ผลของสภาวะการสกัดต่อปริมาณสารประกอบฟีนอลิก สารประกอบฟลาโวนอยด์ และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของส่วนต่าง ๆ ของส้มซ่า

Effects of Extraction Conditions on Total Phenolic Content, Total Flavonoid Content and Antioxidant Activities of Different Parts of *Citrus aurantium* L.

ชมัยพร รอดกลิ่น[1*] เอกรัฐ ศรีสุข[1] และ กล่าวขวัญ ศรีสุข[2]

Chamaiporn Rodglin[1*], Ekaruth Srisook[1] and Klaokwan Srisook[2]

[1]ภาควิชาเคมี ศูนย์ความเป็นเลิศด้านนวัตกรรมทางเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

[2]ภาควิชาชีวเคมี ศูนย์ความเป็นเลิศด้านนวัตกรรมทางเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

[1]Chemistry Department, Center of Excellence for Innovation in Chemistry, Faculty of Science, Burapha University

[2]Biochemistry Department, Center of Excellence for Innovation in Chemistry, Faculty of Science, Burapha University

Received : 17 June 2016

Accepted : 12 Janurary 2017

Published online : 16 February 2017

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้ศึกษาเกี่ยวกับผลสภาวะในการสกัดสารจากเปลือกผล ใบ และกิ่งของส้มซ่าต่อปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม ปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์รวม และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของส้มซ่าที่สกัดด้วยตัวทำละลาย น้ำโดยใช้หม้อนึ่งความดันที่ 121 °C ต้มในน้ำเดือด 100 °C เอทานอลเข้มข้นร้อยละ 40, 70, และ 95 โดยปริมาตร พบว่าส่วนสกัดจากเปลือกผลมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม ความสามารถในการรีดิวซ์ และฤทธิ์กำจัดอนุมูลอิสระ สูงกว่าส่วนสกัดจากใบ แต่ส่วนสกัดจากใบของส้มซ่ามีปริมาณสารฟลาโวนอยด์รวมสูงกว่าส่วนสกัดจากเปลือกผล และกิ่งของส้มซ่า ส่วนสกัดจากเปลือกผล และใบที่สกัดโดยการต้มในน้ำเดือด และส่วนสกัดจากกิ่งที่สกัดด้วยน้ำโดยใช้หม้อนึ่งความดัน มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระสูงกว่าส่วนสกัดที่สภาวะอื่น ๆ (IC_{50} = 0.236 ± 0.008, 0.579 ± 0.021, และ 0.733 ± 0.002 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ) ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกมีความสัมพันธ์ทางบวกกับฤทธิ์กำจัดอนุมูลอิสระ และความสามารถในการรีดิวซ์ (R = 0.5606 และ R = 0.8358 ตามลำดับ) การค้นพบครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าเปลือกผล ใบ และกิ่งของส้มซ่าเป็นแหล่งสารต้านอนุมูลอิสระ ที่อาจจะนำไปใช้ผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร และใช้เป็นเครื่องสำอาง

คำสำคัญ : ปริมาณสารประกอบฟีนอลิก สารประกอบฟลาโวนอยด์ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ส้มซ่า

Abstract

This research study was aimed to determine the effect of extraction conditions on total phenolic, flavonoid content and antioxidant activities of different part of *Citrus aurantium* L. extracts. The peels, leaves, and branches of *C. aurantium* L. were extracted with water (autoclave 121°C), water (100 °C), ethanol 40%, 70%, and 95% v/v, respectively. The peel extract exhibited superior total phenolic content, reducing power, and DPPH radical scavenging activity than that leaf and branch extract. In contrast, total flavonoid content of leaf extracts were higher than that peel and branch extract. The water (100°C) extract of peels and leaves and water (autoclave 121°C) extract of branches with the highest DPPH radical scavenging activity (IC_{50} = 0.236 ± 0.008, 0.579 ± 0.021, and 0.733 ± 0.002 mg/mL, respectively).Total phenolic content showed positive correlations on the DPPH radical scavenging activity and reducing power (R = 0.5606 and R = 0.8358, respectively). These results suggest that the peels, leaves and branches of *Citrus aurantium* L. are sources of antioxidant which might have potential for dietary supplement and cosmetics.

Keywords : total phenolic, total flavonoid, antioxidant, *Citrus aurantium* L.

บทนำ

คนไทยเสียชีวิตด้วยโรคไม่ติดต่อมากขึ้น จากการรายงานขององค์การอนามัยโลกในคนไทยช่วงอายุเฉลี่ย 30-70 ปีเสียชีวิตด้วยโรคไม่ติดต่อ ร้อยละ 71 ของผู้เสียชีวิตทั้งหมด และเสียชีวิตด้วยโรคหัวใจและหลอดเลือด โรคมะเร็ง โรคทางเดินหายใจเรื้อรัง โรคเบาหวาน และโรคไม่ติดต่ออื่น ๆ (World Health Organization, 2014) สาเหตุหนึ่งที่ทำให้เกิดโรคไม่ติดต่อเหล่านี้คืออนุมูลอิสระ อนุมูลอิสระคือโมเลกุลหรือไอออนที่มีอิเล็กตรอนเดี่ยวอยู่วงนอกของอะตอมหรือโมเลกุล เป็นโมเลกุลที่ไม่เสถียร มีความว่องไวต่อการเกิดปฏิกิริยาเคมี มักเกิดปฏิกิริยาลูกโซ่ สามารถเข้าทำปฏิกิริยากับสารอื่นที่อยู่รอบข้างได้ ทำให้เกิดความผิดปกติของร่างกายและก่อให้เกิดโรคขึ้น (Ames *et al.,* 1993) โดยปกติอนุมูลอิสระสามารถเกิดขึ้นในร่างกายได้ แต่ร่างกายมีการกำจัดอนุมูลอิสระอย่างสมดุล หากร่างกายของเราได้รับอนุมูลอิสระจากภายนอกร่างกายมากขึ้น เช่น จากการกินอาหารประเภทปิ้ง ย่าง หรือการทอดโดยใช้น้ำมันซ้ำหลายๆครั้ง มลภาวะจากสิ่งแวดล้อม ควันพิษ รังสีเอ็กซ์ ทำให้ร่างกายไม่สามารถ กำจัดอนุมูลอิสระได้อย่างสมดุลจึงทำให้มีอนุมูลอิสระในร่างกายมากจนทำให้เกิดโรคต่าง ๆ ได้ (Tienboon, 2010)

สารต้านอนุมูลอิสระซึ่งมีคุณสมบัติในการป้องกันการเกิดอนุมูลอิสระ ทำลายหรือยับยั้งอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้น ยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาลูกโซ่ ทำให้สารอนุมูลอิสระมีจำนวนน้อยลง ทำให้ความเสี่ยงของการเกิดโรคลดลง ดังนั้นสารต้านอนุมูลอิสระจึงช่วยลดความเสี่ยงต่อการเกิดโรคร้ายได้ ในผักผลไม้มีสารต้านอนุมูลอิสระหลายชนิดเช่น วิตามินซี เบต้าเคโรทีน (beta-carotene) สารกลุ่มโพลีฟีนอลิก (polyphenolics) เช่น ฟลาโวนอยด์ (flavonoids) เป็นต้น ในปัจจุบันมีการรายงานเกี่ยวกับสารในกลุ่มโพลีฟีนอลิกว่าเป็นสารที่มีบทบาทสำคัญในการต้านอนุมูลอิสระ (Vajragupta *et al*., 2007) งานวิจัยด้านนี้จึงเป็นที่นิยมมาก นักวิจัยพยายามที่จะศึกษาค้นคว้าเกี่ยวกับสารต้านสารอนุมูลอิสระจากพืช

ชนิดต่าง ๆ เพื่อนำมาใช้ เป็นส่วนผสมของยา อาหาร หรือผลิตภัณฑ์เสริมอาหารเพื่อตอบสนองความต้องการของคนยุคใหม่มากขึ้น

ส้มซ่ามีชื่อวิทยาศาสตร์คือ *Citrus aurantium* L. อยู่ในวงศ์ Rutaceae มีชื่อสามัญว่า Sour orange, Bitter orange, Bigarade, Seville orange ชื่ออื่น ๆ กะเหรี่ยงที่จังหวัดแม่ฮ่องสอนเรียกซาอ้อ ส่วนจังหวัดตรังเรียกว่าส้มจังกระ ชาวบ้านนำน้ำส้มซ่ามาใช้ในการประกอบอาหารแทนมะนาว และนำเปลือกมาปรุงแต่งกลิ่นของอาหาร เมื่อเร็ว ๆ นี้ มีรายงานการวิจัยพบว่าน้ำมันหอมระเหย และสารสกัดเมทานอล (methanol) จากเปลือกผล ใบ ดอก เมล็ด รวมทั้งน้ำของส้มซ่ามีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (Sarrou *et al*., 2013; Benamrouche & Madani, 2013; Moulehi *et al*., 2012; Barreca *et al*., 2011) แต่อย่างไรก็ตามยังไม่มีการรายงานเกี่ยวกับการศึกษาผลของสภาวะการสกัดสารจากส้มซ่าต่อปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม ปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์รวม และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ของสารสกัดจากส่วนของใบ เปลือกผล และกิ่งของส้มซ่า ซึ่งเป็นส่วนที่ไม่ได้ใช้ประโยชน์มาสกัดด้วยน้ำที่อุณหภูมิต่างกัน และเอทานอล (ethanol) ที่ความเข้มข้นต่างกัน เปรียบเทียบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระเพื่อใช้เป็นข้อมูลในการเลือกส่วนของส้มซ่า และตัวทำละลายที่ดีที่สุดในการสกัด นำไปสู่การพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์เสริมอาหารหรือใช้ประโยชน์ในด้านอื่นๆต่อไป

วิธีดำเนินการวิจัย

เครื่องมือ

Microplate spectrophotometer (Liopette), Rotary evaporator R-200 (Buchi, ประเทศสมาพันธรัฐสวิส), Freeze dryer DK-3450 (Scanvac, ประเทศราชอาณาจักรเดนมาร์ก)

สารเคมี

สารเคมีที่ใช้ในการศึกษา มีดังนี้ กรดแกลลิก (Gallic acid, Fluka, ประเทศสหพันธ์สาธารณรัฐเยอรมนี), กรดไตรคลอโรอะซิติก (CCl_3COOH, Carlo erba, ประเทศสหพันธ์สาธารณรัฐเยอรมนี), เควอร์เซติน (Quercetin, Sigma-dldrich, ประเทศสหพันธ์สาธารณรัฐเยอรมนี), โซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3, Carlo erba reagent, ประเทศสหพันธ์สาธารณรัฐเยอรมนี), โซเดียมไนไตรท์ ($NaNO_2$, Univar, ประเทศออสเตเรีย), โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4, AR Grade, BDH chemical, ประเทศอังกฤษ), โพแทสเซียมเฟอร์ริกไซยาไนด์ (Potassium ferricyanide, analytical grade, Univar, ประเทศออสเตเรีย), โพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4, Riedel-de Haen AG, ประเทศสหพันธ์สาธารณรัฐเยอรมนี), เฟอร์ริคคลอไรด์เฮกซะไฮเดรต ($FeCl_3.6H_2O$, Fisher Chemical, ประเทศสหราชอาณาจักร), เฟอร์โรซีน (Ferrocene, Sigma-aldrich, ประเทศสหพันธ์สาธารณรัฐเยอรมนี), เฟอร์รัสซัลเฟต ($FeSO_4$, AR grade, Qrec, ประเทศนิวซีแลนด์), เมทานอล (CH_3OH, ACS grade, Honeywell, ประเทศเกาหลี), อะลูมิเนียมคลอไรด์เฮกซะไฮเดรต ($AlCl_3.6H_2O$, Merck, ประเทศสหพันธ์สาธารณรัฐเยอรมนี), เอทานอล (C_2H_5OH, commercial grade), DPPH (2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl, For R&D use only, Aldrich chemistry, ประเทศสหพันธ์สาธารณรัฐเยอรมนี), Folin-Ciocalteu reagent (FCR, Carlo Erba, ประเทศสหพันธ์สาธารณรัฐเยอรมนี), Ethylene diamine tetraacetic acid disodium salt (EDTA.2Na, AR grede, Carlo Erba, ประเทศสหพันธ์สาธารณรัฐเยอรมนี)

พืชตัวอย่าง

การพิสูจน์เอกลักษณ์ของส้มซ่าในช่วงเดือนเมษายน พ.ศ. 2557 โดย ดร. เบญจวรรณ ชิวปรีชา อาจารย์ประจำภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์มหาวิทยาลัยบูรพา

ผลส้มซ่าเก็บมาจาก หมู่ที่ 5 ต. คลองปาง อ. รัษฎา จ.ตรัง ตั้งอยู่ที่ 7°58'05.2"N 99°38'53.8"E7.968120, 99.648285 เก็บ ในช่วงเดือนพฤศจิกายน พ.ศ. 2557 จากนั้นล้างแต่ละส่วนด้วยน้ำกลั่น ผึ่งลมไว้ให้แห้ง ปอกเปลือกส้มซ่าและหั่นเปลือกส้มซ่าเป็นชิ้นเล็ก นำไปอบที่อุณหภูมิ 50 °C เป็นเวลา 1 สัปดาห์ บดให้ละเอียดด้วยเครื่องปั่นเก็บในโหลพลาสติกที่ปิดสนิท

ใบและกิ่งของส้มซ่าเก็บมาจาก หมู่ที่ 5 ต. คลองปาง อ. รัษฎา จ.ตรัง ตั้งอยู่ที่ 7°58'05.2"N 99°38'53.8" E7.968120, 99.648285 เก็บในช่วงเดือนกุมภาพันธ์ พ.ศ. 2558 จากนั้นล้างแต่ละส่วนด้วยน้ำกลั่น ผึ่งลมไว้ให้แห้ง หั่นเปลือกส้มซ่าเป็นชิ้นเล็ก นำไปอบที่อุณหภูมิ 50 °C เป็นเวลา 1 สัปดาห์ บดให้ละเอียดด้วยเครื่องปั่นเก็บในโหลพลาสติกที่ปิดสนิท

1. การสกัดสารจากส่วนต่าง ๆ ของส้มซ่า

ชั่งส่วนของเปลือกผล ใบ และกิ่งของส้มซ่าที่อบแห้ง และบดละเอียดมาส่วนละ 20 กรัม ในอัตราส่วนน้ำหนักแห้งต่อส่วนสกัดเป็น 1 กรัม: 10 มิลลิลิตร มาสกัดด้วยตัวทำละลาย 5 ชนิด คือ สกัดด้วยน้ำโดยใช้หม้อนึ่งความดันที่อุณหภูมิ 121 °C เป็นเวลา 30 นาที ต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 30 นาที แช่ในเอทานอลเข้มข้นร้อยละ 40, 70, และ 95 โดยปริมาตร เป็นเวลา 9 วัน จะได้ส่วนสกัดจากส้มซ่าทั้งหมด 15 ส่วน นำมากรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 4 นำส่วนสกัดไประเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่อง rotary evaporator และทำให้แห้งโดยใช้เครื่อง Freeze dryer เก็บส่วนสกัดในขวดที่อุณหภูมิ 4 °C จนกระทั่งนำมาวิเคราะห์

2. การทดสอบหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม

ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมทดสอบตามวิธีของ (Srisook *et al*., 2010) และเปรียบเทียบกับกรดแกลลิก โดยเตรียมสารละลายกรดแกลลิกในเมทานอลและเจือจางให้ได้ความเข้มข้น 0, 0.03125, 0.0625, 0.125, 0.25 และ 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นเติมสารละลายกรดแกลลิก หรือส่วนสกัดในเมทานอลที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 125 ไมโครลิตร เติมน้ำกลั่น 0.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน เติมสารละลาย Folin-Ciocalteu ปริมาตร 125 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันนำไปบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 6 นาที เติม โซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3) เข้มข้นร้อยละ 7 โดยมวลต่อปริมาตร ปริมาตร 1.25 มิลลิลิตร และน้ำกลั่น ปริมาตร 1 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 90 นาที จากนั้นปิเปตสารผสมปริมาตร 200 ไมโครลิตร ใส่ในหลุมไมโครเพลทนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร ด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสงแบบไมโครเพลท คำนวณปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมจากสมการของกราฟมาตรฐานของแกลลิก แสดงปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมในรูปมิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อส่วนสกัด 1 กรัม ผลการทดลองที่ได้แสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าเฉลี่ยส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน ของการทดลองอย่างน้อย 3 ครั้ง ที่เป็นอิสระต่อกัน แต่ละครั้งทำ 3 ซ้ำ

3. การทดสอบหาปริมาณสารฟลาโวนอยด์รวม

ปริมาณฟลาโวนอยด์ทำตามวิธีของ (Wattanakul *et al*., 2009) เปรียบเทียบกับ เควอร์เซติน (Quercetin) โดยเตรียมสารละลายเควอร์เซตินในเมทานอล และเจือจางให้ได้ความเข้มข้น 0, 0.025, 0.05, 0.1, 0.2 และ 0.4 มิลลิกรัม

ต่อมิลลิลิตร จากนั้นนำสารละลายเควอร์เซติน หรือส่วนสกัดที่ละลายในเมทานอล 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นปริมาตร 2 มิลลิลิตร และสารละลายโซเดียมไนไตรท์ ($NaNO_2$) เข้มข้นร้อยละ 5 โดยมวลต่อปริมาตร ปริมาตร 0.15 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน เติมสารละลายอะลูมิเนียมไตรคลอไรด์ เข้มข้นร้อยละ 10 โดยมวลต่อปริมาตร ปริมาตร 0.15 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันนำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 นาที เติมน้ำกลั่น 2.2 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ปิเปตสารผสมปริมาตร 200 ไมโครลิตร ใส่ในหลุมไมโครเพลท นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 510 นาโนเมตร ด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสงแบบไมโครเพลท คำนวณปริมาณฟลาโวนอยด์จากสมการของกราฟมาตรฐานของเควอร์เซติน แสดงปริมาณฟลาโวนอยด์ในรูปมิลลิกรัมสมมูลของเคอร์เซตินต่อส่วนสกัด 1 กรัม ผลการทดลองที่ได้แสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าเฉลี่ยส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน ของการทดลองอย่างน้อย 3 ครั้ง ที่เป็นอิสระต่อกันแต่ละครั้งทำ 3 ซ้ำ

4. การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของส่วนสกัด

4.1 ทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดโดยใช้ DPPH-radical scavenging activity

การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH (2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl) ทำตามวิธีของ (Srisook *et al*., 2010) โดยใช้สารละลาย DPPH เข้มข้น 0.2 มิลลิโมลาร์ และส่วนสกัดที่ความเข้มข้นต่าง ๆ โดยใช้เมทานอลเป็นตัวทำละลาย ปิเปตสารใส่ในไมโครเพลทดังนี้ หลุม $A_{control}$ ปิเปต เมทานอล 50 ไมโครลิตร และ DPPH 100 ไมโครลิตร หลุม A_{sample} ปิเปต ส่วนสกัด 50 ไมโครลิตร และในเมทานอล 100 ไมโครลิตร หลุม A_{blank} ปิเปต ส่วนสกัด 50 ไมโครลิตร และเมทานอล 100 ไมโครลิตรผสมแต่ละหลุมให้เข้ากันนำไปบ่มในห้องมืด 30 นาทีที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 517 นาโนเมตร ด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสงแบบไมโครเพลท โดยใช้แกลลิกเป็นตัวควบคุมแบบบวก คำนวณเปอร์เซ็นต์ การกำจัดอนุมูลอิสระ ดังสมการ 1

เปอร์เซนต์การกำจัดอนุมูล $DPPH = \left[\frac{A_{control}-(A_{sample}-A_{blank})}{A_{control}}\right] \times 100$ (1)

โดย $A_{control}$ คือ ค่าการดูดกลืนแสงของหลุมควบคุม ที่ประกอบด้วยเมทานอล และสารละลาย DPPH

A_{sample} คือ ค่าการดูดกลืนแสงที่ประกอบด้วย ส่วนสกัดและสารละลาย DPPH

A_{blank} คือ ค่าการดูดกลืนแสงของหลุม ที่ประกอบด้วย ส่วนสกัดและเมทานอล

จากนั้นคำนวณหาค่า IC_{50} จากกราฟความสัมพันธ์ระหว่าง เปอร์เซ็นการกำจัดอนุมูลอิสระกับความเข้มข้นของสารสกัด ผลการทดลองที่ได้แสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าเฉลี่ยส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน ของการทดลองอย่างน้อย 3 ครั้ง ที่เป็นอิสระต่อกัน แต่ละครั้งทำ 3 ซ้ำ

4.2 ทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดโดยใช้ reducing power

ความสามารถในการรีดิวซ์โดยทำตามวิธีของ (Srisook *et al*., 2010) เปรียบเทียบกับกรดแกลลิกโดยการนำสารละลายของส่วนสกัดเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในเมทานอล ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (phosphate buffer) เข้มข้น 0.2 มิลลิโมลาร์ pH 6.6 ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร และสารละลายโพแทสเซียมเฟอริกไซยาไนด์ ($K_3Fe(CN)_6$) เข้มข้นร้อยละ 1 โดยมวลต่อปริมาตร ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันบ่มที่อุณหภูมิ 50 °C เป็นเวลา 30 นาที เติมสารละลายกรดไตรคลอโรอะซิติก (CCl_3COOH) เข้มข้นร้อยละ 10 โดยมวลต่อปริมาตร ปริมาตร

2.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3000 g เป็นเวลา 10 นาที จากนั้น ปิเปตสารละลายส่วนบน ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตรเติมน้ำกลั่น 2.5 มิลลิลิตร และสารละลายเฟอร์ริกคลอไรด์ ($FeCl_3$) เข้มข้นร้อยละ 0.1 โดยมวลต่อปริมาตร ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ปิเปตสารผสมปริมาตร 200 ไมโครลิตร ใส่ในหลุมไมโครเพลท จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 700 นาโนเมตร ด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสงแบบ ไมโครเพลท คำนวณความสามารถในการรีดิวซ์จากกราฟมาตรฐานของแกลลิก โดยสร้างจากการนำสารละลายกรดแกลลิกในเมทานอลที่ความเข้มข้น 0, 0.00625, 0.0125, 0.025, 0.05 และ 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และนำไปวิเคราะห์เช่นเดียวกับส่วนสกัด แสดงค่าความสามารถในการรีดิวซ์ในรูปมิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อส่วนสกัด 1 กรัม ผลการทดลองที่ได้แสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าเฉลี่ยส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน ของการทดลองอย่างน้อย 3 ครั้ง ที่เป็นอิสระต่อกัน แต่ละครั้งทำ 3 ซ้ำ

4.3 การทดสอบความสามารถในการคีเลทโลหะ

การทดสอบความสามารถในการคีเลทโลหะเฟอร์รัสไอออน (Fe^{2+}) เป็นการทดสอบทำตามวิธีของ (Srisook *et al*., 2010) มี EDTA เป็นตัวควบคุมแบบบวก และเตรียมสารละลาย EDTA ในน้ำ และเจือจางให้ได้ความเข้มข้น 0.0625, 0.125, 0.25, 0.5 และ 1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นเติมสารละลายเฟอรัสซัลเฟต ($FeSO_4$) เข้มข้น 2 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 10 ไมโครลิตร เติมสารละลาย EDTA หรือส่วนสกัดในเมทานอล ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ปริมาตร 200 ไมโครลิตร และเติมสารละลายเฟอร์โรซีน (Ferrozine) เข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 20 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 562 นาโนเมตร ด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสงแบบไมโครเพลท คำนวณเปอร์เซ็นต์ความสามารถในการคีเลทโลหะจากสมการที่ 2

$$\text{เปอร์เซนต์การคีเลตโลหะ} = \left[\frac{A_{control}-(A_{sample}-A_{blank})}{A_{control}}\right] \times 100 \qquad (2)$$

โดย $A_{control}$ คือ ค่าการดูดกลืนแสงของหลุม ที่ประกอบด้วยน้ำกลั่นหรือเมทานอล เฟอร์รัสคลอไรด์ และเฟอร์โรซีน

A_{sample} คือ ค่าการดูดกลืนแสงของหลุม ที่ประกอบด้วย สารละลาย EDTA หรือส่วนสกัดเฟอร์รัสคลอไรด์ และเฟอร์โรซีน

A_{blank} คือ ค่าการดูดกลืนแสงของหลุม ที่ประกอบด้วย สารละลาย EDTA หรือส่วนสกัดเฟอร์รัสคลอไรด์ และน้ำกลั่น

จากนั้นคำนวณหาค่า IC_{50} จากกราฟความสัมพันธ์ระหว่างเปอร์เซ็นการคีเลทโลหะกับความเข้มข้นของสารสกัด ผลการทดลองที่ได้แสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าเฉลี่ยส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน ของการทดลองอย่างน้อย 3 ครั้ง ที่เป็นอิสระต่อกัน แต่ละครั้งทำ 3 ซ้ำ

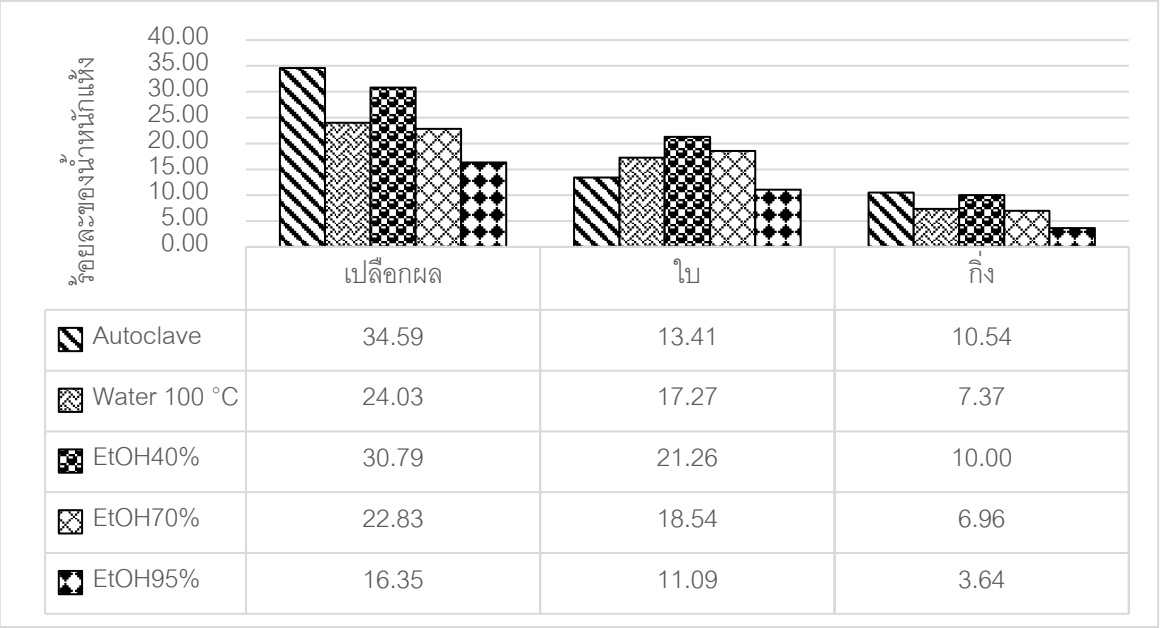
5. การวิเคราะห์ผล

แสดงข้อมูลที่ได้ในรูปค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดลองอย่างน้อย 3 ครั้งที่เป็นอิสระต่อกัน และการทดลองแต่ละครั้งทำซ้ำ 3 ครั้ง นำค่าเฉลี่ยที่ได้มาทดสอบความแปรปรวนโดยใช้ one-way ANOVA ($P<0.05$)

ผลการวิจัยและวิจารณ์ผล

1. การสกัดสารจากส่วนต่าง ๆของส้มซ่า

ค่าร้อยละของน้ำหนักแห้งของส่วนสกัดจากส้มซ่าที่สกัดด้วยตัวทำละลายต่าง ๆ แสดงดังภาพที่ 1 ส่วนสกัดจากเปลือกผลมีร้อยละของน้ำหนักแห้งสูงกว่าส่วนสกัดจากใบ และส่วนสกัดจากกิ่ง เปลือกผลที่สกัดด้วยน้ำโดยใช้หม้อนึ่งความดันที่อุณหภูมิ 121 °C มีค่าร้อยละของน้ำหนักแห้งสูงกว่าการสกัดด้วยตัวทำละลายอื่น มีค่าเท่ากับ 6.92 กรัม หรือร้อยละ 34.59 ส่วนสกัดจากใบที่สกัดด้วยเอทานอลเข้มข้นร้อยละ 40 โดยปริมาตร มีร้อยละของน้ำหนักแห้งสูงกว่าการสกัดด้วยตัวทำละลายอื่น มีค่าเท่ากับ 4.25 กรัม หรือร้อยละ 21.26 และส่วนสกัดจากกิ่งที่สกัดด้วยน้ำโดยใช้หม้อนึ่งความดันที่อุณหภูมิ 121 °C มีค่าร้อยละของน้ำหนักแห้งสูงกว่าการสกัดด้วยตัวทำละลายอื่น มีค่าเท่ากับ 2.11 กรัม หรือร้อยละ10.54



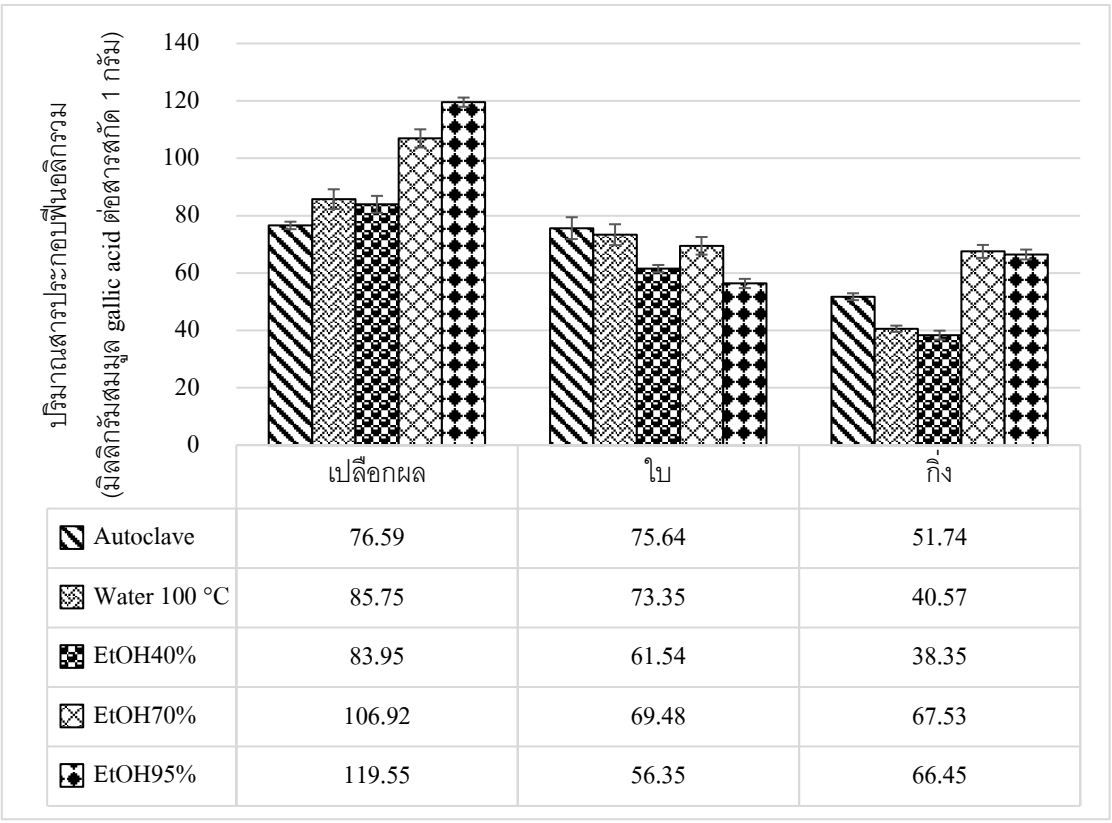
	เปลือกผล	ใบ	กิ่ง
Autoclave	34.59	13.41	10.54
Water 100 °C	24.03	17.27	7.37
EtOH40%	30.79	21.26	10.00
EtOH70%	22.83	18.54	6.96
EtOH95%	16.35	11.09	3.64

ภาพที่ 1 ร้อยละน้ำหนักแห้งของส่วนสกัดจากเปลือกผล ใบ และกิ่งของส้มซ่า

2 ผลการทดสอบหาสารประกอบฟีนอลิกรวมของส่วนสกัดต่าง ๆ ของส้มซ่า

ผลทดสอบหาปริมาณฟีนอลิกรวมของส่วนสกัดจากเปลือกผล ใบ และกิ่งของส้มซ่าที่สกัดในสภาวะแตกต่างกันคำนวณได้จากสมการ $y = 2.6241x + 0.067$ มีค่า $R^2 = 0.9992$ ผลการทดลอง แสดงดังภาพที่ 2 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมของส่วนสกัดจากเปลือกผลของส้มซ่ามีค่าระหว่าง 76.59 ± 1.30-119.55 ± 1.61 มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อส่วนสกัด 1 กรัม ซึ่งสูงกว่าส่วนสกัดจากใบ และส่วนสกัดจากกิ่งของส้มซ่า ผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับงานวิจัยของ (Benamrouche & Madani, 2013) ซึ่งได้ศึกษาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมของเปลือกผล และใบของส้มซ่า พบว่าปริมาณสารประกอบฟีนอลิกสูงของส่วนสกัดจากเปลือกผลสูงกว่าส่วนสกัดจากใบ ในขณะที่ (Li *et al.,* 2006) ได้ศึกษาผลของความเข้มข้นเอทานอลในการสกัดสารจากเปลือกของ *Citrus limon* cv. ต่อปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมพบว่าความเข้มข้นที่เหมาะสมอยู่ในช่วงร้อยละ 72-85 โดยปริมาตร ซึ่งแตกต่างจากปริมาณสารประกอบ

ฟีนอลิก รวมของส่วนสกัดจากเปลือกผลของส้มซ่า คือส่วนสกัดจากเปลือกผลที่สกัดด้วยเอทานอลร้อยละ 95 โดยปริมาตร สูงกว่าส่วนสกัดจากเปลือกผลที่สกัดด้วยตัวทำละลายอื่น ๆ ผลการศึกษาในครั้งนี้ไม่สอดคล้องกับงานวิจัยของ (Lou *et al.,*2016) ที่ศึกษาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมในส่วนสกัดจากเปลือกผล และส่วนสกัดจากเนื้อผลของ *Citrus japonica* var. margarita โดยใช้ตัวทำละลายน้ำที่ 80, 90, และ 100 °C และตัวทำละลายเอทานอลเข้มข้นร้อยละ 50, 60, 70, 80, และ 95 โดยปริมาตร พบว่าปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมของส่วนสกัดที่สกัดด้วยน้ำ ที่ 80 °C สูงกว่าส่วนสกัดที่สกัดจากด้วยตัวทำละลายอื่น ๆ การหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมส่วนสกัดจากใบที่สกัดด้วยน้ำหม้อนึ่งความดัน ที่ 121 °C มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมสูงกว่าส่วนสกัดจากใบที่สกัดด้วยตัวทำละลายอื่น ๆ และส่วนสกัดจากกิ่งที่สกัดด้วยเอทานอลเข้มข้นร้อยละ 70 โดยปริมาตร มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมสูงกว่าส่วนสกัดที่สกัดด้วยตัวทำละลายอื่น ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับส่วนสกัดจากกิ่งที่สกัดด้วยเอทานอลเข้มข้นร้อยละ 95 โดยปริมาตร



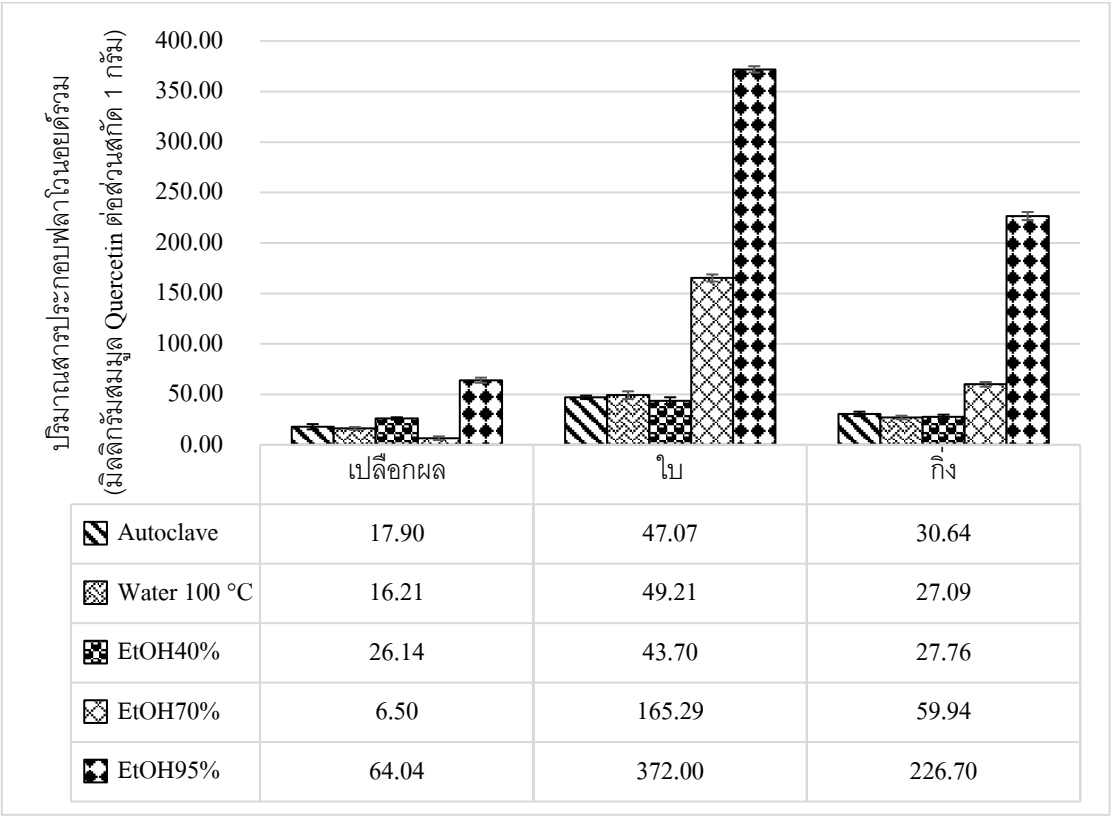
	เปลือกผล	ใบ	กิ่ง
Autoclave	76.59	75.64	51.74
Water 100 °C	85.75	73.35	40.57
EtOH40%	83.95	61.54	38.35
EtOH70%	106.92	69.48	67.53
EtOH95%	119.55	56.35	66.45

ภาพที่ 2 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมของส่วนสกัดจาก เปลือกผล ใบ และกิ่งของส้มซ่า

3 ผลการทดสอบหาปริมาณสารฟลาโวนอยด์รวมของส่วนสกัดต่าง ๆของส้มซ่า

ผลการทดสอบหาปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์รวมของส่วนสกัดจาก เปลือกผล ใบ กิ่งของ ส้มซ่าคำนวณได้จากสมการ $y = 0.1813x + 0.0394$ มีค่า $R^2 = 0.9988$ ผลการทดลองแสดงดังภาพที่ 3 ส่วนสกัดจากใบที่สกัดด้วยตัวทำละลายต่าง ๆ มีปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์รวมอยู่ระหว่าง 43.70 ± 3.42-372.00 ± 3.13 มิลลิกรัมสมมูลของเควอร์เซตินต่อส่วนสกัด 1 กรัม ซึ่งสูงกว่าส่วนสกัดจากเปลือกผล และส่วนสกัดจากกิ่ง ส่วนสกัดจากใบ เปลือกผล และกิ่ง ที่สกัดด้วยเอทานอลเข้มข้นร้อยละ 95 โดยปริมาตร มีปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์รวมสูงกว่าส่วนสกัด

จากใบที่สกัดด้วยตัวทำละลายอื่น ๆ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ (Karimi *et al.,* 2012) ที่ศึกษาผลของตัวทำละลาย เอทานอล น้ำ และเมทานอล ในการสกัดสารจากดอกส้มซ่าต่อปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ พบว่าส่วนสกัดจากดอกส้มซ่าที่สกัดด้วย เอทานอลมีปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์รวมสูงกว่าส่วนสกัดจากดอกส้มซ่าที่สกัดด้วยน้ำ และเมทานอล แต่ผลการทดลองไม่สอดคล้องกับงานวิจัยของ (Lou *et al.,* 2014) ที่ศึกษาปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์รวมที่สกัดจากเปลือกของ *Citrus mitis* Blanco โดยใช้น้ำที่อุณหภูมิ 80, 90,100 °C และเอทานอลเข้มข้นร้อยละ 50, 60, 70, 80 และ 95 โดยปริมาตร พบว่าส่วนสกัดจากเปลือกส้มจี๊ดที่สกัดด้วยน้ำ มีปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์รวมสูงกว่าส่วนสกัดที่ใช้เอทานอลเป็นตัวทำละลาย จากการศึกษาของ (Benamrouche & Madani, 2013) ที่ศึกษาปริมาณสารประกอบฟีนอลิก และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของส้ม 2 สายพันธุ์จาก 7 เมืองของประเทศแอลจีเรีย พบว่าส้มทั้ง 2 สายพันธุ์จากทั้ง 7 เมือง มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่แตกต่างกัน โดยให้คำอธิบายว่าปริมาณสารองค์ประกอบในส้มเกิดจากหลายปัจจัย ได้แก่ สิ่งแวดล้อมที่ปลูก การเก็บรักษาตัวอย่างส้มก่อนสกัด อายุของผลที่เก็บ และพันธุกรรมของส้ม



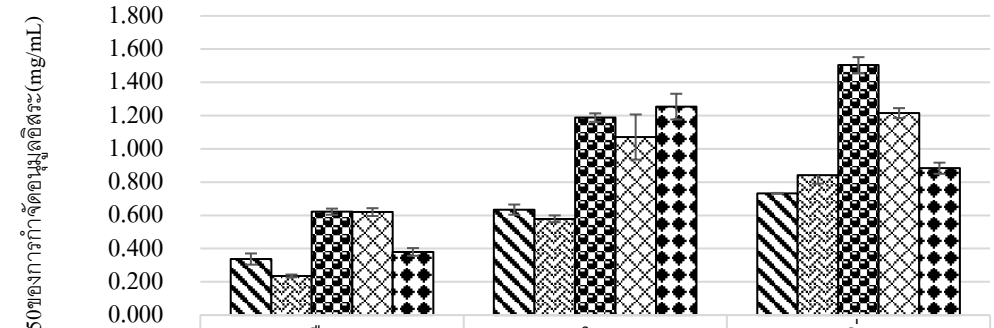
	เปลือกผล	ใบ	กิ่ง
Autoclave	17.90	47.07	30.64
Water 100 °C	16.21	49.21	27.09
EtOH40%	26.14	43.70	27.76
EtOH70%	6.50	165.29	59.94
EtOH95%	64.04	372.00	226.70

ภาพที่ 3 ปริมาณสารฟลาโวนอยด์รวมของส่วนสกัดจาก เปลือกผล ใบ และกิ่งของส้มซ่า

4 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของส่วนสกัดต่าง ๆของส้มซ่า

4.1 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดโดยใช้ DPPH-radical scavenging activity

การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยการทดสอบความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระของส่วนสกัดจากเปลือกผล ใบ กิ่งของส้มซ่าแสดงดังภาพที่ 4 โดยความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระของส่วนสกัดจากส้มซ่า มีค่าต่ำกว่าความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระของแกลลิก ซึ่งมีค่า IC_{50} เท่ากับ 9.03 ± 0.68 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วนสกัดของเปลือกผลมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงกว่าส่วนสกัดจากใบ และส่วนสกัดจากกิ่งที่สกัดโดยวิธีเดียวกัน ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ (Benamrouche & Madani, 2013) ที่พบว่าเปลือกผลส้มซ่ามีฤทธิ์ ต้านอนุมูลอิสระสูงกว่าใบ ส่วนสกัดจากเปลือกผลของส้มซ่าที่สกัดด้วยน้ำที่ 100 °C มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ สูงกว่าส่วนสกัดจากเปลือกผลที่สกัดด้วยตัวทำละลายอื่น ๆ ซึ่งมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ต่ำกว่าการรายงานของ (Karoui & Marzouk, 2013) ที่สกัดสารจากเปลือกของส้มซ่าโดยใช้ตัวทำละลายผสมของอีเทอร์กับเพนเทนในอัตราส่วน 1: 1 ปริมาตร 30 มิลลิลิตร พบว่ามีค่า IC_{50} ของฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ เท่ากับ 190 ± 0.01 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วนสกัดจากใบที่สกัดด้วยน้ำที่ 100 °C มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ สูงกว่าส่วนสกัดจากใบที่สกัดด้วยตัวทำละลายอื่น ๆ และส่วนสกัดจากกิ่งที่สกัดด้วยน้ำโดยใช้หม้อนึ่งความดัน ที่ 121 °C มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ สูงกว่าส่วนสกัดจากกิ่งที่สกัดด้วยตัวทำละลายอื่น ๆ ผลจากการศึกษาในครั้งนี้สอดคล้องกับงานวิจัยของ (Lou *et al*., 2014) ที่รายงานเกี่ยวกับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจากส่วนสกัดของเปลือก และส่วนสกัดจากเนื้อของส้มจี๊ดที่สกัดด้วยตัวทำละลายน้ำอุณหภูมิที่ 80, 90,100 °C และเอทานอลเข้มข้นร้อยละ 50, 60, 70, 80 และ 95 โดยปริมาตร พบว่าส่วนสกัดจากเปลือกผลของส้มจี๊ดที่สกัดด้วยน้ำมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงกว่าส่วนสกัดจากเปลือกผลที่สกัดด้วยเอทานอลที่ความเข้มข้น ต่าง ๆ โดยส่วนสกัดจากเปลือกผลของส้มจี๊ดที่สกัดด้วย น้ำที่ 80 °C มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของส่วนสกัดที่สกัดด้วยตัวทำละลายอื่น ๆ

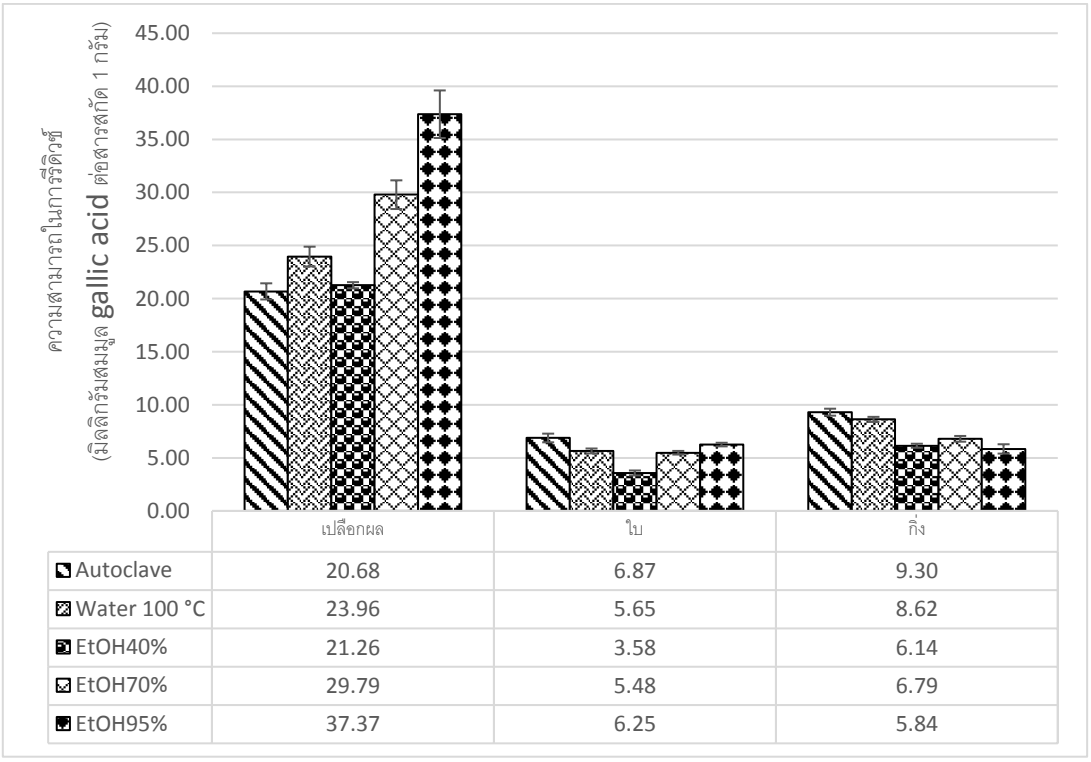


	เปลือกผล	ใบ	กิ่ง
Autoclave	0.337	0.634	0.733
Water 100 °C	0.236	0.579	0.842
EtOH40%	0.622	1.188	1.504
EtOH70%	0.620	1.071	1.215
EtOH95%	0.380	1.254	0.883

ภาพที่ 4 ค่า IC_{50} ของการกำจัดอนุมูลอิสระ ของส่วนสกัดจากเปลือกผล ใบ และกิ่งของส้มซ่า

4.2 ผลการทดสอบความสามารถในการรีดิวซ์ของส่วนสกัดต่าง ๆ ของส้มซ่า

การทดสอบความสามารถในการรีดิวซ์สามารถวิเคราะห์โดยใช้เฟอร์ริกคลอไรด์ โดยสารเชิงซ้อนของเฟอร์ริกไซยาไนด์ ถูกเปลี่ยนให้เป็น เฟอร์รัสไอออน ถ้าความเข้มข้นของเฟอร์รัสไอออนสูงขึ้นแสดงว่ามีความสามารถในการรีดิวซ์สูงขึ้นด้วย สารองค์ประกอบบางชนิดออกฤทธิ์โดยการให้อิเล็กตรอนทำให้ปฏิกิริยาลูกโซ่ของอนุมูลอิสระสิ้นสุดลง (Mathew *et al.,* 2013) การทดสอบความสามารถในการรีดิวซ์ของส่วนสกัดจากเปลือกผล ใบ กิ่ง ของส้มซ่าในสภาวะต่างๆ คำนวณได้จากสมการ y = 8.2496x+0.0695 มีค่า R^2 = 0.9994 ผลการทดลอง แสดงดังภาพที่ 5 โดยส่วนสกัดจากเปลือกผล ใบ กิ่ง ของส้มซ่ามีความสามารถในการรีดิวซ์ต่ำกว่ากรดแกลลิก ส่วนสกัดจากเปลือกผลของส้มซ่ามีความสามารถในการรีดิวซ์ระหว่าง 20.68 ± 0.76-37.37 ± 2.24 มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อส่วนสกัด 1 กรัม ซึ่งสูงกว่าส่วนสกัดจากใบ และส่วนสกัดจากกิ่ง ที่สกัดด้วยวิธีเดียวกัน ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ (Benamrouche & Madani, 2013) ที่รายงานว่าส่วนสกัดจากเปลือกผลมีความสามารถในการรีดิวซ์สูงกว่าส่วนสกัดจากใบ ส่วนสกัดจากเปลือกผลที่สกัดด้วยเอทานอลเข้มข้นร้อยละ 95 โดยปริมาตร มีความสามารถในการรีดิวซ์สูงกว่าส่วนสกัดจากเปลือกผลที่สกัดด้วยตัวทำละลายอื่น ๆ ส่วนสกัดจากใบที่สกัดด้วยน้ำโดยใช้หม้อนึ่งความดัน ที่อุณหภูมิ 121 °C มีความสามารถในการรีดิวซ์สูงกว่าส่วนสกัดจากใบที่สกัดด้วยตัวทำละลายอื่น ๆ ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับส่วนสกัดจากใบที่สกัดด้วยเอทานอลเข้มข้นร้อยละ 95 โดยปริมาตร และส่วนสกัดจากกิ่งที่สกัดด้วยน้ำโดยใช้หม้อนึ่งความดันที่อุณหภูมิ 121 °C มีความสามารถในการรีดิวซ์สูงกว่าส่วนสกัดจากกิ่งที่สกัดด้วยตัวทำละลายอื่น ๆ ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับส่วนสกัดจากกิ่งที่สกัดด้วยน้ำที่ 100 °C

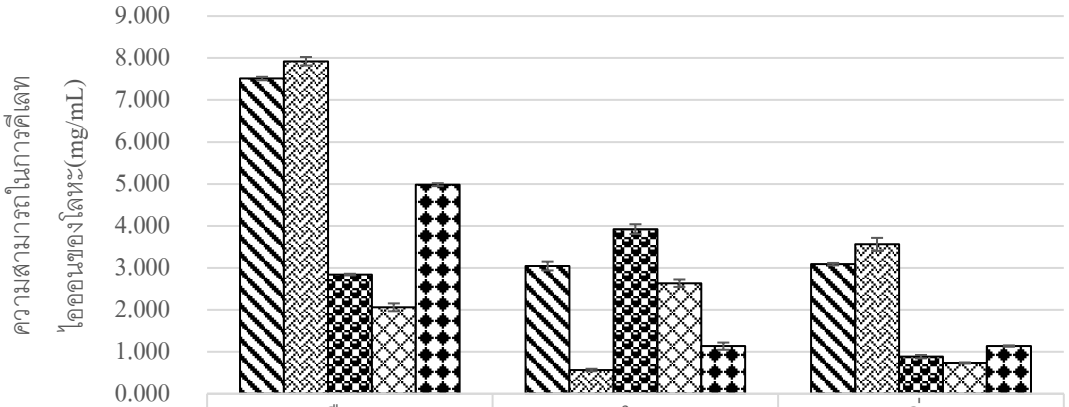


	เปลือกผล	ใบ	กิ่ง
Autoclave	20.68	6.87	9.30
Water 100 °C	23.96	5.65	8.62
EtOH40%	21.26	3.58	6.14
EtOH70%	29.79	5.48	6.79
EtOH95%	37.37	6.25	5.84

ภาพที่ 5 ความสามารถในการรีดิวซ์ ของส่วนสกัดจาก เปลือกผล ใบ และกิ่งของส้มซ่า

4.3 ผลการทดสอบความสามารถในการคีเลทไอออนของโลหะของส่วนสกัดต่างๆของส้มซ่า

การทดสอบความสามารถในการคีเลทไอออนของโลหะ มีความสำคัญอย่างยิ่งสำหรับผู้ที่สนใจเกี่ยวกับสารต้านอนุมูลอิสระ โดยเฉพาะสารกลุ่มนี้ไปช่วยลดความเข้มข้นของโลหะทรานซิชันซึ่งเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมัน (Nair *et al.*, 2012) จากการศึกษาความสามารถในการคีเลทไอออนของโลหะพบว่าส่วนสกัดทุกส่วนของส้มซ่ามีสามารถในการคีเลทไอออนของโลหะ แสดงดังภาพที่ 6 ความสามารถในการคีเลทไอออนของโลหะของส่วนสกัดทุกส่วนของส้มซ่า ต่ำกว่าความสามารถในการคีเลทไอออนของโลหะของ EDTA มีค่า IC_{50} เท่ากับ 18.19 ± 0.16 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วนสกัดจากใบที่สกัดด้วยน้ำที่ 100 °C มีความสามารถในการคีเลทไอออนของโลหะสูงกว่าส่วนสกัดจากใบที่สกัดด้วยตัวทำละลายอื่น ๆ ส่วนสกัดจากเปลือกผลที่สกัดด้วยเอทานอลเข้มข้นร้อยละ 70 โดยปริมาตร มีความสามารถในการคีเลทไอออนของโลหะสูงที่สุด และส่วนสกัดจากกิ่งที่สกัดด้วยเอทานอลเข้มข้นร้อยละ 70 โดยปริมาตร มีความสามารถในการ คีเลทไอออนของโลหะสูงกว่าส่วนสกัดจากกิ่งที่สกัดด้วยตัวทำละลายอื่น ๆ



	เปลือกผล	ใบ	กิ่ง
Autoclave	7.513	3.043	3.088
water 100 °C	7.923	0.565	3.559
EtOH40%	2.839	3.923	0.883
EtOH70%	2.059	2.634	0.733
EtOH95%	4.982	1.133	1.136

ภาพที่ 6 กราฟแสดงค่า IC_{50} ของการคีเลทไอออนของโลหะของส่วนสกัดจาก เปลือกผล ใบ และกิ่งของส้มซ่า

5 การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม ปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์รวม ต่อฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของส่วนสกัดจากส้มซ่า

เมื่อพิจารณาความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณสารประกอบฟีนอลิก ปริมาณสารประกอบ ฟลาโวนอยด์รวม และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยใช้กราฟความสัมพันธ์ของเพียร์สัน (Ramful *et al.*, 2010) พบว่าปริมาณสารประกอบ

ฟีนอลิกรวมมีความสัมพันธ์ทางบวกกับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในระดับปานกลาง และสัมพันธ์กับความสามารถในการรีดิวซ์ระดับสูง ด้วยค่า R เท่ากับ 0.5606 และ 0.8358 ตามลำดับ ดังตารางที่ 1 กล่าวคือเมื่อส่วนสกัดมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมสูงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และความสามารถในการรีดิวซ์ก็จะสูงด้วยเช่นกัน ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ (Lou *et al*., 2016) เนื่องจากสารประกอบฟีนอลิกสามารถให้ไฮโดรเจนแก่อนุมูลอิสระได้ง่ายจึงทำให้ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูง (Benamrouche & Madani, 2013) อย่างไรก็ตามฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระก็ขึ้นอยู่กับโครงสร้างของสารประกอบฟีนอลิกที่เป็นองค์ประกอบในส่วนสกัดแต่ละชนิดด้วย (Su *et al.,* 2008) จะเห็นได้ว่าส่วนสกัดจากเปลือกผลของส้มซ่าที่สกัดด้วยเอทานอลเข้มข้นร้อยละ 70 โดยปริมาตร มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมสูงแต่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระไม่ดีทั้งนี้อาจเป็นเพราะสารที่เป็นองค์ประกอบไม่ใช่สารที่ออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ แต่ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกสัมพันธ์ทางลบกับความสามารถในการคีเลทไอออนของโลหะในระดับต่ำมาก ๆ ด้วยค่า R เท่ากับ -0.2782 เมื่อพิจารณาผลการทดลองจะเห็นได้ว่าในเปลือกผลมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมสูงแต่มีความสามารถในการคีเลทไอออนของโลหะได้น้อยกว่าใบซึ่งมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมต่ำกว่าแต่มีความสามารถในการคีเลทไอออนของโลหะได้สูง ผลการทดลองสอดคล้องกับงานวิจัยของ (Su *et al.,* 2008) พบว่าส่วนสกัดจากสมุนไพรตระกูลส้มมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกสูงแต่มีความสามารถในการคีเลทไอออนของโลหะต่ำ กลไกการคีเลทไอออนของโลหะเกิดจากสารไปจับกับโลหะเกิดเป็นสารเชิงซ้อน ทำให้โลหะไม่สามารถไปเร่งให้เกิดปฏิกิริยา Fenton ได้ ดังนั้นการที่เปลือกผล มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกสูงแต่อาจไม่ใช่สารกลุ่มที่ออกฤทธิ์เกี่ยวกับการคีเลทไอออนของโลหะ ส่วนความสัมพันธ์ของปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์รวมมีความสัมพันธ์ทางลบกับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และความสามารถในการรีดิวซ์ในระดับต่ำด้วยค่า R เท่ากับ -0.3669 และ -0.3499 ตามลำดับ เนื่องจากฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ของสารฟลาโวนอยด์ขึ้นอยู่กับหมู่แทนที่ตรงตำแหน่งวง B ถ้าหมู่แทนที่เป็นสารประเภทฟีนอล หรือเมทอกซีฟีนอล ก็จะส่งผลให้มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระน้อย (Barreca *et al*., 2011) แต่สัมพันธ์ทางบวกกับความสามารถในการคีเลทไอออนของโลหะในระดับต่ำมาก ๆ ด้วยค่า R เท่ากับ 0.2586 แสดงว่าสารประกอบฟลาโวนอยด์ที่พบในส่วนสกัดของส้มซ่าอาจไม่ใช่สารในกลุ่มที่ออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

ตารางที่ 1 ความสัมพันธ์ของปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม ปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์รวม ต่อฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของส่วนสกัดจากส้มซ่า

วิธีการทดสอบ	ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (R)	
	ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม	ปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์รวม
ฤทธิ์การกำจัดอนุมูล DPPH	0.5606	-0.3669
ความสามารถในการรีดิวซ์	0.8358	-0.3499
ความสามารถในการคีเลทไอออนของโลหะ	-0.2782	0.2586

สรุปผลการวิจัย

1. ส่วนสกัดของเปลือกผลมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และร้อยละของน้ำหนักแห้งสูงกว่าส่วนสกัดจากใบ และกิ่ง ส่วนสกัดจากใบมีปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์สูงกว่าส่วนสกัดจากเปลือกผลและกิ่งของส้มซ่า

2. การสกัดสารจากเปลือกผล และใบของส้มซ่าโดยใช้น้ำเดือด และการสกัดสารจากกิ่งของส้มซ่าโดยใช้หม้อนึ่งความดันที่ 121 °C มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระดีที่สุด

3. ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกมีความสัมพันธ์ทางบวกกับความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ และความสามารถในการรีดิวซ์ในระดับปานกลาง และสูงตามลำดับ แต่มีความสัมพันธ์ทางลบกับความสามารถในการคีเลทไอออนของโลหะในระดับต่ำ ส่วนปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์รวมมีความสัมพันธ์ทางลบกับความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ และความสามารถในการรีดิวซ์ในระดับต่ำ แต่มีความสัมพันธ์ทางบวกกับความสามารถในการคีเลทไอออนของโลหะในระดับต่ำมาก ๆ

เอกสารอ้างอิง

Ames, B. N., Shigenaga, M. K. & Hagen, T. M. (1993). Oxidants, antioxidants, and the degenerativedisease of aging. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *90*, 7915-7922.

Barreca, D., Bellocco, E., Caristi, C., Leuzzi, U., & Gattuso, G. (2011). Distribution of *C*- and *O*-glycosyl flavonoids, (3-hydroxy-3-methylglutaryl)glycosyl flavanones and furocoumarins in *Citrus aurantium* L. juice. *Food Chemistry*, *124*, 576-582.

Benamrouchea, L. L., & Madani, K. (2013). Phenolic contents and antioxidant activity of orange varieties (*Citrus sinensis* L. and *Citrus aurantium* L.) cultivated in Algeria: Peels and leaves. *Industrial Crops and Products*, *50*, 723-730.

Karimi, E., Oskoueian, E., Hendra, R., Oskoueian, A., & Jaarar, H. Z. (2012). Phenolic Compounds Characterization and Biological Activities of *Citrus aurantium* Bloom. *Molecules*, *17*, 1203-1218.

Karoui, I. J., & Marzouk, B. (2013). Characterization of Bioactive Compounds in Tunisian Bitter Orange (*Citrus aurantium* L.) Peel and Juice and Determination of Their Antioxidant Activities. *Hindawi Publishing Coporation*, *2013*, 345-415.

Li, B. B., Smith, B., & Hossian, M. M. (2006). Extraction of phenolics from citrus peels I. Solvent extraction method. *Separation and Purification Technology*, *48*, 182-188.

Lou, N. S., Lai, C. Y., Hsu, S. Y., & Ho, T. C. (2014). Flavonoid compositions and antioxidant activity of calamondin extracts prepared using different solvents. *Journal of Food and Druganalysis, 22*, 290-295.

Lou, N. S., Lai, C. Y., Hsu, S. Y., & Ho, T. C. (2016). Phenolic content, antioxidant activity and effective compounds of kumquat extracted by different solvents. *Food Chemistry*, *197*, 1-6.

Mathew, B., Shajie, D., Wadhwa, N., Murthy, K., Murthy, K., & Rashmi, M. (2013). Comparative antioxidant efficacy of *Citrus limonum* pulp and peel e An in vitro study. *Drug Invention Today*, *5*, 296-301.

Moulehi, I., Bourgou, S., Ourghemmi, I., & Tounsi, M. S. (2012). Variety and ripening impact on phenolic composition and antioxidant activity of mandarin (*Citrus reticulate Blanco*) and bitter orange (*Citrus aurantium* L.) seeds extracts. *Industrial Crops and Products*, *39*, 74-80.

Nair, V. D., Panneerselvam, R., & Gopi, R. (2012). Studies on methanolic extract of Rauvolfia species from Southern Western Ghats of India – In vitro antioxidant properties, characterisation of nutrients and phytochemicals. *Industrial Crops and Products*, *39*, 17-25.

Ramful, D., Bahorun, T., Bourdon, E., Tarnus, E., & Aruoma, O. (2010). Bioactive phenolics and antioxidant propensity of flavedo extracts of Mauritian citrus fruits: Potential prophylactic ingredients for functional foods application. *Toxicology*, *278*, 75-87.

Srisook, K., Salee, P., Charoensuk, Y., & Srisook, E. (2010). In vitro anti-oxidant and anti-tyrosinase activities of the rhizomal extracts from Amomum biflorum Jack. *Thai Journal of Botany, 2* (Special Issue), 143-150. (in Thai)

Sarrou, E., Chatzopoulou, P., Theriou, K. D., & Therios, I. (2013). Volatile Constituents and antioxidant activity of peel, flowers and leaf oils of *Citrus aurantium* L. growing in Greece. *Molecules*, *18*, 10639-10647.

Su, M. S., Shyu, Y. T., & Chien, P. J. (2008). Antioxidant activities of citrus herbal product extracts. *Food Chemistry*, *111*, 892-896.

Tienboon, P. (2010). The role of antioxidant on health. *Thai Journal of Clinical Nutrition*, *4*(2), 69-76. (in thai)

Vajragupta, O., Boonchoong, P., Boonyarut, C., & Utsintong, M. (2007). Radical Scavenging Agents. (2). Bangkok : New Thailand friendly printing. (in Thai)

Wattanakul, U., Wattanakul, W., Lerssuthichawal, T., & Puengyam, P. (2009). Determination of Antioxidant Activity, Total Phenolic Compounds and Flavonoid Contents of Mangrove Plants Extracts from Rajamangala Beach, Trang Province. *TSU Conference 19.* Songkla: Thaksin University. (in Thai)

World Health Organization. (2014). *Noncommunicable Diseases Country Profiles 2014*. Retrieved 17 June 2016, from http://www. who.int/global-coordination-mechanism/publications/ncds-country-profiles-eng.pdf