



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การต้านออกซิเดชั่นของสารสกัดจากเปลือกผลไม้ตระกูลส้มที่สกัดด้วย
คลื่นเสียง และการประยุกต์ใช้ในน้ำสลัด

โดย ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เหรียญทอง สิงห์จามุวงศ์และคณะ

สำนักหอสมุด มหาวิทยาลัยนเรศวร

วันลงทะเบียน.....๙-เมย ๒๕๕๗.....

เลขทะเบียน..... 1. ๖๗40893.....

เลขเรียกหนังสือ..... ๖ ๑๗.....

๖๖๖
๒๕๕๗

เดือนกันยายน ปี พ.ศ. ๒๕๕๗

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การต้านออกซิเดชันของสารสกัดจากเปลือกผลไม้ตระกูลส้มที่สกัดด้วย
คลื่นเสียง และการประยุกต์ใช้ในน้ำสลัด

คณะผู้วิจัย สังกัด

1. ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เหริญทอง สิงห์จานุสงค์
คณะเกษตรศาสตร์ ทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยนเรศวร
2. นางสาวสุริยาพร นิพรัมย์
คณะเกษตรศาสตร์ ทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยนเรศวร

สนับสนุนโดยงบประมาณแผ่นดิน มหาวิทยาลัยนเรศวร

ชื่อโครงการวิจัย (ภาษาไทย)

การต้านออกซิเดชันของสารสกัดจากเปลือกผลไม้ตระกูลส้มที่สกัดด้วยคลื่นเสียง และการประยุกต์ใช้ในน้ำสลัด

ผู้วิจัย

ผศ.ดร.เหรียญทอง สิงห์จามรงค์ และนางสาวสุรียาพร นิพรัมย์

บทคัดย่อ

เปลือกส้มและมะนาวเป็นแหล่งที่อุดมไปด้วยสารประกอบฟีนอลิก ได้แก่ กรดฟีนอลและฟลาโวนอยด์ การใช้คลื่นเสียงช่วยสกัดเป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพสำหรับสกัดสารประกอบฟีนอลจากพืช เนื่องจากสามารถลดเวลาการสกัดและเพิ่มปริมาณสารสกัด ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์ 1) เพื่อศึกษาผลของชนิดเปลือกส้ม ชนิดตัวทำละลายและความเข้มข้นที่ใช้สกัดสารฟีนอลทั้งหมดโดยการสกัดด้วยคลื่นเสียง 2) เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมของการสกัดด้วยการใช้คลื่นเสียงโดยวิธีการปั่นผิวดอบสนอง (RSM) และ 3) เพื่อตรวจสอบประสิทธิภาพของสารสกัดจากเปลือกส้มสำหรับการต้านออกซิเดชันในน้ำสลัดเปรียบเทียบกับสารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์ ผลการทดลองพบว่า ปัจจัยเดี่ยวและปัจจัยร่วมของชนิดของเปลือก ชนิดและความเข้มข้นของตัวทำละลาย มีอิทธิพลต่อปริมาณฟีนอลทั้งหมด ฟลาโวนอยด์ ฟลาโวนอน ไกลโคไซด์ และฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระอย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งเปลือกส้มมีฟีนอลิกทั้งหมด ฟลาโวนอยด์ เฮสเปอร์ดิน และกิจกรรมสารต้านอนุมูลอิสระสูงกว่าเปลือกมะนาว จากตัวทำละลายทั้งสามชนิด อะซิโตนเป็นตัวทำละลายที่ดีที่สุดในการสกัดฟีนอลิกทั้งหมดและมีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระที่ดีที่สุด โดยเฉพาะอะซิโตนที่ความเข้มข้น 80 เปอร์เซ็นต์ เหมาะสำหรับใช้สกัดทั้งเปลือกส้มและเปลือกมะนาว ผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของขบวนการสกัดด้วยคลื่นเสียง พบว่าที่อุณหภูมิ 48 องศาเซลเซียส ระยะเวลาการสกัด 40 นาทีและกำลังไฟฟ้าที่ 57.34 วัตต์ เป็นสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการสกัดสารสกัดจากเปลือกส้ม ที่ให้ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด ฟลาโวนอยด์ เฮสเปอร์ดิน นารินจีน และกิจกรรมสารต้านอนุมูลอิสระสูงสุด โดยใช้การวิเคราะห์ด้วยวิธีปั่นผิวดอบสนอง เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของวิธีการสกัดพบว่าการสกัดโดยใช้คลื่นเสียงสามารถเพิ่มผลผลิตของสารสกัดได้มากกว่าการสกัดแบบดั้งเดิมถึง 1.77 เท่า เมื่อนำสารสกัดที่ผ่านการทำแห้งด้วยวิธีแช่เยือกแข็งมาเติมเข้าไปในสลัดน้ำมันรำข้าว ที่ปริมาณ 700, 2,000 และ 4,700 ppm (มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม) เปรียบเทียบกับสารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์ชนิด BHA และ BHT ที่ 140 ppm ตรวจหาค่าเปอร์ออกไซด์ และปริมาณกรดโทโอบาร์บูริก (TBARS) ของน้ำสลัดที่เก็บไว้ 30 และ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 เดือน พบว่าสารสกัดจากเปลือกส้มที่ 700 ppm ที่เติมในน้ำสลัดสามารถยับยั้งการเกิดออกซิเดชันได้ดีกว่าสารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์ชนิด BHA และ BHT ที่ 140 ppm

ชื่อโครงการวิจัย (ภาษาอังกฤษ) Antioxidative activities of citrus peels extract from ultrasonic treatment and its application in salad dressing

บทคัดย่อ

Mandarin and lime peels are rich sources of phenolic compounds including phenolic acids and flavonoids. The ultrasound-assisted extraction (UAE) proved to be an effective method in the extraction of phenolic compounds from plants due to its ability to save extraction time and increase extraction yields. This work aimed 1) to investigate the effects of citrus peel types and solvent types and concentrations on the total phenolic compounds using UAE 2) to determine the optimum condition of UAE of citrus peels using response surface methodology (RSM) and 3) to determine the efficiency of citrus peel extract on oxidative stability and quality of salad dressing compare with synthetic antioxidants. This experiment showed the individual and combination effects including peel type, type and concentration of solvent. The effects showed significant influenced on total phenolic, flavonoid, flavanone glycoside and antioxidant activity. Mandarin peel had total phenolic, flavonoid, hesperidin and antioxidant activities higher than that of lime peel. Among three solvents used, acetone was the best solvent for extraction of total phenolic and antioxidant activity, particularly acetone at 80% concentration was suggested to use in extraction for both mandarin and lime peels. The results showed that the combined effects conditions of temperature 48 °C, extraction time 40 min and ultrasonic power 57.34 watt were optimal for maximizing total phenolic, flavonoid, hesperidin, naringin and ferric reducing power of the extracts using RSM. UAE at optimize condition increased yield more than 1.77 times of maceration extraction. The freeze dried extract from optimize condition was then added into rice bran oil salad dressing at 700, 2,000 and 4,700 ppm comparing with synthetic antioxidants including BHA and BHT at 140 ppm. Peroxide value (PV) and thiobarbituric acid reactive substance (TBARs) of the salad dressing stored at 30 and 40 °C were determined for 2 months. The 700 ppm peel extract added into salad dressing prevented oxidative rancidity better than synthetic antioxidants including 140 ppm BHA and BHT.

สารบัญ

บทที่	หน้า
1 บทนำ.....	1
ความเป็นมาของปัญหา.....	1
จุดมุ่งหมายของการศึกษา.....	2
ขอบเขตของงานวิจัย.....	3
สมมติฐานของการวิจัย.....	4
2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	5
ส้ม.....	5
สารประกอบฟีนอลิก (phenolic Compound).....	6
หลักการของวิธีการวัดกิจกรรมการต้านออกซิเดชัน.....	8
การสกัดสารประกอบฟีนอลิกด้วยคลื่นเสียง.....	13
การต้านการเกิดออกซิเดชันด้วยสารสกัดจากเปลือกส้ม.....	14
3 วิธีดำเนินการวิจัย.....	15
วัตถุประสงค์ เครื่องมือ อุปกรณ์ และสารเคมีที่ใช้ในการวิจัย	15
ตอนที่ 1 การศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการสกัดสารประกอบฟีนอลิกด้วยคลื่นเสียงจากเปลือกผลไม้ตระกูลส้ม.....	17
ตอนที่ 2 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดสารประกอบฟีนอลิกจากเปลือกผลไม้ตระกูลส้ม ด้วยเทคนิคการสกัดด้วยคลื่นเสียง	20
ตอนที่ 3 การเปรียบเทียบประสิทธิภาพการสกัดสารประกอบฟีนอลิกระหว่างการสกัดด้วยคลื่นเสียง กับการสกัดด้วยวิธีการสกัดแบบเดิม (maceration).....	24
ตอนที่ 4 การศึกษาคุณสมบัติการต้านการเกิดออกซิเดชันของสารสกัดจากเปลือกผลไม้ตระกูลส้ม ในผลิตภัณฑ์น้ำสลัด	25
การวิเคราะห์ผลทางสถิติ.....	29

สารบัญ (ต่อ)

บทที่	หน้า
4 ผลการวิจัย.....	30
ตอนที่ 1 การศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการสกัดสารประกอบฟีนอลิกด้วยคลื่นเสียง จากเปลือกผลไม้ตระกูลส้ม.....	30
ตอนที่ 2 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดสารประกอบฟีนอลิกจาก เปลือกผลไม้ตระกูลส้ม ด้วยเทคนิคการสกัดด้วยคลื่นเสียง	40
ตอนที่ 3 การเปรียบเทียบประสิทธิภาพการสกัดสารประกอบฟีนอลิกระหว่าง การสกัดด้วยคลื่นเสียง กับการสกัดด้วยวิธีการสกัดแบบดั้งเดิม (maceration).....	59
ตอนที่ 4 การศึกษาคุณสมบัติการต้านการเกิดออกซิเดชันของสารสกัดจาก เปลือกผลไม้ตระกูลส้ม ในผลิตภัณฑ์น้ำสลัด	60
5 บทสรุป.....	75
เอกสารอ้างอิง.....	76
ภาคผนวก.....	82

สารบัญภาพ

ภาพ	หน้า
1 กราฟการลดลงของความเข้มแสงฟลูออเรสเซนซ์สัมพันธ์ของตัวอย่างและสารมาตรฐาน.....	10
2 โครงสร้างทางเคมีของ DPPH.....	12
3 โครงสร้างทางเคมีของ ABTS.....	13
4 เปลือกส้มขนาด 1 ตารางเซนติเมตร ก่อนเข้าอบแห้ง.....	17
5 เปลือกมะนาวขนาด 1 ตารางเซนติเมตร ก่อนเข้าอบแห้ง.....	18
6 เปลือกส้มและมะนาว นำไปอบให้แห้งในตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 60 °C จนกระทั่งมีความชื้น 9-10 เปอร์เซ็นต์.....	18
7 การสกัดเปลือกส้มและมะนาวด้วยเครื่องอัลตราโซนิก.....	19
8 กรองเปลือกส้มและมะนาวหลังจากผ่านการสกัดด้วยคลื่นเสียง.....	19
9 กรองเปลือกส้มด้วยชุดกรองสุญญากาศหลังจากผ่านการสกัดด้วยคลื่นเสียง.....	20
10 การระเหยตัวทำละลายออกจากสารสกัดจากเปลือกส้มด้วยชุดระเหยตัวทำละลาย (Rotary evaporator).....	23
11 สารสกัดจากเปลือกส้มหลังจากการระเหยตัวทำละลายออกบางส่วน.....	23
12 สารสกัดจากเปลือกส้มนำมาทำแห้งด้วยเครื่องระเหิดแบบสุญญากาศ.....	23
13 สารสกัดจากเปลือกส้มที่ผ่านการทำแห้งด้วยเครื่องระเหิดแบบสุญญากาศ.....	24
14 สารสกัดจากเปลือกส้มเก็บในขวดสีชาก่อนนำไปวิเคราะห์.....	24
15 วัตถุประสงค์สำหรับทำน้ำสลัดน้ำมันรำข้าว.....	26
16 การปั่นผสมน้ำสลัดน้ำมันรำข้าว.....	27
17 น้ำสลัดเติมสารต้านออกซิเดชันจากเปลือกส้ม และสารต้านออกซิเดชันสังเคราะห์.....	27
18 น้ำสลัดน้ำมันรำข้าวถูกเก็บที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส.....	28
19 น้ำสลัดน้ำมันรำข้าวถูกเก็บที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส.....	29

20	พีนอลิกทั้งหมด (A), ฟลาโวนอยด์ (B), เฮสเปอริดิน (C) และนารินจิน (D) ที่สกัดจากเปลือกส้มและเปลือกมะนาว ชนิดสารสกัด และความเข้มข้นที่แตกต่างกัน โดยใช้คลื่นเสียงช่วยในการสกัดที่อุณหภูมิ 40 °C นาน 30 นาที และกำลังไฟฟ้า 50.93 วัตต์.....	33
21	ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ DPPH จากเปลือกส้ม และเปลือกมะนาว โดยใช้สารสกัดเมทานอล (A) เอทานอล(B) และอะซิโตน (C) ที่ความเข้มข้นต่างๆ โดยใช้คลื่นเสียงช่วยในการสกัดที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที และกำลังไฟฟ้า 50.93 วัตต์.....	35
22	ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ FRAB (A), DPPH (B) และ ABTS (C) จากเปลือกส้มและเปลือกมะนาว โดยใช้สารสกัดเมทานอล เอทานอลและอะซิโตน ที่ความเข้มข้นต่างๆ โดยใช้คลื่นเสียงช่วยในการสกัดที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที และกำลังไฟฟ้า 50.93 วัตต์	38
23	พื้นผิวตอบสนองระหว่างตัวแปรอิสระต่อปริมาณผลผลิต โดยใช้คลื่นเสียงช่วยในการสกัด ภาพ A คงกำลังไฟฟ้าที่ 4 level, 45.32 วัตต์; ภาพ B คงระยะเวลาการสกัดที่ 30 นาที; ภาพ C คงอุณหภูมิการสกัดที่ 40 องศาเซลเซียส.....	44
24	พื้นผิวตอบสนองระหว่างตัวแปรอิสระต่อปริมาณพีนอลิกทั้งหมด โดยใช้คลื่นเสียงช่วยในการสกัด ภาพ A คงกำลังไฟฟ้าที่ 4 level, 45.32 วัตต์; ภาพ B คงระยะเวลาการสกัดที่ 30 นาที; ภาพ C คงอุณหภูมิการสกัดที่ 40 องศาเซลเซียส.....	46
25	พื้นผิวตอบสนองระหว่างตัวแปรอิสระต่อปริมาณฟลาโวนอยด์โดยใช้คลื่นเสียงช่วยในการสกัด ภาพ A คงกำลังไฟฟ้าที่ 4 level, 45.32 วัตต์; ภาพ B คงระยะเวลาการสกัดที่ 30 นาที; ภาพ C คงอุณหภูมิการสกัดที่ 40 องศาเซลเซียส.....	48
26	พื้นผิวตอบสนองระหว่างตัวแปรอิสระต่อปริมาณเฮสเปอริดิน โดยใช้คลื่นเสียงช่วยในการสกัด ภาพ A คงกำลังไฟฟ้าที่ 4 level, 45.32 วัตต์; ภาพ B คงระยะเวลาการสกัดที่ 30 นาที; ภาพ C คงอุณหภูมิการสกัดที่ 40 องศาเซลเซียส.....	52
27	พื้นผิวตอบสนองระหว่างตัวแปรอิสระต่อปริมาณนารินจิน โดยใช้คลื่นเสียงช่วยในการสกัด ภาพ A คงกำลังไฟฟ้าที่ 4 level, 45.32 วัตต์; ภาพ B คงระยะเวลาการสกัดที่ 30 นาที; ภาพ C คงอุณหภูมิการสกัดที่ 40 องศาเซลเซียส.....	54

28	พื้นผิวตบสมของระหว่างตัวแปรอิสระต่อฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ FRAB โดยใช้คลื่นเสียงช่วยในการสกัด ภาพ A คงกำลังไฟฟ้าที่ 4 level, 45.32 วัตต์; ภาพ B คงระยะเวลาการสกัดที่ 30 นาที; ภาพ C คงอุณหภูมิการสกัดที่ 40 องศาเซลเซียส...	58
29	ปริมาณกรดทั้งหมด (เทียบกับกรดแอสซิดิก) ของน้ำสลัดที่เปลี่ยนแปลงระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส (A) และ 40 องศาเซลเซียส (B)...	61
30	ค่าความเป็นกรดต่าง (pH) ของน้ำสลัดที่เปลี่ยนแปลงระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส (A) และ 40 องศาเซลเซียส (B).....	62
31	ปริมาณน้ำอิสระ (water activity) ของน้ำสลัดที่เปลี่ยนแปลงระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส (A) และ 40 องศาเซลเซียส (B).....	63
32	น้ำสลัดเติมสารต้านออกซิเดชันจากเปลือกส้ม และสารต้านออกซิเดชันสังเคราะห์.....	64
33	ค่าสี L* ของน้ำสลัดที่เปลี่ยนแปลงระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส (A) และ 40 องศาเซลเซียส (B).....	65
34	ค่าสี a* ของน้ำสลัดที่เปลี่ยนแปลงระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส (A) และ 40 องศาเซลเซียส (B).....	66
35	ค่าสี b* ของน้ำสลัดที่เปลี่ยนแปลงระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส (A) และ 40 องศาเซลเซียส (B).....	66
36	ความหนืด (Index of viscosity) ของน้ำสลัดที่เปลี่ยนแปลงระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส (A) และ 40 องศาเซลเซียส (B).....	67
37	ความคงตัว (consistency) ของน้ำสลัดที่เปลี่ยนแปลงระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส (A) และ 40 องศาเซลเซียส (B).....	68
38	การการยึดเกาะกันระหว่างอนุภาค (Cohesiveness) ของน้ำสลัดที่เปลี่ยนแปลงระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส (A) และ 40 องศาเซลเซียส (B).....	69
39	ความแน่นเนื้อ (Firmness) ของน้ำสลัดที่เปลี่ยนแปลงระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส (A) และ 40 องศาเซลเซียส (B).....	70
40	ปริมาณกรดไขมันอิสระ (เทียบกับกรดโอเลอิก) ของน้ำสลัดที่เปลี่ยนแปลงระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส (A) และ 40 องศาเซลเซียส (B)	72

41	ค่าเปอร์ออกไซด์ของน้ำสลัดที่เปลี่ยนแปลงระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส (A) และ 40 องศาเซลเซียส (B).....	73
42	ค่าเปอร์ออกไซด์ของน้ำสลัดที่เปลี่ยนแปลงระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส (A) และ 40 องศาเซลเซียส (B).....	74



สารบัญตาราง

ตาราง	หน้า	
1	สมภาวะการสกัดเปลือกส้ม จากแผนการทดลองแบบ Box behnken design	22
2	ส่วนประกอบของน้ำสกัดน้ำมันรำข้าว.....	26
3	การวิเคราะห์ความแปรปรวนของปัจจัยหลักและการปฏิสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยของชนิดเปลือกส้ม ชนิดสารสกัด และความเข้มข้นสารสกัด ต่อปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด ฟลาโวนอยด์ เฮสเปอร์ิดิน และนารินจิน โดยใช้คลื่นเสียงช่วยในขบวนการสกัด	31
4	การวิเคราะห์ความแปรปรวนของปัจจัยหลักและการปฏิสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยของชนิดเปลือกส้ม ชนิดสารสกัด และความเข้มข้นสารสกัด ต่อฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ FRAB, DPPH และ ABTS โดยใช้คลื่นเสียงช่วยในขบวนการสกัด	37
5	การวิเคราะห์สหสัมพันธ์ของฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระกับ ฟีนอลิกทั้งหมด ฟลาโวนอยด์ เฮสเปอร์ิดิน และนารินจิน ของสารสกัดจากเปลือกส้มและเปลือกมะนาว.....	39
6	ปริมาณผลผลิต (% yields) ฟีนอลิกทั้งหมด และฟลาโวนอยด์ จากเปลือกส้มที่ใช้คลื่นเสียงช่วยในขบวนการสกัด ด้วยแผนการทดลองแบบ Box Behnken design	41
7	สัมประสิทธิ์การถดถอยแบบพหุนาม สำหรับสมการกำลังสอง (quadratic polynomial model) และการวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) ของปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด และ ฟลาโวนอยด์ จากเปลือกส้มที่ใช้คลื่นเสียงช่วยในขบวนการสกัด	43
8	ปริมาณเฮสเปอร์ิดิน และนารินจิน จากเปลือกส้มที่ใช้คลื่นเสียงช่วยในขบวนการสกัด ด้วยแผนการทดลองแบบ Box Behnken design.....	49
9	สัมประสิทธิ์การถดถอยแบบพหุนาม สำหรับสมการกำลังสอง (quadratic polynomial model) และการวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) ของเฮสเปอร์ิดิน และนารินจินจากเปลือกส้มที่ใช้คลื่นเสียงช่วยในขบวนการสกัด	51
10	ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ FRAP, DPPH และ ABTS จากเปลือกส้มที่ใช้คลื่นเสียงช่วยในขบวนการสกัด ด้วยแผนการทดลองแบบ Box Behnken design.....	55

11	สัมประสิทธิ์การถดถอยแบบพหุนาม สำหรับสมการกำลังสอง (quadratic polynomial model) และการวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) ของฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ FRAP, DPPH และ ABTS จากเปลือกส้มที่ใช้คลื่นเสียงช่วยในกระบวนการสกัด	57
12	เปรียบเทียบคุณสมบัติทางกายภาพ และทางเคมีของเปลือกส้มที่สกัดด้วยคลื่นเสียง (ultrasonic assisted extraction: UAE) ที่สภาวะการสกัดที่เหมาะสมกับการสกัดด้วยวิธีแบบดั้งเดิม (maceration extraction: MAE)	60



บทที่ 1

บทนำ

ความเป็นมาของปัญหา

พืชตระกูลส้ม (*Citrus spp.*) ที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจมี 4 กลุ่ม คือ ส้มเกลี้ยง ส้มเขียวหวาน หรือส้มแมนดาริน ส้มโอ และมะนาว (จันทร์ลัดดา, 2544) เป็นกลุ่มของผลไม้ที่นิยมบริโภคเป็นอย่างมาก มีผลผลิตทั่วโลกมากกว่า 72 ล้านตัน ในปี ค.ศ. 2007-2008 ซึ่งผลผลิตส่วนใหญ่ใช้ในการบริโภคถึง 45 ล้านตัน (USDA, 2008; Khan, et al., 2010) ในขณะที่ผลผลิตของผลไม้ตระกูลส้มของประเทศไทย ในปี พ.ศ. 2553 พบว่าผลผลิตของส้มเขียวหวานมีปริมาณมากถึง 280,160 ตัน พื้นที่เพาะปลูกส่วนใหญ่อยู่ในเขตภาคเหนือ ได้แก่ จังหวัดเชียงใหม่ เชียงราย กำแพงเพชร และสุโขทัย อีกทั้งผลผลิตของมะนาวมีปริมาณมากถึง 152,536 ตัน (คณะทำงานย่อยสำรวจข้อมูลไม้ผลเศรษฐกิจ, 2554)

การบริโภคผลไม้ตระกูลส้มส่วนใหญ่จะบริโภคในรูปผลสด หรือนำมาแปรรูปเป็นน้ำผลไม้ ส่งผลให้มีส่วนที่เหลือจากการบริโภค หรือการแปรรูปคือเปลือก ที่มีปริมาณเป็นครึ่งหนึ่งของน้ำหนักผล โดยส่วนใหญ่แล้วส่วนของเปลือกจะถูกกำจัดทิ้งเป็นขยะซึ่งส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม มีรายงานการศึกษาประโยชน์ของเปลือกพืชตระกูลส้มเพื่อนำกลับมาใช้ประโยชน์ อาทิเช่น การศึกษาสารต้านอนุมูลอิสระ ได้แก่ ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด และกรดฟีนอลิก ในส่วนของเปลือก และเนื้อผลไม้ของพืชตระกูลส้ม จากการศึกษาพบว่า ในส่วนเปลือกมีปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด และกรดฟีนอลิกสูงกว่าในส่วนของเนื้อผลไม้ โดยในเปลือกส้มและเปลือกมะนาวมีปริมาณมากกว่าเปลือกเกรฟฟรุท (Gorinstein, et al., 2001)

ขั้นตอนการสกัดสารประกอบฟีนอลิกจากเปลือกของผลไม้ดังกล่าวสามารถทำได้หลายวิธี เช่น การสกัดด้วยสารเคมี การสกัดด้วยน้ำร้อน และสกัดด้วยเอนไซม์ ซึ่งวิธีดังกล่าวต้องใช้อุณหภูมิสูง ระยะเวลาในการสกัดนาน อีกทั้งต้องใช้สารเคมีสำหรับสกัดปริมาณมากส่งผลให้เกิดปัญหากับสิ่งแวดล้อม และปริมาณสารประกอบฟีนอลิกที่ได้มีปริมาณน้อย ส่วนการสกัดสารประกอบฟีนอลิกด้วยสารเคมีนั้น ชนิดของสารเคมีถือเป็นปัจจัยที่มีผลต่อปริมาณของสารประกอบฟีนอลิก โดยมีรายงานว่าเมทานอลสามารถสกัดสารประกอบฟีนอลิกได้ดี (Zia ur, 2006)

การสกัดโดยใช้คลื่นเสียง (ultrasound-assisted extraction) เป็นวิธีการสกัดที่อาศัยการสั่นพองอากาศที่มีแรงดันสูง สามารถทำลายผนังเซลล์ของพืชได้อย่างรวดเร็ว ทำให้สารที่ต้องการสกัดออกมาเร็วขึ้น มีรายงานการศึกษาเกี่ยวกับการสกัดสารประกอบฟีนอลิก โดยใช้คลื่นเสียงสามารถสกัดสารดังกล่าวได้ปริมาณสูงกว่า และใช้ระยะเวลาในการสกัดสั้นกว่าวิธีการสกัดแบบเดิม (Ma, et al., 2008b) ทั้งนี้มีรายงานการใช้สารสกัดที่แตกต่างกันในกระบวนการสกัดโดยใช้คลื่นเสียง เช่นการใช้สารละลายเมทานอล 80 เปอร์เซ็นต์ (Ma et al., 2008b; Londoño-Londoño, et al., 2010) การใช้สารละลาย

เอทานอล 80 เปอร์เซ็นต์ (Khan, et al., 2010) และการใช้สารละลายอะซิโตน 80 เปอร์เซ็นต์ (1: 5 w/v) (Obob and Ademosun, 2012) ในการสกัดสารประกอบฟีนอลิกจากเปลือกของพืชตระกูลส้ม แต่ยังไม่มียางานการศึกษาปัจจัยด้านชนิดของสารสกัดในวิธีการสกัดโดยใช้คลื่นเสียงว่าชนิดของสารสกัดใดมีผลต่อปริมาณสารประกอบฟีนอลิก

สารประกอบฟีนอลิกเป็นพฤษเคมีที่มีประโยชน์สามารถต้านอนุมูลอิสระในอาหารที่มีองค์ประกอบของไขมัน จัดเป็นสารต้านอนุมูลอิสระหรือแอนติออกซิแดนท์ที่ได้จากธรรมชาติ สามารถป้องกันการเกิดออกซิเดชัน และกลิ่นเหม็นหืนของอาหารที่มีไขมันได้ (Anagnostopoulou, et al., 2006) ทั้งนี้มีการศึกษาการใช้สารประกอบฟีนอลิกยับยั้งการเกิดออกซิเดชันในไขมันปลา (Pazos, et al., 2005) และสามารถต้านการเกิดออกซิเดชันในอิมัลชันของน้ำมันมะกอก (Di Mattia, et al., 2009) นอกจากนี้ยังมีมีการศึกษาสารต้านอนุมูลอิสระที่สกัดได้จากเปลือกของพืชตระกูลส้ม สามารถใช้ต้านออกซิเดชันในน้ำมันข้าวโพด มีประสิทธิภาพเทียบเท่ากับสารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์ (Zia ur, 2006)

น้ำสลัดเป็นผลิตภัณฑ์ที่นิยมบริโภค และใช้เป็นวัตถุดิบเพื่อประกอบอาหาร มีลักษณะเป็นอิมัลชันที่มีการกระจายตัวแบบน้ำมันในน้ำ (oil in water emulsion) ซึ่งองค์ประกอบหลักของน้ำสลัดเป็นไขมันที่มีปริมาณมาก 70 ถึง 80 เปอร์เซ็นต์ (นิรมล, 2548) ทำให้การเกิดออกซิเดชัน และกลิ่นหืนเป็นสาเหตุการเสื่อมเสียหลักของน้ำสลัด ดังนั้นจึงมีการใช้สารต้านอนุมูลอิสระเพื่อชะลอการเสื่อมเสีย โดยสารต้านอนุมูลอิสระที่นิยมใช้ส่วนใหญ่เป็นสารสังเคราะห์ เช่น Butylated hydroxyl anisole (BHA) และ Butylated hydroxyl toluene (BHT) ซึ่งมีคุณสมบัติต้านการเกิดออกซิเดชัน และชะลอการเกิดกลิ่นเหม็นหืนในน้ำสลัด ซึ่งสารดังกล่าวเป็นสารที่ก่อโทษต่อร่างกาย มีผลต่อตับทำให้เกิดมะเร็งในตับได้ (Moure, et al., 2001; Khan, et al., 2010) ดังนั้นผู้วิจัยจึงสนใจที่จะสกัดสารประกอบฟีนอลิกจากเปลือกของผลไม้ตระกูลส้ม ได้แก่ ส้ม และมะนาว ที่เป็นวัสดุเหลือทิ้งจากอุตสาหกรรม และการบริโภค โดยใช้เทคนิคการสกัดด้วยคลื่นเสียงและการนำสารประกอบฟีนอลิกที่สกัดได้มาใช้ประโยชน์เป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่ได้จากธรรมชาติในผลิตภัณฑ์น้ำสลัด เพื่อทดแทนสารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์

จุดมุ่งหมายของการศึกษา

1. เพื่อเพิ่มมูลค่าของเปลือกผลไม้ตระกูลส้มที่เป็นวัสดุเหลือทิ้ง โดยการสกัดเป็นสารต้านอนุมูลอิสระจากธรรมชาติ ทดแทนการใช้สารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์
2. เพื่อศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อวิธีการสกัดสารประกอบฟีนอลิกจากเปลือกของผลไม้ตระกูลส้ม โดยใช้การสกัดด้วยคลื่นเสียงสำหรับเพิ่มประสิทธิภาพการสกัด
3. เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดสารประกอบฟีนอลิก จากเปลือกของผลไม้ตระกูลส้มที่ให้ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด และมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระที่ดีที่สุด
4. เพื่อเปรียบเทียบคุณสมบัติในการต้านการเกิดออกซิเดชันระหว่างสารต้านอนุมูลอิสระที่สกัดได้จากเปลือกของผลไม้ตระกูลส้ม กับสารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์ในผลิตภัณฑ์น้ำสลัด

ขอบเขตของงานวิจัย

1. ศึกษาปัจจัยที่เหมาะสมในการสกัดสารประกอบฟีนอลิกที่เหมาะสม โดยการสกัดด้วยคลื่นเสียงโดยใช้เครื่องอัลตราโซนิก โดยศึกษาปัจจัย 3 ปัจจัย ได้แก่ ชนิดของเปลือกพีชตระกูลส้มชนิดของสารที่ใช้สกัด และความเข้มข้นของสารที่ใช้สกัด ปัจจัยที่ 1 ชนิดของเปลือกผลไม้ตระกูลส้ม เปรียบเทียบระหว่างเปลือกส้มเขียวหวาน และเปลือกมะนาว ปัจจัยที่ 2 ชนิดของสารที่ใช้สกัด เปรียบเทียบระหว่างเมทานอล เอทานอล และอะซิโตน ปัจจัยที่ 3 ความเข้มข้นของสารสกัด เปรียบเทียบความเข้มข้นที่ 20, 50 และ 80 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) และตรวจวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด ปริมาณฟลาโวนอยด์ และฟลาวาโนน ไกลโคไซด์ ชนิด Hesperidin และ Naringin

2. หาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดสารประกอบฟีนอลิก จากเปลือกผลไม้ตระกูลส้ม โดยคัดเลือกสิ่งทดลองจากข้อที่ 1 ที่ให้ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดสูงที่สุด มาศึกษาสภาวะในการสกัดที่เหมาะสม โดยสภาวะที่ศึกษาได้แก่ อุณหภูมิ เวลา และกำลังไฟฟ้า ที่ใช้ในการสกัดด้วยเครื่อง อัลตราโซนิก โดยใช้เทคนิค response surface methodology (RSM) วางแผนการทดลองแบบ Box Behnken design (BBD) ตรวจวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด ปริมาณฟลาโวนอยด์ และ ฟลาวาโนนไกลโคไซด์ ชนิด Hesperidin และ Naringin และฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ ได้แก่ การวิเคราะห์ ABTS radical scavenging activity, Ferric reducing antioxidant power (FRAP) และ DPPH radical scavenging activity

3. เปรียบเทียบประสิทธิภาพการสกัดสารประกอบฟีนอลิก ระหว่างการสกัดด้วยคลื่นเสียงในสภาวะการสกัดที่เหมาะสมจากข้อที่ 2 เปรียบเทียบกับการสกัดด้วยวิธีการสกัดที่ใช้ทั่วไป (maceration) โดยเปรียบเทียบปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด ปริมาณฟลาโวนอยด์ เปอร์เซ็นต์ผลผลิตที่ได้ (yield %) และฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ ได้แก่ การวิเคราะห์ ABTS radical scavenging activity, Ferric reducing antioxidant power (FRAP) และ DPPH radical scavenging activity

4. เปรียบเทียบคุณสมบัติการต้านการเกิดออกซิเดชันในผลิตภัณฑ์น้ำสลัด โดยเปรียบเทียบสารสกัดที่ได้จากเปลือกผลไม้ตระกูลส้มที่ปริมาณแตกต่างกัน กับสารต้านการเกิดออกซิเดชันสังเคราะห์ คือ Butylated hydroxyl anisole (BHA) และ Butylated hydroxy toluene (BHT) ที่ 140 ppm และน้ำสลัดตัวอย่างควบคุม (control) เป็นระยะเวลา 4 เดือน ที่อุณหภูมิห้อง และอุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ตรวจวิเคราะห์ทางด้านเคมี ได้แก่ ปริมาณกรดไขมันอิสระ (free fatty acids) ค่าเปอร์ออกไซด์ (peroxide value), Thiobarbituric acid (TBARs) ค่าความเป็นกรดต่าง และปริมาณกรดทั้งหมด ตรวจวิเคราะห์ทางด้านกายภาพ ได้แก่ ค่าสี L^* , a^* , b^* และคุณลักษณะของเนื้อสัมผัส ได้แก่ ความแน่นเนื้อ (firmness) ความหนืด (viscosity) ความคงตัว (consistency) และการเกาะกันระหว่างอนุภาค (cohesiveness) ทุก 5 เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 30 และ 40 องศาเซลเซียส

สมมติฐานของการวิจัย

1. เปลือกของผลไม้ตระกูลส้มมีองค์ประกอบของ สารประกอบฟีนอลิก และฟลาโวนอยด์ ซึ่งเป็น สารต้านอนุมูลอิสระมีฤทธิ์ในการต้านการเกิดออกซิเดชันของไขมัน ในน้ำสลัดมีส่วนประกอบหลักเป็น ไขมันซึ่งการเสื่อมเสียหลักมาจากการเกิดออกซิเดชัน ถ้ามีการสกัดสารประกอบฟีนอลิกจากเปลือกผลไม้ ตระกูลส้มเติมในผลิตภัณฑ์น้ำสลัด จะสามารถยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันในน้ำสลัดได้ ดังนั้นสาร สกัดจากเปลือกส้มจึงสามารถให้ทดแทนสารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์ที่เป็นอันตรายต่อสุขภาพได้

2. การสกัดสารด้วยคลื่นเสียงเป็นการสกัดที่ใช้ฟองอากาศแรงดันสูง ทำลายผนังเซลล์ทำให้สาร สกัดที่ต้องการออกมาได้เร็วกว่าวิธีที่ใช้ในปัจจุบัน ถ้ามีการใช้สภาวะที่เหมาะสม สำหรับขบวนการสกัด เช่น ชนิดสารสกัด อุณหภูมิในการสกัด ระยะเวลาที่เหมาะสม และกำลังไฟฟ้าที่เหมาะสม การสกัด สารประกอบฟีนอลิกจากเปลือกผลไม้ตระกูลส้ม จะทำให้ได้สารสกัดปริมาณมากขึ้น และจะมีฤทธิ์การต้าน อนุมูลอิสระเพิ่มขึ้น



บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

1. ส้ม

ส้มมีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Citrus spp.* เป็นพืชที่อยู่ในตระกูลรูตาซีอี (Rutaceae) มีหลายสกุลด้วยกัน เช่น มะขวิด ส้ม ส้มจี๊ด และสนสามใบ แต่มีเพียง สกุลส้มหรือสกุลซิตรีส์เพียงสกุลเดียวที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ สามารถแบ่งออกเป็น 4 กลุ่ม โดยอาศัยความสำคัญทางเศรษฐกิจ แบ่งเป็น 4 กลุ่มใหญ่ ดังนี้

1.1 กลุ่มส้มเกลี้ยง และส้มตรา (Orange group)

เป็นกลุ่มที่ใหญ่ที่สุด และมีความสำคัญมากที่สุดในโลก โดยมีถิ่นกำเนิดในทวีปเอเชียทางทิศตะวันออกเฉียงเหนือของอินเดียทางแถบทิเบตไปจนถึงจีนและพม่า แบ่งเป็น 2 กลุ่มย่อยคือ

1.1.1 ส้มที่มีรสหวาน (sweet orange) ได้แก่ ส้มเกลี้ยงพันธุ์ชามูติ คาลาเบรียสเบลลาดอนนา และวาเลนเซีย เป็นต้น ส่วนพันธุ์ที่ปลูกในประเทศไทยคือ ส้มตรา ส้มกา และส้มเซ่ง

1.1.2 ส้มที่มีรสเปรี้ยว หรือมีรสออกขม (sour or bitter orange) ลักษณะของส้มชนิดนี้คล้ายกลุ่มแรก แต่มีลักษณะย่อยที่แตกต่างกัน เช่น เปลือกมีผิวขรุขระมากเพราะต่อมน้ำมันที่มีขนาดใหญ่ มีรสชาติเปรี้ยวออกขมปนอยู่ด้วย ส้มเหล่านี้ไม่นิยมใช้เป็นผลไม้สด แต่มักนิยมใช้ทำแยมผิวส้ม และสกัดน้ำมันไปใช้ในอุตสาหกรรมผลิตหัวน้ำหอม

1.2 กลุ่มส้มจีน ส้มเขียวหวาน หรือกลุ่มแมนดาริน (Mandarin group)

มีถิ่นกำเนิดในอินเดียทางตะวันออกเฉียงเหนือ บางพันธุ์มีถิ่นกำเนิดในแถบประเทศอินโดจีนและญี่ปุ่น จัดเป็นส้มที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจในภูมิภาคเขตร้อน มีขนาดผลใกล้เคียงกับส้มเกลี้ยง แต่มีสีแตกต่างกันไป ส้มที่มีเปลือกสีส้มหรือแดง เรียกว่า แทนเจอริน ส่วนส้มที่มีเปลือกเหลืองอ่อนเรียกว่าแมนดาริน ส้มกลุ่มนี้แบ่งออกเป็น 4 กลุ่มย่อย คือ

1.2.1 ซัทซุมาแมนดาริน (*Citrus unshiu* Marcovitch) มีถิ่นกำเนิดในประเทศญี่ปุ่น ผลค่อนข้างเล็ก กลม แกนกลางผลกลวง ไม่มีเมล็ด ในบางครั้งอาจพบเมล็ดบ้าง ต่อมน้ำมันบนผิวมีขนาดใหญ่ และนูนเห็นได้ชัด

1.2.2 คิงแมนดาริน (*Citrus nobilis* Loureiro) มีถิ่นกำเนิดในประเทศจีน ผลมีขนาดใหญ่ในบรรดาส้มกลุ่มแมนดาริน เปลือกมีลักษณะติดเนื้อ แต่ปอกออกได้ง่าย แกนกลางผลไม้ใหญ่ และกลวง เนื้อผลไม่มีลักษณะอ่อนนุ่ม สีส้มจัด มีกลิ่นแรง และมีเมล็ดน้อย

1.2.3 เมดิเตอร์เรเนียนแมนดาริน (*Citrus deliciosa* Tenore) เป็นส้มที่ใช้ปลูกเป็นไม้ประดับ มีความสำคัญทางเศรษฐกิจน้อย

1.2.4 คอมมอนแมนดาริน (*Citrus reticulata* Blanco) ได้แก่ ส้มเขียวหวาน ส้มจีน ขนาดผลปานกลางถึงค่อนข้างใหญ่ เปลือกของส้มมีลักษณะหนา ผิวขรุขระ ต่อม้ำมันจมน้ำส้ม เปลือกมีกลิ่น

1.3 กลุ่มส้มโอ และเกรฟฟรุท (Pamelo and Grapefruit group) แบ่งเป็น 2 กลุ่มย่อย

1.3.1 ส้มโอ (*Citrus grandis* Linn) มีผลขนาดใหญ่ที่สุดในพืชตระกูลส้มมีหลากหลายพันธุ์ เช่น ขาวพวง ขาวแป้น ทองดี ขาวใหญ่ ขาวแตงกวา ขาวน้ำผึ้ง ขาวจีบ บัตตาเวียและบางขุนนนท์ เป็นต้น

1.3.2 เกรฟฟรุท (*Citrus paradise*) มีถิ่นกำเนิดในทวีปอเมริกาที่มีการติดผลคล้ายองุ่น

1.4 กลุ่มมะนาว (Common acid members) แบ่งเป็นกลุ่มย่อยดังนี้

1.4.1 ซิตรอน (citron) มีถิ่นกำเนิดในประเทศอินเดีย แล้วแพร่กระจายไปยังกรีซ และอิตาลี ผลมีขนาดใหญ่จนถึงใหญ่มาก รสชาติของผลไม่เปรี้ยว มีเมล็ดมาก ในประเทศไทยเรียกว่าส้มมะละกอ หรือ ส้มมะนาว

1.4.2 มะนาวฝรั่ง (Lemon) ที่สำคัญมี 3 พันธุ์ คือ ลิสบอน (Lisbon) วิลลาฟรานก้า (villaf Franca) และยูเรก้า (Eureka) ผลมีสีเหลืองอมเขียวปลายผลมีลักษณะนูน (จันทรลัดดา, 2544)

2. สารประกอบฟีนอลิก (phenolic Compound)

สารประกอบฟีนอลิกเป็นสารกลุ่มใหญ่ ที่สามารถพบได้ทั่วไปในพืชทุกชนิด และมีบทบาทสำคัญในการทำให้เกิดสี และรสชาติในผักและผลไม้ รวมถึงเป็นส่วนที่สำคัญต่อการเจริญเติบโต และผลผลิตจากพืช คล้ายกับเนื้อเยื่อของพืชที่มีกลไกการทำงานในการต้านภาวะที่เกิดจากการติดเชื้อจากแมลงและจุลินทรีย์ทำให้เกิดโรค และภาวะเครียดที่เกิดจากสิ่งแวดล้อม เช่น รังสีอัลตราไวโอเล็ต อุณหภูมิ และมลพิษทางอากาศ (Horax, Hettiarachchy and Islam, 2005) โครงสร้างทั่วไปของสารประกอบฟีนอลิก คือ วงอะโรมาติก ที่เรียกว่า วงเบนซีน (benzene ring, C₆) และมีหมู่แทนที่เป็นหมู่ไฮดรอกซิล (hydroxyl group) อย่างน้อย 1 หมู่จับที่วงแหวน จัดเป็นสารเมตาบอไลต์ทุติยภูมิ (secondary metabolites) โดยทั่วไป สารประกอบฟีนอลิกจะมีฤทธิ์เป็นกรด เนื่องจากความสามารถในการแตกตัวในธรรมชาติของหมู่ไฮดรอกซิล (โสภา และคณะ, 2549)

สารประกอบฟีนอลิกสามารถแบ่งได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่ คือ ซิมเปิลฟีนอล (simple phenols) และ โพลีฟีนอล (polyphenols) ในส่วนซิมเปิลฟีนอลแบ่งเป็น กรดฟีนอลิก (phenolic acid) และคูมาริน (coumarins) ส่วนโพลีฟีนอลแบ่งเป็น ฟลาโวนอยด์ (flavonoid) และแทนนิน (tannin) (Hurtado-Fernandez, et al., 2010)

สารประกอบฟีนอลิกหลายชนิดมีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ ซึ่งส่วนใหญ่ละลายได้ในน้ำ หรือตัวทำละลายอินทรีย์ และในพืชแต่ละชนิดจะมีสารประกอบฟีนอลิกที่แตกต่างกัน ส่วนใหญ่ประกอบด้วยกรดฟีนอลิก กรดเบนโซอิก (benzoic acid) ฟลาโวนอยด์ ฟีนิลโพรพานอยด์ (phenylpropanoid) แทนนิน และลิกแนน (lignan) (Horax, Hettiarachchy and Islam, 2005)

2.1 สารประกอบฟีนอลิกในเปลือกของพืชตระกูลส้ม

ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกในเปลือกของพืชตระกูลส้มมีปริมาณมากกว่าส่วนของเนื้อ เช่น มะนาว (*Citrus limon*) ส่วนของเปลือกมีปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด 190 ± 10.6 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม เทียบกับกรดโคโลโรจินิก มากกว่าส่วนเนื้อมะนาวที่มีเพียง 164 ± 10.3 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม เทียบกับกรดโคโลโรจินิก อีกทั้งเปลือกส้ม (*Citrus sinensis*) มีฟีนอลิกทั้งหมด 179 ± 10.5 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม เทียบกับกรดโคโลโรจินิก มากกว่าส่วนเนื้อส้มที่มี 154 ± 10.2 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม เทียบกับ กรดโคโลโรจินิก และเปลือกเกรฟฟรุท (*Citrus paradisi*) มีปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด 155 ± 10.3 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม เทียบกับกรดโคโลโรจินิก มากกว่าส่วนเนื้อเกรฟฟรุทมี 135 ± 10.1 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม เทียบกับกรดโคโลโรจินิก ซึ่งในเปลือกมะนาวมีปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดสูงกว่าเปลือกส้ม และ เปลือกส้มโอ ตามลำดับ (Gorinstein, et al., 2001)

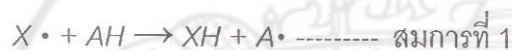
พืชตระกูลส้มมีสารต้านอนุมูลอิสระที่สำคัญคือ ฟลาโวนอยด์ (flavonoids) ซึ่งเป็นสารกลุ่มใหญ่ในสารประกอบฟีนอลิก มีคุณสมบัติช่วยส่งเสริมให้ร่างกายสามารถต้านอนุมูลอิสระ (free radicals) และยังช่วยในการป้องกันโรค เช่น โรคมะเร็ง โรคเกี่ยวกับหลอดเลือด ด้านการอักเสบ และด้านจุลินทรีย์ (Ejaz, et al., 2006)

ฟลาโวนอยด์ในผลไม้ตระกูลส้มสามารถแบ่งได้เป็น 5 กลุ่ม ได้แก่ ฟลาโวน (flavones) ฟลาวาโนน (flavanones) ฟลาโวนอล (flavonols) ฟลาแวน (flavans) และแอนโทไซยานิน (anthocyanins) โดยในผลไม้ตระกูลส้มจะมีฟลาวาโนนปริมาณมาก ซึ่งประกอบไปด้วย naringenin, hesperidin, neohesperidosides, rutinoides, naringin และ neoeriocitrin โดยมีปริมาณสูงในส่วนของเปลือกมากกว่าเมล็ด (Yusof, Ghazali and King, 1990) เปลือกมะนาวมีไกลโคซิดิก ฟลาโวนอยด์ในปริมาณสูงประกอบไปด้วย naringin, neohesperidin และ neoeriocitrin (Bocco, et al., 1998; Gonzalez-Molina, et al., 2010)

3. หลักการของวิธีการวัดกิจกรรมการต้านออกซิเดชัน (Huang, Ou and Prior, 2005)

3.1 วิธีการที่วัดการแลกเปลี่ยนอะตอมไฮโดรเจน (based on hydrogen atom transfer (HAT) reaction)

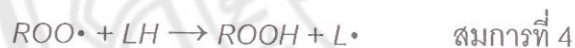
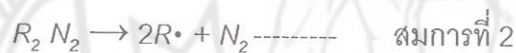
วิธีการนี้เป็นปฏิกิริยาที่เกิดการแข่งขันระหว่างสารต้านออกซิเดชัน กับสารตั้งต้นของปฏิกิริยา โดยจะมีการกระตุ้นสารประกอบอะโซ (azo compounds) ด้วยความร้อนเพื่อให้เกิดการสลายตัวกลายเป็นอนุมูลเพอร์ออกซิลเพื่อเป็นตัวแทนอนุมูลอิสระตามธรรมชาติ วิธีการในกลุ่มนี้ ได้แก่ oxygen radical absorbance capacity (ORAC) assay และ total radical trapping antioxidant parameter (TRAP) assay มีกลไกดังแสดงในสมการที่ 1 ซึ่งวิธีการกลุ่มนี้จะวัดปริมาณอะตอมไฮโดรเจนที่มีการแลกเปลี่ยน โดยจะวัดการเรืองแสงของสารฟลูออเรสเซนต์ ที่ลดลงเมื่อเกิดการออกซิเดชัน เมื่อระบบมีสารต้านออกซิเดชัน สารต้านออกซิเดชันจะไปแย่งจับสารเรืองแสง ส่งผลให้ความเข้มสารฟลูออเรสเซนต์ลดลงด้วยความเร็วที่ช้าลง ส่วนกลไกในการยับยั้งการเกิดออกซิเดชันแสดงในสมการที่ 2-9



เมื่อ $X \cdot$ = สารประกอบต่างๆ

AH = สารต้านออกซิเดชัน

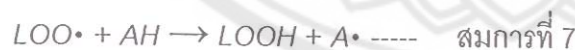
Initiation



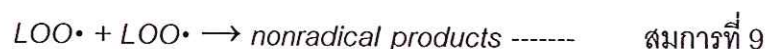
Propagation



Inhibition



Termination



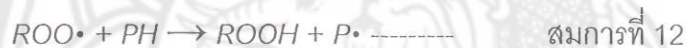
เมื่อ $R_2 N_2$ = สารประกอบอะโซ (azo compound)

$ROO \cdot$ = อนุมูลเพอร์ออกซิล (peroxyl radical)

LH = สารตั้งต้น (substrate)

AH = สารต้านออกซิเดชัน (antioxidant)

วิธีการวิเคราะห์ในกลุ่มนี้ ได้แก่ ORAC และ TRAP จำเป็นต้องใช้สารตัวแทนเพื่อเป็นสารตั้งต้นของปฏิกิริยา (probes or substrates) โดยสารต้านออกซิเดชันจะแย่งกันทำปฏิกิริยากับสารตั้งต้นในระบบการทดลองจะประกอบด้วยสารกลุ่มอะโซเพื่อผลิตอนุมูลอิสระ (AAPH), probes เพื่อติดตามปฏิกิริยาที่เกิดขึ้น (สารฟลูออเรสเซิน) และสารต้านออกซิเดชัน โดย AAPH จะถูกให้ความร้อนเพื่อสร้างอนุมูลเพอร์ออกไซด์ เมื่อใส่ฟลูออเรสเซิน และสารต้านออกซิเดชันแล้ว จะเกิดการแย่งกันทำปฏิกิริยากับอนุมูลเพอร์ออกไซด์ โดยสารต้านออกซิเดชันจะทำปฏิกิริยาอย่างรวดเร็วเมื่อสารต้านออกซิเดชันทำปฏิกิริยาจนหมดแล้วสารฟลูออเรสเซินจึงเข้าทำปฏิกิริยาต่อ การเรืองแสงฟลูออเรสเซินซึ่งจึงค่อยๆ ลดลง กลไกการแย่งทำปฏิกิริยาของสารต้านออกซิเดชันและฟลูออเรสเซิน แสดงในสมการที่ 10-13

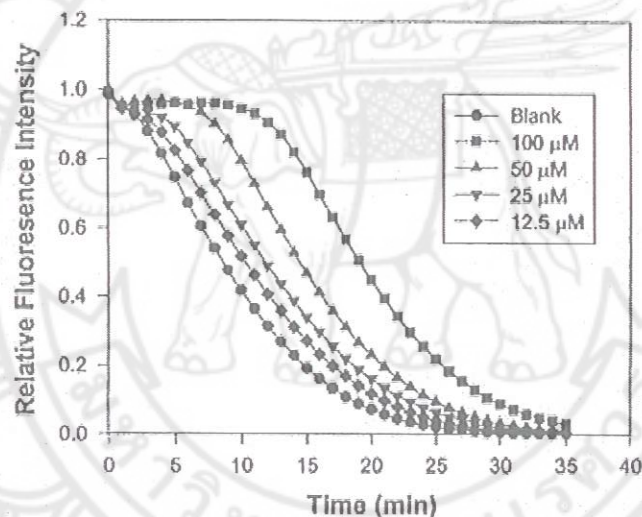


เมื่อ PH = สารตัวแทนสารตั้งต้น (oxidized probes)

3.1.1 Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC) assay

วิธีนี้เป็นวิธีการวัดกิจกรรมของสารต้านออกซิเดชัน โดยอาศัยหลักการลดลงของแสงฟลูออเรสเซินเมื่อวัดด้วยเครื่องวัดการดูดกลืนแสงฟลูออเรสเซิน โดยเมื่อฟลูออเรสเซิน ทำปฏิกิริยากับอนุมูลเพอร์ออกไซด์แล้วความเข้มของแสงจะลดลง หากในระบบมีปริมาณสารต้านออกซิเดชันน้อยจะทำให้ความเข้มของแสงฟลูออเรสเซินลดลงอย่างรวดเร็ว แต่ถ้าปริมาณสารต้านออกซิเดชันมากความเข้มของแสงฟลูออเรสเซินจะลดลงช้า เนื่องจากอนุมูลอิสระต้องทำปฏิกิริยากับสารต้านออกซิเดชันจนหมดก่อนแล้วจึงทำปฏิกิริยากับฟลูออเรสเซิน วิธีนี้นิยมใช้กันอย่างกว้างขวาง และสามารถใช้ได้ทั้งการวัดกิจกรรมของสารต้านออกซิเดชันในพืชและระบบร่างกายในช่วงแรกของการพัฒนาวิธีนี้มีการใช้ B-PE (B-phycoerythrin) เป็น probes ซึ่งทำหน้าที่เช่นเดียวกับสารฟลูออเรสเซิน แต่ B-PE มีข้อเสียหลายประการ ได้แก่ B-PE ผลิตมาจาก *Porphyridium cruentum* ทำให้ในแต่ละครั้งการผลิตมีความแปรปรวนค่อนข้างสูง นอกจากนั้น B-PE จะมีสีซีดลง (photobleached) เมื่ออยู่ในสภาวะของการทดลองด้วย plate-reader และประการสุดท้าย B-PE จะทำปฏิกิริยากับสารพอลิฟีนอลแล้วสีซีดลง แม้ยังไม่ได้เติมสารที่ผลิตอนุมูลอิสระลงไปในระบบก็ตาม ทำให้ภายหลังเปลี่ยนมาใช้ฟลูออเรสเซินซึ่งเป็นสารสังเคราะห์

ทดแทนการใช้ B-PE วิธี ORAC นี้เป็นการรวมกันระหว่างการหาค่าเวลาในการยับยั้งอนุมูลอิสระ (inhibition time) และปริมาณการยับยั้งอนุมูลอิสระ ในขณะที่วิธีการอื่นมักหาค่าเวลาในการยับยั้งเมื่อกำหนดปริมาณการยับยั้งอนุมูลอิสระ หรือหาปริมาณในการยับยั้งอนุมูลอิสระเมื่อกำหนดระยะเวลา หลักการคร่าวๆ ของวิธี ORAC คือนำตัวอย่าง หรือตัวแทนควบคุม หรือสารมาตรฐานผสมกับสารฟลูออเรสเซิน แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส แล้วเติม AAPH เพื่อเริ่มปฏิกิริยา วัดความเข้มของแสงฟลูออเรสเซินที่มีความยาวคลื่น 485 nm excitation/525 nm emission เป็นเวลา 35 นาที โดยประมาณ และตั้งอุณหภูมิภายในเครื่องที่ 37 องศาเซลเซียส โดยในการทดลองใช้ สาร Trolox (สารจำลองของวิตามินอี) ความเข้มข้น 4-5 ระดับ เป็นสารมาตรฐาน ได้ผลดังแสดงในภาพที่ 1 นำผลที่ได้คำนวณหาพื้นที่ใต้กราฟ (area under curve, AUC) แล้วคำนวณเป็นค่าพื้นที่ใต้กราฟสุทธิ (net AUC) นำค่าที่ได้มาเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นของ Trolox (Y) (μM) กับพื้นที่ใต้กราฟ (X) ค่าที่ได้แสดงเป็นไมโครโมลของ Trolox ต่อตัวอย่างสด 100 กรัม



ภาพ 1 กราฟการลดลงของความเข้มแสงฟลูออเรสเซินที่สัมพันธ์กับเวลาของตัวอย่างและสารมาตรฐาน

ที่มา: Huang, Ou & Prior (2005)

การวัดค่าด้วยวิธี ORAC นี้ เพื่อให้ได้ผลการทดลองที่ดีขึ้นควรใช้ปิเปตชนิดหลายทาง (multichannel) เพื่อใช้เวลาในการเตรียมตัวอย่างลงในไมโครเพลตให้สั้นที่สุด ควบคู่กับเครื่องอ่านค่าพร้อมถาดชนิด 96 หรือ 48 หลุม นอกจากนั้นวิธีนี้ค่อนข้างไวต่ออุณหภูมิ จึงต้องควบคุมทั้งอุณหภูมิภายในเครื่อง และอุณหภูมิของบัฟเฟอร์ที่นำมาใช้ให้อยู่ที่ 37 องศาเซลเซียส ก่อนนำมาละลายสาร AAPH สิ่งสำคัญอีกเรื่องหนึ่งคือในการทดลองแต่ละครั้งไม่ควรใช้เวลาเกิน 1 ชั่วโมง เนื่องจากสารหมดประสิทธิภาพ (Prior, Wu and Schaich, 2005)

3.1.2 Total radical trapping antioxidant parameter (TRAP) assay

วิธีนี้เป็นวิธีที่ใช้หลักการเดียวกับวิธี ORAC คือใช้สาร AAPH ในการผลิตอนุมูลเพอร์ออกซิล ผลที่ได้เปรียบเทียบกับ Trolox และใช้สารฟลูออเรสเซินเป็นสารเรืองแสงเช่นเดียวกัน แต่แตกต่าง

กันตรงที่ วิธี ORAC สนใจความเข้มของแสงที่ลดลงเมื่อวัดด้วยเครื่องวัดการดูดกลืนแสงฟลูออเรสเซนซ์โดยเปรียบเทียบพื้นที่ใต้กราฟ ในขณะที่วิธี TRAP สนใจปริมาณออกซิเจนที่ถูกใช้ไปในปฏิกิริยาโดยดูที่เวลาการเกิดปฏิกิริยาเป็นหลัก ผลที่ได้คำนวณออกมาเป็นค่าไมโครโมลของอนุมูลเพอร์ออกซิลที่ถูกจับไว้ต่อพลาสมา 1 ลิตร แต่วิธีการนี้มีปัญหาเนื่องจากมีจุดสิ้นสุดของปฏิกิริยา (endpoint) หลายจุด ซึ่งอาจทำให้เกิดความสับสนในการทดลองได้

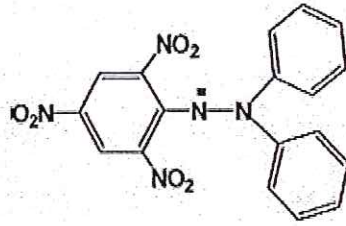
3.2 วิธีการที่วัดการแลกเปลี่ยนอิเล็กตรอนเดี่ยว (based on single electron transfer (SET) reaction)

วิธีการนี้จะวัดความสามารถของสารต้านออกซิเดชันในปฏิกิริยาการรับของตัวรับอิเล็กตรอน ปฏิกิริยานี้จะมีการเปลี่ยนแปลงสีเมื่อเกิดการแลกเปลี่ยนอิเล็กตรอน โดยการเปลี่ยนสีจะสัมพันธ์กับความเข้มข้นของสารต้านออกซิเดชัน คือถ้าสารต้านออกซิเดชันมีความเข้มข้นมาก สีของสารละลายจะลดลงเร็วขึ้น วิธีการในกลุ่มนี้ ได้แก่ total phenols assay by Folin-Ciocalteu reagent (FCR), 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical scavenging capacity (DPPH) assay, trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) assay หรือ ABTS และ ferric ion reducing antioxidant power (FRAP) assay มีกลไกดังแสดงในสมการที่ 14



3.2.1 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical scavenging capacity (DPPH) assay

วิธีนี้จะวัดความสามารถในการยับยั้ง 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical (DPPH) ดังภาพที่ 2 โดย DPPH เป็นสารอนุมูลไนโตรเจนที่ค่อนข้างคงตัว โดยขณะเริ่มต้นการทดลองจะให้สารสีเข้ม เมื่อเกิดปฏิกิริยามากขึ้นสารจะมีสีที่จางลง ทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ ความยาวคลื่น 515 นาโนเมตร ตามระยะเวลาที่กำหนด หากในระบบมีปริมาณสารต้านออกซิเดชันมากสีของสารละลายก็จะลดลงเร็ว กลไกของการเกิดปฏิกิริยาแสดงในสมการที่ 15 ค่าที่ได้สามารถแสดงได้หลายรูปแบบ ได้แก่ แสดงเป็นร้อยละของการยับยั้งอนุมูลอิสระ (% radical scavenging activity), ค่าความเข้มข้นของสารสกัดที่สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระได้ร้อยละ 50 จากปริมาณอนุมูลอิสระเริ่มต้น (IC50) หรือค่าความสามารถในการต้านออกซิเดชัน (antiradical efficiency, AE)



ภาพ 2 โครงสร้างทางเคมีของ DPPH

ที่มา: Prior, Wu & Schaich (2005)

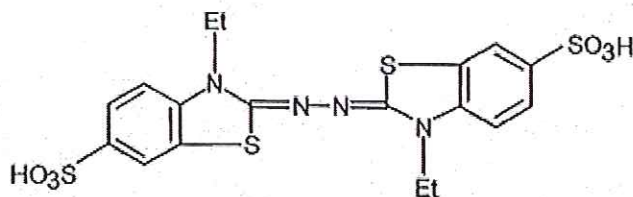
Probe (oxidant) + e (from antioxidant) → reduced probe + oxidized antioxidant

สมการที่ 15

วิธีนี้เป็นวิธีที่ง่าย มีความแม่นยำ ใช้เวลาน้อย และใช้เครื่องมือแค่เครื่องวัดการดูดกลืนแสงเท่านั้น เหมาะสำหรับการวัดกิจกรรมของสารต้านออกซิเดชันในน้ำผักและน้ำผลไม้ หรือในสารสกัดผักและผลไม้ แต่ไม่เหมาะสำหรับการวัดกิจกรรมของสารต้านออกซิเดชันในพลาสติก เนื่องจากสาร DPPH ต้องละลายในเมทานอล จึงส่งผลให้เกิดการตกตะกอนของโปรตีน วิธีการวัดกิจกรรมของสารต้านออกซิเดชันในกลุ่มนี้ เช่น DPPH TEAC และ FRAP จะมีความสัมพันธ์ดีมาก ($R^2 > 0.99$) กับการวัดปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด เนื่องจากกลไกในการเกิดปฏิกิริยาเป็นกลไกเดียวกัน (Huang, Ou and Prior, 2005) แต่ในบางกรณีสารต้านอนุมูลอิสระบางชนิดมีที่ประสิทธิภาพดี วัดผลได้รวดเร็วเมื่อวัดด้วยวิธีอื่นอาจให้ผลที่ไม่ดี หรือให้ผลการยั้งยั้งช้าเมื่อวัดด้วยวิธีนี้ เนื่องจากเป็นวิธีการวัดกลไกที่แตกต่างกัน

3.2.2 Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) assay หรือ ABTS assay

วิธีนี้เป็นวิธีการวัดความเข้มข้นของ Trolox ที่ทำหน้าที่เป็นสารต้านออกซิเดชันต่อ 0.1 มิลลิโมลาร์ของสารตั้งต้นที่ยับยั้งอนุมูลอิสระของ ABTS (ABTS radical cation, $ABTS^{\cdot+}$) สาร ABTS (2,2-azonobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonate)) มีสูตรโครงสร้าง ดังแสดงในภาพที่ 8 ซึ่งสภาวะปกติจะดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 342 นาโนเมตร เมื่อถูกกระตุ้นให้ผลิตอนุมูลอิสระจะเปลี่ยนมาดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 414 นาโนเมตร หลักการของวิธีนี้คือวัดความสามารถของสารต้านออกซิเดชันในการยับยั้งอนุมูลเพอร์ออกซิลของ ABTS วัดได้จากการลดลงของสีในสารละลาย



ภาพ 3 โครงสร้างทางเคมีของ ABTS

ที่มา: Prior, Wu & Schaich (2005)

3.3 ความสามารถในการต้านออกซิเดชันของสารประกอบฟีนอลิก และฟลาโวนอยด์

สารประกอบฟีนอลิกเป็นสารต้านออกซิเดชันตามธรรมชาติที่มีความสำคัญมากที่สุด โดยมีความสามารถในการต้านออกซิเดชันทั้งในระบบอาหารและในร่างกายมนุษย์ (Robards, et al., 1999) ความสามารถในการต้านออกซิเดชันขึ้นกับโครงสร้างของสาร เช่นกรดฟีนอลิกมีความสามารถในการต้านออกซิเดชันน้อยกว่าฟลาโวนอยด์เนื่องจากมีหมู่ไฮดรอกซิลมาแทนที่น้อยกว่าฟลาโวนอยด์ สารประกอบฟีนอลิกทำหน้าที่เป็นสารต้านออกซิเดชันได้หลายแบบ เช่น กำจัดอนุมูลอิสระ ยับยั้งซิงเกิลต์ ออกซิเจน กำจัดไอออนของเหล็ก และกำจัดอนุมูลซูเปอร์ออกไซด์ เป็นต้น ความสามารถในการต้านออกซิเดชันของฟลาโวนอยด์สัมพันธ์กับตำแหน่ง และปริมาณการแทนที่ของหมู่ไฮดรอกซิลโดยเฉพาะบน วงแหวน B แต่การแทนที่ของหมู่ไฮดรอกซิลเพียงตำแหน่งจะไม่ส่งผลหรือส่งผลน้อยมากต่อประสิทธิภาพการต้านออกซิเดชัน เช่น ฮีสเพอริทิน และนารินจีนิน เป็นสารในกลุ่มฟลาโวนอนซึ่งมีหมู่ไฮดรอกซิลมาแทนที่บนวงแหวน B เพียงตำแหน่งเดียว พบว่ามีประสิทธิภาพในการต้านออกซิเดชันน้อยมาก ในขณะที่ ควอเซติน และไซยานิดิน ซึ่งมีหมู่ไฮดรอกซิลเข้ามาแทนที่ในตำแหน่ง 3 และ 4 บนวงแหวน B ส่งผลให้ประสิทธิภาพการต้านออกซิเดชันสูงกว่า Trolox ถึง 4 เท่า นอกจากนั้นการที่มีน้ำตาลเข้ามาแทนที่ในโครงสร้างจะทำให้ประสิทธิภาพการต้านออกซิเดชันลดลง เช่น ฟลาโวนอยด์ที่มีน้ำตาลเป็นองค์ประกอบมีค่า ORAC น้อยกว่าโครงสร้างที่ไม่มีน้ำตาลเป็นองค์ประกอบ (Robards, et al., 1999) และยังพบว่าพบว่ามี การเสริมฤทธิ์กันระหว่างส่วนที่ชอบน้ำ และส่วนที่ชอบไขมัน ทำให้ในการทดลองจำเป็นต้องวัดค่าทั้งสองส่วนในการทดลองวัดกิจกรรมของสารต้านออกซิเดชันในสารต่างๆ ควรวัดหลายวิธีเพื่อเป็นการยืนยันผล

4. การสกัดสารประกอบฟีนอลิกด้วยคลื่นเสียง

4.1 คลื่นอัลตราโซนิก (ultrasound, sonication)

เป็นคลื่นเสียง ที่มีความถี่อยู่ในช่วงที่มนุษย์ไม่สามารถได้ยิน โดยคลื่นเสียงที่มนุษย์สามารถได้ยินมีความถี่ช่วง 16-20 kHz ในขณะที่ความถี่ช่วงอัลตราโซนิกมีความถี่อยู่ในช่วง 20 kHz ถึง 10 MHz และเมื่อคลื่นนี้ผ่านน้ำจะทำให้เกิดคลื่นน้ำและฟองอากาศเรียกว่า cavitation ซึ่งเป็นการเกิดคลื่นน้ำและฟองอากาศซ้ำแล้วซ้ำอีกในขนาดที่เล็กมาก ประมาณหนึ่งในหนึ่งล้านเมตร (ขนาดไมครอน) ทำให้ได้

พลังงานจำนวนมาก จากพลังงานที่ได้นี้จึงนำไปใช้ประยุกต์ในการสกัดสารที่ต้องการ โดยฟองอากาศขนาดเล็กที่มีพลังงานสูงหรือเรียกว่า ไมโครเจตส์ (microjets) สามารถทำลายผนังเซลล์พืชได้อย่างรวดเร็วทำให้สารที่ต้องการสกัดสามารถหลั่งออกสู่ภายนอกเซลล์พืชได้เร็ว (Chemat, Zill e and Khan, 2011)

4.2 การประยุกต์ใช้อัลตราโซนิกในการสกัด

Ma, et al. (2008b) มีการสกัดสารประกอบฟีนอลิกจากเปลือกส้มโดยใช้คลื่นเสียงเปรียบเทียบกับวิธีการสกัดแบบทั่วไป พบว่า การสกัดด้วยคลื่นเสียงโดยใช้เมทานอลเป็นสารสกัดที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที กำลังไฟฟ้า 8 วัตต์ มีปริมาณฟลาโวนอยด์ โกลโคไซด์ และปริมาณกรดฟีนอลิก สูงกว่าการสกัดแบบทั่วไปที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส นาน 8 ชั่วโมง

Londono, et al. (2010) มีการใช้คลื่นเสียงในการสกัดฟลาโวนอยด์ และฟีนอลิกทั้งหมดด้วยน้ำ ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 30 นาที ใช้เปลือกผลไม้ตระกูลส้ม ได้แก่ มะนาว ส้ม และส้มจีน มีปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด 74.80 , 66.36 และ 58.68 มิลลิกรัมต่อกรัม (gallic acid equivalents) ตามลำดับ เปลือกส้มมีองค์ประกอบของฟลาโวนอยด์ ได้แก่ neohesperidin, diosmin, nobiletin และ tangeritin ในส้มจีน มีองค์ประกอบของฟลาโวนอยด์ ได้แก่ hesperidin และ neohesperidin

Khan, et al. (2010) ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดสารประกอบฟีนอลิก และฟลาโวนอยด์ ในเปลือกส้ม โดยใช้การสกัดด้วยคลื่นเสียง มีสภาวะที่เหมาะสมคือ อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส กำลังไฟฟ้า 150 วัตต์ และเอทานอล 80 เปอร์เซ็นต์ สามารถสกัดฟีนอลิกทั้งหมดได้ 275.8 มิลลิกรัม (gallic acid equivalents) ต่อ 100 กรัม naringin และ hesperidin มี 70.3 และ 205.2 มิลลิกรัม (gallic acid equivalents) ต่อ 100 กรัม ตามลำดับ และมีปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด naringin และ hesperidin มากกว่าวิธีการสกัดแบบทั่วไป

5. การต้านการเกิดออกซิเดชันด้วยสารสกัดจากเปลือกส้ม

ฟีนอลิก และฟลาโวนอยด์ จากพืชตระกูลส้มมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระในสภาวะแวดล้อมที่เป็นไฮโดรฟิลิก (hydrophilic) และไลโปฟิลิก (lipophilic) นอกจากนี้ยังสามารถออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้หลายชนิด เช่น อนุมูลไฮดรอกซี ($\cdot\text{OH}$) อนุมูลซูเปอร์ออกไซด์ ($\text{O}_2^{\cdot-}$) และต้านการเกิดออกซิเดชันจากไขมัน (Finotti and Di Majo, 2003)

Zia ur (2006) สกัดสารจากเปลือกส้มที่สกัดด้วยสารชนิดต่าง ๆ พบว่า เมทานอล สามารถสกัดสารได้ปริมาณผลผลิตสูงที่สุด และสารสกัดจากเปลือกส้มปริมาณ 1,600 หนึ่งในล้านส่วน (ppm) สามารถต้านการเกิดออกซิเดชันในน้ำมันข้าวโพดได้เทียบเท่ากับสารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์ชนิด BHA และ BHT ที่ความเข้มข้น 200 ppm

บทที่ 3

วิธีดำเนินงานวิจัย

วัตถุดิบ เครื่องมือ อุปกรณ์ และสารเคมีที่ใช้ในการวิจัย

1. วัตถุดิบ

- 1.1 เปลือกส้ม
- 1.2 เปลือกมะนาว
- 1.3 ไข่ไก่
- 1.4 น้ำมันรำข้าว
- 1.5 น้ำส้มสายชู
- 1.6 น้ำตาล
- 1.7 มัสตาร์ด

2. สารเคมีในการวิเคราะห์

- 2.1 Folin-Ciocalteu reagent
- 2.2 Sodium carbonate
- 2.3 Calcium bicarbonate
- 2.4 Gallic acid
- 2.5 1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl 90%(DPPH)
- 2.6 Ethylene diamine tetra-acetic acid (EDTA)
- 2.7 Butylated hydroxyanisole (BHA)
- 2.8 Butylated hydroxytoluene (BHT)
- 2.9 Methanol
- 2.10 Ethanol
- 2.11 Acetone
- 2.12 2,4,6-Tris(2-pyridyl)-s-triazine (TPTZ)
- 2.13 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid (Trolox)
- 2.14 Potassium acetate
- 2.15 Ferric chloride
- 2.16 Sodium chloride,
- 2.17 Anhydrous sodium sulfate

2.18 Potassium iodide

2.19 Trichloroacetic acid

2.20 Thiobarbituric acid

3. เครื่องมือและอุปกรณ์ในการวิเคราะห์

3.1 ตู้อบลมร้อน ยี่ห้อ Lab Tech รุ่น LDO-150F ประเทศผู้ผลิต เกาหลีใต้

3.2 เครื่องบดลดขนาด ยี่ห้อ Cleo รุ่น CCB-404 ประเทศผู้ผลิต ไทย

3.3 ตะแกรงร่อน Aperture 300 μm and Mesh 50 ยี่ห้อ Retsch รุ่น D-422759 ประเทศ ผู้ผลิต เยอรมันนี

3.4 เครื่องชั่งน้ำหนัก ทศนิยม 4 ตำแหน่ง ยี่ห้อ Sartorius รุ่น BSA224S AW ประเทศผู้ผลิต เยอรมนี

3.5 เครื่องอัลตราโซนิก ยี่ห้อ Crest รุ่น 175DAE ประเทศผู้ผลิต มาเลเซีย

3.6 เครื่อง HPLC ยี่ห้อ Agilent รุ่น 1100 ประเทศผู้ผลิต สหรัฐอเมริกา

3.7 เครื่อง Spectrophotometer ยี่ห้อ HACH รุ่น DR/4000U ประเทศผู้ผลิตสหรัฐอเมริกา

3.8 บั๊มชุดกรองสุญญากาศ ยี่ห้อ Sparmax รุ่น TC-501v ประเทศผู้ผลิต ไต้หวัน

3.9 ชุดเครื่องระเหยสุญญากาศ ยี่ห้อ Bochi รุ่น B-490 ประเทศผู้ผลิต สวิตเซอร์แลนด์

3.10 เครื่องทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง ยี่ห้อ Labconco รุ่น S/N 26502 ประเทศผู้ผลิต สหรัฐอเมริกา

4. อุปกรณ์เครื่องครัว และภาชนะบรรจุสำหรับบรรจุน้ำสกัด

4.1 กระดาษกรอง whatman No. 1

4.2 ขวดแก้วสีชา

4.3 ถาดสแตนเลส

4.4 เครื่องแก้ว

วิธีการดำเนินการวิจัย

งานวิจัยนี้แบ่งวิธีการดำเนินงานวิจัยออกเป็น 4 ตอน ดังนี้

1. การศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการสกัดสารประกอบฟีนอลิกด้วยคลื่นเสียงจากเปลือกผลไม้ตระกูลส้ม
2. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดสารประกอบฟีนอลิกจากเปลือกผลไม้ตระกูลส้มด้วยเทคนิคการสกัดด้วยคลื่นเสียง
3. การเปรียบเทียบประสิทธิภาพการสกัดสารประกอบฟีนอลิก ระหว่างการสกัดด้วยคลื่นเสียงกับการสกัดด้วยวิธีการสกัดแบบเดิม (maceration)
4. การศึกษาคุณสมบัติการต้านการเกิดออกซิเดชันของสารสกัดจากเปลือกผลไม้ตระกูลส้มในผลิตภัณฑ์น้ำสกัด

ตอนที่ 1 การศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการสกัดสารประกอบฟีนอลิกด้วยคลื่นเสียงจากเปลือกผลไม้ตระกูลส้ม

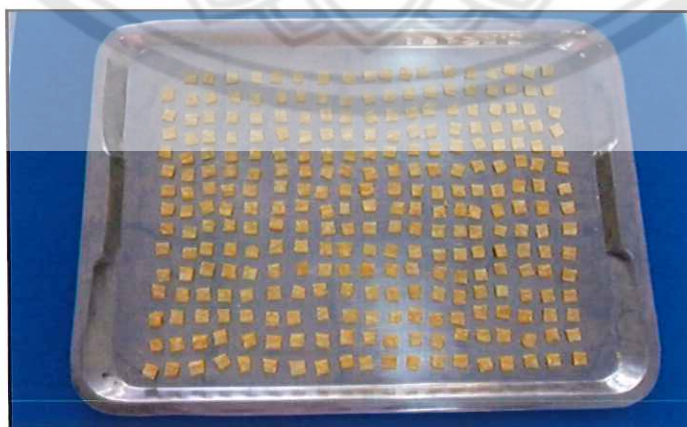
จัดการทดลองแบบแฟคตอเรียลในแผนการทดลองแบบสุ่มในบล็อกสมบูรณ์ (Factorial in Randomize Complete Block Design) โดยศึกษาปัจจัย 3 ปัจจัย ได้แก่ ชนิดของเปลือกผลไม้ตระกูลส้ม ชนิดของสารที่ใช้สกัด และ ความเข้มข้นของสารที่ใช้สกัด ปัจจัยที่ 1 ชนิดของเปลือกส้ม เปรียบเทียบระหว่างเปลือกส้มเขียวหวาน และเปลือกมะนาว ปัจจัยที่ 2 ชนิดของสารที่ใช้สกัด เปรียบเทียบระหว่าง เมทานอล เอทานอล และอะซิโตน ปัจจัยที่ 3 ความเข้มข้นของสารสกัด เปรียบเทียบความเข้มข้นที่ 20, 50 และ 80 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) ในการทดลองใช้เครื่องอัลตราโซนิกในการสกัด ซึ่งเป็นการสกัดโดยใช้คลื่นเสียงพลังงานต่ำไม่เกิน 60 วัตต์

1. วัตถุดิบที่ใช้ในงานวิจัย

เปลือกส้มที่ใช้ในการทดลองเป็นเปลือกส้มสายน้ำผึ้ง (*Citrus reticulata* Blanco cv. Sainampung) อายุ 10 เดือน หลังจากเริ่มติดผลเก็บเกี่ยว 3 ครั้งในช่วง เดือนธันวาคม พ.ศ. 2555 และเดือนมกราคม และกุมภาพันธ์ พ.ศ. 2556 จากสวนส้มโชควิชัย อำเภอฝาง จังหวัดเชียงใหม่

เปลือกมะนาว (*Citrus aurantifolia*) อายุ 4 เดือน หลังจากเริ่มติดผล เก็บเกี่ยว 3 ครั้งในช่วง เดือนธันวาคม พ.ศ. 2555 และเดือนมกราคม และกุมภาพันธ์ พ.ศ. 2556 จากตำบล บ้านใหม่ อำเภอเมือง จังหวัดพิษณุโลก

ผลส้มและมะนาวจากแหล่งที่ปลูกข้างต้น นำมาล้างด้วยน้ำสะอาด ปอกเปลือก และตัดให้มีขนาด 1 ตารางเซนติเมตร ดังภาพที่ 4-5 จากนั้นนำไปอบแห้งที่ตู้อบลมร้อน (Hot air oven) ดังภาพที่ 6 ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง จนความชื้นลดลงเหลือ 9-10 เปอร์เซ็นต์ เปลือกที่ได้นำไปบดด้วยเครื่องบด จากนั้นนำไปร่อนผ่านตะแกรงขนาด 50 เมช (300 ไมครอน) นำไปบรรจุลงในขวดสีชา เก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาวิเคราะห์



ภาพ 4 เปลือกส้มขนาด 1 ตารางเซนติเมตร ก่อนเข้าอบแห้ง



ภาพ 5 เปลือกมะนาวขนาด 1 ตารางเซนติเมตร ก่อนเข้าอบแห้ง



ภาพ 6 เปลือกส้มและมะนาว นำไปอบให้แห้งในตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 60 °C จนกระทั่งมีความชื้น 9-10 เปอร์เซ็นต์

2. การสกัดตัวอย่างโดยใช้คลื่นเสียง

นำตัวอย่างผงเปลือกส้มและมะนาวที่ผ่านการเตรียมจากข้อ 1 มาชั่งน้ำหนักปริมาณ 1 กรัม เติลงในขวดสีชาขนาด 120 มิลลิลิตร จากนั้นเติมตัวทำละลายลงไป 20 มิลลิลิตร ปิดฝาขวดให้สนิทป้องกันการระเหยของตัวทำละลายระหว่างการสกัด นำไปใส่ในเครื่องอัลตราโซนิกซึ่งมีขนาดของอ่าง 16.4x13.3x12.2 เซนติเมตร (ภาพ 7) ความถี่ของคลื่น 38.5 กิโลเฮิร์ต กำลังไฟฟ้าที่ 50.93 วัตต์ (ระดับ 5) ตั้งอุณหภูมิสำหรับการสกัดที่ 40 องศาเซลเซียส จากนั้นเปิดเครื่องดำเนินการสกัดนาน 30 นาที ระหว่างการสกัดระดับของตัวทำละลายในขวดต้องอยู่ต่ำกว่าระดับน้ำของเครื่องเพื่อให้คลื่นเสียงผ่านตัวกลางที่เป็นของเหลวเมื่อดำเนินการสกัดเสร็จ นำไปกรองผ่านกระดาษกรองเบอร์ 1 นำส่วนใสที่กรองได้เก็บในขวดสีชา (ภาพ 8) เพื่อทำการวิเคราะห์ทางเคมีได้แก่

- 2.1 วิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด (Anagnostopoulou, et al., 2006)
- 2.2 วิเคราะห์ปริมาณฟลาโวนอยด์ (Ramful, et al., 2010)
- 2.3 วิเคราะห์ฟลาโวนอน ชนิด Hesperidin และ Naringin (Khan, et al., 2010)
- 2.4 ABTS radical scavenging activity (Babbar, et al., 2011)
- 2.5 Ferric reducing antioxidant power (FRAP) (Ma, et al., 2008b)
- 2.6 DPPH radical scavenging activity (Anagnostopoulou, et al., 2006)



ภาพ 7 การสกัดเปลือกส้มและมะนาวด้วยเครื่องอัลตราโซนิก



ภาพ 8 กรองเปลือกส้มและมะนาวหลังจากผ่านการสกัดด้วยคลื่นเสียง

คัดเลือกชนิดของเปลือกผลไม้ตระกูลส้ม ชนิดของสารสกัด และความเข้มข้นของสารสกัด ที่ให้ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ และปริมาณฟีนอลิกสูงที่สุด แล้วนำไปจ้จัดงกล่าวมาหาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดสารประกอบฟีนอลิกด้วยเครื่องอัลตราโซนิกในตอนที 2

ตอนที่ 2 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดสารประกอบฟีนอลิกจากเปลือกผลไม้ตระกูลส้ม ด้วยเทคนิคการสกัดด้วยคลื่นเสียง

โดยคัดเลือกสิ่งทดลองจากตอนที่ 1 ที่ให้ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดสูงที่สุด มาศึกษาสภาวะในการสกัดสารประกอบฟีนอลิกที่เหมาะสม โดยสภาวะที่ศึกษาได้แก่ อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส) เวลา (นาที) และ กำลังไฟฟ้า (วัตต์) ที่ใช้ในการสกัดด้วยเครื่องอัลตราโซนิก โดยใช้เทคนิค response surface methodology (RSM) วางแผนการทดลองแบบ Box behnken design ช่วงอุณหภูมิที่ศึกษา 30, 40 และ 50 องศาเซลเซียส ระยะเวลาที่ใช้ในการสกัด 20, 30 และ 40 นาที และกำลังไฟฟ้า 3 ระดับ (ระดับ 1 = 30.34 วัตต์, ระดับ 4 = 44.85 วัตต์ และ ระดับ 7 = 59.36 วัตต์)

1. การสกัดตัวอย่างโดยการใช้คลื่นเสียง

นำตัวอย่างที่ผ่านการคัดเลือกจากตอนที่ 1 คือ เปลือกส้ม สกัดด้วยอะซิโตน ความเข้มข้น 80 เปอร์เซ็นต์ นำผงเปลือกส้มซึ่งน้ำหนักปริมาณ 1 กรัม เติลงในขวดสีชาขนาด 120 มิลลิลิตร จากนั้นเติมตัวทำละลายลงไป 20 มิลลิลิตร ทำการสกัดโดยนำไปใส่ในเครื่องอัลตราโซนิกเช่นเดียวกับตอนที่ 1 โดยสภาวะของการสกัดถูกกำหนดทั้งหมด 17 สิ่งทดลอง ดังตารางที่ 1 เมื่อดำเนินการสกัดเสร็จ นำไปกรองผ่านกระดาษกรองเบอร์ 1 ด้วยชุดกรองสุญญากาศ ดังภาพที่ 9 นำส่วนใสที่กรองได้เก็บในขวดสีชา



ภาพ 9 กรองเปลือกส้มด้วยชุดกรองสุญญากาศหลังจากผ่านการสกัดด้วยคลื่นเสียง

2. การทำแห้ง

นำสารสกัดที่ผ่านการกรองจากข้อ 1 ไประเหยเอาตัวทำละลายออกเพื่อให้มีความเข้มข้นด้วยชุดระเหยตัวทำละลาย (Rotary evaporator) ทำการระเหย 1 ครั้ง ใช้สารสกัด 100 มิลลิลิตร ระเหยที่ 50 องศาเซลเซียส ความดัน 100 มิลลิบาร์ (mbar) เป็นเวลา 5 นาที ดังภาพที่ 10 นำสารสกัดที่ผ่านการ

ระเหยแล้วจะมีสีเหลืองส้ม ลักษณะขุ่นขึ้นดังภาพที่ 11 นำสารดังกล่าวไปทำแห้งด้วยเครื่องระเหยแบบสุญญากาศ (Freeze drier) โดยใช้สารสกัด 100 มิลลิลิตร บรรจุในขวดสำหรับแช่แข็ง นำไปแช่แข็งในเอทานอลที่อุณหภูมิ -40 องศาเซลเซียส เพื่อให้เกิดผลึกน้ำแข็งเกาะกับขวดเป็นชั้นบางๆ จากนั้นนำไปแช่แข็งที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส นาน 12 ชั่วโมง จึงนำมาเข้าเครื่องระเหยแบบสุญญากาศ ดังภาพที่ 12 ที่อุณหภูมิ -75 องศาเซลเซียส ความดัน $1-3 \times 10^{-4}$ mbar นาน 12 ชั่วโมง จะได้สารสกัดจากเปลือกส้มที่แห้งเป็นลักษณะเกล็ดหยาบดังภาพที่ 13 นำตัวอย่างที่เตรียมได้ไปบรรจุลงขวดสีชา ดังภาพที่ 14 และเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส นำไปวิเคราะห์ทางเคมีได้แก่

- 2.1 วิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด (Anagnostopoulou, et al., 2006)
- 2.2 วิเคราะห์ปริมาณฟลาโวนอยด์ (Ramful, et al., 2010)
- 2.3 วิเคราะห์ฟลาโวนชนิด Hesperidin และ Naringin (Khan, et al., 2010)
- 2.4 ทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี
 - 2.4.1 ABTS radical scavenging activity (Babbar *et al.*, 2011)
 - 2.4.2 Ferric reducing antioxidant power (FRAP) (Ma, et al., 2008b)
 - 2.4.3 DPPH radical scavenging activity (Anagnostopoulou, et al., 2006)

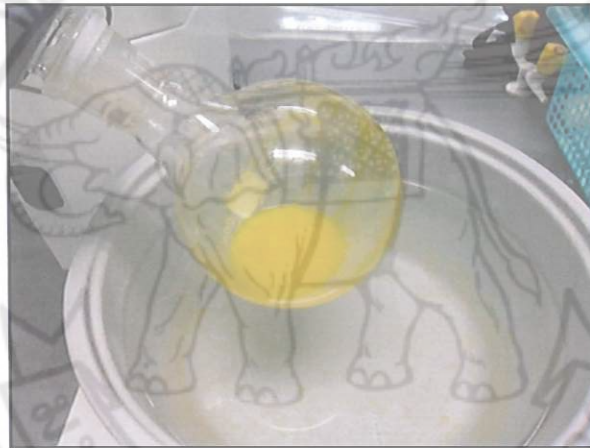
คัดเลือกสภาวะที่ให้ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดสูงสุด และมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระดีที่สุด แล้วนำสภาวะที่คัดเลือกนี้ไปเปรียบเทียบประสิทธิภาพการสกัดด้วยวิธีการสกัดแบบเดิมในตอนที่ 3

ตารางที่ 1 สภาวะการสกัดเปลือกส้ม จากแผนการทดลองแบบ Box behnken design

สภาวะที่	สภาวะการสกัดที่ใช้ในการทดลอง		
	อุณหภูมิ (°C)	เวลา (min)	กำลังไฟฟ้า (watt)
1	30	20	44.85
2	50	20	44.85
3	30	40	44.85
4	50	40	44.85
5	30	30	30.34
6	50	30	30.34
7	30	30	59.36
8	50	30	59.36
9	40	20	30.34
10	40	40	30.34
11	40	20	59.36
12	40	40	59.36
13	40	30	44.85
14	40	30	44.85
15	40	30	44.85
16	40	30	44.85
17	40	30	44.85



ภาพ 10 การระเหยตัวทำละลายออกจากสารสกัดจากเปลือกส้มด้วยชุดระเหยตัวทำละลาย (Rotary evaporator)



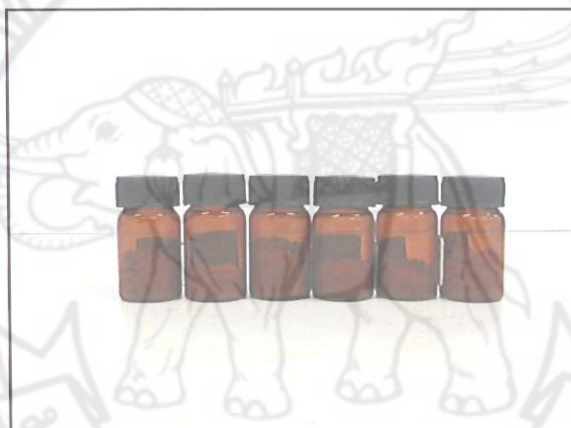
ภาพ 11 สารสกัดจากเปลือกส้มหลังจากการระเหยตัวทำละลายออกบางส่วน



ภาพ 12 สารสกัดจากเปลือกส้มนำมาทำแห้งด้วยเครื่องระเหิดแบบสุญญากาศ



ภาพ 13 สารสกัดจากเปลือกส้มที่ผ่านการทำแห้งด้วยเครื่องระเหิดแบบสูญญากาศ



ภาพ 14 สารสกัดจากเปลือกส้มเก็บในขวดสีชาก่อนนำไปวิเคราะห์

ตอนที่ 3 การเปรียบเทียบประสิทธิภาพการสกัดสารประกอบฟีนอลิก ระหว่างการสกัดด้วยคลื่นเสียงกับการสกัดด้วยวิธีการสกัดแบบเดิม (maceration)

นำสภาวะการสกัดที่เหมาะสมของการสกัดสารประกอบฟีนอลิกจากเปลือกผลไม้ตระกูลส้มด้วยคลื่นเสียงจากตอนที่ 2 มาใช้ในการทดลองในตอนนี้

1. การสกัดด้วยคลื่นเสียงด้วยสภาวะที่เหมาะสม

นำสภาวะที่เหมาะสมจากการทดลองตอนที่ 2 คืออุณหภูมิ 48 องศาเซลเซียส ระยะเวลาการสกัด 40 นาที กำลังไฟฟ้าที่ใช้สกัด 57.34 วัตต์ (level 6 ของเครื่องสกัดมีความใกล้เคียงกับกำลังไฟฟ้าที่เหมาะสมที่สุด ดังนั้นในการทดลองจึงเลือกใช้ level 6) นำผงเปลือกส้มซึ่งน้ำหนักปริมาณ 1 กรัม เติลงใน



ขูดสีชาขนาด 120 มิลลิเมตร จากนั้นเติมตัวทำละลายอะซิโตนลงไป 20 มิลลิเมตร ทำการสกัดนำไปใส่ในเครื่องอัลตราโซนิกตามสภาวะข้างต้น จากนั้นนำมากรองและทำแห้งเช่นเดียวกับตอนที่ 2 เก็บตัวอย่างที่ได้ในขวดสีชาที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

i.6740893

2. การสกัดด้วยวิธีการสกัดแบบเดิม (maceration)

นำผงเปลือกส้มซึ่งน้ำหนักปริมาณ 1 กรัม เติลงในขวดสีชาขนาด 120 มิลลิเมตร จากนั้นเติมตัวทำละลายอะซิโตนลงไป 20 มิลลิเมตร ทำการสกัดนำไปใส่ในอ่างของเครื่องอัลตราโซนิก โดยให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 48 องศาเซลเซียส ระยะเวลาการสกัด 40 นาที โดยไม่ให้พลังงานคลื่นเสียงระหว่างการสกัด จากนั้นนำมากรองและทำแห้งเช่นเดียวกับตอนที่ 2 เก็บตัวอย่างที่ได้ในขวดสีชาที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

3. เปรียบเทียบการสกัดด้วยคลื่นเสียงด้วยสภาวะที่เหมาะสมกับการสกัดด้วยวิธีการสกัดที่ใช้ทั่วไป (maceration)

โดยเปรียบเทียบองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดที่ได้จากทั้งสองวิธี ได้แก่

- 3.1 วิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด (Anagnostopoulou, et al., 2006)
- 3.2 วิเคราะห์ปริมาณฟลาโวนอยด์ (Ramful, et al., 2010)
- 3.3 วิเคราะห์ฟลาวาโนน ชนิด Hesperidin และ Naringin (Khan, et al., 2010)
- 3.4 ทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี
 - 3.4.1 ABTS radical scavenging activity (Babbar, et al., 2011)
 - 3.4.2 Ferric reducing antioxidant power (FRAP) (Ma, et al., 2008b)
 - 3.4.3 DPPH radical scavenging activity (Anagnostopoulou, et al., 2006)
- 3.5 เปอร์เซ็นต์ผลผลิตที่ได้ (% yield) (Khan, et al., 2010)

ตอนที่ 4 การศึกษาคุณสมบัติการต้านการเกิดออกซิเดชันของสารสกัดจากเปลือกผลไม้ตระกูลส้ม ในผลิตภัณฑ์น้ำสลัด

โดยเปรียบเทียบฤทธิ์การต้านออกซิเดชันของสารสกัดที่ได้จากเปลือกผลไม้ตระกูลส้มที่ปริมาณแตกต่างกัน 3 ระดับ คือ 700, 2,000 และ 4,700 ppm กับ สารต้านออกซิเดชันสังเคราะห์ คือ Butylated hydroxyl anisole (BHA) และ Butylated hydroxy toluene (BHT) ที่ความเข้มข้น 140 ppm ของปริมาณน้ำสลัด และน้ำสลัดสูตรควบคุม (control) เป็นระยะเวลา 2 เดือน ที่อุณหภูมิในการเก็บ 2 อุณหภูมิ คือ อุณหภูมิ 30 และอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส

1. การผลิตน้ำสลัดน้ำมันรำข้าว

การทำน้ำสลัดน้ำมันรำข้าวมีส่วนประกอบได้แก่ น้ำมันรำข้าว ไข่แดง น้ำส้มสายชู น้ำตาล เกลือ นมข้นหวาน และมัสตาร์ด ดังตารางที่ 2 และภาพที่ 15 โดยเริ่มจากนำสารสกัดจากเปลือกส้มมาทำการละลายด้วยน้ำส้มสายชูสำหรับตัวอย่างที่ใส่สารสกัดจากเปลือกส้ม ส่วนตัวอย่างที่ใช้สารสกัดสังเคราะห์ BHA และ BHT ให้ละลายด้วยน้ำมันรำข้าว การทำน้ำสลัดเริ่มด้วยนำน้ำตาลทราย เกลือ ไข่แดง บั่นผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องปั่นผสม จากนั้นเติมนมข้นหวานและมัสตาร์ดแล้วปั่นผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน แบ่งน้ำมันรำข้าวและน้ำส้มสายชูออกเป็น 5 ส่วน จากนั้นค่อยๆ เติมน้ำมันรำข้าวส่วนที่ 1 จนหมดใช้เวลา 2 นาที น้ำสลัดที่ปั่นอยู่จะมีความหนืดมากขึ้นเมื่อเติมน้ำมันเพิ่มขึ้น จากนั้นเติมนมข้นหวานส่วนที่ 1 ในเวลา 1 นาที น้ำสลัดจะหนืดลดลง จากนั้นเติมน้ำมันรำข้าวส่วนที่ 2 สลับกับน้ำส้มสายชูส่วนที่ 2 ทำซ้ำจนน้ำมันรำข้าวกับน้ำส้มสายชูครบทั้ง 5 ส่วน ดังภาพที่ 16 จากนั้นนำน้ำสลัดที่ได้ไปบรรจุลงขวดแก้วที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ปริมาณขวดละ 200 กรัม และปิดฝาให้สนิทดังภาพที่ 17

ตารางที่ 2 ส่วนประกอบของน้ำสลัดน้ำมันรำข้าว

ส่วนประกอบ	ปริมาณ (กรัม)	ปริมาณ (%)
น้ำส้มสายชู	105	14
น้ำตาลทรายขาว	123	16.4
นมข้นหวาน	75	10
เกลือ	6	0.8
มัสตาร์ด	6	0.8
ไข่แดง	60	8
น้ำมันรำข้าว	375	50
รวมทั้งหมด	750	100



ภาพ 15 วัตถุดิบสำหรับทำน้ำสลัดน้ำมันรำข้าว



ภาพ 16 การปั่นผสมน้ำสลัดน้ำมันรำข้าว



ภาพ 17 น้ำสลัดเติมสารต้านออกซิเดชันจากเปลือกส้ม และสารต้านออกซิเดชันสังเคราะห์

- A: น้ำสลัดสูตรควบคุม
- B: น้ำสลัดเติมสารต้านออกซิเดชันจากเปลือกส้ม ความเข้มข้น 700 ppm
- C: น้ำสลัดเติมสารต้านออกซิเดชันจากเปลือกส้ม ความเข้มข้น 2,000 ppm
- D: น้ำสลัดเติมสารต้านออกซิเดชันจากเปลือกส้ม ความเข้มข้น 4,700 ppm
- E: น้ำสลัดเติมสารต้านออกซิเดชันชนิด ความเข้มข้น BHA 140 ppm
- F: น้ำสลัดเติมสารต้านออกซิเดชันชนิด ความเข้มข้น BHT 140 ppm

2. การเก็บรักษาน้ำสลัดเพื่อศึกษาฤทธิ์การต้านออกซิเดชัน

น้ำสลัดสูตรควบคุม น้ำสลัดเติมสารต้านออกซิเดชันจากเปลือกส้ม 700, 2,000 และ 4,000 ppm น้ำสลัดเติมสารต้านออกซิเดชันชนิด ความเข้มข้น BHA และ BHT 140 ppm เก็บในตู้ป่ม (incubator) ที่ควบคุมอุณหภูมิเก็บ 2 อุณหภูมิ คือ อุณหภูมิ 30 และอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ดังภาพที่ 18 และ 19 เก็บน้ำสลัดเป็นระยะเวลา 60 วัน โดยตรวจวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงทางด้านเคมี และทางกายภาพของน้ำสลัด ทุกๆ 5 วัน ได้แก่

- 2.1 ปริมาณกรดไขมันอิสระ (free fatty acids) (AOAC., 2000)
- 2.2 ค่าเปอร์ออกไซด์ (peroxide value) (AOAC., 2000)
- 2.3 Thiobarbituric acid (TBARs) (AOAC., 2000)
- 2.4 ค่าความเป็นกรดต่าง ด้วยเครื่องวัดค่าความเป็นกรดต่าง (pH meter)
- 2.5 ปริมาณกรดทั้งหมด (AOAC., 2000)
- 2.6 ค่าสี L^* , a^* , b^* ด้วยเครื่อง Hunter lab scale
- 2.7 คุณลักษณะของเนื้อสัมผัส ด้วย texture analyser (Liu, Xu and Guo, 2007)
 - 2.7.1 ความแน่นเนื้อ (firmness)
 - 2.7.2 ความหนืด (viscosity)
 - 2.7.3 ความคงตัว (consistency)
 - 2.7.4 การเกาะกันระหว่างอนุภาค (cohesiveness)



ภาพ 18 น้ำสลัดน้ำมันรำข้าวถูกเก็บที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส



ภาพ 19 น้ำสลัดน้ำมันรำข้าวถูกเก็บที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส

การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ โดยวิธีวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of Variance) โดยการทดลองตอนที่ 1 จัดการทดลองแบบแฟคตอเรียลในแผนการทดลองแบบสุ่มในบล็อกสมบูรณ์ (Factorial in Randomize Complete Block Design) วิเคราะห์ผลด้วยวิธี F-Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยระหว่างสิ่งทดลองโดยวิธี Duncan' Mutiple Range Test (DMRT) ประมวลผลด้วยโปรแกรม SPSS เวอร์ชัน 11.5 โดยนำเสนอข้อมูลเป็นตาราง

การทดลองตอนที่ 2 วางแผนการทดลองแบบ Box behnken design (BBD) วิเคราะห์หาสมการด้วย Multiple linear regression และใช้เทคนิค Response surface methodology (RSM) ในการหาสถานะที่ดีที่สุด ด้วยโปรแกรม Design expert นำเสนอข้อมูลเป็นตาราง และกราฟ

การทดลองตอนที่ 3 วิเคราะห์ผลด้วยวิธี t-Test นำเสนอข้อมูลเป็นตาราง และการทดลองตอนที่ 4 วิเคราะห์ผลด้วย วิธี F-Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยระหว่างสิ่งทดลองโดยวิธี Least Significant Different Test (LSD) ประมวลผลด้วยโปรแกรม SPSS เวอร์ชัน 11.5 โดยนำเสนอข้อมูลเป็นตาราง

บทที่ 4

ผลการวิจัย

การนำเสนองานวิจัยแบ่งเป็น 4 ตอน ดังนี้

ตอนที่ 1 การศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการสกัดสารประกอบฟีนอลิกด้วยคลื่นเสียงจากเปลือกผลไม้ตระกูลส้ม

ในการทดลองใช้เครื่องอัลตราโซนิก (model 175DAE, Crest Ultrasonics Co. Ltd, Malaysia) ที่มีความถี่ 38.5 kHz กำลังไฟฟ้าที่ 50.93 วัตต์ สภาวะในการสกัดคือใช้อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที (Ma, et al., 2009)

เมื่อเปรียบเทียบเปลือกผลไม้ตระกูลส้มแต่ละชนิดพบว่า มีผลต่อฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ (DPPH: IC₅₀) ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด (total phenolic content) ปริมาณฟลาโวนอยด์ (total flavonoid content) ปริมาณเฮสเปอร์ดิซิน (hesperidin) และ ปริมาณนารินจิน (narigin) แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ $p < 0.05$ และ $p < 0.01$ ดังตารางที่ 3 โดยเปลือกส้มมีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ 0.72 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งมากกว่าเปลือกมะนาว ($p < 0.01$) เนื่องจากในเปลือกส้มมีปริมาณ ฟีนอลิกทั้งหมด 2,456.71 มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อ 100 กรัม ปริมาณฟลาโวนอยด์ 2,146.41 มิลลิกรัมสมมูลของควอเซอรินต่อ 100 กรัม ปริมาณเฮสเปอร์ดิซิน 528.77 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม แต่มีปริมาณนารินจินน้อยกว่าเปลือกมะนาวโดยมีเพียง 14.65 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม ($p < 0.05$) ดังตารางที่ 3 ซึ่งสารฟีนอลิก ฟลาโวนอยด์ เฮสเปอร์ดิซิน และนารินจินมีคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระ (free radical) โดยสามารถให้ไฮโดรเจนอะตอมจากหมู่ไฮดรอกซิลกับอนุมูลอิสระ (free radicals) (Benavente-García, et al., 1997) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยที่เปรียบเทียบปริมาณฟลาโวนอยด์ในเปลือกส้มแมนดาริน (*Citrus reticulata* Blanco) กับเปลือกมะนาว (*C. limon* L. Bur) ซึ่งพบว่าในเปลือกส้มแมนดารินมีปริมาณฟลาโวนอยด์ 49.2 ± 1.33 มิลลิกรัมต่อกรัม มากกว่าในเปลือกมะนาวซึ่งมีเพียง 32.7 ± 1.06 มิลลิกรัมต่อกรัม ที่ระดับนัยสำคัญ $p \leq 0.05$ เนื่องจากมีปริมาณฟลาโวนอยด์ซึ่งเป็นฟลาโวนอยด์กลุ่มหลักของผลไม้ตระกูลส้มสูงกว่าในมะนาว โดยมีปริมาณเฮสเปอร์ดิซิน 29.5 ± 0.32 มิลลิกรัมต่อกรัม สูงกว่าในมะนาวที่มีเพียง 9.42 ± 0.41 มิลลิกรัมต่อกรัม แต่ปริมาณนารินจินในมะนาวคือ 1.51 ± 0.05 มิลลิกรัมต่อกรัม ซึ่งมากกว่าค่าที่พบในส้ม 0.54 ± 0.02 มิลลิกรัมต่อกรัมที่ระดับนัยสำคัญ $p < 0.05$ (Wang, et al., 2008) นอกจากนี้ยังมีรายงานการเปรียบเทียบฟลาโวนอยด์ในระหว่างมะนาว (lemon and lime) กับเกรฟฟรุต (grapefruit)

พบว่า เลมอนมีปริมาณฟลาโวนอน 26 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม และ ไลม์มี 17 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม ซึ่งน้อยกว่าในเกรฟรุฟที่มีปริมาณฟลาโวนอน 27 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม (Peterson, et al., 2006)

ตารางที่ 3 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของปัจจัยหลักและการปฏิสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยของชนิดเปลือกส้ม ชนิดสารสกัด และความเข้มข้นสารสกัด ต่อปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด ฟลาโวนอยด์ เฮสเปอร์ดิทิน และนารินจิน โดยใช้คลื่นเสียงช่วยในกระบวนการสกัด

Source of variation	Total phenolic (mg 100 g ⁻¹)	Total flavonoid (mg 100 g ⁻¹)	Hesperidin (mg 100 g ⁻¹)	Naringin (mg 100 g ⁻¹)
Citrus peel types (A)	xx	xx	xx	xx
Mandarine peel	2,456.71 ± 34.97 ^A	2,146.41 ± 27.52 ^A	528.77 ± 49.13 ^A	14.65 ± 1.46 ^B
Lime peel	987.51 ± 21.85 ^B	600.83 ± 11.37 ^B	257.05 ± 18.68 ^B	26.09 ± 2.03 ^A
Extraction solvents (B)	Xx	xx	xx	xx
Methanol	1,640.72 ± 99.35 ^b	1,247.43 ± 99.43 ^c	338.95 ± 37.61 ^b	23.47 ± 1.38 ^z
Ethanol	1,548.64 ± 61.43 ^c	1,339.17 ± 103.37 ^b	286.50 ± 31.46 ^b	15.53 ± 1.50 ^b
Acetone	1,976.91 ± 113.51 ^a	1,534.35 ± 120.13 ^a	545.56 ± 64.29 ^a	22.52 ± 2.97 ^a
Solvent concentrations (C)	xx	xx	xx	xx
20	1,592.55 ± 92.22 ^z	1,315.61 ± 106.57 ^y	187.87 ± 13.43 ^z	12.38 ± 1.59 ^z
50	1,851.24 ± 106.75 ^x	1,421.91 ± 112.09 ^x	362.39 ± 33.78 ^y	20.56 ± 1.76 ^y
80	1,722.53 ± 117.74 ^y	1,383.43 ± 108.54 ^x	648.07 ± 62.53 ^x	28.74 ± 2.81 ^x
Interaction				
A x B	xx	xx	xx	xx
A x C	xx	ns	xx	ns
B x C	xx	xx	xx	x
A x B x C	xx	xx	x	x

xx = $p \leq 0.01$; x = $p \leq 0.05$; ns = not significantly different.

A and B Mean values with different letters in columns are significantly different; $p < 0.05$ for citrus peel types

a, b and c Mean values with different letters in columns are significantly different; $p < 0.05$ for solvent extraction types

x, y and z Mean values with different letters in columns are significantly different; $p < 0.05$ for solvent concentrations

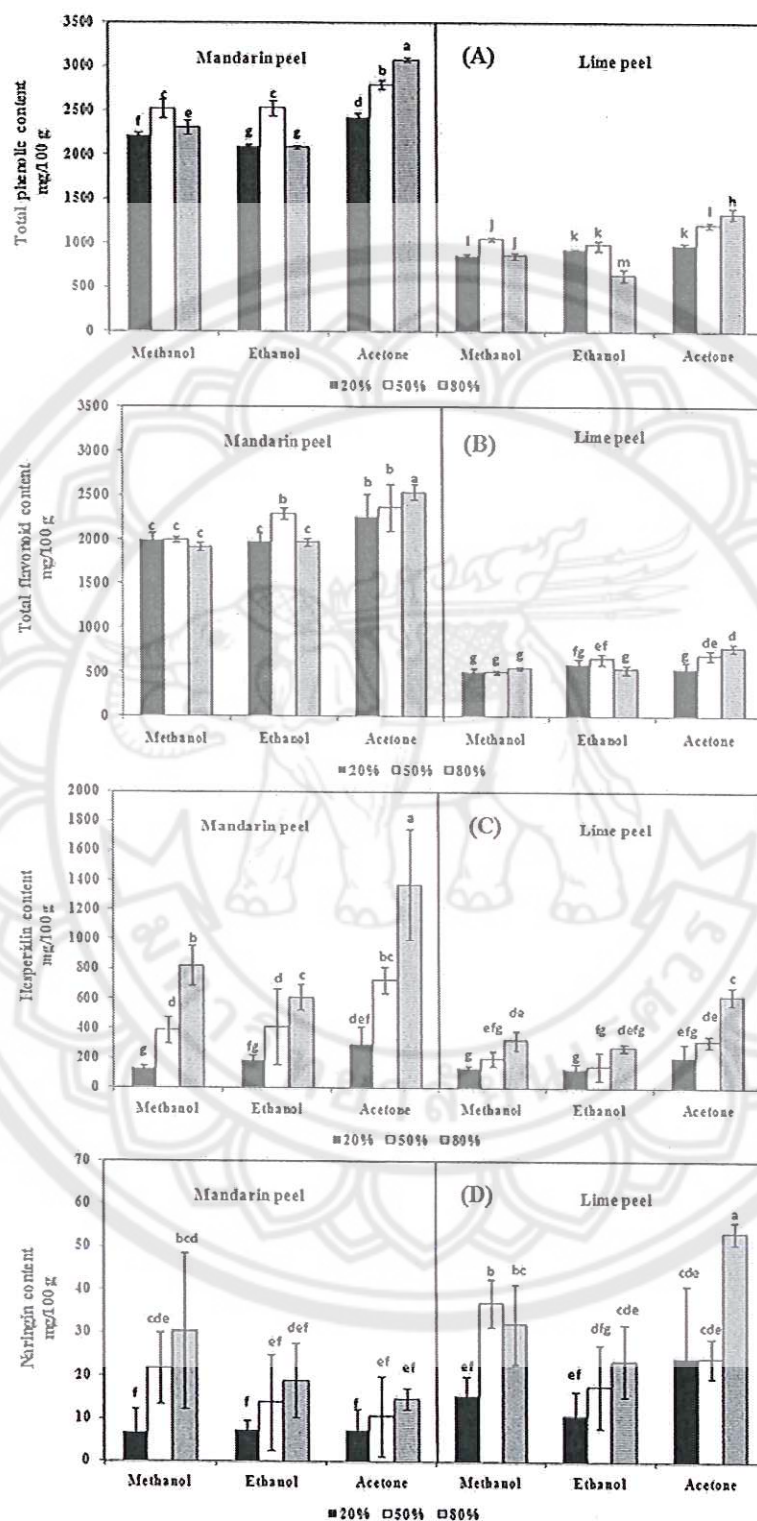
Values are mean ± standard error

เมื่อเปรียบเทียบชนิดของสารสกัดที่ใช้สกัดสารต้านอนุมูลอิสระพบว่า อะซิโตนสามารถสกัดสารดังกล่าวโดยใช้คลื่นเสียงช่วยในการสกัดออกมาได้มากที่สุด สารสกัดที่สกัดโดยอะซิโตนมีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระมากกว่าการใช้เอทานอล โดยมีปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด ฟลาโวนอยด์ และเฮสเปอร์ดิทิน 1,976.91 มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อ 100 กรัม 1,534.35 มิลลิกรัมสมมูลของควอเทอร์ทินต่อ 100 กรัม และ 545.56 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม ตามลำดับ ซึ่งมากกว่าการสกัดด้วยเมทานอล และ เอทานอล

ที่ระดับนัยสำคัญ $p < 0.05$ ดังตารางที่ 3 เนื่องจากอะซิโตนมีความหนืด (Viscosity) ต่ำเพียง 0.32 cP ซึ่งต่ำกว่าเมทานอล และเอทานอลที่มีความหนืด 0.6 และ 1.2 cP ตามลำดับ นอกจากนี้อะซิโตนยังมีค่าแรงตึงผิว (surface tension) 23.7 mN/cm ต่ำกว่าน้ำ Vapor pressure 229.52 mmHg สูงกว่าเอทานอลและเมทานอล (Hemwimol, Pavasant and Shotipruk, 2006) เมื่อใช้อะซิโตนร่วมกับการสกัดสารต้านอนุมูลอิสระด้วยคลื่นเสียงที่มีหลักการใช้ฟองอากาศที่มีแรงดันสูงในการทำลายผนังเซลล์ทำให้เซลล์แตก (Chemat, Zill e and Khan, 2011) จึงทำให้สารที่ต้องการสามารถละลายออกมากับตัวทำละลายได้ดี

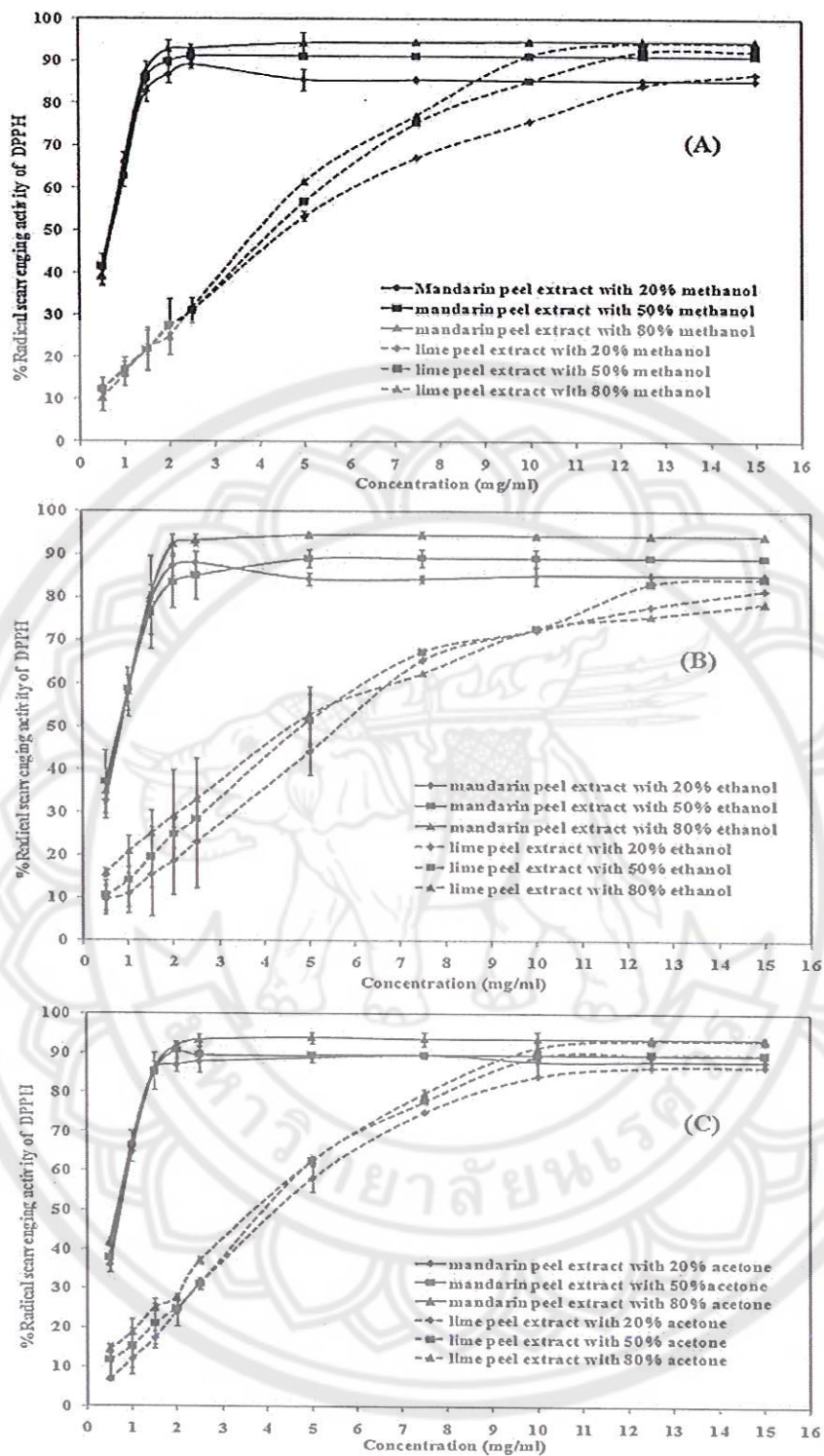
เมื่อเปรียบเทียบความเข้มข้นของสารสกัดที่ใช้สกัดสารต้านอนุมูลอิสระโดยใช้คลื่นเสียงช่วยสกัดพบว่าที่ความเข้มข้น 80 เปอร์เซ็นต์ สามารถสกัดสารที่ให้ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระสูง ให้ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด 1,722.53 มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อ 100 กรัม ฟลาโวนอยด์ 1,383.43 มิลลิกรัมสมมูลของควอเทอร์ตินต่อ 100 กรัม เฮสเปอร์ดิซิน 648.07 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม และนารินจิน 28.74 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม ดังตารางที่ 3 ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยก่อนหน้านี้ที่สรุปว่าการใช้สารสกัดที่ความเข้มข้น 80 เปอร์เซ็นต์ เหมาะสมต่อการสกัดสารต้านอนุมูลอิสระโดยใช้คลื่นเสียงช่วยในการสกัด (Khan, et al., 2010)

การปฏิสัมพันธ์ระหว่างปัจจัย พบว่าในขบวนการสกัดที่ต้องใช้สารสกัดร่วมกับความเข้มข้นของสารสกัดในการสกัดเปลือกส้มทั้งสองชนิดมีผลต่อการสกัดปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด ฟลาโวนอยด์ ที่ระดับนัยสำคัญ $p < 0.01$ มีผลต่อการสกัดเฮสเปอร์ดิซิน และนารินจิน ที่ระดับนัยสำคัญ $p < 0.01$ จากผลดังกล่าวนำมาวิเคราะห์ทางสถิติเปรียบเทียบระหว่างสิ่งทดลองที่มีปฏิสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยได้ทั้งหมด 18 สิ่งทดลอง พบว่าสารสกัดเปลือกส้มสกัดมีปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด (2,104.20-3,083.61 มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อ 100 กรัม) ฟลาโวนอยด์ (1,992.12-2,539.82 มิลลิกรัมสมมูลของควอเทอร์ตินต่อ 100 กรัม) เฮสเปอร์ดิซิน (133.91-1,374.20 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม) สูงกว่าสารสกัดจากเปลือกมะนาว ดังภาพที่ 20 A-C อย่างไรก็ตามสารสกัดจากเปลือกมะนาวพบนารินจิน (10.80-53.39 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม) ซึ่งสูงกว่าสารสกัดจากเปลือกส้ม ดังภาพที่ 20D และยังพบอีกว่าอะซิโตนเป็นสารสกัดที่ให้ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด ฟลาโวนอยด์ เฮสเปอร์ดิซิน สูงกว่าเอทานอลและเมทานอล โดยเฉพาะอย่างยิ่งเปลือกส้มที่ใช้อะซิโตนความเข้มข้น 80 เปอร์เซ็นต์ เป็นสารสกัด เป็นสิ่งทดลองที่ให้ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด ฟลาโวนอยด์ เฮสเปอร์ดิซิน 3,083.61 มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อ 100 กรัม 2,539.82 มิลลิกรัมสมมูลของควอเทอร์ตินต่อ 100 กรัม และ 1,374.20 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม ตามลำดับ ดีที่สุดดังภาพที่ 20 เนื่องจากอะซิโตนความเข้มข้น 80 เปอร์เซ็นต์ เป็นสารสกัดที่มีขี้วและความหนืดต่ำ เมื่อนำมาใช้สกัดสารจากเปลือกส้มด้วยคลื่นเสียงจะทำให้สารฟีนอลิกออกจากตัวอย่างได้ง่ายและเร็วขึ้น



ภาพ 20 ฟีนอลิกทั้งหมด (A), ฟลาโวนอยด์ (B), เฮสเปอร์ดิซิน (C) และนารินจิน (D) ที่สกัดจากเปลือกส้มและเปลือกมะนาว ชนิดสารสกัด และความเข้มข้นที่แตกต่างกัน โดยใช้คลื่นเสียงช่วยในการสกัดที่อุณหภูมิ 40 °C นาน 30 นาที และกำลังไฟฟ้า 50.93 วัตต์

การหาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ DPPH เป็นวิธีที่เป็นที่นิยมสำหรับการวิเคราะห์ในเปลือกผลไม้ตระกูลส้ม (Thitima, Sakamon and Naphaporn, 2009; Khan, et al., 2010; Babbar et al., 2011; Oboh and Ademosun, 2012) การเปลี่ยนแปลงเปอร์เซ็นต์ DPPH เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของเปลือกส้มและเปลือกมะนาว เมื่อใช้ชนิดของสารสกัดและความเข้มข้นที่แตกต่างกัน แสดงในภาพที่ 21 พบว่าเปอร์เซ็นต์ฤทธิ์การต้านอนุมูล DPPH ของสารสกัดจากเปลือกส้มที่สกัดด้วยเมทานอล เอทานอล และอะซิโตน เพิ่มปริมาณอย่างรวดเร็วในช่วงความเข้มข้น 0.5-2.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และหลังจาก 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จะมีฤทธิ์การต้านอนุมูลจะคงตัว ซึ่งต่างจากเปอร์เซ็นต์ฤทธิ์การต้านอนุมูล DPPH ของสารสกัดจากเปลือกมะนาวโดยฤทธิ์จะค่อยๆเพิ่มปริมาณขึ้นเมื่อความเข้มข้นของสารสกัดอยู่ในช่วง 2.5-12.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร หลังจากนั้นฤทธิ์จะคงที่ เมื่อเปรียบเทียบฤทธิ์การต้านอนุมูล DPPH ของเปลือกส้มอยู่ในช่วง 85.53-94.65 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งไม่แตกต่างจากเปลือกมะนาวที่มีฤทธิ์การต้านอนุมูลช่วง 86.47-94.33 เปอร์เซ็นต์ แต่อย่างไรก็ตามเมื่อพิจารณาฤทธิ์การต้านอนุมูลที่ 50 เปอร์เซ็นต์ พบว่าสารสกัดจากเปลือกส้มมีประสิทธิภาพการยับยั้งดีกว่าเปลือกมะนาว เนื่องจากใช้ปริมาณสารสกัดน้อยกว่าสำหรับการยับยั้งอนุมูล DPPH ที่ 50 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Thitima, Sakamon and Naphaporn (2009) ที่รายงานว่ฤทธิ์การต้านอนุมูล DPPH ที่ 93.9 เปอร์เซ็นต์ ต้องใช้เปลือกมะนาว 500 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และรายงานของ Babbar et al. (2011) ที่รายงานว่เปลือกส้มมีฤทธิ์การต้านอนุมูล DPPH ที่ 83 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้นการวิเคราะห์เพื่อหาฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ในรูปแบบการยับยั้งที่ 50 เปอร์เซ็นต์ (IC_{50}) จึงมีความแม่นยำกว่าการวิเคราะห์ในรูปแบบเปอร์เซ็นต์



ภาพ 21 ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ DPPH จากเปลือกส้ม และเปลือกมะนาว โดยใช้สารสกัดเมทานอล (A) เอทานอล (B) และอะซิโตน (C) ที่ความเข้มข้นต่างๆ โดยใช้คลื่นเสียงช่วยในการสกัดที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที และกำลังไฟฟ้า 50.93 วัตต์

ปัจจัยด้านชนิดของเปลือก ชนิดสารสกัด และความเข้มข้นสารสกัด มีอิทธิพลต่อฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ FRAB, DPPH และ ABTS ที่ระดับนัยสำคัญ $p < 0.01$ แสดงในตารางที่ 4 โดยเปลือกส้มมีปริมาณฟีนอลิกสูงจากภาพที่ 22 และตารางที่ 4 ส่งผลให้การต้านอนุมูลอิสระสูงตาม

เมื่อพิจารณาการปฏิสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยทั้งสามเปรียบเทียบกันทั้ง 18 สิ่งทดลอง ดังภาพที่ 22 พบว่าสารสกัดจากเปลือกส้มมีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ FRAB, DPPH และ ABTS 1,676.31-2,521.50 มิลลิกรัมสมมูลของ trolox ต่อ 100 กรัม 0.61-0.86 และ 1.12-1.47 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ซึ่งสูงกว่าสารสกัดจากเปลือกมะนาว ในเปลือกส้มมีฟีนอลิกและ ฟลาโวนอยด์เป็นสารที่มีประสิทธิภาพให้ไฮโดรเจนที่ดีกับอนุมูล DPPH เทียบเท่ากับ BHT (Babbar et al., 2011) และสารสกัดจากเปลือกพืชตระกูลส้มมีฤทธิ์การต้านอนุมูล DPPH IC_{50} อยู่ในช่วง 0.46-0.78 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (Su, Shyu and Chien, 2008) และในเปลือกส้มแมนดารินสามารถรีดิวซ์ Fe^{3+} ไปเป็น Fe^{2+} ได้ดีกว่าเปลือกส้มชนิดอื่นๆ (Ramful et al., 2010)

อะซิโตนเป็นสารสกัดที่ดีที่สุดของการทดลองนี้ เพราะมีฤทธิ์การต้านอนุมูล FRAB ดีที่สุด เนื่องจากอะซิโตนเป็นสารที่มีความเป็นขั้ว ความหนืดและแรงตึงผิวต่ำเมื่อนำไปสกัดสารประกอบฟีนอลิก ทำให้ออกมาได้ง่าย (Gorinstein, et al., 2001; Hemwimol, Pavasant and Shotipruk, 2006; Li, et al., 2013) แต่ฤทธิ์การต้านอนุมูล DPPH และ ABTS ไม่ขึ้นอยู่กับชนิดของสารเนื่องจากใช้สารปริมาณน้อยมาก จึงมีนัยสำคัญที่ $p > 0.05$ ไม่แตกต่างกันดังภาพที่ 22 และตารางที่ 4

เมื่อเพิ่มปริมาณน้ำในสารสกัดจะทำให้ความเป็นขั้ว ความหนืดและแรงตึงผิวของสารสกัดเพิ่มมากขึ้นส่งผลให้การสกัดสารฟีนอลิกออกมายากขึ้น (Peterson, et al., 2006; Tripoli, et al., 2007) ถ้าใช้สารสกัดที่เป็นสารอินทรีย์มากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ ทำให้ประสิทธิภาพการสกัดสารฟีนอลิกดีกว่าความเข้มข้นต่ำกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ (Musa, et al., 2011) ซึ่งเปลือกส้มที่สกัดด้วยอะซิโตนความเข้มข้น 80 เปอร์เซ็นต์ มีฤทธิ์การต้านอนุมูล FRAB 2,521.50 มิลลิกรัมสมมูลของ trolox ต่อ 100 กรัม ดีที่สุดที่ระดับนัยสำคัญ $p < 0.05$

ตารางที่ 4 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของปัจจัยหลักและการปฏิสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยของ ชนิดเปลือกส้ม ชนิดสารสกัด และความเข้มข้นสารสกัด ต่อฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ FRAB, DPPH และ ABTS โดยใช้คลื่นเสียงช่วยในขบวนการสกัด

Source of variation	FRAP mg Trolox equivalent	Radical scavenging activity (IC ₅₀)	
		DPPH	ABTS
Citrus peel type (A)			
Mandarine peel	1,917.61 ± 34.10 ^A	0.72 ± 0.02 ^B	1.26 ± 0.03 ^B
Lime peel	523.68 ± 14.52 ^B	4.99 ± 0.14 ^A	9.46 ± 0.18 ^A
Solvent type (B)			
Methanol	1,092.11 ± 8.88 ^b	2.63 ± 0.48 ^b	5.48 ± 1.04 ^b
Ethanol	1,053.10 ± 8.66 ^c	3.31 ± 0.61 ^a	5.79 ± 1.03 ^a
Acetone	1,561.71 ± 8.30 ^a	2.62 ± 0.47 ^b	4.80 ± 1.04 ^c
Solvent concentration (C)			
20	1,166.33 ± 96.13 ^z	3.01 ± 0.56 ^x	5.66 ± 1.04 ^x
50	1,211.12 ± 99.55 ^y	2.83 ± 0.52 ^{xy}	5.39 ± 1.04 ^y
80	1,283.53 ± 10.65 ^x	2.72 ± 0.50 ^y	5.03 ± 1.03 ^z
Interaction			
A x B	xx	xx	xx
A x C	xx	ns	xx
B x C	xx	ns	ns
A x B x C	xx	ns	ns

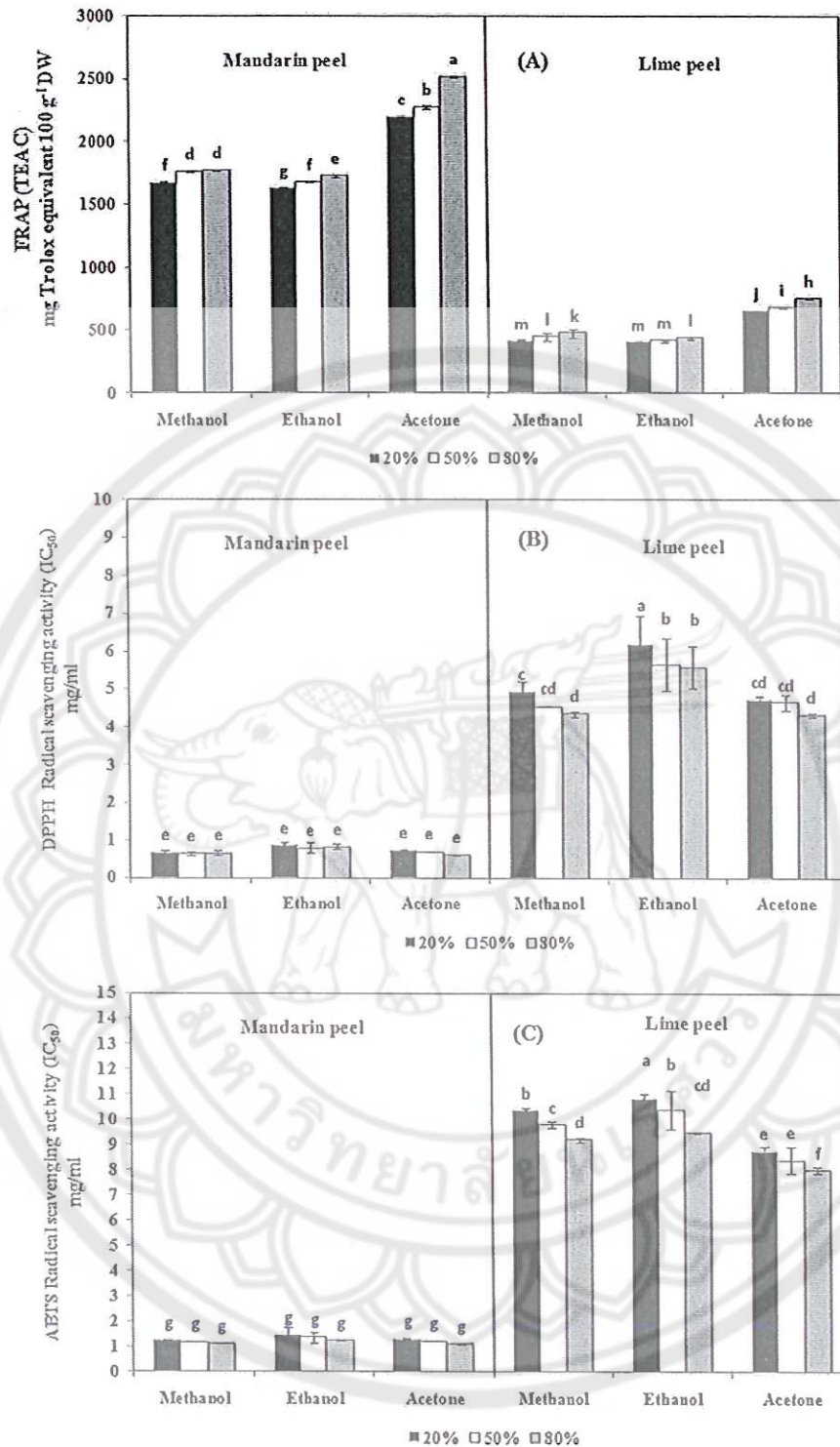
xx = $p \leq 0.01$; x = $p \leq 0.05$; ns = not significantly different

A and B Mean values with different letters in columns are significantly different; $p < 0.05$ for citrus peel types

a, b and c Mean values with different letters in columns are significantly different; $p < 0.05$ for solvent extraction types

x, y and z Mean values with different letters in columns are significantly different; $p < 0.05$ for solvent concentrations

Values are mean ± standard error



ภาพ 22 กุทธิการต้านอนุมูลอิสระ FRAB (A), DPPH (B) และ ABTS (C) จากเปลือกส้ม และ เปลือกมะนาว โดยใช้สารสกัดเมทานอล เอทานอล และอะซิโตน ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ โดยใช้คลื่นเสียงช่วยในการสกัดที่อุณหภูมิ 40 °C นาน 30 นาที และกำลังไฟฟ้า 50.93 วัตต์

สหสัมพันธ์ระหว่างฟีนอลิกทั้งหมด ฟลาโวนอยด์ เฮสเปอร์ดิน และนารินจิน กับฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ FRAB, DPPH และ ABTS ของสารสกัดจากเปลือกส้มและเปลือกมะนาวด้วยวิธี Pearson correlation coefficients แสดงในตารางที่ 5 สารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดมีสหสัมพันธ์เชิงบวกที่ดีกับฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ FRAB $r = 0.978$ แต่มีสหสัมพันธ์เชิงลบกับฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ DPPH และ ABTS ที่ $r = -0.939$ และ -0.949 ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยก่อนหน้านี้ที่รายงานความสอดคล้องของสารประกอบฟีนอลิกกับฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ (Ramful, et al., 2010; Babbar, et al., 2011; Musa, et al., 2011) ยิ่งกว่านั้นฟลาโวนอยด์มีสหสัมพันธ์เชิงบวกที่ดีกับฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ FRAB $r=0.973$ และมีสหสัมพันธ์เชิงลบกับฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ DPPH และ ABTS ที่ $r = -0.950$ และ -0.966 ตามลำดับ ฟลาโวนอยด์มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระที่ดีกว่ากรดฟีนอลิก (Babbar, et al., 2011) ซึ่งฟลาโวนอยด์มีความคงตัวสูงถูกทำลายได้ยากกว่าสารประกอบฟีนอลิกตัวอื่นๆ เมื่อผ่านการสกัดด้วยคลื่นเสียง (Biesaga, 2011)

ตารางที่ 5 การวิเคราะห์สหสัมพันธ์ของฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระกับฟีนอลิกทั้งหมด ฟลาโวนอยด์ เฮสเปอร์ดิน และนารินจิน ของสารสกัดจากเปลือกส้มและเปลือกมะนาว

	Total phenolic (mg 100 g ⁻¹)	Total flavonoid (mg 100 g ⁻¹)	Hesperidin (mg 100 g ⁻¹)	Naringin (mg 100 g ⁻¹)	FRAP (mg Trolox eq 100 g ⁻¹)	DPPH (IC ₅₀) (mg ml ⁻¹)	ABTS (IC ₅₀) (mg ml ⁻¹)
Total phenolic (mg/100 g)	1						
Total flavonoid (mg/100 g)	0.973**	1					
Hesperidin (mg/100 g)	0.575**	0.495**	1				
Naringin (mg/100 g)	-0.311**	-0.361**	0.157	1			
FRAP (mg Trolox eq/100 g)	0.978**	0.973**	0.571**	-0.328**	1		
DPPH (IC ₅₀) (mg/ml)	-0.939**	-0.950**	-0.482**	0.239	-0.941**	1	
ABTS (IC ₅₀) (mg/ml)	-0.949**	-0.966**	-0.502**	0.250	-0.955**	0.984**	1

**p ≤ 0.01

ตอนที่ 2 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดสารประกอบฟีนอลิกจากเปลือกผลไม้ตระกูลส้มด้วยเทคนิคการสกัดด้วยคลื่นเสียง

ตัวแปรต้นที่ใช้ในการทดลองมี 3 ตัวแปร คือ อุณหภูมิ (x1) ระยะเวลา (x2) และพลังงาน(x3) ใน ขบวนการสกัดด้วยคลื่นเสียงใช้ตัวแปรทั้ง 3 วางแผนการทดลองแบบ Box Behnken design ได้สิ่งทดลอง ทั้งหมด 17 สิ่งทดลอง ทั้ง 17 สิ่งทดลอง ทำการทดลองเพื่อหาค่าตอบสนองต่อตัวแปรตามคือ Y ได้แก่ ปริมาณผลผลิต (Y1) ฟีนอลิกทั้งหมด (Y2) และฟลาโวนอยด์ (Y3) ดังตารางที่ 6 พบว่า ทั้ง 17 สภาวะ ของการสกัดได้ปริมาณผลผลิตอยู่ในช่วง 20.45 – 26.28 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักแห้ง) เนื่องจากเปลือกส้มใน แต่ละช่วงฤดูกาลมีปริมาณสารสำคัญอยู่ในเปลือกที่แตกต่างกัน ส่งผลให้ปริมาณสารสกัดที่ได้มีปริมาณ แตกต่างกัน (Goulas and Manganaris, 2012) ซึ่งสารสำคัญได้แก่ สารกลุ่ม โพลีฟีนอล ฟลาโวนอยด์ เฮสเปอร์ดิน และนารินจีน (Wang, Chuang and Hsu, 2008; Khan, et al., 2010; Kim and Kim, 2011) ซึ่งในงานวิจัยนี้หาปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด และฟลาโวนอยด์ ทั้ง 17 สภาวะการสกัด อยู่ในวง 12,922.26 -15,262.47 มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิก ต่อ 100 กรัมและ 10,985.61-12,977.20 มิลลิกรัม สมมูลของควอเซอ์ทิน ต่อ 100 กรัม ตามลำดับ

ตารางที่ 6 ปริมาณผลผลิต (% yields) ฟีนอลิกทั้งหมด และฟลาโวนอยด์ จากเปลือกส้มที่ใช้คลื่นเสียงช่วยในขบวนการสกัด ด้วยแผนการทดลองแบบ Box Behnken design

Run	Independent variables			Dependent variables		
	X1 (°C)	X2 (min)	X3 (watt)	Yield (%)	Total phenolic mg/100g	Total flavonoid mg/100g
1	30	20	44.85	21.72	14,385.52	12,227.16
2	50	20	44.85	24.21	14,435.62	12,271.21
3	30	40	44.85	23.72	14,488.68	12,313.65
4	50	40	44.85	25.50	14,853.66	12,624.02
5	30	30	30.34	20.45	12,922.26	10,985.61
6	50	30	30.34	22.38	13,447.61	11,429.00
7	30	30	59.36	21.04	14,987.79	12,743.25
8	50	30	59.36	24.41	15,019.87	12,764.36
9	40	20	30.34	21.97	13,464.61	11,438.58
10	40	40	30.34	22.95	13,394.81	11,384.97
11	40	20	59.36	23.30	15,096.55	12,829.87
12	40	40	59.36	26.28	15,262.47	12,977.20
13	40	30	44.85	23.76	14,808.50	12,588.08
14	40	30	44.85	23.80	14,619.73	12,426.01
15	40	30	44.85	24.01	14,663.83	12,463.01
16	40	30	44.85	24.01	14,673.44	12,473.83
17	40	30	44.85	24.34	14,635.62	12,441.10

X1 = temperature (°C); X2 = time (min); X3 = power (W)

จากตารางที่ 6 เมื่อนำค่าปริมาณสารสกัดจากเปลือกส้ม ไปหาสัมประสิทธิ์การถดถอยแบบพหุนาม (Estimated coefficients) สำหรับสมการกำลังสอง และวิเคราะห์ค่าความแปรปรวน ได้ผลการทดลองดังตารางที่ 7 พบว่า อุณหภูมิ ระยะเวลา และพลังงานที่ใช้ในขบวนการสกัดมีผลต่อปริมาณผลผลิต ปริมาณ ฟีนอลิกทั้งหมด และฟลาโวนอยด์ ($p < 0.05$) ซึ่งมีผลในเชิงบวก จากค่าสัมประสิทธิ์การถดถอยแบบพหุนาม ถ้าเพิ่มอุณหภูมิ ระยะเวลา และกำลังไฟฟ้า จะทำให้ปริมาณสารสกัดจากเปลือกส้มเพิ่มขึ้น

ในขณะที่อิทธิพลร่วมระหว่างอุณหภูมิกับระยะเวลาที่มีสัมประสิทธิ์การถดถอยในเชิงลบสำหรับปริมาณผลผลิตทั้งหมด แสดงว่าเมื่อเพิ่มอุณหภูมิกับระยะเวลาไปพร้อมๆ กัน ทำให้ปริมาณสารสกัดจากเปลือกส้มลดลง อย่างไรก็ตามอิทธิพลร่วมระหว่างอุณหภูมิกับกำลังไฟฟ้ามียังมีสัมประสิทธิ์การถดถอยในเชิงลบสำหรับปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด และฟลาโวนอยด์ แสดงว่าเมื่อเพิ่มอุณหภูมิและกำลังไฟฟ้าไปพร้อมๆ กัน ทำให้ปริมาณสารสกัดจากเปลือกส้มลดลง ดังสมการตอบสนองต่อปริมาณผลผลิต (Y1) ฟีนอลิกทั้งหมด (Y2) และฟลาโวนอยด์ (Y3) ที่ได้จากสภาวะการสกัดดังสมการที่ 16-18

$$\% \text{ Yield (Y1)} = 23.98 + 1.20(X1) + 0.91(X2) + 0.91(X3) - 0.88(X1)^2 + 0.68(X2)^2 - 0.14(X3)^2 - 0.18(X1)(X2) + 0.36(X1)(X3) + 0.50(X2)(X3)$$

สมการที่ 16

$$\text{Total phenolic content (Y2)} = 14,680.22 + 121.56(X1) + 77.16(X2) + 892.17(X3) - 174.79(X1)^2 + 35.44(X2)^2 - 411.05(X3)^2 + 78.72(X1)(X2) - 123.32(X1)(X3) + 58.93(X2)(X3)$$

สมการที่ 17

$$\text{Flavonoid content (Y3)} = 12478.41 + 102.37(X1) + 66.63(X2) + 759.56(X3) - 148.25(X1)^2 + 28.85(X2)^2 - 349.60(X3)^2 + 66.58(X1)(X2) + 0.0196(X1)(X3) + 0.1947(X2)(X3)$$

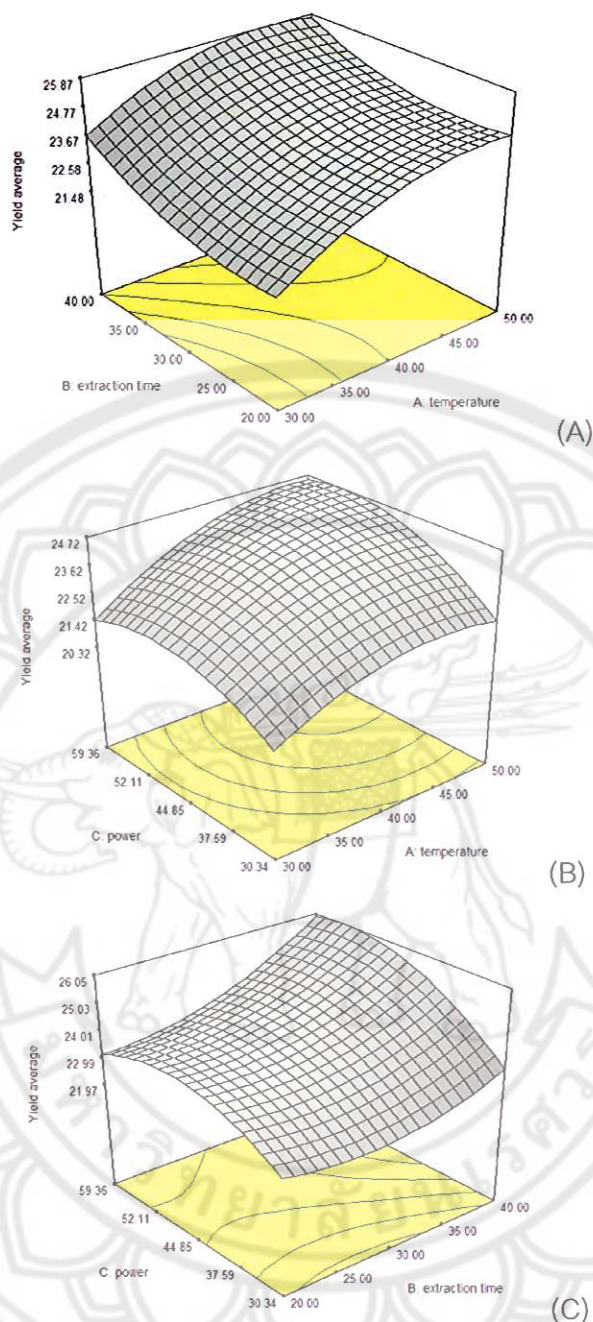
สมการที่ 18

จากสมการข้างต้นทั้งสามสมการมีความเหมาะสมกับการทำนายค่าตัวแปร Y1-Y3 สามารถดูจากค่า P value ของ Model และ Lack of fit ซึ่งอธิบายถึงความเหมาะสมของโมเดลจากสมการ และความไม่เหมาะสมของสมการต่อโมเดล ซึ่งจากสมการทั้ง 3 มีค่า P value ของโมเดลที่ตอบสนองต่อตัวแปร Y1-Y3 มีค่าน้อยกว่า 0.05 และ p value ของ Lack of fit ของสมการตอบสนองต่อตัวแปร Y1-Y3 คือ 0.092, 0.315 และ 0.352 ตามลำดับ ซึ่งมากกว่า 0.05 จึงปฏิเสธความไม่เหมาะสมของสมการ แสดงว่าสมการมีความเหมาะสมกับการทำนายปริมาณผลผลิตสารสกัดจากเปลือกส้ม ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด และ ฟลาโวนอยด์ ดังตารางที่ 7 การนำสมการที่ 16-18 มาใช้เพื่อทำนายตัวแปร Y1-Y3 มีความแม่นยำในการทำนายที่ 97.50, 99.34 และ 99.37 % ตามลำดับ จากค่า R² (0.975, 0.9934 และ 0.9937) ซึ่งถือว่ามี ความแม่นยำสูง ซึ่งค่า R² ที่มีความแม่นยำสูงควรมีค่ามากกว่า 0.8 (Li, et al., 2013)

ตารางที่ 7 สัมประสิทธิ์การถดถอยแบบพหุนาม สำหรับสมการกำลังสอง (quadratic polynomial model) และการวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) ของปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด และฟลาโวนอยด์ จากเปลือกส้มที่ใช้คลื่นเสียงช่วยในกระบวนการสกัด

Parameter	Estimated coefficients			Prob(P)>F		
	Yield	Total phenolic	Total Flavonoid	Yield	Total phenolic	Total Flavonoid
Intercept	23.98	14680.22	12478.41			
X1	1.20	121.56	102.37	<0.0001	0.0047	0.0044
X2	0.91	77.16	66.63	0.0002	0.0362	0.0311
X3	0.91	892.17	759.56	0.0002	< 0.0001	< 0.0001
X1 ²	-0.88	-174.79	-148.25	0.0016	0.0038	0.0034
X2 ²	0.68	35.44	28.85	0.0063	0.4177	0.4261
X3 ²	-1.04	-411.05	-349.60	0.0006	< 0.0001	< 0.0001
X1xX2	-0.18	78.72	66.58	0.3621	0.1046	0.0991
X1xX3	0.36	-123.32	-105.57	0.0885	0.0223	0.0196
X2xX3	0.50	58.93	50.23	0.0278	0.2055	0.1947
Model				<0.0001	< 0.0001	< 0.0001
Lack of fit				0.0921	0.3156	0.3523
R ²				0.9750	0.9934	0.9937

พื้นผิวตอบสนองต่อปริมาณผลผลิตสารสกัดจากเปลือกส้ม ด้วยการสกัดที่สภาวะต่างๆ โดยใช้คลื่นเสียง แสดงดังภาพที่ 23 พบว่า เมื่อเพิ่มอุณหภูมิกับระยะเวลาในกระบวนการสกัดทำให้ปริมาณผลผลิตของสารสกัดเพิ่มมากขึ้น แต่เมื่อเพิ่มอุณหภูมิเกิน 48 องศาเซลเซียสที่ระยะเวลา 35 ถึง 40 นาที ปริมาณผลผลิตของสารสกัดมีแนวโน้มลดลงดังภาพที่ 23(A) นอกเหนือจากนี้การเพิ่มอุณหภูมิ และกำลังไฟฟ้าของคลื่นเสียงไปพร้อมๆ กันในกระบวนการสกัด พบว่าปริมาณผลผลิตของสารสกัดมีปริมาณสูงขึ้น ดังภาพที่ 23(B) และเมื่อเพิ่มระยะเวลาร่วมกับกำลังไฟฟ้าของคลื่นเสียงไปพร้อมๆ กันในกระบวนการสกัด พบว่าปริมาณผลผลิตของสารสกัดมีปริมาณเพิ่มขึ้น ดังภาพที่ 23(C) ซึ่งการใช้อุณหภูมิที่สูงเกิน 40 องศาเซลเซียส ในกระบวนการสกัดด้วยคลื่นเสียงสามารถทำลายสารประกอบฟีนอลิกบางชนิดได้ (Khan, et al., 2010)

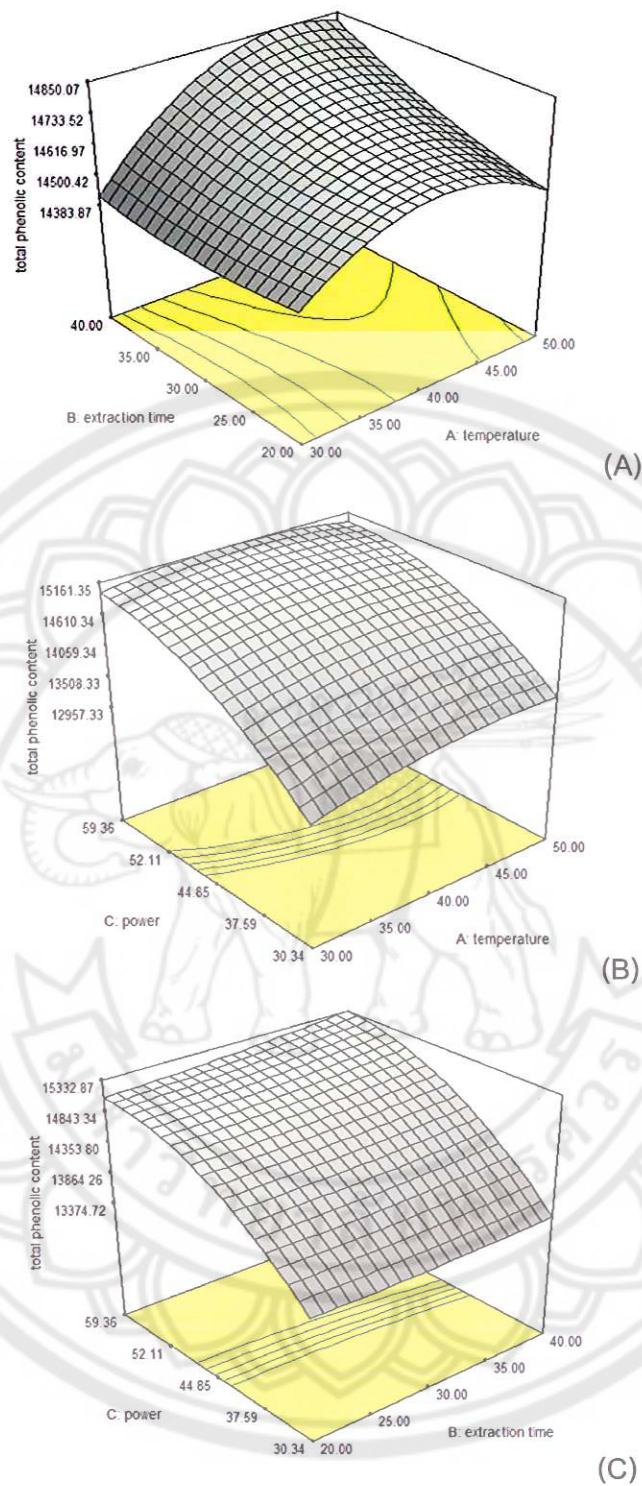


ภาพ 23 พื้นผิวตอบสนองระหว่างตัวแปรอิสระต่อปริมาณผลผลิต โดยใช้คลื่นเสียงช่วยในการสกัด ภาพ A คงกำลังไฟฟ้าที่ 4 level, 45.32 วัตต์; ภาพ B คงระยะเวลาการสกัดที่ 30 นาที; ภาพ C คงอุณหภูมิการสกัดที่ 40 องศาเซลเซียส

พื้นผิวตอบสนองต่อปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด ด้วยการสกัดที่สภาวะต่างๆ โดยใช้คลื่นเสียง ดังภาพที่ 24 พบว่า เมื่อเพิ่มระยะเวลาการสกัดจาก 20 ถึง 40 นาที ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดค่อนข้างคงที่ แต่เมื่อเพิ่มอุณหภูมิในขบวนการสกัดจาก 30 ถึง 50 องศาเซลเซียส ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดเพิ่มขึ้นและลดลงช่วง

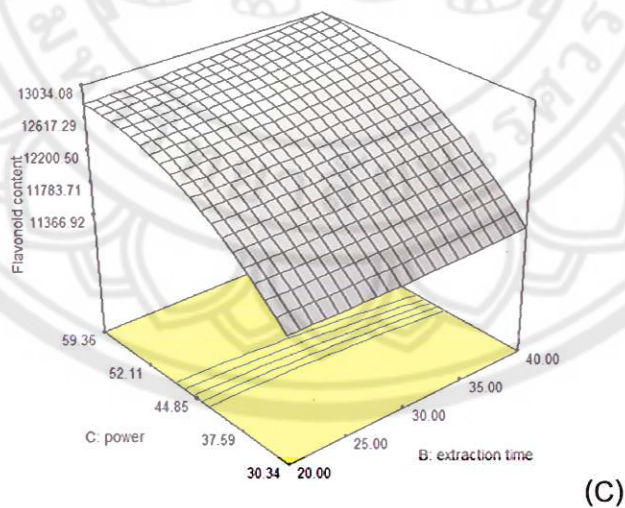
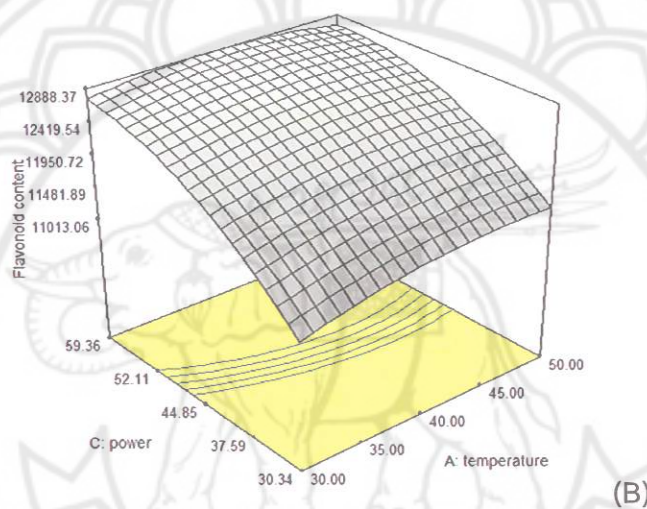
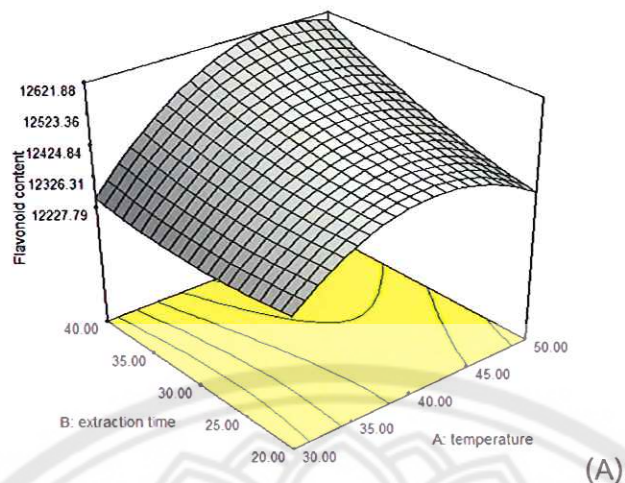
อุณหภูมิหลัง 45 องศาเซลเซียส ซึ่งการเพิ่มระยะเวลาการสกัดร่วมกับอุณหภูมิส่งผลให้ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดเพิ่มขึ้น ดังภาพที่ 24(A) แต่การสกัดด้วยคลื่นเสียงโดยการเพิ่มกำลังไฟฟ้าเป็นตัวแปรหลักร่วมกับปัจจัยด้านระยะเวลา และอุณหภูมิในการสกัดเป็นการเพิ่มปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด ดังภาพที่ 24 (B และ C) เนื่องจากคลื่นเสียงที่ได้จากแหล่งกำเนิด (Ultrasonic transducer) มีปริมาณความแรงของคลื่นแตกต่างกันขึ้นอยู่กับปริมาณกำลังไฟฟ้าที่ให้ต่อแหล่งกำเนิด ในการทดลองนี้ใช้พลังงานสำหรับสร้างคลื่นเสียงพลังงานต่ำเนื่องจากต้องการประหยัดพลังงาน จึงจำเป็นต้องหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการสกัดโดยใช้พลังงานน้อย ช่วง 30-60 วัตต์ พบว่าการใช้พลังงานน้อยสามารถเพิ่มปริมาณการสกัดได้โดยการเพิ่มพลังงานจาก 30.34 ไปถึง 59.63 สามารถเพิ่มปริมาณการสกัดปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดตามปริมาณพลังงานที่เพิ่มขึ้น เนื่องจากคลื่นเสียงทำให้น้ำมีสภาพเป็นฟองอากาศขนาดเล็กที่มีพลังงานสูงสามารถเคลื่อนที่ทะลุทะลวงส่วนของผนังเซลล์พืชได้ ทำให้สารที่ต้องการสามารถหลุดออกจากเซลล์ได้รวดเร็ว (Hemwimol, Pavasant and Shotipruk, 2006; Ma, et al., 2009; Khan, et al., 2010; Li, et al., 2013)





ภาพ 24 พื้นผิวตอบสนองระหว่างตัวแปรอิสระต่อปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด โดยใช้คลื่นเสียงช่วยในการสกัด ภาพ A คงกำลังไฟฟ้าที่ 4 level, 45.32 วัตต์; ภาพ B คงระยะเวลาการสกัดที่ 30 นาที; ภาพ C คงอุณหภูมิการสกัดที่ 40 องศาเซลเซียส

พื้นผิวตอบสนองต่อปริมาณฟลาโวนอยด์ ด้วยการสกัดที่สภาวะต่างๆ โดยใช้คลื่นเสียง ดังภาพที่ 24 พบว่ากราฟมีลักษณะคล้ายกับกราฟฟีนอลิกทั้งหมด คือระยะเวลาการสกัดเพิ่มจาก 20 ถึง 40 นาที ปริมาณฟลาโวนอยด์ค่อนข้างคงที่ แต่เมื่อเพิ่มอุณหภูมิในขบวนการสกัดจาก 30 ถึง 50 องศาเซลเซียส ปริมาณฟลาโวนอยด์เพิ่มขึ้นและลดลงช่วงอุณหภูมิหลัง 45 องศาเซลเซียส การเพิ่มระยะเวลาพร้อมกับ อุณหภูมิทำให้ปริมาณฟลาโวนอยด์เพิ่มขึ้น ดังภาพที่ 25(A) เพิ่มมากขึ้น แต่การสกัดด้วยคลื่นเสียงโดยการ เพิ่มกำลังไฟฟ้าเป็นตัวแปรหลักร่วมกับตัวแปรอื่นๆ เป็นการเพิ่มปริมาณฟลาโวนอยด์ และจากค่า สัมประสิทธิ์การถดถอยของกำลังไฟฟ้าในตารางที่ 7 มีค่าสูงที่สุดที่ 759.56 ดังนั้นในการทดลองนี้การสกัด ด้วยคลื่นเสียงเพื่อสกัดฟลาโวนอยด์ เมื่อใช้กำลังไฟฟ้าร่วมกับปัจจัยอื่นๆ จะทำให้ฟลาโวนอยด์มีปริมาณ มากขึ้นดังภาพที่ 25(B และ C) เช่นเดียวกับการสกัดฟีนอลิกทั้งหมด เนื่องจากฟลาโวนอยด์เป็นฟีนอลิก ชนิดหนึ่งที่เป็นกลุ่มใหญ่ที่สุด เป็นองค์ประกอบหลักในพืชตระกูลส้ม (Peterson, et al., 2006; Procházková, Boušová and Wilhelmová, 2011; Oboh and Ademosun, 2012) จึงทำให้ปัจจัยที่ ส่งผลต่อการสกัดฟีนอลิกทั้งหมด และส่งผลต่อการสกัดฟลาโวนอยด์เหมือนกัน และทำให้รูปแบบของ กราฟพื้นผิวตอบสนองของทั้งฟีนอลิกทั้งหมด และฟลาโวนอยด์มีลักษณะคล้ายกัน



ภาพ 25 พื้นผิวตอบสนองระหว่างตัวแปรอิสระต่อปริมาณฟลาโวนอยด์ โดยใช้คลื่นเสียงช่วยในการสกัด ภาพ A คงกำลังไฟฟ้าที่ 4 level, 45.32 วัตต์; ภาพ B คงระยะเวลาการสกัดที่ 30 นาที; ภาพ C คงอุณหภูมิการสกัดที่ 40 องศาเซลเซียส

จากผลการทดลองพบว่า ปริมาณเฮสเปอริดินจากเปลือกส้ม ที่ผ่านการสกัดด้วยคลื่นเสียงที่สภาวะต่างๆ ทั้ง 17 สภาวะ ได้ปริมาณเฮสเปอริดิน และนารินจินอยู่ในช่วง 5,805.66 - 6,647.72 และ 44.64 - 54.42 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม ตามลำดับ ดังตารางที่ 8 เนื่องจากเปลือกส้มมีฟลาโวนอยด์ 'ไกลโคไซด์ที่สำคัญ' ได้แก่ เฮสเปอริดินที่พบมากในส้มแมนดาริน และนารินจินพบมากในมะนาว ซึ่งสารดังกล่าวมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระและยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ (Peterson, et al., 2006; Ma, et al., 2008a; Chemat, Zill e and Khan, 2011; Goulas and Manganaris, 2012)

ตารางที่ 8 ปริมาณเฮสเปอริดิน และนารินจิน จากเปลือกส้มที่ใช้คลื่นเสียงช่วยในขบวนการสกัดด้วยแผนการทดลองแบบ Box Behnken design

Run	Independent variables			Dependent variables	
	X1 (°C)	X2 (min)	X3 (watt)	Hesperidin (mg/100g)	Naringin (mg/100g)
1	30	20	44.85	6,088.60	47.99
2	50	20	44.85	6,448.07	54.42
3	30	40	44.85	6,193.48	53.49
4	50	40	44.85	6,649.72	49.48
5	30	30	30.34	5,858.62	43.51
6	50	30	30.34	6,122.38	47.64
7	30	30	59.36	5,805.66	44.04
8	50	30	59.36	6,380.94	47.63
9	40	20	30.34	6,199.48	49.44
10	40	40	30.34	6,407.16	46.66
11	40	20	59.36	6,420.60	51.42
12	40	40	59.36	6,092.19	48.33
13	40	30	44.85	6,256.60	48.71
14	40	30	44.85	6,246.58	48.16
15	40	30	44.85	6,194.31	47.69
16	40	30	44.85	6,371.10	47.55
17	40	30	44.85	6,335.96	49.37

X1 = temperature (°C); X2 = time (min); X3 = power (W)

สัมประสิทธิ์การถดถอยแบบพหุนามสำหรับสมการกำลังสอง และวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนสำหรับทำนายตัวแปร Y4 คือ ปริมาณเฮสเปอร์ิดิน และ Y5 คือปริมาณนารินจิน พบว่า การสกัดเฮสเปอร์ิดิน และนารินจิน อุณหภูมิ ระยะเวลา และกำลังไฟฟ้าที่ใช้สกัดมีผลต่อปริมาณการเพิ่มปริมาณเฮสเปอร์ิดิน และนารินจิน โดยเฉพาะอุณหภูมิในการสกัดมีผลต่อปริมาณเฮสเปอร์ิดินและนารินจิน สูงที่สุดเนื่องจากมีค่าสัมประสิทธิ์การถดถอยสูงที่สุดที่ 206.84 และ 1.27 ตามลำดับ ยิ่งไปกว่านั้นการใช้อิทธิพลร่วมระหว่างอุณหภูมิกับปัจจัยด้านระยะเวลา และกำลังไฟฟ้าส่งผลต่อการสกัดทำให้ได้ปริมาณเฮสเปอร์ิดิน และนารินจินเพิ่มมากขึ้น ยกเว้นแต่อิทธิพลร่วมระหว่างระยะเวลากับกำลังไฟฟ้าส่งผลต่อปริมาณเฮสเปอร์ิดิน และนารินจินลดลง ระหว่างการสกัดโดยสังเกตจากค่าสัมประสิทธิ์การถดถอยดังตารางที่ 9 เนื่องในระหว่างขบวนการสกัดสารต้านอนุมูลอิสระที่ถูกสกัดด้วยคลื่นเสียงให้ออกมาละลายอยู่ในสารละลายแล้ว เมื่อสัมผัสกับแรงที่เกิดจากอนุภาคของฟองอากาศที่ถูกกำเนิดด้วยคลื่นเสียงเป็นระยะเวลาาน สารดังกล่าวจะถูกทำลายได้ (Khan, et al., 2010; Londoño-Londoño, et al., 2010; Chemat, Zill e and Khan, 2011) ดังนั้นจึงมีความจำเป็นอย่างยิ่งที่ต้องทำการหาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดด้วยคลื่นเสียง เพื่อป้องกันสารสกัดที่ต้องการถูกทำลายจากปัจจัยต่างๆ ของขบวนการสกัดจากค่าสัมประสิทธิ์การถดถอยของตัวแปรต้นนำมาสร้างสมการ เพื่อทำนายปริมาณเฮสเปอร์ิดินและนารินจินจากขบวนการสกัดด้วยคลื่นเสียง ตามสมการที่ 19-20

$$\text{Hesperidin (Y4)} = 6280.91 + 206.84(X1) + 23.22(X2) + 13.97(X3) - 86.95(X1)^2 + 151.01(X2)^2 - 152.06(X3)^2 + 24.19(X1)(X2) + 77.88(X1)(X3) - 134.02(X2)(X3)$$

สมการที่ 19

$$\text{Naringin (Y5)} = 48.29 + 1.27(X1) - 0.66(X2) + 0.52(X3) - 0.10(X1)^2 + 3.15(X2)^2 - 2.49(X3)^2 - 2.61(X1)(X2) - 0.14(X1)(X3) - 0.077(X2)(X3)$$

สมการที่ 20

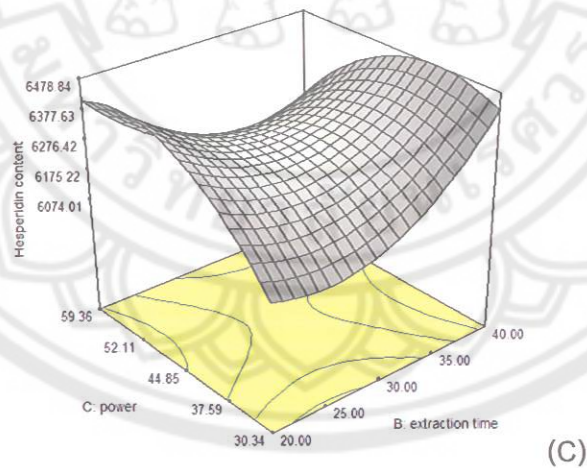
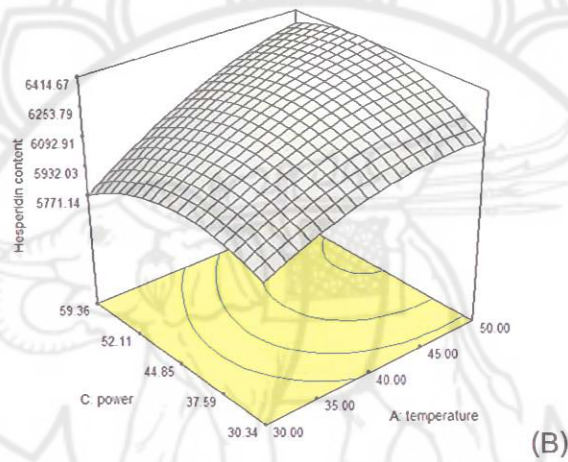
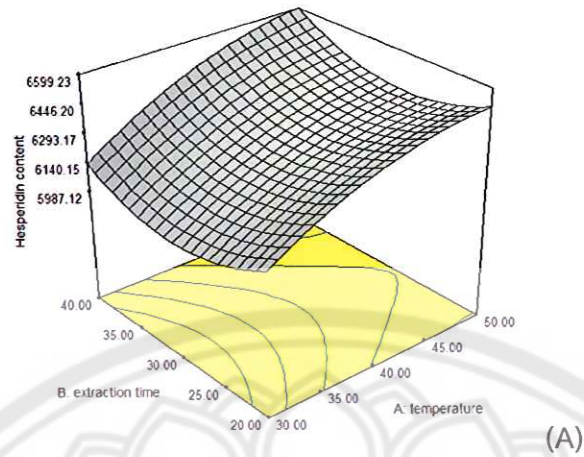
จากสมการที่ 19 และ 20 เป็นสมการ quadratic polynomial ที่มีค่านัยสำคัญของสมการหรือโมเดล $P < 0.05$ แสดงว่าสมการมีความเหมาะสมกับการทำนายค่าตัวแปร Y4 และ Y5 คือ เฮสเปอร์ิดิน และนารินจินจากเปลือกส้ม สอดคล้องกับค่า Lack of fit ซึ่งอธิบายถึงความไม่เหมาะสมของสมการ ซึ่งจากสมการ มีค่า p value ของ Lack of fit มากกว่า 0.05 จึงปฏิเสธความไม่เหมาะสมของสมการ แสดงว่าสมการมีความเหมาะสมสามารถใช้ทำนายปริมาณเฮสเปอร์ิดิน และนารินจิน ตามลำดับ ดังตารางที่ 9 และสมการที่ 19-20

จากตารางที่ 9 ค่า R^2 ที่บอกถึงความแม่นยำของสมการ 19 และ 20 ที่ใช้ทำนายเฮสเปอร์ิดิน และนารินจิน มีค่า R^2 เท่ากับ 0.9239 และ 0.9008 คือสมการที่ 19 มีความสามารถในการทำนายปริมาณเฮสเปอร์ิดินได้แม่นยำที่ 92.39% และ สมการที่ 20 มีความสามารถที่จะทำนายปริมาณนารินจินได้แม่นยำที่ 90.08 %

ตารางที่ 9 สัมประสิทธิ์การถดถอยแบบพหุนาม สำหรับสมการกำลังสอง (quadratic polynomial model) และการวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) ของเฮสเปอร์ิดิน และนารินจिनจากเปลือกส้มที่ใช้คลื่นเสียงช่วยในกระบวนการสกัด

Parameter	Estimated coefficients		Prob(P) > F	
	Hesperidin	Naringin	Hesperidin	Naringin
Intercept	6280.91	48.29		
X1	206.84	1.27	0.0003	0.0300
X2	23.22	-0.66	0.4810	0.1973
X3	13.97	0.52	0.6679	0.2993
X1 ²	-86.95	-0.10	0.0829	0.8784
X2 ²	151.01	3.15	0.0098	0.0017
X3 ²	-152.06	-2.49	0.0095	0.0061
X1xX2	24.19	-2.61	0.6006	0.0055
X1xX3	77.88	-0.14	0.1210	0.8418
X2xX3	-134.02	-0.077	0.0189	0.9103
Model			0.0037	0.0087
Lack of fit			0.2277	0.0611
R ²			0.9239	0.9008

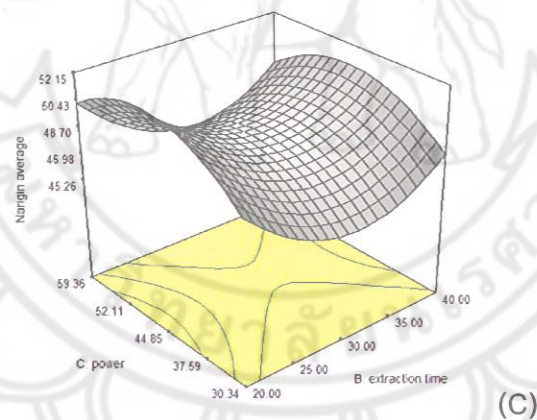
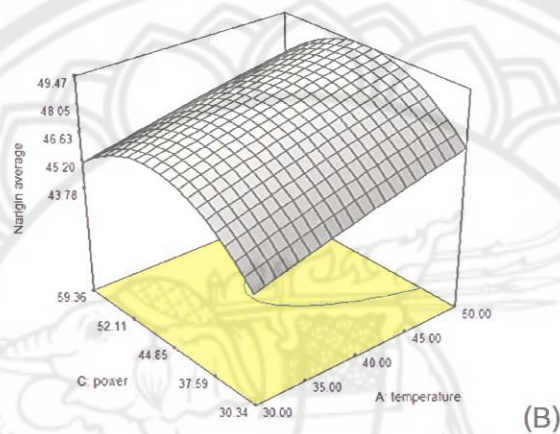
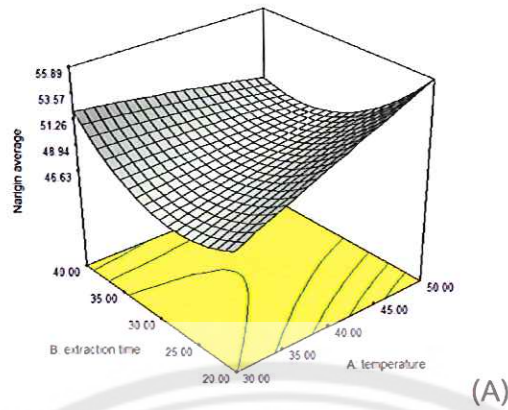
พื้นผิวตอบสนองของตัวแปรต้นอุณหภูมิ ระยะเวลา และกำลังไฟฟ้า ต่อตัวแปรตามได้แก่ ปริมาณเฮสเปอร์ิดิน ถูกสร้างจากสมการที่ 19 นำมาสร้างกราฟพื้นผิวตอบสนอง แสดงดังภาพที่ 26 พบว่า เมื่อเพิ่มอุณหภูมิระหว่างการสกัดจาก 30 ไปเป็น 50 องศาเซลเซียส ปริมาณเฮสเปอร์ิดินสูงตามอุณหภูมิ ยิ่งไปกว่านั้นถ้าเพิ่มอุณหภูมิกับระยะเวลาควบคู่กับในกระบวนการสกัดจะส่งผลให้ปริมาณเฮสเปอร์ิดินสูงมากขึ้นดังภาพที่ 26(A) แต่การเพิ่มอุณหภูมิจึงร่วมกับกำลังไฟฟ้าของคลื่นเสียงระหว่างการสกัดสามารถเพิ่มปริมาณเฮสเปอร์ิดินในช่วงแรก แต่เมื่อเพิ่มกำลังไฟฟ้าเกิน 44.85 วัตต์ ปริมาณเฮสเปอร์ิดินที่ได้มีปริมาณลดลง ดังภาพที่ 26(B) โดยเฉพาะการเพิ่มกำลังไฟฟ้าของคลื่นเสียงที่สูงร่วมกับระยะเวลาของกระบวนการสกัดที่นานขึ้น ดังภาพที่ 26(C) เมื่อเพิ่มกำลังไฟฟ้าที่ 52.11 ขึ้นไปร่วมกับระยะเวลาที่นานกว่า 35 นาที พบว่าปริมาณเฮสเปอร์ิดินลดลง เนื่องจากฟองอากาศที่กำเนิดจากคลื่นเสียงมีพลังงานสูงสามารถทำลายสารต้านอนุมูลอิสระได้ (Ma, et al., 2008b; Ma, et al., 2009; Londoño-Londoño, et al., 2010)



ภาพ 26 พื้นผิวตอบสนองระหว่างตัวแปรอิสระต่อปริมาณเฮสเปอร์ิดิน โดยใช้คลื่นเสียงช่วยในการสกัด ภาพ A คงกำลังไฟฟ้าที่ 4 level, 45.32 วัตต์; ภาพ B คงระยะเวลาการสกัดที่ 30 นาที; ภาพ C คงอุณหภูมิการสกัดที่ 40 องศาเซลเซียส

พื้นผิวตอบสนองของตัวแปรต้นอุณหภูมิ ระยะเวลา และกำลังไฟฟ้า ของขบวนการสกัดโดยใช้คลื่นเสียงต่อตัวแปรตามได้แก่ ปริมาณนารินจิน จากสมการที่ 20 นำมาสร้างกราฟพื้นผิวตอบสนอง แสดงดังภาพที่ 27 จากผลการทดลองพบว่า ปริมาณนารินจินจะมีปริมาณลดลงเมื่อเพิ่มอุณหภูมิร่วมกับเวลาในขบวนการสกัด อุณหภูมิที่สูงขึ้นช่วงระยะเวลา 45-50 นาที ทำให้ปริมาณ นารินจินที่ได้จากการสกัดลดลง ดังภาพที่ 27(A) แต่เมื่อเพิ่มกำลังไฟฟ้าปริมาณสูงเกิน 52.11 วัตต์ ร่วมกับอุณหภูมิที่สูงขึ้น ส่งผลให้ปริมาณนารินจินลดลง ดังภาพที่ 27(B) นารินจินเป็นฟลาโวนอยด์ไกลโคไซด์ที่มีมากในเปลือกส้มโดยเฉพาะเปลือกมะนาวซึ่งมีรสฝาด (Peterson, et al., 2006; Kim and Kim, 2011) มีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ สามารถถูกทำลายได้เมื่อใช้ปริมาณพลังงานหรือความเข้มข้นของคลื่นเสียงที่สูง (Chemat, Zill e and Khan, 2011)





ภาพ 27 พื้นผิวตอบสนองระหว่างตัวแปรอิสระต่อปริมาณนารินจิน โดยใช้คลื่นเสียงช่วย ในการสกัด ภาพ A คงกำลังไฟฟ้าที่ 4 level, 45.32 วัตต์; ภาพ B คงระยะเวลาการสกัดที่ 30 นาที; ภาพ C คงอุณหภูมิการสกัดที่ 40 องศาเซลเซียส

ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากเปลือกส้ม ที่ผ่านการสกัดด้วยคลื่นเสียงที่สภาวะต่างๆ ทั้ง 17 สภาวะ ดังตารางที่ 10 พบว่า สารสกัดจากเปลือกส้มมีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP อยู่ใน ช่วง 3,797.05-4,658.61 มิลลิกรัมสมมูล trolox ต่อ 100 กรัม ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ DPPH (IC_{50}) อยู่ใน ช่วง 0.31-0.38 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ ฤทธิ์การต้านอนุมูล ABTS (IC_{50}) อยู่ใน ช่วง 0.38-0.46

มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เนื่องจากเปลือกส้มมีสารประกอบฟีนอลิกชนิดฟลาโวนอยด์ อยู่ปริมาณมาก จากตารางที่ 6 ซึ่งสารดังกล่าวมีคุณสมบัติยับยั้งอนุมูลอิสระ ซึ่งสอดคล้องกับรายงานวิจัยว่าสารฟีนอลิก และฟลาโวนอยด์ ในผักผลไม้มีฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระได้ (Tripoli, et al., 2007; Su, Shyu and Chien, 2008; Procházková, Boušová and Wilhelmová, 2011; Moulehi, et al., 2012)

ตารางที่ 10 ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ FRAP, DPPH และ ABTS จากเปลือกส้มที่ใช้คลื่นเสียงช่วยใน ขบวนการสกัด ด้วยแผนการทดลองแบบ Box Behnken design

Run	Independent variables			Dependent variables		
	X1 (°C)	X2 (min)	X3 (watt)	FRAP (mg/100g)	DPPH (mg/ml; IC ₅₀)	ABTS (mg/ml; IC ₅₀)
1	30	20	44.85	4,022.51	0.37	0.46
2	50	20	44.85	4,061.20	0.37	0.40
3	30	40	44.85	4,119.62	0.38	0.44
4	50	40	44.85	4,403.10	0.36	0.42
5	30	30	30.34	3,797.05	0.32	0.38
6	50	30	30.34	3,898.46	0.35	0.42
7	30	30	59.36	4,553.90	0.33	0.39
8	50	30	59.36	4,658.61	0.36	0.43
9	40	20	30.34	3,924.15	0.32	0.38
10	40	40	30.34	3,869.41	0.36	0.41
11	40	20	59.36	4,462.33	0.35	0.39
12	40	40	59.36	4,800.74	0.31	0.39
13	40	30	44.85	4,294.84	0.34	0.40
14	40	30	44.85	4,282.82	0.34	0.41
15	40	30	44.85	4,259.60	0.34	0.40
16	40	30	44.85	4,336.79	0.35	0.41
17	40	30	44.85	4,251.44	0.34	0.40

X1 = temperature (°C); X2 = time (min); X3 = power (W)

สัมประสิทธิ์การถดถอยแบบพหุนามสำหรับสมการกำลังสอง และวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนสำหรับทำนายตัวแปร Y6 คือ FRAP, Y7 คือ DPPH และ Y8 คือ ABTS ดังตารางที่ 11 พบว่าสามารถสร้างสมการทำนายตัวแปร Y6 ได้ แต่ไม่สามารถสร้างสมการทำนายตัวแปร Y7 และ Y8 เนื่องจากผลการทดลองฤทธิ์การต้านอนุมูล DPPH และ ABTS มีค่าไม่แตกต่างกัน สำหรับการทดลองนี้การหาฤทธิ์การต้านอนุมูล DPPH และ ABTS ทำในรูปแบบ IC_{50} ซึ่งฤทธิ์ยับยั้งแต่ละสภาวะการสกัดมีฤทธิ์ยับยั้งที่ 50 เปอร์เซ็นต์ไม่แตกต่างกัน สำหรับฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ FRAP ใช้วิธีการวิเคราะห์โดยเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน Trolox ค่าจากการทดลองดังตารางที่ 11 สามารถนำมาสร้างสมการกำลังสองเพื่อใช้ทำนายได้ จากค่า p -value <0.0001 และ lack of fit ที่ 0.352 โดยสมการมีค่าความแม่นยำสำหรับทำนายตัวแปร Y6 ที่ 99.28 เปอร์เซ็นต์ โดยปัจจัยทั้ง 3 คือ อุณหภูมิ ระยะเวลา และกำลังไฟฟ้าที่ใช้สกัดมีผลต่อฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ FRAP ในเชิงบวก โดยเฉพาะกำลังไฟฟ้าที่ใช้สกัดมีอิทธิพลสูงที่สุดเนื่องจากมีค่าสัมประสิทธิ์การถดถอยสูงที่สุดที่ 373.31 ยิ่งไปกว่านั้นการใช้อิทธิพลร่วมระหว่างกำลังไฟฟ้าที่ใช้สกัดกับปัจจัยด้านอุณหภูมิ และระยะเวลาส่งผลต่อฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ FRAP โดยสังเกตจากค่าสัมประสิทธิ์การถดถอยดังแสดงในตารางที่ 11 เนื่องจากคลื่นเสียงสามารถสกัดสารประกอบฟีนอลิกจากเซลล์พืชได้ ซึ่งสารปริมาณมากขึ้นส่งผลให้ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ FRAP สูงขึ้น สอดคล้องกับผลการทดลองก่อนหน้านี้ ดังตารางที่ 5 จากค่าสัมประสิทธิ์การถดถอยของตัวแปรต้นนำมาสร้างสมการ เพื่อทำนายฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ FRAP ตามสมการที่ 21

$$\text{FRAP (Y6)} = 4,285.10 + 66.03(X1) + 90.33(X2) + 373.31(X3) - 85.32(X1)^2 - 48.17(X2)^2 - 27.23(X3)^2 + 61.20(X1)(X2) + 0.83(X1)(X3) + 98.29(X2)(X3)$$

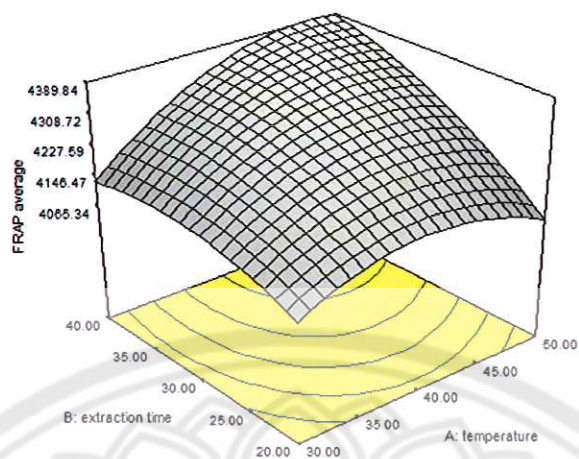
สมการที่ 21

ตารางที่ 11 สัมประสิทธิ์การถดถอยแบบพหุนาม สำหรับสมการกำลังสอง (quadratic polynomial model) และการวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) ของฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ FRAP, DPPH และ ABTS จากเปลือกส้มที่ใช้คลื่นเสียงช่วยในขบวนการสกัด

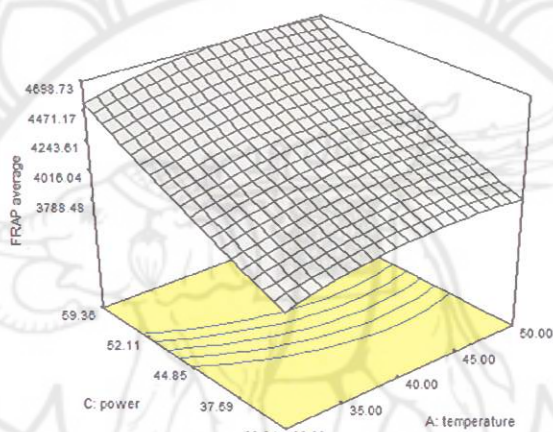
Parameter	Estimated coefficients			Prob(P)>F		
	FRAP	DPPH	ABTS	FRAP	DPPH	ABTS
Intercept	4,285.10	-	-	-	-	-
X1	66.03	-	-	0.0015	-	-
X2	90.33	-	-	0.0002	-	-
X3	373.31	-	-	< 0.0001	-	-
X1 ²	-85.32	-	-	0.0021	-	-
X2 ²	-48.17	-	-	0.0316	-	-
X3 ²	27.23	-	-	0.1738	-	-
X1xX2	61.20	-	-	0.0128	-	-
X1xX3	0.83	-	-	0.9656	-	-
X2xX3	98.29	-	-	0.0011	-	-
Model				<0.0001	-	-
Lack of fit				0.3520	-	-
R ²				0.9928	-	-

หมายเหตุ – คือ ไม่สามารถหาค่าสัมประสิทธิ์การถดถอยแบบพหุนามได้

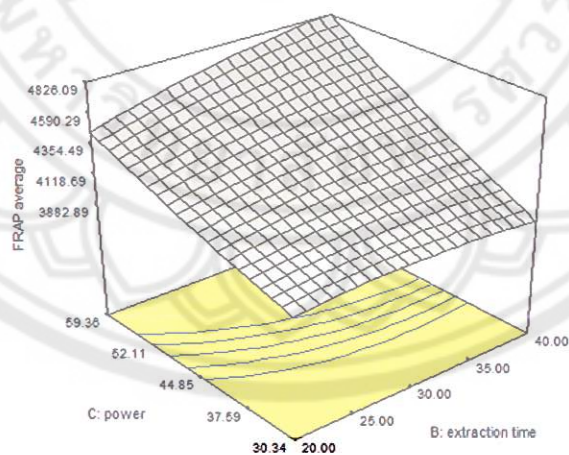
พื้นผิวตอบสนองของตัวแปรต้นอุณหภูมิ ระยะเวลา และกำลังไฟฟ้า ต่อตัวแปรตามคือฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ FRAP ที่สร้างจากสมการที่ 21 นำมาสร้างกราฟพื้นผิวตอบสนอง ดังภาพที่ 28 พบว่าเมื่อเพิ่มอุณหภูมิระหว่างการสกัดจาก 30 ไปถึง 50 องศาเซลเซียส ร่วมกับการเพิ่มระยะเวลาทำให้ปริมาณฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ FRAP สูงมากขึ้นดังภาพที่ 28(A) ยิ่งไปกว่านั้นถ้าเพิ่มกำลังไฟฟ้าของคลื่นเสียงควบคู่กับอุณหภูมิ หรือกำลังไฟฟ้าของคลื่นเสียงควบคู่กับระยะเวลาในขบวนการสกัดจะส่งผลให้ปริมาณฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ FRAP สูงมากขึ้นดังภาพที่ 28 (B และ C)



(A)



(B)



(C)

ภาพ 28 พื้นผิวตอบสนองระหว่างตัวแปรอิสระต่อฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ FRAB โดยใช้คลื่นเสียงช่วยในการสกัด ภาพ A คงกำลังไฟฟ้าที่ 4 level, 45.32 วัตต์; ภาพ B คงระยะเวลาการสกัดที่ 30 นาที; ภาพ C คงอุณหภูมิการสกัดที่ 40 องศาเซลเซียส

จากสมการข้างต้นตั้งแต่สมการที่ 16-21 นำมาคำนวณหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการสกัดสารด้านอนุมูลอิสระด้วยคลื่นเสียง ด้วยโปรแกรม Design expert โดยกำหนดสภาวะที่เหมาะสมที่ต้องการโดยให้มีปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด ฟลาโวนอยด์ เฮสเปอร์รีดิน และ ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ FRAP สูงที่สุดจากการคำนวณด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ได้สภาวะที่เหมาะสมสำหรับการสกัดสารด้านอนุมูลอิสระจากเปลือกส้มคือ อุณหภูมิช่วง 48-50 องศาเซลเซียส ระยะเวลาการสกัด 40 นาที กำลังไฟฟ้าที่ใช้สกัด 57.34 วัตต์ (level 6) เหมาะสมต่อการสกัดด้วยคลื่นเสียงที่ใช้พลังงานต่ำ

ตอนที่ 3 การเปรียบเทียบประสิทธิภาพการสกัดสารประกอบฟีนอลิก ระหว่างการสกัดด้วยคลื่นเสียง กับการสกัดด้วยวิธีแบบดั้งเดิม (maceration)

การทดลองตอนที่ 1 และ 2 ได้สภาวะที่เหมาะสมสำหรับการสกัดเปลือกผลไม้ตระกูลส้ม ที่ได้ปริมาณสารด้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระสูง คือใช้เปลือกส้มสกัดด้วยอะซิโตนที่ความเข้มข้น 80 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้สภาวะการสกัดของเครื่องอัลตราโซนิก คือ อุณหภูมิ 48 องศาเซลเซียส ระยะเวลาการสกัด 40 นาที กำลังไฟฟ้าที่ใช้สกัด 57.34 วัตต์ (level 6) สภาวะดังกล่าวเป็นสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการทดลองที่นำไปเปรียบเทียบกับสภาวะการสกัดด้วยวิธีแบบดั้งเดิมคือ การนำเปลือกส้มมาสกัดโดยแช่ในอะซิโตนที่ความเข้มข้น 80 เปอร์เซ็นต์ อุณหภูมิ 48 องศาเซลเซียส ระยะเวลาการสกัด 40 นาที โดยไม่ให้เกิดคลื่นเสียงในการสกัด เมื่อเปรียบเทียบสภาวะการสกัดทั้งสอง พบว่าสารสกัดได้จากการสกัดโดยใช้คลื่นเสียงมีปริมาณมากกว่าการนำเปลือกส้มไปผ่านขบวนการสกัดแบบดั้งเดิม อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) โดยเฉพาะอย่างยิ่งปริมาณผลผลิตของสารสกัดที่ได้มีปริมาณมากกว่าถึง 1.77 เท่า สารสกัดที่ได้มีลักษณะเป็นเกล็ดสีเหลืองส้ม มีปริมาณความชื้นไม่แตกต่างกัน ปริมาณสารออกฤทธิ์ ได้แก่ สารประกอบฟีนอลิก ฟลาโวนอยด์ เฮสเปอร์รีดิน และนารินจีน มากกว่าเปลือกส้มไปผ่านขบวนการสกัดแบบดั้งเดิม อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ส่งผลให้ฤทธิ์ของสารดังกล่าวในการต้านอนุมูลอิสระมีมากกว่าวิธีสกัดแบบดั้งเดิม ดังตารางที่ 12 โดยสารสกัดจากเปลือกส้มที่ผ่านขบวนการสกัดด้วยการใช้คลื่นเสียงสามารถต้านอนุมูล DPPH, ABTS และ FRAP ได้ดีกว่าสารสกัดจากเปลือกส้มที่สกัดด้วยวิธีดั้งเดิม อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยก่อนหน้านี้ที่ประยุกต์ใช้คลื่นเสียงสำหรับสกัดสารชนิดต่างๆ และได้ปริมาณสารที่ต้องการสูงกว่าวิธีอื่นๆ เช่น การใช้คลื่นเสียงสกัดเอาน้ำมันออกจากเมล็ดทับทิมได้ปริมาณน้ำมันสูงกว่าการสกัดด้วยสารเคมี (Tian, et al., 2013) การใช้คลื่นเสียงเพื่อสกัดฟลาโวนอยด์จากเมล็ดฮอร์ธอร์นได้ปริมาณฟลาโวนอยด์สูงกว่าการสกัดแบบ conventional reflux ถึง 1.32 เท่า (Pan, et al., 2012)

ตารางที่ 12 เปรียบเทียบคุณสมบัติทางกายภาพ และทางเคมีของเปลือกส้มที่สกัดด้วยคลื่นเสียง (ultrasonic assisted extraction: UAE) ที่สภาวะการสกัดที่เหมาะสมกับการสกัดด้วยวิธีแบบดั้งเดิม (maceration extraction: MAE)

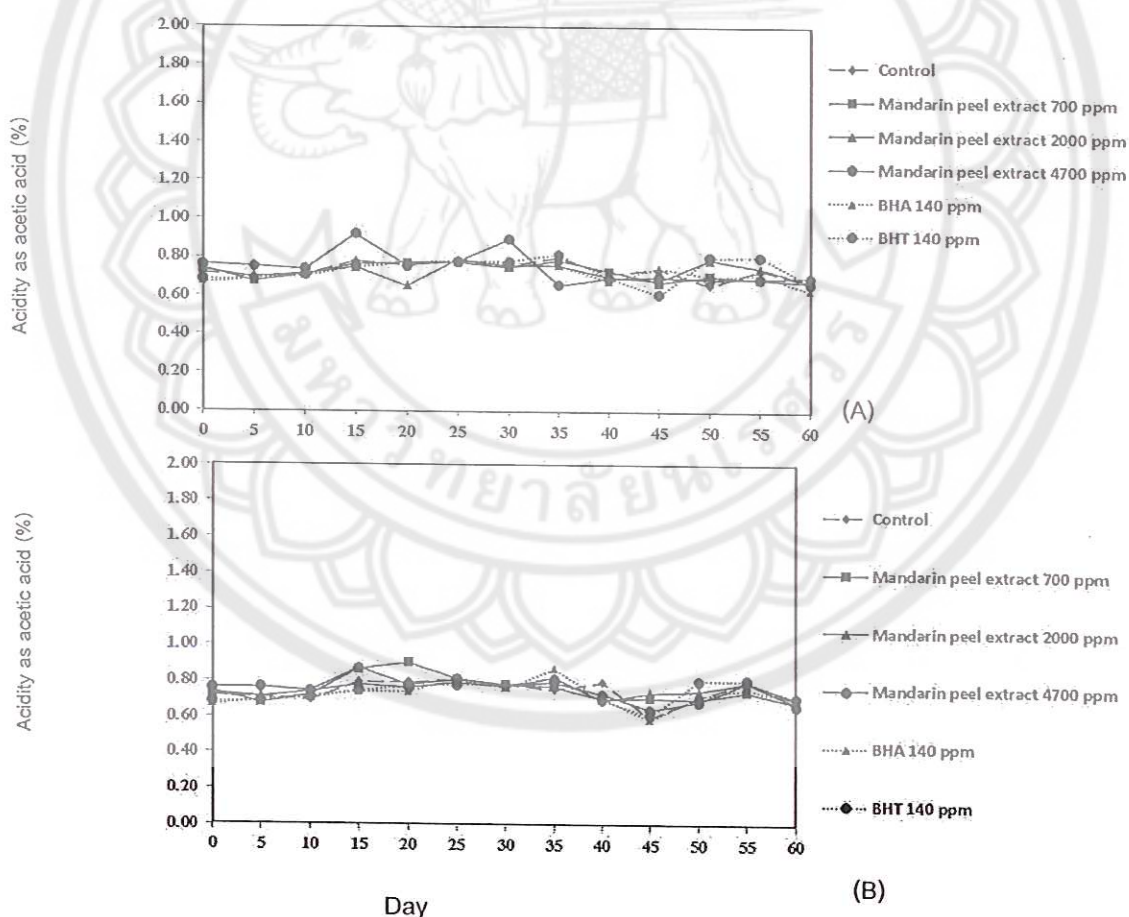
Parameters	Extraction method	
	UAE	MAE
Yield (%)	26.50±0.01a	14.95±0.22b
Water activity	0.317±0.00a	0.389±0.00b
Moisture content (%)	8.64±0.23ns	8.83±0.25ns
Total phenolic content (mg GA 100 ⁻¹ g)	14,898.64±0.01a	12,519.73±95.96b
Total flavonoid content (mg QUE 100 ⁻¹ g)	12,979.11±44.19a	9,014.84±144.76b
Hesperidin (mg 100 ⁻¹ g)	6,409.84±0.05a	6,153.22±0.11b
Naringin (mg 100 ⁻¹ g)	63.66±0.01a	44.63±0.02b
Ferric reducing antioxidant power (Trolox 100 ⁻¹ g)	6,466.67±43.39a	5,423.91±38.73b
DPPH Radical scavenging (IC ₅₀ : mg ml ⁻¹)	0.32±0.00b	0.39±0.00a
ABTS Radical scavenging (IC ₅₀ : mg ml ⁻¹)	1.10±0.00b	1.20±0.00a

a และ b หมายถึง ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรที่แตกต่างกันในแผนภูมิแสดงว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p < 0.05)

ตอนที่ 4 การศึกษาคุณสมบัติการต้านออกซิเดชันของสารสกัดจากเปลือกผลไม้ตระกูลส้ม ในผลิตภัณฑ์น้ำสลัด

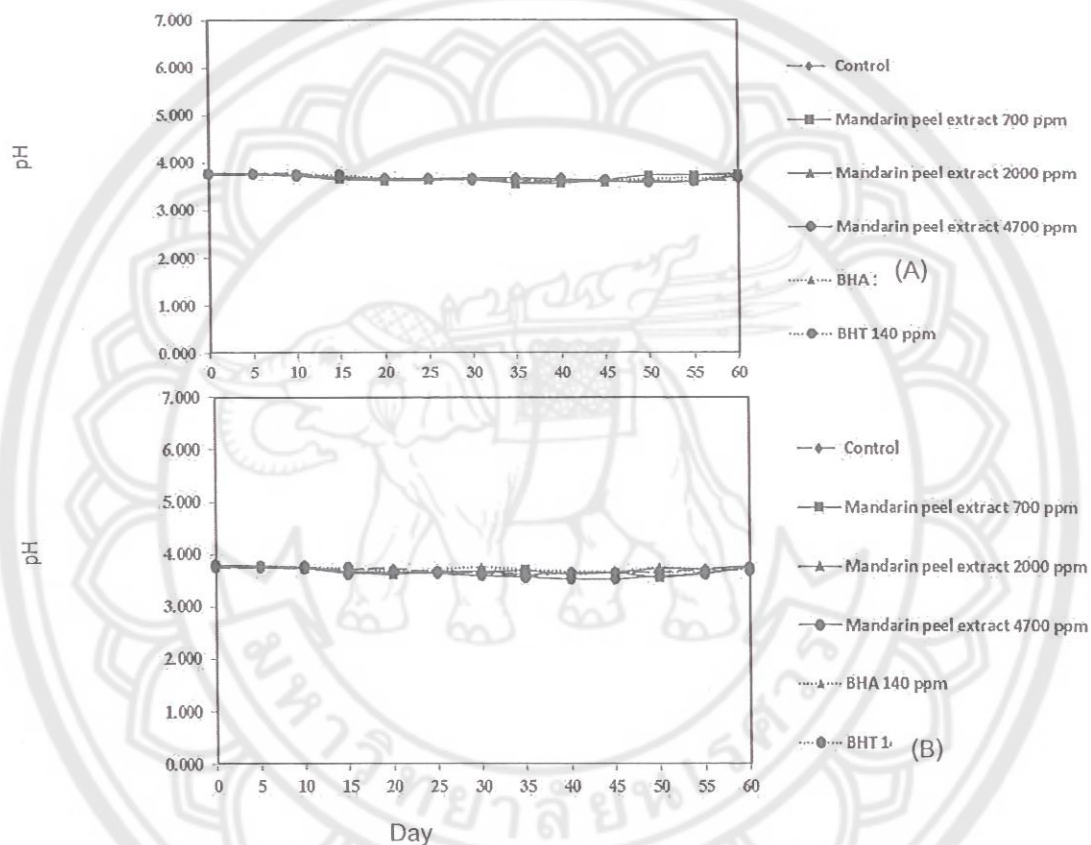
เมื่อนำสารสกัดจากเปลือกส้มที่ผ่านขบวนการสกัดด้วยคลื่นเสียงด้วยสภาวะการสกัดที่เหมาะสม คือ อุณหภูมิ 48 องศาเซลเซียส ระยะเวลาในการสกัด 40 นาที ใช้กำลังไฟฟ้าที่ระดับ 6 (59.36 วัตต์) ได้ สารสกัดดังกล่าวมีลักษณะเป็นผลึกสีเหลืองส้ม ดังภาพที่ 13 สารสกัดดังกล่าวมาใช้เพื่อยับยั้งการเกิดออกซิเดชันในน้ำสลัดครีม ซึ่งมีปริมาณไขมันเป็นส่วนประกอบมากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ ส่วนประกอบของน้ำสลัดครีมประกอบไปด้วย น้ำมันรำข้าว นมข้นหวาน น้ำส้มสายชู ไข่แดง น้ำตาลทราย เกลือ และมัสตาร์ด ดังภาพที่ 15 โดยแบ่งน้ำสลัดออกเป็นทั้งหมด 6 สิ่งทดลอง คือ 1) น้ำสลัดสูตรควบคุม 2) น้ำสลัดเติมสารสกัดจากเปลือกส้ม 700 ppm 3) น้ำสลัดเติมสารสกัดจากเปลือกส้ม 2,000 ppm 4) น้ำสลัดเติมสารสกัดจากเปลือกส้ม 4,700 ppm 5) น้ำสลัดเติมสารต้านออกซิเดชันสังเคราะห์ชนิด BHA 140 ppm และ 6) น้ำสลัดเติมสารต้านออกซิเดชันสังเคราะห์ชนิด BHT 140 ppm ดังภาพที่ 17 โดยนำสลัดดังกล่าวจะนำไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 30 และ 40 องศาเซลเซียส ดังภาพที่ 19-20 เป็นระยะเวลา 60 วัน และนำมาตรวจวิเคราะห์ทุกๆ 5 วัน

เมื่อเปรียบเทียบการเปลี่ยนแปลงของปริมาณกรดในน้ำสลัดน้ำมันรำข้าวสูตรควบคุมกับใช้สารต้านออกซิเดชันจากเปลือกส้ม และใช้สารต้านออกซิเดชันสังเคราะห์ พบว่าปริมาณกรดของน้ำสลัดทั้งหมดมีค่าเริ่มต้นไม่แตกต่างกัน มีค่าปริมาณกรดของน้ำสลัดทุกสูตรที่ 0.7-0.8 เปอร์เซ็นต์ โดยเทียบกับกรดแอสตริก เนื่องจากน้ำสลัดมีกรดตัวหลักคือกรดแอสตริกที่เติมลงในส่วนผสมอยู่ที่ 14 เปอร์เซ็นต์เหมือนกันทุกสิ่งทดลอง เมื่อเก็บรักษาน้ำสลัดที่อุณหภูมิ 30 และ 40 องศาเซลเซียสนาน 60 วัน พบว่าปริมาณกรดทั้งหมด ไม่ค่อยมีการเปลี่ยนแปลงดังภาพที่ 29 เนื่องจากน้ำสลัดเป็นอาหารที่มีความเป็นกรดสูงสามารถยับยั้งจุลินทรีย์ที่สร้างกรดบางชนิดได้ทำให้ปริมาณกรดไม่เปลี่ยนแปลง (Smittle, 2000) และสภาวะที่เป็นกรดทำให้ไม่เหมาะกับการกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ไลเปสที่เปลี่ยนไขมันไปเป็นกรดไขมันอิสระ (Zhou and Elias, 2013) อีกทั้งน้ำมันรำข้าวที่ใช้ทำน้ำสลัดไม่ได้ผ่านความร้อนสูง เช่น ขบวนการทอดทำให้ไม่เกิดการแตกตัวของกรดไขมันอิสระ (Yi, et al., 2013)



ภาพ 29 ปริมาณกรดทั้งหมด (เทียบกับกรดแอสตริก) ของน้ำสลัดที่เปลี่ยนแปลงระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส (A) และ 40 องศาเซลเซียส (B)

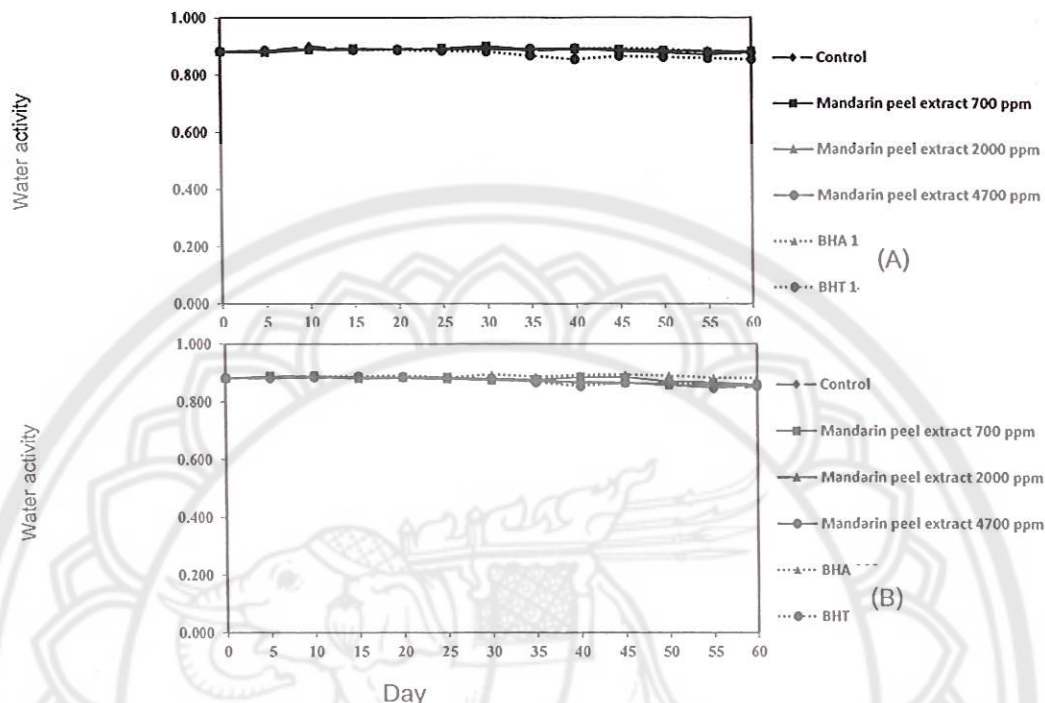
เมื่อเปรียบเทียบการเปลี่ยนแปลงของค่าความเป็นกรดต่างในน้ำสลัดน้ำมันรำข้าวสูตรควบคุมกับใช้สารต้านออกซิเดชันจากเปลือกส้ม และใช้สารต้านออกซิเดชันสังเคราะห์ พบว่าปริมาณค่าความเป็นกรดต่างของน้ำสลัดทั้งหมดมีค่าเริ่มต้นน้ำสลัดทุกสูตรที่ 3.8-3.9 เนื่องจากน้ำสลัดทุกสูตรเติมกรดแอซิติกที่เติมลงในส่วนผสมมีอยู่ที่ 14 เปอร์เซ็นต์ เหมือนกันทุกสิ่งทดลอง เมื่อเก็บรักษาน้ำสลัดที่อุณหภูมิ 30 และ 40 องศาเซลเซียสนาน 60 วัน พบว่าค่าความเป็นกรดต่างคงที่ ไม่มีการเปลี่ยนแปลงดังภาพที่ 30 สอดคล้องกับปริมาณกรดไม่มีการเปลี่ยนแปลงดังภาพที่ 29



ภาพ 30 ค่าความเป็นกรดต่าง (pH) ของน้ำสลัดที่เปลี่ยนแปลงระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส (A) และ 40 องศาเซลเซียส (B)

เมื่อเปรียบเทียบการเปลี่ยนแปลงของปริมาณน้ำที่จุลินทรีย์สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ในน้ำสลัดน้ำมันรำข้าวสูตรควบคุม กับใช้สารต้านออกซิเดชันจากเปลือกส้ม และใช้สารต้านออกซิเดชันสังเคราะห์ พบว่าปริมาณน้ำที่จุลินทรีย์สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ของน้ำสลัดทั้งหมดมีค่าเริ่มต้นไม่แตกต่างกัน อยู่ที่ 0.85-0.9 น้ำสลัดเป็นอาหารที่มีปริมาณน้ำอยู่สูง ซึ่งมาจากองค์ประกอบของส่วนผสมที่มีน้ำอยู่สูง เช่น น้ำส้มสายชู นมข้นหวาน และไข่แดง และเมื่อเก็บรักษาน้ำสลัดที่อุณหภูมิ 30 และ 40

องศาเซลเซียสนาน 60 วัน พบว่าปริมาณน้ำที่จุลินทรีย์สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้คงที่ ไม่มีการเปลี่ยนแปลงดังภาพที่ 31



ภาพ 31 ปริมาณน้ำอิสระ (water activity) ของน้ำสลัดที่เปลี่ยนแปลงระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส (A) และ 40 องศาเซลเซียส (B)

สีของน้ำสลัดน้ำมันรำข้าวสูตรควบคุม สูตรที่ใช้สารต้านออกซิเดชันจากเปลือกส้ม และใช้สารต้านออกซิเดชันสังเคราะห์ ที่เก็บรักษาวันที่ 0 ดังภาพที่ 32 (แถวที่ 1) พบว่าสีเริ่มต้นน้ำสลัดสูตรควบคุม สูตรที่ใช้สารต้านออกซิเดชันจากเปลือกส้มที่ 700 ppm และใช้สารต้านออกซิเดชันสังเคราะห์ ไม่มีความแตกต่างกัน แต่สูตรที่ใช้สารต้านออกซิเดชันจากเปลือกส้มที่ 2,000 และ 4,700 ppm มีสีเข้มมากกว่าจากค่า L^* , a^* และ b^* ดังภาพที่ 33-35 ตามลำดับ เนื่องจากสารสกัดจากเปลือกส้มมีสีเหลืองส้มเมื่อเพิ่มปริมาณของสารสกัดทำให้เกิดสีเหลืองที่เข้มขึ้นตามปริมาณการใส่ที่มากขึ้น แต่ BHA และ BHT เป็นผลึกใสเมื่อเติมลงไปปริมาณเล็กน้อยทำให้สีไม่แตกต่างจากสูตรควบคุม

เมื่อเก็บรักษาน้ำสลัดทุกสูตรที่อุณหภูมิ 30 และ 40 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 60 วัน พบว่าสีของน้ำสลัดมีการเปลี่ยนแปลงโดยสีจะเข้มขึ้นทุกสิ่งทดลอง ดังภาพที่ 33 โดยเฉพาะน้ำสลัดที่เก็บที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ดังภาพที่ 33 (แถวที่ 3) มีสีเข้มมากกว่าที่เก็บที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส (แถวที่ 2) โดยสีที่เข้มขึ้นสนับสนุนผลจากการวัดสีค่า L^* ที่บ่งบอกถึงสีขาวและดำ a^* บ่งบอกถึงสีแดงและเขียว และ b^* บ่งบอกถึงสีเหลืองและน้ำเงิน



ภาพที่ 32 น้ำสลัดเติมสารต้านออกซิเดชันจากเปลือกส้ม และสารต้านออกซิเดชันสังเคราะห์

A: น้ำสลัดสูตรควบคุม

B: น้ำสลัดเติมสารต้านออกซิเดชันจากเปลือกส้ม ความเข้มข้น 700 ppm

C: น้ำสลัดเติมสารต้านออกซิเดชันจากเปลือกส้ม ความเข้มข้น 2,000 ppm

D: น้ำสลัดเติมสารต้านออกซิเดชันจากเปลือกส้ม ความเข้มข้น 4,700 ppm

E: น้ำสลัดเติมสารต้านออกซิเดชันชนิด ความเข้มข้น BHA 140 ppm

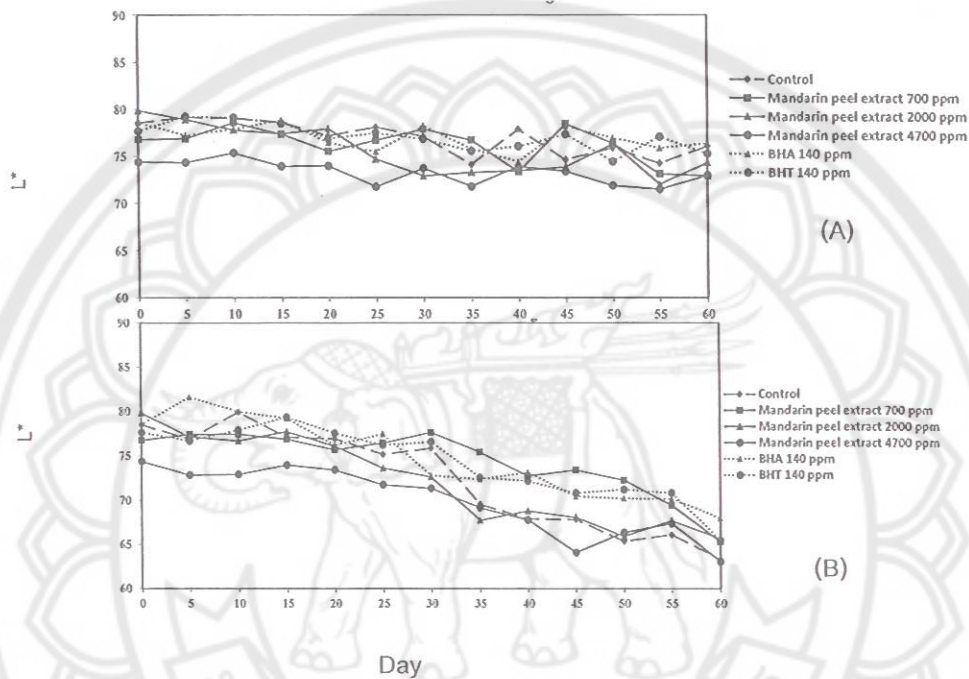
F: น้ำสลัดเติมสารต้านออกซิเดชันชนิด ความเข้มข้น BHT 140 ppm

น้ำสลัดที่เก็บที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส สีของตัวอย่างสูตรควบคุม และสูตรใช้สารต้านออกซิเดชันจากเปลือกส้มที่ 4,700 ppm มีสีเข้มมากกว่า คือมีค่า L^* ลดลง และค่า a^* เพิ่มขึ้น มากกว่าน้ำสลัดที่ใช้สารต้านออกซิเดชันจากเปลือกส้มที่ 700 ppm, BHA และ BHT เมื่อระยะเวลาการเก็บนานขึ้น

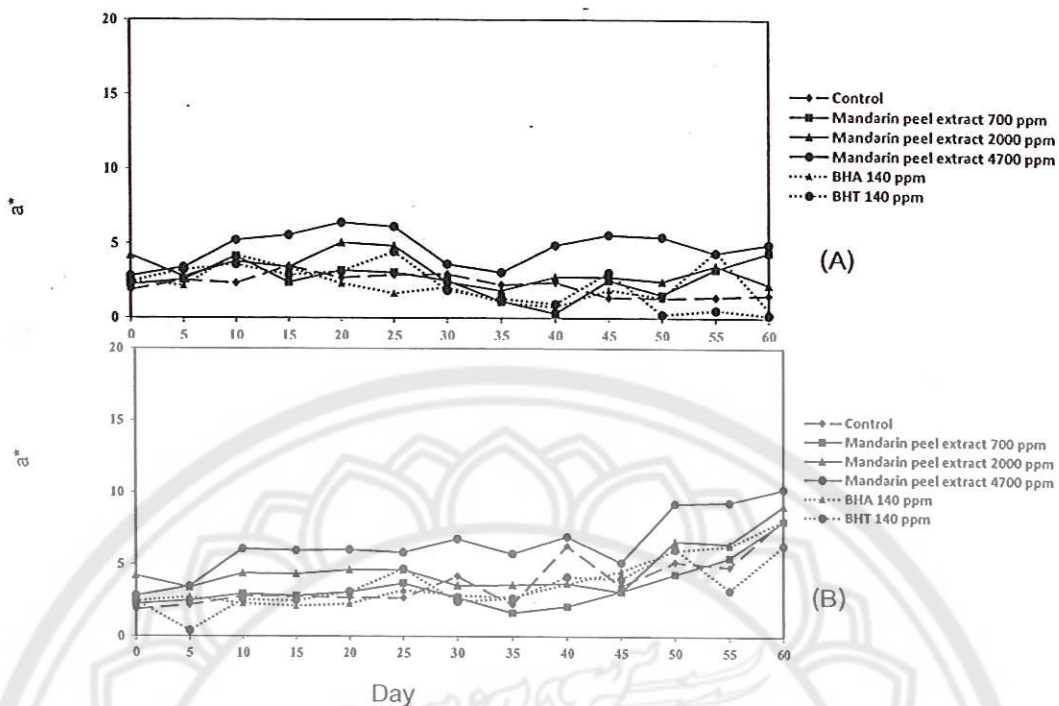
น้ำสลัดสามารถเกิดสีน้ำตาลแบบปฏิกิริยาเมลลาร์ดได้ เนื่องจากในไข่แดงมีส่วนผสมของน้ำตาลรีดิวซ์และกรดอะมิโนชนิดอิสระ (free amino acids) สามารถเกิดขึ้นได้อย่างช้าๆ ที่สภาวะที่เป็นกรดมี pH ประมาณ 3-4 (Smittle, 2000) สังเกตได้จากน้ำสลัดสูตรควบคุมเกิดสีน้ำตาลได้ดีกว่า เมื่อเติมสารต้านอนุมูลอิสระสารดังกล่าวสามารถยับยั้งการเกิดสีน้ำตาลได้จาก ดังภาพที่ 32-35

แต่สูตรใช้สารต้านออกซิเดชันจากเปลือกส้มที่ 4,700 ppm มีสีเข้มกว่าสิ่งทดลองอื่นๆ เกิดปฏิกิริยาสีน้ำตาลที่รุนแรงกว่าเนื่องจากสารสกัดจากเปลือกส้มมีองค์ประกอบของฟลาโวนอยด์ที่มี

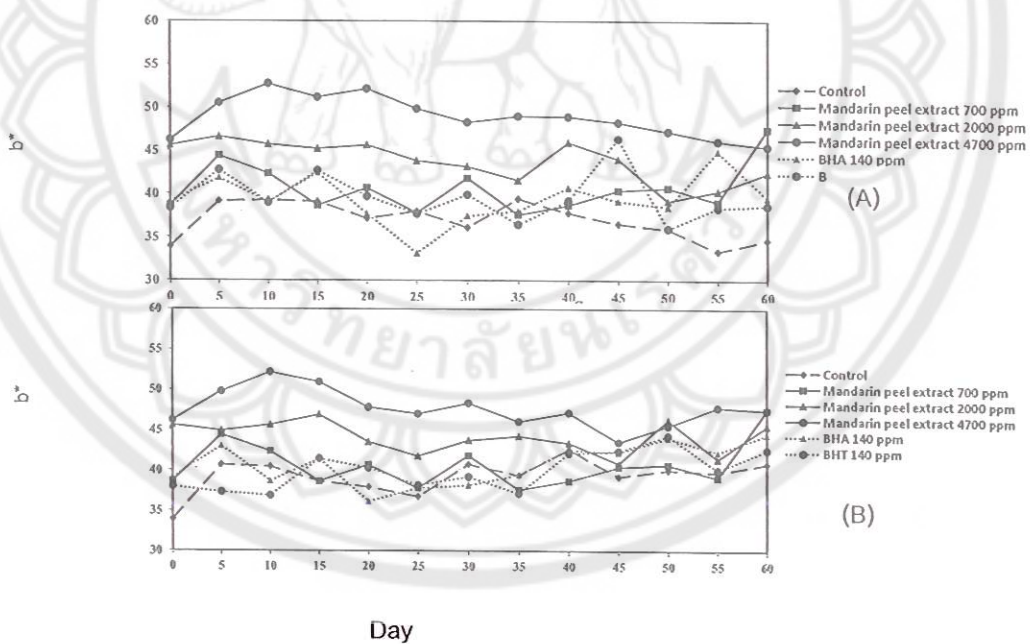
คุณสมบัติเป็นทั้งสารต้านออกซิเดชัน และโปรออกซิเดชัน เมื่อใส่มากเกินไปสารดังกล่าวจะแปรตัวเองเป็นอนุมูลอิสระไปกระตุ้นให้เกิดการออกซิเดชันได้ดี และเร่งการเกิดสีน้ำตาลได้เร็วขึ้น (Hernández, et al., 2009) ดังนั้นการเติมสารต้านอนุมูลอิสระจึงมีความจำเป็นต่อหาปริมาณที่เหมาะสมที่จะเติมลงไปให้อาหาร ในการทดลองนี้ที่ใช้สารต้านออกซิเดชันจากเปลือกส้มที่ 700 ppm ในน้ำสลัดสามารถยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาสีน้ำตาลเทียบเท่ากับสารต้านออกซิเดชันสังเคราะห์ที่ 140 ppm



ภาพ 33 ค่าสี L* ของน้ำสลัดที่เปลี่ยนแปลงระหว่างการรักษาที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส (A) และ 40 องศาเซลเซียส (B)

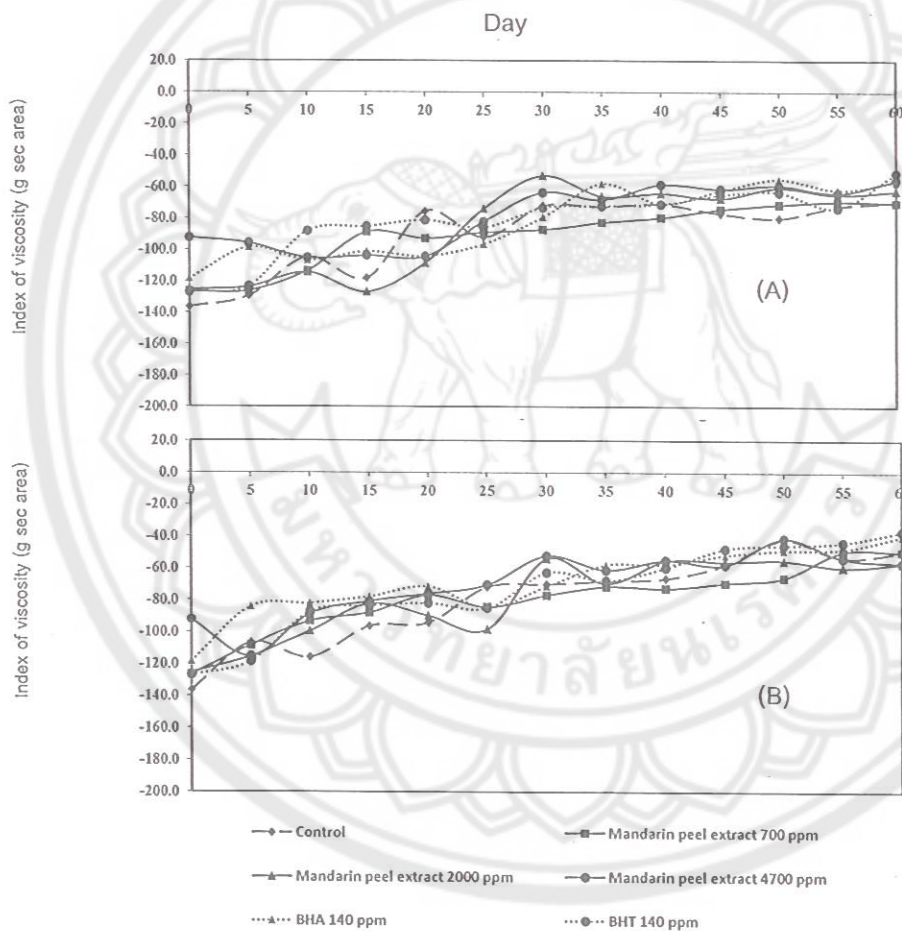


ภาพ 34 ค่าสี a^* ของน้ำสลัดที่เปลี่ยนแปลงระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ
องศาเซลเซียส (A) และ 40 องศาเซลเซียส (B) 30

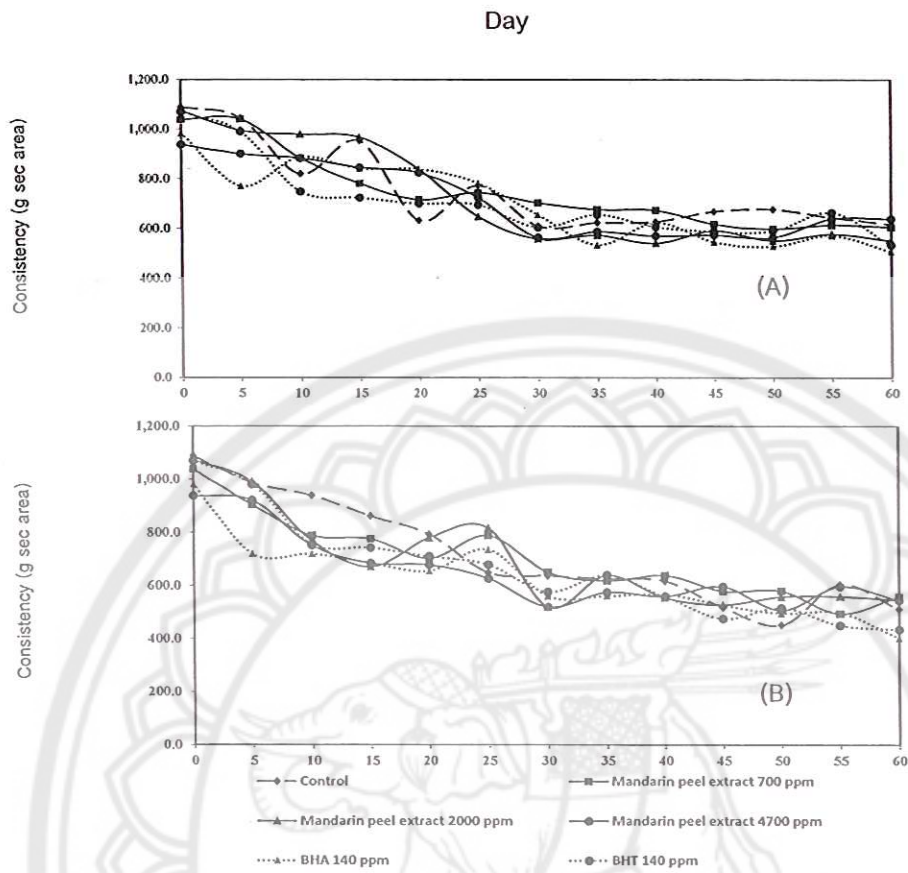


ภาพ 35 ค่าสี b^* ของน้ำสลัดที่เปลี่ยนแปลงระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ
30 องศาเซลเซียส (A) และ 40 องศาเซลเซียส (B)

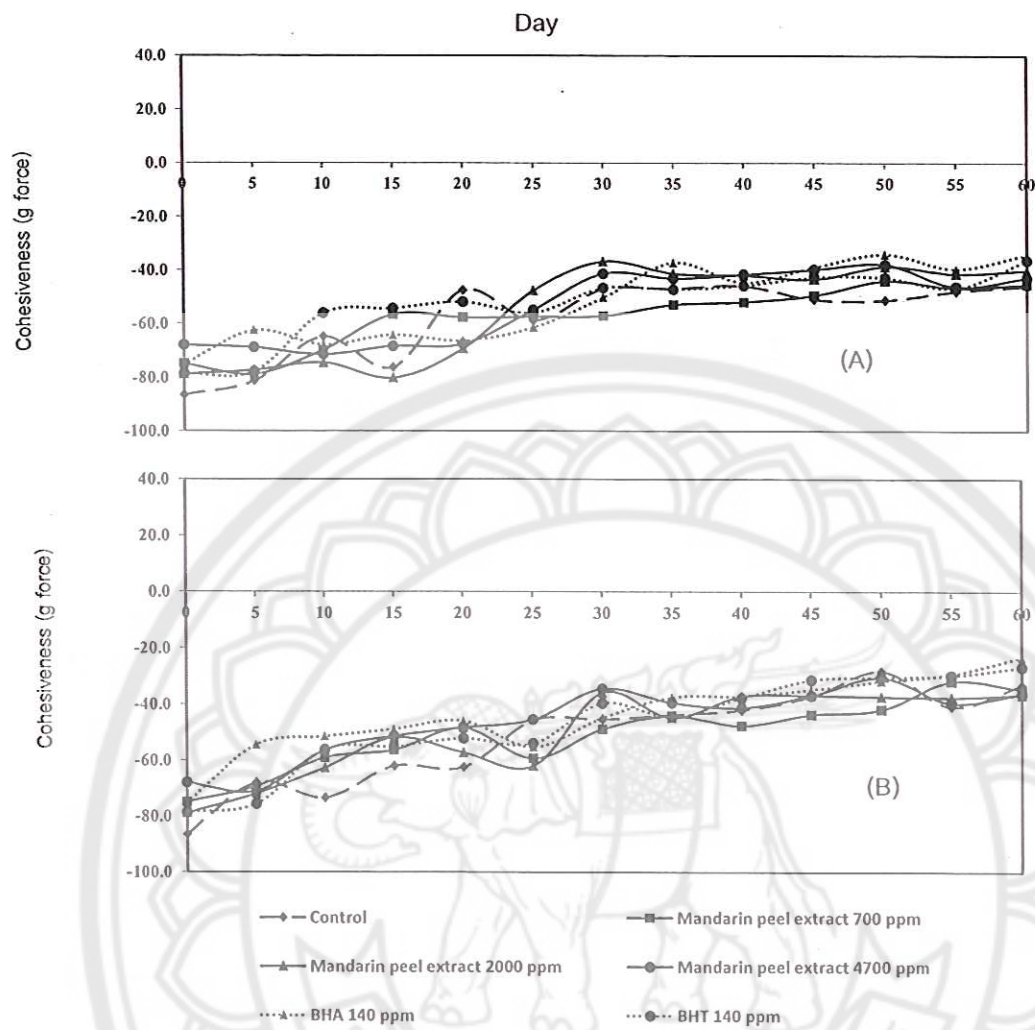
ทุกพารามิเตอร์ที่ตรวจวัดเนื้อสัมผัสด้วยเครื่อง texture analyzer แสดงในภาพที่ 36-39 เมื่อเปรียบเทียบการเปลี่ยนแปลงด้านเนื้อสัมผัสของน้ำสลัดน้ำมันรำข้าว สูตรควบคุมกับใช้สารต้านออกซิเดชันจากเปลือกส้ม และใช้สารต้านออกซิเดชันสังเคราะห์ พบว่าเมื่อเก็บนานขึ้น น้ำสลัดมีความคงตัว ความแน่นเนื้อ และความหนืดลดลง โดยเฉพาะที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เนื่องจากอุณหภูมิที่สูงขึ้นสามารถทำลายอิมัลชันของน้ำสลัดได้ ทำให้เมล็ดไขมันที่หุ้มด้วยน้ำเกิดการรวมตัวกันทำให้เกิดเมล็ดที่ใหญ่ขึ้น ส่งผลให้ความคงตัว ความแน่นเนื้อ และความหนืดลดลง และเป็นสาเหตุทำให้น้ำสลัดเกิดการแยกชั้น (Liu, Xu and Guo, 2007) เมื่อเปรียบเทียบแต่ละสิ่งทดลอง พบว่าลักษณะการเปลี่ยนแปลงด้านเนื้อสัมผัสของทุกสิ่งทดลองมีรูปแบบการเปลี่ยนแปลงที่เหมือนกัน



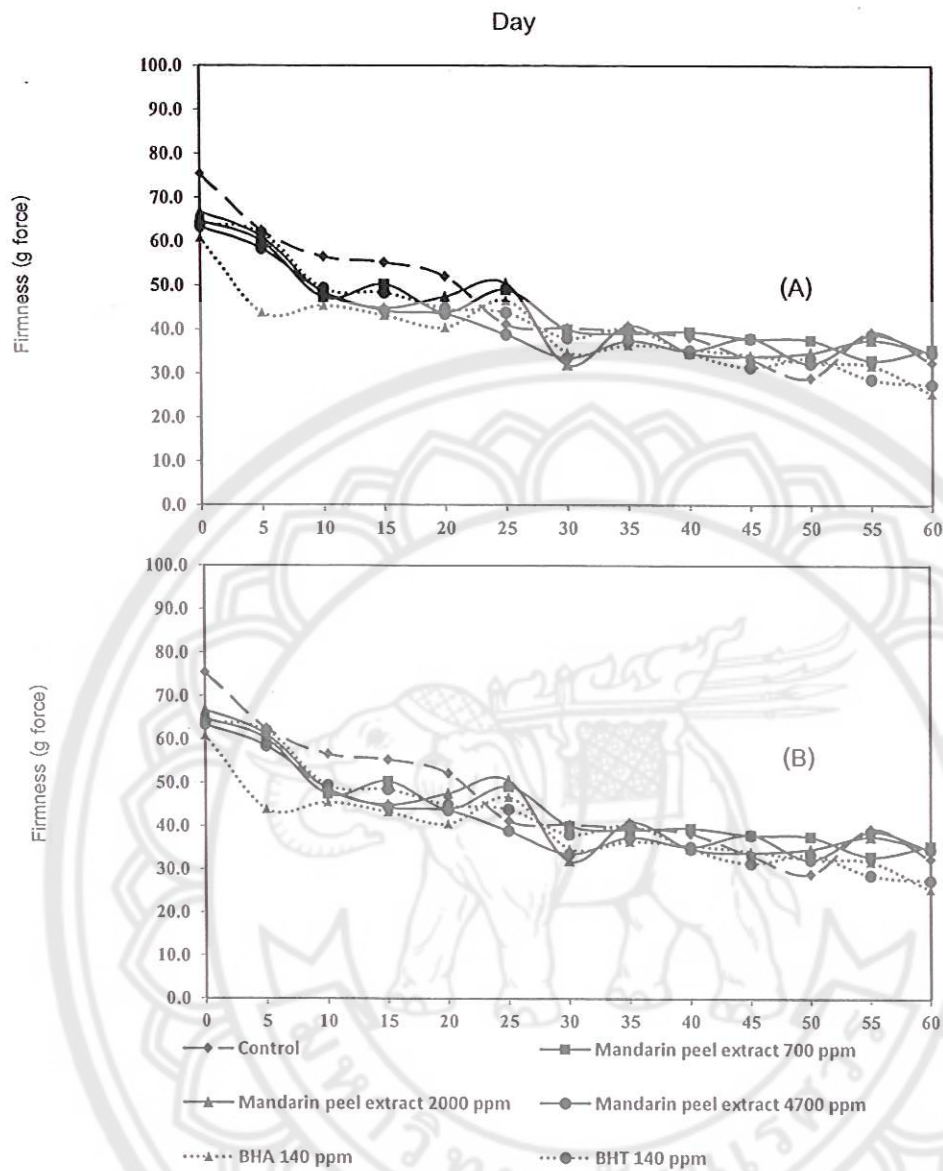
ภาพ 36 ความหนืด (Index of viscosity) ของน้ำสลัดที่เปลี่ยนแปลงระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส (A) และ 40 องศาเซลเซียส (B)



ภาพ 37 ความคงตัว (consistency) ของน้ำสลัดที่เปลี่ยนแปลงระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส (A) และ 40 องศาเซลเซียส (B)



ภาพ 38 การการยึดเกาะกันระหว่างอนุภาค (Cohesiveness) ของน้ำสลัดที่เปลี่ยนแปลงระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส (A) และ 40 องศาเซลเซียส (B)



ภาพ 39 ความแน่นเนื้อ (Firmness) ของน้ำสลัดที่เปลี่ยนแปลงระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส (A) และ 40 องศาเซลเซียส (B)

ปริมาณกรดไขมันอิสระในน้ำสลัดเริ่มต้นมีค่าประมาณ 0.5 % oleic of oil extract และเพิ่มปริมาณมากขึ้น ตามระยะเวลาการเก็บที่มากขึ้น น้ำสลัดที่เก็บที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในวันที่ 60 มีกรดไขมันอิสระ 3.5 – 4 เปอร์เซ็นต์ และที่เก็บที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส กรดไขมันอิสระมากถึง 4 – 4.5 เปอร์เซ็นต์ ดังภาพที่ 40 การเพิ่มปริมาณของกรดไขมันอิสระ เนื่องจากหลายสาเหตุ เช่น กรดที่เติมลงไป ในน้ำสลัด เอ็นไซม์ไลเปสในน้ำมัน และความชื้น สามารถทำให้เกิดการแตกตัวของไขมันอิสระจาก ไตรกลีเซอไรด์ได้ (Yi et al., 2013)

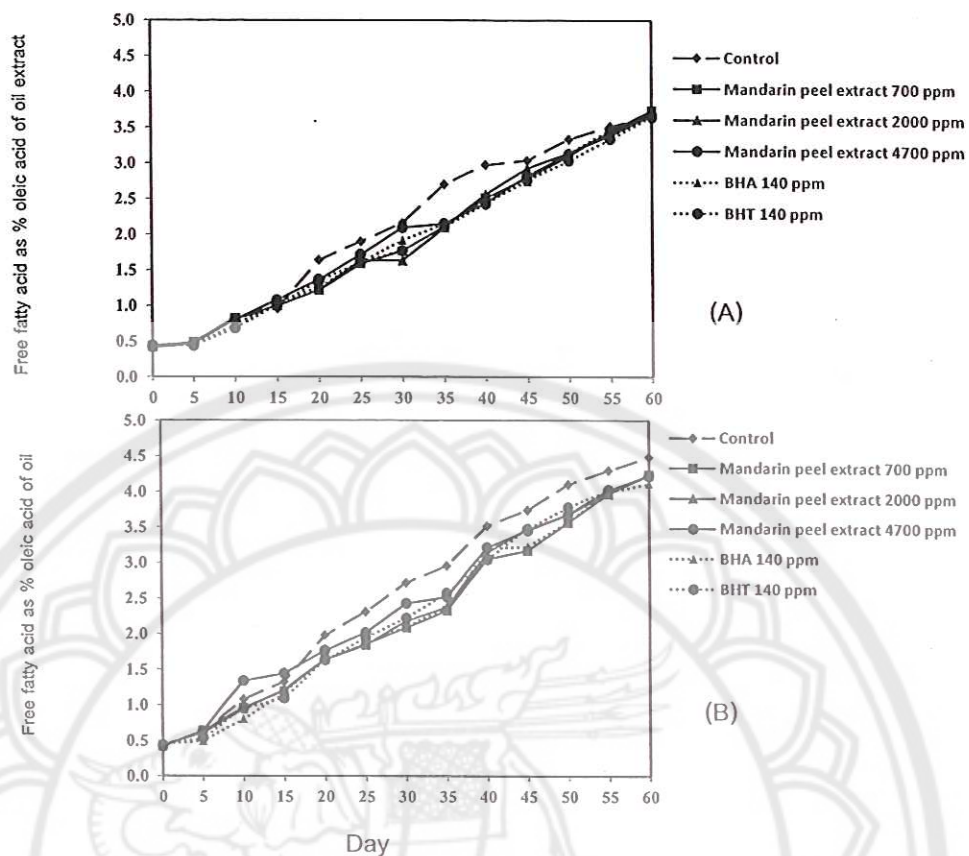
การใช้สารสกัดจากเปลือกส้มเพื่อต้านการเกิดออกซิเดชันในน้ำสลัดน้ำมันรำข้าวที่ 700 ppm สามารถต้านการเกิดออกซิเดชันได้ โดยชะลอการเกิด hydroperoxides จากการตรวจวัด peroxide value ดังภาพที่ 41 และ Thiobarbituric acid reactive substances (TBARs) ดังภาพที่ 42 หลังจากการเก็บเป็นระยะเวลา 60 วัน ตัวอย่างน้ำสลัดสูตรควบคุมมีค่า peroxide เพิ่มขึ้นมากกว่าน้ำสลัดใช้สารต้านออกซิเดชันจากเปลือกส้มที่ 700 และ 2,000 ppm และใช้สารต้านออกซิเดชันสังเคราะห์ BHA และ BHT

โดยน้ำสลัดสูตรควบคุมมีค่า peroxide สูงสุดในวันที่ 35 สำหรับตัวอย่างที่เก็บที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และสูงสุดในวันที่ 20 สำหรับตัวอย่างที่เก็บที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นค่า peroxide ลดลงอย่างรวดเร็วในขณะที่ค่า TBA เพิ่มขึ้น เนื่องจากการเกิดลิปิดออกซิเดชันมีปฏิกิริยาหลักอยู่ 2 อย่างคือ primary oxidation เกิด hydroperoxide และในขั้น secondary oxidation จะเปลี่ยน hydroperoxide ไปเป็น malondialdehyde ซึ่งมีกลิ่นเหม็นหืน (Velasco, Andersen and Skibsted, 2004; Papastergiadis, et al., 2012) อย่างไรก็ตาม การเปลี่ยนแปลงลักษณะที่กล่าวมาเกิดในน้ำสลัดที่ใช้สารต้านออกซิเดชันจากเปลือกส้มที่ 700 และ 2,000 ppm ได้ช้ากว่าสูตรควบคุม เนื่องจากการต้านออกซิเดชันของสารประกอบฟีนอลิกที่อยู่ในสารสกัดจากเปลือกส้มสามารถต้านการเกิดอนุมูลอิสระลดการเกิด hydroperoxide และ malondialdehyde

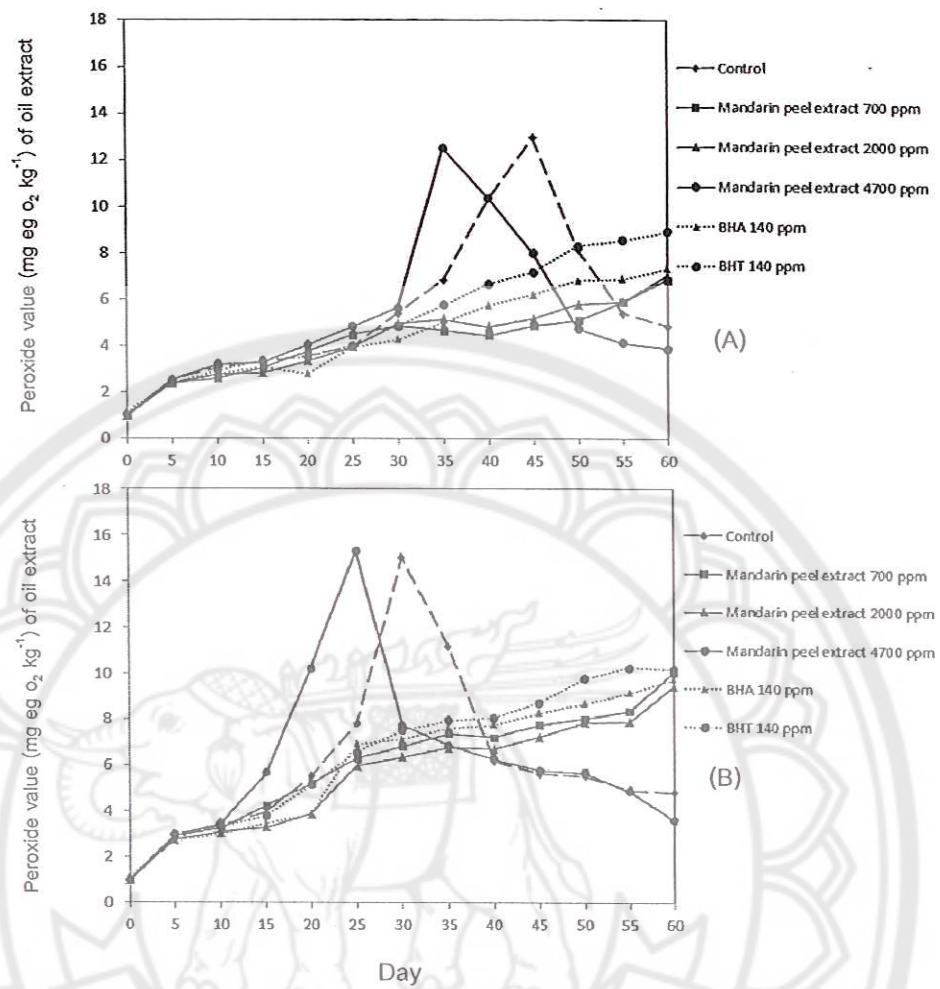
สารประกอบฟีนอลิกที่พบในสารสกัดเป็นฟลาโวนอยด์ ซึ่งเป็นฟีนอลิกที่ละลายน้ำ ดังนั้นจะละลายในส่วนของน้ำที่หุ้มเม็ดไขมันในน้ำสลัดซึ่งจะหลังสารป้องกันการเกิดออกซิเดชันบริเวณนี้ เป็นส่วนที่เกิดออกซิเดชันมากที่สุด เพราะบริเวณพื้นผิวของเม็ดไขมันจะสัมผัสกับออกซิเจนจากน้ำ และอากาศ (Tananuwong and Tewaruth, 2010; Li, et al., 2014)

ถึงแม้สารต้านออกซิเดชันจากเปลือกส้มจะสามารถต้านออกซิเดชันได้ดี แต่ก็ยังต้องใช้ในปริมาณที่มากกว่า BHA และ BHT ที่ใช้เพียง 140 ppm เนื่องจากการทำงานของ BHA และ BHT สามารถละลายได้ดีในน้ำมัน และมีฤทธิ์การต้านที่ดีกว่า แต่สารต้านออกซิเดชันจากเปลือกส้มถึงจะใช้มากถึง 700 ppm แต่เป็นสารสกัดจากธรรมชาติมีความปลอดภัยสูงกว่า

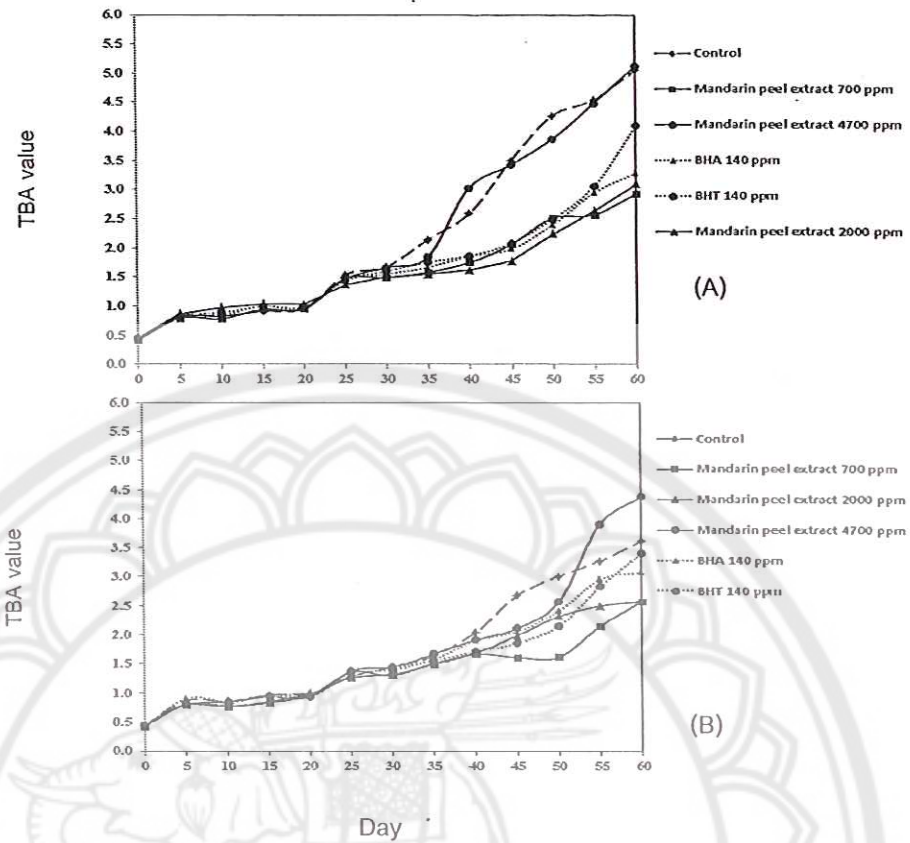
แต่การใช้สารสกัดจากเปลือกส้มสำหรับต้านออกซิเดชันก็มีข้อจำกัด กรณีน้ำสลัดที่ใช้สารสกัด 4,700 ppm ไม่สามารถชะลอการเกิดออกซิเดชันได้ แต่สามารถเกิดออกซิเดชันได้ดีทั้งในขั้นตอน primary oxidation และในขั้น secondary oxidation เนื่องจากฟลาโวนอยด์เป็น proantioxidant สามารถทำหน้าที่เป็นอนุมูลอิสระได้ในกรณีที่มีมากเกินไป (Hernández, et al., 2009; Beker, et al., 2011)



ภาพ 40 ปริมาณกรดไขมันอิสระ (เทียบกับกรดโอเลอิก) ของน้ำสลัดที่เปลี่ยนแปลงระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส (A) และ 40 องศาเซลเซียส (B)



ภาพ 41 ค่าเปอร์ออกไซด์ของน้ำสลัดที่เปลี่ยนแปลงระหว่างการรักษาที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส (A) และ 40 องศาเซลเซียส (B)



ภาพ 42 ค่า TBARS ของน้ำสลัดที่เปลี่ยนแปลงระหว่างการรักษาที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส (A) และ 40 องศาเซลเซียส (B)

บทที่ 5

บทสรุป

สรุปผลการวิจัย

จากงานวิจัยนี้สามารถนำเปลือกส้มซึ่งเป็นวัสดุเหลือทิ้งจากการบริโภคที่มีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ และมีปริมาณฟีนอลิกสูง โดยสารฟีนอลิกที่มีบทบาทสำคัญสำหรับการต้านอนุมูลอิสระ DPPH, ABTS และ FRAP คือ เฮสเปอร์ดิน มาดำเนินการเกิดไลปิดออกซิเดชันในน้ำสลัดได้ โดยอะซิโตนที่ความเข้มข้น 80 เปอร์เซ็นต์ เป็นสารสกัดที่เหมาะสมที่สามารถสกัดสารประกอบฟีนอลิกออกมาได้ปริมาณมากที่สุด และมีฤทธิ์สูงสุด เมื่อใช้วิธีการสกัดด้วยคลื่นเสียงที่มีพลังงานต่ำ

สภาวะการสกัดที่อุณหภูมิ 48 องศาเซลเซียส ระยะเวลาการสกัดนาน 40 นาที และใช้กำลังไฟฟ้าของแหล่งกำเนิดคลื่นเสียงที่ 57.34 วัตต์ เป็นสภาวะที่ได้จากการทำนายสมการ โดยคำนวณจาก quadratic polynomial model เป็นสภาวะที่เหมาะสมต่อการสกัดสารต้านอนุมูลอิสระจากเปลือกส้ม โดยสภาวะดังกล่าวสามารถสกัดสารประกอบฟีนอลิกได้ออกมาปริมาณมากที่สุด และมีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ FRAP สูงที่สุด โดยสมการที่ได้แต่ละสมการเพื่อใช้ทำนาย ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด ฟลาโวนอยด์ เฮสเปอร์ดิน นาวินจีน และมีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ FRAP สามารถทำนายได้แม่นยำมากกว่า 90 เปอร์เซ็นต์

วิธีการสกัดสารต้านอนุมูลอิสระจากเปลือกส้ม ด้วยการใช้คลื่นเสียงช่วยในขบวนการสกัด โดยใช้สภาวะที่เหมาะสมข้างต้นสามารถสกัดสารสกัดจากเปลือกส้มได้ดีกว่าการสกัดด้วยวิธีแบบเดิม สามารถให้ปริมาณสารสกัดมากกว่า 1.77 เท่า นอกจากนี้ยังมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิก และฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระสูงกว่า

สารสกัดจากเปลือกส้มสามารถนำมาประยุกต์ใช้เพื่อดำเนินการเกิดไลปิดออกซิเดชันในน้ำสลัดได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยการใช้สารสกัดที่ความเข้มข้น 700 ppm สามารถยับยั้งการเกิดออกซิเดชันได้ดีกว่าสูตรควบคุม และยังยับยั้งได้เทียบเท่าสารต้านออกซิเดชันสังเคราะห์ชนิด BHA และ BHT ที่ 140 ppm นอกจากนี้สารสกัดจากเปลือกส้มความเข้มข้น 700 ppm สามารถชะลอการเกิดปฏิกิริยาสีน้ำตาลในน้ำสลัดได้

เอกสารอ้างอิง

- คณะทำงานย่อยสำรวจข้อมูลไม้ผลเศรษฐกิจ. 20 พฤษภาคม 2554. สถานการณ์การผลิตผลไม้ปี 2553. สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. สืบค้นเมื่อ 10 มิถุนายน 2554, จาก http://www.oae.go.th/ewt_news.php?nid=89918filename=index
- จันทร์ลัดดา โชติรัตนดิถ. 2544. การวิเคราะห์ลิโมนีนในเปลือกส้มโดยแก๊สโครมาโทกราฟี. รายงานการวิจัย, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าพระนครเหนือ.
- นิรมล ศักดิ์สกุลชาญ. 2548. การดัดแปรแป้งข้าวที่มีปริมาณอะมิโลสต่างกันด้วยกรดเพื่อทดแทนไขมันในน้ำสลัด. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- โสภา วัชรคุปต์, ปรีชา บุญจง, จันทนา บุญยะรัตน์ และมาลีรักษ์ อัดดีสินทอง. 2549. สารต้านอนุมูลอิสระ (Radical scavenging agents). สำนักพิมพ์ พี. เอส. พรินท์, กรุงเทพฯ.
- Anagnostopoulou, M.A., Kefalas, P., Papageorgiou, V.P., Assimopoulou, A.N. and Boskou, D. (2006). Radical scavenging activity of various extracts and fractions of sweet orange peel (*Citrus sinensis*). *Food Chemistry*, 94(1), 19-25.
- AOAC. (2000). Association of Official Analytical Chemists. Official methods of Analysis. 17th ed. International. Galthesbury, Maryland. 2087-2417, USA.
- Babbar, N., Oberoi, H.S., Uppal, D.S. and Patil, R.T. (2011). Total phenolic content and antioxidant capacity of extracts obtained from six important fruit residues. *Food Research International*, 44(1), 391-396.
- Beker, B.Y., Bakır, T., Sönmezoğlu, I., İmer, F. and Apak, R. (2011). Antioxidant protective effect of flavonoids on linoleic acid peroxidation induced by copper(ii)/ascorbic acid system. *Chemistry and Physics of Lipids*, 164(8), 732-739.
- Benavente-García, O., Castillo, J., Marin, F.R., Ortuño, A. and Del Río, J.A. (1997). Uses and properties of citrus flavonoids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45(12), 4505-4515.
- Biesaga, M. (2011). Influence of extraction methods on stability of flavonoids. *Journal of Chromatography A*, 1218(18), 2505-2512.
- Bocco, A., Cuvelier, M.-E., Richard, H. and Berset, C. (1998). Antioxidant activity and phenolic composition of citrus peel and seed extracts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(6), 2123-2129.

- Chemat, F., Zill e, H. and Khan, M.K. (2011). Applications of ultrasound in food technology: Processing, preservation and extraction. *Ultrasonics Sonochemistry*, 18(4), 813-835.
- Di Mattia, C.D., Sacchetti, G., Mastrocola, D. and Pittia, P. (2009). Effect of phenolic antioxidants on the dispersion state and chemical stability of olive oil o/w emulsions. *Food Research International*, 42(8), 1163-1170.
- Ejaz, S., Ejaz, A., Matsuda, K. and Lim, C.W. (2006). Limonoids as cancer chemopreventive agents. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 86(3), 339-345.
- Finotti, E. and Di Majo, D. (2003). Influence of solvents on the antioxidant property of flavonoids. *Food / Nahrung*, 47(3), 186-187.
- González-Molina, E., Domínguez-Perles, R., Moreno, D.A. and García-Viguera, C. (2010). Natural bioactive compounds of citrus limon for food and health. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 51(2), 327-345.
- Gorinstein, S., Martín-Belloso, O., Park, Y.S., Haruenkit, R., Lojek, A., Čiř, M., Caspi, A., Libman, I. and Trakhtenberg, S. (2001). Comparison of some biochemical characteristics of different citrus fruits. *Food Chemistry*, 74(3), 309-315.
- Goulas, V. and Manganaris, G.A. (2012). Exploring the phytochemical content and the antioxidant potential of citrus fruits grown in cyprus. *Food Chemistry*, 131(1), 39-47.
- Hemwimol, S., Pavasant, P. and Shotipruk, A. (2006). Ultrasound-assisted extraction of anthraquinones from roots of *morinda citrifolia*. *Ultrasonics Sonochemistry*, 13(6), 543-548.
- Hernández, I., Alegre, L., Van Breusegem, F. and Munné-Bosch, S. (2009). How relevant are flavonoids as antioxidants in plants? *Trends in Plant Science*, 14(3), 125-132.
- Horax, R., Hettiarachchy, N. and Islam, S. (2005). Total phenolic contents and phenolic acid constituents in 4 varieties of bitter melons (*momordica charantia*) and antioxidant activities of their extracts. *Journal of Food Science*, 70(4), C275-C280.
- Huang, D., Ou, B. and Prior, R.L. (2005). The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(6), 1841-1856.
- Hurtado-Fernández, E., Gómez-Romero, M., Carrasco-Pancorbo, A. and Fernández-Gutiérrez, A. (2010). Application and potential of capillary electroseparation methods to determine antioxidant phenolic compounds from plant food material. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 53(5), 1130-1160.

- Khan, M.K., Abert-Vian, M., Fabiano-Tixier, A.S., Dangles, O. and Chemat, F. (2010). Ultrasound-assisted extraction of polyphenols (flavanone glycosides) from orange (*Citrus sinensis* L.) peel. *Food Chemistry*, 119(2), 851-858.
- Kim, J.H. and Kim, M.Y. (2011). Effect of citrus waste substrate on the production of bioactive component, and antioxidant and antitumor activity of *Grifola frondosa*. *Life Science Journal*, 8(3), 564-571.
- Li, C.-Y., Kim, H.-W., Li, H., Lee, D.-C. and Rhee, H.-I. (2014). Antioxidative effect of purple corn extracts during storage of mayonnaise. *Food Chemistry*, 152(0), 592-596.
- Li, Y., Fabiano-Tixier, A.S., Tomao, V., Cravotto, G. and Chemat, F. (2013). Green ultrasound-assisted extraction of carotenoids based on the bio-refinery concept using sunflower oil as an alternative solvent. *Ultrasonics Sonochemistry*, 20(1), 12-18.
- Liu, H., Xu, X.M. and Guo, S.D. (2007). Rheological, texture and sensory properties of low-fat mayonnaise with different fat mimetics. *LWT - Food Science and Technology*, 40(6), 946-954.
- Londoño-Londoño, J., Lima, V.R.D., Lara, O., Gil, A., Pasa, T.B.C., Arango, G.J. and Pineda, J.R.R. (2010). Clean recovery of antioxidant flavonoids from citrus peel: Optimizing an aqueous ultrasound-assisted extraction method. *Food Chemistry*, 119(1), 81-87.
- Ma, Y.-Q., Chen, J.-C., Liu, D.-H. and Ye, X.-Q. (2009). Simultaneous extraction of phenolic compounds of citrus peel extracts: Effect of ultrasound. *Ultrasonics Sonochemistry*, 16(1), 57-62.
- Ma, Y., Ye, X., Hao, Y., Xu, G., Xu, G. and Liu, D. (2008a). Ultrasound-assisted extraction of hesperidin from pengan (*Citrus reticulata*) peel. *Ultrasonics Sonochemistry*, 15(3), 227-232.
- Ma, Y.Q., Chen, J.C., Liu, D.H. and Ye, X.Q. (2008b). Effect of ultrasonic treatment on the total phenolic and antioxidant activity of extracts from citrus peel. *Journal of Food Science*, 73(8), T115-T120.
- Moulehi, I., Bourgou, S., Ourghemmi, I. and Tounsi, M.S. (2012). Variety and ripening impact on phenolic composition and antioxidant activity of mandarin (*Citrus reticulata* blanco) and bitter orange (*Citrus aurantium* L.) seeds extracts. *Industrial Crops and Products*, 39(0), 74-80.

- Moure, A., Cruz, J.M., Franco, D., Domínguez, J.M., Sineiro, J., Domínguez, H., José Núñez, M.a. and Parajó, J.C. (2001). Natural antioxidants from residual sources. *Food Chemistry*, 72(2), 145-171.
- Musa, K., Abdullah, A., Jusoh, K. and Subramaniam, V. (2011). Antioxidant activity of pink-flesh guava (*psidium guajava* l.): Effect of extraction techniques and solvents. *Food Anal. Methods*, 4(1), 100-107.
- Oboh, G. and Ademosun, A.O. (2012). Characterization of the antioxidant properties of phenolic extracts from some citrus peels. *Journal of Food Science and Technology*, 49(6), 729-736.
- Pan, G., Yu, G., Zhu, C. and Qiao, J. (2012). Optimization of ultrasound-assisted extraction (uae) of flavonoids compounds (fc) from hawthorn seed (hs). *Ultrasonics Sonochemistry*, 19(3), 486-490.
- Papastergiadis, A., Mubiru, E., Van Langenhove, H. and De Meulenaer, B. (2012). Malondialdehyde measurement in oxidized foods: Evaluation of the spectrophotometric thiobarbituric acid reactive substances (tbars) test in various foods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(38), 9589-9594.
- Pazos, M., Gallardo, J.M., Torres, J.L. and Medina, I. (2005). Activity of grape polyphenols as inhibitors of the oxidation of fish lipids and frozen fish muscle. *Food Chemistry*, 92(3), 547-557.
- Peterson, J.J., Beecher, G.R., Bhagwat, S.A., Dwyer, J.T., Gebhardt, S.E., Haytowitz, D.B. and Holden, J.M. (2006). Flavanones in grapefruit, lemons, and limes: A compilation and review of the data from the analytical literature. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19, Supplement(0), S74-S80.
- Prior, R.L., Wu, X. and 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(10), 4290-4302.
- Procházková, D., Boušová, I. and Wilhelmová, N. (2011). Antioxidant and prooxidant properties of flavonoids. *Fitoterapia*, 82(4), 513-523.
- Ramful, D., Bahorun, T., Bourdon, E., Tarnus, E. and Aruoma, O.I. (2010). Bioactive phenolics and antioxidant propensity of flavedo extracts of mauritian citrus fruits: Potential prophylactic ingredients for functional foods application. *Toxicology*, 278(1), 75-87.

- Robards, K., Prenzler, P.D., Tucker, G., Swatsitang, P. and Glover, W. (1999). Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits. *Food Chemistry*, 66(4), 401-436.
- Smittle, R.B. (2000). Microbiological safety of mayonnaise, salad dressings, and sauces produced in the united states: A review. *Journal of Food Protection*, 63(8), 1144-1153.
- Su, M.-S., Shyu, Y.-T. and Chien, P.-J. (2008). Antioxidant activities of citrus herbal product extracts. *Food Chemistry*, 111(4), 892-896.
- Tananuwong, K. and Tewaruth, W. (2010). Extraction and application of antioxidants from black glutinous rice. *LWT - Food Science and Technology*, 43(3), 476-481.
- Thitima, K., Sakamon, D. and Naphaporn, C. (2009). Evolution of antioxidant compounds in lime residues during drying. *Food Chemistry*, 113(944-949).
- Tian, Y., Xu, Z., Zheng, B. and Martin Lo, Y. (2013). Optimization of ultrasonic-assisted extraction of pomegranate (*punica granatum l.*) seed oil. *Ultrasonics Sonochemistry*, 20(1), 202-208.
- Tripoli, E., Guardia, M.L., Giammanco, S., Majo, D.D. and Giammanco, M. (2007). Citrus flavonoids: Molecular structure, biological activity and nutritional properties: A review. *Food Chemistry*, 104(2), 466-479.
- Velasco, J.n., Andersen, M.L. and Skibsted, L.H. (2004). Evaluation of oxidative stability of vegetable oils by monitoring the tendency to radical formation. A comparison of electron spin resonance spectroscopy with the rancimat method and differential scanning calorimetry. *Food Chemistry*, 85(4), 623-632.
- Wang, Y.-C., Chuang, Y.-C. and Hsu, H.-W. (2008). The flavonoid, carotenoid and pectin content in peels of citrus cultivated in taiwan. *Food Chemistry*, 106(1), 277-284.
- Yi, J., Zhu, Z., Dong, W., McClements, D.J. and Decker, E.A. (2013). Influence of free fatty acids on oxidative stability in water-in-walnut oil emulsions. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 115(9), 1013-1020.
- Yusof, S., Ghazali, H.M. and King, G.S. (1990). Naringin content in local citrus fruits. *Food Chemistry*, 37(2), 113-121.
- Zhou, L. and Elias, R.J. (2013). Antioxidant and pro-oxidant activity of (–)-epigallocatechin-3-gallate in food emulsions: Influence of ph and phenolic concentration. *Food Chemistry*, 138(2–3), 1503-1509.

Zia ur, R. (2006). Citrus peel extract – a natural source of antioxidant. *Food Chemistry*, 99(3), 450-454.





ภาคผนวก ก
การวิเคราะห์ทางกายภาพ

มหาวิทยาลัยพระนคร

1. การวิเคราะห์คุณลักษณะเนื้อสัมผัส

ใช้วัดลักษณะความแน่นเนื้อ (firmness) ความหนืด (viscosity) ความคงตัว (consistency) และการเกาะกันระหว่างอนุภาค (cohesiveness)

1.1. อุปกรณ์

1.1.1. เครื่อง Texture Analyzer รุ่น TA.XT.plus บริษัท Charpa Techcenter Co.,Ltd.

TA Settings: Mode	Measure Force in Compression
Option	Return To Start
Pre-Test Speed	1.0 mm/s
Test Speed	1.0 mm/s
Post-Test Speed	10.0 mm/s
Distance	2.5 mm
Trigger Type	Auto – 3 g
Tare Mode	Auto
Data Acquisition Rate	200 pps
หัววัด A/BE	

1.2. วิธีการ

1.2.1. เปิดเครื่อง Computer

1.2.2. เปิดเครื่อง Texture Analyzer

1.2.3. เข้าโปรแกรม Texture Exponent 32

1.2.4. เปิด Graph Texture โดยเลือก File Menu เลือก Graph

1.2.5. Calibrate Force สังเกตค่า Capacity ว่าถูกต้องหรือไม่ แล้วกด Next พิมพ์น้ำหนักลูกตุ้มที่ใช้ จากนั้นวางตุ้มน้ำหนัก กด Next กด Finish

1.2.6. Calibrate Height ควรตั้ง Return Distance สูงกว่าความสูงตัวอย่าง

1.2.7. Texture Analyzer Setting เลือก Library เพื่อกำหนดรูปแบบการวัด และตั้งค่า Value เพื่อกำหนดการเคลื่อนที่ของ Probe

1.2.8. Texture Analyzer Run a Test

1.2.8.1. เขียนรายละเอียด และเลือก Drive ที่ต้องการบันทึกข้อมูลเพื่อให้สามารถเรียกใช้ได้

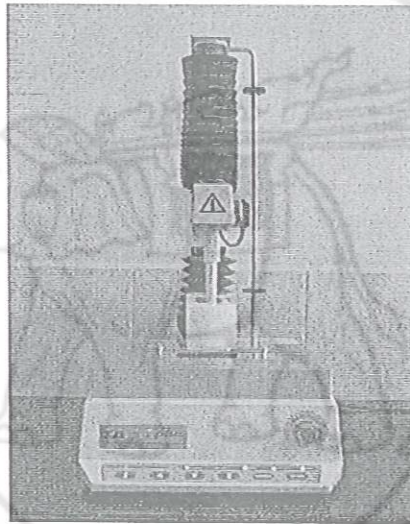
1.2.8.2. เลือกชนิด Probe ให้ตรงกับ Probe ที่ใช้เสมอ

1.2.8.3. เลือก Parameter ที่ต้องการวัดขึ้นอยู่กับจุดประสงค์ที่ต้องการวัด

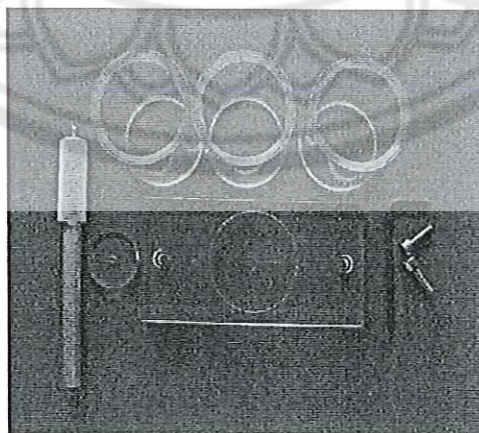
1.2.8.4. เลือก Data acquisition เพื่อกำหนดอัตราการเก็บข้อมูล (Point Per Sec.)

1.2.9. การ Run Macro

- 1.2.9.1. ไม่มีสูตร เลือก Graph ที่ต้องการวัด กด View Select Only ทดสอบเขียนสูตรเพื่อให้ได้สูตรที่ต้องการ เลือก Record Macro เพื่อเขียนสูตร บันทึก Macro โดยตั้งชื่อสูตรตามค่าที่วิเคราะห์เลือก Graph ทุก Graph ที่ต้องการ กด Run Macro แสดง Graph ทีละ Graph ตรวจสอบความถูกต้องของตำแหน่งที่ Cursor ที่ Click OK เมื่อตำแหน่งที่ถูกต้อง วิเคราะห์ผลที่ได้
- 1.2.9.2. มีสูตร ตรวจสอบชื่อสูตร บันทึก Macro โดยตั้งชื่อสูตรตามที่วิเคราะห์ เลือก Graph ทุก Graph ที่ต้องการ กด Run ชื่อ Macro แสดง Graph ทีละ Graph ตรวจสอบความถูกต้องตรงตำแหน่งที่ Cursor ที่ Click OK เมื่อตำแหน่งที่ถูกต้อง วิเคราะห์ผลที่ได้



ภาพผนวก 1 การวัดเนื้อสัมผัสน้ำสลัดน้ำมันรำข้าว



ภาพผนวก 2 ลักษณะหัววัด A/BE สำหรับวัดความหนืด และความคงตัวในน้ำสลัดข้าว

2. การวิเคราะห์คุณสมบัติด้านสี

2.1. อุปกรณ์

2.1.1. เครื่อง Hunter Lab รุ่น Hunter Lab Colorflex 4510

2.1.2. ถ้วยใส่ตัวอย่าง

2.2. วิธีการ

2.2.1. เปิดเครื่องคอมพิวเตอร์ เข้าโปรแกรม

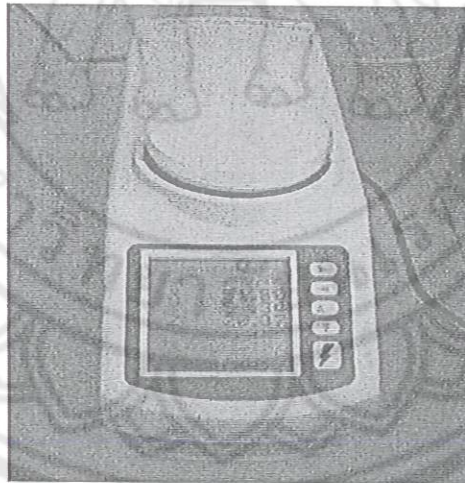
2.2.2. ทำการ Standardize ที่ปรากฏอยู่ด้านหน้าโปรแกรม Linivese เครื่องจะโชว์หน้าจอดัดตั้ง mode, area view size และ livfilter เลือกแล้วคลิก OK

2.2.3. วางแผ่น Black Glass, light trap ตามแต่ mode ของการวัด และรุ่นของเครื่องตามตำแหน่งที่โปรแกรมแจ้งมา

2.2.4. วางแผ่น White Tile ตามตำแหน่งที่โปรแกรมแจ้งมา

2.2.5. จบขั้นตอนของการ Standardize เครื่องพร้อมสำหรับใช้งาน

2.2.6. ทำการวัดตัวอย่าง แล้วอ่านค่า L^* , a^* และ b^*



ภาพผนวก 3 การวัดค่าสีตัวอย่างน้ำสลัด

ภาคผนวก ข
การวิเคราะห์ทางเคมี



1. การหาปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด (Anagnostopoulou, et al., 2006)

- 1.1 นำของเหลวที่สกัดได้จากเปลือกผลไม้ตระกูลส้มปริมาตร 1 มิลลิลิตร มาเจือจางด้วยตัวทำละลายในขวดปรับปริมาตร 10 มิลลิลิตร จนได้สกัดสารสกัดปริมาณสุดท้ายที่ 10 มิลลิลิตร
- 1.2 นำตัวอย่างที่เจือจางแล้วในข้อ 1.1 มา 0.5 มิลลิลิตร ผสมกับสาร 0.5 มิลลิลิตร ของสาร Folin-Ciocalteu's ที่ให้ทำปฏิกิริยานาน 3 นาที
- 1.3 เติม 1 มิลลิลิตร ของโซเดียมคาร์บอเนตอิมตัว (25 กรัม โซเดียมคาร์บอเนตละลายด้วยน้ำกลั่น 20 มิลลิลิตร)
- 1.4 เจือจางตัวอย่างด้วยน้ำกลั่น 5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน และทิ้งไว้ให้ทำปฏิกิริยานาน 1 ชั่วโมง ในที่มืด
- 1.5 การเตรียม blank เตรียมทุกอย่างดังข้อที่ 1.1-1.4 เพียงแต่ไม่ใส่ตัวอย่าง
- 1.6 นำ blank และตัวอย่างไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 725 nm
- 1.7 นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปคำนวณโดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของกรดแกลลิก คำนวณในรูปของ มิลลิกรัมสมมูลต่อกรดแกลลิก 100 กรัม ของน้ำหนักแห้ง

2. การหาปริมาณฟลาโวนอยด์ (Ramful, et al., 2010)

- 2.1 นำของเหลวที่สกัดได้จากเปลือกผลไม้ตระกูลส้มปริมาตร 1 มิลลิลิตร มาเจือจางด้วยตัวทำละลายในขวดปรับปริมาตร 10 มิลลิลิตร จนได้สกัดสารสกัดปริมาณสุดท้ายที่ 10 มิลลิลิตร
- 2.2 นำตัวอย่างที่เจือจางแล้ว 2.5 มิลลิลิตร ผสมกับ 150 ไมโครลิตร โซเดียมไนไตรท์ความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ ที่ให้ทำปฏิกิริยานาน 5 นาที
- 2.3 เติมอลูมิเนียมคลอไรด์ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 150 ไมโครลิตร ที่ให้ทำปฏิกิริยานาน 1 นาที
- 2.4 เติมโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 1 โมล จำนวน 1 มิลลิลิตร ลงในตัวอย่างผสมให้เข้ากัน
- 2.5 การเตรียม blank เตรียมทุกอย่างดังข้อที่ 2.1-2.4 เพียงแต่ไม่ใส่ตัวอย่าง
- 2.6 นำ blank และตัวอย่างไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 510 nm
- 2.7 นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปคำนวณโดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของควอเซอริน คำนวณในรูปของ มิลลิกรัมสมมูลต่อควอเซอริน 100 กรัม ของน้ำหนักแห้ง

3. การหาปริมาณ เฮสเปอร์ดิซิน (Hesperidin) และ นารินจีน (naringin) (Khan, et al., 2010)
 - 3.1 การวิเคราะห์สารดังกล่าวใช้ เครื่อง HPLC ที่มี UV-visible detector ที่ 280 nm โดยใช้ คอลัมน์ C18 reversed-phase (Agilent TC-C18 250 mm x 4.6 mm, 5 μ m) อุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส
 - 3.2 ซีดตัวอย่างที่สกัดได้ปริมาตร 20 ไมโครลิตร โดยใช้ mobile phase 2 ชนิด คือ mobile phase A แอซิติกความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ และ mobile phase B อะซิโตไนไตรท์ 100 เปอร์เซ็นต์
 - 3.3 การเปลี่ยนแปลงของ mobile phase ทั้ง 2 ชนิด ระหว่างการวิเคราะห์ตัวอย่างมีการเปลี่ยนแปลงของ mobile phase B แบบ linear solvent gradient ที่เวลา 0-10 นาที mobile phase B เพิ่มจาก 10-30%, เวลา 20-25 นาที mobile phase B เพิ่มจาก 30-35% และ คงที่ 35% ที่ 25-30 นาที
 - 3.4 ระหว่างการวิเคราะห์มี flow rate ที่ 1 มิลลิลิตรต่อนาที
 - 3.5 นำพื้นที่ใต้กราฟที่ได้ไปคำนวณโดย พื้นที่ใต้กราฟมาตรฐาน คำนวณในรูปของ มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม ของน้ำหนักแห้ง
4. การวิเคราะห์ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี Ferric reducing antioxidant power (Ma, et al., 2008b)
 - 4.1 การเตรียมสารละลาย FRAP เตรียมโดย
 - 4.1.1 อะซิเตดบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 200 mM ที่ pH 3.6
 - 4.1.2 2,4,6-tripyridyl-s-triazine (TPTZ) ความเข้มข้น 10 mM ละลายด้วย 40 mM HCL
 - 4.1.3 สารละลาย ferric chloride ที่ความเข้มข้นที่ 20 mM ละลายในน้ำกลั่น
 - 4.1.4 ผสมสารทั้ง 3 ในอัตราส่วน 10:1:1 (4.1.1: 4.1.2: 4.1.3) โดยปริมาตร สำหรับการทดลองนี้ผสมอัตราส่วน 50: 5: 5 มิลลิลิตร
 - 4.2 นำของเหลวที่สกัดได้จากเปลือกผลไม้ตระกูลส้มปริมาณ 1 มิลลิลิตร มาเจือจางตัวทำละลายในขวดปรับปริมาตร 10 มิลลิลิตร จนได้สกัดสารสกัดปริมาณสุดท้ายที่ 10 มิลลิลิตร
 - 4.3 นำตัวอย่างที่เจือจางแล้ว 100 ไมโครลิตร ผสมกับ 4900 ไมโครลิตร ของสารละลาย FRAP ผสมให้เข้ากัน และทิ้งให้ทำปฏิกิริยานาน 30 นาที ในที่มืด
 - 4.4 การเตรียม blank เตรียมทุกอย่างดังข้อที่ 4.2-4.3 เพียงแต่ไม่ใส่ตัวอย่าง

- 4.5 นำ blank และตัวอย่างไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 593 nm
- 4.6 นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปคำนวณโดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของ trolox (เป็นวิตามินอี ในรูปที่ละลายน้ำได้) คำนวณในรูปของมิลลิกรัมสมมูล trolox ต่อ 100 กรัม ของน้ำหนักแห้ง (TEAC)
5. การวิเคราะห์ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH radical scavenging activity (Anagnostopoulou, et al., 2006)
- 5.1 การวิเคราะห์ทำในรูปแบบ IC₅₀ โดยเตรียมตัวอย่างสารสกัดจากเปลือกส้มที่ความเข้มข้นต่างๆ กัน ประมาณ 5 ความเข้มข้นเพื่อนำมาสร้างกราฟได้
- 5.2 นำตัวอย่างสารสกัด 1 มิลลิลิตร ผสมกับ 2 มิลลิลิตร ของ 0.1 mM DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) ที่เตรียมในเมทานอล
- 5.3 การเตรียม blank ทำทุกอย่างเหมือนตัวอย่างเพียงแต่ไม่ใส่ตัวอย่าง
- 5.4 นำตัวอย่างและ blank ทิ้งไว้ในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที
- 5.5 นำ blank และตัวอย่างไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 517 nm
- 5.6 นำมาคำนวณหาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ DPPH ดังสมการต่อไปนี้
- ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ DPPH (%) =
$$\frac{[(\text{ค่าการดูดกลืนแสง}_{\text{control}} - \text{ค่าการดูดกลืนแสง}_{\text{sample}}) / \text{ค่าการดูดกลืนแสง}_{\text{control}}] * 100}{}$$
- 5.7 การคำนวณหา IC₅₀ หน่วยมิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยการสร้างกราฟระหว่างความเข้มข้นแต่ละความเข้มข้นกับเปอร์เซ็นต์การต้านอนุมูลอิสระ DPPH จะได้สมการ linear regression และแทนค่าสมการที่การต้านอนุมูลอิสระ DPPH 50% ต้องใช้ตัวอย่างที่ความเข้มข้นเท่าไร
6. การวิเคราะห์ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS radical scavenging activity (Babbar, et al., 2011)
- 6.1 การเตรียมสารละลาย ABTS เตรียมโดย
- 6.1.1 ไปแทชเซียมเปอร์ซัลเฟต ที่ความเข้มข้นที่ 2.45 mM
- 6.1.2 ABTS ที่ความเข้มข้น 7 mM
- 6.1.3 ผสมสาร 6.1.1 กับ 6.1.2 ในอัตราส่วน 1:1 ทิ้งให้ทำปฏิกิริยาในที่มืดเป็นระยะเวลา 16 ชั่วโมง
- 6.1.4 นำสารที่เตรียมในข้อ 6.1.3 ไปเจือจางด้วยเอทานอลจนได้ 0.7 ที่ความยาวคลื่นที่ 734 nm

6.2 การวิเคราะห์ทำในรูปแบบ IC₅₀ โดยเตรียมตัวอย่างสารสกัดจากเปลือกส้มที่ความเข้มข้นต่างๆ กัน ประมาณ 5 ความเข้มข้นเพื่อนำมาสร้างกราฟได้

6.3 นำตัวอย่างสารสกัด 100 ไมโครลิตร ผสมกับ 3.8 มิลลิลิตร ของสารละลาย ABTS ที่ให้ทำปฏิกิริยา 2 นาที

6.4 การเตรียม blank ทำทุกอย่างเหมือนตัวอย่างเพียงแต่ไม่ใส่ตัวอย่าง

6.5 นำ blank และตัวอย่างไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 734 nm

6.6 นำมาคำนวณหาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ DPPH ดังสมการต่อไปนี้

ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ ABTS (%) =

$$\left[\frac{\text{ค่าการดูดกลืนแสง}_{\text{control}} - \text{ค่าการดูดกลืนแสง}_{\text{sample}}}{\text{ค่าการดูดกลืนแสง}_{\text{control}}} \right] * 100$$

6.7 การคำนวณหา IC₅₀ หน่วยมิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยการสร้างกราฟระหว่างความเข้มข้นแต่ละความเข้มข้นกับเปอร์เซ็นต์การต้านอนุมูลอิสระ ABTS จะได้สมการ linear regression และแทนค่าสมการที่การต้านอนุมูลอิสระ ABTS 50% ต้องใช้ตัวอย่างที่ความเข้มข้นเท่าไร

7. การวิเคราะห์หาค่าเปอร์ออกไซด์ (Peroxide value) (AOAC, 2000)

7.1 ชั่งตัวอย่างน้ำมันประมาณ 5 กรัม ใส่ลงในฟลาค์สที่สะอาดและแห้ง ทำ blank ไปพร้อมกัน โดยไม่ต้องใส่ตัวอย่าง

7.2 เติมสารละลาย กรดอะซิติก-คลอโรฟอร์ม อัตราส่วน (3:2) ปริมาตร 30 มิลลิลิตรลงในฟลาค์ส

7.3 เติมสารละลายโพแทสเซียมไอโอไดด์อิ่มตัว ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตรลงใน (โพแทสเซียมไอโอไดด์ 25 กรัมละลายในน้ำ 20 มิลลิลิตร) ในฟลาค์สเขย่าประมาณ 1 นาที จากนั้นทิ้งไว้ในที่มีเวลานาน 5 นาที

7.4 เติมน้ำกลั่น 30 มิลลิลิตร และเติมน้ำแข็ง 0.5 มิลลิลิตร เป็นอินดิเคเตอร์

7.5 ไตรเอตรทสารละลายในฟลาค์สด้วยสารละลายโซเดียมไธโอซัลเฟตความเข้มข้น 0.01 โมลจนถึงจุดยุติ (สีม่วงดำจางหายไปหมดจนไม่มีสี)

7.6 บันทึกปริมาตรของสารละลายโซเดียมไธโอซัลเฟตที่ใช้กับน้ำมันตัวอย่าง คำนวณตามสมการดังต่อไปนี้ (= S มิลลิลิตร) และให้ใช้กับ blank (= B มิลลิลิตร)

7.7 การคำนวณ

$$\text{คำนวณค่าเปอร์ออกไซด์ (meq peroxide/kg fat)} = \frac{(S-B) \times N \times 1000}{\text{น้ำหนักตัวอย่าง(g)}}$$

คำนวณค่าเปอร์ออกไซด์ของถั่วลิสง (mg eq peroxide/kg oil extract)

$$= \frac{(S-B) \times N \times 1000}{\text{น้ำหนักตัวอย่าง(g)}}$$

โดยที่

S = จำนวนมิลลิลิตรของสารละลายโซเดียมไฮโอซัลเฟตที่ใช้ไตเตรตกับตัวอย่าง

B = จำนวนมิลลิลิตรของสารละลายโซเดียมไฮโอซัลเฟตที่ใช้ไตเตรตกับ blank

N = ความเข้มข้นของสารละลาย $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ มาตรฐานเป็นนอร์มัล

8. การวิเคราะห์ค่าความเป็นกรดไขมันอิสระ (Free Fatty Acids) (AOAC,2000)

8.1 สารเคมีที่ใช้

8.1.1 เอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ (95% Ethanol)

8.1.2 โซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.1 โมล (0.1 M NaOH)

8.1.3 ฟีนอล์ฟทาลีน 1 เปอร์เซ็นต์ (1% Phenolphthalein) ใน 95% เอทานอล

8.2 ชั่งตัวอย่างไขมันที่หลอมละลายแล้ว หรือน้ำมันประมาณ 5 กรัม เติมสารละลาย 95% Ethanol จนกว่าตัวอย่างจะมีค่า pH = 7 โดยใช้ 1% Phenolphthalein 2-3 หยดเพื่อเป็นการ indicator

8.3 ไตรเตรตสารละลายตัวอย่างด้วยสารละลายมาตรฐานโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) จนกระทั่งถึงจุดยุติ (สีชมพูคงที่) บันทึกปริมาตรของ NaOH ที่ใช้กับตัวอย่าง (มีค่า = s)

8.4 นำมาคำนวณหา Percent Free Fatty Acids

การคำนวณ

$$\% \text{ Free fatty acid as oleic acid} = \frac{S \times \text{Normality of NaOH} \times 28.2 \text{ (mg)}}{\text{น้ำหนักตัวอย่าง (g)}}$$

9. การวิเคราะห์ TBA reactive substances ในน้ำมันที่สกัดจากอาหาร (direct method) (AOAC,2000)

9.1 สารเคมีที่ใช้

9.1.1 1-butanol

9.1.2 0.2% (w/v) 2-thiobarbituric acid in butanol

9.2 ชั่งน้ำหนักน้ำมัน 0.1 กรัม ละลายด้วยบุทานอลจนมีปริมาตรสุดท้าย 25 มิลลิลิตร

9.3 ดูด 5 มิลลิลิตร จากข้อ 9.2 ผสมกับ 0.2% (w/v) 2-thiobarbituric acid in butanol ในหลอด screw cup ปิดฝาให้สนิท

- 9.4 นำไปใส่ในอ่างควบคุมอุณหภูมิที่ 95 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง จากนั้นให้แช่ในน้ำเย็นทันที จนมีอุณหภูมิเท่ากับอุณหภูมิห้อง
- 9.5 การเตรียม blank ทำทุกอย่างเหมือนตัวอย่างเพียงแต่ไม่ใส่ตัวอย่าง
- 9.6 นำ blank และตัวอย่างไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 532 nm
- 9.7 นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปคำนวณโดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของ melonaldehyde bis (dimethyl acetate) คำนวณในรูปของ TBA value





รายงานตัวชี้วัด

1. กรณีตีพิมพ์ในวารสารระดับชาติ และนานาชาติ

ลำดับ ที่	ชื่อนักวิจัยและชื่อผลงาน	เป็นส่วนหนึ่งของ งานวิจัยเรื่อง	ปีงบประมาณ ที่ได้รับการ สนับสนุน	แหล่งทุน	อยู่ใน ฐานข้อมูล (Scopus/ IS/SJRT CI)	ค่า IF
1	Riantong Singanusong Suriyaporn Nipomram Worasit Tochampa and Puntarika Rattanatraiwong Low Power Ultrasound- Assisted Extraction of Phenolic Compounds from Mandarin (<i>Citrus reticulata</i> Blanco cv. Sainampueng) and Lime (<i>Citrus aurantifolia</i>) Peels and the Antioxidant	การต้าน ออกซิเดชันของ สารสกัดจาก เปลือกผลไม้ ตระกูลส้มที่ สกัดด้วยคลื่น เสียง และการ ประยุกต์ใช้ในน้ำ สกัด	ปีงบประมาณ 2556	งบประมาณ แผ่นดิน มหาวิทยาลัย นครสวรรค์	Scopus ชื่อ วารสาร	ปี 2556 มี IF 1.802

Fwd: Decision on your manuscript #FANM-D-14-00338R1

Riantong Singanusong <pwansri@yahoo.com>
ถึง: suri nipo <surinipo@gmail.com>

5 กันยายน 2557 09:17

The best news of the year!!!!

Sent from my iPad

Begin forwarded message:

From: "Food Analytical Methods" <em@editorialmanager.com>
Date: 4 กันยายน 2557 19 นาฬิกา 33 นาที 25 วินาที GMT+7
To: "Riantong Singanusong" <pwansri@yahoo.com>
Subject: Decision on your manuscript #FANM-D-14-00338R1
Reply-To: "Food Analytical Methods" <mark.balbas@springer.com>

CC: fanm.editor@gmail.com

Dr. Riantong Singanusong
Naresuan University
Muang Phitsanulok
THAILAND

Re: Low Power Ultrasound-Assisted Extraction of Phenolic Compounds from Mandarin (*Citrus reticulata* Blanco cv. Sainampung) and Lime (*Citrus aurantifolia*) Peels and the Antioxidant

Dear Dr. Riantong Singanusong:

I am pleased to inform you that your manuscript, "Low Power Ultrasound-Assisted Extraction of Phenolic Compounds from Mandarin (*Citrus reticulata* Blanco cv. Sainampung) and Lime (*Citrus aurantifolia*) Peels and the Antioxidant" has been accepted for publication in Food Analytical Methods.

For queries regarding your accepted paper, please click the following link <http://www.springer.com/12161>; then click on "Contacts", and then "Production Editor", complete the query form and click "Submit".

Please remember to always include your manuscript number, #FANM-D-14-00338R1, whenever inquiring about your manuscript. Thank you.

Best regards,

David Rodriguez-Lazaro, PhD
Food Analytical Methods

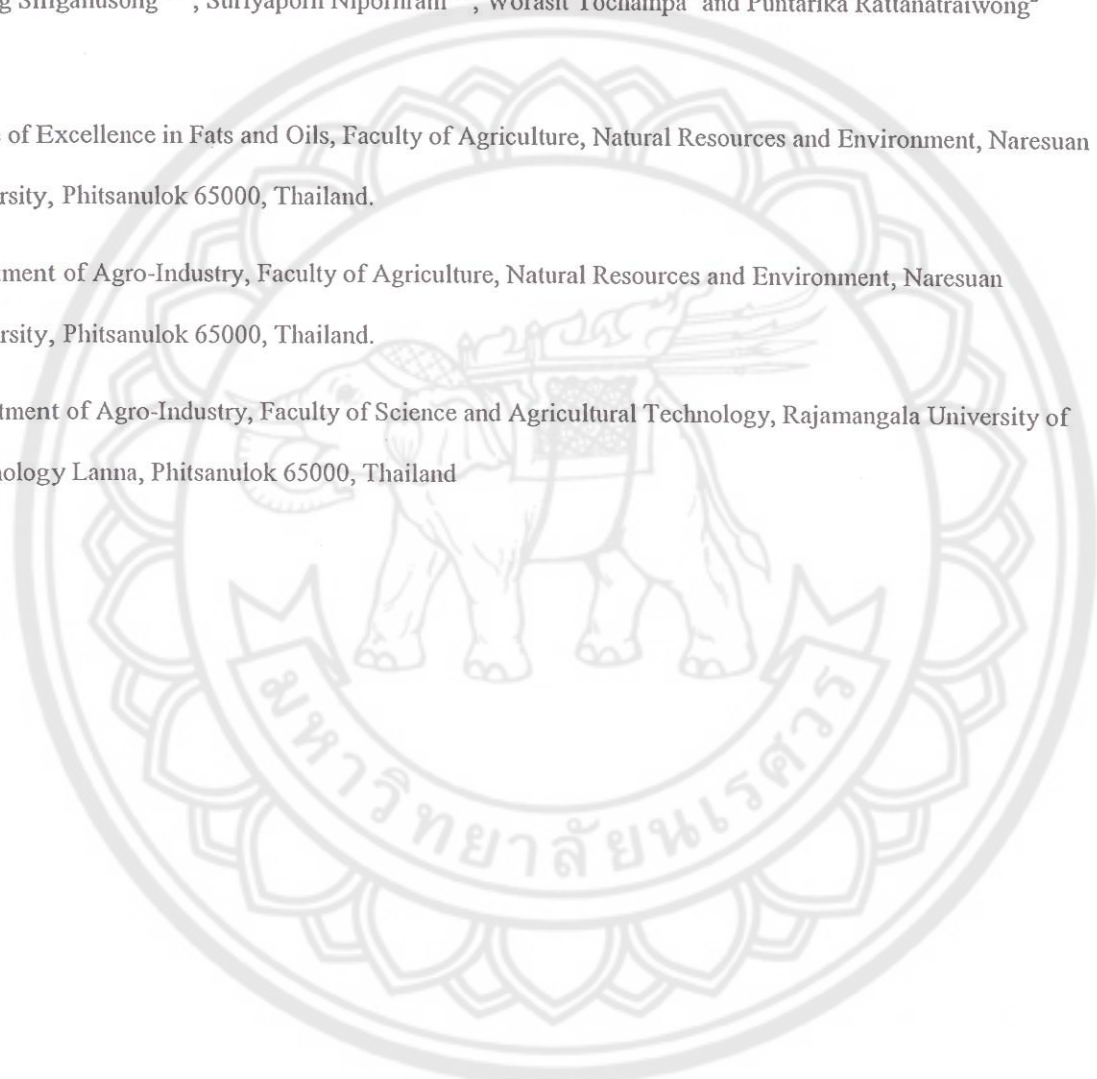
Low Power Ultrasound-Assisted Extraction of Phenolic Compounds from Mandarin (*Citrus reticulata* Blanco cv. Sainampueng) and Lime (*Citrus aurantifolia*) Peels and the Antioxidant

Riantong Singanusong^{1,2*}, Suriyaporn Nipornram^{2,3}, Worasit Tochampa² and Puntarika Rattanatraiwong²

¹ Centre of Excellence in Fats and Oils, Faculty of Agriculture, Natural Resources and Environment, Naresuan University, Phitsanulok 65000, Thailand.

² Department of Agro-Industry, Faculty of Agriculture, Natural Resources and Environment, Naresuan University, Phitsanulok 65000, Thailand.

³ Department of Agro-Industry, Faculty of Science and Agricultural Technology, Rajamangala University of Technology Lanna, Phitsanulok 65000, Thailand



Abstract

Mandarin and lime peels are rich sources of phenolic compounds including phenolic acids and flavonoids. The ultrasound-assisted extraction (UAE) proved to be an effective method in the extraction of phenolic compounds from plants due to its ability to save extraction time and increase extraction yields. In this research, factorial randomized complete experimental design has been used to investigate the effect of various factors on ultrasound-assisted extraction (UAE) using low power (50.93 Watt). Influence of citrus peel types and solvent types and concentrations on the total phenolic compounds, total flavonoids, flavanone glycosides (hesperidin and naringin) were studied. Antioxidant activity of the extracts was measured by FRAP, ABTS and DPPH assays. The optimum extraction conditions occurred when mandarin peel and 80% acetone were used. In those conditions, the extract contained 3,083.61 mg gallic acid equivalent (eq) 100 g^{-1} DW of total phenolic compounds, 2,539.82 mg quercetin eq 100 g^{-1} DW of total flavonoid, 1,374.20 mg 100 g^{-1} DW of hesperidin and the measured antioxidant activity was (0.61 mg mL^{-1} of DPPH IC_{50} , 1.12 mg mL^{-1} of ABTS IC_{50} and 2,521.47 mg trolox eq 100 g^{-1} for FRAP). A strong correlation between total phenolic content and antioxidant activity was also observed.

Keywords Flavonoids, Antioxidant activity, Mandarin peel, Lime peel, Ultrasound assisted extraction

Introduction

Total production of citrus fruit in the last few years has continuously increased with an estimated world production up to 50 million tons in the session 2013–2014 (Khan et al. 2010; United States Department of Agriculture Service 2014). Mandarin and lime is the major citrus produced in Thailand. The productions of Mandarin and Lime in 2012 were 185,084 tons and 132,281 tons, respectively (Office of Agricultural Economics 2013). Consumption of citrus fruit is mostly in the form of juice, so peel which accounts for half the total weight of fruit is widely available by-product. Nowadays, interest in the use of plant materials as a source of natural bioactive compounds has grown and many reports on the benefits of citrus peels has been made. The peels contain more bioactive compounds than the flesh and juice (Gorinstein et al. 2001; Peterson et al. 2006). The total phenolic compounds in peels of mandarin, lime, lemons, oranges and grapefruits were higher than that of the flesh (Anagnostopoulou et al. 2006; Babbar et al. 2011; Gorinstein et al. 2001; Londoño-Londoño et al. 2010; Peterson et al. 2006).

Mandarin and lime peels are rich sources of human beneficial phytochemicals such as phenolic compounds (e.g., flavonoids, phenolic acids), ascorbic acid, carotenoids, limonoids and reducing sugar (Gattuso et al. 2007; Guimarães et al. 2010; Procházková et al. 2011; Thitima et al. 2009) which can help the body scavenging free radicals effectively. In addition, these phenolic compounds have been found to be effective with many other health-related properties, such as antioxidant, antiviral, anticancer and anti-inflammatory activities (Procházková et al. 2011; Tripoli et al. 2007).

Phenolic compounds extraction capacity and efficiency have previously been evaluated for various methods, such as solvent extraction, enzyme-assisted extraction and heat treatment (Benavente-García et al. 1997; Biesaga 2011; Procházková et al. 2011). However, all these extraction methods have disadvantages such as low efficiency, long extraction time, high temperature requirements or large volumes of solvent. Furthermore, phenolic compounds are very sensitive to light, heat and oxygen. Therefore, it is necessary to investigate efficient extraction methods that can preserve the phenolic compounds stability.

Ultrasound-assisted extraction (UAE) has attracted increasing attentions to researchers due to its efficiency compared to traditional methods (Khan et al. 2010; Ma et al. 2008a). Ultrasonic enhancement the phenolic

compounds extraction is ascribed to the action of the cavitation bubbles generated during the propagation of the acoustic waves. Collapse of those bubbles can disrupt the plant cell wall increasing the release of extractable compounds (Chemat et al. 2011). UAE was used to extract phenolic compounds from plant cell but the method used high power 150-650 Watt (Chemat et al. 2011) and 150 Watt (Khan et al. 2010). UAE, using low power for energy saving in extraction of phenolic compound, the optimal solvent used to provide higher extraction efficiency must be necessary investigated. Many organic solvents were tested for the isolation of phenolic compounds from citrus peels, especially flavonoids, for example methanol (Londoño-Londoño et al. 2010; Ziaur 2006), food grade ethanol (Khan et al. 2010) and acetone (Oboh and Ademosun 2012). This study aims at the effects of citrus peel types (mandarin and lime), solvent extraction types (methanol, ethanol and acetone) and solvent concentrations using UAE on the total phenolic content, total flavonoids, flavanone glycosides (hesperidin and naringin) content, and further study on the antioxidant activity of selected extracts with targeted phenolic compounds.

Materials and methods

Plant materials

Fresh mandarins, (*Citrus reticulata* Blanco cv. Sainampung) 10 months after bloom, were harvested 3 times in December 2012 and January and February 2013 from Fang district, Chiang Mai province, Thailand. Limes, (*Citrus aurantifolia*) were harvested 4 months after bloom, at same period as the mandarin; but from Phitsanulok province, Thailand. The peels were cut into a 1 cm² pieces and dried by hot air oven at 60 °C for 2 h until reaching a moisture content of 9-10%. The dried peels were grounded with a blade mixer, sieved through a 300 µm and stored in an amber glass bottle at -20 °C until used.

Ultrasound-assisted extraction

An ultrasonic bath (model 175DAE, Crest Co. Ltd., Malaysia) consisting in a rectangular container (16.4 cm x 13.3 cm x 10.2 cm) with transducers (38.5 kHz) annealed at the bottom was used at an ultrasonic power 50.93 W. One g of ground dried peel was added into 20 mL of solvent (1:20 w/v) (Ma et al. 2009) in a 120 mL amber glass bottle. The bottle was then immersed into the ultrasonic bath at an operating temperature of 40 °C for 30 min. After extraction, the supernatant was filtered under vacuum through Whatman paper No. 4.

Experimental design

The factorial randomized complete experimental design was used. The effects of three extraction factors, namely the citrus peel type (mandarin and lime), the solvent type (methanol, ethanol and acetone) and the solvent concentration (20, 50 and 80% v/v) were studied. This resulted in 18 different experiment combinations were analyzed in triplicate. Total phenolic compounds, total flavonoids, flavanone glycosides (hesperidin and naringin) and antioxidant activity (FRAP, DPPH and ABTS radical scavenging activity) were investigated for every extract.

HPLC analysis

HPLC analysis were carried out on an Agilent 1100 chromatograph using a UV-visible detector at 280 nm and a C18 reversed-phase column (Agilent TC-C18 250 mm x 4.6 mm, 5 μ m) operated at 37 °C. The mobile phase consisted of two solvents including 0.5% acetic acid (A) and 100% acetonitrile (B). The linear solvent gradient in volume ratios was as follows: 10–30% B over 20 min. The solvent gradient was increased to reach 35% B at 25 min and was maintained at 35% B for 5 min. The flow rate was 1 mL min⁻¹ and injection volume was 20 μ L (Khan et al. 2010). Identification of hesperidin and naringin was based on retention times compared with standard (Sigma-Aldrich from Germany). Analyses were performed at least three times and only mean values were reported. Hesperidin and naringin content were calculated from peak area according to calibration curves by using the external standard method and expressed as mg 100 g⁻¹ dry weight (DW).

Total phenolic content

The total phenolic content was determined using the Folin–Ciocalteu colorimetric method according to Anagnostopoulou et al. (2006) with slight modifications. The reaction mixture consisted of 0.5 mL of the diluted extract (1 mL extract diluted in solvent until final volume 10 mL) and 0.5 mL of the Folin–Ciocalteu's reagent. After 3 min, 1 mL of saturated sodium carbonate solution was added and then 5 mL distilled water was added. The mixture was incubated in the dark at room temperature for 1 h. The absorbance was measured at 725 nm using a spectrophotometer (model DR/4000U, HACH Co. Ltd., USA). A blank was prepared following this

method without the sample. Gallic acid (Sigma-Aldrich from Germany) was used as the standard for the calibration curve. The total phenolic content was expressed as mg gallic acid eq 100 g⁻¹ DW.

Total flavonoid content

Total flavonoids were measured using a colorimetric assay in accordance with the method of Ramful et al. (2010). The diluted extract (1 mL extract diluted in solvent until final volume 10 mL), yellow for mandarin and green for lime, 2.5 mL was mixed in a test tube with 150 µL of 5% aqueous sodium nitrite. After 5 min, 150 µL of 10% aqueous aluminium chloride was poured into the reaction, then 1 minute later 1 mL of 1 M sodium hydroxide was added, resulting in pink solution. The solution was then mixed and the absorbance of the mixture was measured at 510 nm by spectrophotometer (model DR/4000U, HACH Co. Ltd., USA). A blank was prepared using solvent without sample. Total flavonoid was calculated with respect to quercetin (Sigma-Aldrich from Germany) standard curve. The results were expressed in mg of quercetin eq 100 g⁻¹ DW.

Ferric reducing antioxidant power (FRAP)

The FRAP assay was realized according to the method of Ma et al. (2008b). The FRAP working solution was prepared by mixing 200 mM acetate pH 3.6 solution, with 10 mM TPTZ (2, 4, 6-tripyridyl-s-triazine) in 40 mM HCl solution and 20 mM ferric chloride solution in the volume ratio of 10:1:1 (v/v/v). 100 µL of the diluted extract (1 mL extract diluted in solvent until final volume 10 mL) were added to 4900 µL of the FRAP solution and incubated in the dark at room temperature for 30 min. The absorbance was measured at 593 nm by spectrophotometer (model DR/4000U, HACH Co. Ltd., USA). Ferric reducing antioxidant power was calculated with respect to trolox (a water-soluble vitamin E analog of Sigma-Aldrich from Germany) standard curve. The results were expressed as trolox eq antioxidant capacity (TEAC) mg 100 g⁻¹ of DW.

DPPH Radical scavenging activity (DPPH)

Antioxidant activities were determined in accordance with the method of Anagnostopoulou et al. (2006) and Brand-Williams et al. (1995) with slight modifications. Different concentrations for mandarin and lime peel extracts (0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 5.0, 7.5, 10.0, 12.5 and 15.0 mg mL⁻¹) were tested. These dilutions of each

aqueous extract, 1 mL was mixed with 2 mL of 0.1 mM DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) in methanol. A blank was prepared using the reaction solvent without sample. Absorbance at 517 nm was determined after leaving the sample and blank for 30 min in the dark at room temperature. The percentage of scavenging activity of DPPH was calculated according to the following equation:

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

(A_{control} = absorbance without extract; A_{sample} = absorbance with extract)

IC₅₀ value (mg mL⁻¹) is the concentration at which the scavenging activity was 50% from linear regression analysis.

ABTS Radical scavenging activity (ABTS)

The ABTS assay was determined in accordance with the method of Babbar et al. (2011) with some modifications. The ABTS stock solution was prepared by mixing 2.45 mM potassium persulphate solution and 7 mM ABTS solution in equal volume to react for 16 h in the dark at room temperature before use. The working solution was diluted from stock solution with ethanol until absorbance of 0.7 at 734 nm. ABTS working solution 3.8 mL was added to 100 µL of the diluted extract and mixed well. After 2 min, the absorbance was measured at 734 nm by spectrophotometer. Different concentration for mandarin peel extracts (0.5, 1.0, 1.5 and 2.0 mg mL⁻¹) and lime peel extracts (2.5, 5.0, 7.5 and 10 mg mL⁻¹) were tested (Guha et al. 2010). A blank was prepared using the reaction solvent without sample. Percentage scavenging of ABTS radical was calculated according to the following equation.

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

(A_{control} = absorbance without extract; A_{sample} = absorbance with extract)

IC₅₀ value (mg mL⁻¹) is the concentration at which the scavenging activity was 50% from linear regression analysis.

Statistical analysis

All measurements were replicated three times and experimental results are expressed as means. The data were analyzed by analysis of variance (ANOVA) and the means separated by Duncan's multiple range tests in SPSS. Pearson's correlation coefficients were used to determine the correlation between the phenolic compounds and antioxidant activities.

Results and Discussion

Effect of citrus peel types on total phenolic, total flavonoid, hesperidin and naringin extraction

The effect of citrus peel types factor (A) and interaction effect between citrus peel factor and other factors (solvent type and concentration) using UAE showed significant difference ($p < 0.05$) on total phenolic, total flavonoid, hesperidin and naringin content as shown in Table 1. Mandarin peel extract contained total phenolic, total flavonoid, and hesperidin content of 2,456.71 mg gallic acid eq 100 g^{-1} , 2,146.40 mg quercetin eq 100 g^{-1} and 528.77 mg 100 g^{-1} , respectively which are higher than that of lime peel extract. However, naringin contained 14.65 mg 100 g^{-1} which is lower than that of lime peel ($p < 0.05$). The mandarin peel extract using UAE with different solvent types and concentrations are shown in Figure 1. It can be seen that the mandarin extract had higher total phenolic (2,104.20-3,083.61 mg gallic acid eq 100 g^{-1}), total flavonoid (1,992.12-2,539.82 mg quercetin eq 100 g^{-1}) and hesperidin (133.91-1,374.2 mg 100 g^{-1}) than that of the lime peel extract (Figures. 1A-1C). However, the extract of lime peel had naringin (10.80-53.39 mg 100 g^{-1}) higher than that of the mandarin peel extract (Figure 1D). The results were also in agreement with other reports that the citrus peels contain phenolic compounds such as phenolic acids and flavonoids which are major components (Abeyasinghe et al. 2007; Gorinstein et al. 2001; Khan et al. 2010; Ma et al. 2009; Makovšek et al. 2012; Oboh and Ademosun 2012; Tripoli et al. 2007). Total phenolic compounds and total flavonoids of mandarin peel in these results were classified in the high level group according to Ramful et al. (2010) due to its containing total phenolic compounds and flavonoids content higher than 550 and 360 mg 100^{-1} g , respectively. The main citrus flavonoid was flavanones such as hesperidin and naringin (Abeyasinghe et al. 2007; Biesaga 2011; Tripoli et al. 2007). Especially, hesperidin content was the highest flavonoid in mandarin peel that was extracted by UAE (Brand-Williams et al. 1995; Khan et al. 2010). Recent results from others reported that hesperidin of citrus peel from Taiwan contained 100-2,900 mg 100 g^{-1} (Wang et al. 2008) and dry mandarin peel contained hesperidin 600-3,200 mg 100 g^{-1} (Makovšek et al. 2012) which supports the results in this study.

Effect of extraction solvent on total phenolic, total flavonoid, hesperidin and naringin extraction

The solvents used in this study were methanol, ethanol and acetone. They were different in their polarities relative to the polar phenolic compounds of citrus peel (Gattuso et al. 2007). The results of the variable factors, extraction solvent (B) and interaction effect between the other factors (citrus peel types and solvent concentration) show significant differences ($p < 0.05$) on total phenolic, total flavonoid, hesperidin and naringin content (Table 1). It was found that acetone had the highest ($p < 0.05$) total phenolic, total flavonoid and hesperidin content of 1,976.91 mg gallic acid eq 100 g⁻¹, 1,534.35 mg quercetin eq 100 g⁻¹ and 545.56 mg 100 g⁻¹, respectively. These results support those findings in using different solvent types and solvent concentrations to extract phenolic compounds from mandarin and lime peels (Figure 1). It was found acetone as extraction solvent showed the highest phenolic compounds for both mandarin and lime peels. This is because acetone and citrus flavonoid having similar structures in containing C=O functional groups (Hemwimol et al. 2006). The different extraction efficiencies of these solvents can be attributed to their different polarities and viscosities. Although, the polarity indices of acetone, methanol and ethanol are quite similar; 5.1, 5.1 and 5.2 respectively, acetone has a lower viscosity (0.32 cP) than methanol (0.60 cP) and ethanol (1.20 cP) (Hemwimol et al. 2006). In addition, the extraction solvent with low viscosity has low density and high diffusivity, and can be easily diffused into the pores of the plant material (Londoño-Londoño et al. 2010). When ultrasound was applied, ability to extract phenolic compounds by acetone was increased because acetone can be easily diffused or penetrated into the plant matrix. Furthermore, acoustic cavitation occurs more readily in the extraction solvent with low viscosity since the ultrasonic energy more easily exceed the inter-molecular forces of the liquid. However, acetone has high vapor pressure (229.52 mmHg) thus resulting in less violence and intensity of bubbles collapse (Hemwimol et al. 2006). Recent report from other researcher revealed that phenolic compounds and antioxidant activity from pummelo extract was significantly different according to solvent type (Jayaprakasha et al. 2008) which supports the results from this study. The result was also in agreement with the researchers who reported that acetone was used to extract phenolic compounds from *Ellingera elatior* Jack. by solvent extraction (Wijekoon et al. 2011). Of those researches, Musa et al. (2011) found that acetone provided the highest extraction efficiency from pink-flesh guava fruit. Hemwimol et al. (2006) reported that acetone extract showed higher anthraquinones from *Morinda citrifolia* than that of methanol and ethanol by UAE. Furthermore, acetone is acceptable for used in food extract with good manufacturing practice (GMP) (Chemat et al. 2011; Hemwimol et al. 2006).

Effect of solvent concentration on total phenolic, total flavonoid, hesperidin and naringin content

Various solvent concentration (C) showed significant differences ($p < 0.05$) in the extraction of total phenolic, total flavonoid, hesperidin and naringin content. Furthermore, the interaction effect between the solvent concentration and other factors on total phenolic and hesperidin was also significantly different ($p < 0.05$) as shown in Table 1. For solvent concentration, 20% solvent concentration showed the lowest ($p < 0.05$) total phenolic, total flavonoid, hesperidin and naringin content due to increasing water level, as a result phenolic compounds had more difficulties to diffuse from citrus peel to solvent. Moreover, as the level of water increased, the intensity of cavitation bubbles were increased which could result in destroyed phenolic compounds (Chemat et al. 2011; Hemwimol et al. 2006). However, hesperidin was slightly degraded by cavitation bubbles due to its containing sugar rhamnosyl- α -1,6 glucose (Tripoli et al. 2007) which can protect molecules against degradation (Biesaga 2011). The results were also in agreement with the others who reported that the extraction yield of quercetin increased with increasing percentage of methanol more than 60% (Biesaga 2011). Therefore, 80% concentration of all solvents had the highest ($p < 0.05$) hesperidin and naringin content of 648.07 and 28.74 mg 100 g⁻¹, respectively as shown in Table 1. The findings are in good agreement with Khan et al. (2010) who used 80% ethanol: water ratio for extracting hesperidin and naringin from fresh citrus peel.

Total combination of the interaction between citrus peel type, solvent types and solvent concentrations of 18 treatments were compared in terms of total phenolic, total flavonoid, hesperidin and naringin content (Figure 1). It was found that in the extraction from mandarin peel by UAE, 80% acetone provided the highest ($p < 0.05$) total phenolic, total flavonoid, hesperidin content of 3,083.61 mg gallic acid eq 100 g⁻¹, 2,539.82 mg quercetin eq 100 g⁻¹ and 1,374.20 mg 100 g⁻¹, respectively. In addition, for lime peel extract 80% acetone also showed the highest ($p < 0.05$) naringin 53.39 mg 100 g⁻¹ since 80% acetone was polar solvent and had low viscosity therefore, phenolic compounds can be easily released into the solvent by UAE using low power.

DPPH Radical scavenging activity

DPPH is a free radical compound that has been popularly used to determine the free radical scavenging activity of various citrus samples (Babbar et al. 2011; Khan et al. 2010; Oboh and Ademosun 2012; Su et al. 2008; Thitima et al. 2009). The changes of DPPH radical scavenging percentage with increased concentration of

mandarin and lime peels using different solvent types and solvent concentrations by UAE were shown in Figure 2. It was found that percentage of DPPH radical scavenging of mandarin peel extracted with methanol, acetone and ethanol increased rapidly during concentrations of 0.5 to 2.5 mg mL⁻¹ and thereafter remaining steady at 5.0 mg mL⁻¹. However, the percentage of DPPH radical scavenging of lime peel extract was slightly increased during concentrations of 2.5 to 12.5 mg mL⁻¹ and thereafter remaining steady. From this result, it was found that the highest percentage of DPPH radical scavenging of mandarin content was 85.53-94.65% and lime peel content was 86.47-94.33%. Extraction with methanol and acetone provided similar results. The results were in agreement with Thitima et al. (2009) who reported 93.9% of DPPH radical scavenging with a lime peel and Babbar et al. (2011) 83% of DPPH radical scavenging with mandarin peel. However, when considered the concentration that inhibited DPPH radical scavenging at 50%, the mandarin peel extracts had stronger radical scavenging than lime peel extracts as it used a less amount of the peel extract than lime peel for inhibition of DPPH radical scavenging at 50%. Therefore, this experiment illustrated that the radical scavenging DPPH IC₅₀ form was more accurate than that of the DPPH percentage form.

Effect of citrus peel type on antioxidant activity

The results of the variable factors, citrus peel type (A) showed significant differences ($p < 0.01$) on antioxidant activity including FRAP, DPPH and ABTS as shown in Table 2. As mandarin peel contained a high level of phenolic compounds (Table 1 and Figure 1) the extracts exert higher antioxidant activity. This is due to phenolic compounds reducing ferric and inhibiting DPPH and ABTS radicals (Procházková et al. 2011; Su et al. 2008). Total combination of interaction between citrus peel types, solvent types and solvent concentrations of 18 treatments were compared in terms of FRAP, DPPH and ABTS assays and are shown in Figure 3. It was found that the mandarin peel had FRAP, DPPH and ABTS of 1,676.31-2,521.50 trolox eq mg 100 g⁻¹ DW, 0.61-0.86 and 1.12-1.47 mg mL⁻¹, respectively which was higher than that of lime peel due to the higher levels of total phenolic, flavonoid and hesperidin content in mandarin peel than in lime peel. The mandarin peel was considered as a strong antioxidant which had good hydrogen donor to DPPH radical at the same level as BHT (Babbar et al. 2011). The inhibition 50% DPPH (IC₅₀) of mandarin peel was 0.61-0.86 mg mL⁻¹ which was in agreement with Su et al. (2008) who obtained the IC₅₀ of 0.46-0.78 mg mL⁻¹ from citrus herbal. The mandarin peel (*Citrus reticulata*) reduced Fe³⁺ to Fe²⁺ better than other citrus peels (satsumah, tangor, bergarmot, lemon and orange) (Ramful et al. 2010).

Effect of solvent type on antioxidant activity

The results of the variable factors, solvent type (B) showed significant differences ($p < 0.01$) on antioxidant activity including FRAP, DPPH and ABTS. However, interaction between solvent type and solvent concentration (B×C) and interaction effect between citrus peel type, solvent type and solvent concentration (A×B×C) did not show significant differences ($p > 0.05$) on antioxidant activity DPPH and ABTS as shown in Table 2. Figure 3 show that acetone was the best solvent for extraction which had the highest FRAP content. Due to its polarity index, viscosity and surface tension of acetone causing phenolic compounds to be easily diffused into the solvent (Gorinstein et al. 2001; Hemwimol et al. 2006; Li et al. 2013). However, DPPH and ABTS radical scavenging activity of mandarin peel extract of all solvents which was not significantly different ($p > 0.05$) as it used less concentration of extract at 0.6-0.8 and 1.1-1.5 mg mL⁻¹ to inhibit 50% of DPPH and ABTS radicals, respectively.

Effect of solvent concentration on antioxidant activity

The effect of the variable factor, solvent concentration (C), showed significant differences ($p < 0.05$) on antioxidant activity including FRAP, DPPH and ABTS as shown in Table 2. Furthermore, 80% concentration had the highest antioxidant activities especially FRAP and ABTS ($p < 0.05$). This might be due to the polarity index, viscosity and surface tension of water (10, 0.89 cP, 72.8 mN cm⁻¹) (Hemwimol et al. 2006; Musa et al. 2011) which is higher than that of methanol, ethanol and acetone. Increase level of water content in the solvent resulted in phenolic compounds having difficulty in diffusing into the solvent which was in agreement with Musa et al. (2011) who reported that water showed the lowest activity compared with organic solvent used for extraction of antioxidant compounds, and higher antioxidant activity should have up to 50% organic solvent in the extraction mixture. However, all solvents and concentrations used to extract mandarin peel had no significant difference ($p > 0.05$) in IC₅₀ of DPPH and ABTS as shown Figure 3. Mandarin peel extract of 0.61-0.86 and 1.12-1.47 mg mL⁻¹ showed the inhibition to DPPH and ABTS radicals at 50%, respectively. Mandarin peel extracted with 80% acetone showed the highest FRAP content of 2,521.50 mg of trolox eq 100 g⁻¹ DW due to the highest phenolic compounds which were easily diffused into the solvent by UAE, and can reduce more ferric and inhibit DPPH and ABTS radicals (Babbar et al. 2011; Peterson et al. 2006; Tripoli et al. 2007).

Correlation between phenolic compounds and antioxidant activities

The correlations between phenolic compounds (total phenolic, total flavonoid, hesperidin and naringin content) and antioxidant activity (FRAP, DPPH and ABTS) from mandarin and lime peel extracts with the Pearson correlation coefficients are shown in Table 3. The total phenolic contents showed a good positive correlation and significant correlation with antioxidant activity $r = 0.978$ for FRAP. Moreover, it had a strong negative correlation and significant correlation with DPPH (IC_{50}) and ABTS (IC_{50}) $r = -0.939$ and -0.949 , respectively. The result showed a similar correlation between phenolic contents and antioxidant activity reported previously (Babbar et al. 2011; Musa et al. 2011; Ramful et al. 2010; Huang et al. 2005; Prior et al. 2005). Furthermore, the citrus flavonoid had a good positive correlation with antioxidant activity $r = 0.973$ for FRAP and a strong negative correlation with DPPH (IC_{50}) and ABTS (IC_{50}) $r = -0.950$ and -0.966 , respectively, showing stronger activity than that of phenolic content, which was also proved in other studies, as of such, mandarin peel contains less total phenolic content lower than litchi seed and grape seed, but it demonstrates higher antioxidant activity due to higher flavonoids (Babbar et al. 2011). Moreover, flavonoids are chemically least degradable compound by UAE comparing to other phenolic compounds which attributes to the better stability in the solvent (Biesaga 2011).

Conclusion

The effects of low power UAE depend on individual or interaction parameter. This experiment showed the individual and combination effects including peel type, type and concentration of solvent. The effects showed significant influenced on total phenolic, flavonoid, flavanone glycoside and antioxidant activity. Mandarin peel had total phenolic, flavonoid, hesperidin and antioxidant activities higher than that of lime peel but naringin was lower than that of lime peel. Among three solvents used, acetone was the best solvent for extraction of total phenolic and antioxidant activity, particularly acetone at 80% concentration was suggested to use in extraction for both mandarin and lime peels by UAE because it provided high efficient extraction and lower the risk of antioxidant damaged by ultrasonic energy used at optimum condition.

References

- Abeyasinghe DC, Li X, Sun C, Zhang W, Zhou C, Chen K (2007) Bioactive compounds and antioxidant capacities in different edible tissues of citrus fruit of four species. *Food Chem* 104:1338-1344. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.01.047>
- Anagnostopoulou MA, Kefalas P, Papageorgiou VP, Assimopoulou AN, Boskou D (2006) Radical scavenging activity of various extracts and fractions of sweet orange peel (*Citrus sinensis*). *Food Chem* 94:19-25. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.09.047>
- Babbar N, Oberoi HS, Uppal DS, Patil RT (2011) Total phenolic content and antioxidant capacity of extracts obtained from six important fruit residues. *Food Res Int* 44:391-396. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2010.10.001>
- Benavente-García O, Castillo J, Marin FR, Ortuño A, Del Río JA (1997) Uses and properties of citrus flavonoids. *J Agric Food Chem* 45:4505-4515. doi:[10.1021/jf970373s](https://doi.org/10.1021/jf970373s)
- Biesaga M (2011) Influence of extraction methods on stability of flavonoids. *J Chromatogr.A* 1218:2505-2512. doi:[10.1016/j.chroma.2011.02.059](https://doi.org/10.1016/j.chroma.2011.02.059)
- Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C (1995) Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Sci Technol* 28:25-30. doi:[http://dx.doi.org/10.1016/S0023-6438\(95\)80008-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0023-6438(95)80008-5)
- Chemat F, Zill e H, Khan MK (2011) Applications of ultrasound in food technology: Processing, preservation and extraction. *Ultrason. Sonochem* 18:813-835. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.ultsonch.2010.11.023>
- Gattuso G, Barreca D, Gargiulli C, Leuzzi U, Caristi C (2007) Flavonoid composition of citrus juices. *Molecules* 12:1641-1673. doi:<http://www.mdpi.com/1420-3049/12/8/1641>
- Gorinstein S, Martín-Belloso O, Park YS; Haruenkit R; Lojek A; Číž M; Caspi A; Libman I; Trakhtenberg S (2001) Comparison of some biochemical characteristics of different citrus fruits. *Food Chem* 74:309-315. doi:[http://dx.doi.org/10.1016/S0308-8146\(01\)00157-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0308-8146(01)00157-1)
- Guha G, Rajkumar V, Ashok Kumar R, Mathew L (2010) Aqueous extract of *Phyllanthus amarus* inhibits chromium(VI)-induced toxicity in MDA-MB-435S cells. *Food Chem Toxicol* 48:396-401. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2009.10.028>
- Guimarães R, Barros L, Barreira JCM, Sousa MJ, Carvalho AM, Ferreira ICFR (2010) Targeting excessive free radicals with peels and juices of citrus fruits: Grapefruit, lemon, lime and orange. *Food Chem Toxicol* 48:99-106. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2009.09.022>

- Hemwimol S, Pavasant P, Shotipruk A (2006) Ultrasound-assisted extraction of anthraquinones from roots of *Morinda citrifolia*. *Ultrason Sonochem* 13:543-548.
doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.ultsonch.2005.09.009>
- Huang D, Ou B, Prior RL (2005) The Chemistry behind antioxidant capacity assays. *J Agric Food Chem* 53:1841-1856. doi:10.1021/jf030723c
- Jayaprakasha GK, Girenavar B, Patil BS (2008) Antioxidant capacity of pummelo and navel oranges: Extraction efficiency of solvents in sequence. *LWT - Food Sci Technol* 41:376-384.
doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2007.03.017>
- Khan MK, Abert-Vian M, Fabiano-Tixier AS, Dangles O, Chemat F (2010) Ultrasound-assisted extraction of polyphenols (flavanone glycosides) from orange (*Citrus sinensis* L.) peel. *Food Chem* 119:851-858.
doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.08.046>
- Li Y, Fabiano-Tixier AS, Tomao V, Cravotto G, Chemat F (2013) Green ultrasound-assisted extraction of carotenoids based on the bio-refinery concept using sunflower oil as an alternative solvent. *Ultrason Sonochem* 20:12-18. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.ultsonch.2012.07.005>
- Londoño-Londoño J, Lima VRD, Lara O, Gil A, Pasa TBC, Arango GJ, Pineda JRR (2010) Clean recovery of antioxidant flavonoids from citrus peel: Optimizing an aqueous ultrasound-assisted extraction method. *Food Chem* 119:81-87. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.05.075>
- Ma Y-Q, Chen J-C, Liu D-H, Ye X-Q (2009) Simultaneous extraction of phenolic compounds of citrus peel extracts: Effect of ultrasound. *Ultrason Sonochem* 16:57-62.
doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.ultsonch.2008.04.012>
- Ma Y, Ye X, Hao Y, Xu G, Xu G, Liu D (2008a) Ultrasound-assisted extraction of hesperidin from Penggan (*Citrus reticulata*) peel. *Ultrason. Sonochem* 15:227-232.
doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.ultsonch.2007.03.006>
- Ma YQ, Chen JC, Liu DH, Ye XQ (2008b) Effect of ultrasonic treatment on the total phenolic and antioxidant activity of extracts from citrus peel. *J Food Sci* 73:T115-T120. doi:10.1111/j.1750-3841.2008.00908.x
- Makovšek K, Knez Ž, Škerget M (2012) Influence of process parameters on the extraction of flavanones from mandarin peel. *Acta ChimSlov* 59:879-887.
doi:<http://eds.b.ebscohost.com/ehost/pdfviewer/pdfviewer?sid=73d53e7a-c6c8-4c48-adf5-220b34eda980%40sessionmgr115&vid=2&hid=101>

- Musa K, Abdullah A, Jusoh K, Subramaniam V (2011) Antioxidant activity of pink-flesh guava (*Psidium guajava* L.): Effect of extraction techniques and solvents. *Food Anal Methods* 4:100-107. doi:[10.1007/s12161-010-9139-3](https://doi.org/10.1007/s12161-010-9139-3)
- Oboh G, Ademosun AO (2012) Characterization of the antioxidant properties of phenolic extracts from some citrus peels. *J of Food Sci Technol* 49:729-736. doi:[10.1007/s13197-010-0222-y](https://doi.org/10.1007/s13197-010-0222-y)
- Office of Agricultural Economics (2013) Agricultural production data. Mandarin. http://www.oae.go.th/ewt_news.php?nid=13577. Accessed 29.January.2013
- Peterson JJ, Beecher GR, Bhagwat SA, Dwyer JT, Gebhardt SE, Haytowitz DB, Holden JM (2006) Flavanones in grapefruit, lemons, and limes: A compilation and review of the data from the analytical literature. *J. Food Compos Anal* 19, Supplement:S74-S80 doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.jfca.2005.12.009>
- Prior RL, Wu X, Schaich K (2005) Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *J Agric Food Chem* 53:4290-4302. doi:[10.1021/jf0502698](https://doi.org/10.1021/jf0502698)
- Procházková D, Boušová I, Wilhelmová N (2011) Antioxidant and prooxidant properties of flavonoids. *Fitoterapia* 82:513-523. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.fitote.2011.01.018>
- Ramful D, Bajorun T, Bourdon E, Tarnus E, Aruoma OI (2010) Bioactive phenolics and antioxidant propensity of flavedo extracts of Mauritian citrus fruits: Potential prophylactic ingredients for functional foods application. *Toxicology* 278:75-87. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.tox.2010.01.012>
- Su M-S, Shyu Y-T, Chien P-J (2008) Antioxidant activities of citrus herbal product extracts. *Food Chem* 111:892-896. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.05.002>
- Thitima K, Sakamon D, Naphaporn C (2009) Evolution of antioxidant compounds in lime residues during drying. *Food Chem* 113:944-949. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.08.026>
- Tripoli E, Guardia ML, Giammanco S, Majo DD, Giammanco M (2007) Citrus flavonoids: Molecular structure, biological activity and nutritional properties: A review. *Food Chem* 104:466-479. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.11.054>
- United States Department of Agricultural Service (2014) Citrus: World markets and trade. <http://usda.mannlib.cornell.edu/MannUsda/viewDocument Info.do?documentID=1774>. Accessed 08.April.2014
- Wang YC, Chuang YC, Hsu HW (2008) The flavonoid, carotenoid and pectin content in peels of citrus cultivated in Taiwan. *Food Chem* 106:277-284. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.05.086>

Wijekoon MMJO, Bhat R, Karim AA (2011) Effect of extraction solvents on the phenolic compounds and antioxidant activities of bunga kantan (*Etilingera elatior* Jack.) inflorescence. J Food Compos Anal 24:615-619. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.jfca.2010.09.018>

Zia ur R (2006) Citrus peel extract – A natural source of antioxidant. Food Chem 99:450-454. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.07.054>



Table 1

Analysis of variance of main and interactive effects on the total phenolic, total flavonoid, hesperidin and naringin content as an effect of citrus peel type, solvent type and concentration of extraction solvent using UAE of citrus peel (means and significance of differences)

Source of variation	Total phenolic (mg 100 g ⁻¹)	Total flavonoid (mg 100 g ⁻¹)	Hesperidin (mg 100 g ⁻¹)	Naringin (mg 100 g ⁻¹)
Citrus peel types (A)	xx	xx	xx	xx
Mandarine peel	2,456.71 ± 34.97 ^A	2,146.41 ± 27.52 ^A	528.77 ± 49.13 ^A	14.65 ± 1.46 ^B
Lime peel	987.51 ± 21.85 ^B	600.83 ± 11.37 ^B	257.05 ± 18.68 ^B	26.09 ± 2.03 ^A
Extraction solvents (B)	xx	xx	xx	xx
Methanol	1,640.72 ± 99.35 ^b	1,247.43 ± 99.43 ^c	338.95 ± 37.61 ^b	23.47 ± 1.38 ^a
Ethanol	1,548.64 ± 61.43 ^c	1,339.17 ± 103.37 ^b	286.50 ± 31.46 ^b	15.53 ± 1.50 ^b
Acetone	1,976.91 ± 113.51 ^a	1,534.35 ± 120.13 ^a	545.56 ± 64.29 ^a	22.52 ± 2.97 ^a
Solvent concentrations (C)	xx	xx	xx	xx
20	1,592.55 ± 92.22 ^z	1,315.61 ± 106.57 ^y	187.87 ± 13.43 ^z	12.38 ± 1.59 ^z
50	1,851.24 ± 106.75 ^x	1,421.91 ± 112.09 ^x	362.39 ± 33.78 ^y	20.56 ± 1.76 ^y
80	1,722.53 ± 117.74 ^y	1,383.43 ± 108.54 ^x	648.07 ± 62.53 ^x	28.74 ± 2.81 ^x
Interaction				
A x B	xx	xx	xx	xx
A x C	xx	ns	xx	ns
B x C	xx	xx	xx	x
A x B x C	xx	xx	x	x

xx = $p \leq 0.01$; x = $p \leq 0.05$; ns = not significantly different.

A and B Mean values with different letters in columns are significantly different; $p < 0.05$ for citrus peel types

a, b and c Mean values with different letters in columns are significantly different; $p < 0.05$ for solvent extraction types

x, y and z Mean values with different letters in columns are significantly different; $p < 0.05$ for solvent concentrations

Values are mean ± standard error

Table 2

Analysis of variance of main and interactive effects on the antioxidant activity as an effect of citrus peel type, solvent type and concentration of extraction solvent using UAE of citrus peel (means and significance of differences)

Source of variation	FRAP mg Trolox equivalent	Radical scavenging activity (IC ₅₀)	
		DPPH	ABTS
Citrus peel type (A)	xx	xx	xx
Mandarine peel	1,917.61 ± 34.10 ^A	0.72 ± 0.02 ^B	1.26 ± 0.03 ^B
Lime peel	523.68 ± 14.52 ^B	4.99 ± 0.14 ^A	9.46 ± 0.18 ^A
Solvent type (B)	xx	xx	xx
Methanol	1,092.11 ± 8.88 ^b	2.63 ± 0.48 ^b	5.48 ± 1.04 ^b
Ethanol	1,053.10 ± 8.66 ^c	3.31 ± 0.61 ^a	5.79 ± 1.03 ^a
Acetone	1,561.71 ± 8.30 ^a	2.62 ± 0.47 ^b	4.80 ± 1.04 ^c
Solvent concentration (C)	xx	x	xx
20	1,166.33 ± 96.13 ^z	3.01 ± 0.56 ^x	5.66 ± 1.04 ^x
50	1,211.12 ± 99.55 ^y	2.83 ± 0.52 ^{xy}	5.39 ± 1.04 ^y
80	1,283.53 ± 10.65 ^x	2.72 ± 0.50 ^y	5.03 ± 1.03 ^z
Interaction			
A x B	xx	xx	xx
A x C	xx	ns	xx
B x C	xx	ns	ns
A x B x C	xx	ns	ns

xx = p ≤ 0.01; x = p ≤ 0.05; ns = not significantly different

A and B Mean values with different letters in columns are significantly different; p < 0.05 for citrus peel types

a, b and c Mean values with different letters in columns are significantly different; p < 0.05 for solvent extraction types

x, y and z Mean values with different letters in columns are significantly different; p < 0.05 for solvent concentrations

Values are mean ± standard error

Table 3

Correlation analyses for antioxidant activity, total phenolic, total flavonoid, hesperidin and naringin content from mandarin and lime peel extracts

	Total phenolic (mg 100 g ⁻¹)	Total flavonoid (mg 100 g ⁻¹)	Hesperidin (mg 100 g ⁻¹)	Naringin (mg 100 g ⁻¹)	FRAP (mg Trolox eq 100 g ⁻¹)	DPPH (IC ₅₀) (mg ml ⁻¹)	ABTS (IC ₅₀) (mg ml ⁻¹)
Total phenolic (mg/100 g)	1						
Total flavonoid (mg/100 g)	0.973**	1					
Hesperidin (mg/100 g)	0.575**	0.495**	1				
Naringin (mg/100 g)	-0.311**	-0.361**	0.157	1			
FRAP (mg Trolox eq/100 g)	0.978**	0.973**	0.571**	-0.328**	1		
DPPH (IC ₅₀) (mg/ml)	-0.939**	-0.950**	-0.482**	0.239	-0.941**	1	
ABTS (IC ₅₀) (mg/ml)	-0.949**	-0.966**	-0.502**	0.250	-0.955**	0.984**	1

**p ≤ 0.01

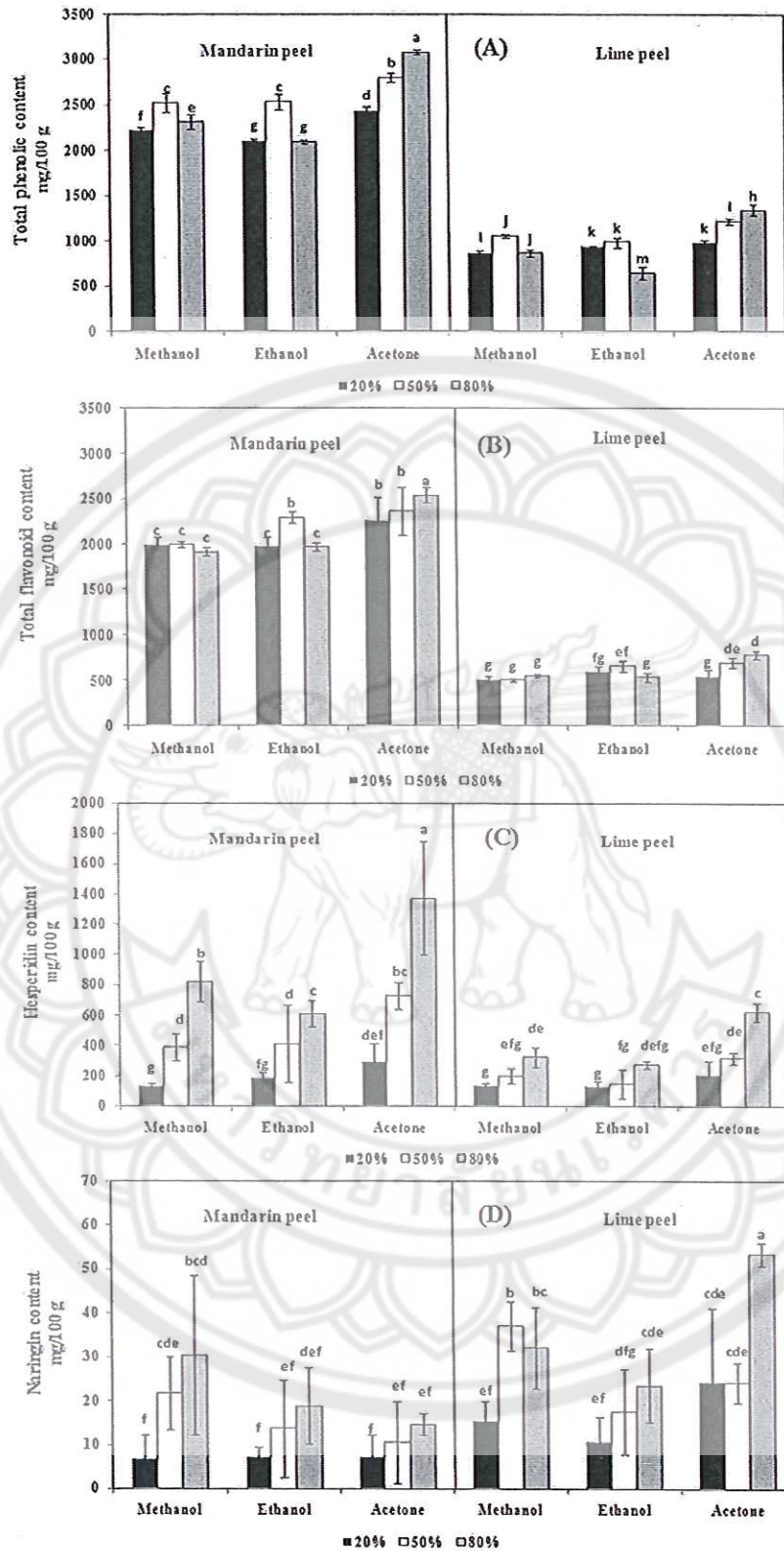


Fig. 1 Total phenolic content (A), total flavonoid (B), hesperidin (C) and naringin (D) from mandarin and lime peel extracts using UAE with different solvent extraction types and solvent

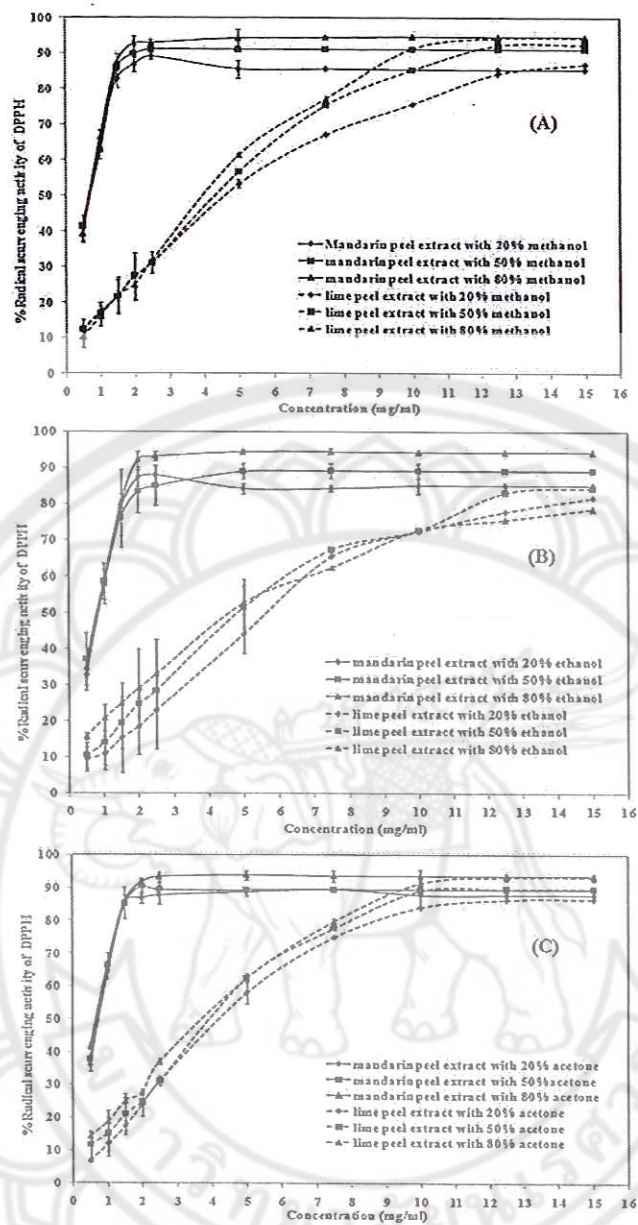


Fig. 2 DPPH radical scavenging activity of antioxidants from mandarin and lime peel using methanol (A) ethanol (B) and acetone (C) at different concentrations by UAE with 40 °C of temperature, 30 minutes and 50.93 watts of power. Data are expressed as means \pm SD (n=3).

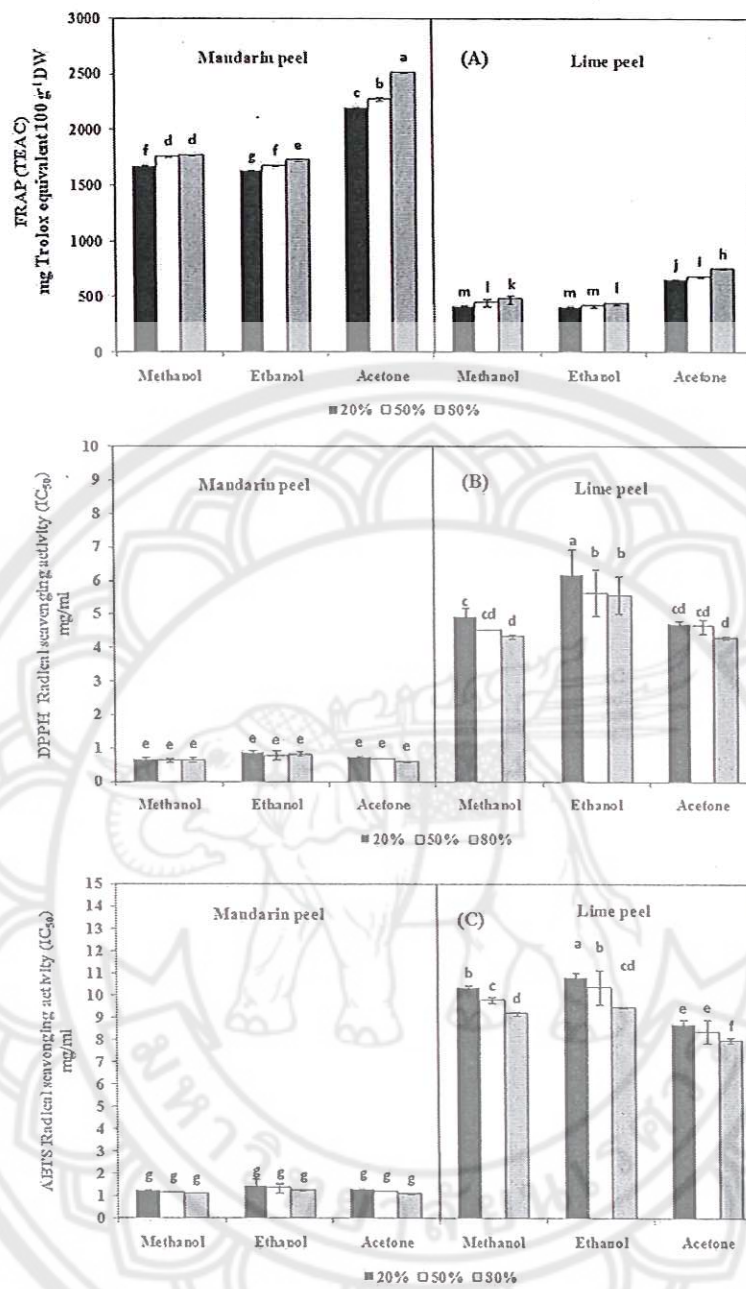
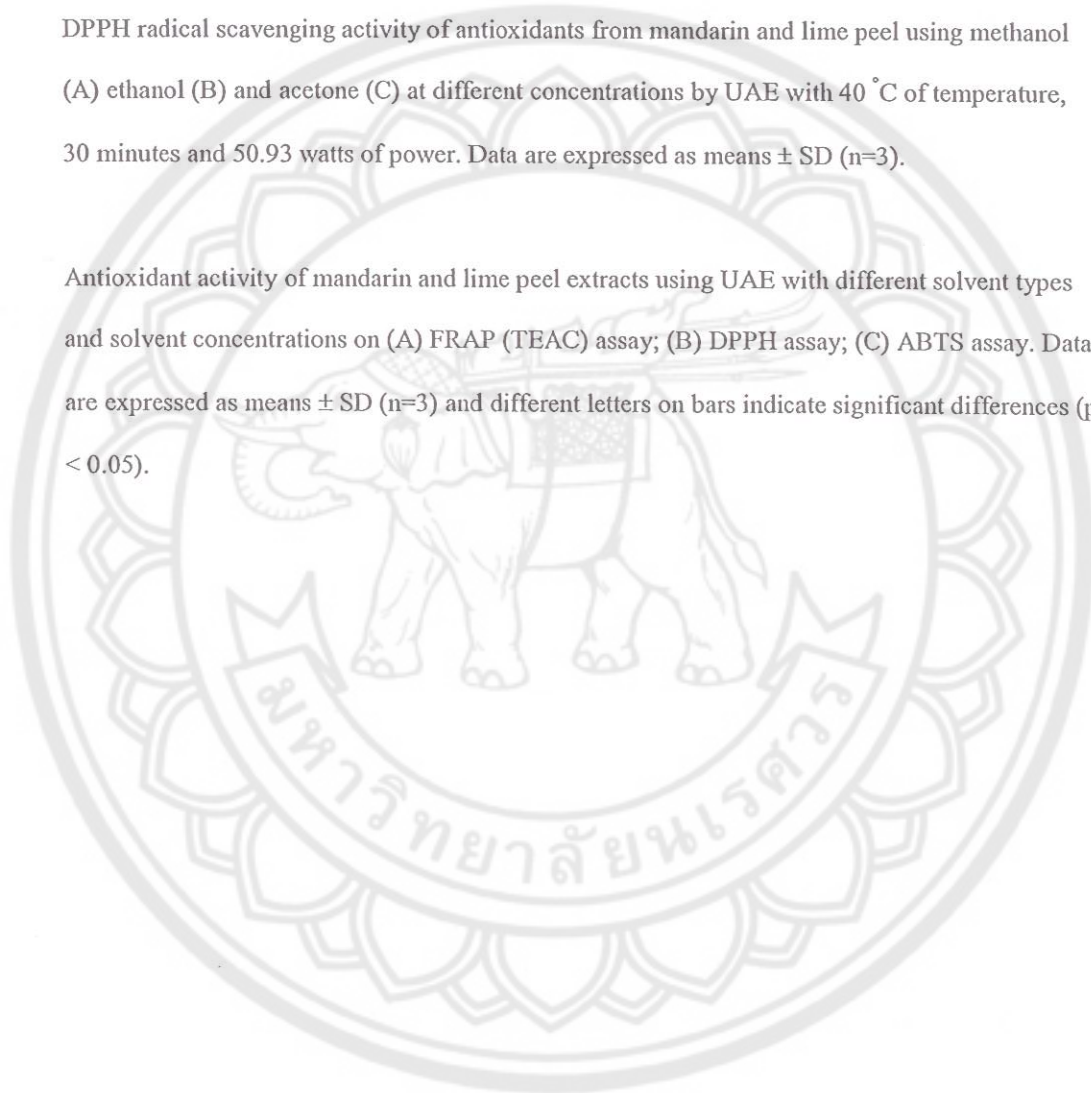


Fig. 3 Antioxidant activity of mandarin and lime peel extracts using UAE with different solvent types and solvent concentrations on (A) FRAP (TEAC) assay; (B) DPPH assay; (C) ABTS assay. Data are expressed as means \pm SD (n=3) and different letters on bars indicate significant differences ($p < 0.05$).

Figure Captions

- Fig. 1.** Total phenolic content (A), total flavonoid (B), hesperidin (C) and naringin (D) from mandarin and lime peel extracts using UAE with different solvent extraction types and solvent concentrations. Data are expressed as means \pm SD (n=3) and different letters on bars indicate significant differences ($p < 0.05$).
- Fig. 2.** DPPH radical scavenging activity of antioxidants from mandarin and lime peel using methanol (A) ethanol (B) and acetone (C) at different concentrations by UAE with 40 °C of temperature, 30 minutes and 50.93 watts of power. Data are expressed as means \pm SD (n=3).
- Fig. 3.** Antioxidant activity of mandarin and lime peel extracts using UAE with different solvent types and solvent concentrations on (A) FRAP (TEAC) assay; (B) DPPH assay; (C) ABTS assay. Data are expressed as means \pm SD (n=3) and different letters on bars indicate significant differences ($p < 0.05$).



2. กรณีนำเสนอในการประชุมหรือสัมมนาระดับชาติและนานาชาติ

ลำดับ ที่	ชื่อนักวิจัยและชื่อผลงาน	เป็นส่วนหนึ่งของ งานวิจัยเรื่อง	ปีงบประมาณ ที่ได้รับการ สนับสนุน	ชื่อการ ประชุมสัมมนา วิชาการ	ตีพิมพ์เป็น Proceedings	
					Oral	Poster
1	Suriyaporn Nipornram Worasi Tochampa Puntarika Rattana Raiwong and Riantong Singanusong Effect of Ultrasound Assisted Extraction on the Antioxidant Activity and Polyphenols from Lime (<i>Citrus aurantifolia</i>) Peel	การต้าน ออกซิเดชันของ สารสกัดจาก เปลือกผลไม้ ตระกูลส้มที่ สกัดด้วยคลื่น เสียง และการ ประยุกต์ใช้น้ำ สลัด	ปีงบประมาณ 2556 งบประมาณ แผ่นดิน มหาวิทยาลัย นครสวรรค์	the 13th ASEAN Food 9-11 September 2013, Singapore Meeting Future Food Demands: Security & Sustainability		✓

Effect of Ultrasound Assisted Extraction on the Antioxidant Activity and Polyphenols from Lime (*Citrus aurantifolia*) Peel

Suriyaporn Nipornram^{1,*}, Worasit Tochampa², Puntarika Rattanatraiwong² and Riantong Singanusong²

¹ Department of Agro-Industry, Faculty of Science and Agricultural Technology, Rajamangala University of Technology Lanna, Phitsanuloke Campus, Phitsanuloke 65000, Thailand

² Department of Agro-Industry, Faculty of Agriculture, Natural Resources and Environment, Naresuan University, Phitsanulok 65000, Thailand.

*Corresponding author: surinipo@gmail.com

Abstract Lime peel is a rich source of polyphenols including phenolic acids and flavonoid. The ultrasound assisted extraction method has been widely applied in extraction of polyphenols from plant materials due to its ability to help in reducing extraction times and increasing extraction yields. However, there have been a few reports on the effects of solvent types and solvent concentrations on the polyphenols by the ultrasound assisted extraction. The aim of this work was therefore to investigate the effects of solvent types (methanol, ethanol and acetone and concentrations (20, 50 and 80% v/v) using ultrasound assisted extraction on the antioxidant activity, total phenolic content, total flavonoid content and flavanone glycosides (hesperidin and naringin) of lime peel. The results showed that the lime peel extract obtained from using 80% acetone provided the highest antioxidant activity (IC₅₀ by DPPH radical scavenging 4.32 mg/ml), total phenolic content (1,338.18 mg of gallic acid equivalent/100 g DW), total flavonoid content (781.89 mg of quercetin equivalent/100 g DW) and flavanone glycosides (622.53 mg of hesperidin and 53.39 mg of naringin/100 g DW). Therefore, 80% acetone was regarded as a suitable solvent for extraction of polyphenols by ultrasound assisted extraction from lime peel.

Keywords Ultrasound assisted extraction, Lime peel, Flavonoid, Hesperidin, Naringin

1. Introduction

The citrus consumption in the last few years is continuously increasing with an estimated global production of citrus fruits up to 50 million tons in the session 2010 – 2012 [1, 2]. Moreover, in 2011 the production of lime in Thailand was 152,536 tons. Consumption of lime is mostly in the form of juice, so there is a peel available which accounts for half the weight of the volume. Most peels are disposed as waste, which causes pollution to the environment. Nowadays, renewed interest in the use of plant materials as a source of naturally bioactive compounds has grown. There have been many reports on the benefits of citrus peels which contain total polyphenol contents in peels of lime, lemons, oranges and grapefruits were higher than that of the fresh [3, 4].

Lime peel contains phenolics, flavonoids, ascorbic acid, carotenoids and reducing sugars and high antioxidant activity [5] which can help the body scavenge free radicals effectively. Moreover, these polyphenolic compounds have been found effective in many health-related properties, such as antioxidant, anticancer, antiviral and anti-inflammatory activities [6].

The extraction capacity and efficiency of different methods for polyphenol from citrus peels have been evaluated, such as solvent extraction, enzyme-assisted extraction and heat treatment [7, 8]. However, these extraction methods have low efficiency, such as long extraction time, high temperature and large volumes of organic solvent used which can be

resulted in an environmental pollution. Furthermore, polyphenols are very sensitive to light, heat and oxygen. Therefore, it is necessary to build efficient extraction method and keep the stability of polyphenols.

Ultrasound assisted extraction (UAE) has attracted more and more attention due to its higher extraction efficiency with shorter extraction time compared to traditional methods, such as solvent extraction and soxhlet extraction [1, 9]. The ultrasonic enhancement is mainly attributed to behaviors of the bubbles of cavitation upon the propagation of the acoustic waves. Collapse of bubbles can disrupt biological cell wall to facilitate the release of extractable compounds [1, 10]. There have been many solvent types for isolation of polyphenols from citrus plants by ultrasound assisted extraction, for example methanol was used for extraction of phenolic compounds from plant materials [11, 12]. In addition, food grade ethanol [1] and acetone [13] were used for extraction of polyphenols especially flavonoids from citrus peels. However, there have been a few reports on the effects of solvent types and solvent concentrations on the polyphenols by the ultrasound assisted extraction from lime peel.

This work aimed to study the effects of solvent types (methanol, ethanol and acetone) and concentrations (20, 50 and 80% v/v) using UAE on the antioxidant activity, total phenolic content, total flavonoid content and flavanone glycosides (hesperidin and naringin) of lime peel.

2. Materials and methods

2.1 Plant Materials

Lime, (*Citrus aurantifolia*) 4 months after bloom, were collected 3 times in December 2011, January and February 2012 from Phitsanuloke province, Thailand. The peels were cut into a size of 1 cm² and dried in hot air oven at 60 °C for 2 h or until reaching a moisture content of 9-10%. The dried peels were grounded with a blade mixer, sieved through a 50 mesh and kept in a brown glass bottle at -20 °C until used.

2.2 Ultrasound assisted extraction (UAE)

For the UAE experiments, an ultrasonic bath was used as an ultrasound source. The bath (model 175DAE, Crest Co. Ltd., Malaysia) was a rectangular container (16.4 cm x 13.3 cm x 10.2 cm). The transducers (frequency 38.5 kHz) were annealed at the bottom. The ultrasonic power level 5 (50.93 W) was used in this study. One g of ground dried peel was added into 20 ml of solvent in a 120 ml brown glass bottle. The bottle was immersed into the ultrasonic bath which contained 1200 ml of water at 40 °C for 30 min. After extraction, the supernatant was filtered under vacuum through Whatman paper No. 4 and analyzed for the antioxidant activity, total phenolic, flavonoid, hesperidin and naringin content.

2.3 Experimental design

The factorial randomized complete block designs was used for the experimental design to determine the factor in this study with 3 replications. The effects of two factors, including the extraction solvents (methanol, ethanol and acetone) and solvent concentrations (20, 50 and 80% v/v) on the antioxidant activity (DPPH radical scavenging activity), phenolic compounds and flavonoid from citrus peels by UAE were investigated. The total of 9 different experiment combinations were analyzed.

2.4 HPLC analysis

HPLC analysis were carried out on a Agilent 1100 chromatograph using a UV detector at 280 nm and a C18 reversed-phase column (Agilent TC-C18 250 mm x 4.6 mm, 5

µm) operated at 37 °C. The mobile phase consisted of two solvents: 0.5% acetic acid (A) and 100% acetonitrile (B). The solvent gradient in volume ratios was as follows: 10–30% B over 20 min. The solvent gradient was increased to 35% B at 25 min and it was maintained at 35% B for 5 min at 1 ml/min. The injection volume was 20 µl [1]. Analyses were performed at least three times and only mean values were reported. Quantification was carried out by using the external standard method and the final concentrations were calculated in mg/100 g DW.

2.5 Total phenolic content (TPC)

The total phenolics content was determined according to the method of Anagnostopoulou et al. [14]. The reaction mixture was consisted of 0.5 ml of the aqueous extract (1 ml extract diluted in solvent 10 ml at a ratio of 1:10), 5 ml of distilled water and 0.5 ml of the Folin–Ciocalteu's reagent. After a period of 3 min, 1 ml of saturated sodium carbonate solution was added. The 10 ml volumetric flasks were vortexed and allowed to stand for 1 h. The absorbance was measured at 725 nm in spectrophotometer (model DR/4000U, HACH Co. Ltd., USA). The total phenolic content was expressed as mg gallic acid equivalent /100 g DW.

2.6 Determination of antioxidant activity (DPPH radical scavenging activity)

Antioxidant activities were determined according to the method of Anagnostopoulou et al. [14]. Aqueous extract 1 ml was added to 2 ml of 1 mM DPPH in methanol. A blank was prepared using the reaction solvent without sample. Absorbance at 517 nm was determined after leaving the sample and blank for 30 min at room temperature in the dark room. The inhibition of DPPH activity was calculated according to the following equation:

$$\text{Scavenging activity (\%)} = [(A_{\text{control}} - A_{\text{sample}})/A_{\text{control}}] * 100$$

(A_{control} = absorbance without extract; A_{sample} = absorbance with extract)

IC₅₀ value (mg/ml) is the concentration at which the scavenging activity was 50% from linear regression analysis.

2.7 Total flavonoid content

Total flavonoids were measured using a colorimetric assay according to the method of Ramful et al. [15]. Aqueous extract 2.5 ml was added to 150 µl of 5% aqueous NaNO₂ and the mixture was vortexed. A blank was prepared using solvent without sample. After 5 min, 150 µl of 10% aqueous AlCl₃ was added. One ml of 1 M NaOH was added 1 min after the addition of AlCl₃. Solution was mixed and the absorbance was measured at 510 nm. Total flavonoids were calculated with respect to quercetin standard curve. Results were expressed in mg of quercetin equivalent /100 g DW.

3. Statistical analysis

Experimental results are expressed as means. All measurements were replicated three times. The data were analyzed by analysis of variance (ANOVA) and the means separated by Duncan's multiple range test.

4. Results and discussion

The results of the variability factors including extraction solvent types (methanol, ethanol and acetone) and solvent concentrations (20, 50 and 80% v/v) and interaction effects between the variability factors of lime peel by UAE shown significantly different ($p \leq 0.05$) on

DPPH radical scavenging activity (IC₅₀), total phenolic, total flavonoid, hesperidin and naringin content. However, the interaction effect between the variability factors on the DPPH radical scavenging activity (IC₅₀) did not show significant difference ($p > 0.05$) as shown in Table 1.

The solvents used in this study were methanol, ethanol and acetone. They were different in their polarities (Table 2) relative to polyphenol of lime peel as phenolic acid, flavonoid, flavanone glycoside (hesperidin and naringin) were polar compounds [16]. Recent results from others reported that polyphenol and antioxidant activity from pummelo extract was significantly different on comparison with solvent type [17] which support the results from this study.

Table 1. Analysis of variance for main and interactive effects on the antioxidant activity and polyphenols as an effect of type and concentration of extraction solvent using UAE of lime peel (means and significance of differences)

Source of variation	DPPH Radical scavenging activity (IC ₅₀)	Total phenolic content	Total flavonoid content	Hesperidin content	Naringin content
Extraction solvents (A)	xx	xx	xx	xx	xx
Solvent concentration (B)	x	xx	xx	xx	xx
Interaction A x B	ns	xx	xx	xx	xx

xx = $p \leq 0.01$; x = $p \leq 0.05$; ns = no significant.

Properties of the extracts from lime peel using UAE with three different solvent types showed that acetone gave the highest antioxidant activity (lowest DPPH IC₅₀) 4.59 mg/ml, total phenolic content 1179.60 mg gallic acid equivalent /100 g, total flavonoid content 679.11 mg quercetin equivalent/100 g, hesperidin content 365.10 mg/100 g and naringin content 33.11 mg/100 g ($p \leq 0.05$) as shown in Table 1. The different extraction efficiencies of these solvents are attributed to their differing polarities and viscosities. Although, the polarity indices of acetone, methanol and ethanol are similar but acetone has the low viscosity 0.32 cP [18]. When ultrasound was applied, ability to extract polyphenol by acetone was increased because acetone can be easily diffused into the plant matrix. As for the influence of liquid viscosity, acoustic cavitation occurs more easily in the liquid with low viscosity because the ultrasonic intensity applied could more easily exceed the molecular forces of the liquid. In addition, the liquid with low viscosity has low density and high diffusivity, and can easily able to diffuse into the pores of the plant materials [10]. The result was also in agreement with the others who reported that acetone were used to extract anthraquinones from *Morinda citrifolia* by ultrasonic [18] and free soluble phenolic from citrus peel [13].

Table 2. Properties of methanol, ethanol and acetone (at 25 °C)

Type of solvents	Polarity index	Surface tension (mN/cm)	Vapor pressure (mmHg)	Viscosity (cP)
Methanol	5.1	22.6	127.05	0.60
Ethanol	5.2	23.7	59.02	1.20
Acetone	5.1	23.7	229.52	0.32
Water	9.0	72.8	23.80	0.89

Source: Hemwimol et al. [18]

The effect of solvent concentrations at three levels using UAE to extract lime peel found that 80% (v/v) solvent concentration provided the highest antioxidant activity (DPPH IC₅₀), total flavonoid, hesperidin and naringin content of 4.75 mg/ml, 624.81 mg quercetin equivalent/100 g, 392.84 mg/g and 35.81 mg/g, respectively ($p \leq 0.05$) as shown in Table 3. The findings are in good agreement with Khan et al. [1] that ethanol:water ratio of 80% (v/v) were chosen as optimal for extracted hesperidin and naringin from fresh citrus peel. However, 20% (v/v) solvent concentration showed the lowest antioxidant activity (DPPH IC₅₀), total flavonoid, hesperidin and naringin content of 5.28 mg/ml, 554.33 mg quercetin equivalent/100 g, 160.99 mg/g and 17.15 mg/g, respectively ($p \leq 0.05$) because viscosity, surface tension and polarity increased due to increasing in water level as a result polyphenol difficultly diffused from the plant matrix into solvent.

Table 3. Effect of solvent types and concentrations of solvent on DPPH radical scavenging activity, total phenolic, total flavonoid and hesperidin and naringin content using UAE of lime peel (means and significance of differences)

Effect of types and concentration solvents		DPPH radical scavenging activity (IC ₅₀) mg/ml	Total phenolic content (mg/100 g)	Total flavonoid (mg/100 g)	Hesperidin content (mg/100 g)	Naringin content (mg/100 g)
Solvent types	Methanol	4.60b	855.06c	525.58c	223.02b	27.24a
	Ethanol	5.50a	927.87b	597.82b	184.67c	17.65b
	Acetone	4.59b	1179.60a	679.11a	365.10a	33.11a
Solvent concentration (%)	20	5.28a	929.69b	554.33b	160.99c	17.15c
	50	4.95ab	1084.93a	623.36a	224.95b	25.69b
	80	4.75b	947.92b	624.81a	392.84a	35.81a

a, b and c – Mean values with different letters in columns are significantly different; $p \leq 0.05$.

The extracts using methanol, ethanol and acetone at concentration of 20, 50 and 80% (v/v) by UAE contained total phenolic and total flavonoid content with the range of 644.61-1338.18 mg gallic acid equivalent/100 g and 508.38-781.00 mg quercetin equivalent/100 g, respectively. The result was also in agreement with another reported that lime peel contain total phenolic content of 811 mg/100 g [19].

The acetone 80% extract had the highest total phenolic contents and total flavonoid content 1338.18 mg gallic acid equivalent/ 100 g and 781.89 mg quercetin equivalent/ 100 g, respectively ($p \leq 0.05$) as shown in Table 4 because it was low in viscosity (Table 2), Therefore, polyphenol can be easily released into the solvent.

Table 4. Total phenolic, total flavonoid, hesperidin and naringin content from lime peel using UAE with different solvent types and concentrations

Treatments		Total Phenolic content (mg/100g)	Total flavonoid content (mg/100g)	Hesperidin content (mg/100g)	Naringin content (mg/100g)
Solvent types	Solvent concentration (%)				
Methanol	20	868.55±17.16f	515.55±30.69ef	139.61±12.87e	10.80±4.43e
	50	1054.13±14.78c	508.38±18.03f	201.58±52.35cd	37.05±5.54b
	80	860.95±33.34f	552.82±52.83e	322.50±66.32b	32.16±9.23bc
Ethanol	20	936.68±14.99e	593.70±66.47d	128.77±37.56e	15.58±5.75de
	50	983.87±55.39d	660.05±63.49c	148.87±98.43de	17.67±9.65de
	80	644.61±66.28g	539.70±48.87ef	276.35±28.02b	23.64±8.39cd
Acetone	20	983.83±29.28d	553.77±72.08e	210.57±88.00c	24.28±16.94cd
	50	1216.80±32.27b	701.66±57.02b	321.06±38.00b	24.20±4.60cd
	80	1338.18±63.13a	781.89±43.52a	622.53±57.24a	53.39±26.38a

a, b, c, d, e, f and g – Mean values with different letters in columns are significantly different; $p \leq 0.05$.

Hesperidin and naringin were major flavonoid of citrus peel [6, 20-23]. The extract using 80% acetone had the highest hesperidin and naringin content of 622.53 and 53.39 mg/100 g, respectively as shown in Table 4. There has been reported that citrus peel contain 100-2900 mg/ 100 g hesperidin [20] and 19.3-492 mg/100 g naringin [24] which in agreement with this present study.

Radical scavenging activity (IC_{50}) of nine extracts from lime peel of different solvents and concentrations were tested by DPPH method and the results are illustrated in Figure 1. Acetone and methanol at 20, 50 and 80% (v/v) extracts inhibited DPPH radicals significantly higher than that of ethanol extracts because acetone and methanol had lower viscosity than that of ethanol [18]. In addition, phenolic acid, flavonoid, hesperidin and naringin can be easily diffused into solvent. Therefore, the extracts are intercept the free radical chain of oxidation and donate hydrogen from the phenolic hydroxyl groups, thereby forming stable end product. The extracts isolated from citrus peels are free radical scavengers and primary antioxidants that react with DPPH radical, which may be attributed to its proton donating ability. The antioxidant activity of the citrus peel fractions was ascribed to their hydrogen donating ability [17].

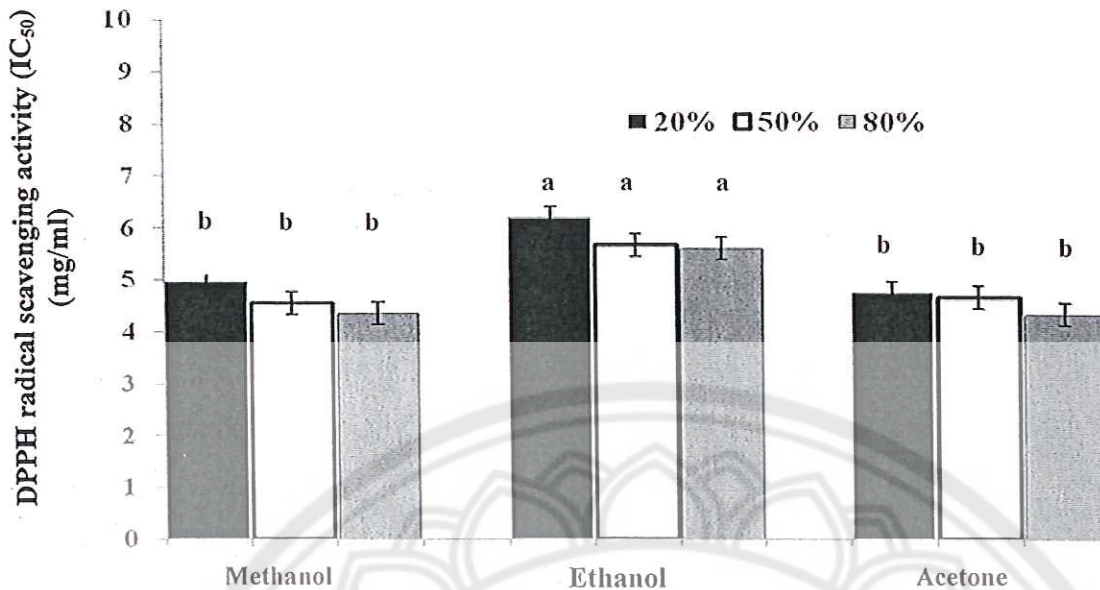


Figure 1. DPPH radical scavenging activity (IC_{50}) of lime peel extracts of different types and concentrations of solvent using UAE (a and b – Mean values with different letters above bars are significantly different; $p \leq 0.05$.)

5. Conclusion

This study showed that the factors in the UAE had a significant influence on the DPPH radical scavenging activity (IC_{50}), total phenolic content, total flavonoid content, hesperidin content and naringin content of lime peel were solvent type and solvent concentration. The interaction of factors, acetone at 80% (v/v) was regarded as a suitable solvent for extraction of lime peel as it had the highest antioxidant activity (DPPH IC_{50} 4.32 mg/ml), total phenolic content (1,338.18 mg of gallic acid equivalent/100 g DW), total flavonoid content (781.89 mg of quercetin/100 g DW) and flavanone glycosides (622.53 mg of hesperidin and 53.39 mg of naringin/100 g DW).

Acknowledgments

This project was financially supported by Naresuan University. Experimental and technical supports were kindly from Naresuan University and Rajamangala University of Technology Lanna.

References

- [1] M.K. Khan, M. Abert-Vian, A.S. Fabiano-Tixier, O. Dangles, F. Chemat, Ultrasound-assisted extraction of polyphenols (flavanone glycosides) from orange (*Citrus sinensis* L.) peel, *Food Chemistry*, 119 (2010) 851-858.
- [2] United States Department of Agriculture/Foreign Agricultural Service, *Citrus: World markets and trade*, Available from <http://usda.mannlib.cornell.edu/MannUsda/viewDocumentInfo.do?documentID=1774>. Accessed 29.01.13 2013.
- [3] J.J. Peterson, G.R. Beecher, S.A. Bhagwat, J.T. Dwyer, S.E. Gebhardt, D.B. Haytowitz, J.M. Holden, Flavanones in grapefruit, lemons, and limes: A compilation and review of the data from the analytical literature, *Journal of Food Composition and Analysis*, 19, Supplement (2006) S74-S80.
- [4] S. Gorinstein, O. Martín-Belloso, Y.S. Park, R. Haruenkit, A. Lojek, M. Číž, A. Caspi, I. Libman, S. Trakhtenberg, Comparison of some biochemical characteristics of different citrus fruits, *Food Chemistry*, 74 (2001) 309-315.

- [5] R. Guimarães, L. Barros, J.C.M. Barreira, M.J. Sousa, A.M. Carvalho, I.C.F.R. Ferreira, Targeting excessive free radicals with peels and juices of citrus fruits: Grapefruit, lemon, lime and orange, *Food and Chemical Toxicology*, 48 (2010) 99-106.
- [6] E. Tripoli, M.L. Guardia, S. Giammanco, D.D. Majo, M. Giammanco, Citrus flavonoids: Molecular structure, biological activity and nutritional properties: A review, *Food Chemistry*, 104 (2007) 466-479.
- [7] O. Benavente-García, J. Castillo, F.R. Marin, A. Ortuño, J.A. Del Río, Uses and properties of citrus flavonoids, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45 (1997) 4505-4515.
- [8] D. Procházková, I. Boušová, N. Wilhelmová, Antioxidant and prooxidant properties of flavonoids, *Fitoterapia*, 82 (2011) 513-523.
- [9] Y. Ma, X. Ye, Y. Hao, G. Xu, G. Xu, D. Liu, Ultrasound-assisted extraction of hesperidin from Penggan (*Citrus reticulata*) peel, *Ultrasonics Sonochemistry*, 15 (2008) 227-232.
- [10] F. Chemat, H. Zill e, M.K. Khan, Applications of ultrasound in food technology: Processing, preservation and extraction, *Ultrasonics Sonochemistry*, 18 (2011) 813-835.
- [11] R. Zia ur, Citrus peel extract – A natural source of antioxidant, *Food Chemistry*, 99 (2006) 450-454.
- [12] J. Londoño-Londoño, V.R.D. Lima, O. Lara, A. Gil, T.B.C. Pasa, G.J. Arango, J.R.R. Pineda, Clean recovery of antioxidant flavonoids from citrus peel: Optimizing an aqueous ultrasound-assisted extraction method, *Food Chemistry*, 119 (2010) 81-87.
- [13] G. Oboh, A.O. Ademosun, Characterization of the antioxidant properties of phenolic extracts from some citrus peels, *J Food Sci Technol*, 49 (2012) 729-736.
- [14] M.A. Anagnostopoulou, P. Kefalas, V.P. Papageorgiou, A.N. Assimopoulou, D. Boskou, Radical scavenging activity of various extracts and fractions of sweet orange peel (*Citrus sinensis*), *Food Chemistry*, 94 (2006) 19-25.
- [15] D. Ramful, T. Bahorun, E. Bourdon, E. Tarnus, O.I. Aruoma, Bioactive phenolics and antioxidant propensity of flavedo extracts of Mauritian citrus fruits: Potential prophylactic ingredients for functional foods application, *Toxicology*, 278 (2010) 75-87.
- [16] G. Gattuso, D. Barreca, C. Gargiulli, U. Leuzzi, C. Caristi, Flavonoid composition of citrus juices, *Molecules*, 12 (2007) 1641-1673.
- [17] G.K. Jayaprakasha, B. Girenavar, B.S. Patil, Antioxidant capacity of pummelo and navel oranges: Extraction efficiency of solvents in sequence, *LWT - Food Science and Technology*, 41 (2008) 376-384.
- [18] S. Hemwimol, P. Pavasant, A. Shotipruk, Ultrasound-assisted extraction of anthraquinones from roots of *Morinda citrifolia*, *Ultrasonics Sonochemistry*, 13 (2006) 543-548.
- [19] T. Kuljarachanan, S. Devahastin, N. Chiewchan, Evolution of antioxidant compounds in lime residues during drying, *Food Chemistry*, 113 (2009) 944-949.
- [20] Y.C. Wang, Y.C. Chuang, H.W. Hsu, The flavonoid, carotenoid and pectin content in peels of citrus cultivated in Taiwan, *Food Chemistry*, 106 (2008) 277-284.
- [21] A. Garg, S. Garg, L.J.D. Zaneveld, A.K. Singla, Chemistry and pharmacology of the citrus bioflavonoid hesperidin, *Phytotherapy Research*, 15 (2001) 655-669.
- [22] A.N. Giannuzzo, H.J. Boggetti, M.A. Nazareno, H.T. Mishima, Supercritical fluid extraction of naringin from the peel of *Citrus paradisi*, *Phytochemical Analysis*, 14 (2003) 221-223.
- [23] F. Pellati, S. Benvenuti, M. Melegari, High-performance liquid chromatography methods for the analysis of adrenergic amines and flavanones in *Citrus aurantium* L. var. amara, *Phytochemical Analysis*, 15 (2004) 220-225.
- [24] D.C. Abeysinghe, X. Li, C. Sun, W. Zhang, C. Zhou, K. Chen, Bioactive compounds and antioxidant capacities in different edible tissues of citrus fruit of four species, *Food Chemistry*, 104 (2007) 1338-1344.