รายงานการวิจัย

ปริมาณฟลาโวนอยด์และฤทธิ์ยับยั้งการสังเคราะห์เม็ดสีเมลานินของน้ำมันว่านน้ำ

Flavonoids and melanogenesis inhibiting activity of sweet flag oil.

สุวรรณา ผลใหม่ Suwanna Pholmai

ฐิติกร พรหมบรรจง Thitikorn Prombanchong

คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย

ได้รับการสนับสนุนทุนวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย

งบประมาณเงินรายได้ ประจำปี พ.ศ. 2562

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยฉบับนี้ได้รับการสนับสนุนทุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย งบประมาณเงินรายได้ประจำปี 2562 เป็นงานวิจัยพื้นฐานเพื่อก่อให้เกิดองค์ความรู้ใหม่ในการประเมินความเป็นไปได้ที่จะพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ที่มีประโยชน์ ตลอดจนผลการวิจัยสามารถใช้เป็นแนวทางส่งเสริมให้มีการนำไปใช้ประโยชน์ทางการแพทย์ อาหาร เครื่องสำอาง และอุตสาหกรรม

ขอขอบคุณมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัยที่ได้ให้การสนับสนุนทุนในการทำวิจัยนี้ ขอขอบคุณผู้เกี่ยวข้องทุกฝ่ายที่ได้ให้ความช่วยเหลือในด้านต่าง ๆ ทั้งความสะดวกในการใช้อุปกรณ์และเครื่องมือวิเคราะห์ ตลอดจนสถานที่ในการตรวจวิเคราะห์ตัวอย่าง ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการที่ให้การช่วยเหลืออำนวยความสะดวกด้วยดีตลอดมา ขอขอบคุณผู้ร่วมวิจัยที่อุทิศกำลังกายและกำลังใจช่วยในการวิจัยครั้งนี้ลุล่วงได้ด้วยดี ตลอดจนครอบครัวและผองเพื่อนที่ให้ความห่วงใยเป็นกำลังใจให้เสมอมา ประโยชน์อันใดที่เกิดจากงานวิจัยนี้ย่อมเป็นผลมาจากความกรุณาของท่านและหน่วยงาน ผู้วิจัยจึงใคร่ขอขอบพระคุณมา ณ โอกาส นี้

สุวรรณา ผลใหม่
ฐิติกร จันทร์วุ่น
มีนาคม 2563

ปริมาณฟลาโวนอยด์และฤทธิ์ยับยั้งการสังเคราะห์เม็ดสีเมลานินของน้ำมันว่านน้ำ

สุวรรณา ผลใหมและฐิติกร พรหมบรรจง

บทคัดย่อ

การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อวิเคราะห์หาปริมาณฟลาโวนอยด์และทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการสังเคราะห์เม็ดสีเมลานินของน้ำมันว่านน้ำ ทำการวิเคราะห์หาปริมาณฟลาโวนอยด์ด้วยวิธี Aluminium chloride method และทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการสังเคราะห์เม็ดสีเมลานินด้วยวิธี Dopachrome โดยใช้ L-dopa เป็นสารตั้งต้น จากการศึกษาพบว่าน้ำมันว่านน้ำมีปริมาณฟลาโวนอยด์เท่ากับ 9.35±0.60 มิลลิกรัมเคอร์ซิตินต่อมิลลิลิตร และฤทธิ์ยับยั้งการสังเคราะห์เม็ดสีเมลานินแสดงด้วยค่า IC_{50} เท่ากับ 0.06±0.15 (μl/ml) เปรียบเทียบกับกรดโคจิกซึ่งใช้เป็นสารควบคุมเชิงบวก ดังนั้นข้อมูลจากผลการวิจัยทั้งหมดแสดงให้เห็นว่าน้ำมันว่านน้ำสามารถใช้เป็นข้อมูลในการพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางสำหรับผิวกระจ่างใส

คำสำคัญ : ฟลาโวนอยด์ ว่านน้ำ เม็ดสีเมลานิน

Flavonoids and melanogenesis inhibiting activity of sweet flag oil.

Suwanna Pholmai and Thitikorn Prombanchong

Abstract

The purpose of this study was determined flavonoids content and melanogenesis inhibiting activity of sweet flag oil (*Acorus calamus* L.). Flavonoids content were determined by the aluminium chloride method and melanogenesis inhibiting activity of sweet flag oil was assayed by the dopachrome method using L-dopa as a substrate. The result show that essential oil from Sweet flag had total flavonoids content is 9.35±0.60 mgQE/ml. The melanogenesis inhibiting activity of essential oil showing IC_{50} value of 0.06±0.15 (µl/ml) compared to kojic acid, the positive control. The results provided evidence that the findings suggest possible applications for sweet flag oil in skin lightening cosmetic products.

Keywords: flavonoid, melanin, sweet flag

สารบัญ

เรื่อง	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ก
บทคัดย่อ	ข
Abstract	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	จ
สารบัญภาพ	ฉ
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ	ช
บทที่ 1 บทนำ	1
บทที่ 2 วิธีการดำเนินงานวิจัย	32
บทที่ 3 ผลการวิจัยและวิจารณ์ผล	35
บทที่ 4 สรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ	37
เอกสารอ้างอิง	38

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
ตารางที่ 1.1	8
ตารางที่ 1.2	30
ตารางที่ 2.1	33
ตารางที่ 3.1	35
ตารางที่ 3.2	36

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
ภาพที่ 1.1 โครงสร้างของสารธรรมชาติในน้ำมันหอมระเหยจากพืช	5
ภาพที่ 1.2 isoprenoid pathway	6
ภาพที่ 1.3 โครงสร้างทางเคมีของ BHA	15
ภาพที่ 1.4 โครงสร้างทางเคมีของ BHT	15
ภาพที่ 1.5 โครงสร้างทางเคมีของ trolox	15
ภาพที่ 1.6 โครงสร้างทางเคมีของ gallic acid	15
ภาพที่ 1.7 โครงสร้างทางเคมีของ quercetin	16
ภาพที่ 1.8 โครงสร้างทางเคมีของสารประกอบฟีนอลิก	17
ภาพที่ 1.9 โครงสร้างทางเคมีของฟลาวาโนน (flavanols)	18
ภาพที่ 1.10 โครงสร้างทางเคมีของฟลาแวน (flanvanes)	18
ภาพที่ 1.11 โครงสร้างทางเคมีของฟลาวานอล (flavanols)	19
ภาพที่ 1.12 โครงสร้างทางเคมีของฟลาโวนอล (flavonols)	19
ภาพที่ 1.13 โครงสร้างทางเคมีของฟลาโวน (flavonoes)	19
ภาพที่ 1.14 โครงสร้างทางเคมีของแอนโทไซยานิดิน (anthocyanidins)	19
ภาพที่ 1.15 ปฏิกิริยาของ ABTS	21
ภาพที่ 1.16 ตัวอย่างสารในกลุ่มฟีนอลิก	23
ภาพที่ 1.17 ตัวอย่างสารในกลุ่มฟลาโวนอยด์	25
ภาพที่ 1.18 กลไกการยับยั้งเอนไซม์ Tyrosinase	28
ภาพที่ 1.19 โครงสร้างปฏิกิริยารีดอกซ์ของวงแหวนควิโนน	29

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

ในปัจจุบันประเทศไทยจึงมีการนำเข้าน้ำมันหอมระเหยสูงถึง 3,600 ล้านบาทต่อปี เนื่องจากการผลิตน้ำมันหอมระเหยของไทยเป็นที่ยอมรับยังมีน้อย ผู้ผลิตยังไม่เข้าใจถึงกระบวนการผลิต ตลอดจนการควบคุมคุณภาพอย่างแท้จริงทำให้ไม่เป็นที่ยอมรับของตลาดต่างประเทศ ดังนั้น การส่งเสริมการผลิตน้ำมันหอมระเหยอย่างจริงจัง ทั้งในด้านการวิจัยและพัฒนาการผลิตเพื่อการส่งออกของประเทศ การตรวจสอบปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของสารจึงนับเป็นเรื่องจำเป็นที่จะช่วยเพิ่มแนวทางในการนำไปใช้ประโยชน์ ดังนั้น การผลิตผลิตภัณฑ์ที่มีส่วนผสมของน้ำมันหอมระเหยจากธรรมชาติที่มีคุณภาพและได้มาตรฐานจึงเป็นสิ่งสำคัญยิ่ง

น้ำมันหอมระเหยเป็นผลิตภัณฑ์ธรรมชาติจากพืช มีกลิ่นหอมและระเหยง่ายสามารถสกัดจากส่วนต่างๆ ของพืช เช่น ดอก แก่น ลำต้น ใบ ราก และผล ด้วยวิธีการกลั่นหรือวิธีอื่น ตั้งแต่อดีตถึงปัจจุบัน น้ำมันหอมระเหยถูกนำมาใช้ในส่วนผสมของน้ำหอม การรักษาโรคทางร่างกายและจิตใจ บำรุงผิวพรรณ เพิ่มรสชาติ เพิ่มรสชาติ เพิ่มความหอมของอาหารและเครื่องดื่ม สุคนธบำบัดหรือการบำบัดด้วยกลิ่นโดยใช้น้ำมันหอมระเหยเป็นส่วนประกอบสำคัญ ถือเป็นทางเลือกหนึ่งของการบำบัดรักษาโรคนอกเหนือจากการใช้ยาแพทย์แผนปัจจุบัน เนื่องจากมีรายงานถึงฤทธิ์ทางชีวภาพ การดูดซึมผ่านผิวหนังโดยผ่านการสูดดม การทา หรือการรับประทาน จะช่วยพาน้ำมันหอมระเหยเข้าสู่กระแสเลือด เพื่อไปออกฤทธิ์ในส่วนที่เป็นโรค ช่วยบำบัดรักษาโรคซึมเศร้า โรคท้องผูก อาการปวดหัว นอนไม่หลับ ปวดกล้ามเนื้อ ระบบหายใจขัดข้อง โรคผิวหนัง และโรคมะเร็ง น้ำมันหอมระเหยถูกใช้ในอุตสาหกรรมเครื่องสำอางเพื่อใช้ในการดูแลผิวพรรณและน้ำหอม สมุนไพรหลายชนิดที่ให้น้ำมันหอมระเหยที่มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาต่อผิวพรรณ เช่น ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (Lertsatitthanakorn *et al*., 2006) ฤทธิ์ต้านเอนไซม์ไทโรซิเนส ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ลดความเข้มของผิว (Matsuura *et al*., 2006) ฤทธิ์ต้านเอนไซม์อีลาสเทส (elastase enzyme) ซึ่งส่งผลลดความหย่อนยานของผิวหนังหรือฤทธิ์ต้านจุลชีพต่าง ๆ (Viyoch *et al*., 2006) นอกจากนี้ยังมีการศึกษาประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยในด้านต่าง ๆ เช่น น้ำมันหอมระเหยจากกระเพรา โหระพา ตะไคร้หอม ตะไคร้แกง มะกรูด ขิง และไพล มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ยับยั้งแบคทีเรีย *Propionibacterium acnes* เป็นเชื้อทำให้เกิดสิว และศึกษาฤทธิ์ต้านการอักเสบ (Lertsatitthanakorn *et al*., 2006; Aiemsaard *et al*., 2006) มีการศึกษาเปรียบเทียบประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยจากมะนาว สน และผลไม้จำพวกส้มมีฤทธิ์ต้านเอนไซม์อีลาสเทสไม่เท่ากัน เนื่องจากมีประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระได้ไม่เท่ากัน (Masashiro *et al*., 2002) น้ำมันหอมระเหยจากขิงแก่สดจากการต้มกลั่นมีประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระ 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) มีค่า % scavenging effect เท่ากับ 97.16% รองลงมาคือ น้ำมันหอมระเหยจากขิงแก่แห้งจากการต้มกลั่น 88.79% (วทันยา ลิมปพะยอม และณัฏฐา เลาหกุลจิตต์, 2557) น้ำมันหอมระเหยจากเกสรบัวหลวงราชินีที่สกัดด้วยตัวทำละลายมีค่า IC_{50} เท่ากับ 31.00$\pm$0.94 μg/ml มีประสิทธิภาพน้อยกว่าวิตามินซีที่มีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.75$\pm$0.22 μg/ml [1] น้ำมันหอมระเหยยังถูกใช้ในอุตสาหกรรมอาหารสัตว์เป็นจำนวนมาก โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อเป็นสารเสริมสุขภาพให้แก่สัตว์ ป้องกันการเกิดออกซิเดชันของอาหารสัตว์ ลดต้นทุนในการใช้สารเสริมสุขภาพสัตว์ และทดแทนการใช้สารสังเคราะห์ที่อาจเป็นอันตรายต่อ

สัตว์ (Brenes and Roura, 2010).นอกจากนี้ในอุตสาหกรรมการเลี้ยงสัตว์ในประเทศไทย ได้มีการนำวัตถุดิบที่เสริมเติมลงในอาหารสัตว์ (feed additives) โดยเฉพาะสารปฏิชีวนะเร่งการเจริญเติบโต (antibiotic growth promoter) และการรักษาโรค ซึ่งการนำเข้าวัตถุเหล่านี้ ทำให้เสียดุลทางการค้าและมีผลกระทบต่อตัวสัตว์ สิ่งแวดล้อม และมนุษย์ทั้งสิ้น ดังนั้นปัจจุบันจึงมีการนำสมุนไพรพื้นบ้านมาใช้ประโยชน์ทางเภสัชวิทยา เพื่อรักษาสุขภาพสัตว์สารประกอบในพืชที่มีฤทธิ์ทางยาที่สำคัญ คือสารประกอบฟีนอลิก (phenolic compound) เป็นสารที่ละลายน้ำ และสามารถสกัดด้วยอีเทอร์และเอทานอล ทำให้ทั้งวงการแพทย์และอุตสาหกรรมกาเลี้ยงสัตว์จึงนำเอาพืชหรือผลไม้ที่มีสารประกอบฟีนอลิกสูงมาใช้ร่วมในการป้องกันและรักษาโรคต่าง ๆ มากมาย

ผิวหนังของคน เป็นอวัยวะที่สำคัญอย่างหนึ่งในระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย ในการปกป้องสิ่งแปลกปลอมจากเชื้อโรค (แอนติเจน) โดยเซลล์ของผิวหนังในขบวนการย่อยหรือทำลายแอนติเจนของผิวหนังโดย Langerhans cells ซึ่งมีแขนขายื่นออกไปเป็นร่างแหในผิวหนังกำพร้า (epidermis) ซึ่งจะทำหน้าที่จับสารแปลกปลอมแล้วสลายเป็นชิ้นเล็ก ๆ แล้วนำไปไว้ที่ต่อมน้ำเหลือง เพื่อให้เซลล์คุ้มกันตัวอื่น คือ เม็ดเลือดขาว (T-lymphocyte) สร้างภูมิคุ้มกัน (antibody) แล้วถูกทำลายไปโดย macrophage แสงแดดเป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้มีการทำงานของเม็ดสีผิดปกติ ทำให้เกิดฝ้า กระ รอยด่างดำ ปัจจุบันผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางที่ทำให้ผิวขาวเป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้รับความนิยมในทุกเพศทุกวัย โดยทั่วไปผลิตภัณฑ์ให้ผิวขาวมักใช้สารเคมีในการยับยั้งการสร้างเมลานิน (ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส) ได้แก่ สารประกอบของปรอทและไฮโดรควิโนน สารทั้งสองชนิดมีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส แต่อาจเป็นอันตรายต่อผิว และระบบอื่นๆ ของร่างกาย ทั้งนี้กระทรวงสาธารณสุขได้ประกาศห้ามใช้สารทั้งสองชนิดนี้เป็นส่วนผสมในเครื่องสำอาง (อรลักษณ์, 2554) ในปัจจุบันมีผู้ให้ความสนใจในการนำสมุนไพรมาประยุกต์ใช้ด้านเวชสำอางเพิ่มมากขึ้น ไม่ว่าจะเป็นผลิตภัณฑ์เสริมอาหารและด้านผลิตภัณฑ์บำรุงผิว ทั้งนี้เพราะผู้บริโภคตระหนักถึงความปลอดภัยในการใช้ผลิตภัณฑ์มากขึ้น อีกทั้งปัจจุบันยังมีวิทยาการในการสกัดสารออกฤทธิ์จากสมุนไพรที่ก้าวหน้า ข้อมูลการศึกษาคุณสมบัติทั้งทางเคมี กายภาพ และประสิทธิภาพการใช้สมุนไพรที่น่าเชื่อถือ

สารพฤกษเคมี (phytonunutrients) พบในพืช ที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่สำคัญ ได้แก่ แอนทราควิโนนไกลโคไซด์ (anthraquinone glycoside) มีฤทธิ์เป็นยาระบาย (Sakulpanich and Grissanapan, 2008) สารประกอบฟีนอลิก (phenolic compounds) และสารฟลาโวนอยด์ (flavonoids) มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน (Beer *et al*., 2002; Pourmorad *et al*., 2006) ต้านการอักเสบ (Sharma *et al*., 2011) ในปัจจุบันสารสารพฤกษเคมีที่ได้รับความสนใจมาก ได้แก่ สารประกอบฟีนอลิกและสารฟลาโวนอยด์ เนื่องจากสารกลุ่มนี้มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่หลากหลายโดยเฉพาะฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (พิชญ์อร, 2549; พิสมัย, 2548; Ghasemzadeh *et al*., 2010)

สารในกลุ่มฟลาโวนอยด์เหมาะที่จะนำมาพัฒนาพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์บำรุงผิว ที่เหมาะกับทุกสภาพผิวทั้งใบหน้าและเรือนร่าง มีสรรพคุณช่วยเพิ่มความชุ่มชื้นให้กับเซลล์ผิวหนัง ต่อต้านการเกิดริ้วรอยก่อนวัยและป้องกันการเกิดมะเร็งผิวหนัง ดังนั้นโครงการวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อวิเคราะห์หาปริมาณฟลาโวนอยด์และฤทธิ์ยับยั้งการสังเคราะห์เม็ดสี เมลานินของน้ำมันว่านน้ำ สำหรับประยุกต์ใช้ในการพัฒนาผลิตภัณฑ์สุขภาพและเวชสำอาง ก็จะเป็นประโยชน์ต่อผู้บริโภค อีกทั้งเพื่อเป็นการเพิ่มมูลค่าให้กับวัชพืชอีกทางหนึ่งด้วย

ว่านน้ำ (*Acorus calamus* L.) อยู่ในวงศ์ Acoraceae ชื่อสามัญ Calamus, Calamus Flargoot, Flag Root, Mytle Grass, Myrtyl sedge, Sweet Flag, Sweet Sedge ชื่อท้องถิ่น ได้แก่ ว่านน้ำเล็ก ตะไคร้น้ำ คาเจียงจี้ ทิสีปุตอ ผมผา สัมชื่น ฮางคาวน้ำ ฮางคาวบ้าน ว่านน้ำมีข้อมูลทางคลีนิค คือ รักษาอาการกระจกตาอักเสบ รักษาอาการลำไส้อักเสบ ข้อมูลทางเภสัชวิทยา คือ มีฤทธิ์ในการรักษาอาการชัก มีฤทธิ์ระงับอาการไอและขับเสมหะ จากคุณสมบัติของน้ำมันหอมระเหยที่มีสารประกอบฟีนอลิก ฤทธิ์เป็นสาร

ต้านอนุมูลอิสระ มีประโยชน์ในด้านเวชสำอาง คือนำน้ำมันหอมระเหยดังกล่าวไปพัฒนาในการตั้งตำรับเพื่อใช้ในการบำรุงผิว เนื่องจากคุณสมบัติของน้ำมันหอมระเหยที่สามารถต่อต้านอนุมูลอิสระ ทำให้ลบเลือนริ้วรอย ต้านการอักเสบ หรือลดการเกิดเม็ดสีเมลานิน ซึ่งสามารถนำไปพัฒนาเป็นตำรับที่ใช้ในเวชสำอางต่อไป ดังนั้นการส่งเสริมการผลิตน้ำมันหอมระเหยอย่างจริงจัง ทั้งในด้านการวิจัยและพัฒนาการผลิตเพื่อการส่งออกของประเทศ การตรวจสอบปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของสารจึงนับเป็นเรื่องจำเป็นที่จะช่วยเพิ่มแนวทางในการนำไปใช้ประโยชน์ ดังนั้นการผลิตผลิตภัณฑ์ที่มีส่วนผสมของน้ำมันหอมระเหยจากธรรมชาติที่มีคุณภาพและได้มาตรฐานจึงเป็นสิ่งสำคัญยิ่งโครงการวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อหาปริมาณเบต้าแคโรทีน สารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของน้ำมันหอมระเหยจากว่านน้ำที่มีคุณสมบัติเหมาะสมในการพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์

ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงวิเคราะห์หาปริมาณฟลาโวนอยด์และทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการสังเคราะห์เม็ดสีเมลานินของน้ำมันว่านน้ำ สำหรับเป็นข้อมูลเบื้องต้นในการศึกษาและใช้ประโยชน์ทางด้านเภสัชวิทยาของน้ำมันหอมระเหยจากว่านน้ำ

1.2 หลักการ แนวคิด ทฤษฎี

ชีววิทยาของว่านน้ำ

ชื่อท้องถิ่น: ว่านน้ำเล็ก ตะไคร้น้ำ คาเจียงจี้ ทิสีปุตอ ผมผา สัมชื่น ฮางคาวน้ำ ฮางคาวบ้าน

ชื่อสามัญ:Calamus, CalamusFlargoot, Flag Root, Mytle Grass, Myrtyl sedge, Sweet Flag, Sweet Sedge

ชื่อวิทยาศาสตร์: *Acoruscalamus* L.

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์:

ต้นว่านน้ำกำเนิดในทวีปยุโรป จัดเป็นพรรณไม้ขนาดเล็ก มีความสูงของต้นประมาณ 50-80 เซนติเมตร และมีเหง้าเจริญเติบโตไปตามยาวขนานกับพื้นดิน เหง้าเป็นรูปทรงกระบอกค่อนข้างแบน ลักษณะเป็นข้อ ๆ ผิวนอกเป็นสีน้ำตาลอ่อนหรือสีน้ำตาลอมชมพู มีรากฝอยเป็นเส้นเล็กยาวติดอยู่ทั่วไป พันรุงรังไปตามข้อปล้องของเหง้า เนื้อภายในเป็นสีเนื้อแก่ มีกลิ่นหอม รสเผ็ดร้อนฉุนและขม มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 5-10 มิลลิเมตร ขยายพันธ์โดยวิธีการแยกหน่อ มักพบขึ้นเองตามบริเวณริมหนองน้ำ สระ บ่อ คู คลอง ในที่ที่มีน้ำท่วมขัง หรือที่ชื้นแฉะหรือแหล่งน้ำตื้น

ใบว่านน้ำใบเป็นใบเดี่ยว เรียงสลับกันซ้ายขวาแบบทแยงกัน ใบแตกออกมาจากเหง้าเป็นเส้นตรงและยาวลักษณะของใบเป็นรูปเรียวแหลม ปลายใบแหลม ใบมีขนาดกว้างประมาณ 1-2 เซนติเมตร และยาวประมาณ 80-110 เซนติเมตร แผ่นใบเรียบ

ดอกว่านน้ำออกดอกเป็นช่อ แทงออกจากเหง้า ลักษณะดอกเป็นแท่งทรงกระบอก เป็นสีเหลืองออกเขียว ดอกมีขนาดประมาณ 0.7-1.5 เซนติเมตร และยาวประมาณ 5-10 เซนติเมตร ประกอบด้วยดอกย่อยเรียงตัวติดแน่น กลีบเลี้ยงดอกมี 6 กลีบ ลักษณะเป็นรูปกลม ปลายกลีบโค้งงอ

น้ำมันหอมระเหย

น้ำมันหอมระเหย (essential oil) คือน้ำมันที่พืชสังเคราะห์ขึ้น เป็นกลุ่มสารอินทรีย์และเก็บไว้ในส่วนต่าง ๆ เช่น ดอก ใบผล ลำต้น และเมล็ดซึ่งพบแตกต่างกันไปในพืชแต่ละชนิด น้ำมันหอมระเหยมักมีกลิ่นหอมและระเหยได้ง่ายที่อุณหภูมิปกติ ในอดีตชาวอียิปต์สกัดน้ำมันหอมระเหยได้โดยวิธีการแช่ ชาวกรีกและชาวโรมันใช้วิธีการกลั่นจากนั้นนำน้ำมันหอมระเหยมาใช้ในการนวดบำบัดโรคและผลิตน้ำหอมเพื่อเป็นการเพิ่มมูลค่าให้กับน้ำมันหอมระเหย (Osborn, 2007) ประเทศบราซิล จีน อเมริกา อินโดนีเซีย อินเดีย และ

เม็กซิโก เป็นประเทศที่มีการผลิตน้ำมันหอมระเหยมากที่สุดในโลก ส่วนประเทศอเมริกา ญี่ปุ่น เยอรมันนี และฝรั่งเศส เป็นกลุ่มประเทศที่มีการใช้น้ำมันหอมระเหยมากที่สุดในโลก (Djilani and Dicko, 2012) ความหอม องค์ประกอบทางเคมี ปริมาณการผลิตน้ำมันหอมระเหยจากพืชในแต่ละปีอาจจะแปรผันได้ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายประการ เช่น พื้นที่เพาะปลูก ดิน สภาพอากาศ ความสูงจากระดับน้ำทะเล ปริมาณน้ำฝน ฤดูกาล (ก่อนและหลังก่อนออกดอก) โรคพืช และช่วงเวลาในการเก็บเกี่ยว (Daviet and Schalk, 2010; Andrade *et al*., 2011) ตลอดจนเทคนิคและวิธีการสกัดและการกลั่นล้วนมีผลต่อปริมาณและคุณภาพน้ำมันหอมระเหย ดังนั้นน้ำมันหอมระเหยจึงมีราคาสูงเนื่องจากมีปริมาณจำกัดและใช้เทคนิคหลายขั้นตอน ในปัจจุบันน้ำมันหอมระเหยที่ได้รับความนิยมอย่างมากในตลาดผู้บริโภคทั่วโลก ถูกนำมาใช้ในทางการแพทย์ อาหารและเครื่องดื่ม สปาและการผ่อนคลาย การทำความสะอาด น้ำมันหอมระเหยที่ใช้ในครัวเรือน ได้แก่ น้ำมันหอมระเหยจากลาเวนเดอร์ คาโมมายล์ เปเปอร์มินต์ กุหลาบ มะลิ ส่วนน้ำมันหอมระเหยที่นิยมใช้ในอุตสาหกรรม ได้แก่ น้ำมันหอมระเหยจากส้ม ยูคาลิปตัส มะนาว และตะไคร้หอม (Hunter, 2009)

น้ำมันหอมระเหยมีคุณสมบัติในการช่วยบรรเทาความเครียด ทำให้สดชื่นและเพิ่มพลังงานแก่ผู้ใช้ อีกทั้งยังมีฤทธิ์ทางชีวภาพ เช่น การต้านเชื้อแบคทีเรีย เชื้อจุลินทรีย์ เชื้อไวรัส และมีการอ้างว่าสามารถบรรเทาอาการของโรคอัลไซเมอร์ โรคหลอดเลือดอุดตัน โรคปวดกล้ามเนื้อ ปวดท้องก่อนคลอด และโรคมะเร็ง (Perry and Perry, 2006; Jimbo *et al*., 2009; Smith *et al*., 2011; Lai *et al*., 2011) นอกจากนี้ พบว่าการใช้น้ำมันหอมระเหยธรรมชาติจะมีประสิทธิภาพในการบำบัดโรคได้ดีกว่าการใช้น้ำมันหอมระเหยสังเคราะห์ซึ่งมักมีสารระคายเคืองผิวผสมอยู่ด้วย (Celeiro *et al*., 2014)

1) สมบัติของน้ำมันหอมระเหย

น้ำมันหอมระเหยจะระเหยได้ง่าย ส่วนใหญ่จะเป็นของเหลวที่มีลักษณะเป็นน้ำมัน มีส่วนน้อยที่เป็นของแข็ง ไม่ละลายน้ำ ละลายใน ethyl alcohol น้ำมันหอมระเหยประกอบขึ้นด้วยสารประกอบออกซิเจน เช่น แอลกอฮอล์ แอลดีไฮด์และคีโทน มีจุดเดือด อยู่ระหว่าง 150-300 องศาเซลเซียส แบ่งชนิดของน้ำมันหอมระเหยตามชนิดขององค์ประกอบได้ดังนี้

1.1) hydrocarbon volantile oilน้ำมันหอมระเหยมีไฮโดรคาร์บอนเป็นองค์ประกอบหลักพบได้ทั้งในรูปไฮโดรคาร์บอนโมโนไซคลิกเทอร์ปีน เช่น limoneneซึ่งพบได้ในน้ำมันมิ้นต์ น้ำมันจากส้ม กระวาน และน้ำมันสน และ p-cymene ซึ่งพบได้ในน้ำมันลูกผักชี อบเชย ยังพบไฮโดรคาร์บอนในรูปไดไซคลิกโมโนเทอร์ปีน เช่น pineneซึ่งพบในน้ำมันยูคาลิปตัส น้ำมันดอกส้ม และน้ำมันลูกผักชี

1.2) alcohol volantile oilน้ำมันหอมระเหยที่มีแอลกอฮอล์ เป็นองค์ประกอบหลัก ที่สำคัญได้แก่น้ำมันมินต์ น้ำมันลูกผักชี น้ำมันดอกส้ม ดอกกุหลาบ น้ำมันสน ได้แก่ geraniolcitronellolซึ่งเป็น acyclic alcohol ส่วน menthol ซึ่งเป็น acyclic alcohol

1.3) aldehyde volantile oilน้ำมันหอมระเหยที่มีสารจำพวกแอลดีไฮด์ ได้แก่ น้ำมันอบเชย ส้ม มะนาว และตะไคร้หอม ตัวอย่างของ aldehyde ที่พบได้แก่ geranial, neral

1.4) ketone volantile oilมีสารจำพวกคีโทน ตัวอย่างคีโทน ได้แก่ menthone, pule gone เป็น monocyclic terpene ketone นอกจากนี้ยังพบ camphor, fenchoneซึ่งเป็น dicyclic ketone น้ำมันหอมระเหยที่สำคัญในกลุ่มนี้ ได้แก่ การบูร มินต์

1.5) phenol volantile oilฟีนอลที่พบ ได้แก่ eugenol, thymol, carvacrolน้ำมันหอมระเหยในกลุ่มนี้ ได้แก่ น้ำมันกานพลู

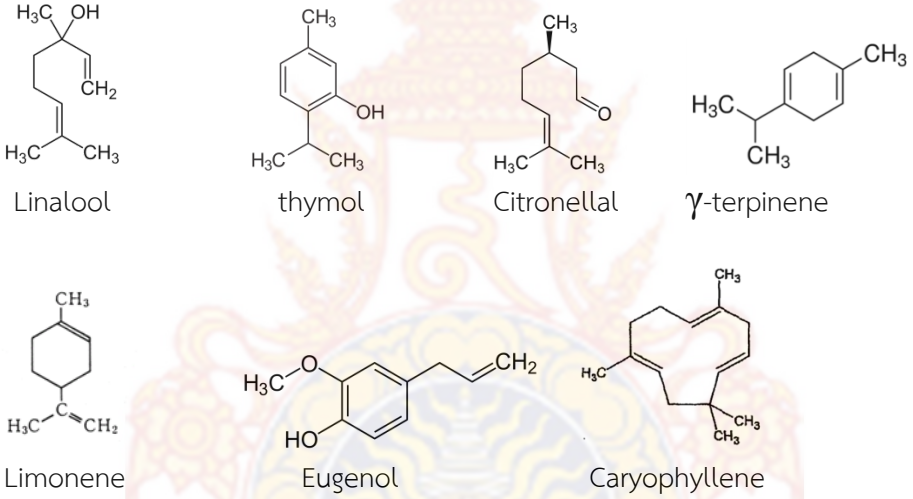
1.6) phenolic volantile oilตัวอย่างน้ำมันหอมระเหยที่สำคัญในกลุ่มนี้ ได้แก่ น้ำมันโป๊ยกั๊กซึ่งพบสาร anetholeน้ำมันจันเทศ และน้ำมัน sassafras

1.7) oxide volantile oilตัวอย่างของสารออกไซด์ที่พบในน้ำมันหอมระเหย ได้แก่ cineole ซึ่งพบในน้ำมันยูคาลิปตัส

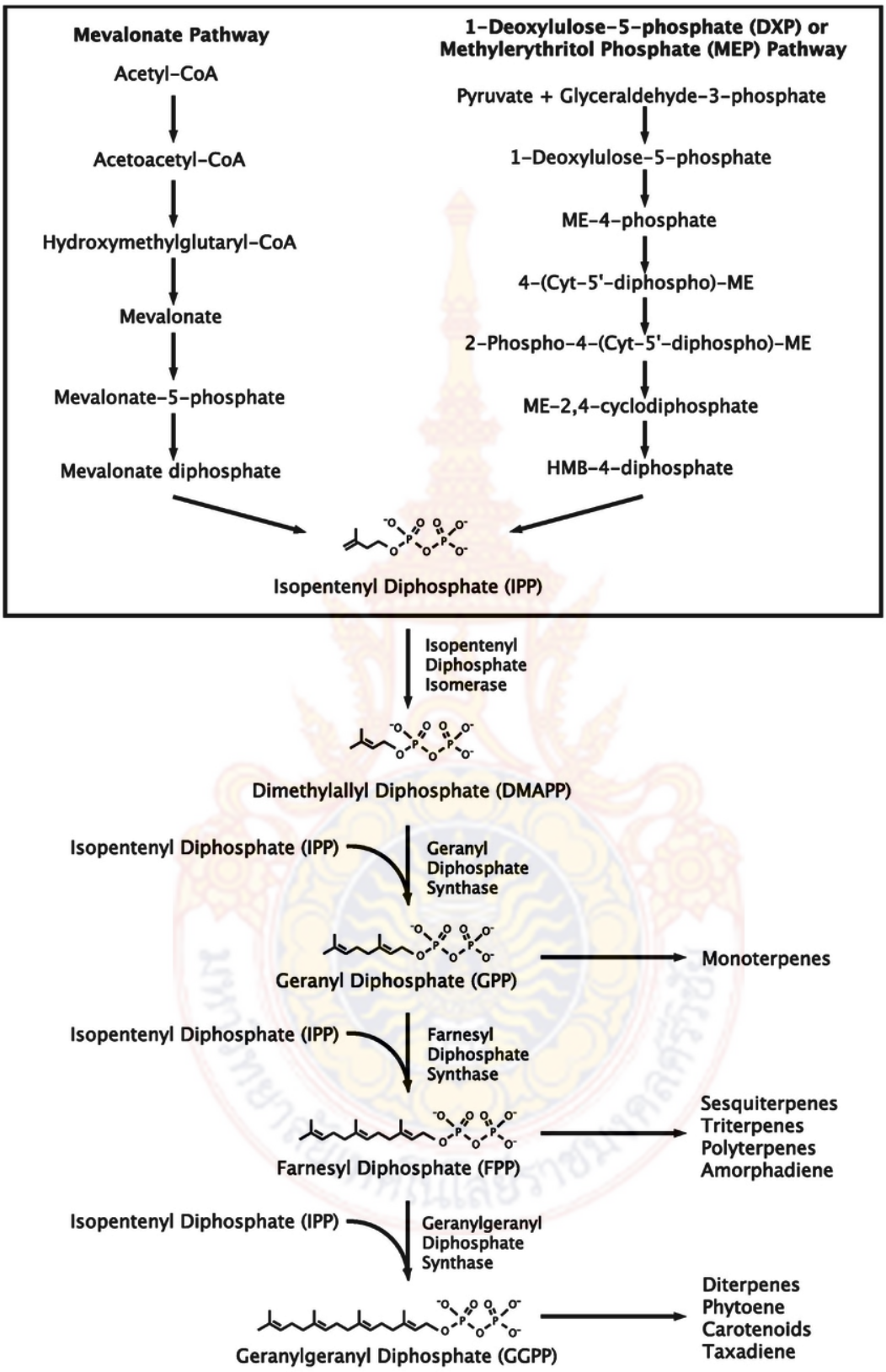
1.8) ester volantile oilตัวอย่างได้แก่ allylisothiocyanateพบในน้ำมันมัสตาด methyl salicylate พบได้ใน wintergreen oil

ชีวสังเคราะห์น้ำมันหอมระเหย

น้ำมันหอมระเหย เป็นสารที่ไม่ชอบน้ำ ละลายในแอลกอฮอล์ เป็นสารไม่มีขั้ว มีส่วนผสมของสารไฮโดรคาร์บอน มีหมู่ฟังก์ชันประเภทแอลกอฮอล์ อัลดีไฮด์ เอสเตอร์ อีเทอร์ คีโตน ฟีนอล และเทอร์พีน ส่วนมากไม่มีสีหรือสีเหลืองอ่อน ๆ ยกเว้น คาโมมายล์ ที่มีสีน้ำเงิน มีความหนาแน่นน้อยกว่าน้ำ ยกเว้น น้ำมันหอมระเหยจากต้นแซสซาฟรัส (*Sassafras albidum*) แฝกหอม (*Vetiveria zizanioides*) อบเชย (*Cinnamomum velum*) และกานพลู (*Syzygium aromaticum*) (Gupta *et al.,* 2010; Martin *et al.,* 2010) สารระเหยง่ายที่เป็นองค์ประกอบหลักของน้ำมันหอมระเหยที่เป็นที่นิยม ได้แก่ สาร linalool (ลาเวนเดอร์) thymol (ต้นทีทรี) Citronellal (ตะไคร้หอม) limonene (มะนาว) Eugenol (กานพลู) β-Caryophyllene (โรสแมรี่) และ γ-terpinene (มะกรูด)



ภาพที่ 1.1 โครงสร้างของสารธรรมชาติในน้ำมันหอมระเหยจากพืช



ภาพที่ 1.2 isoprenoid pathway
(Zuzarte and Salgueiro, 2015)

สารทุติยภูมิกลุ่มใหญ่ที่พืชสังเคราะห์โดย isoprenoid pathway ได้แก่ monoterpene และ sesquiterpene เป็นสารที่ได้มาจากการควบแน่นของ isopentanyl diphosphate (IPP) และ dimethyllyl diphosphate (DMAPP) วิถีที่จะนำไปสู่การผลิตสารตั้งต้นสองตัวนี้ คือ วิถี 1-deoxyxylulose –D-5-phosphate (DXP) หรือ 2-C-methyl-D-erythritol-4-phosphate pathway (MEP) และ mevalonate pathway (MVA) วิถี MVA พบในเห็ด เชื้อรา สัตว์ และไซโตซอลของเซลล์พืชเท่านั้น ส่วนวิถี MEP พบในแบคทีเรียและพลาสติดในเซลล์พืช การควบแน่นของ IPP และ DMAPP อาศัยเอนไซม์ prenyltransferase ได้เป็น geranyl diphosphate (GPP) farnesyl diphosphate (FPP) และ geranylgeranyl diphosphate (GGPP) จากนั้นเกิดปฏิกิริยาไซโคลเซชั่นของ GPP, FPP และ GGPP ได้เป็น mono-, sesqui- และ diterpenes จากนั้นอาศัยเอนไซม์ cytochrome P450 monooxygenase และ oxidoreductases ในการทำหน้าที่ปรับเปลี่ยนโครงสร้างเพื่อให้ได้เป็นเทอร์พีนอีกหลายชนิดที่พบได้ในธรรมชาติ

ประเภทของสารประกอบในน้ำมันหอมระเหย

โครงสร้างของน้ำมันหอมระเหยประกอบด้วยพันธะคู่โอลีฟีนิก (olefenic double bond) และหมู่ฟังก์ชัน เช่น หมู่ไฮดรอกซิล อัลดีไฮด์หรือเอสเตอร์ เมื่อได้รับแสงแดดและความร้อนจะถูกออกซิไดซ์ได้โดยง่าย สารประกอบในน้ำมันหอมระเหยแบ่งได้เป็น 8 ประเภท ดังแสดงในตารางที่ 1.1

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย

ตารางที่ 1.1 ชนิดและฤทธิ์ทางชีวภาพของสารประกอบที่พบในน้ำมันหอมระเหย (Djilani and Dicko, 2012)

ชนิดของสารประกอบ	ตัวอย่างสารประกอบ	ฤทธิ์ทางชีวภาพ
1.ไฮโดรคาร์บอน	Limonene, pinene, sabinene, cymene, myrcene, phellandrene	เป็นสารกระตุ้น ต้านไวรัส ต้านมะเร็ง ต้านแบคทีเรีย ป้องกันโรคตับ
2.เอสเตอร์	Linalyl acetate, geraniol acetate, eugenol acetate, bornyl acetate	ผ่อนคลายกล้ามเนื้อ ต้านการอักเสบ
3.ออกไซด์	Bisabolone oxide, linalool oxide, scareol oxide, ascaridole	เป็นสารกระตุ้น ต้านการอักเสบ แก้ไอ
4. แลคโตน	Nepetalactone, bergaptene, costuslactone, dihydronepetalactone, alantrolactone	ต้านจุลชีพ ต้านไวรัส บรรเทาเจ็บปวด ลดไข้
5. แอลกอฮอล์	Linalool, menthol, borneol, santalol, nerol, citronellol, geraniol	ต้านจุลชีพ ผ่อนคลายกล้ามเนื้อ ต้านอักเสบ
6. ฟีนอล	Thymol, eugenol, carvacrol, chavicol	ต้านจุลชีพ ผ่อนคลายกล้ามเนื้อ กระตุ้นระบบภูมิคัน
7. อัลดีไฮด์	Citral, myrtenal, cuminaldehyde, citronellal, cinnamaldehyde, benzaldehyde	ต้านจุลชีพ ต้านเชื้อรา ช่วยให้หลอดเลือดขยายตัว ผ่อนคลายกล้ามเนื้อ ลดไข้
8. คีโตน	Carvone, methone, pulegone, fenchone, camphor, thujone, verbenone	ละลายเสมหะ สร้างเซลล์ใหม่ ต้านไวรัส ช่วยย่อยอาหาร บรรเทาอาการปวด

วิธีการสกัดน้ำมันหอมระเหย

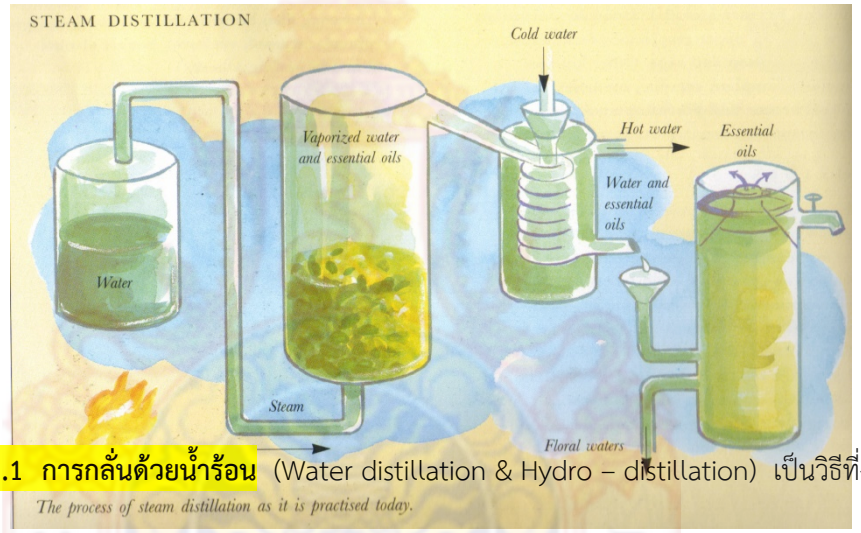
1. การกลั่นน้ำมันหอมระเหย (distillation)

การกลั่นเป็นวิธีหนึ่งที่นิยมใช้กันอย่างแพร่หลายในการสกัดน้ำมันหอมระเหย หลักการของการกลั่นคือ ใช้น้ำร้อนหรือไอน้ำเข้าไปแยกน้ำมันหอมระเหยออกมาจากพืช โดยการแทรกซึมเข้าไปในเนื้อเยื่อพืช ความร้อนจะทำให้สารละลายออกมากลายเป็นไอ ปนมากับน้ำร้อนหรือไอน้ำ อย่างไรก็ดี การกลั่นเพื่อให้ได้

น้ำมันหอมระเหยที่มีคุณภาพดีนั้น ต้องอาศัยเทคนิคและขบวนการทางเคมีและกายภาพหลายอย่างประกอบกัน โดยทั่วๆ ไปเทคนิคการกลั่นน้ำมันหอมระเหยที่ใช้กันอยู่มี 3 วิธี ได้แก่

1.1 การกลั่นด้วยน้ำร้อน (Water distillation & Hydro – distillation) เป็นวิธีที่ง่ายที่สุดของการกลั่นน้ำมันหอมระเหย การกลั่นโดยวิธีนี้ พื้นที่กลั่นต้องจุ่มในน้ำเดือดทั้งหมด อาจพบพืชบางชนิดเบา หรือให้ท่อไอน้ำผ่านการกลั่น น้ำมันหอมระเหยนี้ใช้กับของที่ติดกันง่ายๆ เช่น ใบไม้บางๆ กลีบดอกไม้อ่อนๆ

ข้อควรระวังในการกลั่นโดยวิธีนี้คือ พืชจะได้รับความร้อนไม่สม่ำเสมอ ตรงกลางมักจะได้ความร้อนมากกว่าด้านข้าง จะมีปัญหาในการไหม้ของตัวอย่าง กลิ่นไหม้จะปนมากับน้ำมันหอมระเหยและมีสารไม่พึงประสงค์ติดมาในน้ำมันหอมระเหยได้ วิธีแก้ไข คือ ใช้ไอน้ำ หรืออาจใช้ closed steam coil จุ่มในหม้อต้ม แต่การใช้ steam coil นี้ไม่เหมาะกับดอกไม้บางชนิด เพราะเมื่อกลีบดอกไม้ถูก steam coil จะหดกลายเป็น glutinous mass จึงต้องใช้วิธีใส่ลงไปในน้ำ กลีบดอกไม้จะสามารถหมุนเวียนไปอย่างอิสระในการกลั่นเปลือกไม้ก็เช่นกัน ถ้าใช้วิธีกลั่นด้วยน้ำ น้ำจะซึมเข้าไปและนำกลิ่นออกมา หรือกลิ่นจะแพร่กระจายออกจากเปลือกไม้ได้ง่ายขึ้น ดังนั้นการเลือกใช้วิธีการกลั่นจึงขึ้นกับชนิดของพืชที่นำมากลั่นด้วย



The process of steam distillation as it is practised today.

1.1 การกลั่นด้วยน้ำร้อน (Water distillation & Hydro – distillation) เป็นวิธีที่ง่ายที่สุดของการกลั่นน้ำมันหอมระเหย การกลั่นโดยวิธีนี้ พื้นที่กลั่นต้องจุ่มในน้ำเดือดทั้งหมด อาจพบพืชบางชนิดเบา หรือให้ท่อไอน้ำผ่านการกลั่น น้ำมันหอมระเหยนี้ใช้กับของที่ติดกันง่ายๆ เช่น ใบไม้บางๆ กลีบดอกไม้อ่อนๆ

1.2 การกลั่นด้วยน้ำและไอน้ำ (water and steam distillation) การกลั่นโดยวิธีนี้ใช้ตะแกรงรองของที่จะกลั่นให้เหนือระดับน้ำในหม้อกลั่น ต้มให้เดือด ไอน้ำจะลอยตัวขึ้นไปผ่านพืชหรือตัวอย่างที่จะกลั่น ส่วนน้ำจะไม่ถูกกับตัวอย่างเลย ไอน้ำจากน้ำเดือดเป็นไอน้ำที่อิ่มตัว หรือเรียกว่า ไอเปียก ไม่ร้อน จัดเป็นการกลั่นที่สะดวกที่สุด คุณภาพของน้ำมันออกมาดีกว่าวิธีแรก การกลั่นแบบนี้ใช้กันอย่างกว้างขวางในการผลิตน้ำมันหอมระเหยทางการค้า

1.3 การกลั่นด้วยไอน้ำ (direct steam distillation) วิธีนี้วางของอยู่บนตะแกรงในหม้อกลั่น ซึ่งไม่มีน้ำอยู่เลย ไอน้ำภายนอกที่อาจจะเป็นไอน้ำเปียก หรือไอร้อนจัดแต่ความดันสูงกว่าบรรยากาศ ส่งไปตามท่อใต้ตะแกรง ให้ไอผ่านขึ้นไปถูกกับของบนตะแกรง ไอน้ำต้องมีปริมาณเพียงพอที่จะช่วยให้น้ำมันแพร่ระเหยออกมาจากตัวอย่าง ตัวอย่างบางชนิดอาจใช้ไอร้อนได้ แต่บางชนิดก็ใช้ไอเปียก น้ำมันจึงจะถูกปล่อยออกมา

ข้อดีของการกลั่นวิธีนี้ คือ สามารถกลั่นได้อย่างรวดเร็ว เมื่อเอาพืชใส่หม้อกลั่นไม่ต้องเสียเวลารอให้ร้อน ปล่อยไอร้อนเข้าไปได้เลย ปริมาณของสารที่นำเข้ากลั่นก็ได้มาก ปริมาณทำให้ได้น้ำมันหอมระเหยมาก

การกลั่นทั้ง 3 วิธี ผู้ปฏิบัติควรพิจารณาด้วยว่า การแพร่กระจายของน้ำมันหอมระเหยและน้ำร้อยผ่านเยื่อบาง ๆ ของพืช การไฮโดรไลซ์สาร องค์ประกอบต่างๆ เนื่องจากสัมผัสกับน้ำตลอดเวลา ตลอดจนการสลายตัวของสารในน้ำมันหอมระเหย อันเนื่องมาจากความร้อนถึงแม้ว่าก่อนนำพืชมากลั่นจะต้องหั่นหรือทำให้เซลล์แตกก่อน เพื่อให้ได้น้ำมันหอมระเหยออกมาจากเซลล์ได้ง่าย แต่ถึงกระนั้น ก็ยังมีน้ำมันหอมระเหยบางส่วนที่อยู่ที่ผิวและถูกทำให้กลายเป็นไออย่างรวดเร็วด้วยไอน้ำ น้ำมันส่วนที่เหลือภายในจะออกมาสู่ผิวได้โดยการซึมผ่านผนังบางๆ ของพืช และจะดำเนินไปได้ดีที่อุณหภูมิสูง สารประกอบพวกเอสเทอร์จะถูกไฮโดรไลซ์ให้เป็นกรด และแอลกอฮอล์ได้ง่าย ดังนั้นเพื่อให้ได้น้ำมันหอมระเหยที่มีคุณภาพดีที่สุด ควรกลั่นที่อุณหภูมิต่ำสุดเท่าที่จะทำได้ หากได้น้ำมันน้อย ควรใช้อุณหภูมิสูงขึ้น ใช้เวลาให้สั้นที่สุด การกลั่นจะต้องพิจารณาให้รอบคอบ วัดอุณหภูมิและเวลาให้อยู่ในช่วงที่เหมาะสมที่สุด

ในการกลั่นน้ำมันหอมระเหยทั้ง 3 วิธีนี้ สามารถทำเองได้ อุปกรณ์ที่สำคัญสำหรับใช้กลั่น มี 3 อย่าง คือ หม้อกลั่น (still) เครื่องควบแน่น (condenser) และภาชนะรองรับ (receiver) การกลั่นด้วยไอน้ำจะต้องมีหม้อต้มน้ำ (boiler) สำหรับทำไอน้ำเพิ่มอีกอย่างหนึ่ง

หม้อกลั่น (still) น้ำหรือไอน้ำ จะสัมผัสกับพืชในภาชนะ ซึ่งมีรูปร่างที่ง่ายที่สุดเป็นถังทรงกระบอก ทำด้วยเหล็กหรือทองแดง เส้นผ่าศูนย์กลางเท่าหรือน้อยกว่าความสูงเล็กน้อย มีฝาเปิด – ปิดได้ ด้านบนมีท่อต่อสายรัดให้ไอน้ำพาน้ำมันหอมระเหยไปสู่เครื่องควบแน่น ถ้าเป็นการกลั่นแบบใช้น้ำผสมไอน้ำ ต้องมีตะแกรงวางตัวอย่างที่จะกลั่นให้สูงกว่าก้นหม้อกลั่น ส่วนการกลั่นด้วยไอน้ำ น้ำจะถูกฉีดเข้าไปใต้ตะแกรงนั้น ก้นหม้อกลั่นจะต้องมีท่อก๊อกระบายน้ำที่กลั่นตัวลงหม้อกลั่น และฝาควรมีฉนวนหุ้มกันความร้อนสูญหาย

เครื่องควบแน่น (condenser) ส่วนผสมของไอน้ำและน้ำมันหอมระเหยที่ออกมาจากหม้อกลั่น จะถูกส่งผ่านไปยังเครื่องควบแน่น ซึ่งทำหน้าที่เปลี่ยนไอน้ำและน้ำมันหอมระเหยให้เป็นของเหลว ลักษณะเป็น coil ม้วนอยู่ใต้ถังที่มีน้ำเย็นผ่านจากด้านล่าง สวนทางกับไอน้ำ และน้ำมันหอมระเหยที่นิยมอีกแบบหนึ่ง คือ ให้ไอน้ำและน้ำมันหอมระเหยผ่านในท่อ (tube) ให้น้ำเย็นไหลเวียนรอบๆ tube เครื่องควบแน่นควรมีขนาดใหญ่พอให้ไอกลั่นตัวเร็ว เพื่อจะได้น้ำมันหอมระเหยที่มีคุณภาพ ถ้านานไปจะทำให้เกิดไฮโดรไลซ์ของเอสเทอร์ วัสดุที่เป็น coil หรือ tube ควรใช้ทองแดงผสมดีบุกที่รองรับน้ำหรือน้ำมันหอมระเหย (receiver) น้ำมีปริมาณมากกว่าน้ำมันจึงต้องมีการไขน้ำทิ้งตลอดเวลา ส่วนนี้จึงทำหน้าที่แยกน้ำ และน้ำมันหอมระเหย ถ้าน้ำมันเบากว่าน้ำ น้ำมันก็จะอยู่ที่ส่วนบน ไขน้ำด้านล่างออก ถ้าน้ำมันหนักกว่าน้ำ น้ำมันจะอยู่ด้านล่าง ก็ไขน้ำด้านบนออก เครื่องมือในห้องปฏิบัติการมักเป็นแก้วมองเห็นได้ง่าย ปริมาณน้อยกว่า 10 ลิตร แต่ถ้ามากกว่า 10 ลิตร ควรเป็นทองแดงผสมดีบุก ไม่ควรใช้ตะกั่ว เพราะตะกั่วจะทำปฏิกิริยากับกรดไขมัน เกิดเป็นเกลือที่เป็นพิษ การกลั่นน้ำมันหอมระเหยไม่ควรใช้สายยางต่อ เพราะสายยางจะละลายไปติดน้ำมันหอม ทำให้กลิ่นผิดไปจากความจริง หากน้ำมันหอมระเหยไม่ค่อยแยกจากกัน ต้องใช้กรวยยาวๆ รองรับ distillate

ปลายกรวยงอขึ้น การไหลของ distillate จะไม่ไปรบกวนชั้นของน้ำมัน และหยดน้ำมันจะลอยขึ้นช้าๆ ไปอยู่ในชั้นของน้ำมัน น้ำมันควรแยกออกจากน้ำให้เร็วที่สุดเก็บไว้ในภาชนะสุญญากาศที่อากาศเย็น

การกลั่นดังกล่าวแม้จะเป็นวิธีที่ใช้กันมาก แต่มีข้อเสียหลายประการอันเนื่องมาจากความร้อนทำให้ปฏิกิริยาสลายตัวต่างๆ เกิดขึ้น กลิ่นที่ได้อาจผิดเพี้ยนไปจากธรรมชาติ สารประกอบบางตัวในน้ำมันหอมระเหยที่ละลายได้ดี มีจุดเดือดสูง จะไม่ถูกพามาโดยไอน้ำ ดังนั้นน้ำมันหอมระเหยที่ได้จากการกลั่นอาจไม่ใช่ที่เกิดในธรรมชาติเสมอไป โดยเฉพาะน้ำมันหอมระเหยจากดอกไม้ทั้งหลายซึ่งเสียได้ง่าย เช่น มะลิ ซ่อนกลิ่น ไวโอเลต ดอกพุด ไฮยาซิน เป็นต้น เมื่อเวลากลั่นจะไม่ได้น้ำมันหรือน้ำมันที่ได้มีปริมาณน้อยมาก และคุณภาพไม่ดี การใช้วิธีกลั่นจึงไม่เหมาะสม ต้องใช้วิธีอื่นที่ทำให้ได้น้ำมันหอมระเหยใกล้เคียงที่เกิดในธรรมชาติมากที่สุด

ตัวอย่างสมุนไพรที่ใช้ในการกลั่นน้ำมันหอมระเหย

ไพล เหมาะสมกับการกลั่นด้วยน้ำและไอน้ำ (Water and steam distillation) ใช้เหง้าในการกลั่น ก่อนจะทำการกลั่นควรมีการหั่นบางๆ เพื่อให้ไปน้ำผ่านได้ง่าย และได้น้ำมันที่มีคุณภาพและปริมาณมาก เมื่อกลั่นแล้วจะได้เป็นของเหลว ไม่มีสี หรือมีสีเหลืองอ่อน ปราศจากตะกอน และสารแขวนลอย ไม่มีการแยกชั้นของน้ำ มีกลิ่นเฉพาะตัวของไพล

ขมิ้น เหมาะสมกับการกลั่นด้วยน้ำและไอน้ำ (water and steam distillation) ใช้ส่วนเหง้าในการกลั่น ก่อนจะทำการกลั่นควรมีการหั่นบางๆ เพื่อให้ไอน้ำผ่านได้ง่ายและได้น้ำมันที่มีคุณภาพและปริมาณมาก เมื่อกลั่นแล้วจะได้เป็นของเหลวใส มีสีเหลืองอ่อนปราศจากตะกอนและสารแขวนลอย ไม่มีการแยกชั้นของน้ำ มีกลิ่นเฉพาะตัวของขมิ้น

ตะไคร้หอม เหมาะสมกับการกลั่นด้วยน้ำและไอน้ำ (water and steam distillation) ใช้ส่วนใบของตะไคร้หอมในการกลั่น เมื่อกลั่นแล้วจะได้ของเหลวใส สีเหลืองอ่อน ปราศจากตะกอนและแยกชั้นของน้ำ มีกลิ่นเฉพาะตัวของตะไคร้

2. การสกัดด้วยน้ำมันสัตว์ (extraction by animal fat)

ใช้กับน้ำมันหอมระเหยที่ระเหยได้ง่ายเมื่อใช้วิธีกลั่นด้วยไอน้ำ วิธีนี้จะใช้เวลานานเพราะต้องแช่พืชไว้ในน้ำมันหลายวัน ซึ่งน้ำมันจะช่วยดูดเอากลิ่นหอมของน้ำมันหอมระเหยออกมา วิธีนี้ใช้ในการสกัดน้ำมันหอมระเหยจากดอกมะลิ ดอกกุหลาบ เป็นต้น

3. การสกัดด้วยสารเคมี (solvent extraction)

วิธีนี้จะได้น้ำมันหอมระเหยที่มีความเข้มข้นสูง แต่คุณภาพไม่ดีเท่าการกลั่นเพราะหลังจากการสกัดจะได้สารอื่นปนออกมาด้วย การสกัดแบบนี้จะได้น้ำมันหอมระเหยที่เรียกว่า absolute oil วิธีนี้ใช้กับพืชใช้กับพืชทนความร้อนสูงไม่ได้ เช่น มะลิ และที่สำคัญคือ หลังจากการสกัดต้องทำการระเหยสารเคมีที่ใช้เป็นตัวสกัดออกให้หมด สารเคมีที่นิยมใช้เป็นตัวสกัดคือ แอลกอฮอล์

4. การคั้นหรือบีบ

ทำให้น้ำมันที่อยู่ในเปลือกของผลไม้ เช่น เปลือกพืชตระกูลส้ม ออกมาแต่น้ำมันหอมระเหยที่ได้จะมีปริมาณน้อยและไม่ค่อยบริสุทธิ์

5. การสกัดด้วยคาร์บอนไดออกไซด์เหลว

โดยปล่อยคาร์บอนไดออกไซด์ที่ถูกทำให้เป็นของเหลวที่ความดันสูงเป็นวิธีที่ปัจจุบันนิยมใช้มากเพราะจะได้น้ำมันหอมระเหยที่มีกลิ่นดี มีความบริสุทธิ์สูง แต่วิธีนี้จะมีต้นทุนการผลิตที่สูง

วิธีการนำน้ำมันหอมระเหยเข้าสู่ร่างกาย

น้ำมันหอมระเหยสามารถเข้าสู่ร่างกายผ่านทางสารอาหารหรือผ่านทางผลิตภัณฑ์ และสามารถผ่านโครงสร้างที่กั้นระหว่างเลือดและสมองได้ง่ายเนื่องจากมีคุณสมบัติไม่ชอบน้ำ (lipophilic) การออกฤทธิ์ของน้ำมันหอมระเหยเริ่มต้นจากการเข้าสู่ร่างกาย โดยการสูดดม การรับประทาน และการแพร่ผ่านเนื้อเยื่อผิวหนัง การสูดดมเป็นวิธีการที่รวดเร็วที่สุดที่น้ำมันหอมระเหยเข้าสู่ร่างกาย (Moss *et al*., 2003) รองลงมาเป็นการแพร่ผ่านเนื้อเยื่อผิวหนังเนื่องจากน้ำมันหอมระเหยสามารถละลายได้ในไขมัน ดังนั้นจึงซึมผ่านเนื้อเยื่อผิวหนังที่มีฟอสโฟลิปิดที่เรียงตัวเป็นสองชั้น (phospholipid bilayer) จากนั้นเข้าสู่ระบบหมุนเวียนเลือดเพื่อส่งต่อไปยังอวัยวะเป้าหมาย (Baser and Buchbauer, 2010) เมื่อน้ำมันหอมระเหยเข้าสู่ร่างกายแล้วจะเกิดปฏิกิริยาทางเคมีกับฮอร์โมนและเอนไซม์ต่าง ๆ หรือน้ำมันหอมระเหยบางชนิดออกฤทธิ์เหมือนกับฮอร์โมน เช่น น้ำมันหอมระเหยจากเม็ดยี่หร่าประกอบด้วยสารประกอบที่คล้ายกับฮอร์โมนเอสโตรเจน ทำให้เมื่อได้รับน้ำมันหอมระเหยชนิดนี้จะทำให้กระตุ้นน้ำนมและการมีประจำเดือน ในจมูกจะมีเซลล์ตัวรับ (receptor) โดยน้ำมันหอมระเหยจะส่งสัญญาณให้ตัวรับและสัญญาณจะถูกถ่ายทอดไปยังระบบลิมปิกและไฮโปทาลามัสของสมอง ผ่านทางออลแฟคทอรี บัลบ์ สัญญาณเหล่านี้ทำให้สมองปล่อยสารสื่อประสาท เช่น โซโรโทนิน (serotonin) เอ็นดอร์ฟิน (endorphin) และ นอร์อะดรีนาลิน (noradrenaline) เพื่อทำให้รู้สึกผ่อนคลาย (Buchbauer, 1993)

อนุมูลอิสระ (free radical)

อนุมูลอิสระ คือ อะตอม โมเลกุลหรือไอออนซึ่งมีอิเล็กตรอนคู่โดดเดี่ยวหรือการจัดเรียงเป็นเชลล์เปิด (open shell) อนุมูลอิสระอาจมีประจุเป็นบวก ลบหรือเป็นศูนย์ก็ได้ ด้วยข้อยกเว้นบางประการ อิเล็กตรอนคู่โดดเดี่ยวเหล่านี้ทำให้อนุมูลอิสระว่องไวต่อปฏิกิริยาสูงมาก โดยอนุมูลอิสระจะไปแย่งจับหรือดึงเอาอิเล็กตรอนจากโมเลกุลหรืออะตอมสารที่อยู่ข้างเคียงเพื่อให้ตัวมันเสถียร โมเลกุลที่อยู่ข้างเคียงที่สูญเสียหรือรับอิเล็กตรอนจะกลายเป็นอนุมูลอิสระชนิดใหม่ ซึ่งอนุมูลอิสระที่เกิดมาใหม่นี้จะไปทำปฏิกิริยากับสารโมเลกุลอื่นต่อไป เกิดเป็นปฏิกิริยาลูกโซ่ต่อกันไปเรื่อย ๆ อนุมูลอิสระมีสมบัติเหมือนสารทั่วไป คือ มีความสามารถในการเข้าทำปฏิกิริยากับสารอื่นสามารถเปลี่ยนแปลงได้ตามอุณหภูมิ ความเป็นกรด ด่าง และความชื้น อนุมูลอิสระมีบทบาทสำคัญในการสันดาป เคมีบรรยากาศ พอลิเมอไรเซชัน เคมีพลาสมา ชีวเคมี และกระบวนการทางเคมีอีกหลายอย่าง ในสิ่งมีชีวิต ซูเปอร์ออกไซด์ ไนตริกออกไซด์และผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาของมันควบคุมหลายกระบวนการ เช่น ควบคุมการบีบตัวของหลอดเลือด ซึ่งควบคุมความดันโลหิตอีกต่อหนึ่ง นอกจากนี้ อนุมูลอิสระยังมีบทบาทสำคัญในเมแทบอลิซึมตัวกลางของสารประกอบทางชีวภาพหลายชนิด

อนุมูลอิสระเกิดขึ้นเป็นปกติจากปฏิกิริยาในร่างกายอยู่แล้ว โดยเฉพาะอย่างยิ่ง เมื่อมีธาตุเหล็ก ทองแดง แมงกานีส โคบอลต์ โครเมียม นิเกิลน้อย มักเกิดเป็นปฏิกิริยาลูกโซ่ โดยร่างกายจะมีระบบกำจัดอนุมูลอิสระ แต่หากร่างกายได้รับสารอนุมูลอิสระจากภายนอก เช่น ได้รับจากอาหารบางชนิด จากขบวนการประกอบอาหาร เช่น การย่างเนื้อสัตว์ที่มีไขมันประกอบสูง การนำน้ำมันที่ใช้ทอดอาหารที่อุณหภูมิสูง ๆ มาใช้อีก หรือจากสิ่งแวดล้อม เช่น แสงอาทิตย์ซึ่งมีรังสีอัลตราไวโอเลต การแผ่รังสี รังสีเอกซ์ หรือจากมลพิษ

เช่น ควันบุหรี่ ก๊าซคาร์บอนมอนอกไซด์จากไอเสียรถยนต์ มากเกินไป หรือในภาวะที่ร่างกายสามารถกำจัดอนุมูลอิสระได้ลดลง ก็จะทำให้มีอนุมูลอิสระมากเกินไป เป็นสาเหตุของโรคภัยได้

อนุมูลอิสระที่มากเกินไปจะเป็นอันตรายต่อไขมัน (โดยเฉพาะไลโปโปรตีนความหนาแน่นต่ำ) โปรตีน หน่วยพันธุกรรม และคาร์โบไฮเดรต ซึ่งจะไม่กล่าวถึงรายละเอียดในที่นี้ ทำให้เพิ่มอัตราการเสี่ยงต่อการเป็นโรคหลายชนิด โรคที่สำคัญและมีการศึกษากันมาก ได้แก่ โรคหลอดเลือดตีบและแข็งตัว โรคมะเร็งบางชนิด โรคอัลไซเมอร์ โรคไขข้ออักเสบ โรคความแก่ เป็นต้น

ปฏิกิริยาของอนุมูลอิสระ

อนุมูลอิสระจะเกิดปฏิกิริยาที่เป็นแบบปฏิกิริยาลูกโซ่ แบ่งเป็น 3 ขั้นตอน คือ ขั้นแรกเป็นขั้นที่อนุมูลอิสระถูกสร้างหรือผลิตขึ้น เรียกขั้นตอนนี้ว่า ขั้นตอนอินนิทิเอชัน (initiation step) ขั้นที่สองเป็นขั้นที่อนุมูลอิสระถูกเปลี่ยนไปเป็นอนุมูลอิสระตัวอื่นต่อ ๆ กันไป เรียกว่าขั้นพรอพพาเกชัน (propagation step) และขั้นสุดท้ายเรียกว่า ขั้นเทอร์มิเนชั่น (termination step) เป็นขั้นหยุดของอนุมูลอิสระ เป็นขั้นตอนที่มีการรวมกันของอนุมูลอิสระ 2 อนุมูล ได้เป็นสารที่มีความเสถียร โดยทั่วไปการที่โมเลกุลหรืออะตอมของสารที่มีอิเล็กตรอนเข้าคู่กันครบเสียอิเล็กตรอนไปกลายเป็น อนุมูลอิสระได้นั้น ต้องอยู่ในสภาวะอุณหภูมิสูง

โทษของอนุมูลอิสระ

กระบวนการหายใจของคนมีการสร้างอนุมูลอิสระ เช่นไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ไฮดรอกซิลแรดิคัล เปอร์ออกซิลแรดิคัล และซูเปอร์ออกไซด์เรดิคัล ในร่างกายคนปกติมีเอนไซม์เป็นสารต้านอนุมูลอิสระ เช่น เอนไซม์ superoxide dismutase, catalase และ phospholipase เพื่อรักษาสมดุลย์ระหว่างอนุมูลอิสระกับสารต้านอนุมูลอิสระ แต่ถ้าในร่างกายระดับอนุมูลอิสระกับสารต้านอนุมูลอิสระไม่สมดุล เรียกว่า สภาวะถูกออกซิไดซ์เกินสมดุล (oxidative stress) ทำให้เกิดโรคต่าง ๆ เช่น โรคพาร์คินสัน โรคอัลไซม์เมอร์ โรคหลอดเลือดหัวใจ และโรคแก่ก่อนวัย

สารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidants)

สารต้านอนุมูลอิสระ หรือ สารต้านออกซิเดชัน คือ สารที่มีสมบัติในการป้องกันหรือช่วยยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน กลไกการต้านอนุมูลอิสระของสารต้านอนุมูลอิสระมีหลายวิธี เช่น การดักจับอนุมูลอิสระ (radical scavenging) การยับยั้งการทำงานของออกซิเจนที่ขาดอิเล็กตรอน การจับกับโลหะที่สามารถเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันได้ (metal chelation) และการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาอนุมูลอิสระ (enzyme inhibition) (บุหรัน, 2556) ร่างกายมีระบบต้านออกซิเดชัน แบ่งเป็น 2 กลุ่มใหญ่ คือ

1) ป้องกันการเกิดสารอนุมูลอิสระ ได้แก่ เอนไซม์ superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase, และ phospholipase ทองแดง สังกะสี ซีเลเนียมโปรตีน

2) สารต้านออกซิเดชัน เป็นกลุ่มสารที่ทำลายระบบลูกโซ่ ได้แก่ วิตามินอี เบต้า-แคโรทีน วิตามินซี อัลบูมิน ซิสเตอีนในโปรตีนของเนื้อสัตว์ ยูบิควิโนน หมู่ซัลไฮดริล

ร่างกายสามารถสร้างสารต้านอนุมูลอิสระเองได้ เช่น กลุ่มเอนไซม์ superoxide dismutase, glutathione peroxidase และ catalase เป็นต้น นอกจากนี้ยังพบสารต้านอนุมูลอิสระหลายชนิดในผักผลไม้และสมุนไพร เช่น สารประกอบฟีนอลิก (phenolic compounds) และวิตามินซี (วาริน, 2546) สารที่จัดอยู่ในกลุ่มของสารประกอบฟีนอลิก ได้แก่ ฟลาโวนอยด์ (flavonoids), ฟลาโวนด์ (flavones), กรดแกล

ลิก (gallic acid), กรดเอลลาจิก (ellagic acid), แอนโธไซยานินส์ (anthocyanins), แคโรทีนอยด์ (carotenoids) และอนุพันธ์ของกรดซินนามิก (cinnamic acid) (Indu and Alan, 2009) สารในกลุ่มนี้ทำให้พืชผักและผลไม้มีสีสัน เช่น สารแคโรทีนอยด์ ให้สีส้มเหลืองในแครอท ฟักทอง มะละกอ สารแอนโธไซยานินส์ พบในผลเชอร์รี่ทำให้มีสีแดง ผลองุ่น ดอกอัญชันมีสีม่วง ในพืชวงศ์ขิงหลายชนิดมีรายงานว่ามีสารต้านอนุมูลอิสระมาก นอกจากสารประกอบฟีนอลิกจะมีสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระแล้ว ยังมีสมบัติอื่นๆ อีก เช่น ช่วยขยายหลอดเลือด ลดการอักเสบ กระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน ลดความเสี่ยงสำหรับโรคเรื้อรัง รวมทั้งโรคมะเร็งและหัวใจ การรับประทานอาหารที่มีสารต้านอนุมูลอิสระมาก ทำให้ร่างกายมีสารต้านอนุมูลอิสระเพิ่มสูงขึ้นในกระแสเลือด (Cao et al, 1998) การรับประทานอาหารประเภทผักใบเขียว ผลไม้และสมุนไพรเป็นประจำทำให้ร่างกายสามารถป้องกันโรคที่มีสาเหตุจากการทำลายของอนุมูลอิสระ เช่น โรคไขมันในเลือดสูง โรคหัวใจ เบาหวาน โรคมะเร็ง โรคไตรวมทั้งความแก่ชราได้ สารต้านอนุมูลอิสระสามารถแบ่งได้ 2 ประเภท ดังนี้

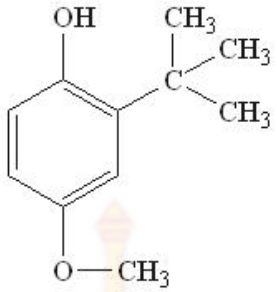
1) สารต้านอนุมูลสังเคราะห์ (synthetic antioxidant) สารต้านอนุมูลอิสระที่ได้จากการสังเคราะห์ส่วนใหญ่จะมีโมเลกุลขนาดเล็ก และใช้โครงสร้างจากสารต้านอนุมูลอิสระที่มีในธรรมชาติ และสมุนไพร มาดัดแปลงให้มีคุณสมบัติทางเคมี และมีฤทธิ์ที่ดีขึ้น (พัชรี, 2550) โดยพัฒนามาจากโครงสร้างของวิตามินอี และโครงสร้างสารพอลิฟีนอล ตัวอย่างสารต้านอนุมูลสังเคราะห์ เช่น

1.1 บีเอชเอ (BHA : butylated hydroxyanisole) มีลักษณะเป็นผลึกสีขาวหรือสีเหลืองอ่อน มีกลิ่นฉุน ไม่ละลายน้ำ แต่ละลายในแอลกอฮอล์ เป็นสารกำจัดอนุมูลอิสระที่นิยมใช้กันมากในโรงงานอุตสาหกรรมอาหาร สารบีเอชเอมีฤทธิ์ในการรีดิวซ์สูงกว่าสารบีเอชที และการแทนที่แบบต่าง ๆ ในโครงสร้างพื้นฐานของสารทั้งสอง พบว่าการแทนที่ด้วยหมู่เมทอกซี (-OCH_3) จะเพิ่มความสามารถในการรีดิวซ์ และการจับกับอนุมูล DPPH (พัชรี, 2550)

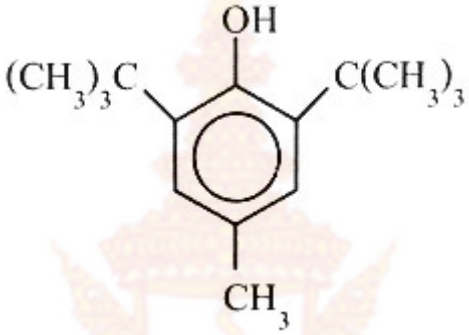
1.2 Trolox หรือ 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid ($C_{14}H_{18}O_4$) เป็นอนุพันธ์ของวิตามินอี โดยการเปลี่ยนสายอัลเคนเป็นหมู่คาร์บอกซิลิก ละลายน้ำได้ดี ออกฤทธิ์เร็วกว่าวิตามินอี นิยมใช้ Trolox เป็นสารมาตรฐานในการตรวจสอบกิจกรรมต้านออกซิเดชัน

1.3 Gallic acid หรือ 3,4,5-hydroxybenzoic acid ($C_7H_6O_5$) เป็นสารประกอบอินทรีย์ของแทนนินพบมากในองุ่น ใบชา เปลือกไม้โอ้ค ใช้เกี่ยวกับอุตสาหกรรมทางยา คุณสมบัติของ gallic acid สามารถยับยั้งเชื้อรา เชื้อไวรัส และเป็นสารต้านออกซิเดชัน

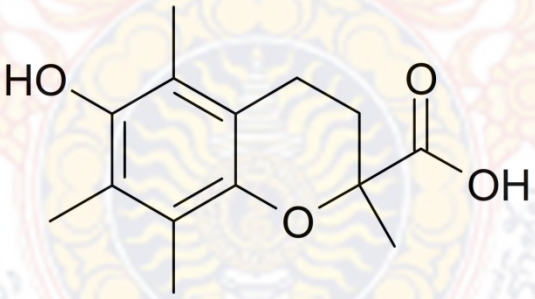
1.4 Quercetin ($C_{15}H_{10}O_7$) เป็นสารต้านออกซิเดชัน จัดอยู่ในกลุ่มฟลาโวนอยด์ พบมากในหัวหอม หอมแดง และพืชตระกูลถั่ว มีฤทธิ์ป้องกันการอักเสบ การแพ้ การแข็งตัวของเลือด ป้องกันแบคทีเรีย และไวรัส ช่วยกระตุ้นการทำงานของหัวใจให้มีประสิทธิภาพสูง



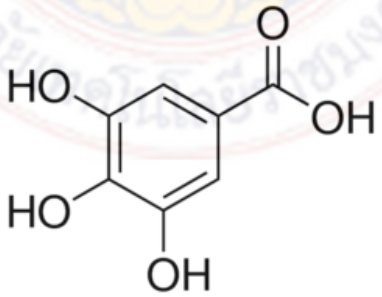
ภาพที่ 1.3 โครงสร้างทางเคมีของ BHA



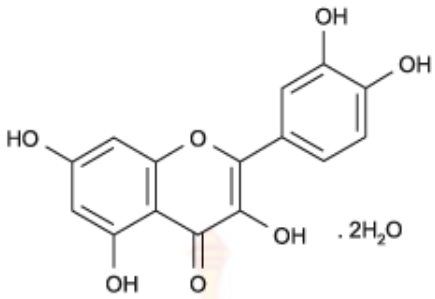
ภาพที่ 1.4 โครงสร้างทางเคมีของ BHT



ภาพที่ 1.5 โครงสร้างทางเคมีของ trolox



ภาพที่ 1.6 โครงสร้างทางเคมีของ gallic acid



ภาพที่ 1.7 โครงสร้างทางเคมีของ quercetin

สารต้านอนุมูลในธรรมชาติ (natural antioxidant) สารต้านอนุมูลอิสระที่ได้จากธรรมชาติได้รับความสนใจ และมีการค้นคว้าอย่างมากในปัจจุบัน เนื่องจากมีความปลอดภัยในการบริโภคมากกว่าสารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์ สารต้านอนุมูลอิสระเหล่านี้ พบได้ทั้งในจุลชีพ สัตว์ และพืช (เจนจิราและประสงค์, 2554) ตัวอย่างสารต้านอนุมูลในธรรมชาติ เช่น

วิตามินซี หรือกรดแอสคอร์บิก (Ascorbic acid) พบมากในผักและผลไม้ที่มีรสเปรี้ยว มีคุณสมบัติละลายน้ำได้ดี ในโครงสร้างมีหมู่ไฮดรอกซี 2 หมู่ ที่สามารถแตกตัวให้ไฮโดรเจน โดยกลไกในการต้านอนุมูลอิสระ คือ วิตามินซีที่อยู่ในร่างกาย จะให้อิเล็กตรอน 1 ตัว แต่ไม่เป็นอันตรายต่อเซลล์ เพราะจะไปทำหน้าที่เป็นสารกำจัดอนุมูลอิสระในร่างกาย ดังนั้นวิตามินซีจึงช่วยควบคุมระบบการทำงานของเอนไซม์ต่าง ๆ โดยเฉพาะเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการหายใจ และการเผาผลาญ ดังนั้นวิตามินซีจึงเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่มีอนุภาพสูงในการขจัดฤทธิ์ของอนุมูลอิสระที่มีผลมาจากสิ่งแวดล้อม เช่น แสงแดด หมอก และควัน (พัชรี, 2550)

นอกจากนี้ USDA ได้ให้คำนิยามของสารต้านออกซิเดชันว่า เป็นสารที่ใช้สำหรับยืดอายุการเก็บรักษาของอาหาร โดยชะลอการเสื่อมเสีย การเกิดกลิ่นหืน หรือการเปลี่ยนแปลงสี อันเป็นผลมาจากปฏิกิริยาออกซิเดชัน (Shahidi and Wanasundara, 1996) สามารถแบ่งชนิดของสารต้านออกซิเดชันได้เป็นประเภทต่างๆ คือ สารต้านออกซิเดชันปฐมภูมิ (Primary or chain-breaking antioxidants) สารต้านออกซิเดชันทุติยภูมิ (Secondary antioxidants) หรือสารต้านอนุมูลอิสระที่เสริมฤทธิ์ (Synergist antioxidants) เป็นสารที่ทำหน้าที่ต่อต้านหรือยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน หยุดปฏิกิริยาลูกโซ่ของอนุมูลอิสระ ป้องกันไม่ให้อนุมูลอิสระไปมีผลทำลายเซลล์ในร่างกายซึ่งก่อให้เกิดโรคหลายชนิด โดยปกติในร่างกาย มีระบบควบคุมหรือป้องกันอนุมูลอิสระแบ่งออกเป็น 3 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มของเอนไซม์ กลุ่มของสารและโปรตีนบางชนิด และกลุ่มของสารอาหารบางชนิด (อัญชนา, 2546) ปัจจุบันสารต้านอนุมูลอิสระ ถูกนำมาใช้ในการส่งเสริมสุขภาพป้องกันและรักษาโรคต่างๆ ในรูปของอาหารและสมุนไพร โดยเฉพาะประเภทที่มีวิตามินซี อี และเอ ซีลีเนียมและเบต้า-แคโรทีน รวมทั้งสารประกอบฟีนอลิก ซึ่งทำหน้าที่ขจัดอนุมูลอิสระได้ดี

Ilkay and Osman, (2011). ได้ศึกษาการหาปริมาณรวมฟีนอลและสารต้านอนุมูลอิสระที่ยับยั้งเอนไซม์ในเห็ดจากตุรกี ในการศึกษาปัจจุบันการตรวจสอบเอนไซม์ (AChE) สามารถยับยั้งสารสกัดจากเอทานอลในสายพันธุ์ของเห็ด ที่เจริญเติบโตในประเทศตุรกี ส่วนใหญ่ เป็นสายพันธุ์ Polyporus ได้แก่ (Polyporus gilvus, Polyporus sulphureus, Polyporus annosus, Polyporus radiates, Polyporus Pinicola, Polyporus volvatus, Polyporus fomentarius, Polyporus stevenii, Polyporus badius)

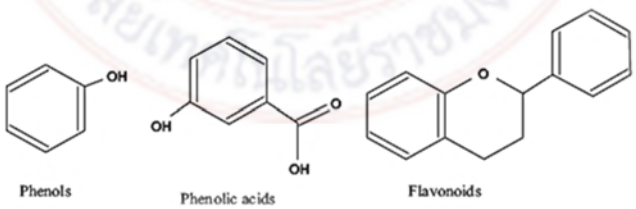
รวมทั้ง Cantharellus cibarius, Lactarius deliciosus, and Trametes versicolor. การดำเนินการวิเคราะห์โดยใช้เทคนิค spectrophotometric จาก Ellman ใน ELISA อ่าน microplate reader ที่ 500 mg/ml เนื่องจากโรคอัลไซเมอร์ (AD) มีความเกี่ยวข้องกับการเสื่อมสภาพของเซลล์ วิธีการของสารต้านอนุมูลอิสระได้นำไปใช้กับสารสกัดจากเห็ด เช่น 1,1-diphenyl-2-picrylhydazyl (DPPH) ผลการจับไอออนเหล็กเฟอริกจะช่วยลดสารต้านอนุมูลอิสระ (FRAP) การทดสอบการฟอกสีเบต้าแคโรทีนและปริมาณฟีนอลิกรวมของสารสกัด นอกจากนี้ยังพบว่า Folin-Ciocalteu reagent ช่วยในการป้องกัน AChE assa ที่ใช้งานมากที่สุดคือ *P.sulphureus* มี 31.44% ของการยับยั้ง *P.voluatus* แสดงให้เห็นถึงผลการขับที่ดีที่สุดกับ DPPH ในขณะที่ทุกสารสกัดมีความจุต่ำในคีเลติ้งไอออนเหล็กและลดไอออนเฟอริก

Nick K. *et al*, (2013). องค์ประกอบของน้ำมันดิบ กรดไขมัน สเตอรอยด์ และปริมาณฟีนอลิกรวม (TPC) พบว่ามีอยู่ในเห็ดทั้งห้าสายพันธุ์ คือ (Lactarius deliciosus, Lactarius sanguifluus, Lactarius semisanguifluus, Russula delica, Suillus bellinii) ที่เกาะ Lesvos ในกรีซ นอกจากนี้ยังมีความสามารถในการขับไล่ DPPH, เฟอริกไอออน (FRAP) และ สารสกัดจากเมทานอลที่มีหมู่สเตอรอยด์ ergosterol predominated ที่ระดับความเข้มข้น 9.2-18.0 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม/น้ำหนักสด ปริมาณฟีนอลิกรวมของสารสกัดจากเห็ดอยู่ระหว่าง 6.0-20.8 มิลลิกรัม GAE/100 gfw ถึง19 ตัวอย่าง พบว่าในสารสกัดจากเห็ดเป็น p-OH-benzoic acid, -OH-phenylacetic acid, o-coumaric acid ferulic acid และ chrysin นอกจากนี้ กรด oleanolic triterpenic และ ursolic ที่ได้รับการตรวจฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและธาตุเหล็กคีเลตไอออนเป็นครั้งแรกในเห็ดทุกชนิด ความสามารถในการวิเคราะห์และองค์ประกอบหลักมีความสัมพันธ์ที่ดีระหว่าง TPC

สารประกอบฟีนอลิก (phenolic compounds)

สารประกอบฟีนอลิก (phenolic compounds) หรือสารประกอบฟีนอล เป็นสารที่พบตามธรรมชาติในพืชหลายชนิด เช่น ผัก ผลไม้ เครื่องเทศ สมุนไพร ถั่วเมล็ดแห้ง เมล็ดธัญพืช ซึ่งถูกสร้างขึ้นเพื่อประโยชน์ในการเจริญเติบโต สารประกอบฟีนอลิก มีโภชนเภสัช ซึ่งสรรพคุณที่ดีต่อสุขภาพคือ มีสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลิสระ (antioxidant) สามารถละลายได้ในน้ำ

โครงสร้างโมเลกุลของสารประกอบฟีนอลิก



ภาพที่ 1.8 โครงสร้างทางเคมีของสารประกอบฟีนอลิก

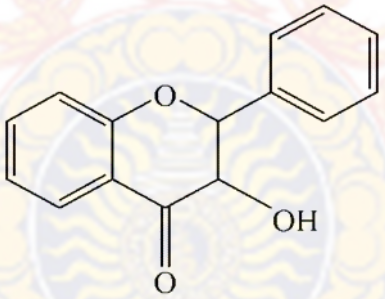
(ที่มา http://www.foodnetworksolution.com/wiki/word/2585/phenolic-compound)

สารประกอบฟีนอลิก มีสูตรโครงสร้างทางเคมีเป็นวงแหวน ที่เป็นอนุพันธ์ของวงแหวนเบนซิน มีหมู่ไฮดรอกซิล (-OH group) อย่างน้อยหนึ่งหมู่ต่ออยู่ สารประกอบฟีนอลพื้นฐาน คือ สารฟีนอล (phenol) ใน

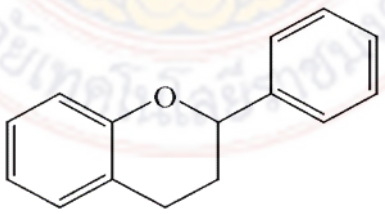
โมเลกุลประกอบด้วยวงแหวนเบนซิน 1 วง และหมู่ไฮดรอกซิล 1 หมู่ สารประกอบฟีนอลที่พบในธรรมชาติมีมากมายหลายชนิด และมีลักษณะสูตรโครงสร้างทางเคมีที่แตกต่างกัน ตั้งแต่กลุ่มที่มีโครงสร้างอย่างง่าย เช่น กรดฟีนอลิก (phenolic acids) ไปจนถึงกลุ่มที่มีโครงสร้างเป็นพอลิเมอร์ เช่น ลิกนิน (lignin) กลุ่มใหญ่ที่สุดที่พบคือ สารประกอบพวกฟลาโวนอยด์ (flavonoid) สารประกอบฟีนอลที่พบในพืชมักจะรวมอยู่ในโมเลกุลของน้ำตาลในรูปของสารประกอบไกลโคไซด์ (glycoside) น้ำตาลชนิดที่พบมากที่สุดในโมเลกุลของสารประกอบฟีนอล คือ น้ำตาลกลูโคส (glucose) และพบว่าอาจมีการรวมตัวกันระหว่างสารประกอบฟีนอลด้วยกันเอง หรือสารประกอบฟีนอลกับสารประกอบอื่นๆ เช่น กรดอินทรีย์ (organic acid) รวมอยู่ในโมเลกุลของโปรตีน แอลคาลอยด์ (alkaloid) และเทอร์พีนอยด์ (terpenoid) เป็นต้น

สารประกอบฟีนอลิก (phenolic compounds) จัดเป็นสารต้านอนุมูลที่พบได้มากในธรรมชาติ ได้แก่ พืชผัก ผลไม้ และชาเขียว เป็นต้น ในปัจจุบันพบสารประกอบฟีนอลิกมากกว่า 8,000 ชนิด ในธรรมชาติตั้งแต่โมเลกุลอย่างง่าย เช่น กรดฟีนอลิก ฟีนิลโปรพานอยด์ และฟลาโวนอยด์ ไปจนถึงโครงสร้างโพลิเมอร์ที่ซับซ้อน เช่น ลิกนิน เมลานิน และแทนนิน เป็นต้น (ปริยานุช, 2551) ตัวอย่างสารที่จัดอยู่ในกลุ่มของสารประกอบฟีนอลิก เช่น

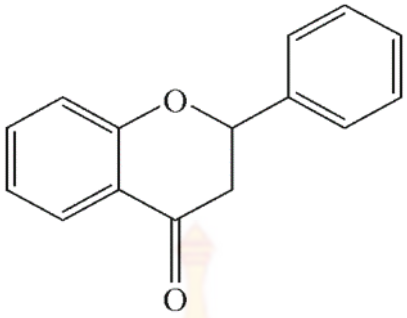
สารกลุ่มฟลาโวนอยด์ (flavonoids) แบ่งเป็นกลุ่มย่อยได้หลายกลุ่ม ตามความแตกต่าง ของสูตรโครงสร้างโดยเฉพาะที่วงที่มีอะตอมออกซิเจนอยู่ในรูปแบบต่างๆ เช่น อีเทอร์ คีโตน รวมทั้งการมรหมู่ไฮดรอกซีแทนที่บนวงอะโรมาติกในโมเลกุล ตัวอย่างของสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ ได้แก่ ฟลาแวน (flanvanes), ฟลาวาโนน (flavanols), ฟลาวานอล (flavanols), ฟลาโวนอล (flavonols), ฟลาโวน (flavonoes) และแอนโทไซยานิดิน (anthocyanidins) เป็นต้น โครงสร้างของกลุ่มฟลาโวนอยด์บางชนิด ดังภาพ



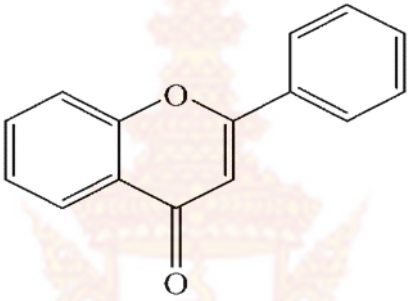
ภาพที่ 1.9 โครงสร้างทางเคมีของฟลาวาโนน (flavanols)



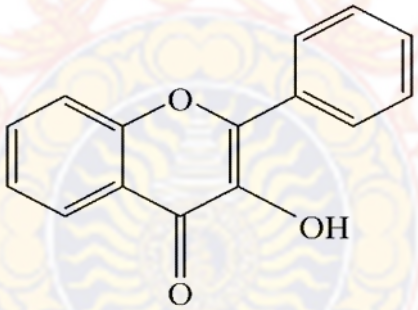
ภาพที่ 1.10 โครงสร้างทางเคมีของฟลาแวน (flanvanes)



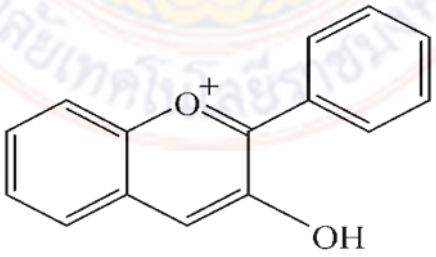
ภาพที่ 1.11 โครงสร้างทางเคมีของฟลาวานอล (flavanols)



ภาพที่ 1.12 โครงสร้างทางเคมีของฟลาโวนอล (flavonols)



ภาพที่ 1.13 โครงสร้างทางเคมีของฟลาโวน (flavonoes)



ภาพที่ 1.14 โครงสร้างทางเคมีของแอนโทไซยานิดิน (anthocyanidins)

Palacios I. *et al*, (2011) ได้ทำการประเมินผลรวมของปริมาณฟลาโวนอยด์ และปริมาณสารประกอบฟีนอลิก ที่เกิดขึ้นในเห็ดทั้งแปดชนิด (*Agaricus bisporus, Boletus edulis, Calocybe*

gambosa, Cantharellus cibarius, Craterellus cornucopiodes, Hygrophorus marzuolus, Lactarius deliciosus and Pleurotus ostreatus) ตามลำดับ โดยการทดสอบ Folin-Ciocalteau และสีจากปฏิกิริยาของ $NaNO_2$ และ $AlCl_3$ ในขั้นพื้นฐาน โดยทั่วไปการวิเคราะห์เห็ดที่มีความเข้มข้น ระหว่าง 1 และ 6 มิลลิกรัมของฟีนอลิกต่อกรัมของเห็ดแห้ง ขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ ในขณะที่ความเข้มข้นของปริมาณฟลาโวนอยด์ อยู่ระหว่าง 0.9 และ3.0 มิลลิกรัมต่อกรัม ของน้ำหนักแห้ง รายละเอียดและความเข้มข้นของสารประกอบฟีนอลิก ที่ได้จากวิธี liquid chromatography ที่มีประสิทธิภาพสูง กรด Homogentisic เป็นกรดฟีนอลิกอิสระที่มีอยู่ในเห็ดทั้งหมด แม้ว่ามีปริมาณแตกต่างกันเป็นอย่างมากในสายพันธุ์ที่นำมาวิเคราะห์ ปริมาณฟลาโวนอยด์ เช่น myricetin และ catechin ที่ถูกตรวจพบในเห็ด ได้ศึกษาคุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดเมทานอลจากเห็ดได้รับการประเมินโดยการตรวจสอบสารต้านอนุมูลอิสระ กรดไลโนเลอิก และเห็ดสายพันธุ์ที่มีการยับยั้งด้วย *C. cibarius* ที่มีประสิทธิภาพมากที่สุดกับระดับการเกิดออกซิเดชันในไขมัน (74% ของการยับยั้ง) และ *A.bisporus* สายพันธุ์ที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระต่ำสุด (10%ของการยับยั้ง)

อรวัสสา และคณะ (2547) ได้ทำการวิจัยครั้งนี้มีจุดประสงค์เพื่อเตรียมสารสกัดเห็ดด้วยเอทานอลในช่วงเวลาการสกัดและอุณหภูมิต่างๆกันพบว่าสารสกัดเห็ดฟางที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เวลา 6 ชั่วโมง ให้ปริมาณร้อยละของผลผลิตต่อน้ำหนักแห้งสูงสุด จากนั้นนำสารสกัดเห็ดฟางมาทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพและปริมาณฟีนอลิกรวม พบว่าในสารสกัดเห็ดฟางที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 24 ชั่วโมง แสดงร้อยละการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH และปริมาณฟีนอลิกรวมสูงที่สุด (ร้อยละ 82.08+3.17 ที่ 250 mg/ml และ 324.48+2.70 mgGAE/100 g crude ตามลำดับ) และสารสกัดเห็ดฟางที่อุณภูมิ 25 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 3 ชั่วโมง แสดงร้อยละการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสสูงที่สุด (ร้อยละ 57.66+0.90 ที่ 1000 mg/ml) นอกจากนี้ยังพบความสัมพันธ์ระหว่างฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระกับปริมาณฟีนอลิกรวม (R^2 =0.6919)

สรรพคุณของสารประกอบฟีนอลิก

1) ประโยชน์ต่อสุขภาพ สารประกอบฟีนอลหลายชนิดมีฤทธิ์เป็นสารต้านออกซิเดชัน (antioxidant) ยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชันและเป็นสารต้านการกลายพันธุ์ (antimutagrns) มีสรรพคุณที่ดีต่อสุขภาพ สามารถการป้องกันโรคต่างๆ โดยเฉพาะโรคหัวใจขาดเลือด และมะเร็ง โดยสารประกอบฟีนอล จะทำหน้าที่กำจัดอนุมูลอิสระ (free radical) และไอออนของโลหะที่สามารถเร่งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมันและโมเลกุลอื่นๆ โดยใช้ตัวเองเป็นตัวรับอนุมูลอิสระ (free radical) ทำให้ยับยั้งปฏิกิริยาลูกโซ่ ที่มีอนุมูลอิสระเป็นสาเหตุ แต่สารต้านอนุมูลอิสระจะถูกทำลายไปด้วย

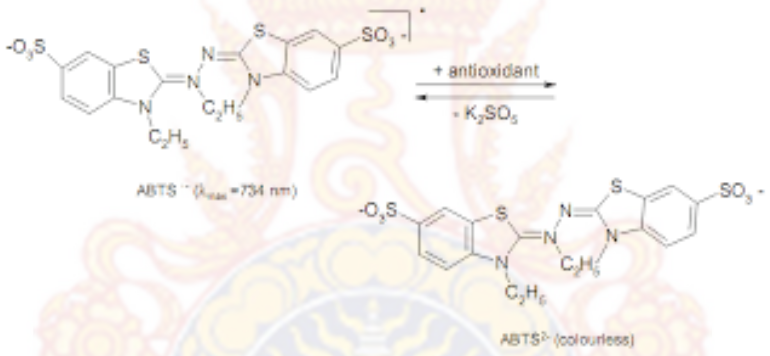
2) ใช้เพื่อการถนอมอาหาร โดยใช้เป็นสารกันหืน ป้องกันปฏิกิริยาการออกซิเดชันของลิพิด (lipid oxidation)

วิธีการวิเคราะห์สารต้านอนุมูลอิสระ

งานวิจัยส่วนใหญ่ประเมินประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระโดยรวม (total antioxidant capacity, TAC) การวิเคราะห์ค่าโดยทั่วไปจะมีการสร้างอนุมูลอิสระที่ทราบความเข้มข้นแน่นอน และวิเคราะห์ความสามารถในการยับยั้งหรือขจัดอนุมูลอิสระของสารตัวอย่างที่สนใจ โดยวัดปริมาณอนุมูลอิสระที่ลดลงหรือที่เหลือ สารที่นิยมใช้เป็นตัวกำเนิดอนุมูลอิสระมักจะใช้สารประกอบ 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) หรือใช้สารประกอบกลุ่มเอโซ เช่น 2,2-azinobis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid, ABTS)

ABTS

ใช้สาร ABTS หรือ 2,2-azinobis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid ($C_{18}H_{18}N_4O_6S_4$) โดยถูกออกซิไดซ์ด้วย potassium persulfate ให้กลายเป็น ABTS เก็บไว้ในที่มืด 1 คืน ดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร เมื่อทดสอบสารที่มีกิจกรรมต้านออกซิเดชัน รวมทั้งโพลีฟีนอล ไทออล และวิตามินซี ทำให้ ABTS จางลง สารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูง จะวัดค่าดูดกลืนแสงได้น้อย ฤทธิ์การจับอนุมูลอิสระ ABTS ค่าที่บ่งชี้ความแรงของฤทธิ์จะเป็นค่าที่เทียบกับสารมาตรฐาน trolox



ภาพที่ 1.15 ปฏิกิริยาของ ABTS

Total phenolic compound (TPC)

เป็นสารที่มีสูตรโครงสร้างทางเคมีเป็นวงแหวนที่มีหมู่ไฮดรอกซิลอย่างน้อยหนึ่งหมู่ ละลายน้ำได้ พบได้ในพืชทั่วไปมักรวมกับน้ำตาลในรูปของสารประกอบไกลโคไซด์ (glycoside) พบช่องว่างภายในเซลล์ สารประกอบฟีนอลิกที่พบในธรรมชาติ กลุ่มใหญ่สุด คือสารประกอบกลุ่มฟลาโวนอยด์ (flavonoids) นอกจากนี้ก็จะมีสารประกอบพวก monocyclic phenol, phenyl propanoid, phenolic quinine และ polyphenolic ได้แก่ lignin, tannin และยังพบสารประกอบฟีนอลรวมอยู่กับโปรตีนอัลคาลอยด์ และเทอร์ปินอยด์ สารประกอบฟีนอลิกที่มีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ ได้แก่ ฟลาโวนอยด์ กรดฟีโนลิก และแทนนิน สารประกอบฟีนอลิกทำหน้าที่ขับไล่อนุมูล peroxyl โดยอาศัยกลไก 2 แบบ เมื่อมีความเข้มข้นต่ำเมื่อเทียบกับสารออกซิไดซ์ สารประกอบฟีนอลิกจะป้องกันการเกิดปฏิกิริยาออกซิไดซ์ นอกจากนี้อนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นในปฏิกิริยาจะถูกทำให้เป็นสารที่มีความเสถียร ทำให้สามารถป้องกันการเกิดขั้นตอนพรอพาเกชันได้ นอกจากนี้สารประกอบฟีนอลิกบางชนิดยังทำหน้าที่เป็นสารคีเลต ดักจับไอออนของโลหะเข้าไว้ใน

โมเลกุล เช่น เคอร์ซิทิน (quercetin) สารประกอบฟีนอลิกยังทำหน้าที่เป็นสารให้อิเล็กตรอน หรือ เป็นตัวให้ไฮโดรเจน และกำจัดออกซิเจนที่อยู่ในรูปแอคทีฟ ทำให้สารประกอบฟีนอลิกเป็นสารต้านออกซิเดชันที่สำคัญชนิดหนึ่ง

การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดด้วยวิธี Folin-ciocalteu reagent โดยทำปฏิกิริยากับสารทดสอบ เติมสารละลาย Folin-ciocalteu phenol reagent เติมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3) วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร คำนวณเทียบกับกราฟมาตรฐานกรดแกลลิก (gallic acid) รายงานผลเป็นมิลลิกรัมต่อกรัมกรดแกลลิก (mg/g gallic acid equivalent, GAE)

Total Flavonoid Content (TFC)

เป็นสารประกอบฟีนอลิกที่พบมากในผักและผลไม้ มีหน้าที่เป็นรงควัตถุ ทำหน้าที่กรองแสงที่มีความยาวคลื่นที่จำเพาะเจาะจง และทำหน้าที่เป็นสารต้านออกซิเดชัน โดยกำจัดอนุมูลอิสระในเซลล์พืชออกไป ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระขึ้นอยู่กับโครงสร้างของฟลาโวนอยด์ ฟลาโวนอยด์ยังมีคุณสมบัติต้านการอักเสบ ช่วยให้หลอดเลือดแข็งตัว ต่อต้านแบคทีเรียและไวรัส ลดโคเลสเตอรอล พบในส้ม พริกไทย และพวกเบอรี่ต่าง ๆ ฟลาโวนอยด์แบ่งได้เป็น 5 ประเภท คือ

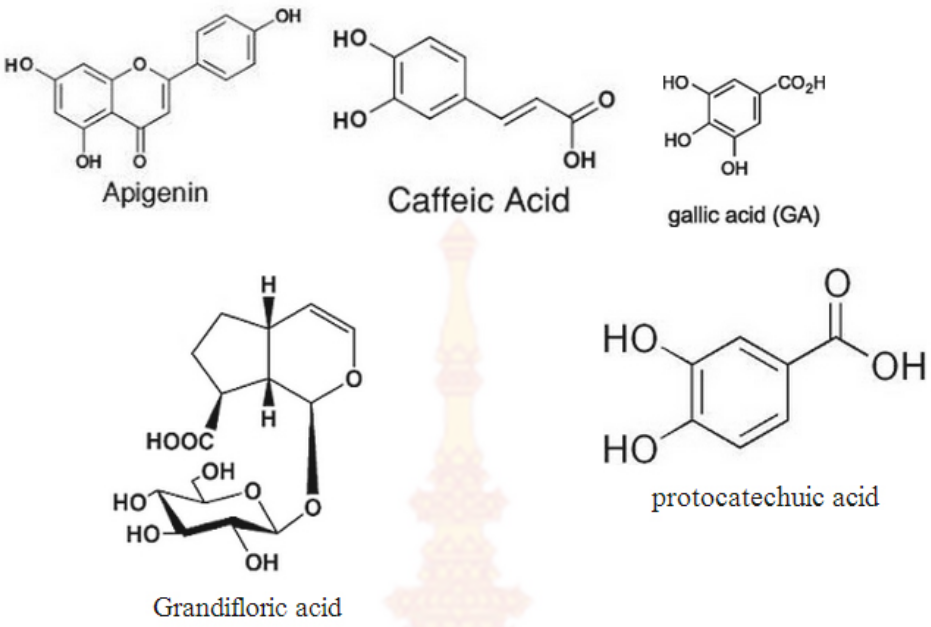
1. แอนโทไซยานิดิน (anthocyanidin), แอนโทคลอร์ส (anthochlors) และออโรนัส (auronus) เป็นสารที่เป็นรงควัตถุในพืชให้สีน้ำเงินแดง ขึ้นกับชนิดของพืช ได้แก่ บลูเบอร์รี่ เชอรี่ องุ่นแดง หัวหอม กะหล่ำปลี ส่วน แอนโทคลอร์สเป็นรงควัตถุที่ให้สีเหลืองพบมากในดอกไม้

2. ฟลาโวโนน (flavonones) ฟลาวาน-3-ออล (flava-3-ols) ไดไฮโดรฟลาโวน (dihydroflavone) และไดไฮโดรชาล์โคน (dihydrochalcones) เป็นสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ที่พบน้อยในธรรมชาติ พบในพืชตระกูลส้ม องุ่น

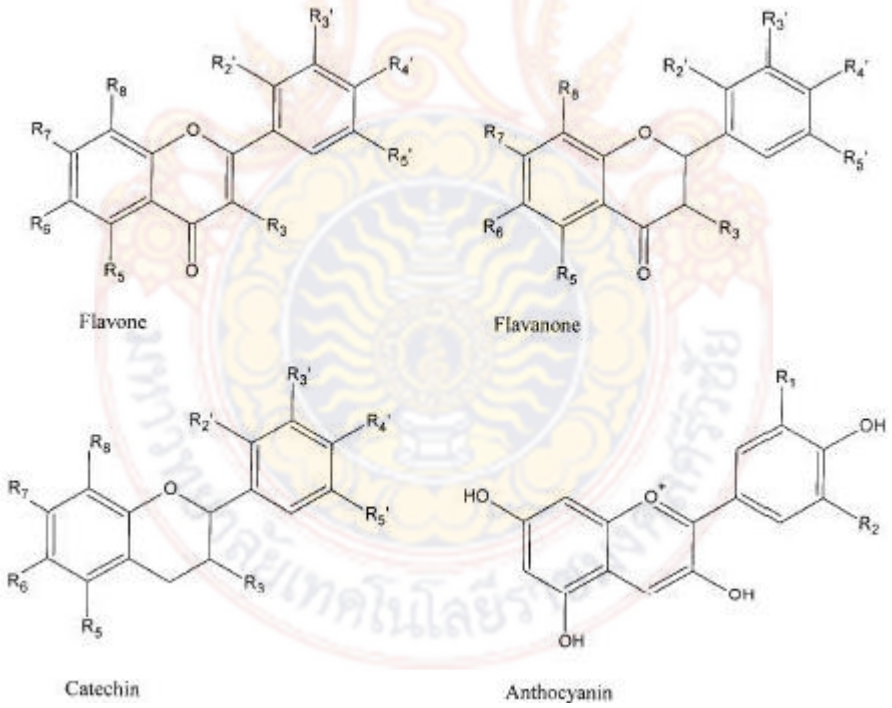
3. ฟลาโวน (flavone) และฟลาโวนอล (flavonols) เป็นกลุ่มที่พบมากที่สุดของฟลาโวนอยด์ พบในบลูเบอร์รี่ เชอรี่หวาน บรอคคอลี่ หัวหอม ชาดำ ชาเขียว มันฝรั่ง แครอท ผักขม ส้ม องุ่น

4. ไอโซฟลาโวนอยด์ (isoflavonoid) พบมากในพืชตระกูลถั่ว

การตรวจสอบปริมาณฟลาโวนอยด์ ด้วยวิธี aluminum chloride colorimetric assay ขึ้นอยู่กับการต่อตัวของสารประกอบเชิงซ้อน aluminum-flavonoid โดยนำสารสกัดมาทำปฏิกิริยากับ $AlCl_3$, $NaNO_2$, น้ำกลั่น, NaOH ตามขั้นตอน แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 510 นาโนเมตร คำนวณปริมาณสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมดเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน quercetin equivalent ต่อน้ำหนักตัวอย่างแห้ง 1 กรัม (QE/g crude extract)



ภาพที่ 1.16 ตัวอย่างสารในกลุ่มฟีนอลิก



ภาพที่ 1.17 ตัวอย่างสารในกลุ่มฟลาโวนอยด์

กระบวนการสร้างและควบคุมเม็ดสีเมลานิน (melanogenesis and its regulation)

กระบวนการสร้างเม็ดสีที่ผิวหนังขึ้นกับองค์ประกอบ ขนาด จำนวน และการกระจายของเม็ดสีภายในเซลล์ โดยเมลาโนไซต์จะทำหน้าที่สร้างเม็ดสีเมลานินแล้วเก็บไว้ในเมลาโนไซมแล้วส่งต่อไปยังเคราติโนไซต์ที่ชั้นล่างสุดของเอพิเดอร์มิสหรือชั้นหนังกำพร้า แสงแดดหรือรังสียูวีเป็นตัวกระตุ้นการสร้างเมลานิน ทำให้ไฟโบรบลาสต์หลั่งสารต่าง ๆ ออกมา ได้แก่ ไซโตไคน์ (cytokines), growth factors, inflammatory วิถีการสังเคราะห์เมลานินมีกระบวนการดังนี้ (Pilaiyar, Manickam and Namasivayam, 2017; Niu and Aisa, 2017, Ebanks, Wickett and Boissy, 2009)

ขั้นตอนที่ 1 เปลี่ยนแอลไทโรซีน (L-tyrosine) ไปเป็น 3,4-ไดไฮดรอกซีฟีนิลอะลานีนหรือแอลโดปา (3,4-dihydroxyphenylalanine, L-DOPA)

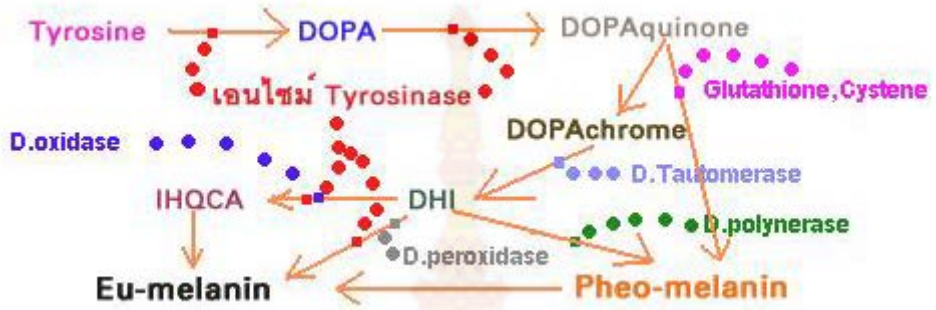
ขั้นตอนที่ 2 แอลโดปาถูกออกซิไดซ์ไปเป็นโดปาควิโนน (DOPA quinone) จากนั้นสังเคราะห์เป็นยูเมลานิน (eumelanin) และฟีโอเมลานิน (pheomelanin) การสังเคราะห์ยูเมลานินเป็นเม็ดสีเมลานินสีน้ำตาลอาศัยโปรตีน tyrosinase-related protein 1 (TRP-1) และเอนไซม์ DOPA chrome tautomerase (DCT หรือ TRP-2)

ขั้นตอนที่ 3 เม็ดสีเมลานินเหล่านี้จะถูกขนส่งไปเก็บไว้ในเมลาโนโซม จากนั้นจะถูกขนส่งไปตามเดนไดรต์ เพื่อส่งเม็ดสีไปที่เคราติโนไซต์ซึ่งอยู่ที่ชั้นใต้ผิวหนัง โดยปกติผิวหนังของคนจะมีรอบการผลัดเซลล์ผิวประมาณ 28-29 วัน จากนั้นจะเกิดสร้างเซลล์ผิวหนังขึ้นมาใหม่ เพื่อให้ความกระจ่างใสของผิว ถ้าหากไม่เป็นตามรอบนั้นจะทำให้เกิดความหมองคล้ำ (Grove and Kligman, 1983)

กระบวนการสังเคราะห์เมลานิน มี 3 ขั้นตอน คือ พลังงานจากรังสีอัลตร้าไวโอเลตออกซิไดซ์ไทโรซีนให้เปลี่ยนเป็น DOPA อาศัยเอนไซม์ไทโรซิเนส ในหนังกำพร้าเมื่อได้รับรังสีอัลตร้าไวโอเลต ปริมาณของ sulfhydryl group มีปริมาณลดลง ส่งผลให้กระบวนการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสตามธรรมชาติหมดไป และอุณหภูมิของผิวหนังจะสูงขึ้น โดยอุณหภูมิที่สูงขึ้นนี้ไปเร่งให้มีการสังเคราะห์เมลานินโดยตรง โดยเร่งให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของเอนไซม์ไทโรซิเนสและเพิ่มออกซิเดชันที่ sulfhydryl group (สุกัญญา เดชอดิศัย และคณะ, 2555)

เมลานินมีหน้าที่ช่วยกรองแสงอัลตราไวโอเลตจากแสงแดดและช่วยกระจายแสง เช่น แสงที่มีความยาวคลื่นสั้น เช่น แสงสีม่วง เมื่อกระทบผิวหนังทำให้หักเหออกไป แต่ถ้ามีปริมาณเมลานินมากเกินไปจะทำให้เกิดความผิดปกติของสีผิว (Solano *et al*., 2006) ปัจจัยที่มีผลต่อการสร้างเมลานิน ได้แก่ รังสียูวีและพันธุกรรม รังสียูวีมีผลต่อการสร้างเมลานิน 2 ทาง คือ ทางที่ 1 รังสียูวีกระตุ้นเซลล์เมลาโนไซต์โดยตรง ทำให้กระตุ้นเอนไซม์ไทโรซิเนสสร้างเมลานินมากขึ้นทำให้ผิวคล้ำ ทางที่ 2 รังสียูวีกระตุ้นเซลล์เคราติโนไซต์ก่อให้เกิดการควบคุมการส่งสัญญาณแบบพาราไครน์ (paracrine regulation process) ทำให้เซลล์เคราติโนไซต์หลั่งสารหลายชนิดออกมา ได้แก่ โพรสตาแกลนดิน อี2 (Prostaglandin E_2) หรือ PGE_2 ฮอร์โมนเมลาโนไซต์สติมูเลติง (α-melanocyte stimulating hormone, α-MSH) เป็นฮอร์โมนที่สร้างจากเซลล์เมลาโนไซต์ แล้วหลั่งมาจากต่อมใต้สมองส่วนกลางไปกระตุ้นการสร้างเมลานิน ผ่าน cyclic AMP (cAMP) ซึ่งไปกระตุ้นเอนไซม์โปรตีนไคเนส เอ (proteinkinase A) เร่งปฏิกิริยาการเติมหมู่ฟอสเฟตให้กับโปรตีน ทำให้ยีน microphthalmia associated transcription factor (mitf gene) ทำหน้าที่ควบคุมการทำงานของเซลล์เมลาโนไซต์ โดยการควบคุมการแบ่งเซลล์ การสร้างเมลานิน และควบคุมการจำลองแบบดีเอ็นเอของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการสร้างเมลานิน ได้แก่ เอนไซม์ไทโรซิเนส, TRP-1 และ TRP-2 เมลาโนไซต์ยังถูกกระตุ้นด้วยผิวหนังที่เกิดกระบวนการอักเสบ ทำให้มีการหลั่งไซโตไคน์ interleukin-1 มีผลกระตุ้น MSH

receptor ทำให้มีการสร้างเมลานินมากขึ้น เช่นเดียวกับ ACTH กระตุ้นไนตริกออกไซด์ให้ไปเร่งการทำงานของฮอร์โมน α-MSH (Slominski *et al*., 2012)



ภาพที่ 1.18 กลไกการสร้างเม็ดสีเมลานิน

การเกิดสีผิวตามธรรมชาติในร่างกาย

1) เอนไซม์ไทโรซิเนส

เอนไซม์ไทโรซิเนสเป็นโปรตีนที่มีขนาด 60-70 กิโลดัลตัน ภายในโครงสร้างของเอนไซม์มีคอปเปอร์เป็นองค์ประกอบ เอนไซม์ไทโรซิเนสเป็นเอนไซม์ที่มีหน้าที่เร่งปฏิกิริยาไฮดรอกซิเลชั่น (hydroxylation) ของไทโรซีนได้เป็น o-diphenols และปฏิกิริยาออกซิเดชั่นของ o-diphenols ได้เป็น o-quinones ซึ่งเป็นกระบวนการที่สังเคราะห์เมลานินที่เป็นรงควัตถุสีน้ำตาลหรือสีดำในสิ่งมีชีวิต เอนไซม์ไทโรซิเนสพบในสิ่งมีชีวิตหลายชนิดทั้งพืชและสัตว์ สำหรับมนุษย์เอนไซม์ไทโรซิเนสพบมากที่บริเวณผิวหนังเนื่องจากมีการสร้างเมลานินขึ้นมามากเพื่อป้องกันร่างกายจากสิ่งแวดล้อม ถ้าผิวหนังมีการสะสมเมลานินมากบริเวณนั้นจะมีสีคล้ำ เมลานินจะปกป้องผิวหนังโดยดูดซับรังสียูวีในแสงแดดเอาไว้ กระบวนการสร้างเมลานินเกิดขึ้นในชั้นหนังกำพร้าชั้นล่างสุด (stratum basale) มีกลุ่มเซลล์สร้างสีผิว (melanocytes) มีหน้าที่สร้างและหลั่งเมลาโนโซม (melanosomes) ซึ่งเป็นเม็ดสีน้ำน้ำตาลที่ภายในประกอบด้วยเอนไซม์ไทโรซิเนส ที่ทำหน้าที่ออกซิไดซ์ไทโรซีนให้ได้เป็นเมลานิน โดยเมลานินจัดเป็นคิวนอยด์โพลิเมอร์สามารถแบ่งออกได้เป็น 2 ชนิดใหญ่ ๆ คือ ฟีโอเมลานิน (phaeomelanin) มีสีแดงและสีเหลือง และยูเมลานิน (eumelanins) มีสีดำและสีน้ำตาล สีผิวของคนแต่ละคนขึ้นกับปัจจัยทางกรรมพันธุ์ ฮอร์โมน MSH (melanocyte stimulating hormone) และการสัมผัสกับแสงยูวี ซึ่งบุคคลที่ได้รับแสงแดดมากก็จะมีผิวคล้ำกว่าปกติ นอกจากนี้ผู้หญิงที่ตั้งครรภ์หรือหญิงที่กินยาคุมกำเนิดจะหลั่งฮอร์โมน MSH มากกว่าปกติมีผลทำให้กระตุ้นการสร้างเมลานินมากขึ้นอีกด้วย ทำให้เกิดเป็นฝ้า (พิมพร ลีลาพรพิสิฐ, 2551) ส่วนในกุ้ง ปู และแมลงต่าง ๆ เอนไซม์ไทโรซิเนสมีหน้าที่สร้างเปลือกแข็งหลังจากลอกคราบทำให้กระดองของสัตว์เหล่านั้นมีสีคล้ำ ส่วนในผักและผลไม้เอนไซม์ไทโรซิเนสเป็นตัวการที่ทำให้เกิดสีน้ำตาลทำให้อายุการเก็บผลิตภัณฑ์สั้น

ลง (พัชรี และคณะ, 2551) ในปัจจุบันในอุตสาหกรรมเครื่องสำอาง อาหารเสริม และยา มุ่งเน้นหาสารสำคัญที่สามารถยับยั้งการสร้างเม็ดสีเมลานิน ทั้งนี้ควบคุมกลไกการสร้างเม็ดสีให้มีน้อย มีหลายกลไก ได้แก่ การยับยั้งการสังเคราะห์เอนไซม์ไทโรซิเนส การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส TRP-1 TRP-2 และ peroxidase การเร่งการผลัดเซลล์ผิวหนัง การยับยั้งการขนส่งเมลาโนโซม การยับยั้งกระบวนการอักเสบ และการดักจับอนุมูลอิสระ (Sarkar *et.,al* 2016)

2) กลไกการขจัดสีผิว

สีผิวที่เห็นเป็นองค์ประกอบรวมของฮีโมโกลบิน แคโรทีน และเมลานิน โดยส่วนใหญ่เกิดจากสีของเมลานินหรือเม็ดสี ดังนั้นการขจัดสีผิว (depigmentation) จึงมุ่งเน้นที่กระบวนการสร้างเมลานินซึ่งสามารถทำได้หลายขั้นตอน ได้แก่ การทำลายเซลล์สร้างเม็ดสี การรบกวนชีวสังเคราะห์ของเมลานินและสารเริ่มต้นของกระบวนการสังเคราะห์ การยับยั้งปฏิกิริยาของเอนไซม์ไทโรซิเนส การเปลี่ยนแปลงเมลานินที่สร้างแล้วใน melanosome จาก oxidize form (สีเข้ม) เป็น reduced form (สีจาง) (พิมพร ลีลาพรพิสิฐ, 2551) ในปัจจุบันพบมีสารสังเคราะห์เพื่อใช้ในผลิตภัณฑ์ขจัดสีผิวสามารถแบ่งออกเป็น 4 กลุ่ม คือ

- สารเคลือบคลุม (opacifying or covering agent) ทำหน้าที่เคลือบคลุม กลบเกลื่อนสีผิวเดิม สารมักมีสีขาว เป็นการทำให้ผิวขาวทางอ้อม

- สารต่อต้านกลไกการสร้างสีผิว (depigmentating agent) ได้แก่ สารที่ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส

- สารป้องกันแสงแดด (sunscreen agent) ได้แก่ สารที่ทำหน้าที่ดูดซับหรือเปลี่ยนแปลงรังสีอุลตร้าไวโอเลตให้กลายเป็นรังสีที่มีช่วงคลื่นยาวกว่า ซึ่งไม่ทำอันตรายต่อผิวหนัง และไม่ส่งผลต่อการกระตุ้นการสร้างเมลานิน

- สารออกซิไดเซอร์ (oxidizer agent) ทำหน้าที่ฟอกสีผิวโดยปฏิกิริยาออกซิเดชัน

สารเคมีที่มีฤทธิ์ยับยั้งการสร้างเมลานิน หรือสารที่ทำให้ผิวขาว (whitening agents) ได้แก่ สารปรอทและไฮโดรควิโนน สารประกอบทั้งสองชนิดมีผลยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส แต่อาจเป็นอันตรายต่อผิว และระบบอื่น ๆ ของร่างกาย ทั้งนี้กระทรวงสาธารณสุขได้ประกาศห้ามใช้เป็นส่วนผสมในเครื่องสำอาง

กลไกการออกฤทธิ์ของสารที่ทำให้ผิวขาวมี 2 กลุ่มใหญ่ กลุ่มแรก เป็นกลุ่มที่ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส เช่น arbutin licorice กลุ่มที่สอง กลุ่มที่ทำให้ผิวหนังชั้นนอกหลุดออก เช่น alpha hydroxyl acid (AHA), butyrated hydroxyanisole (BHA)

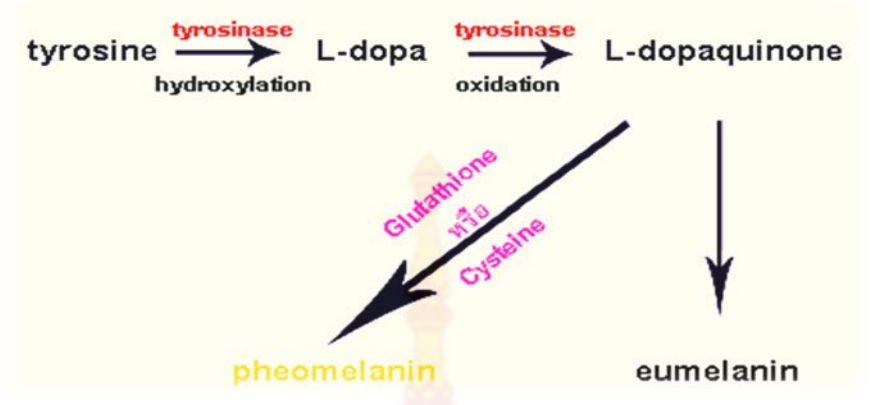
สารกลุ่มฟลาโวนอยด์ (flavonoid) เป็นสารพฤกษเคมีที่มีคุณสมบัติต่อต้านอนุมูลอิสระ พบในเม็ดสีชนิดละลายน้ำของผัก ผลไม้ เมล็ดธัญพืช ใบไม้ และเปลือกไม้ ฟลาโวนอยด์มีอยู่มากมายหลายชนิด แบ่งเป็นกลุ่มย่อยได้หลายกลุ่มตามความแตกต่างของสูตรโครงสร้างโดยเฉพาะที่วงที่มีอะตอมออกซิเจนอยู่ในรูปแบบต่าง ๆ เช่น อีเทอร์ คีโตน รวมทั้งการมีหมู่ไฮดรอกซีแทนที่บนวงอะโรมาติกในโมเลกุล ตัวอย่างของสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ ได้แก่ ฟลาแวน (flanvanes), ฟลาวาโนน (flavanols), ฟลาวานอล (flavanols), ฟลาโวนอล (flavonols), ฟลาโวน (flavonoes) และแอนโทไซยานิดิน (anthocyanidins) ฟลาโวนอยด์ทำหน้าที่ในการยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมันแอลดีแอล (LDL) (สัมพันธ์กับการอุดตันของเส้นเลือดแดงและการเกิดโรคกล้ามเนื้อหัวใจขาดเลือด) มากกว่าวิตามินอี ฟลาโวนอยด์ชนิดต่าง ๆ ที่พบ มีดังนี้

1) แคเทคิน (catechin) จัดเป็นพอลิฟีนอลฟลาโวนอยด์ มีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย กลุ่มสแตฟไฟโลคอกคัส แคเทคินยังช่วยควบคุมระดับโคเลสเตอรอลในเลือด และยังช่วยป้องกันฟันผุ และยังพบแคเทคินช่วยลดอัตราการเกิดมะเร็งกระเพาะอาหารและมะเร็งปอดด้วย

2) เรสเวอราทรอล (resveratrol) จัดเป็นพอลิฟีนอลฟลาโวนอยด์ มีการศึกษาว่าช่วยลดความเสี่ยงของโรคหัวใจและเส้นเลือดในสมองตีบ โดยการยับยั้งการก่อตัวของลิ่มเลือดและไขมันชนิดแอลดีแอล และยังพบว่าช่วยยับยั้งการสร้างเซลล์มะเร็ง และสามารถเปลี่ยนเซลล์มะเร็งร้ายให้กลับคืนเป็นเซลล์ปกติได้

3) โปรแอนโทไซยานิดินส์ (proanthocyanidins) และแอนโทไซยานิดินส์ (anthocyanidins) หรือเรียกว่าโอลิโกเมอริก โปรแอนโทไซยานิดินส์ (OPCs) พบที่ผนังหลอดเลือด และสร้างความแข็งแรงให้กับคอลลาเจนบริเวณเนื้อเยื่ออ่อน เส้นเอ็น และกระดูก ทำให้ OPCs ช่วยรักษาเส้นเลือดฝอยที่แตกง่าย เช่น อาการฟกช้ำ เส้นเลือดขอดบริเวณขา และริดสีดวงทวาร และยังมีส่วนสำคัญในการป้องกันโรคกระดูกพรุน OPCs เป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่สามารถผ่านระบบกั้นระหว่างเส้นเลือดกับสมองได้ ดังนั้น OPCs จึงสามารถช่วยปกป้องสมองและเนื้อเยื่อประสาทจากการเข้าทำลายของอนุมูลอิสระได้

เอนไซม์ไทโรซิเนส (tyrosinase)



ภาพที่ 1.19 กลไกการยับยั้งเอนไซม์ Tyrosinase
(ที่มา http://supplement-to-health.blogspot.com/2013/11/glutathione-and-skin-whitening.html)

สารยับยั้งการสร้างเม็ดสี (Tyrosinase Inhibitor)

สารสังเคราะห์และสารที่พบในธรรมชาติสามารถเป็นสารยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส สารที่พบในธรรมชาติที่เป็นสารยับยั้ง ได้แก่ สารในกลุ่มโพลีฟีนอล ฟลาโวนอยด์ ไกลโคไซด์ เทอร์ปีน สเตอรอยด์ กรดคาร์บอกซิลิค กรดไขมัน คูมาริน วิตามินซี วิตามินอี สารเหล่านี้เป็นตัวยับยั้งเอนไซม์แบบแข่งขัน (competitive inhibition) และแบบไม่แข่งขัน (noncompetitive inhibition) ขึ้นอยู่กับโครงสร้างของสารยับยั้ง การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสเป็นชนิด monophenolase และ diphenolase ตัวอย่างของสารที่ทำให้ผิวขาวที่เป็นที่รู้จักและเป็นที่นิยม ได้แก่

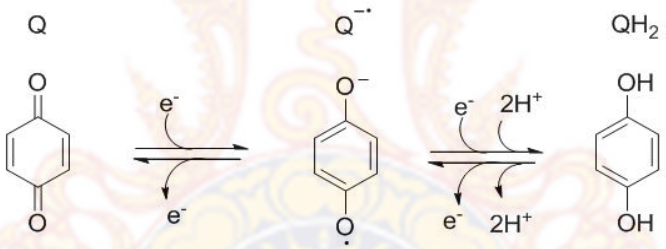
1) กรดโคจิก (kojic acid) สามารถยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสได้ โดยจับกับคอปเปอร์ ทำให้ลดการสร้างยูเมลานิน ยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาเทาโทเมอไรเซชัน (tautomerization) เปลี่ยนโดปาโครมไปเป็น DHIC กรดโคจิกเป็นสารที่ได้จากกระบวนการเมแทบอลิซึมของเชื้อรา *Aspergillus* sp. *Penicilium* sp. และเชื้อแบคทีเรีย *Acetobacter* sp. กรดโคจิกถูกนำไปใช้ในการรักษาฝ้ากระ

2) กรดอะเซลาอิก (azelaic acid) จัดเป็นกรดคาร์บอกซิลิคที่อิ่มตัว พบได้ตามธรรมชาติในเมล็ดข้าวสาลี ข้าวไรน์ และข้าวบาร์เลย์

3) กรดแอลฟาไฮดรอกซี ทำให้เซลล์ผิวหนังที่ตายแล้ว (corneocyte) หลวมตัวและหลุดออกจากกัน ทำให้เกิดการผลัดเปลี่ยนเซลล์ผิว ส่งผลให้ผิวขาวขึ้น

การศึกษาฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสจากสารสกัดของมะหาด พบมีฤทธิ์ยับยั้ง เท่ากับ 92.17% พบสารบริสุทธิ์ 2 ชนิดคือ 2, 4, 3', 5'-tetrahydroxystilbene และ 4, 3', 5'-trihydroxystilbene มีค่า IC_{50} ในการยับยั้งเอนไซม์เท่ากับ 38.5 และ 946.6 μM ตามลำดับ (Sritularak และคณะ, 1998) จากการศึกษาการยับยั้งเอนไซม์ ไทโรซิเนสในรากหาดหนุน (*Artocarpus gomezianus*) พบสารบริสุทธิ์ 2 ชนิด คือ artogimezianol และ andalasin A มีค่า IC_{50} ในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสเท่ากับ 68 และ 39 μM ตามลำดับ (Likhitwitayawuid และคณะ , 2001) นอกจากนี้ยังมีการศึกษาการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารในเปลือกผลตระกูลส้ม (*Citrus* sp.) พบได้สาร nobiletin นำมาเปรียบเทียบกับ kojic acid ให้ค่า IC_{50} เท่ากับ 46.2 และ 77.4 μM ตามลำดับ ดังนั้น nobiletin มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสได้ดีกว่า kojic acid (Sasaki and Yoshizaki, 2002)

1) ไฮโดรควิโนน (Hydroquinone) หรือ 1,4-dihydroxybenzene เป็นสารไวท์เทนนิ่งที่ดีที่สุดแต่อันตรายมาก ที่ในประเทศไทยนั้นไม่สามารถผสมในเครื่องสำอางได้ กลไกการออกฤทธิ์ที่ทำให้ผิวขาวของสารกลุ่มนี้ โดยยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส (tyrosinase inhibitor)



ภาพที่ 1.20 โครงสร้างปฏิกิริยารีดอกซ์ของวงแหวนควิโนน
(ที่มา https://www.google.co.th/ไฮโดรควิโนน)

2) Hydroquinone เรียกได้ว่าเป็นสารที่มีประสิทธิภาพสูงสุดในการเป็นไวท์เทนนิ่ง เพราะการทำงานที่กว้าง

กระตุ้นการสร้าง ROS ขึ้นมาเพื่อทำลายเยื่อหุ้มและโปรตีนของเอนไซม์ Tyrosinase ลดการสร้าง DNA และ RNA ของเซลล์เมลาโนไซด์ และอาร์บูติน (Arbutin) พบมากในผลไม้พวกตระกูลเบอร์รี่และลูกแพร์ เป็นอนุพันธ์หนึ่งของไฮโดรควิโนน ชื่อว่า Hydroquinone-Beta-D-Glucoside มีผลข้างเคียงน้อยกว่าหรือแทบไม่มีเลยเมื่อเทียบกับไฮโดรควิโนน Arbutin ซึ่งมีคุณสมบัติที่คล้ายกับ Hydroquinone แต่ว่ามีความปลอดภัยกว่า (คือเกิด Melanocyte Cytotoxicity น้อยกว่า และไม่ส่งผลกระทับกับ mRNA) Arbutin ปกป้องผิวด้วยการต่อต้านการทำลายผิวจากอนุมูลอิสระ Arbutin เป็นสารกลุ่ม whitening ที่เป็นที่นิยมใน Japan และ Asian สำหรับการลดเลือนความหมองคล้ำจากเม็ดสี โดยมันจะไปยับยังการฟอร์มเป็นเม็ดสีโดยไปบล็อกการทำงานของ Tyrosinase Inhibitor ดังนั้น Arbutin เป็นสารที่ปลอดภัยสำหรับการใช้ทาภายนอกซึ่งไม่ก่อให้เกิดพิษเหมือน Hydroqinone. (บริษัท ซีดีไอพี (ประเทศไทย) จำกัด 131 อาคารกลุ่มนวัตกรรม1 ห้อง 204 อุทยานวิทยาศาสตร์ประเทศไทย ถนนพหลโยธิน ตำบลคลองหนึ่ง อำเภอคลองหลวง จังหวัดปทุมธานี 12120.)

ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของน้ำมันหอมระเหย

การออกฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของน้ำมันหอมระเหย (ตารางที่ 1.2)

ตารางที่ 1.2 การรักษาอาการต่าง ๆ ของน้ำมันหอมระเหย (Buckle, 2007; Price and Price, 2011; Varney and Buckle, 2013)

สภาวะ/อาการ	แหล่งของน้ำมันหอมระเหย
วิตกกังวล สั่นเครียด	*Angellica archangelica* (โกฏหัวบัว) *Cistus ladaniferus* (แลบดานัม) *Citrus bergamia* (มะกรูด) *Citrus sinensis* (ส้มเกลี้ยง) *Lavandula angustifolla* (ลาเวนเดอร์) *Ocimum basilicum* (โหระพา) *Origanum majorana* (มาโจแรม) *Pelargonium graveolens* (เจอราเนียม)
อาการกระสับกระส่าย กระวนกระวาย	*Pogostemon patchouli* (พิมเสน) *Lavandula angustifolia* (ลาเวนเดอร์) *Santalum album* (ไม้จันทร์) *Boswellia carteri* (กำยาน)
เหนื่อย เมื่อยล้า	*Citrus paradise* (เกรปฟรุต) *Coriandrum sativum* (ผักชี) *Cymbopogon nardus* (ตะไคร้หอม) *Eucalyptus radiate* (เปปเปอร์มิ้นดำ)
นอนไม่หลับ	Zingiber officinate (ขิง) *Cananga odorata* (กระดังงา) *Chamaemelum nobile* (คาโมมายส์)
เหนื่อยทางจิตใจ	*Mentha piperita* (เปปเปอร์มินต์) *Helichrysum angustifolium* (บานไม่รู้โรย) *O. basilicum* (โหระพา)
ความจำเสื่อม	Litsea cubeba (เมแชง) *R. officinalis cineole* (โรสแมรี่) *M. piperita* (เปปเปอร์มินต์)
อาการปวด	*Z. officinale* (ขิง) *Chamaemelum nobile* (คาโมมายส์) *Lavandula angustifolia* (ลาเวนเดอร์)

ฤทธิ์ต้านจุลชีพของน้ำมันหอมระเหย

น้ำมันหอมระเหยถูกนำมาทดสอบการออกฤทธิ์กับจุลชีพทั้งแบคทีเรียและยีสต์ ทำให้น้ำมันหอมระเหยกลายเป็นทางเลือกหนึ่งในการใช้เป็นยาปฏิชีวนะได้เนื่องจากน้ำมันหอมระเหยมีคุณสมบัติไม่ชอบน้ำ ทำให้สามารถทำลายผนังเซลล์ของแบคทีเรียทำให้เซลล์เกิดความเสียหาย ไซโทพลาสซึมเกิดการแข็งตัว โปรตีนที่เป็นองค์ประกอบของเยื่อหุ้มเซลล์เกิดความเสียหาย เกิดการรั่วไหลของเนื้อเซลล์ ลดแรงขับเคลื่อนของโปรตอน ลดการสร้าง ATP ทำให้น้ำมันยั้งหอมระเหยสามารถเจาะเข้าไปภายในเซลล์ของจุลชีพ ก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างและการทำงานของเซลล์ ทำให้จุลชีพตาย (Nazzaro *et al*., 2013) เช่น การ

ทดสอบการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียชนิด *Fusobacterium nucleatum*, Porphyromonas gingivalis, *Streptococcus mutans*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans* และ *Streptococus sobrinus* เป็นแบคทีเรียที่ติดต่อทางช่องปาก (Karbach *et al*., 2015)

ฤทธิ์ต้านการอักเสบของน้ำมันหอมระเหย

น้ำมันจากต้นทีทรี (*Melaleuca alternifolia*) สามารถยับยั้งปฏิกิริยาของฮิสตามีน (histamine) ซึ่งเป็นปฏิกิริยาที่ทำให้เกิดผื่นแดงในมนุษย์ น้ำมันหอมระเหยไม่มีฤทธิ์ทำลายเซลล์โดยตรง แต่จะเพิ่มการผลิตไซโตไคน์ interleukin-10 ที่มีฤทธิ์ต้านการอักเสบ (Murbach Teles Andrade *et al*., 2014) จากการทดลองของ Aazza และคณะ (2014) พบน้ำมันหอมระเหยจากมะนาว (*Citrus limon*) ยูคาลิปตัส (*Eucalyptus globulus*) และจากต้นไทม์ (*Thymus vulgaris*) มีฤทธิ์ต้านการอักเสบ

ฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งของน้ำมันหอมระเหย

กระบวนการตายของเซลล์มะเร็งอาศัยกลไก caspase-dependent ในเซลล์มะเร็ง น้ำมันหอมระเหยจากกระวานมีสารประกอบ geraniol มีฤทธิ์รักษาเนื้องอกในเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ (Carnessecchi, *et al*., 2002) เซลล์มะเร็งผิวหนังเมลาโนมา (melanoma M14 WT) ถูกยับยั้งด้วยน้ำมันทีทรีและ terpinen-4-ol (Calcabrini *et al*., 2004)

ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของน้ำมันหอมระเหย

อนุมูลอิสระที่ผลิตขึ้นระหว่างที่เกิดอาการอักเสบ สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายพันธุ์ของยีน ถ้าอนุมูลอิสระเหล่านี้ไม่ถูกกำจัดออกไป อนุมูลอิสระก็จะแพร่กระจายก่อให้เกิดความเสียหายต่อร่างกาย น้ำมันจากต้นทีทรี น้ำมันคานูก้า (*Kunzzea ericoides*) มานูก้า (*Leptospermum scoparium*) และน้ำมันหอมระเหยจากเมล็ดเทียนดำ (*Nigella sativa* L.) มีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ โดยไปเปลี่ยนแปลงการทำงานของเอนไซม์ superoxide dismutase (Baratta *et al*., 1998)

1.3 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1. เพื่อวิเคราะห์หาปริมาณฟลาโวนอยด์ของน้ำมันว่านน้ำ
2. เพื่อทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการสังเคราะห์เม็ดสีเมลานินของน้ำมันว่านน้ำ

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าได้รับ

ได้น้ำมันหอมระเหยจากว่านน้ำ ที่รู้ปริมาณของฟลาโวนอยด์และฤทธิ์ยับยั้งการสังเคราะห์เม็ดสีเมลานินของน้ำมันว่านน้ำ สำหรับประยุกต์ใช้ในการพัฒนาผลิตภัณฑ์สุขภาพและเวชสำอางซึ่งจะเป็นประโยชน์ต่อผู้บริโภค อีกทั้งเพื่อเป็นการเพิ่มมูลค่าให้กับวัชพืชได้อีกด้วย

บทที่ 2
วิธีการดำเนินงานวิจัย

2.1 สารเคมี

Tris (hydroxymethyl) aminomethane ยี่ห้อ Sigma Chemical Co.
HCl (hydrochloric acid) ยี่ห้อ Merch
NaCl ยี่ห้อ Fluka
Citric acid ยี่ห้อ Ajax chemical
KOH ยี่ห้อ Ajax chemical
Sodium carbonate ยี่ห้อ Fluka
Ethanol ยี่ห้อ Merch
Folin -Ciocalteu colorimetric
DPPH [2,2-diphenyl-1-picryhydrazyl]

2.2 อุปกรณ์และเครื่องมือ

กระดาษกรองเบอร์ 1
เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ ยี่ห้อ Biochrom รุ่น Libra S22
เครื่องปั่น ยี่ห้อ PHILIPS รุ่น HR-2001
เครื่องเซนตริฟิวจ์
เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง ยี่ห้อ METTLER TOLEDO รุ่น PB 153-s/FACT
เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง รุ่น BSA2202S
ตู้อบ (Hot air oven) ยี่ห้อ BINDER รุ่น FED, BF
เตาให้ความร้อน
เครื่องกวนสารละลาย ยี่ห้อ CAT รุ่น M6
ไมโครปิเปต ยี่ห้อ SOCOREX

2.3 วิธีการดำเนินงานวิจัย

2.3.1 การเตรียมน้ำมันหอมระเหยว่านน้ำ

นำเหง้าของว่านน้ำมาล้างทำความสะอาด หั่นเป็นชิ้นเล็ก ๆ แล้วนำว่านน้ำ 1 กิโลกรัม มาอบที่อุณหภูมิ 50°C เป็นเวลา 12 ชั่วโมง จากนั้นนำเหง้าที่อบแห้งแล้ว 100 กรัม ไปกลั่นน้ำมันหอมระเหยต่อเนื่องเป็นเวลา 12 ชั่วโมง

2.3.2 วิเคราะห์หาปริมาณฟลาโวนอยด์ของน้ำมันว่านน้ำ

การเตรียมสารละลายมาตรฐาน Quercetin เข้มข้น 1 mg/ml โดยชั่ง Quercetin มา 0.01 g ละลายด้วยเมทานอล 10 ml จากนั้นเจือจางให้มีความเข้มข้น 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 และ 0.5 mg/ml จากนั้นเติม 5% $NaNO_2$ ปริมาตร 150 µl บ่ม 5 นาที แล้วเติม 10% สารละลายอะลูมิเนียมคลอไรด์ ($AlCl_3$) ปริมาตร 150 µl เขย่า 30 วินาที ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 510 นาโมเมตร

การวิเคราะห์หาปริมาณฟลาโวนอยด์ เริ่มจากเจือจางน้ำมัน (10 เท่า) ใช้น้ำมันว่านน้ำ 1 ml เจือจางด้วย เอทานอล 10 ml จากนั้นกรองสารสกัดอีกครั้งด้วย membrane filter ขนาด 0.45 µm 2 ครั้ง จากนั้นดูดสารสกัด 0.5 ml จากนั้นเติม 5% $NaNO_2$ ปริมาตร 150 µl บ่ม 5 นาที แล้วเติม 10% สารละลายอะลูมิเนียมคลอไรด์ ($AlCl_3$) ปริมาตร 150 µl เขย่า 30 วินาที ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 510 นาโมเมตร คำนวณปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมดในหน่วยมิลลิกรัมสมมูลของ Quercetin ต่อปริมาณน้ำมันว่านน้ำ 1 ml (mg QE/1 ml น้ำมันว่านน้ำ)

2.3.3 ทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการสังเคราะห์เม็ดสีเมลานิน (เอนไซม์ไทโรซิเนส) ของน้ำมันว่านน้ำ

การเตรียมตัวอย่างน้ำมันว่านน้ำ เจือจางน้ำมัน 10 เท่า ใช้น้ำมัน 1 ml เจือจางด้วย DMSO 10 ml เตรียม substrate (L-dopa) ความเข้มข้น 2.5 mM ปริมาตร 10 ml ชั่ง L-dopa 0.0049 g ละลายด้วย0.1 M Tris-HCl, pH 6.8 และปรับปริมาตรเป็น 10 ml และเตรียมเอนไซม์ไทโรซิเน 52 unit/ml ใน 0.1 M Tris-HCl, pH 6.8

การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส ด้วยวิธี dopachrome method ดัดแปลงจาก Masuda และคณะ (2005) โดยแบ่งออกเป็น 4 หลอด (A, B, C, D) และเติมสารต่าง ๆ ตามตารางที่ 1 ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที หลังจากนั้นในแต่ละหลอด เติม 2.5 mM L-dopa ตั้งทิ้งไว้ 10 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 492 นาโนเมตร โดยใช้ 1% kojic acid เป็นสารมาตรฐาน

ตารางที่ 2.1 ชนิดและปริมาณสารที่ใส่ลงในหลอด A, B, C, D

หลอดที่	H_2O (µl)	0.1 M Tsis-HCl, pH 6.8 (µl)	Tyrosinase (52 U/ml)	น้ำมันว่านน้ำ (µl)
A	40	80	40	-
B	40	120	-	-
C	-	80	40	40
D	-	120	-	40

คำนวณหาร้อยละในการยับยั้งการสังเคราะห์เม็ดสีเมลานิน (เอนไซม์ไทโรซิเนส) จากสูตร

$$\% \text{ tyrosinase inhibition} = \frac{\left[(A-B)-(C-D)\right]}{A-B} \times 100$$

บทที่ 3
ผลการวิจัยและวิจารณ์ผล

1. ปริมาณฟลาโวนอยด์ของน้ำมันว่านน้ำ

นำว่านน้ำมากลั่นน้ำมัน จากนั้นวิเคราะห์หาปริมาณฟลาโวนอยด์ของน้ำมันว่านน้ำ พบว่าน้ำมันว่านน้ำมีปริมาณ ฟลาโวนอยด์เท่ากับ 9.35±0.60 มิลลิกรัมเคอร์ซิตินต่อมิลลิลิตร ซึ่งพบมีปริมาณมากกว่าดอกถั่วแระและดอกส้มป่อยที่ให้ค่าปริมาณฟลาโวนอยด์เท่ากับ 0.22±0.3 มิลลิกรัมเคอร์ซิตินต่อมิลลิลิตร และ 0.98±0.3 มิลลิกรัมเคอร์ตินต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ปริมาณฟลาโวนอยด์จากน้ำมันว่านน้ำ พบมีค่าน้อยกว่าดอกของเทียนบ้าน (44.74±0.82 มิลลิกรัมเคอร์ตินต่อกรัม) (อินทิราและพัชรพรรณ, 2561)

ตารางที่ 3.1 ปริมาณฟลาโวนอยด์ของน้ำมันว่านน้ำ

ตัวอย่างน้ำมันหอมระเหย	ปริมาณฟลาโวนอยด์ (มิลลิกรัมเคอร์ซิตินต่อมิลลิลิตร)
น้ำมันว่านน้ำ	9.35±0.60

2. ฤทธิ์ยับยั้งการสังเคราะห์เม็ดสีเมลานิน (เอนไซม์ไทโรซิเนส) ของน้ำมันว่านน้ำ

จากการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการสังเคราะห์เม็ดสีเมลานิน (เอนไซม์ไทโรซิเนส) ของน้ำมันว่านน้ำด้วยวิธี dopachrome method พบว่าน้ำมันว่านน้ำมีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.06±0.15 μl/ml (v/v) ซึ่งพบว่ามีประสิทธิภาพต่ำกว่า Kojic acid ซึ่งเป็นสารมาตรฐานที่ให้ค่า IC_{50} เท่ากับ 0.03±0.21 μl/ml (v/v) แต่มีประสิทธิภาพสูงกว่าสารสกัดจากดอกถั่วแระและดอกส้มป่อยที่ให้ค่า IC_{50} เท่ากับ 2.21±0.16 และ 1.91±0.0.09 มิลลิกรัม/มิลลิตร ตามลำดับ (สุธิราและประสบอร, 2559) สอดคล้องกับการทดลองของ Kubo และคณะ, 2000 พบสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ที่สกัดได้จากดอก *Heterotheca inuloides* เช่น quecetin มีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.07 mM, luteolin มีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.19 mM, kaempferol มีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.23 mM มีความสามารถในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสที่ดีเมื่อเทียบกับสารมาตรฐานกรดโคจิก (IC_{50} เท่ากับ 0.014mM) quecetin มีความสามารถยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสได้ดีเนื่องจากเนื่องจากมีโครงสร้างคล้ายกับสารมาตรฐานกรดโคจิก

ตารางที่ 3.2 ฤทธิ์ยับยั้งการสังเคราะห์เม็ดสีเมลานินของน้ำมันว่านน้ำ

ตัวอย่าง	$IC_{50} \pm$ SD (μl/ml)
น้ำมันว่านน้ำ	0.06±0.15
Kojic acid	0.03±0.21

บทที่ 4
สรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ

การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อวิเคราะห์หาปริมาณฟลาโวนอยด์และทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการสังเคราะห์เม็ดสีเมลานินของน้ำมันว่านน้ำ ทำการวิเคราะห์หาปริมาณฟลาโวนอยด์ด้วยวิธี Aluminium chloride method และทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการสังเคราะห์เม็ดสีเมลานินด้วยวิธี Dopachrome โดยใช้ L-dopa เป็นสารตั้งต้น จากการศึกษาพบว่าน้ำมันว่านน้ำมีปริมาณฟลาโวนอยด์เท่ากับ 9.35±0.60 มิลลิกรัมเคอร์ซิตินต่อมิลลิลิตร และฤทธิ์ยับยั้งการสังเคราะห์เม็ดสีเมลานินแสดงด้วยค่า IC_{50} เท่ากับ 0.06±0.15 (μl/ml) เปรียบเทียบกับกรดโคจิกซึ่งใช้เป็นสารควบคุมเชิงบวก ดังนั้นข้อมูลจากผลการวิจัยทั้งหมดแสดงให้เห็นว่าน้ำมันว่านน้ำสามารถใช้เป็นข้อมูลในการพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางสำหรับผิวกระจ่างใส

บรรณานุกรม

บุษราคัม สิงห์ชัย, นิศา ตระกูลภักดี, และสาวิตรี ทองลิ้ม. (2560). น้ำมันหอมระเหยจากเกสรบัวหลวงราชินี. วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี. 25(1): 27-34.

ประภัสสร วีระพันธ์, และวัชรี คุณกิตติ. (2554). คุณสมบัติในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของน้ำมันหอมระเหยในหลอดทดลอง. วารสารเภสัชศาสตร์อีสาน. 7(3): 30-38.

ปวันรัตน์ วิหงส์, พัชริน ส่งศรี, พลัง สุริหาร, คุมศร ลมไธสง, และกมล เลิศรัตน์ .(2557). ปริมาณสารไลโคปีนและเบต้าแคโรทีนในตัวอย่างฟักข้าวสายต้นต่าง ๆ. แก่นเกษตร. 42: 166-171.

พัชรี ขุนหลัด ยงยุทธ ตัณฑุลเวสส ธารารัตน์ ศุภศิริ และวราดุล ฉัตรทอง. 2551. การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารประกอบเคอร์คิวมินอยด์จากผงขมิ้น (*Curcuma longa* Linn.) วารสารวิทยาศาสตร์ มศว. 24(1), 125-139.

พิมพร ลีลาพรพิสิฐ. 2551. เครื่องสำอางสำหรับผิวหนัง.พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพฯ: โอ. เอส. พริ้นติ้งเฮ้าส์.

มานิตา หาญพานิชเจริญ. 2546. สารทำให้ผิวขาว. วารสารศูนย์บริการวิชาการ. 11(4), 19-23.

วทันยา ลิมปพะยอม, และณัฏฐา เลาหกุลจิตต์. (2557). องค์ประกอบทางเคมีและฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของน้ำมันหอมระเหยขิง. วารสารวิจัยและพัฒนา มจธ. 37(30): 297-303.

วรัญญา ชูขาวและนภาพร รัตนาถ. 2558. การตรวจสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของเปลือกและเนื้อผลไม้. การประชุมวิชาการและเสนอผลงานวิจัยระดับชาติ สร้างสรรค์และพัฒนา เพื่อก้าวหน้าสู่ประชาคมอาเซียน ครั้งที่ 2. 127-134.

สิรินภา คงเจริญ, วีระพันธุ์ ศรีดอกจันทร์, พัชรินทร์ ตัญญะ, พรศิริ เลี้ยงสกุม และรณฤทธิ์ ฤทธิรณ. (2557). การวิเคราะห์ปริมาณเบต้าแคโรทีนในผลปาล์มน้ำมันแบบรวดเร็ว. Khon kaen agriculture J. 42: 375-381.

สุกัญญา เดชอดิศัย นุรฮายานา โต๊ะเก็ง มาริณี ปลาปง อารีนา ดาราบากอ และอัสมัน ดือลง. 2555. ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของผลิตภัณฑ์สมุนไพรทำให้ผิวขาว. วารสารมหาวิทยาลัยทักษิณ. 15(2), 44-51.

สุธิรา มณีฉายและประสบอร รินทอง. 2559. ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารสกัดเมทานอลจากดอกถั่วและดอกส้มป่อย. ว. วิทย. มข. 44(1):142-152.

สุวรรณี แสนทวีสุข, ดวงใจ จงตามกลาง, ทัศน์วรรณ สมจันทร์, และปิติพงษ์ โตบันลือภพ. (2555). ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด ความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ และความสามารถในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ของพืชสมุนไพรบางชนิด. แก่นเกษตร. 40(2): 480-483.

อัญชนา เจนวิถีสุข. 2546. ป้องกันโรคด้วยสารต้านอนุมูลอิสระ .ในจดหมายข่าว RISE–AT New sletter. กรกฎาคม–สิงหาคม. [Online] Availablehttp : //www.ist.cmu.ac.th/

อรนุช นาคชาติ, วรรณา เอกทอง, และอรนุช คงลัก. (2555). สารประกอบฟีนอลิกและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในผงผักแขยง. วารารวิทยาศาสตร์ คชสาส์น. 36(2): 55-64.

โอภา วัชระคุปต์. 2549. *ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ*. โรงพิมพ์ พี เอส ปริ้นท์. กรุงเทพฯ.

Aazza, S., Lyoussi, B., Megias, C., Cortes-Giraldo, I., Vioque, J., Figueiredo, A.C. and Miguel, M.G. 2014. Antioxidant, anti-inflammatory and anti-proliferative activities of Moroccan commercial essential oils. Natural Product Communication, 9(4): 587-594.

Abdelnaser, A.E., Tran, D.X., Haruo, K. & Shinkichi, T. (2007). Antioxidant activity and contents of essential oil and phenolic compounds in flowers and seeds of *Alpinia zerumbet* (Pers) B. L. Burtt. & R.M. Sm

Aiemsaard, J., Aiumiamai, S., Taweechaisuppapong, S., Aromdee, C. & Khunkitti, W. (2010). Chemical composition, antioxidant activity and antibacterial action of eight essential oils against clinical isolates of mastitis pathogens. Int J Essent Oil Ther. 4:37-43.

Ando, H., Kondoh, H., Ichihashi, M. and Hearing, V.J. (2007). Approaches to identify inhibitors of melanin biosynthesis via the quality control of tyrosinase. Journal of Investigative Dermatology, 127, 751-761.

Andrade, E.H.A., Alves, C.N., Guimaraes, E.F., Carreira, L.M.M. and Main, J.G.S. (2011) Variability in essential oil composition of Piper dilatatum L.C. Rich. Biochemical Systematics and Ecology. 39(4-6): 669-675.

Baratta, M.T., Dorman, H.J.D., Dean, S.G., Brondi, D.M. and Ruberto, G. (1998). Chemical composition, antimicrobial and antioxidant activity of laurel, sage, rosemary, oregano and coriander essential oils. Journal of Essential Oil Research, 10(6): 618-627.

Baser, K.H.C. and Buchbauer, G. (2010). Handbook of essential oils: Science, Technology and Applications. Florida: CRC Press.

Brenes, A. & Roura, E. (2010). Essential oils in poultry nutrition: Main effects and modes of action. Animal Feed Science and Technology. 158(1): 1-14.

Buchbauer, G. (1993). Molecular interaction: biological effects and modes of action of essential oils. International. Journal of Aromatherapy. 5(1): 11-14.

Buckle, J. (2007). Literature review: should nursing take aromatherapy more seriously. Brittish Journal of Nursing. 16(2): 116-120.

Calcabrini, A., Stringaro, A., Toccacieli, L., Meschini, S., Marra, M., Colone, M., Salvatore, G., Mondello, F., Arancia, G. and Molinari, A. (2004). Terpinen-4-ol, the main component of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil inhibits the in vitro growth of human melanoma cells. Journal of Investigative Dermatology, 122(2): 349-360.

Carnesecchi, S., Langley, K., Exinger, F., Gosse, F. and Raul, F. (2002). Geraniol, a component of plant essential oils sensitizes human colon cancer cells to 5-fluorouracil treatment. IARC Scientific Publications. 156: 407-409.

Celeiro, M., Guerra, E., Lamas, J.P., Lores, M., Garcia-Jares, C. and Llompart, M. (2014). Development of a multianalyte method based on micro-matrix-solid-phase dispersion for the analysis of fragrance allergens and preservatives in personal care products. Journal of Chromatography A. 1344: 1-14.

Dadaung, J., Vichitphan, S., Dadaung, S., Hongsprabhas, P. & Boomsiri, P. (2011). High phenolics and antioxidants of some tropical vegetable related to antibacterial and anticancer activities. Afr. J. Pharm. Pharmacol. 5(5): 608-615.

Daviet, L. and Schalk, M. (2010). Biotechnology in plant essential oil production progress and perspective in metabolic engineering of the terpene pathway. Flavour and Fragrance Journal. 25(3): 123-127.

Djilani, A. and Dicko, A. (2012). The therapeutic benefits of essential oils, nutrition, well-being and health. In J. Bouayed (Ed.), InTech. DOI. 10:

Ebanks, J.P., Wickett, R.R. and Boissy, R.E. (2009). Mechanisms regulating skin pigmentation: The rise and fall of complexion coloration.International Journal of Molecular Sciences. 10(9): 4066-4087.

Grove, G.L. and Kligman, A.M. (1983). Age-associated changes in human epidermal cell renewal. Journal of Gerontology, 38(2): 137-142.

Gupta, V., Mittal, P., Bansal, P., Khokra, S.L. and Kaushik, D. (2010). Pharmacological potential of *Matricaria recutita*. Internation Jounal of Pharmaceutiical Sciences and Drug Reseach. 2(1): 12-16.

Halliwell, B. 1994. Antioxidant : sense or speculation. Nutrition Today. 29: 15-19.

Hunter, M. (2009). Essential oils: art, agriculture, science, industry and entrepreneurship. New York: Nova Science Publishers.

Jimbo, D., Kimura, Y., Taniguchi, M., Inoue, M. and Urakami, K. (2009). Effect of aromatherapy on patients with Alzheimer's disease. Psychogeriatrics. 9(4): 173-179.

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

Karbach, J., Ebenezer, S., Warnke, P.H., Behrens, E. and Al-Nawas, B. (2015). Antimicrobial effect of Australian antibacterial essential oils as alternative to common antiseptic solutions against clinically relevant oral pathogens. Clinical Laboratory. 61(1): 61-68.

Kim, J.H. & Kim, B.J. (1997). Biological screening of 100 plant extracts for cosmetic use: antioxidative activity and free radical scavenging activity. Int J. CosmetSci.19: 299-307.

Kubo, l., Kinst-Hori, l., Chaudhuri, S.K., Kubo, Y., SaAnchezb, Y. and Ogurab, T. (2000). Flavonols from Heterotheca inuloides: tyrosinase inhibitory activity and structural criteria. Bioorganic & Medicinal Chemistry. 8:1749-1755.

Kumar, R., Sharma, S., Sharma, S. and Kumar, N. 2016.Drying methods and distillation time affects essential oil content and chemical compositions of Acoruscalamus L. in the westwrn Himalayas. J.ApplyReserch on Medicinal and Aromatic Plant. 3:136-141.

Kumar, R., Sharma, S., Sharma, S., Kumari, A., Kumar, G.N., Padwad, Y., Ogra, R.K. and Kumar, N. 2016. Chemical composition, cytotoxicity and insecticidal activities of *Acorus calamus* accessions from the western Himalayas. Industrial Crops and Product. 94:520-527.

Lai, T.K., Cheung, M.C., Lo, C.K., Ng, K.L., Fung, Y.H., Tong, M. and Yau, C.C. (2011). Effectiveness of aroma massage on advanced cancer patients with constipation: a pilot study. Complementary Therapies in Clinical Practice. 17(1): 37-43.

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

Likhitwitayawuid, K. and Sriitularak, B. 2001. A new dimeric stilbene with tyrosinase inhibitory activity from *Artocarpus gomezianus*. Journal of Natural Products. 64, 1457-1495.

Martin, A., Varona, S., Navarrete, A. and Cocero, M.J. (2010). Encapsulation and co-precipitation processes with supercritical fluids: applications with essential oils. Open Chemical Engineering Journal. 4: 31-41.

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

Masuda, T., Yonemeri, S. & Nakata, M. (1999). Evaluation and Antioxidant Activity of Environmental plant: Activity of the Leaf Extracts from Seashore Plants. J. Agri. Food Chem. 47(4): 1749-1754.

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

Moss, M., Cook, J., Wesnes, K. and Duckett, P. (2003). Aroma of rosemary and lavender essential oils differentially affect cognition and mood in healthy adults. International Jounal of Neuroscience. 113(1): 15-38.

Murbach Teles Andrade, B.F., Conti, B.J., Santiago, K.B., Fernandes Junior, A. and Sforcin, J.M. (2014). Cymbopogon martini essential oiland geraniol at noncytotoxic concentrations exerted immunomodulatory anti-inflammatory effects in human monocytes. Journal of Pharmacy and Pharmacology. 66(10): 1491-1496.

Nazzaro, F., Fratianni, F., Martino, L.D., Coppola, R. Feo, V.D. (2013). Effect of essential oils on pathogenic bacteria. Pharmaceuticals. 6(12): 1451-1474.

Niu, C. and Aisa, H.A. (2017). Upregulation of melanogenesis and tyrosinase activity: Potential agents for Vitiligo. Molecules, 22(8): 1303.

Perry, N. and Perry, E. (2006). Aromatherapy in the management of psychiatric disorders clinical and neuropharmacological perspectives. CNS Drugs. 20(4): 257-280.

Pilaiyar, T., Manickam, M. and Namasivayam, V. (2017). Skin whitening agents: Medicinal chemistry perspective of tyrosinase inhibitors. Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry, 32(1), 403-425.

Price, S. and Price, L. (2011). Aromatherapy for health professionals. New York: Elsevier Churchill Livingstone.

Sarkar, R., Chugh, S. and Garg, V.K. (2012). Newer and upcoming therapies for melisma. Indian Journal of Dermatology, Venereology,and Leprology,78(4): 417.

Sasaki, K. and Yoshizaki, F. (2002). Nobiletin as a tyrosinase inhibitor from the peel of Citrus fruit. Biological and Pharmaceutical Bulletin. 25, 806-808.

Slinkard, K. & Singleton, V.L. (1977). Total phenol analysis: automation and comparison with manual methods. American Journal of Enology and Viticulture. 28(1): 49-55.

Slominski, A., Tobin, D.J., Shibahara, S. and Wortsman, J. (2012). Melanin pigmentation in mammalian skin and its hormonal regulation. Physiological Reviews. 84(4): 1155-1228.

Smith, C.A., Colins, C.T. and Crowther, C.A. (2011). Aromatherapy for pain management in labour. Cochrane Database of Systematic Reviews, 7. DOl: 10.1002/14651858. CD009215.

Sritularak, B., De-Eknamkul, W. and Likhitwitayawuid, K. 1998. Tyrosinase inhibitors from *Artocarpus lakoocha*. Thai Journal Phamaceutical Science. 22, 149-155.

Varney, E. and Buckle, J. (2013). Effect of inhaled essential oils on mental exhaustion and moderate burnout: a small pilot study. Journal of Alternative & Complementary Medicine. 19(1): 69-71.

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

Wangcharoen, W. & Morasuk, W. 2007. Antioxidant capacity and phenolic content of holy basil. Songklanakarin Journal of Science and Technology. 29(5): 1407-1415.

Zuzarte, M. and Salqueiro, L. (2015). Essential oils chemistry. In de Sousa D. (Eds). Bioactive essential oils and cancer. (pp. 19-61). Cham: Springer.