

การวิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญและฤทธิ์ต้านออกซิเดชันในส้มโอ

บัณฑิตพรพรรณ ฐระพระ¹, จันทนา บุญยรัตน์², เยาวเรศ ชูลิขิต², สุภาวดี ดาวดี^{3*}

บทคัดย่อ

บทนำ: การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อวิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญและฤทธิ์ต้านออกซิเดชันจากส้มโอ 3 สายพันธุ์ ได้แก่ ทับทิมสยาม ทองดีและขาวน้ำผึ้ง **วิธีดำเนินการวิจัย:** เตรียมสารสกัดโดยนำส่วนประกอบต่างๆ ของส้มโอหมักด้วยเอทานอลเป็นเวลา 7 วัน จากนั้นนำสารสกัดหยาบส่วนต่างๆ ของส้มโอทั้ง 3 สายพันธุ์มาศึกษาปริมาณสารสำคัญในกลุ่มแคโรทีนอยด์ ฟลาโวนอยด์ ฟีนอลิก แอนโทไซยานินและศึกษาฤทธิ์ต้านออกซิเดชันด้วยวิธี DPPH, ABTS และ FRAP **ผลการวิจัย:** พบปริมาณสารสำคัญกลุ่มแคโรทีนอยด์ ฟลาโวนอยด์ ฟีนอลิก แอนโทไซยานินและฤทธิ์ต้านออกซิเดชันจากสารสกัดส่วนต่างๆ ของส้มโอทั้ง 3 สายพันธุ์ โดยสารสกัดส้มโอพันธุ์ทับทิมสยามมีปริมาณสารสำคัญมากที่สุด รองลงมาคือส้มโอพันธุ์ทองดีและขาวน้ำผึ้ง ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบปริมาณสารสำคัญในส่วนต่างๆ ของส้มโอพบปริมาณแคโรทีนอยด์และปริมาณฟลาโวนอยด์ในส่วนเปลือกนอกของส้มโอทั้ง 3 ชนิดจะมีปริมาณมากที่สุด ปริมาณฟีนอลิกในส่วนเนื้อเยื่อจากส้มโอทั้ง 3 ชนิดมีปริมาณมากที่สุด ส่วนปริมาณแอนโทไซยานินพบมากที่สุดในส่วนน้ำคั้น จากการทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชันทั้ง 3 วิธีสารสกัดจากส้มโอพันธุ์ทับทิมสยามมีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันดีที่สุดในส่วนเนื้อเยื่อของส้มโอทั้ง 3 ชนิดมีฤทธิ์ดีที่สุด โดยเรียงจากพันธุ์ทับทิมสยาม ทองดีและขาวน้ำผึ้ง ตามลำดับ ในขณะที่ส่วนเมล็ดของส้มโอทั้ง 3 ชนิดมีฤทธิ์น้อยที่สุด โดยเรียงจากพันธุ์ทับทิมสยาม ทองดีและขาวน้ำผึ้ง ตามลำดับ **สรุปผลการวิจัย:** จากการศึกษาในครั้งนี้สรุปได้ว่าส้มโอประกอบด้วยสารสำคัญในกลุ่มแคโรทีนอยด์ ฟีนอลิก ฟลาโวนอยด์ และแอนโทไซยานินมีความสามารถในการต้านออกซิเดชันที่ดี โดยฤทธิ์ทางชีวภาพที่ดีที่สุดพบในพันธุ์ทับทิมสยาม ดังนั้นส้มโอจึงเป็นผลไม้ที่มีศักยภาพในการนำมาศึกษาและวิจัยต่อยอดด้านเภสัชวิทยา และยังเป็นการเพิ่มมูลค่าทางเศรษฐกิจแก่ผลไม้ไทยอีกด้วย

คำสำคัญ : ส้มโอ, ปริมาณสารสำคัญ, ฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน

วารสารเภสัชศาสตร์อีสาน 2559; 11(ฉบับพิเศษ): 80-91

¹ นักศึกษาปริญญาโท คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น จ. ขอนแก่น 40002

¹ ปร.ด., ผู้ช่วยศาสตราจารย์ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น จ. ขอนแก่น 40002

¹ ปร.ด., ผู้ช่วยศาสตราจารย์ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น จ. ขอนแก่น 40002

¹ ปร.ด., รองศาสตราจารย์ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น จ. ขอนแก่น 40002

* **ติดต่อผู้พิมพ์:** รองศาสตราจารย์ ดร.สุภาวดี ดาวดี คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น จ. ขอนแก่น 40002

E-mail: supawadeedaodee@gmail.com

Determination of Active Constituents and Antioxidative Activity in *Citrus maxima* (Burm.) Merr.

Buntarawan Turapra¹, Chantana Boonyarat², Yaowared Chulikhit³, Supawadee Daodee⁴

Abstract

Introduction: This study aimed to determine total active constituents and antioxidant activities from three kinds of *Citrus maxima* (Burm.) Merr including Tubtim Siam, Thong Dee and Kao Nampheung.

Methods: Three kinds of *C. maxima* were macerated with ethanol for 7 days. The dried crude extract of each part was determined for carotenoid, phenolic, flavonoid and anthocyanin content. The antioxidative activity was evaluated by DPPH, ABTS and FRAP assay. **Results:** The results indicated that Tubtim Siam showed the highest active constituents and antioxidative activity followed by Thong Dee and Kao Nampheung, respectively. When comparing the amount of active constituents in various parts of *C. maxima*, flavedo part showed the highest carotenoid and flavonoid content, while endocarp part had the highest total phenolic content and juice of *C. maxima* showed the highest anthocyanin content. The results showed that the endocarp part exhibited the highest antioxidant activity by DPPH, ABTS and FRAP assay. While seed showed the lowest antioxidant activity. **Conclusion:** From this study, it could be concluded that the *C. maxima* extracts contained many active constituents and showed antioxidant activities especially for Tubtim Siam variety and had excellent potential for further study about pharmacological and increased the economic value of Thai's fruit.

Keywords: *Citrus maxima* (Burm.) Merr, Active constituents, Antioxidative activity

IJPS 2016; 11(Supplement): 80-91

¹ Master degree student, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002

² Ph.D., Assistant Professor, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002

³ Ph.D., Assistant Professor, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002

⁴ Ph.D., Associate Professor, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002

*Corresponding author: Supawadee Daodee, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002

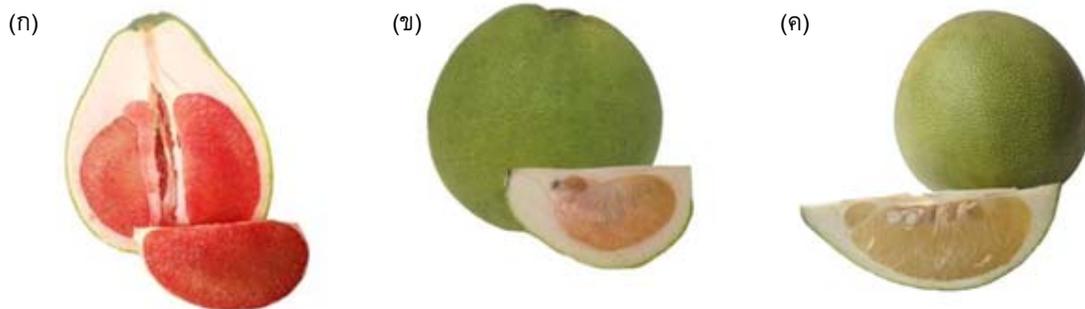
E-mail: supawadeedaodee@gmail.com

บทนำ

ส้มโอ (*Citrus maxima* (Burm.) Merr) จัดอยู่ในวงศ์ Rutaceae เป็นพืชตระกูลส้มขนาดใหญ่ที่มีถิ่นกำเนิดในภูมิภาคเอเชียบริเวณจีนตอนใต้บริเวณเอเชียตะวันออกเฉียงใต้และบริเวณตะวันออกเฉียงเหนือของอินเดีย ส้มโอสามารถพบได้ทั่วทุกของภาคประเทศไทย ส้มโอสามารถแบ่งออกเป็น 3 ชั้นได้แก่ ชั้นนอกสุด (exocarp) เรียกว่า ฟลาวิโด (flavedo) มีลักษณะเป็นสีเขียวแต่เมื่อผลแก่จะเปลี่ยนเป็นสีเหลืองอ่อนบริเวณอพิเทอมีสจะมีคิวติเคิลหนาและมีความมัน (oil gland) กระจายอยู่ทั่วไปตามผิว ถัดมาเป็นชั้นกลาง (mesocarp) เรียกว่าอัลบิโด (albedo) เป็นเซลล์ฟองสปอนจีฟาเรนโดมา (spongy parenchyma) มีสีขาวและหนามากขึ้นส่วนชั้นในสุด (endocarp) เมื่อมีการพัฒนาของผลเซลล์ผนังด้านในของชั้นนี้จะมีการแบ่งเซลล์และขยายตัวออกกลายเป็นถุงน้ำหวาน (juice sac) ทำหน้าที่เก็บสะสมน้ำ น้ำตาล และสารต่างๆ ลักษณะลำต้นของส้มโอมีสีน้ำตาลมีหนามขนาดเล็กต้นสูงประมาณ 5-15 เมตร ใบลักษณะมนรีที่ปลายใบและโคนใบจะมนขอบใบเป็นคลื่นเล็กน้อย ผลส้มโอมีลักษณะลูกกลมโตบางพันธุ์ตรงบริเวณขั้วจะนูนขนาดของผลประมาณ 5-7 นิ้ว เนื้อส้มโอจะมีประมาณ 12-18 กลีบจะมีสีขาวหรือสีชมพูขึ้นอยู่กับพันธุ์ของส้มโอ ซึ่งส้มโอจัดเป็นผลไม้เศรษฐกิจสำคัญของประเทศเนื่องจากนิยมบริโภคทั้งในและต่างประเทศ มีประโยชน์หลากหลาย พร้อมทั้งมีสรรพคุณทางยาในการรักษาโรคต่างๆ เช่นผิวส้มโอนำมาใช้ร่วมกับสมุนไพรชนิดอื่นๆ มีสรรพคุณในการ

แก้ลมวิงเวียนอาเจียนแก้ลมจุกแน่นในท้อง ส่วนใบส้มโอสามารถใช้เป็นยาแก้ปวดข้อท้องอืดแน่นและแก้ปวดหัว ดอกของส้มโอสามารถช่วยลดอาการปวดกระเพาะอาหารปวดกระบังลมขับลมในท้องขับเสมหะ ส่วนของเนื้อส้มโอสามารถแก้อาการเมาสุราขับลมในลำไส้และกระเพาะอาหารทำให้เจริญอาหาร รากสามารถช่วยแก้อาการหวัดแก้ไอแก้ปวด จากรายงานการวิจัยพบว่าส้มโออุดมไปด้วยสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน (antioxidant) (Pichaiyongvongdee et al., 2009; Rakesh et al., 2013; Tsai et al., 2007) นอกจากนี้ยังพบการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพและฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของส้มโอพันธุ์ทองดีในประเทศไทย (Chaiwong et al., 2010) ซึ่งประกอบไปด้วยสารสำคัญหลายชนิดเช่นวิตามินซี แคโรทีนอยด์ ฟลาโวนอยด์และสารประกอบฟีนอลิก โดยฤทธิ์ต้านออกซิเดชันมีบทบาทสำคัญในการช่วยชะลอและยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันอันเป็นสาเหตุของการเกิดโรคต่างๆ เช่น โรคมะเร็ง, โรคอัลไซเมอร์และเกิดริ้วรอยก่อนวัยอันควร อย่างไรก็ตามยังไม่พบการศึกษาที่ครอบคลุมถึงปริมาณสารสำคัญและฤทธิ์ทางชีวภาพของส่วนประกอบต่างๆ จากผลสุกของส้มโอ อาทิเช่น ส่วนเปลือกนอก เปลือกใน เนื้อเยื่อหุ้มส่วนเนื้อผลไม้ น้ำคั้นและเมล็ด

งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาปริมาณสารสำคัญและสารออกฤทธิ์ต้านออกซิเดชันจากส้มโอ 3 สายพันธุ์ ได้แก่ พันธุ์ทับทิมสยาม ทองดีและขาวน้ำผึ้ง โดยศึกษาส่วนประกอบต่างๆ จากผลสุก



รูปที่ 1 ลักษณะส้มโอ ก) สายพันธุ์ทับทิมสยาม ข) สายพันธุ์ทองดี ค) สายพันธุ์ขาวน้ำผึ้ง

วิธีดำเนินการวิจัย

1. อุปกรณ์และสารเคมี

Microplate reader จากบริษัท metertech สารมาตรฐานเบต้าแคโรทีน (beta carotene) กรดแกลลิก (gallic acid) โทรลออกซ์ (trolox) เควอซิติน (quercetin) กรดแอสคอร์บิก (ascorbic acid) จากบริษัท Sigma-Aldrich โฟลินซีโอเคาทูรีเอเจนต์ (Folin-Ciocalteu's phenol reagent) ดีพีพีเอส (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) เอ บี ที เอส (3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonicacid) ที พี ที แซ ด (2,4,6-tri(2-pyridyl)-s-triazine) สารเคมีอื่น ๆ และตัวทำละลายที่ใช้เป็นเกรตสำหรับการวิเคราะห์

2. แหล่งที่มาของตัวอย่าง

ตัวอย่างส้มโอ 3 สายพันธุ์ได้แก่ ทับทิมสยามทองดี ขาวน้ำผึ้ง ส้มโอพันธ์ทับทิมสยามมาจากจังหวัดนครศรีธรรมราช ส้มโอพันธ์ทองดีมาจากจังหวัดนครปฐมและส้มโอพันธ์ขาวน้ำผึ้งมาจากจังหวัดชัยภูมิ เก็บตัวอย่างในช่วงเดือนสิงหาคม-กันยายน 2557 ตรวจเอกลักษณ์ด้วยรูปวิชาโดย ผศ.ดร. ประชาน ภาชา จากสาขาวิชาเภสัชเวทและพิษวิทยา คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

3. การเตรียมตัวอย่าง

นำส้มโอทั้ง 3 สายพันธุ์มาล้างทำความสะอาด แล้วทำการตัดแยกชิ้นส่วนต่างๆ ออกเป็นเปลือกนอก เปลือกใน เนื้อเยื่อ น้ำคั้นและเมล็ด จากนั้นนำส่วนเปลือกนอก เปลือกใน เนื้อเยื่อและเมล็ดไปอบที่อุณหภูมิ 50°C จนแห้งสนิทแล้วบดจนเป็นผงส่วนน้ำคั้นนำไปทำให้แห้งด้วยวิธีแบบแช่เยือกแข็งด้วยเครื่องทำแห้งภายใต้ความเย็นและสุญญากาศ (freeze dryer) จากนั้นนำส่วนต่างๆ ของส้มโอมาหมักด้วย 95% เอทานอลในอัตราส่วน 1:4 ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน ทำการกรองแยกสารสกัดออกจากกากแล้วนำสารสกัดไประเหยแห้งตัวทำละลายออกด้วยเครื่องกลั่นระเหยสารแบบหมุน (rotary

evaporator) จากนั้นนำสารสกัดเก็บในภาชนะปิดสนิทที่อุณหภูมิ -20°C

4. การวิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญ

การหาปริมาณแคโรทีนอยด์รวม ดัดแปลงจากวิธีของ Davies และคณะ (1976) โดยชั่งสารตัวอย่าง 1 mg ละลายด้วยเอทานอล 10 mL นำไปเขย่าด้วยเครื่องโซนิเคเตอร์ (sonicator) เป็นเวลา 15 นาที แล้วกรองผ่านกระดาษกรอง whatman No. 1 วัดค่าการดูดกลืนแสง (OD) ที่ความยาวคลื่น 450 nm ปริมาณแคโรทีนอยด์รวมหาได้จากการนำค่าการดูดกลืนแสงของสารตัวอย่างเทียบกับกราฟมาตรฐานของสารละลายเบต้าแคโรทีน ปริมาณที่ได้แสดงในหน่วย mg/g extract as beta-carotene equivalents.

การหาปริมาณฟีนอลิกรวม ดัดแปลงจากวิธีของ Follin และคณะ (1927) โดยชั่งสารตัวอย่าง 1 mg ละลายด้วย 80% เอทานอล 1 mL นำสารละลายตัวอย่าง 0.5 mL ใส่ในขวดปรับปริมาตรสีชา เติมสารละลาย 0.2 N Folin-Ciocalteu's phenol reagent 2.5 mL ตั้งไว้ในที่มืดเป็นเวลา 5 นาที จากนั้นเติมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนตความเข้มข้น 7.5% ปริมาตร 2 mL แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 10 mL ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องในที่มืดเป็นเวลา 2 hr นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง (OD) ที่ความยาวคลื่น 760 nm ปริมาณฟีนอลิกรวมหาได้จากการนำค่าการดูดกลืนแสงของสารตัวอย่างเทียบกับกราฟมาตรฐานของสารละลายกรดแกลลิก ปริมาณที่ได้แสดงในหน่วย mg/g extract as gallic acid equivalent.

การหาปริมาณฟลาโวนอยด์รวม ดัดแปลงจากวิธีของ Woisky และคณะ (1998) โดยชั่งสารตัวอย่าง 1 mg ละลายด้วย 80% เอทานอล 1 mL นำสารละลายตัวอย่างมา 0.5 mL ใส่ในขวดปรับปริมาตรสีชา เติมสารละลายอะลูมิเนียมคลอไรด์ (2.5%) ปริมาตร 0.4 mL และโซเดียมอะซิเตด (100 g/L) ปริมาตร 0.5 mL จากนั้นเติมน้ำกลั่น 4 mL ผสมให้เข้ากันแล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง (OD) ที่ความยาวคลื่น 430 nm

ใช้สารละลายควอร์ซีนเป็นสารมาตรฐาน ปริมาณฟลาโวนอยด์รวมหาได้จาก การนำค่าการดูดกลืนแสงของสารตัวอย่างเทียบกับกราฟมาตรฐานของสารละลายควอร์ซีน ปริมาณที่ได้แสดงในหน่วย mg/g extract as quercetin equivalent.

การหาปริมาณแอนโทไซยานินรวม ดัดแปลงจากวิธีของ Lee และคณะ (2005) โดยชั่งสารตัวอย่าง 1 mg ละลายด้วย 80% เอทานอล 1 mL นำสารละลายตัวอย่างมา 0.5 mL แล้วปรับปริมาตรด้วย

$$\text{สมการ Monomeric anthocyanin} = (A \times MW \times DF \times 1000) / (\text{Molar absorptivity} \times 1)$$

โดย $A = (A_{535 \text{ nm}} - A_{700 \text{ nm}})_{\text{pH } 1.0} - (A_{535 \text{ nm}} - A_{700 \text{ nm}})_{\text{pH } 4.5}$

MW = มวลโมเลกุลของไซยานิดิน-3-กลูโคไซด์ เท่ากับ 449.2

DF = ค่าการเจือจางเท่ากับ 10 เมื่อสารตัวอย่าง 1 mL ต่อสารละลายบัฟเฟอร์ 10 mL

Molar absorptivity = ค่าจะขึ้นกับชนิดของแอนโทไซยานินและชนิดตัวทำละลาย

โดยทั่วไปมักใช้ค่าของไซยานิดิน-3-กลูโคไซด์ ในสารละลายบัฟเฟอร์ pH 1.0 เท่ากับ $26,900 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$

5. การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน

วิธี ดี พี พี เอ ซ (1, 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) (DPPH) radical scavenging assay ดัดแปลงจากวิธีของ Brand และคณะ (1995) โดยใช้สารที่มีคุณสมบัติเป็นอนุมูลอิสระคืออนุมูลอิสระ ดีพีพีเอซ (DPPH[•], 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) ซึ่งเป็นสารสังเคราะห์ที่อยู่ในรูปอนุมูลอิสระที่คงตัวและมีสีม่วง เมื่อ DPPH[•] ทำปฏิกิริยากับสารต้าน

สารละลายบัฟเฟอร์ pH 1.0 จนครบ 100 mL เช่นเดียวกันนำสารละลายตัวอย่างมา 0.5 mL ปรับปริมาตรด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ pH 4.5 จนครบ 100 mL วัดค่าการดูดกลืนแสง (OD) ของสารละลายบัฟเฟอร์ pH 1 และ pH 4.5 ที่ความยาวคลื่น 535 และ 700 nm ตามลำดับ นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้จากการวัดมาแทนค่าในสมการ เพื่อหาปริมาณแอนโทไซยานินรวม

ออกซิเดชันที่ละลายด้วยเอทานอล จะทำให้สีม่วงจางลงจนเป็นสีเหลือง การเตรียมสารละลายดีพีพีเอซ (DPPH reagent) โดยชั่งดีพีพีเอซ 0.0079 g ละลายในเอทานอล 100 mL ทำการทดสอบสารตัวอย่าง โดยผสมสารละลายตัวอย่าง 100 μL กับสารละลายดีพีพีเอซ 100 μL ใน 96 well plate ตั้งทิ้งไว้ที่มีเป็นเวลา 30 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 517 nm โดยใช้โทรลอกซ์เป็นสารมาตรฐาน จากนั้นนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้งจากสมการ

$$\% \text{ Inhibition} = [(A_{\text{ดีพีพีเอซ}} - A_{\text{สารตัวอย่าง}}) / (A_{\text{ดีพีพีเอซ}} - A_{\text{สารอ้างอิง}})] \times 100$$

ฤทธิ์การต้านออกซิเดชันจะแสดงเป็นค่า IC₅₀ คือความเข้มข้นของสารที่สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระได้ 50 %

วิธีเอบีทีเอส (ABTS radical cation decolorization assay) ดัดแปลงจากวิธีของ Arnao และคณะ (2001) เป็นการทดสอบด้วย ABTS^{•+}, 2, 2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) radical สารสังเคราะห์ที่มีสีเขียวน้ำเงินสามารถดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 700 nm การเตรียมสารละลายเอบีที

เอส (ABTS reagent) โดยการชั่งสารเอบีทีเอส 0.0036 g ละลายในน้ำกลั่น 1 mL ผสมสารโพแทสเซียมเปอร์ซัลเฟต 0.00067 g แล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องในที่มีให้เกิดปฏิกิริยาเป็นเวลา 12-16 ชั่วโมง ทำการทดสอบสารตัวอย่างโดยผสมสารละลายตัวอย่าง 50 μL กับสารละลายเอบีทีเอสปริมาตร 100 μL ใน 96 well plate ตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 15 นาทีเพื่อให้เกิดปฏิกิริยา

วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 734 nm โดยใช้โทรลอคซ์เป็น
สารมาตรฐาน จากนั้นนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มา

คำนวณหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้งจากสมการ

$$\% \text{ inhibition} = [(A_{\text{เอมีทีเอส}} - A_{\text{สารตัวอย่าง}}) / (A_{\text{เอมีทีเอส}} - A_{\text{สารอ้างอิง}})] \times 100$$

ฤทธิ์การต้านออกซิเดชันจะแสดงเป็นค่า IC₅₀ คือความเข้มข้นของสารที่สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระได้ 50 %

**วิธีทดสอบความสามารถในการรีดิวซ์เฟอร์ริกของ
สารต้านออกซิเดชัน (Ferric ion reducing
antioxidant power (FRAP) assay)** (Benzie and
Strain, 1996) หลักการของสารต้านออกซิเดชันที่
สามารถถ่ายเทอิเล็กตรอนให้กับสารประกอบเชิงซ้อน
ของเฟอร์ริก [Fe(III)(TPTZ)₂]³⁺ ทำให้เกิดการเปลี่ยน
รูปเป็นสารประกอบเชิงซ้อนของเฟอร์รัส
[Fe(II)(TPTZ)₂]²⁺ จากสารละลายสีเหลืองจะถูก
เปลี่ยนเป็นสารละลายสีน้ำเงินม่วง ปริมาณของ
[Fe(II)(TPTZ)₂]²⁺ ที่เกิดขึ้นคือความสามารถในการเป็น
สารต้านออกซิเดชันที่แสดงผลในรูป FRAP value
เทียบกับกราฟมาตรฐานของโทรลอคซ์ (trolox
equivalent) การเตรียมสารละลาย FRAP reagent
โดยการชั่งเฟอร์ริกคลอไรด์ 0.054 g ละลายในน้ำกลั่น
10 mL และซิงก์ที่พีซีแสด (TPTZ) 0.031 g ละลายใน
กรดไฮโดรคลอริก 10 mL ที่อุณหภูมิ 50°C แล้วผสม
ด้วยอะซิเตทบัฟเฟอร์ (pH 3) 100 mL เติมน้ำกลั่น 12

mL เก็บสารละลายไว้ที่อุณหภูมิ 37°C ทำการทดสอบ
สารตัวอย่างโดยผสมสารตัวอย่าง 50 µL กับ
สารละลาย FRAP reagent 150 µL ใน 96 well plate
วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 593 nm โดยใช้โทรลอคซ์เป็น
สารมาตรฐาน

ผลการวิจัย

1. ผลการศึกษาปริมาณสารสำคัญ

การเตรียมสารสกัดจากส่วนต่างๆของส้มโอ
ทั้ง 3 สายพันธุ์ พบว่าร้อยละของสารสกัดเมื่อเทียบกับ
น้ำหนักผงแห้ง (%yield extract/dry) มีค่าดังแสดงใน
ตารางที่ 1 สำหรับปริมาณสารสำคัญรวมทั้ง 4 ชนิด
ได้แก่แคโรทีนอยด์ ฟีนอลิก ฟลาโวนอยด์และแอน
โทไซยานินรวม แสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 1 แสดงร้อยละของสารสกัดจากส่วนต่างๆของส้มโอพันธุ์ต่างๆ

ส้มโอ	ร้อยละของสารสกัดเมื่อเทียบกับน้ำหนักผงแห้ง (%w/w)				
	เปลือกนอก	เปลือกใน	เนื้อเยื่อ	น้ำคั้น	เมล็ด
ทับทิมสยาม	0.92	1.13	1.86	1.92	3.69
ทองดี	1.61	0.47	2.68	4.11	3.72
ขาวน้ำผึ้ง	0.71	0.17	1.9	4.42	0.28

1.1 ปริมาณแคโรทีนอยด์รวม สามารถ
คำนวณได้จากกราฟมาตรฐานของเบต้าแคโรทีน
(y=0.0038x + 0.056, R² = 0.9939) พบว่าในส้มโอ

พันธุ์ทับทิมสยามจะมีปริมาณมากที่สุด รองลงมาคือ
พันธุ์ทองดีและขาวน้ำผึ้งตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบ
ปริมาณในส่วนต่างๆ ของส้มโอจะพบว่าเปลือกนอก

ของส้มโอพันธุ์ทับทิมสยามจะมีปริมาณมากที่สุดเท่ากับ 120.30 ± 3.76 mg/g extract ส่วนเมล็ดของส้มโอพันธุ์ขาวน้ำผึ้งมีปริมาณน้อยที่สุดเท่ากับ 7.60 ± 1.01 mg/g extract

1.2 ปริมาณฟีนอลิกรวม สามารถคำนวณได้จากกราฟมาตรฐานของกรดแกลลิก ($y = 0.0011x + 0.0425$, $R^2 = 0.9939$) พบว่าในส้มโอพันธุ์ทับทิมสยามจะมีปริมาณที่มากที่สุด และรองลงมาด้วยพันธุ์ทองดีและขาวน้ำผึ้ง ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบปริมาณในส่วนต่าง ๆ ของส้มโอพบว่าเนื้อเยื่อของส้มโอพันธุ์ทับทิมสยามจะมีปริมาณมากที่สุดเท่ากับ 19.92 ± 0.46 mg/g extract ส่วนเมล็ดของส้มโอพันธุ์ขาวน้ำผึ้งมีปริมาณน้อยที่สุดเท่ากับ 4.49 ± 0.17 mg/g extract

1.3 ปริมาณฟลาโวนอยด์รวม สามารถคำนวณได้จากกราฟมาตรฐานของเคออสติทิน ($y = 0.0031x + 0.044$, $R^2 = 0.9900$) พบว่าในส้มโอพันธุ์ทับทิมสยามจะมีปริมาณที่มากที่สุด และรองลงมาด้วยพันธุ์ทองดีและขาวน้ำผึ้ง ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบปริมาณในส่วนต่าง ๆ ของส้มโอพบว่าเนื้อเยื่อของส้มโอพันธุ์ทับทิมสยามจะมีปริมาณมากที่สุดเท่ากับ 14.14 ± 0.98 mg/g extract ส่วนเมล็ดของส้มโอพันธุ์ขาวน้ำผึ้งมีปริมาณน้อยที่สุดเท่ากับ 2.15 ± 0.07 mg/g extract

1.4 ปริมาณแอนโทไซยานินรวม สามารถคำนวณได้จากสมการ พบว่าในส้มโอพันธุ์ทับทิมสยามมีปริมาณที่มากที่สุด และรองลงมาด้วยพันธุ์ทองดีและขาวน้ำผึ้ง ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบปริมาณในส่วนต่าง ๆ ของส้มโอพบว่าเนื้อเยื่อของส้มโอพันธุ์ทับทิมสยามจะมีปริมาณมากที่สุดเท่ากับ 1.11 ± 0.02 mg/g extract ส่วนเมล็ดของส้มโอพันธุ์ขาวน้ำผึ้งมีปริมาณน้อยที่สุดเท่ากับ 0.20 ± 0.04 mg/g extract

2. ผลการศึกษาฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน

2.1 การทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชันด้วยวิธี DPPH assay รายงานค่าเป็น IC_{50} ที่แสดงถึง

ความเข้มข้นของสารตัวอย่างที่มีฤทธิ์ในการต้านออกซิเดชันที่ทำให้ความเข้มข้นของอนุมูล DPPH ลดลงร้อยละ 50 เมื่อเปรียบเทียบในสารสกัดส้มโอ 3 สายพันธุ์ได้แก่ ทับทิมสยาม ทองดี และขาวน้ำผึ้งพบว่า ส้มโอพันธุ์ทับทิมสยามมีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันดีที่สุด หากเปรียบเทียบกับส้มโอพันธุ์ทองดีและขาวน้ำผึ้งตามลำดับ และเมื่อเปรียบเทียบส่วนต่าง ๆ ของส้มโอทั้ง 3 สายพันธุ์ พบว่าส่วนเนื้อเยื่อมีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันดีที่สุด รองลงมาคือเปลือกนอก น้ำคั้นเปลือกในและเมล็ด ตามลำดับ เปรียบเทียบกับสารมาตรฐานโทรลอกซ์ ซึ่งฤทธิ์ต้านออกซิเดชันจากวิธี DPPH ของส่วนเนื้อเยื่อของส้มโอพันธุ์ทับทิมสยามมีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันดีที่สุดเนื่องจากมีค่า IC_{50} ต่ำที่สุด มีค่า $IC_{50} = 378.98 \pm 2.54$ μ g/mL ดังแสดงในตารางที่ 3

2.2 การทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชันด้วยวิธี ABTS assay เมื่อเปรียบเทียบในสารสกัดส้มโอ 3 สายพันธุ์ได้แก่ ทับทิมสยาม ทองดี และขาวน้ำผึ้งพบว่าส้มโอพันธุ์ทับทิมสยามมีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันดีที่สุด หากเปรียบเทียบกับส้มโอพันธุ์ทองดี และขาวน้ำผึ้ง ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบส่วนต่าง ๆ ของส้มโอทั้ง 3 สายพันธุ์พบว่าส่วนเนื้อเยื่อมีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันดีที่สุด เปลือกนอก น้ำคั้นเปลือกในและเมล็ด ตามลำดับ เทียบกับกราฟมาตรฐานของโทรลอกซ์ จากวิธี ABTS ฤทธิ์ต้านออกซิเดชันดีที่สุด พบในส่วนเนื้อเยื่อส้มโอพันธุ์ทับทิมสยามมีค่า $IC_{50} = 300.65 \pm 2.71$ μ g/g extract ซึ่งฤทธิ์ต้านออกซิเดชันจากวิธี DPPH และ ABTS ส่วนเมล็ดของส้มโอทั้ง 3 สายพันธุ์มีฤทธิ์น้อยที่สุดมีค่า IC_{50} มากกว่า 1,000 μ g/g extract ดังแสดงในตารางที่ 3

2.3 การทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชันด้วยวิธี FRAP assay รายงานค่าเป็น mg trolox equivalent/ g extract คือความสามารถในการเป็นสารต้านออกซิเดชันได้ในรูป FRAP value เทียบกับกราฟมาตรฐานของ โทรลอกซ์ (trolox equivalent) เป็นวิธีทดสอบความสามารถในการรีดิวซ์เพอร์ริกของสารต้านออกซิเดชัน เปรียบเทียบในสารสกัดส้มโอทั้ง 3 สายพันธุ์ได้แก่ ทับทิมสยาม ทองดีและ

ขาน้ำผึ้ง พบว่าส้มโอพันธุ์ทับทิมสยามมีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันดีที่สุดในเนื้อเยื่อส้มโอพันธุ์ทองดีและขาน้ำผึ้ง ตามลำดับ และเมื่อเปรียบเทียบส่วนต่างๆ ของส้มโอทั้ง 3 สายพันธุ์พบว่าส่วนเนื้อเยื่อมีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันดีที่สุดในเปลือกนอก น้ำคั้น เปลือก

ในและเมล็ด ตามลำดับ ฤทธิ์ต้านออกซิเดชันดีที่สุดในเนื้อเยื่อส้มโอพันธุ์ทับทิมสยาม 181.81±5.57 mg trolox equivalent/g extract ส่วนในเมล็ดของส้มโอทั้ง 3 สายพันธุ์พบฤทธิ์เฉพาะในสารสกัดพันธุ์ทับทิมสยามเท่านั้นดังแสดงในตารางที่ 3

ตารางที่ 2 ปริมาณสารสำคัญที่พบในสารสกัดส้มโอ 3 สายพันธุ์ (n=3)

ส้มโอ	ปริมาณสารสำคัญ (mg/g extract)				
	แคโรทีนอยด์	ฟีนอลิก	ฟลาโวนอยด์	แอนโทโรไซยานิน	
ทับทิมสยาม	เปลือกนอก	120.30±3.76	14.20±0.38	14.14±0.98	0.45±0.01
	เปลือกใน	20.41±2.08	9.49±0.27	8.45±0.07	0.3±0.04
	เนื้อเยื่อ	27.57±1.09	19.92±0.46	5.69±0.08	0.62±0.01
	น้ำคั้น	113.30±8.30	12.72±0.19	9.24±0.15	1.1±0.02
	เมล็ด	13.19±1.42	6.28±0.27	2.97±0.05	0.22±0.01
ทองดี	เปลือกนอก	91.48±1.09	12.74±0.24	12.08±0.14	0.29±0.02
	เปลือกใน	15.59±0.84	8.78±0.22	8.26±0.08	0.26±0.01
	เนื้อเยื่อ	21.64±1.01	17.70±0.24	4.37±0.06	0.33±0.02
	น้ำคั้น	71.35±1.01	10.16±0.44	6.74±0.06	0.96±0.03
	เมล็ด	10.32±0.89	5.30±0.15	2.36±0.05	0.21±0.01
ขาน้ำผึ้ง	เปลือกนอก	89.74±1.17	10.20±0.20	10.34±0.07	0.24±0.02
	เปลือกใน	14.45±0.89	7.63±0.17	4.14±0.07	0.23±0.02
	เนื้อเยื่อ	21.16±0.89	10.84±0.33	3.47±0.12	0.31±0.03
	น้ำคั้น	46.60±0.95	9.04±0.50	3.88±0.05	0.6±0.02
	เมล็ด	7.60±1.01	4.49±0.17	2.15±0.07	0.2±0.04

ตารางที่ 3 แสดงฤทธิ์ในการต้านออกซิเดชันในสารสกัดหยาบส้มโอ (n=3)

ส้มโอ	ฤทธิ์ในการต้านออกซิเดชัน			
	DPPH assay IC ₅₀ (µg/ml)	ABTS assay IC ₅₀ (µg/ml)	FRAP assay (mg Trolox equivalent/g extract)	
ทับทิมสยาม	เปลือกนอก	402.59 ± 1.56	402.45 ± 0.87	135.92 ± 0.56
	เปลือกใน	780.53 ± 5.94	532.93 ± 3.24	26.30 ± 0.24
	เนื้อเยื่อ	378.98 ± 2.54	300.65 ± 2.71	181.81 ± 5.57
	น้ำคั้น	443.85 ± 0.92	432.60 ± 2.56	75.70 ± 0.73
	เมล็ด	> 1,000	> 1,000	3.35 ± 0.24
ทองดี	เปลือกนอก	844.44 ± 1.28	425.46 ± 1.79	62.30 ± 0.74
	เปลือกใน	992.66 ± 4.15	601.68 ± 4.85	23.00 ± 0.12
	เนื้อเยื่อ	684.96 ± 1.47	362.83 ± 2.26	72.41 ± 0.24
	น้ำคั้น	733.91 ± 1.46	436.30 ± 0.64	27.00 ± 0.49
	เมล็ด	> 1,000	> 1,000	-
ขาวน้ำผึ้ง	เปลือกนอก	914.29 ± 1.45	589.26 ± 1.57	26.16 ± 0.32
	เปลือกใน	990.34 ± 2.70	657.09 ± 1.00	16.69 ± 0.32
	เนื้อเยื่อ	906.75 ± 1.84	502.34 ± 1.19	51.78 ± 0.53
	น้ำคั้น	944.59 ± 1.85	619.70 ± 1.96	24.20 ± 1.08
	เมล็ด	> 1,000	> 1,000	-

อภิปราย และสรุปผลการวิจัย

จากการศึกษาปริมาณสารสำคัญและฤทธิ์ต้านออกซิเดชันในส้มโอในส่วนเปลือกนอก เปลือกใน เนื้อเยื่อ น้ำคั้นและเมล็ดของส้มโอพันธุ์ทับทิมสยาม ทองดี และขาวน้ำผึ้ง พบว่าปริมาณสารสำคัญในส้มโอมีปริมาณแคโรทีนอยด์ในส้มโอพันธุ์ทับทิมสยามมากที่สุด รองลงมาคือทองดีและขาวน้ำผึ้ง ตามลำดับ แต่อย่างไรก็ตามวิธีการวิเคราะห์ แคโรทีนอยด์ที่ใช้แสดงเป็นค่าเทียบเท่ากับเบตา-แคโรทีนเท่านั้น ไม่ได้จำเพาะเจาะจงกับแคโรทีนอยด์ชนิดใด จึงควรที่ทำการศึกษาต่อโดยวิธีอื่น ๆ ที่มีความจำเพาะเจาะจงมากยิ่งขึ้น อาทิเช่น HPLC สำหรับใช้ในการวิเคราะห์

เบต้า- แคโรทีน เมื่อเปรียบเทียบในส่วนต่างๆ ของส้มโอแต่ละสายพันธุ์พบว่าปริมาณแคโรทีนอยด์พบมากที่สุด ในส่วนเปลือกนอกของส้มโอทั้ง 3 สายพันธุ์มีปริมาณ เท่ากับ 120.30 ± 3.76, 91.48 ± 0.09 และ 89.74 ± 1.17 mg/g extract ตามลำดับ ปริมาณแคโรทีนอยด์พบน้อยที่สุดในเมล็ดของส้มโอทั้ง 3 สายพันธุ์มีปริมาณ เท่ากับ 13.19 ± 1.42, 10.32 ± 0.89 และ 7.60 ± 1.01 mg/g extract ตามลำดับ ปริมาณฟีนอลิกในส้มโอพันธุ์ทับทิมสยามจะมีปริมาณมากที่สุด รองลงมาคือ ทองดี และขาวน้ำผึ้ง ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบในส่วนต่าง ๆ ของส้มโอแต่ละสายพันธุ์พบว่าปริมาณฟีนอลิกพบมากที่สุดในส่วนเนื้อเยื่อของส้มโอทั้ง 3 สายพันธุ์ มีปริมาณเท่ากับ 19.92 ± 0.46, 17.70 ± 0.24 และ 10.84 ± 0.33 mg/g extract ตามลำดับ ปริมาณฟีนอลิกพบน้อยที่สุดในเมล็ดของ

ส้มโอทั้ง 3 สายพันธุ์ มีปริมาณเท่ากับ 6.28 ± 0.27 , 5.30 ± 0.15 และ 4.49 ± 0.17 mg/g extract ตามลำดับ ปริมาณฟลาโวนอยด์ในส้มโอพันธุ์ทับทิมสยามจะมีปริมาณมากที่สุด รองลงมาคือ ทองดี และชาน้ำผึ้ง ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบในส่วนต่างๆ ของส้มโอแต่ละสายพันธุ์พบว่าปริมาณฟลาโวนอยด์พบมากที่สุดในส่วนเปลือกนอกของส้มโอทั้ง 3 สายพันธุ์ มีปริมาณเท่ากับ 14.14 ± 0.98 , 12.08 ± 0.14 และ 10.34 ± 0.07 mg/g extract ตามลำดับ ปริมาณฟลาโวนอยด์พบน้อยที่สุดในเมล็ดของส้มโอทั้ง 3 สายพันธุ์ มีปริมาณเท่ากับ 2.97 ± 0.05 , 2.36 ± 0.05 และ 2.15 ± 0.07 mg/g extract ตามลำดับ ปริมาณแอนโทไซยานินของส้มโอพันธุ์ทับทิมสยามจะมีปริมาณมากที่สุด รองลงมาคือ ทองดีและชาน้ำผึ้ง ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบในส่วนต่างๆ ของส้มโอแต่ละสายพันธุ์ พบว่าปริมาณแอนโทไซยานินพบมากที่สุดในส่วนน้ำคั้นของส้มโอทั้ง 3 สายพันธุ์มีปริมาณเท่ากับ 1.10 ± 0.02 , 0.96 ± 0.03 และ 0.60 ± 0.02 mg/g extract ตามลำดับ ปริมาณแอนโทไซยานินพบน้อยที่สุดในเมล็ดของส้มโอทั้ง 3 สายพันธุ์มีปริมาณเท่ากับ 0.22 ± 0.01 , 0.21 ± 0.01 และ 0.20 ± 0.04 mg/g extract ตามลำดับ การทดสอบฤทธิ์ฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของส้มโอพันธุ์ทับทิมสยาม ทองดี และชาน้ำผึ้ง ด้วยวิธี DPPH ABTS และ FRAP พบว่าในสารสกัดส้มโอพันธุ์ทับทิมสยามมีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันดีที่สุด รองลงมาคือพันธุ์ทองดีและพันธุ์ชาน้ำผึ้ง เมื่อเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านออกซิเดชันจากทั้ง 3 วิธีพบว่าส่วนเนื้อเยื่อของส้มโอทั้ง 3 สายพันธุ์มีฤทธิ์ดีที่สุด สำหรับฤทธิ์ต้านออกซิเดชันจากวิธี DPPH ส่วนเนื้อเยื่อของส้มโอพันธุ์ทับทิมสยาม พันธุ์ทองดี และพันธุ์ชาน้ำผึ้ง มีค่า $IC_{50} = 378.98 \pm 2.54$, 684.96 ± 1.47 และ 906.75 ± 1.84 μ g/ml ตามลำดับ วิธี ABTS $IC_{50} = 300.65 \pm 2.71$, 362.83 ± 2.26 และ 502.34 ± 1.19 μ g/ml และ วิธี FRAP มีค่า

181.81 ± 5.57 , 72.41 ± 0.24 และ 51.78 ± 0.53 mg Trolox equivalent/g extract และส่วนเมล็ดของส้มโอทั้ง 3 สายพันธุ์มีฤทธิ์น้อยที่สุด ฤทธิ์ต้านออกซิเดชันจากวิธี DPPH วิธี ABTS ของส้มโอทั้ง 3 สายพันธุ์มีค่า $IC_{50} =$ มากกว่า $1,000$ μ g/ml และส่วนวิธี FRAP พบฤทธิ์ต้านออกซิเดชันจากเมล็ดของส้มโอพันธุ์ทับทิมสยามเท่านั้น ซึ่งมีค่าเท่ากับ 3.35 ± 0.24 mg Trolox equivalent/g extract จากการศึกษาถึงความสัมพันธ์ของปริมาณสารสำคัญชนิดต่างๆ ที่ศึกษาต่อฤทธิ์ต้านออกซิเดชันในส้มโอ พบว่าปริมาณฟีนอลิกที่พบในส่วนต่างๆ ของส้มโอทั้ง 3 สายพันธุ์ น่าจะมีบทบาทและความสัมพันธ์กับฤทธิ์ต้านออกซิเดชันวิธี DPPH, ABTS และ FRAP มากที่สุด ซึ่งสอดคล้องกับในส่วนเนื้อเยื่อพบปริมาณฟีนอลิกมากที่สุดเมื่อเทียบกับส่วนอื่นๆ อย่างไรก็ตามกลไกที่ใช้ในการศึกษาทั้ง 3 วิธียังไม่สามารถอธิบายกลไกการออกฤทธิ์ต้านออกซิเดชันทั้งหมดได้และฤทธิ์ต้านออกซิเดชันที่พบนั้นมีความเป็นไปได้ที่จะมาจากสารสำคัญหลายชนิดที่มีฤทธิ์ นอกจากนี้ปริมาณสารสำคัญของสารสกัดเอทานอลจากทั้ง 3 สายพันธุ์ก็พบในปริมาณที่แตกต่างกัน อาทิเช่น ปริมาณแอนโทไซยานินที่พบในส่วนเนื้อเยื่อจากพันธุ์ทับทิมสยามมีสูงกว่าพันธุ์อื่นๆ เกือบ 2 เท่า จึงควรที่จะมีการศึกษาด้วยกลไกอื่น ๆ ที่เกี่ยวข้องต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย ที่สนับสนุนทุนการวิจัยครั้งนี้ และขอขอบคุณคณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ที่ให้การสนับสนุนการดำเนินงานทำให้การวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงได้ดี

References

- Arnao MB, Cano A, Acosta M. The hydrophilic and lipophilic contribution to total antioxidant activity. *Food Chem* 2001; 73: 239–244.
- Benzie IFF, Strain JJ. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: the FRAP assay. *Anal Biochem* 1996; 239: 70–76.
- Brand WW, Cuvelier M, Berset C. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel wissenschaft und tech* 1995; 28: 25–30.
- Chaiwong S, Theppakorn T. Bioactive compounds and antioxidant capacity of pink pummelo (*Citrus grandis* (L.) Osbeck) CV “Thongdee” in Thailand. *J of ISSAAS* 2010; 16(2): 10-16.
- Chaiwong S, Theppakorn T. Investigation of limonoids, flavanones, total polyphenol content and antioxidant activity in Seven Thai pummelo cultivars. *Kasetsart J Nat Sci* 2010; 43: 458–466.
- Davies BH. Carotenoids. *Chemistry and biochemistry of plant pigments*. London: Academic Press 1976; 38-165.
- Dudonne S, Vitrac X, Coutiere P, et al. Comparative study of antioxidant properties and total phenolic content of 30 plant extracts of industrial interest using DPPH, ABTS, FRAP, SOD, and ORAC Assays. *J of Agri and Food Chem* 2009; 57(5): 1768–1774.
- Folin, Ciocalteu. On tyrosine and tryptophan determinations in proteins. *J of Biol Chem* 1927; 73: 627–650.
- Judprasong K, Charoenkiatkul S, Thiyajai P, et al. Nutrients and bioactive compounds of Thai indigenous fruits. *Food Chem* 2013; 140(3): 507-12.
- Lee J, Durst RW, Wrolstad RE. Determination of total monomeric anthocyanin pigment content of fruit juices, beverages, natural colorants, and wines by the pH differential method: Collaborative study. *J of the AOAC Inter* 2005; 88: 1269–1278.
- Masisi M, Beta T, Moghadasian M. Antioxidant properties of diverse cereal grains: A review on in vitro and in vivo studies. *Food Chem* 2015; 196: 90-97.
- Oyedepo T. Antioxidant potential of *Citrus maxima* fruit juice in rats. *Glob Adv Res J of Med and Medic Sci* 2012; 1(5): 122-126.
- Pichaiyongvongdee S, Haruenkit R. Investigation of limonoids, flavanones, total polyphenol content and antioxidant activity in seven Thai pummelo cultivars. *Kasetsart J Nat Sci* 2009; 43: 458-466.
- Rakesh K, Saurabh V, Nawaz V, et al. Comparative nutritional analysis and Antioxidant activity of fruit juices of some *Citrus spp.* *Octa J of biosci* 2013; 1(1): 44-53.
- Thaipong K, Boonprakob U, Crosby K, et al. Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. *J of Food Comp and Anal* 2006; 19(6-7): 669–675.
- Tsai H, Chang S, Chang S. Antioxidant content and free radical scavenging ability of fresh red pummelo

[*Citrus grandis* (L.) Osbeck] juice and freeze-dried products. *J of Agri and Food Chem* 2007; 55(8): 2867-2872.

United States Department of Agriculture. National Nutrient Database for Standard (Pummelo) [Online]. 2011 Dec 19 [cited 2014 Aug 25]. Available from: <http://ndb.nal.usda.gov>.

Woisky RG, Salatino A. Analysis of propolis: some parameters and procedures for chemical quality Control. *J of Agri Res* 1998; 37(2): 99-105.