บทที่ 1

บทนำ

บทนำต้นเรื่อง

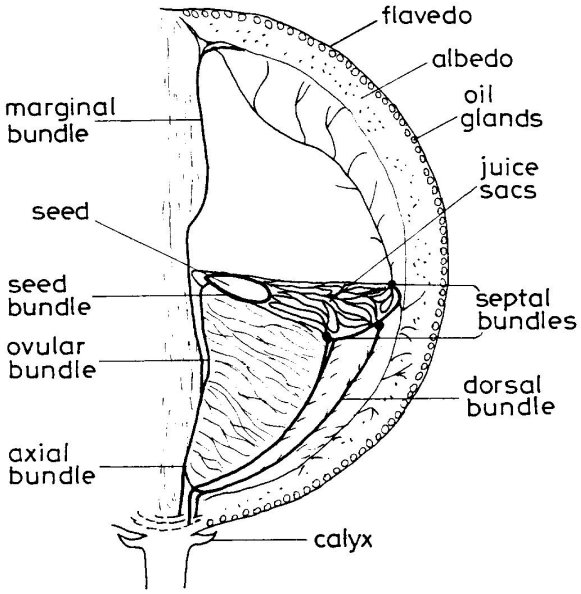
ปัจจุบันมีการใช้สารสังเคราะห์หรือยาปฏิชีวนะประยุกต์ในอาหารและยา เป็นเหตุให้มีการตกค้างของสารเคมีส่งผลเสียต่อสุขภาพ จึงหันมาสนใจสารสกัดจากพืชประกอบกับประเทศไทยมีพืชหลากหลายชนิดโดยมีการนำไปใช้ประโยชน์อย่างมากมายไม่ว่าจะเป็นยาในแพทย์แผนโบราณ เครื่องสำอาง ส่วนประกอบของอาหารทั้งคาวหวาน และอุตสาหกรรมสปา โดยเฉพาะน้ำมันหอมระเหย ซึ่งกำลังได้รับความนิยมเป็นอย่างยิ่ง เนื่องจากมีกลิ่นเป็นที่ยอมรับทำให้รู้สึกผ่อนคลาย สารสกัดจากพืชเป็นสารอินทรีย์ที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพหลายชนิด เช่น แอนทราควิโนน (anthraquinone) คูมาริน (coumarin) ฟลาโวนอยด์ (flavonoid) แทนนิน (tannin) น้ำมันหอมระเหย (essential oil) และวิตามิน (vitamin) เป็นต้น การประยุกต์สารสกัดจากพืชจึงเป็นเรื่องที่น่าสนใจเนื่องจากมีสมบัติเป็นสารยับยั้งจุลินทรีย์ สารต่อต้านอนุมูลอิสระ สารยับยั้งเซลล์มะเร็ง สารออกฤทธิ์ต่อศัตรูพืช เป็นต้น และสารสกัดบางชนิดมีกลิ่น รสเป็นที่ยอมรับเมื่อนำมาใช้ในอาหารเนื่องจากมีสารพวกน้ำมันหอมระเหยซึ่งจะพบในพืชชนิดต่าง ๆ รวมทั้งพืชตระกูลส้ม (citrus fruit)

น้ำมันหอมระเหยเป็นน้ำมันที่พืชผลิตขึ้นมาตามธรรมชาติ เก็บไว้ในส่วนต่าง ๆ ของพืช เช่น กลีบดอก ใบ ผิวเปลือกของผล เกสร ราก เปลือกของลำต้น โดยมีสมบัติในการระเหยได้เร็วเมื่อได้รับความร้อนจะระเหยออกมารอบ ๆ ทำให้ต้นไม้มีกลิ่นอบอวลไปทั่ว บางกลิ่นช่วยดึงดูดให้แมลงมาช่วยผสมเกสร รักษาความชุ่มชื้นให้แก่พืชนั้น ๆ (สุรัตน์วดี จิวะจินดา, 2545) บางกลิ่นก็ช่วยปกป้องการรุกรานจากศัตรู

พืชตระกูลส้มเป็นไม้ผลในเขตร้อนที่มีคุณค่าทางโภชนาการสูง และเป็นไม้ผลเศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศ เช่น ส้มเขียวหวาน (*Citrus reticulate*) ส้มโอ (*Citrus maxima* Merr.) มะกรูด (*Citrus hystrix* DC.) และมะนาว (*Citrus aurantifolia* Swingle) เป็นต้น เมื่อ 25 ปีที่ผ่านมาอุตสาหกรรมการแปรรูปส้มมีการเติบโตอย่างรวดเร็วและพัฒนามาเรื่อย ๆ จนกลายเป็นอุตสาหกรรมที่สำคัญ เนื่องจากพืชตระกูลส้มมีกลิ่น รสที่มีลักษณะเฉพาะตัวผู้บริโภคยอมรับ ซึ่งนิยมบริโภคเป็นอาหารและเครื่องดื่ม (Kale and Adsule, 1995 อ้างโดย Yadav *et al*., 2004) ในประเทศอเมริกามีการนำเข้าน้ำมันหอมระเหยจากมะนาวในปริมาณที่สูงมาก โดยนำมาประยุกต์ในการแต่งกลิ่นรสขนมหวานพวกเบเกอรี น้ำหอมและยารักษาโรค (Lucker *et al*., 2002) ส้มชนิดต่าง ๆ เป็นผลไม้ที่

สามารถหาซื้อได้ตลอดทั้งปี ผลของพืชตระกูลนี้บริโภคในรูปผลไม้ยกเว้นชนิดที่มีรสเปรี้ยวมาก เช่น มะกรูด มะนาว ซึ่งนำมาใช้เป็นเครื่องเทศปรุงแต่งอาหาร ทำยาสมุนไพร การนำผลพืชตระกูลส้มมาใช้ประโยชน์ใด ๆ นั้นส่วนใหญ่พบว่าจะใช้ส่วนของเนื้อใน และทิ้งส่วนผิวเปลือกโดยไม่ได้นำมาใช้ประโยชน์แต่อย่างใด ยกเว้นผู้บริโภคบางคนหรืออุตสาหกรรมบางประเภทที่อาจนำผิวเปลือกผลส้มบางชนิดมาทำให้เกิดประโยชน์ด้วยกรรมวิธีต่าง ๆ เช่น ผิวส้มโอแช่อิ่ม ผิวส้มแห้งเค็ม มะนาวดอง เป็นต้น (ธิราภา แสนเสนา และนพดล กิตติวราฤทธิ์, 2536)

ในอุตสาหกรรมการผลิตน้ำส้มจะมีส่วนกากและเปลือกเหลือใช้เป็นจำนวนมากจึงได้นำมาเป็นแหล่งของใยอาหาร โดยมีปริมาณใยอาหาร 52.89 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักแห้ง ซึ่งมีสีและกลิ่นที่เฉพาะตัวสามารถนำไปใช้ในผลิตภัณฑ์อาหารได้หลากหลาย (นิธิมา อรรถวานิช และปราณี อ่านเปรื่อง, 2546) นอกจากนี้ในกระบวนการแปรรูปน้ำมะกรูดผงอบแห้งแบบแช่เย็นจะมีส่วนของเหลือนั่นก็คือผิวเปลือกมะกรูด ซึ่งสามารถนำไปสกัดน้ำมันหอมระเหยได้ (Chaisawadi *et al*., 2005)



ภาพที่ 1 โครงสร้างของผลส้ม

Figure 1. Structure of citrus fruit.

ที่มา : Roy และ Goldschmidt (1996)

จะเห็นว่าน้ำมันหอมระเหยผลิตมาจากส่วนผิวเปลือกหรือ flavedo ของผลดังแสดงในภาพที่ 1 ซึ่งชั้นนี้เป็น epidermis ปกคลุม exocarp ที่เป็น parenchymatous cell โดยปกคลุมต่อมน้ำมัน (oil glands) และชั้นต่อมาเป็นชั้น albedo เป็นเนื้อเยื่อที่หนาคล้ายฟองน้ำมีเพคติน (pectins) ในปริมาณมาก (Lucker *et al*., 2002)

Ezeonu และคณะ (2001) รายงานว่าน้ำมันหอมระเหยที่สกัดได้จากเปลือกส้มเกลี้ยง (*Citrus sinensis*) และมะนาว (*Citrus aurantifolia* Swingle) สามารถฆ่าแมลงวัน ยุง และแมลงสาบได้ เนื่องจากพืชตระกูลส้มมีสารสำคัญหลายชนิด เช่น limonene, γ-terpinene, α-terpinene เป็นต้น สารสำคัญเหล่านี้โดยส่วนใหญ่พบอยู่ในน้ำมันหอมระเหย นอกจากน้ำมันหอมระเหยมีสมบัติในเรื่องกลิ่น รสเป็นที่ยอมรับแล้วยังมีสมบัติในการยับยั้งแบคทีเรีย รา ไวรัสบางชนิด มีฤทธิ์เป็นยากระตุ้น มีการศึกษาฤทธิ์ทางด้านเภสัชวิทยาของสารสกัดที่ได้จากเปลือกผิวส้มชนิดต่าง ๆ เพื่อนำมาใช้ประโยชน์ทางการเป็นยาและอื่น ๆ โดยธิราภา แสนเสนา และนภดล กิตติวราฤทธิ์ (2536) พบว่าสารสกัดเอทานอล 80 เปอร์เซ็นต์จากมะกรูดและมะนาวมีกิจกรรมการยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกได้ดี Caccioni และคณะ (1998) พบว่าน้ำมันหอมระเหยจาก citrange ยับยั้ง *Penicillium digitatum* ได้ดีกว่า *Penicilliumitalicum* ส่วน Chaisawadi และคณะ (2003) ศึกษาการยับยั้งจุลินทรีย์ของสมุนไพรไทย 15 ชนิด ซึ่งหาได้ง่ายและราคาถูก ทดสอบด้วยวิธี agar diffusion พบว่าหอมแดง ผิวมะกรูดและมะนาวเป็นสมุนไพรที่ใช้ประกอบอาหารที่มีศักยภาพสูงในการยับยั้งเชื้อก่อโรค 3 ชนิดคือ *Bacillus cereus*, *Salmonella typhi* และ *Staphylococcus aureus*

ดังนั้นโครงการวิจัยเพื่อวิทยานิพนธ์ครั้งนี้จึงมุ่งเน้นที่จะศึกษากิจกรรมการยับยั้งจุลินทรีย์ของสารสกัดและน้ำมันหอมระเหยจากพืชตระกูลส้ม โดยคัดเลือกพืชตระกูลส้มจากวิธีการสกัดด้วยเอธิลอะซิเตตและการกลั่นด้วยไอน้ำ จากนั้นนำสารสกัดแต่ละวิธีมาทดสอบกิจกรรมการยับยั้งจุลินทรีย์ทั้งแบคทีเรีย ยีสต์ และรารวม 8 สายพันธุ์ แล้วนำสารสกัดและน้ำมันหอมระเหยที่มีกิจกรรมการยับยั้งที่ดีที่สุดของแต่ละวิธีวิเคราะห์หาองค์ประกอบเชิงคุณภาพด้วย gas chromatograph-mass spectrometry (GC-MS) จากนั้นจึงศึกษาปัจจัยต่าง ๆ ประกอบด้วยพีเอช อุณหภูมิ และส่วนประกอบของอาหาร (แป้ง น้ำมันปาล์ม และหางนม) ที่มีผลต่อประสิทธิภาพการยับยั้งจุลินทรีย์ของสารสกัดจากพืชตระกูลส้ม รวมทั้งศึกษาอัตราการรอดชีวิตของจุลินทรีย์ด้วยวิธี plate count และทำ TEM ท้ายสุดศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเพื่อเป็นแนวทางในการประยุกต์ในอาหารและยารักษาโรคต่อไป

บทตรวจเอกสาร

1. พืชตระกูลส้ม

Family Rutaceae

Subfamily Aurantioideae

Division Lignosae

Subphylum Dicotyledoneae

ส้มอยู่ในจีนัส *Citrus* มีมากกว่า 1,000 สปีชีส์ เป็นไม้ผลขนาดเล็ก เติบโตกระจายอยู่ทั่วโลก โดยมากมีน้ำมันหอมระเหยในใบ ดอก และผล (Roy and Goldschmidt, 1996) ส้มที่สำคัญมีดังนี้

1.1 มะกรูด (kaffir lime, leech lime และ mauritius) มีชื่อวิทยาศาสตร์คือ *Citrus hystrix* DC. เป็นไม้ผลยืนต้นขนาดเล็กถึงกลางสูง 10-15 เมตร ลำต้นสีเทาอมน้ำตาล เปลือกค่อนข้างฉ่ำน้ำ มีหนามแหลมยาวตามลำต้นและกิ่งก้าน ลักษณะทรงพุ่ม ใบเดี่ยวคอดตรงกลาง ดอกสมบูรณ์เพศ ผลค่อนข้างกลมเป็นผลเดี่ยว ผิวเปลือกนอกขรุขระเป็นคลื่น บริเวณผิวมีต่อมน้ำมันกระจายอยู่ทั่วไปและมีจุกที่ขั้วและก้นผล ผลอ่อนมีสีเขียวแก่ เมื่อผลสุกจะเปลี่ยนเป็นสีเหลืองขนาดผลเท่ากับผลมะนาวหรือใหญ่กว่าเล็กน้อย ภายในผลมีเมล็ดจำนวนมาก มีประโยชน์ทางด้านอาหารนิยมใช้ใบปรุงแต่งกลิ่นคาวอาหาร ส่วนน้ำมะกรูดช่วยถนอมอาหาร เมื่อนำใบมะกรูดมากลั่นด้วยไอน้ำจะให้น้ำมันหอมระเหยในปริมาณ 1.29 เปอร์เซ็นต์ สำหรับผิวมะกรูด 6-7 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งน้ำมันหอมระเหยจากมะกรูดจะมีกรดซิตริก วิตามินซี และกรดอินทรีย์ชนิดอื่น ๆ ทางด้านสมุนไพรมีคุณสมบัติแก้ไอ เจ็บคอ แก้พิษฝีภายใน แก้ปวดท้อง (ปิยะ เฉลิมกลิ่น, 2541) นอกจากมะกรูดเป็นสมุนไพรที่ใช้เป็นยาแพทย์แผนโบราณแล้ว ปัจจุบันยังนิยมใช้ในอุตสาหกรรมสปาและเครื่องสำอาง โดยเฉพาะในด้านการบำรุงผมและหนังศีรษะ

นอกจากนี้มะกรูดยังมีสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพในการยับยั้งราและแบคทีเรียได้หลายชนิด ปัจจุบันความต้องการมะกรูดของตลาดในประเทศและต่างประเทศมีแนวโน้มสูงขึ้น จากการทดลองผลผลิตในหน่วยบริการอุตสาหกรรม มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรีพบว่ามะกรูด 1 ตันได้น้ำมะกรูด 80 กิโลกรัม ผิวมะกรูด 300 กิโลกรัม เนื้อมะกรูด 604 กิโลกรัม และเมล็ดมะกรูด 16 กิโลกรัม ซึ่งทำให้ได้ผลผลิตเป็นมะกรูดผง 13.5 กิโลกรัม น้ำมันหอมระเหยมะกรูด 6 ลิตร ผิวเปลือกมะกรูดผง 160 กิโลกรัม เนื้อมะกรูดอบแห้ง 240 กิโลกรัม เมล็ดมะกรูดบดย่อย 12 กิโลกรัม (Chaisawadi *et al*., 2005)

1.2 มะนาว (lime) มีชื่อวิทยาศาสตร์คือ *Citrus aurantifolia* Swingle เป็นไม้ยืนต้นขนาดเล็ก ทรงพุ่ม มีหนามตามต้น ก้านใบสั้น ดอกเล็กมีสีขาวอมเหลืองกลิ่นหอมอ่อน ๆ มีผลกลมเปลือกบางเรียบและมีน้ำมันหอมระเหย มีฤทธิ์ขับลม แก้ท้องอืดท้องเฟ้อได้ โดยทั่วไปมะนาวเป็นเครื่องเทศ

ใช้เป็นส่วนประกอบและปรุงแต่งรสอาหาร นอกจากนี้มีสรรพคุณทางยา แก้เจ็บคอ แก้ซางเด็ก แก้พิษฝีภายใน รักษาบาดแผลเรื้อรัง รักษาเกลื้อน (Sotheeswaran and Doyle, 1998)

1.3 ส้มโอ (pomelo) มีชื่อวิทยาศาสตร์คือ *Citrus maxima* Merr. เป็นไม้ผลยืนต้นสูง 5-10 เมตร แตกกิ่งก้านสาขาซึ่งมีขนและหนามเล็ก ๆ ใบประกอบมีใบย่อยใบเดี่ยวเรียงสลับกัน ผลเป็นรูปทรงกลม บางพันธุ์ตรงขั้วมีจุกสูงขึ้นมาเหนือผิวผล ตอนผลอ่อนมีสีเขียวเมื่อแก่จัดเปลี่ยนเป็นสีเขียวอมเหลืองผิวของผลไม่เรียบ ผิวผลมีน้ำมันหอมระเหย มีการนำไปใช้ประโยชน์ส่วนของเปลือกผลสีขาวสามารถเชื่อมเป็นอาหารหวาน เนื้อผลรับประทานเป็นผลไม้ได้ (ปิยะ เฉลิมกลิ่น, 2541)

1.4 ส้มจุก (neck orange) มีชื่อวิทยาศาสตร์คือ *Citrus reticulate* Blanco เป็นส้มที่มีรูปทรงกลม ตรงหัวจะเป็นมนป้านยื่นขึ้นไปคล้ายจุกจึงเรียกกันว่า “ส้มจุก” ตามภาษาท้องถิ่นภาคใต้เรียกว่า “ส้มแป้นหัวจุก” หรือ “ส้มจุกจะนะ” เนื่องจากเดิมมีการปลูกกันมากที่อำเภอจะนะ จังหวัดสงขลา ผลมีสีเขียว กลิ่นหอม ลักษณะโตกว่าส้มเขียวหวาน เปลือกหนามีต่อมน้ำมันหอมระเหย รสชาติหวานอมเปรี้ยว มีกลิ่นหอม (มนตรี แสนสุข, 2543)

1.5 ส้มโชกุน (chugun) มีชื่อวิทยาศาสตร์คือ *Citrus reticulate* cv Chugun เป็นส้มเขียวหวานที่ได้จากการผสมพันธุ์ระหว่างส้มเขียวหวานธรรมดากับส้มจีนพันธุ์บิกกาจากซัวเถา ส้มโชกุนมีลักษณะที่พิเศษคือมีรสหวานเข้ม ไม่มีกาก กลิ่นหอมคล้ายส้มจีน ผลส้มมีทรงกลมแป้นเล็กน้อย ส่วนสูงจะสั้นกว่าส่วนกว้าง ผลส้มขนาดกลางสูงประมาณ 5.9 เซนติเมตร และกว้าง 6.8 เซนติเมตร ส่วนผลที่มีขนาดโตจะสูงประมาณ 6.5 เซนติเมตร กว้าง 7.5 เซนติเมตร ด้านปลายผลราบเป็นแอ่งตื้น ๆ ฐานผลส่วนใหญ่มน ผิวผลเรียบ มีตุ่มน้ำมันหอมระเหยเกิดถี่เต็มผิวผล ผิวผลแก่จัดมีสีเขียวอมเหลือง เปลือกบาง ล่อน ปอกง่าย (พจมาลย์ ลาภลือชา, 2544)

1.6 ส้มเช้ง (acidless orange) มีชื่อวิทยาศาสตร์คือ *Citrus paradisi* เป็นไม้พุ่มยืนต้นขนาดกลางแตก กิ่งก้านสาขามาก มีใบเป็นใบประกอบ มีดอกเดี่ยวหรือดอกช่อ ผลเป็นผลเดี่ยวกลมผลฉ่ำน้ำเนื่องจากมีถุงน้ำจำนวนมาก เนื้อในมีสีเหลืองนวลเป็นกลีบ เปลือกบางมีต่อมน้ำมันหอม-ระเหย เมื่อผลสุกผิวเปลี่ยนเป็นสีเหลืองอมเขียว การใช้ประโยชน์นอกจากรับประทานเป็นผลไม้แล้วยังมีสรรพคุณเป็นยา โดยเปลือกแก้ลมวิงเวียน จุกเสียดแน่นท้อง (วันดี กฤษณพันธ์, 2539)

1.7 ส้มจี๊ด (round kumquat) มีชื่อวิทยาศาสตร์คือ *Citrus japonica* Thunb เป็นไม้พุ่มขนาดกลางแตกแขนงเป็นพุ่มแน่น ใบรูปไข่ มีสีเขียวสดเป็นมัน ดอกเดี่ยวแต่มักออกรวมกันเป็นกลุ่มมีสีขาว ติดผลดก ผลกลมเหมือนส้มทั่วไปแต่มีขนาดเล็ก มีต่อมน้ำมันหอมระเหยเล็ก ๆ อยู่รอบผล ผลสุกมีสีเหลือง รับประทานแทนมะนาวได้เนื่องจากมีรสเปรี้ยวคล้ายมะนาว มีสรรพคุณทางยา แก้ไอขับเสมหะ อมแก้เจ็บคอ (วันดี กฤษณพันธ์, 2539)

2. สารประกอบที่พบในน้ำมันหอมระเหยจากพืชตระกูลส้ม

น้ำมันหอมระเหยจากพืชประกอบด้วยสารเคมีหลาย ๆ กลุ่มรวมกัน การหาส่วนประกอบของน้ำมันหอมระเหยนิยมใช้ gas chromatography mass spectrometry (GC-MS), high performance liguid chromatography (HPLC) และ nuclear magnetic resonance (NMR) สารประกอบหลักคือ ไฮโดรคาร์บอน (hydrocarbon) สารประกอบออกซิจิเนต (oxygenated compound) และสารประกอบพวกซัลเฟอร์ ซึ่งพบในพืชบางชนิดเท่านั้น กลิ่นและรสของน้ำมันหอมระเหยส่วนใหญ่เกิดมาจากสารประกอบออกซิจิเนต ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ชนิดของสารประกอบที่พบในน้ำมันหอมระเหย

Table 1. Classes of compounds found in essential oils.

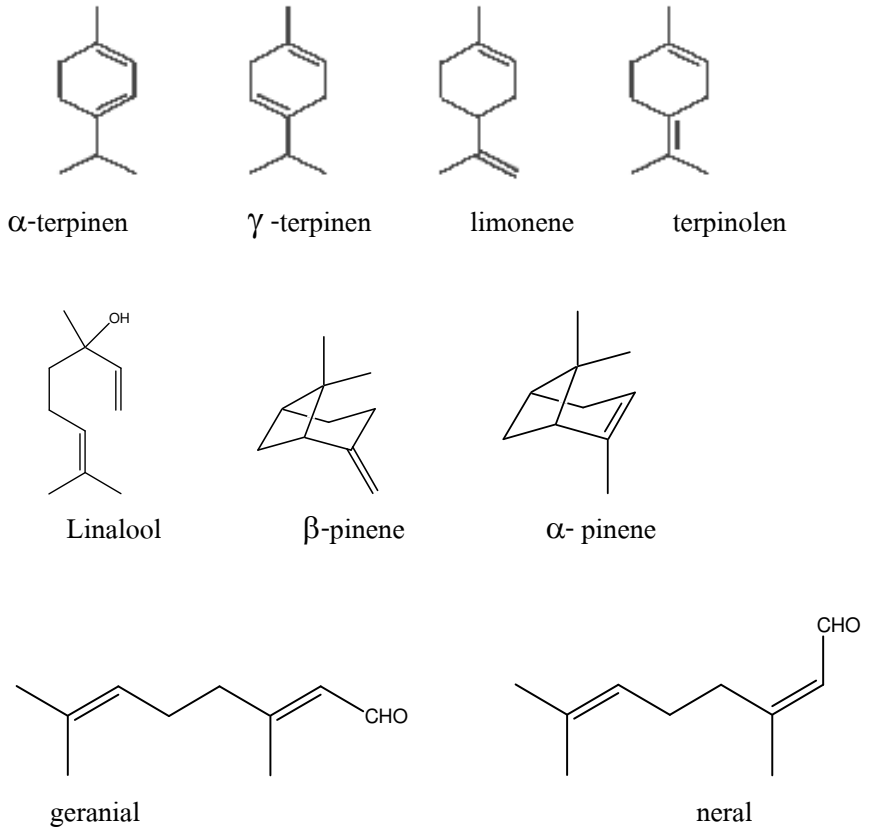
Classes of compounds	Components
Hydrocarbon	Terpenes
Oxygenated	alcohols, aldehydes, ketones, esters, phenols, oxides, peroxides, lactones, acid, furans, ethers
Other	sulphur

ที่มา : Tisserand และ Balacs (1995)

น้ำมันหอมระเหยจากพืชตระกูลส้มพบได้มากในส่วนของ flavedo oil gland และ albedo (Caccioni *et al*., 1998) เป็นไขมันประเภทไม่อิ่มตัว และไม่เสถียร มีส่วนผสมของสารที่ระเหยง่ายและมีสารประกอบพวก monoterpene hydrocarbon เป็นส่วนใหญ่ ดังแสดงในภาพที่ 2 ซึ่งถูกทำลายได้ง่ายด้วยแสง ความร้อน การออกซิเดชัน (oxidation) และไฮเดรชัน (hydration)

นอกจากนี้ยังมี coumarins หรือ furanocoumarins เล็กน้อยและสารอนุพันธ์ในกลุ่ม flavonoids คือ hesperidine, narirunin, naringin, diosmin และ eriocitrin ซึ่งมีสมบัติเป็นสารต้านออกซิเดชัน (Del-Rio *et al*., 2004) โครงสร้างของสารประกอบที่พบในพืชตระกูลส้มส่วนใหญ่เป็นสารประกอบในกลุ่มเทอร์ปีน (terpenes) ดังแสดงในตารางที่ 2 ซึ่งมีสูตรโครงสร้างทางเคมีเป็น$(C_5H_8)_n$ มักพบได้ในรูปของ diterpenes (C_{20}), triterpenes (C_{30}) และ sesquiterpene (C_{15}) เมื่อมีการรวมตัวกับออกซิเจนจะได้สารประกอบในรูปของ terpenoids นอกจากสารพวกเทอร์ปีนแล้วยังมีสารพวกที่ให้กลิ่นรส เช่น แอลดีไฮด์และเอสเตอร์ เป็นต้น โดยส่วนใหญ่น้ำมันหอมระเหยประกอบด้วยสารประกอบ monoterpene ได้แก่ terpinen-4-ol, sabinene, myrcene, pinene ฯลฯ มีสมบัติต่อการยับยั้งจุลินทรีย์และทำลายผนังเซลล์ (Knobloch *et al*., 1988 อ้างโดย Cox *et al*., 2000) ส่วนสารประกอบออกซิจิเนตเป็น

สารที่มีสมบัติในการยับยั้งเชื้อราได้อย่างมีประสิทธิภาพสูง (Caccioni and Guizzardi, 1994 อ้างโดย Lanciotti *et al*., 2004)



ภาพที่ 2 โครงสร้างทางเคมีของสารประกอบที่พบในน้ำมันหอมระเหยจากพืชตระกูลส้ม

Figure 2. Structural formulae of components in citrus essential oil.

ที่มา : ดัดแปรจาก Ikan (1991)

Dongyan และคณะ (1998) ได้วิเคราะห์น้ำมันหอมระเหยจาก *Citrus tangerine* ของจังหวัดฮูนานในประเทศจีน ซึ่งได้จากการกลั่นด้วยไอน้ำ พบสารประกอบทั้งหมด 22 ชนิด โดยสารประกอบส่วนใหญ่เป็นเทอร์ปีนและมีสารประกอบพวก aromatic และ aliphatic เล็กน้อย

Manosroi และคณะ (1999) พบว่าน้ำมันหอมระเหยจากมะกรูด *Citrus hystrix* DC. ที่กลั่นด้วยไอน้ำประกอบด้วยสารประกอบหลากหลายชนิด เช่น β-pinene (30.6 เปอร์เซ็นต์) limonene (29.2 เปอร์เซ็นต์) sabinene (22.6 เปอร์เซ็นต์) และ citronellal (4.2 เปอร์เซ็นต์) ในน้ำมะกรูดประกอบด้วยวิตามิน กรดซิตริก และสารประกอบอื่น ๆ สอดคล้องกับ Forest Research Institute Malaysia,

2006 พบว่า β-pinene, limonene, terpinen-4-ol และ α-terpineol เป็นสารประกอบที่พบในน้ำมันหอมระเหยจากผิวมะกรูดเช่นกัน

ตารางที่ 2 เทอร์ปีนบางชนิดที่พบในน้ำมันหอมระเหย

Table 2. Some common terpenes found in essential oils.

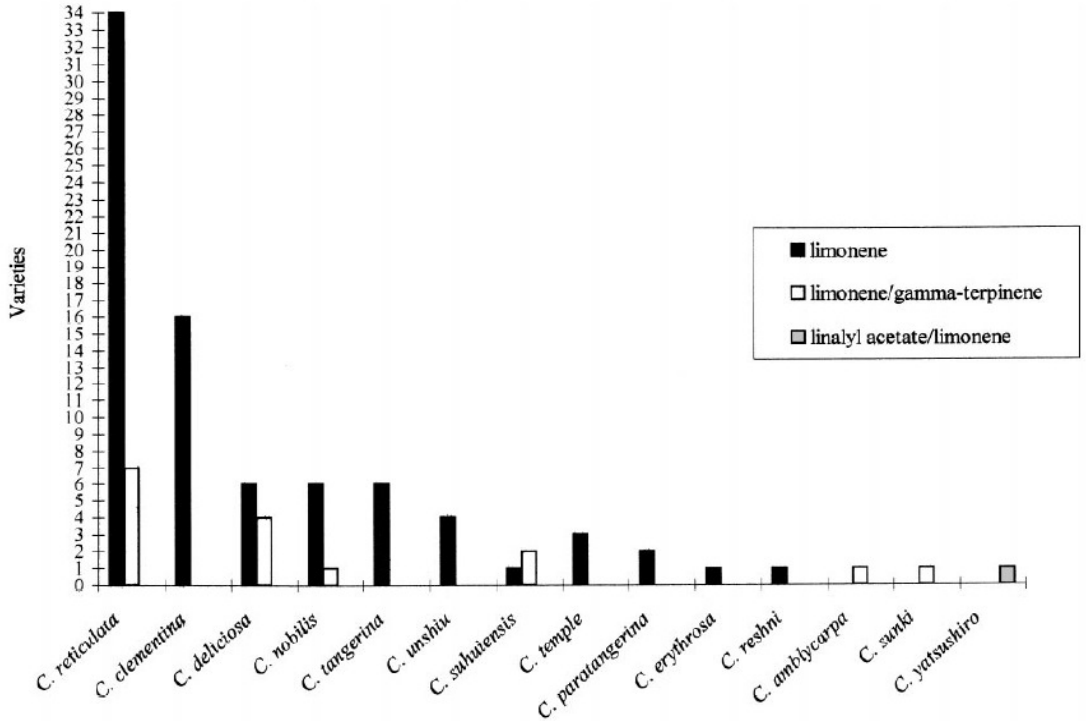
Monoterpenes	Sesquiterpenes
camphene	bisabolene
careen	cadinene
cymene	caryophyllene
dipentene	cedrene
limonene	chamazulene
myrcene	copaene
ocimene	farnesene
phellandrene	germacrene-d
pinene	humulene
sabinene	selinene
terpinene	terpinolene

ที่มา : Tisserand แล ะ Balacs (1995)

Lota และคณะ (2000) ศึกษาน้ำมันหอมระเหยจากผิวเปลือกและใบของส้ม *Citrus reticulate* Blanco จำนวน 41 สายพันธุ์ โดยมีการควบคุมสภาวะการปลูก และวิเคราะห์องค์ประกอบสารด้วยวิธี capillary GC, GC-MS และ C^{13} NMR พบสารที่สำคัญในผิวเปลือกส้ม 2 ชนิด คือ limonene และ limonene/γ-terpinene ในใบพบสารสำคัญ 3 ชนิดคือ sabinene/linalool, linalool/γ-terpinene และ methyl N-methylanthranilate ต่อมา Lota และคณะ (2001) ก็ได้ศึกษาในลักษณะเดียวกันแต่ใช้ส้ม 58 สายพันธุ์ มี 15 สปีชีส์ที่แตกต่างกันพบว่าสารประกอบในผิวเปลือกส้มมี 3 ชนิด คือ limonene, limonene/γ-terpinene และ linalyl acetate/limonene ดังแสดงในภาพที่ 3 ซึ่ง limonene พบได้มากกว่า γ-terpinene ส่วนในใบพบสารประกอบ 3 ชนิดคือ sabinene, γ-terpinene/linalool และ methyl N-methyllanthranila

Gonzalez และคณะ (2002) ศึกษาส่วนประกอบของน้ำมันหอมระเหยจากส่วน pericarp ของพืชตระกูลส้ม 4 ชนิดคือ *Citrus paradisi*, *Citrus limon*, *Citrus grandis* และ *Citrus reticulate*

ซึ่งเก็บในช่วงเดือนตุลาคมถึงธันวาคม ที่ San Joaquin de Navay รัฐ Tachira ประเทศเวเนซูเอล่าพบองค์ประกอบหลักคือ limonene ยกเว้น *Citrus grandis* ซึ่งองค์ประกอบหลักคือ linalool



ภาพที่ 3 สารประกอบทางเคมี 3 ชนิดที่พบในผิวเปลือกของ *Citrus reticulate* Blanco

Figure 3**.** Three chemotypes distinguished for peel mandarin oils.

ที่มา : Lota และคณะ (2001)

Quintero และคณะ (2003) ศึกษาส่วนประกอบของน้ำมันหอมระเหยจาก *Citrus aurantium amara* L. ของรัฐ Tachira ประเทศเวเนซูเอล่า พบส่วนประกอบหลัก ๆ เป็นพวก monoterpenes (limonene 77.90 เปอร์เซ็นต์, β-pinene 3.40 เปอร์เซ็นต์, myrcene 1.81 เปอร์เซ็นต์ และ trans-ocimene 1.16 เปอร์เซ็นต์) sesquiterpenes (valencene 0.52 เปอร์เซ็นต์) aldehydes (decanal 3.51 เปอร์เซ็นต์, dodecanal 0.36 เปอร์เซ็นต์ และ geranial 0.29 เปอร์เซ็นต์) alcohols (β-nerolidol 0.85 เปอร์เซ็นต์, linalool 0.89 เปอร์เซ็นต์) และ ketone พบชนิดเดียวคือ nootkatone

Vekiari และคณะ (2004) ศึกษาน้ำมันหอมระเหยจากใบและผิวเปลือกของ *Citrus medicar* var “Diamante” โดยใช้ GC-MS พบว่าใบมีสารประกอบจำนวน 27 ชนิด ส่วนผิวเปลือกมีสารประกอบ 29 ชนิด โดยมี limonene เป็นสารประกอบหลักทั้งในใบและผิวเปลือก แสดงในตารางที่ 3 สารประกอบอื่นๆ เช่น oxygenated monoterpene, geranial, neral, geranyl acetate และ neryl acetate

ตารางที่ 3 สารประกอบของน้ำมันหอมระเหยจากใบและผิวเปลือกของ *Citrus medicar* var "Diamante"

Table 3. Components of essential oil from *Citrus medicar* var "Diamante" leaves and peels.

Components	Leaves (%)	Peels (%)
Monoterpenic hydrocarbons		
α- pinene	0.97	2.25
β- pinene	2.87	12.54
myrcene	12.78	12.59
δ-3-carene	1.64	0.74
limonene	205.4	249.3
(Z)-β-ocimene	2.97	3.48
(E) -β-ocimene	4.45	6.76
γ-terpinene	1.47	3.32
Terpinolene	0.72	0.44
Oxygenated monoterpenes		
linalool	7.69	5.31
terpinen-4-ol	-	2.57
α-terpineol	4.54	2.29
neral	165.2	80.8
geraniol	10.1	22.3
geranial	175.8	133.7
citronellyl acetate	1.61	0.62
neryl acetate	10.76	10.57
geranyl acetate	38.5	6.3
neryl propionate	1.54	0.15
geranyl propionate	4.2	1.14
Aliphatic compound		
nonanal	4.17	1.62
decanal	7.72	1.35
undecanal	4.85	1.54

ตารางที่ 3 (ต่อ)

Table 3. (cont.)

Components	Leaves (%)	Peels (%)
dodecanal	3.56	0.7
Sesquiterpenic hydrocarbons		
β-caryophyllene	4.71	4.07
trans-α-bergamotene	2.28	3.29
α-humulene	3.84	5.27
farnesene	2.22	1.43

ที่มา : ดัดแปรจาก Vekiari และคณะ (2004)

Selli และคณะ (2004) ศึกษาสารประกอบใน *Citrus sinensis* ซึ่งเป็นส้มพันธุ์พื้นเมืองของประเทศตุรกี วิเคราะห์โดย GC-MS พบว่ามีสารสำคัญ 34 ชนิด โดยมีเอสเตอร์ 7 ชนิด แอลดีไฮด์ 2 ชนิด แอลกอฮอล์ 5 ชนิด เทอร์ปีน 5 ชนิด เทอร์ปีนอยด์ 12 ชนิด และคีโตน 3 ชนิด ซึ่งสารประกอบสำคัญ ๆ คือ linalool, limonene, β-phellandrene, terpinene-4-ol และ ethyl-3-hydroxy hexanoate น้ำมันหอมระเหยมีลักษณะเฉพาะตัว ซึ่งสารประกอบจะอยู่รวมกันทั้งในรูปของสารละลายและน้ำมันหอมระเหย โดยทั่วไปจะพบ sesquiterpenes น้อย เช่น valencene, nootkatone, alpha-sinensal และ beta-sinensal

Yadav และคณะ (2004) ศึกษาสารประกอบทั้งในมะนาวสดและแห้งของ *Citrus aurantifolia* (Christm) พบสารประกอบทั้งหมด 32 ชนิดแสดงในตารางที่ 4 น้ำมันหอมระเหยจากมะนาวแห้งที่มีความชื้น 5 เปอร์เซ็นต์จะมีปริมาณของ terpene hydrocarbons, alcohol, ester และ aldehydes ลดลงเมื่อเทียบกับมะนาวสด

Selvaraj และคณะ (2004) ศึกษาสารประกอบของน้ำมันหอมระเหยจากผิวเปลือกมะนาว *Citrus aurantifolia* swingle ที่มีผิวเปลือกสีเขียวแก่และสีเหลืองพบว่าสารประกอบจะไม่แตกต่างกัน แต่ปริมาณของสารประกอบในน้ำมันหอมระเหยจากมะนาวที่มีผิวเปลือกสีเหลืองจะลดลงแต่ปริมาณของสารประกอบหลักอย่าง limonene, β-pinene และ γ-terpinene ใกล้เคียงกัน

Sawamura และคณะ (2004) ศึกษาการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบของน้ำมันหอมระเหยในมะนาวพบว่าสารประกอบพวก monoterpene จะค่อย ๆ ลดลงจาก 97.1 เปอร์เซ็นต์ไปเป็น 30.7 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเก็บไว้เป็นระยะเวลา 1 ปี ส่วนสารประกอบ ρ-cymene จะเพิ่มขึ้นเมื่อ γ-terpinene และ citral ลดลง

Sharma และ Tripathi (2006) ศึกษาส่วนประกอบของน้ำมันหอมระเหยของ *Citrus sinensis* (L.) พบสารประกอบทั้งหมด 10 ชนิดแสดงในตารางที่ 5 โดยมี limonene (84.4 เปอร์เซ็นต์) เป็นองค์ประกอบหลัก

ตารางที่ 4 ส่วนประกอบของน้ำมันหอมระเหยจากผลสดและผลแห้งของมะนาว *Citrus aurantifolia* (Christm) Swingle

Table 4. Composition of volatile oils of freshed and dehydrated *Citrus aurantifolia* (Christm) Swingle.

Components	Fresh (µl/100 g)	Dried (µl/100 g)
linalool	1.3	0.6
fenehol	0.4	1.2
4-terpineol	6.8	4.7
α-terpineol	13.3	10.2
neral	1.8	0.3
geranial	4.1	0.6
δ- elemene	0.6	1.1
neryl-acetate	0.5	0.4
geranyl acetate	0.6	0.5
α-cedrene	4.5	3.4
α-bergamotene	4.7	3.5
α-humulene	0.4	0.3
(Z)-β-santalene	0.2	0.2
(Z)-β-farnesene	0.6	0.4
Germacrene	0.7	0.2
valencene	Tr	0.1
nerolidol	14.3	6.4
α- pinene	6.8	6.6
β- pinene	32.1	17.6
Limonene	75.5	53.3

ตารางที่ 4 (ต่อ)

Table 4**.** (cont.)

Components	Fresh (µl /100 g)	Dried (µl /100 g)
γ-terpinene	19.0	18.1
terpinolene	3.2	5.1
(E)- β-farnesene	Tr	0.1
γ-elemene	0.5	0.2
α-bisabolol	0.2	Tr
(E)- γ-bisabolene	0.2	0.1
β-bisabolol	0.4	0.1
hexadecanoic acid	0.5	0.1
cis-ocimene	0.7	Tr
β-elemene	0.6	1.0

Tr = trace < 0.01 เปอร์เซ็นต์

ที่มา : ดัดแปรจาก Yadav และคณะ (2004)

ตารางที่ 5 สารประกอบของ *Citrus sinensis* (L.) Osbeck

Table 5. Components of *Citrus sinensis* (L.) Osbeck epicarp essential oil.

Components	%
α- pinene	0.9
β- pinene	0.6
myrcene	4.1
limonene	84.2
linalool	4.4
citral	0.5
α- terpineol	0.8
terpinolene	1.3
citronellal	1.9
geraniol	1.3

ที่มา : Sharma และ Tripathi (2006)

สมบัติของน้ำมันหอมระเหยในพืชแต่ละชนิดขึ้นกับปัจจัยทางภูมิอากาศ ฤดูกาล และภูมิประเทศ ดิน ฟ้า อากาศ ซึ่งปัจจัยเหล่านี้ส่งผลต่อส่วนประกอบในพืชแต่ละชนิด (Lanciotti *et al*., 2004) เช่นเดียวกับพืชตระกูลส้มจะมีสารประกอบที่มีความหลากหลายแตกต่างกันออกไปโดยองค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันหอมระเหยขึ้นอยู่กับลักษณะทางพันธุกรรม สิ่งแวดล้อมและการดูแลรักษา (Lota *et al*., 2000)

3. วิธีการเตรียมสารสกัดและน้ำมันหอมระเหย

3.1 การสกัดด้วยตัวทำละลาย (solvent extraction)

ตัวทำละลายอินทรีย์ที่มีสมบัติระเหยได้ เช่น ปิโตเลียมอีเทอร์ เบนซีน อะซิโตน เฮกเซน เอธิลอะซิเตต และเอทานอล เป็นต้น โดยเฉพาะปิโตรเลียมอีเทอร์นิยมใช้เป็นตัวทำละลายในอุตสาหกรรมการทำน้ำหอมเนื่องจากราคาถูกและมีจุดเดือดต่ำ จึงกำจัดได้ง่าย วิธีนี้จะใช้ถังหมักขนาดใหญ่มีลักษณะคล้ายเพอร์โคเลเตอร์ (percolator) ภายในมีตะแกรงวางซ้อนกันหลาย ๆ ชั้นบรรจุตัวอย่างพืชและตัวทำละลาย แล้วนำตัวทำละลายจากการหมักมากลั่นเพื่อแยกน้ำมันหอมระเหยออกมา นอกจากนี้ก็มีการสกัดแบบต่อเนื่องโดยใช้เครื่องมือสกัดต่อเนื่อง (soxhlet apparatus) ซึ่งวิธีนี้เหมาะสำหรับการสกัดน้ำมันหอมระเหยที่มีปริมาณน้อย หรือสกัดในกากพืชที่เหลือจากการบีบ (ศรีรัตน์ กสิวงศ์, 2534)

ข้อดีของการสกัดสารด้วยสารเคมี

เนื่องจากตัวทำละลายต่าง ๆ เช่น เอทานอล เมทธานอล อะซิโตน ราคาถูก มีจุดเดือดต่ำจึงกำจัดออกได้ง่าย

ข้อเสียของการใช้วิธีการสกัดด้วยสารเคมีดังนี้

1. ใช้เวลานานในการสกัดเนื่องจากตัวทำละลายที่เป็นของเหลวจะผ่านเข้าไปในโครงสร้างที่แข็งแรงของพืชทำให้ละลายออกมาได้ช้า
2. ใช้ตัวทำละลายในปริมาณมากเพื่อจะให้ได้ตัวถูกละลายออกมาในปริมาณมาก
3. ใช้ตัวทำละลายที่มีค่าการละลายสูง (high solubility) เพื่อที่จะทำการละลายเอาตัวถูกละลายที่อยู่ภายในโครงสร้างของแข็ง หรืออนุภาคออกมาให้มากที่สุด มีผลทำให้ตัวทำละลายเหลือตกค้างอยู่ในผลิตภัณฑ์ในปริมาณมาก (poor purity product)
4. ความสามารถในการเลือกละลายของตัวทำละลายต่ำ (poor selectivity) ทำให้กรณีที่มีตัวถูกละลายที่มีคุณสมบัติใกล้เคียงกันที่อยู่ในโครงสร้างของแข็งหรืออนุภาคนั้นถูกละลายออกมาด้วย มีผลทำให้ได้สารบางตัวที่ไม่ต้องการและจำเป็นต้องเพิ่มขั้นตอนการผลิตเพื่อกำจัดสารที่ไม่ต้องการนี้ ซึ่งเป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้ต้นทุนสูงขึ้น

5. ประสิทธิภาพในการสกัดโดยรวมต่ำ (low efficiency)
6. ไม่เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อมและสิ่งมีชีวิตเนื่องจากตัวทำละลายที่ไม่มีขั้ว (non-polar solvent) ซึ่งโดยส่วนใหญ่มักใช้สารประกอบไฮโดรคาร์บอนเป็นหลัก เนื่องจากเป็นสารที่ระเหยง่ายและไวไฟ ซึ่งสามารถก่อให้เกิดอันตรายต่อร่างกายและทรัพย์สินได้ (สมใจ ขจรชีพพันธุ์งาม และอาทิตย์ รังษีสันติวานนท์, 2546)

3.2 การสกัดด้วยไขมัน (enfleurage)

เป็นวิธีการสกัดน้ำมันหอมระเหยที่มีปริมาณน้อย ๆ ในกลีบดอกไม้โดยการเอาน้ำมันหรือไขมัน เช่น น้ำมันหมูบริสุทธิ์ใส่ในกะบะที่อุณหภูมิต่ำ ๆ น้ำมันหมูจะแข็ง แล้วนำกลีบดอกไม้ไปวางบนไขมัน เก็บในที่เย็น น้ำมันหอมระเหยจะถูกดูดซับกลิ่นด้วยน้ำมันหมู ซึ่งเรียกว่าโปเมด (pomade) เมื่อดอกไม้หมดกลิ่นจะเปลี่ยนกลีบดอกไม้ ซึ่งในแต่ละครั้งจะใช้เวลาประมาณ 7 วัน จากนั้นสกัดน้ำมันหอมระเหยจากไขมันด้วยแอลกอฮอล์จะได้สารสกัดเรียกว่า “extracts of flower” ส่วนไขมันที่เหลือยังมีกลิ่นหอมสามารถเอามาทำสบู่ได้ ต่อจากนั้นกำจัดแอลกอฮอล์ออกไปจะได้หัวน้ำหอมซึ่งมีราคาแพงมาก วิธีนี้จะเก็บความหอมของดอกไม้ได้ละเอียดอ่อน นิยมใช้ในอุตสาหกรรมทำน้ำหอม (ศรีรัตน์ กสิวงศ์, 2534)

3.3 การกลั่น (distillation)

เป็นการกลั่นโดยนำเอาสารอินทรีย์และน้ำออกมาด้วยกัน โดยสารที่กลั่นด้วยวิธีนี้ต้องไม่รวมเป็นเนื้อเดียวกันกับน้ำ ทั้งสารอินทรีย์และน้ำจะกลั่นออกมาที่อุณหภูมิต่ำกว่าจุดเดือดของของเหลวทั้งสอง การกลั่นด้วยไอน้ำมีประโยชน์ในการแยกสารที่ระเหยง่าย และไม่ละลายน้ำออกจากสารที่เป็นไอได้ง่าย มักใช้แยกผลิตภัณฑ์ธรรมชาติอย่างพวกน้ำมันหอมระเหยจากใบ ดอก ผล เมล็ด รากของพืช ชุดเครื่องกลั่นประกอบด้วย 3 ส่วนคือ

1. ขวดแก้วก้นกลมใช้สำหรับต้มสมุนไพร
2. ตัวเครื่องควบแน่น
3. ตัวดักจับน้ำมันหอมระเหย

ในขณะกลั่นน้ำมันหอมระเหยจะถูกพาออกมากับไอน้ำร้อนซึ่งเมื่อผ่านเข้าเครื่องควบแน่นจะกระทบกับความเย็นก็จะกลั่นตัวเป็นของเหลวตกลงมาในเครื่องดักจับน้ำมันหอมระเหย ซึ่งน้ำมันหอมระเหยที่ได้เบากว่าน้ำจึงลอยแยกตัวอยู่ชั้นบน

การกลั่นมีหลายวิธี ได้แก่

3.3.1 การกลั่นด้วยไอน้ำ (hydrodistillation)

นำตัวอย่างพืชใส่ลงในภาชนะแล้วผ่านไอน้ำลงไปในตัวอย่างเพื่อให้ได้น้ำมันหอมระเหยและน้ำมันหอมระเหยออกมาควบแน่นลงในภาชนะรองรับ พืชที่นำมากลั่นด้วยวิธีนี้เป็นพืชสดที่

น้ำมันหอมระเหยถูกทำลายได้ง่ายด้วยความร้อน วิธีการนี้เป็นวิธีการที่มีประสิทธิภาพได้น้ำมันปริมาณมากกว่าแต่อาจจะไม่สะดวกเพราะมีชิ้นส่วนของเครื่องมือมากขึ้น (คมสันต์ หุตะแพทย์, 2545)

3.3.2 การกลั่นโดยใช้น้ำ (waterdistillation)

วิธีนี้ทำโดยนำชิ้นส่วนของพืชที่ต้องการกลั่นมาต้มกับน้ำ ส่วนของไอน้ำและน้ำมันหอมระเหยจะระเหยขึ้นมาควบแน่นในเครื่องควบแน่น (condenser) แล้วลงมาในภาชนะรองรับ พืชที่นำมากลั่นด้วยวิธีนี้ ต้องมีน้ำมันที่ไม่ถูกทำลายด้วยน้ำและความร้อนได้แก่ น้ำมันสน ข้อควรระวังคือพืชที่ติดกับภาชนะจะได้รับความร้อนสูงอาจไหม้ได้ทำให้น้ำมันที่ได้มีกลิ่นไม่ดี (ศรีรัตน์ กสิวงศ์, 2534)

3.3.3 การกลั่นโดยใช้น้ำและไอน้ำ (water and hydrodistillation)

วิธีนี้นำตัวอย่างพืชมาทำให้ชื้นด้วยน้ำในภาชนะ แล้วผ่านไอน้ำลงไปในตัวอย่างพืชเพื่อให้น้ำมันหอมระเหยระเหยออกมาพร้อมกับไอน้ำแล้วควบแน่นลงในภาชนะรองรับ พืชที่นำมากลั่นด้วยวิธีนี้อาจเป็นพืชแห้งหรือสดก็ได้ เหมาะสมกับน้ำมันหอมระเหยที่ถูกทำลายด้วยความร้อนจากการต้มโดยตรง เช่น เปลือกอบเชย ดอกกานพลู

จากการกลั่นทั้งสามวิธีจะมีน้ำมันหอมระเหยและน้ำควบแน่นลงมาในภาชนะรองรับ ซึ่งในระดับอุตสาหกรรมจะใช้ภาชนะคือ “florentine flask” เป็นภาชนะที่มีท่อสำหรับให้ของเหลวไหลออกทั้งด้านบนและด้านล่าง เมื่อน้ำมันแยกตัวจากน้ำ ซึ่งส่วนใหญ่น้ำมันจะเบากว่าน้ำและลอยขึ้นเหนือน้ำ (ยกเว้นน้ำมันบางชนิด เช่น น้ำมันกานพลูจะหนักกว่าน้ำ) สามารถแยกน้ำมันออกมาได้ ส่วนน้ำซึ่งอยู่ข้างล่าง ถ้ามีปริมาณมากจะไหลออกไปอีกภาชนะหนึ่ง ซึ่งในน้ำนี้จะมีน้ำมันส่วนหนึ่งละลายอยู่อาจนำมาใช้เป็นน้ำดอกไม้ (aromatic water) หรือนำมากลั่นเพื่อแยกน้ำมันออกมาอีกครั้งหนึ่ง วิธีการนี้เรียกว่าโคโฮเบชัน (cohobation)

ข้อดีการกลั่น

เป็นวิธีที่นิยมใช้กันอย่างแพร่หลายเนื่องจากสามารถสกัดพืชได้ครั้งละมาก ๆ ประหยัดทำได้ไม่ยากและสูญเสียน้ำมันเพียงเล็กน้อย (สุรัตน์วดี จิวะจินดา, 2545)

ข้อเสียของวิธีการกลั่น

เป็นการเปลืองพลังงานหรือใช้พลังงานมากในการทำน้ำให้กลายเป็นไอน้ำเพื่อใช้ในกระบวนการกลั่นและความร้อนจากไอน้ำอาจทำให้สารที่สกัดได้บางตัวสลายตัวได้

3.4 การบีบ (expression)

เป็นวิธีการเตรียมน้ำมันหอมระเหย โดยไม่ใช้ความร้อนแต่ใช้แรงบีบหรือเป็นวิธีการทำให้เซลล์ที่มีน้ำมันแตกออก แล้วน้ำมันจะออกมาได้เอง ซึ่งมีวิธีการที่แตกต่างกันออกไปดังนี้

3.4.1 กรรมวิธีใช้ฟองน้ำ (sponge process)

เป็นวิธีการสกัดเบื้องต้นโดยทั่วไปใช้กับผลส้ม มะนาว โดยการนำผลมาผ่าซีกตามขวาง ควักเอาเนื้อออก ส่วนของเปลือกนำมาผ่าเป็น 3 แฉก ล้างน้ำให้สะอาดแล้วกดในเครื่องมือที่มีลักษณะคล้ายกับที่ทับกล้วยปิ้ง ซึ่งมีไม้แข็งสองแผ่น มีบานพับติดอยู่ด้านหนึ่ง ตรงกลางแผ่นไม้จะบุด้วยฟองน้ำ ซึ่งเป็นส่วนที่วางเปลือกส้ม เมื่อกดบีบน้ำมันจะถูกซับด้วยฟองน้ำและไหลลงในภาชนะที่รองรับ (ศรีรัตน์ กสิวงศ์, 2534)

3.3.2 วิธีการใช้ของแหลมทิ่มเซลล์ (ecuelle method)

วิธีนี้จะใช้เหล็กปลายแหลมทิ่มผิวของเปลือกส้มหรือมะนาว ทำให้เซลล์น้ำมันแตกออก หรืออาจทำเป็นถังกลมภายในถังจะมีเข็มเล็ก ๆ อยู่โดยรอบ เมื่อนำผลส้มใส่ลงไปแล้วหมุนถังให้เข็มทิ่มแทงเซลล์น้ำมัน น้ำมันจะไหลออกมาแล้วเก็บใส่ภาชนะ วิธีการนี้จะได้น้ำมันหอมระเหยน้อยกว่ากรรมวิธีใช้ฟองน้ำ

3.3.3 กรรมวิธีใช้เครื่องจักร (machine process)

วิธีนี้ใช้เครื่องบีบกำลังสูง (hydrauric pressure) บีบเปลือกส้ม มะนาวที่ควักเอาเนื้อออกไปแล้วน้ำมันหอมระเหยที่ได้มาต้องทำให้บริสุทธิ์อีก โดยการสกัดด้วยตัวทำละลายหรือการกลั่น

3.4 การสกัดโดยใช้คาร์บอนไดออกไซด์เหนือจุดวิกฤต (supercritical carbondioxide extractsion)

การสกัดโดยใช้ของไหลเหนือจุดวิกฤตคือการใช้ของเหลวใด ๆ เพื่อการสกัดที่สภาวะความดันและอุณหภูมิสูงกว่าจุดวิกฤตของของไหลชนิดนั้น ๆ ของไหลเหนือจุดวิกฤตจะมีสมบัติในการเคลื่อนที่และการแพร่กระจายได้ดีกว่าของเหลว การสกัดสารออกจากของแข็งจึงทำได้รวดเร็ว ความหนาแน่นคล้ายของเหลวซึ่งจะเป็นการเพิ่มค่าการละลาย แต่ความหนืดน้อยคล้ายกับก๊าซและไม่มีแรงตึงผิวจึงสามารถเคลื่อนที่ผ่านเข้าไปในโครงสร้างที่มีรูพรุนได้ง่าย ซึ่งช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการสกัด ภายหลังการสกัดจะระเหยตัวทำละลายออกจากตัวถูกละลายได้อย่างรวดเร็ว และไม่เหลือตกค้าง เมื่อลดความดันเป็นปกติซึ่งเป็นเทคนิคการสกัดสารด้วยของไหลวิกฤตยิ่งยวดที่เข้ามามีบทบาทต่อการสกัดสารจากผลิตภัณฑ์ธรรมชาติไม่ว่าเป็นการสกัดกลิ่น สี สารออกฤทธิ์เพื่อใช้สำหรับยา การใช้คาร์บอนไดออกไซด์วิกฤติยิ่งยวดมาเป็นตัวทำละลายในการสกัดสารเพราะว่ามีค่าจุดวิกฤตต่ำสามารถสกัดสารประกอบพวกไม่มีขั้ว เช่น ไฮโดรคาร์บอน (Vagi *et al*., 2004)

ข้อดีของการสกัดโดยใช้คาร์บอนไดออกไซด์เหนือจุดวิกฤต

ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์มีคุณสมบัติเป็นก๊าซเฉื่อย ไม่ไวไฟ มีราคาถูก ง่ายต่อการจัดหา ไม่มีกลิ่นรสและความเป็นพิษ เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม

ข้อเสียของการสกัดโดยใช้คาร์บอนไดออกไซด์เหนือจุดวิกฤต

เครื่องมือที่ใช้ในการสกัดมีราคาแพง

3.5 การกลั่นทำลาย (destructive distillation)

เป็นวิธีการกลั่นโดยใช้ความร้อนสูงแต่ไม่ให้อากาศเข้าไป จะได้ส่วนของสารที่ระเหยออกมาและส่วนที่เหลือมักจะเหนียว ๆ หรือกลายเป็นถ่าน วิธีการกลั่นแบบนี้มักใช้กับเนื้อไม้หรือเรซินของพืชกลุ่มสนเขา (วงศ์ pinaceae) สำหรับสารที่ระเหยออกมาจะแยกเป็นสองชั้นคือ ชั้นน้ำประกอบด้วยเมทานอลกับกรดไพโรลิเนียสและชั้นของเหลวเหนียว ๆ ประกอบด้วยน้ำมันหอมระเหยกับทาร์ของแก่นไม้ ประมาณ 10 เปอร์เซ็นต์ มีกลิ่นคล้ายยาหม้อจึงเรียกว่า “empyreumatic oil” (ศรีรัตน์ กสิวงศ์, 2534)

4. กิจกรรมทางชีวภาพของสารสกัดและน้ำมันหอมระเหยจากพืชตระกูลส้ม

4.1 กิจกรรมการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์

สารสกัดและน้ำมันหอมระเหยจากพืชตระกูลส้มมีสมบัติในการต้านเชื้อจุลินทรีย์ได้หลายชนิด สาร terpenenes หรือ terpenoids เป็นกลุ่มสารที่มีความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรีย ไวรัส และโปรโตซัว มีรายงานว่า 60 เปอร์เซ็นต์ของน้ำมันหอมระเหยสามารถยับยั้งเชื้อรา สารประกอบบางชนิดจากน้ำมันหอมระเหยจากพืชตระกูลส้มมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อราได้ดี (Caccioni *et al*., 1998) และ 30 เปอร์เซ็นต์ สามารถยับยั้งแบคทีเรีย (Cowan, 1999)

ธิราภา แสนเสนา และนพดล กิตติวราฤทธิ์ (2536) สกัดน้ำมันหอมระเหยจากผิวเปลือกพืชตระกูลส้มด้วยแอลกอฮอล์ 80 เปอร์เซ็นต์ นำมาทดสอบกับแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคด้วยวิธี paper disc diffusion พบว่าสารสกัดแอลกอฮอล์จากมะกรูดและมะนาวที่ระดับความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีกิจกรรมการยับยั้ง *S. aureus* และ *B. cereus* มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้งรอบแผ่นดิสก์เท่ากับ 11.5 มิลลิเมตร

Dabbah และคณะ (1970) ศึกษากิจกรรมการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคทางเดินอาหารของน้ำมันหอมระเหยจากมะนาว เกรฟฟรุต ส้มแมนดาริน สกัดด้วยวิธีบีบเย็น ระดับความเข้มข้นที่ใช้คือ 1 มิลลิลิตรต่อลิตร พบว่าน้ำมันหอมระเหยจากมะนาวยับยั้ง *S. aureus* ได้ 100 เปอร์เซ็นต์ *Escherichia coli* และ *Salmonella senftenberg* 775W ได้ 98 เปอร์เซ็นต์ ส่วน *Pseudomonas* sp. (no. 18) ได้ 90 เปอร์เซ็นต์ และน้ำมันหอมระเหยจากส้มแมนดารินยับยั้ง *S. aureus* ได้ 100 เปอร์เซ็นต์ *S. senftenberg* 775W ได้ 98 เปอร์เซ็นต์ และ *E. coli* ได้ 96 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งน้ำมันหอมระเหยจากพืชตระกูลส้มสามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกได้ดีกว่าแบคทีเรียแกรมลบ นอกจากนี้ได้นำเทอร์ปีนและอนุพันธ์มาทดสอบพบว่า terpineol ให้ผลการยับยั้งต่อเชื้อทั้ง 4 ชนิดได้ 100 เปอร์เซ็นต์

Caccioni และคณะ (1998) ศึกษาประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยจากพืชตระกูลส้ม 6 ชนิด คือ *Citrus sinensis* cvv. “washington navel”, “Sangvinello”, “Tarocco”, “Moro”, “Valencia

late", และ "Ovale"), bitter (sour) orange *(Citrus aurantium*), mandarin (*Citrus deliciosa* cv "Avana"), grapefruit (*Citrus paradisi* cvv. "Marsh seedless" และ "Red Blush"), citrange (*Citrus sinensis* × *Poncirus trifoliate* cvv. "Carrizo" และ "Troyer") และ lemon (*Citrus limon* cv "Femminello") ต่อการเติบโตของ *P. digitatum* และ *P. italicum* ซึ่งเป็นราที่ก่อให้เกิดโรคในพืชตระกูลส้มหลังการเก็บเกี่ยวพบว่าน้ำมันหอมระเหยจาก citrange และ lemon สามารถยับยั้ง *P. digitatum* ได้ดีโดยมีค่า ED_{50} (Median effective dose) คือปริมาณของน้ำมันหอมระเหยที่ให้ผลต่อกิจกรรมการยับยั้งเชื้อราร้อยละ 50 แสดงในตารางที่ 6 นอกจากนี้ยังได้ศึกษาสหสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของกลุ่มสารประกอบต่าง ๆ แสดงในตารางที่ 7 ในน้ำมันหอมระเหยพืชตระกูลส้มต่อประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อรา

Chaisawadi และคณะ (2003) ศึกษากิจกรรมการยับยั้งแบคทีเรียจากสมุนไพรไทย ซึ่งหาได้ง่ายและราคาถูกจำนวน 15 ชนิด ประกอบด้วยผักชี หอมแดง ขิง ข่า ตระไคร้ ใบมะกรูด ผิวมะนาว พริกขี้หนู ขมิ้น โหระพา กะเพรา มะระขี้นก ผิวมะกรูด มะเขือพวง และลูกยอ มาคั้นน้ำสด และสกัดน้ำมัน แล้วนำมาทดสอบกิจกรรมการยับยั้งแบคทีเรียด้วยวิธี agar diffusion พบว่าพืช 6 ชนิดคือ ขิง หอมแดง ข่า ใบมะกรูด ผิวมะนาว และผิวมะกรูด แสดงกิจกรรมการยับยั้ง *B. cereus* และ *S. aureus* เฉพาะขิงเท่านั้นที่ไม่แสดงการยับยั้ง *S. typhi* โดยน้ำมันหอมระเหยมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อได้ดีกว่าน้ำคั้นสด ผิวมะกรูด หอมแดง และผิวมะนาวเป็นสมุนไพรไทยที่ใช้ประกอบอาหารที่มีศักยภาพสูงในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรค 3 ชนิดที่นำมาศึกษา

Ponce และคณะ (2003) ศึกษากิจกรรมการยับยั้งจุลินทรีย์ที่พบในผักกาดหวาน (swiss chard) โดยใช้น้ำมันหอมระเหยชนิดต่าง ๆ แสดงในตารางที่ 8 พบว่าน้ำมันหอมระเหยจาก *Citrus limonum* สามารถยับยั้งจุลินทรีย์มีค่า MIC เท่ากับ 0.05 มิลลิลิตรต่อ100 มิลลิลิตร ค่า MBC เท่ากับ >1.5 มิลลิลิตรต่อ100 มิลลิลิตร

Statti และคณะ (2004) พบว่าสารสกัดจาก bergamot (*Citrus bergamia*) ที่สกัดด้วยเมธานอลที่ระดับความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีกิจกรรมการยับยั้งของรา *T. meniagrophytes* ได้ดีกว่า *P. ultimum* ซึ่งยับยั้งได้ที่ระดับ 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

Wannissorn และคณะ (2005) ทดสอบกิจกรรมการยับยั้งแบคทีเรียของน้ำมันหอมระเหยจากพืชสมุนไพรไทยจำนวน 32 ชนิดต่อเชื้อ *Salmonella* spp., *E. coli* O157 : H7, *Campylobacter jejunii* และ *Clostridium perferingens* ซึ่งเป็นเชื้อที่มีความสำคัญพบในอาหารแช่แข็งพวกสัตว์ปีกส่งออก ทดสอบโดยใช้วิธี disc diffusion (ในดิสก์ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร) โดยหยดน้ำมันหอมระเหยปริมาณ 15 ไมโครลิตรต่อดิสก์ และวัดค่าบริเวณยับยั้ง ซึ่งกิจกรรมการยับยั้งของน้ำมันหอมระเหยในกลุ่มของพืชตระกูลส้มแสดงในตารางที่ 9

ตารางที่ 6 กิจกรรมการยับยั้งเชื้อราของน้ำมันหอมระเหยจากพืชตระกูลส้ม

Table 6. Antifungul activities of citrus essential oils.

Citrus species	ED_{50}	
	P. digitatum	*P. italicum*
Citrus sinensis		
A1= Washington Navel	2180.2	5407.5
A2 = Sanguinello	1594.1	4277.4
A3 = Tarocco	1496.9	4470.6
A4 = Moro	1004.6	3147.2
A5 = Valencia Late	2245.6	4330.0
A6 = Ovale	2389.9	4436.3
Citrus aurantium		
AM= Sour orange	1015.4	1490.6
Citrus deliciosa		
M1= Avana	713.3	1977.0
Citrus paradisi		
P1= Marsh Seedless	910.3	1498.4
P2= Red Blush	688.7	2361.7
Citrus limon		
L1= Femminello (Dec.)	1056.4	2505.4
L2= Femminello (Feb.)	574.1	1040.9
L3= Femminello (Jan.)	569.1	1687.9
Citrus sinensis × *Pocirus trifoliata*		
CZ= Carmizo citrange	275.5	246.2
TY= Troyer citrange	311.8	251.2

ED_{50} (Median effective dose) = เป็นปริมาณของน้ำมันหอมระเหยที่ให้ผลต่อกิจกรรมการยับยั้งเชื้อรา ร้อยละ 50

ที่มา : Caccioni และคณะ (1998)

ตารางที่ 7 สหสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญของกลุ่มสารประกอบในน้ำมันหอมระเหยจากพืชตระกูลส้มกับกิจกรรมการยับยั้งเชื้อรา

Table 7. Component of citrus essential oils grouped in classes and significant correlation with antifungal activities.

Components	*Citrus* spp.																
																Significance [b]	
	A1	A2	A3	A4	A5	A6	AM	M1	P1	P2	L1	L2	L3	CZ	TY	*P. digitatum*	*P. itaticum*
minor monoterpene hydrocarbons	3.23	3.4	2.51	3.59	3.06	3.24	2.99	24.7	3.4	3.66	23.6	21.8	34.4	16.5	14	a	
limonene	94.8	92	95.3	91.1	96	95	94.3	72.7	93.6	93.7	71.1	69.4	60.2	65.4	72		
total monoterpene hydrocarbons	98	96	97.8	94.7	98	98.2	97.3	97.4	97	97.4	94.7	91.2	94.9	81.9	86		
oxygenated monoterpenes	1.26	2.5	1.31	3.9	0.9	1.29	1.49	1.02	1.09	1.01	3.49	5.92	3.29	1.97	0.9		
total monoterpene other than limonene	4.49	5.9	3.82	7.49	3.96	4.53	4.48	25.7	4.49	4.67	27.1	27.8	37.6	18.1	15	a	a

ตารางที่ 7 (ต่อ)

Table 7. (cont.)

Components	*Citrus* spp.																
																Significance[b]	
	A1	A2	A3	A4	A5	A6	AM	M1	P1	P2	L1	L2	L3	CZ	TY	*P. digitatum*	*P. itaticum*
sesquiterpenes	0.01	0.1	< 0.01	0.15	0.04	< 0.01	0.2	0.29	0.37	0.3	0.5	0.93	0.74	9.96	9.9	a	a
aliphatic aldehydes	0.47	0.7	0.49	0.78	0.68	0.23	0.2	0.19	0.94	0.69	0.24	0.19	0.25	1.4	1		
aliphatic alcohols	0.07	0.2	0.18	0.24	0.12	0.03	0.38	0.03	0.15	0.16	0.01	0.04	0.06	0.2	0.1		
esters	-	-	-	-	-	-	0.28	0.46	0.06	0.07	0.56	0.94	0.54	0.15	0.2		

เมื่อ [a] คือค่า เปอร์เซ็นต์พื้นที่จากค่าเฉลี่ยของพืชตระกูลส้ม

[b] คือความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของความเข้มข้น (เปอร์เซ็นต์) ของกลุ่มสารประกอบต่าง ๆ ในน้ำมันหอมระเหยจากพืชตระกูลส้มกับกิจกรรมการยับยั้งเชื้อรา (ED_{50})

A1 = *C. sinensis* Washington Navel, A2 = *C. sinensis* Sanguinello, A3 = *C. sinensis* Tarocco, A4 = *C. sinensis* Moro, A5= *C. sinensis* Valencia Late, A6 = *C. sinensis* Ovale, AM = *C. aurantium* Sour orange, M1 = *C. deliciosa* Avana, P1 = *C. paradisi* Marsh seedless, P2 = *C. paradisi* Red blush, L1 = *C. limon* Femminello (Dec), L2 = *C. limon* Femminello (Feb), L3 = *C. limon* Femminello (Jan), CZ = *C. sinensis* ×*P. trifoliata* Carmizo citrange, TY = *C. sinensis* × *P. trifoliata* Troyer citrange

ที่มา : ดัดแปลงจาก Caccioni และคณะ (1998)

ตารางที่ 8 ค่า MIC และ MBC ของน้ำมันหอมระเหยจากพืชชนิดต่าง ๆ

Table 8. Values of MIC and MBC for different oils.

Essential oils	MIC [a] (ml/100 ml)	MBC [b] (ml/100 ml)
Eucalyptus globutus	0.3	0.33
Melaleuca alternifolia	0.09	0.36
Melissa officinalis	0.05	1.5
Ocimum basillicum	0.06	>1.5
Pimpinella anisum	0.05	0.53
Citrus limonum	0.05	>1.5
Rosmarinus officinalis	0.14	1.5
Syzygium aromaticum	0.049	0.093
Origanum vulgare	0.43	>1.5

[a] Minimum inhibitory concentration

[b] Minimum bactericidal concentration

ที่มา : Ponce และคณะ (2003)

Moreira และคณะ (2005) ศึกษาการยับยั้ง *E. coli* สายพันธุ์ต่าง ๆ โดยใช้น้ำมันหอมระเหยชนิดต่าง ๆ ด้วยวิธี agar diffusion พบว่าน้ำมันหอมระเหยจาก *Citrus limonum* ให้ค่าบริเวณยับยั้งเท่ากับ 11±1 มิลลิเมตร (ในดิสก์ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร) มีค่า MIC เท่ากับ 2.5 มิลลิลิตรต่อ 100 มิลลิลิตร และ MBC เท่ากับ 2.8 มิลลิลิตรต่อ 100 มิลลิลิตร ประสิทธิภาพในการยับยั้ง *E. coli* ATCC 25158 ของน้ำมันหอมระเหยจากมะนาวต่ำเมื่อเทียบกับน้ำมันหอมระเหยจากกานพลู ทีทรี และโรสแมรี ซึ่งมีค่าบริเวณยับยั้งเท่ากับ 61±5, 27±1 และ 19±3 มิลลิเมตร ตามลำดับ น้ำมันหอมระเหยมีกิจกรรมในการยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกได้ดีกว่าแบคทีเรียแกรมลบเนื่องจากแบคทีเรียแกรมลบมีชั้นของผนังเซลล์ชั้นนอกที่มีองค์ประกอบซับซ้อนและแข็งแรงกว่า เมื่อน้ำมันหอมระเหยทำปฏิกิริยากับแบคทีเรียแกรมบวก ผลการยับยั้งจะเกิดขึ้นหลัง 24 ชั่วโมง ในขณะที่แบคทีเรียแกรมลบเกิดขึ้นในชั่วโมงที่ 48 (Ouattara *et al*., 1997 อ้างโดย Burt, 2004)

ตารางที่ 9 กิจกรรมการยับยั้งแบคทีเรียของน้ำมันหอมระเหยจากพืชตระกูลส้ม

Table 9. Antimicrobial activities of essential oils from citrus cultivars.

Citrus cultivars	Plant parts	Inhibition zone (mm)				
		S. t	S. en	E. co	Cl. per	C. jeju
Citrus aurantifolia Swingle	peels	16.5	10	10.3	20.5	11.8
Citrus hystrix DC	leaves	18.3	0	12	90	0
Citrus maxima Merr	peels	21	20	21.5	20	34.5
Citrus reticulate Blanco	peels	9	0	0	34.5	19.3

เมื่อ S.t = *Salmonella typhimurium* TISTR 292 ; S. en = *Salmonella enterittidis* DMST 17368 ; E. co = *Escherichia coli* TISTR 292 ; Cl. per = *Clostridium perfringens* DMST 15191 ; C. jeju = *Campylobacter jejuni* DMST 15190

ที่มา : ดัดแปลงจาก Wannissorn และคณะ (2005)

Sharma และ Tripathi (2006) ศึกษาผลของน้ำมันหอมระเหยจาก epicarp ของ *citrus sinensis* (L.) osbeck ต่อการเติบโตและลักษณะรูปร่างของของ *Aspergillus niger* (L.) van Tieghem พบว่า เส้นใย (mycelium) ถูกยับยั้งและตายที่ระดับความเข้มข้นเดียวกันคือ 2.5 และ 3 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรใน Potato dextrose broth และ Potato dextrose agar ตามลำดับ

Lertsatithanakorn และคณะ (2006) ศึกษาประสิทธภาพของน้ำมันหอมระเหยจากพืชสมุนไพรไทยมาใช้ในผลิตภัณฑ์ถนอมผิวและน้ำหอม โดยมีการใช้น้ำมันหอมระเหย 7 ชนิดคือตะไคร้หอม (*Cymbopogon nardus* L.) ตะไคร้ (*Cymbopogon citrates* DC.) ผิวมะกรูด (*Citrus hystrix* DC.) ใบกะเพรา (*Ocimum sanctum*) ใบโหระพา (*Ocimum basilicum* L.) ไพล (*Zingiber cassumunar* Roxb) และขิง (*zingiber officinale* Roscoe) ทดสอบต่อเชื้อ *Propionibacterium acnes* ด้วยวิธี disc diffusion โดยใช้น้ำมันหอมระเหยที่ระดับความความเข้มข้น 0.25, 0.50, 1.00 และ 2 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) ละลายใน 95 เปอร์เซ็นต์เอธานอล แล้วหยดน้ำมันหอมระเหยที่เตรียมไว้ 45 ไมโครลิตรต่อดิสก์ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 8 มิลลิเมตร โดยมี 95 เปอร์เซ็นต์เอธานอลปริมาณ 45 ไมโครลิตร เป็นชุดควบคุม ค่าบริเวณยับยั้งของน้ำมันหอมระเหยแต่ละชนิดขึ้นกับปริมาณที่ใช้แสดงในตารางที่ 10 โดยน้ำมันหอมระเหยจากมะกรูดและตะไคร้หอม แสดงบริเวณยับยั้งในทุกความเข้มข้น นอกจากนี้ยังได้หาความเข้มข้นต่ำสุดของน้ำมันหอมระเหย MIC โดยใช้เทคนิค broth microdilution แสดงในตารางที่ 11 พบว่าน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้หอม ให้ค่า MIC 0.005-0.3 และ MBC 0.6-1.2 ไมโครลิตรต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ตะไคร้ให้ค่า MIC 0.6 ไมโครลิตรต่อมิลลิลิตร ส่วนผิวมะกรูดและใบ

กะเพราให้ค่า MIC เท่ากับ 5 ไมโครลิตรต่อมิลลิลิตร และค่า MBC มีค่าเท่ากับ 5 และ 5.0-10.0 ไมโครลิตรต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

ตารางที่ 10 บริเวณยับยั้งของน้ำมันหอมระเหยจากพืชสมุนไพรไทยต่อเชื้อ *P. acnes* ด้วยวิธี disc diffusion

Table 10. Inhibition zone of seven Thai herb essential oils to *P. acnes* by the disc diffusion method.

Essential oils	inhibition zone (mm)			
	0.25% v/v	0.50% v/v	1 % v/v	2 % v/v
citronella grass (*Cymbopogon nardus* L.)	-	-	9.5 ± 0.8	10.1 ± 0.8
lemongrass (*Cymbopogon citratus* DC.)	9.2 ± 0.2	10.5 ± 0.6	13.2 ± 0.6	14.043 ± 1.5
kaffir lime (*Citrus hystrix* DC.)	11.5 ± 0.9	19.6 ± 0.6	25.0 ± 0.5	28.250 ± 0.2
holy basil (*Ocimum sanctum* L.)	-	-	9.2 ± 0.6	9.750 ± 0.8
sweet basil (*Ocimum basilicum* L.)	-	-	9.5 ± 0.3	9.750 ± 0.6
plai (*Zingiber cassumunar* Roxb)	-	-	-	-
ginger (*Zingiber officinale* Roscoe)	-	-	-	-
control (0.2 % ethanol)	-	-	-	-

ที่มา : ดัดแปรจาก Lertsatithanakorn และคณะ (2006)

ตารางที่ 11 ค่า MIC และ MBC ของน้ำมันหอมระเหย 7 ชนิดด้วยวิธี broth microdilution assay.

Table 11. MIC and MBC of seven essential oils to *P. acnes* measured by the broth microdilution method.

Essential oils	MIC (µl/ml)	MBC (µl/ml)
Cymbopogon nardus L.	0.005-0.3	0.6-1.2
Cymbopogon citratus DC.	0.6	0.6
Citrus hystrix DC.	5.0	5.0
Ocimum sanctum L.	5.0	5.0-10.0
Ocimum basilicum L.	50.0	50.0
Zingiber cassumunar Roxb	25.0	25.0
Zingiber officinale Roscoe	75.0	75.0

ที่มา : Lertsatithanakorn และคณะ (2006)

4.2 ฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็ง

Monoterpenes เช่น limonene และ perillyl alcohol เป็นสารที่พบในน้ำมันหอมระเหยจากผลไม้โดยเฉพาะพืชตระกูลส้ม ผักและสมุนไพรหลายชนิด ซึ่งมีประสิทธิภาพในการป้องกันและการบำบัดมะเร็งได้หลายชนิด (Gould, 1997) สาร limonene มีสมบัติเป็นสารที่ป้องกันการเกิดเนื้องอกที่ชักนำโดยสารเคมี (chemopreventive) และยับยั้งเนื้องอก (Chan, 2001)

Nakaizumi และคณะ (1997) ศึกษาผลของ d-limonene ต่อการยับยั้ง N-nitrosobis (2-oxopropyl) amine (BOP) ที่ชักนำให้เกิดมะเร็งตับอ่อนในหนูแฮมเตอร์ ในสัปดาห์ที่ 26 พบว่าหนูแฮมเตอร์ที่ได้รับ d-limonene จะยับยั้งการพัฒนาของมะเร็งตับอ่อน (pancreatic carcinoma)

Iwase และคณะ (1999) ศึกษาผลของสารสกัดเฮกเซนและเอธานอลจากผิวเปลือกและเมล็ดของพืชตระกูลส้ม พบว่าสารสกัดเฮกเซนของผิวเปลือกจาก *Citrus aurantifolia*, *Citrus grandis* (cv. Shytian you), *Citrus sinensis* osbeck, *Citrus shunkokan* Hort, *Citrus sudachi* Hort. Ex Shrai, *Citrus nobilis* Lour var. kunep, *Citrus yatsushiro* Hort, *Citrus Keraji* Hort, *Citrus Kinokuni* Hort, *Citrus leiocarpa* Hort. Ex Tanaka และสารสกัดเอธานอลของผิวเปลือกจาก *Citrus unshiu* Marc. และ *Citrus madurensis* Lour มีฤทธิ์การยับยั้งต่อ Epstein-Barr virus early antigen (EBV-EA) ที่ถูกกระตุ้นโดย 12-*O*-tetradecanoylphorbol 13-acetate (TPA) ได้ 100 เปอร์เซ็นต์ ที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และมากกว่า 60 เปอร์เซ็นต์ ที่ระดับความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

4.3 ฤทธิ์ทำลายแมลง

น้ำมันหอมระเหยหรือสารสกัดจากพืชมีฤทธิ์ทางชีวภาพได้หลากหลายรวมถึงเป็นแหล่งของสารที่มีฤทธิ์ในการขับไล่แมลง ยาฆ่าแมลง และตัวอ่อนของแมลงที่ได้จากธรรมชาติ (Gbolade, 2001 อ้างโดย Burfield and Reekie, 2005) พืชตระกูลส้มก็เป็นแหล่งของสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพในการขับไล่แมลงเช่นเดียวกัน

รัตติยา และพิทยา (2542) ได้คัดเลือกพืชที่มีสารยับยั้งการกินของหนอนกระทู้ผัก โดยศึกษาจากพืชจำนวน 63 ชนิดใน 27 ตระกูล สามารถคัดเลือกพืชได้ 5 ชนิด ได้แก่ กิ่งประยงค์ เปลือกผลมะกรูด รากหนอนตายหยาก ผลดีปลี และลำต้นใต้ดินค้างคาวดำ ซึ่งมีค่า antifeedant index (AFI) หรือฤทธิ์ยับยั้งการกินของหนอนกระทู้ผักของสารสกัดหยาบ เท่ากับ 17.94±6.73, 18.51±1.83, 19.35±1.00, 23.29±7.59 และ 25.32±6.04 ตามลำดับ ซึ่งเปลือกผลมะกรูดมีฤทธิ์ยับยั้งการกินของหนอนกระทู้ผักได้ค่อนข้างดี นั่นแสดงว่าสามารถนำมาใช้ประโยชน์ทางด้านการเกษตร ควบคุมแมลงศัตรูมนุษย์และสัตว์เลี้ยงได้อีกมาก

Ezeonu และคณะ (2001) พบว่าน้ำมันหอมระเหยจากผิวเปลือกพืชตระกูลส้ม 2 ชนิดคือ *Citrus sinensis* และ *Citrus aurantifolia* มีฤทธิ์ในการฆ่ายุง แมลงสาบ และแมลงวัน หลังจากสเปรย์น้ำมันหอมระเหยเป็นเวลา 60 นาที พบว่า *C. sinensis* มีประสิทธิภาพในการฆ่าแมลงเหล่านี้ได้ดีที่สุด และน้ำมันหอมระเหยจากส้ม 2 ชนิดนี้มีฤทธิ์ในการฆ่าแมลงสาบได้ดีกว่ายุงและแมลงวัน

Lucker และคณะ (2002) พบว่า *Citrus limon* มีส่วนประกอบของ monoterpenoids 90 เปอร์เซ็นต์ โดยเฉพาะในส่วนของ flavedo ที่ผิวเปลือกของส้ม เทอร์ปีนในพืชนอกจากสามารถยับยั้งแบคทีเรียแล้วยังขับไล่แมลง ป้องกันโรคพืช ช่วยดึงดูดแมลงในการผสมเกสร

Jujun (2002) ศึกษาประสิทธิภาพในการขับไล่ยุงของน้ำมันหอมระเหยจาก *Ocimum americanum* (L.) และ *Citrus hystrix* DC. พบว่าสูตรที่ประกอบด้วยน้ำมันหอมระเหยจากมะกรูด (20.1 เปอร์เซ็นต์) ethyl alcohol (9.1 เปอร์เซ็นต์) propylene glycol (14.4 เปอร์เซ็นต์) Tween 80 (11.1 เปอร์เซ็นต์) vanilline (0 เปอร์เซ็นต์) และ poloxamer 188 (45.6 เปอร์เซ็นต์) มีประสิทธิภาพในการไล่ยุงได้ดีที่สุดเป็นเวลา 195 นาที

5. กลไกการยับยั้งจุลินทรีย์ของสารสกัดและน้ำมันหอมระเหย

สมบัติของสารสกัดและน้ำมันหอมระเหยในการยับยั้งจุลินทรีย์มีการศึกษามาตั้งแต่อดีต แต่กลไกการเกิดปฏิกิริยานั้นยังไม่ได้มีการศึกษากันมากนัก (Lambert *et al*., 2001 อ้างโดย Burt, 2004) สารประกอบกลุ่มต่าง ๆ ที่พบในสารสกัดและน้ำมันหอมระเหยจะแสดงกิจกรรมการยับยั้งจุลินทรีย์แต่จะไม่แสดงความจำเพาะเจาะจงต่อเซลล์ใดเซลล์หนึ่งแต่มีหลาย ๆ เป้าหมายในเซลล์ (Carsonet *et al*., 2002 อ้างโดย Burt, 2004) เมื่อสารสกัดหรือน้ำมันหอมระเหยทำปฏิกิริยากับแบคทีเรีย ตำแหน่งของแบคทีเรียที่เกิดการเปลี่ยนแปลงคือ ผนังเซลล์เกิดการฉีกขาด (Odhav *et al*., 2002 อ้างโดย Souza *et al*., 2005)เยื่อหุ้มเซลล์ (cytoplasmic membrane) ถูกทำลาย (Ultee *et al*., 2002 อ้างโดย Burt, 2004) โปรตีนที่เป็นองค์ประกอบของเยื่อหุ้มเซลล์ (membrane proteins) ถูกทำลาย ส่งผลให้ชั้นของไขมัน(lipid bilayer) แยกออกจากกัน (Juven *et al*., 1994 อ้างโดย Souza *et al*., 2005) ส่วนประกอบของเซลล์ถูกทำลาย (Cox *et al*., 2000) ไซโตพลาสซึมเกิดการตกตะกอนและโปรตรอนโมทีฟฟอซ (proton motive force) ถูกทำลาย (Ultee and Smid, 2001 อ้างโดย Burt, 2004)

Cox และคณะ (2000) พบว่ากลไกการเกิดปฏิกิริยาของน้ำมันหอมระเหยจากทีทรีมีผลในการยับยั้งกระบวนการหายใจ แต่เพิ่มประสิทธิภาพในการซึมผ่านสาร (permeability) ในไซโตพลาสมิกของแบคทีเรีย และพลาสมาเมมเบรนของยีสต์ด้วยเทคนิคการใช้ propidium iodide ในกรณีของ *E. coli* AG100 และ *S. aureus* เมื่อน้ำมันหอมระเหยจากทีทรีเข้าทำปฏิกิริยากับเซลล์แบคทีเรียพบว่าโพแทสเซียมไอออนเกิดการรั่วไหลออกมา และจากการตรวจสอบ *E. coli* หลังการ

เติมน้ำมันหอมระเหยจากทีทรีโดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน พบว่าผนังเซลล์เกิดการสูญเสียอิเล็กตรอน และเกิดการตกตะกอนของไซโตพลาซึมโดยเกิดขึ้นหลังจากเซลล์ตายแล้ว เมื่อพิจารณาถึงสารประกอบที่พบในน้ำมันหอมระเหยจากทีทรีเป็นสารประกอบพวก cyclic monoterpenes โดย 50 เปอร์เซ็นต์ เป็นสารประกอบในกลุ่มออกซิจิเนต และอีก 50 เปอร์เซ็นต์ เป็นสารประกอบพวกไฮโดรคาร์บอน

สารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพกลุ่มเทอร์ปีนมีผลทำให้ผนังเซลล์แบคทีเรียและราถูกทำลาย (Coz *et al*., 2000 อ้างโดย Lanciotti *et al*., 2004) โมเลกุลของส่วนที่ไม่ชอบน้ำของน้ำมันหอมระเหยละลายในเยื่อเซลล์พลาสมาทำให้ส่วนที่ชอบน้ำเข้าสู่ผนังเซลล์ของจุลินทรีย์เกิดการยับยั้งเอนไซม์ (Cox *et al*., 2000) เมื่อมีการฉีกขาดของผนังเซลล์จะเกิดการรั่วไหลของไอออนจำเพาะต่าง ๆ ส่งผลให้ลดการสร้าง ATP (Lanciotti *et al*., 2004) น้ำมันหอมระเหยจาก oregano ส่งเสริมให้เกิดการเพิ่มประสิทธิภาพในการซึมผ่านของสารได้ดีในเซลล์ของ *P. aeruginosa* และ *S. aureus* ทำให้โปรตอน ฟอสเฟต และโปรตัสเซียมเกิดการรั่วไหล (Lambert *et al*., 2001 อ้างโดย Burt, 2004) นอกจากนี้สารในกลุ่มเทอร์ปีนพวก carvacrol ซึ่งพบในน้ำมันหอมระเหยของพืชพวก oregano, thyme, marjoram และกานพลูจะทำลายกลุ่มยีนที่สร้างพลังงานใน *B. cereus* ส่งผลให้ลดการสังเคราะห์หรือการแยกสลายด้วยน้ำ (hydrolysis) (Ultee *et al*., 1999 อ้างโดย Lanciotti *et al*., 2004) ถึงแม้ว่าผนังเซลล์แบคทีเรียจะเกิดรอยแตกร้าว แต่ก็ยังมีชีวิตรอดอยู่ได้ แต่เมื่อรอยร้าวนั้นครอบคลุมบริเวณกว้างทำให้เซลล์สูญเสียองค์ประกอบภายในเซลล์ โมเลกุลและไอออนเกิดภาวะวิกฤตส่งผลให้แบคทีเรียตายในที่สุด (Denver and Hugo, 1991 อ้างโดย Burt, 2004)

6. การประยุกต์สารสกัดและน้ำมันหอมระเหยในอาหาร

สารสกัดและน้ำมันหอมระเหยจากพืชนำมาประยุกต์ในอาหาร เครื่องดื่ม เครื่องสำอาง ยา สารปรุงแต่งกลิ่นและเป็นสารพวก aromatherapy (Salunkhe and Kadam, 1995 อ้างโดย Sawamura *et al*., 2004) นอกจากนี้สารสกัดและน้ำมันหอมระเหยจากพืชตระกูลส้มสามารถใช้เป็นสารถนอมอาหารในกระบวนการแปรรูปผลไม้เนื่องจากมีสมบัติในการยับยั้งจุลินทรีย์ (Lanciotti *et al*., 2004)

Dabbah และคณะ (1970) นำน้ำมันหอมระเหยจากพืชตระกูลส้มผสมกับนมชนิดต่าง ๆ ความเข้มข้น 1 มิลลิลิตรต่อลิตร แล้วเก็บไว้ที่ 4 องศาเซลเซียสในตู้เก็บปลอดเชื้อ พบว่าหลังจาก 60 วัน ลักษณะของหางนมยังคงปกติอยู่ แต่หลังจาก 73 วัน เริ่มมีกลิ่น ส่วนนมที่ไม่เติมน้ำมันหอม-ระเหยจากส้มจะมีกลิ่นผิดปกติหลัง 28 วัน

การใช้น้ำมันหอมระเหยเป็นสารถนอมอาหารเพื่อยืดอายุการเก็บรักษาอาหารนั้นปัจจัยต่าง ๆ ที่ต้องคำนึงถึงคือชนิดของน้ำมันหอมระเหย จำนวนเชื้อเริ่มต้นที่มีอยู่ในอาหาร ระยะเวลา พีเอชของ

อาหารและองค์ประกอบที่มีในอาหารนั้น เนื่องจากปัจจัยเหล่านี้มีผลต่อกิจกรรมการยับยั้งจุลินทรีย์ของน้ำมันหอมระเหย

6.1 พีเอช เป็นปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อประสิทธิภาพการยับยั้งจุลินทรีย์ในอาหาร ที่ระดับพีเอชต่ำโมเลกุลของสารสกัดหรือน้ำมันหอมระเหยมีการยึดเกาะกันได้ดี เมื่อสัมผัสกับเมมเบรนของผนังเซลล์จุลินทรีย์ด้วยพันธะไฮโดรเจน ทำให้การซึมผ่านของสารสกัดหรือน้ำมันหอมระเหยได้ดี ส่งเสริมให้เกิดกิจกรรมการยับยั้งได้ดี (Juven *et al*., 1994 อ้างโดย Burt, 2004) จากการรายงานของ Stonsaovapak และคณะ (2000) ศึกษาอิทธิพลของพีเอชต่อกิจกรรมการยับยั้งของสารสกัดจากใบพลู (*Piper betle* L.) ต่อ *E. coli* O157 : H7 และเปลือกทับทิม (*Punica granatum* Linn.) ต่อการยับยั้ง *Yersinia enterocolitica* พบว่ากิจกรรมการยับยั้งแบคทีเรียเกิดขึ้นได้ดีที่พีเอช 4.5 เมื่อเทียบกับความเข้มข้นเดียวกันที่พีเอชสูง โดย *E. coli* และ *Y. enterocolitica* สามารถเจริญได้ในช่วงพีเอช 4.5-9.5 นั่นแสดงว่าผลการยับยั้งเกิดจากสารสกัดของพืชไม่ได้มีผลมาจากพีเอชของอาหาร

6.2 ส่วนประกอบของอาหาร ไขมันและโปรตีนในอาหารส่งผลต่อกิจกรรมการยับยั้งจุลินทรีย์ ซึ่งจะเป็นตัวปกป้องแบคทีเรียจากปฏิกิริยาของน้ำมันหอมระเหย (Tassou *et al*., 1995 อ้างโดย Burt, 2004) เนื่องจากน้ำมันหอมระเหยละลายในชั้นไขมันของอาหารมากกว่าละลายในชั้นน้ำของแบคทีเรีย (Mejlholm and Dalgaard, 2002 อ้างโดย Burt, 2004) น้ำมันหอมระเหยจากพืชมีกิจกรรมการยับยั้งจุลินทรีย์ในเนยแข็งที่มีไขมันต่ำดีกว่าในเนยแข็งที่มีไขมันสูงเนื่องจากไขมันในเนยแข็งจะเป็นตัวดูดซับสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ (Holley and Patel, 2005) นอกจากนี้ระดับไขมันในอาหารที่พอดีคือมากกว่า 16 เปอร์เซ็นต์ ทำให้กิจกรรมการยับยั้งแบคทีเรียเกิดขึ้นได้ดี (Smith-Palmer *et al*., 2001)

Singh และคณะ (2003) ศึกษาประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยจาก thyme และกานพลู โดยนำมาประยุกต์ในไส้กรอกที่ไม่มีไขมัน (0 กรัมต่อกิโลกรัม) มีไขมันต่ำ (90 กรัมต่อกิโลกรัม) และมีไขมันสูง (260 กรัมต่อกิโลกรัม) ต่อการยับยั้ง *L. monocytogenes* พบว่าน้ำมันหอมระเหยจาก thyme สามารถลดปริมาณเชื้อที่ระดับ 1 มิลลิลิตรต่อลิตรในไส้กรอกที่ไม่มีไขมันและไขมันต่ำ แต่ปริมาณเชื้อจะไม่ลดในไส้กรอกที่มีไขมันสูง น้ำมันหอมระเหยจาก thyme ที่ระดับ 10 มิลลิลิตรต่อลิตร สามารถลดเชื้อได้ >1.3 Log CFU ต่อกรัม ในไส้กรอกที่ไม่มีไขมัน แต่ประสิทธิภาพจะลดลงในไส้กรอกไขมันต่ำและสูง ส่วนน้ำมันหอมระเหยจากกานพลูมีประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อที่ระดับ 1 มิลลิลิตรต่อลิตร ในไส้กรอกที่มีไขมันทุกระดับและมีประสิทธิภาพมากกว่าน้ำมันหอมระเหยจาก thyme ที่ระดับ 5 มิลลิลิตรต่อลิตร

6.3 อุณหภูมิ เป็นปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อประสิทธิภาพการยับยั้งจุลินทรีย์ในอาหาร น้ำมันหอมระเหยของ cinnamaldehyde และ thymol มีประสิทธิภาพในการยับยั้ง *Salmonella* sp. ในเมล็ด

ถั่ว alfalfa ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส แต่เมื่อเพิ่มอุณหภูมิเป็น 70 องศาเซลเซียส พบว่าประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยลดลง (Weissinger *et al*., 2001 อ้างโดย Burt, 2004)

6.4 ลักษณะทางกายภาพของอาหาร เป็นปัจจัยจำกัดต่อกิจกรรมการยับยั้งจุลินทรีย์ของน้ำมันหอมระเหย มีการศึกษาสหสัมพันธ์ของน้ำมันหอมระเหยจาก oregano ต่อการยับยั้ง *S. typhimurium* ในอาหารเหลวและเจลาตินพบว่ากิจกรรมการยับยั้งจุลินทรีย์ของน้ำมันหอมระเหยในเจลาตินจะลดลง เนื่องจากมีข้อจำกัดในเรื่องการแพร่ผ่านของสารในเจลาติน (Skandamis *et al*., 2000 อ้างโดย Burt, 2004)

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. คัดเลือกสารสกัดและน้ำมันหอมระเหยจากพืชตระกูลส้มที่มีกิจกรรมการยับยั้งจุลินทรีย์
2. ศึกษาส่วนประกอบของสารสกัดและน้ำมันหอมระเหยจากพืชตระกูลส้มที่คัดเลือกได้
3. หาค่าความเข้มข้นต่ำสุด MIC และ MBC/MFC ของสารสกัดหรือน้ำมันหอมระเหยจากพืชตระกูลส้มที่สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์
4. ผลของพีเอช อุณหภูมิ และองค์ประกอบในอาหารที่มีผลต่อกิจกรรมการยับยั้งจุลินทรีย์ของสารสกัดหรือน้ำมันหอมระเหยจากพืชตระกูลส้มที่คัดเลือกได้
5. ศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งของสารสกัดหรือน้ำมันหอมระเหยจากพืชตระกูลส้มที่คัดเลือกได้