องค์ประกอบทางเคมี และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดถั่งเช่าสีทอง (*Cordyceps militaris*) ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเหลว และอาหารเพาะแข็งธัญพืชลูกเดือย

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

เยาวภา ทองอร่าม[1]
Yaowapar Tongaram[1]

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

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้ มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาองค์ประกอบทางเคมี และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดถั่งเช่าสีทองที่เพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเหลว และอาหารเพาะแข็งธัญพืชลูกเดือย ผลการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีด้วยวิธี GC-MS พบสารในสารสกัดถั่งเช่าสีทองที่เพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเหลว 23 ชนิด ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเพาะแข็งธัญพืชลูกเดือย 26 ชนิด มีสารเหมือนกันในสารสกัดทั้งสอง 16 ชนิด และสารหลักที่พบในสารสกัดทั้งสองชนิด คือ คอร์ไดซีปิน โดยพบในสารสกัดถั่งเช่าสีทองที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว 20.57 % area ซึ่งมากกว่าที่เพาะเลี้ยงในอาหารเพาะแข็งธัญพืชลูกเดือย (2.17 % area) ส่วนการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ พบว่า ปริมาณฟีนอลิกรวมและฟลาโวนอยด์รวมของสารสกัดถั่งเช่าสีทองที่เพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเหลว คือ 178.01±0.71 mgGE/gExt และ 91.00±0.95 mgQE/gExt ซึ่งสูงกว่าที่เพาะเลี้ยงในอาหารเพาะแข็งธัญพืชลูกเดือย (135.48±0.60 mgGE/gExt และ 6.81±0.19 mgQE/gExt) ความสามารถในการยับยั้งการเกิดออกซิเดชั่นด้วยวิธี DPPH และ ABTS ของสารสกัดถั่งเช่าสีทองที่เพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเหลว มีค่า IC_{50} เป็น 0.49±0.04 และ 0.06±0.00 mg/mL ซึ่งสูงกว่าที่เพาะเลี้ยงในอาหารเพาะแข็งธัญพืชลูกเดือย (0.99±0.06 และ 0.22±0.01 mg/mL)

ผลจากการวิจัยครั้งนี้ แสดงให้เห็นว่า สารสกัดถั่งเช่าสีทองที่เพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเหลว มีสารคอร์ไดซีปิน และมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงกว่าสารสกัดถั่งเช่าสีทองที่เพาะเลี้ยงในอาหารเพาะแข็งธัญพืชลูกเดือย ฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์รวมในสารสกัดทำหน้าที่เป็นสารออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

คำสำคัญ: ถั่งเช่าสีทอง อาหารเพาะ 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 IC_{50} 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 antioxiadant 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 และเอเชีย[1] มีการนำถั่งเช่า (*Cordyceps*) มาใช้ในงานทางการแพทย์แผนโบราณ แพทย์พื้นบ้านในเอเชีย[2,3] โดยเฉพาะในเอเชียตะวันออก[4] มีการนำมาใช้เป็นยามาอย่างยาวนานนับศตวรรษ ทั้งในตำรับยาจีนและทิเบต[5,6] ในเอเชียตะวันออกนิยมนำมาใช้ทั้งเป็นยา อาหารบำรุงกำลัง[7] บริโภคโดยตรงในรูปของอาหารและเป็นผลิตภัณฑ์เพื่อสุขภาพ

ถั่งเช่าสีทองได้รับความสนใจเป็นอย่างมากโดยเฉพาะ นำมาใช้เป็นอาหารเสริมเพื่อสุขภาพ ทำให้มีอายุยืนยาว และใช้เป็นยาทางเลือกเพื่อบรรเทาโรคต่างๆ เช่น โรคหลอดเลือดสมอง เจ็บคอ วัณโรค โรคลมชัก และโรคมะเร็ง นอกจากนี้ มีการนำถั่งเช่าสีทองที่ได้จากการเพาะเลี้ยง มาทำเป็นยาเพื่อบำรุงรักษาการทำงานของไตและปอด ชะลอวัย ควบคุมการนอน รักษาโรคหลอดลมเรื้อรัง[8] โรคที่เกี่ยวกับระบบหมุนเวียนเลือด ระบบหายใจ ต่อมต่างๆ และระบบเมตาโบลิซึม[9]

ถั่งเช่าสีทอง มีสารออกฤทธิ์ เช่น คอร์ไดซีปิน (cordycepin) อะดีโนซิน (adenosine) โพลีแซคคาร์ไรด์ (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) และกรดซินามิค (cinnamic acid)[15]

คอร์ไดซีปิน เป็นสารหลักที่ถูกสกัดออกมาได้เป็นครั้งแรกจากถั่งเช่าสีทอง ต่อมาได้พบในถั่งเช่าธิเบต (*Ophiocordyceps sinensis* ชื่อเดิม *C. sinensis*) ด้วย[16] ถั่งเช่าสีทอง มีคอร์ไดซีปิน และอะดีโนซินในปริมาณที่สูงกว่าถั่งเช่าธิเบต[17,18] คอร์ไดซิปินในสารสกัดจากส่วนดอกมีปริมาณสูงกว่าจากส่วนเส้นใย[19]

สารออกฤทธิ์ที่พบในถั่งเช่าสีทอง มีฤทธิ์ทางชีวภาพหลายชนิด เช่น ฤทธิ์ต้านมะเร็ง (anti-cancer) ยับยั้งการสร้างเซลล์มะเร็ง[16,20] ต้านการกระจายตัวของมะเร็ง (anti-metastatic)[21] ยับยั้งการเจริญของมะเร็ง (inhibit cancer growth) [4] ต้านไวรัส (anti-viral) ต้านเชื้อรา (ant-ifungal) ต้านการอักเสบ (anti-inflammatory) [22] ต้านการมีน้ำตาลในเลือดสูง (anti-hyperglycemic) ต้านเนื้องอก (anti-tumor) [23] และต้านจุลินทรีย์ (anti-microbial) [24,25] คอร์ไดซีปินที่แยกได้จากถั่งเช่าสีทอง มีศักยภาพสูงในการยับยั้งการเจริญของพืช (plant growth inhibitor) [26] โพลีแซคคาร์ไรด์ที่พบในถั่งเช่าสีทอง มีฤทธิ์ต้านมะเร็ง ปรับสมดุลของภูมิคุ้มกัน[27] และต้านอนุมูลอิสระ[28] โพลีแซคคาร์ไรด์ที่แยกจากส่วนดอกถั่งเช่าสีทองที่ได้จากการเพาะเลี้ยง ซึ่งส่วนใหญ่เป็นน้ำตาลแมนโนส (mannose) กลูโคส (glucose) และกาแลคโตส (galactose) มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ โดยสามารถกำจัดอนุมูลอิสระ ลดอนุมูลอิสระ และจับกับไอออนของเหล็กได้[29] สารสกัดจากถั่งเช่าสีทองมีฤทธิ์ต้านการสร้างหลอดเลือด (anti-angiogenetic) [30]ต้านการอักเสบ[31] ต้านอนุมูลอิสระ (anti-oxidant) [32,33] ต้านเนื้องอก[34,35] ป้องกันการทำลายดีเอนเอ (DNA) และเพิ่มประสิทธิภาพในการกำจัดและการยับยั้งการสร้างอนุมูลอิสระ[23] สารสกัดเมทานอลถั่งเช่าสีทองมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ โดยยับยั้งขบวนการออกซิเดชันของไขมัน ลดและกำจัดอนุมูลอิสระ ยับยั้งเซลล์ก่อมะเร็ง และยังมีคุณสมบัติในการต้านจุลินทรีย์ทั้งแบคทีเรียและรา[15,7] สารสกัดเมทานอลจากส่วนดอก มีฤทธิ์ในการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH สูงกว่าจากส่วนเส้นใย ขณะที่สารสกัดจากส่วนเส้นใย มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระโดยรวม และความสามารถในการจับและลดอนุมูลอิสระสูงกว่าจากส่วนดอก[7]

ถั่งเช่าสีทองมีสารออกฤทธิ์และฤทธิ์ทางชีวภาพคล้ายกับถั่งเช่าธิเบต จึงมีการนำถั่งเช่าสีทองมาใช้แทนถั่งเช่าธิเบต[36] สารออกฤทธิ์จากถั่งเช่าสีทอง ได้รับการตรวจสอบ และได้รับการยอมรับว่ามีคุณประโยชน์อย่างยิ่งต่อสุขภาพของมนุษย์ โดยเฉพาะคอร์ไดซีปิน ปัจจุบันมีการเพาะเลี้ยงถั่งเช่าสีทองเพื่อการค้าอย่างแพร่หลาย โดยเพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเหลว เพื่อรวบรวมเส้นใย และเพาะเลี้ยงในอาหารเพาะแข็ง เพื่อผลิตส่วนดอก ทั้งนี้เพราะถั่งเช่าสีทองมีสารออกฤทธิ์ และมีฤทธิ์ทางชีวภาพหลายประการดังกล่าว จึงมีการนำมาประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมยา อาหาร และเครื่องสำอาง[37,38]

ถั่งเช่าสีทองเป็นเห็ดเศรษฐกิจชนิดใหม่ของไทย มีการเพาะเลี้ยง ผลิตเป็นอาหารเสริมสุขภาพ จำหน่ายทั้งภายในประเทศและต่างประเทศ การวิจัยในครั้งนี้ มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาองค์ประกอบทางเคมี และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดถั่งเช่าสีทองที่เพาะเลี้ยงในอาหารเพาะต่างกัน คือ

อาหารเพาะเหลวและอาหารเพาะแข็งธัญพืชลูกเดือย เพื่อเป็นแนวทางสำหรับพัฒนาการใช้ถั่งเช่าสีทองให้เกิดประโยชน์และมีประสิทธิภาพยิ่งขึ้น โดยเฉพาะอย่างยิ่งการเป็นแหล่งทรัพยากรธรรมชาติ ในการใช้เป็นสารต้านอนุมูลอิสระ

วัสดุอุปกรณ์ และวิธีการศึกษา

1. การเตรียมถั่งเช่าสีทอง นำถั่งเช่าสีทอง (*Cordyceps militaris*)

จากฟาร์มครูพยง จ.อ่างทอง มาตัดเป็นชิ้นเล็กๆ จากนั้น นำมาวางเพาะเลี้ยงบนอาหารพีดีเอ (Potato Dextrose Agar: PDA) บ่มเชื้อในสภาวะมืด ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วัน จะได้แม่เชื้อ หรือเชื้อต้นตอ ทำการขยายเชื้อโดยการตัดแม่เชื้อบนอาหารพีดีเอ ใส่ในอาหารเหลวพีดีบี (Potato Dextrose Broth: PDB) แล้วบ่มบนเครื่องเขย่า ที่ความเร็ว 120 รอบ/นาที ในที่มืด ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4-5 วัน จะได้หัวเชื้อเหลว นำหัวเชื้อเหลวเลี้ยงในอาหารเพาะเหลว (มีหนอนไหมพันธุ์ไทยพื้นบ้าน (นางลายวัย 5) กลูโคส สารสกัดจากยีสต์ และเปปโตน เป็นองค์ประกอบหลัก) และในอาหารเพาะแข็งเมล็ดธัญพืชลูกเดือย ซึ่งมีองค์ประกอบเหมือนในอาหารเพาะเหลว แต่เพิ่มเมล็ดธัญพืชลูกเดือยขวดละ 30 กรัมต่ออาหารเหลว 60 มิลลิลิตร (อ้างอิงจากปริญญานิพนธ์วิทยาศาสตรบัณฑิต รร.จปร ปี 2556 เรื่อง การเปรียบเทียบเมล็ดธัญพืชที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงเส้นใยเชื้อ *Cordyceps militaris*. พบว่า เมื่อใช้เมล็ดลูกเดือยเป็นแหล่งคาร์บอนในอาหารเพาะเลี้ยงพบการเจริญของเส้นใยเป็นตุ่มดอกและพัฒนาเป็นดอกได้ดีกว่าเมล็ดธัญพืชชนิดอื่น[55] และ งานวิจัยเรื่องการเปรียบเทียบการเพาะเลี้ยงถั่งเช่าสีทองโดยใช้หัวเชื้อเหลวและหัวเชื้อแข็งบนเมล็ดธัญพืชลูกเดือย ในปี 2558[56]) 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 ชั่งโมง แล้วอบแห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสนาน 24 ชั่วโมง จะได้ถั่งเช่าสีทองอบแห้ง เก็บไว้ในภาชนะทึบแสง สะอาด แห้ง และมีฝาปิดสนิท

2. การเตรียมสารสกัดถั่งเช่าสีทอง

นำถั่งเช่าสีทองอบแห้ง มาหั่นเป็นชิ้นเล็กๆ แล้วบดเป็นผง จากนั้นนำไปสกัด โดยการหมักในตัวทำละลาย เอทานอล 95% ในอัตราส่วนผงถั่งเช่าสีทอง 400 กรัม ต่อเอทานอล 1000 มิลลิลิตร หมักส่วนผสมทิ้งไว้นาน 1 สัปดาห์ นำส่วนผสมมากรองเพื่อแยกเอาส่วนที่เป็นกากออกด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 นำส่วนที่กรองได้มาระเหยเพื่อเอาตัวทำละลายออกด้วยเครื่อง Rotary evaporator จนกระทั่งได้สารสกัดหยาบ (Crude extract) นำสารสกัดที่ได้บรรจุในขวดทึบแสง เก็บไว้ในตู้ที่ควบคุมอุณหภูมิที่ 4 องศาเซลเซียส เพื่อรอการนำไปใช้ในการทดลองต่อไป

3. การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี

นำสารสกัดที่ได้ ไปวิเคราะห์หาองค์ประกอบทางเคมี โดยใช้เครื่อง Gas Chromatography - Mass Spectrometer (GC-MS) โดยใช้แก๊สฮีเลียมเป็นตัวพา คอลัมน์ที่ใช้ คือ Bruker รุ่น 450 GC Rtx-5MS capillary column (30 m x 0.25 mm x 0.25 µm) อัตราการไหล 1 มิลลิตร/นาที มีอุณหภูมิเริ่มต้นของคอลัมน์ที่ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที จากนั้น เพิ่มอุณหภูมิในอัตรา 4.5 องศาเซลเซียส/นาที จนถึง 250 องศาเซลเซียส แล้วจึงฉีดสารทดสอบ ในส่วน Mass Spectrometer อุณหภูมิแหล่งกำเนิดอิเล็กตรอน เป็น 230 องศาเซลเซียส อุณหภูมิส่วนคัดแยกเป็น 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 benzothia zoline-6-sulfonic acid) cation radical scavenging assay (ABTS assay) ดังต่อไปนี้

4.1 การหาปริมาณฟีนอลลิกรวม นำสารตัวอย่างหรือสารมาตรฐานปริมาตร 100 ไมโครลิตร เติมด้วยสารละลาย 10% Folin–Ciocalteu reagent (v/v) ปริมาตร 500 ไมโครลิตร เขย่า และทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 นาที แล้วเติมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต (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 รายงานผลเป็นหน่วยมิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อน้ำหนักสารสกัดแห้ง 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 ลงไปเขย่าให้เข้ากัน แล้วเติมน้ำกลั่น 2,000 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง UV-Vis Spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 415 นาโนเมตร ทำการทดลองซ้ำทั้งหมด 5 ซ้ำ นำผลที่ได้เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน ซึ่งมีเคอร์ซิติน (Quercetin) เป็นสารมาตรฐาน รายงานผลที่ได้เป็นหน่วยมิลลิกรัมสมมูลของเคอร์ซิตินต่อน้ำหนักสารสกัดแห้ง 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 Spectrophoto- meter 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 คำนวณหาค่า 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 $K_2S_2O_8$ แล้วปล่อยทิ้งไว้ในที่มืดเป็นเวลา 16 ชั่วโมง ทำการเจือจางสารละลาย ABTS•+ ด้วยน้ำกลั่น ในอัตราส่วน 1: 50 จากนั้นนำสารสกัดตัวอย่างมาปริมาตร 100 ไมโครลิตร เติมสารละลาย ABTS•+ ที่เจือจาง ปริมาตร 900 ไมโครลิตรลงไป ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที แล้วนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่จางลงของอนุมูลอิสระ ABTS•+ ที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง UV-Vis Spectrophotometer จากนั้นนำค่าที่วัดได้ไปวิเคราะห์หาเปอร์เซ็นต์ในการยับยั้งการเกิดออกซิเดชัน 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 สารสกัดถั่งเช่าสีทองที่เพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเหลว มีสารทั้งหมด 23 ชนิด (Figure 1 และ Table 1) สารสกัดถั่งเช่าสีทองที่เพาะเลี้ยงในอาหารเพาะแข็งธัญพืชลูกเดือย มีสารทั้งหมด 26 ชนิด (Figure 2 และ Table 2)

พบสารซึ่งเป็นองค์ประกอบทางเคมีที่เหมือนกันในสารสกัดถั่งเช่าสีทองทั้งสองชนิดนี้ 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

สารที่พบเฉพาะในสารสกัดถั่งเช่าสีทองที่เพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเหลว 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 linolelaidate และ (E) -9-octadecanoic acid ethyl ester

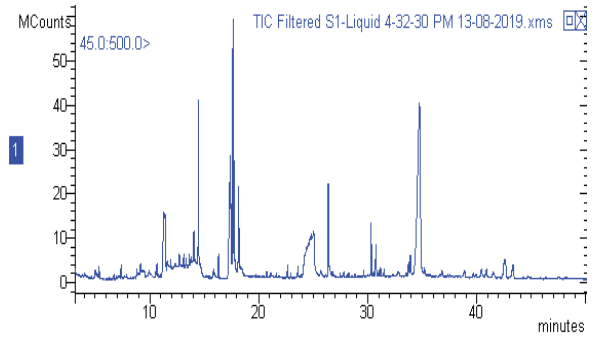

Figure 1 Chromatogram of extract from *C. militaris* cultured in liquid media

สารที่พบเฉพาะในสารสกัดถั่งเช่าสีทองที่เพาะเลี้ยงในอาหารเพาะแข็งเมล็ดธัญพืชลูกเดือย 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

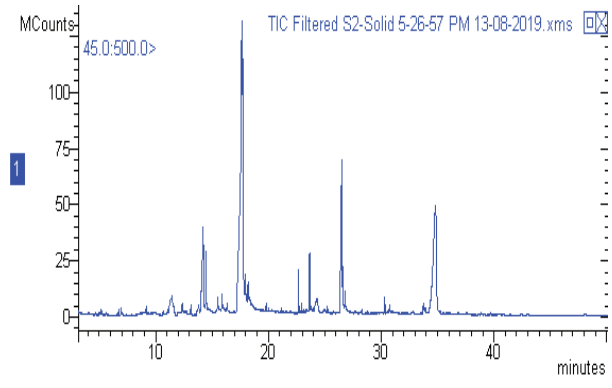

Figure 2 Chromatogram of extract from *C.militaris* cultured in Job's tears solid media

การพบคอร์ไดซีปีนในสารสกัดทั้งสองชนิดในการวิจัยครั้งนี้ สอดคล้องกับรายงานการวิจัยที่ผ่านมา ที่พบคอร์ไดซีปีน เป็นองค์ประกอบหลักในส่วนต่างๆ ของถั่งเช่าสีทองและในสารสกัดของถั่งเช่าสีทอง รวมทั้งเห็ดเป็นยาหลายชนิด [10,11,12,19,16, 20,43,13,44,9, 26] หากพิจารณาจาก % area ปริมาณของคอร์ไดซีปีนในสารสกัดถั่งเช่าสีทองที่เพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเหลว มีปริมาณมากกว่าที่เพาะเลี้ยงในอาหารเพาะแข็งเมล็ดธัญพืชลูกเดือย คือ 20.57% (Table 1) และ 2.17% (Table 2) ตามลำดับ

มีรายการพบสารสำคัญ หรือสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพบางชนิดในถั่งเช่าสีทองแตกต่างกัน เช่น เมื่อนำถั่งเช่าสีทองมาเพาะเลี้ยง 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 acid[13] การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของถั่งเช่าสีทองที่ได้จากการเพาะเลี้ยง โดยใช้วิธี GC-MS พบสารทั้งหมดจำนวน 39 ชนิด ซึ่งเป็นพวกนิวคลีโอไทด์ คาร์โบไฮเดรต และกรดแอมิโน [38] เห็ดที่มีอยู่ในเห็ดธรรมชาติและเห็ดที่ได้จากการเพาะเลี้ยง มีนิวคลีโอไทด์แตกต่างกัน และความแตกต่างนี้ยังขึ้นอยู่กับส่วนของเห็ดที่นำมาวิเคราะห์[45] และจากการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของถั่งเช่าสีทองที่ได้จากการเพาะเลี้ยง โดยใช้วิธี GC-MS พบว่า คอร์ไดซีปีนมีปริมาณมากที่สุดในระยะที่ 4 (aging period) [38] และ คอร์ไดซีปีนและอะดีโนซีน มีปริมาณมากที่สุดในส่วนดอกถั่งเช่าสีทองที่เพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเมล็ดข้าว (rice medium) เมื่อเทียบกับที่เพาะเลี้ยงในอาหารเพาะหนอนไหม (silkworm chrysalis medium) และข้าวสาลี (wheat medium) ตามลำดับ[18]

เป็นที่น่าสังเกตว่า ในการวิจัยครั้งนี้ สารที่พบในสารสกัดจากถั่งเช่าสีทองที่เพาะเลี้ยงในอาหารเพาะแข็งเมล็ดธัญพืชลูกเดือย ส่วนหนึ่งเป็นสารชนิดเดียวกับที่พบในลูกเดือย ซึ่งเป็นไขมัน โพลีฟีนอล ไฟโตสเตอรอล[46,47,48] จึงเป็นไปได้ว่าสารที่พบในถั่งเช่าสีทอง ส่วนหนึ่งได้รับมาจากส่วนประกอบในอาหารเพาะ ดังเคยมีรายงานว่า อาหารเพาะมีอิทธิพลอย่างยิ่งต่อการสะสมสารออกฤทธิ์[49,50]

การวิจัยครั้งนี้พบสารแตกต่างกันเมื่อเพาะเลี้ยงถั่งเช่าสีทองในอาหารเพาะที่แตกต่างกัน ชี้ให้เห็นว่า อาหารเพาะเป็นปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อชนิดของสารที่เป็นองค์ประกอบในถั่งเช่าสีทอง จึงอาจกล่าวได้ว่า การพบสารในถั่งเช่าสีทองแตกต่างกัน เป็นผลมาจาก วิธีการที่ใช้ในการวิเคราะห์ แหล่งที่มาของถั่งเช่าสีทอง ส่วนของถั่งเช่าสีทองที่นำมาวิเคราะห์ อาหารที่ใช้เพาะเลี้ยง และระยะเวลาในการเก็บเกี่ยวผลผลิตเป็นต้น

2. ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

2.1 การหาปริมาณฟีนอลิกรวม พบว่า สารสกัดจาก

ถั่งเช่าสีทองที่เพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเหลว มีปริมาณฟีนอลิกรวมสูงกว่าสารสกัดจากถั่งเช่าสีทองที่เลี้ยงในอาหารเพาะแข็งเมล็ดธัญพืชลูกเดือย ($p<0.05$) 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, (3.beta.,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* cutlrured in liquid medium, CME JTSM = extract from *C. militaris* cutlrured in Job's tear solid medium)

สารประกอบฟีนอลิก (phenolic compounds) ซึ่งประกอบด้วย phenolic acids, oxidized polyphenols, hydroxybenzoic acids, flavonoids, tannins, hydroxycinnamic acids, stilbenes และ lignans ที่พบในเห็ดและในสารสกัดเห็ดมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ โดยทำหน้าที่สลายเอนไซม์ peroxidase ทำให้โลหะอยู่ในภาวะที่ไม่สามารถทำงานได้ และยังกำจัดออกซิเจน หรือยับยั้งอนุมูลอิสระได้[51] โพลีฟีนอลที่พบในเห็ดถั่งเช่าสีทอง ก็ออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ[52]

การพบสารประกอบฟีนอลิกรวมในสารสกัดจากถั่งเช่าสีทองในงานวิจัยครั้งนี้ สอดคล้องกับการพบกรดซีเบนโซอิค (p-hydroxy benzoic acid) ซึ่งเป็นพวกกรดฟีนอลิก ชนิดเดียวที่พบในเห็ดชนิดนี้[15] ชี้ให้เห็นว่า สามารถนำสารสกัดถั่งเช่าสีทองมาใช้เป็นสารต้านอนุมูลอิสระได้ แต่เนื่องจากสารประกอบฟีนอลิกรวมในสารสกัดถั่งเช่าสีทองที่เพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเหลวนี้ มีปริมาณมากกว่าในสารสกัดถั่งเช่าสีทองที่เพาะเลี้ยงในอาหารเพาะแข็งธัญพืชลูกเดือย ทำให้สารสกัดถั่งเช่าสีทองที่เพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเหลวมีแนวโน้มในการออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระดีกว่าสารสกัดถั่งเช่าสีทองที่เพาะเลี้ยงในอาหารเพาะแข็งธัญพืชลูกเดือย

2.2 การหาปริมาณฟลาโวนอยด์รวม พบว่าสารสกัดจากถั่งเช่าสีทองที่เลี้ยงในอาหารเพาะเหลว มีปริมาณ ฟลาโวนอยด์รวมสูงกว่าสารสกัดจากถั่งเช่าสีทองที่เลี้ยงในอาหารเพาะแข็งธัญพืชลูกเดือย อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) คือ 91.00± 0.95 และ 6.81± 0.19 mgQE/gEtx ตามลำดับ (Table 3)

ปกติจะพบฟลาโวนอยด์ในพืช หรือถูกหลั่งออกมาจากพืช อย่างไรก็ตาม มีรายงานว่า มีฟลาโวนอยด์ในพวกเห็ด ทั้งนี้อาจเป็นไปได้ว่า เห็ดเหล่านี้มีการดูดซึมสารอาหารและสารประกอบต่างๆ จากวัตถุที่เห็ดเหล่านี้เจริญอยู่ และมีรายงานว่า สารประกอบฟลาโวนอยด์ในถั่งเช่าสีทองมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ[52] การพบฟลาโวนอยด์รวมในสารสกัดถั่งเช่าสีทองที่เพาะเลี้ยงในอาหารเพาะทั้งสองชนิด แต่สารสกัดถั่งเช่าสีทองที่เพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเหลว มีปริมาณฟลาโวนอยด์รวมมากกว่าสารสกัดถั่งเช่าสีทองที่เพาะเลี้ยงในอาหารเพาะแข็งธัญพืชลูกเดือย ทำให้สารสกัดถั่งเช่าสีทองที่เพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเหลว มีแนวโน้มในการออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระดีกว่าสารสกัดถั่งเช่าสีทองที่เพาะเลี้ยงในอาหารเพาะแข็งธัญพืชลูกเดือย

2.3 การวิเคราะห์ความสามารถในการยับยั้งการเกิดออกซิเดชัน โดยใช้วิธี DPPH assay พบว่า สารสกัดถั่งเช่าสีทองที่เลี้ยงในอาหารเพาะเหลว มีความสามารถในการยับยั้งการเกิดออกซิเดชัน สูงกว่าสารสกัดถั่งเช่าสีทองที่เลี้ยงในอาหารเพาะแข็งธัญพืชลูกเดือย โดยมีค่า IC_{50} เป็น 0.49±0.04 และ 0.99±0.06 mg/ml ตามลำดับ อย่างไรก็ตาม สารสกัดทั้งสองชนิดนี้มีความสามารถในการยับยั้งการเกิดออกซิเดชันได้น้อยกว่า Ascorbic acid (IC_{50} = 0.004±0.0002 mg/ml) และTrolox (IC_{50}= 0.016±0.0012 mg/ml) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) (Table 3) เนื่องจากการทดลองในครั้งนี้ใช้เอทานอล 95% เป็นตัวทำละลายในการสกัด จึงกล่าวได้ว่า สารสกัดเอทานอลของถั่งเช่าสีทอง มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH สอดคล้องกับรายงานวิจัยที่พบว่า สารสกัดเมทานอลของถั่งเช่าสีทอง มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ เมื่อทดสอบด้วยวิธี DPPH assay[53] นอกจากนี้ ยังมีรายงานว่า สารสกัดน้ำถั่งเช่าสีทองมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH สูงที่สุด เมื่อเทียบกับสารสกัดที่ใช้สารละลายอื่นเป็นตัวทำละลาย[49] และส่วนดอกถั่งเช่าสีทอง มีฤทธิ์ในการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH สูงกว่าส่วนเส้นใย[7]

2.4 การวิเคราะห์ความสามารถในการยับยั้งออกซิเดชัน โดยวิธี ABTS assay พบว่า สารสกัดถั่งเช่าสีทองที่เลี้ยงในอาหารเพาะเหลว มีความสามารถในการยับยั้งออกซิเดชัน สูงกว่าสารสกัดถั่งเช่าสีทองที่เพาะเลี้ยงในอาหารเพาะแข็งธัญพืชลูกเดือย โดย มีค่า IC_{50} เป็น 0.06±0.00 และ 0.22±0.01 mg/mL ตามลำดับ แต่สารสกัดทั้งสอง มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระน้อยกว่า Ascorbic acid และ Trolox อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) ซึ่งมีค่า IC_{50} เป็น 0.007±0.0001 และ 0.016±0.0003 mg/mLตามลำดับ (Table 3)

มีรายงานว่า สารสกัดถั่งเช่าสีทองสามารถกำจัดอนุมูลอิสระ ABTS•+ และลดอนุมูลอิสระได้ แสดงให้เห็นว่าสารสกัดถั่งเช่าสีทองมีความสามารถในการเป็นตัวให้ไฮโดรเจน (hydrogen donators) [52]

คอร์ไดซีปิน และอะดีโนซีน ในถั่งเช่าสีทองมีฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระ เมื่อวิเคราะห์โดยวิธี Trolox equivalent antioxidant capacity method) สารประกอบโพลีฟีนอล ฟลาโวนอยด์ และโพลีแซคคาไรด์ในถั่งเช่าสีทอง ก็ออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ[52] ส่วนดอกของถั่งเช่าสีทอง มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยมีศักยภาพสูงในการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH ขณะที่ส่วนเส้นใยมีฤทธิ์สูงในการต้านอนุมูลอิสระโดยรวม และมีความสามารถสูงในการจับและการลดอนุมูลอิสระ แสดงให้เห็นว่าแต่ละส่วนของถั่งเช่าสีทองมีหน้าที่ และกลไกในการออกฤทธ์ในการต้านอนุมูลอิสระต่างกัน[7] ถั่งเช่าสีทองจากการเพาะเลี้ยงมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูง โดยฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระนี้ ส่วนหนึ่งเกิดจากโพลีแซคคาไรด์ในส่วนเส้นใย[54] และแนวโน้มในการกำจัดและลดอนุมูลอิสระของสารสกัดถั่งเช่าสีทอง ขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของสารสกัด[52]

ผลการวิจัยในครั้งนี้ สารสกัดจากถั่งเช่าสีทองที่เพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเหลว มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงกว่าสารสกัดถั่งเช่าสีทองที่เลี้ยงในอาหารเพาะแข็งธัญพืชลูกเดือย ดังนั้น อาหารเพาะจึงเป็นปัจจัยหนึ่งในการออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

กล่าวโดยรวม ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของถั่งเช่าสีทองขึ้นอยู่กับปัจจัยต่างๆ ได้แก่ ชนิด และปริมาณของสารออกฤทธิ์ ชนิดของตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัด วิธีการที่ใช้ในการวิเคราะห์ ส่วนของถั่งเช่าสีทองที่นำมาวิเคราะห์ และอาหารเพาะ เป็นต้น

สรุปผลการทดลอง

สารสกัดถั่งเช่าสีทอง มีคอร์ไดซีปินเป็นสารหลัก สารสกัดถั่งเช่าสีทองที่เพาะเลี้ยงในอาหารเพาะต่างกัน มีองค์ประกอบทางเคมีส่วนหนึ่งต่างกัน และมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระต่างกัน สารสกัดถั่งเช่าสีทองที่เพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเหลว มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงกว่าสารสกัดถั่งเช่าสีทองที่เพาะเลี้ยงในอาหารเพาะแข็งธัญพืชลูกเดือย สารประกอบฟีนอลและฟลาโวนอยด์ที่พบในสารสกัด ทำหน้าที่เป็นสารออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยการเป็นตัวให้ไฮโดรเจน และสารสกัดถั่งเช่าสีทองสามารถเป็นแหล่งธรรมชาติของสารต้านอนุมูลอิสระ

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ กองทุนพัฒนาโรงเรียนนายร้อยพระจุลจอมเกล้า 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.
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) Chineese caterpiller 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, Calhelha 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. Afri J Microbiol Res 2009 ; 3 (12) : 957-961. http://www. academic journals.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 sinesis* 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 lachryma*-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, วิทูร รุพห์รักษ์สกุล, หรรษธร ระฤกชาติ, และ เศกสรร โชคพัฒนกิจ. (2556) การเปรียบเทียบเมล็ดธัญพืชที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงเส้นใยเชื้อ *Cordyceps militaris*. ปริญญานิพนธ์วิทยาศาสตร์บัณฑิต. โรงเรียนนายร้อยพระจุลจอมเกล้า. นครนายก: โรงเรียนนายร้อยพระจุลจอมเกล้า.102 หน้า.
56. เยาวภา ทองอร่าม. การศึกษาเปรียบเทียบการเพาะเลี้ยงถั่งเช่าสีทองโดยใช้หัวเชื้อเหลวและหัวเชื้อแข็งของ *Cordyceps militaris* บนเมล็ดธัญพืช. วารสารวิชาการโรงเรียนนายร้อยพระจุลจอมเกล้า. 2558 ; 13: 87-99.