

การพัฒนาฟิล์มไบโอดีเซลที่มีสารสกัดจากพรอพโพลิส

นางสาววรรณา วิชาญกิตติ

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเทคโนโลยีทางอาหาร ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2552

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

DEVELOPMENT OF CHITOSAN FILM CONTAINING PROPOLIS EXTRACT

Miss Waranya Vitchayakitti

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Food Technology

Department of Food Technology

Faculty of Science

Chulalongkorn University

Academic Year 2009

Copyright of Chulalongkorn University

วรัญญา วิชญกิตติ : การพัฒนาฟิล์มไคโตซานที่มีสารสกัดจากพรอพโพลิส.
(DEVELOPMENT OF CHITOSAN FILM CONTAINING PROPOLIS EXTRACT) อ. ที่
ปริกษาวิทยานิพนธ์หลัก : รศ.ดร.อุบลรัตน์ สิริภัทราวรรณ, 81 หน้า.

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการใช้ประโยชน์ของสารสกัดจากพรอพโพลิสของประเทศไทย ในการนำมาใช้เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระและยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ของฟิล์มไคโตซาน การทดลองขั้นแรกเป็นการศึกษาการแปรอัตราส่วนของน้ำต่อเอทานอลที่ต่างกันคือ 70:30, 60:40, 50:50, 40:60 และ 30:70 ในตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดพรอพโพลิส ติดตามผลโดยการหาปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดในสารสกัด ด้วยวิธี Folin-Ciocalteu การวิเคราะห์สารประกอบฟีนอลิกโดยใช้ High Performance Liquid Chromatography (HPLC) การศึกษาปฏิกิริยาการจับอนุมูล 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) และศึกษาความสามารถของสารสกัดพรอพโพลิสในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ 4 ชนิด ได้แก่ *Staphylococcus aureus* (TISTR 118), *Salmonella enteritidis* (DMST 17368), *Escherichia coli* (TISTR 780) และ *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) ด้วยวิธี agar diffusion พบว่าปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดในสารสกัดอยู่ในช่วง 5.56-41.00 mg gallic acid equivalent/g การเพิ่มปริมาณเอทานอลในตัวทำละลายสูงขึ้นส่งผลให้มีปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดสูงขึ้น และพบ rutin และ quercetin ทุกตัวอย่างทดลอง นอกจากนี้ยังพบว่าปฏิกิริยาการจับอนุมูล DPPH มีค่าแปรผันตามปริมาณสารประกอบฟีนอลิก เมื่อปริมาณสารประกอบฟีนอลิกเพิ่มขึ้นปฏิกิริยาการจับอนุมูล DPPH จะสูงขึ้น ยกเว้นในการสกัดด้วยตัวทำละลายน้ำต่อเอทานอล 40:60 พบว่าความสามารถในการจับอนุมูล DPPH ลดลง จากการศึกษาความสามารถในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ พบว่าเกิดบริเวณการยับยั้งการเจริญของ *S. aureus* เพียงชนิดเดียวเท่านั้น สารสกัดพรอพโพลิสที่ได้จากการสกัดที่อัตราส่วนของน้ำต่อเอทานอลที่ 70:30 เกิดบริเวณยับยั้งสูงที่สุด และสารสกัดพรอพโพลิสที่ได้จากการสกัดที่อัตราส่วนของน้ำต่อเอทานอลที่ 40:60 และ 30:70 ไม่เกิดบริเวณการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ จึงเลือกใช้ตัวทำละลายที่มีอัตราส่วนของน้ำต่อเอทานอลเป็น 70:30 สำหรับการสกัดพรอพโพลิสเพื่อใช้ในการทดลองขั้นต่อไป การทดลองขั้นที่สองเป็นการศึกษาผลของการเติมสารสกัดพรอพโพลิสต่อคุณสมบัติของฟิล์มไคโตซาน โดยแปรความเข้มข้นของสารสกัดพรอพโพลิสเป็น 0.5, 1.5, 2.5, 5 และ 10% (w/v) ติดตามผลโดยการวัดสมบัติทางกายภาพ ได้แก่ การวัดค่าสี (ΔE), transparency (%T), water vapor permeability (WVP), oxygen gas transmission rate (OTR), tensile strength (TS), elongation at break (%E) การวิเคราะห์ทางเคมี ได้แก่ การหาปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด การวิเคราะห์สารประกอบฟีนอลิกโดยใช้ HPLC และการศึกษาปฏิกิริยาการจับอนุมูล DPPH การศึกษา interaction ของหมู่ฟังก์ชันของฟิล์มไคโตซานที่เติมสารสกัดพรอพโพลิสโดยใช้ Fourier Transform Infrared Spectrometer (FT-IR) การวัดค่า Glass transition temperature (T_g) โดยใช้เครื่อง Differential Scanning Calorimeter (DSC) รวมทั้งการศึกษสมบัติการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ พบว่าการเติมสารสกัดพรอพโพลิสที่เข้มข้นสูงขึ้นส่งผลให้มีค่า ΔE , TS และ %E สูงขึ้น ส่วนค่า %T ลดลง ในขณะที่เดียวกันพบว่าค่า WVP และค่า OTR ของฟิล์มไคโตซานที่เติมสารสกัดพรอพโพลิสลดลงและแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) กับฟิล์มไคโตซานที่ไม่เติมสารสกัดพรอพโพลิส (ตัวอย่างควบคุม) พบว่าการเติมสารสกัดพรอพโพลิสที่ความเข้มข้นสูงขึ้นส่งผลให้มีปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดและมีปฏิกิริยาการจับอนุมูล DPPH ในฟิล์มสูงขึ้น และพบ rutin ในทุกตัวอย่างการทดลอง โดยพบการเกิดพันธะไฮโดรเจนระหว่าง amine group ของไคโตซาน และ hydroxyl group ของสารประกอบฟีนอลิก ในสารสกัดพรอพโพลิส นอกจากนี้ยังพบว่าการเติมสารสกัดพรอพโพลิสที่ความเข้มข้น 0.5-2.5% (w/v) ทำให้ค่า T_g สูงขึ้น แต่เมื่อเติมสารสกัดพรอพโพลิสเพิ่มขึ้นจาก 5-10% (w/v) กลับส่งผลให้ค่า T_g ลดลง อย่างไรก็ตามแม้ว่าไม่เกิดบริเวณการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ทั้ง 4 ชนิด แต่ไม่พบการเจริญของจุลินทรีย์บริเวณที่สัมผัสกับฟิล์มไคโตซานที่เติมสารสกัดพรอพโพลิส

ภาควิชา.....เทคโนโลยีทางอาหาร.....

ลายมือชื่อ.....

สาขาวิชา.....เทคโนโลยีทางอาหาร.....

ลายมือชื่อ อ.ที่ปริกษาวิทยานิพนธ์หลัก.....

ปีการศึกษา.....2552.....

5072452223 : MAJOR FOOD TECHNOLOGY

KEYWORDS : Propolis / Chitosan / Film / Antioxidant / Antimicrobial

WARANYA VITCHAYAKITTI : DEVELOPMENT OF CHITOSAN FILM CONTAINING PROPOLIS EXTRACT. THESIS ADVISOR : ASSOC. PROF. UBONRAT SIRIPATRAWAN, Ph.D., 81 pp.

The objective for this research was to study the use of propolis in Thailand for improvement of antioxidant and antimicrobial properties of chitosan film. Firstly, the propolis extract was prepared by using solvent with different water to ethanol ratios including 70:30, 60:40, 50:50, 40:60 and 30:70. The total phenolic content using Folin-Ciocalteu method, the phenolic compound using high performance liquid chromatography (HPLC), 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging activity and the ability to inhibit *Staphylococcus aureus* (TISTR 118), *Salmonella enteritidis* (DMST 17368), *Escherichia coli* (TISTR 780) and *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) using agar diffusion technique were determined in order to selected the optimum extraction condition. The results showed that the total phenolic contents were in the range of 5.56-41.00 mg gallic acid equivalent/g. The total phenolic contents, rutin, quercetin and DPPH increased with increasing ethanol concentration in the solvent. It was also found that the extract using 70 :30 solvent was able to inhibit *S. aureus* whereas those using 40:60 and 30:70 were ineffective. Therefore, the water to ethanol ratio of 70:30 was the optimum solvent and was used for further experiment. Secondly, the effect of adding propolis extract with different concentrations 0.5, 1.5, 2.5, 5 and 10% (w/v) to the chitosan film was determined by measuring the physical properties including surface colour (ΔE), transparency (%T), water vapor permeability (WVP), oxygen gas transmission rate (OTR), tensile strength (TS), elongation at break (%E), chemical property including TPC, phenolic compound and DPPH radical scavenging activity. The interaction of functional group in the chitosan film containing propolis extract and glass transition temperature (T_g) were also determined using the Fourier Transform Infrared Spectrometer (FT-IR) and Differential Scanning Calorimeter (DSC), respectively. The results showed that ΔE , TS, %E, total phenolic contents and DPPH radical scavenging of the film increased, while %T and WVP, OTR decreased with increasing concentration of the propolis. Rutin was found in all samples. The FT-IR spectra indicated that there was hydrogen bond between functional groups of chitosan and phenolic compounds of propolis. It was also found that adding propolis extract affected the T_g of the of chitosan film, resulting changes in physical properties of the films. The antimicrobial property of all film samples indicated there was no inhibition zone of all 4 bacteria tested. However, there was no bacterial growth under the contact surface of the chitosan film containing propolis extract.

Department : Food Technology

Field of Study : Food Technology

Academic Year : 2009

Student's Signature

Advisor's Signature

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้เสร็จสมบูรณ์ได้ โดยความกรุณาและความช่วยเหลืออย่างดี
 ยิ่งจาก รองศาสตราจารย์ ดร.อุบลรัตน์ สิริภักทวารวณ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่ได้กรุณา
 สละเวลาอันมีค่าเพื่อให้คำปรึกษา คำแนะนำ ตลอดจนความเอาใจใส่ดูแลและให้ความช่วยเหลือ
 อย่างใกล้ชิดมาโดยตลอด รวมถึงกรุณาช่วยตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้จนเสร็จสมบูรณ์

ขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.รมณี สงวนดีกุล ประธานกรรมการ
 สอบวิทยานิพนธ์ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ สุทธิศักดิ์ สุขในศิลป์ และรองศาสตราจารย์ ดร.สุวิธสา
 พงษ์อำไพ กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ เป็นอย่างสูงที่กรุณาเสียสละเวลามาตรวจสอบ พร้อมทั้ง
 ชี้แนะแนวทางในการปรับปรุงวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้มีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณ พี่สุนัน และพี่แก้ว เจ้าหน้าที่ศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์และ
 เทคโนโลยี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้ความช่วยเหลือและคำแนะนำในการใช้เครื่องมือ

ขอขอบพระคุณเจ้าหน้าที่ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหารและเจ้าหน้าที่ประจำ
 ห้องปฏิบัติการทุกท่านที่ช่วยอำนวยความสะดวกในด้านต่างๆ

ขอขอบคุณพี่ น้อง และเพื่อนๆ ปริญญาโท ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร คณะ
 วิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย สำหรับกำลังใจ และน้ำใจที่มีให้ตลอดการวิจัย และผู้ที่มี
 ส่วนช่วยเหลือที่ได้กล่าวนาม ก็ขอได้รับความขอบคุณจากผู้วิจัยไว้ ณ โอกาสนี้

ท้ายสุดนี้ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดา คุณตา คุณยาย และทุกคนใน
 ครอบครัวทุกท่าน ที่ได้สั่งสอนให้ผู้วิจัยมีความอดทน ให้กำลังใจ และความห่วงใยพร้อมทั้งให้
 ความช่วยเหลือสนับสนุนในทุกด้านแก่ผู้วิจัยเสมอมาจนสำเร็จการศึกษา

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ญ
สารบัญภาพ.....	ฐ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
บทที่ 2 วารสารปริทัศน์.....	3
2.1 พรอพโพลิส.....	3
2.1.1 คำจำกัดความ แหล่งทางพฤกษศาสตร์ ความสำคัญ.....	3
2.1.2 ส่วนประกอบทางเคมี.....	6
2.1.3 สมบัติการต้านอนุมูลอิสระ.....	7
2.1.4 สมบัติการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์.....	10
2.1.5 การประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรม.....	12
2.2 फिल्मที่สามารถบริโภคได้ (Edible film).....	13
2.3 ไคโตซาน.....	14
2.3.1 สมบัติการต้านอนุมูลอิสระ.....	16
2.3.2 สมบัติการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์.....	17
2.3.3 फिल्मไคโตซานและการประยุกต์ใช้ผลิตภัณฑ์อาหาร.....	18
บทที่ 3 การดำเนินงานวิจัย.....	21
3.1 ศึกษาอัตราส่วนของน้ำต่อเอทานอลที่เหมาะสมในการสกัดพรอพโพลิส.....	23
3.1.1 ศึกษาปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดในสารสกัดพรอพโพลิส.....	23
3.1.2 ศึกษาสารประกอบฟีนอลิกในสารสกัดพรอพโพลิส.....	23
3.1.3 ศึกษาปฏิกิริยาการจับอนุมูล 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) ในสารสกัดพรอพโพลิส.....	24

	หน้า
3.1.4 ศึกษาสมบัติการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์.....	24
3.1.5 การวิเคราะห์ผลทางสถิติ.....	25
3.2 ศึกษาผลของความเข้มข้นของสารสกัดพรอพโพลิสต่อสมบัติฟิล์มโคโตซาน..	25
3.2.1 สมบัติทางกายภาพ.....	26
3.2.1.1 วัดค่าสี.....	26
3.2.1.2 วัดค่าความโปร่งใส.....	26
3.2.1.3 วัดค่าการซึมผ่านของไอน้ำ.....	26
3.2.1.4 วัดค่าอัตราการซึมผ่านของก๊าซออกซิเจน.....	27
3.2.1.5 วัดสมบัติเชิงกล.....	27
3.2.2 สมบัติทางเคมี.....	27
3.2.2.1 ศึกษา TPC ในฟิล์มโคโตซานที่เติมสารสกัดพรอพโพลิส ที่ความเข้มข้นต่างกัน.....	28
3.2.2.2 ศึกษาสารประกอบฟีนอลิกในฟิล์มโคโตซานที่เติมสารสกัด พรอพโพลิสที่ความเข้มข้นต่างกัน.....	28
3.2.2.3 การศึกษาปฏิกิริยาการจับอนุมูล DPPH ในฟิล์มโคโตซานที่ เติมสารสกัดพรอพโพลิสที่ความเข้มข้นต่างกัน.....	28
3.2.3 ศึกษา interaction ของหมู่ฟังก์ชันของฟิล์มโคโตซานที่เติมสารสกัด พรอพโพลิส.....	28
3.2.4 วัดค่า Glass transition temperature.....	29
3.2.5 สมบัติการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์.....	29
3.2.6 การวิเคราะห์ผลทางสถิติ.....	29
บทที่ 4 ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง.....	30
4.1 ผลการศึกษาอัตราส่วนของน้ำต่อเอทานอลในตัวทำละลายที่เหมาะสม ในการสกัดพรอพโพลิส.....	30
4.1.1 การศึกษาปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดในสารสกัดพรอพโพลิส.....	30
4.1.2 การศึกษาสารประกอบฟีนอลิกในสารสกัดพรอพโพลิส.....	31
4.1.3 การศึกษาปฏิกิริยาการจับอนุมูล DPPH ในสารสกัดพรอพโพลิส.....	34
4.1.4 การศึกษาสมบัติการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ของ สารสกัดพรอพโพลิส.....	36

	หน้า
4.2 การศึกษาความเข้มข้นของสารสกัดพรอพโพลิสต่อสมบัติฟิล์มไคโตซาน.....	38
4.2.1 สมบัติทางกายภาพ.....	38
4.2.1.1 การวัดค่าสี.....	38
4.2.1.2 การวัดค่าความโปร่งใส.....	39
4.2.1.3 การวัดค่าการซึมผ่านของไอน้ำ.....	40
4.2.1.4 การวัดค่าอัตราการซึมผ่านของก๊าซออกซิเจน.....	41
4.2.1.5 การวัดสมบัติเชิงกล.....	42
4.2.2 สมบัติทางเคมี.....	43
4.2.2.1 การศึกษา TPC ในฟิล์มไคโตซานที่เติมสารสกัดพรอพโพลิสที่ความเข้มข้นต่างกัน.....	43
4.2.2.2 การศึกษาสารประกอบฟีนอลิกในฟิล์มไคโตซานที่เติมสารสกัดพรอพโพลิสที่ความเข้มข้นต่างกัน.....	45
4.2.2.3 การศึกษาปฏิกิริยาการจับอนุมูล DPPH ในฟิล์มไคโตซานที่เติมสารสกัดพรอพโพลิสที่ความเข้มข้นต่างกัน.....	47
4.2.3 การศึกษา interaction ของหมู่ฟังก์ชันของฟิล์มไคโตซานที่เติมสารสกัดพรอพโพลิส.....	48
4.2.4 การวัดค่า Glass transition temperature.....	53
4.2.5 สมบัติการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์.....	55
บทที่ 5 สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ.....	58
รายการอ้างอิง.....	60
ภาคผนวก.....	70
ภาคผนวก ก.....	71
ภาคผนวก ข.....	72
ภาคผนวก ค.....	74
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....	81

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
2.1 ส่วนประกอบของพรอพโพลิส.....	4
2.2 ประเภทของพรอพโพลิส แห่่งกำเนิด และส่วนประกอบทางเคมี.....	5
2.3 ตัวอย่างการประยุกต์ใช้ไคโตซาน.....	15
4.1 ค่า TPC ในสารสกัดพรอพโพลิสเมื่อแปรอัตราส่วนของน้ำต่อเอทานอล.....	30
4.2 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกที่พบในสารสกัดพรอพโพลิสที่สกัดด้วยตัวทำละลายที่มีอัตราส่วนของน้ำต่อเอทานอลต่างกัน.....	33
4.3 ปฏิริยาการจับอนุมูล DPPH (%) ในสารสกัดพรอพโพลิสเมื่อแปรอัตราส่วนของน้ำต่อเอทานอล.....	35
4.4 การยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ของสารสกัดพรอพโพลิสเมื่อแปรอัตราส่วนของน้ำต่อเอทานอล.....	36
4.5 ค่าสี L*, a*, b* และ ΔE ของฟิล์มไคโตซานที่เติมสารสกัดพรอพโพลิสที่ความเข้มข้นต่างกัน.....	38
4.6 ค่า %T ของฟิล์มไคโตซานที่เติมสารสกัดพรอพโพลิสที่ความเข้มข้นต่างกัน.....	39
4.7 ค่า WVP ของฟิล์มไคโตซานที่เติมสารสกัดพรอพโพลิสที่ความเข้มข้นต่างกัน.....	40
4.8 ค่า OTR ของฟิล์มไคโตซานที่เติมสารสกัดพรอพโพลิสที่ความเข้มข้นต่างกัน.....	41
4.9 ค่า TS และ %E ของฟิล์มไคโตซานที่เติมสารสกัดพรอพโพลิสที่เข้มข้นต่างกัน.....	42
4.10 ค่า TPC ในฟิล์มไคโตซานที่เติมสารสกัดพรอพโพลิสที่มีความเข้มข้นต่างกัน.....	44
4.11 สารประกอบฟีนอลิกที่พบในสารละลายฟิล์มไคโตซานที่เติมสารสกัดพรอพโพลิสที่ความเข้มข้นต่างกัน.....	47
4.12 ปฏิริยาการจับอนุมูล DPPH (%) ในสารละลายฟิล์มไคโตซานที่เติมสารสกัดพรอพโพลิสที่ความเข้มข้นต่างกัน.....	48
4.13 ผลการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ของฟิล์มไคโตซานที่เติมสารสกัดพรอพโพลิสที่ความเข้มข้นต่างกัน.....	56
ก.1 ความหนาของฟิล์มไคโตซานที่เติมสารสกัดพรอพโพลิสที่ความเข้มข้นต่างกัน.....	71
ค.1 ความแปรปรวน (ANOVA) จากการวิเคราะห์ผลทางสถิติของปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดในสารสกัดพรอพโพลิสเมื่อแปรอัตราส่วนของน้ำต่อเอทานอลที่ระดับความเชื่อมั่น 95%.....	74

ตารางที่	หน้า
ค.2 ความแปรปรวน (ANOVA) จากการวิเคราะห์ผลทางสถิติของปฏิบัติการจับอนุภาค DPPH ในสารสกัดพรอพโพลิสเมื่อแปรอัตราส่วนของน้ำต่อเอทานอล ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%.....	74
ค.3 ความแปรปรวน (ANOVA) จากการวิเคราะห์ผลทางสถิติของผลการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ของสารสกัดพรอพโพลิสเมื่อแปรอัตราส่วนของน้ำต่อเอทานอล ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%.....	75
ค.4 ความแปรปรวน (ANOVA) จากการวิเคราะห์ผลทางสถิติของค่าสี L* ของฟิล์มไคโตซานที่เติมสารสกัดพรอพโพลิสที่ความเข้มข้นต่างกัน ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%.....	75
ค.5 ความแปรปรวน (ANOVA) จากการวิเคราะห์ผลทางสถิติของค่าสี a* ของฟิล์มไคโตซานที่เติมสารสกัดพรอพโพลิสที่ความเข้มข้นต่างกัน ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%.....	76
ค.6 ความแปรปรวน (ANOVA) จากการวิเคราะห์ผลทางสถิติของค่าสี b* ของฟิล์มไคโตซานที่เติมสารสกัดพรอพโพลิสที่ความเข้มข้นต่างกัน ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%.....	76
ค.7 ความแปรปรวน (ANOVA) จากการวิเคราะห์ผลทางสถิติของค่าสี ΔE ของฟิล์มไคโตซานที่เติมสารสกัดพรอพโพลิสที่ความเข้มข้นต่างกัน ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%.....	77
ค.8 ความแปรปรวน (ANOVA) จากการวิเคราะห์ผลทางสถิติของค่าความโปร่งใสของฟิล์มไคโตซานที่เติมสารสกัดพรอพโพลิสที่ความเข้มข้นต่างกัน ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%.....	77
ค.9 ความแปรปรวน (ANOVA) จากการวิเคราะห์ผลทางสถิติของค่าการซึมผ่านของไอน้ำของฟิล์มไคโตซานที่เติมสารสกัดพรอพโพลิสที่ความเข้มข้นต่างกัน ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%.....	78
ค.10 ความแปรปรวน (ANOVA) จากการวิเคราะห์ผลทางสถิติของค่าอัตราการซึมผ่านของก๊าซออกซิเจนของฟิล์มไคโตซานที่เติมสารสกัดพรอพโพลิสที่ความเข้มข้นต่างกัน ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%.....	78

ตารางที่	หน้า
ค.11 ความแปรปรวน (ANOVA) จากการวิเคราะห์ผลทางสถิติของค่า tensile strength ของฟิล์มไคโตซานที่เติมสารสกัดพรอพโพลิส ที่ความเข้มข้นต่างกัน ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%.....	79
ค.12 ความแปรปรวน (ANOVA) จากการวิเคราะห์ผลทางสถิติของค่า elongation at break ฟิล์มไคโตซานที่เติมสารสกัดพรอพโพลิส ที่ความเข้มข้นต่างกัน ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%.....	79
ค.13 ความแปรปรวน (ANOVA) จากการวิเคราะห์ผลทางสถิติของปริมาณฟีนอลิก ทั้งหมดในฟิล์มไคโตซานที่เติมสารสกัดพรอพโพลิสที่ความเข้มข้นต่างกัน ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%.....	80
ค.14 ความแปรปรวน (ANOVA) จากการวิเคราะห์ผลทางสถิติของปฏิกิริยาการ จับอนุมูล DPPH ในฟิล์มไคโตซานที่เติมสารสกัดพรอพโพลิส ที่ความเข้มข้นต่างกัน ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%.....	80

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
2.1 โครงสร้างของ flavan.....	8
2.2 โครงสร้างของโคตินและโคโตซาน.....	14
3.1 ลักษณะของพรอปโพลิส.....	22
4.1 HPLC Chromatogram แสดงสารประกอบฟีนอลิกที่พบในสารสกัดพรอปโพลิส.....	32
4.2 โครงสร้างโมเลกุลของ rutin และ quercetin.....	33
4.3 HPLC Chromatogram แสดงสารประกอบฟีนอลิกที่พบในฟิล์มโคโตซาน ที่เติมสารสกัดพรอปโพลิส.....	46
4.4 FT-IR spectra ของสารสกัดพรอปโพลิส.....	49
4.5 FT-IR spectra ของฟิล์มโคโตซานที่เติมสารสกัดพรอปโพลิส.....	52
4.6 DSC thermograms แสดงค่า T_g ของฟิล์มโคโตซานที่เติมสารสกัดพรอปโพลิส.....	54
ข.1 สารสกัดพรอปโพลิสที่สกัดด้วยตัวทำละลายน้ำต่อเอทานอลที่แตกต่างกัน.....	72
ข.2 สารสกัดพรอปโพลิสที่สกัดด้วยตัวทำละลายน้ำต่อเอทานอล 70:30 ที่มีความเข้มข้น (%w/v) ที่แตกต่างกัน.....	72
ข.3 ฟิล์มโคโตซานที่เติมสารสกัดพรอปโพลิสที่มีความเข้มข้น (%w/v) ต่างกัน.....	73

บทที่ 1

บทนำ

โคโตซาน คือสารโพลีเมอร์ชีวภาพที่สกัดจากโคติน ซึ่งได้จากเปลือกกุ้ง ปู แขนปลาหมึก ซึ่งเป็นของเหลือทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรมสัตว์น้ำ การนำเปลือกกุ้ง ปู หรือแขนปลาหมึกมาสกัด แล้วนำกลับมาใช้ใหม่เป็นการเพิ่มมูลค่าให้แก่วัตถุดิบ นอกจากนี้โคโตซานสามารถขึ้นรูปเป็นฟิล์มได้ง่าย และมีสมบัติในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ จึงมีผลให้ฟิล์มโคโตซานมีสมบัติในการยืดอายุการเก็บของอาหารได้ ทั้งนี้โคโตซานเป็นวัตถุดิบได้จากธรรมชาติ สามารถย่อยสลายได้โดยธรรมชาติ และไม่ส่งผลกระทบต่อภาวะแวดล้อม จึงสามารถนำมาใช้ทดแทนวัตถุดิบที่ได้จากเคมีสังเคราะห์

ประสิทธิภาพของฟิล์มโคโตซานขึ้นอยู่กับหลายปัจจัย เช่น ลักษณะโมเลกุลของโคโตซาน ได้แก่ degree of acetylation และน้ำหนักโมเลกุล, สารประกอบอื่นในระบบ ได้แก่ ประเภทและความเข้มข้นของกรด, ปริมาณของโปรตีน ไขมัน ไอออน และส่วนประกอบอื่นในอาหาร และสภาวะแวดล้อม ได้แก่ อุณหภูมิ และความชื้นสัมพัทธ์ (Bégin and Van Calsteren, 1999) ถึงแม้ว่าฟิล์มโคโตซานจะมีสมบัติในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ แต่ยังคงมีประสิทธิภาพในการใช้เป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่ต่ำ (Kanatt *et al.*, 2008) ที่ผ่านมามีการใช้สารสังเคราะห์ต่างๆ เช่น โปแตสเซียมซอร์เบต เติมลงในฟิล์มโคโตซานเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพให้แก่ฟิล์มโคโตซาน แต่เนื่องจากในปัจจุบันผู้บริโภคมีความต้องการอาหารที่ปราศจากสารเคมีสังเคราะห์ที่ใช้ในการถนอมอาหาร จึงมีการศึกษาการใช้สารสกัดจากธรรมชาติเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพให้แก่ฟิล์มโคโตซานทั้งทางด้านกายภาพ การต้านอนุมูลอิสระ และการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์

พรอพโพลิส (Propolis) หรือชันผึ้ง คือสารที่ผึ้ง (*Apis mellifera* L.) เก็บจากเปลือกและตาของต้นไม้สายพันธุ์ต่างๆ และเกิดจากการผสมระหว่างขี้ผึ้ง (wax) กับสารประกอบอื่น ทำให้พรอพโพลิสเป็นวัตถุดิบที่ได้จากธรรมชาติที่มีลักษณะคล้ายเรซิน พรอพโพลิสประกอบด้วยสารประกอบทางเคมีที่หลากหลาย เช่น polyphenols ได้แก่ flavonoids aglycone, phenolic acids และ esters, phenolic aldehydes, alcohols, ketones, fatty acids และ esters, terpenes, steroids, amino acids และสารประกอบอนินทรีย์ (Bankova, Castro and Marcucci, 2000) ชนิดและปริมาณของสารประกอบที่มีอยู่ในพรอพโพลิสขึ้นอยู่กับบริเวณการเพาะปลูก เนื่องจากสภาพภูมิศาสตร์ที่แตกต่างกันส่งผลให้ตัวอย่างพรอพโพลิสมีสารประกอบทางเคมีที่แตกต่างกัน

จากการศึกษาที่ผ่านมา มีหลายงานวิจัยบ่งชี้ว่าสารสกัดพรอพโพลิสสามารถต้านอนุมูลอิสระและยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ได้ อาทิเช่น การศึกษาของ Choi และคณะ (2006) ที่ศึกษาปฏิบัติการต้านอนุมูลอิสระและยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ของพรอพโพลิสจากประเทศเกาหลี พบว่าสารสกัดพรอพโพลิสจากประเทศเกาหลีมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด สมบัติการต้านอนุมูลอิสระ โดยวัดจากปฏิบัติการจับอนุมูล 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) นอกจากนี้ยังมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของ *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Salmonella typhimurium* และ *Candida albicans* ดีกว่าสารสกัดพรอพโพลิสจากประเทศบราซิล อย่างไรก็ตามยังไม่มีงานวิจัยที่ศึกษาถึงความเป็นไปได้ในการใช้สารสกัดจากพรอพโพลิสของประเทศไทย เพื่อเพิ่มคุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระและยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ของฟิล์มไบโอดีซาน

ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการใช้ประโยชน์ของสารสกัดจากพรอพโพลิสของประเทศไทย และนำมาใช้เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการใช้เป็นสารต้านอนุมูลอิสระและยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ของฟิล์มไบโอดีซาน

บทที่ 2

วารสารปริทัศน์

2.1 พรอพโพลิส

พรอพโพลิส (propolis) หรือ ชันผึ้ง (bee glue) คือสารที่มีลักษณะคล้ายเรซิน โดยผึ้งประเภทที่ผลิตน้ำผึ้งและชันผึ้ง (honeybees) (*Apis mellifera* L.) เก็บมาจากเปลือกและตาของต้นไม้ของพืชสายพันธุ์ต่างๆ และเกิดจากการผสมระหว่างชันผึ้ง (wax) กับสารประกอบอื่น (Burdock, 1998)

2.1.1 คำจำกัดความ แหล่งทางพฤกษศาสตร์ ความสำคัญ

พรอพโพลิส คือเรซินที่ได้จากผึ้งโดยการเก็บจากพืชสายพันธุ์ต่างๆ อาจจะมีสีที่แตกต่างหลากหลายตั้งแต่สีเหลืองอ่อนจนถึงสีน้ำตาลเข้มซึ่งส่งผลต่อสีของรังผึ้ง และอาจพบพรอพโพลิสในน้ำผึ้ง (USDA, 1985)

พรอพโพลิสคือคำที่มาจากภาษากรีก pro- มีความหมายว่าป้องกัน polis- คือเมืองรวมมีความหมายว่าการป้องกันเมือง หรือในที่นี้หมายถึงรังของผึ้ง (Ghisalberti, 1979) พรอพโพลิสเป็นสารที่มีความเหนียวสูงมีลักษณะคล้ายเรซิน ผึ้งใช้พรอพโพลิสในการอุดรูของรังผึ้ง (honeycombs) ทำให้ผนังภายในของรังผึ้งมีความเรียบเนียน และใช้ในการป้องกันการบุกรุกของศัตรูจากทางเข้าของรังผึ้ง ลักษณะความเป็นเรซินของพรอพโพลิสเกิดจากการเคี้ยว การย่อยบางส่วนของเอนไซม์จากน้ำลายผึ้ง และการผสมกับชันผึ้ง (beeswax) (Marcucci, 1995) ถึงแม้ว่าพรอพโพลิสอาจจะประกอบไปด้วยละอองเกสรดอกไม้ แต่พรอพโพลิสไม่ใช่เกสร แตกต่างไปจากอาหารสำหรับเลี้ยงตัวอ่อนของผึ้งซึ่งประกอบด้วยน้ำผึ้งและเกสรดอกไม้ (beebread) และ royal jelly ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ที่แตกต่างออกไป

พรอพโพลิสคือผลผลิตที่ได้จากรังผึ้ง โดยคนเลี้ยงผึ้งจะเก็บจากรัง (superstructure) โดยใช้เครื่องมือเฉพาะ (hive tool) ในช่วงฤดูใบไม้ร่วงของทุกปีหลังจากเก็บน้ำผึ้งแล้ว ส่วนประกอบของวัตถุดิบพรอพโพลิสจะขึ้นอยู่กับแหล่งที่พบ โดยทั่วไปจะมีส่วนประกอบดังแสดงในตารางที่ 2.1 ส่วนที่เป็นชันผึ้งและสารประกอบอินทรีย์จะถูกแยกออกระหว่างกระบวนการสกัดด้วยตัวทำละลายแอลกอฮอล์ (Cirasino et al., 1987)

ตารางที่ 2.1 ส่วนประกอบของพรอพโพลิส

ส่วนประกอบ	ปริมาณ (%)
เรซิน และขี้ผึ้ง	50
ขี้ผึ้ง (wax)	30
essential และ aromatic oil	10
ละอองเกสรดอกไม้	5
ส่วนประกอบอื่นรวมถึงสารประกอบอินทรีย์	5

ที่มา: Kaal (1991)

สาร populus คือส่วนประกอบของรสชาติ ซึ่งมักจะถูกเข้าใจว่าเป็นพรอพโพลิส เนื่องจาก populus ถูกเก็บจาก *Populus balsamifera* L. และสายพันธุ์ *Populus* ชนิดอื่น และได้ถูกกล่าวไว้ว่าเป็นวัตถุดิบที่มีลักษณะคล้ายเรซินที่ได้จากตาของต้นไม้ (buds) ที่ถูกป้องกันด้วยส่วนผสมของยางเหนียว และสารประกอบที่มีลักษณะคล้ายน้ำมัน เกิดเป็นสารผสมระหว่างน้ำมันและยางไม้ (oleoresin) ซึ่งสารประกอบเหล่านี้สามารถสกัดด้วยตัวทำละลายไฮโดรคาร์บอน และสามารถถูกกลั่นหรือสกัดด้วยแอลกอฮอล์ สารที่ได้จากการสกัดจะมีกลิ่นหอมของขี้ผึ้งคล้ายอบเชย ซึ่งใช้ในการเพิ่มกลิ่นรสของเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ (Burdock, 1995) populus มีโครงสร้างทางเคมีคล้ายพรอพโพลิส เนื่องจากมีเรซินที่ได้จากการเก็บของผึ้งเป็นส่วนผสมหลักเหมือนกัน

Marcucci (1995) ได้รายงานว่าส่วนผสมที่อยู่ในเรซินของพรอพโพลิสที่ยังไม่ผ่านกระบวนการสกัดมาจาก 3 แห่ง คือ ยางที่ซึมออกมาจากพืชที่ถูกเก็บโดยผึ้ง สารคัดหลั่งจากกระบวนการเมตาบอลิซึมของผึ้ง และวัตถุดิบที่ถูกผลิตขึ้นระหว่างกระบวนการผลิตพรอพโพลิส โดยยางที่ซึมออกมาเกิดจากพืชตระกูล poplar หลายชนิด แต่ยังคงไม่สามารถอธิบายได้ว่าเพราะเหตุใดผึ้งถึงยังสามารถผลิตพรอพโพลิสในพื้นที่เขตร้อน ซึ่งไม่พบพืชตระกูล poplar ส่วนประกอบของพรอพโพลิสสามารถแสดงให้เห็นถึงแหล่งที่พบได้ ซึ่งการวิเคราะห์ทางเคมีพบว่าพรอพโพลิสสามารถเกิดขึ้นได้จากพืชหลายสายพันธุ์ดังแสดงในตารางที่ 2.2

ตารางที่ 2.2 ประเภทของพรอพโพลิส แหล่งกำเนิด และส่วนประกอบทางเคมี

Propolis type	Geographic origin	Plant source	Main biologically active substances
Poplar propolis	Europe, North American, non-tropic regions of Asia	<i>Populus</i> spp. Of section Flavones, <i>Aigeiros</i> , most often <i>P. nigra</i> L.	flavanones, cinnamic acids and their esters
Birch propolis	Russia	<i>Betula verrucosa</i> Ehrh.	Flavones and flavonols (not the same as in poplar propolis)
Green (alecrim) propolis	Brazil	<i>Baccharis</i> spp., predominantly <i>B. dracunculifolia</i> DC.	Prenylated <i>p</i> -coumaric acids, diterpenic acids
Red (Clusia) propolis	Cuba, Venezuela	<i>Clusia</i> spp.	Polyprenylated benzophenones
Pacific propolis	Pacific region (Okinawa, Taiwan)	Unknown	C-prenylflavanones
Canarian propolis	Canary Islands	Unknown	Furofuran lignans

ที่มา: Salatino และคณะ (2005)

2.1.2 ส่วนประกอบทางเคมี

พรอพโพลิสมีลักษณะเหนียวคล้ายเรซิน สีที่พบมีตั้งแต่สีเหลือง-สีเขียว จึงถึงสีน้ำตาลเข้ม ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับแหล่งที่พบและอายุการเก็บ พรอพโพลิสสามารถนำมาใช้เป็นกาว และเมื่อสัมผัสกับบริเวณผิวหนังจะเกิดปฏิกิริยาระหว่างน้ำมันและโปรตีนบนผิวหนัง ทำให้สามารถล้างออกได้ยากเมื่ออุณหภูมิต่ำจะมีลักษณะแข็งและเปราะ และในทางกลับกันเมื่อมีอุณหภูมิสูงขึ้นจะมีลักษณะที่นิ่มและเหนียว (Ghisalberti, 1979)

กระบวนการสกัดพรอพโพลิสมี 3 ขั้นตอนหลักดังนี้

ขั้นที่ 1 วิเคราะห์วัตถุดิบ ถ้าพรอพโพลิสมีลักษณะที่มีความมันสูง จะนำไปล้างความมันออกด้วยน้ำเย็น (cold-water washing process) จากนั้นทำให้แห้งด้วยลม เมื่อความมันลดลงแล้วจะเข้าสู่ขั้นตอนที่ 2

ขั้นที่ 2 ละลายพรอพโพลิสในเอทานอล เพื่อแยกขี้ผึ้งและส่วนประกอบอื่นที่ไม่ต้องการออกจากพรอพโพลิส

ขั้นที่ 3 กรองแยกอนุภาคขนาดเล็กออกจากสารละลายพรอพโพลิส

ในการวิเคราะห์ส่วนประกอบทางเคมีของพรอพโพลิสมักจะพบส่วนผสมของ flavonoids มากที่สุด ซึ่งโดยทั่วไปแล้วจะพบ flavonoids เฉพาะในกลุ่มของฟิซ ดังนั้นสามารถพบ flavones จากตัวอย่างพรอพโพลิสที่ต่างกัน และการพบ flavonoids จากพรอพโพลิสนั้นมีความสัมพันธ์กับชนิดของสายพันธุ์พืชที่ผึ้งเก็บ มีการรายงานว่ flavones เกิดการดัดแปลงโดยเอนไซม์ในผึ้ง และมีความเป็นไปได้ว่าการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างนั้นเกิดจากเอนไซม์ของน้ำลายผึ้ง ระหว่างกระบวนการเก็บ สารประกอบ aromatic ที่พบได้โดยทั่วไปในพืชนั้นจะสามารถพบได้ในพรอพโพลิสด้วย ซึ่งสารประกอบทางเคมีที่พบในพรอพโพลิสมีลักษณะเหมือนกับสารประกอบที่พบในอาหาร หรือวัตถุเจือปนในอาหารที่มีความปลอดภัย (Generally recognized as safe substances, GRAS) (Burdock, 1998)

ส่วนประกอบของวัตถุดิบพรอพโพลิสขึ้นอยู่กับแหล่งที่พบและยางของตาจากต้นไม้ที่แตกต่างกัน โดยทั่วไปจะพบ *populus* ในเขตที่อุณหภูมิพอเหมาะ (temperate zones), *betula* ในเขตทางตอนเหนือ, *delchampia* ในเขตที่ใกล้เส้นศูนย์สูตร, *clusia* ในประเทศเวเนซุเอลา และ *xanthorrhoea* ในประเทศออสเตรเลีย (Burdock, 1998) ในปัจจุบันเป็นที่ยอมรับโดยทั่วไปว่าในเขตที่อุณหภูมิพอเหมาะ ยางของตาจากต้นไม้สายพันธุ์ *populus* เกิดการผสมกับแหล่งวัตถุดิบหลักของพรอพโพลิส โดยพบสารประกอบที่สำคัญคือ pinobanksin และ 3-O-acetate, chrysin, galangin และ caffeates (benzyl, phenylethyl, prenyl) นอกจากนี้ยังพบส่วนประกอบทางเคมีที่แตกต่างกันมากกว่า 200 ชนิดในพรอพโพลิส (Bankova et al., 2000) สารประกอบที่มีอยู่ใน

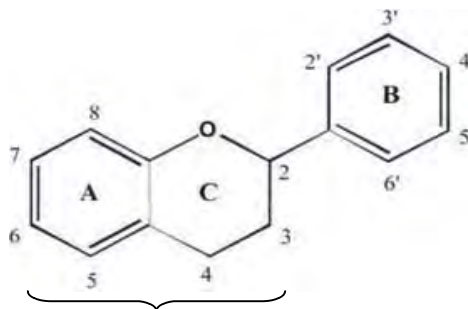
พหุฟิโพลีซินขึ้นอยู่กับบริเวณการเพาะปลูก เนื่องจากสภาพภูมิศาสตร์ที่แตกต่างกันส่งผลให้ ตัวอย่างพหุฟิโพลีซินมีสารประกอบทางเคมีที่แตกต่างกัน Johnson และคณะ (1994) ศึกษา ปริมาณเรซินและความสามารถในการละลายเรซินของพหุฟิโพลีซินด้วยเมทานอล พบว่า พหุฟิโพลีซินในเขตของทวีปอเมริกาเหนือ มีปริมาณเรซินที่ไม่คงที่ แต่ในทวีปยุโรปมีปริมาณเรซิน อยู่ในช่วง 16-80% ซึ่งเป็นอัตราส่วนที่มีประสิทธิภาพเพียงพอต่อการนำไปใช้สำหรับซ่อมแซมรัง ซึ่งมีส่วนช่วยทำให้รังผึ้งมีลักษณะที่แข็งแรง หรืออาจใช้เคลือบบางๆ บริเวณพื้นผิวของรังผึ้ง และยัง พบขี้ผึ้งหลายชนิดในพหุฟิโพลีซินในช่วงที่พบว่ามีปริมาณเรซินน้อย (Meyer, 1956) จากการศึกษา พหุฟิโพลีซินทางตอนใต้ของประเทศจอร์เจีย ซึ่งอยู่ในเขตที่เป็นป่าสนมีส่วนของเรซินปริมาณต่ำ ซึ่ง จะส่งผลให้พหุฟิโพลีซินที่อยู่ในเขตนั้นมีอัตราส่วนของเรซินที่ต่ำลงด้วย และพบว่าพหุฟิโพลีซินที่ เก็บจากรังผึ้งในรัฐโอไฮโอของประเทศอเมริกา จะมีส่วนประกอบเคมีที่หลากหลายมากกว่า 30 ชนิด ส่วนพหุฟิโพลีซินที่เก็บจากทางตอนใต้ของประเทศจอร์เจีย พบว่ามีน้อยกว่า 10 ชนิด เมื่อ วิเคราะห์ด้วย paper chromatography

ถึงแม้ว่าการสกัดพหุฟิโพลีซินด้วยเอทานอล จะเป็นวิธีที่ใช้กันโดยทั่วไป แต่อาจใช้ตัว ทำละลายชนิดอื่นเพื่อใช้ในการศึกษาวิเคราะห์สารประกอบต่างๆ ที่มีอยู่ในพหุฟิโพลีซิน ซึ่งอาจมี มากกว่า 200 ชนิด (Marcucci, 1995) พหุฟิโพลีซินประกอบด้วยสารประกอบทางเคมีที่ หลากหลาย เช่น polyphenols ได้แก่ flavonoids aglycone, phenolic acids และ esters, phenolic aldehydes, alcohols, ketones, fatty acids และ esters, terpenes, steroids, amino acids และสารประกอบอินทรีย์ (Bankova, Castro and Marcucci, 2000) จากการศึกษาที่ผ่านมา มีหลายงานวิจัยบ่งชี้ว่าสารสกัดพหุฟิโพลีซินสามารถต้านอนุมูลอิสระและยับยั้งการเจริญของ จุลินทรีย์ได้

2.1.3 สมบัติการต้านอนุมูลอิสระ

พหุฟิโพลีซินประกอบด้วยสารประกอบโพลีฟีนอลิก อนุพันธ์ของ caffeic acid และ flavonoids ซึ่งมีสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (Heim *et al.*, 2002; Russo *et al.*, 2002; Kumazawa *et al.*, 2004)

flavonoids คือสารประกอบฟีนอลิกชนิดหนึ่ง มีสูตรโครงสร้างหลักเป็น flavan หรือ 2-phenylbenzopyran ประกอบด้วยคาร์บอน 15 อะตอม เรียงกันเป็นระบบ $C_6C_3C_6$ โดยมีวง benzene 2 วง จับกันด้วยคาร์บอน 3 อะตอม ซึ่งอาจเรียงเกิดเป็นวงที่ 3 ทำให้โครงสร้างหลักที่ได้ เหมือนโครงสร้างของวิตามินอี ที่เป็นโครงสร้างแบบ chroman หรือ benzopyran ดังแสดงในภาพ ที่ 2.1



chroman structure

ภาพที่ 2.1 โครงสร้างของ flavan

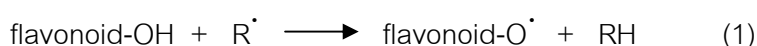
ที่มา: Cushnie และ Lamb (2005)

flavonoids แบ่งเป็นกลุ่มย่อยได้หลายกลุ่ม ตามความแตกต่างของสูตรโครงสร้าง โดยเฉพาะที่วง C ซึ่งเป็นวงที่มีอะตอมออกซิเจนอยู่ในรูปแบบต่างๆ เช่น ether ketone รวมทั้งการมี hydroxyl group แทนที่บน aromatic ring ในโมเลกุล ตัวอย่างสารในกลุ่ม flavonoids ได้แก่ flavone, flavonal, flavanone, flavanonal และ isoflavone (Xiao and Lu, 1989)

ปรีชา บุญจง (2549) ได้อธิบายกลไกในการต้านอนุมูลอิสระของสารกลุ่ม flavonoids รวมถึงโพลีฟีนอลอื่นๆ ไว้ว่ามี 3 กลไก คือ

1. เป็นสาร chelating agent โดยเฉพาะสารโพลีฟีนอลที่มีโครงสร้างเป็น ortho-diphenolic ทำหน้าที่จับหรือเกิดพันธะโคออร์ดิเนตกับโลหะหนัก เช่น ทองแดง และเหล็ก เป็นต้น ซึ่งมีบทบาทสำคัญในการกระตุ้นการสร้างอนุมูลอิสระ รวมทั้งปฏิกิริยาถูกใช้ของอนุมูลอิสระ

2. เป็นสารต้านออกซิเดชันโดยหยุดปฏิกิริยาลูกโซ่ (chain breaking antioxidant) ในการยับยั้งหรือกำจัดอนุมูลอิสระ เช่น lipid alkoxyl และ peroxy radicals เป็นต้น โดยทำหน้าที่เป็นตัวให้ไฮโดรเจนแก่อนุมูลเหล่านั้น ดังแสดงในปฏิกิริยาที่ (1) หลังจากที่ flavonoids ถูกออกซิไดซ์แล้วจะได้อนุมูลของ flavonoid-phenoxyl ซึ่งมีความเสถียรมากกว่า เนื่องจากโครงสร้างของ flavonoids มี delocalization ของอิเล็กตรอนตลอดเวลา ดังนั้นจากรายงานการศึกษาการต้านออกซิเดชันของ flavonoids จะพบว่า flavonoids ที่มีโครงสร้างซึ่งทำให้เกิด delocalization ของอิเล็กตรอนได้ดี จะสามารถต้านอนุมูลอิสระได้ดีกว่า



flavonoid-OH คือสารในกลุ่ม flavonoids, R^{\cdot} คือ อนุมูลอิสระ, flavonoid-O $^{\cdot}$ คือ phenoxyl radical

3. ทำหน้าที่ regenerate วิตามินอี (α -tocopherol) โดยจะ reduce อนุมูล

α -tocopheroxyl กลับเป็น α -tocopherol เหมือนเดิม ทำให้สามารถทำหน้าที่เป็นสารต้านอนุมูลอิสระได้ต่อไป

สารประกอบในกลุ่ม flavonoids ได้แก่ rutin, myricetin, quercetin, kaempferol, apigenin, pinocebrine, chrysin และ galangin สามารถใช้ระบุความแตกต่างของคุณภาพพรอพโพลิส รวมทั้งความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระด้วย (Zhao *et al.*, 2005) พรอพโพลิสของประเทศจีนนั้นเป็นที่นิยมอย่างมาก เนื่องจากพรอพโพลิสของประเทศจีนจะประกอบด้วยสารในกลุ่มของ flavonoids ในปริมาณที่สูงซึ่งจะผลดีต่อสุขภาพ เช่น สามารถยับยั้งการเกิดกระบวนการออกซิเดชันด้วย copper-catalyzed ของ low-density lipoprotein, การยับยั้งการจับตัวเป็นก้อนเลือดของเกล็ดเลือด และ arachidonate metabolism, การลดการอักเสบของตับจาก peroxidized oil และมีสมบัติการเป็นสารป้องกันมะเร็ง เป็นต้น (Barak *et al.*, 2002)

Isla และคณะ (2001) ศึกษาปฏิกิริยาการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดพรอพโพลิสของประเทศอาร์เจนตินา 13 แห่งที่แตกต่างกัน โดยศึกษาปฏิกิริยา kinetics ของการเกิด oxidation โดยใช้ copper-induce พบว่าสามารถแบ่งความแตกต่างของพรอพโพลิสออกเป็น 3 กลุ่ม คือ

กลุ่มที่ 1 เป็นพรอพโพลิสจาก Cerrillos, El Corte, La Banda Oeste, El Molino และ La Banda Este ซึ่งสามารถยับยั้งการเกิด lipid oxidation ระหว่างช่วงเริ่มต้น (initiation) และ propagation phase แม้ว่าจะใช้ที่ความเข้มข้นต่ำ

กลุ่มที่ 2 เป็นพรอพโพลิสจาก Roque Saenz Pena, Juan José Castelli และ Arroyo Mixta ซึ่งสามารถเพิ่มระยะเวลาในขั้น lag-phase สำหรับการสร้าง conjugated diene ซึ่งพรอพโพลิสในกลุ่มที่ 1 และกลุ่มที่ 2 สามารถลดอัตราการสร้างและปริมาณของพันธะคู่

กลุ่มที่ 3 เป็นพรอพโพลิสจาก El Paraiso, Raco, Fernández, Veronica และ Tafi del Valle ซึ่งพรอพโพลิสในกลุ่มนี้ไม่มีผลต่อการยับยั้งการเกิดปฏิกิริยา lipid oxidation

ดังนั้นสามารถใช้พรอพโพลิสจากประเทศอาร์เจนตินาในกลุ่มที่ 1 และกลุ่มที่ 2 เป็นแหล่งของสารต้านอนุมูลอิสระที่ได้จากธรรมชาติ ในการยับยั้งปฏิกิริยา oxidation

Kalogeropoulos และคณะ (2009) ศึกษาปฏิกิริยาการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดพรอพโพลิสของประเทศกรีซและไซปรัส พบว่าพรอพโพลิสที่สกัดด้วยเอทานอลมีปริมาณของ flavonoids, anthraquinones และ chrysophanol สูง และพบ phenolic acids และ ester ในปริมาณต่ำ มีปริมาณ polyphenols ทั้งหมดอยู่ในช่วง 31.2-299 mg gallic acid equivalent (GAE)/g ของสารสกัดพรอพโพลิส และมีปฏิกิริยาการจับอนุมูล 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) อยู่ในช่วง 0.33-1.11 mM Trolox equivalents/g ของสารสกัดพรอพโพลิส ผลที่ได้จาก

การศึกษาแตกต่างจากพรอพโพลิสที่ได้จากยุโรป แต่ได้ผลเหมือนกับพรอพโพลิสที่ได้จากทางฝั่งตะวันออกของทะเลเมดิเตอร์เรเนียน

Mohammadzadeh และคณะ (2007) ศึกษาประสิทธิภาพการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดพรอพโพลิสของประเทศอิหร่าน โดยการตรวจสอบ flavonoid และ polyphenol ของพรอพโพลิสที่สกัดด้วยเอทานอล โดยการวิเคราะห์ด้วยวิธี aluminum nitrate และ Folin-Ciocalteu colorimetric พบว่ามีปริมาณ flavonoid อยู่ในช่วง 1.22-7.79 g/100 g และมีปริมาณ polyphenol อยู่ในช่วง 3.08-8.46 g/100 g ของสารสกัดพรอพโพลิส

Moreira และคณะ (2008) ศึกษาสมบัติการต้านอนุมูลอิสระและปริมาณฟีนอลทั้งหมดของตัวอย่างพรอพโพลิสของประเทศโปรตุเกส โดยใช้ตัวอย่างพรอพโพลิสที่อยู่ในเขต Bornes และ Fundao พบว่ามีปริมาณฟีนอลทั้งหมดเท่ากับ 329 mg GAE/g และ 151 mg/g ของ GAE ตามลำดับ ประสิทธิภาพการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดพรอพโพลิส วิเคราะห์จากผลของการจับอนุมูล 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) และการวิเคราะห์หาความสามารถที่ลดลงของ iron (III)/ferricyanide complex พบว่าสารสกัดพรอพโพลิสที่อยู่ในเขต Bornes มีประสิทธิภาพในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระได้กว่าสารสกัดพรอพโพลิสที่อยู่ในเขต Fundao

2.1.4 สมบัติการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์

ในหลายปีที่ผ่านมา มีนักวิจัยให้ความสนใจในการศึกษาการใช้ประโยชน์จากพรอพโพลิสในการใช้เป็นยาและเครื่องสำอาง ถึงแม้ว่าในสมัยโบราณจะมีการใช้พรอพโพลิสเป็นยาพื้นเมือง ยังคงมีการศึกษาสมบัติการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ และมีการยืนยันว่าพรอพโพลิสมีปฏิริยาการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย, ไวรัส, รา และโปรโตซัว (Marcucci, 1995) สารประกอบที่ส่งผลต่อปฏิริยาการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ของพรอพโพลิสที่สำคัญคือ aromatic acids, สารประกอบฟีนอลิกโดยเฉพาะสารในกลุ่มของ flavonoids และ phenolic acids สมบัติการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ของสารประกอบที่ได้จากธรรมชาติเป็นผลมาจาก flavonones pinocembrin, flavonols galangin และ caffeic acids phenethyl ester (Burdock, 1998) Kedzia (1990) และ Krol และคณะ (1993) รายงานว่ากลไกการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ของพรอพโพลิสเกิดจากการทำงานร่วมกันระหว่างสารประกอบฟีนอลิกและสารประกอบอื่นในเรซิน (Ghisalberti, 1979) ซึ่งเป็นสารที่มีผลในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ (Cowan, 1999) ในขณะที่อนุพันธ์ของ gallic acid มีผลในการยับยั้งแบคทีเรียชนิดแกรมบวกและแกรมลบ (Kayser and Kolodziej, 1997) จากการศึกษาของ Tosi และคณะ (2007) พบว่าสามารถใช้สารสกัดพรอพโพลิสในการใช้เป็นวัตถุเจือปนในอาหาร เพื่อยับยั้งการเจริญของ *Escherichia coli*

ประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของสารสกัดพอรอปโพลิส และวิธีการสกัด

Kalogeropoulos และคณะ (2009) ศึกษาสมบัติการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ของสารสกัดพอรอปโพลิสจากประเทศกรีซและไซปรัส โดยการสกัดพอรอปโพลิสด้วยเอทานอล พบว่าหากพอรอปโพลิสมี terpenoids ในปริมาณมากจะส่งผลให้พอรอปโพลิสสามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ได้ดี สารสกัดพอรอปโพลิสจากประเทศกรีซและไซปรัสสามารถยับยั้งการเจริญของ *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus helveticus*, *Candida albicans* และ *Candida tropicalis*

Silici และ Kutluca (2005) ศึกษาปฏิริยาการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ของพอรอปโพลิส 3 ชนิด คือ *Populus alba*, *Populus tremuloides* และ *Salix alba* พบว่าตัวอย่างพอรอปโพลิสมีปฏิริยาการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียชนิดแกรมบวก เช่น *S. aureus* ได้ดี แต่มีปฏิริยาการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียชนิดแกรมลบ เช่น *E. coli* และ *Pseudomonas aeruginosa* และยีสต์ เช่น *C. albicans* ได้ต่ำ ตัวอย่างพอรอปโพลิสที่เก็บโดยผึ้ง *Apis mellifera caucasica* มีปฏิริยาการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่สูงกว่าตัวอย่างพอรอปโพลิสที่เก็บโดยผึ้ง *Apis mellifera carnica*

Kartal และคณะ (2003) ศึกษาปฏิริยาการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ของตัวอย่างพอรอปโพลิสจากคาซัคสถานและมาร์มาริสของอนาโตเลีย ด้วยวิธี disc diffusion พบว่าตัวอย่างพอรอปโพลิสจากคาซัคสถานมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์สูงกว่า โดยสามารถยับยั้งการเจริญของ *S. aureus*, *S. epidermidis*, *Bacillus subtilis*, *Corynebacterium diphtheria*, *Branhamella catarrhalis* และ *C. albicans* ในขณะที่ตัวอย่างพอรอปโพลิสจากมาร์มาริสสามารถยับยั้งการเจริญของ *S. aureus*, *S. epidermidis* และ *B. subtilis* ได้เท่านั้น

Lu, Chen และ Chou (2005) ศึกษาปฏิริยาการยับยั้งการเจริญของ *Staphylococcus aureus* ของพอรอปโพลิสของประเทศไต้หวันที่เก็บในช่วงเวลาที่แตกต่างกันคือ เดือนมิถุนายน, สิงหาคม และตุลาคม โดยการสกัดพอรอปโพลิสด้วยเอทานอล พบว่าสารสกัดพอรอปโพลิสที่เก็บในช่วงเดือนสิงหาคมมีปฏิริยาการยับยั้งการเจริญของ *S. aureus* สูงกว่าการเก็บในช่วงเดือนอื่น

Orsi และคณะ (2005) ศึกษาพอรอปโพลิสของประเทศบราซิลและบัลแกเรียต่อการยับยั้งการเจริญของ *Salmonella Typhimurium* ของเซลล์เม็ดเลือดขาว พบว่าพอรอปโพลิสของประเทศบราซิลมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของ *S. Typhimurium* ที่ดีกว่าพอรอปโพลิสของประเทศบัลแกเรีย เนื่องจากการมีองค์ประกอบทางเคมีในสารสกัดพอรอปโพลิสที่แตกต่างกัน

Sforcin และคณะ (2000) ศึกษาปฏิกิริยาการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ของพรอพโพลิสของประเทศบราซิล พบว่าสารสกัดพรอพโพลิสสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียชนิดแกรมบวกได้เมื่อใช้ความเข้มข้นของสารสกัดพรอพโพลิส 0.4% ในขณะที่การยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียชนิดแกรมลบมีค่า minimal inhibitory concentration (MIC) อยู่ในช่วง 4.5-8.0% สามารถกล่าวได้ว่าพรอพโพลิสของประเทศบราซิลมีผลในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียชนิดแกรมบวกได้ดีแบคทีเรียชนิดแกรมลบ

2.1.5 การประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรม

ในอดีตที่ผ่านมาการเลี้ยงผึ้งนำไปสู่การใช้ประโยชน์ของผลิตภัณฑ์จากผึ้ง รวมทั้งการประยุกต์ใช้ประโยชน์ของพรอพโพลิส การใช้พรอพโพลิสมานานกว่า 300ปีก่อนคริสต์ศักราช (Ghisaberti, 1979) จนกระทั่งถึงปัจจุบันโดยมีการใช้เป็นยาสามัญประจำบ้าน และใช้เป็นยาสำหรับพอกพูน เนื่องจากพรอพโพลิสมีความสามารถในการเป็นสารต้านจุลินทรีย์, สารยับยั้งเชื้อรา, มีคุณสมบัติในการสมานผิวหรือห้ามเลือด, สามารถลดอาการกล้ามเนื้อหดเกร็ง, ลดการอักเสบ และมีสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระ การประยุกต์เหล่านี้ยังรวมถึงการใช้เป็นยารักษาโรคผิวหนังที่สามารถหาซื้อได้ทั่วไป ซึ่งใช้ในการสมานแผลรักษาแผลที่เกิดจากการไหม้ แผลเปื่อย โรคผิวหนังเรื้อรัง โรคเรื้อรัง อาการคัน และยับยั้งเชื้อราบนผิวหนัง ในทางการตลาดใช้รักษาโรคไขข้อ การเคล็ดขัดยอก และสามารถใช้ในช่องปากเพื่อใช้เป็นยาชา และออกฤทธิ์ได้ดีกว่าโคเคน 5 เท่า ใช้เป็นยาสีฟันและยาบ้วนปากเพื่อใช้ในการรักษาอาการเหงือกบวม รักษาอาการอักเสบของริมฝีปากและเนื้อเยื่อปากอักเสบ การใช้ในทางเภสัชกรรมและผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางเช่น ครีมทาหน้า ครีมทาภายนอก และโลชั่น ทางการตลาดใช้เป็นเม็ด ผง และเป็นหมากฝรั่ง (Ayala *et al.*, 1985; Bankova *et al.*, 1983; Bjorkner, 1994; Dobrowolski *et al.*, 1991; Marcucci, 1995)

ถึงแม้ว่าชาวยุโรปมีแนวโน้มในการใช้ผลิตภัณฑ์ที่มีส่วนผสมของพรอพโพลิสมากกว่าชาวอเมริกัน แต่ในอเมริกามีขายในร้านขายอาหารเสริมเพื่อสุขภาพในรูปแบบแคปซูล (ประมาณ 50 mg/capsule) และมีการใช้ในตลาดขนาดใหญ่สำหรับการผลิตเป็นไหมขัดฟันและยาสีฟัน มีการศึกษาการใช้เป็นสารถนอมอาหารแทนสารเคมีที่ใช้ในผลิตภัณฑ์จากเนื้อ (Han and Park, 1995) และมีการใช้ทดลองสำหรับยับยั้งตัวอ่อนของแมลง (*Galleria mellonella* L.) ซึ่งเป็นสัตว์รบกวนในบริเวณที่เลี้ยงผึ้ง โดยผลการทดลองการยับยั้งตัวอ่อนของแมลง พบว่าพรอพโพลิสมีประสิทธิภาพในการยับยั้งที่ต่ำ (Johnson *et al.*, 1994)

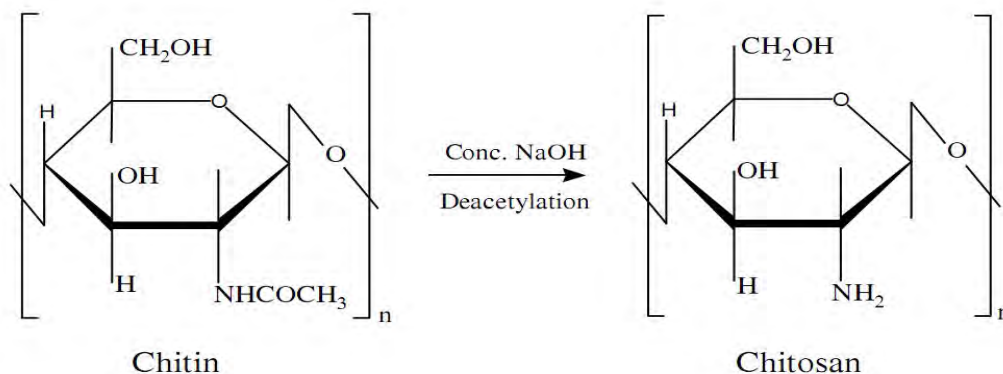
2.2 พลาสติกที่บริโภคได้ (Edible film)

ในอดีตที่ผ่านมาฟิล์มที่ใช้เป็นบรรจุภัณฑ์สำหรับอาหารจะทำด้วยโพลีเมอร์ที่ได้จากการสังเคราะห์ เช่น polyethylene (PE), polyvinyl chloride (PVC), polyvinyl alcohol (PVA), polylactic acids (PLA) และ nylon (Dutta *et al.*, 2009) และในปัจจุบันผู้บริโภคมองมีความต้องการใช้บรรจุภัณฑ์ที่ได้จากเคมีสังเคราะห์ลดลง ฟิล์มที่บริโภคได้จึงมีบทบาทมากขึ้นในการใช้เป็นบรรจุภัณฑ์อาหาร เนื่องจากมีข้อดีมากกว่าวัสดุที่ได้จากการสังเคราะห์ อาทิเช่น สามารถย่อยสลายได้ และเป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม (Tharanathan, 2003) และจากคุณสมบัติของฟิล์มที่บริโภคได้ ได้แก่ สมบัติในการเลือกผ่านโมเลกุล, การขัดขวางไอของสารประกอบอินทรีย์, การลดการซึมผ่านไอน้ำ, การขัดขวางตัวถูกละลาย เช่น ไขมัน, เกลือ, วัตถุเจือปน และรงควัตถุ และการลดการซึมผ่านของก๊าซ เช่น ก๊าซออกซิเจน, ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ และก๊าซไนโตรเจน (Gennadios and Weller, 1990) ด้วยเหตุนี้จึงมีการใช้ฟิล์มที่บริโภคได้เป็นตัวส่งผ่าน หรือใช้สำหรับการห่อหุ้มของวัตถุเจือปนในอาหาร หรือส่วนประกอบในอาหาร

ฟิล์มที่บริโภคได้สามารถปรับปรุงสมบัติเชิงกลของอาหารเพื่อให้มีลักษณะที่ง่ายต่อการรักษา หรือสะดวกต่อการขนส่ง นอกจากนี้ยังมีการปรับปรุงลักษณะทางประสาทสัมผัส เช่น สี, ความสว่าง, ความโปร่งใส, ความหยابหรือความเหนียวอีกด้วย (Dutta *et al.*, 2009) ทำให้นักวิจัยสนใจศึกษาการใช้ประโยชน์จากฟิล์มชนิดนี้มากขึ้น โดยทั่วไปฟิล์มที่บริโภคได้สามารถทำได้จากโปรตีน, โพลีแซ็กคาไรด์, ไขมัน และเรซิน (Baldwin, 1999) และสามารถเพิ่มประสิทธิภาพฟิล์มโดยการเติมวัตถุเจือปนอาหารลงในฟิล์ม เช่น สารต้านอนุมูลอิสระ, สารยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์, สารให้สี และสารให้รสชาติ เป็นต้น (Pena and Torres, 1991) ซึ่งประสิทธิภาพของฟิล์มจะขึ้นอยู่กับส่วนประกอบของฟิล์มด้วย

2.3 ไคโตซาน

ไคโตซานเป็นอนุพันธ์ของไคตินที่ได้จากการทำปฏิกิริยากำจัดหมู่อะซิทิลของไคติน หรือที่เรียกว่าปฏิกิริยา deacetylation โดยแซ่ไคตินในสารละลายต่างเข้มข้น ไคโตซานมีปริมาณของไนโตรเจนสูงกว่า 7% โดยน้ำหนัก (Muzzarelli, 1985) และมี degree of deacetylation (DD) มากกว่า 70% (Li *et al.*, 1992) มีโครงสร้างดังแสดงในภาพที่ 2.2



ภาพที่ 2.2 โครงสร้างของไคตินและไคโตซาน (Dutta *et al.*, 2009)

ไคโตซานมีชื่อทางเคมีว่า poly [β -(1 \rightarrow 4)-2-amino-2-deoxy-D-glucopyranose] มีลักษณะเป็นโคโพลิเมอร์ที่อยู่รวมกันในสายโซ่ของโมเลกุลระหว่างโมโนเมอร์ของไคตินและโมโนเมอร์ของไคโตซาน ซึ่งเป็นวัสดุธรรมชาติของกลุ่มคาร์โบไฮเดรตที่พบมากที่สุดเป็นลำดับที่ 2 รองจากเซลลูโลส ไคโตซานสกัดได้จากเปลือกกุ้ง ปู แกนปลาหมึก มีสมบัติในการต่อต้านจุลินทรีย์และเชื้อราบางชนิด ไคโตซานไม่เป็นพิษ สามารถย่อยสลายได้ในธรรมชาติ ในหลายประเทศได้ขึ้นทะเบียนไคตินและไคโตซานให้เป็นวัตถุเจือปนในอาหาร ช่วยรักษากลิ่นรส ใช้เป็นสารเคลือบอาหาร ผัก และผลไม้ หรือผลิตในรูปฟิล์มที่รับประทานได้ (edible film) (Shahidi, Arachchi and Jeon, 1999) ไคโตซานมีการประยุกต์ใช้ในรูปแบบที่หลากหลาย เนื่องจาก amino groups ที่ตำแหน่ง C2 และ primary และ secondary hydroxyl groups ที่ตำแหน่งที่ C3 และ C6 ตามลำดับ (Frusaki *et al.*, 1996) ซึ่งทำให้มีความแตกต่างจาก polysaccharides ทั่วไป โดยไคโตซานจะมีความเป็นขั้วบวกเนื่องจากมี amino groups ในโมเลกุล สายโซ่โพลิเมอร์ของไคโตซานสามารถจับกับโมเลกุลที่เป็นขั้วลบบนพื้นผิวโดยการเชื่อมต่อดัวยพันธะไฮออนิกหรือพันธะไฮโดรเจน (Shahidi, 1995) การประยุกต์ใช้ไคโตซานแสดงในตารางที่ 2.3

ตารางที่ 2.3 ตัวอย่างการประยุกต์ใช้โคโคซาน

เกษตรกรรม	<p>ป้องกันกลไกในพืช</p> <p>กระตุ้นการเจริญของพืช, เคลือบเมล็ด, ป้องกันการกลายเป็นน้ำแข็ง</p> <p>ลดเวลาการใส่ปุ๋ยและเพิ่มสารอาหารให้แกดิน</p>
น้ำและการบำบัดน้ำเสีย	<p>การทำให้น้ำบริสุทธิ์ สำหรับการดื่ม, สระว่ายน้ำ</p> <p>แยกไขมันของเหล็ก</p> <p>เป็นโพลีเมอร์ที่ได้จากธรรมชาติ</p> <p>ลดกลิ่น</p>
อาหารและเครื่องดื่ม	<p>ใช้เป็นใยอาหาร (dietary fiber)</p> <p>จับกับไขมัน (ลดคอเลสเตอรอล)</p> <p>ใช้เป็นสารถนนอมอาหาร</p> <p>สารให้ความข้นและความคงตัวสำหรับซอส</p> <p>สำหรับเคลือบผลไม้ใช้ป้องกันเชื้อราและยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์</p>
เครื่องสำอาง	<p>รักษาความชื้นให้กับผิว</p> <p>รักษาผิว</p> <p>เพิ่มความนุ่มให้กับเส้นผม</p> <p>ลดไฟฟ้าสถิตในผม</p> <p>ปรับสภาพผิว</p> <p>ผลิตภัณฑ์ดูแลช่องปาก เช่น ยาสีฟัน, หมากฝรั่ง</p>
เภสัชกรรม	<p>การสร้างภูมิคุ้มกันโรค, ป้องกันเนื้องอก, ใช้ในการห้ามเลือดและช่วยในการแข็งตัวของเลือด, ใช้ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์</p>

ที่มา: Rinaudo (2006)

2.3.1 สมบัติการต้านอนุมูลอิสระ

โคโตซานมีสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่สกัดได้จากธรรมชาติ มีการรายงานกลไกการต้านอนุมูลอิสระของโคโตซานไว้ว่า โคโตซานสามารถกำจัดอนุมูลอิสระหรือสามารถจับกับไฮดรอกซิลของโลหะได้ (Muzzarelli, Muzzarelli and Terbojerich, 1997) โดยการเกิดปฏิกิริยาระหว่างอนุมูลอิสระกับ hydrogen ion จาก ammonium ions (NH_3^+) ที่ตำแหน่ง C2 ของโคโตซาน โดยจะเปลี่ยนโครงสร้างอนุมูลอิสระให้เป็นโมเลกุลที่เสถียร (Park, Je and Kim, 2004; Xie *et al.*, 2001 จากการศึกษาของ Peng, Wang และ Tang (1998) พบว่าโคโตซานสามารถยับยั้งการเกิด lipid oxidation ได้ โดยโคโตซานสามารถจับกับ ferrous ions ในระบบ ซึ่ง ferrous ions จะเป็นตัวเร่งในการเกิดปฏิกิริยา prooxidant จึงทำให้เกิด lipid oxidation ซ้ำลง และ Anraku และคณะ (2008) รายงานว่าโคโตซานที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ ยังคงมีประสิทธิภาพในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ โดยมีปฏิกิริยาการจับ hydroxyl radicals ($\cdot\text{OH}$) และ hydrogen peroxide (H_2O_2) นอกจากนี้ Youn, Kim และ Ahn (2001) รายงานว่าเมื่อน้ำหนักโมเลกุลและความเข้มข้นของโคโตซานสูงขึ้น จะส่งผลให้มีประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระสูงขึ้นด้วย

Kim และ Thomas (2007) ศึกษาการใช้โคโตซานที่มีน้ำหนักโมเลกุลแตกต่างกัน คือ 30, 90 และ 120 kDa ในการต้านอนุมูลอิสระในปลาแซลมอน พบว่าโคโตซานทั้ง 3 ชนิดสามารถลดการเกิด lipid oxidation และการใช้โคโตซานที่มีน้ำหนักโมเลกุล 30 kDa สามารถละลายน้ำได้ดีและสามารถใช้เป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่ได้จากธรรมชาติได้

Xie, Xu และ Liu (2001) ศึกษาปฏิกิริยาการต้านอนุมูลอิสระของโคโตซานที่มีน้ำหนักโมเลกุลที่ต่างกัน ปลาแซลมอน ซึ่งมีโปรตีนในเนื้อเยื่อของปลาหลายบริเวณที่สามารถเกิดพันธะกับเหล็กได้ เช่น myoglobin, hemoglobin, ferritin และ transferrin เหล็กที่โปรตีนอาจถูกปลดปล่อยระหว่างการเก็บ และอาจถูกกระตุ้นด้วยออกซิเจนก่อให้เกิด lipid oxidation (Angelo, 1996) โดยศึกษาการจับ hydroxyl radical ของโคโตซานที่มีน้ำหนักโมเลกุลแตกต่างกัน พบว่าน้ำหนักโมเลกุลของโคโตซานมีผลต่อประสิทธิภาพในการเกิดพันธะกับโลหะ

Kamil, Jeon และ Shahidi (2002) ศึกษาความแตกต่างของความหนืดของโคโตซานต่อการยับยั้งการเกิด lipid oxidation ในปลาแฮร์ริง พบว่าโคโตซานที่ความหนืด 14 cp มีประสิทธิภาพสูงที่สุด ในการยับยั้งการเกิด lipid oxidation

Darmadji และ Izumimoto (1994) ศึกษาประสิทธิภาพของโคโตซานในการยับยั้งการเกิด lipid oxidation ในเนื้อวัว โดยการเติมโคโตซานที่ความเข้มข้น 1% (w/v) ลงในเนื้อวัวระหว่างการเก็บรักษา พบว่าสามารถลดค่า thiobarbituric acid-reactive substances (TBARS) ได้ถึง 70% หลังจากการเก็บเนื้อวัวเป็นเวลา 3 วัน ที่ 4°C

2.3.2 สมบัติการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์

โคโตซานถูกใช้ในอาหารอย่างแพร่หลาย Roller และ Covill (1999), Tsai และคณะ (2000) อธิบายกลไกการออกฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ของโคโตซานไว้ว่าหมู่อะมิโนของโคโตซานสามารถดูดซับสารอาหาร และไอออนของโลหะที่เป็นประโยชน์ต่อการเจริญของจุลินทรีย์ จึงสามารถลดอัตราการเจริญหรือยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ได้ Choi และคณะ (2001) รายงานว่าโคโตซานสามารถเกิดเป็นสารประกอบที่ซับซ้อนบริเวณผิวหน้าของผนังเซลล์จุลินทรีย์ โดยก่อตัวเป็นชั้นบางๆ รอบเซลล์ขัดขวางการส่งผ่านสารอาหารที่จำเป็นต่อการเจริญของจุลินทรีย์เข้าสู่ภายในเซลล์ ทำให้คุณสมบัติการเลือกผ่านของเซลล์สูญเสียไป นอกจากนี้ประจุบวกของโคโตซานสามารถจับกับประจุลบของผนังเซลล์จุลินทรีย์ ทำให้โครงสร้างของผนังเซลล์จุลินทรีย์เกิดการเปลี่ยนแปลง และเกิดความเสียหาย (Choi *et al.*, 2001; Helander *et al.*, 2001; Roller and Covill, 1999)

ปัจจัยที่มีผลต่อประสิทธิภาพในการยับยั้งจุลินทรีย์ของโคโตซาน

1. น้ำหนักโมเลกุล โคโตซานมีความสามารถในการละลายต่ำ สารละลายที่เตรียมจากโคโตซานที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง จะมีความหนืดมาก ไม่สะดวกในการนำมาประยุกต์ใช้กับกระบวนการผลิตอาหาร โคโตซานที่มีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วง 10,000-100,000 Daltons สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ได้ (Chen, 1998) และโคโตซานที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำเกินไป จะไม่มีสมบัติในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ Tokura และคณะ (1994) รายงานว่าโคโตซานที่มีน้ำหนักโมเลกุล 9,300 Daltons มีผลในการยับยั้งการเจริญของ *Escherichia coli* และโคโตซานที่มีน้ำหนักโมเลกุล 2,200 Daltons ไม่มีผลในการยับยั้งการเจริญของ *E. coli*
2. ชนิดของตัวทำละลายที่ใช้เตรียมสารละลายโคโตซาน โคโตซานสามารถละลายได้ดีในกรดทั้งกรดอินทรีย์และกรดอนินทรีย์ อย่างไรก็ตามการนำโคโตซานมาประยุกต์ใช้ในอาหารเป็นข้อจำกัดให้สามารถใช้ได้เพียงกรดอินทรีย์เป็นตัวทำละลายเท่านั้น
3. ชนิดและสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ ความเข้มข้นของโคโตซานที่ใช้ในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ อาจแตกต่างกันไปขึ้นกับชนิดและสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ มีการรายงานว่าโคโตซานสามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกได้ดีกว่าแบคทีเรียแกรมลบ (Jeon *et al.*, 2001; Xie *et al.*, 2002) กลไกของปฏิริยาการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ของโคโตซานมีความแตกต่างระหว่างแบคทีเรียชนิดแกรมบวกและแกรมลบ โดย Zheng และ Zhu (2003) ศึกษาโคโตซานต่อการยับยั้งการเจริญของ *Staphylococcus aureus* ซึ่งเป็นแบคทีเรียชนิดแกรมบวก และ *E. coli* ซึ่งเป็นแบคทีเรียชนิดแกรมลบ พบว่าโคโตซานมีปฏิริยาการยับยั้งการเจริญของ *S. aureus* ได้สูงขึ้น เมื่อน้ำหนักโมเลกุลของโคโตซานสูงขึ้น ในขณะที่มีปฏิริยาการยับยั้งการเจริญของ *E. coli* สูงขึ้นเมื่อน้ำหนักโมเลกุลของโคโตซานลดลง โดยโคโตซานมีกลไกการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่แตกต่างกันคือ โคโตซานสามารถสร้างโพลีเมอร์บริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ของ *S. aureus* เพื่อ

ขีดขวางการส่งผ่านของสารอาหารเข้าสู่เซลล์ของจุลินทรีย์ และโคโตซานที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำสามารถแทรกซึมหรือแพร่กระจายเข้าสู่เซลล์ได้ดีจึงสามารถยับยั้งการเจริญของ *E. coli* ได้ และสารละลายโคโตซานที่ความเข้มข้น 0.10 mg/ml สามารถยับยั้งการเจริญของ *Xanthomonas pathogenic bacteria* ได้ (Li et al., 2008)

4. ลักษณะของอาหาร ชนิดของอาหารแตกต่างกันต้องใช้ความเข้มข้นของโคโตซานแตกต่างกัน โดยถ้าลักษณะของอาหารมีส่วนประกอบมากก็จะขีดขวางการเคลื่อนที่ของโมเลกุลโคโตซาน ซึ่งเป็นการลดโอกาสโคโตซานในการสัมผัสกับเซลล์ของจุลินทรีย์

5. อุณหภูมิ มีงานวิจัยที่สนับสนุนว่าประสิทธิภาพของโคโตซาน ในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ว่าจะเกิดขึ้นได้ดี เมื่อใช้ร่วมกับการเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่ำ Roller และ Covill (2000) พบว่า ประสิทธิภาพของโคโตซานในการเป็นวัตถุกันเสียในมายองเนสควรร่วมใช้ร่วมกับการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4°C

2.3.3 พิล์มโคโตซานและการประยุกต์ใช้ในผลิตภัณฑ์อาหาร

ฟิล์มโคโตซานเป็นฟิล์มที่สามารถเตรียมได้ง่าย โดยการละลายด้วยสารละลายกรดเจือจาง (Park, Marsh and Rhim, 2002) ฟิล์มโคโตซานสามารถยืดอายุผลิตภัณฑ์อาหารได้ เนื่องจากสมบัติของโคโตซานด้านการต้านอนุมูลอิสระและการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ อย่างไรก็ตามประสิทธิภาพของฟิล์มโคโตซานขึ้นอยู่กับหลายปัจจัย เช่น ลักษณะโมเลกุลของโคโตซาน ได้แก่ degree of acetylation และน้ำหนักโมเลกุล, สารประกอบอื่นในระบบ ได้แก่ ประเภทและความเข้มข้นของกรด, ปริมาณของโปรตีน ไขมัน ไอออน และส่วนประกอบอื่นในอาหาร และสภาวะแวดล้อม ได้แก่ อุณหภูมิ และความชื้นสัมพัทธ์ (Bégin and Van Calsteren, 1999)

Pranoto, Rakshit และ Salokhe (2004) รายงานการเพิ่มประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ของฟิล์มโคโตซานโดยการเติมน้ำมันกระเทียม โปแตสเซียมซอร์เบต และไนซิน ที่ความเข้มข้นต่างๆ พบว่าการเติมน้ำมันกระเทียม โปแตสเซียมซอร์เบต และไนซิน สามารถเพิ่มประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของ *S. aureus*, *L. monocytogenes* และ *B. cereus* การเติมน้ำมันกระเทียมลงในฟิล์มโคโตซานส่งผลเพียงเล็กน้อยต่อสมบัติเชิงกลของฟิล์มโคโตซาน ในขณะที่การเติมโปแตสเซียมซอร์เบต และไนซิน มีผลทำให้ค่า tensile strength ลดลง และจากการศึกษา interaction ของหมู่ฟังก์ชันของฟิล์ม ด้วยเครื่อง Fourier Transform Infrared (FT-IR) พบว่าการเติมน้ำมันกระเทียม โปแตสเซียมซอร์เบต และไนซิน ไม่เกิด interaction กับหมู่ฟังก์ชันของโคโตซาน

Li และคณะ (2006) ศึกษาสมบัติและการใช้ฟิล์มแบบผสมของ glucomannan-chitosan-nisin ในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ พบว่าการใช้อัตราส่วน konjac glucomannan 80/chitosan 20 ให้ฟิล์มที่มีค่า tensile strength ดีที่สุด ฟิล์มที่ได้มีความใส ละลายน้ำได้ดี มีอัตราการซึมผ่านของไอน้ำต่ำ และมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรคในอาหาร 4 สายพันธุ์ ได้แก่ *E. coli*, *S. aureus*, *L. monocytogenes* และ *B. cereus*

Chien, Sheu และ Yang (2005) ศึกษาผลของการเคลือบไคโตซานต่อคุณภาพและอายุการเก็บของมะม่วงที่หั่นเป็นชิ้นบาง โดยแช่มะม่วงในสารละลายไคโตซานที่ความเข้มข้นแตกต่างกันแล้วห่อด้วยฟิล์ม polyvinylidene chloride (PVDC) และเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 6°C พบว่าการเคลือบด้วยไคโตซานช่วยลดการสูญเสียและชะลอการเสื่อมเสียของคุณภาพทางประสาทสัมผัส

Vargus, Albors และ González-Martínez (2006) ศึกษาผลของการเคลือบสตรอเบอร์รี่ด้วยไคโตซานที่เต็มและไม่เต็มกรดโพลีอิกและเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4±1°C พบว่าไคโตซานไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลง acidity, pH, soluble solids และ anthocyanin contents ของสตรอเบอร์รี่ตลอดระยะเวลาการเก็บ แต่มีผลในการรักษาคุณสมบัติเชิงกลและสีของผลไม้ระหว่างการเก็บ ส่วนการเคลือบสตรอเบอร์รี่ด้วยไคโตซานและกรดโพลีอิกช่วยยับยั้งการเจริญของเชื้อรา และเพิ่มความต้านทานการซึมผ่านของน้ำออกจากสตรอเบอร์รี่ ส่งผลให้อายุการเก็บของสตรอเบอร์รี่ยาวนานขึ้น

Sangsuwan, Rattanapanone และ Rachtanapun (2008) ศึกษาผลการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ของฟิล์มไคโตซาน/เมทิลเซลลูโลส และฟิล์มไคโตซาน/เมทิลเซลลูโลสที่เติมวานิลลิน (Vanillin, 4-hydroxy-3-methoxybenzaldehyde) หรือฟิล์มวานิลลิน ในการห่อแคนตาลูปและสับปะรดที่หั่นเป็นชิ้น พบว่าฟิล์มไคโตซาน/เมทิลเซลลูโลส และฟิล์มวานิลลิน มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของ *E. coli* และ *Saccharomyces cerevisiae* การใช้ฟิล์มวานิลลินห่อแคนตาลูป และสับปะรด ให้ผลที่แตกต่างกันคือฟิล์มวานิลลินจะมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ในผลไม้ที่มี pH ต่ำ หรือมีประสิทธิภาพยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ในสับปะรดได้ดีกว่าในแคนตาลูป

Beverly และคณะ (2008) ศึกษาการใช้ฟิล์มไคโตซานที่เตรียมจากกรด 2 ชนิดที่แตกต่างกัน ได้แก่ กรดอะซิติก และกรดแลกติก ในการควบคุมปริมาณเชื้อ *L. monocytogenes* บนผลิตภัณฑ์เนื้ออย่างพร้อมบริโภคระหว่างการเก็บในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4°C พบว่าผลิตภัณฑ์เนื้ออย่างพร้อมบริโภคที่ห่อด้วยฟิล์มไคโตซานที่เตรียมจากกรดอะซิติกมีผลในการยับยั้ง

L. monocytogenes ได้ดีกว่าฟิล์มไคโตซานที่เตรียมจากกรดแลกติก

Kanatt, Chander และ Sharma (2008) ศึกษาการใช้ไคโตซานผสมสารสกัดจากมินต์ เพื่อใช้เป็นสารถนอมอาหารที่มีสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระและยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ในผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ จากการศึกษาปฏิกิริยาการจับอนุมูล DPPH พบว่าไคโตซานที่ผสมสารจากจากมินต์มีค่า IC_{50} ลดลง เมื่อเทียบกับสารสกัดมินต์ และไคโตซานที่เติมสารสกัดมินต์มีประสิทธิภาพในการจับ superoxide และ hydroxyl radicals จากการศึกษาสมบัติการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดที่ทำให้อาหารเน่าเสีย และก่อให้เกิดโรค ได้แก่ *E. coli*, *Pseudomonas fluorescens*, *S. typhimurium*, *S. aureus* และ *B. cereus* พบว่าไคโตซานที่เติมสารสกัดมินต์มีประสิทธิในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียชนิดแกรมบวก ได้แก่ *S. aureus* และ *B. cereus* ได้ดีกว่าแบคทีเรียชนิดแกรมลบ และพบว่าไคโตซานที่เติมสารสกัดมินต์ลงในไส้กรอกหมูสามารถยืดอายุการเก็บไส้กรอกหมูที่อุณหภูมิ 0-3°C ให้ยาวนานขึ้นได้

บทที่ 3

การดำเนินงานวิจัย

สารเคมี

สารละลายเอทานอลความเข้มข้น 95% และ 99.5% (A.R. grade)

สารละลาย Folin-Ciocalteu reagent (Merck, Germany)

สารละลายโซเดียมคาร์บอเนตความเข้มข้น 20% (w/v) (A.R. grade)

สารละลายเมทานอลความเข้มข้น 95% (A.R. grade)

สารละลายกรดฟอสฟอริกความเข้มข้น 0.4% (v/v) (A.R. grade)

สารละลาย 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) (Fluka, Germany)

สารละลายกรดอะซิติกความเข้มข้น 2% (v/v) (A.R. grade)

สารละลายมาตรฐาน rutin (Acros organics, USA)

สารละลายมาตรฐาน quercetin (Fluka, Germany)

สารละลายมาตรฐาน naringenin (Sigma-Aldrich, USA)

สารละลายมาตรฐาน kaempferol (Fluka, Germany)

สารละลายมาตรฐาน baicalin (Fluka, Germany)

สารละลายมาตรฐาน chrysin (Fluka, Germany)

สารละลายมาตรฐาน acacetin (Fluka, Germany)

สารละลายมาตรฐาน galangin (Sigma-Aldrich, USA)

สารโปแตสเซียมโบรไมด์ (A.R. grade)

เครื่องมือ

เครื่องชั่ง (E5500-S, Sartorius, Sartorius Mechatronics, Gottingen, Germany)

เครื่อง Shaker (New Brunswick Scientific, Edison, USA)

เครื่อง Water bath shaker (SW23, Julabo, JULABO Labortechnik GmbH, Seelbach, Germany)

เครื่อง Rotary evaporator (Rotavapor R-200, BÜCHI, BÜCHI Laboratory Equipment, Flawil, Switzerland)

เครื่อง Vortex shaker (VX100, Labnet, Labnet International Inc., Woodbridge, USA)

เครื่อง Magnetic stirrer (Steromag, Steroglass, Steroglass S.r.l., Perugia, Italy)

เครื่อง Spectrophotometer (GENESYS 20, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA)
 เครื่อง High Performance Liquid Chromatography (HPLC) (Prostar, Varian Inc. Scientific Instruments, Palo Alto, USA)
 เครื่อง Fourier Transform Infrared Spectrometer (FT-IR) (Spectrum One, Perkin-Elmer, Waltham, USA)
 เครื่อง Homogenizer (D-79282, Ystral GmbH, Ballrechten-Dottingen, Germany)
 เครื่อง Sonicator (136H, Ultrasonik™, Fisher Scientific, Waltham, USA)
 เครื่อง Chroma Meter (Model CR-300 Series, Minolta, Osaka, Japan) ระบบ CIELAB
 เครื่อง Instron universal materials testing machine (Model 5565, Instron Engineering Corp., Canton, USA)
 เครื่อง Differential Scanning Calorimeter (STAR[®] SW 9.20, Mettler Toledo, Mettler-Toledo International Inc., Greifensee, Switzerland)
 เครื่อง Oxygen Permeation Analyzer (Model 8000, Illinois Instruments Inc., Johnsburg, USA)

การเตรียมวัตถุดิบ

พروفโพลิสที่ใช้ในการทดลองเป็นพروفโพลิสของจังหวัดเชียงใหม่ จากบริษัทเชียงใหม่เฮลตี้โปรดักส์จำกัด (Chiangmai Healthy Product Co.,Ltd., Chiangmai, Thailand) มีลักษณะปรากฏดังแสดงในภาพที่ 3.1 เก็บรักษาแบบแช่เยือกแข็งในถุงลามิเนตอลูมิเนียมฟอยล์ ที่อุณหภูมิ -18°C ตลอดระยะเวลาการศึกษา



ภาพที่ 3.1 ลักษณะของพروفโพลิส

โคโตซานที่ใช้ในการทดลองที่มีค่า degree of deacetylation 95% น้ำหนักโมเลกุล 100,000 daltons (Seafresh Chitosan (LAB) Co., Ltd., Bangkok, Thailand)

ขั้นตอนและวิธีการดำเนินงานวิจัย

3.1 ศึกษาอัตราส่วนของน้ำต่อเอทานอลที่เหมาะสมในการสกัดพรอพโพลิส

การศึกษาการแปรอัตราส่วนของน้ำต่อเอทานอลในตัวทำละลาย ทำโดยใช้พรอพโพลิส ปริมาณ 3 g ละลายด้วยตัวทำละลายที่มีอัตราส่วนของน้ำต่อเอทานอล 95% (v/v) ที่แตกต่างกัน คือ 70:30, 60:40, 50:50, 40:60 และ 30:70 เขย่าในที่มีดด้วยเครื่อง Shaker (New Brunswick Scientific, Edison, USA) ใช้ความเร็วรอบ 200 rpm ที่อุณหภูมิ 27°C เป็นเวลา 24 h จากนั้นกรองผ่านกระดาษกรอง Whatman No.1 นำสารสกัดแยกเอทานอล ออกจากน้ำด้วยเครื่อง Rotary evaporator (Rotavapor R-200, BÜCHI, BÜCHI Laboratory Equipment, Flawil, Switzerland) ภายใต้การลดความดันที่อุณหภูมิ 60°C 15 min นำสารที่ได้จากการสกัดมาวิเคราะห์ในการทดลอง ต่อไป

3.1.1 ศึกษาปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดในสารสกัดพรอพโพลิส

การหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (Total phenolic contents, TPC) ใช้วิธี Folin-Ciocalteu ดัดแปลงจากวิธีของ Choi และคณะ (2006) โดยปิเปตสารสกัดพรอพโพลิส 0.1 ml ลงในหลอดทดลอง เติมน้ำกลั่น 7 ml แล้วตามด้วย Folin-Ciocalteu reagent (Merck, Germany) 0.5 ml ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 8 min เติมน้ำกลั่น 20% (w/v) (A.R. grade) 1.5 ml เติมน้ำกลั่น 0.9 ml ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง Vortex shaker (VX100, Labnet, Labnet International Inc., Woodbridge, USA) ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 2 h (ห้ามสัมผัสแสง) วัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายที่ได้ที่ความยาวคลื่น 765 nm โดยใช้เครื่อง Spectrophotometer (GENESYS 20, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA) ใช้ น้ำกลั่นเป็น blank

3.1.2 ศึกษาสารประกอบฟีนอลิกในสารสกัดพรอพโพลิส

วิเคราะห์สารประกอบฟีนอลิก 8 ชนิด คือ rutin, quercetin, naringenin, kaempferol, baicalin, chrysin, acacetin และ galangin ด้วยเครื่อง High Performance Liquid Chromatography (HPLC) (Prostar, Varian Inc. Scientific Instruments, Palo Alto, USA) ใช้ UV-VIS detector (photodio Array 335 detector), autosample model 410, column C₁₈

reverse phase, 5 μ m, 250x4.6 mm (ChromSpher 5, Chromsep, Varian Inc. Scientific Instruments, Palo Alto, USA) mobile phase คือ methanol/0.4% phosphoric acid (60:40) และ flow rate 0.8 ml/min กรองสารด้วย syringe filter (Whatman, 0.45 μ m) ฉีดสารสกัด ปริมาตร 50 μ l วิเคราะห์สารประกอบฟีนอลิกที่ความยาวคลื่น 280 nm (Zhou *et al.*, 2008)

3.1.3 ศึกษาปฏิกิริยาการจับอนุมูล 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) ในสารสกัดพรอพโพลิส

การหาปฏิกิริยาการจับอนุมูล DPPH ดัดแปลงจากวิธีของ Kumazawa, Hamasaka และ Nakayama (2004) โดยปีเปตสารสกัดพรอพโพลิส 3 ml ใส่ลงในหลอดทดลอง จากนั้นปีเปตสารละลาย DPPH ในเอทานอล 99.5% (v/v) ความเข้มข้น 0.2 mM ปริมาตร 3 ml ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง Vortex shaker ตั้งทิ้งไว้ในที่มืด ที่อุณหภูมิห้อง 30 min วัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายที่ได้ที่ความยาวคลื่น 517 nm โดยใช้เครื่อง Spectrophotometer ใช้ น้ำกลั่นเป็น blank และใช้สารละลาย DPPH ที่เติมน้ำกลั่นแทนสารสกัดพรอพโพลิสเป็นตัวอย่างควบคุม คำนวณความสามารถในการจับอนุมูล DPPH ของสารสกัด (C_{AO}) ตามสมการที่ (1)

$$C_{AO} (\%) = \frac{A_{AO} - A_{RO}}{A_{RO}} \times 100 \quad (1)$$

A_{AO} และ A_{RO} คือค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างที่มีและไม่มีสารสกัด ตามลำดับ

3.1.4 ศึกษาสมบัติการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ของสารสกัดพรอพโพลิส

การศึกษสมบัติของสารสกัดพรอพโพลิสในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรค และมักพบในอาหารที่เกิดการปนเปื้อน โดยใช้วิธี agar diffusion ดัดแปลงจากวิธีของ Tosi และคณะ (2007) ในการทดลองใช้จุลินทรีย์ชนิดแกรมบวก ได้แก่ *Staphylococcus aureus* (TISTR 118) จากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย และจุลินทรีย์ชนิดแกรมลบ ได้แก่ *Escherichia coli* (TISTR 780) จากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) จาก American Type Culture Collection และ *Salmonella enteritidis* (DMST 17368) จากศูนย์เก็บรักษาสายพันธุ์จุลินทรีย์ทางการแพทย์แห่งชาติ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ โดยเชื้อจุลินทรีย์ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อมาตรฐาน nutrient broth (HiMedia Laboratories Pvt. Ltd., India) แล้วบ่มที่ 37°C เป็นเวลา 18 h วัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายที่ความยาวคลื่น 600 nm ให้ได้ค่าดูดกลืนแสงเป็น 0.40 ซึ่งมีปริมาณจุลินทรีย์อยู่ในช่วง 10^6 - 10^7 CFU/ml ปีเปตเชื้อจุลินทรีย์ 0.1 ml ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ

มาตรฐาน nutrient agar (HiMedia Laboratories Pvt. Ltd., India) จากนั้นกระจายเชื้อจุลินทรีย์ด้วยวิธี spread plate ปิเปตสารสกัดพรอพโพลิส 0.1 ml ลงบน paper discs ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 mm และผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว จากนั้นวาง paper discs ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อมาตรฐาน nutrient agar ที่มีปริมาณจุลินทรีย์อยู่ในช่วง 10^6 - 10^7 CFU/ml บ่มที่ 37°C เป็นเวลา 24 h ตรวจสอบบริเวณการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ (inhibitory zone) โดยวัดจากเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณโดยรอบ paper disc และการตรวจสอบบริเวณผิวสัมผัส (contact surface) ที่ paper disc สัมผัสกับจุลินทรีย์บน agar plate โดยตรง

3.1.5 การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

การทดลองข้อที่ 3.1.1, 3.1.3 และ 3.1.4 ออกแบบการทดลองแบบ Complete Randomized Design (CRD) ทำการทดลอง 3 ซ้ำ วิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติของข้อมูล และเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์สำเร็จรูป Statistic Package for the Social Science (SPSS version 16, USA)

3.2 ศึกษาผลของความเข้มข้นของสารสกัดพรอพโพลิสต่อสมบัติของฟิล์มไคโตซาน

เตรียมสารละลายไคโตซานความเข้มข้น 2% (w/v) โดยซิงไคโตซาน (Seafresh Chitosan (LAB) Co., Ltd., Bangkok, Thailand) ที่มีค่า degree of deacetylation 95% น้ำหนักโมเลกุล 100,000 daltons ปริมาณ 4 g แล้วเติมน้ำกลั่น 50 ml ตั้งทิ้งไว้ 15 min เติมสารละลาย acetic acid ความเข้มข้น 2% (v/v) 100 ml คนให้เข้ากันด้วยเครื่อง Magnetic stirrer (Steromag, Steroglass, Steroglass S.r.l., Perugia, Italy) 15 min แล้วปิดปากบีกเกอร์ด้วยพาราฟิล์ม นำไปแช่ใน water bath shaker ที่อุณหภูมิ 60°C เป็นเวลา 24 h จากนั้นเติมกลีเซอรอล 1.2 g เติมสารสกัดพรอพโพลิสที่เตรียมจากการสกัดด้วยตัวทำละลายที่มีอัตราส่วนของน้ำต่อเอทานอลที่ได้จากการศึกษาในข้อที่ 3.1 จากนั้นแปรความเข้มข้นของสารสกัดพรอพโพลิสเป็น 0.5, 1.5, 2.5, 5 และ 10% (w/v) ลงในสารละลายฟิล์มปริมาตร 25% (v/v) ของสารละลายฟิล์ม นำสารละลายฟิล์มมาทำให้เป็นเนื้อเดียวกันด้วยเครื่อง Homogenizer (D-79282, Ystral GmbH, Ballrechten-Dottingen, Germany) ใช้ความเร็ว 19000 rpm ด้วยหัวเบอร์ 18/G เป็นเวลา 1.5 min แล้วนำไปใส่ฟองอากาศด้วยเครื่อง Sonicator (136H, Ultrasonik™, Fisher Scientific, Waltham, USA) เป็นเวลา 15 min เทสารละลายฟิล์มประมาณ 95 ± 1 g ใส่พิมพ์เซรามิกขนาด 12 x 29 cm จากนั้นเก็บฟิล์มในตู้ควบคุมอุณหภูมิและความชื้นสัมพัทธ์ (RH) ที่ 27°C และ RH $50 \pm 5\%$ นำฟิล์มที่ได้มาวิเคราะห์ในการทดลองขั้นต่อไป

3.2.1 สมบัติทางกายภาพ

3.2.1.1 วัดค่าสี

วัดค่าสีของแผ่นฟิล์มด้วยเครื่อง Chroma Meter (Model CR-300 Series, Minolta, Osaka, Japan) ระบบ CIELAB และบันทึกค่า L* value (lightness) a* value (redness) ค่า b* value (yellowness)

3.2.1.2 วัดค่าความโปร่งใส (%Transparency, %T)

วัดค่าความโปร่งใสของฟิล์ม โดยตัดฟิล์มให้มีขนาด 1.5 x 5 cm ใส่ลงในเซลล์วัดค่าดูดกลืนแสงที่ทำจาก quartz มีขนาด 1 x 4 cm วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 nm โดยใช้เครื่อง Spectrophotometer โดยดัดแปลงจาก ASTM D 1746-92 (ASTM, 1987) คำนวณหาค่า %T จากสมการที่ (2)

$$\% T = \frac{\text{Abs}_{600}}{x} \quad (2)$$

Abs_{600} คือค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 nm, x คือความหนาของฟิล์มที่ใช้ในการทดลอง

3.2.1.3 วัดค่าการซึมผ่านของไอน้ำ (Water vapor permeability, WVP)

วัด WVP (g mm/Pa day m²) โดยดัดแปลงจาก ASTM (1980) ทำโดยหึ่ง silica gel ปริมาณ 20 g ใส่ลงในขวดแก้วที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 3 cm ตัดฟิล์มให้มีขนาด 6 x 6 cm หุ้มฟิล์มบริเวณปากขวดแล้วหึ่งฟิล์มให้ตั้งด้วยพาราฟิล์ม เก็บไว้ในเดซิเคเตอร์ที่มีน้ำกลั่น RH 100% และอุณหภูมิ 30°C ซึ่งน้ำหนักขวดตัวอย่างทุกชั่วโมง จนกระทั่งน้ำหนักคงที่ จากนั้นคำนวณหาค่า WVP จากสมการที่ (3)

$$\text{WVP} = \frac{(w \cdot x)}{A \cdot t \cdot (P_2 - P_1)} \quad (3)$$

w คือน้ำหนักฟิล์มที่เพิ่มขึ้น (g), x คือความหนาของฟิล์มที่ใช้ในการทดลอง (mm), A คือพื้นที่หน้าตัดของแผ่นฟิล์ม (m²), t คือระยะเวลาที่ใช้ในการทดลอง (h), (P₂ - P₁) คือผลต่างของค่าความดันไอน้ำภายนอกและภายในของขวดแก้ว (Pa)

3.2.1.4 วัดค่าอัตราการซึมผ่านของก๊าซออกซิเจน (Oxygen gas transmission rate, OTR)

วัดค่า OTR ($\text{cm}^3/\text{m}^2/\text{day}$) โดยดัดแปลงจากวิธี ASTM D3985 (1995) เตรียมตัวอย่างฟิล์มโดยการควบคุมภาวะในการทดลองที่อุณหภูมิ 23°C และ RH 0% แล้ววัดด้วยเครื่อง Oxygen Permeation Analyzer (Model 8000, Illinois Instruments Inc., Johnsburg, USA)

3.2.1.5 วัดสมบัติเชิงกล

วัดสมบัติเชิงกล โดยการตัดฟิล์มให้มีขนาด $3 \times 15 \text{ cm}$ วัดค่า Tensile strength (TS) และ Elongation at break (%E) (ASTM, 1989) ด้วยเครื่อง Instron universal testing machine (Model 5565, Instron Engineering Corp., Canton, USA) โดยใช้หัววัดแบบตั้งขึ้นที่กำหนดให้มีระยะห่างของหัววัด 5 cm ใช้อัตราเร็วในการดึงตัวอย่าง 5 mm/s ค่า TS (MPa) คำนวณจากสมการที่ (4) และค่า %E คำนวณจากสมการที่ (5)

$$\text{TS} = \frac{f}{A} \quad (4)$$

f คือค่าแรงสูงสุด maximum load (MPa), A คือพื้นที่ของตัวอย่างฟิล์ม (m^2)

$$\%E = \frac{\Delta L}{L} \times 100 \quad (5)$$

ΔL คือระยะที่ฟิล์มยืดได้สูงที่สุดจนขาด (cm), L คือระยะฟิล์มเริ่มต้นก่อนการยืด (5 cm)

3.2.2 สมบัติทางเคมี

การศึกษาสมบัติการต้านอนุมูลอิสระในฟิล์มโคโคซานที่เติมสารสกัดพรอพโพลิสที่ความเข้มข้นต่างกัน โดยการใส่ฟิล์ม 250 mg แล้วตัดให้เป็นชิ้นเล็ก เติมน้ำกลั่น 30 ml จากนั้นคนด้วยเครื่อง Magnetic stirrer เป็นเวลา 5 min กรองแล้วนำสารละลายฟิล์มที่ได้มาใช้ในการทดลองขั้นต่อไป

3.2.2.1 ศึกษา TPC ในฟิล์มไคโตซานที่เติมสารสกัดพรอพโพลิสที่ความเข้มข้นต่างกัน

การหา TPC จากสารละลายฟิล์ม ใช้วิธี Folin-Ciocalteu โดยดัดแปลงจากวิธีของ Choi และคณะ (2006) ทำการทดลองเช่นเดียวกับในข้อ 3.1.1

3.2.2.2 ศึกษาสารประกอบฟีนอลิกในฟิล์มไคโตซานที่เติมสารสกัดพรอพโพลิสที่ความเข้มข้นต่างกัน

วิเคราะห์สารประกอบฟีนอลิก 8 ชนิด คือ rutin, quercetin, naringenin, kaempferol, baicalin, chrysin, acacetin และ galangin ด้วยเครื่อง HPLC ใช้ UV-VIS detector, autosample model 410, column C₁₈ reverse phase, 5 μ m, 250x4.6 mm mobile phase คือ methanol/0.4% phosphoric acid (60:40) และ flow rate 0.8 ml/min กรองสารด้วย syringe filter (Whatman, 0.45 μ m) ฉีดสารสกัดที่ 100 μ l วิเคราะห์สารประกอบฟีนอลิกที่ความยาวคลื่น 280 nm (Zhou *et al.*, 2008)

3.2.2.3 ศึกษาปฏิกิริยาการจับอนุมูล DPPH ในฟิล์มไคโตซานที่เติมสารสกัดพรอพโพลิสที่ความเข้มข้นต่างกัน

ศึกษาปฏิกิริยาการจับอนุมูล DPPH จากสารละลายฟิล์ม โดยดัดแปลงจากวิธีของ Kumazawa, Hamasaka และ Nakayama (2004) ใช้สารละลาย DPPH ที่ความเข้มข้น 0.1 mM โดยทำการทดลองเช่นเดียวกับในข้อ 3.1.3

3.2.3 ศึกษา interaction ของหมู่ฟังก์ชันของฟิล์มไคโตซานที่เติมสารสกัดพรอพโพลิส

ศึกษาหมู่ฟังก์ชันของสารสกัดพรอพโพลิสที่สกัดด้วยตัวทำละลายที่ต่างกันเตรียมตัวอย่างโดยการชั่งสารสกัดพรอพโพลิส 1-2 mg ใส่ในโกร่งอะเกต แล้วบดให้ละเอียด เติมนิโคตอซินไฮดรอกไซด์ 100 – 150 mg ในอัตราส่วนระหว่างสารสกัดกับนิโคตอซินไฮดรอกไซด์ 1:100 บดสารสกัดกับนิโคตอซินไฮดรอกไซด์ ให้เข้ากันโดยเร็วที่สุด จากนั้นอัดส่วนผสมให้เป็นเนื้อเดียวกันโดยใช้เครื่องอัด ที่แรงอัด 10 tons ทิ้งไว้ประมาณ 1 min จะได้ตัวอย่างที่มีลักษณะเป็นแผ่นกลมบางใส (pellet) ส่วนการศึกษา interaction ของหมู่ฟังก์ชันของฟิล์มไคโตซานที่เติมสารสกัดพรอพโพลิสที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน เตรียมตัวอย่างโดยการหยดสารละลายฟิล์มลงบนแผ่นแก้วที่ใช้สำหรับการวิเคราะห์ จากนั้นรอจนฟิล์มแห้ง วิเคราะห์ตัวอย่างด้วยเครื่อง Fourier Transform Infrared Spectrometer (FT-IR) (Spectrum One, Perkin-Elmer, Waltham, USA) วัดค่าการ

ดูดกลืนแสงอินฟราเรดที่ความยาวคลื่น 400-4000 cm^{-1} วิเคราะห์ตัวอย่างโดยตั้งค่า resolution เท่ากับ 4.0 cm^{-1} และจำนวน scan 16 ครั้ง

3.2.4 วัดค่า Glass transition temperature (T_g)

วัดค่า Glass transition temperature (T_g) โดยใช้เครื่อง Differential Scanning Calorimeter (DSC) (STAR[®] SW 9.20, Mettler Toledo, Mettler-Toledo International Inc., Greifensee, Switzerland) ซึ่งตัวอย่างฟิล์มน้ำหนักประมาณ 5 mg ใส่ Aluminum volatile sample pan แล้วปิดฝา pan ด้วยเครื่องปิดฝาให้สนิท ใส่ pan ในช่อง sample และใส่ pan เปล่าที่ปิดฝาสนิทในช่อง reference ของเครื่อง DSC อุณหภูมิที่ใช้ในการทดลองอยู่ในช่วง -50 ถึง 250 $^{\circ}\text{C}$ อัตราการให้ความร้อนที่ 10 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ อัตราการไหลเวียนของก๊าซไนโตรเจนที่ 50 ml/min ค่า T_g คือค่าที่อยู่ตรงกลางระหว่างจุด onset และ endset

3.2.5 สมบัติการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์

การศึกษาสมบัติการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ 4 ชนิด คือ *S. aureus*, *S. enteritidis*, *E. coli* และ *P. aeruginosa* โดยใช้วิธี agar diffusion ดัดแปลงจากวิธีของ Tosi และคณะ (2007) โดยทำการทดลองเช่นเดียวกับในข้อ 3.1.3 โดยเปลี่ยนจากสารสกัดใน paper disc เป็นการใส่ฟิล์มที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 mm แทน

3.2.6 การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

การทดสอบสมบัติทางกายภาพ ทางเคมี และการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ ออกแบบการทดลองแบบ Complete Randomized Design (CRD) ทำการทดลอง 3 ซ้ำ วิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติของข้อมูล และเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์สำเร็จรูป Statistic Package for the Social Science (SPSS version 16, USA)

บทที่ 4

ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง

4.1 ผลการศึกษาอัตราส่วนของน้ำต่อเอทานอลที่เหมาะสมในการสกัดพรอพโพลิส

4.1.1 การศึกษาปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดในสารสกัดพรอพโพลิส

การเปรียบเทียบสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (Total phenolic contents, TPC) ในพรอพโพลิส โดยสกัดด้วยตัวทำละลายที่มีอัตราส่วนของน้ำต่อเอทานอลที่แตกต่างกัน 5 ระดับ ได้ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 ค่า TPC ในสารสกัดพรอพโพลิสเมื่อแปรอัตราส่วนของน้ำต่อเอทานอล

น้ำ:เอทานอล (ml)	TPC* (mg gallic acid equivalent/g)
70:30	5.56 ^c ±0.42
60:40	8.38 ^c ±0.58
50:50	11.96 ^c ±0.86
40:60	22.04 ^b ±1.56
30:70	41.00 ^a ±8.39

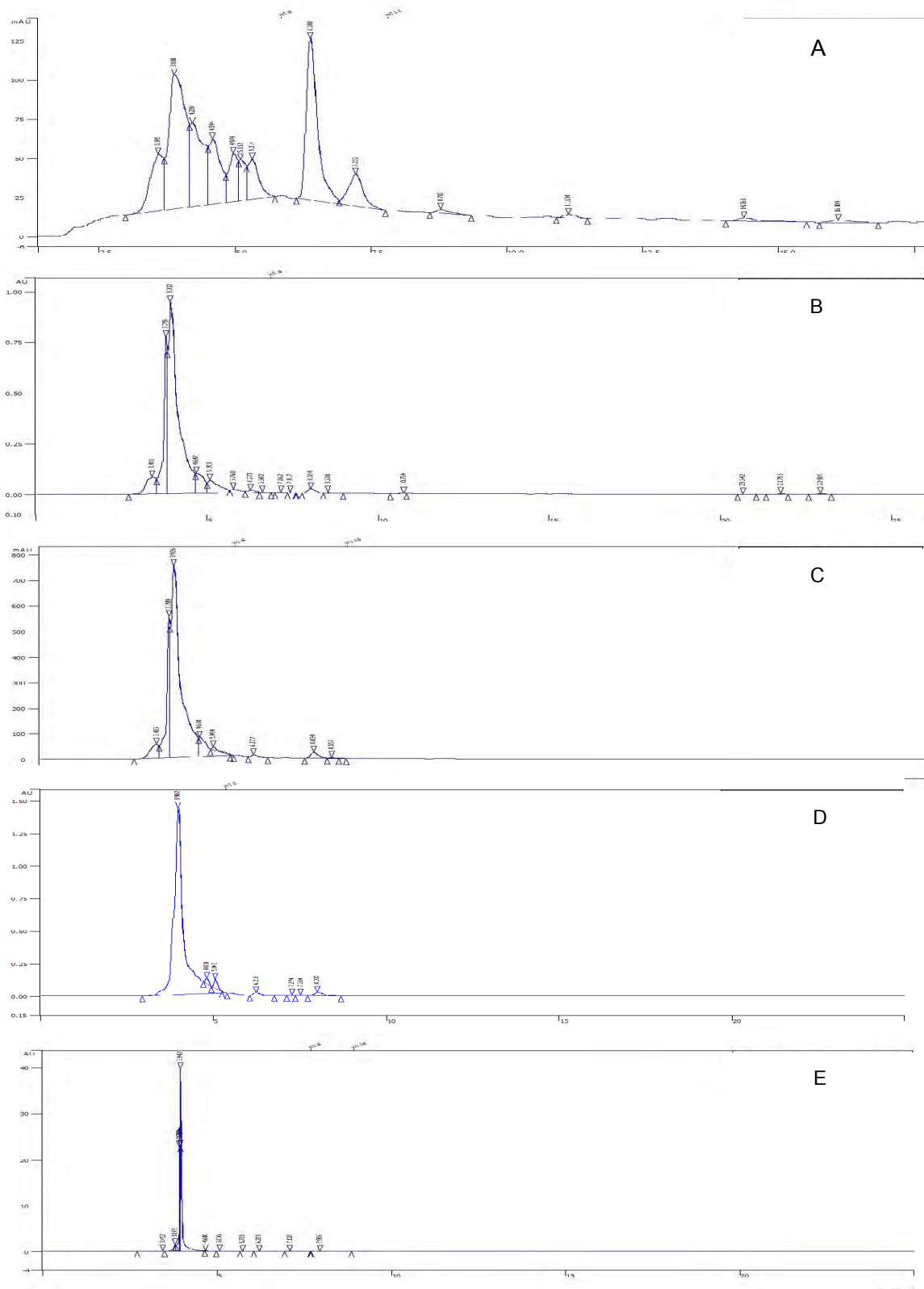
* a, b,... ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรกำกับแตกต่างกันในแนวตั้งเดียวกันมีค่าแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)

จากผลการทดลองพบว่า การสกัดที่ใช้อัตราส่วนของน้ำต่อเอทานอลเป็น 30:70 ให้ TPC สูงที่สุด คือ 41.00±8.39 mg gallic acid equivalent/g และที่ 70:30 ให้ TPC ต่ำที่สุดคือ 5.56±0.42 mg gallic acid equivalent/g เมื่อเพิ่มปริมาณเอทานอลในตัวทำละลายสูงขึ้นส่งผลให้มีปริมาณ TPC ที่สูงขึ้น ทั้งนี้อาจเนื่องจากสารประกอบฟีนอลิกที่มีอยู่ในพรอพโพลิสสามารถละลายได้ดีในเอทานอล ผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับงานวิจัยของ Kumazawa, Hamasaka และ Nakayama (2004) ที่ศึกษาปริมาณ TPC ของพรอพโพลิสโดยการสกัดด้วยเอทานอลจากแหล่งต่างๆ รวมถึงประเทศไทย พบว่าสารสกัดพรอพโพลิสของประเทศไทยมี TPC คือ 31.2±0.7 mg gallic acid equivalent/g ในขณะที่พรอพโพลิสของประเทศอาร์เจนตินา, ออสเตรเลีย, บราซิล, บัลแกเรีย, ซิลี, จีน (Hebei, Hubei และ Zhejiang), อินเดีย, นิวซีแลนด์, แอฟริกาใต้, ยูเครน, อุรุกวัย, อเมริกา, อุซเบกิสถาน มีปริมาณ TPC อยู่ในช่วง 99.5±4.4 - 299±0.5 mg gallic acid equivalent/g ทั้งนี้ Antolovich และคณะ (2000) กล่าวว่า ความสามารถในการละลายของ

สารประกอบฟีนอลิกนอกจากจะขึ้นอยู่กับประเภทของตัวทำละลายที่ใช้แล้ว ยังขึ้นอยู่กับ degree of polymerization และปฏิกิริยาภายในของฟีนอลิกกับสารประกอบชนิดอื่นที่อาจมีโครงสร้างที่ซับซ้อนหรือกับสารที่ไม่สามารถละลายได้

4.1.2 การศึกษาสารประกอบฟีนอลิกในสารสกัดพรอพโพลิส

การศึกษาเพื่อหาสารประกอบฟีนอลิก 8 ชนิด คือ rutin, quercetin, naringenin, kaempferol, baicalin, chrysin, acacetin และ galangin ที่ได้จากการสกัดด้วยตัวทำละลายที่มีอัตราส่วนของน้ำต่อเอทานอลต่างกัน ซึ่งการวิเคราะห์คุณภาพของพรอพโพลิสจะใช้สารประกอบฟีนอลิกเหล่านี้เป็นสารประกอบฟีนอลิกมาตรฐาน (Zhou *et al.*, 2008) ภาพที่ 4.1 (A - E) แสดง HPLC Chromatogram ของสารประกอบฟีนอลิกที่พบในสารสกัดพรอพโพลิสโดยสกัดด้วยตัวทำละลายที่มีอัตราส่วนของน้ำต่อเอทานอลต่างกัน ส่วนปริมาณสารประกอบฟีนอลิกที่พบในสารสกัดพรอพโพลิสแสดงไว้ในตารางที่ 4.2



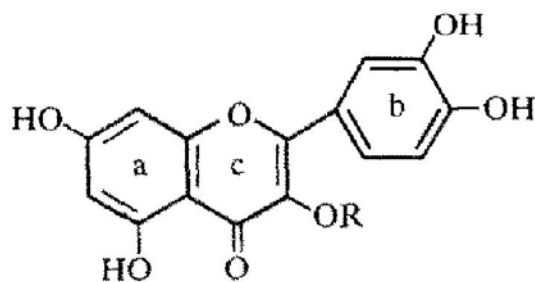
ภาพที่ 4.1 HPLC Chromatogram แสดงสารประกอบฟีนอลิกที่พบในสารสกัดพรอพโพลิสโดยสกัดด้วยตัวทำละลายที่มีอัตราส่วนของน้ำต่อเอทานอลเป็น 70:30 (A), 60:40 (B), 50:50 (C), 40:60 (D) และ 30:70 (E)

ตารางที่ 4.2 ปริมาณของสารประกอบฟีนอลิกที่พบในสารสกัดพรอพโพลิสที่สกัดด้วยตัวทำละลายที่มีอัตราส่วนของน้ำต่อเอทานอลต่างกัน

สารประกอบฟีนอลิก		ปริมาณสารประกอบฟีนอลิก ($\mu\text{g/ml}$)				
		70:30	60:40	50:50	40:60	30:70
rutin	(4.654)	13.47	35.27	36.11	6.15	72.42
quercetin	(6.734)	4.47	0.08	0.27	0.69	3.46
naringenin	(7.022)	0.88	0.06	-	0.06	0.50
kaempferol	(9.154)	-	-	-	-	-
baicalin	(10.452)	-	0.01	-	-	-
chrysin	(18.358)	-	-	-	-	-
acacetin	(20.695)	-	0.02	-	-	-
galangin	(22.881)	-	0.10	-	-	-

- not detected, ตัวเลขในวงเล็บระบุ retention time (min)

จากผลการทดลองพบว่าอัตราส่วนของน้ำต่อเอทานอลที่แตกต่างกันมีผลต่อปริมาณสารประกอบฟีนอลิกที่สกัดได้จากพรอพโพลิส ซึ่งสารสกัดพรอพโพลิสที่ใช้ในการวิเคราะห์พบ rutin และ quercetin ในทุกตัวอย่างทดลอง โดย rutin และ quercetin มีโครงสร้างโมเลกุลดังแสดงในภาพที่ 4.2



quercetin R = H

rutin R = D-Glucose-L-Rhamnose

ภาพที่ 4.2 โครงสร้างโมเลกุลของ rutin และ quercetin

ที่มา : Afanas'ev และคณะ (1989)

ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระจะมีความสัมพันธ์กับจำนวนและตำแหน่งของหมู่ไฮดรอกซีบนวง b โดยพบว่าโมเลกุลที่มีโครงสร้างแบบ ortho diphenolic หรือ catechol จะสามารถต้านอนุมูลอิสระได้ดี และเมื่อพิจารณาโครงสร้างโมเลกุลของ rutin และ quercetin มีความแตกต่างกันที่หมู่แทนที่ไฮดรอกซิลที่ตำแหน่ง C₃, (3-OH) บนวง c ซึ่ง rutin เป็น 3-O-glycoside ของ quercetin มีการแทนที่หมู่ 3-OH ด้วยหมู่กลัยโคไซด์ ทำให้ rutin มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระต่ำกว่า quercetin เกือบ 2 เท่า (ปรีชา บุญจุง, 2549)

การแปรอัตราส่วนของน้ำต่อเอทานอลที่อัตราส่วน 30:70 พบปริมาณสารประกอบฟีนอลิกมากที่สุด เนื่องจากส่วนประกอบหลักทางเคมีในพรอพโพลิสจะประกอบด้วย flavonoids, ฟีนอลิก และ aromatic compound ต่างๆ ซึ่งสารประกอบเหล่านี้มีความสามารถในการละลายน้ำ และละลายในตัวทำละลายไฮโดรคาร์บอนต่ำ แต่โดยทั่วไปแล้วจะสามารถละลายได้ดีในแอลกอฮอล์ (Mizrahi and Lensky, 1997) สารประกอบฟีนอลิกที่มีอยู่ในพรอพโพลิสจะอยู่ในโครงสร้างที่เป็นเรซิน และเอทานอลมีความสามารถในการทำละลายเรซินจึงส่งผลให้สารประกอบฟีนอลิกสูงขึ้น เมื่อใช้อัตราส่วนของเอทานอลสูงขึ้นด้วย โดยทั่วไปสารประกอบฟีนอลิกประมาณ 20-30% ของสารสกัดพรอพโพลิสที่สกัดด้วยเอทานอลจะประกอบได้ด้วย galangin, isalpinin, kaemferol, kaemferid, rhamnetin, quercetin, pinocembrin, ponostrobin และ pinobanksin (Havsteen, 1983) อย่างไรก็ตามจากการศึกษาของ Kumasawa, Hamasaka และ Nakayama (2004) ซึ่งวิเคราะห์สารประกอบฟีนอลิกของพรอพโพลิสจากแหล่งต่างๆรวมถึงประเทศไทยโดยการสกัดด้วยเอทานอล แต่ไม่พบ quercetin จากสารสกัดพรอพโพลิสของประเทศไทย อย่างไรก็ตามผู้วิจัยไม่ได้ระบุว่าพรอพโพลิสเป็นของเขตใดในประเทศไทย จึงมีความเป็นไปได้ว่าพรอพโพลิสที่ใช้ในการทดลองนี้มาจากพื้นที่ต่างกัน เนื่องจากปริมาณและชนิดของสารประกอบฟีนอลิกจะแตกต่างกันขึ้นอยู่กับแหล่งที่พบ (Bankova, Castro and Marcucci, 2000)

4.1.3 การศึกษาปฏิกิริยาการจับอนุมูล DPPH ในสารสกัดพรอพโพลิส

DPPH คืออนุมูลอิสระที่เสถียรและสามารถรับอิเล็กตรอนได้ เมื่อได้รับอะตอมไฮโดรเจนจากโมเลกุลอื่นจะทำให้สารดังกล่าวไม่เป็นอนุมูลอิสระ ดังนั้นการศึกษาประสิทธิภาพของสารต้านอนุมูลอิสระจะศึกษาปฏิกิริยาของสารสกัดในการจับกับอนุมูล DPPH (Gordon, 1990) จากการศึกษาสารสกัดพรอพโพลิสที่ได้จากการสกัดด้วยตัวทำละลายที่มีอัตราส่วนของน้ำต่อเอทานอลแตกต่างกันต่อความสามารถในการเกิดปฏิกิริยาในการจับอนุมูล DPPH ได้ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 4.3

ตารางที่ 4.3 ปฏิริยาการจับอนุมูล DPPH (%) ในสารสกัดพรอพโพลิสเมื่อแปรอัตราส่วนของน้ำต่อเอทานอล

น้ำ:เอทานอล (ml)	DPPH free radical scavenging activity (%) [*]
70:30	65.52 ^d ±1.18
60:40	80.89 ^c ±2.61
50:50	89.04 ^b ±0.08
40:60	34.21 ^e ±2.06
30:70	94.88 ^a ±4.95

* a, b,... ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรกำกับแตกต่างกันในแนวตั้งเดียวกันมีค่าแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)

จากผลการทดลองพบว่าความสามารถในการจับอนุมูล DPPH ที่ได้จะสอดคล้องกับปริมาณสารประกอบฟีนอลิก โดยเมื่อปริมาณสารประกอบฟีนอลิกเพิ่มขึ้นเปอร์เซ็นต์การจับอนุมูล DPPH จะสูงขึ้น ยกเว้นในการสกัดด้วยตัวทำละลายน้ำต่อเอทานอล 60:40 พบว่าความสามารถในการจับอนุมูล DPPH ลดลง

ถึงแม้ว่าการสกัดด้วยตัวทำละลายที่ใช้ น้ำต่อเอทานอล 40:60 มีปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดที่สูง แต่พบว่าปฏิริยาในการจับอนุมูล DPPH กลับลดลง ซึ่งสอดคล้องกับผลการวิเคราะห์สารประกอบฟีนอลิกด้วยเครื่อง HPLC โดยจะพบ rutin, quercetin และ naringenin ในปริมาณที่ต่ำกว่าเมื่อเทียบกับการสกัดโดยใช้อัตราส่วนของน้ำต่อเอทานอลที่อัตราส่วนอื่น (ตารางที่ 4.2) ดังนั้นอาจกล่าวได้ว่าปริมาณของ rutin quercetin และ naringenin มีผลต่อความสามารถในการจับอนุมูล DPPH และอัตราส่วนของน้ำต่อเอทานอลมีผลต่อชนิดของสารประกอบฟีนอลิกที่ได้ซึ่งส่งผลต่อสมบัติการต้านอนุมูลอิสระในสารสกัดพรอพโพลิส

จากรายงานการศึกษาของ Rice-Evans, Miller และ Paganga (1996) ถึงความสามารถของการต้านอนุมูลของสารประกอบฟีนอลิก เปรียบเทียบกับสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน (Trolox equivalent antioxidant, TEAC) โดยวัดความเข้มข้นของสารละลาย Trolox ที่สามารถต้านอนุมูลอิสระเท่ากับสารละลายทดสอบความเข้มข้น 1 mM โดยค่า TEAC จะบ่งบอกถึงความสามารถของสารในการเป็น hydrogen-donating ในการยับยั้งอนุมูลอิสระ ถ้า TEAC มีค่าสูง แสดงว่าสารนั้นมีความสามารถต้านออกซิเดชันที่ดี ซึ่ง rutin, quercetin และ naringenin มีค่า TEAC เท่ากับ 2.40, 4.72 และ 1.53 mM ตามลำดับ โดย quercetin มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุด ดังนั้นการที่ค่า ปฏิริยาการจับอนุมูล DPPH ของสารสกัดที่สกัดด้วยตัวทำละลายที่มีอัตราส่วนของน้ำต่อเอทานอลเป็น 40:60 ลดลง จึงเนื่องมาจากการใช้ภาวะดังกล่าว

ทำให้มีปริมาณ rutin, quercetin และ naringenin ลดลง ซึ่งส่งผลโดยตรงต่อความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัด

4.1.4 การศึกษาสมบัติการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ของสารสกัดพรอพโพลิส

จากการศึกษาผลของการแปรอัตราส่วนของน้ำต่อเอทานอลต่อสมบัติการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ของสารสกัดพรอพโพลิส ด้วยวิธี agar diffusion โดยใช้จุลินทรีย์ 4 ชนิด คือ *S. aureus*, *S. enteritidis*, *E. coli* และ *P. aeruginosa* ซึ่งจุลินทรีย์ทั้ง 4 ชนิดนี้เป็นจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรค และพบได้ทั่วไปในอาหารที่เกิดการปนเปื้อน ปริมาณจุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลองคือ 10^6 - 10^7 CFU/ml ตรวจสอบบริเวณการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ (inhibitory zone) โดยวัดจากเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณโดยรอบ paper discs และบริเวณผิวสัมผัส (contact surface) ใช้สำหรับทดสอบบริเวณที่สารสกัดสัมผัสโดยตรงกับจุลินทรีย์ ได้ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 4.4

ตารางที่ 4.4 การยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ของสารสกัดพรอพโพลิสเมื่อแปรอัตราส่วนของน้ำต่อเอทานอล

Propolis extract	<i>S. aureus</i>		<i>S. enteritidis</i>		<i>E. coli</i>		<i>P. aeruginosa</i>	
water:	Inhibitory Contact		Inhibitory Contact		Inhibitory Contact		Inhibitory Contact	
ethanol	zone*	surface	zone	surface	zone	surface	zone	surface
	(mm)		(mm)		(mm)		(mm)	
70:30	4.44 ^a ±0.20	+	0.00±0.00	+	0.00±0.00	+	0.00±0.00	+
60:40	4.22 ^a ±0.51	+	0.00±0.00	+	0.00±0.00	+	0.00±0.00	+
50:50	4.11 ^a ±0.51	+	0.00±0.00	+	0.00±0.00	+	0.00±0.00	+
40:60	0.00 ^b ±0.00	+	0.00±0.00	+	0.00±0.00	+	0.00±0.00	+
30:70	0.00 ^b ±0.00	+	0.00±0.00	+	0.00±0.00	+	0.00±0.00	+

* a, b,... ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรกำกับแตกต่างกันในแนวตั้งเดียวกันมีค่าแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)

+ คือไม่มีการเจริญของจุลินทรีย์

จากผลการทดลองพบว่าไม่พบการเจริญของจุลินทรีย์ทั้ง 4 ชนิด ในบริเวณที่ผิวสัมผัสของจุลินทรีย์กับสารสกัด อย่างไรก็ตามไม่พบการเกิดบริเวณการยับยั้งการเจริญของ *S. enteritidis*, *E. coli* และ *P. aeruginosa* ซึ่งเป็นแบคทีเรียประเภทแกรมลบ แต่พบการเกิดบริเวณการยับยั้งการเจริญของ *S. aureus* ซึ่งเป็นแบคทีเรียประเภทแกรมบวก สารสกัดพรอพโพลิสที่ได้จากการสกัดที่อัตราส่วนของน้ำต่อเอทานอลที่ 70:30 เกิดการยับยั้งสูงที่สุดคือ 4.44 ± 0.20 mm เนื่องจากเป็นอัตราส่วนที่พบปริมาณของ quercetin สูงที่สุด Rauha และคณะ

(2000) ได้รายงานไว้ว่า quercetin มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ได้ดีกว่า rutin และสารสกัดพรอพโพลิสที่ได้จากการสกัดที่อัตราส่วนของน้ำต่อเอทานอลที่ 40:60 และ 30:70 ไม่เกิดบริเวณการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ ผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับงานวิจัยของ Silici และ Kutluca (2005) ซึ่งศึกษาการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ของพรอพโพลิสที่สกัดโดยใช้เอทานอล และพบว่าสารสกัดที่ได้สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ประเภทแกรมบวก ได้แก่ *S. aureus* ได้ดี และมีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ประเภทแกรมลบ ได้แก่ *E. coli* และ *P. aeruginosa* และยีสต์ *Candida albicans* ต่ำ ทั้งนี้อาจเนื่องจาก ผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมลบจะบางกว่าแบคทีเรียแกรมบวก แต่จะมีส่วนประกอบทางเคมีและโครงสร้างซับซ้อนมากกว่าของแบคทีเรียแกรมบวก ประกอบด้วย outer membrane ซึ่งเป็นสารประกอบพวก phospholipid lipopolysaccharide และ lipoprotein และ ชั้นของ peptidoglycan โดยเป็นชั้น peptidoglycan เพียง 5 - 20 % ของผนังเซลล์ทั้งหมดเท่านั้น (Mandelstam, McQuillen and Dawes, 1982) และจากงานวิจัยของ Bankova (2005) ซึ่งศึกษาความหลากหลายของสารประกอบเคมีในพรอพโพลิส พบว่ามีความสัมพันธ์ที่ตรงกันข้ามกันระหว่างค่า TPC กับค่า minimum inhibitory concentration (MIC) คือเมื่อปริมาณสารประกอบฟีนอลิกสูงขึ้นจะส่งผลให้ค่า MIC ลดลง ทั้งนี้การยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ของพรอพโพลิสเกิดจาก flavonoids, aromatic acids, และ esters กลไกของปฏิกิริยาการยับยั้งเป็นผลมาจากการทำงานร่วมกันของฟีนอลิกและสารประกอบอื่นในเรซิน (Burdock, 1998)

Zheng และคณะ (1996) ได้รายงานไว้ว่า flavonoid ที่สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ได้ มีความสามารถในการกระจายตัวต่ำ การที่ไม่พบบริเวณการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ของสารสกัดพรอพโพลิสที่ได้จากการสกัดที่อัตราส่วนของน้ำต่อเอทานอลที่ 40:60 และ 30:70 อาจเนื่องมาจากสารสกัดพรอพโพลิสที่ได้จากการสกัดที่อัตราส่วนของน้ำต่อเอทานอลที่ 40:60 และ 30:70 จะมีลักษณะที่เหนียวและข้นกว่าจึงส่งผลให้ความสามารถในการแพร่ของสารสกัดจาก paper disc ลดลง บริเวณการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์จึงลดลง

การสกัดที่มีอัตราส่วนของน้ำต่อเอทานอลเป็น 70:30 ให้ TPC ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p > 0.05$) กับการสกัดที่น้ำต่อเอทานอล 60:40 และ 50:50 ซึ่งจากการทดลองอัตราส่วนการสกัดดังกล่าวมีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ และในขณะเดียวกันการสกัดที่มีอัตราส่วนของน้ำต่อเอทานอลเป็น 70:30 มีสารประกอบฟีนอลิกที่มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระและยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ได้ดี และสารสกัดที่ได้จากการสกัดด้วยอัตราส่วนนี้มีปริมาณของสารสกัดสูงที่สุด เพราะการใช้เอทานอลที่สูงขึ้นส่งผลให้ปริมาณสารที่ได้จากการสกัดลดลง นอกจากนี้หากมีการนำไปประยุกต์ใช้จริงในอุตสาหกรรม การสกัดที่ใช้เอทานอลในปริมาณมาก อาจส่งผลทั้งต่อต้นทุนการผลิตและการกำจัดเอทานอลที่ใช้แล้วออกจากสารสกัดส่งผลต่อ

ต้นทุนการผลิตด้วย ดังนั้นจากผลการทดลองจึงสามารถสรุปได้ว่าอัตราส่วนของน้ำต่อเอทานอลในตัวทำละลายที่เหมาะสม เพื่อใช้ในการสกัดพอลิฟอสฟอไรต์คือการใช้อัตราส่วนของน้ำต่อเอทานอลเป็น 70:30 และใช้อัตราส่วนดังกล่าวสำหรับการทดลองในขั้นต่อไป

4.2 การศึกษาความเข้มข้นของสารสกัดพอลิฟอสฟอไรต์ต่อสมบัติฟิล์มไคโตซาน

การศึกษาค่าความเข้มข้นของสารสกัดพอลิฟอสฟอไรต์ที่ใช้ในการทดลองคือ 0.5, 1.5, 2.5, 5 และ 10% (w/v) โดยใช้อัตราส่วนของน้ำต่อเอทานอล 70:30 ในการสกัด จากนั้นเติมลงในสารละลายฟิล์มไคโตซาน แล้วศึกษาผลของการเติมสารสกัดพอลิฟอสฟอไรต์ต่อคุณสมบัติด้านต่างๆของฟิล์มไคโตซาน ดังต่อไปนี้

4.2.1 สมบัติทางกายภาพ

4.2.1.1 การวัดค่าสี (L^* , a^* , b^* และ ΔE)

ผลการศึกษาค่าสีของฟิล์มไคโตซานที่เติมสารสกัดพอลิฟอสฟอไรต์ที่ความเข้มข้น 0, 0.5, 1.5, 2.5, 5 และ 10% (w/v) ต่อค่าสี L^* คือความเข้มถึงสว่างมีค่าระหว่าง 0-100, a^* คือสีเขียว (-) ถึงสีแดง (+), b^* คือสีน้ำเงิน (-) ถึงสีเหลือง (+) และ ΔE คือผลรวมค่าสีที่เปลี่ยนแปลงไปเมื่อเทียบกับแผ่นมาตรฐาน (สีขาว) ได้ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 4.5

ตารางที่ 4.5 ค่าสี L^* , a^* , b^* และ ΔE ของฟิล์มไคโตซานที่เติมสารสกัดพอลิฟอสฟอไรต์ที่ความเข้มข้นต่างกัน

ความเข้มข้นของพอลิฟอสฟอไรต์ (% w/v)	L^*	a^*	b^*	ΔE
0	87.01 ^a ±1.27	-2.30 ^d ±0.51	25.40 ^c ±4.38	24.86 ^d ±4.46
0.5	85.04 ^a ±1.48	-1.87 ^d ±0.48	26.13 ^c ±3.70	26.07 ^d ±3.89
1.5	81.46 ^b ±1.37	-0.53 ^{cd} ±1.13	29.21 ^c ±3.49	30.03 ^{cd} ±3.69
2.5	79.21 ^b ±2.55	0.83 ^c ±1.48	31.34 ^{bc} ±3.85	33.62 ^{bc} ±3.46
5	73.97 ^c ±2.18	3.92 ^b ±1.77	36.42 ^{ab} ±2.48	39.97 ^{ab} ±3.33
10	65.32 ^d ±1.64	8.30 ^a ±1.00	39.29 ^a ±1.35	44.09 ^a ±3.36

* a, b,... ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรกำกับแตกต่างกันในแนวตั้งมีค่าแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)

จากการทดลองพบว่าฟิล์มไคโตซานที่ไม่เติมสารสกัดพริกพลีตจะมีความสว่างสูงที่สุด โดยฟิล์มจะให้ค่าสีเขียวสูง และมีค่าสีเหลืองต่ำ รวมทั้งยังมีค่า ΔE ต่ำที่สุด เมื่อเทียบกับฟิล์มไคโตซานที่เติมสารสกัดพริกพลีต การเติมสารสกัดพริกพลีตลงในฟิล์มที่ความเข้มข้นสูงส่งผลให้ฟิล์มมีสีเข้มขึ้นหรือมีความสว่างลดลง โดยฟิล์มจะให้ค่าสีแดงและสีเหลืองสูงขึ้น การเติมสารสกัดพริกพลีตที่ 10% (w/v) ลงในฟิล์มไคโตซานส่งผลให้มีค่า ΔE สูงที่สุด ผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับการศึกษาของ Ojagh และคณะ (2010) ที่ศึกษาการเติม cinnamon essential oil ลงในฟิล์มไคโตซาน และพบว่าการเติม cinnamon essential oil ที่ความเข้มข้นที่สูงส่งผลให้ค่า ΔE สูงขึ้นด้วย ดังนั้นอาจกล่าวได้ว่าสีของสารสกัดที่เติมลงในฟิล์มไคโตซานมีผลโดยตรงต่อค่าสีฟิล์ม และเมื่อนำฟิล์มไปประยุกต์ใช้อาจต้องคำนึงถึงค่าสีของฟิล์ม เนื่องจากสีของฟิล์มอาจส่งผลต่อการยอมรับผลิตภัณฑ์บางชนิดของผู้บริโภค (Sivarooban, Hettiarachchy and Johnson, 2008)

4.2.1.2 การวัดค่าความโปร่งใส (%Transparency, %T)

การวัดค่า %T ของฟิล์มวัดที่ความยาวคลื่น 600 nm ได้ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 4.6

ตารางที่ 4.6 ค่า %T ของฟิล์มไคโตซานที่เติมสารสกัดพริกพลีตที่ความเข้มข้นต่างกัน

ความเข้มข้นของพริกพลีต (% w/v)	%T*
0	87.09 ^a ±1.96
0.5	82.33 ^b ±1.65
1.5	79.51 ^{bc} ±1.35
2.5	77.30 ^c ±3.53
5	72.46 ^d ±1.25
10	64.43 ^e ±1.28

* a, b,... ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรกำกับแตกต่างกันในแนวตั้งมีค่าแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)

จากผลการทดลองพบว่าฟิล์มไคโตซานที่ไม่เติมสารสกัดพริกพลีตมีค่าความโปร่งใสสูงที่สุดคือ 87.09±1.96% และฟิล์มไคโตซานที่เติมสารสกัดพริกพลีตที่ความเข้มข้น 10% (w/v) มีความโปร่งใสต่ำที่สุดคือ 64.43±1.28% ทั้งนี้ %T เท่ากับ 100 หมายความว่าแสงสามารถผ่านฟิล์มได้ 100% จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าเมื่อมีการเติมสารสกัด

พรอพโพลิสที่มีความเข้มข้นสูงขึ้น ความโปร่งใสจะลดลง เนื่องจากสารสกัดพรอพโพลิสจะมีสีเข้มขึ้น เมื่อความเข้มข้นสูงขึ้น ดังนั้นจึงส่งผลโดยตรงต่อค่าความโปร่งใสที่ลดลง นอกจากนี้ %T ยังอาจขึ้นอยู่กับกระบวนการขึ้นรูปฟิล์ม, ลักษณะของสารสกัดที่เติมลงในฟิล์ม ได้แก่ ระดับความเข้มข้นของสารสกัด, การกระจายตัว และขนาดโมเลกุลอีกด้วย (Villalobos *et al.*, 2005)

4.2.1.3 การวัดค่า Water vapor permeability (WVP)

จากการวัดค่า WVP ของฟิล์มไคโตซานที่เติมสารสกัดพรอพโพลิสที่มีความเข้มข้นแตกต่างกัน โดยวัดที่ RH 100% อุณหภูมิ 30°C ได้ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 4.7

ตารางที่ 4.7 ค่า WVP ของฟิล์มไคโตซานที่เติมสารสกัดพรอพโพลิสที่มีความเข้มข้นต่างกัน

ความเข้มข้นของพรอพโพลิส (% w/v)	WVP (g mm/Pa day m ²)
0	0.67 ^a ±0.08
0.5	0.52 ^b ±0.04
1.5	0.53 ^b ±0.03
2.5	0.52 ^b ±0.03
5	0.56 ^b ±0.02
10	0.55 ^b ±0.06

* a, b,... ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรกำกับแตกต่างกันในแนวตั้งมีค่าแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)

จากผลการทดลองการวัดค่า WVP พบว่าฟิล์มไคโตซานที่เติมสารสกัดพรอพโพลิสที่มีความเข้มข้นต่างกันให้ผลการทดลองไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) แต่แตกต่างกับฟิล์มไคโตซานที่ไม่มีการเติมสารสกัดพรอพโพลิส อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าการเติมสารสกัดพรอพโพลิสลงในฟิล์มไคโตซานทำให้ค่า WVP ลดลง เนื่องจากฟิล์มไคโตซานเป็นฟิล์มที่มีลักษณะชอบน้ำ (hydrophilic) จึงมีความสามารถในการต้านทานความชื้นต่ำ (Caner, Vergano and Wiles, 1998) และเมื่อเติมสารสกัดพรอพโพลิสซึ่งอยู่ในกลุ่มของ hydrophobic ลงในฟิล์มไคโตซาน จึงส่งผลให้ฟิล์มไคโตซานที่เติมสารสกัดพรอพโพลิสมีค่า WVP ลดลง อาจเนื่องจากการเกิดพันธะระหว่างโครงสร้างของฟิล์มไคโตซานกับสารสกัดพรอพโพลิส มีผลทำให้ปริมาณของ hydroxyl และ amino groups ลดลง การเกิด interaction ระหว่างฟิล์มไคโตซาน-น้ำ จึงเกิดได้อย่างจำกัด ส่งผลให้ค่า WVP ของฟิล์มลดลง (Siripatrawan and Harte, 2010) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ ของ Zivanovic, Chi และ Draughon (2005) ศึกษาค่า WVP ของฟิล์มไคโตซานที่เติม oregano oil ที่ 1 และ 2% (v/v)

พบว่า การเติม oregano oil ลงในฟิล์มไคโตซานทำให้ค่า WVP ลดลง เนื่องจากการเพิ่มสารในกลุ่มของ hydrophobic ลงในฟิล์มไคโตซาน จึงมีผลทำให้การดูดซึมของน้ำลดลง และจากงานวิจัยของ Ojagh และคณะ (2010) ศึกษาค่า WVP ของฟิล์มไคโตซานที่เติม cinnamon essential oil ที่ความเข้มข้น 0.4, 0.8, 1.5 และ 2 % (v/v) พบว่าการเติม cinnamon essential oil ลงในฟิล์มไคโตซานมีผลทำให้ค่า WVP ลดลง เนื่องจากการเติม cinnamon essential oil ลงในฟิล์มจะส่งผลในการเพิ่มสมบัติ hydrophobic ให้แก่พื้นผิวของฟิล์ม ทำให้ได้ฟิล์มที่มีลักษณะกั้นน้ำได้ดีขึ้น ดังนั้นจากผลการทดลองอาจกล่าวได้ว่าการเติมสารสกัดพริกไทยลงในฟิล์มไคโตซาน มีผลทำให้ฟิล์มไคโตซานมีค่า WVP ลดลง หรือฟิล์มสามารถกั้นน้ำได้ดีขึ้น

4.2.1.4 การวัดค่าอัตราการซึมผ่านของก๊าซออกซิเจน (Oxygen gas transmission rate, OTR)

การวัดค่า OTR ในการทดลองวัดจากการที่ก๊าซออกซิเจนซึมผ่านฟิล์มที่มีภาวะในการทดลองที่อุณหภูมิ 23°C และมี RH 0% และได้ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 4.8

ตารางที่ 4.8 ค่า OTR ของฟิล์มไคโตซานที่เติมสารสกัดพริกไทยที่ความเข้มข้นต่างกัน

ความเข้มข้นของพริกไทย (% w/v)	OTR (cm ³ /m ² /day)
0	6.13 ^a ±0.16
0.5	2.28 ^e ±0.20
1.5	5.35 ^b ±0.27
2.5	4.70 ^c ±0.19
5	3.46 ^d ±0.00
10	2.44 ^e ±0.30

* a, b,... ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรกำกับแตกต่างกันในแนวตั้งมีค่าแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)

จากผลการทดลองการวัดค่า OTR พบว่าการเติมสารสกัดพริกไทยลงในฟิล์มไคโตซานส่งผลให้มีค่า OTR ลดลง ฟิล์มไคโตซานที่เติมสารสกัดพริกไทยที่ความเข้มข้น 0.5% และ 10% w/v ให้การทดลองไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) ผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับผลของค่า WVP ของฟิล์มไคโตซานที่เติมสารสกัดพริกไทย การเกิด interaction ระหว่างฟิล์มไคโตซานและสารสกัดพริกไทยมีผลให้ค่า OTR ลดลง ทั้งนี้เนื่องจาก การเรียงตัวของโมเลกุลของไคโตซานและสารสกัดพริกไทยทำให้มีลักษณะโครงสร้างภายในของฟิล์มที่เปลี่ยนไป ส่งผลให้เกิดการกีดขวางการเคลื่อนที่ของโมเลกุลของการ

ก๊าซออกซิเจน (Arvanitoyannis *et al.*, 1997) การเปลี่ยนแปลงของค่า OTR ขึ้นอยู่กับลักษณะของโครงสร้าง หรือ microstructure ของฟิล์ม ได้แก่ ความหนาแน่นที่เพิ่มขึ้น, ช่องว่าง (void) ภายในโครงสร้างฟิล์ม และรูปแบบของการเรียงตัวของโพลีเมอร์ (Mannapperuma and Singh, 1990) อย่างไรก็ตามจากการศึกษาของ Altiok, Altiok และ Tihminlioglu (2010) ซึ่งวัดค่า OTR ของฟิล์มไคโตซานที่เติม thyme oil พบว่าการเติม thyme oil ลงในฟิล์มไคโตซานมีผลทำให้ค่า OTR สูงขึ้น เนื่องจากเกิดช่องว่างภายในโครงสร้างของฟิล์ม

4.2.1.5 การวัดสมบัติเชิงกล

การวัดสมบัติเชิงกลของฟิล์มไคโตซานที่เติมสารสกัดพริกไทยที่มีความเข้มข้นต่างกัน โดยการวัดค่า tensile strength (TS) หรือความต้านแรงดึงขาด และ elongation at break (%E) หรือการยืดตัวก่อนขาด ให้ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 4.9

ตารางที่ 4.9 ค่า TS และ %E ของฟิล์มไคโตซานที่เติมสารสกัดพริกไทยที่มีความเข้มข้นต่างกัน

ความเข้มข้นของพริกไทย (% w/v)	TS (MPa)	%E
0	6.23 ^e ±0.71	5.41 ^e ±0.58
0.5	8.07 ^d ±0.17	8.65 ^c ±0.70
1.5	17.38 ^{bc} ±0.89	13.22 ^a ±0.81
2.5	16.37 ^c ±0.39	11.58 ^b ±0.96
5	18.33 ^b ±0.81	12.36 ^{ab} ±1.05
10	21.47 ^a ±1.00	6.93 ^d ±0.41

* a, b,... ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรกำกับแตกต่างกันในแนวตั้งมีค่าแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)

จากผลการวัดค่า TS ของฟิล์มไคโตซานที่เติมสารสกัดพริกไทยที่มีความเข้มข้นต่างกัน พบว่าฟิล์มไคโตซานที่เติมสารสกัดพริกไทยที่มีความเข้มข้น 10% (w/v) มีค่า TS สูงที่สุดคือ 21.47±1.00 MPa และฟิล์มไคโตซานที่ไม่เติมสารสกัดพริกไทยมีค่า TS ต่ำที่สุดคือ 6.23±0.71 MPa จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าค่า TS แปรผันตรงกับความเข้มข้นของพริกไทยที่เติมลงในฟิล์มไคโตซานคือ เมื่อความเข้มข้นของสารสกัดพริกไทยสูงขึ้น ส่งผลให้ค่า TS สูงขึ้นด้วย และจากผลการวัดค่า %E พบว่าการเติมสารสกัดพริกไทยลงในฟิล์มไคโตซานส่งผลให้ค่า %E สูงขึ้น และฟิล์มไคโตซานที่เติมสารสกัดพริกไทยที่มีความเข้มข้น 1.5% (w/v) ให้ค่า %E สูงที่สุดคือ 13.22±0.81% การที่ค่า TS ของฟิล์มไคโตซานที่เติมสารสกัด

พรอพโพลิสสูงขึ้น อาจเนื่องจากการเกิด interaction ภายในโมเลกุลระหว่างไคโตซานและ สารประกอบพีนอลิกในพรอพโพลิส โดยโครงสร้างของโพลีเมอร์เกิดการเชื่อมต่อกันของสารโซ่เป็น แบบร่างแห โดยกระบวนการเชื่อมโยงข้าม (crosslink) หรืออาจกล่าวได้ว่าการเติมสารสกัด พรอพโพลิสลงในฟิล์มไคโตซาน มีผลทำให้ฟิล์มไคโตซานมีสมบัติเชิงกลที่ดีขึ้น โดยฟิล์มจะมี ลักษณะที่มีความต้านแรงดึงที่สูงขึ้น และมีความยืดหยุ่นมากขึ้น ทำให้ง่ายต่อการนำไปประยุกต์ใช้ ในการห่อผลิตภัณฑ์อาหาร อย่างไรก็ตามการเติมสารสกัดพรอพโพลิสที่ความเข้มข้น 10% (w/v) ส่งผลให้ค่า %E ลดลง อาจเนื่องจากการเกิดพันธะภายในโครงสร้างฟิล์มในปริมาณที่สูงขึ้น ส่งผล ให้ฟิล์มมีลักษณะที่แข็งแรงขึ้นแต่เปราะ จากการศึกษาค้นคว้าของ Pranoto, Rakshit และ Salokhe (2005) ศึกษาค่า TS และ %E ของฟิล์มไคโตซานที่เติมน้ำมันกระเทียมที่ความเข้มข้นต่างกัน พบว่าการเติมน้ำมันกระเทียมที่ความเข้มข้นสูงทำให้ค่า TS และ %E ลดลง เมื่อเปรียบเทียบกับฟิล์มไคโตซานที่ไม่เติมน้ำมันกระเทียม การศึกษาของ Zivanovic, Chi และ Draughon (2005) ศึกษาค่า TS และ %E ของฟิล์มไคโตซานที่เติม oregano oil พบว่าการเติม oregano oil ลงในฟิล์มไคโตซานที่ความเข้มข้นสูงส่งผลให้ค่า TS ลดลง และค่า %E สูงขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับฟิล์มไคโตซานที่ไม่เติม oregano oil ทั้งนี้ผู้วิจัยได้อธิบายไว้ว่า ค่า TS และ %E อาจขึ้นอยู่กับส่วนประกอบของโครงสร้างของฟิล์ม อาทิเช่น ประเภทของกรดที่ใช้ หรือสารสกัดที่เติมลงในฟิล์ม เป็นต้น ซึ่งสิ่งเหล่านี้มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของค่า TS และ %E ของฟิล์ม

4.2.2 สมบัติทางเคมี

4.2.2.1 การศึกษา TPC ในฟิล์มไคโตซานที่เติมสารสกัดพรอพโพลิสที่ความเข้มข้นต่างกัน

จากการศึกษา TPC ในฟิล์มไคโตซานที่เติมสารสกัดพรอพโพลิสที่ความเข้มข้นต่างกัน ได้ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 4.10

ตารางที่ 4.10 ค่า TPC ในฟิล์มไคโตซานที่เติมสารสกัดพรอพโพลิสที่มีความเข้มข้นต่างกัน

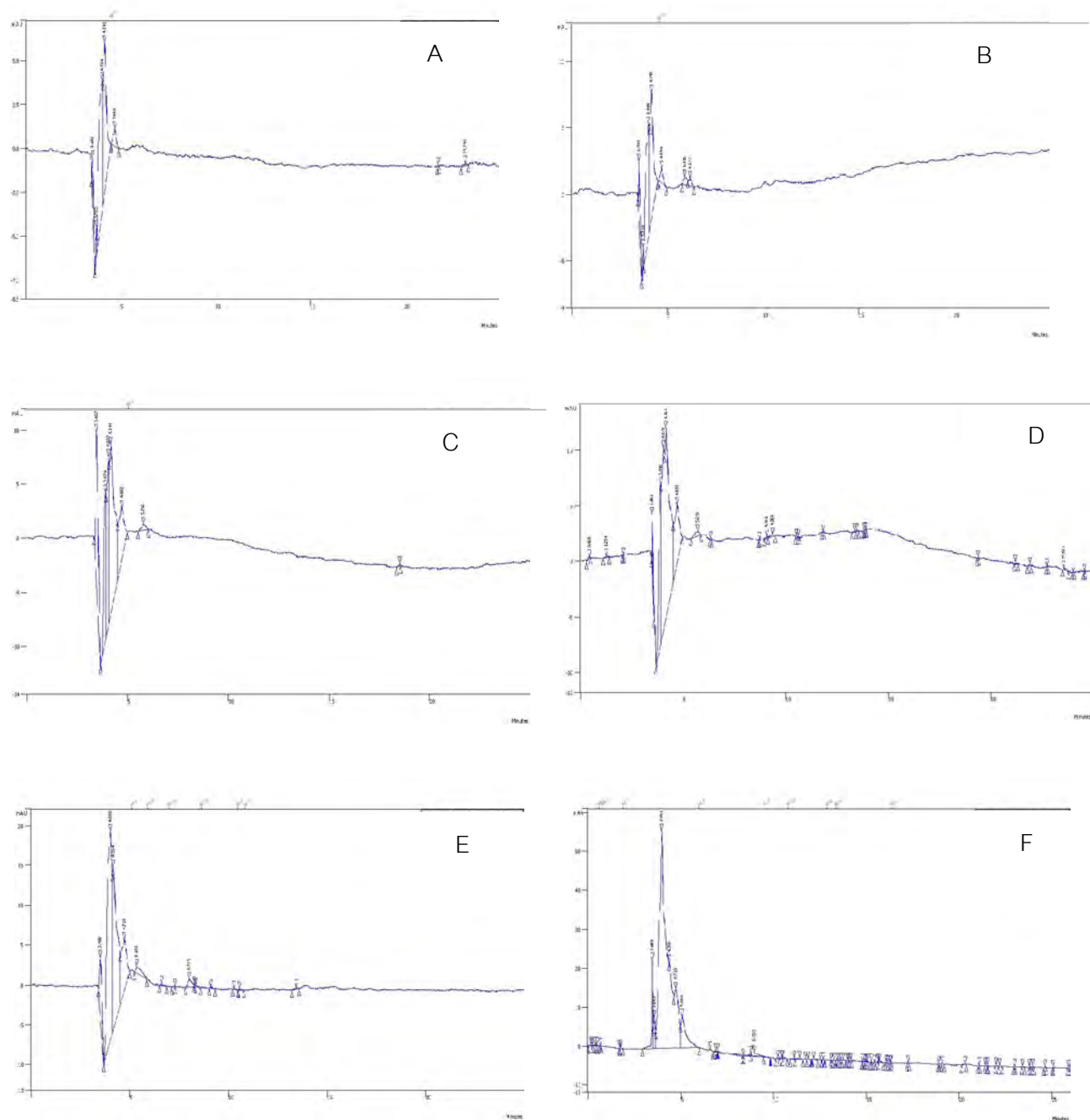
ความเข้มข้นของพรอพโพลิส (% w/v)	TPC* (mg gallic acid equivalent/g)
0	4.05 ^b ±0.06
0.5	4.13 ^b ±0.25
1.5	4.24 ^b ±0.25
2.5	4.36 ^b ±0.45
5	4.90 ^a ±0.17
10	5.52 ^a ±0.06

* a, b,... ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรกำกับแตกต่างกันในแนวตั้งเดียวกันมีค่าแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)

จากผลการทดลองพบว่าฟิล์มไคโตซานที่เติมสารสกัดพรอพโพลิสที่มีความเข้มข้น 10% มีค่า TPC สูงที่สุดคือ 5.52±0.06 mg gallic acid equivalent /g ค่า TPC สูงขึ้น เมื่อเติมสารสกัดพรอพโพลิสที่มีความเข้มข้นสูงขึ้นไปในฟิล์มไคโตซาน แต่ในฟิล์มไคโตซานที่เติมสารสกัดพรอพโพลิสที่มีความเข้มข้น 0, 0.5, 1.5 และ 2.5% (w/v) ให้ผลที่ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) ทั้งนี้เนื่องจากสารประกอบฟีนอลิกที่มีอยู่ในพรอพโพลิสจะอยู่ในโครงสร้างของเรซินซึ่งละลายได้ดีในตัวทำละลายที่มีขั้ว เช่น เอทานอล (Catchpole *et al.*, 2004) ในขณะที่ในการศึกษานี้มุ่งเน้นในการพัฒนาฟิล์มเพื่อนำไปประยุกต์ใช้ในการห่อผลิตภัณฑ์อาหารที่อาจมีความชื้นสูง จึงนำฟิล์มที่ได้จากการทดลองละลายด้วยน้ำเพื่อทดสอบสมบัติการต้านอนุมูลอิสระของฟิล์มไคโตซานที่เติมสารสกัดพรอพโพลิส ดังนั้นอาจกล่าวได้ว่าสารประกอบฟีนอลิกที่มีอยู่ในสารสกัดพรอพโพลิสมีความสามารถในการละลายน้ำได้ดี หรือสารประกอบฟีนอลิกอาจเกิดพันธะกับโครงสร้างของไคโตซานทำให้ไม่สามารถละลายออกได้ด้วยน้ำ มีผลทำให้ได้ค่า TPC ลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับค่า TPC ของสารสกัดพรอพโพลิสก่อนเติมลงในสารละลายฟิล์มไคโตซาน และผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับงานวิจัยของ Mayachiew และ Devahastin (2010) ที่ ศึกษาค่า TPC ของฟิล์มไคโตซานที่เติมสารสกัดจากมะขามป้อมอินเดีย พบว่าการเติมสารสกัดจากมะขามป้อมที่ความเข้มข้นที่สูงขึ้นไปในฟิล์มไคโตซาน มีผลทำให้ค่า TPC ของฟิล์มไคโตซานสูงขึ้น แต่ให้ผลที่ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) ทั้งนี้ผู้วิจัยได้อธิบายไว้ว่าอาจเกิดจากการที่สารประกอบฟีนอลิกเกิด interaction กับโมเลกุลของไคโตซานทำให้เกิดโครงสร้างที่ซับซ้อน และสารประกอบฟีนอลิกไม่สามารถถูกปลดปล่อยออกจากโครงสร้างของฟิล์มได้ จึงมีผลทำให้ค่า TPC ไม่แตกต่างกัน เมื่อเติมสารสกัดจากมะขามป้อมที่ความเข้มข้นที่สูงขึ้นไปในฟิล์มไคโตซาน

4.2.2.2 การศึกษาสารประกอบฟีนอลิกในฟิล์มไคโตซานที่เติมสารสกัดพรอพโพลิสที่ความเข้มข้นต่างกัน

จากการวิเคราะห์เพื่อหาสารประกอบฟีนอลิก 8 ชนิด คือ rutin, quercetin, naringenin, kaempferol, baicalin, chrysin, acacetin และ galangin ในฟิล์มไคโตซานที่เติมสารสกัดพรอพโพลิสที่ความเข้มข้นต่างกัน ได้ผลการทดลองแสดงในภาพที่ 4.3 และปริมาณสารประกอบฟีนอลิกที่พบแสดงในตารางที่ 4.11



ภาพที่ 4.3 HPLC Chromatogram แสดงสารประกอบฟีนอลิกที่พบในฟิล์มโคโตนที่เติมสารสกัดพรอพโพลิสที่ความเข้มข้นต่างกันคือ 0 (A), 0.5 (B), 1.5 (C), 2.5 (D), 5 (E) และ 10 (F) % (w/v)

ตารางที่ 4.11 สารประกอบฟีนอลิกที่พบในสารละลายฟิล์มโคโตซานที่เติมสารสกัดพรอพโพลิส ที่ความเข้มข้นต่างกัน (%w/v)

	ปริมาณสารประกอบฟีนอลิก (µg/ml)					
	0	0.5	1.5	2.5	5	10
rutin	0.11	0.12	0.99	0.99	1.26	2.67
quercetin	-	-	-	-	-	-
naringenin	-	-	-	-	-	-
kaempferol	-	-	-	-	-	-
baicalin	-	-	-	-	-	-
chrysin	-	-	-	-	-	-
acacetin	-	-	-	-	-	-
galangin	-	-	-	-	-	-

- not detected

จากผลการทดลองสารละลายฟิล์มโคโตซานที่เติมสารสกัดพรอพโพลิสที่ความเข้มข้นต่างกัน พบ rutin เพียงชนิดเดียวเท่านั้น เมื่อเปรียบเทียบกับสารประกอบฟีนอลิกของสารสกัดพรอพโพลิสก่อนเติมลงในสารละลายฟิล์มโคโตซาน พบว่าไม่พบ quercetin ในสารละลายฟิล์ม ทั้งนี้อาจเนื่องจาก quercetin ละลายได้ดีในตัวทำละลายที่มีสภาพขั้วต่ำ (Pinelo *et al.*, 2004) แต่ในการทดลองนี้ใช้น้ำเป็นตัวทำละลายฟิล์มก่อนนำมาวิเคราะห์ นอกจากนี้ยังพบว่าเมื่อเติมสารสกัดพรอพโพลิสมีความเข้มข้นสูงขึ้นในฟิล์มโคโตซานก็พบว่ามีปริมาณ rutin สูงขึ้นด้วย ดังนั้นจากการทดลองแสดงให้เห็นว่า rutin สามารถละลายน้ำ หรือสามารถถูกปลดปล่อยออกมาจากโครงสร้างของฟิล์มโคโตซานได้ดีกว่า quercetin และจากการศึกษาของ Zi, Peng และ Yan (2007) สามารถยืนยันได้ว่า rutin สามารถละลายน้ำได้ และจะละลายได้ดีขึ้นเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้น

4.2.2.3 การศึกษาปฏิกิริยาการจับอนุมูล DPPH ในฟิล์มโคโตซานที่เติมสารสกัดพรอพโพลิสที่ความเข้มข้นต่างกัน

จากการศึกษาปฏิกิริยาการจับอนุมูล DPPH ของฟิล์มโคโตซานที่เติมสารสกัดพรอพโพลิสที่ความเข้มข้นต่างกัน ได้ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 4.12

ตารางที่ 4.12 ปฏิบัติการการจับอนุมูล DPPH (%) ในสารละลายฟิล์มโคโตะซานที่เติมสารสกัดพรอพโพลิสที่ความเข้มข้นต่างกัน

ความเข้มข้นของพรอพโพลิส (% w/v)	DPPH free radical scavenging activity (%) [*]
0	11.63 ^d ±2.15
0.5	25.56 ^c ±1.14
1.5	31.97 ^b ±2.83
2.5	32.34 ^b ±1.51
5	53.86 ^a ±1.88
10	54.85 ^a ±1.34

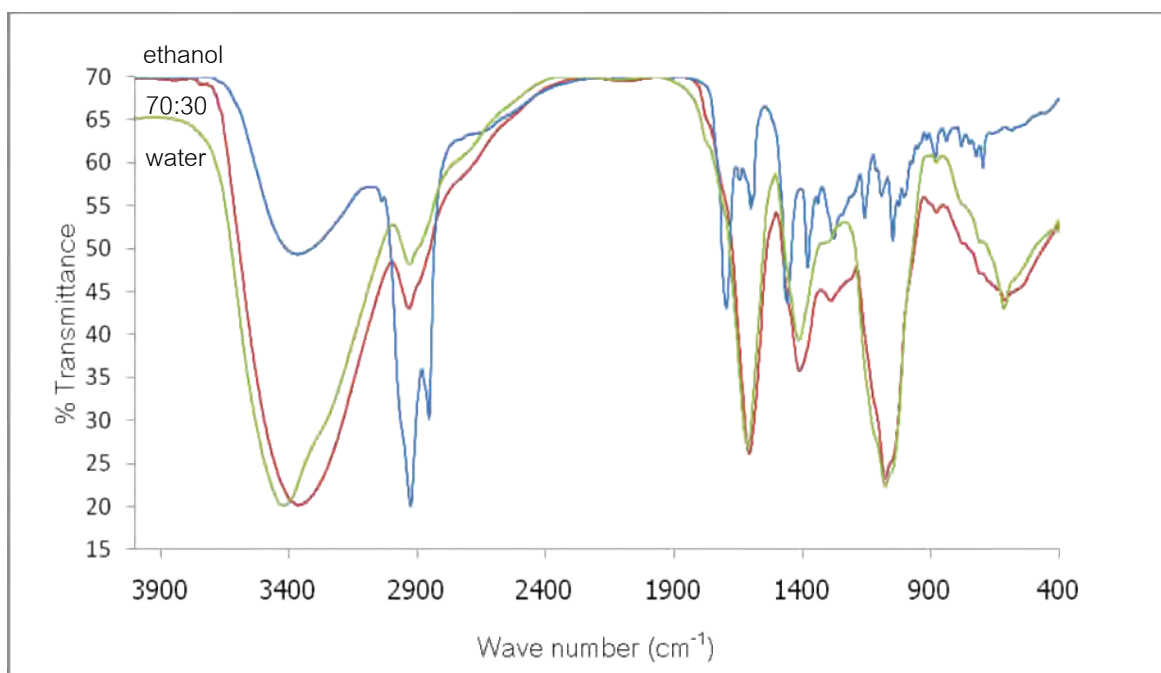
^{*} a, b,... ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรกำกับแตกต่างกันในแนวตั้งมีค่าแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)

จากผลการทดลองพบว่าฟิล์มโคโตะซานที่เติมสารสกัดพรอพโพลิสที่ความเข้มข้น 10% (w/v) มีปฏิบัติการการจับอนุมูล DPPH สูงที่สุด คือ 54.85±1.34% และฟิล์มโคโตะซานที่ไม่ได้เติมสารสกัดพรอพโพลิสมีปฏิบัติการการจับอนุมูล DPPH ต่ำที่สุดคือ 11.63±2.15% จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าเมื่อเติมสารสกัดพรอพโพลิสสูงที่ความเข้มข้นสูงขึ้นไปในฟิล์มโคโตะซานส่งผลให้ฟิล์มโคโตะซานมีปฏิบัติการในการจับอนุมูล DPPH สูงขึ้นด้วย ซึ่งเป็นผลการทดลองที่สอดคล้องกับค่า TPC และปริมาณ rutin ที่พบในฟิล์ม และจากการศึกษาของ Yang, Guo และ Yuan (2008) ซึ่งศึกษาปฏิบัติการการจับอนุมูล DPPH ของ rutin เปรียบเทียบกับ ascorbic acid และ butylated hydroxytolulene (BHT) ที่ความเข้มข้น 0.05 mg/ml พบว่า rutin, ascorbic acid และ BHT มีปฏิบัติการการจับอนุมูล DPPH เป็น 90.4, 92.8 และ 58.8% ตามลำดับ ดังนั้นอาจกล่าวได้ว่าการเติมสารสกัดพรอพโพลิสที่ความเข้มข้นสูงขึ้นไปในฟิล์มโคโตะซาน ทำให้ค่า TPC และปริมาณ rutin สูงขึ้น มีผลทำให้มีปฏิบัติการการจับอนุมูล DPPH ที่สูงขึ้น ซึ่งส่งผลให้ฟิล์มโคโตะซานมีสมบัติต้านอนุมูลอิสระที่ดีขึ้นด้วย

4.2.3 การศึกษา interaction ของหมู่ฟังก์ชันของฟิล์มโคโตะซานที่เติมสารสกัดพรอพโพลิส

การศึกษาในขั้นตอนนี้แบ่งเป็นการวิเคราะห์หมู่ฟังก์ชันของสารสกัดพรอพโพลิสที่สกัดโดยใช้ตัวทำละลายแตกต่างกัน และวิเคราะห์ interaction ระหว่างโคโตะซานและสารสกัดพรอพโพลิสของฟิล์มโคโตะซานที่มีการเติมสารสกัดพรอพโพลิสที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน

การศึกษามูฟฟังก์ชันของสารสกัดพรอพโพลิส โดยใช้ Fourier Transform Infrared Spectrometer (FT-IR) มีหลักการ คือ โมเลกุลของสารเมื่อได้รับพลังงานจากแสงก็จะดูดกลืนพลังงานที่เหมาะสมไว้ โมเลกุลที่ดูดกลืนแสงอินฟราเรดจะถูกกระตุ้น (excite) ให้มีพลังงานสูงกว่าที่สภาวะ ground state ซึ่งเป็นพลังงานที่ทำให้โมเลกุลเกิดการสั่น (vibration) และเกิดการหมุน (rotation) ขึ้น ในการสั่นนั้นพันธะของโมเลกุลจะเกิดการยืด (stretching) หรือเกิดการงอ (bending) (ปธานอม ขาวเมฆ, 2549) จากผลการวิเคราะห์ FT-IR spectra ดังแสดงในภาพที่ 4.4



ภาพที่ 4.4 FT-IR spectra ของสารสกัดพรอพโพลิสที่สกัดด้วยตัวทำละลาย 3 ชนิดที่ต่างกัน คือ เอทานอล, น้ำต่อเอทานอล (70:30) และ น้ำ

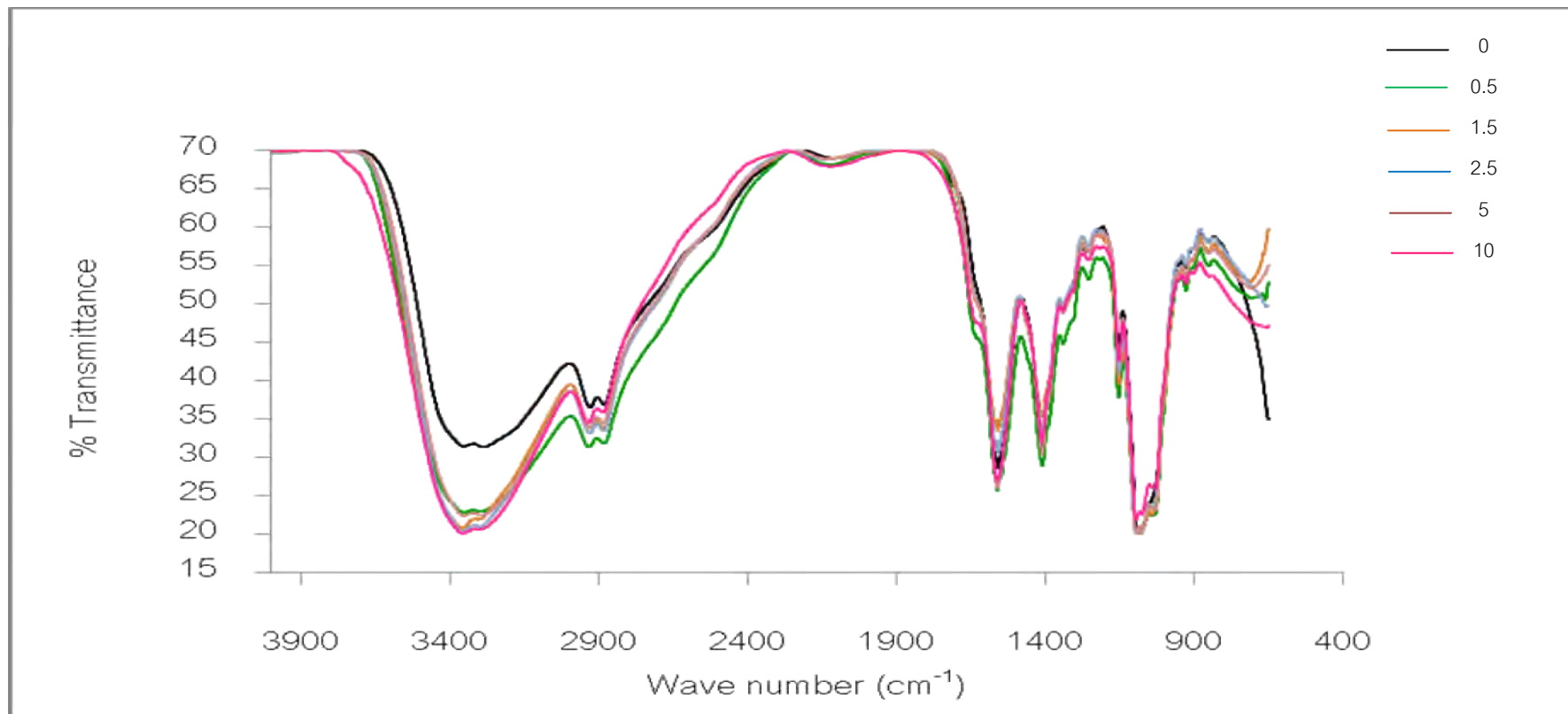
จากผลการทดลองพบว่าการสั่นของโมเลกุลของสารสกัดพรอพโพลิสเกิดการ stretching ของหมู่ฟังก์ชัน C=O, -C=C-C=O, -C=C- [(in-ring) aromatic], -C-C- [(in-ring) aromatic], C-O (esters, ethers) และ C-O (polyols) ที่การดูดกลืนคลื่นอินฟราเรดในช่วง 1800-1000 cm^{-1} ซึ่งพันธะเหล่านี้คือสารประกอบฟีนอลิกที่อยู่ในสารสกัดพรอพโพลิส (Roy *et al.*, 2010) C-H stretching ซึ่งดูดกลืนคลื่นอินฟราเรดที่ 3000-2840 cm^{-1} , C-H aromatic ring ซึ่งดูดกลืนคลื่นอินฟราเรดที่ 1650-1450 cm^{-1} และ 870-675 cm^{-1} จะเห็นพีคได้ชัดเจนจากการสกัดพรอพโพลิสด้วยเอทานอล และยังพบว่า มี -C=C- aromatic ring ซึ่งดูดกลืนคลื่นอินฟราเรดที่ 1650 cm^{-1} เฉพาะการสกัดพรอพโพลิสด้วยเอทานอลเท่านั้น พบ OH-stretching ซึ่งดูดกลืนคลื่น

อินฟราเรดที่ $3400-3200\text{ cm}^{-1}$ เมื่อความเข้มข้นของ OH ลดลงพีคจะปรากฏเด่นชัดขึ้น (ปรานอม ชาวเมฆ, 2549)

ในการศึกษานี้จะเห็นความแตกต่างของสารสกัดพรอพโพลิส เมื่อใช้ทำตัวละลายที่แตกต่างกันอย่างชัดเจน โดยการสกัดพรอพโพลิสด้วยเอทานอลนั้นจะมีปริมาณพีคของหมู่ฟังก์ชันของ C-H aromatic ring และ -C=C- aromatic ring ที่มากกว่า สอดคล้องกับงานวิจัยของ Wu และคณะ (2008) ซึ่งศึกษาการแยกสารสกัดพรอพโพลิสของประเทศจีน และ poplar buds โดยการสกัดพรอพโพลิสด้วยเอทานอล จะพบหมู่ฟังก์ชันของสารประกอบฟีนอลิก ซึ่งใกล้เคียงกับที่ได้ในการศึกษานี้ การสกัดพรอพโพลิสด้วยเอทานอลจะสามารถทำละลายสารประกอบฟีนอลิกที่มี aromatic ring ได้ดีกว่าการสกัดพรอพโพลิสด้วยน้ำ ซึ่งจากผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับผลการศึกษาค่า TPC ในสารสกัดพรอพโพลิสที่สกัดด้วยตัวทำละลายที่มีอัตราส่วนของน้ำต่อเอทานอลที่ต่างกัน (การทดลองที่ 4.1.1) โดยพบว่าเมื่อเพิ่มอัตราส่วนของเอทานอลสูงขึ้นจะส่งผลให้มีค่า TPC สูงขึ้นด้วยเช่นกัน

การศึกษา interaction ของหมู่ฟังก์ชันของฟิล์มไคโตซานที่เติมสารสกัดพรอพโพลิสที่ความเข้มข้น 0.5, 1.5, 2.5, 5 และ 10% (w/v) ได้ผลการทดลองดังแสดงในภาพที่ 4.5 จากผลการทดลองพบว่าฟิล์มทุกตัวอย่างให้ FT-IR spectrum ที่คล้ายคลึงกันโดยพบหมู่ hydroxyl group (-OH) (Kim *et al.*, 2006) N-H stretching ดูดกลืนคลื่นอินฟราเรดที่ $3500-3300\text{ cm}^{-1}$ (Nunthanids *et al.*, 2001), C-H stretching ซึ่งดูดกลืนคลื่นอินฟราเรดที่ $3000-2850\text{ cm}^{-1}$ ester และ ether (C-O) ซึ่งดูดกลืนคลื่นอินฟราเรดที่ $1280-1000\text{ cm}^{-1}$, แอลกอฮอล์หรือฟีนอลซึ่งดูดกลืนคลื่นอินฟราเรดที่ $1140-1025\text{ cm}^{-1}$ และ C-H aromatic ring ซึ่งดูดกลืนคลื่นอินฟราเรดที่ $870-675\text{ cm}^{-1}$ ในฟิล์มไคโตซานที่เติมสารสกัดพรอพโพลิส นอกจากนี้ยังพบว่ามีการเกิด interaction ระหว่าง amine group ของไคโตซาน และ hydroxyl group ของพรอพโพลิสโดยสังเกตได้จากพีคการดูดกลืนคลื่นอินฟราเรดที่ $3400-3200\text{ cm}^{-1}$ ผลการทดลองที่ได้สนับสนุนผลการศึกษามบัติเชิงกลของฟิล์มไคโตซานที่เติมสารสกัดพรอพโพลิส (การทดลองที่ 4.2.1.4) โดยพบว่าเมื่อเติมสารสกัดพรอพโพลิสที่ความเข้มข้นสูงขึ้นไปในฟิล์มไคโตซาน มีผลทำให้ค่า TS และ ค่า %E ของฟิล์มไคโตซานสูงขึ้น ทั้งนี้เนื่องจากสารประกอบฟีนอลิกที่มีอยู่ในสารสกัดพรอพโพลิสสามารถเกิดพันธะไฮโดรเจนกับหมู่ฟังก์ชันที่อยู่ในโครงสร้างของไคโตซานโพลิเมอร์ได้ (Balasundram, Sundram and Samman, 2006) ผลการทดลองสอดคล้องกับงานวิจัยของ Siripatrawan และ Harte (2010) ซึ่งศึกษา interaction ระหว่างสารประกอบฟีนอลิกกับไคโตซาน โดยใช้ FT-IR และพบว่าสารประกอบฟีนอลิกสามารถเกิดพันธะไฮโดรเจนกับ NH_3^+ ในโครงสร้างของฟิล์มไคโตซาน และส่งผลให้ค่า TS ของฟิล์มสูงขึ้น ดังนั้นการเติมสารสกัดพรอพโพลิสที่ความเข้มข้นที่สูงขึ้นไป

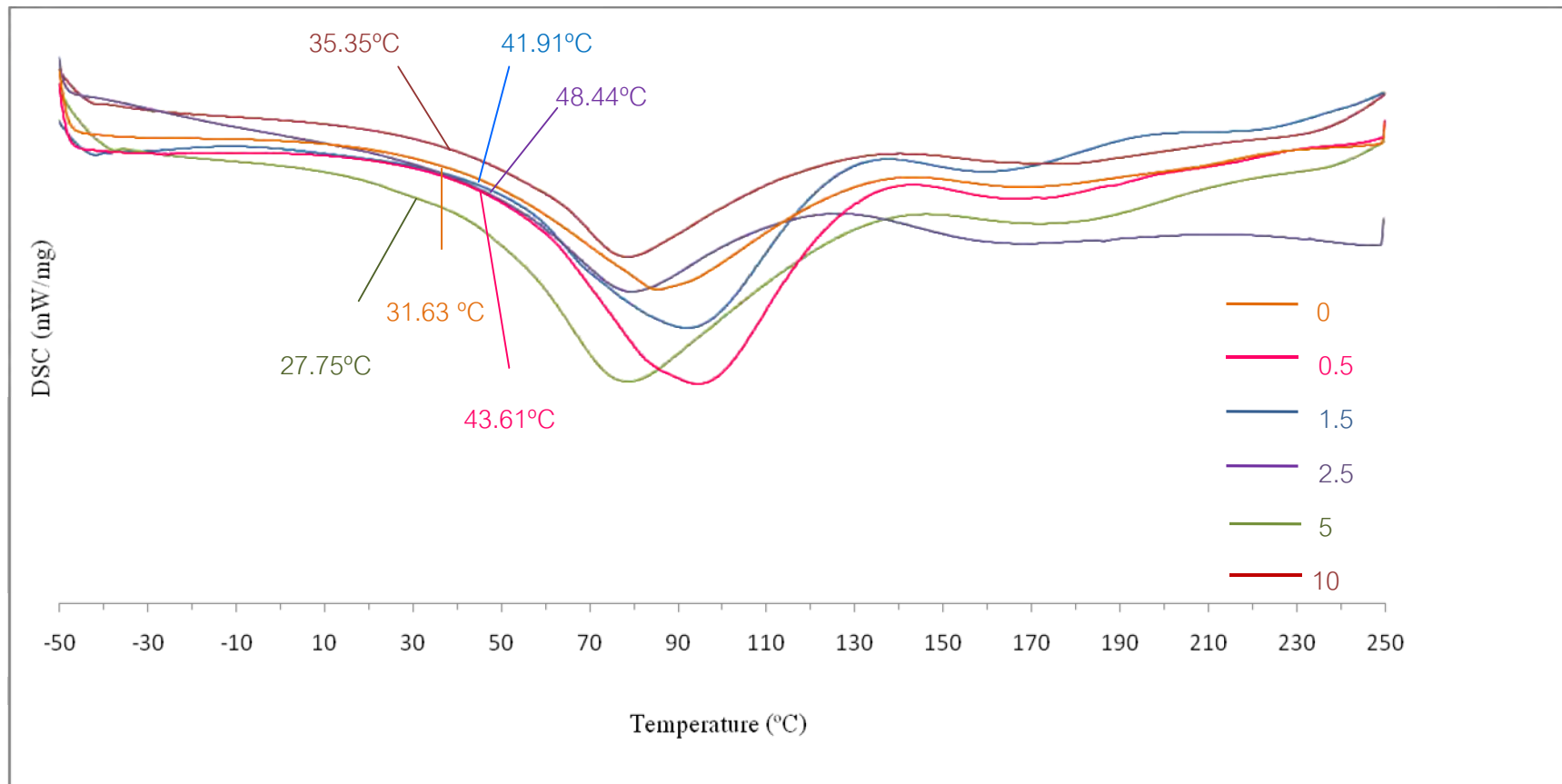
ฟิล์มไคโตซานทำให้มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกที่สูงขึ้น และส่งผลให้เกิดพันธะไฮโดรเจนกับโครงสร้างของไคโตซานโพลีเมอร์เพิ่มมากขึ้น



ภาพที่ 4.5 FT-IR spectra ของฟิล์มไคโตซานที่เติมสารสกัดพอลิโพลิสที่ความเข้มข้นต่างกัน (%w/v)

4.2.4 การวัดค่า Glass transition temperature (T_g)

การวัดค่า T_g โดยใช้เครื่อง Differential Scanning Calorimeter (DSC) อุณหภูมิที่ใช้ในการทดลองอยู่ในช่วง -50 ถึง 250 °C ค่า T_g เป็นอุณหภูมิที่เกิดการเปลี่ยน glass transition ซึ่งเป็นการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นกับฟิล์ม โดยไม่เปลี่ยนสถานะ เมื่ออุณหภูมิห้องต่ำกว่าค่า T_g ฟิล์มจะมีลักษณะเป็นของแข็งโดยมีสถานะเป็น glassy state ฟิล์มจะมีลักษณะที่ค่อนข้างแข็งแต่เปราะ และเมื่ออุณหภูมิห้องสูงกว่าค่า T_g ฟิล์มจะมีสถานะเป็น rubbery state จากผลทดลองการเติมสารสกัดพอลิฟอสฟอไรต์ที่ความเข้มข้นต่างกันพบว่าเมื่อเพิ่มค่า T_g ของฟิล์มไคโตซาน ดังแสดงในภาพที่ 4.6 ซึ่งฟิล์มไคโตซานที่เติมสารสกัดพอลิฟอสฟอไรต์ที่ความเข้มข้น 0, 0.5, 1.5, 2.5, 5 และ 10% (w/v) วัดค่า T_g ได้ 31.63°C , 43.61°C , 41.91°C , 48.44°C , 27.75°C และ 35.35°C ตามลำดับ



ภาพที่ 4.6 DSC thermograms แสดงค่า T_g ของฟิล์มไคโตซานที่เติมสารสกัดพอลิฟอสที่ความเข้มข้นต่างกัน (% w/v)

ปัจจัยที่อาจส่งผลต่อค่า T_g ได้แก่ น้ำหนักโมเลกุล และ degree of deacetylation, แหล่งของวัตถุดิบ และวิธีการสกัดที่แตกต่าง (Lazaridou and Biliaderis, 2002) นอกจากนี้การเปลี่ยนแปลงค่าความจุความร้อนยังเกี่ยวข้องกับค่า specific volume ของฟิล์ม จากผลการทดลองพบว่าการเติมสารสกัดพรอพโพลิสซึ่งเป็นสารประกอบอินทรีย์ที่มีลักษณะคล้ายเรซินลงในฟิล์มไคโตซาน มีผลทำให้ค่า T_g ของฟิล์มเพิ่มขึ้นแล้วลดลง โดยพบว่าในช่วงแรกของการทดลองค่า T_g จะเพิ่มขึ้น อาจเนื่องจากการเติมสารสกัดพรอพโพลิสที่ความเข้มข้น 0.5-2.5% (w/v) มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกในปริมาณที่ต่ำ สารประกอบฟีนอลิกจึงสามารถจับหรือเข้าไปอยู่ในโครงสร้างของฟิล์มไคโตซาน และโครงสร้างโพลิเมอร์ยังมีการเรียงตัวกันอย่างเป็นระเบียบ จึงทำให้ฟิล์มมีโครงสร้างที่แข็งแรง ส่งผลให้ฟิล์มมีลักษณะที่แข็งแต่เปราะขึ้น แต่เมื่อเติมสารสกัดพรอพโพลิสที่ความเข้มข้นสูงขึ้นไป 5-10% (w/v) สารประกอบฟีนอลิกซึ่งมีปริมาณมากขึ้น และไม่สามารถจับกับ active group ของไคโตซานได้ จึงอาจเข้าไปแทรกอยู่ในโครงสร้างทำให้เกิดช่องว่างภายในไคโตซานโพลิเมอร์ที่มากขึ้น ส่งผลทำให้ค่า T_g ลดลง และฟิล์มมีลักษณะอ่อนตัวลง ซึ่งเป็นผลการทดลองที่สอดคล้องกับการศึกษาค่า TS และ %E ของฟิล์มไคโตซานที่เติมสารสกัดพรอพโพลิส นอกจากนี้การเกิด interaction ระหว่าง amine group ของไคโตซาน และ hydroxyl group ของพรอพโพลิสนั้นยังเป็นเหตุผลหนึ่งที่ส่งผลให้ค่า T_g ของฟิล์มไคโตซานที่เติมสารสกัดพรอพโพลิสมีค่าที่สูงขึ้น ยกเว้นในการเติมสารสกัดพรอพโพลิสที่ความเข้มข้น 5% (w/v) ที่พบว่าค่า T_g ลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับฟิล์มไคโตซานที่ไม่ได้เติมสารสกัดพรอพโพลิส

4.2.5 สมบัติการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์

การศึกษาสมบัติการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ 4 ชนิด คือ *S. aureus*, *S. enteritidis*, *E. coli* และ *P. aeruginosa* ของฟิล์มไคโตซานที่เติมสารสกัดพรอพโพลิส ทำโดยตัดฟิล์มไคโตซานที่เติมสารสกัดพรอพโพลิสให้มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 mm วางบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีการเจริญของจุลินทรีย์อยู่ในช่วง 10^6 - 10^7 CFU/ml ตรวจสอบบริเวณการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ (Inhibitory zone) โดยวัดจากเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณโดยรอบแผ่นฟิล์ม และบริเวณผิวสัมผัส (Contact surface) ใช้สำหรับทดสอบบริเวณที่ฟิล์มสัมผัสโดยตรงกับจุลินทรีย์ ได้ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 4.13

ตารางที่ 4.13 ผลการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ของฟิล์มไคโตซานที่เติมสารสกัดพรอพโพลิสที่ความเข้มข้นต่างกัน

Propolis extract (% w/v)	<i>S. aureus</i>		<i>S. enteritidis</i>		<i>E. coli</i>		<i>P. aeruginosa</i>	
	Inhibitory Contact		Inhibitory Contact		Inhibitory Contact		Inhibitory Contact	
	zone (mm)	surface	zone (mm)	surface	zone (mm)	surface	zone (mm)	surface
0	0.00±0.00	-	0.00±0.00	-	0.00±0.00	-	0.00±0.00	-
0.5	0.00±0.00	+	0.00±0.00	+	0.00±0.00	+	0.00±0.00	+
1.5	0.00±0.00	+	0.00±0.00	+	0.00±0.00	+	0.00±0.00	+
2.5	0.00±0.00	+	0.00±0.00	+	0.00±0.00	+	0.00±0.00	+
5	0.00±0.00	+	0.00±0.00	+	0.00±0.00	+	0.00±0.00	+
10	0.00±0.00	+	0.00±0.00	+	0.00±0.00	+	0.00±0.00	+

- คือมีการเจริญของจุลินทรีย์, + คือไม่มีการเจริญของจุลินทรีย์

จากผลการทดลองสมบัติการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ของฟิล์มไคโตซานที่เติมสารสกัดพรอพโพลิสที่ความเข้มข้นต่างกัน พบว่าไม่มีการเจริญของจุลินทรีย์ที่ใช้ในการศึกษาทั้ง 4 ชนิด ภายใต้บริเวณที่ฟิล์มสัมผัสกับจุลินทรีย์โดยตรง อย่างไรก็ตามไม่พบบริเวณยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ทั้ง 4 ชนิด ทั้งนี้เนื่องจากสารสกัดพรอพโพลิสจะมีลักษณะที่ข้นเหนียวและละลายน้ำได้ต่ำ จึงไม่สามารถแพร่ออกจากฟิล์มไปบนอาหารเลี้ยงเชื้อได้ ส่งผลทำให้ไม่พบบริเวณการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ งานวิจัยของ Altiook, Altiook และ Tihminlioglu (2010) ซึ่งศึกษาสมบัติการยับยั้งการเจริญของ *E. coli*, *P. aeruginosa* และ *S. aureus* ของฟิล์มไคโตซานที่เติม thyme oil ที่ความเข้มข้น 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1 และ 1.2% (v/v) และพบว่าฟิล์มไคโตซานที่เติม thyme oil ไม่มีการเจริญของจุลินทรีย์ทั้ง 3 ชนิดในบริเวณที่ฟิล์มสัมผัสกับจุลินทรีย์โดยตรง และพบว่าเกิดบริเวณการยับยั้งการเจริญของ *E. coli*, *P. aeruginosa* และ *S. aureus* เมื่อเติม thyme oil ที่ความเข้มข้น 0.8, 1.2 และ 1% (v/v) ตามลำดับ เช่นเดียวกับงานวิจัยของ Pranoto, Rakshit และ Salokhe (2005) ที่ศึกษาสมบัติการยับยั้งการเจริญของ *E. coli*, *S. aureus*, *Salmonella typhimurium*, *Listeria monocytogenes* และ *Bacillus cereus* ของฟิล์มไคโตซานที่เติมน้ำมันกระเทียม, โปแตสเซียมซอร์เบต และไนซิน และพบว่าฟิล์มทั้ง 3 ชนิด ไม่เกิดบริเวณการยับยั้งการเจริญของ *E. coli* และ *S. typhimurium* แต่เกิดบริเวณยับยั้งการเจริญของ *S. aureus*, *L. monocytogenes* และ *B. cereus* โดยที่ฟิล์มไคโตซานที่เติมไนซินมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์สูงที่สุด รองลงมาคือฟิล์มไคโตซานที่เติมน้ำมันกระเทียม และฟิล์มไคโตซานที่เติมโปแตสเซียมซอร์เบตมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ต่ำที่สุด

ดังนั้นจากการทดลองสามารถกล่าวได้ว่า การเติมสารสกัดพรอพพิลิสลงในฟิล์มไคโตซาน สามารถช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ได้ หากในการนำไปใช้ฟิล์มมีการสัมผัสกับจุลินทรีย์โดยตรง

บทที่ 5

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

1. การศึกษาภาวะการสกัดพหอพโพลิสที่เหมาะสมคือ การสกัดที่มีอัตราส่วนของน้ำต่อเอทานอลเป็น 70:30 ซึ่งมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (Total phenolic contents, TPC) 5.26 mg gallic acid equivalent/g พบ rutin, quercetin และ naringenin ในสารสกัด พบบริเวณการยับยั้งการเจริญของ *S. aureus* และการใช้อัตราส่วนดังกล่าวจะมีปริมาณสารที่ได้จากการสกัดสูงที่สุด

2. การศึกษาสมบัติทางกายของฟิล์มไคโตซานที่เติมสารสกัดพหอพโพลิสที่ความเข้มข้น 0.5, 1.5, 2.5, 5 และ 10% (w/v) พบว่าการเติมสารสกัดพหอพโพลิสที่ความเข้มข้นที่สูงขึ้นลงในฟิล์มไคโตซาน มีผลทำให้ฟิล์มมีค่าความสว่างลดลง โดยฟิล์มจะให้ค่าสีแดงและสีเหลืองสูงขึ้น มีค่าสีที่เปลี่ยนไปสูงขึ้น และฟิล์มจะมีความโปร่งใสลดลง และการเติมสารสกัดพหอพโพลิสลงในฟิล์มไคโตซานยังมีผลทำให้ค่าการซึมผ่านของไอน้ำ และค่าการซึมผ่านของก๊าซออกซิเจนลดลง แต่มีผลทำให้ค่า tensile strength และ elongation at break สูงขึ้น

3. การศึกษาสมบัติการต้านอนุมูลอิสระในฟิล์มไคโตซานที่เติมสารสกัดพหอพโพลิสที่ความเข้มข้น 0.5, 1.5, 2.5, 5 และ 10% (w/v) แสดงให้เห็นว่าการเติมสารสกัดพหอพโพลิสที่ความเข้มข้นที่สูงขึ้นลงในฟิล์มไคโตซาน ส่งผลให้ฟิล์มไคโตซานมีสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระที่สูงขึ้นด้วยฟิล์มไคโตซานที่เติมสารสกัดพหอพโพลิสที่ความเข้มข้น 10% (w/v) มี TPC, ปริมาณ rutin และปฏิกิริยาการจับอนุมูล DPPH สูงที่สุด คือ 5.52 ± 0.06 mg gallic acid equivalent /g, $2.67 \mu\text{g/ml}$ และ $54.85 \pm 1.34\%$ ตามลำดับ และฟิล์มไคโตซานที่ไม่เติมสารสกัดพหอพโพลิสมีสมบัติการต้านอนุมูลอิสระต่ำที่สุด

4. การศึกษา interaction ของหมู่ฟังก์ชันของฟิล์มไคโตซานที่เติมสารสกัดพหอพโพลิสพบว่าพันธะไฮโดรเจนระหว่างสารประกอบฟีนอลิกของสารสกัดพหอพโพลิสกับโครงสร้างของไคโตซาน และจากการวัดค่า Glass transition temperature (T_g) พบว่าการเติมสารสกัดพหอพโพลิสลงในฟิล์มไคโตซานส่งผลให้ค่า T_g ของฟิล์มเกิดการเปลี่ยนแปลง

5. การศึกษาสมบัติการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ของฟิล์มไคโตซานที่เติมและไม่เติมสารสกัดพหอพโพลิส พบว่าการเติมสารสกัดพหอพโพลิสลงในฟิล์มไคโตซาน ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่ใช้ในการศึกษาทั้ง 4 ชนิด ในบริเวณที่ฟิล์มสัมผัสกับจุลินทรีย์โดยตรง

ข้อเสนอแนะ

การศึกษาสมบัติการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ ควรมีการศึกษาเพิ่มเติมถึงประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ในเชิงปริมาณ เช่น การใช้วิธี broth dilution จะทำให้ทราบถึงปริมาณจุลินทรีย์ที่ลดลง และความเข้มข้นของสารสกัดที่ต่ำที่สุดที่มีสมบัติในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์

งานวิจัยนี้ได้พัฒนาสมบัติของฟิล์มไบโอดีซานด้วยการเติมสารสกัดพรอพโพลิส เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการนำไปประยุกต์ใช้สำหรับห่อและยืดอายุการเก็บผลิตภัณฑ์อาหาร พบว่าการเติมสารสกัดพรอพโพลิสลงในฟิล์มไบโอดีซาน มีส่วนช่วยให้ฟิล์มมีสมบัติทางกายภาพ การต้านอนุมูลอิสระ และยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่ดีขึ้น ดังนั้นจึงควรนำฟิล์มที่ได้ไปประยุกต์ใช้ในรูปแบบของฟิล์มห่ออาหาร เพื่อสามารถนำไปใช้ในการยืดอายุการเก็บผลิตภัณฑ์อาหารในอุตสาหกรรมต่อไป

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

- ปธานอม ขาวเมฆ. 2549. คู่มือหลักสูตรเข้มข้นการวิเคราะห์โดยใช้ Fourier transform infrared spectrometer. พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพมหานคร: ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- โอภา วัชรคุปต์, ปรีชา บุญจุง, จันทนา บุญยะรัตน์ และ มาลีรักษ์ อัดดีสินทอง. 2549. สารต้านอนุมูลอิสระ. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพมหานคร: พี.เอส.พรินท์.

ภาษาอังกฤษ

- Afanas'ev, I. B., Dorozhko, A. I., Brodskii, A. V., Kostyuk, V. A., and Potapovitch, A. I. 1988. Chelating and free radical scavenging mechanisms of inhibitory action of rutin and quercetin in lipid peroxidation. Biochemical Pharmacology. 38: 1763-1769.
- Altiok, D., Altiok, E., and Tihminlioglu, F. 2010. Physical, antibacterial and antioxidant properties of chitosan films incorporated with thyme oil for potential wound healing applications. Journal of Materials Science: Materials in Medicine.
- Anraku, M., Kabashima, M., Namura, T., Maruyama, T., Otagiri, M., Et, A. L., and Gebicki, J. M. 2008. Antioxidant protection of human serum albumin by chitosan. International Journal of Biological Macromolecules. 43: 159-164.
- Antolovich, M., Prenzler, P. D., Robards, K., and Ryan, D. 2000. Sample preparation in the determination of phenolic compounds in fruits. Analyst. 125: 989-1009.
- Arvanitoyannis, I., Kolokuris, I., Nakayama, A., Yamamoto, N., and Aiba, S. 1997. Physico-chemical studies of chitosan-poly (vinyl alcohol) blends plasticized with sorbitol and sucrose. Carbohydrate Polymer. 34: 9-19.
- ASTM. 1980, Annual Book of ASTM Standards. Philadelphia. PA: American Society for Testing and Materials.
- ASTM. 1987, Annual Book of ASTM Standards. Philadelphia. PA: American Society for Testing and Materials.
- ASTM. 1989, Annual Book of ASTM Standards. Philadelphia. PA: American Society for Testing and Materials.

- ASTM. 1995, Annual Book of ASTM Standards. Philadelphia. PA: American Society for Testing and Materials.
- Ayala, F., Lembo, G., Nappa, P., and Balato, N. 1985. Contact dermatitis from propolis. Contract Dermatitis. 12: 181-182.
- Balasundram, N., Sundarm, K., and Samman, S. 2006. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, potential uses. Food Chemistry. 99: 191-203.
- Baldwin, E. A. 1991. Surface Treatments and Edible Coatings in Food Preservation. Handbook of Food Preservative. pp. 577-609.
- Bankova, V. S., Popov, S. S., and Marekov, N. L. 1983. A study on flavonoids of propolis. Journal of Natural Products. 46: 471-474.
- Bankova, V. 2005. Chemical diversity of propolis and the problem of standardization. Journal of Ethnopharmacology. 100: 114-117.
- Bankova, V. S., Castro, S. L. D., and Marcucci, M. C. 2000. Propolis: Recent advances in chemistry and plant origin. Apidologie. 31: 3-15.
- Barak, V., Birkenfeld, S., Halperin, T., and Kalickman, I. 2002. The effect of herbal remedies on the production of human inflammatory and anti-inflammatory cytokines. The Israel Medical Association Journal. 4: 919-922.
- Bégin, A., and Van Calsteren, M. R. 1999. Antimicrobial films produced from chitosan. International Journal of Biological Macromolecules. 26: 63-67.
- Beverly, R. L., Janes, M. E., Prinyawiwatkuta, W., and No, H. K. 2008. Edible chitosan films on ready-to-eat roast beef for the control of *Listeria monocytogenes*. Food Microbiology. 25: 534-537.
- Bjorkner, B. E. 1994. Industrial airborne dermatoses. Dermatology Clinics. 12: 501-509.
- Burdock, G. C. 1995. Fenaroli's Handbook of Flavor Ingredients. 3rd edition. CRC Press. Boca Raton, Florida. 350 pp.
- Burdock, G. C. 1998. Review of the biological properties and toxicity of bee propolis (propolis). Food and Chemical Toxicology. 36: 347-363.
- Caner, C., Vergano, P. J., and Wiles, J. L. 1998. Chitosan film mechanical and permeation properties and affected by acid, plasticizer and storage. Journal of Food Science. 63: 1049-1053.

- Catchpole, O. J., Grey, J. B., Mitchell, K. A., and Lan, J. S. 2004. Supercritical antisolvent fractionation of propolis tincture. Journal of Supercritical Fluids. 29: 97-106.
- Chen, C. S., Liao, W. Y., and Tsai, G. J. 1998. Antibacterial effects of N-sulfonated and N-sulfobenzoyl chitosan and application to oyster preservation. Journal of Food Protection. 61: 11-24.
- Chien, P. J., Sheu, F., and Yang, F. 2005. Effects of edible chitosan coating on quality and shelf life of sliced mango fruit. Journal of Food Engineering. 78: 225-229.
- Choi, B. K., Kim, K. Y., Yoo, Y. J., Oh, S. J., Choi, J. H., and Kim, C. Y. 2001. In Vitro Antimicrobial Activity of a chito-oligosaccharide mixture against *Actinobacillus actionmycetemcomitans* and *Streptococcus mutans*. International Journal of Antimicrobial Agents. 18: 553-557.
- Choi, Y. M., Noh, D. O., Cho, S. Y., Suh, H. J., Kim, K. M., and Kim, J. M. 2006. Antioxidant and antimicrobial activities of propolis from several regions of Korea. LWT. 39: 756-761.
- Cowan, M. M. 1999. Plant products as antimicrobial agents. Clinical Microbiological Review. 12(4) : 564-582.
- Cushnie, T. P., and Lamb, A. J. 2005. Antimicrobial activity of flavonoids. International Journal of Antimicrobial Agents. 26: 343-356.
- Darmadji, R., and Izumimoto, M. 1994. Effect of chitosan in meat preservation. Meat Science. 27: 1016-1018.
- Dobrowolski, J., Vohora, S. B., Sharma, K., Shah, S. A., Naqvi, S. A. H., and Dandiya, P. C. 1991. Antibacterial, antifungal, antiamoebic, anti-inflammatory and antipyretic studies on propolis bee products. Journal of Ethnopharmacology. 35: 77-82.
- Dutta, P. K., Tripathi, S., Mehrotra, G. K., and Dutta, J. 2009. Perspectives for chitosan based antimicrobial films in food applications. Food Chemistry. 114: 1173-1182.
- Furusaki, E., Ueno, Y., Sakairi, N., Nishi, N., and Tokura, S. 1996. Facile preparation and inclusion ability of chitosan derivative bearing carboxymethyl-beta-cyclodextrin. Carbohydrate Polymers. 9: 29-34.
- Gennadios, A., and Weller, C. L. 1990. Edible films and coatings from wheat and corn propeins. Food Technology. 44: 63-69.

- Ghisalberti, E. L. 1979. Propolis: a review. Bee World. 60: 59-84.
- Gordon, M. H. 1990. The mechanism of antioxidant action in vitro. Food antioxidants. London Elsevier. 1-15 pp.
- Han, S. K., and Park, H. K. 1995. A study on the preservation of meat products by natural propolis: Effect of EEP on protein change of meat products. Korean Journal of Animal Science. 37: 551-557.
- Havsteen, P. 1983. Flavonoids, a class of natural products of high pharmacological potency. Biochemical Pharmacology. 32: 1141-1148.
- Heim, K. E., Tagliaferro, A. R., and Bobilya, D. J. 2002. Flavonoids antioxidants: Chemistry, metabolism and structure-activity relationship. Journal of Nutritional Biochemistry. 13: 572-584.
- Helander, I. M., Nurmiäho-Lassila, E. L., Ahvenainen, R., Rhoades, J., and Roller, S. 2001. Chitosan disrupts the barrier properties of the outer membrane of gram-negative bacteria. International Journal of Food Microbiology. 71: 235-244
- Isla, M. I., Moreno, M. I., Sampietro, A. R., and Vattuone, M. A. 2001. Antioxidant activity of Argentine propolis extracts. Journal of Ethnopharmacology. 76: 165-170.
- Jeon, Y., Park, P. J., and Kim, S. K. 2001. Antimicrobial effect of chitooligosaccharides produced by bioreactor. Carbohydrate Polymers. 44: 71-76
- Johnson, K. S., Eischen, F. A., and Giannasi, D. E. 1994. Chemical composition of North American bee propolis and biological activity towards larvae of greater wax moth (Lepidoptera: Pyralidae). Journal of Chemical Ecology. 20: 1783-1792.
- Kaal, J. 1991. Natural medicine from honey bees (Apitherapy). Kaal's Printing House. Amsterdam. 93 pp.
- Kalogeropoulos, N., Konteles, S. J., Troullidou, E., Mourtzinou, J., and Karathanos, V. T. 2009. Chemical composition, antioxidant activity and antimicrobial properties of propolis extracts from Greece and Cyprus. Food Chemistry. 116: 452-461.
- Kamil, Y. V. V. A., Jeon, Y. J., and Shahidi, F. 2002. Antioxidative activity of chitosans of different viscosity in cooked comminuted flesh of herring (*Clupea harengus*). Food Chemistry. 79: 69-77.
- Kanatt, S. R., Chander, R., and Sharma, A. 2008. Chitosan and mint mixture: A new preservative for meat and meat products. Food Chemistry. 107: 845-852.

- Kartal, M., Yildiz, S., Kaya, S., Kurucu, S., and Topcu, G. 2003. Antimicrobial activity of propolis samples from two different regions of Anatolia. Journal of Ethnopharmacology. 86: 69-73.
- Kayser, O., and Kolodziej, H. 1997. Antibacterial activity of extracts and constituents of *Pelargonium sidoides* and *Pelargonium reniforme*. Planta Medica. 63(6): 508-510.
- Kedzia, A. 1990. Sensitivity of anaerobic bacteria to the ethanol extract of propolis. Phytotherapie. 6: 4-6.
- Kim, K. M., Son, J. H., Kim, S. K., Weller, C. L., and Hanna, M. A. 2006. Properties of chitosan films as a function of pH and solvent type. Journal of Food Science. 71: 119-124.
- Kim, K. W., and Thomas, R.L. 2007. Antioxidative activity of chitosans with varying molecular weights. Food Chemistry. 101: 308-313.
- Krol, W., Scheller, S., Shani, J., Pietsz, G., and Czuba, Z. 1993. Synergistic effect of ethanolic extract of propolis and antibiotics on the growth of *Staphylococcus aureus*. Arzneimittel-Forschung Drug Research. 43: 607-609.
- Kumazawa, S., Hamasaka, T., and Nakayama, T. 2004. Antioxidant activity of propolis of various geographic origins. Food Chemistry. 84: 329-339.
- Lazaridou, A., and Biliaderis, C. G. 2002. Thermophysical properties of chitosan, chitosan–starch and chitosan–pullulan films near the glass transition. Carbohydrate Polymers. 48: 179-190.
- Li, B., Kennedy, J. F., Peng, J. L., Yie, X., and Xie, B. J. 2006. Preparation and performance evaluation of glucomannan-chitosan-nisin ternary antimicrobial blend film. Carbohydrate Polymers. 65: 488-494.
- Li, B., Wang, X., Chen, R., Huangfu, W., and Xie, G. 2008. Antibacterial activity of chitosan solution against *Xanthomonas* pathogenic bacteria isolated from *Euphorbia pulcherrima*. Carbohydrate Polymers. 72: 287-292.
- Li, Q., Dunn, E. T., Granmaison, E. W., and Goosen, M. F. A. 1992. Applications and properties of chitosan. Journal of Bioactive and Compatible Polymers. 7: 370-397.
- Lu, L. C., Chen, Y. W., and Chou, C. C. 2005. Antibacterial activity of propolis against *Staphylococcus aureus*. International Journal of Food Microbiology. 102: 213-220.

- Mandelstam, J., McQuillen, K., and Dawes, I. 1982. Biochemistry of Bacterial Growth. Blackwell Scientific Publication. 449 pp.
- Mannapperuma, J. D., and Singh, R. P. 1990. Modeling of gas exchange in polymeric package of fresh fruits and vegetables. In IFT Annual meeting, Anachcim, CA, 16-20 June.
- Marcucci, M. C. 1995. Propolis: Chemical composition, biological properties and therapeutic activity. Apidologie. 26: 83-99
- Mayachiew, P., and Devahastin, S. 2010. Effects of drying methods and conditions on release characteristics of edible chitosan films enriched with Indian gooseberry extract. Food Chemistry. 118: 594-601.
- Meyer, W. 1956. Propolis bees and their activities. Bee World. 37: 25-36.
- Mizrahi, A., and Lensky, Y. 1997. Bee Products Properties, Applications, and Apitherapy. New York: Plenum.
- Mohammadzadeh, S., Sharriatpanahi, M., Hamedi, M., Amanzadeh, Y., Ebrahimi, S. E. S., and Ostad, S. N. 2007. Antioxidant power of Iranian propolis extract. Food Chemistry. 103: 729-733.
- Moreira, L., Dias, L. G., Pereira, J. A., and Estevinho, L. 2008. Antioxidant properties, total phenols and pollen analysis of propolis samples from Portugal. Food and Chemical Toxicology.
- Muzzarelli, R. A. A., Muzzarelli, C. M., and Terbojerich, M. 1997. Chitin chemistry, upgrading a renewable source. Carbohydrate European. 19: 10-17.
- Nunthanids, J., Puttupipatkachorn, S., Yamamoto, K., and Peck, G. E. 2001. Physical properties and molecular behavior of chitosan films. Drug Development and Industrial Pharmacy. 27: 143-257.
- Ojagh, S. M., Rezaei, M., Razavi, S. H., and Hosseini, S. M. H. 2010. Development and evaluation of a novel biodegradable film made from chitosan and cinnamon essential oil with low affinity toward water. Food Chemistry. (In print)
- Orsi, R. O., Sforcin, J. M., Funari, S. R. C., and Bankova, V. 2005. Effects of Brazilian and Bulgarian propolis on bactericidal activity of macrophages against *Salmonella* Typhimurium. International Immunopharmacology. 5: 359-368.

- Park, P. J., Je, J. Y., and Kim, S. W. 2004. Free radical scavenging activities of different deacetylated chitosans using an ESR spectrometer. Carbohydrate Polymer. 55: 17-22.
- Park, S., and Zhao, Y. 2004. Incorporation of a high concentration of mineral or vitamin into chitosan-based films. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 52: 1933-1939.
- Park, S. Y., Marsh, K. S., and Rhim, J. W. 2002. Characteristics of different molecular weight chitosan films affected by the type of organic solvents. Journal of Food Science. 61: 194-197.
- Pena, D. C., and Torres, J. A. 1991. Sorbic acid and potassium sorbate permeability of an edible methylcellulose-palmitic acid films: Water activity and pH effects. Journal of Food Science. 56: 497-499.
- Peng, C., Wang, Y., and Tang, Y. 1998. Synthesis of crosslinked chitosan crown ethers and evaluation of these products as adsorbents for metal ions. Journal of Applied Polymer Science. 70: 501-506.
- Pinelo, M., Manzocco, L., Nunez, M. J., and Nicoli, M. C. 2004. Solvent effect on quercetin antioxidant capacity. Food Chemistry. 88: 201-207.
- Pranoto, Y., Rakshit, S. K., and Salokhe, V. M. 2005. Enhancing antimicrobial activity of chitosan films by incorporating garlic oil, potassium sorbate and nisin. LWT. 38: 859-865.
- Rauha, J. P., Remes, S., Heinonen, M., Hopia, A., Kahkonen, M., Kujala T., Piihlaja, K., Vuorela H., and Vuorela, P. 2000. Antimicrobial effects of finnish plant extracts containing flavonoids and other phenolic compounds. International Journal of Food Microbiology. 56: 3-12.
- Rice-Evans, C. A., Miller, N. J., and Paganga, G. 1996. Structure-antioxidant activity relationship of flavonoids and phenolic acids. Free Radical Biology and Medicine. 20: 933-956.
- Rinaudo, M. 2006. Chitin and chitosan: Properties and applications. Progress in Polymer Science. 31: 603-632.
- Roller, S., and Covill, N. 1999. The antifungal of chitosan in laboratory media and apple juice. International Journal of Food Microbiology. 47: 67-77.

- Roy, N., Mondal, S., Laskar, R. A., Basu, S., Mandal, D., and Begum, N. A. 2010. Biogenic synthesis of Au and Ag nanoparticles by Indian propolis and its constituents. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces. 76: 317-325.
- Russo, A., Longo, R., and Vanella, A. 2002 Antioxidant activity of propolis: role of caffeic acid phenethyl ester and galangin. Fitoterapie. 73: 21-29.
- Salatino, A., Teixeira, E. W., Negri, G., Negri, G., and Message D. 2005. Origin and chemical variation of Brazilian propolis. Evidence-based Complementary and Alternative Medicine. 2: 33-38.
- Sangsuwan, J., Rattanapanone, N., and Rachtanapun, P. 2008. Effect of chitosan/methyl cellulose films on microbial and quality characteristics of fresh-cut cantaloupe and pineapple. Postharvest Biology and Technology. 49: 403-410.
- Sforcin, J. M., Fernandes, A. J., Lopes, C. A. M., Bankova, V., and Funari, S. R. C. 2000. Seasonal effect on Brazilian propolis antimicrobial activity. Journal of Ethnopharmacology. 73: 243-249
- Shahidi, F., Arachchi, J. K., and Jeon, Y. J. 1999. Food application of chitin and chitosan. Trends in Food Science and Technology. 10: 37-51.
- Silici, S., and Kutluca, S. 2005. Chemical composition and antibacterial activity of propolis collected by three different races of honeybees in the same region. Journal of Ethnopharmacology. 99: 69-73.
- Siripatrawan, U., and Harte, B. R. 2010. Physical properties and antioxidant activity of an active film from chitosan incorporated with green tea extract. Food Hydrocolloid. (In print)
- Sivarooaban, T., Hettiarachchy, N. S., and Johnson, M. G. 2008. Physical and antimicrobial properties of grape seed extract, nisin, and EDTA incorporated soy protein edible films. Food Research international. 41: 781-785.
- Tharanathan, R. 2003. Biodegradable films and composite coating: past, present and future. Trends in Food Science and Technology. 14: 71-78.
- Tim Cushnie, T. P., and Lamb, A. J. 2005. Antimicrobial activity of flavonoids. International Journal of Antimicrobial Agents. 26: 343-356.

- Tokura, S., Miuray, Y., Johmen, M., Nishi, N., and Nishimura, S. I. 1994. Induction of drug specific antibody and the controlled release of drug by 6-O-carboxymethyl-chitin. Journal of Controlled Release. 28: 235-241.
- Tosi, E. A., Ré, E., Ortega, M. E., and Cazzoli, A. F. 2007. Food preservative based on propolis: Bacteriostatic activity of propolis polyphenols and flavonoids upon *Escherichia coli*. Food Chemistry. 104: 1025-1029.
- USDA. 1985. United States Department of Agriculture. United States Standards for Grades of Extracted Honey. Agricultural Marketing Service. Fruit and Vegetable Division. Processed Products Branch. Washington, DC.
- Vargus, M., Albors, A., and González-Martínez, C. 2006. Quality of cold-stored strawberries as affected by chitosan-oleic acid edible coatings. Postharvest Biology and Technology. 41: 164-171.
- Villalobos, R., Hernandez-Munoz, P., and Chiralt, A. 2006. Effect of surfactants on water sorption and barrier properties of hydroxypropyl methylcellulose films. Food Hydrocolloids. 20: 502-509.
- Wu, Y. W., Sun, S. Q., Zhao, J., Li, Y., and Zhou, Q. 2008. Rapid discrimination of extracts of Chinese propolis and poplar buds by FT-IR and 2D IR correlation spectroscopy. Journal of Molecular Structure. 883-884: 48-54.
- Xiao, C. H., and Lu, Y. R. 1989. Chemistry of traditional Chinese medicine. Shanghai: Shanghai Science and Technology Press. P. 192.
- Xie, W. M., Xu, P., and Liu, Q. 2001. Antioxidant activity of water-soluble chitosan derivatives. Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters. 11: 1699-1701.
- Xie, W., Xu, P., Wang, W., and Liu, Q. 2002. Preparation and Antimicrobial Activity of a Water Soluble Chitosan Derivative. Carbohydrate Polymers. 50: 35-40.
- Yang, J., Guo, J., and Yuan, J. 2008. In vitro antioxidant properties of rutin. LWT. 41: 1060-1066.
- Youn, S. K., Kim, Y. J., and Ahn, D. H. 2001. Antioxidative effects of chitosan in meat sausage. Journal of Korean Society Food Science Nutrition, 30: 477-481.
- Zhao, J., Li, Y., Xue, X. F., and Cai, Y. 2005. The study of the parts of higher activity of the flavones contents in propolis. Apicultural of China. 56(3): 9-10.

- Zheng, M., and Zhu, J. F. 2003. Study of antimicrobial activity of chitosan with different molecular weight. Carbohydrate Polymers. 54: 527-530.
- Zheng, W. F., Tan, R. X., Yang, L., and Liu, Z. L. 1996. Two flavones from *Artemisia giraldii* and their antimicrobial activity. Journal of Medicinal Plant and Natural Product Research. 62: 160-201.
- Zhou, J., Li, Y., Zhao, J., Xue, X., Wu, L., and Chen, F. 2008. Geographical traceability of propolis by high-performance liquid-chromatography fingerprints. Food Chemistry. 108: 749-759 .
- Zi, J., Peng, B., and Yan, W. 2007. Solubilities of rutin in eight solvent at $T = 283.15, 298.15, 313.15, 323.15, \text{ and } 333.15$ K. Fluid Phase Equilibria. 261: 111-114.
- Zivanovic, S., Chi, S., and Draughon, A. F. 2005. Antimicrobial activity of chitosan films enriched with essential oils. Journal of Food Science. 70: 45-51.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก
ข้อมูลผลการทดลองเพิ่มเติม

ตารางที่ ก.1 ความหนาของฟิล์มไคโตซานที่เติมสารสกัดพรอพโพลิสที่ความเข้มข้นต่างกัน

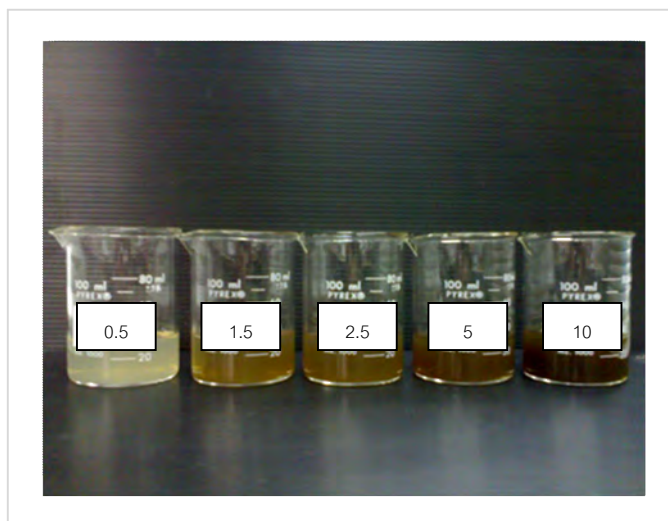
ความเข้มข้นของพรอพโพลิส (% w/v)	ความหนา (μm) [*]
0	74.67 ^a ±2.24
0.5	68.70 ^{ab} ±2.42
1.5	67.02 ^b ±5.61
2.5	66.63 ^b ±3.72
5	66.94 ^b ±5.08
10	66.85 ^b ±0.75

* a, b,... ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรกำกับแตกต่างกันในแนวตั้งมีค่าแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)

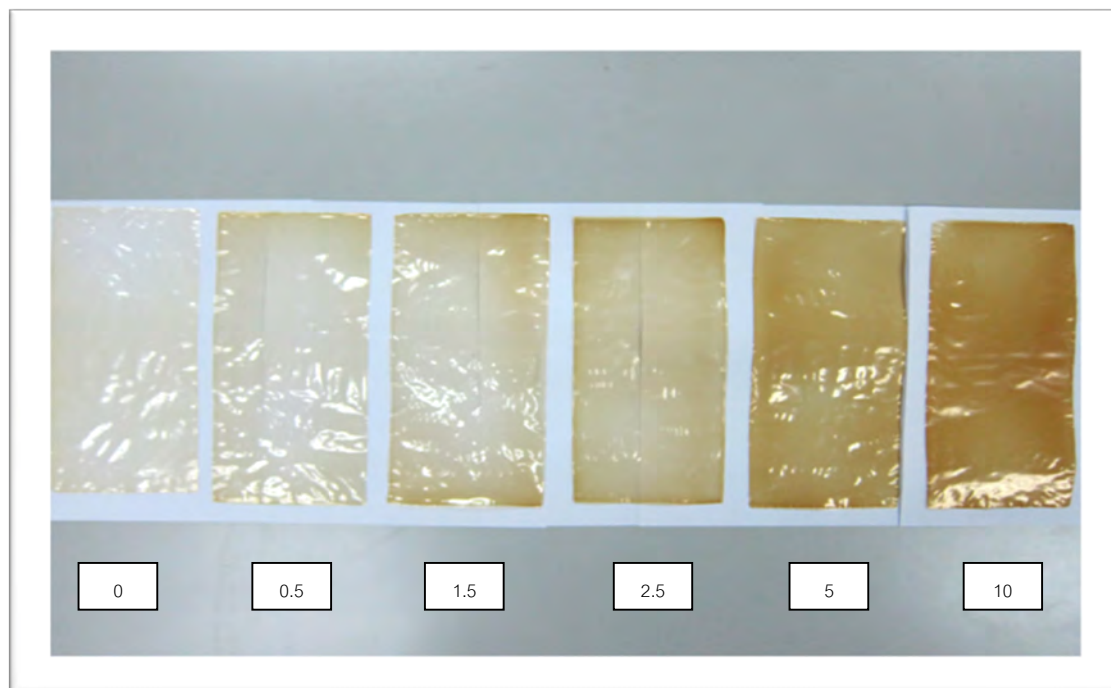
ภาคผนวก ข
ภาพประกอบงานวิจัย



ภาพที่ ข.1 สารสกัดพหุพอพโพลิสที่สกัดด้วยตัวทำละลายน้ำต่อเอทานอลที่ต่างกัน



ภาพที่ ข.2 สารสกัดพหุพอพโพลิสที่สกัดด้วยตัวทำละลายน้ำต่อเอทานอล 70:30 ที่มีความเข้มข้น (%w/v) ที่ต่างกัน



ภาพที่ ๓.3 फिल्मไคโตซานที่เติมสารสกัดพรอพโพลิสที่ความเข้มข้นต่างกัน (%w/v)

ภาคผนวก ค
การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

ตารางที่ ค.1 ความแปรปรวน (ANOVA) จากการวิเคราะห์ผลทางสถิติของปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดในสารสกัดพรอพโพลิสเมื่อแปรอัตราส่วนของน้ำต่อเอทานอล ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	2486.879 ^a	4	621.720	41.995	.000
Intercept	4742.452	1	4742.452	320.337	.000
trt	2486.879	4	621.720	41.995	.000
Error	148.046	10	14.805		
Total	7377.377	15			
Corrected Total	2634.924	14			

a. R Squared = .944 (Adjusted R Squared = .921)

ตารางที่ ค.2 ความแปรปรวน (ANOVA) จากการวิเคราะห์ผลทางสถิติของปฏิกิริยาการจับอนุมูล DPPH ในสารสกัดพรอพโพลิสเมื่อแปรอัตราส่วนของน้ำต่อเอทานอล ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	7003.543 ^a	4	1750.886	236.614	.000
Intercept	79873.692	1	79873.692	10794.082	.000
trt	7003.543	4	1750.886	236.614	.000
Error	73.998	10	7.400		
Total	86951.233	15			
Corrected Total	7077.541	14			

a. R Squared = .990 (Adjusted R Squared = .985)

ตารางที่ ค.3 ความแปรปรวน (ANOVA) จากการวิเคราะห์ผลทางสถิติของผลการยับยั้งการเจริญ
ของจุลินทรีย์ของสารสกัดพรอพโพลิสเมื่อแปรอัตราส่วนของน้ำต่อเอทานอล
ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	65.501 ^a	4	16.375	147.074	.000
Intercept	97.997	1	97.997	880.160	.000
trt	65.501	4	16.375	147.074	.000
Error	1.113	10	.111		
Total	164.611	15			
Corrected Total	66.614	14			

a. R Squared = .983 (Adjusted R Squared = .977)

ตารางที่ ค.4 ความแปรปรวน (ANOVA) จากการวิเคราะห์ผลทางสถิติของค่าสี L* ของฟิล์ม
โคโตนานที่เติมสารสกัดพรอพโพลิสที่ความเข้มข้นต่างกัน ที่ระดับความเชื่อมั่น
95%

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	955.140 ^a	5	191.028	58.480	.000
Intercept	111401.440	1	111401.440	34103.758	.000
trt	955.140	5	191.028	58.480	.000
Error	39.199	12	3.267		
Total	112395.779	18			
Corrected Total	994.339	17			

a. R Squared = .961 (Adjusted R Squared = .944)

ตารางที่ ค.5 ความแปรปรวน (ANOVA) จากการวิเคราะห์ผลทางสถิติของค่าสี a* ของฟิล์ม
ไคโตซานที่เติมสารสกัดพรอพโพลิสที่ความเข้มข้นต่างกัน ที่ระดับความเชื่อมั่น
95%

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	246.874 ^a	5	49.375	36.490	.000
Intercept	34.973	1	34.973	25.846	.000
trt	246.874	5	49.375	36.490	.000
Error	16.237	12	1.353		
Total	298.084	18			
Corrected Total	263.112	17			

a. R Squared = .938 (Adjusted R Squared = .913)

ตารางที่ ค.6 ความแปรปรวน (ANOVA) จากการวิเคราะห์ผลทางสถิติของค่าสี b* ของฟิล์ม
ไคโตซานที่เติมสารสกัดพรอพโพลิสที่ความเข้มข้นต่างกัน ที่ระดับความเชื่อมั่น
95%

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	468.964 ^a	5	93.793	8.290	.001
Intercept	17617.522	1	17617.522	1557.100	.000
trt	468.964	5	93.793	8.290	.001
Error	135.772	12	11.314		
Total	18222.258	18			
Corrected Total	604.736	17			

a. R Squared = .775 (Adjusted R Squared = .682)

ตารางที่ ค.7 ความแปรปรวน (ANOVA) จากการวิเคราะห์ผลทางสถิติของค่า ΔE ของฟิล์ม
ไคโตซานที่เติมสารสกัดพรอพโพลิสที่ความเข้มข้นต่างกัน ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	884.865 ^a	5	176.973	12.776	.000
Intercept	19728.925	1	19728.925	1424.263	.000
trt	884.865	5	176.973	12.776	.000
Error	166.224	12	13.852		
Total	20780.014	18			
Corrected Total	1051.089	17			

a. R Squared = .842 (Adjusted R Squared = .776)

ตารางที่ ค.8 ความแปรปรวน (ANOVA) จากการวิเคราะห์ผลทางสถิติของค่าความโปร่งใสของ
ฟิล์มไคโตซานที่เติมสารสกัดพรอพโพลิสที่ความเข้มข้นต่างกัน ที่ระดับความเชื่อมั่น
95%

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	1107.837 ^a	5	221.567	55.230	.000
Intercept	106317.364	1	106317.364	26501.640	.000
trt	1107.837	5	221.567	55.230	.000
Error	48.141	12	4.012		
Total	107473.342	18			
Corrected Total	1155.978	17			

a. R Squared = .958 (Adjusted R Squared = .941)

ตารางที่ ค.9 ความแปรปรวน (ANOVA) จากการวิเคราะห์ผลทางสถิติของค่าการซึมผ่านของ
 ใยน้ำของฟิล์มไคโตซานที่เติมสารสกัดพรอพโพลิสที่ความเข้มข้นต่างกัน ที่ระดับ
 ความเชื่อมั่น 95%

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	.050 ^a	5	.010	4.093	.021
Intercept	5.634	1	5.634	2289.050	.000
trt	.050	5	.010	4.093	.021
Error	.030	12	.002		
Total	5.714	18			
Corrected Total	.080	17			

a. R Squared = .630 (Adjusted R Squared = .476)

ตารางที่ ค.10 ความแปรปรวน (ANOVA) จากการวิเคราะห์ผลทางสถิติของค่าอัตราการซึมผ่าน
 ของก๊าซออกซิเจนของฟิล์มไคโตซานที่เติมสารสกัดพรอพโพลิสที่ความเข้มข้น
 ต่างกัน ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	25.001 ^a	5	5.000	112.470	.000
Intercept	197.560	1	197.560	4443.704	.000
Trt	25.001	5	5.000	112.470	.000
Error	.267	6	.044		
Total	222.828	12			
Corrected Total	25.268	11			

a. R Squared = .989 (Adjusted R Squared = .981)

ตารางที่ ค.11 ความแปรปรวน (ANOVA) จากการวิเคราะห์ผลทางสถิติของค่า tensile strength ของฟิล์มไคโตซานที่เติมสารสกัดพรอพโพลิสที่ความเข้มข้นต่างกัน ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	553.650 ^a	5	110.730	211.856	.000
Intercept	3859.397	1	3859.397	7384.050	.000
trt	553.650	5	110.730	211.856	.000
Error	6.272	12	.523		
Total	4419.319	18			
Corrected Total	559.922	17			

a. R Squared = .989 (Adjusted R Squared = .984)

ตารางที่ ค.12 ความแปรปรวน (ANOVA) จากการวิเคราะห์ผลทางสถิติของค่า elongation at break ของฟิล์มไคโตซานที่เติมสารสกัดพรอพโพลิสที่ความเข้มข้นต่างกัน ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	150.516 ^a	5	30.103	49.383	.000
Intercept	1691.293	1	1691.293	2774.506	.000
trt	150.516	5	30.103	49.383	.000
Error	7.315	12	.610		
Total	1849.124	18			
Corrected Total	157.831	17			

a. R Squared = .954 (Adjusted R Squared = .934)

ตารางที่ ค.13 ความแปรปรวน (ANOVA) จากการวิเคราะห์ผลทางสถิติของปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดในฟิล์มไคโตซานที่เติมสารสกัดพรอพโพลิสที่ความเข้มข้นต่างกัน ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	3.455 ^a	5	.691	11.214	.000
Intercept	362.523	1	362.523	5882.456	.000
trt	3.455	5	.691	11.214	.000
Error	.740	12	.062		
Total	366.718	18			
Corrected Total	4.195	17			

a. R Squared = .824 (Adjusted R Squared = .750)

ตารางที่ ค.14 ความแปรปรวน (ANOVA) จากการวิเคราะห์ผลทางสถิติของปฏิกิริยาการจับอนุมูล DPPH ในฟิล์มไคโตซานที่เติมสารสกัดพรอพโพลิสที่ความเข้มข้นต่างกัน ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	4203.878 ^a	5	840.776	234.304	.000
Intercept	22092.020	1	22092.020	6156.510	.000
trt	4203.878	5	840.776	234.304	.000
Error	43.061	12	3.588		
Total	26338.959	18			
Corrected Total	4246.939	17			

a. R Squared = .990 (Adjusted R Squared = .986)

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาววรรณีญา วิชญุกิตติ เกิดเมื่อวันที่ 5 ธันวาคม พ.ศ. 2528 ที่จังหวัด กรุงเทพมหานคร สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร จากคณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏสวนสุนันทา เมื่อปีการศึกษา 2549 เข้าศึกษาต่อในหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีทางอาหาร ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อปีการศึกษา 2550

การนำเสนอผลงานทางวิชาการ

Vitchayakitti, W., Siripatrawan, U., and Sanguandeeikul, R. 2009. Total phenolic content and antimicrobial property of propolis from Nan province [CD-ROM] in Proceedings of the 35th congress on Science and Technology of Thailand. (Session H). October15-17, 2009 at The Tide Resort, Bangsaen Beach, Chonburi, Thailand.