

การประเมินผลศักยภาพการต้านอนุมูลอิสระ และปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม เฟลโวนอยด์ แทนนิน จากสารสกัดหยาบของเห็ดระโงกบางชนิด

กฤษฎา จำปาทาสี, นุจรี ชำนาญทัฬห, อาริรัตน์ ไส้ส่อง, ขวัญเรือน นาคสุวรรณกุล*

ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม 44150

*ผู้รับผิดชอบบทความ: khwanruan.p@msu.ac.th

บทคัดย่อ

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อประเมินศักยภาพของเห็ดระโงกที่รับประทานได้ 2 ชนิด คือ เห็ดระโงกขาว (*Amanita princeps* Corner & Bas.) และเห็ดระโงกเหลือง (*Amanita javanica* (Corner & Bas.) T. Oda, Tanaka & Tsuda) ซึ่งเป็นเห็ดที่รู้จักทั่วไปมีราคาแพง โดยการตรวจสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS และ FRAP assay และหาปริมาณสารประกอบกลุ่มฟีนอล ได้แก่ ฟีนอลิกรวม เฟลโวนอยด์ และแทนนิน จากสารสกัดหยาบด้วยตัวทำละลายเอทานอล เมทานอล และน้ำร้อน ผลการทดลองพบว่าสารสกัดหยาบของเห็ดระโงกเหลืองที่สกัดด้วยน้ำร้อนมีผลผลิตมากที่สุดเท่ากับร้อยละ 28.97 ส่วนสารประกอบฟีนอลิกและเฟลโวนอยด์พบว่าสารสกัดหยาบของเห็ดระโงกขาวที่สกัดด้วยเอทานอลมีปริมาณสูงที่สุดเท่ากับ 18.41 ± 0.13 mg GAE/g extract เมื่อเทียบกับสารมาตรฐานกรดแกลลิก และ 1017.99 ± 8.18 mg QE/g extract เมื่อเทียบกับสารมาตรฐานเคอร์เซติน และปริมาณแทนนินมากที่สุดพบในสารสกัดเห็ดระโงกขาวที่สกัดด้วยน้ำร้อนเท่ากับ 13.53 ± 0.45 mg tannic acid/g extract เมื่อเทียบกับสารมาตรฐานกรดแทนนิก ส่วนการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจากทั้ง 2 วิธี พบว่าสารสกัดหยาบที่สกัดด้วยน้ำร้อนของเห็ดระโงกเหลืองมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุดด้วยวิธี ABTS assay มีค่าความเข้มข้นของสารที่สามารถยับยั้งปฏิกิริยาไปครั้งหนึ่ง (IC_{50}) เท่ากับ 0.75 ± 0.04 mg/mL ส่วนวิธี FRAP assay พบว่าสารสกัดหยาบของเห็ดระโงกขาวที่สกัดด้วยเอทานอลมีค่าต้านอนุมูลอิสระมากที่สุดเท่ากับ 3650.67 ± 35.77 mg FeSO₄/g extract

คำสำคัญ: การต้านอนุมูลอิสระ, ฟีนอลิกรวม, เฟลโวนอยด์, แทนนิน, เห็ดระโงก

The Evaluation of Potentials of Antioxidant Activities, Total Phenolic, Flavonoid, and Tannin Contents from Selected Species in *Amanita* Crude Extract

Kritsada Champatasi, Nucharee Chamnantap, Areerat Saisong, Khwanyuruan Naksuwankul*

Department of Biology, Faculty of Science, Mahasarakham University, Mahasarakham 44150, Thailand

*Corresponding Author: khwanruan.p@msu.ac.th

Abstract

The objective of this study was to evaluate the potential of two common edible species of *Amanita*, *A. princeps* Corner & Bas. and *A. javanica* Corner & Bas. T. Oda, Tanaka & Tsuda, which are local mushrooms of high commercial value. The antioxidant activities were determined by ABTS and FRAP assays, and the amounts of polyphenols (total phenolic, flavonoid compounds, and tannin) were examined in ethanol, methanol, and boiling water crude extracts of the mushrooms. The results showed that the highest percentage yields of 28.97% of total phenolic and flavonoid compounds were found in *A. princeps* crude ethanolic extract at 18.41 ± 0.13 mg GAE/g extract using a gallic acid standard and 1017.99 ± 8.18 mg QE/g extract with a quercetin standard, while *A. princeps* crude extract with boiling water had the highest tannin level at 13.53 ± 0.45 mg tannic acid/g extract using a tannic acid standard. Regarding antioxidant activity testing, the two assays showed the highest values with boiling water extract of *A. javanica* in the ABTS assay, IC_{50} as 0.75 ± 0.04 mg/mL, while the FRAP assay of ethanolic *A. princeps* extract recorded 3650.67 ± 35.77 mg $FeSO_4$ /g extract.

Key words: antioxidant activity, total phenolic, flavonoid, tannin, *Amanita*

บทนำและวัตถุประสงค์

เห็ดระโงกเป็นเห็ดที่อยู่ในสกุล *Amanita* วงศ์ Amanitaceae และเห็ดกลุ่มนี้ส่วนใหญ่พบเป็นเห็ดที่รับประทานได้และรู้จักกันทั่วไป เช่น เห็ดระโงกเหลือง (*Amanita javanica* (Corner & Bas.) T. Oda, Tanaka & Tsuda) เห็ดระโงกขาว (*Amanita princeps* Corner & Bas.) เป็นต้น มีความสำคัญต่อวิถีชีวิตของคนในชุมชนโดยเฉพาะในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ เห็ดรับประทานได้พบในป่าชุมชนหรือป่าโคกในฤดูฝนและได้รับความนิยมในการบริโภคเห็ดป่ามากขึ้นทำให้สามารถสร้างรายได้ในชุมชนได้อีกทางหนึ่ง^[1-4] แต่ในจำนวนเห็ดในสกุล *Amanita* บาง

ชนิดมีพิษทำให้เกิดการเจ็บป่วยกับผู้นำมาบริโภคได้ เช่น เห็ดระงากขาวพิษ (*Amanita exitialis* Zhu L. Yang & T.H. Li) เห็ดระงากดำพิษ (*Amanita brunneitoxicaria* Thongbia, Raspe & K.D. Hyde) ซึ่งเห็ดพิษเหล่านี้พบเจริญปะปนกับเห็ดรับประทานได้ในช่วงฤดูฝนเช่นกัน ดังนั้น ผู้บริโภคเห็ดป่าหรือผู้มีอาชีพเก็บเห็ดป่ามาจำหน่ายจำเป็นต้องรู้จักหรือมีความรู้ในการจำแนกชนิดของเห็ดด้วย เพื่อป้องกันการเจ็บป่วยจากการได้รับสารพิษจากเห็ด^[2,5-6] อย่างไรก็ตาม จากรสชาติของเห็ดระโงกที่มีความอร่อยแล้วเห็ดยังเป็นแหล่งอาหารที่อุดมไปด้วยสารอาหารที่สำคัญหลายชนิด เช่น คาร์โบไฮเดรต โปรตีน กรดอะมิโน เส้นใย

วิตามิน และเกลือแร่ต่าง ๆ เป็นต้น และเห็ดมีปริมาณไขมันค่อนข้างน้อย กลุ่มคนรักสุขภาพจึงนิยมบริโภคเห็ดทดแทนโปรตีนจากเนื้อสัตว์ นอกจากนี้เห็ดยังมีคุณสมบัติที่มีประโยชน์ต่อร่างกายอีกมากมาย เช่น มีสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีคุณสมบัติต้านเซลล์มะเร็ง ป้องกันภาวะไขมันในเลือดสูง ลดระดับน้ำตาลในเลือด ฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ ภูมิคุ้มกันบำบัด และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ เป็นต้น^[7-8]

ดังนั้นการศึกษาวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาศักยภาพในการต้านอนุมูลอิสระและปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม เฟลโวนอยด์ และแทนนินของสารสกัดหยาบจากเห็ดระโงกขาวและเห็ดระโงกเหลืองที่พบในพื้นที่จังหวัดมหาสารคาม ซึ่งเป็นเห็ดที่ได้รับการยอมรับในการรับประทานและมีราคาแพงกว่าเห็ดชนิดอื่นที่เจริญและจำหน่ายในช่วงเวลาเดียวกัน เพื่อเป็นตัวแทนเห็ดกลุ่มนี้ที่คนในชุมชนภาคตะวันออกเฉียงเหนือนิยมรับประทานแม้ว่าจะราคาจะแพงกว่าเห็ดชนิดอื่น และยังเป็นข้อมูลด้านโภชนาการเบื้องต้นที่จะเป็นประโยชน์ต่อผู้นิยมบริโภคเห็ดป่าทั่วไป

ระเบียบวิธีศึกษา

1. อุปกรณ์และสารเคมีสำหรับศึกษา

เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง ตู้อบลมร้อน หม้อนึ่งความดันไอ เครื่องระเหยสารแบบหมุน เครื่องทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง เครื่อง UV-vis Spectrophotometer เครื่อง Microplate Reader เอทานอลร้อยละ 95 เมทานอล น้ำกลั่น ABTS (2, 2-azinobis (3-ethyl-benzothiazoline-6-sulfonic acid) (SIGMA-AIDRICH, China) โซเดียมเปอร์ซัลเฟต อะซิเตตบัฟเฟอร์ เฟอริกคลอไรด์ TPTZ (2,4,6-Tris(2-pyridyl)-s-triazine) (SIGMA-AIDRICH, Switzerland)

กรดไฮโดรคลอริก โซเดียมไบคาร์บอเนต Folin-Ciocalteu's reagent (Merck, Germany) กรดแอสคอร์บิก (ascorbic acid) (SIGMA-AIDRICH, Germany) โทรลอคซ์ (Trolox) (SIGMA-AIDRICH, Switzerland) กรดแทนนิก (tannic acid) (SIGMA-AIDRICH, China) เควอร์ซีติน (quercetin) (SIGMA-AIDRICH, India)

2. ตัวอย่างเห็ดระโงกสำหรับศึกษา

ตัวอย่างเห็ดระโงกขาว และเห็ดระโงกเหลือง ชนิดละ 3 กิโลกรัม โดยซื้อจากตลาดในท้องถิ่น ใกล้ป่าชุมชนโคกหินลาด อำเภอนาคู จังหวัดมหาสารคาม นำตัวอย่างเห็ดระโงกทั้ง 2 ชนิดมาทำการระบุชนิดในห้องปฏิบัติการ และเปรียบเทียบกับลักษณะบรรยายที่สำคัญได้จากเอกสารต่าง ๆ^[1-2,5,7,9-14] ทำการระบุชนิดเห็ดที่ถูกต้องโดย รศ.ขวัญเรือน นาคสุวรรณกุล ภัณฑารักษ์ประจำพิพิธภัณฑ์เห็ดที่มีฤทธิ์ทางยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม นำตัวอย่างเห็ดทั้งสองชนิดล้างให้สะอาด หั่นเป็นชิ้นขนาด 0.2-0.5 เซนติเมตร และนำไปอบให้แห้งในตู้อบด้วยอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

3. นำตัวอย่างเห็ดระโงกไปสกัดด้วยตัวทำละลาย

การสกัดแบบแช่สกัด (maceration) โดยนำเห็ดชิ้นเล็กที่อบแห้งเรียบร้อยแล้วมาชั่งชนิดละ 10 กรัม ใส่ในขวดแก้วและเติมตัวทำละลายเอทานอลร้อยละ 95 ปริมาตร 300 มิลลิลิตร และอีกขวดใส่ตัวทำละลายเมทานอลปริมาตร 300 มิลลิลิตร ปิดฝาให้สนิทและตั้งทิ้งไว้ ที่อุณหภูมิห้อง 24 ชั่วโมง จากนั้นกรองเก็บสารละลายด้วยกระดาษกรอง whatman เบอร์ 1 กากที่เหลือเติมตัวทำละลายและทำซ้ำเหมือนเดิมอีก

2 ครั้ง นำสารที่กรองได้ทั้ง 3 ครั้งมารวมกันและนำไประเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่อง evaporator จากนั้นเก็บไว้ในขวดเก็บสารและนำไปแช่ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส จากนั้นทำให้แห้งด้วยเครื่อง freeze dryer และเก็บสารสกัดหยาบในขวดปิดมิดชิดเพื่อนำไปทดสอบต่อไป

การสกัดแบบต้มด้วยน้ำ (boiling water) นำเห็ดที่อบแห้งเรียบร้อยแล้วมาชั่งชนิดละ 10 กรัม ใส่ในเหยือกสเตนเลสเติมน้ำกลั่นปริมาตร 300 มิลลิลิตร นำไปต้มบน hotplate โดยให้น้ำเดือดที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นกรองเก็บสารละลายด้วยกระดาษกรอง whatman เบอร์ 1 กากที่เหลือนำไปต้มกับน้ำกลั่นและทำซ้ำเหมือนเดิมอีก 2 ครั้ง นำสารที่กรองได้ทั้ง 3 ครั้งมารวมกัน และดำเนินการเช่นเดียวกับการสกัดด้วยเอทอลและเมทานอล

$$\text{ร้อยละของผลผลิต} = \frac{\text{น้ำหนักตัวอย่างหลังการสกัด}}{\text{น้ำหนักตัวอย่างแห้งก่อนการสกัด}} \times 100$$

4. การหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมของสารสกัดหยาบเห็ดระโงกด้วยวิธี Folin-Ciocalteu phenol method^[15]

วิธีการทดสอบดัดแปลงตามวิธีของ Ratana และ Sungthong^[15] เตรียมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนตเข้มข้นร้อยละ 7.5 โดยชั่งโซเดียมคาร์บอเนต 7.5 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรให้ครบ 100 มิลลิลิตร เตรียมสารละลาย Folin-Ciocalteu phenol reagent เข้มข้นร้อยละ 10 โดยผสมสารละลาย Folin-Ciocalteu phenol reagent ปริมาตร 10 มิลลิลิตรกับน้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้ครบ 100 มิลลิลิตร

เตรียมสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิกเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาตร 10 มิลลิลิตร โดยชั่ง

กรดแกลลิก 0.0005 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่นและปรับปริมาตรให้ครบ 10 มิลลิลิตร สร้างกราฟมาตรฐานกรดแกลลิกโดยนำสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิกเข้มข้น 0.05 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มาเจือจางด้วยน้ำกลั่นให้มีความเข้มข้น 0.002, 0.004, 0.006, 0.008, 0.010, 0.012, 0.014, 0.016 และ 0.018 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร การหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมทำได้โดยปิเปตสารละลายปริมาตร 1 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร เติมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนตเข้มข้นร้อยละ 10 ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันแล้วเติมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนตเข้มข้นร้อยละ 7.5 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เขย่าให้สารละลายผสมกันตั้งทิ้งไว้ในที่มืด 30 นาที นำสารละลายไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 740 นาโนเมตร (A740) ด้วยเครื่อง UV-Visible spectrophotometer ทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง แล้วหาค่าเฉลี่ยนำค่าการดูดกลืนแสงและความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิกมาเขียนกราฟมาตรฐานเพื่อเปรียบเทียบปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมในสารสกัดหยาบของเห็ดต่อไป

การวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมในสารสกัดหยาบของเห็ดระโงกขาวและเห็ดระโงกเหลือง โดยเตรียมสารละลายตัวอย่างเห็ดระโงกความเข้มข้น 1 กรัมต่อลิตร ปริมาตร 10 มิลลิลิตร โดยชั่งสารสกัดหยาบเห็ดระโงก 0.01 กรัม ละลายด้วยตัวทำละลายที่ใช้สกัดแล้วปรับปริมาตรให้ครบ 10 มิลลิลิตร นำสารละลายมาเจือจางด้วยน้ำกลั่นให้มีความเข้มข้น 0.1, 0.2 และ 0.3 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร การหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมทำได้โดยปิเปตสารละลายมา 1 มิลลิลิตร ทำตามขั้นตอนเหมือนกับสารมาตรฐานกรดแกลลิกทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง แล้วหาค่าเฉลี่ย แล้วนำค่าการวัดการดูดกลืนแสงที่ได้ไปคำนวณหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมในสาร

สกัดหยาบจากกราฟมาตรฐานกรดแกลลิก

5. การหาปริมาณเฟลโวนอยด์ ด้วยวิธี Aluminium Chloride Colorimetric^[16]

วิธีการทดสอบดัดแปลงตามวิธีของ Daupor, *et al*^[16] เตรียมสารละลายอะลูมิเนียมคลอไรด์เข้มข้นร้อยละ 2 โดยชั่งอะลูมิเนียมคลอไรด์ 2 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรให้ครบ 100 มิลลิลิตร

เตรียมสารละลายมาตรฐานเคอร์ซีตินเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ปิเปตปริมาตร 10 มิลลิลิตร โดยชั่งเคอร์ซีติน 0.001 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรให้ครบ 10 มิลลิลิตร นำสารละลายมาตรฐานเคอร์ซีตินเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มาเจือจางด้วยน้ำกลั่นให้มีความเข้มข้นเป็น 0.005, 0.010, 0.020, 0.040 และ 0.080 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปิเปตปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร โดยแยกแต่ละหลอดทดลอง นำหลอดทุกความเข้มข้นมาเติมอะลูมิเนียมคลอไรด์เข้มข้นร้อยละ 2 ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร นำไปเขย่าให้สารผสมกันด้วยเครื่องผสม ตั้งทิ้งไว้ในที่มืด 30 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 425 นาโนเมตร (A_{425}) นำค่าการดูดกลืนแสงและความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานเคอร์ซีตินมาเขียนกราฟมาตรฐานและหาค่าความชันเพื่อใช้วิเคราะห์ปริมาณเฟลโวนอยด์ในสารสกัดต่อไป

การวิเคราะห์ปริมาณเฟลโวนอยด์ในสารสกัดตัวอย่าง นำสารละลายตัวอย่างความเข้มข้น 1000 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาตร 10 มิลลิลิตร โดยชั่งสารสกัด 0.01 กรัม ละลายตัวทำละลายที่ใช้สกัดแล้วปรับปริมาตรให้ครบ 10 มิลลิลิตร นำสารละลายมาเจือจางด้วยน้ำกลั่นให้มีความเข้มข้นเป็น 0.1, 0.2 และ 0.3 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปิเปตปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร และทำวิธีเหมือนกับสารละลายมาตรฐานเคอร์ซีติน

นำค่าการดูดกลืนแสงและความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานเคอร์ซีตินมาเขียนกราฟมาตรฐานและหาค่าความชันเพื่อใช้วิเคราะห์ปริมาณเฟลโวนอยด์ในสารสกัดต่อไป

6. การหาปริมาณสารประกอบแทนนินด้วยวิธี Folin-Ciocalteu phenol method^[17]

วิธีการทดสอบดัดแปลงตามวิธีของ Cham, *et al*^[17] เตรียมสารละลาย Folin-Ciocalteu phenol reagent ความเข้มข้นร้อยละ 10 โดยผสม Folin-Ciocalteu phenol 10 มิลลิลิตร ในเอทานอลและปรับปริมาตรให้ครบ 100 มิลลิลิตร เตรียมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนตความเข้มข้นร้อยละ 7 โดยการชั่งโซเดียมคาร์บอเนต 7 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 100 มิลลิลิตร เตรียมสารละลายมาตรฐานกรดแทนนิกเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร เตรียมโดยชั่งกรดแทนนิก 0.002 กรัม ละลายในเอทานอลและปรับปริมาตรให้ครบ 10 มิลลิลิตร ในขวดปรับปริมาตร นำสารละลายมาตรฐานกรดแทนนิกเข้มข้น 0.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มาเจือจางด้วยเอทานอลให้มีความเข้มข้นเป็น 0, 0.040, 0.080, 0.120, 0.160 และ 0.200 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปิเปตปริมาตร 1 มิลลิลิตร จากนั้นเติมน้ำกลั่นลงไปในสารละลายมาตรฐานที่เตรียมไว้ 2.5 มิลลิลิตร เติมสารละลาย Folin-Ciocalteu phenol reagent เข้มข้นร้อยละ 10 และเติมโซเดียมคาร์บอเนตร้อยละ 7 ปริมาตร 2 มิลลิลิตร เขย่าให้สารผสมกัน ทิ้งไว้ในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที แล้วนำไปวิเคราะห์ค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดในช่วงความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร (A_{750}) ด้วยเครื่อง UV-vis Spectrophotometer โดยทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง แล้วหาค่าเฉลี่ย

การวิเคราะห์ปริมาณแทนนินในสารสกัดหยาบ

เห็ดระโงก นำสารสกัดตัวอย่างมาตัวอย่างละ 0.01 กรัม มาละลายด้วยตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัด ปริมาตร 10 มิลลิลิตร นำสารสกัดที่เตรียมได้มาเจือจางด้วยตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดให้มีความเข้มข้นเป็น 0, 0.4, 0.8 และ 1.20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปิเปตปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลอง จากนั้นทำตามขั้นตอนการ เตรียมสารละลายมาตรฐานกรดแทนนิก นำค่าการดูดกลืนแสงความยาวคลื่นที่วัดได้ที่ 750 นาโนเมตรของตัวอย่าง หาปริมาณสารประกอบแทนนินจาก กราฟมาตรฐานกรดแทนนิก

7. การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS assay^[18]

วิธีการทดสอบดัดแปลงตามวิธีของ Seekhaw, *et al*^[18] เตรียมสารละลาย ABTS ความเข้มข้น 7 มิลลิโมลาร์ และสารละลายโพแทสเซียมเปอร์ซัลเฟต ($K_2S_2O_8$) ความเข้มข้น 2.45 มิลลิโมลาร์ ผสมกันด้วยอัตราส่วน 1:2 ปั่นทิ้งไว้ 12-16 ชั่วโมง แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงให้อยู่ในช่วง 0.7 ± 0.02 ก่อนนำไปใช้ต่อไป

การเตรียมสารละลายมาตรฐานกรดแอสคอร์บิก และไทรอลอกซ์เข้มข้น 0.05 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 5 มิลลิลิตร เจือจางด้วยเอทานอลให้มีความ

เข้มข้นเป็น 0, 0.005, 0.010, 0.015, 0.020, 0.025 และ 0.030 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปิเปตปริมาตร 20 ไมโครลิตร ใส่ในภาชนะที่ 1 และเตรียมโดยชั่งไทรอลอกซ์ 0.0025 กรัม ละลายในเอทานอลและปรับปริมาตรให้ครบ 5 มิลลิลิตร ในขวดปรับปริมาตร เจือจางด้วยเอทานอลให้มีความเข้มข้น 0, 0.005, 0.010, 0.020, 0.025 และ 0.030 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปิเปตปริมาตร 20 ไมโครลิตร ใส่ในภาชนะที่ 1 จากนั้นเติมสารละลาย ABTS ลงไปในสารละลายมาตรฐานทั้ง 2 ที่เตรียมไว้ 280 ไมโครลิตร เขย่าผสมให้เข้ากัน ทิ้งไว้ในที่มืดเป็นเวลา 4 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นที่วัดได้ที่ 734 นาโนเมตร ทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง แล้วหาค่าเฉลี่ย ด้วยเครื่อง Microplate Reader นำค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นที่วัดได้ที่ 734 นาโนเมตร ทำการคำนวณร้อยละ radical scavenging คำนวณค่าความเข้มข้นของสารที่สามารถยับยั้งปฏิกิริยาไปครึ่งหนึ่ง (IC_{50})

การวิเคราะห์ความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระในสารสกัดหยาบเห็ดระโงก นำสารสกัดมาตัวอย่างละ 0.01 กรัม ละลายด้วยตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดปริมาตร 1 มิลลิลิตร เจือจางด้วยตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดให้มีความเข้มข้นเป็น 0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 และ 2.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปิเปตใส่

ตารางที่ 1 ปริมาณร้อยละของผลผลิตของสารสกัดหยาบเห็ดระโงกขาว (*A. princeps*) และเห็ดระโงกเหลือง (*A. javanica*)

ชนิดเห็ด	ตัวทำละลาย	ลักษณะสีของสารสกัด	ร้อยละผลผลิต
เห็ดระโงกขาว	เมทานอล	สีส้มอมเหลือง	16.50
	เอทานอล	สีเหลืองอมน้ำตาล	9.51
	น้ำร้อน	สีน้ำตาลอมดำ	26.52
เห็ดระโงกเหลือง	เมทานอล	สีส้มอมเหลือง	23.44
	เอทานอล	สีน้ำตาลอ่อน	12.79
	น้ำร้อน	สีน้ำตาลอมดำ	28.97

96 well plate ปริมาตร 20 ไมโครลิตร จากนั้นทำตามขั้นตอนการทดสอบตามวิธีที่ใช้ทดสอบสารละลายมาตรฐานโทรลอคซ์ และกรดแอสคอร์บิก นำค่าการดูดกลืนแสงความยาวคลื่นที่วัดได้ที่ 734 นาโนเมตรทำการคำนวณร้อยละ radical scavenging คำนวณค่าความเข้มข้นของสารที่สามารถยับยั้งปฏิกิริยาไปครึ่งหนึ่ง (IC_{50}) เปรียบเทียบกับสารมาตรฐานกรดแอสคอร์บิก และโทรลอคซ์จากผลการทดลองที่ได้ โดยคำนวณหาร้อยละ radical scavenging จากสมการ

$$\% \text{ Radical scavenging activity} = [A_{\text{control}} - A_{\text{sample}} / A_{\text{control}}] \times 100$$

A_{control} = ค่าการดูดกลืนแสงของ ABTS

A_{sample} = ค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่าง

8. การวิเคราะห์ความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP assay^[19]

วิธีการทดสอบดัดแปลงตามวิธีของ Satsea, et al^[19] การเตรียมสารละลาย FRAP reagent เตรียมเฟอร์ริกคลอไรด์ความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ โดยชั่งเฟอร์ริกคลอไรด์มา 0.054 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร และเตรียมที่พีพีซีความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ โดยชั่งที่พีพีซีมา 0.031 กรัม ละลายในกรดไฮโดรคลอริก 10 มิลลิลิตร (ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส) ผสมเฟอร์ริกคลอไรด์ความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ และที่พีพีซีความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ ด้วยแอซิเตตบัฟเฟอร์ 100 มิลลิลิตร จากนั้นเติมน้ำกลั่น 12 มิลลิลิตร (เก็บที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส) การเตรียมแอซิเตต บัฟเฟอร์ความเข้มข้น 300 มิลลิโมลาร์ pH 3.6 ซึ่งโซเดียมแอซิเตต จำนวน 1.8 กรัม และเติมกรดกลูเซอแอซิติก 8 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 500 มิลลิลิตร ปรับ pH ให้ได้ 3.6 เก็บ

ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส การเตรียมไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 4 มิลลิโมลาร์ปิเปตกรดไฮโดรคลอริก 0.0033 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร เพื่อไปละลายที่พีพีซีความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์

การเตรียมสารมาตรฐานเฟอร์รัสซัลเฟต 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เตรียมโดยชั่งเฟอร์รัสซัลเฟต 0.02 กรัม ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร ในขวดปริมาตร การสร้างกราฟมาตรฐานเฟอร์รัสซัลเฟต นำสารละลายมาตรฐานเฟอร์รัสซัลเฟต 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มาเจือจางด้วยน้ำกลั่นให้มีความเข้มข้นเป็น 0.4, 0.8, 1.2 และ 1.6 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปิเปตใส่ในหลอดทดลอง ปริมาตร 1 มิลลิลิตร นำทุกหลอดมาเติม FRAP reagent 1 มิลลิลิตร ลงในสารละลายมาตรฐานที่เตรียมไว้ ทั้งไว้ 4 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 593 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง UV-Vis spectrophotometer โดยทำการทดลองตัวอย่างละ 3 ครั้ง

การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP ในสารสกัดเห็ดระโงก ซึ่งสารสกัดตัวอย่างมาตัวอย่างละ 0.01 กรัม มาละลายในตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดปริมาตร 10 มิลลิลิตร เจือจางในตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดให้มีความเข้มข้นเป็น 0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 และ 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปิเปตปริมาตร 1 มิลลิลิตรใส่ในหลอดทดลองจากนั้นทำตามขั้นตอนการเตรียมสารมาตรฐานเฟอร์รัสซัลเฟต

9. สถิติสำหรับวิเคราะห์ข้อมูล

การวิเคราะห์ข้อมูลใช้สถิติพื้นฐาน ได้แก่ การหาร้อยละ (%) การหาค่าเฉลี่ย (Mean) การหาค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (S.D.) ด้วยโปรแกรมไมโครซอฟต์เอ็กเซล (microsoft excel) และคำนวณค่าความ

แตกต่างกันมีนัยสำคัญทางสถิติโดยใช้ One-way ANOVA ในโปรแกรม SPSS ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p < 0.05$)

ผลการศึกษา

1. ปริมาณร้อยละของผลผลิต (% yield) ของสารสกัดหยาบเห็ดระโงก

จากขั้นตอนการสกัดสารจากเห็ดระโงกขาวและเห็ดระโงกเหลืองด้วยวิธีการแช่สกัดและการต้มด้วยน้ำร้อน พบว่าปริมาณร้อยละของผลผลิตมากที่สุดคือ สารสกัดเห็ดระโงกเหลืองที่ได้จากการต้มด้วยน้ำร้อนเป็นเวลา 1 ชั่วโมง เท่ากับ 28.97 ส่วนเห็ดระโงกขาวมีปริมาณร้อยละ 26.52 (ตารางที่ 1) ร้อยละของผลผลิตของเห็ดทั้งสองชนิดมีค่ามากที่สุดคือ สารสกัดที่มีตัวทำละลายด้วยน้ำร้อน รองลงมาคือ เมทานอล และเอทานอลตามลำดับ

2. ปริมาณฟีนอลิกรวมของสารสกัดเห็ดระโงก

ผลการวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกรวมของสารสกัดหยาบเห็ดระโงกขาวและเห็ดระโงกเหลือง โดย

เปรียบเทียบกับสารมาตรฐานกรดแกลลิกจากสมการ $y = 50.478x + 0.0082$ ค่า $R^2 = 0.9978$ (ภาพที่ 1 D) คำนวณหาปริมาณฟีนอลิกรวมในหน่วย mg GAE/g extract พบว่าเห็ดระโงกขาวที่สกัดด้วยเอทานอลร้อยละ 95 มีปริมาณฟีนอลิกสูงที่สุดเท่ากับ 18.41 ± 0.13 mg GAE/g รองลงมาคือเห็ดระโงกเหลืองที่สกัดด้วยเมทานอลเท่ากับ 18.01 ± 0.07 mg GAE/g extract (ตารางที่ 2)

3. ปริมาณฟลาวะโนอยด์ของสารสกัดเห็ดระโงก

ผลการทดสอบปริมาณฟลาวะโนอยด์ของสารสกัดหยาบเห็ดระโงกทั้งสองชนิดโดยเปรียบเทียบกับสารมาตรฐานเคอร์ซีตินจากสมการ $Y = 11.027x + 0.0144$ ค่า $R^2 = 0.9978$ (ภาพที่ 1E) คำนวณหาปริมาณฟลาวะโนอยด์ในหน่วย mg QE/g extract พบว่าปริมาณฟลาวะโนอยด์สูงที่สุดพบในสารสกัดหยาบเห็ดระโงกขาวด้วยเอทานอลร้อยละ 95 เท่ากับ 1017.99 ± 8.18 mg QE/g extract และเห็ดระโงกเหลืองที่สกัดด้วยเอทานอลร้อยละ 95 พบว่ามีปริมาณฟลาวะโนอยด์สูงเช่นกันเมื่อเปรียบเทียบกับสารสกัดด้วยตัวทำละลายเมทานอลและน้ำร้อน (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 ปริมาณฟีนอลิกรวม ฟลาวะโนอยด์ และแทนนินของสารสกัดหยาบเห็ดระโงกขาว (*A. princeps*) และเห็ดระโงกเหลือง (*A. javanica*) ในตัวทำละลายที่แตกต่างกัน

ชนิดเห็ด	ตัวทำละลาย	ฟีนอลิกรวม (mg GAE/g extract)	ฟลาวะโนอยด์ (mg QE/g extract)	แทนนิน (mg Tannin acid/g extract)
เห็ดระโงกขาว	เมทานอล	14.29 ± 0.30	999.85 ± 5.83	6.05 ± 30.27
	เอทานอล	18.41 ± 0.13	1017.99 ± 8.18	7.38 ± 0.34
	น้ำร้อน	16.96 ± 0.20	160.74 ± 3.04	13.53 ± 0.45
เห็ดระโงกเหลือง	เมทานอล	18.01 ± 0.07	517.81 ± 7.33	5.84 ± 0.13
	เอทานอล	16.52 ± 0.14	832.99 ± 9.13	5.92 ± 0.39
	น้ำร้อน	17.60 ± 0.27	146.23 ± 5.71	9.27 ± 0.45

4. ปริมาณแทนนินของสารสกัดเห็ดระโงก

ปริมาณแทนนินในเห็ดระโงกวิเคราะห์โดยเปรียบเทียบกับสารมาตรฐานกรดแทนนิกจากสมการ $Y = 6.4667x + 0.0637$ ค่า $R^2 = 0.9905$ (ภาพที่ 1 F) การคำนวณหาปริมาณแทนนินในหน่วย mg Tannic acid/g extract ปริมาณแทนนินสูงพบในสารสกัดด้วยน้ำร้อนทั้งเห็ดระโงกขาวและเห็ดระโงกเหลือง เท่ากับ 13.53 ± 0.45 และ 9.27 ± 0.45 mg Tannic acid/g extract ตามลำดับ (ตารางที่ 2)

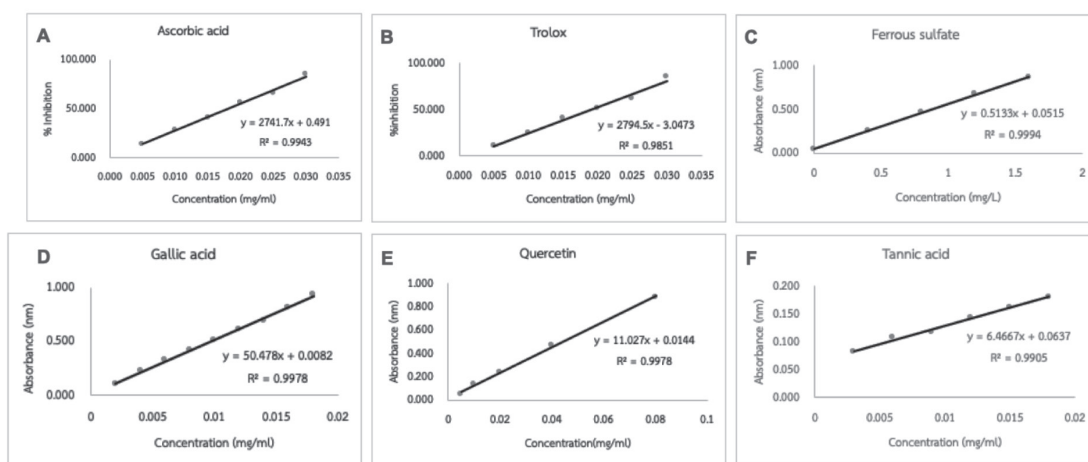
5. การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS assay

ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดเห็ดระโงกขาวและเห็ดระโงกเหลือง เปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน 2 ชนิด ได้แก่ กรดแอสคอร์บิก และโทรลอกซ์ โดยนำค่าการดูดกลืนแสงที่ 734 นาโนเมตร แล้วนำมาคำนวณร้อยละ radical scavenging และค่าความเข้มข้นของสารที่สามารถยับยั้งปฏิกิริยา

ไปครึ่งหนึ่ง (IC_{50}) เปรียบเทียบกับกราฟสารมาตรฐาน กรดแอสคอร์บิก ($IC_{50} = 0.02$ mg/mL) และกราฟสารมาตรฐานโทรลอกซ์ ($IC_{50} = 0.02$ mg/mL) (ภาพที่ 1A & 1B) พบว่าสารสกัดเห็ดระโงกขาวและเห็ดระโงกเหลืองที่สกัดด้วยน้ำร้อนมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระดีที่สุด มีค่าความเข้มข้นของสารที่สามารถยับยั้งปฏิกิริยาไปครึ่งหนึ่ง (IC_{50}) เท่ากับ 1.01 ± 0.09 และ 0.75 ± 0.04 mg/mL ตามลำดับ สารสกัดเห็ดระโงกขาวมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระน้อยกว่า 50 เท่า ส่วนสารสกัดเห็ดระโงกเหลืองมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระน้อยกว่า 37 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน กรดแอสคอร์บิกและโทรลอกซ์ (ตารางที่ 3)

6. การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP assay

ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธีนี้โดยเปรียบเทียบกับสารเฟอร์รัสซัลเฟต (Ferrous sulfate) เป็นสารมาตรฐาน โดยการสร้างกราฟ



ภาพที่ 1 กราฟของสารมาตรฐานที่ใช้ในการเปรียบเทียบ A. กรดแอสคอร์บิก (ascorbic acid) B. โทรลอกซ์ (trolox) C. เฟอร์รัสซัลเฟต (ferrous sulfate) D. กรดแกลลิก (gallic acid) E. เคอร์ควิติน (quercetin) และ F. กรดแทนนิก (tannic acid)

ตารางที่ 3ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบเห็ดระโงกขาว (*A. princeps*) และเห็ดระโงกเหลือง (*A. javanica*) ทดสอบด้วยวิธี ABTS assay และ FRAP assay

ชนิดเห็ด	ตัวทำละลาย	ABTS assay IC ₅₀ (mg/mL)	FRAP assay (mg FeSO ₄ /g extract)
เห็ดระโงกขาว	เมทานอล	2.07 ± 0.03	2791.31 ± 30.69
	เอทานอล	2.37 ± 0.06	3650.67 ± 35.77
	น้ำร้อน	1.01 ± 0.09	418.86 ± 10.31
เห็ดระโงกเหลือง	เมทานอล	1.88 ± 0.02	2672.25 ± 23.41
	เอทานอล	1.55 ± 0.08	2169.78 ± 64.43
	น้ำร้อน	0.75 ± 0.04	508.47 ± 20.62
สารมาตรฐานกรดแอสคอร์บิก		0.02 ± 0.0	
สารมาตรฐานโทรลอคซ์		0.02 ± 0.0	

มาตรฐานเพื่อหาความสัมพันธ์ปริมาณเฟอร์รัสซัลเฟต ในการคำนวณหาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในหน่วย mg FeSO₄/g extract จากผลการทดสอบพบว่าสารสกัดหยาบเห็ดระโงกขาวด้วยตัวทำละลายด้วยเอทานอล ร้อยละ 95 มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเท่ากับ 3650.67 ± 35.77 mg FeSO₄/g extract ส่วนสารสกัดหยาบเห็ดระโงกเหลืองที่สกัดด้วยเมทานอลมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเท่ากับ 2672.25 ± 23.41 mg FeSO₄/g extract (ตารางที่ 3)

อภิปรายผล

จากการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบเห็ดระโงกขาวและเห็ดระโงกเหลือง ฤทธิ์ต้านอนุมูลที่ตีพบในสารสกัดด้วยน้ำร้อนของเห็ดทั้ง 2 ชนิดเมื่อเปรียบเทียบกับค่าความเข้มข้นของสารที่สามารถยับยั้งปฏิกิริยาไปครึ่งหนึ่ง (IC₅₀) กับสารสกัดด้วยเมทานอลและเอทานอล โดยสารสกัดเห็ดระโงกขาวสกัดด้วยน้ำร้อนมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระน้อยกว่า 50 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับสารมาตรฐานกรด

แอสคอร์บิกและโทรลอคซ์ ส่วนสารสกัดเห็ดระโงกเหลืองมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระน้อยกว่า 37.5 เท่า จากการทดสอบด้วยวิธี ABTS assay ส่วนสารสกัดจากเอทานอลเห็ดระโงกเหลืองและเห็ดระโงกขาวมีค่าความเข้มข้นของสารที่สามารถยับยั้งปฏิกิริยาไปครึ่งหนึ่ง (IC₅₀) เท่ากับ 1.55 และ 2.37 mg/mL พบว่ามีประสิทธิภาพใกล้เคียงกับรายงานของ Seekhaw, *et al.*^[18] ที่ศึกษาในเห็ดผึ้ง 4 ชนิด ได้แก่ เห็ดผึ้งเหลือง เห็ดผึ้งน้ำคราม เห็ดผึ้งไซ และเห็ดผึ้งแยะ โดยทำการสกัดด้วยเอทานอลและใช้วิธีทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS เช่นกัน พบว่าเห็ดผึ้งป่าทั้ง 4 ชนิด มีค่าความเข้มข้นของสารที่สามารถยับยั้งปฏิกิริยาไปครึ่งหนึ่ง (IC₅₀) อยู่ในช่วง 1.33 ± 0.07-3.10 ± 0.07 mg/mL ส่วนในรายงานผลการวิจัยของ Taweepanit และ Tumkhom^[20] ทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS ในสารสกัดเห็ดระโงกขาวและเห็ดระโงกแดงด้วยตัวทำละลาย เฮกเซน เอทิลอะซิเตท และเอทานอล แต่มีประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระน้อยกว่าในงานวิจัยครั้งนี้ เนื่องจากผลการวิจัยไม่

สามารถวัดค่าความเข้มข้นของสารที่สามารถยับยั้งปฏิกิริยาไปครึ่งหนึ่ง (IC_{50}) ได้

ส่วนการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP assay โดยใช้สารมาตรฐานเฟอร์รัสซัลเฟต ($FeSO_4$) ซึ่งค่า FRAP value คำนวณเป็นหน่วยมิลลิกรัมสมมูลเฟอร์รัสซัลเฟต/กรัมของสารสกัด พบว่าสารสกัดหยาดเห็ดระโงกขาวที่สกัดด้วยเอทานอลมีค่าการต้านอนุมูลอิสระเท่ากับ 3650.67 ± 35.77 mg $FeSO_4$ /g extract ซึ่งมีค่ามากกว่าสารสกัดด้วยน้ำร้อนถึง 8.7 เท่า (ตารางที่ 3) ส่วนเห็ดระโงกเหลืองที่สกัดด้วยเอทานอลมีค่าการต้านอนุมูลอิสระเท่ากับ 2169.78 ± 64.43 mg $FeSO_4$ /g extract และมีค่ามากกว่าสารสกัดด้วยน้ำร้อน 4.2 เท่า (ตารางที่ 3) มีค่าการต้านอนุมูลอิสระมากกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับสารสกัดหยาดด้วยเอทานอลของเห็ดผึ้ง 4 ชนิด จากจังหวัดเลย^[21] โดยทดสอบด้วยวิธี FRAP เช่นกัน ในสารสกัดเห็ดผึ้งมีค่าเท่ากับ 8.71 ± 0.02 - 33.14 ± 0.29 mg $FeSO_4$ /g extract ส่วนการทดสอบด้วยวิธีนี้จากเห็ดป่าในพื้นที่จังหวัดอุบลราชธานี พบว่าสารสกัดด้วยเอทิลอะซิเตท และเอทานอลของเห็ดห้าพานเท่านั้นที่แสดงค่าต้านอนุมูลอิสระได้ดี^[20]

จากผลการวิจัยครั้งนี้พบว่าสารสกัดเห็ดระโงกขาวและเห็ดระโงกเหลืองที่สกัดด้วยน้ำร้อนแสดงค่าต้านอนุมูลอิสระได้ดีโดยการทดสอบด้วยวิธี ABTS assay อาจเนื่องมาจากมีคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระด้วยการให้อะตอมไฮโดรเจนได้ดีกว่าสารสกัดจากเอทานอล ส่วนค่าต้านอนุมูลอิสระจากค่า FRAP value แสดงผลในทางที่ต่างกัน คือ สารสกัดด้วยเอทานอลมีค่าต้านอนุมูลอิสระได้ดีกว่าสารสกัดด้วยน้ำร้อนของเห็ดระโงกขาวและเห็ดระโงกเหลือง อาจเนื่องมาจากสารสกัดด้วยเอทานอลมีความสามารถในการรีดิวซ์เหล็กได้ดีกว่า และน่าเป็นตัวทำละลายที่

มีขี้มากกว่าเอทานอลและเมทานอล

การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS assay^[21] เป็นการวัดความสามารถในการฟอกสีอนุมูลอิสระเอบีทีเอส ($ABTS^{+•}$, 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6- sulfonic acid) radical) ที่จางลงของการยับยั้งอนุมูลอิสระ $ABTS^{+•}$ และคำนวณเทียบกับสารมาตรฐานโทรลอคซ์ วิธีนี้มีข้อดีคือ $ABTS^{+•}$ สามารถละลายน้ำได้ดีและตัวทำละลายอินทรีย์จึงทำปฏิกิริยาได้อย่างรวดเร็ว และทำปฏิกิริยาได้ดีในช่วง pH กว้าง แต่ก็มีข้อเสียคือ $ABTS^{+•}$ ไม่เป็นสารธรรมชาติที่พบในร่างกายหรือในเซลล์สิ่งมีชีวิต ส่วนการวิเคราะห์ปริมาณของอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP assay^[21] เป็นวิธีตรวจสอบความสามารถในการต้านออกซิเดชันโดยอาศัยปฏิกิริยารีดอกซ์และติดตามการเปลี่ยนแปลงของสีสารประกอบเชิงซ้อน ferric tripyridyltriazine (Fe^{3+} -TPTZ) ได้รับอิเล็กตรอนจากสารต้านออกซิเดชันแล้วจะเปลี่ยนไปอยู่ในรูปสารประกอบเชิงซ้อน ferrous tripyridyltriazine (Fe^{2+} -TPTZ) มีสีม่วงน้ำเงิน และวัดความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระได้ในรูป FRAP value เทียบกับกราฟมาตรฐานของเฟอร์รัสซัลเฟต ($FeSO_4$) วิธีการตรวจสอบนี้เป็นวิธีที่ง่าย ใช้เวลาน้อย มีค่าใช้จ่ายน้อย และทำซ้ำหลายครั้งก็ให้ผลเหมือนเดิม แต่มีข้อเสีย คือ ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นเป็นปฏิกิริยาเคมีไม่เกี่ยวข้องกับสภาวะร่างกาย และต้องใช้น้ำปราศจากไอออน^[21] อย่างไรก็ตามวิธีวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระทั้ง 2 วิธี มีทั้งข้อดีและข้อเสีย แต่เป็นวิธีที่นิยมใช้กันทั่วไปเนื่องจากทำได้ง่าย ไม่ยุ่งยากซับซ้อน และมีค่าใช้จ่ายไม่แพง การวิจัยครั้งนี้ก็เช่นกันเลือกใช้การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS assay และ FRAP assay เนื่องจากเป็นสารสกัดหยาดของเห็ดระโงกที่สกัดด้วยน้ำร้อน

เอทานอลและเมทานอลซึ่งเป็นตัวทำละลายที่มีขั้วปานกลางถึงมีขั้วมาก จึงน่าจะเป็นวิธีที่เหมาะสมในการตรวจสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้

ข้อสรุป

การรับประทานเห็ดระโงกขาวและเห็ดระโงกเหลืองจากป่าธรรมชาติด้วยวิธีการประกอบอาหาร เช่น ต้ม แกง นึ่ง หรือทำให้สุกด้วยการใช้ความร้อน ก็สามารถได้รับปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม เฟลโวนอยด์และแทนนินได้ แม้ว่าจากผลการวิจัยจะพบปริมาณฟีนอลิกรวมและเฟลโวนอยด์รวมน้อยกว่าเมื่อสกัดด้วยเมทานอลและเอทานอล มีเพียงแทนนินเท่านั้นที่พบมากในการสกัดด้วยน้ำร้อน การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS assay ยังพบว่าสารสกัดเห็ดจากน้ำร้อนมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระดีแม้ว่าจะพบฟีนอลิกรวมและเฟลโวนอยด์รวมต่ำ ส่วนการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP พบว่ามีค่าต้านอนุมูลอิสระสูง และพบปริมาณฟีนอลิกรวมและเฟลโวนอยด์สูงในสารสกัดด้วยเอทานอล และเมทานอล มากกว่าสารสกัดด้วยน้ำ อาจเนื่องมาจากสารสกัดของเห็ดระโงกขาว และเห็ดระโงกเหลืองมีความสามารถในการรีดิวซ์เหล็กได้ดีกว่าการให้อะตอมไฮโดรเจน

อย่างไรก็ตาม สารประกอบกลุ่มโพลีฟีนอล มีคุณสมบัติในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ ช่วยบำรุงร่างกาย ป้องกันการเกิดโรคบางชนิด แม้ว่าจากงานวิจัยนี้ตรวจพบในปริมาณที่น้อยแต่ยังสามารถแสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้ดี ดังนั้นการรับประทานเห็ดระโงกนอกจากจะได้ประโยชน์ด้านเป็นอาหารซึ่งเป็นแหล่งโปรตีน ไขมัน แร่ และสารอาหารอื่น ยังได้รับสารประกอบต่าง ๆ เพื่อบำรุงร่างกายและป้องกันโรคได้อีกทางหนึ่ง

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม ที่สนับสนุนทุนสำหรับโครงการทางชีววิทยา และอุปกรณ์ในการทำงานวิจัยประจำปี พ.ศ. 2563 และขอขอบคุณศูนย์เครื่องมือกลาง มหาวิทยาลัยมหาสารคามที่เอื้อเฟื้อเครื่องมือในการปฏิบัติการทดลอง ทำให้โครงการวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี

References

1. Sanoamuang N. Wild mushroom of Thailand: biodiversity and utilization. Bangkok: Universal graphic and trading. 2010; 424 pp. (in Thai)
2. Royal Academy. Edible and poisonous mushrooms in Thailand. The 1st publish, Bangkok: Royal Academy. 1996; 180 pp. (in Thai)
3. Jandrasrikul A. Mushroom in Thailand. Bangkok: Thawattanapanit Co.,Ltd.; 1992. 161 pp. (in Thai)
4. Jandrasrikul A, Suwanarit P, Sangwanit U. Diversity of mushrooms and macrofungi in Thailand. Bangkok: Kasatsart University Press; 2008; 514 pp. (in Thai)
5. Naksuwankul K, Panmen S, Sikaphan S, Leudang S, Nooron N, Thongbor A, Chantharasena C. Handbook of study on morphological characteristics of mushroom, poisonous mushroom and surveillance. Department of Medical Sciences, Ministry of Public Health. 2019. 214 pp. (in Thai)
6. Panmen S, Tongboa A, Jansena C, Sikapan S, Luadung S, Jantaporn S. Poisonous mushroom manual. Department of Medical Science, Ministry of Public Health. 2018; 214 pp. (in Thai)
7. Sangwanit U, Suwanarit P, Payappanon A, Laungsa-ard J, Jandrasrikul A, Sakolrak B. Checklist of biodiversity of mushroom. Biodiversity-Based Economy Development Office (Public Organization). Bangkok: 2013; 374 pp. (in Thai)
8. Department of Thai Traditional and Alternative Medicine, Ministry of Public Health. Healthy mushroom for food, medicine, and economy from traditional knowledge of folk healer. Agricultural cooperative printing demonstrations of Thai Co., Ltd.; 2013. 408 pp. (in Thai)

9. Chandrasrikul A. Mushroom in Thailand. Bangkok: Thaiwatnapanit Co., Ltd.; 1992. 190 pp. (in Thai)
10. Chandrasrikul A, Suwanarit P, Sangwanit U. Biodiversity of Mushroom and Macrofungi in Thailand. Bangkok: Kasetsart University; 2008; 210 pp. (in Thai)
11. The Royal Institute. Mushroom in Thailand, The Royal Institute version 2nd publish. Bangkok: Treefilm Co., Ltd.; 2007. 120 pp. (in Thai)
12. Biodiversity-Based Economy Development Office. List of biological property of microorganism (mushroom). Bangkok: Auksonsiam Publishing; 2009. 520 pp. (in Thai)
13. Chandrasrikul A, Suwanarit P, Sangwanit U, Lumyong S, Payapanon A, Sanoamuang N, Pukahuta C, Petcharat V, Sardud U, Duengkae K, Klinhom U, Thongkantha S, Thongklam S. Checklist of mushrooms (basidiomycetes) in Thailand: Office of Natural Resources and Environmental Policy and Planning. Bangkok: 2011. 230 pp.
14. Sakolrak B, Aryawong J, Duengkae K, Pongpanich K, Himaman W. Agaric: at Kaeng Krachan forest, Chiang Dao Wildlife Sanctuary and Phu Khiao Wildlife Sanctuary. Department of National Parks, Wildlife and Plant Conservation. Bangkok: 2016. (in Thai)
15. Rattana S, Sungthong B. Antioxidant activities and total phenolic contents of methanolic extract from five fragrant flowers. The 12th Mahasarakham University Research Conference; Proceeding. 2016. (in Thai)
16. Daupor H, Saha, A, Chelong A, Meechai A, Waema S. Determination of total flavonoid content from propolis stingless bee and bacterial inhibition of *Escherichia coli* in soap product. The 6th Science and Technology Conference; Proceeding. Fatoni University Yala. 2017. (in Thai)
17. Cham P, Poonsri W, Lichanporn I, Lapsongphon N. Effects of ripening stages and extraction conditions on tannin content of “Namwa” banana peel powder. The 20th National Graduate Research Conference; Proceeding. 2019; 689-95. (in Thai)
18. Seekhaw P, Rachinta S, Thurnakul N, Panitan S. Determination of total phenolic and flavonoid contents, antioxidant and antibacterial activities of four wild edible mushrooms from the community market in Loei Province. PSRU Journal of Science and Technology. 2018;5(3):60-73. (in Thai)
19. Satsea S, Thapphasaraphong S, Dumrongrungrua T. Antioxidant and Collagen Stimulating Activities in Human Gingival Fibroblast Cell Culture of Plant Extracts. Isan Journal of Pharmaceutical Science. 2014;(9) (Suppl.):38-43. (in Thai)
20. Taweepanit S, Tumkhom P. Antioxidant activity and total phenolic content of wild edible mushroom extracts in Ubonratchathani Province. Proceedings UBRC 7th. 2013. 27-35. (in Thai)
21. Phansawan B. Free radicals, antioxidants and antioxidant activity determination. Journal of Science and Technology. 2013;21(3):275-86. (in Thai)
22. Boonsong S, Klaypradit W, Wiliapun P. Antioxidant activity of extracts from five edible mushrooms using different extractants. Agriculture and Natural Resources. 2016;50:89-97.