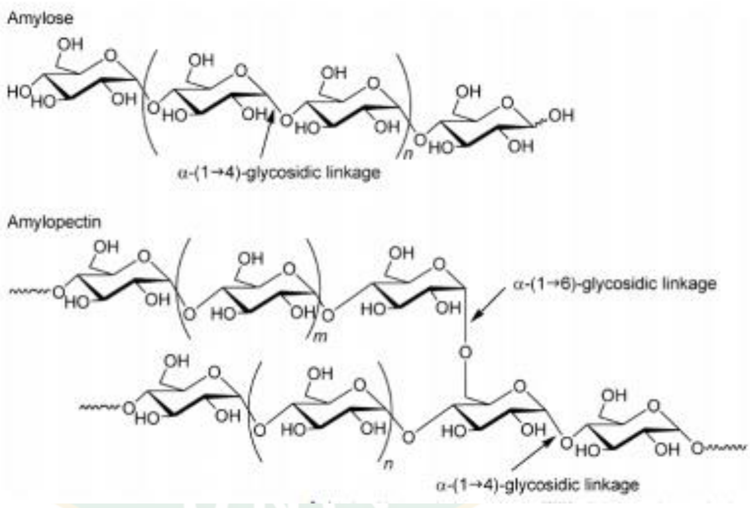
โครงสร้างของพอลิแซคคาไรด์จะแตกต่างกันตามแหล่งที่มา เช่น พอลิแซคคาไรด์จากเห็ดมีโครงสร้างพื้นฐานดังภาพที่ 3 ลักษณะโครงสร้างพื้นฐานเป็นพอลิเมอร์ของกลูโคส คือเป็นสายโซ่ตรงของน้ำตาลกลูโคส โดยกลูโคสแต่ละโมเลกุลเชื่อมต่อกันที่ตำแหน่ง C1 และ 3 ต่อกันด้วยพันธะไกลโคซิดิกชนิด β-1,3 เรียกพอลิแซคคาไรด์กลุ่มนี้ว่า เบต้า-ดี-กลูแคน โครงสร้างพื้นฐานของพอลิแซคคาไรด์จากเห็ดแตกต่างจากพอลิแซคคาไรด์ที่เป็นส่วนประกอบของผนังเซลล์พืชซึ่งมีโครงสร้างพื้นฐานเป็นพอลิเมอรของกลูโคสต่อกันด้วยพันธะไกลโคซิดิกชนิด β-1,4 ดังภาพที่ 4 พอลิแซคคาไรด์จากธัญพืชประเภทแป้งประกอบด้วยอะมิโลสและอะมิโลเพคติน โดยอะมิโลสมีโครงสร้างสายโซ่ตรงของกลูโคสต่อกันด้วยพันธะไกลโคซิดิกชนิด α-1,4 สวนโครงสร้างของอะมิโลเพคติน ประกอบด้วยสายโซ่ตรงของกลูโคสต่อกันด้วยพันธะไกลโคซิดิกชนิด α-1,4 และมีสายโซกิ่งของสายโซตรงกลูโคสที่มีจำนวนกลูโคส 15-45 โมเลกุลต่อตรง C6 ด้วยพันธะไกลโคซิดิกชนิด α-1,6 ดังภาพที่ 5



ภาพที่ 3 โครงสร้างพื้นฐานของพอลิแซคคาไรด์จากเห็ด (เบต้า-ดี-กลูแคน; β – D - glucan)
ที่มา: Friedman (2016)



ภาพที่ 4 โครงสร้างพอลิแซคคาไรด์ของผนังเซลล์พืช (เซลลูโลส, cellulose)
ที่มา: Nakhawatchana *et al*. (2020)



ภาพที่ 5 โครงสร้างพอลิแซคคาไรด์ของสตาร์ชจากธัญพืช
ที่มา: Nakhawatchana *et al*. (2020)

2.5.1 พอลิแซคคาไรด์ในเห็ด

เป็นส่วนประกอบสำคัญของผนังเซลล์เห็ดซึ่งแตกต่างกันตามชนิดของเห็ดเป็นสารอาหารประเภทคาร์โบไฮเดรต ในเห็ดประกอบด้วย คาร์โบไฮเดรตประมาณร้อยละ 2-7 (Yue et al., 2013)

ในอาณาจักรเห็ดรา พอลิแซคคาไรด์เป็นสารที่ออกฤทธิ์ ทางชีวภาพ โดยมีอนุพันธ์ต่างๆ ตัวอย่างเช่น ในเห็ดถั่งเช่าสีทองส่วนประกอบของพอลิแซคคาไรด์จากส่วนดอก และเส้นใยมีปริมาณประมาณร้อยละ 3 ถึง 8 ของน้ำหนักแห้งทั้งหมด (Yue et al., 2013) รายงาน อื่นๆ พบพอลิแซคคา

ไรด์สกัด มีส่วนประกอบของน้ำตาลดี-กาแล็กโทส, แอล-แอระบิโนส, ดี-ไซโลส, แอล-แรมโนส และกรดดี-กาแลกตูโรนิก และเมื่อสกัดส่วนของกลูโคกาแลกโตแมนแนนที่สกัดบริสุทธิ์ด้วยเบส พบน้ำตาลชนิดแมนโนส ร้อยละ 56.7 กาแล็กโทสร้อยละ 34.5 และกลูโคสร้อยละ 8.8 ของ น้ำหนักแห้ง (Ohta et al., 2007; Yan et al., 2008) ในเห็ดถั่งเช่าพบทรีฮาโลสร้อยละ 3 แมนนิทอลร้อยละ 9 และพอลิแซคคาไรด์ร้อยละ 3-8 ของน้ำหนักแห้ง (Li et al., 2006; Wang et al., 2009) ซึ่งคุณสมบัติทางชีวภาพจะสัมพันธ์กับปัจจัยต่างๆ เช่น ขนาดโมเลกุล ชนิดและสัดส่วนองค์ประกอบของน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว โครงสร้าง ตำแหน่งและการต่อกันของ พันธะไกลโคซิดิกร่วมกับลำดับของน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว (Luo et al., 2017; Zhao et al., 2014)

จากการวิจัยพบว่าเห็ดแต่ละชนิดมีปริมาณและ ชนิดของพอลิแซคคาไรด์ไม่เหมือนกัน พอลิแซคคาไรด์ที่พบในเห็ดส่วนใหญ่เป็นเบต้า-ดี-กลูแคนดังกล่าวแล้ว โดยปกติเบต้า-ดี-กลูแคนเป็นสารที่สามารถพบได้ทั่วไปในสิ่งมีชีวิตหลายชนิด เช่น ยีสต์ ข้าวโอ๊ต บาร์เลย์ ว่างหางจระเข้ และเห็ดบางชนิด เบต้า-ดี-กลูแคนในเห็ดสมุนไพรหลายชนิดมีสูตรโครงสร้างแตกต่างกัน โดยจะแตกต่างกันที่มีโมเลกุลของน้ำตาลโมเลกุลอื่น ๆ นอกจากน้ำตาลกลูโคส เช่น น้ำตาลแมนโนส และน้ำตาลกาแลคโตสร่วมด้วย หรือมีสายโซ่ของโมเลกุลน้ำตาลกลูโคสแยกโดยมีพันธะพันธะไกลโคซิดิก ที่ตำแหน่ง C1 และ 6 เชื่อมกับสายโซ่ตรงที่ตำแหน่งต่าง ๆ ขึ้นกับชนิดของเห็ด

2.5.2 ประโยชน์ของพอลิแซคคาไรด์จากเห็ดต่อร่างกาย

เห็ดสมุนไพรเป็นแหล่งพอลิแซคคาไรด์ที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพและฤทธิ์ทางยาที่หลากหลายสามารถรักษาโรคได้ จากการศึกษาพอลิแซคคาไรด์ในเห็ดที่รับประทานได้ส่วนมากไม่เป็นพิษ สามารถพัฒนาไปเป็นส่วนผสมอาหารฟังก์ชันและนูตราซูติคอลหรือเภสัชโภชนภัณฑ์ ส่งเสริมสุขภาพ บำบัดรักษาและป้องกันการเกิดโรคได้ พอลิแซคคาไรด์ในถั่งเช่าสีทองพบว่ามีในปริมาณร้อยละ 3-8 ของน้ำหนักเห็ดถั่งเช่าแห้ง (Wen *et al*., 2006) พอลิแซคคาไรด์จากเห็ดมีประโยชน์ต่อร่างกายดังนี้

2.5.2.1 ต้านออกซิเดชัน ได้แก่ จับกับอนุมูลอิสระ สารสกัดพอลิแซคคาไรด์จากเห็ดถั่งเช่าสีทองมีความสามารถในการจับกับอนุมูลอิสระที่ดี ได้แก่ อนุมูล DPPH อนุมูลไฮดรอกซิล อนุมูลซูเปอร์ออกไซด์และอนุมูล $ABTS^{\bullet+}$ นอกจากนี้ยังมีความสามารถในการจับกับโลหะพวกเฟอรัสและรีดิวซ์เฟอริกได้ด้วย ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการทำงานของเอนไซม์ซูเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเตสและเอนไซม์กลูตาไธโอนเปอร์ออกซิเดส (Li *et al*., 2003; Chen *et al*., 2006) พอลิแซคคาไรด์จากเห็ดบางชนิด เช่น *Trocholoma lobayense* Heim สามารถจับกับ อนุมูล DPPH และอนุมูลซูเปอร์

ออกไซด์ได้ดีกว่าวิตามินซี (Liu *et al*., 2016) นอกจากนี้ยังพบว่าถ้าเป็นพอลิแซคคาไรด์ที่จับอยู่กับโปรตีนหรือเปปไทด์จะมีความสามารถในการต้านออกซิเดชันสูงกว่าที่ไม่ได้จับกับโปรตีนหรือเปปไทด์ด้วย (Huang *et al*., 2013; Sun *et al*., 2014) พอลิแซคคาไรด์ช่วยส่งเสริมการทำงานของเอนไซม์ที่ช่วยต้านออกซิเดชันในร่างกาย เช่น เอนไซม์คะตะเลส, เอนไซม์ซูเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเตส, เปอร์ออกซิเดส, เอนไซม์กลูตาไธโอนเปอร์ออกซิเดส นอกจากนี้ยังช่วยทางด้านช่วยลดปฏิกิริยาเปอร์ออกซิเดชันของลิปิด ส่งเสริมการสร้างและส่งเสริมการทำงานด้านกลืนกินของมาโครฟาจ ช่วยให้หัวใจทำหน้าที่ได้ดีขึ้นและช่วยบรรเทาความเสียหายจากการออกซิเดชันของร่างกาย (Wu *et al*., 2010; Fu *et al*., 2013)

2.5.2.2 ช่วยยับยั้งเนื้องอก โดยอาจมีบทบาทโดยตรงคือยังยั้งการเจริญของเซลล์เนื้องอกหรือมีบทบาทโดยอ้อมคือช่วยเสริมสร้างระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย และอาจมีบทบาทในการช่วยเสริมฤทธิ์การรักษาด้วยคีโม (Chen *et al*., 2006) และช่วยป้องกันการเกิดสารก่อกลายพันธุ์ ซึ่งอาจทำให้เกิดเนื้องอกและมะเร็งได้

2.5.2.3 ช่วยต้านการชรา ได้แก่ ทางด้านเมตาโบลิซึมและจุลินทรีย์ในลำไส้ ระบบภูมิคุ้มกันและความแก่ ต้านความเหี่ยวย่นของผิวหนัง

2.5.2.4 ช่วยต้านการอักเสบ การอักเสบเป็นกลไกการป้องกันตัวเองของร่างกาย โดยเมื่อเซลล์หรืออวัยวะเกิดการบาดเจ็บ ร่างกายจะหลั่งสารอักเสบออกมาเพื่อช่วยรักษาอาการบาดเจ็บดังกล่าว อย่างไรก็ตามถ้ามีการอักเสบเกิดมากเกินไปจะทำให้เกิดการอักเสบเรื้อรัง และสุดท้ายทำให้เกิดการเจ็บป่วยได้ เช่น การเกิดโรคมะเร็ง เป็นต้น สารพอลิแซคคาไรด์สามารถช่วยต้านการอักเสบได้โดยช่วยยับยั้งการสร้างสารอักเสบของร่างกาย ได้แก่ ทูเมอร์ เนคโครซิส แฟคเตอร์-อัลฟา tumor necrosisfactor-α, interleukin-1, interleukin-6, interleukin-8 และ monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) เป็นต้น นอกจากนี้ยังช่วยป้องกันการบาดเจ็บของเซลล์โดยกลไกการต้านออกซิเดชัน ช่วยยับยั้งการเกิดอนุมูลต่างๆ ที่เป็นพิษกับเซลล์ และช่วยกระตุ้นหรือเพิ่มประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ที่ยับยั้งการออกซิเดชันและจับกับอนุมูลอิสระ (Mingyi *et al*., 2019)

2.5.2.5 ช่วยเสริมสร้างระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย มีงานวิจัยที่พบว่าพอลิแซคคาไรด์จากเห็ดช่วยส่งเสริมการทำงานของแมโครฟาจให้สามารถจับและกลืนกินเชื้อโรค สารพิษและสิ่งแปลกปลอมต่างๆ ได้ดียิ่งขึ้น กระตุ้นการทำงานของ natural killer cells ช่วยการเจริญเติบโตของ

เซลล์ม้าม เพิ่มปริมาณสาร Th1 cytokines ช่วยส่งเสริมการสร้างสารอินเตอร์ลิวคินต่างๆ และอินเตอร์ฟีรอน ซึ่งเป็นสารที่เสริมสร้างภูมิคุ้มกันให้กับร่างกาย นอกจากนี้ยังพบว่าพอลิแซคคาไรด์จากเห็ดยังช่วยส่งเสริมการทำงานของต่อมไทมัสซึ่งเกี่ยวข้องกับภูมิคุ้มกันของร่างกาย

2.5.2.6 ช่วยต้านโรคเบาหวาน โดยช่วยในป้องกันความเสียหายของเบต้าเซลล์ของตับอ่อนเนื่องจากการที่ร่างกายมีอนุมูลอิสระมากเกินไป และช่วยการฟื้นฟูเบต้าเซลล์ของตับอ่อนจากความเสียหาย ช่วยเพิ่มการเผาผลาญน้ำตาลของร่างกาย ช่วยในการสร้างไกลโคเจนของร่างกาย ช่วยชะลอการเพิ่มระดับน้ำตาลในเลือดได้ร้อยละ 54.และช่วยเพิ่มระดับอินซูลิน 1 3.64 เท่าเมื่อเปรียบเทียบกับหนูทดลองตัวอย่างควบคุม(Choi *et al.*, 2016) นอกจากนี้ยังช่วยเพิ่มคอเลสเตอรอลชนิดความหนาแน่นสูงหรือคอเลสเตอรอลชนิดดี ลดคอเลสเตอรอลชนิดความหนาแน่นต่ำหรือคอเลสเตอรอลชนิดเลว ช่วยลดภาวะดื้ออินซูลินได้อีกด้วย

2.5.2.7 เป็นพรีไบโอติกส์ (prebiotics) พอลิแซคคาไรด์จากเห็ด ประกอบด้วยโมโนแซคคาไรด์มาเชื่อมต่อกันด้วยพันธะเบต้าไกลโคซิดิก ซึ่งร่างกายไม่สามารถย่อยได้ จึงมีคุณสมบัติเป็นเส้นใยอาหาร พอลิแซคคาไรด์จากเห็ดจะถูกย่อยโดยจุลินทรีย์ในลำไส้ใหญ่ได้กรดไขมันสายสั้นซึ่งเป็นแหล่งพลังงานให้กับร่างกาย ช่วยเพิ่มจำนวนแบคทีเรียที่มีประโยชน์ต่อร่างกายจึงสามารถจัดเป็นพรีไบโอติกส์ได้

2.5.2.8 ช่วยบำรุงตับ โดยช่วยป้องกันการเกิดเนื้อเยื่อพังผืดในตับโดยช่วยป้องกันไม่ให้คอลลาเจนมากเกาะที่ตับและป้องกันการเกิดออกซิเดชันของลิปิด ลดปริมาณมาลอนไดอัลดีไฮด์ป้องกันตับแข็ง ช่วยให้ตับทำงานได้ดีขึ้น เช่น เพิ่มความสามารถในการกำจัดสารพิษให้ตับ เป็นต้น เพิ่มจำนวนเอนไซม์กำจัดอนุมูลอิสระที่จะมาทำลายตับ เช่น เอนไซม์ซูเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเตส เป็นต้น ลดระดับเอนไซม์ ALT (alanine aminotransferase) และ AST (aspartate aminotransferase) ในเลือด ซึ่งถ้ามี ALT และ AST สูงแสดงว่าเซลล์ตับเกิดการบาดเจ็บหรืออักเสบ

2.5.2.9 ช่วยลดไขมันในเลือด เป็นการช่วยปกป้องหัวใจและตับ ลดคอเลสเตอรอลทั้งหมดและไตรกลีเซอไรด์ เพิ่มคอเลสเตอรอลชนิดลิโปโปรตีนชนิดที่มีความหนาแน่นสูงและมีบทบาทในการช่วยลดระดับน้ำตาลในเลือดด้วย

2.5.2.10 ลดระดับน้ำตาลในเลือด โดยช่วยส่งเสริมการทำงานของเอนไซม์ ได้แก่ กลูโคไคเนส เฮกโซไคเนสและกลูโคส-6 ฟอสเฟต ดีไฮโดรจีเนสเป็นต้น ช่วยลดไตรกลีเซอไรด์และคอเลสเตอรอลในเลือด ลดการใช้น้ำตาลของเนื้อเยื่อไขมัน

2.5.3 ปัจจัยที่มีผลต่อสมบัติของพอลิแซคคาไรด์สกัดจากเห็ด

2.5.3.1 องค์ประกอบและโครงสร้างของพอลิแซคคาไรด์ พอลิแซคคาไรด์จะประกอบด้วยน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว ซึ่งชนิดและปริมาณน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวที่มีตามธรรมชาติของเห็ดแต่ละชนิดจะมีผลต่อความสามารถในการต้านออกซิเดชันของพอลิแซคคาไรด์จากเห็ด ตัวอย่างเช่น จากงานวิจัยของ Zhang *et al*. (2018) พบว่าน้ำตาลอะราบิโนสและกาแลคโตสช่วยเพิ่มความสามารถในการจับกับอนุมูล DPPH น้ำตาลไซโลสช่วยเพิ่มค่าความสามารถในการรีดิวซ์อิออนของเหล็กชนิดเฟอริก น้ำตาลกลูโคสช่วยเพิ่มความสามารถในการต้านออกซิเดชัน เป็นต้น

Cheung *et al.* (2012) พบว่าการที่มีโปรตีนในพอลิแซคคาไรด์สกัดมีบทบาทในการเพิ่มความสามารถในการต้านออกซิเดชันจากพอลิแซคคาไรด์ที่สกัดจากเห็ด โดยได้สกัด วิธีคือ 2 ใช้น้ำร้อน(hot water extraction; HWE) และใช้อัลตราโซนิค (ultrasound-assisted extraction; UAE) พบว่าใช้อัลตราโซนิคมีความสามารถในการต้านออกซิเดชันสูงกว่าและมีปริมาณโปรตีนสูงกว่า ดังตารางที่ 1 แสดงปริมาณโปรตีนในสารสกัดทั้ง 2 แบบ ซึ่งการใช้อัลตราโซนิคทำให้โปรตีนในสารสกัดเพิ่มขึ้นในช่วงร้อยละ 17.2-66.7 ซึ่งการทำแตกต่างไปตามชนิดของเห็ด ยังไม่ทราบกลไกควรมีการศึกษาเพิ่มเติม

ตารางที่ 2 ปริมาณโปรตีนในสารสกัดพอลิแซคคาไรด์จากเห็ดชนิดต่างๆ ที่สกัดโดยวิธีที่แตกต่างกัน

	ปริมาณโปรตีน (ร้อยละ)		
เห็ด	UAE	HWE	ร้อยละที่เพิ่มขึ้น
Grifola frondosa	33 ± 2.9	21 ± 0.3	57.1
Coriolus versicolor	25 ± 0.3	15 ± 0.7	66.7
Lentinus edodes	34 ± 0.3	29 ± 0.1	17.2

หมายเหตุ รายงานผลเป็นค่าเฉลี่ย±SD (n = 3); UAE = ultrasound assisted extraction; HWE = hot water extraction

ที่มา Cheung *et al.* (2012)

Leung *et al.* (2009) ได้วิจัยพบว่ามีความสัมพันธ์ระหว่างค่า TEAC (Trolox equivalent antioxidant capacity) จากการวัดความสามารถของสารในการจับกับอนุมูล $ABTS^{\bullet+}$ กับปริมาณโปรตีนในสารสกัดพอลิแซคคาไรด์จากเห็ดถั่งเช่าทิเบต (*Cordyceps sinensis*) โดยมีค่า R^2 เท่ากับ 0.8289 ผู้วิจัยได้แนะนำว่าการดัดแปลงสมบัติของโมเลกุลพอลิแซคคาไรด์โดยวิธีการทางเคมีจึงอาจ

เป็นทางเลือกที่มีประโยชน์ในการเพิ่มความสามารถในการต้านออกซิเดชันของพอลิแซคคาไรด์ นอกจากนี้ในงานวิจัยนี้ยังพบว่าการกำจัดสารที่มีโมเลกุลเล็กโดยวิธีการไดอะลิซิสและ การกำจัดโปรตีนโดยวิธี Savage ยังทำให้สารสกัดพอลิแซคคาไรด์ที่ได้มีความสามารถในการต้านออกซิเดชันลดลงอีกด้วย

2.5.3.2 สภาวะในการสกัดพอลิแซคคาไรด์ สภาวะในการสกัดพอลิแซคคาไรด์จะมีผลต่อผลผลิตที่ได้และความสามารถในการออกฤทธิ์ทางชีวภาพด้วย สภาวะดังกล่าว ได้แก่ อุณหภูมิ ชนิดของตัวทำละลาย pH และระยะเวลาในการสกัด เป็นต้น ตัวอย่างเช่น UAE หรือ การให้ความร้อนที่ 60 องศาเซลเซียสช่วยเพิ่มทั้งผลผลิตและความสามารถในการออกฤทธิ์ทางชีวภาพ (Cheung *et al.*2012 and Tan *et al.*, 2017) การสกัดด้วยกรดซิตริกได้สารสกัดที่สามารถจับกับอนุมูล DPPH และอนุมูลไฮดรอกซิลที่ดีกว่าการสกัดด้วยน้ำร้อน สารละลายเกลือหรือสารละลายด่าง (Yan *et al.*, 2018) วิธีการสกัดพอลิแซคคาไรด์จากดอกเห็ดและเส้นใยเห็ด ตามปกติจะสกัดด้วยน้ำ สารละลายกรดหรือเบส สารละลายบัฟเฟอร์ ร่วมกับความร้อน สารสกัดที่ได้นำไปทำให้บริสุทธิ์ขึ้นโดยวิธี Sevage คือใช้สารผสมระหว่างคลอโรฟอร์มกับ 1-บิวทานอลในอัตราส่วน ต่อ 1 แล้ว 4 ไดอะไลซิส ทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง ก็จะได้สารสกัดพอลิแซคคาไรด์ตามต้องการ ร้อยละของผลผลิตและกิจกรรมทางชีวภาพจะขึ้นกับวิธีการและสภาวะในการสกัดทีใช้ ได้แก่ อุณหภูมิ ชนิดของสารละลาย pH และระยะเวลา ดังนั้นจึงต้องมีการศึกษาวิธีการสกัดที่เหมาะสมด้วย (Mingyi *et al.*, 2019) การสกัดด้วยน้ำร้อน เป็นวิธีที่ใช้มากที่สุดและสะดวกที่สุด แต่มีข้อเสียคือต้องใช้อุณหภูมิสูง ใช้ระยะเวลาในการสกัดนานและได้ผลผลิตต่ำ (Shi *et al.*2006) พบว่าการสกัดพอลิแซคคาไรด์โดยใช้น้ำและไมโครเวฟ นาที จะพอลิแซคคาไรด์สกัดหยาบร้อยละ 10 80.79 วิธีการใหม่ๆ ที่ช่วยในการเพิ่มประสิทธิภาพการสกัด ได้แก่ subcritical water extraction (SWE), ultra-high pressure extraction (UPE), microwave extraction (ME) และ ultrasonic extraction (UE) โดยวิธีที่ได้รับความสนใจมากที่สุดคือการใช้อัลตราโซนิกช่วยในการสกัดร่วมด้วย และได้มีการนำไปใช้กับพืชหลายชนิด

2.5.4 การประยุกต์ใช้พอลิแซคคาไรด์จากเห็ดสมุนไพรในอาหารฟังก์ชัน (function food) และโภชนเภสัช (nutraceuticals)

การนำพอลิแซคคาไรด์ที่สกัดได้ในรูปสารบริสุทธิ์โดยเฉพาะยาต้านมะเร็งต้องมีการศึกษาทดลองในหลอดทดลองหรือสิ่งมีชีวิต (*in vitro* or *in vivo*) สำหรับการใช้พอลิแซคคาไรด์จากเห็ดเพื่อ

ใช้ในผลิตภัณฑ์อาหารฟังก์ชันหรือโภชนเภสัช เพื่อกล่าวอ้างถึงสรรพคุณของพอลิแซคคาไรด์จากเห็ดที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่หลากหลายดังได้กล่าวข้างต้น จำเป็นต้องศึกษาถึงผลกระทบจากกระบวนการแปรรูป เช่น ความร้อน pH ความดันสูง เอนไซม์ และกรดอินทรีย์ เป็นต้น เพราะสิ่งเหล่านี้จะมีผลต่อปริมาณพอลิแซคคาไรด์ เช่น เห็ดหลินจือสามารถถูกย่อยสลายด้วย เอนไซม์เพคติเนส และเด็กทราเนส ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่อยู่ ในอาหาร (Xie et al., 2012) เลนติแนนในเห็ดหอมจับกับคาราจีแนนทำให้ประสิทธิภาพในการต้านเนื้องอกลดลง (Maeda and Chihara, 1999) พบว่ากระบวนการทำแห้งแบบระเหิด เป็นวิธีการทำแห้งที่ดีที่สุดเมือเปรียบเทียบกับการทำแห้งแบบให้ความร้อน และทำแห้งแบบระบบสุญญากาศ โดยจะทำให้คุณสมบัติการต้านออกซิเดชันของพอลิแซคคาไรด์จากเห็ดหลินจือแดงยังคงเหลืออยู่มากที่สุด

ตัวอย่างของผลิตภัณฑ์อาหารฟังก์ชันจากพอลิแซคคาไรด์จากเห็ด เช่น กลูแคนจากเห็ดหอมใส่ลงในขนมปัง หรือเส้นก๋วยเตี๋ยวแทนแป้งสาลี ช่วยเพิ่มความยืดหยุน และความหนืดให้กับผลิตภัณฑ์ และมีผลด้านสุขภาพคือมีสมบัติการต้านออกซิเดชันสูง และช่วยลดคอเลสเตอรอล (Kim et al., 2009)

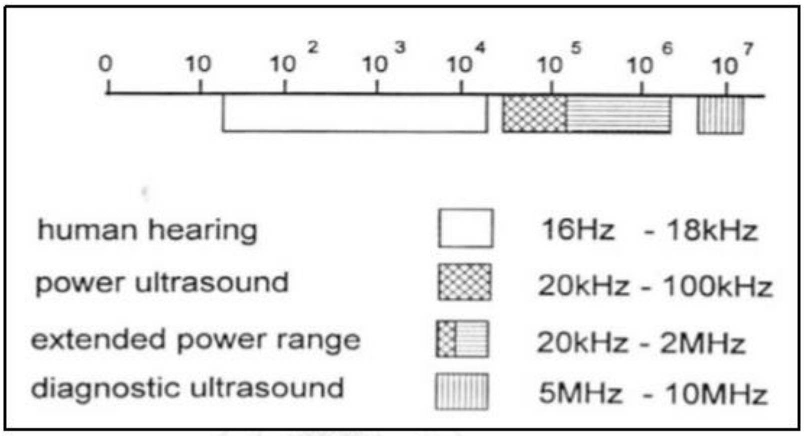
2.6 คลื่นอัลตราซาวด์หรือคลื่นอัลตราโซนิก (ultrasonic waves)

คลื่นอัลตราซาวด์หรือคลื่นอัลตราโซนิก (ultrasonic waves) หมายถึง คลื่นเสียงที่มีการสั่นของคลื่นประมาณ 20,000 เฮิร์ตหรือสูงกว่า (Hoover, 2000) ส่วนคำว่าอัลตราโซนิก หรือโซนิเคชั่น หมายถึง การศึกษาเกี่ยวกับคลื่นเสียงหรืออัลตราซาวด์ในช่วงความถี่ดังกล่าวซึ่งมนุษย์ไม่สามารถได้ยิน

การใช้ประโยชน์จากอัลตราซาวด์ตั้งแต่ต้นจนถึงปัจจุบัน พบว่ามีการนำอัลตราซาวด์มาประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมโดยสามารถแบ่งออกได้เป็น 2 ประเภทใหญ่ๆ ได้แก่ (ดังภาพที่ 6)

1. การใช้อัลตราซาวด์กำลังต่ำและความถี่สูง (low power and high frequencies) ซึ่งใช้ในด้านการวิเคราะห์ (diagnostic ultrasound) เป็นส่วนใหญ่

2. การใช้อัลตราซาวด์กำลังสูงและความถี่ต่ำ (high power and low frequencies) ใช้ในกระบวนการต่างๆ (Liu et al., 2012)



ภาพที่ 6 การใช้ประโยชน์จากคลื่นความถี่อัลตราซาวด์
ที่มา : Liu et al., (2012)

ระบบอัลตราซาวด์ มีอุปกรณ์ที่สำคัญอยู่ 3 ส่วน ได้แก่

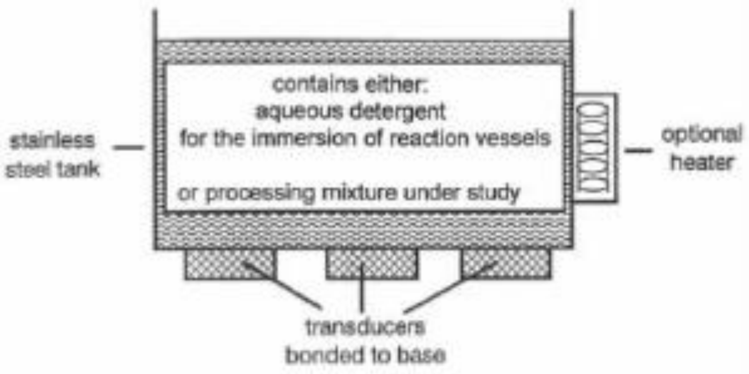
1.เครื่องกำเนิดกระแสไฟฟ้าโดยการเปลี่ยนไฟฟ้ากระแสตรงไปเป็นไฟฟ้ากระแสสลับที่ความถี่ที่ต้องการและผ่านเข้าสู่ทรานสดิวเซอร์

2.ทรานส์ดิวเซอร์ ซึ่งทำหน้าที่เปลี่ยนไฟฟ้ากระแสสลับความถี่สูงไปเป็นการสั่นเนื่องจากพลังงานกลทรานส์ดิวเซอร์ที่นิยมในปัจจุบัน คือชนิดที่ใช้เทคโนโลยีพีโซอิเล็คตริก ตัวทรานส์ดิวเซอร์จะอยู่ติดกับบูสเตอร์หรือฮอร์น ด้านบนและเชื่อมต่อกับระบบส่งถ่ายพลังงาน

3.ระบบส่งถ่ายพลังงาน ซึ่งจะทำหน้าที่ส่งถ่ายพลังงานการสั่นสะเทือนไปยังของเหลว ในกรณีที่เป็นอ่างอัลตราโซนิก ตัวทรานสดิวเซอร์จะอยู่บริเวณฐานตรงด้านล่างของตัวอ่างหรือถังและส่งถ่ายพลังงานโดยตรงไปยังของเหลวที่อยู่ภายในอ่าง ส่วนระบบที่ต้องการพลังงานที่สูงกว่านี้ จะใช้วิธีขยายสัญญาณหรือพลังงานและส่งถ่ายพลังงานไปยังของเหลว โดยใช้อุปกรณ์ที่เรียกว่า ฮอร์น ซึ่งเป็นแท่งโลหะที่มีรูปร่างแตกต่างกันติดกับทรานสดิวเซอร์ นิยมใช้ส่วนปลายฮอร์นชนิดที่ถอดเข้าออกได้และเป็นเกลียวซึ่งสามารถเปลี่ยนได้ง่าย

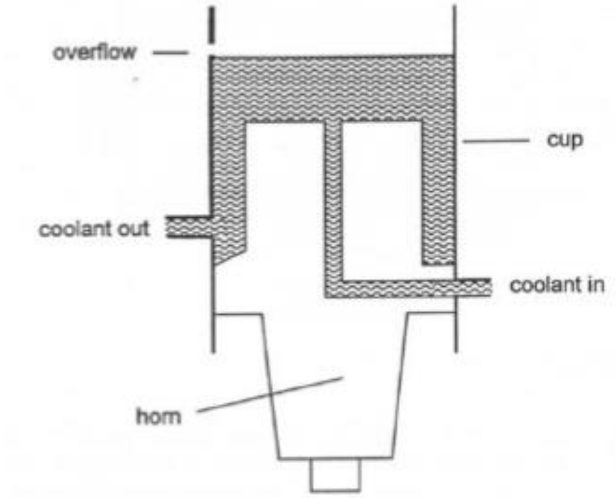
เครื่องอัลตราโซนิกที่ใช้อยู่ทั่วไปในปัจจุบันมีความแตกต่างกันตรงที่การออกแบบแหล่งกำเนิดไฟฟ้า แหล่งกำเนิดคลื่นและตัวเครื่องหรือเซลล์ที่ใช้ร่วมกับแหล่งกำเนิดคลื่น โดยสามารถแบ่งเป็นชนิดต่างๆ ดังนี้

1. อ่างอัลตราโซนิก อ่างอัลตราโซนิกเป็นอุปกรณ์ที่นิยมใช้กันอย่างแพร่หลายในห้องปฏิบัติการเนื่องจากมีราคาไม่แพงเมื่อเปรียบเทียบกับเครื่องที่ใช้ระบบโพรบ โดยทั่วไปทรานส์ดิวเซอร์จะติดอยู่กับบริเวณฐานด้านล่างของอ่างและความถี่ที่ใช้งานส่วนใหญ่ประมาณ 40 kHz อ่างอัลตราโซนิกมีลักษณะดังภาพที่ 7



ภาพที่ 7 อ่างอัลตราโซนิก (ultrasonic bath)
ที่มา : Liu et al., (2012)

สำหรับอ่างอัลตราโซนิกนั้นพลังงานสูงสุดที่สร้างได้จะอยู่ตรงบริเวณระดับความสูงค่าหนึ่งตลอดความลึกของอ่าง ทั้งนี้ เนื่องจากการเกิดคลื่นจากการสะท้อนของคลื่นอัลตราซาวด์ที่ถูกสร้างขึ้นตรงบริเวณรอยต่อระหว่างอากาศและของเหลว ดังนั้นถ้าระดับน้ำในอ่างลดลงต่ำกว่าความยาวคลื่น (λ) จะทำให้ไม่สามารถทำให้เกิดคลื่นเสียงที่มีพลังงานสูงได้ อ่างอัลตราโซนิกนั้นมีอุปกรณ์เสริมประเภทต่างๆ ที่นำมาใช้เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการทำงานให้ดีขึ้น เช่น อุปกรณ์ควบคุม อุณหภูมิอัตโนมัติ อุปกรณ์กระจายคลื่น ที่ทำให้คาวิเทชันเกิดขึ้นอย่างสม่ำเสมอ อุปกรณ์ปรับระดับ พลังงานสวิทซ์เปิดปิดแบบจังหวะหรือนาฬิกาจับเวลา เป็นต้น อ่างอัลตราโซนิกทั่วไปมักจะให้พลังงานต่ำ เพื่อหลีกเลี่ยงความเสียหายจากคาวิเทชันที่เกิดขึ้นบริเวณผนังด้านในของอ่าง นอกจากนั้นของเหลวที่เติมในอ่างมักมีปริมาณมากทำให้ปริมาณพลังงานมีค่าลดลง รูปแบบของอ่างอัลตราโซนิกอีกประเภทหนึ่งเรียกว่า คัพฮอร์น (cup horn) แสดงดังภาพที่ 8 โดยเป็นอ่างอัลตราโซนิกที่สร้างพลังงานได้สูงมาก ทั้งนี้ เนื่องจากบริเวณผิวหน้าที่เกิดคลื่นอัลตราซาวด์ ซึ่งติดอยู่กับทรานส์ดิวเซอร์จะสัมผัสโดยตรงกับของเหลวและลักษณะการท้าให้เกิดพลังงานหรือคลื่นจะขึ้นอยู่กับปัจจัยที่เกี่ยวข้องและระดับของของเหลวซึ่งมีความสำคัญมาก

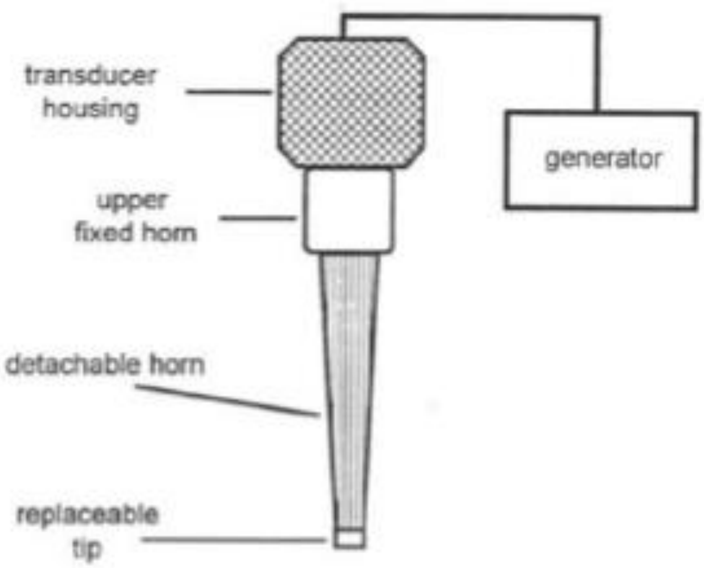


ภาพที่ 8 อ่างอัลตราโซนิกแบบคัพฮอร์น
ที่มา : Liu et al. (2012)

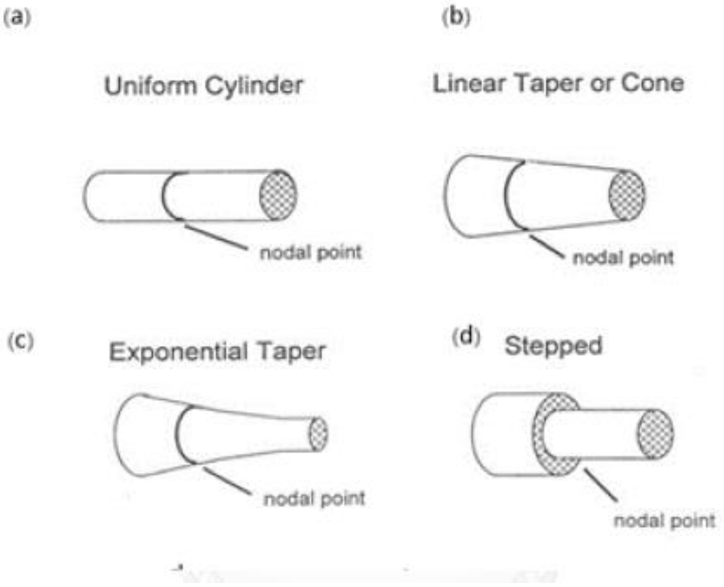
2. ระบบอัลตราโซนิกแบบโพรบ

ในการขยายพลังงานหรือคลื่นเสียงที่เกิดขึ้นจากทรานส์ดิวเซอร์นัน โดยทั่วไปจะนำทรานส์ดิวเซอร์มาต่อเข้ากับอุปกรณ์ที่เรียกว่าฮอร์น ดังภาพที่ 9 ลักษณะของฮอร์นจะมีความแตกต่างกันออกไปดังภาพที่ 10 แอมพลิจูด ที่สร้างขึ้นจากระบบนี้จะขึ้นกับรูปร่างลักษณะของฮอร์น สำหรับฮอร์นที่มีลักษณะเป็นแท่งทรงกระบอกจะทำหน้าที่ขยายหรือเพิ่มการส่งถ่ายพลังงานเสียง ขนาดความยาวคลื่นที่ได้จากตัวขยายสามารถคำนวณได้จากอัตราส่วนของเส้นผ่านศูนย์กลางของพื้นผิวหน้าตัดในฮอร์นระหว่าง2 พื้นที่คือ driven face (D) และ emitting face (d) ตัวอย่างเช่นในฮอร์นที่มีรูปร่างเป็น exponential หรือ linear tapered (cone) (รูปที่ 10 b และc) จะมีอัตราส่วนเท่ากับ D/d ในขณะที่ฮอร์นที่มีลักษณะเป็น stepped (ภาพที่ 10 d) จะมีอัตราส่วนเท่ากับ (D/d) ซึ่งจะเห็นว่าฮอร์นแบบ stepped จะมีความสามารถในการขยายสัญญาณได้สูงกว่าเสมอ แต่เพื่อเป็นการหลีกเลี่ยงความเสียหายจากความเค้นภายในตัววัตถุอัตราส่วนระหว่าง D/d จะต้องมีค่าไม่สูงจนเกินไป ในทางปฏิบัติขนาดของพลังงานสูงสุดที่ได้จากแหล่งกำเนิดพลังงานนั้นขึ้นอยู่กับปัจจัยที่สำคัญสองส่วน ได้แก่ คุณสมบัติของวัสดุที่ใช้ในการผลิตทรานส์ดิวเซอร์และพื้นผิวที่ปลดปล่อยคลื่น ในส่วนของวัสดุที่นำมาใช้ผลิตทรานส์ดิวเซอร์นั้นนิยมใช้วัสดุที่สามารถยืดและคืนตัวกลับได้ดี เช่น ไทเทเนียม หรืออะลูมิเนียมอัลลอย ซึ่งวัสดุทั้งสองชนิดมีความทนเนื่องมาจากแรงกล แต่อะลูมิเนียมอัลลอยนั้นไม่เหมาะสมที่จะสัมผัสกับของเหลวที่เกิดปฏิกิริยาคาวิเทชัน เนื่องจากจะถูกกักร่อนได้ง่าย จึงควรใช้วัสดุพวกไทเทเนียมอัลลอยแทน สำหรับพื้นผิวที่ปลดปล่อยคลื่นนั้น พบว่าพื้นที่ขนาดเล็กจะให้

ประสิทธิภาพที่สูงกว่า แต่ที่แอมพลิจูดสูงจะมีข้อจำกัดเนื่องจากฟองอากาศที่เกิด ขึ้นบริเวณพื้นผิวหน้าจากปฏิกิริยาคาวิเทชันจะรบกวนการส่งถ่ายของพลังงานไปยังของเหลว



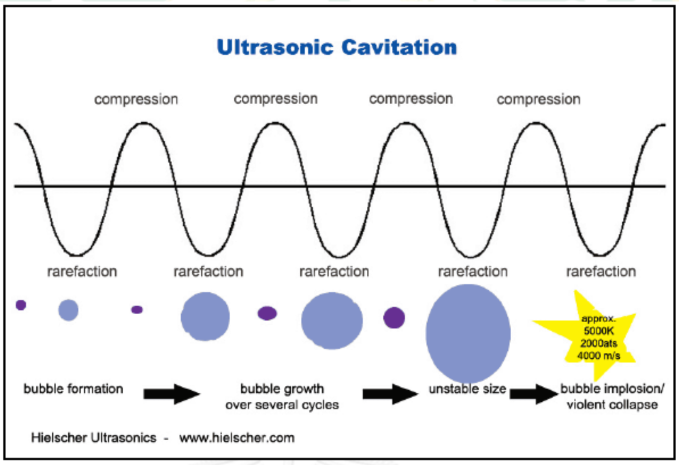
ภาพที่ 9 ระบบอัลตราโซนิกแบบโพรบ
ที่มา : Liu et al. (2012)



ภาพที่ 10 ลักษณะของฮอร์น
ที่มา : Liu *et al*. (2012)

2.6.1 ปรากฏการณ์คาวิเทชัน (cavitation)

ปรากฏการณ์คาวิเทชัน เป็นกระบวนการที่เกิดขึ้นได้ในตัวกลาง หรือสารละลายที่ได้รับคลื่นเสียงอัลตราซาวด์ โดยทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางด้านเคมีและทางกายภาพ (จากแรงกล) เนื่องมาจากฟองอากาศที่เกิดขึ้น ซึ่งการที่ฟองอากาศเกิดขึ้นได้นั้นเนื่องมาจากโครงสร้างของของเหลวที่ได้รับคลื่นอัลตราซาวด์จะถูกบีบอัด และคลายตัว ซ้ำไปมาเป็นจำนวนหลายพันรอบทำให้เกิดโพรงช่องว่างขึ้นแสดงดังภาพที่ 11 โดยจะสัมผัสกับแรงสั่นที่เกิดจากคลื่นอัลตราซาวด์เป็นระยะและเกิดการแลกเปลี่ยนแก๊สระหว่างกัน เป็นผลให้เกิดฟองอากาศมีขนาดใหญ่ขึ้นเรื่อย ๆจนกระทั่งไม่เสถียรและแตกในที่สุด



ภาพที่ 11 หลักการเกิดฟองอากาศในตัวกลางเนื่องจากคลื่นอัลตราซาวด์
ที่มา : Suslick, (1988)

(Frizzel, 1988) รายงานว่าคาวิเทชันสามารถแบ่งออกเป็น 2 ประเภท ได้แก่ คาวิเทชันแบบถาวร และคาวิเทชันแบบชั่วคราว ซึ่งแต่ละแบบจะมีผลทำให้ลักษณะของฟองแก๊สที่ได้รับคลื่นอัลตราซาวด์แตกต่างกันออกไป โดยคาวิเทชันแบบถาวรจะเกิดขึ้นเมื่อฟองอากาศ หรือฟองแก๊สเกิดการสั่นแกว่ง เมื่อได้รับคลื่นอัลตราซาวด์เป็นจำนวนหลายรอบของการสั่นแต่ไม่เกิดการแตกของฟองอากาศหรือฟองแก๊ส ซึ่งฟองอากาศหรือฟองแก๊สนี้ อาจจะเพิ่มขนาดขึ้นถึงขนาดเรโซแนนซ์ หรือเป็นขนาดของฟองแก๊สที่มีความถี่ธรรมชาติเท่ากันกับความถี่ในการสั่น ส่วนคาวิเทชันแบบชั่วคราวนั้น เกิดขึ้นในระยะการบีบอัดของฟองแก๊ส ในของเหลวที่ได้รับความเครียด ที่เกิดขึ้นขณะเริ่มเกิดการขยายตัวของฟองแก๊ส ทำให้การแตกของฟองแก๊สเกิดขึ้นอย่างรวดเร็ว หรืออาจเกิดจากฟองแก๊สเกิดการสั่นแกว่ง

และขยายขนาดเพิ่มขึ้นในลักษณะคงที่ในระยะเวลาหนึ่ง ก่อนที่จะแตกออกอย่างรวดเร็วเมื่อฟองแก๊สนั้นขยายขนาดขึ้นเมื่อถึงขนาดที่จำเพาะ

(Suslick, 1988) รายงานว่า สภาวะที่ฟองอากาศแตกนั้นพบว่าอุณหภูมิสูงขึ้นถึง 5,000 เคลวิน และความดันสูงถึง 2,000 บรรยากาศ ทั้งนี้ เนื่องจากในระหว่างเกิดการขยายและหดตัวของฟองแก๊สนั้น จะเกิดสมดุลขึ้นระหว่างความดันไอภายในและภายนอกฟองแก๊ส และพื้นที่ผิวของฟองแก๊สขณะขยายตัวจะมีมากกว่าพื้นที่ผิวของฟองแก๊สขณะหดตัว จึงเป็นผลให้การซึมผ่านของแก๊สในขณะที่ขยายตัวเกิดขึ้นได้มากกว่าและฟองแก๊สนี้จะขยายตัวเพิ่มขึ้นเมื่อจำนวนรอบความถี่เพิ่มขึ้นโดยอัตราส่วนของอัตราการซึมผ่านของแก๊สในขณะขยายตัวต่ออัตราการซึมผ่านของแก๊สในขณะถูกอัดจะเพิ่มมากขึ้นในแต่ละรอบจนกระทั่งฟองแก๊สมีขนาดเรโซแนนซ์ ทำให้ช่องว่างภายในฟองแก๊สมีขนาดโตขึ้นอย่างรวดเร็วภายในหนึ่งรอบของการสั่น และเนื่องจากพลังงานที่ได้รับจากคลื่นอัลตราซาวด์ไม่เพียงพอในการคงสภาวะของแก๊สหรือไอ จึงทำให้เกิดการควบแน่นขึ้นโดยโมเลกุลที่ควบแน่นนั้นจะชนซึ่งกันและกันอย่างรุนแรง ทำให้เกิดคลื่นกระแทกขึ้นและเกิดจุดหรือบริเวณเล็กๆ ที่มีอุณหภูมิและความดันที่สูงมาก (Suslick, 1988)และเป็นที่เชื่อกันว่าปรากฏการณ์นี้เป็นปรากฏการณ์ที่สำคัญที่เกิดในระหว่างที่ของเหลวได้รับคลื่นอัลตราซาวด์ ซึ่งทันทีที่ฟองแก๊สแตกจะเกิดการปลดปล่อยพลังงานที่ใช้ในการเร่งปฏิกิริยาเคมีหรือทำให้เกิดผลิตภัณฑ์ใหม่ที่แตกต่างไปจากปฏิกิริยาเดิมจากสภาวะปกติ

การใช้อัลตราซาวด์ช่วยในการสกัดขึ้นกับขนาดอนุภาค ถ้าจะให้เห็นความแตกต่างของผลผลิต ขนาดอนุภาคควรมากกว่า 0.28 มิลลิเมตร ส่วนความสามารถในการต้านออกซิเดชันพบว่าการใช้อัลตราโซนิกช่วยในการสกัด ทำให้มีโปรตีนอยู่ในสารสกัดสูงกว่าและมีความสัมพันธ์กับความสามารถในการต้านออกซิเดชัน (Cheung *et al*., 2012; Leung *et al*., 2009) ขนาดโมเลกุลของพอลิแซคคาไรด์ในสารสกัด ถ้ามีขนาดเล็ก ต่ำกว่า 10 กิโลดาลตัน จะมีความสามารถในการต้านออกซิเดชันที่ดีกว่าที่มีขนาดโมเลกุลใหญ่ อาจเนื่องจากมีจำนวนของหมู่ไฮดรอกซิลในสารละลายมากกว่าเมื่อเปรียบเทียบที่ความเข้มข้นเท่ากัน โดยหมู่ไฮดรอกซิลเป็นหมู่ที่มีบทบาทสำคัญในการต้านออกซิเดชัน ซึ่งพบว่าถ้าใช้อัลตราโซนิกช่วยในการสกัดร่วมด้วยจะได้ขนาดของพอลิแซคคาไรด์เล็กว่าที่สกัดด้วยน้ำร้อนตามปกติ (Cheung *et al*., 2012) การสกัดร่วมกับการใช้เอนไซม์ผสม ประกอบด้วยการใช้เอนไซม์เซลลูเลส เพคติเนส ทริปซินในอัตราส่วน 2 ต่อ 2 ต่อ 1 ในการสกัดพอลิแซคคาไรด์จากเห็ดยามาบูชิตาเกะ (*Hericium erinaceus*) ก่อนที่จะทำการสกัดด้วยน้ำร้อน ที่ 100 องศาเซลเซียส นาน 3 ชั่วโมง 2 รอบ เปรียบเทียบกับการสกัดด้วยน้ำร้อนเพียงอย่างเดียว (ไม่ได้ย่อยด้วยเอนไซม์มาก่อน) หลังจากนั้นจึงทำให้เข้มข้นและตกตะกอนด้วยเอทานอลเข้มข้นร้อยละ 80 เป็นเวลา 12 ชั่วโมง

ที่ 4 องศาเซลเซียส เซนตริฟิวจ์เพื่อแยกตะกอนพอลิแซคคาไรด์ ทำให้แห้งด้วยวิธีการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง แล้วชั่งน้ำหนักผงพอลิแซคคาไรด์ที่ได้เทียบกับน้ำหนักเห็ดผงเริ่มต้น พบว่าการใช้เอนไซม์ทำให้ได้ร้อยละผลผลิตเพิ่มขึ้นร้อยละ 67.7 (ได้ผลผลิตร้อยละ 13.46 ± 0.37) โดยพอลิแซคคาไรด์ที่ได้จากการสกัดทั้ง 2 แบบมีหมู่ฟังก์ชันเหมือนกัน แต่มีรูปทรงที่แตกต่างกัน ซึ่งวิธีการสกัดโดยใช้เอนไซม์นี้อาจช่วยเพิ่มร้อยละผลผลิตในเห็ดชนิดอื่นได้เช่นกัน สำหรับสภาวะในการย่อยด้วยเอนไซม์ที่เหมาะสมที่ได้จากการทดลองนี้คือที่ pH 5.71 อุณหภูมิ 52.03 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 33.79 นาที (Zhu *et al*., 2014)

มหาวิทยาลัยแม่โจ้ MAEJO UNIVERSITY แม่โจ้ ๒๔๗๗

บทที่ 3
วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.1 สายพันธุ์เห็ดถั่งเช่าสีทอง (*Cordyceps militaris*)

เห็ดถั่งเช่าสีทองอายุ 65 วัน ขนาดประมาณ 10 เซนติเมตร

3.2 วัสดุอุปกรณ์และเครื่องมือ

- เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง (Sartorius, LA2035, Germany)
- ตู้อบลมร้อน (Tribest, SD-P9000/SD-S9000, U.S.A)
- โถดูดความชื้น (desiccator) (GL32, Glaswerk Wertheim, Germany)
- อ่างอัลตราโซนิค (ultrasonic bath หรือ sonicator) (GT Sonic, VGT-1730QTD, China)
- เครื่องทำแห้งแบบระเหิด (Freeze dryer) (Heto Power Dry, DW8, Denmark)
- เครื่องกลั่นระเหยสารแบบหมุน (Heidolph VV2000, Germany)
- เครื่อง High-Performance Liquid Chromatography (HPLC) (Agilent 1100, U.S.A.)
- อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath))Memmert, wnb 22, Germany)
- เครื่องปั่น (blender) (Panasonic, MX-J210GN, China)
- เครื่องปั่น (blender) (Tefal ,BL309166, China)
- เครื่องวัดสีในระบบ CIE (HUNTER LAB , COLORFLEX® EZ. U.S.A.)
- เครื่องวัดค่า WATER ACTIVITY (AQUALAB, AQUA LAB SERIES 3 TE, U.S.A.)
- ไมโครปิเปต ขนาด 10-แ 100ละ 20- ไมโครลิตร 200(Gilson, U.S.A.)
- กระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 (Whatman, United Kingdom)
- ตะแกรงมาตรฐาน ขนาด เมช 60
- ขวดแก้วเพาะเลี้ยงเห็ด 24 ออนซ์
- หลอดทดสอบฝาเกลียว (Pyrex, Germany)
- บีกเกอร์ ขนาด 60, 100, 250 และ 600 มิลลิลิตร (Pyrex, GermanyX)
- เมมเบรนขนาด 0.45 ไมครอน

3.3 สารเคมี

- 2,2′-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid; ABTS(Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany)
- 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany)
- 4-hydroxybenzoic acid (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany)
- Acetonitrile (Reag. Ph Eur, merck, Germany)
- Adenosine standard (Sigma, U.S.A.)
- Anthrone (ACS,Reag. Ph Eur, merck, Germany)
- Cordycepin standard (Sigma, U.S.A.)
- Cinnamic acid AR (Loba chemie , India)
- Ethanol (A.R. Grade ,RCI Labscan, Thailand)
- Ferric chloride ($FeCl_3$) (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany)
- Ferrous sulphate (A.R. Grade, Ajax, Australia)
- Ferrozine (Sigma-Aldrich, Switzerland)
- Formic acid hplc (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany)
- Glucose standard (Sigma-Aldrich, U.S.A.)
- Gallic acid monohydrate (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany)
- Hydrogen peroxide 30% (ISO, Merck, Germany)
- β-nicotinamide adenine dinucleotide (NADH) (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany)
- Nitro blue tetrazolium (NBT) (Sigma-Aldrich, Steinheim, U.S.A.)
- Potassium ferricyanide (AR/ACS, loba chemie, India)
- Potassium persulphate (A.R. Grade, Ajax,Australia)
- Phenol (ACS,Reag. Ph Eur, merck, Germany)
- Phosphate buffer, pH 7.2 (merck, Germany)
- Phenazine methosulphate (PMS) (Sigma-Aldrich, srael)
- p-Coumaric acid (merck, Germany)
- Protocatechuic acid (merck, Germany)

- Sodium ethylenediaminetetraacetic acid (ACS,Reag. Ph Eur, merck, Germany)
- Sulphuric acid, conc. 98% (A.R. Grade ,RCI Labscan, Thailand)
- Trichloroacetic acid (ACS, Reag. Ph Eur, merck, Germany)
- Trolox® [(S)-(2)-6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethyl-chroman-2-carboxylic acid] (Sigma-Aldrich, Germany)
- WATER, HPLC (น้ำเกรด HPLC) (RCI Labscan, Thailand)

3.4 วิธีการทดลอง

3.4.1 การเตรียมตัวอย่าง

นำเห็ดถั่งเช่าสีทองไปอบแห้งด้วยตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง (Wu *et al*., 2019) บดด้วยโถปั่นอาหาร ร่อนผ่านตะแกรง 60 เมช บรรจุในภาชนะปิดสนิท เก็บในตู้เย็นที่มีอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำไปทำการวิเคราะห์

3.4.2 การศึกษาคุณภาพทางเคมีและกายภาพของเห็ดถั่งเช่าสีทอง

นำตัวอย่างเห็ดถั่งเช่าสีทองไปทำการวิเคราะห์ปริมาณความชื้น ไขมัน โปรตีน เถ้า ค่า water activity ค่าสี (L* a* b*) ดังนี้

3.4.2.1 การวิเคราะห์ปริมาณคอร์ไดซิปินและอะดีโนซีน

นำเห็ดถั่งเช่าสีทองทั้ง 4 ตัวอย่างไปทำการวิเคราะห์ปริมาณคอร์ไดซิปินและอะดีโนซีนดังนี้ ชั่งตัวอย่างเห็ดถั่งเช่าสีทองผง จำนวน 0.10 กรัม เติมสารละลายเอทานอลร้อยละ 50 ปริมาตร 60 มิลลิลิตร สกัดด้วยเครื่องอัลตราซาวด์ที่ 60 องศาเซลเซียส นาน 60 นาทีหลังจากนั้นกรองด้วยผ้าขาวบางแล้วกรองWhatman เบอร์ 1 นำสารละลายใสที่ได้ไปกรองด้วยเมมเบรนขนาด 0. 45 ไมครอน แล้วนำไปวิเคราะห์ปริมาณคอร์ไดซิปินและอะดีโนซีนด้วยเครื่อง HPLC (high performance liquid chromatography) โดยใช้ C18-reversed phase column ที่ flow rate 0.5 นาที เฟสเคลื่อนที่ KH_2PO :$_4$Methanol (85:15) ต่อสารละลาย acetonitrile = 95 ต่อ 5 (ปริมาตร/ปริมาตร) ใช้UV-Visible detector ที่ความยาวคลื่น 242 นาโนเมตร เปรียบเทียบกับสารมาตรฐานคอร์ไดซิปินและอะดีโนซีน

3.4.2.2 การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี ได้แก่

ความชื้น ทำตามวิธีของ AOAC (2003) ดังนี้ ชั่งตัวอย่าง 1 กรัมให้ได้น้ำหนักที่แน่นอน อบแห้งด้วยตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส นาน 3 ชั่วโมง คำนวณปริมาณความชื้น ดังนี้

$$\text{ปริมาณความชื้น (ร้อยละ)} = \frac{[\text{น้ำหนักของตัวอย่างก่อนอบ (กรัม)} - \text{น้ำหนักของตัวอย่างหลังอบ (กรัม)}] \times 100}{\text{น้ำหนักของตัวอย่างก่อนอบ (กรัม)}}$$

ไขมัน ทำตามวิธีของ AOAC (2003) ดังนี้ ชั่งตัวอย่าง 1 กรัมให้ได้น้ำหนักที่แน่นอน นำไปสกัดไขมันด้วยเฮกเซน นาน 5 ชั่วโมง ทำการระเหยตัวทำละลายออก ชั่งน้ำหนักไขมันที่ได้ คำนวณปริมาณไขมันดังนี้

$$\text{ปริมาณไขมัน (ร้อยละ)} = \frac{\text{น้ำหนักไขมัน(กรัม)} \times 100}{\text{น้ำหนักของตัวอย่างก่อนสกัด (กรัม)}}$$

โปรตีน โดยวิธี Kjeldahl Method ทำตามวิธี AOAC (2000) ชั่งตัวอย่าง 5 กรัม ใส่ลงใน Kjeldalh flask เติม Mixed catalyst: $CuSO_4$ 0.1 กรัม, $NaSO_4$ 2 กรัม และconc.H_2SO_4 25กรัม

การย่อย(Digestion)

ย่อยบน heating mantle โดยให้ความร้อนอ่อนๆจนกระทั่ง หมดฟองแล้วค่อยเพิ่มความร้อนอุณหภูมิ 400 องศาเซลเซียส จนกระทั่ง สารละลายใส ทิ้งไว้ให้เย็น

การกลั่น (Distillation)

เติมน้ำกลั่นลงในหลอดย่อย10-15 มิลลิลิตร นำหลอดย่อยมาต่อเข้ากับเครื่องกลั่น หลังจากนั้นเติม 40% NaOH 40-50 ml นำ receiving flask ที่มี 4% boric acid อยู่ 20-25 ml และเติม indicator รียบร้อยแล้วมา รองรับสารละลายที่กลั่นได้ กลั่นจนได้สารละลายประมาณ 25 ml ไทเทรตสารละลายที่กลั่นได้ด้วย 0.1 N HCl จนกระทั้งสีของสารละลายเปลี่ยนจากสีเขียวเป็นสีม่วงอมชมพู คำนวณหาปริมาณโปรตีนจากสูตร

$$\text{ปริมาณโปรตีน (ร้อยละ)} = \frac{(A - B) \times N \times 1.4 \times F}{Wt}$$

A คือ ปริมาตรของกรดไฮโดรคลอริกที่ใช้ในการไทเทตรตัวอย่าง (มิลลิลิตร)

B คือ ปริมาตรของกรดไฮโดรคลอริกที่ใช้ในการไทเทรตกับ blank (มิลลิลิตร)

Wt คือ น้ำหนักของตัวอย่าง

N คือ ความเข้มข้นของกรดไฮโดรคลอริก (N)

F คือค่าแฟคเตอร์ (4.70)

เถ้า ทำตามวิธี AOAC (2000) ดังนี้เผาถ้วยกระเบื้องเคลือบในเตาเผาไฟฟ้า ที่อุณหภูมิ 525-550 องศาเซลเซียส (เท่ากับอุณหภูมิที่ใช้เผาตัวอย่าง) นาน 30 นาที ทำให้เย็นในโถดูดความชื้น ชั่งน้ำหนัก (W1) และใส่ตัวอย่างในถ้วยกระเบื้องเคลือบ ชั่งให้ได้น้ำหนักแน่นอนประมาณ 2กรัม (W2) นำไปเผาด้วยไฟอ่อนบนเตาไฟฟ้า โดยเพิ่มความร้อนขึ้นทีละน้อยจนตัวอย่างไหม้เกรียม และเผาจนหมดควัน นำไปเผาต่อในเตาเผาไฟฟ้า ที่อุณหภูมิ 525-550 องศาเซลเซียส จนได้เถ้าสีขาว ปล่อยให้เย็นในโถดูดความชื้น ชั่งน้ำหนักที่ได้ (W3)

$$\text{ปริมาณเถ้า (ร้อยละ)} = \frac{[(W_3 - W_1) \times 100]}{W_2 - W_1}$$

W1 = น้ำหนักของถ้วยกระเบื้องเคลือบ เป็น กรัม

W2 = น้ำหนักของถ้วยกระเบื้องเคลือบและตัวอย่าง เป็น กรัม

W3 = น้ำหนักของถ้วยกระเบื้องเคลือบและเถ้า เป็น กรัม

คาร์โบไฮเดรต โดยการหักลบตามสูตร

ปริมาณคาร์โบไฮเดรต (ร้อยละ) = 100 – ปริมาณความชื้น (ร้อยละ) - ปริมาณไขมัน (ร้อยละ) - ปริมาณโปรตีน (ร้อยละ) – ปริมาณเถ้า (ร้อยละ)

การวิเคราะห์ค่า water activity

โดยวัดด้วยเครื่องวัดค่า water activity Aqualab, AQUA LAB Series 3 TE, U.S.A.)

การวิเคราะห์ค่าสี (L* a* b*)

วัดด้วยเครื่องวัดค่าสี รายงานค่าเป็นค่า L* a* b* โดยค่า L* -value (ค่าความสว่าง), a* -value (สีแดง/เขียว), b* -value (สีเหลือง/สีน้ำเงิน)

3.4.3 การศึกษาสภาวะในสกัดพอลิแซคคาไรด์จากเห็ดถั่งเช่าสีทอง

3.4.3.1 การสกัดไขมันออกจากเห็ดถั่งเช่าสีทอง

นำตัวอย่างเห็ดผง 1 กรัม มาสกัดไขมันออกด้วยเอทานอลเข้มข้นร้อยละ 80 จำนวน 200 มิลลิลิตร เป็นเวลานาน 5 ชั่วโมง จำนวน 2 รอบ โดยใช้ชุดกลั่น Soxhlet ทำการวิเคราะห์ปริมาณไขมันและความชื้นในตัวอย่างก่อนสกัด ตัวอย่างหลังการสกัดรอบที่ 1 และตัวอย่างหลังการสกัดรอบที่ 2

3.4.3.2 การเตรียมสารสกัดจากเห็ดถั่งเช่าสีทอง

นำเห็ดถั่งเช่าสีทองผงที่สกัดไขมันหรือไม่สกีดไขมันออก (โดยการสกัดไขมันออกจากตัวอย่างด้วยเอทานอลเข้มข้นร้อยละ80 โดยกลั่นจำนวน 2 รอบ พบว่าหลังการสกัดรอบที่ 1 มีไขมันร้อยละ 2.453 ± 0.09 และนำตัวอย่างมาสกัดรอบที่ 2 พบว่ามีไขมันร้อยละ 1.098 ± 0.08 ดังนั้นในการทดลองจึงได้ทำการสกัดไขมัน 2 รอบเพื่อใช้ในการทดลองต่อไปมาทำการสกัดด้วยน้ำกลั่น ในอัตราส่วนของเห็ดถั่งเช่าสีทองผงต่อน้ำกลั่น เท่ากับ 10 ต่อ 100 (กรัม ต่อ มิลลิลิตร) สกัดด้วยเครื่องล้างอัลตราโซนิคหรือไม่ได้ใช้เครื่องล้างอัลตราโซนิค (ใช้อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ) ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง ตามสภาวะที่ได้ทำการทดลองมาก่อนหน้านี้ (ไม่ได้แสดงข้อมูล) แยกกากด้วยผ้าขาวบาง กรองด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 นำสารละลายใสที่กรองได้ ไปทำแห้งแบบด้วยเครื่องทำแห้งแบบระเหิด ทำการเก็บตัวอย่างที่ได้ในภาชนะปิดสนิท ในตู้เย็นจนกว่าจะทำการวิเคราะห์ ดังนั้นในการทดลองนี้มีตัวอย่างสารสกัดทั้งหมดจำนวน 4 ตัวอย่าง ดังนี้

เห็ดถั่งเช่าสีทอง

↓

อบแห้งด้วยตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง

↓

บดให้เป็นผงด้วยเครื่องบดไฟฟ้า นำผงเห็ดที่ได้ร่อนผ่านตะแกรงขนาด 60 เมซ

↓

สกัดไขมันออกโดยการสกัดด้วยเอทานอลร้อยละ 80 ด้วยชุดกลั่นแบบ soxhlet
ในอัตราส่วนของเห็ดผงต่อเอทานอลร้อยละ 80 เท่ากับ 1 ต่อ100 (น้ำหนักต่อปริมาตร)
นาน 5 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 85 องศาเซลเซียส

↓

ระเหยเอทานอลร้อยละ 80 แล้วนำกากที่ได้มาทำการสกัดซ้ำอีก 1 รอบ

↓

นำมาสกัดพอลิแซคคาไรด์โดยเห็ดถั่งเช่าสีทองผง 20 กรัม มาเติมน้ำกลั่น 200 มิลลิลิตร
นำไปสกัดที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 60 นาที ไม่ใช้และใช้อัลตราซาวด์ช่วยในการสกัด

↓

แยกกากด้วยผ้าขาวบาง กรองด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 4

↓

นำสารละลายใสที่กรองได้ ไปทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (freeze drying)

↓

สารสกัดหยาบที่ได้ 4 ตัวอย่าง ได้แก่

ND-NU : เป็นตัวอย่างที่ได้จากเห็ดถั่งเช่าสีทองที่ไม่ผ่านการสกัดไขมันออกและไม่ใช้อัลตราซาวด์ช่วยในการสกัด

ND- U : เป็นตัวอย่างที่ได้จากเห็ดถั่งเช่าสีทองที่ไม่ผ่านการสกัดไขมันออกและใช้อัลตราซาวด์ช่วยในการสกัด

D-NU : เป็นตัวอย่างที่ได้จากเห็ดถั่งเช่าสีทองที่ผ่านการสกัดไขมันออกและไม่ใช้อัลตราซาวด์ช่วยในการสกัด

D-U : เป็นตัวอย่างที่ได้จากเห็ดถั่งเช่าสีทองที่ผ่านการสกัดไขมันออกและใช้อัลตราซาวด์ช่วยในการสกัด

ภาพที่ 12 กระบวนการเตรียมสารสกัดจากเห็ดถั่งเช่าสีทอง

3.4.3.3 ปริมาณผลผลิต ชั่งน้ำหนักสารสกัดพอลิแซคคาไรด์ที่ได้ทั้ง 4 ตัวอย่าง คำนวณร้อยละของผลผลิตเปรียบเทียบกับน้ำหนักเห็ดถั่งเช่าสีทองผงเริ่มต้น ตามสูตร

$$\text{ผลผลิต (ร้อยละ)} = \frac{\text{น้ำหนักสารสกัดพอลิแซคคาไรด์(กรัม)} \times 100}{\text{น้ำหนักของตัวอย่างก่อนสกัด (กรัม)}}$$

3.4.3.4 การวิเคราะห์ปริมาณคอร์ไดซิปินและอะดีโนซีน เหมือนข้อ3.4.2.1

3.4.4 การวิเคราะห์ปริมาณพอลิแซคคาไรด์

3.4.4.1 วิธี Phenol sulfuric acid assay (Dubois *et al*., 1956) หลักการ ในสารละลายกรดร้อน น้ำตาลกลูโคสถูกดึงน้ำออกทำให้เกิดสีน้ำตาลของสาร ไฮดรอกซีเมทิลเฟอฟิวรอล สารละลายมาตรฐานกลูโคส เข้มข้น 150 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แล้วเตรียมให้มีความเข้มข้นต่างๆ จำนวน 5 ความเข้มข้น ได้แก่ 0 0.2 0.4 0.6 0.8 และ 1.0 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร โดยนำมา 200 ไมโครลิตร มาเติมสารละลาย 2.5% phenol 950-800 ไมโครลิตร สารละลายตัวอย่างที่มีความเข้มข้นต่างๆ จำนวน 5 ความเข้มข้น ได้แก่ 0 0.2 0.4 0.6 0.8 และ 1.0 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร โดยนำมา 200 ไมโครลิตร มาเติมสารละลาย 2.5%phenol 800 ไมโครลิตร และกรดซัลฟูริกเข้มข้น 2.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน วางให้เย็น ประมาณ 20 นาที จะได้สารละลายมีสีน้ำตาลออกเหลือง วัดค่า A 490 nm ด้วยเครื่อง Spectrophotometer ใช้ Glucose standard solution ปิเปต 0.5 มิลลิลิตร ที่ความเข้มข้นต่างๆ จำนวน 5 ความเข้มข้น ได้แก่ 0 0.2 0.4 0.6 0.8 และ 1.0 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร

3.4.4.2 วิธี Anthrone test ชั่ง anthrone 0.2 กรัม เติมใน H_2SO_4 100 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ประมาณ 30 นาที นำตัวอย่างที่ความเข้มข้น (0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0) จำนวน 0.5 มิลลิลิตร เติมในสารละลาย anthrone 2.5 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ประมาณ 5 นาที จะได้สารละลายมีสีเขียวออกน้ำเงิน วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 625 ด้วยเครื่อง Spectrophotometer ใช้ Glucose standard solution 0.5 มิลลิลิตร ที่ความเข้มข้นต่างๆ จำนวน 5 ความเข้มข้น ได้แก่ 0 0.2 0.4 0.6 0.8 และ 1.0 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร

3.4.5 การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด

นำตัวอย่างที่ความเข้มข้นต่างๆ จำนวน 5 ความเข้มข้น ได้แก่ 0 0.2 0.4 0.6 0.8 และ 1.0 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ปิเปตมา 0.2 มิลิลิตร เติมน้ำกลั่น 3 มิลลิลิตร จากนั้นเติม Folin-Ciocalteu reagent เจือจาง 10 เท่า ลงไป 3 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน วางทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน

10 นาที เติม 20% disodium carbonate solution ลงไป 0.6 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปวางในอ่างน้ำอุ่นที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที เมื่อครบเวลานำมาลดอุณหภูมิจนเท่าอุณหภูมิห้อง และนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 755 nm โดยใช้น้ำกลั่น set zero ใช้ gallic acid standard solution ที่ความเข้มข้นต่างๆ จำนวน 5 ความเข้มข้น ได้แก่ 0 0.2 0.4 0.6 0.8 และ 1.0 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ปิเปตมา 0.2 มิลลิลิตร รายงานปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดเป็นมิลลิกรัมสมมูลย์ของกรดแกลลิก/สารละลายตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร

3.4.6 การวัดความสามารถในการต้านออกซิเดชัน

3.4.6.1 ความสามารถในการยับยั้ง DPPH (DPPH radical scavenging assay) ดัดแปลงจากวิธีของ Yang *et al*. (2013) ดังนี้ ทำการเตรียมสารละลายตัวอย่าง โดยละลายในสารละลายเอทานอลเข้มข้นร้อยละ 50 ที่ความเข้มข้นต่างๆ จำนวน 5 ความเข้มข้น ได้แก่ 0 0.2 0.4 0.6 0.8 และ 1.0 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ปิเปตสารละลายตัวอย่าง จำนวน 2 มิลลิลิตร โดยใช้ไมโครปิเปต เติมสารละลาย 0.1 mM DPPH (ละลายใน 95% เอทานอล) จำนวน 2 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน เก็บไว้ในที่มืด ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ที่ 517 นาโนเมตร ใช้กรดแอสคอร์บิกเป็น positive control ปิเปตมา 2 มิลลิลิตร ที่ความเข้มข้นต่างๆ จำนวน 5 ความเข้มข้น ได้แก่ 0 0.2 0.4 0.6 0.8 และ 1.0 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร เติมสารละลาย 0.1 mM DPPH (ละลายใน 95% เอทานอล) จำนวน 2 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน เก็บไว้ในที่มืด ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ที่ 517 นาโนเมตร โดยใช้เมทานอลเข้มข้นร้อยละ 50 เป็นตัวอย่างควบคุม คำนวณค่าความสามารถในการยับยั้ง DPPH นำค่าที่ได้มาสร้างกราฟระหว่างร้อยละการยับยั้งกับความเข้มข้นแล้วรายงานเป็นค่า IC_{50}

% การยับยั้ง

$$= \frac{(\mathrm{A}517\ \text{ของตัวอย่างควบคุม} - \mathrm{A}517\ \text{ของตัวอย่างที่แต่ละความเข้มข้น}) \times 100}{\mathrm{A}517\ \text{ของตัวอย่างควบคุม}}$$

3.4.6.2 ความสามารถในการยับยั้ง ABTS (Improved ABTS radical cation decolorization assay) การเตรียม ABTS radical cation จะต้องทำการเตรียม ABTS radical cation stock solution โดยเตรียมจาก ชั่ง ABTS 0.0360 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร (7 มิลลิโมลาร์) และชั่ง $K_2S_2O_8$ 0.3784 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร

(140 มิลลิโมลาร์) หลังจากนั้นผสม 7 มิลลิโมลาร์ ABTS 10 มิลลิลิตร กับ 140 มิลลิโมลาร์ $K_2S_2O_8$ 176 ไมโครลิตร ในขวดสีชา ตั้งทิ้งไว้ในที่มืดเป็นเวลา 16 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง หลังจากนั้น นำมาเจือจางด้วยน้ำกลั่นในอัตราส่วนของ ABTS radical cation stock solution : น้ำกลั่น 1:75 มิลลิลิตร ทำการบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาทีจะได้สารละลายอนุมูล $ABTS^{\cdot+}$ ที่มีค่าการดูดกลืนแสงที่ 734 นาโนเมตร มีค่าดูดกลืนแสงอยู่ในช่วง 0.70 ± 0.02 หลังจากนั้นนำสารละลายอนุมูล $ABTS^{+}$ จำนวน 2.5 มิลลิลิตร มาผสมกับสารละลายตัวอย่างจำนวน 0.5 มิลลิลิตร ที่ความเข้มข้นต่างๆ จำนวน 5 ความเข้มข้น ได้แก่ 0 0.2 0.4 0.6 0.8 และ 1.0 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันเบาๆ แล้ววางไว้ที่อุณหภูมิห้องและที่มืดเป็นเวลา 6 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 734 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Spectrophotometer ใช้กรดแอสคอร์บิกเป็น positive control จำนวน 0.5 มิลลิลิตร ที่ความเข้มข้นต่างๆ จำนวน 5 ความเข้มข้น ได้แก่ 0 0.2 0.4 0.6 0.8 และ 1.0 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร มาผสมกับสารละลายอนุมูล $ABTS^{+}$ จำนวน 2.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันเบาๆ แล้ววางไว้ที่อุณหภูมิห้องและที่มืดเป็นเวลา 6 นาที และใช้โทรลอกซ์เป็น positive control จำนวน 0.5 มิลลิลิตร ที่ความเข้มข้นต่างๆ จำนวน 5 ความเข้มข้น ได้แก่ 0 0.2 0.4 0.6 0.8 และ 1.0 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร มาผสมกับสารละลายอนุมูล $ABTS^{+}$ จำนวน 2.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันเบาๆ ใช้น้ำกลั่นเป็นตัวอย่างควบคุม วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 734 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Spectrophotometer คำนวณค่าความสามารถในการยับยั้ง ABTS นำค่าที่ได้มาสร้างกราฟระหว่างร้อยละ การยับยั้งกับความเข้มข้นแล้วรายงานเป็นค่า IC_{50}

$$\% \text{ การยับยั้ง} = \frac{(A734 \text{ ของตัวอย่างควบคุม} - A734 \text{ ของตัวอย่างที่แต่ละความเข้มข้น}) \times 100}{A734 \text{ ของตัวอย่างควบคุม}}$$

3.4.6.3 ความสามารถในการยับยั้งอนุมูลซูเปอร์ออกไซด์ (superoxide radical scavenging assay) ทำตามวิธีของ Sasikumar และ Kalaisezhiyen (2014) ดังนี้ สารละลายตัวอย่างที่ความเข้มข้นต่างๆ จำนวน 5 ความเข้มข้น ได้แก่ 0 0.2 0.4 0.6 0.8 และ 1.0 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร จำนวน 2 มิลลิลิตร สารละลาย phosphate buffer (0.1 M, pH 7.2) 1.0 มิลลิลิตร สารละลาย 2mM NADH 1.0 มิลลิลิตร สารละลาย 0.5 mM NBT 1.0 มิลลิลิตร และสารละลาย 0.03 mM PMS 0.1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันดี บ่มที่อุณหภูมิห้อง นาน 5 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 562 นาโนเมตร เพื่อดูว่ามีสารฟอร์มาแซน (formazan) เกิดขึ้นเท่าไร เปรียบเทียบกับโทรลอกซ์และกรดแอสคอร์บิกที่ความเข้มข้นต่างๆ จำนวน 5 ความเข้มข้น ได้แก่ 0 0.2 0.4 0.6 0.8 และ 1.0

มิลลิกรัม/มิลลิลิตร จำนวน 2 มิลลิลิตร สารละลาย phosphate buffer (0.1 M, pH 7.2) 1.0 มิลลิลิตร สารละลาย 2mM NADH 1.0 มิลลิลิตร สารละลาย 0.5 mM NBT 1.0 มิลลิลิตร และสารละลาย 0.03 mM PMS 0.1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันดี บ่มที่อุณหภูมิห้อง นาน 5 นาที ใช้น้ำกลั่นเป็นตัวอย่างควบคุม วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 562 นาโนเมตร คำนวณค่าความสามารถในการยับยั้งอนุมูลซูเปอร์ออกไซด์ นำค่าที่ได้มาสร้างกราฟระหว่าง% การยับยั้งกับความเข้มข้น แล้วรายงานเป็นค่า IC_{50}

% การยับยั้ง

$$= \frac{(\mathrm{A}562 \text{ ของตัวอย่างควบคุม} - \mathrm{A}562 \text{ ของตัวอย่างที่แต่ละความเข้มข้น}) \times 100}{\mathrm{A}562 \text{ ของตัวอย่างควบคุม}}$$

3.4.6.4 ความสามารถในการยับยั้งอนุมูลไฮดรอกซิล (hydroxyl radical scavenging assay) ทำตามวิธีของ Yan *et al*. (2018) ดังนี้ ละลายตัวอย่างในน้ำกลั่นที่ความเข้มข้นต่างๆ จำนวน 5 ความเข้มข้น ได้แก่ 0 0.2 0.4 0.6 0.8 และ 1.0 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ปิเปตสารละลายตัวอย่าง จำนวน 0.2 มิลลิลิตร เติมสารละลาย 5mM $FeSO_4$ จำนวน 0.2 มิลลิลิตร และสารละลาย 1% (v/v) H_2O_2 จำนวน 0.2 มิลลิลิตร คนตลอดเวลา บ่มที่อุณหภูมิห้อง นาน 60 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 510 นาโนเมตร ใช้กรดแอสคอร์บิกเป็น positive control ที่ความเข้มข้นต่างๆ จำนวน 5 ความเข้มข้น ได้แก่ 0 0.2 0.4 0.6 0.8 และ 1.0 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร จำนวน 0.2 มิลลิลิตร เติมสารละลาย 5mM $FeSO_4$ จำนวน 0.2 มิลลิลิตร และสารละลาย 1% (v/v) H_2O_2 จำนวน 0.2 มิลลิลิตร คนตลอดเวลา บ่มที่อุณหภูมิห้อง นาน 60 นาที นาที ใช้น้ำกลั่นเป็นตัวอย่างควบคุม วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 510 นาโนเมตร คำนวณค่าความสามารถในการยับยั้งอนุมูลไฮดรอกซิล นำค่าที่ได้มาสร้างกราฟระหว่าง% การยับยั้งกับความเข้มข้น แล้วรายงานเป็นค่า IC_{50}

% การยับยั้ง

$$= \frac{(\mathrm{A}510 \text{ ของตัวอย่างควบคุม} - \mathrm{A}510 \text{ ของตัวอย่างที่แต่ละความเข้มข้น}) \times 100}{\mathrm{A}510 \text{ ของตัวอย่างควบคุม}}$$

3.4.6.5 ความสามารถในการจับกับอิออนของเฟอรัส (ferrous-ion-chelating activity) โดยการวัดการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนของ ferrous iron-ferrozine ดังนี้ (Jing et al., 2015) โดยนำสารละลายตัวอย่างเข้มข้นที่ความเข้มข้นต่างๆ จำนวน 5 ความเข้มข้น ได้แก่ 0 0.2 0.4 0.6 0.8 และ 1.0 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร จำนวน 2 มิลลิลิตร ผสมกับน้ำกลั่น 3.7 มล และ 2.0 mM $FeSO_4$ 0.1 มล และ 5.0 mM ferrozine 0.2 มล ให้ทำปฏิกิริยา 10 นาที นาที ใช้น้ำกลั่นเป็นตัวอย่าง

ควบคุม วัดค่าการดูดกลืนแสง 562 นาโนเมตร ใช้ ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) เป็น positive control ที่ความเข้มข้นต่างๆ จำนวน 5 ความเข้มข้น ได้แก่ 0 0.2 0.4 0.6 0.8 และ 1.0 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร จำนวน 2 มิลลิลิตร ผสมกับน้ำกลั่น 3.7 มล และ 2.0 mM $FeSO_4$ 0.1 มล และ 5.0 mM ferrozine 0.2 มล ให้ทำปฏิกิริยา 10 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสง 562 นาโนเมตร คำนวณค่าความสามารถในการจับกับโลหะ นำค่าที่ได้มาสร้างกราฟระหว่างร้อยละ ความสามารถในการจับกับอิออนของเฟอรัสกับความเข้มข้น แล้วรายงานเป็นค่า IC_{50}

% ความสามารถการจับกับอิออนของเฟอรัส

$$= \frac{(A562\ \text{ของตัวอย่างควบคุม} - A562\ \text{ของตัวอย่าง}) \times 100}{A562\ \text{ของน้ำกลั่น}}$$

3.4.6.6 ค่าความสามารถในการรีดิวซ์ (reducing power) ทำตามวิธีของ Yen และ Chen (1995) วิธีนี้เป็นการดูความสามารถของสารละลายตัวอย่างในการรีดิวซ์สารประกอบเฟอริกไปเป็นเฟอรัส โดยทำตาม ferric-reducing antioxidant power (FRAP assay) โดยนำสารละลายตัวอย่างที่ความเข้มข้นต่างๆ จำนวน 5 ความเข้มข้น ได้แก่ 0 0.2 0.4 0.6 0.8 และ 1.0 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ใช้กรดแอสคอร์บิกเป็น positive control ที่ความเข้มข้นต่างๆ จำนวน 5 ความเข้มข้น ได้แก่ 0 0.2 0.4 0.6 0.8 และ 1.0 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร จำนวน 2.5 มิลลิลิตร เติม 0.2 M สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์, pH 6.6 จำนวน 2.5 มิลลิลิตร เติมสารละลายโพแทสเซียมเฟอริไซยาไนด์เข้มข้นร้อยละ 1 (น้ำหนัก/ปริมาตร) จำนวน 2.5 มิลลิลิตร ให้ทำปฏิกิริยาที่ 50 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที เติมกรดไตรคลอโรอะซิติกความเข้มข้นร้อยละ 10 (น้ำหนัก/ปริมาตร) จำนวน 2.5 มิลลิลิตร หมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 3000-5000 รอบต่อนาที 10 นาที นำสารละลายส่วนใส (supernatant) มา 2.5 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่น 2.5 มิลลิลิตร เติมสารละลายเฟอริกคลอไรด์เข้มข้นร้อยละ 0.1 (น้ำหนัก/ปริมาตร) จำนวน 0.5 มิลลิลิตร วางไว้ 10 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 700 นาโนเมตร ค่าการดูดกลืนแสงที่เพิ่มขึ้นแสดงว่า มีความสามารถในการรีดิวซ์ได้มากขึ้น รายงานผลเป็นมิลลิกรัมสมมูลย์ของกรดแอสคอร์บิก/สารละลายตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร และ มิลลิกรัมสมมูลย์ของโทรลอกซ์สารละลายตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร

3.4.7 การวิเคราะห์ชนิดและปริมาณของสารประกอบฟีนอลิกด้วย HPLC

3.4.7.1 ขั้นตอนการสกัด

นำเห็ดถั่งเช่าสีทองผง 1.5 กรัม สกัดด้วยเมทานอล: น้ำ (80:20, v/v) 30 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1.5 ชั่วโมง sonication เป็นเวลา 15 นาที สารสกัดจะถูกกรองผ่านกระดาษ Whatman No. 4 จากนั้นนำกากที่เหลือมาสกัดใหม่ด้วยเมทานอล: น้ำ (80:20, v / v; 30 มล) นำไปประเหยภายใต้ความดันลดลงเพื่อกำจัดเมทานอล โดยใช้เครื่องระเหยแบบหมุน (Rotary Evaporator) ล้างด้วยไดเอทิลอีเธอร์ 2×20 มล. เอทิลอะซิเตรท 2×20 มล.กรองด้วย กระดาษ Whatman No. 4 ในขั้นตอนนี้เติมโซเดียมซัลเฟตเพื่อทำให้ปราศจากน้ำ โดยระเหยจนแห้ง แล้วละลายใหม่ในเมทานอล: น้ำ (80:20, v / v; 30 มล) (Barros et al., 2009) นำสารสกัดที่ได้มา 1 มล กรองผ่านฟิลเตอร์แบบใช้แล้วทิ้งขนาด 0.22 μm สำหรับการวิเคราะห์ HPLC

3.4.7.2 Chromatographic analysis

การวิเคราะห์ดำเนินการโดยใช้ เครื่อง High-Performance Liquid Chromatography (HPLC) (Agilent Technologies, Germany) C-18 (4.6 ×100 mm 2.7 micron) ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ตัวทำละลายเคลื่อนที่ (mobile phase) เป็นกรดฟอร์มิก 0.1% กับเมทานอล (85:15) และอัตราการไหลที่ 1.0 mL/min โดยใช้ปริมาตรการฉีดสาร (Inject volume) ที่ 20 μL และเป็นระบบแบบเดี่ยวในการนำตัวทำละลายเคลื่อนที่เข้าระบบ (isocratic system) สารมาตรฐานที่ใช้ได้แก่ gallic acid, Protocatechuic acid, p-Hydroxybenzoic acid, p-Coumaric acid และ cinnamic acid เวลาที่ใช้ทดลอง 20 นาทีต่อตัวอย่าง ที่ความยาวคลื่น 271 นาโนเมตร ตรวจวัดสารที่สามารถดูดกลืนคลื่นแสงที่ UV-Visible detector

3.5 การวางแผนการทดลองและการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

การดำเนินงานมีการทดลอง 3 ซ้ำ วางแผนการทดลองแบบ 2 x 2 Factorial in Completely Randomized Design (CRD) โดยการศึกษาผลของ 2 ปัจจัย คือ ปัจจัยที่ 1 (A) สกัดไขมันโดยใช้ชุดกลั่น Soxhlet (B) ไม่สกัดไขมัน และ 2 แบบ ประกอบด้วย 2.1) นำไป sonication ที่ 60°C นาที 602.2) นำไปสกัดด้วยน้ำร้อน 60°C นาที water bath รวมทั้งหมด 4 สิ่งทดลอง (treatments) การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ โดยการวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of Variance) และความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan’s Multiple Ranges Test โดยใช้โปรแกรมสถิติ SPSS เวอร์ชั่น 25 (SPSS, Inc., USA)

บทที่ 4
ผลการวิจัยและวิจารณ์

4.1 คุณภาพทางเคมีและกายภาพของเห็ดถั่งเช่าสีทองอบแห้ง

4.1.1 ปริมาณคอร์ไดซิปินและอะดีโนซีน

ปริมาณคอร์ไดซิปินและอะดีโนซีนในเห็ดถั่งเช่าสีทองที่ใช้ในการทดลองนี้มีค่าเท่ากับ 7.1181 ± 0.1495 และ 0.4179 ± 0.0699 มิลลิกรัม/กรัม ตามลำดับ โดยมีปริมาณคอร์ไดซิปิน+อะดีโนซีน 7.5360 มิลลิกรัม/กรัม ซึ่งมีค่าต่ำกว่าในเห็ดถั่งเช่าสีทองจากงานทดลองของ Hur (2008) ที่มีปริมาณคอร์ไดซิปินเท่ากับ 9.7 มิลลิกรัม/กรัม แต่ก็สูงกว่าในเห็ดถั่งเช่าสีทองและเห็ดถั่งเช่าทิเบตจากงานทดลองของ Huang *et al.* (2009) ที่มีปริมาณคอร์ไดซิปินเท่ากับ 0.980 ± 0.01 และ 2.654 ± 0.02 มิลลิกรัม/กรัม ตามลำดับ อาจเนื่องจากความแตกต่างกันทางด้านสายพันธุ์ ความแข็งแรงของสายพันธุ์ วิธีการเพาะเลี้ยง สภาพแวดล้อม ระยะเวลาที่ใช้เพาะเลี้ยง องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ pH การกวน แสง รวมไปถึงขั้นตอนการสกัดและการวิเคราะห์ (Aramwit *et al*.,2014; Adnan *et al*.,2017)

4.1.2 องค์ประกอบทางเคมี ได้แก่ ความชื้น ไขมัน โปรตีน เถ้า คาร์โบไฮเดรต

เห็ดถั่งเช่าสีทองอบแห้งมีความชื้นร้อยละ 8.31 ± 0.23 ปริมาณความชื้น เป็นค่าที่บ่งชี้ปริมาณน้ำที่มีอยู่ในอาหาร ปริมาณไขมันร้อยละ 3.19 ± 0.25 โดย Hur (2008) รางานว่าไขมันในเห็ดถั่งเช่าสีทอง ส่วนใหญ่ (ร้อยละ 70) เป็นกรดไขมันไม่อิ่มตัวโดยส่วนใหญ่เป็นกรดลิโนเลอิก (ร้อยละ 61) โปรตีนร้อยละ 30.97 ± 0.30 ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Yu et al. (2021) โดยมีปริมาณโปรตีนร้อยละ 29 เถ้าร้อยละ 6.3 ± 0.17 คาร์โบไฮเดรตร้อยละ 14.9 ± 0.35 ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Yue *et al*. (2013) พบว่าในเห็ดถั่งเช่าสีทองส่วนประกอบของพอลิแซคคาไรด์จากส่วนดอกและเส้นใยของเห็ดมีปริมาณผลผลิตร้อยละ 3 ถึง 8 ของน้ำหนักแห้งทั้งหมด chan et al. (2015) รายงานผลการวิเคราะห์ใกล้เคียง (เช่น ความชื้น เถ้า โปรตีน ไขมัน คาร์โบไฮเดรต และพลังงาน) พบว่าส่วนดอกและเส้นใยของเห็ดถั่งเช่าสีทองเป็นแหล่งโปรตีนที่ดี มีปริมาณโปรตีนร้อยละ 59.8 ในส่วนของดอกเห็ด และ ร้อยละ 39.5 ในเส้นใยของเห็ด ส่วนดอกของเห็ดถั่งเช่ามีปริมาณกรดอะมิโนทั้งหมดคือ 57.39 มก./กรัม

4.1.3 ค่า water activity

ค่า a_w เป็นน้ำอิสระที่จุลินทรีย์สามารถนำมาใช้ในการเจริญเติบโต มีความสำคัญต่ออายุการเก็บรักษา การเสื่อมเสีย และความปลอดภัยของอาหาร ค่า a_w 0.6 Lewicki et al. (2004) จากการหาค่า a_w ในเห็ดถั่งเช่าสีทองอบแห้ง พบว่ามีค่า a_w 0.30 ± 0.05 ซึ่งสอดคล้องกับข้อกำหนดดังกล่าว

4.1.4 ค่าสี (L* a* b*)

ค่าสี L* เป็นค่าความสว่างมีค่าตั้งแต่ 0-100 โดยค่า L* เข้าใกล้ 0 หมายถึงตัวอย่างมีความสว่างน้อยหรือมีสีดำ ส่วนถ้า L* เข้าใกล้ 100 หมายถึงตัวอย่างมีความสว่างมากจนเป็นสีขาว สำหรับค่าสี a* เป็นค่าสีที่แสดงถึงความเข้มของสีแดง และสีเขียว โดยถ้าค่า a* เป็นค่าสีที่แสดงถึงความเข้มของสีแดง และสีเขียว โดยถ้าค่า a* เป็นบวก หมายถึง ตัวอย่างเป็นสีแดง แต่ถ้าค่า a* เป็นลบ หมายถึงตัวอย่างเป็นสีเขียว และค่า b* เป็นค่าที่แสดงความเข้มของสีเหลือง และสีน้ำเงิน โดยถ้าค่า b* เป้นบวก หมายถึงตัวอย่างมีสีเหลือง แต่ถ้าค่า b* เป็นลบ หมายถึง ตัวอย่างเป็นสีน้ำเงิน (Hunter *et al.*, 1987) จากผลการทดลองในตารางที่ 3 พบว่าสีของผงเห็ดถั่งเช่าสีทองอบแห้ง มีค่า L* a* b* เท่ากับ 51.12 ± 0.07, 13.56 ± 0.15, 18.85±0.07

ตารางที่ 3 คุณภาพทางเคมี กายภาพของผงเห็ดถั่งเช่าสีทอง

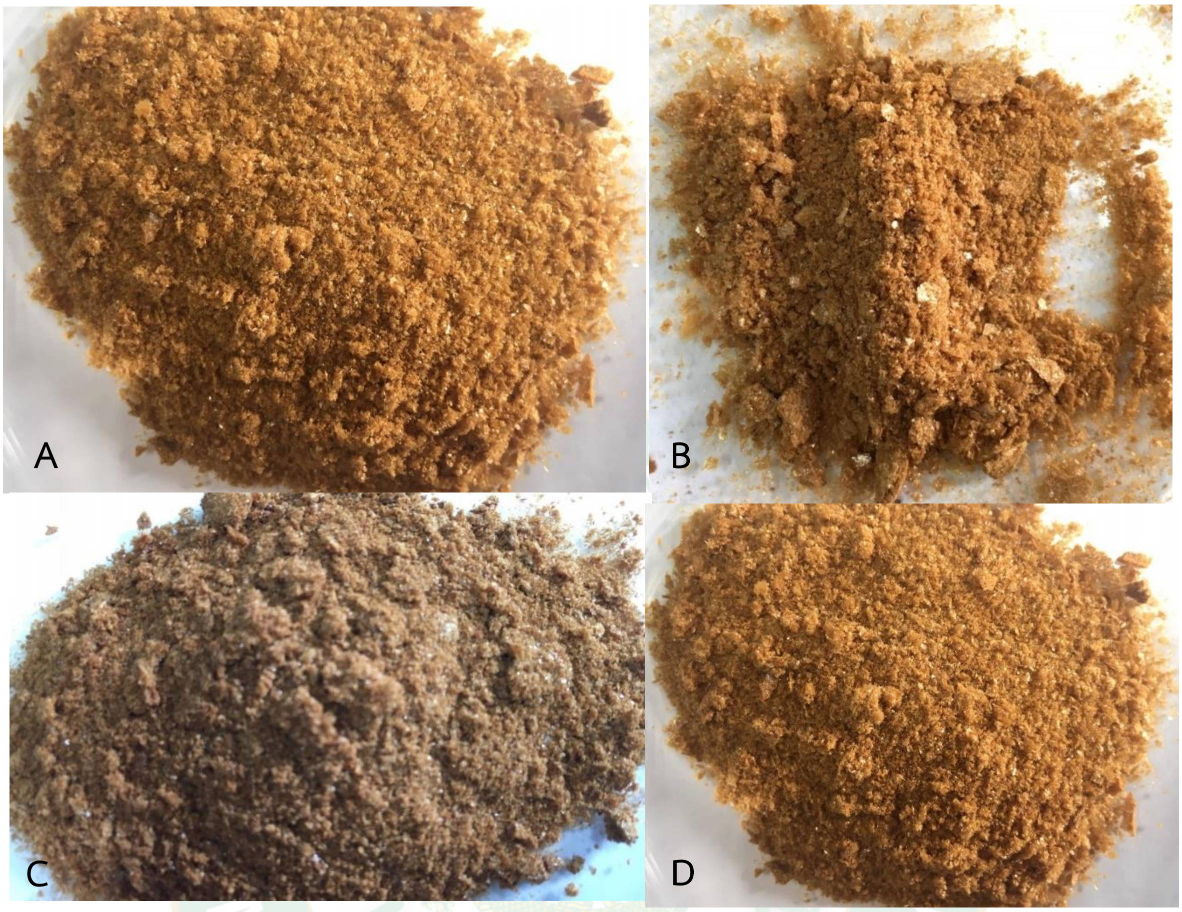
คุณภาพ	เห็ดถั่งเช่าสีทอง
คอร์ไดซิปิน (มิลลิกรัม/กรัม)	7.1181 ± 0.1495
อะดีโนซีน (มิลลิกรัม/กรัม)	0.4179 ± 0.0699
คอร์ไดซิปิน + อะดีโนซีน (มิลลิกรัม/กรัม)	7.5360
องค์ประกอบทางเคมี	
ความชื้น (ร้อยละ)	8.31 ± 0.23
ไขมัน (ร้อยละ)	3.19 ± 0.25
โปรตีน (ร้อยละ)	30.97 ± 0.30
เถ้า (ร้อยละ)	6.30 ± 0.17
คาร์โบไฮเดรต (ร้อยละ)	14.9 ± 0.35
ค่า a_w	0.30 ± 0.05
ค่าสี	
L*	51.12 ± 0.07
a*	13.56 ± 0.15
b*	18.85 ± 0.07

หมายเหตุ - ค่าของข้อมูลแสดงค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (n=3)

4.2 ปริมาณผลผลิตและคุณภาพของสารสกัด

นำผงเห็ดถั่งเช่าสีทองมาเตรียมสารสกัดภายใต้สภาวะในการสกัดที่แตกต่างกัน แล้วทำการศึกษาคุณภาพทางด้านต่างๆ ของสารสกัดที่ได้ เพื่อจะได้ทราบสภาวะการสกัดที่ดีที่สุดสำหรับ

นำไปใช้ประโยชน์ต่อไป ลักษณะสารสกัด 4 ตัวอย่างของเห็ดถั่งเช่าสีทองพบว่า สารสกัดจากเห็ดถั่งเช่าสีทองสกัดไขมันออก, ไม่ใช้อัลตราซาวด์ (C) มีสีค่อนข้างเข้มกว่า 3 ตัวอย่าง (ภาพที่13) อาจเนื่องมาจากตัวอย่างได้ทำการสกัดไขมันออกโดยใช้วิธีการสกัดโดยใช้ซอกฮ์เลท (soxhlet extraction) และการรีฟลักซ์ (reflux extraction) และกัดไขมันออกด้วยเอทานอลเข้มข้นร้อยละ 80 จำนวน 200 มิลลิลิตร เป็นเวลานาน 5 ชั่วโมง จำนวน 2 รอบ โดยเทคนิคการแยกสารออกฤทธิ์ดังกล่าวเป็นที่นิยมเนื่องจากอุปกรณ์ไม่ยุ่งยากและ ราคาไม่แพง แต่เทคนิคดังกล่าวก็ยังมีข้อด้อยบางประการได้แก่ ใช้เวลาในการสกัดนาน ทำให้เกิดการสูญหายและการสลายตัวของสารประกอบบางตัว และใช้อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง จึงทำเกินสีน้ำตาลเข้ม โดยสภาวะต่างๆ ได้แก่ อุณหภูมิ ชนิดของตัวทำละลาย pH และระยะเวลาในการสกัด เป็นต้น โดยในอาณาจักรเห็ดราพอลิแซคคาไรด์เป็นสารที่ออกฤทธิ์ ทางชีวภาพ โดยมีอนุพันธ์ต่างๆ ตัวอย่างเช่น ในเห็ดถั่งเช่าสีทองส่วนประกอบของพอลิแซคคาไรด์จากส่วนดอก และเส้นใยมีปริมาณประมาณร้อยละ 3 ถึง 8 ของน้ำหนักแห้งทั้งหมด (Yue et al., 2013) รายงาน อื่นๆ พบพอลิแซคคาไรด์สกัด มีส่วนประกอบของน้ำตาลดี-กาแล็กโทส, แอล-แอระบิโนส, ดี-ไซโลส, แอล-แรมโนส และกรดดี-กาแลกตูโรนิก และเมื่อสกัดส่วนของกลูโคกาแลกโตแมนแนนที่สกัดบริสุทธิ์ด้วยเบส พบน้ำตาลชนิดแมนโนส ร้อยละ 56.7 กาแล็กโทสร้อยละ 34.5 และกลูโคสร้อยละ 8.8 ของ น้ำหนักแห้ง (Ohta et al., 2007; Yan et al., 2008) ในเห็ดถั่งเช่าพบทรีฮาโลสร้อยละ 3 แมนนิทอลร้อยละ 9 และพอลิแซคคาไรด์ร้อยละ 3-8 ของน้ำหนักแห้ง (Li et al., 2006; Wang et al., 2009) ซึ่งคุณสมบัติทางชีวภาพจะสัมพันธ์กับปัจจัยต่างๆ เช่น ขนาดโมเลกุล ชนิดและสัดส่วนองค์ประกอบของน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว โครงสร้าง ตำแหน่งและการต่อกันของ พันธะไกลโคซิดิกร่วมกับลำดับของน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว (Luo et al., 2017; Zhao et al., 2014) และมีการเปลี่ยนแปลงเป็นผลึกของแข็งที่มีลักษณะแข็ง มีสีน้ำตาล สามารถดูดความชื้นจากสิ่งแวดล้อมได้ง่าย ทำให้เกิดปฏิกิริยาทางเคมีต่าง ๆ เช่นปฏิกิริยาการเกิดสีน้ำตาล



ภาพที่ 13 สารสกัด 4 ตัวอย่างของเห็ดถั่งเช่าสีทอง

A: สารสกัดจากเห็ดถั่งเช่าสีทองที่ ไม่สกัดไขมันออก, ไม่ใช้อัลตราซาวด์

B: สารสกัดจากเห็ดถั่งเช่าสีทองไม่สกัดไขมันออก, ใช้อัลตราซาวด์

C: สารสกัดจากเห็ดถั่งเช่าสีทองสกัดไขมันออก, ไม่ใช้อัลตราซาวด์

D: สารสกัดจากเห็ดถั่งเช่าสีทองสกัดไขมันออก, ใช้อัลตราซาวด์

4.2.1 ปริมาณผลผลิต

ตารางที่ 4 แสดงร้อยละผลผลิตของสารทั้ง 4 ตัวอย่าง พบว่าวิธีการเตรียมตัวอย่างไม่มีผลต่อร้อยละของผลิตที่ได้ ($p > 0.05$) โดยมีค่าอยู่ในช่วงร้อยละ 40.89– 41.64 การใช้อัลตราซาวด์ช่วยและไม่ช่วยในการสกัด รวมทั้งการสกัดไขมันออกและไม่สกัดไขมันออก ไม่มีผลต่อร้อยละผลผลิต เนื่องจากเป็นเห็ดชนิดเดียวกัน มีงานทดลองที่พบว่าการสกัดที่ได้ผลผลิตต่างกันเพราะเป็นเห็ดคนละชนิดกันทำให้มีสมบัติทางกายภาพต่างกัน ลักษณะการกระจายตัวในน้ำที่ดีจะช่วยให้ได้ผลผลิตสูงกว่าการจับตัวเป็นก้อนในน้ำ ซึ่งทำให้สกัดยาก (Cheung *et al.*, 2012) นอกจากนั้นยังมีงานทดลองที่พบว่าการใช้อัลตราซาวด์ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการสกัดจะได้ผลถ้าผงเห็ดมีขนาดเล็กพอ (Sun *et al.*, 2011) โดยได้สกัดเบต้าแคโรทีนจากเปลือกส้ม และผลผลิตจะเพิ่มขึ้นถ้าขนาดผงเล็กลง โดยถ้าเล็กกว่า 0.28 มิลลิเมตร ค่าผลผลิตที่ได้จะไม่แตกต่างกัน แต่ถ้าเปรียบเทียบที่มากกว่า0.28 มิลลิเมตร จะแตกต่างกัน โดยเกี่ยวกับ พื้นที่ผิวที่เพิ่มขึ้นเมื่อขนาดเล็กลงตามสมการ

$$K = \pi r^2 E$$

โดย K คือค่าคงที่ r คือเส้นผ่านศูนย์กลางของอนุภาค และ E คือผลผลิตของการสกัด ถ้าขนาดเล็กมากแล้ว การใช้อัลตราซาวด์ช่วยจะไม่มีผลในการเพิ่มผลผลิต เพราะผนังเซลล์ได้ถูกทำลายไปเรียบร้อยแล้วจากการลดขนาด และมีพื้นที่ผิวมากพอแล้ว (Sun *et al.*, 2011) ตามการทดลองนี้ได้บดจนเห็ดผงสามารถร่อนผ่านตะแกรงขนาด 60 เมช หรือคือมีขนาดอนุภาคต่ำกว่า 0.25 มิลลิเมตร

ตารางที่ 4 ร้อยละของผลผลิตของสารสกัดจากเห็ดถั่งเช่าสีทอง

ตัวอย่าง	ร้อยละของผลผลิต	Sig
Defat^{ns}		0.2697
Not defat	41.268 ± 0.142	
Defat	40.889 ± 0.583	
Ultrasound^{ns}		0.1806
Not ultrasound	41.635 ± 0.565	
Ultrasound	41.189 ± 0.517	
Defat × Ultrasound		0.909
(Treatment combination)^{ns}		
ND-NU	40.890 ± 0.476	
ND-U	41.268 ± 0.116	
D-NU	41.189 ± 0.422	
D-U	41.635 ± 0.461	

หมายเหตุ ^{ns} = not significantly different in the same column ($p > 0.05$).

ND-NU = ไม่สกัดไขมันออก, ไม่ใช้อัลตราซาวด์ ND-U = ไม่สกัดไขมันออก, ใช้อัลตราซาวด์ D-NU = สกัดไขมันออก, ไม่ใช้อัลตราซาวด์ และ D-U = สกัดไขมันออก, ใช้อัลตราซาวด์ A = สกัดไขมันออก และไม่สกัดไขมัน B = ใช้อัลตราซาวด์ และไม่ใช้อัลตราซาวด์

4.2.2 ปริมาณคอร์ไดซิปินและอะดีโนซีนของสารสกัดพอลิแซคคาไรด์จากเห็ดถั่งเช่าสีทอง

ตารางที่5 ปริมาณคอร์ไดซิปินและอะดีโนซีนของสารสกัดพอลิแซคคาไรด์จากเห็ดถั่งเช่าสีทอง พบว่าตัวอย่างที่สกัดไขมันออกและใช้อัลตร้าซาวน์มีปริมาณอะดีโนซีนและคอร์ไดเซปินสูงสุด ($p \leq 0.05$) มีค่า 965.22 ± 12.07 และ 689.04 ± 4.42 มิลลิกรัม/100 กรัม ตามลำดับ ซึ่งมีปริมาณมากกว่าเห็ดถังเช่าผงในตารางที่ 3 อาจเนื่องมาจากการสกัดโดยใช้อัลตราซาวด์เป็นเทคนิคการสกัดโดยใช้คลื่นอัลตราซาวด์เป็นการเพิ่มประสิทธิภาพของการสกัด โดยอาศัยหลักการคาวิเตชั่นที่เกิดขึ้นในตัวกลางที่ได้รับคลื่นอัลตราซาวด์ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางเคมีและทางกายภาพ ซึ่งประกอบด้วยช่วงอัดตัวของคลื่นเสียงมีผลทำให้โมเลกุลถูกบีบเข้าหากันและช่วงขยายของคลื่นเสียงทำให้ โมเลกุลแยกตัวจากกัน โดยมีการเปลี่ยนแปลงเป็นจังหวะต่อเนื่องคล้ายกับการกวนอย่างรุนแรง ทำให้การแพร่ ของตัวทำละลายในตัวอย่างดีขึ้นเนื่องจากเป็นการเพิ่มพื้นที่สัมผัสระหว่างตัวทำละลายและตัวอย่าง ส่งผลให้อัตราการสกัดเร็วขึ้น และปัจจัยสำคัญของกระบวนการที่มีผลต่อปริมาณสารสกัดและฤทธิ์ทางชีวภาพได้แก่ กำลังไฟฟ้า และระยะเวลาในการสกัด นอกจากนี้การใช้ความร้อนยังมีส่วนช่วยให้การสกัดเป็นไปอย่างมี ประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น (Pan *et al.*, 2012)

ตารางที่ 5 ปริมาณคอร์ไดซิปินและอะดีโนซีนของสารสกัดจากเห็ดถั่งเช่าสีทอง

ตัวอย่าง	ปริมาณสารต่อน้ำหนักสารสกัด polysaccharide (มิลลิกรัม/100กรัม)	
	Cordycepin	Adenosine
ND-NU	710.57 ± 35.26[a]	680.5 ± 4.75[c]
ND-U	914.36 ± 19.64[b]	657.42 ± 3.74[a]
D-NU	952.37 ± 10.36[c]	660.71 ± 3.75[b]
D-U	965.22 ± 12.07[d]	689.04 ± 4.42[d]

หมายเหตุ [abcd] = significantly different in the same column ($p < 0.05$).

4.2.3 ปริมาณพอลิแซคคาไรด์

จากการวิเคราะห์ปริมาณพอลิแซคคาไรด์ในสารสกัดที่ได้จากเห็ดถั่งเช่าสีทอง ตารางที่ 6 เมื่อทดสอบปัจจัย ทั้ง 2 ปัจจัยร่วมกัน คือ ผ่านการสกัด และไม่ผ่านการสกัดไขมันออก และการใช้อัลตราซาวด์ช่วย และไม่ใช้อัลตราซาวด์ช่วยในการสกัด พบว่ามีความแตกต่างกันทั้ง 2 ปัจจัยอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) พบว่า ND-NU ซึ่งเป็นตัวอย่างที่สกัดจากเห็ดถั่งเช่าสีทองที่ไม่ได้ทำการสกัดไขมันออกและไม่ได้ใช้อัลตราซาวด์ช่วยในการสกัดมีปริมาณพอลิแซคคาไรด์น้อยที่สุด

($p < 0.05$) โดย D-U ซึ่งเป็นตัวอย่างที่สกัดจากเห็ดถั่งเช่าสีทองที่ได้ทำการสกัดไขมันออกและใช้อัลตราซาวด์ช่วยในการสกัด มีค่าสูงที่สุด ($p < 0.05$) กระบวนการอัลตราซาวด์ร่วมกับการสกัดไขมันออกมีผลทำให้ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดและน้ำตาลรีดิวซ์มีปริมาณเพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับการใช้อัลตราซาวด์ หรือการสกัดไขมันออกเพียงอย่างเดียว เนื่องจากการอัดตัวของคลื่นเสียงจากกระบวนการสกัดด้วยอัลตราซาวด์ทำให้โมเลกุลของตัวอย่างถูกบีบอัดและขยายตัวสลับกันคล้ายการกวนอย่างรุนแรง และเมื่อเพิ่มระยะเวลาการสกัดจะทำให้ตัวทำละลายมีเวลาแพร่เข้าสู่ตัวอย่างได้เต็มที่ทำให้ปริมาณตัวถูกละลายที่ชะได้จากตัวอย่างเพิ่มขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของวงศ์เทวัญ และคณะ (2559) ที่ได้ศึกษาการสกัดสารพอลิแซคคาไรด์โดยการใช้คลื่นอัลตราโซนิคร่วมกับการให้ความร้อน พบว่า การใช้คลื่นอัลตราโซนิคในการสกัดมีผลทำให้เพิ่มประสิทธิภาพในการสกัดได้ดีขึ้นและช่วยลดระยะเวลาในการสกัดลง ได้ และรายงานวิจัยของ อัครเกียรติและศุภกาญจน์ (2563) ที่ได้ศึกษาการสกัดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากรำข้าวโดยการให้ความร้อนแบบไฮโดรเทอร์มอลร่วมกับการใช้คลื่นอัลตราซาวด์ รายงานว่าการสกัดด้วยวิธี ดังกล่าวจะช่วยเพิ่มปริมาณสารประกอบฟีนอลิกในการสกัด เนื่องจากการให้ความร้อนจะช่วยทำลายผนังเซลล์ของพืชและการใช้คลื่นอัลตราซาวด์มีผลทำให้ผนังเซลล์แตกออกทำให้สารที่อยู่ภายใต้ผิววัตถุดิบของพืชถูกปลดปล่อยออกสู่ตัวทำละลายและคลื่นเสียงจากอัลตราซาวด์ส่งผลให้เกิดคลื่นฟองอากาศขนาดเล็กของตัวทำละลายสามารถเข้าไปชะสารที่ต้องการในตัวอย่างพืชได้ดีขึ้น

ตารางที่ 6 ปริมาณพอลิแซคคาไรด์ของสารสกัดจากเห็ดถั่งเช่าสีทอง

ตัวอย่าง	% Polysaccharides			Sig
	Phenol sulfuric acid assay	Anthrone test	เฉลี่ย	
defat	-	-	-	0.000
Not defat	6.594 ± 0.03^{a}	6.900 ± 0.04^{a}	6.747 ± 0.04^{a}	-
Defat	7.226 ± 0.01^{b}	7.521 ± 0.00^{b}	7.373 ± 0.00^{b}	-
ultrasound	-	-	-	0.000
Not ultrasound	8.786 ± 0.01^{a}	8.982 ± 0.01^{a}	8.884 ± 0.01^{a}	-
Ultrasound	10.274 ± 0.01^{b}	10.358 ± 0.02^{b}	10.316 ± 0.02^{b}	-
Defat × Ultrasound (Treatment combination)	-	-	-	0.000
ND-NU	6.594 ± 0.02^{a}	6.900 ± 0.03^{a}	6.747 ± 0.03^{a}	-
ND-U	7.226 ± 0.02^{b}	7.521 ± 0.01^{b}	7.374 ± 0.02^{b}	-
D-NU	8.786 ± 0.01^{c}	8.982 ± 0.02^{c}	8.884 ± 0.02^{c}	-
D-U	10.274 ± 0.01^{d}	10.358 ± 0.01^{d}	10.316 ± 0.01^{d}	

หมายเหตุ ^{abcd} = significantly different in the same column ($p < 0.05$).

ND-NU = ไม่สกัดไขมันออก, ไม่ใช้อัลตราซาวด์ ND-U = ไม่สกัดไขมันออก, ใช้อัลตราซาวด์ D-NU = สกัดไขมันออก, ไม่ใช้อัลตราซาวด์ และ D-U = สกัดไขมันออก, ใช้อัลตราซาวด์ A = สกัดไขมันออก และไม่สกัดไขมัน B = ใช้อัลตราซาวด์ และไม่ใช้อัลตราซาวด์

4.2.4 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด

องค์ประกอบหลักทางเคมีที่มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระในเห็ดคือ สารประกอบฟีนอลิก และองค์ประกอบอื่นๆ ที่ ถูกพบน้อยมาก เช่น วิตามินซี เบต้าเคโรทีน ไลโคพีนและวิตามินอี เป็นต้น (Barros *et al*., 2008) ซึ่งสารประกอบฟีนอลิกมีความหลากหลายขึ้นอยู่กับ โครงสร้างทางเคมีของสารประกอบฟีนอลิก เช่น สารฟีนอล กรดฟีนอล และพอลิฟีนอล เป็นต้น สารประกอบฟีนอลิกมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระประสิทธิภาพสูง โดยสารประกอบฟีนอลิก มีโครงสร้างทั่วไปที่ประกอบด้วยโครงสร้างที่เป็นวงอะโรมาติก ที่มีหมู่แทนที่เป็นไฮดรอกซิล อย่างน้อย 1 หมู่ เป็นหลัก และอาจมีหมู่แทนที่ต่างๆ แทนในตำ แหน่งออโท (ortho) หรือ พารา (para) ได้อีก เช่น กลุ่มเมธอกซิลและกลุ่มเมธิล เป็นต้น โดยสารเหล่านี้จะทำ หน้าที่เป็นตัวรีดิวซ์และทำ หน้าที่ในการ บริจาคไฮโดรเจนอิออนของหมู่ไฮดรอกซิลให้กับอะตอมหรือ โมเลกุลที่มีอิเล็คตรอนเดี่ยว หรือที่เรียกว่าอนุมูลอิสระ ส่งผล ให้เกิดการยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน (Khaskheli *et al*., 2015) จากการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกในสารสกัดที่ได้จากเห็ดถั่งเช่าสีทองพบว่าเมื่อทดสอบปัจจัย ทั้ง 2 ปัจจัยร่วมกัน คือ ผ่านการ สกัด และไม่ผ่านการสกัดไขมันออก การใช้อัลตราซาวด์ช่วย และไม่ใช้อัลตราซาวด์ช่วยในการสกัด พบว่าทั้ง 2 ปัจจัยมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ได้ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 7 โดยสารสกัดพอลิแซคคาไรด์จากเห็ดถั่งเช่าสีทองตัวอย่างที่ 4, 3, 2 และ 1 ตามลำดับ พบว่า ND-NU ซึ่งเป็นตัวอย่างที่สกัดจากเห็ดถั่งเช่าสีทองที่ไม่ได้ทำการสกัดไขมันออกและไม่ได้ใช้อัลตราซาวด์ช่วยในการสกัดมีสารประกอบฟีนอลิกน้อยที่สุด ($p < 0.05$) โดยมีค่าเท่ากับ 0.483 ± 0.001 มิลลิกรัม / มิลลิตร โดย D-U ซึ่งเป็นตัวอย่างที่สกัดจากเห็ดถั่งเช่าสีทองที่ได้ทำการสกัดไขมันออกและใช้อัลตราซาวด์ช่วยในการสกัด มีค่าสูงที่สุด ($p < 0.05$) โดยมีค่าเท่ากับ 0.579 ± 0.003 มิลลิกรัม / มิลลิตร (ตารางที่ 7) ทั้งนี้จากวิธีการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดด้วยสาร Folin-Ciocaltue มีข้อจำกัดคือ ปริมาณค่าการดูดแสงที่วัดได้มีผลจากทั้งปริมาณสารประกอบฟีนอลิกและตัวรีดิวซ์อื่น เช่น วิตามินซี (L-ascorbic acid) จึงอาจส่งผลให้ค่าดังกล่าวที่วัดได้นั้นสูงกว่าความเป็นจริง นอกจากนี้ ชนิดและตำแหน่งของหมู่แทนที่ในสารประกอบฟีนอลิกที่แตกต่างกันสามารถส่งผลให้รูปแบบการเกิดปฏิกิริยากับตัวทำปฏิกิริยาได้แตกต่างกัน ซึ่งอาจเป็นอีกสาเหตุของข้อผิดพลาด ในการตรวจวัดปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมดังนั้น การคัดเลือกสารสกัดจะต้องมีประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระที่ดี และมีปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์รวมสูงเพื่อประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระ จากข้อมูลเบื้องต้นสารสกัดถั่งเช่าสีทองที่ผ่านการสกัดไขมันและใช้อัลตร้าซาวน์ใน

การสกัด มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกที่สูง มีประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระได้ดี ดังนั้นวิธีการสกัดหยาบจากเห็ดถั่งเช่าสีทองโดยผ่านการสกัดไขมันและใช้อัลตร้าซาวน์ในการสกัดเป็นวิธีที่ได้สารสกัดเห็ดถั่งเช่าสีทองที่มี ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกสูงและมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ

Nayak *et al*. (2015) ได้ศึกษาเปรียบเทียบกับเทคนิคการสกัดแบบอัลตราโซนิค การใช้ไมโครเวฟ และการเขย่า โดยพบว่าเทคนิคการสกัดแบบอัลตราโซนิค ให้ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกมากที่สุด

ตารางที่ 7 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดจากเห็ดถั่งเช่าสีทอง

ตัวอย่าง	**Total phenolic content (mg GAE/ ml of crude extract)**	Sig
defat	-	0.000
Not defat	0.483 ± 0.002[a]	-
Defat	0.524 ± 0.002[b]	-
ultrasound	-	0.000
Not ultrasound	0.552 ± 0.004[a]	-
Ultrasound	0.579 ± 0.004[b]	-
Defat × Ultrasound (Treatment combination)	-	0.004
ND-NU	0.483 ± 0.001[a]	-
ND-U	0.524 ± 0.004[b]	-
D-NU	0.552 ± 0.001[c]	-
D-U	0.579 ± 0.003[d]	-

หมายเหตุ [abcd] = significantly different in the same column ($p<0.05$).

ND-NU = ไม่สกัดไขมันออก, ไม่ใช้อัลตราซาวด์ ND-U = ไม่สกัดไขมันออก, ใช้อัลตราซาวด์ D-NU = สกัดไขมันออก, ไม่ใช้อัลตราซาวด์ และ D-U = สกัดไขมันออก, ใช้อัลตราซาวด์ A = สกัดไขมันออก และไม่สกัดไขมัน B = ใช้อัลตราซาวด์ และไม่ใช้อัลตราซาวด์

4.2.5 ความสามารถในการต้านออกซิเดชัน

สารสกัดพอลิแซคคาไรด์ทั้ง 4 ตัวอย่าง นำมาวัดความสามารถในการต้านออกซิเดชันด้วยวิธีต่าง ๆ ดังนี้ความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH, ความสามารถในการยับยั้ง ABTS•+ ความสามารถในการยับยั้งอนุมูลซูเปอร์ออกไซด์, ความสามารถในการจับกับอนุมูลไฮดรอกซิล, การวัดกิจกรรมการจับกับอิออนของเฟอรัส และค่าความสามารถในการรีดิวซ์

ในการทดลองนี้พบว่าการใช้อัลตราซาวด์ช่วยในการสกัดในการทดลองนี้จะได้สารสกัดที่มีความสามารถในการต้านออกซิเดชันสูงกว่า ซึ่งสอดคล้องกับงานทดลองของ Cheung *et al*. (2012) เมื่อทดสอบปัจจัย ทั้ง 2 ปัจจัยร่วมกัน คือ ผ่านการสกัด และไม่ผ่านการสกัดไขมันออก การใช้อัลตราซาวด์ช่วย และไม่ใช้อัลตราซาวด์ช่วยในการสกัด พบว่ามีความแตกต่างกันทั้ง 2 ปัจจัยมีมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

4.2.5.1 ความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH

จากการทดสอบฤทธิ์การต้านออกซิเดชันของสารสกัดที่ได้จากเห็ดถั่งเช่าสีทองด้วยวิธีการวัดความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH จากตารางที่ 8 พบว่า ND-NU ซึ่งเป็นตัวอย่างที่สกัดจากเห็ดถั่งเช่าสีทองที่ไม่ได้ทำการสกัดไขมันออกและไม่ได้ใช้อัลตราซาวด์ และ D-NU ซึ่งเป็นตัวอย่างที่สกัดจากเห็ดถั่งเช่าสีทองที่ทำการสกัดไขมันออกและไม่ได้ใช้อัลตราซาวด์ มากกว่า ND-U ซึ่งเป็นตัวอย่างที่สกัดจากเห็ดถั่งเช่าสีทองที่ไม่ทำการสกัดไขมันออกและใช้อัลตราซาวด์ และ D-U ซึ่งเป็นตัวอย่างที่สกัดจากเห็ดถั่งเช่าสีทองที่ทำการสกัดไขมันออกและใช้อัลตราซาวด์ โดย **DPPH** คืออนุมูลอิสระที่มีความเสถียร (stable free radical) เป็นสารที่นิยมนำไปใช้เป็นตัวชี้วัดความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารที่สนใจ ใช้หลักการของ DPPH$^{\bullet}$ ในรูปของอนุมูลอิสระ ที่อยู่ในสารละลายจะมีสีม่วงเข้มและดูดกลืนคลื่นแสงที่ความยาวคลื่น 515 นาโนเมตร Lebeau *et al*. (2000) การสูญเสียอิเล็กตรอนอิสระให้กับโมเลกุลอื่นโดยมีตัวรับอิเล็กตรอน คือ สารต้านอนุมูลอิสระหรือสารสกัดจากสมุนไพรจะเกิดการเปลี่ยนแปลงไปอยู่ในรูปออกซิไดซ์ (DPPH) ซึ่งการลดลงของอนุมูลอิสระดังกล่าวจะสังเกตได้จากการจางลงของสีม่วงในสารละลายสามารถวัดการค่าการดูดกลืนคลื่นแสงที่ลดลงที่ความยาวคลื่น 515 นาโนเมตร เป็นตัวชี้วัดของปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นหรือก็คือการลดลงของ DPPH ที่มีผลมาจากสารต้านอนุมูลอิสระ ดังนั้นพบว่าการกลั่นแบบ Soxhlet จะให้ความร้อนแก่ตัวทำละลายเพื่อให้กลายเป็นไอและเมื่อไอของตัวทำละลายสัมผัสถูกน้ำหล่อเย็นที่บริเวณคอนเดนเซอร์จะเปลี่ยนเป็นของเหลวอีกครั้ง หลังจากตัวทำละลายได้เปลี่ยนเป็นของเหลวจะทำหน้าที่

สกัดไขมันออกจากตัวอย่าง เมื่อครบรอบตัวทำละลายจะถูกให้ความร้อนและกลายเป็นไออีกครั้ง หมุนเวียนอย่างนี้จนครบเวลาที่สกัดจึงทำให้ไขมันลดลงและร่วมด้วยกับเทคนิคการสกัดโดยใช้คลื่นอัลตราซาวด์เป็นการเพิ่มประสิทธิภาพของการสกัด โดยอาศัยหลักการคาวิเตชั่นที่เกิดขึ้นในตัวกลางที่ได้รับคลื่นอัลตราซาวด์ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางเคมีและทางกายภาพ ซึ่งประกอบด้วยช่วงอัดตัวของคลื่นเสียงมีผลทำให้โมเลกุลถูกบีบเข้าหากันและช่วงขยายของคลื่นเสียงทำให้ โมเลกุลแยกตัวจากกัน โดยมีการเปลี่ยนแปลงเป็นจังหวะต่อเนื่องคล้ายกับการกวนอย่างรุนแรง ทำให้การแพร่ของตัวทำละลายในตัวอย่างดีขึ้นเนื่องจากเป็นการเพิ่มพื้นที่สัมผัสระหว่างตัวทำละลายและตัวอย่าง ส่งผลให้อัตราการสกัดเร็วขึ้น และเวลาในการสกัดลดลง (สุภาษิต และคณะ, 2556; วงศ์เทวัญ และคณะ, 2559) ดังนั้นเทคนิคการสกัดด้วยคลื่นอัลตราซาวด์ จึงเป็นทางเลือกที่สามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการสกัดสารสำคัญต่าง ๆ จากแหล่งทางธรรมชาติได้ ผลการทดลองสอดคล้องกับจากงานวิจัยของ Zhan et al. (2006) ได้ทำการสกัดเห็ดถั่งเช่าสีทอง เมื่อทดสอบฤทธิ์การต้านออกซิเดชันโดยวิธี DPPH assay พบว่าสารสกัดดังกล่าวมีฤทธิ์การยับยั้งสูงถึงร้อยละ 60-80 โดยใช้กรดแอสคอบิกเป็นสารมาตรฐาน นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าสารสกัดน้ำเห็ดถั่งเช่าสีทองมีฤทธิ์การต้านออกซิเดชันโดยการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH สูงที่สุด เมื่อเทียบกับสารสกัดที่ใช้สารละลายอื่นเป็นตัวทำละลาย Gu et al.(2007)

ตารางที่ 8 IC_{50} ของความสามารถในการจับกับ DPPH ของสารสกัดจากเห็ดถั่งเช่าสีทอง

ตัวอย่าง	IC_{50} (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)	Sig
	DPPH	
defat	-	0.863
Not defat	0.863 ± 0.045^{b}	-
Defat	0.634 ± 0.024^{a}	-
ultrasound	-	0.000
Not ultrasound	0.802 ± 0.035^{b}	-
Ultrasound	0.687 ± 0.041^{a}	-
Defat × Ultrasound (Treatment combination)	-	0.030
ND-NU	0.863 ± 0.037^{b}	-
ND-U	0.634 ± 0.020^{a}	-
D-NU	0.803 ± 0.029^{b}	-
D-U	0.687 ± 0.033^{a}	-
ascorbic acid	0.466 ± 0.000	-
Trolox	0.450 ± 0.001	-

หมายเหตุ ^{abcdef} = significantly different in the same column ($p < 0.05$).

ND-NU = ไม่สกัดไขมันออก, ไม่ใช้อัลตราซาวด์ ND-U = ไม่สกัดไขมันออก, ใช้อัลตราซาวด์ D-NU = สกัดไขมันออก, ไม่ใช้อัลตราซาวด์ และ D-U = สกัดไขมันออก, ใช้อัดตราซาวด์ A = สกัดไขมันออก และไม่สกัดไขมัน B = ใช้อัลตราซาวด์ และไม่ใช้อัลตราซาวด์

IC_{50} คือความเข้มข้นของสารที่สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระได้ร้อยละ 50

4.2.5.2 ความสามารถในการยับยั้ง $ABTS^{\bullet+}$

ความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระ $ABTS^{\bullet+}$ พบว่า D-U ซึ่งเป็นตัวอย่างที่สกัดจากเห็ดถั่งเช่าสีทองที่ทำการสกัดไขมันออกและใช้อัลตราซาวด์โทรล็อกซ์สามารถยับยั้งได้ดีที่สุด

(IC_{50}=0.594 ± 0.001 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) จากเห็ดถั่งเช่าสีทองตัวอย่างที่ 3, 2 และ 1 ตามลำดับ มีรายงานว่า สารสกัดถั่งเช่าสีทองสามารถกำจัดอนุมูลอิสระ $ABTS^{\bullet+}$ และลดอนุมูลอิสระได้ แสดงให้เห็นว่าสารสกัดถั่งเช่าสีทองมีความสามารถในการเป็นตัวให้ไฮโดรเจน (hydrogen donators) (Hamburger, 2007)

ตารางที่ 9 IC_{50} ของความสามารถในการจับกับ $ABTS^{\bullet+}$ ของสารสกัดจากเห็ดถั่งเช่าสีทอง

ตัวอย่าง	**IC_{50} (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)**	**Sig**
	$ABTS^{\bullet+}$	
Defat	-	0.000
Not defat	0.948 ± 0.001^{b}	-
Defat	0.814 ± 0.002^{a}	-
Ultrasound	-	0.000
Not ultrasound	0.762 ± 0.002^{b}	-
Ultrasound	0.594 ± 0.001^{a}	-
Defat × Ultrasound	-	0.000
(Treatment combination)		
ND-NU	0.948 ± 0.001^{d}	-
ND-U	0.814 ± 0.002^{c}	-
D-NU	0.762 ± 0.002^{b}	-
D-U	0.594 ± 0.001^{a}	-
ascorbic acid	0.557 ± 0.001	-
Trolox	0.547 ± 0.001	-

หมายเหตุ ^{abcdef} = significantly different in the same column ($p < 0.05$).

ND-NU = ไม่สกัดไขมันออก, ไม่ใช้อัลตราซาวด์ ND-U = ไม่สกัดไขมันออก, ใช้อัลตราซาวด์ D-NU = สกัดไขมันออก, ไม่ใช้อัลตราซาวด์ และ D-U = สกัดไขมันออก, ใช้อัลตราซาวด์ A = สกัดไขมันออก และไม่สกัดไขมัน B = ใช้อัลตราซาวด์ และไม่ใช้อัลตราซาวด์

IC_{50} คือความเข้มข้นของสารที่สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระได้ร้อยละ 50

4.2.5.3 ความสามารถในการยับยั้งอนุมูลซูเปอร์ออกไซด์

จากตารางที่ 10 ความสามารถในการจับกับอนุมูลซูเปอร์ออกไซด์ พบว่า D-U ซึ่งเป็นตัวอย่างที่สกัดจากเห็ดถั่งเช่าสีทองที่ได้ทำการสกัดไขมันออกและใช้อัลตราซาวด์ช่วยในการสกัดมีความสามารถในการจับกับอนุมูลซูเปอร์ออกไซด์ได้ดีที่สุด (IC_{50}=0.673 ± 0.001 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) รองลงมา D-NU ซึ่งเป็นตัวอย่างที่สกัดจากเห็ดถั่งเช่าสีทองที่ได้ทำการสกัดไขมันออกและไม่ใช้อัลตราซาวด์ (IC_{50} = 0.734 ± 0.001 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) ND-U ซึ่งเป็นตัวอย่างที่สกัดจากเห็ดถั่งเช่าสีทองที่ไม่สกัดไขมันออกและใช้อัลตราซาวด์ (IC_{50} = 0.826 ± 0.004มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) และ ND-NU ซึ่งเป็นตัวอย่างที่สกัดจากเห็ดถั่งเช่าสีทองที่ไม่สกัดไขมันออกและไม่ใช้อัลตราซาวด์ (IC_{50} = 0.869 ± 0.001มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) ตามลำดับ

4.2.5.4 ความสามารถในการจับกับอนุมูลไฮดรอกซิล

จากตารางที่ 11 ความสามารถในการจับกับอนุมูลไฮดรอกซิลลของสารสกัดพอลิแซคคาไรด์จากเห็ดถั่งเช่าสีทองพบว่าตัวอย่างที่สกัดจากเห็ดถั่งเช่าสีทองที่ได้ทำการสกัดไขมันออกและใช้อัลตราซาวด์ช่วยในการสกัดมีความสามารถในการจับกับอนุมูลซูเปอร์ออกไซด์ได้ดีที่สุด (IC_{50}=0.685 ± 0.002 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) อาจเนื่องจากในการสกัดสารด้วยการใช้คลื่นเสียงความถี่สูงร่วมด้วย โดยเป็นวิธีที่ใช้คลื่นเสียงความถี่สูงหรืออัลตราโซนิค ร่วมกับตัวทำละลายอินทรีย์หรือน้ำในการสกัดสารต้านออกซิเดชันจากวัตถุดิบ เครื่องมือดังกล่าวจะปล่อยคลื่นเสียงความถี่สูงออกมาในตัวพาซึ่งในที่นี้คือน้ำหรือตัวทำละลายอินทรีย์กระบวนการดังกล่าวจะทำให้เกิดฟองก๊าซซึ่งเกิดการหดตัวและขยายตัวเป็นวัฏจักร เมื่อฟองก๊าซขยายตัวจะดึงสารที่อยู่ภายในวัสดุออกมาละลายในตัวทำละลาย และในขณะที่ฟองก๊าซแตกออกจะเกิดความดันและความร้อนอย่างมากในบริเวณนั้นซึ่งจะมีผลทำให้เนื้อเยื่อของวัสดุฉีกขาด ด้วยอุณหภูมิที่สูงขึ้นทำให้สารต้านออกซิเดชันที่ต้องการสกัดละลายในตัวทำละลายได้ดีขึ้น

ตารางที่ 10 IC_{50} ของความสามารถในการยับยั้งอนุมูลซูเปอร์ออกไซด์ของสารสกัดจากเห็ดถั่งเช่าสีทอง

ตัวอย่าง	IC_{50} (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)	Sig
	superoxide	
Defat	-	0.000
Not defat	0.869 ± 0.001[b]	-
Defat	0.826 ± 0.005[a]	-
Ultrasound	-	0.000
Not ultrasound	0.734 ± 0.001[b]	-
Ultrasound	0.678 ± 0.001[a]	-
Defat × Ultrasound	-	0.000
(Treatment combination)		
ND-NU	0.869 ± 0.001[d]	-
ND-U	0.826 ± 0.004[c]	-
D-NU	0.734 ± 0.001[b]	-
D-U	0.673 ± 0.001[a]	-
ascorbic acid	0.585 ± 0.001	-
Trolox	0.600 ± 0.002	-

หมายเหตุ [abcdef] = significantly different in the same column ($p < 0.05$).

ND-NU = ไม่สกัดไขมันออก, ไม่ใช้อัลตราซาวด์ ND-U = ไม่สกัดไขมันออก, ใช้อัลตราซาวด์ D-NU = สกัดไขมันออก, ไม่ใช้อัลตราซาวด์ และ D-U = สกัดไขมันออก, ใช้อัลตราซาวด์ A = สกัดไขมันออก และไม่สกัดไขมัน B = ใช้อัลตราซาวด์ และไม่ใช้อัลตราซาวด์

IC_{50} คือความเข้มข้นของสารที่สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระได้ร้อยละ 50

ตารางที่ 11 IC_{50} ของความสามารถในการยับยั้งอนุมูลไฮดรอกซิลของสารสกัดจากเห็ดถั่งเช่าสีทอง

ตัวอย่าง	IC_{50} (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)	Sig
	hydroxyl	
Defat	-	0.000
Not defat	1.115 ± 0.004^{b}	-
Defat	0.870 ± 0.003^{a}	-
Ultrasound	-	0.000
Not ultrasound	0.757 ± 0.002^{b}	-
Ultrasound	0.685 ± 0.002^{a}	-
Defat × Ultrasound	-	0.000
(Treatment combination)		
ND-NU	1.115 ± 0.003^{d}	-
ND-U	0.870 ± 0.002^{c}	-
D-NU	0.757 ± 0.001^{b}	-
D-U	0.685 ± 0.002^{a}	-
ascorbic acid	0.551 ± 0.002	-
Trolox	0.567 ± 0.001	-

หมายเหตุ ^{abcdef} = significantly different in the same column ($p < 0.05$).

ND-NU = ไม่สกัดไขมันออก, ไม่ใช้อัลตราซาวด์ ND-U = ไม่สกัดไขมันออก, ใช้อัลตราซาวด์ D-NU = สกัดไขมันออก, ไม่ใช้อัลตราซาวด์ และ D-U = สกัดไขมันออก, ใช้อัลตราซาวด์ A = สกัดไขมันออก และไม่สกัดไขมัน B = ใช้อัลตราซาวด์ และไม่ใช้อัลตราซาวด์

IC_{50} คือความเข้มข้นของสารที่สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระได้ร้อยละ 50

4.2.5.5 ความสามารถในการจับกับอิออนของเฟอรัส

ส่วนการวัดกิจกรรมการจับกับอิออนของเฟอรัส เป็นการวัดความสามารถของสารต้านออกซิเดชันในการจับกับเฟอรัส โดยสารต้านออกซิเดชันในตัวอย่างจะมีบทบาทขัดขวางการจับกับเฟอรัสของสารประกอบเฟอโรซีน ทำให้การเกิดสารประกอบเชิงซ้อนของเฟอรัส-เฟอโรซีนลดลง ค่าการดูดกลืนแสงที่ 562 นาโนเมตรก็จะลดลง มักทำเปรียบเทียบกับสาร EDTA (Zhang *et al*., 2013) จึงทำให้ความสามารถในการจับกับอิออนของเฟอรัสของ D-U ซึ่งเป็นตัวอย่างที่สกัดจากเห็ดถั่งเช่าสีทองที่ได้ทำการสกัดไขมันออกและใช้อัลตราซาวด์ช่วยในการสกัดมีค่าสูงที่สุด (IC_{50}=0.641 ± 0.002 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) (ตารางที่ 12) เนื่องจากสารที่ต้องการสกัดจะละลายออกมาจากวัสดุด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ที่กลั่น และควบแน่นวนกลับมาอย่างต่อเนื่อง (d’Alessandro *et al*., 2012) และเมื่อนำไปทำการสกัดสารด้วยการใช้คลื่นเสียงความถี่สูงร่วมด้วยในการสกัดเป็นวิธีที่ใช้คลื่นเสียงความถี่สูงหรืออัลตราโซนิคร่วมกับตัวทำละลายอินทรีย์หรือน้ำในการสกัดสารต้านอนุมูลอิสระจากวัตถุดิบกระบวนการดังกล่าวจะทำให้เกิดฟองก๊าซซึ่งเกิดการหดตัวและขยายตัวเป็นวัฏจักร เมื่อฟองก๊าซขยายตัวจะดึงสารที่อยู่ภายในวัสดุออกมาละลายในตัวทำละลาย และในขณะที่ฟองก๊าซแตกออกจะเกิดความดันและความร้อนอยางมากในบริเวณนั้นซึ่งจะมีผลทำให้เนื้อเยื่อของวัสดุฉีกขาดด้วยอุณหภูมิที่สูงขึ้นทำให้สารต้านอนุมูลอิสระที่ต้องการสกัดละลายในตัวทำละลายได้ดีขึ้น (Tabaraki and Nateghi, 2011)

ตารางที่ 12 IC_{50} ของความสามารถในการจับกับอิออนของเฟอรัสของสารสกัดจากเห็ดถั่งเช่าสีทอง

ตัวอย่าง	IC_{50} (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) ferrous chelating	Sig
Defat	-	0.000
Not defat	0.926 ± 0.001^{b}	-
Defat	0.799 ± 0.003^{a}	-
Ultrasound	-	0.000
Not ultrasound	0.685 ± 0.002^{b}	-
Ultrasound	0.641 ± 0.002^{a}	-
Defat × Ultrasound (Treatment combination)	-	0.000
ND-NU	0.926 ± 0.001^{d}	-
ND-U	0.799 ± 0.003^{c}	-
D-NU	0.685 ± 0.001^{b}	-
D-U	0.641 ± 0.002^{a}	-
EDTA	0.536 ± 0.000	-

หมายเหตุ ^{abcde} = significantly different in the same column ($p < 0.05$).

ND-NU = ไม่สกัดไขมันออก, ไม่ใช้อัลตราซาวด์ ND-U = ไม่สกัดไขมันออก, ใช้อัลตราซาวด์ D-NU = สกัดไขมันออก, ไม่ใช้อัลตราซาวด์ และ D-U = สกัดไขมันออก, ใช้อัลตราซาวด์ A = สกัดไขมันออก และไม่สกัดไขมัน B = ใช้อัลตราซาวด์ และไม่ใช้อัลตราซาวด์

EDTA = ethylenediaminetetraacetic acid

IC_{50} คือความเข้มข้นของสารที่สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระได้ร้อยละ 50

4.2.5.6 ค่าความสามารถในการรีดิวซ์ (reducing power)

ความสามารถในการรีดิวซ์ของ D-U ซึ่งเป็นตัวอย่างที่สกัดจากเห็ดถั่งเช่าสีทองที่ได้ทำการสกัดไขมันออกและใช้อัลตราซาวด์ช่วยมีค่าสูงที่สุด ($p \leq 0.05$) ดังตารางที่ 13 เนื่องจากค่าความสามารถในการรีดิวซ์ จะมีความสัมพันธ์โดยตรงกับกิจกรรมการต้านออกซิเดชัน ถ้าในตัวอย่างมีสารรีดักโตน (reductone) อยู่ ซึ่งสามารถเกิดสารประกอบเชิงซ้อนที่มีสีกับสารโปตัสเซียมเฟอริไซยาไนด์ กรดไตรคลอโรอะซิติกและเฟอริกคลอไรด์โดยถ้าค่าการดูดกลืนแสงที่ 700 นาโนเมตรมีค่าสูง แสดงว่าตัวอย่างมีสารรีดักโตนสูงหรือมีค่าความสามารถในการรีดิวซ์สูงนั่นเอง จากการที่สารสกัดพอลิแซคคาไรด์แต่ละตัวอย่างมีค่าความสามารถในการต้านออกซิเดชันที่สูงในทุกรายการวิเคราะห์ เนื่องจากสารสกัดในการทดลองนี้เป็นการสกัดแบบหยาบ ทำให้สารสกัดที่ได้อยู่ในรูปของพอลิแซคคาไรด์ที่จับอยู่กับโปรตีน ซึ่งจะมีความสามารถในการต้านออกซิเดชันที่ดีกว่า (Cheung *et al*. 2012) พบว่าในสารสกัดที่มีการใช้อัลตราซาวด์ช่วยในการสกัดมีโปรตีนสูงกว่าที่สกัดโดยน้ำร้อนเพียงอย่างเดียวโดยไม่มีการใช้อัลตราซาวด์ช่วยในการสกัด

ตารางที่ 13 ค่าความสามารถในการรีดิวซ์ของสารสกัดจากเห็ดถั่งเช่าสีทอง

ตัวอย่าง	ascorbic acid equivalent (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)	Trolox equivalent (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)	Sig
Defat	-	-	0.000
Not defat	0.259 ± 0.002^{a}	0.331 ± 0.002^{a}	-
Defat	0.292 ± 0.002^{b}	0.369 ± 0.002^{b}	-
Ultrasound	-	-	0.000
Not ultrasound	0.292 ± 0.002^{a}	0.383 ± 0.004^{a}	-
Ultrasound	0.305 ± 0.003^{b}	0.462 ± 0.007^{b}	-
Defat × Ultrasound (Treatment combination)	-	-	0.000
ND-NU	0.259 ± 0.002^{a}	0.331 ± 0.002^{a}	-
ND-U	0.292 ± 0.002^{b}	0.369 ± 0.002^{b}	-
D-NU	0.292 ± 0.003^{b}	0.383 ± 0.003^{c}	-
D-U	0.305 ± 0.006^{c}	0.462 ± 0.005^{d}	-

หมายเหตุ ^{abcd} = significantly different in the same column. ($p < 0.05$)

ND-NU = ไม่สกัดไขมันออก, ไม่ใช้อัลตราซาวด์ ND-U = ไม่สกัดไขมันออก, ใช้อัลตราซาวด์ D-NU = สกัดไขมันออก, ไม่ใช้อัลตราซาวด์ และ D-U = สกัดไขมันออก, ใช้อัลตราซาวด์ A = สกัดไขมันออก และไม่สกัดไขมัน B = ใช้อัลตราซาวด์ และไม่ใช้อัลตราซาวด์

IC_{50} คือความเข้มข้นของสารที่สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระได้ร้อยละ 50

4.2.5.7 ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด ปริมาณพอลิแซคคาไรด์ ปริมาณคอร์ไดซิปินและอะดีโนซีจากเห็ดถั่งเช่าสีทองกับความสามารถในการต้านออกซิเดชันจากเห็ดถั่งเช่าสีทอง

จากตารางที่ 14 พบว่าในการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดเพิ่มขึ้น สารสกัดพอลิแซคคาไรด์ และคอร์ไดซิปิน มีผลต่อค่า IC_{50} ที่ลดลง แสดงให้เห็นว่า มีความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ความเชื่อมั่นร้อยละ 95 โดยสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดเป็นปัจจัยหลักในกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระ โดยวิธี 6 วิธีความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระชนิด DPPH, ABTS, ซูเปอร์ออกไซด์, และไฮดรอกซิล ความสามารถในการจับกับอิออนของเฟอรัส และค่าความสามารถในการรีดิวซ์ แต่พบว่าการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณอะดีโนซีนที่เพิ่มขึ้น ทำให้มีผลต่อต่อค่า IC_{50} ในเชิงบวก แสดงให้เห็นว่าอะดีโนซีนของสารสกัดพอลิแซคคาไรด์จากเห็ดถั่งเช่าสีทองมีผลต่อความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ

ตารางที่ 14 ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด ปริมาณพอลิแซคคาไรด์ ปริมาณคอร์ไดซิปินและอะดีโนซีจากเห็ดถั่งเช่าสีทองกับความสามารถในการต้านออกซิเดชันจากเห็ดถั่งเช่าสีทอง

ตัวแปร	DPPH	$ABTS^{\cdot +}$	superoxide	hydroxyl	ferrous chelating	reducing power
TPC	-0.483^{ns}	-0.973^{**}	-0.973^{**}	-0.984^{**}	-0.983^{**}	-0.989^{**}
polysaccharides	-0.310^{ns}	-0.965^{**}	-0.995^{**}	-0.905^{**}	-0.944^{**}	0.959^{**}
Adenosine	-0.264^{ns}	-0.196^{ns}	0.099^{ns}	0.294^{ns}	0.402^{ns}	0.411^{**}
Cordycepin	0.941^{**}	0.642^{*}	0.413^{ns}	0.613^{**}	0.506^{ns}	0.519^{**}

หมายเหตุ** หมายถึง Correlation is significant at the 95%.

ns หมายถึง not significantly different 95

4.2.5.8 ชนิดและปริมาณของสารประกอบฟีนอลิกด้วย HPLC

จากการวิเคราะห์หาปริมาณ gallic acid, Protocatechuic acid, p-Hydroxybenzoic acid, p-Coumaric acid และ cinnamic acid ในตัวอย่างสารสกัดจากเห็ดถั่งเช่าสีทองทั้ง 4 ตัวอย่าง พบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) โดย D-U มีปริมาณ Gallic acid สูงที่สุด (0.128 ± 0.01 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) และ ND-NU มีปริมาณ Gallic acid น้อยที่สุด (0.074 ± 0.03 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) ส่วนปริมาณProtocatechuic acid ในตัวอย่างเห็ดถั่งเช่าสีทอง พบว่า D-U มีปริมาณ Protocatechuic acid สูงที่สุด ND-U มีปริมาณ Protocatechuic acid น้อยที่สุด และ ND-NU , D-NU ไม่พบปริมาณ Protocatechuic acid ส่วนปริมาณ p-Hydroxybenzoic acid พบว่า D-U มีปริมาณ p-Hydroxybenzoic acid มากที่สุด (0.042 ± 0.001 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) และND-U มีปริมาณ p-Hydroxybenzoic acid น้อยที่สุด (0.014 ± 0.004 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) และ ND-NU , D-NU ไม่พบปริมาณ p-Hydroxybenzoic acid และนอกจากนี้ D-U มีปริมาณ p-Coumaric acid มากที่สุด (0.110 ± 0.002 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) รองลงมา D-NU มีปริมาณ p-Coumaric acid (0.110 ± 0.002 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) ND-U มีปริมาณ p-Coumaric acid น้อยที่สุด (0.020 ± 0.002 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) และ ND-NU ไม่พบปริมาณ p-Coumaric acid แต่ทั้ง 4 ตัวอย่างไม่พบปริมาณ cinnamic acid จากการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกในเห็ดถั่งเช่าสีทอง พบว่าตัวอย่างที่ผ่านการสกัดไขมันออก และใช้อัลราซาวช่วยมีผลต่อชนิดและปริมาณฟีนอลิก อาจเนื่องมากจากงานวิจัยนี้ใช้การสกัดด้วยคลื่นอัลตร้าซาวน์ (Ultrasound-assisted extraction) ซึ่งเป็นการใช้อัลตราโซนิกที่มีความถี่มากกว่า 20 กิโลเฮิร์ตซ์ ช่วยในการสกัดสารต้านอนุมูลอิสระออกจากโครงสร้างของพืชออกมาอยู่ในตัวทำละลาย โดยคลื่นอัลตราโซนิกทำให้โครงสร้างของตัวทำละลายถูกบีบอัดสลับกับการคลายตัวหลายรอบส่งผลให้เกิดฟองอากาศขนาดเล็กและเพิ่มขนาดฟองอากาศมากขึ้นจนกระทั่งแตกตัวออกในที่สุด ก่อให้เกิดแรงดันสูงที่เข้าไปทำลายผนังเซลล์ของเนื้อเยื่อพืชและตัวทำละลาย สามารถแทรกซึมเข้าสู่เนื้อเยื่อพืชได้อย่างรวดเร็ว และเกิดแรงเฉือนสูงทำให้สารสำคัญถูกชะหรือเกิด การถ่ายเทมวลสารออกจากเนื้อเยื่อพืชละลายออก มากับตัวทำละลายได้มากขึ้น Vilkhu et al. (2008) และการให้ความความร้อนสูงในการสกัดช่วยทำให้เนื้อเยื่อพืชอ่อนนุ่มจึงช่วยเพิ่มความสามารถในการถ่ายเทมวลสารและการแทรกซึมของตัวทำละลายเข้าสู่โครงสร้างของพืชได้มากขึ้น ช่วยทำลายพันธะระหว่างสารประกอบฟีนอลที่เชื่อมต่ออยู่กับโปรตีนและพอลิแซคคาไรด์ในโครงสร้างของพืชช่วยเพิ่มความสามารถในการละลายและสัมประสิทธิ์การแพร่ของสารประกอบฟีนอลให้ถูกชะออกมาอยู่ในตัวทำละลายได้มากขึ้น (Hidalgo and Almajano, 2017)

ผลการศึกษานี้สอดคล้องกับรายงานของ Xu et al. (2008) ที่พบว่าปริมาณสารประกอบฟีนอลเพิ่มสูงขึ้นเมื่อใช้อุณหภูมิสูงในการสกัดเปลือกมะนาวในตัวทำละลายเอทานอลเข้มข้นร้อยละ 95 และสกัดด้วยคลื่นอัลตราโซนิกที่ 60 องศาเซลเซียส 30 นาทีมีผลต่อสารประกอบฟีนอลและฤทธิ์การต้านออกซิเดชันในสารสกัดเปลือกมะนาว นอกจากนี้งานทดลองของ

ตารางที่ 15 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกในเห็ดถั่งเช่าสีทอง

สารประกอบฟีนอลิก (mg/g)	ND-NU	ND-U	D-NU	D-U
Gallic acid	0.074 ± 0.03[d]	0.104 ± 0.02[c]	0.116 ± 0.03[b]	0.128 ± 0.01[a]
Protocatechuic	nd	0.024 ± 0.002[b]	nd	0.078 ± 0.001[a]
p-Hydroxybenzoic acid	nd	0.014 ± 0.004[b]	nd	0.042 ± 0.001[a]
p-Coumaric acid	nd	0.020 ± 0.002[c]	0.033 ± 0.001[b]	0.110 ± 0.002[a]
cinnamic acid	nd	nd	nd	nd

หมายเหตุ [abcd] = significantly different in the same column ($p < 0.05$).

- nd ไม่พบปริมาณสารในเห็ดถั่งเช่าสีทอง

บทที่ 5
สรุปผล

5.1 ผงเห็ดถั่งเช่าสีทองมีปริมาณคอร์ไดเซปินและอะดีโนซีนสูงสุด ($p < 0.05$) โดยมีค่าเท่ากับ 711.81 ±14.95 และ 41.79 ± 6.99 มิลลิกรัม/100 กรัม ตามลำดับและมีความชื้นร้อยละ 8.31 ± 0.23 มีปริมาณโปรตีนร้อยละ 30.97 ± 0.30 ปริมาณเถ้าร้อยละ 6.3 ± 0.17 ค่า aw พบว่าเท่ากับ 0.30 ± 0.05 ค่าสี L* a* b* เท่ากับ 51.12 ± 0.07, 13.56 ± 0.15, 18.85 ± 0.07 ตามลำดับ

5.2 ร้อยละของผลผลิตของสารสกัดจากเห็ดถั่งเช่าสีทองที่สกัดด้วยสภาวะที่ต่างกัน พบว่าไม่แตกต่างกัน ($p > 0.05$) โดยมีค่าอยู่ในช่วงร้อยละ 40.89 – 41.64

5.3 ปริมาณคอร์ไดซิปินและอะดีโนซีนของสารสกัดจากเห็ดถั่งเช่าสีทอง พบว่าตัวอย่างที่สกัดไขมันออกและใช้อัลตร้าซาวน์มีปริมาณอะดีโนซีนและคอร์ไดเซปินสูงสุด ($p \leq 0.05$) โอยมีค่า 965.22 ± 12.07 และ 689.04 ± 4.42 ตามลำดับ

5.4 ความสามารถในการต้านออกซิเดชันของสารสกัดหยาบพอลิแซคคาไรด์ที่สกัดจากเห็ดถั่งเช่าสีทองที่สกัดด้วยสภาวะที่ต่างกัน โดยการประเมินด้วยวิธีต่าง ๆ ได้แก่ความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH, ความสามารถในการยับยั้ง ABTS•+ ความสามารถในการยับยั้งอนุมูลซูเปอร์ออกไซด์, ความสามารถในการจับกับอนุมูลไฮดรอกซิล, การวัดกิจกรรมการจับกับอิออนของเฟอรัส และค่าความสามารถในการรีดิวซ์ พบว่ามีความแตกต่างกัน ($p < 0.05$)

5.5 สารสกัดที่ได้จากการสกัดไขมันออกก่อน ทั้งที่ใช้และไม่ใช้อัลตร้าซาวน์ช่วยในการสกัด มีความสามารถในการจับกับอนุมูล DPPH ดีกว่าตัวอย่างสารสกัดที่ไม่ได้สกัดไขมันออกก่อนและไม่ได้ใช้อัลตร้าซาวน์ช่วยในการสกัด ($p < 0.05$)

5.6 สารสกัดที่ได้จากการสกัดไขมันออกก่อนและใช้อัลตร้าซาวน์ช่วยในการสกัดมีความสามารถในการจับกับอนุมูล $ABTS^{\bullet +}$, ความสามารถในการยับยั้งอนุมูลซูเปอร์ออกไซด์, ความสามารถในการจับกับอนุมูลไฮดรอกซิล ดีกว่าตัวอย่างอื่น ($p < 0.05$) โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.594 ± 0.001, 0.673 ± 0.001 และ 0.685 ± 0.002 ตามลำดับ

5.7 ความสามารถในการจับกับอิออนของเฟอรัส (Fe^{2+}) ของสารสกัดที่ได้จากการสกัดไขมันออกก่อนและใช้อัลตร้าซาวน์ช่วยในการสกัดมีค่าดีที่สุด ($p < 0.05$) เมื่อเทียบกับตัวอย่างอื่น รองลงมาเป็นตัวอย่างที่สกัดไขมันออกก่อนและไม่ใช้อัลตราซาวด์ช่วยในการสกัด

5.8 จากการวิเคราะห์หาปริมาณ gallic acid, Protocatechuic acid,p-Hydroxybenzoic acid, p-Coumaric acid และ cinnamic acid ในตัวอย่าสารสกัดจากงเห็ดถั่งเช่าสีทองทั้ง 4 ตัวอย่าง พบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) โดย D-U มีปริมาณ Gallic acid สูงที่สุด (0.128± 0.01 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) และ ND-NU มีปริมาณ Gallic acid น้อยที่สุด (0.074 ± 0.03 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) ส่วนปริมาณProtocatechuic acid ในตัวอย่างเห็ดถั่งเช่าสีทอง พบว่า D-U มีปริมาณ Protocatechuic acid สูงที่สุด ND-U มีปริมาณ Protocatechuic acid น้อยที่สุด และ ND-NU , D-NU ไม่พบปริมาณ Protocatechuic acid ส่วนปริมาณ p-Hydroxybenzoic acid พบว่า D-U มีปริมาณ p-Hydroxybenzoic acid มากที่สุด (0.042 ± 0.001 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) และND-U มีปริมาณ p-Hydroxybenzoic acid น้อยที่สุด (0.014 ± 0.004 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) และ ND-NU , D-NU ไม่พบปริมาณ p-Hydroxybenzoic acid และนอกจากนี้ D-U มีปริมาณ p-Coumaric acid มากที่สุด (0.110 ± 0.002 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) รองลงมา D-NU มีปริมาณ p-Coumaric acid (0.110 ± 0.002 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) ND-U มีปริมาณ p-Coumaric acid น้อยที่สุด (0.020 ± 0.002 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) และ ND-NU ไม่พบปริมาณ p-Coumaric acid และสารสกัดทั้ง 4 ตัวอย่างไม่พบปริมาณ cinnamic acid

บรรณานุกรม

บรรณานุกรม

Adnan, M., Ashraf, S. A., Khan, S., Alshammari, E. & Awadelkareem, A. M. 2017. Effect of pH, temperature and incubation time on cordycepin production from *Cordyceps militaris* using solid-state fermentation on various substrates. **CyTA-Journal of Food**, 15(4), 617-621.

Ahn, Y.-J., Park, S.-J., Lee, S.-G., Shin, S.-C. & Choi, D.-H. 2000. Cordycepin: Selective growth inhibitor derived from liquid culture of *Cordyceps militaris* against *Clostridium spp*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 48(7), 2744-2748.

Aramwit, P., Bang, N., Ratanavaraporn, J., Nakpheng, T. & Srichana, T. 2014. An anti-cancer cordycepin produced by *Cordyceps militaris* growing on the dead larva of *Bombyx mori* silkworm. **Journal of Agricultural Science**, 6(6), 41.

Azzi, A., Davies, K. J. & Kelly, F. 2004. Free radical biology–terminology and critical thinking. **FEBS Letters**, 558(1-3), 3-6.

Barros, L., Dueñas, M., Ferreira, I. C., Baptista, P. & Santos-Buelga, C. 2009. Phenolic acids determination by HPLC–DAD–ESI/MS in sixteen different Portuguese wild mushrooms species. **Food and Chemical Toxicology**, 47(6), 1076-1079.

Barros, L., Falcão, S., Baptista, P., Freire, C., Vilas-Boas, M. & Ferreira, I. C. 2008. Antioxidant activity of *Agaricus sp*. mushrooms by chemical, biochemical and electrochemical assays. **Food Chemistry**, 111(1), 61-66.

Benzie, I. F. 2003. Evolution of dietary antioxidants. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology**, 136(1), 113-126.

Carneiro, A. A., Ferreira, I. C., Dueñas, M., Barros, L., Da Silva, R., Gomes, E. & Santos-Buelga, C. 2013. Chemical composition and antioxidant activity of dried powder formulations of *Agaricus blazei* and *Lentinus edodes*. **Food Chemistry**, 138(4), 2168-2173.

Cui, J. D. 2015. Biotechnological production and applications of *Cordyceps militaris,* a valued traditional Chinese medicine. **Critical Reviews in Biotechnology**, 35(4), 475-484.

d'Alessandro, L. G., Kriaa, K., Nikov, I. & Dimitrov, K. 2012. Ultrasound assisted extraction of polyphenols from black chokeberry. **Separation and Purification Technology***,* 93,42-47.

Dong, C., Yang, T. & Lian, T. 2014. A comparative study of the antimicrobial, antioxidant, and cytotoxic activities of methanol extracts from fruit bodies and fermented mycelia of caterpillar medicinal mushroom *Cordyceps militaris*. **International Journal of Medicinal Mushrooms***,* 16(5).485-495.

El Enshasy, H. A. & Hatti-Kaul, R. 2013. Mushroom immunomodulators: unique molecules with unlimited applications. **Trends in Biotechnology***,* 31(12)*,* 668-677.

Eliza, J., Daisy, P. & Ignacimuthu, S. 2010. Antioxidant activity of costunolide and eremanthin isolated from *Costus speciosus* (Koen ex. Retz) Sm.**Chemico-Biological Interactions***,* 188(3)*,* 467-472.

Frizzel, L. 1988. Biological effects of acoustic cavitation. **Ultrasound, its chemical, physical and biological effects**. New York:VCH Publishers, 1988; 287-304.

Gu, Y.-X., Wang, Z.-S., Li, S.-X. & Yuan, Q.-S. 2007. Effect of multiple factors on accumulation of nucleosides and bases in *Cordyceps militaris*. **Food Chemistry***,* 102(4)*,* 1304-1309.

Hibbett, D. S., Binder, M., Bischoff, J. F., Blackwell, M., Cannon, P. F., Eriksson, O. E., Huhndorf, S., James, T., Kirk, P. M. & Lücking, R. 2007. A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. **Mycological Research***,* 111(5)*,* 509-547.

Hidalgo, G.-I. & Almajano, M. P. 2017. Red fruits: extraction of antioxidants, phenolic content, and radical scavenging determination: a review. **Antioxidants***,* 6(1)*,* 7.

Jo, W. S., Choi, Y. J., Mm, H. J., Lee, J. Y., Nam, B. H., Lee, J. D., Lee, S. W., Seo, S. Y. & Jeong, M. H. 2010. The anti-inflammatory effects of water extract from *Cordyceps militaris* in murine macrophage. **Mycobiology***,* 38(1)*,* 46-51.

Khaskheli, S. G., Zheng, W., Sheikh, S. A., Khaskheli, A. A., Liu, Y., Soomro, A. H., Feng, X., Sauer, M. B., Wang, Y. F. & Huang, W. 2015. Characterization of *Auricularia auricula* polysaccharides and its antioxidant properties in fresh and pickled product. **International Journal of Biological Macromolecules***,* 81,387-395.

Kim, S.-Y., Chung, S.-I., Nam, S.-H. & Kang, M.-Y. 2009. Cholesterol lowering action and antioxidant status improving efficacy of noodles made from unmarketable oak mushroom (*Lentinus edodes*) in high cholesterol fed rats. **Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry**, 52(3), 207-212.

Lebeau, J., Furman, C., Bernier, J.-L., Duriez, P., Teissier, E. & Cotelle, N. 2000. Antioxidant properties of di-tert-butylhydroxylated flavonoids. **Free Radical Biology and Medicine**, 29(9), 900-912.

Li, S., Yang, F. & Tsim, K. W. 2006. Quality control of Cordyceps sinensis, a valued traditional Chinese medicine. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, 41(5), 1571-1584.

Lin, R., Liu, H., Wu, S., Pang, L., Jia, M., Fan, K., Jia, S. & Jia, L. 2012. Production and in vitro antioxidant activity of exopolysaccharide by a mutant, *Cordyceps militaris* SU5-08. **International Journal of Biological Macromolecules**, 51(1-2), 153-157.

Liu, J., Sun, Y., Yu, H., Zhang, C., Yue, L., Yang, X., Wang, L. & Liu, J. 2012. Purification and identification of one glucan from golden oyster mushroom (Pleurotus citrinopileatus (Fr.) Singer). **Carbohydrate Polymers**, 87(1), 348-352.

Liu, R. H. 2004. Potential synergy of phytochemicals in cancer prevention: mechanism of action. **The Journal of Nutrition**, 134(12), 3479S-3485S.

Liu, X.-C., Zhu, Z.-Y., Tang, Y.-L., Wang, M.-f., Wang, Z., Liu, A.-J. & Zhang, Y.-M. 2016. Structural properties of polysaccharides from cultivated fruit bodies and mycelium of *Cordyceps militaris*. **Carbohydrate Polymers**, 142(63-72.

Losso, J. N., Bansode, R. R., Trappey II, A., Bawadi, H. A. & Truax, R. 2004. In vitro anti-proliferative activities of ellagic acid. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, 15(11), 672-678.

Luo, X., Duan, Y., Yang, W., Zhang, H., Li, C. & Zhang, J. 2017. Structural elucidation and immunostimulatory activity of polysaccharide isolated by subcritical water extraction from *Cordyceps militaris*. **Carbohydrate Polymers**, 157(794-802.

Maeda, Y. Y. & Chihara, G. (1999). Lentinan and other antitumoral polysaccharides. In **Immunomodulatory agents from plants** (pp. 203-221): Springer.

Maisuthisakul, P., Pongsawatmanit, R. & Gordon, M. H. 2007. Characterization of the phytochemicals and antioxidant properties of extracts from Teaw (*Cratoxylum formosum* Dyer). **Food Chemistry***,* 100(4)*,* 1620-1629.

Mishra, K., Ojha, H. & Chaudhury, N. K. 2012. Estimation of antiradical properties of antioxidants using DPPH assay: A critical review and results. **Food Chemistry***,* 130(4)*,* 1036-1043.

Morse, D., Lin, L., Choi, A. M. & Ryter, S. W. 2009. Heme oxygenase-1, a critical arbitrator of cell death pathways in lung injury and disease. **Free Radical Biology and Medicine***,* 47(1)*,* 1-12.

Nakamura, K., Shinozuka, K. & Yoshikawa, N. 2015. Anticancer and antimetastatic effects of cordycepin, an active component of *Cordyceps sinensis*. **Journal of Pharmacological Sciences***,* 127(1)*,* 53-56.

Nayak, B., Liu, R. H. & Tang, J. 2015. Effect of processing on phenolic antioxidants of fruits, vegetables, and grains—a review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition***,* 55(7)*,* 887-918.

Ohta, Y., Lee, J.-B., Hayashi, K., Fujita, A., Park, D. K. & Hayashi, T. 2007. In vivo anti-influenza virus activity of an immunomodulatory acidic polysaccharide isolated from *Cordyceps militaris* grown on germinated soybeans. **Journal of Agricultural and Food Chemistry***,* 55(25)*,* 10194-10199.

Oke, F. & Aslim, B. 2011. Protective effect of two edible mushrooms against oxidative cell damage and their phenolic composition. **Food Chemistry***,* 128(3)*,* 613-619.

Park, J. G., Son, Y.-J., Lee, T. H., Baek, N. J., Yoon, D. H., Kim, T. W., Aravinthan, A., Hong, S., Kim, J.-H. & Sung, G.-H. 2017. Anticancer efficacy of *Cordyceps militaris* ethanol extract in a xenografted leukemia model. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine***,* 2017 8474703.

Queirós, B., Barreira, J. C., Sarmento, A. C. & Ferreira, I. C. 2009. In search of synergistic effects in antioxidant capacity of combined edible mushrooms. **International Journal of Food Sciences and Nutrition***,* 60(sup6)*,* 160-172.

Quy, T. N., Xuan, T. D., Andriana, Y., Tran, H.-D., Khanh, T. D. & Teschke, R. 2019. Cordycepin isolated from *Cordyceps militaris*: Its newly discovered herbicidal

property and potential plant-based novel alternative to glyphosate. **Molecules**, 24(16), 2901.

Reis, F. S., Barros, L., Calhelha, R. C., Ćirić, A., Van Griensven, L. J., Soković, M. & Ferreira, I. C. 2013. The methanolic extract of *Cordyceps militaris* (L.) Link fruiting body shows antioxidant, antibacterial, antifungal and antihuman tumor cell lines properties. **Food and Chemical Toxicology**, 62,91-98.

Richert, J., Palencia, J., Thayer, M., Chastain, C., Richert, B. & Nelssen, J. 2018. Effects of cordyceps mushroom powder on nursery pig performance. **Kansas Agricultural Experiment Station Research Reports**, 4(9), 20.

Samaranayaka, A. G. & Li-Chan, E. C. 2011. Food-derived peptidic antioxidants: A review of their production, assessment, and potential applications. **Journal of Functional Foods**, 3(4), 229-254.

Shrestha, B., Zhang, W., Zhang, Y. & Liu, X. 2012. The medicinal fungus *Cordyceps militaris:* research and development. **Mycological Progress**, 11(3), 599-614.

Soltani, M., Abd Malek, R., Ware, I., Ramli, S., Elsayed, E., Aziz, R. & El Enshasy, H. 2017. Optimization of cordycepin extraction from Cordyceps militaris fermentation broth. **Journal of Scientific and Industrial Research**,76(355-361.

Sunil, C. & Ignacimuthu, S. 2011. In vitro and in vivo antioxidant activity of *Symplocos cochinchinensis* S. Moore leaves containing phenolic compounds. **Food and Chemical Toxicology**, 49(7), 1604-1609.

Suslick, K. S. 1988. **Ultrasound: its chemical, physical, and biological effects**. VCH Publishers.

Szabo, M. E., Gallyas, E., Bak, I., Rakotovao, A., Boucher, F., De Leiris, J., Nagy, N., Varga, E. & Tosaki, A. 2004. Heme oxygenase-1–related carbon monoxide and flavonoids in ischemic/reperfused rat retina. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, 45(10), 3727-3732.

Tabaraki, R. & Nateghi, A. 2011. Optimization of ultrasonic-assisted extraction of natural antioxidants from rice bran using response surface methodology. **Ultrasonics Sonochemistry**, 18(6), 1279-1286.

Tuli, H. S., Sharma, A. K., Sandhu, S. S. & Kashyap, D. 2013. Cordycepin: a bioactive metabolite with therapeutic potential. **Life Sciences**, 93(23), 863-869.

Vilkhu, K., Mawson, R., Simons, L. & Bates, D. 2008. Applications and opportunities for ultrasound assisted extraction in the food industry—A review. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, 9(2), 161-169.

Wang, S., Yang, F. Q., Feng, K., Li, D. q., Zhao, J. & Li, S. p. 2009. Simultaneous determination of nucleosides, myriocin, and carbohydrates in Cordyceps by HPLC coupled with diode array detection and evaporative light scattering detection. **Journal of Separation Science**, 32(23-24), 4069-4076.

Wei, H., Xiao, B. & Hu, K. 2004. Pharmaceutical values of *Cordyceps militaris*. **Journal of Traditional Chinese Medicine**, 27,215-217.

Wu, F., Yan, H., Ma, X., Jia, J., Zhang, G., Guo, X. & Gui, Z. 2011. Structural characterization and antioxidant activity of purified polysaccharide from cultured *Cordyceps militaris*. **African Journal of Microbiology Research**, 5(18), 2743-2751.

Xie, J., Zhao, J., Hu, D.-J., Duan, J.-A., Tang, Y.-P. & Li, S.-P. 2012. Comparison of polysaccharides from two species of Ganoderma. **Molecules**, 17(1), 740-752.

Xu, G., Chen, J., Liu, D., Zhang, Y., Jiang, P. & Ye, X. 2008. Minerals, phenolic compounds, and antioxidant capacity of citrus peel extract by hot water. **Journal of Food Science**, 73(1), C11-C18.

Yan, F., Wang, B. & Zhang, Y. 2014. Polysaccharides from *Cordyceps sinensis* mycelium ameliorate exhaustive swimming exercise-induced oxidative stress. **Pharmaceutical Biology**, 52(2), 157-161.

Yan, H., Zhu, D., Xu, D., Wu, J. & Bian, X. 2008. A study on *Cordyceps militaris* polysaccharide purification, composition and activity analysis. **African Journal of Biotechnology**, 7(22).

Yu, H. M., Wang, B.-S., Huang, S. C. & Duh, P.-D. 2006. Comparison of protective effects between cultured Cordyceps militaris and natural Cordyceps sinensis against oxidative damage. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 54(8), 3132-3138.

Yu, X.-Y., Zou, Y., Zheng, Q.-W., Lu, F.-X., Li, D.-H., Guo, L.-Q. & Lin, J.-F. 2021. Physicochemical, functional and structural properties of the major protein

fractions extracted from *Cordyceps militaris* fruit body. **Food Research International**, 142,110211.

Yue, K., Ye, M., Zhou, Z., Sun, W. & Lin, X. 2013. The genus Cordyceps: a chemical and pharmacological review. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, 65(4), 474-493.

Zhan, Y., Dong, C. H. & Yao, Y. J. 2006. Antioxidant activities of aqueous extract from cultivated fruit-bodies of *Cordyceps militaris* (L.) Link in vitro. **Journal of Integrative Plant Biology**, 48(11), 1365-1370.

Zhang, G. & Liang, Y. 2013. Improvement of fruiting body production in *Cordyceps militaris* by molecular assessment. **Archives of microbiology**, 195(8), 579-585.

Zhao, J., Xie, J., Wang, L. & Li, S. 2014. Advanced development in chemical analysis of Cordyceps. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, 87(271-289).

MAEJO UNIVERSITY

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก
รูปภาพประกอบทำวิจัย

มหาวิทยาลัยแม่โจ้ MAEJO UNIVERSITY

ภาพผนวก 1 สภาวะในการเพาะเลี้ยงเห็ดถั่งเช่าสีทอง

ภาพผนวก 2 เห็ดถั่งเช่าสีทอง

ภาพผนวก 3 เห็ดถั่งเช่าสีทองผง

ภาพผนวก 4 สารสกัดจากเห็ดถั่งเช่าสีทองที่ ไม่สกัดไขมันออก, ไม่ใช้อัลตราซาวด์

ภาพผนวก 5 สารสกัดจากเห็ดถั่งเช่าสีทองไม่สกัดไขมันออก, ใช้อัลตราซาวด์

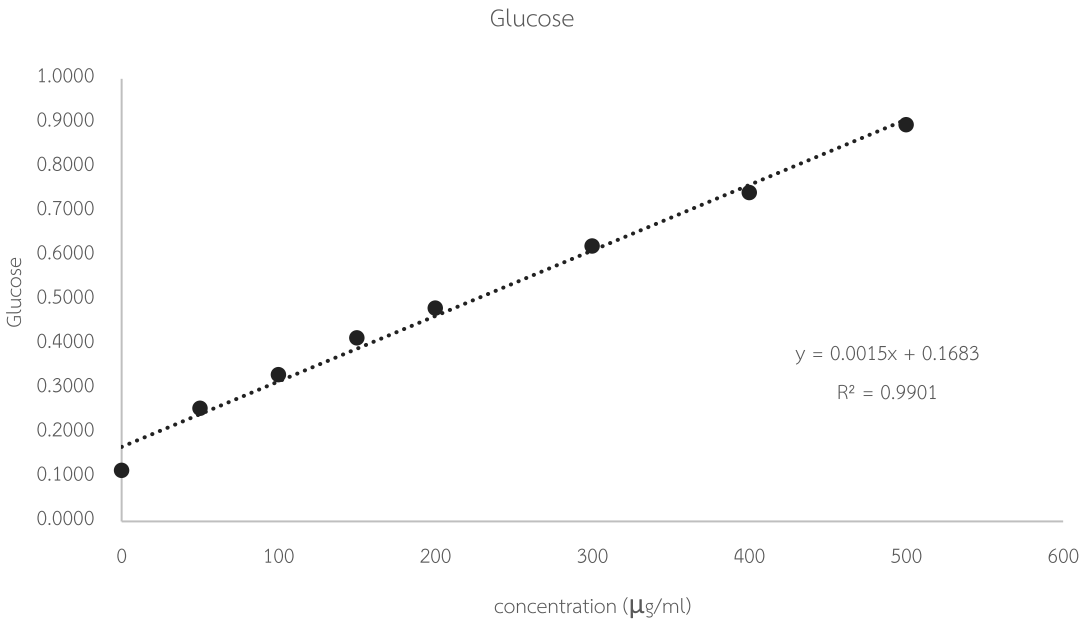
ภาพผนวก 6 สารสกัดจากเห็ดถั่งเช่าสีทองสกัดไขมันออก, ไม่ใช้อัลตราซาวด์

ภาพผนวก 7 สารสกัดจากเห็ดถั่งเช่าสีทองสกัดไขมันออก, ใช้อัลตราซาวด์

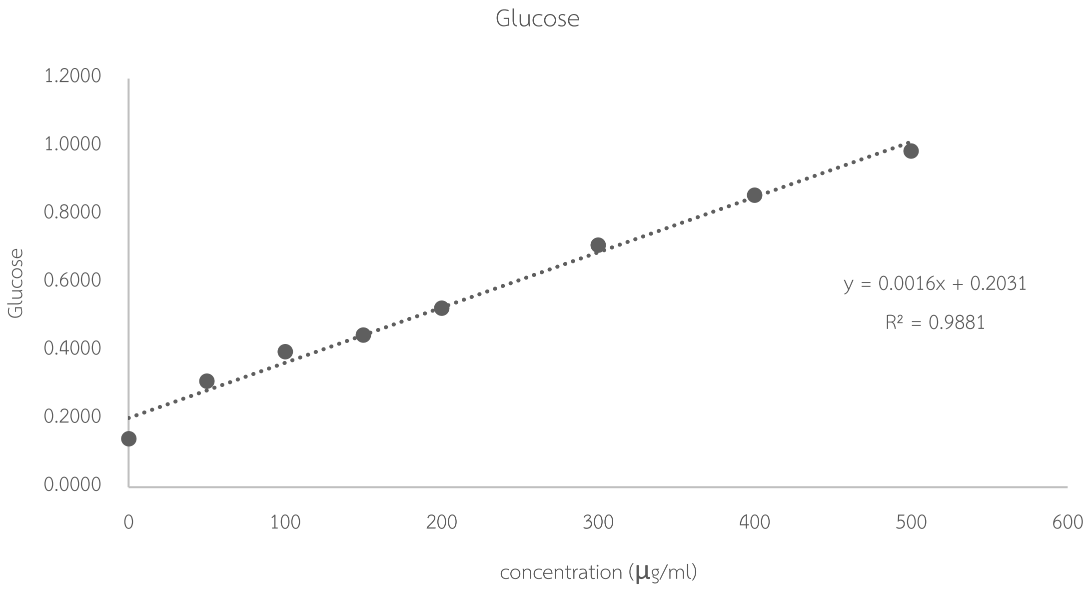
MAEJO UNIVERSITY

ภาคผนวก ข
กราฟมาตรฐานในการวิเคราะห์หาปริมาณพอลิแซคคาไรด์ ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกและความสามารถในการต้านออกซิเดชัน

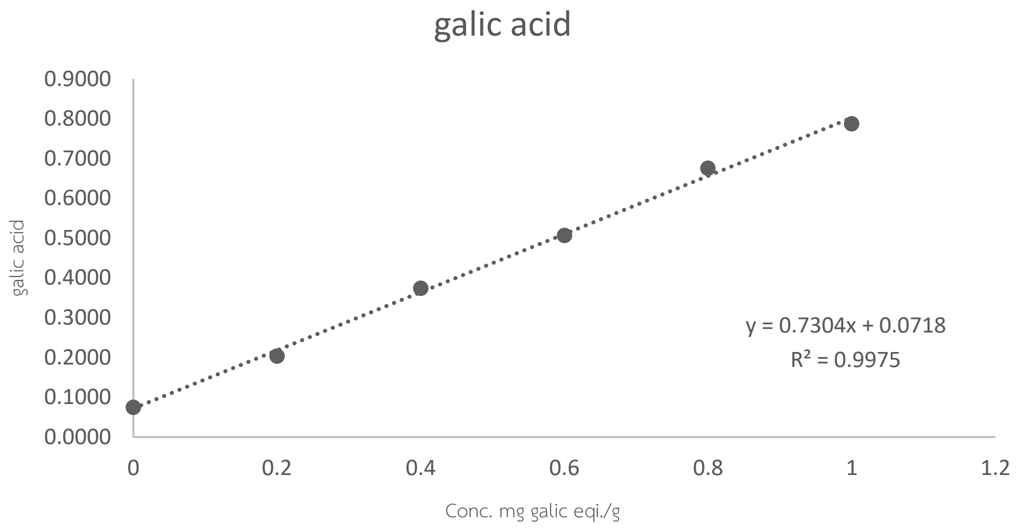
มหาวิทยาลัยแม่โจ้ ๘๕ MAEJO UNIVERSITY



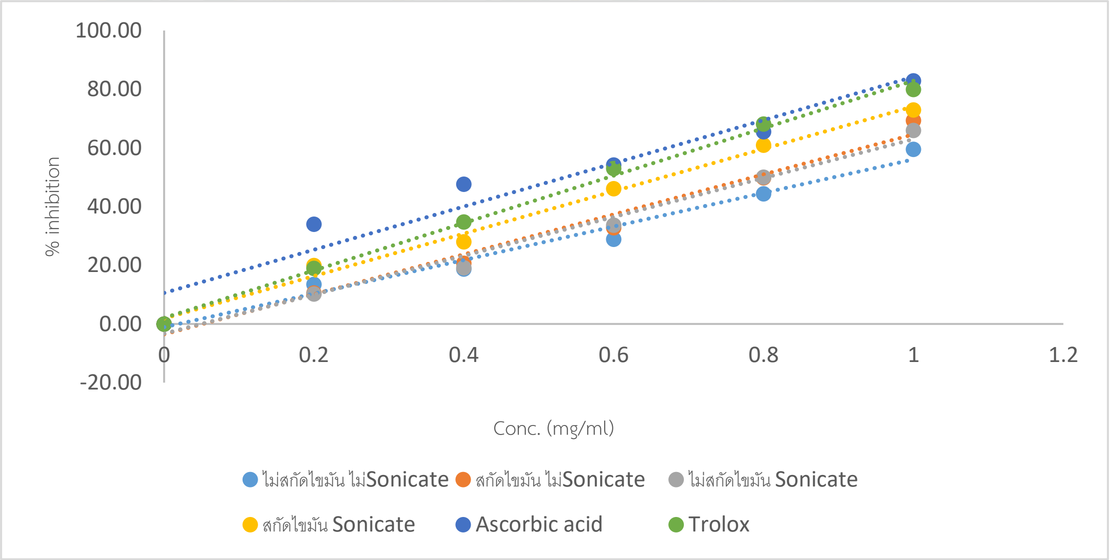
ภาพผนวก 8 กราฟมาตรฐานของน้ำตาลกลูโคสสำหรับวิเคราะห์หาปริมาณพอลิแซคคาไรด์โดยวิธี Phenol sulfuric acid assay



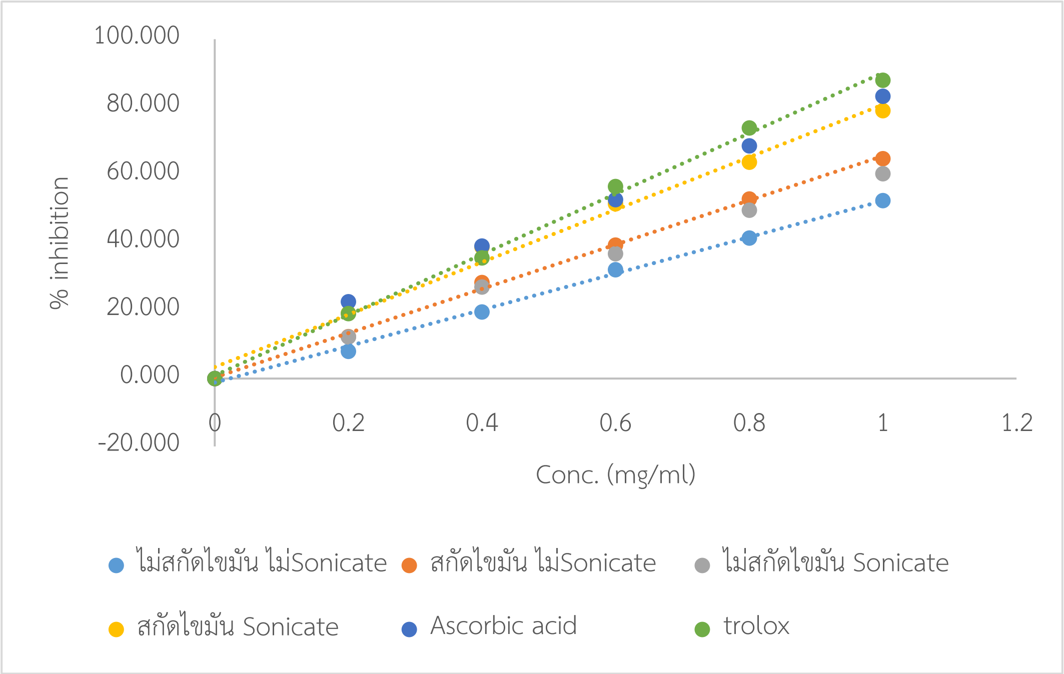
ภาพผนวก 9 กราฟมาตรฐานของน้ำตาลกลูโคสสำหรับวิเคราะห์หาปริมาณพอลิแซคคาไรด์โดยวิธี Anthrone test



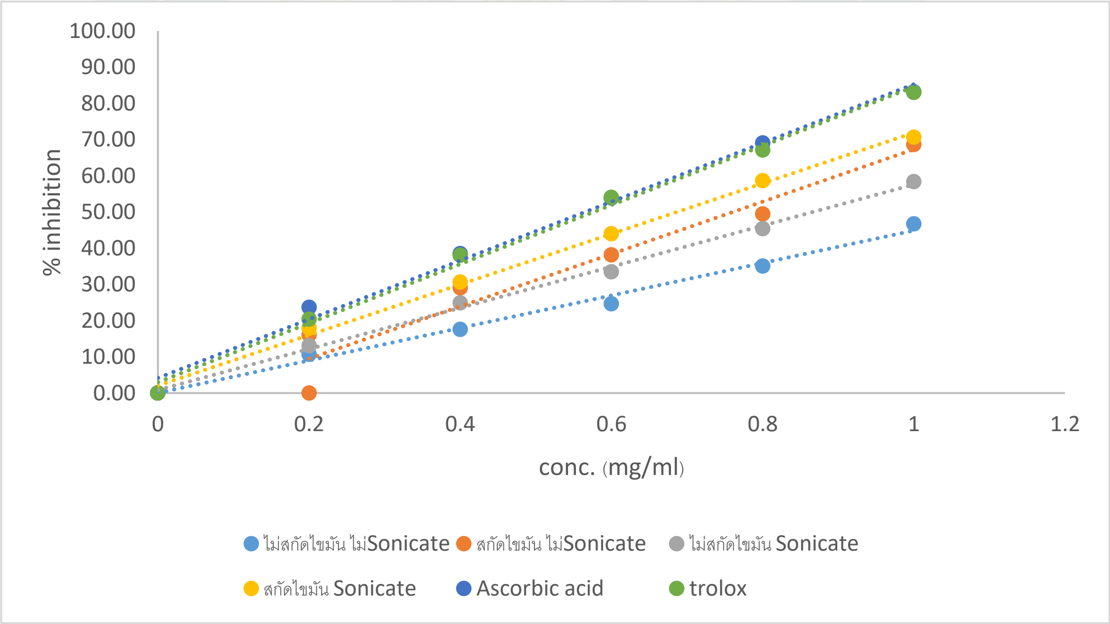
ภาพผนวก 10 กราฟมาตรฐานของกรดแกลลิกสำหรับวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด



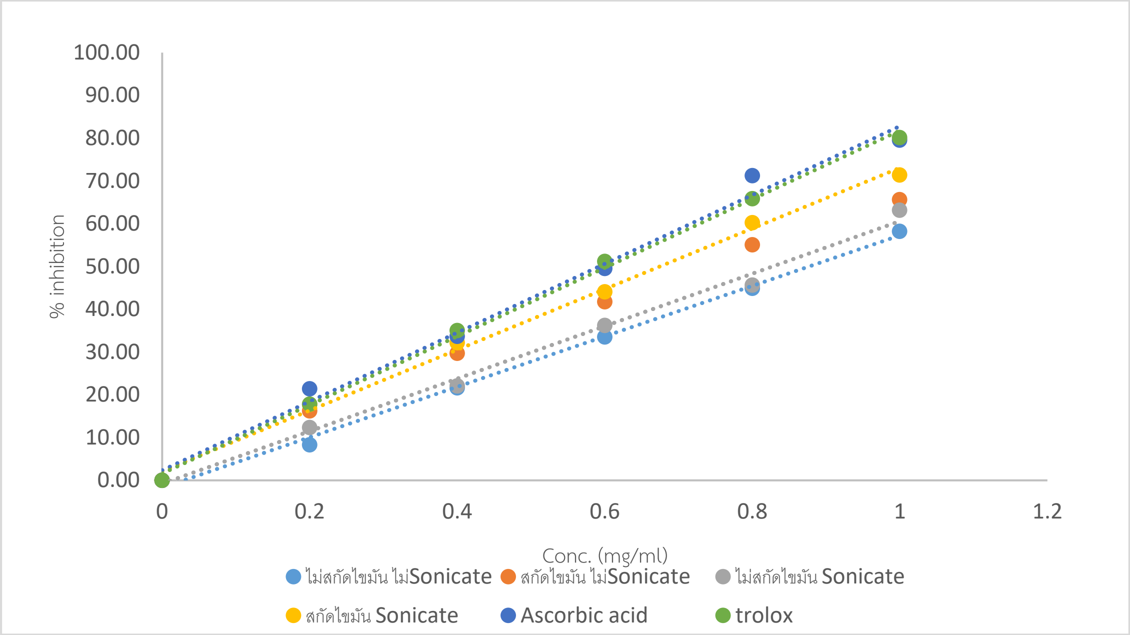
ภาพผนวก 12 ความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH ของสารสกัดจากเห็ดถั่งเช่าสีทองที่สกัดด้วยวิธีต่างๆ ที่ความเข้มข้นต่างๆ



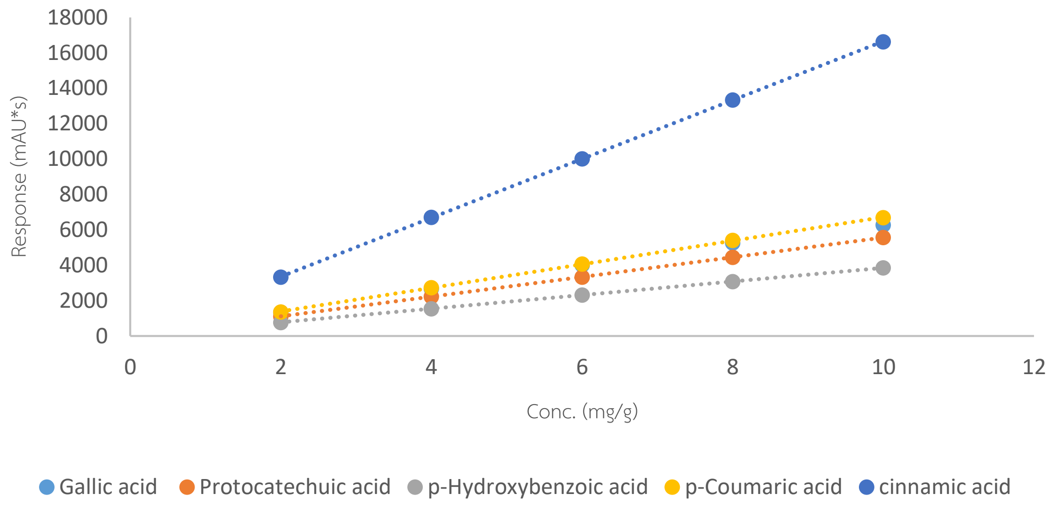
ภาพผนวก 13 ความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระ ABTS ของสารสกัดจากเห็ดถั่งเช่าสีทองที่สกัดด้วยวิธีต่างๆ ที่ความเข้มข้นต่างๆ



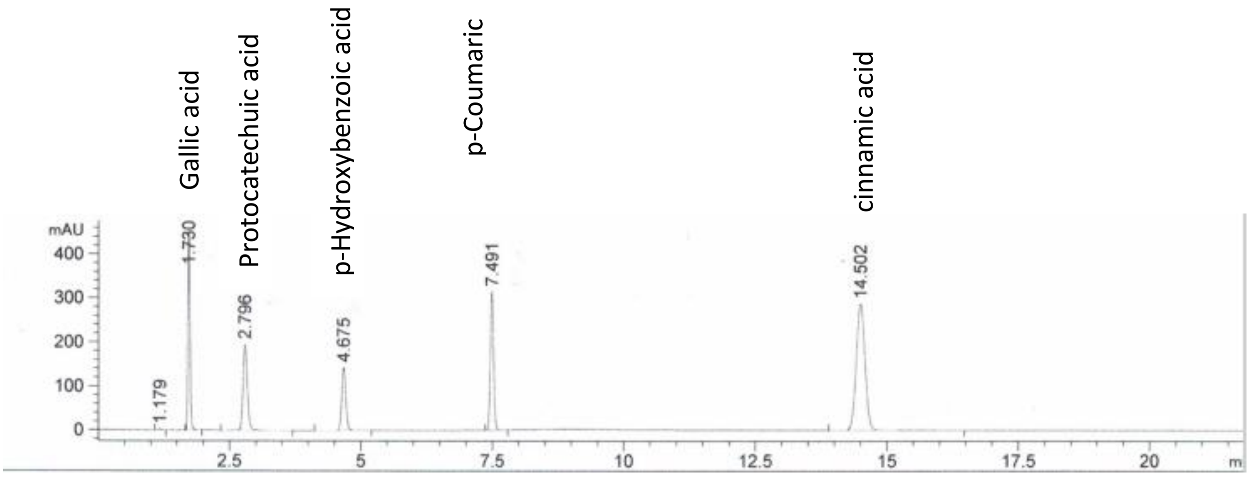
ภาพผนวก 14 ความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระไฮดรอกซิลของสารสกัดจากเห็ดถั่งเช่าสีทองที่สกัดด้วยวิธีต่างๆ ที่ความเข้มข้นต่างๆ



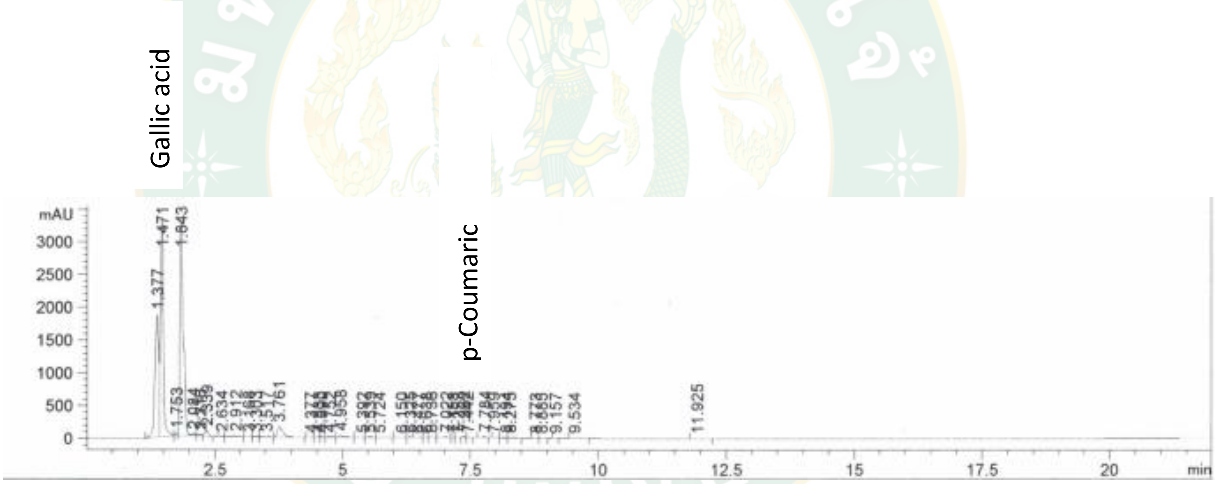
ภาพผนวก 15 ความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระซูเปอร์ออกไซด์ของสารสกัดจากเห็ดถั่งเช่าสีทองที่สกัดด้วยวิธีต่างๆ ที่ความเข้มข้นต่างๆ



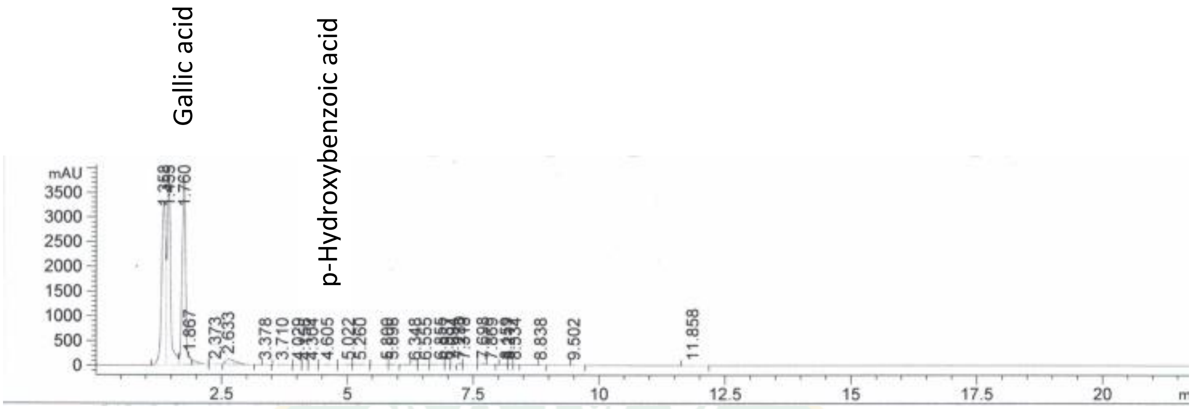
ภาพผนวก 16 *กราฟมาตรฐาน Gallic acid Protocatechuic acid p-Hydroxybenzoic acid p-Coumaric acid cinnamic acid สำหรับวิเคราะห์ HPLC*



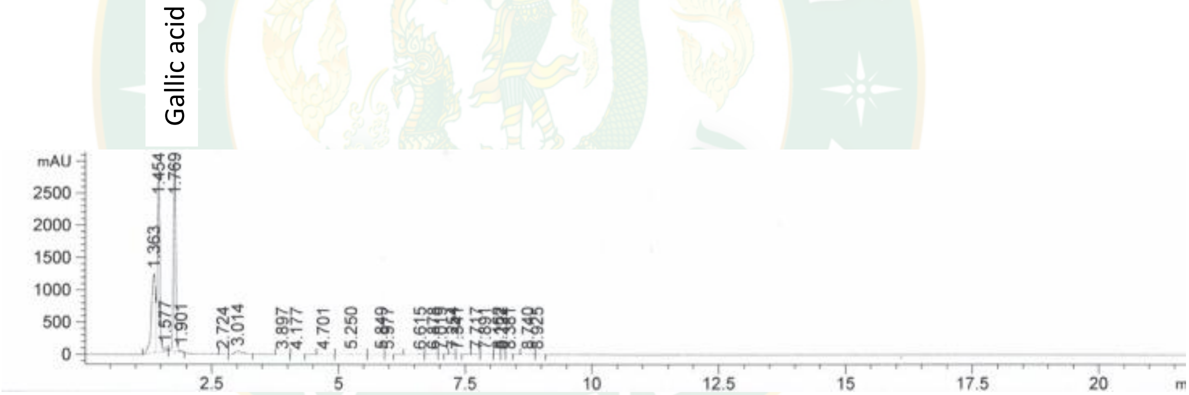
ภาคผนวก 17 โครมาโตแกรมของมาตรฐาน Gallic acid Protocatechuic acid p-Hydroxybenzoic acid p-Coumaric acid cinnamic acid



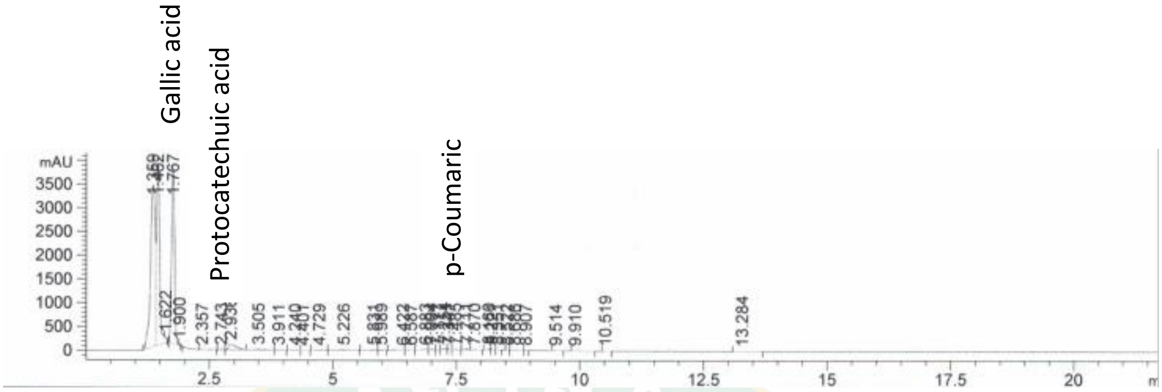
ภาคผนวก 18 โครมาโตแกรมของตัวอย่างไม่สกัดไขมันออก, ไม่ใช้อัลตราซาวด์



ภาคผนวก 19 โครมาโตแกรมของตัวอย่างไม่สกัดไขมันออก, ใช้อัลตราซาวด์



ภาคผนวก 20 โครมาโตแกรมของตัวอย่างสกัดไขมันออก, ไม่ใช้อัลตราซาวด์



ภาคผนวก 21 โครมาโตแกรมของตัวอย่างสกัดไขมันออก, ใช้อัลตราซาวด์

ประวัติผู้วิจัย

ชื่อ-สกุล	นางสาวสุทธิดา สุทธิเลิศ
เกิดเมื่อ	3 ธันวาคม 2536
ประวัติการศึกษา	มัธยมศึกษา: โรงเรียนวชิรวิทย์ / วิทยาศาสตร์ คณิตศาสตร์ ปริญญาตรี วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร คณะวิศวกรรมและอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้
ประวัติการทำงาน	1.บริษัท ปริ๊นเซสฟูดส์ จำกัด ประเภทธุรกิจ : อาหารแช่แข็ง ตำแหน่งงาน : หัวหน้าควมคุมคุณภาพ(QC) ประเภทสินค้า : ผลิตภัณฑ์ผักแปรรูปแช่แข็ง, ผลิตภัณฑ์ผลไม้แปรรูปแช่แข็ง, ผลิตภัณฑ์อาหารพร้อมบริโภคแช่แข็ง ระยะเวลางาน : ปี 2559 – ปี 2560 2. โครงการ การถ่ายทอดเทคโนโลยีการแปรรูปและการตลาดอาหารอินทรีย์ คณะวิศวกรรมและอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้ ตำแหน่งงาน : เจ้าหน้าที่บริหารโครงการ ทดสอบผลิตภัณฑ์ เตรียมการฝึกอบรมและประสานงาน และเป็นผู้ช่วยวิทยากรช่วยวิทยากร ระยะเวลางาน : ปี 2561 – ปี 2562 ผลงานตีพิมพ์ Proceeding :วิจิตรา แดงปรก, วิวัฒน์ หวังเจริญ, ธีระพล เสนพันธุ์, มงคล ถิรบุญยานนท์ และสุทธิดา สุทธิเลิศ (2564) การเตรียมสารประกอบฟีนอลิกและฤทธิ์การต้านออกซิเดชันของสารสกัดพอลิแซคคาไรด์จากเห็ดถั่งเช่าสีทอง.การประชุมวิชาการวิจัยและนวัตกรรมสร้างสรรค์ ครั้งที่ 7CRCI 2021.สถาบันวิจัยและพัฒนา หาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคล. หน้า 452-467