การประเมินฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและคุณสมบัติทางกายภาพเคมีของน้ำมันหอมระเหย

Evaluation of Free-radical Scavenging Activity and their Physico-chemical Properties of Essential Oils

ประไพ วงศ์สินคงมั่น[1] ธนวัฒน์ ทองจีน[1]
Prapai Wongsinkongman Tanawat Tongchin
จารีย์ บันสิทธิ์[1] ธิดารัตน์ บุญรอด[1]
Jaree Bansiddhi Tidarat Boonraud
อภิวัฏ ธวัชสิน[2] อุษาวดี ถาวระ[2]
Apiwat Tawatsin Usavadee Thavara
นพมาศ สุนทรเจริญนนท์[3] ปราณี ชวลิตธำรง[1]
Noppamas Soonthorncharoennon Pranee Chavalittumrong

บทคัดย่อ

ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของน้ำมันหอมระเหย 15 ชนิดที่ได้จากการกลั่นด้วยน้ำจากสมุนไพรไทย 12 ชนิด 8 วงศ์ ที่ได้ทำการศึกษาโดยใช้วิธี DPPH พบว่า น้ำมันหอมระเหย 6 ชนิด ที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระดีมาก คือ เมล็ด (หรือลูกจันทน์) และรกหุ้มเมล็ด (หรือดอกจันทน์), ผล, ใบของจันทน์เทศ (*Myristica fragrans* Houtt.) ใบกะเพรา (แดง)(*Ocimum sanctum* L.) ใบเสม็ด (*Melaleuca cajuputi* Powell) และผลผักคาวตอง (*Houttuynia cordata* Thunb.) โดยมีค่า IC_{50} ที่ 0.60, 0.79, 2.39, 2.88, 3.24 และ 4.19 μl/ml ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับวิตามินซี ซึ่งเป็นสารควบคุมที่ให้ผลบวก พบว่ามีค่า IC_{50} ที่ 3.55 μg/ml นอกจากนี้ คุณสมบัติทางกายภาพเคมีของน้ำมันหอมระเหยทั้ง 6 ชนิดได้ทำการศึกษาในหัวข้อต่างๆ ได้แก่ เอกลักษณ์ทางเคมี (ปฏิกิริยาการเกิดสี วิธีโครมาโตกราฟี

[1] สถาบันวิจัยสมุนไพร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข
[2] สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข
[3] คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

ผิวบาง วิธีแก๊สโครมาโตกราฟี-แมสสเปกโตรเมทรี) การละลายในเอทานอล ความหนาแน่นสัมพัทธ์ และค่าดัชนีหักเห

Abstract

Free-radical scavenging activity of 15 essential oils obtained by hydro-distillation from 12 species (8 families) of Thai herbs was studied using DPPH assay. It was found that 6 types of essential oils from nutmeg tree seeds (or nutmeg) and arils (or mace), fruits, and leaves (*Myristica fragrans* Houtt.), holy basil leaves (*Ocimum sanctum* L.), cajuput tree leaves (*Melaleuca cajuputii* Powell) and fishwort fruits (*Houttuynia cordata* Thunb.) were potent free-radical scavenger with IC_{50} at 0.60, 0.79, 2.39, 2.88, 3.24 and 4.19 μl/ml, respectively. Compared to a positive control, vitamin C showed IC_{50} at 3.55 μg/ml. The physico-chemical properties of these oils were also studied using identification (color test, thin-layer chromatography, gas chromatography-mass spectrometry), miscibility in ethanol, relative density, and refractive index.

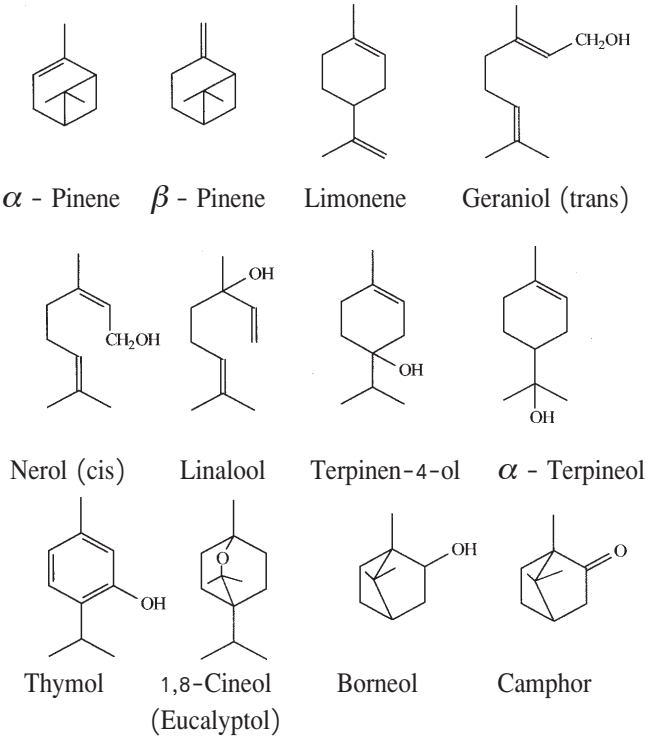
KEY WORDS: free-radical scavenging activity, DPPH assay, essential oils, physico-chemical properties

บทนำ

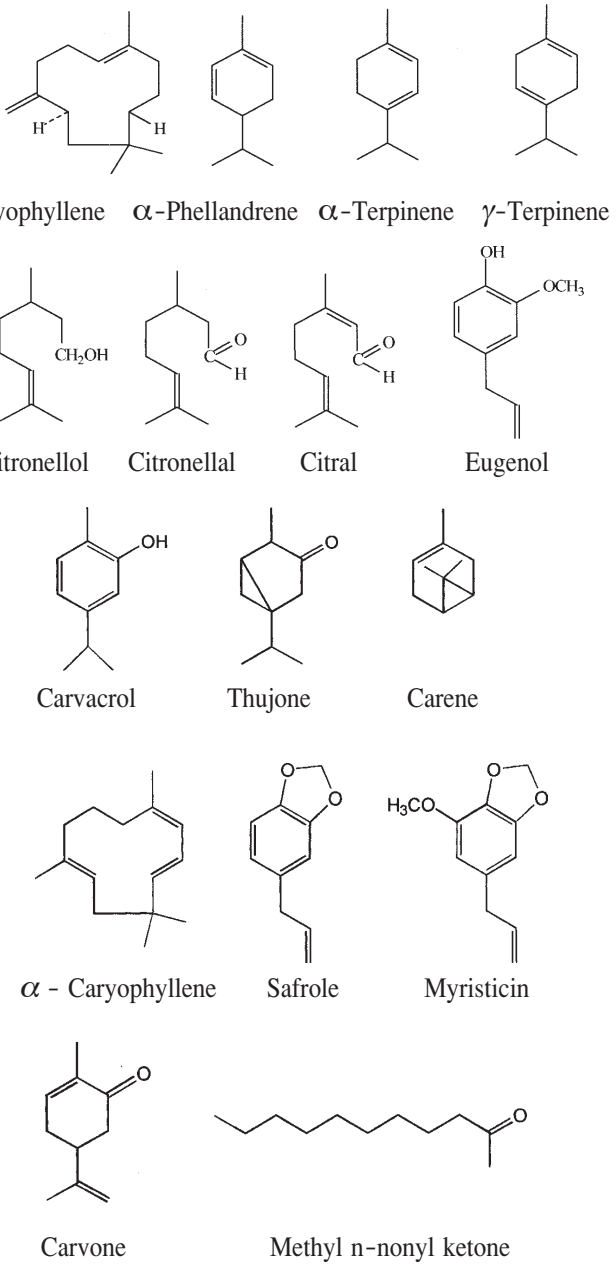
น้ำมันหอมระเหย (Essential Oil or Volatile Oil) คือ น้ำมันที่พืชสร้างขึ้นและเก็บสะสมไว้ในส่วนต่างๆ ของพืช เช่น ดอก ใบ ผล ลำต้น เหง้า ราก และเมล็ด มีคุณสมบัติเฉพาะตัว คือ มีกลิ่นเฉพาะตัว และระเหยได้ง่ายแม้แต่ในอุณหภูมิห้อง มักเป็นของเหลวใส ไม่มีสีหรือมีสีเหลืองอ่อน น้ำมันหอมระเหยที่กลั่นจากพืชสดมักจะมีคุณภาพดีกว่าพืชแห้ง โดยมากน้ำมันหอมระเหยจะไม่มีสี แต่เมื่อถูกออกซิไดซ์จะทำให้มีสีเข้มขึ้น นอกจากนี้ น้ำมันหอมระเหยจะไม่คงตัว เนื่องจาก มีจุดเดือดต่ำและจะระเหยได้ที่อุณหภูมิห้อง ดังนั้น ควรเก็บน้ำมันหอมระเหยในขวดสีชา ที่ปิดสนิทโดยมีจุก 2 ชั้น และเก็บในที่เย็นและแห้ง องค์ประกอบทางเคมีที่พบในน้ำมันหอมระเหยมักเป็นสารเคมีประเภท monoterpenes, sesquiterpenes และ oxygenated terpenes ความแตกต่างขององค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันหอมระเหยของพืชช่วยจำแนกน้ำมันหอมระเหยออกเป็น 7 ประเภท ได้แก่ ไฮโดรคาร์บอน, อัลกอฮอล์, อัลดีไฮด์, คีโตน, ฟีโนลิกเอสเทอร์, ออกไซด์ และเอสเทอร์ การมีองค์ประกอบทางเคมีที่แตกต่างกันของน้ำมันหอมระเหยเหล่านี้ ทำให้มีคุณสมบัติและมีกลิ่นที่แตกต่างกัน ซึ่งถูกนำไปใช้ประโยชน์ที่แตกต่างกันออกไป[1,2]

ในการแพทย์แผนไทย นิยมใช้สมุนไพรที่มีน้ำมันหอมระเหยผสมในสูตรตำรับ เพื่อใช้เป็นยาขับลม กระตุ้นหรือแต่งกลิ่น[1] ปัจจุบันน้ำมันหอมระเหยมีการนำไปใช้ประโยชน์อย่างกว้างขวางทั้งในอาหาร

ยา เครื่องสำอาง และผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร ตลอดจนการแพทย์ทางเลือกอื่นๆ เช่น สุวคนธบำบัด (aromatherapy) การนวด ช่วยกระตุ้นการไหลเวียนของโลหิต ทำให้ผ่อนคลาย ช่วยให้หลับหรือสงบจิตใจ ระงับกลิ่น ทำให้สดชื่น[2] นอกจากนี้ มีรายงานถึงการนำมาใช้ประโยชน์ที่หลากหลาย ตัวอย่างเช่น ฤทธิ์ขับปัสสาวะ[1] ใช้เพื่อป้องกันกำจัดแมลงทางการแพทย์[3-9] ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (free-radical scavenging activity)[10-11] ฤทธิ์ต้านออกซิแดนท์ (antioxidant)[12-20] ฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์หรือเชื้อราหรือเชื้อไวรัส[16-19] ในทางเครื่องสำอางอาจใช้น้ำมันหอมระเหยเพื่อแต่งกลิ่นในน้ำหอม เพิ่มความชุ่มชื้นและความยืดหยุ่นของผิวหนัง หรือเพิ่มความเงางามเป็นประกายของเส้นผม[21] สำหรับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระนั้น มีรายงานว่า น้ำมันหอมระเหยที่มีองค์ประกอบทางเคมีเป็นสารประเภทฟีโนลิกจะมีฤทธิ์ดังกล่าว เช่น thymol, carvacrol, eugenol, carvone, thujone (ดูสูตรโครงสร้างในรูปที่ 1) อาจเนื่องมาจากสารประเภทฟีโนลิกมีคุณสมบัติในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระได้ โดยการให้ไฮโดรเจน อะตอมกับ alkoxy radicals หรือ peroxyl radicals ผลผลิตที่ได้คือ อนุมูลอิสระ phenoxy ที่มีความคงตัวสูง (เนื่องมาจากการมี delocalisation ของอิเลกตรอนคู่โดดเดี่ยวใน aromatic ring) ซึ่งจะไปลดการทำปฏิกิริยาระหว่างอนุมูลอิสระกับไขมัน (lipid peroxidation inhibition) นอกจากนี้ หากมีกลุ่มไฮดรอกซีเพิ่มขึ้นที่ตำแหน่ง ortho หรือ para ของ phenolic ring จะยิ่งเพิ่มฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ เนื่องจากเกิดพันธะไฮโดรเจนภายในโมเลกุล (intramolecular hydrogen-bonding) ซึ่งช่วยให้ phenoxyl radicals มีความคงตัวมากขึ้น[22-24]



รูปที่ 1 สูตรโครงสร้างของสารเคมีประเภทเทอร์ปีนส์บางชนิดที่พบในน้ำหอมระเหย



รูปที่ 1 (ต่อ) สูตรโครงสร้างของสารเคมีประเภทเทอร์ปีนส์บางชนิดที่พบในน้ำหอมระเหย

เนื่องจากอนุมูลอิสระ (free radicals and active oxygen species) เกี่ยวข้องกับอาการทางพยาธิวิทยาหลายประการ เช่น การเสื่อมอายุของเซลล์ (aging process) และการเกิดมะเร็ง (cancer) ดังนั้น การทราบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ จะเป็นประโยชน์ต่อการนำไปพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์เพื่อสุขภาพ ในงานวิจัยนี้ ผู้วิจัยจึงสนใจที่จะศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของน้ำมันหอมระเหยจากสมุนไพรไทย

โดยใช้วิธี DPPH ซึ่งเป็นวิธีหนึ่งที่นิยมศึกษาในห้องปฏิบัติการ เนื่องจากสะดวกและสามารถบอกได้ทั้งเชิงคุณภาพด้วยวิธีโครมาโตกราฟีผิวบาง และเชิงปริมาณด้วยวิธีวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตรด้วยวิธียูวี-วิสสเปกโตรโฟโตเมทรี เนื่องจากการผลิตน้ำมันหอมระเหยแต่ละครั้งนั้นอาจได้ผลผลิตที่มีคุณภาพแตกต่างกัน ขึ้นกับปัจจัยหลายประการ เป็นต้นว่า แหล่งที่มาของพืช อายุในการเก็บเกี่ยวพืช เทคนิคและวิธีการกลั่นและเวลาที่ใช้ในการกลั่น ดังนั้น ผู้วิจัยจึงได้ศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันหอมระเหยที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ โดยใช้วิธี GC-MS ตลอดจนศึกษาคุณสมบัติทางกายภาพเคมีของน้ำมันหอมระเหยที่มีฤทธิ์ดังกล่าว ได้แก่ เอกลักษณ์ทางเคมี การละลายในเอทานอล ค่าดัชนีหักเห และความหนาแน่นสัมพันธ์ เพื่อใช้เป็นแนวทางในการประเมินคุณภาพของน้ำมันหอมระเหยที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระดังกล่าวได้ต่อไป

วิธีดำเนินการวิจัย

ตัวอย่าง

พืชสมุนไพรได้คัดเลือกตามข้อมูลการใช้พื้นบ้านหรือตามภูมิปัญญาท้องถิ่นที่เกี่ยวข้องกับน้ำมันหอมระเหย โดยรวบรวมตัวอย่างวัตถุดิบสมุนไพรที่มีน้ำมันหอมระเหยจากแหล่งธรรมชาติ รวม 12 ชนิด ตามตารางที่ 1 และตรวจสอบชื่อชนิดตามหลักอนุกรมวิธานโดยใช้เอกสารประกอบด้านพรรณพฤกษชาติของประเทศไทยและต่างประเทศ[25-38] นำส่วนสดของตัวอย่างพืชที่ต้องการ ไปล้างด้วยน้ำให้สะอาด แล้วหั่นหยาบๆ นำไปกลั่นด้วยน้ำ โดยใช้ชุดกลั่น Clevenger เมื่อน้ำมันหอมระเหยกลายเป็นไอจะกระทบถูกคอนเดนเซอร์ที่มีน้ำหล่อเย็นอยู่ภายใน ทำให้ไอของน้ำมันหอมระเหยควบแน่นเป็นของเหลวสะสมลงบนชั้นน้ำที่ใส่ไว้ในหลอดแก้วรับตัวอย่าง ถ่ายออกใส่กระบอกตวง และตั้งทิ้งไว้ในตู้เย็นจนชั้นน้ำและชั้นน้ำมันหอมระเหยแยกตัวออกจากกัน แล้วดูดสารละลายชั้นบนซึ่งเป็นชั้นน้ำมันออกด้วยหลอดดูดสารตัวอย่าง เก็บน้ำมันหอมระเหยไว้ในขวดแก้วสีชา มีฝาปิดสนิท ปิดฉลากระบุชื่อสมุนไพร แหล่งที่มา วันที่เก็บ และวันที่เตรียมตัวอย่าง ค่าร้อยละของผลผลิตน้ำมันหอมระเหยที่กลั่นด้วยน้ำจากตัวอย่างสด (% yield) แสดงในตารางที่ 2

เครื่องมือ

1. ชุดกลั่นน้ำมันหอมระเหยชนิด Clevenger ประกอบด้วย เตาบุนวม ขวดแก้ว ชุดเครื่องแก้วรีฟลักซ์ที่มีท่อต่อกับเครื่องหล่อเย็นด้วยน้ำ และหลอดแก้วรองรับตัวอย่างน้ำมันที่ได้จากการกลั่น
2. แผ่นโครมาโตกราฟีผิวบาง ชนิด F254 ขนาด 20x20 ซม. บริษัท Merck, Germany (Merck Number 1.05715)
3. UV cabinet ความยาวคลื่น 254 และ 366 nm ของบริษัท Camag, Switzerland
4. ขวดชั่ง pycnometer ขนาด 1 มล

5. เครื่องแก๊สโครมาโตกราฟี-แมสสเปกโตรมิเตอร์ (GC-MS) รุ่น QP 2010
6. แคปิลลารีคอลัมน์ที่ใช้สำหรับเครื่อง GC-MS ชนิด DB-1 (30 m x 0.25 mm x 0.25 μm)
7. เครื่อง UV-VIS spectrophotometer ยี่ห้อ Thermospectronic รุ่น Biomate 5
8. เครื่องรีแฟรกโตมิเตอร์ ของบริษัท Carl Zeiss
9. เครื่องชั่งวิเคราะห์ที่อ่านค่าทศนิยมได้ 4 ตำแหน่ง รุ่น Genius ของบริษัท Sartorius

ตารางที่ 1 วงศ์ ชื่อวิทยาศาสตร์ ชื่ออังกฤษ ชื่อไทยและส่วนที่ใช้ของสมุนไพรที่นำมาสกัดน้ำมันหอมระเหย

ตัวอย่าง	วงศ์	ชื่อวิทยาศาสตร์	ชื่ออังกฤษ	ชื่อไทย	ส่วนที่ใช้(สด)
1.	Alliaceae	*Allium sativum* L.	Garlic	กระเทียม	หัว
2.	Labiatae	*Ocimum sanctum* L. (Syn. *O. tenuiflorum* L.)	Holy Basil	กะเพรา(แดง)	ใบ
3.	Labiatae	*Vitex trifolia* L.	Khontiso	คนทิสอ	ใบ
4.	Myristicaceae	*Myristica fragrans* Houtt.	Nutmeg tree	จันทน์เทศ	เมล็ดและรก
5.	Myristicaceae	*Myristica fragrans* Houtt.	Nutmeg tree	จันทน์เทศ	ผล
6.	Myristicaceae	*Myristica fragrans* Houtt.	Nutmeg tree	จันทน์เทศ	ใบ
7.	Myrtaceae	*Psidium guajava* L.	Guava	ฝรั่ง	ใบ
8.	Myrtaceae	*Melaleuca cajuputi* Powell	Cajuput tree	เสม็ด	ใบ
9.	Piperaceae	*Piper nigrum* L.	Pepper	พริกไทย	ผลแก่
10.	Rutaceae	*Citrus hystrix* DC.	Leech Lime, Kaffir Lime	มะกรูด	ใบ
11.	Saururaceae	*Houttuynia cordata* Thunb.	Fishwort	ผักคาวตอง	ผล
12.	Saururaceae	*Houttuynia cordata* Thunb.	Fishwort	ผักคาวตอง	ใบ
13.	Zingiberaceae	*Alpinia galanga* (L.) Willd.	Galangal	ข่า	เหง้า
14.	Zingiberaceae	*Curcuma longa* L.	Turmeric	ขมิ้นชัน	เหง้า
15.	Zingiberaceae	*Zingiber officinale* Roscoe	Ginger	ขิง	เหง้า

สารเคมี

สารเคมีที่ใช้ทุกชนิดเป็นชนิด analytical grade และน้ำที่ใช้เป็นน้ำกลั่น
วิตามินซี (ascorbic acid) ของบริษัทซิกม่า
ดีพีพีเอช (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl, approx.90%) ของบริษัทซิกม่า

วิธีการ

- **การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของน้ำมันหอมระเหย**[39]

การเตรียมสารละลายเปรียบเทียบ (positive control)

ชั่งวิตามินซี 0.8 มก ใส่ในขวดปรับปริมาตรขนาด 5 มล เติมเอทานอลจนครบปริมาตร สารละลายที่เตรียมได้มีความเข้มข้นเป็น 0.16 มก/มล

การเตรียมสารละลายตัวอย่าง (sample preparation)

เจือจางตัวอย่างน้ำมันหอมระเหยให้มีความเข้มข้นเป็น 10% v/v ในเอทานอล

การเตรียมน้ำยาดีพีพีเอช (DPPH solution)

เตรียมน้ำยาดีพีพีเอช (DPPH = 2,2 -diphenyl-1-picrylhydrazyl) ให้มีความเข้มข้น 60 μM ในเอทานอล

วิธีการ

เตรียมสารละลายตัวอย่างให้มีความเข้มข้นเป็น 0.4, 0.8, 1.6, 3.2, 6.4 และ 12.8 มคก/มล ตามลำดับโดยปิเปตจากสารละลายตัวอย่างที่มีความเข้มข้น 10% โดยปริมาตรจำนวน 20, 40, 80, 160, 320 และ 640 มคก ตามลำดับ ลงในขวดปรับปริมาตรขนาด 5 มล แล้วปรับปริมาตรให้ครบด้วยเอทานอล นำสารละลายตัวอย่างแต่ละขวดมาเติมสารละลายดีพีพีเอชจำนวน 5.0 มล เขย่าผสมให้เข้ากันดี ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องในตู้ทึบแสงเป็นเวลา 30 นาที โดยใช้น้ำยาดีพีพีเอช เป็นสารละลายควบคุม และเอทานอลเป็น blank สำหรับสารละลายเปรียบเทียบ ให้ปิเปตจากสารละลายวิตามินซีที่มีความเข้มข้น 0.16 มก/มล จำนวน 10, 20, 40, 80, 160 และ 320 มคล ตามลำดับ ลงในขวดปรับปริมาตรขนาด 5 มล แล้วปรับปริมาตรให้ครบด้วยเอทานอล จะได้สารละลายเปรียบเทียบที่มีความเข้มข้นเป็น 0.32, 0.64, 1.28, 5.12 และ 10.24 มคก/มล ตามลำดับ นำสารละลายตัวอย่าง สารละลายควบคุม และสารละลายเปรียบเทียบมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร ด้วยเครื่องยูวี-วิสสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ รวม 3 ครั้ง หาค่าเฉลี่ยที่วัดได้ แล้วนำไปคำนวณ

การคำนวณ

นำค่าเฉลี่ยที่ได้ไปคำนวณหาค่าความเข้มข้นที่สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระดีพีพีเอช ดังนี้

$$\text{Radical scavenging activity (\%)} = \{(OD_{control} - OD_{sample})/OD_{control}\} \times 100$$

$OD_{control}$ = ค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ยของสารละลายควบคุม

OD_{sample} = ค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ยของสารละลายตัวอย่าง

นำข้อมูลที่ได้ไปสร้างกราฟที่มีแกน Y เป็น radical scavenging activity (%) และแกน x เป็นค่า Log C (มคล/มล, มคก/มล) คำนวณหาค่าความเข้มข้นของสารละลายที่ยับยั้งอนุมูลอิสระดีพีพีเอชที่ 50% (IC_{50}) โดยใช้โปรแกรม prism ผลการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระแสดงในรูปที่ 2 ตารางที่ 3

- **การศึกษาคุณภาพทางเคมีของน้ำมันหอมระเหย**

1. การตรวจเอกลักษณ์ทางเคมี

1.1 การตรวจสอบเบื้องต้นด้วยการทดสอบปฏิกิริยาการเกิดสี

เติมเมทานอล 3 มล ลงในหลอดทดลอง เติมน้ำมันหอมระเหยด้วยหลอดหยด จำนวน 2 หยด ผสมให้เข้ากันดี แล้วเติมสารละลายวานิลลิน-กรดกำมะถัน (เตรียมโดยละลายวานิลลิน 1 ก ในเอทานอล 100 มล เติมกรดกำมะถัน 0.5 มล แล้วผสมให้เข้ากัน)[40] จำนวน 2 หยด สังเกตสีของสารละลายที่เปลี่ยนแปลง (ตารางที่ 4)

1.2 การตรวจสอบด้วยวิธีโครมาโตกราฟีผิวบาง (Thin-layer Chromatography)

การเตรียมน้ำยาตัวอย่าง

เจือจางตัวอย่างน้ำมันหอมระเหยให้มีความเข้มข้น 10% โดยปริมาตรในเมทานอล

การเตรียมน้ำยามาตรฐาน

เจือจางสารมาตรฐาน *d*-limonene, myristicin, safrole, β-pinene, eucalyptol, β-caryophyllene, nerol, α-pinene, isoeugenol, eugenol (ดูสูตรโครงสร้างในรูปที่ 1) ให้มีความเข้มข้น 25, 1, 0.4, 2, 2, 2, 1, 1, 1 และ 0.2% โดยปริมาตรตามลำดับในเมทานอล ส่วน α-terpineol เจือจางให้มีความเข้มข้น 10 มก/มล

อุปกรณ์และน้ำยาแยก

แผ่นกระจกฉาบสารดูดซับ ใช้แผ่นกระจกขนาด 20 x 20 ซม ที่ฉาบด้วยซิลิกาเจลจีเอฟ 254 หนา 0.25 มม (Merck Number 1.05715)

น้ำยาแยก (Developing solvent)

ผสมเฮกเซน เอทิลอะซีเตท และกรดอะซีติก ในอัตราส่วน 90 : 10 : 1 ตามลำดับ เขย่าให้เข้ากันดี

ถังทำโครมาโตกราฟี (Chromatographic tank)

ใส่น้ำยาแยกลงในถังให้มีความสูงจากก้นถังประมาณ 1 ซม ตั้งทิ้งไว้อย่างน้อย 1 ชม ก่อนใช้ เพื่อให้บรรยากาศในถังอิ่มตัวด้วยน้ำยาแยก

วิธีการ

ใช้หลอดรูเล็กบรรจุน้ำยาตัวอย่างของแต่ละชนิดหลอดละ 5 มคล และน้ำยามาตรฐานแต่ละชนิดหลอดละ 2 มคล มาแต้มบนแผ่นกระจกฉาบสารดูดซับในแนวระดับเดียวกัน ให้ห่างจากขอบล่างของกระจกประมาณ 1.5 ซม และห่างจากด้านข้างของกระจกประมาณ 2 ซม นอกจากนี้ระยะห่างระหว่างแถวไม่น้อยกว่า 1 ซม ผึ่งให้แห้ง นำไปตั้งในถังโครมาโตกราฟีที่เตรียมไว้ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง ให้น้ำยาแยกซึมขึ้นไปตามผิวที่ฉาบสูง 15 ซม นำแผ่นกระจกออกจากถัง ทิ้งไว้ให้แห้ง นำไปตรวจสอบด้วยการพ่นด้วยน้ำยาดีพีพีเอช (ความเข้มข้น 16 มก ในเอทานอล 100 มล) ทิ้งให้แห้งที่อุณหภูมิห้องแล้วนำไปตรวจสอบด้วยการดูภายใต้แสงธรรมชาติ (visible light) สังเกตผลภายใน 30 นาที ซึ่งหากมีองค์ประกอบทางเคมีที่ยับยั้งอนุมูลอิสระดีพีพีเอช จะพบว่า เกิดจุดไม่มีสีบนพื้นสีม่วง (รูปที่ 3) นอกจากนี้ สำหรับการตรวจสอบองค์ประกอบทางเคมีชนิดอื่นของน้ำมันหอมระเหยนั้น ให้นำแผ่นกระจกอีกแผ่นที่ทำวิธีเดียวกันกับที่กล่าวมาข้างต้นไปตรวจสอบด้วยแสงยูวีที่

ความยาวคลื่น 254 nm บันทึกผล แล้วนำไปพ่นด้วยน้ำยาอะนีซัลดีไฮด์-กรดกำมะถัน (เตรียมโดยผสมอะนีซัลดีไฮด์ 0.5 มล กรดอะซีติก 10 มล เมทานอล 85 มล และกรดกำมะถัน 5 มล เข้าด้วยกันตามลำดับ) ทิ้งให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง นำแผ่นกระจกไปอังด้วยเตาไฟฟ้าที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที แล้วนำไปตรวจสอบโดยการดูภายใต้แสงธรรมชาติ[40-41]

ผลการตรวจสอบ

สังเกตตำแหน่งและสีของจุดสีต่างๆ บนแผ่นกระจก บันทึกผลค่า hR_f (100 R_f) โดยค่า R_f (retardation factor หรือ relative factor) หมายถึง อัตราส่วนของระยะทางที่สารเคลื่อนที่ต่อระยะทางที่น้ำยาแยกเคลื่อนที่ ค่า hR_f แสดงในตารางที่ 5-6 ภาพโครมาโตแกรมผิวบางของน้ำมันหอมระเหยทั้ง 6 ตัวอย่างแสดงในรูปที่ 3-4

1.3 การตรวจสอบด้วยวิธีแก๊สโครมาโตกราฟี-แมสสเปกโตรเมทรี (Gas Chromatography-Mass Spectrometry/GC-MS)

การเตรียมน้ำยาตัวอย่าง

เจือจางน้ำมันหอมระเหยของตัวอย่างให้มีความเข้มข้น 3.33% โดยปริมาตรใน tetrachloroethylene ปริมาณที่ใช้ในการฉีดตัวอย่างชนิดละ 0.1 มคล

วิธีการ

ฉีดน้ำยาตัวอย่างผ่านคอลัมน์ DB-1 ขนาด 30 m x 0.25 μm โดยตั้งค่าอุณหภูมิของ injector เป็น 200 °C การตรวจสอบโครมาโตแกรมทำได้โดยใช้ MS Detector ที่อุณหภูมิ 230 °C อุณหภูมิของตู้อบที่ใช้เริ่มจาก 50, 100, 150 และ 200 °C ตามลำดับ โดยมีอัตราการเพิ่มขึ้นของอุณหภูมิเป็น 10, 2.5 และ 15 °C ต่อนาที นาน 3, 1, 1 และ 3 นาทีตามลำดับ แก๊สพา (carrier gas) ที่ใช้เป็นแก๊สฮีเลียมซึ่งมีอัตราเร็วเป็น 1.22 มล ต่อนาที แรงดันบรรยากาศที่ 69.4 กิโลพาสคาล และ Split ratio ที่อัตราส่วน 1:100 ผลของแก๊สโครมาโตแกรมของน้ำมันหอมระเหยทั้ง 6 ชนิด แสดงใน รูปที่ 5 ทำการค้นหา peak ที่พบ (peak found) โดยเปรียบเทียบจากฐานข้อมูลที่มีในเครื่อง MS (ตารางที่ 7)

2. การทดสอบการละลายในเอทานอล[42]

ทดสอบการละลายของตัวอย่างน้ำมันหอมระเหยด้วย 85% เอทานอล โดยเริ่มจากอัตราส่วน 1:1 หากพบว่าสารละลายขุ่น ให้เพิ่มปริมาณตัวทำละลาย บันทึกค่าการละลายที่ทำให้เกิดสารละลายใส ดังแสดงในตารางที่ 8

3. การหาความหนาแน่นสัมพันธ์[42-43]

ความหนาแน่นสัมพันธ์ (relative density) เป็นเอกลักษณ์ของตัวอย่างที่เป็นของเหลว ความหนาแน่นสัมพันธ์ของตัวอย่าง คือ อัตราส่วนของมวลของตัวอย่างต่อมวลของน้ำกลั่นโดยเปรียบเทียบในปริมาตรที่เท่ากันของตัวอย่าง และน้ำกลั่น โดยใช้ pycnometer ที่อุณหภูมิที่กำหนดในการทดลองนี้ใช้อุณหภูมิ 20 °C จากนั้น นำมาคำนวณหาค่าความหนาแน่นสัมพันธ์ ดังนี้

$$\text{ความหนาแน่นสัมพันธ์ของตัวอย่าง} = \frac{\text{น้ำหนักของตัวอย่างและภาชนะ - น้ำหนักภาชนะ}}{\text{น้ำหนักของน้ำกลั่นและภาชนะ - น้ำหนักภาชนะ}}$$

ผลการคำนวณความหนาแน่นสัมพันธ์ แสดงในตารางที่ 8

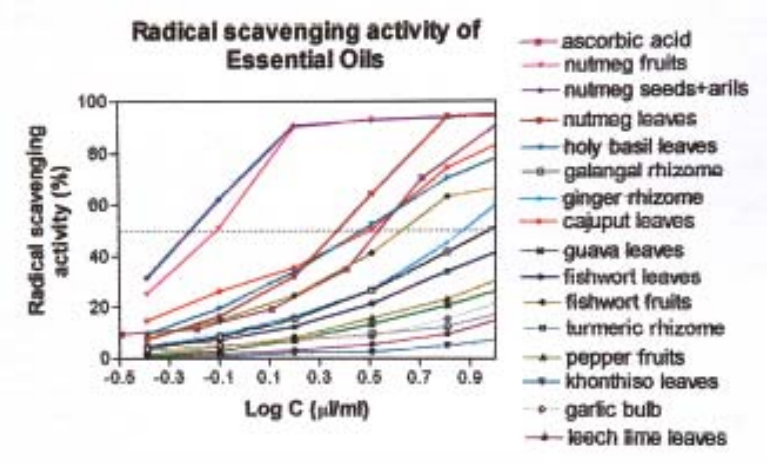
4. การหาค่าดัชนีหักเห[44,45]

ค่าดัชนีหักเหเป็นการพิสูจน์เอกลักษณ์ทางกายภาพของตัวอย่างที่เป็นของเหลว และทดสอบความบริสุทธิ์ของตัวอย่างโดยใช้เครื่องรีแฟรกโตมิเตอร์ ความยาวคลื่นที่ใช้ในการวัดเป็นแสงโซเดียม D (589.3 นาโนเมตร) และอ่านค่าที่อุณหภูมิ 20 °C ดังแสดงในตารางที่ 8

ผลการวิจัย

ตารางที่ 2 ค่าร้อยละของผลผลิตน้ำมันหอมระเหยที่กลั่นด้วยน้ำจากตัวอย่างสด (% yield)

ชนิดของสมุนไพร	ค่าร้อยละของผลผลิตน้ำมันหอมระเหยที่กลั่นด้วยน้ำจากตัวอย่างสด (%v/w)
1. กระเทียม (หัว)	0.12
2. กะเพรา (แดง) (ใบ)	0.16
3. คนทิสอ (ใบ)	0.16
4. จันทน์เทศ (เมล็ดและรก)	0.85
5. จันทน์เทศ (ผล)	0.11
6. จันทน์เทศ (ใบ)	0.66
7. ฝรั่ง (ใบ)	0.16
8. เสม็ด (ใบ)	0.43
9. พริกไทย (ผลแก่)	0.08
10. มะกรูด (ใบ)	0.53
11. ผักคาวตอง (ผล)	0.20
12. ผักคาวตอง (ใบ)	0.20
13. ข่า (เหง้า)	0.83
14. ขมิ้นชัน (เหง้า)	0.18
15. ขิง (เหง้า)	0.12



รูปที่ 2 ความสัมพันธ์ระหว่างฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระ และความเข้มข้นของตัวอย่าง

ตารางที่ 3 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของน้ำมันหอมระเหยโดยศึกษาด้วยวิธีการยับยั้งอนุมูลอิสระดีพีพีเอช (DPPH assay)

ตัวอย่าง	ค่า Log ความเข้มข้นที่ยับยั้งอนุมูลอิสระที่ 50% ($Log\ IC_{50}$) (µl/ml)	ค่าความเข้มข้นที่ยับยั้งอนุมูลอิสระที่ 50% (IC_{50}) (µl/ml)
1. กระเทียม (หัว)	>1	>10
2. กะเพรา (แดง) (ใบ)	0.46	2.88
3. คนทิสอ (ใบ)	>1	>10
4. จันทน์เทศ (เมล็ดและรก)	-0.22	0.60
5. จันทน์เทศ (ผล)	-0.10	0.79
6. จันทน์เทศ (ใบ)	0.38	2.39
7. ฝรั่ง (ใบ)	>1	>10
8. เสม็ด (ใบ)	0.51	3.24
9. พริกไทย (ผลแก่)	>1	>10
10. มะกรูด (ใบ)	>1	>10
11. ผักคาวตอง (ผล)	0.62	4.19
12. ผักคาวตอง (ใบ)	>1	>10
13. ข่า (เหง้า)	0.96	9.19
14. ขมิ้นชัน (เหง้า)	>1	>10
15. ขิง (เหง้า)	0.87	7.41
16. วิตามินซี	0.55	3.55

ตารางที่ 4 ผลการทดสอบปฏิกิริยาการเกิดสีของน้ำมันหอมระเหย

ชนิดของน้ำมันหอมระเหย	สีของสารละลายที่เกิดจากการทดสอบด้วยสารละลายวานิลลิน-กรดกำมะถัน
1. จันทน์เทศ (เมล็ดและรก)	สีน้ำเงินอ่อน
2. จันทน์เทศ (ผล)	สีน้ำเงินอ่อน
3. จันทน์เทศ (ใบ)	สีน้ำเงินอ่อน
4. เสม็ด (ใบ)	สีน้ำเงินอ่อน
5. กะเพรา (แดง) (ใบ)	สีม่วงอมแดง
6. ผักคาวตอง (ผล)	สีม่วงอมแดงแล้วเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล

ตารางที่ 5 ค่า hR_f ของสารต้านอนุมูลอิสระในน้ำมันหอมระเหย 6 ชนิด

ชนิดของน้ำมันหอมระเหย	จุดที่	ค่า hR_f
1. จันทน์เทศ (เมล็ดและรก)	1	21
	2	31
	3	54
2. จันทน์เทศ (ผล)	1	21
	2	31
	3	54
3. จันทน์เทศ (ใบ)	1	21
	2	31
	3	54
4. เสม็ด (ใบ)	1	31
	2	47
	3	88
5. กะเพรา (แดง) (ใบ)	1	7
	2	40
	3	51
	4	88
6. ผักคาวตอง (ผล)	1	49
	2	63

ตารางที่ 6 ค่า hR_f และผลการตรวจสอบสารประเภทเทอร์ปีนอยด์ในน้ำมันหอมระเหย 6 ชนิด

ชนิดของน้ำมันหอมระเหย	จุดที่	ค่า hR_f	สีที่สังเกตด้วย	
			UV254	แสงธรรมชาติ
1. จันทน์เทศ (เมล็ดและรก)	1	11	-	ชมพูอ่อน
	2	21	-	ชมพูอ่อน
	3	29	ทึบแสง	ชมพูอ่อน
	4	36	ทึบแสง	ชมพูเข้ม
	5	54	ทึบแสง	ส้มอ่อน
	6	71	-	ชมพูอ่อน
	7	88	-	ชมพูอ่อน

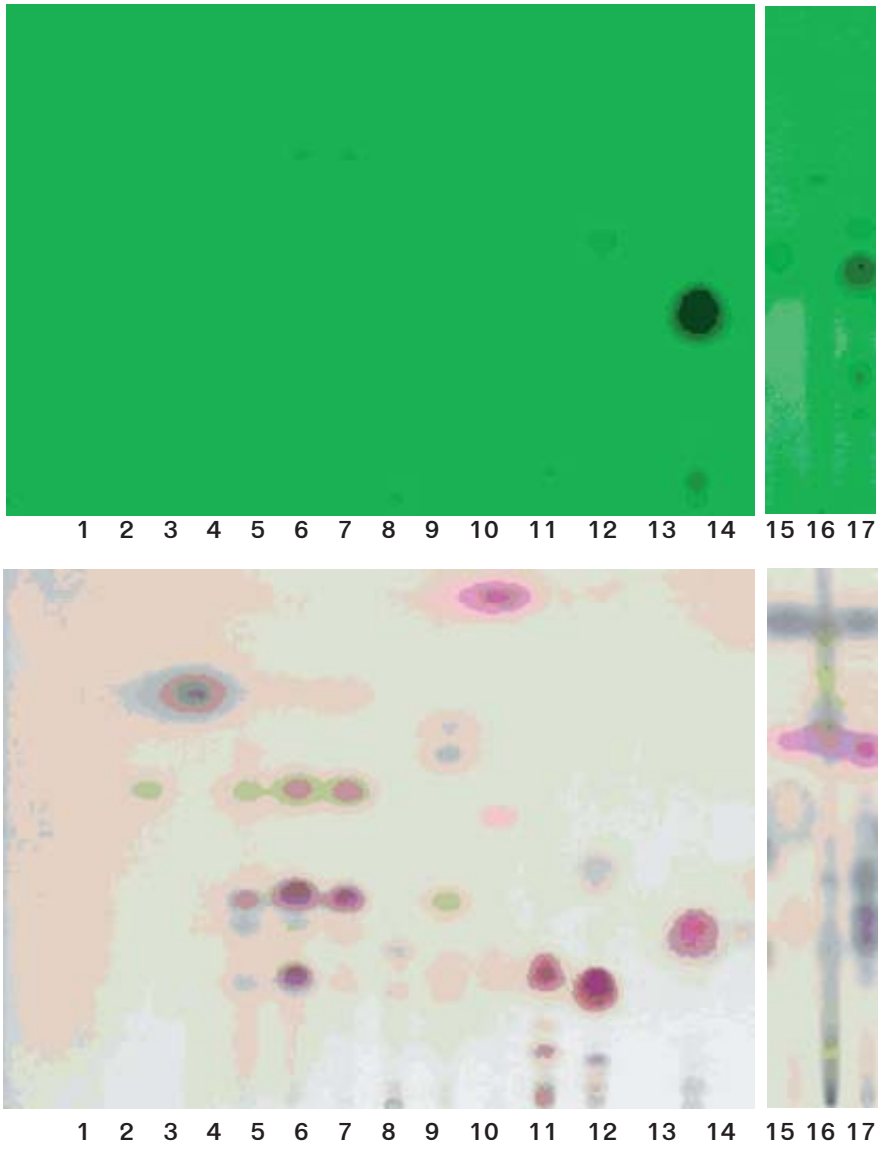
ตารางที่ 6 (ต่อ)ค่า hR_f และผลการตรวจสอบสารประเภทเทอร์ปีนอยด์ในน้ำมันหอมระเหย 6 ชนิด

ชนิดของน้ำมันหอมระเหย	จุดที่	ค่า hR_f	สีที่สังเกตด้วย	
			UV254	แสงธรรมชาติ
2. จันทน์เทศ (ผล)	1	11	-	ชมพูอ่อน
	2	21	-	ชมพูเข้ม
	3	29	ทึบแสง	ชมพูอ่อน
	4	36	ทึบแสง	ชมพูเข้ม
	5	54	ทึบแสง	ส้ม
	6	88	-	ชมพูอ่อน
3. จันทน์เทศ (ใบ)	1	11	-	ชมพูอ่อน
	2	21	-	ชมพูอ่อน
	3	29	ทึบแสง	ชมพูอ่อน
	4	36	ทึบแสง	ชมพูเข้ม
	5	54	ทึบแสง	ส้มอ่อน
	6	88	-	ชมพูอ่อน
4. เสม็ด (ใบ)	1	3	ทึบแสง	ชมพูอ่อน
	2	11	ทึบแสง	ชมพูอ่อน
	3	17	ทึบแสง	ม่วงอ่อน
	4	23	-	ม่วงเข้ม
	5	28	ทึบแสง	ม่วงเข้ม
	6	33	-	ม่วงเข้ม
	7	39	ทึบแสง	เหลือง
	8	47	-	ชมพู
	9	58	ทึบแสง	ชมพูเข้ม
	10	87	ทึบแสง	ม่วงเข้ม
5. กะเพรา (แดง) (ใบ)	1	7	ทึบแสง	-
	2	31	-	เหลือง
	3	52	ทึบแสง	เหลือง
	4	63	-	ชมพูเข้ม
	5	85	-	ม่วงเข้ม
6. ผักคาวตอง (ผล)	1	9.5	-	ม่วงอ่อน
	2	27	-	ม่วงอ่อน
	3	40	-	ม่วงอ่อน
	4	63	-	ชมพูเข้ม
	5	66	ทึบแสง	ม่วงอ่อน
	6	74	ทึบแสง	เหลือง
	7	82	ทึบแสง	เหลือง
	8	92	-	ม่วงอ่อน

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17

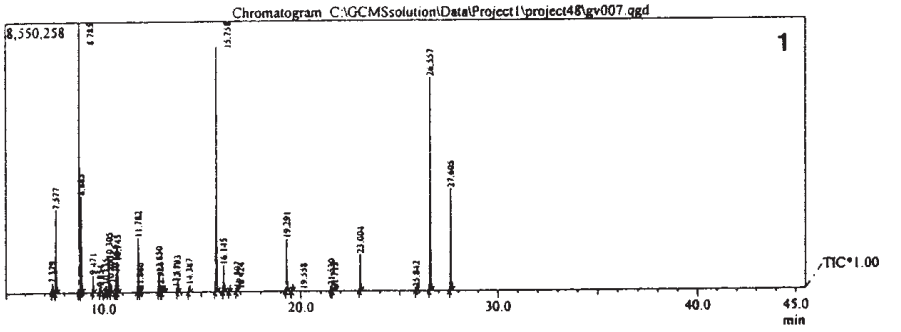
รูปที่ 3 ลักษณะทางโครมาโตแกรมผิวบางขององค์ประกอบทางเคมีที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในน้ำมันหอมระเหย เมื่อใช้เฮกเซน/เอทิลอะซีเตท/กรดอะซีติก (90:10:1) เป็น mobile phase แล้วพ่นด้วยน้ำยา DPPH

1 = *d*-limonene; 2 = myristicin; 3 = safrole; 4 = น้ำมันใบจันทน์เทศ;
5 = น้ำมันผลจันทน์เทศ; 6 = น้ำมันเมล็ดและรกจันทน์เทศ; 7 = β-pinene;
8 = eucalyptol; 9 = β-caryophyllene; 10 = α-terpineol; 11 = nerol;
12 = α-pinene; 13 = isoeugenol; 14 = eugenol; 15 = น้ำมันใบกะเพรา(แดง);
16 = น้ำมันผลผักคาวตอง; 17 = น้ำมันใบเสม็ด



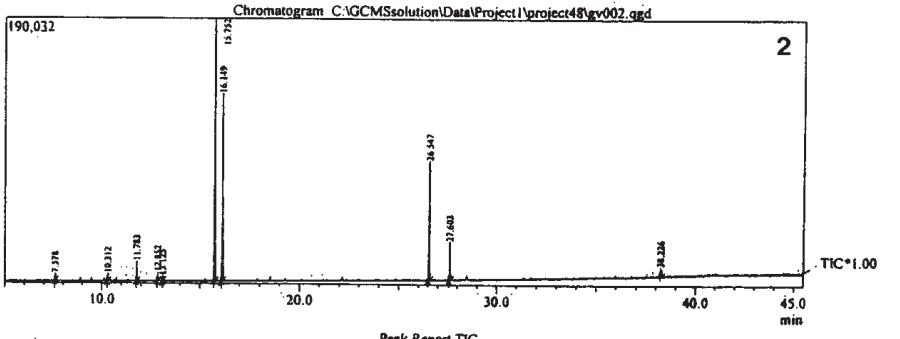
รูปที่ 4 ลักษณะทางโครมาโตแกรมผิวบางของสารประเภทเทอร์ปีนส์ในน้ำมันหอมระเหยชนิดต่างๆ เมื่อใช้เฮกเซน/เอทิลอะซีเตท/กรดอะซีติก (90:10:1) เป็น mobile phase และสังเกตด้วยยูวี 254 nm (I) แล้วพ่นด้วยน้ำยาอะนีซัลดีไฮด์-กรดกำมะถันแล้วอังให้ร้อนที่อุณหภูมิ 105 °C นาน 5 นาที และดูภายใต้แสงธรรมชาติ (II)

1 = *d*-limonene; 2 = myristicn; 3 = safrole; 4 = น้ำมันใบจันทน์เทศ; 5 = น้ำมันผลจันทน์เทศ; 6 = น้ำมันเมล็ดและรกจันทน์เทศ; 7 = β-pinene; 8 = eucalyptol; 9 = β-caryophyllene; 10 = α-terpineol; 11 = nerol; 12 = α-pinene; 13 = isoeugenol; 14 = eugenol; 15 = น้ำมันใบกะเพรา(แดง); 16 = น้ำมันผลผักคาวตอง; 17 = น้ำมันใบเสม็ด



Peak Report TIC

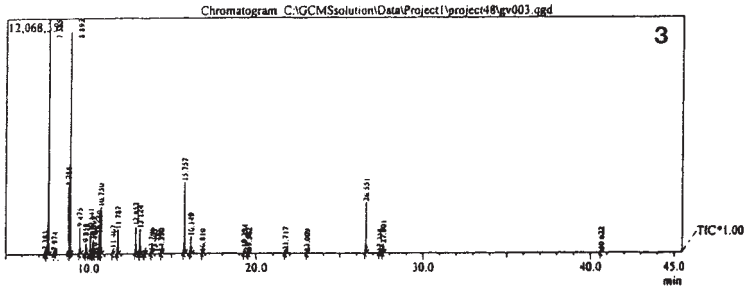
Peak#	R.Time	I.Time	F.Time	Area	Area%	Height	Height%	A/H	Mark	Name
1	7.379	7.333	7.425	729048	0.65	334209	0.76	2.18		
2	7.577	7.517	7.642	5906016	5.28	2666889	6.05	2.21		
3	8.785	8.717	8.833	20028526	17.89	8548631	19.41	2.34		
4	8.885	8.833	8.950	7141521	6.38	3091254	7.02	2.31	V	
5	9.471	9.417	9.533	1365003	1.22	578770	1.31	2.35		
6	9.854	9.800	9.908	456961	0.41	193154	0.44	2.36		
7	10.135	10.083	10.192	590942	0.53	250411	0.57	2.35		
8	10.305	10.192	10.358	2616730	2.34	1076374	2.44	2.43	V	
9	10.400	10.358	10.458	737647	0.66	314830	0.71	2.34	V	
10	10.664	10.600	10.700	1737521	1.55	641270	1.46	2.70		
11	10.745	10.700	10.800	2459881	2.20	1001169	2.27	2.45	V	
12	11.782	11.717	11.833	4244031	3.79	1744324	3.96	2.43		
13	11.866	11.833	11.917	223444	0.20	97484	0.22	2.29	V	
14	12.850	12.792	12.892	1562484	1.40	623913	1.42	2.50		
15	12.924	12.892	12.975	255735	0.23	108854	0.25	2.34	V	
16	13.119	12.975	13.167	384466	0.34	159116	0.36	2.41		
17	13.793	13.742	13.850	820177	0.73	333385	0.76	2.46		
18	14.387	14.333	14.442	574064	0.51	227278	0.52	2.52		
19	15.758	15.675	15.833	20476093	18.29	7749361	17.59	2.64		
20	16.145	16.083	16.217	2307296	2.06	855345	1.94	2.69		
21	16.424	16.392	16.475	165849	0.15	72102	0.16	2.30	V	
22	16.807	16.758	16.858	282392	0.25	113632	0.26	2.48		
23	19.291	19.225	19.358	4536585	4.05	1676010	3.80	2.70		
24	19.558	19.517	19.608	94850	0.08	39636	0.09	2.39		
25	21.530	21.475	21.583	455904	0.41	175985	0.40	2.59		
26	21.713	21.583	21.767	154267	0.14	61151	0.14	2.52	V	
27	23.004	22.942	23.075	3213951	2.87	1186715	2.69	2.70		
28	25.842	25.792	25.892	224411	0.20	93919	0.21	2.38		
29	26.557	26.475	26.633	19300007	17.24	6774087	15.38	2.84		
30	27.605	27.533	27.683	8898042	7.95	3260506	7.40	2.72		
				111943844	100.00	44049764	100.00			



Peak Report TIC

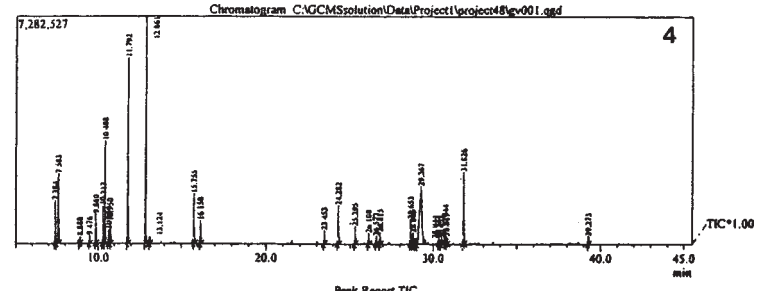
Peak#	R.Time	I.Time	F.Time	Area	Area%	Height	Height%	A/H	Mark	Name
1	7.578	7.550	7.617	8580	0.75	5323	1.12	1.61		
2	10.312	10.275	10.342	9685	0.84	5338	1.12	1.81		
3	11.783	11.750	11.825	27450	2.39	14311	3.01	1.91		
4	12.852	12.817	12.883	12487	1.09	6484	1.36	1.92		
5	13.125	13.100	13.142	3251	0.28	3713	0.78	0.87		
6	15.752	15.700	15.817	471508	41.03	188022	39.50	2.50		
7	16.149	16.092	16.200	331857	28.88	134417	28.24	2.46		
8	26.547	26.492	26.608	207900	18.09	85396	17.94	2.43		
9	27.603	27.558	27.650	60929	5.30	27788	5.84	2.19		
10	38.226	38.200	38.325	15514	1.35	5156	1.08	3.00		
				1149161	100.00	475948	100.00			

รูปที่ 5 แก๊สโครมาโตแกรมของน้ำมันหอมระเหยจำนวน 2 ชนิด เมื่อใช้แคปิลลารีคอลัมน์ชนิด DB-1 (30 m x 0.25 mm x 0.25 μm) และใช้ mass spectrometer เป็น detector
1 = น้ำมันเมล็ดและรกจันทน์เทศ; 2 = น้ำมันผลจันทน์เทศ



Peak Report TIC

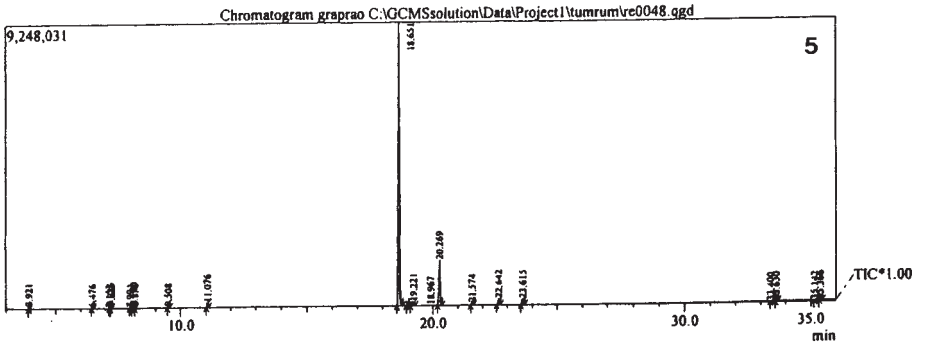
Peak#	R.Time	I.Time	F.Time	Area	Area%	Height	Height%	A/H	Mark	Name
1	7.383	7.333	7.433	480370	0.42	236564	0.49	2.03		
2	7.585	7.433	7.658	26992831	23.34	12066822	25.12	2.23		
3	7.974	7.892	8.017	479137	0.41	190809	0.40	2.51		
4	8.788	8.725	8.833	8566424	7.41	3536564	7.36	2.42		
5	8.893	8.833	8.967	26845795	23.21	11440431	23.82	2.34	V	
6	9.475	9.417	9.550	3183265	2.75	1404475	2.92	2.26		
7	9.858	9.783	9.917	1414226	1.22	588354	1.22	2.40		
8	10.141	10.083	10.200	2826159	2.44	1169264	2.43	2.41		
9	10.309	10.225	10.358	1766122	1.53	746813	1.55	2.36		
10	10.404	10.358	10.458	402839	0.35	172183	0.36	2.33	V	
11	10.669	10.600	10.708	2804396	2.42	1054840	2.20	2.65		
12	10.750	10.708	10.817	5914049	5.13	2437849	5.08	2.43	V	
13	11.467	11.417	11.525	643302	0.56	278579	0.58	2.30		
14	11.787	11.725	11.850	3109332	2.69	1249884	2.60	2.48		
15	12.853	12.792	12.917	3676579	3.18	1440359	3.00	2.55		
16	13.124	13.067	13.192	3187019	2.76	1295002	2.70	2.46		
17	13.405	13.358	13.450	132997	0.11	55145	0.11	2.41		
18	13.796	13.750	13.850	316734	0.27	126067	0.26	2.51		
19	14.390	14.342	14.442	222062	0.19	89858	0.19	2.47		
20	15.757	15.683	15.833	9760577	8.44	3702407	7.71	2.63		
21	16.149	16.083	16.217	2346826	2.03	884209	1.84	2.65		
22	16.810	16.767	16.858	131835	0.11	56298	0.12	2.34		
23	19.294	19.233	19.358	727007	0.63	272883	0.57	2.66		
24	19.562	19.517	19.617	282873	0.24	109266	0.23	2.58		
25	21.717	21.667	21.775	347587	0.30	134684	0.28	2.58		
26	23.009	22.967	23.058	132742	0.11	53545	0.11	2.47		
27	26.551	26.475	26.625	7462410	6.45	2652224	5.52	2.81		
28	27.358	27.317	27.408	91627	0.08	36972	0.08	2.47		
29	27.601	27.542	27.667	1184909	1.02	464983	0.97	2.54		
30	40.622	40.575	40.683	213886	0.18	82456	0.17	2.59		
				115665917	100.00	48029789	100.00			



Peak Report TIC

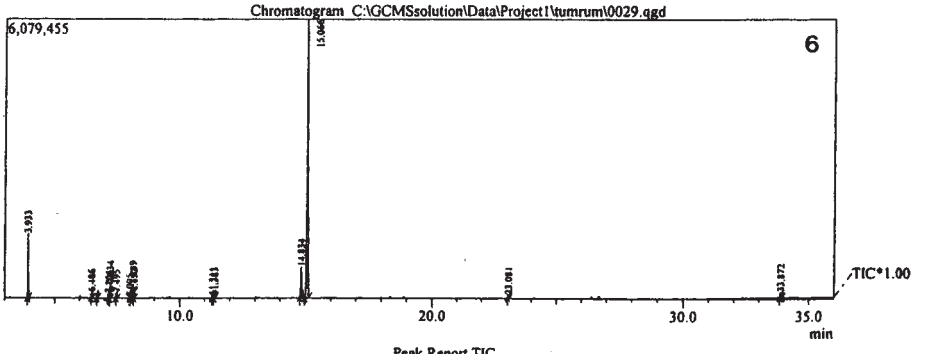
Peak#	R.Time	I.Time	F.Time	Area	Area%	Height	Height%	A/H	Mark	Name
1	7.384	7.333	7.442	2945302	2.67	1389802	3.78	2.11		
2	7.583	7.442	7.642	4955077	4.50	2238099	6.09	2.21	V	
3	8.888	8.833	8.933	553613	0.50	239534	0.65	2.31		
4	9.476	9.433	9.525	568512	0.52	261899	0.71	2.17		
5	9.860	9.808	9.917	2266061	2.06	957978	2.61	2.36		
6	10.313	10.258	10.358	3040369	2.76	1220533	3.32	2.49		
7	10.408	10.358	10.475	7920137	7.19	3298780	8.97	2.40	V	
8	10.654	10.600	10.708	1289224	1.17	455013	1.24	2.83		
9	10.750	10.708	10.808	1683814	1.53	711922	1.94	2.36	V	
10	11.792	11.725	11.858	14823441	13.45	5959793	16.21	2.48		
11	12.861	12.792	12.933	18843735	17.10	7279468	19.80	2.58		
12	13.124	13.083	13.175	590569	0.54	247752	0.67	2.38		
13	15.755	15.700	15.825	4505003	4.09	1611778	4.38	2.79	V	
14	16.150	16.092	16.217	1926018	1.75	745514	2.03	2.58		
15	23.453	23.400	23.508	1207099	1.10	436170	1.19	2.76		
16	24.282	24.217	24.350	3503165	3.18	1242314	3.38	2.81		
17	25.295	25.233	25.358	1683506	1.53	582833	1.59	2.88		
18	26.100	26.050	26.158	967262	0.88	350265	0.95	2.76		
19	26.573	26.517	26.633	806343	0.73	262796	0.71	3.06		
20	26.815	26.758	26.875	1101839	1.00	391079	1.06	2.81		
21	28.653	28.592	28.717	2309824	2.10	801673	2.18	2.88		
22	28.805	28.717	28.867	1086125	0.99	366655	1.00	2.96	V	
23	28.944	28.875	29.000	518344	0.47	186113	0.51	2.78		
24	29.267	29.008	29.475	20393266	18.51	1847056	5.02	11.04		
25	30.344	30.300	30.400	470197	0.43	178219	0.48	2.63		
26	30.493	30.433	30.550	610366	0.55	174203	0.47	3.50		
27	30.744	30.683	30.783	1481280	1.34	508722	1.38	2.91		
28	30.819	30.783	30.892	721297	0.65	242449	0.66	2.97	V	
29	31.826	31.758	31.900	6677428	6.06	2322362	6.32	2.87		
30	39.273	39.225	39.333	742638	0.67	257344	0.70	2.88		
				110190854	100.00	36768118	100.00			

รูปที่ 5 **(ต่อ)** แก๊สโครมาโตแกรมของน้ำมันหอมระเหยจำนวน 2 ชนิด เมื่อใช้แคปิลลารีคอลัมน์ชนิด DB-1 (30 m x 0.25 mm x 0.25 μm) และใช้ mass spectrometer เป็น detector 3 = น้ำมันใบจันทน์เทศ; 4 = น้ำมันใบเสม็ด



Peak Report TIC

Peak#	R.Time	I.Time	F.Time	Area	Area%	Height	Height%	A/H	Mark	Name
1	3.921	3.892	3.950	126337	0.32	82382	0.69	1.53		
2	6.476	6.442	6.525	61029	0.16	42663	0.36	1.43		
3	7.153	7.133	7.192	37248	0.09	25360	0.21	1.46		
4	7.225	7.200	7.267	105304	0.27	76837	0.64	1.37		
5	7.994	7.967	8.033	33122	0.08	24271	0.20	1.36		
6	8.140	8.033	8.158	151689	0.39	95422	0.80	1.58		
7	8.178	8.158	8.217	62626	0.16	46044	0.38	1.36	V	
8	9.508	9.467	9.567	70699	0.18	41986	0.35	1.68		
9	11.076	11.025	11.125	342241	0.87	159881	1.33	2.14		
10	18.651	18.558	18.808	30464959	77.43	9233915	76.97	3.29	S	
11	18.967	18.933	19.033	33385	0.08	10726	0.09	3.11		
12	19.221	19.100	19.300	499031	1.27	123631	1.03	4.03		
13	20.269	20.183	20.375	5396109	13.71	1503161	12.53	3.58		
14	21.574	21.517	21.650	234489	0.60	73212	0.61	3.20		
15	22.642	22.558	22.725	770630	1.96	209432	1.75	3.67		
16	23.615	23.542	23.700	745192	1.89	202001	1.68	3.68		
17	33.400	33.383	33.592	52677	0.13	6849	0.06	7.69		
18	33.630	33.592	33.708	64155	0.16	15137	0.13	4.23	V	
19	35.142	35.125	35.333	33261	0.08	5523	0.05	6.02		
20	35.366	35.333	35.467	63155	0.16	18142	0.15	3.48	V	
				39347338	100.00	11996575	100.00			



Peak Report TIC

Peak#	R.Time	I.Time	F.Time	Area	Area%	Height	Height%	A/H	Mark	Name
1	3.933	3.900	3.975	1980193	8.32	1403345	14.51	1.41		
2	6.486	6.458	6.517	177703	0.75	126210	1.31	1.40		
3	6.724	6.692	6.750	137023	0.58	97767	1.01	1.40		
4	7.164	7.133	7.200	148376	0.62	103697	1.07	1.43		
5	7.234	7.200	7.267	441624	1.85	315008	3.26	1.40		
6	7.495	7.467	7.533	166044	0.70	117269	1.21	1.41		
7	8.005	7.983	8.033	41693	0.18	27772	0.29	1.50		
8	8.149	8.033	8.167	459983	1.93	313490	3.24	1.46	V	
9	8.192	8.167	8.225	240353	1.01	150377	1.56	1.59	V	
10	11.311	11.275	11.350	107546	0.45	49285	0.51	2.18		
11	11.383	11.350	11.425	109042	0.46	50656	0.52	2.15	V	
12	14.834	14.775	14.900	1915193	8.04	677126	7.00	2.82		
13	15.066	14.967	15.150	17336937	72.81	6060532	62.68	2.86		
14	23.081	23.042	23.142	162634	0.68	58895	0.61	2.76		
15	33.872	33.825	33.950	387550	1.63	118048	1.22	3.28		
				23811894	100.00	9669477	100.00			

รูปที่ 5 **(ต่อ)** แก๊สโครมาโตแกรมของน้ำมันหอมระเหยจำนวน 2 ชนิด เมื่อใช้แคปิลลารีคอลัมน์ชนิด DB-1 (30 m x 0.25 mm x 0.25 μm) และใช้ mass spectrometer เป็น detector
5 = น้ำมันใบกะเพรา(แดง); 6 = น้ำมันผลผักคาวตอง

ตารางที่ 7 องค์ประกอบทางเคมีที่พบของน้ำมันหอมระเหยจำนวน 6 ชนิดที่วิเคราะห์ด้วยเครื่อง GC-MS (เรียงตาม Area%)

ชนิดของ น้ำมันหอมระเหย	สารเคมีที่พบ Peak Found	อัตราส่วนร้อยละของพื้นที่(%) Percentage Ratio(Area%)	เวลา (นาที) Retention Time (min)
1. เมล็ดและ รกจันทน์เทศ	terpinen-4-ol	18.29	15.758
	β-phellandrene	17.89	8.785
	myristicin	17.24	26.557
	Benzene,1,2,3-trimethoxy -5-(2-propenyl)-	7.95	27.605
	β-pinene	6.38	8.885
	α-pinene	5.28	7.577
2. ผลจันทน์เทศ	terpinen-4-ol	41.03	15.752
	α-terpineol	28.88	16.149
	myristicin	18.09	26.547
	unidentified	5.30	27.603
3. ใบจันทน์เทศ	α-pinene	23.34	7.585
	β-pinene	23.21	8.893
	terpinen-4-ol	8.44	15.757
	myristicin	6.45	26.551
	d-limonene	5.13	10.750
4. ใบเสม็ด	unidentified	18.51	29.267
	4-carene	17.10	12.861
	γ-terpinene	13.45	11.792
	cymene	7.19	10.408
	unidentified	6.06	31.826
	α-pinene	4.50	7.583
	terpinen-4-ol	4.09	15.755
	caryophyllene	3.18	24.282
	thujene	2.67	7.384
5. ใบกะเพรา(แดง)	benzene, 1,2-dimethoxy -4-(2-propenyl)-	77.43	18.651
	caryophyllene	13.71	20.269
	germacrene-D	1.96	22.642
6. ผลผักคาวตอง	methyl n-nonyl ketone	72.81	15.066
	bornyl acetate	8.04	14.834
	eucalyptol	1.93	8.149

ตารางที่ 8 คุณสมบัติทางกายภาพของน้ำมันหอมระเหย

ชนิดของน้ำมันหอมระเหย	ลักษณะของตัวอย่าง	การละลายด้วย 85% เอทานอล	ความหนาแน่นสัมพันธ์ที่อุณหภูมิ 20°C	ค่าดัชนีหักเหที่อุณหภูมิ 20°C
1. เมล็ดและรกจันทน์เทศ	ของเหลวใส ไม่มีสี	1:3	0.9360	1.4904
2. ผลจันทน์เทศ	ของเหลวใส สีเหลืองอ่อน	1:3	0.9492	1.4890
3. ใบจันทน์เทศ	ของเหลวใส ไม่มีสี	1:7	0.8780	1.4782
4. ใบเสม็ด	ของเหลวใส สีเหลืองอ่อน	1:8	0.9416	1.5012
5. ใบกะเพรา (แดง)	ของเหลวใส สีเหลืองอ่อน	1:1	0.9994	1.5263
6. ผลผักคาวตอง	ของเหลวใส สีเหลืองอ่อน	1:4000 ใน 85% เอทานอล 1:1ในเอทิลอะซีเตท 1:1ในไดคลอโรมีเทน	0.8461	1.4897

วิจารณ์

ในงานวิจัยนี้ ได้ทำการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของน้ำมันหอมระเหยจำนวน 15 ชนิดที่ได้จากการกลั่นด้วยน้ำ (ตารางที่ 1) ด้วยวิธี DPPH Assay สำหรับการตรวจวิเคราะห์เชิงคุณภาพด้วยวิธีโครมาโตกราฟีผิวบาง พบว่า น้ำมันหอมระเหยส่วนมากให้ผลบวกกับน้ำยา DPPH โดยเกิดจุดไม่มีสีบนพื้นสีม่วง (รูปที่ 3) ในขณะที่น้ำมันหอมระเหยจากกระเทียมไม่ให้ผลบวก (ไม่ได้แสดงข้อมูล) เมื่อนำมาตรวจวิเคราะห์เชิงปริมาณด้วยวิธีการวัดการดูดกลืนแสงด้วยวิธียูวี-วิสสเปกโตรโฟโตเมทรี (รูปที่ 2) พบว่า น้ำมันหอมระเหยที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระดีมาก มีจำนวน 6 ชนิด ได้แก่ เมล็ดและรกจันทน์เทศ ผลจันทน์เทศ ใบจันทน์เทศ ใบเสม็ด ใบกะเพรา(แดง) ผลผักคาวตอง โดยมีค่า IC_{50} ที่ 0.60, 0.79, 2.39, 2.88, 3.24 และ 4.19 μl/ml ตามลำดับ โดยทั้ง 6 ชนิดนี้มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระดีกว่าหรือใกล้เคียงกับวิตามินซี ซึ่งมีค่า IC_{50} ที่ 3.55 μl/ml ส่วนน้ำมันหอมระเหยจากขิงและข่ามีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระต่ำกว่าวิตามินซี 2-3 เท่า โดยมีค่า IC_{50} ที่ 7.41, 9.19 μl/ml ตามลำดับ ในขณะที่น้ำมันหอมระเหยจากกระเทียม คนทีสอ ฝรั่ง พริกไทย มะกรูด ขมิ้นชัน และกระชาย มีค่า IC_{50} มากกว่า 10 μl/ml (ตารางที่ 3)

น้ำมันหอมระเหยทั้ง6ชนิดที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระดีนั้นได้นำมาศึกษาคุณสมบัติทางกายภาพ เคมีด้วยการพิสูจน์เอกลักษณ์ทางเคมีโดยปฏิกิริยาการเกิดสี วิธีโครมาโตกราฟีผิวบาง (TLC) และวิธีแก๊สโครมาโตกราฟีแมสสเปกโตรเมทรี (GC-MS) ตรวจพินิจลักษณะทางกายภาพ การละลายในเอทานอล ความหนาแน่นสัมพันธ์ และค่าดัชนีหักเหผลจากการศึกษาเอกลักษณ์ทางเคมี ได้แก่ การทดสอบเบื้องต้นด้วยปฏิกิริยาการเกิดสี โดยการทำปฏิกิริยากับสารละลายวานิลลิน-กรดกำมะถัน พบว่า เกิดสีต่างๆกันไป เช่น สีฟ้า ม่วงแดง น้ำตาล แสดงว่า น่าจะมีสารเคมีประเภทเทอร์ปีนส์[40] (ตารางที่ 4) เมื่อทดสอบด้วยวิธีโครมาโตกราฟีผิวบาง (TLC) โดยใช้แสงยูวีที่ความยาวคลื่น 254 nm พบว่า องค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันหอมระเหยทั้ง 6 ชนิดนั้น เกิดจุดทึบแสง ซึ่งเกิดจากคุณสมบัติของการ มี conjugated double bond อย่างน้อย 2 พันธะอยู่ในโครงสร้างของสารเคมีในน้ำมันหอมระเหย ตัวอย่างเช่น สารเคมีกลุ่ม phenylpropane derivatives จะมีคุณสมบัติดังกล่าว และเมื่อตรวจสอบด้วยการพ่นด้วยน้ำยาอะนีซัลดีไฮด์-กรดกำมะถัน พบว่า เกิดจุดสีต่างๆกัน เช่น สีม่วง แดง น้ำเงิน น้ำตาล เขียว แสดงว่า มีสารเคมีประเภทเทอร์ปีนส์[40-41] สำหรับน้ำมันหอมระเหยจากจันทน์เทศทั้ง 3 ตัวอย่าง พบ myristicin และ safrole เป็นองค์ประกอบทางเคมีที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ในขณะที่น้ำมันหอมระเหยจากใบเสม็ดและใบกะเพรา(แดง) พบ β-caryophyllene เป็นองค์ประกอบทางเคมีที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (รูปที่ 3-4 และตารางที่ 5-6)

ผลจากการศึกษาแก๊สโครมาโตแกรม ด้วยวิธีแก๊สโครมาโตกราฟีแมสสเปกโตรเมนทรี (GC-MS) (รูปที่ 5 และตารางที่ 7) ทำให้ทราบถึงองค์ประกอบหลักทางเคมีของน้ำมันหอมระเหยทั้ง 6 ชนิด พบว่า น้ำมันจากเมล็ดและรกหรือผลหรือใบของต้นจันทน์เทศมีองค์ประกอบหลักเป็นสารเคมีกลุ่ม phenylpropane derivatives (เช่น myristicin, safrole) ส่วนน้ำมันหอมระเหยจากเมล็ดและรกหรือผลจันทน์เทศจะพบองค์ประกอบทางเคมีกลุ่ม monoterpene alcohols (เช่น terpinen-4-ol, α-terpineol) อยู่มาก ในขณะที่น้ำมันหอมระเหยจากใบจันทน์เทศจะพบองค์ประกอบหลักเป็นสารเคมีกลุ่ม monoterpenes (เช่น α-pinene, β-pinene, limonene) โดยพบว่า สัดส่วนของ myristicin ในผลจันทน์เทศมีมากกว่ารกและเมล็ดและมีมากกว่าใบ ดังนั้น ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของน้ำมันหอมระเหยจากต้นจันทน์เทศทั้งสามส่วน น่าจะเกิดจากสารเคมีเหล่านี้ ซึ่งให้ผลบวกกับน้ำยา DPPH เมื่อทดสอบด้วยวิธีโครมาโตกราฟีผิวบาง (รูปที่ 3) นอกจากนี้ ยังเคยมีรายงานว่าสาร myristicin และ dehydrodiisoeugenol ที่พบในรกแห้งจากจันทน์เทศมีฤทธิ์ยับยั้ง lipid peroxidation ในหนูทดลอง[46] สำหรับน้ำมันหอมระเหยจากใบเสม็ด พบว่า มีสารที่ไม่ทราบสูตรโครงสร้างสูงถึง 18.51% และมี 4-carene, γ-terpinene อยู่ในปริมาณที่สูงรองลงมาในอันดับสองและสาม เนื่องจากยังไม่ทราบว่าเป็นสารใด ดังนั้น จึงยังไม่สามารถระบุได้ว่าฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเกิดจากองค์ประกอบทางเคมีชนิดใด แต่เป็นไปได้ว่า ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของน้ำมันใบเสม็ดนั้น อาจเกิดได้จากองค์ประกอบทางเคมีที่กล่าวมาแล้ว และอาจรวมถึงสารเคมีชนิดอื่นด้วย เช่น caryophyllene เนื่องจากสารนี้ให้ผลบวกกับน้ำยา DPPH เมื่อทดสอบด้วยวิธีโครมาโตกราฟีผิวบาง (รูปที่ 3) ส่วนน้ำมันจากใบกะเพรา (แดง) มี

องค์ประกอบหลักเป็น 1,2-dimethoxy-4-(2-propenyl)-benzene และ caryophyllene ดังนั้น สารเคมีทั้งสองชนิดนี้น่าจะเป็นสารออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสำหรับน้ำมันหอมระเหยจากผลผักคาวตอง พบว่ามีองค์ประกอบส่วนใหญ่เป็น methyl n-nonyl ketone หรือ undecanone โดยมีอัตราส่วนร้อยละของพื้นที่ (Area %) สูงถึง 72.81% (ตารางที่ 7) ดังนั้น สารเคมีชนิดนี้น่าจะเป็นสารออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

สำหรับการศึกษาคุณสมบัติอื่นๆด้านกายภาพของน้ำมันหอมระเหยทั้ง 6 ชนิดนี้ ได้แก่ ลักษณะของตัวอย่าง การละลายด้วยเอทานอล ค่าดัชนีหักเห และความหนาแน่นสัมพันธ์ (ตารางที่ 8) เป็นการบ่งบอกถึงคุณภาพทางกายภาพ ซึ่งเป็นเอกลักษณ์เฉพาะตัวอันจะเป็นประโยชน์ต่อการควบคุมคุณภาพของน้ำมันหอมระเหยแต่ละชนิดต่อไป

สรุปผลการวิจัย

การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของน้ำมันหอมระเหยทั้ง 15 ชนิดนี้จากสมุนไพรไทยได้แก่ กระเทียม (หัว), กะเพราแดง (ใบ), คนทิสอ (ใบ), จันทน์เทศ (เมล็ดและรก, ผล, ใบ), เสม็ด (ใบ), พริกไทย (ผลแก่), มะกรูด (ใบ), ผักคาวตอง (ผล, ใบ), ข่า (เหง้า), ขมิ้นชัน (เหง้า), ขิง (เหง้า) โดยวิธี DPPH Assay พบว่า น้ำมันหอมระเหยจากส่วนผลหรือเมล็ดและรกของต้นจันทน์เทศมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้ดีใกล้เคียงกันและสูงกว่าวิตามินซีประมาณ 4-5 เท่า (IC_{50} = 0.79 และ 0.60 μl/ml ตามลำดับ) รองลงมาคือ น้ำมันหอมระเหยจากใบจันทน์เทศ ใบกะเพรา(แดง) ใบเสม็ด และผลผักคาวตอง (IC_{50} = 2.39, 2.88, 3.24 และ 4.19 μl/ml ตามลำดับ) ซึ่งมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระดีกว่าเล็กน้อยหรือเทียบเท่ากับวิตามินซี (IC_{50} = 3.55 μg/ml) ส่วนน้ำมันหอมระเหยที่มีฤทธิ์รองลงมาได้แก่ น้ำมันจากเหง้าขิงและเหง้าข่ามีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระต่ำกว่าวิตามินซีอยู่ประมาณ 2-3 เท่า (IC_{50} = 7.41 และ 9.19 μl/ml ตามลำดับ) นอกจากนี้ได้รายงานถึงผลการศึกษาคุณสมบัติทางเคมีและกายภาพของน้ำมันหอมระเหยทั้ง 6 ชนิดในหัวข้อเอกลักษณ์ทางเคมี ลักษณะของตัวอย่าง การละลายด้วยเอทานอล ค่าดัชนีหักเห และความหนาแน่นสัมพัทธ์ไว้ด้วย ซึ่งจะเป็นประโยชน์ในการควบคุมคุณภาพของน้ำมันหอมระเหยจากสมุนไพรดังกล่าวต่อไป

เอกสารอ้างอิง

1 วันดี กฤษณพันธ์. พฤกษเคมีเบื้องต้น. ใน:วีณา จิรัจฉริยากูล. ยาและผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติ. กรุงเทพฯ: ภาควิชาเภสัชวินิจฉัย คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล. 2534. หน้า 25-72, 307.

2 http://www.tistr.or.th/pharma

3 สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์. สมุนไพรป้องกันกำจัดแมลงทางการแพทย์. กรุงเทพฯ: บริษัท ดีไซร์ จำกัด. 2546. 72 หน้า.

4 สถาบันวิจัยสมุนไพร สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์. สมุนไพรป้องกันกำจัดแมลงทางการแพทย์ 2: น้ำมันหอมระเหย. กรุงเทพฯ: บริษัท ดีไซร์ จำกัด. 2548. 80 หน้า.

5 Tawatsin A, Wratten SD, Scott RR, Thavara U, Techadamrongsin Y. Repellency of Volatile Oils from Plants against Three Mosquito Vectors. J Vector Ecol. 2001; 26(1): 76-82.

6 Tawatsin A, Thavara U, Bansiddhi J, Wongsinkongman P, Boonruad T, Komalamisra N, Mulla MS. Novel Mosquito Repellants Derived from Essential Oils of Plants in Thailand. Presented in the XXII International Congress of Entomology (ICE), 15-21 August 2004. Brisbane, Australia.

7 Tawatsin A, Thavara U, Wongsinkongman P, Bansiddhi J, Boonruad T, Chavalittumrong P, Asavadachanukorn P, Komalamisra N, Mulla MS. Repellancy and Ovipositional Deterrent Effects of Essential Oils Extracted from Plants in Thailand against Four Mosquito Vectors (Diptera: Calcidae). J Am Mosq Control Assoc. 2005 (In press).

8 Tawatsin A, Thavara U, Chansang U, Chavalittumrong P, Boonruad T, Wongsinkongman P, Bansiddhi J, Mulla MS. Field Testing of Repellants Derived from Plant Essential Oils against Mosquitoes (Diptera: Culcidae), Black Flies (Diptera: Simulidae) and Land Leeches (Hirudinea: Haemadipsidae) in Thailand. J Am Mosq Control Assoc. 2005 (In press).

9 Trongtokit Y, Rongsriyam Y, Komalamisra N, Apiwathnasorn C. Comparative Repellency of 38 Essential Oils against Mosquito Bites. Phytother Res. 2005; 19(4): 303-9.

10 Choi HS, Song HS, Ukeda H, Sawamura M. Readical-scavenging Activities of Citrus Essential Oils and their Components: Detection using 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl. J Agri Food Chem. 2000; 48(9): 4156-61.

11 Tominaga H, Kobayashi Y, Goto T, Kasemura K, Nomura M. DPPH Radical-scavenging Effect of several Phenylpropanoid Compounds and their Glycoside Derivatives. Yakugaku Zasshi. 2005; 154(4): 371-5.

12 Ko FN, Liao CH, Kuo YH, Lin YL. Antioxidant Properties of Demethyldiisoeugenol. Biochim Biophys Acta. 1995; 1258(2): 145-52.

13 Masuda Y, Kikuzaki H, Hisamoto M, Nakatani N. Antioxidant Properties of Gingerol Related Compounds from Ginger. Biofactors. 2004; 21(1-4): 293-6.

14 Chen YY, Liu JF, Chen CM, Chao PY, Chang TJ. A Study of the Antioxidative and Antimutagenic Effects of Houttuynia cordata Thunb. Using an Oxidized Frying Oil-Fed Model. J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo). 2003; 49(5): 327-33.

15 Ito M, Murakami K, Yoshino M. Antioxidant Action of Eugenol Compounds: Role of Metal lon in the Inhibition of Lipid Peroxidation. Food Chem Toxicol. 2005; 43(3): 464-6.

16 Lean LP, Mohamed S. Antioxidative and Antimycotic Effects of Turmeric, Lemon-grass, Betel Leaves, Clove, Black Pepper Leaves and Garcinia atrivirdis on Butter Cakes. J Sci of Food and Agri. 1999; 79(3): 1817-22.

17 Ricci D, Fraternale D, Giamperi L, Bucchini A, Epifano F, Burini G, Curini M. Chemical Composition, Antimicrobial and Antioxidant Activity of the Essential Oil of Teucrium marum (Lamiaceae). J Ethnopharmacol. 2005; 98(1-2): 195-200.

18 Simic A, Sokovic MD, Ristic M, Grujic-Jovanovic G, Vukojevic J, Marin PD. The Chemical Composition of some Lauraceae Essential Oils and their Antifungal Activities. Phytother Res. 2004; 18(9): 713-7.

19 Sokmen M, Serkedjieva J, Daferra D, Gullace M, Polissiou M, Tepe B, Akpulat HA, Sahin F, Sokmen A. In vitro Antioxidant, Antimicrobial, and Antiviral Activities of the Essential Oil and Various Extracts from Herbal Parts and callus Cultures of Origanum acutidens. J Agri Food Chem. 2004; 56(5): 677-81.

20 Sun W, Xu Z, Wang C, Qu W, Lin C. Study on Antioxidant Activity of Essential Oils and its Monomer from Pelargonium graveolens. Zhong Yao Cai. 2005; 28(2): 87-9.

21 Aburjai T, Natsheh FM. Plants Used in Cosmetics. Phytother Res. 2003; 17(9): 987-1000.

22 Priyadarsini KI, Guha SN, Rao MN. Physico-chemical Properties and Antioxidant Activities of Methoxyphenols. Free Radic Biol Med. 1998; 24(6): 933-41.

23 Rajakumar DV, Rao MN. Dehydrozingerone and Isoeugenol as Inhibitors of Lipid Peroxidation and as Free Radical Scavengers. Biochem Pharmacol. 1993; 46(11): 2067-72.

24 Rish SJ, Ho C. Spices Flavor Chemistry and Antioxidant Properties. Washington, DC: American Chemical Society. 1997. p.176-87.

25 ส่วนพฤกษศาสตร์ป่าไม้. สำนักวิชาการป่าไม้ กรมป่าไม้. ชื่อพรรณไม้แห่งประเทศไทย. เต็ม สมิตินันท์ ฉบับแก้ไขเพิ่มเติม พ.ศ.2544. กรุงเทพฯ: บริษัทประชาชน จำกัด. 2544. หน้า 24, 26, 79, 131, 160, 283, 349, 372, 382, 417, 435, 554, 563.

26 จารีย์ บันสิทธิ์. พฤกษศาสตร์และการใช้ประโยชน์พื้นบ้านจากผักคาวตอง. ใน: ปราณี ชวลิตธำรง และคณะ. สมุนไพรน่ารู้ 2: ผักคาวตอง. สถาบันวิจัยสมุนไพร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ นนทบุรี: โรงพิมพ์องค์การสงเคราะห์ทหารผ่านศึก. 2546. หน้า 2-17.

27 Backer CA, Bakhuizen van Den Brink RC. Saururaceae, Myristicaceae, Piperaceae, Myrtaceae. Flora of Java. 1963; 1: 1-60, 137-9, 167-73, 334-5.

28 Backer CA, Bakhuizen van Den Brink RC. Rutaceae. Flora of Java. 1965;2: 107-8.

29 Backer Ca, Bakhuizen van Den Brink RC. Zingiberaceae. Flora of Java. 1968;3: 64-9.

30 Burtt BL, Smith RM. Zingiberaceae. A Revised Handbook to the Flora of Ceylon. 1983; 4: 498, 508-9.

31 Kochummen KM. Myrtaceae. Tree Flora of Malaya. 1978; 3 : 248-9.

32 Larsen K. Saururaceae. Flora of Thailand. 2000; 7(2): 344-6.

33 Mabberley DJ. The Plant-Book. 2 nd edition. UK: Cambridge University Press. 1997: 749.

34 Parnell J, Chantaranothai P. Myrtaceae. Folra of Thailand. 2002; 7(4): 801-4.

35 Quattrocchi U. Plant Names. Vol.2. USA: CRC Press LLC. 2000: 1258.

36 Thai Herbal Pharmacopoeia. Vol.1. Bangkok: Department of Medical Sciences, Public Health Ministry. 1995. p.32, 38, 57.

37 Thai Herbal Pharmacopoeia. Vol.2. Bangkok: Department of Medical Sciences, Public Health Ministry. 2000. p.19, 37.

38 van Steenis CGGJ. Saururaceae. Flora Malesiana. 1949; 4(2): 47-8.

39 Cavin A, Hostettmann K, Dyatmyko W. Potterat O. Antioxidant and Lipophilic Constituents of Tinospora crispa. Planta Medica. 1998;64: 393-6.

40 Wagner H, Bladt S, Zgainski EM. Plant Drug Analysis. 1990:6-8,19-23, 28-29, 293, 299.

41 Jork H, Funk W, Fischer W,Wimmer H. Thin-layer Chromatography, Regents and detection methods. Vol. la, 1990: 194-8.

42 ISO 875-1999. Essential Oils-Evaluation of Miscibility in Ethanol.

43 Thai Pharmacopoeia. Vol.1. Bangkok: Department of Medical Sciences, Public Health Ministry. 1987. p 388-91.

44 ISO279-1998. Essential Oils-Determination of Relative Density at 20 °C (Reference Method)

45 ISO280-1998. Essential Oils-Determination of Refractive Index.

46 Hattori M, Yang XW, Miyashiro H, Namba T. Inhibitory Effects of Monomeric and Dimeric Phenylpropanoids from Mace on Lipid Peroxidation in vivo and in vitro. Phytother Res. 1993; 7: 395-401.