

นารินจินจากเปลือกส้มโอ *Citrus grandis* (L.) Osbeck

นางสาว กนกอร สุดโต

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2550

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

**NARINGIN FROM POMELO *Citrus grandis* (L.) Osbeck PEEL**

Miss Kanokorn Sudto

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements  
for the Degree of Master of Science Program in Biotechnology

Faculty of Science

Chulalongkorn University

Academic Year 2007


Copyright of Chulalongkorn University

501311

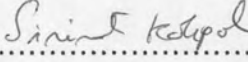
Thesis Title            NARINGIN FROM POMELO *Citrus grandis* (L.) Osbeck PEEL  
By                         Miss Kanokorn Sudto  
Filed of Study         Biotechnology  
Thesis Advisor        Associate Professor Supason Wanichwecharungruang, Ph.D.

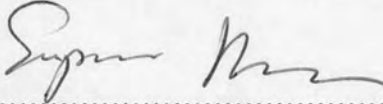
---

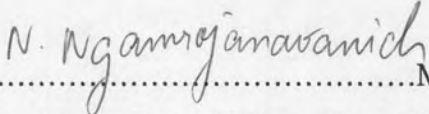
Accepted by the Faculty of Science, Chulalongkorn University in Partial  
Fulfillment of the Requirements for the Master's Degree

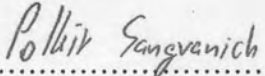
  
.....Dean of the Faculty of Science  
(Professor Supot Hannongbua, Ph.D.)

#### THESIS COMMITTEE

  
.....Chairman  
(Associate Professor Sirirat Kokpol, Ph.D.)

  
.....Thesis advisor  
(Associate Professor Supason Wanichwecharungruang, Ph.D.)

  
.....Member  
(Associate Professor Nattaya Ngamrojavanich, Ph.D.)

  
.....Member  
(Associate Professor Polkit Sangvanich, Ph. D.)

กนกอร สุดโต : นารินจินจากเปลือกส้มโอ *Citrus grandis* (L.) Osbeck

(NARINGIN FROM POMELO *Citrus grandis* (L.) Osbeck PEEL)

อ. ที่ปรึกษา: รศ. ดร. ศุภสร วณิชเวชารุ่งเรือง, 53 หน้า

ในงานวิจัยนี้ได้สกัดและตรวจสอบฤทธิ์ด้านการจับอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ด้านการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส และฤทธิ์กรองรังสียูวี ของส่วนสกัดจากเปลือกส้มโอพันธุ์ขาวใหญ่ ขาวแตงกวา ขาวน้ำผึ้ง และพันธุ์ทองดี พบว่าส่วนสกัดหยาบเมทานอล จากเปลือกขาวของสายพันธุ์ขาวแตงกวา ให้ฤทธิ์ด้านการจับอนุมูลอิสระและฤทธิ์ด้านการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสที่ดีกว่าสายพันธุ์อื่น และยังสามารถดูดกลืนรังสียูวีเอ และ ยูวีบีได้ สารออกฤทธิ์หลักที่พบในเปลือกส้มโอพันธุ์นี้คือ นารินจิน ซึ่งเป็นสารในกลุ่มฟลาโวนอยด์ ไกลโคไซด์ ทำการหาวิธีการแยกนารินจินให้บริสุทธิ์ พบว่าวิธีสกัดโดยใช้น้ำ และ ไดคลอโรมีเทน ควบคู่ไปกับการตกผลึก สามารถแยกนารินจินที่บริสุทธิ์ได้ถึง 2.4 % (น้ำหนักโดยน้ำหนัก) จากเปลือกขาวของส้มโอพันธุ์ขาวแตงกวา โดยสารที่ได้มีความบริสุทธิ์มากกว่า 97 % นอกจากนี้ยังพบ นารินจินในปริมาณสูงในเปลือกขาวของสายพันธุ์ ขาวใหญ่ ขาวน้ำผึ้ง และ ทองดี เช่นกัน

สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ

ปีการศึกษา 2007

ลายมือชื่อนิสิต..... กนกอร สุดโต

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา..... อ.สุภาว

## 4872203823 : MAJOR BIOTECHNOLOGY

KEY WORD: POMELO / *Citrus grandis* (L.) Osbeck / PEEL / NARINGIN /  
FLAVONOIDS / ALBEDO

KANOKORN SUDTO: NARINGIN FROM POMELO *Citrus grandis* (L.)

Osbeck PEEL. THESIS ADVISOR: ASSOC. PROF. SUPASON

WANICHWECHARUNGRUANG, Ph. D., 53pp.

In this study, Pomelo peels, consist of albedo and flavedo from the cultivars Khao Taeng-gwa (KT), Khao Yai (KY), Khao Nam Pheung (KN) and Tong Dee (TD) were extracted and screened for free-radical scavenging, tyrosinase inhibition and UV absorption activities. The result indicated that methanolic crude extract of the KT albedo possessed strongest free-radical scavenging and tyrosinase inhibition activities and showed UV-A and UV-B absorption activity. The main of bioactive compound in KT peel was identified to be naringin, a flavanone glycoside. Efficient process to isolate high purity naringin from albedo was then explored. A simple liquid-liquid extraction (dichloromethane/water) coupled with crystallization gave 2.4 % (w/w) yield of naringin in >> 97 % purity. Moreover, naringin also found in albedo of KY, KN and TD cultivars with the high yield.

Field of Study: Biotechnology

Academic Year: 2007

Student's Signature: *Kanakorn Sudto*

Advisor's Signature: *Supason*

## ACKNOWLEDGEMENTS

Many people have contributed to development of this study, which I am very appreciated for their kind cooperation and their advice. First I would like to express my gratitude to my advisor, Assoc. Prof. Dr. Supason Wanichweacharungraung for her invaluable advice, understanding throughout this study. I am also deeply appreciated.

I am also gratefully acknowledgement the members of my thesis committee, Assoc. Prof. Dr. Sirirat Kokpol, Assoc. Prof. Dr. Nattaya Ngamrojanavanich and Assoc. Prof. Dr. Polkit Sangvanich for my discussion, advice and dedicating time for thesis examination.

I greatly appreciated to Assist. Prof. Dr. Surachai Pornpakakul about his advice for NMR analysis and helps to characterize of naringin.

I greatly gratefully the Graduated school, Chulalongkorn University for partial financial supports (Graduated School Thesis Grant) of my thesis.

Finally, I would like to express my appreciated tiation to for my family for their love, encourangement and understanding throughout my entire thesis

## CONTENTS

	<b>Page</b>
ABSTRACT (THAI).....	iv
ABSTRACT (ENGLISH).....	v
ACKNOWLEDGEMENTS.....	vi
LIST OF TABLES.....	ix
LIST OF FIGURES.....	x
LIST OF SCHEMES.....	xii
LIST OF ABBREVIATIONS.....	xiii
CHAPTER I INTRODUCTION.....	1
Introduction.....	1
Objective of research.....	10
Literature reviews.....	11
CHAPTER II EXPERIMENTAL.....	15
2.1 Instruments and equipments.....	15
2.2 Standards and reagents.....	15
2.3 Sample preparation.....	16
2.4 Extraction and isolation of naringin.....	16
2.5 Naringin purity determination using HPLC.....	18
2.6 Determination of total phenolic contents.....	18
2.7 Determination of free- radical scavenging activity.....	18
2.8 Determination of tyrosinase inhibition activity.....	19
2.9 Determination of UV absorption activity.....	20
CHAPTER III RESULTS AND DISCUSSION.....	21
3.1 Yield of crude extracts from four cultivars pomelo peels .....	21
3.2 Screening of free- radical scavenging, tyrosinase-inhibition and UV absorption activities from crude pomelo peels.....	21
3.3 Constituents of the crude MeOH extract .....	25

	<b>Page</b>
3.4 Isolation of naringin from KT peel .....	25
3.5 Naringin purity.....	26
3.6 Total phenolic contents.....	27
3.7 Tyrosinase inhibition activity .....	28
3.8 Comparison of naringin content in pomelo peels.....	29
3.9 Characterization of naringin.....	30
CHAPTER IV CONCLUSION.....	34
REFERENCES.....	35
APPENDICES.....	43
Appendix A.....	44
Appendix B.....	45
Appendix C.....	46
VITA.....	53



## LIST OF TABLES

Table	Page
1.1 Products and by-products from various tissues of citrus fruits.....	3
1.2 Characteristics of four pomelo cultivars.....	9
3.1 Preliminary screening tests of free-radical scavenging, tyrosinase-inhibition and UV absorption activities in methanolic crude extracts (10,000 mg/L) from pomelo peels of various cultivars.....	22
3.2 % Yield of naringin from pomelo peels of various cultivars.....	29
3.2 1D and 2D NMR spectroscopic data for naringin in acetone- $d_6$ .....	31

## LIST OF FIGURES

Figure	Page
1.1 Structure of naringin.....	5
1.2 Hydrolysis of naringin into prunin, rhamnase, naringenin and glucose by naringinase expressing $\alpha$ -rhamnosidase and $\beta$ -glucosidase activities.....	6
1.3 Four Pomelo cultivars.....	8
1.4 Structure of naringin and hesperidin.....	13
3.1 Free-radical scavenging and tyrosinase inhibition activities of KT, KY, KN, TD albedo peels and KT flavedo peel were tested at concentration 10,000 mg/L compared with standard (Kojic acid and BHT) by TLC autographic assay.....	23
3.2 UV spectra of 50 mg/L methanolic crude extracts of pomelo peels from various cultivars.....	24
3.3 TLC plate using solvents system MeOH: CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> (2:3).....	25
3.4 HPLC chromatogram of naringin from pomelo peel A) the obtained naringin B) standard naringin of 97 % purity.....	27
3.5 Calibration curve of gallic acid of concentration at 20, 40, 60 and 80 mg/L.....	28
3.6 % Tyrosinase inhibition capacity of A) Kojic acid and B) naringin. Results are means of three replicates.....	28
3.5 The COSY correlation of naringin.....	32
3.6 The HMBC correlation of naringin.....	33
B-1 UV Spectra of naringin.....	45
C-1 The <sup>13</sup> C NMR spectrum (Acetone- <i>d</i> <sub>6</sub> ) of naringin.....	46
C-2 The <sup>1</sup> H NMR spectrum (Acetone- <i>d</i> <sub>6</sub> ) of naringin.....	47
C-3 The COSY spectrum (Acetone- <i>d</i> <sub>6</sub> ) of naringin.....	48
C-4 HMBC spectrum (Acetone- <i>d</i> <sub>6</sub> ) of naringin.....	49
C-5 HSQC spectrum (Acetone- <i>d</i> <sub>6</sub> ) of naringin.....	50
C-6 The IR spectrum of naringin.....	51

C-7 The MS spectrum of naringin.....	52
--------------------------------------	----

**LIST OF SCHEMES**

<b>Scheme</b>	<b>Page</b>
2.1 Extraction of KT pummelo peels.....	17
3.2 Isolation of naringin from pummelo peels.....	26

## LIST OF ABBREVIATIONS

$^1\text{H}$ NMR	proton nuclear magnetic resonance
$^{13}\text{C}$ NMR	carbon nuclear magnetic resonance
BHT	butylated hydroxytoulene
$\text{CH}_2\text{Cl}_2$	dichlorometane, methylene chloride
COSY	correlated spectroscopy
d	doublet (NMR)
DPPH	2, 2-diphenyl-1-picryl ydrazyl
EtOAc	ethyl acetate
g	gram (s)
HMBC	heteronuclear multiple bond correlation experiment
HSQC	heteronuclear multiple-quantum coherence experiment
$J$	coupling constant
IR	infrared
m	multiplet (NMR)
MeOH	methanol
Min	minute
mg	milligram
mL	milliliter
mL/min	milliliter per minute
mm	millimeter
mM	millimolar
MS	mass spectrometry
MW	molecular weight
m/z	mass to charge ratio
$\text{M}^+$	positive molecular ion
ppm	part per million
s	singlet (NMR)

TLC	thin layer chromatography
v/v	volumn by volumn
w/w	weight by weight
$\delta$	chemical shift
$\beta$	beta
$\alpha$	gramma
$\lambda_{\text{max}}$	maximum wavelength
$\epsilon$	molar absorptivity