

บทที่ 2

แนวคิด ทฤษฎี เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

กระเจี๊ยบแดง (*Hibiscus sabdariffa* Linn.)

กระเจี๊ยบแดง มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Hibiscus sabdariffa* Linn. เป็นพืชในวงศ์ Malvaceae มีชื่อภาษาอังกฤษว่า Rosella, Red sorrel หรือ Jamaica sorrel เป็นพืชสมุนไพรที่ใช้ทำเครื่องดื่ม สีส้มอาหารและยารักษาโรค (แจ๊ล์ม มาศวรรณ และคณะ, 2545)

1) ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

กระเจี๊ยบแดงเป็นพรรณไม้พุ่มขนาดเล็ก สูงประมาณ 1-2 เมตร ลำต้นอ่อนมีสีเขียว เมื่อแก่จะเปลี่ยนเป็นสีแดงม่วง ใบเป็นใบเดี่ยวเรียงสลับ มีดอกใหญ่สีเหลืองอ่อน (บางพันธุ์เป็นสีชมพู) กลางดอกมีสีแดง มีผลทรงรีรูปไข่ป้อมสีแดง มีกลีบเลี้ยงรองรับผล ลักษณะหนาแข็งและแตกหักง่าย ภายในผลมีเมล็ดสีน้ำตาล รูปไต เมื่อแก่แห้งจะแตกออก



ภาพที่ 2.1 กระเจี๊ยบแดง

2) พันธุ์

มีการปลูกกระเจี๊ยบแดงทั่วทั้งในเขตร้อนและกึ่งร้อน ขยายพันธุ์โดยใช้เมล็ด เจริญเติบโตได้ดีในดินร่วนซุยหรือดินเหนียวที่ชุ่มน้ำ โดยพันธุ์ที่เกษตรกรไทยนิยมนำมาปลูกคือ พันธุ์ชูดานหรือพันธุ์เกษตร ซึ่งมีกลีบเลี้ยงขนาดใหญ่หนามมีสีแดงเข้มถึงม่วง

3) การปลูก

กระเจี๊ยบแดงเป็นพืชที่ไวแสงสามารถปลูกได้ทั่วไป ทนต่อความแห้งแล้งได้ดี สำหรับประเทศไทยมีแหล่งปลูกที่สำคัญอยู่ในจังหวัดลพบุรี ชัยนาท และสุพรรณบุรี โดยเกษตรกรมักเริ่มปลูกประมาณเดือนกรกฎาคม ถึงเดือนสิงหาคมและนิยมปลูกแบบหว่านเมล็ดอย่างง่ายในแปลงปลูก หรือขุดหลุมปลูกซึ่งใช้เมล็ดพันธุ์ประมาณ 3-5 เมล็ดต่อหลุม (ระยะห่างระหว่างต้น 1 เมตร ระยะห่างระหว่างแถว 1-1.5 เมตร)

สำหรับการดูแลและบำรุงรักษาดันควรให้น้ำสม่ำเสมอในช่วง 1-2 เดือนแรก หลังจากนั้นสามารถปล่อยให้โตตามธรรมชาติ ส่วนการให้ปุ๋ยคอกหรือเคมีสูตร 15-15-15 อัตรา 25 กิโลกรัมต่อไร่ ในระยะเริ่มเจริญเติบโต (อายุประมาณ 10-15 วัน และ 40-50 วัน) ในด้านการกำจัดวัชพืช บางแหล่งปลูกอาจกำจัดประมาณ 2 ครั้งต่อปี ในช่วงเวลาเดียวกับการให้ปุ๋ย

4) การเก็บเกี่ยวผลผลิต

ระยะเวลาตั้งแต่ปลูกถึงเก็บเกี่ยวกระเจี๊ยบประมาณ 5-6 เดือน โดยเกษตรกรจะเก็บเกี่ยวในช่วงประมาณเดือนธันวาคม ถึงเดือนมกราคม ซึ่งสามารถเก็บเกี่ยวทั้งต้นหรือเก็บเฉพาะดอก จากนั้นจึงนำดอกกระเจี๊ยบแดงมากระทุ้งด้วยเหล็กให้กลีบดอกและกระเปาะหลุดออกจากกัน แล้วนำกลีบเลี้ยงมาตากแดดในภาชนะที่สะอาดไม่มีฝุ่นประมาณ 5-6 แดดให้แห้งสนิท ส่วนกระเปาะหรือผล เมื่อแห้งสนิทแล้วจะแตกออก เกษตรกรสามารถร่อนนำเมล็ดไปจำหน่ายต่อไปได้

5) ประโยชน์ของกระเจี๊ยบแดง

กระเจี๊ยบแดงเป็นสมุนไพรที่ใช้กันอย่างแพร่หลายในประเทศต่างๆ เพื่อช่วยลดไขมันในเส้นเลือด ลดความดันโลหิต มีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย ต้านเชื้อรา แก้อาการอักเสบ ป้องกันการเกิดนิ่วในกระเพาะปัสสาวะและกระเจี๊ยบแดงยังมีสรรพคุณทางยาด้วย เช่น ในแอฟริกาใต้ใช้เมล็ดกระเจี๊ยบต้มกิน เป็นยาขับปัสสาวะ ยาบำรุง และใช้น้ำมันจากเมล็ดรักษาแผลให้สุก ในแอฟริกาตะวันออกใช้ใบต้มน้ำกินแก้อาการ ลดความดันโลหิตสูง ขับปัสสาวะลดคอเลสเตอรอล ลดความหนืดของเลือด ขับพยาธิ ในอียิปต์ใช้กลีบเลี้ยงต้มน้ำดื่มกับน้ำตาลวันละสามเวลา ใช้รักษาความดันโลหิตสูง ใช้ทั้งต้นต้มน้ำรักษาโรคหัวใจและโรคประสาท กินเป็นยาลดน้ำหนักเนื่องจากช่วยระบาย และยังเป็นยาช่วยฆ่าเชื้อในลำไส้ (แจลล์ มาศวรรณ และคณะ, 2545) ส่วนกัวเตมาลาใช้น้ำตาลต้มน้ำกลีบเลี้ยงแห้งเป็นยาขับปัสสาวะ ยาลดการอักเสบของไต ในอินเดียและ

เม็กซิโกใช้กระเจี๊ยบเป็นยา คือ ใช้ใบต้มน้ำกินเพราะเชื่อว่าจะทำให้เลือดบริสุทธิ์และใช้ตากแห้งต้มน้ำกินแก้ไอ ในประเทศไทยใช้ใบสดและกลีบเลี้ยงสดและแห้งของกระเจี๊ยบต้มน้ำกินแก้ไอ แก้วน้ำ อดไข้ ชับน้ำดี ใช้ใบสดต้มน้ำหรือแกงกิน ใช้กลีบเลี้ยงแห้งต้มน้ำหรือชงน้ำร้อนกิน ในกลีบดอกของกระเจี๊ยบแดงมีสารประกอบฟีนอลิก สารแอนโทไซยานิน (Anthocyanin) นอกจากนี้ยังเป็นแหล่งรวมสารอาหารที่สำคัญต่อร่างกายมากมายหลายชนิด โดยเฉพาะแคลเซียม ฟอสฟอรัส แมกนีเซียม เหล็ก และวิตามิน เป็นต้น สารประกอบฟีนอลิก สารแอนโทไซยานิน และวิตามินซี จะมีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ

6) สารสำคัญในกระเจี๊ยบแดง

แฉล้ม มาศวรรณ และคณะ (2545) ได้ทำการศึกษาปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระในกลีบกระเจี๊ยบแดง 29 สายพันธุ์ กระเจี๊ยบแดงเป็นพืชชนิดหนึ่งที่มีสารต้านอนุมูลอิสระหลายชนิด เช่น สารแอนโทไซยานิน สารประกอบฟีนอลิก และวิตามินซีในปริมาณมาก จึงได้ทำการศึกษาปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระในกลีบดอกกระเจี๊ยบแดง ได้แก่ สารแอนโทไซยานิน และสารประกอบฟีนอลิกของกระเจี๊ยบแดง 29 สายพันธุ์ ที่รวบรวมโดยกรมวิชาการเกษตรและปลูกที่ศูนย์วิจัยพืชไร่ขอนแก่น พบว่า ปริมาณสารแอนโทไซยานินมีค่าอยู่ระหว่าง 51 - 442 มิลลิกรัม/100 กรัมน้ำหนักแห้ง มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 127 มิลลิกรัม/100 กรัมน้ำหนักแห้ง โดยกระเจี๊ยบแดงลพบุรี และกระเจี๊ยบแดงขอนแก่น มีปริมาณแอนโทไซยานินสูงสุดคือ 439 และ 442 มิลลิกรัม/100 กรัมน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ ส่วนพันธุ์ที่มีปริมาณแอนโทไซยานินต่ำสุดคือ พันธุ์ JRC/710 H ส่วนปริมาณสารประกอบฟีนอลิกอยู่ระหว่าง 196 - 495 GAE (Gallic acid equivalent) มิลลิกรัม/กรัมน้ำหนักแห้ง มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 314 GAE มิลลิกรัม/กรัมน้ำหนักแห้ง โดยพันธุ์กระเจี๊ยบแดงขอนแก่นมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกสูงสุดรองลงมาคือ พันธุ์ JRC/624 H (419 GAE มิลลิกรัม/กรัมน้ำหนักแห้ง) ส่วนพันธุ์ที่มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกต่ำสุดคือ พันธุ์ NPL/JRC/601 กระเจี๊ยบแดงแต่ละพันธุ์จะมีปริมาณสารแอนโทไซยานินและสารประกอบฟีนอลิกแตกต่างกัน พันธุ์กระเจี๊ยบแดงที่มีปริมาณสารแอนโทไซยานิน และสารประกอบฟีนอลิกสูง จะมีลักษณะกลีบหนา มีน้ำหนักมาก และมีสีแดงเข้ม

7) ส่วนประกอบและคุณค่าทางอาหารของกระเจี๊ยบแดง

แอลัม มาศวรรณา และคณะ (2545) กล่าวว่า กระเจี๊ยบแดงเป็นแหล่งของ แคลเซียม ฟอสฟอรัส และวิตามินเอ ดังแสดงในตารางที่ 2.1

ตารางที่ 2.1 คุณค่าทางอาหารของกระเจี๊ยบแดงสด 100 กรัม

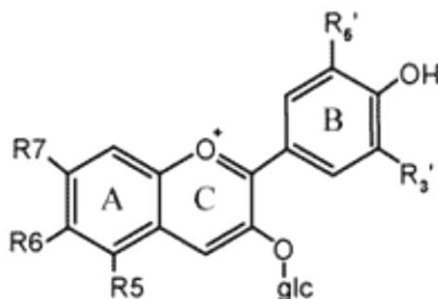
Nutrient	Values
Moisture (%)	86.60
Total energy (Calories)	460.00
Total fat (g)	0.30
Total carbohydrate (g)	9.40
Crude fiber (g)	1.30
Protein (g)	1.40
Calcium (mg)	151.00
Phosphorus (mg)	59.00
Iron (mg)	1.00
Vitamin B1 (mg)	0.01
Vitamin B2 (mg)	0.24
Niacin (mg)	1.80
Vitamin A (mg)	10,833.00

ที่มา: แอลัม มาศวรรณา และคณะ (2545)

แอนโทไซยานิน (Anthocyanin)

แอนโทไซยานินมีรากศัพท์มาจากภาษากรีกคือ Anthos หมายถึง ดอกไม้ และ Kyanos หมายถึง สีน้ำเงินแอนโทไซยานินเป็นสารประกอบในกลุ่มฟลาโวนอยด์ (Flavonoid) เป็นรงควัตถุที่ละลายอยู่ในเซลล์แซป (Cell sap) พบในผักผลไม้และดอกไม้ เช่นในกะหล่ำปลีสีม่วงกระเจี๊ยบแดงองุ่นแดงและดอกอัญชัน แอนโทไซยานินสามารถละลายน้ำได้มีสีช่วงสีแดงถึงสีน้ำเงิน แต่ไม่ละลายในตัวทำละลายประเภท อะซิโตน เบนซีน คลอโรฟอร์ม และอีเทอร์ เป็นต้น ซึ่งมีโครงสร้างหลักเป็น $C_6-C_3-C_6$ ดังแสดงในภาพที่ 2.2 การแทนที่ของหมู่ไฮดรอกซิลและหมู่เมทิลในตำแหน่ง R- ทำให้เกิดแอนโทไซยานินชนิดที่แตกต่างกันไปแอนโทไซยานินพบมากในธรรมชาติในรูปไกลโคไซด์ (Glycoside) ซึ่งจับน้ำตาลด้วยพันธะไกลโคซิดิกหรือเรียกว่าแอนโทไซยานิดิน (Anthocyanidin) มี 6 กลุ่มคือ Cyanidin Delphinidin Malvidin Pelargonidin Peonidin และ Petunidin ดังแสดงใน

ตารางที่ 2 แอนโทไซยานินมีค่าการดูดกลืนแสงในช่วงคลื่น 510 - 540 นาโนเมตร สารละลายแอนโทไซยานินมีการเปลี่ยนแปลงสีตามค่าความเป็นกรดต่าง (pH) เมื่อ pH ต่ำจะมีสีแดง pH ปานกลางจะมีสีน้ำเงินม่วงและเมื่อ pH สูงจะมีสีเหลืองซีด (จุพาลักษณ์ ทวีบุตร, 2551)



ภาพที่ 2.2 โครงสร้างพื้นฐานของแอนโทไซยานิน

ที่มา: จุพาลักษณ์ ทวีบุตร (2551)

ตารางที่ 2.2 แอนโทไซยานินที่สำคัญ

Anthocyanidins	หมู่แทนที่บนคาร์บอนตำแหน่งที่		
	3	4	5
Cyanidin	OH	OH	H
Delphinidin	OH	OH	OH
Malvidin	Ome	OH	Ome
Pelargonidin	H	OH	H
Peonidin	Ome	OH	H
Petunidin	Ome	OH	OH

ที่มา: จุพาลักษณ์ทวีบุตร (2551)

1) แหล่งของแอนโทไซยานิน

แอนโทไซยานินมีอยู่ในผัก ผลไม้และดอกไม้ จะพบมากในองุ่นพันธุ์สีดำ และพันธุ์อื่นๆ นอกจากนี้ยังมีอยู่ในกระเจี๊ยบแดง ผลไม้ที่มีสีแดงสดสีต่างๆไปประเภทบลูเบอรี่ แครนเบอรี่ และยังสามารถสกัดได้จากกระเจี๊ยบใช้สีแดงจากกลีบหุ้มผล (ปารมี ชุมศรี, 2549) ดอกอัญชันสีน้ำเงิน ผลสมันมะนาว สกัดได้จากกลีบดอก ข้าวเหนียวดำ ซึ่งทำการสกัดได้จากเมล็ดข้าวเหนียวดำ ถั่วดำ สกัดได้จากเมล็ดถั่วดำ และพืชชนิดอื่นๆอีก (ดวงกมล ลิ้มจันทร์, 2550) ดังแสดงในตารางที่ 3

ตารางที่ 2.3 แหล่งของแอนโทไซยานินจากพืชที่นำมาใช้เป็นสีผสมอาหาร

แหล่งสีที่ได้จากการสกัด	
องุ่น <i>Vitisvinifera</i>	ม่วง – แดง
องุ่น Hybrid	ม่วง – แดง
แครนเบอรี่	ชมพู – แดง
กะหล่ำปลีแดง	ม่วง – แดง
ลูกเชอร์รี่	แดง
กระเจี๊ยบแดง	แดง
ข้าวโพดม่วง	แดง

ที่มา: บุศวรรรัตน์ สายเชื้อ (2545)

2) ประโยชน์ของแอนโทไซยานิน

แอนโทไซยานินเป็นสิ่งสำคัญในธรรมชาติ เช่น การเป็นตัวต้านออกซิเดชัน (Antioxidant) การป้องกันการทำลายจากแสง ปฏิกิริยาการป้องกันตนเองของพืช ปรากฏการณ์ฟิงพากันในระบบนิเวศน์ เช่น สีของ Delphinidin ดึงดูดแมลงที่เข้ามาถ่ายละอองเกสร โดยผึ้ง Bumblebees เข้ามาช่วยในการถ่ายละอองเกสรของ *Mimuluslewisii* ในขณะที่นก Hummingbird เข้าไปช่วยในพืช *Mimulus cardinalis* แอนโทไซยานินบางชนิดทำหน้าที่เป็นสารควบคุมโดยวิธี เช่น Cyanidin-3-glucoside ยับยั้งการเจริญของ *Heliothisviriscens* ในยาสูบ (Harbone, 1988) นอกจากนี้แอนโทไซยานินยังช่วยเพิ่มการสังเคราะห์แสงและลด Photoinhibition เพราะแอนโทไซยานินดูดกลืนแสงในช่วงคลื่น 510 - 540 นาโนเมตร ซึ่งเป็นช่วงคลื่นเดียวกับ Chlorophyll b จากการศึกษาใน *Begonia* Ridl และ *Triolenahirsutab* Triana ที่มีแอนโทไซยานินจะทำให้ Photoinhibition ลดลงและยังทำให้การสังเคราะห์แสงและความเข้มข้นของคลอโรฟิลล์เพิ่มสูงขึ้นด้วย ในระหว่างการพัฒนาของใบอ่อนจะมีกระบวนการ Metabolism ที่สูง และเกิด Peroxide ทำให้มีอนุมูลอิสระเกิดขึ้นมากมาย แอนโทไซยานินจะทำหน้าที่เป็น Antioxidant กำจัดอนุมูลอิสระเหล่านั้น (Cooper-Driver, 2001)

ลักษณะปรากฏของสีในผลผลิตสดมีความสำคัญทางเศรษฐกิจอย่างมาก ลักษณะปรากฏที่ดีมีความสำคัญต่อการได้ราคาที่สูง (Harbone & Grayer, 1988) ในอุตสาหกรรมมีความต้องการสารให้สีที่มาจากธรรมชาติ แอนโทไซยานินเป็นหนึ่งในสารสีจากธรรมชาติที่น่าสนใจแต่มี

ข้อเสียคือ สลายตัวได้ง่าย แอนโทไซยานินจะมีความคงตัวมากที่สุดเมื่ออยู่ในสภาวะที่เป็นกรด โดยลักษณะการให้สี และความคงตัวเกี่ยวข้องกับหมู่ที่มาเชื่อมอยู่บนโครงสร้างหลัก (Aglycone) การสลายตัวของแอนโทไซยานินเกิดขึ้นไม่เฉพาะจากการสกัดจากเนื้อเยื่อเท่านั้น แต่เกิดขึ้นในระหว่างการผลิตและการเก็บรักษาด้วย (Schwartz *et. al*, 2008)

โดยจากอดีตที่ผ่านมามนุษย์ใช้แอนโทไซยานินในฐานะสีย้อม และสีแต่งอาหารมาโดยตลอด แต่ในปัจจุบันนี้เทคโนโลยีต่างๆทั้งทางการแพทย์ และการโภชนาการได้พัฒนาไปมาก มีการศึกษาถึงคุณค่าที่มีอยู่ในสารสกัดธรรมชาติหลายๆชนิดที่เป็นภูมิปัญญามาแต่โบราณ ในส่วนของสารแอนโทไซยานินก็เช่นกันเริ่มจากการพบว่าผู้คน และสัตว์ที่มีการใช้ประโยชน์จากดอกไม้ และผลไม้ที่มีสีเข้มจัด เป็นอาหารจึงมีลักษณะทางกายภาพหลายๆอย่างที่ดีกว่าที่อื่น เช่น การมีสีผิวและสีผมที่ดีกว่า โอกาสในการป่วยใช้น้อยกว่า (บุศวรรัตน์ สายเชื้อ, 2545)

3) คุณสมบัติของสารประกอบแอนโทไซยานิน

ในสภาพที่เป็นกรด แอนโทไซยานินดูดกลืนแสงในช่วงแสงสีเขียวกว ความยาวคลื่น 465 - 550 นาโนเมตร โดยวงแหวนในช่วงแสงอัลตราไวโอเล็ต ความยาวคลื่น 270 - 280 นาโนเมตร โดยวงแหวน A การดูดกลืนคลื่นแสงของแอนโทไซยานินนี้เปลี่ยนแปลงได้เมื่อกลุ่มต่างๆที่เกาะ กับโครงสร้างหลักเปลี่ยนแปลง เช่น เมื่อเกิด Hydroxylation หรือเพิ่มหมู่ Hydroxyl เข้าไป จะทำให้ช่วงการดูดกลืนแสงขยับไปในช่วงคลื่นที่ยาวขึ้น แต่เมื่อเกิด Glycosylation หรือมีน้ำตาลเข้ามาเกาะกับคาร์บอนตำแหน่งต่างๆ การดูดกลืนแสงจะขยับเข้าไปในช่วงคลื่นที่สั้นลง และเมื่อเกิด Acylation หรือมีหมู่ Acyl ของกรดในกลุ่ม Cinnamic ต่างๆมาเกาะกับน้ำตาลจะทำให้มีการดูดกลืนแสงเพิ่มขึ้นอีกในช่วงความยาวคลื่น 310 - 335 นาโนเมตร แต่การ Methylation หรือการมีหมู่ Methyl เข้ามาเกาะไม่ทำให้การดูดกลืนแสงเปลี่ยนไปมากนัก จากการดูดกลืนแสงของแอนโทไซยานินดังกล่าวข้างต้นจึงทำให้แอนโทไซยานินทำตัวเหมือน Indicator ในสารละลาย กล่าวคือ มีโครงสร้างและสีเปลี่ยนแปลงไปตาม pH ของสารละลาย ในสารละลายที่เป็นกรดมากๆ แอนโทไซยานินจะให้สีค่อนข้างแดงของ Flavylium แต่เมื่อ pH เพิ่มขึ้นในช่วงกรดอ่อนหรือเป็นกลาง สีจะค่อยๆจางลงจนไม่มีสีของ Pseudobase เมื่อสารละลายมีสภาพเป็นเบสอ่อน จะให้สีน้ำเงินของ Anhydrobase แอนโทไซยานินในทั้ง 3 รูปนี้ยังเปลี่ยนกลับไปกลับมาได้ แต่ในสภาพที่เป็นเบสแก่ แอนโทไซยานินจะถูกทำลายและไม่อาจเปลี่ยนกลับไปอยู่ในรูปอื่นได้อีก

4) แอนโทไซยานินในใบพืช

แอนโทไซยานินที่พบมากในใบพืชอยู่ในกลุ่มของ Cyanidin - 3 - Glucoside เป็นส่วนกำเนิดสีหลักทำให้พบแอนโทไซยานินได้มากกว่า 250 ชนิด การสะสมแอนโทไซยานินในใบขึ้นอยู่กับสภาพแวดล้อมหลายอย่าง โดยเฉพาะอย่างยิ่งแสง โดยทั่วไปยังมีความเข้มแสงมากใบ

พืชก็จะสะสมแอนโทไซยานินได้มาก อุณหภูมิต่ำในช่วงฤดูใบไม้ร่วง ช่วยให้มีการสังเคราะห์และสะสมแอนโทไซยานินมากขึ้น สภาพความเครียดต่างๆทั้งการขาดธาตุอาหาร การขาดน้ำสภาพที่มีแสงอัลตราไวโอเล็ตมาก การเกิดบาดแผล การเข้าทำลายของโรคและแมลง ล้วนกระตุ้นให้เกิดการสร้างและการสะสมแอนโทไซยานินในใบได้มาก

5) การสกัดแอนโทไซยานิน

แอนโทไซยานินเป็นรงควัตถุจากธรรมชาติที่สามารถนำมาใช้เป็นสีผสมอาหารได้ การเลือกวัตถุดิบที่ใช้ในการสกัดมักพิจารณาเหตุผลทางด้านเศรษฐศาสตร์ เทคนิคการผลิต ดังนั้นวัตถุดิบที่เลือกใช้ควรสามารถหาได้ง่ายในปริมาณมากราคาไม่แพง และสีที่สกัดได้ควรมีลักษณะและองค์ประกอบตรงตามข้อบังคับ วัตถุดิบต่างๆ ที่มีศักยภาพสามารถนำมาสกัดแอนโทไซยานินได้แก่ องุ่น ผลแครนเบอร์รี่ ดอกอัญชัน และกลีบดอกกระเจี๊ยบ เป็นต้น

การผลิตสี ประกอบด้วยขั้นตอนสำคัญคือ การสกัดแอนโทไซยานินและการทำให้แอนโทไซยานินที่สกัดได้เข้มข้นขึ้นบางครั้งอาจมีการทำแห้งด้วยวิธี Spray dry (Main, Clydesdale & Francis, 1978) เพื่อยืดอายุการเก็บของผลิตภัณฑ์ให้นานขึ้น

ปัจจุบันสีแอนโทไซยานินที่ผลิตในเชิงการค้ามี 2 ลักษณะ

1) ลักษณะผง ประชาคมเศรษฐกิจแห่งยุโรป (EEC) กำหนดให้แอนโทไซยานินมีลักษณะและสมบัติ ดังนี้สกัดจากเปลือกองุ่นพันธุ์ *Vitisvinifera* และผ่านกระบวนการทำแห้งด้วยวิธี Spray dry ผลิตภัณฑ์ที่ได้มีลักษณะเป็นผงสีแดงเข้ม สามารถละลายได้ดีในน้ำ และให้ค่า $E_{1\%}^{1\text{cm}} = 12.5$ ในสารละลายบัฟเฟอร์ pH 3.2 แอนโทไซยานินที่พบเป็นชนิดที่แอนโทไซยานินเป็น Pelargonidin, Cyanidin, Peomidin, Delphinidin, Petunidin และ Malvidin ในการผลิตให้ใช้ Sulfur dioxide เป็นวัตถุกันเสียและกำหนดให้มีปริมาณตกค้างได้ไม่เกิน 50 ส่วนในหนึ่งล้านส่วน (ppm)

2) ลักษณะสารละลายเข้มข้น มีลักษณะและสมบัติดังนี้

สกัดจากเปลือกองุ่นพันธุ์ *Vitisvinifera* และอนุญาตให้ใช้ Propyleneglycol เป็นวัตถุกันเสียผลิตภัณฑ์มีลักษณะสีม่วงแดงมีกลิ่นรสเฉพาะตัวและให้ค่า $E_{1\%}^{1\text{cm}} = 3.0 - 3.5$ ในสารละลายบัฟเฟอร์ pH 3.0 ผลิตภัณฑ์ที่ได้ใช้ในอุตสาหกรรมลูกกวาด แยม เยลลี่ ไอศกรีม เครื่องดื่มทั้งประเภทที่มี และไม่มีแอลกอฮอล์ เป็นส่วนผสมปริมาณการใช้ร้อยละ 0.1 - 0.4 โดยน้ำหนักต่อน้ำหนักมีอายุการใช้งานประมาณ 2 เดือน ควรเก็บในที่เย็นและแห้ง แอนโทไซยานินเป็นรงควัตถุที่ละลายอยู่ในเซลล์แชป ดังนั้นในการสกัดจึงต้องทำลายเยื่อหุ้มเซลล์เพื่อให้รงควัตถุ

ละลายออกมา ปัจจัยที่สำคัญต่อการสกัดคือตัวทำละลายในการสกัดแอนโทไซยานินจากผลแอนเดอร์เบอร์รี่ และพบว่าเอทานอลและเมทานอลเป็นตัวทำละลายที่มีประสิทธิภาพการสกัดสูงกว่าตัวทำละลายอื่นๆ ประสิทธิภาพการสกัดสูงขึ้นเมื่อใช้สารละลายกรดไฮโดรคลอริกที่ละลายในเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 0.03 และการใช้กรดไฮโดรคลอริกจะช่วยให้แอนโทไซยานินที่สกัดได้มีเสถียรภาพดีขึ้นเนื่องจากแอนโทไซยานินมีความคงตัวที่ดีในสารละลายที่เป็นกรด

6) การวิเคราะห์หาแอนโทไซยานิน

Francis (1982) ได้วิเคราะห์ปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมด (Total Anthocyanins, Tacy) แบ่งตามลักษณะตัวอย่างออกเป็น 2 กลุ่ม

1) ตัวอย่างที่มีสารประกอบซึ่งดูดกลืนแสงในช่วงเดียวกับแอนโทไซยานินที่ปนอยู่เล็กน้อยหรือไม่มีเลยตามปกติสารละลายแอนโทไซยานินที่เพิ่งสกัดจากผัก ผลไม้ หรือ ดอกไม้ จะมีสารประกอบซึ่งดูดกลืนแสงในช่วงเดียวกับแอนโทไซยานิน (460 - 550 นาโนเมตร) อยู่เล็กน้อย ประกอบกับสารประกอบ Phenolic อื่นๆ ในสารละลายที่สกัดได้มีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดในช่วงความยาวคลื่นที่ห่างออกไป ดังนั้นปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมดสามารถหาจากหลักการวัดการดูดกลืนแสงได้

ในการศึกษาปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมดการทำให้เจือจางเป็นสิ่งที่จะต้องพิจารณาเนื่องจากค่าการดูดกลืนแสงสูงสุด ขึ้นอยู่กับระดับความเป็นกรด - ด่าง ชนิดของตัวทำละลาย การมี อิออนของโลหะ อุณหภูมิ และระยะเวลา ก่อนค่าการดูดกลืนแสงซึ่งมีความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นกับค่าการดูดกลืนแสงจะเป็นเส้นตรงได้ในความเข้มข้นต่ำๆ เท่านั้น

Fuleki & Francis (1968) ได้ศึกษาปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมดจากผลแครนเบอร์รี่ โดยใช้สารละลายผสมเอทานอลกับไฮโดรคลอริกในอัตราส่วน 85:15 โดยปริมาตรเป็นตัวทำละลายในการสกัด และคำนวณปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมด โดยเจือจางสารละลายที่สกัดได้ด้วยตัวทำละลายในการสกัด เพื่อให้ค่าการดูดกลืนแสงอยู่ในช่วงที่เหมาะสม จากนั้นเก็บไว้ในที่มืดนาน 2 ชั่วโมงเพื่อให้เกิดสมดุลของรูปแบบต่างๆ ของแอนโทไซยานินแล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 535 นาโนเมตร

ปริมาณแอนโทไซยานินหาได้จากสูตร

$$T_{Acy} = O.D. \times DV \times \frac{100}{SV} \times \frac{TEV}{SW} \times \frac{1}{E_{1CM}^{1\%}/10}$$

โดยที่

- T_{Acy} คือ ปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมดที่อยู่ในตัวอย่าง (มิลลิกรัมแอนโทไซยานินต่อวัตถุดิบ 100 กรัม)
- O.D. คือ ค่าการดูดกลืนแสงที่อ่านได้จากตัวอย่างที่เจือจางแล้ว
- DV คือ ปริมาตรของสารละลายที่สกัดได้ที่เตรียมสำหรับเจือจาง (มิลลิลิตร)
- SW คือ น้ำหนักของตัวอย่างที่ใช้สกัด (กรัม)
- TEV คือ ปริมาตรทั้งหมดของสารละลายที่สกัดได้
- $E_{1CM}^{1\%}$ คือ ได้จากค่าเฉลี่ยโดยน้ำหนักของ E ของแอนโทไซยานินทุกตัวที่มีอยู่ในตัวอย่างพืชนั้นๆ

ในกรณีที่ทราบค่า E ของแอนโทไซยานินของผลแครนเบอร์รี่ แทนในการคำนวณปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมด ซึ่งสามารถตัดความผิดพลาดที่เกิดขึ้นจากการคำนวณทิ้งได้เมื่อใช้คำนวณเปรียบเทียบปริมาณแอนโทไซยานินที่สกัดได้ (Fuleki & Francis, 1968)

นอกจากนี้อาจใช้ค่า E ของแอนโทไซยานินของตัวใดตัวหนึ่งที่มีในตัวอย่างในการคำนวณปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมดได้ เช่น

DU & Francis (1973) คำนวณปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมดของดอกกระเจี๊ยบแดง (*Hibiscus sabdariffa* L.) โดยใช้ค่า E ของ Delphinidin - 3 - Glucoside ซึ่งมีค่าเท่ากับ 559 และเป็นแอนโทไซยานินตัวหนึ่งที่มีในดอกกระเจี๊ยบแดง

Bronnum-Hansen, Jacobsen, & Flink (1985) คำนวณปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมดของผลแครนเบอร์รี่ (*Sambucus nigra* L.) โดยใช้ค่า E ของ Cyaniding - 3 - Glucoside ซึ่งมีค่าเท่ากับ 851 และเป็นแอนโทไซยานินหลักที่มีในผลแอนเดอร์เบอร์รี่

Buckmire & Francis (1978) คำนวณปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมดของผลมิราเคิล (*Synsepalum Dulcificum*) โดยใช้ค่า E ของ Delphinidin - 3 - Glucoside ซึ่งมีค่าเท่ากับ 851 และเป็นแอนโทไซยานินหลักในผลมิราเคิล

เนื่องจากแอนโทไซยานินในกะหล่ำปลีม่วงมีแอนโทไซยานินเป็น Cyanidin และไม่มี
 ทราปค่า E ของแอนโทไซยานินในกะหล่ำปลีม่วงดังนั้นในการวิจัยนี้ใช้ค่า E ของ Cyanidin - 3 -
 Glucoside ซึ่งมีเท่ากับ 85 สำหรับคำนวณปริมาณแอนโทไซยานินในกะหล่ำปลีม่วง

2) ตัวอย่างที่มีสารประกอบซึ่งดูดกลืนแสงในช่วงเดียวกับแอนโทไซยานินเป็นการ
 วัดปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมดในผลิตภัณฑ์ที่เก็บไว้โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ช่วงความยาว
 คลื่นที่ให้ค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดวิธีในข้อ 1 พบว่าบ่อยครั้งที่เกิดความผิดพลาด เนื่องจากการ
 รบกวน (Interfere) ของ Degradation products ซึ่งสารเหล่านี้อาจเกิดจากปฏิกิริยาระหว่าง
 น้ำตาลกับกรดอะมิโนหรืออาจเกิดจากปฏิกิริยาการสลายตัวของแอนโทไซยานิน เมื่อระยะเวลา
 การเก็บนานขึ้นการสะสมของ Degradation products จะมากขึ้นด้วย

ปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมดสำหรับตัวอย่างประเภทนี้สามารถหาได้ 2 วิธี

1) โดยการแยกสารประกอบที่ดูดกลืนแสงในช่วงเดียวกับแอนโทไซยานินออกก่อน
 ด้วยวิธีการแยกวิธีใดวิธีหนึ่ง เช่น Ion-exchange, Paper, Thin-laye, Column chromatography,
 Gas chromatography และ High performance liquid chromatography เป็นต้น

2) ไม่จำเป็นต้องแยกสารประกอบซึ่งดูดกลืนแสงในช่วงเดียวกับแอนโทไซยานิน
 ออกก่อนแต่อาศัยหลักการหนึ่งดังนี้

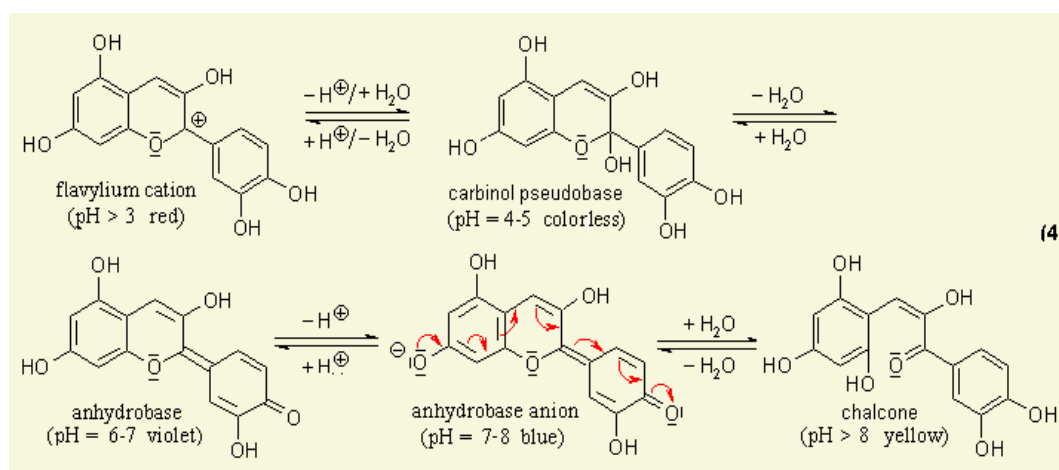
2.1) วิธี Subtractive อาศัยหลักการวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายที่สกัด
 ได้ในช่วงเดียวกันและหลังปฏิกิริยาการฟอกสี (Bleach) แอนโทไซยานินโดยใช้ Sodium sulfite
 หรือ Hydrogen peroxide ด้วยวิธีนี้สามารถหาค่าการดูดกลืนแสงเนื่องจากปริมาณแอนโทไซ
 ยานินที่มีอยู่ได้ และคำนวณปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมดโดยทำ Calibration curve แต่วิธีการนี้
 จะทำให้ปริมาณแอนโทไซยานินที่คำนวณได้สูงกว่าค่าจริง ดังนั้นวิธีนี้จึงไม่ค่อยเป็นที่นิยม

2.2) วิธี Differential เนื่องจากโครงสร้างของแอนโทไซยานินจะเปลี่ยนแปลง ซึ่ง
 ส่งผลให้สีของสารละลายเปลี่ยนเมื่อความเป็นกรดเป็นด่างของสารละลายเปลี่ยนไปดังนั้น
 สามารถคำนวณปริมาณแอนโทไซยานินจากค่าความแตกต่างของการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น
 เดียวกันระหว่างสารละลายที่ระดับความเป็นกรด - ต่างต่างกันได้ เช่น ระดับความเป็นกรด-ต่าง
 1.0 กับระดับความเป็นกรดต่าง 4.5 ทั้งนี้เพราะค่าการดูดกลืนแสงเนื่องจากการมีสารประกอบอื่น
 นอกเหนือจากแอนโทไซยานินซึ่งดูดกลืนแสงในช่วงเดียวกับแอนโทไซยานินถูกหักล้างไป

7) ความเป็นกรดเป็นด่าง

ความเป็นกรดเป็นด่างนั้น เป็นปัจจัยที่มีความสำคัญมากซึ่งมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของแอนโทไซยานิน โดยจะเริ่มตั้งแต่สีแดง สีส้ม น้ำเงิน – แดง ม่วง น้ำเงิน และเขียว จนถึงเหลือง ซึ่งแอนโทไซยานิน สามารถมากับผลิตภัณฑ์ในสภาวะที่เป็นกรดเท่านั้น โดยต้องอยู่ในช่วงความเป็นกรดเป็นด่างเท่ากับ 4 หรือต่ำกว่า ถ้าค่าความเป็นกรดต่างยิ่งสูง สียิ่งมีการเปลี่ยนแปลง ซึ่งค่าความเป็นกรดเป็นด่างที่เริ่มมีการเปลี่ยนแปลงสีจะมีการเปลี่ยนแปลงสีจะมีค่าประมาณ 4 - 5

แอนโทไซยานินมีลักษณะที่แตกต่างกันในสภาวะที่ความเป็นกรดเป็นด่างต่างกัน ซึ่งแฟลวิลเลียมแคตไอออน (Flavyliumcation) ที่ค่าความเป็นกรดสูงจะให้สีแดง เมื่อค่าความเป็นกรดประมาณ 3.2 - 4.0 แอนโทไซยานินจะอยู่ในรูปของไม่มีสี (Colorless) การเปลี่ยนแปลงนี้เป็นผลมาจากการรักษาสมดุลระหว่างโครงสร้าง 2 ชนิด ภายในโมเลกุลของแอนโทไซยานิน คือ แฟลวิลเลียมแคตไอออน (Flavyliumcation) ซึ่งมีประจุบวก เมื่อค่าความเป็นกรดสูงขึ้นเท่ากับ 4.5 โครงสร้างของ (Flavyliumcation) จะเกิดการสูญเสียประจุและเปลี่ยนเป็น Carbinolpseudobase โครงสร้างนี้จะไม่มีสี และเมื่อค่าความเป็นกรดเท่ากับ 6 - 7 จะเป็นสีม่วง โครงสร้างจะอยู่ในรูปของ Quinoidal Base และเมื่อค่าความเป็นกรดลดลงจนค่าความเป็นกรดเท่ากับ 7 - 8 Quinoidal base anion จะเกิดการสูญเสียประจุบวกและอยู่ในรูปโครงสร้างของ Anion ซึ่งจะมีสีน้ำเงิน และเมื่อค่าความเป็นกรดต่างสูงขึ้นที่มากกว่า 8 - Quinoidal base anion จะเกิดการสูญเสียโปรตอนในโมเลกุลทำให้ได้ Chalcone ซึ่งจะมีสีเหลือง ตามที่แสดงในภาพที่ 2.3



ภาพที่ 2.3 การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของ Cyanidin ในสภาวะที่ค่า pH เปลี่ยนแปลง

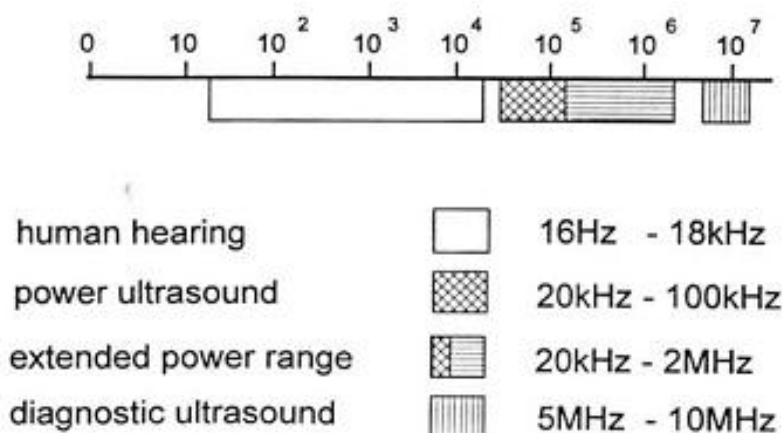
ที่มา: Pedrielli *et.al* (2001)

อัลตราโซนิก (Ultrasonic)

คลื่นอัลตราซาวนด์ หรือคลื่นอัลตราโซนิกส์ (Ultrasonic waves) หมายถึงพลังงานที่เกิดจากคลื่นเสียงที่มีการสั่นของคลื่นประมาณ 20,000 ครั้งต่อวินาทีหรือสูงกว่า (Hoover, 2000) หรือหมายถึงคลื่นความดัน (Pressure waves) ที่มีความถี่ (Frequency) สูงกว่าคลื่นเสียงปกติ (สูงกว่า 20,000 กิโลเฮิรตซ์, kHz) ส่วนคำว่าอัลตราโซนิกส์ (Ultrasonic) หรือโซนิเคชันส (Sonications) หมายถึงการศึกษาเกี่ยวกับคลื่นเสียงหรืออัลตราซาวนด์ในช่วงความถี่ดังกล่าวซึ่งมนุษย์ไม่สามารถได้ยิน

โดยทั่วไปแล้วคลื่นเสียง (Sound) ที่มนุษย์ได้ยินนั้นเกิดจากการสั่นสะเทือนของตัวกลางที่ยืดหยุ่น (Elastic medium) ที่มีความถี่อยู่ในช่วง 20 – 20,000 kHz คลื่นเสียงผ่านเข้าสู่ตัวกลางที่ยืดหยุ่นในลักษณะที่เป็นคลื่นตามยาว (Longitudinal waves) แต่คลื่นเสียงที่ผ่านเข้าไปภายในวัตถุที่เป็นของแข็งอาจอยู่ในลักษณะที่เป็นคลื่นตามยาวหรือคลื่นตามขวาง (Transverse waves)

ในการศึกษาการใช้ประโยชน์จากอัลตราซาวนด์ตั้งแต่ต้นจนถึงปัจจุบันพบว่ามีการนำ อัลตราซาวนด์มาประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมหรือในกระบวนการแปรรูปอาหารโดยสามารถแบ่งออกได้เป็น 2 ประเภทใหญ่ ๆ ได้แก่ การใช้ อัลตราซาวนด์กำลังต่ำและความถี่สูง (พลังงานที่ต่ำและความถี่สูง) ซึ่งใช้ในการวินิจฉัย (Diagnostic ultrasound) เป็นส่วนใหญ่ และการใช้ อัลตราซาวนด์กำลังสูงและความถี่ต่ำ (ไฟสูงและความถี่ต่ำ) หรือที่เรียกว่าพาวเวอร์อัลตราซาวนด์ (Power ultrasound) ที่มักนำมาประยุกต์ใช้ในกระบวนการแปรรูปอาหาร (Mason, 1998) คลื่นความถี่ของ อัลตราซาวนด์ในช่วงต่างๆ แสดงดังภาพที่ 2.4



ภาพที่ 2.4 คลื่นความถี่ของอัลตราซาวนด์ในช่วงต่าง ๆ

ที่มา : Mason (1998)

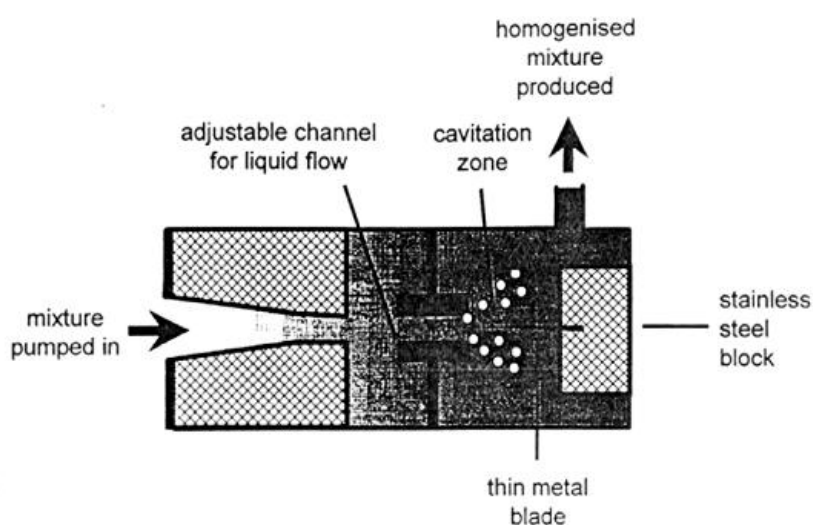
การใช้พาวเวอร์อัลตราซาวนด์ในกระบวนการแปรรูปอาหาร ทำให้เกิดผลต่อคุณสมบัติทางกลและทางเคมีของอาหารเนื่องจากคลื่นดังกล่าวทำให้เกิดปรากฏการณ์ แควิเทชัน (Cavitation) และส่วนมากใช้คลื่นในช่วงความถี่ 20 – 40 kHz ซึ่งเป็นความถี่ที่สร้างขึ้นจากอุปกรณ์อัลตราซาวนด์ทั่วไปที่ใช้ในการทำความสะดวก การทำให้เซลล์แตกและในการขึ้นรูปพลาสติก เป็นต้น

การสร้างคลื่นอัลตราซาวนด์

แหล่งของคลื่นอัลตราซาวนด์และชนิดของอุปกรณ์ให้กำเนิดคลื่นที่สร้างขึ้นจากทรานสดิวเซอร์ (Transducer) ซึ่งเป็นอุปกรณ์ที่เปลี่ยนพลังงานกลหรือพลังงานไฟฟ้าไปเป็นพลังงานเสียงเป็นสิ่งสำคัญอันดับแรกในการตัดสินใจใช้อัลตราซาวนด์มาประยุกต์ใช้ ในกระบวนการแปรรูปอาหารโดยทั่วไปสามารถแบ่งทรานสดิวเซอร์ เป็นประเภทใหญ่ ๆ ได้ 3 ประเภท ได้แก่

1. ลิควิดไดรฟ์เฟวทรานสดิวเซอร์ (Liquid driven transducer)

ลักษณะการทำงานของทรานสดิวเซอร์ชนิดนี้ทำให้เกิดคลื่นอัลตราซาวนด์โดยการบังคับของเหลวและผ่านไปกระทบกับแผ่นโลหะขนาดบาง (ใบมีดบาง) ซึ่งวางอยู่ในทิศทางการเคลื่อนที่ของของเหลวทำให้แผ่นโลหะนั้นเกิดการสั่นไปมาในการสั่นแต่ละครั้งจะทำให้ผิวหน้าของแผ่นโลหะเกิดการปะทะกับของเหลวเป็นผลทำให้เกิดคลื่น ความดันขึ้นและทำให้เกิดปรากฏการณ์แควิเทชันขึ้นภายในของเหลวนั้นการเกิดคลื่นความดันสลับกับแควิเทชันเป็นผล ทำให้ของเหลวสามารถผสมเข้ากันได้ดียิ่งขึ้นลักษณะของทรานสดิวเซอร์ชนิดนี้แสดงดังภาพที่ 2.5



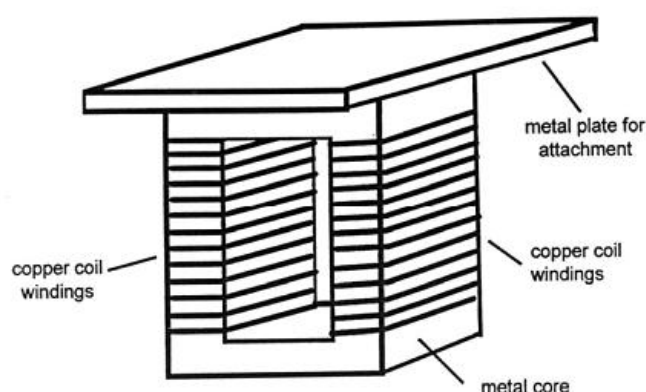
ภาพที่ 2.5 ลิควิดไครสตัลฟเวทธานส์ดิวเซอร์

ที่มา : Mason (1998)

2. แมกนีโตสตริกทีฟฟเวทธานส์ดิวเซอร์ (Transducer magnetostrictive)

ฟเวทธานส์ดิวเซอร์ชนิดนี้เป็นอุปกรณ์ที่เปลี่ยนพลังงานไฟฟ้าไปเป็นพลังงานกลโดยใช้คุณสมบัติแมกนีโตสตริกชัน (Magnetostriction) ซึ่งเป็นผลมาจากการที่สารเฟอร์โรแมกเนติก (ferromagnetic materials) เช่น นิกเกิล (Nickel) หรือเหล็ก (Iron) เกิดการเปลี่ยนแปลงของมิติหรือขนาดเมื่ออยู่ในสนามแม่เหล็ก (Magnetic field) ลักษณะของฟเวทธานส์ดิวเซอร์ชนิดนี้คล้ายกับโซลินอยด์ (Solenoid) ที่ใช้สารเฟอร์โรแมกเนติกเป็นแกนโดยแกนดังกล่าวประกอบขึ้นจากแผ่นนิกเกิลหรือนิกเกิลอัลลอย (Nickel alloy) ขนาดบางจำนวนหลายชั้นโดยรูปที่ง่ายที่สุดจะมีลักษณะเป็นวงสี่เหลี่ยมที่พันด้วยลวดทองแดงในแต่ละด้านที่อยู่ตรงกันข้ามดังภาพที่

2.6



ภาพที่ 2.6 แมกนีโตสตริกทีฟฟเวทธานส์ดิวเซอร์

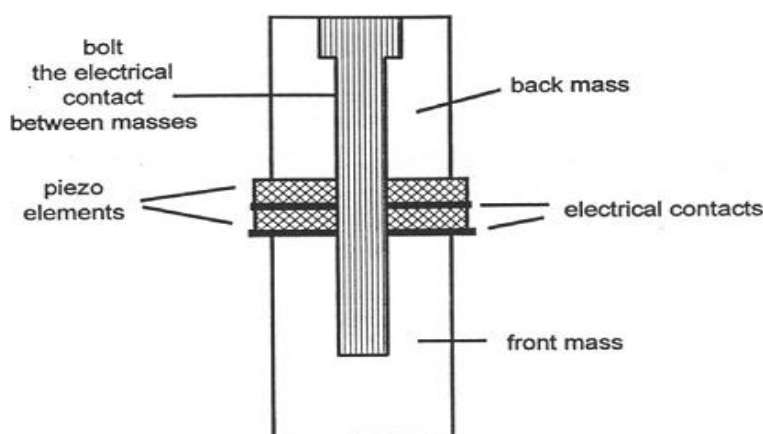
ที่มา : Mason (1998)

จากภาพเมื่อผ่านกระแสไฟฟ้าเข้าสู่ขดลวดจะทำให้เกิดการลดขนาดของแกนซึ่งผลิตจากสารเฟอร์โรแมกเนติก (เรียกว่าเกิดแมกนีโตสตริกชัน - Magnetostriction) และทำให้ขนาดของฟเวทธานส์ดิวเซอร์ลดลงไปด้วยและเมื่อหยุดให้กระแสไฟฟ้าจะทำให้แกนหรือฟเวทธานส์ดิวเซอร์กลับมามีขนาดเท่าเดิมดังนั้นการให้และหยุดให้กระแสไฟฟ้าแก่ตัวแกนจะทำให้แกนบิดแรงสั่นที่ต้องการขึ้นได้ ทั้งนี้จะต้องออกแบบฟเวทธานส์ดิวเซอร์ให้มีขนาดที่เหมาะสมเพื่อทำให้เกิดการสั่นตามความถี่ของคลื่นที่กำหนดไว้ ข้อเสียของฟเวทธานส์ดิวเซอร์ชนิดนี้ได้แก่

□สามารถสร้าง คลื่นอัลตราซาวด์ □ ได้ □ ต่ำกว่า 100 kHz และระบบมีประสิทธิภาพในการใช้ □ กระแสไฟฟ้าเพียง 60% โดยจะสูญเสียพลังงาน ในรูปของความร้อนระบบนี้จึงมักต้องใช้เวลาทำ ความเย็นภายนอกควบคู่กันไปด้วย ส่วนข้อดีได้แก่ การที่ระบบนี้มี โครงสร้างที่แข็งแรงและทนทาน

3. พิโซอิเล็กตริกทรานส์ดิวเซอร์ (Transducer piezoelectric)

ทรานส์ □ ดิวเซอร์ □ ชนิดนี้เป็นที่นิยมใช้กันทั่วไปในการทำให้เกิดคลื่นอัลตราซาวด์ □ โดย การ ใช้ □ เซรามิกซ์ (Ceramics) ที่มีส่วนผสมของสารพิโซอิเล็กตริก (Piezoelectric materials) เช่นแบเรียมไทเทเนต (Barium titanate) หรือเลดเมตาไนโอเบต (Lead metaniobate) สารพิโซเซรามิกซ์ดังกล่าวนิยมใช้ในเครื่องอัลตราซาวด์ □ ที่ใช้ชะล้างสกปรกที่ ติดอยู่ให้หลุดออกหรือเพื่อทำ ความสะอาดหรือใช้ □ กับระบบโพรบ (Probe ระบบ) โดยจะมีลักษณะเป็นแผ่นกลมที่มีรูตรงกลาง ทรานส์ดิวเซอร์เซรามิกซ์นี้ จะมีความเปราะและแตกหักง่ายมากดังนั้นจึงต้องใช้แท่งโลหะมา ประกบทั้งทางด้านหน้าและด้านหลัง ซึ่งนอกจากจะช่วยป้องกันการแตกหักแล้วยังช่วยป้องกัน ความเสียหายที่เกิดจากความร้อนส่วนเกินโดยทำหน้าที่เป็นตัวรับความร้อนโดยทั่วไปโครงสร้าง ของทรานส์ดิวเซอร์ชนิดนี้จะประกบกันโดยใช้แผ่นพิโซเซรามิกซ์สองชนิด (เรียกว่าการก่อสร้างแซนวิช) ซึ่งจะทำให้การสั่นสะเทือนเพิ่มมากขึ้นกว่าการใช้เพียงชนิดเดียวพิโซอิเล็กตริกทรานส์ □ ดิวเซ ออร์ □ แสดงดังภาพที่ 2.7 โดยทรานส์ดิวเซอร์นี้มีประสิทธิภาพในการใช้ □ กระแสไฟฟ้าสูงกว่า 95% และสามารถปรับใช้งานได้ □ ทุกข □ วงของคลื่นอัลตราซาวด์ □



ภาพที่ 2.7 พิโซอิเล็กตริกทรานส์ดิวเซอร์

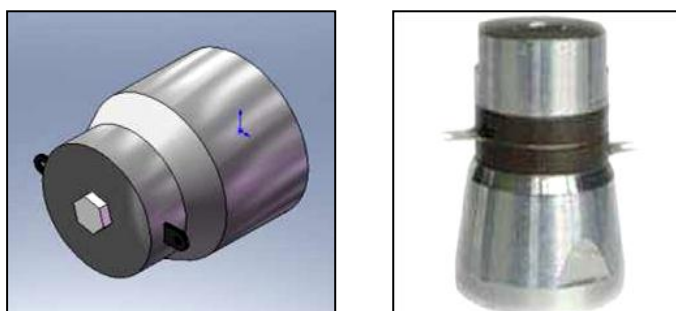
ที่มา : Mason (1998)

การออกแบบระบบอัลตราโซนิก

ระบบอัลตราโซนิกที่ใช้ลิวทราเนชันสวิตเซอร์นั้นเป็นระบบที่ง่ายที่สุดและมีความทนทาน แต่ในการใช้งานจะขึ้นอยู่กับความเร็วในการบีบของเหลวให้เคลื่อนที่ผ่านรูขนาดเล็กไปยังแผ่นโลหะขนาดบาง ดังนั้นการนำไปประยุกต์ใช้งานของระบบอัลตราโซนิกที่ใช้ลิวทราเนชันสวิตเซอร์จึงได้แก่การผสม (Mixing) และการโฮโมจีไนส์ (Homogenization) ซึ่งช่วยทำให้กระบวนการดังกล่าวมีประสิทธิภาพเพิ่มขึ้น อุปกรณ์ส่วนใหญ่ที่ใช้เป็นตัวให้กำเนิดพาวเวอร์อัลตราซาวด์ในปัจจุบันได้แก่ระบบที่ใช้ไฟฟ้าเพื่อทำให้เกิดคลื่นเสียง (Electroacoustic systems) เช่นไพโซอิเล็กทริกหรือแมกนีโตสตริกที่พาวเวอร์สวิตเซอร์ หลังจากที่ใช้อุปกรณ์ดังกล่าวให้กำเนิดคลื่นแล้วจะต้องมีอุปกรณ์ที่ใช้ในการส่งถ่ายคลื่นอัลตราซาวด์ไปยังของเหลว โดยสรุปแล้วระบบอัลตราซาวด์จะต้องมีอุปกรณ์ที่สำคัญและจำเป็นอยู่ 3 ส่วน ได้แก่

ส่วนที่ 1 เครื่องกำเนิดกระแสไฟฟ้า (Generator) โดยการเปลี่ยนกระแสไฟฟ้ากระแสตรงไปเป็นกระแสสลับที่มีความถี่ที่ต้องการและผ่านเข้าสู่ทรานส์ดิวเซอร์

ส่วนที่ 2 ทรานส์ดิวเซอร์ ซึ่งทำหน้าที่เปลี่ยนไฟฟ้ากระแสสลับความถี่สูงไปเป็นการสั่นเนื่องจากพลังงานกล ทรานส์ดิวเซอร์ที่นิยมในปัจจุบันคือชนิดที่ใช้เทคโนโลยีไพโซอิเล็กทริกประกอบด้วยชิ้นสารเซรามิคสี่เหลี่ยมซึ่งมีผิวโลหะเงินฉาบอยู่ทั้ง 2 หน้าเพื่อให้ต่อสายไฟออกมาเป็นขา 2 ขา ทรานส์ดิวเซอร์แบบเซรามิคที่มีจำหน่ายกันจะมีความถี่เรโซแนนซ์ให้เลือกตั้งแต่ 23 kHz ขึ้นไปจนถึง 40 kHz แต่ที่พบบ่อยก็มี 23 kHz , 25 kHz และ 40 kHz โดยความถี่ 40 kHz เป็นรุ่นที่นิยมใช้กันมากที่สุดเพราะมีทิศทางดีกว่าแสดงในภาพที่ 2.8 โดยที่รูปร่างและขนาดของทรานส์ดิวเซอร์ที่นำมาประกอบกันจะขึ้นอยู่กับความถี่ที่ต้องการใช้งานและพลังงานจากทรานส์ดิวเซอร์แต่ละชนิดจะแปรผกผันกับกำลังสองของความถี่ ดังนั้นในการประยุกต์ใช้พาวเวอร์อัลตราซาวด์จึงมักใช้ในช่วงความถี่ต่ำ โดยตัวทรานส์ดิวเซอร์จะอยู่ติดกับบูสเตอร์ (Booster) หรือฮอร์น (Horn) ด้านบนและเชื่อมต่อกับระบบส่งถ่ายพลังงาน



ภาพที่ 2.8 ชุดเพียโซอิเล็กทริกทรานส์ดิวเซอร์

ที่มา: ยศพนธ์ ฉัตรจรัสแสง (2551)

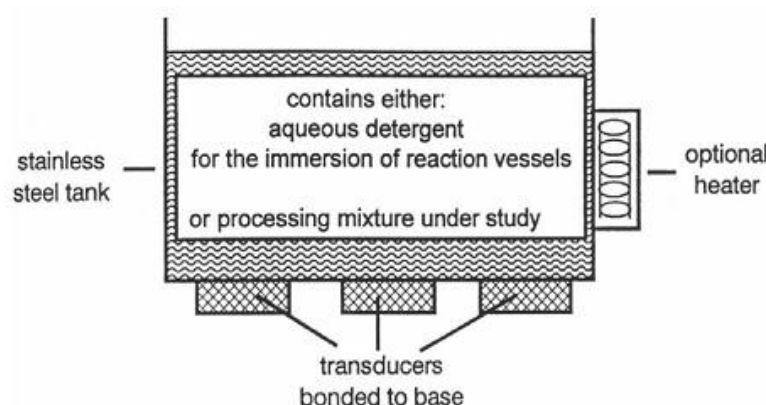
ส่วนที่ 3 ระบบส่งถ่ายพลังงาน (Delivery systems) ซึ่งจะทำหน้าที่ส่งถ่ายพลังงานจากการสั่นสะเทือนไปยังของเหลว ในกรณีที่เป็นอ่างอัลตราโซนิก (Ultrasonic bath) ตัวทรานส์ดิวเซอร์จะอยู่บริเวณฐานตรงด้านล่างของตัวอ่างหรือถังและส่งถ่ายพลังงานโดยตรงไปยังของเหลวที่อยู่ภายในอ่าง ส่วนระบบที่ต้องการพลังงานที่สูงกว่านี้ จะใช้วิธีขยายสัญญาณหรือพลังงานและส่งถ่ายพลังงานไปยังของเหลว โดยใช้อุปกรณ์ที่เรียกว่าฮอρνซึ่งเป็นแท่งโลหะที่มีรูปร่างแตกต่างกันและจะติดกับทรานส์ดิวเซอร์ โดยตัวฮอρνมักทำจากวัสดุที่ทำให้เกิดขนาดของความยาวคลื่นครึ่งหนึ่งหรือเพิ่มขึ้นเป็นจำนวนเท่าตัวของความยาวคลื่นเสียง หลังจากใช้งานเป็นเวลานานจะทำให้บริเวณส่วนปลายของฮอρνเกิดการกัดกร่อนและมีผลต่อความยาวของฮอρνโดยทำให้สั้นลง จึงนิยมใช้ส่วนปลายฮอρνชนิดที่ถอดเข้าออกได้และเป็นเกลียวซึ่งสามารถเปลี่ยนได้ง่าย

ประเภทของเครื่องอัลตราโซนิก (Ultrasonic reactor)

เครื่องอัลตราโซนิกที่ใช้อยู่ทั่วไปในปัจจุบันมีความแตกต่างกันตรงที่การออกแบบแหล่งกำเนิดไฟฟ้า แหล่งกำเนิดคลื่นและตัวเครื่องหรือเซลล์ที่ใช้ร่วมกับแหล่งกำเนิดคลื่น โดยสามารถแบ่งเป็นชนิดต่างๆ ดังนี้

1. อ่างอัลตราโซนิก (Ultrasonic baths)

อ่างอัลตราโซนิกเป็นอุปกรณ์ที่นิยมใช้กันอย่างแพร่หลายและมีการนำมาใช้เป็นเวลานานแล้วโดยเฉพาะในห้องปฏิบัติการเนื่องจากมีราคาไม่แพงเมื่อเปรียบเทียบกับเครื่องที่ใช้ระบบโพรบ โดยทั่วไปทรานส์ดิวเซอร์จะติดอยู่กับบริเวณฐานด้านล่างของอ่างและความถี่ที่ใช้งานส่วนใหญ่ประมาณ 40 kHz อ่างอัลตราโซนิกมีลักษณะดังภาพที่ 2.9



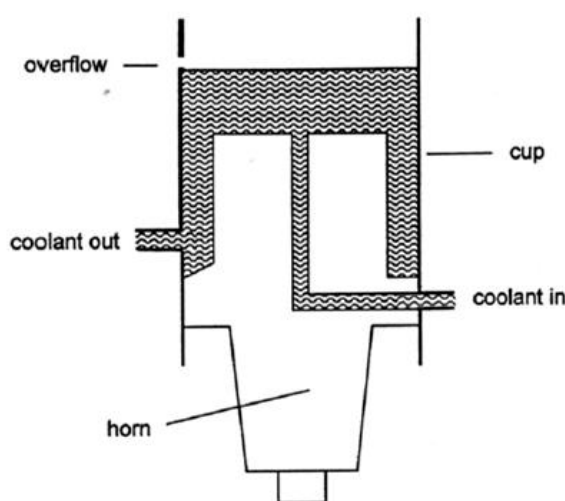
ภาพที่ 2.9 อ่างอัลตราโซนิก

ที่มา : Mason (1998)

สำหรับอ่างอัลตราโซนิกนั้นพลังงานสูงสุดที่สร้างได้จะอยู่ตรงบริเวณระดับความสูงค่าหนึ่งตลอดความลึกของอ่าง ทั้งนี้เนื่องจากการเกิดคลื่นจากการสะท้อน (Reflection) ของคลื่นอัลตราซาวด์ที่ถูกสร้างขึ้นตรงบริเวณรอยต่อระหว่างอากาศและของเหลว ซึ่งแยกโดยระยะทางที่เทียบเท่ากับครึ่งหนึ่งของความยาวคลื่นเสียงของของเหลวภายในอ่าง (สำหรับน้ำ มีค่า $\lambda = 37$ มิลลิเมตรที่ความถี่ 40 kHz) ดังนั้นถ้าระดับน้ำในอ่างลดลงต่ำกว่าค่า λ จะส่งผลทำให้ไม่สามารถทำให้เกิดคลื่นเสียงที่มีพลังงานสูงได้

อ่างอัลตราโซนิกนั้นมีอุปกรณ์เสริมประเภทต่างๆ ที่นำมาใช้เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการทำงานให้ดีขึ้น เช่น อุปกรณ์ควบคุมอุณหภูมิอัตโนมัติ (Thermostatically controlled heating) อุปกรณ์กระจายคลื่น (frequency sweeps) ที่ทำให้แคปิตเวชันเกิดขึ้นอย่างสม่ำเสมอ อุปกรณ์ปรับระดับพลังงาน สวิตช์เปิดปิดแบบจังหวะหรือนาฬิกาจับเวลา เป็นต้น อ่างอัลตราโซนิกทั่วไปมักจะให้พลังงานต่ำ เพื่อหลีกเลี่ยงความเสียหายจากแคปิตเวชันที่เกิดขึ้นตรงบริเวณผนังด้านในของอ่างนอกจากนั้นของเหลวที่เติมในอ่างมักมีปริมาณมากทำให้ปริมาณพลังงานมีค่าลดลง

รูปแบบของอ่างอัลตราโซนิกอีกประเภทหนึ่งเรียกว่าคัพฮอร์น (Cup horn) แสดงดังภาพที่ 2.10 โดยจัดว่าเป็นอ่างอัลตราโซนิกที่สร้างพลังงานได้สูงมาก เนื่องจากบริเวณผิวหน้าที่เกิดคลื่นอัลตราซาวด์ซึ่งติดอยู่กับทรานส์ดิวเซอร์จะสัมผัสโดยตรงกับของเหลว และลักษณะการทำให้เกิดพลังงาน

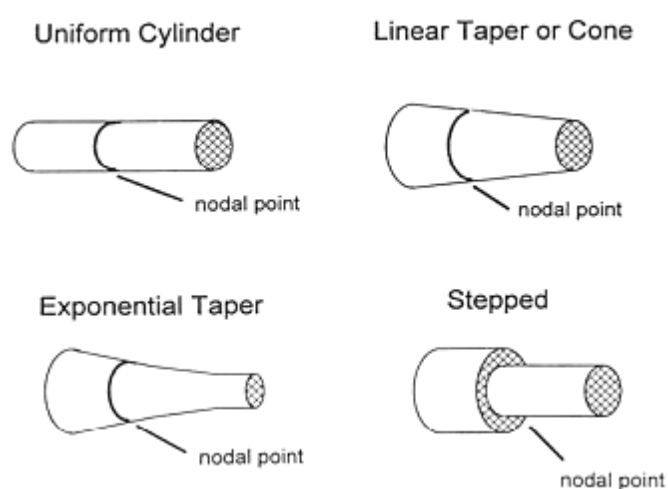


ภาพที่ 2.10 อ่างอัลตราโซนิกแบบคัพฮอร์น

ที่มา : Mason (1998)

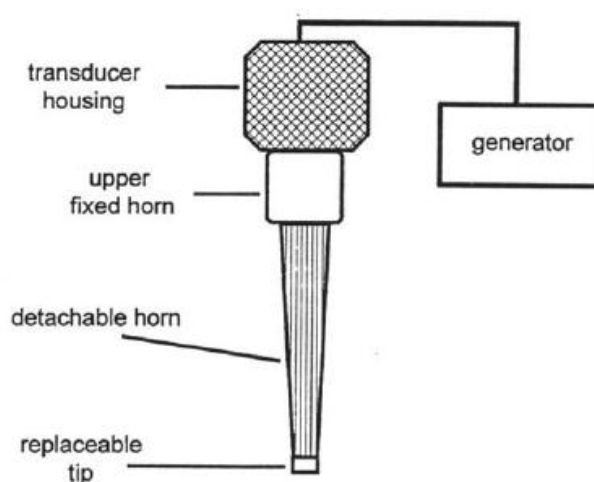
2. ระบบอัลตราโซนิกแบบโพรบ (Ultrasonic probe systems)

ในการขยายพลังงานหรือคลื่นเสียงที่เกิดขึ้นจากทรานส์ดิวเซอร์นั้น โดยทั่วไปจะนำทรานส์ดิวเซอร์มาต่อเข้ากับอุปกรณ์ที่เรียกว่าฮอร์น (Horn) ลักษณะของฮอร์นจะมีความแตกต่างกันออกไปดังภาพที่ 2.11 โดยฮอร์นส่วนใหญ่จะให้ขนาดของความยาวคลื่นครึ่งหนึ่งหรือเป็นพหุคูณกับความยาวของคลื่นเสียงของวัสดุที่นำมาผลิต ระบบอัลตราโซนิกแบบโพรบแสดงดังภาพที่ 2.12



ภาพที่ 2.11 ลักษณะของฮอร์นชนิดต่างๆ

ที่มา : Mason (1998)



ภาพที่ 2.12 ระบบอัลตราโซนิกแบบโพรบ

ที่มา : Mason (1998)

แอมพลิจูดที่สร้างขึ้นจากระบบนี้จะขึ้นกับรูปร่างลักษณะของฮอร์น สำหรับฮอร์นที่มีลักษณะเป็นแท่งทรงกระบอก (Uniform cylinder) นั้นแอมพลิจูดจะไม่มีเปลี่ยนแปลง แต่ฮอร์นจะทำหน้าที่ขยายหรือเพิ่มการส่งถ่ายพลังงานเสียง ขนาดความยาวคลื่นที่ได้จากตัวขยาย (Amplifier) สามารถคำนวณได้จากอัตราส่วนของเส้นผ่านศูนย์กลางของพื้นผิวหน้าตัดในฮอร์นระหว่างสองพื้นที่คือ Driven face (D) และ Emitting face (d) ตัวอย่างเช่นในฮอร์นที่มีรูปร่างเป็น Exponential หรือ Linear tapered (cone) (ภาพที่ 2.11 บนขวาหรือล่างซ้าย) จะมีอัตราส่วนเท่ากับ D/d ในขณะที่ฮอร์นที่มีลักษณะเป็น Stepped (ภาพที่ 2.11 ล่างขวา) จะมีอัตราส่วนเท่ากับ $(D/d)^2$ ซึ่งจะเห็นว่าฮอร์นแบบ Stepped จะมีความสามารถในการขยายสัญญาณได้สูงกว่าเสมอ แต่เพื่อเป็นการหลีกเลี่ยงความเสียหายจากความเค้นภายในตัววัตถุ (Internal stress) อัตราส่วนระหว่าง D/d จะต้องไม่สูงจนเกินไป ในทางปฏิบัติขนาดของพลังงานสูงสุดที่ได้จากแหล่งกำเนิดพลังงานนั้นขึ้นอยู่กับปัจจัยที่สำคัญสองส่วน ได้แก่ คุณสมบัติของวัสดุที่ใช้ในการผลิตทราเนอไดรเซอร์และพื้นผิวที่ปลดปล่อยคลื่น (Emitting surface) ในส่วนของวัสดุที่นำมาใช้ผลิตทราเนอไดรเซอร์นั้น นิยมใช้วัสดุที่สามารถยืดและคืนตัวกลับได้ดี เช่นไทเทเนียม (Titanium) หรืออะลูมิเนียมอัลลอย (Aluminium alloy) ซึ่งวัสดุทั้งสองชนิดมีความทนต่อการล้าเนื่องจากแรงกล แต่อะลูมิเนียมอัลลอยนั้นไม่เหมาะสมที่จะสัมผัสกับของเหลวที่เกิดปฏิกิริยาแคปติเวชันเนื่องจากถูกกัดกร่อนได้ง่าย จึงควรใช้วัตถุพวกไทเทเนียมอัลลอยแทน สำหรับพื้นผิวที่ปลดปล่อยคลื่นนั้นพบว่าพื้นที่ขนาดเล็กจะให้ประสิทธิภาพที่สูงกว่า แต่ที่แอมพลิจูดสูงจะมีข้อจำกัดเนื่องจากฟองอากาศที่เกิดขึ้นบริเวณพื้นผิวหน้าจากปฏิกิริยาแคปติเวชันจะรบกวนการส่งถ่ายของพลังงานไปยังของเหลว

3. อุปกรณ์ที่ใช้ระบบแผ่นสั่นคู่ขนาน (Equipment involving parallel vibrating plates)

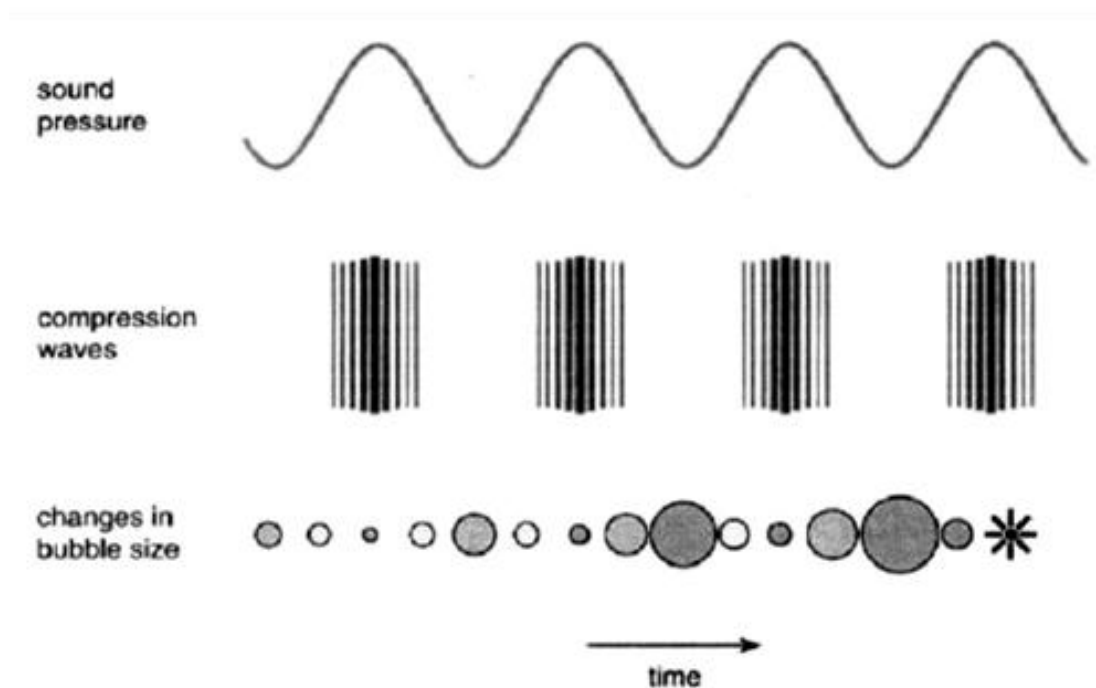
ระบบนี้พบว่าเป็นทางเลือกที่ดีในการนำคลื่นอัลตราซาวด์มาใช้กับงานที่มีลักษณะต่อเนื่อง โดยผลิตภัณฑ์จะได้รับคลื่นอัลตราซาวด์อย่างสม่ำเสมอในระหว่างทางที่ไปยังเครื่องอูลตราโซนิกซึ่งทำให้เกิดการสั่นที่บริเวณผนังด้านในตัวเครื่อง เมื่อแผ่นดังกล่าวเคลื่อนที่เข้ามาใกล้กันมากขึ้นจะมีผลทำให้การลดทอนพลังงาน (Attenuation) ของคลื่นเสียงภายในของเหลวมีค่าต่ำสุดและไม่เกิดคลื่น ข้อดีของระบบแผ่นสั่นคู่ที่ติดตั้งในแต่ละด้านของของเหลวเมื่อเปรียบเทียบกับการใช้ระบบแผ่นสั่นแผ่นเดียวคือคลื่นพลังงานที่เกิดขึ้นก่อนที่จะส่งถ่ายไปยังของเหลวจะสะท้อนไปยังแผ่นที่สั่นอีกแผ่นหนึ่งที่อยู่ตรงกันข้าม ทำให้ผลที่เกิดจากแรงกลมีค่าสูงสุด

4. ระบบการสั่นตามแนวรัศมี (Radial vibrating systems)

ในการให้พลังงานคลื่นอุลตราซาวด์กับของเหลวที่ไหลอยู่ภายในท่อนั้น วิธีที่ดีที่สุดคือการใช้การสั่นของท่อเพื่อทำให้เกิดคลื่นพลังงานขึ้น ซึ่งจะทำให้อัตราการไหลมีค่าสูงขึ้นรวมทั้งใช้ได้กับผลิตภัณฑ์ที่มีความข้นหนืดสูงได้ ลักษณะการตัดขวางของท่อดังกล่าวมีความสำคัญโดยท่อทรงกระบอกที่สั้นจะทำให้เกิดคลื่นอุลตราซาวด์สูงสุดตรงบริเวณกึ่งกลางของท่อเช่นเดียวกับท่อที่มีลักษณะหกลเหลี่ยมและการเกิดพลังงานน้อยกว่าตรงบริเวณที่ใกล้พื้นผิวด้านในของท่อมีผลคือช่วยลดปัญหาที่เกิดจากการกัดกร่อนตรงบริเวณดังกล่าว การนำทรานส์ดิวเซอร์มาเชื่อมติดกับท่อโลหะโดยตรง ทำให้สามารถเกิดคลื่นในแนวรัศมีและเกิดบัพ (Nodes) และปฏิบัพ (Antinodes) เป็นช่วงระยะเท่ากับ $\lambda/2$ ตามความยาวของท่อ

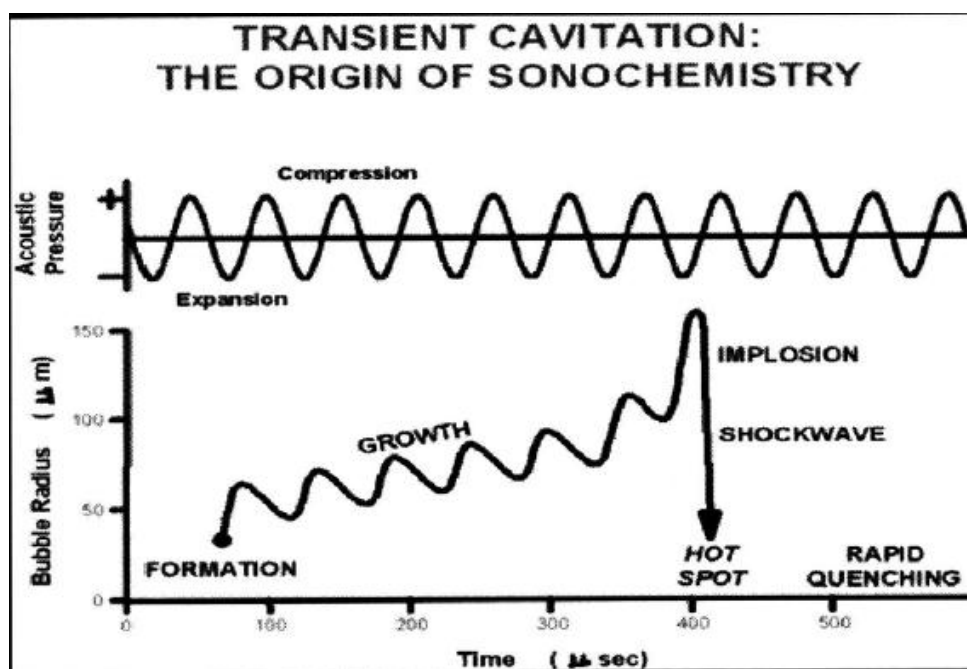
ปรากฏการณ์แคปวิเตชัน (Cavitation)

ปรากฏการณ์แคปวิเตชันหมายถึงกระบวนการที่เกิดขึ้นในตัวกลาง หรือสารละลายที่ได้รับคลื่นเสียงอุลตราซาวด์ โดยทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางด้านเคมีและทางกายภาพ (จากแรงกล) เนื่องจากฟองอากาศ (Bubbles) ที่เกิดขึ้น ซึ่งการที่ฟองอากาศเกิดขึ้นได้นั้นเนื่องจากโครงสร้างของของเหลวที่ได้รับคลื่นอุลตราซาวด์จะถูกบีบอัด (Compress) และคลายตัว (Stretch) ซ้ำไปมาเป็นจำนวนหลายพันรอบ ทำให้เกิดฟองอากาศขึ้นแสดงดังภาพที่ 2.13 และฟองอากาศที่เกิดขึ้นภายในของเหลวนี้จะสัมผัสกับแรงสั่นที่เกิดจากคลื่นอุลตราซาวด์เป็นระยะและเกิดการแตกเปลี่ยนแก๊สระหว่างกัน (Atchley and Crum, 1998) เป็นผลให้ฟองอากาศมีขนาดใหญ่ขึ้นไปเรื่อยๆ จนกระทั่งแตกออกในที่สุดแสดงดังภาพที่ 2.14



ภาพที่ 2.13 การเกิดฟองอากาศในตัวกลางเนื่องจากคลื่นอัลตราซาวด์

ที่มา : Suslick (1994)



ภาพที่ 2.14 การเกิดฟองอากาศในตัวกลางเนื่องจากคลื่นอัลตราซาวด์

ที่มา : Suslick (1994)

สารต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant)

อนุมูลอิสระ (Free radical) เป็นโมเลกุลที่มีอะตอมหรือโมเลกุลที่มีอิเล็กตรอนเดี่ยว (Single หรือ Unpaired electron) อยู่รอบนอกและมีอายุสั้นมาก จึงจัดเป็นโมเลกุลที่ไม่เสถียรและว่องไวต่อปฏิกิริยาเคมี ชนิดที่พบบ่อยเช่น Superoxide radical ($O_2^{\bullet-}$) Hydroxyl radical ($OH^{\bullet}$) Peroxyl radical ($ROO^{\bullet}$) เป็นต้น อนุมูลอิสระเหล่านี้สามารถผลิตขึ้นเองในร่างกายจากระบวนการหายใจระดับเซลล์ ระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายในการฆ่าเชื้อโรคของเม็ดเลือดขาวและระบบส่งสัญญาณระหว่างเซลล์ (Signal transduction) นอกจากนี้อนุมูลอิสระยังเกิดขึ้นได้จากการได้รับสารเคมี สารพิษจากสิ่งแวดล้อม รังสี ยาบางชนิด อนุมูลอิสระเป็นโมเลกุลที่ไม่คงตัวจึงมีความไวสูงในการเข้าทำปฏิกิริยากับสารต่างๆ เช่น ไขมัน โปรตีน คาร์โบไฮเดรต และกรดนิวคลีอิก ผลที่เกิดขึ้นหลังจากการทำปฏิกิริยาทำให้ส่วนประกอบต่างๆ ของเซลล์เสียหาย และเซลล์อาจถูกทำลายได้ในที่สุด หากเป็นการทำลายหรือเปลี่ยนแปลงโครงสร้างดีเอ็นเอทำให้มีการสร้างยีนส์ที่ผิดปกติจนอาจกลายเป็นเซลล์มะเร็ง (วาริน แสงกิตติโกมล, 2546) นอกจากนี้ยังส่งผลให้เกิดโรคต่างๆ ตามมาไม่เพียงแต่โรคมะเร็งเท่านั้นยังรวมถึงโรคหลอดเลือดหัวใจตีบ หัวใจวาย ไตวาย เบาหวาน ความชรา และ ต้อกระจก เป็นต้น (Knight, 1995) โดยปกติร่างกายสามารถป้องกันและยับยั้งอนุมูลอิสระโดยอาศัยสารต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant) ในร่างกายเช่น กลุ่มของเอนไซม์ได้แก่ Superoxide dismutase, Glutathione peroxidase และ Catalase เป็นต้น และกลุ่ม Metal - binding protein ได้แก่ Ferritin, Transferrin และ Ceruloplasmin เป็นต้น (Halliwell, B. & Gutteridge, J.M.C., 1989)

นอกจากนี้สารต้านอนุมูลอิสระยังสามารถพบได้ในผัก ผลไม้ และสมุนไพร ซึ่งมีสารต้านอนุมูลอิสระหลายชนิด เช่น สารประกอบฟีนอลิกส์ (Phenolic compounds) และวิตามินซี (วาริน แสงกิตติโกมล, 2546)

สารที่อยู่ในกลุ่มสารประกอบฟีนอลิกส์ ได้แก่ Flavonoids, Flavones, Gallic acid, Ellagic acid, Anthocyanins, Carotenoids และอนุพันธ์ของ Cinnamic acid (Cowan, 1999; Helmja *et al.*, 2007) สารในกลุ่มนี้เป็นสารที่ให้สีส้มแก่พืช ผัก ผลไม้ เช่น สาร Carotenoids ให้สีส้ม เหลืองในแครอท พักทอง มะละกอ สาร Anthocyanins พบในผลเชอร์รี่ทำให้มีสีแดง ผลองุ่น ดอกอัญชันมีสีม่วง สารเหล่านี้พบมากน้อยต่างกันขึ้นอยู่กับชนิดของพืช สารต้านอนุมูลอิสระพวกนี้ทำให้พืชมีภูมิคุ้มกันจากการติดเชื้อต่างๆ และสามารถทนต่อปฏิกิริยา Photooxidation ในการสร้างอาหารได้ (วาริน แสงกิตติโกมล, 2546) เมื่อรับประทานอาหารที่มีสารต้านอนุมูลอิสระมากทำให้ร่างกายมีสารต้านอนุมูลอิสระเพิ่มสูงขึ้นในกระแสเลือด (Cao *et al.*, 1989) ซึ่งสามารถป้องกันอันตรายที่เกิดจากการทำลายของอนุมูลอิสระได้ การรับประทานอาหารประเภทผักใบเขียว

ผลไม้และสมุนไพรเป็นประจำทำให้ร่างกายสามารถป้องกันโรคที่มีสาเหตุจากการทำลายของอนุมูลอิสระเช่นโรคไขมันในเลือดสูง โรคหัวใจ เบาหวาน โรคมะเร็ง โรคไต รวมทั้งความแก่ชรา

1) สารต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidants)

สารต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidants) เป็นสารที่สามารถทำปฏิกิริยากับอนุมูลอิสระโดยตรงเพื่อกำจัดอนุมูลอิสระให้หมดไปหรือหยุดปฏิกิริยาถูกใช้ไม่ให้เกิดต่อไปเป็นศัพท์ที่แปลมาจากคำว่า Antiradical ปัจจุบันได้ถูกบัญญัติใหม่เป็นสารขจัดหรือกำจัดอนุมูล (Radicalscavenger) เพื่อให้ตรงกับหน้าที่การทำงานและอาจใช้คำว่า “สารแอนตีออกซิแดนท์” แทนอย่างไรก็ตามในภาษาไทยยังคงใช้คำว่าสารต้านอนุมูลอิสระอยู่ (โสภา วัชรคุปต์, 2550)

1.1) ความสำคัญในการประเมินปริมาณสารอนุมูลอิสระและวิธีการหาปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระ

อนุมูลอิสระเป็นโมเลกุลที่ไม่คงตัวจึงมีความไวสูงในการเข้าทำปฏิกิริยากับสารชีวโมเลกุลต่างๆของร่างกายไม่ว่าจะเป็นไขมัน โคเลสเตอรอล กรดไขมันไม่อิ่มตัว โปรตีน และสารพันธุกรรมของร่างกายจึงทำให้โครงสร้าง และบทบาทการทำงานของสารชีวโมเลกุลนี้มีความผิดปกติไป และสามารถเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันต่อเนื่องจากสารชีวโมเลกุลหนึ่งไปยังสารชีวโมเลกุลอื่นจนเกิดอนุมูลใหม่เป็นปฏิกิริยาลูกโซ่ได้ ทำให้เกิดสภาวะที่เซลล์หรือเนื้อเยื่อต่างๆ อาจถูกทำลายได้ในที่สุด ถ้าปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นเป็นการทำลายหรือเปลี่ยนแปลงโครงสร้างดีเอ็นเอ และทำให้มีการสร้างยีนส์ที่ผิดปกติอาจทำให้กลายเป็นเซลล์มะเร็ง นอกจากนี้ยังส่งผลให้เกิดโรคต่างๆมากมาย เช่น โรคเกี่ยวกับหลอดเลือดหัวใจ (Cardiovascular) พาร์กินสัน (Parkinson's disease) อัลไซเมอร์ (Alzheimer's disease) หรือแม้แต่การแก่ก่อนวัย (Aging) (ไกรสิทธิ์ ตันติศิริพันธ์, 2538)

1.2) ความสำคัญในการประเมินหาปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระ

การประเมินหาปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระในตัวอย่างพืชสมุนไพร ผักผลไม้ มีความสำคัญและมีผู้ให้ความสนใจทำการวิจัยเป็นจำนวนมาก โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อวิเคราะห์หาพืชที่เป็นแหล่งของสารต้านอนุมูลอิสระและนำข้อมูลที่ได้มาใช้เป็นฐานข้อมูลในการบ่งชี้ว่าสมุนไพร และผลไม้ชนิดใดที่มีความเหมาะสมในการนำไปใช้ปรุงอาหารหรือนำไปบริโภคเพื่อเป็นอาหารสุขภาพ การประเมินความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระในตัวอย่างประเภทต่างๆสามารถทำได้หลายวิธี เช่น การวิเคราะห์หาปริมาณสารชนิดใดชนิดหนึ่งหรือกลุ่มใดกลุ่มหนึ่งที่พบว่ามีคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระ เช่น วิตามินซี วิตามินเอ หรือสารประกอบฟีนอลิก (Zulueta, *et al.*, 2007) แต่ในความเป็นจริงสารต้านอนุมูลอิสระในตัวอย่างหนึ่งๆมักจะประกอบไปด้วยสารต้านอนุมูลอิสระหลายๆชนิดผสมกันอยู่ซึ่งรวมถึงสารต้านอนุมูลอิสระที่ทราบว่าเป็น สารชนิดใด

แน่นอน และสารที่มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระแต่ยังไม่ทราบโครงสร้างของสารจนระบุได้ว่าเป็นสารใด ดังนั้นการที่จะประเมินความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระโดยการวัด และแยกวิเคราะห์ว่ามีสารชนิดใดบ้าง จึงเป็นการยากและไม่จำเป็น เพราะโดยความเป็นจริงแล้วเมื่อมีสารผสมกันหลายชนิดในอาหาร เครื่องดื่ม หรือวิตามิน สิ่งที่เราสนใจตรวจวัดควรจะเป็นการประเมินความสามารถต้านอนุมูลอิสระโดยรวม (Total antioxidant capacity, TAC) มากกว่าที่จะต้องวิเคราะห์จนระบุชี้ชัดว่าเป็นสารใด ซึ่งการวัดเป็น TAC นี้เป็นเทคนิคที่ได้รับความนิยม เพราะสามารถแสดงประสิทธิภาพการต้านอนุมูลอิสระของตัวอย่างที่ใกล้เคียงความเป็นจริงมากกว่า (Wang, Cao & Prior, 1996)

2) วิเคราะห์ฤทธิ์สารต้านอนุมูลอิสระ (รัชยาพร อโนราช และนาถิตา วีระปรียากร, 2548)

2.1) Trolox equivalent antioxidant capacity assay (TEAC I)

Trolox equivalent antioxidant capacity assay (TEAC I) หลักการเป็นการทำปฏิกิริยาออกซิเดชันของ 2,2-Azino-Bis-(3-Ethyl benz thiazoline-Sulfonic acid) (ABTS) กับ Metmyoglobin และ H_2O_2 ได้สารอนุมูลอิสระ $ABTS^{\bullet+}$ ที่มีสีเขียวแกมน้ำเงินที่มีการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร หากสารตัวอย่างมีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันจะยับยั้งการดูดกลืนแสงของอนุมูลอิสระ $ABTS^{\bullet+}$

ขั้นตอนการทดลอง เตรียมสารละลายผสมของ ABST, H_2O_2 กับ Metmyoglobin ในสารละลายบัฟเฟอร์ (Phosphate buffer saline solution) pH 7.4 เพื่อทำให้เกิด $ABTS^{\bullet+}$ ส่วนตัวอย่างที่จะนำมาทดลองให้ละลายในน้ำ ทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงของ $ABTS^{\bullet+}$ ที่ลดลง ณ เวลาต่างๆ หลังจากผสมสารตัวอย่างที่จะทดสอบกับ $ABTS^{\bullet+}$

2.2) TEAC with MnO_2 (TEAC II)

TEAC with MnO_2 (TEAC II) หลักการ เป็นการทำปฏิกิริยาออกซิเดชันของ ABTS กับ Manganese dioxide (MnO_2) โดยการกรอง ABTS ผ่าน MnO_2 เพื่อให้ได้ $ABTS^{\bullet+}$ ที่มีค่าการดูดกลืนแสงที่ 734 นาโนเมตร แล้วนำไปทำปฏิกิริยาต่อกับสารที่จะทดสอบ หากสารที่นำมาทดสอบมีฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน การดูดกลืนแสงของ $ABTS^{\bullet+}$ จะลดลง

ขั้นตอนการทดลอง เตรียมสาร ABTS ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 5 โมล, pH 7.4 (PBS) กรองผ่านผง MnO_2 แล้วนำไปกรองต่อผ่าน Syringe filter ขนาด 0.2 ไมครอนเมตร เพื่อกำจัด MnO_2 ที่เกินมาแล้วเจือจางด้วย 5 โมล PBS, pH 7.4 ทำการปรับความเข้มข้นเพื่อให้วัดค่าการดูดกลืนแสงได้ประมาณ 0.700 ± 0.020 ที่ค่าความยาวคลื่น 743 นาโนเมตร ทิ้งไว้ 2 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้องจะได้สารละลายของอนุมูลอิสระ $ABTS^{\bullet+}$ ในการทดสอบใช้

สารละลาย ABT^{•+} 1 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลายที่ต้องการทดสอบในน้ำปริมาตร 200 ไมโครลิตร นำไปเขย่า 30 วินาที แล้วปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 รอบต่อนาที นาน 60 วินาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วย UV-Vis Spectrophotometer หลังจากเวลา 2 นาที การทดลองต้องมีหลอดทดลองที่เป็น Blank (PBS) และหลอดควบคุม (สารละลาย ABTS^{•+} และน้ำ) การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจะดูจากการดูดกลืนแสงที่ลดลงที่ความเข้มข้นต่างๆของสารละลายตัวอย่างที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร

2.3) TEAC assay with ABTS and K₂O₈S₂ (TEAC III)

TEAC assay with ABTS and K₂O₈S₂ (TEAC III) หลักการ คล้ายกับ TEAC I และ II โดยพิจารณาฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของสารที่จะทดสอบจากการไปลดปริมาณอนุมูลอิสระ ABST^{•+} แต่ไม่สามารถใช้ทดสอบได้ทั้งสารตัวอย่างที่มีความชอบน้ำ (Hydrophilic) หรือสารที่มีความชอบไขมัน (Lipophilic) ถ้าสารที่ทดสอบมีฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน การเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันจะลดลง

ขั้นตอนการทดลอง เตรียมสารละลายผสมระหว่าง ABST 7 โมล ในน้ำกับสารละลาย 2.45 โมล Potassium persulfate (K₂O₈S₂) ที่ทิ้งไว้ 12-14 ชั่วโมง เพื่อให้ปฏิกิริยา ABST^{•+} สมบูรณ์ และเพื่อให้ค่าการดูดกลืนแสงคงที่ หลังจากนั้นเจือจางสารละลายที่มี ABST^{•+} ด้วยน้ำ หรือเอทานอลให้มีการดูดกลืนแสงประมาณ 0.700±0.020 ที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร เติมสารที่จะทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน ในปริมาณ 100 ไมโครลิตร ผสมกับสารละลาย ABST^{•+} 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ 45 วินาที แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงทันทีภายใน 1 นาที ที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร ฤทธิ์ต้านออกซิเดชันคำนวณจากค่าการดูดกลืนแสงที่ลดลงจากการใช้ความเข้มข้นต่างๆของสารที่ทดสอบ

2.4) TRAP assay (Total radical-trapping antioxidant parameter assay)

TRAP assay (Total radical-trapping antioxidant parameter assay) หลักการ เป็นการหาความสามารถในการจับกับอนุมูลอิสระโดยรวม (Total radical-trapping) ของสารที่ทดสอบ เนื่องจาก Peroxyl radical จากตัวกำเนิดอนุมูลอิสระ (Radical generator) 2,2-Azo-Bis (2-Amidino-Propane) Hydrochloride (ABAP) จะทำลายการเรืองแสงฟลูออเรสเซนซ์ของโปรตีน R - Phycoerythrin ซึ่งเรืองแสงฟลูออเรสเซนซ์ที่ความยาวคลื่น Excitation 495 นาโนเมตร และที่ความยาวคลื่น Emission 575 นาโนเมตร ถ้าสารที่ทดสอบมีฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน จะสามารถจับกับอนุมูลอิสระจาก ABAP ทำให้การเรืองแสงของ R - Phycoerythrin เพิ่มขึ้น หากสามารถจับกับอนุมูลอิสระได้อย่างสมบูรณ์จะทำให้การเรืองแสงฟลูออเรสเซนซ์ของ R - Phycoerythrin คงอยู่เป็นเวลานาน ซึ่งสามารถวัดได้โดย Spectrofluorometer

ขั้นตอนการทดลอง เตรียมสารละลายแขวนตะกอนของ R - Phycoerythrin ในความเข้มข้นของสาร 100 ไมโครลิตรใน Phosphate buffer saline, pH 7.0 ปริมาตร 100 ไมโครลิตร นำไปผสมกับ Phosphate buffer saline, pH 7.4 ปริมาตร 250 ไมโครลิตร และเติมสารที่ทดสอบ 50 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันทิ้งไว้ 37 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที เริ่มปฏิกิริยาออกซิเดชัน โดยการเติมสารละลาย 26 โมล ABAP นำสารละลายผสมไปวัดการเรืองแสงฟลูออเรสเซนซ์ทุก ๆ 5 นาที ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารที่ทดสอบดูจากการเพิ่มการเรืองแสงฟลูออเรสเซนซ์ของ R - Phycoerythrin

2.5) DPPH assay

DPPH assay หลักการ สารที่มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันจะจับกับอนุมูลอิสระ DPPH (2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl) ที่มีการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 515 นาโนเมตร ดังนั้นถ้าสารมีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันจะลดการดูดกลืนแสงของ DPPH

ขั้นตอนการทดลอง เตรียมสารละลาย DPPH ในความเข้มข้น 2.4 มิลลิกรัมในเมทานอลปริมาตร 100 มิลลิตร แล้วนำสารละลายของ DPPH ในปริมาตร 1.95 มิลลิตร มาผสมกับสารที่จะทดสอบที่มีปริมาตร 50 ไมโครลิตร ทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วย UV-Vis Spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 515 นาโนเมตร ณ เวลาต่างๆ ฤทธิ์ต้านออกซิเดชันอันเนื่องมาจากการจับกับอนุมูลอิสระหาได้จากค่าการดูดกลืนแสงที่ลดลงจากการใช้สารความเข้มข้นต่างๆ

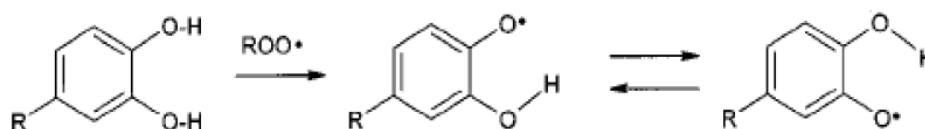
2.6) DMPD assay (N,N-Dimethyl *p*-Phenylendiamine assay)

DMPD assay (N,N-Dimethyl *p*-Phenylendiamine assay) หลักการ จะเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันจากการทำปฏิกิริยากับ Fe(III)Cl_3 ได้อนุมูลอิสระ $\text{DMPD}^{\bullet}$ ที่มีสีม่วง และมีความสามารถดูดกลืนแสงที่ 505 นาโนเมตร ถ้าสารที่ทดสอบมีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันจะสามารถจับกับอนุมูลอิสระ ทำให้สีจางลง และวัดค่าการดูดกลืนแสงได้ลดลง

ขั้นตอนการทดลอง เตรียมสารละลาย 1 มิลลิตร ของสารละลาย DMPD ในน้ำในความเข้มข้น 100 โมล (2.09 มิลลิกรัมของ DMPD ในน้ำ 10 มิลลิตร) ปิเปตสารละลาย DMPD 1 มิลลิตร ลงใน 100 มิลลิตร 0.1 M Acetate buffer, pH 5.25 หลังจากนั้นเติมสารละลายความเข้มข้น 0.05 โมลของ Ferric chloride ในปริมาตร 0.2 มิลลิตร ได้ $\text{DMPD}^{\bullet+}$ ที่มีสีม่วงปรับความเข้มข้นให้มีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 505 นาโนเมตร ให้มีค่าประมาณ 0.900 ทั้งนี้สารละลายของ $\text{DMPD}^{\bullet+}$ จะคงที่อยู่นาน 12 ชั่วโมง นำสารละลาย $\text{DMPD}^{\bullet+}$ 1 ไมโครลิตร มาผสมกับสารที่จะทดสอบในปริมาตร 50 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันและเขย่านาน 10 นาที ที่ 25 องศาเซลเซียส วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 505 นาโนเมตร

3) แอนโทไซยานินกับคุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระ

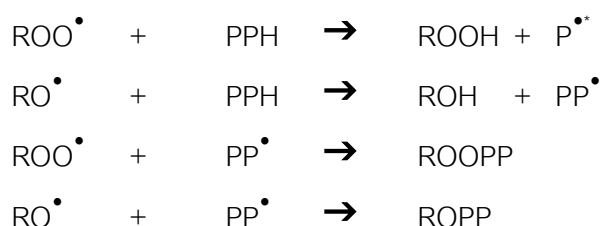
Pedrielli *et.al* (2001) กล่าวว่าแอนโทไซยานินเป็นสารประกอบฟลาโวนอยด์ และได้ศึกษากลไกการต้านอนุมูลอิสระ พบว่า โครงสร้างฟลาโวนอยด์ที่วงแหวน B (วงแหวนเบนโซไพแรน) มีพันธะไฮโดรเจนอยู่ที่ 3', 4' Catechol โดยมีกลไกการทำงานของสารต้านอนุมูลอิสระคือ กำจัดอนุมูลอิสระ โดยการให้ไฮโดรเจนแก่อนุมูลอิสระ ($\text{ROO}^\bullet$) ที่เกิดจากปฏิกิริยาออกซิเดชันซึ่ง อัตราการเข้าทำปฏิกิริยากับอนุมูลอิสระจะเร็วกว่าสารตั้งต้นชนิดอื่น ทำให้ปฏิกิริยาหยุดชะงัก และ สารประกอบที่เกิดขึ้นดังกล่าว จะไม่เหนี่ยวนำให้เกิดอนุมูลอิสระเกิดขึ้นอีก ตามที่แสดงในภาพที่ 2.15



ภาพที่ 2.15 กลไกการต้านอนุมูลอิสระของโครงสร้างฟลาโวนอยด์ที่วงแหวน B

ที่มา: Pedrielli *et.al* (2001)

วิวัฒน์ หวังเจริญ (2545) กล่าวว่าสารประกอบฟีนอล (PPH) เมื่อรวมตัวกับอนุมูลอิสระ ($\text{ROO}^\bullet$, $\text{RO}^\bullet$) ทำให้เกิดอนุมูลอิสระจากสารประกอบฟีนอล ($\text{PP}^\bullet$) และอนุมูลอิสระที่เกิดจากสารประกอบฟีนอลนี้ยังสามารถไปรวมตัวกับอนุมูลอิสระอื่นได้อีก ($\text{ROO}^\bullet$, $\text{RO}^\bullet$) จึงทำให้ลดจำนวนอนุมูลอิสระลงได้อีกครั้ง ดังปฏิกิริยาต่อไปนี้



4) คุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระของกระเจี๊ยบแดง

Tee *et.al* (2002) ได้ศึกษาคุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากกระเจี๊ยบแดงโดยสกัดด้วยเมทานอล และทำการเปรียบเทียบคุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระกับบิวทิเลเตด ไฮดรอกซีอะนิโซล (BHA) และแอลฟา-โทโคเฟอรอล พบว่าสารสกัดจากกระเจี๊ยบแดงมีคุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระที่ดีกว่าบิวทิเลเตดไฮดรอกซีอะนิโซล และแอลฟา - โทโคเฟอรอล สารสกัดจากกระเจี๊ยบแดงที่มีความเข้มข้น 200 ส่วนในล้านส่วน เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระได้มากกว่าร้อยละ 85 และสารสกัดจากกระเจี๊ยบแดงมี

ปริมาณสารประกอบฟีนอลเท่ากับ 2.96 มิลลิกรัมกรดแกลลิกต่อกรัมสารสกัดจากกระเจี๊ยบแดง ดังนั้นสารสกัดจากกระเจี๊ยบแดงจึงมีคุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระที่ดี

วิธีการพื้นที่การตอบสนอง(Response Surface Methodology;RSM) (กัณฐวุฒินุญมี, 2553)

ปัจจุบันมีความสนใจในการออกแบบเพื่อหาความสอดคล้องกับพื้นที่ของการตอบสนองและประเมินความเหมาะสมในสภาวะของการทดลอง การออกแบบที่เรียกว่า Response Surface Design (RSD) และการวิเคราะห์ที่ได้ถูกนำมาใช้เพื่อค้นหาคำตอบของการทดลองที่ประกอบด้วยจำนวนปัจจัยร่วมการทดลองหลายปัจจัย ซึ่งนำมาสู่การพบพื้นที่การตอบสนองที่เหมาะสมที่สุด การตอบสนองที่เหมาะสมสามารถพิจารณาได้ใน 2 ลักษณะ คือ การตอบสนองที่มากที่สุด (Maximum) หรือการตอบสนองน้อยที่สุด (Minimum) ขึ้นอยู่กับการทดลอง วิธีการของพื้นที่การตอบสนองประกอบด้วยกลุ่มของเทคนิคที่ใช้การศึกษาจากค่าการตอบสนอง (Response Variable) ที่วัดได้ 1 หรือ 2 ค่า เช่น ผลผลิต ดัชนีค่าสี และความหนืด กับตัวแปรที่ใช้ทดลอง (Input variables) เช่น เวลา อุณหภูมิ ความดัน และความเข้มข้น (ไพโรจน์ วิริยจารี, 2544)

ความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปรอิสระกับตัวแปรตามสามารถอธิบายได้ด้วยสมการทางคณิตศาสตร์ และการนำเสนอข้อมูลในรูปแบบกราฟสามมิติ เพื่ออธิบายความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปรอิสระ (Independent variable) 2 ตัว อยู่ในแนวระนาบ (แกน x และแกน y) กับตัวแปรตามอยู่ในแนวแกนตั้ง (แกน z) เรียกว่า RSM โดยระดับการวัดของตัวแปรต้องอยู่ในระดับ Interval scale หรือ Ratio scale จึงจะนำเสนอแบบ RSM ได้ โดยมีการเทคนิคการฉายภาพแบบ Top view ให้เป็น Contour plot หรือ Surface plot โดยสามารถเขียนรูปแบบความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปรตอบสนองกับตัวแปรอิสระดังสมการที่ 1

$$Y = f(x_1, x_2, \dots, x_k) \quad (1)$$

โดย Y คือ ตัวแปรตอบสนอง

$x_1, x_2, \dots, x_k$ คือ ตัวแปรอิสระธรรมชาติ (Natural independent variable หรือ Actual factor) k ตัว

เพื่อความสะดวกในการคำนวณและการแปลผลการวิเคราะห์โดยทั่วไปในการวิเคราะห์พื้นผิวตอบสนองนิยมแปลงค่า (Transformation) ตัวแปรอิสระธรรมชาติให้อยู่ในรูปรหัสที่ไม่มี

หน่วย เรียกว่า ตัวแปรอิสระรหัส (Coded variable หรือ Code factor) โดยตัวแปรอิสระรหัส ($x_1, x_2, \dots, x_k$) อาจมีค่าเป็น -1, 0 และ 1 โดยการแปลงค่าสามารถทำได้ดังนี้

$$X_i = \frac{\bar{x}_i - \bar{X}}{\text{Mid-Range}} \quad \text{โดย } i=1, 2, \dots, k \quad (2)$$

โดย

$$\bar{X} = \frac{\max(\bar{x}_i) + \min(\bar{x}_i)}{2} \quad (3)$$

$$\text{Mid-Range} = \frac{\max(\bar{x}_i) - \min(\bar{x}_i)}{2} \quad (4)$$

$\max(\bar{x}_i)$ คือ ค่ามากที่สุดของตัวแปรอิสระธรรมชาติที่ i

$\min(\bar{x}_i)$ คือ ค่าที่น้อยที่สุดของตัวแปรอิสระธรรมชาติที่ i

เนื่องจากไม่ทราบรูปแบบความสัมพันธ์ที่แท้จริงระหว่างตัวแปรตอบสนองกับตัวแปรอิสระ ในทางปฏิบัติจึงนิยมประมาณความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปรเหล่านี้ในตัวแบบพหุนามดังนี้

- 1) ตัวแบบพหุนามอันดับหนึ่ง (First order polynomial model)

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i X_i + \varepsilon \quad (5)$$

- 2) ตัวแบบพหุนามอันดับหนึ่งที่มีอิทธิพลร่วม (First order polynomial with interaction model)

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i X_i + \sum_{i=1}^{k-1} \sum_{j=i+1}^k \beta_{ij} X_{ij} + \varepsilon \quad (6)$$

- 3) ตัวแบบพหุนามอันดับสอง (Second order polynomial model)

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i X_i + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} X_{ii} + \sum_{i=1}^{k-1} \sum_{j=i+1}^k \beta_{ij} X_{ij} + \varepsilon$$

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1} \beta_i X_i + \sum_{i=1} \beta_{ii} X_i^2 + \sum_{i=1} \sum_{j=i+1} \beta_{ij} X_{ij} + \varepsilon \quad (7)$$

โดย

Y คือ ตัวแปรตอบสนอง

X_i, X_i^2 และ X_{ij} คือ ตัวแปรอิสระ

k คือ จำนวนตัวแปรอิสระ

β_0 คือ สัมประสิทธิ์การถดถอยที่เป็นค่าคงที่ของสมการ

β_i ($i = 1, 2, \dots, k$) คือ สัมประสิทธิ์การถดถอยของเทอม X_i

β_{ii} ($i = 1, 2, \dots, k$) คือ สัมประสิทธิ์การถดถอยของเทอม X_i^2

β_{ij} ($i = 1, 2, \dots, k-1$ และ $j = 1, 2, \dots, k$) คือ สัมประสิทธิ์การถดถอยของเทอม X_{ij}

ε คือ ค่าคลาดเคลื่อนสุ่ม

จะเห็นได้ว่าตัวแบบเริ่มต้นที่ใช้ในการแสดงความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปรตอบสนองกับตัวแปรอิสระมีลักษณะคล้ายกับตัวแบบที่ใช้ในการวิเคราะห์การถดถอย (Regression analysis) การวิเคราะห์การถดถอยเป็นการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปรตามกับตัวแปรอิสระโดยมีวัตถุประสงค์เพื่อต้องการทำนาย หรือ ประมาณค่าตัวแปรตาม สามารถจำแนกได้ 2 แบบ คือ การวิเคราะห์การถดถอยอย่างง่าย (Simple regression analysis) และการวิเคราะห์การถดถอยแบบพหุ (Multiple regression analysis)

การวิเคราะห์พื้นที่ผิวตอบสนองทำโดยการสร้างฟังก์ชันพื้นผิวตอบสนองที่แสดงให้เห็นแนวโน้มการเปลี่ยนแปลงของค่าตอบสนองเมื่อระดับของปัจจัยเปลี่ยนแปลง ทำให้สามารถหาระดับของปัจจัยที่เหมาะสม (Optimum level) ที่ให้ผลตอบสนองตามต้องการอาจจะเป็นค่าต่ำสุด ค่าสูงสุด หรือค่าตามที่ต้องการ

การออกแบบ Composite designs

ปัญหาจากการเกิดข้อเสียเนื่องจากไม่สามารถหมุนการออกแบบ 3^n Factorial designs จะทำให้จำนวนสิ่งทดลองค่อนข้างมากในจุดของการออกแบบและจะต้องทำการทดลองค่อนข้างมากเช่นกัน เพื่อจะลดจำนวนสิ่งทดลองในการออกแบบ อาจจะเริ่มจากตัวอย่าง 2^n Factorial designs และเพิ่มจุดของการออกแบบเพิ่มเติมอย่างเพียงพอให้สามารถสร้างรูปแบบหุ่นลำดับสองได้ การออกแบบนี้ไม่เพียงแต่จะมีจุดที่น้อยกว่า เมื่อเปรียบเทียบกับ 3 ระดับของ

Factorial designs แต่ยังไม่สามารถถูกแสดงในขั้นตอนตัวอย่างขั้นตอน 2^n Factorial designs อาจจะใช้เพื่อการสร้างหุ่นลำดับที่หนึ่งโดยการทำซ้ำเพื่อบรรลุถึงจุดใกล้ Stationary point สำหรับการตอบสนองที่เหมาะสมเพื่อให้ใกล้จุด Stationary point ได้ถูกกำหนดขึ้น การเพิ่มจุด $2n+1$ สามารถเพิ่มการออกแบบ 2^n Factorial designs เพื่อสร้างรูปแบบหุ่นลำดับที่สองให้สอดคล้องกับข้อมูลเพื่อค้นหาการตอบสนองที่เหมาะสม ถ้า $n=3$ จะทำการออกแบบ 2^n Factorial designs $+(2n+1)$ มีทั้งหมด 15 สิ่งทดลอง ในการออกแบบ Composite designs เปรียบเทียบกับ 3^n จะมีทั้งหมด 27 สิ่งทดลอง ในการออกแบบ 3 ระดับของ 3^n Factorial designs

ในการออกแบบ 2^n จุดของ 2 ระดับ Factorial designs การเพิ่มจุดพิเศษ $(2n+1)$ เพื่อให้จุดหนึ่งของการเพิ่มเป็นจุดกึ่งกลาง และจุดที่เหลือ $2n$ เป็นจุดห่าง α จากจุดกึ่งกลางการกระจายจะเท่าๆกันในคู่บนแกน n ของการออกแบบ สำหรับ $n=3$ การแสดงสามมิติของ 3 คอลัมน์ของค่าคงที่ที่แสดงดังตารางที่ 2.4

ตารางที่ 2.4 จุดร่วมของ 3 ปัจจัยในการออกแบบ Composite designs กับคอลัมน์ของค่าคงที่ (การออกแบบเมตริก)

จุดของการออกแบบ I	ค่าคงที่ β_0	ตัวแปรเชิงปริมาณ			
		X_{1i}	X_{2i}	X_{3i}	
1	1	-1	-1	-1	8 จุดของ 2^n Factorial designs
2	1	1	-1	-1	
3	1	-1	1	-1	
4	1	1	1	-1	
5	1	-1	-1	1	
6	1	1	-1	1	
7	1	-1	1	1	
8	1	1	1	1	
9	1	0	0	0	จุดกึ่งกลาง
10	1	$-\alpha$	0	0	6 จุดที่มีระยะห่าง α จากจุดกึ่งกลาง
11	1	α	0	0	
12	1	0	$-\alpha$	0	
13	1	0	α	0	

14	1	0	0	$-\alpha$	
15	1	0	0	α	

ที่มา : ไพโรจน์ วรรณจารี (2544)

Composite designs จาก Fractional Factorial

ในการออกแบบ Composite designs จุดของการออกแบบการทดลองจะเพิ่มขึ้นอย่างมากเมื่อ n ถูกเพิ่ม ดังนั้นการออกแบบ Composite designs ที่ต้องการคือ 2^n Factorial designs ที่ถูกแทนด้วย Fractional ที่ทำซ้ำของ 2^n เพื่อเป็นไปตามจุดมุ่งหมายของ Composite designs การทำ Fractional replications ควรจะถูกออกแบบเพื่อให้เกิดการประมาณค่าทั้งหมดของผลเชิงเส้นตรง และผลเชิงเส้นโค้ง และผลของปฏิริยาสัมพันธ์บางส่วนในรูปแบบหุ่นลำดับที่สอง เพื่อให้บรรลุความสำเร็จนี้การทำ Fractional replication จะต้องไม่มี Main effect ถูก Confound กับค่าเฉลี่ย จากการออกแบบ Fractional replication composite designs

การจัดการออกแบบ Composite design ใน Blocks

เพื่อให้เกิดความเที่ยงตรงมากขึ้น และด้วยเหตุผลในทางปฏิบัติ การออกแบบจะถูกจัดการในลักษณะ Block ซึ่งขนาดจะน้อยกว่าจำนวนของจุดการออกแบบการทดลอง การออกแบบ Composite design สามารถทำได้ง่ายในลักษณะที่เรียกว่า Orthogonal blocking arrangement การจัดการบล็อกออกโฮกอนดอล จะทำเพื่อสัมผัสประสิทธิภาพของรูปแบบหุ่นการตอบสนองให้เป็นอิสระต่อบล็อกที่แตกต่างกัน การออกแบบ Composite designs ประกอบด้วย n_c จุดที่จุดยอดของสี่เหลี่ยมลูกบาศก์ ซึ่งตรงกับการออกแบบ 2^n Factorial หรือ Fraction ที่เหมาะสมของมัน นอกจากนี้ยังประกอบด้วยจุดบนแกน $2n$ และจุดกึ่งกลาง 1 จุด ที่ทำซ้ำ n_0 ครั้ง ชุดของการออกแบบหุ่นลำดับที่หนึ่ง ชุดดังกล่าวทั้งสองของการออกแบบ Composite designs จะถูกกำหนดในบล็อกที่แตกต่างกัน จุดกึ่งกลางจะถูกทำซ้ำในแต่ละบล็อกย่อยเท่าที่จำเป็นเพื่อให้บล็อกเป็น Orthogonal ให้ n_{c0} และ n_{a0} แทนจำนวนซ้ำของจุดกึ่งกลางที่กำหนดในส่วนของสี่เหลี่ยมลูกบาศก์ และส่วนบนแกน ตามลำดับ ดังนั้นการออกแบบ Orthogonal blocking ของการออกแบบ Composite designs จึงเป็นไปตามที่ประสงค์

ขั้นตอนการทำ RSM

1) การเลือกแผนการทดลองที่เหมาะสม

ขั้นตอนการทำและการวิเคราะห์พื้นผิวตอบสนองจะทำได้ง่ายขึ้น ถ้าผู้วิจัยเลือกแผนการทดลองที่เหมาะสม เช่น แผนการทดลองแบบ Central composite design (CCD), Box Behnken design เป็นต้น

เนื่องจากไม่ทราบรูปแบบความสัมพันธ์ที่แท้จริงโดยทั่วไปนิยมประมาณรูปแบบความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปรตอบสนองกับตัวแปรอิสระด้วยโพลีโนเมียลอันดับสองโดยนิยมใช้แผนการทดลองแบบ CCD ซึ่งมีลักษณะตัวอย่างเป็นทรงกลม (Sphere) ประกอบด้วยส่วนสำคัญ 3 ส่วน (Box & Wilson, 1951) คือ

1.1) แฟคทอเรียล (Factorial points; n_f)

ประกอบด้วยส่วนแฟคทอเรียลพอยท์ที่มี k ปัจจัย แต่ละปัจจัยมี 2 ระดับ คือ -1 (แทนระดับต่ำ) และ $+1$ (แทนระดับสูง) โดย $n_f = 2^k$ แฟคทอเรียลพอยท์นั้นถูกนำไปใช้ในการประมาณค่า β_i และ β_{ij} เขียนแทนด้วยสัญลักษณ์ได้ดังนี้

$$(X_1, X_2, \dots, X_k) = (\pm 1, \pm 1, \dots, \pm 1) \quad (8)$$

1.2) สตาร์พอยท์หรือแอกเซียลพอยท์ (Star หรือ Axial point; n_s)

ประกอบด้วยข้อมูลที่มีตำแหน่งห่างจากจุดศูนย์กลางด้วยระยะทางที่เท่ากัน คือ ระยะ α โดย $n_s = 2k$ สตาร์พอยท์นั้นถูกนำไปใช้ในการประมาณค่า β_{ii} เขียนแทนด้วยสัญลักษณ์ ดังนี้

$$(\pm\alpha, 0, 0, \dots, 0), (0, \pm\alpha, 0, \dots, 0), \dots, (0, 0, 0, \dots, \pm\alpha) \quad (9)$$

1.3) จุดศูนย์กลาง (Center points; n_c)

เป็นส่วนที่ใช้เพื่อช่วยสำหรับการทดสอบความเหมาะสมที่จุดศูนย์กลางเขียนแทนด้วยสัญลักษณ์ดังนี้

$$(X_1, X_2, \dots, X_k) = (0, 0, \dots, 0) \quad (10)$$

ดังนั้นจำนวนการทดลอง (Design size; N) ของแผนการทดลองแบบ CCD คือ $n_f + n_s + n_c$ หรือเท่ากับ $2^k + 2k + n_c$

ตารางที่ 2.5 แนวทางในการเลือกแผนการทดลองที่เหมาะสมจากจุดประสงค์ของการทดลอง

จุดประสงค์การทดลอง			
จำนวนปัจจัย	การเปรียบเทียบ แต่ละปัจจัย	การคัดกรองปัจจัย ที่ศึกษา	การสร้างพื้นผิวตอบสนอง เพื่ออธิบายความสัมพันธ์ ของปัจจัยที่ศึกษากับตัว แปรตาม
1	1-factor completely randomized design	-	-
2-4	Randomized block design	Full factorial, Fractional factorial	Central composite design, Box-Behnken
5 หรือ มากกว่า	Randomized block design	Fractional factorial, Plackett- Burman	Screen first

ที่มา: Myers & Montgomery (2002)

2) การสร้างตัวแบบด้วยวิธีวิเคราะห์ความถดถอย

การวิเคราะห์แบบถดถอยเป็นอีกวิธีการหนึ่งที่ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปรสองประเภทที่ศึกษาคือ ตัวแปรตามนิยมใช้สัญลักษณ์ Y และตัวแปรอิสระนิยมใช้สัญลักษณ์ X โดยมุ่งเน้นที่จะพยากรณ์ตัวแปรตามด้วยค่าความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปรตาม และตัวแปรอิสระเรียกว่า ค่าสัมประสิทธิ์การถดถอย (Regression coefficient) การหาค่าสัมประสิทธิ์การถดถอยจะทำได้หลังจากที่ได้สร้าง หรือกำหนดตัวแบบความสัมพันธ์ของสมการ ในแผนการทดลองแบบ RSM มีตัวแบบอยู่ 4 ตัวแบบ คือ Linear model, Linear+ Interaction model, Linear + Square model และ Full quadratic model

2.1) วิธีการพิจารณาความเหมาะสมของสมการ

การวิเคราะห์ผลการทดลองโดยใช้ RSM ใช้อธิบายความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปรตาม และตัวแปรอิสระมีอยู่ 4 ตัวแบบ ดังที่ได้กล่าวมา ดังนั้นการนำตัวแบบใดมาใช้ อธิบายความสัมพันธ์ควรจะต้องมีหลักการในการเลือกสมการที่มีความเหมาะสม โดยพิจารณาจากค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (Standard error; SE) และค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (Coefficient of determination; R^2) มีหลักการดังนี้

-พิจารณาค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน

ถ้าค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานมีค่าน้อยแสดงว่าสมการที่นำมาใช้มีความสะสมควรข้างมาก ในกรณีที่ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานที่ค่าเท่ากับศูนย์ แสดงว่าสมการมีความเหมาะสมดีมาก

-พิจารณาค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ

ค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจคำนวณได้จากสมการที่ 12 มีค่าอยู่ระหว่าง 0-1 สมการที่ดีควรจะได้สัมประสิทธิ์การตัดสินใจเข้าใกล้ 1 หรือเท่ากับ 1 แสดงว่า ตัวแปรอิสระที่อยู่ในสมการสามารถอธิบายการเปลี่ยนแปลงของตัวแปรตามได้ดี ค่า R^2 (adj) คือ สัมประสิทธิ์การตัดสินใจที่ปรับค่าแล้วใช้ประกอบการพิจารณาเมื่อข้อมูลมีจำนวนน้อยกว่า 30 ตัวอย่าง สามารถคำนวณได้จากสมการที่ 11

$$R^2 = 1 - \frac{(SS_{\text{residual}})}{(SS_{\text{model}} - SS_{\text{residual}})} \quad (11)$$

โดย

SSresidual คือ ผลบวกกำลังสองของ residual error

SSmodel คือ ผลบวกกำลังสองของแบบจำลอง regression

$$R^2 (\text{adj}) = 1 - \frac{(n-1)}{(n-k-1)} \times (1 - R^2) \quad (12)$$

โดย

n คือ จำนวนการทดลอง

k คือ จำนวนสัมประสิทธิ์ในแบบจำลอง

2.2) วิธีการทดสอบสมมติฐานเกี่ยวกับค่าสัมประสิทธิ์การถดถอย (β_i)

เป็นการตรวจสอบว่าตัวแปรอิสระแต่ละตัวที่นำมาใช้ในสมการสามารถนำมาพยากรณ์ตัวแปรตามได้หรือไม่ โดยการทดสอบค่าสัมประสิทธิ์การถดถอยมีการทดสอบ 2 ลักษณะดังนี้

-การทดสอบค่าสัมประสิทธิ์การถดถอยของตัวแปรอิสระทุกตัวพร้อมๆกันโดยกำหนดสมมติฐานทางสถิติดังนี้

$H_0 : \beta_i = \beta_1 = \beta_2 = \dots = \beta_k = 0$ หรือตัวแปรอิสระทุกตัวไม่มีอิทธิพลต่อตัวแปรตาม

$H_1 : \beta_i \neq 0$ อย่างน้อย 1 ตัวแปรอิสระที่มีอิทธิพลต่อตัวแปรตาม

ค่าสถิติที่ใช้ทดสอบคือ F-test หรือค่า p value ก็ได้โดยผู้ทดสอบจะต้องกำหนดระดับนัยสำคัญ (α) มาก่อน ถ้า p value มีค่าสูงกว่าระดับนัยสำคัญจะตัดสินใจยอมรับสมมติฐาน H_0 คือ ตัวแปรอิสระทุกตัวในสมการไม่สามารถใช้พยากรณ์ตัวแปรตามได้ แต่ถ้า p value มีค่าต่ำกว่าระดับนัยสำคัญจะตัดสินใจปฏิเสธสมมติฐาน H_0 (ยอมรับสมมติฐาน H_1) แสดงว่ามีตัวแปรอิสระในแบบจำลองอย่างน้อย 1 ตัว สามารถใช้พยากรณ์ตัวแปรตามได้

-การทดสอบค่าสัมประสิทธิ์การถดถอยของตัวแปรอิสระแต่ละตัวโดยกำหนดสมมติฐานดังนี้

$H_0 : \beta_i = 0$ หรือตัวแปรอิสระที่ i ไม่มีอิทธิพลต่อตัวแปรตาม

$H_1 : \beta_i \neq 0$ หรือตัวแปรอิสระที่ i มีอิทธิพลต่อตัวแปรตาม

สถิติที่ใช้ทดสอบคือ t-test หรือค่า p value ก็ได้โดยผู้ทดสอบกำหนดระดับนัยสำคัญถ้า p value ของตัวแปรที่ i มีค่าสูงกว่าระดับนัยสำคัญจะตัดสินใจยอมรับ

สมมติฐาน H_0 แสดงว่าตัวแปรอิสระที่ i ไม่มีอิทธิพลต่อตัวแปรตามแต่ถ้า p value ของตัวแปรที่ i มีค่าต่ำกว่าระดับนัยสำคัญจะตัดสินใจปฏิเสธสมมติฐาน H_0 (ยอมรับสมมติฐาน H_1) แสดงว่าตัวแปรอิสระที่ i มีอิทธิพลต่อตัวแปรตาม

2.3 การสร้าง Surface plot หรือ Contour plot จากสมการ

การสร้าง Surface plot หรือ Contour plot เพื่อศึกษารูปแบบความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปรตอบสนองกับตัวแปรอิสระเพื่อวิเคราะห์อิทธิพลของตัวแปรอิสระต่อตัวแปรตาม ในช่วงที่ทำการศึกษาเพื่อแนวโน้มและอธิบายผลของตัวแปรอิสระแต่ละตัวต่อตัวแปรตาม

2.4 การตรวจสอบจุดหรือช่วงที่เหมาะสม (Optimization)

การตรวจสอบจุดหรือช่วงที่เหมาะสมเพื่อหาเงื่อนไขของปัจจัยต่างๆในระบบที่ทำให้ได้ค่าของตัวแปรตอบสนองที่ดีที่สุดตามที่ผู้ทดลองต้องการ

2.5 การพิสูจน์สมการตัวแบบที่สร้างได้

โดยการใช้จุดที่อยู่ในบริเวณช่วงที่เหมาะสมของตัวแปรอิสระเพื่อนำไปทำการทดลองอีกครั้งแล้ววัดค่าตัวแปรตามเพื่อตรวจสอบกับตัวแปรตามที่ได้จากสมการว่ามีความใกล้เคียงกันหรือไม่ หรืออาจกล่าวได้ว่าเป็นการเปรียบเทียบค่าสังเกตที่ได้จากการทดลองกับค่าที่ได้จากการทำนายผลสมการที่เหมาะสม) เพื่อตรวจสอบความถูกต้องของสมการถ้าสมการไม่เหมาะสมให้เริ่มต้นทดลองใหม่เพื่อให้ได้ข้อมูลมาสร้างสมการใหม่ที่เหมาะสม

วิธีการพื้นผิวตอบสนองโดยโปรแกรม

Design-Expert, Mini TAB เป็นโปรแกรมสำเร็จรูปทางสถิติที่ใช้ในการตรวจสอบความสัมพันธ์ของตัวแปรต่างๆที่เป็นที่สนใจของนักวิจัยผลที่ตามมาคือ นักวิจัยสามารถที่จะหาสูตร หรือสภาวะที่เหมาะสมจากความสัมพันธ์เหล่านั้นได้ เมื่อพิจารณาตัวแปรที่สนใจเหล่านั้นพร้อมๆกันโดยความรู้พื้นฐานที่ต้องใช้คือ การวางแผนการทดลอง การวิเคราะห์สมการถดถอย และความรู้ในการใช้โปรแกรมที่สร้าง Contour plot เช่น STATISTICA หรือไม่ก็ได้เพราะโปรแกรม

Design –Expert เองก็สามารถสร้าง Contour plot ได้เหมือนกันแต่ไม่ค่อยสวยงาม สามารถสรุปขั้นตอนการทำ RSM จากโปรแกรมได้ดังนี้

1) เลือกแผนการทดลองที่เหมาะสมที่สามารถให้ข้อมูลเพียงพอในการสร้าง Contour plot

แผนการทดลองที่เหมาะสมที่สามารถให้ข้อมูลเพียงพอในการสร้าง Contour plot สำหรับแผนการทดลองที่ใช้ศึกษาความสัมพันธ์ของตัวแปรต่างๆที่สนใจเหล่านั้นพร้อมๆกัน เช่นแผนการทดลอง Box-Behnken (Box & Behnken, 1960) และ CCD เป็นต้น

2) สร้างสมการ Regression ที่ดีที่สุดโดย

2.1) การวิเคราะห์ความเหมาะสมของสมการ

ในการอธิบายการเปลี่ยนแปลงตัวแปรตามด้วยตัวแปรอิสระอาศัยสมการ 4 ตัวแบบ คือ Linear model, Linear + interaction model, Full quadratic model และ Cubic model ถูกนำมาวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม

$$Y = \text{Full quadratic model} + \sum_{i=1}^k \beta_{iii} X_i^3 + \sum_{i=1}^k \sum_{j=i+1}^k \beta_{ijj} X_i^2 X_j + \beta_{ijk} X_i X_j X_k + \varepsilon \quad (13)$$

โดย

Y คือ ตัวแปรตอบสนอง

$X_i^3, X_i^2 X_j$ และ $X_i X_j X_k$ คือ ตัวแปรอิสระ

k คือ จำนวนตัวแปรอิสระ

β_{iii} ($i = 1, 2, \dots, k$) คือ สัมประสิทธิ์การถดถอยของเทอม X_i^3

β_{ijj} ($i = 1, 2, \dots, k$ และ $j = 1, 2, \dots, k$) คือ สัมประสิทธิ์การถดถอยของเทอม $X_i^2 X_j$

β_{ijk} คือ สัมประสิทธิ์การถดถอยของเทอม $X_i X_j X_k$

ε คือ ค่าคลาดเคลื่อนสุ่ม

พิจารณาค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน ค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ และค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจที่ปรับค่าแล้วเพื่อเลือกสมการที่เหมาะสม

2. 2) การวิเคราะห์นัยสำคัญของสมการ

การวิเคราะห์หัยสำคัญของสมการ คือ การวิเคราะห์ความแปรปรวนของสมการที่เหมาะสมจาก 1) เป็นการวิเคราะห์หัยสำคัญจากค่าสัมประสิทธิ์การถดถอยของตัวแปรอิสระทุกตัวพร้อมกัน โดยพิจารณาผลรวมกำลังสองทั้งหมด (SS_T : Total sum of squares) มีค่าเท่ากับผลบวกระหว่างผลรวมกำลังสองของค่าความคลาดเคลื่อนจากตัวแบบ (SS_R : Sum of squares due to regression) กับผลรวมกำลังสองของค่าความคลาดเคลื่อนจากส่วนตกค้าง (SS_E : Sum of squares due to residual error)

$$SS_T = SS_R + SS_E \quad (14)$$

สถิติที่ใช้ทดสอบสมมติฐาน คือ F value (ตารางที่ 2.6) โดยเปรียบเทียบ F value ที่คำนวณกับ F value จากตาราง แล้วพิจารณาว่าตกบริเวณวิกฤตหรือไม่ กรณีปฏิเสธ H_0 สรุปได้ว่ามีตัวแปรอิสระอย่างน้อย 1 ตัว ที่มีอิทธิพลต่อตัวแปรตามนำไปใช้ในตัวแบบได้ หรือ พิจารณาค่า P value ถ้ามีค่าน้อยกว่าระดับนัยสำคัญที่กำหนด สรุปได้ว่ามีตัวแปรอิสระอย่างน้อย 1 ตัว ที่มีอิทธิพลต่อตัวแปรตามนำไปใช้ในตัวแบบได้ (Myers & Montgomery, 2002)

ตารางที่ 2.6 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของตัวแบบเพื่อคำนวณหาค่าสถิติ F value โดย k = จำนวนสัมประสิทธิ์ และ n = จำนวนการทดลอง

Sources of variation	Sum of squares	DF	Mean square	F value
Regression	SS_R	k	MS_R	MS_R/MS_E
Residual Error	SS_E	$n-k-1$	MS_E	
Total	SS_T	$n-1$		

ที่มา : Myers & Montgomery (2002)

2.3) การวิเคราะห์หัยสำคัญของค่าสัมประสิทธิ์การถดถอยของแต่ละตัวแปรอิสระ

การทดสอบหัยสำคัญของอิทธิพลของตัวแปรอิสระที่มีต่อตัวแปรตาม โดยพิจารณาค่า 95% CI Low และ 95% CL High ร่วมกันถ้าเป็นช่วงที่ครอบคลุม 0 และค่า

สัมประสิทธิ์การถดถอยของแต่ละตัวแปรอิสระมีค่าใกล้ 0 แสดงว่าตัวแปรอิสระที่ i ไม่มีอิทธิพลต่อตัวแปรตาม เมื่อวิเคราะห์ค่าทางสถิติเพื่อสมการ Regression ที่ดีที่สุด หลังจากนั้นจะวิเคราะห์อิทธิพลของตัวแปรอิสระต่อตัวแปรตาม โดยการสร้าง Contour plot และ Surface plot พร้อมทั้งหาสภาวะที่เหมาะสมต่อไป

3) การสร้าง Contour plot และ Surface plot จากสมการที่หามาได้

การแสดงผลผิวตอบสนองในรูปของกราฟ Contour plot และ Surface plot เพื่อวิเคราะห์อิทธิพลของตัวแปรอิสระแต่ละตัวต่อตัวแปรตามในช่วงที่ทำการศึกษาเพื่อดูแนวโน้มและอธิบายผลของตัวแปรอิสระแต่ละตัวต่อตัวแปรตาม

4) การหาสภาวะที่เหมาะสม

การตรวจสอบความถูกต้อง (Verification) และการหาสภาวะที่เหมาะสมทางสถิติ โดยโปรแกรม เป็นการนำ Desirability functions มาใช้ในการวิเคราะห์สภาวะที่เหมาะสม (Myers & Montgomery, 2002) มีสิ่งที่ต้องพิจารณาคือ Desirability function, ค่าเป้าหมาย (T_i), ค่าขอบล่าง (Low limit) และขอบเขตบน (High limit) ของตัวแปรตอบสนองและตัวแปรอิสระและค่า Weight (w_i) สามารถอธิบายได้ดังนี้

4.1) Desirability function

ค่า Desirability function เป็นการคิดผลการตอบสนองที่พิจารณาเพียงตัวแปรเดียว หรือหลายตัวแปรพร้อมกัน (Multiple response method) เขียนแทนรูป D มีค่าอยู่ระหว่าง 0-1 โดยเลือกสภาวะ (Solution) ที่มีค่า D มากที่สุดเป็นสภาวะที่เหมาะสม สูตรการคำนวณค่า D แสดงดังสมการ 15

$$D = (d_1 \times d_2 \times d_3 \times \dots \times d_n)^{1/n} \quad (15)$$

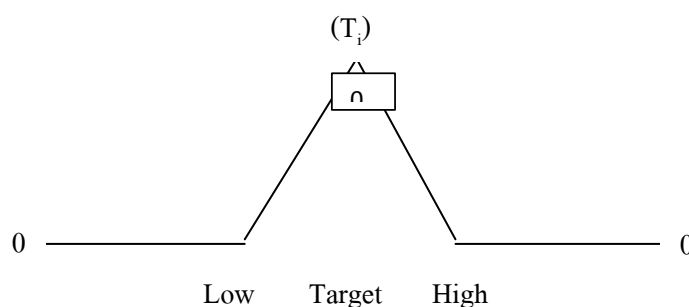
โดย

D คือ ค่า Desirability functions เมื่อพิจารณาผลการตอบสนองหลายตัวแปรพร้อมกัน n ตัว

d_i คือ ค่า Desirability functions เมื่อพิจารณาผลการตอบสนองเพียงตัวแปรเดียว

4.2) ค่าเป้าหมาย

เนื่องจากวัตถุประสงค์ในการหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิต จะต้องมีการกำหนดค่าเป้าหมายที่ผู้วิจัยต้องการ เพื่อให้ได้คำตอบของสภาวะที่เหมาะสมมีค่าเข้าใกล้ค่าเป้าหมายที่กำหนดมากที่สุดต้องกำหนดแบบ Is target โปรแกรมจะคำนวณสภาวะที่เหมาะสมโดยค่า d_i พิจารณาได้เป็น 4 กรณี ดังภาพที่ 2.16



ภาพที่ 2.16 ค่า Desirability functions เมื่อเลือกค่าเป้าหมาย Is target

ที่มา : Myers & Montgomery (2002)

- หมายเหตุ**
- T_i คือ ค่าเป้าหมาย
 - Low คือ ขอบเขตล่าง
 - High คือ ขอบเขตบน
 - $d_i = 0$ เมื่อ Y_i มีค่า $\leq$ ขอบเขตล่าง
 - $0 \leq d_i \leq 1$ เมื่อ Y_i มีค่าอยู่ระหว่างขอบเขตล่างกับค่าเป้าหมาย
 - $1 \geq d_i \geq 0$ เมื่อ Y_i มีค่าอยู่ระหว่างค่าเป้าหมายกับค่าขอบเขตบน
 - $d_i = 0$ เมื่อ Y_i มีค่า $\geq$ ขอบเขตล่าง

4.3) ค่าขอบล่างและขอบเขตบนของค่าตัวแปรตอบสนองและตัวแปรอิสระ

เนื่องจากการหาสภาวะที่เหมาะสมมีวัตถุประสงค์เพื่อให้ได้ค่า Y_i เข้าใกล้ค่าเป้าหมายมากที่สุด ดังนั้นจึงต้องกำหนดค่าขอบเขตล่าง และขอบเขตบนของตัวแปรตอบสนองและตัวแปรอิสระที่เราสนใจเพื่อใช้เป็นเงื่อนไข (Constraints) ในการพิจารณาหาสภาวะที่เหมาะสม

4.4) ค่า Weight (wt)

ค่า Weight เป็นตัวกำหนดรูปแบบของ Desirability functions เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตโดยมีค่าอยู่ระหว่าง 0.1-10 นิยมกำหนดให้เป็น 1

สรุปได้ว่าการหาสภาวะที่เหมาะสมต้องกำหนดเงื่อนไขในการพิจารณา คือ ค่าเป้าหมาย ค่าขอบเขตล่างและขอบเขตบนของค่าตัวแปรตอบสนองและตัวแปรอิสระและค่า Weight ก่อนหน้านั้นโปรแกรมจะประมวลผลโดยเลือกสภาวะที่ค่า Desirability functions เข้าใกล้ 1 มากที่สุดเป็นสภาวะที่เหมาะสม

เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (UV-Vis Spectrophotometer)

เครื่อง UV-Vis Spectrophotometer เป็นเครื่องมือที่นำเทคนิค UV-Vis Spectroscopy ไปใช้งานเครื่องมือตัวนี้ทำหน้าที่ในการตรวจวัดความเข้มแสงที่ผ่านหรือสะท้อนจากตัวอย่างเปรียบเทียบกับความเข้มแสงจากแหล่งกำเนิด เครื่อง UV-Vis Spectrophotometer โดยทั่วไปแล้วจะมีส่วนประกอบหลักๆ ที่เหมือนกันได้แก่แหล่งกำเนิดแสง เกรตติงหรือโมโนโครเมเตอร์ เซลล์ที่บรรจุสารตัวอย่างและเครื่องตรวจวัดแหล่งกำเนิดแสงจะต้องให้แสงที่คงที่อย่างต่อเนื่อง ตัวที่นิยมใช้คือหลอดทังสเตน-ฮาโลเจน ซึ่งให้แสงที่มีความยาวคลื่นในช่วง 320-2,500 นาโนเมตรสำหรับแหล่งกำเนิดแสงในช่วงรังสียูวีนั้นจะใช้หลอดไฮโดรเจนหรือหลอดดิวทีเรียมซึ่งให้แสงในช่วงความยาวคลื่น 160-375 นาโนเมตรแต่แสงที่ได้จากแหล่งกำเนิดนั้นจะมีความยาวคลื่นต่างๆ ดังนั้นจึงต้องใช้โมโนโครเมเตอร์เป็นตัวกระจายแสงออกเพื่อให้แสงที่จะผ่านไปยังตัวอย่างมีความยาวคลื่นค่าเดียวตามที่ต้องการหลังจากนั้นแสงความยาวคลื่นค่าเดียวจะผ่านไปยังเซลล์ที่บรรจุสารตัวอย่างและสารเปรียบเทียบ (Cuvettes) ซึ่งมีรูปร่างต่างกันออกไปแต่โดยส่วนใหญ่จะมีลักษณะเป็นกล่องทรงสี่เหลี่ยมผืนผ้าที่มีความกว้างภายใน 1 เซนติเมตร (ซึ่งค่านี้จะเป็นค่าระยะทางเดินของแสงที่ผ่านเข้าไปในตัวอย่างตามกฎของ Beer-Lambert) เครื่อง UV-Vis Spectrophotometer บางรุ่นสามารถใช้หลอดทดลองเป็น Cuvettes ได้แต่ Cuvettes ที่ดีที่สุดนั้นทำมาจากควอตซ์ที่มี

คุณภาพสูง สำหรับ Cuvettes ที่ทำจากแก้วหรือพลาสติกนั้นก็เป็นที่นิยมใช้กันทั่วไปแต่สามารถใช้ได้เฉพาะในช่วงแสงขาวเท่านั้นเพราะแก้วและพลาสติกดูดกลืนแสงในช่วงรังสียูวีแสงในส่วนที่ไม่ถูกดูดกลืนจะเดินทางผ่านตัวอย่างมาถึงเครื่องตรวจวัด สำหรับเครื่องตรวจวัดที่นิยมใช้ ได้แก่ PMT (Photomultiplier Tube), Diode Arrays และ CCDs (Charge Coupled Devices) เครื่องจะทำการบันทึกค่าความยาวคลื่นร่วมกับค่ามุมของแต่ละความยาวคลื่นที่เกิดการดูดกลืน ผลของสเปกตรัมที่ได้จะแสดงในรูปของกราฟระหว่างค่า Absorbance และค่าความยาวคลื่น (แมน อมรสิทธิ์, 2539)

เครื่อง UV-Vis Spectrophotometer สามารถแบ่งได้เป็น 2 ระบบ คือ แบบลำแสงเดี่ยวและแบบลำแสงคู่ สำหรับเครื่องแบบลำแสงเดี่ยวเป็นเครื่องที่ใช้ลำแสงเดี่ยวจากแหล่งกำเนิดผ่านไปยังตัวอย่างเครื่องมือนี้ได้รับการออกแบบให้สามารถใช้งานได้ง่ายสะดวกและมีราคาไม่แพงมากนักสำหรับเครื่องแบบลำแสงคู่ นั้น แสงจะถูกแยกออกเป็น 2 ลำก่อนที่จะไปตกลงบนตัวอย่างโดยแสงลำหนึ่งจะใช้เป็นลำแสงอ้างอิงขณะที่อีกลำจะผ่านไปยังตัวอย่างเครื่องมือที่เป็นแบบลำแสงคู่บางรุ่นจะมีเครื่องตรวจวัด 2 ตัวเพื่อที่จะตรวจวัดแสงอ้างอิงและแสงที่มาจากตัวอย่างได้พร้อมกัน แต่ในบางรุ่นจะมีเครื่องตรวจวัดเพียงตัวเดียว โดยแสงทั้งสองลำจะผ่านตัว Beam chopper ซึ่งจะทำหน้าที่กักแสงลำหนึ่งไว้ในช่วงระยะเวลาหนึ่งเครื่องตรวจวัดจึงสามารถตรวจวัดความแตกต่างของแสงทั้งสองลำได้ (แมน อมรสิทธิ์, 2539)

งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Valero, Recrosio, Saura, Munoz, Marti, Lizama. (2007). ได้ทำการศึกษาผลกระทบของวิธีการใช้คลีนอุลตราโซนิกในกระบวนการผลิตน้ำส้ม อิทธิพลของการใช้คลีนอุลตราโซนิก และการใช้กระบวนการทำความร้อนแบบดั้งเดิมภายใต้สภาวะของกระบวนการที่แตกต่างกันที่มีต่อการหยุดยั้งและความเป็นไปได้ของการเติบโตที่ตามมาของจุลินทรีย์ในน้ำส้มนั้นจะได้รับการค้นคว้า แม้ว่าระดับที่ถูกจำกัดของการยับยั้งจุลินทรีย์ ($\geq 61.08 \log \text{ CFU ml}^{-1}$) นั้นได้ถูกพบจากการใช้คลีนอุลตราโซนิกในส่วนที่เลือกไว้ที่ระดับ 500 กิโลเฮิร์ตซ์ต่อ 240 วัตต์ เป็นเวลา 15 นาทีแต่การเติบโตของจุลินทรีย์นั้นก็ยังถูกพบในสารตั้งต้นในอีก 14 วันต่อมาหลังจากถูกเก็บไว้ในตู้เย็น (5 องศาเซลเซียส) และในสภาพแวดล้อมที่มีอุณหภูมิไม่เหมาะสมเล็กน้อย (12 องศาเซลเซียส) ขณะที่เนื้อที่มีอยู่ในน้ำส้มนั้นได้เพิ่มความสามารถในการต้านทานจุลินทรีย์ที่มีต่อคลีนอุลตราโซนิกหลังจากการใช้คลีนอุลตราโซนิกอย่างต่อเนื่องในอัตราการใช้ที่ 3000 L h^{-1} นั้นพบว่าจำนวนจุลินทรีย์นั้นมีการลดลงเพียงเล็กน้อย ไม่พบว่าคลีนอุลตราโซนิกนั้นเกี่ยวข้องกับอันตรายที่มีต่อ

คุณลักษณะของน้ำส้ม (ปริมาณไลโมนิน, เม็ดสี และสีน้ำตาล) ดังนั้นเพื่อป้องกันการพัฒนาตัวของเชื้อโรคที่มีอยู่ในอาหารในน้ำส้มนั้น จึงมีความจำเป็นในการผสมผสานกลิ่นอุลตราโซนิก ร่วมกับกรรมวิธีอื่นๆที่มีศักยภาพในการต่อต้านจุลินทรีย์

Tao Xia, Siquan Shi & Xiaochun Wan. (2006). ได้ทำการศึกษาผลกระทบของการสกัดโดยใช้คลื่นอุลตราโซนิกที่มีต่อคุณภาพด้านประสาทสัมผัสและด้านเคมีของส่วนผสมของชา ผลกระทบของการสกัดโดยใช้คลื่นอุลตราโซนิกเข้าช่วยที่มีต่อคุณภาพด้านประสาทสัมผัสและด้านเคมีของส่วนผสมของชา การสกัดโดยใช้คลื่นอุลตราโซนิกได้แสดงให้เห็นถึงผลกระทบที่ดีกว่าที่มีต่อประสิทธิภาพการสกัดของสารประกอบทางเคมีที่ได้จากชาที่ระดับอุณหภูมิต่ำ ปริมาณของโพลีฟีนอลของชา, กรดอะมิโน และคาเฟอีน ในส่วนผสมของชานั้นมีจำนวนมากที่ได้มากกว่าจำนวนที่ได้จากการสกัดแบบดั้งเดิม นอกจากนี้ การสกัดโดยใช้คลื่นอุลตราโซนิกยังยับยั้งกระบวนการสกัดตัวของโปรตีน และเพกทิน ผลที่ได้ยังแสดงว่าการสกัดด้วยคลื่นอุลตราโซนิกสร้างเพิ่มแนวโน้มการสกัดของสารประกอบโรรมา และสารตั้งต้นของกลีโคไซด์คโรรมา เช่นเดียวกันกับการเปลี่ยนแปลงของดัชนี Owuor ในส่วนผสมของชา การตรวจสอบคุณภาพทางประสาทสัมผัส นั้นชี้ให้เห็นว่าคุณภาพด้านรสชาติของส่วนผสมของชาที่สกัดด้วยคลื่นอุลตราโซนิกนั้นดีกว่าคุณภาพด้านประสาทสัมผัสของส่วนผสมของชาที่สกัดด้วยการสกัดแบบดั้งเดิม

ยศพนธ์ ฉัตรจรัสแสง (2551) ได้ทำการศึกษาการสกัดสารสำคัญจากผลส้มแขกด้วยคลื่นอุลตราโซนิกส้มแขกเป็นสมุนไพรสำคัญชนิดหนึ่งของไทย มีมากทางภาคใต้และมีสารสำคัญที่เป็นประเภทกรดอินทรีย์อยู่หลายชนิด โดยเฉพาะ สารไฮดรอกซีซิตริก แอซิด (Hydroxy Citric Acid, HCA) ซึ่งเป็นกรดอ่อน มีคุณสมบัติในการยับยั้งการสะสมของไขมันส่วนเกินในร่างกาย และลดความอยากอาหารได้ ประกอบกับในปัจจุบันมีการนำคลื่นอุลตราโซนิกมาประยุกต์ใช้ในการแปรรูปอาหาร เพิ่มขึ้นตามลำดับเพื่อช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิต งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์ เพื่อศึกษาการนำคลื่นอุลตราโซนิกมาใช้ในการสกัดสารสำคัญจากผลส้มแขก พร้อมทั้งศึกษาผลกระทบของตัวแปรที่เกี่ยวข้อง เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัด ตัวแปรที่ศึกษาประกอบด้วย ความเข้มข้นของตัวทำละลายเอทานอล (ร้อยละ 0-95) เวลาในการสกัด (30-90 นาที) และอัตราส่วนของผงส้มแขกต่อตัวทำละลายเอทานอล (1:5-1:15 กรัมต่อมิลลิลิตร) ตัวอย่างที่ได้จากการสกัดนำมาวิเคราะห์หาปริมาณผลผลิตที่ได้ (%Yield), ปริมาณกรดทั้งหมด, ค่าสี, ความหนาแน่น, ค่า pH, Soluble solids และ Insoluble solids จากการศึกษาพบว่า สภาวะ

ที่เหมาะสมในการสกัดสารสำคัญจากผลส้มแขกด้วยคลีนอุลตราโซนิก ความถี่ 40 กิโลเฮิร์ตซ์คือ สกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอลเข้มข้นร้อยละ 30 เวลาที่ใช้ในการสกัด 30 นาที และอัตราส่วนของ ผลส้มแขกต่อตัวทำละลายเอทานอล 1:5 กรัมต่อมิลลิลิตร จะให้ปริมาณกรดทั้งหมด (Total acidity) สูงสุดเท่ากับร้อยละ 5.16 และปริมาณผลผลิตของสารสกัดที่ได้ร้อยละ 50.93

ณัฐวรรณ ยศวัฒน์ และสุรชิต ฮวดสาขาม (2550) ได้ทำการศึกษาการสกัดสารเจเนนินทิน จากกวาวเครือแดงด้วยคลีนอุลตราโซนิก การสกัดสารเจเนนินทินจากกวาวเครือแดงโดยใช้ เมทานอลเป็นตัวทำละลายด้วยคลีนอุลตราโซนิก พบว่าสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดได้แก่ (1) อุณหภูมิที่ 60 องศาเซลเซียส (2) อัตราส่วนของวัตถุดิบต่อปริมาณตัวทำละลายคือ 1:20 และ (3) ระยะเวลาในการสกัด 1 ชั่วโมง พบว่าสกัดสารเจเนนินทินได้ 1.208 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม กวาวเครือแดงแห้งเมื่อทำการเปรียบเทียบกับวิธีการสกัดแบบอื่นๆที่ใช้ระยะเวลาการสกัดที่เท่ากัน คือ 6 ชั่วโมงพบว่าปริมาณสารเจเนนินทินที่สกัดได้โดยวิธีซอห์คเคิลต์คลีนอุลตราโซนิกแบบแช่ในตัว ทำละลายที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส และมาซีเรชั่นได้ผลดังนี้ 1.496, 1.332, 1.111, และ 0.977 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัมกวาวเครือแดงแห้ง ตามลำดับ

ณัฐวรรณ ยศวัฒน์ และสุรชิต ฮวดสาขาม (2550) ได้ทำการศึกษาการสกัดสารเคอร์คิวมิน ฟีนอสโตรบิน คาเฟอีน จากกระชายดำด้วยคลีนอุลตราโซนิกกระชายดำ (*Kaempferia parviflora*) เป็นพืชสมุนไพรอยู่ในตระกูลขิง (Zingiberaceae) เป็นที่รู้จักในด้านสรรพคุณ รับประทานแก้ปวดเมื่อยโรคความดันโลหิตสูง ขยายหลอดเลือดหัวใจ โรคกระเพาะ อาหารบำรุง กำหนด และยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราและแบคทีเรีย สารสำคัญ ที่สนใจศึกษาในกระชายดำคือ (1) เคอร์คิวมิน (Curcumin) เป็นสารสีเหลืองมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในการต้านการอักเสบ กระตุ้นเอนไซม์ให้มีการหลั่งน้ำดีมากขึ้นเป็นผลให้การย่อยอาหารดีขึ้นชะลอการเกิดริ้วรอยและการเสื่อมโทรมของเซลล์ (2) ฟีนอสโตรบิน (Pinostrobin) เป็นสารไม่มีสีมีฤทธิ์ต้านการเจริญของ แบคทีเรียชื่อ *Helicobacter pylori* ที่เป็นสาเหตุของโรคกระเพาะอาหารและมีฤทธิ์ต้านเชื้อรา (3) คาเฟอีน (Caffeine) มีฤทธิ์ในการกระตุ้นระบบประสาทส่วนกลางทำให้ตื่นตัวไม่ง่วงซึมรู้สึก และหายอ่อนเพลียงานวิจัยนี้ทำการสกัดกระชายดำผง 0.5 มิลลิเมตรด้วยคลีนอุลตราโซนิก (Ultrasonic Activated-Extraction, UAE) และใช้เอทานอลเป็นตัวทำละลายพบว่าสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดได้แก่ (1) อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส (2) เวลาที่ใช้ในการสกัด 2 ชั่วโมง (3) อัตราส่วนกระชายดำต่อปริมาณเอทานอลคือ 1:20 เมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการสกัดแบบอื่นพบว่า

ปริมาณสารที่สกัดได้โดยวิธีซอห์คเล็ท 3 และ 6 ชั่วโมง คลื่นอุลตราไวโตนิก 2 ชั่วโมง และมาซีเรชั่น (แช่ที่อุณหภูมิห้อง) 2 ชั่วโมง ปริมาณสารเคอร์คิวมินพิโนสโตรบิน และคาเฟอีนที่สกัดได้จากวิธี คลื่นอุลตราไวโตนิก 2 ชั่วโมงจะมีค่ามากที่สุด (ซึ่งใกล้เคียงกับวิธีซอห์คเล็ท 6 ชั่วโมง) โดยมีค่าดังนี้ 2.229, 492.3, และ 1096.4 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมกระชายดำแห้ง ตามลำดับ แต่เปอร์เซ็นต์ผลได้ (ผลิตภัณฑ์รวม) จากการสกัดวิธีซอห์คเล็ท 6 ชั่วโมงได้ค่ามากที่สุด

เดือนเพ็ญ ก่อเกียรติพกุล (2552) ได้ทำการศึกษาการหาปริมาณของแอนโทไซยานินใน ผักสดและผลไม้สดด้วยวิธีสเปกโทรโฟโตเมทรี ผักและผลไม้ที่มีสีส้มสวยงามกำลังได้รับความนิยมสนใจอย่างมากเพราะในผักผลไม้ที่มีสีส้มต่างๆนั้นจะมีสารเคมีที่พืชสังเคราะห์ขึ้นเพื่อป้องกันอนุมูลอิสระซึ่งเรียกว่าสารแอนติออกซิแดนท์ แอนโทไซยานิน (Anthocyanins) เป็นแอนติออกซิแดนท์ชนิดหนึ่ง ซึ่งมีรายงานว่าช่วยลดการเป็นหลอดเลือดหัวใจอุดตัน ลดความเสี่ยงของการเกิดโรคมะเร็งและการเพิ่มประสิทธิภาพสายตาทดลองครั้งนี้ได้นำผักสดและผลไม้สดในกลุ่มที่มีสีม่วงแดง ได้แก่ แอปเปิ้ล องุ่น พลัม กะหล่ำปลีม่วง และมะเขือม่วง ตามลำดับมาทำการศึกษา โดยมีวัตถุประสงค์ เพื่อหาปริมาณแอนโทไซยานิน และศึกษาผลของระยะเวลาการเก็บรักษาผักสดและผลไม้สด ณ อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส ที่มีต่อปริมาณแอนโทไซยานิน จากการศึกษาปริมาณแอนโทไซยานินที่สกัดจากผักสดและผลไม้สด 5 ชนิด โดยใช้ร้อยละ 0.1 กรดไฮโดรคลอริกในเมทานอลเป็นสารสกัดและใช้เทคนิค pH Differential method ในการหาปริมาณแอนโทไซยานินโดยใช้เครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ ผลปรากฏว่า ผักสดและผลไม้สดทั้ง 5 ชนิด มีปริมาณแอนโทไซยานิน 4.09 ± 0.48 , 12.05 ± 1.18 , 98.94 ± 5.85 , 115.36 ± 7.84 และ 11.88 ± 1.40 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม น้ำหนักสด ตามลำดับ การเก็บรักษาผักสดและผลไม้สด ณ อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส ในระยะเวลา 4 สัปดาห์ ผลปรากฏว่าผักสดและผลไม้สดทั้ง 5 ชนิด มีปริมาณแอนโทไซยานินลดลง โดย แอปเปิ้ล องุ่น พลัม กะหล่ำปลีม่วง และมะเขือม่วง จะมีปริมาณแอนโทไซยานินลดลงไม่แตกต่างกันทางสถิติตลอดระยะเวลาการเก็บรักษา

ดวงกมล ลิ้มจันทร์ (2550) ได้ทำการศึกษาการสกัดแอนโทไซยานินจากข้าวเหนียวดำ เริ่มจากการคัดเลือกปัจจัยที่มีผลต่อการสกัดโดยใช้การจัดการทดลองแบบแฟกต์เรียดแอนด์เบอร์แมน (Plackett and Burman design) 4 ปัจจัยคืออัตราส่วนข้าวเหนียวดำต่อน้ำ อุณหภูมิ เวลา และการเขย่า พบว่าอุณหภูมิและการเขย่ามีผลต่อปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมดที่สกัดได้ อุณหภูมิและเวลามีผลต่อปริมาณของแข็งทั้งหมด จากการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัด

แอนโทไซยานินจากข้าวเหนียวดำโดยใช้การจัดการทดลองแบบแฟคทอเรียล 3 x 4 ด้วยแผนการทดลองแบบสุ่มตลอดโดยสมบูรณ์ (Complete randomized design) ศึกษา 2 ปัจจัยคืออุณหภูมิ 55, 60 และ 65 องศาเซลเซียสและเวลา 45, 60, 75 และ 90 นาที วิเคราะห์ผลโดยวิธีการพื้นผิวตอบสนอง (Response surface methodology) พบว่าสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดคือที่อุณหภูมิ 62 – 65 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 67 – 75 นาที โดยใช้อัตราส่วนข้าวเหนียวดำต่อน้ำเท่ากับ 1 : 3 ด้วยเครื่องควบคุมอุณหภูมิแบบเขย่า (Shaking water bath)

รุ่งทิพา วงศ์ไพศาลฤทธิ์ (2551) ได้ทำการศึกษาความคงตัวของแอนโทไซยานินในผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มบางชนิด งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความคงตัวของแอนโทไซยานินในผลิตภัณฑ์น้ำลูกหมากแดงพาสเจอร์ไรส์พร้อมดื่ม 25% และไวน์หมากแดง ในผลิตภัณฑ์น้ำลูกหมากแดงพาสเจอร์ไรส์พร้อมดื่ม 25% ได้ศึกษาผลของความร้อนต่อความคงตัวของแอนโทไซยานินในลูกหมากแดงพาสเจอร์ไรส์พร้อมดื่ม 25% ผลการทดลองพบว่า น้ำคั้นมี pH 2.85 ± 0.2 ของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด 8 ± 0.4 องศาบริกซ์ แอนโทไซยานินทั้งหมด 32.250 ± 0.002 มิลลิกรัมต่อ 100 มิลลิลิตร สารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด 38.439 ± 0.011 มิลลิกรัมต่อ 100 มิลลิลิตร เมื่อนำน้ำคั้นที่ได้จากลูกหมากแดงมาผลิตเป็นลูกหมากแดงพาสเจอร์ไรส์ 25% มาศึกษาการเปลี่ยนแปลงคุณภาพระหว่างการเก็บรักษา พบว่าระยะเวลาการเก็บรักษามีผลต่อปริมาณแอนโทไซยานินการสลายตัวของแอนโทไซยานินในน้ำลูกหมากแดงพาสเจอร์ไรส์ 25% มีค่าคงที่ของการสลายตัวมีแนวโน้มลดลง ซึ่งสามารถบอกได้ว่าระยะเวลาในการเก็บรักษาน้ำลูกหมากแดงพาสเจอร์ไรส์ 25% มีผลต่อปริมาณแอนโทไซยานินที่มีอยู่ในผลิตภัณฑ์ การสลายตัวของแอนโทไซยานินในน้ำลูกหมากแดงพาสเจอร์ไรส์ 25% ที่บรรจุในขวดแก้วโปร่งแสงขนาด 15 มิลลิลิตร แล้วเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 สัปดาห์ โดยที่ค่า k มีแนวโน้มลดลงทุกสัปดาห์ ค่า ΔE^* และค่า ΔH^* ของน้ำลูกหมากแดงเพิ่มขึ้นตลอดเวลาระหว่างการเก็บรักษา แสดงว่ามีการเปลี่ยนแปลงของสีเมื่อเทียบกับตัวอย่างเริ่มต้น รวมถึงการเปลี่ยนแปลงของเฉดสีในระหว่างการเก็บรักษาด้วย ด้านผลิตภัณฑ์ไวน์หมากแดงพบว่ามีแอนโทไซยานินทั้งหมด 32.250 ± 0.002 มิลลิกรัมต่อ 100 มิลลิลิตร และมีปริมาณการสลายตัวของแอนโทไซยานินในระหว่างการหมักเท่ากับ -1.81 และ -2.23 ในระหว่างการบ่ม และพบว่าระยะเวลาในการหมักและแสงสว่างในการบ่มไวน์ในขวดพลาสติกใสมีผลต่อปริมาณแอนโทไซยานิน การสลายตัวของแอนโทไซยานินตลอดเวลาการหมักและบ่มและค่า ΔE^* มีแนวโน้มลดลง แสดงว่าการเปลี่ยนแปลงของสีเกิดขึ้นในผลิตภัณฑ์ สามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า และค่า ΔH^* ของไวน์หมากแดงเพิ่มขึ้นแสดงให้เห็นว่า

ในระหว่างการหมักไวน์ และระหว่างการบ่มไวน์ มีการเปลี่ยนแปลงของกรดที่เกิดขึ้น ค่า C^* ของไวน์หนามแดงมีค่าลดลงเป็นผลมาจากการเสื่อมสลายของแอนโทไซยานินทำให้สีแดงของผลิตภัณฑ์ลดลงซึ่งสัมพันธ์กับ TCD ที่ลดลงเช่นกัน

ปารมี ชุมศรี (2549) ได้ทำการศึกษาการพัฒนาผลิตภัณฑ์กระเจี๊ยบแดงสกัดเข้มข้น กระเจี๊ยบแดงสด (Fresh roselle, *Hibiscus sabdariffa* Linn.) มีค่าสี L^* a^* และ b^* เท่ากับ 0.09 ± 0.01 , 0.02 ± 0.01 และ 0.05 ± 0.01 ตามลำดับ ปริมาณกรดทั้งหมดแสดงในรูปกรดมาลิก ค่าพีเอช และปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด $4.20 \pm 0.01\%$, 2.16 ± 0.05 และ 5.83 ± 0.04 องศาบริกซ์ ตามลำดับ ค่าผลผลิต (ร้อยละ) ของกระเจี๊ยบแดงสด (ปริมาณความชื้นร้อยละ 86.0) และกระเจี๊ยบแดงแห้ง (ปริมาณความชื้นร้อยละ 10.0) เท่ากับร้อยละ 47.45 ± 0.71 และร้อยละ 9.58 ± 0.77 ตามลำดับ สภาวะที่เหมาะสมที่สุดในการสกัดกระเจี๊ยบแดงสดและกระเจี๊ยบแดงแห้งด้วยน้ำคือ ใช้อัตราส่วนกระเจี๊ยบแดงสดต่อน้ำเท่ากับ 1 ต่อ 2 (น้ำหนักต่อปริมาตร) และใช้อัตราส่วนกระเจี๊ยบแดงแห้งต่อน้ำเท่ากับ 1 ต่อ 10 (น้ำหนักต่อปริมาตร) สกัดที่อุณหภูมิ 50.0 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที ให้สารสกัดกระเจี๊ยบแดงสดและสารสกัดกระเจี๊ยบแดงแห้งที่ได้มีปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมด (ไซยานิดิน 3-กาแลกโตไซด์) ปริมาณสารประกอบฟีนอลทั้งหมด (กรดแกลติก) และกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระแสดงเป็นค่า EC_{50} (Efficient concentration, BHT เป็นสารละลายมาตรฐาน) มีค่าเท่ากับ 45.13 ± 0.08 และ 502.33 ± 0.52 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัมของกระเจี๊ยบแดง 22.25 ± 0.31 และ 43.00 ± 0.97 มิลลิกรัมต่อกรัมของสารสกัดกระเจี๊ยบแดง 27.87 ± 1.27 และ 44.78 ± 0.49 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ วิธีการที่เหมาะสมในการทำให้เข้มข้นของสารสกัดกระเจี๊ยบแดงสดและกระเจี๊ยบแดงแห้ง คือการทำให้เข้มข้นภายใต้สุญญากาศ ใช้ความดัน 44 เซนติเมตรปรอท อุณหภูมิ 70.0 องศาเซลเซียส จนกระทั่งสารสกัดมีปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมดเท่ากับ 25 องศาบริกซ์ สารสกัดกระเจี๊ยบแดงสดเข้มข้น และสารสกัดกระเจี๊ยบแดงแห้งเข้มข้นที่ได้มีปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมด ปริมาณสารประกอบฟีนอลทั้งหมด และค่า EC_{50} มีค่าเท่ากับ 37.67 ± 0.02 และ 340.97 ± 0.15 มิลลิกรัมต่อกรัมกระเจี๊ยบแดง 31.26 ± 0.75 และ 31.18 ± 0.62 มิลลิกรัมต่อกรัมของกระเจี๊ยบแดงสกัดเข้มข้นและ 39.37 ± 0.61 และ 47.53 ± 0.85 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ การพัฒนาสูตรส่วนผสมของกระเจี๊ยบแดงสกัดเข้มข้นและประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัส พบว่าสูตรผลิตภัณฑ์กระเจี๊ยบแดงสกัดเข้มข้นที่มีส่วนผสมของกระเจี๊ยบแดงสกัดเข้มข้น ฟรุคโตส น้ำผึ้ง โอลิโกฟรุคโตส วิตามินอี และวิตามินเอ เท่ากับร้อยละ 50.00, 31.9835, 10.00, 8.00 และ 0.0035 ตามลำดับ เป็นสูตรที่ได้รับ

การยอมรับทางประสาทสัมผัสมากที่สุด โดยให้ค่าคะแนนเฉลี่ยความชอบที่พิจารณาในคุณลักษณะสี ความหวาน ความเปรี้ยว ความรู้สึกภายในปาก และการยอมรับโดยรวมมีค่าเท่ากับ 7.73 ± 0.69 , 7.17 ± 0.83 , 6.97 ± 0.93 , 7.07 ± 1.05 และ 7.23 ± 0.68 ตามลำดับ เมื่อนำผลิตภัณฑ์กระเจี๊ยบแดงสกัดเข้มข้นในขวดแก้วฝาเกลียวล๊อคความจุ 70 มิลลิลิตร ดังกล่าวมาผ่านการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ด้วยเครื่องฆ่าเชื้อ Steam water spray automated batch พบว่าอุณหภูมิ ณ จุดร้อนซ้ำที่สุดของผลิตภัณฑ์กระเจี๊ยบแดงสกัดเข้มข้นเท่ากับ 101.0 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที ผลิตภัณฑ์กระเจี๊ยบแดงสกัดเข้มข้นที่ได้มีคุณภาพทางจุลินทรีย์ ตามข้อกำหนดมาตรฐานเครื่องดื่มน้ำผลไม้และเครื่องดื่มในบรรจุที่ปิดสนิท หลังการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ผลิตภัณฑ์กระเจี๊ยบแดงสกัดเข้มข้นมีปริมาณวิตามินเอและวิตามินอีอยู่เท่ากับ 105.00 ไมโครกรัมและ 4.90 มิลลิกรัมตามลำดับ ซึ่งปริมาณวิตามินเอ และวิตามินอีเปรียบเทียบกับร้อยละของปริมาณสารอาหารที่แนะนำให้บริโภคต่อวันสำหรับคนไทยอายุตั้งแต่ 6 ปีขึ้นไป (%Thai RDI) เท่ากับร้อยละ 15.0 และร้อยละ 50.0 ตามลำดับ

การศึกษาผลของอุณหภูมิในการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4.0 ± 1.0 องศาเซลเซียส และ 27.0 ± 1.0 องศาเซลเซียส และระยะเวลา 0, 15, 30, 45 และ 60 วันต่อการเปลี่ยนแปลงคุณภาพทางเคมีและคุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระ พบว่าอุณหภูมิและระยะเวลาในการเก็บรักษาไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงคุณภาพทางเคมีของผลิตภัณฑ์กระเจี๊ยบแดงสกัดเข้มข้น โดยการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์กระเจี๊ยบแดงสกัดเข้มข้นที่อุณหภูมิ 4.0 ± 1.0 องศาเซลเซียส และ 27.0 ± 1.0 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 วัน มีคุณภาพทางเคมีแสดงค่าเฉลี่ยโดยค่าพีเอช ปริมาณกรดทั้งหมด และปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมดโดยเฉลี่ยเท่ากับ 2.80 ± 0.01 , 2.24 ± 0.02 และ 44.56 ± 0.01 องศาบริกซ์ ตามลำดับ อย่างไรก็ตามอุณหภูมิ และระยะเวลามีผลอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) ต่อการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระของผลิตภัณฑ์กระเจี๊ยบแดงสกัดเข้มข้น โดยการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์กระเจี๊ยบแดงสกัดเข้มข้นที่อุณหภูมิ 4.0 ± 1.0 องศาเซลเซียส และ 27.0 ± 1.0 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 วัน มีคุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระ ประกอบด้วยปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมด (ไซยานิดิน 3-กลูโคไซด์) ปริมาณสารประกอบฟีนอลทั้งหมด และค่า EC_{50} เท่ากับ 308.18 ± 1.89 และ 135.93 ± 1.78 มิลลิกรัมต่อลิตรของกระเจี๊ยบแดงสกัดเข้มข้น 4.19 ± 0.13 และ 3.11 ± 0.11 มิลลิกรัมต่อกระเจี๊ยบแดงสกัดเข้มข้น 321.29 ± 1.06 และ 347.04 ± 1.49 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ สำหรับคุณภาพทางจุลินทรีย์ ผลิตภัณฑ์กระเจี๊ยบแดงสกัดเข้มข้นเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4.0 ± 1.0 องศาเซลเซียส และ 27.0 ± 1.0 องศาเซลเซียสเมื่อเก็บรักษาเป็นเวลา 60 วัน ยังมีคุณภาพเป็นไปตามข้อกำหนดมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมน้ำผลไม้และเครื่องดื่มในภาชนะ

บรรจุที่ปิดสนิท (ประกาศกระทรวงสาธารณสุข, 2543) ส่วนการประเมินทางประสาทสัมผัสของผลิตภัณฑ์กระเจี๊ยบแดงสกัดเข้มข้นระหว่างการเก็บรักษาเป็นเวลา 60 วัน ที่อุณหภูมิ 4.0 ± 1.0 องศาเซลเซียส และ 27.0 ± 1.0 องศาเซลเซียส พบว่าอิทธิพลร่วมระหว่างระยะเวลาการเก็บรักษาและอุณหภูมิในการเก็บรักษาไม่มีผลอย่างมีนัยสำคัญ ($P > 0.05$) ต่อการประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัสในทุกคุณลักษณะที่พิจารณาโดยค่าเฉลี่ยของคะแนนในคุณลักษณะด้านสี ความหวาน ความเปรี้ยว ความรู้สึกภายในปาก และการยอมรับโดยรวม มีระดับคะแนนอยู่ในช่วง 7-8 (ชอบปานกลางถึงชอบมาก) ผลิตภัณฑ์กระเจี๊ยบแดงสกัดเข้มข้นมีคุณภาพยังเป็นที่ยอมรับของผู้บริโภค เมื่อเก็บรักษาเป็นเวลา 60 วัน ผลิตภัณฑ์กระเจี๊ยบแดงสกัดเข้มข้น (ปริมาตร 70 มิลลิลิตร) จากกระบวนการผลิตกระเจี๊ยบแดงสกัดเข้มข้นมีต้นทุนการผลิตเท่ากับ 19.98 บาทต่อขวด

บุศวรรัตน์ สายเชื้อ (2545) ได้ทำการศึกษาแอนโทไซยานินจากกระเจี๊ยบแดง เพื่อใช้เป็นสีผสมอาหาร ในงานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการสกัดแอนโทไซยานินจากกลีบกระเจี๊ยบแดง *Hibiscus sabdariffa* L. การทำแห้งสารละลายสกัดแอนโทไซยานินแบบเยือกแข็งและการทำเข้มข้นสารละลายสกัดแอนโทไซยานินรวมทั้งศึกษาการเปลี่ยนแปลงของสีแอนโทไซยานินทำแห้งแบบเยือกแข็งและสีแอนโทไซยานินเข้มข้น และทำ Model system น้ำหวานโดยใช้สีจากกลีบดอกกระเจี๊ยบแดง เทียบกับสี SAN RED RC และสีคาร์โมอีซิน ในขั้นตอนแรกได้ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดแอนโทไซยานินจากกลีบกระเจี๊ยบแดงพบว่าชนิดของตัวทำละลาย และ pH ที่เหมาะสมคือ น้ำ : เอทานอล (1:1) ปรับ pH เป็น 2.5 ด้วยกรดไฮโดรคลอริก อัตราส่วนระหว่างปริมาณกลีบกระเจี๊ยบแดงต่อตัวทำละลายเป็น 1:4 ขั้นตอนต่อมาศึกษาการทำแห้งแบบเยือกแข็งสารละลายสกัดแอนโทไซยานิน จากการศึกษาพบว่าสีแอนโทไซยานินทำแห้งแบบเยือกแข็งที่ได้ Trehalose และ Maltodextrin ที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 2 และ ร้อยละ 3 (w/w) เป็น Stabilizer มีค่าร้อยละปริมาณแอนโทไซยานินคงเหลือหลังการทำแห้ง และค่า Degradation Index (DI) ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) เมื่อเทียบกับตัวอย่างควบคุมเมื่อเก็บรักษาสีแอนโทไซยานินทำแห้งแบบเยือกแข็งเป็นเวลา 15 สัปดาห์พบว่าในทุกตัวอย่างมีค่าร้อยละปริมาณแอนโทไซยานินคงเหลือลดลงและเมื่อพิจารณาค่าครึ่งชีวิตของแอนโทไซยานินพบว่าสีแอนโทไซยานินทำแห้งแบบเยือกแข็งที่ได้ Maltodextrin ความเข้มข้นร้อยละ 3 (w/v) มีค่าครึ่งชีวิตมากที่สุด คือ 578 วัน ขั้นที่สามศึกษาการทำเข้มข้นสารละลายสกัดแอนโทไซยานินโดยทำเข้มข้นแบบสุญญากาศพบว่าสภาวะที่เหมาะสมคือ ทำเข้มข้นที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที

จากนั้นศึกษาผลของน้ำตาล Glucose, Sucrose, Trehalose และ Maltodextrin ความเข้มข้นร้อยละ 2 และร้อยละ 3 (w/v) เพื่อเป็น Stabilizer ของสีแอนโทไซยานินที่ผ่านการทำเข้มข้น พบว่าสีแอนโทไซยานินเข้มข้นมีค่าร้อยละปริมาณแอนโทไซยานินคงเหลือหลังทำเข้มข้นและค่า DI ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) เมื่อเทียบกับตัวอย่างควบคุมและเมื่อเก็บรักษาสีแอนโทไซยานินเข้มข้นเป็นเวลา 15 สัปดาห์ พบว่าสีแอนโทไซยานินทำเข้มข้นที่ได้ Maltodextrin ความเข้มข้นร้อยละ 3 (w/v) มีค่าครึ่งชีวิตมากที่สุดคือ 86 วันเมื่อศึกษาการนำไปใช้โดยทำ Model system น้ำหวานโดยผสมสี 3 ชนิด คือ สีแอนโทไซยานินที่สกัดจากกลีบดอกกระเจี๊ยบแดงสี SAN RED RC และสีสังเคราะห์ คือ สีคาร์โมอีซินเมื่อเก็บรักษาเป็นเวลา 84 วันพบว่าค่า L^* ค่า ΔE^* และค่า Hue angle ในน้ำหวานใส่สีแอนโทไซยานินทั้ง 2 ชนิดมีค่าเพิ่มขึ้นแต่ค่า a^* และค่า Chroma มีค่าลดลงในขณะที่น้ำหวานที่ใส่สีคาร์โมอีซินไม่มีการเปลี่ยนแปลงของค่าดังกล่าว ข้างต้นผลการทดสอบด้านประสาทสัมผัสด้านความชอบรวมพบว่าน้ำหวานที่ใส่สีแอนโทไซยานินจากกลีบดอกกระเจี๊ยบแดงผู้ทดสอบไม่ยอมรับหลังจากผ่านไป 56 วัน ในขณะที่น้ำหวานที่ใส่สี SAN RED RC และสีคาร์โมอีซินได้รับการยอมรับตลอดระยะเวลา 84 วัน

Frizzell (1988) รายงานว่าแคปพิเตชันสามารถแบ่งออกเป็น 2 ประเภท ได้แก่ แคปพิเตชันแบบถาวร (stable cavitation) และแคปพิเตชันแบบชั่วคราว (transient cavitation) ซึ่งแต่ละแบบจะมีผลทำให้พฤติกรรมหรือลักษณะของฟองแก๊สที่ได้รับคลื่นอัลตราซาวนด์แตกต่างกันออกไป โดยแคปพิเตชันแบบถาวรจะเกิดขึ้นเมื่อฟองอากาศหรือฟองแก๊สเกิดการสั่นแกว่ง (oscillate) เมื่อได้รับคลื่นอัลตราซาวนด์เป็นจำนวนหลายรอบของการสั่นแต่ไม่เกิดการแตกของฟองอากาศหรือฟองแก๊สดังกล่าว ซึ่งฟองอากาศหรือฟองแก๊สนี้อาจจะเพิ่มขนาดขึ้นจนถึงขนาดเรโซแนนซ์ (resonance size) (เป็นขนาดของฟองแก๊สที่มีความถี่ธรรมชาติเท่ากับกับความถี่ในการสั่นแบบบังคับ) ส่วนแคปพิเตชันแบบชั่วคราวนั้น เกิดขึ้นในระยะเวลาการบีบอัดของฟองแก๊ส (compression phase) ในของเหลวที่ได้รับความเครียด (tension stress) ที่เกิดขึ้นขณะเริ่มเกิดการขยายตัวของฟองแก๊ส ซึ่งมีผลทำให้การแตกของฟองแก๊สเกิดขึ้นอย่างรวดเร็ว หรืออาจเกิดจากฟองแก๊สเกิดการสั่นแกว่งและขยายขนาดเพิ่มขึ้นในลักษณะคงที่ในระยะเวลาหนึ่ง ก่อนที่จะแตกออกอย่างรวดเร็วเมื่อฟองแก๊สนั้นขยายขนาดขึ้นเมื่อถึงขนาดที่จำเพาะ

Sala และคณะ. (1995) รายงานว่าในสถานะที่ฟองอากาศแตกนั้นพบว่าทำให้เกิดอุณหภูมิสูงขึ้นถึง 5,000 เคลวิน (K) และความดันสูงถึง 2,000 atm ในบริเวณจุดที่เกิดคลื่น

กระแทก (shock waves) ทั้งนี้เนื่องจากในระหว่างการเกิดการขยายและหดตัวของฟองแก๊สนั้น จะเกิดสมดุขึ้นระหว่างความดันไภายในและภายนอกฟองแก๊สและพื้นที่ผิวของฟองแก๊สขณะขยายตัวจะมีมากกว่าพื้นที่ผิวของฟองแก๊สขณะหดตัว จึงเป็นผลให้การซึมผ่านของแก๊สในขณะที่ยขยายตัวเกิดขึ้นได้มากกว่าและฟองแก๊สนี้จะขยายตัวเพิ่มขึ้นเมื่อจำนวนรอบความถี่เพิ่มขึ้น โดยอัตราส่วนของอัตราการซึมผ่านของแก๊สในขณะขยายตัวต่ออัตราการซึมผ่านของแก๊สในขณะถูกอัดจะเพิ่มมากขึ้นในแต่ละรอบ จนกระทั่งฟองแก๊สมีขนาดเรโซแนนซ์ ซึ่งทำให้ช่องว่างภายในฟองแก๊สมีขนาดโตขึ้นอย่างรวดเร็วภายในหนึ่งรอบของการสั่น และเนื่องจากพลังงานที่ได้รับจากคลื่นอัลตราซาวนด์ไม่เพียงพอในการคงสถานะของแก๊สหรือไอ จึงทำให้เกิดการควบแน่น (condensation) ขึ้นทันทีทันใด โดยโมเลกุลที่ควบแน่นนั้นจะชนซึ่งกันและกันอย่างรุนแรง ทำให้เกิดคลื่นกระแทกขึ้นและเกิดจุดหรือบริเวณเล็กๆ ที่มีอุณหภูมิและความดันที่สูงมาก (Suslick, 1988) และเป็นที่เชื่อกันว่าปรากฏการณ์นี้เป็นปรากฏการณ์ที่สำคัญที่เกิดขึ้นในระหว่างที่ของเหลวได้รับคลื่นอัลตราซาวนด์ ซึ่งทันทีที่ฟองแก๊สหรือฟองอากาศแตกจะเกิดการปลดปล่อยพลังงานที่ใช้ในการเร่งปฏิกิริยาเคมีหรือสร้างวิถีของปฏิกิริยา (reaction pathway) หรือทำให้เกิดผลิตภัณฑ์ใหม่ที่แตกต่างไปจากปฏิกิริยาเดิมจากสภาวะปกติ Williams (1994) รายงานว่าในการพุดคุยทั่วไป พบว่ากำลังของเสียง(sound power levels) มีค่าประมาณ 10^{-7} Wm^{-2} และเครื่องขุดเจาะถนน (pneumatic drill) ที่มีความดังของเสียง 110 dB จะให้ค่ากำลังของเสียงที่ประมาณ 10^{-1} Wm^{-2} แต่ในส่วนของคลื่นอัลตราซาวนด์กำลังสูง (high power ultrasound) พบว่าค่าระดับกำลังของเสียงอยู่ในช่วง 10^{-3} to 10^{-6} Wm^{-2} (ที่ 10^6 Wm^{-2} พบว่าอัลตราซาวนด์จะสามารถเจาะทะลุแผ่นอะลูมิเนียมฟอยล์ได้ภายใน 30วินาที) และความดันที่เกิดขึ้นจะสูงถึง 10^4 atm และมีอุณหภูมิสูงประมาณ 1,000 ถึง 1,500 K