



ปัญหาพิเศษ

การศึกษาประสิทธิภาพและการใช้ประโยชน์จากสารสกัดเปลือกส้มโอ

THE STUDY OF EFFICIENCY AND UTILIZATION OF EXTRACTS
FROM POMELO PEEL

โดย

นางสาวทศวรรณจำเริญ

ภาควิชาวิทยาศาสตร์ คณะศิลปศาสตร์และวิทยาศาสตร์

มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

พ.ศ. 2562



ใบรับรองปัญหาพิเศษ
ภาควิชาวิทยาศาสตร์คณะศิลปศาสตร์และวิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยาศาสตร์บัณฑิต (วิทยาศาสตร์ชีวภาพ)

ปริญญา

วิทยาศาสตร์ชีวภาพ

สาขา

วิทยาศาสตร์

ภาควิชา

เรื่อง การศึกษาประสิทธิภาพและการใช้ประโยชน์จากสารสกัดเปลือกส้มโอ

THE STUDY OF EFFICIENCY AND UTILIZATION OF EXTRACTS FROM POMELO
PEEL

นามผู้วิจัย.....นางสาวทศวรรณจำเริญ.....

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

ประธานกรรมการ.....

(อาจารย์พุทธพร ส่องศรี, D.Eng.)

ภาควิชาวิทยาศาสตร์คณะศิลปศาสตร์และวิทยาศาสตร์

มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ แดงอ่อน พรหมนิ, ป.ร.ด.)

หัวหน้าภาควิชาวิทยาศาสตร์

วันที่.....เดือน.....พ.ศ. 2562

การศึกษาประสิทธิภาพและการใช้ประโยชน์จากสารสกัดเปลือกส้มโอ

ทศวรรณจำเ และ พุทธพร สองศรี

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้ทำการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดสารจากเปลือกส้มโอ โดยสภาวะที่ศึกษา คือ ระยะเวลาในการสกัดได้แก่ 3 ชั่วโมง 3 วัน และ 15 วัน วิธีการสกัด คือ วิธีการสกัดแบบสกัดครั้งเดียว และแบบสกัดซ้ำ 3 ครั้ง โดยใช้เฮกเซนเป็นตัวทำละลายพบว่า สภาวะที่เหมาะสมในการสกัด คือ การสกัดซ้ำใช้เวลา 1 วัน (3 ชั่วโมง) ได้ปริมาณสารสกัด 0.26 กรัม มากกว่าการสกัดที่ระยะเวลาอื่นๆ และเมื่อทดสอบสารสกัดโดยใช้เทคนิคโครมาโทกราฟี พบกว่า สารส่วนที่แยกด้วยอะซีโตนและเฮกเซน(1:9) สามารถแยกสารสกัดจากเปลือกส้มโอได้ชัดเจนที่สุด และยังพบสารลิโมนีนอยู่ในสารสกัดเปลือกส้มโอ สำหรับการศึกษาปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดโดยวิธี Folin-Ciocateu assay พบว่าสารสกัดจากเปลือกส้มโอมีปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดที่สกัดด้วยเอทานอล 1:10 สูงที่สุด (75.222 ± 4.476 mg GAE/10 g DW) การตรวจสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระดีที่สุดโดยการสกัดเปลือกส้มโอด้วยเอทานอล 1:10 สูงที่สุดร้อยละ 22.732 ± 3.108 ด้วยวิธี DPPH scavenging activity ผลการหาความยาวคลื่นที่ดูดกลืนแสงสูงสุด (λ_{max}) ของสารสกัด ที่ความยาวคลื่น 400-800 นาโนเมตร พบว่ามีค่า λ_{max2} ค่า คือ 438 และ 574 นาโนเมตร

คำสำคัญ: เปลือกส้มโอ, ลิโมนีน, ฟีนอลิก, ต้านอนุมูลอิสระ

THE STUDY OF EFFICIENCY AND UTILIZATION OF EXTRACTS FROM POMELO PEEL

ThodsawanChamleand PuttapornSongsri

ABSTRACT

This research was performed to study on the optimum conditions for the extraction from pomelo peel. The studied conditions were the extraction times that varied from 3 hours, 3 days and 15 days, the other condition was the extraction methods which were one times and three times extraction method by using hexane as solvent. It was found that the optimal conditions for extraction were multiple extraction with 1 days extraction for 3 times and the yield of crude extract was 0.26 g, might yield than extracting at other time periods and when testing the chromatography techniques, the fraction eluted by acetone and hexane (1:9) can extract the extract from pomelo peel most clearly and found limonine in pomelo peel extract. For the study of total phenolic content by Folin-Ciocateu assay, it was found that the extract from pomelo peel had the highest phenolic content of 1:10 (75.222 ± 4.476 mg GAE/10 g DW). Determination of the best antioxidant activity by extracting pomelo peel with ethanol 1:10, the highest of 22.732 ± 3.108 % with DPPH scavenging activity. Spectral scan λ_{max} of pomelo peel extract were found to be 438 and 574 nm.

Keywords: pomelo peel, limonine, phenolic, antioxidants

Student's signature

Advisor's signature

____/____/____

บทนำ

ส้มโอ *Citrus maxima* (Burm.) Merr. อยู่ในวงศ์ Rutaceae เป็นผลไม้ที่มีความนิยมของผู้บริโภค จึงเป็นที่ต้องการของตลาดผลส้มโอ นั้นเป็นผลไม้ที่ไม่รับประทานเปลือกจึงต้องทำลายทิ้งไป โดย Kimball (1991) ได้ศึกษาพืชตระกูลส้มมีน้ำมันหอมระเหย (essential oil) ที่ผิวเปลือก ซึ่งเป็นสารระเหยในกลุ่มเทอร์พีน (terpenes) องค์ประกอบหลักของน้ำมันที่ผิวของผลไม้ตระกูลส้มเป็นสารประกอบ ไฮโดรคาร์บอนและตัวหลักๆที่พบคือ ดี-ลิโมนีน (d-Limonene) Chaiwong et al. (2010) ได้ศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพและฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของส้มโอพันธุ์ทองดีในประเทศไทย ซึ่งประกอบไปด้วยสารสำคัญหลายชนิดเช่น วิตามินซี แคโรทีนอยด์ฟลาโวนอยด์ และสารประกอบฟีนอลิก โดยฤทธิ์ต้านออกซิเดชันมีบทบาทสำคัญในการช่วยชะลอและยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันอันเป็นสาเหตุของการเกิดโรคต่าง ๆ เช่น โรคมะเร็ง โรคอัลไซเมอร์และเกิดริ้วรอยก่อนวัยอันควร

Negro et al. (2016) ได้รายงานว่าการเปลือกส้มและสารตกค้างจากการผลิตน้ำผลไม้ที่หมักด้วย D-Limonene ถูกใช้ในด้านโภชนาการทางยาและเครื่องสำอาง ประโยชน์จากการแปรรูปของส้มเป็นวัตถุดิบที่เหมาะสมในการนำผลิตภัณฑ์ที่เหลือใช้ในการเพิ่มมูลค่า PHI et al. (2006) ได้ทำการศึกษาค่าประกอบในน้ำมันหอมระเหยจากเปลือก Citrus (Natsuda et al. 1984) Hayata ที่สกัดโดยใช้การบีบเย็น โดยวิธีวิเคราะห์ด้วยเครื่องมือ พบสารประกอบลิโมนีนมากที่สุดและพบสารประกอบเฮปทิลอะซีเตต, ลิโมนีน ออกไซด์, 2, 3 บิวทอะไดอิน ซึ่งมีความสำคัญต่อการสังเคราะห์กลิ่น Natsuda et al. (1984) ได้ศึกษาการสกัดลิโมนีนจากผิวมะนาวควาย มะนาวและมะกรูดด้วยวิธีสกัดด้วยไอน้ำและวิธีสกัดด้วยตัวทำละลายเฮกเซนจากการวิเคราะห์ปริมาณลิโมนีนในน้ำมันหอมระเหยที่สกัดได้ด้วยแก๊สโครมาโทกราฟี-แมสสเปกโตรเมทรี พบว่าที่ผิวของมะนาวควายมีปริมาณลิโมนีนมากที่สุดทั้งจากการสกัดด้วยไอน้ำและการสกัดด้วยตัวทำละลายเฮกเซน คือ มีปริมาณ 2.88 และ 5.97 มิลลิกรัม/ลิตร ตามลำดับ ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าวิธีที่ให้ปริมาณลิโมนีนมากที่สุดคือการสกัดด้วยตัวทำละลายเฮกเซน Smith et al. (2001) ได้เสนอวิธีการสกัดสารลิโมนีนจากเปลือกส้มโดยการสกัดด้วยตัวทำละลายเพนเทนในอัตราส่วนเปลือกส้มต่อตัวทำละลายเท่ากับ 1:3 (กรัมต่อมิลลิกรัม) แช่ทิ้งไว้ 10 นาที กรองสารละลายที่ได้ใส่ลงในกรวยแยกเติมแอนไฮดรัสโซเดียมซัลเฟต 1.00 กรัม เขย่าทิ้งไว้ 15 นาที เพื่อกำจัดน้ำออก กรองสารละลายที่ได้เพื่อกำจัดโซเดียมซัลเฟตให้สมบูรณ์ ก่อนนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี

การศึกษานี้เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดสารจากเปลือกส้มโอ การแยกสารสกัดจากเปลือกส้มโอด้วยวิธี thin layer chromatography และ วิธี column chromatography (CC) การตรวจสอบความยาวคลื่นที่ดูดกลืนแสงสูงสุด (λ_{max}) ของสารแต่ละส่วน ศึกษาการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด ศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ การทดสอบการละลายโพลีโพลีไตรีนเพื่อศึกษาการใช้ประโยชน์สารสกัดจากเปลือกส้มโอ ในด้านอาหาร ยา เครื่องสำอาง และสิ่งแวดล้อม โดยการนำไปสู่การสร้างผลิตภัณฑ์

อุปกรณ์และวิธีการ

1. การเตรียมเปลือกส้มโอ

นำเปลือกส้มโอสดมาทำความสะอาดด้วยน้ำและผึ่งให้แห้ง จากนั้นนำมาหั่นเป็นชิ้นเล็กๆ ขนาดประมาณ 0.5×0.5 เซนติเมตร แล้วนำไปสกัดด้วยวิธีการสกัดโดยใช้เฮกเซนเป็นตัวทำละลาย

2. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดสารจากเปลือกส้มโอ

สภาวะในการสกัดดัดแปลงวิธีการของ สุกัญญา (2551) โดยสภาวะในการสกัดที่ศึกษาคือ

2.1 ระยะเวลาในการสกัด (ระยะเวลาในการแช่เปลือกส้มโอในตัวทำละลาย) ใช้ 3 ชั่วโมง

3 วัน และ 15 วัน และหาปริมาณสารสกัดที่สกัดได้จากการสกัดที่ระยะเวลาต่างกัน เพื่อหาระยะเวลาที่ได้สกัดมากที่สุด

2.2 วิธีการสกัด โดยการเปรียบเทียบระหว่างวิธีการสกัดครั้งเดียวและการสกัดซ้ำ 3 ซ้ำ

2.2.1 การสกัดครั้งเดียว

ชั่งเปลือกส้มโอที่เตรียมจากข้อ 1 ใส่ในขวดรูปกรวย 3 ขวด ขวดละ 40 กรัม เติมหกเซน 360 มิลลิลิตร ลงในแต่ละขวด ปิดฝา เขย่าแล้วเก็บไว้ในตู้เย็นมืดเป็นเวลา 3 ชั่วโมง (3 วัน และ 15 วัน) เมื่อครบกำหนดแล้วกรองแยกเปลือกส้มโอออก นำสารละลายที่กรองได้ใส่ในกรวยแยก แล้วเติมโซเดียมซัลเฟตที่ไร้น้ำ 1 กรัม เขย่าประมาณ 2 นาที ตั้งทิ้งไว้ 15 นาทีเพื่อกำจัดน้ำออก แล้วใส่สารละลายผ่านกระดาษกรองใส่ขวดขนาด 250 มิลลิลิตร จากนั้นนำสารสกัดที่ได้ไประเหยด้วยเครื่อง Water Bath 70°C จนแห้ง จากนั้นทิ้งให้เย็น ชั่งน้ำหนักบีกเกอร์ก่อนและหลังการสกัด เปรียบเทียบกับเวลาอื่นๆ เพื่อจะได้ทราบสภาวะที่เหมาะสมที่สุดในการสกัด

2.2.2 การสกัดซ้ำ

ชั่งเปลือกส้มโอใส่ในขวดรูปกรวย 3 ขวด ขวดละ 40 กรัม เติมหกเซน 120 มิลลิลิตร ลงในแต่ละขวด ปิดฝาขวดรูปกรวย เขย่าแล้วเก็บไว้ในตู้เย็นมืดเป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วกรองสารสกัดใส่ขวดรูปกรวย ปิดฝา เก็บไว้ในตู้ควบคุมอุณหภูมิแล้วนำเปลือกส้มโอที่กรองได้สกัดซ้ำอีก 2 ครั้ง โดยเติมหกเซนครั้งละ 120 มิลลิลิตร นำสารที่กรองได้รวมกับสารที่กรองได้เดิม และสกัดสารโดยเปลี่ยนระยะเวลาในการแช่เปลือกส้มโอจาก 1 ชั่วโมง เป็น 1 วัน (3 ซ้ำ) และ 5 วัน (3 ซ้ำ) แล้วนำสารสกัดที่ได้ทำการทดลองต่อเหมือนข้อ 2.2.1

3. การแยกสารสกัดจากเปลือกส้มโอ

3.1 การทดสอบสารสกัดจากเปลือกส้มโอโดยใช้เทคนิคโครมาโทกราฟี

เตรียมขวดแก้วที่มีฝาปิด 3 ขวด เติมสารที่ใช้เป็นเฟสเคลื่อนที่ (ตัวทำละลาย) คือ สารผสมของอะซีโตนกับเฮกเซนในอัตราส่วน 1:1 , 1:2 และ 1:9 ในแต่ละขวด โดยปริมาตรที่ใช้ 10 มิลลิลิตร แล้วใส่กระดาษกรองขนาดเท่าแผ่น TLC เพื่อให้ระบบอ้อมตัวด้วยตัวทำละลาย จากนั้นปิดฝาขวด แล้วใช้หลอดคอปิลลารีหยดสารสกัดบนแผ่น TLC แต่ละแผ่นให้ห่างจากขอบล่างของแผ่น TLC ประมาณ 1 เซนติเมตร แล้วหย่อนแผ่น TLC ลงในขวดที่เตรียมไว้ในแนวดิ่ง ปิดฝาขวด รอจนตัวทำละลายเคลื่อนที่ถึงระดับที่ต้องการ ประมาณ 0.5 เซนติเมตร จากขอบบนที่เคลือบเฟสอยู่กับที่ไว้ แล้วนำแผ่น TLC ออก รอให้แห้งแล้วพ่น Phosphomolybdic acid ลงบนแผ่น TLC นำใส่ตู้อบ

ลมร้อน อุณหภูมิ 80 °C เปรียบเทียบกับการนำไปอบกับ Iodine กับ Silicagel 60 เป็นตัวดูดซับ ทำเครื่องหมายในตำแหน่งที่สารแยกทั้ง 3 แผ่น

3.2 วิธี Column Chromatography (CC)

เลือกอัตราส่วนตัวทำละลายในข้อ 4.1 ที่สามารถแยกสารได้ดีที่สุด แล้วเตรียมคอลัมน์โดยใช้ Aluminium oxide 90 ที่ละนิด 20 เซนติเมตร ค่อยๆหยดตัวทำละลายจนซึมออกด้านล่าง นำสารสกัดที่แยกได้แต่ละส่วน (fraction) มาตรวจสอบด้วยการทำTLC โดยใช้ตัวทำละลายที่สามารถแยกสารได้ดีที่สุดทำ เพื่อนำไปใช้วิเคราะห์ต่อไป โดยคำนวณระยะทางที่สารเคลื่อนที่ในรูปค่า Rf (Rate of flow)

4. หาความยาวคลื่นที่ดูดกลืนแสงสูงสุด (λ_{max}) ของสารแต่ละส่วน

โดยนำสารที่ได้จากการสกัด วัดค่า λ_{max} ด้วยเครื่อง visible spectrophotometer โดยวัดช่วงความยาวคลื่น 400 – 800 นาโนเมตร นำผลที่วัดได้ไปเขียนความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงและความยาวคลื่น

5. การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (Analysis of Total Phenolic Content: TPC)

การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดในเปลือกส้มโอ Singleton et al. (1965) ด้วยวิธี Folin-Ciocalteu (FC) โดยมีการดัดแปลงบางส่วน วัดการดูดกลืนแสงที่ 765 นาโนเมตร ทำการทดลองตัวอย่างละสามซ้ำ ความเข้มข้นสุดท้ายของฟีนอลิกทั้งหมดในสารสกัดจะเทียบกับกราฟมาตรฐาน ($y = 0.009x + 0.008$, $R^2 = 0.9972$) ของกรดแกลลิก

6. การวิเคราะห์ปริมาณการต้านอนุมูลอิสระ

การวิเคราะห์ปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) scavenging activity โดยวิธีของ Andrica et al. (2016) การวัดทั้งหมดทำสามซ้ำ วัดการดูดกลืนแสงที่ 517 นาโนเมตร โดยใช้สารบิวทิลไฮดรอกซีโทลูอีน (butylated hydroxy toluene, BHT) เป็นสารมาตรฐาน

7. ทดสอบการละลายโพลีโพลีสไตรีน

นำสารสกัดในสถานะที่เหมาะสมที่สุดที่ได้จากข้อ 2.2 มาทดสอบการละลายโพลีโพลีสไตรีน โดยชั่งน้ำหนักโพลีโพลีสไตรีน และนำไปละลายในสารสกัดทีละน้อยจนไม่สามารถละลายได้อีก

8. การทำโน้ตชันบำรุงผิวกาย สูตรผิวนุ่ม ชุ่มชื้น

1. เติมน้ำกลั่นบริสุทธิ์สำหรับเครื่องสำอาง (DI Water) 0.46 กก. อีดีทีเอ (EDTA 4Na) 0.5 กรัม กลีเซอริน (Glycerin) 15 กรัม ลงไปตามลำดับ คนละลายให้เข้ากัน
2. ค่อยๆเทข้อ 1 ลงไปใน วิสโคลาม เอที 100 พี (Viscolam AT 100 P) 10 กรัม ปั่นจนให้ขึ้นเป็นเนื้อครีม (ไม่แนะนำให้เติมข้อ 1 ลงทีเดียว ควรเติมทีละน้อย แล้วคนให้เข้ากัน ค่อยๆเติมจนกว่าข้อ 1 จะหมด) หลังจากนั้นนำให้ความร้อนที่ 65-70 องศาเซลเซียส
3. ชั่งคอสมแม็ก ซีโตสเตียร์ล แอลกอฮอล์ (CosmaqCetostearyl Alcohol) 10 กรัม คอสมแม็กอีมีลซิฟอิง แวกซ์ (อีแวกซ์) (CosmaqEmulsifying Wax) (E-Wax) 15 กรัม ทวิน 20

(Tween 20) 10 กรัม น้ำมันมะกอก (Olive Oil) 15 กรัม ไอโซโพรพิล ไมริสเตส (IPM) 15 กรัม รวมกัน หลังจากนั้นนำไปให้ความร้อนที่ 65-70 องศาเซลเซียส

4. ค่อยๆเติมข้อ 3 ลงในข้อที่ 2 หลังจากนั้นคนหรือปั่นให้เข้ากันจนขึ้นเป็นเนื้อครีม

5. เมื่ออุณหภูมิลดลง 40 องศาเซลเซียส ค่อยๆเติม ไมโครแคร์ พีเอชซี (Microcare PHC) 3 กรัม สารสกัดจากเปลือกส้มโอ 0.5 กรัม ลงไป คนหรือปั่นให้เข้ากัน

9. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

การวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติ (One-way ANOVA) และเปรียบเทียบความแตกต่างค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($P < 0.05$)

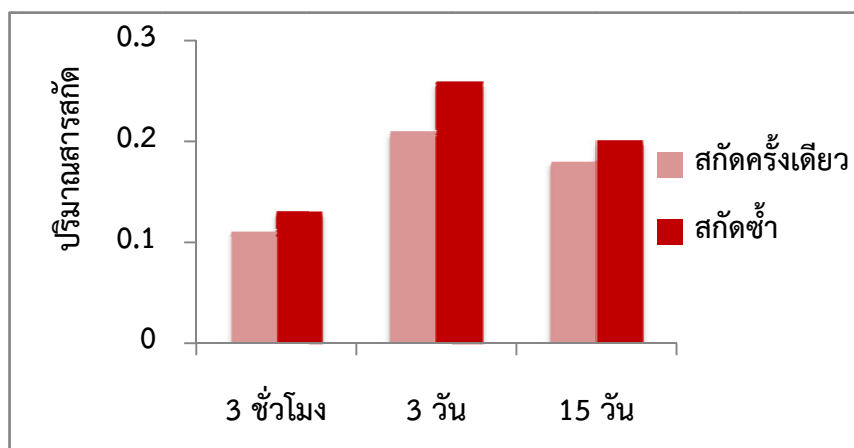
ผลการศึกษา

การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดสารจากเปลือกส้มโอจากการศึกษาสภาวะที่ใช้ในการสกัดคือ ระยะเวลาในการสกัด(3 ชั่วโมง 3 วัน และ 15 วัน)และวิธีการสกัด(สกัดครั้งเดียวและสกัดซ้ำ) โดยใช้เฮกเซนเป็นตัวทำละลายพบว่า ปริมาณสารที่สกัดได้เป็นดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ปริมาณของสารสกัดที่ได้จากเปลือกส้มโอที่สภาวะต่างๆ

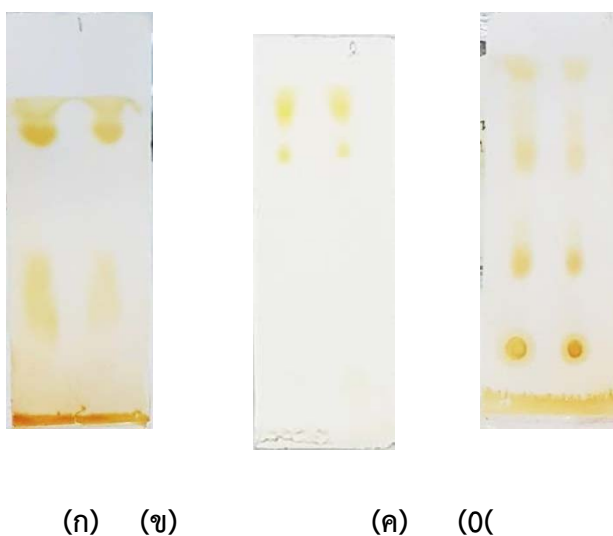
ระยะเวลาในการสกัด	ปริมาณของสารสกัดจากเปลือกส้มโอ(กรัม)	
	สกัดครั้งเดียว	สกัดซ้ำ
3 ชั่วโมง	0.11	0.13
3 วัน	0.21	0.26
15 วัน	0.18	0.20

จากผลการทดลองพบว่าสารสกัดที่ได้จากวิธีการสกัดแบบสกัดซ้ำ ได้ปริมาณสารสกัดมากกว่าวิธีการสกัดแบบสกัดครั้งเดียว ปริมาณสารที่สกัดได้ในแต่ละสภาวะมีปริมาณแตกต่างกันโดยการสกัดครั้งเดียวเมื่อใช้เวลา 3 ชั่วโมงได้สารสกัด 0.11 กรัม เมื่อเพิ่มเวลาเป็น 3 วันปริมาณสารที่สกัดได้เพิ่มขึ้น แต่ถ้าเพิ่มเวลาเป็น 15 วันปริมาณสารที่สกัดได้เป็น 0.18 กรัม ส่วนการสกัดซ้ำพบว่า ระยะเวลาในการสกัด 1 วัน(3 ชั่วโมง)จะได้ปริมาณสารสกัด 0.26 กรัม มากกว่าการสกัดที่ระยะเวลาอื่นๆ ดังนั้นสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดสารจากเปลือกส้มโอคือ การสกัดซ้ำระยะเวลา 1 วัน(3 ชั่วโมง) และจากตารางที่ 1 สามารถเปรียบเทียบเป็นกราฟได้ดังภาพที่ 1



ภาพที่ 1 ปริมาณสารสกัดจากเปลือกส้มโอในแต่ละสภาวะหลังจากกระเหยตัวทำละลายจนแห้ง

จากการทดสอบสารสกัดด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีโดยใช้ อะซีโตน:เฮกเซน ในอัตราส่วน 1:11:2 และ 1:9 เป็นตัวทำละลายเพื่อทดสอบสารสกัดได้แผ่น TLC ที่มีลักษณะดังภาพที่ 2 จากแผ่น TLC จะเห็นว่าเมื่อใช้อัตราส่วนอะซีโตน:เฮกเซน 1:9 เป็นเฟสเคลื่อนที่สามารถแยกสารสกัดจากเปลือกส้มโอได้ชัดเจน

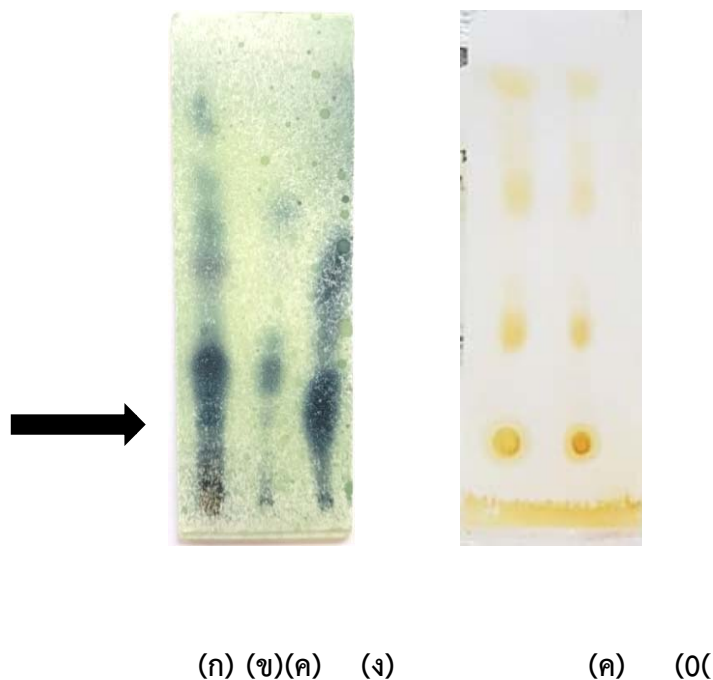


ภาพที่ 2 TLC ของสารสกัดจากเปลือกส้มโอโดยใช้ตัวทำละลายอะซีโตน:เฮกเซน ในอัตราส่วนต่าง ๆ (ก) 1:1 (ข) 1:2 และ (ค) 1:9

จากการทดสอบสารสกัดด้วยวิธีเทคนิคโครมาโทกราฟีจะทำให้เกิดการแยกสารต่าง ๆ ออกจากกันโดยใช้ อะซีโตน:เฮกเซน ในอัตราส่วน 1:9 เป็นตัวทำละลายเพื่อทดสอบสารสกัด

เนื่องจากเป็นเฟสเคลื่อนที่สามารถแยกสารสกัดจากเปลือกส้มโอได้ชัดเจนที่สุด จากการทดลองนี้ใช้วิธีการอบ Iodine และ Silicagel 60 เป็นตัวดูดซับตำแหน่งของสารมีลักษณะสีเหลือง ผลของการแยกสารสกัดเกิดขึ้นเป็นแถบสีเหลืองบนแผ่น TLC คาดว่าจะเป็นสารลิโมนีน เมื่อเทียบกับ standard

จากการทดสอบสารสกัดจากเปลือกส้มโอโดยใช้เทคนิคโครมาโทกราฟีพบว่าได้ผลดังภาพที่ 3 เมื่อเปรียบเทียบวิธีการพ่น Phosphomolybdic acid ลงบนแผ่น TLC แล้วนำไปใส่ตู้อบลมร้อนจะเห็นว่า จุดที่แสดงตำแหน่งของสารมีลักษณะสีน้ำเงิน (ก) (ข) (ค) เปรียบเทียบวิธีอบ Iodine และ Silicagel 60 เป็นตัวดูดซับตำแหน่งของสารมีลักษณะสีเหลือง (ง) จะเห็นได้ว่าตำแหน่งที่ถูกครีชีเป็นสารลิโมนีนเนื่องจากพบจุดสารที่ตรงกันกับ (R)-(+)-Limonene analytical standard



ภาพที่ 3 TLC ที่ใช้ตัวทำละลาย อะซีโตน:เฮกเซนในอัตราส่วน 1:9

ที่พ่น Phosphomolybdic acid ลงบนแผ่น TLC นำใส่ตู้อบลมร้อน อุณหภูมิ 80 °C

(ก) สารสกัดจากเปลือกส้มโอ (ข) (R)-(+)-Limonene analytical standard

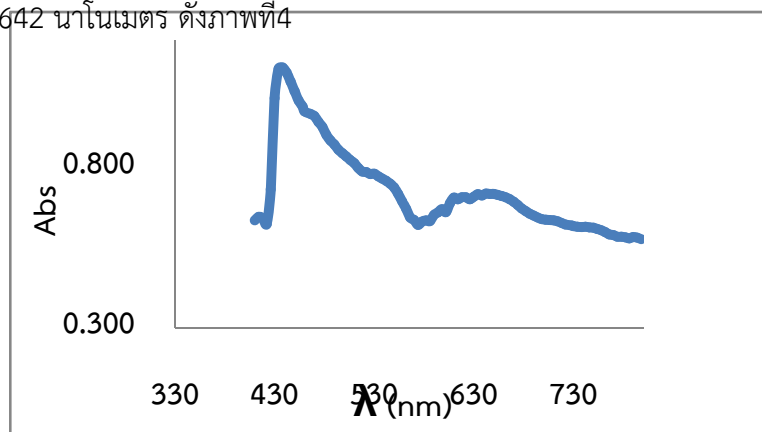
และ (ค) D-Limonene สารขจัดเห็บ ลูกศรชี้ตำแหน่งของสารลิโมนีน เปรียบเทียบกับ

(ง) สารสกัดจากเปลือกส้มโอที่นำไปอบกับ Iodine กับ Silicagel 60 เป็นตัวดูดซับ

จากผลการทดสอบการทำ Column Chromatography (CC) โดยนำสารสกัดที่แยกได้แต่ละส่วน (fraction) มาตรวจสอบด้วยการทำ TLC เพื่อนำไปใช้วิเคราะห์นั้น โดยคำนวณระยะทางที่สารเคลื่อนที่ในรูปค่า R_f (Rate of flow) เพื่อทำการหาลำดับของสารที่ออกมา ก่อน-หลัง เนื่องจากไม่สามารถมองเห็นสารได้ เพราะสารไม่มีสี พบว่า ค่า R_f หลอดที่ 1 ควรสูงคือมีค่า 0.78 และหลอดที่ 40

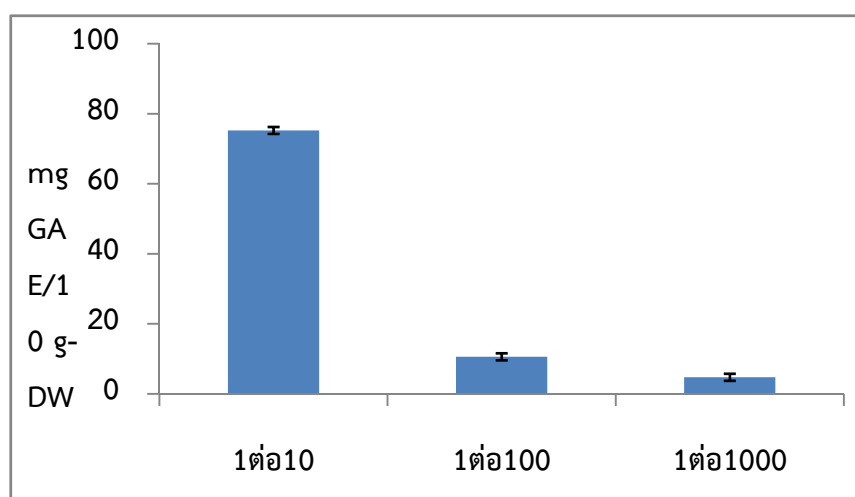
ค่า Rf เท่ากับ 0.56 ส่วนสีโมเนีนจะอยู่ด้านล่างเนื่องจากมีแรงยึดเหนี่ยวมากคาดว่าจะยังไม่ออกมาดังตารางผนวกที่ ข 1

ผลวิเคราะห์สเปกตรัมการดูดกลืนแสงของสารสกัด พบว่ามีค่า λ_{max} หลัก 2 ค่า คือ ที่ 438 นาโนเมตร และ 642 นาโนเมตร ดังภาพที่ 4



ภาพที่ 4 สเปกตรัมของสารสกัดจากเปลือกส้มโอที่วิเคราะห์ด้วยเครื่อง Spectrophotometer ที่ช่วงความยาว คลื่น 400 – 800 นาโนเมตร

ผลการวิเคราะห์ปริมาณความเข้มข้นสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดจากเปลือกส้มโอที่สกัดด้วยเอทานอล 1:10, 1:100 และ 1:1,000 ด้วยวิธี Folin-Ciocalteu (FC) พบว่าปริมาณความเข้มข้นสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดที่สกัดด้วยเอทานอล 1:10 สูงที่สุด (75.222 ± 4.476 mg GAE/10 g DW) และตามด้วยเอทานอล 1:100 (10.593 ± 1.156 mg GAE/10 g DW) และเอทานอล 1:1,000 (4.741 ± 2.864 mg GAE/10 g DW) ตามลำดับดังตารางผนวกที่ ข 2 คำนวณค่าเฉลี่ยและเบี่ยงเบนมาตรฐานด้วยโปรแกรม Excel 2010 การวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติ (One-way ANOVA) และเปรียบเทียบความแตกต่างค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($P < 0.05$)



ภาพที่ 5 ปริมาณความเข้มข้นสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดจากเปลือกส้มโอ

ผลการวิเคราะห์ปริมาณการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากเปลือกส้มโอด้วยวิธี DPPH scavenging activity โดยสารสกัดเปลือกส้มโอเจือจางด้วยเอทานอล1:10มีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ ร้อยละ 22.732 ± 3.108 ส่วนการเจือจางด้วยเอทานอล1:100 ร้อยละ 6.277 ± 3.372 และเอทานอล 1:1,000 ร้อยละ 2.152 ± 2.988 ตามลำดับดังตารางที่ 2 โดยคำนวณค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานด้วยโปรแกรม Excel 2010 การวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติ (One-way

Sample	เปอร์เซ็นต์ของกิจกรรมต้านอนุมูลอิสระ (RSA%)			ค่าเฉลี่ยของ % การต้านอนุมูลอิสระ $\pm$ SD
	1	2	3	
1ต่อ10	25.000	19.190	24.007	22.732 ± 3.108^a
1ต่อ100	2.419	7.746	8.664	6.277 ± 3.372^b
1ต่อ1,000	5.242	1.937	-0.722	2.152 ± 2.988^b

ANOVA) และเปรียบเทียบความแตกต่างค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($P < 0.05$)

ตารางที่ 2 ค่าเปอร์เซ็นต์ของกิจกรรมต้านอนุมูลอิสระจากสารสกัดโดยเจือจางปริมาตรต่างกัน

หมายเหตุ: ค่าในตารางแสดงค่าเฉลี่ย $\pm$ SD

a และ b แสดงถึงค่าเฉลี่ยที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

จากการทดสอบการละลายโพลีโพลีไตรนของสารสกัดพบว่าสารสกัดจากเปลือกส้มโอสามารถละลายโพลีโพลีไตรนได้เพียงเล็กน้อยเท่านั้น จะทำให้การละลายได้มากขึ้นจำเป็นต้องใช้ตัวทำละลาย เช่น อะซีโตน จึงสามารถช่วยทำให้ประสิทธิภาพของการละลายโพลีดีขึ้น

การทดสอบทำโลชั่นบำรุงผิวกาย สูตรผิวนุ่ม ชุ่มชื้นพบว่า โลชั่นที่มีส่วนผสมของสารสกัดเปลือกส้มโอมีเนื้อเป็นสีขาว มีลักษณะเป็นเนื้อเดียวกัน มีกลิ่นที่หอมสดชื่น มีลักษณะคงตัวที่ดี

วิจารณ์ผลการศึกษา

การสกัดเปลือกส้มโอโดยใช้เฮกเซนเป็นตัวทำละลาย โดยหาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดเปลือกส้มโอ พบว่าสภาวะที่เหมาะสมในการสกัด คือใช้วิธีการสกัดแบบสกัดซ้ำที่ระยะเวลาในการสกัด3วัน(1วัน3ซ้ำ)จะได้ปริมาณสารสกัด0.26 กรัม ซึ่งเป็นปริมาณที่สูงที่สุดเมื่อเทียบกับสภาวะอื่นๆ แสดงว่าการสกัดครั้งเดียวการเพิ่มระยะเวลาในการสกัดไม่เพิ่มปริมาณสาร การสกัดครั้งเดียวและการสกัดซ้ำที่ระยะเวลาเท่ากัน การสกัดซ้ำจะมีปริมาณสารสกัดที่ได้มากกว่าการสกัดครั้งเดียว สอดคล้องกับงานวิจัยของ นฤมล.(2551) ผิวนอกสุดของผลส้มโอ ประกอบด้วย limonene, myrcene และมีน้ำมันหอมระเหย 0.3-0.9%

จากการทดสอบสารสกัดด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีโดยใช้อะซีโตน:เฮกเซน ในอัตราส่วน 1:1, 1:2 และ 1:9 จากแผ่นTLC จะเห็นว่าเมื่อใช้อัตราส่วนอะซีโตน:เฮกเซน1:9 เป็นเฟสเคลื่อนที่ สามารถแยกสารสกัดจากเปลือกส้มโอได้ชัดเจน (เนื่องจากเฮกเซนเป็นตัวทำละลายที่ไม่มีขั้วเมื่อผสมกับอะซีโตนซึ่งเป็นตัวทำละลายที่มีขั้วสูงในอัตราส่วนที่เหมาะสมจะทำให้สารแยกออกจากกันได้ชัดเจน) เมื่อเปรียบเทียบวิธีการพันPhosphomolybdic acid ลงบนแผ่นTLC แล้วนำไปใส่ตู้อบลมร้อน จะเห็นว่า จุดที่แสดงตำแหน่งของสารมีลักษณะสีน้ำเงินจะสะดวกแต่อาจทำให้แผ่นTLC หลุดลอกได้ จึงจำเป็นต้องใช้ความชำนาญ เปรียบเทียบวิธีอบ Iodine และ Silicagel 60 เป็นตัวดูดซับตำแหน่งของสารมีลักษณะสีเหลืองสอดคล้องกับงานวิจัยของ วรณทิวา. (2545) ได้รายงานว่าการรมด้วยไอของไอโอดีนทำให้เกิดจุดสีเหลืองบนน้ำตาลบนจุดของสารที่แยก ช่วยให้เห็นตำแหน่งของสารได้ชัดเจนขึ้น

การทำวิธี Column Chromatography (CC)ทำคอลัมน์โดยใช้ Aluminium oxide 90 ค่อยๆหยดตัวทำละลายจนซึมออกด้านล่าง นำสารสกัดที่แยกได้แต่ละส่วน (fraction) มาตรวจสอบด้วยการทำTLC เพื่อนำไปใช้วิเคราะห์นั้น โดยคำนวณระยะทางที่สารเคลื่อนที่ในรูปค่า Rf (Rate of flow) เพื่อทำการหาลำดับของสารที่ออกมาก่อน-หลัง เนื่องจากไม่สามารถมองเห็นสารได้ เพราะสารไม่มีสี พบว่า ค่า Rfหลอดที่ 1 ควรสูงคือมีค่า 0.78 เพราะว่าสารออกมาจากคอลัมน์ได้เร็ว สารที่อยู่ข้างบนแผ่น TLC จะออกมาก่อน เนื่องจากเคลื่อนที่ได้เร็ว ในขณะที่หลอด 40 ค่า Rfเท่ากับ 0.56 ส่วนลิโมนีนจะอยู่ด้านล่างเนื่องจากมีแรงยึดเหนี่ยวมากคาคว่ายังไม่ออกมาสอดคล้องหนังสือของ แม้น อรณศิริ. (2552)กล่าวว่า basic aluminium oxides (alumina) aluminaเป็นตัวดูดซับที่มีขั้วคล้ายๆกับ silica gel ซึ่งจะดูดซับสารที่มี double bonds และพวก aromatic hydrocarbons ส่วน polyamide 6 และ 11 จะมี amide group ที่สามารถเกิด hydrogen bond กับสารได้ และ polyamide ยังมีกลไกการแยกเป็นทั้งแบบ adsorption, partition และ ion exchange ซึ่งทำให้สามารถแยกสารได้หลายกลุ่ม นอกจากนี้การใช้ตัวดูดซับที่ผสมกันจะทำให้ได้ resolution ของการแยกสารบางชนิดนั้นด้วย

ผลการวิเคราะห์ปริมาณความเข้มข้นสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดจากเปลือกส้มโอเจือจางด้วยเอทานอลในปริมาตร 1:10 , 1:100 และ 1:1,000 ด้วยวิธี Folin-Ciocalteu (FC)พบว่าปริมาณความเข้มข้นสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดที่สกัดด้วยเอทานอล1:10 สูงที่สุด สอดคล้องกับงานวิจัยของ ศิวาพร และคณะ (2546) ได้ทดลองสกัดสารประกอบฟีนอลิกจากเปลือกมันฝรั่งด้วยน้ำ เมทานอล เอทานอล95% และอะซีโตน สารสกัดที่ได้นำไปทำให้แห้งแบบระเหิดพบว่าสารสกัดด้วยเมทานอลและเอทานอล95% มีค่าฟีนอลิกทั้งหมดสูงที่สุด ผลการวิเคราะห์สารสกัดแห้งด้วย HPLC พบว่าสารประกอบฟีนอลิกที่พบมากคือแกลลิก สารสกัดแห้งด้วยเมทานอลและเอทานอล95% มีประสิทธิภาพในการเป็นวัตถุดิบในน้ำมันถั่วเหลืองได้ดั่งนั้นแสงอุณหภูมิมิผลต่อความคงตัวของสารสกัดแห้งจากเปลือกมันฝรั่ง

ผลการวิเคราะห์ปริมาณการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากเปลือกส้มโอด้วยวิธี DPPH scavenging activity โดยสารสกัดเจือจางด้วยเอทานอล1:10 มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระร้อยละ 22.732 ± 3.108 ดีที่สุดจะเป็นสารละลายสีม่วง ส่วนสารสกัดเจือจางเอทานอล1:100 1:1,000

ร้อยละ 6.277 ± 3.372 และ ร้อยละ 2.152 ± 2.988 ตามลำดับ ซึ่งจะเห็นเป็นสารละลายสีเหลืองนวลซึ่งเจือจางเกินไป สอดคล้องกับงานวิจัยของ Ionita. (2005) รายงานว่าอนุมูลอิสระ DPPH ในสารละลายจะมีสีม่วง เมื่อสารต้านอนุมูลอิสระให้อิเล็กตรอนแก่อนุมูลอิสระ DPPH จะได้เป็นสาร DPPH ที่ไม่เป็นอนุมูลอิสระต่อไป ซึ่งจะเป็นสารสีเหลืองนวล ส่วน phenoxy radical ที่เกิดขึ้นจะจับกัน ทำให้ปฏิกิริยาถูกโซ่ของการเกิดอนุมูลอิสระหมดไป

การทดสอบการละลายโพลีโพลีสไตรีนของสารสกัดเปลือกส้มโอ ผลการศึกษานั้นไม่เป็นไปตามที่คาดหวัง เนื่องจากสารสกัดจากเปลือกส้มโอสามารถละลายโพลีโพลีสไตรีนได้เพียงเล็กน้อยเท่านั้นจะทำให้การละลายได้ดีมากขึ้นจำเป็นต้องใช้ตัวทำละลาย เช่น อะซีโตน จึงสามารถช่วยให้ประสิทธิภาพของการละลายโพลีโพลีสไตรีนดีขึ้นแต่ปัจจุบันการใช้โพลีโพลีสไตรีนที่ย่อยลง การใช้เคลือบอาจยังไม่คุ้มค่า น่าจะเอาสารสกัดไปทำอย่างอื่นที่มีมูลค่าสูงกว่า เช่น เครื่องสำอาง ยา เป็นต้น ดีกว่านำมาละลายโพลีโพลีสไตรีนซึ่งเป็นของที่มีมูลค่าต่ำ สอดคล้องกับงานวิจัยของ Gil-Jasso et al. (2019) ได้รายงานว่าการใช้สารลิโมนีนเป็นตัวทำละลายในการใช้เคลือบโพลีโพลีสไตรีนที่อุณหภูมิห้องโดยใช้น้ำมันหอมระเหยในเชิงพาณิชย์ สามารถละลายโพลีโพลีสไตรีนได้อย่างสมบูรณ์ ซึ่งสารลิโมนีนเป็นตัวทำละลายที่ได้จากธรรมชาติ โดยการสกัดสารจากเปลือกส้มโอนั้นในการเก็บสารสกัดจากเปลือกส้มโอใช้วิธีการเก็บไม่ค่อยดีจึงมีประสิทธิภาพน้อยลง รวมถึงระยะเวลาที่มากเกินไปอาจเกิดการระเหยส่งผลกระทบต่อการทำงาน

ผลการทดสอบทำโลชั่นบำรุงผิวกาย สูตรผิวนุ่ม ชุ่มชื้น พบว่า โลชั่นที่มีส่วนผสมของสารสกัดเปลือกส้มโอมีเนื้อเป็นสีขาว มีลักษณะเป็นเนื้อเดียวกัน เนื้อโลชั่นสามารถซึมเข้าสู่ผิวได้เร็ว ไม่ทำให้เหนียวเหนอะหนะ ซึ่งมีลักษณะทางกายภาพเป็นไปตามมาตรฐาน มีกลิ่นที่หอมสดชื่น มีลักษณะคงตัวที่ดีเมื่ออยู่ในอุณหภูมิห้องสามารถอยู่ได้โดยไม่เกิดการแยกชั้นสอดคล้องกับงานวิจัยของ Haze et al. (2002) พบว่าการกระตุ้นด้วยกลิ่น (olfactory stimulation) ของน้ำมันตระกูลส้มซึ่งมีลิโมนีน (limonene) เป็นองค์ประกอบหลัก จะช่วยกระตุ้นการทำงานของระบบประสาทอัตโนมัติ (sympathetic nerve innervating) มีผลให้เกิดการสลายไขมัน เกิดการย่อยไตรกลีเซอไรด์ที่สะสมในเซลล์ไขมันให้ กลายเป็นกลีเซอรอลและกรดไขมันอิสระ ส่งผลให้ลด และป้องกันการสะสมของไขมันในเซลล์ไขมัน นอกจากนี้ยังมีรายงานว่า น้ำมันตะไคร้และน้ำมันมะนาวเป็นน้ำมันหอมระเหยที่ช่วย กระตุ้นการไหลเวียนของโลหิต McClung (2003) และมีรายงานว่า กลิ่นของน้ำมันหอมระเหยบางชนิดสามารถช่วยกระตุ้นให้ระบบประสาท อัตโนมัติทำงานเพิ่มขึ้นได้ Haze et al. (2005)

สรุปผลการศึกษา

สภาวะการสกัดแบบสกัดซ้ำที่ระยะเวลา 3 วัน (1วัน3ซ้ำ)สามารถสกัดได้ปริมาณที่มากที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับสภาวะต่างๆ จึงเหมาะสมต่อการสกัด สารสกัดเปลือกส้มโอมีสารประกอบฟีนอลิกเป็นองค์ประกอบอยู่จึงมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระค่อนข้างสูง สารสกัดจากเปลือกส้มโอจึงมีศักยภาพในการใช้ประโยชน์ทางด้านเครื่องสำอางเพื่อแต่งกลิ่นธรรมชาติได้ดี ดังนั้นอาจนำสารสกัดจากเปลือกส้มโอไปพัฒนาเพื่อต่อยอดเชิงพาณิชย์ต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณภาควิชาวิทยาศาสตร์ และ ฝ่ายกิจการนิสิต คณะศิลปศาสตร์และวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน ที่ให้ความสนับสนุนทุนการทำวิจัยในครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

- นฤมลมานิพนพาน. 2551. สัมผัสผลไม้เศรษฐกิจที่มาจากคุณค่า. สำนักพิมพ์ประสานมิตรจำกัด. กรุงเทพฯ.
- วาสนา คำกวน. 2548. ปริมาณลิโมนีนในน้ำมันหอมระเหยที่สกัดได้จากผิวของพืชตระกูลส้มบางชนิด. รายงานการวิจัย. ภาควิชาวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง.
- ศิวาพร ศิวเวช และคณะ 2546 การสกัดสารประกอบฟีนอลิกจากเปลือกมันฝรั่ง. งานวิจัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ.
- สุกัญญาช่วยสุวรรณ. 2550. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดลิโมนีนจากเปลือกมะนาวเพื่อใช้ไซเคิลโฟมโพลีสไตรีน. ปัญหาพิเศษปริญญาตรี. สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ คณะศิลปศาสตร์และวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- Andrica, F.M., G.A. Draghici, C. Soica, I. Pinzaru, D. Coricovac, C. Citu and C. Dehelean. 2016. Antioxidant Activity Assessment of Ethanolic Spirulina Extracts. **Revista de Chimie Bucharest** 67:289-290.
- Chaiwong, S., T. Theppakorn. 2010. Bioactive compounds and antioxidant capacity of pink pummelo (Citrus grandis(L.) Osbeck) CV“Thongdee” in Thailand). The International Society for Southeast Asia Agricultural Science 16: 10-16.
- Gli-Jasso, N.D., M. A. Segura-González, G. Soriano-Giles, J. Neri-Hipolito, N. López, E. Mas-Hernández, C. E. Barrera-Díaz, V. Varela-Guerrero and M. F. Ballesteros-Rivasa. 2019. Dissolution and recovery of waste expanded polystyrene using alternative essential oils. **The Science and Technology of Fuel and Energy** 239: 611-616
- Pichaiyongvongdee, S. and R. Haruenkit. 2009. Investigation of limonoids, flavanones, total polyphenol content and antioxidant activity in Seven Thai pummelo cultivars. **Kasetsart Journal Natural Science** 43: 458-466.
- Ionita, P. 2005. Is Dpph Stable Free Radical a Good Scavenger for Oxygen Active Species. **Chemicals papers** 59: 11-16
- Phi, N.T.L., C. Nishiyama, H. Choi and M. Sawamura. 2006. Evaluation of Characteristic

- Aroma Compounds of Citrus natsudaoid Hayata (Natsudaoid) Cold-Pressed Peel Oil. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry** 70: 1832-1838.
- Negro, V., G. Mancini, B. Ruggeri and D. Fino. 2016. Citrus waste as feedstock for bio-based products recovery. **Bioresource Technology** 214: 806-815
- Smith, D.C., S. Forland, E. Bachanos, M. Matejka and V. Barrett V. 2001. Solvent extraction. **Chem Educator** 6: 28-31
- Singleton, V.L., A. Joseph and A. Rossi. 1965. Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. **American Journal of Enology and Viticulture** 16: 144-158.
- McClung, J.H. 2003. Composition for topical application to skin. **US 6,579,543 B1**. 14: 19-145.
- Haze, S., K. Sakai and Y. Gozu. 2002. Effects of fragrance inhalation on sympathetic activity in normal adults. **Japanese journal of pharmacology** 90: 247-53.
- Haze, S., K. Sakai, Y. Gozu, Y. Koizumi, Y. Hariya, Y. Shibata and Y. Sakiguchi. 2005. Sympathetic nerve-stimulating fragrant compositions. **Japanese journal of pharmacology** 84: 133-256.

ภาคผนวก ก
สารเคมีและวิธีการเตรียมสาร

สารเคมี

1. น้ำกลั่น (distilled water)
2. โซเดียมซัลเฟต (Sodium sulfate)
3. เฮกเซน (Hexane)
4. อะซิโตน (Acetone)
5. เมทานอล (Methanol)
6. Aluminiumoxid 60 G
7. Phosphomolybdic acid
8. Iodine
9. Silicagel 60
10. Aluminium oxide 90
11. Folin-Ciocalteu (FC) reagents
12. sodium carbonate
13. gallic acid
14. butylatedhydroxytoluene (BHT)
15. 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH)
16. (R)-(+)-Limonene analytical standard
17. D-Limonene สารขจัดเห็บ (Chemipan)

ตารางผนวกที่ ก 1 การเตรียมสารละลายกรดแกลลิก(gallic acid) เตรียมสารละลายเข้มข้นที่ความเข้มข้น100 มิลลิกรัมต่อลิตร

ความเข้มข้น (µg/ml)	gallic acid 100 mg/L (ml)	น้ำกลั่น (ml)
0	0	10
20	2	8
40	4	6
60	6	4
80	8	2
100	10	0

ตารางผนวกที่ ก 2การเตรียม butylatedhydroxytoluene (BHT)

ความเข้มข้น (µg/ml)	BHT 100 µg/100ml (ml)	Methanol(ml)
0	0	4
20	2	8
40	4	6
60	6	4
80	8	2
100	10	0

ภาคผนวก ข
วิธีการทดลองและผลการทดลอง

สูตรการคำนวณค่า R

$$R_f = \text{ระยะทางที่สารเคมีเคลื่อนที่ (cm)} / \text{ระยะทางที่ตัวทำละลายเคลื่อนที่ (cm)}$$

วิธีการวิเคราะห์สารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด

- เติมน้ำยาเคมี Folin-Ciocalteu (FC) 10% ปริมาตร 5 มิลลิลิตรผสมกับสารสกัดที่สกัดด้วยตัวทำละลายปริมาตรต่าง ๆ อย่างละ 1 มิลลิลิตร
- ตามด้วยเติมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต โดยการชั่งโซเดียมคาร์บอเนต 7.5 กรัม ละลายในน้ำ 100 มิลลิลิตร ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตรจากนั้นนำไปไว้ในที่มืด 30 นาที
- หลังจากนั้นวัดการดูดกลืนแสงที่ 765 นาโนเมตรโดยใช้เครื่อง visible spectrophotometer ทำการทดสอบตัวอย่างละสามซ้ำ

วิธีการวิเคราะห์ปริมาณการต้านอนุมูลอิสระ

- นำสารสกัดเปลือกส้มโอจากตัวทำละลายปริมาตรที่ต่างกัน ใส่หลอดอย่างละ 1 มิลลิลิตร
- จากนั้นเติมเมทานอลตัวอย่างละ 10 มิลลิลิตรโดยเติม 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) ความเข้มข้น 1 mmol/L ในเมทานอล ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตรแล้วเขย่าให้สารเข้ากัน
- จากนั้นบ่มตัวอย่าง 20 นาที ในที่มืด และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 517 nm การวัดทั้งหมดทำทั้งหมดสามซ้ำ โดยใช้ BHT เป็นสารมาตรฐาน

สูตรการคำนวณเปอร์เซ็นต์ของกิจกรรมต้านอนุมูลอิสระ (radical scavenging activity, RSA%)

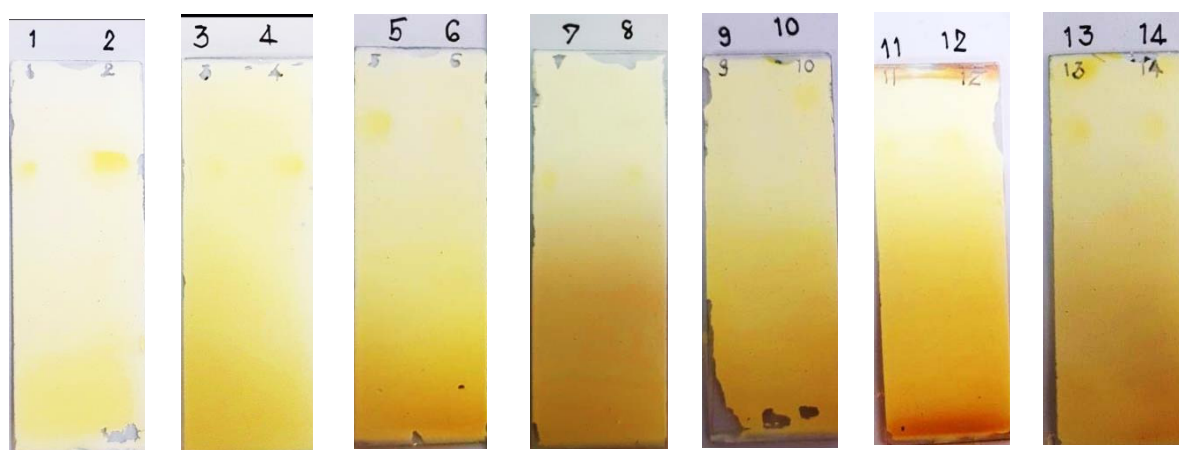
โดยคำนวณดังนี้

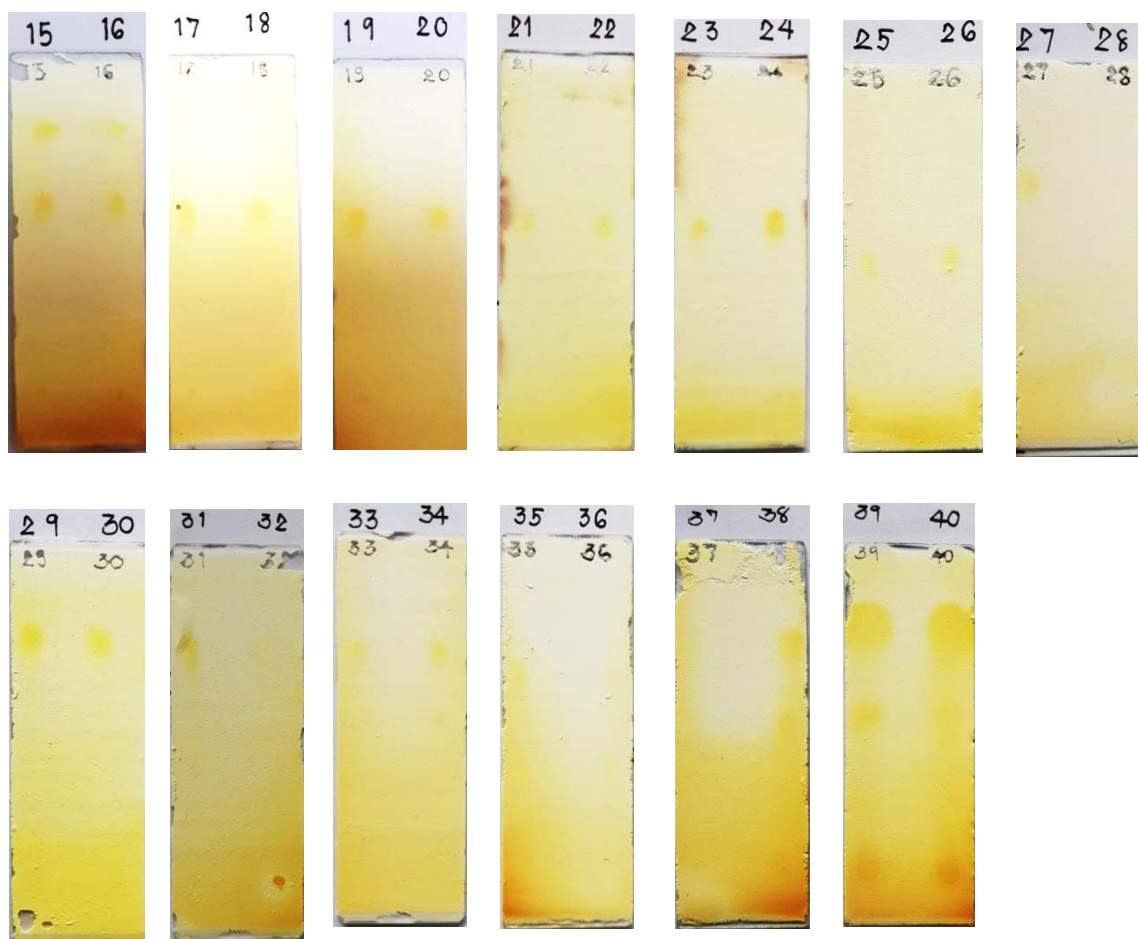
$$(RSA, \%) = [(A_{\text{control}} - A_{\text{sample}}) / A_{\text{control}}] \times 100$$

เมื่อ A_{control} คือ ค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ของสารละลาย DPPH

A_{sample} คือ ค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ของสารตัวอย่างผสมกับสารละลาย

DPPH

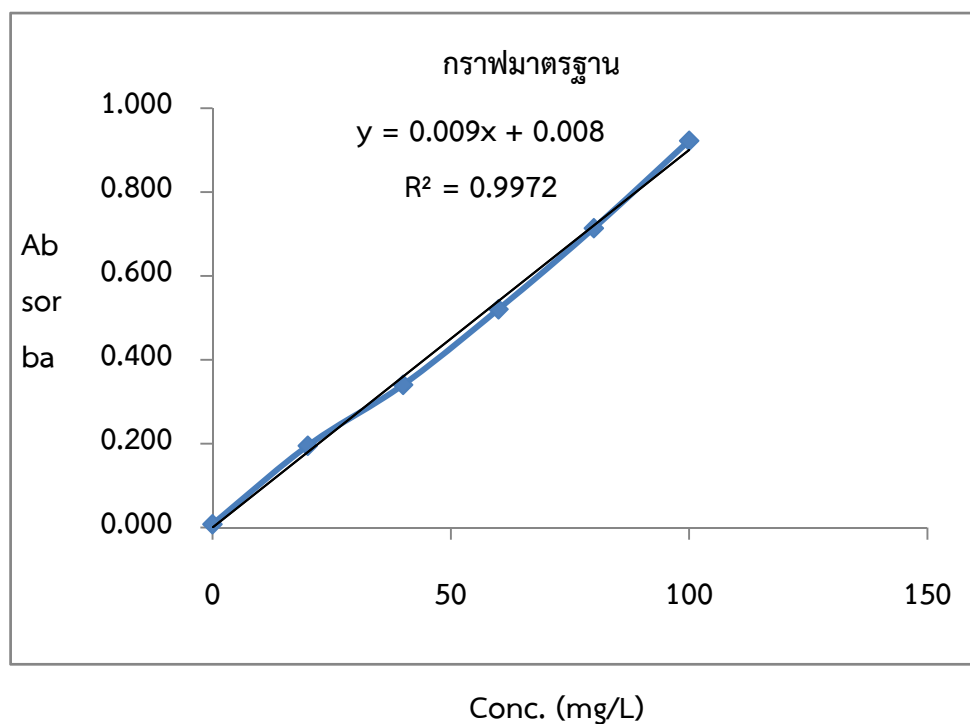




ภาพที่ข 1TLC ของสารสกัดจากเปลือกส้มโอโดยใช้วิธี Column Chromatography (CC)

ตารางผนวกที่ข 1ค่า Rf ของสารสกัดเปลือกส้มโอ

จุดที่	Rf1	Rf2	จุดที่	Rf1	Rf2	จุดที่	Rf1	Rf2	จุดที่	Rf1	Rf2
1	0.78		11	0.87		21	0.63		31	0.75	
2	0.78		12	0.87		22	0.63		32	0.75	
3	0.74		13	0.78	0.95	23	0.55		33	0.77	
4	0.77		14	0.78	0.95	24	0.61		34	0.74	
5	0.77		15	0.54	0.89	25	0.45		35	0.37	0.66
6	0.69		16	0.54	0.89	26	0.48		36	0.37	0.66
7	0.72		17	0.57		27	0.70		37	0.50	0.79
8	0.72		18	0.63		28	0.74		38	0.50	0.79
9	0.84		19	0.63		29	0.83		39	0.56	0.85
10	0.84		20	0.63		30	0.81		40	0.56	0.85



Sample	X			ปริมาณสารประกอบฟีนอลิก (mg GAE/10 g DW) ± SD
	1	2	3	
เอทานอล1 : 10	73.333	72.000	80.333	75.222 ± 4.476 ^a
เอทานอล1 : 100	11.889	10.222	9.667	10.593 ± 1.156 ^b
เอทานอล1 : 1,000	7.333	1.667	5.222	4.741 ± 2.864 ^b

ภาพผนวกที่ ข 2 กราฟมาตรฐานของสารละลายกรดแกลลิก (gallic acid)

ตารางผนวกที่ ข 2 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดจากสารสกัดโดยเจือจางปริมาตรต่างกัน

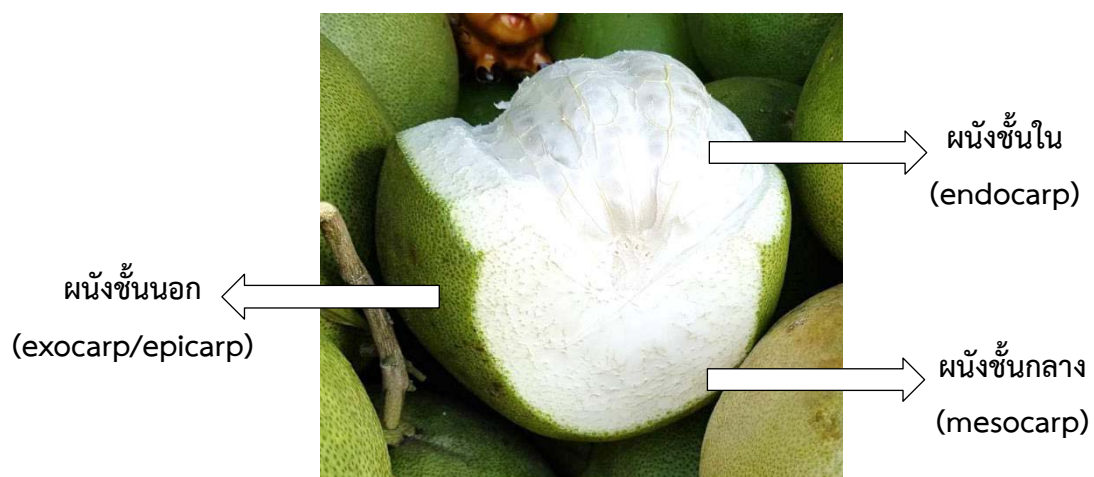
หมายเหตุ: ค่าในตารางแสดงค่าเฉลี่ย ±SD

a และ b แสดงถึงค่าเฉลี่ยที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05)

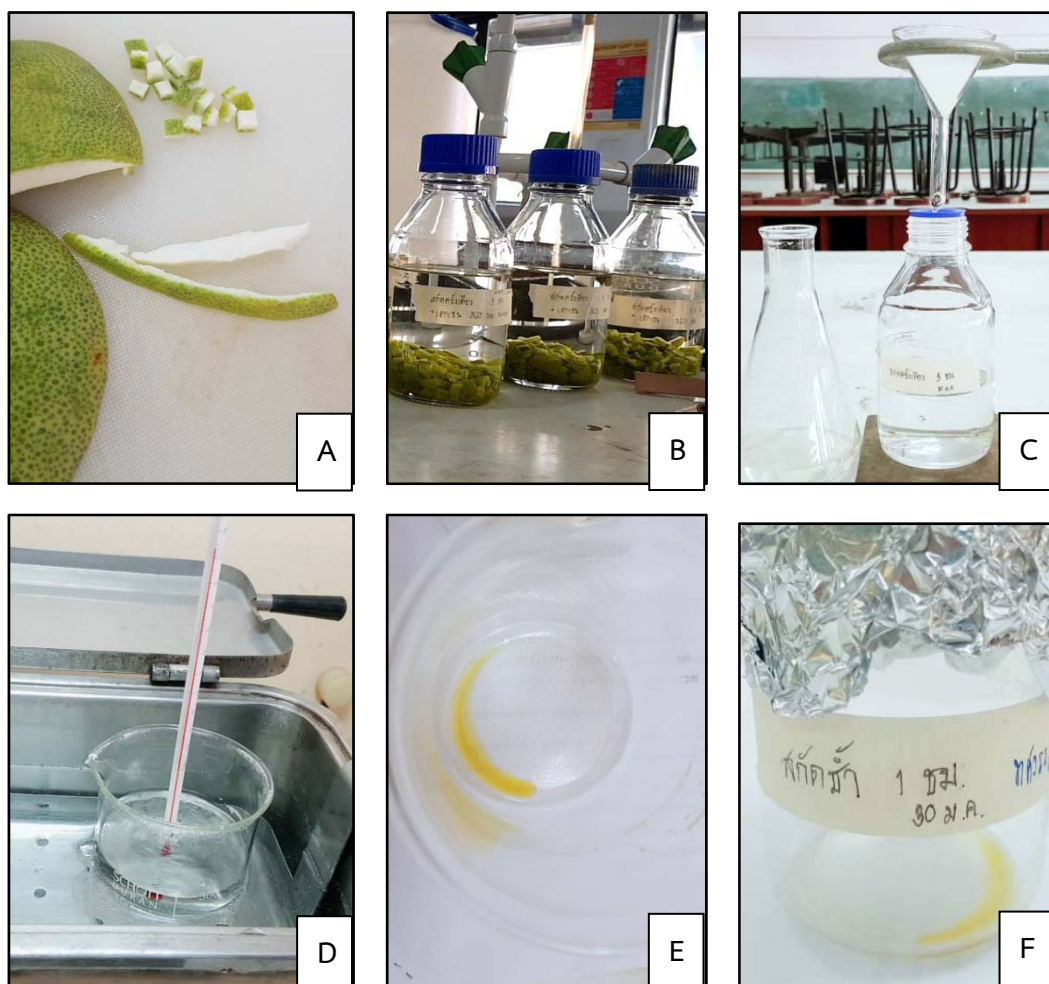
ตารางผนวกที่ ข 3 ค่าดุดกลืนแสงของกราฟมาตรฐานบิวทิลไฮดรอกซีโทลูอิน(BHT)

ความเข้มข้น	ค่าการดูดกลืนแสง		
	1	2	3
0	0.248	0.568	0.554
20	0.181	0.390	0.368
40	0.120	0.274	0.239
60	0.080	0.184	0.155
80	0.056	0.121	0.107
100	0.042	0.100	0.078

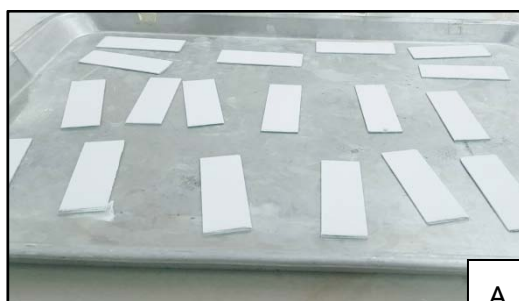
ภาคผนวก ค
ภาพการทดลอง



ภาพผนวกที่ ค1 ส่วนประกอบของส้มโอ



ภาพผนวกที่ ค 2 ขั้นตอนการสกัดสาร (A) เปลือกส้มโอส่วนสีเขียวมาหั่นเป็นชิ้น, (B) ชั่งเปลือกส้มโอใส่ขวด 3 ขวด ขวดละ 40.00 กรัม เติมหะกอก 360.00 มิลลิกรัม ปิดฝาแช่เย็นไว้ที่อุณหภูมิห้อง 3 ชั่วโมง (3 วัน และ 15 วัน), (C) แยกเปลือกส้มโอออก นำสารละลายที่กรองได้ใส่ในขวดเติมโซเดียมซัลเฟต 1.00 กรัม แช่ 2 นาที ทิ้งไว้ 15 นาทีแล้วไซสารละลายผ่านกระดาษกรองใส่ขวด, (D) ระเหยสารสกัดด้วยเครื่อง Water Bath 70 °C จนแห้ง, (E) ทิ้งให้เย็น ชั่งน้ำหนัก, (F) หุ้มอลูมิเนียมฟอยล์



A

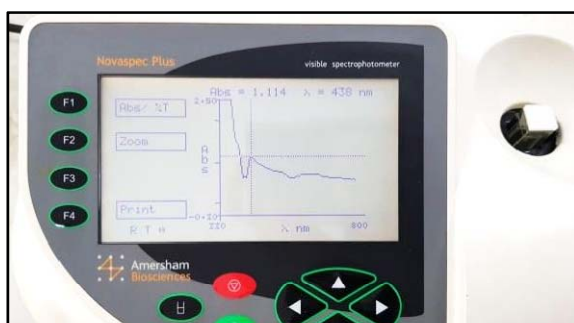


B

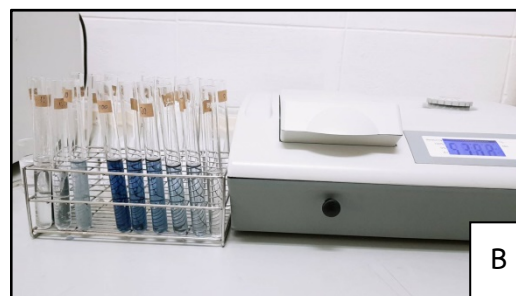
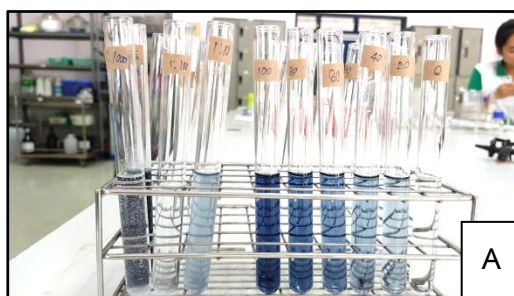
ภาพผนวกที่ ค 3 การเตรียมอุปกรณ์สำหรับ thin layer chromatography (A) การเตรียมแผ่น TLC จาก Aluminium oxid 60 G และ (B) การชะด้วยตัวทำละลาย



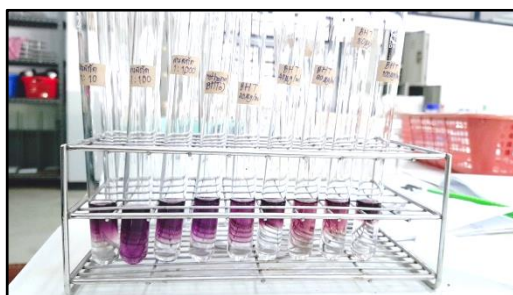
ภาพผนวกที่ ค 4 การทำคอลัมน์โครมาโทกราฟีของสารสกัดเปลือกส้มโอ



ภาพผนวกที่ ค 5 การหาความยาวคลื่นที่ดูดกลืนแสงสูงสุด (λ_{max}) ของสารแต่ละส่วน โดยค่า λ_{max} ด้วยเครื่อง visible spectrophotometer วัดช่วงความยาวคลื่น 400 – 800 นาโนเมตร



ภาพผนวกที่ ค 6 การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (A) น้ำยาเคมี Folin-Ciocalteu 10% 5 มิลลิลิตร ผสมกับสารสกัด 1 มิลลิลิตร เติมน้ำละลายโซเดียมคาร์บอเนต 7.5% 1.5 มิลลิลิตร ไว้นาน 30 นาที, (B) วัดการดูดกลืนแสงที่ 765 นาโนเมตร โดยเครื่อง visible spectrophotometer



ภาพผนวกที่ ค 7 การวิเคราะห์ปริมาณการต้านอนุมูลอิสระ (A) สารสกัดเปลือกส้มโอจาก
ตัวทำละลายปริมาตรต่างกัน 1 มิลลิลิตรเติมเมทานอล 10 มิลลิลิตร เติม DPPH
0.5 มิลลิลิตรเขย่าให้เข้ากัน, (B) บ่ม 20 นาที ในที่มืด และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่
517 นาโนเมตร โดยเครื่อง visible spectrophotometer



ภาพผนวกที่ ค 8 การทดสอบการละลายโพลีโพลีสไตรีน



ภาพผนวกที่ ค 9 การทำโลชั่นบำรุงผิวกาย สูตรผิวนุ่ม ชุ่มชื้น