



องค์ประกอบทางเคมี ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ต้านมะเร็งของน้ำมันหอมระเหยจากเปลือกผลมะขวง Chemical Composition, Antioxidant and Anticancer Activities of Essential Oils from the Pericarp of *Zanthoxylum rhetsa*

วัชรารณ ประภาสะโนบล^{1*} พิชิต สุดตา¹ มหิสร ประภาสะโนบล² สุธิดา สุนทรหงษ์¹ และแพทชรียา ไชยนา¹
Vatcharaporn Prapasanobol^{1*}, Pichit Sudta¹, Mahisorn Prapasanobol², Suthida Suntornhong¹
and Patchareeya Chaiyana¹

¹คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบุรี จังหวัดเพชรบุรี 76000 ประเทศไทย

²คณะเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบุรี จังหวัดเพชรบุรี 76000 ประเทศไทย

¹Faculty of Science and Technology, Phetchaburi Rajabhat University, Phetchaburi 76000, Thailand

²Faculty of Agricultural Technology, Phetchaburi Rajabhat University, Phetchaburi 76000, Thailand

*Corresponding author, e-mail: vatcharaporn.pra@mail.pbru.ac.th

(Received: Feb 20, 2026; Revised: Apr 29, 2026; Accepted: May 12, 2026)

บทคัดย่อ

มะขวง (*Zanthoxylum rhetsa*) เป็นพืชสมุนไพรท้องถิ่นของไทยที่มีการใช้ในภูมิปัญญาพื้นบ้านมาอย่างยาวนาน อย่างไรก็ตาม ข้อมูลเชิงวิทยาศาสตร์เกี่ยวกับน้ำมันหอมระเหยจากเปลือกผลในเขตภาคตะวันตกของประเทศไทยยังจำกัด การวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันหอมระเหยจากเปลือกผลมะขวงที่เก็บจากอำเภอหนองหญ้าปล้อง จังหวัดเพชรบุรี ประเมินฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ศึกษาฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ (HT-29) และเซลล์มะเร็งตับ (HepG2) รวมทั้งประเมินความปลอดภัยต่อเซลล์ปกติ โดยสกัดน้ำมันหอมระเหยด้วยวิธีการกลั่นด้วยน้ำ วิเคราะห์องค์ประกอบด้วยเทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟีควบคู่แมสสเปกโตรเมตรี ทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH และประเมินความเป็นพิษต่อเซลล์ด้วยวิธี MTT assay ผลการวิจัยพบว่า น้ำมันหอมระเหยให้ผลผลิตร้อยละ 1.42 (%w/w) ตรวจพบสารประกอบทั้งหมด 25 ชนิด โดยมีซาบินีน ($42.45 \pm 1.21\%$) และเทอร์พีนีน-4-อล ($12.76 \pm 0.14\%$) เป็นองค์ประกอบหลัก จัดอยู่ในกลุ่มเคมีแบบที่มีซาบินีนเป็นองค์ประกอบหลัก ซึ่งแตกต่างจากรายงานในพื้นที่อื่นของประเทศไทย สะท้อนอิทธิพลของปัจจัยภูมิศาสตร์ต่อการสังเคราะห์สารทุติยภูมิ น้ำมันหอมระเหยแสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระระดับปานกลาง ($IC_{50} = 36.23 \pm 1.47$ มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) และแสดงฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์ HT-29 ($IC_{50} = 147.80 \pm 1.33$ ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) และ HepG2 ($IC_{50} = 125.58 \pm 1.64$ ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) แบบขึ้นกับความเข้มข้น โดยเซลล์ HepG2 มีความไวต่อสารมากกว่า ขณะที่ไม่พบความเป็นพิษต่อเซลล์ไฟโบรบลาสต์ปกติในช่วงความเข้มข้นที่ทดสอบ (6.25 – 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) ผลการศึกษานี้ชี้ให้เห็นว่าน้ำมันหอมระเหยจากเปลือกผลมะขวงเป็นแหล่งของสารกลุ่มเทอร์พีนที่มีศักยภาพทางชีวภาพ ทั้งฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็ง พร้อมความปลอดภัยในระดับเซลล์เบื้องต้น ซึ่งสนับสนุนการใช้ประโยชน์สมุนไพรท้องถิ่นของไทยและการพัฒนาผลิตภัณฑ์สุขภาพอย่างยั่งยืน

คำสำคัญ : มะขวง น้ำมันหอมระเหย องค์ประกอบทางเคมี ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ต้านมะเร็ง

Abstract

Makhwaen (*Zanthoxylum rhetsa*) is a Thai indigenous medicinal plant widely used in traditional practices. However, scientific information on essential oils derived from the fruit pericarp in western Thailand remains limited. This study aimed to analyze the chemical composition of essential oil extracted from the fruit pericarp of *Z. rhetsa* collected from Nong Ya Plong District, Phetchaburi Province, evaluate its antioxidant activity, investigate its anticancer effects against human colorectal cancer (HT-29) and liver cancer (HepG2) cell lines, and assess its safety toward normal cells. The essential oil was obtained by hydrodistillation, and its chemical composition was analyzed using gas chromatography–mass spectrometry (GC–MS). Antioxidant activity was determined using the DPPH radical scavenging assay, while cytotoxicity was evaluated using the MTT assay. The results showed that the essential oil yield was 1.42% (w/w), and a total of 25 compounds were identified. The major constituents were sabinene ($42.45 \pm 1.21\%$) and

terpinen-4-ol ($12.76 \pm 0.14\%$), indicating a sabinene-dominant chemotype, which differs from reports in other regions of Thailand. This finding highlights the influence of geographical factors on secondary metabolite biosynthesis. The essential oil exhibited moderate antioxidant activity with an IC_{50} value of 36.23 ± 1.47 mg/mL. It also demonstrated dose-dependent inhibitory effects on HT-29 ($IC_{50} = 147.80 \pm 1.33$ μ g/mL) and HepG2 cells ($IC_{50} = 125.58 \pm 1.64$ μ g/mL), with HepG2 cells being more sensitive. Notably, no cytotoxicity was observed against normal fibroblast cells within the tested concentration range (6.25–200 μ g/mL). These findings suggest that the essential oil from the fruit pericarp of *Z. rhetsa* is a promising source of bioactive terpenes with antioxidant and anticancer properties, along with preliminary safety toward normal cells. This study supports the scientific utilization of Thai indigenous medicinal plants and their potential development into sustainable health-related products.

Keywords: *Zanthoxylum rhetsa*, Essential oil, Chemical composition, Antioxidant activity, Anticancer activity

บทนำ

พืชในสกุลซานโซลิ้ม (*Zanthoxylum*) วงศ์ส้ม (Rutaceae) เป็นพืชสมุนไพรที่มีการกระจายพันธุ์อย่างกว้างขวางในเขตร้อนและกึ่งเขตร้อนของเอเชีย แอฟริกา และอเมริกา โดยได้รับความสนใจอย่างต่อเนื่องในฐานะแหล่งของสารทุติยภูมิและน้ำมันหอมระเหยที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพหลากหลาย ได้แก่ ฤทธิ์ต้านจุลชีพ ต้านการอักเสบ ต้านอนุมูลอิสระ ต้านแมลง และต้านมะเร็ง (Chua *et al.*, 2018) น้ำมันหอมระเหยจากพืชสกุลนี้มักมีสารกลุ่มโมโนเทอร์พีนและเซสควิเทอร์พีน ซึ่งมีบทบาทสำคัญต่อฤทธิ์ทางชีวภาพดังกล่าว ในประเทศไทย *Zanthoxylum rhetsa* (Roxb.) DC. ซึ่งมีชื่อพ้องทางพฤกษศาสตร์ว่า *Zanthoxylum limonella* Alston และ *Zanthoxylum budranga* Wallex DC. เป็นพืชสมุนไพรพื้นบ้านที่มีชื่อเรียกหลากหลายตามภูมิภาคต่าง ๆ ในภาคเหนือรู้จักในชื่อ “มะขวง” หรือ “มะแขว่น” ขณะที่ภาคตะวันออกเฉียงเหนือเรียกว่า “หมากแขว่น” หรือ “กำจัดต้น” และในบางพื้นที่ของภาคกลางและภาคตะวันตกอาจเรียกว่า “พริกพราน” หรือ “พริกหอม” นอกจากนี้ยังมีชื่อพื้นเมืองอื่น ๆ เช่น “มะแข่น” และ “มะแขว่นป่า” ซึ่งสะท้อนถึงลักษณะทางพฤกษศาสตร์และการใช้ประโยชน์ของพืชชนิดนี้ในวิถีชีวิตของชุมชนท้องถิ่น ผลแห้งของมะขวงนิยมใช้เป็นเครื่องเทศในอาหารพื้นบ้านเนื่องจากมีกลิ่นหอมเฉพาะตัวและรสเผ็ดซ่า นอกจากนี้ยังมีการใช้มะขวงในตำรับยาแผนพื้นบ้านเพื่อบรรเทาอาการต่าง ๆ รวมถึงการรักษาอาการของระบบทางเดินอาหารและการอักเสบ ซึ่งเป็นผลจากสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีอยู่ในพืชชนิดนี้ งานวิจัยก่อนหน้านี้รายงานว่า การใช้ส่วนต่าง ๆ ของมะขวงมีฤทธิ์ทางชีวภาพที่หลากหลาย ไม่ว่าจะเป็นฤทธิ์ต้านการอักเสบและฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน จึงสะท้อนถึงการนำไปใช้เพื่อบรรเทาอาการที่เกี่ยวข้องกับความผิดปกติจากภาวะเครียดออกซิเดชันในชุมชนพื้นบ้าน (Quoc, 2023)

องค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันหอมระเหยจากผลมะขวงที่เคยมีรายงานก่อนหน้านี้พบว่า มีสารสำคัญในกลุ่มโมโนเทอร์พีน ได้แก่ ลิโมนีน (Limonene) ซาบินีน (Sabinene) แอลฟาไพเนน (α -Pinene) และเทอร์พีน-4-อล (Terpinen-4-ol) ซึ่งแสดงฤทธิ์ต้านจุลชีพและต้านอนุมูลอิสระอย่างมีนัยสำคัญ (Chua *et al.*, 2018) นอกจากนี้ สารสกัดหยาบจากส่วนต่าง ๆ ของมะขวง เช่น ลำต้นและผล ยังแสดงฤทธิ์ทางชีวภาพอื่น ๆ ได้แก่ ฤทธิ์ต้านจุลชีพและฤทธิ์ต้านการอักเสบ ซึ่งสนับสนุนการนำไปใช้เพื่อรักษาอาการเกี่ยวกับการติดเชื้อและภาวะ oxidative stress ในระบบชีวภาพ การศึกษาของ Charoensuk *et al.* (2021) รายงานว่า สารสกัดเมทานอลจากลำต้นของมะขวงสามารถลดระดับมาลอนไดอัลดีไฮด์ (MDA) และเพิ่มระดับกลูตาไธโอน (GSH) และเอนไซม์แคตาเลส (CAT) ในเซลล์มะเร็งต่อมลูกหมาก ซึ่งสะท้อนถึงกลไกการต้านออกซิเดชันในระดับเซลล์

ความเครียดออกซิเดชันเป็นปัจจัยสำคัญที่เกี่ยวข้องกับการเกิดโรคเรื้อรังหลายชนิด เช่น โรคหัวใจและหลอดเลือด โรคระบบประสาทเสื่อม และโรคมะเร็ง การสะสมของอนุมูลอิสระในระดับสูงสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดความเสียหายต่อดีเอ็นเอ โปรตีน และไขมันในเยื่อหุ้มเซลล์ ซึ่งนำไปสู่การกลายพันธุ์และการเพิ่มจำนวนของเซลล์อย่างผิดปกติ (Klaunig *et al.*, 2018) โรคมะเร็งโดยเฉพาะมะเร็งลำไส้ใหญ่และมะเร็งตับเป็นสาเหตุสำคัญของการเสียชีวิตทั่วโลก โดยองค์การอนามัยโลกรายงานว่า มะเร็งลำไส้ใหญ่เป็นมะเร็งที่พบบ่อยอันดับสามของโลกและเป็นสาเหตุการเสียชีวิตอันดับสองจากโรคมะเร็ง (Sung *et al.*, 2021) ขณะที่มะเร็งตับพบได้สูงในภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้รวมถึงประเทศไทย โดยเป็นมะเร็งที่พบบ่อยอันดับหนึ่งในผู้ชายไทย และเป็นสาเหตุการเสียชีวิตจากมะเร็งอันดับต้นของประเทศ (National Cancer Institute Thailand, 2020) การค้นหาแหล่งสารต้านอนุมูลอิสระและสารต้านมะเร็งจากธรรมชาติจึงมีความสำคัญอย่างยิ่งในด้านเภสัชและการพัฒนาผลิตภัณฑ์สุขภาพ

แม้ว่างานวิจัยก่อนหน้านี้จะมีรายงานเกี่ยวกับองค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันหอมระเหยจากผลสดหรือผลแห้งของมะขวงแบบรวมส่วน แต่ข้อมูลเกี่ยวกับน้ำมันหอมระเหยที่สกัดจากเปลือกผล (Pericarp) โดยเฉพาะยังมีอยู่อย่างจำกัด ทั้งที่จากลักษณะทางกายวิภาคพืชของพืชวงศ์ส้ม แสดงให้เห็นว่าเปลือกผลเป็นบริเวณที่มีต่อมน้ำมันหอมระเหยสะสมอยู่มากที่สุด และอาจมีองค์ประกอบทางเคมีแตกต่างจากเนื้อผลหรือส่วนอื่นของมะขวง ซึ่งอาจส่งผลต่อความแรงและชนิดของฤทธิ์ทางชีวภาพ การศึกษาเจาะจงเฉพาะส่วนเปลือกผลจะช่วยให้ได้ข้อมูลองค์ประกอบเคมีที่บริสุทธิ์และเข้มข้นที่สุดจากแหล่งกักเก็บน้ำมันที่แท้จริง ปัญหาสำคัญของการวิจัยมะขวงในอดีตคือความแปรปรวนขององค์ประกอบเคมีตามแหล่งภูมิศาสตร์ (Chemotypic Plasticity) ซึ่งเป็นปรากฏการณ์ที่พบได้ทั่วไปในพืชที่ผลิตน้ำมันหอมระเหย (Figueiredo *et al.*, 2008) งานวิจัยหลายชิ้นชี้ให้เห็นว่ามะขวงชนิดเดียวกันแต่ปลูกต่างพื้นที่จะมี Chemotype หรือสารหลักต่างกันอย่างมาก เช่นในพื้นที่จังหวัดพะเยาพบ เทอร์พีน-4-อลเป็นองค์ประกอบหลัก (Wongkattiya *et al.*, 2018) ในจังหวัดน่านพบลิโมนีนเป็นสารเด่น (Buranrat & Utsintong, 2023) และในเวียดนามพบซาปิเนนคู่กับเทอร์พีนโนลีน (Terpinolene) เป็นองค์ประกอบสำคัญ (Tran *et al.*, 2019) ความแปรปรวนนี้ทำให้ยากต่อการกำหนดมาตรฐานคุณภาพ (Standardization) เพื่อใช้ในอุตสาหกรรมยาหรือผลิตภัณฑ์สุขภาพ การระบุเอกลักษณ์ทางเคมีเฉพาะของมะขวงจากแหล่งที่เจาะจงจึงมีความจำเป็นเพื่อสร้างฐานข้อมูลสำหรับวัตถุดิบในแต่ละภูมิภาคของประเทศไทย โดยเฉพาะอย่างยิ่งในเขตภาคตะวันตกที่ยังมีข้อมูลจำกัด

การศึกษาฤทธิ์ต้านมะเร็งของน้ำมันหอมระเหยจากพืชสกุลชานโธโซลิ้ม โดยเฉพาะการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ (HT-29) และเซลล์มะเร็งตับ (HepG2) ยังมีรายงานอย่างจำกัด แม้ว่าจะมีการศึกษาฤทธิ์ต้านมะเร็งของสารสกัดและน้ำมันหอมระเหยจากพืชสกุลนี้มาบ้างแล้ว โดยเฉพาะในเซลล์มะเร็งเต้านม (MCF-7) และเซลล์มะเร็งปอด (A549) อย่างที่ได้รายงานในงานวิจัยของ Huang *et al.* (2010) และ Wang *et al.* (2016) อย่างไรก็ตามพบว่า งานวิจัยที่ทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่และเซลล์มะเร็งตับมีอยู่อย่างจำกัดมาก ในขณะที่ข้อมูลจากทะเบียนมะเร็งระดับชาติของประเทศไทยแสดงให้เห็นว่ามะเร็งตับเป็นมะเร็งที่พบบ่อยอันดับหนึ่งในผู้ชายไทย และมะเร็งลำไส้ใหญ่มีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นอย่างต่อเนื่องในทั้งเพศชายและหญิง (National Cancer Institute Thailand, 2020) การขยายขอบเขตการศึกษาไปยังเซลล์มะเร็งทั้งสองชนิดนี้จึงเป็นสิ่งจำเป็นเพื่อตอบสนองต่อบริบทสุขภาพของประชากรไทย และอาจเปิดโอกาสใหม่ในการพัฒนาสารต้นแบบทางยาที่เหมาะสมกับปัญหาสาธารณสุขของประเทศ อีกทั้งการประเมินความปลอดภัยและความจำเพาะเจาะจงต่อเซลล์มะเร็ง (Selective cytotoxicity) ยังเป็นข้อกังวลสำคัญในงานวิจัยเกี่ยวกับน้ำมันหอมระเหยจากพืชสกุลชานโธโซลิ้ม แม้จะงานวิจัยหลายชิ้นจะยืนยันฤทธิ์ต้านมะเร็งของสารสกัดหรือน้ำมันหอมระเหยจากพืชสกุลนี้ (Huang *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2016) แต่พบว่า ข้อมูลการทดสอบเปรียบเทียบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งและเซลล์ปกติในสภาวะทดลองเดียวกันยังมีอยู่อย่างจำกัด ซึ่งสอดคล้องกับข้อสังเกตของ Efferth และ Koch ในปี 2011 ที่ระบุว่า การศึกษาสารออกฤทธิ์จากธรรมชาติส่วนใหญ่มักขาดการประเมินดัชนีความจำเพาะ (Selectivity Index) อย่างเป็นระบบ ทำให้เกิดความกังวลเรื่องผลข้างเคียงและความปลอดภัยในการนำไปพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ตามแนวทางการพัฒนายาต้านมะเร็งสมัยใหม่ สารต้นแบบที่มีศักยภาพควรแสดงความจำเพาะต่อเซลล์มะเร็งมากกว่าเซลล์ปกติอย่างน้อยสองเท่า การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติควบคู่ไปกับเซลล์มะเร็งในสภาวะทดลองเดียวกันจึงเป็นสิ่งจำเป็นตามมาตรฐานสากล (National Cancer Institute, 2020) เพื่อยืนยันความจำเพาะและศักยภาพในการพัฒนาเป็นสารต้นแบบทางยาที่ปลอดภัยและมีประสิทธิภาพต่อไป

จากข้อกังวลองค์ความรู้ดังกล่าว งานวิจัยนี้จึงมุ่งเน้นการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันหอมระเหยจากเปลือกผลมะขวงที่เก็บรวบรวมจากพื้นที่อำเภอนองพญาปล้อง จังหวัดเพชรบุรี เพื่อระบุเอกลักษณ์ทางเคมีเฉพาะของวัตถุดิบในเขตภาคตะวันตกของไทย นอกจากนี้ยังมุ่งประเมินฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และศึกษาฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่และเซลล์มะเร็งตับ พร้อมทั้งทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติไฟโบรเบลลัส เพื่อประเมินความจำเพาะและศักยภาพในการพัฒนาเป็นสารออกฤทธิ์จากธรรมชาติในอนาคต ผลการศึกษาที่ได้จะช่วยเติมเต็มช่องว่างองค์ความรู้เกี่ยวกับส่วนเปลือกผลของมะขวง สร้างฐานข้อมูลเอกลักษณ์ทางเคมีเฉพาะถิ่น พิสูจน์ความปลอดภัยและความจำเพาะต่อเซลล์มะเร็ง และสนับสนุนการใช้ประโยชน์สมุนไพรท้องถิ่นของไทยในเชิงวิทยาศาสตร์ เพื่อการพัฒนาเป็นสารต้นแบบทางยาหรือผลิตภัณฑ์สุขภาพที่ยั่งยืน

วิธีดำเนินการวิจัย

สารเคมีและเครื่องมือ

สารเคมีที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้เป็นเกรดวิเคราะห์ (Analytical grade) ได้แก่ 2,2-ไดฟีนิล-1-พิกริลไฮดราซิล (2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl: DPPH) เอทานอล (Ethanol) เฮกเซน (Hexane) และแอนไฮไดรอสัลเฟต (Anhydrous sodium sulfate) น้ำกลั่นและวิตามินซี (L-Ascorbic acid) ใช้เป็นสารมาตรฐานในการทดสอบฤทธิ์ต้าน

อนุโมลิสระ และเครื่องมือหลักที่ใช้ในการวิจัยประกอบด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ยูวี-วิสิเบิล (UV-Visible spectrophotometer รุ่น UV mini-1240V) สำหรับวัดค่าการดูดกลืนแสง เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 4 ตำแหน่ง (รุ่น AG204) สำหรับชั่งน้ำหนักสาร เครื่องกลั่นด้วยน้ำพร้อมชุดคอนเดนเซอร์และอุปกรณ์ควบแน่น เครื่องกลั่นระเหยสารแบบหมุน (Rotary evaporator) สำหรับกำจัดตัวทำละลาย และเครื่องวิเคราะห์ห้องค์ประกอบทางเคมีด้วยเทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟีควบคู่แมสสเปกโตรเมทรี (Gas Chromatography–Mass Spectrometry: GC-MS) และอุปกรณ์เครื่องแก้วที่ใช้ ได้แก่ ขวดกั่นกลม กรวยแยกสาร ขวดวัดปริมาตร ปิกเกอร์ ปีเปต กระบอกตวง ขาตั้งและแคลมป์ รวมถึงอุปกรณ์พื้นฐานอื่น ๆ สำหรับงานปฏิบัติการเคมี

การเตรียมตัวอย่างพืช

ตัวอย่างมะขวง (*Zanthoxylum rhetsa*) เก็บจากอำเภอนองหญ้าปล้อง จังหวัดเพชรบุรี ประเทศไทย ในเดือนพฤษภาคม พ.ศ. 2565 โดยตัวอย่างพืชแห่งได้รับการพิสูจน์เอกลักษณ์ทางพฤกษศาสตร์ด้วยการเปรียบเทียบข้อมูลพันธุ์ไม้ที่สำนักงานหอพรรณไม้ กรมอุทยานแห่งชาติสัตว์ป่าและพันธุ์พืช และเก็บตัวอย่างพืชแห้ง (PCS-Z-002) ไว้ที่หน่วยวิจัยเคมีผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบุรี จากนั้นผลที่เก็บได้ถูกทำให้แห้งในที่ร่มและมีการถ่ายเทอากาศดี จากนั้นแยกส่วนเปลือกและเมล็ดออกจากกัน โดยใช้เฉพาะส่วนเปลือกสำหรับการสกัดน้ำมันหอมระเหย

การสกัดน้ำมันหอมระเหย (AOAC, 2019)

เปลือกผลแห้งของมะขวงบดหยาบ ชั่งน้ำหนัก 57.9658 กรัม เติมน้ำกลั่น 700 มิลลิลิตร ลงในขวดกั่นกลม พร้อมใส่เศษกระเบื้องเพื่อป้องกันการเดือดกระเด็น จากนั้นทำการกลั่นด้วยน้ำ (Hydrodistillation) ที่อุณหภูมิประมาณ 95 องศาเซลเซียส จนกระทั่งได้น้ำมันหอมระเหยแยกชั้นกับน้ำ นำชั้นน้ำมันที่แยกได้เก็บรวบรวมไว้ และส่วนชั้นน้ำที่เหลือนำไปสกัดซ้ำด้วยเฮกเซนในกรวยแยกจำนวน 3 ครั้ง รวมชั้นเฮกเซนทั้งหมดและทำให้แห้งด้วยแอนไฮดรัสโซเดียมซัลเฟต จากนั้นกรองและนำไประเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องกลั่นระเหยสารแบบหมุนภายใต้ความดันลดลง จนได้เป็นน้ำมันหอมระเหยบริสุทธิ์ เก็บรักษาในขวดสีชาปิดสนิทที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำไปวิเคราะห์

การวิเคราะห์ห้องค์ประกอบทางเคมี (Adams, 2017)

องค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันหอมระเหยถูกวิเคราะห์ด้วยเทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟีควบคู่แมสสเปกโตรเมทรี โดยใช้อุปกรณ์แก๊สโครมาโทกราฟีควบคู่แมสสเปกโตรเมทรี ที่ติดตั้งคอลัมน์ชนิดไม่มีขั้ว HP-5MS ความยาว 30 เมตร เส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 0.25 มิลลิเมตร ความหนาฟิล์ม 0.25 ไมโครเมตร ก๊าซฮีเลียมถูกใช้เป็นก๊าซพา (Carrier gas) ด้วยอัตราการไหลคงที่ประมาณ 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที ตัวอย่างน้ำมันหอมระเหยถูกเจือจางด้วยเฮกเซนเกรดวิเคราะห์ และฉีดเข้าสู่ระบบแบบแยก (อัตราส่วน split 1:20) ปริมาตร 1 ไมโครลิตร โปรแกรมอุณหภูมิเตาอบเริ่มต้นที่ 60 องศาเซลเซียส คงไว้ 2 นาที จากนั้นเพิ่มอุณหภูมิด้วยอัตรา 3–5 องศาเซลเซียสต่อนาที จนถึง 250–280 องศาเซลเซียส และคงไว้ช่วงท้าย 5–10 นาที อุณหภูมิของหัวฉีด (Injector) และเครื่องตรวจจับ (Detector) ตั้งไว้ที่ประมาณ 250 และ 280 องศาเซลเซียสตามลำดับ เครื่องแมสสเปกโตรมิเตอร์ทำงานในโหมดไอออนไนเซชันด้วยอิเล็กตรอน (Electron ionization: EI) ที่พลังงาน 70 อิเล็กตรอนโวลต์ ช่วงการสแกนมวล (Mass range) 40–500 มวลต่อประจุ การระบุชนิดของสารประกอบในน้ำมันหอมระเหยดำเนินการโดยอาศัยข้อมูลจากเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟีควบคู่แมสสเปกโตรเมทรี โดยอาศัยข้อมูลแมสสเปกตรัมเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลแมสสเปกตรัมของคอมพิวเตอร์และข้อมูลของ Adams (2017) นอกจากนี้ ได้ทำการคำนวณค่าดัชนีการกักเก็บ (Retention Indices; RI) ของสารแต่ละชนิดโดยเปรียบเทียบกับอนุกรมสารมาตรฐานกลุ่มแอลเคน (C8–C20) ภายใต้สภาวะการวิเคราะห์เดียวกันบนคอลัมน์แคปิลลารีชนิด Elite-5MS การยืนยันชนิดของสารประกอบพิจารณาจากความสอดคล้องของค่าดัชนีการกักเก็บที่คำนวณได้กับค่าที่รายงานในเอกสารอ้างอิง (Retention index matching) ร่วมกับค่าความสอดคล้องของสเปกตรัมมวล (Mass spectral matching) ที่อยู่ในระดับที่ยอมรับได้ และในกรณีที่มิสามารถหาฐานอ้างอิง ได้ทำการยืนยันเพิ่มเติมด้วยวิธีโคอินเจกชัน (Coinjection) และองค์ประกอบเชิงปริมาณของสารแต่ละชนิดรายงานในรูปของร้อยละสัมพัทธ์ (% Relative peak area) ซึ่งคำนวณจากพื้นที่ใต้พีคของโครมาโทแกรมทั้งหมด โดยไม่ได้ปรับแก้ด้วยปัจจัยการตอบสนองของเครื่องมือ (Response factor correction)

การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธีทดสอบการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH (Buranrat & Utsintong, 2023)

ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของน้ำมันหอมระเหยประเมินด้วยวิธีทดสอบการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH ซึ่งอาศัยหลักการที่ว่า DPPH ซึ่งเป็นอนุมูลอิสระที่มีสีม่วงและดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร จะถูกรีดิวซ์โดยสารต้านอนุมูลอิสระ

ทำให้สีจางลง โดยการเตรียมสารละลาย DPPH ความเข้มข้น 0.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยชั่ง DPPH 0.0079 กรัม ละลายในเอทานอลและปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร

ขั้นตอนการทดสอบ ผสมสารตัวอย่าง (น้ำมันหอมระเหยความเข้มข้นเริ่มต้น 12.50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ปริมาตร 2 มิลลิลิตรกับสารละลาย DPPH ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ได้ปริมาตรรวม 4 มิลลิลิตร จัดชุดทดลองเป็น 3 ชุด ได้แก่

ชุด A (Test sample) : ตัวอย่าง + DPPH

ชุด B (Blank) : ตัวอย่าง + เอทานอล

ชุด C (Control) : เอทานอล + DPPH

บ่มสารละลายในที่มืดที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 517 นาโนเมตร ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ยูวี-วิสิเบิล ทำการทดลองอย่างน้อย 3 ซ้ำ

$$\text{การคำนวณผล \% Radical scavenging} = \frac{(A_{\text{control}} - A_{\text{sample}}) \times 100}{A_{\text{control}}}$$

โดย A control คือ ค่าการดูดกลืนแสงของชุด C

A sample คือ ค่าการดูดกลืนแสงของชุด A -ค่าของชุด B

ค่าความเข้มข้นที่สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระได้ร้อยละ 50 (IC₅₀) คำนวณจากกราฟความสัมพันธ์ระหว่างร้อยละการยับยั้งอนุมูลอิสระกับความเข้มข้นของสารสกัด เปรียบเทียบกับสารมาตรฐานวิตามินซี

การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ (Cytotoxicity assay) (Buranrat & Utsintong, 2023)

การเพาะเลี้ยงเซลล์ เซลล์ที่ใช้ในการศึกษา ได้แก่

เซลล์ปกติ : Human fibroblast cell

เซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ : Human colorectal adenocarcinoma cell (HT-29)

เซลล์มะเร็งตับ : Human hepatoma cell (HepG2)

เซลล์ถูกเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่เหมาะสม DMEM เสริมด้วยซีรัมลูกโคในครรภ์ (Fetal bovine serum) ร้อยละ 10 และยาปฏิชีวนะ ภายใต้สภาวะ 37 องศาเซลเซียส ในบรรยากาศที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ ฤทธิ์ต้านเซลล์ของน้ำมันหอมระเหยจากเปลือกผลมะขาม ประเมินด้วยวิธี MTT assay โดยเซลล์ถูกใส่ลงในแผ่นเพาะเลี้ยงเซลล์แบบ 96 หลุม และบ่มจนได้ความหนาแน่นที่เหมาะสม จากนั้นเติมน้ำมันหอมระเหยที่ความเข้มข้น 0 6.25 12.5 25 50 100 และ 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และบ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังครบเวลาบ่ม เติมน้ำย MTT และบ่มต่อ จากนั้นละลายผลึกฟอร์มาซาน (Formazan crystal) ด้วยตัวทำละลายที่เหมาะสม และวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องอ่านไมโครเพลต (Microplate reader) โดยใช้ยา Doxorubicin เป็น Positive controls

$$\text{การคำนวณร้อยละการอยู่รอดของเซลล์ (Cell viability, \%)} = \frac{A_{\text{sample}} \times 100}{A_{\text{control}}}$$

ค่าความเข้มข้นที่ยับยั้งการเจริญของเซลล์ได้ร้อยละ 50 (IC₅₀) คำนวณจากกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นกับร้อยละการอยู่รอดของเซลล์

การวิเคราะห์ทางสถิติ

การทดลองทั้งหมดดำเนินการอย่างน้อยสามซ้ำแบบอิสระ (n = 3 independent experiments) และแสดงผลเป็นค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Mean ± SD)

ผลการวิจัย

ผลผลิตและลักษณะทางกายภาพของน้ำมันหอมระเหยจากเปลือกผลมะขาม

จากการสกัดน้ำมันหอมระเหยจากเปลือกผลมะขาม ด้วยวิธีการกลั่นด้วยน้ำ ดังภาพที่ 1 โดยใช้ตัวอย่างน้ำหนัก 57.9658 กรัมพบว่า ได้น้ำมันหอมระเหย 0.8259 กรัม คิดเป็นร้อยละผลผลิตเท่ากับร้อยละ 1.42 โดยน้ำหนัก และลักษณะทางกายภาพของน้ำมันหอมระเหยที่สกัดได้มีลักษณะเป็นของเหลวใส ไม่มีสี และมีกลิ่นหอมเฉพาะตัว ดังภาพที่ 2



ภาพที่ 1 ชุดกลั่นด้วยน้ำ

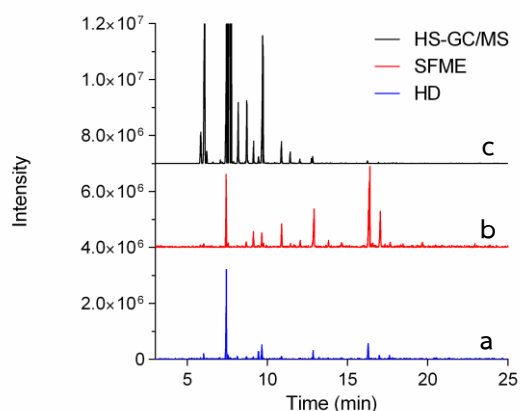


ภาพที่ 2 ลักษณะของน้ำมันหอมระเหยที่กลั่นได้

ซึ่งเป็นลักษณะทั่วไปของน้ำมันหอมระเหยในพืชสกุลชานโธโซลิสม์ ผลดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าเปลือกผลมะขวงเป็นแหล่งของน้ำมันหอมระเหยที่ให้ผลผลิตในระดับที่เหมาะสมสำหรับการนำไปศึกษาทางเคมีและชีวภาพต่อไป

องค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันหอมระเหย

ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันหอมระเหยด้วยเทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟีควบคู่แมสสเปกโตรเมทรี ดังตารางที่ 1 และโครมาโทแกรมแบบไอออนรวม (Total ion GC chromatograms) ของน้ำมันหอมระเหยที่สกัดจากเปลือกผล ของ *Z. rhetsa* ภาพที่ 3



ภาพที่ 3 โครมาโทแกรมแบบไอออนรวม (Total ion GC chromatograms) ของน้ำมันหอมระเหยที่สกัดจากเปลือกผลของ *Z. rhetsa* โดยใช้เทคนิค (a) การกลั่นด้วยน้ำ (Hydrodistillation; HD) (b) การสกัดด้วยไมโครเวฟแบบไม่ใช้ตัวทำละลาย (Solvent-free microwave extraction; SFME) และ (c) เทคนิคเฮดสเปซ-แก๊สโครมาโทกราฟี/แมสสเปกโตรเมทรี (Headspace gas chromatography/mass spectrometry; HS-GC/MS)

ตารางที่ 1 องค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันหอมระเหยที่สกัดได้จากเปลือกมะขามโดยวิธีการกลั่นด้วยน้ำ

No.	Constituent	Molecular formula	Molecular weight	RI _{Exp}	RI _{Lit}	Relative peak area (%)
1	Tricyclene	C ₁₀ H ₁₆	136	920	921	tr
2	α -Thujene	C ₁₀ H ₁₆	136	922	924	0.29 $\pm$ 0.01
3	α -Pinene	C ₁₀ H ₁₆	136	927	932	1.67 $\pm$ 0.01
4	Camphene	C ₁₀ H ₁₆	136	949	946	tr
5	Sabinene	C ₁₀ H ₁₆	136	963	967	42.45 $\pm$ 1.21
6	β -Pinene	C ₁₀ H ₁₆	136	967	973	1.57 $\pm$ 0.04
7	β -Myrcene	C ₁₀ H ₁₆	136	982	983	0.84 $\pm$ 0.02
8	α -Phellandrene	C ₁₀ H ₁₆	136	997	998	1.47 $\pm$ 0.02
9	α -Terpinene	C ₁₀ H ₁₆	136	1009	1010	0.37 $\pm$ 0.02
10	<i>p</i> -Cymene	C ₁₀ H ₁₄	134	1015	1014	4.88 $\pm$ 0.05
11	β -Phellandrene	C ₁₀ H ₁₆	136	1022	1021	9.31 $\pm$ 0.11
12	1,8-Cineole	C ₁₀ H ₁₈ O	154	1023	1026	0.39 $\pm$ 0.00
13	γ -Terpinene	C ₁₀ H ₁₆	136	1053	1054	1.65 $\pm$ 0.00
14	(<i>E</i>)-sabinene hydrate	C ₁₀ H ₁₈ O	154	1065	1062	0.13 $\pm$ 0.01
15	1-Octanol	C ₈ H ₁₈ O	130	1069	1064	0.27 $\pm$ 0.05
16	Terpinolene	C ₁₀ H ₁₆	136	1081	1079	0.40 $\pm$ 0.00
17	Linalool	C ₁₀ H ₁₈ O	154	1102	1101	4.20 $\pm$ 0.24
18	(<i>Z</i>)- <i>p</i> -2-menthen-1-ol	C ₁₀ H ₁₈ O	154	1122	1118	0.56 $\pm$ 0.04
19	Terpinen-4-ol	C ₁₀ H ₁₈ O	154	1179	1177	12.76 $\pm$ 0.14
20	Cryptone	C ₉ H ₁₄ O	138	1184	1184	0.07 $\pm$ 0.02
21	α -Terpineol	C ₁₀ H ₁₈ O	154	1194	1189	2.89 $\pm$ 0.00
22	Decanal	C ₁₀ H ₂₀ O	156	1207	1206	4.21 $\pm$ 0.13
23	Linalyl acetate	C ₁₂ H ₂₀ O ₂	196	1254	1257	0.09 $\pm$ 0.06
24	Phellandral	C ₁₀ H ₁₆ O	152	1266	1276	0.08 $\pm$ 0.02
25	(<i>Z</i>)-5-Tridencane	C ₁₃ H ₂₆	182	1270	1274	tr

RI_{Exp} retention indices determined relative to C₈-C₂₀ alkane homolog series on Elite-5MS capillary column

RI_{Lit} retention indices taken from literature

tr, trace amount (relative peak area lower than 0.01%)

จากตารางที่ 1 ผลการวิเคราะห์พบสารประกอบทั้งหมด 25 ชนิด สามารถจัดกลุ่มสารออกเป็น 2 กลุ่มหลัก ได้แก่ 1) กลุ่มโมโนเทอร์พีน ไฮโดรคาร์บอน (Monoterpene hydrocarbons) ตรวจพบสารในกลุ่มนี้จำนวน 14 ชนิด โดยสารที่พบในปริมาณสูงสุด ได้แก่ ซาปิเนน (ร้อยละ 42.45 $\pm$ 1.21) เบตา-เฟลแลนดรีน (ร้อยละ 9.31 $\pm$ 0.11) และพารา-ไซมิน (ร้อยละ 4.88 $\pm$ 0.05) สารในกลุ่มนี้คิดเป็นสัดส่วนหลักขององค์ประกอบทั้งหมด โดยเฉพาะซาปิเนนซึ่งเป็นองค์ประกอบเด่นของน้ำมันหอมระเหยจากเปลือกผลมะขาม และ 2) กลุ่มโมโนเทอร์พีนชนิดมีออกซิเจน (Oxygenated monoterpenes) ตรวจพบสารในกลุ่มนี้จำนวน 11 ชนิด โดยสารสำคัญที่พบในปริมาณสูง ได้แก่ เทอร์พีเนน-4-อล (ร้อยละ 12.76 $\pm$ 0.14) เดคานัล (ร้อยละ 4.21 $\pm$ 0.13) และไลนาลูล (ร้อยละ 4.20 $\pm$ 0.24) การตรวจพบเทอร์พีเนน-4-อล ในปริมาณสูงสะท้อนถึงศักยภาพทางชีวภาพของน้ำมันหอมระเหย เนื่องจากสารในกลุ่มโมโนเทอร์พีนชนิดมีออกซิเจนมักมีบทบาทสำคัญต่อฤทธิ์ทางชีวภาพของน้ำมันหอมระเหย โดยภาพรวม น้ำมันหอมระเหยจากเปลือกผลมะขามมีองค์ประกอบหลักเป็นโมโนเทอร์พีน ไฮโดรคาร์บอน และโมโนเทอร์พีนชนิดมีออกซิเจน ซึ่งสอดคล้องกับลักษณะทางเคมีของพืชในสกุลซานโรโซลัม

ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธีทดสอบการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH

ผลการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของน้ำมันหอมระเหยจากเปลือกผลมะขวิดด้วยวิธีทดสอบการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH พบว่า รั้อยละการยับยั้งอนุมูลอิสระเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของสาร (Dose-dependent manner) ดังนี้ ความเข้มข้น 12.50 25.00 50.00 100.00 และ 200.00 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ให้ค่ารั้อยละการยับยั้งเท่ากับ 17.09 ± 0.33 33.76 ± 1.09 69.55 ± 3.19 91.90 ± 0.04 และ 93.34 ± 0.25 ตามลำดับ และพบว่า ค่าความเข้มข้นที่สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระได้รั้อยละ 50 (IC_{50}) ของน้ำมันหอมระเหยมีค่าเท่ากับ 36.23 ± 1.47 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อเปรียบเทียบกับสารมาตรฐานวิตามินซี ซึ่งมีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.0008 ± 0.0002 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรพบว่า น้ำมันหอมระเหยมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระต่ำกว่าวิตามินซี อย่างไรก็ตาม แนวโน้มการเพิ่มขึ้นของรั้อยละการยับยั้งอนุมูลอิสระตามความเข้มข้นบ่งชี้ว่าน้ำมันหอมระเหยมีศักยภาพในการยับยั้งอนุมูลอิสระ ทั้งนี้อาจสัมพันธ์กับองค์ประกอบหลัก ได้แก่ ซาบินเนน และเทอร์พีน-4-อล ซึ่งเป็นสารในกลุ่มโมโนเทอร์พีนไฮโดรคาร์บอน และโมโนเทอร์พีนชนิดมีออกซิเจน

ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็ง

ผลต่อเซลล์ปกติ (Normal fibroblast cells) พบว่า น้ำมันหอมระเหยในช่วงความเข้มข้น 6.25–200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ไม่แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติ ซึ่งพบว่า มีค่าการอยู่รอดของเซลล์อยู่ในช่วงรั้อยละ 102.09–105.59 เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (รั้อยละ 100) จากผลทดสอบของน้ำมันหอมระเหยมะขวิด แสดงให้เห็นว่าน้ำมันหอมระเหยไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติในช่วงความเข้มข้นที่ทดสอบ และอาจมีความปลอดภัยในระดับเซลล์เบื้องต้น

ผลต่อเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่พบว่า น้ำมันหอมระเหยมีผลลดการอยู่รอดของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่แบบขึ้นกับความเข้มข้น โดยเฉพาะที่ความเข้มข้น 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรพบว่า การอยู่รอดของเซลล์ลดลงเหลือรั้อยละ 29.88 ± 1.43 และผลทดสอบของน้ำมันหอมระเหยมะขวิดในช่วงความเข้มข้นต่ำถึงปานกลาง (6.25–100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) พบว่า มีรั้อยละการอยู่รอดของเซลล์ลดลงอยู่ในช่วงรั้อยละ 85.29–93.37 และฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ได้รั้อยละ 50 ที่ 147.80 ± 1.33 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แสดงให้เห็นว่าน้ำมันหอมระเหยจากเปลือกผลมะขวิดเริ่มมีฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่อย่างชัดเจนที่ความเข้มข้นสูง

ผลต่อเซลล์มะเร็งตับพบว่า น้ำมันหอมระเหยแสดงฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งตับอย่างชัดเจนและสัมพันธ์กับความเข้มข้นโดยที่ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรการอยู่รอดของเซลล์ลดลงเหลือรั้อยละ 61.20 ± 4.87 และที่ 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรลดลงเหลือรั้อยละ 15.54 ± 2.29 และฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งตับได้รั้อยละ 50 ที่ 125.58 ± 1.64 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากผลทดสอบนี้แสดงให้เห็นว่าน้ำมันหอมระเหยจากเปลือกผลมะขวิดมีฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งตับสูงกว่าเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ในช่วงความเข้มข้นที่ทดสอบ

จากผลการวิจัยพบว่า น้ำมันหอมระเหยจากเปลือกผลมะขวิด แสดงความจำเพาะต่อเซลล์มะเร็ง โดยมีผลยับยั้งเซลล์มะเร็งตับและเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่อย่างมีนัยสำคัญที่ความเข้มข้นสูง ขณะที่ไม่ก่อให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติ ลักษณะดังกล่าวแสดงให้เห็นถึงศักยภาพของสารประกอบกลุ่มเทอร์พีนในน้ำมันหอมระเหยที่อาจเหนี่ยวนำกระบวนการตายของเซลล์แบบโปรแกรมได้ (Apoptosis) หรือภาวะเครียดออกซิเดชันในเซลล์มะเร็ง

อภิปรายผลการวิจัย

การวิจัยครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันหอมระเหยจากเปลือกผลมะขวิด ประเมินฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และศึกษาฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ และเซลล์มะเร็งตับ พร้อมทั้งประเมินความปลอดภัยต่อเซลล์ปกติ ผลการวิจัยที่ได้สามารถอภิปรายตามประเด็นดังนี้

ผลผลิตและองค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันหอมระเหยจากเปลือกผลมะขวิดที่ได้จากการกลั่นด้วยน้ำพบว่า ให้ผลผลิตน้ำมันหอมระเหยรั้อยละ 1.42 ซึ่งอยู่ในช่วงที่รายงานไว้สำหรับพืชในสกุลชานไฮโซลัม โดยองค์ประกอบหลักที่ตรวจพบได้แก่ ซาบินเนน (รั้อยละ 42.45) และเทอร์พีน-4-อล (รั้อยละ 12.76) ข้อมูลนี้แสดงให้เห็นว่ามะขวิดจากอำเภอนองพญาปล้อง จังหวัดเพชรบุรี จัดอยู่ในกลุ่ม Sabinene-dominant chemotype ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญจากมะขวิดในแหล่งอื่น เช่น จังหวัดพะเยาที่มีเทอร์พีน-4-อลเป็นสารหลัก (รั้อยละ 32.33) (Wongkattiya *et al.*, 2018) หรือจังหวัดน่านที่พบลิโมนีนเป็นสารเด่น (Buranrat & Utsintong, 2023) ความแปรปรวนขององค์ประกอบทางเคมีนี้เป็นปรากฏการณ์ทางธรรมชาติที่เรียกว่า Chemotypic Plasticity ซึ่งได้รับอิทธิพลจากปัจจัยทางภูมิศาสตร์ สภาพดิน และสภาพภูมิอากาศเฉพาะถิ่น อย่างไรก็ตามองค์ประกอบทางเคมีนี้สอดคล้องกับรายงานการศึกษาน้ำมันหอมระเหยของพืชในสกุลนี้ที่ระบุว่าโมโนเทอร์พีนเป็นองค์ประกอบหลัก (Chua *et al.*, 2018) ทั้งนี้ การพบซาบินเนนในสัดส่วนสูงยังสอดคล้องกับรายงานการวิเคราะห์

องค์ประกอบน้ำมันหอมระเหยของพืชสกุลชานโระไสลัม ในช่วงหลังที่พบว่าซาบิเนนเป็นองค์ประกอบสำคัญของผลและเปลือกผล (Nguyen *et al.*, 2023) ขณะที่เทอร์พีน-4-อล ซึ่งจัดอยู่ในกลุ่มโมโนเทอร์พีนชนิดมีออกซิเจน เป็นสารที่มีบทบาทสำคัญต่อฤทธิ์ทางชีวภาพ โดยเฉพาะฤทธิ์ด้านการอักเสบและต้านจุลชีพ (Sharifi-Rad *et al.*, 2017) ดังนั้นองค์ประกอบทางเคมีที่พบในงานวิจัยนี้จึงสะท้อนลักษณะเฉพาะทางเคมีของพืชสกุลชานโระไสลัมและสนับสนุนศักยภาพทางชีวภาพของน้ำมันหอมระเหยจากเปลือกผล ซึ่งยังมีข้อมูลค่อนข้างจำกัดในงานวิจัยที่ผ่านมา

ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธีการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH แสดงให้เห็นว่าน้ำมันหอมระเหยมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระแบบขึ้นกับความเข้มข้น โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 36.23 ± 1.47 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร แม้ว่าจะมีประสิทธิภาพต่ำกว่าวิตามินซีอย่างมีนัยสำคัญ แต่แนวโน้มการเพิ่มขึ้นของร้อยละการยับยั้งอนุมูลอิสระสะท้อนถึงศักยภาพในการกำจัดอนุมูลอิสระที่ดังกล่าว่าอาจสัมพันธ์กับองค์ประกอบทางเคมีที่พบว่าเป็นโมโนเทอร์พีน เช่น ซาบิเนน และเทอร์พีน-4-อล ซึ่งมีรายงานว่าสามารถทำหน้าที่เป็นสารให้อะตอมไฮโดรเจน (Hydrogen donor) และลดความเสียหายจากสารชนิดออกซิเจนที่ว่องไวต่อปฏิกิริยา (Reactive oxygen species; ROS) (Sharifi-Rad *et al.*, 2017; Salehi *et al.*, 2019) นอกจากนี้ โมโนเทอร์พีนชนิดมีออกซิเจน (Oxygenated monoterpenes) มักมีศักยภาพในการต้านอนุมูลอิสระสูงกว่าโมโนเทอร์พีนไฮโดรคาร์บอน เพราะมีหมู่ฟังก์ชันออกซิเจนที่เกี่ยวข้องกับกลไกการให้โปรตอนและการถ่ายโอนอิเล็กตรอน ทั้งนี้พบข้อจำกัดของวิธีการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในงานวิจัยนี้ เนื่องจาก DPPH ละลายในเอทานอลที่มีข้อจำกัดทำให้ละลายน้ำมันหอมระเหยได้ไม่เต็มที่ จึงควรมีการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระวิธีอื่นควบคู่ไปด้วย เช่น ABTS assay หรือ Lipid peroxidation assay อย่าง TBARS หรือ β -carotene bleaching เพื่อประเมินฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของน้ำมันหอมระเหยจากเปลือกผลมะขวง แม้ว่าฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของน้ำมันหอมระเหยจากเปลือกผลมะขวงจะไม่สูงเท่าสารมาตรฐาน แต่ผลการศึกษาสนับสนุนความสามารถของน้ำมันมะขวงในการเป็นแหล่งสารต้านอนุมูลอิสระจากธรรมชาติที่ช่วยลดความเสียหายของเซลล์จากภาวะเครียดออกซิเดชัน อันเป็นสาเหตุของโรคเรื้อรัง

ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งและความจำเพาะต่อเซลล์มะเร็ง พบว่าน้ำมันหอมระเหยจากเปลือกผลมะขวงไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติในช่วงความเข้มข้น 6.25–200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยมีค่าการอยู่รอดมากกว่าร้อยละ 100 แสดงถึงความปลอดภัยในระดับเซลล์เบื้องต้น ในทางตรงกันข้าม น้ำมันหอมระเหยสามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ ($IC_{50} = 147.80 \pm 1.33$ ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) และเซลล์มะเร็งตับ ($IC_{50} = 125.58 \pm 1.64$ ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) แบบขึ้นกับความเข้มข้น โดยเฉพาะในเซลล์มะเร็งตับที่แสดงความไวต่อสารมากกว่า (ร้อยละ 15.54 $\pm$ 2.29 ที่ความเข้มข้น 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) ผลดังกล่าวสอดคล้องกับรายงานที่ระบุว่าโมโนเทอร์พีนหลายชนิดสามารถเหนี่ยวนำกระบวนการตายของเซลล์แบบโปรแกรม (Apoptosis) และเพิ่มระดับภาวะเครียดออกซิเดชันในเซลล์มะเร็ง (Sharifi-Rad *et al.*, 2017; Salehi *et al.*, 2019) นอกจากนี้ เทอร์พีน-4-อล และไลนาลูล มีรายงานว่า สามารถกระตุ้นการตายของเซลล์แบบโปรแกรมผ่านวิถีไมโทคอนเดรีย (Mitochondrial pathway) โดยเกี่ยวข้องกับการกระตุ้นต่อเนื่องของแคสเปสและการลดการแสดงออกของโปรตีนด้านการตายของเซลล์ เช่น โปรตีนควบคุมการตายของเซลล์แบบมีโปรแกรม Bcl-2 (B-cell lymphoma 2) ในเซลล์มะเร็งหลายชนิด (Di Giacomo *et al.*, 2019) กล่าวถึงความสามารถในการยับยั้งเซลล์มะเร็งตับและมะเร็งลำไส้ใหญ่ที่พบในการศึกษานี้ ดังนั้นการที่น้ำมันหอมระเหยแสดงฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งโดยไม่เป็นพิษต่อเซลล์ปกติ แสดงให้เห็นว่าน้ำมันมะขวงมีความจำเพาะในการออกฤทธิ์ (Selectivity index) ที่ดี เนื่องจากไม่พบความเป็นพิษต่อเซลล์ไฟโบรบลาสต์ปกติ แม้จะใช้ความเข้มข้นสูงถึง 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งแสดงถึงความปลอดภัยและความจำเพาะต่อเซลล์มะเร็งที่เหนือกว่าสารสกัดจากพืชหลายชนิด (Santhanam *et al.*, 2016) จึงสนับสนุนศักยภาพในการพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์เสริมสุขภาพหรือสารตั้งต้นทางเภสัชกรรมในอนาคต

น้ำมันหอมระเหยจากเปลือกผลมะขวงในเขตภาคตะวันตกของไทยมีเอกลักษณ์ทางเคมีเฉพาะตัวและมีศักยภาพทางชีวภาพที่โดดเด่นทั้งในการต้านอนุมูลอิสระและต้านเซลล์มะเร็งตับและลำไส้ใหญ่ ข้อมูลนี้ไม่เพียงแต่ช่วยเติมเต็มช่องว่างด้านองค์ความรู้เฉพาะถิ่น แต่ยังสนับสนุนการใช้ประโยชน์จากสมุนไพรไทยบนฐานข้อมูลวิทยาศาสตร์ เพื่อการพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์สุขภาพหรือสารต้นแบบทางยาที่ปลอดภัยในอนาคต อย่างไรก็ตามควรมีการศึกษาเพิ่มเติมในระดับกลไกโมเลกุล การทดสอบในสัตว์ทดลอง และการประเมินความเป็นพิษระยะยาว เพื่อยืนยันศักยภาพในการพัฒนาเชิงผลิตภัณฑ์อย่างยั่งยืน

สรุปผลการวิจัย

การวิจัยครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันหอมระเหยจากเปลือกผลมะขวง ประเมินฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และศึกษาฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ และเซลล์มะเร็งตับ พร้อมทั้งประเมินความปลอดภัยต่อเซลล์

ปกติ โดยสามารถสรุปผลตามวัตถุประสงค์ได้ดังนี้ การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีการสกัดน้ำมันหอมระเหยด้วยวิธีการกลั่นด้วยน้ำให้ผลผลิตเท่ากับร้อยละ 1.42 โดยน้ำหนัก น้ำมันที่ได้มีลักษณะเป็นของเหลวใส ไม่มีสี และมีกลิ่นเฉพาะตัวของมะขวง ผลการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟีควบคู่แมสสเปกโตรเมตรี ตรวจพบสารประกอบทั้งหมด 25 ชนิด โดยมีองค์ประกอบหลักเป็นกลุ่มโมโนเทอร์พีนไฮโดรคาร์บอนและโมโนเทอร์พีนชนิดมีออกซิเจน สารสำคัญที่พบในปริมาณสูง ได้แก่ ซาบินีน (ร้อยละ 42.45) และเทอร์พิเนน-4-อล (ร้อยละ 12.76) ซึ่งแสดงลักษณะเฉพาะทางเคมีของพืชสกุลซานโงไสลัม และบ่งชี้ถึงศักยภาพทางชีวภาพของน้ำมันหอมระเหยจากส่วนเปลือกผล การประเมินฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระน้ำมันหอมระเหยแสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH แบบขึ้นกับความเข้มข้น มีค่า IC_{50} เท่ากับ 36.23 ± 1.47 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร แม้ว่าจะมีประสิทธิภาพต่ำกว่าวิตามินซี แต่ผลการทดลองยืนยันศักยภาพในการกำจัดอนุมูลอิสระ ซึ่งอาจสัมพันธ์กับองค์ประกอบหลักในกลุ่มโมโนเทอร์พีนไฮโดรคาร์บอน และ โมโนเทอร์พีนชนิดมีออกซิเจน และการศึกษาฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งและความปลอดภัยต่อเซลล์ปกติพบว่า น้ำมันหอมระเหยไม่แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติในช่วงความเข้มข้นที่ทดสอบ (6.25 – 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) ขณะที่สามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ ($IC_{50} = 147.80 \pm 1.33$ ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) และเซลล์มะเร็งตับ ($IC_{50} = 125.58 \pm 1.64$ ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) แบบขึ้นกับความเข้มข้น โดยเฉพาะในเซลล์มะเร็งตับ ซึ่งมีความไวต่อสารมากกว่า ผลดังกล่าวแสดงถึงความจำเพาะต่อเซลล์มะเร็งในระดับเซลล์ทดลอง และแสดงถึงศักยภาพเบื้องต้นในการพัฒนาเป็นสารจากธรรมชาติที่มีฤทธิ์ต้านมะเร็ง กล่าวโดยสรุป น้ำมันหอมระเหยจากเปลือกผลมะขวงเป็นแหล่งของสารประกอบกลุ่มเทอร์พีนที่มีศักยภาพทางชีวภาพ ทั้งด้านฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็ง พร้อมทั้งมีความปลอดภัยต่อเซลล์ปกติในระดับเบื้องต้น ผลการศึกษานี้ช่วยเพิ่มองค์ความรู้เกี่ยวกับการใช้ประโยชน์ส่วนเปลือกผลของมะขวง และสนับสนุนการพัฒนาสมุนไพรท้องถิ่นของไทยในเชิงวิทยาศาสตร์และการพัฒนาผลิตภัณฑ์สุขภาพอย่างยั่งยืนในอนาคต

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนและการช่วยเหลือด้านสถานที่ เครื่องมือ และอุปกรณ์ที่ใช้ในการดำเนินงานวิจัยครั้งนี้จากสาขาวิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบุรี จนสำเร็จจุลวงด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

- Adams, R. P. (2017). *Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry* (5th ed.). Allured Publishing.
- Association of Official Analytical Chemists. (2019). *Official methods of analysis* (21st ed.). AOAC.
- Buranrat, B. & Utsintong, M. (2023). Phytochemical screening, antioxidant and anticancer activities of *Zanthoxylum rhetsa* (Roxb.) DC. essential oil from Nan province, Thailand. *Trends in Sciences*, 20(4), Article 5133. <https://doi.org/10.48048/tis.2023.5133>
- Charoensuk, N., Srisook, E. & Itharat, A. (2021). Antioxidant mechanisms of methanolic extract from: *Zanthoxylum limonella* stem in prostate cancer cells. *Molecules*, 26(12), Article 3578. <https://doi.org/10.3390/molecules26123578>
- Chua, L. S., Lee, S. Y. & Abdullah, S. (2018). Chemical composition and biological activities of essential oils from: *Zanthoxylum* species: A review. *Journal of Essential Oil Research*, 30(4), 241–255. <https://doi.org/10.1080/10412905.2018.1469552>
- Di Giacomo, S., Abete, L., Cocchiola, R., Mancinelli, R. & Nicoletti, M. (2019). Essential oils and their constituents as anticancer agents: A mechanistic view. *Phytotherapy Research*, 33(8), 1995–2011. <https://doi.org/10.1002/ptr.6391>
- Efferth, T. & Koch, E. (2011). Complex mixtures versus single entities: A dichotomy in phytotherapy. *Planta Medica*, 77(11), 1239–1247. <https://doi.org/10.1055/s-0030-1270823>
- Figueiredo, A. C., Barroso, J. G., Pedro, L. G. & Scheffer, J. J. (2008). Factors affecting secondary metabolite production in plants: Volatile components and essential oils. *Flavour and Fragrance Journal*, 23(4), 213–226. <https://doi.org/10.1002/ffj.1875>



- Huang, W. Y., Cai, Y. Z. & Zhang, Y. (2010). Natural phenolic compounds from medicinal herbs and dietary plants: Potential use for cancer prevention. *Nutrition and Cancer*, 62(1), 1–20.
<https://doi.org/10.1080/01635580903191585>
- Klaunig, J. E., Wang, Z., Pu, X. & Zhou, S. (2018). Oxidative stress and oxidative damage in chemical carcinogenesis. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 254(2), 86–99.
<https://doi.org/10.1016/j.taap.2009.02.022>
- National Cancer Institute Thailand. (2020). *Thailand cancer statistics 2018*. National Cancer Institute, Department of Medical Services, Ministry of Public Health. <https://www.nci.go.th>
- Nguyen, T. H. V., Tran, T. T., Do, H. N., Quan, P. M., Pham, C. B., Dang, H. H. & Lam, D. T. (2024). Chemical constituents from different parts of *Zanthoxylum rhetsa* and their biological activities. *Natural Product Research*, 38(5), 760–767. <https://doi.org/10.1080/14786419.2023.2297261>
- Quoc, L. P. T. (2023). Chemical composition, extraction methods and uses of *Zanthoxylum rhetsa* (Roxb.) DC.: A review. *Agriculturae Conspectus Scientificus*, 88(4), 265–273.
- Salehi, B., Upadhyay, S., Orhan, I. E., Jugran, A. K., Jayaweera, S. L., Dias, D. A., Gozzo, F., Galli, V., Bosco, S. D., Rodrigues, M., Pezzani, R., Setzer, W. N. & Sharifi-Rad, J. (2019). Therapeutic potential of α - and β -pinene: A miracle gift of nature. *Biomolecules*, 9(11), Article 738.
<https://doi.org/10.3390/biom9110738>
- Santhanam, J., Al-Zubairi, A. S., Elhassan, T. O. & Abas, R. (2016). *In vitro* cytotoxicity and antioxidant activities of the essential oil and various extracts of *Zanthoxylum rhetsa* (Roxb.) DC. towards human cancer cell lines. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 6(3), 101–105.
<https://doi.org/10.7324/JAPS.2016.60317>
- Sharifi-Rad, J., Sureda, A., Tenore, G. C., Daglia, M., Sharifi-Rad, M., Valussi, M., Tundis, R., Sharifi-Rad, M., Loizzo, M. R., Ademiluyi, A. O., Sharifi-Rad, R., Ayatollahi, S. A. & Iriti, M. (2017). Biological activities of essential oils: From plant chemoecology to traditional healing systems. *Molecules*, 22(1), Article 70. <https://doi.org/10.3390/molecules22010070>
- Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A. & Bray, F. (2021). Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 71(3), 209–249. <https://doi.org/10.3322/caac.21660>
- Tran, T. H., Nguyen, H. X., Nguyen, M. T. & Le, T. V. (2019). Chemical composition and biological activities of essential oils from *Zanthoxylum* species in Vietnam. *Journal of Essential Oil Research*, 31(4), 289–297. <https://doi.org/10.1080/10412905.2019.1580223>
- Wang, C. F., Yang, Y. C., Chen, H. Y., Cheng, M. J., Wang, Y. N., Chung, M. J. & Chang, S. T. (2016). Topical application of *Zanthoxylum ailanthoides* essential oil prevents UV-B induced photoaging in hairless mice through its antioxidant effect. *Molecules*, 21(9), Article 1157.
<https://doi.org/10.3390/molecules21091157>
- Wongkattiya, N., Sotta, P. & Suntornhong, S. (2018). Chemical composition and biological activities of *Zanthoxylum limonella* Alston essential oil from Phayao province, Thailand. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 8(10), 074–080. <https://doi.org/10.7324/JAPS.2018.81010>