

# การประเมินฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและ คุณสมบัติทางกายภาพเคมีของ น้ำมันหอมระเหย

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

ประไพ วงศ์สินคองมน<sup>1</sup>

Prapai Wongsinkongman

จารีย์ บันสิทธิ์<sup>1</sup>

Jaree Bansiddhi

อภิวัฏ รัชสิน<sup>2</sup>

Apiwat Tawatsin

นพมาศ สุนทรเจริญนนท์<sup>3</sup>

Noppamas Soonthorncharoenon

ธนวัฒน์ ทองจีน<sup>1</sup>

Tanawat Tongchin

ธิดารัตน์ บุญรอด<sup>1</sup>

Tidarat Boonraud

อุษาวดี ถาวระ<sup>2</sup>

Usavadee Thavara

ปราณี ชวลิตธำรง<sup>1</sup>

Pranee Chavalittumrong

### บทคัดย่อ

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

<sup>1</sup> สถาบันวิจัยสมุนไพร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข

<sup>2</sup> สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข

<sup>3</sup> คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

ผิวนาง 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  $\mu$ l/ml, respectively. Compared to a positive control, vitamin C showed  $IC_{50}$  at 3.55  $\mu$ g/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.

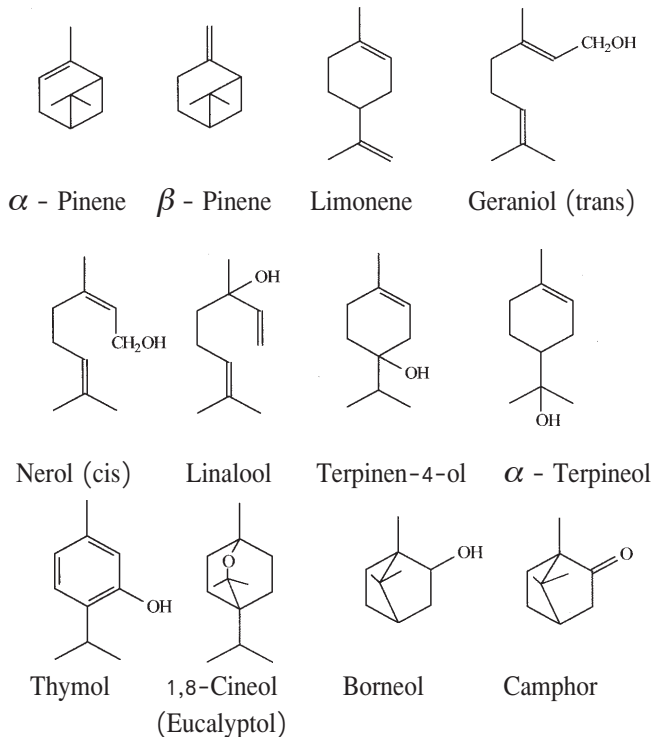
**KEY WORDS:** free-radical scavenging activity, DPPH assay, essential oils, physico-chemical properties

## บทนำ

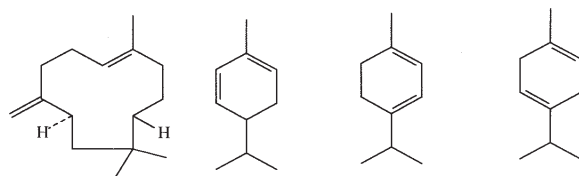
น้ำมันหอมระเหย (Essential Oil or Volatile Oil) คือ น้ำมันที่พืชสร้างขึ้นและเก็บสะสมไว้ในส่วนต่างๆ ของพืช เช่น ดอก ใบ ผล ลำต้น เหง้า ราก และเมล็ด มีคุณสมบัติเฉพาะตัว คือ มีกลิ่นเฉพาะตัว และระเหยได้ง่ายแม้แต่ในอุณหภูมิห้อง มักเป็นของเหลวใส ไม่มีสีหรือมีสีเหลืองอ่อน น้ำมันหอมระเหยที่กลั่นจากพืชสดมักจะมีคุณภาพดีกว่าพืชแห้ง 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, ฟีนอลิกเอสเทอร์, ออกไซด์ และเอสเทอร์ การมีองค์ประกอบทางเคมีที่แตกต่างกันของน้ำมันหอมระเหยเหล่านี้ ทำให้มีคุณสมบัติและมีกลิ่นที่แตกต่างกัน ซึ่งถูกนำไปใช้ประโยชน์ที่แตกต่างกันออกไป<sup>1,2</sup>

ในการแพทย์แผนไทย นิยมใช้สมุนไพรที่มีน้ำมันหอมระเหยผสมในสูตรตำรับ เพื่อใช้เป็นยา ขับลม กระตุ้นหรือแต่งกลิ่น ปัจจุบันน้ำมันหอมระเหยมีการนำไปใช้ประโยชน์อย่างกว้างขวางทั้งในอาหาร

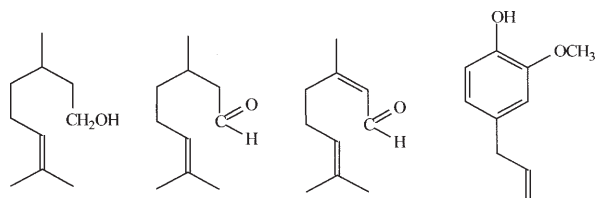
ยา เครื่องสำอาง และผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร ตลอดจนการแพทย์ทางเลือกอื่นๆ เช่น สுவคนธบำบัด (aromatherapy) การนวด ช่วยกระตุ้นการไหลเวียนของโลหิต ทำให้ผ่อนคลาย ช่วยให้หลับหรือสงบจิตใจ ระวังกลิ่น ทำให้สดชื่น<sup>2</sup> นอกจากนี้ มีรายงานถึงการนำมาใช้ประโยชน์ที่หลากหลาย ตัวอย่างเช่น ฤทธิ์ขับปัสสาวะ<sup>1</sup> ใช้เพื่อป้องกันกำจัดแมลงทางการแพทย์<sup>3-9</sup> ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (free-radical scavenging activity)<sup>10-11</sup> ฤทธิ์ต้านออกซิแดนท์ (antioxidant)<sup>12-20</sup> ฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์หรือเชื้อราหรือเชื้อไวรัส<sup>16-19</sup> ในทางเครื่องสำอางอาจใช้น้ำมันหอมระเหยเพื่อแต่งกลิ่นในน้ำหอมเพิ่มความชุ่มชื้นและความยืดหยุ่นของผิวหนัง หรือเพิ่มความงามเป็นประกายของเส้นผม<sup>21</sup> สำหรับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระนั้น มีรายงานว่า น้ำมันหอมระเหยที่มีองค์ประกอบทางเคมีเป็นสารประเภทฟีนอลิกจะมีฤทธิ์ดังกล่าว เช่น thymol, carvacrol, eugenol, carvone, thujone (ดูสูตรโครงสร้างในรูปที่ 1) อาจเนื่องมาจากสารประเภทฟีนอลิกมีคุณสมบัติในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระได้ โดยการให้ไฮโดรเจน อะตอมกับ alkoxy radicals หรือ peroxy radicals ผลผลิตที่ได้คือ อนุมูลอิสระ phenoxy ที่มีความคงตัวสูง (เนื่องมาจากการมี delocalisation ของอิเล็กตรอนคู่โดดเดี่ยวใน aromatic ring) ซึ่งจะปลดการทำปฏิกิริยาระหว่างอนุมูลอิสระกับไขมัน (lipid peroxidation inhibition) นอกจากนี้ หากมีกลุ่มไฮดรอกซีเพิ่มขึ้นที่ตำแหน่ง ortho หรือ para ของ phenolic ring จะยิ่งเพิ่มฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเนื่องจากเกิดพันธะไฮโดรเจนภายในโมเลกุล (intramolecular hydrogen-bonding) ซึ่งช่วยให้ phenoxy radicals มีความคงตัวมากขึ้น<sup>22-24</sup>



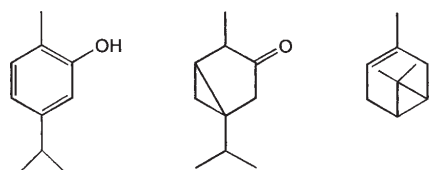
รูปที่ 1 สูตรโครงสร้างของสารเคมีประเภทเทอร์ปีนส์บางชนิดที่พบในน้ำมันหอมระเหย



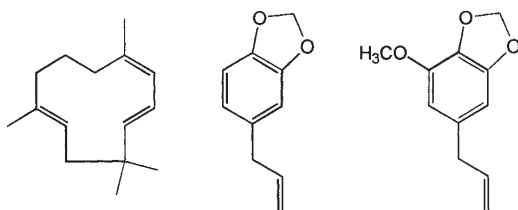
$\beta$ -Caryophyllene     $\alpha$ -Phellandrene     $\alpha$ -Terpinene     $\gamma$ -Terpinene



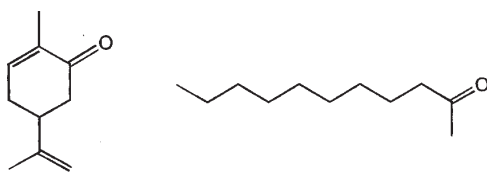
Citronellol    Citronellal    Citral    Eugenol



Carvacrol    Thujone    Carene



$\alpha$  - Caryophyllene    Safrole    Myristicin



Carvone    Methyl n-nonyl ketone

### 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 เนื่องจากการผลิตน้ำมันหอมระเหยแต่ละครั้งนั้น อาจได้ผลผลิตที่มีคุณภาพแตกต่างกัน ขึ้นกับปัจจัยหลายประการ เป็นต้นว่า แหล่งที่มาของพืช อายุในการเก็บเกี่ยวพืช เทคนิคและวิธีการกลั่นและเวลาที่ใช้ในการกลั่น ดังนั้น ผู้วิจัยจึงได้ศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันหอมระเหยที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ โดยใช้วิธี GC-MS ตลอดจนศึกษาคุณสมบัติทางกายภาพเคมีของน้ำมันหอมระเหยที่มีฤทธิ์ดังกล่าว ได้แก่ เอกลักษณ์ทางเคมี การละลายในเอทานอล ค่าดัชนีหักเห และความหนาแน่นสัมพัทธ์ เพื่อใช้เป็นแนวทางในการประเมินคุณภาพของน้ำมันหอมระเหยที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระดังกล่าวได้ต่อไป

## วิธีดำเนินการวิจัย

### ตัวอย่าง

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

### เครื่องมือ

1. ชุดกลั่นน้ำมันหอมระเหยชนิด Clevenger ประกอบด้วย เตาบุงวม 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  $\mu$ m)
7. เครื่อง UV-VIS spectrophotometer ยี่ห้อ Thermospectronic รุ่น Biomate 5
8. เครื่องรีแฟรคโตมิเตอร์ 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     | <i>Allium sativum</i> L.                                    | Garlic                     | กระเทียม    | หัว            |
| 2.       | Labiatae      | <i>Ocimum sanctum</i> L.<br>(Syn. <i>O. tenuiflorum</i> L.) | Holy Basil                 | กะเพรา(แดง) | ใบ             |
| 3.       | Labiatae      | <i>Vitex trifolia</i> L.                                    | Khontiso                   | คนทีสอ      | ใบ             |
| 4.       | Myristicaceae | <i>Myristica fragrans</i> Houtt.                            | Nutmeg tree                | จันทน์เทศ   | เมล็ดและรก     |
| 5.       | Myristicaceae | <i>Myristica fragrans</i> Houtt.                            | Nutmeg tree                | จันทน์เทศ   | ผล             |
| 6.       | Myristicaceae | <i>Myristica fragrans</i> Houtt.                            | Nutmeg tree                | จันทน์เทศ   | ใบ             |
| 7.       | Myrtaceae     | <i>Psidium guajava</i> L.                                   | Guava                      | ฝรั่ง       | ใบ             |
| 8.       | Myrtaceae     | <i>Melaleuca cajuputi</i> Powell                            | Cajuput tree               | เสม็ด       | ใบ             |
| 9.       | Piperaceae    | <i>Piper nigrum</i> L.                                      | Pepper                     | พริกไทย     | ผลแก่          |
| 10.      | Rutaceae      | <i>Citrus hystrix</i> DC.                                   | Leech Lime,<br>Kaffir Lime | มะกรูด      | ใบ             |
| 11.      | Saururaceae   | <i>Houttuynia cordata</i> Thunb.                            | Fishwort                   | ผักคาวตอง   | ผล             |
| 12.      | Saururaceae   | <i>Houttuynia cordata</i> Thunb.                            | Fishwort                   | ผักคาวตอง   | ใบ             |
| 13.      | Zingiberaceae | <i>Alpinia galanga</i> (L.) Willd.                          | Galangal                   | ข่า         | เหง้า          |
| 14.      | Zingiberaceae | <i>Curcuma longa</i> L.                                     | Turmeric                   | ขมิ้นชัน    | เหง้า          |
| 15.      | Zingiberaceae | <i>Zingiber officinale</i> Roscoe                           | Ginger                     | ขิง         | เหง้า          |

## สารเคมี

สารเคมีที่ใช้ทุกชนิดเป็นชนิด analytical grade และน้ำที่ใช้เป็นน้ำกลั่น

วิตามินซี (ascorbic acid) ของบริษัทซิกม่า

ดีพีพีเอช (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl, approx.90%) ของบริษัทซิกม่า

## วิธีการ

- การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของน้ำมันหอมระเหย<sup>39</sup>

การเตรียมสารละลายเปรียบเทียบ (positive control)

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

การเตรียมสารละลายตัวอย่าง (sample preparation)

เจือจางตัวอย่างน้ำมันหอมระเหยให้มีความเข้มข้นเป็น 10% v/v ในเอทานอล

การเตรียมน้ำยาดิฟิฟิเอช (DPPH solution)

เตรียมน้ำยาดิฟิฟิเอช (DPPH = 2,2 -diphenyl-1-picrylhydrazyl) ให้มีความเข้มข้น 60  $\mu$ M ในเอทานอล

### วิธีการ

เตรียมสารละลายตัวอย่างให้มีความเข้มข้นเป็น 0.4, 0.8, 1.6, 3.2, 6.4 และ 12.8 มก/มล ตามลำดับโดยปิเปตจากสารละลายตัวอย่างที่มีความเข้มข้น 10% โดยปริมาตรจำนวน 20, 40, 80, 160, 320 และ 640 มก ตามลำดับ ลงในขวดปรับปริมาตรขนาด 5 มล แล้วปรับปริมาตรให้ครบด้วย เอทานอล นำสารละลายตัวอย่างแต่ละขวดมาเติมน้ำยาดิฟิฟิเอชจำนวน 5.0 มล เขย่าผสมให้เข้า กันดี ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องในตู้ที่บแสงเป็นเวลา 30 นาที โดยใช้น้ำยาดิฟิฟิเอช เป็นสารละลายควบคุม และเอทานอลเป็น blank สำหรับสารละลายเปรียบเทียบ ปิเปตจากสารละลายวิตามินซีที่มีความเข้มข้น 0.16 มก/มล จำนวน 10, 20, 40, 80, 160 และ 320 มก ตามลำดับ ลงในขวดปรับปริมาตรขนาด 5 มล แล้วปรับปริมาตรให้ครบด้วยเอทานอล จะได้สารละลายเปรียบเทียบที่มีความเข้มข้นเป็น 0.32, 0.64, 1.28, 5.12 และ 10.24 มก/มล ตามลำดับ นำสารละลายตัวอย่าง สารละลายควบคุม และ สารละลายเปรียบเทียบมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง ยูวี-วิสสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ รวม 3 ครั้ง หาค่าเฉลี่ยที่วัดได้ แล้วนำไปคำนวณ

### การคำนวณ

นำค่าเฉลี่ยที่ได้ไปคำนวณหาความเข้มข้นที่สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระดิฟิฟิเอช ดังนี้

$$\text{Radical scavenging activity (\%)} = \left\{ \frac{(\text{OD}_{\text{control}} - \text{OD}_{\text{sample}})}{\text{OD}_{\text{control}}} \right\} \times 100$$

$\text{OD}_{\text{control}}$  = ค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ยของสารละลายควบคุม

$\text{OD}_{\text{sample}}$  = ค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ยของสารละลายตัวอย่าง

นำข้อมูลที่ได้ไปสร้างกราฟที่มีแกน Y เป็น radical scavenging activity (%) และแกน x เป็นค่า Log C (มก/มล, มก/มล) คำนวณหาความเข้มข้นของสารละลายที่ยับยั้งอนุมูลอิสระ ดิฟิฟิเอชที่ 50% ( $\text{IC}_{50}$ ) โดยใช้โปรแกรม prism ผลการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระแสดงในรูปที่ 2 ตารางที่ 3

- การศึกษาคุณภาพทางเคมีของน้ำมันหอมระเหย

### 1. การตรวจเอกลักษณ์ทางเคมี

### 1.1 การตรวจสอบเบื้องต้นด้วยการทดสอบปฏิกิริยาการเกิดสี

เติมเมทานอล 3 มล ลงในหลอดทดลอง เติมน้ำมันหอมระเหยด้วยหลอดหยดจำนวน 2 หยด ผสมให้เข้ากันดี แล้วเติมสารละลายวานิลลิน-กรดกำมะถัน (เตรียมโดยละลายวานิลลิน 1 ก ในเอทานอล 100 มล เติมกรดกำมะถัน 0.5 มล แล้วผสมให้เข้ากัน)<sup>40</sup> จำนวน 2 หยด สังเกตสีของสารละลายที่เปลี่ยนแปลง (ตารางที่ 4)

### 1.2 การตรวจสอบด้วยวิธีโครมาโตกราฟีผิวนาง (Thin-layer Chromatography)

#### การเตรียมน้ำยาด้อย่าง

เจือจางตัวอย่างน้ำมันหอมระเหยให้มีความเข้มข้น 10% โดยปริมาตรในเมทานอล

#### การเตรียมน้ำยามาตรฐาน

เจือจางสารมาตรฐาน *d*-limonene, myristicin, safrole,  $\beta$ -pinene, eucalyptol,  $\beta$ -caryophyllene, nerol,  $\alpha$ -pinene, isoeugenol, eugenol (สูตรโครงสร้างในรูปที่ 1) ให้มีความเข้มข้น 25, 1, 0.4, 2, 2, 2, 1, 1, 1 และ 0.2% โดยปริมาตรตามลำดับในเมทานอล ส่วน  $\alpha$ -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 เอทิลอะซิเตท และกรดอะซิติก ในอัตราส่วน 90 : 10 : 1 ตามลำดับ เขย่าให้เข้ากันดี

#### ถังทำโครมาโตกราฟี (Chromatographic tank)

ใส่น้ำยาแยกลงในถังให้มีความสูงจากก้นถึงประมาณ 1 ซม ตั้งทิ้งไว้อย่างน้อย 1 ซม ก่อนใช้ เพื่อให้บรรยากาศในถังอิ่มตัวด้วยน้ำยาแยก

#### วิธีการ

ใช้หลอดรูเล็กบรรจุน้ำยาด้อย่างของแต่ละชนิดหลอดละ 5 มล และน้ำยามาตรฐานแต่ละชนิดหลอดละ 2 มล มาแต้มบนแผ่นกระจกฉาบสารดูดซับในแนวระดับเดียวกัน ให้ห่างจากขอบล่างของกระจกประมาณ 1.5 ซม และห่างจากด้านข้างของกระจกประมาณ 2 ซม นอกจากนี้ระยะห่างระหว่างแถวไม่น้อยกว่า 1 ซม ผึ่งให้แห้ง นำไปตั้งในถังโครมาโตกราฟีที่เตรียมไว้ ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง ให้น้ำยาแยกซึมขึ้นไปตามผิวที่ฉาบสูง 15 ซม นำแผ่นกระจกออกจากถัง ทิ้งไว้ให้แห้ง นำไปตรวจสอบด้วยการพ่นด้วยน้ำยาดีฟิฟิเอซ (ความเข้มข้น 16 มก ในเอทานอล 100 มล) ทั้งให้แห้งที่อุณหภูมิห้องแล้วนำไปตรวจสอบด้วยการดูภายใต้แสงธรรมชาติ (visible light) สังเกตผลภายใน 30 นาที ซึ่งหากมีองค์ประกอบทางเคมีที่ยับยั้งอนุมูลอิสระดีฟิฟิเอซ จะพบว่า เกิดจุดไม่มีสีบนพื้นสีม่วง (รูปที่ 3) นอกจากนี้ สำหรับการตรวจสอบองค์ประกอบทางเคมีชนิดอื่นของน้ำมันหอมระเหยนั้น ให้นำแผ่นกระจกอีกแผ่นที่ทำวิธีเดียวกันกับที่กล่าวมาข้างต้นไปตรวจสอบด้วยแสงยูวีที่



ความยาวคลื่น 254 nm บันทึกผล แล้วนำไปพ่นด้วยน้ำยาอะนิลีนไฮโดรคลอไรด์-กรดกำมะถัน (เตรียมโดยผสมอะนิลีนไฮโดรคลอไรด์ 0.5 มล กรดอะซิติก 10 มล เมทานอล 85 มล และกรดกำมะถัน 5 มล เข้าด้วยกันตามลำดับ) ที่ให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง นำแผ่นกระจกไปอังด้วยเตาไฟฟ้าที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที แล้วนำไปตรวจสอบโดยการดูภายใต้แสงธรรมชาติ<sup>40-41</sup>

#### 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-แมสสเปกโตรเมตรี (Gas Chromatography-Mass Spectrometry/GC-MS)

#### การเตรียมน้ำยาตัวอย่าง

เจือจางน้ำมันหอมระเหยของตัวอย่างให้มีความเข้มข้น 3.33% โดยปริมาตรใน tetrachloroethylene ปริมาณที่ใช้ในการฉีดตัวอย่างชนิดละ 0.1 มล

#### วิธีการ

ฉีดน้ำยาตัวอย่างผ่านคอลัมน์ DB-1 ขนาด 30 m x 0.25  $\mu$ m โดยตั้งค่าอุณหภูมิของ injector เป็น 200 °C การตรวจสอบโครมาโตแกรมทำได้โดยใช้ MS Detector ที่อุณหภูมิ 230 °C อุณหภูมิของตัวบ่งชี้เริ่มจาก 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) โดยเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลที่มีในเครื่อง MS (ตารางที่ 7)

### 2. การทดสอบการละลายในเอทานอล<sup>42</sup>

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

### 3. การหาความหนาแน่นสัมพัทธ์<sup>42-43</sup>

ความหนาแน่นสัมพัทธ์ (relative density) เป็นเอกลักษณ์ของตัวอย่างที่เป็นของเหลว ความหนาแน่นสัมพัทธ์ของตัวอย่าง คือ อัตราส่วนของมวลของตัวอย่างต่อมวลของน้ำกลั่นโดยเปรียบเทียบในปริมาตรที่เท่ากันของตัวอย่าง และน้ำกลั่น โดยใช้ pycnometer ที่อุณหภูมิที่กำหนดในการทดลองนี้ใช้อุณหภูมิ 20 °C จากนั้น นำมาคำนวณหาความหนาแน่นสัมพัทธ์ ดังนี้

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

ผลการคำนวณความหนาแน่นสัมพันธ์ แสดงในตารางที่ 8

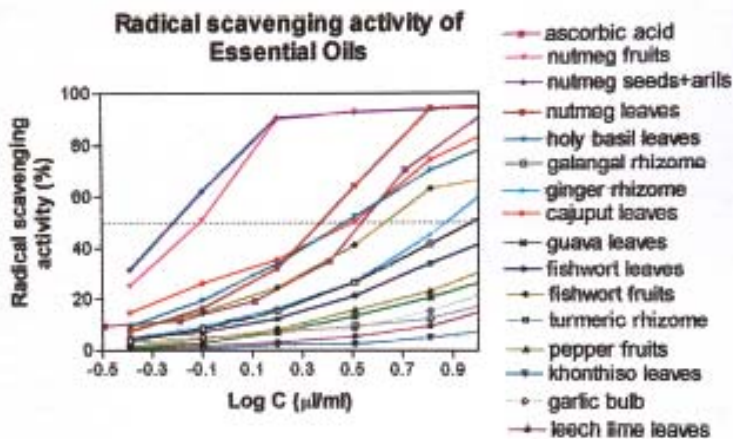
#### 4. การหาค่าดัชนีหักเห<sup>44,45</sup>

ค่าดัชนีหักเหเป็นการพิสูจน์เอกลักษณ์ทางกายภาพของตัวอย่างที่เป็นของเหลว และทดสอบความบริสุทธิ์ของตัวอย่างโดยใช้เครื่องรีแฟรคโตมิเตอร์ 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. คนทีสอ (ใบ)             | 0.16                                                                |
| 4. จันทน์เทศ (เมล็ดและราก) | 0.85                                                                |
| 5. จันทน์เทศ (ผล)          | 0.11                                                                |
| 6. จันทน์เทศ (ใบ)          | 0.66                                                                |
| 7. ฝรั่ง (ใบ)              | 0.16                                                                |
| 8. เสมีด (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 ความเข้มข้นที่<br>ยับยั้งอนุมูลอิสระที่ 50%<br>(Log IC <sub>50</sub> ) (μl/ml) | ค่าความเข้มข้นที่<br>ยับยั้งอนุมูลอิสระที่ 50%<br>(IC <sub>50</sub> ) (μl/ml) |
|---------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------|
| 1. กระเทียม (หัว)         | >1                                                                                     | >10                                                                           |
| 2. กะเพรา (แดง) (ใบ)      | 0.46                                                                                   | 2.88                                                                          |
| 3. คนทีสอ (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     | สีของสารละลายที่เกิดจากการทดสอบด้วย<br>สารละลายวานิลลิน-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. เสมีด (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    |

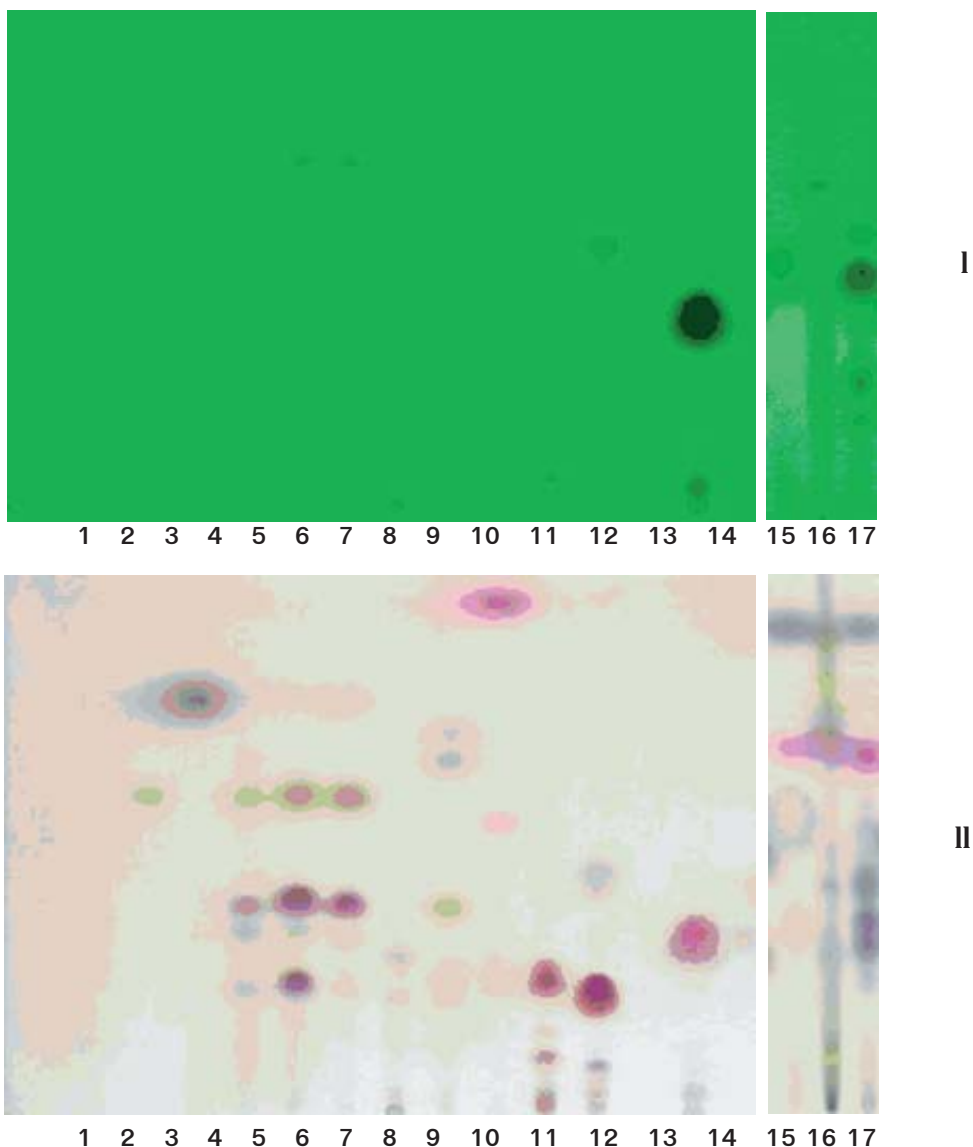
ตารางที่ 6 (ต่อ)ค่า  $hR_f$  และผลการตรวจสอบสารประเภทเทอร์ปีนอยด์ในน้ำมันหอมระเหย 6 ชนิด

| 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. เสมีด (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    |



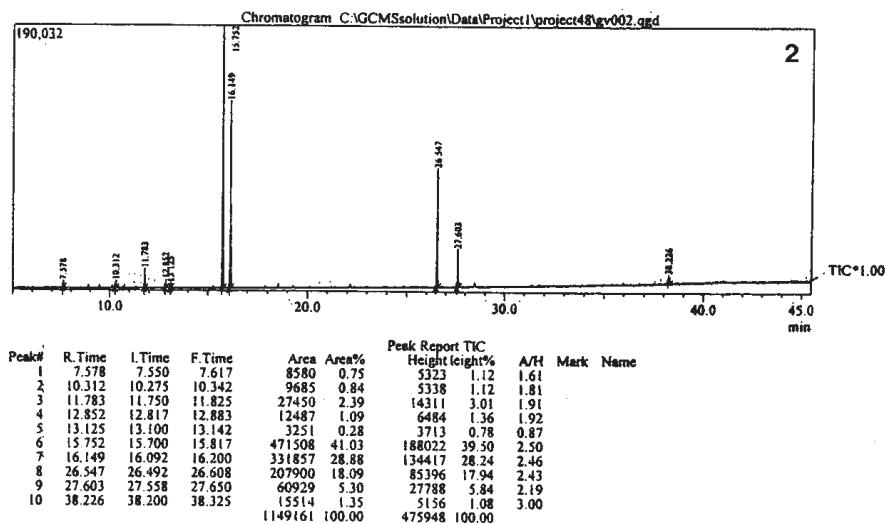
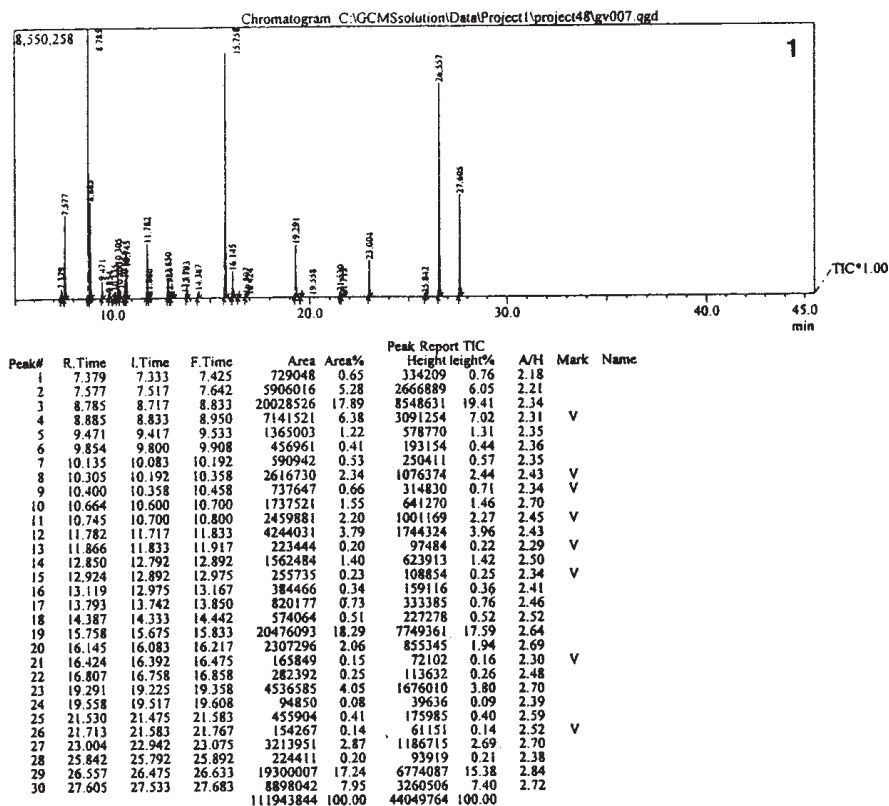
**รูปที่ 3** ลักษณะทางโครมาโตแกรมผิวบางขององค์ประกอบทางเคมีที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในน้ำมันหอมระเหย เมื่อใช้เฮกเซน/เอทิลอะซีเตต/กรดอะซีติก (90:10:1) เป็น mobile phase แล้วพ่นด้วยน้ำยา DPPH

- 1 = *d*-limonene; 2 = myristicin; 3 = safrole; 4 = น้ำมันใบจันทน์เทศ;  
 5 = น้ำมันผลจันทน์เทศ; 6 = น้ำมันเมล็ดและรากจันทน์เทศ; 7 =  $\beta$ -pinene;  
 8 = eucalyptol; 9 =  $\beta$ -caryophyllene; 10 =  $\alpha$ -terpineol; 11 = nerol;  
 12 =  $\alpha$ -pinene; 13 = isoeugenol; 14 = eugenol; 15 = น้ำมันใบกะเพรา(แดง);  
 16 = น้ำมันผลผักคาวตอง; 17 = น้ำมันใบเสมา



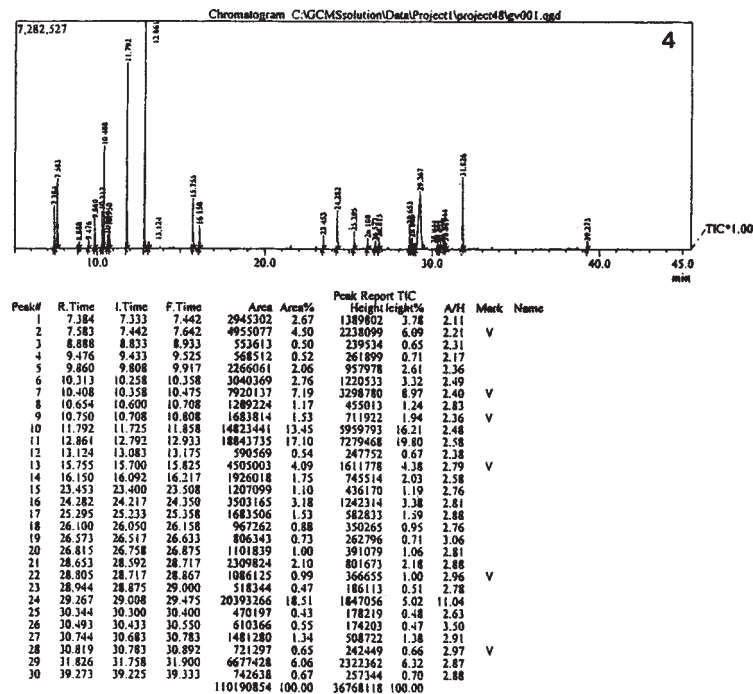
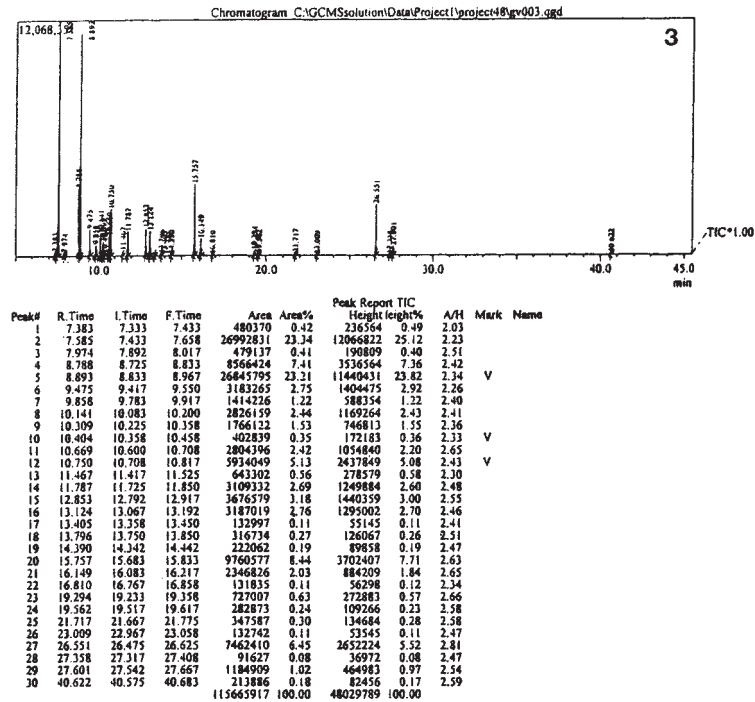
**รูปที่ 4** ลักษณะทางโครมาโตแกรมผิวบางของสารประเภทเทอร์ปีนส์ในน้ำมันหอมระเหยชนิดต่างๆ เมื่อใช้เฮกเซน/เอทิลอะซีเตท/กรดอะซีติก (90:10:1) เป็น mobile phase และสังเกตด้วยยูวี 254 nm (I) แล้วพ่นด้วยน้ำยาอะนิลีนดีไฮด์-กรดกำมะถันแล้วอังให้ร้อนที่อุณหภูมิ 105 °C นาน 5 นาที และดูภายใต้แสงธรรมชาติ (II)

- 1 = *d*-limonene; 2 = myristicin; 3 = safrole; 4 = น้ำมันใบจันทร์เทศ;  
 5 = น้ำมันผลจันทร์เทศ; 6 = น้ำมันเมล็ดและรากจันทร์เทศ; 7 =  $\beta$ -pinene;  
 8 = eucalyptol; 9 =  $\beta$ -caryophyllene; 10 =  $\alpha$ -terpineol; 11 = nerol;  
 12 =  $\alpha$ -pinene; 13 = isoeugenol; 14 = eugenol; 15 = น้ำมันใบกะเพรา(แดง);  
 16 = น้ำมันผลผักคาวตอง; 17 = น้ำมันใบเสมา

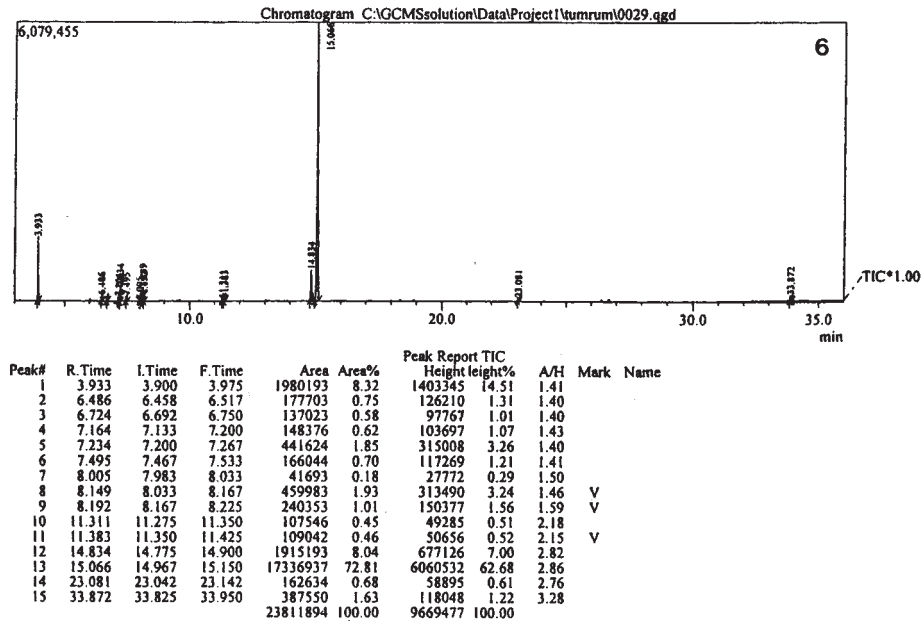
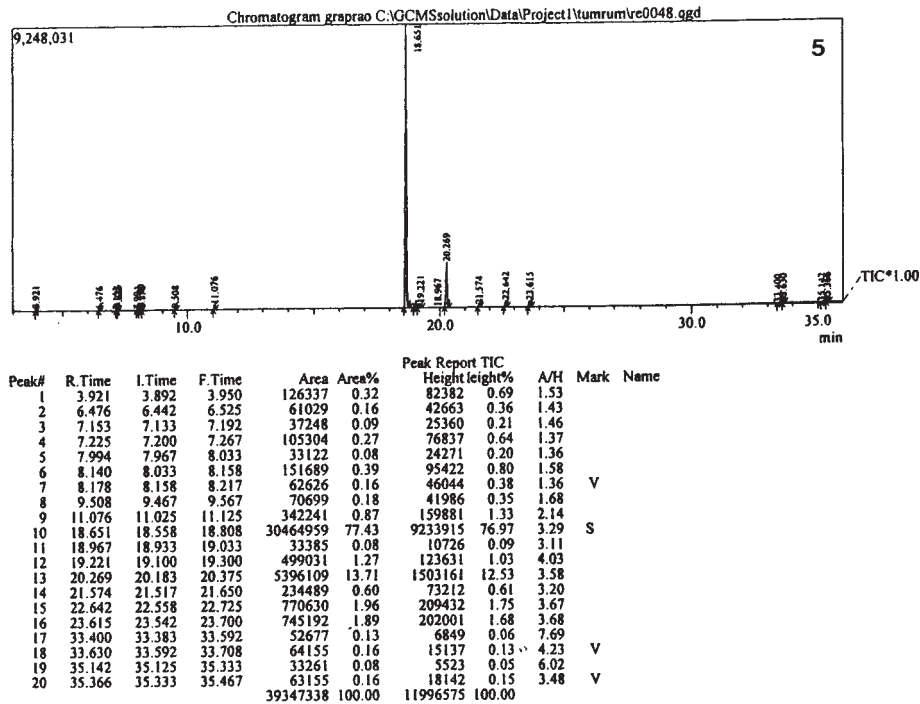


รูปที่ 5 แก๊สโครมาโตแกรมของน้ำมันหอมระเหยจำนวน 2 ชนิด เมื่อใช้แคปิลลารีคอลัมน์ชนิด DB-1 (30 m x 0.25 mm x 0.25  $\mu$ m) และใช้ mass spectrometer เป็น detector  
1 = น้ำมันเมล็ดและรากจันทน์เทศ; 2 = น้ำมันผลจันทน์เทศ





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 = น้ำมันใบเสมีด



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

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

| ชนิดของ<br>น้ำมันหอมระเหย   | สารเคมีที่พบ<br>Peak Found                    | อัตราส่วนร้อยละของพื้นที่(%)<br>Percentage Ratio(Area%) | เวลา (นาที)<br>Retention Time (min) |
|-----------------------------|-----------------------------------------------|---------------------------------------------------------|-------------------------------------|
| 1. เมล็ดและ<br>รากจันทร์เทศ | terpinen-4-ol                                 | 18.29                                                   | 15.758                              |
|                             | $\beta$ -phellandrene                         | 17.89                                                   | 8.785                               |
|                             | myristicin                                    | 17.24                                                   | 26.557                              |
|                             | Benzene, 1,2,3-trimethoxy<br>-5-(2-propenyl)- | 7.95                                                    | 27.605                              |
|                             | $\beta$ -pinene                               | 6.38                                                    | 8.885                               |
|                             | $\alpha$ -pinene                              | 5.28                                                    | 7.577                               |
| 2. ผลจันทร์เทศ              | terpinen-4-ol                                 | 41.03                                                   | 15.752                              |
|                             | $\alpha$ -terpineol                           | 28.88                                                   | 16.149                              |
|                             | myristicin                                    | 18.09                                                   | 26.547                              |
|                             | unidentified                                  | 5.30                                                    | 27.603                              |
| 3. ใบจันทร์เทศ              | $\alpha$ -pinene                              | 23.34                                                   | 7.585                               |
|                             | $\beta$ -pinene                               | 23.21                                                   | 8.893                               |
|                             | terpinen-4-ol                                 | 8.44                                                    | 15.757                              |
|                             | myristicin                                    | 6.45                                                    | 26.551                              |
|                             | d-limonene                                    | 5.13                                                    | 10.750                              |
| 4. ใบเสมีด                  | unidentified                                  | 18.51                                                   | 29.267                              |
|                             | 4-carene                                      | 17.10                                                   | 12.861                              |
|                             | $\gamma$ -terpinene                           | 13.45                                                   | 11.792                              |
|                             | cymene                                        | 7.19                                                    | 10.408                              |
|                             | unidentified                                  | 6.06                                                    | 31.826                              |
|                             | $\alpha$ -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<br>-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

| ชนิดของน้ำมัน<br>หอมระเหย  | ลักษณะ<br>ของตัวอย่าง     | การละลายด้วย<br>85% เอทานอล                                          | ความหนาแน่น<br>สัมพัทธ์ที่<br>อุณหภูมิ 20°C | ค่าดัชนีหักเห<br>ที่อุณหภูมิ 20°C |
|----------------------------|---------------------------|----------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------|-----------------------------------|
| 1. เมล็ดและ<br>รกจันทร์เทศ | ของเหลวใส ไม่มีสี         | 1:3                                                                  | 0.9360                                      | 1.4904                            |
| 2. ผลจันทร์เทศ             | ของเหลวใส<br>สีเหลืองอ่อน | 1:3                                                                  | 0.9492                                      | 1.4890                            |
| 3. ใบจันทร์เทศ             | ของเหลวใส ไม่มีสี         | 1:7                                                                  | 0.8780                                      | 1.4782                            |
| 4. ใบเสม็ด                 | ของเหลวใส<br>สีเหลืองอ่อน | 1:8                                                                  | 0.9416                                      | 1.5012                            |
| 5. ใบกะเพรา<br>(แดง)       | ของเหลวใส<br>สีเหลืองอ่อน | 1:1                                                                  | 0.9994                                      | 1.5263                            |
| 6. ผลผักคาวตอง             | ของเหลวใส<br>สีเหลืองอ่อน | 1:4000 ใน 85%<br>เอทานอล<br>1:1 ในเอทิลอะซิเตท<br>1:1 ในไดคลอโรมีเทน | 0.8461                                      | 1.4897                            |

## วิจารณ์

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

น้ำมันหอมระเหยทั้ง 6 ชนิดที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้นั้นได้นำมาศึกษาคุณสมบัติทางกายภาพ เคมีด้วยการพิสูจน์เอกลักษณ์ทางเคมีโดยปฏิกิริยาการเกิดสี วิธีโครมาโตกราฟีผิวบาง (TLC) และวิธี แก๊สโครมาโตกราฟีแมสสเปกโตรเมทรี (GC-MS) ตรวจพินิจลักษณะทางกายภาพ การละลายใน เอทานอล ความหนาแน่นสัมพัทธ์ และค่าดัชนีหักเหผลจากการศึกษาเอกลักษณ์ทางเคมี ได้แก่ การทดสอบเบื้องต้นด้วยปฏิกิริยาการเกิดสี โดยการทำให้ปฏิกิริยากับสารละลายวานิลลิน-กรดกำมะถัน พบว่า เกิดสีต่างกันไป เช่น สีฟ้า ม่วงแดง น้ำตาล แสดงว่า น่าจะมีสารเคมีประเภทเทอร์ปีนส์<sup>40</sup> (ตารางที่ 4) เมื่อทดสอบด้วยวิธีโครมาโตกราฟีผิวบาง (TLC) โดยใช้แสงยูวีที่ความยาวคลื่น 254 nm พบว่า องค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันหอมระเหยทั้ง 6 ชนิดนั้น เกิดจุดทึบแสง ซึ่งเกิดจากคุณสมบัติ ของการ มี conjugated double bond อย่างน้อย 2 พันธะอยู่ในโครงสร้างของสารเคมีในน้ำมันหอม ระเหย ตัวอย่างเช่น สารเคมีกลุ่ม phenylpropane derivatives จะมีคุณสมบัติดังกล่าว และเมื่อตรวจ สอบด้วยการพ่นด้วยน้ำยาอะนิซัลดีไฮด์-กรดกำมะถัน พบว่า เกิดจุดสีต่างกันไป เช่น สีม่วง แดง น้ำเงิน น้ำตาล เขียว แสดงว่า มีสารเคมีประเภทเทอร์ปีนส์<sup>40-41</sup> สำหรับน้ำมันหอมระเหยจากจันทน์เทศทั้ง 3 ตัวอย่าง พบ myristicin และ safrole เป็นองค์ประกอบทางเคมีที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ในขณะที่ น้ำมันหอมระเหยจากใบเสมีดและใบกะเพรา(แดง) พบ  $\beta$ -caryophyllene เป็นองค์ประกอบทางเคมี ที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (รูปที่ 3-4 และตารางที่ 5-6)

ผลจากการศึกษาแก๊สโครมาโตแกรม ด้วยวิธีแก๊สโครมาโตกราฟีแมสสเปกโตรเมทรี (GC-MS) (รูปที่ 5 และตารางที่ 7) ทำให้ทราบถึงองค์ประกอบหลักทางเคมีของน้ำมันหอมระเหยทั้ง 6 ชนิด พบว่า น้ำมันจากเมล็ดและรกรหรือผลหรือใบของต้นจันทน์เทศมีองค์ประกอบหลักเป็นสารเคมี กลุ่ม phenylpropane derivatives (เช่น myristicin, safrole) ส่วนน้ำมันหอมระเหยจากเมล็ดและ รกหรือผลจันทน์เทศจะพบองค์ประกอบทางเคมีกลุ่ม monoterpene alcohols (เช่น terpinen-4-ol,  $\alpha$ -terpineol) อยู่มาก ในขณะที่น้ำมันหอมระเหยจากใบจันทน์เทศจะพบองค์ประกอบหลักเป็นสารเคมี กลุ่ม monoterpenes (เช่น  $\alpha$ -pinene,  $\beta$ -pinene, limonene) โดยพบว่า สัดส่วนของ myristicin ใน ผลจันทน์เทศมีมากกว่ารอกและเมล็ดและมีมากกว่าใบ ดังนั้น ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของน้ำมันหอม ระเหยจากต้นจันทน์เทศทั้งสามส่วน น่าจะเกิดจากสารเคมีเหล่านี้ ซึ่งให้ผลบวกกับน้ำยา DPPH เมื่อ ทดสอบด้วยวิธีโครมาโตกราฟีผิวบาง (รูปที่ 3) นอกจากนี้ ยังเคยมีรายงานว่าสาร myristicin และ dehydrodiisoeugenol ที่พบในรอกจันทน์เทศมีฤทธิ์ยับยั้ง lipid peroxidation ในหนูทดลอง<sup>46</sup> สำหรับน้ำมันหอมระเหยจากใบเสมีด พบว่า มีสารที่ไม่ทราบสูตรโครงสร้างสูงถึง 18.51% และมี 4-carene,  $\gamma$ -terpinene อยู่ในปริมาณที่สูงรองลงมาในอันดับสองและสาม เนื่องจากยังไม่ทราบว่า เป็นสารใด ดังนั้น จึงยังไม่สามารถระบุได้ว่าฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเกิดจากองค์ประกอบทางเคมีชนิดใด แต่เป็นไปได้ว่า ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของน้ำมันใบเสมีดนั้น อาจเกิดได้จากองค์ประกอบทางเคมีที่ กล่าวมาแล้ว 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 ชนิดนี้ได้แก่ ลักษณะของตัวอย่าง การละลายด้วยเอทานอล ค่าดัชนีหักเห และความหนาแน่นสัมพัทธ์ (ตารางที่ 8) เป็นการบ่งบอกถึงคุณภาพทางกายภาพ ซึ่งเป็นเอกลักษณ์เฉพาะตัวอันจะเป็นประโยชน์ต่อการควบคุมคุณภาพของน้ำมันหอมระเหยแต่ละชนิดต่อไป

## สรุปผลการวิจัย

การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของน้ำมันหอมระเหยทั้ง 15 ชนิดจากสมุนไพรไทยได้แก่ 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  $0.60 \mu\text{l/ml}$  ตามลำดับ) รองลงมาคือ น้ำมันหอมระเหยจากใบจันทน์เทศ ใบกะเพรา(แดง) ใบเสม็ด และผลผักคาวตอง ( $IC_{50} = 2.39, 2.88, 3.24$  และ  $4.19 \mu\text{l/ml}$  ตามลำดับ) ซึ่งมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระดีกว่าเล็กน้อยหรือเทียบเท่ากับวิตามินซี ( $IC_{50} = 3.55 \mu\text{g/ml}$ ) ส่วนน้ำมันหอมระเหยที่มีฤทธิ์รองลงมาได้แก่ น้ำมันจากเหง้าขิงและเหง้าข่ามีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระต่ำกว่าวิตามินซีอยู่ประมาณ 2-3 เท่า ( $IC_{50} = 7.41$  และ  $9.19 \mu\text{l/ml}$  ตามลำดับ) นอกจากนี้ได้รายงานถึงผลการศึกษาคุณสมบัติทางเคมีและกายภาพของน้ำมันหอมระเหยทั้ง 6 ชนิดในหัวข้อเอกลักษณ์ทางเคมี ลักษณะของตัวอย่าง การละลายด้วยเอทานอล ค่าดัชนีหักเห และความหนาแน่นสัมพัทธ์ไว้ด้วย ซึ่งจะเป็นประโยชน์ในการควบคุมคุณภาพของน้ำมันหอมระเหยจากสมุนไพรดังกล่าวต่อไป

## เอกสารอ้างอิง

1. วันดี กฤษณพันธ์. พฤษเคมีเบื้องต้น. ใน: วิชา จิรจรรย์กุล. ยาและผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติ. กรุงเทพฯ: ภาควิชาเภสัชวินิจฉัย คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล. 2534. หน้า 25-72, 307.
2. <http://www.tistr.or.th/pharma>
3. สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์. สมุนไพรป้องกันกำจัดแมลงทางการแพทย์. กรุงเทพฯ: บริษัท ดีไซน์ 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: Culicidae). *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: Culicidae), Black Flies  
(Diptera: Simuliidae) 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. Radical-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 Ion 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 atrovirdis* on Butter Cakes. *J Sci of Food and Agri*. 1999; 79(3): 1817-22.
- 17 Ricci D, Fraternali 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: ปรารถนา ชวลิตขำรง และคณะ. สมุนไพรหน้ารู้ 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.