

องค์ประกอบทางเคมี และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดถึงเชื้อเห็ด Cordyceps militaris ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเหลว และอาหารเพาะแข็งธัญพืชลูกเดี๋ย

Chemical components and antioxidant activity of extracts from *Cordyceps militaris* cultured in liquid and Job's-Tears solid media

เยาวภา ทองอร่าม¹

Yaowapar Tongaram¹

Received: 22 March 2020 ; Revised: 22 June 2020 ; Accepted: 2 July 2020

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาองค์ประกอบทางเคมี และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดถึงเชื้อเห็ด Cordyceps militaris ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเหลว และอาหารเพาะแข็งธัญพืชลูกเดี๋ย ผลการศึกษาขององค์ประกอบทางเคมีด้วยวิธี GC-MS พบสารในสารสกัดถึงเชื้อเห็ด Cordyceps militaris ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเหลว 23 ชนิด ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเพาะแข็งธัญพืชลูกเดี๋ย 26 ชนิด มีสารเหมือนกันในสารสกัดทั้งสอง 16 ชนิด และสารหลักที่พบในสารสกัดทั้งสองชนิด คือ คอร์ดิเซปิน โดยพบในสารสกัดถึงเชื้อเห็ด Cordyceps militaris ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเหลว 20.57 % area ซึ่งมากกว่าที่เพาะเลี้ยงในอาหารเพาะแข็งธัญพืชลูกเดี๋ย (2.17 % area) ส่วนการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ พบว่า ปริมาณฟีนอลิกรวมและฟลาโวนอยด์รวมของสารสกัดถึงเชื้อเห็ด Cordyceps militaris ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเหลว คือ 178.01±0.71 mgGE/gExt และ 91.00±0.95 mgQE/gExt ซึ่งสูงกว่าที่เพาะเลี้ยงในอาหารเพาะแข็งธัญพืชลูกเดี๋ย (135.48±0.60 mgGE/gExt และ 6.81±0.19 mgQE/gExt) ความสามารถในการยับยั้งการเกิดออกซิเดชันด้วยวิธี DPPH และ ABTS ของสารสกัดถึงเชื้อเห็ด Cordyceps militaris ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเหลว มีค่า IC₅₀ เป็น 0.49±0.04 และ 0.06±0.00 mg/mL ซึ่งสูงกว่าที่เพาะเลี้ยงในอาหารเพาะแข็งธัญพืชลูกเดี๋ย (0.99±0.06 และ 0.22±0.01 mg/mL)

ผลจากการวิจัยครั้งนี้ แสดงให้เห็นว่า สารสกัดถึงเชื้อเห็ด Cordyceps militaris ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเหลว มีสารคอร์ดิเซปิน และมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงกว่าสารสกัดถึงเชื้อเห็ด Cordyceps militaris ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเพาะแข็งธัญพืชลูกเดี๋ย ฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์รวมในสารสกัดทำหน้าที่เป็นสารออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

คำสำคัญ: ถึงเชื้อเห็ด Cordyceps militaris, องค์ประกอบทางเคมี, ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

Abstract

The aims of this research were to analyze the chemical components and to determine antioxidant activity of the extracts from *Cordyceps militaris* cultured in liquid and Job's-tears solid media. Chemical components revealed using GC-MS revealed that 23 compounds were found in the extracts from *C. militaris* cultured in liquid medium, while 26 compounds were found in the extract from *C. militaris* cultured in Job's-tears solid medium. Cordycepin was a main chemical in both extracts. It constituted 20.57% of compounds found in the extracts from *C. militaris* cultured in liquid medium which was higher than that cultured in Job's-tears solid medium (2.17%). The total phenolic and flavonoid contents in the extract from *C. militaris* cultured in liquid medium were 178.01±0.71 mgGE/gExt and 91.00±0.95 mgQE/gExt, which were higher than those from the extract from *C. militaris* cultured in Job's-tears solid medium (135.48 ± 0.60 mgGE/gExt and 6.81±0.19 mgQE/gExt). The anti-oxidant activity determined using DPPH and ABTS assays showed that the extract from *C. militaris* cultured in liquid medium was more potent than that from the extract from *C. militaris* cultured in Job's-tears solid medium with IC₅₀ of 0.49±0.04 and 0.06±0.00, and 0.99±0.06 and 0.22±0.01 mg/mL, respectively.

¹ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ กองวิชาวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อมโรงเรียนนายร้อยพระจุลจอมเกล้า อ.เมือง จ.นครนายก 26001

¹ Assist.Prof. Department of Environmental Science Academic Division, Chulachomklao Royal Military Academy, Muang District, Nakhon Nayok, 26001, Thailand E-mail: yaowapar.to@crma.ac.th

The results indicate that the extract from *C. militaris* cultured in liquid medium possesses more cordycepin and better antioxidant activity. The active compounds, phenolic and flavonoid contents in the extracts are responsible for the antioxidant activity.

Keywords: *Cordyceps militaris*, cultured media, chemical components, antioxidant activity

บทนำ

ถั่งเช่าสีทอง (*Cordyceps militaris*) เป็นราก่อโรคในแมลง จัดอยู่ในสกุล *Cordyceps* วงศ์ Clavicipitaceae เป็นเห็ดสำคัญชนิดหนึ่งในกลุ่มเห็ดเป็นยา (Medicinal mushroom) มีการกระจายแพร่หลายทั้งในอเมริกาเหนือ อเมริกาใต้ ยุโรป และเอเชีย¹ มีการนำถั่งเช่า (*Cordyceps*) มาใช้ในงานทางการแพทย์แผนโบราณ แพทย์พื้นบ้านในเอเชีย^{2,3} โดยเฉพาะในเอเชียตะวันออก⁴ มีการนำมาใช้เป็นยาอย่างยาวนานนับศตวรรษ ทั้งในตำรายาจีนและทิเบต^{5,6} ในเอเชียตะวันออกนิยมนำมาใช้ทั้งเป็นยา อาหารบำรุงกำลัง⁷ บริโภคโดยตรงในรูปของอาหาร และเป็นผลิตภัณฑ์เพื่อสุขภาพ

ถั่งเช่าสีทองได้รับความสนใจเป็นอย่างมากโดยเฉพาะ นำมาใช้เป็นอาหารเสริมเพื่อสุขภาพ ทำให้มีอายุยืนยาว และใช้เป็นยาทางเลือกเพื่อบรรเทาโรคต่างๆ เช่น โรคหลอดเลือดสมอง เจ็บคอ วัณโรค โรคลมชัก และโรคมะเร็ง นอกจากนี้ มีการนำถั่งเช่าสีทองที่ได้จากการเพาะเลี้ยง มาทำเป็นยาเพื่อบำรุงรักษาการทำงานของไตและปอด ชะลอวัย ควบคุมการนอน รักษาโรคหลอดเลือดหัวใจ⁸ โรคที่เกี่ยวข้องระบบหมุนเวียนเลือด ระบบหายใจ ต่อมต่างๆ และระบบเมตาบอลิซึม⁹

ถั่งเช่าสีทอง มีสารออกฤทธิ์ เช่น คอร์ดิเซปิน (cordycepin) อะดีโนซีน (adenosine) โพลีแซคคาไรด์ (polysaccharide) เออร์โกสเตอรอล (ergosterol) แมนนิทอล (mannitol) เปปไทด์ (peptide)^{10,11,12,13} กรดแอมิโน (amino acid) กรดไขมัน (fatty acid)¹⁴ กรดไขมันไม่อิ่มตัว (polyunsaturated fatty acids) กรดไขมันอิ่มตัว (saturated fatty acids) วิตามิน E (vitamin E) กรดอินทรีย์ (organic acids) และกรดซินนามิก (cinnamic acid)¹⁵

คอร์ดิเซปิน เป็นสารหลักที่ถูกสกัดออกมาได้เป็นครั้งแรกจากถั่งเช่าสีทอง ต่อมาได้พบในถั่งเช่าทิเบต (*Ophiocordyceps sinensis* ชื่อเดิม *C. sinensis*) ด้วย¹⁶ ถั่งเช่าสีทอง มีคอร์ดิเซปิน และอะดีโนซีนในปริมาณที่สูงกว่าถั่งเช่าทิเบต^{17,18} คอร์ดิเซปินในสารสกัดจากส่วนดอกมีปริมาณสูงกว่าจากส่วนเส้นใย¹⁹

สารออกฤทธิ์ที่พบในถั่งเช่าสีทอง มีฤทธิ์ทางชีวภาพหลายชนิด เช่น ฤทธิ์ต้านมะเร็ง (anti-cancer) ยับยั้งการสร้างเซลล์มะเร็ง^{16,20} ด้านการกระจายตัวของมะเร็ง (anti-metastatic)²¹ ยับยั้งการเจริญของมะเร็ง (inhibit cancer

growth)⁴ ต้านไวรัส (anti-viral) ต้านเชื้อรา (anti-fungal) ต้านการอักเสบ (anti-inflammatory)²² ด้านการมีน้ำตาลในเลือดสูง (anti-hyperglycemic) ต้านเนื้องอก (anti-tumor)²³ และต้านจุลินทรีย์ (anti-microbial)^{24,25} คอร์ดิเซปินที่แยกได้จากถั่งเช่าสีทอง มีศักยภาพสูงในการยับยั้งการเจริญของพืช (plant growth inhibitor)²⁶ โพลีแซคคาไรด์ที่พบในถั่งเช่าสีทอง มีฤทธิ์ต้านมะเร็ง ปรับสมดุลของภูมิคุ้มกัน²⁷ และต้านอนุมูลอิสระ²⁸ โพลีแซคคาไรด์ที่แยกจากส่วนดอกถั่งเช่าสีทองที่ได้จากการเพาะเลี้ยง ซึ่งส่วนใหญ่เป็นน้ำตาลแมนโนส (mannose) กลูโคส (glucose) และกาแลคโตส (galactose) มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ โดยสามารถกำจัดอนุมูลอิสระ ลดอนุมูลอิสระ และจับกับไอออนของเหล็กได้²⁹ สารสกัดจากถั่งเช่าสีทองมีฤทธิ์ต้านการสร้างหลอดเลือด (anti-angiogenic)³⁰ ต้านการอักเสบ³¹ ต้านอนุมูลอิสระ (anti-oxidant)^{32,33} ต้านเนื้องอก^{34,35} ป้องกันการทำลายดีเอ็นเอ (DNA) และเพิ่มประสิทธิภาพในการกำจัดและการยับยั้งการสร้างอนุมูลอิสระ²³ สารสกัดเมทานอลถั่งเช่าสีทองมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ โดยยับยั้งขบวนการออกซิเดชันของไขมัน ลดและกำจัดอนุมูลอิสระ ยับยั้งเซลล์ก่อมะเร็ง และยังมีคุณสมบัติในการต้านจุลินทรีย์ทั้งแบคทีเรียและรา^{15,7} สารสกัดเมทานอลจากส่วนดอก มีฤทธิ์ในการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH สูงกว่าจากส่วนเส้นใย ขณะที่สารสกัดจากส่วนเส้นใย มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระโดยรวม และสามารถในการจับและลดอนุมูลอิสระสูงกว่าจากส่วนดอก⁷

ถั่งเช่าสีทองมีสารออกฤทธิ์และฤทธิ์ทางชีวภาพคล้ายกับถั่งเช่าทิเบต จึงมีการนำถั่งเช่าสีทองมาใช้แทนถั่งเช่าทิเบต³⁶ สารออกฤทธิ์จากถั่งเช่าสีทอง ได้รับการตรวจสอบ และได้รับการยอมรับว่ามีคุณประโยชน์อย่างยิ่งต่อสุขภาพของมนุษย์ โดยเฉพาะคอร์ดิเซปิน ปัจจุบันมีการเพาะเลี้ยงถั่งเช่าสีทองเพื่อการค้าอย่างแพร่หลาย โดยเฉพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเห็ด เพื่อรวบรวมเส้นใย และเพาะเลี้ยงในอาหารเพาะแข็ง เพื่อผลิตส่วนดอก ทั้งนี้เพราะถั่งเช่าสีทองมีสารออกฤทธิ์ และมีฤทธิ์ทางชีวภาพหลายประการดังกล่าว จึงมีการนำมาประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมยา อาหาร และเครื่องสำอาง^{37,38}

ถั่งเช่าสีทองเป็นเห็ดเศรษฐกิจชนิดใหม่ของไทย มีการเพาะเลี้ยง ผลิตเป็นอาหารเสริมสุขภาพ จำหน่ายทั้งภายในประเทศและต่างประเทศ การวิจัยในครั้งนี้ มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาองค์ประกอบทางเคมี และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดถั่งเช่าสีทองที่เพาะเลี้ยงในอาหารเพาะต่างกัน คือ

อาหารเพาะเห็ดและอาหารเพาะเชื้อพืชลูกเห็ด เพื่อเป็นแนวทางสำหรับการใช้เชื้อเห็ดเพื่อให้เกิดประโยชน์และมีประสิทธิภาพยิ่งขึ้น โดยเฉพาะอย่างยิ่งการเป็นแหล่งทรัพยากรธรรมชาติ ในการใช้เป็นสารต้านอนุมูลอิสระ

วัสดุอุปกรณ์ และวิธีการศึกษา

1. การเตรียมถึงเชื้อเห็ด นำถึงเชื้อเห็ด (*Cordyceps militaris*)

จากฟาร์มครูพวง จ.อ่างทอง มาตัดเป็นชิ้นเล็กๆ จากนั้น นำมาวางเพาะเลี้ยงบนอาหารพีดีเอ (Potato Dextrose Agar: PDA) บ่มเชื้อในสภาวะมืด ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 วัน จะได้แม่เชื้อ หรือเชื้อต้นตอ ทำการขยายเชื้อโดยการตัดแม่เชื้อบนอาหารพีดีเอ ใส่ในอาหารเหลวพีดีบี (Potato Dextrose Broth: PDB) แล้วบ่มบนเครื่องเขย่า ที่ความเร็ว 120 รอบ/นาที ในที่มืด ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 4-5 วัน จะได้หัวเชื้อเห็ด นำหัวเชื้อเห็ดเลี้ยงในอาหารเพาะเห็ด (มีหน่อใหม่พันธุ์ไทยพื้นบ้าน (นางลายวัย 5) กลูโคส สารสกัดจากยีสต์ และเปปโตเน เป็นองค์ประกอบหลัก) และในอาหารเพาะเชื้อเมล็ดพืชลูกเห็ด ซึ่งมีส่วนประกอบเหมือนในอาหารเพาะเห็ด แต่เพิ่มเมล็ดพืชลูกเห็ดชนิดละ 30 กรัมต่ออาหารเหลว 60 มิลลิลิตร (อ้างอิงจากปริญญาานิพนธ์วิทยาศาสตร์บัณฑิต รร.จปร ปี 2556 เรื่อง การเปรียบเทียบเมล็ดพืชที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงเส้นใยเชื้อ *Cordyceps militaris*. พบว่า เมื่อใช้เมล็ดลูกเห็ดเป็นแหล่งคาร์บอนในอาหารเพาะเลี้ยงพบการเจริญของเส้นใยเป็นตุ่มดอกและพัฒนาเป็นดอกได้ดีกว่าเมล็ดพืชชนิดอื่น⁵⁵ และ งานวิจัยเรื่องการเปรียบเทียบการเพาะเลี้ยงถึงเชื้อเห็ดโดยใช้หัวเชื้อเห็ดและหัวเชื้อแข็งบนเมล็ดพืชลูกเห็ด ในปี 2558⁵⁶) บ่มเชื้อในสภาวะมืด ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ 80% จนเส้นใยเจริญเต็มผิวหน้าอาหาร จากนั้นให้แสง 1000 ลักซ์ (12 ชม./วัน) ที่อุณหภูมิ 18 องศาเซลเซียส เพื่อกระตุ้นให้เส้นใยเปลี่ยนสี เกิดตุ่มดอก และพัฒนาเป็นดอก เมื่อได้ดอกที่ยาวประมาณ 7-8 เซนติเมตร (ประมาณ 3 ใน 4 ส่วนของขวดเพาะเลี้ยง) จึงเก็บส่วนดอกออกจากส่วนฐาน นำไปผึ่งลม 24 ชั่วโมง แล้วอบแห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสนาน 24 ชั่วโมง จะได้ถึงเชื้อเห็ดของอบแห้ง เก็บไว้ในภาชนะที่ปิดสนิท สะอาด แห้ง และมีฝาปิดสนิท

2. การเตรียมสารสกัดถึงเชื้อเห็ด

นำถึงเชื้อเห็ดอบแห้ง มาหั่นเป็นชิ้นเล็กๆ แล้วบดเป็นผง จากนั้นนำไปสกัด โดยการหมักในตัวทำละลายเอทานอล 95% ในอัตราส่วนผงถึงเชื้อเห็ด 400 กรัม ต่อเอทานอล 1000 มิลลิลิตร หมักส่วนผสมทิ้งไว้ 1 สัปดาห์ นำส่วนผสมมากรองเพื่อแยกเอาส่วนที่เป็นกากออกด้วยกระดาษกรอง

Whatman เบอร์ 1 นำส่วนที่กรองได้มาระเหยเพื่อเอาตัวทำละลายออกด้วยเครื่อง Rotary evaporator จนกระทั่งได้สารสกัดหยาบ (Crude extract) นำสารสกัดที่ได้บรรจุในขวดทึบแสง เก็บไว้ในตู้ที่ควบคุมอุณหภูมิที่ 4 องศาเซลเซียส เพื่อรอการนำไปใช้ในการทดลองต่อไป

3. การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี

นำสารสกัดที่ได้ไปวิเคราะห์หาองค์ประกอบทางเคมี โดยใช้เครื่อง Gas Chromatography - Mass Spectrometer (GC-MS) โดยใช้แก๊สฮีเลียมเป็นตัวพา คอลัมน์ที่ใช้คือ Bruker รุ่น 450 GC Rtx-5MS capillary column (30 m x 0.25 mm x 0.25 μ m) อัตราการไหล 1 มิลลิลิตร/นาที มีอุณหภูมิเริ่มต้นของคอลัมน์ที่ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที จากนั้น เพิ่มอุณหภูมิในอัตรา 4.5 องศาเซลเซียส/นาที จนถึง 250 องศาเซลเซียส แล้วจึงฉีดสารทดสอบ ในส่วน Mass Spectrometer อุณหภูมิแหล่งกำเนิดอิเล็กตรอน เป็น 230 องศาเซลเซียส อุณหภูมิส่วนตัดแยกเป็น 150 องศาเซลเซียส มีพลังงานของอิเล็กตรอนที่วิ่งชนโมเลกุลของสารเท่ากับ 70 eV นำข้อมูลที่ได้เปรียบเทียบกับข้อมูลใน National Institute of Standards and Technology (NIST) Mass Spectral Library 2008 ตรวจวิเคราะห์ ณ ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี จังหวัดนครราชสีมา

4. การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

ศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ด้วยการวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกรวมและฟลาโวนอยด์รวม และวิเคราะห์ความสามารถในการต้านออกซิเดชันโดยวิธี 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical scavenging assay (DPPH assay) และวิธี 2,2'-azino-bis (3-ethyl benzothiazoline-6-sulfonic acid) cation radical scavenging assay (ABTS assay) ดังต่อไปนี้

4.1 การหาปริมาณฟีนอลิกรวม นำสารตัวอย่างหรือสารมาตรฐานปริมาตร 100 ไมโครลิตร เติมน้ำสารละลาย 10% Folin-Ciocalteu reagent (v/v) ปริมาตร 500 ไมโครลิตร เขย่า และทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 นาที แล้วเติมน้ำสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3) 7.5% (w/v) ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร เขย่า และทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง ในที่มืดประมาณ 30 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง UV-Vis Spectro- photometer ที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร ทำการทดลอง 5 ซ้ำ นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน โดยใช้กรดแกลลิก (Gallic acid) เป็นสารมาตรฐาน รายงานผลเป็นหน่วยมิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิก ต่อน้ำหนักสารสกัดแห้ง 1 กรัม (Gallic acid equivalents, mg GAE/g dried extract)³⁹

4.2 การหาปริมาณฟลาโวนอยด์รวม นำสารตัวอย่าง หรือสารมาตรฐานปริมาตร 100 ไมโครลิตร มาเติมด้วยสารละลาย 5% NaNO_2 (w/v) ปริมาตร 500 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากัน และทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที เติมสารละลาย 10% AlCl_3 (w/v) ปริมาตร 400 ไมโครลิตร ลงไป เขย่าให้เข้ากัน แล้วเติมน้ำกลั่น 2,000 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง UV-Vis Spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 415 นาโนเมตร ทำการทดลองซ้ำทั้งหมด 5 ซ้ำ นำผลที่ได้เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน ซึ่งมีเคอร์ซีติน (Quercetin) เป็นสารมาตรฐาน รายงานผลที่ได้เป็นหน่วย มิลลิกรัมสมมูลของเคอร์ซีตินต่อน้ำหนักสารสกัดแห้ง 1 กรัม (Quercetin equivalents, mgQE/g dried extract) ⁴⁰

4.3 การวิเคราะห์ความสามารถในการยับยั้งการเกิดออกซิเดชันโดยวิธี DPPH assay นำสารตัวอย่างหรือสารมาตรฐาน 100 ไมโครลิตร เติมสารละลาย DPPH ปริมาตร 900 ไมโครลิตรลงไป เขย่าให้เข้ากัน ทิ้งไว้ในที่มืดนาน 30 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 515 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง UV-Vis Spectrophotometer บันทึกค่าการดูดกลืนแสง แล้วนำไปคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเกิดออกซิเดชัน (% Inhibition) แล้วเทียบกับสารที่ใช้เป็นสารมาตรฐาน คือ Ascorbic acid และ Trolox

คำนวณหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเกิดออกซิเดชัน (% Inhibition) จากสูตร

$$\% \text{ Inhibition} = (A - B) / A \times 100$$

โดย A = ค่าการดูดกลืนแสงของปฏิกิริยาควบคุม (สารทั้งหมดยกเว้นสารตัวอย่าง)

B = ค่าการดูดกลืนแสงของสารตัวอย่าง

จากนั้น คำนวณค่า IC_{50} จากกราฟเส้นตรงแสดงความสัมพันธ์ระหว่างเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเกิดออกซิเดชันกับสารตัวอย่างในแต่ละความเข้มข้น โดยใช้สมการเส้นตรง $Y=aX+b$ รายงานผลเป็นค่า IC_{50} (50% Inhibitory concentration)

4.4 การวิเคราะห์ความสามารถในการยับยั้งการเกิดออกซิเดชันโดยวิธี ABTS assay เตรียมสารละลาย ABTS ด้วยการเปลี่ยน ABTS ให้เป็นอนุมูลอิสระ ABTS^{•+} โดยการเติมสารละลาย $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ แล้วปล่อยให้มันมืดเป็นเวลา 16 ชั่วโมง ทำการเจือจางสารละลาย ABTS^{•+} ด้วยน้ำกลั่น ในอัตราส่วน 1: 50 จากนั้นนำสารสกัดตัวอย่างมาปริมาตร 100 ไมโครลิตร เติมสารละลาย ABTS^{•+} ที่เจือจาง ปริมาตร 900 ไมโครลิตร ลงไป ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที

แล้วนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่จำลงของอนุมูลอิสระ ABTS^{•+} ที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง UV-Vis Spectrophotometer จากนั้นนำค่าที่วัดได้ไปวิเคราะห์หาเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเกิดออกซิเดชัน รายงานผลเป็นค่า IC_{50} แล้วเทียบกับสารที่ใช้เป็นสารมาตรฐาน คือ Ascorbic acid และ Trolox (การคำนวณกระทำเช่นเดียวกับวิธี DPPH assay) ⁴²

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ข้อมูลที่ได้แสดงเป็นค่าเฉลี่ย±ค่าความคลาดเคลื่อนเฉลี่ย (mean±SEM) ของการทดลองละ 5 ซ้ำ ทำการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียว (One-way analysis of variance ; One-way ANOVA) และวิเคราะห์ความแตกต่างของแต่ละกลุ่มตัวอย่าง และแต่ละความเข้มข้นด้วยวิธี Duncan multiple range test ระดับความเชื่อมั่นทางสถิติ ที่ $p\text{-value}<0.05$ การคำนวณค่าสถิติ และหาความสัมพันธ์ของข้อมูลใช้โปรแกรมสถิติสำเร็จรูป SPSS

ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. องค์ประกอบทางเคมี การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีด้วยเครื่อง GC-MS พบว่า สารสกัดถึงเข้าสีทองที่เพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเห็ด มีสารทั้งหมด 23 ชนิด (Figure 1 และ Table 1) สารสกัดถึงเข้าสีทองที่เพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเชื้อราฟลูโคเดียม มีสารทั้งหมด 26 ชนิด (Figure 2 และ Table 2)

พบสารซึ่งเป็นองค์ประกอบทางเคมีที่เหมือนกันในสารสกัดถึงเข้าสีทองทั้งสองชนิดนี้ จำนวน 16 ชนิด ได้แก่ uric acid, pyrrolo [1,2-a] pyrazine-1,4-dione, hexahydro-, lidocaine, n-hexa decanoic acid, hexadecanoic acid, ethyl ester, 9-octadecanoic acid (Z) -, octadecanoic acid, ethyl ester, 2 propenoic acid, 2-dimethyl amino) ethyl ester, glycerol beta-palmitate, cordycepin, beta-mono linolein, dehydroergosterol 3,5-dinitro benzoate, anthiaergostan - 5, 7, 9, 16, 22 - penten, ergosta-5,7,9 (11), 22 - tetraen - 3 -ol, (3 beta, 22E, 24S) -, ergosta - 5, 8, 22-trien-3-ol, (3 beta, 22E) และ ergosterol

สารที่พบเฉพาะในสารสกัดถึงเข้าสีทองที่เพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเห็ด มี 7 ชนิด ได้แก่ 5-thiazoleethanol, 4-methyl-, ethyl pentadecanoate, pyrrolo [1,2-a] pyrazine-1, 4-dione, hexahydro-3- (2-methyl propyl) -, eicosanoic acid, ethyl ester, linoleic acid, methyl linolealdate และ (E) -9-octadecanoic acid ethyl ester

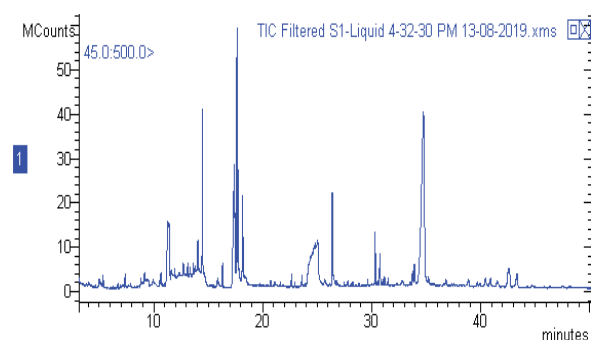


Figure 1 Chromatogram of extract from *C. militaris* cultured in liquid media

สารที่พบเฉพาะในสารสกัดถึงเชื้อราที่เพาะเลี้ยงในอาหารเพาะแมลงมีลักษณะเฉพาะ มี 10 ชนิด ได้แก่ 3-pyridine carboxamide, tetradecanoic acid, pentadecanoic acid, 5,10-diethoxy - 2, 3, 7, 8-tetrahydro-1H, 6H-dipyrrolo [1,2-a ; 1', 2'-d] pyrazine, 9-tetradecen-1-ol, acetate, (E) -11,14-eicosadienoic acid methyl ester, 9,12-octadecadienal, octadecanoic acid และ 7,11-hexadecadienal

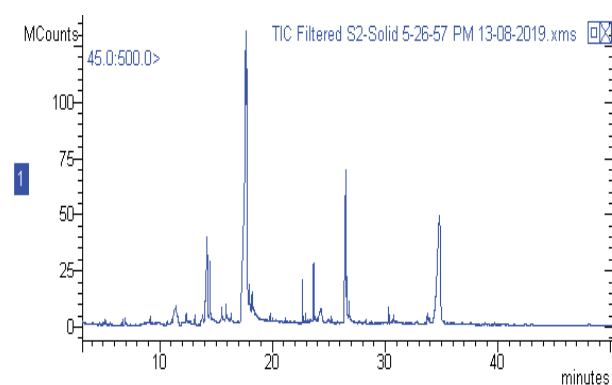


Figure 2 Chromatogram of extract from *C. militaris* cultured in Job's tears solid media

การพบคอร์ไดเซปินในสารสกัดทั้งสองชนิดในการวิจัยครั้งนี้ สอดคล้องกับรายงานการวิจัยที่ผ่านมา ที่พบคอร์ไดเซปิน เป็นองค์ประกอบหลักในส่วนต่างๆ ของถึงเชื้อรา และในสารสกัดของถึงเชื้อรา รวมทั้งเป็นยาหลายชนิด 10,11,12,19,16, 20,43,13,44,9, 26 หากพิจารณาจาก % area ปริมาณของคอร์ไดเซปินในสารสกัดถึงเชื้อราที่เพาะเลี้ยงในอาหารเพาะแมลง มีปริมาณมากกว่าที่เพาะเลี้ยงในอาหารเพาะแมลงมีลักษณะเฉพาะ คือ 20.57% (Table 1) และ 2.17% (Table 2) ตามลำดับ

มีรายการพบสารสำคัญ หรือสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพบางชนิดในถึงเชื้อราที่แตกต่างกัน เช่น เมื่อนำถึงเชื้อ

ราไปเพาะเลี้ยง แล้วทำการแยกหาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ พบสารทั้งหมด 9 ชนิด ได้แก่ สารกลุ่ม 10-membered macrolides สาร cepharosporolide C สาร cepharosporolides E สาร cepharosporolides F สาร 2-carboxymethyl-4-(3'-hydroxybutyl) furan สาร cordycepin และสาร pyridine-2, 6-dicarboxylic acid¹³ การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของถึงเชื้อราที่ได้จากการเพาะเลี้ยง โดยใช้วิธี GC-MS พบสารทั้งหมดจำนวน 39 ชนิด ซึ่งเป็นพวกนิวคลีโอไทด์ คาร์โบไฮเดรต และกรดอะมิโน³⁸ เติบโตอยู่ในเห็ดธรรมชาติ และเห็ดที่ได้จากการเพาะเลี้ยง มีนิวคลีโอไทด์แตกต่างกัน และความแตกต่างนี้ขึ้นอยู่กับส่วนของเห็ดที่นำมาวิเคราะห์⁴⁵ และจากการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของถึงเชื้อราที่ได้จากการเพาะเลี้ยง โดยใช้วิธี GC-MS พบว่า คอร์ไดเซปิน มีปริมาณมากที่สุดในระยะที่ 4 (aging period)³⁸ และ คอร์ไดเซปิน และอะดีโนซีน มีปริมาณมากที่สุดในส่วนดอกถึงเชื้อราที่เพาะเลี้ยงในอาหารเพาะแมลงข้าว (rice medium) เมื่อเทียบกับที่เพาะเลี้ยงในอาหารเพาะหนอนไหม (silkworm chrysalis medium) และข้าวสาลี (wheat medium) ตามลำดับ¹⁸

เป็นที่น่าสังเกตว่า ในการวิจัยครั้งนี้ สารที่พบในสารสกัดจากถึงเชื้อราที่เพาะเลี้ยงในอาหารเพาะแมลงมีลักษณะเฉพาะ ส่วนหนึ่งเป็นสารชนิดเดียวกับที่พบในลูกเห็ด ซึ่งเป็นไขมัน โพลีฟีนอล ไฟโตสเตอรอล^{46,47,48} จึงเป็นไปได้ว่า สารที่พบในถึงเชื้อรา ส่วนหนึ่งได้รับมาจากส่วนประกอบในอาหารเพาะ ดังเคยมีรายงานว่า อาหารเพาะมีอิทธิพลอย่างยิ่งต่อการสะสมสารออกฤทธิ์^{49,50}

การวิจัยครั้งนี้พบสารแตกต่างกันเมื่อเพาะเลี้ยงถึงเชื้อราในอาหารเพาะที่แตกต่างกัน ซึ่งให้เห็นว่า อาหารเพาะเป็นปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อชนิดของสารที่เป็นองค์ประกอบในถึงเชื้อรา จึงอาจกล่าวได้ว่า การพบสารในถึงเชื้อราแตกต่างกัน เป็นผลมาจาก วิธีการที่ใช้ในการวิเคราะห์ แหล่งที่มาของถึงเชื้อรา ส่วนของถึงเชื้อราที่นำมาวิเคราะห์ อาหารที่ใช้เพาะเลี้ยง และระยะเวลาในการเก็บเกี่ยวผลผลิตเป็นต้น

2.ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

2.1 การหาปริมาณฟีนอลิกรวม พบว่า สารสกัดจาก

ถึงเชื้อราที่เพาะเลี้ยงในอาหารเพาะแมลง มีปริมาณฟีนอลิกรวมสูงกว่าสารสกัดจากถึงเชื้อราที่เพาะเลี้ยงในอาหารเพาะแมลงมีลักษณะเฉพาะ ($p < 0.05$) คือ 178.01 ± 0.71 และ 135.48 ± 0.60 mgGE/gEtX ตามลำดับ (Table 3)

Table 1 Chemical components of the extract from *C. militaris* cultured in liquid media

No	RT (min)	Peak Name	Area	%Area	%Prob
1	5.368	5-Thiazole ethanol, 4 methyl-	6.22E+06	0.27	93.0
2	10.670	Uric acid	6.84E+06	0.30	29.3
3	11.317	Pyrrolo[1,2-a]pyrazine-1,4-dione, hexahydro-	1.83E+08	7.96	82.4
4	12.723	Ethyl pentadecanoate	6.66E+06	0.29	45.7
5	13.124	Lidocaine	6.91E+06	0.30	21.8
6	13.638	Pyrrolo[1,2-a]pyrazine-1,4-dione, hexahydro-3-(2-methylpropyl) -	1.15E+07	0.50	75.1
7	14.056	n-Hexadecanoic acid	2.68E+07	1.17	58.2
8	14.476	Hexadecanoic acid, ethyl ester	1.11E+08	4.85	50.3
9	15.867	9-Octadecanoic acid (z) -	7.83E+06	0.34	22.1
10	16.312	Eicosanoic acid, ethyl ester	1.53E+07	0.67	23.3
11	17.383	Linoleic acid	1.93E+08	8.39	12.1
12	17.634	Methyl linolelaidate	1.89E+08	8.24	12.0
13	17.720	(E) -9-Octadecenoic acid ethyl ester	8.65E+07	3.77	30.9
14	18.168	Octadecanoic acid, ethyl ester	5.66E+07	2.46	42.1
15	22.638	2-Propenoic acid, 2-(dimethylamino) ethyl ester	8.06E+06	0.35	12.2
16	23.586	Glycerol beta-palmitate	8.17E+06	0.36	51.2
17	25.004	Cordycepin	4.73E+08	20.57	56.8
18	26.385	beta-Monolinolein	8.37E+07	3.64	19.2
19	30.313	Dehydroergosterol 3,5-dinitrobenzoate	3.95E+07	1.72	58.3
20	30.740	Anthiaergostan-5,7,9,16,22-penten	2.75E+07	1.20	58.6
21	33.738	Ergosta-5,7,9(11),22-tetraen-3-ol, (3beta,22E,24S) -	1.68E+07	0.73	48.4
22	33.917	Ergosta-5,8,22-trien-3-ol, (3.beta.,22E)	2.41E+07	1.05	16.3
23	34.749	Ergosterol	7.09E+08	30.87	66.0
Total			2.30E+09	100.00	

Table 2 Chemical components of the extract from *C. militaris* cultured in Job's Tear solid media

No	RT (min)	Peak Name	Area	%Area
1	6.916	3-Pyridine carboxamide	1.37E+07	0.36
2	10.669	Uric acid	6.21E+06	0.16
3	11.067	Tetradecanoic acid	3.49E+06	0.09
4	11.429	Pyrrolo[1,2-a]pyrazine-1,4-dione, hexahydro-	1.52E+08	4.03
5	12.362	Pentadecanoic acid	9.35E+06	0.25
6	13.123	Lidocaine	1.19E+07	0.31
7	13.819	5,10-Diethoxy-2,3,7,8-tetrahydro-1H,6H-dipyrrolo[1,2-a ; 1', 2'-d] pyrazine	3.26E+07	0.86
8	14.226	n-Hexadecanoic acid	2.93E+08	7.76
9	14.480	Hexadecanoic acid, ethyl ester	7.05E+07	1.86
10	15.513	9-Tetradecen-1-ol, acetate, (E) -	2.19E+07	0.58
11	15.888	9-Octadecanoic acid (z) -	2.46E+07	0.65
12	17.642	11,14-Eicosadienoic acid, methyl ester	6.82E+08	18.06
13	17.726	9,12-Octadecadienal	6.09E+08	16.12
14	17.972	Octadecanoic acid	3.41E+07	0.90
15	18.197	Octadecanoic acid, ethyl ester	2.41E+07	0.64
16	22.672	2-Propenoic acid, 2-(dimethylamino) ethyl ester	5.64E+07	1.49
17	23.653	Glycerol beta-palmitate	8.95E+07	2.37
18	24.308	Cordycepin	8.19E+07	2.17
19	26.501	beta-Monolinolein	4.28E+08	11.33
20	26.596	7,11-Hexadecadienal	8.46E+07	2.24
21	26.802	Glycerol 1-monostearate	2.06E+07	0.55
22	30.316	Dehydroergosterol 3,5-dinitrobenzoate	2.56E+07	0.68
23	30.740	Anthiaergostan-5,7,9,16,22-penten	1.34E+07	0.35
24	33.762	Ergosta-5,7,9(11),22-tetraen-3-ol, (3beta,22E,24S) -	2.69E+07	0.71
25	33.921	Ergosta-5,8,22-trien-3-ol, (3beta,22E)	1.24E+07	0.33
26	34.792	Ergosterol	9.50E+08	25.15
Total			3.78E+09	100.00

Table 3 Anti-oxidant activity of extracts from *C. militaris* cultured in liquid and Job's Tear solid media

Samples	Total Phenolic Content (mgGE/gExt)	Total Flavonoid Content (mgQE/gExt)	DPPH assay IC ₅₀ (mg/mL)	ABTS assay IC ₅₀ (mg/mL)
CMELM	178.01±0.71 ^b	91.00±0.95 ^b	0.49±0.04 ^c	0.06±0.00 ^c
CMEJTSM	135.48±0.60 ^a	6.81±0.19 ^a	0.99±0.06 ^d	0.22±0.01 ^d
Ascorbic acid	-	-	0.004±0.0002 ^a	0.007±0.0001 ^a
Trolox	-	-	0.016±0.0012 ^b	0.016±0.0003 ^b

Mean ± SEM in the same column with the different superscripts were significantly different (p<0.05)

(CMELM = extract from *C. militaris* cultured in liquid medium, CME JTSM = extract from *C. militaris* cultured in Job's tear solid medium)

สารประกอบฟีนอลิก (phenolic compounds) ซึ่งประกอบด้วย phenolic acids, oxidized polyphenols, hydroxybenzoic acids, flavonoids, tannins, hydroxycinnamic acids, stilbenes และ lignans ที่พบในเห็ดและในสารสกัดเห็ด มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ โดยทำหน้าที่สลายเอนไซม์ peroxidase ทำให้โลหะอยู่ในภาวะที่ไม่สามารถทำงานได้ และยังกำจัดออกซิเจน หรือยับยั้งอนุมูลอิสระได้¹ โพลีฟีนอลที่พบในเห็ดถึงเชื้อราของ ก็ออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ⁵²

การพบสารประกอบฟีนอลิกรวมในสารสกัดจากถึงเชื้อราของในงานวิจัยครั้งนี้ สอดคล้องกับการพบกรดซีเบนโซอิก (p-hydroxy benzoic acid) ซึ่งเป็นพวกกรดฟีนอลิก ชนิดเดียวที่พบในเห็ดชนิดนี้¹⁵ ซึ่งให้เห็นว่า สามารถนำสารสกัดถึงเชื้อราของมาใช้เป็นสารต้านอนุมูลอิสระได้ แต่เนื่องจากสารประกอบฟีนอลิกรวมในสารสกัดถึงเชื้อราของที่เพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเหลวนั้น มีปริมาณมากกว่าในสารสกัดถึงเชื้อราของที่เพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อฟัซูลูกเดียว ทำให้สารสกัดถึงเชื้อราของที่เพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเหลวนั้นมีแนวโน้มในการออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระดีกว่าสารสกัดถึงเชื้อราของที่เพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อฟัซูลูกเดียว

2.2 การหาปริมาณฟลาโวนอยด์รวม พบว่าสารสกัดจากถึงเชื้อราของที่เพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเหลวนั้น มีปริมาณ ฟลาโวนอยด์รวมสูงกว่าสารสกัดจากถึงเชื้อราของที่เพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อฟัซูลูกเดียว อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05) คือ 91.00± 0.95 และ 6.81± 0.19 mgQE/gExt ตามลำดับ (Table 3)

ปกติจะพบฟลาโวนอยด์ในพืช หรือถูกหลั่งออกมาจากพืช อย่างไรก็ตาม มีรายงานว่า มีฟลาโวนอยด์ในพวกเห็ด ทั้งนี้อาจเป็นไปได้ว่า เห็ดเหล่านี้มีการดูดซึมสารอาหารและสารประกอบต่างๆ จากวัตถุที่เห็ดเหล่านี้เจริญอยู่ และมีรายงานว่า สารประกอบฟลาโวนอยด์ในถึงเชื้อราของมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ⁵² การพบฟลาโวนอยด์รวมในสารสกัดถึงเชื้อราของที่เพาะเลี้ยงในอาหารเพาะทั้งสองชนิด แต่สารสกัดถึงเชื้อราของที่เพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเหลวนั้น มีปริมาณฟลาโวนอยด์

รวมมากกว่าสารสกัดถึงเชื้อราของที่เพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อฟัซูลูกเดียว ทำให้สารสกัดถึงเชื้อราของที่เพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเหลวนั้น มีแนวโน้มในการออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระดีกว่าสารสกัดถึงเชื้อราของที่เพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อฟัซูลูกเดียว

2.3 การวิเคราะห์ความสามารถในการยับยั้งการเกิดออกซิเดชัน โดยใช้วิธี DPPH assay พบว่า สารสกัดถึงเชื้อราของที่เพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเหลวนั้น มีความสามารถในการยับยั้งการเกิดออกซิเดชัน สูงกว่าสารสกัดถึงเชื้อราของที่เพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อฟัซูลูกเดียว โดยมีค่า IC₅₀ เป็น 0.49±0.04 และ 0.99±0.06 mg/ml ตามลำดับ อย่างไรก็ตาม สารสกัดทั้งสองชนิดนี้มีความสามารถในการยับยั้งการเกิดออกซิเดชันได้น้อยกว่า Ascorbic acid (IC₅₀ = 0.004±0.0002 mg/ml) และ Trolox (IC₅₀ = 0.016±0.0012 mg/ml) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05) (Table 3) เนื่องจากการทดลองในครั้งนี้ใช้เอทานอล 95% เป็นตัวทำละลายในการสกัด จึงกล่าวได้ว่า สารสกัดเอทานอลของถึงเชื้อราของ มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH สอดคล้องกับรายงานวิจัยที่พบว่า สารสกัดเมทานอลของถึงเชื้อราของ มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ เมื่อทดสอบด้วยวิธี DPPH assay⁵³ นอกจากนี้ ยังมีรายงานว่า สารสกัดน้ำถึงเชื้อราของมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH สูงที่สุด เมื่อเทียบกับสารสกัดที่ใช้สารละลายอื่นเป็นตัวทำละลาย⁴⁹ และส่วนดอกถึงเชื้อราของ มีฤทธิ์ในการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH สูงกว่าส่วนเส้นใย⁷

2.4 การวิเคราะห์ความสามารถในการยับยั้งออกซิเดชัน โดยใช้วิธี ABTS assay พบว่า สารสกัดถึงเชื้อราของที่เพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเหลวนั้น มีความสามารถในการยับยั้งออกซิเดชัน สูงกว่าสารสกัดถึงเชื้อราของที่เพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อฟัซูลูกเดียว โดยมีค่า IC₅₀ เป็น 0.06±0.00 และ 0.22±0.01 mg/mL ตามลำดับ แต่สารสกัดทั้งสอง มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระน้อยกว่า Ascorbic acid และ Trolox อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05) ซึ่งมีค่า IC₅₀ เป็น 0.007±0.0001 และ 0.016±0.0003 mg/mLตามลำดับ (Table 3)

มีรายงานว่า สารสกัดถึงเข้าสู่ห้องสามารถกำจัดอนุมูลอิสระ ABTS^{•+} และลดอนุมูลอิสระได้ แสดงให้เห็นว่าสารสกัดถึงเข้าสู่ห้องมีความสามารถในการเป็นตัวให้อิโอรเจน (hydrogen donators)⁵²

คอร์ไดเซปิน และอะดีโนซีน ในถึงเข้าสู่ห้องมีฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระ เมื่อวิเคราะห์โดยวิธี Trolox equivalent antioxidant capacity method) สารประกอบโพลีฟีนอล ฟลาโวนอยด์ และโพลีแซคคาไรด์ในถึงเข้าสู่ห้อง ก็ออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ⁵² ส่วนดอกของถึงเข้าสู่ห้อง มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยมีศักยภาพสูงในการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH ขณะที่ส่วนเส้นใยมีฤทธิ์สูงในการต้านอนุมูลอิสระโดยรวม และมีความสามารถสูงในการจับและการลดอนุมูลอิสระ แสดงให้เห็นว่าแต่ละส่วนของถึงเข้าสู่ห้องมีหน้าที่ และกลไกในการออกฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระต่างกัน⁷ ถึงเข้าสู่ห้องจากการเพาะเลี้ยงมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูง โดยฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระนี้ ส่วนหนึ่งเกิดจากโพลีแซคคาไรด์ในส่วนเส้นใย⁵⁴ และแนวโน้มในการกำจัดและลดอนุมูลอิสระของสารสกัดถึงเข้าสู่ห้อง ขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของสารสกัด⁵²

ผลการวิจัยในครั้งนี้ สารสกัดจากถึงเข้าสู่ห้องที่เพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเห็ด มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงกว่าสารสกัดถึงเข้าสู่ห้องที่เลี้ยงในอาหารเพาะเชื้อราพิชุลูกเดียว ดังนั้น อาหารเพาะจึงเป็นปัจจัยหนึ่งในการออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

กล่าวโดยรวม ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของถึงเข้าสู่ห้องขึ้นอยู่กับปัจจัยต่างๆ ได้แก่ ชนิด และปริมาณของสารออกฤทธิ์ ชนิดของตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัด วิธีการที่ใช้ในการวิเคราะห์ ส่วนของถึงเข้าสู่ห้องที่นำมาวิเคราะห์ และอาหารเพาะ เป็นต้น

สรุปผลการทดลอง

สารสกัดถึงเข้าสู่ห้อง มีคอร์ไดเซปินเป็นสารหลัก สารสกัดถึงเข้าสู่ห้องที่เพาะเลี้ยงในอาหารเพาะต่างกัน มีองค์ประกอบทางเคมีส่วนหนึ่งต่างกัน และมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระต่างกัน สารสกัดถึงเข้าสู่ห้องที่เพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเห็ด มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงกว่าสารสกัดถึงเข้าสู่ห้องที่เพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเชื้อราพิชุลูกเดียว สารประกอบฟีนอลและฟลาโวนอยด์ที่พบในสารสกัด ทำหน้าที่เป็นสารออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยการเป็นตัวให้อิโอรเจน และสารสกัดถึงเข้าสู่ห้องสามารถเป็นแหล่งธรรมชาติของสารต้านอนุมูลอิสระ

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ กองทุนพัฒนาโรงเรียนนายร้อย พระจุลจอมเกล้า ปี พ.ศ. 2558 ในการสนับสนุนการวิจัย

เอกสารอ้างอิง

1. Mains EB. North American Entomogenous species of *Cordyceps*. Mycologia: 1958 ; 169-222.
2. Hur H. Chemical ingredients of *Cordyceps militaris*. Microbiol 2008 ; 36(4) : 233-235.
3. Sung GH, Hywel-Jones NL, Sung JM, Luangsa-ard JJ, Shrestha B, Spatafora JW. Phylogenetic classification of *Cordyceps* and the Clavicipitaceous fungi. Stud Mycol 2007 ; 57: 5-59.
4. Park JG, Son YJ, Lee TH, Baek NJ, Yoon DH, Kim TW, Aravinthan A, Hong S, Kim JH, Sung GH, Cho JY. Anticancer efficacy of *Cordyceps militaris* ethanol extract in a xenografted leukemia model, Hindawi Evidence-Based Complem Alt Med 2017. [https://DOI.org/10.1155/2017/8474703](https://doi.org/10.1155/2017/8474703).
5. Gui ZZ, Zhu YH. Advance on cultivation, bioactive compound and pharmacological mechanism of *Cordyceps militaris*. Sci Seri 2008 ; 34: 178-184.
6. Zheng P, Xia Y, Xiao G, Xiong C, Hu X, Zhang S, Zheng H, Huang Y, Zhou Y, Wang S *et al*. Genome sequence of the insect pathogenic fungus *Cordyceps militaris*, a valued traditional Chinese medicine. Genome Biol 2011 ; (12) : 116.
7. Dong CH, Yang T, Lian T. 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* (Ascomycetes). Int J Med Mushrooms 2014 ; 16(5) : 485-495 DOI: 10.1615/Int J Med Mushrooms.v16.i5.70
8. Dai JJ, Fan T, Wu CH, Xiao LZ, Tian SF. Summarization of the study on the artificial cultivation of *Cordyceps militaris* Link. J Anhui Agric Sci 2007 ; 35: 5469-5471.
9. Paterson R. *Cordyceps*: a traditional Chinese medicine and another fungal therapeutic biofactory. Phytochem 2008 ; 69: 1469-1495.
10. Cui J.D. Biotechnological production and applications of *Cordyceps militaris*, a valued traditional Chinese medicine. Crit Rev Biotechnol 2014 ; 35: 475-484.
11. Mizuno T. Medicinal effects and utilization of *Cordyceps* (Fr.) Link (Ascomycetes) and *Isaria* Fr. (Mitosporic Fungi) Chinese caterpillar fungi, "Tochukaso" (Review). Int J Med Mushroom 1999 ; 1: 251-261.

12. Ng TB, Wang HX. Pharmacological actions of Cordyceps, a prized folk medicine. J Pharm Pharmacol 2005 ; 57: 1509- 1519.
13. Rukachaisirikul V, Pramjit S, Pakawatchai C, Isaka M, Supothina S. 10-Membered macrolides from the insect pathogenic fungus *Cordyceps militaris* BCC 2816. J Nat Prod 2004 ; 67: 1953-1955.
14. Hur H. Chemical ingredients of *Cordyceps militaris* Microbiol 2008 ; 36(4) : 233-235.
15. Reis FS, Barros L, Calhella RC, Cirić A, van Griensven LJ, Soković M, Ferreira IC. The methanolic extract of *Cordyceps militaris* (L.) Link fruiting body shows antioxidant, antibacterial, antifungal and antihuman tumor cell lines properties. Food Chem Toxicol 2013 ; 62: 91-8. DOI: 10.1016/j.fct.2013.08.033.
16. Cunningham KG, Hutchinson SA, Manson W, Spring FS. Cordycepin, a metabolic product from cultures of *Cordyceps militaris* (Linn.) Link. Part I. Isolation and characterization. J Chem Soc 1951 ; 2299–3200.
17. Yu HM, Wan BS, Huang SC, Duh PD. Comparison of protective effects between cultured *Cordyceps militaris* and natural *Cordyceps sinensis* against oxidative damage. J Agric Food Chem 2006 ; 54: 3132-3138.
18. Huang L, Li Q, Chen Y, Wang X, Zhou X. Determination and analysis of cordycepin and adenosine in the products of *Cordyceps* spp. Afr J Microbiol Res 2009 ; 3 (12) : 957-961. <http://www.academicjournals.org/ajmr>
19. Chou SM, Lai WJ, Hong TW, Lai JY, Tsai SH, Chen YH, Yu SH, Kao CH, Chu R, Ding ST, Li TK, Shen TL. Synergistic property of cordycepin in cultivated *Cordyceps militaris*-mediated apoptosis in human leukemia cells. Phytomed 2014 ; 21: 1516-1524.
20. Ahn YJ, Park SJ, Lee SG, Shin SC, Choi DH. Cordycepin: selective growth inhibitor derived from liquid culture of *Cordyceps militaris* against *Clostridium* spp. J Agric Food Chem 2002 ; 48: 2744-2748.
21. Nakamura K, Shinozuka K, Yoshikawa N. Anticancer and antimetastatic effects of cordycepin, an active component of *Cordyceps sinensis*. J Pharmacol Sci 2015 ; 127: 53-56.
22. Jo WS, Choi YJ, Kim HJ, Lee JY, Nam BH, Lee JD, Lee SW, Seo SY, Jeong MH. The anti-inflammatory effects of water extract from *Cordyceps militaris* in murine macrophage. Mycobiol 2010 ; 38(1) : 46-51. DOI: 10.4489/MYCO.2010.38.1.046.
23. Jeong MH, Park YS, Jeong DH, Lee CG, Kim JS, Oh SJ, JeongSK, Yang K, Jo WS. In vitro evaluation of *Cordyceps militaris* as a potential radioprotective agent. Int J Molec Med 2014 ; 34: 1349-1357. DOI: 10.3892/ijmm.2014.1901
24. Tuli HS, Sharma AK, Sandhu SS, Kashyap D. Cordycepin: a bioactive metabolite with therapeutic potential. Life Sci 2013 ; 93: 863-869.
25. Shrestha B, Zhang W, Zhang Y, Liu X. The medicinal fungus *Cordyceps militaris*: research and development. Mycol Prog 2012 ; 11: 599-614.
26. Quy TN, Xuan TD, Andriana Y, Tran HD, Khanh TD, Teschke R. Cordycepin Isolated from *Cordyceps militaris*: Its newly discovered herbicidal property and potential plant-based novel alternative to glyphosate. Molec 2019 ; 24: 2901. DOI: 10.3390/molecules24162901 www.mdpi.com/journal/molecules
27. Wasser SP. Medicinal mushrooms as a source of antitumor and immunomodulating polysaccharides. Appl Microbiol Biotechnol 2002 ; 60: 258-274.
28. Liu F, Ooi VEC, Chang ST. Free radical scavenging activities of mushroom polysaccharide extracts. Life Sci 1997 ; 60: 763-771.
29. Wu F, Yan H, Ma X, Jia J, Zhang G, Guo X, Gui Z. Structural characterization and antioxidant activity of purified polysaccharide from cultured *Cordyceps militaris*. Afr J Microbiol Res 2011 ; 5(18) : 2743-2751. <http://www.academicjournals.org/ajmr> DOI: 10.5897/AJMR11.548
30. Yoo HS, Shin JW, Cho JH, *et al.* Effects of *Cordyceps militaris* extract on angiogenesis and tumor growth. Acta Pharmacol Sin 2004 ; 25: 657-665.
31. Won SY, Park EH. Anti-inflammatory and related pharmacological activities of cultured mycelia and fruiting bodies of *Cordyceps militaris*. J Ethnopharmacol 2005 ; 96: 555-561.

32. Yu HM, Wang BS, Huang SC, Duh PD. Comparison of protective effects between cultured *Cordyceps militaris* and natural *Cordyceps sinensis* against oxidative damage. J Agric Food Chem 2006 ; 54: 3132-3138.
33. Chen C, Luo SS, Li Y, Sun YJ, Zhang CK. Study on antioxidant activity of three *Cordyceps* sp. by chemiluminescence. Shanghai J Trad Chinese Med 2004 ; 38: 53-55.
34. Wu WC, Hsiao JR, Lian YY, Lin CY, Huang BM. The apoptotic effect of cordycepin on human OEC-M1 oral cancer cell line. Cancer Chemother Pharmacol 2007 ; 60: 103-111.
35. Lin YW, Chiang BH. Anti-tumor activity of the fermentation broth of *Cordyceps militaris* cultured in the medium of *Radix astragali*. Proc Biochim 2008 ; 43: 244-250.
36. Wei HP, Xiao B, Hu KZ. Pharmaceutical values of *Cordyceps militaris*. J Chin Med Mater 2004 ; 27: 215-217.
37. Patel KJ, Ingalhalli RS. *Cordyceps militaris* (L.: Fr.) Link - An important medicinal mushroom. J Pharmacog Phytochem 2013 ; 2: 315. www.phytojournal.com
38. Oh J, Yoon DH, Shrestha B, Choi HK, Sung GH. Metabolomic profiling reveals enrichment of cordycepin in senescence- process of *Cordyceps militaris* fruit bodies. J Microbiol 2019 ; 57(1) : 54-63. DOI: 10.1007/s12275-019-8486-z
39. Singleton VL, Orthofer RLR. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. Methods Enzym 1999 ; 299: 152-178.
40. Chang C, Yang M, Wen HCJ. Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. J Food Drug Anal 2002 ; 10: 178-182.
41. Ursini F, Maiorino M, Morazzoni P, Roveri A PG. A novel antioxidant flavonoid (IdB 1031) affecting molecular mechanisms of cellular activation. Free Radic Biol Med 1994 ; 16: 547-553.
42. Lee HL, Halliwell B. Oxidation and generation of hydrogen peroxide by thiol compounds in commonly used cell culture media. Biochem Biophys Res Commun 2001 ; 286: 991-994.
43. Guo C, Zhu J, Zhang C, Zhang LJ. Determination of adenosine and 3'-deoxyadenosine in *Cordyceps militaris* (L.) Link. by HPLC. J Chinese Med 1998 ; 23: 236-237.
44. Jung EC, Kim KD, Bai CH, Kim JC, Kim DK, Kim HH. A mushroom lectin from ascomycete *Cordyceps militaris*. Biochem Biophys Acta Gen Subj 2007 ; 1770: 833-838.
45. Sun YJ, Lu P, Ling JY, Zhang HX, Chen C, Zhang CK. Nucleoside from *Cordyceps kyushuensis* and the distribution of two active components in its different parts. Yao Xue Xue Bao 2003 ; 38: 690-694.
46. Fan Z. Coix: Chemical composition and health effects. Trends Food Sci & Technol 2017 ; 61: 160-175.
47. Kondo Y, Nakajima K, Nozoe S, Suzuki S. Isolation of ovulatory-active substances from crops of Job's Tears (*Coix lacryma-jobi* L. var. ma-yuen Stapf.). Chem Pharm Bull 1988 ; 36: 3147-152.
48. Nagao T, Otsuka H, Kohda H, Sato T, Yamasaki K. Benzoxazinones from *Coix lacryma-jobi* var. ma-yuen. Phytochem 1985 ; 24: 2959-2962.
49. Gu YX, Wang ZS, Li SX, Yuan QS. Effect of multiple factors on accumulation of nucleosides and bases in *Cordyceps militaris*. Food Chem 2007 ; 102: 1304-1309.
50. Shih IL, Tsai KL, Hsieh C. Effects of culture conditions on the mycelial growth and bioactive metabolite production in submerged culture of *Cordyceps militaris*. Biochem Eng J 2007 ; 33: 193-201.
51. Dziezak JD. Antioxidants - the ultimate answer to oxidation. Food Technol 1986 ; 40: 94.
52. Mei H, Wang YS, Huang SC, Duh PD. Comparison of protective effects between cultured *Cordyceps militaris* and natural *Cordyceps sinensis* against oxidative damage. J Agric Food Chem 2006 ; 54(8) : 3132-3138. <https://DOI.org/10.1021/jf053111w>
53. Joshi M, Sagar A, Singh zkanwar S and Singh S. Anticancer, antibacterial and antioxidant activities of *Cordyceps militaris*, Ind J Experimental Biol 2019 ; 57: 15-20. <http://nopr.niscair.res.in/handle/123456789/45567>

54. Li SP, Li P, Dong TT, Tsim KW. Anti-oxidation activity of different types of natural *Cordyceps sinensis* and cultured *Cordyceps mycelia*. *Phytomed* 2001 ; 8: 207-212.
55. ทรงชัย สีโชติ, ธนกฤต แก้วถาวร, ชินวัฒน์ บุญเมือง, วิฑูร รุพหิรัญสกุล, วรรณธร ระฤกชาติ, และ เสกสรร โชคพัฒนกิจ. (2556) การเปรียบเทียบเมล็ดธัญพืชที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงเส้นใยเชื้อ *Cordyceps militaris*. ปรินญาณิพนธ์วิทยาศาสตร์บัณฑิต. โรงเรียนนายร้อยพระจุลจอมเกล้า. นครนายก: โรงเรียนนายร้อยพระจุลจอมเกล้า. 102 หน้า.
56. ยาวภา ทองอร่าม. การศึกษาเปรียบเทียบการเพาะเลี้ยงถึงเชื้อสืทองโดยใช้หัวเชื้อเหลวและหัวเชื้อแข็งของ *Cordyceps militaris* บนเมล็ดธัญพืช. วารสารวิชาการโรงเรียนนายร้อยพระจุลจอมเกล้า. 2558 ; 13: 87-99.