Antioxidant Activity, Total Phenolic Content, and Wound Healing Property of Pomelo (*Citrus maxima* (Burm.f.) Merr.) Extracts

Panthip Rattanasinganchan[1], Piyamaporn Phankoo[1], Thanaporn Jaturonwanich[1], Rungrawee Phetset[1], Asamaporn Na Bangchang[1], Kanokporn Kongweha[1], Titaporn Thidkliang[1] and Kittipat Sopitthummakhun[2*]

[1]*Faculty of Medical Technology, Huachiew Chalermprakiet University, Samut Prakan Province, Thailand*
[2]*Faculty of Science amd Technology, Huachiew Chalermprakiet University, Samut Prakan Province, Thailand*

Abstract

This research investigated the biological properties of different parts of Pomelo (*Citrus maxima* (Burm.f.) Merr.) extract involving antioxidant activity, total phenolic content, and wound healing activity. The extraction process employed the maceration in hexane and methanol, utilizing various parts of pomelo, namely flavedo (FL), albedo (AL), segmented membrane (SM), and juice sac (JS). The results indicated that the methanolic extract of JS demonstrated antioxidant activity with an IC_{50} of 1.021 ± 0.031 mg/mL by DPPH scavenging method, while methanolic extract of AL exhibited an IC_{50} of 0.126 ± 0.004 mg/mL by ABTS scavenging method. The highest total phenolic content was determined in methanolic extract of SM with the value of 3.196 ± 0.022 mg GAE g^{-1} dry material. Moreover, the cytotoxicity assay conducted on HaCaT cells using MTT revealed that extract from both hexane and methanol did not exhibit cytotoxicity at concentrations of 0.5 and 1 μg/mL respectively. Interestingly, at non-toxic dose, hexane and methanolic extracts of AL and methanolic extract of FL showed a significant reduction in wound area compared with control ($p < 0.05$). In conclusion, extracts from *C. maxima* (Burm.f.) Merr. exhibit both antioxidant and wound-healing activity. This study revealed significant promises for

***Corresponding author E-mail address:** ksopittha@gmail.com
Received: 28 December 2023 Revised: 2 March 2024 Accepted: 8 March 2024

advancing research and development in wound healing products for patients dealing with chronic wound issues. Furthermore, it explores an alternative utilization of agricultural waste, presenting potential avenues for its application.

Keywords: Antioxidant, Wound healing assay, Total phenolic content, Khao-Yai Pomelo

การต้านอนุมูลอิสระ ปริมาณรวมของสารประกอบฟีนอลิก และสมบัติการสมานแผลของสารสกัดจากส้มโอพันธุ์ขาวใหญ่

ปานทิพย์ รัตนศิลป์กัลชาญ[1] ปิยมาภรณ์ แผนคู้[1] ธนาภร จาตุรนต์วาณิชย์[1] รุ่งระวี เพชรเศรษฐ์[1] อสมาภรณ์ ณ บางช้าง[1] กนกพร ก้องเวหา[1] ฐิตาภรณ์ ทิศเกลี้ยง[1] และ กิตติพัฒน์ โสภิตธรรมคุณ[2*]

[1]คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ จังหวัดสมุทรปราการ
[2]คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ จังหวัดสมุทรปราการ

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้ได้ศึกษาสมบัติการออกฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดจากส่วนต่าง ๆ ของส้มโอพันธุ์ขาวใหญ่ ได้แก่ การต้านอนุมูลอิสระ ปริมาณรวมของสารประกอบฟีนอลิก และสมบัติการสมานแผล สารสกัดจากส้มโอพันธุ์ขาวใหญ่เตรียมจากเปลือกชั้นนอก เปลือกชั้นกลาง เยื่อหุ้มเนื้อ และเนื้อผล ด้วยการแช่ในเฮกเซน และเมทานอล การต้านอนุมูลอิสระที่ดีที่สุด พบในชั้นเมทานอลในเนื้อผล มีค่า IC_{50} ต่ออนุมูลอิสระ DPPH เท่ากับ 1.021 ± 0.031 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในขณะที่ค่าการต้านอนุมูลอิสระ ABTS พบในส่วนของเปลือกชั้นกลางในชั้นเมทานอล มีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.126 ± 0.004 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สารประกอบฟีนอลิกมีปริมาณรวมสูงสุดในชั้นเมทานอลในส่วนเยื่อหุ้มเนื้อผล มีค่าเทียบเท่า 3.196 ± 0.022 มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อกรัมน้ำหนักแห้งของสารสกัด ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ HaCaT ด้วยวิธี MTT ที่ความเข้มข้นของสารสกัดที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้ สารสกัดจากเปลือกชั้นนอก เปลือกชั้นกลาง และเนื้อผล ในเฮกเซนและเมทานอล ไม่พบความเป็นพิษต่อเซลล์ทดสอบที่ความเข้มข้น 0.5 และ 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งเป็นที่น่าสนใจอย่างยิ่ง ที่ความเข้มข้นที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์นี้ สารสกัดจากเปลือกชั้นนอกในเมทานอล และสารสกัดจากเปลือกชั้นกลางในเมทานอลและเฮกเซน สามารถลดพื้นที่รอยแผลให้เล็กลงได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับตัวแปรควบคุม ($p < 0.05$) สรุปได้ว่า สารสกัดจากส้มโอมีทั้งฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์การสมานแผล การศึกษาครั้งนี้จึงเป็นประโยชน์ต่อการวิจัย และการพัฒนาผลิตภัณฑ์เพื่อการสมานแผล สำหรับผู้ป่วยที่มีปัญหาเรื่องบาดแผลเรื้อรัง รวมทั้งเป็นการนำของเหลือทิ้งทางการเกษตรมาใช้ให้เกิดประโยชน์อีกทางหนึ่งด้วย

คำสำคัญ: สารต้านอนุมูลอิสระ การวัดค่าการสมานแผล ปริมาณรวมสารประกอบฟีนอลิก ส้มโอพันธุ์ขาวใหญ่

***ผู้รับผิดชอบบทความ E-mail address:** ksopittha@gmail.com
รับบทความ: 28 ธันวาคม 2566 แก้ไขบทความ: 2 มีนาคม 2567 รับตีพิมพ์บทความ: 8 มีนาคม 2567

บทนำ

ส้มโอพันธุ์ขาวใหญ่ (Khao-Yai Pomelo) จัดอยู่ในกลุ่มไม้ยืนต้นขนาดเล็กถึงขนาดกลาง กิ่งอ่อนเป็นเหลี่ยมมีขน ใบประกอบ มีใบย่อยใบเดียว รูปไข่ถึงวงรี ปลายใบแหลมมน โคนใบกลมหรือกึ่งรูปหัวใจ ขอบใบเกือบเรียบถึงหยักมน ดอกช่อกระจะกึ่งเชิงหลั่น อาจพบว่ามีดอกย่อย หรือ ดอกเดี่ยว ถึงหลายดอก ออกดอกที่ซอกใบ กลีบดอกสีขาว มีเกสรตัวผู้ 20-25 อัน ผลส้มโอมีความคล้ายผลส้ม มีลักษณะทรงแป้น ส่วนที่กว้างที่สุดอยู่บริเวณกลางผล บริเวณขั้วผลจะแบน สีเปลือกเขียวแกมเหลือง ความมันของผิวปานกลาง มีต่อมน้ำมันเด่นชัด เปลือกหนาประมาณ 2.5 เซนติเมตร เนื้อผลมีสีขาวอมเหลือง มีความฉ่ำน้ำปานกลาง (Fig. 1) ส้มโอพันธุ์ขาวใหญ่จัดอยู่ในวงศ์ “Rutaceae” มีชื่อวิทยาศาสตร์ คือ *Citrus maxima* (Burm.f.) Merr. เป็นพืชตระกูลส้มขนาดใหญ่ มีรสเปรี้ยวอมหวาน[1] เป็นสายพันธุ์ที่ได้รับความนิยมในการบริโภค พบได้ในทุกภูมิภาคของประเทศไทย แต่นิยมปลูกแถบจังหวัดสมุทรสงคราม โดยถือเป็นพืชเศรษฐกิจสำคัญในภูมิภาค มีรายงานการศึกษาการออกฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดหยาบจากเปลือกส้มโอ ได้แก่ ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระและช่วยชะลอการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน ซึ่งเป็นสาเหตุสำคัญของการเกิดโรคในมนุษย์ มีการใช้ประโยชน์จากส่วนของเนื้อผลที่มีเส้นใยอาหารสูง เพื่อนำไปสกัดเป็นเซลลูโลสบริสุทธิ์ และเส้นใยนาโนเซลลูโลสที่มีความเสถียรทนความร้อนได้ดี[2] ส่วนประกอบของไฟเบอร์ที่พบในเปลือกส้มโอยังสามารถช่วยป้องกันโรคอ้วน และลดระดับไขมันที่ผิดปกติในเลือดจากการศึกษาในหนูทดลอง[3] รายงานการศึกษาส้มโอสายพันธุ์ต่าง ๆ โดยการเปรียบเทียบปริมาณรวมของสารประกอบในกลุ่มฟีนอล และความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH scavenging ระหว่างส้มโอพันธุ์ขาวใหญ่ ทองดี ขาวแตงกวา ขาวน้ำผึ้ง ท่าข่อย และทับทิมสยาม พบว่าส้มโอพันธุ์ขาวใหญ่มีทั้งปริมาณรวมของสารประกอบฟีนอลิก และการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH scavenging สูงกว่าสายพันธุ์อื่น ๆ[4] นอกจากนี้ยังมีรายงานการศึกษาเกี่ยวกับสารสกัดจากเปลือกส้มโอ ที่เตรียมด้วยวิธีแช่ในตัวทำละลายอินทรีย์ พบว่ามีสมบัติช่วยสมานแผลในหนูทดลองที่มีภาวะแผลเรื้อรังจากการเป็นเบาหวานด้วย[5]

การปลูกส้มโอพันธุ์ขาวใหญ่เพื่อจำหน่าย ผู้บริโภคส่วนใหญ่จะใช้เฉพาะส่วนของเนื้อผลเป็นหลัก โดยมีส่วนต่าง ๆ ของส้มโอที่ไม่ได้ใช้ประโยชน์และถูกทิ้งเป็นของเสียทางการเกษตร จึงเป็นที่มาของวัตถุประสงค์ในการวิจัยครั้งนี้ คือ การทดสอบสมบัติการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH scavenging และการหาปริมาณรวมสารออกฤทธิ์สำคัญที่พบในพืช คือ สารประกอบฟีนอลิก โดยการศึกษาเปรียบเทียบระหว่างส่วนเนื้อผล ซึ่งเป็นส่วนที่นำไปบริโภค กับส่วนที่เหลือทิ้งเป็นขยะทางการเกษตร ได้แก่ ส่วนเปลือกชั้นนอก เปลือกชั้นกลาง และเยื่อหุ้มเนื้อ รวมทั้งการศึกษาสารสกัดจากส่วนต่าง ๆ ของส้มโอพันธุ์ขาวใหญ่เกี่ยวกับสมบัติการช่วยสมานแผล (wound healing) ในเซลล์ผิวหนังมนุษย์ HaCaT โดยกลุ่มผู้วิจัยมีความหวังว่า ข้อมูลผลการวิจัยจากการศึกษาครั้งนี้ จะได้มีการนำไปต่อยอด และพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์สำหรับต้านอนุมูลอิสระ รวมทั้งผลิตภัณฑ์ที่ใช้สำหรับการสมานแผล โดยเฉพาะในกลุ่มผู้ป่วยที่มีปัญหาเรื่องการเกิดบาดแผลเรื้อรัง อีกทั้งยังเป็นช่องทางการนำของเหลือทิ้งทางการเกษตรมาใช้ให้เกิดประโยชน์อีกทางหนึ่ง

วัสดุและวิธีการ

1. การเตรียมสารสกัดจากส่วนต่าง ๆ ของส้มโอพันธุ์ขาวใหญ่

ใช้ตัวอย่างส้มโอพันธุ์ขาวใหญ่อายุ 8 เดือน จากพื้นที่สวนส้มโอ จังหวัดสมุทรสงคราม (พิกัดอ้างอิงแหล่งเพาะปลูก 13.4268760, 99.9518210) ซึ่งมีข้อมูลขึ้นทะเบียนสายพันธุ์ (geographical indication, GI)[6] นำมาล้างด้วยน้ำให้สะอาด เช็ดเปลือกด้านนอกด้วยเอทานอลเข้มข้นร้อยละ 70 จากนั้นแยกส่วนประกอบ ได้แก่ เปลือกชั้นนอก (flavedo, FL) เปลือกชั้นกลาง (albedo, AL) เยื่อหุ้มเนื้อ (segmented membrane, SM) และ เนื้อผล (juice sac, JS) (Fig. 1) ชั่งและบันทึกน้ำหนักสด แล้วนำไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ใช้เวลา 48 ชั่วโมง (ลักษณะทางกายภาพเปรียบเทียบระหว่างตัวอย่างสดกับตัวอย่างอบแห้งของส่วนประกอบต่าง ๆ แสดงใน Fig. 2) ตัวอย่างที่แห้งและผ่านการอบแล้วนำมาชั่งและบันทึกน้ำหนักแห้งอีกครั้ง เพื่อควบคุมสัดส่วนระหว่างน้ำหนักตัวอย่างแห้ง (กรัม) ต่อปริมาตรของตัวทำละลาย (มิลลิลิตร) โดยใช้สัดส่วน 1:8 ในการสกัดส่วนประกอบของส้มโอพันธุ์ขาวใหญ่แต่ละส่วนในเฮกเซนด้วยวิธีแช่ในตัวทำละลาย (maceration) เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นนำไปสกัดเพิ่มเติมด้วยวิธี sonication ใช้เวลาอีก 30 นาที ด้วยเครื่อง Sonicator (Bandelin Sonorex Digitec, Germany) แยกสารสกัดออกจากกากที่ไม่ละลายโดยการกรองผ่านกระดาษกรอง Whatman no. 1 ทำซ้ำอีกครั้งโดยเปลี่ยนตัวทำละลายจากเฮกเซนเป็นเมทานอล จากนั้นนำสารสกัดทั้งในชั้นตัวทำละลายเฮกเซนและชั้นเมทานอลไประเหยตัวทำละลายส่วนเกินออก โดยใช้วิธีระเหยแห้งภายใต้ความดัน (evaporation) ด้วยเครื่อง Rotary Evaporator (BUCHI Vacuum Controller V-850, Rotavapor R-210, Switzerland) จากนั้นนำสารสกัดที่แห้งไปชั่งและบันทึกน้ำหนักด้วยเครื่องชั่งสี่ตำแหน่ง เพื่อใช้ในการคำนวณความเข้มข้นที่แน่นอน แล้วแบ่งเก็บในขวดสีชาที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสเพื่อรอทำการทดสอบในขั้นตอนต่อไป สำหรับการทดสอบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระและสมบัติการสมานแผล จะนำสารสกัดส้มโอที่สกัดด้วยเฮกเซนและเมทานอลไปละลายในตัวทำละลายเฮกเซน หรือเมทานอลตามลำดับ และคำนวณความเข้มข้นที่แน่นอนก่อนนำไปทดสอบ

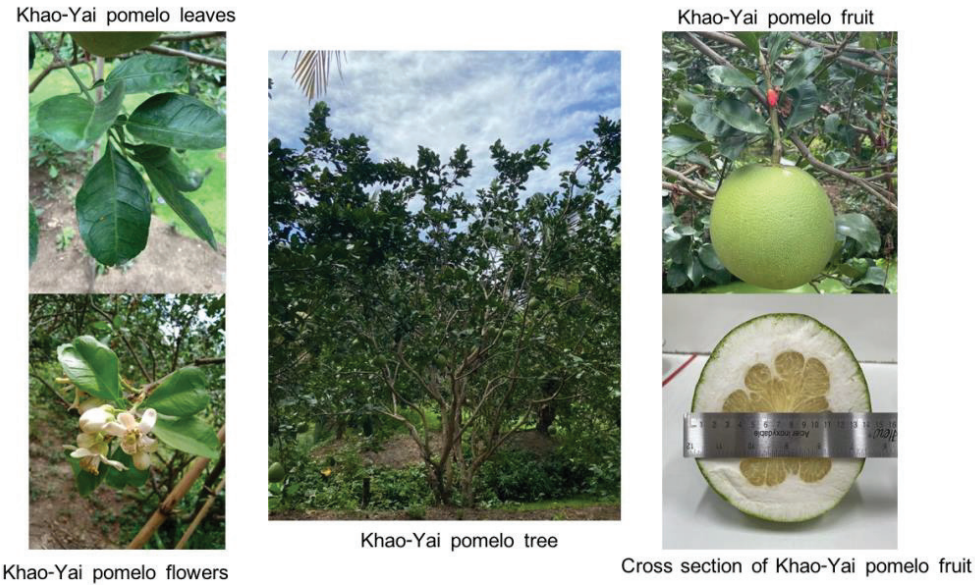


Fig. 1 Khao-Yai Pomelo (*Citrus maxima* (Burm.f.) Merr.) located plant at 13.4268760, 99.9518210 Samut Songkhram, Thailand.

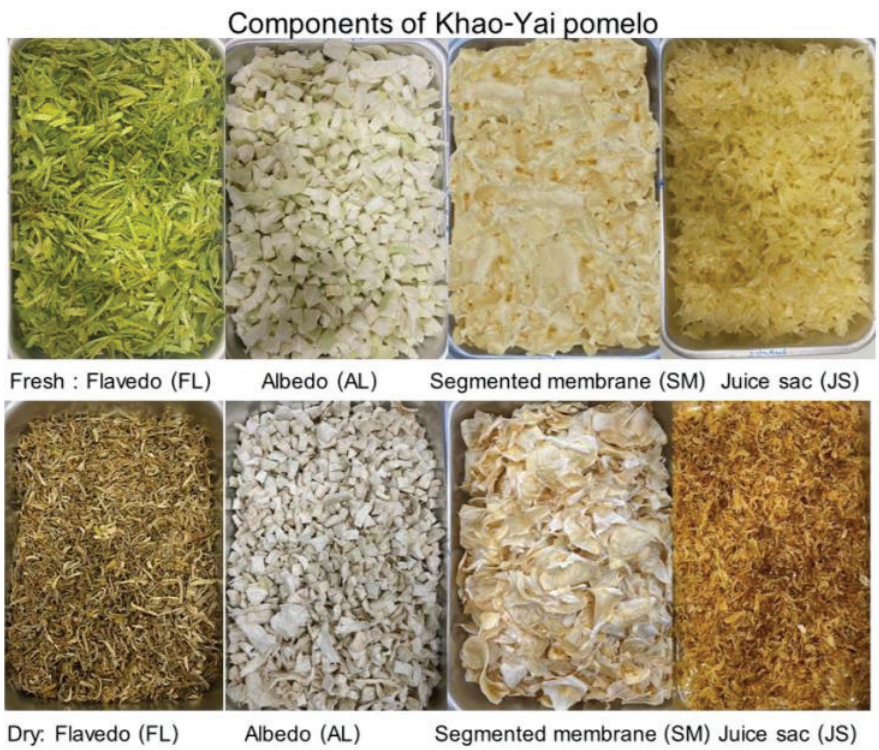


Fig. 2 Fresh and dry components of Khao-Yai pomelo before maceration.

2. การทดสอบสมบัติการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH และ ABTS scavenging assay

การทดสอบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระชนิด DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) ใช้หลักการ absorption spectrophotometry วัดการลดลงของอนุมูลอิสระที่มีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุด (λ_{max}) ที่ความยาวคลื่น 515 นาโนเมตร[7] ในปฏิกิริยาที่มีปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 1 มิลลิลิตร โดยมีความเข้มข้นสุดท้ายของสารละลาย ซึ่งประกอบด้วย DPPH 0.1 มิลลิโมลาร์ (ละลายในเมทานอลเข้มข้นร้อยละ 95) ผสมกับสารสกัดจากส่วนต่าง ๆ ของส้มโอพันธุ์ขาวใหญ่ ได้แก่ เปลือกชั้นนอก เปลือกชั้นกลาง เยื่อหุ้มเนื้อ และเนื้อผล ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ทำการทดลองเปรียบเทียบกับสารละลายมาตรฐาน BHT (butylated hydroxytoluene) กรดแอสคอร์บิก และ Trolox (6 hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid) บ่มปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้อง ในที่ไม่มีแสงรบกวนเป็นเวลา 1 ชั่วโมง นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 515 นาโนเมตร แล้วคำนวณค่าร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ (% inhibition) ดังสมการที่ 1

การทดสอบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระชนิด ABTS (2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic) acid) ใช้หลักการ absorption spectrophotometry โดยให้อนุมูลอิสระ ABTS อยู่ในรูป "cation radical" ($ABTS^{\bullet+}$) เตรียมโดยชั่งน้ำหนัก และคำนวณค่าความเข้มข้นของ ABTS ให้เท่ากับ 10 มิลลิโมลาร์ ละลายในน้ำกลั่น นำไปผสมกับสารละลายโพแทสเซียมเปอร์ซัลเฟตเข้มข้น 2.45 มิลลิโมลาร์ในสัดส่วน 1:0.5 (โดยปริมาตร) บ่มทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ในที่ไม่มีแสง ประมาณ 18-24 ชั่วโมง จากนั้นจึงนำสารละลายผสมดังกล่าว ไปหาความเข้มข้นของ $ABTS^{\bullet+}$ ที่แน่นอน ด้วยการใช้ค่า extinction coefficient ที่ 734 นาโนเมตร[8] การวัดค่าการต้านอนุมูลอิสระ $ABTS^{\bullet+}$ ของส้มโอพันธุ์ขาวใหญ่ทำในปฏิกิริยาที่มีปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 1 มิลลิลิตร มีความเข้มข้นสุดท้ายของสารละลาย $ABTS^{\bullet+}$ เท่ากับ 0.066 มิลลิโมลาร์ ผสมกับสารสกัดจากส่วนต่าง ๆ ของส้มโอพันธุ์ขาวใหญ่ ได้แก่ เปลือกชั้นนอก เปลือกชั้นกลาง เยื่อหุ้มเนื้อ และเนื้อผล ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ทำการทดลองเปรียบเทียบกับสารละลายมาตรฐาน BHT, กรดแอสคอร์บิก และ Trolox โดยบ่มปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้อง ในที่ไม่มีแสงรบกวนเป็นเวลา 10 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร คำนวณค่าร้อยละการต้านอนุมูลอิสระดังสมการที่ 1

สมการที่ 1 ร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ (% inhibition) = $\{(Abs_{cont.} - Abs_{react.}) / Abs_{cont.}\} \times 100$

กำหนดให้ $Abs_{cont.}$ และ $Abs_{react.}$ คือ ค่าการดูดกลืนแสงของอนุมูลอิสระ DPPH (λ_{max} 515 นาโนเมตร) หรือ อนุมูลอิสระ $ABTS^{\bullet+}$ (λ_{max} 734 นาโนเมตร) ที่ผสมกับสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน (BHT, กรดแอสคอร์บิก หรือ Trolox) หรือสารสกัดจากส่วนต่าง ๆ ของส้มโอพันธุ์ขาวใหญ่ ที่ใช้ในการทดสอบครั้งนี้

การคำนวณหาค่าความเข้มข้นของสารสกัดจากส่วนต่าง ๆ ของส้มโอพันธุ์ขาวใหญ่ ที่ให้ผลการต้านอนุมูลอิสระที่ร้อยละ 50 (half maximum inhibitory concentration, IC_{50}) ต่ออนุมูลอิสระแต่ละชนิด ใช้วิธีเขียนกราฟเส้นตรงแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าความเข้มข้นของสารทดสอบที่ใช้ (X-axis) ต่อค่าร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ (Y-axis)

ใช้ความสัมพันธ์เชิงเส้นตรง โดย m คือค่าความชัน (slope) ของกราฟเส้นตรง ซึ่งแสดงในสมการที่ 2 (สมการเส้นตรง) แล้วจึงคำนวณหาค่า IC_{50} ต่อไป

สมการที่ 2 $Y = mX + C$

3. การหาปริมาณรวมของสารประกอบฟีนอลิก

การวัดปริมาณรวมของสารประกอบฟีนอลิก ดัดแปลงวิธีการที่อ้างอิงจาก Ainsworth EA และ Gillespie KM, พ.ศ. 2550[9] โดยใช้หลักการวัดการดูดกลืนแสงของสารประกอบเชิงซ้อนระหว่างสารวิเคราะห์ ที่มีโครงสร้างจัดอยู่ในกลุ่มสารประกอบฟีนอลิก กับสารละลาย Folin-Ciocalteu ซึ่งดูดกลืนคลื่นแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร การวิเคราะห์หาปริมาณรวมของสารประกอบฟีนอลิก ใช้วิธีสร้างกราฟมาตรฐานโดยใช้กรดแกลลิกเป็นสารมาตรฐาน ปฏิกิริยาการทดสอบประกอบด้วย สารวิเคราะห์ 100 ไมโครลิตร สารละลาย Folin-Ciocalteu reagent 10 ไมโครลิตร บ่มสารละลายผสมดังกล่าวที่อุณหภูมิห้อง ในที่ไม่มีแสง เป็นเวลา 5 นาที แล้วเติมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนตเข้มข้น 1 โมลาร์ ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ขั้นตอนสุดท้ายเติมเมทานอลเข้มข้นร้อยละ 95 เพื่อปรับปริมาตรสุดท้ายให้ได้เท่ากับ 1 มิลลิลิตร บ่มปฏิกิริยาในที่มืดเป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร ทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง นำค่าที่ได้มาคำนวณในหน่วยมิลลิกรัมสมมูลกรดแกลลิกต่อน้ำหนักแห้ง 1 กรัม ของสารสกัดตัวอย่าง

4. การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ด้วยวิธี MTT

ทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ด้วยวิธี MTT อ้างอิงวิธีทดสอบของ Stockert JC และคณะ, พ.ศ. 2555[10] โดยใช้หลักการวัดจำนวนเซลล์ที่ยังมีชีวิตอยู่ด้วยเอนไซม์ออกซิโดรีดักเทส ซึ่งทำงานได้เฉพาะในเซลล์ที่มีชีวิต ออกซิโดรีดักเทสจะเร่งปฏิกิริยาการเปลี่ยน MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide) ไปเป็นผลึกฟอร์มาซาน (MTT formazan crystal) ที่มีสีม่วง โดยมีปริมาณแปรผันตามจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต วิธีการทดสอบทำโดยเพาะเลี้ยงเซลล์ HaCaT จำนวน 5,000 เซลล์ต่อหนึ่งหลุม ในจานเพาะเลี้ยงไมโครเพลท ชนิด 96 หลุม เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วจึงนำไปทดสอบกับสารสกัดจากส่วนต่าง ๆ ของส้มโอพันธุ์ขาวใหญ่ที่เตรียมไว้ โดยใช้ตัวแปรควบคุม (control) คือ อาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมเฮกเซน และเมทานอล เข้มข้นร้อยละ 1 เพื่อให้แน่ใจว่าเซลล์ที่ตาย (cell cytotoxicity) ไม่ได้เกิดจากผลของการเติมเฮกเซน และเมทานอล นอกจากนี้ยังมีปัญหาของสารสกัดที่ได้จากชั้นตัวทำละลายเฮกเซน และเมทานอล ซึ่งละลายได้น้อยมากในตัวทำละลายน้ำ และ DMSO (dimethyl sulfoxide) จึงต้องใช้วิธีละลายสารสกัดด้วยตัวทำละลายที่ใช้ในขั้นตอนการสกัดสาร เพื่อให้สารสกัดละลายได้ดีที่สุดก่อนที่จะนำไปทดสอบต่อไป นำเซลล์ไปเลี้ยงในตู้ควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส ในบรรยากาศที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 บ่มทิ้งไว้เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเติมสารละลาย MTT ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 10 ไมโครลิตร เพื่อให้ MTT เปลี่ยนเป็นผลึกฟอร์มาซานที่มีสีม่วง นำผลึกฟอร์มาซานที่เกิดขึ้น มาละลายในตัวทำละลาย DMSO ปริมาตร 200 ไมโครลิตร แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายที่ความยาวคลื่น 540 นาโมเมตร ด้วยเครื่อง microplate reader ค่าการดูดกลืนแสงจะแปรผันตรงกับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต ทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง นำค่าที่ได้มาประเมินเพื่อเลือกใช้ค่าความ

เข้มข้นของสารสกัด โดยใช้ช่วงความเข้มข้นที่เซลล์มีชีวิตรอดเกินกว่าร้อยละ 90 สำหรับการทดสอบสมบัติการสมานแผล

5. การทดสอบความสามารถการสมานแผลในเซลล์ผิวหนัง HaCaT

ทดสอบสมบัติการสมานแผลด้วยวิธี *in vitro* กับเซลล์ผิวหนัง (human keratinocyte) ชนิด HaCaT ด้วยวิธี "scratch assay"[11] ใช้หลักการสร้างรอยขีดข่วนบนผิวเซลล์ที่เพาะเลี้ยงบนจานเลี้ยงเซลล์ ให้เกิดพื้นที่ปลอดเซลล์เพื่อวัดค่าความสามารถในการสมานรอยแผลที่แยกออกจากกัน โดยสังเกตจากการเพิ่มของทั้งจำนวนเซลล์ และการเคลื่อนที่ของเซลล์ ด้วยการบันทึกภาพนิ่งด้วยกล้องจุลทรรศน์หัวกลับ (inverted microscope) ตามขั้นตอนโดยย่อดังนี้ นำเซลล์ HaCaT จำนวน 2×10^5 เซลล์ต่อปริมาตร 2 มิลลิลิตร ไปบ่มในจานเพาะเลี้ยงขนาด 35x10 มิลลิเมตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ในตู้ควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส ในบรรยากาศที่มีความเข้มข้นคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 จากนั้นสร้างรอยแผลโดยการขูดด้วย sterile pipette tip ขนาด 200 ไมโครลิตร แล้วล้างเซลล์ที่หลุดออกด้วยสารละลาย PBS (phosphate buffer saline) พีเอช 7.4 เติมอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีสารสกัดจากส่วนต่าง ๆ ของส้มโอพันธุ์ขาวใหญ่ เลือกใช้ช่วงความเข้มข้นที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ (อ้างอิงผลการทดสอบจาก MTT assay) โดยมีตัวแปรควบคุมในการทดลองนี้ คือ อาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีเฮกเซน หรือเมทานอล เข้มข้นร้อยละ 1 เนื่องจากสารสกัดส้มโอพันธุ์ขาวใหญ่ที่ได้จากการสกัดด้วยเฮกเซนและเมทานอล ละลายได้น้อยมากในอาหารเลี้ยงเซลล์ จึงต้องละลายในตัวทำละลายเฮกเซนและเมทานอลก่อน แล้วจึงเจือจางให้มีความเข้มข้นของตัวทำละลายทั้งสองไม่เกินร้อยละ 1 ซึ่งไม่เป็นพิษต่อเซลล์ จากนั้นนำเซลล์ HaCaT ในภาวะต่าง ๆ ไปบ่มในตู้เลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาแล้วจึงวัดหาค่าพื้นที่รอยแผลภายใต้กล้องจุลทรรศน์หัวกลับ (รุ่น CKX31, OLYMPUS, Japan) และถ่ายภาพโดยใช้กล้อง (Zeiss, Germany) คำนวณหาพื้นที่รอยแผลโดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป Zen 3.6 (Blue Edition) วัดพื้นที่เริ่มต้นการทดสอบในวันที่ทำให้เกิดเป็นรอยแผล (day 0) และคำนวณเทียบให้เป็นร้อยละ 100 ติดตามการเปลี่ยนแปลงของพื้นที่รอยแผลในวันที่ 1 และวันที่ 2 เปรียบเทียบระหว่างสภาวะควบคุมกับสภาวะที่ใส่สารสกัดจากส่วนต่าง ๆ ของส้มโอพันธุ์ขาวใหญ่ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง นำค่าที่ได้มาวิเคราะห์ค่าทางสถิติ

6. สถิติที่ใช้ในการวิจัย

การวิเคราะห์ค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ใช้วิธีการ One-way ANOVA; $p < 0.05$, (SPSS Statistics version 15)

ผลการวิจัย

1. สมบัติการต้านอนุมูลอิสระ DPPH และ ABTS ของสารสกัดจากส้มโอพันธุ์ขาวใหญ่

การประเมินความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH และ ABTS แสดงด้วยค่าความเข้มข้นของสารทดสอบที่มีผลยับยั้งจนทำให้ปริมาณอนุมูลอิสระลดลงครึ่งหนึ่ง นั่นคือค่า "IC_{50}" สารสกัดในชั้นเมทานอลที่สามารถต้านอนุมูลอิสระ DPPH ได้ดีที่สุด คือ สารสกัดจากส่วนเนื้อผล (JS) โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 1.021 ± 0.031 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งมีค่าใกล้เคียงที่สุดกับค่า IC_{50} ของสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน BHT (0.011 ± 0.001 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) สำหรับความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระชนิด ABTS ที่ดีที่สุดก็พบในสารสกัดจากชั้น

เมทานอลเช่นกัน แต่พบในส่วนของเปลือกชั้นนอก (AL) โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.126 ± 0.004 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งใกล้เคียงที่สุดกับค่า IC_{50} ของสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐานกรดแอสคอร์บิก (0.012 ± 0.002 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ทั้งนี้ค่า IC_{50} เมื่อเทียบระหว่างสารสกัดส่วนอื่น ๆ ในตัวทำละลายเมทานอลด้วยกัน พบว่าส่วนประกอบต่าง ๆ ของส้มโอมีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) (Table 2) ผลการทดสอบการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากส้มโอพันธุ์ขาวใหญ่ในชั้นเฮกเซน พบว่ามีปัญหาการละลายสารสกัดในระบบตัวทำละลาย (เมทานอล) ที่ใช้ทดสอบการต้านอนุมูลอิสระ DPPH และ ABTS โดยมีการแยกชั้นของสารสกัด จึงทำให้ไม่สามารถวัดค่าการต้านอนุมูลอิสระได้

2. ปริมาณรวมของสารประกอบฟีนอลิกในสารสกัดจากส้มโอพันธุ์ขาวใหญ่

จากผลการทดลอง พบว่า ค่าการต้านอนุมูลอิสระ DPPH และ ABTS ของสารสกัดจากส้มโอพันธุ์ขาวใหญ่ ไม่สอดคล้องกับปริมาณรวมของสารประกอบฟีนอลิก (Table 2) โดยสารสกัดจากส้มโอพันธุ์ขาวใหญ่ในชั้นเมทานอลที่มีปริมาณรวมของสารประกอบฟีนอลิกมากที่สุด คือ ส่วนเยื่อหุ้มเนื้อ (SM) มีปริมาณเทียบเท่า 3.196 ± 0.022 มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อน้ำหนักแห้ง 1 กรัม รองลงมาคือส่วนเปลือกนอก (FL) และเปลือกชั้นกลาง (AL) ซึ่งพบปริมาณเทียบเท่า 2.947 ± 0.063 และ 1.720 ± 0.021 มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อน้ำหนักแห้ง 1 กรัม ตามลำดับ ส่วนที่มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมน้อยที่สุดคือส่วนเนื้อผล (JS) ซึ่งมีปริมาณเทียบเท่า 0.083 ± 0.001 มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อน้ำหนักแห้ง 1 กรัม ทั้งนี้ปริมาณรวมของสารประกอบฟีนอลิกของแต่ละส่วนของส้มโอในชั้นเมทานอลที่ได้จากการวิเคราะห์มีค่าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) (Table 2) และปริมาณรวมของสารประกอบฟีนอลิกสามารถหาได้เฉพาะในสารสกัดจากชั้นเมทานอล เนื่องจากสารสกัดในชั้นเฮกเซนมีปัญหาเรื่องการละลาย พบว่ามีการแยกชั้นและบางส่วนตกตะกอนไม่เป็นเนื้อเดียวกันกับระบบตัวทำละลายที่ใช้ในสารละลาย Folin-Ciocalteu จึงไม่สามารถทดสอบหาปริมาณรวมของสารประกอบฟีนอลิกจากสารสกัดในชั้นเฮกเซนได้

Table 1 Summary of fresh and dry weight pertaining to distinct components - flavedo (FL), albedo (AL), segmented membrane (SM) and juice sac (JS), derived from Khao-Yai pomelo.

Pomelo part	Fresh Weight (g)	Dry Weight (g)	% Dry Weight
Flavedo (FL)	834	271	32.51
Albedo (AL)	781	280	35.84
Segmented membrane (SM)	631	250	39.62
Juice sac (JS)	1,314	202	15.38

Table 2 The assessment of antioxidant properties and total phenolic contents extracted through hexane and methanol from each segment of Khao-Yai pomelo.

Khao-Yai pomelo segments	IC_{50} (mg/mL)		Total phenolic contents (mg GAE g^{-1} DM)
	DPPH	ABTS	
Hexane extracts			
Flavedo (FL)	ND	1.149 ± 0.062	ND
Albedo (AL)	ND	ND	ND
Segmented membrane (SM)	ND	ND	ND
Juice sac (JS)	ND	ND	ND
Methanol extracts			
Flavedo (FL)	1.279 ± 0.048 [a]	0.206 ± 0.007 [b]	2.947 ± 0.063 [c]
Albedo (AL)	2.550 ± 0.076 [a]	0.126 ± 0.004 [b]	1.720 ± 0.021 [c]
Segmented membrane (SM)	1.988 ± 0.056 [a]	0.174 ± 0.008 [b]	3.196 ± 0.022 [c]
Juice sac (JS)	1.021 ± 0.031 [a]	0.544 ± 0.009 [b]	0.083 ± 0.001 [c]
Standard antioxidant agent			
BHT	0.011 ± 0.001	0.006 ± 0.0001	
Ascorbic acid	0.005 ± 0.0001	0.012 ± 0.002	
BHT	0.004 ± 0.0001	0.005 ± 0.0001	

Data is presented as mean ± standard deviation with triplicated values.

Total phenolic content is expressed as mg of Gallic acid equivalent (GAE) g^{-1} dry material (DM).

[a] IC_{50} in DPPH scavenging assay in methanolic extracts shows a significant difference at $p < 0.05$.

[b] IC_{50} in ABTS scavenging assay in methanolic extracts shows a significant difference at $p < 0.05$.

[c] Total phenolic contents in methanolic extracts shows a significant difference at $p < 0.05$.

ND is not determined due to the limitation of solubility in methanol.

3. ค่าความเป็นพิษของสารสกัดจากส้มโอพันธุ์ขาวใหญ่

การทดสอบค่าความเป็นพิษของสารสกัดจากส่วนต่าง ๆ ของส้มโอพันธุ์ขาวใหญ่ที่มีต่อเซลล์ผิวหนังมนุษย์ชนิด HaCaT โดยการทดลองใช้ตัวแปรควบคุม คือเฮกเซน และเมทานอล เข้มข้นร้อยละ 1 ในอาหารเลี้ยงเซลล์ ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารสกัดในระยะเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อพิจารณาโดยใช้เกณฑ์อัตราการอยู่รอดของเซลล์จากความเป็นพิษของสารสกัดที่ต้องมากกว่าร้อยละ 90 ขึ้นไป (อ้างอิงผลการทดลองใน Table 3) พบว่าสารสกัดจากชั้นตัวทำละลายเฮกเซนจากส่วนต่าง ๆ (เปลือกชั้นนอก เปลือกชั้นกลาง เยื่อหุ้มเนื้อ และเนื้อผล) มีค่าร้อยละการรอดของเซลล์ (% survival) ที่มีค่ามากกว่าร้อยละ 90 อยู่ในช่วงความเข้มข้น 0.04-1.71 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในขณะที่สารสกัดจากชั้นตัวทำละลายเมทานอลมีค่าร้อยละการรอดของเซลล์ที่มากกว่าร้อยละ 90 ที่แตกต่างกันในแต่ละส่วน คือ ในส่วนของเปลือกชั้นนอก (FL) อยู่ที่ความเข้มข้น 0.64-2.50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แต่ในส่วนที่เหลือ ได้แก่ เปลือกชั้นกลาง (AL) เยื่อหุ้มเนื้อ (SM) และเนื้อผล (JS) มีค่าอยู่ในช่วงความเข้มข้น 0.69-25.53 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สำหรับการทดลองที่เกี่ยวกับ "สมบัติการสมานแผลของเซลล์ HaCaT โดยสารสกัดจากส้มโอพันธุ์ขาวใหญ่" ก็ได้ใช้เกณฑ์สมบัติการละลายของสารสกัดในชั้นตัวทำละลายเฮกเซน และเมทานอลในอาหารที่ใช้เลี้ยงเซลล์เป็นเกณฑ์ที่ใช้เลือกค่าความเข้มข้นในการทดสอบต่อไป

Table 3 Cytotoxicity of pomelo extract compartments on human keratinocytes (HaCaT).

Khao-Yai pomelo segments	MTT assay	
	μg/mL	%survival (>95%)
Hexane extracts		
Flavedo (FL)	0.10 – 1.52	106.2 – 96.2
Albedo (AL)	0.11 – 1.71	107.3 – 95.7
Segmented membrane (SM)	0.10 – 1.60	102.9 – 110.1
Juice sac (JS)	0.04 – 0.61	110.9 – 104.6
Methanol extracts		
Flavedo (FL)	0.64 – 10.19	95.9 – 5.1
Albedo (AL)	0.96 – 15.30	98.0 – 89.1
Segmented membrane (SM)	0.69 – 10.97	114.8 – 123.1
Juice sac (JS)	1.60 – 25.53	117.2 – 117.4

4. สมบัติการสมานแผลของเซลล์ HaCaT ด้วยสารสกัดจากส้มโอพันธุ์ขาวใหญ่

การทดสอบสมบัติการสมานแผลของเซลล์ผิวหนังมนุษย์ชนิด HaCaT ได้ใช้เกณฑ์เลือกความเข้มข้นของสารสกัดโดยพิจารณาปัจจัย 2 ข้อ ข้อแรกคืออัตราการอยู่รอดของเซลล์จากความเป็นพิษของสารสกัดต้องมากกว่าร้อยละ 90 ขึ้นไป (อ้างอิงจากผลการวิจัยค่าความเป็นพิษจากสารสกัด) และข้อที่สองคือ ความเข้มข้นที่มากที่สุดของสารสกัดจากส้มโอพันธุ์ขาวใหญ่ที่ละลายได้ในอาหารเลี้ยงเซลล์ สำหรับการทดสอบสมบัติการสมานแผลของเซลล์ HaCaT จะเปรียบเทียบระหว่างวันที่เริ่มการทดลอง (day 0 - ยังไม่ใส่สารสกัด) กับวันที่ 2 ที่ได้รับสารสกัด (day 2) จากการทดลองพบว่าสารสกัดในชั้นตัวทำละลายเฮกเซนจากเปลือกชั้นกลาง (AL) มีช่วงความเข้มข้นที่เหมาะสมคือ 0.06-0.50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยมีค่าความเข้มข้นที่ดีที่สุดในการออกฤทธิ์สมานแผลที่ 0.25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (Fig. 3A) สารสกัดในชั้นตัวทำละลายเมทานอลจากเปลือกชั้นนอก (FL) มีช่วงความเข้มข้นที่เหมาะสม คือ 0.13-1.00 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยมีค่าความเข้มข้นที่ดีที่สุดในการออกฤทธิ์สมานแผลที่ 0.50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (Fig. 3B) และสารสกัดในชั้นตัวทำละลายเมทานอลจากเปลือกชั้นกลาง (AL) มีช่วงความเข้มข้นที่เหมาะสม คือ 0.13-1.00 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยมีค่าความเข้มข้นที่ดีที่สุดในการออกฤทธิ์สมานแผลที่ 0.13 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (Fig. 3C) ในการทดสอบสมบัติการสมานแผลของเซลล์ผิวหนังมนุษย์ชนิด HaCaT พบว่าสารสกัดจากส้มโอพันธุ์ขาวใหญ่ในส่วนที่กล่าวมาแล้วข้างต้น สามารถลดพื้นที่รอยแผลให้เล็กลงได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับตัวแปรควบคุม (เมทานอล และเฮกเซน เข้มข้นร้อยละ 1) ($p < 0.05$, one-way ANOVA, SPSSv.15)

Figure 3A

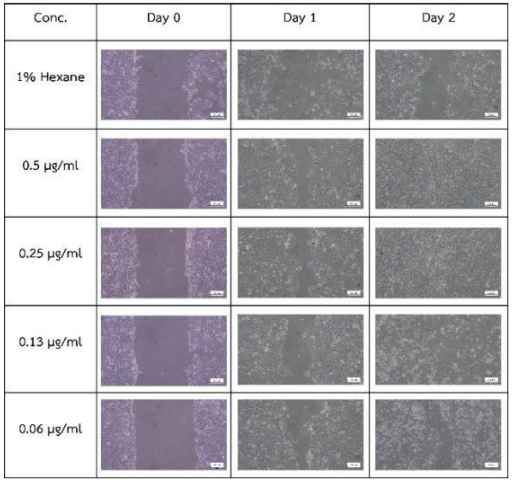


Figure 3B

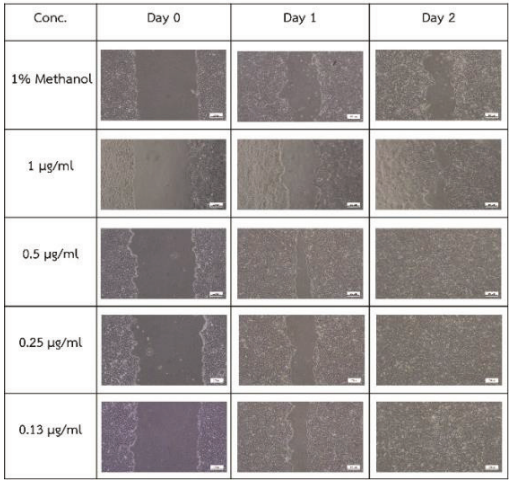


Figure 3C

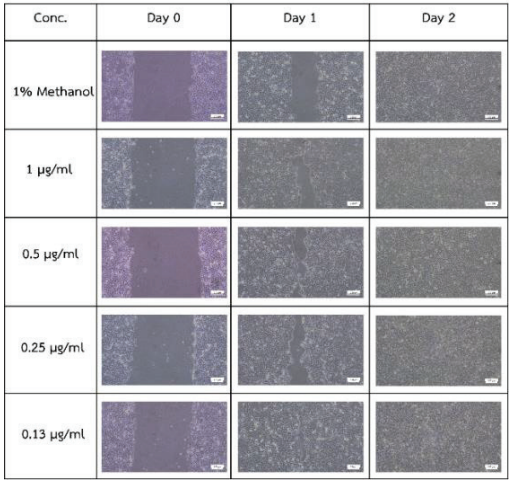


Fig. 3 Wound healing effect in HaCaT using various parts of Khao-Yai pomelo from hexane and methanol extracts and visualized under an inverted microscope (10x). Fig. 3A) hexane extract from albedo (AL); Fig. 3B) methanolic extract from flavedo (FL); and Fig. 3C) methanolic extract from albedo (AL). The analysis of the wound healing effect of various parts of Khao-Yai pomelo revealed that the flavedo (FL) extracted with methanol, has a statistically significant effect to reducing wound area ($p < 0.05$, one-way ANOVA).

วิจารณ์และสรุป

ส้มโอพันธุ์ขาวใหญ่ที่ได้นำมาศึกษาในครั้งนี้ ได้จากพื้นที่สวนส้มโอ จังหวัดสมุทรสงคราม โดยมีข้อมูลลักษณะทางสัณฐานวิทยาของพันธุ์พืช ได้แก่ ลักษณะต้น ใบ ดอก และผล ดังแสดงใน Fig. 1 สำหรับอ้างอิงการเลือกชนิดและสายพันธุ์ หรือลักษณะภายนอกเพื่อการศึกษาครั้งนี้ การศึกษาสมบัติทางชีวภาพของสารสกัดจากส่วนประกอบต่าง ๆ ของตัวอย่างส้มโอเตรียมด้วยวิธีแช่ตัวอย่างในตัวทำละลาย (maceration) คือ เฮกเซนและเมทานอล โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อสกัดสารที่มีความมีขั้วต่างกันออกมาตรวจสอบสมบัติการต้านอนุมูลอิสระ และปริมาณรวมของสารประกอบฟีนอลิกในส่วนประกอบต่าง ๆ ของผลส้มโอ ผลการทดสอบพบว่าส่วนของเนื้อผลมีน้ำหนักแห้งน้อยที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับส่วนอื่น (Table 1) อาจเป็นเพราะเนื้อผลมีน้ำเป็นองค์ประกอบหลักซึ่งมากกว่าส่วนอื่น และด้วยการใช้ระยะเวลาที่เท่ากันในการอบแห้งทำให้ส่วนอื่น ๆ ของส้มโอพันธุ์ขาวใหญ่มีสัดส่วนของน้ำหนักแห้งมากกว่า จึงมีความเป็นไปได้ที่สารออกฤทธิ์สำคัญในกลุ่มโพลีฟีนอล ฟลาโวนอยด์ และคาโรทีนอยด์ น่าจะพบได้ในส่วนที่ไม่ละลายน้ำ และละลายได้ดีในไขมัน[12] ดังนั้นส่วนของเปลือกชั้นนอก (FL) เปลือกชั้นกลาง (AL) และเยื่อหุ้มเนื้อ (SM) จึงน่าจะเป็นส่วนที่น่าสนใจในแง่การสะสมของสารออกฤทธิ์สำคัญในกลุ่มที่ได้กล่าวมาข้างต้น และผลการทดลองพบว่าการสกัดด้วยเมทานอลให้ร้อยละน้ำหนักแห้งของสารสกัดสูงกว่าการสกัดด้วยเฮกเซน (Table 1) นอกจากนี้ยังพบว่าสารสกัดจากส่วนต่าง ๆ ของผลที่สกัดด้วยเฮกเซน เมื่อนำไปทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH และ ABTS scavenging เกิดปัญหาการแยกชั้นระหว่างตัวอย่างสารสกัดและระบบตัวทำละลายเมทานอลที่ใช้ในการทดสอบ ทำให้ไม่สามารถตรวจวัดฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระในส่วนที่สกัดด้วยเฮกเซนได้ การวิจัยในครั้งนี้จึงได้เปรียบเทียบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระในสารสกัดจากส่วนต่าง ๆ ของส้มโอเฉพาะที่สกัดด้วยเมทานอลเท่านั้น ผลการทดสอบพบว่า ส่วนของผลส้มโอที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH scavenging ได้ดีที่สุดคือส่วนเนื้อผล (JS) ลำดับถัดมา ได้แก่ เปลือกชั้นนอก (FL) เยื่อหุ้มเนื้อ (SM) และเปลือกชั้นกลาง (AL) ตามลำดับ (Table 2) สอดคล้องกับผลการทดลองของ Sukkhaphet K และ Kraiklang R, พ.ศ. 2557[13] ที่ได้ศึกษาการต้านอนุมูลอิสระในส้มโอสายพันธุ์ต่าง ๆ และพบว่าส่วนของเนื้อผล มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้ดีที่สุด ทั้งนี้ผลการทดสอบมีความแตกต่างจากรายงานของ Pichaiyongvongdee S และคณะ, พ.ศ. 2557[14] ที่พบว่าเปลือกชั้นกลางมีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระที่ดีที่สุด ด้วยวิธี DPPH scavenging สำหรับการทดสอบหาปริมาณฟีนอลิกรวมในส้มโอพันธุ์ขาวใหญ่พบว่า มีมากที่สุดในเยื่อหุ้มเนื้อ (Table 2) ซึ่งแตกต่างจากรายงานของ Chang SQ และ Azrina A, พ.ศ. 2560[15] ที่พบว่าเปลือกชั้นกลาง (AL) มีปริมาณรวมของสารประกอบฟีนอลิกมากที่สุด ดังนั้นจะเห็นได้ว่าความแตกต่างระหว่างปริมาณรวมของสารประกอบฟีนอลิก ในส่วนต่าง ๆ ของผลส้มโอ อาจเป็นผลจากหลายปัจจัย เช่น สายพันธุ์ของส้มโอ ช่วงเวลาเก็บเกี่ยว ลักษณะของภูมิประเทศ ตลอดจนพื้นที่เพาะปลูก รวมทั้งยังขึ้นกับวิธีการสกัดและตัวทำละลายที่ใช้ สำหรับการวิจัยครั้งนี้ใช้วิธีอบแห้งที่ 60 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้วจึงบ่มในตัวทำละลายเฮกเซนและเมทานอล และช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการสกัดด้วยการใช้วิธี sonication ส่วน Chang SQ และ Azrina A, พ.ศ. 2560[15] เลือกใช้วิธีทำแห้งแบบแช่แข็ง (freeze dry) และนำผงที่ได้มาสกัดในเมทานอล 3 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส แล้วจึง

กรองสารสกัดออกมาทดสอบ อย่างไรก็ตาม ทั้งสองการทดลองพบว่าปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมไม่มีความสอดคล้องกับฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ[15] ทั้งนี้อาจเป็นเพราะสารประกอบในกลุ่มฟีนอลิกซึ่งเป็นสารพฤกษเคมี (phytochemical) ที่พบในพืชนั้น นอกจากมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระแล้วยังอาจมีฤทธิ์ทางชีวภาพอื่น ๆ อีก เช่น การต้านการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง (*in vitro* experiment) ความสามารถในการต้านการอักเสบ การลดน้ำตาล และไขมันในเลือด[16]

สมบัติการสมานแผลของสารสกัดส้มโอพันธุ์ขาวใหญ่ที่พบในการศึกษาครั้งนี้ เมื่อทดสอบด้วยวิธี scratch assay โดยใช้เซลล์ผิวหนังมนุษย์ชนิด HaCaT พบว่า สารสกัดที่มีสมบัติที่ดีในการช่วยสมานแผลควรต้องมีผลต่อการอยู่รอดของเซลล์ที่ต้องมากกว่าร้อยละ 90 ขึ้นไป ซึ่งเป็นข้อมูลที่ได้จากการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ด้วยวิธี MTT และยังควรต้องมีสมบัติละลายได้ดีในอาหารเลี้ยงเซลล์ด้วย แต่สารสกัดส้มโอที่ได้ในการวิจัยครั้งนี้ละลายในอาหารเลี้ยงเซลล์โดยตรงได้ไม่ดีต้องใช้ตัวทำละลายช่วย จึงทำให้เกิดข้อจำกัดจากความเป็นพิษของตัวทำละลายที่มีต่อเซลล์ ซึ่งต้องเจือจางลงให้เหลือเพียงร้อยละ 1 ทำให้การทดสอบฤทธิ์การสมานแผลโดยใช้เซลล์ HaCaT ต้องใช้ปริมาณสารสกัดระดับไมโครกรัมซึ่งต่างจากการทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระซึ่งไม่ได้ทดสอบต่อเซลล์จึงใช้ปริมาณสารสกัดได้ในระดับมิลลิกรัม จากผลการวิจัยครั้งนี้พบสารสกัดที่มีสมบัติละลายน้ำได้ดีและมีความเป็นพิษต่อเซลล์ต่ำในสารสกัดในชั้นตัวทำละลายเฮกเซนจากเปลือกชั้นกลาง (AL) และสารสกัดในชั้นตัวทำละลายเมทานอลจากเปลือกชั้นนอก (FL) และเปลือกชั้นกลาง (AL) (Fig. 3) โดยสามารถลดพื้นที่แผลลงได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเทียบกับตัวแปรควบคุม สอดคล้องกับรายงานของ Ahmad AA และคณะ, พ.ศ. 2561[5] ที่ทดสอบการสมานแผลในหนูที่มีภาวะเป็นโรคเบาหวาน โดยใช้สารสกัดจากเปลือกส้มโอ (pomelo peel extract; PPE) ซึ่งพบว่าสามารถสมานแผลในหนูที่เป็นเบาหวาน เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมหนูที่เป็นเบาหวานและกลุ่มควบคุมหนูที่ไม่ได้เป็นเบาหวาน สอดคล้องกับงานวิจัยในครั้งนี้ที่มีส่วนประกอบของส้มโอ คือ เปลือกชั้นนอก (FL) และเปลือกชั้นกลาง (AL) ซึ่งมีความสามารถในการสมานแผลได้ดี ดังนั้นสารสกัดจากส้มโอพันธุ์ขาวใหญ่จึงมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ในการสมานแผล ทั้งในส่วนเนื้อและเปลือก[5] นอกจากนี้ยังมีรายงานเกี่ยวกับการศึกษาสมบัติการสมานแผลที่ทดสอบในเซลล์ผิวหนังมนุษย์ชนิด HaCaT ของสารสกัดที่ได้จากส่วนของเปลือกและเนื้อผลของ grapefruit (*Citrus* × *aurantium* f. *aurantium*) ที่มีสมบัติในการสมานแผลสอดคล้องกับผลการวิจัยที่ได้จากการศึกษาในส้มโอพันธุ์ขาวใหญ่เช่นกัน[17]

ความแตกต่างระหว่างสมบัติทางชีวภาพในแต่ละส่วนของส้มโอพันธุ์ขาวใหญ่ อาจมีสาเหตุมาจากส่วนประกอบสำคัญในสารสกัดจากส่วนต่าง ๆ ของส้มโอมีองค์ประกอบของสารออกฤทธิ์ที่มีโครงสร้าง และมีสมบัติทางชีวภาพที่แตกต่างกันด้วย ทั้งนี้อาจกล่าวได้เบื้องต้นจากการวิจัยครั้งนี้ว่าความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัด อาจไม่มีความสัมพันธ์กับสมบัติการสมานแผลในแต่ละส่วนประกอบของส้มโอพันธุ์ขาวใหญ่ และการที่พบว่าส่วนใดของส้มโอพันธุ์ขาวใหญ่มีสมบัติใดนั้นเป็นขั้นตอนเบื้องต้น งานวิจัยที่ควรดำเนินต่อไปคือการศึกษาว่าสารออกฤทธิ์นั้นคือสารใด โดยแยกส่วนประกอบที่อยู่ในสารสกัดจากส้มโอพันธุ์ขาวใหญ่ ซึ่งเป็นความท้าทาย ที่จะนำไปสู่การสร้างองค์ความรู้ที่สำคัญในทางเภสัชศาสตร์และทางการแพทย์ในอนาคตต่อไปได้

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ ศาสตราจารย์ฤทัยวรรณ โต๊ะทอง มหาวิทยาลัยมหิดล และ ศาสตราจารย์ประณีต โอปณะโสภิต มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ที่ให้ความอนุเคราะห์เซลล์ผิวหนังมนุษย์ ชนิด HaCaT สำหรับการวิจัยในครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

1. Niyomdham C. *Citrus maxima* (Burm.) Merr. Verheij, E.W.M. and Coronel, R.E. (Editors). Plant Resources of South-East Asia No. 2. Edible fruits and nuts. PROSEA Foundation, Bogor, Indonesia. Database record: 1991 [cited 2023 Dec 4]. Available from https://he01.tci-thaijo.org/index.php/jmt-amtt/information/authors
2. Yang Z, Chen Q. Enzymatic preparation and characterization of honey pomelo peel cellulose and its cellulose nanofibers. Ind Crops Prod 2023; 206: 117655.
3. Ni J, Shangguan Y, Jiang L, He C, Ma Y, Xiong H. Pomelo peel dietary fiber ameliorates alterations in obesity-related features and gut microbiota dysbiosis in mice fed on a high-fat diet. Food Chem 2023; 100993: 1-9.
4, Mäkynen K, Jitsaardkul S, Tachasamran P, *et al.* Cultivar variations in antioxidant and antihyperlipidemic properties of pomelo pulp (*Citrus grandis* [L.] Osbeck) in Thailand. Food Chem 2013; 139: 735-43.
5. Ahmad AA, II AI Khalifa, Abudayeh ZH. The role of pomelo peel extract for experimentally induced wound in diabetic rats. Pharmacogn J 2018; 10: 885-91.
6. Thai Geographical Indication. [homepage on the Internet] Department of Intellectual Property Thailand [cited 2023 Dec 4]. Available from https://www.ipthailand.go.th/th/gi.html
7. Xie J, Schaich KM. Re-evaluation of the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl free radical (DPPH) assay for antioxidant activity. J Agric Food Chem 2014; 62: 4251-60.
8. Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. Free Radic Biol Med 1999; 26: 1231-7.
9. Ainsworth EA, Gillespie KM. Estimation of total phenolic content and other oxidation substrates in plant tissues using Folin-Ciocalteu reagent. Nat Protoc 2007; 2: 875-7
10. Stockert JC, Blázquez-Castro A, Cañete M, Horobin RW, Villanueva A. MTT assay for cell viability:intracellular localization of the formazan product is in lipid droplets. Acta Histochemica 2012; 114: 785-96.
11. Cappiello F, Casciaro B, Mangoni ML. A novel *In vitro* wound healing assay to evaluate cell migration. J Vis Exp 2018; 133: 56825.

12. Shahbaz MU, Arshad M, Mukhtar K, *et al*. Natural plant extracts: an update about novel spraying as an alternative of chemical pesticides to extend the postharvest shelf life of fruits and vegetables. Molecules 2022; 27: 5152-71.
13. Sukkhaphet K, Kraiklang R. Contents of total phenolic, total flavonoid, vitamin C and antioxidant activity in Khoa-Hom, Tong-Dee and Manee-E-San Pomelo Strain. KKUJPHR 2022; 15: 14-28.
14. Pichaiyongvongdee S, Rattanapun B, Haruenkit R. Total polyphenol content and antioxidant properties in different tissues of seven Pomelo (*Citrus grandis* (L.) Osbeck) Cultivars. Kasetsart J (Nat. Sci.) 2014; 48: 989-96.
15. Chang SQ, Azrina A. Antioxidant content and activity in different parts of pomelo [*Citus grandis* (L.) Osbeck] by-products. Acta Horticulturae 2017; 1152: 27-34.
16. Alu'datt MH, Rababah T, Alhamad MN, *et al*. Occurrence, types, properties, and interactions of phenolic compounds with other food constituents in oil-bearing plants. Crit Rev Food Sci Nutr 2018; 58: 3209-18.
17. Savci Y, Kirbas QK, Bozkurt BT, *et al*. Grapefruit-derived extracellular vesicles as a promising cell-free therapeutic tool for wound healing. Food & Function 2021; 12: 5144-56.