

นิพนธ์ต้นฉบับ

**การวิเคราะห์ปริมาณสารยูจีนอลและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของน้ำต้มกานพลูที่ได้จาก
การต้มในระยะเวลาที่แตกต่างกัน**

ขมาภรณ์ ชาญตะปะ¹ อาริรัตน์ ระเด่น¹ วศิน บำรุงชัยชนะ¹ และ นิติรัตน์ มีกาย^{1*}

¹ หลักสูตรการแพทย์แผนไทยบัณฑิต, วิทยาลัยการสาธารณสุขสิรินธร จังหวัดพิษณุโลก

*ผู้นิพนธ์ที่ให้การติดต่อ E-mail: Nitirat@scphpl.ac.th

Received date: July 4, 2025; Revised date: December 24, 2025; Accepted date: December 24, 2025

บทคัดย่อ

งานวิจัยการศึกษาปริมาณสาร Eugenol และฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระในกานพลูโดยวิธีการต้ม โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาปริมาณสาร Eugenol ในกานพลูโดยวิธีการต้มในระยะเวลาต่างๆ และเพื่อศึกษาฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระในกานพลูโดยวิธีการต้มในระยะเวลาต่างๆ วิธีการทำโดยมีการต้มน้ำดอกกานพลู 4 ดอกต่อน้ำ 2,000 มิลลิลิตรในกาต้มน้ำร้อน เก็บน้ำต้มดอกกานพลูครั้งละ 100 มิลลิลิตร ตั้งแต่ต้มเดือด ทุก 10 นาทีเป็นเวลา 1 ชั่วโมง และ ทุก 3 ชั่วโมงเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เป็นจำนวน 15 ตัวอย่าง ทำการทดสอบปริมาณสารโดยวิธี High Performance Liquid Chromatography (HPLC) ซึ่งจะใช้ Eugenol เป็นสารมาตรฐาน

จากผลการทดสอบพบว่า พีคของสารมาตรฐาน Eugenol ในโครมาโตแกรมปรากฏที่เวลา 8 นาที และตัวอย่างน้ำต้มดอกกานพลูที่เก็บแต่ละเวลาพบว่า ปริมาณสารมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นในช่วงเวลา 0-9 ชั่วโมงแรก และปริมาณสารมีแนวโน้มลดลงตั้งแต่ช่วง 12 ชั่วโมง ซึ่งช่วงที่มีความเข้มข้นของสารมากที่สุด คือ ช่วง 6 ชั่วโมง และความเข้มข้นของสารมีความคงตัวในช่วง 6-9 ชั่วโมงซึ่ง และผลการทดสอบฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH assay และ ABTS assay ผลการทดสอบพบว่า ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระที่ทดสอบด้วยวิธี DPPH assay และ ABTS assay น้ำต้มดอกกานพลูที่ระยะเวลา 3 ชั่วโมง มีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระมากกว่าน้ำต้มดอกกานพลูที่ระยะเวลา 1 ชั่วโมง ซึ่งน้ำต้มดอกกานพลูที่ระยะเวลา 1 ชั่วโมง และ 3 ชั่วโมง มีค่า IC₅₀ of DPPH เท่ากับ 121.48 mg/ml และ 100.41 mg/ml ตามลำดับ และ มีค่า IC₅₀ of ABTS เท่ากับ 94.98 mg/ml และ 70.71 mg/ml ตามลำดับ

คำสำคัญ: กานพลู, ยูจีนอล, ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

**Analysis of Eugenol Content and Antioxidant Activity in Clove
Syzygium aromaticum (L.) Merr. & L.M. Perry Extracted Decoction
Prepared at Different Boiling Times**

**Chamapron Chantapa¹ Areerat Raden¹ Wasin Bumrungchaichana¹
and Nitirat Meekai^{1*}**

¹ Bachelor of Thai Traditional Medicine Program, Sirindhorn College of Public Health, Phitsanulok

*Corresponding Author E-mail: Nitirat@scphpl.ac.th

Abstract

This study aimed to determine the Eugenol content and evaluate the antioxidant activity of clove (*Syzygium aromaticum*) decoctions prepared at different boiling times. The specific objectives were to quantify the Eugenol levels extracted during various boiling durations and to examine the corresponding antioxidant activity of the clove decoctions. The decoction was prepared by boiling four clove flower buds in 2,000 ml of distilled water using an electric kettle. A total of 15 samples (100 ml each) were collected starting from the boiling point: every 10 minutes for the first 60 minutes and every 3 hours up to 24 hours. The analysis of Eugenol content was performed using High-Performance Liquid Chromatography (HPLC), with Eugenol used as a standard reference compound.

The chromatographic analysis revealed that the peak of the Eugenol standard appeared at a retention time of approximately 8 minutes. The clove decoction samples collected at different boiling times showed that the Eugenol content tended to increase during the first 0–9 hours, followed by a decline at 12 hours. The highest concentration was observed at 6 hours, and the Eugenol content remained relatively stable between 6 and 9 hours. For antioxidant activity, both DPPH and ABTS assays demonstrated that the clove decoction boiled for 3 hours exhibited higher free radical scavenging activity compared to the decoction boiled for 1 hour. The IC₅₀ values for the DPPH assay were 121.48 mg/ml and 100.4124 mg/ml for the 1-hour and 3-hour samples, respectively. Additionally, the IC₅₀ values for the ABTS assay were 94.98 mg/ml and 70.71 mg/ml for the 1-hour and 3-hour samples, respectively.

Keywords: Clove, Eugenol, Antioxidant activity

บทนำ

การเลี้ยงดูบุตรด้วยนมแม่เป็นที่ยอมรับในระดับสากลว่าเป็นวิธีที่ดีที่สุดสำหรับการเจริญเติบโตและพัฒนาการของบุตร เนื่องจากนมแม่ประกอบด้วยสารอาหารและภูมิคุ้มกันที่จำเป็นในการสร้างเสริมสุขภาพให้แก่บุตร ในบางกรณี เช่น มารดาที่มีปัญหาด้านสุขภาพการทำงานที่จำกัดเวลาหรือไม่สามารถให้นมบุตรได้อย่างต่อเนื่อง จำเป็นต้องใช้นมผสมเป็นทางเลือกเสริม การชงนมด้วยกาน้ำร้อนจึงเป็นอีกวิธีหนึ่งที่นิยมใช้ในครอบครัวหลายกลุ่ม เนื่องจากช่วยประหยัดเวลา และสะดวกต่อการเตรียมนม แต่หากให้บุตรใช้ขวดนมไม่ถูกวิธีอาจทำให้มีลมเข้าไปท้องมาก และเกิดอาการท้องอืด⁽¹⁾ ซึ่งนิยมใช้นมดัดแปลงสำหรับทารก (Infant formula) หรือนมผงที่ดัดแปลงจากนมวัว ให้มีส่วนประกอบใกล้เคียงนมแม่ ใช้ในทารกช่วง 12 เดือนแรกเมื่อละลายน้ำตามอัตราส่วนปกติ คือ นมผงประมาณ 4 กรัม ละลายน้ำจนได้น้ำนม 30 มิลลิลิตร จะได้น้ำนมผสมที่มีพลังงาน 20 กิโลแคลอรี/30 มิลลิลิตร มีความเข้มข้นของโปรตีน 1.24-1.50 กรัม/เดซิลิตร มีอัตราส่วนของชนิดโปรตีน whey ต่อ casein ใกล้เคียงนมแม่มาก คือ เท่ากับหรือใกล้เคียง 60 ต่อ 40 คาร์โบไฮเดรตประกอบด้วยแลคโตส และถูกปรับให้ปริมาณเพิ่มขึ้นเท่ากับในนมแม่ คือ 7 กรัม/เดซิลิตร และนมผงที่เหมาะสมสำหรับเด็กอายุตั้งแต่ 6 เดือน ถึง 3 ปี คือ นมดัดแปลงสูตรต่อเนื่องสำหรับทารกและเด็กเล็ก (Follow-on formula) หรือ นมผงที่ดัดแปลงจากนมวัว เมื่อละลายน้ำตามอัตราส่วนปกติจะได้น้ำนมที่มีพลังงาน 20 กิโลแคลอรี/30 มิลลิลิตร มีความเข้มข้นของโปรตีน 2.0-2.5 กรัม/เดซิลิตร มีอัตราส่วนของชนิดโปรตีน whey ต่อ casein เท่ากับ 60 ต่อ 40 จนถึง 35 ต่อ 65 คาร์โบไฮเดรตประกอบด้วยแลคโตสเป็นหลัก⁽²⁾ อาการท้องอืดในเด็กเป็นปัญหาสุขภาพที่พบบ่อยในเด็กแรกเกิดจนถึงวัยเด็กเล็กโดยเฉพาะในช่วง 1-2 ปี แรก ซึ่งเป็นช่วงเวลาที่ระบบย่อยอาหารยังพัฒนาไม่สมบูรณ์อาการนี้ส่งผลกระทบต่อคุณภาพชีวิตของเด็กและครอบครัว เช่น การนอนหลับไม่เพียงพอ ความหงุดหงิด และอาการร้องไห้อย่างผิดปกติ นอกจากนี้อาการท้องอืดอาจเกี่ยวข้องกับปัจจัยหลายประการ เช่น พฤติกรรมการรับประทานอาหาร การให้นม การเลือกอาหาร และสภาพแวดล้อม จากข้อมูลทางการแพทย์พบว่า อาการท้องอืดในเด็กอาจเกิดจากการกลืนอากาศในระหว่างรับประทานอาหารการย่อยอาหารผิดปกติ หรือการแพ้โปรตีนในนมวัวเป็นต้น การรับรู้และการจัดการปัญหาอย่างเหมาะสมจึงเป็นสิ่งสำคัญเพื่อช่วยลดความทุกข์ทรมานของเด็กและป้องกันปัญหาสุขภาพในระยะยาว⁽³⁾

กานพลู ชื่อวิทยาศาสตร์ *Syzygium aromaticum* (L.) Merr. & L.M.Perry ชื่อวงศ์ Myrtaceae เป็นพืชพื้นเมืองของหมู่เกาะโมลุกกะ (Molucca) ประเทศอินโดนีเซียนิยมปลูกในเขตร้อนทั่วโลกชอบดินร่วนซุยระบายน้ำได้ดีมีความชื้นสูง⁽⁴⁾ และฝนตกชุกในประเทศไทยมีการนำมาปลูกแต่ไม่แพร่หลายมีปลูกมากที่จังหวัดจันทบุรี และชุมพร ส่วนที่นิยมนำมาใช้ทำยาคือ ดอกตูมแห้งรูปทรงคล้ายลูกโกร่งบดยาหรือน้ำตาลหรือสีน้ำตาลเข้มส่วนล่างเป็นฐานดอกรูปด้วยลักษณะคล้ายก้านรูปทรงกระบอกค่อนข้างแบนหรือเป็นสันสี่เหลี่ยมตันมีต่อมน้ำมันกระจายอยู่ทั่วไปส่วนบนมีกลีบเลี้ยง 4 กลีบ รูปสามเหลี่ยม ถัดเข้าไปเป็นกลีบดอก 4 กลีบบาง ซ่อนเหลี่ยมและโค้งเข้าหากันหุ้มรอบเกสรเพศผู้ และเกสรเพศเมียไว้ทำให้มีลักษณะเป็นก้อนกลมสีจางกว่าส่วนโคนกลีบหอมเฉพาะมีรสเผ็ดร้อน และชา⁽⁵⁾ ซึ่งในตำราแพทย์แผนโบราณทั่วไป สาขาเภสัชกรรม กล่าวว่า รสเผ็ดร้อนนั้นมีสรรพคุณแก้โรคลมจุกเสียดขับลมให้ผายหรือเรอบำรุงเตโชธาตุ (ธาตุไฟ) ขับเหงื่อช่วยย่อยอาหารนอกจากนี้กานพลูยังมีองค์ประกอบหลักเป็นมันระเหยง่าย (Volatile oil) และกรดгалโลแทนนิก (Gallotannic acid) และประกอบด้วยสารกลุ่มเทอร์พีนอยด์ (Terpenoids) หลายชนิดที่สำคัญคือ ยูจีนอล (Eugenol) ยูจีนอลหรือเรียกอีกชื่อหนึ่งว่า 4-allyl-2-methoxyphenol เป็นน้ำมันหอมระเหยในกลุ่ม ของสารประกอบอะโรมาติก มีสูตรโมเลกุล คือ $C_{10}H_{12}O_2$ ⁽⁶⁾ ซึ่ง

การใช้ในอดีตนั้น ก็จะเป็นการใช้ตามตำรายาไทยในรูปแบบของสารแห้งที่มีอยู่ในน้ำมันดอกกานพลู เช่น ใช้แก้ท้องอืดท้องเฟ้อโดยในผู้ใหญ่ใช้ดอกตูม 4-6 ดอกใช้ทุบให้เข้าชงน้ำดื่มครั้งละครั้งถ้วยแก้วหรือใช้ดอกแห้ง 5-8 ดอก ต้มน้ำพอเดือดดื่มแต่น้ำถ้าบดเป็นผง 0.12-0.6 กรัม ชงน้ำสุกดื่มเด็กอ่อนใช้ดอกแห้ง 1 ดอก ทุบแช่ไว้ในน้ำเดือด 1 กระติก ความจุประมาณครึ่งลิตรสำหรับชงนมใส่ขวดให้เด็กดูดแก้ท้องอืด⁽⁷⁾ กานพลูเป็นสมุนไพรที่ได้รับการใช้มาช้านานทั้งในตำรับอายุรเวทและแพทย์แผนไทย โดยมีการอ้างถึงสรรพคุณในการบรรเทาอาการท้องอืด จุกเสียด และแน่นเฟ้อ ซึ่งมักเกิดจากการคั่งของลมและแก๊สในระบบทางเดินอาหาร⁽⁸⁾ สารออกฤทธิ์สำคัญของกานพลูคือ Eugenol เป็นสารในกลุ่ม phenylpropanoids ซึ่งจัดเป็น phenolic compounds ที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงซึ่งมีฤทธิ์หลายด้านรวมถึงฤทธิ์ด้านการอักเสบ บรรเทาอาการปวด และฤทธิ์ด้านออกซิเดชันอย่างชัดเจน⁽⁹⁾ บทบาทของ Eugenol ในกานพลูได้รับการศึกษาอย่างกว้างขวางน้ำมันกานพลู (essential oil) ที่มี Eugenol เป็นองค์ประกอบหลักส่วนใหญ่ >50% มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ด้านการอักเสบ และฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาอื่น ๆ เช่น antinociceptive (บรรเทาปวด), antimicrobial และ antispasmodic⁽¹⁰⁾ จากมุมมองทางสรีรวิทยาอาการท้องอืดแน่นเฟ้อ โดยเฉพาะในกลุ่มโรคที่เรียกว่า Functional Gastrointestinal Disorders (FGIDs) มักเกี่ยวข้องกับความผิดปกติของการเคลื่อนไหวของลำไส้การหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบลำไส้ ความไวของเยื่อและภาวะอักเสบระดับต่ำรวมทั้งมีหลักฐานที่ชี้ว่าภาวะออกซิเดชัน (oxidative stress) และความไม่สมดุลของระบบต้านอนุมูลอิสระในเยื่อทางเดินอาหารอาจมีผลต่ออาการเหล่านี้⁽¹¹⁾ กานพลูจึงอาจมีสรรพคุณช่วยบรรเทาอาการท้องอืดผ่านกลไก 2 รูปแบบได้แก่ 1) Eugenol มีฤทธิ์ทาง Carminative effect และ Antispasmodic activity ช่วยคลายการหดเกร็งของ Gastrointestinal smooth muscle การหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบในระบบทางเดินอาหารส่งเสริม Normal gut motility ช่วยคลายปรับการเคลื่อนไหวให้ปกติ Gas retention ลดการคั่งของแก๊ส และ Bloating และ Abdominal discomfort บรรเทาอาการแน่นท้อง ท้องอืด⁽¹²⁾ 2) สาร Eugenol ในกานพลูมี Antioxidant activity สามารถยับยั้ง Reactive oxygen species (ROS) ลด Oxidative damage ต่อ Gastrointestinal mucosa ส่งผลช่วยลด Low-grade inflammation และความผิดปกติของเยื่อที่พบใน Functional gastrointestinal disorders (FGIDs) เช่น อาการท้องอืดและแน่นท้องจึงอาจช่วยลดการอักเสบระดับต่ำและความผิดปกติของเยื่อที่เกี่ยวข้องกับอาการ FGIDs ได้⁽¹³⁾ ถึงแม้จะมีการใช้กานพลูในการแพทย์แผนไทยมายาวนานแต่ยังไม่มีการศึกษาเชิงระบบเกี่ยวกับปริมาณสารมาตรฐาน Eugenol ที่คงเหลือหลังกระบวนการต้มและผลกระทบต่อฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และทั้งนี้ยังขาดข้อมูลทางวิทยาศาสตร์ที่ยืนยันถึงขนาดและปริมาณรวมถึงอุณหภูมิในการต้มดอกกานพลู

คณะวิจัยจึงสนใจศึกษาปริมาณสารมาตรฐาน Eugenol และฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระในกานพลูโดยวิธีการต้มด้วยกาน้ำร้อนเพื่อหาปริมาณสารมาตรฐาน Eugenol ที่มีอยู่หลังจากต้มด้วยกาน้ำร้อนตามระยะเวลาที่แตกต่างกันเพื่อให้ได้ช่วงเวลาที่สารมาตรฐาน Eugenol ยังคงอยู่ และการศึกษาครั้งนี้ยังมุ่งเน้นการประยุกต์ใช้กานพลูเพื่อบรรเทาอาการท้องอืดในทารกโดยอาศัยคุณสมบัติทางเภสัชวิทยาของสารมาตรฐาน Eugenol ซึ่งยังขาดหลักฐานเชิงประจักษ์ทางวิทยาศาสตร์ที่ชัดเจน

วัตถุประสงค์การวิจัย

1. เพื่อศึกษาปริมาณสาร Eugenol ในน้ำต้มดอกกานพลูที่เตรียมด้วยการต้มด้วยกาน้ำร้อนในระยะเวลาที่แตกต่างกันโดยวิเคราะห์ปริมาณ Eugenol ด้วยวิธี High-Performance Liquid Chromatography (HPLC) เปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน Eugenol
2. เพื่อประเมินฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของน้ำต้มดอกกานพลูที่เตรียมด้วยการต้มด้วยกาน้ำร้อนในระยะเวลาที่แตกต่างกันโดยทดสอบด้วยวิธี DPPH assay และ ABTS assay และเปรียบเทียบผลกับสารมาตรฐานวิตามินซีและสารมาตรฐาน Eugenol

ระเบียบวิธีศึกษา

1. ขอบเขตการศึกษา

การศึกษานี้เป็นการศึกษาเชิงทดลอง (Experimental research) เพื่อการศึกษาปริมาณสารมาตรฐาน Eugenol และฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระในกานพลูโดยวิธีการต้มด้วยกาน้ำร้อนในช่วงเวลาที่แตกต่างกัน ประกอบด้วย ทุก 10 นาที เป็นเวลา 1 ชั่วโมง และทุก 3 ชั่วโมง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตรวจสอบหาปริมาณสารสำคัญ Eugenol ด้วยกระบวนการ High Performance Liquid Chromatography (HPLC) ด้วยเครื่องยี่ห้อ Agilent รุ่น 1200 Series ขนาด Column C₁₈ (150 mm * 4.6 mm, 5 μ m) ยี่ห้อ Agilent เปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน Eugenol ReagentPlus®, 99% PCode 1026111678 จากบริษัท Sigma-Aldrich และทำการทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธีการ DPPH assay และ ABTS assay

2. วิธีการดำเนินการวิจัย

การเตรียมสารสกัด

- 1) ใช้ดอกกานพลู จำนวน 4 ดอก หุบให้พอแหลก
- 2) นำดอกกานพลู ใส่ลงในกาน้ำร้อนไฟฟ้าในอัตราส่วน 4 ดอก ต่อน้ำ 2,000 มิลลิลิตร
- 3) โดยเก็บน้ำต้มดอกกานพลูตั้งแต่ต้มเดือดทุก 10 นาทีเป็นเวลา 1 ชั่วโมง และทุก 3 ชั่วโมง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
- 4) นำน้ำต้มดอกกานพลูที่ได้บรรจุใส่ภาชนะเก็บสารสกัดไว้ในตู้เย็น

การเตรียมสารเพื่อทดสอบ

- 1) นำสารละลายมาตรฐาน Eugenol ชั่ง 10 มิลลิกรัม ผสมกับ Methanol 1,000 ไมโครลิตรต่อ มิลลิลิตร จากนั้นเจือจาง 500:500 กับ Ethyl Alcohol 10 ความเข้มข้น (1, 0.5, 0.25, 0.125, 0.0625, 0.03125, 0.015625, 0.007813, 0.003906, 0.001953(mg/ml))
- 2) นำสารมาตรฐานวิตามินซี ชั่ง 10 มิลลิกรัม ผสมกับ Ethyl Alcohol 95 % 1,000 ไมโครลิตรต่อ มิลลิลิตร จากนั้นเจือจาง 500:500 กับ Ethyl Alcohol 10 ความเข้มข้น (1, 0.5, 0.25, 0.125, 0.0625, 0.03125, 0.015625, 0.007813, 0.003906, 0.001953 (mg/ml))
- 3) นำน้ำต้มดอกกานพลูที่ระยะเวลา 1 ชั่วโมง และ 3 ชั่วโมง ปริมาตร 1,000 ไมโครลิตร เจือจาง 500:500 กับ น้ำ 10 ความเข้มข้น (100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.125, 1.5625, 0.78125, 0.39625, 0.195313 (mg/ml)) มาทดสอบตรวจสอบหาปริมาณสารสำคัญ Eugenol และการทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ ดังนี้

3. การทดสอบ High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

- 1) เตรียมสารละลายตัวอย่าง โดยการนำสารละลายมาตรฐาน Eugenol มากรองสารโดยใช้ Syringe Filter และ Syringe ขนาด 1 ml ดูดใส่ขวด Vial 10 ความเข้มข้น
- 2) เตรียมสารละลายตัวอย่างน้ำต้มกานพลู ตั้งแต่ต้มเดือด, ทุกๆ 10 นาทีเป็นเวลา 1 ชั่วโมง และทุกๆ 3 ชั่วโมง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จำนวน 15 ตัวอย่างกรองสารโดยใช้ Syringe Filter และ Syringe ขนาด 1 ml ดูดใส่ขวด
- 3) สภาวะที่ใช้ในการวิเคราะห์จะมีความยาวคลื่น 243 นาโนเมตร ขนาด Column C₁₈ (150 mm * 4.6 mm, 5 μ m) Flow rate 0.7 cm³/min และใช้ Mobile phase คือ Methanol-acetonitrile-water ที่อัตราส่วน 10:50:40 โดยใช้เวลาดำเนินการ 1 injection 10 นาที (FARHIN INAM, 2014)
- 4) ทำการทดสอบซ้ำ 3 ครั้ง หาค่าเพื่อหาค่าเฉลี่ยของการทดลองอ่านผลโครมาโตแกรมและบันทึกผลการ

4. การทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธีการ DPPH assay

การทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธีการ DPPH assay ดัดแปลงจากวิธีของรุจิลักษณ์ รัตตะรมย์ และคณะ⁽⁷⁾ โดยใช้สารที่มีคุณสมบัติเป็น อนุมูลอิสระคือ 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH เป็นสารสังเคราะห์ที่อยู่ในรูปอนุมูลอิสระที่มี ค่าคงที่และสีม่วง เมื่อ DPPH ทำปฏิกิริยากับสารต้านออกซิเดชันที่ละลายด้วยเอทานอลทำให้สารละลาย สีม่วงจะเปลี่ยนเป็นสีเหลือง มีค่าดูดกลืนแสง 515 นาโนเมตร ดังนี้

- 1) นำสารละลาย DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) จากบริษัท Sigma-Aldrich ซึ่งในปริมาณ 15.7 มิลลิกรัม ผสมกับกับ Ethyl Alcohol 95 % จำกัดปริมาณ 200 ไมโครลิตร ทั้งในที่มี 30 นาที
- 2) นำสารสกัดหรือสารละลายมาตรฐาน ซึ่งอย่างละ 10 มิลลิกรัม ผสมกับ Ethyl Alcohol 95 % ปริมาณ 1,000 ไมโครลิตรต่อมิลลิตร จากนั้นเจือจาง 500:500 จาก 10 ความเข้มข้น (1, 0.5, 0.25, 0.125, 0.0625, 0.03125, 0.015625, 0.007813, 0.003906, 0.001953 (mg/ml))
- 3) นำสารมาใส่ Microwell plate 96 โดยนำสารมาตรฐาน Eugenol, สารมาตรฐานวิตามินซี และน้ำต้มดอกกานพลูที่ 1 และ 3 ชั่วโมง ความเข้มข้นละ 75 ไมโครลิตรต่อมิลลิตร ผสมกับสารละลาย DPPH 150 ไมโครลิตรต่อมิลลิตร ความเข้มข้นตัวอย่างซ้ำ 3 ครั้ง ทั้งในที่มี 30 นาที
- 4) วิเคราะห์ข้อมูลร้อยละของการยับยั้งด้วยเครื่อง Spectrophotometer จากสูตร

$$\text{DPPH radical scavenging (\%)} = (100 - (A_o/A_s) * 100)$$
- 5) วิเคราะห์ค่า IC₅₀ จากสมการเส้นตรงซึ่งได้จากการสร้างกราฟระหว่างค่า % inhibition กับความเข้มข้นของสารสกัด จากสูตร $y = ax + b$ อ่านค่า IC₅₀ ทำการทดสอบซ้ำ 3 ครั้ง หาค่าเพื่อหาค่าเฉลี่ยของการทดลองและบันทึกผล

5. การทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธีการ ABTS assay

การทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธีการ ABTS assay ดัดแปลงจากวิธีของรุจิลักษณ์ รัตตะรมย์ และคณะ⁽¹⁴⁾ ถูกเปลี่ยนเป็น ABTS ด้วยการเติมโพแทสเซียมเปอร์ซัลเฟต (Potassium persulfate) ไอออนบวกเรดิคัลนี้ เป็นสีเขียว และค่าดูดกลืนแสงที่ 734 นาโนเมตร ABTS ทำปฏิกิริยาต่อสารต้านอนุมูลอิสระ ABTS ถูกแปลงกลับไปเป็นรูปไม่มีสีที่เป็นกลางและตรวจวัดได้ เมื่อนำไปเทียบกับค่าของ Toxol ซึ่งเป็นสารอนุพันธ์ของวิตามินอี (Vitamin E) ดังนี้

- 1) นำสารละลาย ABTS (2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) จากบริษัท Sigma-Aldrich ชั่งในปริมาณ 18 มิลลิกรัม
- 2) นำสารละลาย Potassium persulfate ชั่งในปริมาณ 10 มิลลิกรัม ผสมกับน้ำกลั่นปริมาณ 15 มิลลิลิตร คนสารให้เข้ากัน
- 3) นำสารละลาย Potassium persulfate ผสมกับน้ำกลั่น ใส่ในขวดปรับปริมาตร (Volumetric flask) ปริมาณ 5 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลาย ABTS ในปริมาณ 18 มิลลิกรัม เขย่าสารให้เข้ากัน ท่อหุ้มด้วยอะลูมิเนียมฟอยล์ เก็บไว้ในที่มืด 12 ชั่วโมง
- 4) นำสารละลาย ABTS ที่เตรียมตามวิธีข้างต้น ทดสอบสารละลาย ABTS หรือเจือจางด้วยน้ำกลั่นให้มีค่าประมาณ + 0.7
- 5) นำสารสกัดหรือสารละลายมาตรฐาน ชั่งอย่างละ 10 มิลลิกรัม ผสมกับ Ethyl Alcohol 95 % 1,000 ไมโครลิตรต่อมิลลิลิตร จากนั้นเจือจาง 500:500 จาก 10 ความเข้มข้น (1, 0.5, 0.25, 0.125, 0.0625, 0.03125, 0.015625, 0.007813, 0.003906, 0.001953 (mg/ml))
- 6) นำสารมาใส่ microwell plate 96 โดยนำสารมาตรฐาน Eugenol, สารมาตรฐานวิตามินซี และน้ำต้มดอกกานพลูที่ 1 และ 3 ชั่วโมง ความเข้มข้นละ 20 ไมโครลิตรต่อมิลลิลิตร ผสมกับสารละลาย ABTS 180 ไมโครลิตรต่อมิลลิลิตรความเข้มข้น ตัวอย่างซ้ำ 3 ครั้ง ทั้งในที่มืด 6 นาที
- 7) วิเคราะห์ข้อมูลร้อยละของการยับยั้งด้วยเครื่อง Spectrophotometer จากสูตร

$$\text{ABTS radical scavenging (\%)} = (100 - (A_o/A_s) * 100)$$
- 8) วิเคราะห์ค่า IC₅₀ จากสมการเส้นตรงซึ่งได้จากการสร้างกราฟระหว่างค่า % inhibition กับความเข้มข้นของสารสกัด จากสูตร $y = ax + b$ อ่านค่า IC₅₀ ทำการทดสอบซ้ำ 3 ครั้ง หาค่าเพื่อหาค่าเฉลี่ยของการทดลองและบันทึกผล

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

การวิเคราะห์การตรวจสอบหาปริมาณสารสำคัญ Eugenol ด้วยกระบวนการ High Performance Liquid Chromatography (HPLC) การทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธีการ DPPH assay และ ABTS assay โดยใช้สถิติเชิงพรรณนา ได้แก่ ค่าความถี่ ค่าเฉลี่ย ร้อยละ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

ผลการศึกษา

1. ผลการทดสอบปริมาณสารมาตรฐาน Eugenol ในกานพลูด้วยวิธี High performance liquid chromatography

ผลการศึกษาจากความเข้มข้นของสารมาตรฐาน Eugenol โดยเจือจางเป็น 10 ความเข้มข้น (1, 0.5, 0.25, 0.125, 0.0625, 0.03125, 0.015625, 0.007813, 0.003906, 0.001953) พบว่า พีคของสารมาตรฐาน Eugenol ในโครมาโตแกรมปรากฏที่เวลา 8 นาที (ตารางที่ 1 และภาพที่ 1)

2. ผลการทดสอบน้ำต้มกานพลูด้วยวิธี High performance liquid chromatography

ผลการศึกษาโดยใช้น้ำต้มกานพลูโดยวิธีการต้มด้วยกาน้ำร้อนโดยเก็บตัวอย่างสารทุกๆ 3 ชั่วโมง พบว่า ปริมาณสารมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นในช่วงเวลา 0-9 ชั่วโมงแรก และปริมาณสารมีแนวโน้ม

ลดลงตั้งแต่ช่วง 12 ชั่วโมง ซึ่งช่วงที่มีความเข้มข้นของสารมากที่สุด คือ ช่วง 6 ชั่วโมง และ ความเข้มข้นของสารมีความคงตัวในช่วง 6-9 ชั่วโมงซึ่งค่าความเข้มข้นของสารตัวอย่าง ได้จากการแทนค่าจากสมการเส้นตรงสารมาตรฐาน (ตารางที่ 2 และภาพที่ 2)

3. ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH assay

การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH assay พบว่า สารมาตรฐานและน้ำต้มดอกกานพลูมีแนวโน้มของค่าการดูดกลืนแสง (absorbance) เปลี่ยนแปลงตามความเข้มข้นของตัวอย่างที่แตกต่างกัน โดยเมื่อความเข้มข้นของสารทดสอบ ลดลง ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย DPPH เพิ่มขึ้นแสดงว่าในช่วงความเข้มข้นสูงสารทดสอบสามารถกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH ได้มากกว่า ทำให้ค่าการดูดกลืนแสงลดลง ซึ่งเป็นไปตามหลักการของการทดสอบ DPPH radical scavenging

สารมาตรฐานวิตามินซีและ Eugenol (ตารางที่ 3)

ผลการทดสอบวิตามินซีที่ใช้เป็นสารมาตรฐานเชิงบวก พบว่าในความเข้มข้น 1 mg/ml มีค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ยเท่ากับ 0.07 ± 0.01 และเมื่อเจือจางลงเป็น 0.5, 0.25 และ 0.125 mg/ml ค่าการดูดกลืนแสงเพิ่มขึ้นเป็น 0.07 ± 0.01 , 0.07 ± 0.01 และ 0.08 ± 0.01 ตามลำดับ เมื่อความเข้มข้นลดลงต่อเนื่องเป็น 0.0625 และ 0.03125 mg/ml ค่าเฉลี่ยการดูดกลืนแสงเพิ่มเป็น 0.18 ± 0.01 และ 0.19 ± 0.01 ตามลำดับ และในช่วงความเข้มข้นต่ำมาก ได้แก่ 0.015625, 0.007813, 0.003906 และ 0.001953 mg/ml ค่าการดูดกลืนแสงสูงขึ้นอย่างชัดเจนเป็น 0.55 ± 0.04 , 0.73 ± 0.02 , 0.85 ± 0.03 และ 0.89 ± 0.02 แสดงให้เห็นว่าที่ความเข้มข้นเริ่มต้นสูง วิตามินซีมีความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระได้ดีมาก

ผลการทดสอบ Eugenol ซึ่งเป็นสารสำคัญหลักของกานพลูพบลักษณะการเปลี่ยนแปลงในทิศทางเดียวกัน โดยที่ความเข้มข้น 1 mg/ml มีค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ย 0.08 ± 0.01 และเพิ่มขึ้นเป็น 0.09 ± 0.01 , 0.09 ± 0.02 และ 0.12 ± 0.01 ที่ความเข้มข้น 0.5, 0.25 และ 0.125 mg/ml ตามลำดับ เมื่อความเข้มข้นลดลงเป็น 0.0625 และ 0.03125 mg/ml ค่าเฉลี่ยการดูดกลืนแสงเพิ่มเป็น 0.22 ± 0.01 และ 0.37 ± 0.01 และที่ความเข้มข้นต่ำ 0.015625, 0.007813, 0.003906 และ 0.001953 mg/ml ให้ค่าการดูดกลืนแสง 0.55 ± 0.01 , 0.63 ± 0.03 , 0.65 ± 0.04 และ 0.85 ± 0.01 ตามลำดับ

เมื่อเปรียบเทียบระหว่างวิตามินซีและ Eugenol พบว่า ในช่วงความเข้มข้นสูงวิตามินซีมีค่าการดูดกลืนแสงต่ำกว่าเล็กน้อยเมื่อเทียบกับ Eugenol ที่ความเข้มข้นเท่ากันสะท้อนว่ามีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงกว่าเล็กน้อยอย่างไรก็ตาม Eugenol แสดงให้เห็นศักยภาพในการกำจัดอนุมูลอิสระได้ดีเช่นกัน โดยเฉพาะในช่วงความเข้มข้นปานกลางถึงสูง ซึ่งสอดคล้องกับบทบาทของ Eugenol ในฐานะสารออกฤทธิ์หลักของกานพลู

น้ำต้มดอกกานพลูที่ต้ม 1 ชั่วโมงและ 3 ชั่วโมง (ตารางที่ 4)

ผลการทดสอบน้ำต้มดอกกานพลูที่เตรียมโดยการต้ม 1 ชั่วโมง พบว่า เมื่อวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 515 นาโนเมตร ในช่วงความเข้มข้น 100 – 0.195313 mg/ml ค่าการดูดกลืนแสงมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นตามลำดับความเข้มข้นที่ลดลง โดยที่ความเข้มข้น 100 mg/ml มีค่าเฉลี่ย 0.53 ± 0.04 และเพิ่มขึ้นเป็น 0.76 ± 0.01 , 0.84 ± 0.01 , 0.87 ± 0.01 และ 0.92 ± 0.01 ที่ความเข้มข้น 50, 25, 12.5 และ 6.25 mg/ml ตามลำดับ เมื่อความเข้มข้นลดลงต่อเนื่องเป็น 3.125, 1.5625, 0.78125 และ 0.390625 mg/ml ค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 0.88 ± 0.04 , 0.93 ± 0.01 , 0.90 ± 0.03 และ 0.89 ± 0.04 ตามลำดับ และที่ความเข้มข้นต่ำสุด 0.19 mg/ml มีค่าเฉลี่ย 0.84 ± 0.16 ยังคงอยู่ในช่วงค่าที่สูงเมื่อเทียบกับความเข้มข้นเริ่มต้น

ผลการทดสอบน้ำต้มดอกกานพลูที่ต้มเป็นเวลา 3 ชั่วโมง พบแนวโน้มในทิศทางเดียวกัน แต่ให้ค่าการดูดกลืนแสงสูงกว่าระยะเวลา 1 ชั่วโมงในความเข้มข้นส่วนใหญ่ โดยที่ความเข้มข้น 100 mg/ml มีค่าเฉลี่ย 0.445 ± 0.0075 และเพิ่มขึ้นเป็น 0.73 ± 0.01 , 0.84 ± 0.02 , 0.88 ± 0.01 และ 0.92 ± 0.02 ที่ความเข้มข้น 50, 25, 12.5 และ 6.25 mg/ml ตามลำดับ ในช่วงความเข้มข้น 3.125, 1.5625, 0.78125 และ 0.390625 mg/ml มีค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ยเท่ากับ 0.89 ± 0.01 , 0.86 ± 0.02 , 0.88 ± 0.04 และ 0.89 ± 0.01 ตามลำดับ และที่ความเข้มข้นต่ำสุด 0.19 mg/ml มีค่า 0.87 ± 0.03

เมื่อเปรียบเทียบระหว่างน้ำต้มดอกกานพลู 1 ชั่วโมงและ 3 ชั่วโมงที่ความเข้มข้นเท่ากันโดยรวมพบว่า น้ำต้มที่ผ่านการต้ม 3 ชั่วโมง ให้ค่าการดูดกลืนแสงสูงกว่าเล็กน้อยในหลายช่วงความเข้มข้น ซึ่งตามหลักการของการทดสอบ DPPH หมายถึงมีปริมาณ DPPH ที่ตกค้างในสารละลายมากกว่าเล็กน้อย แต่เมื่อพิจารณาพร้อมกับค่าร้อยละการยับยั้งและค่า IC_{50} ที่คำนวณได้ (น้ำต้ม 3 ชั่วโมงมีค่า IC_{50} ต่ำกว่าน้ำต้ม 1 ชั่วโมง) สะท้อนว่าการต้มเป็นเวลานานขึ้นช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระของน้ำต้มดอกกานพลู ซึ่งสัมพันธ์กับปริมาณ Eugenol ที่ถูกสกัดออกมาเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาการต้ม

4. ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS assay

การศึกษากฎที่ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS assay พบว่า ทั้งสารมาตรฐานและน้ำต้มดอกกานพลูมีแนวโน้มของค่าการดูดกลืนแสงเปลี่ยนแปลงตามความเข้มข้นของตัวอย่าง กล่าวคือ เมื่อความเข้มข้นของสารทดสอบลดลง ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย ABTS มีแนวโน้มเพิ่มขึ้น สะท้อนว่าที่ความเข้มข้นสูง สารทดสอบสามารถกำจัดอนุมูลอิสระ ABTS ได้มากกว่า

สารมาตรฐานวิตามินซีและ Eugenol (ตารางที่ 5)

ผลการทดสอบวิตามินซีที่ใช้เป็นสารมาตรฐานเชิงบวก พบว่า ที่ความเข้มข้น 1 mg/ml มีค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ย 0.05 ± 0.01 เมื่อเจือจางลงเป็น 0.5 mg/ml ให้ค่าเฉลี่ย 0.04 ± 0.01 และที่ 0.25 mg/ml มีค่าเฉลี่ย 0.06 ± 0.02 ในขณะที่ที่ความเข้มข้น 0.125 mg/ml มีค่าเฉลี่ย 0.06 ± 0.02 เมื่อความเข้มข้นลดลงต่อเนื่องเป็น 0.0625 และ 0.03125 mg/ml ค่าการดูดกลืนแสงเพิ่มขึ้นอย่างชัดเจนเป็น 0.55 ± 0.03 และ 0.77 ± 0.03 ตามลำดับ ในช่วงความเข้มข้นต่ำมาก ได้แก่ 0.01563, 0.00781, 0.00391 และ 0.00195 mg/ml วิตามินซีให้ค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ย 0.83 ± 0.01 , 0.84 ± 0.01 , 0.84 ± 0.01 และ 0.83 ± 0.01 ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าที่ความเข้มข้นเริ่มต้นสูง วิตามินซีมีศักยภาพในการกำจัดอนุมูลอิสระได้ดีมาก ส่งผลให้ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย ABTS อยู่ในระดับต่ำ

ผลการทดสอบ Eugenol พบรูปแบบการเปลี่ยนแปลงคล้ายคลึงกัน โดยที่ความเข้มข้น 1 mg/ml มีค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ย 0.05 ± 0.01 ที่ความเข้มข้น 0.5 mg/ml มีค่าเฉลี่ย 0.05 ± 0.01 และที่ 0.25 mg/ml มีค่าเฉลี่ย 0.05 ± 0.01 เมื่อเจือจางลงเป็น 0.125 และ 0.0625 mg/ml ค่าการดูดกลืนแสงเพิ่มขึ้นเป็น 0.14 ± 0.16 และ 0.23 ± 0.12 ตามลำดับ ขณะที่ความเข้มข้น 0.03125 และ 0.01563 mg/ml ค่าเฉลี่ยการดูดกลืนแสงเพิ่มขึ้นอย่างมากเป็น 0.50 (SD 0.06) และ 0.55 ± 0.09 ในช่วงความเข้มข้นต่ำ 0.00781, 0.00391 และ 0.00195 mg/ml ค่าเฉลี่ยการดูดกลืนแสงเท่ากับ 0.67 ± 0.02 , 0.70 ± 0.06 และ 0.75 ± 0.03 ตามลำดับ

เมื่อเปรียบเทียบระหว่างวิตามินซีและ Eugenol ในช่วงความเข้มข้นสูง 1–0.25 mg/ml พบว่าค่าการดูดกลืนแสงของทั้งสองสารอยู่ในระดับใกล้เคียงกัน แสดงถึงศักยภาพในการกำจัดอนุมูลอิสระที่ใกล้เคียงกัน อย่างไรก็ตาม ในช่วงความเข้มข้นต่ำกว่าประมาณ 0.0625 mg/ml วิตามินซีมีค่าการดูดกลืนแสงโดยรวมต่ำกว่า

เล็กน้อยเมื่อเทียบกับ Eugenol สะท้อนว่ามีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่แรงกว่าเล็กน้อยในช่วงความเข้มข้นต่ำ ขณะที่ Eugenol ยังคงแสดงศักยภาพที่ดีและมีบทบาทสำคัญในฐานะสารออกฤทธิ์หลักของดอกกานพลู

น้ำต้มดอกกานพลูที่ต้ม 1 ชั่วโมงและ 3 ชั่วโมง (ตารางที่ 6)

ผลการทดสอบน้ำต้มดอกกานพลูด้วยวิธี ABTS assay จากตารางที่ 6 พบว่า น้ำต้มดอกกานพลูที่เตรียมโดยการต้ม 1 ชั่วโมง มีค่าการดูดกลืนแสงเริ่มต้นที่ 100 mg/ml เท่ากับ 0.35 โดยมี SD 0.06 และเพิ่มขึ้นเมื่อความเข้มข้นลดลงเป็น 50 mg/ml ให้ค่าเฉลี่ย 0.54 ± 0.05 ที่ความเข้มข้น 25 mg/ml มีค่าเฉลี่ย 0.72 ± 0.01 และที่ 12.5 mg/ml มีค่าเฉลี่ย 0.68 ± 0.01 เมื่อความเข้มข้นลดลงต่อเนื่องเป็น 6.25 และ 3.125 mg/ml ค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ยเท่ากับ 0.73 ± 0.01 และ 0.77 ± 0.01 ตามลำดับ ในช่วงความเข้มข้นต่ำ 1.5625, 0.78125, 0.39063 และ 0.19531 mg/ml ให้ค่าเฉลี่ยการดูดกลืนแสง 0.77 ± 0.05 , 0.82 ± 0.04 , 0.80 ± 0.04 และ 0.78 ± 0.06 ตามลำดับ โดยภาพรวมพบว่าเมื่อความเข้มข้นของน้ำต้มลดลง ค่าการดูดกลืนแสงเพิ่มขึ้น สอดคล้องกับการลดลงของความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระในสารละลาย

สำหรับน้ำต้มดอกกานพลูที่ต้ม 3 ชั่วโมง พบค่าการดูดกลืนแสงเริ่มต้นที่ 100 mg/ml เท่ากับ 0.27 ± 0.04 ซึ่งต่ำกว่ากลุ่มต้ม 1 ชั่วโมง สะท้อนถึงศักยภาพในการกำจัดอนุมูลอิสระที่สูงกว่าในช่วงความเข้มข้นเริ่มต้น เมื่อความเข้มข้นลดลงเป็น 50 และ 25 mg/ml ค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ยเพิ่มเป็น 0.42 ± 0.03 และ 0.59 ± 0.01 ตามลำดับ ที่ความเข้มข้น 12.5 และ 6.25 mg/ml มีค่าเฉลี่ย 0.69 ± 0.02 และ 0.73 ± 0.04 ตามลำดับ ส่วนที่ความเข้มข้น 3.125 และ 1.5625 mg/ml ค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 0.78 ± 0.01 และ 0.79 ± 0.01 ขณะที่ในช่วงความเข้มข้นต่ำ 0.78125, 0.39063 และ 0.19531 mg/ml ให้ค่าเฉลี่ย 0.78 ± 0.01 , 0.78 ± 0.01 และ 0.79 ± 0.01 ตามลำดับ

เมื่อเปรียบเทียบระหว่างน้ำต้มดอกกานพลูที่ต้ม 1 ชั่วโมงและ 3 ชั่วโมงในแต่ละความเข้มข้น พบว่ากลุ่มที่ต้ม 3 ชั่วโมงมีค่าการดูดกลืนแสงต่ำกว่าในช่วงความเข้มข้นสูง 100 – 50 mg/ml ซึ่งสะท้อนถึงศักยภาพในการกำจัดอนุมูลอิสระที่ดีกว่า อย่างไรก็ตาม ในช่วงความเข้มข้นปานกลางถึงต่ำตั้งแต่ประมาณ 25 mg/ml ลงมา ค่าการดูดกลืนแสงของทั้งสองกลุ่มมีแนวโน้มใกล้เคียงกัน แสดงว่าเมื่อเจือจางมากขึ้น ความแตกต่างของฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระระหว่างสองระยะเวลาการต้มลดลง

5. สรุปผลการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH assay และ ABTS assay

การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธีการ DPPH assay และ ABTS assay ของน้ำต้มดอกกานพลูที่ระยะเวลา 1 และ 3 ชั่วโมง โดยใช้สารควบคุมคือวิตามินซี และสารมาตรฐาน Eugenol พบว่า IC_{50} of DPPH ของวิตามินซี คือ 0.03 mg/ml ของยูจินอล คือ 0.03 mg/ml ของน้ำต้มดอกกานพลูที่ระยะเวลา 1 ชั่วโมง คือ 121.48 mg/ml และ น้ำต้มดอกกานพลูที่ระยะเวลา 3 ชั่วโมง คือ 100.41 mg/ml และ IC_{50} of ABTS ของวิตามินซี คือ 0.10 mg/ml ของ Eugenol คือ 0.03 mg/ml ของน้ำต้มดอกกานพลูที่ระยะเวลา 1 ชั่วโมง คือ 94.98 mg/ml และ น้ำต้มดอกกานพลูที่ระยะเวลา 3 ชั่วโมง คือ 70.71 mg/ml (ตารางที่ 7)

อภิปรายผล

ผลจากการทดสอบปริมาณสาร Eugenol ในกานพลูด้วยวิธี High performance liquid chromatography ผลการศึกษาจากความเข้มข้นของสารมาตรฐาน Eugenol โดยเจือจางเป็น 10 ความเข้มข้น (1, 0.5, 0.25, 0.125, 0.0625, 0.03125, 0.015625, 0.007813, 0.003906, 0.001953) พบว่า พีคของสารมาตรฐาน Eugenol ในโคร

มาโตแกรมปรากฏใช้เวลา 8 นาที สอดคล้องกับ Munishama Gowda YN และคณะ⁽¹⁵⁾ ทำการศึกษาพบว่า การสกัดดอกกานพลูด้วยการต้มพบสารมาตรฐาน Eugenol พืชของสารมาตรฐาน Eugenol ในโครมาโตแกรมปรากฏใช้เวลา 8 นาที และสอดคล้องกับ Mahasin Ahmed Wadi⁽¹⁶⁾ ทำการศึกษาสารสกัดน้ำจากดอกกานพลูในการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีด้วย GC-MS พบสารประกอบทั้งหมด 58 ชนิด โดย สารมาตรฐาน Eugenol เป็นสารที่พบในปริมาณสูงที่สุด คิดเป็น 53.24% ขององค์ประกอบทั้งหมด จึงมีความเป็นไปได้ว่าการสกัดดอกกานพลูด้วยวิธีการต้มอาจทำให้ได้สารมาตรฐาน Eugenol ได้ และพบว่าผลการศึกษาโดยใช้น้ำต้มกานพลูโดยวิธีการต้มด้วยกาน้ำร้อนการต้มเดือดตามทฤษฎีการแพทย์แผนไทย⁽¹⁷⁾ โดยเก็บตัวอย่างสารทุกๆ 3 ชั่วโมง จะเห็นได้ว่าปริมาณสารมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นในช่วงเวลา 0-9 ชั่วโมงแรก และปริมาณสารมีแนวโน้มลดลงตั้งแต่ช่วง 12 ชั่วโมง ซึ่งช่วงที่มีปริมาณสารมากที่สุด คือ ช่วง 6 ชั่วโมง และ ปริมาณสารมีความคงตัวในช่วง 6-9 ชั่วโมง เนื่องจากสารมาตรฐาน Eugenol เป็นสารกลุ่มน้ำมันหอมระเหยจึงอาจเป็นไปได้ว่าการต้มเป็นเวลานานจนเกินไปสารสำคัญอาจจะเกิดการระเหยไปได้หรืออาจเกิดการแตกตัวเปลี่ยนแปลงไปเป็นอนุพันธ์แบบอื่นสอดคล้องกับ Xuyan Song และคณะ⁽¹⁸⁾ ที่พบว่า สารมาตรฐาน Eugenol เป็นสารกลุ่มน้ำมันหอมระเหยหาต้มหรือใช้เวลาดำมนานอาจส่งผลต่อการลดลงของปริมาณสารได้หรืออาจเกิดการเปลี่ยนแปลงไปเป็นสารอนุพันธ์แบบอื่นได้ และสอดคล้องกับ Khadiza Fitri Shafira และคณะ⁽¹⁹⁾ ที่พบว่า ไม่ได้ให้ปริมาณสารมาตรฐาน Eugenol สูงที่สุดเมื่อเทียบกับวิธีการสกัดด้วยวิธีอื่น ๆ แต่พบว่า หากทำการต้มไปถึงช่วงเวลาหนึ่งจะพบว่า สารมาตรฐาน Eugenol จะมีปริมาณเพิ่มขึ้นและจะลดลงเมื่อโดนความร้อนเป็นเวลานานสารสำคัญ Eugenol จะสูญเสียไปกับการระเหย

ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH assay และ ABTS assay

ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH assay พบว่า เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารทดสอบ ค่า % inhibition เพิ่มขึ้น ทั้งในสารมาตรฐานวิตามินซี, สารมาตรฐาน Eugenol และน้ำต้มดอกกานพลู แสดงถึงความสามารถในการบริจาคิอิเล็กตรอนเพื่อต้านอนุมูลอิสระที่เพิ่มสูงขึ้นตามปริมาณสารเมื่อเปรียบเทียบกับประสิทธิภาพด้วยค่า IC_{50} พบว่า วิตามินซี มีค่า IC_{50} ต่ำที่สุด 0.03 mg/ml แสดงถึงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่สูงที่สุด Eugenol มีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.03 mg/ml ซึ่งอยู่ในระดับที่ใกล้เคียงและยังคงมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดดเด่น น้ำต้มดอกกานพลูที่ต้ม 3 ชั่วโมง มีค่า IC_{50} 100.41 mg/ml ต่ำกว่าน้ำต้มที่ต้ม 1 ชั่วโมง ที่มีค่า IC_{50} 121.48 mg/ml แสดงว่าน้ำต้มกานพลูที่ผ่านการต้มเป็นเวลานานขึ้น มีประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระดีขึ้น ผลดังกล่าวสอดคล้องกับงานของ Aziz Zouhri และคณะ ที่รายงานว่าสารสกัดน้ำดอกกานพลูมี % inhibition สูงถึง 95.13% และมีค่า IC_{50} = 0.16 mg/ml ยืนยันว่ากานพลูมีสารสำคัญที่ให้ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้อย่างชัดเจน⁽²⁰⁾

1. ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS assay แสดงให้เห็นว่า เมื่อความเข้มข้นของตัวอย่างเพิ่มขึ้น ค่า % inhibition มีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นทั้งในสารมาตรฐานวิตามินซี, Eugenol และน้ำต้มดอกกานพลู ซึ่งบ่งชี้ว่าความสามารถในการบริจาคิอิเล็กตรอนเพื่อต้านอนุมูลอิสระเพิ่มขึ้นตามปริมาณสารออกฤทธิ์ที่มีอยู่ในตัวอย่าง จากค่าการประเมินประสิทธิภาพด้วย IC_{50} พบว่า Eugenol มีค่า IC_{50} ต่ำที่สุด 0.03 mg/ml แสดงถึงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่สูงใกล้เคียงกับสารมาตรฐานวิตามินซี 0.10 mg/ml ขณะที่น้ำต้มดอกกานพลูที่ต้ม 3 ชั่วโมงมีค่า IC_{50} เท่ากับ 70.71 mg/ml ต่ำกว่าน้ำต้มที่ต้มเพียง 1 ชั่วโมง 94.98 mg/ml แสดงว่าการเพิ่มระยะเวลาการต้มสามารถช่วยปลดปล่อยสารออกฤทธิ์ เช่น Eugenol ลงสู่น้ำต้มมากขึ้น ส่งผลให้ประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระเพิ่มขึ้นตามไปด้วย ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับงานวิจัยของ Abdelmuhsin Abdegadir Abdelmuhsin และ

คณะ ซึ่งรายงานว่สารสกัดน้ดอกกานพลูมีค่า ABTS IC₅₀ เท่ากับ 0.18 ± 0.01 mg/ml แสดงถึงศักยภาพในการกำจัดอนุมูลอิสระได้ดี⁽²¹⁾ นอกจากนี้ Dawidowicz และ Olszowy ยังพบว่าสารมาตรฐาน Eugenol บริสุทธิ์ และน้ำมันกานพลูมีค่า ABTS IC₅₀ใกล้เคียงกัน $\approx 0.14\text{--}0.15$ mg/ml ยืนยันว่า Eugenol เป็น active compound หลักที่มีบทบาทในการออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในดอกกานพลูอย่างมีนัยสำคัญ⁽²²⁾

ข้อสรุป

จากการศึกษาครั้งนี้พบว่า ระยะเวลาการต้มมีผลต่อปริมาณ Eugenol ในน้ำต้มดอกกานพลูโดยมีปริมาณสูงสุดในช่วง 6–9 ชั่วโมง และลดลงเมื่อเวลาต้มเกิน 12 ชั่วโมง นอกจากนี้ น้ำต้มที่ต้ม 3 ชั่วโมงมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงกว่าที่ต้ม 1 ชั่วโมง ซึ่งสอดคล้องกับปริมาณ Eugenol ที่เพิ่มขึ้นตามระยะเวลาการต้มอย่างไรก็ตาม การศึกษาครั้งนี้ประเมินเฉพาะฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในระดับห้องปฏิบัติการยังไม่สามารถสรุปเชิงสาเหตุเกี่ยวกับประสิทธิภาพต่ออาการท้องอืดได้โดยตรง แม้มีรายงานว่สาร Eugenol มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาที่เกี่ยวข้องกับการคลายกล้ามเนื้อเรียบของระบบทางเดินอาหารดังนั้น ข้อมูลจากการศึกษานี้สามารถเป็นหลักฐานพื้นฐานสนับสนุนศักยภาพของน้ำต้มดอกกานพลูต่อการนำไปประยุกต์ใช้ และควรมีการศึกษาต่อยอดด้านกลไกทางชีวภาพและประสิทธิภาพทางคลินิกต่ออาการท้องอืดเพื่อยืนยันสรรพคุณดังกล่าวอย่างเป็นระบบต่อไป

ตาราง ภาพ และแผนภาพ

ตารางที่ 1 ผลการศึกษาโดยใช้สารมาตรฐาน Eugenol ด้วยวิธี High performance liquid chromatography

ความเข้มข้น (mg/ml)	Area Under Curve
1	24,843.90
0.5	12,321.20
0.25	5,982.60
0.125	2,861.20
0.0625	1,344.40
0.03125	636.60
0.015625	304.10
0.007813	146.40
0.003906	69.70
0.001953	33.20

ตารางที่ 2 ผลการทดสอบโดยใช้น้ำต้มกานพลูโดยวิธีการต้มด้วยกาน้ำร้อนด้วยวิธี High performance liquid chromatography

ระยะเวลา ในการต้ม (ชั่วโมง)	ปริมาณสาร mg/ml			ค่าเฉลี่ย	SD
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3		
0	0.0059	0.0059	0.0056	0.0058	0.0002
0.1	0.0072	0.0062	0.0060	0.0064	0.0007
0.2	0.0086	0.0067	0.0084	0.0079	0.0010
0.3	0.0096	0.0109	0.0089	0.0098	0.0010
0.4	0.0115	0.0125	0.0104	0.0115	0.0010
0.5	0.0139	0.0158	0.0117	0.0138	0.0021
1	0.0149	0.0171	0.0135	0.0152	0.0018
3	0.0232	0.0288	0.0212	0.0244	0.0039
6	0.0255	0.0315	0.0226	0.0266	0.0045
9	0.0255	0.0315	0.0226	0.0265	0.0046
12	0.0249	0.0279	0.0206	0.0245	0.0037
15	0.0252	0.0238	0.0186	0.0225	0.0035
18	0.0244	0.0183	0.0159	0.0196	0.0044
21	0.0224	0.0135	0.0146	0.0168	0.0049
24	0.0213	0.0088	0.0129	0.0143	0.0064

ตารางที่ 3 ค่าเฉลี่ย และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานจากการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH assay ของสารมาตรฐานวิตามินซี และสารมาตรฐาน Eugenol

ค่าเฉลี่ย และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานในการต้านอนุมูลอิสระแต่ละความเข้มข้น (mg/ml)				
ความเข้มข้น	วิตามินซี		Eugenol	
	ค่าเฉลี่ย	SD	ค่าเฉลี่ย	SD
1	0.079	0.0010	0.085	0.0040
0.5	0.074	0.0032	0.097	0.0148
0.25	0.078	0.0017	0.092	0.0026
0.125	0.075	0.0006	0.111	0.0038
0.0625	0.084	0.0097	0.193	0.0130
0.03125	0.190	0.0097	0.372	0.0310
0.015625	0.551	0.0434	0.550	0.0198
0.007813	0.739	0.0208	0.693	0.0032
0.003906	0.853	0.0031	0.810	0.0046
0.001953	0.897	0.0215	0.853	0.0146

ตารางที่ 4 ค่าเฉลี่ย และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานจากการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH assay ของตำกานพลูโดยวิธีการต้มด้วยกาน้ำร้อนที่ระยะเวลา 1 ชั่วโมง และ 3 ชั่วโมง

ค่าเฉลี่ย และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานในการต้านอนุมูลอิสระแต่ละความเข้มข้น (mg/ml)				
ความเข้มข้น	ต้ม 1 ชั่วโมง		ต้ม 3 ชั่วโมง	
	ค่าเฉลี่ย	SD	ค่าเฉลี่ย	SD
100	0.533	0.0450	0.445	0.0075
50	0.763	0.0130	0.731	0.0108
25	0.846	0.0075	0.844	0.0245
12.5	0.879	0.0017	0.882	0.0163
6.25	0.902	0.0546	0.874	0.0295
3.125	0.885	0.0435	0.891	0.0095
1.5625	0.933	0.0021	0.863	0.0070
0.78125	0.903	0.0386	0.883	0.0452
0.390625	0.893	0.0441	0.896	0.0173
0.195313	0.846	0.1692	0.872	0.0341

ตารางที่ 5 ตารางแสดงค่าเฉลี่ย และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานจากการศึกษาที่ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS assay ของสารมาตรฐานวิตามินซี และสารมาตรฐาน Eugenol

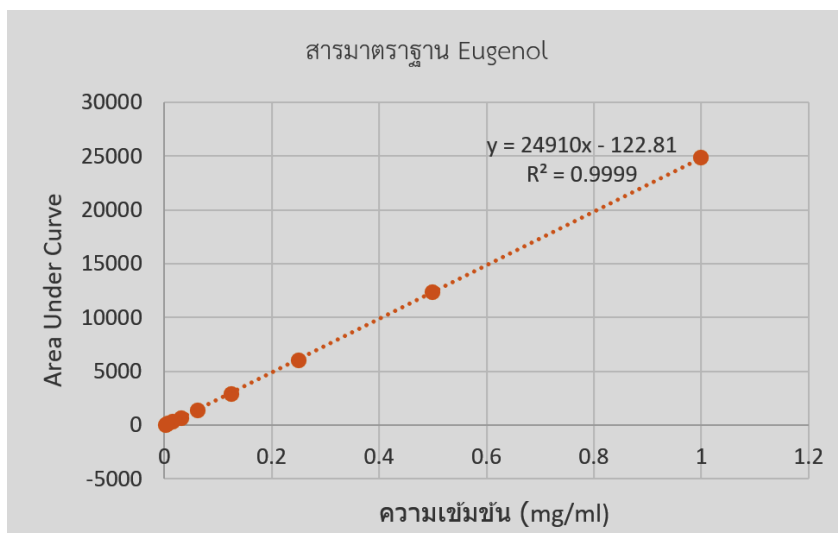
ค่าเฉลี่ย และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานในการต้านอนุมูลอิสระแต่ละความเข้มข้น (mg/ml)				
ความเข้มข้น	วิตามินซี		Eugenol	
	ค่าเฉลี่ย	SD	ค่าเฉลี่ย	SD
1	0.052	0.0080	0.0453	0.0025
0.5	0.045	0.0040	0.0507	0.0115
0.25	0.061	0.0173	0.0503	0.0055
0.125	0.150	0.0195	0.1443	0.1608
0.0625	0.549	0.0269	0.2280	0.1194
0.03125	0.773	0.0317	0.5047	0.0581
0.015625	0.831	0.0121	0.5460	0.0901
0.007813	0.841	0.0006	0.6737	0.0237
0.003906	0.843	0.0101	0.7040	0.0589
0.001953	0.833	0.0093	0.7497	0.0326

ตารางที่ 6 ค่าเฉลี่ย และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานจากการศึกษาที่ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS assay ของตำกานพลูโดยวิธีการต้มด้วยกาน้ำร้อนที่ 1 ชั่วโมง และ 3 ชั่วโมง

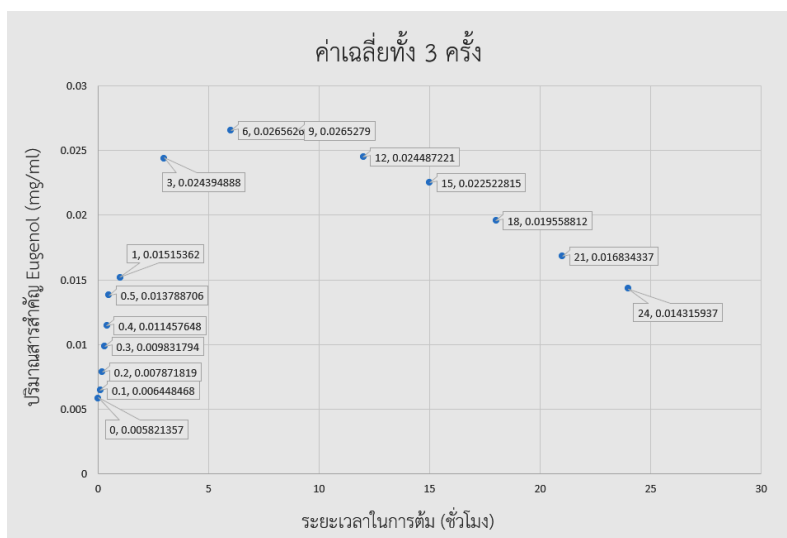
ค่าเฉลี่ย และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานในการต้านอนุมูลอิสระแต่ละความเข้มข้น (mg/ml)				
ความเข้มข้น	ต้ม 1 ชั่วโมง		ต้ม 3 ชั่วโมง	
	ค่าเฉลี่ย	SD	ค่าเฉลี่ย	SD
100	0.352	0.0553	0.272	0.0443
50	0.543	0.0509	0.423	0.0291
25	0.717	0.0090	0.589	0.0130
12.5	0.684	0.0142	0.685	0.0159
6.25	0.731	0.0045	0.727	0.0401
3.125	0.771	0.0006	0.776	0.0130
1.5625	0.769	0.0050	0.788	0.0050
0.78125	0.815	0.0365	0.778	0.0065
0.390625	0.802	0.0330	0.777	0.0046
0.195313	0.776	0.0055	0.793	0.0075

ตารางที่ 7 ตารางสรุปผลการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH assay และ ABTS assay

ลำดับ	สารตัวอย่าง	ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระตามวิธีต่างๆ	
		IC ₅₀ of DPPH (mg/ml)	IC ₅₀ of ABTS (mg/ml)
1	วิตามินซี	0.020597	0.107476
2	Eugenol	0.020065	0.038792
3	ต้ม 1 ชั่วโมง	121.4851	94.98595
4	ต้ม 3 ชั่วโมง	100.4124	70.71568



ภาพที่ 1 กราฟมาตรฐานของ Eugenol ด้วยวิธี High performance liquid chromatography HPLC
ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นและพื้นที่ใต้กราฟ (AUC)



ภาพที่ 2 แนวโน้มผลการศึกษาโดยใช้น้ำต้มกานพลูโดยวิธีการต้มด้วยกาน้ำร้อน วิเคราะห์ด้วยวิธี High performance liquid chromatography

เอกสารอ้างอิง

1. นางนิภา เพียรพิจารณ. **คู่มือการพยาบาลการส่งเสริมสายสัมพันธ์แม่-ลูกและการเลี้ยงลูกด้วยนมแม่ในห้องคลอด**. สืบค้นเมื่อ 10 สิงหาคม 2567, จาก https://www2.si.mahidol.ac.th/division/nursing/sins/attachments/article/222/sins_nursing_manual_2558_10.pdf
2. Donovan SM. (2019). Human Milk Proteins: Composition and Physiological Significance. **Nestle Nutrition Institute Workshop Series**. 90, 93-101.
3. โรงพยาบาลกรุงเทพจันทบุรี. **ท้องอืดในเด็กเล็ก**. สืบค้นเมื่อ 20 สิงหาคม 2567, จาก <https://bangkokhospitalchanchaburi.com/article/303>
4. Xue Q, et al. (2022). Recent advances in nutritional composition, phytochemistry, bioactive, and potential applications of *Syzygium aromaticum* L. (Myrtaceae). **Frontiers in Nutrition**. 9, 1002147.
5. ฐานข้อมูลเครื่องยาไทย คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี. **กานพลู**. สืบค้นเมื่อ 20 สิงหาคม 2567, จาก <https://phar.ubu.ac.th/herb-DetailThaicrudedrug/18>
6. พัชรพรรณ ดิษยมนตรี และพรพิมล ม่วงไทย. (2560). การวิเคราะห์ปริมาณยูจีนอลและไอโซยูจีนอลพร้อมกันในยาไทยพื้นบ้านบางชนิด. **วารสารมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ**. 9(17), 64-72.
7. สถานการแพทย์แผนไทยประยุกต์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์. **กานพลู**. สืบค้นเมื่อ 20 สิงหาคม 2567, จาก <https://www.med.tu.ac.th/department/attm/?p=2080>
8. สุพย์ จันทรสกา และวรรณารีย์ เจริญทรัพย์. (2543). การตรวจสอบคุณภาพกานพลูและผลิตภัณฑ์ยาที่เตรียมสมุนไพรที่มีกานพลูเป็นส่วนประกอบ. **คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่**, ข.
9. Nisar MF, et al. (2021). Pharmacological Properties and Health Benefits of Eugenol: A Comprehensive Review. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**.
10. Cortés Rojas DF, et al. (2014). Clove (*Syzygium aromaticum*): a precious spice. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**. 4(2), 90-96.
11. Pandey VK., et al. (2024). Bioactive properties of clove (*Syzygium aromaticum*) essential oil nano emulsion: A comprehensive review. **Heliyon**. 10, e22437.
12. กรมการแพทย์แผนไทยและการแพทย์ทางเลือก. **กานพลูคุณสมบัติและการใช้เพื่อแก้ท้องอืด/ท้องเฟ้อ**. กรมการแพทย์แผนไทยและการแพทย์ทางเลือก. สืบค้นเมื่อ 20 สิงหาคม 2567, จาก <http://ittm.dtam.moph.go.th/images/leaga/3/18%E0%B8%81%E0%B8%B2%E0%B8%99%E0%B8%9E%E0%B8%A5%E0%B8%B9%20%E0%B8%AB%E0%B8%99%E0%B9%89%E0%B8%B250-52.pdf>
13. Ali S, et al. (2014). Eugenol-rich Fraction of *Syzygium aromaticum* (Clove) Reverses Biochemical and Histopathological Changes in Liver Cirrhosis and Inhibits Hepatic Cell Proliferation. **Journal of Cancer Prevention**. 19(4), 288-300.

14. รุจิลักษณ์ รัตตะรมย์ และคณะ. (2560). การศึกษามาตรฐานตำรับยาสมุนไพรเบญจกูลที่จำหน่ายในประเทศไทย. *วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยมหาสารคาม*. 36(5), 578-588.
15. Munishama Gowda YN, et al. (2024). A validated comparative study of RP-HPLC, GC-FID and UV spectrophotometric methods for the quantification of eugenol isolated from *Syzygium Aromaticum* L. *J Pharmacogn Phytochem*. 13(5), 544-550.
16. Wadi MA. (2025). Evaluation of antibacterial activity and chemical analysis of clove aqueous extract (*Syzygium aromaticum*). *BMC Complementary Medicine and Therapies*. 25(1), 146.
17. นริศรา เนตรศิริยา และคณะ. (2566). การศึกษาองค์ความรู้ทางการแพทย์ไทยเกี่ยวกับการเตรียมยาสมุนไพรในรูปแบบของยาต้มดื่ม. *วารสารพุทธศาสตร์สหวิทยาการ*. 1(4), R0941.
18. Song X, et al. (2021). Heat Triggered Release Behavior of Eugenol from Tobacco Leaf. *Applied Sciences*. 11(18), 8642.
19. Shafira KF, et al. (2019). Extraction and quantification of eugenol from clove buds using HPLC. *Current Chromatography*, 6, 1.
20. Zouhri A, et al. (2022). *Syzygium aromaticum*: Traditional uses, antioxidants, anti-inflammatory activities and photo-protective properties. *Arabian Journal of Medicinal and Aromatic Plants*. 8(3), 43-55.
21. Abdelmuhsin AA, et al. (2025). Clove (*Syzygium aromaticum*) Pods: Revealing Their Antioxidant Potential via GC-MS Analysis and Computational Insights. *Pharmaceuticals*. 18(4), 504.
22. Dawidowicz AL, and Olszowy M. (2014). Does antioxidant properties of the main component of essential oil reflect its antioxidant properties? The comparison of antioxidant properties of essential oils and their main components. *Natural Product Research*, 28(22), 1952–1963.