



โครงการทางวิทยาศาสตร์ชีวภาพ

การใช้ประโยชน์สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากผลมะนาวเทศ

UTILIZATION OF BIOACTIVE COMPOUNDS FROM LIME BERRY
(*TRIPHASIA TRIFOLIA*)

โดย

นางสาว สุชานันท์ เหมือนใจนีก

ภาควิชาวิทยาศาสตร์และนวัตกรรมชีวภาพ
คณะศิลปศาสตร์และวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

พ.ศ. 2567



ใบรับรองโครงการทางวิทยาศาสตร์ชีวภาพ
ภาควิชาวิทยาศาสตร์และนวัตกรรมชีวภาพ
คณะศิลปศาสตร์และวิทยาศาสตร์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยาศาสตร์บัณฑิต (วิทยาศาสตร์ชีวภาพ)

ปริญญา

วิทยาศาสตร์ชีวภาพ

วิทยาศาสตร์และนวัตกรรมชีวภาพ

สาขา

ภาควิชา

เรื่อง การใช้ประโยชน์สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากผลมะนาวเทศ
UTILIZATION OF BIOACTIVE COMPOUNDS FROM LIME BERRY
(TRIPHASIA TRIFOLIA)

นามผู้วิจัย.....นางสาวสุชานันท์ เหมือนใจนิก.....

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

ประธานกรรมการ.....

(...อาจารย์พุทธพร ส่องศรี, D.Eng.)

กรรมการ.....

(...อาจารย์ชัยวัฒน์ วามวรรตน์, วท.บ.)

ภาควิชาวิทยาศาสตร์และนวัตกรรมชีวภาพ คณะศิลปศาสตร์และวิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

(...รองศาสตราจารย์แดงอ่อน พรหมมี, ปร.ด...)

หัวหน้าภาควิชาวิทยาศาสตร์และนวัตกรรมชีวภาพ

วันที่.....เดือน.....พ.ศ. 2567

การใช้ประโยชน์สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากผลมะนาวเทศ

สุชานันท์ เหมือนใจนีก ชัยวัฒน์ วามวรรรัตน์ และ พุทธพร ส่องศรี

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้เพื่อศึกษาและวิเคราะห์สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพและประเภณีศาสตร์ของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ใช้ประโยชน์จากผลมะนาวเทศซึ่งเป็นผลไม้ที่มีคุณค่าทางโภชนาการสูงและมีสารประกอบที่มีคุณสมบัติในการส่งเสริมสุขภาพได้อย่างหลากหลาย มะนาวเทศเป็นแหล่งของสารต้านอนุมูลอิสระ เช่น ฟลาโวนอยด์และสารประกอบฟีนอลิก ซึ่งมีฤทธิ์ในการต้านการอักเสบ, การฆ่าเชื้อโรค, และการปรับสมดุลของระบบภูมิคุ้มกันในร่างกาย นอกจากนี้ยังพบว่าผลมะนาวเทศสามารถช่วยลดความเสี่ยงของการเกิดโรคเรื้อรังต่างๆ เช่น โรคหัวใจและหลอดเลือด, โรคเบาหวาน, และโรคมะเร็งบางชนิด โดยสารเหล่านี้ช่วยในการยับยั้งการเกิดอนุมูลอิสระและการอักเสบในระดับเซลล์ได้ Folin-Ciocalteu ได้ยืนยันถึงการมีอยู่ของสารประกอบฟีนอลิกในผลมะนาวเทศ ขณะที่การทดสอบ DPPH ยืนยันถึงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ นอกจากนี้มีการระบุถึงการมีอยู่ของฟลาโวนอยด์ และพบว่าผลมะนาวเทศไม่สามารถยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสได้หรือยับยั้งได้ระดับน้อยมาก ผลการศึกษาเหล่านี้ไม่เพียงแต่ช่วยเพิ่มความเข้าใจเกี่ยวกับคุณสมบัติทางชีวภาพของมะนาวเทศ แต่ยังส่งเสริมการใช้ทรัพยากรธรรมชาติที่มีอยู่ให้เกิดประโยชน์สูงสุดในการพัฒนาผลิตภัณฑ์ที่เกี่ยวข้องกับสุขภาพอย่างยั่งยืน นอกจากนี้ยังเปิดโอกาสให้เกิดการวิจัยเพิ่มเติมในด้านการใช้มะนาวเทศเป็นวัตถุดิบหลักในการพัฒนาผลิตภัณฑ์สุขภาพใหม่ๆ ที่มีประสิทธิภาพสูง

คำสำคัญ: สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ, มะนาวเทศ, ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ, ฟีนอลิก

UTILIZATION OF BIOACTIVE COMPOUNDS FROM LIME BERRY
(*TRIPHASIA TRIFOLIA*)

Suchanan Muenjainuk Chaiwat Wamwarrarat and Puttaporn Songsri

ABSTRACT

This study aims to investigate and analyze the bioactive compounds and assess the potential of utilizing these compounds from Thai lime, a fruit renowned for its high nutritional value and rich in bioactive compounds with diverse health-promoting properties. Thai lime is a significant source of antioxidants, such as flavonoids and phenolic compounds, which exhibit anti-inflammatory, antimicrobial, and immune-regulating effects. Moreover, it has been shown that Thai lime can help mitigate the risk of chronic diseases, including cardiovascular diseases, diabetes, and certain cancers, by inhibiting the formation of free radicals and controlling inflammation at the cellular level. The Folin-Ciocalteu method confirmed the presence of phenolic compounds in Thai lime, while the DPPH assay validated its antioxidant activity. Additionally, flavonoids were identified, although Thai lime was found to have minimal or no inhibitory effect on tyrosinase activity. These findings not only contribute to a deeper understanding of the biological properties of Thai lime but also encourage the sustainable use of natural resources in the development of health-related products. Furthermore, they open avenues for future research into utilizing Thai lime as a key ingredient in the creation of new, highly effective health products.

Keywords: bioactive compounds, lime berry, antioxidant properties, phenolic

Student's signature

Advisor's signature

____/____/____

บทนำ

มะนาวเทศ (*Triphasia trifolia*) มีชื่อสามัญว่า Lime berry เป็นไม้พุ่มในวงศ์ Rutaceae (Santos *et al.*, 2008) ที่มีการนำเข้ามาปลูกเมืองไทย มีถิ่นกำเนิดในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ มะนาวเทศออกดอกตลอดปี ผลเป็นสีแดงสด ขนาดเล็ก มีรสเปรี้ยวอมหวาน นิยมนำมารับประทานผล ทั้งที่เป็นผลดิบและผลสุก ซึ่งผลสุกสีแดงเนื้อด้านในฉ่ำน้ำ (Sittularak *et al.*, 1998) นอกจากนี้ยังนิยมนำมาปรุงอาหารหรือนำมาแปรรูป เช่น นำไปดอง ทำเป็นแยม ทำเป็นผลไม้กวน หรือเป็นส่วนผสมในเครื่องดื่ม (Kim and Uyama, 2005) รวมถึงมีการใช้ประโยชน์ผลมะนาวเทศในวงการแพทย์แผนไทย และการแพทย์พื้นบ้าน (Jung *et al.*, 2005) โดยมีสรรพคุณบรรเทาอาการไอ แก้เจ็บคอ ช่วยขับเสมหะ

ผลมะนาวเทศ มีสารประกอบฟีนอลิก (Phenolic compounds) และฟลาโวนอยด์ (Flavonoids) ที่เป็นสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพสำคัญ (Ameer *et al.*, 1996) และยังมีโพลีฟีนอลที่สามารถยับยั้งการออกซิเดชันของ LDL ลดความเสี่ยงของการสะสมของคราบไขมันในหลอดเลือด (Manach *et al.*, 2003) โดยเฉพาะสารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ เช่น กรดฟีนอลิกและสารประกอบน้ำมันหอมระเหย (Kawaii *et al.*, 1999)

ปัจจุบันจึงมีการนำผลมะนาวเทศมาสกัดเป็นน้ำมันหอมระเหย สามารถพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ในอุตสาหกรรมต่างๆ (Khan, 2007) เช่น ผลิตภัณฑ์เสริมอาหารที่ต้านอนุมูลอิสระ เครื่องสำอางที่ช่วยปกป้องผิว ซึ่งสารสกัดจากผลมะนาวเทศ (Chang, 2009) โดยใช้เอทานอลมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารในน้ำมันหอมระเหย จากผลมะนาวเทศยังช่วยลดความเสียหายของเซลล์ที่เกิดจากปฏิกิริยาออกซิเดชัน (Rice-Evans *et al.*, 1997)

ในช่วงที่โควิด-19 แพร่กระจายไปทั่วโลก พบว่าสมุนไพรในวงศ์มะนาวเทศ มีคุณสมบัติในการต้านและฟื้นฟูร่างกายจากการติดเชื้อโควิด-19 (Herdiana *et al.*, 2024) รวมถึงมีสรรพคุณบรรเทาอาการไอ แก้เจ็บคอ (González-Molina *et al.*, 2010) ทำให้คนจำนวนมากตื่นตัว และหันมาสนใจพืชในวงศ์มะนาวเทศ จึงเห็นความสำคัญของมะนาวเทศ อีกทั้งยังสามารถใช้ทรัพยากรที่มีอยู่ให้เกิดประโยชน์สูงสุด (Dai and Mumper, 2010) จากที่ได้กล่าวมาข้างต้นเป็นสาเหตุที่ทำให้สนใจที่จะทำการศึกษา มีวัตถุประสงค์ที่จะศึกษาและวิเคราะห์สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สกัดจากผลมะนาวเทศและประเมินศักยภาพการนำสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพไปใช้ในอุตสาหกรรม สมุนไพร และเภสัชกรรม

อุปกรณ์และวิธีการ

1. การเตรียมตัวอย่างผลมะนาวเทศ

นำผลมะนาวเทศหั่นให้เป็นชิ้นขนาดเล็ก ชั่งน้ำหนักผลสดก่อนเข้าสู่อบลมร้อน น้ำหนักได้ 142.92 กรัม จากนั้นนำไปอบในตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส (เป็นอุณหภูมิที่สูงที่สุดที่ยังมีสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพเหลืออยู่มาก แต่ป้องกันการเกิดเชื้อราได้) เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นนำผลมะนาวเทศมาชั่งน้ำหนักแห้งได้ 35.45 กรัม (ความชื้นหายไป 75.19%) การคำนวณความชื้นที่หายไป

เป็น % ในการอบลมร้อน
$$\frac{\text{น้ำหนักสด} - \text{น้ำหนักแห้ง}}{\text{น้ำหนักสด}} \times 100$$

2. การเตรียมสารสกัดจากผลมะนาวเทศ

นำตัวอย่างผลมะนาวเทศแห้งที่ 35.45 กรัม นำไปสกัดด้วยตัวทำละลาย 95% Ethanol 300 มิลลิลิตร ใส่ในขวด Duran เป็นเวลา 1 สัปดาห์ เก็บไว้ในที่มืดที่อุณหภูมิห้อง เริ่มกรองสารสกัดด้วยผ้าขาวบางใส่บีกเกอร์เพื่อแยกกากที่มีขนาดใหญ่ และกรองสารสกัดโดยใช้กระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 แยกกากทิ้ง จากนั้นนำสารสกัดจากผลมะนาวเทศที่ได้มาบรรจุใส่ในขวด Duran ขนาด 500 ml เพื่อไปใช้วิเคราะห์ขั้นตอนถัดไป

3. การทดสอบปริมาณสารประกอบฟีนอลิก

การหาปริมาณฟีนอลิกในสารสกัดจากผลมะนาวเทศ โดยวิธี Folin-Ciocalteu ดัดแปลงวิธีบางส่วนจาก Singleton et al.(1996) เตรียมสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิก ในน้ำกลั่นความเข้มข้นต่างๆ (0,20,40,60,80 และ 100 มิลลิกรัมต่อลิตร) จากนั้นใช้ปิเปตดูดสารละลายที่เจือจางแล้วใส่หลอดทดลองปริมาตรหลอดละ 1 มิลลิลิตร เตรียมสารสกัดตัวอย่างเจือจาง 95% Ethanol 1:10 และ 1:100 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร จากนั้นเติมสารละลาย 10% Folin-Ciocalteu Reagent หลอดละ 1 มิลลิลิตร เติมสารละลาย 7% Sodium Carbonate (Na_2CO_3) หลอดละ 4 มิลลิลิตร และน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร ลงในตัวอย่าง ผสมให้เข้ากัน ตั้งไว้ในที่มืด เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 760 นาโนเมตร โดยใช้เครื่อง Spectrophotometer คำนวณปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด

4.การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH

การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) โดยดัดแปลงจากวิธีการของ Andrica et al. (2016) เตรียมสารมาตรฐาน Butylated hydroxytoluene (BHT) ในเอทานอล ความเข้มข้นต่างๆ (0,20,40,60,80 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) จากนั้นใช้ปิเปตดูดสารละลายที่เจือจางแล้วใส่หลอดทดลองปริมาตรหลอดละ 1 มิลลิลิตร และเตรียมสารสกัดตัวอย่างปริมาตร 1 มิลลิลิตร และสารสกัดตัวอย่างเจือจางด้วยน้ำ 1:10 และ 1:100 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เตรียมเอทานอล 3 มิลลิลิตรทุกหลอด จากนั้นเติมสารละลาย DPPH ในเอทานอล เข้มข้น 1 mmol/L ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตรทุกหลอด ผสมให้เข้ากัน เก็บไว้ในที่มืด 20 นาที จากนั้นวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Spectrophotometer จากนั้นเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระกับสารละลายมาตรฐาน Butylated hydroxytoluene (BHT) โดยใช้ %Radical scavenging

5.การทดสอบปริมาณฟลาโวนอยด์

การทดสอบปริมาณฟลาโวนอยด์รวมใช้วิธี Aluminium chloride ดัดแปลงวิธีบางส่วนจาก ภาณุมาศ (2563) เตรียมสารมาตรฐานเคออลิควิน ความเข้มข้นต่างๆ (0,40,80 และ120 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) จากนั้นเตรียมสารสกัดจากมะนาวเทศที่ละลายด้วยตัวทำละลาย 95% Ethanol ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ละลายด้วยตัวทำละลาย 95% Ethanol ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร เติม 1 โมลาร์ Potassium acetate 100 μ l จากนั้นเติม 10% Aluminium chloride 100 μ l และเติมน้ำกลั่น 3 ml เขย่าให้เข้ากันด้วยเครื่องเขย่าสาร ตั้งทิ้งไว้ที่มืด ณ อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 20 นาที นำสารละลายที่ได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 415 นาโนเมตร

6.การวิเคราะห์การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส

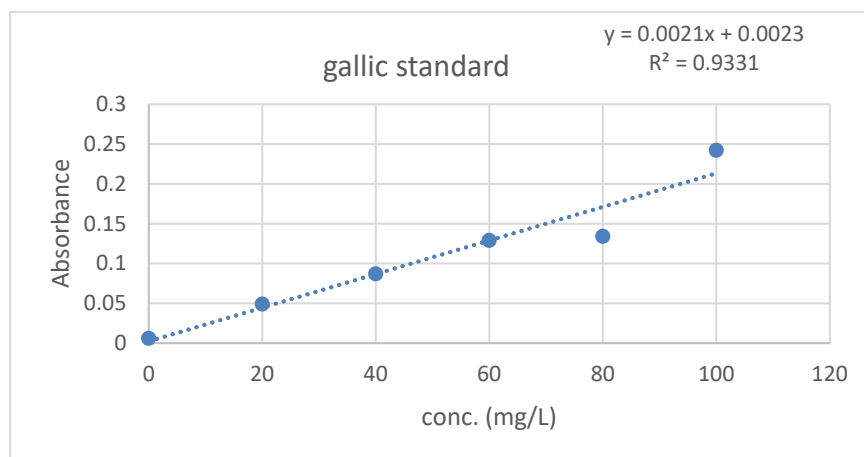
การวิเคราะห์การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสโดยดัดแปลงวิธีการของ (Neagu et al., 2016) โดยเติมสารละลายเอนไซม์ 12 ยูนิตต่อ 100 ไมโครลิตร ปริมาตร 500 ไมโครลิตร จากนั้นเติมสารสกัดที่ความเข้มข้นต่างๆกัน ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ตามด้วยเติมสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช 6.8 ปริมาตร 4 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 นาที จากนั้นเติมสารละลาย L-3,4-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA) ความเข้มข้น 2.5 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 200 ไมโครลิตร วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 475 นาโนเมตร โดยทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงตามเวลาที่ 0,8,14 และ 21 นาที หลังเกิดปฏิกิริยาซึ่งทำสามซ้ำโดยใช้ 10 มิลลิโมลาร์ Ascorbic acid เป็นสารมาตรฐาน

7. การวิเคราะห์ข้อมูล

การทดลองทั้งหมดดำเนินการ 3 ซ้ำและวิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้การทดสอบ ANOVA ข้อมูลแสดงเป็นค่าเฉลี่ย \pm ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน(SD) ค่าเฉลี่ยถูกแยกโดยใช้การทดสอบหลายช่วง และพิจารณาความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ $p \leq 0.05$

ผลการศึกษา

ผลการทดสอบปริมาณสารประกอบฟีนอลิกของสารสกัดจากผลมะนาวเทศด้วยวิธี Folin-ciocalteu พบว่าปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดเทียบกับกราฟสารมาตรฐานของกรดแกลลิก สารสกัดจากผลมะนาวเทศที่เจือจาง 1:10 และสารสกัดจากผลมะนาวเทศที่เจือจาง 1:100 มีสารประกอบฟีนอลิกเป็นองค์ประกอบและมีปริมาณฟีนอลิกโดยรวม สูงสุดเท่ากับ 0.072 mg GAE/gDW และ 0.020 mg GAE/gDW ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าสารสกัดจากผลมะนาวเทศ 1:10 มีปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดเฉลี่ย 0.058 ± 0.016 mg GAE/gDW

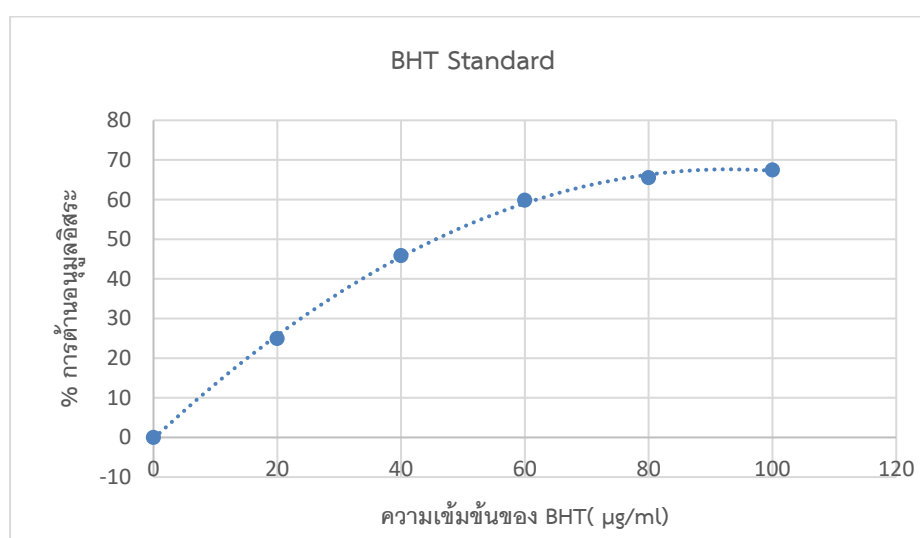


ภาพที่ 1 กราฟมาตรฐานของแกลลิก

ตารางที่ 1 ผลการหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกของสารสกัดผลมะนาวเทศ

ตัวอย่าง	ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด			ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดเฉลี่ย (mg GAE/g DW) \pm SD
	1	2	3	
1:10	0.064	0.072	0.038	0.058 \pm 0.016
1:100	0.020	0.011	0.020	0.017 \pm 0.005

ผลการทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดผลมะนาวเทศโดยใช้ % DPPH scavenging activity พบว่า สารสกัดจากผลมะนาวเทศที่เจือจาง 1:10 และสารสกัดจากผลมะนาวเทศที่เจือจาง 1:100 มีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระสูงสุด 30.58% และ 3.23% ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าสารสกัดจากผลมะนาวเทศที่เจือจาง 1:10 มีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระสูงสุด มีเปอร์เซ็นต์ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระเฉลี่ยเท่ากับ 28.63 ± 2.07

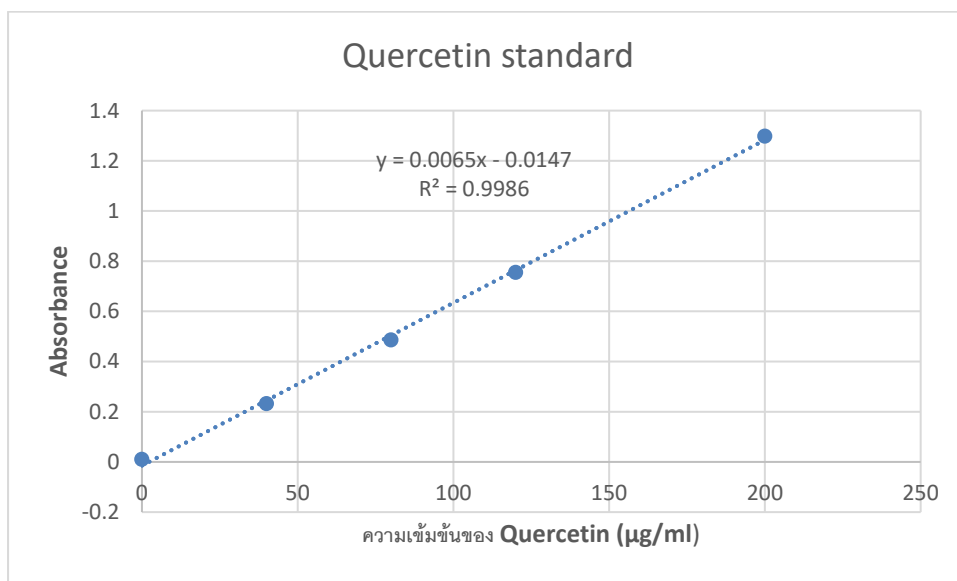


ภาพที่ 2 กราฟมาตรฐานของ Butylated hydroxytoluene (BHT)

ตารางที่ 2 ผลการหา %ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดผลมะนาวเทศเทียบเท่ากราฟมาตรฐาน BHT ที่ความเข้มข้น 0,20,40,60,80,100 และ120 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ตัวอย่าง	%Radical scavenging			ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระเฉลี่ย
	1	2	3	± SD
1: 10	26.07	29.23	30.58	28.63 ± 2.07
1:100	0.76	0.98	3.23	1.66 ± 1.23

ผลการทดสอบปริมาณฟลาโวนอยด์ของสารสกัดผลมะนาวเทศ พบว่าสารสกัดจากผลมะนาวเทศที่เจือจาง 1:10 และ 1:100 มีปริมาณฟลาโวนอยด์เป็นองค์ประกอบสูงสุดอยู่ที่ 1:10 เท่ากับ 0.232 mg QE/gDW และมีปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมดเฉลี่ย 0.223 ± 0.009 mg QE/gDW



ภาพที่ 3 กราฟมาตรฐานของ Quercetin

ตารางที่ 3 ผลการทดสอบปริมาณฟลาโวนอยด์ของสารสกัดมะนาวเทศ

ตัวอย่าง	ปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด			ปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมดเฉลี่ย (mg QE/gDW) \pm SD
	1	2	3	
1:10	0.224	0.212	0.232	0.223 \pm 0.009
1:100	0.045	0.042	0.037	0.041 \pm 0.004

ผลการวิเคราะห์หาสารยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารสกัดมะนาวเทศพบว่า การเปลี่ยนแปลงการดูดกลืนแสงที่ 475 นาโนเมตร ณ เวลา 21 นาทีเทียบกับเวลา 0 นาที สารสกัดมะนาวเทศมีค่ายับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสมากที่สุดที่อัตราการเจือจาง 1:10 ผลการทดสอบสารสกัดผลมะนาวเทศมีความสามารถในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสเฉลี่ย 1.651 ± 0.564 แสดงว่าผลมะนาวเทศสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสได้

ตารางที่ 4 ผลประสิทธิภาพการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส

ตัวอย่าง	ค่าดูดกลืนแสงที่ 475 nm		การยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์ ไทโรซิเนส (%) \pm SD
	ค่าเฉลี่ยรวม 3 ซ้ำ ณ เวลาทุก 0 และ 21 นาที (nm)		
Blank	0		0
Control	0.545		0
1:10	0.536		1.651 \pm 0.564
1:100	0.542		0.550 \pm 0.546

วิจารณ์ผลการศึกษา

จากผลการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกของผลมะนาวเทศ พบว่ามีสารประกอบฟีนอลิกเป็นองค์ประกอบ และมีปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดเฉลี่ย 0.058 ± 0.016 mg GAE/gDW สอดคล้องกับการศึกษาของ (Dugo and Mondello, 2002) ที่รายงานว่าผลไม้ในวงศ์ส้มมีการกระจายตัวของสารฟีนอลิกหลากหลายชนิดในส่วนของผลและเนื้อผล นอกจากนี้การประเมินฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของผลมะนาวเทศ ด้วยวิธี DPPH แสดงให้เห็นว่าสารสกัดจากผลมะนาวเทศที่เจือจาง 1:10 มีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุด คิดเป็นเปอร์เซ็นต์ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระเฉลี่ยเท่ากับ 28.63 ± 2.07 เมื่อเทียบกับการเจือจางแบบ 1:100 สอดคล้องกับวิจัยของ (Benzie and Strain, 1996) ที่ชี้ว่าสารออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในสารสกัดพืชผักลดลงเมื่อมีการเจือจางมากขึ้น ขณะเดียวกันการวิเคราะห์ปริมาณฟลาโวนอยด์พบว่าสารสกัดผลมะนาวเทศที่เจือจาง 1:10 มีปริมาณฟลาโวนอยด์โดยรวมสูงสุดอยู่ที่ 0.232 mg QE/gDW และเฉลี่ย 0.223 ± 0.009 mg QE/gDW ซึ่งมากกว่าการเจือจางแบบ 1:100 อย่างชัดเจน แสดงให้เห็นว่าปริมาณสารสำคัญเหล่านี้สัมพันธ์กับความเข้มข้นของสารสกัดด้วยเช่นกัน และเมื่อทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส พบว่าค่าการยับยั้งของสารสกัดมะนาวเทศ ทั้งอัตราส่วน 1:10 และ 1:100 อยู่ในระดับต่ำ ค่า 1.651% และ 0.550% ตามลำดับ หากเปรียบเทียบกับสารมาตรฐานอย่างกรดแอสคอร์บิกที่ยับยั้งได้ถึง 50% จึงอาจกล่าวได้ว่าสารสกัดจากมะนาวเทศไม่เหมาะที่จะนำไปพัฒนาด้านการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส สำหรับเครื่องสำอาง เพื่อลดรอยดำ แต่มีศักยภาพในแง่การเป็นแหล่งสารต้านอนุมูลอิสระและสารฟีนอลิก ซึ่งสามารถต่อยอดในงานวิจัยและการพัฒนาผลิตภัณฑ์เพื่อสุขภาพหรือผลิตภัณฑ์เสริมอาหารได้ต่อไป

สรุปผลการศึกษา

จากการทดลองนี้สามารถสรุปได้ว่า ผลมะนาวเทศเป็นแหล่งของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่น่าสนใจ เนื่องจากประกอบด้วยสารฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ ซึ่งมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระอย่างมีนัยสำคัญ ชี้ให้เห็นถึงศักยภาพในการนำไปต่อยอดเป็นผลิตภัณฑ์เพื่อส่งเสริมสุขภาพหรือผลิตภัณฑ์เสริมอาหารได้อย่างหลากหลาย อย่างไรก็ตาม ในส่วนของการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสกลับพบว่ามีประสิทธิภาพค่อนข้างต่ำ จึงอาจไม่เหมาะสำหรับการพัฒนาผลิตภัณฑ์ในด้านลดเลือนเม็ดสีผิวหรือความงามโดยตรง

อย่างไรก็ดี ข้อมูลที่ได้จากงานวิจัยครั้งนี้ นับเป็นก้าวสำคัญในการทำความเข้าใจคุณสมบัติทางชีวภาพของผลมะนาวเทศ และเอื้อให้เกิดแนวทางใหม่ๆ ในการนำทรัพยากรชีวภาพชาติมาใช้ประโยชน์อย่างยั่งยืน เช่น การเพิ่มมูลค่าเป็นวัตถุดิบหลักสำหรับนวัตกรรมอาหารเพื่อสุขภาพหรือผลิตภัณฑ์เวชสำอางสูตรใหม่ พร้อมทั้งยังเปิดโอกาสให้นักวิจัยคนอื่นๆ ได้ศึกษาเชิงลึก หรือประยุกต์ใช้ร่วมกับเทคโนโลยีสมัยใหม่ เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพและมูลค่าของสารสกัดจากมะนาวเทศได้ในอนาคต

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ ภาควิชาวิทยาศาสตร์และนวัตกรรมชีวภาพ และ ฝ่ายกิจการนิสิต คณะศิลปศาสตร์และวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน ที่ให้ความสนับสนุนทุนการทำวิจัย

ขอขอบคุณอาจารย์พุทธพร ส่องศรี และอาจารย์ชัยวัฒน์ วามวรรรัตน์ อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการทางวิทยาศาสตร์ที่ให้คำปรึกษาในครั้งนี้ และขอขอบคุณเจ้าหน้าที่สาขาวิชาชีวเคมีผู้ที่มีความช่วยเหลือในด้านอุปกรณ์และสารเคมีทำให้การศึกษานี้สำเร็จไปได้ด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

- Ameer, B., Weintraub, R. A., Johnson, J. V., Yost, R. A., and Rouseff, R. L. 1996. Flavanone absorption after naringin, hesperidin, and citrus administration. **Clinical Pharmacology & Therapeutics** 60(1): 34-40.
- Benzie, I. F., and Strain, J. J. 1996. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: The FRAP assay. **Analytical Biochemistry** 239(1): 70-76.
- Chang, T. S. 2009. An updated review of tyrosinase inhibitors. **International Journal of Cosmetic Science** 31(2): 79-90.
- Dai, J., and Mumper, R. J. 2010. Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. **Molecules** 15(10): 7313-7352.
- Dugo, G., and Mondello, L. 2002. Flavonoids in Citrus: structure, distribution and biological functions. **Journal of Essential Oil Research** 14(3): 205-214.

- González-Molina, E., Domínguez-Perles, R., Moreno, D. A., and García-Viguera, C. 2010. Natural bioactive compounds of Citrus limon for food and health. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis** 51(2): 327-345.
- Herdiana, N., Hidayati, S., Sartika, D., Subeki, Suharyono, Yuliandari, P., and Zuidar, A.S. 2024. Identification of Bioactive Compounds and Antibacterial Activity of Limeberry (*Triphasia trifolia*) fruit Ethanol Extract against *Staphylococcus aureus*. **Tropical Journal of Natural Product Research** 8(1): 5820-5824.
- Jung, U. J., Lee, M. K., Park, Y. B., Kang, M. A., and Choi, M. S. 2005. Effect of citrus flavonoids on lipid metabolism and glucose-regulating enzyme mRNA levels in type-2 diabetic mice. **International Journal of Biochemistry & Cell Biology** 37(11): 2184-2194.
- Kawai, S., Yasuhiko, T., Eriko, K., Kazunori, O., Masamichi, Y., and Meisaku, K. 1999. Quantitative study of flavonoids in leaves of Citrus plants. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 47(9): 3565-3571.
- Khan, M. I. 2007. Tyrosinase: structure, function and inhibition. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry** 22(4): 387-398.
- Kim, Y. J., and Uyama, H. 2005. Tyrosinase inhibitors from natural and synthetic sources: structure, inhibition mechanism and perspective for the future. **Cellular and Molecular Life Sciences** 62(15): 1707-1723.
- Manach, C., Mazur, A., and Scalbert, A. 2003. Polyphenols and prevention of cardiovascular diseases. **Current Opinion in Lipidology** 16(1): 77-84.
- Olivares, A., and Solano, F. 2009. Tyrosinase inhibition: current challenges and future perspectives. **Journal of Investigative Dermatology** 129(10): 2310-2312.
- Rice-Evans, C. A., Miller, N. J., and Paganga, G. 1997. Antioxidant properties of phenolic compounds. **Trends in Plant Science** 2(4): 152-159.
- Santos, Renata P. dos; Trevisan, Maria Teresa Salles; Silveira, Edilberto R; Pessoa, Otilia Deusdenia L; Melo and Vania Maria M. 2008. Chemical composition and biological activity of leaves and fruits of *Triphasia trifolia*; Composicao quimica e atividade biologica das folhas e frutos de *Triphasia trifolia*. **ResearchGate** 31(1): 53-58.

Sritularak, B., De-eknamkul, W., and Likhitwitayawuid, K. 1998. Tyrosinase inhibitors from *Artocarpus lakoocha*. **The Thai Journal of Pharmaceutical Sciences** 22(4): 149–155.

ภาคผนวก ก
สารเคมีและการเตรียมสาร

สารเคมี

1. 95% Ethanol
2. 7% Sodium Carbonate (Na_2CO_3)
3. 10% Folin-Ciocalteu
4. Gallic acid
5. Butylated hydroxytoluene (BHT)
6. 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH)
7. Quercetin
8. 10% Aluminium chloride
9. Potassium acetate
10. Tyrosinase
11. L-3,4-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA)
12. 0.1M Phosphate buffer pH 6.8
13. Ascorbic acid

ตารางผนวกที่ 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

ตารางผนวกที่ ก2 การเตรียมสารมาตรฐาน butylated hydroxytoluene (BHT)
ความเข้มข้นต่างๆ

ความเข้มข้น (µg/L)	BHT (100 µg/L)	Ethanol
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

ตารางผนวกที่ ก3 การเตรียมสารมาตรฐาน Quercetin ความเข้มข้นต่างๆ

ความเข้มข้น (µg/L)	(200 µg/mL)	Ethanol
0	0 ml	10 ml
40	2 ml	8 ml
80	4 ml	6 ml
120	6 ml	4 ml
200	10 ml	0 ml

ภาคผนวก ข
วิธีการทดลองและผลการทดลอง

วิธีวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด

โดยวิธี Folin-Ciocalteu Colorimetric Method

1. นำสารสกัดผลมะนาวเทศที่ละลายด้วยเอทานอลที่อัตราการใช้ต่าง ๆ ปริมาตร 1 ml ใส่ในหลอดทดลอง
2. เติม 10% Folin-Ciocalteu ปริมาตร 1 ml
3. เติมสารละลาย 7% Sodium carbonate ปริมาตร 4 ml
4. เติม Gallic acid ปริมาตร 1 ml
5. เติมน้ำกลั่น 10 ml เขย่าผสมสารให้เข้ากันด้วยเครื่อง Vortex Mixer
6. จากนั้นตั้งทิ้งไว้ในที่มืดที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 20 นาที พอครบแล้วนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 760 nm ด้วยเครื่อง spectrophotometer โดยทำการทดสอบตัวอย่างอย่างละ 3 ครั้ง

วิธีการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

โดยวิธี DPPH scavenging assay

1. นำสารสกัดผลมะนาวเทศที่ละลายด้วยเอทานอลที่อัตราการใช้ต่าง ๆ ปริมาตร 1 ml ใส่ในหลอดทดลอง
2. เติมเอทานอลตัวอย่างละ 3 ml
3. เติม 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) ความเข้มข้น 1 mmol/L ในเอทานอล ปริมาตร 0.5 ml เขย่าผสมสารให้เข้ากันด้วยเครื่อง Vortex Mixer
4. จากนั้นตั้งทิ้งไว้ในที่มืดที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 20 นาที พอครบแล้วนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 nm ด้วยเครื่อง spectrophotometer โดยทำการทดสอบตัวอย่างอย่างละ 3 ครั้ง

สูตรคำนวณเปอร์เซ็นต์ของการต้านอนุมูลอิสระ

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

วิธีวิเคราะห์ปริมาณฟลาโวนอยด์

1. นำสารสกัดผลมะนาวเทศที่ละลายด้วยเอทานอลที่อัตราการใช้จางต่างๆ ปริมาตร 500 μl ใส่ในหลอดทดลอง
2. เติมเอทานอลตัวอย่างอย่างละ 1.5 ml
3. เติม Potassium acetate 100 μl
4. เติม Aluminium chloride 100 μl
5. เติมน้ำกลั่น 3 ml เขย่าผสมสารให้เข้ากันด้วยเครื่อง Vortex Mixer
6. จากนั้นตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 20 นาที พอครบแล้วนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 415 nm ด้วยเครื่อง spectrophotometer โดยทำการทดสอบตัวอย่างอย่างละ 3 ครั้ง

วิธีวิเคราะห์การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส

1. นำสารสกัดมะนาวเทศที่เจือจางจากตัวทำละลาย 95% Ethanol ที่ความเข้มข้น 1:10 และ 1:100 มาหลอดละ 100 ไมโครลิตร
2. เติมสารละลายเอนไซม์ไทโรซิเนส 12 ยูนิตต่อ 100 μl ปริมาตร 500 μl
3. จากนั้นเติมสารสกัดที่ความเข้มข้นต่างๆกัน ปริมาตร 100 μl
4. ด้วยเติมสารละลาย 0.1M Phosphate buffer pH 6.8 ปริมาตร 4 ml เขย่าผสมสารให้เข้ากันด้วยเครื่อง Vortex Mixer ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 20 นาที
5. จากนั้นเติมสารละลาย L-3,4-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA) ปริมาตร 200 μl วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 475 nm โดยทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 0, 8, 14, และ 21 นาที

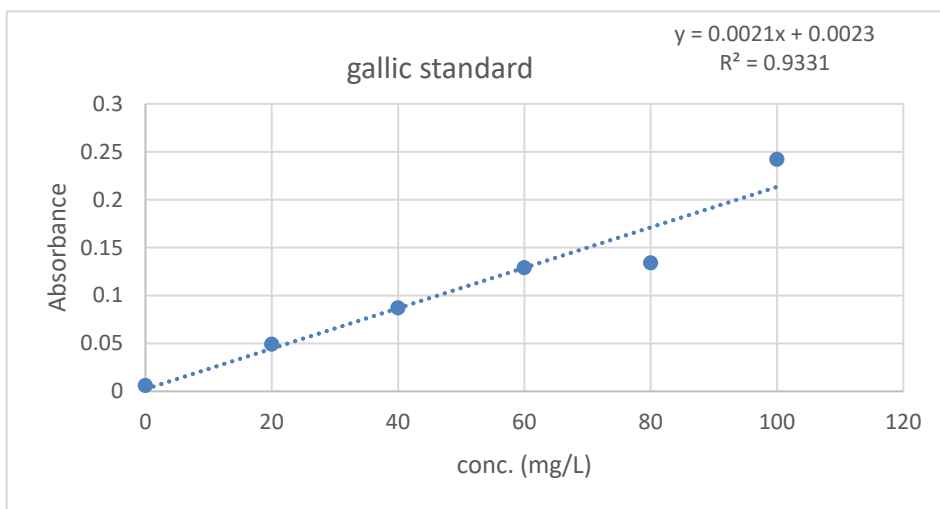
สูตรคำนวณ Tyrosinase inhibition activity

การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส

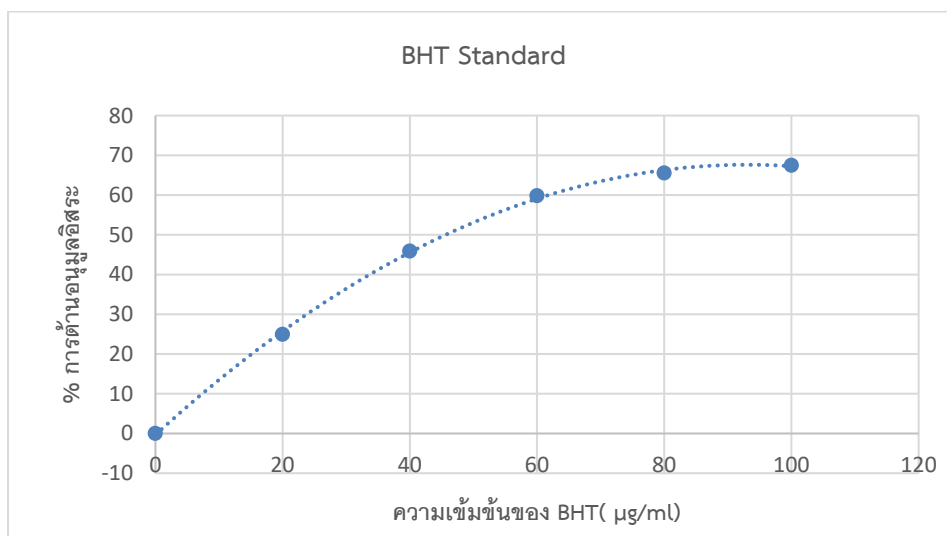
$$\text{คำนวณ การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส (\%)} = [(A_{\text{control}} - A_{\text{ascorbic}})] / A_{\text{control}} \times 100$$

เมื่อ A_{control} คือ ค่าการเปลี่ยนแปลงค่าดูดกลืนแสงของชุดควบคุมที่เวลา 0 และ 21 นาที

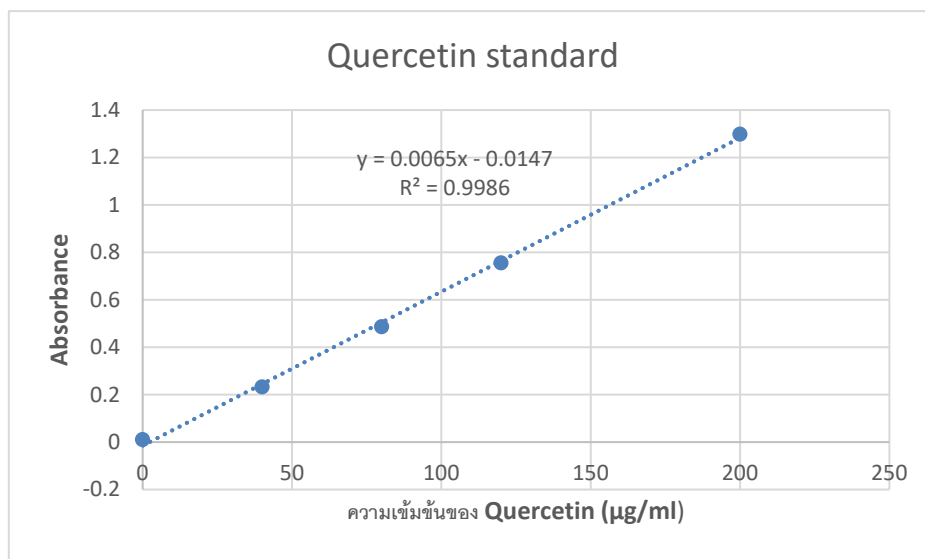
เมื่อ A_{ascorbic} คือ ค่าการเปลี่ยนแปลงค่าดูดกลืนแสงของสารสกัดผลมะเขือเทศ ที่เวลา 0 และ 21 นาที



ภาพผนวกที่ ข1 กราฟมาตรฐานความเข้มข้น Gallic มีค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 760 นาโนเมตร จากปฏิกิริยา Folin-Ciocalteu colorimetric วิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกรวม



ภาพผนวกที่ ข2 กราฟมาตรฐานความเข้มข้น Butylated hydroxytoluene (BHT) มีค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร

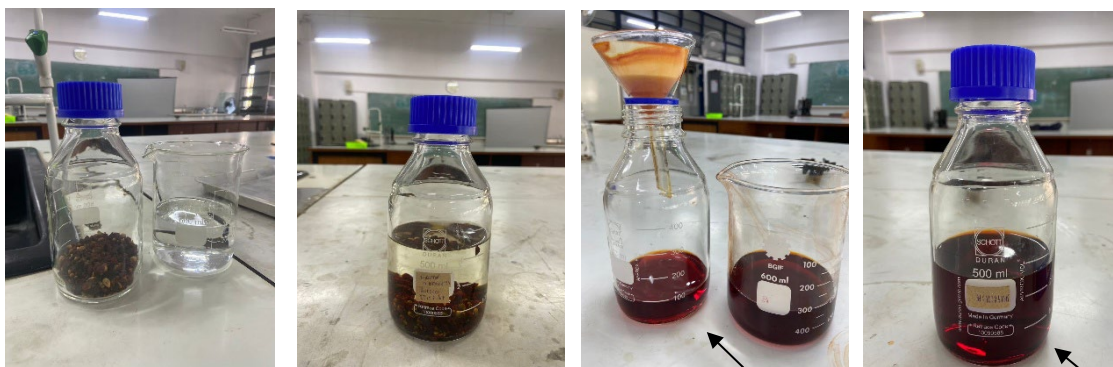


ภาพผนวกที่ ข3 กราฟมาตรฐานความเข้มข้น Quercetin มีค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 415 นาโนเมตร วิเคราะห์ปริมาณฟลาโวนอยด์

ภาคผนวก ค
ภาพการทดลอง



ภาพผนวกที่ ค1 การเตรียมผลมะนาวเทศที่แช่เย็น -20 องศาเซลเซียส (A), ทั่นให้เป็นชิ้นเล็กๆ (B), กรองน้ำมะนาวเทศออก (C), นำมะนาวเทศใส่ในถาดที่ห่อฟอยล์นำไปเข้าตู้อบลมร้อน (D), ผลมะนาวเทศที่แห้ง (E)



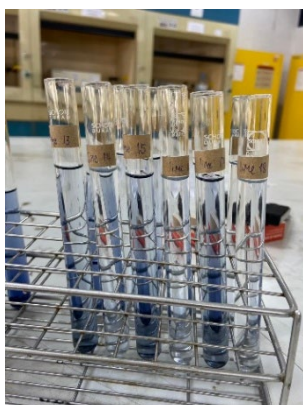
ภาพผนวกที่ ค2 การเตรียมสารสกัดด้วย 95% Ethanol

กรองแยกกากทิ้ง

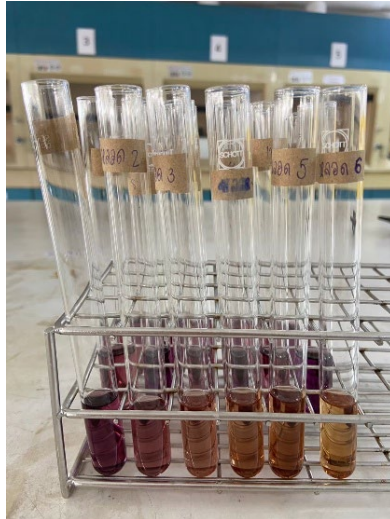
สารสกัดจากผลมะนาวเทศ



ภาพผนวกที่ ค3 สารละลายมาตรฐานแกลลิก



ภาพผนวกที่ ค4 ผลการทดสอบปริมาณสารประกอบฟีนอลิกของสารสกัดตัวอย่างที่เจือจางความเข้มข้นที่อัตราส่วน 1:10 และ 1:100



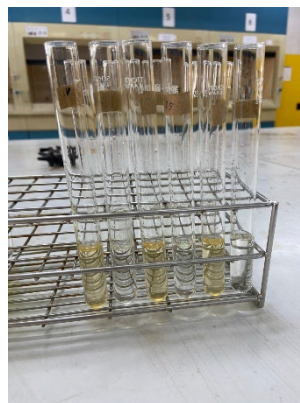
ภาพผนวกที่ ค5 สารละลายมาตรฐาน Butylated hydroxytoluene (BHT)



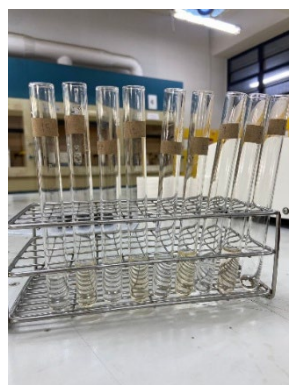
ภาพผนวกที่ ค6 ผลการทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของสารสกัดตัวอย่างที่เจือจาง 1:10 (หลอดที่ 13, 15, 17) และสารสกัดตัวอย่างที่เจือจาง 1:100 (หลอดที่ 14, 16, 18)



ภาพผนวกที่ ค7 สารละลายมาตรฐาน Quercetin



ภาพผนวกที่ ค8 ผลการทดสอบปริมาณฟลาโวนอยด์ของสารสกัดตัวอย่างที่เจือจาง 1:10 (หลอดที่ 12, 14, 16) และสารสกัดตัวอย่างที่เจือจาง 1:100 (หลอดที่ 13, 15, 17)



ภาพผนวกที่ ค9 ผลการทดสอบการยับยั้งของเอนไซม์ไทโรซิเนสสารสกัดตัวอย่างที่เจือจาง 1:10 (หลอดที่ 10, 11, 12) และสารสกัดตัวอย่างที่เจือจาง 1:100 (หลอดที่ 13, 14, 15)