

การประเมินฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของน้ำมันหอมระเหยจากใบฝรั่ง

Evaluation of antioxidant activities of essential oil from guava leaf

ณัฐกิติ ภูริน¹, กนกพร ช้างเสวก¹, ภัทริน วิจิตรตระการ¹, จำรูญ เล้าสินวัฒนา¹
และ มณฑินี ธีรารักษ์^{1*}

Natthakiti Phuruen¹, Kanokporn Changsawake¹, Pattharin Wichittrakarn¹,
Chamroon Laosinwattana¹ and Montinee Teerarak^{1*}

บทคัดย่อ: การศึกษาในการทดลองครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษากิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระของน้ำมันหอมระเหยจากใบฝรั่ง (*Psidium guajava* Linn.) โดยใช้วิธี DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) การประเมินความสามารถในการจับโลหะไอออน และความสามารถในการรีดิวซ์ พบว่าน้ำมันหอมระเหยจากใบฝรั่งมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH มีค่าความเข้มข้นของน้ำมันหอมระเหยจากใบฝรั่งที่ทำให้อนุมูลอิสระลดลงครึ่งหนึ่งของปริมาณอนุมูลอิสระทั้งหมด หรือค่า IC₅₀ เท่ากับ 44,864.21 mg/L เมื่อเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน 2 ชนิด คือ วิตามินซี และ butylated hydroxytoluene (BHT) มีค่า IC₅₀ เท่ากับ 3.16 และ 21.82 mg/L ตามลำดับ การประเมินความสามารถในการจับโลหะไอออน พบว่าน้ำมันหอมระเหยจากใบฝรั่ง มีค่า IC₅₀ เท่ากับ 2,110.76 mg/L ขณะที่สารมาตรฐาน คือ ethylenedinitrilotetraacetic acid (EDTA) มีค่า IC₅₀ เท่ากับ 18.32 mg/L และการวิเคราะห์หาความสามารถในการรีดิวซ์ พบว่าฤทธิ์ในการทำให้เกิดปฏิกิริยารีดักชันของน้ำมันหอมระเหยจากใบฝรั่งมีค่าเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของน้ำมันหอมระเหยจากใบฝรั่งที่เพิ่มขึ้น

คำสำคัญ: ใบฝรั่ง, น้ำมันหอมระเหย, กิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระ, ความสามารถในการกำจัดโลหะไอออน, ความสามารถในการรีดิวซ์

ABSTRACT: The aim of this study was to evaluating antioxidant activities of essential oil of guava leaf (*Psidium guajava* Linn.) by using DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) free radical-scavenging activity, metal chelating activity and reducing power activity. The antioxidant activities shown that essential oil of guava leaf has the DPPH free radical-scavenging activity with the half maximal inhibitory concentration (IC₅₀) value was 44,864.21 mg/L compared with IC₅₀ values of standard vitamin C and butylated hydroxytoluene (BHT) were 3.16 and 21.82 mg/L, respectively. In addition, the guava leaf essential oil has metal chelating activity with IC₅₀ value was 2,110.76 mg/L, while ethylenedinitrilotetraacetic acid (EDTA) as standard has IC₅₀ value was 18.32 mg/L. Moreover, reducing power ability of essential oil of guava leaf *increased concentration-dependently*.

Keywords: guava leaf, essential oil, antioxidant activity, metal ion chelator, reducing power

¹ สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง กรุงเทพฯ

Department of Plant Production Technology, Faculty of Agricultural Technology, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang, Bangkok

* Corresponding author: ktmontin@kmitl.ac.th

บทนำ

ฝรั่ง (*Psidium guajava* Linn.) เป็นพืชที่นิยมปลูกโดยทั่วไปเพื่อรับประทานผลสด แต่ส่วนของใบฝรั่งประกอบด้วยสารหลักสำคัญ คือ เคอร์ซีติน (quercetin) และพบสารแทนนิน (tannins) เป็นองค์ประกอบด้วย (Begum et al., 2004) มีฤทธิ์ในด้านการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ (Caceres et al., 1993; Arima and Danno, 2002) และฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ (Gordon, 1996; Wei et al., 2012) สารต้านอนุมูลอิสระ มีอีกชื่อว่า Antioxidant ซึ่งเป็นสารปริมาณน้อยที่สามารถป้องกันหรือชะลอการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของอนุมูลอิสระได้ (Halliwell, 2009) สารเหล่านี้มีกลไกในการต้านอนุมูลอิสระหลายแบบ เช่น ดักจับ (scavenge) อนุมูลอิสระโดยตรง, ยับยั้งการสร้างอนุมูลอิสระหรือเข้าจับ (chelate) กับโลหะเพื่อป้องกันการสร้างอนุมูลอิสระ (Sies et al, 1992) วิธีการตรวจวัดชนิดและความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระจึงเป็นสิ่งสำคัญเนื่องจากวิธีการตรวจวัดที่ดีและเหมาะสมจะทำให้ได้ข้อมูลที่ถูกต้องเที่ยงตรง และแม่นยำ (บุหรณ์, 2556) สารต้านอนุมูลอิสระมีมากในพืชผักและผลไม้บางชนิด จึงได้มีการสนับสนุนให้รับประทานสิ่งเหล่านี้เพิ่มมากขึ้น เนื่องจากสารต้านอนุมูลอิสระ มีบทบาทที่สำคัญในการป้องกันการเกิดโรคภัยและชะลอการเสื่อมสภาพของร่างกาย ซึ่งนักวิจัยจึงได้ทดสอบหาสารจากธรรมชาติที่มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระแทนการใช้สารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์ในรูปของสารสกัดหยาบและสารบริสุทธิ์จากพืช รวมถึงน้ำมันหอมระเหย ซึ่งเป็นสารที่ได้จากธรรมชาติจึงได้มีการนำมาทดสอบการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ น้ำมันหอมระเหยจากพืชได้ถูกนำมาใช้ประโยชน์หลายๆ ด้าน เช่น ใช้เป็นสารกันบูดในผลิตภัณฑ์อาหาร โดยการควบคุมปฏิกิริยาออกซิเดชัน จากการเติมสารต้านอนุมูลอิสระลงไปสามารถยับยั้งสารตั้งต้นที่ทำให้คุณภาพของอาหารเสื่อมสภาพ (Gramza et al., 2006) องค์ประกอบหลักของน้ำมันหอมระเหยมักเป็นสารประกอบฟีนอลิก จึงมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ น้ำมัน

หอมระเหยจากพืชหลายชนิดได้รับความสนใจและมีการค้นคว้าอย่างมากเกี่ยวกับคุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระ (Zhu et al., 2002; Sokmen et al., 2004; Li et al., 2010) ดังนั้นการศึกษาในครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของน้ำมันหอมระเหยจากใบฝรั่งโดยวิธีการวัดความสามารถในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชัน โดยวิธี DPPH, ความสามารถของสารในการแย่งจับกับโลหะไอออน Fe^{2+} และความสามารถในการรีดิวซ์ของสารต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี Reducing power

วิธีการทดลอง

น้ำมันหอมระเหยและสารเคมี

น้ำมันหอมระเหย ได้แก่ น้ำมันหอมระเหยจากใบฝรั่งที่ใช้ในการศึกษาซึ่งจากบริษัทอุตสาหกรรมเครื่องหอมไทย-จีน จำกัด สารเคมี ได้แก่ 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ (Ferrous Sulphate), 3-(2-Pyridyl)-5, 6-diphenyl-1,2,4-triazine-4,4-disulfonic acid sodium salt (Ferrozine), NaH_2PO_4 (Sodium dihydrogen phosphate anhydrous), Na_2HPO_4 (di-Sodium hydrogen orthophosphate), $K_3Fe(CN)_6$ (Potassium ferricyanide), Trichloroacetate acid, Iron (III) chloride ($FeCl_3$), butylated hydroxytoluene (BHT), ethylenedinitrilotetraacetic acid (EDTA), Ascorbic acid, เอทานอล และน้ำกลั่น

ศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของน้ำมันหอมระเหยจากใบฝรั่ง โดยวิธี DPPH

วัดความสามารถในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชัน (DPPH free radical-scavenging activity) เจือจางน้ำมันหอมระเหยจากใบฝรั่งที่ระดับความเข้มข้น 10,000, 20,000, 30,000, 40,000 และ 50,000 มิลลิกรัมต่อลิตร ละลายในเอทานอล จากนั้นเติมน้ำมันหอมระเหยจากใบฝรั่งที่เตรียมไว้ในแต่ละความเข้มข้น ใส่ลงในหลอดทดลอง ปริมาตร 2 มิลลิตร และเติม

สารละลาย DPPH ความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์ ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันทันทีแล้วบ่มในที่มืดที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที จึงนำสารละลายไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่มีความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ ทำการทดสอบอย่างละ 3 ซ้ำ บันทึกค่าการดูดกลืนแสง และนำค่าดูดกลืนแสงที่ได้ไปคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH โดยใช้วิตามินซี และ BHT เป็นสารละลายมาตรฐาน

ทดสอบความสามารถในการแย่งจับกับ Fe^{2+} ของน้ำมันหอมระเหยจากใบฝรั่ง (Metal chelating activity assay)

เตรียมน้ำมันหอมระเหยจากใบฝรั่งที่ความเข้มข้น 500, 1,000, 2,500, 5,000, 7,500 และ 10,000 มิลลิกรัมต่อลิตร ละลายในเอทานอล จากนั้นเติมน้ำมันหอมระเหยจากใบฝรั่งที่เตรียมไว้ในแต่ละความเข้มข้น ใส่ลงในหลอดทดลอง ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมกับเอทานอล ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร เติมสารละลายเฟอร์รัสซัลเฟต ($FeSO_4$) ความเข้มข้น 2 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันและเติมสารละลายเฟอร์รีนความเข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ผสมส่วนผสมให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที จากนั้นจึงนำสารละลายไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่มีความยาวคลื่น 562 นาโนเมตร ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ ทำการทดสอบตัวอย่างละ 3 ซ้ำ บันทึกค่าการดูดกลืนแสง และนำค่าดูดกลืนแสงที่ได้ไปคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ความสามารถในการแย่งจับกับโลหะไอออน Fe^{2+} โดยใช้ EDTA เป็นสารละลายมาตรฐาน

ทดสอบความสามารถในการรีดิวซ์ของสารต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี Reducing power

เตรียมน้ำมันหอมระเหยจากใบฝรั่งที่ความเข้มข้น 500, 1,000, 2,500, 5,000, 7,500 และ 10,000 มิลลิกรัมต่อลิตร ละลายในเอทานอล จากนั้นเติมน้ำมันหอมระเหยจากใบฝรั่งที่เตรียมไว้ในแต่ละความเข้มข้น

ใส่ลงในหลอดทดลอง ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมกับฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 6.6 ความเข้มข้น 200 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร และโพแทสเซียมเพอร์ริโธไซยาไนด์ ($K_3Fe(CN)_6$) ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที เติมกรดไตรคลอโรอะเซติก ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปหมุนเหวี่ยง 3000 รอบที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที จากนั้นดูดสารละลายใส ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร ใส่หลอดทดลอง ผสมกับน้ำกลั่น ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร และเฟอร์ริกคลอไรด์ ($FeCl_3$) ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วนำสารละลายไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที หลังจากนั้นวัดค่าการดูดกลืนแสงที่มีความยาวคลื่น 700 นาโนเมตร ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ ทำการทดสอบตัวอย่างละ 3 ซ้ำ บันทึกค่าการดูดกลืนแสง โดยใช้วิตามินซีเป็นสารละลายมาตรฐาน

ผลและวิจารณ์

การวัดความสามารถการต้านอนุมูลอิสระของน้ำมันหอมระเหยจากใบฝรั่งโดยใช้วิธี DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) เป็นวิธีเบื้องต้นที่นิยมใช้ในการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลของสารต้านออกซิเดชันจากธรรมชาติ และเป็นการทดสอบความสามารถของสารทดสอบในการกำจัดอนุมูล DPPH โดยวิธีให้ไฮโดรเจนอะตอมในหลอดทดลอง (Hou et al., 2001) ผลการทดสอบความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระของน้ำมันหอมระเหยจากใบฝรั่ง โดยวิธี DPPH เปรียบเทียบกับสารต้านอนุมูลอิสระ 2 ชนิด คือ วิตามินซี และ BHT พบว่าประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระ โดยวิธี DPPH ของน้ำมันหอมระเหยจากใบฝรั่ง มีค่า IC_{50} เท่ากับ 44,864.21 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่วนวิตามินซี และ BHT มีค่า IC_{50} เท่ากับ 3.16 และ 21.82 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ (Table 1) ส่วนความสามารถในการคีเลตไอออนของโลหะเป็นการทดสอบความสามารถ

ของสารทดสอบในการแย่งจับกับโลหะไอออน Fe^{2+} เป็นอีกกลไกหนึ่งในการต้านอนุมูลอิสระ เนื่องจากโลหะไอออนเป็นตัวการสำคัญในการเร่งปฏิกิริยาทำให้เกิดสารอนุมูลอิสระต่างๆ มากมายหลายชนิด โดยเฉพาะโลหะไอออน Fe^{2+} จะทำปฏิกิริยาออกซิเดชันกับออกซิเจนในอากาศ เกิดเป็นสารอนุมูล superoxide anion radical (O_2^-) ซึ่งเป็นอนุมูลอิสระตัวเริ่มต้นที่ทำให้เกิดอนุมูลอิสระตัวอื่นๆ ต่อไป (Rice-Evans et al., 1995) ผลการทดสอบความสามารถในการแย่งจับกับโลหะซึ่งเป็นการทดสอบความสามารถของน้ำมันหอมระเหยจากใบฝรั่งในการคีเลท หรือการแย่งจับกับโลหะไอออน Fe^{2+} เปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน EDTA พบว่า เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของน้ำมันหอมระเหยจากใบฝรั่งมีผลทำให้ความสามารถในการแย่งจับโลหะไอออน Fe^{2+} เพิ่มขึ้น โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 2,110.76 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่วน EDTA มีค่า IC_{50} เท่ากับ 18.32 มิลลิกรัมต่อลิตร (Figure 1) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Viuda-Manuel et al. (2010) แสดงให้เห็นความสามารถของน้ำมันหอมระเหยจากพืช 5 ชนิด ได้แก่ กานพลู (*Syzygium aromaticum*) ออริกาโน (*Origanum vulgare*) โรสแมรี่ (*Rosmarinus officinalis*) ไทม์ (*Thymus vulgaris*) และเสจ (*Salvia officinalis*) ในการต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH และความสามารถในการแย่งจับกับโลหะไอออน Fe^{2+} เพิ่มขึ้นตามความ

เข้มข้นที่เพิ่มขึ้น และผลการทดสอบความสามารถในการรีดิวซ์หรือความสามารถในการให้อิเล็กตรอนของน้ำมันหอมระเหยจากใบฝรั่ง พบว่า ความสามารถในการให้อิเล็กตรอนของน้ำมันหอมระเหยจากใบฝรั่งมีค่าเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของน้ำมันหอมระเหยจากใบฝรั่งที่เพิ่มขึ้น (Figure 2) น้ำมันหอมระเหยจากใบฝรั่งมีคุณสมบัติเป็นตัวให้อิเล็กตรอนสามารถทำให้อนุมูลอิสระเปลี่ยนเป็นอนุมูลที่เสถียร จึงส่งผลให้หยุดปฏิกิริยาลูกโซ่ของอนุมูลอิสระได้ โดยศึกษาหลักการเกิดปฏิกิริยารีดักชันของ $\text{Fe}^{3+}(\text{CN})_6$ ไปเป็น $\text{Fe}^{2+}(\text{CN})_6$ (Dehpour et al., 2009) แสดงว่าน้ำมันหอมระเหยจากใบฝรั่งมีกลไกการต้านอนุมูลอิสระ โดยอาจจะลดการเกิดปฏิกิริยา lipid peroxidation และลดการเกิดอนุมูลอิสระ เนื่องจากธาตุเหล็กที่อยู่ในรูปเฟอร์รัส (Fe^{2+}) เป็นตัวการสำคัญในการเร่งปฏิกิริยา lipid peroxidation

สรุป

จากการศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของน้ำมันหอมระเหยจากใบฝรั่ง โดยการวิเคราะห์เชิงปริมาณด้วยวิธีการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH, การแย่งจับกับโลหะไอออน Fe^{2+} และการรีดิวซ์ของน้ำมันหอมระเหยจากใบฝรั่งนั้น แสดงให้เห็นว่าน้ำมันหอมระเหยจากใบฝรั่งมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้

Table 1 DPPH free radical-scavenging activity of guava leaf essential oil, BHT and ascorbic acid.

	IC_{50} (mg/L) ^{1/}
Guava leaf essential oil	44,864.21±51.18*
Ascorbic acid	3.16± 0.01
BHT	21.82± 0.18

^{1/} IC_{50} Concentration (mg/L) for a 50% inhibition. , ±SD ; Standard deviation.

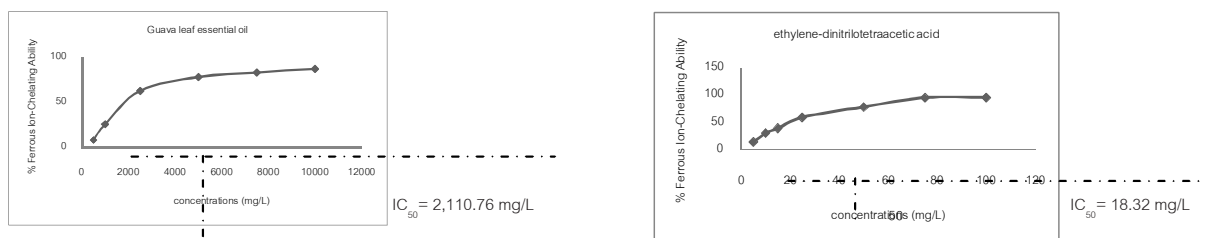


Figure 1 Results of metal chelating activity of essential oil from guava leaf and standard (EDTA).

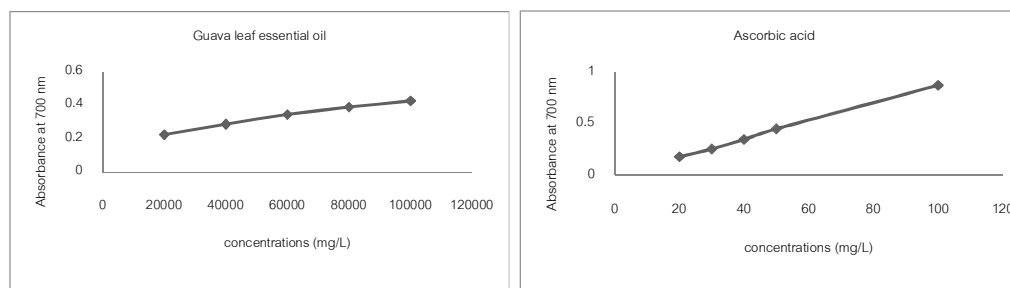


Figure 2 Reducing power of essential oil from guava leaf and standard (Ascorbic acid).

เอกสารอ้างอิง

บุรินทร์ พันธุ์สุวรรณ. 2556. อนุมูลอิสระ สารต้านอนุมูลอิสระ และ การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ. วารสารวิทยาศาสตร์ และเทคโนโลยี 21(3): 275-286.

Arima, H. and G. Danno. 2002. Isolation of antimicrobial compounds from guava (*Psidium guajava* L.). Bioscience Biotechnology and Biochemistry 66: 1727-1730.

Begum, S., S. I. Hassan, and B. S. Siddiqui. 2004. Chemical constituents from the leaves of *Psidium guajava*. Natural Product Research 18: 135-140.

Caceres, A., L. Figueroa, A. M. Taracena, and B. Samayoa. 1993. Plants used in Guatemala for the treatment of respiratory diseases. 2: evaluation of activity of 16 plants against gram-positive bacteria. Journal of Ethnopharmacol 39: 77-82.

Dehpour, A.A., M.A. Ebrahimzadeh, N.S. Fazel, and N.S. Mohammad. 2009. Antioxidant activity of the methanol extract of *Ferula assafoetida* and its essential oil composition. Grasasy Aceites 60(4): 405-412.

Gramza, A., S. Khokhar, S. Yoko, A. Gliszczynska-Swiglo, M. Hes and J. Korczak. 2006. Antioxidant activity of tea extracts in lipids and correlation with polyphenol content. European Journal of Lipid Science and Technology 108: 351-362.

Halliwel, B. 2009. The wanderings of a free radical. Free Radical Biology and Medicine 46: 531-542.

Hou, W.C., M.H., Lee, H.J., Chen, W.L., Liang, C. H., Han, Y.W., Liu and Y. H. Lin. 2001. Antioxidant activities of dioscorin, the storage protein of yam (*Dioscorea batatas* Decne) tuber. Journal of Agricultural and Food Chemistry 49: 4956-4960.

Li, J., S. Nie, Z. Qiu, M. Che, C. Li and M. Xie. 2010. Antimicrobial and antioxidant activities of the essential oil from *Herba Moslae*. Science of Food and Agriculture 90: 1347-1352.

Rice-Evans, C.A., N.J. Miller, P.G. Bolwell, P.M. Bramley and J.B. Pridham. 1995. The relative antioxidant activities of plant derived polyphenolic flavonoids. Free Radical Research 22: 375-383.

Sies, H., W. Stahl and A. Sundquist. 1992. Antioxidant functions of vitamins, vitamin E and C, beta-carotene and other carotenoids. Annals of the New York Academy of sciences 368: 7-19.

Sokmen, A., M. Gulluce, H.A. Akpulat, D. Daferera, B. Tepe and M. Polissious. 2004. The in vitro antimicrobial and antioxidant activities of the essential oils and methanol extracts of endemic *Thymus spathulius*. Food Control 15: 627-634.

Viuda-Martos, M., Y.R. Navajas, E.S. Zapata, J. Fernandez-Lopez and J.A. Perez-Alvarez. 2010. Antioxidant activity of essential oils of five spice plants widely used in a Mediterranean diet. Flavour and Fragrance Journal 25: 13-19

Zhu, Q.Y., R.M. Hackman, J.L. Ensuna, R.R. Holt and C.L. Keen. 2002. Antioxidative activities of oolong tea. Journal of Agricultural and Food Chemistry 50: 6929-6934.