

การเพิ่มประสิทธิภาพของสารสกัดเมล็ดมะเกี๋ยง *Cleistocalyx nervosum* var. *paniala*  
ด้วยสารดูดซับสำหรับการควบคุมแบคทีเรียก่อโรควางชนิดในแคนตาลูปตัดแต่ง

นางสาวนันทนิกส์ บาลเมือง



บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)  
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของวิทยานิพนธ์ ที่ส่งผ่านทางบัณฑิตวิทยาลัย

The abstract and full text of theses from the academic year 2011 in Chulalongkorn University Intellectual Repository (CUIR)  
are the thesis authors' files submitted through the University Graduate School.

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเทคโนโลยีทางอาหาร ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2558

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

INCREASING EFFICIENCY OF  
MA-KIANG *Cleistocalyx nervosum* var. *paniala* SEED EXTRACTS BY  
ADSORBENTS FOR CONTROLLING SOME PATHOGENIC BACTERIA IN FRESH  
CUT CANTALOUPE

Miss Nunthanics Balmuang



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 2015

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์

การเพิ่มประสิทธิภาพของสารสกัดเมล็ดมะเกี๋ยง  
*Cleistocalyx nervosum* var. *paniala* ด้วยสารดูดซับ  
สำหรับการควบคุมแบคทีเรียก่อโรคบางชนิดในแคนตาลูป  
ตัดแต่ง

โดย

นางสาวนันท์นิศ บาลเมือง

สาขาวิชา

เทคโนโลยีทางอาหาร

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

รองศาสตราจารย์ ดร.สุเมธ ตันตระเจียร

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้บัณฑิตวิทยาลัย  
ของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

..... คณบดีคณะวิทยาศาสตร์  
(รองศาสตราจารย์ ดร.พลกฤษณ์ แสงวงนิช)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ  
(รองศาสตราจารย์ ดร.นินนาท ชินประหัตษ์)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก  
(รองศาสตราจารย์ ดร.สุเมธ ตันตระเจียร)

..... กรรมการ  
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.จันทร์ประภา อิ่มจงใจรัก)

..... กรรมการ  
(อาจารย์ ดร.กิติพงศ์ อัครกุล)

..... กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย  
(รองศาสตราจารย์ ดร.วราวุฒิ ครูส่ง)

นันทนิล บาลเมือง : การเพิ่มประสิทธิภาพของสารสกัดเมล็ดมะเกี๋ยง *Cleistocalyx nervosum* var. *paniala* ด้วยสารดูดซับสำหรับการควบคุมแบคทีเรียก่อโรคบางชนิดในแคนตาลูปตัดแต่ง (INCREASING EFFICIENCY OF MA-KIANG *Cleistocalyx nervosum* var. *paniala* SEED EXTRACTS BY ADSORBENTS FOR CONTROLLING SOME PATHOGENIC BACTERIA IN FRESH CUT CANTALOUPE) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์  
หลัก: รศ. ดร.สุเมธ ตันตระเจียร, 82 หน้า.

งานวิจัยนี้มุ่งศึกษาการเพิ่มประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบเมล็ดมะเกี๋ยง (Ma-kiang seed extracts , MKSE) ด้วยสารดูดซับชนิดต่างๆ ในการต้านการเจริญของแบคทีเรียก่อโรค และนำสารสกัดที่ทำให้บริสุทธิ์บางส่วนด้วยสารดูดซับไปใช้ในการควบคุมจำนวนแบคทีเรียก่อโรคบางชนิด (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* และ *Salmonella Typhimurium*) ในแคนตาลูปตัดแต่ง การใช้สารดูดซับ 3 ชนิด ได้แก่ เรซินชนิดรูพรุนขนาดใหญ่ (MARs), ถ่านกัมมันต์ชนิดผง (PAC) และโพลีไวนิลไพร์โรลิโดน (PVPP) พบว่าการใช้สารดูดซับ MARs สามารถเพิ่มอัตราส่วนของสารประกอบฟีนอลิกและมีปริมาณของสารสกัดที่ถูกทำให้บริสุทธิ์บางส่วนได้สูงที่สุด โดย MARs สามารถดูดซับรูทีน และคาเทชินใน MKSE ได้ดีอีกด้วย สัดส่วนของ MARs ในการดูดซับคือ 37.5 mg ในสารละลาย MKSE 40 ml ที่ความเข้มข้น 12.5 mg/ml สามารถดูดซับสารประกอบฟีนอลิกได้สูงสุด ร่วมกับการใช้ความเข้มข้นเอทานอลร้อยละ 70 สามารถปลดปล่อยสารได้ดีและมีสารประกอบฟีนอลิกมากที่สุด โดยสามารถเพิ่มอัตราส่วนของสารประกอบฟีนอลิกได้สูงกว่าเดิม 7% จากนั้นได้นำ MKSE ที่ทำให้บริสุทธิ์บางส่วนด้วยสารดูดซับทั้ง 3 ชนิด มาเปรียบเทียบกับการต้านแบคทีเรียก่อโรค 3 ชนิด ได้แก่ แบคทีเรียแกรมลบ (*E. coli* และ *S. Typhimurium*) และแบคทีเรียแกรมบวก (*S. aureus*) ด้วยการทดสอบค่า MIC และ MBC โดยพบว่าหลังการทำให้บริสุทธิ์บางส่วนด้วย MARs และ PVPP สามารถเพิ่มประสิทธิภาพการยับยั้งแบคทีเรียได้ถึง 4 เท่าของ แต่การทำให้บริสุทธิ์บางส่วนด้วย PAC เพิ่มประสิทธิภาพการยับยั้งได้เพียง 2 เท่า ส่วนประสิทธิภาพการต้านแบคทีเรียของสารสกัดที่ถูกทำให้บริสุทธิ์บางส่วนด้วย MARs (ppMARs) ที่ปลดปล่อยด้วยตัวทำละลายที่เหมาะสม สามารถเพิ่มประสิทธิภาพการยับยั้งได้ 8 เท่า จึงได้นำสภาวะดังกล่าวมาใช้ในการควบคุมจำนวนแบคทีเรียก่อโรสดังกล่าวในแคนตาลูปตัดแต่ง ต่อไป พบว่าเวลาในการแช่แคนตาลูปที่เหมาะสมในการลดจำนวนจุลินทรีย์ เมื่อแช่ด้วยสารละลาย ppMARs ที่ความเข้มข้น 1 MBC คือ 3 นาที จึงนำมาใช้เป็นเวลาสำหรับการแช่แคนตาลูปตัดแต่งด้วยสารละลายต่างๆ และเมื่อศึกษาอายุการเก็บของแคนตาลูปตัดแต่งต่อการเปลี่ยนแปลงจำนวนเชื้อแบคทีเรียที่การเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 9 วัน พบว่า เมื่อแช่ด้วยน้ำกลั่นมีแบคทีเรียเจริญเติบโตอย่างต่อเนื่อง ในขณะที่การแช่ด้วย MKSE และ ppMARs สามารถลดจำนวน *E. coli* และควบคุมการเจริญของแบคทีเรีย *S. aureus* ได้ อย่างไรก็ตามปริมาณสาร ppMARs ในสารละลาย ความเข้มข้น 1 MBC มีปริมาณสารในสารละลายน้อยกว่าสารละลายของ MKSE ถึง 4 เท่า แต่การใช้สารละลาย ppMARs ก็ยังทำให้เกิดการเปลี่ยนสีของชิ้นแคนตาลูป จึงได้นำสารละลาย ppMARs ไปใช้ร่วมกับกรดซิตริก (CM) พบว่าสามารถเพิ่มประสิทธิภาพของสารละลาย ppMARs ด้านการควบคุมจำนวนแบคทีเรียทั้งหมด และ *S. Typhimurium* นอกจากนี้สามารถลดจำนวนของ *E. coli* และ *S. aureus* ได้ในระหว่างการเก็บรักษา ทั้งยังช่วยปรับปรุงลักษณะปรากฏได้แก่ สีของชิ้นแคนตาลูปตัดแต่งให้ดีขึ้น

ภาควิชา เทคโนโลยีทางอาหาร

ลายมือชื่อนิสิต .....

สาขาวิชา เทคโนโลยีทางอาหาร

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาหลัก .....

ปีการศึกษา 2558

# # 5572225623 : MAJOR FOOD TECHNOLOGY

KEYWORDS: MA-KIANG SEED EXTRACT / ADSORBENT / ANTIMICROBIAL ACTIVITY

NUNTHANICS BALMUANG: INCREASING EFFICIENCY OF MA-KIANG *Cleistocalyx nervosum* var. *paniala* SEED EXTRACTS BY ADSORBENTS FOR CONTROLLING SOME PATHOGENIC BACTERIA IN FRESH CUT CANTALOUPE. ADVISOR: ASSOC. PROF. SUMATE TANTRATIAN, Ph.D., 82 pp.

The objectives of this study were to improve the antimicrobial activity of Ma-kiang seed extracts (MKSE) using adsorbents and application for controlling the selected pathogenic bacteria (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Salmonella Typhimurium*) in fresh cut cantaloupe. The adsorbents used in this study were macroporous resin (MARs), powdered activated carbon (PAC) and polyvinyl polypyrrolidone (PVPP). The results showed that partially purified MKSE with MARs (ppMARs) contained the highest phenolic compounds which found to adsorb rutin and catechin well and gave the highest yield. It was found that appropriate ratio of 37.5 mg MARs to MKSE at 40 ml of 12.5 mg/ml MKSE solution and 70% ethanol in desorption step was suitable for increasing the phenolic content at and. The antimicrobial activity of partially purified MKSE against gram positive (*S. aureus*) and gram negative (*E. coli* and *S. Typhimurium*) pathogenic bacteria were determined. It revealed that ppMARs and ppPVPP could increased the inhibition efficiency by 4-fold as compared to MKSE while the partially purified with PAC could showed by 2 fold. The appropriate adsorption-desorption of ppMARs showed antimicrobial activity by 8-fold compared with MKSE. For further experiment, ppMARs was chosen for controlling the pathogenic bacteria in fresh cut cantaloupe. It was found that soaking cantaloupe in 1 MBC for 3 mins provided significant reduction in bacterial number. So it is set for the time for soaking the cut cantaloupe. The study on the storage of cut cantaloupe under 4 °C after soaked in various solutions, it was found that soaking with water did not inhibit the growth of bacteria while soaking with 1 MBC of MKSE and ppMARs could reduce number of *E. coli* and *S. aureus* during storage. We found that the solution of 1 MBC of ppMARs contained less solid substance by 4 fold. The cut cantaloupe soaking in ppMARs solutions showed darkening in color during storage. The mixture of citric acid and ppMARs solution found to have efficiency to control the color of cut cantaloupe and also total bacteria count of studied pathogenic bacteria.

Department: Food Technology

Student's Signature .....

Field of Study: Food Technology

Advisor's Signature .....

Academic Year: 2015

## กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. สุเมธ ตันตระเจียร อาจารย์ที่ปรึกษา ที่ให้คำปรึกษาและคำแนะนำในงานวิจัย ให้ความช่วยเหลือ ตลอดดูแลให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้มีความถูกต้องสมบูรณ์

ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. นินนาท ชินประหัชชัฐ ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ รวมถึง ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.จันทรประภา อิ่มจงใจรัก อาจารย์ ดร.กิติพงศ์ อัครกุล คณะกรรมการการสอบวิทยานิพนธ์ และ รองศาสตราจารย์ ดร.วราวุฒิ ครุสง์ กรรมการผู้ทรงคุณวุฒิภายนอก เป็นอย่างสูงที่ได้ให้คำแนะนำ ชี้แนะข้อบกพร่อง ตลอดจนเสียสละเวลาอันมีค่าตรวจสอบแก้ไขวิทยานิพนธ์และทำให้วิทยานิพนธ์นี้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณการสนับสนุนทุนวิจัยจาก “ทุน 90 ปี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย” กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ขอขอบคุณสถาบันวิจัยเทคโนโลยีเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลล้านนา จังหวัดลำปาง ที่เอื้อเพื่อสนับสนุนมะเกี๋ยงอันเป็นวัตถุดิบหลักในงานวิจัยนี้

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่และบุคลากร ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยทุกท่านที่คอยให้ความช่วยเหลือในการทำงานวิจัย

ขอขอบคุณเพื่อนๆ พี่ๆ น้องๆ ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้กำลังใจ และความช่วยเหลือต่างๆ ในทุกๆด้านตลอดระยะเวลาการศึกษาและการทำงานวิจัย

ท้ายสุดผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดา และสมาชิกทุกคนในครอบครัว รวมทั้งญาติผู้ใหญ่ทุกท่าน ที่ให้การสนับสนุน รวมถึงกำลังใจอันเป็นแรงผลักดันจนวันนี้ได้บรรลุสำเร็จดังที่หวังไว้

## สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ฎ
สารบัญภาพ .....	ฏ
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ .....	ด
บทที่ 1 บทนำ .....	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....	1
1.2 วัตถุประสงค์และขอบเขตงานวิจัย .....	2
1.3 ประโยชน์ที่ได้รับจากงานวิจัย .....	2
บทที่ 2 วารสารปริทัศน์.....	3
2.1 มะเกี้ยง (Ma-kiang).....	3
2.2 สารประกอบฟีนอลิก.....	4
2.2.1 กรดฟีนอลิก (Phenolic acids).....	5
2.2.2 ฟลาโวนอยด์ (flavonoids) .....	7
2.2.2.1 ฟลาโวน (Flavone).....	7
2.2.2.2 ฟลาโวนอล (Flavonols) .....	7
2.2.2.3 ฟลาวานอล (Flavanols) .....	8
2.2.2.4 ฟลาวาโนน (Flavanone) .....	8
2.2.2.5 ฟลาวาโนนอล (Flavanonols).....	8
2.2.2.6 ไอโซฟลาโวน (Isoflavones).....	8

2.2.2.7 แอนโทไซยานิน (anthocyanin) .....	8
2.2.3 แทนนิน (Tannin) .....	9
2.3 การสกัดสารประกอบฟีนอลิก (phenolic extraction) .....	12
2.3.1 การสกัดด้วยตัวทำละลาย (solid-liquid extraction).....	12
2.4 การทำให้สารประกอบฟีนอลิกบริสุทธิ์บางส่วน .....	14
2.4.1 กระบวนการดูดซับ (Adsorption process).....	14
2.4.2 สารดูดซับ .....	17
2.4.2.1 ถ่านกัมมันต์ (Powdered activated carbon, PAC) .....	17
2.4.2.2 เรซินรูพรุนขนาดใหญ่ (Macroporous resins, MARs) .....	18
2.4.2.3 โพลีไวนิล โพลีไพร์โรลิดอน (PVPP).....	19
2.4.3 การปลดปล่อยสารประกอบฟีนอลิกจากสารดูดซับ .....	21
2.5 ความสามารถในการต้านการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ของสารสกัดหยาบจากพืช .....	22
2.6 แบคทีเรียก่อโรค .....	24
2.6.1 <i>Escherichia coli</i> .....	24
2.6.2 <i>Staphylococcus aureus</i> .....	25
2.6.3 <i>Salmonella Typhimurium</i> .....	26
2.7 การปนเปื้อนจุลินทรีย์แคนดิดาอุปดัดแต่ง .....	27
2.8 การล้างผักและผลไม้ดัดแต่ง .....	28
2.8.1 การใช้สารสกัดจากพืชในการควบคุมแบคทีเรียในผักและผลไม้ .....	29
2.8.2 การใช้กรดซิตริกในการควบคุมแบคทีเรียและสมบัติทางกายภาพในผลไม้ดัดแต่ง .....	29
2.8.3 ประสิทธิภาพกรดซิตริกร่วมกับสารสกัดจากพืชต่อการลดจำนวนเชื้อจุลินทรีย์ในผักและผลไม้ .....	30
บทที่ 3 วัสดุ อุปกรณ์และวิธีการทดลอง .....	31



3.1	วัตถุประสงค์ และสารเคมี.....	31
3.1.1	วัตถุประสงค์.....	31
3.1.2	แบคทีเรียที่ใช้ทดสอบ.....	31
3.1.3	อุปกรณ์และเครื่องมือ.....	31
3.1.4	เครื่องมือ.....	32
3.1.5	วัสดุที่เป็นสารดูดซับ.....	33
3.1.6	สารเคมีและอาหารเลี้ยงเชื้อ.....	34
3.2	ขั้นตอนการวิจัย.....	35
3.2.1	การเตรียมตัวอย่างสารสกัดหยาบเมล็ดมะเกี๋ยง.....	35
3.2.1.1	การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด.....	35
3.2.1.2	วิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมด.....	36
3.2.1.3	การตรวจวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดหยาบเมล็ดมะเกี๋ยง ด้วยเครื่อง HPLC (High-performance liquid chromatography)....	36
3.2.2	การศึกษาชนิดของสารดูดซับที่เหมาะสมในการเพิ่มอัตราสารประกอบฟีนอลิกจาก สารสกัดหยาบเมล็ดมะเกี๋ยง.....	37
3.2.3	การศึกษาสัดส่วนของสารดูดซับที่เหมาะสมต่อปริมาณสารสกัดแห้งที่ได้และ อัตราส่วนของสารประกอบฟีนอลิกที่ได้.....	39
3.2.4	การศึกษาชนิดของความเข้มข้นเอทานอลที่เหมาะสมในการเพิ่มอัตรา สารประกอบฟีนอลิกจากสารสกัดหยาบเมล็ดมะเกี๋ยง.....	39
3.2.5	การศึกษาฤทธิ์การต้านแบคทีเรียก่อโรคของ สาร pp ด้วยสารดูดซับชนิดต่างๆ...40	
3.2.5.1	การเตรียมเชื้อแบคทีเรีย.....	40
3.2.5.2	การทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียก่อโรคของสาร pp ด้วยสารดูดซับชนิด ต่างๆ ด้วยวิธีดิสก์ ดิฟฟิวชัน (disc diffusion method; DDM).....	40

3.2.5.3 การทดสอบค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสาร pp ด้วยสารดูดซับชนิดต่างๆที่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียได้ หรือค่า MIC (minimum inhibitory concentration) โดยมาโครบรอตไดลูชัน macro Broth Dilution Technique .....	41
3.2.5.4 ทดสอบค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสาร pp ด้วยสารดูดซับที่สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรียได้ หรือค่า MBC (minimum bactericidal concentration).....	42
3.2.6 การศึกษาฤทธิ์การต้านแบคทีเรียก่อโรคของสาร pp ด้วยสารดูดซับที่ใช้ความเข้มข้นเอทานอลแตกต่างกัน .....	43
3.2.7 การศึกษาการใช้สารละลาย pp ด้วยสารดูดซับที่เหมาะสมร่วมกับกรดซิตริกเพื่อใช้ในการควบคุมการเจริญของแบคทีเรียในแคนดาลูบตัดแต่งและผลทางด้านสีของแคนดาลูบตัดแต่ง .....	43
3.2.7.1 เตรียมตัวอย่าง .....	43
3.2.7.2 การศึกษาเวลาในการแช่แคนดาลูบของสารละลาย pp ด้วยสารดูดซับที่เหมาะสมเพื่อลดจำนวนของเชื้อแบคทีเรียก่อโรค .....	43
3.2.7.3 ศึกษาเวลาในการแช่แคนดาลูบของสารละลาย pp ด้วยสารดูดซับที่เหมาะสมต่อค่าสีของแคนดาลูบก่อนแช่และหลังแช่ .....	44
3.2.7.4 ศึกษาการใช้สารละลาย pp ด้วยสารดูดซับ กรดซิตริก และ สารละลาย pp ด้วยสารดูดซับร่วมกับกรดซิตริกเพื่อลดจำนวนของเชื้อแบคทีเรียทั้งหมด และ แบคทีเรียก่อโรคบางชนิดในแคนดาลูบตัดแต่ง .....	45
3.2.7.5 ศึกษาการใช้สารละลาย pp ด้วยสารดูดซับ กรดซิตริก และ สารละลาย pp ด้วยสารดูดซับร่วมกับกรดซิตริกเพื่อควบคุมค่าสีของแคนดาลูบตัดแต่ง.....	45
บทที่ 4 ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง .....	46
4.1 ปริมาณสารสกัดแห้งและสารประกอบฟีนอลิกของสารสกัดหยาบเมล็ดมะเกี๋ยง .....	46

4.2 การเพิ่มอัตราส่วนของสารประกอบฟีนอลิกของ MKSE ที่ทำให้บริสุทธิ์บางส่วนด้วยสาร ดูดซับชนิดต่างๆ .....	47
4.3 ผลของสัดส่วนของสารดูดซับที่เหมาะสมในการดูดซับสารประกอบฟีนอลิก และความ เข้มข้นเอทานอลที่ใช้ในการปลดปล่อยสารประกอบฟีนอลิกจากสารดูดซับที่เหมาะสม..50	
4.4 การเพิ่มประสิทธิภาพการต้านแบคทีเรียก่อโรคของ MKSE ที่ทำให้บริสุทธิ์บางส่วนด้วย สารดูดซับ .....	53
4.5 การเพิ่มประสิทธิภาพการต้านแบคทีเรียก่อโรคของสาร ppMARs ที่การปลดปล่อยด้วย ความเข้มข้นของเอทานอลที่แตกต่างกัน .....	55
4.6 เวลาที่เหมาะสมในการแช่แคนตาลูปตัดแต่งของสารละลาย ppMARs เพื่อการลดจำนวน ของเชื้อแบคทีเรียก่อโรบบางชนิดและผลต่อค่าสีที่เปลี่ยนแปลงของแคนตาลูปตัดแต่ง ...58	
4.7 ประสิทธิภาพของสารสกัดชนิดต่างๆ กรดซิตริก และการใช้สารละลาย ppMARs ร่วมกับ กรดซิตริกในการแช่แคนตาลูปตัดแต่งเพื่อลดจำนวนเชื้อแบคทีเรีย .....	61
บทที่ 5 สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ .....	70
5.1 สรุปผลการทดลอง .....	70
5.2 ข้อเสนอแนะ .....	70
รายการอ้างอิง .....	71
ภาคผนวก ก .....	73
ภาคผนวก ข .....	78
ภาคผนวก ค .....	79
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์ .....	82

## สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 2.1	แหล่งการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ในผักและผลไม้ระหว่างกระบวนการผลิต.....	28
ตารางที่ 3.1	ความเข้มข้นของสาร pp ด้วยสารดูดซับชนิดต่างๆบนหลอดทดลองเพื่อหาค่า MIC.....	42
ตารางที่ 4.1	ปริมาณสารสกัดแห้งและสารประกอบฟีนอลิกของสารสกัดหยาบเมล็ดมะเกี๋ยง.....	46
ตารางที่ 4.2	ชนิดและปริมาณ (%โดยน้ำหนัก) ของสารประกอบฟีนอลิกในสารสกัดหยาบเมล็ดมะเกี๋ยง.....	46
ตารางที่ 4.3	อิทธิพลของชนิดของสารดูดซับต่อปริมาณสารสกัดและร้อยละความเข้มข้นของสารประกอบฟีนอลิกที่มีอยู่ใน MKSE ที่ทำให้บริสุทธิ์บางส่วนด้วยสารดูดซับ..	48
ตารางที่ 4.4	ร้อยละโดยน้ำหนัก (% recovery) ของปริมาณและชนิดของสารประกอบฟีนอลิกของ สารสกัดที่ทำให้บริสุทธิ์บางส่วนด้วยสารดูดซับชนิดต่างๆจาก MKSE.....	49
ตารางที่ 4.5	ผลของสัดส่วนของ MARs ต่อปริมาตรสารละลาย MKSE (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ต่อปริมาณสารสกัดของผงเมล็ดมะเกี๋ยงและร้อยละ(โดยน้ำหนัก) ของความเข้มข้นของสารประกอบฟีนอลิกที่มีอยู่ในสาร ppMARS.....	51
ตารางที่ 4.6	ผลของความเข้มข้นเอทานอลที่แตกต่างกันต่อปริมาณสารสกัดที่ได้ ร้อยละโดยน้ำหนักของ TPC และ TFC (ที่มีอยู่ใน ppMARS).....	52
ตารางที่ 4.7	ค่าเส้นผ่านศูนย์กลางโชนการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย 3 ชนิดด้วย MKSE ที่ไม่ผ่านและที่ผ่านสารดูดซับ.....	53
ตารางที่ 4.8	ประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรีย (MIC, mg/ml) ของสาร pp ด้วยสารดูดซับชนิดต่างๆ.....	55
ตารางที่ 4.9	ประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรีย (MBC, mg/ml) ของสาร pp ด้วยสารดูดซับชนิดต่างๆ.....	55
ตารางที่ 4.10	ค่าเส้นผ่านศูนย์กลางโชนการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย 3 ชนิดของสาร ppMARS ที่ desorption ด้วยความเข้มข้นเอทานอลแตกต่างกัน.....	57

ตารางที่ 4.11 ประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรีย (MIC, mg/ml) ของสาร ppMARs ที่ desorption ด้วยความเข้มข้นของเอทานอลแตกต่างกันในการต้านแบคทีเรียทั้ง 3 ชนิด .....58

ตารางที่ 4.12 ประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรีย (MBC, mg/ml) ของสาร ppMARs ที่ desorption ด้วยความเข้มข้นของเอทานอลแตกต่างกันในการต้านแบคทีเรียทั้ง 3 ชนิด .....58

ตารางที่ 4.13 เวลาในการแช่แคนตาลูปตัดแต่งด้วยสารละลาย ppMARs ต่อจำนวนแบคทีเรียก่อโรคบางชนิด .....60

ตารางที่ 4.14 ความแตกต่างของสีแคนตาลูปตัดแต่งก่อนแช่และหลังแช่ด้วยสารละลาย ppMARs ที่ระยะเวลาต่างๆ .....61

ตารางที่ 4.15 ค่าพีเอช (pH) ของสารละลาย MKSE; สารละลาย ppMARs; กรดซิตริก (CA) และสารละลาย ppMARs ร่วมกับกรดซิตริก (CM) .....63



## สารบัญภาพ

	หน้า
ภาพที่ 2.1 ลักษณะของผลมะเกี๋ยง .....	3
ภาพที่ 2.2 โครงสร้างทางเคมีพื้นฐานของสารประกอบฟีนอลิก .....	5
ภาพที่ 2.3 โครงสร้างทางเคมีของกรดฟีนอลิกทั้ง 2 กลุ่ม .....	6
ภาพที่ 2.4 โครงสร้างฟลาโวนอยด์ .....	7
ภาพที่ 2.5 โครงสร้างฟลาโวนอยด์ชนิดต่างๆ .....	9
ภาพที่ 2.6 โครงสร้างของแทนนิน .....	10
ภาพที่ 2.7 โครงสร้างทางเคมีของ hydrolysable tannins .....	10
ภาพที่ 2.8 โครงสร้างทางเคมีของ condensed tannins .....	11
ภาพที่ 2.9 โครงสร้างทางเคมีของ PVPP - $(C_6H_9NO)_n = (111.1)_n$ .....	20
ภาพที่ 2.10 ลักษณะปรากฏโดยทั่วไปและพื้นผิวส่วนสัณฐานวิทยาของ PVPP เมื่อส่องโดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน (electron microscope) .....	20
ภาพที่ 2.11 การดูดซับของคาเทชิน (catechin) โดย PVPP รวมทั้งอิเล็กตรอนในออร์บิทัลโมเลกุลไม่ได้้อยู่ประจำที่ (delocalized electrons) .....	21
ภาพที่ 4.1 การเปลี่ยนแปลงจำนวนเชื้อแบคทีเรียทั้งหมด (TBC) ของแคนดาลูบที่ไม่ได้แช่ (un-treated); แคนดาลูบที่แช่น้ำกลั่นปลอดเชื้อ (water); แคนดาลูบที่แช่ด้วยกรดซิตริก (CA); แคนดาลูบที่แช่ในสารละลาย ppMARs; แคนดาลูบที่แช่ในสารละลาย MKSE และแคนดาลูบที่แช่ในสารละลาย ppMARs ร่วมกับกรดซิตริกความเข้มข้น (CM) ระหว่างเก็บรักษาที่อุณหภูมิ $4\pm 2$ องศาเซลเซียส เป็นเวลา 9 วัน .....	62
ภาพที่ 4.2 การเปลี่ยนแปลงจำนวนเชื้อแบคทีเรีย <i>E. coli</i> ในแคนดาลูบตัดแต่งของแคนดาลูบที่ไม่ได้แช่ (un-treated); แคนดาลูบที่แช่น้ำกลั่น (water); แคนดาลูบที่แช่ด้วยกรดซิตริก (CA); แคนดาลูบที่แช่ในสารละลาย ppMARs; แคนดาลูบที่แช่ในสารละลาย MKSE และแคนดาลูบที่แช่ในสารละลาย ppMARs ร่วมกับกรดซิตริกความเข้มข้น (CM) ระหว่างเก็บรักษาที่อุณหภูมิ $4\pm 2$ องศาเซลเซียส เป็นเวลา 9 วัน .....	64

ภาพที่ 4.3	การเปลี่ยนแปลงจำนวนเชื้อแบคทีเรีย <i>S. Typhimurium</i> ของแคนดาลูปที่ไม่ได้แช่ (un-treated); แคนดาลูปที่แช่น้ำกลั่นปลอดเชื้อ (water); แคนดาลูปที่แช่ด้วยกรดซิตริก (CA); แคนดาลูปแช่ในสารละลาย ppMARs ; แคนดาลูปที่แช่ในสารละลาย MKSE และแคนดาลูปที่แช่ในสารละลาย ppMARs ร่วมกับกรดซิตริกความเข้มข้น (CM) ระหว่างเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4±2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 9 วัน.....	65
ภาพที่ 4.4	การเปลี่ยนแปลงจำนวนเชื้อแบคทีเรีย <i>S. aureus</i> ของแคนดาลูปที่ไม่ได้แช่ (un-treated); แคนดาลูปที่แช่น้ำกลั่นปลอดเชื้อ (water); แคนดาลูปที่แช่ด้วยกรดซิตริก (CA); แคนดาลูปแช่ในสารละลาย ppMARs; แคนดาลูปที่แช่ในสารละลาย MKSE และแคนดาลูปที่แช่ในสารละลาย .....	66
ภาพที่ 4.5	สีของสารสกัดและกรดซิตริก ที่ความเข้มข้น 1 MBC ได้แก่ (1) สารละลาย MKSE; (2) สารละลาย ppMARs; (3) กรดซิตริก (CA); และ (4) สารละลาย ppMARs (0.5 MBC) ร่วมกับกรดซิตริก (0.5 MBC) (CM).....	67
ภาพที่ 4.6	การเปลี่ยนแปลงของค่าสีของค่า $L^*$ ของแคนดาลูปที่ไม่ได้แช่ (un-treated); แคนดาลูปที่แช่น้ำกลั่นปลอดเชื้อ (water); แคนดาลูปที่แช่ด้วยกรดซิตริก (CA); แคนดาลูปแช่ในสารละลาย ppMARs; แคนดาลูปที่แช่ในสารละลาย MKSE และ แคนดาลูปที่แช่ในสารละลาย ppMARs ร่วมกับกรดซิตริกความเข้มข้น (CM) ระหว่างเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4±2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 9 วัน .....	68
ภาพที่ 4.7	การเปลี่ยนแปลงของค่าสีของค่า $a^*$ ของ แคนดาลูปที่ไม่ได้แช่ (un-treated); แคนดาลูปที่แช่น้ำกลั่นปลอดเชื้อ (water); แคนดาลูปที่แช่ด้วยกรดซิตริก (CA); แคนดาลูปแช่ในสารละลาย ppMARs; แคนดาลูปที่แช่ในสารละลาย MKSE และ แคนดาลูปที่แช่ในสารละลาย ppMARs ร่วมกับกรดซิตริกความเข้มข้น (CM) ระหว่างเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4±2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 9 วัน .....	69
ภาพที่ 4.8	ลักษณะปรากฏของแคนดาลูปที่ไม่ได้แช่ (un-treated); แคนดาลูปที่แช่น้ำกลั่นปลอดเชื้อ (water); แคนดาลูปที่แช่ด้วยกรดซิตริก (CA); แคนดาลูปแช่ในสารละลาย ppMARs ; แคนดาลูปที่แช่ในสารละลาย MKSE และ แคนดาลูปที่แช่ในสารละลาย ppMARs ร่วมกับกรดซิตริกความเข้มข้น (CM) ระหว่างเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4±2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 9 วัน .....	69
ภาพที่ ก.1	กราฟมาตรฐานกรดแกลลิก (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร).....	86
ภาพที่ ก.2	กราฟมาตรฐานเคอร์ซีทิน (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร).....	87

ภาพที่ ก.3	โครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐาน.....	88
ภาพที่ ก.4	โครมาโทแกรมของสารสกัดหยาบเม็ล็ดมะเกี๋ยง.....	88
ภาพที่ ก.5	โครมาโทแกรมของสารสกัดที่ทำให้บริสุทธิ์บางส่วนด้วย MARs.....	89
ภาพที่ ก.6	โครมาโทแกรมของสารสกัดที่ทำให้บริสุทธิ์บางส่วนด้วย PAC.....	89
ภาพที่ ก.7	โครมาโทแกรมของสารสกัดที่ทำให้บริสุทธิ์บางส่วนด้วย PVPP.....	89





## คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

MKSE (Ma-kiang seed extracts) สารสกัดหยาบเมล็ดมะเกี๋ยง

MARs (Macroporous resins) เรซินรูพรุนขนาดใหญ่

PAC (powdered activated carbon) ถ่านกัมมันต์ชนิดผง

PVPP (polyvinylpyrrolidone) โพลีไวนิล-โพลีไพร์โรลิโดน

pp (partially purified) การทำให้บริสุทธิ์บางส่วน

ppMARs (partially purified with MARs) สารสกัดที่ทำให้บริสุทธิ์บางส่วนด้วย MARs

ppPAC (partially purified with PAC) สารสกัดที่ทำให้บริสุทธิ์บางส่วนด้วย PAC

ppPVPP (partially purified with PVPP) สารสกัดที่ทำให้บริสุทธิ์บางส่วนด้วย PVPP

GAE (gallic acid equivalent)

QE (quercetin equivalent)



## บทที่ 1

### บทนำ

#### 1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

มะเกี๋ยงมีชื่อวิทยาศาสตร์คือ *Cleistocalyx nervosum* var. *paniala* เป็นพืชวงศ์ Myrtaceae เจริญ และพบมากในภาคเหนือตอนบนของประเทศไทย ออกผลในช่วงเดือนกรกฎาคม ถึงสิงหาคม เมล็ดนำมาสกัดน้ำมันหอมระเหยได้ ด้านอุตสาหกรรมอาหารนิยมนำผลมะเกี๋ยงไปแปรรูป เป็นผลิตภัณฑ์อาหาร เช่น แยมมะเกี๋ยง ไวน์มะเกี๋ยง น้ำมะเกี๋ยง เป็นต้น และจากการแปรรูปผล มะเกี๋ยงทำให้มีเมล็ดมะเกี๋ยงเหลือเป็นของเสีย ทั้งนี้เมล็ดมะเกี๋ยงมีสารประกอบฟีนอลิกในปริมาณสูง โดยสารประกอบฟีนอลิกนั้นพบว่ามีคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระ และต้านการเจริญของแบคทีเรีย องค์ประกอบที่สำคัญของสารสกัดเมล็ดมะเกี๋ยงเป็นสารจำพวกเทอร์พีนแอลกอฮอล์ซึ่งมีกลิ่นหอม โดย เบื้องต้นสารประกอบฟีนอลิกที่พบในเมล็ดมะเกี๋ยง จะอยู่ในกลุ่มฟลาโวนอยด์ ซาโปนิน และแทนนิน สำหรับสมบัติการต้านจุลินทรีย์ของสารประกอบฟีนอลิก พบว่าเมื่อสกัดแยกส่วนด้วยตัวทำละลาย อินทรีย์ และตรวจพิสูจน์ชนิดสารองค์ประกอบหลักในสารสกัดด้วยเอทิลอะซิเตต พบสารประกอบ ฟีนอลิก เช่น กรดแกลลิก กรดเอลลาจิก เป็นต้น และสามารถแยกสารบริสุทธิ์ได้ในกลุ่มซาลิโคน (พิมพ์ใจ อาษา, 2551) นอกจากนี้สารสกัดเอทานอลของดอกตูมของหว่าขาว (*Cleistocalyx operculatus* Roxb) ซึ่งเป็นตระกูลเดียวกับมะเกี๋ยงมีสารฟลักซ์เคมี ได้แก่ สเตอรอล ฟลาโวนอน และซาลิโคนซึ่งเป็นองค์ประกอบหลัก มีสมบัติต้านการเจริญแบคทีเรียแกรมบวกได้ดีกว่าแกรมลบ สามารถยับยั้ง *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* และ *Listeria monocytogenes* โดยมีค่า MIC อยู่ในช่วง 0.25 – 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร และมีค่า MBC อยู่ในช่วงระหว่าง 1-2 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร (Dung และคณะ, 2008) การเพิ่มประสิทธิภาพของสาร สกัดเมล็ดมะเกี๋ยงด้วยสารดูดซับจัดว่าเป็นวิธีที่สามารถเพิ่มอัตราส่วนของสารประกอบฟีนอลิกที่ ต้องการในสารสกัดขยายมาใช้ในการยับยั้งจุลินทรีย์ได้ โดยปัจจัยสำคัญที่ส่งผลต่อความสามารถใน การเพิ่มอัตราส่วนสารประกอบฟีนอลิกของสารดูดซับ ได้แก่ กลไกของสารดูดซับในการดูดซับ สารประกอบฟีนอลิก นอกจากนี้ยังมีปัจจัยของความเข้มข้นของตัวทำละลายที่เหมาะสมในการแยก สารประกอบฟีนอลิก ซึ่งส่งผลต่อปริมาณและชนิดของสารประกอบฟีนอลิกที่ได้ โดยมีการศึกษาใน ด้านประสิทธิภาพทางเคมีเท่านั้น แต่ยังไม่มีการศึกษาประสิทธิภาพในการต้านแบคทีเรียก่อโรค รวมทั้งในปัจจุบันผู้บริโภคนิยมรับประทานผลไม้สดตัดแต่งโดยเฉพาะแคนตาลูป จึงมีแนวคิดนำสาร สกัดเมล็ดมะเกี๋ยงที่ทำให้บริสุทธิ์บางส่วนด้วยสารดูดซับมาใช้ร่วมกับกรดซิตริก ไปใช้ในแคนตาลูปตัด แต่งเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการควบคุมปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนในแคนตาลูปตัดแต่ง ซึ่งพบว่า

การปนเปื้อนของแบคทีเรียก่อโรคโดยเฉพาะร้านขายผลไม้สดในเขตกรุงเทพฯ และปริมณฑลจากการสำรวจพบว่ามีการปนเปื้อนแบคทีเรียก่อโรคในระดับที่เกินมาตรฐานกฎหมายกำหนด

## 1.2 วัตถุประสงค์และขอบเขตงานวิจัย

- 1.2.1 เพื่อศึกษาสารดูดซับที่เหมาะสมในการเพิ่มอัตราส่วนของสารประกอบฟีนอลิกเพื่อนำไปใช้เพิ่มประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรียได้
- 1.2.2 เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของสารดูดซับที่ใช้ในกระบวนการดูดซับและปลดปล่อยต่อการเพิ่มอัตราส่วนของสารประกอบฟีนอลิกและประสิทธิภาพการยับยั้งแบคทีเรีย
- 1.2.3 เพื่อศึกษาเวลาที่เหมาะสมในการใช้สารสกัดหยาบเมล็ดมะเกี๋ยงที่ทำให้บริสุทธิ์บางส่วนด้วยสารดูดซับที่เหมาะสมในการลดและควบคุมเชื้อแบคทีเรียก่อโรคบางชนิดในแคนตาลูปตัดแต่ง
- 1.2.4 เพื่อศึกษาการใช้สารสกัดเมล็ดมะเกี๋ยงที่ทำให้บริสุทธิ์บางส่วนด้วยสารดูดซับที่เหมาะสมร่วมกับกรดซิตริกในการลดและควบคุมเชื้อแบคทีเรียก่อโรคบางชนิดในแคนตาลูปตัดแต่ง

## 1.3 ประโยชน์ที่ได้รับจากงานวิจัย

- 1.3.1 ได้สารดูดซับที่เหมาะสมในการเพิ่มอัตราส่วนของสารประกอบฟีนอลิกเพื่อนำไปใช้เพิ่มประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรียได้
- 1.3.2 ได้สภาวะที่เหมาะสมของสารดูดซับที่ใช้ในกระบวนการดูดซับและปลดปล่อยต่อการเพิ่มอัตราส่วนของสารประกอบฟีนอลิกและประสิทธิภาพการยับยั้งแบคทีเรีย
- 1.3.3 ได้เวลาที่เหมาะสมในการใช้สารสกัดหยาบเมล็ดมะเกี๋ยงที่ทำให้บริสุทธิ์บางส่วนด้วยสารดูดซับในการลดเชื้อแบคทีเรียก่อโรคบางชนิดในแคนตาลูปตัดแต่งและลักษณะปรากฏ ได้แก่ ค่าสีของแคนตาลูปตัดแต่ง
- 1.3.4 การใช้สารสกัดเมล็ดมะเกี๋ยงที่ทำให้บริสุทธิ์บางส่วนด้วยสารดูดซับร่วมกับกรดซิตริกสามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการควบคุมเชื้อแบคทีเรียก่อโรคบางชนิดในแคนตาลูปตัดแต่งของสารสกัดหยาบเมล็ดมะเกี๋ยงได้และลักษณะปรากฏ ได้แก่ ค่าสีของแคนตาลูปตัดแต่ง

## บทที่ 2 วารสารปริทัศน์

### 2.1 มะเกี๋ยง (Ma-kiang)

มะเกี๋ยง มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Cleistocalyx nervosum* (DC.) Kost.var. *paniala* (Roxb.) Parn.& Chant. เป็นพืชในอันดับ Myrtales จัดอยู่ในวงศ์ Myrtaceae มะเกี๋ยงเป็นไม้ยืนต้นขนาดกลางถึงขนาดใหญ่ โดยอาจสูงได้ถึง 20 เมตร อย่างไรก็ตามความสูงลำต้นเฉลี่ยอยู่ที่ประมาณ 10-15 เมตร ต้นมะเกี๋ยงมีเส้นผ่านศูนย์กลางทรงพุ่มประมาณ 8-12 เมตร

ผลมะเกี๋ยงประกอบด้วยเนื้อ และเมล็ด ผลอ่อนมีสีเหลืองปนเขียว ผลแก่มีเปลือกบางสีแดงปนม่วงถึงม่วงปนดำ โดยเนื้อผลชั้นในเป็นเยื่อบางหุ้มรอบเมล็ด ในผลหนึ่งๆมีเมล็ดเพียง 1 เมล็ด ลักษณะของเมล็ดมะเกี๋ยงนั้นเป็นรูปไข่หรือกลมขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.8-1.0 เซนติเมตร ภายในเมล็ดมีหลายเอ็มบริโอ (poly embryony) เรียงตามขวางของเมล็ด เมล็ดมะเกี๋ยงมีสีน้ำตาลอ่อนภายในสีเขียว และนำมาสกัดน้ำมันหอมระเหยได้ องค์ประกอบหลักที่สำคัญของน้ำมันเมล็ดมะเกี๋ยงคือ ลินาโลอล (linalool) เป็นสารจำพวกเทอร์พีน ซึ่งมีกลิ่นหอม (ทงศ์กัณฑ์ มณีวรรณ, 2544) ลักษณะของผลมะเกี๋ยงแสดงตามภาพที่ 2.1



ภาพที่ 2.1 ลักษณะของผลมะเกี๋ยง

ที่มา: สำนักงานโครงการอนุรักษ์พันธุพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ (2558)

ผลมะเกี๋ยงมีรสเปรี้ยวและมีกลิ่นหอมเฉพาะตัว จากการทดสอบองค์ประกอบทางเคมีของลูกมะเกี๋ยงสุกด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟี พบว่าสีของเปลือกผลมีสารกลุ่มแอนโทไซยานิน (anthocyanin) เป็นองค์ประกอบหลัก ได้แก่ ไซยานิดิน-3-กลูโคไซด์ (cyanidin 3-glucoside) ส่วนเนื้อผลสุกพบว่ามีกรดซิตริก (citric acid) และกรดมาลิก (malic acid) ซึ่งเป็นกรดอินทรีย์ที่ให้รสเปรี้ยว (ทวีพร อุณจักร, 2545) โดยมีน้ำหนักต่อผลประมาณ 1.4-2.4 กรัม

มะเขี๋ยงพบได้ในประเทศอินเดีย พม่า และเขตภาคเหนือตอนบนของประเทศไทย จากการสำรวจในพื้นที่ดังกล่าวระหว่างปี พ.ศ. 2537-2538 พบต้นมะเขี๋ยงในพื้นที่จังหวัดเชียงใหม่ เชียงราย ลำพูน ลำปาง พะเยา และน่าน มากกว่าในจังหวัดแพร่ แม่ฮ่องสอนและพิษณุโลก ในจังหวัดอื่นๆ สำรวจไม่พบต้นมะเขี๋ยง มะเขี๋ยงเติบโตได้ดีในพื้นที่สูงจากระดับน้ำทะเล 350-550 เมตร โดยเฉพาะพื้นที่ริมห้วย หนองบึง ที่มีความชุ่มชื้นตลอดปี ไม่มีน้ำท่วมขัง และมีสภาพหนาวเย็น (ทวีพร อุณจักร, 2545)

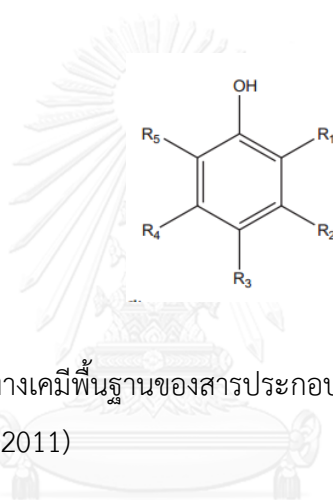
มะเขี๋ยง และหว่านเป็นพืชอยู่ในตระกูลเดียวกัน จึงมีความคล้ายคลึงกันอยู่บ้าง อย่างไรก็ตาม ยังมีความแตกต่างที่สามารถจำแนกได้ โดยพบว่าลักษณะของกลีบเลี้ยง (calyx) ของมะเขี๋ยงจะปิดที่กลีบตุมของดอก ในขณะที่หว่านจะไม่มีกลีบเลี้ยงปิด นอกจากนี้ใบของหว่านมีสีเขียวเข้มและมีสีเขียวสว่างที่ก้านใบ ในขณะที่ใบของมะเขี๋ยงมีสีเขียวสว่างและก้านใบมีสีม่วงเข้ม (John และ Chantaranothai, 2002)

โดยทั่วไปคนท้องถิ่นนิยมบริโภคผลมะเขี๋ยงสด จากการรายงานคุณค่าทางโภชนาการต่อน้ำหนักมะเขี๋ยง 100 กรัม มีองค์ประกอบ (ร้อยละ) ความชื้น 78-92.5; โปรตีน 0.56-1.73; ไขมัน 0.15-0.71; ปริมาณเยื่อใย 2.30-8.24 กรัม 0.33-1.15; คาร์โบไฮเดรต 4.77-14.75; น้ำตาลทั้งหมด 0.09-7.32; พลังงาน 23.7-64.5 กิโลแคลอรี และเกลือแร่ วิตามิน ได้แก่ แคลเซียม 22.1-135.1 มิลลิกรัม; แมกนีเซียม 4.89-25.4 มิลลิกรัม; เหล็ก 0.61-1.11 มิลลิกรัม; สังกะสี 0.10-0.90 มิลลิกรัม; วิตามินบี1 15.6 มิลลิกรัม; วิตามินบี2 33.3 มิลลิกรัม; วิตามินซี 14.6 มิลลิกรัมและเบต้าแคโรทีน 34.3-2115.1 IU (ทวีพร อุณจักร, 2530; อธิวัฒน์ ชาญฤทธิเสนา, 2555) การใช้ประโยชน์จากมะเขี๋ยงมีหลากหลายโดยนิยมนำผลมาทำเป็นผลิตภัณฑ์อาหารเช่น ชามะเขี๋ยง แยมมะเขี๋ยง น้ำมะเขี๋ยง ไวน์มะเขี๋ยง เป็นต้น ซึ่งจะนำส่วนที่เป็นเนื้อของผลไปใช้เท่านั้น ทำให้เหลือเมล็ดซึ่งไม่นำมาใช้ประโยชน์ แต่เมล็ดมะเขี๋ยงมีสารประกอบฟีนอลิกซึ่งสามารถนำมาใช้ประโยชน์ต่างๆ ได้ เช่น การต้านอนุมูลอิสระ การต้านการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย เป็นต้น (พิมพ์พร ลีลาพรพิสิฐ, 2547)

## 2.2 สารประกอบฟีนอลิก

พืชประกอบด้วยสารพฤกษเคมีมากมายหลายชนิด เพื่อทำหน้าที่ในการเจริญเติบโต ปกป้องตัวเอง จากสภาวะแวดล้อม โดยแบ่งเป็น 2 ชนิดตามคุณสมบัติเชิงหน้าที่ ได้แก่ สารเมตาโบไลต์ปฐมภูมิ (primary metabolite) และสารเมตาโบไลต์ทุติยภูมิ (secondary metabolite) หนึ่งในสารเมตาโบไลต์ทุติยภูมิที่มีความสำคัญคือ สารประกอบฟีนอลิก โดยพืชสร้างขึ้นเพื่อเป็นองค์ประกอบในใบ ดอก ผล เพื่อทำหน้าที่ต่างๆรวมทั้งปกป้องตัวเองจากสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม เช่น ต่อด้านเชื้อแบคทีเรีย เชื้อรา แมลง สัตว์ ไวรัส รังสียูวีจากแสงแดด กำจัดโลหะหนัก (chelation) และต้าน

อนุมูลอิสระจากกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสงของพืช จากรังสียูวีและอนุมูลอิสระ พืชสร้างสารประกอบฟีนอลิกโดยการสังเคราะห์ทางกระบวนการชีวภาพโดยผ่านวิถี shikimate/phenylpropanoid pathway ซึ่งมีผลต่อโครงสร้างของสารประกอบฟีนอลิก นอกจากนี้ยังพบว่าชนิดและปริมาณของสารประกอบฟีนอลิกที่มีนั้นอาจแตกต่างกันขึ้นกับส่วนต่างๆ ของพืช เช่น ผล ใบ เมล็ด ลำต้น และราก เป็นต้น รวมถึงวงศ์ และสกุลของพืช รวมทั้งปัจจัยภายนอก เช่น แสง อุณหภูมิ และสภาวะการเกิดบาดแผลของพืช (วิทยา ทรัพย์เย็น, 2550) จากภาพที่ 2.2 โครงสร้างทางเคมีพื้นฐานของสารประกอบฟีนอลิกเป็นวงแหวนอะโรมาติกที่มีหมู่ไฮดรอกซิลอย่างน้อยหนึ่งหมู่หรือมากกว่านั้น หรืออาจประกอบด้วยหนึ่งหรือสองวงแหวนอะโรมาติกโดยต่อเข้ากับสองหรือมากกว่าของหมู่ไฮดรอกซิลก็ได้ (Ignat และคณะ, 2011)



ภาพที่ 2.2 โครงสร้างทางเคมีพื้นฐานของสารประกอบฟีนอลิก  
ที่มา: Ignat และคณะ (2011)

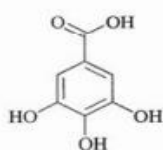
สารประกอบฟีนอลิกที่มีอยู่ในธรรมชาติพบได้ทั้งรูปอิสระ เช่น โกลโคซิลเลตเตด (glycosylated) หรืออนุพันธ์อะซิลเลตเตด (acylated derivatives) โอลิโกเมอร์ริก (oligomeric) และโครงสร้างพอลิเมอร์ เช่น คอนเดนซ์แทนนิน (condensed tannins) ฟลอโรแทนนิน (phlorotannins) หรือลิกนิน (lignins) และสามารถพบได้ในรูปที่เชื่อมต่อกับสารประกอบอื่นที่มีอยู่ในพืชเองอีกด้วย โดยรวมกับผนังเซลล์ คาร์โบไฮเดรต หรือโปรตีน พืชสร้างสารประกอบฟีนอลิกที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่เป็นประโยชน์ต่อมนุษย์ Dai และ Mumper (2010) ได้กล่าวว่าสารประกอบ ฟีนอลิกที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพโดยเฉพาะการยับยั้งจุลินทรีย์คือ กรดฟีนอลิก ฟลาโวนอยด์ และแทนนิน

### 2.2.1 กรดฟีนอลิก (Phenolic acids)

กรดฟีนอลิกมีโครงสร้างเป็นหมู่คาร์บอกซิลจับเชื่อมกับวงแหวนเบนซีน (Lafly และ Gil-Izquierdo, 2008) กรดฟีนอลิกมีรูปแบบที่หลากหลายขึ้นอยู่กับตำแหน่งและจำนวนของหมู่ไฮดรอกซิลที่เชื่อมหรือจับกับวงแหวนอะโรมาติก (Robbins, 2003) กรดฟีนอลิกที่มีอยู่ในพืชพบได้ใน

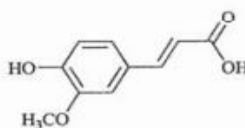
รูปอิสระและรูปที่จับกับสารประกอบอื่น (bound forms) สารประกอบฟีนอลิกแบบ bound forms จะเชื่อมต่อกับส่วนต่างๆที่เป็นองค์ประกอบของพืช สามารถคอนจูเกตกับน้ำตาล กรดอินทรีย์หรือโครงสร้างที่แข็งแรงของผนังเซลล์พืชได้ (Zadernowski และคณะ, 2009) สภาวะการสกัดที่ต่างกัน ส่งผลต่อชนิดของสารประกอบฟีนอลิกที่มีความเสื่อมสลายแตกต่างกัน กรดฟีนอลิกแบ่งออกเป็นกลุ่มย่อย 2 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มไฮดรอกซีเบนโซอิก (hydroxybenzoic) ที่มีโครงสร้างเป็นวงแหวนอะโรมาติกต่อกับคาร์บอน 1 อะตอม (C6-C1) หรือหมู่คาร์บอกซิลิก ได้แก่ กรดแกลลิก (gallic acid) กรดพาราไฮดรอกซีเบนโซอิก (p-hydroxybenzoic acids) กรดโปรโตคาเทชูอิก (protocatechuic acids) กรดวานิลลิก (vanillic acids) และ กรดไซรินจิก (syringic acids) อีกกลุ่มคือกรดไฮดรอกซีซินนามิก (hydroxycinnamic acids) ซึ่งมีโครงสร้างเป็นวงแหวนอะโรมาติกต่อกับสายคาร์บอน 3 ตัว (C6-C3) ได้แก่ กรดคาเฟอิก (caffeic acids) กรดเฟอร์ูลิก (ferulic acids) กรดพาราคูมาริก (p-coumaric acids) และกรดซินแนปิก (sinapic acids) ที่พบเป็นส่วนใหญ่ (Bravo, 1998) โครงสร้างทางเคมีทั้งสองกลุ่มแสดงในภาพที่ 2.3

#### Hydroxybenzoic acid

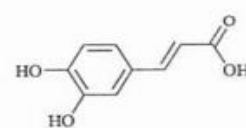


Gallic acid

#### Hydroxycinnamic Acid



Ferulic acid



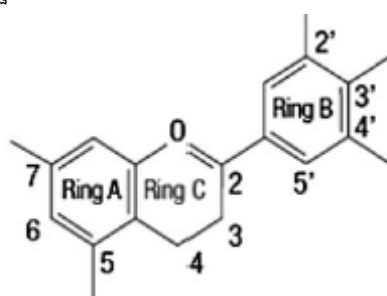
Caffeic acid

ภาพที่ 2.3 โครงสร้างทางเคมีของกรดฟีนอลิกทั้ง 2 กลุ่ม  
ที่มา: Dai และ Mumper (2010)

กรดฟีนอลิกมีกลไกในการต้านแบคทีเรีย โดยไปทำลายการซึมผ่านของเยื่อหุ้มเซลล์ ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ การเข้าทำปฏิกิริยากับหมู่ซัลไฟไฮดริล (sulfhydryl group) รวมทั้งยับยั้งการสร้างกรดนิวคลีอิกซึ่งจำเป็นต่อการเจริญของแบคทีเรีย (Ergun และคณะ, 2011) สมบัติทางเคมีของกรดฟีนอลิกได้แก่ ความมีขี้ขี้ และหมู่ไฮดรอกซิลมีผลต่อฤทธิ์การต้านแบคทีเรีย จากการศึกษาของ Borges และคณะ (2013) พบว่า จำนวนหมู่ไฮดรอกซิลที่เพิ่มขึ้นของกรดไฮดรอกซีเบนโซอิก และกรดไฮดรอกซีซินนามิก ทำให้ประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรียมีมากขึ้น รวมถึงโครงสร้างของกรดฟีนอลิกที่มีคาร์บอนที่มีสายโซ่ยาวมีผลทำให้ประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรียมีมากขึ้นด้วย นอกจากนี้พบว่า กรดเฟอร์ูลิก ยังมีประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรีย *E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa* และ *L. monocytogenes* ได้ดีกว่ากรดแกลลิก เนื่องจากกรดเฟอร์ูลิกมีโครงสร้างของคาร์บอนสายโซ่ที่ยาวกว่า

## 2.2.2 ฟลาโวนอยด์ (flavonoids)

สารประกอบฟลาโวนอยด์ เป็นสารประกอบฟีนอลิกที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ โดยเป็นสารประกอบฟีนอลิกกลุ่มใหญ่ที่พบในพืชมากกว่า 8000 ชนิด สารประกอบฟลาโวนอยด์มีอยู่ทั่วไปในพืชที่มีสีเขียว และพบในทุกส่วนของพืช เช่น ใบ ราก เปลือกไม้ ดอก ผล และเมล็ด (Hollman และ Katan, 1999) มีสูตรโครงสร้างหลักเป็นฟลาเวน (flavan) ฟลาโวนอยด์ประกอบด้วยคาร์บอน 15 อะตอม ที่มีสูตรโครงสร้างพื้นฐานเป็น C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub> ซึ่งประกอบด้วยวงแหวนอะโรมาติก A และ B ที่เชื่อมต่อกับวงแหวนเฮเทอโรไซคลิก (heterocyclic ring) ของวงแหวน C (Merken และ Beecher, 2000) โครงสร้างพื้นฐานของฟลาโวนอยด์แสดงตามภาพที่ 2.4



ภาพที่ 2.4 โครงสร้างฟลาโวนอยด์

ที่มา: Ionat และคณะ (2011)

Balasundram และคณะ (2006) ได้กล่าวว่ารูปแบบการจัดเรียงตัวของหมู่ฟังก์ชันของวงแหวน C ทำให้สามารถแบ่งสารประกอบฟลาโวนอยด์ออกเป็นกลุ่มต่างๆได้ดังนี้

### 2.2.2.1 ฟลาโวน (Flavone)

สารกลุ่มฟลาโวน หรือ 2-ฟีนิลเบนโซไพรีน (2-phenylbenzopyrene) เป็นโมเลกุลที่มีพันธะคู่ระหว่างคาร์บอนตำแหน่งที่ 2 และ 3 ฟลาโวนเป็นสารประกอบไม่มีสี ตัวอย่างเช่น อะจิปินิน (agipenin) ลูเตโอลิน (luteolin) และไตรเซติน (tricitin)

### 2.2.2.2 ฟลาโวนอล (Flavonols)

สารกลุ่มฟลาโวนอลเป็นสารประกอบฟลาโวนอยด์ที่มีการแทนที่แตกต่างกันในหมู่ไฮดรอกซิลที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 3 ตัวอย่างของฟลาโวนอลได้แก่ เควอร์เซติน (quercetin) หรือ 3, 5, 6, 3, 4'-pentahydroxy flavone แคมพ์เฟอร์อล (kaempferol) และไมริเซติน (myricetin) อะไกลโคนที่เป็นอนุพันธ์ของฟลาโวน และฟลาโวนอลที่ทราบโครงสร้างมีอีกประมาณ 60 ชนิดซึ่งจะแตกต่างกันที่หมู่ไฮดรอกซิลและหมู่เมทอกซี



### 2.2.2.3 ฟลาวานอล (Flavanols)

สารกลุ่มฟลาวานอลหรือ ฟลาแวน-3-อล (flavane-3-ol) ซึ่งมักพบรูปอิสระในผลไม้ เป็นหน่วยของสารโพรแอนโทไซยานิดินที่ถูกนำมาสกัดแยกออกจากพืช เช่น คาเทชิน (catechin) แกลโลคาเทชิน (gallocatechin) อีพิกาคเทชิน (epicatechin) อีพิกัลโลคาเทชิน (epigallocatechin) อีพิกาคเทชิน-3-แกลเลต (epicatechin-3-gallate) อีพิกัลโลคาเทชิน-3-แกลเลต (epigallocatechin-3-gallate)

### 2.2.2.4 ฟลาวาโนน (Flavanone)

สารกลุ่มฟลาวาโนน มีสูตรโครงสร้างคล้ายฟลาโวนแต่พันธะระหว่างคาร์บอนตำแหน่งที่ 2 และ 3 เป็นพันธะเดี่ยว ฟลาวาโนนมักพบอยู่ในรูปไกลโคไซด์ซึ่งจับกับน้ำตาลโมเลกุลคู่ เช่น รุติโนส (rutinose) เป็นต้น ตัวอย่างของฟลาวาโนน เช่น เฮสเพอริดีน (hesperidin) ในส้ม และ นารินจิน (naringin) ในองุ่น ที่พีเอชเป็นด่าง (พีเอช 12) วงแหวนที่อยู่ภายในโมเลกุลของเฮสเพอริดีนจะเปิดออกได้เป็นซาลโคน (chalcone) เหมือนการสลายตัวของแอนโทไซยานิน ซาลโคนมีสีเหลืองถึงสีน้ำตาล (นิธิยา รัตนาปนนท์, 2553)

### 2.2.2.5 ฟลาวาโนนอล (Flavanonols)

สารกลุ่มฟลาวาโนนอลมีสูตรโครงสร้างคล้ายฟลาวาโนน แต่มีหมู่ไฮดรอกซิลเพิ่มขึ้น ในตำแหน่งที่ C<sub>3</sub> โดยพบในผลไม้กลุ่มซิตรัส

### 2.2.2.6 ไอโซฟลาโวน (Isoflavones)

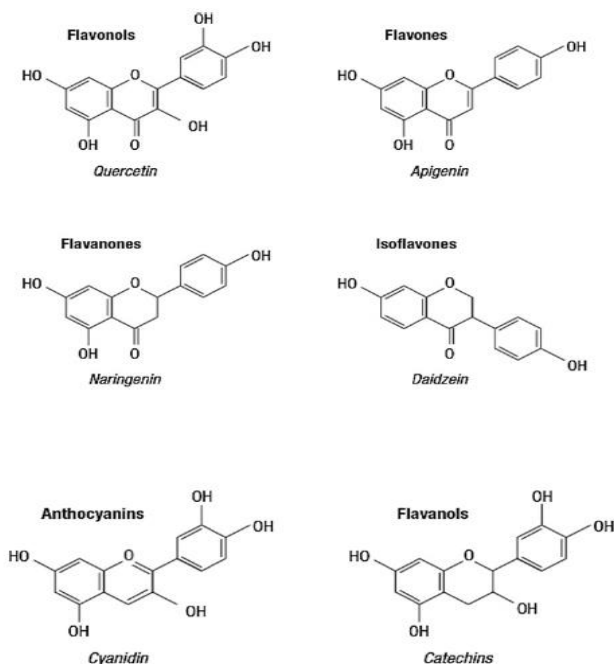
สารกลุ่มไอโซฟลาโวน มีสูตรโครงสร้างเช่นเดียวกับฟลาโวน แต่วงแหวนฟีนิลที่อยู่ ณ ตำแหน่ง 3 เป็น 3-ฟีนิลเบนโซไพโรน (3-phenylbenzopyrone) โครงสร้างของไอโซฟลาโวน คล้ายฮอร์โมนเอสโตรเจน (estrogens)

### 2.2.2.7 แอนโทไซยานิน (anthocyanin)

สารกลุ่มแอนโทไซยานินเป็นไกลโคไซด์ ซึ่งประกอบด้วยส่วนที่เป็นอะไกลโคน (aglycone) เรียกว่า แอนโทไซยานิดิน (anthocyanidin) และส่วนที่เป็นน้ำตาล น้ำตาลที่เป็นองค์ประกอบในโมเลกุลของแอนโทไซยานิน จะมี 1 2 หรือ 3 โมเลกุลก็ได้ และเป็นได้ทั้ง โมโนแซ็กคาไรด์ ไดแซ็กคาไรด์ และไตรแซ็กคาไรด์ (นิธิยา รัตนาปนนท์, 2553) แอนโทไซยานิดินมีโครงสร้างที่ประกอบด้วยวงแหวนอะโรมาติก ต่อกับวงแหวนเฮเทอโรไซคลิก และมีวงแหวนอะโรมาติกหรืออาจเป็นหมู่ของเมทอกซิล และไฮดรอกซิล มาต่ออีก 1 วง (Castañeda-Ovando และคณะ, 2009) โครงสร้างของแอนโทไซยานินขึ้นอยู่กับชนิดของแอนโทไซยานิดิน และชนิดของน้ำตาลที่มาสร้างพันธะกับแอนโทไซยานิดิน นอกจากนี้ยังพบแอนโทไซยานินในลักษณะของกลุ่ม

พอลิเมอร์ (polymer) เรียกว่า โพรแอนโทไซยานิน ซึ่งประกอบด้วยแอนโทไซยานิดิน 3 โมเลกุล สารกลุ่มนี้ให้สารสีในผัก และผลไม้ที่มีสีแดง ม่วง จนดำ เช่น แอปเปิล องุ่น และผลไม้ตระกูลเบอร์รี่ (นิตยา รัตนาปนนท์, 2553)

โครงสร้างทางเคมีของสารประกอบฟลาโวนอยด์แต่ละชนิดแสดงในภาพที่ 2.5



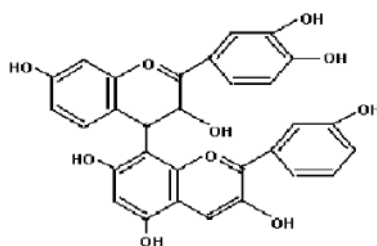
ภาพที่ 2.5 โครงสร้างฟลาโวนอยด์ชนิดต่างๆ

ที่มา: Ionat และคณะ (2011)

สารประกอบฟลาโวนอยด์ เช่น แคมพ์เฟอรอล ไมริสทิน นารินจิน เควอร์ซิทิน รูทีน มีฤทธิ์ต่อต้านจุลินทรีย์ก่อโรค ด้วยกลไกในการยับยั้งการสังเคราะห์กรดนิวคลีอิก และการทำหน้าที่ของไซโตพลาสติก เมมเบรน และส่งผลต่อพลังงานที่ใช้ในเมตาบอลิซึม (Cushnie และ Lamb, 2005) สารประกอบฟลาโวนอยด์ในกลุ่มไครซิน (Chrysin) ยังมีฤทธิ์ในการทำลายแบคทีเรียด้วยการเชื่อมต่อกับสารประกอบเชิงซ้อนในผนังเซลล์ของแบคทีเรียอีกด้วย

### 2.2.3 แทนนิน (Tannin)

แทนนินคือกลุ่มสารประกอบฟีนอลิกที่สำคัญลำดับที่สาม โดยเป็นสารประกอบเชิงซ้อนที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง แทนนินเป็นสารประกอบฟีนอลิกที่มีหมู่ไฮดรอกซิล (hydroxyl) เป็นจำนวนมากดังภาพที่ 2.6

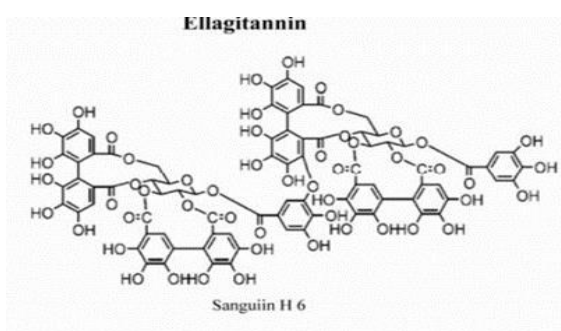


ภาพที่ 2.6 โครงสร้างของแทนนิน

ที่มา: O' Connell (2000)

แทนนินมีความเป็นกรดอ่อน รสฝาด นอกจากนี้ยังเป็นสารให้ความฝาดในพืช และมีสีเหลืองจนสีน้ำตาล พบได้ในพืชหลายชนิดจากราก เปลือก ก้าน ใบ ผล รวมถึงเมล็ด ส่วนใหญ่จะพบแทนนินอยู่ในส่วนของแควิวอลหรือผิวหน้าแว็กซ์ของพืชนั้น โดยแบ่งเป็น 2 กลุ่ม ได้แก่ hydrolysable tannin และ condensed tannins (Himanshu และคณะ, 2015)

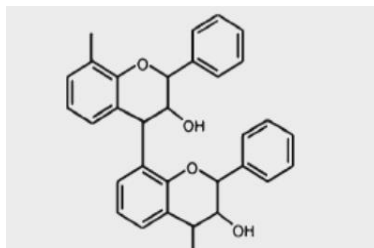
- hydrolysable tannins หมายถึง กลุ่มของสารประกอบแทนนินที่เป็นอนุพันธ์ของสารประกอบฟีนอลิก เช่น กรดแกลลิก และกรดเอลลาจิก กรดแกลลิกสามารถเอสเทอร์ไฟด์กับน้ำตาลกลูโคสได้เป็นไกลโคไซด์ ชื่อ เบต้ากลูโคแกลลิน (beta-glucogallin) (นิธิยา รัตนาปนนท์, 2553) กรดแกลลิกจะรวมตัวกันเอง 2 โมเลกุล ได้เป็นกรดเมตาไดแกลลิก (meta-digallic acid) หรือรวมตัวกัน 3 โมเลกุล ได้เป็นกรดเมตา-ไตรแกลลิก (meta-trigallic acid) โดยแทนนินกลุ่มนี้สามารถละลายน้ำได้ดี สำหรับแทนนินที่เป็นพอลิเมอร์ของกรดแกลลิก และกรดเอลลาจิกคือ แกลโลแทนนิน (gallotannins) และเอลลาจิทแทนนิน (ellagitanins) ตามลำดับ และจะมีน้ำตาลกลูโคส 1 โมเลกุลอยู่ภายในโครงสร้าง (Hagerman, 2002) ดังแสดงในรูปภาพที่ 2.7



ภาพที่ 2.7 โครงสร้างทางเคมีของ hydrolysable tannins

ที่มา: Dai และ Mumper (2010)

- condensed tannins คือ กลุ่มของสารประกอบแทนนินที่เป็นสารประกอบโพลีฟีนอลที่มีความซับซ้อน โดยเป็นโพลีเมอร์ของสารประกอบฟลาโวนอยด์ โครงสร้างเกิดมาจากการรวมตัวแบบพอลิเมอร์ของสารประกอบฟีนอลิกในกลุ่มสารประกอบฟลาโวนอยด์ (Himanshu และคณะ, 2015) ดังแสดงในภาพที่ 2.8



ภาพที่ 2.8 โครงสร้างทางเคมีของ condensed tannins

ที่มา: Ionat และคณะ (2011)

อาจกล่าวได้ว่าสารประกอบกลุ่มนี้เป็นอนุพันธ์ของคาเทชิน (catechin) มีคุณสมบัติสลายตัวยากแต่ละลายน้ำได้ไม่ดีเท่าสารประกอบกลุ่มแรก แต่ละลายได้ในสภาพที่เป็นกรดและอุณหภูมิสูง (สุปรีณา ศรีใสคำ, 2552)

แทนนินมีผลต่อระบบชีวเคมี เนื่องจากสามารถรวมตัวกับโลหะไอออนให้สารที่มีสีได้ มีสมบัติเป็นแอนติออกซิแดนท์ สมบัติต้านจุลินทรีย์ และแทนนินยังมีสมบัติในการทำปฏิกิริยากับโปรตีนได้ดีด้วยการตกตะกอนโปรตีน เนื่องจากวงแหวนของ hydrophobic benzenoid และพันธะไฮโดรเจนของหมู่ไฮดรอกซิลเกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนที่ไม่ละลายน้ำ (Hagerman, 2002)

แทนนินมีฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรียได้โดยไปทำลายสมบัติการซึมผ่านของเยื่อหุ้มเซลล์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ รวมทั้งไปจับกับไอออนโลหะซึ่งเป็นจำเป็นต่อการเจริญของแบคทีเรีย การยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของ condensed tannins อย่างเช่น คาเทชิน มีฤทธิ์ในการต้านแบคทีเรียซึ่งมีผลต่อระบบการสังเคราะห์กรดไขมันที่มีอยู่ในไซโตพลาสซึมเมมเบรนของ *E. coli* และแบคทีเรียอื่นอีกด้วย (Zhang และ Rock, 2004) ประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของ condensed tannins พบว่าขึ้นอยู่กับหมู่ไฮดรอกซิลในโครงสร้าง ยังมีหมู่ไฮดรอกซิลมากทำให้ประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรียดีขึ้น (Scalbert, 1991) ส่วนกลุ่ม hydrolysable tannins เช่น กรดแทนนิก ซึ่งเป็นน้ำตาลกลูโคสถูกเอสเทอร์รีไฟด์ด้วยกรดแกลลิก ซึ่งมีความสามารถในการจับไอออนของโลหะมากขึ้น จึงส่งผลต่อฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียเพิ่มมากกว่ากรดฟีนอลิก (Akiyama และคณะ, 2011)

## 2.3 การสกัดสารประกอบฟีนอลิก (phenolic extraction)

เมื่อหลายปีที่ผ่านมาความสนใจในการศึกษาเกี่ยวกับกระบวนการสกัดองค์ประกอบของสารประกอบฟีนอลิกที่มีอยู่ในพืชซึ่งมีวิธีการสกัดหลายวิธี โดยทั่วไปวิธีการสกัดที่เหมาะสมขึ้นกับปัจจัยต่างๆ (Pinelo และคณะ, 2005) ได้แก่

- คุณค่าของสารสกัดและค่าใช้จ่ายในการสกัด หากต้องการสกัดสารที่มีคุณค่าทางการรักษาน้อย มักใช้วิธีสกัดที่ไม่ยุ่งยาก นอกจากนี้ควรคำนึงถึงค่าใช้จ่ายทั้งหมดเปรียบเทียบกับปริมาณสารสกัดที่ได้ รวมถึงการนำไปใช้ประโยชน์

- ความต้องการที่จะให้การสกัดที่สมบูรณ์ (exhausted extraction) หรือเกือบสมบูรณ์ หากต้องการสารสกัดเจือจาง การใช้มาเซอเรชัน (maceration) ก็เพียงพอแล้ว แต่ถ้าต้องการสารสกัดเข้มข้นก็ควรใช้วิธีเพอร์โคเลชัน (percolation) หรือการสกัดแบบต่อเนื่อง

- ธรรมชาติของตัวอย่างพืช หากสารประกอบฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์เป็นองค์ประกอบที่อยู่ในเซลล์ของพืช หากใช้เป็นตัวอย่างสด จะต้องสกัดทันทีหรืออาจเก็บเป็นระยะสั้นๆ ที่อุณหภูมิต่ำ เนื่องจากตัวอย่างสดมีการเปลี่ยนแปลงได้ง่าย ดังนั้นในการสกัดจึงต้องทำตัวอย่างให้แห้งก่อนเพื่อชะลอการเปลี่ยนแปลง (วิทยา ทรัพย์เย็น, 2550)

### 2.3.1 การสกัดด้วยตัวทำละลาย (solid-liquid extraction)

กระบวนการสกัดโดยใช้ตัวทำละลายคือกระบวนการที่ออกแบบเพื่อแยกสารประกอบฟีนอลิกที่สามารถละลายได้ออกมาจากเซลล์พืช โดยการแพร่กระจาย (diffusion) โดยใช้ของเหลวหรือเรียกว่าตัวทำละลาย ซึ่งเมื่อแพร่เข้าสู่เซลล์แล้วจะทำให้เกิดการพองตัวขึ้น (swelling) ทำให้สามารถละลายหรือชะเอาสารต่างๆ จากเซลล์ จึงเป็นการถ่ายเทมวลขององค์ประกอบที่ต้องการนำมาใช้ประโยชน์ออกจากเซลล์มาสู่ตัวทำละลาย (Castañeda-Ovando และคณะ, 2009)

การสกัดด้วยตัวทำละลายเป็นวิธีแยกสารประกอบฟีนอลิกออกจากเนื้อเยื่อพืชตามสมบัติของการละลายของสารแต่ละชนิด ทั้งนี้สารต่างชนิดจะละลายในตัวทำละลายต่างชนิดกันได้ต่างกันและสารชนิดเดียวกันละลายในตัวทำละลายต่างชนิดได้ต่างกัน (Xu และ Chang, 2007) โดยเมล็ดมะเกี๋ยมองค์ประกอบของสารประกอบฟีนอลิกและน้ำมันหอมระเหย (ทวีพร คุณจักร, 2545) การใช้วิธีการสกัดนี้ทำให้สกัดปริมาณน้ำมันหอมระเหยได้ลดลงจากวิธีที่สกัดด้วยการกลั่นโดยใช้เครื่องมือ Clevenger ถึงร้อยละ 96 (โดยน้ำหนัก) (Galhiane และคณะ, 2006) จึงเหมาะสมในการสกัด

สารประกอบฟีนอลิกจากเมล็ดมะเกี๋ยง โดยการสกัดองค์ประกอบสารประกอบฟีนอลิกด้วยตัวทำละลายนั้น มีปัจจัยที่ส่งผลต่อประสิทธิภาพการสกัดคือ

- ชนิดและความเข้มข้นของตัวทำละลาย ตัวทำละลายที่เหมาะสม ควรมีสมบัติทั่วไปดังนี้ คือ ละลายสารที่ต้องการได้ดี ไม่ละลายสารอื่นลงในของผสมนั้น ไม่ทำปฏิกิริยากับสารที่ต้องการสกัด มีจุดเดือดต่ำ ระเหยได้ง่าย เมื่อสกัดสารออกเป็นสารละลายแล้ว สามารถแยกตัวทำละลายออกจากสารละลายนั้นได้ง่าย ไม่เป็นพิษ หาง่าย และราคาถูก ทั้งนี้การละลายของสารประกอบฟีนอลิกขึ้นอยู่กับชนิดของตัวทำละลายที่ใช้ ตามความแตกต่างของสภาพขั้วของตัวทำละลายที่ต่างกัน (Xu และ Chang, 2007) การศึกษาอิทธิพลของความเข้มข้นของตัวทำละลายเอทานอลในการสกัดสารประกอบฟีนอลิกจากเมล็ดหว่า พบว่าการใช้ตัวทำละลายเอทานอลร้อยละ 50 (โดยปริมาตร) สามารถสกัดสารประกอบฟีนอลิก ฟลาโวนอยด์ และสารสกัดแห้งที่ได้สูงสุด (เพ็ญวิภา บัลลังโพธิ์, 2556)

- วิธีการสกัด วิธีการสกัดด้วยตัวทำละลายต่าง ๆ นั้นมีได้หลายวิธีวิธีการสกัดที่เหมาะสม จะต้องมีการละลายเอาสารประกอบฟีนอลิกออกมาได้มากที่สุดและมีการสลายของสารประกอบฟีนอลิกน้อยที่สุด ดังนั้นวิธีการสกัดจึงมีความสำคัญในการสกัดสารประกอบฟีนอลิกจากพืช (Orsat และ Routray, 2012) วิธีการสกัดที่แตกต่างกันส่งผลต่ออัตราการถ่ายโอนมวล (mass transfer rate) ของสารที่ต้องการสกัดแตกต่างกัน โดยมีวิธีการสกัดที่นิยม ได้แก่ การใช้มาเชอเรนซ์ (maceration) การเขย่า (shaking) การสกัดด้วยคลื่นอัลตราโซนิก (UAE) และคลื่นไมโครเวฟ (MAE) จากการศึกษาของ Ince และคณะ (2014) พบว่าอิทธิพลของวิธีสกัดมีผลต่อความสามารถในการสกัดสารประกอบฟีนอลิกและสารประกอบฟลาโวนอยด์ การใช้คลื่นไมโครเวฟ (MAE) สามารถสกัดสารประกอบ ฟีนอลิกฟลาโวนอยด์และมีปริมาณสารสกัดแห้งที่ได้สูงที่สุด เนื่องจากการสกัดด้วย MAE และ UAE เป็นวิธีการสกัดที่ใช้ระยะเวลาในการสกัดสั้นกว่าการเขย่า (shaking) และมีการเสื่อมสลายของสารประกอบฟีนอลิกน้อยกว่า (Liazid และคณะ, 2007) นอกจากนี้ประสิทธิภาพของวิธีการสกัดโดยใช้ร่วมกับการย่อยด้วยเอนไซม์ Zhang และคณะ (2013) พบว่าการสกัดด้วยคลื่นไมโครเวฟร่วมกับการย่อยด้วยเอนไซม์ (microwave-assisted enzymatic extraction, MAEE) ช่วยทำให้ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกเพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับการสกัดด้วย MAE เพียงอย่างเดียว

- สัดส่วนของแข็งต่อตัวทำละลายและขนาดอนุภาคตัวอย่าง เมื่อศึกษาองค์ประกอบของสารประกอบฟีนอลิกจากเมล็ดพืชโดยใช้ตัวทำละลายอะซิโตน 50% (โดยปริมาตร) ในสัดส่วนระหว่างของแข็งและตัวทำละลาย (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) ที่แตกต่างกัน พบว่าสัดส่วนของตัวทำ

ละลายที่มากขึ้นทำให้สัปดาห์สารประกอบฟีนอลิกเพิ่มขึ้น ซึ่งเกี่ยวเนื่องการโอนถ่ายมวลของตัวทำละลายซึ่งสามารถโอนถ่ายมวลได้มากขึ้น อย่างไรก็ตามการเลือกใช้สัปดาห์ที่เหมาะสมต้องคำนึงถึงด้านราคาในการสกัดด้วย (Al-Farsi และ Lee, 2008; Hayouni และคณะ, 2007)

-อุณหภูมิร่วมกับระยะเวลาที่ใช้ในการสกัด ความร้อนมีผลต่อการแพร่ผ่านของผนังเซลล์ โดยเพิ่มการละลายและสัมประสิทธิ์การแพร่ผ่านของสารที่ถูกสกัดและลดความหนืดของตัวทำละลาย อย่างไรก็ตามการใช้อุณหภูมิที่สูงร่วมกับเวลานานในการสกัดอาจทำให้เกิดการสลายของสารประกอบฟีนอลิกที่ไม่ทนความร้อนได้ (Himanshu และคณะ, 2015)

การสกัดสารประกอบฟีนอลิกด้วยตัวทำละลายเป็นวิธีที่นิยมใช้ เนื่องจากให้ความสะดวก (Jeffery และคณะ, 2008) ถ้าหากมีการควบคุมสถานะในการสกัดให้มีความเหมาะสมจะทำให้ได้สารสกัดหายากจากพืชที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ เช่น ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ และการต้านจุลินทรีย์ (George และคณะ, 2005) อย่างไรก็ตามสารสกัดหายากที่ได้นั้นมีองค์ประกอบของสารประกอบฟีนอลิกและสารประกอบอื่นๆ ที่ไม่ใช่สารประกอบฟีนอลิก เช่น คาร์โบไฮเดรต น้ำตาล ไขมัน สารรงควัตถุ แวกซ์ เป็นต้น การมีสิ่งปนเปื้อนเหล่านี้ทำให้อัตราส่วนของสารประกอบฟีนอลิกในสารสกัดหายากต่ำทำให้ประสิทธิภาพของคุณสมบัติต่างๆไม่ดีเท่าที่ควร (Perez-Magarino และคณะ, 2008)

## 2.4 การทำให้สารประกอบฟีนอลิกบริสุทธิ์บางส่วน

สารสกัดหายากจากพืชมีทั้งสารประกอบฟีนอลิกและสารประกอบอื่นๆ ที่ไม่ใช่สารประกอบฟีนอลิกผสมอยู่ จึงจำเป็นต้องทำให้สารประกอบฟีนอลิกในสารสกัดหายากบริสุทธิ์มากขึ้น ซึ่งทำได้โดยกระบวนการดูดซับ-ปลดปล่อย โดยการใช้สารดูดซับที่มีประสิทธิภาพ (Liu และคณะ, 2008)

### 2.4.1 กระบวนการดูดซับ (Adsorption process)

Suffet และคณะ (1978) ได้อธิบายว่า กระบวนการดูดซับ หมายถึง การเพิ่มความเข้มข้นของสารที่พื้นผิวของสารดูดซับ (adsorbent) ซึ่งตามธรรมชาติต้องประกอบด้วยรูพรุนจำนวนมาก โมเลกุลของของไหลซึ่งประกอบด้วยตัวทำละลายและตัวถูกดูดซับที่ต้องการสมบัติเชิงหน้าที่ไปใช้ประโยชน์จะแพร่เข้าไปภายในรูพรุนและจะถูกดูดซับไว้ภายใน ซึ่งกระบวนการดูดซับมี 3 ขั้นตอน โดยขั้นตอนแรกคือการแพร่ไปยังผิวของสารดูดซับ (diffusion to adsorbent surface) โมเลกุลของตัวถูกดูดซับแพร่ผ่านไปยังผิวด้านนอกของสารดูดซับ ขั้นที่สองจะเกิดการผ่านเข้ารูพรุนของสารดูดซับ (migration into pores of adsorbent) โมเลกุลของตัวถูกดูดซับจะเคลื่อนที่ผ่านบริเวณพื้นที่ผิวด้านนอก ไปยังรูพรุนภายในที่มีพื้นที่ผิวมากกว่า ซึ่งการดูดซับเกือบทั้งหมดเกิดขึ้นในขั้นตอนนี้ และเกิด

การสะสมหรือเพิ่มพูนแบบชั้นเดียวของตัวถูกดูดซับอย่างรวดเร็ว (monolayer build up of adsorption) จากนั้นโมเลกุลของตัวถูกดูดซับจะยึดติดอยู่ที่ผิวภายในรูพรุนเป็นชั้นตอนสุดท้ายของการดูดซับ

กระบวนการดูดซับมีกลไกในการดูดซับ 2 รูปแบบ ได้แก่ การดูดซับทางกายภาพ (physical adsorption) และการดูดซับทางเคมี (chemical adsorption) โดยกลไกแรกเป็นการดูดซับที่เกิดจากการสัมผัสกัน ทำให้เกิดแรงดึงดูดระหว่างโมเลกุล และแรงแวนเดอร์วาลส์ (van der Waals) แรงแผ่กระจาย (dispersion forces) ซึ่งแรงยึดเหนี่ยวระหว่างโมเลกุลอย่างอ่อนๆ จึงไม่มีการถ่ายเท หรือใช้อิเล็กตรอนร่วมกัน ทำให้โครงสร้างที่ผิวของสารดูดซับไม่มีการเปลี่ยนแปลง (Kammerer และคณะ, 2006) ส่วนกลไกที่สอง เกิดจากการสร้างพันธะระหว่างตัวที่ถูกดูดซับกับสารดูดซับ โดยอาศัยพลังงานกระตุ้นให้ปฏิกิริยาเคมีทำลายแรงยึดเหนี่ยวระหว่างอะตอมที่มีอยู่เดิม แล้วสร้างหรือจัดเรียงอะตอมขึ้นใหม่ พันธะที่เกิดขึ้นจึงมีความแข็งแรง และเกิดอย่างจำเพาะเจาะจง เนื่องจากต้องแลกเปลี่ยนอิเล็กตรอนร่วมกัน การดูดซับจึงเป็นแบบชั้นเดียว (monolayer) โดยการดูดซับทางเคมีจะหยุดลงเมื่อ reactive site ที่ผิวของสารดูดซับหมดลง (Fu และคณะ, 2005) อย่างไรก็ตามการดูดซับสารประกอบฟีนอลิกมีหลายปัจจัยที่เกี่ยวข้อง ได้แก่

- ขนาดและพื้นที่ผิวของสารดูดซับ โดยอัตราการดูดซับเป็นสัดส่วนผกผันกับขนาด หรือ เส้นผ่านศูนย์กลางของสารดูดซับเมื่อสารดูดซับนั้นไม่มีรูพรุน แต่ถ้าสารดูดซับนั้นมีรูพรุนอัตราการดูดซับจะเป็นสัดส่วนโดยตรงกับขนาดของสารดูดซับ สารดูดซับที่มีพื้นที่ผิวมากจะมีความสามารถในการดูดซับมากกว่าสารที่มีพื้นที่ผิวในการดูดซับน้อย (ปริญทร เต็มญารศิลป์, 2551)

- สัดส่วนของสารดูดซับต่อสารละลาย สัดส่วนของสารดูดซับมีอิทธิพลต่อความสามารถในการดูดซับสารประกอบฟีนอลิกในสารสกัดหยาบจากพืช Magalhaes และคณะ (2010) ได้ศึกษาถึงสัดส่วนของสารดูดซับที่เหมาะสมในการดูดซับสารประกอบฟีนอลิกพบว่าเมื่อสัดส่วนของสารดูดซับมากขึ้น ทำให้สามารถดูดซับสารประกอบฟีนอลิกได้เพิ่มมากขึ้นจนถึงจุดหนึ่งที่มีการดูดซับสารประกอบฟีนอลิกไม่เปลี่ยนแปลง เนื่องจากการเพิ่มสัดส่วนของสารดูดซับที่มากขึ้นทำให้พื้นที่ผิวของสารดูดซับอิสระมีมากขึ้น จึงสามารถดูดซับสารประกอบฟีนอลิกได้ดี จนกระทั่งไม่สามารถดูดซับสารประกอบฟีนอลิกได้เพิ่ม ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกที่ได้จึงไม่มีการเปลี่ยนแปลง การใช้สัดส่วนในการดูดซับสารประกอบฟีนอลิกแต่ละชนิดในสารสกัดหยาบจากพืชมีความแตกต่างกัน จากรายงานของ Lin และคณะ (2012) ศึกษาการใช้สัดส่วนของสารดูดซับเรซินชนิดรูพรุนขนาดใหญ่ (MARs) ในการดูดซับกรดฟีนอลิกจากสารสกัดใบ *Rabdosia serra* (MAXIM.) HARA โดยใช้สัดส่วนสารดูดซับ/สารละลาย เป็น คือ 12.5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ในขณะที่ He และ Xia (2008) ใช้สัดส่วนของสารดูด



ซึบ MARS ในการดูดซึบสารประกอบฟลาโวนอยด์จากสารสกัดหยาบจาก *Canarium album L.* คือ 50 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร นอกจากนี้ Suárez-Quiroz และคณะ (2014) ใช้สัดส่วนสารดูดซึบถ่านกัมมันต์ชนิดผง (PAC) ในการดูดซึบกรดคลอโรจินิกในสารสกัดเมล็ดกาแฟเขียว พบว่าสัดส่วนของสารดูดซึบต่อสารละลายที่เหมาะสมคือ คือ 40 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร งานวิจัยนี้จึงได้ศึกษาสัดส่วนสารดูดซึบที่เหมาะสมเพื่อใช้ในสารสกัดหยาบเมล็ดมะเกี๋ยง

- ความปั่นป่วน ที่เกิดจากการกวนน้ำหรือสารละลาย โดยอัตราเร็วในการดูดซึบขึ้นอยู่กับความปั่นป่วนของระบบ ถ้าระบบปั่นป่วนต่ำจะส่งผลให้ชั้นฟิล์มซึ่งล้อมรอบสารดูดซึบมีความหนาเนื่องจากไม่ถูกรบกวน เป็นอุปสรรคต่อการเคลื่อนที่ของโมเลกุลเข้าไปหาสารดูดซึบ (ปริณิทร เต็มญารศิลป์, 2551)

- พีเอช เป็นปัจจัยสำคัญต่อการดูดซึบสารประกอบฟีนอลิก ที่สภาวะพีเอชเป็นกรด พบว่าสามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการสกัดสารประกอบฟีนอลิกได้ เนื่องจากฟีนอลซึ่งเป็นโครงสร้างพื้นฐานของสารประกอบฟีนอลิกที่มีในสารสกัดหยาบ สามารถแตกตัว และกระจายตัวในสารละลายได้ดี โดยไฮโดรเจนไอออนมีบทบาทสำคัญ นอกจากนี้พบว่าการดูดซึบสารประกอบฟีนอลิกจะลดลงที่สภาวะเป็นด่าง เนื่องจากการแตกตัวของกลุ่มไฮดรอกซิลและคาร์บอนิลมีผลทำลายโครงสร้างของสารประกอบฟีนอลิก (Fu และคณะ, 2005; Yoon และคณะ, 1997) อย่างไรก็ตามได้มีการรายงานว่าช่วงระดับพีเอชที่เป็นกรดของสารละลายจะไม่มีผลในการดูดซึบสารประกอบฟีนอลิกของเรซิน (Caqueret และคณะ, 2008)

- อุณหภูมิ มีผลต่อการดูดซึบ 2 ประการ คือ การเพิ่มอัตราการส่งผ่านความร้อนภายในรูพรุนของสารดูดซึบ มีผลต่อการลดลงของความหนืด อีกประการหนึ่งคือเปลี่ยนความสามารถในการดูดซึบ (Qiu และคณะ, 2007) โดยพบว่าเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นจะช่วยเพิ่มปฏิกิริยาผันแบบกลับไม่ได้ เมื่อศึกษาผลทางด้านบวกและด้านลบของอุณหภูมิที่สูงขึ้น และใช้สารดูดซึบที่ต่างชนิดกัน Juang และ Shiau (1999) พบว่าความสามารถในการดูดซึบทางเคมีจะเพิ่มขึ้นในสารดูดซึบบางชนิด เช่น ถ่านกัมมันต์ แร่ เรซิน แต่เรซินรูพรุนขนาดใหญ่ เช่น เรซินชนิดอะคริลิก พบว่าอุณหภูมิไม่มีผลต่อการดูดซึบและปลดปล่อยสารประกอบฟีนอลิกที่ได้ (Scordino และคณะ, 2003)

- ระยะเวลาที่ของเหลวสัมผัสกับสารดูดซึบ การดูดซึบจะมีค่าเพิ่มมากขึ้นตามเวลา จนกระทั่งระบบเข้าสู่จุดสมดุล ซึ่งเป็นเวลาที่อัตราการดูดซึบเท่ากับอัตราการคาย ความสามารถในการดูดซึบจะมีค่ามากที่สุด และมีค่าคงที่เมื่อเวลามากขึ้น (รุจิรา ปิ่นแก้ว, 2556)

การดูดซับสารประกอบฟีนอลิกในสารละลาย เป็นเทคนิคทางเลือกที่เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม เป็นวิธีที่ง่ายและไม่ก่อให้เกิดสารพิษ นอกจากนี้ยังมีต้นทุนต่ำ อย่างไรก็ตามควรหลีกเลี่ยงการใช้ตัวทำละลายที่มีความเป็นพิษ

#### 2.4.2 สารดูดซับ

ปริญทร์ เต็มญารศิลป์ (2551) ได้อธิบายว่า สารดูดซับหรืออีกชื่อหนึ่งเรียกว่าสารดูดติดผิว หมายถึง สารที่มีอำนาจดูดโมเลกุลต่างๆมาติดที่ผิว ทำให้สามารถแยกองค์ประกอบของสารที่ต้องการออกจากของเหลวได้ สารดูดซับแบ่งออกเป็น 3 ประเภท

- สารอนินทรีย์ เช่น ดินเหนียวชนิดต่างๆ แมกนีเซียมออกไซด์ ซิลิกา ถ่านกระดุก เป็นต้น สารธรรมชาติเหล่านี้มักมีพื้นที่ผิวจำเพาะประมาณ 50-200 ตารางเมตรต่อกรัม สามารถจับโมเลกุลได้ น้อย จึงเป็นข้อจำกัดสำหรับการใช้สารดูดซับประเภทนี้

- ถ่านกัมมันต์ ซึ่งเป็นสารดูดซับอนินทรีย์สังเคราะห์ อย่างไรก็ตามสารดูดซับนี้เป็นสารดูดซับ ที่ดีกว่าสารอนินทรีย์อื่นๆ เนื่องจากมีพื้นที่ผิวจำเพาะประมาณ 600-1,000 ตารางเมตรต่อกรัม

- สารอินทรีย์สังเคราะห์ ได้แก่ เรซินแลกเปลี่ยนไอออน (ion exchange resin) เรซินรูพรุน ขนาดใหญ่ (macroporous resins) PVPP (polyvinyl polypyrrolidone) สารเรซินเหล่านี้มีพื้นที่ผิว จำเพาะประมาณ 300-800 ตารางเมตรต่อกรัม แต่อย่างไรก็ตามเรซินมีข้อได้เปรียบกว่า คือ สามารถ ปรับคืนสภาพ (regenerate) ได้ง่ายกว่ามาก และวิธีที่ใช้ในการปรับคืนสภาพสามารถทำได้ง่าย โดย ตัวอย่างของสารดูดซับที่นำมาใช้ในการดูดซับสารประกอบฟีนอลิกมี 3 ชนิดด้วยกัน ได้แก่

##### 2.4.2.1. ถ่านกัมมันต์ (Powdered activated carbon, PAC)

ถ่านกัมมันต์เป็นถ่านที่อยู่ในรูปคาร์บอนอสัณฐาน (amorphous carbon) ชนิดหนึ่ง การผลิตโดยใช้กระบวนการก่อกัมมันต์ (activation) ซึ่งทำให้พื้นที่ผิวภายใน (internal surface area) เพิ่มขึ้นอันเนื่องมาจากโครงสร้างที่เป็นรูพรุนจำนวนมาก ถ่านกัมมันต์มีความสามารถในการดูดซับสูงอันเนื่องมาจากมีพื้นที่ผิวมากมีความจุในการดูดซับสูง ผิวโครงสร้างเป็นแบบรูพรุนขนาดเล็ก (microporous structure) จำนวนมาก และมีความว่องไวในการดูดซับสูง โดยทั่วไปแล้ว ผิวหน้าของถ่านกัมมันต์นั้นไม่มีขั้วแต่เนื่องจากมีสารประกอบออกไซด์เกิดขึ้นเสมอที่ผิวหน้าและการจัดเรียงของอะตอมอยู่ในลักษณะเฮกซะโกนัล (hexagonal) ทำให้ผิวหน้าของถ่านกัมมันต์มีพื้นที่ผิว สูงกว่าตัวดูดซับอื่นๆ เช่น ซิลิกา เจล (silica gel) จึงทำให้ดูดซับสารได้มากกว่า สำหรับการดูดซับ สารประกอบฟีนอลิกของถ่านกัมมันต์อาศัยกลไกแบบกายภาพเพียงอย่างเดียว เนื่องจากพื้นที่ผิวที่

ขรุขระจึงสามารถทำให้สารประกอบฟีนอลิกแพร่ผ่านไปในพื้นที่ผิวแล้วถูกดูดซับเอาไว้ (Soto และคณะ, 2011)

ถ่านกัมมันต์ถูกใช้ในการกำจัดสารอินทรีย์จากสารละลาย เช่น ใช้ในกระบวนการอุตสาหกรรมในระบบบำบัดของน้ำเสีย ซึ่งประกอบด้วย ฟีนอล (phenols) และการกำจัดสีจากอุตสาหกรรมผลิตน้ำตาลไม้ (Arslanoğlu และคณะ, 2005) ถ่านกัมมันต์นิยมใช้ทำให้สารสกัดเข้มข้น และทำให้สารประกอบเพอรูติกบริสุทธิ์มากขึ้น (Caqueret และคณะ, 2008; Couteau และ Mathaly, 1997) ถ่านกัมมันต์มีประสิทธิภาพใกล้เคียงกับเรซินแบบโพลีเมอร์สังเคราะห์ในการดูดซับสารประกอบฟลาโวนอยด์ (Aehle และคณะ, 2004) หรือสารประกอบประกอบฟีนอลิกที่มีโครงสร้างไม่ซับซ้อน เช่น กรดเพอรูติก กรดซาลิไซลิก (Otero และคณะ, 2004) และกรดคลอโรจินิกในสารสกัดหยาบเมสตีเดียวของกาแฟ (Suárez-Quiroz และคณะ, 2014)

ถ่านกัมมันต์สามารถแบ่งตามขนาดอนุภาคได้ 2 ชนิด ตามมาตรฐานอุตสาหกรรม (มอก.) 900-2547 ได้แก่

- ถ่านกัมมันต์ชนิดเม็ด (granular activated carbon) มีลักษณะเป็นเม็ดซึ่งได้จากการอัดผ่านเครื่องอัดเป็นเส้นกลมๆ แล้วตัดออกเป็นท่อนเท่าๆ กันหรืออาจทำเป็นเกล็ดที่ได้จากการย่อยอนุภาคขนาดใหญ่ ถ่านกัมมันต์ชนิดนี้มักใช้ในการดูดซับแก๊สและไอระเหย

- ถ่านกัมมันต์ชนิดผง (powdered activated carbon) มีลักษณะเป็นผงซึ่งได้จากการบด ถ่านกัมมันต์ชนิดนี้มักใช้งานเกี่ยวกับการดูดซับในสถานะของเหลว

#### 2.4.2.2 เรซินรูพรุนขนาดใหญ่ (Macroporous resins, MARs)

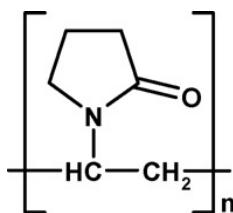
เป็นสารดูดซับที่เป็นพอลิเมอร์สังเคราะห์ (synthetic polymers) ประกอบด้วยวัสดุที่มีความชอบน้ำ (hydrophilic) หรือไม่ชอบน้ำ (hydrophobic) ภายในโครงสร้างของวัสดุ เช่น โพลีสไตรีน-ไดไวนิลเบนซีน (polystyrene-divinylbenzene) นอกจากนี้ยังมี โคพอลิเมอร์ (copolymers) คือ พอลิเมอร์ที่ประกอบด้วยหน่วยเล็ก ๆ ของมอนอเมอร์ต่างชนิดกันอยู่อย่างน้อย 2 ชนิด เช่น พอลิเมทาคริเลต (polymethacrylate) ไดไวนิลเบนซีน-เอทิลไวนิลเบนซีน (divinylbenzene-ethylvinylbenzene) และไวนิลไพริดีน (vinylpyridine) เป็นต้น ถึงแม้ว่าพื้นที่ผิวจำเพาะ (ตารางเมตรต่อกรัม) จะเล็กกว่าถ่านกัมมันต์ แต่ MARs เป็นวัสดุที่มีความคงทน ความเฉื่อยต่อปฏิกิริยาเคมี และความเสถียรมากกว่า นอกจากนี้ยังมีความสามารถในการดูดซับสารประกอบฟีนอลิกสูง มีความจำเพาะในการดูดซับสารประกอบฟีนอลิก และง่ายในการนำกลับมาใช้ ดันทุ่นถูกและไม่มีความเป็นพิษ โดยในการคืนสภาพ (regeneration) ของ MARs ไม่มีการใช้ความ

ร้อน จึงไม่ต้องกังวลปัญหาเรื่องการใช้พลังงาน และยังสามารถนำไปประยุกต์ใช้ทางด้านอุตสาหกรรมอาหารและทางด้านเภสัชกรรม (Mingjiang และคณะ, 2012) มีงานวิจัยที่ศึกษากลไกในการดูดซับสารประกอบฟีนอลิกของ MARs พบว่าเป็นการดูดซับโดยอาศัยสมบัติทางเคมี กล่าวคือ เกิดจากโมเลกุลของสารประกอบฟีนอลิกแทรกผ่านรวมเข้าอยู่ด้วยกันกับโมเลกุลที่อยู่ระหว่างพื้นผิวของเรซินด้วยสมบัติความมีขั้วของโมเลกุล และเกิดพันธะไฮโดรเจนระหว่างสารประกอบฟีนอลิกและ MARs นอกจากนี้มีการดูดซับโดยอาศัยสมบัติทางกายภาพ กล่าวคือ โมเลกุลของสารประกอบฟีนอลิกสามารถที่จะแพร่เข้าไปภายในรูพรุนและถูกดูดซับไว้ภายในพื้นที่ผิว (Sun และคณะ, 2015) ประสิทธิภาพการทำให้สารสกัดบริสุทธิ์บางส่วนโดยผ่านสารดูดซับขึ้นกับน้ำหนักโมเลกุล ความมีขั้ว โครงสร้างที่แตกต่างกันของโมเลกุลของสารประกอบฟีนอลิกในสารละลาย ซึ่งมีผลต่อความสามารถ รวมถึงชนิดของสารประกอบฟีนอลิกที่ถูกดูดซับซึ่งอาจมีความแตกต่างกัน (Fu และคณะ, 2005; Kammerer และคณะ, 2006) การเลือกใช้สารดูดซับให้เหมาะสมกับสารประกอบฟีนอลิกที่ต้องการทำให้สามารถเพิ่มความเข้มข้นหรือปริมาณของสารประกอบฟีนอลิกในสารสกัดหยาบได้ เมื่อจำแนกตามลักษณะความมีขั้วของ MARs อาจแบ่งสารนี้ออกเป็น 3 ชนิด ได้แก่ ชนิดมีขั้ว (polar) มีขั้วปานกลาง (moderate polar) และไม่มีขั้ว (none polar) โดย MARs ที่มีความมีขั้วปานกลางจะมีความเหมาะสมในการดูดซับสารประกอบฟีนอลิกที่มีขั้วปานกลางเช่น กรดแกลลิก (gallic acid) กรดเอลลาจิก (ellagic acid) คอริลาจिन (corilagin) ไฮเพอริน (hyperin) และแคมพ์เฟอรอล (kaempferol) (He และ Xia, 2008)

Suffet และคณะ (1978) ได้ศึกษาการเปรียบเทียบสารดูดซับที่แตกต่างกันระหว่างเรซินชนิดรูพรุนขนาดใหญ่และถ่านกัมมันต์ พบว่าเรซินชนิดรูพรุนขนาดใหญ่ ได้แก่ XAD-2 มีการดูดซับสารอินทรีย์ส่วนใหญ่้น้อยกว่าถ่านกัมมันต์โดยพื้นฐานโดยมวล อย่างไรก็ตามเรซินชนิดมีรูพรุนขนาดใหญ่ มีความสามารถจำเพาะต่อการดูดซับสารอินทรีย์มวลโมเลกุลต่ำ เช่น สารประกอบฟีนอลิกได้ดีกว่า นอกจากนี้การคืนสภาพของเรซินทำได้ง่ายกว่าด้วยตัวทำละลายต่างๆ ส่วนการคืนสภาพของถ่านกัมมันต์ต้องทำที่อุณหภูมิสูง และ/หรือใช้ไอน้ำ (Cairo และคณะ, 1982)

#### 2.4.2.3 โพลีไวนิล โพลีไพร์โรลิดอน (PVPP)

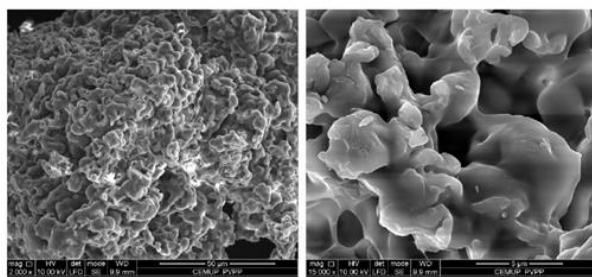
สารชนิดนี้ใช้ในการดูดซับสารประกอบฟีนอลิกได้เช่นกัน PVPP เป็นวัสดุทางการค้าที่ผลิตโดยใช้พันธะเชื่อมข้ามระหว่าง polyvinylpyrrolidone (PVP) โครงสร้างทางเคมีและสูตรโมเลกุลของ PVPP แสดงในภาพที่ 2.9



ภาพที่ 2.9 โครงสร้างทางเคมีของ PVPP –  $(\text{C}_6\text{H}_9\text{NO})_n = (111.1)_n$ .

ที่มา: Magalhaes และคณะ (2010)

ลักษณะปรากฏโดยทั่วไปและพื้นผิวส่วนฐานของ PVPP เมื่อส่องโดยใช้กล้องอิเล็กตรอน (electron microscope) แสดงในภาพที่ 2.10



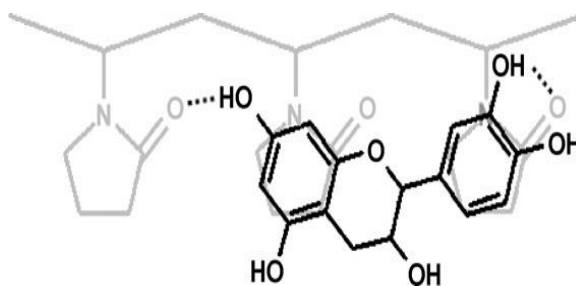
ภาพที่ 2.10 ลักษณะปรากฏโดยทั่วไปและพื้นผิวส่วนฐานของ PVPP เมื่อส่องโดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน (electron microscope)

ที่มา: Magalhaes และคณะ (2010)

โดยทั่วไป PVPP ถูกใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตเครื่องดื่ม เช่น เบียร์ ไวน์ น้ำผลไม้ เป็นต้น โดยผลิตภัณฑ์ดังกล่าวมีองค์ประกอบของสารประกอบพินอลิก ซึ่งมีความจำเป็นในการกำจัดสารประกอบโพลีฟีนอลเพื่อที่จะป้องกัน การเกิดความขุ่น (haze) ในเครื่องดื่ม (Barbosa-Pereira และคณะ, 2013)

สารดูดซับนี้เป็นสารดูดซับที่มีความเฉื่อยต่อการเกิดปฏิกิริยาชีวเคมี จึงไม่อันตรายในการนำมาใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตอาหาร (Jankowiak และคณะ, 2015) กลไกในการดูดซับของสารประกอบโพลีฟีนอล อาศัยพันธะไฮโดรเจนระหว่างโปรตอนตัวให้จากสารประกอบโพลีฟีนอลและหมู่คาร์บอนิลจาก PVPP (Simone และคณะ, 2008) นอกจากนี้ยังมีการซ้อนเหลื่อมกันของออร์บิทัลอะตอม โดยมีหลักการสำคัญของทฤษฎีออร์บิทัลโมเลกุลจะพิจารณาว่าอิเล็กตรอนในออร์บิทัลของโมเลกุลไม่ได้อยู่ประจำที่ (delocalized electrons) แต่สามารถเคลื่อนที่ไปได้ทั่วทั้งโมเลกุล ออร์บิทัล  $p$  ทั้งสองเกิดการซ้อนเหลื่อมตามแนวข้างเกิดเป็นพันธะไพ ( $\pi$ -bond) ด้วยแรงมีซัวร์

นอกจากนี้ยังมีอันตรกิริยาที่ไม่ชอบน้ำระหว่างหมู่วงแหวนอะโรมาติกของสารประกอบโพลีฟีนอลและวงแหวนของ PVPP (Doner และคณะ, 1993; Laborde และคณะ, 2006) ดังแสดงในภาพที่ 2.11



ภาพที่ 2.11 การดูดซับของคาเทชิน (catechin) โดย PVPP รวมทั้งอิเล็กตรอนในออร์บิทัลโมเลกุลไม่ได้อยู่ประจำที่ (delocalized electrons)

ที่มา: Magalhaes และคณะ (2010)

นอกจากนี้ความสามารถในการดูดซับสารประกอบฟีนอลิกของ PVPP จะเพิ่มขึ้นตามจำนวนของหมู่ไฮดรอกซิลของสารประกอบฟีนอลิกที่มากขึ้นซึ่งสามารถเกิดขึ้นมากขึ้นตามพันธะไฮโดรเจน PVPP มีสมบัติไม่ละลายในน้ำจึงเหมาะสมสำหรับการคืนสภาพ และเป็นเหตุผลสำคัญสำหรับการยอมรับให้ใช้ในผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มในกระบวนการอุตสาหกรรมเครื่องดื่ม (Barbosa-Pereira และคณะ, 2013; Jankowiak และคณะ, 2015)

### 2.4.3 การปลดปล่อยสารประกอบฟีนอลิกจากสารดูดซับ

นอกจากกระบวนการดูดซับสารประกอบฟีนอลิกจะมีความสำคัญแล้ว กระบวนการปลดปล่อยสารประกอบฟีนอลิกยังมีความสำคัญเป็นอย่างยิ่ง การเลือกใช้ความเข้มข้นของตัวทำละลายให้เหมาะสมและสอดคล้องกับความมีขั้วของสารประกอบฟีนอลิกที่ถูกดูดซับไว้จะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการดูดซับ รวมถึงสามารถเพิ่มอัตราส่วนของสารประกอบฟีนอลิกในสารสกัดหยาบได้ โดยการใช้เอทานอลเป็นตัวทำละลายในการปลดปล่อยสารประกอบฟีนอลิกจากสารดูดซับช่วยให้เกิดความปลอดภัยที่จะนำมาใช้อุตสาหกรรมอาหาร และอุตสาหกรรมเภสัชกรรม จากรายงานพบว่า ตัวทำละลายชนิดนี้ถูกใช้ในการปลดปล่อยสารประกอบฟีนอลิกจาก MARs ในสารสกัดพวกคาเฟอีนในชา การปลดปล่อยกลุ่มสารประกอบโพลีฟีนอลจาก MARs (Liu และคณะ, 2016) ถ่านกัมมันต์ (Ena

และคณะ, 2012) และ PVPP (Haider และคณะ, 2009) โดยนิยมใช้ความเข้มข้นของเอทานอลตั้งแต่ร้อยละ 10-95 โดยปริมาตร ซึ่งการที่จะเลือกใช้ค่าความเข้มข้นใดความเข้มข้นหนึ่งต้องคำนึงถึงความเหมาะสมทางด้านสารสกัดแห้งที่ได้ และการเพิ่มอัตราส่วนของสารประกอบฟีนอลิกที่ต้องการในสารสกัดหยาบที่ได้ รวมถึงฤทธิ์ทางด้านชีวภาพในการต้านอนุมูลอิสระ และต้านแบคทีเรีย สารประกอบกลุ่มกรดฟีนอลิก ได้แก่ กรดแกลลิก กรดเอลลาจิก สามารถปลดปล่อยได้ดีโดยใช้ความเข้มข้นของเอทานอลร้อยละ 50 (โดยปริมาตร) (He และ Xia, 2008) ในขณะที่ความเข้มข้นร้อยละ 70-80 (โดยปริมาตร) พบว่าสามารถปลดปล่อยสารประกอบฟลาโวนอยด์ ได้แก่ รูทีน เควอร์ซิทิน คาเทชิน ได้ดีขึ้น อย่างไรก็ตามเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของตัวทำละลายมากกว่าช่วงดังกล่าว พบว่าสามารถปลดปล่อยสารประกอบฟลาโวนอยด์ในกลุ่มนี้จาก MARs ได้ลดลงจากเดิม (Fu และคณะ, 2005)

นอกจากนี้ความเข้มข้นของตัวทำละลายเป็นปัจจัยสำคัญในการแยกสารประกอบฟีนอลิกจากสารสกัดหยาบ โดยมีการศึกษาปริมาณร้อยละสารประกอบฟีนอลิกที่ได้จาก MARs ได้แก่ HP-20 และ XAD-7HP ด้วยความเข้มข้นของเอทานอลร้อยละ 30 50 70 และ 90 (โดยปริมาตร) พบว่า สารดูดซับทั้งสองสามารถแยกเอาสารประกอบฟีนอลิกด้วยร้อยละสูงที่สุดที่ความเข้มข้นของตัวทำละลายร้อยละ 70 ซึ่งขึ้นอยู่กับความมีขี้ของตัวทำละลายและสารที่ถูกดูดซับ ซึ่งเมื่อความมีขี้ของสารใกล้เคียงกันก็จะสามารถละลายออกมาได้ดี (Lin และคณะ, 2012) การใช้ความเข้มข้นของตัวทำละลายที่สูง ทำให้ได้ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกสูงขึ้น เพราะสารประกอบฟีนอลิกเป็นสารประกอบที่มีความมีขี้ เนื่องจากมีหมู่ไฮดรอกซิลจำนวนมาก ตลอดจนสามารถเกิดพันธะไฮโดรเจนกับ MARs ได้ จึงไม่เหมาะสมที่จะชะด้วยน้ำกลั่นหรือเอทานอลความเข้มข้นต่ำๆ (Mingjiang และคณะ, 2012)

CHULALONGKORN UNIVERSITY

## 2.5 ความสามารถในการต้านการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ของสารสกัดหยาบจากพืช

จากการศึกษาพบว่าสารสกัดหยาบจากเมล็ดมะเกี๋ยง และพืชตระกูลใกล้เคียง มีองค์ประกอบของสารประกอบฟีนอลิกที่มีความสามารถในการต้านแบคทีเรีย พิมพ์ใจ อาษา (2551) ได้ศึกษาฤทธิ์การต้านแบคทีเรียของสารสกัดเมล็ดมะเกี๋ยงที่สกัดด้วยวิธีการสกัดแบบไหลย้อนกลับ (reflux extraction) ด้วยตัวทำละลายเอทานอลร้อยละ 50 ด้วยวิธี agar well diffusion บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Mueller Hinton agar (MHA) พบว่าสารสกัดหยาบเมล็ดมะเกี๋ยงที่ความเข้มข้นร้อยละ 2.5 (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) มีโซนการยับยั้ง *S. aureus* และ *P. acnes* เท่ากับ  $26.16 \pm 0.25$  และ  $25.78 \pm 0.91$  มิลลิเมตร ตามลำดับ

การศึกษาฤทธิ์การต้านแบคทีเรีย *B. subtilis*, *L. monocytogenes*, *P. aeruginosa* และ *S. aureus* ของสารสกัดจากดอกตูมของหว่าขาว (*Cleistocalyx operculatus*) ซึ่งใช้เอทานอลเป็น

ตัวทำละลาย พบว่ามีค่า MIC และ MBC อยู่ในช่วง 0.25-1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (Dong และคณะ, 2015)

Chandrasekaran และ Venkatesalu (2004) ศึกษาสมบัติด้านการเจริญของจุลินทรีย์ของสารสกัดจากเมล็ดหัวว่าพบที่สามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวก ได้แก่ *B. subtilis* และ *S. aureus* ได้ดีกว่าแบคทีเรียแกรมลบ ได้แก่ *S. Typhimurium*, *P. aeruginosa*, *K. pneumonia* และ *E. coli* โดยค่า MIC และ MBC ของแบคทีเรียแกรมบวก อยู่ในช่วง 62.5–250 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ 125-500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ นอกจากนี้การรายงานของ Hajoori และคณะ (2013) ซึ่งศึกษาผลของตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดต่อความสามารถด้านการเจริญของจุลินทรีย์ของสารสกัดจากเมล็ดหัวว่า (*Syzygium cumini* L. Skeels) โดยใช้ตัวทำละลายในการสกัดต่างกันได้แก่ น้ำ เมทานอล เอทานอล กรดอะซิติก และปิโตรเลียมอีเทอร์ ผลการศึกษาพบว่า สารสกัดเมล็ดหัวว่าที่ใช้น้ำและเอทานอลเป็นตัวทำละลายที่ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ ได้แก่ *S. aureus*, *S. paratyphi*, *B. cereus* และ *B. subtilis* ได้ดีกว่าการใช้ตัวทำละลายอื่น

### 2.5.1 การเพิ่มประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรียของสารสกัดหยาบจากพืช

สารสกัดหยาบจากพืชมีประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรียได้ในระดับหนึ่ง งานวิจัยต่างๆจึงได้ศึกษาการเพิ่มประสิทธิภาพการยับยั้งแบคทีเรียของสารสกัดหยาบ ด้วยวิธีต่างๆดังนี้

Kotodziejczyk และคณะ (2013) ศึกษาการเพิ่มประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรียของสารสกัดจากกากเชอร์รี่ที่ได้จากโรงงานอุตสาหกรรม โดยนำสารสกัดหยาบมาทำให้บริสุทธิ์บางส่วนด้วยคอลัมน์โครมาโตกราฟีชนิด Amberlite XAD-7HP จากนั้นแยกสาร (fractions) ที่ออกมาจากคอลัมน์คือ CHPE1 CHPE2 และ CHPE3 แล้วนำสาร (fractions) ต่างๆ ที่แยกได้ไปศึกษาการเปลี่ยนแปลงจำนวนแบคทีเรีย *L. monocytogenes* ที่อยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งพบว่า CHPE2 และ CHPE3 สามารถลดจำนวน *L. monocytogenes* ได้มากกว่าการใช้สารสกัดหยาบถึง 3 log CFU/ml และเมื่อศึกษาองค์ประกอบของ CHPE2 และ CHPE3 พบว่ามีองค์ประกอบของสารประกอบกลุ่มสารประกอบฟีนอลิกและฟลาโวนอลในปริมาณสูงกว่าสารสกัดหยาบ ทำให้มีฤทธิ์การยับยั้งที่ดีกว่า

Chan และคณะ (2011) ศึกษาการเพิ่มประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรียของสารสกัดใบ *Etligeria elatior* โดยนำสารสกัดหยาบดังกล่าวมาทำให้บริสุทธิ์บางส่วนด้วยคอลัมน์โครมาโตกราฟีชนิด Diaion HP-20 จากนั้นแยกสาร (fractions) ที่ออกมาจากคอลัมน์ ได้แก่ fractions1 fractions 2 และ fractions 3 โดย พบว่า fractions2 มีองค์ประกอบของสารประกอบฟีนอลิกเพิ่มขึ้นประมาณ 2 เท่าของสารสกัดหยาบ นอกจากนี้เมื่อวิเคราะห์ปริมาณและชนิดสารประกอบ ฟีนอลิกด้วยเครื่อง



HPLC พบว่ามีปริมาณกรดคลอโรจินิกและกรดคาเฟอิกเพิ่มขึ้นอีกด้วย จากนั้นนำสาร (fractions) ต่างๆ ที่แยกได้ไปศึกษาการต้านแบคทีเรียโดยวิธี paper disc diffusion โดยทดสอบค่า MID (minimum inhibitory dose) ในการต่อต้านแบคทีเรีย *S. aureus* และ *Bacillus cereus* พบว่า สาร fractions 2 มีค่า MID ของเชื้อทั้ง 2 เท่ากับ 0.06 มิลลิกรัมต่อดิสก์ ซึ่งต่ำกว่า ค่า MID ของสาร สกัดหยาบ ซึ่งมีค่า 0.13 มิลลิกรัมต่อดิสก์

## 2.6 แบคทีเรียก่อโรค

จุลินทรีย์ในอาหารมีมากมายหลายชนิด โดยมีความสำคัญทั้งคุณประโยชน์ และโทษ โดยโทษของจุลินทรีย์เป็นตัวชี้วัดถึงคุณภาพและความปลอดภัยของอาหาร เช่น แบคทีเรียที่ก่อให้เกิดอาหารเน่าเสีย (food spoilage) แบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของการเกิดโรคในมนุษย์ ได้แก่ โรคอาหารเป็นพิษ (food poisoning) ที่เป็นอันตรายในอาหาร (food hazard) จากข้อมูลสถานการณ์การสำรวจการปนเปื้อนผลไม้ตัดแต่งในร้านขายผลไม้ตัดแต่ง พบว่ามีจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดที่เกินกำหนด นอกจากนี้ยังพบการปนเปื้อนของแบคทีเรียก่อโรค (นภาพร เขียวชาญ, 2557) ในที่นี้จะยกตัวอย่างของแบคทีเรียมา 3 ชนิด

### 2.6.1 *Escherichia coli*

วีรบุรุษ หลาง (2555) ได้อธิบายว่า *E.coli* เป็นแบคทีเรียแกรมลบ เซลล์รูปท่อนสั้น ไม่สร้างสปอร์ บางสายพันธุ์ที่แยกได้จากนอกลำไส้สร้างแคปซูลได้ ให้โคโลนีเรียบ ไม่มีสี มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 2-3 มิลลิเมตร ในเวลา 18 ชั่วโมง สามารถย้อมติดแกรมลบ มีการดำรงชีวิตแบบ facultative anaerobes เคลื่อนที่โดยมี flagella ชนิดรอบตัว (peritrichous) หรือบางทีอาจไม่เคลื่อนที่ แต่ถ้าเจริญบน differential media เช่น Mac Conkey agar โคโลนีมีสีแดงชมพู ขนาดใหญ่ ย่อยแล็กโทส ได้กรดและก๊าซที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ภายใน 24-48 ชั่วโมง หรือเลี้ยงในอาหาร Eosin methylene blue agar (EMB) และ Endo agar โคโลนีมีสีมันวาวคล้ายโลหะ เชื้อนี้เจริญได้ในอุณหภูมิช่วงกว้าง (15-45 องศาเซลเซียส) นอกจากนี้พบว่า บางสายพันธุ์สามารถทนความร้อนที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที หรืออุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที

แบคทีเรีย *E. coli* เป็นแบคทีเรียในกลุ่มโคลิฟอร์ม เป็นตัวชี้การปนเปื้อนของอุจจาระในน้ำ มีอยู่ตามธรรมชาติ ในลำไส้ใหญ่ของสัตว์และมนุษย์ ซึ่งผู้บริโภคมีโอกาสที่จะได้รับเชื้อโรคชนิดนี้และชนิดอื่นที่มาจากระบบทางเดินอาหารโดยอาจปะปนมากับอุจจาระคนหรือสัตว์ (Kornacki, 2010) จากการศึกษาพบว่าในอุจจาระคนมี *E. coli* สูงถึง 92.9 % และมีปริมาณมากถึง  $10^9$  เซลล์ต่อกรัม (dry weight) เชื้อจะไม่ทนสภาวะภายนอกได้นาน ดังนั้นเมื่อพบ *E. coli* ในอาหารจึงสันนิษฐานว่า

อาหารนั้นมีการสัมผัสกับสิ่งขับถ่ายโดยตรง หรือมีการปนเปื้อนทางอ้อมจากสิ่งอื่นที่เชื้ออาศัย หรือเจริญได้ โดยทั่วไปแล้ววัตถุดิบที่จะนำมาประกอบอาหารไม่ควรมี *E. coli* ปนอยู่ การตรวจพบ *E. coli* ในวัตถุดิบหมายถึงโอกาสที่มีการปนเปื้อนของจุลินทรีย์อื่นๆ ที่ก่อให้เกิดโรคในคนด้วย ในทางจุลชีววิทยาทางอาหารจึงนิยมใช้ *E. coli* เป็นตัวบ่งชี้สำหรับการตรวจวิเคราะห์เชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคในระบบทางเดินอาหารโดยตรง (enteropathogenic) เช่น *E. coli* O157 : H7 สามารถทำให้ทารกที่มีอายุต่ำกว่าหนึ่งปีเกิดอาการท้องร่วง โดยการเกาะติดกับเซลล์ของเนื้อเยื่อ ทำให้เกิดการรวมตัวกับเยื่อเมือกในลำไส้ จากนั้นเกิดการเจริญเติบโตและเพิ่มจำนวนในเยื่อเมือกของลำไส้ (สมณฑา วัฒนสินธุ์, 2549)

### 2.6.2 *Staphylococcus aureus*

วีรบุช หลาง (2555) ได้อธิบายว่า *S. aureus* เป็นแบคทีเรียแกรมบวก ใน Class Schizomycetes, Order Eubacteriales จัดอยู่ในตระกูลไมโครค็อกคาซี (Micrococcaceae) เมื่อส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์จะเห็นรูปร่างทรงกลม เรียงตัวเป็นกลุ่มคล้ายพวงองุ่น หรือเป็นคู่ หรือเป็นสายสั้นๆ ไม่เคลื่อนที่ ไม่สร้างสปอร์ เซลล์มีเส้นผ่านศูนย์กลางระหว่าง 0.5-1.5 ไมโครเมตร โดยทั่วไปแบคทีเรียกลุ่มนี้สามารถทนทานต่อสภาพแวดล้อมต่างๆ ได้ดี เช่น ทนความร้อนอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที และที่อุณหภูมิต่ำ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลาหลายเดือน และยังสามารถสาร infectant ได้แก่ ฟีนอล และเมอร์คิวริกคลอไรด์มากกว่าแบคทีเรียอื่นๆ นอกจากนี้ยังสามารถรอดชีวิตในน้ำเกลือความเข้มข้นสูง 6.5%

*Staphylococci* สามารถหมักน้ำตาลได้หลายชนิด ผลผลิตเกิดเป็นกรดแลคติกแต่ไม่เกิดก๊าซ เชื้อในกลุ่มนี้ได้แก่ *S. aureus* สามารถหมักน้ำตาลแลคโตสและสร้างกรด

*S. aureus* มีความสำคัญในทางจุลชีววิทยาอาหาร เนื่องจากเป็นหนึ่งในจุลินทรีย์บ่งชี้ (indicator microorganism) ถึงความปลอดภัยของอาหารที่จะบริโภค จากการที่เชื้อ *S. aureus* อาศัยอยู่บริเวณผิวหนังหรือเยื่อเมือกของมนุษย์ ดังนั้นหากพบเชื้อ *S. aureus* ในอาหารที่ตรวจสอบบ่งชี้ได้ว่าสัญลักษณ์ของการผลิตอาหารนั้นไม่มีความสะอาดเพียงพอ ผู้บริโภคอาจได้รับอันตรายจากแบคทีเรียก่อโรคนี้อื่นๆ ผ่านการสัมผัสด้วยมือ ผิวหนัง ช่องปากหรือช่องจมูกของผู้ผลิต รวมทั้งแสดงถึงสัญลักษณ์ในการบริโภคที่ไม่ดี เช่น การรับประทานอาหารที่ปนเปื้อนหรือทิ้งไว้โดยไม่ใส่ตู้เย็นหลายชั่วโมง

โรคอาหารเป็นพิษ (food poisoning) มีสาเหตุเกิดจากการกินอาหารที่มีสารพิษของเชื้อ *S. aureus* สายพันธุ์ที่สร้าง enterotoxin ที่เป็น single-chain globular proteins ที่มีน้ำหนักโมเลกุล 28,000-35,000 ดาลตัน โดยมีทั้งหมด 7 ชนิด ได้แก่ A, B, C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub>, D, E และ toxic shock toxin (TST) สารพิษทุกชนิดยกเว้น TST ทำให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษ สำหรับชนิดที่พบบ่อยที่สุดคือ

เอนเทอโรทอกซิน A และ D สารพิษทุกชนิดมีคุณสมบัติละลายน้ำได้ ทนความร้อน ได้สูงถึงอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลาครึ่งถึงหนึ่งชั่วโมง ทนเอนไซม์ในกระเพาะอาหาร สารนี้เป็นสาเหตุของอาการอาหารเป็นพิษในมนุษย์ โดยปริมาณสารพิษที่จะทำให้เกิดโทษแก่ผู้บริโภคได้ต้องไม่ต่ำกว่า 0.1-1 ไมโครกรัมต่ออาหาร 100 กรัม ซึ่งจะต้องพบจำนวนเชื้อเป็นปริมาณมากถึง  $10^5 - 10^6$  เซลล์ต่อกรัม อาหาร จำนวนของ *S. aureus* ที่อนุญาตให้มีในอาหารต้องไม่เกิน 10-100 เซลล์ต่อกรัม (Varnam, 1991) ซึ่งปริมาณระดับนี้มักถูกปนเปื้อนโดยผู้ประกอบอาหารที่มีเชื้ออยู่ในมือ และอาหารนั้นมักเก็บไว้ในตู้เย็นที่ไม่เย็นพอ รวมถึงไม่มีการควบคุมกระบวนการผลิตที่ดีจึงทำให้เชื้อเจริญเติบโตและสร้างสารพิษได้ อาหารที่มักมีเชื้อปะปน ได้แก่ อาหารพวกคัสตาร์ดหรือขนมปังที่มีครีม อาหารพวกแฮม เนื้อที่ผ่านกรรมวิธีการปรุงแล้ว ไอศกรีม cottage cheese สลัดไก่ และผักผลไม้สด โดยอาหารที่มี enterotoxin ปะปนมักมีกลิ่น รส และสภาพของอาหารเป็นปกติ ปริมาณสารพิษที่มากพอจะทำให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษที่สร้างขึ้นภายในเวลา 4-6 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

อาการของโรคจะเกิดภายใน 2-6 ชั่วโมงหลังจากกินอาหารเข้าไป โดยมีอาการเป็นตะคริวรุนแรง ปวดท้อง อาเจียน คลื่นเหียน ท้องร่วง อาจมีอาการเหงื่อแตกและปวดศีรษะ แต่มักไม่มีไข้ อาการของโรคจะหายได้เร็วภายใน 6-8 ชั่วโมง (สุมนทนา วัฒนสินธุ์, 2549)

### 2.6.3 *Salmonella* Typhimurium

วีรานุช หลาง (2555) ได้อธิบายว่า *Salmonella* เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปร่างท่อนสั้น มีขนาดกว้าง 0.5-0.7 ไมครอนและยาว 2-3 ไมครอน ไม่สร้างสปอร์อยู่ในวงศ์ *Enterobacteriaceae* *S. Typhimurium* เจริญในสภาวะที่มีหรือไม่มีอากาศก็ได้ (facultative-anaerobe) เคลื่อนที่ได้โดยอาศัยแฟลกเจลลารอบตัว (peritrichous flagella) ยกเว้นสายพันธุ์ Pullorum และ Gallinarum ซึ่งไม่มีแฟลกเจลลาจึงไม่สามารถเคลื่อนที่ได้ ซาลโมเนลลาส่วนใหญ่อาศัยอยู่ในลำไส้ของคนและสัตว์ (D' Aoust, 1994) นอกจากนี้ ยังมีความทนทานในสิ่งแวดล้อม แม้ *Salmonella* เป็นแบคทีเรียที่ไม่สร้างสปอร์ แต่ทนต่อสภาพแวดล้อมที่แห้งแล้งหรือเย็นจัด สามารถอยู่รอดได้นานในที่ที่ขาดอาหาร พบ *Salmonella* อยู่รอดในดินได้นานถึง 200 วัน ในฝุ่นนาน 10 เดือน อุจจาระของสัตว์ฟันแทะนาน 5 เดือน และในฟองไข่ได้นานกว่า 4 ปี นอกจากนี้สามารถแบ่งตัวในอาหารที่อุณหภูมิ 7-46 องศาเซลเซียส และอยู่รอดได้ที่พีเอช (pH) 4.5

*S. Typhimurium* ถูกทำลายที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง หรือ 60 องศาเซลเซียส นาน 15-20 นาที หรือ 62 องศาเซลเซียส นาน 4 นาที ส่วนที่อุณหภูมิต่ำกว่า 5 องศาเซลเซียส ไม่สามารถทำลายเชื้อได้ เพียงแต่เป็นการยับยั้งการเจริญของเชื้อเท่านั้น (สุมนทนา วัฒนสินธุ์, 2549)

### ลักษณะการก่อโรค

เชื้อชนิดนี้มักแพร่กระจายมากับน้ำและอาหารที่มีการปนเปื้อนอุจจาระของผู้ป่วย การเข้าทำลายระบบทางเดินอาหารของมนุษย์เกิดขึ้นคล้ายกลไกของเชื้อ *S. aureus*

สำนักงานมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ (2557) พบว่าการปนเปื้อนของ *Salmonella* ที่พบทั่วไปในอาหารได้แก่

- นมและผลิตภัณฑ์นม เช่น ไอศกรีม เนยแข็ง เนื่องจากถูกปนเปื้อนด้วยอุจจาระหรือผ่านกระบวนการพาสเจอร์ไรเซชันไม่เพียงพอ หรือผ่านการประกอบอาหารที่ไม่ดีพอ
- อาหารทะเลสดต่างๆ เช่น ปลาหมึก
- ผลิตภัณฑ์จากไข่ เช่น ไข่แห้งหรือไข่แช่แข็ง ซึ่งเชื้อติดต่อมาจากสัตว์ปีกหรือปนเปื้อนในกระบวนการการผลิต
- เนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์ เช่น ไส้กรอก อาจติดเชื้อจากสัตว์ที่เป็นโรคหรือปนเปื้อนกับอุจจาระของคนหรือสัตว์ฟันแทะ
- ผักและผลไม้สด เช่น ผักและผลไม้สดตัดแต่ง

### 2.7 การปนเปื้อนจุลินทรีย์แคนตาลูปตัดแต่ง

แคนตาลูปมีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Cucumis melo var. cantalupensis* ผลสดนิยมบริโภคไปทั่วโลก และมักจะนำมาทำเป็นผลไม้ตัดแต่งพร้อมบริโภค (fresh-cut product หรือ minimally processed product) ในประเทศไทยมีมาตรฐานรับรองความปลอดภัยโดยกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ตามเกณฑ์คุณภาพทางจุลชีววิทยาของอาหารและโภชนาการได้กำหนดถึงปริมาณจุลินทรีย์ที่พบในตัวอย่างผลไม้ตัดแต่ง โดยปริมาณแบคทีเรียทั้งหมด ต้องพบไม่เกิน  $10^4$  CFU/g สำหรับปริมาณแบคทีเรีย *E. coli* ต้องไม่เกิน 10 CFU/g ในขณะที่ปริมาณ *S. aureus* ต้องไม่เกิน  $10^2$  CFU/g และต้องตรวจไม่พบแบคทีเรีย *S. Typhimurium* (กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์, 2553) อย่างไรก็ตามการปนเปื้อน *Salmonella* spp. ของแคนตาลูปยังคงมีอย่างต่อเนื่อง จากการรายงานของ Centers for Disease Control and Prevention (CDC) ของประเทศสหรัฐอเมริกา ได้รายงานว่ามีเหตุการณ์ระบาดถึง 9 เหตุการณ์ โดยตรวจพบโรคซาลโมเนลลาซิสซึ่งมีสาเหตุการปนเปื้อนจากแบคทีเรียก่อโรคในแคนตาลูปตัดแต่งดังกล่าว ตั้งแต่ปี ค. ศ. 1990 ถึง 2014 ซึ่งผู้ติดเชื้อเกือบ 500 คน เกิดอาการป่วย และเสียชีวิตทั้งหมด 5 ราย เมื่อตรวจสอบสาเหตุ พบว่าเกิดจากการฝังตัวของเชื้อภายในเนื้อแคนตาลูปนั้นเนื่องจากการไม่มีการล้างแคนตาลูปก่อนปอกเปลือกและไม่ได้ล้างมีดหลังการหั่นแต่ละผลทำให้เกิดการปนเปื้อนข้ามในผลต่อผลได้ (CDC,

2014) สำหรับในประเทศไทย แคนตาลูปตัดแต่งเป็นผลไม้ที่ได้รับความนิยม จากการสำรวจสถานการณ์การปนเปื้อนแบคทีเรียก่อโรคของรถเข็นที่ขายผลไม้ตัดแต่งในกรุงเทพมหานคร พบว่ามี การปนเปื้อนของแบคทีเรียก่อโรค ได้แก่ *E. coli*, *S. Typhimurium* และ *S. aureus* ในระดับที่เกิน กำหนดตามกฎหมาย ทั้งนี้อาจจะมาจากกระบวนการผลิตที่ไม่เหมาะสม (วรดา อ่ำบุญ และคณะ, 2557) ดังแสดงในตารางที่ 2.1

**ตารางที่ 2.1** แหล่งการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ในผักและผลไม้ระหว่างกระบวนการผลิต

กระบวนการผลิต	ที่มาของการปนเปื้อน
การเพาะปลูกและการเก็บเกี่ยว เช่น การปลูก การเก็บและการมัดแบ่งเป็นกำ	น้ำ มูลสัตว์ การขาดสุขลักษณะที่ดีในการจัดการ
กระบวนการผลิตขั้นต้น เช่น การล้าง การเคลือบไซ การคัด การบรรจุกล่องหรือลัง พลาสติก	น้ำล้าง การจับต้องของพนักงาน ภาชนะ การปนเปื้อนของจุลินทรีย์ข้ามจากแหล่งหนึ่งไปอีก แหล่งหนึ่ง
กระบวนการผลิตขั้นสุดท้าย เช่นการหั่น การคั้นน้ำ การปอก การบรรจุ	น้ำล้างการจับต้องของพนักงาน ภาชนะ การปนเปื้อนของจุลินทรีย์ข้ามจากแหล่งหนึ่งไปยังอีก แหล่งหนึ่ง
การขนส่งโดยใช้รถบรรทุก	รถบรรทุกไม่สะอาด น้ำแข็งที่ใช้

ที่มา: นภาพร เชี่ยวชาญ (2557)

## 2.8 การล้างผักและผลไม้ตัดแต่ง

ในปัจจุบันผลิตภัณฑ์ผักและผลไม้สดที่ตัดแต่งแล้วจะนิยมบริโภคทันที (fresh-cut) เนื่องจากมีคุณค่าทางโภชนาการที่ดี อย่างไรก็ตามอาหารสดก็ยังคงเกิดการเสื่อมเสียได้ง่าย มีอายุการเก็บไม่นาน อีกทั้งถ้าไม่มีการควบคุมสุขลักษณะที่ดีก็จะทำให้เกิดการปนเปื้อนของแบคทีเรียก่อโรคในผักและผลไม้สดเหล่านั้น จึงต้องพิจารณาถึงความปลอดภัยทางอาหารเป็นสำคัญ (Bhagwat, 2006; FSA, 2007) คุณภาพของน้ำล้างและอุณหภูมิของผู้เย็นของผลิตภัณฑ์หลังจากการเก็บเกี่ยวจึงมีความสำคัญมาก (CDC, 2009) เป็นที่ทราบกันดีว่าการล้างเป็นการควบคุมการปนเปื้อนของแบคทีเรียระหว่างกระบวนการตัดแต่งผักและผลไม้ ซึ่งส่งผลต่อคุณภาพ และความปลอดภัยรวมถึงอายุการเก็บของผลิตภัณฑ์สุดท้ายอีกด้วย

การล้างนั้นใช้เพื่อกำจัดสิ่งสกปรก สารฆ่าแมลงที่ตกค้าง และจุลินทรีย์ที่สามารถทำให้คุณภาพของผลิตภัณฑ์ลดลง จะมีการทำให้เย็นเบื้องต้นเพื่อลดการเอื้ออำนวยต่อการเจริญของจุลินทรีย์ ผักและผลไม้ที่ผ่านการตัดแต่งส่วนใหญ่ใช้สารละลายคลอรีนเป็นสารล้างและช่วยฆ่าเชื้อ

เนื่องจากมีประสิทธิภาพและช่วยประกันความปลอดภัยของผลิตภัณฑ์ อย่างไรก็ตามการใช้สารฆ่าเชื้อ เช่น คลอรีน ยังมีข้อเสียอีกมากมายทั้งทางด้านสิ่งแวดล้อมและความเสี่ยงต่อสุขภาพของผู้บริโภค เนื่องจากสามารถเกิดสารตกค้างที่เป็นสารก่อมะเร็ง ได้แก่ คลอรามินและไตรฮาโลมีเทน ทำให้เกิดพิษต่อผู้บริโภคได้ นอกจากนี้ยังมีกลิ่นตกค้างของสารประกอบคลอรีนอีกด้วย (บุษกร ทองใบ, 2556; มัลลิกา ปัญญาคะโป และ ผ่องศรี เผ่าภูรี, 2550)

ปัจจัยที่มีผลต่อการต้านจุลินทรีย์ของผักและผลไม้สด โดยผลไม้ที่ผ่านการตัดแต่งมีพื้นที่ผิวที่เพิ่มขึ้นจากการตัดแต่งก็มีผลต่อประสิทธิภาพสารฆ่าเชื้อโดย Rodgers และคณะ (2004) พบว่า ผักผลไม้ตัดแต่งสามารถลด *Salmonella* spp. ได้น้อยกว่าบนแคนตาลูปทั้งผลได้ สาเหตุเนื่องจากการตัดแต่งเป็นการช่วยเพิ่มพื้นที่ผิวของผักผลไม้ได้ ทำให้แบคทีเรียเกาะได้มากขึ้น รวมทั้งการหั่นหรือตัดทำให้เพิ่มสารอินทรีย์มากขึ้นซึ่งจะไปลดประสิทธิภาพของสารฆ่าเชื้อ และลักษณะพื้นผิวของผักและผลไม้จะมีโครงสร้างไม่ชอบน้ำของชั้นไขที่เคลือบอยู่ที่ผิวซึ่งจะเป็นตัวป้องกันการยึดเกาะและแทรกตัวของแบคทีเรียที่มีอยู่ตามธรรมชาติของผักผลไม้ การตัดแต่งจึงเป็นการไปทำลายกลไกป้องกันตามธรรมชาติของผักผลไม้ทำให้แบคทีเรียสามารถแทรกตัวฝังในผักผลไม้ได้

### 2.8.1 การใช้สารสกัดจากพืชในการควบคุมแบคทีเรียในผักและผลไม้

สารสกัดจากพืชเป็นสารสกัดจากธรรมชาติที่มีความปลอดภัย และมีประสิทธิภาพในการควบคุมแบคทีเรียก่อโรคในผักและผลไม้ (วิญญู เพ็ชรจันทร์ และ อีรพร กงบังเกิด, 2551) โดยองค์ประกอบที่สำคัญคือสารประกอบฟีนอลิกที่มีฤทธิ์ในการต้านแบคทีเรียที่มีผลต่อการทำลายเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรีย ทำให้สูญเสียสภาพการควบคุมการผ่านเข้าออกของสารในเยื่อหุ้มเซลล์ (permeable membrane) อย่างไรก็ตามการใช้สารสกัดหยาบจากพืชในการล้างหรือแช่ผักและผลไม้ทำให้ตัวอย่างผักและผลไม้มักกล่าวว่ามีสีที่คล้ำขึ้น และไม่เป็นที่ต้องการของผู้บริโภค อีกทั้งการใช้สารสกัดหยาบในการควบคุมจำนวนแบคทีเรียในหลายๆงานวิจัยพบว่า ระยะเวลาเก็บรักษามีผลต่อแนวโน้มการเพิ่มขึ้นของจำนวนแบคทีเรียก่อโรค (บุษกร ทองใบ และคณะ, 2557; วิญญู เพ็ชรจันทร์ และ อีรพร กงบังเกิด, 2551) ซึ่งได้มีการแก้ปัญหาดังกล่าวด้วยการเพิ่มปริมาณความเข้มข้นของสารสกัดและ/หรือเพิ่มระยะเวลาในการแช่ (contact time) อย่างไรก็ตามยังพบว่าทำให้ตัวอย่างผักและผลไม้มีการเปลี่ยนแปลงของสีด้วย

### 2.8.2 การใช้กรดซิตริกในการควบคุมแบคทีเรียและสมบัติทางกายภาพในผลไม้ตัดแต่ง

กรดซิตริก (citric acid , Citro, Hydrocerola, 2-Hydroxytricarballic acid) เป็นกรดผลไม้ ซึ่งมีอยู่ในผลไม้ เช่น ส้ม มะนาว หรือบางครั้งเรียกว่า กรดมะนาว มีสูตรโมเลกุลคือ  $C_6H_8O_7$

กรดซิตริกเป็นกรดอินทรีย์ที่ระบุว่ามีความปลอดภัย (generally recognized as safe (GRAS) สำหรับการเป็นวัตถุเติมในส่วนผสมของอาหาร (Park และคณะ, 2011) เนื่องจากมีความปลอดภัยและไม่อันตรายและมักใช้ในการควบคุมการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ในผลิตภัณฑ์ผลไม้ตัดแต่งและผัก (Rahman และคณะ, 2011) นอกจากนี้กรดซิตริกยังเป็นหนึ่งในกรดอินทรีย์ที่มีตามธรรมชาติในผลไม้ โดยไม่ส่งผลต่อรสชาติและกลิ่นของสินค้าบริโภคจากพืช อรรถพร ทักษณอุดม และ จุฑามาศ ธีระสาโรช (2549) ได้ศึกษาการใช้กรดซิตริกในการล้างมะละกอและสับปะรดตัดแต่งสามารถลดจำนวนแบคทีเรียก่อโรคได้สูงที่สุด (ประมาณ 3 log CFU/g) เนื่องจากเป็นกรดอินทรีย์ชนิดอ่อน จึงมีผลต่อการทำลายจุลินทรีย์โดยเมื่อกรดอินทรีย์เข้าสู่เซลล์ของแบคทีเรียแล้วทำให้ความเป็นกรดภายในเซลล์สูงขึ้น ทำให้เซลล์ตายลง และมีส่วนในการยับยั้งการสังเคราะห์สารต่างๆภายในเซลล์ เช่น RNA, DNA และโปรตีน รวมทั้งขัดขวางการขนส่งสารต่างๆภายในเซลล์ ทำให้เซลล์ตายลง นอกจากนี้การใช้กรดซิตริกที่ระดับความเข้มข้น 0.5 % ในการล้างแอปเปิล สามารถลดจำนวนแบคทีเรียป้องกันการเกิดปฏิกิริยาการเกิดสีน้ำตาล (browning reaction) ซึ่งส่งผลต่อลักษณะทางปรากฏของแอปเปิลได้ (Chen และคณะ, 2016) และยังคงรักษาคุณภาพของตัวอย่างอาหารที่ผ่านกระบวนการตัดแต่งเอาไว้

### 2.8.3 ประสิทธิภาพกรดซิตริกร่วมกับสารสกัดจากพืชต่อการลดจำนวนเชื้อจุลินทรีย์ในผักและผลไม้

การศึกษาค่าใช้สารสกัดจากพืชร่วมกับกรดซิตริกในการลดจำนวนเชื้อจุลินทรีย์ในผัก พบว่าสารประกอบฟีนอลิกในสารสกัดจากพืชสามารถทำลายเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรียได้ จึงทำให้ส่วนที่ไม่แตกตัวของกรดอินทรีย์ เช่นกรดซิตริก สามารถแพร่เข้าสู่เซลล์ของแบคทีเรียได้ง่ายขึ้น เกิดการแตกตัวเป็นไฮโดรเจนไอออน ค่าพีเอชภายในเซลล์ลดลง จึงไปยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ กรดนิวคลีอิกภายในเซลล์แบคทีเรีย แบคทีเรียเกิดการบาดเจ็บและตายในที่สุด โดย ลักษณะ บรรณสาร (2552) ได้ศึกษาค่าใช้สารสกัดจากพืชร่วมกับกรดซิตริก พบว่าสามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการลดจำนวนเชื้อแบคทีเรีย *S. Typhimurium* ที่ปนเปื้อนในผลมะเขือเทศ นอกจากนี้ความเป็นกรดของสารละลายกรดซิตริกยังสามารถเพิ่มประสิทธิภาพฤทธิ์ต้านแบคทีเรียอีกด้วย เนื่องจากสารประกอบฟีนอลิก โดยเฉพาะ condensed tannins จะละลายได้ดีในสภาวะที่เป็นกรดที่จะเพิ่มประสิทธิภาพฤทธิ์การต้านแบคทีเรียได้ดีขึ้น (บุษกร ทองใบ และคณะ, 2557) ทั้งนี้การใช้กรดซิตริกที่ระดับความเข้มข้นใดนั้น ควรพิจารณาถึงความเหมาะสมของตัวอย่างอาหารที่จะนำมาแช่เป็นหลัก ซึ่งภายหลังจากแช่ตัวอย่างอาหารควรมีกลิ่นรสที่ปกติ ไม่สามารถรู้สึกได้ถึงกลิ่นรสที่เปลี่ยนแปลงไปในขณะรับประทาน อันเกิดจากผลของการแช่กรดซิตริกที่ระดับความเข้มข้นที่อาจมากเกินไป

## บทที่ 3

### วัสดุ อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

#### 3.1 วัสดุ อุปกรณ์ และสารเคมี

##### 3.1.1 วัสดุ

- มะเขี๊ยงสดซึ่งได้รับความเอื้อเฟื้อจากสถาบันวิจัยเทคโนโลยีเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลล้านนา จังหวัดลำปาง
- แคนตาลูปพันธุ์ชั้นเลิศ ห้างสรรพสินค้า โลตัส สาขารัตนาธิเบศร์

##### 3.1.2 แบคทีเรียที่ใช้ทดสอบ

*Salmonella* Typhimurium ATCC13311, *Escherichia coli* ATCC 2592 และ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 จากห้องปฏิบัติการวิจัยและทดสอบอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โดยนำแบคทีเรียมาเชื่อมลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ nutrient agar (NA) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา  $18 \pm 2$  ชั่วโมง และเก็บรักษาที่อุณหภูมิ  $4 \pm 2$  องศาเซลเซียส ทำการต่อเชื้อทุก 3 สัปดาห์

##### 3.1.3 อุปกรณ์และเครื่องมือ

###### อุปกรณ์

- กระดาษกรอง (paper filter) ยี่ห้อ Whatman เบอร์ 1
- กระดาษกรอง เส้นผ่านศูนย์กลาง 0.6 mm (paper disc)
- กระบอกตวง (cylinder) ขนาด 20 50 และ 100 มิลลิลิตร
- เข็มเขี่ยเชื้อปลายกลม (loop)
- ขวดก้นกลม (round bottom flasks)
- ขวด duran ขนาด 250, 500 และ 1000 มิลลิลิตร
- ขวดปริมาตร (volumetric flask) ขนาด 10 100 250 และ 1,000 มิลลิลิตร
- ขวดรูปชมพู่ขนาด (Erlenmeyer flask) 200 250 500 และ 1000 มิลลิลิตร
- ขวดสีชาสำหรับเก็บสาร (dark bottle)
- คิวเวตชนิดแก้ว (cuvett)
- คีมคีบ (forceps)



- จานอาหารเลี้ยงเชื้อพลาสติก (plastic petri dish)
- ช้อนตักสาร (spatula)
- ชุดกรองพร้อมขวดลดความดัน
- ตะแกรงร่อน (sieve) ขนาด 45 เมช
- ตะเกียงแอลกอฮอล์
- ถุงตีตัวอย่าง (stomacher bag)
- ถุงพลาสติกชนิดปิดผนึก (plastic bag)
- ที่คีบ (tong)
- ที่วางหลอดทดลอง (tube rack)
- ทิป (tip) ที่ใช้กับไมโครปิเปต ขนาด 200 และ 1,000 ไมโครลิตร
- แท่งแก้วคนสาร (stirring rod)
- บีกเกอร์ (beager) ขนาด 25 50 100 250 500 1000 และ 2,000 มิลลิลิตร
- ปิเปตขนาด 1 5 และ 10 มิลลิลิตรและลูกยาง
- พาราฟิล์ม (parafilm)
- ไมโครปิเปต (micropipette) ขนาด 20-200 และ 100-1,000 ไมโครลิตร
- หลอดทดลองฝาตรง (test tube) ขนาด 16 x 150 มิลลิลิตร
- หลอดทดลองฝาเกลียว (test tube screw cap) ขนาด 16 x 150 มิลลิลิตร
- หลอดสำหรับปั่นเหวี่ยงขนาด 15 และ 50 มิลลิลิตร
- สเปรดเดอร์ (spreader)
- สำลี (absorbent cotton)
- แผ่นเปลวอะลูมิเนียมฟอยล์ (aluminium foil)

#### 3.1.4 เครื่องมือ

- เครื่องกลั่นระเหยสารแบบหมุน (Rotary Evaporator (Rotavapor R-200BUCHI ประเทศสหรัฐอเมริกา)
- เครื่องโครมาโทกราฟีเหลวสมรรถนะสูง (High Performance Liquid Chromatography, HPLC, Agilent Technologies® รุ่น 1100 Series ประเทศเยอรมัน)

- เครื่องฆ่าเชื้อแบบใช้ความดัน (autoclave, Tomy SX700 ประเทศญี่ปุ่น)
- เครื่องชั่งน้ำหนักหยาบ 2 ตำแหน่ง (analytical balance, Metter Toledo ML1602/01 ประเทศสวิตเซอร์แลนด์)
- เครื่องชั่งน้ำหนักละเอียด 4 ตำแหน่ง (analytical balance, Metter Toledo ML204/01 ประเทศสวิตเซอร์แลนด์)
- เครื่องปั่นเหวี่ยง (Hettich zentrifugen 19 ประเทศเยอรมัน)
- เครื่องปั่นเหวี่ยง (Kubota 5310 ประเทศญี่ปุ่น)
- เครื่องปั๊มสุญญากาศ (Vacuum pump, Gast ประเทศสหรัฐอเมริกา)
- เครื่องโม่แห้ง (grinding mill, Lita ประเทศไทย)
- เครื่องผสมสาร (Vortex mixer, Vortex-2 Genie ประเทศสหรัฐอเมริกา)
- เครื่องวัดกรด ต่าง (pH meter, Mettler Toledo AG8603 ประเทศสวิตเซอร์แลนด์)
- เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (UV-Visible Spectrophotometer, Genesys ประเทศไทย)
- เครื่องวัดสี (Minolta Chroma, Konica Minolta Model CR-400 version 1.11 ประเทศญี่ปุ่น)
- ตู้บ่มอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส (incubator, WTC Binder ประเทศเยอรมัน)
- ตู้ปลอดเชื้อ (laminar flow cabinet, ISSCO BVT-123 ประเทศไทย)
- ตู้เย็น (refrigerator, Whirlpool WRN-57HGG3 ประเทศเกาหลี)
- ตู้อบลมร้อน (hot air oven, WTB Binder FD 115 ประเทศเยอรมัน)
- เต้าอบไมโครเวฟ (LG, MS2127CW ประเทศไทย)

### 3.1.5 วัสดุที่เป็นสารดูดซับ

- ถ่านกัมมันต์ชนิดผง (powdered activated carbons (PAC), Sigma-Aldrich ประเทศเยอรมัน)
- โพลีไวนิล-โพลีไพร์โรลิดอน (polyvinyl-polypyrrolidone (PVPP), Sigma-Aldrich ประเทศเยอรมัน)

- เรซินรูพรุนขนาดใหญ่ (Macroporous resins (MARs), Sigma-Aldrich ประเทศเยอรมัน)

### 3.1.6 สารเคมีและอาหารเลี้ยงเชื้อ

- กรดแกลลิก (gallic acid, Sigma-Aldrich ประเทศเยอรมัน)
- กรดคลอโรจีนิก (chlorogenic acid, Sigma-Aldrich ประเทศเยอรมัน)
- กรดซิตริก (citric acid, Sigma-Aldrich ประเทศเยอรมัน)
- กรดฟอร์มิก (formic acid, Merck ประเทศเยอรมัน)
- คาเทชิน (catechin, Sigma-Aldrich ประเทศเยอรมัน)
- เควอร์ซีทิน (quercetin, Sigma-Aldrich ประเทศเยอรมัน)
- โซเดียมคลอไรด์ (sodium chloride, Univar ประเทศออสเตรเลีย)
- โซเดียมแอนไฮไดรอส คาร์บอเนต (sodium anhydrous, Univar ประเทศออสเตรเลีย)
- นิวเทรียน อาการ์ (nutrient agar (NA), Himedia ประเทศอินเดีย)
- บัฟเฟอร์เปปโตโนวอเตอร์ (buffered peptone water, Merck ประเทศเยอรมัน)
- มุลเลอร์ ฮินตัน บร็อท (Mueller Hinton broth (MHB), Merck ประเทศเยอรมัน)
- มุลเลอร์ ฮินตัน อาการ์ (Mueller Hinton agar (MHA), Merck ประเทศเยอรมัน)
- เมทานอล (methanol, Merck ประเทศเยอรมัน)
- อะลูมิเนียมคลอไรด์ เฮกซะไฮเดรต (aluminium chloride hexahydrate, QREC ประเทศมาเลเซีย)
- อาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ชนิดสำเร็จรูปแบบแห้งสำหรับตรวจ *E. coli* (EC Compact dry, Nissui ประเทศญี่ปุ่น)
- เอทานอล (ethanol, ความเข้มข้นร้อยละ 95 จากห้างหุ้นส่วน เอิร์ต เคมี แล็บ ประเทศไทย)
- Folin-Ciocalteu reagent (Merck, ประเทศเยอรมัน)

## 3.2 ขั้นตอนการวิจัย

### 3.2.1 การเตรียมตัวอย่างสารสกัดหยาบเมล็ดมะเกี๋ยง

นำผลมะเกี๋ยงสดมาแยกเมล็ดและเนื้อออกจากกัน นำเมล็ดมะเกี๋ยงใส่ในถาด ปริมาณ ถาดละ 300 กรัม จำนวน 10 ถาด แล้วนำมาอบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เวลา 18 ชั่วโมง ด้วย ตู้อบลมร้อนแบบถาด (tray dry) จากนั้นนำมาบดเป็นผงด้วยเครื่องโม่แห้งและร่อนด้วยตะแกรงขนาด 40 เมช แล้วนำไปวิเคราะห์ปริมาณความชื้น (แสดงรายละเอียดตามภาคผนวก ก.1) นำผงเมล็ดมะเกี๋ยงบรรจุในถุงสุญญากาศ แล้วใส่ในกล่องสุญญากาศ นำไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิแช่แข็ง (-18 องศาเซลเซียส)

นำผงเมล็ดมะเกี๋ยงมาสกัดสารสกัดหยาบจากเมล็ดมะเกี๋ยงโดยใช้ตัวทำละลายเอทานอล 50% โดยปริมาตรของเอทานอลต่อน้ำ (เพ็ญวิภา บัลลังโพธิ์, 2556) ในอัตราส่วนของเมล็ดมะเกี๋ยงต่อตัวทำละลายเท่ากับ 1 : 5 จากนั้นใช้คลื่นอัลตราโซนิคช่วยในการสกัด (ultrasonic assisted extraction UAE) โดยใช้อ่างอัลตราโซนิคซึ่งมีความถี่เท่ากับ 37 กิโลเฮิร์ตซ์ เป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง (อรรวรรณ ศิริเวทย์วุฒิ, 2558) จากนั้นนำตัวอย่างสารละลายเมล็ดมะเกี๋ยงที่ได้มา เหยี่ยงแยกด้วยเครื่อง centrifuge ความเร็ว 2500 rpm เวลา 20 นาที นำส่วนผสมที่ได้มารองด้วย กระดาษกรอง Whatman No.1 แล้วนำไประเหยตัวทำละลายด้วยเครื่อง rotary evaporator ที่ อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส จนแห้ง แล้วนำมาชั่งเพื่อบันทึกน้ำหนักแห้งของสารสกัดหยาบเมล็ดมะเกี๋ยง

แล้วนำมาคำนวณดังนี้ตามสมการ

$$\text{ร้อยละของสารสกัดแห้งที่ได้ (\%)} = \frac{\text{น้ำหนักของสารสกัดหยาบเมล็ดมะเกี๋ยง (กรัม)} \times 100}{\text{น้ำหนักผงเมล็ดมะเกี๋ยง (กรัม)}} \text{-----(3.1)}$$

นำสารสกัดแห้งที่ได้มาละลายด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อที่ในอัตราส่วน 1 กรัม ต่อ 5 มิลลิลิตร (Dung และคณะ, 2008) แล้วจึงนำสารสกัดหยาบที่ละลายน้ำแล้วมาตรวจวิเคราะห์ ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด ฟลาโวนอยด์ทั้งหมด และปริมาณของแกลลิก เควอร์ซิทิน รูทีน คาเทชิน และ กรดคลอโรจีนิกด้วย HPLC

#### 3.2.1.1 การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด

วิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดหรือค่า TPC (total phenolic content) ด้วยวิธี Folin-Ciocalteu method โดยดัดแปลงจากวิธีจาก Maisuthisakul (2012) โดยใช้สารสกัดตัวอย่างละลายด้วยน้ำกลั่น ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร เติมสารละลาย Folin-Ciocalteu

ความเข้มข้นร้อยละ 10 (โดยปริมาตรต่อปริมาตร) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร แล้วผสมด้วยเครื่องผสมสาร ตั้งทิ้งไว้ 3 นาที จากนั้นเติมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนตความเข้มข้นร้อยละ 7.5 (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) ปริมาตร 0.8 มิลลิลิตร ผสมสารละลายให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมสาร ตั้งทิ้งไว้ในที่มืดเป็นเวลา 120 นาที แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร โดยใช้กรดแกลลิกเป็นสารละลายมาตรฐานในการทำกราฟมาตรฐานกรดแกลลิก (ภาคผนวก ก.2) คำนวณปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดเทียบกับกราฟมาตรฐานแล้วรายงานผลในหน่วยของมิลลิกรัม เมื่อเทียบกับกรดแกลลิก (mg GAE equivalent) ต่อน้ำหนักของตัวอย่าง

### 3.2.1.2 วิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมด

วิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมด (total flavonoid content; TFC) ด้วยวิธี aluminum chloride colorimetric method ตามวิธีของ Chang และคณะ (2002) โดยใช้ตัวอย่างสารสกัดปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ผสมกับเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 95 (โดยปริมาตรต่อปริมาตร) ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร ตามด้วยสารละลายอะลูมิเนียมคลอไรด์ความเข้มข้นร้อยละ 10 ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร สารละลายโพแทสเซียมอะซิเตต ความเข้มข้น 1 โมลาร์ ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร และน้ำกลั่นปริมาตร 2.8 มิลลิลิตร ตามลำดับ ผสมสารละลายให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมสาร ตั้งทิ้งไว้ในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 415 นาโนเมตร รายงานผลการทดลองเป็นค่าสมมูลมิลลิกรัมของเคอร์ซีทินต่อน้ำหนักสารสกัดหยาบเมล็ด 1 กรัม (mg QE /g dried extract) โดยคำนวณเทียบกับกราฟมาตรฐานเคอร์ซีทิน (ภาคผนวก ก.3)

### 3.2.1.3 การตรวจวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดหยาบเมล็ดมะเกี๋ยง ด้วยเครื่อง HPLC (High-performance liquid chromatography)

เตรียมสารสกัดเมล็ดมะเกี๋ยงแห้งมาละลายด้วยตัวทำละลายเมทานอลความเข้มข้นร้อยละ 99.9 (HPLC grade) โดยควบคุมความเข้มข้นของสารละลายผสมให้มีความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นกรองด้วยเมมเบรน (syringe filter) ชนิดไนลอน (nylon) ขนาด 0.45 ไมโครเมตร นำตัวอย่างที่เตรียมไว้ส่งวิเคราะห์ที่ห้องปฏิบัติการวิจัยและทดสอบอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โดยวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC (Dukić และคณะ, 2011) ดังนี้

เฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) สารละลาย A = เมทานอล (methanol)

สารละลาย B = กรดฟอร์มิกความเข้มข้นร้อยละ 1 (formic 1%)

อัตราส่วนของเฟสเคลื่อนที่ (gradient) สารละลาย A (ร้อยละ 10) ต่อ B (ร้อยละ 90)

เป็นเวลา 0-10 นาที

	สารละลาย A (ร้อยละ 10-20) ต่อ B (ร้อยละ 90-80) เป็นเวลา 10-25 นาที
	สารละลาย A (ร้อยละ 20-30) ต่อ B (ร้อยละ 80-90) เป็นเวลา 25-30 นาที
	สารละลาย A (ร้อยละ 60-70) ต่อ B (ร้อยละ 40-30) เป็นเวลา 30-45 นาที
อัตราการไหล (flow rate)	1 มิลลิลิตรต่อนาที
อุณหภูมิ (Temperature)	30 องศาเซลเซียส
คอลัมน์ (column)	Esliip XDB-C18 (4.6x50 มิลลิเมตร)
ตัวตรวจวัดสัญญาณ (detector)	diode array detector ที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร
ปริมาณสารตัวอย่างที่ฉีดสู่คอลัมน์	ปริมาตร 20 ไมโครลิตร
สารมาตรฐาน	กรดแกลลิก เควอร์ซิทิน, รุทีน คาเทชิน และกรดคลอโรจีนิก

การอ่านผลโครมาโตแกรมของสารสกัดทำได้โดยการคำนวณพื้นที่ใต้กราฟของแต่ละพีคเพื่อแยกสารต่างๆที่ปรากฏตาม retention time ที่ต่างกัน แล้วนำไปสร้างตารางเปรียบเทียบองค์ประกอบทางเคมีด้วยค่า retention time โดยใช้พื้นที่ใต้กราฟ เพื่อหาลักษณะองค์ประกอบทางเคมีที่เหมือนและแตกต่างกันของสารแต่ละชนิดด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป Chemstation (Agilent Technology, ประเทศเยอรมัน)

### 3.2.2 การศึกษาชนิดของสารดูดซับที่เหมาะสมในการเพิ่มอัตราสารประกอบฟีนอลิกจากสารสกัดหยาบเมล็ดมะเกี๋ยง

การเตรียมสารดูดซับเบื้องต้น ได้แก่ เรซินรูพรุนขนาดใหญ่ (MARs) โพลีไวนิล-ไพร์โรลิดอน (PVPP) และถ่านกัมมันต์ชนิดผง (PAC) โดยนำสารดูดซับทั้งสามชนิดมาแช่ในเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 95 (โดยปริมาตร) โดยให้ปริมาตรเอทานอลเป็น 2 เท่าของสารดูดซับ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่นจนกว่าพีเอชของสารละลายจะเป็นกลาง แล้วนำสารดูดซับไปแช่ในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 1 M เป็นเวลา 8 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาแล้วปรับพีเอชของสารละลายให้เป็นกลางด้วยน้ำกลั่น แล้วนำไปแช่ในสารละลายไฮโดรคลอริก 1 M เป็นเวลา 8 ชั่วโมง ปรับพีเอชของสารละลายให้เป็นกลางด้วยน้ำกลั่น หลังจากนั้นนำสารดูดซับที่ผ่านการเตรียมไปอบแห้งที่ตู้สุญญากาศ อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ก่อนนำมาใช้งานทุกครั้ง (Jian และคณะ, 2007)

วิธีการทำสารสกัดให้บริสุทธิ์บางส่วน (pp) ด้วยสารดูดซับ ดัดแปลงจากวิธีของ Lin และคณะ (2014) โดยใส่สารดูดซับปริมาณ 0.5 กรัม ลงในสารสกัดหยาบเมล็ดมะเกี๋ยงที่ความเข้มข้น 12.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (ที่ใช้น้ำกลั่นเป็นตัวทำละลาย) ปริมาตร 40 มิลลิลิตร เขย่าสารละลายและสารดูดซับด้วยเครื่องเขย่าด้วยความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาที (rpm) ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 8 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำไปกรองภายใต้ชุดกรองสุญญากาศด้วยกระดาษกรอง Whatman No.1 นำสารดูดซับที่อยู่บนกระดาษกรองมาล้างทำความสะอาดด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ ทิ้งให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง แล้วปลดปล่อยสารประกอบฟีนอลิกออกจากสารดูดซับ โดยเติมสารละลายเอทานอลเข้มข้น 50% ปริมาตร 60 มิลลิลิตร ผสมกับสารดูดซับที่แห้งแล้วข้างต้น จากนั้นนำสารผสมเอทานอลและตัวดูดซับไปเขย่า ด้วยเครื่องเขย่าใช้ความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาที (rpm) ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง แล้วกรองเอาตัวดูดซับออก นำสารละลายส่วนใสที่ได้มาทำให้เข้มข้นด้วยเครื่อง rotary evaporator ที่ 45 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 120 rpm แล้วนำไปอบแห้งด้วยเครื่องอบแห้งสุญญากาศ นำไปชั่งน้ำหนักของสารสกัดแห้งที่ได้แล้วคำนวณตามสมการที่ 3.1 แล้วนำสารสกัดแห้งที่ได้ไปวิเคราะห์ปริมาณความชื้น เก็บรักษาสารสกัดในขวดแก้วภายใต้สุญญากาศที่อุณหภูมิแช่แข็งประมาณ -18 องศาเซลเซียส ในที่มืด ก่อนการวิเคราะห์นำสารสกัดที่ได้มาละลายด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อในอัตราส่วน 1 กรัม ต่อ 5 มิลลิลิตร แล้วจึงนำสารสกัดหยาบเมล็ดมะเกี๋ยง (MKSE) ที่ทำให้บริสุทธิ์บางส่วนด้วยสารดูดซับ มาตรวจวิเคราะห์ค่าต่างๆ โดยเทียบกับ MKSE ซึ่งเป็นชุดควบคุม

นำสารที่ได้จากการทำให้บริสุทธิ์บางส่วน (pp) ด้วยสารดูดซับชนิดต่างๆไปวิเคราะห์ปริมาณสารสกัดแห้งและปริมาณของสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดตามวิธีที่ 3.2.1.1 โดยวางแผนการทดลองแบบ CRD ทำการทดลอง 3 ซ้ำ วิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติด้วย analysis of variance (ANOVA) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's new multiple range test (DMRT) ตามวิธีของ Cochran และ Cox (1992)

วิเคราะห์ชนิดของสารประกอบฟีนอลิกที่ได้ตามวิธีที่ 3.2.1.3 แล้วนำมาชั่งเพื่อบันทึกน้ำหนักแห้งของสารสกัดหยาบเมล็ดมะเกี๋ยง

แล้วนำมาคำนวณดังนี้ตามสมการ

$$\text{ร้อยละการคืนสภาพของสารประกอบฟีนอลิกแต่ละชนิด (\%)} = \frac{\text{ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกแต่ละชนิดใน pp (mg)} \times 100}{\text{ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกแต่ละชนิดที่มีอยู่ใน MKSE (mg)}} \text{-----(3.2)}$$

### 3.2.3 การศึกษาสัดส่วนของสารดูดซับที่เหมาะสมต่อปริมาณสารสกัดแห้งที่ได้และอัตราส่วนของสารประกอบฟีนอลิกที่ได้

นำสารดูดซับที่สามารถแยกสารสกัดแห้งและสารประกอบฟีนอลิกได้ปริมาณมากที่สุดจากข้อ 3.2.2 มาศึกษาสัดส่วนสัดส่วนดูดซับที่เหมาะสมต่อปริมาณสารสกัดแห้งที่ได้และอัตราส่วนของสารประกอบฟีนอลิกที่ได้ โดย แปรปริมาตรตัวดูดซับต่อสารละลาย MKSE แล้วทำการทดลองตามข้อ 3.2.2 ในปริมาณสัดส่วนสารดูดซับต่อสารละลาย MKSE 12.5 25 37.5 และ 50 (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) โดยใช้ MKSE ที่ความเข้มข้น 12.5 (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ในสารละลาย MKSE 40 มิลลิลิตร เขย่าสารละลายด้วยเครื่องเขย่าด้วยความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาที (rpm) ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 8 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำไปกรองแบบสุญญากาศด้วยกระดาษกรอง Whatman No.1 นำสารดูดซับที่อยู่บนกระดาษกรองมาล้างทำความสะอาดด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ ก่อนทิ้งให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง แล้วทำการปลดปล่อยสารประกอบฟีนอลิกจากสารดูดซับ ด้วยความเข้มข้นเอทานอลร้อยละ 50 (โดยปริมาตร) ปริมาตร 60 มิลลิลิตร สุดท้ายทำให้เข้มข้นด้วยเครื่อง rotary evaporator ที่ 45 องศาเซลเซียส ที่ 120 rpm แล้วนำไปอบแห้งด้วยเครื่องอบแห้งสุญญากาศ วิเคราะห์ปริมาณสารสกัดแห้งตามสมการที่ 3.1 และสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด ตามวิธี 3.2.1.1 โดยวางแผนการทดลองแบบ CRD ทำการทดลอง 3 ซ้ำ วิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติด้วย analysis of variance (ANOVA) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's new multiple range test ตามวิธีของ Cochran และ COX (1992)

### 3.2.4 การศึกษาชนิดของความเข้มข้นเอทานอลที่เหมาะสมในการเพิ่มอัตราสารประกอบฟีนอลิกจากสารสกัดหยาบเมล็ดมะเกี๋ยง

นำสารดูดซับที่ใช้ในสัดส่วนที่เหมาะสมที่สามารถดูดซับสารประกอบฟีนอลิกได้สูงสุดที่ได้จาก 3.2.3 จากนั้นปลดปล่อยสารประกอบฟีนอลิกด้วยสารละลายเอทานอลที่ความเข้มข้นร้อยละ 30 50 70 และ 90 โดยปริมาตรของเอทานอลต่อน้ำ ปริมาตร 60 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปเขย่าสารละลายด้วยเครื่องเขย่าด้วยความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาที (rpm) ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง สุดท้ายทำให้เข้มข้นด้วยเครื่อง rotary evaporator ที่ 45 องศาเซลเซียส ที่ 120 รอบต่อนาที (rpm) แล้วนำไปอบแห้งด้วยเครื่องอบแห้งสุญญากาศ คำนวณหาปริมาณสารสกัดตามสมการที่ 1 สารประกอบฟีนอลิก และฟลาโวนอยด์ เพื่อเลือกความเข้มข้นของเอทานอลที่เหมาะสม ตามวิธี 3.2.1.1 และ 3.2.1.2 ตามลำดับ โดยวางแผนการทดลองแบบ CRD ทำการทดลอง 3 ซ้ำ วิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติด้วย analysis of variance (ANOVA) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's new multiple range test ตามวิธีของ Cochran และ COX (1992)



### 3.2.5 การศึกษาฤทธิ์การต้านแบคทีเรียก่อโรคของ สาร pp ด้วยสารดูดซับชนิดต่างๆ

#### 3.2.5.1 การเตรียมเชื้อแบคทีเรีย

เตรียมแบคทีเรียทั้ง *S. aureus*, *S. Typhimurium* และ *E. coli* นำเชื้อแบคทีเรีย 1 ลูป (loop) มาถ่ายเชื้อลงในขวดรูปชมพู่ที่มีอาหาร MHB 15 มิลลิลิตร แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ  $37 \pm 2$  องศาเซลเซียส เป็นเวลา  $18 \pm 2$  ชั่วโมง จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกอาหารเลี้ยงเชื้อออกจากแบคทีเรีย แล้วล้างเซลล์ด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ที่ผ่านการฆ่าเชื้อ ความเข้มข้นร้อยละ 0.85 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร 2 ครั้ง หลังจากนั้นปรับค่าความขุ่นด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์เดิม ให้มีค่าประมาณ 0.08-0.13 ที่ความยาวคลื่น 625 นาโนเมตร จะได้จำนวนเชื้อแบคทีเรียประมาณ 8 log CFU/ml (CLSI, 2006) นำไปเจือจาง 100 เท่าด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นเดิม เพื่อให้ได้จำนวนเชื้อจุลินทรีย์ของจุลินทรีย์ประมาณ 6 log CFU/ml

#### 3.2.5.2 การทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียก่อโรคของสาร pp ด้วยสารดูดซับชนิดต่างๆ ด้วยวิธีดิสก์ ดิฟฟิวชัน (disc diffusion method; DDM)

ทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียก่อโรคของตัวอย่างสารสกัด ด้วยวิธีดิสก์ ดิฟฟิวชัน (disc diffusion method; DDM) ดัดแปลงจากวิธีของ Chandrasekaran และ Venkatesalu (2004) โดยปิเปตสารละลายเชื้อที่เตรียมไว้ ในข้อ 3.2.5.1 ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ MHA เกลี่ยสารละลายเชื้อให้ทั่วอาหารเลี้ยงเชื้อโดยเทคนิค spread plate ทิ้งไว้ให้ส่วนของผิวหน้าอาหารแห้ง แล้วจึงนำแผ่นดิสก์ ซึ่งเตรียมโดยใช้กระดาษกรองขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว นำมาเติมสาร pp ด้วยสารดูดซับชนิดต่างๆจากข้อ 3.2.2 ความเข้มข้น 25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ไปวางตามตำแหน่งที่กำหนดไว้ โดยใช้น้ำกลั่นปลอดเชื้อ ปริมาตร 20 ไมโครลิตร เป็นตัวอย่างควบคุม นำไปบ่มที่อุณหภูมิ  $37 \pm 2$  องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง วัดเส้นผ่านศูนย์กลางของโซนการยับยั้ง (inhibition zone) ที่เกิดรอบแผ่นดิสก์ด้วยเวอร์เนียร์คาลิเปอร์ รายงานเป็นหน่วย มิลลิเมตร (mm) วางแผนการทดลองแบบ CRD ทำการทดลอง 3 ซ้ำ วิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติ (ANOVA) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธีDuncan's new multiple range test ตามวิธีของ Cochran และ COX (1992)

### 3.2.5.3 การทดสอบค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสาร pp ด้วยสารดูดซับชนิดต่างๆที่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียได้ หรือค่า MIC (minimum inhibitory concentration) โดยมาโครบรอตไดลูชัน macro Broth Dilution Technique

ใช้วิธีการเตรียมเชื้อแบคทีเรียตามข้อ 3.2.5.1 แล้วนำสาร pp ด้วยสารดูดซับชนิดต่างๆที่ได้จากข้อ 3.2.2 มาทดสอบค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียได้ หรือค่า MIC (minimum Inhibitory concentration) กับเชื้อแบคทีเรียก่อโรค ตามวิธีของ CLSI (2006)

ทำการเจือจางสาร pp ด้วยสารดูดซับชนิดต่างๆ ด้วยการทดสอบแบบลำดับสอง (2-fold dilution) ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ MHB ให้ได้ความเข้มข้นชนิดละ 10 ความเข้มข้น โดยเตรียมหลอดทดลอง 12 หลอด เตรียมสาร pp ด้วยสารดูดซับชนิดต่างๆที่ใช้ในการทดสอบ โดยนำสารที่ได้ทุกตัวอย่างมาละลายด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ ให้ได้ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

นำหลอดทดลองขนาด 12 × 100 มิลลิลิตร ซึ่งผ่านการฆ่าเชื้อและทำให้แห้ง จำนวน 12 หลอด เขียนหมายเลขกำกับไว้ที่หลอด ใช้ปิเปตดูดอาหารเลี้ยงเชื้อ MHB ใส่ลงในหลอดที่ 2-12 หลอดละ 1 มิลลิลิตร โดยหลอดที่ 1 ไม่ใส่อาหารเลี้ยงเชื้อ หลอดที่ 2 ใส่อาหารเลี้ยงเชื้อ MHB ความเข้มข้น 4 เท่า และหลอดต่อไปใส่อาหารเลี้ยงเชื้อความเข้มข้น 2 เท่าถึงหลอดที่ 11 ส่วนในหลอดที่ 12 ใส่อาหารเลี้ยงเชื้อความเข้มข้นปกติหรือความเข้มข้น 1 เท่าเป็นชุดควบคุมเชิงลบ

หลังจากนั้นปิเปตสาร pp ด้วยสารดูดซับชนิดต่างๆที่มีความเข้มข้นเริ่มต้นเท่ากับ 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองที่ 1 และหลอดที่ 2 ดังนั้นในหลอดทดลองที่ 1 ไม่มีอาหารเลี้ยงเชื้ออยู่จึงมีความเข้มข้นของสารเท่าเดิม ปริมาตร 1 มิลลิลิตร จากนั้นผสมให้เข้ากัน แล้วใช้ปิเปตดูดสารหลอดที่ 2 ปริมาณ 1 มิลลิลิตร ใส่ลงหลอดที่ 3 ทำซ้ำเช่นเดียวกัน ไปจนถึงหลอดที่ 11 ดังตารางที่ 3.1 (โดยเปลี่ยนปิเปตทุกครั้งที่เปลี่ยนหลอด) เมื่อผสมสารละลายในหลอดที่ 11 ให้เข้ากันได้ดีแล้วให้ใช้ปิเปตดูดสารละลายทิ้งไป 1 มิลลิลิตร หลอดที่ 12 จะมีอาหารเลี้ยงเชื้อเพียงอย่างเดียว ไม่มีสารสกัด จึงใช้เป็นตัวควบคุมเชิงลบ

เติมสารละลายเชื้อแบคทีเรียที่เตรียมไว้ลงไปหลอด จำนวนหลอดละ 1 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 16-18 ชั่วโมง การอ่านผลหาค่าความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดของสารสกัดที่ใช้ทดสอบที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อได้อย่างสมบูรณ์หรือค่า MIC โดยสังเกตหลอดสุดท้ายที่ไม่มีจุลินทรีย์เจริญหรืออาหารเลี้ยงเชื้อในหลอดไม่ขุ่น

**ตารางที่ 3.1** ความเข้มข้นของสาร pp ด้วยสารดูดซับชนิดต่างๆบนหลอดทดลองเพื่อหาค่า MIC

หลอด ที่	ความเข้มข้นของ อาหารเลี้ยงเชื้อ (เท่า)	ความเข้มข้นของสาร pp ด้วย สารดูดซับชนิดต่างๆรวมกับ อาหารเลี้ยงเชื้อ (มิลลิกรัมต่อ มิลลิลิตร)	ความเข้มข้นสุดท้ายของ สาร pp ด้วยสารดูดซับชนิด ต่างๆหลังเติมเชื้อแบคทีเรีย (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)
1	-	50	25
2	4	25	12.5
3	2	12.5	6.25
4	2	6.25	3.13
5	2	3.13	1.56
6	2	1.56	0.78
7	2	0.78	0.39
8	2	0.39	0.20
9	2	0.20	0.10
10	2	0.10	0.05
11	2	0.05	0.025
12	2	-	0

#### 3.2.5.4 ทดสอบค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสาร pp ด้วยสารดูดซับที่สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรียได้ หรือค่า MBC (minimum bactericidal concentration)

จากการหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ทำให้เชื้อไม่เจริญในอาหารเหลวนี้สามารถนำมาหาค่า MBC ได้ โดยปิเปตอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร จากหลอดที่ทำการทดสอบการหาค่า MIC แล้วพบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อไม่มีความขุ่นทุกหลอด ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ MHA เกลี่ยอาหารเลี้ยงเชื้อให้ทั่วด้วยเทคนิค spread plate นำไปบ่มที่อุณหภูมิ  $37 \pm 2$  องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พิจารณาความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดที่ไม่พบการเจริญของเชื้อแบคทีเรียบนอาหารเลี้ยงเชื้อ ถ้าความเข้มข้นของสารสกัดที่ยับยั้งเชื้อได้สามารถฆ่าเชื้อได้ก็จะไม่พบการเจริญของเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อ แต่ถ้าเชื้อไม่ตายก็จะพบการเจริญของเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งเป็นค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดที่สามารถฆ่าแบคทีเรียได้หรือค่า MBC รายงานในหน่วยมิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (mg/ml) (CLSI, 2006)

### 3.2.6 การศึกษาฤทธิ์การต้านแบคทีเรียก่อโรคของสาร pp ด้วยสารดูดซับที่ใช้ความเข้มข้นเอทานอลแตกต่างกัน

นำสาร pp ด้วยสารดูดซับที่ใช้ความเข้มข้นเอทานอลแตกต่างกัน มาทดสอบฤทธิ์การต้านแบคทีเรียก่อโรคด้วยวิธี DDM และ macro Broth Dilution Technique ตามวิธี 3.2.5

### 3.2.7 การศึกษาการใช้สารละลาย pp ด้วยสารดูดซับที่เหมาะสมร่วมกับกรดซิตริกเพื่อใช้ในการควบคุมการเจริญของแบคทีเรียในแคนตาลูปตัดแต่งและผลทางด้านสีของแคนตาลูปตัดแต่ง

#### 3.2.7.1 เตรียมตัวอย่าง

นำแคนตาลูป (*Cucumis melo* L. var. *cantaloupensis*.) ทั้งผลมาแช่ด้วยโซเดียมไฮโปคลอไรท์ความเข้มข้น 200 ppm เป็นเวลา 15 นาที สะเด็ดน้ำให้แห้งบนตะแกรงที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วเป็นเวลา 30 นาที ในตู้ปลอดเชื้อ ตัดแคนตาลูปโดยใช้มีดตัดแต่งที่ผ่านการฆ่าเชื้อ โดยตัดให้มีขนาด 2.5x2.5x0.5 เซนติเมตร ตัดแปลงวิธีการตัดแต่งตามวิธีของวัณเพ็ญ เพ็ชรจันทร์ และธีรพร กงบังเกิด (2551) แล้วเติมแบคทีเรียก่อโรค 3 ชนิด ได้แก่ *E. coli* S. Typhimurium และ *S. aureus* โดยตัดแปลงวิธีการเตรียมเชื้อตาม จิตศิริ ทองสอน และคณะ (2544) เตรียม suspension ของแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อ MHB บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เวลา 24 ชั่วโมง เจือจางด้วย 0.1% peptone water เพื่อปรับจำนวนเชื้อเป็น  $10^7$  CFU/ml นำแคนตาลูปตัดแต่งแต่ละชิ้นที่เตรียมไว้มาเติมสารละลายเชื้อแบคทีเรียด้วยการปิเปต โดยควบคุมปริมาตรสารแขวนลอยแบคทีเรีย 0.3 มิลลิลิตรต่อตัวอย่างแคนตาลูปตัดแต่ง 1 ชิ้น จากนั้นปล่อยให้แห้งในตู้ปลอดเชื้อที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3 ชั่วโมง แล้วบรรจุในภาชนะออลูมิเนียมที่ผ่านการฆ่าเชื้อหุ้มด้วยฟิล์มพลาสติกชนิด PVC แล้วเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4°C ก่อนทดลองในขั้นต่อไป (Upadhyay และคณะ, 2014)

#### 3.2.7.2 การศึกษาเวลาในการแช่แคนตาลูปของสารละลาย pp ด้วยสารดูดซับที่เหมาะสมเพื่อลดจำนวนของเชื้อแบคทีเรียก่อโรค

แช่แคนตาลูปที่ได้จากข้อ 3.2.7.1 ในสารละลาย pp ที่เหมาะสม ที่ความเข้มข้น 1 MBC จากขั้นตอนที่ 3.2.6 โดยใช้อัตราส่วนแคนตาลูปต่อสารละลายเท่ากับ 1 : 2 (Shahi และคณะ, 2015) โดยแช่แคนตาลูปในสารสกัดดังกล่าว เป็นเวลา 2 3 4 และ 5 นาที ตัวควบคุมแช่ด้วยน้ำกลั่นเป็นเวลา 5 นาที หลังจากนั้นสะเด็ดน้ำให้แห้งบนตะแกรงที่ปลอดเชื้อทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องในตู้ปลอดเชื้อ เป็นเวลา 30 นาที ก่อนนำไปวิเคราะห์จำนวนเชื้อแบคทีเรียก่อโรค 3 ชนิด ได้แก่ *E. coli*, *S. Typhimurium* และ *S. aureus*

โดยนำตัวอย่างแคนดาลูปตัดแต่ง 25 กรัม ใส่ถุงดีตัวอย่าง (stomacher bag) ผสมกับสารละลายบัฟเฟอร์เปปโตโนวอเตอร์ ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 โดยมวลต่อปริมาตร ปริมาตร 225 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปตีปั่นในเครื่องตีผสม เป็นเวลา 2 นาที (จะได้ความเจือจางที่  $10^{-1}$ ) ทำการเจือจางด้วยเทคนิคซีเรียลไดลูชัน (serial dilution) ปิเปตตัวอย่างจากความเจือจางที่  $10^{-1}$  มา 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลองที่มีสารละลายบัฟเฟอร์เปปโตโนวอเตอร์ อยู่จำนวน 9 มิลลิลิตร ผสมของเหลวในหลอดทดลองให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมสาร (จะได้ความเจือจางที่  $10^{-2}$ ) จนได้ความเข้มข้นที่ต้องการ ก่อนนำไป ตรวจแบคทีเรียก่อโรค ได้แก่ *E. coli* ด้วยการเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ EC compact dry นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตรวจนับแบคทีเรียโคโลนิสีน้ำเงิน (AOAC Research Institute, 2013)

ตรวจแบคทีเรียก่อโรค *S. Typhimurium* ด้วยการเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ XLD Xylose lysine deoxycholate agar ตรวจวัดโคโลนิที่มีลักษณะกลมใสตรงกลางมีสีดำขนาด 2-3 มิลลิเมตร ตรวจแบคทีเรียก่อโรค *S. aureus* ด้วยการเพาะเลี้ยงบนอาหาร Baird-Parker สังเกตลักษณะโคโลนิของ *S. aureus* จะมีสีดำล้อมรอบด้วยวงใส (จิตศิริ ทองสอน และคณะ, 2544) รายงานผลเป็น log CFU/g วางแผนการทดลองแบบ CRD เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยจำนวนแบคทีเรียในตัวอย่างที่แช่ในเวลาที่แตกต่างกันด้วยสารสกัดที่ทำให้บริสุทธิ์บางส่วนโดยวิธี Duncan's new multiple range test

### 3.2.7.3 ศึกษาเวลาในการแช่แคนดาลูปของสารละลาย pp ด้วยสารดูดซับที่เหมาะสมต่อค่าสีของแคนดาลูปก่อนแช่และหลังแช่

โดยนำตัวอย่างแคนดาลูปตัดแต่งที่เตรียมไว้ที่ผ่านการแช่ในสารละลาย pp ด้วยสารดูดซับที่เหมาะสม ที่ความเข้มข้น 1 MBC จากขั้นตอนที่ 3.2.6 โดยใช้อัตราส่วน แคนดาลูปต่อสารละลายเท่ากับ 1 : 2 เป็นเวลา 2 3 4 และ 5 นาที ตัวควบคุมแช่ด้วยน้ำกลั่นเป็นเวลา 5 นาที หลังจากนั้นสะเด็ดน้ำให้แห้งบนตะแกรงที่ปลอดเชื้อทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องในตู้ปลอดเชื้อเป็นเวลา 30 นาที โดยนำตัวอย่างแคนดาลูปตัดแต่งที่เตรียมไว้ที่ผ่านการแช่ด้วยสารละลาย pp ด้วยสารดูดซับที่เหมาะสม ที่เหมาะสม มาตรวจวัดสี ( $L^*$ ,  $a^*$ ) ดัดแปลงวิธีจาก Chen และคณะ (2016) โดยวัดค่าสีในระบบ CIE LAB โดย Chroma meter โดยที่  $L^*$  แสดงค่าความสว่างของสีมีค่า 0-100 ที่ 0 แสดงถึงสีดำ และ 100 แสดงถึงสีขาว,  $+a^*$  แสดงลักษณะสีแดง,  $-a^*$  แสดงลักษณะสีเขียว) โดยใช้แหล่งกำเนิดแสง D-light 65 และเทียบมาตรฐานในการวัดสีทุกครั้งก่อนด้วยแผ่นกระเบื้องสีขาว

### 3.2.7.4 ศึกษาการใช้สารละลาย pp ด้วยสารดูดซับ กรดซिटริก และ สารละลาย pp ด้วยสารดูดซับร่วมกับกรดซिटริกเพื่อลดจำนวนของเชื้อแบคทีเรียทั้งหมด และ แบคทีเรียก่อโรควางชนิดในแคนตาลูปตัดแต่ง

แบ่งแคนตาลูปออกเป็น 6 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มที่ 1 แคนตาลูปตัดแต่งที่ไม่ได้แช่ กลุ่มที่ 2 แคนตาลูปตัดแต่งที่แช่ด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ กลุ่มที่ 3 แคนตาลูปที่แช่ในสารละลาย pp ด้วยสารดูดซับที่เวลาที่เหมาะสมที่ได้จากขั้นตอนที่ 3.2.7.2 กลุ่มที่ 4 แคนตาลูปที่แช่ด้วยกรดซिटริกที่ความเข้มข้น 1 MBC (6.25 mg/ml) กลุ่มที่ 5 แคนตาลูปที่แช่ในสารละลาย pp ด้วยสารดูดซับที่เหมาะสมที่ความเข้มข้น 0.5 MBC ร่วมกับกรดซिटริกที่ความเข้มข้น 0.5 MBC และกลุ่มสุดท้ายแช่ใน MKSE ที่ความเข้มข้น 1 MBC หลังจากนั้นสเด็ดน้ำ แคนตาลูปที่ได้แต่ละกลุ่มวางในตู้ปลอดเชื้อ เป็นเวลา 30 นาที เก็บรักษาแคนตาลูปที่ได้แต่ละกลุ่มโดยการแช่เย็นอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ตรวจวิเคราะห์ปริมาณเชื้อต่างๆ เป็นเวลา 0 1 3 5 7 และ 9 วัน เมื่อครบกำหนดเวลาตรวจนับจำนวน *E. coli*, *S. Typhimurium* และ *S. aureus* ด้วยวิธีเดียวกับข้อ 3.2.7.4 รายงานผลเป็น CFU/g วางแผนการทดลองแบบ CRD เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยจำนวนแบคทีเรียในแคนตาลูประหว่างการเก็บรักษาโดยวิธี Duncan's new multiple-range test.

### 3.2.7.5 ศึกษาการใช้สารละลาย pp ด้วยสารดูดซับ กรดซिटริก และ สารละลาย pp ด้วยสารดูดซับร่วมกับกรดซिटริกเพื่อควบคุมค่าสีของแคนตาลูปตัดแต่ง

โดยนำตัวอย่างแคนตาลูปตัดแต่งทั้ง 6 กลุ่ม มาตรวจวัดสี ( $L^*$  และ  $a^*$ ) ตามวิธี 3.2.7.3 เป็นเวลา 0 1 3 5 7 และ 9 วัน

## บทที่ 4

### ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

#### 4.1 ปริมาณสารสกัดแห้งและสารประกอบฟีนอลิกของสารสกัดหยาบเมล็ดมะเกี๋ยง

นำผงเมล็ดมะเกี๋ยงไปวิเคราะห์ปริมาณความชื้น พบว่ามีปริมาณความชื้นร้อยละ 10.14 หลังจากนั้นนำผงเมล็ดมะเกี๋ยง 20 กรัม ไปสกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอลร้อยละ 50 ร่วมกับคลื่นอัลตราโซนิคหลังจากทำการกรอง แยกส่วนที่เป็นของแข็งแล้ว นำส่วนที่เป็นสารละลายไปทำแห้งได้เป็นสารสกัดเมล็ดมะเกี๋ยงแห้ง ปริมาณ 3.21 กรัม ที่มีปริมาณความชื้นร้อยละ 9.07

โดยมีองค์ประกอบสารประกอบฟีนอลิก ฟลาโวนอยด์และปริมาณสารสกัดผงของสารสกัดหยาบเมล็ดมะเกี๋ยง (MKSE) แสดงในตารางที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 ปริมาณสารสกัดแห้งและสารประกอบฟีนอลิกของสารสกัดหยาบเมล็ดมะเกี๋ยง

ตัวอย่าง	ปริมาณสารสกัดผง (ร้อยละโดยน้ำหนัก ของสารสกัดต่อผง มะเกี๋ยง)	ร้อยละของ สารประกอบฟีนอลิกที่ มีอยู่ในสารสกัดผง	ร้อยละของ สารประกอบฟลา โวนอยด์ที่มีอยู่ใน สารสกัดผง
สารสกัดหยาบเมล็ดมะเกี๋ยง	16.06 ± 0.83	31.39 ± 1.39	2.19 ± 0.09

จากการติดตามสารประกอบฟีนอลิกบางชนิดที่สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ได้ เช่น กรดแกลลิก คาเทชิน เควอร์ซิทิน รุทีน และกรดคลอโรจินิก ด้วย HPLC ไม่พบว่า มีกรดคลอโรจินิกในสารสกัดหยาบที่ได้ในการทดลองนี้ แต่สารอื่นๆสามารถพบในปริมาณดังตารางที่ 4.2 และโครมาโทแกรมแสดงในภาคผนวก ก.4

ตารางที่ 4.2 ชนิดและปริมาณ (%โดยน้ำหนัก) ของสารประกอบฟีนอลิกในสารสกัดหยาบเมล็ดมะเกี๋ยง

ตัวอย่าง	กรดแกลลิก (%)	คาเทชิน (%)	เควอร์ซิทิน (%)	รุทีน (%)
สารสกัดหยาบเมล็ดมะเกี๋ยง	0.128	0.029	0.11	0.035

#### 4.2 การเพิ่มอัตราส่วนของสารประกอบฟีนอลิกของ MKSE ที่ทำให้บริสุทธิ์บางส่วนด้วยสารดูดซับชนิดต่างๆ

สารดูดซับที่ใช้ในงานวิจัยนี้มีอยู่ 3 ชนิด ได้แก่ เรซินรูพรุนขนาดใหญ่ (MARs) ถ่านกัมมันต์ชนิดผง (PAC) และโพลีไวนิลไพร์โรลิโดน (PVPP) เพื่อทำการดูดซับสารประกอบฟีนอลิกที่อยู่ใน MKSE หลังจากการปลดปล่อยด้วยเอทานอลแล้วพบว่า

องค์ประกอบของสารประกอบฟีนอลิกในสารที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์บางส่วน (pp) ด้วยสารดูดซับทั้ง 3 ชนิด แสดงในตารางที่ 4.3 พบว่า สารสกัดของ MKSE เริ่มต้นมีองค์ประกอบของสารประกอบฟีนอลิกร้อยละ 31.39 โดยพบว่าเมื่อผ่านการทำทดลองแล้ว MARs มีร้อยละของการ recovery ของสารประกอบฟีนอลิกจาก MKSE สูงที่สุด และสามารถเพิ่มอัตราส่วนของสารประกอบฟีนอลิกในสาร ppMARs สูงที่สุดคือร้อยละ 56.06 และ 90.80 ตามลำดับ ตามด้วย PVPP และ PAC ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Couteau และ Mathaly (1996) ได้ศึกษา ร้อยละปริมาณของกรดฟีนอลิก โดยเปรียบเทียบสารดูดซับ 3 ชนิด ได้แก่ ถ่านกัมมันต์ชนิดผง (PAC) เรซินรูพรุนขนาดใหญ่ชนิด XAD และ โพลีไวนิล-โพลีไพร์โรลิโดน (PVPP) พบว่ากรดฟีนอลิกในสารสกัดจากบิทูทที่ผ่านการดูดซับด้วย MARs มีค่าสูงสุด ซึ่งอธิบายว่า MARs มีความสามารถดูดซับสารประกอบฟีนอลิกได้ดีเนื่องจากมีกลไกการดูดซับทั้งด้านเคมีและกายภาพ อย่างไรก็ตามการใช้สารดูดซับ MARs และ PVPP สามารถเพิ่มอัตราส่วนของสารประกอบฟีนอลิกได้มากกว่าสารสกัดหยาบ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Chan และคณะ (2011) พบว่าสารดูดซับ MARs สามารถเพิ่มอัตราส่วนของสารประกอบฟีนอลิกจากสารสกัดหยาบ เพิ่มขึ้นจากร้อยละ 44.4 เป็นร้อยละ 97.8

จากผลการทดลอง พบว่า ppMARs มีปริมาณสารสกัดแห้งลดลงประมาณ 4 เท่าจากปริมาณสารสกัด MKSE เริ่มต้น แต่สัดส่วนของสารประกอบฟีนอลิกสูงขึ้น ผลดังกล่าวสอดคล้องกับงานวิจัยของ Lin และคณะ (2012) ที่รายงานว่าสารสกัดของ *Rabdosis serra* ที่ผ่านสารดูดซับ MARs มีปริมาณสารแห้ง ( $97.3 \pm 9.2$  มิลลิกรัม) น้อยกว่าสารสกัดหยาบ ( $395.5 \pm 15.3$  มิลลิกรัม) โดยมีสารสกัดแห้งลดลงประมาณ 4 เท่า นอกจากนี้การศึกษากการใช้ MARs ชนิดมีขั้วปานกลางในสารสกัดที่ทำให้บริสุทธิ์บางส่วนในงานวิจัยของ Chan และคณะ (2011) พบว่า มีสารสกัดแห้งที่ได้ผ่านการดูดซับด้วยสารดูดซับมีปริมาณลดลงเหลือ  $871 \pm 105$  มิลลิกรัม จากสารสกัดหยาบ มี  $4470 \pm 240$  มิลลิกรัม



**ตารางที่ 4.3** อิทธิพลของชนิดของสารดูดซับต่อปริมาณสารสกัดและร้อยละความเข้มข้นของสารประกอบฟีนอลิกที่มีอยู่ใน MKSE ที่ทำให้บริสุทธิ์บางส่วนด้วยสารดูดซับ

ชนิดของสารดูดซับ	ร้อยละของการ recovery ของสารประกอบฟีนอลิก	ปริมาณสารสกัด (ร้อยละโดยน้ำหนักของสารสกัดต่อผงมะเกลือ)	ร้อยละของสารประกอบฟีนอลิกที่มีอยู่ในสารสกัด
MKSE	-	16.06 <sup>a</sup> ± 0.83	31.39 <sup>c</sup> ± 1.39
MARs	56.06 <sup>a</sup> ± 0.34	4.06 <sup>b</sup> ± 0.24	90.80 <sup>a</sup> ± 1.26
PAC	7.80 <sup>c</sup> ± 0.21	2.11 <sup>d</sup> ± 0.45	24.06 <sup>d</sup> ± 0.64
PVPP	23.93 <sup>b</sup> ± 0.47	3.11 <sup>c</sup> ± 0.19	49.82 <sup>b</sup> ± 1.69

หมายเหตุ a,b,c,... หมายถึง ค่าเฉลี่ยข้อมูลในแนวตั้งแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ ) เมื่อเปรียบเทียบโดย DMRT

จากตารางที่ 4.3 พบว่าการใช้สารดูดซับที่มีกลไกการดูดซับแตกต่างกันส่งผลต่อปริมาณของสารประกอบฟีนอลิก โดยสารประกอบฟีนอลิกมีมากมายหลายชนิด แต่สารประกอบฟีนอลิกที่มีฤทธิ์ในการต้านแบคทีเรียได้ดี ได้แก่ กรดฟีนอลิก และฟลาโวนอยด์ งานวิจัยนี้จึงเลือก กรดแกลลิก คาเทชิน เควอร์ซิทิน และรูทีน ในการติดตามผลของชนิดของสารดูดซับในการแยกสารประกอบฟีนอลิกจาก MKSE

จากตารางที่ 4.4 แสดงผลของการใช้สารดูดซับต่อร้อยละการได้กลับคืนมา (%recovery) ของสารประกอบฟีนอลิกแต่ละชนิดจาก MKSE จากการทดลองพบว่า การใช้สารดูดซับที่แตกต่างกันส่งผลต่อชนิดและปริมาณสารประกอบฟีนอลิกที่ได้ การมซ์ PAC มีผลให้มี % recovery ของกรดแกลลิกมีค่าสูงสุดถึง 90.11 ทั้งนี้เนื่องจากการดูดซับสารประกอบฟีนอลิกของ PAC สามารถดูดซับสารประกอบฟีนอลิกที่มีโครงสร้างอย่างง่าย เช่น กรดแกลลิก กรดคลอโรจินิก กรดซาลิไซลิก ได้ดีกว่ากลุ่มของสารประกอบฟีนอลิกที่โครงสร้างซับซ้อน โดยโมเลกุลของกรดฟีนอลิกจะแพร่เข้าสู่รูพรุนของ PAC และถูกดูดซับไว้ภายใน (Soto และคณะ, 2011) ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับงานวิจัยของ Suárez-Quiroz และคณะ (2014) ที่รายงานว่า PAC สามารถดูดซับกรดคลอโรจินิกในสารสกัดหยาบเมล็ดกาแฟได้ดี

สำหรับสารดูดซับ MARs และ PVPP มี % recovery ของรูทีนสูงที่สุดมากถึง 88.13 และ 90.60 ตามลำดับ ซึ่งงานวิจัยของ He และ Xia (2012) พบว่า MARs ชนิดที่มีสภาพขั้วปานกลางสามารถดูดซับสารประกอบฟีนอลิกที่มีขั้วปานกลาง เช่น รูทีน เควอร์ซิทิน ซึ่งเป็นองค์ประกอบหลัก

ของสารสกัดหยาบ *Canarium album* เนื่องจากสมบัติความมีขี้ผึ้ง พื้นที่ผิวที่มีความจำเพาะ และขนาดรูพรุนที่เหมาะสม นอกจากนี้ Magalhaes และคณะ (2010) ได้ศึกษาการใช้ PVPP เพื่อดูดซับสารประกอบฟีนอลิกจากสารสกัดฮอป (hop) พบว่าสามารถดูดซับสารประกอบฟลาโวนอยด์ในกลุ่มเคอร์ซีทิน และรูทีน ได้ดีที่สุด เนื่องจากเกิดพันธะไฮโดรเจน นอกจากนี้เกิดอันตรกิริยา (interaction) ระหว่างหมู่วงแหวนอะโรมาติกของสารประกอบฟลาโวนอยด์และวงแหวนของอะโรมาติกของซึ่งเป็นโครงสร้างของสารดูดซับ PVPP ด้วย (Barbosa-Pereira และคณะ, 2013)

**ตารางที่ 4.4** ร้อยละโดยน้ำหนัก (% recovery) ของปริมาณและชนิดของสารประกอบฟีนอลิกของสารสกัดที่ทำให้บริสุทธิ์บางส่วนด้วยสารดูดซับชนิดต่างๆจาก MKSE

สารดูดซับ	กรดแกลลิก (%)	คาเทชิน (%)	เคอร์ซีทิน (%)	รูทีน (%)
MARs	18.28	81.70	59.44	88.13
PAC	90.11	0	4.19	0.96
PVPP	13.01	12.93	76.66	90.60

จากตารางที่ 4.4 พบว่าชนิดของสารดูดซับที่ใช้มีผลต่อร้อยละการได้กลับคืนมา (% recovery) ของสารประกอบฟีนอลิกแต่ละชนิดจาก MKSE โดยสารดูดซับ PAC มี % recovery ของกรดแกลลิกสูงสุดถึง 90.11 เนื่องจาก PAC จะสามารถดูดซับสารประกอบฟีนอลิกที่มีโครงสร้างอย่างง่าย เช่น กรดแกลลิก กรดคลอโรจีนิก กรดซาลิไซลิก ได้ดีกว่ากลุ่มของสารประกอบฟีนอลิกที่มีโครงสร้างซับซ้อน โดยโมเลกุลของกรดฟีนอลิกจะแพร่เข้าสู่รูพรุนของ PAC และถูกดูดซับไว้ภายใน (Soto และคณะ, 2011) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Suárez-Quiroz และคณะ (2014) ที่รายงาน ว่า PAC สามารถดูดซับกรดคลอโรจีนิกในสารสกัดหยาบเมล็ดกาแฟได้ดีอีกด้วย

สำหรับสารดูดซับ MARs และ PVPP มี % recovery ของรูทีนสูงที่สุด คือ 88.13 และ 90.60 ตามลำดับ จากงานวิจัยของ He และ Xia (2012) พบว่า MARs ชนิดที่มีสภาพขี้ผึ้งปานกลางจะสามารถดูดซับสารประกอบฟีนอลิกที่มีขี้ผึ้งปานกลาง เช่น รูทีน เคอร์ซีทิน ซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักของสารสกัดหยาบ *Canarium album* เนื่องจากสมบัติความมีขี้ผึ้ง พื้นที่ผิวที่มีความจำเพาะและขนาดรูพรุนที่เหมาะสม นอกจากนี้ Magalhaes และคณะ (2010) ได้ศึกษาการใช้ PVPP เพื่อดูดซับสารประกอบฟีนอลิกจากสารสกัดฮอป (hop) พบว่าสามารถดูดซับสารประกอบฟลาโวนอยด์ในกลุ่ม เคอร์ซีทิน

และรูทิน ได้ดีที่สุดเนื่องจากเกิดพันธะไฮโดรเจน นอกจากนี้เกิดอันตรกิริยา(Interaction) ระหว่างหมู่วงแหวนอะโรมาติกซึ่งเป็นโครงสร้างของสารประกอบฟลาโวนอยด์และวงแหวนอะโรมาติกซึ่งเป็นโครงสร้างของสารดูดซับ PVPP (Barbosa-Pereira และคณะ, 2013)

#### 4.3 ผลของสัดส่วนของสารดูดซับที่เหมาะสมในการดูดซับสารประกอบฟีนอลิก และความเข้มข้นเอทานอลที่ใช้ในการปลดปล่อยสารประกอบฟีนอลิกจากสารดูดซับที่เหมาะสม

จากงานวิจัยของ Magalhaes และคณะ (2010) พบว่าการเลือกใช้สัดส่วนของปริมาณสารดูดซับมีผลต่อปริมาณสารประกอบฟีนอลิก งานวิจัยนี้จึงศึกษาหาปริมาณสัดส่วนของ MARs ที่เหมาะสมในการดูดซับสารประกอบฟีนอลิกในสารสกัดหยาบเมถืดมะเกี๋ยงที่ความเข้มข้น 12.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากตารางที่ 4.5 พบว่าเมื่อเพิ่มปริมาณสัดส่วนของสารดูดซับต่อสารละลาย MKSE เป็น 37.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถเพิ่มปริมาณของสารประกอบฟีนอลิกได้เพิ่มขึ้นถึงร้อยละ 95.22 เมื่อเพิ่มปริมาณสารดูดซับเป็น 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าปริมาณของสารประกอบฟีนอลิกที่ได้ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p>0.05$ ) กับการใช้สารดูดซับที่ 37.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งอธิบายได้ว่าการเพิ่มความเข้มข้นของสารดูดซับทำให้พื้นที่ผิวของสารดูดซับอิสระมีมากขึ้นจึงทำให้ดูดซับสารประกอบฟีนอลิกได้เพิ่มขึ้น (Magalhaes และคณะ, 2010) แต่อย่างไรก็ตามเมื่อเพิ่มปริมาณสารดูดซับให้มากกว่าหรือเท่ากับ 37.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จะไม่ทำให้การดูดซับสารประกอบฟีนอลิกเปลี่ยนแปลง

จากการทดลองนี้จึงเลือกใช้สัดส่วนของปริมาณ MARs ต่อสารละลายสารสกัดหยาบเมถืดมะเกี๋ยง คือ 37.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เพื่อนำไปใช้ศึกษาการปลดปล่อยสารประกอบฟีนอลิกด้วยความเข้มข้นเอทานอลที่แตกต่างกัน

**ตารางที่ 4.5** ผลของสัดส่วนของ MARs ต่อปริมาตรสารละลาย MKSE (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ต่อ ปริมาณสารสกัดของผงเมล็ดมะเกี๋ยงและร้อยละ(โดยน้ำหนัก) ของความเข้มข้นของ สารประกอบฟีนอลิกมีอยู่ในสาร ppMARs

สัดส่วนของปริมาณ MARs ต่อ สารละลาย MKSE (มิลลิกรัมต่อ มิลลิลิตร)	ร้อยละของการ recovery ของ สารประกอบฟีนอลิก	ปริมาณสารสกัด (ร้อยละโดยน้ำหนัก ของสารสกัดต่อผง มะเกี๋ยง)	ร้อยละของ สารประกอบฟีนอลิก (โดยน้ำหนัก)
12.5	56.06 <sup>a</sup> ± 0.34	4.06 <sup>c</sup> ± 0.25	90.80 <sup>c</sup> ± 1.21
25	57.51 <sup>a</sup> ± 2.10	4.70 <sup>b</sup> ± 0.19	92.66 <sup>b</sup> ± 0.88
37.5	61.22 <sup>b</sup> ± 0.77	5.52 <sup>a</sup> ± 0.07	95.22 <sup>a</sup> ± 0.75
50	61.38 <sup>b</sup> ± 1.82	5.56 <sup>a</sup> ± 0.11	95.26 <sup>a</sup> ± 0.81

หมายเหตุ a,b,c หมายถึง ค่าเฉลี่ยข้อมูลในแนวตั้งแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ ) เมื่อเปรียบเทียบโดย DMRT

จากตารางที่ 4.6 พบว่า ความเข้มข้นของเอทานอลในการปลดปล่อย (desorption) สารประกอบฟีนอลิก (TPC) จาก MARs ที่เหมาะสมคือ ความเข้มข้นของเอทานอลร้อยละ 70 เนื่องจากสามารถเพิ่มสัดส่วนของร้อยละปริมาณสารประกอบฟีนอลิกที่มีอยู่ในสารที่ทำให้บริสุทธิ์ บางส่วนด้วย MARs (ppMARs) ได้สูงถึง 97.24 (โดยน้ำหนัก) สอดคล้องกับงานวิจัยของ Suárez-Quiroz และคณะ (2014) ที่ได้ศึกษาความเข้มข้นของเอทานอลในการปลดปล่อยสารประกอบ ฟีนอลิกจากเรซินรพุนขนาดใหญ่ HP-20 พบว่าที่ความเข้มข้นเอทานอลร้อยละ 70 ให้ปริมาณ สารประกอบฟีนอลิกสูงที่สุด

โดยสารประกอบฟีนอลิกที่เป็นองค์ประกอบหลักใน MKSE มีหลายกลุ่ม ได้แก่ กรดฟีนอลิก ฟลาโวนอยด์ และแทนนิน (Inboot และคณะ, 2012)(Inboot และคณะ, 2014) ซึ่งพบว่า สารประกอบแทนนิน (catechin equivalent) ในสารสกัด *Galla chinensis* ละลายได้ดีในความ เข้มข้นเอทานอลร้อยละ 70 (Lu และคณะ, 2012) เมื่อพิจารณาองค์ประกอบสารประกอบ ฟลาโวนอยด์ (TFC) นั้น พบว่าสารละลายเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 50 70 และ 90 ให้ปริมาณ สารประกอบฟลาโวนอยด์ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p > 0.05$ ) ซึ่งในงานวิจัยของ Yu และคณะ (2007) พบว่าความเข้มข้นของเอทานอลร้อยละ 50 และ 90 สามารถปลดปล่อย สารประกอบฟลาโวนอยด์จากสารสกัด *Chrysanthemum indicum* ได้ไม่แตกต่างกัน

จากการทดลองครั้งนี้พบว่า สารประกอบฟีนอลิกที่แยกได้จาก MARs มีปริมาณสูงที่สุด เอทานอลมีความปลอดภัยเมื่อนำมาใช้กับอาหาร และอิทธิพลของความเข้มข้นเอทานอลที่แตกต่างกัน ส่งผลต่อการปลดปล่อยสารประกอบฟีนอลิกอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ )

การเพิ่มของความเข้มข้นของเอทานอลสามารถปลดปล่อยสารประกอบฟีนอลิกเพิ่มมากขึ้น ในช่วงเอทานอลที่ desorption ด้วยความเข้มข้นความเข้มข้นของเอทานอลร้อยละ 30 - 90 มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ ) เนื่องจากสารประกอบฟีนอลิกเป็นสารประกอบที่มีความมีขั้ว มีหมู่ไฮดรอกซิลจำนวนมาก สามารถเกิดพันธะไฮโดรเจนกับ MARs ได้ จึงไม่เหมาะสมที่จะใช้ด้วยน้ำกลั่นหรือตัวทำละลายเอทานอลความเข้มข้นต่ำๆ ชะเพื่อแยกสารประกอบฟีนอลิกออกมา ดังนั้นการศึกษานี้จึงเลือกใช้ตัวทำละลายเอทานอลร้อยละ 70 ซึ่งทำให้ได้สารประกอบฟีนอลิกสูงที่สุด รวมถึงมีปริมาณสารสกัดแห้งสูงที่สุดในการนำไปประยุกต์ใช้ในการแช่แคนตาลูปตัดแต่ง

**ตารางที่ 4.6** ผลของความเข้มข้นเอทานอลที่แตกต่างกันต่อปริมาณสารสกัดที่ได้ ร้อยละโดยน้ำหนักของ TPC และ TFC (ที่มีอยู่ใน ppMARs)

ความเข้มข้นของเอทานอล	ปริมาณสารสกัด (ร้อยละโดยน้ำหนักของสารสกัดต่อผงมะเขี๋ยง)	ร้อยละของ TPC ที่มีอยู่ใน ppMARs	ร้อยละของ TFC ที่มีอยู่ใน ppMARs
ร้อยละ 30	3.91 <sup>d</sup> ± 0.34	90.80 <sup>d</sup> ± 1.20	3.14 <sup>b</sup> ± 0.13
ร้อยละ 50	5.52 <sup>c</sup> ± 0.25	93.32 <sup>c</sup> ± 1.52	4.84 <sup>a</sup> ± 0.23
ร้อยละ 70	7.34 <sup>a</sup> ± 0.69	97.24 <sup>a</sup> ± 0.69	4.99 <sup>a</sup> ± 0.10
ร้อยละ 90	6.10 <sup>b</sup> ± 0.69	95.16 <sup>b</sup> ± 2.24	4.81 <sup>a</sup> ± 0.23

หมายเหตุ a,b,c,... หมายถึง ค่าเฉลี่ยข้อมูลในแนวตั้งแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ ) เมื่อเปรียบเทียบโดย DMRT

#### 4.4 การเพิ่มประสิทธิภาพการต้านแบคทีเรียก่อโรคของ MKSE ที่ทำให้บริสุทธิ์บางส่วนด้วยสารดูดซับ

เมื่อทราบชนิดและปริมาณของสารประกอบฟีนอลิกของสารสกัดที่ทำให้บริสุทธิ์ดังกล่าวด้วยสารดูดซับชนิดต่างๆ แล้ว ขั้นตอนถัดมาได้ศึกษาประสิทธิภาพของ MKSE ที่ทำให้บริสุทธิ์บางส่วนด้วยสารดูดซับ โดยมาทดสอบฤทธิ์ต้านการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย 3 ชนิด คือ *E. coli*, *S. Typhimurium* และ *S. aureus* ด้วยวิธี DDM โดยทดสอบกับเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกและแบคทีเรียแกรมลบซึ่งมีโครงสร้างเยื่อหุ้มเซลล์ที่แตกต่างกัน ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 4.7 พบว่าการทำให้บริสุทธิ์บางส่วน (pp) ด้วยสารดูดซับทั้ง 3 ชนิด มีโซนการยับยั้งมากกว่าสารสกัดหยาบ การที่สาร pp สามารถยับยั้งแบคทีเรียได้ดีกว่า MKSE เนื่องจากสารดูดซับสามารถดูดซับและปลดปล่อยสารประกอบฟีนอลิกที่มีความสามารถยับยั้งแบคทีเรียได้มากขึ้นซึ่งสัมพันธ์กับปริมาณและชนิดของสารประกอบฟีนอลิกที่ได้ตั้งแสดงในตารางที่ 4.3 และ 4.4 จากการทดลองพบว่าโซนการยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบ (*E. coli* และ *S. Typhimurium*) ของ ppMARs และ ppPVPP ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p>0.05$ )

ตารางที่ 4.7 ค่าเส้นผ่านศูนย์กลางโซนการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย 3 ชนิดด้วย MKSE ที่ไม่ผ่านและที่ผ่านสารดูดซับ

แบคทีเรียก่อโรค	ชนิดของสารดูดซับ	เส้นผ่านศูนย์กลางโซนการยับยั้ง (mm)
<i>Escherichia coli</i>	MKSE	6.09 <sup>c</sup> ± 0.04
	MARs	12.24 <sup>a</sup> ± 0.85
	PAC	6.71 <sup>b</sup> ± 0.10
	PVPP	12.30 <sup>a</sup> ± 0.86
<i>Salmonella Typhimurium</i>	MKSE	6.14 <sup>c</sup> ± 0.05
	MARs	12.62 <sup>a</sup> ± 0.12
	PAC	7.08 <sup>b</sup> ± 0.13
	PVPP	12.54 <sup>a</sup> ± 0.16
<i>Staphylococcus aureus</i>	MKSE	6.79 <sup>d</sup> ± 0.14
	MARs	14.33 <sup>b</sup> ± 0.10
	PAC	8.79 <sup>c</sup> ± 0.16
	PVPP	14.65 <sup>a</sup> ± 0.29

หมายเหตุ a,b,c,... หมายถึง ค่าเฉลี่ยข้อมูลในแนวตั้งเฉพาะแบคทีเรียแต่ละชนิดแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p<0.05$ ) เมื่อเปรียบเทียบโดย DMRT

ทั้งนี้องค์ประกอบของสารประกอบฟีนอลิกในสาร pp ที่ผ่านสารดูดซับทั้ง 3 ชนิดแตกต่างกัน สังเกตได้ว่า ppPAC ประกอบด้วยกรดแกลลิกเป็นส่วนใหญ่ แต่ฤทธิ์การยับยั้งไม่ดีเท่าที่ควร ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Xia และคณะ (2011) ที่พบว่ากรดฟีนอลิก ได้แก่ 3-O-caffeoylquinic acid ในสารสกัดเมล็ด *Prunus mume Sieb.* มีฤทธิ์การยับยั้งแบคทีเรียน้อยกว่าสารสกัดหยาบ ทั้งนี้เนื่องจากประสิทธิภาพการต้านเชื้อได้ดึ้นไม่ได้ขึ้นอยู่กับปริมาณกรดฟีนอลิกที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อได้แต่ยังขึ้นอยู่กับสารเสริมฤทธิ์ของสารประกอบฟีนอลิกแต่ละชนิดซึ่งพบว่า ppPAC มีองค์ประกอบของกรดฟีนอลิกเป็นส่วนใหญ่ โดยองค์ประกอบอื่น เช่น รุทีน เควอร์ซิทิน พบปริมาณน้อยเมื่อเทียบกับสารดูดซับอื่นส่งผลต่อการเสริมฤทธิ์กัน ส่วนโชนการยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวก (*S. aureus*) พบว่าสาร pp ที่ผ่านสารดูดซับ 3 ชนิด ให้การยับยั้งที่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ ) โดย ppPVPP มีค่ามากที่สุดตามด้วย ppMARs ppPAC และ MKSE ตามลำดับ เนื่องจาก ppPVPP มีปริมาณเควอร์ซิทินและรุทีนสูงกว่า ppMARs ซึ่ง Cushnie และ Lamb (2005) รายงานว่าเควอร์ซิทินมีฤทธิ์ต้านการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย โดยทำลายเยื่อหุ้มเซลล์ยับยั้งการสร้างกรดนิวคลีอิก รวมทั้งยับยั้งเมทาบอลิซึมของเชื้อแบคทีเรียจึงทำให้เชื้อแบคทีเรียถูกยับยั้งและทำลายในที่สุด นอกจากนี้ยังมีการรายงานว่า รุทีนและเควอร์ซิทิน มีความสามารถในการเสริมฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย (*S. aureus*) ได้ดีอีกด้วย (Arima และคณะ, 2002)

การศึกษาฤทธิ์การต้านการเจริญของแบคทีเรียสามารถทำได้หลายวิธี นอกจากการทดสอบด้วยวิธี DDM แล้วยังมีการทดสอบด้วยวิธี Broth macro dilution test โดยวิเคราะห์ห้ด้วยค่า MIC และ MBC ดังแสดงในตารางที่ 4.8 และ 4.9 จากการทดลองพบว่าประสิทธิภาพการยับยั้งจุลินทรีย์ของ ppMARs ppPAC และ ppPVPP มีประสิทธิภาพมากกว่าสารสกัดหยาบเมล็ดมะเกี๋ยง โดยมีค่าเป็นประมาณ 4, 2 และ 4 เท่าของ MKSE ตามลำดับ

การทดลองนี้พบว่าทุกตัวอย่างสามารถยับยั้งจุลินทรีย์แกรมบวกได้ดีกว่าแกรมลบเนื่องจาก *S. aureus* ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมบวก ถึงแม้โครงสร้างเยื่อหุ้มเซลล์จะมีชั้นเพปทิโดไกลแคนที่หนา แต่ไม่มีเยื่อหุ้มชั้นนอกเหมือน *S. Typhimurium* และ *E. coli* ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมลบ (Brown และคณะ, 2015) โดยค่า MIC และ MBC ของ ppMARs และ ppPVPP ในการต่อต้านแบคทีเรีย *E.coli* และ *S. Typhimurium* พบว่ามีค่าเท่ากับ 1.56 และ 3.13 mg/ml สำหรับ ppPAC มีค่าเท่ากับ 3.13 และ 6.25 mg/ml และ MKSE มีค่าเท่ากับ 6.25 และ 12.5 mg/ml ในขณะที่ ค่า MIC และ MBC ของ ppMARs และ ppPVPP ในการต่อต้านแบคทีเรีย *S. aureus* ค่าเท่ากับ 0.78 และ 1.56 mg/ml สำหรับ ppPAC มีค่าเท่ากับ 1.56 และ 3.13 mg/ml และ MKSE มีค่าเท่ากับ 3.13 และ 6.25 mg/ml

จากการศึกษาการต้านการเจริญของแบคทีเรียด้วยวิธี Broth macro dilution test พบว่า ppMARs และ ppPVPP มีฤทธิ์ต้านการเจริญของเชื้อแบคทีเรียไม่ต่างกัน แต่ ppMARs มีองค์ประกอบของปริมาณของสารประกอบฟีนอลิก รวมทั้งมีปริมาณสารสกัดแห้งมากที่สุด แสดงให้เห็นว่า MARs เป็นสารดูดซับสำหรับสารประกอบฟีนอลิกในสารสกัดหยาบเมล็ดมะเกี๋ยง ได้มีประสิทธิภาพมากที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับสารดูดซับอื่น จึงเลือกสารดูดซับ MARs มาใช้ในขั้นตอนต่อไป

ตารางที่ 4.8 ประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรีย (MIC, mg/ml) ของสาร pp ด้วยสารดูดซับชนิดต่างๆ

แบคทีเรีย	สาร pp ด้วยสารดูดซับชนิดต่างๆ			MKSE
	MARs	PAC	PVPP	
<i>E. coli</i>	1.56	3.13	1.56	6.25
<i>S. Typhimurium</i>	1.56	3.13	1.56	6.25
<i>S. aureus</i>	0.78	1.56	0.78	3.13

ตารางที่ 4.9 ประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรีย (MBC, mg/ml) ของสาร pp ด้วยสารดูดซับชนิดต่างๆ

แบคทีเรีย	สาร pp ด้วยสารดูดซับชนิดต่างๆ			MKSE
	MARs	PAC	PVPP	
<i>E. coli</i>	3.13	6.25	3.13	12.5
<i>S. Typhimurium</i>	3.13	6.25	3.13	12.5
<i>S. aureus</i>	1.56	3.13	1.56	6.25

#### 4.5 การเพิ่มประสิทธิภาพการต้านแบคทีเรียก่อโรคของสาร ppMARs ที่การปลดปล่อยด้วยความเข้มข้นของเอทานอลที่แตกต่างกัน

เมื่อทราบถึงประสิทธิภาพของสารดูดซับ MARs ที่ทำให้ได้สารประกอบฟีนอลิกชนิดต่างๆที่เหมาะสม จึงได้นำมาศึกษาประสิทธิภาพการต้านแบคทีเรียโดยแปรความเข้มข้นของเอทานอลซึ่งใช้เพื่อการปลดปล่อย (desorption) สารจาก MARs แล้วนำสารที่สกัดได้มาทดสอบด้วยวิธี DDM ได้ผลการทดลองดังตารางที่ 4.10 พบว่า สาร ppMARs ที่ความเข้มข้นคงที่ที่ 25 mg/ml และความเข้มข้น



เอทานอลร้อยละ 70 มีขนาดโชนไสของการยับยั้งแบคทีเรียทั้งสามชนิดสูงที่สุด ซึ่งสอดคล้องกับผลค่า MIC และ MBC ในการต้านแบคทีเรียดังตารางที่ 4.11 และ 4.12 ผลค่า MIC ของสาร ppMARs ที่ desorption ด้วยสารละลายเอทานอลร้อยละ 70 และ 90 พบว่าเพิ่มประสิทธิภาพการยับยั้งได้ 2 เท่าของ ppMARs ที่ desorption ด้วยความเข้มข้นร้อยละ 30 และ 50 แต่เมื่อพิจารณาค่า MBC พบว่าไม่มีความแตกต่างกันเมื่อ desorption ด้วยเอทานอลเข้มข้นร้อยละ 50-70 เพราะว่า ppMARs ที่ desorption ด้วยสารละลายเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 70 มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกสูงสุด ดังตารางที่ 4.6 ซึ่งพบว่าองค์ประกอบที่พบใน ppMARs มีเคอร์ซีทินและคาเทชิน ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้ง จากงานวิจัยของ Kabir และคณะ (2014) พบว่าเคอร์ซีทินมีฤทธิ์ต้านการเจริญของเชื้อแบคทีเรียได้มากที่สุด ตามด้วยกรดเพอรูริก กรดแกลลิก และคลอโรจีนิก ตามลำดับ

จากผลการทดลองนี้จึงนำสารสกัด ppMARs ที่ desorption ด้วยเอทานอลร้อยละ 70 ซึ่งจัดว่าเป็นความเข้มข้นที่เหมาะสมที่สุด นำไปใช้ในการศึกษาประสิทธิภาพการต้านแบคทีเรียก่อโรคบางชนิดในแคนดาลูปัตต์แดงต่อไป โดยจะนำสาร ppMARs ที่ desorption ด้วยความเข้มข้นเอทานอลร้อยละ 70 ที่มีความเข้มข้นที่เหมาะสมไปประยุกต์ใช้ในการศึกษาประสิทธิภาพการต้านแบคทีเรียก่อโรคบางชนิดในแคนดาลูปัตต์แดงต่อไป

ตารางที่ 4.10 ค่าเส้นผ่านศูนย์กลางโซนการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย 3 ชนิดของสาร ppMARs ที่ desorption ด้วยความเข้มข้นเอทานอลแตกต่างกัน

แบคทีเรียก่อโรค	ความเข้มข้นของเอทานอล	เส้นผ่านศูนย์กลางโซนการยับยั้ง (mm)
<i>Escherichia coli</i>	ร้อยละ 30	7.46 <sup>d</sup> ± 0.11
	ร้อยละ 50	10.56 <sup>b</sup> ± 0.23
	ร้อยละ 70	10.90 <sup>a</sup> ± 0.09
	ร้อยละ 90	10.14 <sup>c</sup> ± 0.33
	น้ำกลั่นปลอดเชื้อ	-
<i>Salmonella Typhimurium</i>	ร้อยละ 30	7.37 <sup>d</sup> ± 0.13
	ร้อยละ 50	9.36 <sup>c</sup> ± 0.24
	ร้อยละ 70	11.65 <sup>a</sup> ± 0.30
	ร้อยละ 90	10.82 <sup>b</sup> ± 0.14
	น้ำกลั่นปลอดเชื้อ	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	ร้อยละ 30	10.37 <sup>c</sup> ± 0.18
	ร้อยละ 50	11.89 <sup>b</sup> ± 0.69
	ร้อยละ 70	12.74 <sup>a</sup> ± 0.44
	ร้อยละ 90	12.26 <sup>ab</sup> ± 0.47
	น้ำกลั่นปลอดเชื้อ	-

หมายเหตุ a,b,c,... หมายถึง ค่าเฉลี่ยข้อมูลในแนวตั้งเฉพาะแบคทีเรียแต่ละชนิดแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) เมื่อเปรียบเทียบโดย DMRT

ตารางที่ 4.11 ประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรีย (MIC, mg/ml) ของสาร ppMARs ที่ desorption ด้วยความเข้มข้นของเอทานอลแตกต่างกันในการต้านแบคทีเรียทั้ง 3 ชนิด

แบคทีเรีย	สาร ppMARs ที่ desorption ด้วยความเข้มข้นของเอทานอลแตกต่างกัน (mg/ml)			
	ร้อยละ 30	ร้อยละ 50	ร้อยละ 70	ร้อยละ 90
<i>E. coli</i>	3.125	3.125	1.56	1.56
<i>S. Typhimurium</i>	3.125	3.125	1.56	1.56
<i>S. aureus</i>	1.56	0.78	0.78	0.78

ตารางที่ 4.12 ประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรีย (MBC, mg/ml) ของสาร ppMARs ที่ desorption ด้วยความเข้มข้นของเอทานอลแตกต่างกันในการต้านแบคทีเรียทั้ง 3 ชนิด

แบคทีเรีย	สาร ppMARs ที่ desorption ด้วยความเข้มข้นของเอทานอลแตกต่างกัน (mg/ml)			
	ร้อยละ 30	ร้อยละ 50	ร้อยละ 70	ร้อยละ 90
<i>E. coli</i>	6.25	3.125	3.125	3.125
<i>S. Typhimurium</i>	6.25	3.125	3.125	3.125
<i>S. aureus</i>	3.125	1.56	1.56	1.56

#### 4.6 เวลาที่เหมาะสมในการแช่แคนตาลูปตัดแต่งของสารละลาย ppMARs เพื่อการลดจำนวนของเชื้อแบคทีเรียก่อโรควางชนิดและผลต่อค่าสีที่เปลี่ยนแปลงของแคนตาลูปตัดแต่ง

นำสารละลาย ppMARs จากข้อ 4.5 มาศึกษาระยะเวลาในการแช่แคนตาลูปตัดแต่ง โดยใช้ความเข้มข้นของสารสกัด 1 MBC (3.13 mg/ml) เพื่อลดจำนวนเชื้อแบคทีเรียก่อโรค 3 ชนิด *E. coli*, *S. Typhimurium* และ *S. aureus* จากนั้นนำไปทดสอบปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ตามวิธีในข้อ 3.2.7.2 ซึ่งผลการทดลองแสดงในตารางที่ 4.13

การศึกษาอิทธิพลของเวลาแช่เพื่อการลดจำนวนแบคทีเรียก่อโรค พบว่าการแช่แคนตาลูปตัดแต่งเป็นเวลา 3 4 และ 5 นาที ทำให้มีจำนวนแบคทีเรีย *S. Typhimurium* และ *S. aureus* ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p>0.05$ ) สอดคล้องกับงานวิจัยของ จอมขวัญ สุวรรณรักษ์ และ นิธิยา รัตนานนท์ (2556) ซึ่งพบว่าเวลาในการแช่แคนตาลูปแกะสลักด้วยสารละลายกรดเพอร์ออกซิอะซิติก ความเข้มข้น 40 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่เวลา 3 นาที และ 5 นาที สามารถลดของจำนวนแบคทีเรีย *E. coli* ได้ไม่แตกต่างกัน ในขณะที่เวลา 3 และ 4 นาที มีจำนวนแบคทีเรีย *E. coli* ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p>0.05$ )

นอกจากนี้ผลการทดลองยังพบว่า การแช่ด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อที่เวลา 5 นาทีและแคนตาลูปที่ไม่ได้แช่ โดยมีจำนวนแบคทีเรีย *S. Typhimurium* และ *S. aureus* ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p>0.05$ ) แต่สามารถทำให้แบคทีเรีย *E. coli* ลดลง (ลดลง 0.33 log CFU/g) เนื่องจากน้ำกลั่นสามารถชะล้างเอาแบคทีเรียที่ปนเปื้อนที่บริเวณพื้นผิวของแคนตาลูปตัดแต่งได้ สอดคล้องกับงานวิจัยของ Sapers และ Sites (2003) ซึ่งศึกษาถึงการลดจำนวน *E. coli* และยืดอายุการเก็บรักษาแต่งแคนตาลูปสดตัดแต่งโดยแช่ในน้ำสะอาด ผลปรากฏว่าการแช่ด้วยน้ำสามารถลดจุลินทรีย์ลงได้น้อยกว่า 1 log (10 เซลล์) และจากการทดลองครั้งนี้พบว่าเมื่อแช่แคนตาลูปด้วยสารละลายชนิด ppMARs เป็นเวลา 2 นาที ทำให้แบคทีเรียทั้งสามชนิดลดลงได้มากกว่าน้ำกลั่น โดยมีจำนวนแบคทีเรียแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับน้ำกลั่น ( $p\leq 0.05$ ) โดยเมื่อเพิ่มระยะเวลาในการแช่นานขึ้นเป็น 3 4 และ 5 นาที พบว่าสามารถลดแบคทีเรียดังกล่าวได้มากขึ้น เนื่องจากการใช้ระยะเวลาในการแช่ให้นานขึ้นจะทำให้แคนตาลูปมีโอกาสสัมผัสกับสารสกัดที่ทำหน้าที่ฆ่าเชื้อที่นานขึ้น จึงทำให้สารประกอบฟีนอลิกชนิดต่างๆในสารละลาย ppMARs สามารถสัมผัสเซลล์แบคทีเรียได้นานขึ้น โดยสารประกอบฟีนอลิกนี้จะมีผลต่อเยื่อหุ้มเซลล์ของจุลินทรีย์ทำให้โครงสร้างของเซลล์เสียหายและเยื่อหุ้มเซลล์ถูกทำลาย (Tirpanalan และคณะ, 2011) ดังนั้นการเลือกใช้เวลาที่ 3 นาทีในการแช่แคนตาลูปจึงเป็นเวลาที่เหมาะสมต่อการลดปริมาณแบคทีเรียเริ่มต้น เนื่องจากการแช่ที่เวลา 3 4 และ 5 นาที มีจำนวนแบคทีเรียไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p>0.05$ )

**ตารางที่ 4.13** เวลาในการแช่แคนตาลูปตัดแต่งด้วยสารละลาย ppMARs ต่อจำนวนแบคทีเรียก่อโรค  
บางชนิด

เวลาในการแช่ (นาทีก)	ปริมาณเชื้อ (log CFU/g)		
	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. Typhimurium</i>
ไม่ได้แช่ (0นาทีก)	5.45 <sup>a</sup> ± 0.23	5.26 <sup>a</sup> ± 0.14	5.44 <sup>a</sup> ± 0.13
แช่น้ำกลั่น 5 นาทีก	5.26 <sup>a</sup> ± 0.15	4.93 <sup>b</sup> ± 0.12	5.17 <sup>a</sup> ± 0.05
แช่ 2 นาทีก	4.62 <sup>b</sup> ± 0.07	4.73 <sup>c</sup> ± 0.07	4.79 <sup>b</sup> ± 0.22
แช่ 3 นาทีก	4.39 <sup>c</sup> ± 0.18	4.60 <sup>d</sup> ± 0.14	4.60 <sup>b</sup> ± 0.30
แช่ 4 นาทีก	4.36 <sup>c</sup> ± 0.17	4.59 <sup>d</sup> ± 0.04	4.60 <sup>b</sup> ± 0.28
แช่ 5 นาทีก	4.37 <sup>c</sup> ± 0.19	4.35 <sup>e</sup> ± 0.12	4.51 <sup>b</sup> ± 0.33

หมายเหตุ a,b,c,... หมายถึง ค่าเฉลี่ยในแนวตั้งที่มีอักษรต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ )  
เมื่อเปรียบเทียบโดย DMRT

เมื่อศึกษาอิทธิพลของเวลาในการแช่ด้วยสารละลาย ppMARs ต่อการเปลี่ยนแปลงค่า  $L^*$  และ  $a^*$  (ความสว่างและความมีสีแดง) ของแคนตาลูปหลังแช่ดังตารางที่ 4.14 พบว่าการแช่แคนตาลูปตัดแต่งที่เวลา 2 3 4 และ 5 นาทีก มีค่า  $L^*$  ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p > 0.05$ ) แต่ส่งผลต่อค่า  $a^*$  โดยมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ ) โดยเมื่อเปรียบเทียบค่า  $a^*$  ของแคนตาลูปที่แช่สารละลาย ppMARs นาน 4 และ 5 นาทีก กับแคนตาลูปที่ไม่ได้แช่ พบว่าค่า  $a^*$  ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ ) อาจเกี่ยวเนื่องเวลาในการสัมผัสมากขึ้น ทำให้แคนตาลูปตัดแต่งมีแนวโน้มถึงสีน้ำตาลมากขึ้น (ค่า  $a^*$  สูงขึ้น) เนื่องจากการใช้สารสกัดฟีนอลิกจากพืชในการแช่ผักและผลไม้โดยทั่วไปพบว่าทำให้ตัวอย่างมีสีคล้ำขึ้น (Altunkaya และ GÖKmen, 2012)

ดังนั้นในการทดลองนี้ จึงเลือกที่เวลาในการล้าง 3 นาทีก เป็นสภาวะที่เหมาะสมในการศึกษา  
ขั้นตอนต่อไป

**ตารางที่ 4.14** ความแตกต่างของสีแคนตาลูปตัดแต่งก่อนแช่และหลังแช่ด้วยสารละลาย ppMARs ที่ระยะเวลาต่างๆ

ระยะเวลาในการแช่ด้วยสารสกัดที่ทำ ให้บริสุทธิ์บางส่วน MARs	ค่า $L^*$	ค่า $a^*$
ไม่ได้แช่ (0นาทีก่อน)	77.17 <sup>b</sup> ± 0.11	6.08 <sup>c</sup> ± 0.18
แช่น้ำกลั่น 5 นาที	78.61 <sup>a</sup> ± 0.43	7.11 <sup>a</sup> ± 0.15
แช่ 2 นาที	75.55 <sup>c</sup> ± 0.64	6.47 <sup>b</sup> ± 0.30
แช่ 3 นาที	75.88 <sup>c</sup> ± 0.66	6.25 <sup>c</sup> ± 0.18
แช่ 4 นาที	75.66 <sup>c</sup> ± 0.40	5.61 <sup>d</sup> ± 0.13
แช่ 5 นาที	75.98 <sup>c</sup> ± 0.08	5.58 <sup>d</sup> ± 0.07

หมายเหตุ a,b,c,... หมายถึง ค่าเฉลี่ยข้อมูลในแนวตั้งแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ ) เมื่อเปรียบเทียบโดย DMRT

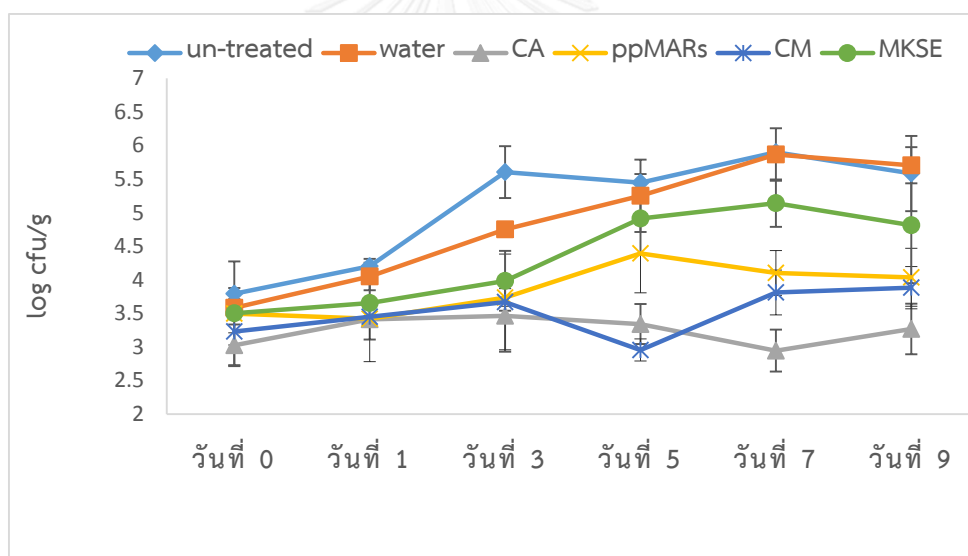
#### 4.7 ประสิทธิภาพของสารสกัดชนิดต่างๆ กรดซิตริก และการใช้สารละลาย ppMARs ร่วมกับกรดซิตริกในการแช่แคนตาลูปตัดแต่งเพื่อลดจำนวนเชื้อแบคทีเรีย

หลังจากที่ได้ระยะเวลาที่เหมาะสมในการแช่แคนตาลูปตัดแต่งในสารละลาย ppMARs แล้ว การทดลองนี้ได้ศึกษาการเพิ่มประสิทธิภาพของสารละลาย MKSE ด้วยการใช้สารละลาย ppMARs ร่วมกับกรดซิตริก (CM) เพื่อลดและควบคุมจำนวนแบคทีเรียก่อโรค และศึกษาผลกระทบทางด้านกายภาพของแคนตาลูปตัดแต่ง ได้แก่ ค่าสีของแคนตาลูปตัดแต่งโดยเปรียบเทียบกับแคนตาลูปตัดแต่งที่แช่ด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ (water) แล้วนำไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 9 วัน

การศึกษการเปลี่ยนแปลงของจำนวนแบคทีเรียทั้งหมด ในการแช่แคนตาลูปตัดแต่งของทุกตัวอย่าง (ภาพที่ 4.1) พบว่าจำนวนเชื้อแบคทีเรียเริ่มต้นในวันแรกเท่ากับ  $3.89 \pm 0.08 \log \text{CFU/g}$  และหลังจากแช่แคนตาลูปในด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ สารละลาย MKSE สารละลาย ppMARs กรดซิตริก (CA) และสารละลาย ppMARs ร่วมกับกรดซิตริก (CM) สามารถลดจำนวนแบคทีเรียทั้งหมด ได้  $3.79 \pm 0.07$   $3.50 \pm 0.37$   $3.49 \pm 0.28$   $3.02 \pm 0.21$  และ  $3.22 \pm 0.30 \log \text{CFU/g}$  ตามลำดับ เมื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงจำนวนเชื้อแบคทีเรียทั้งหมด ตั้งแต่วันแรกจนถึงวันที่ 9 ของการเก็บรักษาพบว่า แคนตาลูปตัดแต่งที่ไม่ผ่านกระบวนการแช่ (un-treated) และ แคนตาลูปตัดแต่งที่แช่ด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ (water) มีการเพิ่มของจำนวนแบคทีเรียทั้งหมด ขึ้นเรื่อยๆตามอายุการเก็บรักษาที่นานขึ้น ในขณะที่การแช่ด้วยสารละลาย MKSE และ ppMARs มีประสิทธิภาพในการควบคุมจำนวนเชื้อแบคทีเรียทั้งหมดได้แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ โดยพบว่าการแช่ด้วย ppMARs นั้นสามารถ

ควบคุมการเพิ่มขึ้นของจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดได้ดีกว่า MKSE นอกจากนี้ยังพบว่าการใช้ สารละลาย ppMARs ร่วมกับกรดซิตริก (CM) ทำให้จำนวนแบคทีเรียทั้งหมดลดลงอย่างต่อเนื่อง โดยพบว่า สารละลาย ppMARs ร่วมกับกรดซิตริก (CM) สามารถควบคุมจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดได้เทียบเท่ากับ ppMARs แต่ปริมาณเนื้อสาร ppMARs ที่อยู่ในสารละลาย ppMARs ร่วมกับกรดซิตริก (CM) จะมีปริมาณน้อยกว่าสาร ppMARs 2 เท่า

เมื่อพิจารณาตามเกณฑ์คุณภาพทางจุลชีววิทยาของอาหารและภาชนะสัมผัสอาหาร (กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์, 2553) ซึ่งกำหนดให้ผัก ผลไม้สดตัดแต่ง ต้องตรวจพบแบคทีเรียทั้งหมดไม่เกิน 4 log CFU/g ซึ่งการใช้ ppMARs CA และ CM แห่แคนตาลูปตัดแต่งสามารถควบคุมแบคทีเรียทั้งหมดให้มีจำนวนไม่เกิน 4 log CFU/g ตลอดระยะเวลา 9 วันในการเก็บรักษา ในขณะที่การแห่แคนตาลูปด้วย MKSE ตรวจพบว่ามีจำนวนแบคทีเรียที่เกินมาตรฐาน ตั้งแต่วันที่ 5 ของการเก็บรักษา



**ภาพที่ 4.1** การเปลี่ยนแปลงจำนวนเชื้อแบคทีเรียทั้งหมด (TBC) ของแคนตาลูปที่ไม่ได้แช่ (un-treated); แคนตาลูปที่แช่น้ำกลั่นปลอดเชื้อ (water); แคนตาลูปที่แช่ด้วยกรดซิตริก (CA); แคนตาลูปแช่ในสารละลาย ppMARs; แคนตาลูปที่แช่ในสารละลาย MKSE และแคนตาลูปที่แช่ในสารละลาย ppMARs ร่วมกับกรดซิตริกความเข้มข้น (CM) ระหว่างเก็บรักษาที่อุณหภูมิ  $4 \pm 2$  องศาเซลเซียส เป็นเวลา 9 วัน

ผลการศึกษาประสิทธิภาพของการแช่ด้วยสารละลายที่นำมาทดสอบ 4 ชนิด เพื่อการควบคุมและลดจำนวนของ *E. coli* ดังแสดงในภาพที่ 4.2 โดยมีการเติมเชื้อ *E. coli* ให้มีจำนวนเชื้อเริ่มต้น

เป็น  $5.28 \pm 0.27 \log \text{CFU/g}$  ในวันแรกของการเก็บรักษา หลังจากนำแคนตาลูปตัดแต่งมาแช่ด้วยสารละลาย MKSE ppMARs CA และ CM เป็นเวลา 3 นาที พบว่าจำนวนแบคทีเรีย *E. coli* ลดลงอย่างมีนัยสำคัญเหลือ  $4.29 \pm 0.32$   $4.21 \pm 0.38$   $3.67 \pm 0.40$  และ  $3.93 \pm 0.22 \log \text{CFU/g}$  ตามลำดับ เมื่อพิจารณาตามระยะเวลาการเก็บรักษาที่มากขึ้น พบว่า แคนตาลูปตัดแต่งที่เดิมเดิมเชื้อ *E. coli* และไม่ผ่านการแช่ด้วยสารละลายใดๆ (un-treated) และแคนตาลูปที่แช่น้ำกลั่นปลอดเชื้อ (water) จะมีการเพิ่มของจำนวน *E. coli* ขึ้นเรื่อยๆตามอายุการเก็บรักษาที่นานขึ้น และการใช้สารละลาย MKSE ในการแช่นั้นสามารถควบคุมแบคทีเรีย *E. coli* ไม่ให้เพิ่มจำนวนดีกว่าการใช้น้ำกลั่นปลอดเชื้อ (water) แต่เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพระหว่างสารละลาย MKSE และ ppMARs ที่ใช้ในการแช่แคนตาลูปตัดแต่งนั้นพบว่ามีประสิทธิภาพของ ppMARs มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย *E. coli* ที่ดีกว่าเนื่องจากสามารถลดจำนวน *E. coli* ได้อย่างต่อเนื่อง

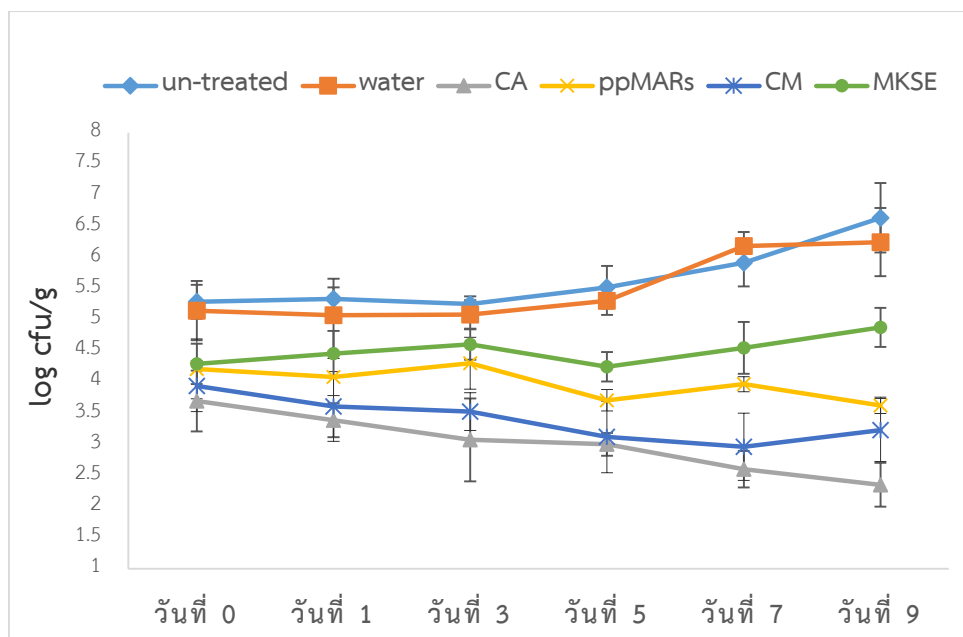
การศึกษาเพิ่มประสิทธิภาพเมื่อแช่ด้วยสารละลาย PPMARs ร่วมกับกรดซิตริก (CM) พบว่าขึ้นแคนตาลูปที่แช่ด้วยสารละลาย PPMARs ร่วมกับกรดซิตริก (CM) สามารถลดจำนวน *E. coli* ได้ดีเช่นเดียวกับการแช่แคนตาลูปด้วยกรดซิตริกเพียงอย่างเดียว (CA) เนื่องจากสารประกอบฟีนอลิกที่พบใน ppMARs เป็นกลุ่มฟลาโวนอยด์ และ condensed tannins ซึ่งพบว่าถ้าอยู่ในสารละลายสภาวะกรด จะทำให้ฤทธิ์ในการต้านแบคทีเรียดีขึ้น จากตารางที่ 4.15 พบว่า CM มีพีเอช (pH) ต่ำกว่า MKSE และ ppMARs โดยกลไกในการทำละลายแบคทีเรียของสารประกอบฟีนอลิกคือการทำลายเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรีย การใช้ร่วมกับกรดซิตริกซึ่งเป็นกรดอินทรีย์สามารถทำลายเชื้อแบคทีเรียได้โดยส่วนที่ไม่แตกตัวในกรดอ่อนแพร่ผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรีย แล้วเกิดการแตกตัวเป็นไฮโดรเจนไอออน (hydrogen ion) จำนวนมาก ทำให้ค่า pH ภายในเซลล์ต่ำ ไฮโดรเจนไอออนที่เกิดขึ้นนั้นจะรบกวนเมแทบอลิซึมต่างๆ ภายในเซลล์แบคทีเรีย เช่น เกิดการยับยั้งเอนไซม์ เป็นต้น ทำให้แบคทีเรียตายในที่สุด (บุษกร ทองใบ, 2557)

**ตารางที่ 4.15** ค่าพีเอช (pH) ของสารละลาย MKSE; สารละลาย ppMARs; กรดซิตริก (CA) และสารละลาย ppMARs ร่วมกับกรดซิตริก (CM)

สารที่แช่แคนตาลูปตัดแต่ง	MKSE	ppMARs	CA	CM
พีเอช (pH)	$4.24^a \pm 0.04$	$3.85^b \pm 0.07$	$2.40^d \pm 0.04$	$3.19^c \pm 0.03$

หมายเหตุ a,b,c,... หมายถึง ค่าเฉลี่ยข้อมูลในแนวนอนแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ ) เมื่อเปรียบเทียบโดย DMRT

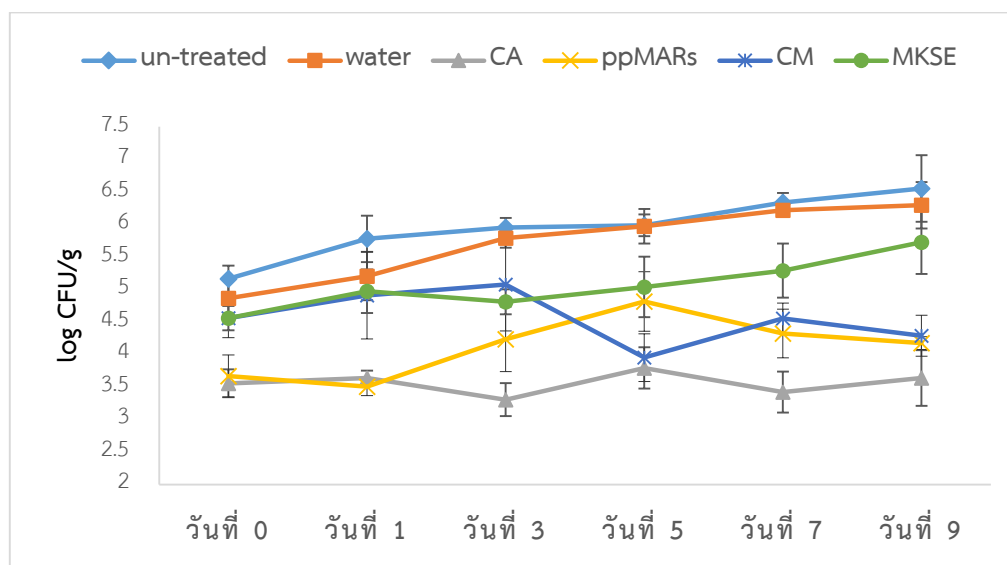




ภาพที่ 4.2 การเปลี่ยนแปลงจำนวนเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* ในแคนตาลูปตัดแต่งของแคนตาลูปที่ไม่ได้แช่ (un-treated); แคนตาลูปที่แช่น้ำกลั่น (water); แคนตาลูปที่แช่ด้วยกรดซิตริก (CA); แคนตาลูปแช่ในสารละลาย ppMARs; แคนตาลูปที่แช่ในสารละลาย MKSE และแคนตาลูปที่แช่ในสารละลาย ppMARs ร่วมกับกรดซิตริกความเข้มข้น (CM) ระหว่างเก็บรักษาที่อุณหภูมิ  $4 \pm 2$  องศาเซลเซียส เป็นเวลา 9 วัน

การเปลี่ยนแปลงจำนวนเชื้อแบคทีเรีย *S. Typhimurium* ในแคนตาลูปตัดแต่งระหว่างเก็บรักษาที่อุณหภูมิ  $4 \pm 2$  องศาเซลเซียส เป็นเวลา 9 วัน โดยในวันแรก แคนตาลูปตัดแต่งมีแบคทีเรีย *S. Typhimurium* เริ่มต้นเป็น  $5.16 \pm 0.20$  log CFU/g หลังจากนั้นนำแคนตาลูปตัดแต่งที่แช่ด้วยสารละลายที่ใช้ทดสอบ 4 ชนิด เป็นเวลา 3 นาที (ภาพที่ 4.3) พบว่าในวันแรกของการเก็บรักษามีการลดลงของแบคทีเรียอย่างมีนัยสำคัญ หลังแช่ด้วยสารละลาย MKSE และ ppMARs พบว่าการลดลงของ *S. Typhimurium* ในตัวอย่างที่ผ่านการแช่ด้วยสารละลายทั้งสองไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ อย่างไรก็ตามเมื่อพิจารณาตามระยะเวลาการเก็บรักษา พบว่าแคนตาลูปที่แช่ด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ (water) สารละลาย MKSE สารละลาย ppMARs มีแบคทีเรีย *S. Typhimurium* เพิ่มจำนวนขึ้น แต่เมื่อพิจารณาระหว่างสารละลาย MKSE และ ppMARs พบว่า ปริมาณสารที่ใช้ใน ค่า 1 MBC นั้นแตกต่างกัน โดยสารละลาย ppMARs ใช้ปริมาณเนื้อสารในสารละลายลดลงถึง 4 เท่าของ MKSE ในขณะที่ CA สามารถควบคุมจำนวนของแบคทีเรีย *S. Typhimurium* ไม่ให้มีการเพิ่มจำนวน แต่เมื่อพิจารณาการใช้ร่วมกันของ ppMARs และ CA (CM) พบว่ามีประสิทธิภาพดีกว่าการใช้สารละลาย

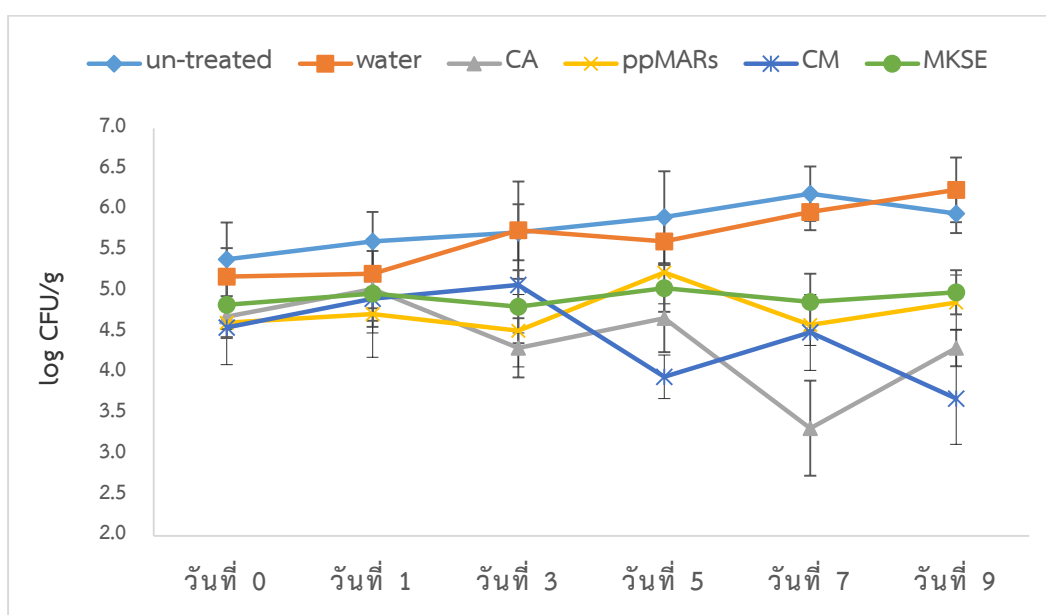
ppMARs และ CA เพียงอย่างเดียว การใช้สารละลาย CM ในการแช่แคนตาลูปตัดแต่งสามารถลดจำนวน *S. Typhimurium* ได้อย่างต่อเนื่อง



**ภาพที่ 4.3** การเปลี่ยนแปลงจำนวนเชื้อแบคทีเรีย *S. Typhimurium* ของแคนตาลูปที่ไม่ได้แช่ (un-treated); แคนตาลูปที่แช่น้ำกลั่นปลอดเชื้อ (water); แคนตาลูปที่แช่ด้วยกรดซิตริก (CA); แคนตาลูปแช่ในสารละลาย ppMARs ; แคนตาลูปที่แช่ในสารละลาย MKSE และแคนตาลูปที่แช่ในสารละลาย ppMARs ร่วมกับกรดซิตริกความเข้มข้น (CM) ระหว่างเก็บรักษาที่อุณหภูมิ  $4 \pm 2$  องศาเซลเซียส เป็นเวลา 9 วัน

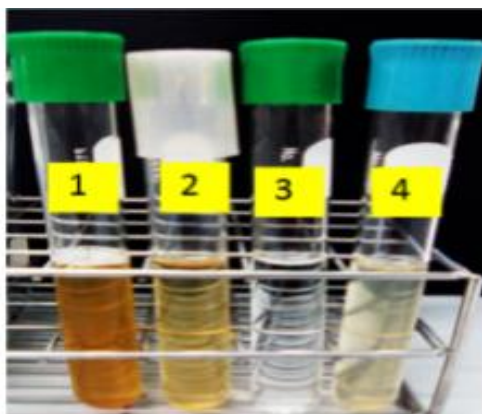
ผลการศึกษาประสิทธิภาพของแช่ด้วยสารละลายทั้ง 4 ชนิด เพื่อการลดและควบคุมแบคทีเรียเชื้อ *S. aureus* (แบคทีเรียแกรมบวก) ดังแสดงในภาพที่ 4.4 โดยแคนตาลูปตัดแต่งและเติมเชื้อมีแบคทีเรีย *S. aureus* (un-treated) จะมีจำนวน *S. aureus* เริ่มต้น  $5.39 \pm 0.45$  log CFU/g เมื่อนำแคนตาลูปตัดแต่งมาแช่ด้วยสารละลาย MKSE ppMARs CA และ CM เป็นเวลา 3 นาที พบว่าจำนวนแบคทีเรีย *S. aureus* ลดลงเหลือ  $4.83 \pm 0.40$   $4.61 \pm 0.51$   $4.68 \pm 0.15$  และ  $4.55 \pm 0.11$  log CFU/g ตามลำดับ เมื่อพิจารณาตามระยะเวลาการเก็บรักษาที่นานขึ้น พบว่าการแช่ด้วยสารละลาย MKSE และ ppMARs มีประสิทธิภาพในการควบคุมแบคทีเรีย *S. aureus* ไม่ให้เพิ่มจำนวนได้ แต่จากผลการทดลองดังภาพที่ 4.3 พบว่าประสิทธิภาพของ ppMARs ลดจำนวนแบคทีเรีย *E. coli* ได้อย่างต่อเนื่อง และยับยั้งแบคทีเรียกลุ่มดังกล่าวได้ดีกว่า MKSE การสารละลาย ppMARs สามารถยับยั้ง *E. coli* ได้ดีกว่า *S. aureus* นั้นพบว่าผลที่ได้สอดคล้องกับงานวิจัยของ Parimala และ Shoba (2014) ที่นำสารสกัดเมล็ด *Nymphaea nouchali* Burm ซึ่งมีองค์ประกอบหลักเป็น คาเทชิน สามารถต้านแบคทีเรีย *E. coli* ได้ดีกว่า *S. aureus* เพราะมีโครงสร้างพื้นที่ผิวของเซลล์แบคทีเรีย

ที่ขาดแคลน O แอนติเจน (antigen) และพอลิแซ็กคาไรด์ที่เป็นโครงสร้างหลัก ทำให้เพิ่มความไวต่อปฏิกิริยา (sensitivity) ของคาเทซินมากขึ้น จึงสามารถยับยั้งแบคทีเรียได้ดีกว่าแกรมบวก (sensitivity) (Yoshii และคณะ, 2013) อย่างไรก็ตามเมื่อพิจารณาการแช่ด้วยสารละลาย CA และ CM สามารถลดจำนวนแบคทีเรีย *S. aureus* ได้อย่างต่อเนื่อง การแช่แคนตาลูปตัดแต่งด้วยสารละลาย CM จึงเป็นการเพิ่มประสิทธิภาพของสารละลาย ppMARs เพื่อการลดจำนวนแบคทีเรียอย่างต่อเนื่องในการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 9 วัน



**ภาพที่ 4.4** การเปลี่ยนแปลงจำนวนเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* ของแคนตาลูปที่ไม่ได้แช่ (un-treated); แคนตาลูปที่แช่น้ำกลั่นปลอดเชื้อ (water); แคนตาลูปที่แช่ด้วยกรดซิตริก (CA); แคนตาลูปแช่ในสารละลาย ppMARs; แคนตาลูปที่แช่ในสารละลาย MKSE และแคนตาลูปที่แช่ในสารละลาย

การใช้ MKSE แช่แคนตาลูปตัดแต่ง ส่งผลต่อลักษณะปรากฏของแคนตาลูปตัดแต่ง เนื่องจากสีของสารละลายดังภาพที่ 4.5 ที่ใช้ในการแช่อาจส่งผลต่อการเปลี่ยนค่าสีของแคนตาลูป มีผลต่อการยอมรับของผู้บริโภค ลักษณะของสารละลายมีสีตั้งแต่สีส้มอ่อนจนถึงสีน้ำตาลเข้ม โดยสารละลาย MKSE มีสีน้ำตาลเข้ม สารละลาย ppMARs มีสีน้ำตาลอ่อนอมส้ม กรดซิตริก CA ไม่มีสี ในขณะที่สารละลาย ppMARs ร่วมกับกรดซิตริก (CM) มีสีน้ำตาลอ่อน



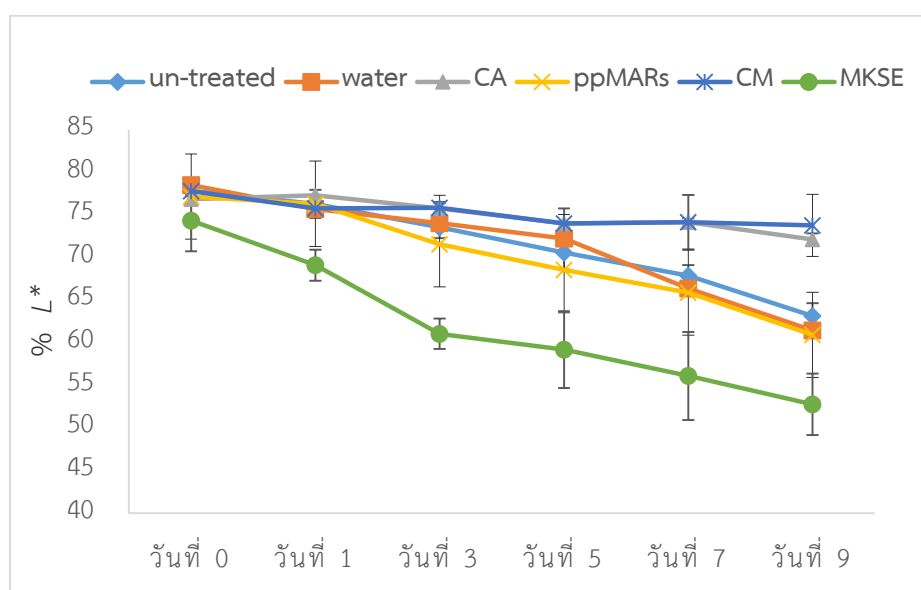
ภาพที่ 4.5 สีของสารสกัดและกรดซิตริก ที่ความเข้มข้น 1 MBC ได้แก่ (1) สารละลาย MKSE; (2) สารละลาย ppMARs ; (3) กรดซิตริก (CA); และ (4) สารละลาย ppMARs (0.5 MBC) ร่วมกับ กรดซิตริก (0.5 MBC) (CM)

การศึกษาการแช่ด้วยสารละลายที่นำมาทดสอบ 4 ชนิด ต่อการเปลี่ยนแปลงของค่าพารามิเตอร์ที่เกี่ยวข้องกับสีของชิ้นแคนตาลูปตัดแต่ง พบว่าชิ้นแคนตาลูปที่ผ่านการแช่ด้วยสารละลายต่างๆมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของสีของแคนตาลูปอย่างมีนัยสำคัญ ดังภาพที่ 4.6 เมื่อพิจารณาค่า  $L^*$  ของชิ้นแคนตาลูปที่แช่ด้วยสารละลาย MKSE และ ppMARs พบว่ามีค่าลดลงตลอดอายุการเก็บรักษาซึ่งแสดงว่าชิ้นแคนตาลูปตัดแต่งมีสีคล้ำขึ้น โดยการแช่ด้วยสารละลาย MKSE ทำให้ชิ้นแคนตาลูปมีค่า  $L^*$  ต่ำที่สุด แสดงว่า MKSE ทำให้ชิ้นแคนตาลูปตัดแต่งมีสีคล้ำขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับแคนตาลูปที่ไม่ได้แช่ เมื่อพิจารณาค่า  $a^*$  ของชิ้นแคนตาลูปที่แช่สารละลาย 4 ชนิด จากภาพที่ 4.7 พบว่าชิ้นแคนตาลูปมีค่า  $a^*$  เพิ่มขึ้นในระหว่างการเก็บรักษา 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 9 วัน โดยผลการทดลองนี้พบว่า ค่า  $L^*$  ที่ลดลง และค่า  $a^*$  ที่เพิ่มขึ้นของผลไม้ตัดแต่งบ่งชี้ถึงการเกิดสีน้ำตาล (Browning) (Qi และคณะ, 2011) นอกจากนี้การรายงานของ Altunkaya และ GÖKmen (2012) ได้ศึกษาการเกิดสีน้ำตาลของผักกาดหอมด้วยการล้างด้วยสารสกัดเมล็ดองุ่น พบว่า ผักกาดหอมมีค่า  $L^*$  ลดต่ำลงอย่างต่อเนื่องตามระยะเวลาการเก็บรักษาที่นานขึ้น กล่าวคือองค์ประกอบของสารประกอบโพลีฟีนอลที่มีอยู่ในเมล็ดองุ่นมีผลต่อลักษณะปรากฏของผักกาดหอม โดยมีสีน้ำตาลได้เร็วกว่าผักกาดหอมที่ล้างด้วยน้ำกลั่น นอกจากนี้ค่าพารามิเตอร์อื่นๆที่เกี่ยวข้องกับการเกิดสีน้ำตาลคือ ค่า  $a^*$  ที่เพิ่มขึ้น การเติมสารสกัดเมล็ดองุ่นมีการเพิ่มของค่า CIE  $a^*$  ของผักกาดหอมตัดแต่งซึ่งแสดงว่ามีการเปลี่ยนจากสีเขียวเป็นสีแดง

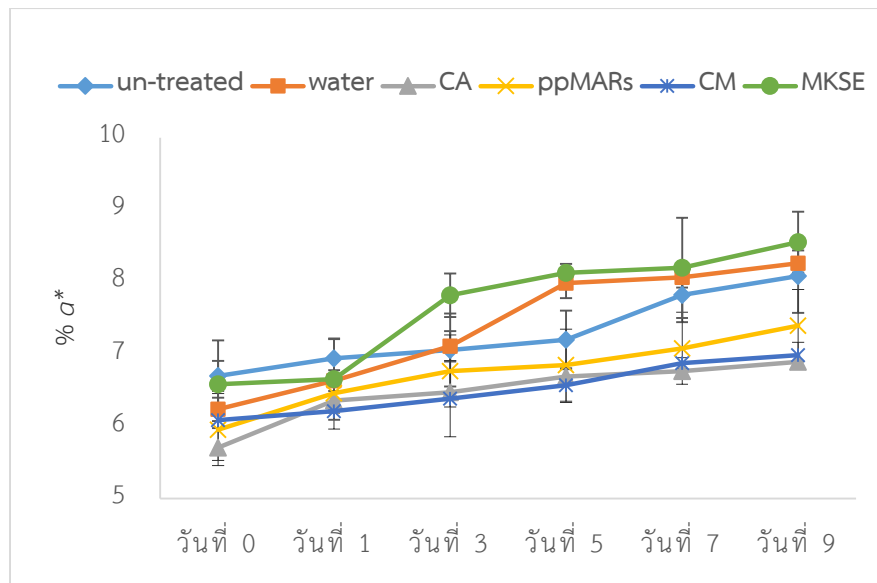
ส่วนชิ้นแคนตาลูปที่แช่ด้วยสารละลาย CA และ CM พบว่ามีสีที่ดีกว่าการใช้สารละลาย ppMARs โดยสามารถควบคุมการลดลงของค่าสี  $L^*$  และควบคุมการเพิ่มขึ้นของค่า  $a^*$  ของชิ้น

แคนตาลูปตัดแต่งดีกว่าการแช่ด้วยสารละลายอื่น จากการรายงานของ Shahi และคณะ (2015) ได้ศึกษาการแช่สตรอเบอร์รี่ด้วยสารสกัดหยาดจากน้ำมะนาวอันซึ่งมีกรดซิตริกเป็นองค์ประกอบหลักเป็นเวลา 5 นาที พบว่าการแช่ด้วยสารละลายดังกล่าวสามารถควบคุมการลดลงค่าสี  $L^*$  และการเพิ่มขึ้นของค่า  $a^*$

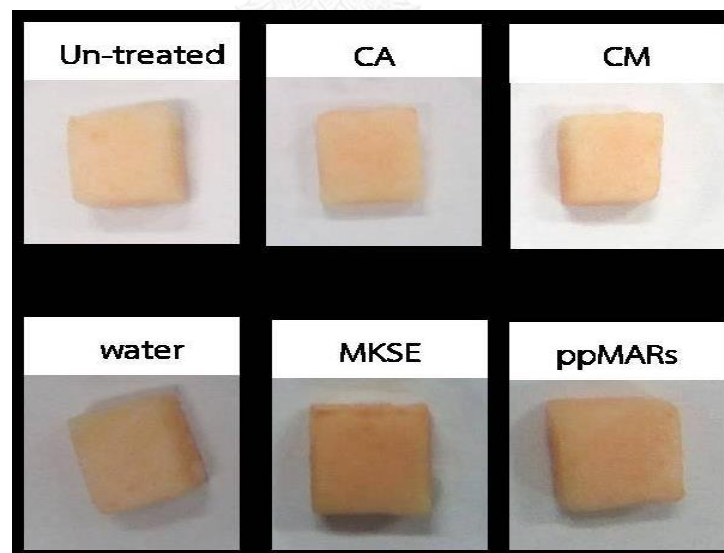
นอกจากนี้การใช้ CM ในการแช่แคนตาลูปตัดแต่ง พบว่าทำให้แคนตาลูปตัดแต่งมีลักษณะปรากฏดีกว่าสารละลาย ppMARs และ MKSE ดังภาพที่ 4.8



ภาพที่ 4.6 การเปลี่ยนแปลงของค่าสีของค่า  $L^*$  ของแคนตาลูปที่ไม่ได้แช่ (un-treated); แคนตาลูปที่แช่น้ำกลั่นปลอดเชื้อ (water); แคนตาลูปที่แช่ด้วยกรดซิตริก (CA); แคนตาลูปแช่ในสารละลาย ppMARs; แคนตาลูปที่แช่ในสารละลาย MKSE และแคนตาลูปที่แช่ในสารละลาย ppMARs ร่วมกับกรดซิตริกความเข้มข้น (CM) ระหว่างเก็บรักษาที่อุณหภูมิ  $4 \pm 2$  องศาเซลเซียส เป็นเวลา 9 วัน



ภาพที่ 4.7 การเปลี่ยนแปลงของค่าสีของค่า  $d^*$  ของ แคนตาลูปที่ไม่ได้แช่ (un-treated); แคนตาลูปที่แช่น้ำกลั่นปลอดเชื้อ (water); แคนตาลูปที่แช่ด้วยกรดซิตริก (CA); แคนตาลูปแช่ในสารละลาย ppMARs; แคนตาลูปที่แช่ในสารละลาย MKSE และ แคนตาลูปที่แช่ในสารละลาย ppMARs ร่วมกับกรดซิตริกความเข้มข้น (CM) ระหว่างเก็บรักษาที่อุณหภูมิ  $4 \pm 2$  องศาเซลเซียส เป็นเวลา 9 วัน



ภาพที่ 4.8 ลักษณะปรากฏของแคนตาลูปที่ไม่ได้แช่ (un-treated); แคนตาลูปที่แช่น้ำกลั่นปลอดเชื้อ (water); แคนตาลูปที่แช่ด้วยกรดซิตริก (CA); แคนตาลูปแช่ในสารละลาย ppMARs ; แคนตาลูปที่แช่ในสารละลาย MKSE และ แคนตาลูปที่แช่ในสารละลาย ppMARs ร่วมกับกรดซิตริกความเข้มข้น (CM) ระหว่างเก็บรักษาที่อุณหภูมิ  $4 \pm 2$  องศาเซลเซียส เป็นเวลา 9 วัน

## บทที่ 5

### สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

#### 5.1 สรุปผลการทดลอง

การใช้สารดูดซับเพื่อการเพิ่มประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบเมล็ดมะเกี๋ยง (MKSE) ในด้านแบคทีเรีย พบว่าสารดูดซับส่งผลต่อสัดส่วนของสารประกอบฟีนอลิก การใช้สารดูดซับเรซินรูพรุนขนาดใหญ่ (MARs) การใช้สารดูดซับ MARs สามารถเพิ่มอัตราส่วนของสารประกอบฟีนอลิกและมีปริมาณของสารสกัดที่ทำให้บริสุทธิ์บางส่วนได้สูงที่สุด โดยสามารถดูดซับรูทิน และคาเทชินใน MKSE ได้ดีอีกด้วย สัดส่วนของ MARs ในการดูดซับสารประกอบฟีนอลิกคือ 37.5 mg ในสารละลาย MKSE 40 ml ที่ความเข้มข้น 12.5 mg/ml สามารถดูดซับสารประกอบฟีนอลิกได้สูงสุด และความเข้มข้นเอทานอลร้อยละ 70 สามารถปลดปล่อยสารได้ดีและมีสารประกอบฟีนอลิกมาก เมื่อนำมาศึกษาประสิทธิภาพการด้านแบคทีเรียของพบว่าสารที่ทำให้บริสุทธิ์บางส่วนด้วย MARs (ppMARs) ที่ใช้ความเข้มข้นเอทานอลร้อยละ 70 สามารถเพิ่มประสิทธิภาพการยับยั้งได้ 8 เท่าของ MKSE จึงได้นำสถานะดังกล่าวมาใช้ในผลิตสาร ppMARs เพื่อใช้ควบคุมจำนวนแบคทีเรียก่อโรครดดังกล่าวในแคนตาลูปตัดแต่ง และศึกษาเวลาในการแช่แคนตาลูปด้วยสารละลาย ppMARs ที่เหมาะสม พบว่าการแช่ด้วยสารละลาย ppMARs ที่ความเข้มข้น 1 MBC เป็นเวลา 3 นาที ทำให้ปริมาณของแบคทีเรีย *S. Typhimurium* และ *S. aureus* ลดลงต่ำที่สุด ซึ่งการแช่ด้วยสารละลาย ppMARs ทำให้เกิดการเปลี่ยนสีของชิ้นแคนตาลูป จึงได้นำสารละลาย ppMARs ไปใช้ร่วมกับกรดซิตริก (CM) โดยสามารถเพิ่มประสิทธิภาพของสารละลาย ppMARs ด้านการควบคุมจำนวนแบคทีเรียทั้งหมด และ *S. Typhimurium* นอกจากนี้สามารถลดจำนวนของ *E. coli* และ *S. aureus* ได้อย่างต่อเนื่อง ช่วยรักษาค่าสีของแคนตาลูปได้ดีกว่า MKSE และ ppMARs เมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 9 วัน

#### 5.2 ข้อเสนอแนะ

จากข้อมูลงานวิจัยด้านการทำให้สารสกัดหยาบจากเมล็ดมะเกี๋ยงบริสุทธิ์บางส่วนด้วย MARs พบว่า ควรจะศึกษาฟิล์มจากสารสกัดที่ผ่านสารสกัดที่ทำให้บริสุทธิ์บางส่วนด้วย MARs ร่วมกับโปรตีนไอโซเลต เนื่องจากสารประกอบฟีนอลิกหลายชนิดมีความสามารถในการเกิดปฏิกิริยากับโปรตีนและทำให้เกิดการเชื่อมข้ามของโปรตีนได้ เพื่อนำไปใช้เป็นฟิล์มย่อยสลายได้ทางชีวภาพ (bio-degradable film) ในผลิตภัณฑ์อาหาร

## รายการอ้างอิง

- Aehle, E., Grandic, S. R. L., Ralainirina, R., Baltora-Rosset, S., Mesnard, F., Prouillet, C., Mazie`re, J. C., and Fliniaux, M. A. (2004). Development and evaluation of an enriched natural antioxidant preparation obtained from aqueous spinach (*Spinacia oleracea*) extracts by an adsorption procedure. *Food Chemistry* **86**, 579–585.
- Akiyama, H., Fujii, K., Iwatsuki, K., Oono, T., and Yamasaki, O. (2011). Antimicrobial action of several tannin against *Staphylococcus aureus*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **48**, 487-491.
- Al-Farsi, M. A., and Lee, C. Y. (2008). Optimization of phenolics and dietary fibre extraction from date seeds. *Food Chemistry* **108**, 977-85.
- Altunkaya, A., and GÖKmen, V. (2012). Effect of Grape Seed Extract on Phenolic Profile and Browning of Fresh-Cut Lettuce (*L. Sativa*). *Journal of Food Biochemistry* **36**, 268-274.
- AOAC Research Institute (2013). "Certificate of performance testedSM status. Certificate no. 110402," AOAC International.
- Arima, H., Ashida, H., and Danno, G. (2002). Rutin-enhanced antibacterial activities of flavonoids against *Bacillus cereus* and *Salmonella enteritidis*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* **66**, 1009-1014.
- Arslanoğlu, F. N., Kar, F., and Arslan, N. (2005). Adsorption of Dark Coloured Compounds from Peach Pulp by Using Granular Activated Carbon. *Journal of Food Engineering* **68**, 409–417.
- Balasundram, N., Sundram, K., and Samman, S. (2006). Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chemistry* **99**, 191-203.
- Barbosa-Pereira, L., Angulo, I., Paseiro-Losada, P., and Cruz, J. M. (2013). Phenolic profile and antioxidant properties of a crude extract obtained from a brewery waste stream. *Food Research International* **51**, 663–669.



- Bhagwat, A. A. (2006). Microbiological safety of fresh-cut produce: where are we now? In: Matthews, K.R. (Ed.), *Microbiology of Fresh Produce*. ASM Press, Washington, DC, 121–165.
- Borges, F. C., Saavedra M.J., and Simões M. (2013). Antibacterial activity and mode of action of ferulic and gallic acids against pathogenic bacteria. *Microbial Drug Resistance Journal* **19**, 256-265.
- Bravo, L. (1998). Polyphenols: Chemistry, Dietary Sources, Metabolism, and Nutritional Significance. *Nutrition Reviews* **56**, 317-333.
- Brown, L., Casadevall, A., Rosales, R. P., and Wolf, J. M. (2015). Through the wall: extracellular vesicles in gram-positive bacteria, mycobacteria and fungi. *Nature Reviews Microbiology* **13**, 620–630.
- Cairo, R. P., James, T., Coyle, J. J., Davis, H. M., Neukrug, I. H., and Suffet, A. W. (1982). Evaluating regenerated activated carbon through laboratory and pilot-column studies. *Journal of American Water Works Association* **74**, 94-102.
- Caqueret, V., Bostyn, S., Cagnon, B., and Fauduet, H. (2008). Purification of sugar beet vinasse - adsorption of polyphenolic and dark colored compounds on different commercial activated carbons. *Bioresource Technology* **99**, 5814-5821.
- Castañeda-Ovando, A., de Lourdes Pacheco-Hernández, M. E., Páez-Hernández, J. A., RodríguezGalán-Vidal, J. A., and Galán-Vidal, C. A. (2009). Chemical studies of anthocyanins: A review. *Food Chemistry* **113**, 859–871.
- CDC (2009). Investigation update : outbreak of *Salmonella* Typhimurium infections, 2008–2009. [online]. Available from: <http://www.cdc.gov/print.do?url=http3A//www.cdc.gov/salmonella/typhimurium> [16 January 2016].
- CDC (2014). List of selected multistate foodborne outbreak investigations. [online]. Available from: <http://www.food.gov.uk/news/newsarchive/2007/apr/morrisalad> [24 May 2015].
- Chan, E. W. C., Yau, Y. L., and Tan, S. P. (2011). Standardised herbal extract of chlorogenic acid from leaves of *Etilingera elatior* (Zingiberaceae). *Pharmacognosy Research* **3**, 178-184.

- Chandrasekaran, M., and Venkatesalu, V. (2004). Antibacterial and antifungal activity of *Syzygium jambolanum* seeds. *Journal of Ethnopharmacology* **91**, 105-108.
- Chang, C., Chern, J., Wen, H., and Yang, M. (2002). Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. *Journal of Food and Drug Analysis* **10**, 178-182.
- Chen, C., Hu, W., He, Y., Jiang, A., and Zhang, R. (2016). Effect of citric acid combined with UV-C on the quality of fresh-cut apples. *Postharvest Biology and Technology* **111**, 126-131.
- CLSI (2006). "Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; approved standard—seven edition," Clinical and Laboratory Standards Institute USA.
- Cochran, W. G., and Cox, G. M. (1992). *Experimental Designs*, 2nd Edition. John Wiley and sons, New York.
- Couteau, D., and Mathaly, P. (1997). Purification of ferulic acid by adsorption after enzymic release from a sugar-beet pulp extract. *Industrial Crops and Products* **6**, 237-252.
- Cushnie, T. P. T., and Lamb, A. J. (2005). Antimicrobial activity of flavonoids. *International Journal of Antimicrobial Agents* **26**, 343-356.
- Dai, J., and Mumper, R. J. (2010). Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules* **15**, 7313-7352.
- Doner, L. W., Becard, G., Irwin, P. L., and (1993). Binding of flavonoids by polyvinylpolypyrrolidone. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **41**, 753-757.
- Dong, Y., Zhao, M., Sun-Waterhouse, D., Zhuang, M., Chen, H., Feng, M., and Lin, L. (2015). Absorption and desorption behaviour of the flavonoids from *Glycyrrhiza glabra* L. leaf on macroporous adsorption resins. *Food Chemistry* **168**, 538-45.
- Dukić, N. M., Mandić, A. I., Milovanović, I. L., Mišana, A. Č., Marijana, B. S., and Sedej, I. J. (2011). Development of a rapid resolution HPLC method for the separation and determination of 17 phenolic compounds in crude plant extracts. *Central European Journal of Chemistry* **9**, 133-142.

- Dung, N. T., Kim, J. M., and Kang, S. C. (2008). Chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of the essential oil and the ethanol extract of *Cleistocalyx operculatus* (Roxb.) Merr and Perry buds. *Food and Chemical Toxicology* **46**, 3632-3639.
- Ena, A., Pintucci, C., and Carlozzi, P. (2012). The recovery of polyphenols from olive mill waste using two adsorbing vegetable matrices. *Journal of Biotechnology* **157**, 573-577.
- Ergun, B. C., Coban, T., Onurdag, F. K., and Banoglu, E. (2011). Synthesis, antioxidant and antimicrobial evaluation of simple aromatic esters of ferulic acid. *Pharmaceutical Research* **34**, 1251-1261.
- FSA (2007). Food Standards Agency Morrisons recalls leaf lettuce. [online]. Available from: <http://www.food.gov.uk/news/newsarchive/2007/apr/morrisalad>. [22 August 2015].
- Fu, B., Liu, J., Li, H., Li, L., Lee, F. S. C., and Wang, X. (2005). The application of macroporous resins in the separation of licorice flavonoids and glycyrrhizic acid. *Journal of Chromatography A* **1089**, 18-24.
- Galhiane, M. S., Rissato, S. R., Chierice, G. O., Almeida, M. V., and Silva, L. C. (2006). Influence of different extraction methods on the yield and linalool content of the extracts of *Eugenia uniflora* L. *Talanta* **70**, 286-292.
- George, S., Brat, P., Alter, P., and Amiot, M. J. (2005). Rapid determination of polyphenols and vitamin C in plant-derived products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **53**, 1370-1373.
- Hagerman, A. E. (2002). Tannin Handbook; Miami University: Oxford, Ohio, USA.
- Haider, S., Li, Z., Lin, H., and Jamil, K. (2009). Optimization of preparative separation and purification of total polyphenols from *Sargassum tenerrimum* by column chromatography. *Journal of Ocean University of China* **8**, 425-430.
- Hajoori, M., Naik, M., Naik, K., and Butani, N. (2013). Evaluation of antimicrobial activity of *Eugenia jambolana* seed extract against human pathogen. *International Journal of Pharmaceutical Chemical and Biological Sciences and Research* **3**, 935-939.

- Hayouni, E. A., Abedrabba, M., Bouix, M., and Hamdi, M. (2007). The effects of solvents and extraction method on the phenolic contents and biological activities in vitro of *Tunisian Quercus coccifera* L. and *Juniperus phoenicea* L. fruit extracts. *Food Chemistry* **105**, 1126–1134.
- He, Z., and Xia, W. (2008). Preparative separation and purification of phenolic compounds from *Canarium album* L. by macroporous resins. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **88**, 493-498.
- Himanshu, D., Karishma, R., and Usha, M. (2015). Polyphenols: methods of extraction. *Scientific Review and Chemical Communication* **5**, 1-6.
- Hollman, P. C. H., and Katan, M. B. (1999). Dietary flavonoids: Intake, health effects and bioavailability. *Food and Chemical Toxicology* **37**, 937-942.
- Ignat, I., Volf, I., and Popa, V. I. (2011). A critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. *Food Chemistry* **126**, 1821-1835.
- Inboot, W., Taya, S., Chailungka, A., Meepowpan, P., and Wongpoomchai, R. (2012). Genotoxicity and antigenotoxicity of the methanol extract of *Cleistocalyx nervosum* var. *paniala* seed using a *Salmonella* mutation assay and rat liver micronucleus tests. *Molecular & Cellular Toxicology* **8**, 19-24.
- Ince, A. E., Sahin, S., and Sumnu, G. (2014). Comparison of microwave and ultrasound-assisted extraction techniques for leaching of phenolic compounds from nettle. *The Journal of Food Science and Technology* **51**, 2776–2782.
- Jankowiak, L., van Avermaete, I., Boom, R., and van der Goot, A. J. (2015). Adsorption of isoflavones onto PVPP in the presence of a soy matrix. *Separation and Purification Technology* **149**, 479-487.
- Jeffery, D. W., Mercurio, M. D., Herderich, M. J., Hayasaka, Y., and Smith, P. A. (2008). Rapid isolation of red wine polymeric polyphenols by solid-phase extraction. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **56**, 2571-2580.
- Jian, H., Yue, R. L., Hue, L. L., Ying, Y. D., Qian, Y., and chen, l. (2007). Preparation of partially decaffeinated instant green tea. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **55**, 3498-3452.

- John, P., and Chantaranothai, P. (2002). *Mytaceaes*. In Santisuk, T and Larsen, K., (eds.). Flora of Thai of Thailand. Prachachon Co.Ltd. Bangkok, Thailand.
- Juang, R., and Shiau, J. (1999). Adsorption isotherms of phenols from water onto macroreticular resins. *Journal of Hazardous Materials* **70**, 171-183.
- Kabir, F., Tanji, N., Katayama, S., and Nakamura, S. (2014). Antimicrobial effects of chlorogenic acid and related compounds. *Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry* **57**, 359–365.
- Kammerer, D. R., Saleh, Z. S., Carle, R., and Stanley, R. A. (2006). Adsorptive recovery of phenolic compounds from apple juice. *European Food Research and Technology* **224**, 605-613.
- Kołodziejczyk, K., Sójka, M., Abadias, M., Viñas, I., Guyot, S., and Baron, A. (2013). Polyphenol composition, antioxidant capacity, and antimicrobial activity of the extracts obtained from industrial sour cherry pomace. *Industrial Crops and Products* **51**, 279-288.
- Kornacki, J. L. (2010). "Principles of microbiological troubleshooting in the industrial food processing environment" Springer, New York.
- Laborde, B., Moine-Ledoux, V., Richard, T., Saucier, C., Dubourdieu, D., and Monti, J. p. (2006). PVPP–polyphenol complexes: a molecular approach. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **54**, 4383–4389.
- Laflly, S., and Gil-Izquierdo, A. (2008). Bioavailability of phenolic acids. *Phytochemistry Review*. **7**, 301-311.
- Liazid, A., Palma, M., Brigui, J., and Barroso, C. G. (2007). Investigation on phenolic compounds stability during microwave-assisted extraction. *Journal of Chromatography A* **1140**, 29-34.
- Lin, L., Zhao, H., Dong, Y., Yang, B., and Zhao, M. (2012). Macroporous resin purification behavior of phenolics and rosmarinic acid from *Rabdosia serra* (MAXIM.) HARA leaf. *Food Chemistry* **130**, 417-424.
- Lin, S., Lai, T. C., Chen, L., Kwok, H. F., Lau, C. B., and Cheung, P. C. K. (2014). Antioxidant and antiangiogenic properties of phenolic extract from *Pleurotus tuber-regium*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **62**, 9488-9498.

- Liu, C., Jiao, R., Yao, L., Zhang, Y., Lu, Y., and Tan, R. (2016). Adsorption characteristics and preparative separation of chaetominine from *Aspergillus fumigatus* mycelia by macroporous resin. *Journal of Chromatography B* **1015**, 135-141.
- Liu, Q., Cai, W., and Shao, X. (2008). Determination of seven polyphenols in water by high performance liquid chromatography combined with preconcentration. *Talanta* **77**, 679–683.
- Lu, C., Wang, H., Lv, W., Ma, C., Lou, Z., Xie, J., and Liu, B. (2012). Ionic liquid-based ultrasonic/microwave-assisted extraction combined with UPLC–MS–MS for the determination of tannins in *Galla chinensis*. *Natural Product Research* **26**, 1842–1847.
- Magalhaes, P. J., Vieira, J. S., Goncalves, L. M., Pacheco, J. G., Guido, L. F., and Barros, A. A. (2010). Isolation of phenolic compounds from hop extracts using polyvinylpyrrolidone: characterization by high-performance liquid chromatography-diode array detection-electrospray tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* **1217**, 3258-3268.
- Maisuthisakul, P. (2012). "Phenolic constituents and antioxidant properties of some Thai plants,". In Venketeshwer Rao (ed.), *Phytochemicals - A Global Perspective of Their Role in Nutrition and Health*. University of the Thai Chamber of Commerce, Intech:Thailand. 187-212.
- Merken, H. M., and Beecher, G. R. (2000). Measurement of food flavonoids by highperformance liquid chromatography : A review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **48**, 577-599.
- Mingjiang, G., Mingxin R., Zhenling L., and Xiaojun Shang. (2012). Free radical scavenging activities of pigment extract from *Hibiscus syriacus* L. petals in vitro. *African Journal of Biotechnology* **11**, 429-435.
- O' Connell, J. E. (2000). *Food Chemistry*. University College, Cork, Ireland: Product Technology Department, NIZO Food Research.
- Orsat, V., and Routray, W. (2012). Microwave-assisted extraction of flavonoids: a review. *Food Bioprocess Technology* **12**, 409–424.

- Parimala, M., and Shoba, G. G. (2014). In vitro antimicrobial activity and HPTLC analysis of hydroalcoholic seed extract of *Nymphaea nouchali* Burm. f. *BMC Complementary and Alternative Medicine* **14**, 1-9.
- Park, S. H., Choi, M. R., Park, J. W., Park, K. H., Chung, M. S., and Ryu, S. (2011). Use of organic acids to inactivate *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* Typhimurium, and *Listeria monocytogenes* on organic fresh apples and lettuce. *Journal of Food Science* **76**, 293–298.
- Perez-Magarino, S., Ortega-Heras, M., and Cano-Mozo, E. (2008). Optimization of a solid-phase extraction method using copolymer sorbents for isolation of phenolic compounds in red wines and quantification by HPLC. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **56**, 11560-11570.
- Pinelo, M., Del Fabbro, P., Manzocco, L., Nunez, M. J., and Nicoli, M. C. (2005). Optimization of continuous phenol extraction from *Vitis vinifera* by products. *Food Chemistry*, **92**, 109–117.
- Qi, H., Hu, W., Jiang, A., Tian, M., and Li, Y. (2011). Extending shelf-life of Fresh-cut ‘Fuji’ apples with chitosan-coatings. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* **12**, 62-66.
- Qiu, N., Guo, S., and Chang, Y. (2007). Study upon kinetic process of apple juice adsorption de-coloration by using adsorbent resin. *Journal of Food Engineering* **81**, 243–249.
- Rahman, S. M. E., Jin, Y. G., and Oh, D. H. (2011). Combination treatment of alkaline electrolyzed water and citric acid with mild heat to ensure microbial safety, shelf-life and sensory quality of shredded carrots. *Food Microbiology* **28**, 484–491.
- Robbins, R. J. (2003). Phenolic acids in foods: An overview of analytical methodology. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **51**, 2866–2887.
- Sapers, G. M., and Sites, J. E. (2003). Efficacy of 1% hydrogen peroxide wash in decontaminating apples and cantaloupe melons. *Journal of Food Science* **68**, 1793-1797.
- Scalbert, A. (1991). Antimicrobial properties of tannins. *Phytochemistry* **30**, 3875-3883.

- Scordino, M., Di Mauro, A., Passerini, A., and Maccarone, E. (2003). Adsorption of flavonoids on resins: hesperidin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **51**, 6998–7004.
- Shahi, N., Min, B., and Bonsi, E. A. (2015). Microbial Decontamination of Fresh Produce (Strawberry) Using Washing Solutions. *Journal of Food Research* **4**, 128-136.
- Simone, G. V., Cabral, P., and George, G. O. (2008). Study of the specificity of cross-Povidone (PVPP) as binding agent in the quantification of polyphenolic Compounds. *Journal of the Brazilian Chemical Society* **19**, 1627-1633.
- Soto, M. L., Moure, A., Domínguez, H., and Parajó, J. C. (2011). Recovery, concentration and purification of phenolic compounds by adsorption: A review. *Journal of Food Engineering* **105**, 1-27.
- Suárez-Quiroz, M. L., Alonso Campos, A., Valerio Alfaro, G., González-Ríos, O., Villeneuve, P., and Figueroa-Espinoza, M. C. (2014). Isolation of green coffee chlorogenic acids using activated carbon. *Journal of Food Composition and Analysis* **33**, 55-58.
- Suffet, I. H., Brenner, L., Coyle, J. T., Cairo, P. R., and (1978). Evaluation of the capability of granular activated carbon and XAD-2 resin to remove trace organics from treated drinking water. *Environmental Science & Technology* **12**, 1315–1322.
- Sun, P. C., Liu, Y., Yi, Y. T., Li, H. J., Fan, P., and Xia, C. H. (2015). Preliminary enrichment and separation of chlorogenic acid from *Helianthus tuberosus L.* leaves extract by macroporous resins. *Food Chemistry* **168**, 55-62.
- Tirpanalan, Ö., Zunabovic, M., Domig, K. J., and Kneifel, W. (2011). Mini review: Antimicrobial strategies in the production of fresh-cut lettuce products. *Science against Microbial Pathogens: Communicating Current Research and Technological Advances* **1**, 176-188.
- Upadhyay, A., Upadhyaya, I., Mooyottu, S., Kollanoor-Johny, A., and Venkitanarayanan, K. (2014). Efficacy of plant-derived compounds combined with hydrogen peroxide as antimicrobial wash and coating treatment for reducing *Listeria monocytogenes* on cantaloupes. *Food microbiology* **44**, 47-53.



- Varnam, A. H. (1991). Foodborne pathogens. 1st.Edn, Wolfe Publication Ltd, London.
- Xia, D., Wu, X., Shi, J., Yang, Q., and Zhang, Y. (2011). Phenolic compounds from the edible seeds extract of Chinese Mei (*Prunus mume* Sieb. et Zucc) and their antimicrobial activity. *LWT - Food Science and Technology* **44**, 347-349.
- Xu, B. J., and Chang, S. K. (2007). A comparative study on phenolic profiles and antioxidant activities of legumes as affected by extraction solvents. *Journal of Food Science* **72**, 159-166.
- Yoon, S. Y., Choi, W. J., Park, J. M., and Yang, J. W. (1997). Selective adsorption of flavonoid compounds from the leaf extract of *Ginkgo biloba* L. *Biotechnology Techniques* **11**, 553-556.
- Yoshii, M., Okamoto, A., and Ohta, M. (2013). Lipopolysaccharide-deficient mutants of *Salmonella enterica* have increased sensitivity to catechins *Advances in Applied Microbiology* **3**, 399-402.
- Zadernowski, R., Czaplicki, S., Naczki, M., and (2009). Phenolic acid profiles of mangosteen fruits (*Garcinia mangostana*). *Food Chemistry* **112**, 685-689.
- Zhang, Y. M., and Rock, C. O. (2004). Evaluation of epigallocatechin gallate and related plant polyphenols as inhibitors of the FabG and FabI reductases of bacterial type II fatty-acid synthase. *The Journal of Biological Chemistry* **279**, 30994-31001.
- กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ (2553). ประกาศกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ เรื่อง เกณฑ์คุณภาพทางจุลชีววิทยาของอาหารและภาชนะสัมผัสอาหาร.
- จอมขวัญ สุวรรณรักษ์ และ นิธิยา รัตนานนท์ (2556). "โครงการการปรับปรุงคุณภาพและการยืดอายุการเก็บรักษาผักและผลไม้แกะสลัก,". รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์ ประจำปี งบประมาณ 2556 คณะเทคโนโลยีคหกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลพระนคร.
- จิตศิริ ทองสอน, ปรียา วิบูลย์เศรษฐ์ และ วราภา มหากาญจนกุล (2544). การลด *Salmonella* Typhimurium ในมะเขือเทศเชอร์รี่และซิงด้วยสารประกอบคลอรีนและกรดอินทรีย์. การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 39 (5-7 กุมภาพันธ์), 317-322.
- ทองศักดิ์ วัฒนวรรณ (2544). "มะเข็ยงพีชในโครงการอนุรักษ์ / สมองพระราชดำริโดยสถาบันเทคโนโลยีราชมงคล สถาบันวิจัยและฝึกอบรมการเกษตรลำปาง กระทรวงศึกษาธิการ," พิมพ์ครั้งที่ 2. ลำปาง: ศิลปการพิมพ์.

- ทวีพร อุณจักร (2530). การวิเคราะห์ลูกมะเกี๋ยงสุก (*Eugenia piniata* Roxb, Myrtaceae).  
วิทยานิพนธ์ปริญญาโทบริหารบัณฑิต สาขา วิทยาศาสตร์เภสัชกรรม บัณฑิตวิทยาลัย  
มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.
- ทวีพร อุณจักร (2545). มะเกี๋ยง : พืชในโครงการอนุรักษ์. กระทรวงศึกษาธิการ. สถาบันเทคโนโลยี  
ราชมงคลสถาบันวิจัยและฝึกอบรมการเกษตรลำปาง.
- ธีรวัลย์ ชาญฤทธิเสน (2555). มะเกี๋ยง ผลไม้พื้นเมืองที่ควรอนุรักษ์. หมอชาวบ้าน **33**, 30-34.
- นภาพร เชี่ยวชาญ (2557). "การควบคุมการปนเปื้อนจุลินทรีย์ในผักและผลไม้." [ออนไลน์]  
<http://www.phtnet.org/> [20 มี.ค.2559]
- นิธิยา รัตนานนท์ (2553). "เคมีอาหาร,". พิมพ์ครั้งที่ 4. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์โอเดียนสโตร์. 430-  
444.
- บุษกร ทองใบ (2556). ผลการยับยั้งจุลินทรีย์ของกรดอะซิติกและสารสกัดฆ่าต่อ *Staphylococcus aureus* ที่ปนเปื้อนผักชี. วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร **44**, 307-310.
- บุษกร ทองใบ, พิชามรณณ์ แผ้วพลสง และ สาวิตรี ทวีพร (2557). ผลของสารสกัดจากกาบมะพร้าว และกรดฟูมาริกต่อจุลินทรีย์ในโหระพาสด. วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยมหาสารคาม ฉบับพิเศษ, 530-536.
- ปริญทร เต็มถาวรศิลป์ (2551). การเตรียมและวิเคราะห์คุณลักษณะเฉพาะของถ่านกัมมันต์จากไม้ตอง และไม้พญาจู้. วิทยานิพนธ์ปริญญาโทบริหารบัณฑิต ภาควิชา เคมี บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- พิมพ์ใจ อาษา (2551). องค์ประกอบทางเคมีและฤทธิ์ต้านเชื้อ *Propionibacterium acnes* และ *Staphylococcus aureus* ของเมล็ดมะเกี๋ยง. วิทยานิพนธ์ปริญญาโทบริหารบัณฑิต สาขา วิทยาศาสตร์เภสัชกรรม บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
- พิมพ์พร ลีลาพรพิสิฐ (2547). การศึกษาพฤกษศาสตร์เคมีและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดเมล็ด มะเกี๋ยงเพื่อใช้ในทางยา เสริมอาหาร และเครื่องสำอาง. รายงานการวิจัยประจำปี คณะเภสัช ศาสตร์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.
- เพ็ญวิภา บัลลังก์โพธิ์ (2556). ประสิทธิภาพของสารสกัดเมล็ดหัวว่า *Syzygium cumini* (L.) Skeels ต่อ การยับยั้งการเจริญของ *Escherichia coli* และ *Salmonella spp.* และการประยุกต์กับใบ โหระพา วิทยานิพนธ์ปริญญาโทบริหารบัณฑิต ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- มัลลิกา ปัญญาคะโป และ ผ่องศรี เผ่าภูรี (2550). การเกิดสารไตรฮาโลมีเทนในน้ำประปาที่ผ่านการ ฆ่าเชื้อโรคด้วยคลอรีน กรณีตัวอย่างระบบประปาของเทศบาลนครปฐม มหาวิทยาลัย ศิลปากร, นครปฐม.

- รุจิรา ปิ่นแก้ว (2556). "การผลิตและการเตรียมถ่านกัมมันต์จากขี้ข้าวโพดเพื่อใช้ในการดูดซับมีเทน,". รายงานผลงานวิจัยประจำปี 2556 ภาควิชาเคมี มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบูรณ์.
- ลักขณา บรรณสาร (2552). ประสิทธิภาพของใบฝรั่งร่วมกับกรดซิตริกและกรดแลคติกในการลดแบคทีเรียก่อโรคในผลมะเขือเทศ. วิทยานิพนธ์ปริญญาโทมหาบัณฑิต. สาขาวิชาเทคโนโลยีการอาหาร บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยมหาสารคาม.
- วรดา อ่าบุญ, กลางกมล จันทราสุทธิ์, วรณวิมล จำไรสินธุ์ และ อัญชลี ทุมเสน (2557). สถานการณ์การปนเปื้อนจุลินทรีย์ในผลไม้สดแช่แข็งในรถเข็น ณ สถานที่จำหน่ายในเขตกรุงเทพมหานคร. ข่าวสารด้านยาและผลิตภัณฑ์เพื่อสุขภาพปีที่ 17 ฉบับที่ 3 (กรกฎาคม-กันยายน). 72-81.
- วิทยา ทรัพย์เย็น (2550). ผลของการบริบูรณ์ต่อปริมาณฟลาโวนอยด์บางชนิด และคุณสมบัติด้านออกซิเดชันในผลหว่า (*Syzygium cumini*). วิทยานิพนธ์ปริญญาโทมหาบัณฑิต. ภาควิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- วีรานุช หลาง (2555). "คู่มือตรวจวิเคราะห์ด้านจุลชีววิทยาทางอาหาร" พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพฯ: โรงพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- สำนักงานโครงการอนุรักษ์พันธุพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ (2558). การอนุรักษ์และการพัฒนาการใช้ประโยชน์จากพืชอนุรักษ์ [ออนไลน์]. แหล่งที่มา: <https://makiangonline.wikispaces.com/MK+Staffs+2558> [วันที่ 24 เมษายน 2559].
- สำนักงานมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ (2557). รายงานการเฝ้าระวังความปลอดภัยสินค้าเกษตรและอาหาร โดยห้องปฏิบัติการขึ้นทะเบียนกับสำนักงานมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหาร ประจำปี พ.ศ. 2554 – 2557. กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ [ออนไลน์]. แหล่งที่มา: [http://www.acfs.go.th/news/docs/acfs\\_23-09-57-06](http://www.acfs.go.th/news/docs/acfs_23-09-57-06) [18 ก.ค. 2559].
- สุปรีณา ศรีใสคำ (2552). ผลของการใช้ใบและก้านสะเดาในอาหารแพะเนื้อต่อกระบวนการหมักในกระเพาะหมักและสมรรถนะการผลิต. วิทยานิพนธ์ปริญญาโทมหาบัณฑิต. ภาควิชาเทคโนโลยีเทคโนโลยีการผลิตสัตว์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี.
- สุมณฑา วัฒนสินธุ์ (2549). ตำราจุลชีววิทยาทางอาหาร. กรุงเทพฯ : จามจุรีโปรดักท์.
- อรณพ ทักศนอุดม และ จุฑามาศ ธีระสาโรช (2549). "ประสิทธิภาพของกรดซิตริกต่อการลดจำนวนเชื้อจุลินทรีย์ในผัก และผลไม้สดแช่แข็ง,". รายงานผลงานวิจัยประจำปี 2549. ภาควิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีทางอาหาร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลล้านนา พิษณุโลก.

อรรรรณ ศิริเวทย์วุฒิ (2558). การใช้สารสกัดเมล็ดหว่า *Syzygium cumini* (L.) Skeels ในการควบคุมจำนวนแบคทีเรียก่อโรควางชนิดในสาระแหง *Metha cordifolia* Opiz.วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.





ภาคผนวก

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
CHULALONGKORN UNIVERSITY

## ภาคผนวก ก

## ก.1 การวิเคราะห์ปริมาณความชื้น (AOAC, 1995)

## อุปกรณ์

- ตู้อบไฟฟ้า (electric oven)
- โถดูดความชื้น (desiccators)
- ภาชนะสำหรับหาความชื้น (crucible)
- เครื่องชั่งไฟฟ้าชนิดละเอียด 4 ตำแหน่ง

## วิธีการ

- อบภาชนะสำหรับหาความชื้นพร้อมฝาที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง นำออกจากตู้อบใส่ไว้ในโถดูดความชื้น ปล่อยให้เย็นอุณหภูมิของภาชนะลดลงเท่ากับอุณหภูมิห้อง แล้วชั่งน้ำหนักอีกครั้ง

- ทำเช่นเดียวกับข้อด้านบนจนได้ผลต่างของน้ำหนักที่ชั่งทั้งสองครั้งติดต่อกันไม่เกิน 1-3 มิลลิกรัม

## มิลลิกรัม

- ชั่งตัวอย่างที่ต้องการหาความชื้นให้ได้น้ำหนักแน่นอน 1-2 กรัม ใส่ลงในภาชนะหาความชื้นที่ทราบน้ำหนักแน่นอน นำไปอบในตู้ที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส นาน 5-6 ชั่วโมง นำออกจากตู้ใส่ไว้ในโถดูดความชื้น ปล่อยให้เย็นกระทั่งอุณหภูมิของภาชนะลดลงเท่ากับอุณหภูมิห้องแล้วชั่งน้ำหนักภาชนะพร้อมตัวอย่าง

- อบซ้ำ จนกว่าได้ผลต่างของน้ำหนักที่ชั่งทั้งสองครั้งติดต่อกันไม่เกิน 1-3 มิลลิกรัม

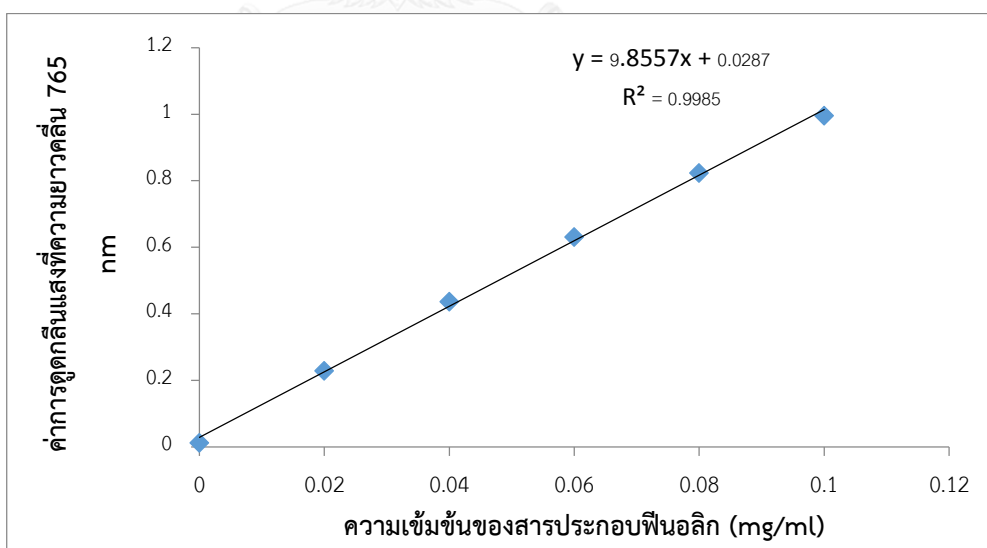
## การคำนวณ

ปริมาณความชื้น (ร้อยละโดยน้ำหนัก) =  $\frac{\text{ผลต่างของน้ำหนักตัวอย่างก่อนอบและหลังอบ (กรัม)} \times 100}{\text{น้ำหนักตัวอย่างเริ่มต้น (กรัม)}}$

## ก.2 การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด

การเตรียมสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิก

- ชั่งน้ำหนักกรดแกลลิกจำนวน  $0.1 \pm 0.01$  กรัม (จัดบันทึกน้ำหนักที่คงที่แน่นอน)
- ละลายกรดแกลลิกที่ได้ด้วยตัวทำละลายเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 50 ปริมาตร 5 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรให้ได้ 50 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น สารละลายที่ได้ใช้เป็นสารละลาย stock
- ปิเปตสารละลาย stock ที่เตรียมไว้มา 0 0.1 0.2 0.3 0.4 และ 0.5 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรให้ได้ 10 มิลลิลิตร จะได้สารละลายมาตรฐานกรดแกลลิกที่มีความเข้มข้น 0 0.02 0.04 0.06 0.08 และ 0.10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ
- ปิเปตสารละลายที่ได้ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลอง แล้วเติมสารละลาย Folin-Ciocalteu reagent ความเข้มข้นร้อยละ 10 (โดยปริมาตรต่อปริมาตร) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมด้วยเครื่องผสมสาร แล้วตั้งทิ้งไว้ 3 นาที เติมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต ความเข้มข้นร้อยละ 7.5 (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) ปริมาตร 0.8 มิลลิลิตร แล้วผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมสาร
- ตั้งทิ้งไว้ในที่มืดเป็นเวลา 120 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร

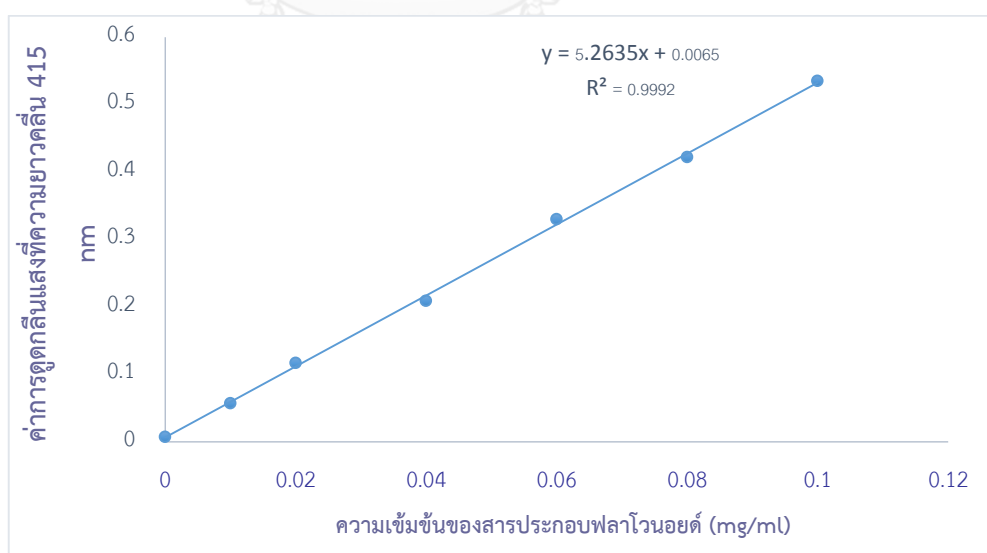


ภาพที่ ก.1 กราฟมาตรฐานกรดแกลลิก (mg/ml)

### ก.3 การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมด

การเตรียมสารละลายมาตรฐานควอร์ซิทิน

- ชั่งน้ำหนักควอร์ซิทินจำนวน  $0.1 \pm 0.01$  กรัม (จุดบันทึกน้ำหนักที่คงที่แน่นอน)
- ละลายควอร์ซิทินที่ได้ด้วยตัวทำละลายเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 50 ปริมาตร 5 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรให้ได้ 50 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น สารละลายที่ได้ใช้เป็นสารละลาย stock
- ปิเปตสารละลาย stock ที่เตรียมไว้มา 0 0.1 0.2 0.3 0.4 และ 0.5 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรให้ได้ 10 มิลลิลิตร จะได้สารละลายมาตรฐานควอร์ซิทินที่ความเข้มข้น 0 0.02 0.04 0.06 0.08 และ 0.10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ
- ปิเปตสารละลายที่ได้ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลอง เติมเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 95 ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร ตามด้วยสารละลายอะลูมิเนียมคลอไรด์ความเข้มข้นร้อยละ 10 ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร สารละลายโพแทสเซียมอะซิเตต ความเข้มข้น 1 โมลาร์ ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร และน้ำกลั่นปริมาตร 2.8 มิลลิลิตร ตามลำดับ ผสมสารละลายให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมสาร เติมสารละลายโพแทสเซียมอะซิเตต ความเข้มข้น 1 โมลาร์ ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร และน้ำกลั่นปริมาตร 2.8 มิลลิลิตร แล้วผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมสาร ทิ้งไว้ในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 415 นาโนเมตร

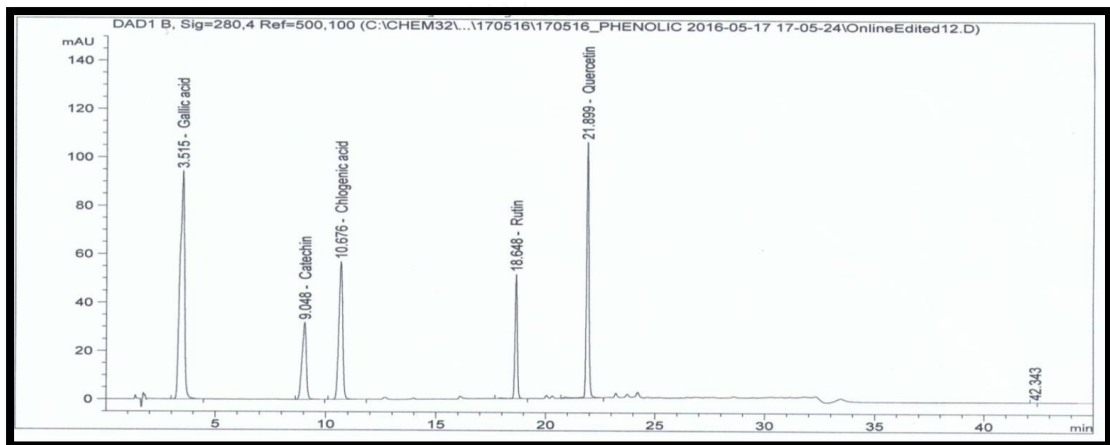


ภาพที่ ก.2 กราฟมาตรฐานควอร์ซิทิน (mg/ml)

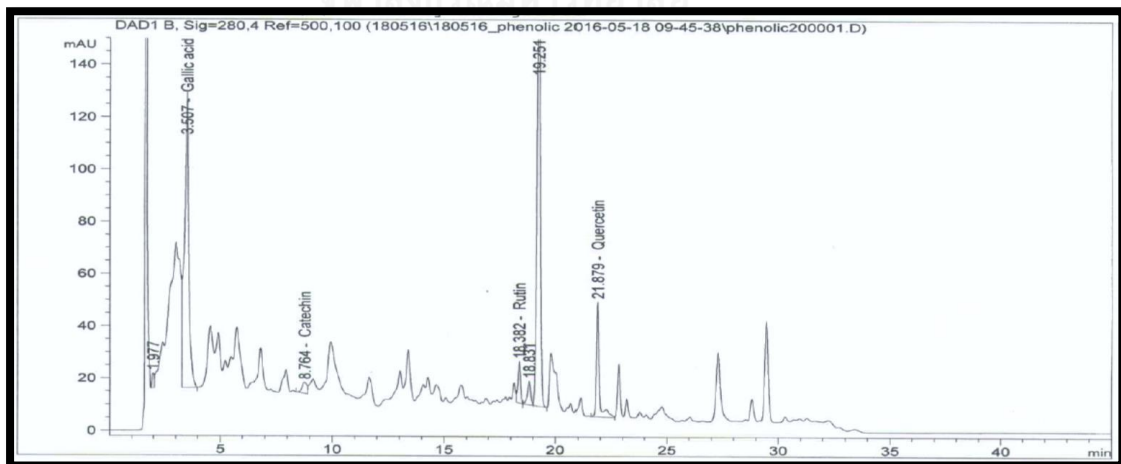


ก.4 โครมาโทแกรมของสารมาตรฐานจากการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC  
 ตารางที่ ก.1 retention time ของสารมาตรฐานที่วิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC

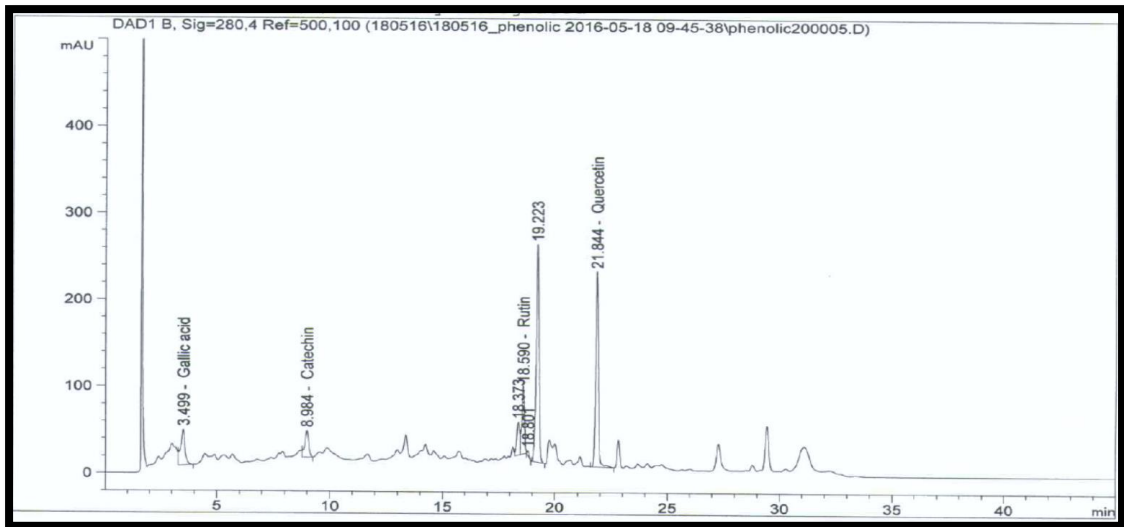
สารมาตรฐาน	retention time (นาที)
กรดแกลลิก	3.501
กรดคลอโรจีนิก	10.526
คาเทชิน	8.764
เคออสิทิน	21.879
รูทีน	18.382



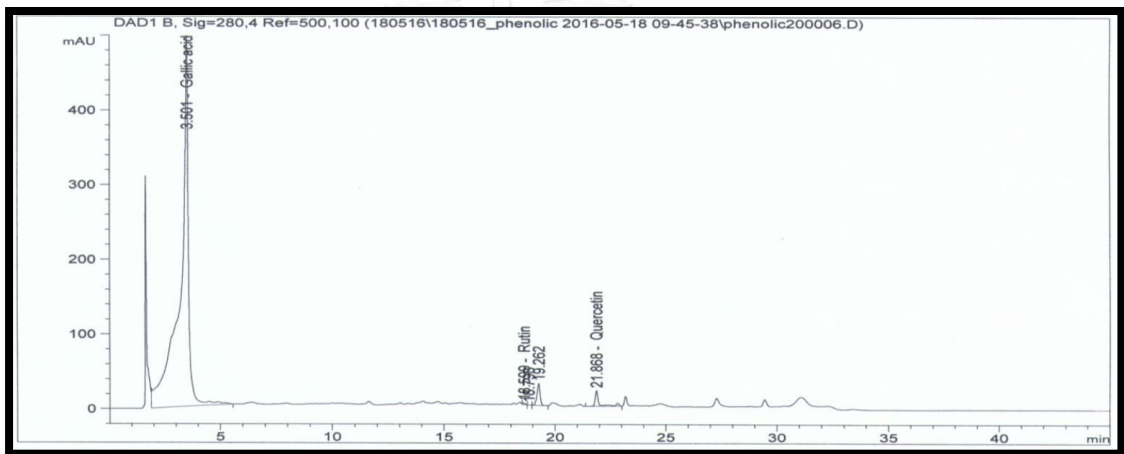
ภาพที่ ก.3 โครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐาน



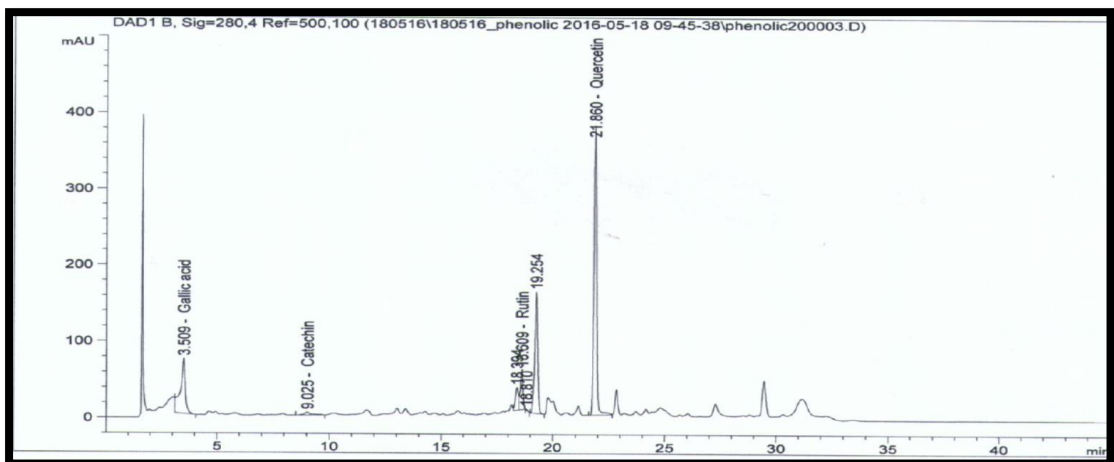
ภาพที่ ก.4 โครมาโทแกรมของสารสกัดหยาบเมล็ดมะเกี๋ยง



ภาพที่ ก.5 โครมาโทแกรมของสารสกัดที่ทำให้บริสุทธิ์บางส่วนด้วย MARS



ภาพที่ ก.6 โครมาโทแกรมของสารสกัดที่ทำให้บริสุทธิ์บางส่วนด้วย PAC



ภาพที่ ก.7 โครมาโทแกรมของสารสกัดที่ทำให้บริสุทธิ์บางส่วนด้วย PVPP

## ภาคผนวก ข

### การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

#### ข.1 Baird Parker agar (BPA)

ชั่งอาหาร BPA 3 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 950 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งอัดความดันที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 1.5 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เวลา 15 นาที รองจานอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส แล้วเติม Egg yolk tellurite 50 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันก่อนนำไปใช้

#### ข.2 Mueller Hinton agar (MHA)

ชั่งอาหาร MHA 34 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 1 ลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งอัดความดันที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 1.5 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เวลา 15 นาที

#### ข.3 Mueller Hinton broth (MHB)

ชั่งอาหาร MHB 21 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 1 ลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งอัดความดันที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 1.5 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เวลา 15 นาที

#### ข.4 Nutrient agar (NA)

ชั่งอาหาร NA 23 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 1 ลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งอัดความดันที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 1.5 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เวลา 15 นาที

#### ข.5 Plate count agar (PCA)

ชั่งอาหาร PCA 23.5 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 1 ลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งอัดความดันที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 1.5 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เวลา 15 นาที

#### ข.6 สารละลายโซเดียมคลอไรด์ (Sodium chloride) ความเข้มข้นร้อยละ 0.85

ชั่งสารโซเดียมคลอไรด์ 0.85 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งอัดความดันที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 1.5 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เวลา 15 นาที

#### ข.7 บัฟเฟอร์เปป्टอนวอเตอร์ (buffered peptone water) ความเข้มข้นร้อยละ 0.1

ชั่ง buffered peptone water 0.1 กรัม ละลายในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้เท่ากับ 100 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งอัดความดันที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 1.5 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เวลา 15 นาที

#### ข.8 Xylose Lysine Deoxycholate agar (XLD)

ชั่ง XLD 3.8 กรัม ละลายในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้เท่ากับ 100 มิลลิลิตร นำไปเข้าเครื่องไมโครเวฟ

## ภาคผนวก ค

## คุณสมบัติของสารดูดซับ

## ค.1 เรซินรูพรุนขนาดใหญ่

## ตาราง ค.1 คุณสมบัติของเรซินรูพรุนขนาดใหญ่

Related Categories	<b>Adsorbent Media (Polymeric), Analytical/Chromatography, Diaion/Sepabeads/MCI GEL, Resins &amp; LC Separation Media, Resins and Media</b>
packaging	<b>pkg of 100 g</b>
matrix	<b>polymethacrylate</b>
particle size	<b>25-50 mesh</b>
pore size	<b>1.2 mL/g pore volume 170 Å mean pore size</b>
surface area	<b>~500 m<sup>2</sup>/g</b>
density	<b>1.09 g/mL at 25 °C (true wet)(lit.)</b>

## ค.2 ถ่านกัมมันต์ชนิดผง (PAC)

### ตาราง ค.2 คุณสมบัติของถ่านกัมมันต์ชนิดผง

Related Categories	<b>A-B, Puriss p.a., Analytical Reagents, Analytical Reagents for General Use, Analytical/Chromatography, Puriss p.a.</b>
vapor pressure	<b>&lt;0.1 mmHg ( 20 °C)</b>
form	<b>powder</b>
autoignition temp.	<b>842 °F</b>
iodine-adsorption (0.05 mol I <sub>2</sub> /l)	<b>&gt;70 mL/g</b>
methylene blue-adsorption	<b>&gt;12 mL/0.1 g, 0.15% sol.</b>
resistivity	<b>1375 μΩ-cm, 20°C (graphite)</b>
ign. residue	<b>≤2%</b>
mp	<b>3550 °C(lit.)</b>
anion traces	<b>chloride (Cl<sup>-</sup>): ≤5000 mg/kg</b> <b>sulfate (SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>): ≤5000 mg/kg</b>
cation traces	<b>Ca: ≤1000 mg/kg</b>
	<b>Cd: ≤10 mg/kg</b>
	<b>Co: ≤10 mg/kg</b>
	<b>Cr: ≤10 mg/kg</b>
	<b>Cu: ≤10 mg/kg</b>
	<b>Fe: ≤300 mg/kg</b>
	<b>K: ≤200 mg/kg</b>
	<b>Mg: ≤200 mg/kg</b>

### ค.3 โพลีไวนิล โพลีไพร์โรลิดอน (PVPP)

#### ตาราง ค.3 คุณสมบัติของโพลีไวนิล โพลีไพร์โรลิดอน

Related Categories	<b>Analytical Reagents, Analytical/Chromatography, Application Specific Reagents, Food &amp; Beverage, Hydrophilic Polymers, Hydrophobic Polymers, Materials Science, Other Reagents for Food Analysis, Poly(vinylpyrrolidinone) (PVP), Poly(vinylpyrrolidone), Poly(vinylpyrrolidone) (PVP) and Copolymers, Polymer Science, Polymers, Reagents for Analysis of Proteins, Reagents for Food Analysis, Vinylpyridine and Vinylpyrrolidone Polymers</b>
particle size	~110 $\mu\text{m}$

## ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

### ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

ชื่อ น.ส. นันทนิภัส บาลเมือง เกิดวันที่ 17 พฤศจิกายน พ.ศ. 2532 เกิดที่จังหวัด กรุงเทพมหานคร สำเร็จการศึกษาปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีทางอาหาร ภาควิชาเทคโนโลยีอุตสาหกรรมเกษตร คณะวิทยาศาสตร์ประยุกต์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าพระนครเหนือ ปีการศึกษา 2554 และเข้าศึกษาต่อวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต หลักสูตรเทคโนโลยีทางอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อปีการศึกษา 2555

เสนองานภาคโปสเตอร์ ในงานประชุมวิชาการระดับนานาชาติ Food Innovation Asia Conference ครั้งที่ 17 ระหว่างวันที่ 18-19 มิถุนายน 2558 ณ ศูนย์นิทรรศการและการประชุมไบเทค บางนา กรุงเทพฯ

เสนอผลงานภาคบรรยาย ในงานประชุมวิชาการระดับชาติและระดับนานาชาติ มหาวิทยาลัยรังสิต ประจำปี 2559 ระหว่างวันที่ 29-30 เมษายน 2559 ณ มหาวิทยาลัยรังสิต รังสิต ปทุมธานี