

ฤทธิ์ต้านสารอนุมูลอิสระและความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเต้านมของสารสกัดเห็ดบดเทียบกับเห็ดหลินจือ

Antioxidant Activity and Cytotoxicity in Breast Cancer Cells Line of Mushrooms Extracts; *Lentinus polychrous* Lev. Compared to *Ganoderma lucidum* (Fr.) Karst

นิภาพร อามัสสา^{1*}, อรอนงค์ พวงชมพู¹, สมศักดิ์ ระยัน², ศรีสุภา ลีทอง³, นาถธิดา วีระปรียากร⁴, ศศิภาวรรณ มาชนะนา⁵
Nipaporn Armassa^{1*}, Onanong Pongchompu¹, Somsak Rayan², Srisupha Leethong³, Natthida Weerapreeyakul⁴,
Sasipawan Machana⁵

Received: 9 Jun 2009

Accepted: 28 Dec 2009

บทคัดย่อ

การวิจัยครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อตรวจสอบฤทธิ์ต้านสารอนุมูลอิสระ จากการตรวจสอบหาฤทธิ์ต้านสารอนุมูลอิสระด้วยวิธี 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radicals (DPPH) และปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด และความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเต้านม (MCF-7) ของสารสกัดเห็ดสมุนไพรเห็ดหลินจือและเห็ดบดด้วยวิธี Neutral red assay จากผลการศึกษาพบว่าสารสกัดจากเส้นใยเห็ดหลินจือ มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ โดยมีค่า DPPH scavenging capacity อยู่ในช่วงระหว่าง 1.34 ± 0.12 และ 13.77 ± 0.98 $\mu\text{mol/g}$ เมื่อวัดด้วยวิธี Folin-Ciocalteu พบว่า มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดเท่ากับ 9.91 ± 2.32 และ 119.70 ± 1.74 $\text{mg}/100\text{g}$ ตามลำดับ สำหรับสารสกัดจากเส้นใยเห็ดบดมีฤทธิ์ต้านสารอนุมูลอิสระโดยมีค่า DPPH scavenging capacity อยู่ในช่วงระหว่าง 1.33 ± 1.58 และ 11.84 ± 1.77 mmol/g และมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดประมาณ 10.42 ± 0.69 ถึง 116.57 ± 5.27 $\text{mg}/100\text{g}$ นอกจากนี้สารสกัดจากเส้นใยเห็ดหลินจือและเห็ดบด ทำให้เซลล์มะเร็งตาย โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 415.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ส่วนสารสกัดเห็ดบดพบว่ามีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งโดยมีค่า IC_{50} มากกว่า 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ผลการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าเห็ดทั้ง 2 ชนิด โดยเฉพาะสารสกัดเห็ดบดซึ่งเป็นเห็ดที่รับประทานได้ของไทยมีฤทธิ์ต้านสารอนุมูลอิสระและปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดไม่ต่างจากสารสกัดเห็ดหลินจือ การศึกษาในอนาคตควรวิเคราะห์และสกัดหาสารสำคัญจากเห็ดบดเปรียบเทียบกับในเห็ดหลินจือที่มีผลต่อการยับยั้งเซลล์มะเร็งและการเกิดอนุมูลอิสระต่อไป

คำสำคัญ: ฤทธิ์ต้านสารอนุมูลอิสระ สารสกัดเห็ดบด สารสกัดเห็ดหลินจือ

วารสารเภสัชศาสตร์อีสาน 2552; 5(3): 243-250

¹ ป.ร.ด. ² ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ³ วท.บ. อาจารย์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลอีสาน วิทยาเขตสกลนคร จ.สกลนคร

⁵ ป.ร.ด. รองศาสตราจารย์ ⁶ นักศึกษาปริญญาโท คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น จ.ขอนแก่น

¹ Ph.D., ² Assistant Professor, ³ B.Sc., Lecturer, Faculty of Natural Resources, Rajamangala University of Technology ISAN Sakon Nakorn Campus, Sakon Nakorn

⁵ Ph.D. Associate Professor, ⁶ Master degree student, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002

* Corresponding author: Nipaporn Armassa, Faculty of Natural Resources, Rajamangala University of Technology ISAN Sakon Nakorn Campus, Phangkhon, Sakon Nakorn 47160 Tel. +66 83 3746450 Fax. +66 42771460 E-mail: Jubjang10@gmail.com

Abstract

This study examined the antioxidative activity, and cytotoxic effect in breast cancer cell line (MCF-7) of medicinal mushrooms extracts; *Lentinus polychrous* Lev. and *Ganoderma lucidum* (Fr.) Karst. Antioxidative activity and cytotoxic effect were determined using the 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radicals (DPPH) assay and the Neutral red assay, respectively. Results show that *G. lucidum* extracts from mycelia have antioxidative activity with the DPPH scavenging capacity in the range 1.34 ± 0.12 and 13.77 ± 0.98 $\mu\text{mol/g}$ and the total phenolic compounds in the range 9.91 ± 2.32 to 119.70 ± 1.74 $\text{mg}/100\text{g}$. *L. polychrous* Lev. extracts from mycelia had antioxidative activity with the DPPH scavenging capacity in the range 1.33 ± 1.58 to 11.84 ± 1.77 $\mu\text{mol/g}$ and the total phenolic compounds was approximately 10.42 ± 0.69 to 116.57 ± 5.27 $\text{mg}/100\text{g}$. This study shows that an extract from edible *L. polychrous* Lev. mushroom extracts exhibited similar antioxidative activity and the total phenolic compounds to the *G. lucidum* extracts. Moreover, the extract from *G. lucidum* caused a 50% decrease in breast cancer cell viability with concentration (IC_{50}) of 415.6 $\mu\text{g/mL}$. The extract from *L. polychrous* Lev. mycelia demonstrated IC_{50} values greater than 500 $\mu\text{g/mL}$. It was found that the *L. polychrous* Lev. Mycelia extract; an edible mushroom in Thailand, possessed radical scavenging activity and the total phenolic content were not different from the *G. lucidum* extract. Future work on the separation of bioactive compounds contributing to the antioxidant activity and cytotoxicity of the *L. polychrous* Lev. Mycelia extract should be performed in comparison to the *G. lucidum* extract.

Keywords: Antioxidant, Medicinal mushrooms, *Ganoderma lucidum* (W.Curtis:Fr.) P. Karst., *Lentinus polychrous* Lev., Breast cancer cells

IJPS 2009: 5(3): 243-250

บทนำ

ปัจจุบันมีการศึกษาอย่างกว้างขวางเกี่ยวกับฤทธิ์ต้านสารอนุมูลอิสระ เนื่องจากอนุมูลอิสระเหนี่ยวนำให้เกิดโรคที่ร้ายแรงต่างๆ เช่น โรคมะเร็ง โรคหลอดเลือดหัวใจตีบ หัวใจวาย โรคเบาหวาน และโรคต่อกระดูก จึงมีการค้นหาสารที่จะนำมาเพื่อต้านฤทธิ์อนุมูลอิสระมากขึ้น ซึ่งสารต้านอนุมูลอิสระพบได้ในพืชสมุนไพร พืชผักผลไม้และเห็ด โดยมีสารต้านอนุมูลอิสระหลายชนิด เช่น เซเลเนียม สารประกอบฟีนอลิกส์ วิตามินซี วิตามินอี และเบต้าแคโรทีน เป็นต้น (วาริน, 2546; วัลลภ และประณีต, 2004; Lui et al., 1997; Lin, 2004) เห็ดเป็นแหล่งมีสารต้านฤทธิ์อนุมูลอิสระดังกล่าว จึงทำให้มีการศึกษาอย่างต่อเนื่องเกี่ยวกับสารต้านฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในเห็ดต่างๆ ได้แก่ เห็ดตระกูลหลินจือ เช่น *G. lucidum*, *G. tsugae* Murrill (Tseng, et al. 2008; Zhao, et al., 2008) เห็ดตระกูลนางรม *Pleurotus florida*, *P. pulmonaris* และ *P. eryngii* var. *eryngii* เห็ดตระกูลหัง *Inonotus obliquus* *Phellinus rimosus*, *P. gilvus* (Ajith,

and Janardhanan, 2007; Chang, et al., 2008) และเห็ดเข็มทอง (นันทนภัส, 2551) เป็นต้น นอกจากนี้เห็ดเหล่านี้จะมีประโยชน์ต่อร่างกายแล้ว ในการแพทย์ต่างประเทศเช่น ประเทศจีน เกาหลี ญี่ปุ่น และสหรัฐอเมริกา ได้ให้ความสำคัญกับการนำเห็ดสมุนไพรมาบำบัดผู้ป่วยที่เป็นโรคมะเร็ง เนื่องจากโรคเอดส์เพิ่มมากขึ้นโดยมีการศึกษาทั้งในระดับห้องปฏิบัติการ และในระดับคลินิกมานานแล้ว โดยเฉพาะเห็ดหลินจือ ซึ่งเป็นที่รู้จัก และนำมาใช้ประโยชน์เชิงสมุนไพรที่มีฤทธิ์เป็นยารักษาหลายปี เนื่องจากมีสารที่มีสรรพคุณทางยาช่วยในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันให้กับร่างกาย สำหรับเห็ดบดหรือเห็ดต้ม (*L. polychrous* Lev.) หมวกดอกมีเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 5-10 cm รูปร่างโค้งนูนคล้ายกรวยลึกขอบโค้งงอ สีขาวนวลถึงน้ำตาลอมเทา ใต้หมวกดอกมีครีบเรียงกันเป็นรัศมีรอบก้านดอกและยาวขนานกับก้านดอกลงไปเกือบถึงโคนก้านดอก มีสีน้ำตาลเข้มกว่าผิวหมวกดอก เมื่อแก่จะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลแดงเกือบดำ ดอกเห็ดมักขึ้นเดี่ยวหรืออยู่รวมกันเป็นกลุ่ม เป็นเห็ดที่ใช้เป็น

ทั้งอาหาร และยาสำหรับตำราพื้นบ้านอีสาน การศึกษาของวินัย และอุษา (2548) พบว่าเห็ดบดสามารถใช้แก้พิษงูและแมลงป่องได้ ส่วนในต่างประเทศพบว่าเห็ดบดสามารถใช้แก้โรคลมวิงเวียนได้ (Arora, 1986; Ying, 1987) ส่วนเกศศินี และจันทร์เพ็ญ (2543) พบว่าเห็ดบดมีสารที่มีฤทธิ์ต้านสารอนุมูลอิสระประมาณ 25 mg และ Charida et al. (2004) รายงานว่าเห็ดบดมีเอนไซม์หลายชนิด เช่น laccase, xylanase และ cellulase เป็นต้น เห็ดบดนอกจากจะใช้เป็นอาหารและมีสรรพคุณทางยาแล้วยังสามารถเพาะเลี้ยงได้ตลอดทั้งปี อย่างไรก็ตามเห็ดบดยังมีการวิจัยและเผยแพร่ค่อนข้างน้อยเมื่อเปรียบเทียบกับเห็ดหลินจือ ดังนั้นการวิจัยครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาฤทธิ์ต้านสารอนุมูลอิสระและการยับยั้งเซลล์มะเร็งของสารสกัดจากเห็ดบดเปรียบเทียบกับเห็ดหลินจือเพื่อใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานก่อนการนำไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมยาหรือผลิตภัณฑ์เพื่อสุขภาพต่อไป

วิธีดำเนินการวิจัย

1. ตัวอย่างเห็ดสมุนไพรในการศึกษานี้ใช้เห็ดสมุนไพร 2 ชนิด คือ เห็ดหลินจือ และเห็ดบด ซึ่งได้จากการเพาะเลี้ยง 2 รูปแบบ คือ

1.1 การเพาะเลี้ยงเพื่อให้เกิดดอกในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ส่วนประกอบต่างๆ คือ ซีลี้อยไม้ยางพารา 10 kg, รำละเอียด 5-8 kg, ปูนขาว 1 kg, ยิปซัม (CaSO_4) 2 kg, ดีเกลือ (MgSO_4) 200 g และปรับความชื้นให้ได้ 65-70 % จากนั้นผสมคลุกให้เข้ากันดีบรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อเพาะลงในพลาสติกท่อนร้อน นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 90-100°C เป็นเวลาไม่น้อยกว่า 3 ชั่วโมง จากนั้นทิ้งให้เย็นแล้วจึงใส่เชื้อเห็ดหลินจือหรือเห็ดบดตามต้องการ นำไปบ่มที่อุณหภูมิประมาณ 28-32°C เพื่อให้เส้นใยและเจริญเป็นดอกเห็ด โดยเห็ดหลินจือใช้เวลาประมาณ 45-60 วัน ส่วนเห็ดบดใช้เวลาประมาณ 30-35 วัน นำดอกเห็ดมาทำให้แห้งด้วยวิธีการ freeze dried ที่อุณหภูมิประมาณ -55°C และอบด้วยลมร้อน (hot air oven) ที่อุณหภูมิประมาณ 50-55°C บดตัวอย่างเห็ดให้ละเอียดเพื่อนำไปสกัดสารต่อไป

1.2 การเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเมล็ดเดียว เพื่อเป็นการเพิ่มปริมาณเส้นใยเห็ด โดยนำดอก

เห็ดหลินจือและเห็ดบด มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA (potato dextrose agar) และบ่มเชื้อที่อุณหภูมิประมาณ 28°C ใช้เวลาประมาณ 3-5 วัน จากนั้นตัดชิ้นส่วนวุ้นที่มีเส้นใยบริเวณรอบนอกของโคโลนีด้วย cork borer ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.8 เซนติเมตร แล้วใช้เข็มเย็บตัดชิ้นวุ้นเชื้อเห็ดย้ายลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเมล็ดเดียวที่เตรียมโดย นำเมล็ดเดียวต้มให้สุกทิ้งให้เย็นกรอกลงในขวดเลี้ยงเชื้อ นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นจึงใส่เชื้อเห็ดหลินจือหรือเห็ดบดตามต้องการ นำไปบ่มที่ อุณหภูมิประมาณ 28-32°C เพื่อให้เห็ดเส้นใยเจริญ ตามระยะเวลาที่ต้องการ จากนั้นนำเส้นใยเห็ดไปทำให้แห้งด้วยวิธีการ freeze dried ที่อุณหภูมิประมาณ -55°C และอบด้วยลมร้อน (hot air oven) ที่อุณหภูมิประมาณ 50-55°C บดตัวอย่างเห็ดให้ละเอียดเพื่อเตรียมนำไปสกัดสารต่อไป

2. การเตรียมสารสกัดเห็ดสมุนไพร นำผงแห้งของดอกและเส้นใยเห็ดสมุนไพรที่เตรียมไว้จากข้อ 1 จำนวน 1 g มาสกัดด้วย 100% methanol ปริมาตร 20 mL ตั้งทิ้งไว้ประมาณ 30 นาที กรองแยกกากออกด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 ปรับปริมาตรสารสกัดให้ได้ 20 mL เก็บสารสกัดที่ได้ไว้ในขวดสีชาที่อุณหภูมิ 4°C เพื่อเตรียมวิเคราะห์ต่อไป

3. การตรวจวิเคราะห์หาสารประกอบฟีนอลิกส์ (total phenolic compounds) โดยดัดแปลงวิธีการของ Folin Ciocalteu (Piljac et al., 2005) ด้วยวิธีการดังนี้ นำตัวอย่างสารสกัดเห็ดสมุนไพร ปริมาตร 70 μL ปิเปตลงในหลอดทดลองแล้วเติมสาร Folin reagent ปริมาตร 4 mL จากนั้นเติมสารละลาย Sodium carbonate ปริมาตร 3.2 mL และน้ำกลั่นปริมาตร 2.8 mL จากนั้นนำหลอดทดลองไปเขย่าให้เข้ากัน ควบคุมการเกิดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 40°C เป็นเวลา 30 นาที ในอ่างควบคุมอุณหภูมิ จากนั้นบันทึก และอ่านค่าดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง UV-spectrophotometer ที่ 765 nm โดยใช้สารละลาย gallic acid เป็นสารมาตรฐาน

4. การทดสอบหาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ด้วยวิธีการวิเคราะห์ความสามารถของสารต้านอนุมูลอิสระด้วยสาร 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) โดยอ้างตาม Naomi et al. (2003) ซึ่งดัดแปลงวิธีการของ Bondet, et al. (1997) ดังนี้คือ ชั่งสาร 0.1 mM DPPH

มา 7 mg ผสมกับ 100 % methanol ในอัตราส่วน 100 mL ซึ่งสาร 0.1 M MES (2-N-morpholino)ethanesulfonic acid buffer), pH 6.0 ผสมสารละลาย DPPH และ MES ที่เตรียมได้ ในอัตราส่วน 8:1 (v/v) หลังจากนั้นเตรียมสารละลายตัวอย่าง ปริมาตร 0.1 mL ผสมกับ สารละลาย DPPH ในอัตราส่วน 0.9 mL ดูดสารละลายตัวอย่าง ปริมาตร 0.5 mL ลงในหลอดทดลองทุกความเข้มข้น เขย่าผสมให้เข้ากันจากนั้นดูดสารละลายตัวอย่างใส่หลอดละ 0.1 mL และ DPPH หลอดละ 0.9 mL ลงในหลอดทดลองทุกความเข้มข้นที่ต้องการ ส่วน control ใช้ 100 % methanol ปริมาตรที่ใช้เท่ากับสารละลายตัวอย่างผสมกับ DPPH เขย่าผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ในที่มืดนาน ประมาณ 1 ชั่วโมง นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 515 nm การทดสอบหาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ด้วยวิธีการนี้รายงานค่าเป็น mmol/g โดยนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปคำนวณ DPPH scavenging capacity ได้ดังนี้คือ

$$\begin{aligned} \text{DPPH scavenging capacity } (\mu\text{mol DPPH/g}) &= (C_{515} - S_{515})v/11.2/m \\ C_{515} &= \text{abs at 515 nm of control} \\ S_{515} &= \text{abs at 515 nm of sample} \\ v &= \text{volume (mL) of reaction mixture} \\ 11.2 &= \text{molar absorption coefficient of DPPH} \\ &\quad (\text{mM}^{-1}) \text{ at 515 nm ใน methanol} \\ m &= \text{plant tissue (g)} \end{aligned}$$

5. การวิเคราะห์ทางสถิติ (Statistic analysis)

ในการศึกษาฤทธิ์ต้านสารอนุมูลอิสระของสารสกัดเห็ดสมุนไพร (เห็ดบดและเห็ดหลินจือ) ทำการทดสอบตัวอย่างซ้ำ 3 ครั้ง (n=3) และนำผลที่ได้มาวิเคราะห์ค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (mean±SD) และคัดเลือกสารสกัดจากเส้นใยเห็ดเห็ดบดและเห็ดหลินจือเพื่อศึกษาต่อไป

6. การตรวจกรองฤทธิ์เบื้องต้นโดยศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเต้านม (MCF-7 cells) ด้วยวิธี Neutral red assay โดยมีวิธีดังนี้ เตรียมสารละลายตัวอย่าง (stock solution) จากสารสกัดเส้นใยของเห็ดหลินจือและเห็ดบด เนื่องจากมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมากกว่าส่วนอื่น โดยละลายในน้ำกลั่น ทำการเจือจางให้ได้ความเข้มข้นที่ต้องการด้วยอาหารเหลวเลี้ยงเซลล์ RPMI-1640 media ทำการทดสอบความเป็นพิษของสารตัวอย่าง ในเซลล์

มะเร็ง MCF-7 โดยทำการเลี้ยงเซลล์มะเร็ง MCF-7 ใน microplate ขนาด 96 หลุม ในอาหารเหลวเลี้ยงเซลล์ RPMI-1640 ที่มี 10% Fetal Bovine Serum และ 1% Penicillin-streptomycin ที่ความหนาแน่นของเซลล์ 3×10^4 cells/mL โดยทำการเปิดสารละลายเซลล์แขวนลอย (cell suspension) 100 μL /well ทำการบ่มเซลล์ในตู้คาร์บอนไดออกไซด์ 5% อุณหภูมิ 37 °C หลังจากนั้น 24 ชั่วโมงทำการเติมสารที่ทดสอบลงในแต่ละหลุมที่มีค่าความเข้มข้นต่างๆ ทำการบ่มต่ออีก 24 ชั่วโมงเติม Neutral red dye ความเข้มข้น 50 $\mu\text{g/mL}$ ในปริมาณ 100 μL บ่มเซลล์ต่ออีก 1 ชั่วโมง เนื่องจากเซลล์ที่มีชีวิตจะสะสมสี Neutral red ในไลโซโซม ดังนั้นจึงสามารถแยกเซลล์ที่มีชีวิตจากเซลล์ตาย หลังจากนั้นละลายสี Neutral red จากเซลล์ ด้วย 0.33% HCl ใน isopropanol ปริมาตร 100 μL วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 และ 650 nm คำนวณร้อยละการตายของเซลล์ดังสมการ ทั้งนี้กลุ่มควบคุมคือเซลล์ที่ไม่มีการเติมสารตัวอย่าง (untreated cells)

$$\text{Cytotoxicity } (\%) = \frac{(\text{OD}_{\text{untreated cells}} - \text{OD}_{\text{treated cells}})}{\text{OD}_{\text{untreated cells}}} \times 100$$

ค่าความเข้มข้นของสารที่ทำให้เซลล์มะเร็งตาย 50% เทียบกับกลุ่มควบคุม คือ ค่า 50% Inhibitory concentration (IC_{50}) หากจากสมการเส้นตรงที่ได้จากกราฟความสัมพันธ์ระหว่างร้อยละการรอดของเซลล์มะเร็งกับค่าความเข้มข้นของสารตัวอย่าง ในการศึกษานี้ทำการศึกษาเปรียบเทียบกับ melphalan ซึ่งเป็นยาต้านมะเร็ง

ผลการศึกษาวิจัย

ผลการตรวจวิเคราะห์หาฤทธิ์ต้านสารอนุมูลอิสระของสารสกัดเห็ดสมุนไพรในเห็ดหลินจือและเห็ดบด โดยทำการตรวจวิเคราะห์หาปริมาณรวมของสารต้านอนุมูลอิสระ ที่ปัจจัยต่างๆ คือ ลักษณะ อุณหภูมิ และอายุของตัวอย่างเห็ด ด้วยวิธี DPPH และตรวจวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลิก (total phenolic compounds) ด้วยวิธี Folin-Ciocalteu พบว่าสารสกัดจากเส้นใยของเห็ดหลินจือเมื่ออายุ 1 เดือน มีสารต้านอนุมูลอิสระ สูงกว่าในดอกเห็ด โดยมีค่า DPPH scavenging capacity คือ

13.77±1.98 µmol/g และปริมาณสารประกอบฟีนอลิกส์ เท่ากับ 31.68±2.32 mg/100g สำหรับระดับอุณหภูมิที่ใช้ในการทำให้สารสกัดจากเส้นใยเห็ดหลินจือแห้งพบว่าระดับอุณหภูมิที่ -55°C เส้นใยเห็ดหลินจือมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ สูงกว่าระดับอุณหภูมิที่ 55°C เท่ากับ 3.110±0.97 µmol/g และปริมาณสารประกอบฟีนอลิกส์ เท่ากับ 31.68±2.32 mg/100g ส่วนอายุของเห็ดตัวอย่างพบว่าที่อายุ 6 เดือน เห็ดหลินจือมีสารต้านอนุมูลอิสระสูงสุด คือ 1.34±0.12 µmol/g นอกจากนี้ยังพบว่าเมื่ออายุ 6 เดือน เห็ดหลินจือมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกส์สูงสุด คือ 119.70±1.74 mg/100g (ตารางที่ 1)

สำหรับการตรวจวิเคราะห์หาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดเห็ดบด พบว่า สารสกัดจากเส้นใยเห็ดบดมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงกว่าในดอกเห็ดโดยมีค่า DPPH scavenging capacity คือ 11.84±1.7 µmol/g และปริมาณสารประกอบฟีนอลิกส์เท่ากับ 30.20±2.77

mg/100g สำหรับระดับอุณหภูมิที่ใช้ในการทำให้สารสกัดจากเส้นใยเห็ดบดแห้ง พบว่าระดับอุณหภูมิที่ -55°C เส้นใยเห็ดบดมีสารต้านอนุมูลอิสระสูงกว่าระดับอุณหภูมิที่ 55°C คือ 3.24±0.37 µmol/g และปริมาณสารประกอบฟีนอลิกส์ เท่ากับ 30.20±2.77 mg/100g ส่วนอายุของเห็ดบด พบว่า ที่อายุ 6 เดือน มีสารต้านอนุมูลอิสระสูงสุด คือ 1.33±1.58 µmol/g สำหรับปริมาณสารประกอบฟีนอลิกส์ส่วนเมื่ออายุ 6 เดือน มีค่าสูงสุด คือ 116.57±5.27 mg/100g (ตารางที่ 1)

การศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารสกัดตัวอย่างของเห็ด 2 ชนิดที่เลือกมา พบว่าสารสกัดจากเส้นใยเห็ดหลินจือมีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเต้านมโดยมีค่า IC₅₀ เท่ากับ 415.6 µg/mL ส่วนสารสกัดเห็ดบดมีค่า IC₅₀ มากกว่า 500 µg/mL ในขณะที่สารมาตรฐานยา melphalan นั้น มีค่า IC₅₀ เท่ากับ 27.3 µg/mL (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 1 ค่าปริมาณสารประกอบฟีนอลิกและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดเห็ดบดและเห็ดหลินจือ

ปัจจัยต่าง ๆ	ปริมาณสารประกอบฟีนอลิก (mg/100g)		ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (DPPH scavenging capacity) (µmol/g)	
	เห็ดหลินจือ	เห็ดบด	เห็ดหลินจือ	เห็ดบด
1. ลักษณะตัวอย่าง				
ดอก	9.91±2.30	10.42±0.69	13.77±1.98	11.84±1.77
เส้นใย	31.68±2.32	30.20±2.77	3.11±0.97	3.24±0.37
2. อุณหภูมิ				
Hot air oven (55°C)	29.03±4.39	27.99±4.68	4.33±0.89	4.12±0.49
Freeze drier (-55°C)	31.68±2.32	30.20±2.77	3.11±0.97	3.24±0.37
3. อายุของตัวอย่าง				
1 เดือน	31.68±2.32	30.20±2.77	3.11±0.97	3.24±0.37
2 เดือน	73.79±0.28	71.03±4.69	2.54±0.34	2.61±0.28
3 เดือน	75.77±3.00	74.83±7.16	2.27±0.18	2.34±0.03
4 เดือน	85.73±1.22	81.29±11.51	2.05±0.13	2.05±0.57
5 เดือน	93.18±17.30	88.70±6.98	1.50±0.25	1.48±0.27
6 เดือน	119.70±1.74	116.57±5.27	1.34±0.12	1.33±1.58

ตารางที่ 2 ร้อยละการตายของเซลล์ MCF-7 เมื่อได้รับสารตัวอย่างเทียบกับยา melphalan และค่า IC₅₀

ค่าความเข้มข้น (µg/mL)	เส้นใยเห็ดหลินจือ	เส้นใยเห็ดบด	Melphalan
10	8.7	32.6	38.8
25	18.0	31.8	51.9
50	28.8	34.9	61.0
100	28.8	31.3	59.7
250	27.8	32.3	62.3
500	60.2	43.9	56.1
IC ₅₀	415.6	>500	27.3

อภิปรายผลและสรุป

จากผลการตรวจวิเคราะห์เพื่อหาฤทธิ์ต้านสารอนุมูลอิสระและสารประกอบฟีนอลิกส์ ในสารสกัดเห็ดหลินจือและเห็ดบด พบว่าสารสกัดของเห็ดทั้ง 2 ชนิด มีสารประกอบฟีนอลิกส์ซึ่งเป็นสารต้านอนุมูลอิสระเป็นองค์ประกอบ ซึ่งมีปริมาณรวมของสารต้านอนุมูลอิสระและสารประกอบฟีนอลิกส์ที่แตกต่างกันขึ้นอยู่กับปัจจัยต่างๆ เช่น ชนิดของดอก เส้นใย อุณหภูมิที่ทำให้แห้ง และอายุการเพาะเลี้ยงเส้นใยเห็ด เป็นต้น ซึ่งมีงานวิจัยที่เกี่ยวข้องและใกล้เคียงกับ Mau et al. (2005) ที่รายงานว่า สารสกัดเห็ดทั้ง *G. tsugae* Murrill มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระอยู่ประมาณ 79.3-96.8% ส่วน Ajith and Janardhanan (2007) พบว่าสารสกัดจากดอกและเส้นใยเห็ดหลินจือ (*G. lucidum*) มีศักยภาพในการต้านอนุมูลอิสระได้หลายชนิดได้แก่ superoxide radical, hydroxyl radical, lipid peroxidation และ nitric oxide โดยมีค่า IC_{50} อยู่ในช่วง 152.5 ± 2.5 - 873.5 ± 7.2 $\mu\text{g/mL}$ และ Tsenga, et al. (2008) รายงานว่าเห็ดหลินจือ *G. lucidum* มีศักยภาพในการต้านอนุมูลอิสระ hydroxyl radical, lipid peroxidation และ nitric oxide โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ $25 \mu\text{g/mL}$ ส่วน Zhao et al. (2008) พบว่าเห็ดหลินจือ *G. lucidum* มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ superoxide radical และ hydroxyl radical ประมาณ $13.4 \pm 1.0\%$ - $82.0 \pm 0.4\%$ สำหรับ Tseng, et al. (2008) พบว่า สารสกัดเห็ดทั้ง *G. tsugae* ที่ได้จากดอกเห็ด และเส้นใย มีศักยภาพในการต้านอนุมูลอิสระโดยมีค่า EC_{50} อยู่ในช่วง 1.10-4.82 mg/mL นอกจากนี้ Acharya et al. (2005) รายงานว่าเห็ดทั้ง *G. applanatum* มีศักยภาพในการต้านอนุมูลอิสระ hydroxyl radical, lipid peroxidation และ nitric oxide โดยมีค่า IC_{50} อยู่ในช่วง 121.88-742 pmol/mg

ส่วนการตรวจวิเคราะห์หาฤทธิ์ต้านสารอนุมูลอิสระของสารสกัดเห็ดบด โดยการวิเคราะห์การตรวจวิเคราะห์หาฤทธิ์ต้านสารอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH ผลที่ได้แสดงค่าในหน่วย $\mu\text{mol/g}$ ซึ่งเป็นการรายงานครั้งแรก ส่วนการตรวจวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกส์ (total phenolic compounds) ด้วยวิธี Folin-Ciocalteu ซึ่งจากการวิเคราะห์ครั้งนี้ พบว่าสารสกัดจากเส้นใย ระดับอุณหภูมิ และอายุของเห็ดบด มีสารต้านอนุมูลอิสระ และปริมาณสารประกอบฟีนอลิกส์ที่แตกต่างกันตามปัจจัยดังกล่าว โดยมีรายงานที่ใกล้เคียงหรือเกี่ยวข้อง ได้แก่ เกศศิณี และจันทร์เพ็ญ (2543) ที่รายงานว่า จากการ

วิเคราะห์มีสารต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี เบต้า-คาโรทีนบลีชชิง (β -carotene bleaching method) เห็ดลมหรือเห็ดบดมีสารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระประมาณ 25 mg และพบว่ามียางงานอื่นของเห็ด เช่น Barros et al. (2007) รายงานว่า เห็ดป่ากินได้ในประเทศโปรตุเกศมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกส์ประมาณ 10.80 ± 0.47 - 17.25 ± 0.65 mg/g นอกจากนี้ นันทน์ภัส (2551) รายงานว่า เห็ดเข็มทองมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกส์ประมาณ 13.6 GAEM/gFW (Gallic acid equivalents mmol/g of fresh weight) มีสารต้านอนุมูลอิสระประมาณ 16.1 TEM/gFW (Trolox equivalents mmol/g of fresh weight) แต่อย่างไรก็ตามเมื่อเปรียบเทียบข้อมูลต่างๆ กับเห็ดหลินจือ พบว่าเห็ดบดมีศักยภาพในการต้านอนุมูลอิสระใกล้เคียงกับเห็ดหลินจือ และเป็นสิ่งที่ยืนยันได้ว่ามีรายงานก่อนหน้านี้ว่าเห็ดเป็นแหล่งมีสารต้านฤทธิ์อนุมูลอิสระที่สำคัญ เช่น เห็ดตระกูลหลินจือ เช่น *G. lucidum*, *G. tsugae* Murrill เห็ดตระกูลนางรม *Pleurotus florida*, *P. pulmonaris* และ *P. eryngii* var. *eryngii* และเห็ดตระกูลหัง *Inonotus obliquus* *Phellinus rimosus*, *P. gilvus* (Ajith and Janardhanan, 2007; Chang et al., 2008; Tseng et al., 2008; Zhao et al., 2008) ซึ่งเป็นรายงานที่สนับสนุนได้ว่าเห็ดมีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระซึ่งเป็นประโยชน์ต่อร่างกาย

สำหรับการศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารสกัดตัวอย่างของเห็ดหลินจือและเห็ดบด พบว่ามีความเป็นพิษต่อเซลล์ที่ศึกษา ซึ่งมีรายงานที่ใกล้เคียงกับ Yang (2005) ที่ศึกษาโดยวิธี cytotoxic assay พบว่า สารสกัด Ganoderic acid จากเห็ดหลินจือที่ระดับ 500 $\mu\text{g/mL}$ สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง hepatoma cell line BEL 7402 ได้ประมาณ 70% ส่วน Tong et al. (2009) รายงานว่า เห็ดหลินจือมีค่า IC_{50} เท่ากับ 44 $\mu\text{g/mL}$ อย่างไรก็ตามสารตัวอย่างที่นำมาศึกษานั้นเป็นสารสกัดที่มีปริมาณสารสำคัญที่ออกฤทธิ์ในปริมาณน้อยและมีสารอื่นร่วมด้วยจึงใช้ค่าความเข้มข้นที่สูงกว่ายาที่นำมาเปรียบเทียบเพื่อให้สามารถฆ่าเซลล์มะเร็งตายที่ 50% เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ดังนั้นแนวทางการศึกษาต่อไปในอนาคตควรวินิจฉัยและสกัดหาสารสำคัญจากเห็ดบดเปรียบเทียบกับในเห็ดหลินจือที่มีผลต่อการยับยั้งเซลล์มะเร็งและการเกิดอนุมูลอิสระ เพื่อเป็นข้อมูลเบื้องต้นสำหรับการพัฒนาเห็ดบดเป็นเครื่องดื่มหรืออาหารเสริมสุขภาพ

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลอีสาน ที่สนับสนุนงานวิจัยครั้งนี้ และขอขอบคุณบริษัท GMH Multimarketing Co.,Ltd. ที่ได้อนุเคราะห์สารสกัดเห็ดสมุนไพรและสารเคมีที่ใช้ในงานวิจัยจนสำเร็จลุล่วงด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

- เกศศิณี ตระกูลทิวากร และจันทร์เพ็ญ ตักดีสิทธิพิทักษ์. ศักยภาพในการต้านสารอนุมูลอิสระของสารสกัดจากผักพื้นบ้านไทย. *วารสารอาหาร* 2543 ก.ค.-ก.ย.; 30(3): 164-173.
- นันทน์ภัส เต็มวงศ์. ปริมาณรวมของสารต้านอนุมูลอิสระ สารประกอบฟีนอลิกส์และวิตามินซีในผักและสมุนไพร. *วารสารก้าวหน้าโลกวิทยาศาสตร์* 2551; 8(2): 114-124.
- วาริน แสงกิตติโกมล. การเปรียบเทียบปริมาณสารโพลีฟีนอลิกส์และปริมาณรวมการต้านสารอนุมูลอิสระในผักและสมุนไพร. *วารสารสหเวชศาสตร์* 2546 ม.ค.-มิ.ย.; 3(1): 91-99.
- วินัย กลิ่นหอม, อุษา กลิ่นหอม. 57 เห็ดเป็นยาแห่งป่าอีสาน. กรุงเทพฯ: มูลนิธิสุขภาพไทย; 2548.
- วัลลภ วิษะรังสรรค์ และประณีต โอปะณะโสภิต. ภาพรวมของอนุมูลอิสระและการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในการสกัดจากพืชในหลอดทดลอง. *SWU J Pharm Sci* 2004 พ.ย.; 9(1): 73-80.
- Acharya K, Yonzon P, Rai M, Rupa A. Antioxidant and nitric oxide synthase activation properties of *Ganoderma applanatum*. *Indian J Exp Bio* 2005; 43(10): 926-931.
- Ajith TA, Janardhanan KK. Indian medicinal mushrooms as a source of antioxidant and antitumor agents. *J Clin Biochem Nutr* 2007; 40(3): 157-162.
- Alma ERE, Hyun JL, Robert BB, Mariadel MJG, Daniel JR. Enhancement of the antioxidants ergothioneine and selenium in *Pleurotus eryngii* var. *eryngii* basidiomata through cultural practices. *World J Microbiol Biotechnol* 2009; 25: 1597-1607.
- Arora D. *Mushrooms Demystified*. Berkeley: Ten Seed Press; 1986.
- Barros L, Calhella RC, Vaz JA, Ferreira ICFR, Baptista P, Estevinho LM. Antimicrobial activity and bioactive compounds of Portuguese wild edible mushrooms methanolic extracts. *Eur Food Res Technol* 2007; 225: 151-156.
- Bondet V, Brand-Williams W, Berset C. Kinetics and mechanism of antioxidant activity using the DPPH free radical method. *Lebensm -Wiss u-Technol* 1997; 30(6): 609-615.
- Charida P, Poonpilai S, Emiko S, Hisashi H, Yoshinori N. Combination of laccase, xylanase and cellulase In lignocellulose degradation by white rot fungi, *Lentinus polychrous* Lev. and *L. squarrosulus* Mont. *Kasetsart J Nat Sci* 2004; 38(1): 65-73.
- Chang ZQ, Hwang MH, Rhee MH, et al. The in vitro anti-platelet, antioxidant and cellular immunity activity of *Phellinus gilvus* fractional extracts. *World J Microbiol Biotechnol* 2008; 24: 181-187.
- Naomi K, Keiko I, Tojiro T, Koji Y, Masuka K. Induction of apoptosis in cancer cells by bilberry (*Vaccinium myrtillus*) and the anthocyanins. *J Agric Food Chem* 2003; 51: 68-75.
- Liu F, Ooi VEC, Chang ST. Free radical scavenging activities of mushroom polysaccharide activities. *Life Science* 1997; 60(10): 763-771.
- Lin ZB. Focus on anti-oxidative and free radical scavenging activity of *Ganoderma lucidum*. *J Appl Pharmacol* 2004; 12: 133-137.
- Mau JL, Tsai SY, Tseng YH, Huang SJ. Antioxidant properties of methanolic extracts From *Ganoderma tsugae*. *Food Chemistry* 2005; 93(4): 641-649.

- Piljac J, Martinez S, Valek L, Ganic KK. A comparison of methods used to define the phenolic content and antioxidant activity of Croatian wines. *Food Technol Biotechnol* 2005; 43: 271-276.
- Tong CC, Choong YK, Umar NAB, Noordin MM, Mohamed S. Cytotoxicactivity induced by crude extractsof *Ganoderma lucidum* (W.Curt.:Fr.) P.Karst. on mouse myeloma cancercell-line. *World J Microbiol Biotechnol* 2009; 25: 687-695.
- Tsenga YH, Yangb JH, Mau JL. Antioxidant properties of polysaccharides from *Ganoderma tsugae*. *Food Chemistry*. 2008; 107(2): 732-738.
- Sun J, He H, xie BJ. Novel antioxidant peptides from fermented mushroom *Ganoderma lucidum*. *J Agric Food Chem*. 2004; 52(21): 6646-6652.
- Yana S, Jing H, Wei K, et al. Identification of *Inonotus obliquus* and analysis of antioxidation and antitumor activities of polysaccharides. *Curr Microbiol* 2008; 57: 454-462.
- Yang Hl. Ganoderic acid produced from submerged culture of *Ganoderma lucidum* induces cell cycle arrest and cytotoxicity in human hepatoma cell line BEL7402. *Biotechnology Letters* 2005; 27: 835-838.
- Ying JZ, Mao XL, Ma QM, Zong YC, Wen HA. *Icons of medicinal fungi from China*. Beijing: Scientific Press; 1987.
- Zhao L, Zhao G, Du M, Zhao Z, Xiao L, Hu X. Effect of selenium on increasing free radical scavenging activities of polysaccharide extracts from a Se-enriched mushroom species of the genus *Ganoderma*. *Eur Food Res Technol* 2008; 226: 499-505.