ชื่อวิทยานิพนธ์	ผลของการกระตุ้นภูมิคุ้มกันและความคงตัวของลิโมนินจากเมล็ดมะนาว
ผู้เขียน	นางสมฤทัย จิตภักดีบดินทร์
สาขาวิชา	เทคโนโลยีอาหาร
ปีการศึกษา	2547

บทคัดย่อ

ลิโมนินเป็นสารไตรเทอร์ปีนอยด์ที่เป็นสารทำให้เกิดรสขมในพืชสกุลส้ม ในการ ศึกษาได้สกัดสารลิโมนินจากเมล็ดของมะนาว ตามวิธีของพิฟเฟอริและคณะ (1993) ได้ลิโมนิน755.03 $\pm$ 32.67 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และมีความบริสุทธิ์ร้อยละ 86-92 การตรวจเอกลักษณ์ของสารลิโมนินได้ตรวจวัดโดยแมส-สเปกโตเมตรี, นิวเคลียร์แมกเนติกเรโซ แนนส์, อินฟราเรดสเปกโตเมตริ และรงคเลขผิวบาง พบว่าลิโมนินที่สกัดมีสูตรโมเลกุล $C_{26}H_{30}O_8$ น้ำหนักโมเลกุล 471.3.นอกจากนั้นยังพบว่าสารลิโมนินที่สกัดให้ช่วงคลื่นการดูดกลืนแสงของกลุ่มคาร์บอนิลที่ชัดเจน และรงคเลขผิวบางของสารลิโมนินที่สกัดเป็นจุดสีส้มที่แตกต่าง ลิโมนินไม่ละลายน้ำ แต่ละลายในแอลกอฮอล์ คลอโรฟอร์ม อะเซโตไนไตล์ และอะซิโตน

ความคงตัวของสารลิโมนินได้ศึกษาทั้งในสภาวะที่เป็นสารละลายและของแข็ง โดยตรวจวัดปริมาณสารที่คงเหลืออยู่ด้วยเครื่องแยกของเหลวแบบสมรรถนะสูง การสลายตัวของสารลิโมนินในสภาวะที่เป็นสารละลายซึ่งเป็นผลจากอุณหภูมิและพีเอช พบว่าเป็นปฏิกริยาอันดับหนึ่งปรากฏ โดยมีความคงตัวในสารละลายพีเอช 5 ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส และมีค่าคงที่ของอัตราปฏิกริยาเป็น 2.06×10^{-4} ต่อนาที พลังงานกระตุ้นของอาร์รีเนียสเป็น 2.45 กิโลแคลอรีต่อโมล และการสลายตัวของสารลิโมนินในสภาวะที่เป็นของแข็งจะเป็นปฏิกริยาอันดับหนึ่ง โดยมีความคงตัวที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส มีค่าคงที่ของอัตราปฏิกริยาเป็น 1.58×10^{-3} ต่อวัน และพลังงานกระตุ้นของอาร์รีเนียสเป็น 3,123.11 กิโลแคลอรีต่อโมล

การศึกษาการกระตุ้นภูมิคุ้มกันได้ให้หนูถีบจักรกินสารลิโมนินความเข้มข้นต่างๆ คือ 5, 10, 20, 50, 100 และ 200 ส่วนในล้านส่วน และประเมินผลความสามารถใน

การจับกินและทำลายสิ่งแปลกปลอมด้วยการตรวจวัดจำนวนของเซลมาโครฟาจหน้าช่องท้องหนู, ตรวจวัดร้อยละของการจับกิน และดัชนีการจับกิน โดยอาศัยเครื่องโฟลไซโตมิเตอร์ พบว่าจำนวนของเซลล์มาโครฟาจหน้าช่องท้องของหนูที่เลี้ยงด้วยสารลิโมนิน 50, 100 และ 200 ส่วนในล้านส่วน วันละ 0.5 มิลลิลิตรต่อตัว เป็นเวลา 6 วัน มีค่า 515.00 ± 19.15 x10^{-4} เซลต่อมิลลิลิตร, 761.25 ± 29.55 x10^{-4} เซลต่อมิลลิลิตร, และ 863.75 ± 25.62 x10^{-4} เซลต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ซึ่งมีจำนวนเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญด้วยระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ลิโมนินความเข้มข้นสูงกว่าและการให้ลิโมนินแก่หนูจำนวนหลายวันให้ผลเพิ่มจำนวนของเซลมาโครฟาจหน้าช่องท้องของหนูทดลองเช่นเดียวกับค่าร้อยละของการจับกิน และดัชนีการจับกินในหนูที่เลี้ยงด้วยสารลิโมนิน 50, 100 และ 200 ส่วนในล้านส่วน วันละ 0.5 มิลลิลิตรต่อตัว เป็นเวลา 6 วัน มีค่า 82.37 ± 0.61 และ 0.9894 ± 0.0106, 103.04 ± 2.76 และ 1.3756 ± 0.0266, และ 114.98 ± 2.57 และ 1.5669 ± 0.0410 ตามลำดับ สำหรับจำนวนเม็ดเลือดขาวในเลือดทั้งหมดในหนูที่เลี้ยงด้วยลิโมนิน 50, 100 และ200 ส่วนในล้านส่วน วันละ 0.5 มิลลิลิตรต่อตัว มีจำนวนเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ และมีค่าสูงที่สุดในหนูที่เลี้ยงด้วยลิโมนิน 200 ส่วนในล้านส่วน ในวันที่ 12 เป็น 470.00 ± 13.04 x10^{4} เซลต่อมิลลิลิตร การสร้างแอนติ้บอดี้จำเพาะในหนูที่เลี้ยงด้วยลิโมนินความเข้มข้นดังกล่าวจะเพิ่มขึ้นเช่นกัน โดยหนูที่เลี้ยงด้วยลิโมนินความเข้มข้น 200 ส่วนในล้านส่วน ในวันที่ 12 หลังการกระตุ้น มีค่าไตเตอร์สูงที่สุดเป็น 1024

กระบวนการผลิตน้ำมะนาวที่ศึกษาได้แก่ การบีบคั้นด้วยมือ, การบีบคั้นด้วยเครื่องจักร, การใช้ความร้อน, และการแช่แข็ง พบว่าลิโมนินในน้ำมะนาวที่บีบคั้นด้วยเครื่องจักรมีปริมาณสูงที่สุดประมาณ 17.49 ± 0.05 ส่วนในล้านส่วน ขณะที่น้ำมะนาวที่บีบคั้นด้วยเครื่องจักรแล้วแช่แข็งให้ปริมาณลิโมนินความเข้มข้นสูงกว่าน้ำมะนาวที่บีบคั้นด้วยเครื่องจักรแล้วทำให้ร้อน กระบวนการผลิตน้ำมะนาวยังมีผลเพิ่มจำนวนเม็ดเลือดขาวทั้งหมดในเลือดของหนูที่เลี้ยงด้วยลิโมนินวันละ 0.5 มิลลิลิตรต่อตัว อย่างมีนัยสำคัญด้วยระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 แต่ไม่พบตวามแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของไตเตอร์การสร้างแอนติ้บอดี้จำเพาะในหนูที่เลี้ยงด้วยน้ำมะนาว

Thesis Title	Immunomodulating Effects and Stability of Limonin from Seeds	(4)
Author	Mrs.Somrutai Jitpukdeebodintra	
Major Program	Food Technology	
Academic Year	2004	

Abstract

Limonin is a triterpenoid that causes a bitter taste in *Citrus* fruits. It was extracted from lime seeds according to the method of Pifferi *et al* (1993) with a yield of 755.03 $\pm$ 32.67 mg/kg. the purity of extracted limonin was 86-92% compared to the standard limonin. Identification of limonin was done by MS, NMR, IR-spectroscopy, and TLC. The molecular formula of limonin was $C_{26}H_{30}O_8$ with molecular weight of 471.3. It exhibited a single broadened, high intensity, carbonyl absorption band. Limonin can best be differentiated detected by the orange spot color of TLC-chromatogram with Ehrlich's reagent. Limonin was insoluble in water, but was soluble in alcohol, chloroform, acetonitrile and acetone.

The stability study was done using both aqueous and solid states, by high performance liquid chromatography. The study of temperature and pH effects on the stability of limonin was indicated that the decomposition of limonin in the aqueous phase followed an apparent first order reaction. It was stable in pH 5 at 45^{o}C with the reaction rate constant of 2.06 x10^{-4}min^{-1}, and Arrhenius activation energy of 2.45 Kcal/mole. Whereas the degradation of solid limonin was a first order reaction, it was stable at 45^{o}C with a reaction rate constant of 1.58 x10^{-3} day^{-1}, and Arrhenius activation energy could be calculated as 3,123.11 Kcal/mole.

The immunomodulating effects of the extracted limonin were investigated using Swiss albino mice by oral administration of various concentrations of limonin from 5, 10, 20, 50, 100 and 200 ppm. The macrophage stimulation activity of limonin was evaluated as the number of exudated cells in the peritoneal cavity (peri (5) exudated cells: PEC number), the percentage of phagocytic (PP), and phagocytic index after limonin administration for several days. It was found that the PEC numbers in mice fed with 0.5 ml/day/mouse of 50 ppm, 100 ppm and 200 ppm of extracted limonin for 6 days were 515.00 ± 19.15 x10^{-4}cell/ml, 761.25 ± 29.55 x10^{-4}cell/ml, and 863.75 ± 25.62 x10^{-4}cell/ml respectively, which was a significant increase compared to the control. The more limonin concentration administered to the mice, the more the PEC number increased. In addition, the more days of limonin administration, the more increase in the PEC number in every group of limonin treated mice with confident level

of 95%, as did the PP and PI in mice fed with 0.5 ml/day/mouse of 50 ppm, 100 ppm and 200 ppm of extracted limonin for 6 days were 82.37 ± 0.61 and 0.9894 ± 0.0106, 103.04 ± 2.76 and 1.3756 ± 0.0266, and 114.98 ± 2.57 and 1.5669 ± 0.0410 consecutively. The total white blood cell counts significantly increased in mice fed with 0.5 ml/day/mouse of 50 ppm, 100 ppm and 200 ppm of extracted limonin. The maximum WBC count was obtained on the 12^{th} day in the mice treated with .0.5 ml/day/mouse of 200 ppm of limonin about 470.00 $\pm$ 13.04 $x10^4$ cell/ml. Specific antibody titers were significantly increased in mice treated with this dose of limonin as well. The maximum antibody titer of 1024 was observed in the dose of 0.5 ml/day/mouse of 200 ppm of limonin treated mice on the 12^{th} day after 20% SRBC immunization.

The processing of lime juice in the study were hand-expressing, machine expressing, heating, and freezing. It was found that limonin expressed by machine had highest concentration of 17.49 ± 0.05 ppm, whereas the machine-expressed and frozen lime juice gave a higher concentration than machine-expressed with heated one. The processing of lime juice affected the total white blood cell count in 0.5 ml/day/mouse of lime juice-treated mice, significantly with 95% confident level, but there was not a significant difference in the specific antibody titers in lime juice-treated mice.