บทที่ 2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 เอกสารที่เกี่ยวข้อง

กลีบกุหลาบ อุดมไปด้วย วิตามินซี แคโรทีน วิตามินบี วิตามินเค แคลเซียม และแร่ธาตุต่าง ๆ ที่จำเป็นต่อร่างกายและระบบเลือด เรียกได้ว่า วิตามินเกลือแร่ต่าง ๆ ที่ร่างกายต้องการนั้นมีอยู่ครบถ้วนในกลีบกุหลาบ เช่น โปแตสเซียม ที่จำเป็นต่อระบบหัวใจ แร่ธาตุทองแดง ที่ร่างกายต้องการเพื่อกระบวนการสร้างเม็ดเลือด และใช้ในกระบวนการทำงานของระบบต่อมไร้ท่อ ไอโอดีน ที่ร่างกายต้องการสำหรับการสร้างฮอร์โมนของต่อมไทรอยด์

สารสกัดจากกลีบกุหลาบ (Rose crysta) มีสารสำคัญคือ Eugeniin แก้ปัญหาผดร้อน ผื่นแดง แพ้ระคายเคืองจากสารเคมี ช่วยสร้างภูมิต้านทานให้กับผิว และ Rose Polyphenol ยับยั้งเอมไซม์ไฮยาลูโรนิเดส (Hyaluroidase) ที่ทำลายไฮยาลูโลนิกแอซิค ในผิวชั้นลึก จึงเสมือนเป็นเกราะป้องกันให้ถูกทำลายน้อยลง ช่วยยืดอายุและปรับโครงสร้าง ให้ผิวแข็งแรง เต่งตึง แน่นฟิตกระชับ อุ้มน้ำ ไม่ยุบตัว หย่อนคล้อยไปตามวัยคงสภาพผิวแรกรุ่น อ่อนเยาว์ ลดการผลิตเม็ดสีเมลานิน ที่ทำให้ผิวคล้ำเสีย หม่นหมอง รอยกระและรอยดำจากสิว ผิวขาวใสขึ้นทั้งผิวหน้าและผิวกาย ลดการอักเสบของผิวไฟไหม้ บวม ร้อนแดง จากรังสียูวีในแสงแดด

นอกจากนี้สารสกัดดอกกุหลาบยังมีสารที่ให้ประโยชน์ในการบำรุงรักษาผิวหนังและผิวกาย ช่วยกระชับรูขุมขนไม่ให้เปิดกว้างหลังการล้างหน้า ช่วยเพิ่มความชุ่มชื้นให้แก่ผิว และช่วยปรับสมดุลของสภาพผิว ฟื้นฟูเซลล์ผิวภายในให้แข็งแรง เป็นสารต้านออกซิเดชัน (Antioxidant) ช่วยลดการเกิดริ้วรอยจุดด่างดำ และช่วยให้ผิวพรรณสว่างสดใน สุขภาพดี สีผิวจุดด่างดำค่อยๆ จางลง (ธิดารัตน์ จันทร์ดอน, 2559)

2.1.1 กุหลาบมอญไกลกังวล (ฟ้าใสวันใหม่, 2556)

ชื่อวิทยาศาสตร์	: *Rosa Damascena* Mill
ชื่อวงศ์	: Rosaceae
ชื่อสามัญ	: Summer Damask Rose
ชื่อเรียกอื่น	: กุหลาบมอญ ยี่สุ่น

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ กุหลาบมอญเป็นไม้พุ่มขนาดเล็ก สูง 1-2 เมตร ลำต้น และกิ่งมีหนาม ใบเป็นใบประกอบแบบขนนก รูปไข่ กว้าง 2-4 ซม. ยาว 3-5 ซม. ปลายใบแหลม โคนใบมน ขอบจักเป็นฟันเลื่อย ออกดอกเป็นช่อดอกสีชมพูหรือสีแดงที่ปลายกิ่ง อยู่รวมกันเป็นกระจุก 3-5 ดอก มีกลีบเลี้ยง 5 กลีบ มีกลีบดอกจำนวนมากเรียงซ้อนกันหลายชั้นเมื่อดอกบานมีเส้นผ่านศูนย์กลาง 4.5-7 ซม. มีกลิ่นหอมแรง (ภาพที่ 2.1)

ฤดูออกดอก ออกดอกตลอดทั้งปี

เขตการกระจายพันธุ์ พบได้ในหลายพื้นที่ทั่วโลก พบมากในอินเดีย ประเทศแถบตะวันออกกลาง และยุโรป โดยเฉพาะในประเทศอิหร่าน ตุรกี และบัลกาเรีย

สรรพคุณ/ประโยชน์ กลีบดอกสด มีน้ำมันหอมระเหย ซึ่งใช้แต่งกลิ่นเครื่องสำอาง น้ำกุหลาบเป็นส่วนผสมของน้ำดอกไม้เทศ ใช้บรรเทาอาการอ่อนเพลีย และกระวนกระวาย กลีบดอกบำรุงหัวใจ ขับน้ำดี แก้อ่อนเพลีย ช่วยระบาย

ในประเทศไทยกุหลาบมอญที่นิยมปลูกมี 3 สายพันธุ์ได้แก่ กุหลาบมอญไกลกังวล กุหลาบมอญแดงประเสริฐ และกุหลาบมอญชมพูประเสริฐ ซึ่งกุหลาบมอญไกลกังวลนั้นเป็นชื่อพระราชทานจาก สมเด็จพระนางเจ้าสิริกิติ์ พระบรมราชินีนาถ พระบรมราชชนนีพันปีหลวง

ลักษณะดอก มีสีชมพูอ่อน ขนาดดอกประมาณ 3 -4 นิ้ว มีกลิ่นหอมแรง

ภาพที่ 2.1 กุหลาบมอญไกลกังวล
ที่มา : (ฟ้าใสวันใหม่, 2556)

2.1.2 กุหลาบสายพันธุ์มอญแดงประเสริฐ (สำนักงานข้อมูลสมุนไพร คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล,2559)

กุหลาบสายพันธุ์มอญแดงประเสริฐ (Damask rose Daengprasert) เป็นหนึ่งในสายพันธุ์ของกุหลาบมอญ กลีบดอกเป็นสีแดง กุหลาบมอญถูกพบว่ามีในประเทศไทยมานาน ถือเป็นกุหลาบโบราณ ชาวมอญเป็นผู้นำเข้ามาในสมัยสมเด็จพระนารายณ์มหาราช โดยปลูกในพระราชอุทยานที่จังหวัดลพบุรี มีถิ่นกำเนิดอยู่ในตะวันออกกลาง ซึ่งชาวพื้นเมืองเรียกว่า กุลอับ (วีณา เชิดบุญชาติ, 2546,น.42)

1) ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

ชื่อวิทยาศาสตร์ : *Rosa Damascena* Mill
ชื่อวงศ์ : ROSACEAE
ชื่อสามัญ : Damask Rose
ชื่ออื่น ๆ : กุหลาบมอญ , ยี่สุ่น , กุหลาบออน

กุหลาบมอญ เป็นไม้พุ่มสูง 1-2 เมตร ลำต้นและกิ่งมีหนามแหลม ใบประกอบขนนกเรียงสลับกัน ใบย่อยรูปไข่ 5-7 ใบ ปลายใบแหลม โคนใบมน ขอบใบหยักเป็นฟันเลื่อย มีกลิ่นหอม

ดอกออกเป็นช่อที่ปลายกิ่ง กลีบดอกซ้อนกันหลายชั้น เมื่อดอกบานเต็มที่วัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางได้ 4.5-7 เซนติเมตร ดังภาพที่ 2.2

ภาพที่ 2.2 กุหลาบสายพันธุ์มอญแดงประเสริฐ
ที่มา Ahmad Fuad Morad (2011)

2) สรรพคุณและวิธีใช้ประโยชน์

ส่วนประกอบกุหลาบมอญที่นิยมนำมาใช้ประโยชน์ คือ กลีบดอกและผล กลีบดอกมีสรรพคุณลดการอักเสบ คลายเครียด ลดระดับคลอเลสเตอรอลในเลือด แก้ตรีโทษ บำรุงหัวใจ บำรุงตับ ขับน้ำดี ต่างประเทศใช้แก้หวัด ใช้บรรเทาอาการอ่อนเพลียและกระวนกระวาย ต้านแบคทีเรียและฆ่าเชื้อทั่วไป ดอกแห้งใช้เป็นยาระบายอ่อน ๆ แก้อ่อนเพลียและบำรุงหัวใจ ผล มีสรรพคุณใช้เป็นยาสมานแผล ต้านโรคติดเชื้อ กระเพาะอาหารอักเสบ รักษาแผลไฟไหม้ น้ำร้อนลวก แก้หลอดลมอักเสบ เจ็บคอ เจ็บปาก ทำให้การไหลเวียนของโลหิตดีขึ้น ช่วยเจริญอาหาร ช่วยย่อย ใช้เป็นส่วนผสมในยาแก้ไอ (วีณา เชิดบุญชาติ, 2546)

3) การเก็บรักษาดอกกุหลาบ

การเก็บรักษาดอกกุหลาบมีวัตถุประสงค์เพื่อยืดอายุหลังการเก็บเกี่ยวให้ดอกไม้มีสภาพเหมือนปกติได้นานที่สุด เพราะว่าหลังการเก็บเกี่ยวดอกกุหลาบจะยังคงมีชีวิตและมีการเปลี่ยนแปลงที่ทำให้เกิดการสูญเสียคุณภาพ วิธีการเก็บรักษาที่ภายใต้อุณหภูมิต่ำเป็นสิ่งจำเป็นสำหรับดอกกุหลาบ โดยพบว่าที่อุณหภูมิสูงจะส่งผลต่ออายุการเก็บรักษา กลีบดอกและใบเสื่อมสภาพ อันเป็นผลมาจากการเพิ่มขึ้นของการผลิตเอทิลีนและการเสื่อมสภาพของชั้นเมมเบรนทำให้มีการรั่วไหลของไอออนเพิ่มมากขึ้น (มัณฑนาและคณะ,2553)

2.1.3 ดอกกุหลาบสายพันธุ์บีชอปอังกฤษ (หนังสือสารานุกรมไม้ประดับในประเทศไทย, 2540)

ชื่อวิทยาศาสตร์ : Rosa hybrid

ชื่อวงศ์ : Rosaceae

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ : จัดเป็นไม้ดอกประเภทพุ่มขนาดใหญ่ ลำต้นตั้งตรง สูง

1-3 เมตร ลำต้นมีหนาม ใบเป็นใบประกอบแบบขนนก สีเขียวมัน มีใบย่อย 5-9 ใบ ออกสลับกัน ดอกเป็นดอกเดี่ยว สีชมพูเข้ม กลีบดอกกึ่งซ้อนมี 6-20 กลีบ กลีบเลี้ยงมี 5 กลีบ สีเขียว อับเรณูสีเหลืองล้อมรอบเกสรเพศเมียรวมเป็นกระจุกบริเวณกลางดอก ผลมีลักษณะกลม สีน้ำตาล เมล็ดค่อนข้างกลม เมล็ดอ่อนมีสีขาวอมเขียว เมล็ดแก่เป็นสีน้ำตาล เส้นผ่าศูนย์กลาง 2-4 มิลลิเมตร จำนวน 2-20 เมล็ด

ภาพที่ 2.3 ดอกกุหลาบสายพันธุ์บีชอปอังกฤษ
ที่มา : Itsamatterofrose (2014)

เขตการกระจายพันธุ์ : อังกฤษ อเมริกา ไทย เนเธอร์แลนด์ ประเทศไทยพบที่เชียงใหม่ เชียงราย ตาก กาญจนบุรี ราชบุรี นครปฐม สมุทรสาคร

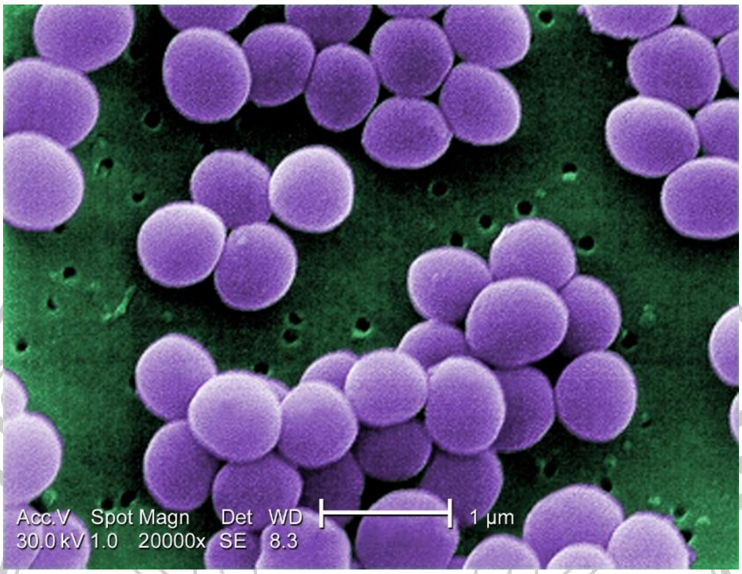
ฤดูออกดอก : ฤดูฝนช่วงเดือนพฤษภาคม – เดือนสิงหาคม
: ฤดูหนาวช่วงเดือนพฤศจิกายน – กุมภาพันธ์

สรรพคุณ/ประโยชน์ : ยาระบาย คลายเครียด แก้ไข้ เป็นวัตถุดิบในการสกัดน้ำมันหอมระเหย

2.1.4 เชื้อแบคทีเรีย

1) *Staphylococcus aureus* (สถาบันอาหาร กระทรวงอุตสาหกรรม, 2556.)

1.1) ลักษณะทั่วไปของเชื้อ “Staphylococcus” มาจากภาษากรีก “staphyle” หมายถึง ลักษณะที่เป็น กลุ่มคล้ายพวงองุ่น (grape-like cluster) ซึ่งคล้ายกับลักษณะการเรียงตัวของแบคทีเรียในวงศ์ Staphylococcaceae สกุล Staphylococcus สปีชีส์ *S. aureus* เป็นแบคทีเรียแกรมบวกเจริญได้ดีในสภาวะที่มีอากาศ ช่วงอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญเติบโตคือ 35-40 องศาเซลเซียส โคโลนีมีลักษณะกลม เรียงตัวเป็นกลุ่มคล้ายพวงองุ่นเป็นคู่ หรือเป็นสายสั้นๆไม่เคลื่อนที่ โคโลนีมีสีเหลืองหรือสีทอง



ภาพที่ 2.4 ลักษณะเซลล์ของ *Staphylococcus aureus*
ที่มา : วิกิพีเดีย สารานุกรมเสรี (2551)

1.2) แหล่งที่พบเชื้อ *Staphylococcus aureus*

เชื้อ *Staphylococcus aureus* พบได้ในอากาศ ฝุ่นละออง ขยะมูลฝอย น้ำ อาหาร นม รวมไปถึงอาหารบรรจุเสร็จ สภาวะแวดล้อมภายนอกมนุษย์และสัตว์จึงเป็นแหล่งของเชื้อชนิดนี้ โดยจะพบอยู่ตาม ทางเดินหายใจ ลำคอ เส้นผมและผิวหนัง

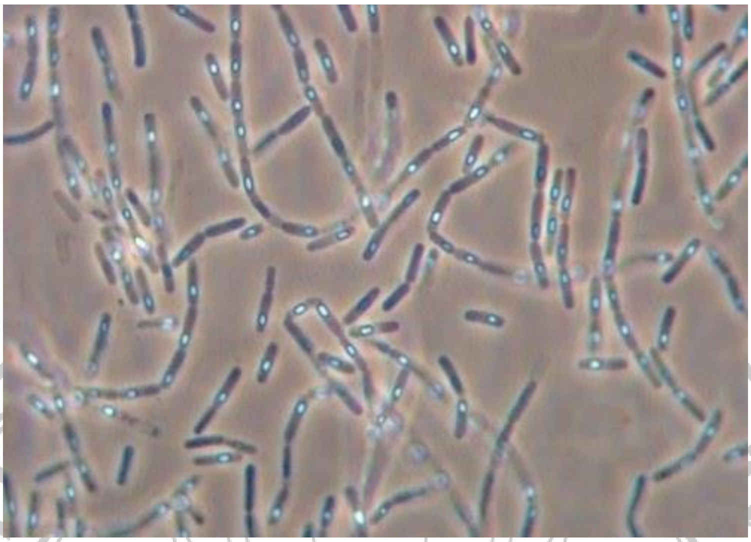
1.3) อาการของโรคที่เกิดจากเชื้อ *Staphylococcus aureus*

เมื่อเชื้อ *Staphylococcus aureus* เข้าสู่ร่างกาย ผู้ที่ได้รับเชื้อจะมีอาการคลื่นไส้ อาเจียน วิงเวียน เป็นตะคริวในช่องท้องและอ่อนเพลีย บางรายอาจมีอาการอื่นแทรกซ้อน เช่น มีอาการปวดหัว เป็นตะคริวที่กล้ามเนื้อ มีการเปลี่ยนแปลงความดันโลหิตเป็นระยะ ๆ รวมทั้งมีการเต้นของชีพจรผิดปกติ โดยทั่วไปอาการจะดีขึ้นภายใน 2-3 วัน

2) *Bacillus cereus* (สถาบันอาหาร กระทรวงอุตสาหกรรม, 2556)

2.1) ลักษณะทั่วไปของเชื้อ

เชื้อ *Bacillus cereus* อยู่ในวงศ์ Bacillaceae ซึ่งอยู่ในวงศ์เดียวกับ Clostridium และ Desulfotomaculum เคลื่อนที่ด้วยแฟลกเจลลา ต้องการออกซิเจนในการเจริญ เป็นแบคทีเรียที่ทนต่อความร้อน ทนต่อความแห้งแล้ง สารเคมี และสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมต่าง ๆ ได้ดี แบคทีเรียรูปร่างเป็นท่อน มีขนาด 0.3-2.2 × 1.2-7.0 ไมโครเมตร สร้างสปอร์และสร้างสารพิษ อุณหภูมิในการเจริญอยู่ระหว่าง 30-37 องศาเซลเซียส



ภาพที่ 2.5 ลักษณะเซลล์ของ *Bacillus cereus*
ที่มา : สถาบันอาหาร กระทรวงอุตสาหกรรม, 2556

2.2) แหล่งที่มักพบเชื้อ *Bacillus cereus*

เชื้อ *Bacillus cereus* พบได้ทั่วไปตามธรรมชาติ ในดิน ฝุ่นละออง ผลิตภัณฑ์จากพืช เช่น ข้าว ธัญพืช แป้ง เครื่องเทศ ผลิตภัณฑ์จากสัตว์ เครื่องปรุงแต่งรส นอกจากนี้ยังพบได้ในอุจจาระของคน

2.3) อาการของโรคที่เกิดจาก เชื้อ *Bacillus cereus*

เชื้อ *Bacillus cereus* เป็นแบคทีเรียที่สร้างสารพิษทำให้เมื่อเข้าสู่ร่างกายจะทำให้อาหารเป็นพิษ การเกิดอาการมี 2 ลักษณะ คือ อาการอาเจียน (Emetic syndrome) เกิดจากที่ร่างกายได้รับสารพิษ (intoxication) ที่แบคทีเรียสร้างขึ้นในอาหารก่อนที่จะบริโภคเข้าไป สารพิษนี้ทนอุณหภูมิสูง ทนความเป็นกรดในกระเพาะได้ดี ผู้ป่วยจะเกิดอาการคลื่นไส้และอาเจียน หลังจากการบริโภคอาหารที่มีสารพิษเข้าไปประมาณ 5 ชั่วโมง โดยทั่วไปอาการเป็นอยู่ไม่เกิน 24 ชั่วโมง โรคอาหารเป็นพิษลักษณะนี้ มักเรียกว่า Chinese restaurant syndrome และอาการถ่ายเหลว (Diarrhea syndrome) เกิดจากการบริโภคอาหารที่เซลล์ของแบคทีเรีย และเพิ่มจำนวนในลำไส้ของมนุษย์ ใช้เวลาฟักตัวประมาณ 8-16 ชั่วโมง มีสารพิษเอนเทอโรทอกซิน (enterotoxin) ที่ไม่ทนร้อน ทำให้เกิดอาการปวดท้อง เป็นตะคริวที่ท้อง และถ่ายอุจจาระเหลว โดยทั่วไปอาการเป็นอยู่ไม่เกิน14 ชั่วโมง ปริมาณเชื้อทำให้เกิดโรค (infective dose) 100-100,000 เซลล์ต่อกรัม

3) *Proteus mirabilis* (กฤตยาและคณะ, 2559)

3.1) ลักษณะทั่วไปของเชื้อ

เชื้อ *Proteus mirabilis* อยู่ในวงศ์ Enterobacteriaceae สกุล Proteus เป็นแบคทีเรียกลุ่มแกรมลบ มีรูปร่างเป็นท่อน เจริญได้ทั้งในภาวะที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน อาจไม่เคลื่อนที่ หรือ เคลื่อนที่ด้วย peritrichous flagella

ภาพที่ 2.6 ลักษณะเซลล์ของ *Proteus mirabilis*

ที่มา : กฤตยาและคณะ, 2559

3.2) แหล่งที่มักพบเชื้อ *Proteus mirabilis* (กฤตยาและคณะ, 2559)

พบในอาหาร ไข่ เนื้อ เป็นสาเหตุทำให้อาหารเน่าเสีย เช่น ไข่เมื่อเกิดการปนเปื้อน *Proteus* จะทำให้อาหารเกิดการเน่าเสีย มีการผลิตแก๊สไฮโดรเจนซันไฟด์ มีกลิ่นเหม็นเน่าคล้ายอุจจาระ เนื่องจากการย่อยสลายของโปรตีนในไข่ โดยเกิดกรดอะมิโน ที่มีซัลเฟอร์อยู่ในโมเลกุล และยังสามารถได้จากก้อนนิ่วและปัสสาวะของผู้ป่วยโรคนิ่วไต

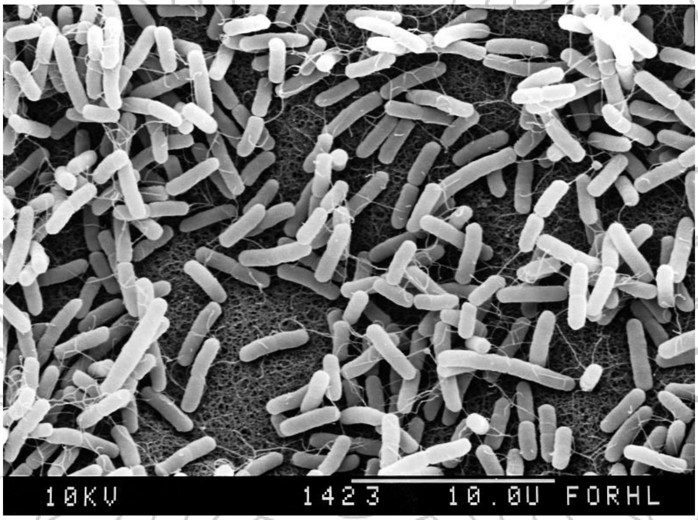
3.3) อาการของโรคที่เกิดจาก เชื้อ *Proteus mirabilis*

ที่มักพบองค์ประกอบทางเคมีในก้อนนิ่วเป็นแมกนีเซียม แอมโมเนียมฟอสเฟต โดยแบคทีเรียสร้างเอนไซม์ยูเรียเอสย่อยสลายยูเรียได้เป็นแอมโมเนีย และคาร์บอนไดออกไซด์ จากนั้นแอมโมเนียจะรวมตัวกับน้ำกลายเป็นแอมโมเนียมไอออน และไฮดรอกไซด์ไอออน ส่งผลให้ปัสสาวะมีความเป็นด่างมากขึ้น นอกจากนี้ยังทำให้เกิดฟอสเฟตไอออนเพิ่มขึ้น เมื่อแอมโมเนียมไอออนและฟอสเฟตไอออนรวมตัวกับแมกนีเซียมไอออนที่มีอยู่ในปัสสาวะส่งผลให้เกิดผลึกแมกนีเซียมแอมโมเนียมฟอสเฟตหรือสตรูไวท์

4) *Escherichia coli*

4.1) ลักษณะทั่วไปของเชื้อ

Escherichia coli เขียนย่อ คือ *E. coli* โดยสามารถจำแนกชั้นทางวิทยาศาสตร์ได้ดังนี้ โดเมน : แบคทีเรีย (Bacteria) อาณาจักร : ยูแบคทีเรีย (Eubacteria) ไฟลัม : Proteobacteria ชั้น : Gamma Proteobacteria อันดับ : Enterobacterialas วงศ์ : Enterobacteriaceae สกุล : Escherichia สปีชีส์ : *Escherichia coli* ลักษณะเป็นเซลล์รูปท่อน ขนาด 1.1-1.5 X 2.0-6.0 ไมโครเมตร แกรมลบ ไม่สร้างสปอร์ อาจเคลื่อนที่ด้วยฟาเจลลาหรือไม่เคลื่อนที่ สามารถเจริญได้ทั้งในสภาวะที่มีออกซิเจน (Aerobe) และสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน (facultative anaerobe) ปกติสามารถเจริญบนอาหารธรรมดาที่ใช้ในห้องปฏิบัติการที่ช่วงอุณหภูมิ 7 - 46 องศาเซลเซียส pH ที่เหมาะสมในการเจริญเติบโตอยู่ที่ 4.4 – 10



ภาพที่ 2.7 ลักษณะเซลล์ของ *Escherichia coli*

ที่มา : สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข, 2557

4.2) แหล่งที่มักพบเชื้อ *Escherichia coli* (สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข, 2557)

Escherichia coli พบได้ในลำไส้ของคนและสัตว์เลือดอุ่น โดยปกติจะไม่ทำอันตรายหรือก่อโรคร้ายแรง เมื่ออยู่ในลำไส้จะช่วยย่อยอาหารที่เรารับประทานเข้าไป

4.3) อาการของโรคที่เกิดจากเชื้อ *Escherichia coli*

Escherichia coli เมื่ออยู่ในลำไส้จะช่วยย่อยอาหาร แต่หากเชื้อ *Escherichia coli* ลุกล้ำเข้าสู่ระบบต่าง ๆ ของร่างกายก็จะทำให้เกิดโรคติดเชื้อรุนแรง เช่น โรคติดเชื้อระบบทางเดินปัสสาวะ โรคเยื่อหุ้มสมองอักเสบ และการติดเชื้อในกระแสเลือด เป็นต้น

2.1.5 การสกัดน้ำมันหอมระเหย

การสกัดน้ำมันหอมระเหยจากพืชธรรมชาติมีหลายวิธีด้วยกัน โดยการเลือกวิธีการสกัดน้ำมันหอมระเหยจะต้องพิจารณาลักษณะและปัจจัยต่าง ๆ ร่วมด้วย ตัวอย่างเช่น ส่วนของพืชที่นำมาสกัด คุณสมบัติทางเคมีและกายภาพของน้ำมันหอมระเหยที่ต้องการ วัตถุประสงค์ของการนำน้ำมันหอมระเหยไปใช้ ฯลฯ วิธีการสกัดน้ำมันหอมระเหยสามารถแบ่งออกได้ ดังต่อไปนี้ (ฐาปนีย์ หงส์รัตนาวรกิจ, 2550)

1) การกลั่น (Distillation)

การกลั่นเป็นวิธีหนึ่งที่นิยมใช้กันอย่างแพร่หลายในการสกัดน้ำมันหอมระเหย หลักการของ การกลั่น คือ ใช้น้ำร้อน หรือ ไอน้ำเข้าไปแยกน้ำมันหอมระเหยออกมาจากพืช โดยการแทรกซึมเข้าไปในเนื้อเยื่อพืช ความร้อนจะทำให้สารละลายออกมากลายเป็นไอ ปนมากับน้ำร้อน หรือ ไอน้ำ การกลั่นเพื่อให้ได้น้ำมันหอมระเหยที่มีคุณภาพดีนั้น ต้องอาศัยเทคนิคและขบวนการทางเคมี และกายภาพหลายอย่างประกอบกัน โดยทั่ว ๆ ไป เทคนิคการกลั่นน้ำมันหอมระเหยที่ใช้กันอยู่มี 3 วิธี ได้แก่

การกลั่นด้วยน้ำร้อน (Water and Hydro – distillation) เป็นวิธีที่ง่ายที่สุดของการกลั่นน้ำมันหอมระเหย การกลั่นโดยวิธีนี้ พื้นที่กลั่นต้องจุ่มในน้ำเดือดทั้งหมดอาจพบพืชบางชนิดเบาหรือให้ท่อไอน้ำผ่านการกลั่น น้ำมันหอมระเหยนี้ใช้กับของที่ติดกันง่าย ๆ เช่น ใบไม้บาง ๆ กลีบดอกไม้อ่อน ๆ ข้อควรระวังในการกลั่นโดยวิธีนี้ คือ พืชจะได้รับความร้อนไม่สม่ำเสมอ ตรงกลางมักจะได้ ความร้อนมากกว่าด้านข้าง จะมีปัญหาในการไหม้ของตัวอย่าง กลิ่นไหม้จะปนมากับน้ำมันหอมระเหยและมีสารไม่พึงประสงค์ติดมาในน้ำมันหอมระเหยได้ ก็คือใช้ไอน้ำร้อนหรืออาจใช้ Closed Steam Coil จุ่มในหม้อต้ม แต่การใช้ Coil นี้ไม่เหมาะกับดอกไม้บางชนิด เช่น กุหลาบ หากกลั่นโดยใช้ Steam Coil ไม่ได้ เพราะเมื่อกลีบกุหลาบถูก Steam Coil จะหดกลายเป็น Glutinous Mass จึงต้องใช้วิธีใส่ลงไปในน้ำ กลีบกุหลาบสามารถจะหมุนเวียนไปอย่างอิสระในการกลั่น เปลือกไม้ก็ เช่นกัน ถ้าใช้วิธีกลั่นด้วยน้ำ น้ำจะซึมเข้าไปและนำกลิ่นออกมา หรือกลิ่นจะแพร่กระจายออกจาก เปลือกไม้ได้ง่ายขึ้น ดังนั้น การเลือกใช้วิธีการกลั่นจึงขึ้นกับชนิดของพืชที่นำมากลั่นด้วย

การกลั่นด้วยน้ำ และไอน้ำ (Water and Steam distillation) การกลั่นโดยวิธีนี้ใช้ตะแกรงรองของที่จะกลั่นให้เหนือระดับน้ำในหม้อกลั่น ต้มให้เดือด ไอน้ำจะลอยตัวขึ้นไปผ่านพืชหรือตัวอย่างที่จะกลั่น ส่วนน้ำจะไม่ถูกกับตัวอย่างเลย ไอน้ำจากน้ำเดือดเป็นไอน้ำที่อิ่มตัว หรือเรียกว่า ไอเปียก ไม่ร้อนจัด เป็นการกลั่นที่สะดวกที่สุด คุณภาพของน้ำมันออกมาดีกว่าวิธีแรก การกลั่นแบบนี้ใช้กันอย่างกว้างขวางในการผลิตน้ำมันหอมระเหยทางการค้า

การกลั่นด้วยไอน้ำ (Direct steam distillation) วิธีนี้ วางของอยู่บนตะแกรงในหม้อกลั่น ซึ่งไม่มีน้ำอยู่เลย ไอน้ำภายนอกที่อาจจะเป็นไอน้ำเปียก หรือไอร้อนจัดแต่ความดันสูงกว่าบรรยากาศ ส่งไปตามท่อใต้ตะแกรง ให้ไอผ่านขึ้นไปถูกกับของบนตะแกรง ไอน้ำต้องมีปริมาณเพียง

พอที่จะช่วยให้น้ำมันแพร่ระเหยออกมาจากตัวอย่าง ตัวอย่างบางชนิดอาจใช้ไอร้อนได้ แต่บางชนิดก็ใช้ไอเปียก น้ำมันจึงจะถูกปล่อยออกมา

ข้อดีของการกลั่นวิธีนี้ คือ สามารถกลั่นได้อย่างรวดเร็ว เมื่อเอาพืชใส่หม้อกลั่นไม่ต้องเสียเวลารอให้ร้อน ปล่อยไอร้อนเข้าไปได้เลย ปริมาณของสารที่นำเข้ากลั่นก็ได้มาก ปริมาณทำให้ได้น้ำมันหอมระเหยมาก

การกลั่นทั้ง 3 วิธี ผู้ปฏิบัติควรพิจารณาด้วยว่า การแพร่กระจายของน้ำมันหอมระเหยและน้ำ ร้อยผ่านเยื่อบาง ๆ ของพืช การไฮโดรไลซ์สาร องค์ประกอบต่าง ๆ เนื่องจากสัมผัสกับน้ำตลอดเวลา ตลอดจนการสลายตัวของสารในน้ำมันหอมระเหย อันเนื่องมาจากความร้อนถึงแม้ว่าก่อนนำพืชมาก ลั่นจะต้องหั่นหรือทำให้เซลล์แตกก่อน เพื่อให้ได้น้ำมันหอมระเหยออกมาจากเซลล์ได้ง่าย แต่ถึงกระนั้น ก็ยังมีน้ำมันหอมระเหยบางส่วนที่อยู่ที่ผิวและถูกทำให้กลายเป็นไออย่างรวดเร็วด้วยไอน้ำ น้ำมันส่วนที่เหลือภายในจะออกมาสู่ผิวได้ โดยการซึมผ่านผนังบาง ๆ ของพืช และจะดำเนินไปได้ดีที่อุณหภูมิสูง สารประกอบพวกเอสเทอร์จะถูกไฮโดรไลซ์ให้เป็นกรด และแอลกอฮอล์ได้ง่าย ดังนั้นเพื่อให้ได้น้ำมันหอมระเหยที่มีคุณภาพดีที่สุด ควรกลั่นที่อุณหภูมิต่ำสุดเท่าที่จะทำได้หากได้น้ำมันน้อยควรใช้อุณหภูมิสูงขึ้น ใช้เวลาให้สั้นที่สุด การกลั่นจะต้องพิจารณาให้รอบคอบ วัดอุณหภูมิและเวลาให้อยู่ในช่วงที่เหมาะสมที่สุด

2) การสกัดด้วยน้ำมันสัตว์ (Extraction by animal fat)

ใช้กับน้ำมันหอมระเหยที่ระเหยได้ง่ายเมื่อใช้วิธีกลั่นด้วยไอน้ำ วิธีนี้จะใช้เวลานานเพราะต้องแช่พืชไว้ในน้ำมันหลายวัน ซึ่งน้ำมันจะช่วยดูดเอากลิ่นหอมของน้ำมันหอมระเหยออกมา วิธีนี้ใช้ในการสกัดน้ำมันหอมระเหยจากดอกมะลิ ดอกกุหลาบ เป็นต้น

การสกัดด้วยไขมันเย็น ไขมันมีคุณสมบัติในการดูดกลิ่นได้สูงมาก จึงนำไขมันมาดูดกลิ่นหอมของดอกไม้ ที่ส่งกลิ่นหอมมาก เช่น มะลิ ซ่อนกลิ่น ฯลฯ โดยเก็บดอกไม้สด เมื่อถึงช่วงเวลาที่ส่งกลิ่นหอมมาก ก็นำไปวาง บนไขมันที่เตรียมไว้ทิ้งไว้ประมาณ 24 ชั่วโมง นำดอกไม้เก่าไปสกัดน้ำมันโดยวิธีอื่น ๆ ส่วนดอกสดใหม่ มาวางอีก ทำเช่นนี้หลายๆ ครั้ง จนสิ้นฤดูดอกไม้ ต่อจากนั้นใช้แอลกอฮอล์ละลายน้ำมันหอมระเหย นั้น นอกจากนั้นแล้วนำไปแยกต่อไป โดยวิธีนี้ ไขมันที่ใช้ต้องสะอาดปราศจากกลิ่นและมีความแข็งแรงพอเหมาะ ถ้าแห้งไปจะดูด กลิ่นไม่ดี แต่ถ้านิ่มเกินไปจะเอาดอกไม้ออกแยกอุณหภูมิที่ทำใช้อุณหภูมิห้องสัดส่วนของไขมันมีดังนี้ ไขสัตว์ที่สะอาดมาก 1 ส่วน น้ำมันหมู 2 ส่วน ส่วนน้ำมันพืชนั้นไม่นิยมเท่าไขสัตว์

การสกัดด้วยไขมันร้อน ดอกไม้บางชนิด เช่น กุหลาบ ดอกส้ม ฯลฯ เมื่อเด็ดมาจากต้นแล้ว Physiological Activity จะหยุดทันทีไม่เหมือนกับมะลิ ซ่อนกลิ่น ฯลฯ ที่จะมีกลิ่นหอมออกมาตลอดเวลา เมื่อสกัดด้วยไขมัน ร้อนจะได้น้ำมันหอมระเหยมากและกลิ่นหอมกว่าสกัดด้วยไขมันเย็น วิธีการเตรียมไขมัน เช่นเดียวกับการสกัดด้วยไขมันเย็น แต่อุ่นไขมันให้ร้อนประมาณ 80 องสาเซลเซียส แช่ดอกไม้ลงไปประมาณครึ่ง ชั่วโมงแล้ว ทำให้เย็นสุดท้าย อุ่นให้ร้อนอีกครั้งเพื่อหลอมเหลวและกรองดอกไม้ออกล้างไขมันที่ติดมา ด้วยน้ำอุ่น หรือวางบนผ้ากรองบีบ หรือ ราดน้ำร้อน ชั้นของน้ำและไขมันจะแยกกันง่าย อาจใช้เซนติฟิวส์เข้าช่วยเอาดอกไม้ออกใช้ไขมันเติม เปลี่ยนดอกไม้สดหลายครั้งจนอิ่มตัว ไขมันร้อนมีกลิ่น น้ำมันหอมระเหยนี้เรียกว่า ปอมเปต เหมือนกับการสกัดด้วย

ไขมันเย็น แล้วนำแอลกอฮอล์ชนิดดีมาสกัดเอาน้ำมันหอมระเหยออกมาทำให้บริสุทธิ์อีกครั้งหนึ่ง จะได้น้ำมันหอมระเหยอย่างดีเยี่ยม เช่นเดียวกับการสกัดด้วยไขมันเย็น

การสกัดด้วยสารเคมี หรือ ตัวทำละลาย (Solvent extraction)

วิธีนี้จะได้น้ำมันหอมระเหยที่มีความเข้มข้นสูง แต่คุณภาพไม่ดีเท่าการกลั่น เพราะหลังจากการสกัดจะได้สารอื่นปนออกมาด้วย การสกัดแบบนี้จะได้น้ำมันหอมระเหยที่เรียกว่า absolute oil วิธีนี้ใช้กับพืชใช้กับพืชทนความร้อนสูงไม่ได้ เช่น มะลิ และที่สำคัญคือ หลังจากการสกัดต้องทำการระเหยสารเคมีที่ใช้เป็นตัวสกัดออกให้หมด สารเคมีที่นิยมใช้เป็นตัวสกัดคือแอลกอฮอล์

การสกัดด้วยตัวทำละลาย (Solvent extraction) เป็นวิธีที่ใช้กันอย่างกว้างขวางในอุตสาหกรรม เช่น การสกัดน้ำมันพืชเพื่อใช้ประกอบอาหาร โดยนำวัตถุดิบมาจากเมล็ดของพืชชนิดต่าง ๆ ได้แก่ เมล็ดทานตะวัน ถั่วเหลือง ปาล์ม ถั่วลิสง ข้าวโพด เมล็ดบัว งา และรำข้าว ในการสกัดน้ำมันพืชนิยมใช้เฮกเซนเป็นตัวทำละลาย หลังการสกัดจะได้สารละลายที่มีน้ำมันพืชละลายอยู่ในเฮกเซน จากนั้นนำไปกรองเอากากเมล็ดพืชออก แล้วนำสารละลายไปกลั่นแยกลำดับส่วนเพื่อแยกเฮกเซนจะได้น้ำมันพืช ซึ่งต้องนำไป ฟอกสี ดูดกลิ่น และกำจัดสารอื่น ๆ ออกก่อน จึงจะได้น้ำมันพืชสำหรับใช้ปรุงอาหาร ทั้งนี้ การสกัดด้วยตัวทำละลาย เป็นวิธีการแยกสารที่ใช้มากในชีวิตประจำวันเป็นการแยกสาร ที่ต้องการออกจากส่วนต่าง ๆ ของพืชหรือจากของผสมต้องเลือกตัวทำละลายที่เหมาะสมในการสกัดสารที่ต้องการด้วย

4) การคั้นหรือบีบ

ทำให้น้ำมันที่อยู่ในเปลือกของผลไม้ เช่น เปลือกพืชตระกูลส้ม ออกมาแต่น้ำมันหอมระเหยที่ได้จะมีปริมาณน้อยและไม่ค่อยบริสุทธิ์

5) การสกัดด้วยคาร์บอนไดออกไซด์เหลว

โดยปล่อยคาร์บอนไดออกไซด์ที่ถูกทำให้เป็นของเหลวที่ความดันสูงเป็นวิธีที่ปัจจุบันนิยมใช้มากเพราะจะได้น้ำมันหอมระเหยที่มีกลิ่นดี มีความบริสุทธิ์สูง แต่วิธีนี้มีต้นทุนการผลิตที่สูง

2.1.6 การสกัดสารจากดอกกุหลาบ

การสกัดสารสำคัญจากพืชอาจทำได้หลายวิธี ขึ้นอยู่กับชนิดของสารที่สกัด คุณสมบัติของสารในการทนต่อความร้อน และชนิดของตัวทำละลายที่ใช้ซึ่งแต่ละวิธีมีข้อดีและข้อจำกัดแตกต่างกัน ได้แก่ (วรพร ศีลศร, 2554)

1) การหมัก (Maceration) เป็นวิธีการสกัดสารสำคัญจากพืช โดยวิธีการหมักตัวอย่างพืชกับตัวทำละลายในภาชนะที่ปิด เช่น ขวดปากกว้าง ขวดรูปชมพู่ หรือโถที่ปิดสนิท ทิ้งไว้ 7 วัน หมั่นเขย่าหรือคนบ่อย ๆ เมื่อครบกำหนดเวลาจึงค่อย ๆ รินเอาสารสกัดออก พยายามบีบเอาสารละลายออกจากกากให้มากที่สุด รวมสารสกัดที่ได้แล้วนำไปกรอง อาจต้องสกัดซ้ำหลาย ๆ ครั้งเพื่อให้ได้สารสกัดทั้งหมด ข้อดีของวิธีนี้คือ สารไม่ถูกความร้อนแต่เป็นวิธีที่สิ้นเปลืองตัวทำละลายมาก

2) การแช่สกัดต่อเนื่อง (Percolation) เป็นวิธีสกัดสารสำคัญแบบต่อเนื่อง โดยใช้เครื่องมือ Percolator วิธีการคือ นำตัวอย่างพืชมาหมักกับตัวทำละลายพอชื้น ทิ้งไว้ 1 ชั่วโมง เพื่อให้พองตัวเต็มที่แล้วค่อย ๆ บรรจุตัวอย่างพืชทีละชั้นลงใน Percolator เติมตัวทำละลายลงไปให้ระดับ

ตัวทำละลายสูงเหนือตัวอย่างพืชประมาณ 0.5 เซนติเมตร ทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง จึงเริ่มไขเอาสารสกัดออก โดยการเติมตัวทำละลายเหนือตัวอย่างพืชอย่าให้แห้ง เก็บสารสกัดจนการสกัดเสร็จสมบูรณ์ บีบกากเอาสารสกัดออกให้มากที่สุด รวมสารสกัดที่ได้แล้วนำไปกรอง ข้อดีของวิธีนี้คือ เป็นการสกัดสารจากพืชได้สมบูรณ์และไม่ใช้ความร้อน แต่เป็นวิธีที่สิ้นเปลืองตัวทำละลายและใช้เวลาในการสกัดนาน

3) การสกัดแบบต่อเนื่อง (Soxhlet extractor) เป็นวิธีสกัดแบบต่อเนื่องโดยใช้ความร้อน ทำให้ตัวทำละลายใน Flask ระเหยขึ้นไป แล้วกลั่นตัวลงมาในทิมเบอร์ (Thimble) ซึ่งบรรจุตัวอย่างพืชไว้ เมื่อตัวทำละลายในเอกซ์แทรกติงแชมเบอร์ (Extracting chamber) สูงถึงระดับจะเกิดกาลักน้ำสารสกัดจะไหลกลับลงไปใน Flask ด้วยวิธีกาลักน้ำ Flask นี้ได้รับความร้อนจากฮีทติงแมนเทิล (Heating mantle) หรือหม้ออังน้ำ ตัวทำละลายจึงระเหยขึ้นไปทิ้งสารสกัดไว้ใน Flask ตัวทำละลาย เมื่อกระทบ Condensor จะกลั่นตัวกลับลงมาสกัดสารใหม่ วนเวียนเช่นนี้จนกระทั่งการสกัดสมบูรณ์ การสกัดด้วยวิธีนี้ ไม่สิ้นเปลืองตัวทำละลาย แต่มีการใช้ความร้อนอาจทำให้สารสำคัญบางตัวสลายไป

2.1.7 การเลือกตัวทำละลายในการสกัดสารสำคัญของพืช

ตัวทำละลายที่เหมาะสมสำหรับใช้ในการสกัดสารจากพืชต้องมีคุณสมบัติดังนี้ คือ เป็นตัวทำละลายที่ละลายสารที่ต้องการสกัดได้ดี ไม่ระเหยง่ายหรือยากเกินไป ไม่ทำปฏิกิริยากับสารที่ต้องการสกัด ไม่เป็นพิษ และราคาไม่แพง ดังนั้นการเลือกใช้ตัวทำละลายอาศัยหลักเกณฑ์ ดังนี้

1) สารละลายและตัวทำละลายมีคุณสมบัติความมีขั้วคล้ายคลึงกัน

2) ละลายสารที่ต้องการออกมามากที่สุดขณะที่ละลายสารที่ไม่ต้องการออกมาน้อยที่สุด

3) แรงที่เกี่ยวข้องในการละลาย ได้แก่ แรงแผ่กระจาย (Dispersion force) แรงดึงดูดระหว่างขั้ว (Dipole dipole force) และพันธะไฮโดรเจน (Hydrogen bonding)

โดยทั่วไปแล้วตัวทำละลายที่มีขั้วเหมาะกับสารที่มีขั้ว และตัวทำละลายที่ไม่มีขั้วเหมาะกับสารที่ไม่มีขั้ว การผสมระหว่างตัวทำละลายที่มีขั้วและไม่มีขั้ว อาจทำให้การละลายดีขึ้น บางครั้งการเลือกตัวทำละลายอาจพิจารณาสูตรโครงสร้างทางเคมีของสารตัวทำละลายอาจจัดเรียงตามลำดับความมีขั้วจากน้อยไปมากดังนี้ เฮกเซน ไดคลอโรมีเทน คลอโรฟอร์ม เอทิลอะซิเตต อะซิโตน เอทานอล เมทานอล และน้ำ ตัวทำละลายที่นิยมใช้ ได้แก่

1) เฮกเซน (Hexane) เหมาะสำหรับสารที่ไม่มีขั้ว มักใช้เป็นตัวทำละลายเหมาะสำหรับกำจัดไขมันจากตัวอย่างพืช และมีราคาถูก

2) อีเทอร์ (Ether) ความสามารถในการละลายน้อยกว่า Chloroform แต่มี selectivity ดีกว่า

3) คลอโรฟอร์ม (Chloroform) เป็นตัวทำละลายที่ดี แต่มี selectivity น้อย เกิดอิมัลชันง่าย ข้อเสีย ระเหยง่าย ระเบิดง่าย เกิดออกไซด์ได้ง่ายและดูดน้ำได้มาก

4) แอลกอฮอล์ (Alcohol) นิยมใช้เมทานอล และเอทานอล เป็นตัวทำละลายในการสกัดสารสำคัญ เนื่องจากมีความสามารถในการละลายกว้างมาก หาง่ายและราคาไม่แพงโดยตัวทำละลายที่ผู้วิจัยเลือกใช้ในการวิจัยนี้คือ เมทานอล เนื่องจากเมทานอลเป็นสารที่มีขั้วสูง สามารถสกัดสารที่มีขั้วจากสารตัวอย่างได้ดีกว่า จากงานวิจัยพบว่าเมทานอลสามารถสกัดสารพฤกษเคมีได้ดีกว่าตัวทำละลายชนิดอื่น ๆ ดังตารางที่ 2.1

ตารางที่ 2.1 ตัวอย่างสารพฤกษเคมีที่สกัดได้จากตัวทำละลายที่แตกต่างกัน

Water	Ethanol	Methanol	Choloroform	Dichoromethanol	Ether	Acetone
Anthocyanin	Tannins	Anthcyanin	Terpenoids	Terpenoids	Terpenoid	Flavones
Tannins	Polyphenol	Terpenoids	Flavones		Alkaloids	
Saponins	Flavonol	Tannins				
Terpenoids	Terpenoids	Saponins				
	Alkaloids	Flavones				
		Polyphenols				

2.1.8 การทำสารสกัดให้เข้มข้น

เมื่อสกัดสารจากพืชด้วยตัวทำละลายที่เหมาะสมแล้ว สารสกัดที่ได้จะมีปริมาตรมากและเจือจาง ทำให้นำไปแยกองค์ประกอบได้ไม่สะดวกและไม่มีประสิทธิภาพ จึงต้องนำมาทำให้เข้มข้นก่อน ซึ่งอาจทำได้หลายวิธี ได้แก่ (รัตนา อินทรานุปกรณ์, 2550)

1) การระเหย (Free evaporation) การระเหยให้แห้งโดยใช้ความร้อนจากหม้ออังไอน้ำ (Water bath) หรือแผ่นความร้อน (Hot plate) วิธีนี้อาจทำให้องค์ประกอบในสารสกัดสลายตัวได้เนื่องมาจากอุณหภูมิสูงเกินไป

2) การกลั่นในสภาวะสุญญากาศ (Distillation in vacuum) เป็นการระเหยเอาตัวทำละลายออกจากสารสกัดโดยกลั่นที่อุณหภูมิต่ำ พร้อมทั้งลดความดันลงให้เกือบเป็นสุญญากาศโดยใช้ปั๊มสุญญากาศ (Vacuum pump) เครื่องมือนี้เรียกว่า เครื่องระเหยแบบลดความดัน (Rotary evaporator)

3) การทำให้แห้ง (Drying) เป็นการระเหยเอาตัวทำละลายออกจากสารสกัดจนแห้งได้สารสกัดออกมาในสภาพของแข็งหรือกึ่งของแข็ง เช่น การใช้ความเย็น (Freeze dryer) หรือการใช้ความร้อน (Spray dryer) เป็นต้น

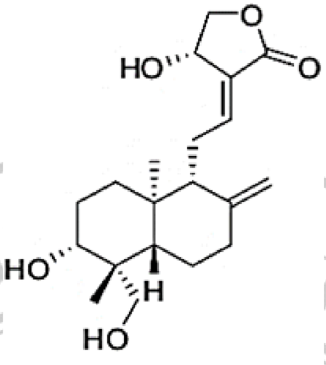
4) อัลตราฟิลเทรชั่น (Ultrafiltration) เป็นการทำสารสกัดด้วยน้ำ ให้เข้มข้นโดยใช้แผ่นเมมเบรน (Membrane) ใช้กับสารที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงกว่า 5,000 จากที่กล่าวมาในเบื้องต้นจะพบว่าการสกัดสารสำคัญจากพืช การเลือกใช้ตัวทำละลายและการทำสารสกัดให้เข้มข้นทำได้หลายวิธี ในงานวิจัยนี้ผู้วิจัยได้เลือกใช้วิธีการสกัดสารจากดอกกล้วยไม้ป่า ด้วยวิธีการหมัก (Maceration) เนื่องจากมีความเหมาะสมในการสกัดส่วนของดอก ซึ่งมีโครงสร้างหรือเนื้อเยื่อที่ไม่แข็งแรงมาก ทั้งยังเป็นวิธีที่ไม่ใช้ความร้อนโดยจะไม่ทำให้สารสำคัญบางตัวสลายไปและใช้เมทานอลเป็นตัวทำละลายตลอดจนวิธีการทำสารสกัดให้เข้มข้นด้วยวิธีการกลั่นในสภาวะสุญญากาศ

2.1.9 สารพฤกษเคมีเบื้องต้น (Phytochemical)

สารพฤกษเคมี (Phytochemical) เป็นสารเคมีชนิดต่าง ๆ ที่พบในพืช ซึ่งจะพบสารเป็นจำนวนมากในพืช สามารถแบ่งกลุ่มสารเคมีในพืชตามสารตั้งต้น (Biosynthetic origin) แบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม คือ สารปฐมภูมิ (Primary metabolites) และสารทุติยภูมิ (Secondary metabolites) ซึ่งสารปฐมภูมิเป็นสารเคมีพื้นฐานที่พบในพืชชั้นสูงโดยทั่วไป พบได้ในพืชเกือบทุกชนิด ส่วนใหญ่เป็นสารที่ได้จากกระบวนการสังเคราะห์แสงของพืชและกระบวนสังเคราะห์กรดอะมิโนบางชนิด เช่นคาร์โบไฮเดรต ไขมัน โปรตีน ส่วนสารทุติยภูมิเป็นสารประกอบที่พบแตกต่างกันในพืชแต่ละชนิด สารเหล่านี้เกิดจากกระบวนการชีวสังเคราะห์ในพืช สารเหล่านี้มักจะแสดงฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาอย่างชัดเจน ได้แก่ แอลคาลอยด์ (Alkaloids), แอนทราควิโนน (Anthraquinones), ซาโปนิน (Saponins), คูมาริน (Coumarins), แทนนิน (Tannins), สเตียรอยด์ (Steroids), เทอร์ปีนอยด์ (Terpenoids) หรือเทอร์พีน (Terpenes), สารประกอบพอลิฟีนอลิก (Polyphenolic compound) เช่น ฟลาโวนอยด์ (Flavonoids) เป็นต้น โดยสารสำคัญที่มักจะพบในดอกกุหลาบ มีดังนี้ (จุฑารัตน์ ศรีประเสริฐ, 2559 ; ศุภชัย โพธิ์ล้อม และคณะ, 2559 ; นิสา จุลโพธิ์, 2559)

1) เทอร์พีนอยด์ (Terpenoid) เป็นสารทุติยภูมิที่พบมากที่สุดในธรรมชาติ เป็นไฮโดรคาร์บอนชนิดที่ไม่อิ่มตัว ถ้าอยู่ในรูปของเหลวสามารถติดไฟได้ ที่พบได้ทั่วไป เช่น น้ำมันหอมระเหย เรซิน หรือ โอเรซิน เป็นต้น เทอร์พีนอยด์จะประกอบด้วยหน่วยของไอโซพรีน (Isoprene) ที่มีคาร์บอน 5 อะตอม (C_5H_8) ซึ่งมีการแบ่งประเภทของเทอร์พีนอยด์ออกเป็นหลายประเภท เช่น เซสควิเทอร์พีน (Sesquiterpene ; C_{15}) เป็นส่วนประกอบสำคัญของน้ำมันหอมระเหยหลายชนิด ไดเทอร์พีนส์ (Diterpenes ; C_{20}) เป็นองค์ประกอบพื้นฐานในเรซิน และแท๊กซอล ที่ใช้เป็นสารต้านมะเร็งและไตรเทอร์พีนส์ (Triterpenes ; C_{30}) เป็นองค์ประกอบในสารกลุ่มสเตอรอยด์ สเตอรอล และคาร์ดิแอกไกลโคไซด์ ที่ใช้เป็นยาออกฤทธิ์ต้านการอักเสบยาระงับความรู้สึกและ ยาฆ่าแมลง

การทดสอบเทอร์พีนอยด์ด้วยปฏิกิริยาการเกิดสี โดยสามารถทดสอบเฉพาะเทอร์พีนบางชนิดเท่านั้น ที่สามารถทำปฏิกิริยากับรีเอเจนต์ แล้วเกิดสี เช่น การทดสอบแซลโควสกิ (Salkowski test) โดยสกัดพืชด้วยอีเทอร์ แล้วเติมคลอโรฟอร์ม และกรดซัลฟิวริกเข้มข้นเล็กน้อย จะปรากฏสีน้ำตาลแดงตรงรอยต่อของสารละลายใช้สำหรับการทดสอบเทอร์พีนอยด์ทั่วไป และรีเอเจต์ 2,6 ไดเทอร์ต บิวทิล พารา ครีซอล (2,6-di-tert-butyl-p-cresol) ในเอทานอลจะปรากฏสารละลายสีม่วง ใช้ทดสอบแพนตะไซคลิกไทรเทอร์พีน (Pentacyclic triterpenes)



Andrographolide

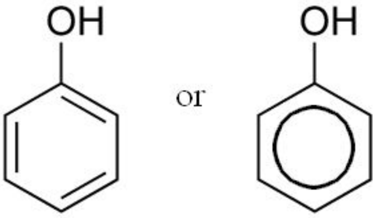
ภาพที่ 2.8 ตัวอย่างโครงสร้างของสารกลุ่มเทอร์พีนอยด์ หรือ เทอร์พีน
ที่มา : (จุฑารัตน์ ศรีประเสริฐ, 2559)

2) สารประกอบฟีนอลิก (Phenolic Compounds) สารประกอบฟีนอลิกเป็นกลุ่มสารที่พบมากในพืช มีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระต้านการอักเสบ ป้องกันความเสียหายที่เกิดจากรังสีอัลตราไวโอเลต และป้องกันการสร้างสารก่อมะเร็งสารกลุ่มนี้ถูกจำแนกตามโครงสร้างทางเคมีออกเป็นกลุ่มย่อยหลายกลุ่ม ซึ่งสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ (Flavonoids) เป็นหนึ่งในกลุ่มย่อยเหล่านี้ ที่มีการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และถูกนำมาใช้ประโยชน์ เป็นอาหาร ยา และเครื่องสำอางกันอย่างแพร่หลายในปัจจุบัน สารประกอบฟีนอลิกมีโครงสร้างพื้นฐาน คือ สารที่มีสูตรโครงสร้างที่มีหมู่ไฮดรอกซิล (OH group) บนวงแหวนอะโรมาติก (Aromatic ring) ตั้งแต่ 1 หมู่ขึ้นไป สารในกลุ่มนี้จึงมีคุณสมบัติที่ละลายน้ำได้ดี พบได้ในพืช ผัก และผลไม้ทั่วไป อาจแบ่งออกได้เป็น 3 กลุ่มใหญ่ ๆ ดังนี้ (นิสา จุลโพธิ์, 2559 ; พิมพ์เพ็ญ พรเฉลิมพงศ์ และนิธิยา รัตนาปนนท์, 2010)

1) ฟีนอลทั่วไป กรดฟีนอลิก และอนุพันธ์ เช่น Gallic acid, Ellagic acid, Tannic acid, Vanillin, Catechol, Resorcinol และ Salicylic acid เป็นต้น สารกลุ่มนี้พบได้ในผลไม้หลายชนิด เช่นRaspberry และ Blackberry

2) ฟีนิลโพรพานอยด์ ได้แก่ สารประกอบฟีนอลิกที่วงแหวนอะโรมาติก มีสายโซ่คาร์บอน 3 คาร์บอนเกาะอยู่ แยกย่อยออกได้หลายกลุ่ม ได้แก่ Hydroxycinnamic acid (Ferulic acid Caffeic acid หรือ Coumaric acid) Coumarins (Umbelliferone Scopoletin Aesculetin หรือ Psoralen) Lignans (Pinoresinol Eugenol หรือ Myristicin) พบได้ในแอปเปิ้ล แพร์ และกาแฟ

3) ฟลาโวนอยด์ เป็นกลุ่มสำคัญของสารประกอบฟีนอลิก ได้แก่ สารที่มีสูตรโครงสร้างเป็น C_6-C_3-C_6 แยกย่อยออกได้เป็นหลายกลุ่ม ได้แก่ Catechins Proanthocyanins Anthocyanidines Flavones Flavovols Flavonones และ Isoflavones จากการที่พบ Flavonoid ได้อย่างกว้างขวาง ทั้งพืช ผัก ผลไม้ รวมทั้งเครื่องดื่มที่เตรียมมาจากพืช เช่น ชา พบว่าในใบชาจะมี Catechins อยู่ถึง 30% ของน้ำหนักแห้ง และเชื่อว่าเป็นสารสำคัญในการออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และ Chemoprevention โดย Anthocyanins เป็นสารที่มีสีในพืช ส่วนกลุ่ม Flavones Flavonols และ Isoflavones จะพบได้ทั่วไปและเชื่อว่าเป็นสารที่มีประโยชน์ต่อร่างกาย



ภาพที่ 2.9 โครงสร้างพื้นฐานของสารประกอบฟีนอลิก
ที่มา : (Vermerris & Nicholson, 2006)

สารประกอบฟีนอลิก (AH) มีสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระ ทำหน้าที่ยับยั้งการเกิดออกซิเดชันของไขมัน โดยการให้ไฮโดรเจนอะตอมแก่อนุมูลอิสระ ดังสมการที่ 2.1 และ 2.2

$$ROO\cdot + AH \rightarrow ROOH + A\cdot \qquad (2.1)$$

$$RO\cdot + AH \rightarrow ROH + A\cdot \qquad (2.2)$$

เมื่อสารประกอบฟีนอลิกให้ไฮโดรเจนอะตอมแก่อนุมูลอิสระไปแล้ว อนุมูลอิสระของสารประกอบฟีนอลิกจะค่อนข้างมีความเสถียร เนื่องจากเกิดการเคลื่อนย้ายของอิเล็กตรอนในวงแหวนเบนซีน และทำให้ไม่มีตำแหน่งที่เหมาะสมต่อการเข้าจับของโมเลกุลออกซิเจน (Shahidi &Naczk, 2004) นอกจากนี้ อนุมูลอิสระของสารประกอบฟีนอลิกบางชนิดยังคงสามารถรวมตัวกับอนุมูลอิสระอื่นได้อีกด้วย ดังสมการที่ 2.3 และ 2.4

$$ROO\cdot + A\cdot \rightarrow ROOA \qquad (2.3)$$

$$RO\cdot + A\cdot \rightarrow ROA \qquad (2.4)$$

โดยความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารประกอบฟีนอลิกนั้นขึ้นอยู่กับตำแหน่ง และหมู่แทนที่บนวงแหวนเบนซีน เช่น การมีหมู่ไฮดรอกซิลลำดับที่ 2 ที่ตำแหน่งออร์โท (Ortho-) และพารา (Para-) ของสารประกอบฟีนอลิก จะไปเพิ่มสมบัติการต้านอนุมูลอิสระ โดยการแทนที่ตรงตำแหน่งของออร์โท และพารา หมายถึง หมู่แทนที่ทั้งสองหมู่นั้นอยู่ที่ตำแหน่ง 1,2- และ 1,4- ของกันและกันในวงแหวนเบนซีน ตามลำดับ นอกจากนี้ การแทนที่ของหมู่แอลคิลที่ตาแหน่งออร์โท และพารา ก็มีผลต่อการเพิ่มสมบัติการต้านอนุมูลอิสระเช่นกัน (Shahidi & Naczk, 2004) โดยสารประกอบที่สำคัญและพบมากที่สุดในกลุ่มสารประกอบฟีนอลิก ได้แก่ ฟลาโวนอยด์

การหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม (Total Phenolic Content) มีหลักการคือ เป็นการวัดปริมาณความเข้มข้นของสารประกอบทั้งหมดที่มีหมู่ไฮดรอกซิลที่อยู่ในโมเลกุล โดยไม่คำนึงถึงปริมาณน้ำหนักโมเลกุลของสารประกอบฟีนอลิกนั้น ๆ ดังนั้นการวิเคราะห์ในรูปแบบนี้จึงไม่มีการระบุชนิดและโครงสร้างของสารประกอบฟีนอลิกที่มีอยู่ในสารตัวอย่าง การวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกด้วยวิธีโฟลิน ซิโอแคลตู (Folin-Ciocalteu method) โดยใช้หลักการแตกตัวของฟี-นอลิกเป็นโปรตอน

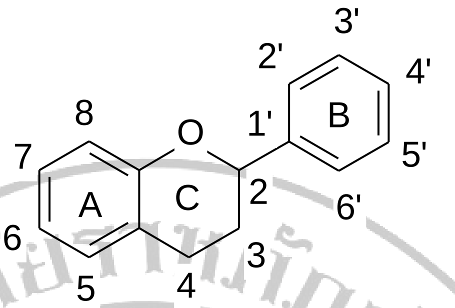
และไอออนลบของฟีนอลเลท (Phenolate) ซึ่งไอออนลบจะไปรีดิวซ์ ฟอลินซิโอแคลตูรีเอเจนต์ (Folin-Ciocalteu reagent) ได้เป็นสารละลายสีน้ำเงิน ดังสมการที่ 2.5-2.7 การวิเคราะห์ฟีนอลิกจึงเป็นการวัดความสามารถของการรีดิวซ์ในลักษณะเดียวกับการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ การศึกษาส่วนใหญ่จึงพบความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงระหว่างฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระกับปริมาณฟีนอลิก อย่างไรก็ตามยังมีสารชนิดอื่นที่ไม่ใช่ฟีนอลิก เช่น กรดอินทรีย์ กรดแอสคอบิก และอื่น ๆ อีกมาก ที่สามารถรีดิวซ์โฟลิน ซิโอแคลตูรีอเจนต์ ได้สีน้ำเงินเช่นเดียวกัน สำหรับการวิเคราะห์นี้จะใช้กรดแกลลิก (Gallic acid) เป็นสารมาตรฐานแล้วรายงานอยู่ในรูปของ Gallic acid equivalents (GAE) ในรูปมิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อกรัมตัวอย่าง (mg GAE.g^{-1}) (วรานนท์ ทองอินลา และคณะ, 2557)

Na_2WO_4 / Na_2MO_4 สีเหลือง $\rightarrow$ (Phenol - $MoW_{11}O_{40})^{-4}$ สีน้ำเงิน (2.5)

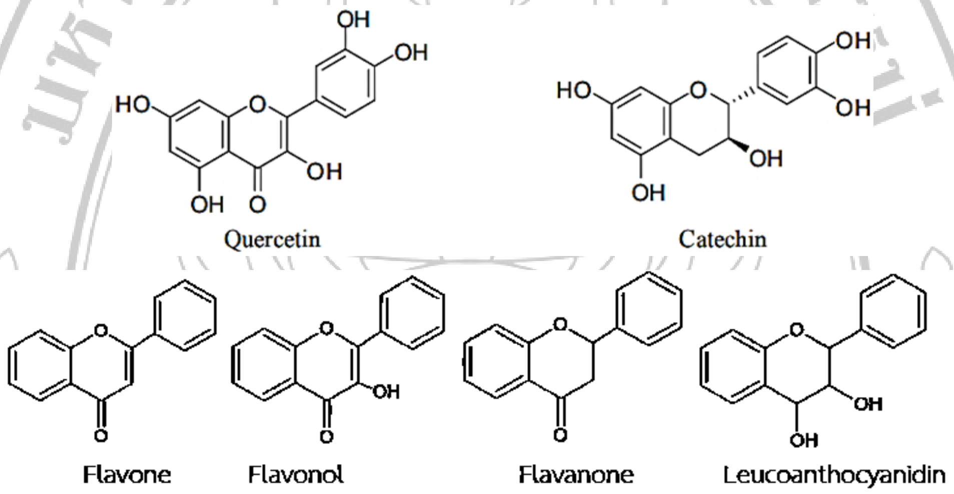
Mo^{+6} สีเหลือง + e^{-1} $\rightarrow$ Mo^{+5} สีน้ำเงิน (2.6)

Mo^{+5} + e^{-1} $\rightarrow$ Mo^{+4} สีน้ำเงิน (2.7)

3) ฟลาโวนอยด์ (Flavonoids) พบได้ทุกส่วนของพืช เป็นสารมีสีทำให้ดอกไม้มีสีสันสวยงาม มีโครงสร้างหลัก ได้แก่ ฟีนิลเบนซิล-แกมมา-ไพโรน (C_6-C_3-C_6) คุณสมบัติของฟลาโวนอยด์ คือ เป็นสารโพลีฟีนอล (Polyphenolic compound) ส่วนใหญ่เป็น o glycoside พบเป็น c glycoside บ้าง และน้ำตาลมักจับตำแหน่ง 3, 5 หรือ 7 ของ Aglycone ฟลาโวนอยด์มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาหลายอย่าง เช่น ต้านอนุมูลอิสระ(antioxidant) ต้านการเกิดมะเร็ง (anticancer) ยับยั้งการแบ่งตัวและเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็ง(antiproliferation) ต้านการอักเสบ antiinflammation) เป็นต้น สาระสำคัญกลุ่มนี้ได้แก่ Hesperidin และ Rutin ซึ่งมีฤทธิ์ทำให้ผนังเส้นเลือดฝอยแข็งแรง ไม่เปราะ ใช้รักษาโรคริดสีดวงทวาร และในธรรมชาติจะพบฟลาโวนอยด์ทั้งในรูปอิสระและในรูปไกลโคไซด์ สารในกลุ่มฟลาโวนอยด์ที่อยู่ในรูปไกลโคไซด์ อาจเรียกว่า ฟลาโวนอยด์ไกลโคไซด์ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาต่อมนุษย์และสัตว์แตกต่างกันมากมาย เช่น ฤทธิ์ต้านการอักเสบ ต้านไวรัส ตัวอย่างเช่น Quercetin และ Catechin

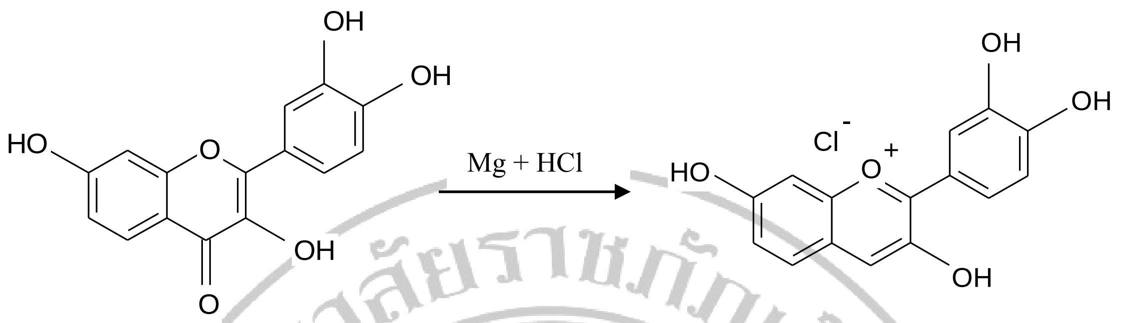


ภาพที่ 2.10 โครงสร้างพื้นฐานของฟลาโวนอยด์
ที่มา : (Bravo, 1998)



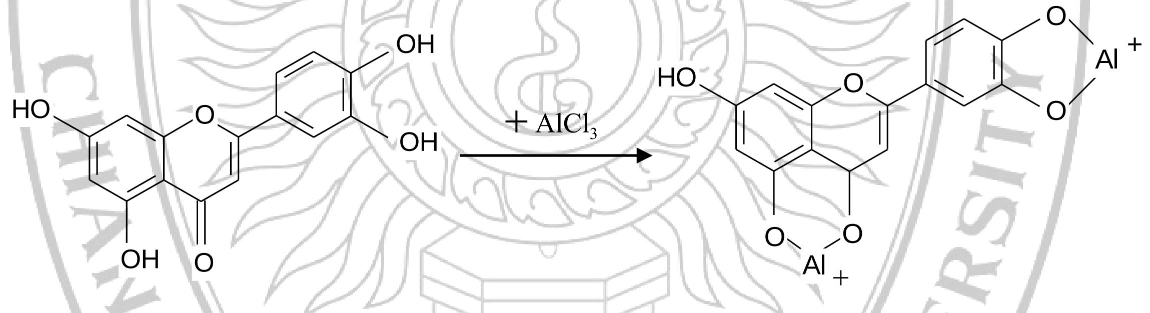
ภาพที่ 2.11 ตัวอย่างโครงสร้างของสารกลุ่มฟลาโวนอยด์
ที่มา : (จุฑารัตน์ ศรีประเสริฐ, 2559)

การทดสอบฟลาโวนอยด์ด้วยปฏิกิริยาการเกิดสีส่วนใหญ่ จะทดสอบโดยใช้ปฏิกิริยาไซยา-นิดิน (Cyanidin reaction) ประกอบด้วยโลหะแมกนีเซียมและกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น ดังรูปให้ผลการทดสอบเฉพาะฟลาโวนอยด์ที่มีฟีนิลเบนซิล แกมมา ไพโรนซึ่งเป็นโครงสร้างหลัก กล่าวคือ สีส้มถึงสีแดง แสดงว่ามีฟลาโวน สีแดงถึงสีแดงเข้มหรือ สีแดงเลือดหมู (Crimson) แสดงว่ามีฟลา-โวนอล สีแดงเข้มถึงสีแดงอมม่วง (Margenta) แสดงว่ามีฟลาโวโนนไกลโคไซด์ ความเข้มข้นของสีที่เกิดขึ้นจะขึ้นอยู่กับปริมาณของฟลาโวนอยด์ บางครั้งอาจเห็นสีไม่ชัดเจน เนื่องจากสีของสารสกัดบดบัง แก้ไขโดยเติมออกทิลแอลกอฮอล์ (Octyl alcohol) ลงไป เพื่อทำให้มองเห็นสีที่ชัดเจนขึ้น



ภาพที่ 2.12 การเกิดปฏิกิริยาไซยานิดินของสารในกลุ่มฟลาโวนอยด์
ที่มา : (Bravo, 1998)

การหาปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ (Flavonoid Compound) โดยวิธีการวิเคราะห์การเปรียบเทียบความเข้มของสี (Colorimetric method) โดยใช้อะลูมิเนียมคลอไรด์ ($AlCl_3$) มีหลักการคือ สารประกอบฟลาโวนอยด์รวมจะใช้ Phenolic hydroxyl groups ทำปฏิกิริยากับอะลูมิเนียมคลอ-ไรด์ ($AlCl_3$) แล้วเกิดสารประกอบเชิงซ้อนที่มีสีเหลือง ดังรูป และดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 415นาโนเมตร จากนั้นนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปวัดหาปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์จากกราฟมาตรฐาน ในการวิเคราะห์นี้ใช้เคอร์ซิติน (Quercetin) เป็นสารมาตรฐานแล้วรายงานอยู่ในรูปของ Quercetin equivalent (QE) ในรูปมิลลิกรัมสมมูลของเคอร์ซิตินต่อกรัมตัวอย่าง (mg QE.g^{-1}) (นิสา จุลโพธิ์, 2559)



ภาพที่ 2.13 ปฏิกิริยาการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนโดยใช้ $AlCl_3$
ที่มา : (นิสา จุลโพธิ์, 2559)

2.1.10 อนุมูลอิสระ (Free radical)

อนุมูลอิสระ (Free radical) เป็นสารที่มีอิเล็กตรอนอิสระอยู่ในวงนอกของอะตอม หรือ โมเลกุล จึงมีความว่องไวในการเข้าทำปฏิกิริยา โดยรับอิเล็กตรอนจากสารอื่น ๆ ใกล้เคียง เป็นผลให้ตัวเองเสถียรขึ้น ในขณะเดียวกันก็ชักนำให้สารที่ให้อิเล็กตรอนไปนั้น มีอิเล็กตรอนไม่ครบคู่ จนอาจกลายเป็นสารที่มีความรุนแรง ซึ่งถ้าเกิดขึ้นในระบบสิ่งมีชีวิต อาจทำอันตรายกับส่วนประกอบสำคัญของเซลล์รอบ ๆ บริเวณนั้น ไม่ว่าจะเป็น โปรตีน ไขมัน คาร์โบไฮเดรต หรือ ดีเอ็นเอ ทำให้สารชีว

โมเลกุลเหล่านี้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้าง และเสียหน้าที่ในการทำงาน ดังนั้น ในสภาวะที่มีการสร้างอนุมูลอิสระเป็นจำนวนมาก จะก่อให้เกิดการบาดเจ็บของเซลล์ ซึ่งเป็นกลไกสำคัญที่ก่อให้เกิดพยาธิสภาพต่าง ๆ ได้ เช่น โรคมะเร็ง โรคหลอดเลือดหัวใจ โรค Parkinson โรค Alzheimer ไขข้ออักเสบ และต้อกระจก เป็นต้น (Ames *et al*., 1993)

แต่อย่างไรก็ตาม มีบางภาวะที่ปริมาณอนุมูลอิสระมีมากเกินกว่าที่ระบบแอนตีออกซิแดนท์จะจัดการได้ จะเกิดภาวะที่เรียกว่า oxidative stress ขึ้น ก่อให้เกิดผลเสียต่อเซลล์ และการทำลายเซลล์

ตัวอย่างของอนุมูลอิสระ เช่น ซุปเปอร์ออกไซด์ (Superoxide anion radical, O_2•), ไฮดรอกซิล (Hydroxyl radical, OH•), เปอร์ออกซิล (Peroxyl radical, ROO•), ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (Hydrogen peroxide, H_2O_2), โอโซน (Ozone, O_3) เป็นต้น

อนุมูลอิสระในร่างกายของมนุษย์แบ่งออกเป็น 2 แบบ คือ

1) อนุมูลอิสระที่เกิดภายในร่างกาย เป็นผลจากการที่ภายในร่างกายของเรามี กระบวนการเมแทบอลิซึม (Metabolism) เกิดขึ้นตลอดเวลา ซึ่งเป็นผลจากปฏิกิริยาเคมี และกิจกรรมของเซลล์ในร่างกาย ที่ต้องดาเนินการตามปกติ ตัวอย่างเช่น ในกระบวนการหายใจจะเกิดออกซิเจนที่มีประจุลบ ซึ่งก็คืออนุมูลอิสระ สารตัวนี้สามารถรวมตัวกับไขมัน LDL (Low Density Lipoproteins) ได้ดี และยังสามารถรวมตัวกับสารบางชนิดในร่างกายก่อให้เกิดสารพิษที่ทำลายเนื้อเยื่อ หรืออาจไปเปลี่ยนแปลงข้อมูลทางพันธุกรรมในดีเอ็นเอ ทำให้เซลล์ปกติเปลี่ยนสภาพไปเป็นเซลล์มะเร็ง เป็นต้น นอกจากนี้ การทำงานของเอนไซม์มีผลต่อการสร้างอนุมูลอิสระภายในร่างกาย เช่น เอนไซม์ลิพอกซีจีเนส (Lipoxygenase) ทำหน้าที่เร่งการออกซิเดชันของกรดไขมันไม่อิ่มตัวสูง (Polyunsaturated acid) ซึ่งโมเลกุลของเอนไซม์นี้มีเหล็ก (Fe^{2+}) เป็นองค์ประกอบ ทำหน้าที่ดึงอะตอมไฮโดรเจนจากกรดไขมันและเติมออกซิเจนให้กรดไขมันเกิดเป็น Hydroperoxide ซึ่งจะสลายตัวเป็นอนุมูลของกรดไขมันต่อไปได้

2) อนุมูลอิสระที่มาจากนอกร่างกาย ซึ่งเกิดได้หลายปัจจัย คือ การได้รับเชื้อโรค เช่นการติดเชื้อไวรัสหรือเชื้อแบคทีเรีย โรคเกี่ยวกับภูมิคุ้มกัน (Autoimmune diseases) เช่น ข้ออักเสบรูมาตอยด์ จากรังสี เช่น รังสีอัลตราไวโอเลต รังสีเอ็กซ์ รังสีแกมมา จากมลภาวะ เช่น ควันบุหรี่ แก๊สจากท่อไอเสียรถยนต์ เช่น ไนตรัสออกไซด์ ไนโตรเจนไดออกไซด์ เขม่าจากเครื่องยนต์ ฝุ่น จากกระบวนการประกอบอาหาร เช่น การย่างเนื้อสัตว์ ที่มีส่วนประกอบของไขมันสูง การนำน้ำมันที่ใช้ทอดอาหารที่มีอุณหภูมิสูง กลับมาใช้อีก หรือเกิดจากการปิ้ง ย่าง จากยาบางชนิด เช่น โดโซรูบิซิน (Doxorubicin), เพนนิซิลามิน (Penicillamine) และพาราเซตามอล (Paracetamol) เป็นต้น

อนุมูลอิสระที่มีมากเกินไปจะเป็นอันตรายต่อไขมัน โปรตีน หน่วยสารพันธุกรรม และคาร์โบไฮเดรต ทำให้เพิ่มความเสี่ยงต่อการเป็นโรคหลายชนิด เช่น โรคหลอดเลือดตีบและแข็งตัว (Atherosclerosis) เกิดการกลาย (Mutation) ของเซลล์ทำให้เกิดมะเร็งบางชนิด โรคอัลไซเมอร์ หรือโรคความจำเสื่อม ทำให้เกิดกระบวนการอักเสบ ทำให้เกิดการทำลายเนื้อเยื่อรุนแรงขึ้น โรคไขข้ออักเสบและความเสื่อมของร่างกาย เป็นต้น จากที่กล่าวมาจะเห็นว่า อนุมูลอิสระถูกสร้างขึ้นมาจากกระบวนการเมแทบอลิซึมของร่างกายเอง และในสภาวะที่ผิดปกติ เช่น ภาวะของโรค หรือภาวะที่ร่างกายได้รับมลภาวะแวดล้อม ภาวะที่ผิดปกติจะส่งผลให้ร่างกายสะสมอนุมูลอิสระเพิ่มมากขึ้นดังนั้น

ร่างกายจึงจำเป็นต้องมีระบบป้องกันไม่ให้อนุมูลอิสระทำลายได้ สิ่งที่ร่างกายสร้างขึ้นมาเพื่อปกป้องตนเอง เรียกว่า สารต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidants) (จุฑารัตน์ ศรีประเสริฐ, 2559)

2.1.11 สารต้านอนุมูลอิสระ

สารต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidants) คือ สารที่ช่วยยับยั้งหรือชะลอปฏิกิริยาออกซิเดชันซึ่งเป็นปฏิกิริยาเคมีที่ทำให้เกิดอนุมูลอิสระในร่างกาย ทำให้เกิดการทำลายเซลล์ หรือเกิดการเปลี่ยนเซลล์ปกติเป็นเซลล์มะเร็ง สารอาหาร เช่น เบต้าแคโรทีน วิตามินซี วิตามินอี สังกะสี และเซเลเนี่ยม เป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่ทราบกันมานานแล้วว่าสามารถช่วยลดความเป็นพิษของสาร พิษที่ร่างกายได้รับจากสิ่งแวดล้อมรอบ ๆ ตัวและช่วยลดการทำลายเซลล์โดยอนุมูลอิสระ จึงช่วยชะลอ ความทรุดโทรมของร่างกายและป้องกันการเปลี่ยนเซลล์ปกติไปเป็นเซลล์มะเร็ง โดยทั่วไปสารต้านอนุมูลอิสระแบ่งเป็น 5 ประเภทใหญ่ ๆ ดังนี้

1) Primary antioxidant สารในกลุ่มนี้ส่วนใหญ่ได้แก่ สารประกอบฟีนอลิก (Phenolic substance) ทำหน้าที่หยุดปฏิกิริยาลูกโซ่ของการเกิดอนุมูลอิสระในปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมัน นอกจากนี้ ยังรวมถึงสารโทโคฟีรอลธรรมชาติ และสังเคราะห์ (Natural and synthetic tocopherol), Alkyl gallate, BHA, BHT, TBHQ และสารอื่น ๆ ซึ่งสารในกลุ่มดังกล่าว ทำหน้าที่เป็นตัวให้อิเล็กตรอน

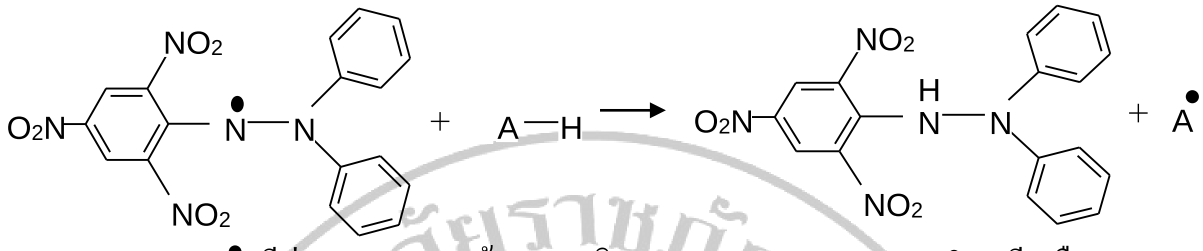
2) Oxygen scavenger สารกลุ่มนี้ได้แก่ กรดแอสคอร์บิกหรือวิตามินซี, Ascorbyl erythorbic acid (Isoascorbic acid) และ Sodium erythorbate เป็นต้น สารในกลุ่มนี้จะเข้าทำปฏิกิริยากับออกซิเจนจึงเป็นการช่วยกำจัดออกซิเจนในระบบปิดได้

3) Secondary antioxidant สารในกลุ่มนี้ได้แก่ Dilauryl thiopropionate และ Thiopropionic acid ทำหน้าที่สลายโมเลกุลของ Lipid hydroperoxide ให้เป็นสารที่มีความเสถียร

4) Enzymic antioxidant สารในกลุ่มนี้ได้แก่ เอนไซม์ต่าง ๆ ซึ่งเป็น Primary antioxidant enzyme และ Ancillary antioxidant enzyme สารในกลุ่มนี้ทำหน้าที่กำจัดออกซิเจนหรืออนุพันธ์ ของออกซิเจนโดยเฉพาะไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์

5) Chelating agent หรือ Sequestrant สารในกลุ่มนี้ เช่น กรดซิตริก กรดอะมิโน เป็นต้นสารในกลุ่มนี้ทำหน้าที่ไปจับกับไอออนของโลหะ เช่น เหล็ก และทองแดง ซึ่งไอออนเหล่านี้เป็นไอออนที่ส่งเสริมและเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมัน ทำให้เกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนที่เสถียร (อัญชนา เจนวิถีสุข, 2544)

การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ในการทดสอบการต้านอนุมูลอิสระมีด้วยกันหลายวิธี ซึ่งมีหนึ่งวิธีที่นิยมใช้กันอย่าง แพร่หลาย คือ วิธี DPPH free radical scavenging assay โดยใช้ 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl, $C_{18}H_{12}N_5O_6$ (DPPH) ซึ่งเป็นอนุมูลอิสระที่เสถียรและสามารถรับอิเล็กตรอนจากโมเลกุลอื่นได้ โดยสารละลาย DPPH ซึ่งมีสีม่วง ดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร เมื่อทำปฏิกิริยากับสารต้านอนุมูลอิสระ(Antioxidant) ในระยะเวลาที่กำหนด พบว่ามีการเปลี่ยนแปลงของสารละลายจากสีม่วงเป็นสีเหลือง เมื่อวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร พบว่าความสามารถในการดูดกลืนแสงลดลง บ่งบอกถึงความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารต้านอนุมูลอิสระ (กัลยาณี วัฒนธีรางกูร, 2551) ดังภาพที่ 2.15 และสมการที่ 5

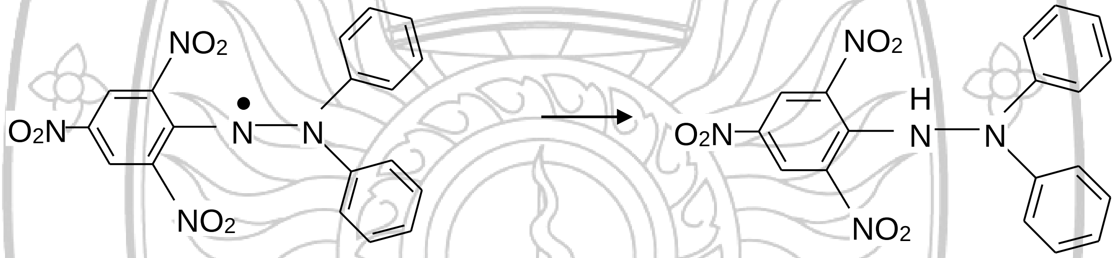


DPPH• (สีม่วง) สารต้านอนุมูลอิสระ DPPH:H (สีเหลือง)

ภาพที่ 2.14 ปฏิกิริยาการทดสอบการต้านอนุมูลอิสระโดยใช้ DPPH
ที่มา : (จุฑารัตน์ ศรีประเสริฐ, 2559)

สูตรการคำนวณ DPPH radical scavenging (%) = [(A0−A1) /A0] × 100 (5)

เมื่อ A0 คือ ค่าการดูดกลืนแสงสารตั้งต้นหรือตัวควบคุม
A1 คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารตัวอย่าง



ภาพที่ 2.15 การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างสารต้านอนุมูลอิสระ
ที่มา : (จุฑารัตน์ ศรีประเสริฐ, 2559)

การตรวจสอบความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระ ซึ่งอนุมูลอิสระที่ใช้ในการศึกษา คือ DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) radical เป็นอนุมูลอิสระที่เสถียร (stable free radical) และสามารถรับอิเล็กตรอนได้อีก เพื่อเปลี่ยนเป็นโมเลกุลที่ไม่เป็นอนุมูลอิสระ และเมื่อได้รับอะตอมไฮโดรเจนจากโมเลกุลอื่นจะทำให้สารดังกล่าวหมดความเป็นอนุมูลอิสระมีโครงสร้างเปลี่ยนไป

ดังนั้น ความสามารถของสารต้านอนุมูลอิสระที่ศึกษานี้เป็นการศึกษาประสิทธิภาพของสารต้านอนุมูลอิสระในการรวมตัวกับ DPPH ที่อยู่ในรูปอนุมูลอิสระที่เสถียร ที่อยู่ในสารละลาย (นิยมใช้ DPPH ที่อยู่ในรูปอนุมูลอิสระมาก เพราะใช้งานง่าย) การลดลงของความเข้มข้นของ DPPH (สีอ่อนลง) บอกถึงความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระของสารต้านอนุมูลอิสระ (วรพร ศีลศร, 2554)

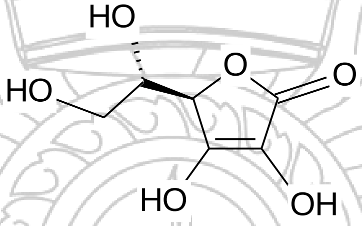
ข้อดีของวิธีนี้ คือ ง่าย สะดวก และรวดเร็ว ส่วนข้อเสีย คือ DPPH• ค่อนข้างเสถียรไม่ไวต่อปฏิกิริยาเหมือนอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นในร่างกายจริง จึงทำให้เกิดปฏิกิริยาได้ช้า ทำให้ค่าการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่วัดได้น้อยกว่าความเป็นจริง และต้องวัดในปฏิกิริยาที่เป็นแอลกอฮอล์ ซึ่งจะทำให้โปรตีนตกตะกอนจึงไม่สามารถวิเคราะห์ในตัวอย่างที่เป็นเลือดได้ อีกทั้งสารปนเปื้อนและโลหะจะ

รบกวน (Interfere) ซึ่งสามารถเป็นตัวรีดิวซ์แล้วทำให้สีของอนุมูลอิสระ DPPH• จางลงได้เช่นกัน (ปวีณา พันทอง, 2559)

ปัจจุบันเป็นที่ยอมรับทั่วไปในวงการแพทย์ว่า การบริโภคอาหารที่อุดมด้วยสารประกอบฟีนอลิก ฟลาโวนอยด์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งผักและผลไม้ที่เป็นประโยชน์ต่อสุขภาพ ซึ่งมีการศึกษาทางระบาดวิทยาพบว่า ความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการเกิดของโรคต่าง ๆ เช่น โรคหัวใจ โรคมะเร็ง ระบบทางเดินอาหาร โรคทางระบบประสาท โรคตับหลอดเลือด โรคอ้วน และโรคภูมิแพ้ มีอัตราการเกิดโรคที่ลดลง (Han *et al*., 2007; Manach *et al*., 2005; Pan *et al*., 2008) ทั้งนี้ คุณสมบัติดังกล่าวนี้จึงมีความสัมพันธ์กับคุณสมบัติการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ ยกตัวอย่างเช่น วิตามินซี (Vitamins) และโทรลอกซ์ เป็นต้น

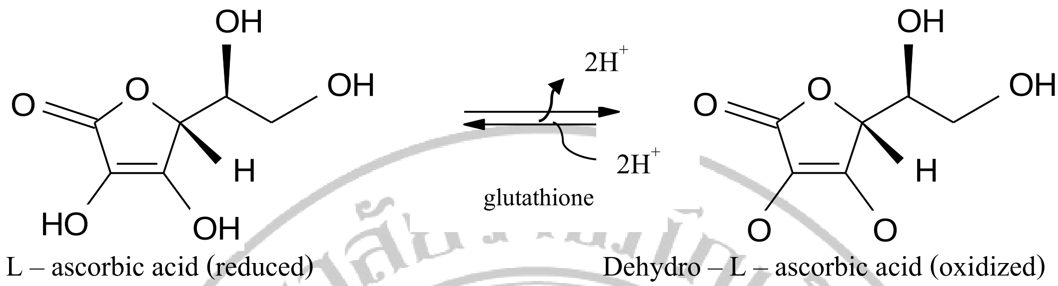
2.1.12 วิตามินซี (Ascorbic acid)

วิตามินซีสามารถยับยั้งอนุมูลอิสระโดยการทำปฏิกิริยารีดักชัน ซึ่งปฏิกิริยาของวิตามินซีจะเกิดขึ้นภายในบริเวณของเซลล์ที่ประกอบไปด้วยน้ำ (Aqueous phase) ซึ่งต่างกับปฏิกิริยาที่เกิดจากวิตามินอีซึ่งเกิดขึ้นในเยื่อหุ้มองค์ประกอบต่าง ๆ ของเซลล์ (Le Prell *et al*., 2007)



ภาพที่ 2.16 โครงสร้างทางเคมีของวิตามินซี
ที่มา : (Oroian & Escriche, 2015)

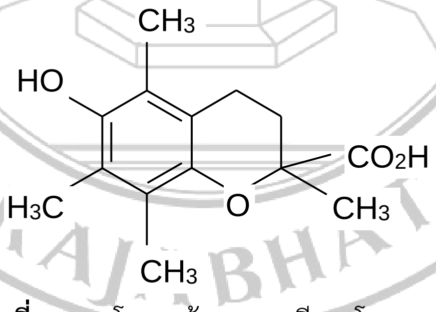
วิตามินซีในอาหารมี 2 รูปแบบซึ่งร่างกายสามารถนำไปใช้ได้ทั้ง 2 ชนิด คือ Ascorbic acid และ Dehydroascorbic acid ซึ่ง Ascorbic acid มีลักษณะโมเลกุลคล้ายกับน้ำตาลกลูโคส มีผลึกสีขาว มีรสเปรี้ยว วิตามินซีเมื่อถูกออกซิไดซ์จะกลายเป็น Dehydroascorbic acid ซึ่งเป็นโมเลกุลที่มีความไวในการทำปฏิกิริยาทางเคมีในร่างกาย วิตามินซีร่วมในปฏิกิริยา Oxidation reduction และปฏิกิริยาในการขนส่งอนุมูล Hydrogen ดังแสดงในภาพที่ 2.15 ด้วยเหตุนี้วิตามินซีจึงเป็นโมเลกุลที่มีความไวในการทำปฏิกิริยา Reduction Agent หรือ Antioxidant ที่มีความสำคัญโดยเฉพาะอย่างยิ่งในปฏิกิริยาการเผาผลาญไขมันและสามารถป้องกันไม่ให้เกิด Oxidation ของ Tetrahydrofolate ซึ่งเป็นโฟเลท โคเอนไซม์ทำให้มีการดูดซึมเหล็กในรูปแบบที่เป็น Non-heme ในลำไส้ให้มากขึ้น



ภาพที่ 2.17 ปฏิกิริยาในการยับยั้งการเกิดอนุมูลอิสระของวิตามินซี
ที่มา : (Oroian & Escriche, 2015)

วิตามินซี มีบทบาทในการเข้ามาช่วยรีดิวซ์วิตามินอีให้กลับมาอยู่ในรูปเดิม โดยการให้ไฮโดรเจนอะตอมกับวิตามินอี ซึ่งส่งผลให้วิตามินอีกลับมามีประสิทธิภาพในการหยุดปฏิกิริยาลูกโซ่อีกครั้ง Ascorbic acid ที่ผ่านการรีดิวซ์จะกลายเป็น Dehydroascorbic acid ที่ไม่พร้อมทำงานจากนั้น Glutathione ในร่างกายจะทำหน้าที่รีดิวซ์ Dehydroascorbic acid ให้กลับไปเป็น Ascorbic acid ที่พร้อมทำงานเช่นเดิม ซึ่ง วิตามินซีสลายตัวได้เร็วที่สุดในจำพวกวิตามินด้วยกัน และมีความไวต่อปฏิกิริยา Oxidation โดยเฉพาะอย่างยิ่งไวต่อออกซิเจนมาก

2.1.13 โทรลอกซ์ (Trolox) สารมาตรฐานที่ใช้ในการเทียบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (Trolox,, 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchlorman-2-carboxylic acid) เช่นเดียวกับวิตามินซี โดยการสร้างกราฟมาตรฐานจากสารละลายมาตรฐานโทรลอกซ์ จากนั้นหาความเข้มข้นของสารสกัดตัวอย่างที่แสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจากกราฟมาตรฐานในรูปมิลลิกรัมของโทรลอกซ์ ต่อกรัมของสารสกัดตัวอย่าง โดยโทรลอกซ์เป็นอนุพันธ์ของวิตามินอีที่ดัดแปลงโครงสร้างโดยการเปลี่ยนแปลงสายอัลเคนให้เป็นหมู่คาร์บอกซิลิก ทำให้สามารถละลายน้ำได้ดีขึ้นจึงทำให้ออกฤทธิ์ได้เร็วกว่าวิตามินอี ซึ่งในการวิจัยที่เกี่ยวข้องกับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระนิยมใช้เป็นสารมาตรฐาน โดยมีขั้นตอนกลไกการยับยั้งอนุมูลอิสระคล้ายคลึงกันกับของวิตามินซี



ภาพที่ 2.18 โครงสร้างทางเคมีของโทรลอกซ์
ที่มา : (Oroian & Escriche, 2015)

2.1.14 การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดในการยับยั้งการเจริญเติบโตเชื้อจุลินทรีย์ (ธีรวุฒิ, 2551) ในการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์นั้น นิยมใช้วิธีการ ดังนี้

1. Dilution Method โดยการเจือจางสารเคมีหรือสารสกัดในอาหารที่ให้เลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ ให้มีความเข้มข้นในระดับต่าง ๆ เลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ในอาหารที่ผสมสารสกัด วัดการเจริญเติบโต ของเชื้อจุลินทรีย์ การเจือจางสามารถเจือจางในอาหารแข็ง ซึ่งเหมาะกับเชื้อราที่มีการเจริญ แผ่ไปบนผิวหน้าอาหาร และการเจือจางในอาหารเหลว ซึ่งเหมาะสำหรับเชื้อแบคทีเรีย ยีสต์ หรือ เชื้อราที่ส่วนขยายพันธุ์มีการเจริญคล้ายยีสต์

2. Disc diffusion method เป็นวิธีที่ใช้กันอย่างแพร่หลายที่สุด เนื่องจากสะดวก ประหยัด และใช้เวลาน้อยกว่าวิธีอื่น ๆ วิธีนี้เป็นการทดสอบในเชิงคุณภาพ สามารถบอกผลได้ว่าเชื้อมีความไว ต่อการทดสอบหรือไม่ วิธีนี้ไม่เหมาะในการทดสอบเชื่อที่เจริญช้า และเชื้อจุลินทรีย์ที่ไม่ใช้อากาศ

3. Agar well diffusion method มีหลักเกณฑ์และวิธีการคล้ายกับ Disc diffusion method เป็นการทดสอบที่เตรียมอาหารวันทดสอบเป็น 2 ชั้น ชั้นล่างเป็นฐาน ส่วนชั้นบนเป็นชั้นที่เพาะเชื้อ เจาะหลุมชั้นบนให้เป็นหลุมขนาด เส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร ใส่สารปฏิชีวนะจนเต็มหลุม แล้วบ่มเพาะเชื้อเพื่อดูบริเวณยับยั้งที่เกิดขึ้น

2.2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

พสุธร อุ่นอมรมาศ และ สรณะ สมโน (2559) ได้ทำการวิเคราะห์หากลุ่มสาระสำคัญ และปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมดจากสารสกัดของดอกไม้ไทยที่บริโภคได้จำนวน 5 ชนิด ได้แก่ ดอกดาวเรือง (Tagetes erecta L.) ดอกเฟื่องฟ้า (Bougainvillea hybrid) ดอกเข็ม (Lxora chinensis Lamk) ดอกพุดซ้อน (Gardenia jasminoides Ellis) และดอกกุหลาบมอญ (Rosa damascene) โดยการสกัดด้วยเฮกเซน ไดคลอโรมีเทน และเมทานอล จากนั้นนำมาจำแนกกลุ่มสารสำคัญด้วยวิธีโครมาโตกราฟฟีแผ่นบาง (TLC) และทำการวิเคราะห์หาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี 2,2-diphenyl-1-picryhydrazyl (DPPH) radical scavenging assay, Trolox-Equivalent Antioxidant Capacity (TEAC) และปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมด จากผลการทดลองพบว่าการสกัดด้วยเมทานอล ให้ปริมาณผลผลิตของสารที่สกัดได้สูงที่สุดร้อยละ 8-12 และการจำแนกสารสำคัญด้วยวิธีโครมาโตกราฟฟีแผ่นบาง (TLC) พบสารสำคัญในกลุ่ม ฟลาโวนอยด์และสารประกอบฟีนอลิกในสารสกัดของดอกไม้ทุกชนิดที่สกัดด้วยเมทานอล สารสกัดเมทานอลจากดอกกุหลาบมอญ ดอกเข็มและดอกดาวเรืองมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH สูงถึงร้อยละ 90 และสารสกัดเมทานอลจากดอกไม้ทั้ง 5 ชนิดมีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี TEAC สูงถึงร้อยละ 90 มากกว่าสารกัดเฮกเซน และไดคลอโรมีเทนอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) และมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระเทียบเท่ากับสารโทรลอกซ์ประมาณ 17 มิลลิกรัมต่อตัวอย่าง 1 กรัม ส่วนสารสกัดเมทานอลจากดอก

กุหลาบมอญมีปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมดสูงที่สุด (31.91 mg GAE.g^{-1}) ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับดอกไม้ที่นำมาทดสอบชนิดอื่น ๆ ($p<0.05$)

สุรพงศ์ รัตนะ และบันลือ สังข์ทอง (ม.ป.ป) ได้ศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดเมทานอลจากดอกไม้หอมจำนวน 5 ชนิด ซึ่งหนึ่งในนั้นคือ กุหลาบ (Rosa spp.) โดยกุหลาบมีองค์ประกอบทางเคมี ได้แก่ Anthocyanins, Quercetins, Catechin และ Phenolic acids เมื่อนำสารสกัดเมทานอลจากกุหลาบไปทดสอบ พบว่า มีปริมาณฟีนอลิก และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมากที่สุด (12.26 ± 0.80 μg/mL) ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับสารสกัดอื่น ($p<0.05$) และเมื่อทดสอบความสัมพันธ์ด้วย Pearson Correlation พบว่าปริมาณฟีนอลิกมีความสัมพันธ์กับการออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (R^2 เท่ากับ 0.899) ซึ่งการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระใช้วิธี DPPH เทียบกับกรดแอสคอร์บิกมาตรฐาน ส่วนการหาปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมด ใช้วิธี Folin-Ciocalteu โดยใช้กรดแกลลิกเป็นสารมาตรฐาน

An-Na Lia *et al*. (2014) ศึกษาปริมาณฟีนอลิกรวม และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของดอกไม้กินได้และดอกไม้ป่าในประเทศจีน 51 ชนิด โดยตรวจสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี Ferric ion reducing antioxidant power assay (FRAP) และวิธี Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) พบว่า กุหลาบ (R. hybrid) หนึ่งในดอกไม้ที่นำมาวิเคราะห์ มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ เท่ากับ 629.24 ± 24.61 μmol Fe (II).g^{-1} และ 175.39 ± 1.74 μmol trolox.g^{-1} ตามลำดับ และตรวจสอบปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมด้วยวิธี Folin – Ciocalteu มีค่า 35.84 ±1.67 mg GAE.g^{-1}

El-Sayed S *et al*. (2012) ศึกษาปริมาณฟีนอลิก ฟลาโวนอยด์รวม และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจากสารสกัดดอกกุหลาบสด (Taif rose) ในประเทศซาอุดิอาระเบีย โดยใช้ตัวทำละลาย 4 ชนิดได้แก่ เมทานอล เอทิลอะซิเตท บิวทานอล และคลอโรฟอร์ม ตามลำดับ เมื่อนำไปหาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี 1,1-diphenyl-picrylhydrazyl (DPPH) ซึ่งใช้กรดแอสคอร์บิกเป็นสารมาตรฐาน มีค่า SC_{50} เท่ากับ 49.44 ± 0.38, 15.62 ± 0.18, 36.29 ± 0.15 และ มากกว่า 100 μg/ml ตามลำดับ พบว่าสารสกัดกุหลาบที่ใช้เอทิลอะซิเตทเป็นตัวทำละลาย มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมากที่สุด ในขณะที่สารสกัดกุหลาบที่ใช้คลอโรฟอร์มเป็นตัวทำละลายมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระต่ำที่สุด ดังนั้น ในการตรวจสอบปริมาณฟีนอลิกรวม ด้วยวิธี Folin -Ciocalteu reagent (FCR) จึงไม่นำสารสกัดคลอโรฟอร์มมาทำการวิเคราะห์เพื่อหาปริมาณฟีนอลิกรวมต่อ พบว่า สารสกัดที่ใช้ เมทานอล เอทิลอะซิเตท และบิวทานอล เป็นตัวทำละลาย มีปริมาณฟีนอลิกรวม เท่ากับ 53.25 ± 5.92, 343.19 ± 11.83 และ 98.62 ± 9.04 mg GAE.g^{-1} ตามลำดับ อีกทั้งเมื่อนำไปตรวจสอบหาปริมาณฟลาโวนอยด์รวม ด้วยวิธี Aluminium chloride โดยใช้รูติน (rutin) เป็นสารมาตรฐาน มีค่า 31.27 ±1.88, 300.82 ± 11.86 และ 53.91 ± 3.11 mg RE.g^{-1} ตามลำดับ พบว่า สารสกัดเอทิลอะซิเตทยังคงมีปริมาณฟีนอลิกรวมมากที่สุด ซึ่งจากผลการศึกษาข้างต้น ถ้าฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูง จะส่งผลให้ปริมาณฟีนอลิก และฟลาโวนอยด์รวมสูงด้วย ซึ่งสามารถสรุปเป็นความสัมพันธ์ได้ว่า ปริมาณฟีนอลิก และฟลาโวนอยด์รวมแปรผันตรงกับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

Jin Hwan Lee *et al*. (2011) ศึกษาองค์ประกอบของแอนโธไซยานิน และฤทธิ์ทางชีวภาพจากกลีบดอกกุหลาบสีแดงของกุหลาบเกาหลีที่กินได้ (R. hybrida cv. Noblered) พบว่า

สารสกัดเมทานอลที่ความเข้มข้น 50 μg/mL มีสารแอนโธไซยานินเป็นองค์ประกอบ ซึ่งประกอบด้วย Cyanidin 3, 5-di-O-glucoside และ Pelargonidin 3, 5-di-O-glucoside เมื่อนำไปตรวจสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของแอนโธไซยานินด้วยวิธี DPPH โดยเครื่อง UV-Vis spectroscopy ทราบว่า Cyanidin 3,5-di-O-glucoside และ Pelargonidin 3, 5-di-glucoside แสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระกับ DPPH มีค่า IC_{50} เท่ากับ 55.2 ± 0.12 และ 118 ± 1.23 μg/mL ตามลำดับ โดย Pelargonidin 3, 5-di-glucoside มีฤทธิ์ต้านมะเร็งที่ LNCap (เซลล์ต่อมลูกหมากของมนุษย์), ACHN (เซลล์ไตของมนุษย์) และ MOLT-4F (เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวของมนุษย์)

Jingyun *et al*. (2018) ได้ศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ปริมาณฟีนอลิกรวม และปริมาณฟลาโวนอยด์รวมของดอกไม้ที่บริโภคได้ทั่วไป 65 ชนิด ในประเทศจีน โดยศึกษาดอกกุหลาบ 4 ชนิด ได้แก่ ดอกกุหลาบ (R. rugosa), ดอกกุหลาบฝรั่งเศส (R. gallica), ดอกกุหลาบยูนนาน (R. centifolia) และดอกกุหลาบจีน (R. chinensis) ในการทดสอบหาปริมาณฟีนอลิกด้วยวิธี Folin Ciocalteu reagent พบว่า ดอกกุหลาบ (R. rugosa), ดอกกุหลาบฝรั่งเศส (R. gallica), ดอกกุหลาบยูนนาน (R. centifolia) และดอกกุหลาบจีน (R. chinensis) มีค่าปริมาณฟีนอลิกรวม เท่ากับ 312.21, 111.34, 108.94 และ 284.80 mg GAE.g^{-1} ตามลำดับ ซึ่งมีค่าปริมาณฟีนอลิกที่ค่อนข้างสูงเมื่อเปรียบเทียบกับดอกไม้ชนิดอื่น การหาปริมาณฟลาโวนอยด์รวมใช้วิธีการวิเคราะห์สี (Colorimetric analysis) โดยนำไปเทียบกับสารมาตรฐานแคททีชิน พบว่า (R. chinensis) มีค่าเท่ากับ 24.13 mg CAE.g^{-1}, (R. rugosa) 23.56 mg CAE.g^{-1}, (R. gallica) 13.43 mg CAE.g^{-1} และ (R. centifolia) 10.91 43 mg CAE.g^{-1} ตามลำดับ และวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยใช้วิธี 2-diphenyl-1-picryhydrazyl ของดอกไม้ที่บริโภคได้ทั่วไปในประเทศจีน พบว่า ดอกไม้ที่มีค่าฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงสุด คือ ดอกกุหลาบ ซึ่งมีค่าเท่ากับ 521.99 μmol TE.g^{-1}

Marta and Renata (2012) ศึกษาปริมาณฟีนอลิก และฟลาโวนอยด์รวม ในกลีบดอกกุหลาบสายพันธุ์ R.rugose ในขั้นตอนการสกัด ใช้ตัวทำละลาย 3 ชนิด คือ ตัวทำละลายผสมระหว่างน้ำกับอะซิโตน เอทานอล หรือ เมทานอล จาการวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกรวม (TPC) โดยวิธี Folin-Ciocalteu พบว่า การสกัดโดยใช้อะซิโตนมีปริมาณฟีนอลิกสูงสุด เท่ากับ 256.74 ± 4.92 mg GAE.g^{-1} ส่วนการสกัดโดยใช้เอทานอลพบปริมาณฟีนอลิก 234.98 ± 3.76 mg GAE.g^{-1} และการสกัดโดยใช้เมทานอล พบปริมาณฟีนอลิกน้อยที่สุด เท่ากับ 171.81 ± 4.96 mg GAE.g^{-1} การวิเคราะห์หาปริมาณฟลาโวนอยด์รวม (TFC) ด้วยวิธี Lamaison และ Carret พบว่า สารสกัดที่ใช้สารสกัดเอทานอลเป็นตัวทำละลายมีปริมาณฟลาโวนอยด์มากที่สุด คือ 3.79 ± 0.10 mg QE.g^{-1} ส่วนการสกัดที่ใช้เมทานอล พบปริมาณฟลาโวนอยด์ คือ 2.62 ± 0.02 mg QE.g^{-1} และสารสกัดที่ใช้อะซิโตน พบค่าฟลาโวนอยด์รวมน้อยที่สุด คือ 1.97 ± 0.05 mg QE.g^{-1}

Valentina and Sonia (2016) ได้ศึกษาปริมาณฟีนอลิกรวม และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในน้ำเชื่อมของดอกโบตั๋น (Paeonia Peregrina Mill. Var. Romanica) และกลีบดอกกุหลาบ (R. Centifolia) โดยหาปริมาณฟีนอลิกรวม ด้วยวิธี Folin-Ciocalteu พบว่า ในน้ำเชื่อมของดอกโบตั๋น และกลีบกุหลาบ มีค่า 642.03 และ 437.91 mg GAE.g^{-1} ตามลำดับ อีกทั้งการหาฤทธิ์สารต้านอนุมูลอิสระ ด้วยวิธี DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) พบว่า ในน้ำเชื่อมของดอกโบตั๋น และกลีบกุหลาบ มีค่าร้อยละ 87.13 และ 62.95 ตามลำดับ

Yakov Vinokur *et al*. (2006) ศึกษาชากลีบกุหลาบเป็นเครื่องดื่มที่อุดมไปด้วยสารต้านอนุมูลอิสระซึ่งศึกษาสายพันธุ์กุหลาบ 12 สายพันธุ์ที่กินได้ เช่นดอกกุหลาบ (R. hybrida), (R. borboniana), (R. indica) และ (R. damascene) โดยนำไปตรวจสอบสารต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS มีค่าอยู่ระหว่าง 712.7 μM TE.g^{-1} และ 1770.7 μM TE.g^{-1} เมื่อเทียบกับ 1227.6 μM TE.g^{-1} น้ำหนักแห้งในชาเขียว การหาปริมาณฟีนอลรวมด้วยวิธี Folin - Ciocalteau พบว่าปริมาณ ฟีนอลทั้งหมดในชาดอกกุหลาบเท่ากับ 50.7 ถึง 119.5 mg GAE.g^{-1} เมื่อเทียบกับ 62.1 mg GAE.g^{-1} น้ำหนักแห้งในชาเขียว โดยสารต้านอนุมูลอิสระ ฟีนอลรวม และปริมาณกรดแกลลิกพบในสายพันธุ์ที่ซานฟรานซิสโก Katharina Zeimet, Mercedes และRosa damascene มากกว่าสายพันธุ์อื่น ๆ

ธชษร (2560) ศึกษาน้ำมันหอมระเหยจากกุหลาบมอญพันธุ์แดงประเสริฐ (Rosa damascena Mill.) และกรรมวิธีการสกัดน้ำมันหอมระเหยจากต้นกุหลาบมอญ พันธุ์แดงประเสริฐ โดยดอกกุหลาบแช่เย็น ดอกกุหลาบสด ใบสด และลำต้นสดใช้วิธีการสกัดแช่ด้วยตัวทำละลายเฮกเซนที่อุณหภูมิห้อง เฮกเซนที่อุ่นร้อน เพนเทน และสกัดดอกกุหลาบสดด้วยวิธีการสกัดแบบซอกเลตโดยใช้ตัวทำ ละลายเฮกเซน สารสกัดที่ได้มีสีเหลืองลักษณะเป็นขี้ผึ้ง และมีกลิ่นของกุหลาบโดยเฉพาะอย่างยิ่งสารสกัดจากใบจะให้ กลิ่นที่ชัดเจนที่สุด เมื่อทำการสกัดซ้ำด้วยเอทานอลได้เป็นสารละลายสีเหลืองที่เรียกว่า absolute rose oil ผลการทดลองปัจจัยที่เกี่ยวข้องในการสกัด มีอัตราส่วนของพืชต่อตัวทำละลายควรใช้อัตราส่วนที่น้อยปริมาณสารสกัดจึงจะได้มากขึ้น อุณหภูมิของตัวทำละลายส่งผลโดยเฮกเซนที่อุ่นร้อนจะให้ปริมาณสารสกัดมากกว่าเฮกเซนที่อุณหภูมิห้อง ดอกสดจะให้ปริมาณสารสกัดที่มากกว่าดอกที่เก็บแช่แข็ง ส่วนระยะเวลาในการสกัด ยิ่งใช้เวลาในการสกัดนานขึ้น ปริมาณของสารสกัดจากใบสดและลำต้นสดด้วยตัวทำละลายเฮกเซนและเพนเทนยิ่งได้มากขึ้น แต่ระยะเวลาที่นานขึ้นไม่มีผลในการสกัดดอกกุหลาบด้วยตัวทำละลายเฮกเซน ในการสกัดด้วยวิธีซอกเลตที่ 8 ชั่วโมง ได้ปริมาณสารสกัด มากกว่าที่ 6 ชั่วโมง เมื่อวิเคราะห์องค์ประกอบของสารสกัดน้ำมันหอมระเหยกุหลาบมอญเทคนิคโปรตอนนิวเคลียร์ แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโทรเมทรี (^{1}H NMR) และ เทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟี-แมสสเปกโทรเมทรี (GC-MS) พบว่า ส่วนดอก ใบ และลำต้น ประกอบด้วยสารฟีนิลเอทิลแอลกอฮอล์เป็นหลักและสารชนิดอื่นๆ ทำให้ ฟีนิลเอทิล แอลกอฮอล์ น่าจะเป็นสารเฉพาะสำคัญที่ให้กลิ่นกุหลาบของดอกกุหลาบมอญพันธุ์แดงประเสริฐ เนื่องจากเป็น สารชนิดเดียวที่พบว่าเป็นสารให้กลิ่น อีกทั้งสารสกัดจากใบให้กลิ่นกุหลาบที่แรงกว่าและจากโครมาโทแกรมพบว่าประกอบด้วย องค์ประกอบของสารอยู่หลายชนิด

บุษราคัม และคณะ (2560) ได้ทำการศึกษาเปรียบเทียบวิธีการสกัดน้ำมันหอมระเหย ที่แตกต่างกันและองค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันหอมระเหยจากเกสรบัวหลวงราชินี ทำการสกัดน้ำมันหอมระเหย 3 วิธี ได้แก่ การสกัดด้วยตัวทำละลาย การสกัดด้วยไขเย็น และการสกัดด้วยไขร้อน ผลการวิจัยพบว่า น้ำมันหอมระเหยที่สกัดด้วยตัวทำละลายจะมีสีน้ำตาลเข้มและเป็นของเหลวหนืด น้ำหนักน้ำมันหอมระเหยได้ 0.9782 กรัม การสกัดด้วยไขแพะด้วยวิธีไขเย็นได้สารสกัดเป็นของเหลวใสสีเหลืองได้น้ำหนักน้ำมันหอมระเหยเท่ากับ 0.6250 กรัมและการสกัดด้วยไขแพะด้วยวิธีไขร้อนได้สารสกัดเป็นของเหลวใสสีเหลืองเข้มได้น้ำหนักน้ำมันหอมระเหยเท่ากับ 1.3520 กรัม และน้ำมันหอมระเหยทั้งหมดมีองค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันหอมระเหยที่แตกต่างกันเป็นส่วนใหญ่

วีระศักดิ์และคณะ (2557) ได้ศึกษาฤทธิ์ต้านจุลชีพจากสารสกัดเอทานอล 95% ของดอกไม้ 30 ชนิด โดยน้ำกลีบของดอกไม้ไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 50 – 55 องศาเซลเซียส เติมเอทานอล 95% ในอัตราส่วน 1:7 หมักทิ้งไว้ 7 วัน 3 ครั้ง พบว่าสารสกัดจากดอกกุหลาบมอญให้ร้อยละผลผลิต 24.23 และนำไปทดสอบการต้านเชื้อแบคทีเรียก่อโรค 5 ชนิด คือ *Bacillus subtilis, Escherichia coli, Salmonella typhimurium, Staphylococcus aureus* และ *Pseudomonas aeruginosa* ด้วยวิธี Agar disc diffusion พบว่ากุหลาบมอญที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอลสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus* โดยค่าบริเวณยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียอยู่ที่ 10.5 มิลลิเมตร ค่า MIC ของกุหลาบมอญอยู่ที่ 600 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และค่าของ MBC ของกุหลาบมอญอยู่ที่ 9,600 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

ธีรวุฒิและรัชนี (2550) ได้ทำการศึกษาสารสกัดเอทานอลของสมุนไพรต่าง ๆ จำนวน 25 ชนิด 5 วงศ์ที่มีผลต่อเชื้อจุลินทรีย์ที่สำคัญในอาหาร 6 ชนิด ได้แก่ *Bacillus cereus, Escherichia coli, Salmonella Typhimurium, Pseudomonas aeruginosa, Staphylococcus aureus*, และ *Candida albicans* ผลการวิจัย พบว่าสารสกัดสมุนไพรจาก 5 วงศ์ จำนวน 25 ชนิด สารสกัดมีเพียงสมุนไพรในวงศ์ Caesalpiniaceae ได้แก่ ฝาง ขี้เหล็กเลือด ขี้เหล็กบ้าน และแสมสาร ที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อทั้ง 6 ชนิดได้โดดเด่นโดยเฉพาะ *B.cereus* และ *S.aureus* ส่วนสารสกัดสมุนไพรในวงศ์อื่นมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์เฉพาะสมุนไพรบางชนิดและเจาะจงกับเชื้อบางสายพันธุ์เท่านั้น

จิราพร (2549) ได้ศึกษาสมบัติของสารสกัดของพืชไม้หอม 40 ชนิด ต่อการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย *Salmonella typhi, Escherichia coli, Staphylococcus aureus* และ*Bacillus subtilis* โดยทำการสกัดสารจากดอกไม้โดยใช้ตัวทำละลาย 4 ชนิด คือ ไดเอทิลอีเทอร์เพนเทน สารผสมของไดเอทิลอีเทอร์และเพนเทนในอัตราส่วน 2: 1 และเอทานอล และทดสอบสมบัติ การยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียของสารสกัดดังกล่าว โดยวิธี Disc agar diffusion method พบว่ากุหลาบมอญแดงที่สกัดด้วยตัวทำลายเอทานอลสามารถยับยั้งแบคทีเรีย *Salmonella typhi* โดยวัดเส้นผ่านศูนย์กลางได้ 2.5 มิลลิเมตร และ *Bacillus subtilis* วัดเส้นผ่านศูนย์กลางได้ 1.5 มิลลิเมตรและกุหลาบมอญชมพูที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอลสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย *Salmonella typhi* วัดเส้นผ่านศูนย์กลางได้ 2.5 มิลลิเมตร, *Bacillus subtilis* วัดเส้นผ่านศูนย์กลางได้ 1.0 มิลลิเมตร และ*Staphylococcus aureus* วัดเส้นผ่านศูนย์กลางได้ 2.0 มิลลิเมตร โดยกุหลาบมอญแดงและกุหลาบมอญชมพูที่สกัดด้วยตัวทำละลายไดเอทิลอีเทอร์เพนเทน สารผสมของไดเอทิลอีเทอร์และเพนเทนในอัตราส่วน 2: 1 ไม่สามารถยับยั้งการเจริญเติมโตของแบคทีเรียได้ นอกจากนี้ยังได้ศึกษาสารสกัดที่สกัดด้วยตัวทำละลาย 4 ชนิด คือ Ether, Pentane, Diethyl ether: Pentane (2: 1) และ Ethanol พบว่าตัวทำละลาย Ethanol มีประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียดีที่สุด รองลงมาคือ คือ Diethyl ether, Diethyl ether: Pentane (2: 1) และ Pentane ตามลำดับ

ปทุมทิพย์และคณะ (2550) ได้ทำการศึกษาการสกัดน้ำมันหอมระเหยจากไม้กฤษณา ตัวแปรที่ศึกษา คือ ชนิดตัวทำละลาย อุณหภูมิในการสกัดและน้ำหนักไม้กฤษณาในการสกัด ซึ่งศึกษาตัวทำละลาย 4 ชนิด ได้แก่ ตัวทำละลายเอทานอล เอทิลแอซิเตต เฮกเซน และไดคลอโรมีเทน ปริมาณไม้กฤษณาที่ใช้ในการสกัด คือ 70, 80, 90 และ 100 กรัมต่อปริมาตรตัวทำละลาย 600 มิลลิลิตร และอุณหภูมิที่ใช้ในการสกัด คือ 30, 33, 36 และ 39 องศาเซลเซียสและวิเคราะห์น้ำมันหอมระเหยด้วยเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟ/แมสสเปกโทรมิเตอร์ จากผลการคำนวณทางสถิติ พบว่า ตัวทำละลายที่เหมาะสมมากที่สุดคือ ไดคลอโรมีเทนได้น้ำหนักสารสกัดมากที่สุด รองลงมาคือ เอทานอล เอทิลอะซิเตต และเฮกเซน พบว่า ปริมาณสารสกัดหยาบที่ได้ คือ 2.30, 1.91, 0.74 และ 0.08% ตามลำดับ