รายงานการวิจัย

ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของน้ำมันหอมระเหยจากเปลือกส้มโอ

Antioxidant and Tyrosinase Inhibitory of Essential Oil from Pomelo Peel

ฌานิกา แซ่แง่ ชูกลิ่น Chanika Saenge Chooklin

ธนากรณ์ ดำสุด Thanakon Dumsud

กัตตินาฏ สกุลสวัสดิพันธ์ Kattinat Sakulsawasdipan

คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการประมง

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย

ได้รับการสนับสนุนทุนวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย

งบประมาณเงินรายได้ ประจำปี พ.ศ. 2565

กิตติกรรมประกาศ

การวิจัยเรื่อง ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของน้ำมันหอมระเหยจากเปลือกส้มโอ ครั้งนี้ได้รับการสนับสนุนงบประมาณจากมหาวิทยาลัยราชมงคลศรีวิชัยในปีงบประมาณ 2565 ขอขอบพระคุณ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย วิทยาเขตตรังที่ให้การสนับสนุนทุนสนับสนุนในการวิจัย อุปกรณ์ เครื่องมือและสถานที่ในการดำเนินการวิจัย ให้สำเร็จลุล่วงไปได้

ขอขอบพระคุณคุณพ่อ คุณแม่และครอบครัว ที่คอยให้คำแนะนำ และให้กำลังใจในการทำโครงการวิจัยในครั้งนี้ และขอขอบคุณพี่ๆ เพื่อนๆ ทุกคนที่คอยให้คำแนะนำ และให้กำลังใจตลอดการทำงานวิจัยครั้งนี้ด้วย

สุดท้ายนี้ขอขอบคุณผู้ร่วมวิจัยทุกท่านที่ร่วมมือกันในการทำวิจัยครั้งนี้จนสำเร็จตามเป้าหมาย

ฌานิกา แซ่แง่ ชูกลิ่น

สิงหาคม 2566

ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของน้ำมันหอมระเหยจากเปลือกส้มโอ

ณานิกา แซ่แง่ ชูกลิ่น[1] ธนากรณ์ ดำสุด[2] และกัตตินาฏ สกุลสวัสดิพันธ์[1]

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาฤทธิ์ทางเคมีเบื้องต้น ได้แก่ ปริมาณฟีนอลิกรวม ปริมาณแทนนินรวม ปริมาณฟลาโวนอยด์รวม ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของน้ำมันหอมระเหยจากเปลือกส้มโอจากเปลือกสีเขียวและเปลือกสีขาว โดยสกัดด้วยไอน้ำ พบว่าเปลือกส้มโอสีเขียวมีปริมาณน้ำมันหอมระเหยมากที่สุดที่เวลา 30 นาที ทำการวิเคราะห์หาปริมาณฟีนอลิก รวม ปริมาณแทนนินรวม ปริมาณฟลาโวนอยด์รวม ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของน้ำมันหอมระเหยด้วยวิธี DPPH radical scavenging และฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสด้วยวิธี Dopachrome method จากการศึกษาพบสารพฤกษเคมีเบื้องต้น ได้แก่ ฟลาโวนอยด์ คูมาริน ซาโปนิน แทนนิน และ โฟลบาแทนนิน และปริมาณฟีนอลิกรวม ปริมาณแทนนินรวม และ ปริมาณฟลาโวนอยด์ เท่ากับ 155.62±0.05 mg GAE/g, 162.47±0.03mg TAE/g และ 144.82±0.05 mg QE/g ตามลำดับ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH radical scavenging พบว่ามีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงสุด โดยมีค่า EC50 เท่ากับ 13.42±0.06มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสด้วยวิธี Dopachrome method พบว่ามี สารสกัดมีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส โดยมีค่า EC50 เท่ากับ 12.58 ±0.04 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยสามารถนำน้ำมันหอมระเหยที่ได้ไปประยุกต์ใช้ในเครื่องสำอางได้

คำสำคัญ: ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส น้ำมันหอมระเหย

---

[1] คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการประมง มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคล ศรีวิชัย

[2] คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคล ศรีวิชัย

Antioxidant and Tyrosinase Inhibitory of Essential Oil from Pomelo Peel

Chanika Saenge Chooklin[1] Thanakon Dumsud[2] and Kattinat Sakulsawasdipan[1]

Abstract

The purpose of this research was to study the initial chemical activity, Total phenolic content, total tannin content, total flavonoid content, antioxidant and tyrosinase inhibitory activity of pomelo peel essential oil from green and white peel. by steam extraction. It was found that green pomelo peel contained the highest essential oil content at 30 min. Total phenolic content, total tannin content were analyzed. total flavonoid content. Antioxidant of essential oils by DPPH radical scavenging method and tyrosinase inhibition activity by Dopachrome method. and flobatannin and total phenolic content Total tannin content and flavonoid content were 155.62±0.05 mg GAE/g, 162.47±0.03mg TAE/g and 144.82±0.05 mg QE/g, respectively. Antioxidant activity by DPPH radical scavenging method showed that It has the highest antioxidant activity with an EC50 value of 13.42±0.06 mg/ml. and tyrosinase inhibitory activity by Dopachrome method. The extract showed tyrosinase inhibitory activity with EC50 of 12.58 ± 0.04 mg/ml.

Keyword: Antioxidant activity, Tyrosinase Inhibition activity, Essencial oil

---

[1]Faculty of Science and Fisheries Technology, Rajamangala University of Technology Srivijaya,Trang

[2]Faculty of Science and Technology, Rajamangala University of Technology Srivijaya, Nakonsrithammarat.

สารบัญ

		หน้า
กิตติกรรมประกาศ		ก
บทคัดย่อภาษาไทย		ข
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ		ค
สารบัญ		ง
สารบัญตาราง		จ
สารบัญภาพ		ฉ
บทที่		
1	บทนำ	1
	บทนำต้นเรื่อง	1
	ตรวจเอกสาร	1
	วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย	10
	ขอบเขตโครงการวิจัย	10
	ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	10
2	วัสดุ อุปกรณ์ วิธีการวิเคราะห์และวิธีการทดลอง	11
	วัสดุและอุปกรณ์	11
	วิธีการวิเคราะห์	11
	วิธีการทดลอง	11
3	ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง	13
	กิตติกรรมประกาศ	16
4	สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ	17
5	เอกสารอ้างอิง	17

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	ปริมาณน้ำมันหอมระเหยที่สกัดด้วยการกลั่นด้วยไอน้ำที่เวลาต่างๆ	13
2	การทดสอบฤทธิ์ทางเคมีเบื้องต้นของน้ำมันหอมระเหยจากเปลือกส้มโอทั้งสองลักษณะที่สกัดได้	13
3	ปริมาณฟีนอลิกรวม แทนนินรวม และฟลาโวนอยด์รวมของน้ำมันหอมระเหยจากเปลือกส้มโอที่สกัดได้	14
4	ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของน้ำมันหอมระเหยที่สกัดได้จากเปลือกส้มโอ	14
5	ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของน้ำมันหอมระเหยที่สกัดได้จากเปลือกส้มโอ	15

บทที่1

บทนำ

บทนำต้นเรื่อง

เอนไซม์ไทโรซิเนสเป็นเอนไซม์ที่มีอะตอมของคอปเปอร์เป็นโคแฟคเตอร์ที่ช่วยเอนไซม์ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาไฮดรอกซิเลชันและออกซิเดชันของสารตั้งต้นที่เป็นสารประกอบโมโนฟีนอลและไดฟีนอลด้วยการทำงานของmonophenolase activity และ diphenolase activity ตามลำดับ โดยใช้ออกซิเจน และได้ผลิตภัณฑ์เป็นสารประกอบ o-dopaquinone และด้วยความสำคัญทางชีวภาพของเอนไซม์ไทโรซิเนสที่เป็นเอนไซม์ตัวแรกในวิถีการสร้างเมลานินซึ่งพบได้ทั้งในแบคทีเรีย เห็ดรา พืช สัตว์ รวมทั้งในมนุษย์ โดยเฉพาะในมนุษย์นั้นเมลานินนี้มีหน้าที่สำคัญในการป้องกันผิวหนังจากแสงแดดและช่วยป้องกันอันตรายจากรังสียูวี (Khan, 2007; Song et al., 2006) แต่อย่างไรก็ตามการผลิตเมลานินที่มากเกินความจำเป็นอาจทำให้เกิดโรคความผิดปกติของการสร้างเม็ดสี(hyperpigmentation) และทำให้เกิด ฝ้า กระ จุดด่างดำได้ (Chen et al., 2013) ด้วยเหตุนี้จึงมีความพยายามที่จะค้นหาสารที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส นั่นทำให้เอนไซม์ไทโรซิเนสเป็นเป้าหมายที่น่าสนใจสำหรับการศึกษาการยับยั้งโดยสารชนิดต่างๆ ทั้งที่ได้จากกระบวนการทางเคมี และสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติสารที่ใช้เป็นตัวยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสในปัจจุบันนั้นคือกรดโคจิก (kojic acid) และอาร์บูติน (arbutin) ซึ่งเป็นสารอนุพันธ์ของสารประกอบไฮดรอกซีไพราโนน และไกลโคซิลไฮโดรควิโนน ตามลำดับ ที่ใช้เป็นส่วนประกอบสำคัญในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง สารอนุพันธ์ทั้งสองชนิดนี้ได้มาจากการสกัดจากธรรมชาติ โดยกรดโคจิกนั้นเป็นสารอนุพันธ์ที่เป็นผลพลอยได้จากกระบวนการหมักข้าวมอลต์โดยเชื้อรา Aspergillus oryzae (Yabuta, 1924; Bently, 2006, Yamada et al., 2014) ในขณะที่สารอาร์บูตินนั้นได้จากการสกัดจากพืชตระกูลแบร์เบอร์รี (Pop et al., 2009) ผลการศึกษาจานวนมากที่แสดงให้เห็นว่าสารอนุพันธ์ทั้งสองชนิดนี้สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสที่เป็นทั้ง monophenolase activity และ diphenolase activity ได้ เนื่องจากคุณสมบัติของการเป็นสารประกอบอะโรมาติกที่มีโครงสร้างคล้ายคลึงกับสารตั้งต้นทั้งที่เป็นสารประกอบโมโนฟีนอลและไดฟีนอล ด้วยเหตุนี้ในโครงการวิจัยนี้จึงสนใจที่จะศึกษาหาสารประกอบทางเคมีที่ได้จากผลิตภัณฑ์ธรรมชาติโดยเฉพาะจากส่วนสกัดจากเปลือกผลไม้เหลือทิ้งที่มีอยู่ในท้องถิ่น ซึ่งน่าจะมีสารที่มีองค์ประกอบทางเคมีที่มีโครงสร้างคล้ายคลึงกับสารตั้งต้นและสามารถแสดงผลการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสได้ นอกจากนั้นยังจะศึกษาสมบัติทางกายภาพและความเสถียรของสารที่สกัดได้ เพื่อประเมินศักยภาพของสารในการพัฒนาเป็นตัวยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสสำหรับใช้ในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางในอนาคต

ตรวจเอกสาร

1. น้ำมันหอมระเหย (essential oil)

เป็นผลิตภัณฑ์ธรรมชาติขั้นทุติยภูมิ ซึ่งสวนใหญ่กระบวนการชีวสังเคราะห์มาจากหน่วยไอโซพรีน (isoprene unit) 2-3 หน่วย เกิดเป็นสารกลุ่มโมโนเทอร์พีน (monoterpene) เซสควิเทอร พีน (sesquiterpene) และสังเคราะห์มาจากกรดชิคิมมิค เกิดเป็นสารกลุ่ม ฟินิลโปรเพน (phenylpropane) พืชบางชนิดเก็บสะสมน้ำมันหอมระเหยไว้ในขนต่อมน้ำมัน เช่น วงศ์โหระพา (Labiatae) พืชบางชนิดเก็บสะสมไว้

ในท่อน้ำมัน เช่น วงศ์ผักชี (Umbelliferae) พืชบางชนิดเก็บสะสมไว้ใน ชองว่างของเนื้อเยื่อขนาดใหญ่ เช่น วงศ์ส้ม (Rutaceae) พืชบางชนิดเก็บสะสมไว้ในเซลล์พาเรนไคมา เช่น ดอกกุหลาบ และ ดอกมะลิ เป็นต้น การศึกษาความหลากหลายของพืชที่สร้างน้ำมันหอมระเหย สะท้อนให้เห็นวาน้ำมันหอมระเหยที่พืชสร้างขึ้นและกระจายในบรรยากาศทำให้มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของระบบนิเวศบริเวณใกล้ อีกทั้งยังมีผลให้เกิดการเคลื่อนย้ายถิ่นฐานของสัตว์บางชนิด รวมทั้งการเจริญเติบโตของพืชบางชนิดด้วย อย่างเช่น กรณีศึกษาป่าสน เป็นต้น การที่พืชสร้างสารเคมีที่เป็นองค์ประกอบของน้ำมันหอมระเหยและทำให้เกิดกลิ่นต่างกันในแต่ละต้น (species) ขึ้นอยู่กับองค์ประกอบทางเคมีต่าง ๆ ที่มารวมกันเข้าซึ่งแตกต่างกันทั้งชนิดและปริมาณ ทำให้เกิดกลิ่นที่แตกต่างกัน ชนิดและปริมาณขององค์ประกอบต่าง ๆ ในแต่ละพืชจะคงที่ จึงทำให้เกิดเป็นกลิ่นเฉพาะตัว เช่น กุหลาบ กระดังงา ราชาวดี เป็นต้น (นิจศิริ เรืองรังษี, 2550) การวิเคราะห์น้ำมันหอมระเหยนั้นสามารถจำแนกตามลักษณะการวิเคราะห์ได้เป็นการวิเคราะห์ เชิงคุณภาพและการวิเคราะห์เชิงปริมาณ ผลการวิเคราะห์สามารถทราบถึงองค์ประกอบทางเคมีว่า ประกอบด้วยสารเคมีอะไรบ้าง ทราบความเข้มข้น ทราบสัดส่วนของสารเคมีชนิดต่าง ๆ ในน้ำมันหอมระเหยนั้น ๆ ซึ่งนำไปสู่การกำหนดมาตรฐานและการตรวจสอบมาตรฐานของน้ำมันหอมระเหย วิธีการหรือ เทคนิควิเคราะห์ทางเคมีนั้นมีหลายวิธี แต่วิธีที่เหมาะสมกับการวิเคราะห์น้ำมันระเหย คือ วิธีแก๊สโคมาโทกราฟ เพราะวิธีนี้สิ่งที่จะวิเคราะห์นั้น ต่องสามารถอยู่ในสภาพแก๊สได้ที่อุณหภูมิเหมาะสม สวนหัววัดของเครื่องแก๊สโคมาโทกราฟ (GC detector) มีหลายประเภท แต่ที่เหมาะกับการแยกและศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันหอมระเหยซึ่งมักประกอบด้วยสารเคมีหลายสิบชนิดและหลายกลุ่มสาร คือ แมสสเปกโทรมิเตอร์ (Mass spectrometer) (นิจศิริ เรืองรังษี, 2550)

2. แหล่งที่มาของน้ำมันหอมระเหย (ฐาปนีย หงสรัตนาวรกิจ, 2550)

น้ำมันหอมระเหยเป็นน้ำมันที่สกัดได้จากส่วนต่าง ๆ ของพืช ได้แก่ ดอก ผล เปลือกผล เมล็ด ใบราก ลำต้นใตดิน เนื้อไม้ หรือเปลือกไม้ โดยพืชเหล่าจะมีบริเวณพิเศษซึ่งทำหน้าที่เก็บสะสมสารที่มีกลิ่นหอม ได้แก่

1. เซลล์น้ำมัน (Oil cells) หรือเซลล์เรซิน (Resin cells) พบได้จากพืชวงศ์อบเชย (Lauraceae) พืชวงศ์ขิง (Zingiberaceae) และพืชวงศ์พริกไทย (Piperaceae)

2. โพรงเก็บน้ำมัน (Oil cavities) หรือถุงน้ำมัน (Oil sacs) พบได้จากพืชวงศ์ส้ม (Rutaceae) และพืชวงศ์ชมพู (Myrtaceae)

3. ช่องเก็บน้ำมัน (Oil canals) หรือช่องเก็บเรซิน (Resin canals) พบได้จากพืชวงศ์ผักชี (Apiaceae/Umbelliferae) และพืชวงศ์สน (Pinaceae)

4. ท่อเก็บน้ำมัน (Oil ducts) พบได้จากพืชวงศ์ Asteraceae เช่น คาโมไมล์

5. Glandular hairs พบได้จากพืชวงศ์กะเพรา (Lamiaceae)

6. Internal hairs พบได้จากพืชวงศ์กล้วยไม้ (Orchidaceae)

7. บริเวณเซลล์เนื้อเยื่อบาง ๆ รอบพาเรนไคมา (Parenchyma) หรือ Idioblast พบได้จากพืชวงศ์จำปา (Magnoliaceae)

น้ำมันหอมระเหยสามารถพบในส่วนต่าง ๆ ของพืช ได้แก่ เมล็ด ใบ ดอก ผล เปลือกผล ราก เนื้อไม้ กัม หรือเรซิน

3. องค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันหอมระเหย (ฐาปนีย หงสรัตนาวรกิจ, 2550)

น้ำมันหอมระเหยเป็นสารประกอบที่มีสวนผสมซับซ้อน แต่ละชนิดประกอบด้วย องค์ประกอบทางเคมีหลายชนิด สวนใหญ่มักจะเป็นสารประกอบจำพวกเทอรพีนส์ (Terpenes) สูตรโดยทั่วไป คือ $(C_5H_8)_n$ สามารถแบ่งตามองค์ประกอบทางเคมีได้ 3 ประเภท ดังนี้

1. โมโนเทอรพีนส์ (Momoterpenes) มีอะตอมของคาร์บอนเป็นโครงสร้าง หลัก10 อะตอม เกิดจากการนำ isoprene 2 ตัวมาเชื่อมต่อกัน มีทั้งในรูปของสารเรียงตัว แบบเป็นวง เชน limonene พบมากในน้ำมันมะนาวและน้ำมันผิวส้ม และเรียงตัวแบบไม่เป็นวง เช่น β-myrcene, linalool น้ำมันหอมระเหยในกลุ่มนี้มีคุณสมบัติในการกระตุ้นระบบประสาท ระงับเชื้อและขับเสมหะ นอกจากนี้ ยังพบว่า มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง และชักนำให้เกิด apoptosis ได้อีกด้วย

2. เสสควิเทอรพีนส (Sesquiterpenes) มีอะตอมของคารบอนเป็นโครงสร้างหลัก 15 อะตอม เกิดจากการนำ isoprene 3 ตัวมาเชื่อมต่อกัน ตัวอย่าง เช่น สาร β-caryophyllene พบมากในน้ำมันในฝรั่ง สาร Zingiberene พบมากในน้ำมันสกัดจากพืชตระกูลขิง สารในกลุ่มมีคุณสมบัติต้านการอักเสบช่วยผ่อนคลาย

3. ฟีนิลโพรพีน (Phenylpropenes) มีโครงสร้างหลักเป็นวงอะโรมาติก (Aromatic ring) ต่อกับอะตอมของคาร์บอน 3 อะตอม เช่น สาร Eugenol/Cinnamic aldehyde พบในน้ำมันหอมระเหยจากกานพลู อบเชยจีน อบเชยลังกา มีคุณสมบัติในการต้านแบคทีเรียและชาเฉพาะที่ (Local anesthetic) สาร Anethole/Estragole พบได้ใน น้ำมันหอมระเหยจากต้นจันทน์เทศ (Nutmeg) โหระพา (Sweet basil) เป็นต้น มีคุณสมบัติในการแก้อาการเกร็ง น้ำมันหอมระเหยแต่ละชนิดจะมีองค์ประกอบที่มีความหลากหลาย แต่สวนใหญ่พืชในวงศ์เดียวกันจะมีองค์ประกอบที่คล้ายกัน เช่น น้ำมันหอมระเหยจากพืชวงศ์ส้มจะมีสารกลุม Monoterpenes โดยเฉพาะ Limonene เป็นองค์ประกอบหลัก

4. วิธีการสกัดน้ำมันหอมระเหย (Methods of Extraction) (Mcguinness H., 2003, ฐาปนีย์ หงส์รัตนาวรกิจ, 2550, สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย, 2548)

การสกัดน้ำมันหอมระเหยจากพืชธรรมชาติมีหลายวิธีด้วยกัน โดยการเลือกวิธีการสกัดน้ำมันหอมระเหยจะต้องพิจารณาลักษณะและปัจจัยต่าง ๆ ร่วมด้วย ตัวอย่าง เช่น ส่วนของพืชที่นำมาสกัด คุณสมบัติทางเคมีและกายภาพของน้ำมันหอมระเหยที่ต้องการ วัตถุประสงค์ของการนำน้ำมันหอมระเหยไปใช้ ฯลฯ วิธีการสกัดน้ำมันหอมระเหยสามารถแบงออกได้ ดังต่อไปนี้

4.1 การกลั่น (Distillation) วิธีนี้เป็นวิธีที่นิยมใช้กันอย่างแพร่หลาย เพราะเป็นวิธีที่ประหยัดและสามารถใช้แยก น้ำมันหอมระเหยได้เกือบทุกชนิด สิ่งที่สำคัญที่ต้องควบคุมในการกลั่น คือ ระยะเวลาและอุณหภูมิ เพราะจะส่งผลถึงคุณภาพและกลิ่นของน้ำมันที่ได้ การกลั่นแบงออกได้3 วิธี คือ

1) การกลั่นด้วยน้ำ (Water distillation / hydrodistillation) นิยมใช้กับพืชที่

มีองค์ประกอบทางเคมีไม่สลายตัวเมื่อถูกความร้อน โดยการนำพืชที่ต้องการกลั่นมาใส่ในหม้อกลั่น แล้ว เติมน้ำจนท่วมพืช ต้มจนน้ำเดือด เมื่อน้ำเดือดระเหยเป็นไอ ไอน้ำจะช่วยพาน้ำมันหอมระเหยที่อยู่ในเนื้อเยื่อพืชออกมา เมื่อผ่านเครื่องควบแน่น ไอน้ำและไอของน้ำมันหอมระเหยจะควบแน่นเป็นของเหลว ได้เป็นน้ำและน้ำมันหอมระเหยแยกออกจากกัน ข้อเสียของวิธีนี้ คือ ในกรณีที่ต้องกลั่นพืช ปริมาณมาก ๆ ความร้อนที่ให้สู่หม้อกลั่นจะไม่สม่ำเสมอตลอดทั้งหม้อกลั่น ก่อให้เกิดการไหม้หรือการ สลายตัวขององค์ประกอบบางชนิดทำให้กลิ่นของน้ำมันหอมระเหยเปลี่ยนไป หรืออาจมีกลิ่นของ ภาชนะติดมาด้วยสำหรับการกลั่นพืชปริมาณน้อย ๆ ในห้องปฏิบัติการ เราสามารถทำได้โดยใช้ชุดกลั่นที่ทำจากเครื่องแก้ว เรียกว่า ชุดกลั่นชนิด Clevenger

2) การกลั่นด้วยน้ำและไอน้ำ (Water and steam distillation) นิยมใช้กับพืชที่มีองค์ประกอบทางเคมีสลายตัวเมื่อถูกความร้อนโดยตรง ทำโดยนำพืชที่ต้องการกลั่นมาวางบนตะแกรงที่อยู่เหนือหม้อต้มน้ำ ให้ความร้อนจนน้ำเดือดกลายเป็นไอน้ำ ไอน้ำจะช่วยพาน้ำมันหอมระเหยแล้ว ควบแน่นกลับมาเป็นน้ำกับน้ำมันหอมระเหย การกลั่นโดยวิธีนี้ อาจเรียกว่า Wet steam พืชที่ใช้กลั่น โดยวิธีนี้จะมีคุณภาพดีกว่าวิธีแรก

3) การกลั่นด้วยไอน้ำ (Steam distillation) ทำโดยการนำพืชที่ต้องการกลั่นมาวางบนตะแกรงที่อยู่เหนือหม้อกลั่นให้ผ่านความร้อนจากไอน้ำ ไอน้ำจะเป็นตัวพาน้ำมันหอมระเหยในพืชระเหยออกมาอย่างรวดเร็ว ข้อดีของวิธีนี้คือ ใช้เวลากลั่นสั้นและน้ำมันหอมระเหยที่ได้มีคุณภาพและ ปริมาณสูงกว่าสองวิธีแรก พืชที่ไม่เหมาะสมในการกลั่นด้วยวิธีนี้คือ ส่วนของพืชที่มีลักษณะบาง เช่น กลีบกุหลาบ ควรใช้วิธีการสกัดโดยใช้ไขมันจะเหมาะสมกว่า

4.2. การสกัดโดยใช้ตัวทำละลาย (Solvent extraction) วิธีนี้จะทำให้ได้น้ำมันหอมระเหยที่มีความเข้มข้นสูง (สิริลักษณ มาลานิยม, 2545) โดยตัวทำละลายที่นิยมใช้ ได้แก่ ปิโตรเลียมอีเทอร์ เบนซีนหรือเฮกเซน ซึ่งจะสกัดสารหอมจากพืชออกมา ซึ่งจะมีไข สารสีและแอลบูมินออกมาด้วย นำสารที่สกัดได้ไประเหยไล่ตัวทำละลายออกที่อุณหภูมิต่ำภายใต้ระบบสุญญากาศจะได้ส่วนที่เรียกว่า concrete เราสามารถนำconcrete ไปใช้ในการแต่งกลิ่นสบู่ได้ แต่ไม่นิยมใช้ในน้ำหอมเพราะยังไม่บริสุทธิ์เพียงพอ วิธีนี้ไม่นิยมนำไปใช้ในอุตสาหกรรมเครื่องสำอางและอาหาร เนื่องจากยังมีสารละลายที่เป็นพิษตกค้างอยู่

4.3. การบีบหรือการบีบเย็น (Expression/Cold expression) วิธีนี้มักใช้กับพืชตระกูลส้ม เช่น ส้ม มะนาว มะกรูด ส้มโอ โดยการบีบเปลือกของ ผลไม้ทำให้เซลล์ของพืชแตกออกแล้วปล่อยน้ำมันออกมา เนื่องจากการสกัดด้วยวิธีนี้ไม่ใช้ความร้อนจึงทำให้น้ำมันหอมระเหยมันหอมระเหยที่ได้มีกลิ่นใกล้เคียงกับพืชสด แต่มีข้อเสียคือ น้ำมันที่ได้จะมีปริมาณน้อยและไม่บริสุทธิ์

4.4. การสกัดโดยใช้ไขมัน (Enfleurage) วิธีนี้มักใช้กับดอกไม้กลีบบางจำพวกกุหลาบและดอกมะลิ โดยการนำดอกไม้มาวาง ทับถาดกระจกที่เกลี่ยด้วยไขมันสัตว์บาง ๆ เพื่อให้ไขมันดูดซับสารหอมจากดอกไม้ โดยใช้เวลาประมาณ 1-3 วันกระบวนการนี้จะทำซ้ำ ๆ กันจนกระทั่งไขมันดูดสารหอมอย่างเพียงพอ ไขมันที่ดูดสารหอมนี้ เรียกว่า Pommade นำ Pommade ไปละลายในแอลกอฮอล์ก็จะได้น้ำมันหอมระเหยออกมาซึ่งการผลิตน้ำมันหอมระเหยมักจะสกัดด้วยวิธีนี้มากกกว่า 10%

4.5. การสกัดโดยใช้คาร์บอนไดออกไซด์ (Super-critical carbon dioxide extraction) วิธีนี้เป็นวิธีการสกัดน้ำมันหอมระเหยแบบใหม่ โดยใช้คาร์บอนไดออกไซด์ในรูปของเหลว และแกสภาพภายใต้ความดันและอุณหภูมิที่สูง โดยใช้ความดันประมาณ 200atm ที่อุณหภูมิประมาณ 30o C น้ำมันหอมระเหยที่ได้จะมีคุณภาพดีและมีความบริสุทธิ์สูง แต่มีข้อเสียคือ เครื่องมือมีราคา แพงมากการวิเคราะห์หาองค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันหอมระเหย (สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย, 2548)

5.น้ำมันหอมระเหยประกอบด้วยองค์ประกอบทางเคมีหลายชนิดแตกต่างกันไป ในการวิเคราะห์หาองค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันหอมระเหย สามารถทำได้หลายวิธี ที่นิยมนำมาใช้ในการวิเคราะห์ ได้แก่

5.1. แก๊สโคมาโทกราฟี (Gas Chromatography, GC) เป็นวิธีที่นิยมใช้ในการวิเคราะห์หาองค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันหอมระเหยมากที่สุด คอลัมน์ที่นิยมใช้เป็นแบบ Capillary ภายในจะบรรจุและเคลือบด้วยเฟสนิ่ง (Stationary phase) เช่น DB-1, Carbowax, OV-1, OV-101 ฯลฯ ในการเลือกชนิดของเฟสนิ่งเป็นสิ่งที่สำคัญมากเพราะจะมีผลต่อประสิทธิภาพในการแยกสารและการวิเคราะห์หากเลือกไม่เหมาะสมอาจเกิดความผิดพลาดและทำให้การวิเคราะห์เป็นไปได้ยาก เครื่องตรวจวัดที่นิยมใช้ ได้แก่ FID (The Flame Ionization Detector) ใช้สำหรับตรวจและวัด ปริมาณขององค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันหอมระเหยบางชนิด

5.2. High Performance Liquid Chromatography (HPLC) เป็นเทคนิคอีกชนิดหนึ่งที่นำมาใช้ในการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีในน้ำมันหอมระเหย แต่ไม่เป็นที่นิยมใช้มากนัก สวนใหญ่จะใช้คอลัมน์ชนิด normal phase

5.3. Hyphenated และ Multidimensional gas chromatography Hyphenated หรือ Multidimensional เป็นเทคนิคที่ใช้ในการวิเคราะห์หาองค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันหอมระเหยที่มีประสิทธิภาพมากขึ้น และเกิดขึ้นเมื่อไม่นานมานี้ (Prats, MS., and Jimenez, A., 2010) เป็นการนำ เทคนิคตั้งแต่ 2 เทคนิคขึ้นไปมาวิเคราะห์หาองค์ประกอบของน้ำมันหอมระเหย โดยอาจนำเครื่องมือ ชนิดเดียวกันต่อพ่วงเข้าด้วยกัน เช่น GC-MS เป็นเทคนิคที่นิยมใช้มากที่สุด เพื่อเป็นการตรวจสอบและยืนยันผลที่ได้ จากการวิเคราะห์ครั้งแรกด้วย GC-FID

5.4. Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy (NMR) เป็นเทคนิคที่ใช้ในการศึกษาโครงสร้างของสารในน้ำมันหอมระเหย โดยดูจากค่าการดูดกลืนพลังงานเรโซแนนซ์ขอะตอมของ โปรตอนและคาร์บอนในโมเลกุลของสารนั้น ๆ

6. การควบคุมคุณภาพของน้ำมันหอมระเหย

การควบคุมคุณภาพของน้ำมันหอมระเหยทำได้ทั้งเชิงคุณภาพและเชิงปริมาณ โดยการควบคุมเชิงคุณภาพจะเป็นการตรวจสอบคุณสมบัติทางเคมีกายภาพของน้ำมันหอมระเหยซึ่งเป็น ลักษณะเฉพาะ ตัวของน้ำมันหอมระเหยแต่ละชนิด เช่น

1. ความหนาแน่น (Density) หรือความถ่วงจำเพาะ (Specific gravity)
2. ดัชนีหักเหของแสง (Refractive index)
3. การละลาย (Solubility)
4. การหมุนระนาบของแสงโพลาไรส์ (Optical rotation)

ส่วนการควบคุมคุณภาพเชิงปริมาณจะวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันหอมระเหย วิธีวิเคราะห์ที่นิยมใช้ ได้แก่

1. โครมาโทกราฟีแบบชั้นบาง (Thin layer chromatography; TLC) เป็นวิธีที่ง่าย และรวดเร็วสามารถใชวิเคราะห์สารได้ทั้งเชิงคุณภาพและปริมาณ

2. โครมาโทกราฟีแบบแกส (Gas chromatography; GC) เป็นวิธีที่ใช้ในกาวิเคราะห์ สารที่ระเหยได้ สามารถแสดงผลการวิเคราะห์ที่เป็นโครมาโทแกรม (Chromatogram) ที่มีรูปแบบเฉพาะตัว

3. โครมาโทกราฟีแบบแกส/แมสสเปกตรีเมตรี (Gas chromatography/Mass spectrometry; GC/MS) เป็นวิธีที่นิยมใช้ในการวิเคราะห์น้ำมันหอมระเหยที่สุดในปัจจุบันมีความ จำเพาะเจาะจงสูง ทำได้รวดเร็ว แต่มี ข้อเสียคือ ต้องใช้ผู้ที่มีความชำนาญเฉพาะในการทำวิเคราะห์ และเครื่องมือมีราคาค่อนข้างสูง

ส่วนใหญ่ปัญหาของการควบคุมคุณภาพของน้ำมันหอมระเหยมักเกิดจากการที่น้ำมันหอมระเหยแต่ละชนิดมีองค์ประกอบทางเคมีหลากหลาย มีสูตรโครงสร้างที่แตกต่างกัน หรือมีสารที่ความคล้ายคลึงกันในปริมาณที่น้อยมาก ทำให้การวิเคราะห์ค่อนข้างยุ่งยาก อย่างไรก็ตามมีการจัดทำด้านระบบมาตรฐานด้านคุณภาพของน้ำมันหอมระเหยโดยหน่วยงาน หรือองค์กรต่าง ๆ เพื่อช่วยในการรับรองความปลอดภัยและคุณภาพของน้ำมันหอมระเหยแต่ละชนิด ระบบมาตรฐานด้านคุณภาพของ น้ำมันหอมระเหยที่สำคัญ และเป็นที่นิยมในปัจจุบัน ได้แก่

1. The International Organization for Standardization (ISO)
2. The Essential Oil Association of the United State (EOA)
3. The International Fragrance Research Association (IFRA)
4. The Food and Drug Administration of the United State (FDA)
5. The Flavor and Extracts Manufacturers Association of the USA (FEMA)
6. The International Federation of Essential Oils and Aroma Trade (IFEAT)

ตำรับยา เช่น British Pharmacopocia (BP), European Pharmacopocia (EP) ได้มีข้อกำหนดเกี่ยวกับการตรวจสอบคุณภาพของน้ำมันหอมระเหยต่าง ๆ ได้แก่

1. ลักษณะทั่วไป เช่น สถานะ สี และกลิ่น เป็นต้น
2. คุณสมบัติทางเคมีชีวภาพ เช่น ความหนาแน่น ความถ่วงจำเพาะ ดัชนีความหักเหของแสง การละลาย และการหมุนระนาบของแสงโพลาไรส์ เป็นต้น
3. องค์ประกอบทางเคมี เช่น การวิเคราะห์โลหะหนัก การวิเคราะห์สารปลอมปน เป็นต้น

บางประเทศมีข้อกำหนดสำหรับผู้ผลิตน้ำมันหอมระเหยเพื่อให้มีคุณภาพและมาตรฐานเดียวกัน โดยผู้ผลิตต้องจัดทำ Material Safety Data Sheet (MSDS) ซึ่งประกอบด้วยข้อมูลดังต่อไปนี้

1. Organoleptic description เช่น สีและกลิ่น เป็นต้น
2. สื่อวิทยาศาสตร์ของน้ำมันหอมระเหย และแหล่งที่มา
3. การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันหอมระเหยโดยวิธี GC/MS
4. ค่าความถ่วงจำเพาะ

5. ค่าดัชนีหักเหของแสง
6. ค่าการหมุนระนาบของแสงโพลาไรส์
7. ค่า Flash point

สิ่งที่ควรคำนึงอีกประการหนึ่งของคุณภาพน้ำมันหอมระเหย คือ การปลอมปน (Adulteration) การปลอมปนอาจทำโดยการเติมสารบางอย่างลงไปเพื่อประโยชน์ทางการค้าส่งผลให้ คุณภาพของน้ำมันหอมระเหยต่ำกว่ามาตรฐาน เช่น น้ำมันหอมระเหยจากธรรมชาติอยู่ในรูปของ ของแข็งหรือกึ่งแข็ง (Semisolid) เช่น กัมเรซิน หรือ absolute เพื่อให้น้ำมันหอมระเหยดังกล่าวอยู่ใน รูปของเหลวผู้ผลิตจึงเติมตัวทำละลายบางชนิดลงไป เช่น benzyl benzoate, propylene glycol, triethy citrate, isopropyl myristate เป็นต้น อย่างไรก็ตามการตรวจสอบการปลอมปนใน เบื้องต้น อาจสังเกตจากลักษณะทางกายภาพของน้ำมันหอมระเหย เช่น สีขุ่นมัว ความหนืดเปลี่ยนไป กลิ่นแตกต่างจากเดิม ถ้าต้องการข้อมูลการปลอมปนที่ชัดเจนต้องส่งไปวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี ของน้ำมันระเหยโดยวิธี GC/MS ก็จะพบว่ามีโครมาโทแกรมที่แสดงถึงสารปลอมปนได้

6. คุณสมบัติของน้ำมันหอมระเหย

น้ำมันหอมระเหยเป็นน้ำมันที่ระเหยได้ง่ายในอุณหภูมิปกติ ไม่ละลายหรืออาจละลายได้เล็กน้อยในน้ำ คุณสมบัติทางกายภาพที่สำคัญของน้ำมันหอมระเหยที่สำคัญได้แก่

6.1 สี ส่วนใหญ่น้ำมันหอมระเหยจะปราศจากสี โดยเฉพาะถ้าบริสุทธิ์มากๆ และยังใหม่อยู่บางครั้งการทำให้ปราศจากสีทำได้โดยการกลั่นอีกครั้งหนึ่ง (redistillation) แต่หลังจากถูกอากาศจะทำให้มีสีต่างๆ เกิดขึ้นเนื่องจากเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชั่น เช่น น้ำมันอบเชย เมื่อถูกแสงสว่างหรือสัมผัสอากาศเป็นเวลานานๆ น้ำมันจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลเข้ม

6.2 กลิ่น เป็นกลิ่นเฉพาะตัวของน้ำมันหอมระเหยแต่ละอย่างจึงทำให้น้ำมันหอมระเหยมีกลิ่นต่างๆกันและกลิ่นนั้นจะสัมผัสได้ดีเมื่อถูกอากาศ

6.3 รส เช่นเดียวกับกลิ่นซึ่งจะแตกต่างกันมาก บางอย่างมีรสหวาน

6.4 จุดเดือด น้ำมันหอมระเหยจะมีจุดเดือดกว้างมาก เนื่องจากประกอบด้วยสารผสมซึ่งซับซ้อนโครงสร้างประกอบด้วยองค์ประกอบหลายชนิดที่มีความแตกต่างกันไป ดังนั้น น้ำมันหอมระเหยทั้งหลายเท่าที่พบจะมีจุดเดือด อยู่ระหว่าง 150-300 องศาเซลเซียส

6.5 การละลาย น้ำมันหอมระเหยละลายได้ในแอลกอฮอล์ อีเทอร์ คลอโรฟอร์มและตัวทำละลายอินทรีย์อื่นๆ นอกจากนี้น้ำมันหอมระเหยยังละลายได้ในพวกไขมัน สารยางเหนียว (resin) น้ำมันพืช ตลอดจนซัลเฟอร์และฟอสฟอรัส

7. การกระจัดกระจายของน้ำมันหอมระเหย

น้ำมันหอมระเหยพบว่ามีอยู่ในพืชหลายวงศ์ด้วยกัน ที่เด่นๆ คือ Labiatae Piperaceae และ Rutaceae มีเซลล์ที่เก็บน้ำมันหอมระเหยไว้ซึ่งอาจเรียกรวมๆว่าเป็น Specialized secretory structutes เซลล์พวกนี้ได้แก่ ต่อมขน (glandular hairs) ซึ่งมักพบในพวก Labiatae เช่น แมงลัก พวก Piperaceae พบในส่วนเนื้อเยื่อ พาเรนไคมา เช่น พริกไทย สำหรับหน้าที่ของน้ำมันหอมระเหยกล่าวได้ว่า เป็นตัวป้องกันดอกใบ ถูกรบกวนและทำลายจากแมลงชนิดต่างๆ อีกทั้งยังช่วยในการผสมข้ามพันธุ์ของดอกอีกด้วย

8. การเก็บรักษาน้ำมันหอมระเหย

เป็นที่ทราบกันว่าองค์ประกอบของน้ำมันหอมระเหย จะไม่คงตัวมีการเสื่อมสลายหรือการเปลี่ยนแปลงได้ง่าย ยากแก่การเก็บรักษา น้ำมันหอมระเหยสามารถเกิดปฏิกิริยาต่างๆได้มากมาย เช่น โฟโตไอโซเมอไรเซชัน (Photoisomerization) โฟโตไซไคลเซชัน (Photocyclization) ออกซิเคทีฟคลีเวจของโพรพินิลฟีนอล (oxidative cleavage of propenylphenols) เปอร์ออกซิเดชั่นของไฮโดรคาร์บอน (peroxidation of hydrocarbons) การสลายตัวไปเป็นสารคีโตนและแอลกอฮอล์และปฏิกิริยาเทอร์โมไอโซเมอไรเซชั่น (themoisomerization) วิธีการเก็บรักษาน้ำมันหอมระเหยทำได้โดยการใช้ภาชนะที่ทำจากสารสแตนเลส หรือขวดแก้วสีชา การบรรจุจะต้องปิดสนิทและแน่นหนาเก็บไว้ภายใต้บรรยากาศที่มีไนโตรเจนเฉื่อย (inert nitrogen atmosphere) นอกจากนี้การเก็บรักษาน้ำมันหอมระเหยยังอาจเติมสารต้านออกซิเดชั่น (antioxidants) ลงไปทั้งนี้ขึ้นกับผลิตภัณฑ์ของน้ำมันหอมระเหยชนิดนั้นๆด้วย

7. ฤทธิ์ทางชีวภาพของน้ำมันหอมระเหย (ฐาปนีย หงสรัตนาวรกิจ, 2550)

น้ำมันหอมระเหยเข้าสามารถเข้าสู่ร่างกายโดยวิธีสุคนธบำบัดมี 3 วิธีคือ ผ่านทางผิวหนัง ผ่านระบบทางเดินหายใจหรือการสูดดม (Mcguinness, H., 2003) และการรับประทาน (วิธีการ รับประทานไม่นิยมมากนัก จะพบมากในประเทศฝรั่งเศสเทานั้น) หลังจากน้ำมันหอมระเหยเข้าสู่ร่างกายแล้วก็จะถูกดูดซึมเข้าไปและมีผลต่อระบบต่าง ๆ ภายในร่างกาย ดังนี้

1. ฤทธิ์ต่อระบบประสาท น้ำมันหอมระเหยมีผลต่อทั้งระบบประสาทส่วนกลางและส่วนนอก (Peripheral nervous system) โดยส่งผลกระตุ้นระบบประสาททำให้รู้สึกตื่นตัว มีกำลัง สดชื่น นิยมนำมาใช้ในผู้ที่มีอาการซึมเศร้า รู้สึกหดหู่ อ่อนเพลีย น้ำมันหอมระเหยที่ใช้ ได้แก่ น้ำมันมะลิ น้ำมันโรสแมรี่ น้ำมันมะนาว

2. ฤทธิ์ต้านจุลชีพ (Antimicrobial effects)

- ฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย น้ำมันหอมระเหยประเภทนี้มีองค์ประกอบสำคัญประเภทสารประกอบฟีนอลสารประกอบแอลดีไฮด์ สารประกอบแอลกอฮอล์ สารประกอบเอสเทอร์ และสารประกอบคีโตน โดยสาร terpenoids จะยับยั้งการทำงานผนังเซลล์ของเชื้อโดยยับยั้งการส่งผ่านอิเลคตรอน การเคลื่อนย้ายโปรตีนตลอดจนปฏิกิริยาต่าง ๆ ของเอนไซม์ทำให้เซลล์ตายได้

- ฤทธิ์ต้านเชื้อรา มีองค์ประกอบสำคัญของสารประกอบแอลดีไฮด์น้ำมันหอมระเหยชนิดนี้ ได้แก่ น้ำมันเทียนสัตบุศย์ น้ำมันเทียนข้าวเปลือก น้ำมันทีทรีน้ำมันข้าวเปลือก

- ฤทธิ์ต้านไวรัส องค์ประกอบสำคัญ ได้แก่anethole, β-caryophyllene, carvone, cinnamic aldehyde,citral เป็นต้น น้ำมันหอมระเหยชนิดนี้ ได้แก่ น้ำมันอบเชยจีน น้ำมันอบเชยลังกา น้ำมันสะระแหน ฯลฯ

3. ฤทธิ์ต่อระบบทางเดินอาหาร น้ำมันหอมระเหยที่ใช้ในระบบทางเดินอาหารได้มาจากพืช

ในวงศ์กะเพรา เช่น กะเพรา โหระพาสะระแหน ไธม์ พิมเสน พืชวงศ์ผักชีและพืชวงศ์ส้ม

4. ฤทธิ์ต่อระบบทางเดินหายใจ ช่วยละลายเสมหะ ขับเสมหะ แก้ไอ บรรเทาอาการคัดจมูก ชวยลดการคั่ง (Decogestant) กระตุ้นระบบทางเดินหายใจ องค์ประกอบของน้ำมันหอมระเหยที่มีคุณสมบัติในการละลายเสมหะ ได้แก่ สารพวกคีโตน เช่น Carvone, Menthone ได้แก่ น้ำมันยูคาลิปตัส น้ำมันสน น้ำมันไธม์ มันสะระแหน

5. ฤทธิ์ต่อระบบกล้ามเนื้อและข้อต่อ น้ำมันหอมระเหยจะทำหน้าที่ในการเพิ่มการไหลเวียนของเลือดบริเวณที่มีเลือดคั่งอยู่ ทำให้ลดอาการบวมหรืออักเสบได้ โดยน้ำมันหอมระเหยที่มีคุณสมบัติต้านการอักเสบ มีองคประกอบที่สำคัญคือ azulene,chamazulene, (-)-**α**-bisabolol เป็นตน น้ำมันหอมระเหยเหลานี้ ได้แก น้ำมันคาโมไมล น้ำมันสะระแหน น้ำมันสน น้ำมันยูคาลิปตัส

6. ฤทธิ์ตอระบบไหลเวียนเลือด หัวใจและหลอดเลือด ช่วยกระตุ้นการไหลเวียนเลือดส่งผลให้หัวใจและสมองทำงานได้ดี น้ำมันหอมระเหยที่ใช้ ได้แก่ น้ำมันกุหลาบ น้ำมันกานพลู น้ำมันโรสแมรี่ เป็นต้น ส่วนน้ำมันที่ช่วยลดอาการปวดไมเกรน ทำให้หลอดเลือดขยาย บางชนิดยังสามารถลดความดันเลือดในผู้ที่มีภาวะเครียดได้ คือ น้ำมันลาเวนเดอร์ น้ำมันกระดังงา น้ำมันดอกส้ม เป็นต้น

7. ฤทธิ์ต่อระบบต่อมไร้ท่อและฮอร์โมน น้ำมันหอมระเหยบางชนิดมีหน้าที่คล้ายฮอร์โมนภายในร่างกาย ตัวอย่าง เช่น น้ำมันเทียนข้าวเปลือกน้ำมันเสจ ช่วยทำให้เซลล์ผิวหนังมีความชุ่มชื่น ซึ่งทำหน้าที่คล้ายกับฮอร์โมน เอสโตรเจน (Estrogen) และน้ำมันกระดังงา ช่วยเพิ่มการหลั่งไขมันที่ผิวหนัง ซึ่งเป็นสาเหตุให้หน้ามัน หรือเป็นสิว ทำหนาที่คล้ายกับฮอร์โมนแอนโดรเจน จากหน้าที่คล้ายคลึงกันนี้ทำให้เราสามารถนำน้ำมันหอมระเหยมาใช้ในการบำบัดอาการผิดปกติที่เกิดจากฮอร์โมนเพศได้

8. เอนไซมไทโรซิเนส (Tyrosinase)

เอนไซม์ไทโรซิเนส (Tyrosinase) หรือ Cresolase, Monophenol oxidase, Phenolase, monophenol monooxygenase (Anonymous, 2006) เป็นเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาออกซิเดชัน (Oxidation) ของสารประกอบฟีนอล (Phenolic compound) โดยทั่วไปเอนไซม์ไทโรซิเนส จะพบใน เนื้อเยื่อสัตว์และพืช ถูกสังเคราะห์ขึ้นใน Rough Endoplasmic Reticulum ภายในโครงสร้างของเอนไซม์มีทองแดง (Cu) ซึ่งมีหน้าที่ทำงานร่วมกับออกซิเจนเพื่อเร่งให้ปฏิกิริยาเกิดได้เร็วขึ้นเอนไซม์ไทโรซิเนส เป็นเอนไซม์ชนิดหนึ่งในกระบวนการสร้างเม็ดสี (Melanogenesis) ซึ่งกระบวนการนี้ทำให้ผิวหนัง มีสีหมองคล้ำลงโดยเอนไซม์ชนิดนี้จะเร่งปฏิกิริยาในขั้นเริ่มต้นของกระบวนการ คือ เร่งปฏิกิริยาของ L-Tyrosine และ 3, 4-Dihydroxy-L-phenylalanine (L-DOPA) ให้เป็น DOPAquinone นอกจากนี้ในกระบวนการสร้างเม็ดสียังมีเอนไซม์ชนิดอื่น ๆ ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาในกระบวนการนี้ด้วยกระบวนการสร้างเม็ดสี (Melanogenesis) กระบวนการสร้างเม็ดสี (Melanogenesis) เริ่มต้นจากเซลล์เมลาโนไซต์ (Melanocytes) บริเวณชั้นล่างผิวหนังกำพร้าถูกกระตุ้นโดยแสงแดดจะมีผลให้มีการสร้างเม็ดสีที่มีชื่อว่า เมลานิน (Melanin) จากนั้นเมลานิน จะถูกนำมาสู่ชั้นผิวหนังกำพร้าด้วยเซลล์คีราติโนไซต์ (Keratinocytes) เมลานิน จะทำหน้าที่กรองรังสีไวเพื่อปกป้องเซลล์และป้องกันการกลายพันุ ของ DNA เม็ดสีจากกระบวนการสร้างเม็ดสีมี 3 ชนิด ได้แก่

1. เม็ดสีดำ (Eumelanin) (1) พบมากในคนเอเชีย และคนที่ผิวคล้ำ

2. เม็ดสีแดงหรือสีเหลือง (Pheomelanin) (2) พบในคนที่ผิวขาว

3. เม็ดสีน้ำตาล (Mixedmelanin, Brown melanin) (3) พบในคนที่ผิวคล้ำปานกลางถึงผิวขาว (จรัสพล, 2548)

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1. ศึกษาการเปรียบเทียบสกัดน้ำมันน้ำมันหอมระเหยจากเปลือกส้มโอเหลือทิ้งในส่วนเปลือกสีเขียวและเปลือกสีขาว ด้วยวิธีการสกัดด้วยไอน้ำ

2. ศึกษาการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสที่ได้จากน้ำมันหอมระเหยของเปลือกส้มโอเหลือทิ้ง

ขอบเขตของโครงการวิจัย

ในการศึกษานี้ กลุ่มผู้วิจัยจะทำการสกัดและทำบริสุทธิ์สารจากน้ำมันหอมระเหยของเปลือกส้มโอเหลือทิ้ง และตรวจสอบคุณภาพของน้ำมันหอมระเหยแล้วจะถูกนำมาทดสอบความสามารถในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ได้น้ำมันหอมระเหยจากเปลือกส้มโอและสามารถยับยั้งเอนไซม์ไทโรจิเนสและเป็นการสร้างมูลค่าเพิ่มแก่วัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร ที่ใช้ทดแทนสารเคมี

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย

บทที่ 2
วัสดุ อุปกรณ์ วิธีการวิเคราะห์และวิธีการทดลอง

วัสดุและอุปกรณ์วิธีการวิเคราะห์และวิธีการทดลอง

1. การสกัดน้ำมันหอมระเหย

การสกัดน้ำมันหอมระเหยจากเปลือกส้มโอเหลือทิ้ง 1) เปลือกสีเขียว 2) บริเวณเนื้อสีขาวก่อนถึงผล นำตัวอย่างทั้ง 2 ชนิด มาล้างด้วยน้ำให้สะอาดแล้วผึ่ง ให้แห้งพอหมาด จากนั้นหั่นตัวอย่างให้เป็นชิ้นเล็ก ๆ ชั่งน้ำหนัก 250 กรัม หลังจากนั้นนำตัวอย่างที่เตรียมไว้ใส่ในขวดก้นกลม และทำการสกัดโดยการสกัดแยกเป็น 2 การทดลอง 1) สกัดจากเปลือกสีเขียว 2) สกัดบริเวณเนื้อสีขาว ของเปลือกส้มโอ โดยการกลั่นด้วยไอน้ำด้วยชุดอุปกรณ์การกลั่นด้วยไอน้ำ เปิดน้ำเข้าเครื่องควบแน่นและเปิดให้ความร้อน ตามลำดับ ทิ้งไวจนได้น้ำมันหอมระเหยออกมาในภาชนะรองรับ เก็บสารที่ได้ใส่กรวยแยก ทิ้งไว้ให้เย็นแยกชั้น ไขเก็บส่วน น้ำมันหอมระเหย และทำการขจัดน้ำออกด้วยการเติม anhydrous Na_2SO_4 และเก็บส่วนที่เป็นน้ำมันหอมระเหยใสขวด จากนั้นชั่งน้ำหนักของน้ำมันหอมระเหยที่ได้ และเก็บในภาชนะขวดสีชาเก็บไวที่อุณหภูมิ 4 °C สำหรับนำไปใช้ทดลองต่อไป

2. การตรวจสอบสารพฤกษเคมีเบื้องต้น

การตรวจสอบสารพฤกษเคมีเบื้องต้นของน้ำมันหอมระเหยจากเปลือกส้มโอ โดยแบ่งการทดสอบสารทุติยภูมิ (Secondary metabolites) ออกเป็น 9 กลุ่ม ได้แก่ ฟลาโวนอยด์ แอนทราควิโนน คูมาริน ซาโปนิน แทนนิน โฟลบาแทนนิน เทอร์ปีนอยด์ สเตียรอยด์ และคาร์ดิแอคไกลโคไซด์ โดยอาศัยปฏิกิริยาการเกิดสีหรือตะกอน โดยการทดสอบนี้เป็นการทดสอบเชิงคุณภาพ (Ayoola et al., 2008; นภดล และคณะ, 2565) ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

3. การหาปริมาณฟีนอลิกรวม (ดัดแปลงวิธีจาก Tsai et al., 2005)

เตรียมสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิก โดยทำการผันแปรความเข้มข้น 0, 20, 40, 60 และ 80 ppm ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร เติมน้ำปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร และเติมสารละลาย Folin-ciocalteu ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันหลังจากนั้นเติมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต (7% Na_2CO_3) ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ในที่มืดเป็นเวลา 90 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 760 นาโนเมตร โดยนำค่าการดูดกลืนคลื่นแสงเทียบกับกราฟมาตรฐานของกรดแกลลิก และนำเสนอใน หน่วยมิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อกรัมน้ำหนักสารสกัดแห้ง (mg GAE/g extract) โดยแต่ละตัวอย่างทำการทดลอง 3 ซ้ำ

4. การหาปริมาณแทนนินรวม (ดัดแปลงวิธีจาก Tsai et al., 2005)

เตรียมสารละลายมาตรฐานกรดแทนนินให้มีความเข้มข้นเป็น 0, 20, 40, 60 และ 80 ppm ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร เติมนน้ำปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร และเติมสารละลาย Folin-ciocalteu ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันและเติมโซเดียมคาร์บอเนต (7% Na_2CO_3) ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ในที่มืดเป็นเวลา 90 นาที หลังจากนั้นวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 760 นาโนเมตร โดยนำค่าการดูดกลืนคลื่นแสงเทียบกับกราฟมาตรฐานแทนนินในสารสกัดจากกราฟมาตรฐานของกรดแทนนิกและนำเสนอใน หน่วยมิลลิกรัมสมมูลของกรดแทนนิกต่อกรัมน้ำหนักสารสกัดแห้ง (mg TAE/g extract) โดยแต่ละตัวอย่างทำการทดลอง 3 ซ้ำ

5. การหาปริมาณฟลาโวนอยด์รวม (ดัดแปลงวิธีจาก Prommuak, et al., 2008)

ด้วยวิธี Aluminium trichloride colorimetric โดยทำการผสมสารละลายมาตรฐานเคอร์ซิติน ผันแปรความเข้มข้นเป็น 0, 20, 40, 60 และ 80 ppm ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร กับสารละลายอะลูมิเนียมไตรคลอไรด์ (1% $AlCl_3$) ปริมาตร 1.8 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน หลังจากนั้นบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่

ความยาวคลื่น 415 นาโนเมตร โดยนำค่าการดูดกลืนคลื่นแสงเทียบกับกราฟมาตรฐานเคอร์ซิตินและนำเสนอค่าปริมาณฟลาโวนอยด์รวมในหน่วยมิลลิกรัมสมมูลของเคอร์ซิตินต่อ น้ำหนักสารสกัดแห้ง (mg QE/g extract)

6. การหาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH (ดัดแปลงวิธีจาก Prommuak et al., 2008)

เตรียมสารละลายสารมาตรฐาน BHT, BHA หรือสารสกัดหยาบของตัวอย่างที่มีความเข้มข้น 500, 250, 125, 62.5, และ 31.25 µg/mL ปิเปตสารละลายมาตรฐานหรือสารสกัดที่มีความเข้มข้นต่างๆ ปริมาตร 2 มิลลิลิตร เติมสารละลาย DPPH $6x10^{-5}$ โมลาร์ ปริมาตร 2 มิลลิลิตรเขย่าให้เข้ากันและตั้งทิ้งไว้ในที่มืดที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที หลังจากนั้นทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 515 นาโนเมตร ทำการทดลอง 3 ซ้ำ คำนวณหา % Radical scavenging จากสูตร

% Radical scavenging = [(Ac – As)/Ac] ×100 ว

โดย Ac คือ ค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ของสารละลาย DPPH

As คือ ค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ของสารตัวอย่างผสมกับ DPPH

ค่าที่ได้มาคำนวณค่าความเข้มข้นของสารสกัดที่ทำให้สารอนุมูลอิสระลดลง 50% Effective concentration (EC50) จากกราฟระหว่างความเข้มข้นของสารตัวอย่างกับ % Radical scavenging

7. การศึกษาฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส (ดัดแปลงวิธีจาก Li, et al., 2010)

นำสารละลายตัวอย่างที่ความเข้มข้นต่างๆ มาทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการท้างานของเอนไซม์ไทโรซิเนส โดยเทียบกับสารละลายมาตรฐานกรดโคจิก (Kojic acid) ผสมสารละลายให้เข้ากันดี แล้วบ่มที่ อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเติมสารละลาย L-DOPA 50 ไมโครลิตร ลงในแต่ละหลุม เขย่าให้เข้ากัน แล้ววัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 492 นาโนเมตร ด้วยเครื่องวัดการดูดกลืนแสง ในจานหลุม (microplate reader) จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส 2 นาที แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงอีกครั้งที่ความยาวคลื่นเดิม แล้วคำนวณหาค่าร้อยละของการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส การคำนวณหาค่าร้อยละของการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส นำค่าที่ได้มาคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการ ทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส (% Inhibition) ดังสมการ

% Inhibition= (Acontrol- Asample)/ Acontrol ×100

สร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นต่างๆของสารสกัดกับ % Inhibition เพื่อคำนวนค่าความเข้มข้นของสารสกัดที่สามารถยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสได้ 50% (EC50)

บทที่ 3
ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

ผลการทดลอง และวิจารณ์

1. การสกัดน้ำมันหอมระเหยจากเปลือกส้มโอ

การสกัดน้ำมันหอมระเหยจากเปลือกส้มโอเหลือทิ้ง 1) เปลือกสีเขียว 2) บริเวณเนื้อสีขาวก่อนถึงผลด้วยวิธีการกลั่นด้วยไอน้ำ โดยปริมาณน้ำมันหอมระเหยที่สกัดได้ ณ เวลาต่างๆ ดังแสดงในตารางที่ 1

ตาราง 1 ปริมาณน้ำมันหอมระเหยที่สกัดด้วยการกลั่นด้วยไอน้ำที่เวลาต่างๆ

ชนิดตัวอย่าง	น้ำหนัก (กรัม)	ปริมาณน้ำมันหอมระเหย (มิลลิลิตร)					
		30 นาที	45 นาที	60 นาที	90 นาที	120 นาที	180 นาที
เปลือกสีเขียว	500	5.25	4.28	3.55	2.14	2.05	0.10
เปลือกสีขาว	500	2.95	2.89	2.55	1.98	1.85	<0.10

จากตารางที่ 1 แสดงปริมาณน้ำมันหอมระเหยที่สกัดได้ โดยพบว่าการสกัดโดยใช้เวลาในการสกัดที่เวลา 30 นาที ได้ปริมาณน้ำมันหอมระเหยมากที่สุดทั้งเปลือกส้มโอที่เป็นเปลือกสีเขียวและเปลือกสีขาวโดยมีปริมาณ 5.25 มิลลิลิตร และ 2.95 มิลลิลิตร ตามลำดับ จากผลการทดลองพบว่าเปลือกส้มโอที่เป็นเปลือกสีเขียวมีปริมาณน้ำมันหอมระเหยที่มากกว่าเปลือกสีขาว ผู้วิจัยจึงเลือกน้ำมันหอมระเหยที่สกัดได้จากเปลือกส้มโอที่เป็นเปลือกสีเขียว ทำการทดลองในขั้นตอนต่อไป

2. การทดสอบสารพฤกษเคมีเบื้องต้น

การทดสอบฤทธิ์เคมีเบื้องต้นของน้ำมันหอมระเหยจากเปลือกส้มโอสีเขียวที่สกัดได้ โดยแบ่งการทดสอบออกเป็น 9 กลุ่ม ได้แก่ ฟลาโวนอยด์ แอนทราควิโนน คูมาริน ซาโปนิน แทนนิน โฟลบาแทนนิน เทอร์ปีนอยด์ สเตียรอยด์ และ คาร์ดิแอคไกลโคไซด์ อาศัยปฏิกิริยาการเกิดสีหรือตะกอน พบว่าสารออกฤทธิ์ทางเคมีของน้ำมันหอมระเหยของน้ำมันหอมระเหยที่สกัดได้ มี 5 ชนิด คือ ฟลาโวนอยด์ คูมาริน ซาโปนิน โฟลบาแทนนิน และแทนนิน ผลการทดลอง ดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2 การทดสอบฤทธิ์ทางเคมีเบื้องต้นของน้ำมันหอมระเหยจากเปลือกส้มโอทั้งสองลักษณะที่สกัดได้

สารออกฤทธิ์ทางเคมี	**น้ำมันหอมระเหย**
ฟลาโวนอยด์	+
แอนทราควิโนน	-
คูมาริน	+
ซาปนิน	+
แทนนิน	+
โฟลบาแทนนิน	+
เทอร์ปีนอยด์	-

สเตียรอยด์	-
คาร์ดิแอคไกลโคไซด์	-

หมายเหตุ: - หมายถึง ทดสอบไม่พบสาร + หมายถึง ทดสอบพบสาร

3. ผลการหาปริมาณฟีนอลิกรวม แทนนินรวม และฟลาโวนอยด์รวมของน้ำมันหอมระเหยจากเปลือกส้มโอสีเขียวที่สกัดได้

เมื่อนำน้ำมันหอมระเหยจากเปลือกส้มโอสีเขียวที่สกัดได้ มาทำการหาปริมาณฟีนอลิกรวม แทนนินรวม และ ฟลาโวนอยด์รวม จะพบว่า น้ำมันหอมระเหยจากเปลือกส้มโอสีเขียวที่สกัดได้ จะมีปริมาณฟีนอลิกรวม แทนนินรวม และ ฟลาโวนอยด์รวม เท่ากับ 155.62±0.05 mg GAE/g, 162.47±0.03mg TAE/g และ 144.82±0.05 mg QE/g ตามลำดับ ผลการทดลอง ดังตารางที่ 3

ตารางที่ 3 ปริมาณฟีนอลิกรวม แทนนินรวม และฟลาโวนอยด์รวมของน้ำมันหอมระเหยจากเปลือกส้มโอที่สกัดได้

สารสำคัญ	น้ำมันหอมระเหยที่สกัดได้จากเปลือกส้มโอ
ปริมาณฟีนอลิกรวม (mg GAE/g extract)	155.62±0.05
ปริมาณแทนนินรวม (mg TAE/g extract)	162.47±0.03
ปริมาณฟลาโวนอยด์รวม (mg QE/g extract)	144.82±0.05

4. ผลการหาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH

ผลการทดลองฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของน้ำมันหอมระเหยที่สกัดได้จากเปลือกส้มโอสีเขียว แสดงให้เห็นว่า น้ำมันหอมระเหยที่สกัดได้จากเปลือกส้มโอสีเขียว มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ โดยมีค่า EC50 เท่ากับ 13.42±0.06 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และเมื่อเทียบกับสารมาตรฐาน BHA และ BHT น้ำมันหอมระเหยที่สกัดได้จากเปลือกส้มโอมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระดีกว่าสารมาตรฐาน ผลแสดงดัง ตารางที่ 4

ตารางที่ 4 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของน้ำมันหอมระเหยที่สกัดได้จากเปลือกส้มโอ

สาร	EC50 (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)
BHT	16.55±0.02
BHA	15.85±0.04
น้ำมันหอมระเหยที่สกัดได้จากเปลือกส้มโอ	13.42±0.06

5. ผลการหาฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส

ผลการศึกษาฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของน้ำมันหอมระเหยที่สกัดได้จากเปลือกส้มโอ โดยนำน้ำมันหอมระเหยไปทดสอบฤทธิ์ ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสด้วยวิธี Modified dopachrome เปรียบเทียบกับวิตามินซี และคำนวณหาความเข้มข้นของน้ำมันหอมระเหยที่สามารถยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสได้ 50% (EC50) พบว่า น้ำมันหอมระเหยที่สกัดได้จากเปลือกส้มโอ สามารถยับยั้ง เอนไซม์ได้ โดยมีค่า EC50 เท่ากับ 12.58±0.04 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ได้ผลแสดงดังตารางที่ 5

ตารางที่ 5 ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของน้ำมันหอมระเหยที่สกัดได้จากเปลือกส้มโอ

สารสกัด	EC50 (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)
วิตามินซี	14.25 ±0.02
EC50 (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	12.58 ±0.04

จากการศึกษาการสกัดน้ำมันหอมระเหยที่สกัดได้ โดยพบว่าการสกัดโดยใช้เวลาในการสกัดที่เวลา 30 นาที ได้ปริมาณน้ำมันหอมระเหยมากที่สุดด้วยเปลือกส้มโอสีเขียวโดยมีปริมาณ 5.25 มิลลิลิตรพบว่าเปลือกส้มโอที่เป็นเปลือกสีเขียวมีปริมาณน้ำมันหอมระเหยที่มากกว่าเปลือกสีขาว

สำหรับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและปริมาณฟีนอลิกรวมในน้ำมันหอมระเหยที่สกัดได้จากเปลือกส้มโอ เมื่อทำการวิเคราะห์หาปริมาณฟีนอลิกรวม ปริมาณแทนนินรวม และปริมาณ ฟลาโวนอยด์รวม พบว่าน้ำมันหอมระเหยที่สกัดได้จากเปลือกส้มโอมีปริมาณสารดังกล่าวเท่ากับ 155.62±0.05 mg GAE/g, 162.47±0.03mg TAE/g และ 144.82±0.05 mg QE/g ตามลำดับ ซึ่งการทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูล DPPH พบว่า ฤทธิ์การต้านอนุมูล DPPH ของน้ำมันหอมระเหยแปรผันตรง กับความเข้มข้นของสารที่ทดสอบ ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระมักแสดงด้วยค่า EC50 คือความเข้มข้นของตัวอย่างพืชที่ส่งผลให้ความเข้มข้นของอนุมูลอิสระ (DPPH) ลดลงครึ่งหนึ่งค่า EC50 ที่ต่ำจึงแสดงถึงฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระที่สูง โดยน้ำมันหอมระเหยจากเปลือกส้มโอมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงโดยมีค่า EC50 เท่ากับ 12.58 ±0.04 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งมีงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการศึกษาปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระจากเปลือกส้มโอมีหลายงานวิจัย

เปลือกส้มโอพบองค์ประกอบของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ได้แก่ แคโรทีนอยด์ วิตามินอี ฟลาโวนอยด์ ไลโมนอยด์ องค์ประกอบของ ฟีนอลิก ลิกนิน ไฟเบอร์เพกทิน และน้ำมันหอมระเหย (Chen et al., 2016) มีหน้าที่เป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่สำคัญโดยพบสารประกอบฟีนอล เช่น ปริมาณฟีนอลิก ปริมาณฟลาโวนอยด์อยู่ เป็นจำนวนมาก ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Turapra et al. (2016) ได้วิเคราะห์ปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของส้มโอ 3 สายพันธุ์ได้แก่ สายพันธุ์ทับทิมสยาม สายพันธุ์ทองดีและ สายพันธุ์ขาวน้ำผึ้ง พบว่าเปลือกนอกสุด (Flavedo) จากส้มโอทั้ง 3 สายพันธุ์มีปริมาณฟีนอลิกสูง โดยมีค่าเท่ากับ 14.20±0.38, 12.74±0.24 และ 10.20±0.20 mg/g extract ตามลำดับ และ Fidrianny et al. (2016) ได้ศึกษาเปลือกส้มโอโดยใช้ตัวทำละลายเอทานอล เฮกเซน และเอทิลอะซิเตทในการสกัดเปลือกส้มโอเพื่อหาปริมาณฟลาโวนอยด์พบว่าการสกัดด้วยตัวละลายเอทิลอะซิเตท จะให้ปริมาณฟลาโวนอยด์มากที่สุด รองลงมาคือ เฮกเซน และเอทานอล มีค่าเท่ากับ 5.69, 3.31 และ 1.17 g Quercetin/100 g ตามลำดับ องค์ประกอบของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ในเปลือกส้มโอเหล่านี้เมื่อนำมาทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสามารถยับยั้งการเกิดออกซิเดชันโดยการศึกษาสารสกัดจากเปลือกและเนื้อของผลส้มโอเพื่อดูฤทธิ์การต้านออกซิเดชันด้วยวิธี FRAP assay และวัดปริมาณการยับยั้งการออกซิเดชันโดยวิธี Trolox equivalent antioxidant capacity เพื่อหาค่า TEAC values พบว่าเปลือกของส้มโอให้ค่า FRAP และTEAC values สูงกว่า ส่วนเนื้อโดยในส่วนเปลือกมีค่าเท่ากับ 1.01±0.08 mMFe2+/100 g of fresh weight และ1.49±0.02 mMFe2+/100 g of fresh weight (Toh et al.,2013) เช่นเดียวกับงานวิจัยของ Pichaiyongvongdee etal. (2014) ได้ศึกษาเปลือกส้มโอส่วนของเปลือกนอก (Flavedo) ทั้ง7 สายพันธุ์โดยได้วิเคราะห์ ฤทธิ์ต้านออกซิเดชันด้วยวิธี DPPH assay และ FRAP assay พบว่าสายพันธุ์ทองดีให้ฤทธิ์ ต้านอนุมูลอิสระสูงสุด รองลงมาคือสายพันธุ์ท่าข่อย และสายพันธุ์ขาวน้ำผึ้งซึ่งมีค่า DPPH ร้อยละ 70.14±2.48, 61.28±2.43 และ 56.42±6.05 ตามลำดับ ส่วนค่า FRAP สายพันธุ์ขาวน้ำผึ้งให้ค่า FRAP สูงกว่าสายพันธุ์ท่าข่อยซึ่งมีค่าเท่ากับ 1227.13±15.95, 1107.40±8.650 และ 1098.07±9.180 mg TE/100 ml ตามลำดับ

การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสสกัดน้ำมันหอมระเหยที่สกัดได้จากเปลือกส้มโอด้วยวิธี Dopachrome method โดยการเปรียเทียบกับวิตามินซี ที่ใช้เป็นสารมาตรฐานเชิงบวกผลการศึกพบว่าสามารถยับยั้งโดยมีค่า EC50 เท่ากับ 12.58±0.04 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากการศึกษาพบว่ากลุ่มสารที่ยับยั้งคือกลุ่มสารที่มีหมู่ไฮดรอกซิล (-OH group) ที่พบในสารกลุ่มฟวาโวนอยด์ คูมาริน ซาปนิน แทนนิน เป็นต้นที่พบในสกัดน้ำมันหอมระเหยที่สกัดได้จากเปลือกส้มโอ มีการศึกษาว่าสารที่มีหมู่ OH สามารถเกิดพันธะไฮโดรเจนกับเอนไซม์ไทโรซิเนส ส่งผลให้การเกิดไฮโดรไลซีส (hydrolysis) กับซับสเตรตลดลง หรือไม่เกิดปฏิกิริยา (Alam et al., 2011)

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย วิทยาเขตตรังที่ให้การสนับสนุนทุนสนับสนุนในการวิจัย อุปกรณ์ เครื่องมือและสถานที่ในการดำเนินการวิจัย

บทที่ 4
สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

สรุปผลการวิจัย

จากการศึกษาการฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและปริมาณฟีนอลิกรวมในน้ำมันหอมระเหยจากเปลือกส้มโอที่สกัดได้ พบสารรวม 5 กลุ่มคือ ฟลาโวนอยด์ คูมาริน ซาโปนิน แทนนิน และ โฟลบาแทนนิน มีปริมาณฟีนอลิกรวม 155.62±0.05 mg GAE/g ปริมาณแทนนินรวม 162.47±0.03mg TAE/g และปริมาณฟลาโวนอยด์รวม 144.82±0.05 mg QE/g มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงโดยมีค่า EC50 เท่ากับ 13.42±0.06 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และมีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสได้โดยมีค่า EC50 เท่ากับ 12.58 ±0.04 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

ข้อเสนอแนะ

1. ผลจากการวิจัยสามารถนำไปพัฒนาต่อยอดในการพัฒนาเครื่องสำอางจากน้ำมันหอมระเหยจากเปลือกส้มโอในการประยุกต์ใช้ในด้านอื่นๆ เช่นเครื่องสำอาง
2. ควรมีการศึกษาเพิ่มเติม เช่น ฤทธิ์ทางชีวภาพของพืชชนิดอื่น

เอกสารอ้างอิง

นภดล ลากะสงค์, ทัศนัย โสคันธิกอุบล, สรวีย์ ศิริพิลา จันจิรา จรามรบูรพงศ์, สมปอง ทองงามดี, อรุณรัตน์ สัณฐิติกวินสกุล และ รุ่งทิวา ชิดทอง. 2565. การตรวจสอบพฤกษเคมีเบื้องต้นและปริมาณฟินอลิกรวมของใบจันทน์หอม. การประชุมวิชาการระดับชาติ ครั้งที่ 14 มหาวิทยาลัยราชภัฏนครปฐม.7-8 กรกฎาคม 2565.

Alam, N., Yoon, K.N., Cha, Y.J., Kim, J.H., K.R. & Lee, T.S. (2011). Appraisal of the antioxidant, phenolic compounds concentration, xanthin oxidase and tyrosinase inhibitory activities of *Pleurotus salmoneostramineus*. African Journal of Agricultural Research, 6, 1555-1563.

Ayoola, G. A., Coker, H. A. B., Adesegun, S. A., Adepoju-Bello, A. A., Obaweya, K., Ezennia, E. C., & Atangbayila, T. O. (2008). Phytochemical screening and antioxidant activities of some selected medicinal plants used for malaria therapy in southwestern nigeria, Journal of pharmaceutical research, 7(3), 1019–1024

Cheong, M. W., Loke, X. Q., Liu, S. Q., Pramudya, K., Curran, P., & Yu, B. (2011). Characterization of volatile compounds and aroma profiles of Malaysian Pomelo (Citrus grandis (L.) Osbeck) Blossom and Peel. Journal of Essential Oil Research, 23(2), 34–44.

Fidrianny, I., Sari, E. & Komar, R. (2016). Phytochemicalcontentand antioxidantactivities in different organs of pomelo (Citrus maxima [BURM.] MERR.) using 2,2- diphenyl-1-picrylhydrazyl and phosphomolybdenum assays. Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research. 9(2), 185-190.

Goh, R. M. V., Lau, H., Liu, S. Q., Lassabliere, B., Guervilly, R., Sun, J., et al., (2019). Comparative analysis of pomelo volatiles using headspace-solid phase micro-extraction and solvent assisted flavor evaporation. Food Science and Technology, 99, 328–345.

He, W., Li, X., Peng, Y., He, X., & Pan, S. (2019). Anti-oxidant and anti-melanogenic properties of essential oil from peel of pomelo cv. Guan Xi. Molecules, 24(2), 242–245 (Basel, Switzerland).

Li, X.; Guo, L.; Sun, Y.; Zhou, J.; Gu, Y.; Li, Y. Baicalein inhibits melanogenesis through activation of the ERK signaling pathway. Int. J. Mol. Med. 2010, 25, 923–927

Prommuak, C., D-Eknamkul, W., & Shotipruk, A. (2008). Extraction of flavonoids and carotenoids from thai silk waste and antioxidant activity of extract, Separation and purification technology, 62, 444-448.

Ritaro, M.; Hiroyuki, U.; Masayoshi, S. Tyrosinase inhibitory activity of citrus essential oils. J. Agric. Food Chem. 2006, 54, 2309–2313.

Seo, S.Y.; Sharma, V.K.; Sharma, N. Mushroom tyrosinase: Recent Prospects. J. Agric. Food Chem. 2003, 51, 2837–2853. [CrossRef] [PubMed]

Turapra, B., Boonyarat, C., Chulikhit, Y. & Daodee, S. (2016). Determination of active constituents and antioxidative activity in Citrus maxima (Burm.) Merr. Isan Journal of Pharmaceutical Sciences. 11, 80-91. (in Thai)

Toh, J.J., Khoo, H.E. & Azrina, A. (2013). Comparisonofantioxidant propertiesof pomelo [Citrus Grandis (L.) Osbeck] varieties. International Food Research Journal. 20(4), 1661-1668.

Tsai, C. C., Chen, H. S., Chen, S. L., Ho, Y. P., Ho, K. Y., & Wu, Y. M. (2005). Lipid peroxidation: a possible role in the induction and progression of chronic periodontitis, Journal periodontal, 40, 378–384

Wang, F., Lin, J., Xu, L., Peng, Q., Huang, H., Tong, L., et al., (2019). On higher nutritional and medical properties of a carotenoid-rich mutant pomelo (Citrus maxima (L.) Osbeck). Industrial Crops & Products, 127, 142–147.

Zhao, Y. L., Yang, X. W., Wu, B. F., Shang, J. H., Liu, Y. P., Dai, Z., et al., (2019). Antiinflammatory effect of pomelo peel and its bioactive coumarins. Journal of Agriculture and Food Chemistry, 67, 8810–8818.