



โครงการทางวิทยาศาสตร์ชีวภาพ

การศึกษาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพและคุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระจาก
เมล็ดส้มเขียวหวาน

THE STUDY OF BIOACTIVE COMPOUNDS AND ANTIOXIDANT
PROPERTIES FROM TANGERINE SEED

โดย

นางสาวชลธิชา ชาญตะปะ

ภาควิชาวิทยาศาสตร์และนวัตกรรมชีวภาพ
คณะศิลปศาสตร์และวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
พ.ศ. 2566



ใบรับรองโครงการทางวิทยาศาสตร์ชีวภาพ
ภาควิชาวิทยาศาสตร์และนวัตกรรมชีวภาพ
คณะศิลปศาสตร์และวิทยาศาสตร์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยาศาสตร์บัณฑิต (วิทยาศาสตร์ชีวภาพ)

ปริญญา

วิทยาศาสตร์ชีวภาพ

วิทยาศาสตร์และนวัตกรรมชีวภาพ

สาขา

ภาควิชา

เรื่อง การศึกษาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพและคุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระจากเมล็ด
ส้มเขียวหวาน

THE STUDY OF BIOACTIVE COMPOUNDS AND ANTIOXIDANT PROPERTIES FROM
TANGERINE SEED

นามผู้วิจัย.....นางสาวชลธิชา ชาญตะนะ.....

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

ประธานกรรมการ.....

(.....อ.ดร. พุทธิพร ส่องศรี, D.Eng.....)

ภาควิชาวิทยาศาสตร์และนวัตกรรมชีวภาพ คณะศิลปศาสตร์และวิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

(.....รองศาสตราจารย์แดงอ่อน พรหมณี, ปร.ด.....)

หัวหน้าภาควิชาวิทยาศาสตร์และนวัตกรรมชีวภาพ

วันที่.....เดือน.....พ.ศ. 2566

การศึกษาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพและคุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระจากเมล็ด ส้มเขียวหวาน

ชลธิชา ชาญตะบะ และ พุทธพร ส่องศรี

บทคัดย่อ

เมล็ดส้มเขียวหวาน เป็นของเหลือทิ้งทางการเกษตรจำนวนมาก จากการผลิตน้ำส้มคั้น ส่วนที่เหลือจะเป็นวัสดุที่เหลือทิ้ง ได้แก่ เปลือกและเมล็ด และจากการบริโภคส้มเขียวหวาน เมล็ดส้มเขียวหวาน มีสารพฤกษเคมีที่มีประโยชน์ คือ สารประกอบฟีนอลิก และฟลาโวนอยด์ ซึ่งสามารถลดระดับน้ำตาลในเลือดได้ และเป็นแหล่งที่อุดมไปด้วยสารต้านอนุมูลอิสระตามธรรมชาติ การศึกษาครั้งนี้ ได้ศึกษาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพและคุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระจากเมล็ดส้มเขียวหวาน โดยการทดสอบปริมาณสารประกอบฟีนอลิกด้วยวิธี Folin-Ciocalteu พบว่า เมล็ดส้มเขียวหวาน มีสารประกอบฟีนอลิกเป็นองค์ประกอบ การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH พบว่า เมล็ดส้มเขียวหวาน มีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระสูง ซึ่งเมื่อมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกมาก แสดงว่าจะมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระมากด้วย การทดสอบปริมาณฟลาโวนอยด์ ด้วยวิธีAluminium chloride พบว่า เมล็ดส้มเขียวหวาน มีฟลาโวนอยด์เป็นองค์ประกอบ การทดสอบแคโรทีนโดยใช้ปฏิกิริยาคาร์ไพโรซ ไม่พบแคโรทีนในเมล็ดส้มเขียวหวานในระดับการตรวจโดยใช้ปฏิกิริยาคาร์ไพโรซ และการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์อะไมเลส เมล็ดส้มเขียวหวานสามารถสกัดสารยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อะไมเลส ที่มีประสิทธิภาพสูงได้ จากการศึกษาครั้งนี้ พบว่า เมล็ดส้มเขียวหวานมีสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพและคุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระที่สามารถช่วยเพิ่มมูลค่าให้เมล็ดส้มเขียวหวาน และช่วยลดปริมาณของเหลือทิ้งทางการเกษตร และยังสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในทางอุตสาหกรรมต่างๆต่อไปได้

คำสำคัญ: สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ, ฟีนอลิก, เมล็ดส้มเขียวหวาน, ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

ลายมือชื่อนิสิต

ลายมือชื่อประธานกรรมการ

The Study of Bioactive Compounds and Antioxidant Properties From Tangerine Seed

Chonthicha Chantaba and Puttaporn Songsri

ABSTRACT

Tangerine seeds it is a large amount of agricultural waste from the production of orange juice the remainder is waste materials, including husks and seeds. And from the consumption of tangerines tangerine seeds there are useful phytochemicals, phenolic compounds and flavonoids which can lower blood sugar levels and is a rich source of natural antioxidants. This study investigated the bioactive compounds and antioxidant properties of tangerine seeds. By testing the content of phenolic compounds by Folin-Ciocalteu found that tangerine seeds contains phenolic compounds. DPPH antioxidant activity test found that tangerine seeds has high antioxidant activity which when there is a large amount of phenolic compounds shows that it has a lot of anti-oxidant effect as well. Flavonoid content test by using the aluminum chloride method, it was found that tangerine seeds Contains flavonoids. Carotene assay using the Car-Price reaction Carotene was not found in tangerine seeds assayed using the Car-Price reaction. And amylase inhibitory activity test Tangerine seeds can extract amylase inhibitors with high efficiency. From this study, it was found that tangerine seeds contain bioactive compounds and antioxidant properties that can help increase the value of tangerine seeds. And help reduce the amount of agricultural waste and can still be applied in various industries.

Keywords: Bioactive Compounds, Phenolic, Tangerine Seed, Antioxidant Properties

Student's signature

Advisor's signature

บทนำ

ในปัจจุบันมีผลผลิตทางการเกษตรหลายชนิดที่ถือเป็นวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร รวมถึงเมล็ดส้ม จากการผลิตน้ำส้มคั้น ส่วนที่เหลือจะเป็นวัสดุที่เหลือทิ้ง ได้แก่ เปลือกและเมล็ด (Braddock, 1995) และส้มเป็นผลไม้ที่มีการบริโภคมาก ส้มเป็นผลไม้ยืนพื้นในชีวิตประจำวันของคนทั่วโลก สำหรับประเทศไทยนั้น การผลิตส้มมีอยู่ทั่วประเทศ ในปัจจุบันพื้นที่ผลิตส้มหลักของประเทศส่วนใหญ่อยู่ภาคเหนือ (อารี และคณะ 2552) พืชตระกูลส้มที่นิยมปลูกในประเทศไทย ได้แก่ กลุ่มส้มเปลือกอ่อนหรือพวกส้มเขียวหวานและส้มจุก (*C. reticulata* Blanco) เช่น ส้มเขียวหวานบางมด ส้มโชกุน ส้มนัมเบอร์วัน กลุ่มส้มโอ (*C. grandis* L.) และกลุ่มมะนาว (*C. aurantifolia* Swingle) (เปรมปรีดี , 2544)

ส้มเขียวหวาน (*Citrus reticulata* Blanco) มีองค์ประกอบของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพมากมาย ซึ่งเมล็ดส้มเขียวหวาน ยังเป็นแหล่งของลิโมนอยด์ (limonoids) ซึ่งเป็นสารพฤกษเคมีที่พบเฉพาะในพืชตระกูลส้ม สารดังกล่าวมีรสขมมากและพบว่ามีสมบัติในการยับยั้งการเกิดเซลล์มะเร็งในสัตว์ทดลองได้ดี (Braddoc, 1995; Bocco *et al.*, 1998) การใช้ประโยชน์จากเปลือกและเมล็ดส้มในแง่สารพฤกษเคมีที่เป็นประโยชน์ต่อสุขภาพโดยเฉพาะสารประกอบฟีนอลิก (phenolic compounds) ซึ่งรวมถึงกรดฟีนอลิก (phenolic acids) และฟลาโวนอยด์ (flavonoids) สำหรับฟลาโวนอยด์ที่พบในพืชตระกูลส้มที่สำคัญมี 2 กลุ่ม คือโพลีเมทอกซีเลทเท็ด เฟลโวน (polymethoxylated flavones) และไกลโคซิเลทเท็ด เฟลวานอน (glycosylated flavanones) (Bocco *et al.*, 1998) ส้มเขียวหวาน ผลไม้รสเปรี้ยว เป็นแหล่งที่อุดมไปด้วยสารต้านอนุมูลอิสระตามธรรมชาติ ซึ่งปัจจุบันได้รับการยอมรับอย่างกว้างขวางว่า มีประโยชน์ต่อสุขภาพของมนุษย์ ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของผลไม้รสเปรี้ยวเป็นหัวข้อวิจัยของงานวิจัยหลายงาน จากการศึกษาเหล่านี้ วิตามิน ฟลาโวนอยด์ และกรดฟีนอลิก มีความสามารถในการต่อต้านอนุมูลอิสระ มีการรายงานวิธีการต่างๆมากมาย สำหรับการประเมินความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของตัวอย่างพืช (Zhang *et al.* 2014) มีหลายวิธีในการประมาณค่ากิจกรรมของสารต้านอนุมูลอิสระ ซึ่งวิธี DPPH นิยมใช้กันอย่างแพร่หลาย องค์ประกอบฟีนอลิกและความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของส้มเขียวหวาน (เปลือก กากเนื้อ เมล็ด และน้ำผลไม้) (Hua *et al.* 2018) มีรายงานว่าสารพฤกษเคมี เช่น สารประกอบฟีนอล ฟลาโวนอยด์ จากพืชหลายชนิด สามารถลดระดับน้ำตาลในเลือดได้โดยการออกฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อัลฟาอะไมเลส (Toh *et al.*, 2015; Martinez-Gonzalez *et al.*, 2019)

จากที่กล่าวมาข้างต้นการศึกษานี้ มีวัตถุประสงค์จะศึกษาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพและคุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระจากสารสกัดเมล็ดส้มเขียวหวาน โดยการหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด ปริมาณฟลาโวนอยด์ และกิจกรรมทางชีวภาพของสารสกัด เพื่อนำมาเป็นข้อมูลพื้นฐานในการนำไปใช้ประโยชน์ในเชิงอุตสาหกรรมอาหาร คุณสมบัติทางยา ผลิตภัณฑ์สำอางจากธรรมชาติ เพื่อเป็นการลดปริมาณและเพิ่มมูลค่าให้กับเมล็ดส้มเขียวหวาน

อุปกรณ์และวิธีการ

1 การเตรียมตัวอย่างเมล็ดส้มเขียวหวาน

นำส้มเขียวหวานมาเอาส่วนของเมล็ดออกเพื่อใช้ในการศึกษา ทำความสะอาดด้วยน้ำและผึ่งให้แห้ง น้ำหนักสด 149.26 กรัม จากนั้นนำไปอบในตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 ชั่วโมง จากนั้นบดเมล็ดแห้งเป็นสารสกัดหยาบ น้ำหนักแห้ง 87.61 กรัม

2 การเตรียมสารสกัดจากเมล็ดส้มเขียวหวาน

นำตัวอย่างเมล็ดแห้งที่บด น้ำหนัก 48.80 กรัม นำไปสกัดด้วยตัวทำละลาย 95% Ethanol 300 มิลลิลิตร ใส่ในขวด Duran เป็นเวลา 1 สัปดาห์ ที่อุณหภูมิห้อง กรองสารสกัดโดยใช้ Buchner funnel และ suction flask แล้วเก็บสารสกัดไว้ในขวดแช่ตู้เย็น 4 °C ไปใช้วิเคราะห์ชั้นตอนถัดไป

3. การทดสอบปริมาณสารประกอบฟีนอลิก

การหาปริมาณฟีนอลิกในสารสกัดจากเมล็ดส้มเขียวหวาน โดยวิธี Folin-Ciocalteu ดัดแปลงวิธีบางส่วนจาก Singleton et al. (1996) เตรียมสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิก ในน้ำกลั่นความเข้มข้นต่างๆ (0,20,40,60,80 และ 100 มิลลิกรัมต่อลิตร) จากนั้นใช้ปิเปตดูดสารละลายที่เจือจางแล้วใส่หลอดทดลองปริมาตรหลอดละ 1 มิลลิลิตร เตรียมสารสกัดตัวอย่างเจือจาง 95% เอทานอล 1:10 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร จากนั้นเติมสารละลาย 10% Folin-Ciocalteu Reagent หลอดละ 1 มิลลิลิตร เติมสารละลาย 7 % Sodium Carbonate (Na_2CO_3) หลอดละ 4 มิลลิลิตร ลงในตัวอย่าง เขย่าให้สารละลายผสมกัน วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 760 นาโนเมตร โดยใช้เครื่อง Spectrophotometer คำนวณปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด

4. การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH

การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH scavenging assay โดยดัดแปลงจากวิธีการของ Andrica et al. (2016) เตรียมสารมาตรฐาน Butylated hydroxytoluene (BHT) ใน methanol ความเข้มข้นต่างๆ (0,20,40,60,80 และ 100 µg/mL) จากนั้นใช้ปิเปตดูดสารละลายที่เจือจางแล้วใส่หลอดทดลองปริมาตรหลอดละ 1 มิลลิลิตร และเตรียมสารสกัดตัวอย่างปริมาตร 1 มิลลิลิตร และสารสกัดตัวอย่างเจือจางด้วยเมทานอล 1:10 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เติมเมทานอล 3 มิลลิลิตรทุกหลอด จากนั้นเติมสารละลาย DPPH ใน methanol เข้มข้น 1 m mol/L ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตรทุกหลอด เขย่าให้ผสมกัน เก็บไว้ในที่มืด 20 นาที จากนั้นวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Spectrophotometer จากนั้นเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระกับสารละลายมาตรฐาน Butylated hydroxytoluene (BHT) โดยใช้ %Radical scavenging

5. การทดสอบปริมาณฟลาโวนอยด์

การทดสอบปริมาณฟลาโวนอยด์ โดยใช้วิธี Aluminium chloride ดัดแปลงวิธีบางส่วนจาก ภาณุมาศ (2563) เตรียมสารมาตรฐานเคออสิติน ความเข้มข้นต่างๆ (0,40,80 และ 120 µg/mL) จากนั้นใช้ปิเปตดูดสารละลายที่เจือจางแล้วใส่หลอดทดลองปริมาตรหลอดละ 1.5 มิลลิลิตร เตรียมสารสกัดตัวอย่างปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร และสารสกัดตัวอย่างเจือจาง 95%เอทานอล 1:10 ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร เติมสารละลาย potassium acetate ปริมาตร 100 ไมโครลิตรทุกหลอด เติม Aluminium chloride ปริมาตร 100 ไมโครลิตรทุกหลอด จากนั้นเติมน้ำกลั่น 13 มิลลิลิตรลงในหลอดสารมาตรฐานเคออสิติน ความเข้มข้นต่างๆ และเติม 95%เอทานอล 13 มิลลิลิตรลงในหลอดสารสกัดตัวอย่าง และสารสกัดตัวอย่างเจือจาง 1:10 เขย่าให้เข้ากัน เก็บไว้ในที่มืดที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 415 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Spectrophotometer คำนวณหาปริมาณสารฟลาโวนอยด์

6. การทดสอบแคโรทีน โดยใช้ปฏิกิริยา คาร์-ไพร์ซ (Carr-price reaction)

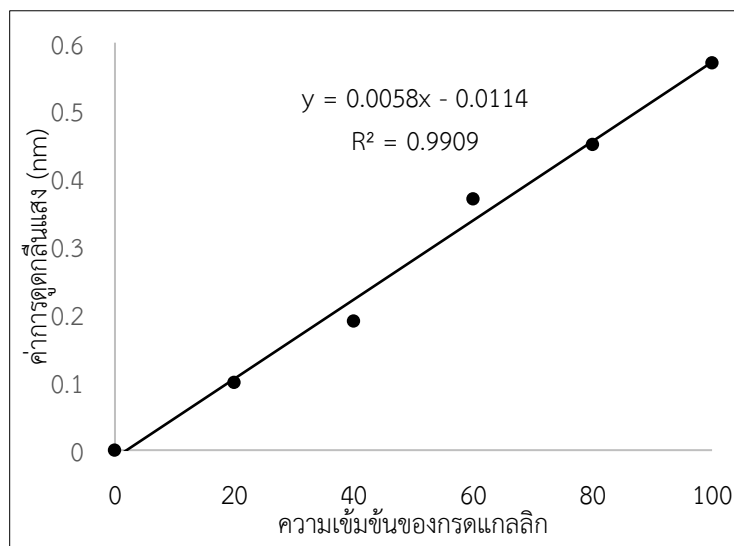
เตรียมสารละลายแคโรทีน 1 มิลลิลิตร และเตรียมสารตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร ในหลอดทดลอง นำทั้งสองหลอดไปแช่เย็น 10 นาที จากนั้นเติมสารละลายแอนติโมนีไตรคลอไรด์ที่เย็นจัด หลอดละ 2 มิลลิลิตร เปรียบเทียบการเกิดสี

7. การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์อะไมเลส

การทดสอบหาสารยับยั้งเอนไซม์อะไมเลส โดยมีการดัดแปลงบางส่วนจากวิธีการของ ญัฐพล , วิษณุ และ ศิวกร (2561) เตรียมน้ำแป้ง ใส่ลงในหลอดทดลองละ 5 มิลลิลิตร จำนวน 2 หลอด นำ 1 หลอดเติม 95%เอทานอล 1 มิลลิลิตร(control) และอีก 1 หลอด เติม 95%เอทานอล 0.5 มิลลิลิตร และสารสกัดตัวอย่าง 0.5 มิลลิลิตร ผสมสารให้เข้ากันด้วยเครื่อง vortex mixer เติมเอนไซม์อะไมเลส 0.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ตั้งไว้ 20 นาที จากนั้นดูดสารแต่ละหลอด 2 มิลลิลิตร ใส่ใน HCl 0.1 M ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน จากนั้นดูดสารละลายหลอดละ 3 มิลลิลิตร ใส่ในสารละลายไอโอดีนปริมาตร 5 มิลลิลิตร จากนั้นดูดสารละลายหลอดละ 1 มิลลิลิตร ใส่ในสารละลายไอโอดีน ปริมาตร 4 มิลลิลิตร(เตรียมใหม่) ผสมให้เข้ากัน นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 620 นาโนเมตร

ผลการศึกษา

ผลการทดสอบปริมาณสารประกอบฟีนอลิกของสารสกัดจากเมล็ดส้มเขียวหวาน ด้วยวิธี Folin-Ciocalteu พบว่า ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดเทียบกับกราฟสารมาตรฐานของกรดแกลลิก แสดงให้เห็นว่า เมล็ดส้มเขียวหวาน มีสารประกอบฟีนอลิกเป็นองค์ประกอบ และมีปริมาณฟีนอลิกโดยรวม สูงสุดเท่ากับ 2.600 mg GAE/gDW และมีปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดเฉลี่ย 2.34 ± 0.30 mg GAE/gDW

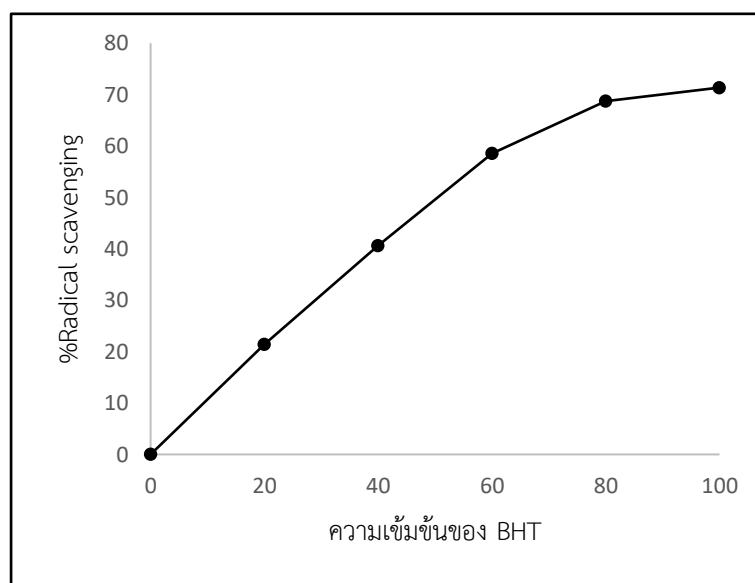


ภาพที่ 1 กราฟมาตรฐานของกรดแกลลิก

ตารางที่ 1 ผลการหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกของสารสกัดเมล็ดส้มเขียวหวาน

ตัวอย่าง	ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด			ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดเฉลี่ย (mg GAE/g DW) ± SD
	1	2	3	
1:10	2.010	2.600	2.424	2.34 ± 0.30

ผลการทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดเมล็ดส้มเขียวหวานโดยใช้ % DPPH scavenging activity พบว่า สารสกัดจากเมล็ดส้มเขียวหวานที่ไม่เจือจาง และสารสกัดจากเมล็ดส้มเขียวหวานที่เจือจาง 1:10 มีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระสูงสุด 88.60% และ 53.23% ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่า สารสกัดจากเมล็ดส้มเขียวหวานที่ไม่เจือจาง มีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุด มีเปอร์เซ็นต์ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระเฉลี่ยเท่ากับ 85.76 ± 2.61

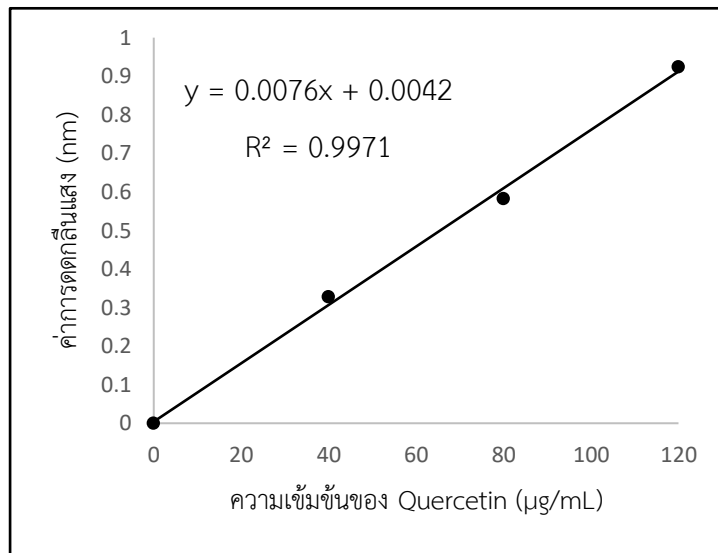


ภาพที่ 2 กราฟมาตรฐานของ Butylated hydroxytoluene (BHT)

ตารางที่ 2 ผลการหา % ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดเมล็ดส้มเขียวหวาน

ตัวอย่าง	%Radical scavenging			ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ เฉลี่ย ± SD
	1	2	3	
ไม่เจือจาง	88.60	83.48	85.19	85.76 ± 2.61
1:10	43.09	53.32	53.23	49.88 ± 5.88

ผลการทดสอบปริมาณฟลาโวนอยด์ของสารสกัดเมล็ดส้มเขียวหวาน พบว่าเมล็ด ส้มเขียวหวาน มีฟลาโวนอยด์เป็นองค์ประกอบ มีปริมาณฟลาโวนอยด์โดยรวมสูงสุดเท่ากับ 0.584 mg QE/g DW และมีปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมดเฉลี่ย 0.54 ± 0.45 mg QE/gDW

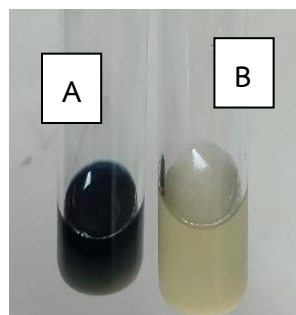


ภาพที่ 3 กราฟมาตรฐานของ Quercetin

ตารางที่ 3 ผลการทดสอบปริมาณฟลาโวนอยด์ของสารสกัดเมล็ดส้มเขียวหวาน

ตัวอย่าง	ปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด			ปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมดเฉลี่ย (mg QE/gDW) ± SD
	1	2	3	
ไม่เจือจาง	0.584	0.544	0.495	0.54 ± 0.45
1:10	0.393	0.298	0.350	0.35 ± 0.48

ผลการทดสอบแคโรทีน โดยใช้ปฏิกิริยา คาร์-ไพร์ซ พบว่า เมื่อเติมสารละลายแอนติโมนีไตร คลอไรด์ สารสกัดตัวอย่างไม่เปลี่ยนสีเป็นสีน้ำเงิน แสดงว่า ไม่พบแคโรทีนในเมล็ดส้มเขียวหวานใน ระดับการตรวจโดยใช้ปฏิกิริยา คาร์-ไพร์ซ



ภาพที่ 4 ผลการทดสอบแคโรทีน แคโรทีน (A), สารสกัดตัวอย่าง (B)

ผลการทดสอบหาสารยับยั้งเอนไซม์อะไมเลส ของสารสกัดเมล็ดส้มเขียวหวาน พบว่า หลอด control มีค่า ΔA เท่ากับ 0.710 จากผลการทดสอบสารสกัดเมล็ดส้มเขียวหวานมีความสามารถในการยับยั้งเอนไซม์ มีประสิทธิภาพยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อะไมเลสเฉลี่ย 97.28 ± 0.52 แสดงว่าเมล็ดส้มเขียวหวานสามารถสกัดสารยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อะไมเลสได้

ตารางที่ 4 ผลประสิทธิภาพการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อะไมเลส

ตัวอย่าง	ΔA /นาที			ประสิทธิภาพยับยั้งการทำงาน ของเอนไซม์อะไมเลส			ประสิทธิภาพยับยั้งการทำงาน ของเอนไซม์อะไมเลสเฉลี่ย
	1	2	3	1	2	3	
สารสกัดตัวอย่าง	0.024	0.018	0.017	96.69	97.49	97.66	97.28 ± 0.52

วิจารณ์ผลการศึกษา

ผลการศึกษาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกของเมล็ดส้มเขียวหวาน พบว่า เมล็ดส้มเขียวหวาน มีสารประกอบฟีนอลิกเป็นองค์ประกอบ และมีปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดเท่ากับ 2.34 ± 0.30 mg GAE/gDW ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Bocco *et al.* (1998) รายงานว่าเมล็ดส้มเขียวหวานจะมีปริมาณสารประกอบโพลีฟีนอลเป็นองค์ประกอบ และพีชะระกูลส้มสายพันธุ์ต่างกันจะมีปริมาณสารประกอบโพลีฟีนอลทั้งหมดต่างกัน การศึกษาปริมาณฟลาโวนอยด์ของเมล็ดส้มเขียวหวาน พบว่า สารสกัดจากเมล็ดส้มเขียวหวานที่สกัดด้วยเอทานอลที่ไม่เจือจาง มีปริมาณฟลาโวนอยด์มากกว่าสารสกัดจากเมล็ดส้มเขียวหวานที่เจือจาง แสดงว่า เมล็ดส้มเขียวหวาน มีฟลาโวนอยด์เป็นองค์ประกอบ ทั้งนี้องค์ประกอบปริมาณ และชนิดของสารฟีนอลิก ประกอบโพลีฟีนอลที่มีอยู่ในเมล็ดส้ม ส่วนใหญ่ประกอบด้วยสารประกอบโพลีฟีนอลกลุ่มฟลาโวนอยด์ 3 ประเภท คือ เพลลาโวน เพลวาโนน และเพลโวนอล (Benavente-Grcia *et al.*, 1997) การศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของเมล็ดส้มเขียวหวานที่สกัดด้วยเมทานอลด้วยวิธี DPPH พบว่า สารสกัดจากเมล็ดส้มเขียวหวานที่ไม่เจือจาง มีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระสูง คิดเป็นเปอร์เซ็นต์เฉลี่ยเท่ากับ 85.76 ± 2.61 ซึ่งพบว่า สารสกัดจากเมล็ดส้มเขียวหวานที่สกัดด้วยเอทานอลที่ไม่เจือจาง มีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระสูงกว่าสารสกัดจากเมล็ดส้มเขียวหวานที่เจือจางเมทานอล สอดคล้องกับวิจัยของ รุ่งทิวา (2549) รายงานว่า เมื่อตรวจสอบโดยวิธี DPPH สารสกัดจากเมล็ดส้มเขียวหวานที่สกัดด้วยเมทานอล มีความสามารถในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันสูง และมีแนวโน้มว่า สารสกัดจากเมล็ดส้มเขียวหวานที่สกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ที่มีขั้วมากจะมีปริมาณสารประกอบโพลีฟีนอลทั้งหมดและความสามารถในการต้านปฏิกิริยา

ออกซิเดชันสูง ซึ่งเมื่อมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกมาก แสดงว่าจะมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระมากตามไปด้วย (เนตรนภา และ เฉลิม, 2557) การทดสอบหาสารยับยั้งเอนไซม์อะไมเลสของเมล็ดส้มเขียวหวาน พบว่า เมล็ดส้มเขียวหวานสามารถสกัดสารยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อะไมเลสได้ ซึ่งสอดคล้องกับรายงานที่กล่าวว่า สารพฤกษเคมี เช่น สารประกอบฟีนอล ฟลาโวนอยด์ จากพืชหลายชนิด สามารถลดระดับน้ำตาลในเลือดได้โดยการออกฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อัลฟาอะไมเลส (Toh *et al.*, 2015; Martinez-Gonzalez *et al.*, 2019)

สรุปผลการศึกษา

การทดสอบสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพและคุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระของเมล็ดส้มเขียวหวาน แสดงให้เห็นว่า สารสกัดจากเมล็ดส้มเขียวหวานที่ไม่เจือจาง มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกสูง แสดงว่ามีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระที่สูงมากด้วย ซึ่งสูงกว่าสารสกัดจากเมล็ดส้มเขียวหวานที่เจือจางความเข้มข้นต่างๆ และพบปริมาณฟลาโวนอยด์ในสารสกัดจากเมล็ดส้มเขียวหวาน และสารสกัดจากเมล็ดส้มเขียวหวานยังสามารถสกัดสารยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อะไมเลสได้ ดังนั้น เมล็ดส้มเขียวหวานมีสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพและคุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระที่สามารถใช้ประโยชน์ช่วยเพิ่มมูลค่าให้เมล็ดส้มเขียวหวาน และยังสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในเชิงอุตสาหกรรมอาหาร คุณสมบัติทางยา ผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติ และอุตสาหกรรมต่างๆได้

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต วิทยาศาสตร์ชีวภาพ ภาควิชาวิทยาศาสตร์และนวัตกรรมชีวภาพ และ ฝ่ายกิจการนิสิต คณะศิลปศาสตร์และวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน ที่ให้ความสนับสนุนทุนการทำวิจัย

ขอขอบคุณอาจารย์พุทธพร สองศรี อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการทางวิทยาศาสตร์ที่ให้คำปรึกษาการศึกษาในครั้งนี้ และขอขอบคุณเจ้าหน้าที่สาขาวิชาชีวเคมีผู้ที่คอยให้ความช่วยเหลือในด้านอุปกรณ์และสารเคมีทำให้การศึกษาในครั้งนี้สำเร็จไปได้ด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

ณัฐพล มนุโสภิชฐ์, วิษณุ สุมาลี และ ศิวกร ชุมคง .2561. สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากของเหลือทิ้งทางการเกษตร.มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

- เนตรนภา เมยกลาง และ เฉลิม เรื่องวิริยะชัย .2557. การหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกและฤทธิ์
การต้านอนุมูลอิสระในเครื่องดื่มน้ำผลไม้. **วารสารวิจัย มข.**14(4).
- ประพันธ์ ปันศิริโรตม และ วันทนี ช่างน้อย .2545. การเปรียบเทียบปริมาณสารประกอบโพลีฟีนอล
ทั้งหมดและศักยภาพการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารสกัดจากเมล็ดพืชตระกูลส้มสาย
พันธุ์ต่างๆ ที่ปลูกในประเทศไทย. **วารสารอาหาร.** 32(4): 300-307.
- เปรมปรีดี ณ สงขลา .2544. **คู่มือการทำสวนอย่างมืออาชีพ**กรุงเทพฯ ., ฐานการพิมพ์.
- ภานุมาศ จินดาวงศ์. 2563. การศึกษาเปรียบเทียบสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากเมล็ดของพวงชมพู
และการนำไปใช้ในผลิตภัณฑ์แยมพวงชมพู .มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- รุ่งทิภา วงศ์ไพศาลฤทธิ์ .2549. **สมบัติการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารสกัดจากเปลือกและ
เมล็ดส้มเขียวหวาน**.สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.
- อารี วิบูลย์พงศ์, ทรงศักดิ์ ศรีบุญจิตต์, กฤษฎา แก่นมณี, รัตนา แก้วเสน, ฐานิตา ถุงแก้ว และ สุวิมล
ทองนอก. 2552. **โครงการทัศนคติและพฤติกรรมของผู้บริโภคส้มสายน้ำผึ้ง**.
มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.
- Andrica, F.M., G.A. Draghici, C. Soica, I. Pinzaru, D. Coricovac, C. Citu and C. Dehelean.
2016. Antioxidant Activity Assessment of Ethanolic Spirulina Extracts. **Revista
de Chimie Bucharest** 67:289-290.
- Benavente-Garcia, O., Castillo, J. Narin, F.R., Ortuno, A. and Del Rio, J.A. 1997. Uses
and Properties of *Citrus Flavonoids*. **J. Agric. Food Chem.** 45(12): 4505–4515.
- Bocco, A., Cuvelier, M.E., Richard, H. and Berset, C. 1998. Antioxidant activity and
phenolic composition of citrus peel and seed extracts. **J. Agric. Food Chem.**
46(6): 2123-2129.
- Braddock, R.J. 1995 . By-products of citrus fruit. **Food Technol** .49(9): 74-77.
- Gow-Chin Yen and Hui-Yin Chen. 1995. Antioxidant Activity of Various Tea Extracts in
Relation to Their Antimutagenicity. **J. Agric. Food Chem** 43: 27-32.
- Martinez-Gonzalez, A.I., Diaz-Sánchez, Á.G., de la Rosa, L.A., Bustos-Jaimes, I., Alvarez-
Parrilla E. 2019. Inhibition of α -amylase by flavonoids: Structure activity
relationship (SAR). **Spectrochimica Acta Part A** 206: 437–447.
- Singleton, V.L., R. Orthofer, R.M. Lamuela-Raventós, and P. Lester. 1999. Analysis of
total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of
Folin-ciocalteu reagent. **Methods in Enzymology** 299: 152-178.

- Toh, Z.S., Wang, H., Yip, Y. M., Lu, Y., Lim, B.J.A., Zhang, D. and Huang, D. 2015. Phenolic group on A-ring is key for dracoflavan B as a selective noncompetitive inhibitor of α -amylase. **Bioorganic and Medicinal Chemistry** 23:7641–7649.
- Zhang Hua, Yang Yi-fei and Zhou Zhi-qin. 2018. Phenolic and flavonoid contents of mandarin (*Citrus reticulata* Blanco) fruit tissues and their antioxidant capacity as evaluated by DPPH and ABTS methods. **Journal of Integrative Agriculture** 17(1): 256–263.
- Zhang Y M, Sun Y, Xi W P, Shen Y, Qiao L P, Zhong L Z, Ye X Q, Zhou Z Q. 2014. Phenolic compositions and antioxidant capacities of Chinese wild mandarin (*Citrus reticulata* Blanco) fruits. **Food Chemistry**, 145: 674–680.

ภาคผนวก ก
สารเคมีและการเตรียมสาร

สารเคมี

1. %95 Ethanol
2. 7% Sodium Carbonate (Na_2CO_3)
3. Gallic acid
4. 10 %Folin – Ciocalteu
5. Butylated hydroxytoluene (BHT)
6. Methanol
7. 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH)
8. Quercetin
9. Aluminium chloride (Al_3Cl_3)
10. Potassium acetate
11. Carotene
12. Antimony trichloride (SbCl_3)
13. HCL 0.1 M
14. Iodine

ตารางที่ ก1 การเตรียมสารมาตรฐาน gallic acid ความเข้มข้นต่างๆ

ความเข้มข้น (mg/L)	gallic acid (100mg/L)	น้ำกลั่น
0	0 ml	10 ml
20	2 ml	8 ml
40	4 ml	6 ml
60	6 ml	4 ml
80	8 ml	2 ml
100	10 ml	0 ml

ตารางที่ ก2 การเตรียมสารมาตรฐาน butylated hydroxytoluene (BHT) ความเข้มข้นต่างๆ

ความเข้มข้น (µg/ml)	BHT (40µg/ml)	Methanol
0	0 ml	10 ml
20	2 ml	8 ml
40	4 ml	6 ml
60	6 ml	4 ml
80	8 ml	2 ml
100	10 ml	0 ml

ตารางที่ ก3 การเตรียมสารมาตรฐาน Quercetin ความเข้มข้นต่างๆ

ความเข้มข้น (µg/ml)	Quercetin (200µg/ml)	ethanol
0	0 ml	4 ml
40	1 ml	3 ml
80	2 ml	2 ml
120	3 ml	1 ml
160	4 ml	0 ml

ภาคผนวก ข
วิธีการทดลองและผลการทดลอง

1 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH

โดยใช้ %Radical scavenging คำนวณดังนี้

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

A_{control} คือ ค่าการดูดกลืนแสงของ DPPH

A_{sample} คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารตัวอย่าง

2 การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์อะไมเลส

คำนวณ $\Delta A/\text{นาที} = A_{\text{control}} - A_{\text{sample}} / \text{เวลาที่ให้เกิดปฏิกิริยา(นาที)}$

ตารางผนวกที่ ข1 ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิก

ความเข้มข้นแกลลิก (mg/L)	ค่าการดูดกลืนแสง (760nm)
0	0
20	0.10
40	0.19
60	0.37
80	0.45
100	0.57

ตารางผนวกที่ ข2 ค่าการดูดกลืนแสงการหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกของสารสกัดเมล็ดส้มเขียวหวาน

ตัวอย่าง	ค่าการดูดกลืนแสง(760nm)		
	1	2	3
1:10	0.451	0.593	0.553

ตารางผนวกที่ ข3 ค่าการดูดกลืนแสงและ %Radical scavenging ของสารละลายมาตรฐาน Butylated hydroxytoluene (BHT)

ค่าความเข้มข้น ($\mu\text{g/ml}$)	ค่าการดูดกลืนแสง (517nm)	%Radical scavenging
0	1.114	0
20	0.876	21.36

40	0.662	40.57
60	0.462	58.53
80	0.349	68.67
100	0.319	71.36

ตารางที่ ข4 ค่าการดูดกลืนแสงการหาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดเมล็ดส้มเขียวหวาน

ตัวอย่าง	ค่าการดูดกลืนแสง 517 nm		
	1	2	3
ไม่เจือจาง	0.127	0.184	0.165
1:10	0.634	0.520	0.521

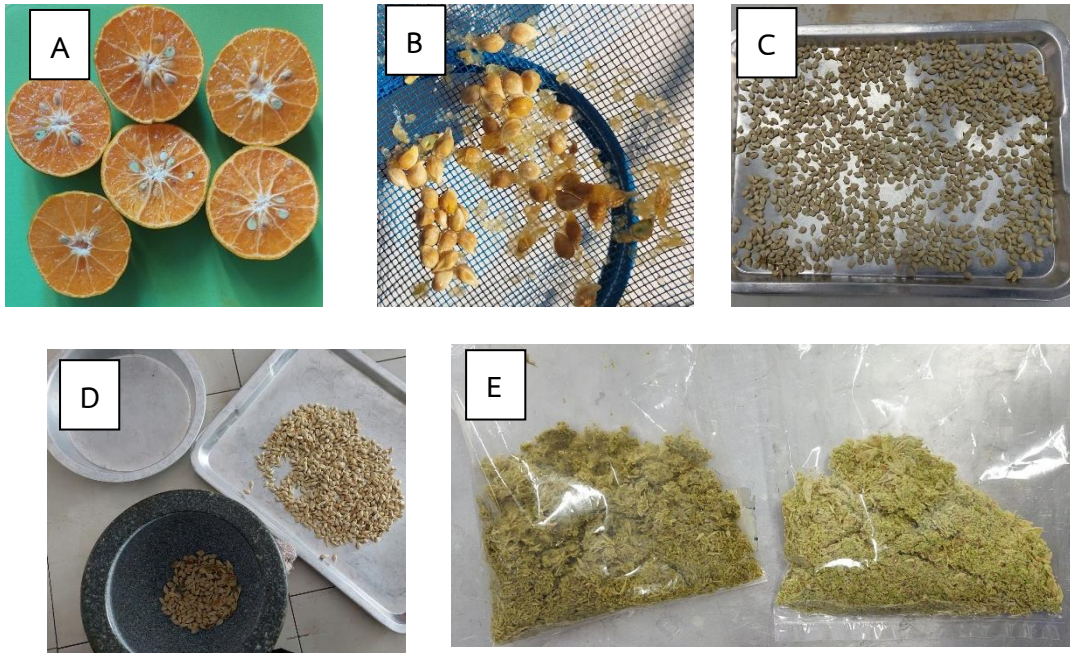
ตารางที่ ข5 ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐาน Quercetin

ความเข้มข้น ($\mu\text{g/mL}$)	ค่าการดูดกลืนแสง 415 nm
0	0
40	0.327
80	0.582
120	0.924

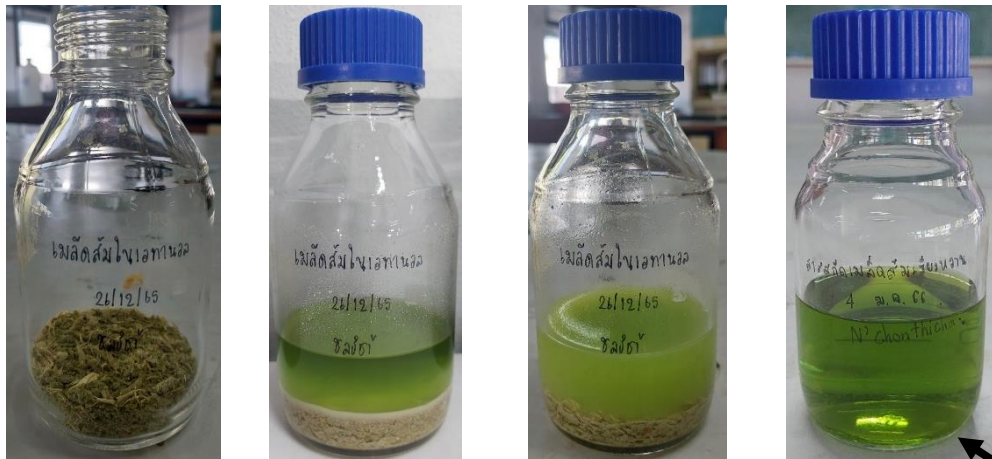
ตารางที่ ข6 ค่าการดูดกลืนแสงของการทดสอบปริมาณฟลาโวนอยด์ของสารสกัดเมล็ดส้มเขียวหวาน

ตัวอย่าง	ค่าการดูดกลืนแสง		
	1	2	3
ไม่เจือจาง	0.190	0.177	0.161
1:10	0.128	0.097	0.114

ภาคผนวก ค
ภาพการทดลอง



ภาพผนวกที่ ค1 การเตรียมตัวอย่าง แบ่งครึ่งผลส้มเขียวหวาน(A), ทำความสะอาดและผึ่งให้แห้ง(B), เมล็ดส้มเขียวหวานหลังอบ(C), บดเมล็ดส้มเขียวหวาน(D), เมล็ดส้มเขียวหวานที่บดหยาบ(E)

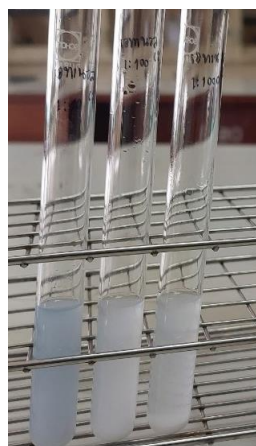


ภาพผนวกที่ ค2 การเตรียมสารสกัดด้วย 95% เอทานอล

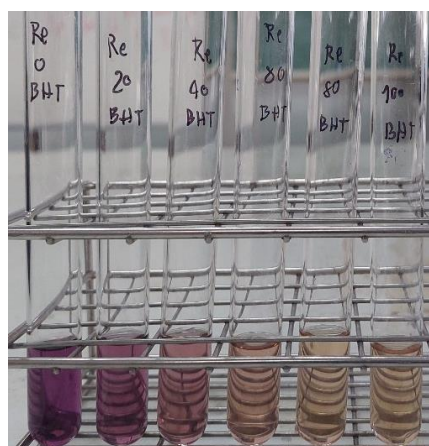
สารสกัดจากเมล็ดส้มเขียวหวาน



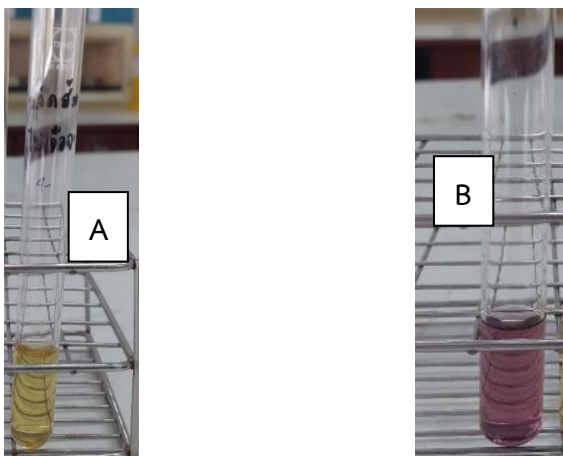
ภาพผนวกที่ ค3 สารละลายมาตรฐานแกลลิก



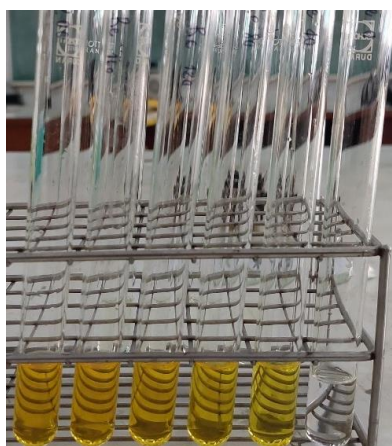
ภาพผนวกที่ ค4 ผลการทดสอบปริมาณสารประกอบฟีนอลิกของสารสกัดตัวอย่างที่เจือจางความเข้มข้นที่อัตราส่วน 1:10, 1:100, 1:1000 ตามลำดับ



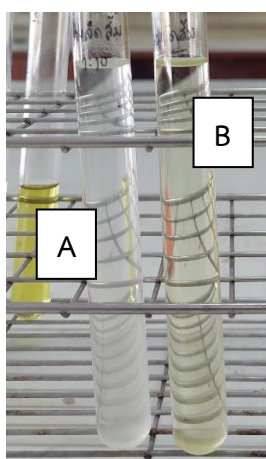
ภาพผนวกที่ ค5 สารละลายมาตรฐาน Butylated hydroxytoluene (BHT)



ภาพผนวกที่ ค6 ผลการทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระDPPH ของสารสกัดตัวอย่างที่ไม่เจือจาง(A), สารสกัดตัวอย่างที่เจือจาง 1:10 (B)



ภาพผนวกที่ ค7 สารละลายมาตรฐาน Quercetin



ภาพผนวกที่ ค8 ผลการทดสอบปริมาณฟลาโวนอยด์ของสารสกัดตัวอย่างเจือจาง 1:10 (A), สารสกัดตัวอย่างไม่เจือจาง (B)



เม็ล็ดสั้มเขียวหวาน

ภาพผนวกที่ ค9 ผลการทดสอบการยับยั้งเอนไซม์อะไมเลส