

การประเมินคุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระและสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ
จากสารสกัดเปลือกส้มโอในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ทางเครื่องสำอาง

EVALUATION OF ANTIOXIDANT PROPERTIES
AND BIOACTIVE COMPOUND FROM POMELO (*Citrus grandis* (L.) Osbeck)
PEEL IN ANTIMICROBIAL FOR COSMETIC PRODUCTS

จิตรวดี ตั้งหิรัญรัตน์^{1*}, ขวัญจิต อิศระสุข², ปิยนุช พรหมภมร³, นิสฎา อิมเสถียร⁴ และ ณัฐรุต ศรีบุรินทร์⁵

^{1*, 2, 3}หลักสูตรวิทยาศาสตรเครื่องสำอาง คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยสวนดุสิต กรุงเทพมหานคร 10700

^{4, 5}ศูนย์เครื่องมือปฏิบัติการวิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยสวนดุสิต กรุงเทพมหานคร 10700

Jittarawadee Tanghiranrat^{1*}, Khwunjit Itsarasook², Piyanuch Promphamorn³,
Nisada Imsathian⁴ and Nuttarut Sriburin⁵

^{1*, 2, 3}Department of Cosmetic Science, Faculty of Science and Technology, Suan Dusit University,
Bangkok, 10700

^{4, 5}Scientific Equipment Center, Faculty of Science and Technology, Suan Dusit University,
Bangkok, 10700

*E-mail: jittarawadee.19@gmail.com

Received: 2019-01-10

Revised: 2019-03-12

Accepted: 2019-07-08

บทคัดย่อ

การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดเปลือกส้มโอพันธุ์ขาวน้ำผึ้ง โดยเปรียบเทียบปัจจัยด้านความเข้มข้นของสารละลายเอทานอล (80, 90 และ 95 %,v/v) และอุณหภูมิการสกัด (60 และ 80 °C) ที่มีผลต่อประสิทธิภาพการต้านออกซิเดชันและปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพแล้วจึงนำไปทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ของสารสกัดสำหรับประสิทธิภาพการต้านออกซิเดชันทดสอบด้วยวิธี DPPH assay และ FRAP assay ตรวจสอบปริมาณฟลาโวนอยด์รวม และปริมาณฟีนอลิกรวม ผลการทดลองพบว่าความเข้มข้นของตัวทำละลายและอุณหภูมิในการสกัดมีผลต่อประสิทธิภาพการต้านออกซิเดชันและปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ โดยสภาวะที่เหมาะสมที่สุด คือ ความเข้มข้นเอทานอล 90 %,v/v และอุณหภูมิในการสกัด 80 °C เนื่องจากได้สารสกัดที่มีกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระสูงสุด

(ค่า $EC_{50} = 2.53 \text{ mg } EC_{50}/\text{g crude extract}$ และ FRAP value = 8.78 mg TE/g crude extract) และได้ปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพสูง (ฟลาโวนอยด์รวม = 8.84 mg CE/g crude extract และปริมาณฟีนอลิกรวม = 6.89 mg GAE/g crude extract) เมื่อนำสารสกัดดังกล่าวมาทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ทางเครื่องสำอางโดยวิธี Agar well diffusion พบว่าสามารถยับยั้งเชื้อ *Aspergillus niger* ได้สูงสุดรองลงมา คือ *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*, *Pseudomonas aeruginosa* และ *Escherichia coli* มีโซนการยับยั้งเท่ากับ 23, 12.33±0.58, 11.33±0.58, 9±1.00 และ 7.67±0.58 ตามลำดับ ดังนั้นสารสกัดจากเปลือกส้มโอจึงมีศักยภาพในการนำมาประยุกต์ใช้เป็นสารกันเสียจากธรรมชาติได้

คำสำคัญ: การต้านอนุมูลอิสระ สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ เปลือกส้มโอ การยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์

ABSTRACT

The objectives of this study were to evaluate the optimum condition for extraction of pomelo peel “Kao Nam Pueng” by varied two factors including ethanol concentration (80, 90 and 95%,v/v) and macerated temperature (60 and 80 °C), on antioxidant activities and bioactive compounds contents. Then, the antimicrobial activity of crude extract obtained from the optimum condition was evaluated DPPH assay, FRAP assay, total flavonoid content and total phenolic content, the results showed that ethanol concentration and macerated temperature affecting antioxidant activities and bioactive compounds efficacy, by optimum condition were 90%,v/v of ethanol concentration and 80 °C of macerated temperature due to highest antioxidant activities (EC_{50} value = 2.53 mg $EC_{50}/\text{g crude extract}$ and FRAP value = 8.78 mg TE/g crude extract) and highest bioactive compounds (total flavonoid content = 8.84 mg CE/g crude extract and total phenolic content = 6.89 mg GAE/g crude extract). Evaluated antimicrobial activity for cosmetic product by agar well diffusion method, found that highest inhibit *Aspergillus niger* followed were *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli* inhibition zone were 23, 12.33±0.58, 11.33±0.58, 9±1.00 and 7.67±0.58 mm respectively. Therefore, pomelo peel extract has the potential to be applied as a natural preservative.

Keywords: Antioxidant activities, Bioactive compounds, Pomelo peel, Antimicrobial activity

บทนำ

การปนเปื้อนของจุลินทรีย์ในเครื่องสำอางสามารถเกิดขึ้นได้ 2 ทาง ได้แก่ ระหว่างขั้นตอนการผลิต และระหว่างการใช้เครื่องสำอาง เชื้อจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนในเครื่องสำอางอาจเป็นเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค เชื้อจุลินทรีย์ฉวยโอกาส รวมทั้งเชื้อจุลินทรีย์ไม่ก่อโรค ซึ่งการเจริญของจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนในเครื่องสำอางสามารถทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติทางเคมี และลักษณะทางกายภาพของผลิตภัณฑ์ได้ ส่งผลให้เกิดการสูญเสียคุณลักษณะของเครื่องสำอาง นอกจากนี้ยังทำให้ผู้บริโภคมีความเสี่ยงต่อการติดเชื้อจุลินทรีย์ทางเครื่องสำอางที่พบได้บ่อย ได้แก่ *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* และ *Aspergillus niger* ดังนั้นการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์จึงเป็นปัญหาหนึ่งที่มีความสำคัญมากในอุตสาหกรรมเครื่องสำอาง การใช้สารกันเสียจึงเป็นอีกวิธีหนึ่งที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ได้ โดยการใช้สารสกัดจากธรรมชาติซึ่งเป็นอีกหนทางเลือกเพื่อเพิ่มความปลอดภัยให้กับผู้บริโภค ได้มีรายงานการวิจัยหลายฉบับที่ได้ศึกษาสารสกัดจากเปลือกส้มโอว่ามีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์บางชนิด เช่นงานวิจัยของ Suklampoo et al. (2012) ได้ศึกษากิจกรรมต้านจุลินทรีย์ของสารสกัดหยาบจากเปลือกส้มโอพันธุ์ขาวใหญ่ และพันธุ์ทองดีพบว่ามีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคทั้ง 6 ชนิด คือ *Bacillus cereus* TISTR 5040, *Bacillus subtilis* TISTR 6633, *Listeria monocytogenes* DMST 17256, *Staphylococcus aureus* TISTR 118, *Escherichia coli* ATCC 25922 และ *Salmonella* Typhimurium DMST 0562 ด้วยวิธี Disk diffusion ในปี 2013 ได้ศึกษาการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์จากสารสกัดจากเปลือกส้มโอด้วยวิธี Agar disc diffusion พบว่าสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ ได้แก่ *Staphylococcus aureus* MTCC 3160, *Salmonella* Typhi MTCC 3215 และ *Escherichia coli* MTCC 40 และมีค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ (Minimum inhibitory concentration, MIC) อยู่ระหว่าง 12.5-200 mg/ml ตามลำดับ (Arumugam et al., 2013) จะเห็นได้ว่าสารสกัดจากเปลือกส้มโอสามารถยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ได้เนื่องจากเปลือกส้มโอยังพบองค์ประกอบของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ได้แก่ แคโรทีนอยด์ วิตามินอี ฟลาโวนอยด์ ไลโมนอยด์ องค์ประกอบของฟีนอลิก ลิกลิน ไฟเบอร์ เพกทิน และน้ำมันหอมระเหย (Chen et al., 2016) มีหน้าที่เป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่สำคัญโดยพบสารประกอบฟีนอล เช่น ปริมาณฟีนอลิก ปริมาณฟลาโวนอยด์อยู่เป็นจำนวนมากซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Turapra et al. (2016) ได้วิเคราะห์ปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของส้มโอ 3 สายพันธุ์ ได้แก่ สายพันธุ์ทับทิมสยาม สายพันธุ์ทองดี และสายพันธุ์ขาวน้ำผึ้ง พบว่าเปลือกนอกสุด (Flavedo) จากส้มโอทั้ง 3 สายพันธุ์ มีปริมาณฟีนอลิกสูงโดยมีค่าเท่ากับ 14.20 ± 0.38 , 12.74 ± 0.24 และ 10.20 ± 0.20 mg/g extract ตามลำดับ และในปีเดียวกัน Fidrianny et al. (2016) ได้ศึกษาเปลือกส้มโอโดยใช้ตัวทำละลายเอทานอล เฮกเซน และเอทิลอะซิเตทในการสกัดเปลือกส้มโอเพื่อหาปริมาณฟลาโวนอยด์ พบว่าการสกัดด้วยตัวละลาย

เอทิลอะซิเตทให้ปริมาณฟลาโวนอยด์มากที่สุดรองลงมาคือเฮกเซน และเอทานอล มีค่าเท่ากับ 5.69, 3.31 และ 1.17 g Quercetin/100 g ตามลำดับ องค์ประกอบของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในเปลือกส้มโอเหล่านี้เมื่อนำมาทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสามารถยับยั้งการเกิดออกซิเดชันโดยการศึกษารสชาติจากเปลือกและเนื้อของผลส้มโอเพื่อดูฤทธิ์การต้านออกซิเดชันด้วยวิธี FRAP assay และวัดปริมาณการยับยั้งการออกซิเดชันโดยวิธี Trolox equivalent antioxidant capacity เพื่อหาค่า TEAC values พบว่าเปลือกของส้มโอให้ค่า FRAP และ TEAC values สูงกว่าส่วนเนื้อ โดยในส่วนเปลือกมีค่าเท่ากับ 1.01 ± 0.08 mM Fe²⁺/100 g of fresh weight และ 1.49 ± 0.02 mM Fe²⁺/100 g of fresh weight (Toh et al., 2013) เช่นเดียวกับงานวิจัยของ Pichaiyongvongdee et al. (2014) ได้ศึกษาเปลือกส้มโอส่วนของเปลือกนอก (Flavedo) ทั้ง 7 สายพันธุ์โดยได้วิเคราะห์ฤทธิ์ต้านออกซิเดชันด้วยวิธี DPPH assay และ FRAP assay พบว่าสายพันธุ์ทองดีให้ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงสุด รองลงมาคือสายพันธุ์ท่าข่อย และสายพันธุ์ขาวน้ำผึ้งซึ่งมีค่า DPPH ร้อยละ 70.14 ± 2.48 , 61.28 ± 2.43 และ 56.42 ± 6.05 ตามลำดับ ส่วนค่า FRAP สายพันธุ์ขาวน้ำผึ้งให้ค่า FRAP สูงกว่าสายพันธุ์ท่าข่อยซึ่งมีค่าเท่ากับ 1227.13 ± 15.95 , 1107.40 ± 8.650 และ 1098.07 ± 9.180 mg TE/100 ml ตามลำดับ

งานวิจัยนี้สังเกตเห็นประโยชน์จากเปลือกส้มโอถือได้ว่าเป็นการลดวัสดุทางการเกษตรและของเหลือใช้ทางการเกษตรโดยทำการศึกษารสชาติจากเปลือกส้มโอที่ระดับความเข้มข้นของสารละลายเอทานอล และอุณหภูมิการสกัดที่แตกต่างกันทดสอบการยับยั้งอนุมูลอิสระ และประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์เพื่อใช้เป็นแนวทางในการพัฒนาเป็นสารกันเสียจากธรรมชาติทางเครื่องสำอางในการทดแทนสารกันเสียสังเคราะห์ได้

วิธีการ

1. การเตรียมผงเปลือกส้มโอเพื่อใช้ในการสกัดเปลือกส้มโอ

เปลือกส้มโอที่ใช้ในการศึกษาคือ สายพันธุ์ขาวน้ำผึ้ง จากจังหวัดนครปฐมมีน้ำหนักเปลือกส้มโอ 20 กิโลกรัมปอกเปลือกและล้างทำความสะอาดเปลือกของส้มโอ (Flavedo) ซึ่งจะมีสีเหลืองปนเขียว จากนั้นใช้มีดตัดส่วนชั้นที่เป็นฟองน้ำสีขาว (Albedo) ออก และหั่นเปลือกส้มโอเป็นชิ้นเล็ก ๆ ทำให้แห้งด้วยตู้อบลมร้อน (ยี่ห้อ Memmert ประเทศเยอรมัน) ที่อุณหภูมิ 60 ± 2 °C จนกว่าจะแห้ง จากนั้นนำมาบดด้วยเครื่องบดแบบละเอียด (ยี่ห้อ Ausa, ประเทศไทยหัวน) ผงเปลือกส้มโอที่ได้ใส่ในถุงออลูมิเนียมฟอยล์แบบซิปล็อค เก็บไว้ในโถดูดความชื้นที่อุณหภูมิห้อง (25 ± 2 °C) (Zarina & Tan, 2013) เพื่อนำวัตถุดิบใช้ในการวิเคราะห์ขั้นต่อไป

2. การสกัดเปลือกส้มโอสำหรับวิเคราะห์สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ

ดัดแปลงตามวิธีของ Suklampoo et al. (2012) และ Toh et al. (2013) ดังนี้ นำผงเปลือกส้มโอ 50 g ผสมกับสารละลายเอทานอล (บริษัท เอสเอ็นพีเอนเนอรัล เทคดิง จำกัด

ประเทศไทย) ปริมาตร 500 ml ที่ความเข้มข้นของเอทานอล : น้ำ ระดับต่าง ๆ ได้แก่ 95 : 5 (0.95 : 0.05), 90 : 10 (0.9 : 0.1) และ 80 : 20 (0.8 : 0.2) บรรจุในขวดรูปชมพู่ขนาด 1,000 ml ปิดปากขวดด้วยอะลูมิเนียมฟอยล์ จากนั้นนำไปแช่ในอ่างควบคุมอุณหภูมิแบบเขย่าที่ระดับอุณหภูมิแตกต่างกัน ได้แก่ 60 และ 80 °C ใช้เวลาในการสกัด 2 ชั่วโมง จากนั้นนำตัวอย่างมากรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 (Whatman No.1) นำสารสกัดที่ได้ไประเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่อง Rotary Vacuum Evaporator (ยี่ห้อ BUCHI รุ่น R-205/V ประเทศสวิตเซอร์แลนด์) ที่อุณหภูมิ 50 ± 2 °C สุดท้ายเก็บสารสกัดที่ได้ใส่ในขวดสีชาที่มีฝาปิดสนิท และเก็บที่อุณหภูมิ -15 °C จนกว่าจะทำการวิเคราะห์

3. ศึกษาองค์ประกอบฤทธิ์ทางชีวภาพ และการต้านออกซิเดชันของสารสกัดจากเปลือกส้มโอ

3.1 การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านออกซิเดชันด้วยวิธี DPPH assay

การทดสอบฤทธิ์สารต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH radical scavenging assay ดัดแปลงตามวิธีของ Ratanasiriwat et al. (2017) และ Turapra et al. (2016) โดยเตรียมสารละลาย DPPH (2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl) ความเข้มข้น 2 mM โดยชั่ง DPPH 0.0078 g ละลายในเมทานอล 100 ml ทำการทดสอบโดยเตรียมสารตัวอย่างและสารละลายมาตรฐานวิตามินซีความเข้มข้นในช่วง 0.023-3 mg/ml ปิเปตสารตัวอย่างหรือสารละลายมาตรฐานวิตามินซีแต่ละความเข้มข้นโดยผสมสารละลายตัวอย่างปริมาตร 75 μ l กับสารละลาย DPPH ปริมาตร 150 μ l ผสมให้เข้ากันทิ้งไว้ในที่มืด 30 นาที นำตัวอย่างไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 515 นาโนเมตรด้วยเครื่องไมโครเพลทรีดเดอร์ (Microplate reader) (ยี่ห้อ biochrom, รุ่น EZ read 2000 ประเทศสหรัฐอเมริกา) บันทึกค่าการดูดกลืนแสง และนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ได้จากสมการ

$$\% \text{ DPPH radical scavenging activity} = \frac{(A_{\text{control}} - A_{\text{sample}})}{A_{\text{control}}} \times 100$$

เมื่อ A_{control} = ค่าการดูดกลืนแสงของปฏิกิริยาควบคุม (ประกอบด้วยสารทั้งหมดยกเว้นตัวอย่างการทดสอบ)

A_{sample} = ค่าการดูดกลืนแสงจากปฏิกิริยาของสารตัวอย่างทดสอบ

จากนั้นคำนวณหาค่าการก่อกำจัดอนุมูลอิสระได้ 50% (Half maximal effective concentration, EC50) โดยใช้โปรแกรม Pad Prism Graph Pad Software ประเทศสหรัฐอเมริกา)

3.2 การทดสอบความสามารถของสารต้านอนุมูลอิสระในการให้อิเล็กทรอนิกส์ด้วยวิธี

FRAP assay

การทดสอบด้วยวิธี FRAP (Ferric reducing antioxidant power) assay เป็นวิธีที่อ้างอิงมาจากดัดแปลงตามวิธีของ Ratanasiriwat et al. (2017) และ Turapra et al. (2016) โดยเตรียมสารละลาย Ferric chloride solution โดยผสมสารละลาย Acetate buffer pH 3.6 ปริมาตร 2.5 ml กับ Ferric chloride solution ปริมาตร 1.25 ml และสารละลาย TPTZ (2,4,6-Tris (2-pyridyl)-1,3,5-triazine) ปริมาตร 1.25 ml ให้เข้ากันในอัตราส่วน 10:1:1 ในปริมาตร 3 ml ก่อนนำไปอุ่นที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 30 นาที ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ เตรียมสารละลายมาตรฐาน Trolox ให้มีความเข้มข้น 0.019–2.5 mg/ml ทำการทดสอบโดยปิเปตสารละลายมาตรฐาน Trolox แต่ละความเข้มข้นหรือสารสกัดปริมาตร 50 µl กับสารละลาย FRAP reagent ปริมาตร 150 µl ใส่ใน 96-well plate และตั้งทิ้งไว้ในที่มืดที่อุณหภูมิห้องนาน 30 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องไมโครเพลทรีดเดอร์ที่ความยาวคลื่น 593 นาโนเมตรวิเคราะห์หาความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระโดยใช้ Trolox เป็นกราฟมาตรฐานและแสดงผลในหน่วย mg Trolox Equivalent (TE)/g crude extract

3.3 ปริมาณฟลาโวนอยด์รวม

การวัดปริมาณฟลาโวนอยด์รวม (Total flavonoid content) ของสารสกัดเปลือกส้มโอโดยวิธี Aluminium chloride colorimetry ตามวิธีของ Zhishen et al. (1999) การวัดปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ทำได้โดยเตรียมสารละลายมาตรฐานคาเทชินที่ความเข้มข้นในช่วง 0.0008–0.1 mg/ml เตรียมสารสกัดที่ความเข้มข้น 10 mg/ml ปิเปต $AlCl_3$ ปริมาตร 100 µl จากนั้นเติมสารสกัดที่ปริมาตร 100 µl ตั้งทิ้งไว้ในที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที จากนั้นวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องไมโครเพลทรีดเดอร์ที่ความยาวคลื่น 415 นาโนเมตร นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้จากสารสกัดจากเปลือกส้มโอมาเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน คาเทชิน (Catechin Equivalent, CE) และคำนวณปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์รวม แสดงผลในหน่วย mg Catechin Equivalent (CE)/g crude extract

3.4 ปริมาณฟีนอลิกรวม

การวัดปริมาณฟีนอลิกรวม (Total phenolic content) ของสารสกัดเปลือกส้มโอโดยวิธี Folin-Ciocalteu colorimetry ดัดแปลงตามวิธีของ Ratanasiriwat et al. (2017) และ Turapra et al. (2016) การวัดปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมทำได้โดยเตรียมสารละลายมาตรฐาน Gallic acid ที่ความเข้มข้นในช่วง 0.016–1.00 mg/ml และเตรียมสารสกัดเปลือกส้มโอความเข้มข้น 10 mg/ml ปิเปตสารละลายมาตรฐาน Gallic acid แต่ละความเข้มข้นหรือสารสกัดจากเปลือกส้มโอปริมาตร 100 µl เติมในสารละลาย Folin-ciocalteu ปริมาตร 100 µl ลงในหลอดทดลอง แล้วบ่มในที่มืดทิ้งไว้ 6 นาที จากนั้นเติมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนตร้อยละ 7.5

น้ำหนักต่อปริมาตรปริมาตร 1,000 μ l หลังจากนั้นปิเปตลงใน 96 Well plate บ่มในที่มืดไว้ 90 นาทีที่อุณหภูมิห้องนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องไมโครเพลทรีดเดอร์ที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตรนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้จากสารสกัดจากเปลือกส้มโอมาเทียบกับกราฟมาตรฐานของ Gallic acid (Gallic Acid Equivalent, GAE) แล้วนำมาคำนวณปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม แสดงผลในหน่วย mg GAE /g crude extract

4. การเตรียมเชื้อจุลินทรีย์

การเพาะเลี้ยง *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Candida albicans* ATCC 10231, *Escherichia coli* ATCC 25922 และ *Aspergillus niger* ATCC 16404 โดยเชื้อแบคทีเรียให้เลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว Mueller Hinton Broth (MHB) และบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สำหรับเชื้อยีสต์และราให้เลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว Sabouraud Dextrose Broth (SDB) บ่มที่อุณหภูมิ 25 °C เป็นเวลา 48 ชั่วโมงสำหรับเชื้อ *Candida albicans* และ 7 วัน สำหรับเชื้อ *Aspergillus niger* จากนั้นนำไปวัดความขุ่นด้วยเครื่องไมโครเพลทรีดเดอร์ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตรให้มีค่า absorbance อยู่ที่ 0.3 (จำนวนเซลล์ 10^8 CFU/ml)

5. การประเมินฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดเปลือกส้มโอด้วยวิธี Agar well diffusion

ดัดแปลงจากวิธีของ Ahmed & Beg (2001) โดยนำเชื้อแบคทีเรียมาเลี้ยงในอาหาร Mueller Hinton Broth (MHB) ส่วนเชื้อยีสต์และราเลี้ยงในอาหาร Sabouraud dextrose broth (SDB) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นปรับค่าความขุ่นของเชื้อให้เท่ากับ McFarland No. 0.5 แล้วทำการเจือจาง 10 เท่าเพื่อให้มีจำนวนจุลินทรีย์เท่ากับ 1.5×10^7 CFU/ml จากนั้นใช้ไม้พันสำลี (Cotton swab) ที่ฆ่าเชื้อแล้วจุ่มลงไปในการละลายของเชื้อที่เตรียมไว้ กดและบิดไม้พันสำลีกับข้างหลอด แล้วกระจายเชื้อให้ทั่วผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อด้วยวิธี Three dimension swab ทิ้งไว้ประมาณ 3-5 นาที โดยเชื้อแบคทีเรียใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ Mueller Hinton Agar (MHA) ยีสต์และราเลี้ยงในอาหาร Sabouraud dextrose Agar (SDA) จากนั้นทำการเจาะอาหารเลี้ยงเชื้อด้วย Steriled cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 mm เตรียมสารสกัดจากเปลือกส้มโอความเข้มข้นที่ 200-600 mg/ml ด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อและ DMSO ความเข้มข้น 1% ปิเปตสารสกัดลงไปในหลุมที่เจาะเอาไว้ ปริมาตร 40 μ l ต่อหลุม ใช้ตัวทำละลายที่ไม่ใส่สารสกัดเป็น Negative control และใช้ Phenoxyethanol ความเข้มข้น 0.5 mg/ml เป็น Positive control จากนั้นนำจานอาหารไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 16 ชั่วโมง แล้วนำไปวัดบริเวณการยับยั้ง (Inhibition zone) แต่ละการทดลองทำซ้ำ 3 ครั้งและนำค่าที่ได้มาหาค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

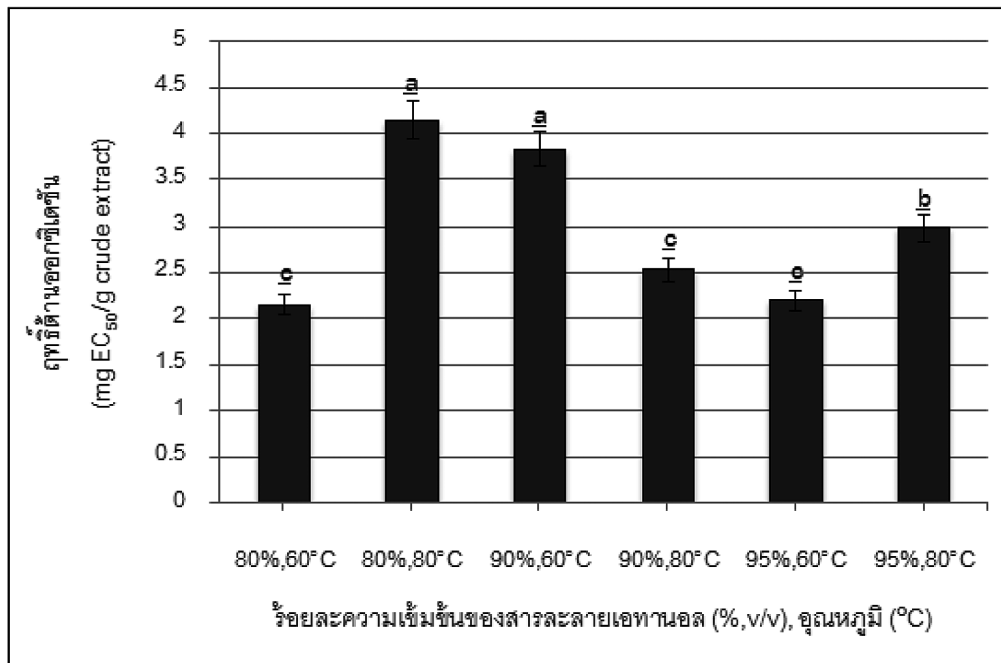
6. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

การวิเคราะห์ทางสถิติ (Statistical analysis) ในการทดลองทำการทดลองซ้ำตัวอย่างละ 3 ครั้ง ($n = 3$) แสดงผลในรูปค่าเฉลี่ยค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ($\text{mean} \pm \text{SD}$) วิเคราะห์ความแปรปรวน (analysis of variance; ANOVA) และเปรียบเทียบความแตกต่างค่าเฉลี่ยโดยใช้ Duncan's new multiple range test ที่ระดับความความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน ปริมาณฟลาโวนอยด์รวม และปริมาณฟีนอลิกรวมของสารสกัดจากเปลือกส้มโอพันธุ์ขาวน้ำผึ้งที่ระดับความเข้มข้นของสารละลายเอทานอลและอุณหภูมิในการสกัดแตกต่างกัน

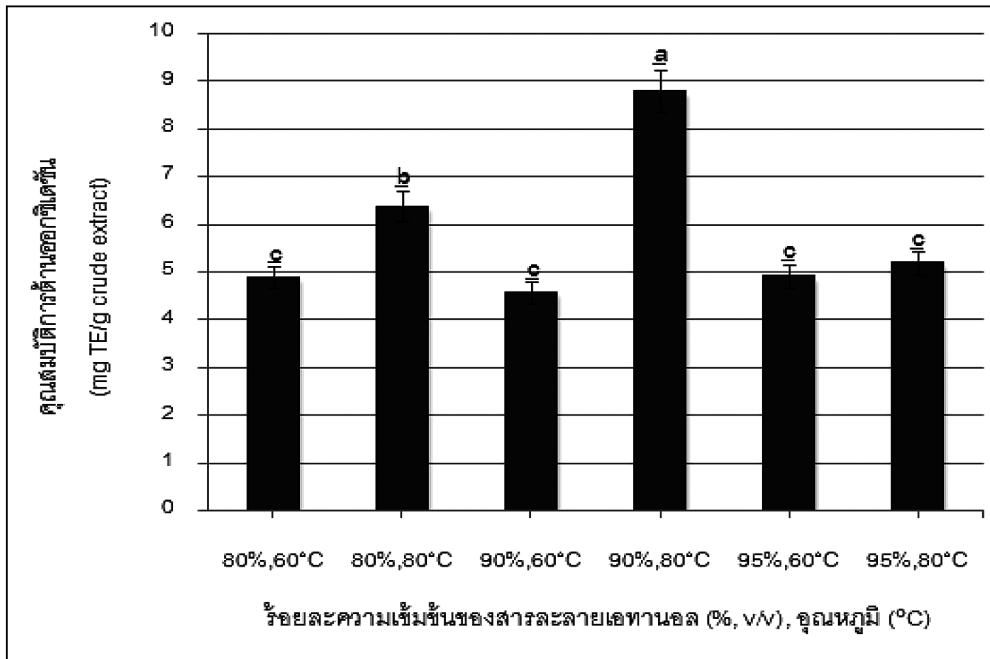
จากการศึกษาเบื้องต้นพบว่าปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อลักษณะเฉพาะทางชีวภาพและทางกายภาพ คือ ความเข้มข้นของตัวทำละลายและอุณหภูมิการสกัด จากนั้นศึกษาสภาวะการสกัดเปลือกส้มโอที่เหมาะสม โดยตัวแปรต้น คือ ระดับความเข้มข้นของตัวทำละลายเอทานอลอยู่ในช่วงร้อยละ 80, 90 และ 95 %,v/v อุณหภูมิการสกัดอยู่ในช่วง 60 และ 80 °C และตัวแปรตาม คือ สมบัติการต้านออกซิเดชัน ปริมาณฟลาโวนอยด์รวม และปริมาณฟีนอลิกรวมเมื่อทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชันด้วยวิธี DPPH ซึ่งแสดงผลเป็นความเข้มข้นที่สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระได้ 50% (Half maximal effective concentration; EC_{50}) (ภาพที่ 1) ผลการทดลองพบว่าความเข้มข้นของสารละลายเอทานอลและอุณหภูมิการสกัดส่งผลโดยตรงต่อค่า EC_{50} โดยช่วงอุณหภูมิการสกัดช่วง 60 °C มีค่า EC_{50} ระหว่าง 2.15 – 3.84 mg EC_{50} /g crude extract เมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้นเป็น 80 °C มีค่าระหว่าง 2.53 – 4.15 mg EC_{50} /g crude extract แสดงว่าความเข้มข้นของสารละลายเอทานอลและอุณหภูมิการสกัดมีผลต่อค่า EC_{50} อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) ซึ่งปริมาณสารสกัดเปลือกส้มโอที่ความเข้มข้นของสารละลายเอทานอล 80 %,v/v อุณหภูมิการสกัด 60 °C มีฤทธิ์การต้านออกซิเดชันที่สูงรองลงมาคือความเข้มข้นของสารละลายเอทานอล 95 %,v/v อุณหภูมิการสกัด 60 °C และความเข้มข้นของสารละลายเอทานอล 90 %,v/v อุณหภูมิการสกัด 80 °C เมื่อพิจารณาจากภาพที่ 1 จะเห็นว่าค่า EC_{50} มีความแตกต่างกันซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Liu et al. (2012) ได้ศึกษาอุณหภูมิการให้ความร้อนกับเปลือกตระกูลส้มโดยการอบแห้งพบว่าเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นจะทำให้ความเข้มข้นที่สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระได้ 50% (EC_{50}) ลดลงเนื่องจากความร้อนส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงของเยื่อหุ้มเซลล์ของพืชซึ่งอาจเป็นสาเหตุให้ความสามารถของการต้านอนุมูลอิสระมีค่าลดลง นอกจากนี้อุณหภูมิที่สูงขึ้นจะเพิ่มความสามารถในการละลายของตัวทำละลายและเพิ่มประสิทธิภาพในการสกัดเช่นกัน นั่นหมายความว่าค่า EC_{50} ที่ต่ำจะบ่งบอกถึงค่าการต้านอนุมูลอิสระที่สูงขึ้น (Tananuwig & Tewaruth, 2010)



ภาพที่ 1 ฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน (ค่า EC₅₀) ที่ระดับความเข้มข้นของสารละลายเอทานอล และอุณหภูมิในการสกัดต่าง ๆ ในสารสกัดจากเปลือกส้มโอ

หมายเหตุ: ข้อมูลแสดงในรูปแบบของค่าเฉลี่ย (Mean)± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Standard deviation, SD) ทำการทดลอง 3 ซ้ำ (n = 3) โดยตัวอักษร^{a-c} มีความแตกต่างกันในคอลัมน์ คือ แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

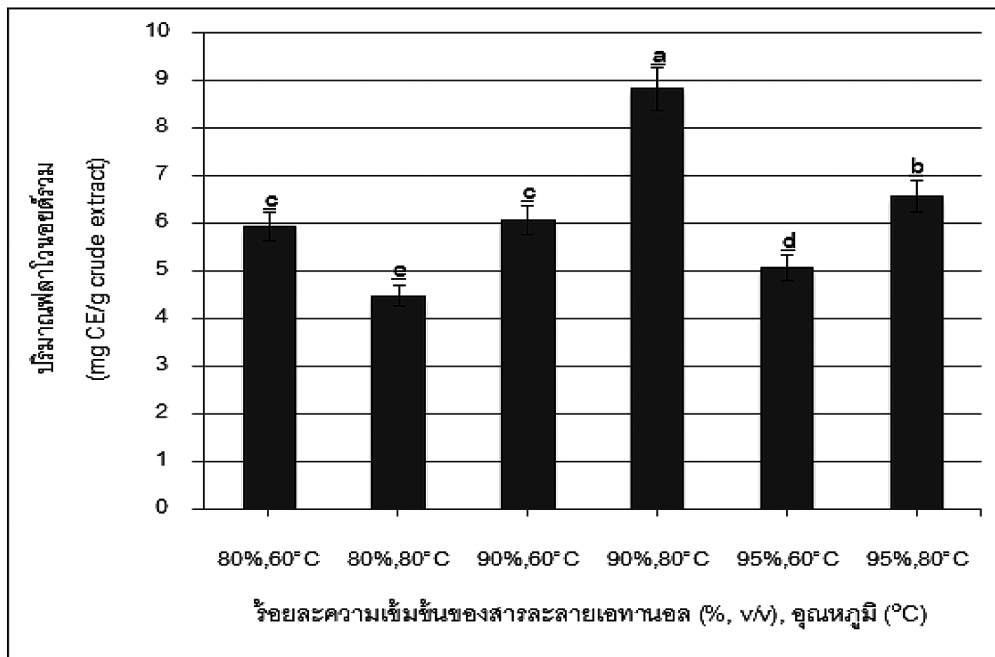
สำหรับคุณสมบัติการต้านออกซิเดชันด้วยวิธี FRAP (ภาพที่ 2) ค่า FRAP value ของสารสกัดที่อุณหภูมิ 60 °C อยู่ระหว่าง 4.58 – 4.90 mg TE/g crude extract ซึ่งมีค่าที่ไม่แตกต่างกัน แต่เมื่อเพิ่มอุณหภูมิอยู่ที่ 80 °C จะให้ค่า FRAP value เพิ่มขึ้นอยู่ระหว่าง 5.19 – 8.78 mg TE/g crude extract ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าอุณหภูมิการสกัดมีผลต่อค่า FRAP value อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) โดยสารที่สกัดด้วยความเข้มข้นของสารละลายเอทานอล 90 %,v/v อุณหภูมิ 80 °C มีค่า FRAP value สูงที่สุดเท่ากับ 8.78 ± 1.14 TE/g crude extract งานวิจัยของ Liu et al. (2012) ได้รายงานไว้ว่าเมื่ออุณหภูมิเพิ่มสูงขึ้นส่งผลให้คุณสมบัติการต้านออกซิเดชันที่สูงอาจเป็นไปได้ว่าความร้อนทำให้เกิดองค์ประกอบของสารใหม่หรือส่งเสริมให้สารต้านอนุมูลอิสระที่มีอยู่ส่งผลต่อปริมาณการต้านอนุมูลอิสระสูงขึ้น (Sharma et al., 2015)



ภาพที่ 2 คุณสมบัติการต้านออกซิเดชัน (ค่า FRAP value) ที่ระดับความเข้มข้นของสารละลายเอทานอลและอุณหภูมิในการสกัดต่าง ๆ ในสารสกัดจากเปลือกส้มโอ

หมายเหตุ: ข้อมูลแสดงในรูปแบบของค่าเฉลี่ย (Mean)± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Standard deviation, SD) ทำการทดลอง 3 ซ้ำ (n = 3) โดยตัวอักษร^{a-c} มีความแตกต่างกันในคอลัมน์ คือ แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

การวิเคราะห์ปริมาณฟลาโวนอยด์รวมจากภาพที่ 3 พบว่าความเข้มข้นของสารละลายเอทานอล 90 %,v/v และอุณหภูมิในการสกัดที่ 80 °C มีปริมาณฟลาโวนอยด์รวมสูงสุดที่ 8.84 ± 0.52 mg CE/g crude extract แสดงให้เห็นว่าความเข้มข้นของสารละลายเอทานอลและอุณหภูมิการสกัดมีผลต่อปริมาณฟลาโวนอยด์รวมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) เช่นเดียวกับความเข้มข้นของสารละลายเอทานอล 80 และ 95 %,v/v ที่อุณหภูมิการสกัด 80 °C ให้ปริมาณฟลาโวนอยด์รวมสูงกว่าอุณหภูมิการสกัด 60 °C เป็นไปได้ว่าอุณหภูมิความร้อนส่งผลต่อปริมาณฟลาโวนอยด์รวม ซึ่งงานวิจัยของ Ho & Lin (2008) ได้รายงานว่ปริมาณฟลาโวนอยด์เพิ่มขึ้นเมื่ออุณหภูมิความร้อนเพิ่มขึ้นจึงทำให้อธิบายได้ว่าองค์ประกอบฟลาโวนอยด์ส่วนใหญ่เป็นองค์ประกอบพอลิฟีนอลขนาดใหญ่เมื่อโดนความร้อนจะทำให้ผนังเซลล์ของพืชถูกทำลายจึงทำให้ปริมาณฟลาโวนอยด์ลดลงแต่เมื่ออุณหภูมิเริ่มสูงขึ้นเรื่อยๆ จะทำให้องค์ประกอบของฟลาโวนอยด์ที่ยึดติดกันด้วยพันธะเอสเทอร์และพันธะไกลโคไซด์จะถูกตัดออกทำให้เกิดเป็นโมเลกุลอิสระส่งผลให้ปริมาณฟลาโวนอยด์ค่อย ๆ เพิ่มขึ้นเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้น (Liu et al., 2012; Xu et al., 2007)

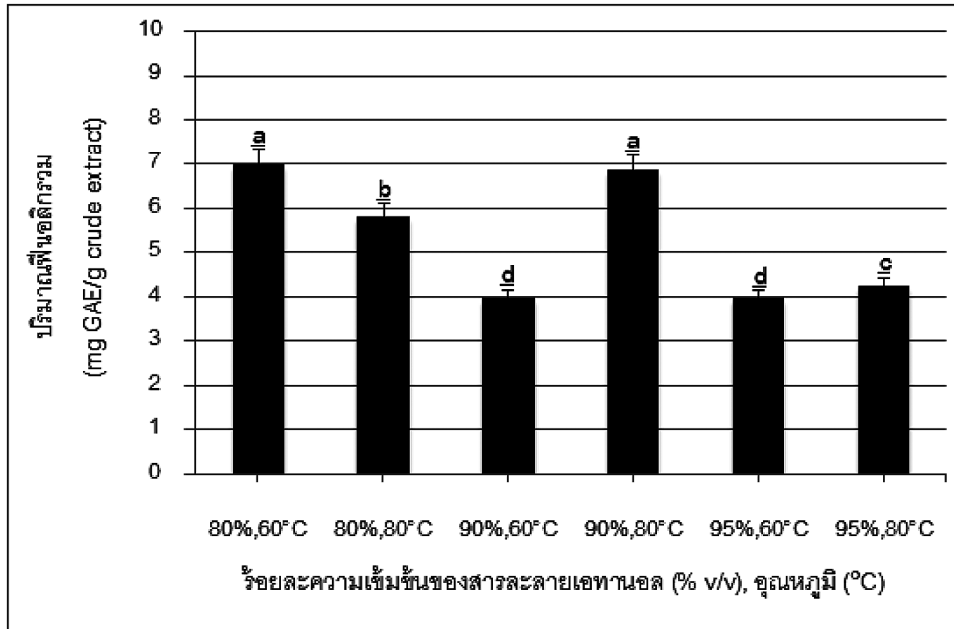


ภาพที่ 3 ปริมาณฟลาโวนอยด์รวมที่ระดับความเข้มข้นของสารละลายเอทานอล และอุณหภูมิในการสกัดต่าง ๆ ในสารสกัดจากเปลือกส้มโอ

หมายเหตุ: ข้อมูลแสดงในรูปแบบของค่าเฉลี่ย (Mean) $\pm$ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Standard deviation, SD) ทำการทดลอง 3 ซ้ำ (n=3) โดยตัวอักษร^{a-c} มีความแตกต่างกันในคอลัมน์ คือ แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

การวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกรวม (ภาพที่ 4) พบว่าความเข้มข้นของสารละลายเอทานอล และอุณหภูมิในการสกัดที่แตกต่างกันส่งผลโดยตรงกับปริมาณฟีนอลิกรวม อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) โดยปริมาณฟีนอลิกสูงสุดจะอยู่ที่สภาวะการสกัดด้วยเอทานอล 80 %,v/v อุณหภูมิ 60 °C รองลงมา คือ ความเข้มข้น 90 %,v/v อุณหภูมิ 80 °C โดยมีปริมาณฟีนอลิกรวมเท่ากับ 6.99 ± 0.05 และ 6.89 ± 0.03 mg GAE/g crude extract ตามลำดับ เมื่อพิจารณาผลการทดลองจะเห็นว่าความเข้มข้นของสารละลายเอทานอลและอุณหภูมิในการสกัดมีค่าที่แตกต่างกันเนื่องจากสารสกัดที่ใช้ในการวิเคราะห์ทำการสกัดด้วยเอทานอลและน้ำเป็นตัวทำละลายเมื่อเพิ่มอุณหภูมิสูงขึ้นทำให้ปริมาณฟีนอลิกรวมเพิ่มขึ้นโดยที่อัตราส่วนขึ้นอยู่กับชนิดของพืช ซึ่งปริมาณฟีนอลิกส่วนใหญ่จะมีปริมาณเพิ่มขึ้นหลังการให้ความร้อน เนื่องจากความร้อนไปทำลายผนังเซลล์ของพืช (Lou et al., 2014) ทำให้เกิดการสลายตัวของโมเลกุลอิสระที่อยู่ในองค์ประกอบของพอลิฟีนอลทำให้พันธะเอสเทอร์และพันธะไกลโคไซด์ถูกตัดออกจนเกิดเป็นส่วนหนึ่งของโมเลกุลอิสระส่งผลให้ปริมาณฟีนอลิกสูงขึ้น (Xu et al., 2007) นอกจากนี้ผลการทดลองนี้ได้ใช้วิธีวิเคราะห์แบบ Folin-Ciocalteu colorimetry ซึ่งวิธีการนี้สาร Folin ที่ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิก

อาจเป็นตัวการที่รบกวนองค์ประกอบของฟีนอลิกที่มีอยู่ในเปลือกส้มโอทำให้ปริมาณฟีนอลิกรวมมีค่าที่สูงขึ้น เนื่องจากในตัวอย่างเปลือกส้มโอประกอบด้วยวงแหวนเบนซินซึ่งหมู่ไฮดรอกซี (OH) และวงแหวนหมู่เอมีนทำให้สาร Folin ทำปฏิกิริยากับองค์ประกอบเหล่านั้นจึงส่งผลต่อปริมาณฟีนอลิก (Prior et al., 2005)



ภาพที่ 4 ปริมาณฟีนอลิกรวมที่ระดับความเข้มข้นของสารละลายเอทานอล และอุณหภูมิในการสกัดต่าง ๆ ในสารสกัดจากเปลือกส้มโอ

หมายเหตุ: ข้อมูลแสดงในรูปแบบของค่าเฉลี่ย (Mean) $\pm$ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Standard deviation, SD) ทำการทดลอง 3 ซ้ำ (n = 3) โดยตัวอักษร^{a-d} มีความแตกต่างกันในคอลัมน์ คือ แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

จากผลการทดลองข้างต้นได้วิเคราะห์ฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน คุณสมบัติการต้านออกซิเดชัน ปริมาณ ฟลาโวนอยด์รวม และปริมาณฟีนอลิกรวมโดยพิจารณาจากระดับความเข้มข้นของสารละลายเอทานอลซึ่งตัวอย่างเปลือกส้มโอที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอลที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ส่งผลต่อปริมาณสารสำคัญเนื่องจากองค์ประกอบส่วนใหญ่เป็นสารประกอบกลุ่มฟีนอลมีโครงสร้างหลักประกอบด้วยวงแอรอแมติกแทนที่ด้วยหมู่ไฮดรอกซี ส่วนมากเป็นสารที่มีขั้วจึงทำให้ละลายได้ดีในตัวทำละลายที่มีขั้วเช่นกัน ส่งผลให้สารสำคัญที่อยู่ในเปลือกส้มโอถูกปลดปล่อยออกมา (Pietta, 2000) นอกจากนี้อุณหภูมิการสกัดยังส่งผลต่อค่า EC_{50} ค่า FRAP value ปริมาณฟลาโวนอยด์รวม และฟีนอลิกรวมเช่นกันดังนั้นความเข้มข้นของสารละลายเอทานอล

และอุณหภูมิในการสกัดตัวอย่างสารสกัดจากเปลือกส้มโออยู่ในช่วงความเข้มข้น 90 %,v/v อุณหภูมิการสกัด 80 °C เป็นช่วงที่ให้ปริมาณสารสำคัญที่สูงรวมทั้งพิจารณาควบคู่กับค่าการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน คุณสมบัติการต้านออกซิเดชัน ปริมาณฟลาโวนอยด์รวม ปริมาณฟีนอลิกรวม เป็นการนำมาใช้ในการวิเคราะห์ ในขั้นตอนถัดไป

2. การทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดจากเปลือกส้มโอพันธุ์ขาวน้ำผึ้งในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ด้วยวิธี Agar well diffusion

การทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดจากเปลือกส้มโอพันธุ์ขาวน้ำผึ้งในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ด้วยวิธี Agar well diffusion ได้แก่ สารสกัดที่สกัดที่ความเข้มข้นของสารละลายอาทานอล 90 %,v/v อุณหภูมิการสกัด 80 °C มาทำการทดสอบการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค 5 ชนิด ได้แก่ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Candida albicans* ATCC 10231, *Escherichia coli* ATCC 25922 และ *Aspergillus niger* ATCC 16404 โดยใช้ระดับความเข้มข้นของสารสกัดหยาบเท่ากับ 200 - 600 mg/ml แสดงดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 บริเวณการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคทั้ง 5 ชนิด ของสารสกัดจากเปลือกส้มโอพันธุ์ขาวน้ำผึ้ง

เชื้อที่ใช้ทดสอบ	เส้นผ่านศูนย์กลางของการยับยั้งการเจริญของเชื้อ (Inhibition zone) (Mean $\pm$ SD; mm)									
	ความเข้มข้นของสารสกัดหยาบจากเปลือกส้มโอ (mg/ml)									
	Positive Control	600	550	500	450	400	350	300	250	200
แบคทีเรีย										
แกรมบวก										
<i>S. aureus</i>	19 ^a	12.33 $\pm$ 0.58 ^b	12 ^{bc}	11.33 $\pm$ 0.58 ^{de}	10.67 $\pm$ 0.58 ^{de}	10 ^{ef}	10 ^{ef}	9.67 $\pm$ 0.58 ^f	8.67 $\pm$ 0.58 ^g	7.17 $\pm$ 0.29 ^h
แบคทีเรีย										
แกรมลบ										
<i>P. aeruginosa</i>	25 ^a	9 $\pm$ 1.00 ^b	9 ^b	8 ^c	7.33 $\pm$ 0.58 ^{cd}	7 ^d	7.67 $\pm$ 1.15 ^{cd}	-	-	-
<i>E. coli</i>	27 ^a	7.67 $\pm$ 0.58 ^b	7.33 $\pm$ 0.58 ^b	6.33 $\pm$ 0.58 ^c	-	-	-	-	-	-
ยีสต์										
<i>C. albicans</i>	33.67 $\pm$ 0.58 ^a	11.33 $\pm$ 0.58 ^b	9.67 $\pm$ 0.58 ^{cd}	10 ^c	9.67 $\pm$ 0.58 ^{cd}	9 ^{cd}	8.67 $\pm$ 1.15 ^d	8.67 $\pm$ 1.15 ^d	-	-
รา										
<i>A. niger</i>	29.67 $\pm$ 0.58 ^a	23 ^b	20 ^c	22 $\pm$ 1.73 ^b	19 ^c	19 ^c	19 ^c	17 ^d	15 ^e	14.3 $\pm$ 0.58 ^e

หมายเหตุ: 6 mm คือ ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของ Cork borer

- หมายถึง ไม่มีโซนการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์

ข้อมูลแสดงในรูปแบบของค่าเฉลี่ย (Mean) $\pm$ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Standard deviation, SD) ทำการทดลอง 3 ซ้ำ (n = 3) โดยตัวอักษร^{a-h} มีความแตกต่างกันในแถว คือ แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

จากผลการทดลองพบว่าสารสกัดจากเปลือกส้มโอพันธุ์ขาวน้ำผึ้งที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอล 90 %,v/v อุณหภูมิ 80 °C ที่ระดับความเข้มข้น 600 mg/ml สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *A. niger* ได้ดีที่สุดรองลงมาเป็น *S. aureus*, *C. albicans*, *P. aeruginosa* และ *E. coli* ตามลำดับ มีโซนการยับยั้ง (Inhibition zone) เท่ากับ 23, 12.33 $\pm$ 0.58, 11.33 $\pm$ 0.58, 9 $\pm$ 1.00 และ 7.67 $\pm$ 0.58 mm ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าสารสกัดจากเปลือกส้มโอที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอล 90 %,v/v อุณหภูมิ 80 °C มีผลต่อการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคทั้ง 5 ชนิดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) และแสดงค่าการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราได้ดีที่สุดซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Singh & Navneet (2017) ได้ศึกษาสารสกัดจากเปลือกส้มโอด้วยตัวทำละลายเอทานอลเพื่อดูโซนยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ (Inhibition zone) พบว่าการสกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอลสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *E. coli*, *S. Typhimurium*, *S. aureus*,

S. pyogenes, *E. faecalis*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*, *S. Typhi*, *Proteus spp.* และ *M. catarrhalis* ตามลำดับ เนื่องจากในเปลือกส้มโอมีองค์ประกอบสำคัญของสาร DL-limonene ที่อยู่ในรูปของน้ำมันหอมระเหย เป็นไปได้ว่ามีสารต้านเชื้อจุลินทรีย์ที่ปลอดภัยรวมถึงสารต้านอนุมูลอิสระเพื่อเพิ่มอายุการเก็บรักษาสินค้าและอาหารทำให้สามารถยับยั้งสารอะฟาทอกซินจากเชื้อราได้ (Singh & Navneet, 2017) สมมติฐานกลไกการยับยั้งจุลินทรีย์อาจเกิดจากสารสกัดจากเปลือกส้มโอไปทำลายเยื่อหุ้มเซลล์หรือเซลล์เมมเบรนของจุลินทรีย์ทำให้สารสกัดสามารถผ่านเซลล์เมมเบรนของจุลินทรีย์เข้าไปทำลายดีเอ็นเอของเชื้อจุลินทรีย์เหล่านั้นจึงเป็นสาเหตุทำให้เชื้อจุลินทรีย์หยุดการเจริญเติบโต ดังนั้นความเข้มข้นของตัวทำละลายและอุณหภูมิการสกัดมีผลต่อฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ โดยสภาวะการสกัดที่เหมาะสมที่สุด คือ ความเข้มข้นเอทานอล 90 %,v/v และอุณหภูมิการสกัด 80 °C ส่งผลให้สารสกัดจากเปลือกส้มโอที่ได้มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อราได้ดีที่สุด รองลงมา คือ เชื้อแบคทีเรียแกรมบวก เชื้อยีสต์ และเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ ตามลำดับ

สรุป

จากการศึกษาองค์ประกอบของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพด้วยการวิเคราะห์ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH assay และ FRAP assay พบว่าความเข้มข้นของเอทานอลและอุณหภูมิในการสกัดส่งผลต่อประสิทธิภาพการต้านออกซิเดชันเมื่อวิเคราะห์ด้วยค่า DPPH assay และ FRAP assay ซึ่งแสดงค่าเป็น EC50 และ FRAP value ตามลำดับ นอกจากนี้ยังมีผลต่อปริมาณฟีนอลิกรวมและปริมาณฟลาโวนอยด์รวมจึงทำให้สภาวะที่เหมาะสมที่สุดในการสกัดเปลือกส้มโอ คือ ความเข้มข้นของสารละลายเอทานอล 90 %,v/v และอุณหภูมิในการสกัด 80 °C เนื่องจากเป็นสภาวะที่สารสกัดมีคุณสมบัติการต้านออกซิเดชันดีที่สุด มีปริมาณฟลาโวนอยด์รวม และปริมาณฟีนอลิกรวมสูง นอกจากนี้ยังมีประสิทธิภาพยับยั้งการเจริญของเชื้อ *A. niger* ได้ดีที่สุด รองลงมา คือ *S. aureus*, *C. albicans*, *P. aeruginosa* และ *E. coli* ตามลำดับ จึงมีศักยภาพในการนำมาประยุกต์ใช้เป็นสารกันเสียจากธรรมชาติได้

กิตติกรรมประกาศ

ในการศึกษาวิจัยในครั้งนี้ได้รับทุนอุดหนุนงบประมาณแผ่นดินด้านการวิจัยปีงบประมาณ 2561 ขอขอบคุณสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.) และขอขอบคุณสถาบันวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยสวนดุสิต

เอกสารอ้างอิง

- Ahmed, I. & Beg, A.Z. (2001). Antimicrobial and phytochemical studies on 45 Indian medicinal plants against multi-drug resistant human pathogens. **Journal of Ethnopharmacology**. 74, 113-123.
- Arumugam, A., Gunasekaran, N. & Perumal, S. (2013). Antimicrobial activity of crude extract of *Citrus Hystrix* and *Citrus Maxima*. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**. 4(1), 1-5.
- Chen, Q., Hu, Z., Yan-Dong Yao, F. & Liang, H. (2016). Study of two-stage microwave extraction of essential oil and pectin from pomelo peels. **Food Science and Technology**. 66, 538-545.
- Fidrianny, I., Sari, E. & Komar, R. (2016). Phytochemical content and antioxidant activities in different organs of pomelo (*Citrus maxima* [BURM.] MERR.) using 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl and phosphomolybdenum assays. **Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research**. 9(2), 185-190.
- Ho, S.C. & Lin, C.C. (2008). Investigation of heat treating conditions for enhancing the anti-inflammatory activity of citrus fruit (*Citrus reticulata*) peels. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 56, 7976-7982.
- Liu, S.C. & Tsai, C.W. (2012). Effects of heating time on the antioxidative capacities of citrus fruit (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) by-products. **Food science and Technology Research**. 18(4), 505-513.
- Lou, S.N., Lin, Y.S., Hsu, Y.S., Chiu, E.M. & Ho, C.T. (2014). Soluble and insoluble phenolic compounds and antioxidant activity of immature calamondin affected by solvents and heat treatment. **Food Chemistry**. 161, 246-253.
- Pichaiyongvongdee, S., Rattanapun, B. & Haruenkit, R. (2014). Total polyphenol content and antioxidant properties in different tissues of seven Pomelo (*Citrus grandis* (L.) Osbeck) cultivars. **Journal of Kasetsart (Natural Sciences)**. 43(3), 989-996. (in Thai)
- Pietta, P.G. (2000). Flavonoids as antioxidants. **Journal of Natural Products**. 63, 1035-1042.
- Prior, R.L., Wu, X. & Schaich, K. (2005). Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 53, 4290-4302.

- Ratanasiriwat, P., Choiykoew, J., Ngamyang, S. & Pienchob, P. (2017). Extraction procedure and antioxidant properties of crude extracts and essential oil from pumelo peel. **Rajamangala University of Technology Tawan-ok Research Journal**. 1-11. (in Thai)
- Sharma, K., Ko, E. Y., Assefa, A. D., Ha, S., Hile, S. H., Lee, E. T. & Park, S. W. (2015). Temperature-dependent studies on the total phenolics, flavonoids, antioxidant activities, and sugar content in six onion varieties. **Journal of Food and Drug Analysis**. 23, 243-252.
- Singh, A. & Navneet. (2017). *Citrus maxima* (Burm.) Merr. A traditional medicine: its antimicrobial potential and pharmacological update for commercial exploitation in herbal drugs – A review. **International Journal of ChemTech Research**. 10(5), 642-651.
- Suklampoo, L., Thawai, C., Weethong, R., Champathong, W. & Wongwongsee, W. (2012). Antimicrobial activities of crude extracts from pomelo peel of Khao-nahm-peung and Khao-paen varieties. **KMITL Science and Technology Journal**. 12(1), 55-57. (in Thai)
- Tananuwong, K. & Tewaruth, W. (2010). Extraction and application of antioxidants from black glutinous rice. **LWT-Food Science and Technology**. 43(3), 476-481.
- Toh, J.J., Khoo, H.E. & Azrina, A. (2013). Comparison of antioxidant properties of pomelo [*Citrus Grandis* (L.) Osbeck] varieties. **International Food Research Journal**. 20(4), 1661-1668.
- Turapra, B., Boonyarat, C., Chulikhit, Y. & Daodee, S. (2016). Determination of active constituents and antioxidative activity in *Citrus maxima* (Burm.) Merr. **Isan Journal of Pharmaceutical Sciences**. 11, 80-91. (in Thai)
- Xu, G., Ye, X., Chen, J. & Liu, D. (2007). Effect of heat treatment on the phenolic compounds and antioxidant capacity of citrus peel extract. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 55, 330-335.
- Zarina, Z. & Tan, S. Y. (2013). Determination of flavonoids in *Citrus grandis* (pomelo) peels and their inhibition activity on lipid peroxidation in fish tissue. **International Food Research Journal**. 20(1), 313-317.
- Zhishen, J., Mengcheng, T. & Jianming, W. (1999). The determination of flavonoid content in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. **Food Chemistry**. 64, 555-559.