

คุณสมบัติในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของน้ำมันหอมระเหยในหลอดทดลอง

ประภัสสร วีระพันธ์¹, วัชรီ คุณกิตติ²

บทคัดย่อ

คุณสมบัติในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของน้ำมันหอมระเหยในหลอดทดลอง

ประภัสสร วีระพันธ์¹, วัชรီ คุณกิตติ²

ว. เกษตรศาสตร์อีสาน 2554;7(3) : 30-38

Received : 17 October 2011

Accepted : 31 December 2011

บทนำ: น้ำมันหอมระเหยจากสมุนไพรหลายชนิดพบว่า มีฤทธิ์ต่อต้านอนุมูลอิสระซึ่งสามารถนำไปพัฒนาใช้ในทางเวชสำอางได้เพื่อใช้ในชะลอความแก่ของผิวและลดริ้วรอยก่อนวัยได้ งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาฤทธิ์ในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของน้ำมันหอมระเหย 8 ชนิด คือ กะเพรา กานพลู ตะไคร้หอม ตะไคร้บ้าน แผลหอม มะนาว โรสแมรี่ และอบเชย **วิธีการทดลอง:** วิเคราะห์องค์ประกอบในน้ำมันหอมระเหย 8 ชนิดด้วยวิธี GC/MS และทดสอบเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการต้านออกซิเดชันของน้ำมันหอมระเหยด้วยวิธี free radical scavenging (DPPH) และ lipid peroxidation inhibition (TBARs) **ผลการศึกษา:** จากการทดสอบพบว่า น้ำมันหอมระเหยที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH พบว่าประสิทธิภาพของ กะเพรา>กานพลู>แผลหอม>ตะไคร้หอมตามลำดับ และจากวิธี TBARs พบว่า อบเชย>ตะไคร้บ้าน > กะเพรา>กานพลู>ตะไคร้หอมตามลำดับ **สรุปผล:** การศึกษานี้พบว่า น้ำมันหอมที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระดีที่สุดจากทั้ง 2 วิธี คือ น้ำมันจากกะเพรา และรองลงมาคือ กานพลู อย่างไรก็ตาม การที่น้ำมันหอมจากสมุนไพรแต่ละชนิด มีคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระได้ไม่เท่ากัน เนื่องจากองค์ประกอบในน้ำมันหอมระเหยแต่ละชนิดต่างกัน ดังนั้นจึงควรศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพอื่นๆ ของน้ำมันหอมระเหย ที่สามารถบ่งชี้ถึงศักยภาพในด้านเวชสำอางต่อไป

คำสำคัญ: น้ำมันหอมระเหย น้ำมันกะเพรา น้ำมันกานพลู น้ำมันตะไคร้หอม ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

¹ นักศึกษาปริญญาโทคณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

² Ph.D., รองศาสตราจารย์, อาจารย์ประจำสาขาวิชาเทคโนโลยีเภสัชกรรม คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น อ.เมืองจ.ขอนแก่น 40002

* ติดต่อผู้พิมพ์: ประภัสสรวีระพันธ์คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น.เมืองจ.ขอนแก่น 40002 โทร/โทรสาร +6643 712345email: pveerapan@yahoo.co.th

¹ Graduate Student, Faculty of Pharmaceutical Sciences, KhonKaen University, KhonKaen 40002

² Ph.D., Associate Professor, Lecturer, Department of Pharmaceutical Technology, Faculty of Pharmaceutical Sciences, KhonKaen University, KhonKaen 40002

* Corresponding author: PraphatsonVeerapan, Faculty of Pharmaceutical Sciences, KhonKaen University, KhonKaen 40002 Thailand, Tel/Fax. +6643 712345 email: pveerapan@yahoo.co.th

Abstract

In Vitro Antioxidant Activities of Essential Oils

Praphatson Veerapan^{1*}, Watcharee Khunkitti²

IJPS, 2011; 7(3) : 30-38

Introduction: Various plant essential oils possess antioxidant activities which could be involved in anti-aging and anti-wrinkle care. The aim of this study was to investigate the antioxidant activity of 8 essential oils from holy basil, clove, citronella, lemongrass, vetiver, lemon, rosemary and cinnamon. **Materials and Methods:** The eight selected essential oils were analyzed by GC/MS analysis to find their major components and tested using free radical scavenging (DPPH) and lipid peroxidation inhibition (TBARs) methods. **Results:** Of the eight tested essential oils, their antioxidant activities for free radical scavenging method were as the following order; holy basil > clove > vetiver > citronella and for lipid peroxidation inhibition were as the following order; cinnamon > lemongrass > holy basil > clove > vetiver > citronella, respectively. **Conclusion:** From the two anti-oxidative tests, holy basil and clove oil were potential natural antioxidant essential oils. However, different herb essential oils are composed of different components. Therefore, it is important to further study the potential cosmetic bioactivities of these essential oils.

Keywords: essential oil, antioxidant activity

บทนำ

น้ำมันหอมระเหยถูกใช้ในด้านผลิตภัณฑ์ที่ดูแลผิวพรรณเพื่อเป็นน้ำหอมหรือเพื่อบำบัดด้วยกลิ่นหอม นอกจากนี้ยังพบว่า น้ำมันหอมระเหยที่ได้จากสมุนไพรหลายชนิดมีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาต่อผิวหนังพรรณ เช่น ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (Lertsatitthanakorn *et al.*, 2006), ฤทธิ์ต้านเอนไซม์ไทโรซิเนส (tyrosinase inhibition activity) ซึ่งสามารถใช้ในการลดความเข้มของสีผิว (Matsuura *et al.*, 2006), ฤทธิ์ต้านเอนไซม์อีลาสเทส (elastase enzyme) ซึ่งส่งผลลดความหย่อนยานของผิวหนัง (Masashiro *et al.*, 2002) หรือฤทธิ์ต้านจุลชีพต่างๆ (Viyoch *et al.*, 2006) เป็นต้น Kim *et al.* (1997) cited in Ames and Saul (1987) พบว่าพืชที่ถูกสกัดได้หลายชนิดที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่สามารถนำไปใช้ในด้านเวชสำอาง นอกจากนี้ยังพบว่า พืชเหล่านี้มีฤทธิ์เป็นสารต้านอนุมูลอิสระซึ่งสามารถนำมาใช้ชะลอความแก่และลดเลือนริ้วรอยได้ มีการรายงานว่าการสกัดจากพืชที่สามารถยับยั้งกระบวนการออกซิเดชันได้มักเป็นสารประกอบพวก phenolic และ poly-phenolic รวมไปถึง tocopherol, flavonoids และ polyfunctional organic acid การที่สารเหล่านี้มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี free radical scavenging นี้สามารถยับยั้งกระบวนการ metogenesis และ

carcinogenesis รวมไปถึงการชะลอความแก่ได้ (Kim *et al.*, 1997 cited in Pratt, 1994) นอกจากนี้ยังมีการศึกษาประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยในด้านต่างๆ เช่น น้ำมันหอมระเหยจากกะเพรา โหระพา ตะไคร้หอม ตะไคร้แกง มะกรูด ขิงและไพล มีฤทธิ์เป็นสารต้านอนุมูลอิสระ ยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *Propionibacterium acnes* ซึ่งเป็นเชื้อก่อให้เกิดสิวและฤทธิ์ในการต้านการอักเสบ (Lertsatitthanakorn *et al.*, 2006; Aiemsard *et al.*, 2010) นอกจากนี้ยังมีการศึกษาของ Masashiro *et al.* (2002) ที่แสดงฤทธิ์ของน้ำมันหอมระเหยในการต้านเอนไซม์อีลาสเทสเช่นน้ำมันหอมระเหยจากมะนาว, ไม้จันทน์ (Juniper) และผลไม้จันทน์ส้ม (Grapefruit) อย่างไรก็ตามในน้ำมันหอมระเหยแต่ละตัวนั้นจะมีประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระได้ไม่เท่ากัน จึงมีการศึกษาเพื่อเปรียบเทียบหาว่าน้ำมันที่สามารถมีฤทธิ์ดังกล่าว โดยทำการทดสอบฤทธิ์ของน้ำมันหอมระเหย 8 ชนิด คือ ตะไคร้หอม (*citronella*, *Cymbopogon winterianus*), ตะไคร้บ้าน (*lemongrass*, *Cymbopogon citratus*), กะเพรา (*holy basil*, *Ocimum sanctum*), อบเชย (*cinnamon*, *Cinnamomum zeylanicum*), กานพลู (*clove*, *Eugenia caryophyllata*), เป็กหอม (*vetiver*, *Vetiveria zizanioides*), โรสแมรี่ (*rosemary*, *Rosmarinus officinalis*) และมะนาว

(lemon, *Citrus limon*) โดยศึกษาเปรียบเทียบกับสารมาตรฐานที่มีฤทธิ์เป็นสารต้านอนุมูลอิสระคือ vitamin e acetate และ BHT (*Butylatedhydroxytoluene*) โดยวิธีที่ใช้ในการศึกษาเปรียบเทียบกับประสิทธิภาพในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระคือ วิธี DPPH (*free radical scavenging*) เปรียบเทียบกับวิธี TBARs (*lipid peroxidation inhibition*)

วิธีดำเนินการวิจัย

1.1 สารเคมี

สารเคมีที่ใช้ในการศึกษามีดังนี้ น้ำมันหอมระเหย กะเพรา กานพลู ตะไคร้หอม ตะไคร้บ้าน แฟกหอม มะนาว โรสแมรี่อบเชยจากบริษัทเครื่องหอมไทยจีน, กรุงเทพมหานคร Vitamin E acetate (บริษัท วันรัตน์หน้าเขียน, ประเทศไทย) Potassium chloride (KCl) และ Sodium lauryl sulphate (SLS) จากบริษัทเอกตรึงเคมีภัณฑ์ กรุงเทพมหานครสารเคมีอื่นๆ เป็น analytical grade ดังนี้ Acetic acid (Scharian, Spain), Butylatedhydroxytoluene (BHT) (Riedel de Haën, Germany), 2,2-azole-(2-aminopropane)-dihydrochloride (ABAP) (Aldrich, Germany), Butanol (Lab Scan, Thailand), 2,2-diphenyl-1-1-picrylhydrazil (DPPH) (Fluka, Germany), Ethanol (Merck, Germany), Thiobarbituric acid (TBA) (Sigma Aldrich, Germany)

1.2 การศึกษาองค์ประกอบของน้ำมันหอมด้วยเทคนิค Gas Chromatography/Mass spectroscopy (GC/MS)

ศึกษาองค์ประกอบของน้ำมันหอมโดยเครื่อง Mass Spectrometer(CN 10402086, Agilent, USA) และ Gas Chromatography(US 35120381, Agilent, China) ด้วยคอลัมน์ DB-5ms (0.25 ไมครอน, 30 เมตร 0.25 มิลลิเมตร) ใช้ Helium (He) เป็น carrier gas ด้วยอัตราเร็ว 1 มิลลิตร/นาที ปริมาณตัวอย่างที่ฉีด 1 ไมโครลิตร และใช้โปรแกรมควบคุมอุณหภูมิดังนี้ ตั้งอุณหภูมิของคอลัมน์เป็น 70 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 นาที แล้วโปรแกรมเครื่องเป็น 120°C เป็นเวลา 2 นาทีโดยเพิ่มอุณหภูมิด้วยอัตราเร็ว 3 องศาเซลเซียส/นาที จากนั้นเพิ่มเป็น 270 ด้วยอัตราเร็ว 5 องศาเซลเซียส/นาที ใช้เวลาในการวิเคราะห์ 53.67 นาทีและใช้ Software MSD Chem Station ในการควบคุมการทำงาน และประเมินผล นำผลที่ได้เปรียบเทียบกับ mass spectra index ของ Wiley 7n.I MS Search และคำนวณปริมาณสารจากพื้นที่ใต้กราฟ

1.3 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของน้ำมันหอมระเหย

1.3.1 การทดสอบฤทธิ์กำจัดอนุมูลอิสระของน้ำมันหอมระเหย (free radical scavenging) ด้วยวิธี 2,2-diphenyl-1-1-picrylhydrazil (DPPH)

เติมน้ำมันหอมระเหยที่ความเข้มข้น 20 $\mu\text{L/mL}$ (ซึ่งละลายใน ethanol) ปริมาณ 50 ไมโครลิตรลงใน microtiter plate 96 หลุม เจือจางความเข้มข้นของน้ำมันหอมด้วย ethanol โดยวิธี 2-fold dilution ที่ละ 50 μL จากนั้นเติมสารละลาย DPPH (2,2-diphenyl-1-1-picrylhydrazil) เข้มข้น 0.0004 โมลาร์ ปริมาตร 50 μL ลงในทุกหลุม ผสมกันในแต่ละหลุมเป็นเวลา 5 นาที และนำไปเก็บในที่มืดเป็นเวลา 25 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วย microplate reader ที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตรเทียบกับค่าการดูดกลืนแสงของ blank (ซึ่งไม่เติมสารละลาย DPPH) และค่าการดูดกลืนแสงของหลอดควบคุมที่ไม่เติมน้ำมันหอมระเหย ซึ่งทำการทดลองในทำนองเดียวกัน (ทำการทดลอง 3 ซ้ำ แล้วหาค่าเฉลี่ย) สำหรับสารมาตรฐาน BHT และ vitamin E acetate สามารถทดสอบได้ตามขั้นตอนเดียวกันนำผลที่ได้มาคำนวณหาค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH ของน้ำมันหอมระเหย และสารมาตรฐาน ได้จากสมการที่ (1)

1.3.2 การทดสอบการยับยั้ง lipid peroxidation ของน้ำมันหอมระเหย ด้วยวิธี Thiobarbituric acid reactive substances(TBARs)

เติมโซเดียมความเข้มข้น 10% (w/v) ในสารละลาย KCL 1.15% (w/v) ปริมาตร 50 μL จากนั้นเติมน้ำมันหอมระเหยความเข้มข้น 10 $\mu\text{L/mL}$ (ซึ่งละลายใน ethanol) ปริมาตร 10 μL และน้ำกลั่น 40 μL แล้วตามด้วยสารละลาย ABAP (2,2 azobis (2-aminopropane) dihydrochloride) เข้มข้น 0.07 โมลาร์ ปริมาตร 5 μL และสารละลาย acetic acid (pH 3.5) เข้มข้น 20% (v/v) ปริมาตร 150 μL ผสมให้เข้ากันแล้วเติมสารละลาย TBA (thiobarbituric acid) เข้มข้น 0.8% (w/v) ในสารละลาย SLS 1.1% (w/v) ปริมาตร 150 μL แล้วนำไปอุ่นในอ่างอ่างน้ำที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 60 นาที หลังจากนั้นทิ้งไว้ให้เย็น สกัดด้วย butanol นำส่วนที่สกัดได้ไปวัดค่าการดูดกลืนที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตรด้วยเครื่อง microplate reader เปรียบเทียบกับค่าการดูดกลืนแสงของ blank ที่ไม่เติม ABAP และหลอดควบคุมที่ไม่เติมน้ำมันหอมระเหยซึ่งทำการทดลองในทำนอง

เดียวกัน (ทำการทดลอง 3 ซ้ำแล้วหาค่าเฉลี่ย) สำหรับสารมาตรฐาน BHT และ vitamin E acetate ทำการทดลองตั้งขั้นตอนเดียวกันนำผลที่ได้มาคำนวณค่าเปอร์เซ็นต์ยับยั้งของน้ำมันหอมระเหยและสารมาตรฐานได้จากสมการที่ 1

$$\% \text{ inhibition} = \frac{\text{Abs}_{\text{control}} - (\text{Abs}_{\text{sample}} - \text{Abs}_{\text{blank}})}{\text{Abs}_{\text{control}}} \times 100$$

Abs_{control} คือ ค่าการดูดกลืนแสงของหลอดควบคุม

Abs_{sample} คือ ค่าการดูดกลืนแสงของน้ำมันหอมระเหยหรือสารมาตรฐาน

Abs_{blank} คือ ค่าการดูดกลืนแสงของ blank

ผลการศึกษาวิจัย

จากการวิเคราะห์องค์ประกอบสำคัญในน้ำมันหอมระเหย 8 ชนิดคือ น้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้บ้าน กะเพรา อบเชย ตะไคร้หอม กานพลู มะนาว โรสแมรี่และแฝกหอม ด้วยวิธี GC/MS พบว่าองค์ประกอบที่สำคัญในน้ำมันคือ citral, methyl eugenol, cinnamaldehyde, citronellal, eugenol, limonene, 1,8-cineole และ zizanoic acid ตามลำดับ (แสดงดังตารางที่ 1) จากนั้นทำการศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH พบว่าน้ำมันหอมระเหยที่ความเข้มข้นเริ่มต้นเท่ากับ 10 µL/mL จะมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH สูงกว่า vitamin E acetate และ BHT คือ น้ำมันจากกะเพรา, ตะไคร้หอม, กานพลูและแฝกหอม (แสดงดังตารางที่ 2) นอกจากนี้ยังทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระโดยการยับยั้งปฏิกิริยาไลโปเปอร์ออกซิเดชันของน้ำมันหอมระเหยที่เริ่มต้น 0.95 µL/mL (หลังใส่ ABAP เพื่อกระตุ้นการเกิดออกซิเดชัน) ด้วยวิธี TBARS พบว่าน้ำมันที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงกว่า vitamin E acetate และ BHT ด้วยวิธี TBARS คือน้ำมันจากตะไคร้บ้าน, กะเพรา, กานพลูและอบเชย (แสดงดังตารางที่ 3) จากการวิเคราะห์หาค่าสถิติ Tukey HSD one-way ANOVA โดยใช้ SPSS version 11.5 พบว่าฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH (ตารางที่ 3) ด้วยน้ำมันหอมระเหยจากกะเพรา ตะไคร้หอม กานพลูและแฝกหอมมีค่าสูงกว่า vitamin E acetate แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.001$) ในทำนองเดียวกัน

จากน้ำมันหอมระเหยดังกล่าวมีฤทธิ์สูงกว่า BHT แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) นอกจากนี้ฤทธิ์การยับยั้งปฏิกิริยาไลโปเปอร์ออกซิเดชันด้วยวิธี TBARS (ตารางที่ 4) ด้วยน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้บ้าน กะเพรา อบเชยและกานพลูมีค่าสูงกว่า vitamin E acetate แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.001$) สำหรับ BHT นั้น น้ำมันจากตะไคร้บ้านและอบเชยมีค่าสูงกว่า BHT แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.001$) แต่น้ำมันจากกะเพราและกานพลูมีค่ามากกว่า BHT แตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$)

จากนั้นเลือกน้ำมันหอมระเหยที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่มีประสิทธิภาพมาทดสอบเพื่อหาค่าความเข้มข้นที่สามารถต่อต้านอนุมูลอิสระที่ 50% (IC₅₀) ด้วยทั้ง 2 วิธีดังกล่าว พบว่า IC₅₀ ที่ใช้ความเข้มข้นต่ำที่สุดในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH คือ น้ำมันกะเพรา และรองลงมาคือน้ำมันกานพลู (แสดงดังตารางที่ 4) และค่า IC₅₀ ในการยับยั้งการเกิด lipid peroxidation ด้วยวิธี TBARS ต่ำที่สุดคือน้ำมันอบเชย และรองลงมาคือ น้ำมันตะไคร้บ้าน, กะเพรา, กานพลูและตะไคร้หอม ตามลำดับ (แสดงดังตารางที่ 5)

อภิปรายผลและสรุป

ในการทดสอบฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH ของน้ำมันหอมระเหย 8 ชนิดคือ น้ำมันหอมระเหยจากกะเพรา อบเชย กานพลู แฝกหอม ตะไคร้หอม ตะไคร้บ้าน โรสแมรี่และมะนาว พบว่าความเข้มข้นของน้ำมันหอมระเหยจากกะเพรา ตะไคร้หอม กานพลูและแฝกหอมมีความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระได้ร้อยละ 50 เท่ากับ 0.037±0.003 (0.038±0.003), 0.657±0.138 (0.761±0.160), 0.134±0.005 (0.127±0.005), 0.635±0.036 (0.707±0.040) mg/mL (µL/mL) ตามลำดับ เปรียบเทียบกับ IC₅₀ ของ vitamin e acetate และ BHT เท่ากับ 42.500±7.280 และ 0.076±0.012 mg/mL ตามลำดับโดยใช้ DPPH ที่มีความเข้มข้นเท่ากับ 0.156 µg/mL จากการศึกษาของ Lertatitthanakorn et al. (2006) พบว่า IC₅₀ (µL/mL) ของกะเพราและตะไคร้หอม เท่ากับ 0.03±0.0 และ 2.0±0.1 µL/mL ตามลำดับ จากการศึกษาของ Jirovetzet et al. (2006) พบว่า IC₅₀ ของใบกานพลู (clove leaf essential oil) เท่ากับ 0.08 µg/mL เนื่องจากเมื่อนำส่วนที่นำมาใช้สกัดน้ำมันหอมระเหยต่างกัน ส่วนประกอบที่ได้ในน้ำมันก็จะแตกต่างกัน

และส่งผลให้ค่าที่ได้จากการทดสอบแตกต่างกันด้วย นอกจากนี้ เมื่อใช้ความเข้มข้นของ DPPH เพิ่มขึ้นจะต้องใช้ความเข้มข้นของสารต้านอนุมูลอิสระเพิ่มขึ้นเช่นเดียวกัน เนื่องจากสารต้านอนุมูลอิสระมักเป็นสารประกอบพวกกลุ่มฟีนอลิก (phenolic compound) (Kim *et al.*, 1997) ซึ่งมีคุณสมบัติในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระได้ดี เนื่องจากน้ำมันกานพลูมีสารสำคัญ คือ ยูจีนอล (eugenol) ทำหน้าที่ให้ไฮโดรเจนแก่ DPPH แล้วเปลี่ยนเป็น DPPHH ได้ (Bondet *et al.*, 1997) จากการศึกษาของ Kim *et al.* (2005) พบว่า IC_{50} ของน้ำมันผักหอมเท่ากับ 7.79 ± 0.25 mg/mL ซึ่งมีค่า IC_{50} สูงมากกว่าการศึกษานี้ อาจเนื่องมาจากใช้ความเข้มข้นของ DPPH ต่ำกว่า งานวิจัยของ Hyun-Jin Kim ใช้ความเข้มข้นของ DPPH เท่ากับ 0.3 mM (0.7595×10^{-3} µg/mL) จึงทำให้สารที่ใช้ปฏิกิริยากับสารสำคัญในน้ำมันหอมมีน้อย จึงทำให้ค่า IC_{50} ที่ได้มีค่าสูงกว่า

ในทำนองเดียวกันในการทดสอบฤทธิ์ในการต่อต้าน lipid peroxidation ด้วยวิธี TBARS ของน้ำมันหอมระเหย 8 ชนิด พบว่าค่าความเข้มข้นของน้ำมันหอมระเหยที่สามารถยับยั้ง lipid peroxidation ได้ค่า IC_{50} ของน้ำมันกานพลู กะเพรา อบเชย ตะไคร้บ้านและตะไคร้หอมเท่ากับ 0.279 ± 0.048 (0.264 ± 0.045), 0.073 ± 0.003 (0.075 ± 0.004), 0.012 ± 0.003 (0.012 ± 0.003), 0.019 ± 0.006 (0.021 ± 0.007) และ 1.490 ± 0.350 (1.726 ± 0.405) mg/mL (µL/mL) ตามลำดับ เปรียบเทียบกับ IC_{50} ของ vitamin E acetate และ BHT เท่ากับ 18.153 ± 1.471 และ 0.005 ± 0.001 mg/mL ตามลำดับ ค่า IC_{50} ด้วยวิธี TBARS จากน้ำมันกะเพราเท่ากับ 250 µg/mL (Geetha and Vasudevan, 2004) จากน้ำมันอบเชยเท่ากับ 240 µg/mL (Lin *et al.*, 2003) จากน้ำมันกานพลูเท่ากับ 17.2 µg/mL โดยเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน BHT และ vitamin e acetate เท่ากับ 1.5 และ 33.6 µg/mL ตามลำดับ (Kim *et al.*, 1997) จะเห็นได้ว่าค่าที่ได้จากการทดลองและจากงานวิจัยนั้นอาจมีค่าแตกต่างกันเนื่องจากขั้นตอนการทำการทดลอง ระยะเวลาให้ความร้อน ความเร็วในการปั่นเหวี่ยง สารที่ใช้เพื่อให้เกิดปฏิกิริยา lipid peroxidation หรือสารที่ใช้สกัดในขั้นตอนสุดท้ายที่แตกต่างกัน ซึ่งจะมีผลต่อค่า IC_{50}

เนื่องจากกลไกการทดสอบฤทธิ์ความเป็นสารต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH คือ น้ำมันหอมระเหยที่มีฤทธิ์เป็นสารต้านออกซิเดชันนั้นจะมีความสามารถในการ

ให้ไฮโดรเจนแก่ DPPH ให้เปลี่ยนเป็น DPPHH (Brand-Williams *et al.*, 1995) จากองค์ประกอบหลักของกะเพราคือ Methyl eugenol และกานพลูคือ Eugenol ทั้งสองตัวนี้เป็นสารประกอบพวก phenolic compounds ซึ่งมีออกซิเจนอยู่ถึง 2 อะตอม (Brand-Williams *et al.*, 1995) ทำให้มีความสามารถในการดึงอิเล็กตรอนเข้าหาตัวเองได้ดีหรือมีค่าพลังงานอิเล็กโตรเนกาติวิตีสูง ทำให้มีความเป็นลบมากแล้วทำให้ไฮโดรเจนตัวที่อยู่ไกลที่สุดมีความเป็นบวกมากและจะสามารถหลุดออกไปได้ง่าย ส่วนอบเชยและตะไคร้บ้านจะมีองค์ประกอบหลักคือ Cinnamaldehyde และ alpha-citral ตามลำดับ (ตารางที่ 1) ซึ่งโครงสร้างของมันจะมีออกซิเจนเพียงตัวเดียวจึงทำให้ดึงอิเล็กตรอนได้น้อยกว่า จึงทำให้สองตัวนี้มีความสามารถในการให้ไฮโดรเจนได้น้อยกว่ากะเพราและกานพลู ในทำนองเดียวกันในการหาฤทธิ์ต่อต้านอนุมูลอิสระจากวิธี TBARS นั้น การทดลองจะทำให้เกิดปฏิกิริยา lipid peroxidation ได้ดี แล้วทำให้เกิด malondialdehyde (MDA) ซึ่งเป็นสารประกอบทางอินทรีย์พวก aldehyde จับกับ TBA แล้วได้สีชมพู ดังนั้นน้ำมันหอมระเหยที่มีฤทธิ์เป็นสารต้านอนุมูลอิสระ จะต้องมีความสามารถในการยับยั้งปฏิกิริยา lipid peroxidation ได้ดี แล้วทำให้เกิด MDA น้อย จึงทำให้สีจางลง จากการทดลองพบว่า การหาฤทธิ์ของความเป็นสารต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี TBARS นั้นมีข้อจำกัดบางประการคือ TBA จับกับ MDA อย่างไม่จำเพาะเจาะจง กล่าวคือ ถ้าหากในระบบดังกล่าวเกิดสารบางอย่าง เช่น น้ำตาล TBA ก็จะสามารถเกิดสีกับสารดังกล่าวแล้วทำให้เกิดสีชมพูได้เช่นเดียวกัน ดังนั้นการที่น้ำมันตะไคร้หอมมีค่าการยับยั้งต่ำด้วยวิธี TBARS แต่มีค่าการยับยั้งสูงด้วยวิธี DPPH นั้นอาจเกิดจากมีสารบางอย่างในระบบเกิดขึ้นซึ่งสามารถรวมตัวกันแล้วจับกับ TBA แล้วทำให้เกิดสีชมพูขึ้นได้ แต่ในการทดลองครั้งนี้ผู้วิจัยได้นำค่าของ blank (ตัวอย่างที่ปราศจาก ABAP) ลบออกจากค่าของตัวอย่างแล้ว และเนื่องจากโครงสร้างของตะไคร้หอมมีโครงสร้างของ citronellal (ตารางที่ 1 พบปริมาณ citronellal ในน้ำมันเท่ากับ 31.790%) ซึ่งเป็นสารประกอบที่มีหมู่คาร์บอนิล (C=O bond) ซึ่งเป็นหมู่ฟังก์ชันที่มีอิเล็กตรอนอยู่หนาแน่นและมีค่าอิเล็กโตรเนกาติวิตีสูง นอกจากนี้ตะไคร้หอมยังมีโครงสร้างเป็น long chain ซึ่งมีความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระโดยการให้ไฮโดรเจนได้ดีกว่า ดังนั้นจึงทำให้ค่าที่ได้จากการเป็นสาร

ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH สูงแต่ค่าการยับยั้งด้วยวิธี TBARs ต่ำ ส่วนน้ำมันอบเชยและตะไคร้บ้านนั้นจะตรงกันข้าม คือเป็นสารต้านที่มีฤทธิ์สูงด้วยวิธี TBARs แต่มีฤทธิ์ต่ำเมื่อทดสอบด้วยวิธี DPPH อาจเนื่องมาจากโครงสร้างของ cinnamaldehyde (ตารางที่ 1 พบปริมาณของ cinnamaldehyde เท่ากับ 66.875%) ซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักนั้นจะมีโครงสร้างของ conjugated dienes, C=OH และ aromatic function และตะไคร้บ้านซึ่งมีองค์ประกอบหลักเป็น citral (ตารางที่ 1) ซึ่งมีโครงสร้างเป็น conjugated dienes เช่นเดียวกัน ซึ่งเป็นหมู่ฟังก์ชันที่มีอิเล็กตรอนหนาแน่นมาก และพร้อมทำปฏิกิริยากับอนุมูลอิสระที่เกิดจากไลเปอออกซิเดชันจากการทดสอบด้วยวิธี TBARs นั้นก่อนที่จะได้ MDA ในระบบจะเกิด radicals มากมายหลายชนิด เช่น lipid peroxy radical, alkoxyl radical เป็นต้น (Antolovich *et al.*, 2002) ซึ่งอนุมูลอิสระเหล่านี้จะเข้าทำปฏิกิริยากับสารต้านอนุมูลอิสระ โดยมันจะไปดึงไฮโดรเจนออกได้หลายตำแหน่งจากหมู่ฟังก์ชันที่เป็น conjugated dienes (Foti *et al.*, 1996) ที่ซึ่งอาจจะทำให้เกิดการต่อต้านทำปฏิกิริยาได้หลากหลายมากกว่าการให้ไฮโดรเจนแก่ DPPH เพียงอย่างเดียว จึงทำให้ผลการทดสอบจากวิธี TBARs สูง นอกจากนี้สารประกอบหลักของน้ำมันอาจมีสารประกอบตัวอื่นที่สามารถทำให้น้ำมันหอมระเหยดังที่กล่าวมามีค่าน้อยแตกต่างกันไป ดังนั้นอาจจะต้องมีการทดสอบหาฤทธิ์ในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระขององค์ประกอบหลักของน้ำมันแต่ละชนิดด้วย

จากคุณสมบัติที่มีฤทธิ์เป็นสารต้านอนุมูลอิสระของน้ำมันหอมระเหยดังกล่าวในการยับยั้งอนุมูลอิสระ ยิ่งไปกว่านั้นคุณสมบัติดังกล่าวจะมีประโยชน์ในด้านเวชสำอางคือน้ำมันหอมระเหยดังกล่าวไปพัฒนาในการตั้งตำรับเพื่อให้บำรุงผิวพรรณเนื่องจากคุณสมบัติของน้ำมันหอมระเหยที่สามารถต่อต้านอนุมูลอิสระ คือ ใช้ลดการเกิดเม็ดสีเมลานิน เป็นต้น ซึ่งสามารถนำไปพัฒนาเพื่อตั้งเป็นตำรับที่ใช้ในด้านเวชสำอางได้ต่อไป

อย่างไรก็ดี ในน้ำมันหอมระเหยดังกล่าวข้างต้นอาจมีส่วนประกอบอื่น ๆ รวมด้วย ซึ่งฤทธิ์ในการต่อต้านอนุมูลอิสระอาจเกิดจากส่วนประกอบอื่นในน้ำมันหอมระเหยได้ ดังนั้น อาจมีการหาประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระของส่วนประกอบทางเคมีของน้ำมันหอมระเหย เพื่อให้ได้ข้อมูลที่ชัดเจนยิ่งขึ้น

น้ำมันหอมระเหย 8 ชนิดที่มีความสามารถในการเป็นต่อต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH ได้แก่ น้ำมันหอมระเหยจากกะเพรา กานพลู ตะไคร้หอมและแฝกหอม ส่วนน้ำมันที่มีความสามารถในการยับยั้งปฏิกิริยาไลเปอออกซิเดชันด้วยวิธี TBARs ได้ดีคือ น้ำมันหอมระเหยจากอบเชย ตะไคร้บ้าน กะเพราและกานพลู ซึ่งจากทั้ง 2 วิธีดังกล่าวนี้ น้ำมันหอมระเหยที่มีประสิทธิภาพในการต่อต้านอนุมูลอิสระและยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาไลเปอออกซิเดชันได้ดีที่สุด คือ น้ำมันจากกะเพราและกานพลู ดังนั้นอาจมีการพัฒนาตำรับทางด้านเวชสำอางจากน้ำมันดังกล่าวต่อไป

ตารางที่ 1 แสดงองค์ประกอบและปริมาณสารสำคัญในน้ำมันแต่ละชนิด

Essential oils	Plant part	Botanical name	Components	%area
lemongrass	Leaves	<i>Cymbopogon citratus</i> DC (Gramineae)	beta-myrcene	7.31
			beta-citral	33.09
			geraniol	3.79
			alpha-citral	44.49
holy basil	Leaves	<i>Ocimum sanctum</i> Linn (Lamiaceae)	eugenol	13.89
			methyl eugenol	43.44
			caryophyllene	22.30
cinnamom	Bark	<i>Cinnamomum zeylanicum</i> (Lauraceae)	benzyl alcohol	9.82
			hexanol	5.51
			cinnamaldehyde	66.88
			benzyl benzoate	14.65

ตารางที่ 1 แสดงองค์ประกอบและปริมาณสารสำคัญในน้ำมันแต่ละชนิด (ต่อ)

Essential oils	Plant part	Botanical name	Components	%area
citronella	Leaves	<i>Cymbopogon winterianus</i> (Gramineae)	citronellal	31.79
			alpha-citronellol	13.16
			geraniol	19.27
clove	Bud	<i>Eugenia caryophyllata</i> (Mytaceae)	eugenol	99.16
			caryophyllene	0.30
lemon ¹	Peel	<i>Citrus lemon</i> (Rutaceae)	limonene	69.97
			Beta-pinene	11.11
			gamma-terpinene	9.09
rosemary ²	Flower	<i>Rosemarinus officinalis</i> (Lamiaceae)	1,8-cineole	88.90
			alpha-pinene	2.70
			camphor	2.40
vetiver ³	Roots	<i>Vetiveria zizanoides</i> (Gramineae)	zizanoic acid	32.40
			khusimol	7.20
			alpha-vetivone	5.40

¹ Dugo *et al.* (2010); ² Daferera *et al.* (2000); ³ Martinez *et al.* (2004)

ตารางที่ 2 แสดงผลการทดสอบฤทธิ์กำจัดอนุมูลอิสระ (free radical scavenging) ด้วยวิธี DPPH ที่ความเข้มข้น 10 µL/mL

ชนิดของน้ำมันหอมระเหย และสารต้านอนุมูลอิสระ	DPPH (%±SD)
Lemongrass	35.10 ± 3.21
Holy basil	90.84 ± 1.79
Cinnamon	23.17 ± 5.14
Citronella	87.37 ± 0.73
Clove oil	85.63 ± 1.09
Lemon oil	6.48 ± 4.63
Rosemary	17.09 ± 1.30
Vetiver	90.18 ± 0.84
Vit E acetate	43.76 ± 8.85
BHT (0.04 mg/mL)	73.74 ± 0.82

ตารางที่ 3 แสดงผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเกิด lipid peroxidation ด้วยวิธี TBARs ที่ความเข้มข้น 0.95 µL/mL

ชนิดของน้ำมันหอมระเหย และสารต้านอนุมูลอิสระ	TBARs (%±SD)
Lemongrass	96.50 ± 1.40
Holy basil	68.10 ± 6.79
Cinnamon	95.80 ± 8.98
Citronella	16.30 ± 1.05
Clove oil	65.80 ± 1.62
Lemon oil	25.60 ± 3.13
Rosemary	25.30 ± 0.93
Vetiver	23.90 ± 5.68
Vit E acetate	38.70 ± 3.50
BHT (0.015 mg/mL)	61.80 ± 2.05

ตารางที่ 4 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างสารต้านอนุมูลอิสระกับความเข้มข้น (mg/mL) ที่สามารถต่อต้านอนุมูลอิสระที่ 50% ด้วยวิธี DPPH

ชนิดของน้ำมันหอมระเหยและสารต้านอนุมูลอิสระ	DPPH (IC50±SD)
Holybasil	0.037 ± 0.003
Citronella	0.657 ± 0.138
Clove oil	0.134 ± 0.005
Vetiver	0.635 ± 0.036
Vitamin e acetate	42.500 ± 7.280
BHT	0.076 ± 0.012

ตารางที่ 5 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างสารต้านอนุมูลอิสระกับความเข้มข้น (mg/mL) ที่สามารถยับยั้ง lipid peroxidation ที่ 50% ด้วยวิธี TBARs

ชนิดของน้ำมันหอมระเหยและสารต้านอนุมูลอิสระ	TBARs (IC50±SD)
Clove oil	0.279 ± 0.048
Holybasil	0.073 ± 0.003
Cinnamon	0.012 ± 0.003
Lemongrass	0.019 ± 0.006
Citronella	1.490 ± 0.350
Vit E acetate	18.153 ± 1.471
BHT	0.005 ± 0.001

References

Aiemsraad J, Aiumlamai S, Taweechaisupapong S, Aromdee C, Khunkitti W. Chemical composition, antioxidant activity and antibacterial action of eight essential oils against clinical isolates of mastitis pathogens. *Int J Essent Oil Ther* 2010; 4:37-43.

Antolovich M, Prenzler PD, Patsalides E, McDonald S, Robards K. Methods for testing antioxidant activity. *Analyst* 2002; 127(1): 183-198.

Bondet V, Brand-Williams W, Berset C. Kinetics and mechanisms of antioxidant activity using the DPPH-free radical method. *Food Science Tech* 1997; 30(6): 609-615.

Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Food Sci Tech* 1995; 28(1): 25-30.

Daferera DJ, Ziogas BN, Polissiou MG. GC-MS analysis of essential oils from some Greek aromatic plants and their fungitoxicity on *Penicillium-digitatum*. *J Agric Food Chem* 2000; 48: 2576-2581.

Dugo P, Ragonese C, Russo M, et al. Sililian lemon oil: Composition of volatile and oxygen heterocyclic fractions and enantiomeric distribution of volatile components. *J Sep Sci* 2010; 33: 3374-3385.

Foti M, Piattelli M, Baratta MT, Ruberto G. Flavonoids, coumarins, and cinnamic acid as antioxidants in a micellar system. Structure-activity relationship. *J Agric Food Chem* 1996; 44(2): 497-501.

Geetha RK, Vasudevan DM. Inhibition of lipid peroxidation by botanical extracts of *Ocimum sanctum*: In vivo and in vitro studies. *Life Sci* 2004; 76(1): 21-28.

Jirovetz L, Buchbauer G, Stoilova I, Stoyanova A, Schmidt E. Chemical composition and antioxidant properties of clove leaf essential oil. *J Agric Food Chem* 2006; 54(17): 6303-6307.

Kim JH, Kim BJ. Biological screening of 100 plant extracts for cosmetic use (II): anti-oxidative activity and free radical scavenging activity. *Int J CosmetSci* 1997; 19: 299-307.

Kim JH, Chen F, Wang X, Chung HY, Jin Z. Evaluation of antioxidant activity of Vetiver (*Vetiveria zizanioides* L.) oil and identification of its antioxidant constituents. *J Agric Food Chem* 2005; 53(20): 7691-7695.

Lertsatitthanakorn P, Taweechaisupapong S, Aromdee C, Khunkitti W. In vitro bioactivities of essential oils used for acne control. *Int J Aromather* 2006; 16: 43-49.

Lin CC, Wu SJ, Chang CH, Nq LT. Antioxidant activity of *Cinnamomum cassia*. *Phytotherapy Res* 2003; 17(7): 726-730.

Martinez J, Rosa TV, Menut C, Leydet A, et al. Valorization of Brazilian Vetiver (*Vetiveria zizanioides* (L.) Nash ex Small) Oil. *J Agric Food Chem* 2004; 52: 6578-6584.

Masashiro M, Norikazu I, Yoshiko K, Miki M, Kazuhito W. Inhibition activity of Citrus essential oils. *J Cosmet Derm* 2002; 1: 183-187.

Matsuura R, Ukeda H, Sawamura M. Tyrosinase inhibition activity of Citrus essential oils. *J Agric Food Chem* 2006; 54: 2309-2313.

Viyoch J, Pisutthanan N, Faikrea A, Nupangta K, Wangtopol K, Ngokkuen J. Evaluation of in vitro antimicrobial activity of Thai basil oils and their micro-emulsion formulas against *Propionibacterium acnes*. *Int J Cosmet Sci* 2006; 28: 125-133.