การพัฒนาตำรับเอสเซนส์ที่มีสารต้านออกซิเดชันจากสารสกัดเห็ดนางรมดำ
Development of antioxidant essence formulation from Kummer (*Pleurotus osttreatus* (Fr.)) extract

ลภัสรดา มุ่งหมาย[1], มธุกร สายนาคำ[1], ธรรมนูญ รุ่งสังข์[1], วีรยา ปรีดาลิขิต[1*]
Lapatrada Mungmai[1], Mathukorn Sainakham[1], Tammanoon Rungsang[1], Weeraya Preedalikit[1*]

Received: 18 October 2019 ; Revised: 29 February 2020 ; Accepted: 7 May 2020

บทคัดย่อ
ในงานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาตำรับเอสเซนส์โดยใช้สารสกัดจากเห็ด โดยคัดเลือกสารสกัดจากเห็ด 3 ชนิด คือ เห็ดหูหนูดำ เห็ดนางฟ้า และเห็ดนางรมดำ ที่มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระที่ดี ซึ่งเห็ดหูหนูดำ เห็ดนางฟ้า และเห็ดนางรมดำ ถูกนำมาสกัดและวิเคราะห์ปริมาณสารพอลิแซ็กคาไรด์รวม ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม และฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธีฟีนอล-กรดซัลฟูริก, Folin-Ciocalteu และ ดีพีพีเอช ตามลำดับ ผลการวิจัยพบว่าสารสกัดเห็ดนางรมดำมีปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์รวมเท่ากับ 90.01 ± 0.26 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) และสารประกอบฟีนอลิกรวม เท่ากับ 1.107 ± 0.05 มิลลิกรัมของกรดแกลลิกต่อกรัมของสารสกัดหยาบ ในขณะที่เห็ดหูหนูดำมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระดีที่สุด ($p<0.05$) โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 159.55 ± 0.47 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร รองลงมาคือสารสกัดเห็ดนางรมดำและเห็ดนางฟ้า เท่ากับ 224.85 ± 1.45 และ 528.44 ± 0.10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ซึ่งมีความต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) ดังนั้นสารสกัดเห็ดนางรมดำซึ่งมีปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์รวม และมีฤทธิ์ทางชีวภาพที่ดีได้ถูกคัดเลือกมาพัฒนาเป็นตำรับเอสเซนส์ หลังผ่านการทดสอบความคงตัวเป็นเวลา 1 เดือน พบว่าตำรับที่มีสารสกัดเห็ดนางรมดำปริมาณ 3 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อน้ำหนัก) มีความคงตัวที่ดี ดังนั้นเอสเซนส์ที่มีส่วนผสมของสารสกัดจากเห็ดนางรมดำจึงมีศักยภาพสำหรับการพัฒนาเพื่อใช้เป็นเครื่องสำอางสำหรับบำรุงผิวได้ต่อไป

คำสำคัญ: เห็ดหูหนูดำ เห็ดนางฟ้า เห็ดนางรมดำ พอลิแซ็กคาไรด์ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ เอสเซนส์

Abstract
In this study, extracts of *Auricularia auricular-judae* (Bull.), *Pleurotus sajor-caju* (Fr.) Sing. and *Pleurotus osttreatus* (Fr.) Kummer were thoroughly screened for further development of natural essences. Extracts were assayed for total polysaccharide content, total phenolic content, and antioxidant activity by the phenol-sulfuric acid method, Folin-Ciocalteu method, and DPPH assay, respectively. *P. osttreatus* extract had total polysaccharide and total phenolic content of 90.01 ± 0.26% and 1.107 ± 0.05 mg GAE/g, respectively, while *A. auricular-judae* extract demonstrated the highest free radical scavenging activity with an IC_{50} value of 159.55 ± 0.47 µg/ml. The antioxidant capacities of *P. osttreatus*, and *P.sajor-caju* extract were also determined as 224.85 ± 1.45, and 528.44 ± 0.10 µg/ml ($p<0.05$), respectively. Consequently, *P. osttreatus* extract showing appropriate total polysaccharide content and bioactivities, was selected to formulate the essence. After a 1-month period of stability test, it was found that the essence containing 3% (w/w) *P. osttreatus* extract was highly stable. Therefore, this formulation has a potential for further development as a cosmetic skin care product.

Keywords: *Auricularia auricular-judae* (Bull.), *Pleurotus sajor-caju* (Fr.) Sing., *Pleurotus osttreatus* (Fr.) Kummer, Polysaccharide, Anti-oxidation, Essence

---

[1] อาจารย์ สาขาวิชาวิทยาศาสตร์เครื่องสำอาง คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยพะเยา จังหวัดพะเยา 56000
[1] Lecturer, Division of Cosmetic Science, School of Pharmaceutical Sciences, University of Phayao, Phayao 56000, Thailand
* Corresponding author at: Weeraya Preedalikit, Division of Cosmetic Science, School of Pharmaceutical Sciences, University of Phayao, Phayao 56000, Thailand, E-mail: weeraya.pr@up.ac.th

บทนำ

ในชีวิตประจำวันผิวหนังต้องเผชิญกับมลภาวะในอากาศอาทิ เช่น แสงแดด ความร้อน ฝุ่นละออง และสารเคมี ซึ่งเป็นปัจจัยกระตุ้นการเกิดอนุมูลอิสระส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของชั้นผิวหนัง ทำให้ผิวหนังเกิดการแก่และขาดความยืดหยุ่น[1] นอกจากนี้ผิวหนังที่ขาดความชุ่มชื้นยังเป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดการแก่ของผิวหนังได้เช่นกัน[2] ดังนั้นการใช้สารต้านอนุมูลอิสระเพื่อชะลอการเกิดริ้วรอยและการใช้พอลิเมอร์ที่ชอบน้ำและมีมวลโมเลกุลสูงจะกระจายตัวเป็นฟิล์มอยู่บนผิวหนัง ช่วยเก็บกักน้ำ ลดการสูญเสียน้ำจากผิว จึงมีส่วนช่วยในการชะลอการเกิดริ้วรอย ซึ่งปัจจุบันการเลือกใช้ผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางจากธรรมชาติที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพในการต้านอนุมูลอิสระและมีประสิทธิภาพในการบำรุงผิว จึงเป็นอีกหนึ่งทางเลือกที่ตรงตามความต้องการของผู้บริโภคมากขึ้น เนื่องจากมีความปลอดภัยมากกว่าการใช้สารเคมีสังเคราะห์และไม่ก่อให้เกิดการระคายเคือง

เห็ดเป็นหนึ่งในพืชที่มีประโยชน์ ได้รับความนิยมในการบริโภค มีหลากหลายสายพันธุ์ สามารถเพาะพันธุ์ได้ง่าย และออกฤทธิ์ทางชีวภาพหลากหลาย จากรายงานการวิจัยที่ผ่านมาพบว่า สารสกัดจากเห็ดมีสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่เป็นประโยชน์กับผิวหนังที่สำคัญหลายชนิด ได้แก่ เลซิติน พอลิแซ็กคาไรด์ สารประกอบฟีนอลิก เทอร์พีนอยด์ เป็นต้น[3] และจากการศึกษาคุณสมบัติของการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระในเห็ดชนิดต่างๆ พบว่าเห็ดมีคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระ ซึ่งสัมพันธ์กับปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์และสารประกอบฟีนอลิก[4]

เห็ดหูหนูดำ (*A. auricular-judae*) เห็ดนางฟ้า (*P. sajor-caju*) และเห็ดนางรมดำ (*P. osttreatus*) เป็นเห็ดพื้นบ้านของไทยที่รู้จักกันอย่างแพร่หลายในกลุ่มผู้บริโภค มีประโยชน์พร้อมทั้งมีสรรพคุณทางยาอันหลากหลาย โดยเห็ดนางฟ้ามีฤทธิ์ฆ่าพยาธิ[5] ลดระดับน้ำตาลในเลือด[6] และมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ[7] เห็ดนางรมดำมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ต้านการอักเสบ และกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน[8] ส่วนเห็ดหูหนูดำสามารถลดการสะสมไขมันที่ตับ มีฤทธิ์ต้านการอักเสบ[9] และมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้[10] นอกจากนี้เห็ดสามารถผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ธรรมชาติออกมาภายนอกเซลล์เพื่อเป็นกลไกในการป้องกันตนเอง และเพื่อให้สามารถยึดติดกับพื้นผิวใดๆ ได้ดี ดังนั้นโครงสร้างของเห็ดโดยทั่วไปจะประกอบไปด้วยเนื้อเยื่อ 3 ชั้น ชั้นนอกสุดหรือผนังเซลล์ประกอบด้วยสารพอลิแซ็กคาไรด์ที่อยู่ในรูปของกลูแคน นอกจากนี้กลูแคนเป็นพอลิเมอร์ของน้ำตาลกลูโคสที่มีคุณสมบัติละลายน้ำได้ มีลักษณะเป็นเมือก และพอลิแซ็กคาไรด์ชนิดอื่นๆ เช่น ไกลโคเจน ไซแลน และเซลลูโลส ที่มีคุณสมบัติในการดูดน้ำเข้าหาตัวสามารถคงความชุ่มชื้นไว้ได้เป็นระยะเวลานาน[11] ซึ่งปัจจุบันยังไม่นิยมนำเห็ดพื้นบ้านของไทยหรือพอลิแซ็กคาไรด์จากเห็ดมาใช้ประโยชน์ทางเครื่องสำอางมากนัก

การประยุกต์ใช้พอลิเมอร์ในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางโดยทั่วไปแบ่งออกเป็น 3 กลุ่ม คือ พอลิเมอร์สังเคราะห์ พอลิเมอร์กึ่งสังเคราะห์ และ พอลิเมอร์จากธรรมชาติ ปัจจุบันมีพอลิเมอร์สังเคราะห์และกึ่งสังเคราะห์ที่เตรียมขึ้นมาเพื่อให้มีคุณสมบัติใกล้เคียงกับพอลิเมอร์จากธรรมชาติ จะมีกำลังการผลิตที่น้อยกว่าและมูลค่าสูง โดยเฉพาะอย่างยิ่งพอลิเมอร์ที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่ดีด้วยนั้นจะมีมูลค่าเพิ่มมากขึ้น โดยพอลิเมอร์จากธรรมชาติกลุ่มพอลิแซ็กคาไรด์เป็นกลุ่มที่มีการใช้มากทางเครื่องสำอาง เนื่องจากหาง่ายและมีคุณสมบัติหลากหลาย มีความเข้ากันได้กับสารอื่นในตำรับ มีความปลอดภัย สารกลุ่มนี้มีหน้าที่เป็นสารเพิ่มความหนืด และใช้เป็นสารก่อเจล มีประสิทธิภาพเป็นสารเพิ่มความชุ่มชื้นประเภท humectant ให้กับผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางได้[12]

จากข้อมูลข้างต้นผู้วิจัยจึงได้สนใจศึกษาการพัฒนาผลิตภัณฑ์เอสเซนส์บำรุงผิวหน้าที่มีส่วนผสมของสารสกัดจากเห็ดเพื่อเพิ่มความชุ่มชื้นให้กับผิวหน้าและสามารถต้านอนุมูลอิสระที่เป็นสาเหตุของริ้วรอย ซึ่งเป็นการใช้วัตถุดิบจากธรรมชาติทดแทนวัตถุดิบสังเคราะห์ที่มีราคาสูง โดยศึกษาเปรียบเทียบปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดเห็ด 3 ชนิด คือ เห็ดหูหนูดำ เห็ดนางฟ้า และเห็ดนางรมดำ จากนั้นคัดเลือกเห็ดที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่ดีเพื่อตั้งตำรับผลิตภัณฑ์เอสเซนส์บำรุงผิวหน้าที่มีส่วนผสมของสารสกัดเห็ดและทดสอบความคงตัวของตำรับเครื่องสำอาง

วิธีการวิจัย

พืชที่นำมาทำการวิจัยนี้ได้แก่ ส่วนของดอก (fruiting bodies) เห็ดนางฟ้า เห็ดนางรมดำ และเห็ดหูหนูดำ ที่ได้จากโรงเพาะเห็ดในจังหวัดพะเยา เก็บเกี่ยวผลผลิตในเดือนมกราคม พ.ศ. 2562 ซึ่งเห็ดที่ใช้ในการทดลองเก็บเกี่ยวในช่วงสัปดาห์ที่ 3 หลังจากถ่ายเชื้อเห็ดลงในก้อนเชื้อและทำการวินิจฉัยสปีชีส์ของเห็ดทั้ง 3 ชนิดโดยการเทียบเคียงข้อมูลทางสัณฐานวิทยาจากรายงานการวิจัยในประเทศไทย

1. วิธีการสกัดสารพอลิแซคคาไรด์

เตรียมเห็ด (เห็ดหูหนูดำ, เห็ดนางฟ้า และเห็ดนางรมดำ) ล้างทำความสะอาดแล้วนำไปอบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง และสกัดด้วยน้ำกลั่นในอัตราส่วนเห็ดต่อน้ำกลั่น คือ 1:25 1:30 และ 1:35 กรัมต่อมิลลิลิตร โดยต้มน้ำกลั่นให้มีอุณหภูมิ 80 ± 5 องศาเซลเซียส ใส่เห็ดลงไปต้มเป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นกรองด้วยผ้าขาวบางเพื่อแยกกากออก นำมาตกตะกอนด้วย 95 เปอร์เซ็นต์ เอธานอล และปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 5,000 รอบต่อนาที เก็บสารละลายส่วนใส

ไประเหยเอธานอลด้วย rotary evaporator (รุ่น Rotavapor 215 บริษัท Buchi ประเทศสวิตเซอร์แลนด์) จากนั้นทำให้แห้งด้วยเครื่องทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (รุ่น Eyela-Freeze Dryer FDU-2110 บริษัท Buchi ประเทศสวิตเซอร์แลนด์) จะได้สารสกัดหยาบ จากนั้นคำนวณร้อยละผลผลิตที่ได้และคัดเลือกเห็ดชนิดที่มีร้อยละผลผลิตมากที่สุดไปทำการทดสอบหาปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์รวม ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม และฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระต่อไป

2. การวิเคราะห์หาปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์รวมด้วยวิธีมาตรฐาน ฟีนอล-กรดซัลฟูริก (Phenolic-sulfuric acid)[13]

สารละลายตัวอย่างความเข้มข้นต่างๆ ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ผสมกับสารละลายกรดซัลฟูริก เข้มข้น ปริมาตร 150 ไมโครลิตร จากนั้นเติมสารละลายฟีนอลที่ความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 30 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากัน แล้วนำไปแช่ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้องเป็นระยะเวลา 5 นาที ตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง microplate reader (รุ่น Synergy H1 บริษัท Biotek ประเทศสหรัฐอเมริกา) หลังจากนั้นนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ ไปคำนวณหาปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์โดยเปรียบเทียบกับกราฟสารละลายมาตรฐานกลูโคสที่ช่วงความเข้มข้น 50 - 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

3. การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม (Total phenolic content)

ปิเปตสาร Folin-Ciocaltue ปริมาตร 100ไมโครลิตร ลงในสารละลายตัวอย่าง ปริมาตร 20 ไมโครลิตร และเติมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนตที่ความเข้มข้น 75 เปอร์เซนต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ปริมาตร 80 ไมโครลิตร ตามลำดับ เขย่าให้เข้ากัน ตั้งไว้ในที่มืดที่อุณหภูมิห้องเป็นระยะเวลา 30 นาที ตรวจวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 765 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง microplate reader (รุ่น Synergy H1 บริษัท Biotek ประเทศสหรัฐอเมริกา) คำนวณหาปริมาณฟีนอลิกรวม โดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิก และแสดงผลเป็นปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมที่พบในสารสกัดหยาบ (mg gallic acid equivalents (GAE)/g)

4. วิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธีดีพีพีเอช (DPPH)

เตรียมสารละลายตัวอย่าง ความเข้มข้น 0.1 - 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยใช้น้ำเป็นตัวทำละลาย ปริมาตร 100 ไมโครลิตร มาผสมกับสารละลาย ดีพีพีเอชในเอธานอล ที่ความเข้มข้น 0.06 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้เป็นระยะเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิ 27 ± 2 องศาเซลเซียส ตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 517 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง microplate reader (รุ่น Synergy H1 บริษัท Biotek ประเทศสหรัฐอเมริกา) และใช้ Trolox เป็นสารละลายมาตรฐาน จากนั้นคำนวณ % radical scavenging และคำนวณหาค่า IC_{50} จากผลการทดลองที่ได้ โดยคำนวณหา % radical scavenging จากสมการ % radical scavenging=$[1-((A_{sample}-A_{blank})/A_{control})]$ x 100 %

เมื่อ

A_{sample} คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารตัวอย่างที่ใส่

A_{blank} คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารตัวอย่าง และ

$A_{control}$ คือ ค่าการดูดกลืนแสงของกลุ่มควบคุมที่ใส่เพียงดีพีพีเอช

5. การตั้งตำรับเอสเซนส์ที่มีส่วนผสมของสารสกัดเห็ด

เลือกสารสกัดเห็ดที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่เหมาะสมมาตั้งตำรับเอสเซนส์ ส่วนประกอบในตำรับ ดังแสดงใน Table 1 เตรียมตำรับโดยค่อยๆ โปรย acrylamide ลงในบีกเกอร์ที่มีน้ำกลั่น ปั่นผสมจนกระทั่ง acrylamide ละลายเป็นเนื้อเดียวกัน หลังจากนั้นเติม PEG - 12 dimethicone, butylene glycol, glycerin และสารกันเสีย (caprylhydroxamic acid (and) 1,2-hexanediol (and) butylene glycol) ตามลำดับ และเตรียมสารสกัดเห็ดที่ละลายด้วยน้ำกลั่นไปปั่นผสมด้วย homogenizer (รุ่น T 25 digital ULTRA-TURRAX บริษัท IKA ประเทศ เยอรมนี) จนกระทั่งตำรับเป็นเนื้อเดียวกัน

6. การทดสอบสมบัติทางเคมีกายภาพของตำรับเอสเซนส์ที่มีส่วนผสมของสารสกัดเห็ดนางรมดำ

ศึกษาคุณสมบัติทางเคมีกายภาพของตำรับเอสเซนส์ทั้งก่อนและหลังการทดสอบความคงตัว โดยแบ่งตัวอย่างผลิตภัณฑ์บรรจุในขวดแก้วขนาด 10 มิลลิลิตร ที่ปิดด้วยฝาโลหะ แล้วจึงนำไปทดสอบความคงตัวแบบเร่งอุณหภูมิร้อน สลับกับเย็น (heating-cooling) จำนวน 6 รอบ โดยเก็บที่อุณหภูมิ 45 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง สลับกับ 4 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นับเป็น 1 รอบ และที่อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส, 45 ± 2 องศาเซลเซียส และ 4 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 เดือน และประเมินลักษณะทางเคมีกายภาพของตำรับ เอสเซนส์ โดยสังเกตสีของเนื้อผลิตภัณฑ์ วัดความหนืดของผลิตภัณฑ์โดยใช้เครื่องวัดความหนืดชนิด cone และ plate (รุ่น RDVD2+Pro

บริษัท Brookfield ประเทศสหรัฐอเมริกา) และวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง โดยใช้ pH meter (รุ่น pH-S20K บริษัท Mettler Toledo ประเทศสหรัฐอเมริกา)

7. การแสดงผลและสถิติที่ใช้

นำข้อมูลร้อยละผลผลิต ปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์รวม สารประกอบฟีนอลิกรวม และฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของสารสกัดเห็ดหูหนูดำ เห็ดนางฟ้า และเห็ดนางรมดำมาวิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติของข้อมูลด้วยวิธีวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบปัจจัยเดียว (One-way ANOVA) และทดสอบหลังการวิเคราะห์ (Post hoc test) โดยใช้วิธี Tukey's HSD post hoc test และทดสอบที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 ด้วยโปรแกรม SPSS Statistics V26 การวิเคราะห์ทำซ้ำ 3 ครั้ง แสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

ผลการวิจัย

1. ผลการสกัดสารพอลิแซ็กคาไรด์จากเห็ด

จากการทดลองสกัดเห็ดสดทั้ง 3 ชนิด คือเห็ดหูหนูดำ เห็ดนางฟ้า และเห็ดนางรมดำ อัตราส่วนของเห็ดต่อน้ำกลั่นเท่ากับ 1:35 พบว่ามีร้อยละผลผลิตมากกว่าที่อัตราส่วน 1:25 และ 1:30 ตามลำดับ โดยที่อัตราส่วน 1:35 สารสกัดเห็ดนางฟ้ามีร้อยละผลผลิตมากที่สุดเท่ากับ 28.20 ± 0.36 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) รองลงมาคือเห็ดนางรมดำเท่ากับ 22.20 ± 0.47 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) และเห็ดหูหนูดำเท่ากับ 9.28 ± 0.52 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ซึ่งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) ดังแสดงใน Table 2

2. การวิเคราะห์หาปริมาณพอลิแซ็ก คาไรด์รวม

จากการวิเคราะห์ปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์รวมในสารสกัดหยาบจากเห็ดหูหนูดำ เห็ดนางฟ้า และเห็ดนางรมดำด้วยวิธีมาตรฐานฟีนอล-กรดซัลฟิวริก โดยใช้กลูโคสเป็นสารมาตรฐาน เป็นวิธีการที่ใช้วิเคราะห์ปริมาณคาร์โบไฮเดรตได้ทั้งน้ำตาลรีดิวซ์หรือน้ำตาลในธรรมชาติทั้งมอนอแซ็กคาไรด์ ไดแซ็กคาไรด์ โอลิโกแซ็กคาไรด์ และพอลิแซ็กคาไรด์ สารประกอบคาร์โบไฮเดรตจำพวกโอลิโกแซ็กคาไรด์และพอลิแซ็กคาไรด์ จะทำปฏิกิริยากับกรดซัลฟิวริก โดยถูกสลายพันธะไกลโคซิดิกด้วยกรดซัลฟิวริกที่อุณหภูมิสูงและแตกออกมาเป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว ซึ่งทำปฏิกิริยาต่อเป็นอนุพันธ์รวมตัวกับสารฟีนอล ได้เป็นอนุพันธ์ของเอสเทอร์ หรือไตรเอริลมีเทนซึ่งเป็นสารประกอบเชิงซ้อนสีส้มอมน้ำตาล[14, 15]

จากการทดลองพบว่าสารสกัดหยาบจากเห็ดนางรมดำที่อัตราส่วนเห็ด 1 กรัม ต่อน้ำกลั่น 35 มิลลิลิตร มีค่าเท่ากับ 90.01 ± 0.26 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) มีค่าสูงใกล้เคียงกับเห็ดนางฟ้าเท่ากับ 89.66 ± 0.95 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ซึ่งไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p>0.05$) และเห็ดหูหนูดำมีค่าน้อยที่สุด ($p<0.05$) มีค่าเท่ากับ 35.06 ± 0.21 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) เมื่อเปรียบเทียบกับสารละลายมาตรฐานกลูโคสดังแสดงใน Table 2

Table 1 Ingredients of Essence recipes that contain form Kummer (*Pleurotus osttreatus* (Fr.)) extract.

Ingredient	Recipe 1 %w/w	Recipe 2 %w/w
mushroom extract	3	5
acrylamide	2	2
PEG-12 dimethicone	2	2
butylene glycol	2.5	2.5
glycerin	2.5	2.5
caprylhydroxamic acid (and) 1,2-hexanediol (and) butylene glycol	1	1
distilled water	q.s. to 100	q.s. to 100

3. การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิก

การวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิก ด้วยวิธี Folin-Cioalteu เปรียบเทียบกับสารมาตรฐานกรดแกลลิก จากการทดลองพบว่า ที่ความเข้มข้นของสารตัวอย่างเท่ากับ 250 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สารสกัดจากเห็ดนางรมดำมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม เท่ากับ 1.107 ± 0.05 มิลลิกรัมของกรดแกลลิกต่อกรัมของสารสกัดหยาบ โดยสารสกัดจากเห็ดหูหนูดำและเห็ดนางฟ้า มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมใกล้เคียงกัน คือ 0.636 ± 0.10 และ 0.502 ± 0.02 มิลลิกรัมของกรดแกลลิกต่อกรัมของสารสกัดหยาบ ตามลำดับ พบว่าปริมาณฟีนอลิกรวมของเห็ดทั้ง 3 ชนิดมีค่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p>0.05$) ดังแสดงใน Table 2

4. การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธีดีพีพีเอช (DPPH)

จากการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในหลอดทดลอง พบว่า สารมาตรฐาน Trolox มีค่าความเข้มข้นของสารที่สามารถทำให้ความเข้มข้นของดีพีพีเอช ลดลงร้อยละ 50 (IC_{50}) เท่ากับ 7.256 ± 0.548 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และจากการทดลองพบว่าค่า IC_{50} ของสารสกัดจากเห็ดทั้ง 3 ชนิด มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$)

Table 2 ร้อยละผลผลิตของสารสกัดหยาบจากเห็ดหูหนูดำ เห็ดนางฟ้า และเห็ดนางรมดำ และผลการทดสอบปริมาณพอลิแซคคาไรด์รวม ปริมาณฟีนอลิกรวม และค่า IC_{50} ในการกำจัดอนุมูลอิสระของสารสกัดเห็ดหูหนูดำ เห็ดนางฟ้า เห็ดนางรมดำ ในอัตราส่วนของเห็ดต่อน้ำกลั่นเท่ากับ 1:35 และสารมาตรฐาน Trolox

Sample Substance	Product Percentage (%w/w)			Total Polysaccharide (%w/w)	Total phenolic compounds (mgGAE/g)	DPPH assay IC_{50} (µg/ml)
	ratio 1:25	ratio 1:30	ratio 1:35			
Auricularia auricular-judae (Bull.)	0.95 ± 0.11*	1.12 ± 0.91*	9.28 ± 0.52*	35.06 ± 0.21*	0.636 ± 0.10	159.55 ± 0.47*
Pleurotus sajor-caju (Fr.) Sing.	3.28 ± 0.85*	13.71 ± 1.23*	28.20 ± 0.36*	89.66 ± 0.95	0.502 ± 0.02	528.44 ± 0.10*
Kummer (Pleurotus osttreatus (Fr.))	2.1 ± 0.53*	11.95 ± 0.72*	22.20 ± 0.47*	90.01 ± 0.26	1.107 ± 0.05	224.85 ± 1.45*
Trolox	-	-	-	-	-	7.256 ± 0.548*

โดยเห็ดหูหนูดำมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระมากที่สุด มีค่า IC_{50} เท่ากับ 159.55 ± 0.47 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เห็ดนางรมดำและเห็ดนางฟ้าเท่ากับ 224.85 ± 1.45 และ 528.44 ± 0.10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ดังแสดงใน Table 2

5. การทดสอบคุณสมบัติทางเคมีกายภาพของตำรับเอสเซนส์ผสมสารสกัดเห็ดนางรมดำ

จากการคัดเลือกสารสกัดโดยพิจารณาจากปริมาณสารสำคัญและฤทธิ์ทางชีวภาพ พบว่าสารสกัดเห็ดนางรมดำถูกคัดเลือกเพื่อนำมาตั้งตำรับเอสเซนส์ในปริมาณเท่ากับ 3 และ 5 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) (ตำรับ 1 และ ตำรับ 2 ตามลำดับ) จากการเตรียมตำรับพบว่า ตำรับ 1 ลักษณะเนื้อเอสเซนส์เป็นสีเหลืองใส มีค่าความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 5.24 ± 0.01 มีค่าความหนืด เท่ากับ 16.50 ± 0.17 cP หลังจากผ่านการทดสอบความคงตัวที่อุณหภูมิ 25, 45, และ 4 องศาเซลเซียส สีของผลิตภัณฑ์ยังคงเป็นสีเหลืองใส มีความหนืดไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p>0.05$) เท่ากับ 17.56 ± 0.64, 15.03 ± 6.41 และ 17.71 ± 0.17 ตามลำดับ และค่าความเป็นกรด-ด่าง ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p>0.05$) ในระยะเวลา 1 เดือน และตำรับ 2 ลักษณะเนื้อเอสเซนส์เป็นสีเหลืองใส มีค่าความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 5.27 ± 0.01 มีค่าความหนืด เท่ากับ 17.90 ± 0.35 cP

Table 3 ผลการทดสอบความคงตัวทางเคมีกายภาพของเอสเซนส์ที่มีส่วนผสมของสารสกัดเห็ดโดยเก็บไว้ที่อุณหภูมิต่ำ (4 ± 2 °C) อุณหภูมิห้อง (25 ± 2 °C) อุณหภูมิสูง (45 ± 2 °C), และ อุณหภูมิร้อนสลับเย็น (heating-cooling cycling: H/C)

Recipe	State	Physical chemistry	Time period		
			start	1 month	6 tests
1	4±2 °C	Color	Transparent yellow	Transparent yellow	-
		Viscosity (cP)	16.50± 0.17	17.71±0.17	-
		pH	5.24±0.01	5.88±0.06	-
	25±2 °C	Color	Transparent yellow	Transparent yellow	-
		Viscosity (cP)	16.50±0.17	17.56±0.64	-
		pH	5.24±0.01	5.82±0.04	-
	45±2 °C	Color	Transparent yellow	Transparent yellow	-
		Viscosity (cP)	16.50±0.17	15.03±6.41	-
		pH	5.24±0.01	5.82±0.02	-
	H/C	Color	Transparent yellow	-	Transparent yellow
		Viscosity (cP)	16.50±0.17	-	25.23±7.94*
		pH	5.24±0.01	-	6.22±0.14*
2	4±2 °C	Color	Transparent yellow	Transparent yellow	-
		Viscosity (cP)	17.90±0.35	28.23±8.03*	-
		pH	5.27±0.01	5.14±0.02	-
	25±2 °C	Color	Transparent yellow	Transparent yellow	-
		Viscosity (cP)	17.90±0.35	38.07±2.32*	-
		pH	5.27±0.01	5.65±0.02	-
	45±2 °C	Color	Transparent yellow	Transparent yellow	-
		Viscosity (cP)	17.90±0.35	41.13±24.48*	-
		pH	5.27±0.01	6.95±0.04	-
	H/C	Color	Transparent yellow	-	Transparent yellow
		Viscosity (cP)	17.90±0.35	-	36.83±15.80*
		pH	5.27±0.01	-	7.15±0.02*

หลังจากผ่านการทดสอบความคงตัวที่อุณหภูมิ 25, 45, และ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 เดือน มีค่าความเป็นกรด-ด่าง ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p>0.05$) แต่ความหนืดเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) และผลการทดสอบทดสอบความคงตัวแบบเร่งอุณหภูมิร้อนสลับกับเย็น พบว่าหลังการทดสอบจำนวน 6 รอบ ตำรับ 1 และ 2 ไม่มีการเปลี่ยนแปลงของสีผลิตภัณฑ์ แต่ค่าความหนืดและความเป็นกรด-ด่างที่เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) ทั้งสองตำรับ ดังแสดงใน Table 3

วิจารณ์และสรุปผล

จากการสกัดพอลิแซ็กคาไรด์ของสารสกัดหยาบเห็ดหูหนูดำ เห็ดนางฟ้า และเห็ดนางรมดำ ความเข้มข้น 250 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ด้วยน้ำร้อนที่อัตราส่วนของเห็ดต่อน้ำกลั่นเท่ากับ 1:35 พบว่าการเพิ่มอัตราส่วนของน้ำที่ใช้สกัดส่งผลต่อการเพิ่มขึ้นของร้อยละผลผลิตสารสกัดหยาบของเห็ดทั้ง 3 ชนิด

ปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์รวมของสารสกัดเห็ดนางรมดำและเห็ดนางฟ้าสูงกว่าเห็ดหูหนูดำตามลำดับ โดยปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์รวมที่ได้มีความแตกต่างกันนั้นขึ้นอยู่กับองค์ประกอบทางเคมีของเห็ดแต่ละสายพันธุ์ ซึ่งวิธีการสกัดสารพอลิแซ็กคาไรด์ด้วยน้ำร้อนทำให้ได้พอลิแซ็กคาไรด์ที่มีคุณสมบัติละลายน้ำ เนื่องจากพอลิแซ็กคาร์ไรด์มีองค์ประกอบของหมู่ไฮดรอกซิล การใช้น้ำร้อนสกัดจะทำให้เส้นใย (mycelia) ของเห็ดพองตัวและอ่อนนุ่มขึ้นทำให้สกัดพอลิแซ็กคาไรด์ออกมาได้ง่าย[16] นอกจากนี้การเติม 95 เปอร์เซ็นต์ เอธานอลจะช่วยตกตะกอนโปรตีนออกมาช่วยให้พอลิแซ็กคาไรด์มีความบริสุทธิ์มากยิ่งขึ้น[17]

องค์ประกอบหลักทางเคมีที่มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระในเห็ดคือ สารประกอบฟีนอลิก และองค์ประกอบอื่นๆ ที่ถูกพบน้อยมาก เช่น วิตามินซี เบต้าเคโรทีน ไลโคพีน วิตามินอี เป็นต้น[18] ซึ่งสารประกอบฟีนอลิกมีความหลากหลายขึ้นอยู่กับโครงสร้างทางเคมีของสารประกอบฟีนอลิก เช่น สารฟีนอล กรดฟีนอล และโพลีฟีนอล เป็นต้น สารประกอบฟีนอลิกมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระประสิทธิภาพสูง โดยสารประกอบฟีนอลิกมีโครงสร้างทั่วไปที่ประกอบด้วยโครงสร้างที่เป็นวงอะโรมาติกที่มีหมู่แทนที่เป็นไฮดรอกซิล อย่างน้อย 1 หมู่ ต่อเป็นหลัก และอาจมีหมู่แทนที่ต่างๆ แทนในตำแหน่งออโท (ortho) หรือ พารา (para) ได้อีก เช่น กลุ่มเมธอกซิล กลุ่มเมธิล เป็นต้น โดยสารเหล่านี้จะทำหน้าที่เป็นตัวรีดิวซ์และทำหน้าที่ในการบริจาคไฮโดรเจนอิออนของหมู่ไฮดรอกซิลให้กับอะตอมหรือโมเลกุลที่มีอิเล็คตรอนเดี่ยว หรือที่เรียกว่าอนุมูลอิสระ ส่งผลให้เกิดการยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน[19, 20] งานวิจัยนี้ได้วิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบของเห็ดทั้ง 3 ชนิดในอัตราส่วนของเห็ดต่อน้ำกลั่นเท่ากับ 1:35 ด้วยวิธี ดีพีพีเอช โดยใช้ Trolox เป็นสารมาตรฐาน ผลการวิจัยพบว่าไม่มีสารสกัดหยาบชนิดใดในการทดลองมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้แรงเท่ากับ Trolox เมื่อเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระกับปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมของสารสกัดหยาบ พบว่าสารสกัดเห็ดนางรมดำมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมที่สูงกว่าเห็ดหูหนูดำและเห็ดนางฟ้า ตามลำดับ สารสกัดจากเห็ดนางฟ้ามีปริมาณฟีนอลิกรวมน้อยกว่าชนิดอื่น ส่งผลให้มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันน้อยที่สุด ($p<0.05$) อย่างไรก็ตามเห็ดนางรมดำมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระน้อยกว่าเห็ดหูหนูดำ ($p<0.05$) โดยผลของค่า IC_{50} เป็นตัวบ่งชี้ถึงประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระของสาร แสดงให้เห็นว่าปริมาณสารประกอบฟีนอลิกของเห็ดนางรมดำที่มีปริมาณสูงกว่าเห็ดชนิดอื่นไม่ส่งผลต่อประสิทธิภาพการต้านอนุมูลอิสระ ทั้งนี้จากวิธีการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมด้วยสาร Folin-Ciocaltue มีข้อจำกัดคือ ปริมาณค่าการดูดแสงที่วัดได้มีผลจากทั้งปริมาณสารประกอบ ฟีนอลิก และตัวรีดิวซ์อื่น เช่น วิตามินซี (L-ascorbic acid) จึงอาจส่งผลให้ค่าดังกล่าวที่วัดได้นั้นสูงกว่าความเป็นจริง นอกจากนี้ชนิดและตำแหน่งของหมู่แทนที่ในสารประกอบฟินอลิกที่แตกต่างกัน สามารถส่งผลให้รูปแบบการเกิดปฏิกิริยากับตัวทำปฏิกิริยาได้แตกต่างกัน ซึ่งอาจเป็นอีกสาเหตุของข้อผิดพลาดในการตรวจวัดปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม[21] ดังนั้นการคัดเลือกสารสกัดเห็ดเพื่อใช้ในผลิตภัณฑ์เอสเซนส์บำรุงผิวหน้านั้น สารสกัดเห็ดจะต้องมีประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระที่ดี และมีปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์รวมสูงเพื่อประสิทธิภาพในการคงความชุ่มชื้นของผิวด้วยนั้น จากข้อมูลเบื้องต้นสารสกัดเห็ดนางรมดำมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกที่สูง มีประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระได้ดี ประกอบกับปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์รวมที่สูง ซึ่งเหมาะสมที่จะนำไปตั้งตำรับต่อไป ในขณะที่สารสกัดเห็ดหูหนูดำมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ดี แต่มีปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์รวมต่ำที่สุด ($p<0.05$) จึงไม่ถูกคัดเลือก โดยปริมาณสารสกัดเห็ดนางรมดำที่ใช้ในตำรับเปรียบเทียบระหว่าง 3 และ 5 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) เนื่องจากต้องการให้ตำรับเอสเซนส์จากสารสกัดเห็ดนางรมดำมีประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระเทียบเคียงกับสารมาตรฐาน Trolox และเป็นปริมาณที่สามารถเพิ่มความหนืดให้กับตำรับเอสเซนส์ได้อย่างเหมาะสม

จากผลการทดสอบคุณสมบัติทางเคมีกายภาพของตำรับเอสเซนส์ผสมสารสกัดเห็ดนางรมดำ พบว่าตำรับ 1 ซึ่งใช้ปริมาณสารสกัดเห็ดนางรมดำ 3 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) เหมาะสมในการพัฒนาตำรับเอสเซนส์บำรุงผิวหน้ามากกว่าตำรับ 2 เนื่องจากมีความคงตัวที่ดีโดยมีค่าความเป็นกรด-ด่างเหมาะสำหรับใช้กับผิวหน้า มีความหนืดที่เหมาะสม และความหนืดไม่เปลี่ยนแปลงหลังจากผ่านการทดสอบความคงตัวที่อุณหภูมิ 25, 45, และ 4 องศาเซลเซียส และจากการเพิ่มปริมาณของสารสกัดเห็ดนางรมดำเป็น 5 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ในตำรับ 2 มีผลต่อความหนืดของเนื้อผลิตภัณฑ์ เมื่อเวลาผ่านไป 1 เดือน เพราะโมเลกุลของพอลิเมอร์สามารถเกิดพันธะกับโมเลกุลของน้ำ (hydration) ซึ่งสามารถกักโมเลกุลของน้ำไว้ เมื่อปริมาณสารสกัดเห็ดที่เพิ่มขึ้นอาจส่งผลให้ใช้เวลานานถึง 1-2 สัปดาห์เพื่อให้ hydration เกิดโดยสมบูรณ์ ความหนืดของตำรับจะเพิ่มขึ้นหลังการผลิตระยะหนึ่ง ดังนั้นการเก็บผลิตภัณฑ์เอสเซนส์บำรุงผิวหน้าที่มีส่วนผสมของเห็ดนางรมดำควรหลีกเลี่ยงการเก็บที่อุณหภูมิสูงจะช่วยยืดระยะเวลาในการเก็บรักษาให้ผลิตภัณฑ์มีความคงตัวนานขึ้น เนื่องจากการเปลี่ยนแปลงของค่าความเป็นกรด-ด่าง และอุณหภูมิในการเก็บรักษา เป็นปัจจัยที่ส่งผลต่อการสลายตัวของพอลิเมอร์ทำให้ความหนืดเปลี่ยนแปลง

ดังนั้น วิธีการสกัดสารสกัดหยาบจากเห็ดนางรมดำโดยใช้น้ำร้อนเป็นวิธีที่ง่าย และได้สารสกัดเห็ดนางรมดำที่มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกสูงและมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระนั้น เป็นข้อมูลพื้นฐานนำไปสู่การต่อยอดเพื่อทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพด้านอื่นๆ และพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางระดับอุตสาหกรรมได้ อันจะเป็นการช่วยเพิ่มมูลค่าให้กับเห็ดพื้นบ้าน เนื่องจากพอลิเมอร์ธรรมชาติเป็นกลุ่มของ พอลิเมอร์ที่มีมูลค่าและมีความต้องการในอุตสาหกรรมเครื่องสำอางสูง งานวิจัยนี้สามารถเป็นแนวทางในการประยุกต์ใช้สารสกัดจากธรรมชาติในระดับอุตสาหกรรมให้กว้างขวางมากขึ้น

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ขอขอบคุณ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยพะเยา และอุทยานวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยพะเยา สำหรับสถานที่และทุนในการทดลองวิจัยนี้

เอกสารอ้างอิง

1. Kosmadaki MG, Gilchrest BA. The role of telomeres in skin aging/photoaging. Micron. 2004 ; 35(3): 155-9.
2. Papakonstantinou E, Roth M, Karakiulakis G. Hyaluronic acid: A key molecule in skin aging. Dermatoendocrinol. 2012 Jun 21 ; 4(3).
3. Wu Y, Choi M-H, Li J, Yang H, Shin H-J. Mushroom Cosmetics: The Present and Future. Cosmetics. 2016 Jul 8 ; 3(3):22.
4. Cheung LM, Cheung PCK, Ooi VEC. Antioxidant activity and total phenolics of edible mushroom extracts. Food Chem. 2003 May 1 ; 81(2): 249-55.
5. Ademola IO, Odeniran PO. Novel trypanocide from an extract of *Pleurotus sajor-caju* against Trypanosoma congolense. Pharm Biol. 2017 Jan 21 ; 55(1): 132-8.
6. Kanagasabapathy G, Malek SNA, Kuppusamy UR, Vikineswary S. Chemical composition and antioxidant properties of extracts of fresh fruiting bodies of *Pleurotus sajor-caju* (Fr.) singer. J Agric Food Chem. 2011 Mar 23 ; 59(6): 2618-26.
7. Finimundy TC, Gambato G, Fontana R, Camassola M, Salvador M, Moura S, *et al.* Aqueous extracts of *Lentinula edodes* and *Pleurotus sajor-caju* exhibit high antioxidant capability and promising in vitro antitumor activity. Nutr Res. 2013 Jan ; 33(1): 76-84.
8. Piska K, Sułkowska-Ziaja K, Muszyńska B. Edible mushroom *pleurotus ostreatus* (Oyster mushroom)-Its dietary significance and biological activity. Acta Sci Pol Hortorum Cultus. 2017 ; 16(1): 151-61.
9. Chiu WC, Yang HH, Chiang SC, Chou YX, Yang HT. Auricularia polytricha aqueous extract supplementation decreases hepatic lipid accumulation and improves antioxidative status in animal model of nonalcoholic fatty liver. Biomed. 2014 Jun 1 ; 4(2): 29-38.
10. Kesari M, Collge J. Studies on Phytochemical Compounds and Antioxidant Potential of *Auricularia Auricula-Judae*. Int J Pharm Sci Res. 2017 ; 8(8): 3508-15.
11. He X, Wang X, Fang J, Chang Y, Ning N, Guo H, *et al.* Polysaccharides in *Grifola frondosa* mushroom and their health promoting properties: A review. Int J Biol Macromol. 2017 Aug 1 ; 101: 910-21.
12. Kanlayavattanakul M, Lourith N. Biopolysaccharides for Skin Hydrating Cosmetics. Polysaccharides. 2015 ; 1867-92.
13. Masuko T, Minami A, Iwasaki N, Majima T, Nishimura S-I, Lee YC. Carbohydrate analysis by a phenol-sulfuric acid method in microplate format. Anal Biochem. 2005 Apr ; 339(1): 69-72.
14. Bhatti M, Kamboj A, Saluja AK. Spectrophotometric estimation of total polysaccharides in *Kalanchoe pinnatum* and *Kalanchoe crenata*. Int J Pharm Pharm Sci. 2013 ; 5(2): 40-1.
15. Xi X, Wei X, Wang Y, Chu Q, Xiao J. Determination of tea polysaccharides in Camellia sinensis by a modified phenol-sulfuric acid method. Vol. 62, Archives of Biological Sciences. 2010. p. 669-76.
16. Khaskheli SG, Zheng W, Sheikh SA, Khaskheli AA, Liu Y, Soomro AH, *et al.* Characterization of *Auricularia auricula* polysaccharides and its antioxidant properties in fresh and pickled product. Int J Biol Macromol. 2015 Nov ; 81: 387-95.
17. Livingston DP. Fructan Precipitation from a Water/ Ethanol Extract of Oats and Barley. Plant Physiol. 1990 Mar ; 92(3): 767-9.
18. Barros L, Falcão S, Baptista P, Freire C, Vilas-Boas M, Ferreira ICFR. Antioxidant activity of *Agaricus sp*. mushrooms by chemical, biochemical and electrochemical assays. Food Chem. 2008 Nov 1 ; 111(1): 61-6.
19. Ikay Koca AKİ, Gençcelep H. Antioxidant Properties of Wild Edible Mushrooms. J Food Process Technol. 2011 ; 02(06).
20. Hirano R, Sasamoto W, Matsumoto A, Itakura H, Igarashi O, Kondo K. Antioxidant ability of various flavonoids against DPPH radicals and LDL oxidation. J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo). 2001 Jun 21 ; 47(5): 357-62.
21. Djordjevic TM, Šiler-Marinkovic SS, Dimitrijevic-Brankovic SI. Antioxidant Activity and Total Phenolic Content in Some Cereals and Legumes. Int J Food Prop. 2011 Jun 2 ; 14(1): 175-84.