รายงานการวิจัย
เรื่อง

ศึกษาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพและการประเมินคุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดเปลือกส้มโอโดยใช้พื้นที่ผิวตอบสนองสามมิติเพื่อพัฒนาเป็นวัตถุดิบในเครื่องสำอาง

Study Bioactive Compound and Radical Scavenging Activities of pomelo peel (*Citrus grandis* Osbeck) extracts using response surface methodology (RSM) to development as a raw material in cosmetic

นางสาวจิตรวดี ตั้งหิรัญรัตน์
นางสาวนิสุฎา อิ่มเสถียร
นางสาวณัฏฐรัตน์ ศรีบุรินทร์

มหาวิทยาลัยสวนดุสิต
พ.ศ. 2561

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยสวนดุสิต

รายงานการวิจัย
เรื่อง

ศึกษาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพและการประเมินคุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดเปลือกส้มโอโดยใช้พื้นที่ผิวตอบสนองสามมิติเพื่อพัฒนาเป็นวัตถุดิบในเครื่องสำอาง

Study Bioactive Compound and Radical Scavenging Activities of pomelo peel (*Citrus grandis* Osbeck) extracts using response surface methodology (RSM) to development as a raw material in cosmetic

นางสาวจิตรวดี ตั้งหิรัญรัตน์
นางสาวนิสุฎา อิ่มเสถียร
นางสาวณัฏฐรัตน์ ศรีบุรินทร์

มหาวิทยาลัยสวนดุสิต
พ.ศ. 2561

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยสวนดุสิต

(งานวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนจากงบประมาณแผ่นดินด้านการวิจัยปีงบประมาณ 2561)

หัวข้อวิจัย ศึกษาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพและการประเมินคุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดเปลือกส้มโอโดยใช้พื้นที่ผิวตอบสนองสามมิติเพื่อพัฒนาเป็นวัตถุดิบในเครื่องสำอาง
ผู้ดำเนินการวิจัย นางสาวจิตรวดี ตั้งหิรัญรัตน์ นางสาวนิสุฎา อิ่มเสถียร และนางสาวณัฏฐรัตน์ ศรีบุรินทร์
ที่ปรึกษา รองศาสตราจารย์ ดร.ทัศนีย์ พาณิชย์กุล
หน่วยงาน หลักสูตรวิทยาศาสตร์เครื่องสำอาง คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยสวนดุสิต
ปี พ.ศ. 2561

การวิจัยครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการสกัดและความเข้มข้นของสารละลายเอทานอล (70%, 80%, 90% และ 95% (w/v)) และอุณหภูมิการบ่มแตกต่างกัน (50 ℃, 60 ℃, 70 ℃ และ 80 ℃) สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ กิจกรรมการต้านออกซิเดชันเพื่อหาภาวะที่เหมาะสม และองค์ประกอบของสารระเหยหลักของสารสกัดเปลือกส้มโอพันธุ์ขาวน้ำผึ้ง โดยศึกษาสารต้านออกซิเดชันด้วยวิธี DPPH assay และ FRAP assay พบว่าอุณหภูมิการบ่มส่งผลโดยตรงต่อค่า EC_{50} และค่า FRAP value เมื่ออุณหภูมิการบ่มเพิ่มขึ้นทำให้กิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระมีค่าลดลง ซึ่งเกิดจากความร้อนทำให้พันธะโคเวนเลนต์ถูกทำลายส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงของเยื่อหุ้มเซลล์ของพืชทำให้เกิดโมเลกุลอิสระถูกปลดปล่อยสารต้านอนุมูลอิสระออกมาอาจเป็นสาเหตุให้ความสามารถของการต้านอนุมูลอิสระมีค่าลดลง นอกจากนี้อุณหภูมิที่สูงขึ้นจะเพิ่มความสามารถในการละลายของตัวทำละลายและเพิ่มประสิทธิภาพในการสกัดเช่นกันนั่นหมายความว่าค่า EC_{50} ที่ต่ำจะบ่งบอกถึงค่าการต้านอนุมูลอิสระที่สูงขึ้น เช่นเดียวกับปริมาณฟลาโวนอยด์รวมโดยอุณหภูมิการบ่มส่งผลต่อปริมาณ ฟลาโวนอยด์รวมทำให้มีค่าที่ลดลงเมื่ออุณหภูมิการบ่มสูงขึ้น ส่วนปริมาณฟีนอลิกรวมความเข้มข้นของสารละลายเอทานอลกับอุณหภูมิการบ่มส่งผลต่อปริมาณฟีนอลิก โดยพบว่าความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารละลายเอทานอลอยู่ในช่วง 72% - 85% โดยปริมาตร เช่นเดียวกับอุณหภูมิการบ่มเนื่องจากความร้อนจะทำให้เกิดการสลายตัวของโมเลกุลอิสระ รวมถึงสาร Folin ที่ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกอาจเป็นตัวการที่รบกวนองค์ประกอบของฟีนอลิกที่มีอยู่ในเปลือกส้มโอทำให้ปริมาณฟีนอลิกมีค่าที่สูงขึ้น เนื่องจากในตัวอย่างเปลือกส้มโอประกอบด้วยวงแหวนเบนซินซึ่งหมู่ไฮดรอกซี (OH) และวงแหวนหมู่เอมีนทำให้สาร Folin ทำปฏิกิริยากับองค์ประกอบเหล่านั้นจึงส่งผลต่อปริมาณฟีนอลิก จากการทดลองความเข้มข้นของสารละลายเอทานอลและอุณหภูมิการบ่มที่แตกต่างกันพบว่าความเข้มข้น 90% (w/v) อุณหภูมิการบ่ม 80 ℃ ให้ระดับความเข้มข้นของสารละลายเอทานอลและอุณหภูมิการบ่มที่เหมาะสม และพบองค์ประกอบสารระเหยหลักคือ D-Limonene ซึ่งมีคุณภาพของพีกอยู่ที่ 99% ขององค์ประกอบสารระเหยทั้งหมด แสดงให้เห็นว่าความเข้มข้นของสารละลายเอทานอลและอุณหภูมิการบ่มนั้นส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างทำให้เกิดเป็นองค์ประกอบสารระเหยสำคัญที่สามารถนำไปใช้ในอุตสาหกรรมเครื่องสำอางได้

คำสำคัญ เปลือกส้มโอ สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ การต้านอนุมูลอิสระ พื้นที่ผิวตอบสนองสามมิติ องค์ประกอบของสารระเหย

Research Title Study Bioactive Compound and Radical Scavenging Activities of pomelo peel (*Citrus grandis* Osbeck) extracts using response surface methodology (RSM) to development as a raw material in cosmetic.
Researcher Miss Jittarawadee Tanghiranrat, Miss Nisuda Imsathian and Miss Nuttarut Sriburin
Research Consultants Assoc.Prof.Dr.Tasanee Panichakul
Organization Program in Cosmetic Science Faculty of Science and Technology Suan Dusit University
Year 2018

The objective of this study was to different ethanol concentration extract (70%, 80%, 90% and 95% (w/v)) and different incubated temperature (50 ℃, 60 ℃, 70 ℃ and 80 ℃) bioactive compounds, antioxidant activities to find optimum conditions and major volatile compounds of pomelo peel extract “Kao Nam Pueng”. Studies antioxidant with DPPH assay and FRAP assay found that incubated temperature effect to EC_{50} and FRAP values, when the increased temperature to antioxidant activities decreased, as a result of the heating causes covalent bond will be destroyed effect to change in the cell membrane of the plant causing the free molecule to released antioxidant, potentially reducing its antioxidant capacities. In addition, increased temperature added to ability of the solvent and increase the extraction efficiency, this means that the low EC_{50} indicates a high antioxidant value. As well as total flavonoid content, the incubated temperature affected total flavonoid content the value decreased as the incubated temperature increased. Total phenolic content, different ethanol concentration and incubated temperature affected phenolic content, the found that the optimum ethanol concentration ranged from 72% - 85% (v/v), as well as incubated temperature, due to heating would cause the disintegration of the free molecule, including Folin used to analyze phenolic content may interfere with the phenolic components present in pomelo peel, resulting in higher total phenolic content because the sample pomelo peel containing a benzene ring which among hydroxy (OH) group and amine ring group Folin reacts with these elements, thus affecting the amount phenolic. The result showed that different ethanol concentration and different incubated temperature found that ethanol concentration at 90% (w/v) and incubated temperature at 80 ℃ provided the optimum of ethanol concentration and incubated temperature and found major volatile compound were D-Limonene which the highest quality at 99% of the total volatile compounds, was found that the ethanol concentration and incubated temperature effect to structural changes causes major volatile compounds can be used in the cosmetic industry.

Key words: Pomelo Peel, Bioactive compounds, Radical Scavenging Activities, Response Surface Methodology (RSM), Volatile compounds

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยฉบับนี้สำเร็จลุล่วงได้เป็นอย่างดี โดยได้รับทุนอุดหนุนจากงบประมาณแผ่นดินด้านการวิจัยปีงบประมาณ 2561 ขอขอบคุณสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.) ที่มอบทุนอุดหนุนงบประมาณแผ่นดิน ขอขอบคุณสถาบันวิจัยและพัฒนาที่ให้คำแนะนำการจัดทำเอกสารและดำเนินการเรื่องเอกสารการวิจัย ขอขอบคุณห้องปฏิบัติการเคมี ห้องปฏิบัติการศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์ และห้องปฏิบัติการชีววิทยาที่ให้ความอนุเคราะห์ในการยืมเครื่องมือเพื่อใช้ทำงานวิจัย และขอขอบคุณห้องปฏิบัติการหลักสูตรวิทยาศาสตร์สำอาง คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยสวนดุสิตที่ให้พื้นที่ในการทำปฏิบัติการครั้งนี้ลุล่วงไปได้ด้วยดี

คณะผู้วิจัย
2561

สารบัญ

		หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย		ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ		ข
กิตติกรรมประกาศ		ค
สารบัญ		ง
สารบัญตาราง		ฉ
สารบัญภาพ		ฎ
บทที่ 1	**บทนำ**	1
	ความเป็นมาและความสำคัญ	1
	วัตถุประสงค์ของการวิจัย	2
	ขอบเขตการวิจัย	2
	ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	2
บทที่ 2	**แนวคิด ทฤษฎี เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง**	3
	ส้มโอ	3
	สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ	11
	ความแตกต่างระหว่างอุณหภูมิและความเข้มข้นของตัวทำละลายที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงในโครงสร้าง	21
	องค์ประกอบของสารระเหยและปัจจัยต่าง ๆ ที่มีผลต่อสารประกอบในโครงสร้าง	22
	แนวทางการประยุกต์ใช้สารสกัดจากพืช	23
บทที่ 3	**วิธีดำเนินการวิจัย**	25
	วัตถุดิบ	25
	สารเคมีและอุปกรณ์	25
	วิธีการดำเนินการวิจัย	27

สารบัญ (ต่อ)

		หน้า
บทที่ 4	**ผลการวิจัย**	34
	การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน ปริมาณฟลาโวนอยด์รวม ปริมาณฟีนอลิกรวมของสารสกัดเปลือกส้มโอพันธุ์ขาวน้ำผึ้ง ที่ระดับความเข้มข้นของสารละลายเอทานอลและอุณหภูมิในการบ่มแตกต่างกัน	34
	การเปรียบเทียบองค์ประกอบของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพเพื่อหาภาวะที่เหมาะสมของตัวอย่างเปลือกส้มโอพันธุ์ขาวน้ำผึ้ง ที่ระดับความเข้มข้นของสารละลายเอทานอลและอุณหภูมิในการบ่มแตกต่างกัน	49
	องค์ประกอบสารระเหยของสารสกัดเปลือกส้มโอที่สภาวะเหมาะสม ที่ความเข้มข้นของสารละลายเอทานอล 90% (w/v) อุณหภูมิการบ่ม 80 ℃	50
บทที่ 5	**สรุปผลการวิจัยอภิปรายผลและข้อเสนอแนะ**	64
	ข้อเสนอแนะในการนำผลการวิจัยไปใช้	65
	ข้อเสนอแนะในการทำวิจัยครั้งต่อไป	65
บรรณานุกรม		66
	บรรณานุกรมภาษาไทย	66
	บรรณานุกรมภาษาต่างประเทศ	66
ภาคผนวก		72
	ภาคผนวก ก การคำนวณสารเคมี	73
	ภาคผนวก ข ทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (Free Radical Scavenging Activity) โดยวิธี DPPH assay และวิธี FARP assay	75
	ภาคผนวก ค การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม และฟลาโวนอยด์รวม	113
	ภาคผนวก ง ผลการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ	124
	ภาคผนวก จ ผลโครมาโทแกรมของการวิเคราะห์องค์ประกอบของสารระเหยโดยวิธี GC-MS Profile	127
ประวัติผู้วิจัย		135

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
2.1	ลักษณะของสีเปลือกชั้นในและสีเนื้อส้มโอในแต่ละสายพันธุ์	4
2.2	ลักษณะผลส้มโอสายพันธุ์ต่าง ๆ ที่นิยมปลูกในประเทศไทย	5
2.3	ปริมาณการผลิตส้มโอทั้งประเทศไทย พ.ศ. 2557 – พ.ศ. 2559	7
2.4	ปริมาณการค้าส้มโอทั้งประเทศไทย พ.ศ. 2557 – พ.ศ. 2559	7
2.5	คุณค่าทางโภชนาการในส้มโอพันธุ์ขาวน้ำผึ้งต่อ 100 กรัม	8
2.6	ชนิดของ ROS และสารต้านอนุมูลอิสระที่สอดคล้องกับ ROS	18
4.1	การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของสารสกัดเปลือกส้มโอพันธุ์ขาวน้ำผึ้ง ที่ระดับความเข้มข้นของสารละลายเอทานอลและอุณหภูมิในการบ่มต่าง ๆ	34
4.2	ค่าสัมประสิทธิ์การถดถอย (Regression coefficients) และค่า R^2 ของสมบัติการต้านออกซิเดชันที่สัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายเอทานอลและอุณหภูมิการบ่มต่อการเปลี่ยนแปลงคุณภาพในเปลือกส้มโอพันธุ์ขาวน้ำผึ้ง	38
4.3	ค่าสัมประสิทธิ์การถดถอย (Regression coefficients) และค่า R^2 ของปริมาณฟลาโวนอยด์รวมที่สัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของละลายเอทานอลและอุณหภูมิการบ่มต่อการเปลี่ยนแปลงคุณภาพในเปลือกส้มโอพันธุ์ขาวน้ำผึ้ง	43
4.4	ค่าสัมประสิทธิ์การถดถอย (Regression coefficients) และค่า R^2 ของปริมาณฟีนอลิกที่สัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายเอทานอลและอุณหภูมิการบ่มต่อการเปลี่ยนแปลงคุณภาพในเปลือกส้มโอพันธุ์ขาวน้ำผึ้ง	47
4.5	องค์ประกอบสารระเหยของสารสกัดเปลือกส้มโอที่สภาวะเหมาะสม ที่ความเข้มข้น 90% (w/v) อุณหภูมิการบ่ม 80 °C	53
ข-1	ค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดเปลือกส้มโอที่สกัดด้วยเอทานอล 70% อุณหภูมิ 50 °C ที่ความยาวคลื่น 515 nm และการหาร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ	76
ข-2	ผลการยับยั้งอนุมูลอิสระได้ 50% ของสารสกัดเปลือกส้มโอที่สกัดด้วยเอทานอล 70% อุณหภูมิ 50 °C ด้วยโปรแกรม Graph pad Prism 3.02	77
ข-3	ค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดเปลือกส้มโอที่สกัดด้วยเอทานอล 70% อุณหภูมิ 60 °C ที่ความยาวคลื่น 515 nm และการหาร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ	78
ข-4	ผลการยับยั้งอนุมูลอิสระได้ 50% ของสารสกัดเปลือกส้มโอที่สกัดด้วยเอทานอล 70% อุณหภูมิ 60 °C ด้วยโปรแกรม Graph pad Prism 3.02	79
ข-5	ค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดเปลือกส้มโอที่สกัดด้วยเอทานอล 70% อุณหภูมิ 70 °C ที่ความยาวคลื่น 515 nm และการหาร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ	80

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่ **หน้า**

ข-6 ผลการยับยั้งอนุมูลอิสระได้ 50% ของสารสกัดเปลือกส้มโอที่สกัดด้วยเอทานอล 70% อุณหภูมิ 70 °C ด้วยโปรแกรม Graph pad Prism 3.02 81

ข-7 ค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดเปลือกส้มโอที่สกัดด้วยเอทานอล 70% อุณหภูมิ 80 °C ที่ความยาวคลื่น 515 nm และการหาร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ 82

ข-8 ผลการยับยั้งอนุมูลอิสระได้ 50% ของสารสกัดเปลือกส้มโอที่สกัดด้วยเอทานอล 70% อุณหภูมิ 80 °C ด้วยโปรแกรม Graph pad Prism 3.02 83

ข-9 ค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดเปลือกส้มโอที่สกัดด้วยเอทานอล 80% อุณหภูมิ 50 °C ที่ความยาวคลื่น 515 nm และการหาร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ 84

ข-10 ผลการยับยั้งอนุมูลอิสระได้ 50% ของสารสกัดเปลือกส้มโอที่สกัดด้วยเอทานอล 80% อุณหภูมิ 50 °C ด้วยโปรแกรม Graph pad Prism 3.02 85

ข-11 ค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดเปลือกส้มโอที่สกัดด้วยเอทานอล 80% อุณหภูมิ 60 °C ที่ความยาวคลื่น 515 nm และการหาร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ 86

ข-12 ผลการยับยั้งอนุมูลอิสระได้ 50% ของสารสกัดเปลือกส้มโอที่สกัดด้วยเอทานอล 80% อุณหภูมิ 60 °C ด้วยโปรแกรม Graph pad Prism 3.02 87

ข-13 ค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดเปลือกส้มโอที่สกัดด้วยเอทานอล 80% อุณหภูมิ 70 °C ที่ความยาวคลื่น 515 nm และการหาร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ 88

ข-14 ผลการยับยั้งอนุมูลอิสระได้ 50% ของสารสกัดเปลือกส้มโอที่สกัดด้วยเอทานอล 80% อุณหภูมิ 70 °C ด้วยโปรแกรม Graph pad Prism 3.02 89

ข-15 ค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดเปลือกส้มโอที่สกัดด้วยเอทานอล 80% อุณหภูมิ 80 °C ที่ความยาวคลื่น 515 nm และการหาร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ 90

ข-16 ผลการยับยั้งอนุมูลอิสระได้ 50% ของสารสกัดเปลือกส้มโอที่สกัดด้วยเอทานอล 80% อุณหภูมิ 80 °C ด้วยโปรแกรม Graph pad Prism 3.02 91

ข-17 ค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดเปลือกส้มโอที่สกัดด้วยเอทานอล 90% อุณหภูมิ 50 °C ที่ความยาวคลื่น 515 nm และการหาร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ 92

ข-18 ผลการยับยั้งอนุมูลอิสระได้ 50% ของสารสกัดเปลือกส้มโอที่สกัดด้วยเอทานอล 90% อุณหภูมิ 50 °C ด้วยโปรแกรม Graph pad Prism 3.02 93

ข-19 ค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดเปลือกส้มโอที่สกัดด้วยเอทานอล 90% อุณหภูมิ 60 °C ที่ความยาวคลื่น 515 nm และการหาร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ 94

ข-20 ผลการยับยั้งอนุมูลอิสระได้ 50% ของสารสกัดเปลือกส้มโอที่สกัดด้วยเอทานอล 90% อุณหภูมิ 60 °C ด้วยโปรแกรม Graph pad Prism 3.02 95

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
ข-21	ค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดเปลือกส้มโอที่สกัดด้วยเอทานอล 90% อุณหภูมิ 70 °C ที่ความยาวคลื่น 515 nm และการหาร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ	96
ข-22	ผลการยับยั้งอนุมูลอิสระได้ 50% ของสารสกัดเปลือกส้มโอที่สกัดด้วยเอทานอล 90% อุณหภูมิ 70 °C ด้วยโปรแกรม Graph pad Prism 3.02	97
ข-23	ค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดเปลือกส้มโอที่สกัดด้วยเอทานอล 90% อุณหภูมิ 80 °C ที่ความยาวคลื่น 515 nm และการหาร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ	98
ข-24	ผลการยับยั้งอนุมูลอิสระได้ 50% ของสารสกัดเปลือกส้มโอที่สกัดด้วยเอทานอล 90% อุณหภูมิ 80 °C ด้วยโปรแกรม Graph pad Prism 3.02	99
ข-25	ค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดเปลือกส้มโอที่สกัดด้วยเอทานอล 95% อุณหภูมิ 50 °C ที่ความยาวคลื่น 515 nm และการหาร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ	100
ข-26	ผลการยับยั้งอนุมูลอิสระได้ 50% ของสารสกัดเปลือกส้มโอที่สกัดด้วยเอทานอล 95% อุณหภูมิ 50 °C ด้วยโปรแกรม Graph pad Prism 3.02	101
ข-27	ค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดเปลือกส้มโอที่สกัดด้วยเอทานอล 95% อุณหภูมิ 60 °C ที่ความยาวคลื่น 515 nm และการหาร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ	102
ข-28	ผลการยับยั้งอนุมูลอิสระได้ 50% ของสารสกัดเปลือกส้มโอที่สกัดด้วยเอทานอล 95% อุณหภูมิ 60 °C ด้วยโปรแกรม Graph pad Prism 3.02	103
ข-29	ค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดเปลือกส้มโอที่สกัดด้วยเอทานอล 95% อุณหภูมิ 70 °C ที่ความยาวคลื่น 515 nm และการหาร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ	104
ข-30	ผลการยับยั้งอนุมูลอิสระได้ 50% ของสารสกัดเปลือกส้มโอที่สกัดด้วยเอทานอล 95% อุณหภูมิ 70 °C ด้วยโปรแกรม Graph pad Prism 3.02	105
ข-31	ค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดเปลือกส้มโอที่สกัดด้วยเอทานอล 95% อุณหภูมิ 80 °C ที่ความยาวคลื่น 515 nm และการหาร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ	106
ข-32	ผลการยับยั้งอนุมูลอิสระได้ 50% ของสารสกัดเปลือกส้มโอที่สกัดด้วยเอทานอล 95% อุณหภูมิ 80 °C ด้วยโปรแกรม Graph pad Prism 3.02	107
ข-33	ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐาน Trolox ที่ความยาวคลื่น 593 nm	108
ข-34	ค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดเปลือกส้มโอที่สกัดด้วยเอทานอล 70% ที่ความยาวคลื่น 593 nm	109
ข-35	ค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดเปลือกส้มโอที่สกัดด้วยเอทานอล 80% ที่ความยาวคลื่น 593 nm	110

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
ข-36	ค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดเปลือกส้มโอที่สกัดด้วยเอทานอล 90% ที่ความยาวคลื่น 593 nm	111
ข-37	ค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดเปลือกส้มโอที่สกัดด้วยเอทานอล 95% ที่ความยาวคลื่น 593 nm	112
ค-1	ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐาน Gallic acid ที่ความยาวคลื่น 765 nm	114
ค-2	ค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดเปลือกส้มโอที่สกัดด้วยเอทานอล 70% ที่ความยาวคลื่น 765 nm	115
ค-3	ค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดเปลือกส้มโอที่สกัดด้วยเอทานอล 80% ที่ความยาวคลื่น 765 nm	116
ค-4	ค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดเปลือกส้มโอที่สกัดด้วยเอทานอล 90% ที่ความยาวคลื่น 765 nm	117
ค-5	ค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดเปลือกส้มโอที่สกัดด้วยเอทานอล 95% ที่ความยาวคลื่น 765 nm	118
ค-6	ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐาน Catechin ที่ความยาวคลื่น 415 nm	119
ค-7	ค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดเปลือกส้มโอที่สกัดด้วยเอทานอล 70% ที่ความยาวคลื่น 415 nm	120
ค-8	ค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดเปลือกส้มโอที่สกัดด้วยเอทานอล 80% ที่ความยาวคลื่น 415 nm	121
ค-9	ค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดเปลือกส้มโอที่สกัดด้วยเอทานอล 90% ที่ความยาวคลื่น 415 nm	122
ค-10	ค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดเปลือกส้มโอที่สกัดด้วยเอทานอล 95% ที่ความยาวคลื่น 415 nm	123
ง-1	การวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) ของค่า EC_{50} ที่สัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายเอทานอลและอุณหภูมิการบ่มที่ภาวะต่าง ๆ ในเปลือกส้มโอพันธุ์ขาวน้ำผึ้ง	125
ง-2	การวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) ของค่า FRAP value ที่สัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายเอทานอลและอุณหภูมิการบ่มที่ภาวะต่าง ๆ ในเปลือกส้มโอพันธุ์ขาวน้ำผึ้ง	125
ง-3	การวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) ของปริมาณฟลาโวนอยด์รวมที่สัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายเอทานอลและอุณหภูมิการบ่มที่ภาวะต่าง ๆ ในเปลือกส้มโอพันธุ์ขาวน้ำผึ้ง	126

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
ง-4	วิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) ของปริมาณฟีนอลิกรวมที่สัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายเอทานอลและอุณหภูมิการบ่มที่ภาวะต่าง ๆ ในเปลือกส้มโอพันธุ์ขาวน้ำผึ้ง	126

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
2.1	สัณฐานวิทยาของผลส้มโอ	4
2.2	ผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ จากผลส้มโอ	6
2.3	สรรพคุณต่าง ๆ ของผลส้มโอ	9
2.4	โครงสร้างของ Naringin	10
2.5	ความสัมพันธ์ระหว่าง Primary metabolism และ Secondary metabolism ในพืช	12
2.6	โครงสร้างทั่วไปของสารประกอบฟีนอลิก	13
2.7	โครงสร้างพื้นฐานของฟลาโวนอยด์	15
2.8	รูปร่างของอนุมูลอิสระ	16
2.9	การเกิดอนุมูลอิสระ ปฏิกิริยาลูกโซ่ การทำลายเซลล์ และการต้านอนุมูลอิสระ	17
2.10	ประเภทของสารต้านอนุมูลอิสระ	18
2.11	การเกิดปฏิกิริยาของอนุมูลอิสระ DPPH• กับสารต้านอนุมูลอิสระ	19
2.12	การรีดิวซ์สารประกอบเชิงซ้อนของเหล็กโดยสารต้านอนุมูลอิสระ	19
2.13	ปัจจัยสำคัญของการให้อุณหภูมิสูงที่มีผลต่อพืช	22
3.1	ขั้นตอนการเตรียมผงเปลือกส้มโอ	27
3.2	ขั้นตอนการสกัดเปลือกส้มโอ	29
4.1	ค่า EC_{50} ที่ระดับความเข้มข้นของสารละลายเอทานอลและอุณหภูมิในการบ่มต่าง ๆ ในเปลือกส้มโอพันธุ์ขาวน้ำผึ้ง	36
4.2	ค่า FRAP value ที่ระดับความเข้มข้นของสารละลายเอทานอลและอุณหภูมิในการบ่มต่าง ๆ ในเปลือกส้มโอพันธุ์ขาวน้ำผึ้ง	36
4.3	พื้นที่ผิวตอบสนอง (RSM) และกราฟ Contour plot ที่สัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายเอทานอลและอุณหภูมิในการบ่มต่อค่า EC_{50}	40
4.4	พื้นที่ผิวตอบสนอง (RSM) และกราฟ Contour plot ที่สัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายเอทานอลและอุณหภูมิในการบ่มต่อค่า FRAP value	41
4.5	ปริมาณฟลาโวนอยด์รวมที่ระดับความเข้มข้นของสารละลายเอทานอลและอุณหภูมิในการบ่มต่าง ๆ ในเปลือกส้มโอพันธุ์ขาวน้ำผึ้ง	42
4.6	พื้นที่ผิวตอบสนอง (RSM) และกราฟ Contour plot ที่สัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายเอทานอลและอุณหภูมิในการบ่มต่อค่าปริมาณฟลาโวนอยด์รวม	44
4.7	ปริมาณฟีนอลิกรวมที่ระดับความเข้มข้นของสารละลายเอทานอลและอุณหภูมิในการบ่มต่าง ๆ ในเปลือกส้มโอพันธุ์ขาวน้ำผึ้ง	45

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
4.8	พื้นที่ผิวตอบสนอง (RSM) และกราฟ Contour plot ที่สัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายเอทานอลและอุณหภูมิในการบ่มต่อค่าปริมาณฟีนอลิกรวม	48
4.9	ภาพซ้อนทับกราฟ Contour plots ของสมบัติการต้านออกซิเดชัน ปริมาณฟลาโวนอยด์รวม ปริมาณฟีนอลิกรวมของตัวอย่างเปลือกส้มโอพันธุ์ขาวน้ำผึ้ง	50
4.10	โครมาโตแกรมองค์ประกอบสารระเหยสำคัญของสารสกัดเปลือกส้มโอที่ความเข้มข้นของสารละลายเอทานอล 90% (w/v) และอุณหภูมิการบ่ม 80 °C	63
ข-1	ภาพแสดงผลการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดเปลือกส้มโอที่สกัดด้วยเอทานอล 70% อุณหภูมิ 50 °C	76
ข-2	ภาพแสดงผลการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดเปลือกส้มโอที่สกัดด้วยเอทานอล 70% อุณหภูมิ 60 °C	78
ข-3	ภาพแสดงผลการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดเปลือกส้มโอที่สกัดด้วยเอทานอล 70% อุณหภูมิ 70 °C	80
ข-4	ภาพแสดงผลการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดเปลือกส้มโอที่สกัดด้วยเอทานอล 70% อุณหภูมิ 80 °C	82
ข-5	ภาพแสดงผลการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดเปลือกส้มโอที่สกัดด้วยเอทานอล 80% อุณหภูมิ 50°C	84
ข-6	ภาพแสดงผลการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดเปลือกส้มโอที่สกัดด้วยเอทานอล 80% อุณหภูมิ 60 °C	86
ข-7	ภาพแสดงผลการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดเปลือกส้มโอที่สกัดด้วยเอทานอล 80% อุณหภูมิ 70 °C	88
ข-8	ภาพแสดงผลการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดเปลือกส้มโอที่สกัดด้วยเอทานอล 80% อุณหภูมิ 80 °C	90
ข-9	ภาพแสดงผลการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดเปลือกส้มโอที่สกัดด้วยเอทานอล 90% อุณหภูมิ 50 °C	92
ข-10	ภาพแสดงผลการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดเปลือกส้มโอที่สกัดด้วยเอทานอล 90% อุณหภูมิ 60 °C	94
ข-11	ภาพแสดงผลการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดเปลือกส้มโอที่สกัดด้วยเอทานอล 90% อุณหภูมิ 70 °C	96
ข-12	ภาพแสดงผลการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดเปลือกส้มโอที่สกัดด้วยเอทานอล 90% อุณหภูมิ 80 °C	98

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
ข-13	ภาพแสดงผลการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดเปลือกส้มโอ ที่สกัดด้วยเอทานอล 95% อุณหภูมิ 50 ℃	100
ข-14	ภาพแสดงผลการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดเปลือกส้มโอ ที่สกัดด้วยเอทานอล 95% อุณหภูมิ 60 ℃	102
ข-15	ภาพแสดงผลการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดเปลือกส้มโอ ที่สกัดด้วยเอทานอล 95% อุณหภูมิ 70 ℃	104
ข-16	ภาพแสดงผลการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดเปลือกส้มโอ ที่สกัดด้วยเอทานอล 95% อุณหภูมิ 80 ℃	106
ข-17	กราฟมาตรฐานสารละลายมาตรฐาน Trolox ที่ความยาวคลื่น 593 nm	108
ค-1	กราฟมาตรฐานสารละลายมาตรฐาน Gallic acid ที่ความยาวคลื่น 765 nm	114
ค-2	กราฟมาตรฐานสารละลายมาตรฐาน Catechin ที่ความยาวคลื่น 415 nm	119
จ-1	โครมาโทแกรมองค์ประกอบสารระเหย D-Limonene ของความเข้มข้นสารละลาย เอทานอล 90% (w/v) และอุณหภูมิการบ่ม 80 ℃	128
จ-2	โครมาโทแกรมองค์ประกอบสารระเหย Benzoic acid ของความเข้มข้นสารละลาย เอทานอล 90% (w/v) และอุณหภูมิการบ่ม 80 ℃	128
จ-3	โครมาโทแกรมองค์ประกอบสารระเหย Geranyl acetate ของความเข้มข้น สารละลายเอทานอล 90% (w/v) และอุณหภูมิการบ่ม 80 ℃	129
จ-4	โครมาโทแกรมองค์ประกอบสารระเหย Trans-Cinnamic acid ของความเข้มข้น สารละลายเอทานอล 90% (w/v) และอุณหภูมิการบ่ม 80 ℃	129
จ-5	โครมาโทแกรมองค์ประกอบสารระเหย Germacrene D ของความเข้มข้น สารละลายเอทานอล 90% (w/v) และอุณหภูมิการบ่ม 80 ℃	130
จ-6	โครมาโทแกรมองค์ประกอบสารระเหย NOOTKATONE ของความเข้มข้น สารละลายเอทานอล 90% (w/v) และอุณหภูมิการบ่ม 80°C	130
จ-7	โครมาโทแกรมองค์ประกอบสารระเหย 7-Hydroxycoumarin ของความเข้มข้น สารละลายเอทานอล 90% (w/v) และอุณหภูมิการบ่ม 80 ℃	131
จ-8	โครมาโทแกรมองค์ประกอบสารระเหย n-Hexadecanoic acid ของความเข้มข้น สารละลายเอทานอล 90% (w/v) และอุณหภูมิการบ่ม 80 ℃	131
จ-9	โครมาโทแกรมองค์ประกอบสารระเหย Scopoletin ของความเข้มข้นสารละลาย เอทานอล 90% (w/v) และอุณหภูมิการบ่ม 80 ℃	132
จ-10	โครมาโทแกรมองค์ประกอบสารระเหย Isoauraptene ของความเข้มข้น สารละลายเอทานอล 90% (w/v) และอุณหภูมิการบ่ม 80 ℃	132

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่ **หน้า**

จ-11 โครมาโทแกรมองค์ประกอบสารระเหย Auraptenol ของความเข้มข้นสารละลายเอทานอล 90% (w/v) และอุณหภูมิการบ่ม 80 °C 133

จ-12 โครมาโทแกรมองค์ประกอบสารระเหย Auraptene ของความเข้มข้นสารละลายเอทานอล 90% (w/v) และอุณหภูมิการบ่ม 80 °C 133

จ-13 โครมาโทแกรมองค์ประกอบสารระเหย Lup-20(29)-en-3-one ของความเข้มข้นสารละลายเอทานอล 90% (w/v) และอุณหภูมิการบ่ม 80 °C 134

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญ

ส้มโอ มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ คือ (*Citrus grandis* Osbeck) เป็นไม้ผลที่มีขนาดใหญ่ที่สุดในตระกูลส้ม ปลูกกันอย่างแพร่หลายภายในประเทศ เช่น ภาคกลาง ภาคตะวันออก และภาคตะวันตก ซึ่งได้แก่ นครปฐม ราชบุรี ชัยนาท สมุทรสาคร พิจิตร นครนายก ตราด ชุมพร สงขลา เป็นต้น มีรสชาติดีและนิยมบริโภคอย่างมาก ถือเป็นไม้ผลเศรษฐกิจที่สร้างรายได้ให้กับประเทศไทยด้านการส่งออกมูลค่าเฉลี่ย 137.01 ล้านบาทต่อปี สายพันธุ์ส้มโอที่นิยม คือ สายพันธุ์ทองดี สายพันธุ์ขาวแตงกวา สายพันธุ์ขาวทองดี สายพันธุ์ขาวน้ำผึ้ง และสายพันธุ์ขาวหอม (ทวีศักดิ์ ด้วงทอง และสุนิสา อธิวงศ์ธนวัฒน์, 2553) นอกจากนี้เปลือกส้มโอยังพบองค์ประกอบของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ได้แก่ แคโรทีนอยด์ วิตามินอี ฟลาโวนอยด์ ไลโมนอยด์ องค์ประกอบของฟีนอลิก โพลีแซ็กคาร์ไรด์ ลิกนิน ไฟเบอร์ เพกทิน และน้ำมันหอมระเหย (Chen et al., 2016) งานวิจัยสารสกัดเปลือกส้มโอพบว่าสารสกัดเปลือกส้มโอสายพันธุ์ Tambun White มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่สูงสุดเมื่อเปรียบเทียบกับสารสกัดเปลือกส้มโอสายพันธุ์ Tambun Pink รวมถึงปริมาณกรดแอสคอร์บิคซึ่งเป็นอีกสายพันธุ์หนึ่งที่มีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระที่สูง (Toh et al., 2013) การได้มาซึ่งสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของเปลือกส้มโอสามารถนำไปประยุกต์ใช้ประโยชน์ในด้านต่าง ๆ เช่น การยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค ดังเช่น งานวิจัยของ Suklampoo et al. (2016) ได้ศึกษาการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียและยีสต์ที่ก่อโรคด้วยสารสกัดเปลือกส้มโอพบว่า สารสกัดเปลือกส้มโอที่สกัดด้วยสารละลายเอทิลอะซิเตทมีผลในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์และเชื้อยีสต์ได้ดีที่สุด การสกัดเปลือกส้มโอที่ใช้พื้นที่ผิวตอบสนองสามมิตินั้นมีงานวิจัยก่อนหน้านี้ของ Chen et al. (2016) ได้ศึกษาวิธีการสกัดเปลือกส้มโอในการหาน้ำมันหอมระเหยและเพกทินโดยการใช้พื้นที่ผิวตอบสนองสามมิติในการวิเคราะห์เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมของเพกทิน พบว่า การสกัดด้วยไมโครเวฟเป็นการเพิ่มประสิทธิภาพในการสกัดเปลือกส้มโอในส่วนของน้ำมันหอมระเหย และการผลิตเพกทินซึ่งสามารถนำไปประยุกต์ใช้ประโยชน์ในด้านอุตสาหกรรม และยังพบองค์ประกอบของสารระเหย Ethyl butanoate, β-myrcene, octanal, linalool, α-pinene และ decanal ให้กลิ่นผลไม้ กลิ่นมะนาว กลิ่นส้ม และกลิ่นมิ้นท์ ซึ่งเป็นองค์ประกอบของกลิ่นในเปลือกส้มโอ

งานวิจัยนี้เล็งเห็นประโยชน์จากเปลือกส้มโอ ถือได้ว่าเป็นการลดวัสดุทางการเกษตรและของเหลือใช้ทางการเกษตร เปลือกส้มโอยังมีองค์ประกอบของสารประกอบพวกฟลาโวนอยด์ สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ และองค์ประกอบของสารระเหยเป็นหลัก เป็นวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรที่น่าสนใจสามารถนำมาสกัดเพื่อหาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ สารต้านออกซิเดชัน ด้วยวิธีพื้นผิวตอบสนองสามมิติ นอกจากนี้เป็นแนวทางในการพัฒนาเป็นวัตถุดิบในเครื่องสำอาง และเป็นการลดต้นทุนในการผลิตอีกทางหนึ่งด้วย

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1.2.1 เพื่อศึกษาการสกัดเปลือกส้มโอที่ระดับความเข้มข้นของสารละลายเอทานอล และอุณหภูมิการบ่มที่แตกต่างกัน

1.2.2 เพื่อศึกษาสารต้านออกซิเดชันของสารสกัดเปลือกส้มโอที่ระดับความเข้มข้นของสารละลายเอทานอล และอุณหภูมิการบ่มที่แตกต่างกัน

1.2.3 หาภาวะที่เหมาะสมของสารสกัดเปลือกส้มโอที่ระดับความเข้มข้นของสารละลายเอทานอลและอุณหภูมิการบ่มที่แตกต่างกัน

1.2.4 เพื่อศึกษาองค์ประกอบของสารระเหยของสารสกัดเปลือกส้มโอที่ภาวะเหมาะสม

1.3 ขอบเขตการวิจัย

จากโครงการวิจัยเป็นการพัฒนาวัตถุดิบที่เหลือใช้ทางการเกษตรกรรมนำมาสู่วัตถุดิบที่มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ และองค์ประกอบของสารระเหยที่สำคัญนำไปสู่วัตถุดิบทางเครื่องสำอางโดยการเตรียมและวิธีการสกัดเปลือกส้มโอโดยการควบคุมความเข้มข้นของสารสกัดและอุณหภูมิการบ่มสารสกัดสำหรับวิเคราะห์สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ และฤทธิ์การต้านออกซิเดชันโดยหาภาวะที่เหมาะสมของความเข้มข้นของสารละลายของเปลือกส้มโอด้วยวิธี Response Surface Methodology (RSM) ทำการศึกษาองค์ประกอบของสารระเหยของสารสกัดเปลือกส้มโอ เพื่อหาองค์ประกอบของสารระเหยที่สำคัญในการสารสกัดเปลือกส้มโอ นำไปสู่การทำวัตถุดิบทางเครื่องสำอาง

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.4.1 ทราบถึงสมบัติการออกฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของสารสกัดเปลือกส้มโอ

1.4.2 ทราบความเข้มข้นของสารละลายที่เหมาะสมในการสกัดสารจากเปลือกส้มโอด้วยวิธี Response Surface Methodology (RSM)

1.4.3 ทราบองค์ประกอบของสารระเหยรวมทั้งเทคนิคในการสกัดสารจากเปลือกส้มโอ

1.4.4 การตีพิมพ์เผยแพร่งานวิจัยในระดับชาติ และระดับนานาชาติได้

1.4.5 การต่อยอดงานวิจัยเพื่อนำไปสู่การพัฒนาวัตถุดิบเป็นผลิตภัณฑ์ทางเครื่องสำอางได้

บทที่ 2
แนวคิด ทฤษฎี เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ส้มโอ

2.1.1 ลักษณะทั่วไปและสายพันธุ์

ส้มโอ มีชื่อทางวิทยาศาสตร์คือ (*Citrus grandis* Osbeck) เป็นไม้ผลที่มีขนาดใหญ่ที่สุดในตระกูลส้ม ปลูกกันอย่างแพร่หลายภายในประเทศไทย เช่น ภาคกลาง ภาคตะวันออก และภาคตะวันตก ซึ่งได้แก่ นครปฐม ราชบุรี ชัยนาท สมุทรสาคร พิจิตร นครนายก ตราด ชุมพร สงขลา เป็นต้น มีรสชาติดีและนิยมบริโภคอย่างมาก ถือเป็นไม้ผลเศรษฐกิจที่สร้างรายได้ให้กับประเทศไทยด้านการส่งออกมูลค่าเฉลี่ย 137.01 ล้านบาทต่อปี สายพันธุ์ส้มโอที่นิยม คือ สายพันธุ์ทองดี สายพันธุ์ขาวแตงกวา สายพันธุ์ขาวทองดี สายพันธุ์ขาวน้ำผึ้ง และสายพันธุ์ขาวหอม (ทวีศักดิ์ ด้วงทอง และสุนิสา อธิวงศ์ธนวัฒน์, 2553)

ส่วนลักษณะสัณฐานวิทยาของผลส้มโอนั้น ประกอบด้วย

1) เปลือกชั้นนอกสุด (Exocarp หรือ Flavedo)

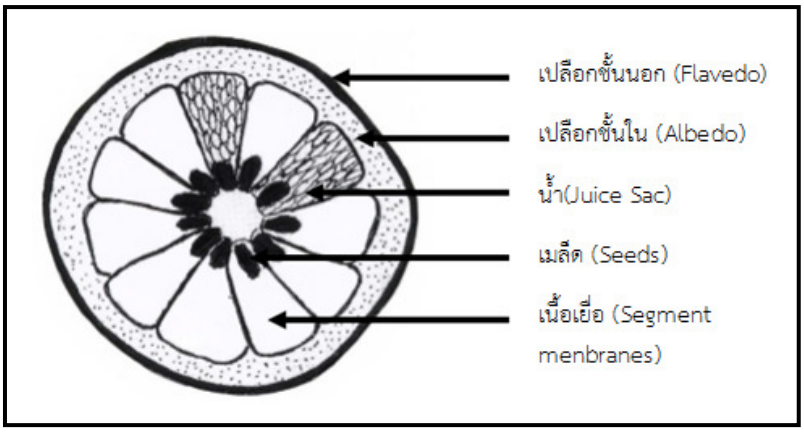
เปลือกชั้นนอกสุดมักจะบางกว่าเปลือกชั้นใน สีของเปลือกชั้นนอกมีสีเขียว และมีลักษณะเหนียว ประกอบด้วยเซลล์ที่มีขนาดเล็ก ๆ เป็นจำนวนมาก ได้แก่ แคโรทีนอยด์ และน้ำมันหอมระเหย (Oil gland) มีอยู่เป็นจำนวนมากและกระจายอยู่ทั่วไปตามผิวของผลส้มโอ เมื่อผลมีขนาดใหญ่ขึ้นจะมีปริมาณต่อมน้ำมันเพิ่มขึ้นเมื่อผลส้มโอสุกจะเกิดการเปลี่ยนแปลง คือ คลอโรพลาสต์มักเปลี่ยนเป็นโครโมพลาสต์ ที่เรียกว่า โครมาโตฟอร์ โดยการสร้างสารแคโรทีนอยด์ทำให้สีที่เปลือกชั้นนอกที่มีสีเขียวเปลี่ยนเป็นสีส้มตามลักษณะสายพันธุ์ต่าง ๆ

2) เปลือกชั้นกลางหรือเปลือกชั้นใน (Mesocarp หรือ Albedo)

เปลือกชั้นในของส้มโอขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของส้มโอ บางสายพันธุ์มีสีขาวอมเหลือง บางสายพันธุ์มีสีชมพู เปลือกชั้นนี้มีทั้งเส้นใยเพคทิน สารพวกเมือก วิตามิน และเอนไซม์ ความหนาเปลือกชั้นในประมาณ 1-3 เซนติเมตร เมื่อจับหรือกดจะอ่อนนุ่มเหมือนฟองน้ำ ในขณะที่ ส้ม มะนาว เลมอน จะมีเปลือกชั้นนอก และชั้นในมีความบางที่ใกล้เคียงกัน

3) เปลือกชั้นในสุดหรือเนื้อเยื่อของผล (Endocarp หรือ Juice sac หรือ segment menbranes)

เนื้อเยื่อของผลถูกเรียงเป็นกลีบของเนื้อส้มโอ มีแกนอยู่ตรงกลางผลสีของเนื้อส้มโอขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของส้มโอ บางสายพันธุ์เนื้อมีสีเหลืองอ่อนสีขาว บางสายพันธุ์เนื้อมีสีชมพูจนถึงสีแดงใน 1 ผลมีกลีบประมาณ 12-14 กลีบ กลีบแต่ละกลีบจะแยกออกจากกันได้ง่ายโดยไม่ยึดติดกันแน่น เนื้อส้มโอที่ใช้รับประทานมีลักษณะเป็นถุงน้ำที่อัดแน่นเป็นระเบียบ มีรสหวานเล็กน้อย หรือหวานอมเปรี้ยว ขนาดของเมล็ดส้มโอจะมีขนาดใหญ่กว่าเมล็ดผลไม้ตระกูลส้มอื่น ๆ ซึ่งในผลเดียวกันอาจมีเมล็ดหลายขนาด สีของเมล็ดมีสีขาวอมเหลือง ผิวของเมล็ดมีลักษณะเป็นร่องเล็ก ๆ โดยจำนวนเมล็ดมักอยู่รวมกันตรงกลางผล ซึ่งแสดงดังภาพที่ 2.1 (Pichaiyongvongdee et al., 2014)



ภาพที่ 2.1 สัณฐานวิทยาของผลส้มโอ
แหล่งที่มา: Pichaiyongvongdee et al. (2014)

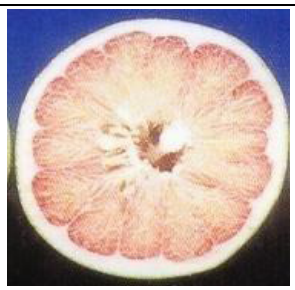
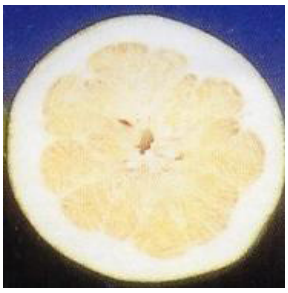
ส้มโอที่ปลูกในประเทศไทยมีอยู่หลายพันธุ์และปลูกหลายจังหวัด จึงมีชื่อที่เรียกแตกต่างกัน ซึ่งสามารถแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ ๆ โดยแบ่งตามสีของเปลือกชั้นในและสีเนื้อส้มโอ ได้แก่ กลุ่มที่ 1 เปลือกชั้นใน และเนื้อเยื่อส้มโอมีสีขาวอมเหลือง ส่วนกลุ่มที่ 2 เปลือกชั้นในและสีเนื้อเยื่อส้มโอมีสีชมพูอ่อน ส่วนสายพันธุ์ที่นิยมปลูกเพื่อเป็นการค้าในภาคกลาง ได้แก่ สายพันธุ์ทองดี สายพันธุ์ขาวน้ำผึ้ง และสายพันธุ์ขาวใหญ่ ดังเช่นตารางที่ 2.1 และตารางที่ 2.2

ตารางที่ 2.1 ลักษณะของสีเปลือกชั้นในและสีเนื้อส้มโอในแต่ละสายพันธุ์

สีเปลือกชั้นในและสีเปลือกส้มโอ	สายพันธุ์ส้มโอ	จังหวัดที่ปลูก
สีขาวอมเหลือง	สายพันธุ์ขาวพวง	นครปฐม สมุทรสาคร ราชบุรี และปราจีนบุรี
	สายพันธุ์ขาวน้ำผึ้ง	นครปฐม สมุทรสาคร
	สายพันธุ์ขาวใหญ่	นครปฐม สมุทรสาคร สมุทรสงคราม และเชียงใหม่
	สายพันธุ์ขาวแป้น	นครปฐม และราชบุรี
	สายพันธุ์ขาวหอม	นครปฐม สมุทรสาคร และราชบุรี
	สายพันธุ์ขาวแตงกวา	ชัยนาท
สีชมพูอ่อน	สายพันธุ์ท่าข่อย	พิจิตร พิษณุโลก และเขตภาคเหนือ
	สายพันธุ์หอมหาดใหญ่	อำเภอหาดใหญ่
	สายพันธุ์ปัตตาเวีย	ชุมพร สุราษฎร์ธานี นครศรีธรรมราช และสงขลา
	สายพันธุ์ทับทิม	นนทบุรี
	สายพันธุ์กรุ่น	อำเภอมโนรมย์ จังหวัดชัยนาท พิจิตร และพิษณุโลก อำเภอสามพราน อำเภอนครไชยศรี
	สายพันธุ์ท่าข่อยบุญยงค์พิจิตร	จังหวัดนครปฐม
	สายพันธุ์ขาวพ้อง	สมุทรสาคร และนนทบุรี

แหล่งที่มา: กรมวิชาการเกษตร (2545)

ตารางที่ 2.2 ลักษณะผลส้มโอสายพันธุ์ต่าง ๆ ที่นิยมปลูกในประเทศไทย

สายพันธุ์ส้มโอ	ลักษณะเปลือกชั้นใน	สีเปลือกชั้นในและเนื้อเยื่อส้มโอ
สายพันธุ์ทองดี	เปลืองค่อนข้างบาง สีของเปลือกใน สีชมพูอ่อน	
สายพันธุ์ขาว น้ำผึ้ง	เปลือกค่อนข้างหนา สีของ เปลือกใน และผนังกลีบมีสีขาว	
สายพันธุ์ขาวใหญ่	เปลือกหนาปานกลาง สีของ เปลือกใน และผนังกลีบมีสีขาว เนื้อมีสีขาวอมเหลือง	

แหล่งที่มา: กรมวิชาการเกษตร (2545)

2.1.2 ข้อมูลทางเศรษฐกิจ

ส้มโอมีความสำคัญทางเศรษฐกิจ เนื่องจากมีผู้บริโภคนิยมรับประทานกันอย่างแพร่หลาย ทั้งภายในประเทศไทยและต่างประเทศ และยังนำมาทำเป็นผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ โดยใช้ส่วนของเนื้อ และเปลือกส้มโอเป็นหลักเพื่อใช้ในการทำเป็นผลิตภัณฑ์อาหาร ขนมหวาน ของคาว และผลิตภัณฑ์ทางเครื่องสำอาง เป็นต้น ดังภาพที่ 2.2 เนื่องจากส้มโอสามารถปลูกและเจริญเติบโตได้ทุกภูมิภาคของประเทศไทย โตเร็วดูแลรักษาง่าย ให้ผลได้ตลอดทั้งปี ดังนั้นจึงทำให้ส้มโอเป็นผลไม้ส่งออกนอกประเทศที่สำคัญของประเทศไทย ทางสำนักงานเศรษฐกิจการเกษตรจึงได้ทำการเปรียบเทียบผลการผลิตและการค้าส้มโอในปี พ.ศ. 2557 - 2559 ดังตารางที่ 2.3 และ 2.4

ยำส้มโอ

เปลือกส้มโอเชื่อม

ส้มโอแก้ว

โลชันบำรุงผิวจากเปลือกส้มโอ

แชมพูและครีมนวดจากเปลือกส้มโอ

เซรั่มบำรุงผิวจากเปลือกส้มโอสกัด

ภาพที่ 2.2 ผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ จากผลส้มโอ
แหล่งที่มา: คณะกรรมาธิการการเกษตรและสหกรณ์ วุฒิสภา (2554)

ตารางที่ 2.3 ปริมาณการผลิตส้มโอทั้งประเทศไทย พ.ศ. 2557 – พ.ศ. 2559

รายการ	พ.ศ. 2557	พ.ศ. 2558	พ.ศ. 2559
เนื้อที่ให้ผล (ไร่)	169,906	169,374	168,963
ผลผลิต (ตัน)	234,980	226,114	240,265
ผลผลิตต่อไร่ (กก.)	1,383	1,335	1,422
ต้นทุนการผลิต (บาท/ตัน)	8,745	9,013	8,518
ราคาที่เกษตรกรขายได้ (บาท/ตัน)	31,210	36,180	33,650
ผลตอบแทนสุทธิ (บาท/ตัน)	22,465	27,167	25,132

แหล่งที่มา: สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร (2559)

ตารางที่ 2.4 ปริมาณการค้าส้มโอทั้งประเทศไทย พ.ศ. 2557 – พ.ศ. 2559

รายการ	พ.ศ. 2557	พ.ศ. 2558	พ.ศ. 2559
ใช้ในประเทศ (ตัน)	222,457	213,934	221,391
ส่งออก			
- ปริมาณ (ตัน)	12,523	12,180	18,874
- มูลค่า (ล้านบาท)	227.88	271.63	375.75
ราคาส่งออก (บาท/ตัน)	18,197	22,302	19,909

แหล่งที่มา: สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร (2559)

2.1.3 สรรพคุณทางยา

ส้มโอถือเป็นพืชที่มีคุณค่าทางอาหารมากมาย อุดมไปด้วยสารอาหาร วิตามิน และแร่ธาตุต่าง ๆ แสดงดังตารางที่ 2.5 ซึ่งตั้งแต่อดีตจนถึงปัจจุบันส้มโอนิยมนำมาประยุกต์ใช้เป็นส่วนประกอบในการรักษาโรคต่าง ๆ เช่น เนื้อส้มโอสามารถแก้อาการเมาสุรา ขับลมในลำไส้ และกระเพาะอาหาร ทำให้เจริญอาหาร มีวิตามินซีสูงช่วยรักษาโรคเลือดออกตามไรฟัน ส่วนรากสามารถช่วยแก้อาการหวัด แก้ไอ แก้ปวด ส่วนใบช่วยแก้อาการปวดข้อ ท้องอืดแน่น และแก้อาการปวดศีรษะ และส่วนเปลือกช่วยแก้ลม (ระบบไหลเวียนโลหิต) แก้เสมหะ และใช้ปรุงเป็นยาหอม (Turapra et al., 2016) แสดงดังภาพที่ 2.3

ตารางที่ 2.5 คุณค่าทางโภชนาการในส้มโอสายพันธุ์ขาวน้ำผึ้งต่อ 100 กรัม

พลังงาน	41	kcal
น้ำ	90	g
น้ำตาล	8.0	g
โปรตีน	0.8	g
ไขมัน	0.2	g
คาร์โบไฮเดรต	9.0	g
ใยอาหาร	1.2	g
เถ้า	0.5	g
โซเดียม	1.0	mg
โพแทสเซียม	218	mg
แมกนีเซียม	8.0	mg
แคลเซียม	8.0	mg
วิตามินซี	41	mg
ฟอสฟอรัส	8.0	mg
เหล็ก	23	mg
สังกะสี	0.18	mg
ไอโอดีน	0.01	µg

แหล่งที่มา: กองโภชนาการ กรมอนามัย กระทรวงสาธารณสุข (2553)

ช่วยบรรเทาอาการไอ

ช่วยบรรเทาอาการท้องอืด

แก้อาการวิงเวียนศีรษะ

ช่วยบรรเทาอาการปวดข้อ

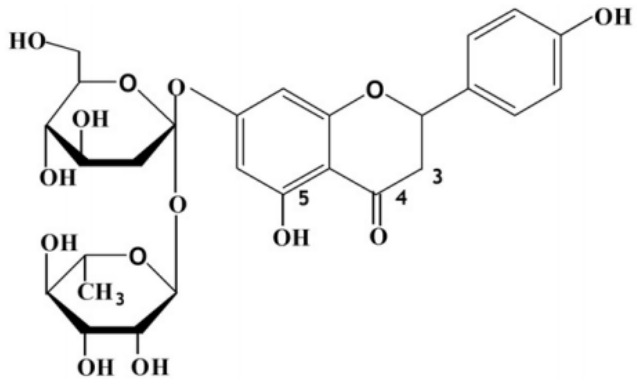
ช่วยรักษาโรคเลือดออกตามไรฟัน

ภาพที่ 2.3 สรรพคุณต่าง ๆ ของผลส้มโอ
แหล่งที่มา: Vijaylakshmi & Radha (2015)

มีงานวิจัยได้ศึกษาสรรพคุณทางยาของเปลือกส้มโอ ดังเช่นงานวิจัยในปี 2013 ได้ศึกษาเนื้อเยื่อของผลส้มโอ 6 สายพันธุ์ พบว่า เนื้อเยื่อผลส้มโอมีผลต่อการยับยั้งไขมันในตับ และลดปริมาณคอเลสเตอรอล และยังพบสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สำคัญ เช่น สารประกอบฟีนอลิกรวม เป็นต้น (Makynen et al., 2013) เช่นเดียวกับการศึกษาสารสกัดจากเปลือกส้มโอกับหนูทดลองเพื่อทดสอบความผิดปกติในการเผาผลาญ พบว่าสารสกัดจากเปลือกส้มโอมีองค์ประกอบของสารกลุ่มฟลาโวนอยด์รวมที่สามารถช่วยลดปริมาณกลูโคสในเลือด ลดไขมัน LDL จากตับ ป้องกันโรคอ้วนที่เกิดจากอาหารที่มีไขมันสูง (HF Diet) นอกจากนี้ช่วยลดปริมาณไขมันและภาวะน้ำตาลในเลือดสูงได้ จึงชี้ให้เห็นว่าสารสกัดจากเปลือกส้มโอมีประสิทธิภาพในการรักษาความผิดปกติในการเผาผลาญ (Ding et al., 2013) งานวิจัยของ Caengprasath et al. (2013) ได้ศึกษาสารสกัดจากเปลือกส้มโอเพื่อวัดค่าการยับยั้งการปฏิกิริยาเมลลาร์ด ซึ่งเป็นขบวนการเกิดสารสีน้ำตาลที่ไม่ต้องใช้เอนไซม์ (Antiglycation) ที่มีผลในการต่อต้าน fructose-mediated protein oxidation และ glycation พบว่าสารสกัดเปลือกส้มโอมีองค์ประกอบของฟลาโวนอยด์ประเภท naringin, hesperidin, neohesperidin และ naringenin ช่วยยับยั้งการเกิด Advanced Glycation end Products (AGEs) และลดระดับ Fructosamine ในเลือด ซึ่งเกี่ยวข้องโดยตรงกับการลดลงของ AGEs and N^{ε}- (carboxymethyl) lysine (CML) นอกจากนี้ยังช่วยยับยั้งการเกิดอนุมูลอิสระของโปรตีน (Protein Oxidation) ป้องกันการสูญเสีย thiol groups และโครงสร้างโปรตีนหมู่คาร์บอนิลถูกลดลง ส่วนในปี 2015 ได้ศึกษาโครงสร้างพฤกษเคมีของเปลือกส้มโอ พบว่าในเปลือกส้มโอมีสารที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพหลายชนิด เช่น คาร์โบไฮเดรต แคโรทีนอยด์ คูมาริน และปริมาณฟลาโวนอยด์รวม มีฤทธิ์ช่วยในการยับยั้งอาการปวด และการอักเสบ ยับยั้งการเกิด

เนื้องอก ป้องกันโรคตับ และยับยั้งแบคทีเรียพวก *Escherichia coli* และ *Salmonella Typhimurium* (Vijaylakshmi & Radha 2015) นอกจากนี้งานวิจัยของ Chowdhury et al. (2015) ได้ศึกษาผงเปลือกส้มโอใช้เป็นอาหารเสริมเพื่อป้องกันความเป็นพิษต่อตับซึ่งทดลองในหนู พบว่าผงเปลือกส้มโอสามารถป้องกันการอักเสบของเซลล์และโรคอ้วนในหนูเนื่องจากในผงเปลือกส้มโอมีองค์ประกอบของ naringin ช่วยป้องกันธาตุเหล็กอิสระในเนื้อเยื่อซึ่งเป็นสาเหตุหลักในการทำลายเนื้อเยื่อนอกจากนี้ยังสามารถใช้ผงส้มโอได้ถึง 2,000 mg/kg โดยไม่ทำให้เกิดความเป็นพิษในหนู และในปี 2017 ได้ศึกษาองค์ประกอบส่วนต่าง ๆ ของผลส้มโอ พบว่าในส่วนของเปลือกส้มโอมีองค์ประกอบของแคโรทีนอยด์มากกว่า 115 ชนิด ช่วยส่งเสริมการทำงานของกระเพาะอาหาร ยับยั้งการอักเสบ กระตุ้นหัวใจ และลดอาการไอ นอกจากนี้สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคด้วยวิธีการหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ได้ (Minimum Inhibitory Concentration ; MIC) และวิธีการหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้ (Minimum Bactericidal Concentration ; MBC) โดยช่วงความเข้มข้นของการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์อยู่ระหว่าง 0.4 - 50.0 mg/ml ซึ่งสามารถยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ *Staphylococcus aureus, Streptococcus pyogenes, Enterococcus feacalis, Pseudomonas aeruginosa, Klebsiella pneumoniae, Escherichia coli, Salmonella typhi, Proteus* spp. และ *Moraxella catarrhalis* ตามลำดับ (Singh & Navneet, 2017)

จะเห็นได้ว่าส่วนเปลือกและผลของส้มโอมีสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพมากมายโดยพบองค์ประกอบทางเคมีที่สำคัญ ได้แก่ Acridone, Acronycine, Anthranilate, Apigenin, Bergamottin, Camphor, Citral, Hesperidine, Limonene, Limonin, Linalool, Myricetin, Naringenin, Nerol, Nomilin, Pinene, Quercetin, Rutin, Scopoletin, Umbelliferone และสารให้ความขมในเปลือกชื่อ Naringin ซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักของเปลือกส้มโอโดยบ่งบอกถึงคุณสมบัติในการเป็นพืชสมุนไพรและพบว่า naringin มีปริมาณมากถึง 99.8% และมีปริมาณ 96% ของฟลาวาโนนไกลโคไซต์ทั้งหมดโดยพบมากในผลส้มโอที่แก่เต็มวัย (Sudto et al., 2009) ซึ่งโครงสร้างของ Naringin ดังภาพที่ 2.4



ภาพที่ 2.4 โครงสร้างของ Naringin
แหล่งที่มา: Chen et al. (2016)

งานวิจัยของ Sudto et al. (2009) ได้ทดสอบหาองค์ประกอบของ naringin โดยแยกจากเปลือกส้มโอ 4 สายพันธุ์ ได้แก่ สายพันธุ์ขาวแตงกวา สายพันธุ์ขาวใหญ่ สายพันธุ์ขาวน้ำผึ้ง และสายพันธุ์ทองดีด้วยการพัฒนาวิธีการทดสอบอย่างง่ายให้มีประสิทธิภาพซึ่ง พบว่าสายพันธุ์ขาวแตงกวา สายพันธุ์ขาวใหญ่ สายพันธุ์ขาวน้ำผึ้ง และสายพันธุ์ทองดีมีปริมาณ Naringin บริสุทธิ์เท่ากับ 24, 22, 20 and 16 mg of naringin g^{-1} ของน้ำหนักเปลือกแห้ง ตามลำดับ แสดงให้เห็นถึงความบริสุทธิ์ของ naringin > 98% ของความบริสุทธิ์

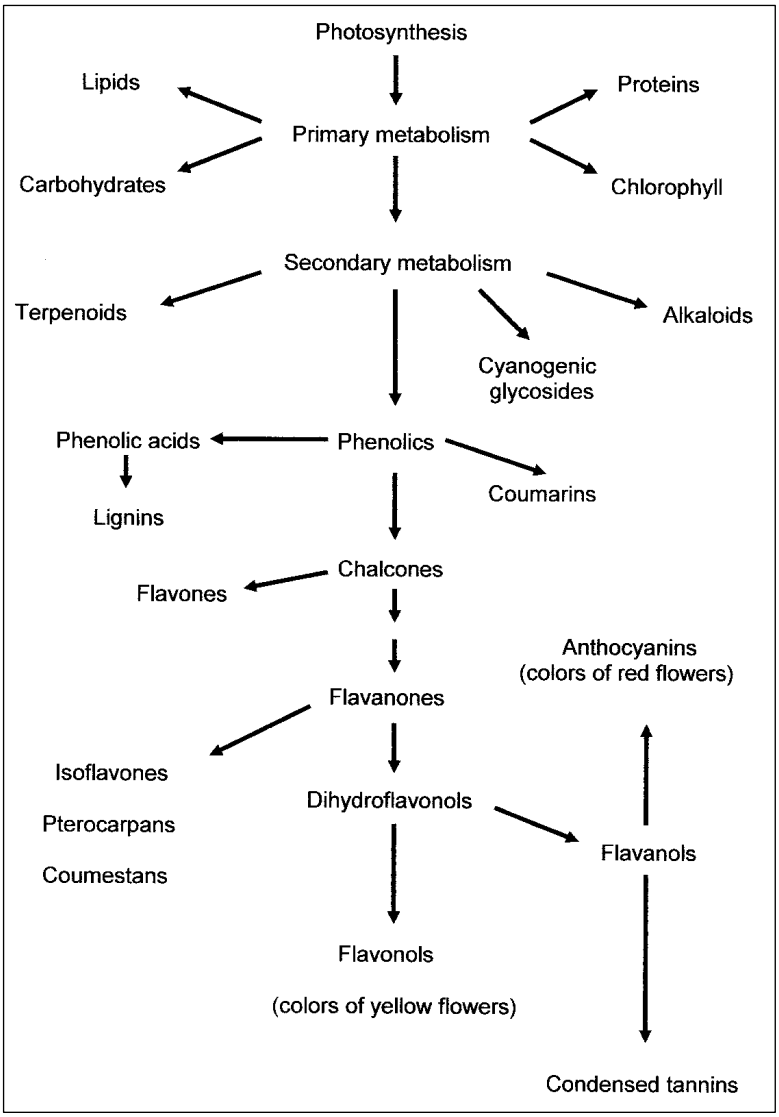
จากข้อมูลการขยายตัวทางด้านเศรษฐกิจของส้มโอจะเห็นว่าส้มโอสายพันธุ์ขาวน้ำผึ้งเป็นสายพันธุ์ที่กำลังเป็นที่นิยม เนื่องจากผลผลิตที่ได้มีคุณภาพดี และเป็นที่ต้องการของท้องตลาดทั้งในและต่างประเทศ จึงคาดการณ์ได้ว่ามีแนวโน้มในการผลิตที่สูงขึ้น นอกจากนี้ข้อมูลสรรพคุณทางยาของส้มโอยังมีงานวิจัยที่แพร่หลายทั้งในส่วนของใบ เมล็ด เนื้อ หรือแม้แต่เปลือกส้มโอซึ่งถือว่าเป็นที่นิยมนำมาสกัดเพื่อใช้ในการรักษา เนื่องจากเป็นวัสดุทางการเกษตรที่สามารถลดต้นทุนการผลิตได้ จึงคาดว่าเปลือกส้มโออาจมีการนำมาสกัดเป็นเพื่อใช้เป็นองค์ประกอบในผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ ได้ ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงเลือกใช้เปลือกส้มโอในการประเมินฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และองค์ประกอบสารระเหยจากความเข้มข้นของสารละลายและอุณหภูมิการบ่มในสภาวะที่แตกต่างกัน ช่วยลดวัสดุทางการเกษตร และเพื่อพัฒนาไปเป็นวัตถุดิบในเครื่องสำอางให้มีมูลค่าที่สูงขึ้น

2.2 สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ

2.2.1 นิยามสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ

สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ หมายถึง สารที่ได้จากสิ่งมีชีวิตตามธรรมชาติมีอยู่ในอาหาร พืช ผัก ผลไม้ เช่น วิตามิน พอลิฟีนอล ใยอาหาร กรดอะมิโน สารต้านอนุมูลอิสระและเอนไซม์ เป็นต้น โดยอยู่บริเวณไซโตพลาสซึมและมีสารบางส่วนที่อยู่บริเวณพอลิแซ็กคาไรด์กับลิกนินบนผนังเซลล์ (Rosenthal et al., 1996) สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพถือเป็นส่วนหนึ่งของห่วงโซ่อาหารซึ่งมีความสำคัญต่อร่างกายมนุษย์ (Biesalski et al., 2009) มีคุณสมบัติในการลดความเสี่ยงในการเกิดโรคมะเร็ง โรคหัวใจและโรคเรื้อรังอื่น ๆ (Joshipura et al., 2001) ในพืช ผัก และผลไม้ต่าง ๆ เช่น ส้มโอ ข้าวโพด ลำไย ลิ้นจี่ ส้ม มะเขือเทศ และชา มักพบสารฟีนอลิก แคโรทีนอยด์ และโทโคฟีรอล ซึ่งมีคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระ

ในสิ่งมีชีวิตตั้งแต่สิ่งมีชีวิตขนาดเล็กเซลล์เดียวไปจนถึงพืช จะมีการสร้างสารประกอบต่าง ๆ เพื่อการดำรงชีพและการอยู่รอด ซึ่งสามารถแบ่งสารประกอบที่สร้างขึ้นได้เป็นสองชนิด ได้แก่ สารปฐมภูมิ (Primary metabolites) คือสารที่สร้างขึ้นเพื่อการเจริญเติบโต เช่น ไขมัน โปรตีน คาร์โบไฮเดรต และกรดอะมิโน สำหรับสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของพืชนั้นจะถูกสร้างขึ้นมาในรูปแบบของสารทุติยภูมิ (Secondary metabolites) (Bernhoft, 2010) ซึ่งเป็นสารที่สร้างขึ้นระหว่างการเจริญเติบโตโดยให้พืชสามารถดำรงชีวิตอยู่รอดได้ในสิ่งแวดล้อม แสดงดังภาพที่ 2.5



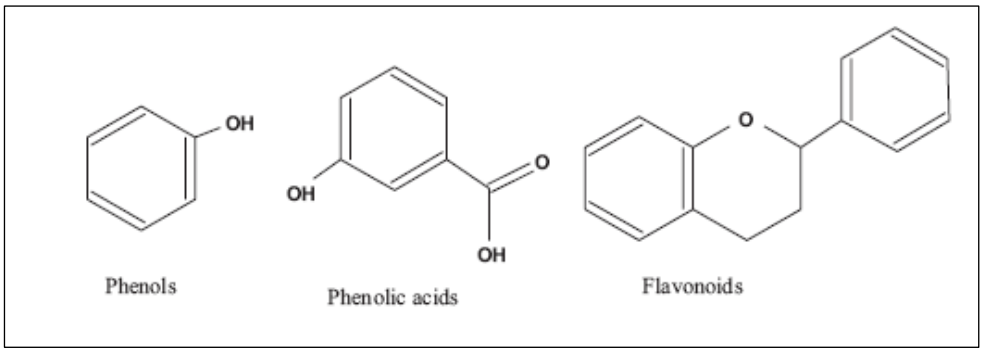
ภาพที่ 2.5 ความสัมพันธ์ระหว่าง Primary metabolism และ Secondary metabolism ในพืช
แหล่งที่มา: Giada (2013)

2.2.2 ปฏิกิริยาและชนิดของสารออกซิเดชัน/สารต้านอนุมูลอิสระ

1) สารประกอบฟีนอลิกรวม (Total Phenolic Compounds)

สารประกอบฟีนอลิกรวม เป็นกลุ่มของสารที่มีหมู่ฟีนอล ซึ่งเป็นวงแหวนเบนซินมีหมู่ไฮดรอกซี (OH) มาเกาะอย่างน้อยหนึ่งหมู่ สารประกอบฟีนอลมีองค์ประกอบพื้นฐาน คือ สารฟีนอล (Phenol Compounds) ในโมเลกุลประกอบด้วยวงแหวนเบนซินจำนวน 1 วง และหมู่ไฮดรอกซิล จำนวน 1 หมู่ เป็นสารกลุ่มใหญ่ในธรรมชาติพบทั่วไปในพืช ผัก และผลไม้ ส่วนใหญ่จะพบมากบริเวณเนื้อเยื่อผิวด้านนอกของพืช มีสมบัติเป็นสารต้านออกซิเดชัน (antioxidant) สามารถละลายได้ในน้ำ (Radenkovs et al., 2014) ดังภาพที่ 2.6 โดยจะอยู่เป็นอิสระหรือเกาะกลุ่มกันในขณะที่พันธะของ

สารประกอบฟีนอลิกเป็นพันธะเอสเทอร์เชื่อมกับผนังเซลล์ที่เป็นพอลิเมอร์ (Vichapong et al., 2010) สารประกอบฟีนอลิกรวมมีองค์ประกอบของสารย่อย ได้แก่ ฟีนิลโพรพานอยด์ (Phenylpropanoids) ฟีนิลเอทานอยด์ (Phenylethanoids) ฟลาโวนอยด์ (Flavonoids) เบนโซฟูราน (Benzofurans) แอนทราคิวโนน (anthraquinones) คูมาริน (Coumarins) แทนนิน (Tannins) และนีโอลิกแนน (Neolignans) เป็นต้น ชนิดของฟีนิลเอทานอยด์ (Phenylethanoids) และฟีนิลโพรพานอยด์ (Phenylpropanoids) ซึ่งเป็นองค์ประกอบที่สำคัญของพืชในส่วนของ Secondary metabolites (Giada, 2013) ดังภาพที่ 2.5



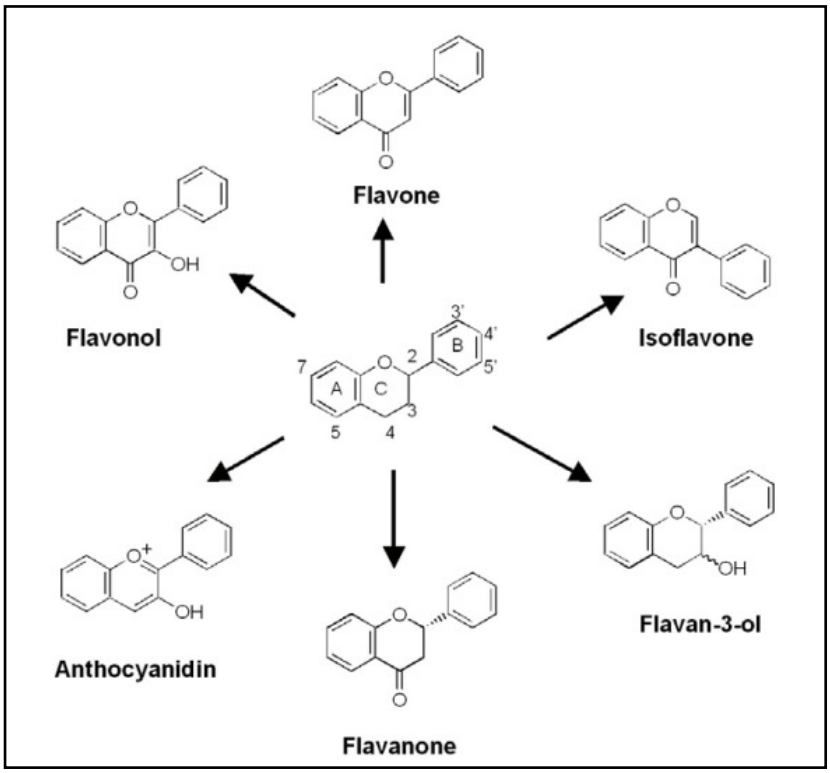
ภาพที่ 2.6 โครงสร้างทั่วไปของสารประกอบฟีนอลิก
แหล่งที่มา: Jideani et al. (2014)

สารประกอบฟีนอลิกรวมที่พบในธรรมชาติมีหลายชนิดด้วยกัน และมีลักษณะสูตรโครงสร้างทางเคมีที่แตกต่างกัน ตั้งแต่กลุ่มโครงสร้างอย่างง่าย เช่น กรดฟีนอลิก (Phenolic acids) ไปจนถึงกลุ่มโครงสร้างที่เป็นพอลิเมอร์ เช่น ลิกนิน (Lignin) กลุ่มใหญ่ที่สุดที่พบได้แก่ สารประกอบฟลาโวนอยด์ (Flavonoid) เป็นต้น สารประกอบฟีนอลที่พบในพืชส่วนใหญ่มักจะรวมอยู่ในโมเลกุลของน้ำตาลรูปของสารประกอบไกลโคไซด์ (Glycoside) ชนิดของน้ำตาลที่พบมากที่สุดในโมเลกุลของสารประกอบฟีนอล ได้แก่ น้ำตาลกลูโคส (Glucose) และอาจมีการรวมตัวกันระหว่างสารประกอบฟีนอล หรือสารประกอบฟีนอลกับสารประกอบอื่น ๆ เช่น กรดอินทรีย์ (Organic acid) รวมอยู่ในโมเลกุลของโปรตีน เป็นต้น สารประกอบฟีนอลจะพบอยู่ในส่วนของช่องว่างภายในเซลล์ (Cell vacuole) ในส่วนต่าง ๆ ของพืช เป็นสารประกอบที่ถูกสร้างขึ้นเพื่อประโยชน์ในกระบวนการเจริญเติบโตและการขยายพันธุ์ของพืชแต่ละชนิด รวมถึงเปลือกส้มโอที่เป็นแหล่งสารประกอบฟีนอลิกที่สำคัญหลายชนิดดังเช่นงานวิจัยของ Turapra et al. (2016) ได้วิเคราะห์ปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของส้มโอ 3 สายพันธุ์ ได้แก่ สายพันธุ์ทับทิมสยาม สายพันธุ์ทองดี และสายพันธุ์ขาวน้ำผึ้ง พบว่าปริมาณฟีนอลิกของเปลือกนอกจากส้มโอทั้ง 3 สายพันธุ์มีปริมาณที่สูงโดยมีค่าเท่ากับ 14.20±0.38, 12.74±0.24 และ 10.20±0.20 mg/g extract ตามลำดับ เช่นเดียวกับงานวิจัยของ Toh et al. (2013) ได้ศึกษาคุณสมบัติของสารต้านอนุมูลอิสระของส้มโอ 2 สายพันธุ์ได้แก่ Tambun White และ Tambun Pink และเปรียบเทียบปริมาณฟีนอลิกรวมระหว่างส่วนเปลือกและส่วนเนื้อของส้มโอแต่ละสายพันธุ์ พบว่าปริมาณฟีนอลิกรวมในส่วนของเปลือกของทั้ง 2 สายพันธุ์มีปริมาณที่มากกว่าส่วนของเนื้อเท่ากับ

406.65±1.85 และ 300.56±3.39 mg GAE/100 g fresh weight ตามลำดับ ในขณะที่ส่วนของเนื้อมีปริมาณฟีนอลิกรวมเท่ากับ 70.56±1.34 และ 61.72±2.48 mg GAE/100 g fresh weight ตามลำดับ

2) ฟลาโวนอยด์รวม (Total Flavonoids)

ฟลาโวนอยด์รวม (Total Flavonoid) เป็นองค์ประกอบของพอลิฟีนอลิกที่ถูกสร้างขึ้นในรูปแบบสารทุติยภูมิ (Secondary metabolism) ในพืชประกอบด้วยวงอะโรมาติก 2 วงขึ้นไป โดยมีการจับกับคาร์บอนและ Aromatic hydroxyl สารกลุ่มฟลาโวนอยด์ที่พบได้ในธรรมชาติมีมากกว่า 4,000 ชนิด โดยมีโครงสร้างพื้นฐานเป็นฟีนิลเบนโซไพโรน (Phenyl benzopyrone) ซึ่งสามารถแบ่งเป็นกลุ่มย่อย ตามโครงสร้างเคมีได้ 7 กลุ่ม ได้แก่ ฟลาโวนอล (Flavonols) ฟลาโวน (Flavones) ฟลาวาโนน (Flavanones) ฟลาวานอล (Flavanols) ฟลาวาโนนอล (Flavanonols) ไอโซฟลาโวน (Isoflavones) และแอนโทไซยานิดิน (Anthocyanidins) (Nishiumi et al., 2011) ดังภาพที่ 2.7 ซึ่งสารในกลุ่มฟลาโวนอยด์รวมจัดเป็นสารจำพวก Nutraceutical มีคุณสมบัติเป็นสารต้านออกซิเดชัน (Antioxidant) โดยทำหน้าที่ในการหน่วงเหนี่ยวหรือเป็นสารต้านปฏิกิริยาออกซิเดชัน (oxidation) จึงช่วยหยุดปฏิกิริยาลูกโซ่ของอนุมูลอิสระ แหล่งอาหารที่พบฟลาโวนอยด์รวมมาก ได้แก่ พืช ผัก เช่น หัวหอม ผักกาดหอม กะหล่ำ และบร็อคโคลี่ ในผลไม้ เช่น ผลไม้ตระกูลส้ม สารสกัดจากเมล็ดองุ่น เป็นต้น ดังเช่นงานวิจัยของ Zarina & Tan (2013) ได้ศึกษาสารสกัดหยาบชั้นเมทานอลและเอทานอลจากเปลือกส้มโอในการหาปริมาณฟลาโวนอยด์ด้วยวิธีการวัดสีโดยระบบ Chromogenic system ของ $NaNO_2$–Al $(NO_3)_3$–NaOH พบว่าสารสกัดหยาบชั้นเอทานอลให้ปริมาณฟลาโวนอยด์สูงสุดเท่ากับ 190.42 mg/L ต่อมาในปี 2014 ได้ศึกษาผลส้มโอในส่วนของเปลือกชั้นนอก (Flavedo) เปลือกชั้นใน (Albedo) เมล็ด (Seeds) และเนื้อเยื่อของผล (Segment membranes) ของส้มโอ 7 สายพันธุ์ ได้แก่ สายพันธุ์ขาวน้ำผึ้ง สายพันธุ์ทองดี สายพันธุ์ขาวแป้น สายพันธุ์ขาวใหญ่ สายพันธุ์ท่าข่อย สายพันธุ์ปัตตาเวีย และสายพันธุ์ขาวแตงกวาในการวิเคราะห์พอลิฟีนอลรวม พบว่าในส่วนของเปลือกชั้นนอก (Flavedo) ของส้มโอสายพันธุ์ขาวน้ำผึ้งให้ปริมาณพอลิฟีนอลรวมมากกว่าสายพันธุ์ขาวใหญ่ สายพันธุ์ขาวแตงกวา สายพันธุ์ปัตตาเวีย และสายพันธุ์ขาวแป้น ซึ่งมีค่าเท่ากับ 2,014.08±153.68, 1,854.42±130.65, 1,895.75±251.92, 1,581.04±179.32 และ 1,096.27±66.780 $\mu g.g^{-1}$,DW ตามลำดับ (Pichaiyongvongdee et al., 2014) นอกจากนี้งานวิจัยของ Fidrianny et al. (2016) ได้ศึกษาเปลือกส้มโอโดยใช้ตัวทำละลายเอทานอล เฮกเซน และเอทิลอะซิเตทในการสกัดเปลือกส้มโอเพื่อหาปริมาณฟลาโวนอยด์ พบว่าการสกัดด้วยตัวละลายเอทิลอะซิเตทให้ปริมาณฟลาโวนอยด์มากที่สุด รองลงมาคือเฮกเซน และเอทานอลมีค่าเท่ากับ 5.69, 3.31 และ 1.17 g QE/100 g ตามลำดับ

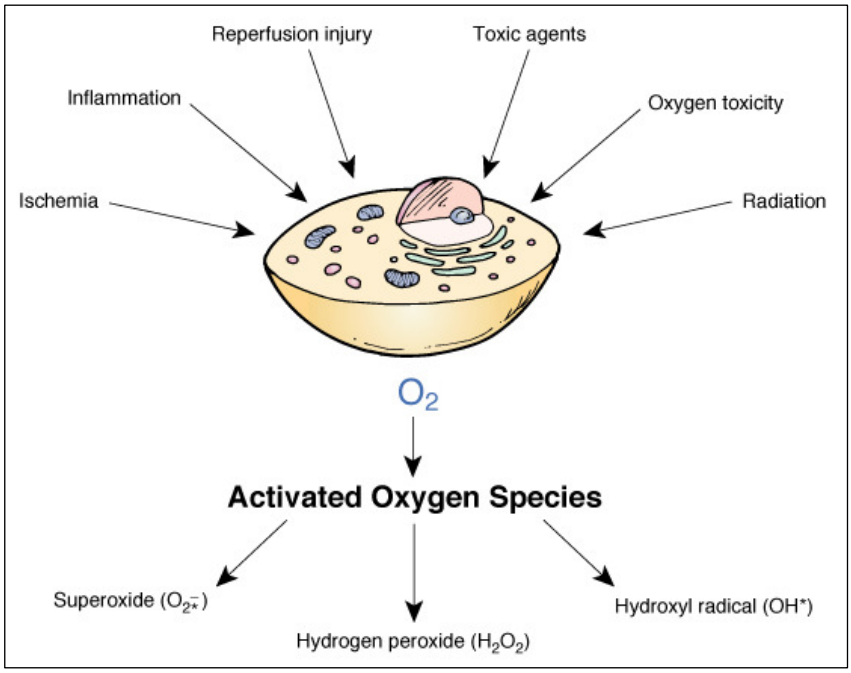


ภาพที่ 2.7 โครงสร้างพื้นฐานของฟลาโวนอยด์
แหล่งที่มา: Nishiumi et al. (2011)

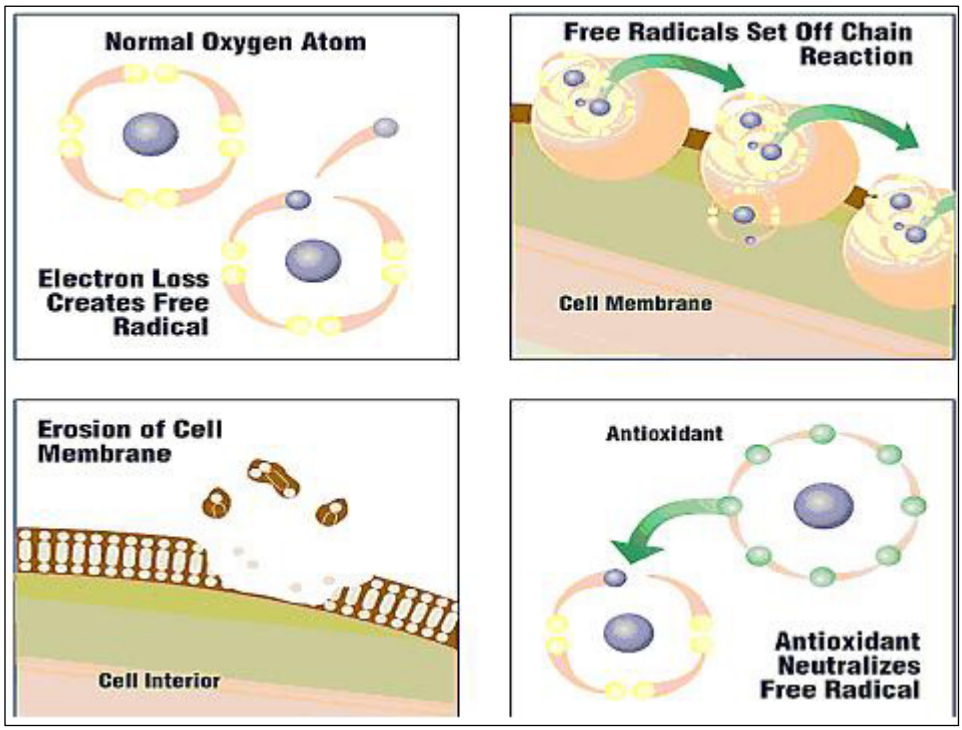
3) อนุมูลอิสระ (Free radical)

อนุมูลอิสระ คือ อะตอม โมเลกุลซึ่งมีอิเล็กตรอนคู่โดดเดี่ยวหรือการจัดเรียงเป็นเชลล์เปิด (Open shell) อนุมูลอิสระอาจมีประจุที่เป็นบวก ลบ หรือเป็นศูนย์ด้วยข้อยกเว้นบางประการ อิเล็กตรอนคู่โดดเดี่ยวเหล่านี้ทำให้อนุมูลอิสระว่องไวต่อปฏิกิริยาสูง ดังภาพที่ 2.8 (Sarma et al., 2010) โดยจะดึงอิเล็กตรอนจากโมเลกุลใกล้เคียงโมเลกุลอื่นเพื่อทำให้ตัวเองเสถียร โมเลกุลที่ถูกดึงก็จะเกิดความไม่เสถียร กลายเป็นอนุมูลอิสระเป็นปฏิกิริยาลูกโซ่ต่อไป ดังภาพที่ 2.9 สารอนุมูลอิสระเป็นตัวเร่งให้เกิดความชราและเป็นสาเหตุของการเกิดโรคต่าง ๆ เช่น โรคเลือดหัวใจอุดตัน เบาหวาน โรคหัวใจ การอักเสบ และโรคมะเร็ง (Baghiani et al., 2011) การเกิดอนุมูลอิสระสามารถเกิดได้ 2 แบบ คือ Endogenous เป็นอนุมูลอิสระที่เกิดจากภายในร่างกายสร้างขึ้นเอง เช่น กระบวนการเผาผลาญในร่างกาย ระบบทางเดินหายใจ โดยอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นภายในร่างกายมนุษย์นั้นจะอยู่ในรูปของ Superoxide anion ($O_2^{\cdot-}$), Hydrogen peroxide (H_2O_2) และ Hydroxyl radical (•OH) เมื่อร่างกายมีการเผาผลาญเมตาบอลิซึม จะเกิดการสะสมของอนุมูลอิสระเหล่านี้ จนก่อให้เกิดการทำลายเซลล์และเกิดโรคต่าง ๆ (Ames, 1998) ส่วน Exogenous เป็นอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นจากภายนอกร่างกายมนุษย์ เช่น แสงแดด ควันจากบุหรี่หรือท่อรถยนต์ มลพิษ สารพิษ และสารเคมีชนิดต่าง ๆ (Sailaja et al., 2011) นอกจากนี้อนุมูลอิสระยังเป็นสาเหตุของการเกิดออกซิเดชันของน้ำมัน (Lipid Peroxidation) ซึ่งก่อให้เกิดการเสื่อมของน้ำมัน และการเหม็นหืนของอาหารรวมถึงเสียคุณค่า

ทางโภชนาการเช่นกัน (Pan et al., 2007) ปฏิกิริยาออกซิเดชันของน้ำมัน (Lipid Peroxidation) อนุมูลอิสระทำปฏิกิริยาออกซิเดชันกับกรดไขมันไม่อิ่มตัว (Unsaturated fatty acid) ซึ่งมีพันธะคู่หรือพันธะสามในโมเลกุลก่อให้เกิดสารจำพวกไฮโดรคาร์บอน คีโตน และสารประกอบแอลดีไฮด์ เช่น มาลอนไดอัลดีไฮด์ (Malondialdehyde) ซึ่งเป็นสาเหตุของการเสื่อมสภาพของเซลล์ การเกิดออกซิเดชันของไขมันประกอบด้วย 3 ขั้นตอน ได้แก่ ขั้นตอนเริ่มต้น (Initiation) เป็นขั้นตอนการเกิดอนุมูลอิสระจากการถูกกระตุ้นด้วยตัวออกซิแดนซ์แสง รังสี หรือความร้อน ส่งผลให้คาร์บอนที่ตำแหน่งพันธะคู่หรือพันธะสามของไขมันสูญเสียอะตอมไฮโดรเจนได้เป็นกรดไขมันที่ไม่เสถียร จากนั้นสู่ขั้นตอนการแพร่ขยาย (Propagation) เป็นขั้นตอนการเกิดปฏิกิริยาลูกโซ่ โดยออกซิเจนทำปฏิกิริยาออกซิเดชันที่ตำแหน่งอนุมูลอิสระของกรดไขมันเกิดเป็นอนุมูลอิสระเปอร์ออกซี (ROO•) และเปลี่ยนเป็นไฮโดรเปอร์ออกไซด์ (ROOH) เมื่อทำปฏิกิริยากับกรดไขมันไม่อิ่มตัวที่อยู่ข้างเคียง ขั้นตอนสุดท้าย (Termination) เป็นขั้นตอนการก่อตัวของอนุมูลอิสระเป็นสารใหม่ เช่น คีโตน แอลกอฮอล์ หรือ แอลดีไฮด์ เป็นต้น ซึ่งส่งผลต่อกลิ่น รส และการหืนของน้ำมัน



ภาพที่ 2.8 รูปร่างของอนุมูลอิสระ
แหล่งที่มา: Sarma et al. (2010)



ภาพที่ 2.9 การเกิดอนุมูลอิสระ ปฏิกิริยาลูกโซ่ การทำลายเซลล์ และการต้านอนุมูลอิสระ
แหล่งที่มา: Kancheva & Kasaikina (2012)

4) สารต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant)

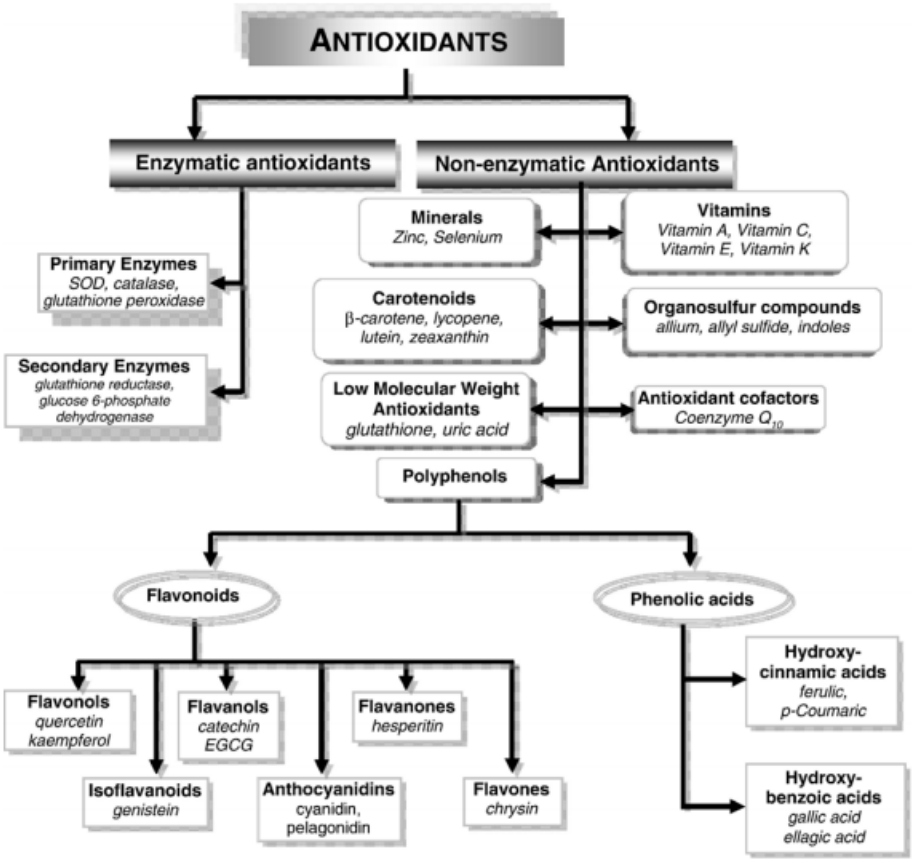
สารต้านอนุมูลอิสระ หมายถึง โมเลกุลสารที่สามารถจับกับตัวรับและยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของโมเลกุลสารอื่น ๆ ได้โดยการกำจัด Reactive oxygen species (ROS) และ Reactive nitrogen species (RNS) หรือป้องกันการสร้าง ROS และ RNS ส่งผลให้สามารถยับยั้งอันตรายที่เกิดจากอนุมูลอิสระแสดงดังตารางที่ 2.6 ทำให้ปฏิกิริยาลูกโซ่ชะลอหรือหยุดลง (Azzi et al., 2004; Halliwell, 1996) โดยสารต้านอนุมูลอิสระจะมีขั้นตอนการป้องกันอนุมูลอิสระอยู่และสามารถแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มได้แก่ กลุ่ม Enzymatic antioxidants สร้างขึ้นภายในเซลล์ทำหน้าที่กำจัดอนุมูลอิสระ เช่น Superoxide dismutase (SOD) ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาในการเปลี่ยน Superoxide ให้เป็น Oxygen และ Hydrogen peroxide (MaCord, 1986) Catalase (CAT) ช่วยเร่งปฏิกิริยาการเปลี่ยน Hydrogen peroxide ให้เป็น Oxygen และน้ำ Glutathione peroxidase (GPx) ช่วยเร่งปฏิกิริยาการสลลาย Hydrogen peroxide กลายเป็นน้ำและแอลกอฮอล์ สำหรับกลุ่ม Non-enzymatic antioxidants เป็นสารที่สังเคราะห์ขึ้นเองภายในเซลล์ ส่วนมากเป็นสารต้านออกซิเดชันที่ได้จากการบริโภค สามารถแบ่งได้หลายชนิด เช่น วิตามินอี วิตามินซี โทโคฟีรอล แคโรทีนอยด์ และสารประกอบฟีนอลิก เป็นต้น (Percival, 1998) พบว่าสารประกอบกลุ่มที่ใหญ่ที่สุดคือสารประกอบ Polyphenol ซึ่งเป็นสารที่พบได้ทั่วไปในธรรมชาติ พืช ผัก และผลไม้มีคุณสมบัติในการต้านออกซิเดชัน โดยโครงสร้างเป็นโมเลกุลวงแหวนหกเหลี่ยมเชื่อมต่อกัน เป็นสารประกอบที่มีโมเลกุลขนาดใหญ่ สารกลุ่มนี้มีอยู่มากมาย เช่น กรดฟีนอลิก (Phenolic acid) แทนนิน (Tannin)

กรดแอลลาจิค (Ellagic acid) เคอร์คูมิน (Curcumin) และฟลาโวนอยด์ (Flavonoid) (Sinha et al., 2009; Youn & H.S., 2012) ดังภาพที่ 2.10

ตารางที่ 2.6 ชนิดของ ROS และสารต้านอนุมูลอิสระที่สอดคล้องกับ ROS

ชนิดของ ROS	ชนิดของ Neutralizing antioxidants
Hydroxyl radical	Vitamin C, Glutathione, Flavonoids, Lipoic acid
Superoxide radical	Vitamin C, Glutathione, Flavonoids, SOD
Hydrogen peroxide	Vitamin C, Glutathione, β-carotene, Vitamin E, CoQ10, Flavonoids, Lipoic acid
Lipid peroxides	β-carotene, Vitamin E, Ubiquinone, Flavonoids, Glutathione peroxidase

แหล่งที่มา: Percival (1998)

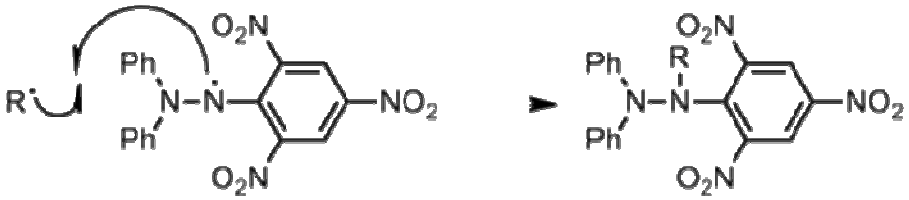


ภาพที่ 2.10 ประเภทของสารต้านอนุมูลอิสระ
แหล่งที่มา: Ratnam et al. (2006)

2.2.3 หลักการวิเคราะห์การต้านอนุมูลอิสระ

1) วิธี 1,1-Diphenyl-2-picylhydrazyl (DPPH) radical scavenging

เป็นการวัดความสามารถการทดสอบในการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH• โดยใช้วิธีให้ไฮโดรเจนอะตอมหรืออิเล็กตรอน เมื่อสารที่มีฤทธิ์ออกซิเดชันให้ไฮโดรเจนอะตอมกับอนุมูลอิสระ DPPH• ในตัวทำละลายเมทานอล ส่งผลให้สารละลายเปลี่ยนจากสีม่วงเป็นสีเหลือง แสดงดังภาพที่ 2.11 ความเข้มข้นของสารละลายที่เป็นสีม่วงจะลดลงหากมีความสามารถในการต้านออกซิเดชันที่สูง โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 515 nm วิธี DPPH มีข้อดีคือทำการวิเคราะห์ได้ง่าย มีความสะดวกรวดเร็วและให้ความถูกต้อง ส่วนข้อเสียคือ ไม่สามารถแยกและจัดอันดับของอนุมูลที่มีความไวได้ เนื่องจากอนุมูล DPPH• มีความคงตัว และไม่ไวต่อปฏิกิริยา นอกจากนี้ต้องวัดในปฏิกิริยาที่มีเมทานอลจึงไม่สามารถใช้วิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของเลือดเพราะส่งผลให้โปรตีนตกตะกอน

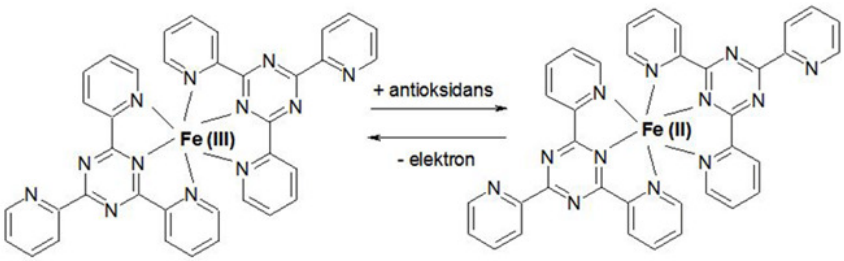


DPPH (free radical) (Purple) — DPPH-H (Yellow)

ภาพที่ 2.11 การเกิดปฏิกิริยาของอนุมูลอิสระ DPPH• กับสารต้านอนุมูลอิสระ

2) วิธี Ferric reducing antioxidant power (FRAP)

ใช้วัดความสามารถในการต้านออกซิเดชันโดยอาศัยปฏิกิริยารีดอกซ์วัดจากความสามารถในการให้อิเล็กตรอนของสารทดสอบแก่สารประกอบเชิงซ้อน Ferric tripyridyltriazine (Fe^{3+}-TPTZ) เมื่อได้รับอิเล็กตรอน (Fe^{2+}-TPTZ) ซึ่งมีสีม่วงน้ำเงิน โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 nm แสดงดังภาพที่ 2.12 วิธีนี้มีข้อดีคือ สะดวก รวดเร็ว ไม่ยุ่งยาก เสียค่าใช้จ่ายน้อย



$[Fe(III)(TPTZ)_2]^{3+}$ Ferric tripyridyltriazine — $[Fe(II)(TPTZ)_2]^{2+}$ Ferrous tripyridyltriazine (Blue)

ภาพที่ 2.12 การรีดิวซ์สารประกอบเชิงซ้อนของเหล็กโดยสารต้านอนุมูลอิสระ

จากข้อมูลข้างต้นเกี่ยวกับหลักการวิเคราะห์การต้านอนุมูลอิสระจะเห็นว่า หลักการวิเคราะห์การต้านอนุมูลอิสระทั้ง 2 วิธี เป็นการวิเคราะห์ที่ใช้กันอย่างแพร่หลายเพื่อนำมาวิเคราะห์หาฤทธิ์ต้านออกซิเดชันในตัวอย่างที่สนใจหรือผลิตภัณฑ์ที่ต้องการวิเคราะห์ดังเช่นงานวิจัยของ Toh et al. (2013) ได้ศึกษาสารสกัดจากเปลือกและเนื้อของผลส้มโอเพื่อดูฤทธิ์ยับยั้งการออกซิเดชันด้วยวิธี FRAP assay และวัดปริมาณการยับยั้งการออกซิเดชัน (TEAC values) พบว่าเปลือกของส้มโอให้ค่า FRAP และ TEAC values สูงกว่าส่วนเนื้อซึ่งมีค่าเท่ากับ 1.01±0.08 mmol Fe (II)/100 g FW และ 1.49±0.02 mmol TE/100 g FW ในขณะที่ส่วนเนื้อให้ค่า FRAP และ TEAC values เท่ากับ 0.6±0.06 mmol Fe (II)/100 g FW และ 0.42±0.04 mmol TE/100 g FW ตามลำดับ ในปี 2014 ได้มีการศึกษาน้ำมันหอมระเหยของเปลือกส้มโอทั้ง 4 สายพันธุ์ เพื่อใช้ตั้งตำรับไมโครอิมัลชัน และได้วิเคราะห์สารต้านออกซิเดชันด้วยวิธี DPPH assay และค่า TEAC values พบว่าส้มโอสายพันธุ์ขาวแตงกวาให้การยับยั้งอนุมูลอิสระสูงสุดเช่นเดียวกับค่า TEAC values รองลงมาคือสายพันธุ์ขาวใหญ่ ขาวน้ำผึ้ง และขาวพวงตามลำดับ (Chaiyana et al., 2014) และในปีเดียวกันงานวิจัยของ Pichaiyongvongdee et al. (2014) ได้ศึกษาเปลือกส้มโอส่วนของเปลือกนอก (Flavedo) ทั้ง 7 สายพันธุ์ โดยได้วิเคราะห์ฤทธิ์ต้านออกซิเดชันด้วยวิธี DPPH assay และ FRAP assay พบว่าสายพันธุ์ทองดีให้ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงสุด รองลงมาคือสายพันธุ์ท่าข่อย และสายพันธุ์ขาวน้ำผึ้งซึ่งมีค่า DPPH เท่ากับ 70.14±2.48 %, 61.28±2.43 % และ 56.42±6.05 % ตามลำดับ ส่วนค่า FRAP สายพันธุ์ขาวน้ำผึ้งให้ค่า FRAP สูงกว่าสายพันธุ์ท่าข่อยซึ่งมีเท่ากับ 1,227.13±15.95, 1107.40±8.650 และ 1098.07± 9.180 mg TE/100 ml ตามลำดับ ต่อมาในปี 2015 ได้ศึกษาสารสกัดจากเปลือกส้มโอ 5 สายพันธุ์ทำการสกัดด้วยวิธีการบีบเย็นจนได้เป็นน้ำมันหอมระเหยจากเปลือกส้มโอ และทำการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านออกซิเดชันด้วยวิธี DPPH assay เพื่อหาค่า IC_{50} พบว่าพันธุ์ NR-VL และพันธุ์ BL-DT มีฤทธิ์การต้านออกซิเดชันดีสุดซึ่งให้ค่า IC_{50} ที่ต่ำนั่นหมายความว่ามีประสิทธิภาพการยับยั้งออกซิเดชันที่สูง (Lan-Phi & Vy., 2015) และในปี 2016 ศึกษาสายพันธุ์ส้มโอ 3 สายพันธุ์ ในส่วนของเปลือกนอกวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านออกซิเดชันด้วยวิธี DPPH assay โดยหาค่า IC_{50} และ FRAP assay พบว่า สายพันธุ์ทับทิมสยามมีค่าฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูดสุด รองลงมาคือสายพันธุ์ทองดี และสายพันธุ์ขาวน้ำผึ้งซึ่งมีค่า IC_{50} เท่ากับ 402.59±1.56, 844.44±1.28 และ 914.29±1.45 μg/ml ส่วน FRAP assay มีค่าเท่ากับ 135.92±0.56, 62.30±0.74 และ 26.16±0.32 mg Trolox equivalent/g extract ตามลำดับ (Turapra et al., 2016)

ทั้งนี้จะเห็นได้ว่าสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพไม่ว่าจะเป็นสารต้านออกซิเดชัน ปริมาณฟีนอลิกรวม ปริมาณฟลาโวนอยด์รวม องค์ประกอบเหล่านี้มีปริมาณมากหรือน้อยนั้นขึ้นอยู่กับปัจจัยด้านอุณหภูมิ และความเข้มข้นของตัวทำละลาย ซึ่งอาจทำให้โครงสร้างขององค์ประกอบมีความเปลี่ยนแปลงและมีปริมาณที่แตกต่างกัน ทั้งนี้การเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบภายในของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพอาจมีผลจากอุณหภูมิและความเข้มข้นของตัวทำละลายที่แตกต่างกัน

2.3 ความแตกต่างระหว่างอุณหภูมิและความเข้มข้นของตัวทำละลายที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงในโครงสร้าง

การใช้อุณหภูมิเพื่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงในโครงสร้างนั้น เป็นเทคนิคโดยการถ่ายโอนความร้อน ซึ่งชนิดของการให้ความร้อนมีหลายชนิดด้วยกัน เช่น การบ่ม การอบ การนึ่งด้วยไอน้ำ และการต้ม (Incubating, Baking, Steaming and Boiling) เป็นวิธีที่ใช้กันอย่างแพร่หลายโดยการให้อุณหภูมิความร้อนในรูปแบบการบ่มโดยอุณหภูมิจะอยู่ที่ 60 – 80 °C ขึ้นไป การอบด้วยลมร้อนเป็นการให้ความร้อนโดยอุณหภูมิจะอยู่ที่ 60 – 100 °C ขึ้นไป การนึ่งด้วยไอน้ำเป็นการให้ความร้อนโดยอุณหภูมิจะอยู่ที่ 121°C ขึ้นไป และการต้มเป็นการให้ความร้อนโดยอุณหภูมิจะอยู่ที่ 100 °C ขึ้นไป จะเห็นว่าการเลือกใช้ความร้อนอาจส่งผลต่อโครงสร้างทางเคมีของพืชนั้น ๆ แสดงดังภาพที่ 2.13 รวมถึงความเข้มข้นของตัวทำละลายแต่ละชนิดมีผลต่อโครงสร้างของพืชเช่นกัน ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพของคุณค่าทางโภชนาการ และโครงสร้างทางจุลภาคของพืช ซึ่งในหลายงานวิจัยได้ศึกษาการใช้อุณหภูมิในรูปแบบต่าง ๆ งานวิจัยของ Xu et al. (2007) ได้ศึกษาผลของการรักษาความร้อนต่อความสามารถในการต้านออกซิเดชันและองค์ประกอบของฟีนอลิกด้วยวิธี HPLC เพื่อวิเคราะห์กรดฟีนอลิกในเปลือกส้มโดยการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 120 °C และ 150 °C เวลาการให้ความร้อน 30 – 90 นาที พบว่าหลังการให้ความร้อนมีโมเลกุลอิสระบางส่วนของกรดฟีนอลิกเพิ่มขึ้นในขณะที่เอสเทอร์ ไกลโคไซด์ และพันธะเอสเทอร์บางส่วนลดลง ทำให้ปริมาณฟลาวาโนนไกลโคไซด์รวมมีปริมาณลดลงเช่นกัน นอกจากนี้เปลือกส้มที่สกัดด้วยเมทานอลให้การต้านอนุมูลอิสระเพิ่มขึ้นเนื่องจากการเพิ่มขึ้นของชินนามิคและเบนโซอิครวมซึ่งเป็นส่วนโมเลกุลอิสระ ดังนั้นจึงมีข้อเสนอแนะให้ใช้ความร้อนที่เหมาะสมเพื่อเพิ่มความสามารถในการต้านออกซิเดชันของเปลือกส้ม เช่นเดียวกับงานวิจัยของ Liu & Tsai (2012) ได้ศึกษาผลของเวลากับการให้ความร้อนและความสามารถในการต้านออกซิเดชันต่อการสกัดเปลือกส้มเพื่อทำเป็นผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ พบว่าเปลือกส้มที่สกัดด้วยเมทานอลที่อุณหภูมิ 100 °C เวลาการให้ความร้อน 180 นาที ให้ปริมาณฟีนอลิกรวมเพิ่มขึ้นเมื่ออุณหภูมิและเวลาเพิ่มขึ้นเท่ากับ 27.99 ± 0.38 GAE mg/g แต่อุณหภูมิและเวลาการให้ความร้อนไม่มีผลต่อคุณสมบัติการต้านออกซิเดชันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งเป็นไปได้ว่าปัจจัยหนึ่งที่ส่งผลในการเพิ่มกิจกรรมต้านออกซิเดชันคือการผลิตสารประกอบพวกฟีนอลระหว่างการให้ความร้อน นอกจากนี้งานวิจัยของ Zarina & Tan (2013) ได้ศึกษาปริมาณฟลาโวนอยด์ในสารสกัดเปลือกส้มโอที่สกัดด้วยเมทานอลและเอทานอลที่อุณหภูมิ 50 °C – 80 °C ผ่านทางอ่างควบคุมอุณหภูมิ พบว่าการสกัดด้วยเอทานอลที่อุณหภูมิ 65 °C เวลา 2 ชั่วโมงเป็นสภาวะที่เหมาะสมที่ให้ปริมาณฟลาโวนอยด์สูงสุดเท่ากับ 190.42 mg/L เนื่องจากการสกัดโดยการบ่มในอ่างควบคุมอุณหภูมิทำให้เนื้อเยื่อพืชอ่อนตัวลงและผนังเซลล์ถูกทำลาย พันธะถูกย่อยสลายรวมทั้งเพิ่มความสามารถในการละลายส่งผลให้ปริมาณฟลาโวนอยด์กระจายอยู่ในตัวทำละลายมากขึ้น และงานวิจัยของชมัยพร รอดกลิ่น และคณะ (2560) ได้ศึกษาสภาวะในการสกัดสารจากเปลือกส้มซ่าต่อปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม ปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์รวม และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ด้วยตัวทำละลายเอทานอลความเข้มข้น 40% 70% และ 95% โดยปริมาตร และใช้หม้อนึ่งแรงดันสูงที่อุณหภูมิ 121 °C เป็นเวลา 30 นาทีในการสกัด พบว่าการสกัดเปลือกส้มซ่าด้วยตัวทำละลายเอทานอลความเข้มข้น 95% ให้ปริมาณฟีนอลิกรวม ปริมาณ

ฟลาโวนอยด์รวม และการกำจัดอนุมูลอิสระ (IC_{50}) ให้ค่าดีที่สุดซึ่งเท่ากับ 119.55 mg EGA/ 1 g extract, 64.04 mgEQ/1 g extract และ 0.38 mg/ml ตามลำดับ เนื่องจากความเข้มข้นของสารละลายเอทานอลที่เหมาะสมจะอยู่ในช่วง 72% - 85% โดยปริมาตร ทั้งนี้การให้ความร้อนและความเข้มข้นของตัวทำละลายต่อโครงสร้างพืชนั้นขึ้นอยู่กับอุณหภูมิ เวลา และความเข้มข้นของสารละลาย ซึ่งในการให้ความร้อนอาจและความเข้มข้นของตัวทำละลายทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างทางเคมีของพืช สารประกอบอินทรีย์ต่าง ๆ ที่ถูกระเหยโดยการวิเคราะห์มวลสาร เพื่อให้ทราบถึงโครงสร้างทางเคมีที่เปลี่ยนแปลงไป

ภาพที่ 2.13 ปัจจัยสำคัญของการให้อุณหภูมิสูงที่มีผลต่อพืช
แหล่งที่มา: Hasanuzzaman et al. (2013)

2.4 องค์ประกอบของสารระเหยและปัจจัยต่าง ๆ ที่มีผลต่อสารประกอบในโครงสร้าง

องค์ประกอบของสารระเหยส่วนใหญ่จะอยู่ในรูปสารประกอบอินทรีย์ สามารถระเหยกลายเป็นไอกระจายตัวไปในอากาศได้ง่ายที่อุณหภูมิและความดันปกติ ไอเหล่านี้สามารถจะเปลี่ยนรูปกลับเป็นของเหลวหรือของแข็งตามสภาวะเดิมได้ โดยการเพิ่มอุณหภูมิหรือลดความดัน โมเลกุลส่วนใหญ่ประกอบด้วยอะตอมของคาร์บอนและไฮโดรเจน อาจมีออกซิเจน หรือธาตุฮาโลเจน เช่น คลอรีน โบรมีนร่วมอยู่ด้วยงานวิจัยของ Qiao et al. (2008) ได้ศึกษาองค์ประกอบของสารระเหยให้กลิ่นของเปลือกส้มโอด้วยวิธี GC-MS และวิธี GC-O พบว่าได้องค์ประกอบของสารระเหยให้กลิ่น 22 องค์ประกอบ และมีองค์ประกอบของสารระเหย 5 องค์ประกอบที่สามารถแยกได้ด้วยวิธี GC-MS โดยพบ Linalool, α-Pinene และ Decanal ให้ปริมาณสูงที่สุดให้กลิ่นเลมอน และกลิ่นผลไม้ ส่วนงานวิจัยของ Cheong (2013) ได้ศึกษาองค์ประกอบของสารระเหยในเปลือกส้มโอ 2 สายพันธุ์ด้วยวิธี HS-SPME/GC-MS พบว่าองค์ประกอบสารระเหยในเปลือกส้มโอที่สำคัญ ได้แก่ Limonene, Cis-β-ocimene, α-Terpinene, Linalool, Methyl Anthranilate และ Indole ซึ่งองค์ประกอบสารระเหยเหล่านี้เป็นองค์ประกอบ

ของเทอร์ปีนไฮโดรคาร์บอนมีอยู่ประมาณ 98% ของสารระเหยทั้งหมดตรวจพบซึ่งเป็นถือว่าเป็นองค์ประกอบสารระเหยหลัก ๆ ที่พบมมากในเปลือกส้มโอ เช่นเดียวกับงานวิจัย Darjaz ในปี 2013 ได้เปรียบเทียบองค์ประกอบสารระเหยที่สำคัญในเปลือกส้มและเปลือกส้มโอด้วยวิธี GC-MS พบว่าพบองค์ประกอบของสารระเหยในเปลือกส้ม 52 องค์ประกอบ และเปลือกส้มโอ 47 องค์ประกอบ ประกอบด้วย Aldehydes, Alcohols, Esters, Ketones, Monoterpenes และ Sesquiterpenes ซึ่งมีองค์ประกอบสารระเหยที่สำคัญที่พบได้แก่ Limonene, γ-Terpinene, β-Myrcene, (E)-β-Ocimene, α-Pinene, β-Pinene neral และ Geranial แสดงให้เห็นถึงคุณภาพที่สูงสามารถนำไปใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร เครื่องสำอาง ผลิตภัณฑ์ที่ถูกสุขลักษณะ และผลิตภัณฑ์อื่น ๆ ในปี 2016 ได้เปรียบเทียบองค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันหอมระเหยในเปลือกส้ม 5 ชนิด ได้แก่ เปลือกส้ม เปลือกเลมอน เปลือกเร้ดเกรฟฟรุ๊ต ไวท์เกรฟฟรุ๊ต และเปลือกส้มโอ สกัดด้วยวิธีการกลั่นและวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีโดยวิธี GC-MS พบว่า Limonene เป็นองค์ประกอบสำคัญในเปลือกส้มทั้ง 5 ชนิด โดยพบในเปลือกส้มโอถึง 82% นอกจากนี้ยังพบองค์ประกอบอื่น ๆ ของ Terpenes ได้แก่ α-Pinene, β-Pinene, α-Terpinene, 1-Terpinen-4-ol, Terpinolen, o-Cymol, 3-Carene; 2-Carene และ α-Terpineol ซึ่งพบปริมาณมากในเปลือกส้มโอ (Manalila et al., 2016) ต่อมางานวิจัยของ Chen et al. (2016) ได้ศึกษาการสกัดน้ำมันหอมระเหยจากเปลือกส้มโอด้วยวิธีการสกัดด้วยไมโครเวฟ 2 ขั้นตอน และวิเคราะห์องค์ประกอบของน้ำมันหอมระเหยด้วยวิธี GC-MS พบว่าในเปลือกส้มโอมีองค์ประกอบหลักของ Limonene, β-Pinene, Linalool, α-Terpineol, Nerolidol และองค์ประกอบของเอสเทอร์ซึ่งพบองค์ประกอบของ Limonene อยู่ 82.6% ด้วยวิธีการกลั่น และ 78.1-86.5 % ด้วยวิธีการสกัดด้วยไมโครเวฟปราศจากตัวทำละลายตามลำดับ เช่นเดียวกับงานวิจัยของ Liu et al. (2017) ได้ศึกษาการให้ความร้อนด้วยไมโครเวฟโดยศึกษาองค์ประกอบของสารระเหยในการสกัดน้ำมันหอมระเหยจากเปลือกส้มโอพบองค์ประกอบของ β-Myrcene, D-Limonene, Aromadendrene, Trans-farnesol และ Nootkatone เป็นองค์ประกอบสำคัญในน้ำมันหอมระเหยของเปลือกส้มโอ ทั้งนี้การศึกษาองค์ประกอบของสารระเหยในเปลือกส้มโอนั้นเพื่อดูองค์ประกอบทางเคมีของพืช รวมถึงองค์ประกอบสำคัญต่าง ๆ ที่สามารถนำมาประยุกต์ใช้เป็นวัตถุดิบทางอุตสาหกรรมต่าง ๆ ได้

2.5 แนวทางการประยุกต์ใช้สารสกัดจากพืช

จากฐานข้อมูลข้างต้นที่กล่าวถึงการสกัดพืชด้วยวิธีต่าง ๆ เพื่อศึกษาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีฤทธิ์การต้านออกซิเดชัน รวมถึงองค์ประกอบที่สำคัญในการสกัดพืช สามารถสรุปแนวทางการประยุกต์ใช้ดังต่อไปนี้

1) สารกันเสียจากธรรมชาติ (Natural Preservative)

สารกันเสียจากธรรมชาติ หมายถึง กลุ่ม Preservative Free เป็นกลุ่มที่มีความปลอดภัยไม่ทำให้เกิดอาการแพ้ เนื่องจากสกัดมาจากธรรมชาติ 100 % พืชส่วนใหญ่ที่นำมาใช้สกัดมักจะเป็นพวกสมุนไพร หรือธัญพืช สามารถยับยั้งและป้องกันการเชื้อจุลินทรีย์ได้ดีหรือเทียบเท่ากับกลุ่มสารกันเสียสังเคราะห์ นอกจากนี้ยังมีรายงานอีกว่าไม่ทำให้เกิดการระคายเคืองต่อผิวจึงสามารถนำมาประยุกต์ใช้เป็นสารกันเสียจากธรรมชาติเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในผลิตภัณฑ์ เช่น ประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อ

แบคทีเรีย ยีสต์และราในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง การยับยั้งการหืนจากไขมันเพื่อเป็นการเพิ่มประสิทธิภาพให้กับผลิตภัณฑ์และยืดอายุการเก็บรักษาของผลิตภัณฑ์ได้

2) ผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง (Cosmetic Products)

ผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง หมายถึง ผลิตภัณฑ์สิ่งปรุงเพื่อใช้บนผิวหนัง หรือส่วนใดส่วนหนึ่งของร่างกาย มีจุดประสงค์เพื่อทำความสะอาด ส่งเสริมให้เกิดความสวยงาม หรือเพื่อเปลี่ยนแปลงรูปลักษณะ ซึ่งสามารถแบ่งประเภทของเครื่องสำอางได้เป็น 2 ประเภทใหญ่ ๆ ได้แก่ เครื่องสำอางที่ไม่ได้ใช้แต่งสีของผิว หรือเครื่องสำอางที่ใช้ทำความสะอาดผิวหนัง และเครื่องสำอางที่ใช้แต่งสีผิว ทำให้ในปัจจุบันมีเครื่องสำอางหลากหลายยี่ห้อและหลากหลายประเภทโดยอ้างถึงคุณสมบัติต่าง ๆ ในการดูแลผิวพรรณโดยมีการใส่สารสกัดจากธรรมชาติหลายชนิดเป็นการเพิ่มมูลค่าให้กับตัวผลิตภัณฑ์ ทั้งนี้ส่วนประกอบของเครื่องสำอางยังคงมีส่วนประกอบสารสังเคราะห์เป็นส่วนใหญ่อาจส่งผลต่อการแพ้สารดังกล่าวของแต่ละบุคคล การสกัดพืชจึงสามารถนำมาประยุกต์ใช้เป็นวัตถุดิบทางเครื่องสำอางได้ เนื่องจากขั้นตอนการสกัดพืชด้วยตัวทำละลายทำให้โครงสร้างพืชที่เปลี่ยนแปลงและสามารถปลอดปล่อยสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพทำให้มีสารต้านออกซิเดชันที่มากขึ้น ไม่มีส่วนประกอบวัตถุดิบที่เป็นสารสังเคราะห์ที่มีผลต่อระบบกลไกการแพ้ และให้ลักษณะทางกายภาพ และทางเคมีใกล้เคียงกับเคียงสำอางตามท้องตลาดในปัจจุบัน

จากฐานข้อมูลของเปลือกส้มโอ และการประยุกต์ งานวิจัยนี้เล็งเห็นถึงการทดลองพัฒนาสารสกัดจากเปลือกส้มโอเป็นวัตถุดิบในเครื่องสำอาง เนื่องด้วยเปลือกส้มโอมีคุณประโยชน์มากมายอีกทั้งเป็นวัตถุดิบที่มีความใกล้เคียงธรรมชาติและคงคุณค่าสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สำคัญของพืชไว้มากที่สุด ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้ที่สารสกัดจากเปลือกส้มโอจะเป็นที่ยอมรับในการเป็นวัตถุดิบของเครื่องสำอาง ซึ่งเป็นการเพิ่มทางเลือกและรูปแบบผลิตภัณฑ์ที่หลากหลายให้แก่ผู้บริโภค รวมถึงเป็นการพัฒนาและเสริมสร้างมูลค่าให้แก่สินค้าทางการเกษตรในส่วนของการลดจำนวนวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร

บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 วัตถุดิบ

สายพันธุ์ของส้มโอที่ใช้ในการศึกษา คือพันธุ์ขาวน้ำผึ้ง เป็นสายพันธุ์ที่นิยมปลูกบริเวณในจังหวัดนครปฐม หาซื้อมาจากบ้านสวนส้มโอนครชัยศรี อำเภอนครชัยศรี จังหวัดนครปฐม ช่วงเก็บเกี่ยวผลผลิตเดือนสิงหาคมถึงกันยายนของทุกปี ที่เลือกส้มโอสายพันธุ์นี้เนื่องจากหาซื้อได้ง่ายเป็นที่ต้องการของท้องตลาด และผู้วิจัยมีความสนใจเปลือกส้มโอจึงนำมาสู่งานวิจัยครั้งนี้

3.2 สารเคมีและอุปกรณ์

3.2.1 สารเคมี

3.2.1.1 Ethanol 95% บริษัท เอสเอ็นพีเยนเนอรัล เทรดดิ้ง จำกัด กรุงเทพมหานคร ประเทศไทย

3.2.1.2 Ethanol 99.9% (AR Grade) บริษัท RCL Labscan จำกัด ประเทศไทย

3.2.1.3 Deionized water บริษัท เอสเอ็นพีเยนเนอรัล เทรดดิ้ง จำกัด กรุงเทพมหานคร ประเทศไทย

3.2.1.4 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl ($C_{18}H_{12}N_5O_6$) (Lot no.STBH0044) บริษัท Sigma -Aldrich จำกัด ประเทศสหรัฐอเมริกา

3.2.1.5 L-ascorbic acid (Lot no.1007089) ประเทศนิวซีแลนซ์

3.2.1.6 Sodium nitrite Grade AR ($NaNO_2$) (Lot no.7) ประเทศนิวซีแลนด์

3.2.1.7 Sodium Hydroxide (NaOH) (Lot no.AF502384) บริษัท Chemieals จำกัด ประเทศออสเตรเลีย

3.2.1.8 Aluminum chloride ($AlCl_3$) (Lot no.F2A261) บริษัท Chemieals จำกัด ประเทศออสเตรเลีย

3.2.1.9 Catechin (Lot no.WXBC3261V) บริษัท Sigma-Aldrich จำกัด ประเทศสหรัฐอเมริกา

3.2.1.10 Gallic acid ($C_7H_6O_5$) HPLC grade (Lot no.098k0245) บริษัท Sigma-Aldrich จำกัด ประเทศสหรัฐอเมริกา

3.2.1.11 Folin-ciocalteu reagent (Lot no.BCBK6010V) บริษัท Sigma-Aldrich จำกัด ประเทศสหรัฐอเมริกา

3.2.1.12 Sodium carbonate (Na_2CO_3) (Lot no.B1403251847) ประเทศออสเตรเลีย

3.2.1.13 6-Hydroxy-2,5,7,8-thyl-chromane-2-carboxylic acid Trolox ($C_{14}H_{18}O_4$) (Lot no.BCBR7575V) บริษัท Sigma-Aldrich จำกัด ประเทศสหรัฐอเมริกา

3.2.1.14 Acetic acid Glacial Grade AR ($C_2H_4O_2$) (Lot no.A1020-1-2501) บริษัท Sigma-Aldrich จำกัด ประเทศสหรัฐอเมริกา

3.2.1.15 Sodium acetate trihydrate ($C_2H_3NaO_2 \cdot 3(H_2O)$) (UN1235) ประเทศออสเตรเลีย

3.2.1.16 Ferric chloride ($FeCl_3$) (Lot no.7) ประเทศนิวซีแลนด์

3.2.1.17 Hydrochloric (HCl) (Lot no.H8040-1-2501) บริษัท Sigma-Aldrich จำกัด ประเทศสหรัฐอเมริกา

3.2.1.18 2,4,6-tri(2-pyridyl)-s-triazine (TPTZ) ($C_{18}H_{12}N_6$) (Lot no.BCBS3837V) บริษัท Sigma-Aldrich จำกัด ประเทศสหรัฐอเมริกา

3.2.1.19 Helium (He) แคลิฟอร์เนีย ประเทศสหรัฐอเมริกา

3.2.1.20 Nitrogen (N_2) แคลิฟอร์เนีย ประเทศสหรัฐอเมริกา

3.2.2 อุปกรณ์และเครื่องมือ

3.2.2.1 เครื่องชั่งดิจิตอลทศนิยมสี่ตำแหน่ง (Analytical Balance) ยี่ห้อ METTLER TOLEDO รุ่น ME204E ประเทศสวิตเซอร์แลนด์

3.2.2.2 เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (Microplate Reader) ยี่ห้อ biochrom, รุ่น EZ read 2000

3.2.2.3 กระดาษกรอง Whatman (No.1) ประเทศจีน

3.2.2.4 เครื่องกลั่นระเหยระบบสุญญากาศ (Rotary Vacuum Evaporater) ยี่ห้อ BUCHI รุ่น R-205/V ประเทศสวิตเซอร์แลนด์

3.2.2.5 ไมโครปิเปตต์ (Micropipette) ขนาด 20-200 µl ยี่ห้อ Nichiryo ประเทศญี่ปุ่น

3.2.2.6 ไมโครปิเปตต์ (Micropipette) ขนาด 100-1000 µl ยี่ห้อ Nichiryo ประเทศญี่ปุ่น

3.2.2.7 เครื่องปั่นบดผงความเร็วสูง (Grinding Pin Mill Machine)

3.2.2.8 ตู้อบลมร้อน (Hot air oven) ยี่ห้อ Memmert ประเทศเยอรมัน

3.2.2.9 เครื่อง Water bath shaker ยี่ห้อ Memmert ประเทศเยอรมัน

3.2.2.10 บีกเกอร์ (Beaker) บริษัท ทีทีเค ซายเอนซ์ จำกัด ประเทศไทย

3.2.2.11 ขวดรูปชมพู่ (Erlenmeyer flask) บริษัท ทีทีเค ซายเอนซ์ จำกัด ประเทศไทย

3.2.2.12 ขวดแก้วสีชา ขนาด 100 ml ประเทศไทย

3.2.2.13 เครื่องผสมสารละลาย (Vortex Mixer) ประเทศไทย

3.2.2.14 หลอดทดลอง (Test Tube) บริษัท ทีทีเค ซายเอนซ์ จำกัด ประเทศไทย

3.2.2.15 จานหลุม 96 หลุมที่สเตอไรส์ (96 Well Plate Sterile) บริษัท ทีทีเค ซายเอนซ์ จำกัด ประเทศไทย

3.2.2.16 กระบอกตวง (Cylinder) บริษัท ทีทีเค ซายเอนซ์ จำกัด ประเทศไทย

3.2.2.17 ขวดวัดปริมาตร (Volumetric Flask) บริษัท ทีทีเค ซายเอนซ์ จำกัด ประเทศไทย

3.2.2.18 แท่งแก้วคนสาร (Glass Stirring Rod) บริษัท ทีทีเค ซายเอนซ์ จำกัด ประเทศไทย

3.2.2.19 เครื่อง GC-MS บริษัท Agilent Technologies, Palo Alto, แคลิฟอร์เนีย ประเทศสหรัฐอเมริกา

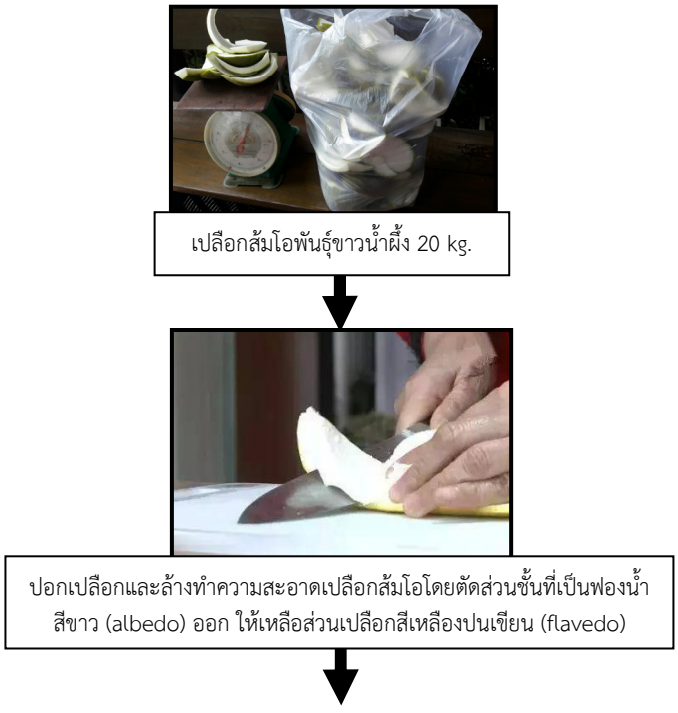
3.2.2.20 HP-5MS Ultra Inert (60 m x 250 µm x 0.25 µm Film Thickness) บริษัท Agilent Technologies, Palo Alto, แคลิฟอร์เนีย ประเทศสหรัฐอเมริกา

3.2.2.21 Detector บริษัท Agilent Technologies, Palo Alto, แคลิฟอร์เนีย ประเทศสหรัฐอเมริกา

3.3 วิธีการดำเนินการวิจัย

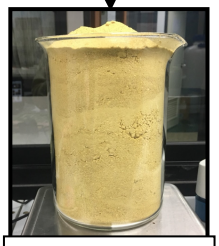
3.3.1 การเตรียมผงเปลือกส้มโอเพื่อใช้ในการสกัดเปลือกส้มโอ

เปลือกส้มโอที่ใช้ในการศึกษาคือ สายพันธุ์ขาวน้ำผึ้ง จากจังหวัดนครปฐมมีน้ำหนักเปลือกส้มโอ 20 kg ปอกเปลือกและล้างทำความสะอาดเปลือกของส้มโอซึ่งจะมีสีเหลืองปนเขียน (flavedo) ให้เรียบร้อย จากนั้นนำมีดมาตัดส่วนชั้นที่เป็นฟองน้ำสีขาว (albedo) ออก และทำการหั่นเปลือกส้มโอเป็นชิ้นเล็ก ๆ ทำให้แห้งด้วยเครื่องอบลมร้อนแบบถาดที่อุณหภูมิ 60±2 ℃ จนกว่าจะแห้ง จากนั้นนำมาบดด้วยเครื่องบดแบบละเอียด ผงเปลือกส้มโอที่ได้ใส่ในถุงอลูมิเนียมฟอยด์แบบซิบล็อค เก็บไว้ในโถดูดความชื้นที่อุณหภูมิห้อง (25±2 ℃) (Zarina & Tan, 2013) เพื่อนำวัตถุดิบใช้ในการวิเคราะห์ขั้นตอนถัดไป แสดงดังภาพที่ 3.1 โดยมีขั้นตอนดังนี้



เปลือกส้มโอเป็นชิ้นเล็ก ๆ ทำให้แห้งด้วยเครื่องอบลมร้อน
แบบถาดที่อุณหภูมิ 60±2°C จนกว่าจะแห้ง

นำมาบดด้วยเครื่องบดแบบละเอียด



ผงเปลือกส้มโอ

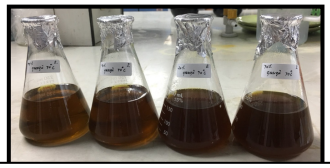
นำผงเปลือกส้มโอใส่ในถุงอลูมิเนียมฟอยล์แบบซิปล็อค
เก็บไว้ในโถดูดความชื้นที่อุณหภูมิห้อง (25±2°C)

นำวัตถุดิบที่ได้ใช้ในการวิเคราะห์ขั้นตอนต่อไป

ภาพที่ 3.1 ขั้นตอนการเตรียมผงเปลือกส้มโอ ดัดแปลงตามวิธีของ Zarina & Tan (2013)

3.3.2 การสกัดเปลือกส้มโอสำหรับวิเคราะห์สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ

นำผงเปลือกส้มโอ 50 g ผสมกับสารละลายเอทานอลปริมาตร 500 ml ที่ความเข้มข้นระดับต่าง ๆ ได้แก่ เอทานอลร้อยละ 95 : น้ำ 5 (0.95 : 0.05) เอทานอลร้อยละ 90 : น้ำ 10 (0.9 : 0.1) เอทานอลร้อยละ 80 : น้ำ 20 (0.8 : 0.2) และเอทานอลร้อยละ 70 : น้ำ 30 (0.7 : 0.3) ตามลำดับ ใส่ผงเปลือกส้มโอที่ผสมกับสารละลายเอทานอลที่ความเข้มข้นแตกต่างกันลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 1,000 ml ปิดปากขวดด้วยอะลูมิเนียมฟอยล์ จากนั้นนำไปบ่มที่ระดับอุณหภูมิแตกต่างกัน ได้แก่ 50 °C, 60 °C, 70 °C และ 80 °C ตามลำดับ แต่ละระดับอุณหภูมิใช้เวลาในการบ่ม 2 ชั่วโมงในอ่างควบคุมอุณหภูมิแบบเขย่า จากนั้นนำตัวอย่างของแต่ละความเข้มข้นมากรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 (Whatman No.1) นำสารสกัดที่ได้ไประเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่อง Rotary Vacuum Evaporator ที่อุณหภูมิ 50±2 °C สุดท้ายเก็บสารสกัดที่ได้ใส่ในขวดสีชาที่มีฝาปิดสนิท และเก็บที่อุณหภูมิ -15 °C จนกว่าจะทำการวิเคราะห์ ดัดแปลงตามวิธีของ Suklampoo et al. (2012) และ Toh et al. (2013) แสดงดังภาพที่ 3.2 โดยพิจารณาผลที่ได้จากสมบัติการต้านออกซิเดชัน ปริมาณฟลาโวนอยด์รวม และปริมาณฟีนอลิกรวม



นำผงเปลือกส้มโอ 50 g. ผสมกับสารละลายเอทานอลปริมาตร 500 ml ที่ความเข้มข้นระดับต่าง ๆ ได้แก่ เอทานอลร้อยละ 95, 90, 80 และ 70 ตามลำดับ

นำไปบ่มด้วยอ่างควบคุมอุณหภูมิแบบเขย่าที่ระดับอุณหภูมิแตกต่างกัน ได้แก่ 50, 60, 70 และ 80°C ตามลำดับ เป็นเวลา 2 ชั่วโมง

นำตัวอย่างแต่ละความเข้มข้นกรองด้วยกระดาษกรอง (Whatman No.1) ด้วยเครื่อง Vacuum pump

ทำการระเหยโดยใช้เครื่องกลั่นระเหยสารแบบหมุน (Rotary Vacuum Evaporator) ที่อุณหภูมิ 50±2 °C

เก็บสารสกัดที่ได้ใส่ในขวดสีชาที่มีฝาปิดสนิท และเก็บที่อุณหภูมิ -15 °C จนกว่าจะทำการวิเคราะห์

ภาพที่ 3.2 ขั้นตอนการสกัดเปลือกส้มโอ ดัดแปลงตามวิธีของ Suklampoo et al. (2012) และ Toh et al. (2013)

3.3.3 ศึกษาองค์ประกอบฤทธิ์ทางชีวภาพ และการต้านออกซิเดชันของสารสกัดเปลือกส้มโอ

1) สมบัติฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน

1.1) การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านออกซิเดชันด้วยวิธี DPPH assay

การทดสอบฤทธิ์สารต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH radical scavenging assay ดัดแปลงตามวิธีของ Ratanasiriwat et al. (2017) และ Turapra et al. (2016) โดยเตรียมสารละลาย DPPH (2,2-diphenyl-l-1-picrylhydrazil) ความเข้มข้น 2 mM โดยชั่ง DPPH 0.0078 g ละลายในเมทานอล 100 ml ทำการทดสอบโดยเตรียมสารตัวอย่างและสารละลายมาตรฐานวิตามินซี ความเข้มข้นในช่วง 0.023 - 3 mg/ml ปิเปตสารตัวอย่าง หรือสารละลายมาตรฐานวิตามินซี แต่ละความเข้มข้นโดยผสมสารละลายตัวอย่างปริมาตร 75 µl กับสารละลาย DPPH ปริมาตร 150 µl ผสมให้เข้ากัน ทิ้งไว้ในที่มืด 30 นาที นำตัวอย่างไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 515 nm ด้วยเครื่องไมโครเพลทรีดเดอร์ (Microplate Reader) บันทึกค่าการดูดกลืนแสง และนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปวัดคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ได้จากสมการข้างล่างดังนี้

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

เมื่อ $A_{control}$ = ค่าการดูดกลืนแสงของปฏิกิริยาควบคุม (ประกอบด้วยสารทั้งหมดยกเว้นตัวอย่างการทดสอบ)

A_{sample} = ค่าการดูดกลืนแสงจากตัวอย่างทดสอบ

สร้างกราฟระหว่างปริมาณของสารอนุมูลอิสระ DPPH ที่ลดลงและความเข้มข้นของสารสกัดจากเปลือกส้มโอเพื่อหาปริมาณของสารสกัดเปลือกส้มโอที่สามารถลดความเข้มข้นของสารอนุมูลอิสระ DPPH ได้ 50% เรียกว่า EC_{50} โดยใช้โปรแกรม SigmaPlot เวอร์ชั่น 11.0 ทำการพล็อตกราฟระหว่างค่า log ของความเข้มข้นของตัวอย่างกับค่า % DPPH radical scavenging activity โดยค่า log ของความเข้มข้นของตัวอย่างอยู่ Column 1 และค่า % DPPH radical scavenging activity อยู่ Column 2 จากนั้นไปเมนูตามลำดับต่อไปนี้ คือ Graph > Create graph > Scatter plot > Simple scatter > XY pair เลือก Data for X เป็น Column 1 และเลือก Data for Y เป็น Column 2 จากนั้นไปที่ Finish จะได้กราฟในหน้า Graph และคลิกเม้าส์ด้านขวาตรงจุดพล็อตในกราฟที่ได้ จะเห็นเมนูปรากฏขึ้นมาแล้วเลือก Fit curve เลือกช่อง Equation category เป็น Sigmoidal โดยเลือก Sigmoidal parameter ที่ให้ค่า R^2 สูงที่สุด จากนั้นไปที่ Finish จะได้กราฟที่มีเส้นแนวโน้มขึ้นมาหลังจากนั้นกลับไปที่หน้า Data จะเห็นว่ามีคอลัมน์เพิ่มขึ้น โดยจะพบว่ามีค่า logของความเข้มข้นของตัวอย่าง กับค่า % DPPH radical scavenging activity อย่างละเอียดจากการพล็อตกราฟเพิ่มขึ้น จากนั้นเลือกค่า log ของความเข้มข้นของตัวอย่างที่ค่า % DPPH radical scavenging activity อยู่ในช่วงที่มีค่า 50 เป็นกลางมา 2 ค่า นำไปคำนวณเทียบหาค่าโดยการทำ Interpolate เพื่อหาดูว่าค่า % DPPH radical scavenging activity เท่ากับ 50 จะมีค่า log ของความเข้มข้นของตัวอย่างเท่ากับเท่าไร และนำค่า log ของความเข้มข้นของตัวอย่างที่ได้มาถอด log เพื่อหาค่าความเข้มข้นของตัวอย่างที่สามารถลดปริมาณสารต้านออกซิเดชันลงได้ร้อยละ 50 หรือค่า EC_{50}

1.2) การทดสอบความสามารถของสารต้านอนุมูลอิสระในการให้อิเล็กตรอนด้วยวิธี FRAP assay

การทดสอบด้วยวิธี FRAP (Ferric reducing antioxidant power) assay เป็นวิธีที่อ้างอิงมาจาก ดัดแปลงตามวิธีของ 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 ให้เข้ากัน ในอัตราส่วน 10:1:1 ในปริมาตร 3 ml ก่อนใช้นำไปอุ่นที่อุณหภูมิ 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 วัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องไมโครเพลทรีดเดอร์ (Microplate Reader) ที่ความยาวคลื่น 593 nm วิเคราะห์หาความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระโดยใช้ Trolox เป็นกราฟมาตรฐานและแสดงผลในหน่วย mg Trolox Equivalent (TE)/g crude extract

2) 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 ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที จากนั้นวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องไมโครเพลทรีดเดอร์ (Microplate Reader) ที่ความยาวคลื่น 415 nm นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้จากสารสกัดเปลือกส้มโอมาเปรียบเทียบกราฟมาตรฐานคาเทชิน (Catechin Equivalent, CE) และคำนวณปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์รวม แสดงผลในหน่วย mg Catechin Equivalent (CE)/g crude extract

3) ปริมาณฟีนอลิกรวม

การวัดปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม (Total Phenolic Content) ของสารสกัดเปลือกส้มโอโดยวิธี Folin-Ciocalteaucolorimetry ดัดแปลงตามวิธีของ Ratanasiriwat et al. (2017) และ Turapra et al. (2016) การวัดปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมทำได้โดยเตรียมสารละลายมาตรฐาน Gallic acid ที่ความเข้มข้นในช่วง 0.016 – 1.00 mg/ml เตรียมสารสกัดที่ความเข้มข้น 10 mg/ml ปิเปตสารละลายมาตรฐาน Gallic acid แต่ละความเข้มข้นหรือสารสกัดเปลือกส้มโอปริมาตร 100 µl เติมในสารละลาย Folin-ciocalteu ความเข้มข้นปริมาตร 100 µl ลงในหลอดทดลอง แล้วบ่มในที่มืดทิ้งไว้ 6 นาที จากนั้นเติมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต 7.5% (w/v) ปริมาตร 1,000 µl หลังจากนั้นปิเปตลงใน 96 Well plate บ่มในที่มืดไว้ 90 นาที ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องไมโครเพลทรีดเดอร์ (Microplate Reader) ที่ความยาวคลื่น 765 nm นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้จากสารสกัดเปลือกส้มโอมาเทียบกับกราฟมาตรฐานของ Gallic acid (Gallic Acid Equivalent, GAE) แล้วนำมาคำนวณปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม แสดงผลในหน่วย mg GAE /g crude extract

3.3.4 ศึกษาภาวะที่เหมาะสมของความเข้มข้นสารละลายและเวลาในการบ่มเปลือกส้มโอสกัดด้วยวิธี Response Surface Methodology (RSM)

หาภาวะที่เหมาะสมของความเข้มข้นของสารละลายที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ และระดับอุณหภูมิการบ่มตามข้อ 3.3.2 ซึ่งกำหนดความเข้มข้นของตัวทำละลายและอุณหภูมิการบ่มอย่างละ 4 ระดับ ได้แก่ เอทานอลร้อยละ 70 : น้ำ 30 (0.7 : 0.3), เอทานอลร้อยละ 80 : น้ำ 20 (0.8 : 0.2) เอทานอลร้อยละ 90 : น้ำ 10 (0.9 : 0.1) และเอทานอลร้อยละ 95 : น้ำ 5 (0.95 : 0.05) ตามลำดับ และระดับอุณหภูมิการบ่ม ได้แก่ 50 ℃, 60 ℃, 70 ℃ และ 80 ℃ ตามลำดับซึ่งแต่ละตัวแปรอิสระได้กำหนดรหัสตัวแปรไว้ ได้แก่ -2, -1, 0 และ +1 วางแผนการทดลองแบบ 4×4 Factorial in CRD และวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) โดยวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติแบบ Duncan's multiple test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% จากนั้นสร้างสมการทำนายผลและค่าคงที่จากสมการรีเกรสชันโดยวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติแบบ Linear regression test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% และสร้างพื้นที่ผิว

ตอบสนองแบบสามมิติด้วยโปรแกรม Response Surface Methodology (RSM) เพื่อดูความสัมพันธ์กันระหว่างความเข้มข้นของสารละลายเอทานอล อุณหภูมิการบ่ม และฤทธิ์ต้านออกซิเดชันในสารสกัดเปลือกส้มโอ

3.3.5 ศึกษาองค์ประกอบของสารระเหยของสารสกัดเปลือกส้มโอ

นำสารสกัดเปลือกส้มโอที่ได้จากภาวะที่เหมาะสมจากข้อ 3.3.4 มาทำการวิเคราะห์เปรียบเทียบกับสารสกัดเปลือกส้มโอที่สกัดด้วยน้ำและไม่ผ่านการบ่ม โดยวิเคราะห์องค์ประกอบของสารระเหยด้วยเครื่อง Analyzed on a GC–MS Agilent 7890B/5977B inert gas chromatograph นำตัวอย่างมา 5 ml ใส่ในขวด Headspace vial ขนาด 20 ml และปิดฝาให้สนิท พยายามใช้เวลาให้น้อยที่สุด นำตัวอย่างในขวด Headspace vial ไปบ่มที่อุณหภูมิ 40 ℃ นาน 15 นาทีและใช้ DVB/CAR/PDMS Fiber ในการ Absorb ตัวอย่างที่อุณหภูมิ 40 ℃ เป็นเวลา 40 นาที และ Desorb ตัวอย่างที่อุณหภูมิ 200 ℃ นาน 5 นาที ก่อนเข้าเครื่อง GC-MS ต่อไป โดยภาวะที่ใช้วิเคราะห์ มีดังนี้

GC (Gas chromatography)
Column: HP-5MS Ultra Inert (60 m x 250 μm x 0.25 μm Film Thickness)
Injection port temperature: Temperature at 230 ℃
Detector port temperature: Temperature at 280 ℃
Carrier gas and flow rate: Helium gas at flow rate 1.2 ml/min
Column temperature programmer: The oven temperature started at 60 ℃; was held for 5 minutes and was increased at a flow rate of 10 ℃/minutes to 120 ℃ (5 minutes hold), 200 ℃ (5 minutes hold) and finally 280 ℃ (15 minutes hold)

MS (Mass spectrometry)
Electron impact (EI) mode: 70 eV
Ion source temperature: Temperature at 230 ℃
Quadrupole temperature: Temperature at 150 ℃
Mass range m/z: 30-500
EM voltage: 1174 V
ดัดแปลงจากวิธีของ Liu et al. (2017)

3.3.6 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ในการทดลองทำการทดลอง 3 ซ้ำ แสดงผลในรูปค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ซึ่งได้จากการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม SPSS เวอร์ชั่น 22 โดยทำการทดสอบแบบ One way Analysis of Variance (ANOVA) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธีของ Duncan’s Multiple Range Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($p \leq 0.05$)

บทที่ 4
ผลการวิจัย

4.1 การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน ปริมาณฟลาโวนอยด์รวม ปริมาณฟีนอลิกรวมของสารสกัดเปลือกส้มโอพันธุ์ขาวน้ำผึ้งที่ระดับความเข้มข้นของสารละลายเอทานอลและอุณหภูมิในการบ่มแตกต่างกัน

จากการศึกษาเบื้องต้นพบว่าปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อลักษณะเฉพาะทางชีวภาพ และทางกายภาพ คือ ความเข้มข้นของตัวทำละลาย และอุณหภูมิการบ่ม จากนั้นนำข้าวเปลือกส้มโอมาศึกษาสภาวะที่เหมาะสม โดยวางแผนการทดลองแบบ 4x4 Factorial in CRD และสร้างพื้นที่ผิวตอบสนองแบบสามมิติด้วยโปรแกรม Response Surface Methodology (RSM) โดยแปรระดับความเข้มข้นของตัวทำละลายอยู่ในช่วง 70%, 80%, 90% และ 95% (w/v) อุณหภูมิการบ่มอยู่ในช่วง 50 °C, 60 °C, 70 °C และ 80 °C ต่อผลของสมบัติการออกฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน ปริมาณฟลาโวนอยด์รวม ปริมาณฟีนอลิกรวม ดังแสดงในตารางที่ 4.1 โดยศึกษาคุณสมบัติ ดังนี้

ตารางที่ 4.1 การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของสารสกัดเปลือกส้มโอพันธุ์ขาวน้ำผึ้งที่ระดับความเข้มข้นของสารละลายเอทานอลและอุณหภูมิในการบ่มต่าง ๆ

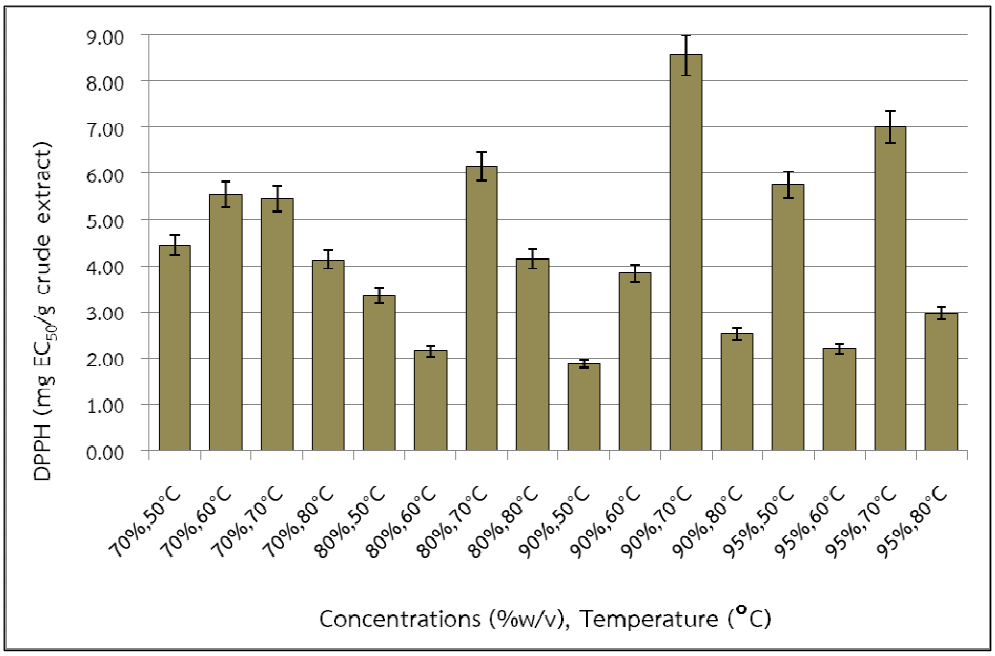
Concentrations (%w/v)	Temperature (°C)	DPPH (mg EC_{50}/ g crude extract)	FRAP Value (mg TE/g crude extract)	Total Flavonoids Content (mg CE/g crude extract)	Total Phenolics Content (mg GAE/g crude extract)
70	50	4.45^{e}±0.39	6.70^{c}±0.16	10.84^{a}±0.12	15.40^{a}±0.96
	60	5.54^{d}±0.28	3.09^{i}±0.16	3.62^{j}±0.06	11.20^{c}±0.61
	70	5.46^{d}±0.67	5.52^{de}±0.12	9.24^{b}±0.12	8.74^{d}±0.041
	80	4.14^{ef}±0.19	10.02^{a}±1.21	8.79^{c}±0.46	12.01^{b}±0.47
80	50	3.36^{gh}±0.15	6.15^{cd}±0.19	7.71^{d}±0.09	6.97^{e}±0.35
	60	2.15^{jk}±0.04	4.89^{ef}±0.19	5.94^{f}±0.04	6.99^{e}±0.05
	70	6.16^{c}±0.29	3.14^{i}±0.18	7.39^{d}±0.23	4.24^{gh}±0.09
	80	4.15^{ef}±0.18	6.37^{c}±0.19	4.49^{i}±0.19	5.84^{f}±0.16
90	50	1.88^{k}±0.22	3.98^{gh}±0.13	4.73^{hi}±0.26	2.69^{j}±0.11
	60	3.84^{fg}±0.07	4.58^{fg}±0.04	6.09^{f}±0.16	3.99^{gh}±0.03
	70	8.56^{a}±0.22	3.34^{hi}±0.19	5.34^{g}±0.16	3.15^{ij}±0.15
	80	2.53^{ij}±0.06	8.78^{b}±1.14	8.84^{c}±0.52	6.23^{f}±0.03
95	50	5.76^{cd}±0.36	4.90^{ef}±0.05	5.35^{g}±0.13	4.44^{g}±0.25
	60	2.20^{jk}±0.04	4.90^{ef}±0.10	5.08^{gh}±0.16	3.99^{gh}±0.05
	70	7.01^{b}±0.29	4.08^{gh}±0.17	6.04^{f}±0.03	3.71^{hi}±0.10
	80	2.98^{hi}±0.54	5.19^{ef}±0.26	6.59^{e}±0.13	4.24^{gh}±0.09

Each value represented a mean ± standard deviation; Means with the different letter in the column are significantly difference at $p \leq 0.05$

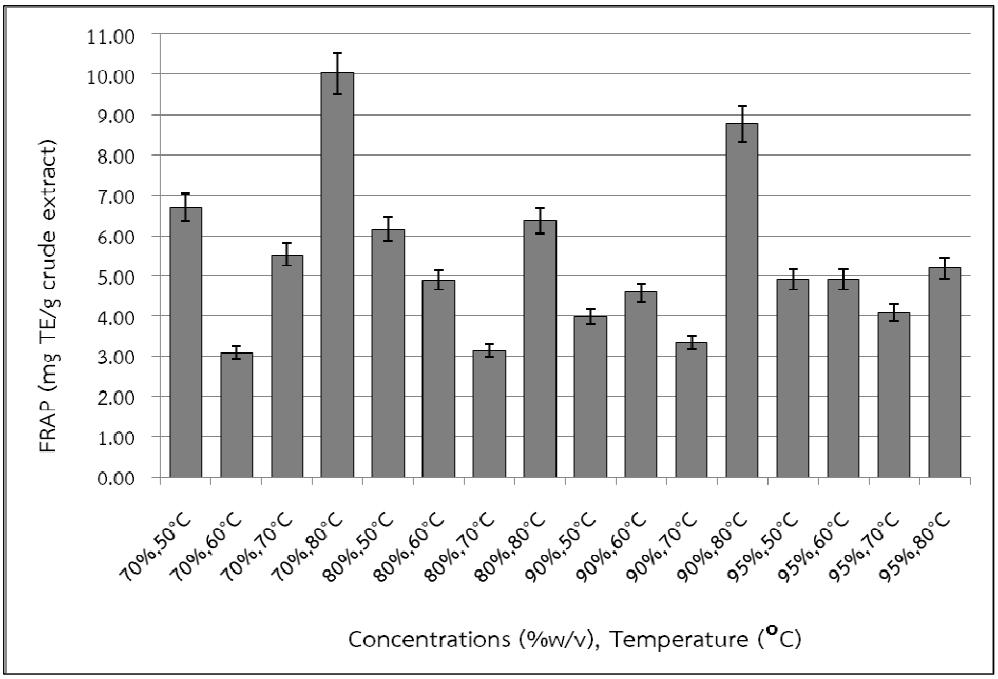
4.1.1 การวิเคราะห์ฤทธิ์การต้านออกซิเดชันของสารสกัดเปลือกส้มโอพันธุ์ขาวน้ำผึ้งที่ระดับความเข้มข้นของสารละลายเอทานอลและอุณหภูมิในการบ่มแตกต่างกัน

เปลือกส้มโอที่ระดับความเข้มข้นของตัวทำละลายและอุณหภูมิการบ่มแตกต่างกันโดยกำหนดช่วงความเข้มข้นของสารละลายเอทานอล 4 ระดับในช่วง 70%, 80%, 90% และ 95% (w/v) อุณหภูมิการบ่ม 4 ระดับในช่วง 50 °C, 60 °C, 70 °C และ 80 °C ได้ถูกนำมาศึกษาและเปรียบเทียบถึงสมบัติการต้านออกซิเดชันโดยใช้วิธี DPPH และ FRAP ซึ่งวิธี DPPH เป็นวิธีที่ใช้ประเมินความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระในเปลือกส้มโอต่อการกำจัดอนุมูลอิสระ $DPPH^{\bullet}$ โดยการให้ไฮโดรเจนอะตอม ส่วนวิธี FRAP เป็นวิธีที่ใช้ประเมินความสามารถของสารต้านอนุมูลอิสระในเปลือกส้มโอในการให้อิเล็กตรอนโดยการรีดิวซ์ Fe^{3+} ไปเป็น Fe^{2+} ผลที่ได้แสดงดังตารางที่ 4.1 พบว่าสมบัติการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH ซึ่งแสดงผลเป็นความเข้มข้นที่สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระได้ 50% (Half maximal effective concentration; EC_{50}) นั้น แสดงให้เห็นว่าอุณหภูมิการบ่มส่งผลโดยตรงต่อค่า EC_{50} เมื่ออุณหภูมิการบ่มมีค่าเพิ่มขึ้นและลดลงซึ่งมีค่าระหว่าง 1.88 – 8.56 mg EC_{50}/g crude extract โดยช่วงอุณหภูมิการบ่มช่วง 50 °C – 60 °C มีค่า EC_{50} ระหว่าง 1.88 – 5.76 mg EC_{50}/g crude extract เมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้นถึง 70 °C มีค่าระหว่าง 5.46 – 8.56 mg EC_{50}/g crude extract หลังจากนั้นค่า EC_{50} ลดลงเมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้นที่ 80 °C มีค่าระหว่าง 2.53 – 4.15 mg EC_{50}/g crude extract ตามลำดับ แสดงดังภาพที่ 4.1 แสดงว่าอุณหภูมิการบ่มมีผลต่อค่า EC_{50} อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

เช่นเดียวกับการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP มีค่า FRAP value เพิ่มขึ้นและลดลงที่อุณหภูมิช่วง 50 °C – 60 °C มีค่า FRAP value อยู่ระหว่าง 3.14 – 6.70 mg TE/g crude extract หลักจากนั้นค่า FRAP value มีค่าเพิ่มขึ้นเมื่ออุณหภูมิอยู่ที่ 80 °C มีค่าอยู่ระหว่าง 5.19 – 10.02 mg TE/g crude extract ตามลำดับ แสดงดังภาพที่ 4.2 แสดงให้เห็นว่าอุณหภูมิการบ่มมีผลต่อค่า FRAP value อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)



ภาพที่ 4.1 ค่า EC_{50} ที่ระดับความเข้มข้นของสารละลายเอทานอลและอุณหภูมิในการบ่มต่าง ๆ ในเปลือกส้มโอพันธุ์ขาวน้ำผึ้ง



ภาพที่ 4.2 ค่า FRAP value ที่ระดับความเข้มข้นของสารละลายเอทานอลและอุณหภูมิในการบ่มต่าง ๆ ในเปลือกส้มโอพันธุ์ขาวน้ำผึ้ง

เมื่อวิเคราะห์การถดถอย (Regression coefficient) เพื่อทำนายปัจจัยด้านความเข้มข้นของสารละลายเอทานอลและอุณหภูมิในการบ่มต่อค่า EC_{50} และค่า FRAP value ที่เกิดขึ้นจากการทำปฏิกิริยาแสดงค่าสัมประสิทธิ์ของสมการ (coefficient) และ ค่า R^2 ดังตารางที่ 4.2 นอกจากนี้สามารถทำนายค่า EC_{50} และค่า FRAP value เมื่อแปรความเข้มข้นของสารละลายเอทานอล (X_1) และอุณหภูมิ (X_2) โดยเฉพาะเทอมที่มีนัยสำคัญมาสร้างเป็นสมการได้ ดังสมการที่ (1) และ (2)

$$EC_{50} = 4.848 + 0.174X_1 - 0.552X_2 + 0.307X_1^2 - 0.729X_2^2 - 0.074X_1X_2 \quad (1)$$

$$\text{FRAP value} = 4.012 - 0.383X_1 + 1.657X_2 + 0.198X_1^2 + 1.159X_2^2 - 0.228X_1X_2 \quad (2)$$

โดยมีค่าปฏิสัมพันธ์การตัดสินใจ (Coefficient of determination) หรือ R^2 เท่ากับ 0.202 และ 0.609 ในส่วนของค่า EC_{50} มีค่า R^2 เท่ากับ 0.202 ถือว่าเป็นค่าที่ต่ำแต่เมื่อพิจารณาค่าสัมประสิทธิ์ (coefficient) ในตารางที่ 4.2 พบว่าค่าสัมประสิทธิ์ของตัวแปรอิสระในเทอมยกกำลังสอง (X_2^2) มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) นั่นหมายถึงสามารถใช้อธิบายการตอบสนองของตัวแปรอิสระ (อุณหภูมิ) ที่มีผลต่อตัวแปรตาม (ค่า EC_{50}) ได้ นอกจากนี้ได้ทำนายค่าตัวแปรตอบสนองจากสมการที่ (1) พบว่าค่าตอบสนองที่ได้จากการทำนายมีค่าใกล้เคียงกับค่าจริง แสดงว่าแบบจำลองที่สร้างขึ้นมีความเหมาะสมกับข้อมูลสมการที่ได้สามารถนำไปใช้ทำนายค่า EC_{50} และค่า FRAP value ในสภาวะที่ไม่ได้ทำการทดลองได้ จากสมการที่ (1) และ (2) พบว่ามีความสัมพันธ์ของอุณหภูมิการบ่มทั้งในเทอมเชิงเส้น (linear) และกำลังสอง (quadratic) ซึ่งค่า EC_{50} มีเทอมเชิงเส้นของอุณหภูมิในการบ่มพบว่าผลของอุณหภูมิมีความสัมพันธ์เชิงลบ แสดงว่าอุณหภูมิการบ่มทำให้ค่า EC_{50} มีค่าสูงขึ้นถึงจุดหนึ่งแล้วพบการลดลงของค่า EC_{50} ส่วนผลของความเข้มข้นของสารละลายเอทานอลไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) แสดงว่าความเข้มข้นของสารละลายเอทานอลไม่มีผลต่อค่า EC_{50} ในส่วนของเทอมกำลังสอง พบว่าผลของอุณหภูมิในการบ่มมีความสัมพันธ์เชิงลบ ซึ่งอุณหภูมิมีผลต่อค่า EC_{50} ทำให้ที่ภาวะอุณหภูมิของการบ่มที่ระดับต่าง ๆ มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) แสดงว่าเมื่อเพิ่มอุณหภูมิในการบ่มจะทำให้ค่า EC_{50} สูงขึ้นและลดลงได้เช่นกัน อธิบายได้ว่าที่อุณหภูมิสูง 50 °C มีค่า EC_{50} ที่ลดลงแต่เมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้นจาก 60 °C ไปจนถึง 70 °C ทำให้ค่า EC_{50} มีค่าที่สูงขึ้น และเริ่มลดลงเมื่อเข้าสู่อุณหภูมิที่ 80 °C นอกจากนี้ความเข้มข้นของสารละลายเอทานอลและอุณหภูมิการบ่มไม่มีปฏิสัมพันธ์กัน นั่นหมายความว่าของสารละลายเอทานอลและอุณหภูมิการบ่มไม่มีการทำงานร่วมกันทำให้ไม่ส่งผลต่อค่า EC_{50} ร่วมกันเมื่อพิจารณาค่าสัมประสิทธิ์ (coefficient) พบว่าอุณหภูมิในการบ่มมีผลต่อค่า EC_{50} ซึ่งมีค่าสัมประสิทธิ์เท่ากับ -0.729 (X_2^2) ซึ่งมีผลทั้งในเชิงเส้นและเทอมยกกำลังสอง แสดงว่าอุณหภูมิการบ่มจะทำให้ค่า EC_{50} มีค่าสูงขึ้นถึงจุดหนึ่งแล้วพบการลดลงของค่า EC_{50}

เช่นเดียวกับค่า FRAP value มีเทอมเชิงเส้นของอุณหภูมิในการบ่มพบว่าผลของอุณหภูมิมีความสัมพันธ์เชิงบวกแสดงว่าอุณหภูมิในการบ่มมีผลต่อ FRAP value ในส่วนของเทอมกำลังสอง พบว่าผลของอุณหภูมิในการบ่มมีความสัมพันธ์เชิงบวกซึ่งอุณหภูมิมีผลต่อค่า FRAP value ทำให้ที่ภาวะอุณหภูมิของการบ่มที่ระดับต่าง ๆ มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) แสดงว่าเมื่อเพิ่ม

อุณหภูมิในการบ่มจะทำให้ค่า FRAP value สูงขึ้น และลดลงได้เช่นกัน อธิบายได้ว่าที่อุณหภูมิสูง 50 ℃ ไปจนถึง 60 ℃ มีค่า FRAP value เริ่มลดลงแต่เมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้นจาก 70 ℃ ไปจนถึง 80 ℃ ค่า FRAP value มีค่าที่สูงขึ้นและเพิ่มขึ้น นอกจากนี้สารละลายเอทานอลและอุณหภูมิการบ่มไม่มีปฏิสัมพันธ์กัน นั่นหมายความว่าสารละลายเอทานอลและอุณหภูมิในการบ่มไม่มีการทำงานร่วมกันทำให้ไม่ส่งผลต่อค่า FRAP value ร่วมกันเมื่อพิจารณาค่าสัมประสิทธิ์ (coefficient) พบว่าอุณหภูมิในการบ่มมีผลต่อค่า FRAP value ซึ่งมีค่าสัมประสิทธิ์ในเทอมเชิงเส้นและเทอมกำลังสองเท่ากับ 1.657 (X_2) และ 1.159 (X_2^2) แสดงว่าอุณหภูมิการบ่มจะทำให้ค่า FRAP value มีค่าสูงขึ้นถึงจุดหนึ่งแล้วมีค่าลดลงที่จุดหนึ่งเช่นกัน

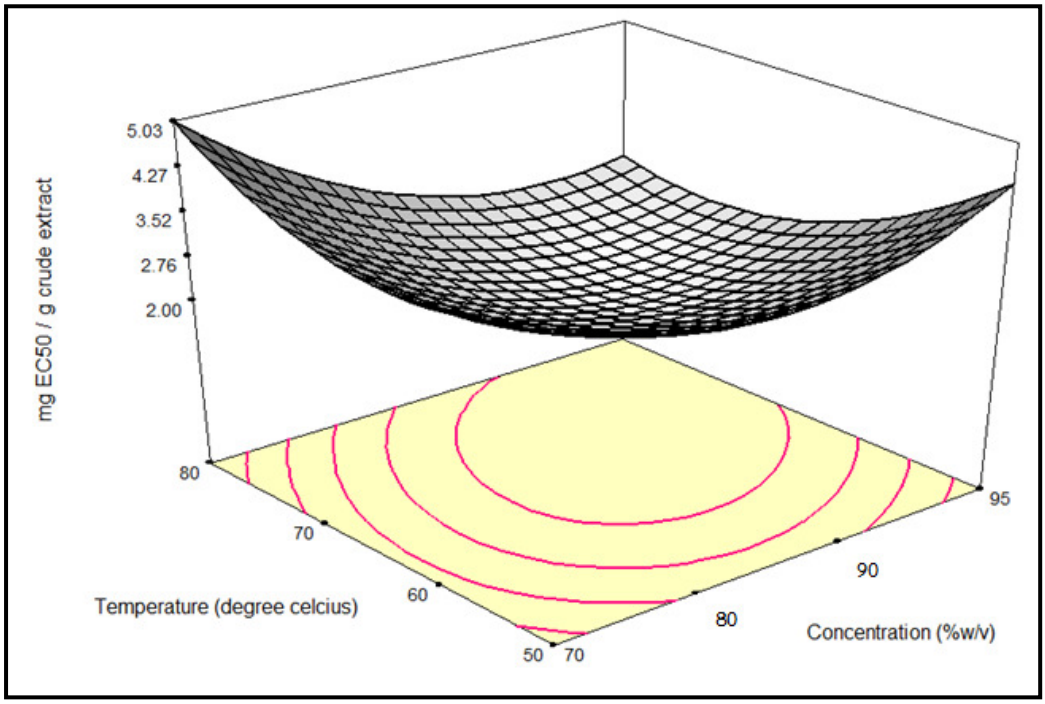
ตารางที่ 4.2 ค่าสัมประสิทธิ์การถดถอย (Regression coefficients), และค่า R^2 ของสมบัติการต้านออกซิเดชันที่สัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายเอทานอลและอุณหภูมิการบ่มต่อการเปลี่ยนแปลงคุณภาพในเปลือกส้มโอพันธุ์ขาวน้ำผึ้ง

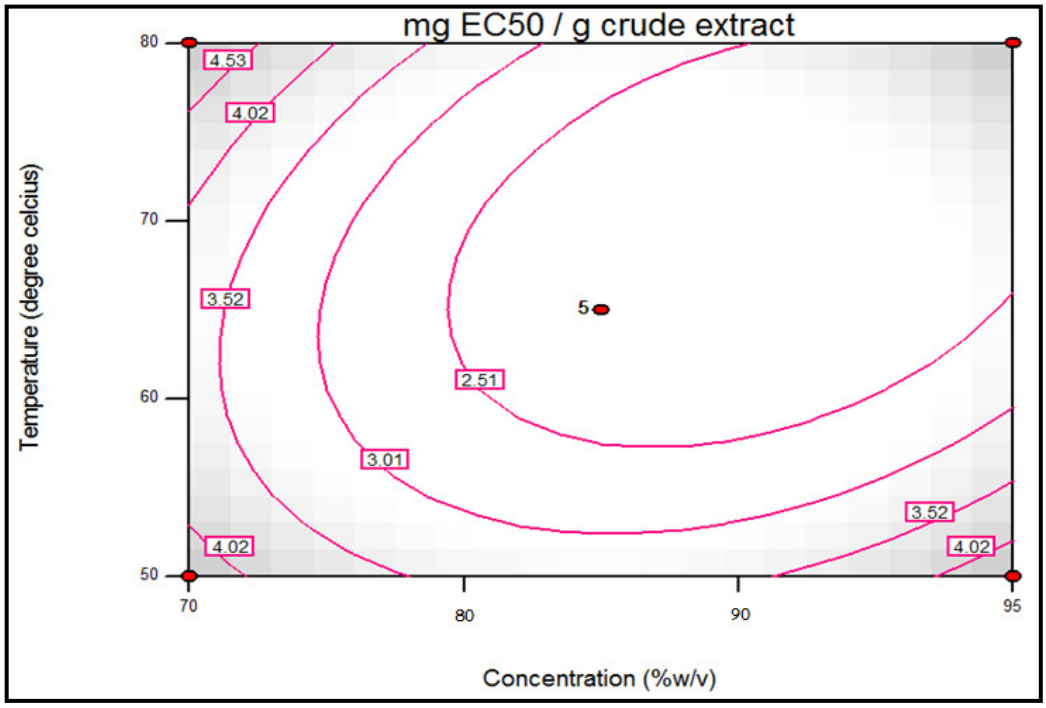
Coefficient	EC_{50}	FRAP Value
X_0	4.848*	4.012*
X_1	0.174	-0.383
X_2	-0.552	1.657*
X_1^2	0.307	0.198
X_2^2	-0.729*	1.159*
$X_1 X_2$	-0.074	-0.228
R^2	0.202	0.609

X_0 = constant, X_1 = concentration, X_2 = temperature, X_1^2 = concentration^2, X_2^2 = temperature^2,
X_1X_2 = coefficient of interaction between concentration and temperature
* Significant at $p \leq 0.05$

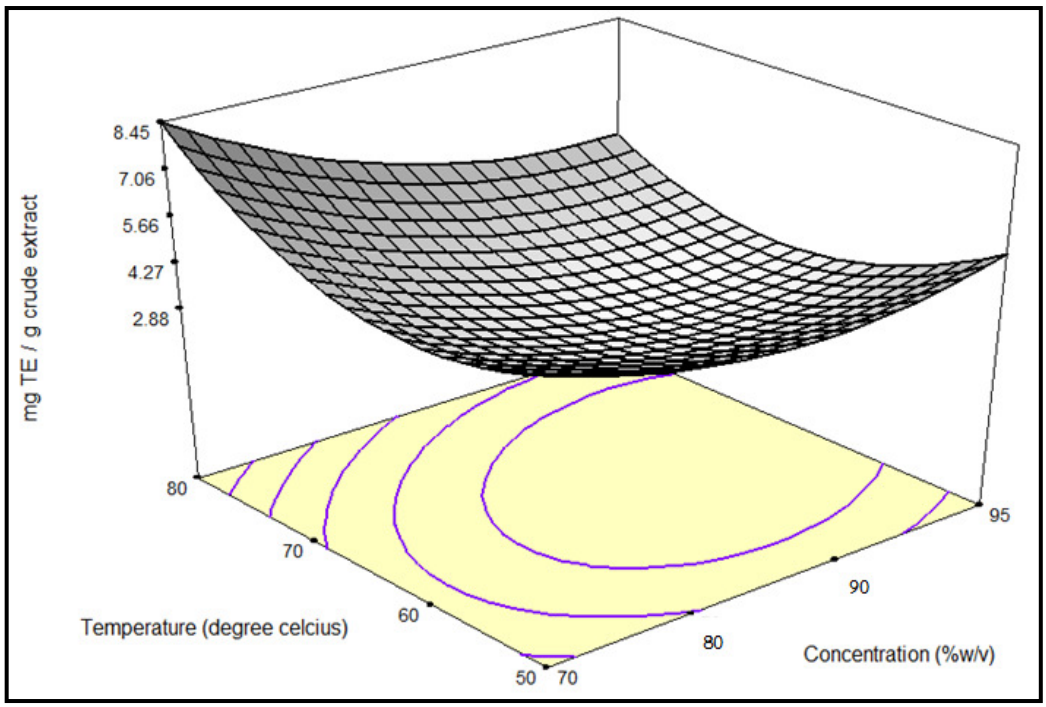
เมื่อนำสมการที่ได้มาสร้างกราฟพื้นที่ผิวตอบสนองสามมิติ (Response surface) แสดงให้เห็นถึงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายเอทานอลและอุณหภูมิการบ่มเปลือกส้มโอต่อค่า EC_{50} และค่า FRAP value ได้ผลการทดลองแสดงดังภาพที่ 4.3 และ 4.4 พบว่าเมื่ออุณหภูมิการบ่มเพิ่มขึ้นมีผลทำให้ค่า EC_{50} มีค่าเพิ่มขึ้นถึงจุดหนึ่งแล้วเริ่มลดลง ส่วนค่า FRAP value เมื่ออุณหภูมิการบ่มเพิ่มขึ้นจะให้ค่าที่เพิ่มขึ้น ในส่วนเทอมกำลังสองของอุณหภูมิดังตารางที่ 4.2 ค่า EC_{50} มีผลในเชิงลบแสดงให้เห็นว่าค่า EC_{50} จะค่อย ๆ เพิ่มสูงขึ้นเมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้นและเริ่มลดลงเมื่ออุณหภูมิอยู่ในช่วง 80 ℃ จากภาพที่ 4.3 สามารถอธิบายได้ว่าค่า EC_{50} มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันได้สูงสุดที่ความเข้มข้น 90% อุณหภูมิ 80 ℃ โดยทั่วไปแล้วสมบัติการต้านอนุมูลอิสระมีความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณฟีนอลิกเนื่องมาจากปริมาณฟีนอลิกที่สูงขึ้นเมื่ออุณหภูมิการบ่มเพิ่มขึ้นทำให้สมบัติการต้านอนุมูลอิสระมีค่าลดลง ซึ่งเกิดจากความร้อนทำให้พันธะโคเวนเลนต์ถูกทำลายส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงของเยื่อหุ้มเซลล์

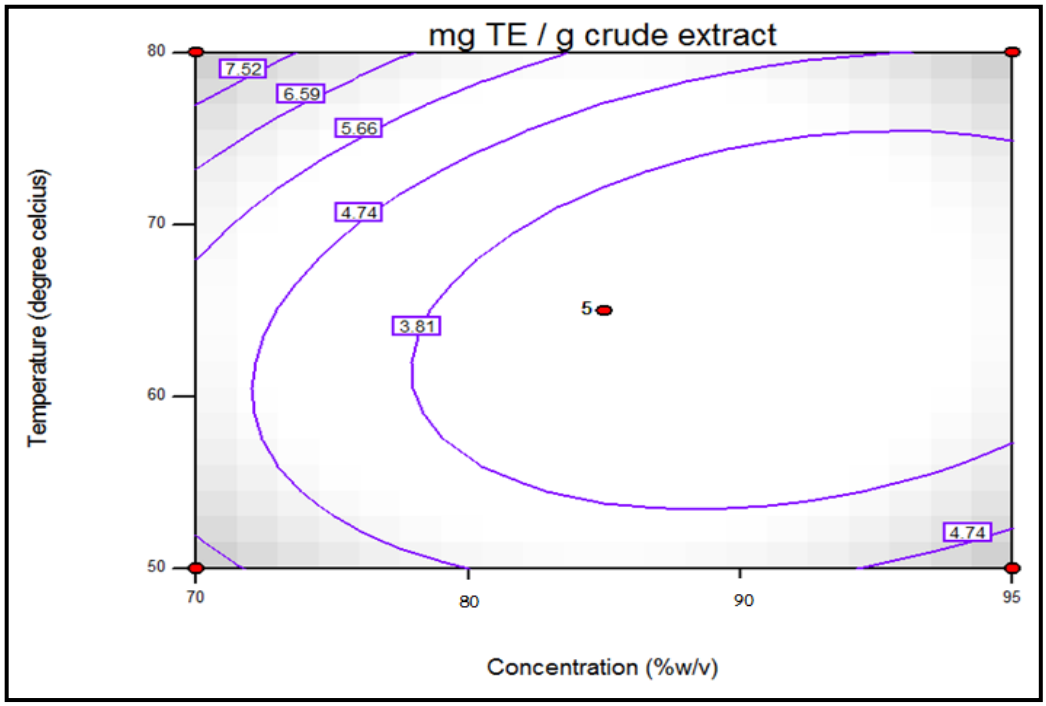
ของพืชทำให้เกิดโมเลกุลอิสระถูกปลดปล่อยสารต้านออกมา ซึ่งอาจเป็นสาเหตุให้ความสามารถของการต้านอนุมูลอิสระมีค่าลดลง (Liu et al., 2012) นอกจากนี้อุณหภูมิที่สูงขึ้นจะเพิ่มความสามารถในการละลายของตัวทำละลายและเพิ่มประสิทธิภาพในการสกัดเช่นกัน นั่นหมายความว่าค่า EC_{50} ที่ต่ำจะบ่งบอกถึงค่าการต้านอนุมูลอิสระที่สูงขึ้น (Tananuwong & Tewaruth, 2010) ในส่วนของเทอมเชิงเส้นและเทอมกำลังสองของค่า FRAP value มีผลเชิงบวกแสดงให้เห็นว่าค่า FRAP จะค่อย ๆ ลดลงเมื่ออุณหภูมิการบ่มสูงขึ้น และมีค่าเพิ่มสูงขึ้นในช่วงอุณหภูมิ 70 °C ไปจนถึง 80 °C จากภาพที่ 4.4 สามารถอธิบายได้ว่าค่า FRAP value มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันได้สูงสุดที่ความเข้มข้น 70% อุณหภูมิ 80 °C อาจเป็นไปได้ว่าความร้อนทำให้เกิดองค์ประกอบของสารใหม่หรือส่งเสริมให้สารต้านอนุมูลอิสระที่มีอยู่ส่งผลต่อปริมาณการต้านอนุมูลอิสระสูงขึ้น (Sharma et at., 2015)





ภาพที่ 4.3 พื้นที่ผิวตอบสนอง (RSM) และกราฟ Contour plot ที่สัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายเอทานอลและอุณหภูมิในการบ่มต่อค่า EC_{50}

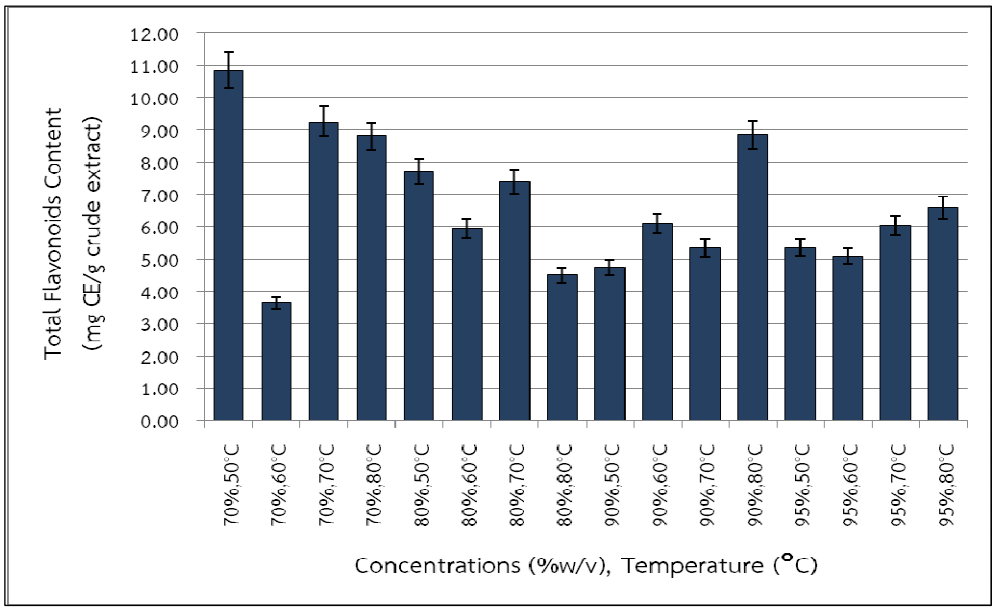




ภาพที่ 4.4 พื้นที่ผิวตอบสนอง (RSM) และกราฟ Contour plot ที่สัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายเอทานอลและอุณหภูมิในการบ่มต่อค่า FRAP value

4.1.2 การวิเคราะห์ปริมาณฟลาโวนอยด์รวมของสารสกัดเปลือกส้มโอพันธุ์ขาวน้ำผึ้งที่ระดับความเข้มข้นของสารละลายเอทานอลและอุณหภูมิในการบ่มแตกต่างกัน

สารประกอบฟลาโวนอยด์ เป็นองค์ประกอบของโพลิฟีนอลิกที่ถูกสร้างขึ้นในรูปแบบสารทุติยภูมิ (Secondary metabolism) ในพืชประกอบด้วยวงอะโรมาติกตั้งแต่ 2 วงขึ้นไป โดยมีการจับกับคาร์บอนและ aromatic hydroxyl (Nishiumi et al., 2011) การวิเคราะห์ปริมาณฟลาโวนอยด์รวมจากเปลือกส้มโอที่ระดับความเข้มข้นของสารละลายเอทานอลและอุณหภูมิในการบ่มแตกต่างกันผลที่ได้แสดงดังตารางที่ 4.1 พบว่าความเข้มข้นของสารละลายเอทานอลและอุณหภูมิในการบ่มที่แตกต่างกันส่งผลโดยตรงกับปริมาณฟลาโวนอยด์ ซึ่งปริมาณฟลาโวนอยด์ที่สูงขึ้นจะอยู่ในช่วงความเข้มข้น 70% อุณหภูมิ 50 ℃ จากนั้นค่อย ๆ ลดลงเมื่ออุณหภูมิเข้าสู่ 60 ℃ และเริ่มมีปริมาณเพิ่มขึ้นเมื่ออุณหภูมิอยู่ระหว่าง 70 ℃ จนถึง 80 ℃ ช่วงความเข้มข้นของสารละลายเอทานอลอยู่ระหว่าง 70% - 95% (w/v) ซึ่งมีปริมาณฟลาโวนอยด์รวมอยู่ระหว่าง 3.62 – 10.84 mg CE/g crude extract ตามลำดับ เมื่อนำทั้งสองสภาวะมาเปรียบเทียบกับปริมาณฟลาโวนอยด์จะเห็นว่าปริมาณฟลาโวนอยด์ค่อย ๆ เพิ่มขึ้น เมื่ออุณหภูมิการบ่มเพิ่มสูงขึ้น เช่นเดียวกับความเข้มข้นของสารละลายเอทานอลช่วงความเข้มข้น 70% (w/v) ให้ปริมาณที่สูงเมื่อความเข้มข้นของเอทานอลอยู่ระหว่าง 80% - 95% (w/v) ให้ปริมาณฟลาโวนอยด์รวมที่ลดลงโดยลดลงมากในช่วงความเข้มข้นของสารละลายเอทานอล 80% (w/v) หลังจากนั้นปริมาณฟลาโวนอยด์รวมจึงมีค่าที่ค่อย ๆ เพิ่มขึ้นแสดงดังภาพที่ 4.5 แสดงว่าความเข้มข้นของสารละลายเอทานอลและอุณหภูมิในการบ่มมีผลต่อปริมาณฟลาโวนอยด์รวมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)



ภาพที่ 4.5 ปริมาณฟลาโวนอยด์รวมที่ระดับความเข้มข้นของสารละลายเอทานอลและอุณหภูมิในการบ่มต่าง ๆ ในเปลือกส้มโอพันธุ์ขาวน้ำผึ้ง

เมื่อวิเคราะห์การถดถอย (Regression coefficient) เพื่อทำนายปัจจัยด้านความเข้มข้นของสารละลายเอทานอลและอุณหภูมิในการบ่มต่อปริมาณฟลาโวนอยด์รวมที่เกิดขึ้นจากการทำปฏิกิริยาแสดงค่าสัมประสิทธิ์ของสมการ (coefficient) และ ค่า R^2 ดังตารางที่ 4.3 นอกจากนี้สามารถทำนายปริมาณฟลาโวนอยด์เมื่อแปรความเข้มข้นของสารละลายเอทานอล (X_1) และอุณหภูมิ (X_2) โดยเฉพาะเทอมที่มีนัยสำคัญมาสร้างเป็นสมการได้ ดังสมการที่ (3)

$$\text{Total Flavonoids content} = 5.599 - 0.230X_1 + 0.904X_2 + 0.314X_1^2 + 0.538X_2^2 + 0.354X_1X_2 \qquad (3)$$

โดยมีค่าปฏิสัมพันธ์การตัดสินใจ (Coefficient of determination) หรือ ค่า R^2 เท่ากับ 0.338 ซึ่งถือว่าเป็นค่าที่ต่ำแต่เมื่อพิจารณาค่าสัมประสิทธิ์ (coefficient) ในตารางที่ 4.3 โดยพิจารณาค่าความต่างจึงพบว่าอุณหภูมิการบ่มมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) แสดงว่าแบบจำลองที่สร้างขึ้นมีความเหมาะสมกับข้อมูลสมการที่ได้สามารถนำไปใช้ทำนายปริมาณฟลาโวนอยด์ในสภาวะที่ไม่ได้ทำการทดลองได้ จากสมการที่ (3) พบว่าความสัมพันธ์ของอุณหภูมิการบ่มทั้งในเทอมเชิงเส้น (linear) และเทอมกำลังสอง (quadratic) ในเทอมเชิงเส้นของอุณหภูมิในการบ่มมีความสัมพันธ์เชิงบวกแสดงว่าเมื่อเพิ่มอุณหภูมิในการบ่มจะทำให้ปริมาณฟลาโวนอยด์เพิ่มขึ้น เช่นเดียวกับในเทอมกำลังสองของอุณหภูมิในการบ่มมีความสัมพันธ์เชิงบวกแสดงว่าเมื่อเพิ่มอุณหภูมิในการบ่มจะทำให้ปริมาณฟลาโวนอยด์เพิ่มขึ้น แสดงว่าเมื่อเพิ่มอุณหภูมิในการบ่มจะทำให้ปริมาณฟลาโวนอยด์จะลดลงและเพิ่มสูงขึ้น อธิบายได้ว่าเมื่ออุณหภูมิจาก 50 °C ไปจนถึง 60 °C ปริมาณฟลาโวนอยด์จะลดลงเรื่อย ๆ แต่เมื่ออุณหภูมิเข้าสู่ 70 °C ไปจนถึง 80 °C ปริมาณฟลาโวนอยด์จะค่อย ๆ เพิ่มขึ้น จึงทำให้อุณหภูมิในการบ่มมีผลต่อปริมาณฟลาโวนอยด์รวมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

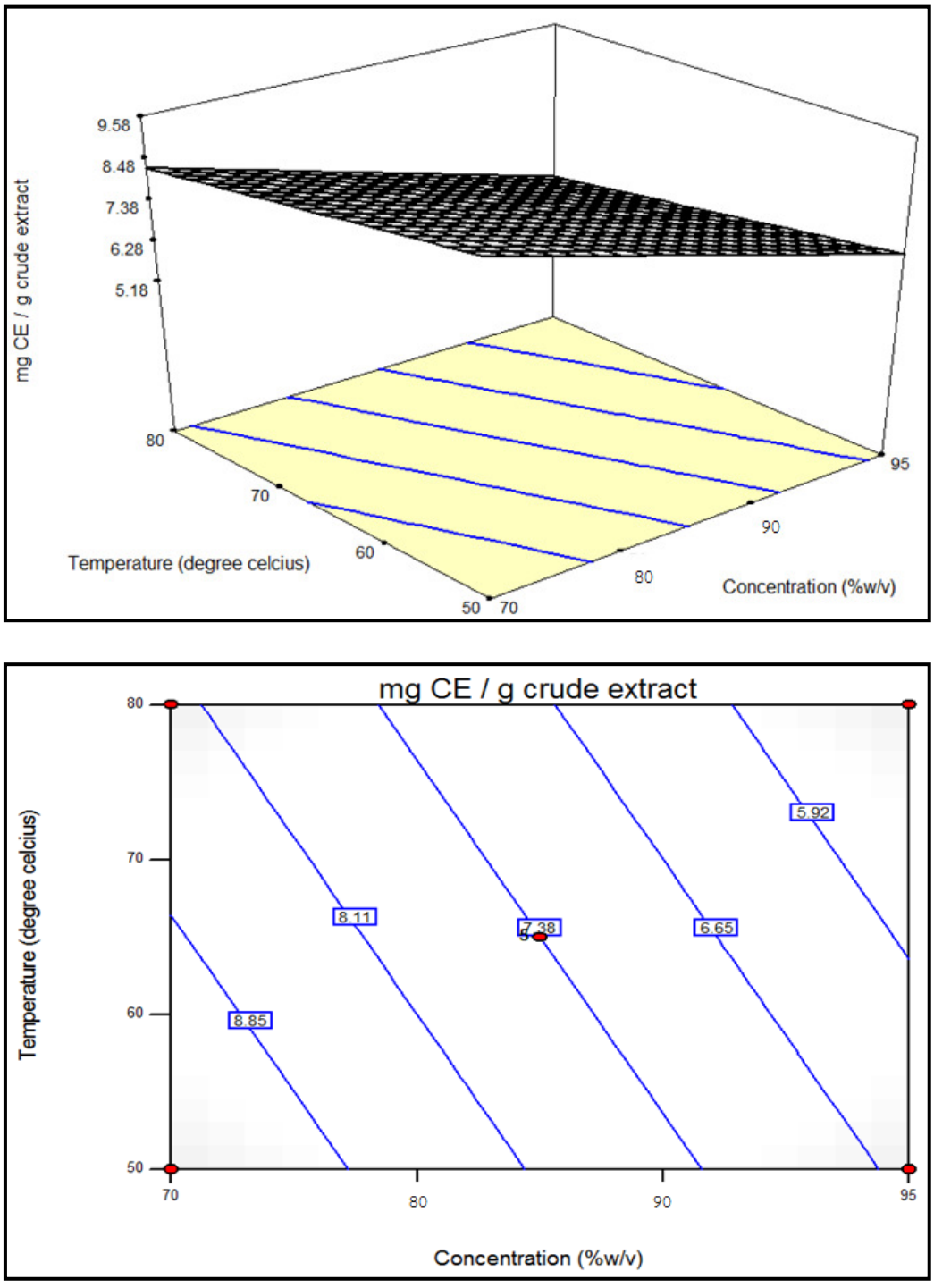
($p \leq 0.05$) ส่วนความเข้มข้นของสารละลายเอทานอลอาจส่งผลต่อปริมาณฟลาโวนอยด์ไม่มากนัก เนื่องจากความเข้มข้นของสารละลายเอทานอลและอุณหภูมิในการบ่มไม่มีปฏิสัมพันธ์กันทำให้ความเข้มข้นของสารละลายเอทานอลไม่มีผลต่อปริมาณฟลาโวนอยด์รวมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) แสดงว่าเมื่ออุณหภูมิการบ่มสูงขึ้นส่งผลให้ปริมาณฟลาโวนอยด์สูงขึ้นด้วย โดยพิจารณาค่าสัมประสิทธิ์ (coefficient) พบว่าการเพิ่มอุณหภูมิในการบ่มมีผลต่อปริมาณฟลาโวนอยด์โดยมีค่าสัมประสิทธิ์เท่ากับ 0.904 (X_2) และ 0.538 (X_2^2) ตามลำดับ

ตารางที่ 4.3 ค่าสัมประสิทธิ์การถดถอย (Regression coefficients), และค่า R^2 ของปริมาณฟลาโวนอยด์รวมที่สัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของละลายเอทานอลและอุณหภูมิการบ่มต่อการเปลี่ยนแปลงคุณภาพในเปลือกส้มโอพันธุ์ขาวน้ำผึ้ง

Coefficient	Total Flavonoids Content
X_0	5.599*
X_1	-0.230
X_2	0.904*
X_1^2	0.314
X_2^2	0.538*
$X_1 X_2$	0.354
R^2	0.338

X_0 = constant, X_1 = concentration, X_2 = temperature, X_1^2 = concentration^2, X_2^2 = temperature^2,
X_1X_2 = coefficient of interaction between concentration and temperature
* Significant at $p \leq 0.05$

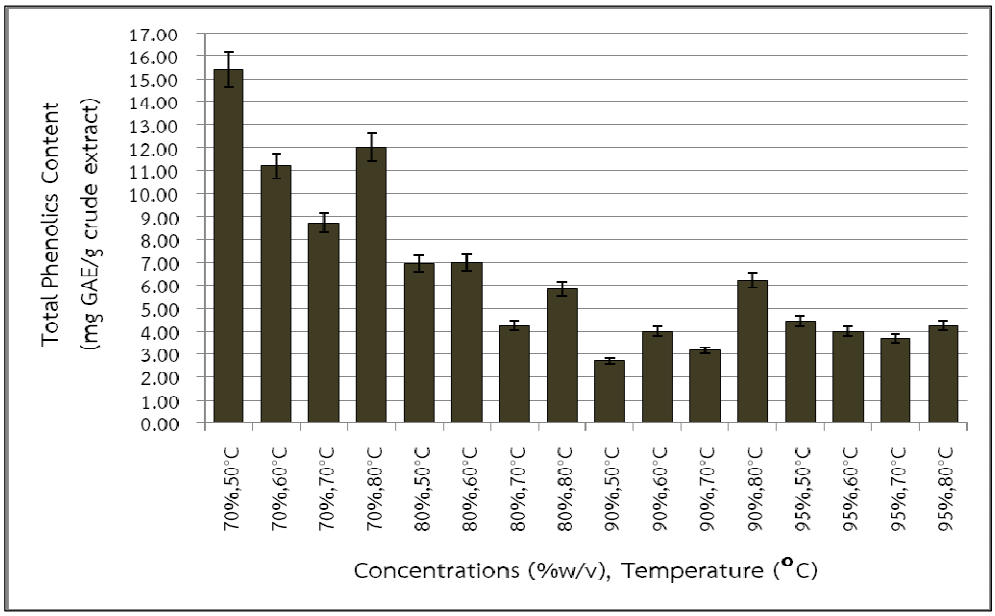
เมื่อนำสมการที่ได้มาสร้างกราฟพื้นที่ผิวตอบสนองสามมิติ (Response surface) แสดงให้เห็นถึงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายเอทานอลและอุณหภูมิในการบ่มเปลือกส้มโอต่อปริมาณฟลาโวนอยด์รวมผลการทดลองแสดงดังภาพที่ 4.6 พบว่าเมื่ออุณหภูมิการบ่มเพิ่มขึ้นมีผลทำให้ปริมาณฟลาโวนอยด์ลดลง ส่วนเทอมกำลังสองของอุณหภูมิแสดงในเชิงบวกแสดงว่าปริมาณฟลาโวนอยด์จะค่อย ๆ เพิ่มสูงขึ้นเมื่ออุณหภูมิเพิ่มสูงขึ้น จากภาพที่ 4.6 สามารถอธิบายได้ว่าปริมาณฟลาโวนอยด์เพิ่มสูงสุดที่ความเข้มข้น 70% อุณหภูมิ 50 ℃ ซึ่งส่วนใหญ่องค์ประกอบของฟลาโวนอยด์เป็นองค์ประกอบโพลิฟีนอลขนาดใหญ่เมื่อโดนความร้อนจะทำให้ผนังเซลล์ของพืชถูกทำลายจึงทำให้ปริมาณฟลาโวนอยด์ลดลง (Liu et al., 2012) แต่เมื่ออุณหภูมิเริ่มสูงขึ้นเรื่อย ๆ จะทำให้องค์ประกอบของฟลาโวนอยด์ที่ยึดติดกันด้วยพันธะ esterified และพันธะ glycosylated จะถูกตัดออกทำให้เกิดเป็นโมเลกุลอิสระส่งผลให้ปริมาณฟลาโวนอยด์ค่อย ๆ เพิ่มขึ้นเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้น (Xu et al., 2007)



ภาพที่ 4.6 พื้นที่ผิวตอบสนอง (RSM) และกราฟ Contour plot ที่สัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายเอทานอลและอุณหภูมิในการบ่มต่อค่าปริมาณฟลาโวนอยด์รวม

4.1.3 การวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกรวมของสารสกัดเปลือกส้มโอพันธุ์ขาวน้ำผึ้งที่ระดับความเข้มข้นของสารละลายเอทานอลและอุณหภูมิในการบ่มแตกต่างกัน

สารประกอบฟีนอลิกเป็นกลุ่มของสารที่มีหมู่ฟีนอล ซึ่งเป็นวงแหวนเบนซินมีหมู่ไฮดรอกซี (OH) มาเกาะอย่างน้อยหนึ่งหมู่พบทั่วไปในพืชมีประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระ (Radenkovs et al., 2014) การวิเคราะห์ปริมาณสารฟีนอลิกรวมจากเปลือกส้มโอที่ระดับความเข้มข้นของสารละลายเอทานอลและอุณหภูมิในการบ่มแตกต่างกันผลที่ได้แสดงดังตารางที่ 4.1 พบว่า ความเข้มข้นของสารละลายเอทานอลและอุณหภูมิในการบ่มที่แตกต่างกันส่งผลโดยตรงกับปริมาณฟีนอลิกรวม โดยปริมาณฟีนอลิกที่เพิ่มขึ้นจะอยู่ในช่วงความเข้มข้น 70% (w/v) อุณหภูมิการบ่ม 50 ℃ จากนั้นค่อย ๆ ลดลงเมื่อเข้าสู่ความเข้มข้น 70% (w/v) อุณหภูมิการบ่ม 60 ℃ จนถึงความเข้มข้น 90% (w/v) อุณหภูมิการบ่ม 70 ℃ และค่อย ๆ เพิ่มขึ้นที่ความเข้มข้น 90% (w/v) อุณหภูมิการบ่ม 80 ℃ จนถึงความเข้มข้น 95% (w/v) อุณหภูมิการบ่ม 80 ℃ ซึ่งมีปริมาณฟีนอลิกรวมอยู่ระหว่าง 3.15 – 12.01 mg GAE/g crude extract ตามลำดับ เมื่อนำทั้ง 2 สภาวะมาเปรียบเทียบกับปริมาณฟีนอลิกจะเห็นได้ว่าปริมาณฟีนอลิกจะลดลงเมื่อความเข้มข้นของสารละลายเอทานอลและอุณหภูมิการบ่มเพิ่มขึ้น และปริมาณฟีนอลิกค่อย ๆ เพิ่มขึ้นเมื่อความเข้มข้นของสารละลายเอทานอลและอุณหภูมิการบ่มเพิ่มขึ้นเช่นกัน ดังจากภาพที่ 4.7 แสดงว่าความเข้มข้นของสารละลายเอทานอลและอุณหภูมิการบ่มมีผลต่อปริมาณฟีนอลิกอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)



ภาพที่ 4.7 ปริมาณฟีนอลิกรวมที่ระดับความเข้มข้นของสารละลายเอทานอลและอุณหภูมิในการบ่มต่าง ๆ ในเปลือกส้มโอพันธุ์ขาวน้ำผึ้ง

เมื่อวิเคราะห์การถดถอย (Regression coefficient) เพื่อทำนายปัจจัยด้านความเข้มข้นของสารละลายเอทานอลและอุณหภูมิในการบ่มต่อปริมาณฟีนอลิกที่เกิดขึ้นจากการทำปฏิกิริยาแสดงค่าสัมประสิทธิ์ของสมการ (coefficient) และค่า R^2 ดังตารางที่ 4.4 นอกจากนี้สามารถทำนายปริมาณฟีนอลิกเมื่อแปรความเข้มข้นของสารละลายเอทานอล (X_1) และอุณหภูมิ (X_2) โดยเฉพาะเทอมที่มีนัยสำคัญมาสร้างเป็นสมการได้ ดังสมการที่ (4)

$$\text{Total Phenolics Content} = 3.019 - 0.792X_1 + 0.746X_2 + 1.476X_1^2 + 0.737X_2^2 + 0.511X_1X_2 \quad (4)$$

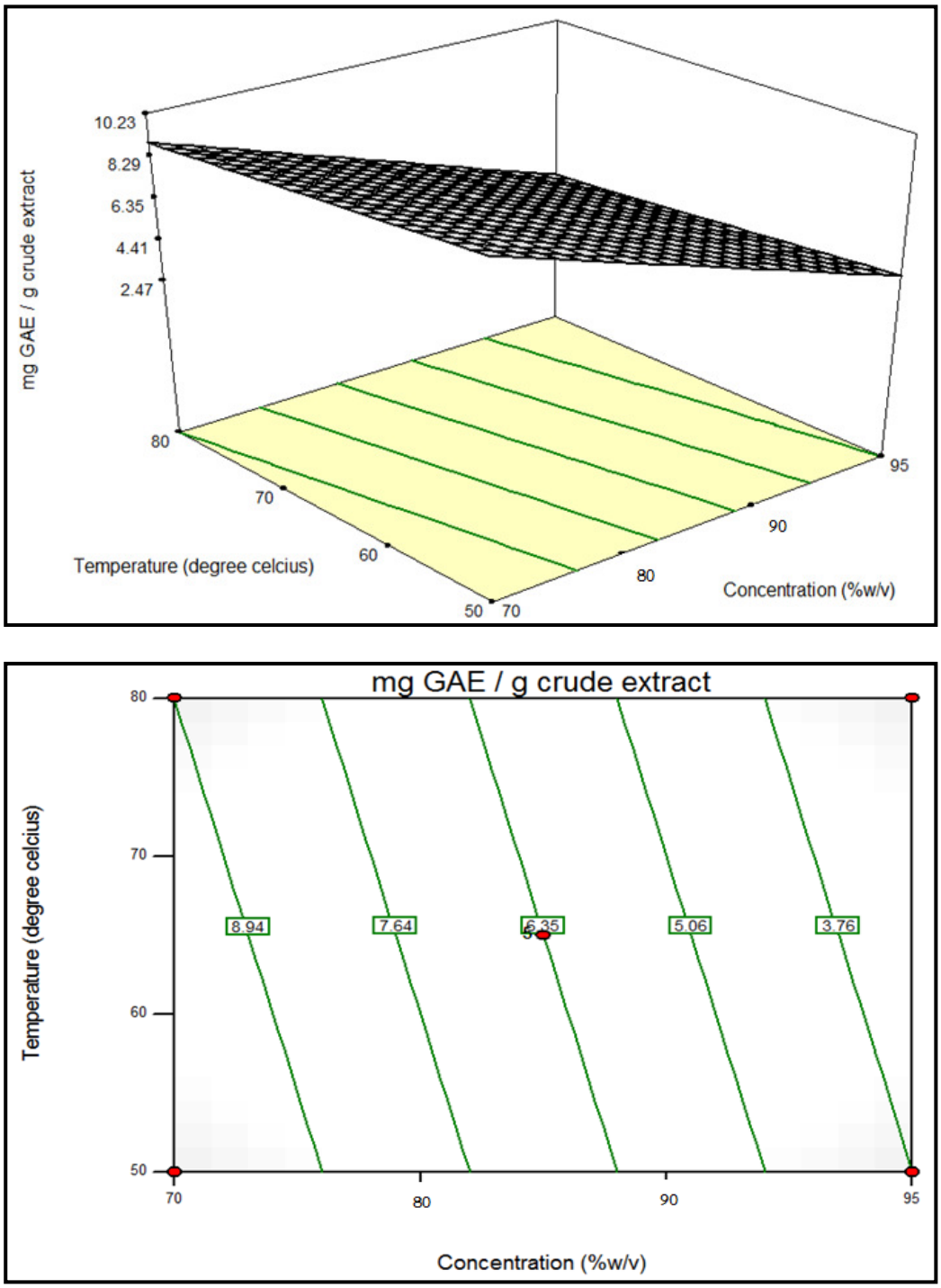
โดยมีค่าปฏิสัมพันธ์การตัดสินใจ (Coefficient of determination) หรือค่า R^2 เท่ากับ 0.895 เมื่อพิจารณาค่าความต่างจึงพบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) แสดงว่าแบบจำลองที่สร้างขึ้นมีความเหมาะสมกับข้อมูลสมการที่ได้ สามารถนำไปใช้ทำนายค่าฟีนอลิกในสภาวะที่ไม่ได้ทำการทดลองได้ จากสมการที่ (4) พบว่าความสัมพันธ์ของความเข้มข้นของสารละลายเอทานอลและอุณหภูมิในการบ่มทั้งในเทอมเชิงเส้น (linear) เทอมกำลังสอง (quadratic) และปฏิสัมพันธ์ (interaction) ในเทอมเชิงเส้นของความเข้มข้นของสารละลายเอทานอลและอุณหภูมิในการบ่มมีความสัมพันธ์เชิงลบและเชิงบวกแสดงว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารละลายเอทานอลคู่กับการเพิ่มอุณหภูมิในการบ่มจะทำให้ปริมาณฟีนอลิกมีค่าที่ลดลงถึงจุด ๆ หนึ่ง และค่อย ๆ เพิ่มขึ้น ในส่วนของเทอมกำลังสองพบว่า ผลของความเข้มข้นของสารละลายเอทานอลและอุณหภูมิในการบ่มมีความสัมพันธ์เชิงบวก แสดงว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารละลายเอทานอลและอุณหภูมิในการบ่มจะทำให้ปริมาณฟีนอลิกลดลงและค่อย ๆ เพิ่มสูงขึ้น อธิบายได้ว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารละลายจาก 70% (w/v) ไปจนถึง 90% (w/v) ปริมาณฟีนอลิกสูงขึ้นและเริ่มลดลงแต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารละลายเอทานอลจาก 90% (w/v) ไปจนถึง 95% (w/v) ปริมาณฟีนอลิกเริ่มสูงขึ้นแต่สูงขึ้นเพียงเล็กน้อย ส่วนอุณหภูมิในการบ่มสามารถอธิบายได้ว่าปริมาณฟีนอลิกมีค่าสูงที่อุณหภูมิ 50 ℃ แต่เมื่ออุณหภูมิอยู่ระหว่าง 50 ℃ - 60 ℃ ปริมาณฟีนอลิกเริ่มลดลงและจะเริ่มสูงขึ้นเมื่ออุณหภูมิอยู่ระหว่าง 70 ℃ - 80 ℃ นอกจากนี้ความเข้มข้นของสารละลายเอทานอลและอุณหภูมิในการบ่มมีปฏิสัมพันธ์กันในเชิงบวก แสดงว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารละลายเอทานอลและเพิ่มอุณหภูมิในการบ่มส่งผลให้ปริมาณฟีนอลิกลดลงถึงจุด ๆ หนึ่งและค่อย ๆ เพิ่มขึ้น เมื่อพิจารณาค่าสัมประสิทธิ์ (coefficient) พบว่าการเพิ่มความเข้มข้นของสารละลายเอทานอลและอุณหภูมิในการบ่มมีผลต่อปริมาณฟีนอลิกโดยมีค่าสัมประสิทธิ์เท่ากับ -0.792 (X_1), 0.746 (X_2), 1.476 (X_1^2), 0.737 (X_2^2) และ 0.511 (X_1X_2)

ตารางที่ 4.4 ค่าสัมประสิทธิ์การถดถอย (Regression coefficients), และค่า R^2 ของปริมาณฟีนอลิกที่สัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายเอทานอลและอุณหภูมิการบ่มต่อการเปลี่ยนแปลงคุณภาพในเปลือกส้มโอพันธุ์ขาวน้ำผึ้ง

Coefficient	Total Phenolics Content
X_0	3.019*
X_1	-0.792*
X_2	0.746*
X_1^2	1.476*
X_2^2	0.737*
$X_1 X_2$	0.511*
R^2	0.895

X_0 = constant, X_1 = concentration, X_2 = temperature, X_1^2 = concentration^2, X_2^2 = temperature^2,
X_1X_2 = coefficient of interaction between concentration and temperature
* Significant at $p \leq 0.05$

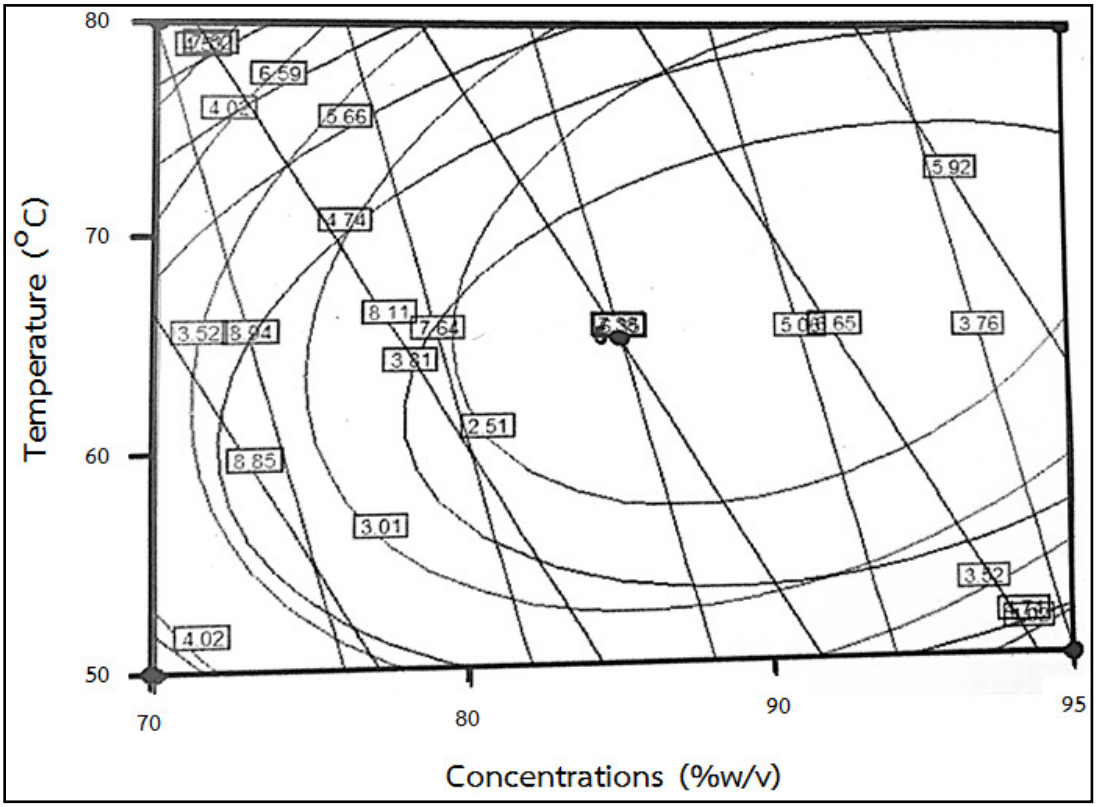
เมื่อนำสมการที่ได้มาสร้างกราฟพื้นที่ผิวตอบสนองสามมิติ (Response surface) แสดงให้เห็นถึงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายเอทานอลและอุณหภูมิในการบ่มเปลือกส้มโอต่อปริมาณฟีนอลิกได้ผลการทดลองแสดงดังภาพที่ 4.8 พบว่าเมื่อความเข้มข้นของสารละลายเอทานอลและอุณหภูมิในการบ่มเพิ่มขึ้นมีผลทำให้ปริมาณฟีนอลิกลดลงและค่อย ๆ เพิ่มสูงขึ้น ส่วนเทอมกำลังสองของทั้งความเข้มข้นของสารละลายเอทานอลและอุณหภูมิในการบ่มดังตารางที่ 4.4 แสดงในเชิงบวกแสดงว่าปริมาณฟีนอลิกจะค่อย ๆ เพิ่มสูงขึ้นเมื่อความเข้มข้นของสารละลายเอทานอลและอุณหภูมิในการบ่มเพิ่มขึ้นจากภาพที่ 4.8 สามารถอธิบายได้ว่าปริมาณฟีนอลิกเพิ่มสูงสุดที่ความเข้มข้น 70% อุณหภูมิ 60 ℃ จากผลการทดลองนี้ได้ใช้วิธีวิเคราะห์แบบ Folin-Ciocalteaucolorimetry ซึ่งวิธีการนี้สาร Folin ที่ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกอาจเป็นตัวการที่รบกวนองค์ประกอบของฟีนอลิกที่มีอยู่ในเปลือกส้มโอทำให้ปริมาณฟีนอลิกมีค่าที่สูงขึ้น เนื่องจากในตัวอย่างเปลือกส้มโอประกอบด้วยวงแหวนเบนซินซึ่งหมู่ไฮดรอกซี (OH) และวงแหวนหมู่เอมีนทำให้สาร Folin ทำปฏิกิริยากับองค์ประกอบเหล่านั้นจึงส่งผลต่อปริมาณฟีนอลิก (Prior et al., 2005) นอกจากนี้ความเข้มข้นของสารละลายเอทานอลมีผลต่อปริมาณฟีนอลิกรวม พบว่าความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารละลายเอทานอลอยู่ในช่วง 72% - 85% โดยปริมาตร (ชมัยพร รอดกลิ่น และคณะ, 2560) ทำให้ช่วงความเข้มข้นดังกล่าวมีปริมาณสูงขึ้นเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารละลายเอทานอลปริมาณฟีนอลิกจึงลดลงและค่อย ๆ เพิ่มสูงขึ้น เช่นเดียวกับการเพิ่มขึ้นของอุณหภูมิการบ่มเนื่องจากความร้อนจะทำให้เกิดการสลายตัวของโมเลกุลอิสระที่อยู่ในองค์ประกอบของพอลีฟีนอลทำให้พันธะเอสเทอร์และพันธะไกลโคไซต์ถูกตัดออกจนเกิดเป็นส่วนของโมเลกุลอิสระ ส่งผลให้ปริมาณฟีนอลิกสูงขึ้น (Xu et al., 2007) แสดงให้เห็นว่าความเข้มข้นของสารละลายเอทานอลและอุณหภูมิในการบ่มมีผลต่อปริมาณฟีนอลิกอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)



ภาพที่ 4.8 พื้นที่ผิวตอบสนอง (RSM) และกราฟ Contour plot ที่สัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายเอทานอลและอุณหภูมิในการบ่มต่อค่าปริมาณฟีนอลิกรวม

4.2 การเปรียบเทียบองค์ประกอบของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพเพื่อหาภาวะที่เหมาะสมของตัวอย่างเปลือกส้มโอพันธุ์ขาวน้ำผึ้งที่ระดับความเข้มข้นของสารละลายเอทานอลและอุณหภูมิในการบ่มแตกต่างกัน

การหาภาวะที่เหมาะสมของความเข้มข้นของสารละลายเอทานอลและอุณหภูมิในการบ่มได้จากการซ้อนทับกราฟ contour plots ของโปรแกรมการตอบสนองต่อพื้นผิวสัมผัส (RSM) ดังแสดงในภาพที่ 4.9 เพื่อหาภาวะที่เหมาะสมในสภาวะความเข้มข้นของสารละลายเอทานอลและอุณหภูมิการบ่มตัวอย่างเปลือกส้มโอเป็นการวัดโดยใช้ค่าการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน ปริมาณฟลาโวนอยด์รวม และปริมาณฟีนอลิกรวม จากการทดลองนี้ได้ศึกษาภาวะที่เหมาะสมของความเข้มข้นของสารละลายเอทานอลและอุณหภูมิในการบ่มของเปลือกส้มโอโดยพิจารณาจากระดับความเข้มข้นของสารละลายเอทานอลเนื่องจากตัวอย่างเปลือกส้มโอที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอลที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ส่งผลต่อปริมาณสารสำคัญเนื่องจากองค์ประกอบส่วนใหญ่เป็นสารประกอบกลุ่มฟีนอลมีโครงสร้างหลักประกอบด้วยวงแอโรแมติกแทนที่ด้วยหมู่ไฮดรอกซี ส่วนมากเป็นสารที่มีขั้วจึงทำให้ละลายได้ดีในตัวทำละลายที่มีขั้วเช่นกัน ส่งผลให้สารสำคัญที่อยู่ในเปลือกส้มโอถูกปลดปล่อยออกมา (Pietta, 2000) นอกจากนี้อุณหภูมิการบ่มยังส่งผลต่อค่า EC_{50} FRAP value ฟลาโวนอยด์รวม และฟีนอลิกรวม เมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นจะเกิดการสลายตัวของโมเลกุลอิสระที่อยู่ในองค์ประกอบของพอลีฟีนอลทำให้พันธะเอสเทอร์และพันธะไกลโคไซต์ถูกปลอดปล่อยออกมาจนเกิดเป็นส่วนของโมเลกุลอิสระ ส่งผลให้ปริมาณสารสำคัญมีปริมาณที่สูงขึ้นและให้ประสิทธิภาพการต้านออกซิเดชันที่ดี (ชมัยพร รอดกลิ่น และคณะ, 2017; Xu et al., 2007) ดังนั้น การหาสภาวะที่เหมาะสมความเข้มข้นของสารละลายเอทานอลและอุณหภูมิในการบ่มตัวอย่างเปลือกส้มโออยู่ในช่วงความเข้มข้น 90% (w/v) อุณหภูมิการบ่ม 80 °C ซึ่งช่วงเข้มข้นของสารละลายเอทานอลและอุณหภูมิในการบ่มดังกล่าวให้ปริมาณสารสำคัญที่สูงรวมทั้งพิจารณาควบคู่กับค่าการวิเคราะห์สมบัติการต้านออกซิเดชัน ปริมาณฟลาโวนอยด์รวม ปริมาณฟีนอลิกรวม ทั้งนี้การหาภาวะที่เหมาะสมของความเข้มข้นของสารละลายเอทานอลและอุณหภูมิในการบ่มนั้นเป็นการนำมาใช้ในการวิเคราะห์ ในขั้นตอนถัดไป



ภาพที่ 4.9 ภาพซ้อนทับกราฟ Contour plots ของสมบัติการต้านออกซิเดชัน ปริมาณฟลาโวนอยด์รวม ปริมาณฟีนอลิกรวมของตัวอย่างเปลือกส้มโอพันธุ์ขาวน้ำผึ้ง

4.3 องค์ประกอบสารระเหยของสารสกัดเปลือกส้มโอที่สภาวะเหมาะสมที่ความเข้มข้นของสารละลายเอทานอล 90% (w/v) อุณหภูมิการบ่ม 80 °C

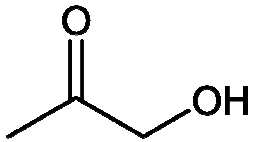
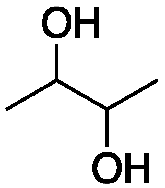
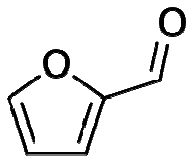
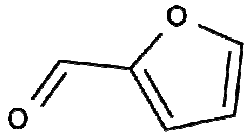
องค์ประกอบของสารระเหยจากสารสกัดจากเปลือกส้มโอที่ความเข้มข้นของสารละลายเอทานอล 90% (w/v) อุณหภูมิการบ่ม 80 ℃ มีองค์ประกอบสารระเหย 35 ชนิด สามารถวิเคราะห์ด้วยวิธี GC-MS Profile ซึ่งสรุปดังตารางที่ 4.5 จากการวิเคราะห์พบว่า D-Limonene, Benzoic acid, Geranyl acetate, Trans-Cinnamic acid, Germacrene D, NOOTKATONE, 7-Hydroxycoumarin, n-Hexadecanoic acid, Scopoletin, Isoauraptene, Auraptenol, Auraptene และ Lup-20(29)-en-3-one แสดงดังภาพที่ 4.10 เป็นสารอยู่ในกลุ่ม Hydrocarbon, Acid, Heterocyclic, Caboxylic acid, Monoterpene, Hydroxyl, Isopropyl, Isomonoterpene, Polycyclic และ Carbonyl มีโครงสร้างเป็น Aromatic ring สามารถพบได้ในเปลือกส้มโอ โดย D-Limonene เป็นองค์ประกอบสารระเหยที่สำคัญสามารถพบในเปลือกส้มโอได้ในปริมาณที่มาก คือมีคุณภาพของ peak อยู่ที่ 99% ขององค์ประกอบสารระเหยทั้งหมด และยังพบส่วนองค์ประกอบที่สำคัญอื่น ๆ ได้แก่ Benzoic acid, Geranyl acetate, Trans-Cinnamic acid, Germacrene D, NOOTKATONE, 7-Hydroxycoumarin, n-Hexadecanoic acid, Scopoletin, Isoauraptene, Auraptenol, Auraptene และ Lup-20(29)-en-3-one ดังเช่นงานวิจัยก่อนหน้าที่ได้ทำการศึกษาองค์ประกอบของสารระเหย

ในเปลือกส้มโอ 2 สายพันธุ์ คือ สายพันธุ์ส้มโอขาว และสายพันธุ์ส้มโอชมพู ด้วยวิธี HS-SPME/GC-MS พบว่าองค์ประกอบสารระเหยในเปลือกส้มโอที่สำคัญ ได้แก่ Limonene, Cis-β-ocimene, α-Terpinene, Linalool, Methyl anthranilate และ Indole ซึ่งองค์ประกอบเหล่านี้เป็นองค์ประกอบของเทอร์ปีนไฮโดรคาร์บอนมีอยู่ประมาณ 98% ของสารระเหยทั้งหมดตรวจพบซึ่งเป็นถือว่าเป็นองค์ประกอบสารระเหยหลัก ๆ ที่พบมากในเปลือกส้มโอ (Cheong, 2013)

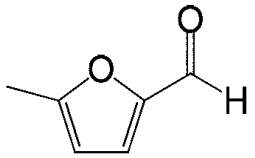
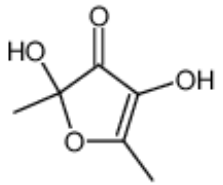
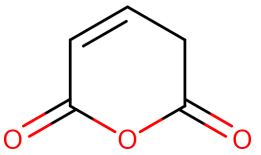
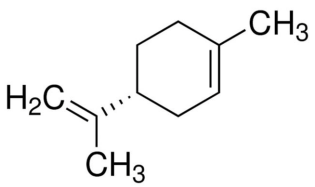
สำหรับงานวิจัยนี้เปลือกส้มโอที่ผ่านการสกัดด้วยทำละลายเอทานอลความเข้มข้น 90% (w/v) อุณหภูมิการบ่ม 80 ℃ ซึ่งสารละลายเอทานอลเป็นสารประกอบอินทรีย์ที่มีองค์ประกอบของพันธะไอโดรเจนและออกซิเจนมีโครงสร้างที่ประกอบด้วยวงแอโรแมติกและถูกแทนที่ด้วยหมู่ไฮดรอกซีส่วนมากเป็นสารที่มีขั้วและไม่มีขั้วจึงทำให้สารละลายเอทานอลสามารถละลายได้ดีในตัวทำละลายที่มีขั้วและไม่มีขั้ว ส่งผลให้สารสำคัญที่อยู่ในเปลือกส้มโอถูกปลดปล่อยออกมาแสดงให้เห็นว่าองค์ประกอบของสารระเหยส่วนใหญ่เป็นหมู่ไฮดรอกซีโดยอยู่ในรูปสารประกอบเทอร์ปีนมีปริมาณ 75% ขึ้นไปบ่งบอกถึงความสามารถเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่ดี นอกจากนี้อุณหภูมิการบ่มส่งผลต่อองค์ประกอบสารระเหยในสารสกัดเปลือกส้มโอโดยความร้อนจะทำให้เกิดการสลายตัวของโมเลกุลอิสระที่อยู่ในองค์ประกอบของโพลีฟีนอลทำให้พันธะเอสเทอร์และพันธะไกลโคไซต์ถูกตัดออกจนเกิดเป็นส่วนของโมเลกุลอิสระ (Xu et al., 2007) มีคุณภาพของพีกที่อยู่ในสารสกัดเปลือกส้มโอถึง 95-99% ขององค์ประกอบสารระเหยทั้งหมด เป็นองค์ประกอบของน้ำมันหอมระเหยที่ให้กลิ่นคล้ายส้ม มีรสขม และมีองค์ประกอบทางเคมีที่คล้ายกันทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิดของพืชตระกูลส้มอาจมีองค์ประกอบเฉพาะที่มีปริมาณน้อย (Manaila et al., 2016) จะเห็นได้ว่าองค์ประกอบสารระเหยดังกล่าวส่วนใหญ่เป็น Monoterpene Hydrocarbon จึงให้ค่าปริมาณเทอร์ปีนที่สูง เนื่องจากเทอร์ปีนประกอบด้วย Isoterpene 2 หน่วยจัดเรียงกันเป็นเส้นตรงหรือเป็นวงแหวน หรือเกิดการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบทางชีวเคมี เช่น การเกิดออกซิเดชันทำให้องค์ประกอบเกิดการเรียงตัวของโมเลกุลใหม่ ซึ่งงานวิจัยของ Darjaz (2013) ได้เปรียบเทียบองค์ประกอบสารระเหยที่สำคัญในเปลือกส้มและเปลือกส้มโอด้วยวิธี GC-MS พบว่าองค์ประกอบของสารระเหยในเปลือกส้ม 52 องค์ประกอบ และเปลือกส้มโอ 47 องค์ประกอบ ประกอบด้วยกลุ่ม Aldehydes, Alcohols, Esters, Ketones, Monoterpenes และ Sesquiterpenes ซึ่งมีองค์ประกอบสารระเหยที่สำคัญที่พบได้แก่ Limonene, γ-Terpinene, β-Myrcene, (E)-β-Ocimene, α-Pinene, β-Pinene, Neral และ Geranial แสดงให้เห็นถึงคุณภาพที่สูงสามารถนำไปใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร เครื่องสำอาง ผลิตภัณฑ์ที่ถูกสุขลักษณะ และผลิตภัณฑ์อื่น ๆ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Manalila et al. (2016) ได้เปรียบเทียบองค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันหอมระเหยในเปลือกส้ม 5 ชนิด ได้แก่ เปลือกส้มเปลือกเลมอน เปลือกเร้ดเกรฟฟรุ๊ต ไวท์เกรฟฟรุ๊ต และเปลือกส้มโอ สกัดด้วยวิธีการกลั่นและวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีโดยวิธี GC-MS พบว่า Limonene เป็นองค์ประกอบที่สำคัญในเปลือกส้มทั้ง 5 ชนิด โดยพบในเปลือกส้มโอถึง 82% นอกจากนี้ยังพบองค์ประกอบอื่นของ Terpenes ได้แก่ α-Pinene, β-Pinene, α-Terpinene, 1-Terpinen-4-ol, Terpinolen, o-Cymol, 3-Carene; 2-carene และ α-Terpineol ซึ่งพบปริมาณมากในเปลือกส้มโอ แสดงให้เห็นว่าเปลือกส้มโอมีองค์ของสารระเหยที่สำคัญอยู่มากมาย ทั้งนี้ปริมาณความเข้มข้นของตัวทำละลาย และอุณหภูมิความร้อนอาจมีผลต่อองค์ประกอบของสารระเหย ดังเช่นงานวิจัยของ Chen et al. (2016) ได้ศึกษาการสกัดน้ำมันหอมระเหยจากเปลือกส้มโอด้วยวิธีการสกัดโดยไมโครเวฟ 2 ขั้นตอน และวิเคราะห์หาองค์ประกอบของน้ำมันหอม

ระเหยด้วยวิธี GC-MS พบว่าในเปลือกส้มโอมีองค์ประกอบหลักของ Limonene, β-Pinene, Linalool, α-Terpineol, Nerolidol และองค์ประกอบของเอสเทอร์ซึ่งพบองค์ประกอบของ limonene อยู่ 82.6% ด้วยวิธีการกลั่น และ 78.1-86.5 % ด้วยวิธีการสกัดด้วยไมโครเวฟปราศจากตัวทำละลาย ตามลำดับ เช่นเดียวกับงานวิจัยของ Liu et al. (2017) ได้ศึกษาการให้ความร้อนด้วยไมโครเวฟโดยศึกษาองค์ประกอบของสารระเหยในการสกัดน้ำมันหอมระเหยจากเปลือกส้มโอพบองค์ประกอบของ β-Myrcene, D-Limonene, Aromadendrene, Trans-farnesol และ Nootkatone เป็นองค์ประกอบที่สำคัญในน้ำมันหอมระเหยของเปลือกส้มโอ ดังนั้นความเข้มข้นของตัวทำละลายและอุณหภูมิความร้อนมีผลต่อองค์ประกอบของสารระเหยแสดงให้เห็นว่าความเข้มข้นของสารละลายเอทานอลและอุณหภูมิการบ่มนั้นส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างทำให้เกิดเป็นองค์ประกอบสารระเหยที่สามารถนำไปใช้ในอุตสาหกรรมเครื่องสำอางได้

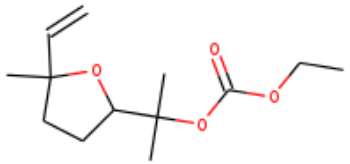
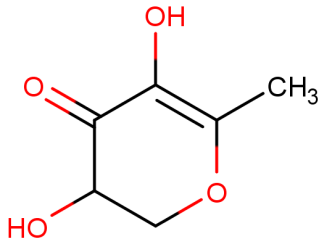
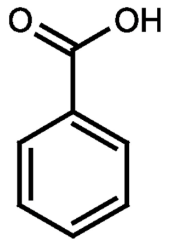
ตารางที่ 4.5 องค์ประกอบสารระเหยของสารสกัดเปลือกส้มโอที่สภาวะเหมาะสมที่ความเข้มข้น 90% (w/v) อุณหภูมิการบ่ม 80 ℃

RTs (minutes)	KIs*	Cas Number	Groups	Compound names**	Molecular Formula	Chemical Structure	% Area	Quality***
5.39	662	116-09-6	Amine	1-Hydroxy-2-propanone	$C_3H_6O_2$		0.19	80
7.56	782	513-85-9	Hydroxyl	2,3-Butanediol	$C_4H_{10}O_2$		0.78	91
8.63	828	98-01-1	Aldehyde	Furfural	$C_5H_4O_2$		0.24	94
9.09	833	90-00-0	Aldehyde	2-Furan-carboxaldehyde	$C_5H_4O_2$		0.35	94

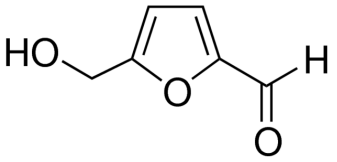
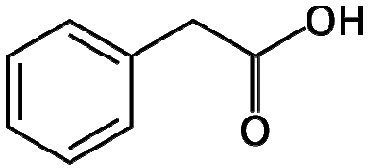
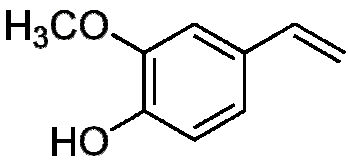
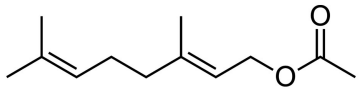
ตารางที่ 4.5 (ต่อ)

RTs (minutes)	KIs*	Cas Number	Groups	Compound names**	Molecular Formula	Chemical Structure	% Area	Quality***
11.64	966	620-02-0	Aldehyde	5-Methyl-2-furancarboxaldehyde	$C_6H_6O_2$		0.19	91
11.99	989	10230-62-3	Furan and Ketone	2,4-Dihydroxy-2,5-dimethyl-3(2H)-furan 3-one	$C_6H_8O_4$		0.43	91
12.34	1005	5926-95-4	Heterocyclic	2H-Pyran-2,6(3H)-dione	$C_5H_4O_3$		0.30	90
13.29	1030	5989-27-5	Hydrocarbon	D-Limonene	$C_{10}H_{16}$		0.48	99

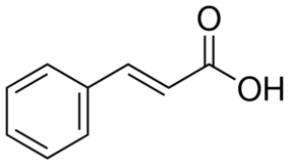
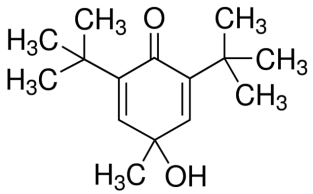
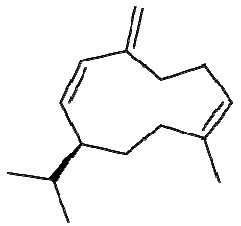
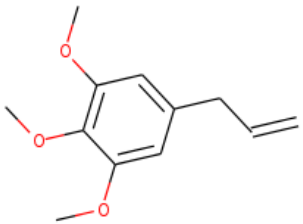
ตารางที่ 4.5 (ต่อ)

RTs (minutes)	KIs*	Cas Number	Groups	Compound names**	Molecular Formula	Chemical Structure	% Area	Quality***
14.52	1090	2000340-67-1	Aldehyde	Ethyl2-(5-methyl-5-vinyltetrahydrofuran-2-yl)propan-2-yl carbonate	$C_{13}H_{22}O_4$		0.95	91
16.82	1162	28564-83-2	Heteromono cyclic	2,3-dihydro-3,5-dihydroxy-6-methyl-4H-pyran-4-one	$C_6H_8O_4$		3.19	97
17.23	1163	65-85-0	Acid	Benzoic acid	$C_7H_6O_2$		2.07	96

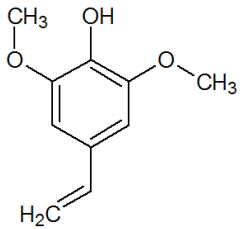
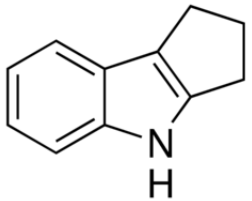
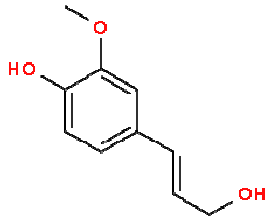
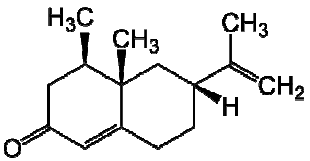
ตารางที่ 4.5 (ต่อ)

RTs (minutes)	KIs*	Cas Number	Groups	Compound names**	Molecular Formula	Chemical Structure	% Area	Quality***
19.12	1230	67-47-0	Aldehyde, Alcohol	5-Hydroxymethyl furfural	$C_6H_6O_3$		4.15	95
19.52	1246	103-82-2	Acid	Benzeneacetic acid	$C_8H_8O_2$		0.53	93
21.33	1322	7786-61-0	Hydroxy	2-Methoxy-4-vinylphenol	$C_9H_{10}O_2$		0.66	95
22.58	1396	105-87-3	Monoterpene	Geranyl acetate	$C_{12}H_{20}O_2$		0.34	90

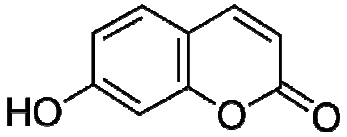
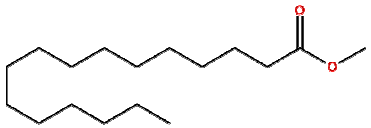
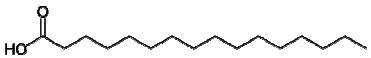
ตารางที่ 4.5 (ต่อ)

RTs (minutes)	KIs*	Cas Number	Groups	Compound names**	Molecular Formula	Chemical Structure	% Area	Quality***
23.34	1454	140-10-3	Acid	Trans-Cinnamic acid	$C_9H_8O_2$		0.61	97
24.24	1478	10396-80-2	Heterocyclic	2,6-Di(t-butyl)-4-hydroxy-4-methyl-2,5-cyclohexadien-1-one	$C_{15}H_{24}O_2$		1.12	92
24.65	1531	23986-74-5	Hydrocarbon	Germacrene D	$C_{15}H_{24}$		0.74	99
25.60	1566	487-11-6	Benzene	1,2,3-Trimethoxy-5-(2-propenyl)-benzene	$C_{12}H_{16}O_3$		1.69	98

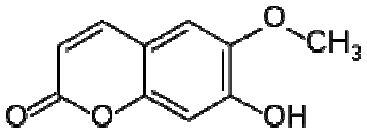
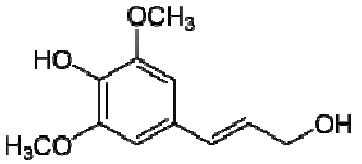
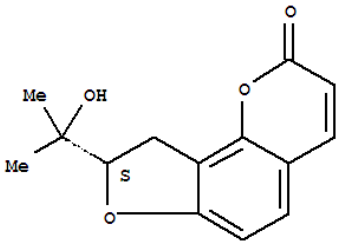
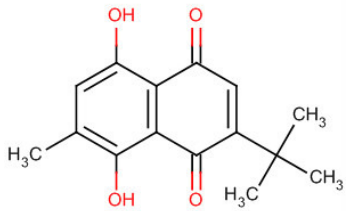
ตารางที่ 4.5 (ต่อ)

RTs (minutes)	KIs*	Cas Number	Groups	Compound names**	Molecular Formula	Chemical Structure	% Area	Quality***
25.86	1565	2000144-68-6	Hydroxyl	4-Vinylsyringol	$C_{10}H_{12}O_3$		3.81	90
26.89	1587	2047-91-8	Hydrocarbon	1,2,3,4-Tetrahydro-cyclopenta[b]indole	$C_{11}H_{11}N$		0.43	90
29.50	1689	32811-40-8	Hydroxyl	4-((1E)-3-Hydroxy-1-propenyl)-2-methoxyphenol	$C_{10}H_{12}O_3$		0.61	96
31.26	1794	4674-50-4	Isopropyl	NOOTKATONE	$C_{15}H_{22}O$		1.02	99

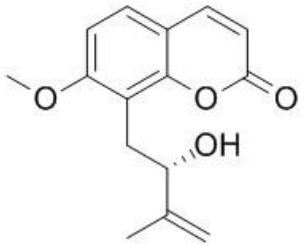
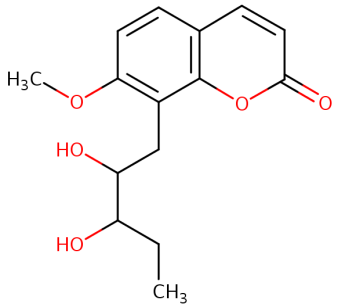
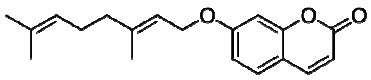
ตารางที่ 4.5 (ต่อ)

RTs (minutes)	KIs*	Cas Number	Groups	Compound names**	Molecular Formula	Chemical Structure	% Area	Quality***
31.71	1828	93-35-6	Carboxylic acid	7-Hydroxycoumarin	$C_9H_6O_3$		2.95	97
32.80	1927	112-39-0	Acid	Methylhexadecanoate	$C_{17}H_{34}O_2$		0.22	98
33.33	1960	57-10-3	Acid	n-Hexadecanoic acid	$C_{16}H_{32}O_2$		2.73	99

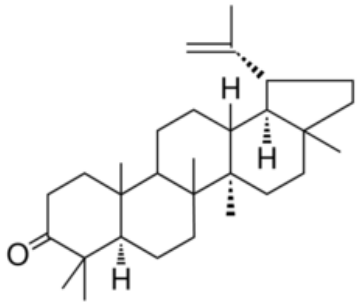
ตารางที่ 4.5 (ต่อ)

RTs (minutes)	KIs*	Cas Number	Groups	Compound names**	Molecular Formula	Chemical Structure	% Area	Quality***
33.80	1974	92-61-5	Hydroxyl	Scopoletin	$C_{10}H_8O_4$		0.88	98
34.08	2034	20675-96-1	Alcohol	Trans-Sinapyl alcohol	$C_{11}H_{14}O_4$		1.04	91
37.29	2081	2000351-65-7	Amide	2-(1-Hydroxy-1-methylethyl)-2,3-dihydrofuro[3,2-g]chromen-7-one	$C_{14}H_{14}O_4$		0.42	95
37.42	2248	1088-17-1	Isomono terpene	Isoauraptene	$C_{15}H_{16}O_4$		1.82	99

ตารางที่ 4.5 (ต่อ)

RTs (minutes)	KIs*	Cas Number	Groups	Compound names**	Molecular Formula	Chemical Structure	% Area	Quality***
37.99	2298	51559-35-4	Polycyclic	Auraptenol	$C_{15}H_{16}O_4$		1.12	91
39.82	2328	5673-37-0	Heterocyclic	8-(2,3-Dihydroxy-3-methylbutyl)-7-methoxy-2H-chromen-2-one	$C_{15}H_{18}O_5$		6.24	99
42.54	2634	495-02-3	Monoterpene	Auraptene	$C_{19}H_{22}O_3$		2.53	99

ตารางที่ 4.5 (ต่อ)

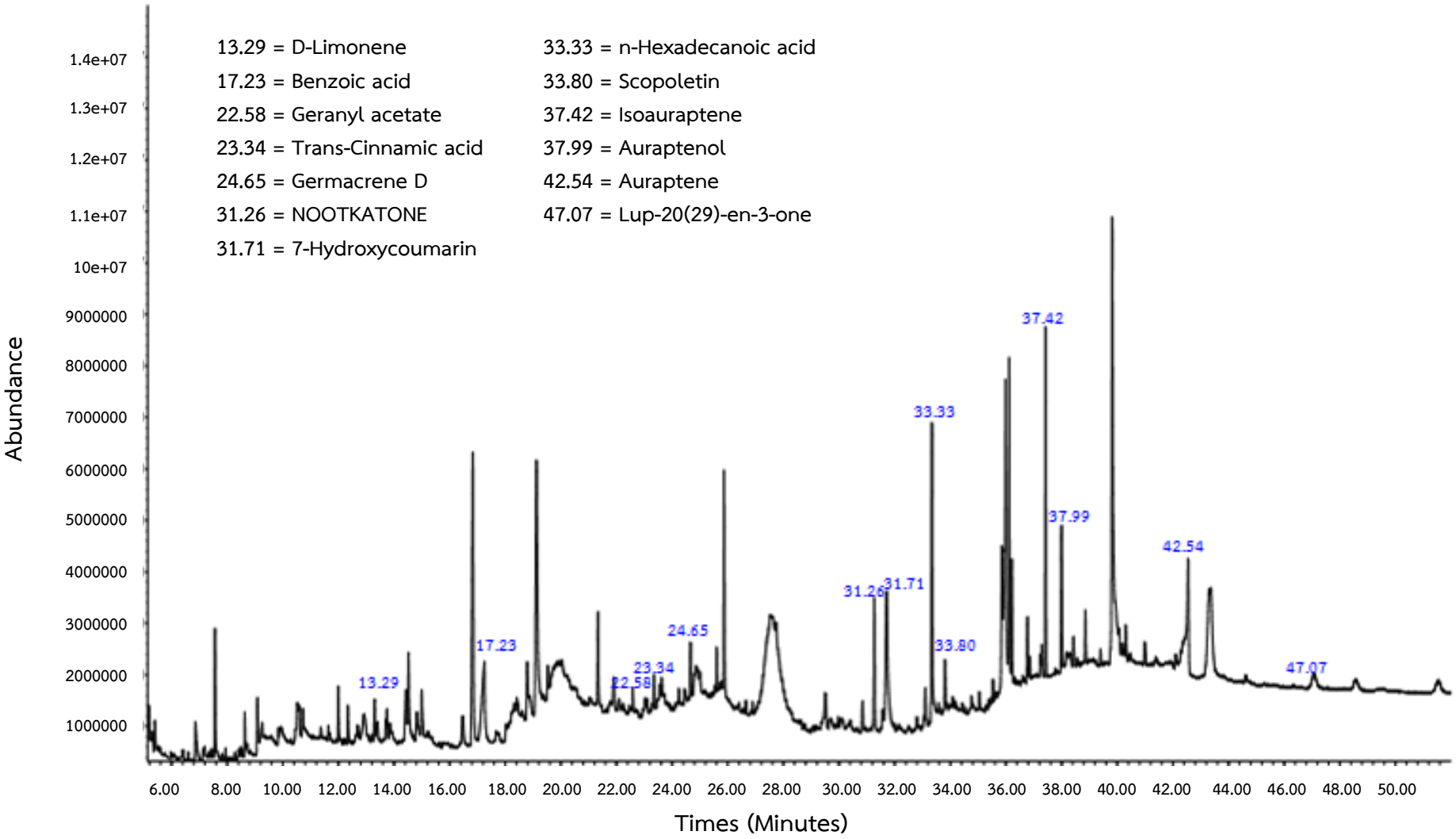
RTs (minutes)	KIs*	Cas Number	Groups	Compound names**	Molecular Formula	Chemical Structure	% Area	Quality***
47.07	2987	1617-70-5	Carbonyl	Lup-20(29)-en-3-one	$C_{30}H_{48}O$		0.50	99

RTs = Retention Times

* = Kovat retention Indices from NIST webbook chemistry (http://webbook.nist.gov)

** = Compound names from a qualitative comparison of peak to W10N14.L database

*** = Report peak quality from 75 to above



ภาพที่ 4.10 โครมาโทแกรมองค์ประกอบสารระเหยสำคัญของสารสกัดเปลือกส้มโอที่ความเข้มข้นของสารละลายเอทานอล 90% (w/v) และอุณหภูมิการบ่ม 80 ℃

บทที่ 5
สรุปผลการวิจัยอภิปรายผลและข้อเสนอแนะ

จากการศึกษาองค์ประกอบของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพด้วยการวิเคราะห์ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH assay และ FRAP assay พบว่าอุณหภูมิในการบ่มส่งผลต่อค่า EC_{50} เมื่ออุณหภูมิการบ่มมีค่าเพิ่มขึ้นและลดลง ส่วนความเข้มข้นของสารละลายเอทานอลไม่มีผลต่อค่า EC_{50} เช่นเดียวกับค่า FRAP value อุณหภูมิการบ่มส่งผลโดยตรงต่อค่า FRAP value โดยตรงเช่นกัน สามารถอธิบายได้ว่าค่า EC_{50} มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันได้สูงสุดที่ความเข้มข้น 90% อุณหภูมิ 80 ℃ โดยทั่วไปแล้วสมบัติการต้านอนุมูลอิสระจะมีความสัมพันธ์กับปริมาณฟีนอลิกรวมเนื่องมาจากปริมาณฟีนอลิกรวมที่สูงขึ้นเมื่ออุณหภูมิการบ่มเพิ่มขึ้นทำให้สมบัติการต้านอนุมูลอิสระมีค่าลดลง ซึ่งเกิดจากความร้อนทำให้พันธะโคเวนเลนต์ถูกทำลายส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงของเยื่อหุ้มเซลล์ของพืชทำให้เกิดโมเลกุลอิสระถูกปลดปล่อยสารต้านออกมา ซึ่งอาจเป็นสาเหตุให้ความสามารถของการต้านอนุมูลอิสระมีค่าลดลง (Liu et al., 2012) นอกจากนี้อุณหภูมิที่สูงขึ้นจะเพิ่มความสามารถในการละลายของตัวทำละลายและเพิ่มประสิทธิภาพในการสกัดเช่นกัน นั่นหมายความว่าค่า EC_{50} ที่ต่ำจะบ่งบอกถึงค่าการต้านอนุมูลอิสระที่สูงขึ้น (Tananuwong & Tewaruth, 2010) ส่วนค่า FRAP value มีค่าค่อย ๆ ลดลงเมื่ออุณหภูมิการบ่มสูงขึ้น และมีค่าเพิ่มสูงขึ้นในช่วงอุณหภูมิ 70 ℃ ไปจนถึง 80 ℃ สามารถอธิบายได้ว่าค่า FRAP value มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันได้สูงสุดที่ความเข้มข้น 70% อุณหภูมิ 80 ℃ อาจเป็นไปได้ว่าความร้อนทำให้เกิดองค์ประกอบของสารใหม่หรือส่งเสริมสารต้านออกซิเดชันที่มีอยู่ส่งผลให้ปริมาณสารการต้านอนุมูลอิสระสูงขึ้น (Sharma et at., 2015) ส่วนปริมาณฟลาโวนอยด์รวมอุณหภูมิการบ่มส่งผลต่อค่าฟลาโวนอยด์รวมทำให้มีค่าที่ลดลงซึ่งองค์ประกอบส่วนใหญ่เป็นพอลิฟีนอลขนาดใหญ่เมื่อโดนความร้อนจะทำให้ผนังเซลล์ของพืชถูกทำลายจึงทำให้ปริมาณฟลาโวนอยด์ลดลง (Liu et al., 2012) แต่เมื่ออุณหภูมิเริ่มสูงขึ้นเรื่อย ๆ จะทำให้องค์ประกอบของฟลาโวนอยด์ที่ยึดติดกันด้วยพันธะ esterified และพันธะ glycosylated จะถูกตัดออกทำให้เกิดเป็นโมเลกุลอิสระส่งผลให้ปริมาณฟลาโวนอยด์ค่อย ๆ เพิ่มขึ้นเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้น (Xu et al., 2007) โดยมีปริมาณฟลาโวนอยด์เพิ่มสูงสุดที่ความเข้มข้น 70% อุณหภูมิ 50 ℃ ส่วนปริมาณฟีนอลิกรวมความเข้มข้นของสารละลายเอทานอลกับอุณหภูมิการบ่มส่งผลต่อปริมาณฟีนอลิก โดยพบว่าความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารละลายเอทานอลอยู่ในช่วง 72% - 85% โดยปริมาตร (ชมัยพร รอดกลิ่น และคณะ, 2560) ทำให้ช่วงความเข้มข้นดังกล่าวมีปริมาณสูงขึ้น เช่นเดียวกับการเพิ่มขึ้นของอุณหภูมิการบ่มเนื่องจากความร้อนจะทำให้เกิดการสลายตัวของโมเลกุลอิสระรวมถึงสาร Folin ที่ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกอาจเป็นตัวการที่รบกวนองค์ประกอบของฟีนอลิกที่มีอยู่ในเปลือกส้มโอทำให้ปริมาณฟีนอลิกมีค่าที่สูงขึ้น เนื่องจากในตัวอย่างเปลือกส้มโอประกอบด้วยวงแหวนเบนซินซึ่งหมู่ไฮดรอกซี (OH) และวงแหวนหมู่เอมีนทำให้สาร Folin ทำปฏิกิริยากับองค์ประกอบเหล่านั้นจึงส่งผลต่อปริมาณฟีนอลิก (Prior et al., 2005; Xu et al., 2007) จากนั้นได้ทำการเปรียบเทียบองค์ประกอบสารต้านอนุมูลอิสระ ปริมาณฟลาโวนอยด์รวม ปริมาณฟีนอลิกรวมของเปลือกส้มโอที่ความเข้มข้นของสารละลายเอทานอลและอุณหภูมิในการบ่มที่แตกต่างกันเพื่อหาจุดที่เหมาะสมโดยพิจารณาความเข้มข้นของสารละลายเอทานอลและอุณหภูมิการบ่มเป็นหลัก

ซึ่งได้จากการซ้อนทับกราฟ Contour plots ของโปรแกรมการตอบสนองต่อพื้นผิวสัมผัส (RSM) จนได้ระดับความเข้มข้นของสารละลายเอทานอลและอุณหภูมิการบ่มที่เหมาะสมเท่ากับความเข้มข้น 90% (w/v) อุณหภูมิการบ่ม 80 ℃ เนื่องจากความเข้มข้นของสารละลายเอทานอลและอุณหภูมิ การบ่มดังกล่าวให้ปริมาณสารสำคัญที่สูงรวมทั้งพิจารณาควบคู่กับค่าการวิเคราะห์ สมบัติการต้านออกซิเดชัน ปริมาณฟลาโวนอยด์รวม ปริมาณฟีนอลิกรวม

ศึกษาองค์ประกอบของสารระเหยพบว่า คือ D-Limonene มีคุณภาพของพีกอยู่ที่ 99% ขององค์ประกอบของสารระเหยทั้งหมด ส่วนองค์ประกอบอื่น ๆ ที่สำคัญ ได้แก่ Benzoic acid, Geranyl acetate, Trans-Cinnamic acid, Germacrene D, NOOTKATONE, 7-Hydroxycoumarin, n-Hexadecanoic acid, Scopoletin, Isoauraptene, Auraptenol, Auraptene และ Lup-20(29)-en-3-one โดยมีคุณภาพของพีกที่อยู่ในสารสกัดเปลือกส้มโอถึง 95-99% ขององค์ประกอบสารระเหยทั้งหมด เป็นองค์ประกอบของน้ำมันหอมระเหยที่ให้กลิ่นคล้ายส้ม มีรสขม และมีองค์ประกอบทางเคมีที่คล้ายกัน (Manaila et al., 2016) แสดงให้เห็นว่าความเข้มข้นของสารละลายเอทานอลและอุณหภูมิการบ่มนั้นส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างทำให้เกิดเป็นองค์ประกอบสารระเหยสำคัญที่สามารถนำไปใช้ในอุตสาหกรรมเครื่องสำอางได้

ข้อเสนอแนะในการนำผลการวิจัยไปใช้

นำสารสกัดเปลือกส้มโอที่ทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ได้จากการเลือกสภาวะเหมาะสมจากโปรแกรมการตอบสนองต่อพื้นผิวสัมผัส (RSM) พร้อมวิเคราะห์องค์ประกอบสารระเหยสามารถนำไปใช้ในเชิงวิชาการให้กับผู้วิจัย นักวิชาการ และนักศึกษาหรือเพื่อต่อยอดในอุตสาหกรรมเชิงพาณิชย์ได้

ข้อเสนอแนะในการทำวิจัยครั้งต่อไป

ทดสอบทางจุลชีววิทยาโดยการทำวิธี Agar well diffusion ทดสอบความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดที่สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ร้อยละ 50 (MIC_{50}) และทดสอบความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียร้อยละ 50 (MBC_{50}) รวมถึงการวิเคราะห์ Challenge Test เพิ่มเติมเพื่อดูประสิทธิภาพของสารสกัดสามารถนำไปใช้เป็นสารกันเสียจากธรรมชาติในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง

บรรณานุกรม

บรรณานุกรมภาษาไทย

กรมวิชาการเกษตร. (2545). *ส้มโอ.* กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.

กองโภชนาการ กรมอนามัย กระทรวงสาธารณสุข. (2553). *คุณค่าทางโภชนาการในผลไม้.* โรงพิมพ์ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย.

คณะกรรมาธิการการเกษตรและสหกรณ์ วุฒิสภา. (2554). *รายงานการพิจารณาศึกษา เรื่อง แนวทางการพัฒนาส้มโอไทยอย่างยั่งยืน*. สำนักการพิมพ์ สำนักงานเลขาธิการวุฒิสภา.

ชมัยพร รอดกลิ่น เอกรัฐ ศรีสุข และกล่าวขวัญ ศรีสุข (2560). ผลของสภาวะการสกัดต่อปริมาณสารประกอบฟีนอลิก สารประกอบฟลาโวนอยด์ และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของส่วนต่าง ๆ ของส้มซ่า. *วารสารวิทยาศาสตร์บรูพา*, 22(1), 211-225.

ทวีศักดิ์ ด้วงทอง และสุนิสา อธิวงศ์ธนวัฒน์. (2553). *การปลูกส้มโอ.* โครงการหนังสืออิเล็กทรอนิกส์ด้านการเกษตร เฉลิมพระเกียรติพระบาทสมเด็จพระเจ้าอยู่หัว มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, 22 หน้า.

สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. (2559). *ส้มโอ สารสนเทศ เศรษฐกิจการเกษตรรายสินค้าปี 2559*. สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.

บรรณานุกรมภาษาอังกฤษ

Ames, B. (1998). Micronutrients prevent cancer and delay aging. *Toxicology Letters, 102*, 5-18.

Azzi, A., Davies, K. J. A. & Kelly, F. (2004). Free radical biology-terminology and critical thinking. *Federation of European Biochemical Societies 558*, 3-6.

Baghiani, A., Boumerfeg, S., Adjadj, M., Ameni, D., Djermouni, M., Touhami, F. K., Charef, N., Khennouf, S. & Arrar, L. (2011). Antioxidants, free radicals scavenging and xanthine oxidase inhibitory potentials of Ajuga iva L. extracts. *Free radicals and antioxidants, 1*(4), 21-30.

Bernhoft, A. (2010). *A brief review on bioactive compounds in plants. In Proceedings from a symposium held at The Norwegian Academy of Science and Letters*. Oslo. Norway.

Biesalski, H., Dragsted, L., Elmadfa, I., Grossklaus, R., Muller, M., Schrenk, D., Walter, P. & Weber, P. (2009). Bioactive compounds: Definition and assessment of activity. *Nutrition, 25*, 1202-1205.

Caengprasath, N., Ngamukote, S., Makynen, K. & Adisakwattana, S. (2013). The Protective Effects of Pomelo Extract (*CITRUS GRANDIS* L. OSBECK) Against Fructose-Mediated Protein Oxidation and Glycation. *EXCLI Journal 12*, 491-502.

Chaiyana, W., Phongpradist, R. & Leelapornpisid, P. (2014). Characterization of Hydrodistillated Pomelo Peel Oil and the Enhancement of Biological Activities using Microemulsion Formulations. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, 6*(9), 596-602.

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.

Chen, R., Qi, Q.-L., Wang, M.-T. & Li, Q.-Y. (2016). Therapeutic potential of naringin: an overview. *Pharmaceutical Biology,* 54(12), 3203–3210.

Cheong, M.-W. (2013) *Chemical Components and Aromatic Profiles of Citrus and Coffee in Asia : CHAPTER 2 Characterization of Volatile Compounds and Aroma Profiles of Malaysian Pomelo (Citrus grandis (L.) Osbeck) Blossom and Peel*. Department of Chemistry National University of Singapore, pp. 33-47.

Chowdhury, M. R. H., Sagor, M. A. T., Tabassum, N., Potol, M. A., Hossain, H. & Alam, M. A. (2015). Supplementation of *Citrus maxima* Peel Powder Prevented Oxidative Stress, Fibrosis, and Hepatic Damage in Carbon Tetrachloride (CCl4) Treated Rats. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 1-10.

Darjaz, B. B. (2013). Comparison of peel volatile components of citron and pummelo (*Citrus* sp.). *International Research Journal of Applied and Basic Sciences, 5*(6), 682-689.

Ding, X., Guo, L., Zhang, Y., Fan, S., Gu, M., Lu, Y., Jiang, D., Li, Y., Huang, C. & Zhou, Z. (2013). Extracts of Pomelo Peels Prevent High-Fat Diet-Induced Metabolic Disorders in C57BL/6 Mice through Activating the PPARα and GLUT4 Pathway. *science and medicine, 10*(8), 1-9.

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.

Giada, M. L. R. (2013). *Chapter 4: Food Phenolic Compounds: Main Classes, Sources and Their Antioxidant Power*. Biochemistry, Genetics and Molecular and Biology.

Halliwell, B. (1996). Antioxidants in human health and diseases. *Annual Review of Nutrition, 16*, 33-50.

Hasanuzzaman, M., Nahar, K., Alam, Md. M., Roychowdhury, R. & Fujita, M. (2013). Physiological, Biochemical, and Molecular Mechanisms of Heat Stress Tolerance in Plants. *International Journal of Molecular Sciences*, *14*(5), 9643-9684.

Jideani, A. I. O., Silungwe, H., Takalani, T., Anyasi, T. A., Udeh, H. & Omolola, A. (2014). Antioxidant-Rich Natural Grain Products and Human Health. *Intechopen*, 167-186.

Joshipura, K. J., Hu, F. B., Manson, J. E., Stampfer, M. J., Limm, F. B., Speizaer, F. E., Colditz, G., Ascherio, A., Rosner, B., Spiegelman, D. & Willett, W. C. (2001). The effect of fruit and vegetables intake on risk for coronary heart diseases. *Annuals of Internal Medicines, 134*, 1106-1114.

Kancheva, V. D. & Kasaikina, O. T. (2012). *Lipid oxidation in homogeneous and micro heterogeneous media in presence of prooxidants, antioxidants and surfactants*. nTech.

Lan-Phi, N. T. & Vy, T. T. (2015). Chemical composition, antioxidant and antibacterial activities of peels essential oils of different pomelo varieties in the south of Vietnam. *International Food Research Journal, 22*(6), 2426-2431.

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.

Liu, Z., Zu, Y. & Yang, L. (2017). A process to preserve valuable compounds and acquire essential oils from pomelo flavedo using a microwave irradiation treatment. *Food Chemistry, 224*, 172–180.

MaCord, J. M. (1986). Superoxide dismutase: rationale for use in reperfusion injury and inflammation. *Free radical Biology and Medicine, 2*, 307-310.

Makynen, K., Jitsaardkul, S., Tachasamran, P., Sakai, N., Puranachoti, S., Nirojsinlapachai, N., Chattapat, V., Caengprasath, N., Ngamukote, S. & Adisakwattana, S. (2013). Cultivar variations in antioxidant and antihyperlipidemic properties of pomelo pulp (*Citrus grandis* [L.] Osbeck) in Thailand. *Food Chemistry, 139*, 735–743.

Manaila, E., Berechet, M. D., Stelescu, M. D., Craciun, G., Mihaiescu, D. E., Purcareanu, B., Calinescu, I., Fudulu, A. & Radu, M. (2016). *Comparation Between Chemical Compositions of Some Essential Oils Obtained by Hydrodistillation from Citrus Peels*. Institute for Scientific Information: Philadelphia, USA. pp. 106-112.

Nishiumi, S., Miyamoto, S., Kawabata, K., Ohnishi, K., Mukai, R., Murakami, A., Ashida, H. & Terao, J. (2011). Dietary flavonoids as cancer-preventive and therapeutic biofactors. *Frontiers in bioscience*, 2-31.

Pan, Y. M., Zhu, J. C., Wang, H. S., Zhang, X. P., Zhang, Y., He, C. H., Ji, X. W. & Li, H. Y. (2007). Antioxidant activity of ethanolic extract of Cortex fraxini and use in peanut oil. *Food Chemistry, 103*, 913-918.

Percival, M. (1998). Antioxidants. *Clinical Nutrition Insights*, 1-4.

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.

Pietta, P. G. (2000). Flavonoids as antioxidants. *Journal of Natural Products*, *63,* 1035-1042.

Prior. RL., 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.

Qiao, Y., Xie, B. J., Zhang, Y., Zhang, Y., Fan, G., Yao, X. L. & Pan, S. Y. (2008). Characterization of Aroma Active Compounds in Fruit Juice and Peel Oil of Jinchen Sweet Orange Fruit (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) by GC-MS and GC-O. *Molecules, 13*, 1333-1344.

Radenkovs, V., Klava, D., Krasnova, I. & Radenkova, K. J. (2014). Application of enzymatic treatment to improve the concentration of bioactive compounds and antioxidant potential of wheat and rye bran. *Foodbalt*, 127-132.

Ratnam, D. V., Ankola, D. D., Bhardwaj, V., Sahana, D. K. & Kumar, M. N. V. R. (2006). Role of antioxidants in prophylaxis and therapy: A pharmaceutical perspective. *Controlled Release, 133*, 189-207.

Ratanasiriwat, P., Choiykoew, J., Ngamying, S. & Pienchob, P. (2017). Extraction Procedure and Antioxidant Properties of Crude Extracts and Essential oil from Pumelo Peel. *RMUTTO Journa,* 1-11.

Rosenthal, A., Pyle, D. L. & Niranjan, K. (1996). Aqueous and enzymatic processes for edible oil extraction. *Enzyme Microbial Technology, 19*, 402-420.

Sailaja, R. P., Kalva, S., Yerramilli, A. & Mamadi, S. (2011). Free radicals and tissue damage: Role of antioxidants. *Free radical and antioxidant, 1*(4), 2-7.

Sarma, A. D., Mallick, A. R. & Ghosh, A. K. (2010). Free radicals and their role in different clinical conditions: An overview. *International Journal of Pharma Sciences and Research, 1*(3), 185-192.

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.

Sinha, A. K., Sharma, N., Shard, A., Sharma, A., Kumar, R. & Sharma, U. K. (2009). Green methodologies in synthesis and natural product chemistry of phenolic compounds. *Indian Journal of Chemistry, 48B*, 1771-1779.

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.

Sudto, K., Pornpakakul, S. & Wanichwecharungruang. S. (2009). An efficient method for the large scale isolation of naringin from pomelo (*Citrus grandis*) peel. *International Journal of Food Science and Technology*, *44,* 1737–1742.

Suklampoo, L., Thawai, C., Weethong, R., Champathong, W. & Wongwongsee, Wanwasan. (2012). Antimicrobial Activities of Crude Extracts from Pomelo Peel of Khao-nahm-peung and Khao-paen Varieties. *KMITL Sci. Tech. J, 12*(1), 55-57.

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.

Vichapong, J., Sookserm, M., Srijesdaruk, V. & Swatsitang, P. (2010). High performance liquid chromatographic analysis of phenolic compounds and their antioxidant activities in rice varieties. *Food Science and Technology, 43,* 1325-1330.

Vijaylakshmi, P. & Radha, R. (2015). An overview: *Citrus maxima*. *Journal of Phytopharmacology, 4*(5), 263-267.

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.

Youn, K. S. & H.S., C. (2012). Optimaization of the roasting temperature and time for preparation of coffee-like maize beverage using the response surface methodology. *Food Science and Technology, 46*, 305-310.

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.

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.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

การคำนวณสารเคมี

1. การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH assay

1.1 การเตรียมสารละลาย DPPH ความเข้มข้น 0.2 mM ปริมาตร 50 ml คำนวณจากสูตร

g/MW = CV/100

g = (0.0002 ×50 × 394.32)/1000

= 0.0039 g

ดังนั้น ชั่ง DPPH 0.0039 g ละลายด้วยเอทานอล และปรับปริมาตรให้ได้ 50 ml

1.2 การเตรียมวิตามินซี (L-ascorbic acid) ความเข้มข้น 3 mg/ml ปริมาตร 1 ml

ชั่งวิตามินซีมา 0.003 g ละลายด้วยน้ำปริมาตร 1 ml

2. การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี Ferric reducing antioxidant power (FRAP)

2.1 การเตรียมสารละลาย Acetate buffer

ปิเปต Acetate acid 1.6 ml และปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 100 ml ด้วยขวดปรับปริมาตร จากนั้นเติม Sodium acetate trihydrate 0.3 g

2.2 การเตรียมสารละลาย Ferric chloride

ชั่ง Ferric chloride 0.27 g และปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 50 ml ด้วยขวดปรับปริมาตร

2.3 การเตรียมสารละลาย TPTZ

ชั่งTPTZ 0.06 g เติม Hydrochloric acid ความเข้มข้น 40 mM ปริมาตร 20 ml

2.4 การเตรียมสารละลาย Trolox ความเข้มข้น 2.5 mg/ml ปริมาตร 1 ml

ชั่ง Trolox 0.0025 g ละลายในเอทานอล และปรับปริมาตรให้ได้ 1 ml ด้วยขวดปรับปริมาตร

3. การวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม ด้วยวิธี Folin-Ciocalteu assay

3.1 การเตรียมสารละลาย 7.5% Na_2CO_3 ปริมาตร 100 ml

ชั่ง Na_2CO_3 7.5 g ละลายในน้ำกลั่น และปรับปริมาตรให้ได้ 100 ml ด้วยขวดปรับปริมาตร

3.2 การเตรียมสารละลาย Gallic acid ความเข้มข้น 1 mg/ml ปริมาตร 100 ml

ชั่ง Gallic acid 100 mg ละลายในน้ำกลั่น และปรับปริมาตรให้ได้ 100 ml ด้วยขวดปรับปริมาตร

4. การวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์รวม ด้วยวิธี Aluminium chloride assay

4.1 การเตรียมสารละลาย Aluminium chloride ความเข้มข้น 10% เตรียม 100 ml

ชั่ง Aluminium chloride 1 g ละลายในน้ำกลั่นและปรับปริมาตร 100 ml ด้วยขวดปรับปริมาตร

4.2 การเตรียมสารละลาย Catechin ความเข้มข้น 0.1 mg/ml ปริมาตร 1 ml

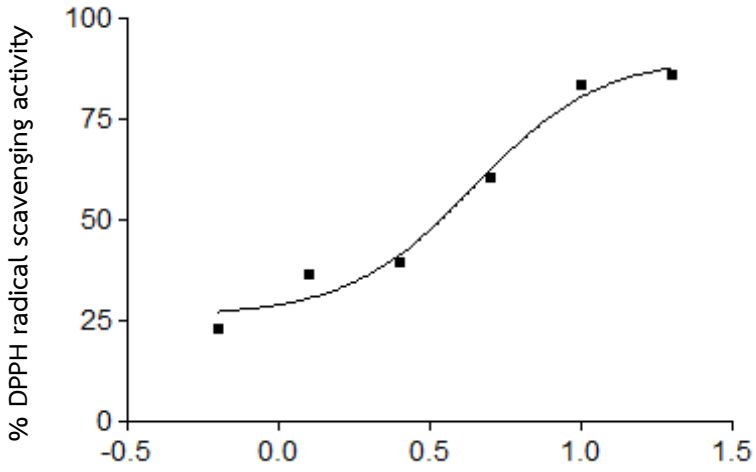
ชั่ง Catechin 0.0001 g ละลายในเอทานอล และปรับปริมาตรให้ได้ 1 ml ด้วยขวดปรับปริมาตร

ภาคผนวก ข

ทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (Free Radical Scavenging Activity) โดยวิธี DPPH assay และวิธี FARP assay

ตารางที่ ข-1 ค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดเปลือกส้มโอที่สกัดด้วยเอทานอล 70% อุณหภูมิ 50 °C ที่ความยาวคลื่น 515 nm และการหาร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ

ความเข้มข้น (mg/ml)	ค่าการดูดกลืนแสง ความยาวคลื่น 515 nm			ค่าเฉลี่ย	ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน	ร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ			ค่าเฉลี่ย	ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน
	1	2	3			1	2	3		
Blank	1.012	1.005	1.009	1.009	0.004	-	-	-	-	-
0.63	0.797	0.760	0.775	0.777	0.019	20.98	24.65	23.17	22.93	1.85
1.25	0.650	0.640	0.642	0.644	0.005	35.56	36.55	36.35	36.15	0.52
2.5	0.612	0.610	0.607	0.610	0.003	39.33	39.52	39.82	39.56	0.25
5	0.375	0.420	0.399	0.398	0.023	62.82	58.36	60.44	60.54	2.23
10	0.171	0.171	0.159	0.167	0.007	83.05	83.05	84.24	83.44	0.69
20	0.145	0.142	0.146	0.144	0.002	85.62	85.92	85.53	85.69	0.21



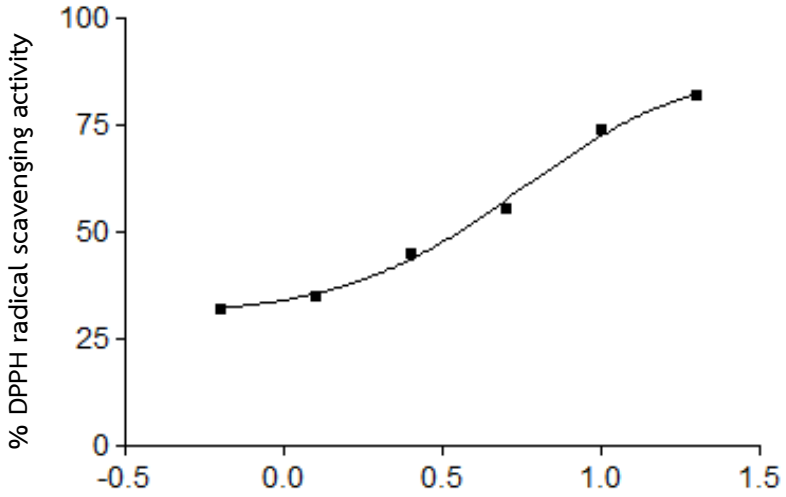
ภาพที่ ข-1 ภาพแสดงผลการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดเปลือกส้มโอที่สกัดด้วยเอทานอล 70% อุณหภูมิ 50 °C

ตารางที่ ข-2 ผลการยับยั้งอนุมูลอิสระได้ 50% ของสารสกัดเปลือกส้มโอที่สกัดด้วยเอทานอล 70% อุณหภูมิ 50 ℃ ด้วยโปรแกรม Graph pad Prism 3.02

Equation 1	Repeat 1	Repeat 2	Repeat 3
Variables			
BOTTOM	23.04	28.35	26.59
TOP	90.32	90.17	90.07
LOGEC50	0.6075	0.6850	0.6476
HILLSLOPE	1.930	2.234	2.150
EC50	4.050	4.842	4.442
Std. Error			
BOTTOM	7.947	5.698	6.748
TOP	9.678	8.756	9.220
LOGEC50	0.1053	0.09357	0.1013
HILLSLOPE	0.9606	1.065	1.087
95% Confidence Intervals			
BOTTOM	-11.15 to57.24	3.836 to 52.87	-2.448 to 55.63
TOP	48.68 to 132.0	52.49 to 127.8	50.40 to 129.7
LOGEC50	0.1545 to 1.061	0.2824 to 1.088	0.2119 to 1.083
HILLSLOPE	-2.203 to 6.064	-2.348 to 6.817	-2.528 to 6.827
EC50	1.427 to 11.50	1.916 to 12.24	1.629 to 12.11
Goodness of Fit			
Degrees of Freedom	2	2	2
R?	0.9799	0.9803	0.9778
Absolute Sum of Squares	71.82	64.05	75.71
Sy.x	5.992	5.659	6.153
Data			
Number of X values	6	6	6
Number of Y replicates	3	3	3
Total number of values	6	6	6
Number of missing values	12	12	12

ตารางที่ ข-3 ค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดเปลือกส้มโอที่สกัดด้วยเอทานอล 70% อุณหภูมิ 60 ℃ ที่ความยาวคลื่น 515 nm และการหาร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ

ความเข้มข้น (mg/ml)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 515 nm			ค่าเฉลี่ย	ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน	ร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ			ค่าเฉลี่ย	ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน
	1	2	3			1	2	3		
Blank	1.012	1.005	1.009	1.009	0.004	-	-	-	-	-
0.63	0.709	0.682	0.672	0.688	0.019	29.71	32.39	33.38	31.82	1.90
1.25	0.659	0.676	0.635	0.657	0.021	34.67	32.98	37.05	34.90	2.04
2.5	0.540	0.543	0.580	0.554	0.022	46.46	46.17	42.50	45.04	2.21
5	0.448	0.455	0.455	0.453	0.004	55.58	54.89	54.89	55.12	0.40
10	0.265	0.262	0.264	0.264	0.002	73.73	74.03	73.83	73.86	0.15
20	0.184	0.189	0.184	0.186	0.003	81.76	81.26	81.76	81.59	0.29



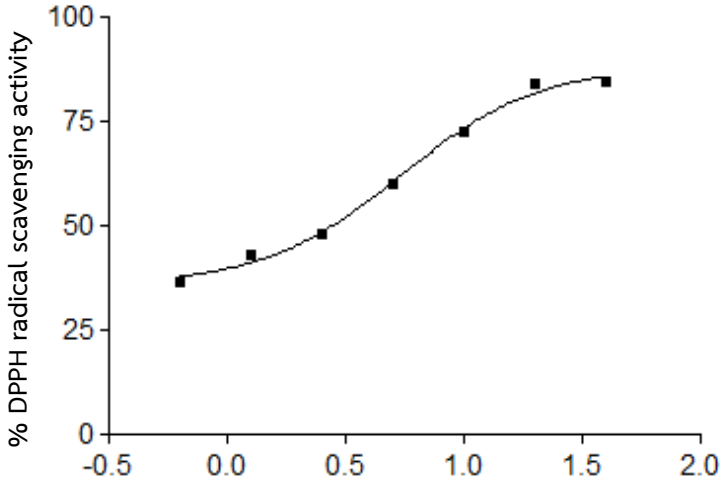
ภาพที่ ข-2 ภาพแสดงผลการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดเปลือกส้มโอที่สกัดด้วยเอทานอล70% อุณหภูมิ 60 ℃

ตารางที่ ข-4 ผลการยับยั้งอนุมูลอิสระได้ 50% ของสารสกัดเปลือกส้มโอที่สกัดด้วยเอทานอล 70% อุณหภูมิ 60 ℃ ด้วยโปรแกรม Graph pad Prism 3.02

Equation 1	Repeat 1	Repeat 2	Repeat 3
Variables			
BOTTOM	24.85	29.69	33.78
TOP	94.30	88.54	86.40
LOGEC50	0.7309	0.7313	0.7684
HILLSLOPE	1.198	1.565	1.990
EC50	5.382	5.386	5.867
Std. Error			
BOTTOM	7.001	5.262	1.546
TOP	13.74	10.44	3.342
LOGEC50	0.1292	0.1131	0.03877
HILLSLOPE	0.4892	0.6604	0.3313
95% Confidence Intervals			
BOTTOM	-5.275 to 54.98	7.052 to 52.34	27.12 to 40.43
TOP	35.17 to 153.4	43.61 to 133.5	72.02 to 100.8
LOGEC50	0.1750 to 1.287	0.2445 to 1.218	0.6016 to 0.9352
HILLSLOPE	-0.9074 to 3.303	-1.277 to 4.406	0.5641 to 3.416
EC50	1.496 to 19.36	1.756 to 16.52	3.996 to 8.615
Goodness of Fit			
Degrees of Freedom	2	2	2
R?	0.9939	0.9892	0.9978
Absolute Sum of Squares	13.24	22.80	4.447
Sy.x	2.573	3.377	1.491
Data			
Number of X values	6	6	6
Number of Y replicates	3	3	3
Total number of values	6	6	6
Number of missing values	12	12	12

ตารางที่ ข-5 ค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดเปลือกส้มโอที่สกัดด้วยเอทานอล 70% อุณหภูมิ 70 ℃ ที่ความยาวคลื่น 515 nm และการหาร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ

ความเข้มข้น (mg/ml)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 515 nm			ค่าเฉลี่ย	ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน	ร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ			ค่าเฉลี่ย	ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน
	1	2	3			1	2	3		
Blank	1.012	1.005	1.009	1.009	0.004	-	-	-	-	-
0.63	0.645	0.648	0.635	0.643	0.007	35.96	35.76	37.05	36.25	0.69
1.25	0.561	0.575	0.591	0.576	0.015	44.38	42.99	41.14	42.93	1.49
2.5	0.535	0.512	0.531	0.526	0.012	46.96	49.24	47.36	47.85	1.22
5	0.435	0.387	0.394	0.405	0.026	56.87	61.63	60.94	59.81	2.57
10	0.277	0.272	0.290	0.280	0.009	72.54	73.03	71.25	72.72	0.92
20	0.163	0.155	0.168	0.162	0.007	83.84	84.63	83.34	83.94	0.65
40	0.158	0.154	0.165	0.159	0.006	84.34	84.73	83.64	84.24	0.55



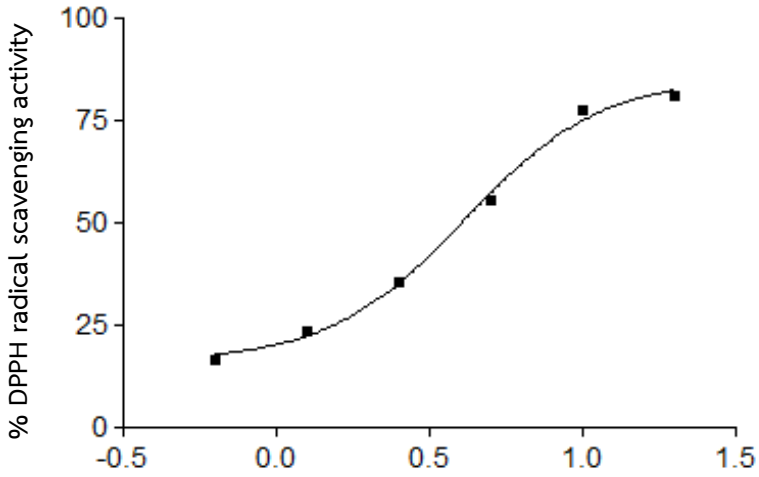
ภาพที่ ข-3 ภาพแสดงผลการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดเปลือกส้มโอ ที่สกัดด้วยเอทานอล 70% อุณหภูมิ 70 ℃

ตารางที่ ข-6 ผลการยับยั้งอนุมูลอิสระได้ 50% ของสารสกัดเปลือกส้มโอที่สกัดด้วยเอทานอล 70% อุณหภูมิ 70 °C ด้วยโปรแกรม Graph pad Prism 3.02

Equation 1	Repeat 1	Repeat 2	Repeat 3
Variables			
BOTTOM	37.76	33.60	35.64
TOP	87.90	89.26	86.97
LOGEC50	0.7917	0.6875	0.7247
HILLSLOPE	1.686	1.354	1.540
EC50	6.190	4.870	5.305
Std. Error			
BOTTOM	3.573	4.143	2.753
TOP	4.662	3.981	2.965
LOGEC50	0.07758	0.06630	0.05183
HILLSLOPE	0.5289	0.3347	0.3138
95% Confidence Intervals			
BOTTOM	26.39 to 49.13	20.41 to 46.78	26.88 to 44.40
TOP	73.07 to 102.7	76.60 to 101.9	77.54 to 96.41
LOGEC50	0.5448 to 1.039	0.4766 to 0.8985	0.5598 to 0.8896
HILLSLOPE	0.003364 to 3.369	0.2884 to 2.419	0.5413 to 2.538
EC50	3.506 to 10.93	2.996 to 7.915	3.629 to 7.755
Goodness of Fit			
Degrees of Freedom	3	3	3
R?	0.9876	0.9940	0.9952
Absolute Sum of Squares	28.73	14.26	10.95
Sy.x	3.095	2.180	1.911
Data			
Number of X values	7	7	7
Number of Y replicates	3	3	3
Total number of values	7	7	7
Number of missing values	14	14	14

ตารางที่ ข-7 ค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดเปลือกส้มโอที่สกัดด้วยเอทานอล 70% อุณหภูมิ 80 °C ที่ความยาวคลื่น 515 nm และการหาร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ

ความเข้มข้น (mg/ml)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 515 nm			ค่าเฉลี่ย	ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน	ร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ			ค่าเฉลี่ย	ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน
	1	2	3			1	2	3		
Blank	1.012	1.005	1.009	1.009	0.004	-	-	-	-	-
0.63	0.844	0.841	0.840	0.842	0.002	16.33	16.62	16.72	16.56	0.21
1.25	0.776	0.767	0.771	0.771	0.005	23.07	23.96	23.56	23.53	0.45
2.5	0.646	0.651	0.661	0.653	0.008	35.96	35.46	34.47	35.29	0.76
5	0.452	0.434	0.467	0.451	0.017	55.19	56.97	53.70	55.29	1.64
10	0.209	0.225	0.251	0.228	0.021	79.28	77.69	75.12	77.36	2.10
20	0.191	0.190	0.196	0.192	0.003	81.06	81.16	80.57	80.93	0.32



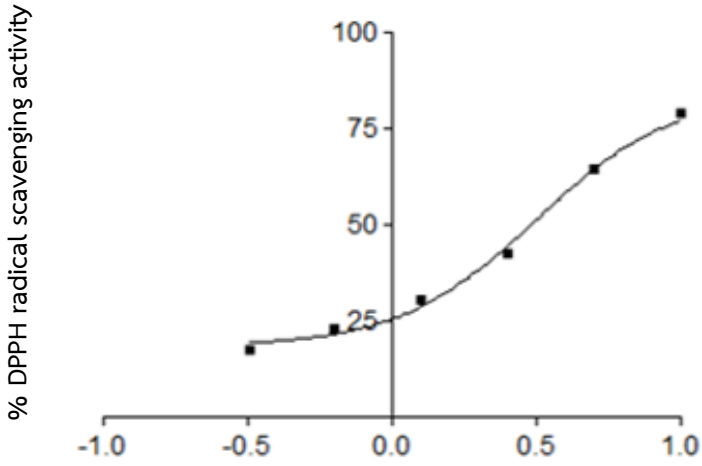
ภาพที่ ข-4 ภาพแสดงผลการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดเปลือกส้มโอที่สกัดด้วยเอทานอล 70% อุณหภูมิ 80 °C

ตารางที่ ข-8 ผลการยับยั้งอนุมูลอิสระได้ 50% ของสารสกัดเปลือกส้มโอที่สกัดด้วยเอทานอล 70% อุณหภูมิ 80 ℃ ด้วยโปรแกรม Graph pad Prism 3.02

Equation 1	Repeat 1	Repeat 2	Repeat 3
Variables			
BOTTOM	15.83	16.19	15.90
TOP	85.85	85.01	85.48
LOGEC50	0.6113	0.6015	0.6387
HILLSLOPE	1.985	2.003	1.849
EC50	4.086	3.995	4.352
Std. Error			
BOTTOM	4.624	3.087	2.989
TOP	5.681	3.665	4.085
LOGEC50	0.05929	0.03954	0.04090
HILLSLOPE	0.5644	0.3817	0.3457
95% Confidence Intervals			
BOTTOM	-4.069 to 35.73	2.913 to 29.48	3.037 to 28.76
TOP	61.41 to 110.3	69.24 to 100.8	67.90 to 103.1
LOGEC50	0.3562 to 0.8664	0.4314 to 0.7716	0.4627 to 0.8147
HILLSLOPE	-0.4430 to 4.414	0.3603 to 3.646	0.3616 to 3.337
EC50	2.271 to 7.353	2.700 to 5.911	2.902 to 6.527
Goodness of Fit			
Degrees of Freedom	2	2	2
R?	0.9932	0.9969	0.9973
Absolute Sum of Squares	26.59	11.78	9.827
Sy.x	3.646	2.427	2.217
Data			
Number of X values	6	6	6
Number of Y replicates	3	3	3
Total number of values	6	6	6
Number of missing values	12	12	12

ตารางที่ ข-9 ค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดเปลือกส้มโอที่สกัดด้วยเอทานอล 80% อุณหภูมิ 50 ℃ ที่ความยาวคลื่น 515 nm และการหาร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ

ความเข้มข้น (mg/ml)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 515 nm			ค่าเฉลี่ย	ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน	ร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ			ค่าเฉลี่ย	ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน
	1	2	3			1	2	3		
Blank	1.012	1.005	1.009	1.009	0.004	-	-	-	-	-
0.32	0.829	0.830	0.843	0.834	0.008	17.81	17.71	16.42	17.32	0.77
0.63	0.785	0.772	0.783	0.780	0.007	22.17	23.46	22.37	22.67	0.69
1.25	0.704	0.707	0.702	0.704	0.003	30.20	29.91	30.40	30.17	0.25
2.5	0580	0.579	0.585	0.581	0.003	42.50	42.60	42.00	42.37	0.32
5	0.350	0.351	0.383	0.361	0.019	65.30	65.20	62.03	64.18	1.86
10	0.231	0.185	0.220	0.212	0.024	77.10	81.66	78.19	78.98	2.38
20	0.207	0.196	0.203	0.202	0.006	79.48	80.57	79.87	79.97	0.55



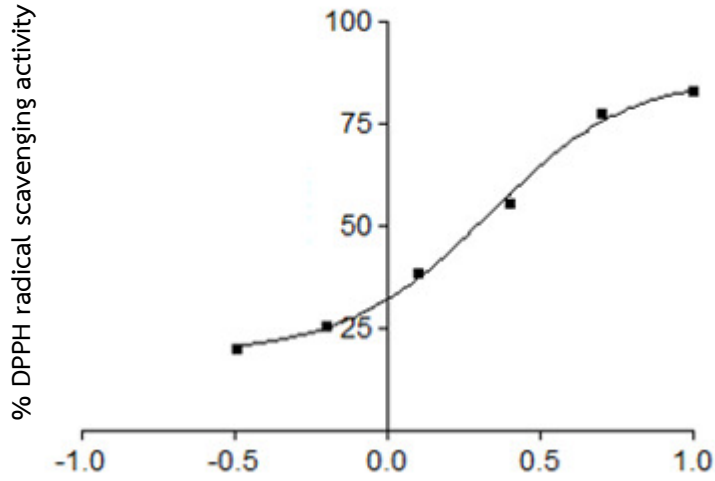
ภาพที่ ข-5 ภาพแสดงผลการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดเปลือกส้มโอ ที่สกัดด้วยเอทานอล 80% อุณหภูมิ 50 ℃

ตารางที่ ข-10 ผลการยับยั้งอนุมูลอิสระได้ 50% ของสารสกัดเปลือกส้มโอที่สกัดด้วยเอทานอล 80% อุณหภูมิ 50 °C ด้วยโปรแกรม Graph pad Prism 3.02

Equation 1	Repeat 1	Repeat 2	Repeat 3
Variables			
BOTTOM	18.34	19.44	16.55
TOP	82.16	84.45	84.97
LOGEC50	0.4809	0.5040	0.5083
HILLSLOPE	1.900	2.010	1.621
EC50	3.026	3.192	3.223
Std. Error			
BOTTOM	2.078	2.923	3.177
TOP	2.579	3.825	4.359
LOGEC50	0.03434	0.04877	0.05193
HILLSLOPE	0.2851	0.4409	0.3313
95% Confidence Intervals			
BOTTOM	11.72 to 24.95	10.14 to 28.74	6.443 to 26.66
TOP	73.96 to 90.37	72.28 to 96.61	71.10 to 98.84
LOGEC50	0.3716 to 0.5902	0.3488 to 0.6592	0.3430 to 0.6735
HILLSLOPE	0.9928 to 2.807	0.6068 to 3.413	0.5665 to 2.675
EC50	2.353 to 3.892	2.233 to 4.562	2.203 to 4.715
Goodness of Fit			
Degrees of Freedom	3	3	3
R?	0.9969	0.9932	0.9949
Absolute Sum of Squares	12.57	29.58	20.92
Sy.x	2.047	3.140	2.641
Data			
Number of X values	7	7	7
Number of Y replicates	3	3	3
Total number of values	7	7	7
Number of missing values	14	14	14

ตารางที่ ข-11 ค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดเปลือกส้มโอที่สกัดด้วยเอทานอล 80% อุณหภูมิ 60 ℃ ที่ความยาวคลื่น 515 nm และการหาร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ

ความเข้มข้น (mg/ml)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 515 nm			ค่าเฉลี่ย	ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน	ร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ			ค่าเฉลี่ย	ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน
	1	2	3			1	2	3		
Blank	1.012	1.005	1.009	1.009	0.004	-	-	-	-	-
0.32	0.815	0.798	0.810	0.807	0.008	19.50	20.89	19.70	20.03	0.75
0.63	0.761	0.745	0.756	0.754	0.008	24.55	26.14	25.05	25.25	0.81
1.25	0.620	0.625	0.625	0.623	0.003	38.53	38.04	38.04	38.20	0.29
2.5	0.460	0.448	0.444	0.451	0.008	54.40	55.58	55.98	55.32	0.83
5	0.211	0.249	0.226	0.229	0.019	79.08	75.31	77.59	77.33	1.90
10	0.164	0.179	0.170	0.171	0.008	83.74	82.25	83.15	83.05	0.75
20	0.158	0.150	0.149	0.152	0.005	84.34	85.13	85.23	84.90	0.49



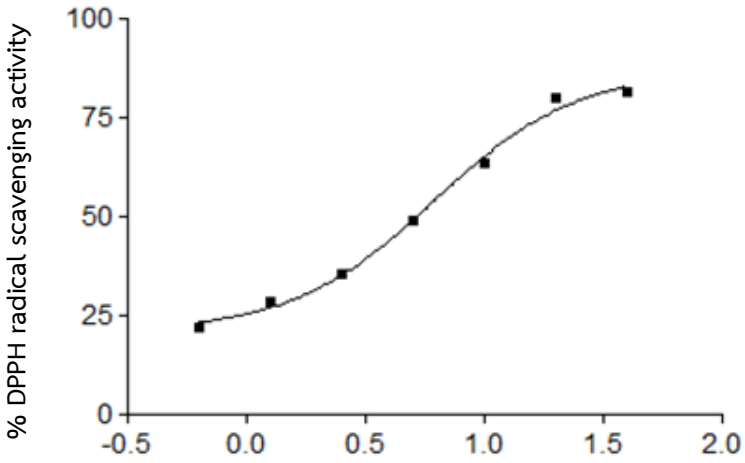
ภาพที่ ข-6 ภาพแสดงผลการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดเปลือกส้มโอที่สกัดด้วยเอทานอล 80% อุณหภูมิ 60 ℃

ตารางที่ ข-12 ผลการยับยั้งอนุมูลอิสระได้ 50% ของสารสกัดเปลือกส้มโอที่สกัดด้วยเอทานอล 80% อุณหภูมิ 60 °C ด้วยโปรแกรม Graph pad Prism 3.02

Equation 1	Repeat 1	Repeat 2	Repeat 3
Variables			
BOTTOM	18.77	19.19	18.42
TOP	86.68	86.73	86.83
LOGEC50	0.3308	0.3410	0.3252
HILLSLOPE	1.962	1.778	1.889
EC50	2.142	2.193	2.115
Std. Error			
BOTTOM	3.803	1.570	2.342
TOP	3.149	1.322	1.901
LOGEC50	0.04806	0.02013	0.02917
HILLSLOPE	0.4220	0.1509	0.2400
95% Confidence Intervals			
BOTTOM	6.669 to 30.87	14.20 to 24.19	10.96 to 25.87
TOP	76.66 to 96.70	82.52 to 90.93	80.78 to 92.88
LOGEC50	0.1779 to 0.4837	0.2770 to 0.4051	0.2324 to 0.4180
HILLSLOPE	0.6198 to 3.305	1.298 to 2.258	1.125 to 2.652
EC50	1.506 to 3.046	1.892 to 2.541	1.708 to 2.618
Goodness of Fit			
Degrees of Freedom	3	3	3
R?	0.9936	0.9990	0.9978
Absolute Sum of Squares	30.33	4.140	10.28
Sy.x	3.180	1.175	1.851
Data			
Number of X values	7	7	7
Number of Y replicates	3	3	3
Total number of values	7	7	7
Number of missing values	14	14	14

ตารางที่ ข-13 ค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดเปลือกส้มโอที่สกัดด้วยเอทานอล 80% อุณหภูมิ 70 ℃ ที่ความยาวคลื่น 515 nm และการหาร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ

ความเข้มข้น (mg/ml)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 515 nm			ค่าเฉลี่ย	ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน	ร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ			ค่าเฉลี่ย	ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน
	1	2	3			1	2	3		
Blank	1.012	1.005	1.009	1.009	0.004	-	-	-	-	-
0.63	0.784	0.795	0.785	0.788	0.006	22.27	21.18	22.17	21.88	0.60
1.25	0.730	0.705	0.736	0.724	0.016	27.63	30.11	27.03	28.26	1.63
2.5	0.652	0.655	0.654	0.654	0.002	35.36	35.06	35.16	35.19	0.15
5	0.528	0.514	0.513	0.518	0.008	47.65	49.04	49.14	48.61	0.83
10	0.376	0.376	0.535	0.368	0.013	62.72	62.72	65.00	63.48	1.32
20	0.200	0.207	0.208	0.205	0.004	80.17	79.48	79.38	79.68	0.43
40	0.190	0.183	0.188	0.187	0.004	80.17	81.86	81.36	81.13	0.87



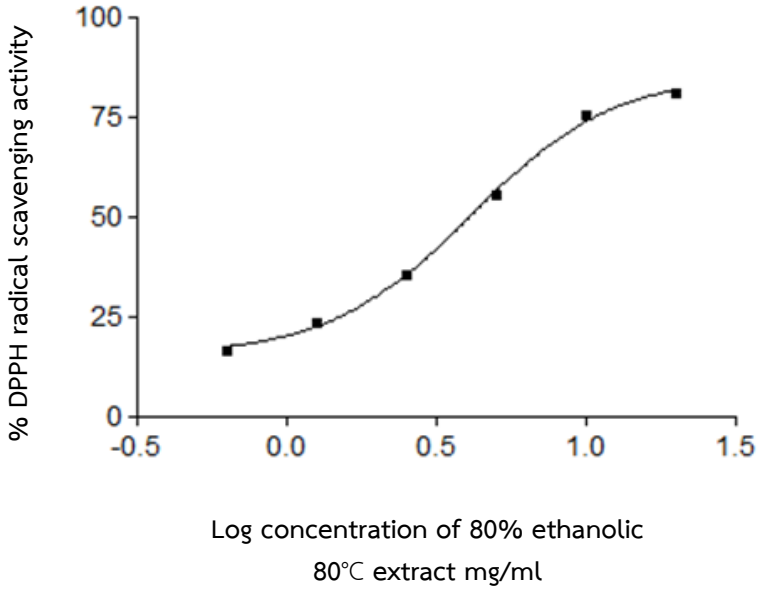
ภาพที่ ข-7 ภาพแสดงผลการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดเปลือกส้มโอ ที่สกัดด้วยเอทานอล 80% อุณหภูมิ 70 ℃

ตารางที่ ข-14 ผลการยับยั้งอนุมูลอิสระได้ 50% ของสารสกัดเปลือกส้มโอที่สกัดด้วยเอทานอล 80% อุณหภูมิ 70 °C ด้วยโปรแกรม Graph pad Prism 3.02

Equation 1	Repeat 1	Repeat 2	Repeat 3
Variables			
BOTTOM	21.52	19.68	20.76
TOP	85.94	89.39	85.84
LOGEC50	0.7980	0.8041	0.7662
HILLSLOPE	1.511	1.290	1.529
EC50	6.280	6.370	5.837
Std. Error			
BOTTOM	3.924	5.201	2.267
TOP	5.289	7.230	2.769
LOGEC50	0.06720	0.08245	0.03615
HILLSLOPE	0.3861	0.3733	0.2143
95% Confidence Intervals			
BOTTOM	9.035 to 34.01	3.135 to 36.23	13.54 to 27.97
TOP	69.11 to 102.8	66.38 to 112.4	77.03 to 94.65
LOGEC50	0.5841 to 1.012	0.5418 to 1.066	0.6512 to 0.8812
HILLSLOPE	0.2828 to 2.740	0.1020 to 2.478	0.8468 to 2.210
EC50	3.838 to 10.28	3.482 to 11.65	4.479 to 7.607
Goodness of Fit			
Degrees of Freedom	3	3	3
R?	0.9926	0.9924	0.9977
Absolute Sum of Squares	25.64	26.48	8.150
Sy.x	2.924	2.971	1.648
Data			
Number of X values	7	7	7
Number of Y replicates	3	3	3
Total number of values	7	7	7
Number of missing values	14	14	14

ตารางที่ ข-15 ค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดเปลือกส้มโอที่สกัดด้วยเอทานอล 80% อุณหภูมิ 80 ℃ ที่ความยาวคลื่น 515 nm และการหาร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ

ความเข้มข้น (mg/ml)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 515 nm			ค่าเฉลี่ย	ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน	ร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ			ค่าเฉลี่ย	ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน
	1	2	3			1	2	3		
Blank	1.012	1.005	1.009	1.009	0.004	-	-	-	-	-
0.63	0.844	0.841	0.840	0.842	0.002	16.33	16.62	16.72	16.56	0.21
1.25	0.776	0767	0.771	0.771	0.005	23.07	23.96	23.56	23.53	0.45
2.5	0.646	0.651	0.661	0.653	0.008	35.96	35.46	34.47	35.29	0.76
5	0.452	0.434	0.467	0.451	0.017	55.19	56.97	53.70	55.29	1.64
10	0.268	0.225	0.251	0.248	0.022	73.43	77.69	75.12	75.41	2.15
20	0.191	0.190	0.196	0.192	0.003	81.06	81.16	80.57	80.93	0.32



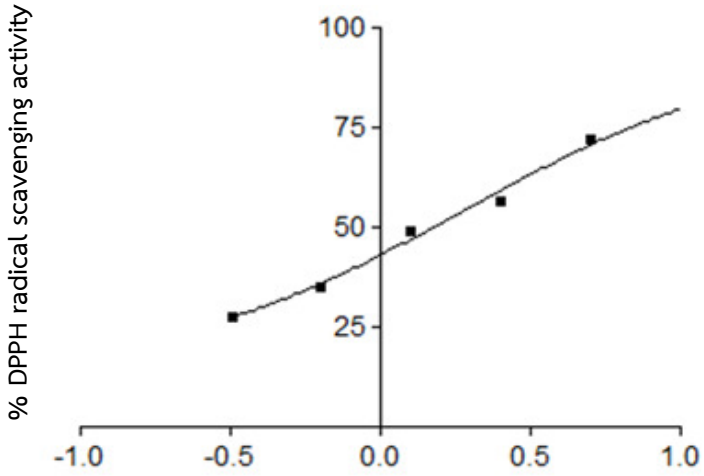
ภาพที่ ข-8 ภาพแสดงผลการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดเปลือกส้มโอ ที่สกัดด้วยเอทานอล 80% อุณหภูมิ 80 ℃

ตารางที่ ข-16 ผลการยับยั้งอนุมูลอิสระได้ 50% ของสารสกัดเปลือกส้มโอที่สกัดด้วยเอทานอล 80% อุณหภูมิ 80 ℃ ด้วยโปรแกรม Graph pad Prism 3.02

Equation 1	Repeat 1	Repeat 2	Repeat 3
Variables			
BOTTOM	13.36	16.19	15.90
TOP	86.63	85.01	85.48
LOGEC50	0.6143	0.6015	0.6387
HILLSLOPE	1.627	2.003	1.849
EC50	4.114	3.995	4.352
Std. Error			
BOTTOM	1.451	3.087	2.989
TOP	1.840	3.665	4.085
LOGEC50	0.01766	0.03954	0.04090
HILLSLOPE	0.1252	0.3817	0.3457
95% Confidence Intervals			
BOTTOM	7.119 to 19.61	2.913 to 29.48	3.037 to 28.76
TOP	78.72 to 94.55	69.24 to 100.8	67.90 to 103.1
LOGEC50	0.5383 to 0.6902	0.4314 to 0.7716	0.4627 to 0.8147
HILLSLOPE	1.089 to 2.166	0.3603 to 3.646	0.3616 to 3.337
EC50	3.454 to 4.901	2.700 to 5.911	2.902 to 6.527
Goodness of Fit			
Degrees of Freedom	2	2	2
R?	0.9996	0.9969	0.9973
Absolute Sum of Squares	1.417	11.78	9.827
Sy.x	0.8416	2.427	2.217
Data			
Number of X values	6	6	6
Number of Y replicates	3	3	3
Total number of values	6	6	6
Number of missing values	12	12	12

ตารางที่ ข-17 ค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดเปลือกส้มโอที่สกัดด้วยเอทานอล 90% อุณหภูมิ 50 ℃ ที่ความยาวคลื่น 515 nm และการหาร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ

ความเข้มข้น (mg/ml)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 515 nm			ค่าเฉลี่ย	ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน	ร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ			ค่าเฉลี่ย	ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน
	1	2	3			1	2	3		
Blank	1.012	1.005	1.009	1.009	0.004	-	-	-	-	-
0.32	0.744	0.724	0.731	0.733	0.010	26.26	28.25	27.55	27.35	1.01
0.63	0.658	0.662	0.652	0.657	0.005	34.79	34.39	35.38	34.85	0.50
1.25	0.518	0.506	0.531	0.518	0.013	48.66	49.85	47.37	48.63	1.24
2.5	0.446	0.434	0.439	0.440	0.006	55.80	56.99	56.49	56.43	0.60
5	0.292	0.283	0.280	0.285	0.006	71.06	71.95	72.25	71.75	0.62
10	0.141	0.161	0.138	0.147	0.013	86.03	84.04	86.32	85.46	1.24



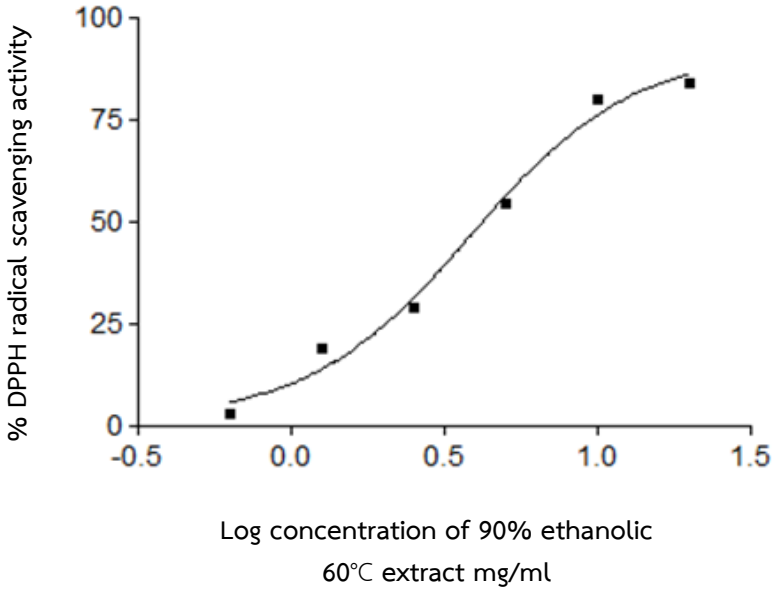
ภาพที่ ข-9 ภาพแสดงผลการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดเปลือกส้มโอ ที่สกัดด้วยเอทานอล 90% อุณหภูมิ 50 ℃

ตารางที่ ข-18 ผลการยับยั้งอนุมูลอิสระได้ 50% ของสารสกัดเปลือกส้มโอที่สกัดด้วยเอทานอล 90% อุณหภูมิ 50 °C ด้วยโปรแกรม Graph pad Prism 3.02

Equation 1	Repeat 1	Repeat 2	Repeat 3
Variables			
BOTTOM	3.937	15.58	16.75
TOP	100.8	90.79	94.93
LOGEC50	0.2440	0.2435	0.3300
HILLSLOPE	0.7106	0.9635	0.9508
EC50	1.754	1.752	2.138
Std. Error			
BOTTOM	29.38	15.88	9.915
TOP	18.56	9.353	7.599
LOGEC50	0.2290	0.1614	0.09434
HILLSLOPE	0.4310	0.4458	0.3025
95% Confidence Intervals			
BOTTOM	-122.5 to 130.4	-52.74 to 83.90	-25.92 to 59.41
TOP	20.99 to 180.7	50.55 to 131.0	62.23 to 127.6
LOGEC50	-0.7415 to 1.229	-0.4508 to 0.9378	-0.07593 to 0.7360
HILLSLOPE	-1.144 to 2.565	-0.9546 to 2.882	-0.3509 to 2.253
EC50	0.1813 to 16.96	0.3541 to 8.666	0.8396 to 5.445
Goodness of Fit			
Degrees of Freedom	2	2	2
R?	0.9944	0.9920	0.9964
Absolute Sum of Squares	13.96	18.45	8.908
Sy.x	2.642	3.037	2.110
Data			
Number of X values	6	6	6
Number of Y replicates	3	3	3
Total number of values	6	6	6
Number of missing values	12	12	12

ตารางที่ ข-19 ค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดเปลือกส้มโอที่สกัดด้วยเอทานอล 90% อุณหภูมิ 60 ℃ ที่ความยาวคลื่น 515 nm และการหาร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ

ความเข้มข้น (mg/ml)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 515 nm			ค่าเฉลี่ย	ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน	ร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ			ค่าเฉลี่ย	ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน
	1	2	3			1	2	3		
Blank	1.012	1.005	1.009	1.009	0.004	-	-	-	-	-
0.63	0.983	0.969	0.988	0.980	0.010	2.58	3.96	2.08	2.87	0.98
1.25	0.799	0.841	0.823	0.821	0.021	20.81	16.65	18.43	18.63	2.09
2.5	0.716	0.720	0.716	0.717	0.002	29.04	28.64	29.04	28.91	0.23
5	0.462	0.451	0.462	0.458	0.006	54.21	55.30	54.21	54.58	0.63
10	0.204	0.205	0.206	0.205	0.001	79.78	79.68	79.58	79.68	0.10
20	0.157	0.158	0.168	0.161	0.006	84.44	84.34	83.35	84.04	0.60



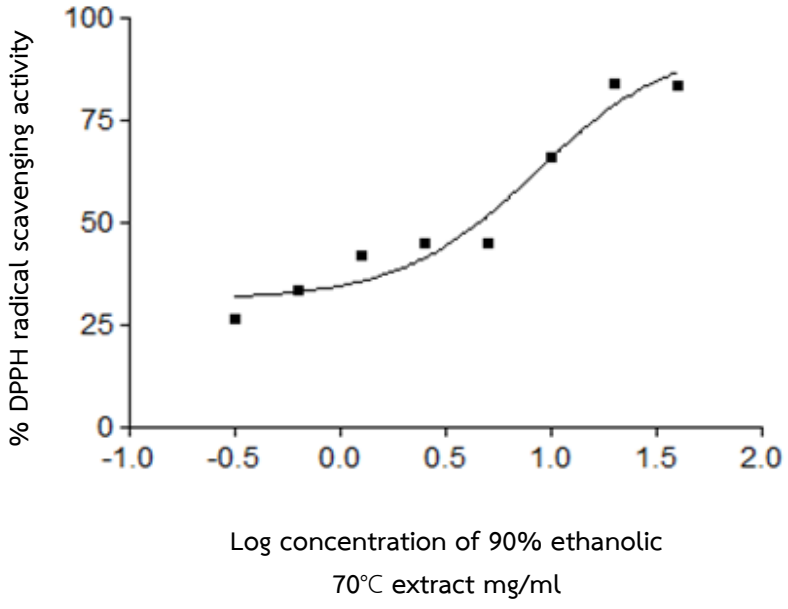
ภาพที่ ข-10 ภาพแสดงผลการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดเปลือกส้มโอ ที่สกัดด้วยเอทานอล 90% อุณหภูมิ 60 ℃

ตารางที่ ข-20 ผลการยับยั้งอนุมูลอิสระได้ 50% ของสารสกัดเปลือกส้มโอที่สกัดด้วยเอทานอล 90% อุณหภูมิ 60 °C ด้วยโปรแกรม Graph pad Prism 3.02

Equation 1	Repeat 1	Repeat 2	Repeat 3
Variables			
BOTTOM	-0.1857	3.224	-0.2250
TOP	94.30	90.13	91.59
LOGEC50	0.5887	0.5901	0.5747
HILLSLOPE	1.480	1.824	1.587
EC50	3.879	3.891	3.756
Std. Error			
BOTTOM	13.77	5.953	10.76
TOP	15.94	6.858	11.79
LOGEC50	0.1201	0.05875	0.09507
HILLSLOPE	0.7595	0.4948	0.6622
95% Confidence Intervals			
BOTTOM	-59.45 to 59.07	-22.39 to 28.84	-46.54 to 46.09
TOP	25.73 to 162.9	60.62 to 119.6	40.85 to 142.3
LOGEC50	0.07201 to 1.105	0.3373 to 0.8429	0.1656 to 0.9838
HILLSLOPE	-1.788 to 4.749	-0.3056 to 3.953	-1.263 to 4.436
EC50	1.180 to 12.74	2.174 to 6.964	1.464 to 9.634
Goodness of Fit			
Degrees of Freedom	2	2	2
R?	0.9850	0.9943	0.9964
Absolute Sum of Squares	82.50	32.22	8.908
Sy.x	6.423	4.014	2.110
Data			
Number of X values	6	6	6
Number of Y replicates	3	3	3
Total number of values	6	6	6
Number of missing values	12	12	12

ตารางที่ ข-21 ค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดเปลือกส้มโอที่สกัดด้วยเอทานอล 90% อุณหภูมิ 70 ℃ ที่ความยาวคลื่น 515 nm และการหาร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ

ความเข้มข้น (mg/ml)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 515 nm			ค่าเฉลี่ย	ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน	ร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ			ค่าเฉลี่ย	ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน
	1	2	3			1	2	3		
Blank	1.012	1.005	1.009	1.009	0.004	-	-	-	-	-
0.32	0.733	0.751	0.746	0.743	0.009	27.35	25.57	26.07	26.33	0.92
0.63	0.672	0.685	0.659	0.672	0.013	33.40	32.11	34.69	33.40	1.29
1.25	0.585	0.589	0.588	0.587	0.002	42.02	41.63	41.72	41.79	0.21
2.5	0.556	0.562	0.559	0.559	0.003	44.90	44.30	44.60	44.60	0.30
5	0.552	0.652	0.560	0.558	0.005	45.29	44.30	44.50	44.70	0.52
10	0.342	0.342	0.356	0.347	0.008	66.11	66.11	64.72	65.64	0.80
20	0.163	0.151	0.168	0.161	0.009	83.85	85.04	83.35	84.08	0.87
40	0.164	0.164	0.174	0.167	0.006	83.75	83.75	82.76	83.42	0.57



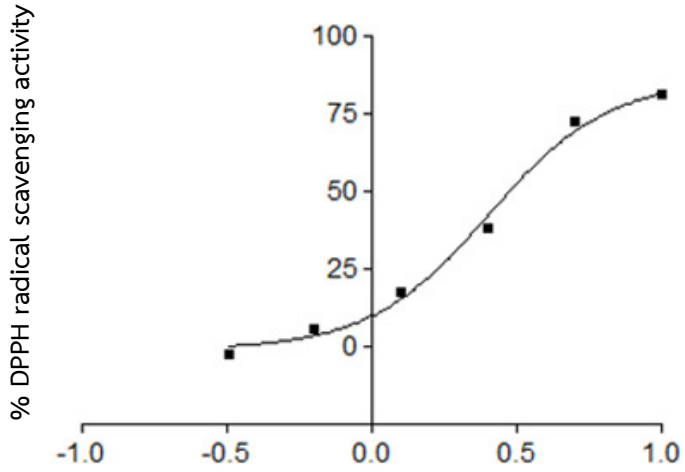
ภาพที่ ข-11 ภาพแสดงผลการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดเปลือกส้มโอที่สกัดด้วยเอทานอล 90% อุณหภูมิ 70 ℃

ตารางที่ ข-22 ผลการยับยั้งอนุมูลอิสระได้ 50% ของสารสกัดเปลือกส้มโอที่สกัดด้วยเอทานอล 90% อุณหภูมิ 70 °C ด้วยโปรแกรม Graph pad Prism 3.02

Equation 1	Repeat 1	Repeat 2	Repeat 3
Variables			
BOTTOM	31.63	30.27	31.54
TOP	93.60	94.14	93.13
LOGEC50	0.9304	0.9220	0.9443
HILLSLOPE	1.351	1.350	1.338
EC50	8.519	8.356	8.795
Std. Error			
BOTTOM	5.875	6.593	6.323
TOP	16.59	18.16	18.70
LOGEC50	0.2145	0.2286	0.2427
HILLSLOPE	0.7682	0.8254	0.8339
95% Confidence Intervals			
BOTTOM	15.32 to 47.94	11.97 to 48.58	13.98 to 49.09
TOP	47.54 to 139.7	43.74 to 144.6	41.23 to 145.0
LOGEC50	0.3348 to 1.526	0.2875 to 1.556	0.2706 to 1.618
HILLSLOPE	-0.7816 to 3.484	-0.9415 to 3.641	-0.9770 to 3.653
EC50	2.162 to 33.57	1.939 to 36.02	1.864 to 41.49
Goodness of Fit			
Degrees of Freedom	4	4	4
R?	0.9546	0.9477	0.9467
Absolute Sum of Squares	152.4	188.9	174.6
Sy.x	6.172	6.872	6.606
Data			
Number of X values	8	8	8
Number of Y replicates	3	3	3
Total number of values	8	8	8
Number of missing values	16	16	16

ตารางที่ ข-23 ค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดเปลือกส้มโอที่สกัดด้วยเอทานอล 90% อุณหภูมิ 80 ℃ ที่ความยาวคลื่น 515 nm และการหาร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ

ความเข้มข้น (mg/ml)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 515 nm			ค่าเฉลี่ย	ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน	ร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ			ค่าเฉลี่ย	ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน
	1	2	3			1	2	3		
Blank	1.012	1.005	1.009	1.009	0.004	-	-	-	-	-
0.32	1.033	1.044	1.036	1.036	0.007	-2.18	-2.38	-3.47	-2.68	0.69
0.63	0.960	0.960	0.957	0.957	0.006	5.85	4.886	4.86	5.19	0.57
1.25	0.835	0.844	0.836	0.836	0.007	17.74	17.25	16.35	17.11	0.70
2.5	0.639	0.611	0.624	0.624	0.014	38.45	36.67	39.45	38.19	1.41
5	0.263	0.286	0.283	0.283	0.018	70.37	73.94	71.66	71.99	1.81
10	0.186	0.188	0.190	0.190	0.006	80.48	81.57	81.37	81.14	0.58
20	0.173	0.172	0.171	0.171	0.003	83.45	82.85	82.95	83.09	0.32



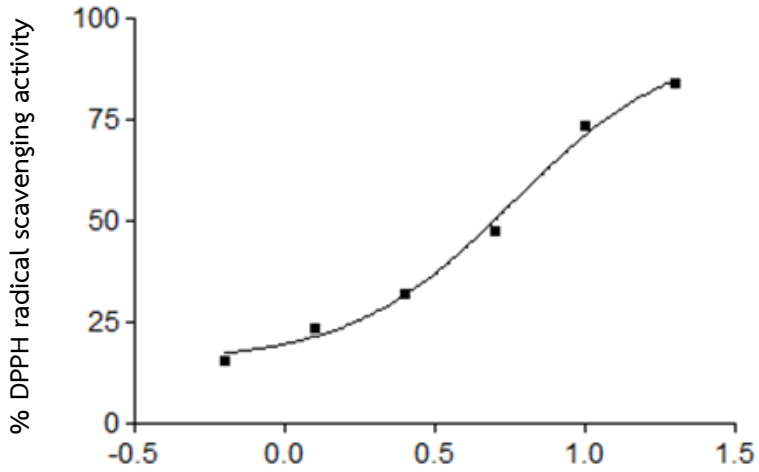
ภาพที่ ข-12 ภาพแสดงผลการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดเปลือกส้มโอที่สกัดด้วยเอทานอล 90% อุณหภูมิ 80 ℃

ตารางที่ ข-24 ผลการยับยั้งอนุมูลอิสระได้ 50% ของสารสกัดเปลือกส้มโอที่สกัดด้วยเอทานอล 90% อุณหภูมิ 80 °C ด้วยโปรแกรม Graph pad Prism 3.02

Equation 1	Repeat 1	Repeat 2	Repeat 3
Variables			
BOTTOM	-1.403	0.03365	-2.203
TOP	86.00	85.32	85.44
LOGEC50	0.4052	0.4124	0.3921
HILLSLOPE	1.964	2.297	2.089
EC50	2.542	2.585	2.467
Std. Error			
BOTTOM	3.405	4.217	3.231
TOP	3.441	4.342	3.157
LOGEC50	0.03670	0.04605	0.03396
HILLSLOPE	0.3256	0.5381	0.3348
95% Confidence Intervals			
BOTTOM	-12.24 to 9.432	-13.38 to 13.45	-12.49 to 8.079
TOP	75.05 to 96.95	71.50 to 99.13	75.40 to 95.49
LOGEC50	0.2885 to 0.5220	0.2659 to 0.5589	0.2840 to 0.5001
HILLSLOPE	0.9278 to 3.000	0.5849 to 4.009	1.024 to 3.154
EC50	1.943 to 3.327	1.845 to 3.622	1.923 to 3.163
Goodness of Fit			
Degrees of Freedom	3	3	3
R?	0.9962	0.9923	0.9964
Absolute Sum of Squares	30.03	63.72	29.80
Sy.x	3.164	4.609	3.152
Data			
Number of X values	7	7	7
Number of Y replicates	3	3	3
Total number of values	7	7	7
Number of missing values	14	14	14

ตารางที่ ข-25 ค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดเปลือกส้มโอที่สกัดด้วยเอทานอล 95% อุณหภูมิ 50 ℃ ที่ความยาวคลื่น 515 nm และการหาร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ

ความเข้มข้น (mg/ml)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 515 nm			ค่าเฉลี่ย	ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน	ร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ			ค่าเฉลี่ย	ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน
	1	2	3			1	2	3		
Blank	1.012	1.005	1.009	1.009	0.004	-	-	-	-	-
0.63	0.853	0.859	0.850	0.854	0.005	15.43	14.84	15.73	15.33	0.45
1.25	0.778	0.761	0.775	0.771	0.009	22.87	24.55	23.177	23.53	0.90
2.5	0.695	0.679	0.684	0.686	0.008	31.10	32.68	32.19	31.99	0.81
5	0.540	0.540	0.508	0.529	0.018	46.46	46.46	49.64	47.52	1.83
10	0.265	0.268	0.273	0.269	0.004	73.73	73.43	72.93	73.36	0.40
20	0.160	0.164	0.171	0.165	0.006	84.14	83.74	83.05	83.64	0.55



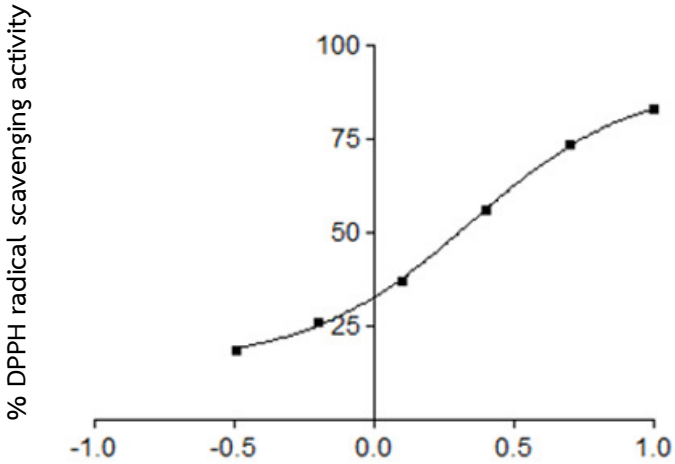
ภาพที่ ข-13 ภาพแสดงผลการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดเปลือกส้มโอ ที่สกัดด้วยเอทานอล 95% อุณหภูมิ 50 ℃

ตารางที่ ข-26 ผลการยับยั้งอนุมูลอิสระได้ 50% ของสารสกัดเปลือกส้มโอที่สกัดด้วยเอทานอล 95% อุณหภูมิ 50 °C ด้วยโปรแกรม Graph pad Prism 3.02

Equation 1	Repeat 1	Repeat 2	Repeat 3
Variables			
BOTTOM	15.99	14.38	14.75
TOP	93.14	96.82	91.87
LOGEC50	0.7697	0.7814	0.7293
HILLSLOPE	1.760	1.487	1.624
EC50	5.885	6.044	5.362
Std. Error			
BOTTOM	4.173	6.896	3.318
TOP	9.416	16.74	6.499
LOGEC50	0.07556	0.1289	0.05369
HILLSLOPE	0.5127	0.6286	0.3355
95% Confidence Intervals			
BOTTOM	-1.966 to 33.94	-15.29 to 44.06	0.4791 to 29.03
TOP	52.62 to 133.7	24.80 to 168.8	63.91 to 119.8
LOGEC50	0.4446 to 1.095	0.2268 to 1.336	0.4983 to 0.9603
HILLSLOPE	-0.4461 to 3.967	-1.218 to 4.191	0.1804 to 3.068
EC50	2.784 to 12.44	1.686 to 21.67	3.150 to 9.127
Goodness of Fit			
Degrees of Freedom	2	2	2
R?	0.9940	0.9903	0.9972
Absolute Sum of Squares	23.31	36.87	10.30
Sy.x	3.414	4.294	2.270
Data			
Number of X values	6	6	6
Number of Y replicates	3	3	3
Total number of values	6	6	6
Number of missing values	12	12	12

ตารางที่ ข-27 ค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดเปลือกส้มโอที่สกัดด้วยเอทานอล 95% อุณหภูมิ 60 ℃ ที่ความยาวคลื่น 515 nm และการหาร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ

ความเข้มข้น (mg/ml)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 515 nm			ค่าเฉลี่ย	ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน	ร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ			ค่าเฉลี่ย	ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน
	1	2	3			1	2	3		
Blank	1.012	1.005	1.009	1.009	0.004	-	-	-	-	-
0.32	0.837	0.816	0.813	0.822	0.013	17.02	19.10	19.40	18.51	1.30
0.63	0.747	0.749	0.750	0.749	0.002	25.94	25.74	25.64	25.78	0.15
1.25	0.628	0.628	0.652	0.636	0.014	37.74	37.74	35.36	36.95	1.37
2.5	0.442	0.440	0.451	0.444	0.006	56.18	56.38	55.29	55.95	0.58
5	0.264	0.268	0.278	0.270	0.007	73.83	73.43	72.44	73.33	0.71
10	0.162	0.172	0.188	0.174	0.013	83.94	82.95	81.36	82.75	1.30



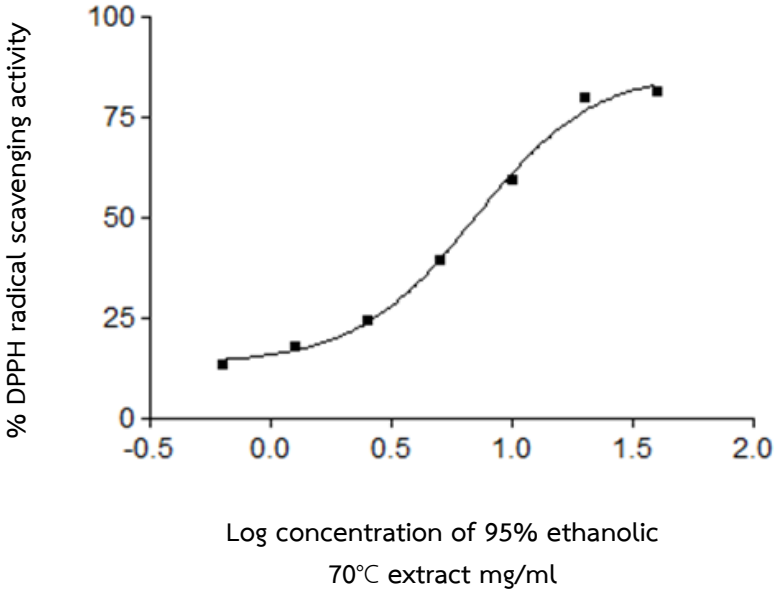
ภาพที่ ข-14 ภาพแสดงผลการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดเปลือกส้มโอที่สกัดด้วยเอทานอล 95% อุณหภูมิ 60 ℃

ตารางที่ ข-28 ผลการยับยั้งอนุมูลอิสระได้ 50% ของสารสกัดเปลือกส้มโอที่สกัดด้วยเอทานอล 95% อุณหภูมิ 60 °C ด้วยโปรแกรม Graph pad Prism 3.02

Equation 1	Repeat 1	Repeat 2	Repeat 3
Variables			
BOTTOM	11.32	15.32	17.56
TOP	94.14	89.97	86.47
LOGEC50	0.3385	0.3387	0.3527
HILLSLOPE	1.309	1.497	1.704
EC50	2.180	2.181	2.253
Std. Error			
BOTTOM	2.630	0.7193	1.482
TOP	3.639	0.9964	2.144
LOGEC50	0.02877	0.008961	0.02104
HILLSLOPE	0.1482	0.05558	0.1558
95% Confidence Intervals			
BOTTOM	0.0002952 to 22.63	12.22 to 18.41	11.18 to 23.94
TOP	78.48 to 109.8	85.69 to 94.26	77.24 to 95.70
LOGEC50	0.2147 to 0.4623	0.3002 to 0.3773	0.2622 to 0.4432
HILLSLOPE	0.6711 to 1.947	1.258 to 1.736	1.034 to 2.375
EC50	1.640 to 2.899	1.996 to 2.384	1.829 to 2.775
Goodness of Fit			
Degrees of Freedom	2	2	2
R?	0.9994	0.9999	0.9994
Absolute Sum of Squares	2.060	0.2698	1.912
Sy.x	1.015	0.3673	0.9777
Data			
Number of X values	6	6	6
Number of Y replicates	3	3	3
Total number of values	6	6	6
Number of missing values	12	12	12

ตารางที่ ข-29 ค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดเปลือกส้มโอที่สกัดด้วยเอทานอล 95% อุณหภูมิ 70 ℃ ที่ความยาวคลื่น 515 nm และการหาร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ

ความเข้มข้น (mg/ml)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 515 nm			ค่าเฉลี่ย	ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน	ร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ			ค่าเฉลี่ย	ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน
	1	2	3			1	2	3		
Blank	1.012	1.005	1.009	1.009	0.004	-	-	-	-	-
0.63	0.897	0.900	0.892	0.896	0.004	11.07	10.77	17.42	13.09	3.75
1.25	0.821	0.830	0.833	0.828	0.006	18.61	17.71	17.42	17.91	0.62
2.5	0.750	0.765	0.772	0.762	0.011	25.64	24.16	23.46	24.42	1.11
5	0.608	0.613	0.620	0.614	0.006	39.72	39.23	38.53	39.16	0.60
10	0.407	0.412	0.418	0.412	0.006	59.65	59.15	58.56	59.12	0.55
20	0.205	0.207	0.250	0.206	0.001	79.65	79.48	79.68	79.61	0.11
40	0.187	0181	0.200	0.189	0.010	81.46	82.06	80.17	81.23	0.96



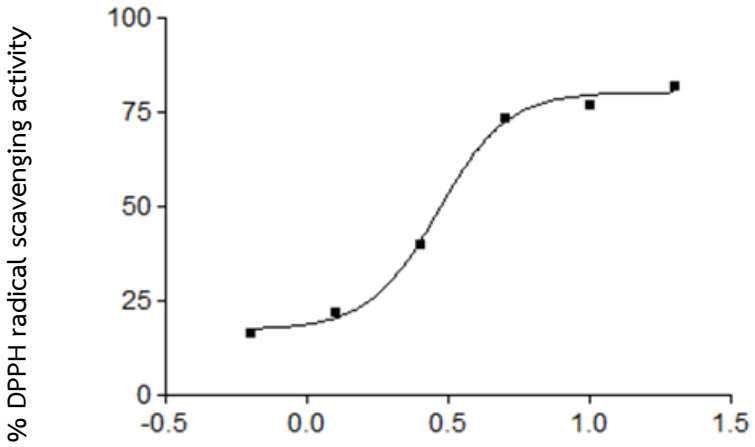
ภาพที่ ข-15 ภาพแสดงผลการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดเปลือกส้มโอที่สกัดด้วยเอทานอล 95% อุณหภูมิ 70 ℃

ตารางที่ ข-30 ผลการยับยั้งอนุมูลอิสระได้ 50% ของสารสกัดเปลือกส้มโอที่สกัดด้วยเอทานอล 95% อุณหภูมิ 70 °C ด้วยโปรแกรม Graph pad Prism 3.02

Equation 1	Repeat 1	Repeat 2	Repeat 3
Variables			
BOTTOM	11.46	11.14	16.67
TOP	87.87	88.12	83.90
LOGEC50	0.8299	0.8409	0.8659
HILLSLOPE	1.576	1.614	2.080
EC50	6.760	6.932	7.343
Std. Error			
BOTTOM	3.823	3.250	2.198
TOP	5.647	4.941	3.351
LOGEC50	0.05889	0.05071	0.03870
HILLSLOPE	0.3546	0.3151	0.3632
95% Confidence Intervals			
BOTTOM	-0.7053 to 23.62	0.7968 to 21.48	9.680 to 23.67
TOP	69.90 to 105.8	72.40 to 103.8	73.24 to 94.57
LOGEC50	0.6425 to 1.017	0.6795 to 1.002	0.7427 to 0.9890
HILLSLOPE	0.4474 to 2.704	0.6110 to 2.616	0.9248 to 3.236
EC50	4.391 to 10.41	4.781 to 10.05	5.530 to 9.750
Goodness of Fit			
Degrees of Freedom	3	3	3
R?	0.9940	0.9954	0.9956
Absolute Sum of Squares	29.93	23.76	20.36
Sy.x	3.158	2.814	2.605
Data			
Number of X values	7	7	7
Number of Y replicates	3	3	3
Total number of values	7	7	7
Number of missing values	14	14	14

ตารางที่ ข-31 ค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดเปลือกส้มโอที่สกัดด้วยเอทานอล 95% อุณหภูมิ 80 ℃ ที่ความยาวคลื่น 515 nm และการหาร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ

ความเข้มข้น (mg/ml)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 515 nm			ค่าเฉลี่ย	ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน	ร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ			ค่าเฉลี่ย	ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน
	1	2	3			1	2	3		
Blank	1.012	1.005	1.009	1.009	0.004	-	-	-	-	-
0.63	0.847	0.843	0.841	0.844	0.003	16.03	16.42	16.62	16.36	0.30
1.25	0.790	0.787	0.794	0.790	0.004	21.68	21.98	21.28	21.65	0.35
2.5	0.611	0.601	0.611	0.608	0.006	39.42	40.42	39.42	39.76	0.57
5	0.204	0.203	0.405	0.271	0.116	79.74	79.87	59.85	73.17	11.53
10	0.275	0.215	0.217	0.236	0.034	72.74	78.68	78.49	76.64	3.38
20	0.184	0.195	0.164	0.181	0.016	81.76	80.67	83.74	82.06	1.56



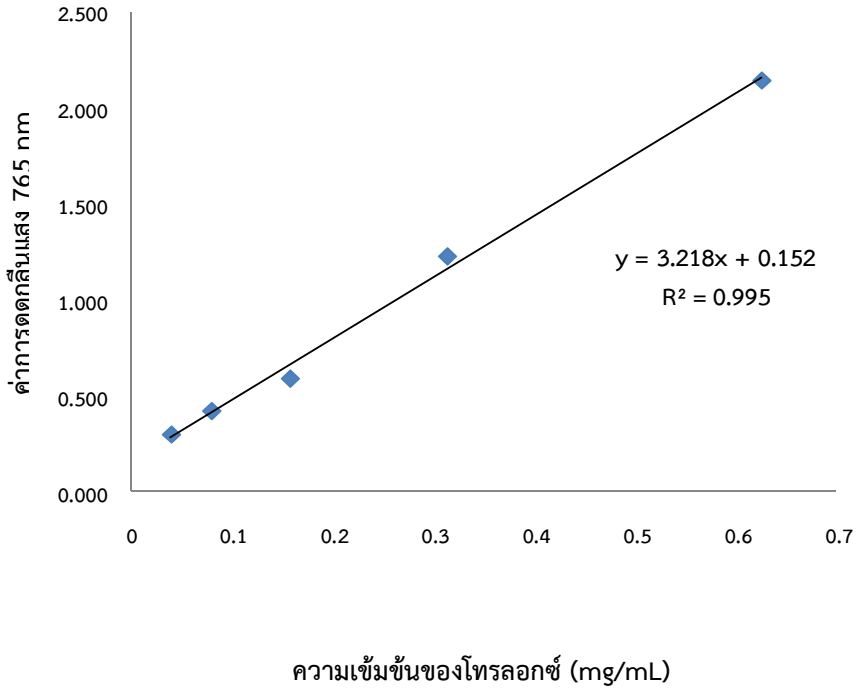
ภาพที่ ข-16 ภาพแสดงผลการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดเปลือกส้มโอที่สกัดด้วยเอทานอล 95% อุณหภูมิ 80 ℃

ตารางที่ ข-32 ผลการยับยั้งอนุมูลอิสระได้ 50% ของสารสกัดเปลือกส้มโอที่สกัดด้วยเอทานอล 95% อุณหภูมิ 80 °C ด้วยโปรแกรม Graph pad Prism 3.02

Equation 1	Repeat 1	Repeat 2	Repeat 3
Variables			
BOTTOM	18.85	19.01	13.30
TOP	78.09	80.07	87.18
LOGEC50	0.4166	0.4370	0.5573
HILLSLOPE	14.74	6.765	1.849
EC50	2.610	2.736	3.608
Std. Error			
BOTTOM	4.013	2.141	2.630
TOP	3.866	2.043	2.700
LOGEC50	2.473	0.03187	0.02877
HILLSLOPE	1881	4.953	0.2481
95% Confidence Intervals			
BOTTOM	1.586 to 36.12	9.798 to 28.22	1.985 to 24.62
TOP	61.46 to 94.73	71.28 to 88.86	75.56 to 98.80
LOGEC50	-10.22 to 11.06	0.2999 to 0.5742	0.4335 to 0.6811
HILLSLOPE	-8080 to 8110	-14.55 to 28.08	0.7812 to 2.916
EC50	5.966e-011 to 1.142e+011	1.995 to 3.751	2.713 to 4.798
Goodness of Fit			
Degrees of Freedom	2	2	2
R?	0.9863	0.9964	0.9986
Absolute Sum of Squares	60.93	16.72	5.889
Sy.x	5.520	2.891	1.716
Data			
Number of X values	6	6	6
Number of Y replicates	3	3	3
Total number of values	6	6	6
Number of missing values	12	12	12

ตารางที่ ข–33 ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐาน Trolox ที่ความยาวคลื่น 593 nm

ความเข้มข้นของ Trolox (mg/ml)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 593 nm			ค่าเฉลี่ย	ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน
	1	2	3		
0.019	0.218	0.197	0.233	0.216	0.018
0.039	0.292	0.299	0.286	0.292	0.0067
0.079	0.407	0.427	0.412	0.415	0.010
0.157	0.577	0.594	0.584	0.585	0.009
0.313	1.202	1.232	1.243	1.226	0.021
0.625	2.053	2.194	2.194	2.147	0.081
1.25	2.450	2.414	2.511	2.458	0.049
2.5	2.300	2.545	2.450	2.432	0.123



ภาพที่ ข-17 กราฟมาตรฐานสารละลายมาตรฐาน Trolox ที่ความยาวคลื่น 593 nm

ตารางที่ ข-34 ค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดเปลือกส้มโอที่สกัดด้วยเอทานอล 70% ที่ความยาวคลื่น 593 nm

สภาวะของสารสกัด	ความเข้มข้นของสารสกัดเอทานอล 70% (mg/ml)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 593 nm			ค่าเฉลี่ย	ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน
		1	2	3		
70%, 50°C	10 mg/ml	1.221	1.208	1.258	1.229	0.026
70%, 60°C	10 mg/ml	0.637	0.680	0.635	0.651	0.025
70%, 70°C	10 mg/ml	1.022	1.060	1.040	1.041	0.019
70%, 80°C	10 mg/ml	1.592	1.726	1.977	1.765	0.195

ตัวอย่างการคำนวณวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบ FRAP

1. สารสกัดเปลือกส้มโอที่สกัดด้วยเอทานอล 70% อุณหภูมิ 50 ℃

จากสมการจากกราฟเส้นตรงของ Trolox

$Y = 3.2186x + 0.1522$ ($R^2 = 0.9957$)

ค่าการดูดกกลืนแสงของสารสกัด 70%, 50°C เท่ากับ 1.221

แทน y; 1.221 $= 3.2186x + 0.1522$

$X = (1.221-0.1522)/3.2186$

$= 0.3321$

ที่ปริมาตร 1 ml สารสกัดมีปริมาณ Trolox เท่ากับ 0.3321 mg

ถ้าที่ปริมาตร 0.15 ml สารสกัดมีปริมาณ Trolox เท่ากับ 0.0498 mg

ดังนั้น สารสกัดปริมาณ 10 mg มี Trolox เท่ากับ 0.0498 mg

ถ้าสารสกัดปริมาณ 1000 mg มี Trolox เท่ากับ $(1000 \times 0.0498)/10$

$= 5.0$ mg TE/g crude extract

ตารางที่ ข-35 ค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดเปลือกส้มโอที่สกัดด้วยเอทานอล 80% ที่ความยาวคลื่น 593 nm

สภาวะของสารสกัด	ความเข้มข้นของสารสกัดเอทานอล 80% (mg/ml)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 593 nm			ค่าเฉลี่ย	ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน
		1	2	3		
80%, 50°C	10 mg/ml	1.115	1.137	1.176	1.143	0.031
80%, 60°C	10 mg/ml	0.960	0.904	0.957	0.940	0.031
80%, 70°C	10 mg/ml	0.625	0.666	0.684	0.658	0.030
80%, 80°C	10 mg/ml	1.150	1.173	1.210	1.178	0.030

ตัวอย่างการคำนวณวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบ FRAP

1. สารสกัดเปลือกส้มโอที่สกัดด้วยเอทานอล 80% อุณหภูมิ 50 ℃

จากสมการจากกราฟเส้นตรงของ Trolox

$Y = 3.2186x + 0.1522$ ($R^2 = 0.9957$)

ค่าการดูดกกลืนแสงของสารสกัด 80%, 50°C เท่ากับ 1.115

แทน y; 1.115 $= 3.2186x + 0.1522$

$X = (1.115-0.1522)/3.2186$

$= 0.2991$

ที่ปริมาตร 1 ml สารสกัดมีปริมาณ Trolox เท่ากับ 0.2991 mg

ถ้าที่ปริมาตร 0.15 ml สารสกัดมีปริมาณ Trolox เท่ากับ 0.0449 mg

ดังนั้น สารสกัดปริมาณ 10 mg มี Trolox เท่ากับ 0.0449 mg

ถ้าสารสกัดปริมาณ 1000 mg มี Trolox เท่ากับ $(1000 \times 0.0449)/10$

$= 4.5$ mg TE/g crude extract

ตารางที่ ข-36 ค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดเปลือกส้มโอที่สกัดด้วยเอทานอล 90% ที่ความยาวคลื่น 593 nm

สภาวะของสารสกัด	ความเข้มข้นของสารสกัดเอทานอล 90% (mg/ml)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 593 nm			ค่าเฉลี่ย	ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน
		1	2	3		
90%, 50°C	10 mg/ml	0.813	0.797	0.772	0.794	0.021
90%, 60°C	10 mg/ml	0.890	0.884	0.896	0.890	0.006
90%, 70°C	10 mg/ml	0.656	0.693	0.719	0.689	0.032
90%, 80°C	10 mg/ml	1.451	1.469	1.775	1.565	0.182

ตัวอย่างการคำนวณวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบ FRAP

1. สารสกัดเปลือกส้มโอที่สกัดด้วยเอทานอล 90% อุณหภูมิ 50 °C

จากสมการจากกราฟเส้นตรงของ Trolox

$Y = 3.2186x + 0.1522$ ($R^2 = 0.9957$)

ค่าการดูดกกลืนแสงของสารสกัด 90%, 50°C เท่ากับ 0.813

แทน y; 0.813 $= 3.2186x + 0.1522$

$X = (0.813-0.1522)/3.2186$

$= 0.2053$

ที่ปริมาตร 1 ml สารสกัดมีปริมาณ Trolox เท่ากับ 0.2053 mg

ถ้าที่ปริมาตร 0.15 ml สารสกัดมีปริมาณ Trolox เท่ากับ 0.0308 mg

ดังนั้น สารสกัดปริมาณ 10 mg มี Trolox เท่ากับ 0.0308 mg

ถ้าสารสกัดปริมาณ 1000 mg มี Trolox เท่ากับ $(1000 \times 0.0308)/10$

$= 3.1$ mg TE/g crude extract

ตารางที่ ข-37 ค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดเปลือกส้มโอที่สกัดด้วยเอทานอล 95% ที่ความยาวคลื่น 593 nm

สภาวะของสารสกัด	ความเข้มข้นของสารสกัดเอทานอล 95% (mg/ml)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 593 nm			ค่าเฉลี่ย	ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน
		1	2	3		
95%, 50°C	10 mg/ml	0.945	0.933	0.945	0.941	0.007
95%, 60°C	10 mg/ml	0.946	0.92	0.949	0.938	0.016
95%, 70°C	10 mg/ml	0.786	0.802	0.839	0.809	0.027
95%, 80°C	10 mg/ml	0.939	1.008	1.015	0.987	0.042

ตัวอย่างการคำนวณวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบ FRAP

1. สารสกัดเปลือกส้มโอที่สกัดด้วยเอทานอล 95% อุณหภูมิ 50 °C

จากสมการจากกราฟเส้นตรงของ Trolox

$Y = 3.2186x + 0.1522$ ($R^2 = 0.9957$)

ค่าการดูดกกลืนแสงของสารสกัด 95%, 50°C เท่ากับ 0.945

แทน y; 0.945 = 3.2186x + 0.1522

X = (0.945-0.1522)/3.2186

= 0.2463

ที่ปริมาตร 1 ml สารสกัดมีปริมาณ Trolox เท่ากับ 0.2463 mg

ถ้าที่ปริมาตร 0.15 ml สารสกัดมีปริมาณ Trolox เท่ากับ 0.0369 mg

ดังนั้น สารสกัดปริมาณ 10 mg มี Trolox เท่ากับ 0.0369 mg

ถ้าสารสกัดปริมาณ 1000 mg มี Trolox เท่ากับ (1000 × 0.0369)/10

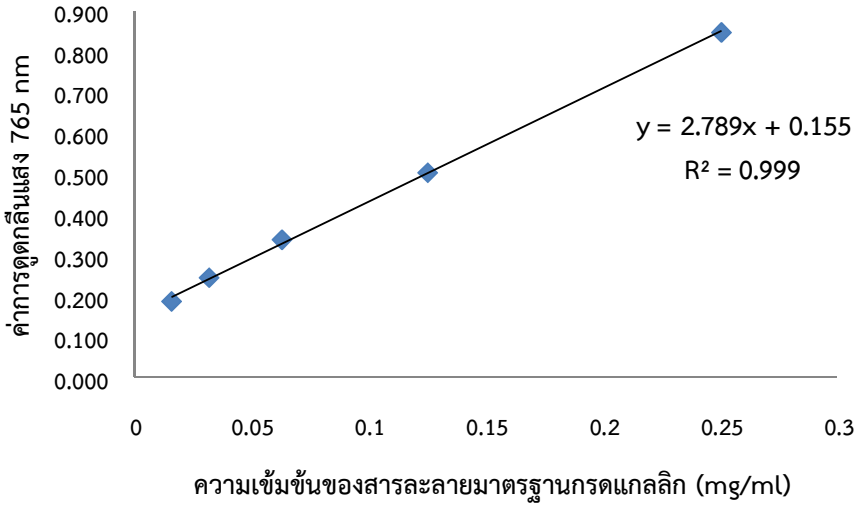
= 3.7 mg TE/g crude extract

ภาคผนวก ค

การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมและฟลาโวนอยด์รวม

ตารางที่ ค-1 ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐาน Gallic acid ที่ความยาวคลื่น 765 nm

ความเข้มข้นของ Gallic acid (mg/ml)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 nm			ค่าเฉลี่ย	ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน
	1	2	3		
0.016	0.187	0.191	0.188	0.189	0.002
0.032	0.248	0.249	0.244	0.247	0.002
0.063	0.328	0.324	0.369	0.340	0.024
0.125	0.508	0.507	0.500	0.505	0.004
0.25	0.931	0.815	0.803	0.850	0.071
0.5	1.149	1.486	1.465	1.367	0.189
1	1.878	1.706	1.873	1.819	0.098



ภาพที่ ค-1 กราฟมาตรฐานสารละลายมาตรฐาน Gallic acid ที่ความยาวคลื่น 765 nm

ตารางที่ ค-2 ค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดเปลือกส้มโอที่สกัดด้วยเอทานอล 70% ที่ความยาวคลื่น 765 nm

สภาวะของสารสกัด	ความเข้มข้นของสารสกัดเอทานอล 70 % (mg/ml)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 nm			ค่าเฉลี่ย	ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน
		1	2	3		
70%, 50°C	10 mg/ml	2.154	2.361	2.394	2.303	0.130
70%, 60°C	10 mg/ml	1.773	1.759	1.625	1.719	0.082
70%, 70°C	10 mg/ml	1.438	1.328	1.358	1.375	0.057
70%, 80°C	10 mg/ml	1.761	1.840	1.892	1.831	0.066

ตัวอย่างการคำนวณวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม

1. สารสกัดเปลือกส้มโอที่สกัดด้วยเอทานอล 70% อุณหภูมิ 50 °C

จากสมการจากกราฟเส้นตรงของ Gallic acid

$Y = 2.7897x + 0.155$ ($R^2 = 0.9992$)

ค่าการดูดกกลืนแสงของสารสกัด 70%, 50°C เท่ากับ 2.154

แทน y; 2.154 = 2.7897x + 0.155

X = (2.154-0.155)/2.7897

= 0.7166

ที่ปริมาตร 1 ml สารสกัดมีปริมาณ Gallic acid เท่ากับ 0.7166 mg

ถ้าที่ปริมาตร 0.15 ml สารสกัดมีปริมาณ Gallic acid เท่ากับ 0.1075 mg

ดังนั้น สารสกัดปริมาณ 10 mg มี Gallic acid เท่ากับ 0.1075 mg

ถ้าสารสกัดปริมาณ 1000 mg มี Gallic acid เท่ากับ (1000 × 0.1075)/10

= 10.8 mg GAE/g crude extract

ตารางที่ ค-3 ค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดเปลือกส้มโอที่สกัดด้วยเอทานอล 80% ที่ความยาวคลื่น 765 nm

สภาวะของสารสกัด	ความเข้มข้นของสารสกัดเอทานอล 80% (mg/ml)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 nm			ค่าเฉลี่ย	ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน
		1	2	3		
80%, 50°C	10 mg/ml	1.094	1.183	1.106	1.128	0.048
80%, 60°C	10 mg/ml	1.126	1.139	1.129	1.131	0.007
80%, 70°C	10 mg/ml	0.733	0.755	0.752	0.747	0.012
80%, 80°C	10 mg/ml	0.947	0.972	0.990	0.970	0.021

ตัวอย่างการคำนวณวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม

1. สารสกัดเปลือกส้มโอที่สกัดด้วยเอทานอล 80% อุณหภูมิ 50 °C

จากสมการจากกราฟเส้นตรงของ Gallic acid

$Y = 2.7897x + 0.155$ ($R^2 = 0.9992$)

ค่าการดูดกกลืนแสงของสารสกัด 80%, 50°C เท่ากับ 1.094

แทน y; 1.094 $= 2.7897x + 0.155$

$X = (1.094-0.155)/2.7897$

$= 0.3366$

ที่ปริมาตร 1 ml สารสกัดมีปริมาณ Gallic acid เท่ากับ 0.3366 mg

ถ้าที่ปริมาตร 0.15 ml สารสกัดมีปริมาณ Gallic acid เท่ากับ 0.0505 mg

ดังนั้น สารสกัดปริมาณ 10 mg มี Gallic acid เท่ากับ 0.0505 mg

ถ้าสารสกัดปริมาณ 1000 mg มี Gallic acid เท่ากับ $(1000 \times 0.0505)/10$

= 5.1 mg GAE/g crude extract

ตารางที่ ค-4 ค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดเปลือกส้มโอที่สกัดด้วยเอทานอล 90% ที่ความยาวคลื่น 765 nm

สภาวะของสารสกัด	ความเข้มข้นของสารสกัดเอทานอล 90% (mg/ml)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 nm			ค่าเฉลี่ย	ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน
		1	2	3		
90%, 50°C	10 mg/ml	0.533	0.544	0.515	0.531	0.015
90%, 60°C	10 mg/ml	0.706	0.714	0.713	0.711	0.004
90%, 70°C	10 mg/ml	0.582	0.583	0.619	0.595	0.021
90%, 80°C	10 mg/ml	1.020	1.022	1.028	1.023	0.004

ตัวอย่างการคำนวณวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม

1. สารสกัดเปลือกส้มโอที่สกัดด้วยเอทานอล 90% อุณหภูมิ 50 °C

จากสมการจากกราฟเส้นตรงของ Gallic acid

$Y = 2.7897x + 0.155$ ($R^2 = 0.9992$)

ค่าการดูดกกลืนแสงของสารสกัด 90%, 50°C เท่ากับ 0.533

แทน y; 0.533 = 2.7897x + 0.155

X = (0.533-0.155)/2.7897

= 0.1355

ที่ปริมาตร 1 ml สารสกัดมีปริมาณ Gallic acid เท่ากับ 0.1355 mg

ถ้าที่ปริมาตร 0.15 ml สารสกัดมีปริมาณ Gallic acid เท่ากับ 0.0203 mg

ดังนั้น สารสกัดปริมาณ 10 mg มี Gallic acid เท่ากับ 0.0203 mg

ถ้าสารสกัดปริมาณ 1000 mg มี Gallic acid เท่ากับ (1000 × 0.0203)/10

= 2.0 mg GAE/g crude extract

ตารางที่ ค-5 ค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดเปลือกส้มโอที่สกัดด้วยเอทานอล 95% ที่ความยาวคลื่น 765 nm

สภาวะของสารสกัด	ความเข้มข้นของสารสกัดเอทานอล 95 % (mg/ml)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 nm			ค่าเฉลี่ย	ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน
		1	2	3		
95%, 50°C	10 mg/ml	0.814	0.762	0.747	0.774	0.029
95%, 60°C	10 mg/ml	0.705	0.718	0.714	0.712	0.005
95%, 70°C	10 mg/ml	0.657	0.684	0.676	0.672	0.011
95%, 80°C	10 mg/ml	0.759	0.746	0.733	0.746	0.011

ตัวอย่างการคำนวณวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม

1. สารสกัดเปลือกส้มโอที่สกัดด้วยเอทานอล 95% อุณหภูมิ 50 °C

จากสมการจากกราฟเส้นตรงของ Gallic acid

$Y = 2.7897x + 0.155$ ($R^2 = 0.9992$)

ค่าการดูดกกลืนแสงของสารสกัด 95%, 50°C เท่ากับ 0.814

แทน y; 0.814 $= 2.7897x + 0.155$

$X = (0.814-0.155)/2.7897$

$= 0.2362$

ที่ปริมาตร 1 ml สารสกัดมีปริมาณ Gallic acid เท่ากับ 0.2362 mg

ถ้าที่ปริมาตร 0.15 ml สารสกัดมีปริมาณ Gallic acid เท่ากับ 0.0354 mg

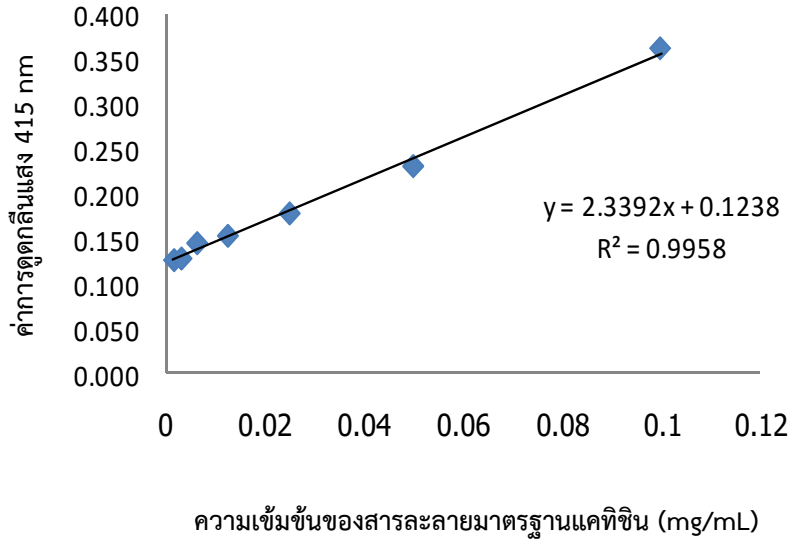
ดังนั้น สารสกัดปริมาณ 10 mg มี Gallic acid เท่ากับ 0.0354 mg

ถ้าสารสกัดปริมาณ 1000 mg มี Gallic acid เท่ากับ $(1000 \times 0.0354)/10$

$= 3.5$ mg GAE/g crude extract

ตารางที่ ค–6 ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐาน Catechin ที่ความยาวคลื่น 415 nm

ความเข้มข้นของ Catechin (mg/ml)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 415 nm			ค่าเฉลี่ย	ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน
	1	2	3		
0.0008	0.116	0.103	0.096	0.105	0.010
0.0016	0.129	0.126	0.127	0.127	0.0016
0.0031	0.139	0.131	0.118	0.129	0.011
0.0063	0.161	0.125	0.153	0.146	0.019
0.0125	0.169	0.135	0.159	0.154	0.017
0.025	0.186	0.178	0.174	0.179	0.006
0.05	0.232	0.220	0.243	0.232	0.012
0.1	0.360	0.364	0.363	0.362	0.002



ภาพที่ ค-2 กราฟมาตรฐานสารละลายมาตรฐาน Catechin ที่ความยาวคลื่น 415 nm

ตารางที่ ค-7 ค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดเปลือกส้มโอที่สกัดด้วยเอทานอล 70% ที่ความยาวคลื่น 415 nm

สภาวะของสารสกัด	ความเข้มข้นของสารสกัดเอทานอล 70% (mg/ml)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 415 nm			ค่าเฉลี่ย	ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน
		1	2	3		
70%, 50°C	10 mg/ml	1.382	1.408	1.386	1.392	0.014
70%, 60°C	10 mg/ml	0.543	0.543	0.555	0.547	0.007
70%, 70°C	10 mg/ml	1.203	1.218	1.191	1.204	0.013
70%, 80°C	10 mg/ml	1.112	1.133	1.214	1.153	0.054

ตัวอย่างการคำนวณวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์รวม

1. สารสกัดเปลือกส้มโอที่สกัดด้วยเอทานอล 70% อุณหภูมิ 50 ℃

จากสมการจากกราฟเส้นตรงของ Catechin

$Y = 2.3392x + 0.1238$ ($R^2 = 0.9958$)

ค่าการดูดกกลืนแสงของสารสกัด 70%, 50°C เท่ากับ 1.382

แทน y; 1.382 = 2.3392x + 0.1238

X = (1.382-0.1238)/2.3392

= 0.5353

ที่ปริมาตร 1 ml สารสกัดมีปริมาณ Catechin เท่ากับ 0.5353 mg

ถ้าที่ปริมาตร 0.2 ml สารสกัดมีปริมาณ Catechin เท่ากับ 0.1071 mg

ดังนั้น สารสกัดปริมาณ 10 mg มี Catechin เท่ากับ 0.1071 mg

ถ้าสารสกัดปริมาณ 1000 mg มี Catechin เท่ากับ (1000 × 0.1071)/10

= 10.7 mg GAE/g crude extract

ตารางที่ ค-8 ค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดเปลือกส้มโอที่สกัดด้วยเอทานอล 80% ที่ความยาวคลื่น 415 nm

สภาวะของสารสกัด	ความเข้มข้นของสารสกัดเอทานอล 80% (mg/ml)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 415 nm			ค่าเฉลี่ย	ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน
		1	2	3		
80%, 50°C	10 mg/ml	1.015	1.025	1.035	1.025	0.010
80%, 60°C	10 mg/ml	0.818	0.823	0.813	0.818	0.005
80%, 70°C	10 mg/ml	0.995	1.010	0.958	0.988	0.027
80%, 80°C	10 mg/ml	0.637	0.674	0.635	0.649	0.022

ตัวอย่างการคำนวณวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์รวม

1. สารสกัดเปลือกส้มโอที่สกัดด้วยเอทานอล 80% อุณหภูมิ 50 °C

จากสมการจากกราฟเส้นตรงของ Catechin

$Y = 2.3392x + 0.1238$ ($R^2 = 0.9958$)

ค่าการดูดกกลืนแสงของสารสกัด 80%, 50°C เท่ากับ 1.015

แทน y; 1.015 $= 2.3392x + 0.1238$

$X = (1.015-0.1238)/2.3392$

$= 0.3784$

ที่ปริมาตร 1 ml สารสกัดมีปริมาณ Catechin เท่ากับ 0.3784 mg

ถ้าที่ปริมาตร 0.2 ml สารสกัดมีปริมาณ Catechin เท่ากับ 0.0757 mg

ดังนั้น สารสกัดปริมาณ 10 mg มี Catechin เท่ากับ 0.0757 mg

ถ้าสารสกัดปริมาณ 1000 mg มี Catechin เท่ากับ $(1000 \times 0.0757)/10$

$= 7.6$ mg GAE/g crude extract

ตารางที่ ค-9 ค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดเปลือกส้มโอที่สกัดด้วยเอทานอล 90% ที่ความยาวคลื่น 415 nm

สภาวะของสารสกัด	ความเข้มข้นของสารสกัดเอทานอล 90% (mg/ml)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 415 nm			ค่าเฉลี่ย	ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน
		1	2	3		
90%, 50°C	10 mg/ml	0.651	0.671	0.710	0.677	0.030
90%, 60°C	10 mg/ml	0.820	0.844	0.845	0.836	0.014
90%, 70°C	10 mg/ml	0.727	0.756	0.762	0.748	0.019
90%, 80°C	10 mg/ml	1.109	1.139	1.226	1.158	0.061

ตัวอย่างการคำนวณวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์รวม

1. สารสกัดเปลือกส้มโอที่สกัดด้วยเอทานอล 90% อุณหภูมิ 50 °C

จากสมการจากกราฟเส้นตรงของ Catechin

$Y = 2.3392x + 0.1238$ ($R^2 = 0.9958$)

ค่าการดูดกกลืนแสงของสารสกัด 90%, 50°C เท่ากับ 0.651

แทน y; 0.651 = 2.3392x + 0.1238

X = (0.651-0.1238)/2.3392

= 0.2228

ที่ปริมาตร 1 ml สารสกัดมีปริมาณ Catechin เท่ากับ 0.2228 mg

ถ้าที่ปริมาตร 0.2 ml สารสกัดมีปริมาณ Catechin เท่ากับ 0.0446mg

ดังนั้น สารสกัดปริมาณ 10 mg มี Catechin เท่ากับ 0.0446 mg

ถ้าสารสกัดปริมาณ 1000 mg มี Catechin เท่ากับ (1000 × 0.0446)/10

= 4.5 mg GAE/g crude extract

ตารางที่ ค-10 ค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดเปลือกส้มโอที่สกัดด้วยเอทานอล 95% ที่ความยาวคลื่น 415 nm

สภาวะของสารสกัด	ความเข้มข้นของสารสกัดเอทานอล 95% (mg/ml)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 415 nm			ค่าเฉลี่ย	ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน
		1	2	3		
95%,50°C	10 mg/ml	0.739	0.767	0.741	0.749	0.007
95%,60°C	10 mg/ml	0.708	0.739	0.707	0.718	0.008
95%,70°C	10 mg/ml	0.834	0.828	0.829	0.830	0.001
95%,80°C	10 mg/ml	0.876	0.903	0.903	0.894	0.007

ตัวอย่างการคำนวณวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์รวม

1. สารสกัดเปลือกส้มโอที่สกัดด้วยเอทานอล 95% อุณหภูมิ 50 °C

จากสมการจากกราฟเส้นตรงของ Catechin

$Y = 2.3392x + 0.1238$ ($R^2 = 0.9958$)

ค่าการดูดกกลืนแสงของสารสกัด 95%, 50°C เท่ากับ 0.739

แทน y; 0.739 $= 2.3392x + 0.1238$

$X = (0.739-0.1238)/2.3392$

$= 0.2604$

ที่ปริมาตร 1 ml สารสกัดมีปริมาณ Catechin เท่ากับ 0.2604 mg

ถ้าที่ปริมาตร 0.2 ml สารสกัดมีปริมาณ Catechin เท่ากับ 0.0521 mg

ดังนั้น สารสกัดปริมาณ 10 mg มี Catechin เท่ากับ 0.0521 mg

ถ้าสารสกัดปริมาณ 1000 mg มี Catechin เท่ากับ $(1000 \times 0.0521)/10$

= 5.2 mg GAE/g crude extract

ภาคผนวก ง

ผลการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ตารางที่ ง-1 วิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) ของค่า EC_{50} ที่สัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายเอทานอลและอุณหภูมิการบ่มที่ภาวะต่าง ๆ ในเปลือกส้มโอพันธุ์ขาวน้ำผึ้ง

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean square	F	Sig.
Corrected Model	164.190	15	10.946	118.174	0.000
Intercept	923.700	1	923.700	9972.328	0.000
Conc	5.894	3	1.965	21.210	0.000
Temp	94.291	3	31.430	339.325	0.000
Conc*Temp	64.005	9	7.112	76.777	0.000
Error	2.964	32	0.093		
Total	1090.854	48			
Corrected Total	167.154	47			

R Squared = 0.982 (Adjusted R Squared = 0.974), Significant at 0.05

ตารางที่ ง-2 วิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) ของค่า FRAP value ที่สัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายเอทานอลและอุณหภูมิการบ่มที่ภาวะต่าง ๆ ในเปลือกส้มโอพันธุ์ขาวน้ำผึ้ง

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean square	F	Sig.
Corrected Model	167.551	15	11.170	56.981	0.000
Intercept	1375.807	1	1375.807	7018.228	0.000
Conc	16.581	3	5.527	28.194	0.000
Temp	93.106	3	31.035	158.317	0.000
Conc*Temp	57.864	9	6.429	32.797	0.000
Error	6.273	32	0.196		
Total	1549.631	48			
Corrected Total	173.824	47			

R Squared = 0.964 (Adjusted R Squared = 0.947), Significant at 0.05

ตารางที่ ง-3 วิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) ของปริมาณฟลาโวนอยด์รวมที่สัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายเอทานอลและอุณหภูมิการบ่มที่ภาวะต่าง ๆ ในเปลือกส้มโอพันธุ์ขาวน้ำผึ้ง

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean square	F	Sig.
Corrected Model	179.889	15	11.993	246.989	0.000
Intercept	2109.441	1	2109.441	43444.224	0.000
Conc	38.291	3	12.764	262.871	0.000
Temp	33.765	3	11.255	231.798	0.000
Conc*Temp	107.833	9	11.981	246.759	0.000
Error	1.554	32	0.049		
Total	2290.884	48			
Corrected Total	181.443	47			

R Squared = 0.991 (Adjusted R Squared = 0.987), Significant at 0.05

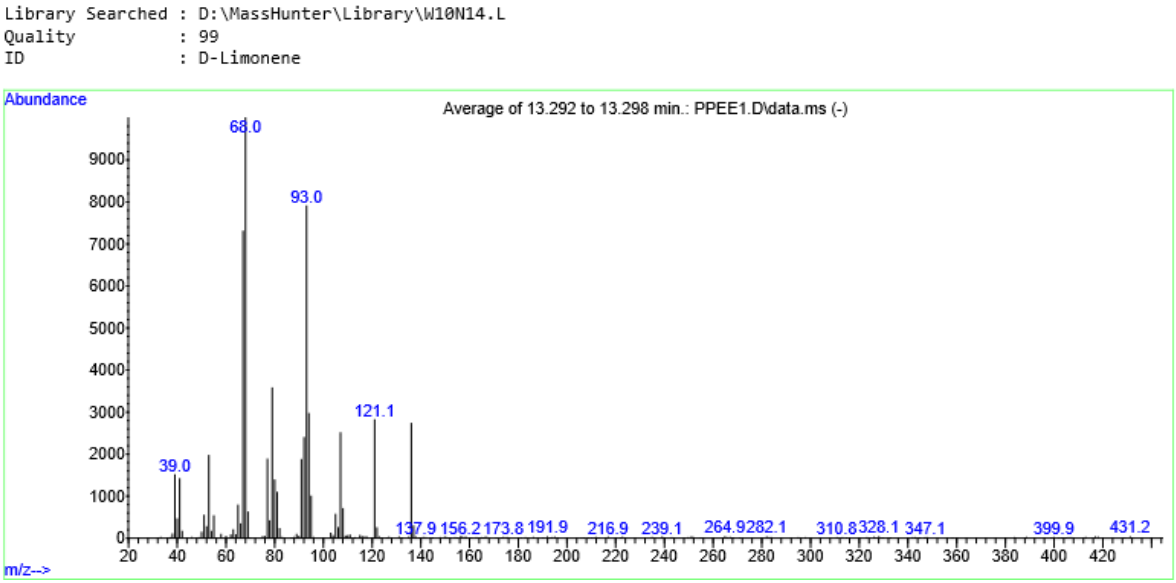
ตารางที่ ง-4 วิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) ของปริมาณฟีนอลิกรวมที่สัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายเอทานอลและอุณหภูมิการบ่มที่ภาวะต่าง ๆ ในเปลือกส้มโอพันธุ์ขาวน้ำผึ้ง

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean square	F	Sig.
Corrected Model	594.808	15	39.654	322.367	0.000
Intercept	2022.024	1	2022.024	16438.109	0.000
Conc	488.477	3	162.826	1323.697	0.000
Temp	41.690	3	13.897	112.974	0.000
Conc*Temp	64.641	9	7.182	58.389	0.000
Error	3.936	32	0.123		
Total	2620.769	48			
Corrected Total	598.744	47			

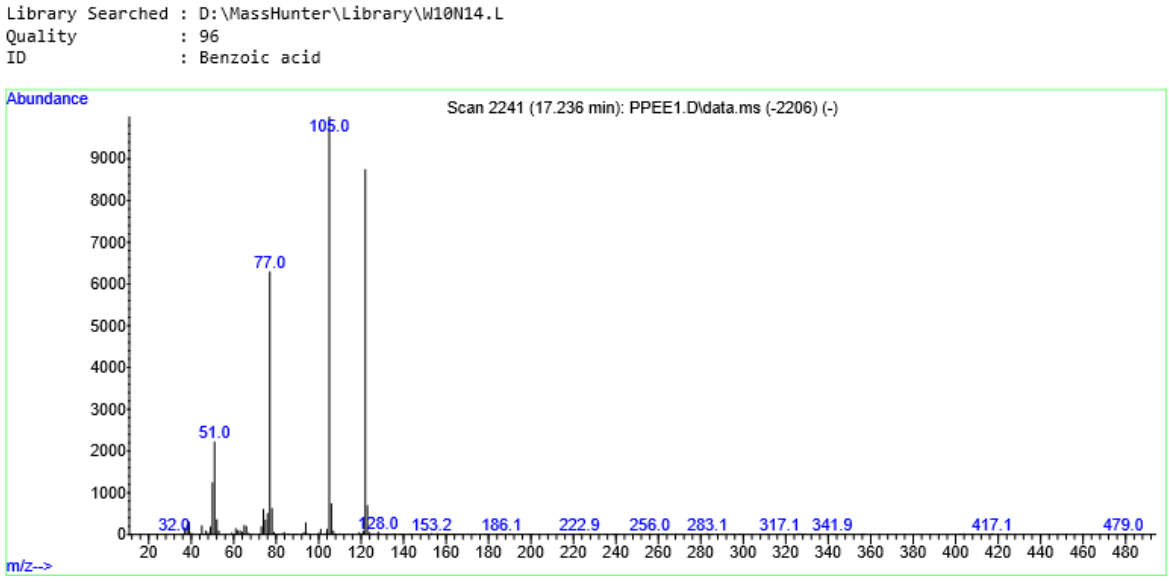
R Squared = 0.993 (Adjusted R Squared = 0.990), Significant at 0.05

ภาคผนวก จ

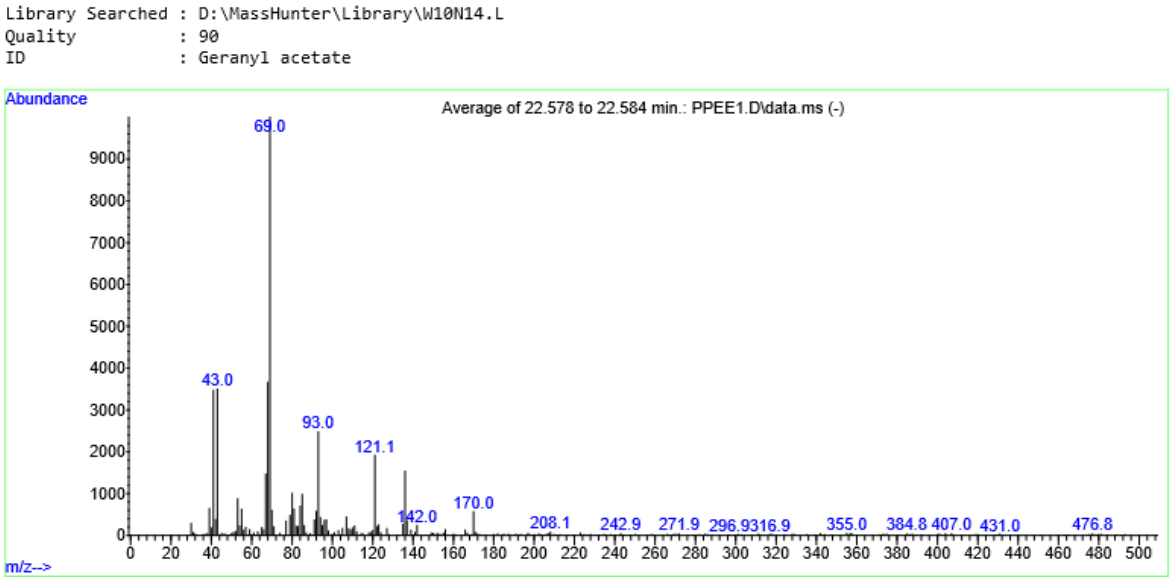
ผลโครมาโทแกรมของการวิเคราะห์องค์ประกอบของสารระเหยโดยวิธี GC-MS Profile



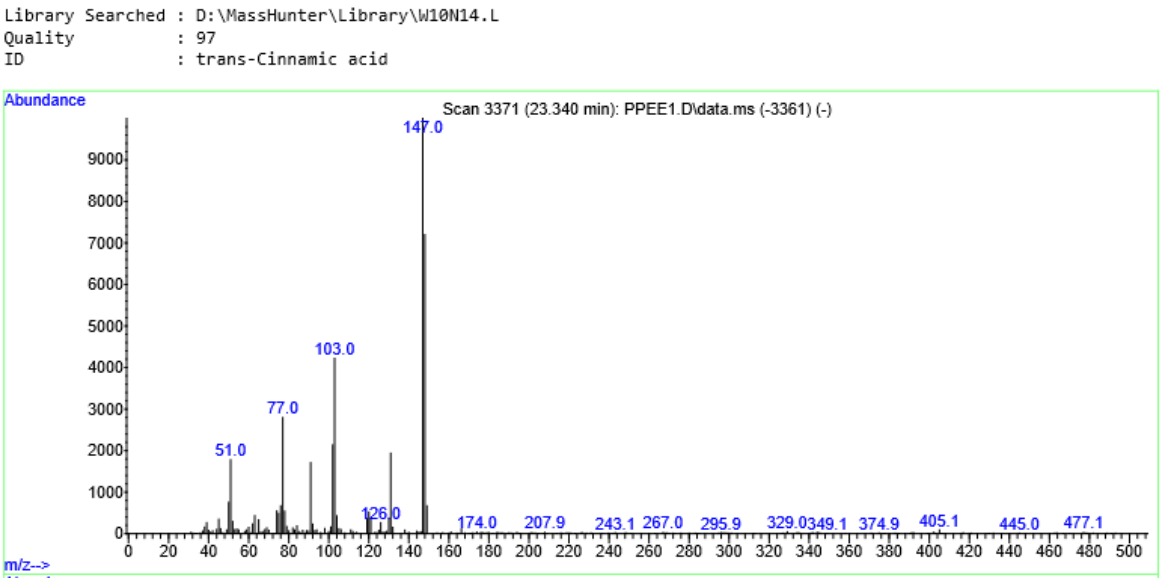
ภาพที่ จ-1 โครมาโทแกรมองค์ประกอบสารระเหย D-Limonene ของความเข้มข้นสารละลายเอทานอล 90% (w/v) และอุณหภูมิการบ่ม 80 ℃



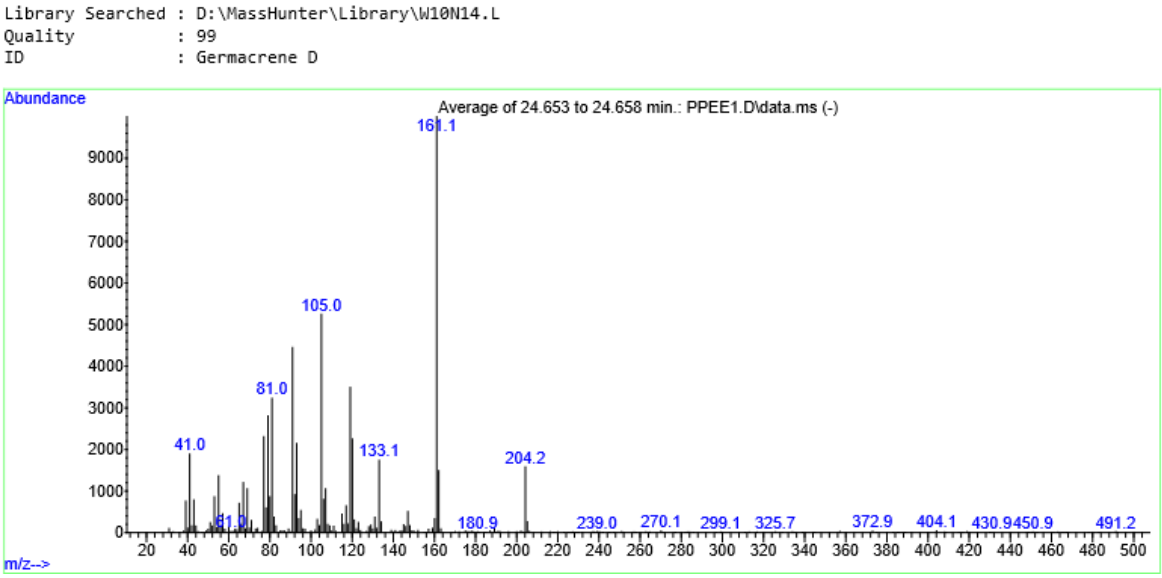
ภาพที่ จ-2 โครมาโทแกรมองค์ประกอบสารระเหย Benzoic acid ของความเข้มข้นสารละลายเอทานอล 90% (w/v) และอุณหภูมิการบ่ม 80 ℃



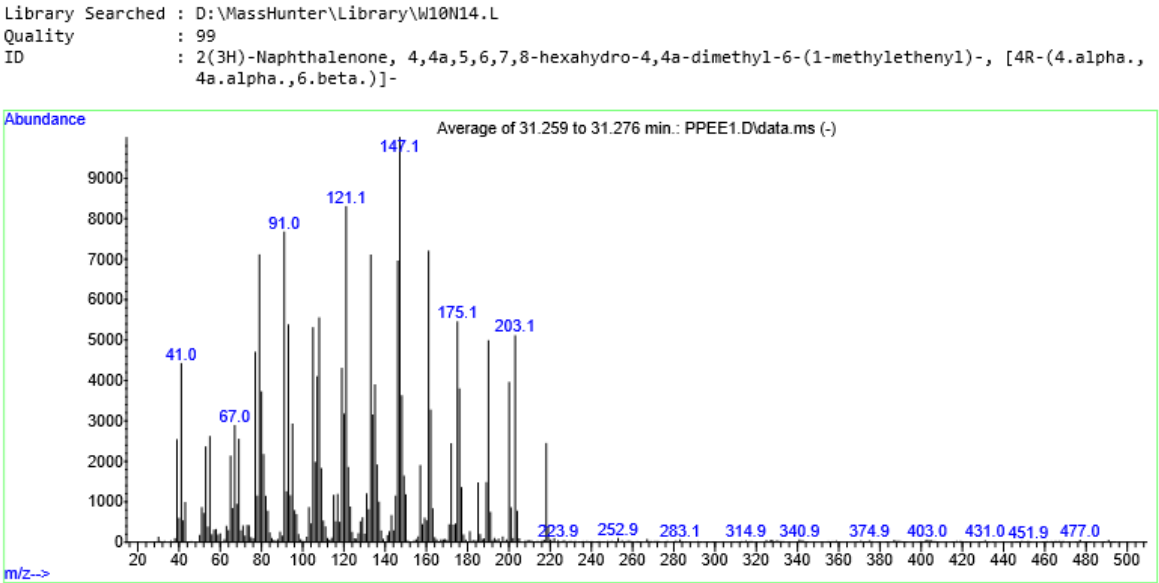
ภาพที่ จ-3 โครมาโทแกรมองค์ประกอบสารระเหย Geranyl acetate ของความเข้มข้นสารละลายเอทานอล 90% (w/v) และอุณหภูมิการบ่ม 80 ℃



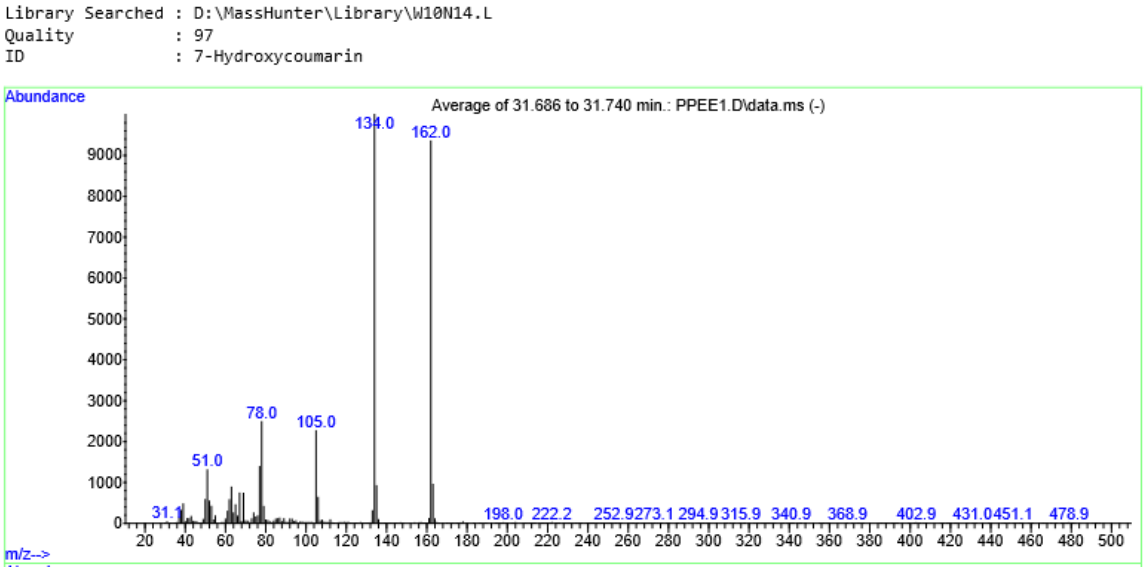
ภาพที่ จ-4 โครมาโทแกรมองค์ประกอบสารระเหย Trans-Cinnamic acid ของความเข้มข้นสารละลายเอทานอล 90% (w/v) และอุณหภูมิการบ่ม 80 ℃



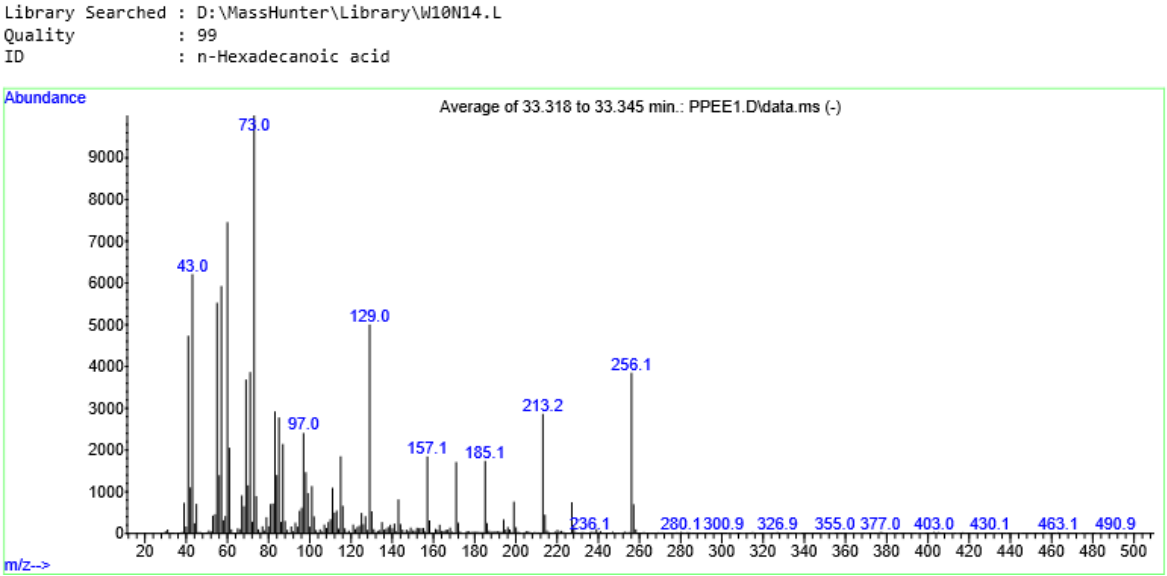
ภาพที่ จ-5 โครมาโทแกรมองค์ประกอบสารระเหย Germacrene D ของความเข้มข้นสารละลายเอทานอล 90% (w/v) และอุณหภูมิการบ่ม 80 ℃



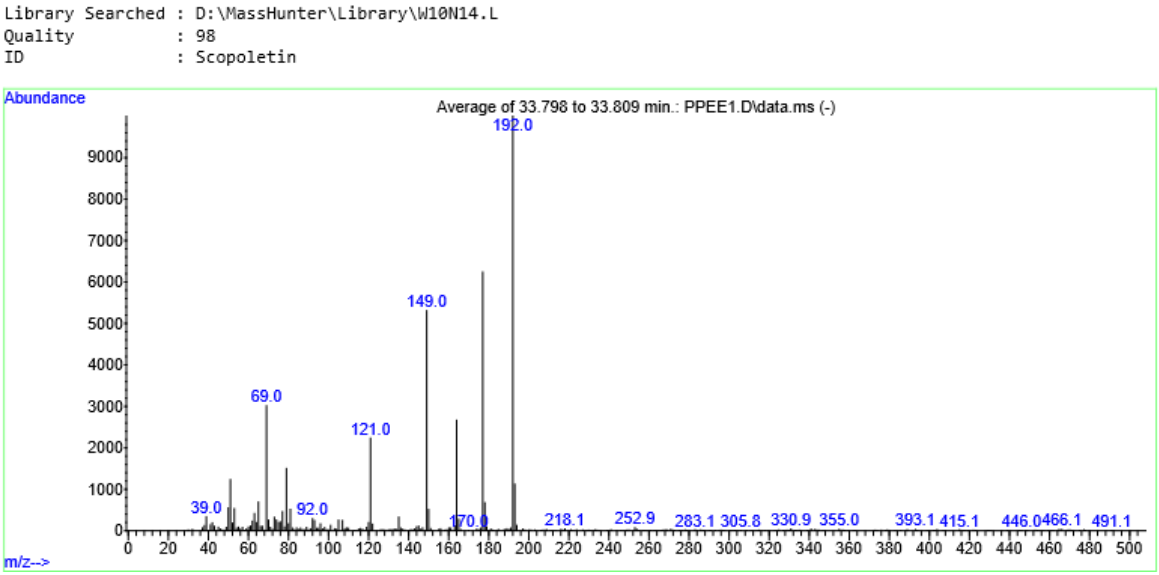
ภาพที่ จ-6 โครมาโทแกรมองค์ประกอบสารระเหย NOOTKATONE ของความเข้มข้นสารละลายเอทานอล 90% (w/v) และอุณหภูมิการบ่ม 80 ℃



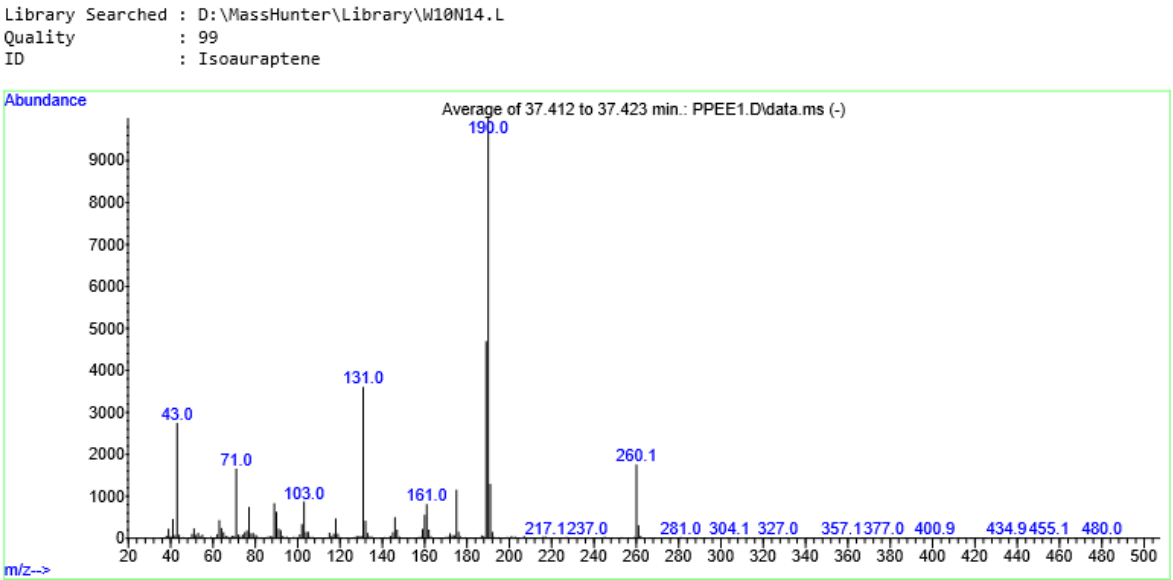
ภาพที่ จ-7 โครมาโทแกรมองค์ประกอบสารระเหย 7-Hydroxycoumarin ของความเข้มข้นสารละลายเอทานอล 90% (w/v) และอุณหภูมิการบ่ม 80 ℃



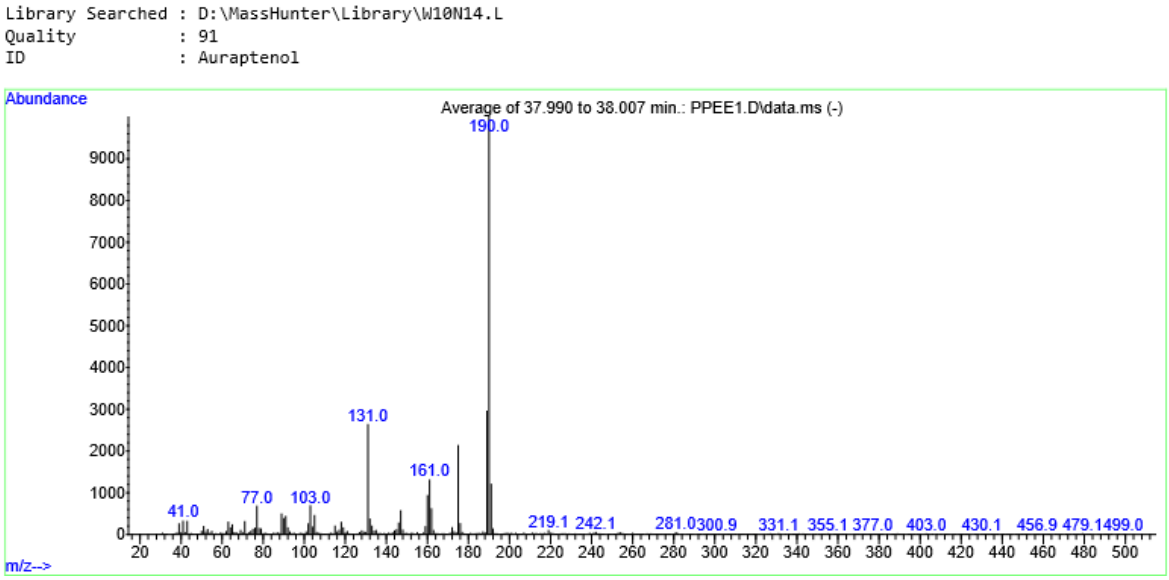
ภาพที่ จ-8 โครมาโทแกรมองค์ประกอบสารระเหย n-Hexadecanoic acid ของความเข้มข้นสารละลายเอทานอล 90% (w/v) และอุณหภูมิการบ่ม 80 ℃



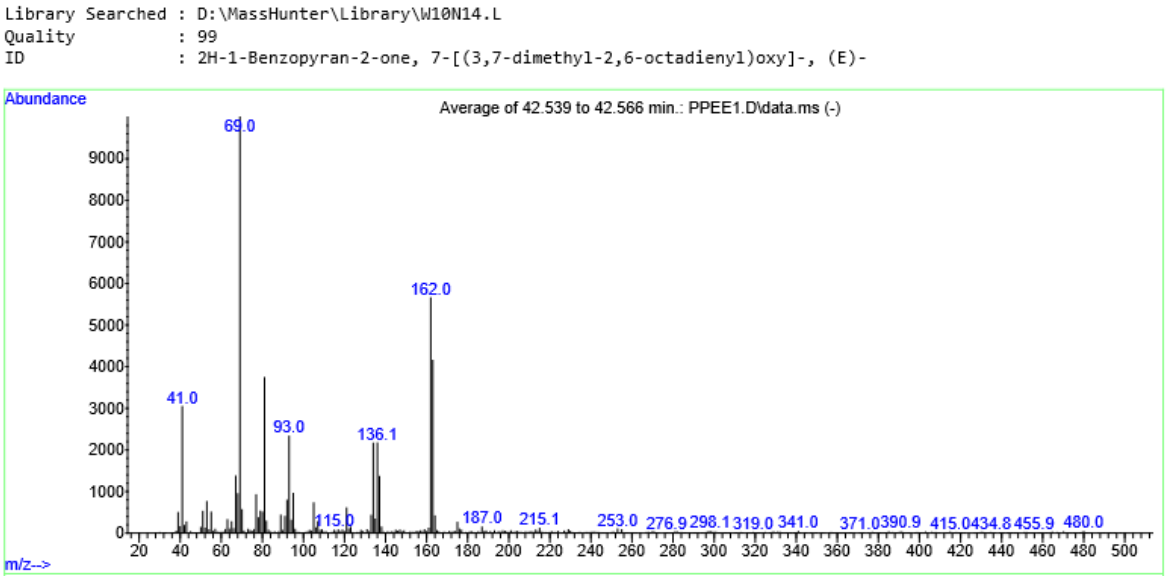
ภาพที่ จ-9 โครมาโทแกรมองค์ประกอบสารระเหย Scopoletin ของความเข้มข้นสารละลายเอทานอล 90% (w/v) และอุณหภูมิการบ่ม 80 ℃



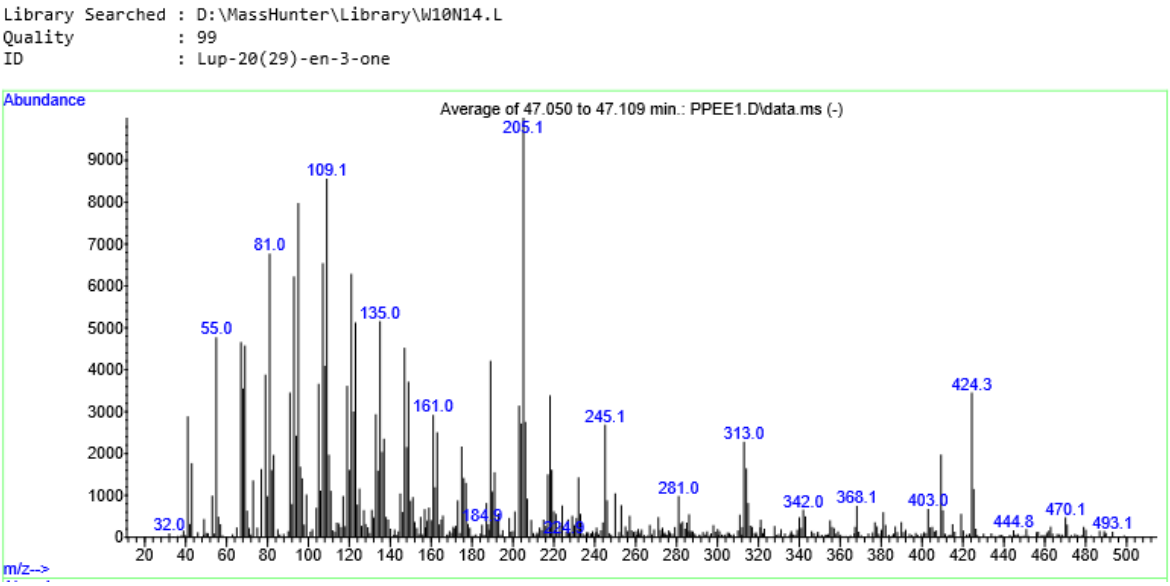
ภาพที่ จ-10 โครมาโทแกรมองค์ประกอบสารระเหย Isoauraptene ของความเข้มข้นสารละลายเอทานอล 90% (w/v) และอุณหภูมิการบ่ม 80 ℃



ภาพที่ จ-11 โครมาโทแกรมองค์ประกอบสารระเหย Auraptenol ของความเข้มข้นสารละลายเอทานอล 90% (w/v) และอุณหภูมิการบ่ม 80 ℃



ภาพที่ จ-12 โครมาโทแกรมองค์ประกอบสารระเหย Auraptene ของความเข้มข้นสารละลายเอทานอล 90% (w/v) และอุณหภูมิการบ่ม 80 ℃



ภาพที่ จ-13 โครมาโทแกรมองค์ประกอบสารระเหย Lup-20(29)-en-3-one ของความเข้มข้นสารละลายเอทานอล 90% (w/v) และอุณหภูมิการบ่ม 80 ℃

ประวัติผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการวิจัย

ชื่อ – นามสกุล	นางสาวจิตรวดี ตั้งหิรัญรัตน์
วันเดือนปีเกิด	19 มกราคม พ.ศ. 2529
วุฒิการศึกษา	ปีการศึกษา 2550: วิทยาศาสตรบัณฑิต (สาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร) มหาวิทยาลัยราชภัฏสวนดุสิต ปีการศึกษา พ.ศ. 2558: วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ) จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ตำแหน่ง	เจ้าหน้าที่
ทุนวิจัย	ปีงบประมาณ 2561: ทุนสนับสนุนการวิจัย มหาวิทยาลัยสวนดุสิต

ผลงานวิจัย

Tanghiranrat, J. and Anprung, P. (2015). Effect of dry heating temperature and time on radical scavenging activities and bioactive compounds in black rice varieties (*Oryza sativa* L. indica). *Journal of Food Science and Agricultural Technology*.1(1): 73-78.

จิตรวดี ตั้งหิรัญรัตน์. (2558). *การผลิตเครื่องดื่มคล้ายกาแฟจากข้าวเหนียวดำพันธุ์ดอยมูเซอ Oryza sativa L. 'Doi Muser' โดยใช้แอลฟา-อะไมเลส.* วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิตสาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ขวัญจิต อิสระสุข กัลยาภรณ์ จันตรี จิตรวดี ตั้งหิรัญรัตน์ สุปรียา บริบูรณ์ สรัญธร โกศลพงษ์ และโชติรส กิจสมชีพ. (2559). *การพัฒนาตำรับอิมัลชันเชิงซ้อนชนิดน้ำในน้ำมันในน้ำ กักเก็บสารสกัดกระเจี๊ยบแดง*. โครงงานวิจัยวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิทยาศาสตร์เครื่องสำอาง คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยสวนดุสิต.

ขวัญจิต อิสระสุข กัลยาภรณ์ จันตรี จิตรวดี ตั้งหิรัญรัตน์ หทัยภัทร บุดดางาม แขสุดา วิทยาสิงห์ และเพ็ญนิภา ปานคำ. (2560). *การสกัดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพและกิจกรรมการต้านเชื้อจุลินทรีย์จากเปลือกส้มโอเพื่อใช้ในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง*. โครงงานวิจัยวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิทยาศาสตร์เครื่องสำอาง คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยสวนดุสิต.

ผู้ร่วมวิจัย 1

ชื่อ - นามสกุล	นางสาวนิสุฎา อิ่มเสถียร
วันเดือนปีเกิด	27 สิงหาคม พ.ศ. 2529
วุฒิการศึกษา	ปีการศึกษา 2552: วิทยาศาสตรบัณฑิต (สาขาเคมี) มหาวิทยาลัยสวนดุสิต ปีการศึกษา 2558: ศึกษาศาสตรมหาบัณฑิต (สาขาการสอนวิทยาศาสตร์) มหาวิทยาลัยรามคำแหง
ตำแหน่ง	เจ้าหน้าที่บริการการศึกษา

ผลงานวิจัย

นิสุฎา อิ่มเสถียร. (2552). *การศึกษาความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระในสารสกัดจากเฟื่องฟ้า.* วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิตสาขาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏสวนดุสิต.

นิสุฎา อิ่มเสถียร. (2558). *การเปรียบเทียบผลสัมฤทธิ์ทางการเรียนและเจตคติต่อการเรียนวิทยาศาสตร์เรื่องเอกภพของนักเรียนชั้นมัธยมศึกษาปีที่ 3 โดยใช้ชุดกิจกรรม การเรียนรู้แบบสืบเสาะหาความรู้ 7Eกับการเรียนแบบปกติ.* สารนิพนธ์ปริญญาศึกษาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาการสอนวิทยาศาสตร์ คณะศึกษาศาสตร์ มหาวิทยาลัยรามคำแหง**.**

ขวัญจิต อิสระสุข และคณะ. (2558). การเตรียมไลโปโซมกักเก็บสารสกัดจากใบขลู่เพื่อพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง. *SDU Research* Journal Sciences and Technology, 10(1), 43-60.

สรรค์ชัย เหลือจันทร์ พรพัสนันท์ เดชประสิทธิโชค และนิสุฎา อิ่มเสถียร. (2560) *การเพิ่มมูลค่าส่วนเหลือทิ้งจากพืชเศรษฐกิจ (เถ้าชานอ้อย) ของประเทศไทย โดยเตรียมเป็นวัสดุฐานรองรับตัวเร่งปฏิกิริยาสำหรับกระบวนการผลิตไบโอดีเซลชุมชนแบบลดต้นทุน***.** มหาวิทยาลัยสวนดุสิต: กรุงเทพ.

ผู้ร่วมวิจัย 2

ชื่อ – นามสกุล	นางสาวณัฏฐรัตน์ ศรีบุรินทร์
วันเดือนปีเกิด	2 พฤศจิกายน พ.ศ. 2529
วุฒิการศึกษา	ปีการศึกษา 2552: วิทยาศาสตรบัณฑิต (สาขาเคมี) มหาวิทยาลัยสวนดุสิต ปีการศึกษา 2558: ศึกษาศาสตรมหาบัณฑิต (สาขาการสอนวิทยาศาสตร์) มหาวิทยาลัยรามคำแหง
ตำแหน่ง	เจ้าหน้าที่บริการการศึกษา

ผลงานวิจัย

ณัฏฐรัตน์ ศรีบุรินทร์. (2558). *การศึกษาทักษะการคิดวิเคราะห์และความคงทนต่อการเรียนวิชาวิทยาศาสตร์เรื่อง มวลสารสัมพันธ์ โดยใช้ชุดกิจกรรมการเรียนรู้แบบร่วมมือปริศนาความคิด “จิ๊กซอว์”กับวิธีปกติของนักศึกษาชั้นปีที่ 3*. วิทยานิพนธ์ปริญญาการศึกษามหาบัณฑิต สาขาการสอนวิทยาศาสตร์ คณะศึกษาศาสตร์ มหาวิทยาลัยรามคำแหง: กรุงเทพ.

ขวัญจิต อิสระสุข และคณะ. (2558). การเตรียมไลโปโซมกักเก็บสารสกัดจากใบขลู่เพื่อพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง. *SDU Research* Journal Sciences and Technology, 10(1), 43-60.

ขวัญจิต อิสระสุข ณัฏฐรัตน์ ศรีบุรินทร์ กัลยาภรณ์ จันตรี พงศธร มณีวิหค และศราวุธ ศรีพุฒสุข. (2558). *การตั้งตำรับนีโอโซมที่มีสารสกัดหยาบจากดอกกระเจี๊ยบแดง.* โครงงานวิจัยวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิทยาศาสตร์เครื่องสำอาง คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยสวนดุสิต.

ขวัญจิต อิสระสุข ณัฏฐรัตน์ ศรีบุรินทร์ นภัสสร ราชรินทร์ จินดารัตน์ ปิ่นนาค และภัทรดา หวังเจริญรุ่ง. (2557). *การเตรียมไมโครอิมัลชันที่มีสารสกัดกระเจี๊ยบแดง.* โครงงานวิจัยวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิทยาศาสตร์เครื่องสำอาง คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยสวนดุสิต.