



ใบรับรองวิทยานิพนธ์
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (วิทยาศาสตรการอาหาร)

ปริญญา

วิทยาศาสตรการอาหาร

วิทยาศาสตรและเทคโนโลยีการอาหาร

สาขา

ภาควิชา

เรื่อง การผลิตอิมัลชันชนิดเอทานอลในน้ำมันในน้ำสำหรับห่อหุ้มสารสกัดจากบัวบก

Production of Ethanol-in-Oil-in-Water Emulsion (E/O/W) for Encapsulation of
Centella asiatica Extracts

นามผู้วิจัย นายศรายุทธ ดวงแก้ว

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(อาจารย์อุทัย กลิ่นเกษร, ประ.ด.)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(รองศาสตราจารย์ปาริฉัตร หงสประภาส, Ph.D.)

หัวหน้าภาควิชา

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ธนะบุญย์ สัจจานันตกุล, Ph.D.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

(รองศาสตราจารย์กัญญา ชีระกุล, D.Agr.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ เดือน พ.ศ.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

การผลิตอิมัลชันชนิดเอทานอลในน้ำมันในน้ำสำหรับห่อหุ้มสารสกัดจากบัวบก

Production of Ethanol-in-Oil-in-Water Emulsion (E/O/W) for Encapsulation of
Centella asiatica Extracts

โดย

นายศรายุทธ ดวงแก้ว

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (วิทยาศาสตรการอาหาร)

พ.ศ. 2554

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ศราวุธ ดวงแก้ว 2554: การผลิตอิมัลชันชนิดเอทานอลในน้ำมันในน้ำสำหรับห่อหุ้ม
สารสกัดจากบัวบก ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (วิทยาศาสตร์การอาหาร) สาขา
วิทยาศาสตร์การอาหาร ภาควิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร อาจารย์ที่ปรึกษา
วิทยานิพนธ์หลัก: อาจารย์อุทัย กลิ่นเกษร, ประ.ด. 98 หน้า

งานวิจัยนี้มุ่งศึกษาการผลิตระบบอิมัลชันชนิดเอทานอลในน้ำมันในน้ำให้มีความคงตัว
สำหรับใช้เป็นระบบห่อหุ้มสารสกัดจากบัวบกที่ละลายได้ในเอทานอลโดยการศึกษาผลของ
ชนิดและความเข้มข้นของอิมัลซิฟายเออร์ต่อความคงตัวของอิมัลชันเชิงเดี่ยวชนิดเอทานอลใน
น้ำมัน และอิมัลชันเชิงซ้อนชนิดเอทานอลในน้ำมันในน้ำ จากผลความคงตัวต่อการแยกชั้น การ
วัดค่าความขุ่น ขนาดของอนุภาค และโครงสร้างระดับจุลภาคของอิมัลชัน พบว่า ชนิดและความ
เข้มข้นของอิมัลซิฟายเออร์มีผลต่อความคงตัวของอิมัลชัน ซึ่งในการผลิตอิมัลชันเชิงเดี่ยวการใช้
Polyglycerol polyricinoleate (PGPR) เป็นอิมัลซิฟายเออร์ให้อิมัลชันที่มีความคงตัวต่อการแยกชั้น
ดีกว่าที่เตรียมโดยใช้ Decaglycerol mono-oleate (DGMO) และเลซิทีน ตามลำดับ อิมัลชันเชิงเดี่ยว
ที่คงตัวเตรียมได้โดยใช้ PGPR เข้มข้นร้อยละ 2.0 โดยน้ำหนัก โดยมีเอทานอลร้อยละ 10 โดย
น้ำหนัก เป็นอนุภาคที่กระจาย อิมัลชันมีการกระจายตัวของอนุภาคแบบ monomodal ที่มีอนุภาค
เฉลี่ยอยู่ในช่วง 0.60 ± 0.09 ไมโครเมตร และอิมัลชันมีความคงตัวต่อการแยกชั้นหลังจากการเก็บ
อิมัลชันดังกล่าวไว้ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส นาน 7 วัน ส่วนอิมัลชันเชิงซ้อนชนิดเอทานอลใน
น้ำมันในน้ำที่คงตัวนั้นเตรียมโดยใช้โซเดียมแคซิเนตเป็นอิมัลซิฟายเออร์ที่มีความเข้มข้นร้อยละ 2.0
โดยน้ำหนัก และปริมาณอิมัลชันเชิงเดี่ยวร้อยละ 5.0 โดยน้ำหนัก ที่มีอนุภาคเฉลี่ยอยู่ในช่วง
 0.30 ± 0.03 ไมโครเมตร อิมัลชันชนิดเอทานอลในน้ำมันในน้ำที่คงตัวนี้สามารถห่อหุ้มสารสกัด
บัวบกไว้ได้ร้อยละ 97 ของปริมาณสารสกัดบัวบกที่เติมในระบบ (ร้อยละ 5 โดยน้ำหนัก) และ
อิมัลชันดังกล่าวมีความคงตัวต่อความร้อน (30-90 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที) การแช่เยือกแข็ง
(-18 องศาเซลเซียส นาน 22 ชั่วโมง/25 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง) ความเป็นกรด-ด่าง
(พีเอช 6-8) และทนต่อการเติมสารละลายเกลือโซเดียมคลอไรด์ (0-200 mM) ซึ่งสามารถนำไปใช้
เป็นระบบห่อหุ้มสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ไม่ละลายน้ำสำหรับเป็นส่วนผสมในผลิตภัณฑ์อาหาร
ชนิดต่างๆ ได้

Sarayuth Duangkaew 2011: Production of Ethanol-in-Oil-in-Water Emulsion (E/O/W) for Encapsulation of *Centella asiatica* Extracts. Master of Science (Food Science), Major Field: Food Science, Department of Food Science and Technology.
Thesis Advisor: Ms. Utai Klinkesorn, Ph.D. 98 pages.

The objective of this research was to create the stable ethanol-in-oil-in-water (E/O/W) multiple emulsions used as a encapsulation system for ethanol soluble bioactive compounds from *Centella asiatica*. The effect of emulsifier type and concentration on stability of single emulsions (E/O emulsions) and multiple emulsions (E/O/W emulsions) was studied by evaluation of creaming stability, turbidity, droplets size and microstructure of the emulsions. The results found that type and concentration of emulsifier affected the stability of the emulsions. The single emulsions stabilized by polyglycerol polyricinoleate (PGPR) were more stable to creaming than decaglycerol mono-oleate (DGM) and lecithin, respectively. A stable single emulsion could be prepared by using 2 wt% PGPR as an emulsifier and 10 wt% ethanol as dispersed phase. The droplet size distribution of this single emulsion was monomodal with Z-average of $0.60 \pm 0.09 \mu\text{m}$. The emulsion was stable to phase separation after storage at 25°C for 7 days. A stable E/O/W multiple emulsion could be prepared by using 2 wt% sodium caseinate as an emulsifier and 5 wt% single emulsion with Z-average of $0.30 \pm 0.03 \mu\text{m}$. The multiple emulsions having high encapsulation efficiency ($\sim 97\%$) were stable to thermal treatments ($30-90^\circ\text{C}$ for 30 min), freeze-thawing (-18°C for 22 h/ 25°C for 2 h), pH (6-8) and addition of sodium chloride (0-200 mM). The multiple emulsion produced in this study could be an excellent system for encapsulation of water insoluble bioactive compounds for use in a variety of food products.

Student's signature

Thesis Advisor's signature

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี เนื่องจากได้รับความช่วยเหลือจากบุคคลหลายท่าน จึงขอกราบขอบพระคุณท่านอาจารย์อุทัย กลิ่นเกษร อาจารย์ประจำภาควิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ที่ให้เกียรติเป็นประธานกรรมการที่ปรึกษา รองศาสตราจารย์ปาริฉัตร หงสประภาส กรรมการที่ปรึกษาร่วมผู้ช่วยศาสตราจารย์เอกพันธ์ แก้วมณีชัย ผู้ทรงคุณวุฒิ จากมหาวิทยาลัยศิลปากร และผู้ช่วยศาสตราจารย์วราภรณ์ บุญทรัพย์ทิพย์ ประธานการสอบวิทยานิพนธ์ในครั้งนี้ และอาจารย์ท่านอื่นๆ ที่ประสาทวิชาความรู้ และให้คำแนะนำอันเป็นประโยชน์อย่างยิ่งแก่ข้าพเจ้า ตลอดจนช่วยตรวจทานและแก้ไขข้อบกพร่องต่างๆ ตลอดจนการทำวิทยานิพนธ์

ขอขอบพระคุณในคำแนะนำอันมีประโยชน์อย่างยิ่ง จากท่านคณาจารย์ของภาควิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ และขอบคุณสถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ที่กรุณาให้ทุนสนับสนุนงานวิจัย ข้าพเจ้าขอขอบพระคุณบทความงานวิจัยทุกบทความที่ข้าพเจ้าได้นำมาประกอบเนื้อหาภายในเล่ม รวมทั้งเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการและอาคารแปรรูปทุกท่านที่ให้ความช่วยเหลือในการใช้เครื่องมือวิเคราะห์ต่างๆ

ขอขอบคุณเพื่อนๆ ปริญญาโททุกท่าน โดยเฉพาะอย่างยิ่งบุคคลที่คอยให้กำลังใจได้แก่ พี่กอล์ฟ พี่ละอองดาว พี่นก พี่จูน แบงค์ พลอย เงิน เอ็กซ์ น้อง และบอย รวมถึงความช่วยเหลือ คำชี้แนะเป็นพิเศษสำหรับข้าพเจ้า ตลอดจนรุ่นพี่ที่จบไปแล้ว และรุ่นน้องในห้องแล็บ เพื่อนจากมหาวิทยาลัยราชภัฏสวนดุสิต และโรงเรียนกาญจนาภิเษกวิทยาลัย สุพรรณบุรี ที่คอยเป็นกำลังใจให้ข้าพเจ้าเสมอ

ขอขอบพระคุณคุณพ่อ คุณแม่ พี่สาวและสมาชิกในครอบครัวดวงแก้วที่เป็นกำลังใจ แรงใจ และเข้าใจเสมอมา

ศรายุทธ ดวงแก้ว

พฤษภาคม 2554

สารบัญ

หน้า

สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(3)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	3
การตรวจเอกสาร	4
อุปกรณ์และวิธีการ	31
อุปกรณ์	31
วิธีการ	33
ผลและวิจารณ์	40
สรุปและข้อเสนอแนะ	83
สรุป	83
ข้อเสนอแนะ	84
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	85
ภาคผนวก	93
ภาคผนวก ก วิธีการเตรียมสารสกัดบัวบก	94
ภาคผนวก ข กราฟมาตรฐานสารสกัดบัวบก	96
ประวัติการศึกษาและการทำงาน	98

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	ชนิดของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่พบในแหล่งอาหาร	5
2	หมู่เคมีในโครงสร้างของสารประกอบไตรเทอร์ปีนทั้ง 4 ชนิด	7
3	ตัวอย่างอิมัลซิฟายเออร์และค่า HLB ที่ใช้โดยทั่วไปในระบบอิมัลชัน	18
4	ค่า HLB ที่สัมพันธ์กับการนำไปใช้ในอุตสาหกรรม	19
5	ขนาดอนุภาคของอิมัลชันเชิงซ้อนชนิดเอทานอลในน้ำมันในน้ำ ที่เตรียมโดยใช้โซเดียมเคซิเนตเป็นอิมัลซิฟายเออร์	53
6	ค่าความขุ่น (เซนติเมตร ⁻¹) ของอิมัลชันเชิงซ้อนเอทานอลในน้ำมัน ในน้ำที่ปริมาณอิมัลชันเชิงเดี่ยวเอทานอลในน้ำมันต่างๆ	57
7	ขนาดอนุภาคของอิมัลชันเชิงซ้อนชนิดเอทานอลในน้ำมันในน้ำ ที่เตรียมโดยใช้ปริมาณอิมัลชันเชิงเดี่ยวเอทานอลในน้ำมันต่างๆ	61
8	ขนาดอนุภาคเฉลี่ยของอิมัลชันเชิงเดี่ยวและเชิงซ้อนที่เตรียมโดยใส่ และไม่ใส่สารสกัดบัวบก	64
9	ขนาดอนุภาคเฉลี่ยของอิมัลชันเชิงซ้อนที่เตรียมโดยใส่และไม่ใส่ สารสกัดบัวบกหลังผ่านการให้ความร้อนที่อุณหภูมิต่างๆ	67

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
1 โครงสร้างหลักของสารประกอบไตรเทอร์ปีนในสารสกัดบัวบก	7
2 อิมัลชันเชิงเดี่ยวชนิดเอทานอลในน้ำมันโดยมีโพลีกลีเซอรอลเอสเทอร์ของกรดไขมันเป็นอิมัลซิฟายเออร์	12
3 อิมัลชันเชิงซ้อนชนิดเอทานอลในน้ำมันในน้ำโดยมีโพลีกลีเซอรอลเอสเทอร์ของกรดไขมันเป็นอิมัลซิฟายเออร์ในส่วนของอิมัลชันเชิงเดี่ยว และเลซิทีน และ/หรือ Span เป็นอิมัลซิฟายเออร์ในส่วนของอิมัลชันเชิงซ้อน	14
4 การเตรียมอิมัลชันเชิงซ้อนชนิดน้ำในน้ำมันในน้ำ	15
5 ลักษณะการจัดเรียงตัวของสารลดแรงตึงผิว	17
6 การสูญเสียความคงตัวของอิมัลชัน (ก: อิมัลชันที่คงตัว ข: การรวมตัวแบบเกาะกลุ่ม (flocculation) ค: การแยกชั้นด้านบนหรือการเกิดครีม (creaming) ง: การรวมตัวแบบหลอมรวม (coalescence) และจะการเกิดแยกชั้นด้านล่างหรือการตกตะกอน (sedimentation)	28
7 อิมัลชันเอทานอลในน้ำมันที่ทำให้คงตัวด้วยเลซิทีน (lecithin) Decaglycerol mono-oleate (DGMO) และ Polyglycerol polyricinoleate (PGPR) ที่ความเข้มข้นร้อยละ 1.0 โดยน้ำหนักหลังจากเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 วัน	42
8 อิมัลชันชนิดเอทานอลในน้ำมันที่ทำให้คงตัวด้วย PGPR ที่ช่วงความเข้มข้นร้อยละ 0.5–5.0 โดยน้ำหนักหลังจากที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 วัน (ก) และ 7 วัน (ข)	43
9 การกระจายตัวของอนุภาคในอิมัลชันเอทานอลในน้ำมันที่ทำให้คงตัวด้วย PGPR หลังจากการเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 วัน (ก) และ 7 วัน (ข)	44
10 ขนาดอนุภาคเอทานอลในอิมัลชันเอทานอลในน้ำมันที่ทำให้คงตัวด้วย PGPR หลังจากการเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 วันและ 7 วัน	44

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
11 โครงสร้างระดับจุลภาคของอิมัลชันเอทานอลในน้ำมันที่ทำให้คงตัวด้วย PGPR ร้อยละ 0.5 – 5.0 โดยน้ำหนัก และเอทานอลร้อยละ 10 โดยน้ำหนัก หลังจากการเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 วัน หยดเอทานอล (ethanol droplet) แสดงเป็นสีม่วง	45
12 อิมัลชันเอทานอลในน้ำมันที่ทำให้คงตัวด้วย PGPR (ร้อยละ 2.0 โดยน้ำหนัก) และความเข้มข้นเอทานอลต่างๆ (ร้อยละ 10-50 โดยน้ำหนัก) หลังจากเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 วัน (ก และ ค) 7 วัน (ข และ ง)	47
13 ค่าความขุ่นของอิมัลชันเอทานอลในน้ำมันที่ทำให้คงตัวด้วย PGPR (ร้อยละ 2.0 โดยน้ำหนัก) และความเข้มข้นเอทานอลต่าง ๆ (ร้อยละ 10-50 โดยน้ำหนัก) หลังจากการเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 วัน และ 7 วัน	48
14 โครงสร้างระดับจุลภาคของอิมัลชันเอทานอลในน้ำมันที่ทำให้คงตัวด้วย PGPR (ร้อยละ 2.0 โดยน้ำหนัก) และความเข้มข้นเอทานอลต่าง ๆ (ร้อยละ 10-50 โดยน้ำหนัก) หลังจากการเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 วัน	48
15 อิมัลชันเชิงซ้อนเอทานอลในน้ำมันในน้ำที่ทำให้คงตัวด้วย Tween 80 และโซเดียมแคซิเนต ที่ความเข้มข้นต่างๆ หลังจากเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 วันและ 7 วัน	50
16 ค่าความขุ่นที่ลดลงของอิมัลชันเอทานอลในน้ำมันในน้ำที่ทำให้คงตัวด้วย Tween 80 และโซเดียมแคซิเนต ที่ความเข้มข้นต่างๆ หลังจากเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส นาน 7 และ 14 วัน	51
17 การกระจายตัวของอนุภาคในอิมัลชันเอทานอลในน้ำมันในน้ำที่ทำให้คงตัวด้วยโซเดียมแคซิเนตที่ความเข้มข้นต่างๆ หลังจากเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสนาน 1 วัน (ก), 7 วัน (ข) และ 14 วัน (ค)	52

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า	
18	โครงสร้างระดับจุลภาคของอิมัลชันเชิงซ้อนชนิดเอทานอลในน้ำมันในน้ำ (ก); อนุภาคเอทานอลในน้ำมัน (หยดเอทานอลสีม่วงขนาดเล็กกระจายตัวอยู่ในหยคน้ำมันสีฟ้า), (ข); อนุภาคน้ำมัน	54
19	โครงสร้างระดับจุลภาคของอิมัลชันเอทานอลในน้ำมันในน้ำที่ทำให้ตัวด้วยโซเดียมแคซิเนตความเข้มข้นต่างๆ หลังจากเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 วัน	55
20	อิมัลชันเชิงซ้อนเอทานอลในน้ำมันในน้ำ ที่ทำให้คงตัวด้วยโซเดียมแคซิเนต (ร้อยละ 2.0 โดยน้ำหนัก) และความเข้มข้นอิมัลชันเชิงเดี่ยวต่างๆ หลังเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 วัน (ก) และ 7 วัน (ข)	56
21	การลดลงของค่าความขุ่นของอิมัลชันเชิงซ้อนเอทานอลในน้ำมันในน้ำที่ทำให้คงตัวด้วยโซเดียมแคซิเนต (ร้อยละ 2.0 โดยน้ำหนัก) และความเข้มข้นอิมัลชันเชิงเดี่ยวต่างๆ หลังเก็บตัวอย่างไว้ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 7 วัน	58
22	ค่าความหนืดของอิมัลชันเชิงซ้อนเอทานอลในน้ำมันในน้ำ ที่ทำให้คงตัวด้วยโซเดียมแคซิเนต (ร้อยละ 2.0 โดยน้ำหนัก) และความเข้มข้นอิมัลชันเชิงเดี่ยวต่างๆ หลังเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 วัน	59
23	การกระจายตัวของอนุภาคอิมัลชันเชิงซ้อนชนิดเอทานอลในน้ำมันในน้ำ ที่ทำให้คงตัวด้วยโซเดียมแคซิเนต (ร้อยละ 2.0 โดยน้ำหนัก) และความเข้มข้นอิมัลชันเชิงเดี่ยวต่างๆ หลังจากเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 วัน (ก) และ 7 วัน (ข)	60
24	โครงสร้างระดับจุลภาคของอิมัลชันเอทานอลในน้ำมันในน้ำที่ทำให้คงตัวด้วยโซเดียมแคซิเนต (ร้อยละ 2.0 โดยน้ำหนัก) และความเข้มข้นอิมัลชันเชิงเดี่ยวต่างๆ หลังจากเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 วัน	62
25	อิมัลชันเชิงเดี่ยวเอทานอลในน้ำมัน (ก, ข) และอิมัลชันเชิงซ้อนเอทานอลในน้ำมันในน้ำ (ค, ง) ที่ไม่มี (ก, ค) และมี (ข, ง) สารสกัดบัวบกหลังเก็บที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 วัน	63

สารบัญภาพ (ต่อ)

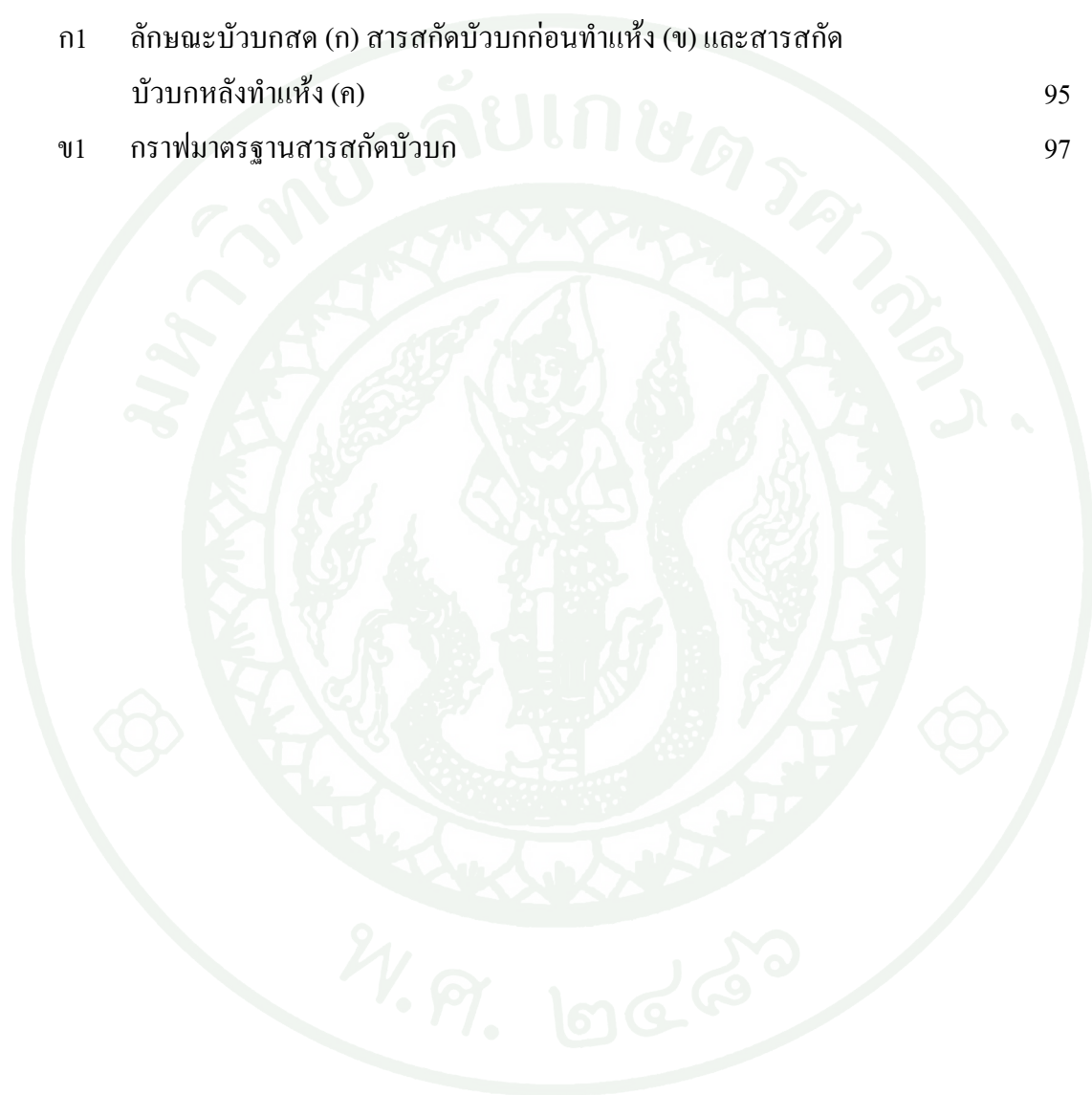
ภาพที่		หน้า
26	การกระจายตัวของขนาดอนุภาคของอิมัลชันเชิงเดี่ยวเอทานอลในน้ำมัน และอิมัลชันเชิงซ้อนเอทานอลในน้ำมันในน้ำในน้ำ หลังจากเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 วัน	64
27	โครงสร้างระดับจุลภาคของอิมัลชันเชิงเดี่ยวเอทานอลในน้ำมันที่ไม่มี (ก) และมีสารสกัดบัวบก (ข) และอิมัลชันเชิงซ้อนเอทานอลในน้ำมันในน้ำที่ไม่มี (ค) และมีสาร สกัดบัวบก (ง) หลังจากเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 วัน	65
28	อิมัลชันเชิงซ้อนเอทานอลในน้ำมันในน้ำที่ไม่มี (ก) และมี (ข) สารสกัดบัวบก หลังผ่านการให้ความร้อนที่ 30-90 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที	66
29	ผลของการให้ความร้อนต่อการกระจายตัวของขนาดอนุภาคของอิมัลชันเชิงซ้อนชนิดเอทานอลในน้ำมันในน้ำที่ไม่มีสารสกัดบัวบก (ก) และมีสารสกัด บัวบก (ข)	67
30	ผลของการให้ความร้อนต่อโครงสร้างระดับจุลภาคของอิมัลชันเชิงซ้อนชนิดเอทานอลในน้ำมันในน้ำที่ไม่มีสารสกัดบัวบก	68
31	ผลของการให้ความร้อนต่อโครงสร้างระดับจุลภาคของอิมัลชันเชิงซ้อนชนิดเอทานอลในน้ำมันในน้ำที่มีสารสกัดบัวบก	69
32	อิมัลชันเชิงซ้อนเอทานอลในน้ำมันในน้ำที่ไม่มีสารสกัดบัวบก (ก) และมีสารสกัดบัวบก (ข) หลังผ่านการแช่แข็งที่อุณหภูมิ -18 องศาเซลเซียส นาน 22 ชั่วโมง และทำละลายที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง	70
33	การกระจายตัวของขนาดอนุภาคของอิมัลชันเชิงซ้อนชนิดเอทานอลในน้ำมันในน้ำที่ไม่มีสารสกัดบัวบก (ก) และมีสารสกัดบัวบก (ข) หลังผ่านการแช่แข็งที่อุณหภูมิ -18 องศาเซลเซียส นาน 22 ชั่วโมง และทำละลายที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง	71
34	ผลของการแช่เยือกแข็งต่อขนาดของอนุภาคของอิมัลชันเชิงซ้อนชนิดเอทานอลในน้ำมันในน้ำ	71

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
35	โครงสร้างระดับจุลภาคของอิมัลชันเชิงซ้อนเอทานอลในน้ำมันในน้ำที่ไม่มีสารสกัดบัวบก (ก) และมีสารสกัดบัวบก (ข) หลังผ่านการแช่แข็งที่อุณหภูมิ -18 องศาเซลเซียส นาน 22 ชั่วโมง และทำละลายที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง	72
36	อิมัลชันเชิงซ้อนชนิดเอทานอลในน้ำมันในน้ำที่ไม่มีสารสกัดบัวบก (ก) และมีสารสกัดบัวบก (ข) หลังผ่านการปรับค่าพีเอชในช่วง 3-8	74
37	การกระจายตัวของขนาดอนุภาคของอิมัลชันเชิงซ้อนชนิดเอทานอลในน้ำมันในน้ำที่ไม่มีสารสกัดบัวบก (ก) และมีสารสกัดบัวบก (ข) หลังผ่านการปรับค่าพีเอชในช่วง 3-8	75
38	ขนาดอนุภาคของอิมัลชันเชิงซ้อนชนิดเอทานอลในน้ำมันในน้ำที่ไม่มีสารสกัดบัวบก และมีสารสกัดบัวบกหลังผ่านการปรับค่าพีเอชในช่วง 3-8	75
39	โครงสร้างระดับจุลภาคของอิมัลชันเชิงซ้อนชนิดเอทานอลในน้ำมันในน้ำที่ไม่มีสารสกัดบัวบกหลังผ่านการปรับค่าพีเอชในช่วง 3-8	76
40	โครงสร้างระดับจุลภาคของอิมัลชันเชิงซ้อนชนิดเอทานอลในน้ำมันในน้ำที่มีสารสกัดบัวบกหลังผ่านการปรับค่าพีเอชในช่วง 3-8	77
41	อิมัลชันเชิงซ้อนชนิดเอทานอลในน้ำมันในน้ำที่ไม่มีสารสกัดบัวบก (ก) และมีสารสกัดบัวบก (ข) หลังการเติมโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้นต่างๆ	78
42	การกระจายตัวของขนาดอนุภาคของอิมัลชันเชิงซ้อนชนิดเอทานอลในน้ำมันที่ไม่มีสารสกัดบัวบก (ก) และมีสารสกัดบัวบก (ข) หลังการเติมโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้นต่างๆ	79
43	ขนาดอนุภาคของอิมัลชันเชิงซ้อนชนิดเอทานอลในน้ำมันในน้ำหลังการเติมโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้นต่างๆ	79
44	โครงสร้างระดับจุลภาคของอิมัลชันเชิงซ้อนเอทานอลในน้ำมันในน้ำที่ไม่มีสารสกัดบัวบกหลังการเติมโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้นต่างๆ	80
45	โครงสร้างระดับจุลภาคของอิมัลชันเชิงซ้อนเอทานอลในน้ำมันในน้ำที่มีสารสกัดบัวบกหลังการเติมโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้นต่างๆ	81

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพผนวกที่	หน้า
ก1 ลักษณะบัวบกสด (ก) สารสกัดบัวบกก่อนทำแห้ง (ข) และสารสกัด บัวบกหลังทำแห้ง (ค)	95
ข1 กราฟมาตรฐานสารสกัดบัวบก	97



การผลิตอิมัลชันชนิดเอทานอลในน้ำมันในน้ำสำหรับห่อหุ้มสารสกัดจากบัวบก

Production of Ethanol-in-Oil-in-Water Emulsion (E/O/W) for Encapsulation of *Centella asiatica* Extracts

คำนำ

สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพเป็นสารที่มีองค์ประกอบและโครงสร้างทางเคมีที่หลากหลาย สามารถสกัดได้จากพืชและสมุนไพรหลายชนิด (Somchit *et al.*, 2004) โดยที่สารดังกล่าวมีประโยชน์ต่อร่างกายหลายด้าน เช่น มีคุณสมบัติในการต้านเนื้องอก (Babu *et al.*, 1995) ด้านออกซิเดชัน (Hamid *et al.*, 2002) และด้านการเจริญของจุลินทรีย์ (Somchit *et al.*, 2004) ตัวอย่างเช่น บัวบกเป็นพืชในวงศ์ Umbelliferae มีชื่อเรียกทางพฤกษศาสตร์ว่า *Centella asiatica* (Linn.) Urban (วันดี, 2541) โดยองค์ประกอบทางเคมีที่สำคัญในบัวบกที่แสดงสมบัติด้านออกซิเดชัน คือ สารประกอบกลุ่มไตรเทอร์ปีน ได้แก่ กรดเอเชียดิก กรดมาเดลาสติก เอเชียดิโคไซด์ และมาเดลาสโคไซด์ เป็นต้น จากประโยชน์ดังกล่าวข้างต้น จึงมีความสนใจนำสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากบัวบกไปเป็นส่วนผสมในผลิตภัณฑ์อาหาร

การห่อหุ้มเป็นวิธีการป้องกันสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากการสลายตัวเนื่องจากแสงสว่าง ออกซิเจน หรือพิษจากสิ่งแวดล้อม และ/หรือเพื่อไปขัดขวางให้เกิดการระเหยที่ช้าลง หรือป้องกันและ/หรือลดการเสื่อมเสียที่เกิดขึ้นระหว่างกระบวนการผลิตได้ ซึ่งวิธีการห่อหุ้มสารสำคัญสามารถที่จะออกแบบให้ผลิตภัณฑ์มีการปลดปล่อยช้าๆ อย่างต่อเนื่องหรือปลดปล่อยในจุดที่แน่นอน โดยส่วนมากการห่อหุ้มสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้ถูกนำไปใช้ในอุตสาหกรรมเครื่องสำอาง ยา และอาหาร โดยที่เทคนิคการห่อหุ้มสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจะนิยมใช้ระบบอิมัลชันเชิงซ้อนชนิดน้ำมันในน้ำมันและอิมัลชันเชิงซ้อนชนิดน้ำมันในน้ำในน้ำมัน เพื่อการห่อหุ้มสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ละลายได้ในน้ำและ/หรือน้ำมัน (McClements *et al.*, 2007)

อย่างไรก็ตาม เนื่องจากสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สกัดจากบัวบก ส่วนใหญ่ไม่สามารถละลายได้ในน้ำมัน และ/หรือละลายได้น้อยในน้ำ แต่สามารถที่จะละลายได้มากในแอลกอฮอล์ เช่น เอทานอล (Van der Graaf *et al.*, 2005) จึงเป็นการยากที่จะนำสารดังกล่าวมาประยุกต์ใช้ในระบบอิมัลชันที่เป็นชนิดน้ำมันในน้ำมันในน้ำ หรือน้ำมันในน้ำในน้ำมันที่สามารถห่อหุ้มสารที่ละลายในน้ำ

หรือน้ำมันได้ ดังนั้นจึงมีความสำคัญในการพัฒนาระบบอิมัลชันเพื่อการห่อหุ้มที่สามารถป้องกันหรือลดการเสื่อมสลายของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากบับกที่มีคุณสมบัติดังกล่าวในระหว่างกระบวนการผลิต และการเก็บรักษา การพัฒนาระบบอิมัลชันแบบเอทานอลในน้ำมันในน้ำจึงเป็นแนวทางที่จะห่อหุ้มสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สกัดได้จากบับกเพื่อแก้ไขปัญหาดังกล่าว

ชนิดและความเข้มข้นของสารอิมัลซิไฟเออร์มีความสำคัญมากที่ทำให้ระบบอิมัลชันมีความคงตัว ดังนั้นจึงจำเป็นต้องทำการศึกษาผลของชนิดและความเข้มข้นของอิมัลซิไฟเออร์ต่อความคงตัวของอิมัลชันชนิดเอทานอลในน้ำมันในน้ำเพื่อที่จะสามารถนำไปเป็นระบบห่อหุ้มสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ (สารสกัดบับก) ในผลิตภัณฑ์อาหาร โดยที่ระบบอิมัลชันในอาหารหลายประเภทจำเป็นต้องผ่านกระบวนการที่ให้ความร้อน (thermal processing) การแช่เย็น (chilling) หรือการแช่เยือกแข็ง (freezing) รวมถึงการปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง และการเติมปริมาณสารละลายเกลือโซเดียมคลอไรด์ ทั้งในระหว่างกระบวนการผลิต การจัดเก็บ หรือในขั้นตอนการนำไปใช้ ดังนั้น อิมัลชันที่ดีจึงควรมีความคงตัวต่อสภาวะต่างๆ ดังที่กล่าวมาข้างต้น (McClement and Guzey, 2006)

วัตถุประสงค์

เพื่อพัฒนาระบบอิมัลชันเชิงซ้อนชนิดเอทานอลในน้ำมันในน้ำสำหรับห่อหุ้มสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ (สารสกัดบัวบก) ที่มีความคงตัวต่อการนำไปประยุกต์ในอุตสาหกรรมอาหารโดย

1. ศึกษาผลของชนิดและความเข้มข้นของอิมัลซิไฟเออร์และปริมาณเอทานอลต่อความคงตัวของอิมัลชันเชิงเดี่ยวชนิดเอทานอลในน้ำมัน (E/O)
2. ศึกษาผลของชนิดและความเข้มข้นของอิมัลซิไฟเออร์และปริมาณอิมัลชันเชิงเดี่ยวชนิดเอทานอลในน้ำมันต่อความคงตัวของอิมัลชันเชิงซ้อนชนิดเอทานอลในน้ำมันในน้ำ (E/O/W)
3. ศึกษาสภาวะแวดล้อมต่อความคงตัวของอิมัลชันเชิงซ้อนชนิดเอทานอลในน้ำมันในน้ำ (E/O/W) ที่ห่อหุ้มสารสกัดจากบัวบก

การตรวจเอกสาร

1. บัวบก

บัวบก มีชื่อภาษาท้องถิ่นว่า ผักหนอก จำปาเครือ ผักแว่น แวนโคก ปะหนะ เอชาเคาะ (ภาษากะเหรี่ยง-แม่ฮ่องสอน) และบัวบกมีชื่อภาษาอังกฤษว่า อินเดีย เพนนิเวิร์ท (Indian Pennywort) โกตุ โคล่า (Gotu Kola) เอเชียติส เพนนิเวิร์ท (Asiatis Pennywort) มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า เซนเทลล่า เอเชียติกา (*Centella asiatica* (Linn.) Urban) จัดอยู่ในวงศ์ Umbelliferae ซึ่งบัวบก จัดเป็นไม้เลื้อย ที่มีลำต้นเลื้อยไปตามดินที่เรียกว่า "ไหล" มีรากงอกออกตามข้อของลำต้น ใบเป็น ใบเดี่ยว มีรูปร่างกลม ฐานใบโค้งเว้าเข้าหากัน ขอบใบมีลักษณะเป็นคลื่นหยักใบงอกออกจากข้อมี ลักษณะตั้งตรง สูงประมาณ 10-15 เซนติเมตร ก้านใบสีเขียว ดอกของบัวบกมีขนาดเล็ก มีสีขาว ชมพู และม่วง ดอกจะออกเป็นช่อเล็กๆ ที่ซอกใบ ผลของบัวบกมีลักษณะแบน ขยายพันธุ์ได้โดยใช้ เมล็ดและไหลปักชำ แต่ส่วนใหญ่นิยมใช้ไหลปักชำ วิธีการคือ นำลำต้น หรือไหลที่มีรากงอก ออกมา ตัดแยกเป็นท่อนๆ แล้วนำมาปักชำในกระบะเพาะ หรือในบริเวณที่ดินมีความชื้นแฉะ และมี แสงแดดพอสมควร (ดวงจันทร์, 2546)

นอกจากนี้ บัวบกยังเป็นพืชสมุนไพรที่สำคัญชนิดหนึ่งในแผนแม่บทของกระทรวง สาธารณสุข และเป็นตัวยาหนึ่งในตำรับอายุรเวท เนื่องจากสารสกัดจากบัวบกมีคุณสมบัติในการ สมานแผล รักษาการอักเสบ เพิ่มความจำและต้านมะเร็ง และยังมีการรายงานฤทธิ์ทางชีวภาพว่าช่วย ปกป้องตับ (hepatoprotection) และป้องกันการเกิดปฏิกิริยาแอมีลอยด์ (β -amyloid) ซึ่งมีผลต่อระบบ ประสาทและโรคอัลไซเมอร์ (Alzheimer) (Poli *et al.*, 2004)

1.1 สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ (bioactive compounds) จากบัวบก

สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพเป็นสารที่สกัดได้จากธรรมชาติ เป็นส่วนประกอบหลักที่ สำคัญและมีปริมาณน้อยในอาหาร โดยมีผลต่อสิ่งมีชีวิตทั้งคน สัตว์ และพืช ส่วนใหญ่สกัดได้จาก พืชและสมุนไพร (ตารางที่ 1) สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ดีต้องเป็นสารที่มีผลจำเพาะเจาะจง เช่น มีฤทธิ์จำเพาะต่อเซลล์ของมะเร็งเต้านม มีฤทธิ์จำเพาะต่อเชื้อวัณโรค เป็นต้น โดยที่สารนั้นจะต้อง ไม่มีผลทางลบต่อร่างกาย หรือมีผลข้างเคียงน้อยมาก เพราะเมื่อสารนั้นถูกนำมาแปรรูปให้เป็น ส่วนประกอบของยา ย่อมไม่ต้องการให้ยาที่มีผลกับส่วนที่ดีของร่างกาย ยกเว้น เชื้อโรค หรือ

ส่วนเกิน (มะเร็ง) เป็นส่วนที่ร่างกายไม่ต้องการ (ปัทมา, 2546) โดยส่วนมากสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพไม่สามารถที่จะละลายได้ในน้ำมันหรือละลายได้น้อยในน้ำ แต่สามารถที่จะละลายได้มากในแอลกอฮอล์ เช่น เอทานอล (van der Graaf *et al.*, 2005)

ตารางที่ 1 ชนิดของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่พบในแหล่งอาหาร

Bioactive Compound	Examples	Sources
Flavonoids		
Flavonols	Quercetin, kaempferol, catechin	Onion, apple, tea, berries, olives, broccoli, lettuce, red wine, cocoa/chocolate
Phytoestrogens		
Lignans, coumestran	Enterolactone, enterodiol, coumestrol	Flaxseed oil, Lucerne, clover
Isoflavones	Genistein, daidzein	Soybeans, legumes
Resveratrol		Grapes, red wine, peanuts
Lycopene		Tomatoes, tomato products
Organosulfur compounds	Allicin, diallyl sulfide, allyl mercaptan	Garlic, onion, leek
Soluble dietary fibers	β -Glucan, pectin, psyllium	Oats, barley, yeast, fruit, vegetables, psyllium seed, fortified cereals and grains
Isothiocyanates (ITC)	Phenethyl (PEITC), benzyl (BITC), sulforaphanes	Cruciferous vegetables (e.g., watercress, broccoli)
Monoterpenes	d-Limonene, perillic acid	Essential oils of citrus fruit, cherries, mint, herbs
Plant sterols	Sitosterol, stigmasterol, campesterol	Tall oil, soybean oil, rice bran oil

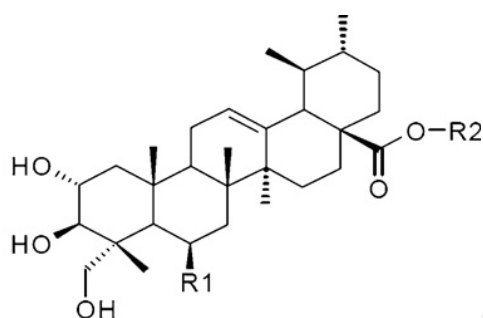
ที่มา: ดัดแปลงมาจาก นฤมล (2551) และ Nakajima *et al.* (2003)

1.1.1 สารประกอบเทอร์พีนอยด์ (terpenoids compound)

สารประกอบเทอร์พีนอยด์เป็นสารสำคัญและเป็นสารที่น่าสนใจที่พบในบัวบก มีสารประกอบเทอร์พีนอยด์หลายชนิดที่ถูกแยกได้จากบัวบก ได้แก่ สารประกอบโมโนและเซสควิเทอร์พีน (mono-and sesquiterpene compounds) ซึ่งสารโมโนและเซสควิเทอร์พีนที่สามารถแยกได้จากบัวบกได้แก่ β -caryophyllene, trans- β -farnesene และ germacrene-D ซึ่งเป็นสารประกอบโมโนและเซสควิเทอร์พีนหลัก นอกจากนี้ยังพบ α -copaene, β -elemene และ bicycloelemene เป็นสารที่ทำให้เกิดกลิ่นฉุนและรสเผ็ดร้อน (Asakawa *et al.*, 1982)

สารประกอบไตรเทอร์พีนเป็นสารสำคัญที่เป็นองค์ประกอบหลักในบัวบก (Bhattacharyya, 1956a, 1956b; Rastogi *et al.*, 1960; Sing and Rastogi, 1969; Rao and Seshadri, 1969; Jia and Lu, 2008) มีงานวิจัยจำนวนมากที่ศึกษาสารไตรเทอร์พีนในบัวบกโดยพบสารไตรเทอร์พีนไกลโคไซด์และสารไตรเทอร์พีนอะไกลโคน ซึ่งสารประกอบไตรเทอร์พีนหลักในบัวบกประกอบด้วย กรดเอเชียติก (asiatic acid) กรดมาเดคาสสิก (madecassic acid) เอเชียติโคไซด์ (asiaticoside) และมาเดคาสโซไซด์ (madecassoside) (Inamdar *et al.*, 1996; Pramongkit, 1997; Jia and Lu, 2008) ซึ่งส่วนประกอบของบัวบกที่นิยมนำมาใช้ในการสกัดสารสำคัญคือ ส่วนใบและก้าน (Muangnoi, 2007; นฤมล, 2551) นอกจากนี้ยังตรวจพบสารประกอบไตรเทอร์พีนชนิดอื่นๆ อีก ได้แก่ 6-เบต้า-ไฮดรอกซีเอเชียติก แอซิด (6- β -hydroxyasiatic acid) กรดเทอร์มินอลิก (terminolic acid) กรดบรามิก (brahmic) บราโมไซด์ (brahmoside) เซนเทลโลไซด์ (centelloside) กรดเซนติก (centic acid) กรดเซนโทอิก (centoic acid) และกรดเซนเทลลิก (centellic acid) เป็นต้น (Pramongkit, 1997)

สารประกอบไตรเทอร์พีนพบได้ในพืชทุกชนิด แต่ส่วนใหญ่จะสังเคราะห์ในพืชชั้นสูงโดยมีโครงสร้างหลักและหมู่เคมีของสารประกอบไตรเทอร์พีนทั้ง 4 ชนิด แสดงในภาพที่ 1 และตารางที่ 2 ตามลำดับ สารประกอบกลุ่มไตรเทอร์พีนมีคุณสมบัติเป็นกรด มีรสขาคีเผ็ดร้อนและขม เช่น ลิโมนินในผลไม้ตระกูลส้ม จะให้รสขม และละลายในไขมัน ส่วนหน้าที่ของสารประกอบกลุ่มไตรเทอร์พีนที่มีต่อพืชยังไม่ทราบแน่ชัด (Harborne, 1983)



ภาพที่ 1 โครงสร้างหลักของสารประกอบไตรเทอร์ปีนในสารสกัดบัวบก

ที่มา: Jia and Lu (2008)

ตารางที่ 2 หมู่เคมีในโครงสร้างของสารประกอบไตรเทอร์ปีนทั้ง 4 ชนิด

สารประกอบ	R ₁	R ₂	สูตรโมเลกุล	น้ำหนัก โมเลกุล
กรดเอเชียติก	H	OH	C ₃₀ H ₄₈ O ₅	488
กรดมาเดกาสติก	H	OH	C ₃₀ H ₄₈ O ₆	504
เอเชียติโคไซด์	OH	Glu-glu-rham	C ₄₈ H ₇₈ O ₁₉	958
มาเดกาสโคไซด์	OH	Glu-glu-rham	C ₄₈ H ₇₈ O ₂₀	974

หมายเหตุ: Glu=glucose; rham=rhamnose

ที่มา: ดัดแปลงมาจาก Pramongkit (1997)

สารประกอบไตรเทอร์ปีนประกอบด้วยโครงสร้างที่เป็นวง 5 วง (pentacyclic triterpenes) มีคาร์บอน 30 อะตอม และมีสารหมู่แอลกอฮอล์ แอลดีไฮด์ หรือ กรดคาร์บอกซิลิก เชื่อมต่อกับวง (ภาพที่ 1) ลักษณะโดยทั่วไปของสารประกอบไตรเทอร์ปีน คือ ไม่มีสี เป็นผลึก จุดหลอมเหลวสูง (Harborne, 1983) สารประกอบกลุ่มไตรเทอร์ปีนจะอยู่ในรูปของไกลโคโคน (glycone) หรืออะไกลโคโคน (aglycone) โดยพบสารไตรเทอร์ปีนไกลโคไซด์และสารไตรเทอร์ปีนอะไกลโคโคน โดยไกลโคไซด์มีโมเลกุลของน้ำตาลต่อกับโครงสร้างของไตรเทอร์ปีน ส่วนอะไกล-

โคนจะไม่มีโมเลกุลน้ำตาล เมื่อไตรเทอร์ปีนในรูปของไกลโคไซด์ผ่านกระบวนการย่อยโมเลกุลของน้ำตาลจะถูกตัดออกด้วยเอนไซม์และจะถูกดูดซึมเข้าลำไส้หรือเส้นเลือดต่อไป (Pramongkit, 1997)

1.2 การสกัดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากบัวบก

นฤมล (2551) ศึกษาผลของตัวทำละลายที่ใช้สกัด (เมทานอล 80 เปอร์เซ็นต์ เอทานอล 80 เปอร์เซ็นต์ น้ำ ปิโตรเลียมอีเทอร์และเฮกเซน) ต่อสารประกอบไตรเทอร์ปีนในบัวบก โดยตรวจสอบปริมาณไตรเทอร์ปีนด้วยเทคนิค High Performance Thin Layer Chromatography (HPTLC) จากผลการทดลองพบว่าสารสกัดเมทานอล 80 เปอร์เซ็นต์ มีสารประกอบไตรเทอร์ปีน 4 ชนิดสูงสุด (มาเดลาสโซไซด์ กรดมาเดลาสสิก เอเชิดิโคไซด์ และกรดเอเชิดิก) รองลงมาคือตัวทำละลายเอทานอล 80 เปอร์เซ็นต์ และตัวทำละลายน้ำ ตามลำดับ ดังนั้นหากนำสารสกัดบัวบกไปใช้ประโยชน์ในระบบอาหารอาจใช้ตัวทำละลายเอทานอล 80 เปอร์เซ็นต์ ในการสกัดสารดังกล่าวซึ่งเป็นตัวทำละลายที่มีความปลอดภัยต่อผู้บริโภคและสามารถสกัดสารไตรเทอร์ปีนทั้ง 4 ชนิดได้ดีเช่นกัน

วิธีการสกัด (แบบเขย่า 24 ชั่วโมง และวิธีการปั่นละเอียด) มีผลต่อปริมาณสารประกอบไตรเทอร์ปีน สารสกัดบัวบกจากวิธีสกัดแบบการปั่นให้ละเอียด (homogenize) มีปริมาณไตรเทอร์ปีนสูงกว่าสารสกัดจากวิธีเขย่า 24 ชั่วโมง ปริมาณของสารไตรเทอร์ปีนมาเดลาสโซไซด์ เอเชิดิโคไซด์ กรดมาเดลาสสิก และกรดเอเชิดิกในสารสกัดเมทานอล 80 เปอร์เซ็นต์ด้วยวิธีสกัดแบบการปั่นให้ละเอียด คือ 41.3, 34.4, 20.1 และ 4.2 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (นฤมล, 2551)

1.3 ความคงตัวของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากบัวบก

1.3.1 ความคงตัวต่อความร้อน

เมื่อนำบัวบกผ่านกระบวนการแปรรูปด้วยวิธีต่างๆ คือ บัวบกทำแห้งแบบเยือกแข็งและบัวบกทำแห้งแบบตากพบว่าความร้อนมีผลต่อปริมาณไตรเทอร์ปีนโดยตรวจสอบปริมาณไตรเทอร์ปีนด้วยเทคนิค High Performance Thin Layer Chromatography (HPTLC) โดยตัวอย่างบัวบกทำแห้งแบบเยือกแข็งมีปริมาณไตรเทอร์ปีนสูงกว่าบัวบกทำแห้งแบบตาก (55 องศาเซลเซียส)

นอกจากนี้ยังพิจารณาผลของไตรเทอร์ปีนทั้ง 4 ชนิดในแต่ละผลิตภัณฑ์ (น้ำบวบผง น้ำบวบ และ น้ำชาบวบ) พบว่าผลิตภัณฑ์ที่ได้รับความร้อนสูง มีปริมาณไตรเทอร์ปีนรวมลดลง โดยน้ำบวบผง น้ำบวบ และน้ำชาบวบ ผ่านการแปรรูปโดยใช้ความร้อนอยู่ในช่วง 80-180 องศาเซลเซียส ทำให้สารไตรเทอร์ปีนเสื่อมสลาย (นฤมล, 2551)

นอกจากนี้ผลของการใช้ความร้อนในขั้นตอนการเตรียมเครื่องดื่มสมุนไพรต่อองค์ประกอบทางเคมีของบวบ ได้แก่ มาเดลาสโซไซด์ เอเชียติโคไซด์ กรดมาเดลาสสิก และกรดเอเชียติก พบว่าการให้ความร้อนที่ 65, 80 และ 100 องศาเซลเซียส มีผลทำให้ปริมาณไตรเทอร์ปีนทั้งหมดลดลง (Kormin, 2005) เช่นเดียวกับการศึกษาของ Choi *et al.* (1982) พบว่าปริมาณไตรเทอร์ปีนลดลงหลังจากการให้ความร้อนในการสกัดที่ 80 องศาเซลเซียส

1.3.2 ความคงตัวของเอนไซม์

Muangnoi (2007) ได้รายงานผลการศึกษาปริมาณไตรเทอร์ปีน หลังจากการเก็บบวบสดไว้ 5 และ 7 วัน พบว่าปริมาณมาเดลาสโซไซด์และเอเชียติโคไซด์ลดลงและปริมาณกรดมาเดลาสสิก และกรดเอเชียติกเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ซึ่ง Bader *et al.* (1998) ให้เหตุผลว่ามาเดลาสโซไซด์และเอเชียติโคไซด์เปลี่ยนรูปไปเป็นกรดมาเดลาสสิก และกรดเอเชียติกเนื่องจากเอนไซม์ไฮโดรไลซิสที่มีอยู่ในบวบ นอกจากนี้ยังทำการศึกษารายการปริมาณไตรเทอร์ปีนจากบวบสดและบวบที่เคี้ยวในโตรเจนเหลว พบว่าบวบที่เคี้ยวในโตรเจนเหลวมีปริมาณมาเดลาสโซไซด์และเอเชียติโคไซด์มากกว่าในบวบสด และมีปริมาณกรดมาเดลาสสิก และกรดเอเชียติกในบวบที่ผ่านการเคี้ยวในโตรเจนเหลวน้อยกว่าในบวบสด ซึ่งเป็นไปได้ว่ากิจกรรมของเอนไซม์ในบวบถูกยับยั้งโดยไนโตรเจนเหลว (Muangnoi, 2007)

นฤมล (2551) ศึกษาผลของเอนไซม์ต่อการไฮโดรไลซิสสารไตรเทอร์ปีนไกลโคไซด์ โดยทำการเปรียบเทียบระหว่างน้ำชาบวบและน้ำชาบวบปั่นผสมกับบวบสด พบว่าไม่พบไตรเทอร์ปีนไกลโคไซด์ (เอเชียติโคไซด์และมาเดลาสโซไซด์) ในตัวอย่างน้ำชาบวบปั่นผสมกับบวบสดแต่พบไตรเทอร์ปีนอะไกลโคน (กรดเอเชียติกและ กรดมาเดลาสสิก) เพิ่มขึ้น ซึ่งแสดงให้เห็นว่าเอนไซม์ในบวบสดจะไฮโดรไลซิสสารไตรเทอร์ปีนไกลโคไซด์ (เอเชียติโคไซด์และมาเดลาสโซไซด์) ให้เป็นสารไตรเทอร์ปีนอะไกลโคน (กรดเอเชียติกและกรดมาเดลาสสิก)

1.4 การใช้ประโยชน์สารประกอบไตรเทอร์ปีน

ในปัจจุบันสารประกอบไตรเทอร์ปีนที่สกัดจากบัวบกได้นำมาใช้ในอุตสาหกรรมยา และเครื่องสำอาง แต่ยังไม่มียานวิจัยที่นำสารประกอบไตรเทอร์ปีนจากบัวบกมาประยุกต์ใช้กับผลิตภัณฑ์อาหาร

Vogel *et al.* (1990) ได้นำสารประกอบไตรเทอร์ปีนจากบัวบกมาใช้ในการกระตุ้นให้แผลสมานตัวได้เร็วขึ้น เนื่องจากสารประกอบดังกล่าว สามารถที่จะเร่งการสร้างคอลลาเจน (collagen) ที่เป็น โครงสร้างของผิว

Park *et al.* (2004) ได้ศึกษาสารสำคัญในบัวบก คือ กรดเอเชียติก ในการยับยั้งการเหนี่ยวนำทำให้เซลล์มะเร็งผิวหนังของคนชนิด SK-MEL-2 เกิด apoptosis ด้วยกลไกการผลิตเอนไซม์ caspase-3 ซึ่งสารดังกล่าวสามารถทำลายดีเอ็นเอของเซลล์มะเร็ง ทำให้เซลล์มะเร็งตาย จึงสามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งได้ นอกจากนี้สารประกอบไตรเทอร์ปีนยังสามารถที่จะขัดขวางการพัฒนาของเนื้องอกในช่องท้องของหนูเมื่อได้รับสารสกัดบัวบกผ่านทางปาก (Babu *et al.*, 1995)

Kim *et al.* (2001) ได้ทำการพัฒนาระบบ mixed micellar system เพื่อที่จะปรับปรุงสมบัติในการละลายของสารสกัดจากบัวบก (titrated extract of *C. asiatica*, TECA) และลดอาการเจ็บปวดหลังจากการฉีดเข้าในกล้ามเนื้อ โดยที่ระบบดังกล่าวเตรียมได้จาก สารผสมอิมัลซิฟายเออร์ร้อยละ 10 ระหว่าง Tween 20 และ Tween 85 กับ สารละลายบัฟเฟอร์ร้อยละ 90 (phosphate-buffered saline, PBS) ที่พีเอช 7.0 สามารถไปปรับปรุงการละลายของสารสกัดบัวบก และรักษาขนาดอนุภาค ปริมาณของเอเชียติโคไซด์ในระหว่างการเก็บไว้ได้

2. ระบบอิมัลชันเพื่อการห่อหุ้มสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ

การห่อหุ้มสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพเป็นกระบวนการที่สารหนึ่งชนิดหรือสารผสมถูกห่อหุ้มด้วยสารอีกชนิดหนึ่ง สารที่ถูกห่อหุมนั้นส่วนใหญ่แล้วจะเป็นของเหลว แต่สามารถเป็นอนุภาคของแข็งหรือแก๊สได้ สารที่ถูกห่อหุมนั้นจะมีชื่อเรียกที่หลากหลายได้แก่ core material,

payload, actives, fill หรือ internal phase ส่วนสารที่เป็นตัวเคลือบหรือตัวห่อหุ้มเรียกว่า wall material, carrier, membrane, shell หรือ coating material (Dziezak, 1988)

การห่อหุ้มเป็นวิธีการป้องกันสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากการสลายตัวเนื่องจากแสงสว่าง ออกซิเจน หรือพิษจากสิ่งแวดล้อม และ/หรือเพื่อไปขัดขวางให้เกิดการระเหยที่ช้าลง หรือป้องกัน และ/หรือลดการเสื่อมเสียที่เกิดขึ้นระหว่างกระบวนการผลิตได้ ซึ่งวิธีการห่อหุ้มสารสำคัญสามารถที่จะออกแบบให้ผลิตภัณฑ์มีการปลดปล่อยช้าๆ อย่างต่อเนื่องหรือปลดปล่อยในจุดที่แน่นอน โดยส่วนมากการห่อหุ้มสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้ถูกนำไปใช้ในอุตสาหกรรมเครื่องสำอาง ยา และอาหาร โดยที่เทคนิคการห่อหุ้มสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจะนิยมใช้ระบบอิมัลชันเชิงซ้อนชนิดน้ำมันในน้ำหรือน้ำมันในน้ำในน้ำมันที่สามารห่อหุ้มสารที่ละลายในน้ำ หรือน้ำมันได้ ดังนั้นจึงมีความสำคัญในการพัฒนาระบบอิมัลชันเพื่อห่อหุ้มที่สามารถป้องกันหรือลดการเสื่อมสลายของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีคุณสมบัติดังกล่าวในระหว่างกระบวนการผลิต และการเก็บรักษา

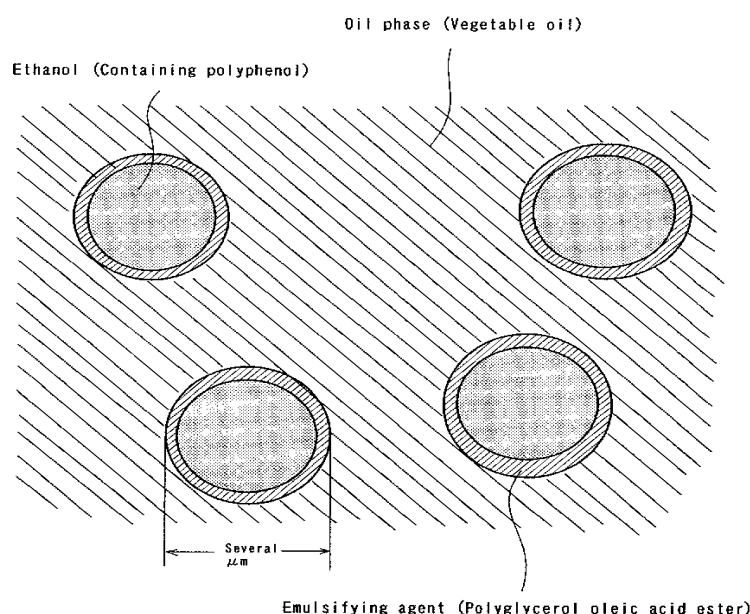
อย่างไรก็ตาม เนื่องจากสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สกัดจากบวบก ส่วนใหญ่ไม่สามารถละลายได้ในน้ำมัน และ/หรือละลายได้น้อยในน้ำ แต่สามารถที่จะละลายได้มากในแอลกอฮอล์ เช่นเอทานอล จึงเป็นการยากที่จะนำสารดังกล่าวมาประยุกต์ใช้ในระบบอิมัลชันที่เป็นชนิดน้ำมันในน้ำหรือน้ำมันในน้ำในน้ำมันที่สามารห่อหุ้มสารที่ละลายในน้ำ หรือน้ำมันได้ ดังนั้นจึงมีความสำคัญในการพัฒนาระบบอิมัลชันเพื่อห่อหุ้มที่สามารถป้องกันหรือลดการเสื่อมสลายของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีคุณสมบัติดังกล่าวในระหว่างกระบวนการผลิต และการเก็บรักษา

อิมัลชันเป็นระบบแขวนลอยของอาหารซึ่งมีของเหลวต่างๆ ผสมกัน โดยมีของเหลวชนิดหนึ่งกระจายอยู่แบบอนุภาคเล็กๆ อยู่ในของเหลวอีกชนิดหนึ่งในลักษณะที่ไม่รวมตัวกัน (immiscible liquids) และมีสารอิมัลซิไฟเออร์หรือสาร โพลีเมอร์ทำให้คงตัว ลักษณะปรากฏของอิมัลชันขึ้นอยู่กับขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของอนุภาค ซึ่งเป็นตัวกระจายถ้าขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางอยู่ในช่วง 0.15-100 ไมโครเมตร (μm) อิมัลชันจะมีลักษณะทึบแสงคล้ายนม ถ้าหากเส้นผ่านศูนย์กลางอยู่ในช่วง 0.0015-0.15 ไมโครเมตร (μm) ซึ่งจัดเป็นอิมัลชันขนาดเล็กมาก (microemulsion) และมีความคงตัวมากกว่า อย่างไรก็ตาม ในผลิตภัณฑ์อาหารอนุภาคส่วนใหญ่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของอนุภาคอยู่ระหว่าง 0.1-100 ไมโครเมตร (μm) ลักษณะดังกล่าวจึงแสดงลักษณะที่สำคัญบางประการของอิมัลชันในผลิตภัณฑ์อาหาร ได้แก่ ลักษณะปรากฏ สี ความสามารถในการกระจายตัว ความยากง่ายในการเตรียม ขนาดของอนุภาค ความคงตัว เป็นต้น (เทพกัญญา, 2545)

2.1 ชนิดและรูปแบบของอิมัลชัน

2.1.1 อิมัลชันเชิงเดี่ยว (Single emulsions)

เป็นระบบการกระจายตัวในลักษณะที่มีอนุภาคที่กระจายและตัวกลางของการกระจายอยู่เพียงชั้นเดียวเท่านั้น กล่าวคือในกรณีหนึ่งของเหลวที่เป็นตัวกลางของการกระจาย (continuous phase) คือ น้ำ และของเหลวอีกชนิดหนึ่งเป็นอนุภาคที่กระจาย (dispersed phase) คือ น้ำมัน จะเรียกอิมัลชันนี้ว่าเป็นอิมัลชันชนิด “น้ำมันในน้ำ” (oil-in-water, O/W) เช่น นม และมายองเนส ในทางกลับกัน หากของเหลวที่เป็นตัวกลางของการกระจาย คือ น้ำมัน และของเหลวที่เป็นอนุภาคที่กระจายตัวอยู่ภายในคือ น้ำ จะเรียกว่าอิมัลชันชนิด “น้ำในน้ำมัน” (water-in-oil, W/O) เช่น มاکารีน และเนย (Belitz and Grosch, 1999; Coupland and McClements, 1996; McClements, 2004) และหากของเหลวที่มีตัวกลางของการกระจายเป็นน้ำมันและของเหลวที่เป็นอนุภาคที่กระจายตัวอยู่ภายในคือเอทานอล จะเรียกอิมัลชันชนิดนี้ว่า เอทานอลในน้ำมัน (ethanol-in-oil, E/O) ซึ่งลักษณะการกระจายตัวของอิมัลชันชนิดนี้สามารถแสดงได้ดังภาพที่ 2



ภาพที่ 2 อิมัลชันเชิงเดี่ยวชนิดเอทานอลในน้ำมัน โดยมีโพลีกลีเซอรอลเอสเทอร์ของกรดไขมันเป็นอิมัลซิฟายเออร์

ที่มา: Xu (2002)

จากงานวิจัยของ Xu *et al.* (2001a) ศึกษาผลของปริมาณเอทานอลและอิมัลซิฟายเออร์ต่อความคงตัวของอิมัลชันชนิดน้ำมันในเอทานอล และเอทานอลในน้ำมัน พบว่า การใช้อิมัลซิฟายเออร์ที่ไม่มีประจุคือ Decaglycerol mono-oleate (DGMO) สามารถทำให้อิมัลชันดังกล่าวมีความคงตัวได้ดีที่ความเข้มข้นน้อยกว่าร้อยละ 5 โดยน้ำหนัก

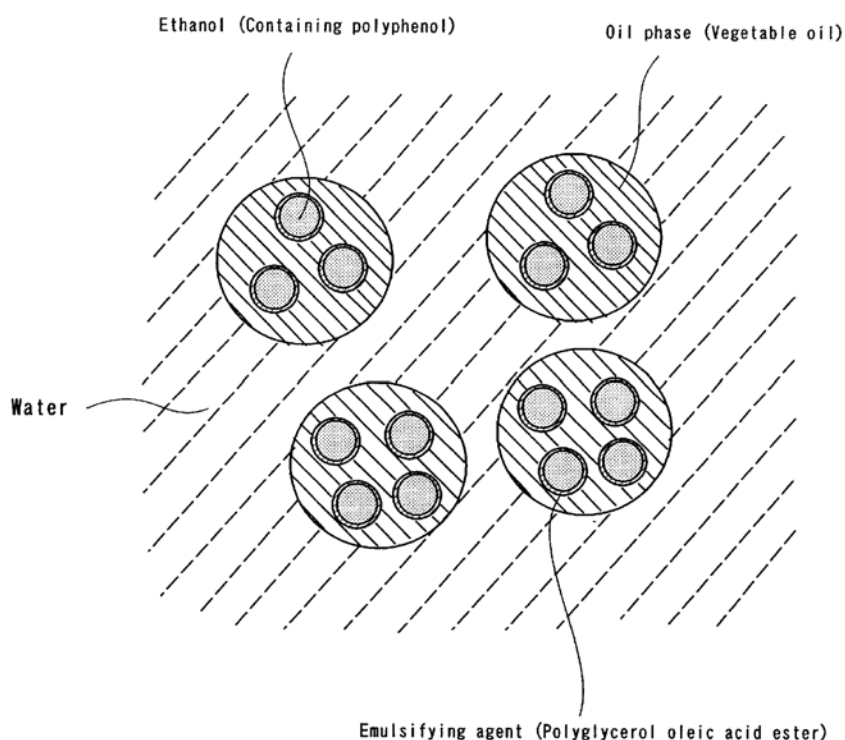
Xu *et al.* (2002) ศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อสมบัติของอิมัลชันชนิดเอทานอลในน้ำมัน พบว่าปริมาณของเอทานอลมีผลต่อสมบัติของอิมัลชันชนิดเอทานอลในน้ำมัน โดยที่เมื่อเพิ่มปริมาณของเอทานอลขนาดของอนุภาคเอทานอลก็จะเพิ่มขึ้นส่งผลให้ความหนืดของอิมัลชันลดลง ทำให้อิมัลชันดังกล่าวเสียความคงตัว

2.1.2. อิมัลชันเชิงซ้อน (Multiple emulsions)

เป็นระบบการกระจายตัวในลักษณะที่มีอนุภาคที่กระจายและตัวกลางของการกระจายอยู่หลายชั้น กล่าวคืออิมัลชันชนิด “น้ำมันในน้ำในน้ำมัน” (oil-in-water-in-oil, O/W/O) หรือ “น้ำในน้ำมันในน้ำ” (water-in-oil-in-water, W/O/W) เช่น ระบบ W/O/W ประกอบด้วยอนุภาคน้ำซึ่งเป็นอนุภาคที่กระจายอยู่ในตัวกลางของการกระจายคือน้ำมันที่มีขนาดใหญ่กว่าและน้ำมันดังกล่าวเป็นอนุภาคที่กระจายตัวในตัวกลางของการกระจาย คือน้ำอีกครั้ง และระบบอิมัลชันชนิดเอทานอลในน้ำมันในน้ำ (ethanol-in-oil-in-water, E/O/W) เป็นระบบที่ประกอบด้วยอนุภาคของเอทานอลกระจายตัวอยู่ในตัวกลางของการกระจายคือน้ำมันและอนุภาคน้ำมันเป็นอนุภาคของการกระจายตัวในตัวกลางของการกระจายตัวคือน้ำอีกครั้ง ระบบอิมัลชันเชิงซ้อนนี้มักพบในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง ยา และสารเคมีในอุตสาหกรรมต่างๆ ส่วนมากระบบอิมัลชันเชิงซ้อนนั้นจะใช้ในการห่อหุ้มสารสำคัญต่างๆ เช่น วิตามิน และยา เป็นต้น ในกรณีที่สารสำคัญดังกล่าวนั้นสามารถที่จะละลายในส่วนของน้ำและน้ำมันเท่านั้น ในขณะที่ระบบอิมัลชันเชิงซ้อนแบบเอทานอลในน้ำมันในน้ำอาจเป็นไปได้ที่ระบบนี้สามารถนำส่งสารสำคัญที่สามารถละลายได้ในเอทานอล ตัวอย่างเช่น สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สกัดจากบัวบก เป็นต้น (ภาพที่ 3)

จากงานวิจัยของ Nakajima *et al.* (2003) ได้ทำการผลิตและศึกษาความคงตัวของอิมัลชันชนิดเอทานอลในน้ำมันในน้ำของสารประกอบจำพวกโพลีฟีนอล (polyphenol compounds) โดยที่ในการผลิตระบบอิมัลชันดังกล่าวจะใช้สารประกอบจำพวกโพลีฟีนอลละลายอยู่ในส่วนของเอทานอล และในระบบอิมัลชันดังกล่าวอัตราส่วนของเอทานอลต่อน้ำมันในอัตราส่วน 1:9 และ 2:8

อิมัลชันที่ได้ไม่เกิดการแยกชั้นเมื่อเก็บไว้เป็นเวลา 5 เดือน และเมื่อเพิ่มอัตราส่วนดังกล่าวเป็น 4:6 อิมัลชันเกิดการแยกชั้นอย่างสมบูรณ์หลังจากการเตรียมและทำให้ความคงตัวของอิมัลชันลดลง



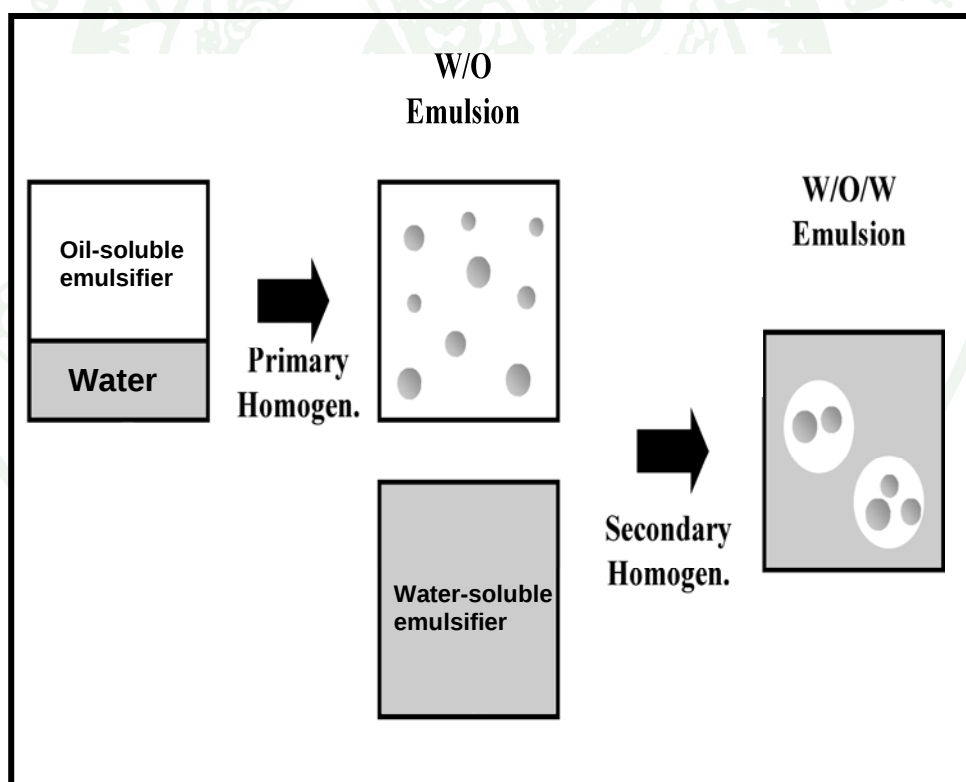
ภาพที่ 3 อิมัลชันเชิงซ้อนชนิดเอทานอลในน้ำมันในน้ำ โดยมีโพลีกลีเซอรอลเอสเทอร์ของกรดไขมันเป็นอิมัลซิฟายเออร์ในส่วนของอิมัลชันเชิงเดี่ยว และเลซิทีนและ/หรือ Span เป็นอิมัลซิฟายเออร์ในส่วนของอิมัลชันเชิงซ้อน

ที่มา: Xu (2002)

2.2 กลไกการเกิดอิมัลชัน

ของเหลวทุกชนิดมีแรงดึงดูดตัวเอง เมื่อนำของเหลวสองชนิดที่ไม่ผสมกันมาเขย่ารวมกันเพื่อให้เกิดอิมัลชัน แรงดึงดูดจะพยายามทำให้อนุภาคของของเหลวรวมตัวเข้าหากันเองและแยกตัวออกจากของเหลวอีกชนิดหนึ่ง เพื่อลดให้มีพื้นที่ผิวน้อยที่สุด เพราะเมื่อของเหลวมีอนุภาคที่ใหญ่ขึ้นจะมีพื้นที่ผิวลดลง ของเหลวใดที่มีความถ่วงจำเพาะต่ำหรือความหนาแน่นน้อยจะแยกตัวลอยอยู่ชั้นบน ส่วนของเหลวที่มีความถ่วงจำเพาะสูงหรือความหนาแน่นมากจะแยกตัวอยู่ชั้นล่าง

การทำอิมัลชัน ต้องทำให้ของเหลวที่เป็นอนุภาคคอลลอยด์แตกตัวเป็นหยดเล็กๆ กระจายตัวอยู่ในตัวกลางของการกระจาย ของเหลวที่มีปริมาตรเท่ากันถ้าทำให้มีขนาดของอนุภาค เล็กมากจะมีพื้นที่ผิวมาก แต่ถ้าขนาดของอนุภาคใหญ่จะมีพื้นที่ผิวน้อย เช่น การเขย่าน้ำมันกับน้ำ น้ำมันจะแตกตัวเป็นอนุภาคเล็กๆ กระจายตัวอยู่ในน้ำซึ่งเป็นตัวกลางของการกระจาย เมื่อเวลาผ่านไปตั้งทิ้งไว้ในระยะเวลาหนึ่ง อนุภาคของน้ำมันที่มีขนาดเล็กจะค่อยๆ รวมตัวกันทำให้มีขนาด อนุภาคใหญ่ขึ้นเรื่อยๆ และแยกตัวออกจากน้ำ ซึ่งทำให้ลักษณะอิมัลชันที่เกิดขึ้นนั้นสลายไป การเกิดอิมัลชันในระยะเวลาสั้นๆ นี้เรียกว่า อิมัลชันชั่วคราว (temporary emulsion) และการทำให้ อิมัลชันมีความคงตัวนั้น ทำได้โดยการเติมสารอิมัลซิฟายเออร์ลงไป โดยที่สารอิมัลซิฟายเออร์จะ ไปแทรกตัวอยู่ระหว่างผิวของอนุภาค และตัวกลางของการกระจาย จะทำให้อนุภาคคอลลอยด์ไม่ สามารถที่จะรวมตัวกันได้เนื่องจากกลไกการรักษาความคงตัวต่างๆ จึงทำให้ได้อิมัลชันที่มีความ- คงตัว เรียกว่า อิมัลชันถาวร (permanent emulsion) (นิธิยา, 2551)



ภาพที่ 4 การเตรียมอิมัลชันเชิงซ้อนชนิดน้ำในน้ำมันในน้ำ

ที่มา : ดัดแปลงจาก McClements *et al.*, (2007)

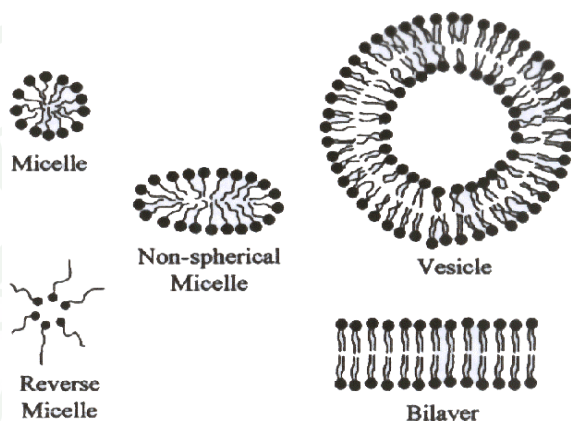
โดยทั่วไปวิธีการที่นิยมใช้ในการเตรียมอิมัลชันเชิงซ้อน (ภาพที่ 4) คือการใช้กระบวนการผลิตอิมัลชันสองขั้น (two-step emulsification) โดยใช้อิมัลซิฟายเออร์ 2 ชนิดด้วยกัน โดยชนิดแรกเป็นอิมัลซิฟายเออร์ที่ชอบน้ำมัน (lipophilic emulsifier) ที่มีค่า HLB (hydrophilic lipophilic balance) ต่ำ (3-6) ซึ่งใช้ในขั้นตอนการสร้างอิมัลชันเชิงเดี่ยวชนิดน้ำมันในน้ำมัน และชนิดที่สองเป็นอิมัลซิฟายเออร์ที่ชอบน้ำ (hydrophilic emulsifier) ที่มีค่า HLB สูง (8-18) ซึ่งใช้ในขั้นตอนการสร้างอิมัลชันชนิดน้ำมันในน้ำ โดยอิมัลชันเชิงเดี่ยวเตรียมด้วยการใช้แรงเฉือนที่สูงโดยอาจใช้วิธีอัลตราโซนิก (ultrasonification) หรือการปั่นผสมความดันสูง (homogenization) ส่วนขั้นตอนถัดมาที่ใช้สร้างอิมัลชันเชิงซ้อนนั้นจะใช้แรงเฉือนที่น้อยกว่าเพื่อป้องกันการแตก (rupture) ของหยดอิมัลชันเชิงเดี่ยว (Garti, 1997; Sugiura *et al.*, 2004)

2.3 สารอิมัลซิฟายเออร์

โดยทั่ว ๆ ไปผลิตภัณฑ์อิมัลชันจะมีความคงตัวต่ำ ตัวอย่างเช่น เมื่อนำน้ำกับน้ำมัน (น้ำมันที่มีปริมาณน้อยกว่าน้ำ) มาผสมกันโดยการเขย่าแรงๆ ส่วนที่เป็นน้ำมันจะกระจายตัวอยู่ทั่วไปในของผสม หลังจากตั้งทิ้งไว้จะเกิดการแยกชั้นระหว่างน้ำกับน้ำมันได้ง่าย โดยที่น้ำมันจะเกิดการรวมตัวกัน ทำให้มีขนาดใหญ่มากขึ้นและเกิดการแยกชั้น และการเติมสารอิมัลซิฟายเออร์ในขณะที่ทำให้เกิดเป็นอิมัลชันจะช่วยลดแรงตึงผิว (interfacial tension) ของอนุภาคที่กระจายตัว (disperse phase) และเฟสต่อเนื่อง (continuous phase) ทำให้เกิดเป็นอิมัลชันได้ง่ายขึ้น สารอิมัลซิฟายเออร์เป็นสารประกอบที่ละลายได้ทั้งในอนุภาคที่กระจายและตัวกลางของการกระจายคือ มีคุณสมบัติเป็น amphiphilic molecule เช่น แคลซีน (casein) ที่มีอยู่ในน้ำนมสามารถละลายหรือกระจายตัวได้ทั้งในน้ำและน้ำมัน การเติมสารอิมัลซิฟายเออร์ลงในส่วนผสมจึงเป็นการเพิ่มความสามารถในการทำให้เกิดเป็นอิมัลชัน สารอิมัลซิฟายเออร์แต่ละชนิดจะลดแรงตึงผิวได้แตกต่างกัน แต่การลดแรงตึงผิวเพียงอย่างเดียวจะไม่ทำให้อิมัลชันนั้นๆ คงตัว เนื่องจากหยดน้ำมันสามารถเคลื่อนที่เข้าหากันแบบบราวเนียน (Brownian movement) และรวมตัวกันได้ในระหว่างการเก็บรักษา ดังนั้นการเลือกใช้สารอิมัลซิฟายเออร์และสารให้ความคงตัวที่เหมาะสมจึงมีความสำคัญ เนื่องจากในการผลิตอาหารย่อมต้องการให้ผลิตภัณฑ์อิมัลชันมีความคงตัวในระดับที่ต้องการภายในระยะเวลาที่กำหนด (ปาริฉัตร, 2545)

อิมัลซิฟายเออร์หรือสารลดแรงตึงผิว (surfactant) จะรวมตัวกันเองในสารละลาย เพื่อทำให้เกิดการจัดเรียงตัวกันของโครงสร้างที่มีความเสถียรทางเทอร์โมไดนามิกส์ส่งผลต่อความคง-

ตัวของอิมัลชัน เรียกลักษณะนี้ว่า association colloids เช่น micelles, bilayers, vesicles และ reverse micelles (ภาพที่ 5) การจัดเรียงตัวของโครงสร้างเหล่านี้เพื่อลดบริเวณสัมผัสระหว่างส่วน non-polar tails ของโมเลกุลสารกับน้ำ ชนิดของ association colloids ของสารจะขึ้นกับความเข้มข้นและรูปร่างของโมเลกุล



ภาพที่ 5 ลักษณะการจัดเรียงตัวของสารลดแรงตึงผิว

ที่มา : McClements (2005)

กลุ่มของอิมัลซิฟายเออร์ที่อนุญาตให้ใช้ในอุตสาหกรรมอาหารแสดงในตารางที่ 3 นั้น ส่วนใหญ่ประกอบด้วย อิมัลซิฟายเออร์ที่ไม่มีประจุ อิมัลซิฟายเออร์ที่มีประจุลบ อิมัลซิฟายเออร์ชนิดแอมโฟเทอริก (amphoteric) โดยที่สารดังกล่าวมีสมบัติเป็น Zwitter ion ซึ่งจะให้ประจุสุทธิเป็นศูนย์ภายใต้สภาวะความเป็นกรดต่าง (Dickinson, 1992)

2.3.1 ค่า HLB (Hydrophilic-lipophilic balance)

ค่า HLB (hydrophilic-lipophilic balance) เป็นค่ามาตรฐานที่แสดงถึงสัดส่วนระหว่างหมู่ที่ชอบน้ำ (hydrophilic) และหมู่ที่ชอบน้ำมัน (lipophilic) ของอิมัลซิฟายเออร์ใช้ในการหาอิมัลซิฟายเออร์ที่เหมาะสมในระบบอิมัลชัน อิมัลซิฟายเออร์แต่ละชนิดจะมีค่า HLB ตามโครงสร้างทางเคมีของสารนั้นๆ โมเลกุลที่มีค่า HLB สูงจะมีอัตราส่วนของหมู่ hydrophilic ต่อหมู่ lipophilic สูง และ โมเลกุลที่มีค่า HLB ต่ำจะมีอัตราส่วนของหมู่ hydrophilic ต่อหมู่ lipophilic ต่ำ

ตารางที่ 3 ตัวอย่างอิมัลซิฟายเออร์และค่า HLB ที่ใช้โดยทั่วไปในระบบอิมัลชัน

Type	Example of Surfactant	HLB Value
Nonionics		
Aliphatic alcohol	Hexadecanol	1
Monoacylglycerol	Glycerol monostearate	3.8
Ester of monoacylglycerols	Lactoyl monopalmitate	8
Span	Sorbitan monostearate	4.7
	Sorbitan monooleate	7
	Sorbitan monolaurate	8.6
Tween 80	Polyoxyethylene sorbitan monooleate	16
Anionics		
Soap	Na oleate	18
Lactic acid esters	Na stearyl-2-lactoyl lactate	21
Phospholipids	Lecithin (Zwitterionic)	Fairly large

ที่มา: Walstra and van Vliet (2007)

ค่า HLB ของสารยังสามารถแสดงถึงความสามารถในการละลายไม่ว่าจะเป็นในเฟสน้ำมันและ/หรือในเฟสน้ำ และใช้ทำนายชนิดของอิมัลชันที่จะเกิดขึ้นได้อีกด้วย เช่น สารลดแรงตึงผิวที่มีค่า HLB ต่ำ (3-6) เป็นสาร hydrophobic (ไม่ชอบน้ำ) ละลายได้ในน้ำมัน และช่วยรักษาความคงตัวของอิมัลชันน้ำในน้ำมัน สารลดแรงตึงผิวที่มีค่า HLB สูง (8-18) เป็นสาร hydrophilic (ชอบน้ำ) ละลายได้ในน้ำช่วยรักษาความคงตัวของอิมัลชันน้ำมันในน้ำ และมีการจัดเรียงตัวแบบไมเซลล์ในน้ำ สารลดแรงตึงผิวที่มีค่า HLB ปานกลาง (6-8) มีลักษณะที่ไม่ได้ชอบน้ำหรือน้ำมันด้านใดด้านหนึ่ง โมเลกุลที่มีค่า HLB น้อยกว่า 3 หรือมากกว่า 18 จะไม่มีสมบัติเกาะติดที่ผิวของอนุภาค (surface active) ทั้งยังมีแนวโน้มที่จะรวมตัวกันในน้ำมันหรือ aqueous phase มากกว่าที่จะเกิดการเรียงตัวที่บริเวณผิวร่วมของน้ำมันและน้ำ (ตารางที่ 4) อนุภาคของอิมัลชันมีแนวโน้มในการรวมตัวกันแบบหลอมรวม (coalescence) เมื่อเติมสารลดแรงตึงผิวที่มีค่า HLB สูง/ต่ำเกินไปหรือปานกลาง โดยค่า HLB สูง/ต่ำมากๆ สารลดแรงตึงผิวจะมีค่า surface activity ต่ำ ทำให้สารไม่เกาะที่ผิวอนุภาค จึงไม่สามารถป้องกันการรวมตัวกันของอนุภาคได้ ที่ค่า

HLB ปานกลาง (6-8) อิมัลชันจะไม่คงตัวจากการที่อนุภาครวมตัวกันมีขนาดใหญ่ขึ้น (coalescence) เพราะมีค่าแรงตึงผิวที่บริเวณผิวร่วม (interfacial tension) ต่ำ ดังนั้นจึงต้องการพลังงานอีกเล็กน้อย ในการทำให้เมมเบรนแตกออก อิมัลชันชนิดน้ำมันในน้ำจะคงตัวมากที่สุดที่ HLB 10-12 ส่วน อิมัลชันชนิดน้ำในน้ำมันจะคงตัวมากที่สุดที่ HLB 3-5 ในการปรับค่า HLB ให้มีประสิทธิภาพอาจ ทำโดยการผสมสารลดแรงตึงผิวมากกว่าหรือเท่ากับ 2 ชนิดเพื่อให้ได้ HLB ต่างๆ กันได้ (เทพกัญญา, 2545)

ตารางที่ 4 ค่า HLB ที่สัมพันธ์กับการนำไปใช้ในอุตสาหกรรม

HLB range	Application
3-6	W/O-emulsifiers
7-9	Humectants
8-18	O/W-emulsifiers
15-18	Turbidity stabilization

ที่มา: เทพกัญญา (2545)

2.3.2 เอสเทอร์ของกรดไขมัน (Polyglycerol fatty acid esters)

เป็นอิมัลซิไฟเออร์ที่สามารถกระจายตัวในน้ำได้เพียงเล็กน้อย แต่สามารถละลายได้ในน้ำมันและไขมันใช้เป็นอิมัลซิไฟเออร์ชนิดน้ำในน้ำมัน มักใช้ในเค้ก เนยขาว เครื่องดื่ม และ มاکารีน ตัวอย่างของอิมัลซิไฟเออร์ที่เป็นเอสเทอร์ของกรดไขมันจะมีค่า HLB อยู่ในช่วง 3-13 ตัวอย่าง ได้แก่

โพลีกลีเซอรอล โพลีริซินโอเลต (polyglycerol polyricinoleate, PGPR) เป็นอิมัลซิไฟเออร์ที่นิยมใช้กันอย่างกว้างขวางในอุตสาหกรรมอาหารและเป็นอิมัลซิไฟเออร์ที่มีประสิทธิภาพมากในส่วนที่ชอบน้ำมัน (hydrophobic emulsifier) ใช้ในอิมัลชันชนิดน้ำในน้ำมัน (Su *et al.*, 2006) และในการผลิตช็อกโกแลตนิยมใช้กันมากในแถบยุโรป เป็นผลผลิตมาจากการ condensation ของสารโพลีกลีเซอรอล และการ condensation กรดไขมันในน้ำมันละหุ่ง (Wilson *et al.*, 1998) PGPR ได้รับการพัฒนาครั้งแรกในสหราชอาณาจักร โดยคุณสมบัติของ PGPR

สามารถลดค่า yield value ของซ็อกโกเลตได้ดี โดยมีผลกระทบต่อความหนืดเล็กน้อย (สุพัตรา, 2543)

เดคะกลีเซอรอล โมโน โอลีเอต (decaglycerol mono-oleate, DGMO) เป็นอิมัลซิฟายเออร์ที่ไม่มีประจุ นิยมใช้รักษาความคงตัวในระบบอิมัลชันในส่วนที่ชอบน้ำ (hydrophilic emulsifier) จากงานวิจัยได้มีการใช้ในการรักษาความคงตัวของอิมัลชันเอทานอลในน้ำมัน (Xu *et al.*, 2001a)

Xu *et al.* (2001a) ได้ศึกษาปริมาณเอทานอลและความเข้มข้นของอิมัลซิฟายเออร์ต่อความคงตัวของอิมัลชันชนิดเอทานอลในน้ำมัน พบว่า decaglycerol mono-oleate (DGMO) เป็นอิมัลซิฟายเออร์ที่รักษาความคงตัวในระบบอิมัลชันเอทานอลในน้ำมันได้ดีที่สุด เมื่อเตรียมที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.1, 0.5 และ 1.0 ตามลำดับ ในขณะที่เมื่อปริมาณ DGMO เพิ่มขึ้นที่ความเข้มข้นร้อยละ 5.0 โดยน้ำหนัก อิมัลชันเสียความคงตัวอาจเนื่องมาจากการรวมตัวกันแล้วเกิด polydispersity เช่นมีลักษณะไม่เป็นรูปแบบของขนาดและรูปร่างของอิมัลซิฟายเออร์ดังกล่าวส่งผลให้อิมัลชันเสียความคงตัว

Marquez *et al.* (2010) ได้ศึกษาผลของปริมาณเกลือแคลเซียมและความเข้มข้นของอิมัลซิฟายเออร์ของอิมัลชันชนิดน้ำในน้ำมัน โดยใช้ PGPR เป็นอิมัลซิฟายเออร์ พบว่าการเพิ่มปริมาณ PGPR และ/หรือปริมาณเกลือแคลเซียมจะทำให้อิมัลชันมีความคงตัวมากขึ้นเนื่องจากปริมาณเกลือแคลเซียมจะไปเพิ่มคุณสมบัติที่เป็น viscoelastic ในชั้นฟิล์มทำให้อิมัลชันน้ำในน้ำมันมีความคงตัวมากขึ้น

Xu *et al.* (2002) ได้ทำการศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อคุณสมบัติของอิมัลชันชนิด เอทานอลในน้ำมัน พบว่า คุณสมบัติของอิมัลชันได้แก่ ขนาดและการกระจายตัวของอนุภาค ความหนืด ค่าความขุ่น เป็นต้น โดยที่ระบบอิมัลชันนั้นมีขนาดของอนุภาคเอทานอลเพิ่มขึ้นและความหนืดลดลงเมื่อปริมาณของเอทานอลเพิ่มขึ้น และคุณสมบัติของผิวสัมผัสระหว่างอนุภาค (interfacial activity) จะไม่แตกต่างกันและขึ้นอยู่กับ degree of polymerization ของอิมัลซิฟายเออร์ และในการปรับปรุงในส่วน of degree of polymerization จะส่งผลให้ความคงตัวของอิมัลชันดังกล่าวเพิ่มขึ้น

2.3.3 เลซิติน (lecithin)

เลซิติน (lecithin) คือสารประกอบของไขมันและฟอสฟอรัส มีสารสำคัญคือ ฟอสฟาติลโคลีน (phosphatidyl choline) ฟอสฟาติลเอทานอลามีน (phosphatidyl ethanolamine) ฟอสฟาติลอินซิทอล (phosphatidyl inositol) และกรดฟอสฟาติก (phosphatidic acid) ผลึกภัณฑ์ของเลซิตินมีลักษณะทั้งที่เป็นของเหลว ชั้น เหนียว และเป็นของแข็ง นิยมใช้ในอิมัลชันแบบน้ำมันในน้ำ (พิมพร, 2540) เลซิตินธรรมชาติที่สกัดได้จากถั่วเหลืองมีส่วนประกอบโดยประมาณดังนี้

น้ำมันถั่วเหลือง	35 เปอร์เซ็นต์
ฟอสฟาติลโคลีน	16 เปอร์เซ็นต์
ฟอสฟาติลเอทานอลามีน	14 เปอร์เซ็นต์
ฟอสฟาติลอินซิทอล	10 เปอร์เซ็นต์
ไฟโตไกลโคลิฟิด	17 เปอร์เซ็นต์
คาร์โบไฮเดรตและสารอื่นๆ	7 เปอร์เซ็นต์
ความชื้น	1 เปอร์เซ็นต์

เลซิตินธรรมชาติที่ได้จากการ degumming น้ำมันถั่วเหลืองดิบ เมื่อนำมากรองและทำให้แห้งจะได้ผลิตภัณฑ์ที่มีสีน้ำตาลเข้ม เมื่อนำไปฟอกสีจะได้เลซิตินที่มีสีจางลง เลซิตินที่ได้จะมีลักษณะเป็นพลาสติกที่อุณหภูมิห้อง มีความหนืดสูง และมีความชื้นประมาณ 2-3 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเติมน้ำมันถั่วเหลืองหรือกรดไขมันลงไป จะทำให้มีความหนืดลดลง ในขณะที่เลซิตินชนิดปราศจากน้ำมันจะมีความไวต่อการเกิด oxidative rancidity ได้ง่ายกว่าเลซิตินธรรมชาติ เพราะเลซิตินที่ได้จากธรรมชาติจะมีวิตามินอีปนอยู่ด้วย จึงทำหน้าที่เป็นสารต้านออกซิเดชัน แต่เมื่อนำไปสกัดเอาน้ำมันออกด้วยอะซิโตน วิตามินอีจะละลายออกไปอยู่ในตัวทำละลายด้วย จึงเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันได้ง่าย

2.3.4 Sorbitan esters

Sorbitan esters จะมีกลุ่มที่ไม่ชอบน้ำค่อนข้างเด่น แต่ถ้าความยาวของกรดไขมันสั้นจะมีความไม่ชอบน้ำลดลง ละลายได้ดีในน้ำมัน ไม่ละลายน้ำแต่กระจายตัวได้ดีในน้ำร้อนและน้ำเย็น อาจใช้เดี่ยวๆ หรือใช้ร่วมกับสารอิมัลซิฟายเออร์อื่น เช่น polysorbate ก็ได้ โดยเมื่อใช้เดี่ยวๆ จะทำให้เกิดอิมัลชันชนิดน้ำในน้ำมัน เมื่อใช้ร่วมกับ polysorbate จะทำให้เกิดอิมัลชันได้ทั้งชนิดน้ำในน้ำมันหรือชนิดน้ำมันในน้ำทั้งนี้ขึ้นอยู่กับปริมาณที่ใช้ คงตัวดีในอิมัลชันโพลีเอสเตอร์หรือฟิเอช ในช่วงกว้าง เข้ากันได้กับตัวยาหลายชนิด ชื่อทางการค้าได้แก่ Span (Atlas Powder Company) หรือ Arlacel (Glyco Product Company) มีหลาย series ซึ่งมีค่า HLB (hydrophile-lipophile balance) ต่างๆ กัน ได้แก่

Span 80 หรือ Arlacel 80 : Sorbitan monooleate (oily liquid) HLB 4.3

Span 60 หรือ Arlacel 60 : Sorbitan monostearate (waxy solid) HLB 4.7

Span 40 หรือ Arlacel 40 : Sorbitan monopalmitate (waxy solid) HLB 6.7

Span 20 หรือ Arlacel 20 : Sorbitan monolaurate (oily liquid) HLB 8.6

Polysorbate มีหลาย series ทำให้ได้สารที่มีคุณสมบัติแตกต่างกันไป โดยมีค่า HLB ต่างๆ กัน ในทางการค้ามีชื่อว่า Tween (Atlas Powder Company) เช่น

Tween 80: Polysorbate 80: Polyoxyethylene (20) Sorbitan monooleate (yellow liquid) HLB 15.0

Tween 60: Polysorbate 60: Polyoxyethylene (20) Sorbitan monostearate (yellow liquid) HLB 14.9

Tween 40: Polysorbate 40: Polyoxyethylene (20) Sorbitan monopalmitate (yellow liquid) HLB 15.6

Tween 20: Polysorbate 60: Polyoxyethylene (20) Sorbitan monolaurate (yellow liquid) HLB 16.7

หมายเลข 20 หมายถึงจำนวน oxyethylene ในสูตรโมเลกุล Polysorbate คงตัวดีในอิมัลชันโพลีเอสเตอร์ที่มีความเข้มข้นสูงๆ และฟิเอชในช่วงกว้าง นิยมใช้ร่วมกับ sorbitan ester โดยเมื่อ

นำมาผสมกันจะทำให้ได้ชนิดของอิมัลชันตามต้องการสารอิมัลซิฟายเออร์อาจใช้เดี่ยวๆ หรือใช้ร่วมกันก็ได้ แต่ในอุตสาหกรรมนิยมเติมสารอิมัลซิฟายเออร์มากกว่า 1 ชนิด จะทำให้อิมัลชันมีความคงตัวมากกว่าการใช้สารอิมัลซิฟายเออร์เดี่ยวๆ ตัวอย่างเช่น การใช้ Span ร่วมกับ Tween จะนิยมใช้คู่ที่มีความยาวของ hydrocarbon chain ที่เหมือนกัน เช่น Span 20 ร่วมกับ Tween 20 จะทำให้เกิด complex interfacial film และแข็งแรงรอบๆ หยดของวัฏภาคภายใน จึงป้องกันการรวมหยดของวัฏภาคภายในได้ดีขึ้น จะทำให้อิมัลชันมีความคงตัวมากขึ้น

ตัวอย่างเช่น Tween 80 (Polyoxyethylene sorbitan monooleate) คือ เอสเทอร์ที่เกิดกรดไขมันทำปฏิกิริยากับ hexitol anhydride ซึ่ง derive มาจาก sorbital เป็นอิมัลซิฟายเออร์ที่ไม่มีประจุ มีลักษณะเป็นของเหลวข้นหนืด (พิมพร, 2540)

2.3.5 โซเดียมเคซีเนต

มีคุณสมบัติในการเป็นอิมัลซิฟายเออร์เนื่องจากโปรตีนจะถูกดูดซับระหว่างผิวของน้ำมันกับน้ำ และมีการจัดเรียงตัวโดยโปรตีนใช้ส่วนที่เป็นแนว แฉก หรือ ทางยาว (train) ซึ่งเป็นส่วนที่ชอบน้ำมันเข้ายึดกับผิวของหยดน้ำมัน และเหลือส่วนหาง (tail) และห่วง (loop) ซึ่งเป็นส่วนชอบน้ำ เคลื่อนไหวอิสระในน้ำ เมื่อหยดน้ำมันเข้ามาใกล้ชิดกัน จะเกิดแรงกระทำระหว่างส่วนหางและห่วงซึ่งก่อให้เกิดแรงผลักที่เรียกว่า steric force และให้เกิดความคงตัวแก่อิมัลชันในระหว่างการเก็บรักษา ได้แก่ ลิโปโปรตีนในไข่แดง (lipovitellins, livetin) โปรตีนเคซีน แคซีนด โปรตีนเวย์ โปรตีนไข่ขาว

โครงสร้างระดับโมเลกุลของแคซีนด (caseinate) และแคซีน (caseins) ยังคงเป็นโครงสร้างขนาดใหญ่ ไม่ละลายน้ำ แต่จะอยู่เป็นคอลลอยด์ที่กระจายตัวในน้ำ ในขณะที่เคซีนจะอยู่ในรูปของเกลือโซเดียมหรือโพแทสเซียมจะละลายน้ำได้ และจะสูญเสียโครงสร้างของโมเลกุลไป ในระหว่างกระบวนการผลิตเคซีนด ดังนั้นประสิทธิภาพของแคซีนดและแคซีนในการเป็นสารอิมัลซิฟายเออร์จึงแตกต่างกัน รวมถึงความคงทนต่อการดอง อุณหภูมิ แรงเฉือน และออสโม (ปาริฉัตร, 2545)

Su *et al.* (2006) ได้ทำการศึกษาประสิทธิภาพในการเสริมฤทธิ์กันระหว่างโพลิกลีเซอรอลโพลิริซินโอเลต (polyglycerol polyricinoleate, PGPR) และ โปรตีนโซเดียมเคซีนด

(sodium caseinate) ซึ่งเป็นอิมัลซิฟายเออร์ที่ใช้ในอาหารสามารถละลายในส่วนของน้ำมันและในส่วนของน้ำในระบบอิมัลชันเชิงซ้อนตามลำดับ พบว่า ระบบอิมัลชันเชิงซ้อนชนิดน้ำในน้ำมันในน้ำ (W/O/W emulsion) ที่เตรียมจาก 4 % (w/v) PGPR เพียงอย่างเดียวในส่วนของอิมัลชันเชิงเดี่ยว (W/O emulsion) และ 0.5 % (w/v) โซเดียมเคซีเนต ในส่วนของอิมัลชันเชิงซ้อน (W/O/W emulsion) มีความคงตัวและมีร้อยละผลได้มากกว่า 90 โดยที่ความเข้มข้นของ PGPR ในส่วนของอิมัลชันเชิงเดี่ยวสามารถลดได้ถึง 2 % (w/v) และไม่มีผลต่อร้อยละผลได้และความคงตัวของระบบอิมัลชันเชิงซ้อนโดยการแทนที่ด้วย 0.5 % (w/v) โซเดียมเคซีเนต ในส่วนของการกระจายในระบบอิมัลชันเชิงเดี่ยวเพื่อเป็นการลดปริมาณการใช้อิมัลซิฟายเออร์สังเคราะห์ได้

Dickinson *et al.* (1997) ได้ศึกษาผลของการเกิดครีม (creaming) และการรวมกันแบบเกาะกลุ่ม (flocculation) ของอิมัลชันชนิดน้ำมันในน้ำ (O/W emulsion) โดยใช้ โปรตีนโซเดียมเคซีเนต (sodium caseinate) พบว่า ปริมาณของน้ำมันและ โปรตีนที่ใช้ในการเตรียมอิมัลชันมีผลต่อขนาดและความคงตัวของอิมัลชันในการดูดซับของโปรตีนที่ผิวสัมผัสของหยดน้ำมัน พบว่า ที่ปริมาณโปรตีนร้อยละ 1 จะส่งผลให้เกิดการรวมตัวกันของน้ำมันแบบเกาะกลุ่มเนื่องจากปริมาณโปรตีนที่ใช้ไม่เพียงพอที่จะห่อหุ้มขนาดของหยดน้ำมันให้คงตัวอยู่ในระบบอิมัลชันไว้ได้ และในการใช้ปริมาณโปรตีนปริมาณตั้งแต่ร้อยละ 3 โดยน้ำหนัก จะสามารถลดอัตราการเกิดครีมและการรวมตัวกันแบบเกาะกลุ่ม ส่งผลให้อิมัลชันที่เตรียมได้มีความคงตัวดีขึ้น

Surh *et al.* (2007) ได้ทำการเตรียมและศึกษาลักษณะของอิมัลชันแบบ W/O และ W/O/W ที่ใส่ biopolymer-gelled ในส่วนของอนุภาคของน้ำโดยใช้ PGPR และ โปรตีนเวย์ (whey protein isolate, WPI) เป็นอิมัลซิฟายเออร์ในส่วนของอิมัลชันเชิงเดี่ยวแบบ W/O emulsion และอิมัลชันเชิงซ้อนแบบ W/O/W emulsion ตามลำดับ โดยมีการให้ความร้อนในส่วนของการละลายที่มี WPI เป็นอิมัลซิฟายเออร์ เพื่อที่จะลดการแตกของอิมัลชันเชิงเดี่ยว (disrupting the single emulsion) ในระหว่างการเตรียมอิมัลชันเชิงซ้อนพบว่า ในการให้และไม่ให้ความร้อนในส่วน of WPI ไม่มีผลแตกต่างกันแต่การให้ความร้อนในระบบอิมัลชันเพื่อให้ส่วนของ WPI เกิดเจลนั้นจะช่วยให้อิมัลชันมีความคงตัวมากขึ้น

2.4 การรักษาความคงตัวของระบบอิมัลชัน

2.4.1 การรักษาความคงตัวโดยประจุบนพื้นผิวของอนุภาคคอลลอยด์ (charge stabilization)

ความคงตัวของระบบคอลลอยด์ขึ้นอยู่กับระยะห่างระหว่างอนุภาคคอลลอยด์ซึ่งสามารถเกิดพันธะต่อกันได้ พันธะที่เกี่ยวข้องนี้เป็นพันธะในกลุ่มของแรงช่วงยาว ซึ่งได้แก่ อันตรกิริยาแวนเดอร์วาลส์ (van der waals) และแรงผลักระหว่างอนุภาคของคอลลอยด์ที่มีประจุเหมือนกัน (electrical repulsion) ผลรวมของแรงดึงดูด และแรงผลักระหว่างอนุภาคคอลลอยด์ที่มีประจุเหมือนกัน (chemical potentials) ซึ่งแรงดังกล่าวนี้จะขึ้นอยู่กับระยะห่างระหว่างอนุภาคคอลลอยด์ เมื่ออนุภาคคอลลอยด์อยู่ห่างกัน ถึงแม้ผลรวมของศักย์เคมีจะมีค่าเป็นลบ คือ แรงดึงดูดมากกว่าแรงผลักระหว่างอนุภาคคอลลอยด์จะไม่เกิดการรวมตัวแบบเกาะกลุ่มกัน เนื่องจากอนุภาคอยู่ไกลกันเกินกว่าจะเกิดพันธะในกลุ่มของแรงช่วงสั้น เช่น พันธะโควาเลนต์ (covalence bond) เมื่ออนุภาคคอลลอยด์เคลื่อนที่เข้ามาใกล้กันมากขึ้น ส่งผลทำให้ผลรวมของศักย์เคมีจะมีค่าเป็นบวก คือ แรงผลักระหว่างอนุภาคคอลลอยด์จะไม่เกิดการรวมตัวกันแบบเกาะกลุ่มหรือแบบหลอมรวม จึงทำให้ระบบคอลลอยด์สามารถที่จะรักษาความคงตัวไว้ได้ ไม่เกิดการแยกชั้นหรือการตกตะกอนขึ้น แต่เมื่อมีการเติมไอออนลงในระบบคอลลอยด์ หรือทำให้ประจุที่ผิวของอนุภาคคอลลอยด์เปลี่ยนแปลง ประจุไฟฟ้าของไอออนจะไปเปลี่ยนศักย์เคมีของระบบคอลลอยด์ทั้งในเฟสที่กระจายตัว และเฟสต่อเนื่อง หรือตัวกลางของการกระจาย ดังนั้นศักย์เคมีที่ระยะห่างระหว่างอนุภาคคอลลอยด์จะเปลี่ยนไป ส่งผลทำให้แรงผลักระหว่างอนุภาคคอลลอยด์สั้นๆ ผลรวมของศักย์เคมีจะมีค่าเป็นลบ คือ แรงดึงดูดมากกว่าแรงผลักระหว่างอนุภาคคอลลอยด์จึงเกิดการรวมตัวกันแบบเกาะกลุ่ม ส่งผลทำให้อิมัลชันเสียความคงตัว (ปาริฉัตร, 2545)

2.4.2 การรักษาความคงตัวโดยโมเลกุลที่ผิวร่วมระหว่างเฟสที่กระจายตัวกับเฟสต่อเนื่องทำหน้าที่กีดขวาง (steric stabilization)

การรักษาความคงตัวของระบบคอลลอยด์โดยโมเลกุลที่ผิวร่วม เกิดขึ้นได้เนื่องจากสารประกอบที่มีส่วนของโมเลกุลที่ละลายได้ทั้งในเฟสที่กระจายตัว (dispersed phase) และเฟสต่อเนื่อง (continuous phase) มีขนาดโมเลกุลใหญ่เพียงพอที่จะกีดขวางการรวมตัวกันของอนุภาคคอลลอยด์ เช่น โปรตีน ซึ่งมีโมเลกุลค่อนข้างใหญ่ จะถูกดูดซับหรือละลายได้ในเฟสของ

น้ำมัน (oil phase) และมีบางส่วนที่ละลายได้ในเฟสของน้ำ (aqueous phase) ดังนั้นที่ผิวร่วมระหว่างน้ำมันกับน้ำ (oil-water interface) จึงเกิดโครงสร้างขึ้นซึ่งสามารถทำหน้าที่กีดขวางการรวมตัวกันของอนุภาคน้ำมันเนื่องจากโปรตีนโมเลกุลขนาดใหญ่พอที่จะทำหน้าที่เป็นเครื่องกีดขวางไม่ให้อนุภาคคอลลอยด์เกิดการรวมตัวกันแบบเกาะกลุ่มได้ (ปาริฉัตร, 2545)

ในขณะที่ โพลีแซคคาไรด์ก็มักนิยมนำมาใช้ในการรักษาความคงตัวของอิมัลชันชนิดน้ำมันในน้ำเพื่อทำหน้าที่ไปเพิ่มความหนืดของเฟสน้ำ ซึ่งทำให้ได้ลักษณะเนื้อสัมผัสที่ต้องการ และเป็นการยับยั้งการเคลื่อนที่ขึ้นด้านบนของอนุภาคน้ำมัน หรือที่เรียกว่าการเกิดครีม (creaming) ของอนุภาคน้ำมัน หากโพลีแซคคาไรด์มีความเข้มข้นที่มากพอที่จะสามารถสร้างโครงสร้างสามมิติ (three-dimensional network) สามารถที่จะห่อหุ้มอนุภาคของน้ำมันไว้ได้ และสามารถที่จะป้องกันการเคลื่อนที่ของอนุภาคน้ำมันไว้ได้ (McClement, 2000)

2.4.3 การรักษาความคงตัวโดยอนุภาคที่ผิวร่วมระหว่างเฟสที่กระจายตัวกับเฟสต่อเนื่อง (particle stabilization)

ความสามารถในการรักษาความคงตัวของระบบคอลลอยด์โดยอนุภาค ขึ้นอยู่กับความสามารถในการจัดเรียงตัวของอนุภาคนั้นๆ ที่ผิวสัมผัสระหว่างเฟสที่กระจายตัวกับเฟสต่อเนื่อง โดยความสามารถในการรักษาความคงตัวโดยกลไกนี้ จะขึ้นอยู่กับชนิดของอนุภาคและมุมที่อนุภาคนั้นสัมผัสกับผิวร่วม ซึ่งเรียกว่า มุมสัมผัส (contact angle) ถ้าอนุภาคละลายได้ง่ายในน้ำมันอนุภาคนั้นจะอยู่ในน้ำมันมากกว่าในน้ำ (มุมสัมผัสน้อยกว่า 90°) ทำให้ประสิทธิภาพในการเป็นเครื่องกีดขวางจะไม่มากเท่าอนุภาคที่สามารถละลายในน้ำและน้ำมันเท่าๆ กัน (มุมสัมผัสเท่ากับ 90°) และถ้าอนุภาคนั้นละลายในน้ำได้ดี อนุภาคจะมีส่วนที่อยู่ในน้ำมากกว่าน้ำมัน (มุมสัมผัสมากกว่า 90°) ทำให้เป็นเครื่องกีดขวางได้ไม่ดีเท่ากับเมื่อมีมุมสัมผัสเท่ากับ 90° เพราะอนุภาคจะหลุดออกจากส่วนที่เป็นน้ำมันได้ง่าย (ปาริฉัตร, 2545)

2.5 การเสถียรภาพของอิมัลชัน

ระบบความคงตัวของอิมัลชันในอาหารมีความซับซ้อน เนื่องจากครอบคลุมปรากฏการณ์และระบบต่างๆ มากมาย ขั้นตอนการสูญเสียความคงตัวคือเกิดการรวมกลุ่มของอนุภาคก่อน จากนั้นหลอมรวมเป็นอนุภาคเดียวกัน แล้วเกิดครีม และสุดท้ายเกิดการแยกชั้นขึ้น

เนื่องจากแรงโน้มถ่วง ซึ่งแต่ละชั้นตอนมีกลไกการเกิดที่ต่างกัน โดยขึ้นอยู่กับ อายุการเก็บรักษา จำนวนของอนุภาค ขนาดของอนุภาคและการจัดเรียงตัวของอนุภาคในอิมัลชัน เป็นต้น

2.5.1 ลักษณะการเสถียรของอิมัลชัน

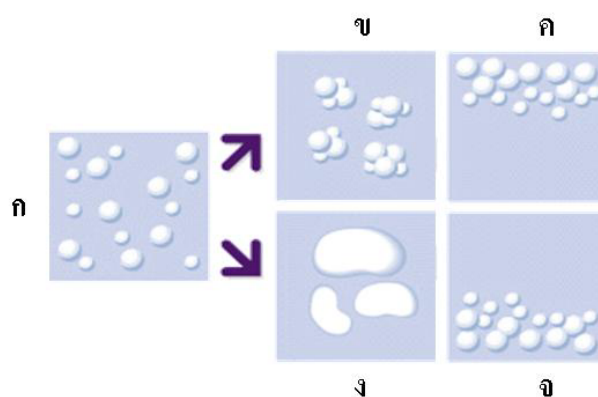
โดยทั่วไประบบอิมัลชันจะมีความคงตัวทางอุณหพลศาสตร์ต่ำ ดังนั้นปัญหาหลักของระบบนี้คือ การเสถียรของอิมัลชันและมักจะเกิดการรวมตัวกันของอนุภาคน้ำมันอย่างรวดเร็ว การที่ระบบอิมัลชันเสถียรสามารถเกิดจากหลายกระบวนการ สามารถอธิบายได้ดังนี้

การแยกชั้นเนื่องจากแรงโน้มถ่วง เกิดจากความแตกต่างของความหนาแน่นของอนุภาคและของเหลวรอบๆ อนุภาคโดยที่แรงโน้มถ่วงทำให้อิมัลชันเกิดการแยกออกจากกัน ถ้าอนุภาคตัวถูกกระจายมีความหนาแน่นน้อยกว่าของเหลวโดยรอบ อนุภาคจะเคลื่อนที่ขึ้นด้านบน ซึ่งหมายความว่า การแยกชั้นด้านบนหรือการเกิดครีม (creaming; ภาพที่ 6ค) ในทางตรงกันข้าม ถ้าอนุภาคมีความหนาแน่นมากกว่าของเหลวโดยรอบ อนุภาคจะเคลื่อนที่ลงด้านล่าง ซึ่งหมายความว่า การเกิดแยกชั้นด้านล่างหรือการตกตะกอน (sedimentation; ภาพที่ 6จ) (McClements, 2005)

การแยกชั้นที่เกิดจากแรงโน้มถ่วงส่งเสริมให้อนุภาคเข้ามาใกล้กันซึ่งส่งผลให้เกิดการชนกันระหว่างอนุภาคกับอนุภาคข้างเคียง หลังจากการชนกันระหว่างอนุภาคในอิมัลชันเกิดการแยกออกจากกันหรือรวมกลุ่มกันขึ้นอยู่กับความสัมพันธ์ของขนาดแรงดึงดูดและแรงผลักที่เกิดระหว่างอนุภาค การรวมกลุ่มกันของอนุภาคในระบบอิมัลชันของอาหารสามารถแบ่งออกได้เป็น 2 ชนิดหลัก คือ การรวมกันแบบเกาะกลุ่ม (flocculation; ภาพที่ 6ข) และการรวมกันแบบหลอมรวม (coalescence; ภาพที่ 6ง)

การรวมกันแบบเกาะกลุ่มเกิดจากอนุภาคสองอนุภาคหรือมากกว่านั้นเข้ามารวมตัวกันโดยที่ยังคงลักษณะเดิมเฉพาะตัวของอนุภาคไว้ได้ ในขณะที่การรวมตัวกันแบบหลอมรวมเป็นอนุภาคเดียวกันนั้นการสูญเสียเกิดจากอนุภาคสองอนุภาคหรือมากกว่านั้นมาหลอมรวมกันกลายเป็นอนุภาคเดียวที่มีขนาดใหญ่ขึ้น (McClements, 2005) การรวมตัวของอนุภาคและการหลอมรวมเป็นอนุภาคเดียวกันนี้สามารถเร่งอัตราเร็วในการเกิดการแยกชั้นเนื่องจากแรงโน้มถ่วงได้ ความคงตัวของอิมัลชันมีทั้งข้อดีและข้อเสีย ในด้านข้อดีนั้นการสูญเสียความคงตัวของอิมัลชันช่วยสร้าง

ลักษณะเนื้อสัมผัสที่ต้องการ ส่วนข้อเสียคือลดอายุการเก็บของผลิตภัณฑ์ ได้ลักษณะปรากฏที่ไม่เป็นเนื้อเดียวกัน เปลี่ยนลักษณะเนื้อสัมผัสและกลิ่นรสของผลิตภัณฑ์อาหารได้



ภาพที่ 6 การสูญเสียความคงตัวของอิมัลชัน: (ก: อิมัลชันที่คงตัว ข: การรวมตัวแบบเกาะกลุ่ม (flocculation) ค: การแยกชั้นด้านบนหรือการเกิดครีม (creaming) ง: การรวมตัวแบบหลอมรวม (coalescence) และจะเกิดการเกิดแยกชั้นด้านล่างหรือการตกตะกอน (sedimentation)

ที่มา: ดัดแปลงจาก McClements (2005)

2.5.2 ผลของสภาวะแวดล้อมต่อการเสียความคงตัวของอิมัลชัน

การให้ความร้อน อาหารที่เป็นอิมัลชันหลายชนิด เมื่อมีการผ่านกระบวนการให้ความร้อนในระหว่างการผลิต การเก็บรักษาหรือการนำไปใช้ ตัวอย่างเช่น การพาสเจอร์ไรซ์ ดังนั้น การที่จะทำให้อาหารที่เป็นอิมัลชันมีความสามารถที่จะต้านทานความร้อนได้ โดยไม่เกิดการแยกชั้นของหยดน้ำมันอาจเนื่องจากการเกาะกลุ่มและ/หรือการหลอมรวม จึงเป็นผลดีในการผลิตอาหารที่เป็นอิมัลชัน โดยทั่วไปการให้ความร้อนจะทำให้อนุภาคน้ำมันเกิดการเกาะกลุ่มและ/หรือหลอมรวมกัน อิมัลซิฟายเออร์ที่ใช้จึงมีความสำคัญเพื่อป้องกันไม่ให้หยดน้ำมันเกิดการเกาะกลุ่มและ/หรือหลอมรวมกันขึ้น ตัวอย่างเช่น อิมัลซิฟายเออร์โมเลกุลขนาดเล็ก จะเกิด phase inversion temperature (PIT) ขึ้นรอบๆหยดน้ำมันทำให้เกิดการหลอมรวมกันขึ้น ในขณะที่ globular protein จะเกิด thermal denaturation temperature (T_m) ขึ้นรอบๆ หยดน้ำมันทำให้เกิดการเกาะกลุ่มกันขึ้น ส่งผลให้อิมัลชันเสียความคงตัว (McClements, 2004) ซึ่งสอดคล้องกับรายงานวิจัยที่ศึกษา อิมัลชัน

แบบผิวสัมผัสหลายชั้นที่ทำให้คงตัวด้วยอิมัลซิฟายเออร์ที่มีประจุลบและโพลีอิเล็กโตรไลต์ที่มีประจุบวกสามารถที่จะทำให้อิมัลชันที่มีความคงตัวโดยการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 30-90 องศาเซลเซียส ตัวอย่างเช่น โซเดียมโคเคซิลซัลเฟต-โคโคซาน (Aoki *et al.*, 2005), เลซิทีน-โคโคซาน (Ogawa *et al.*, 2003) เป็นต้น

การแช่แข็ง อาหารที่เป็นอิมัลชันหลายชนิด จะมีการผ่านกระบวนการแช่เย็น และการแช่แข็งในระหว่างการเก็บรักษาก่อนการนำไปบริโภค เช่น ไอศกรีม และผลิตภัณฑ์นมต่างๆ ในการเก็บรักษาอาหารที่อุณหภูมิต่ำนี้เพื่อที่จะลดการเสื่อมเสียของผลิตภัณฑ์อาหารอาจเนื่องจากจุลินทรีย์ และปฏิกิริยาเคมีต่างๆ อย่างไรก็ตาม อิมัลชันน้ำมันในน้ำโดยทั่วไป จะเกิดการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพโดยเสียความคงตัวเมื่อมีการแช่เย็นและ/หรือการแช่แข็ง และจะแยกชั้นทันทีเมื่อมีการให้ความร้อนอีกครั้ง ดังนั้นประการสำคัญอย่างหนึ่งจะต้องปรับปรุงเทคโนโลยีที่ทำให้อาหารอิมัลชันมีความคงตัวต่อการแช่แข็งและการทำละลาย เมื่อทำการแช่แข็งอาหารอิมัลชันจะเกิดการเปลี่ยนแปลงทางเคมีกายภาพเกิดขึ้นหลายประการ ตัวอย่างเช่น การเกิดผลึกของหยดน้ำมัน การเกิดผลึกน้ำแข็ง การเปลี่ยนแปลงของผิวสัมผัสระหว่างน้ำมันกับน้ำเมื่อมีการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิเกิดขึ้น เป็นต้น ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยที่ศึกษา อิมัลชันน้ำมันปาล์มที่ผ่านการแช่แข็งที่อุณหภูมิ -40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่ทำให้คงตัวด้วยโซเดียมโคเคซิลซัลเฟต พบว่าขนาดอนุภาคมีขนาดเพิ่มขึ้น ซึ่งเกิดจากการเกาะกลุ่มและการหลอมรวมกันของหยดน้ำมัน และอิมัลชันน้ำมันปาล์มที่ทำให้คงตัวด้วยโซเดียมโคเคซิลซัลเฟต-โคโคซาน เมื่อผ่านการแช่แข็ง อิมัลชันมีความคงตัว ไม่แยกชั้น แสดงถึงอิมัลชันแบบผิวสัมผัสหลายชั้นสามารถช่วยหรือชะลอการเสียความคงตัวโดยการแช่แข็งได้ (Thanasukarn *et al.*, 2006)

การปรับความเป็นกรด-ด่าง (ค่าพีเอช) อาหารที่เป็นอิมัลชันหลายชนิด อาจมีการเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรด-ด่าง ทั้งในกระบวนการผลิต การจัดเก็บหรือในขั้นตอนการนำไปใช้ ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับธรรมชาติของผลิตภัณฑ์ด้วย ตัวอย่างเช่น ผลิตภัณฑ์อาหารอิมัลชันน้ำมันในน้ำที่อยู่ในรูปของกรด (ค่าพีเอช 2.5-4.0 เช่น ผลิตภัณฑ์ soft drink) จนถึงผลิตภัณฑ์อาหารอิมัลชันที่อยู่ในรูปของด่าง (ค่าพีเอช 7.0-7.4 เช่น ผลิตภัณฑ์นมบางชนิด) ดังนั้น อาหารที่เป็นอิมัลชันที่ดีจึงควรมีความคงตัวต่อค่าความเป็นกรด-ด่างในช่วงที่กว้าง โดยทั่วไปอิทธิพลของพีเอช จะส่งผลให้หยดน้ำมันเกิดการรวมตัวกันแล้วตกตะกอน ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับแรงที่ผิวสัมผัสและการเปลี่ยนแปลงประจุระหว่างหยดน้ำมันกับน้ำที่เกิดการเปลี่ยนแปลงพีเอชขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยที่ศึกษา อิมัลชันแบบผิวสัมผัสหลายชั้นที่ใช้ เพคติน-เบทาแลคโตโกลบูลิน จะสามารถที่จะหุ้มอนุภาคได้ที่ค่าพีเอช

อยู่ในช่วง 3-5 (Guzey *et al.*, 2004; Moreau *et al.*, 2003) ซึ่งเกิดจากลักษณะของ electrostatic attraction ระหว่างประจุลบของโพลีแซคคาไรด์กับประจุบวกของอนุภาค ซึ่งผลที่ได้พบว่าเพคตินสามารถที่จะปรับปรุงความคงตัวของอนุภาคที่ค่าพีเอช 4 และ 5 เนื่องจากเพคตินจะไปลดประจุที่อยู่รอบอนุภาคอิมัลชันส่งผลให้อิมัลชันมีความคงตัว

การเติมเกลือ อาหารอิมัลชันหลายชนิด ซึ่งความเข้มข้นและชนิดของความแรงไอออน (ionic strength) จะขึ้นอยู่กับธรรมชาติของอาหาร ในการเติมเกลือระหว่างกระบวนการผลิต การจับกันหรือในขั้นตอนการนำไปใช้ ดังนั้นจึงเป็นตัวบ่งชี้ความแรงและขอบเขตของอันตรกิริยาทางไฟฟ้าระหว่างภายในและภายนอกโมเลกุล และมีผลต่อโครงสร้างของอิมัลชัน ดังนั้นอาหารที่เป็นอิมัลชันที่ดีจึงควรมีความคงตัวต่อการเติมเกลือในระหว่างกระบวนการต่างๆ ได้ เนื่องจาก ไอออนจะส่งผลต่อความไม่คงตัวของอิมัลชันซึ่งอาจจะพบในน้ำที่นำมาเตรียมผลิตภัณฑ์อิมัลชันก็ได้ ดังนั้นอิทธิพลของเกลือหรือไอออนจะขึ้นอยู่กับลักษณะของ electrical characteristic ของอิมัลซิฟายเออร์ที่หุ้มอนุภาคอิมัลชันไว้ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยที่ศึกษา อิมัลชันแบบผิวสัมผัสหลายชั้นที่ใช้ เพคติน-เบทาแลคโตโกลบูลินเป็นอิมัลซิฟายเออร์ในส่วนของ primary emulsion เมื่อมีการเติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 100 มิลลิโมลาร์ อิมัลชันเกิดการรวมตัวกันและเกิดการแยกชั้นครีมขึ้น ส่วนใน secondary emulsion อิมัลชันดังกล่าวมีความคงตัวไม่เกิดการแยกชั้น เมื่อเติมสารละลายเกลือโซเดียมคลอไรด์ที่ช่วงความเข้มข้นไม่เกิน 500 มิลลิโมลาร์ อาจเนื่องจากผลของ steric repulsion อยู่ในช่วงที่กว้างทำให้เกิด thicker interfacial membrane ใน secondary emulsion จากเพคติน-เบทาแลคโตโกลบูลิน ที่หุ้มอนุภาคของอิมัลชันไว้ที่พีเอช 3.0 ส่งผลให้อิมัลชันมีความคงตัวไม่แยกชั้นได้ (Moreau *et al.*, 2003)

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. วัตถุดิบและสารเคมี

- 1.1 บัวบกสด (ตลาดอมรพันธุ์ กรุงเทพฯ ประเทศไทย)
- 1.2 น้ำมันถั่วเหลือง (บริษัท น้ำมันพืชไทย จำกัด (มหาชน) ประเทศไทย)
- 1.3 เอทานอล 99.9 % (Ethanol; Scharlau Chemie S.A. Barcelona, Spain)
- 1.4 เลซิทีนชนิดเหลว (Lecithin; Lab Valley Ltd., Part., Bangkok, Thailand; Acetone Insoluble 82 % (minimum), HLB = 7.0, Acid Value (mg KOH/g) 30 % (maximum) และ Moisture 1 % (maximum))
- 1.5 Decaglycerol mono-oleate (DGMO; Sakamoto Yakuhin Kogyo Co., Osaka, Japan; HLB = 12.9, viscous liquid)
- 1.6 Polyglycerol polyricinoleate (PGPR; Sakamoto Yakuhin Kogyo Co., Osaka, Japan; HLB = 3.0, liquid)
- 1.7 Polyoxyethylene sorbitan monooleate (Tween 80, Sigma-Aldrich Chemical Co., Ltd., St. Louis MO, USA; HLB = 15, viscous liquid)
- 1.8 โซเดียมเคซีเนต (Sodium caseinate, Vicchi Enterprise Co., Ltd., Bangkok, Thailand; colour: cream white, protein 90.00 % (minimum), moisture 6.00 % (maximum), Ash 6.00 % (maximum) และ Fat 2.00 % (maximum))
- 1.9 คริสตัลไวโอเลต (Crystal violet, DC Panreac., Barcelona, Spain)
- 1.10 โซเดียมไฮดรอกไซด์ (Sodium hydroxide; NaOH, Ajax Finechem, Australia)
- 1.11 กรดไฮโดรคลอริก (Hydrochloric acid; HCL, Ajax Finechem, Australia)
- 1.12 โซเดียมคลอไรด์ (Sodium chloride; NaCl, Carlo Erba, Rodano, Italy)
- 1.13 โซเดียมเอไซด์ (Sodium azide; NaN₃, Sigma-Aldrich Chemical Co., Ltd., St. Louis MO, USA)

2. อุปกรณ์และเครื่องมือ

2.1 อุปกรณ์เครื่องแก้ว

2.2 เครื่องโฮโมจีไนซ์แบบมือถือ (Hand homogenizer, IKA-ULTRA-TURRAX® T 25 basic, KIKA®-WERKE GMBH & CO.KG, Germany)

2.3 เครื่องโฮโมจีไนซ์ความดันสูงแบบ 2 stage (High pressure homogenizer, 15MR-8TA, APV Gaulin, Inc., Wilmington, MA, USA) (ความดันที่ stage แรกเป็นร้อยละ 10 ของความดันที่ต้องการ)

2.4 เครื่องวัดขนาดอนุภาค (Zetasizer Nano-ZS Instruments, Zen 3600, Malvern Instrument Ltd., Worcestershire, UK)

2.5 เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (Spectrophotometer, Model Spectronic Genesys 10 UV Scanning, Thermo Electron Corporation., Madison, USA)

2.6 กล้องจุลทรรศน์แบบแสงส่องผ่าน (Light optical microscope, Axiolab®, Carl Zeiss Ple Ltd, Germany)

2.7 เครื่องวัดกรด-ด่าง (pH meter, Orions 5 star, Thermo Fisher Scientific Inc., USA)

2.8 ตู้ควบคุมอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส (BC-249, FROZEN Company, Nonthaburi, Thailand)

2.9 เครื่องชั่งแบบ 2 ตำแหน่ง (ARC 120, OHAUS, USA)

2.10 เครื่องชั่งแบบละเอียด 4 ตำแหน่ง (Model SPB 31, Scale Tech, Germany)

2.11 อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water bath, OB 14, Memmert, Schwabach, Germany)

2.12 เครื่องทำแห้งแบบเยือกแข็ง (Freeze dryer, Dura-Top™ MP, FTS SYSTEMS, USA)

2.13 เครื่องทำแห้งแบบเยือกแข็ง (Freeze dryer, Heto model FD2.5, Heto Lab Equipment Manufacturers, Denmark)

2.14 เครื่องบดละเอียด (Blender, VA-M11L, Hitachi, Tokyo, Japan)

2.15 เครื่องสั่นสะเทือนด้วยระบบคลื่นเสียง (Ultra sonicator, RK 52, BANDELIN SONOREX, Germany)

2.16 เครื่องเหวี่ยงแยกแบบควบคุมอุณหภูมิ (Refrigerate centrifuge, Sorvall RC 5C Plus Superspeed Centrifuge, Sorvall, USA)

2.17 เครื่องระเหยแบบหมุนภายใต้สุญญากาศ (Evaporator, BUCHI Rotavapor R-114, BUCHI, Switzerland)

วิธีการ

1. การเตรียมอิมัลชันเชิงเดี่ยวชนิดเอทานอลในน้ำมัน (Ethanol-in-oil emulsion)

1.1 ผลของชนิดอิมัลซิฟายเออร์ต่อความคงตัวของระบบอิมัลชันเอทานอลในน้ำมัน

เตรียมอิมัลชันเอทานอลในน้ำมันโดยการผสมเอทานอลร้อยละ 10 โดยน้ำหนักกับ น้ำมันร้อยละ 90 โดยน้ำหนัก ที่มีอิมัลซิฟายเออร์ชนิดต่างๆ (เลซิทีน, DGMO และ PGPR) ที่ความเข้มข้นร้อยละ 1.0 โดยน้ำหนักของอิมัลชัน กวนผสมอย่างสม่ำเสมอ 5 นาที นำของผสมดังกล่าวมาปั่นผสมโดยใช้เครื่องโฮโมจิไนซ์แบบมือถือที่ความเร็ว 13,500 รอบต่อนาที นาน 2 นาที จะได้อิมัลชันที่มีอนุภาคเอทานอลขนาดใหญ่ หลังจากนั้นนำมาผ่านเครื่องโฮโมจิไนซ์ความดันสูงหนึ่งรอบที่ความดัน 3000 psi (1st stage 300 psi และ 2nd stage 2,700 psi) เก็บอิมัลชันไว้ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง ตรวจสอบความคงตัวต่อการแยกชั้น วัดค่าความขุ่น และขนาดของหยดเอทานอล

1.2 ผลของความเข้มข้นอิมัลซิฟายเออร์ต่อความคงตัวของระบบอิมัลชันเอทานอลในน้ำมัน

เตรียมอิมัลชันเอทานอลในน้ำมันโดยการผสมเอทานอลร้อยละ 10 โดยน้ำหนักกับ น้ำมันร้อยละ 90 โดยน้ำหนัก โดยใช้ PGPR เป็นอิมัลซิฟายเออร์ ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.5-5.0 โดยน้ำหนักของอิมัลชัน กวนผสมอย่างสม่ำเสมอ 5 นาที นำของผสมดังกล่าวมาปั่นผสมโดยใช้เครื่องโฮโมจิไนซ์แบบมือถือที่ความเร็ว 13,500 รอบต่อนาที นาน 2 นาที หลังจากนั้นนำมาผ่านเครื่องโฮโมจิไนซ์ความดันสูงหนึ่งรอบที่ความดัน 3000 psi (1st stage 300 psi และ 2nd stage 2,700 psi) เก็บอิมัลชันไว้ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง ตรวจสอบความคงตัวต่อการแยกชั้น วัดการกระจายตัวและขนาดของหยดเอทานอล และวิเคราะห์โครงสร้างระดับจุลภาค

1.3 ผลของปริมาณเอทานอลต่อความคงตัวของระบบอิมัลชันเอทานอลในน้ำมัน

เตรียมอิมัลชันเอทานอลในน้ำมันที่มีปริมาณเอทานอลต่างๆ โดยผสมเอทานอล (ร้อยละ 10-50 โดยน้ำหนัก) กับน้ำมัน (ร้อยละ 50-90 โดยน้ำหนัก) ที่มี PGPR ร้อยละ 2.0 โดยน้ำหนักอิมัลชัน กวนผสมอย่างสม่ำเสมอ 5 นาที นำของผสมดังกล่าวมาปั่นผสมโดยใช้เครื่อง

ไฮโมจิไนซ์แบบมือถือที่ความเร็ว 13,500 รอบต่อนาที นาน 2 นาที หลังจากนั้นนำมาผ่านเครื่องไฮโมจิไนซ์ความดันสูงหนึ่งรอบที่ความดัน 3000 psi (1st stage 300 psi และ 2nd stage 2,700 psi) เก็บอิมัลชันไว้ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง ตรวจสอบความคงตัวต่อการแยกชั้น วัดค่าความขุ่น ขนาดของหยดเอทานอล และวิเคราะห์โครงสร้างระดับจุลภาค

2. การเตรียมอิมัลชันเชิงซ้อนชนิดเอทานอลในน้ำมันในน้ำ (Ethanol-in-oil-in water emulsion)

2.1 ผลของชนิดและความเข้มข้นของอิมัลซิฟายเออร์ต่อความคงตัวของระบบอิมัลชันเชิงซ้อนชนิดเอทานอลในน้ำมันในน้ำ

ทำการเตรียมอิมัลชันเชิงซ้อนชนิดเอทานอลในน้ำมันในน้ำโดยผสมอิมัลชันเชิงเดี่ยวเอทานอลในน้ำมัน (เอทานอลร้อยละ 10 และ PGPR ร้อยละ 2.0) ร้อยละ 2.5 โดยน้ำหนัก กับ สารละลายอิมัลซิฟายเออร์ร้อยละ 97.5 โดยน้ำหนัก ซึ่งมีอิมัลซิฟายเออร์ (Tween 80 และ โซเดียม-แคซิเนต) เข้มข้นร้อยละ 0.5-5.0 โดยน้ำหนักอิมัลชันเชิงซ้อน กวนของผสมอย่างสม่ำเสมอ นาน 5 นาที นำของผสมดังกล่าวมาปั่นผสมโดยใช้เครื่องไฮโมจิไนซ์แบบมือถือที่ความเร็ว 13,500 รอบต่อนาที นาน 2 นาที หลังจากนั้นนำมาผ่านเครื่องไฮโมจิไนซ์ความดันสูงหนึ่งรอบที่ความดัน 3000 psi (1st stage 300 psi และ 2nd stage 2,700 psi) เก็บอิมัลชันไว้ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง ตรวจสอบความคงตัวต่อการแยกชั้น วัดค่าความขุ่น การกระจายตัวและขนาดอนุภาคของหยดน้ำมัน และโครงสร้างระดับจุลภาค

2.2 ผลของปริมาณอิมัลชันเชิงเดี่ยวชนิดเอทานอลในน้ำมันต่อความคงตัวของอิมัลชันเชิงซ้อนชนิดเอทานอลในน้ำมันในน้ำ

ผสมอิมัลชันเชิงเดี่ยวเอทานอลในน้ำมันปริมาณร้อยละ 2.5-25.0 โดยน้ำหนักกับ สารละลาย โซเดียมแคซิเนตเข้มข้นร้อยละ 2.0 โดยน้ำหนัก ปริมาณร้อยละ 75.0-97.5 โดยน้ำหนัก กวนอย่างสม่ำเสมอ นาน 5 นาที นำของผสมดังกล่าวมาปั่นผสมโดยใช้เครื่องไฮโมจิไนซ์แบบมือถือที่ความเร็ว 13,500 รอบต่อนาที นาน 2 นาที หลังจากนั้นนำมาผ่านเครื่องไฮโมจิไนซ์ความดันสูงหนึ่งรอบที่ความดัน 3,000 psi (1st stage 300 psi และ 2nd stage 2,700 psi) เก็บอิมัลชันไว้ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง ตรวจสอบความคงตัวต่อการแยกชั้น วัดค่าความขุ่น การกระจายตัวและขนาดอนุภาคของหยดน้ำมัน และวิเคราะห์โครงสร้างระดับจุลภาค

2.3 ผลของสารสกัดบัวบกต่อความคงตัวของอิมัลชันเชิงซ้อนเอทานอลในน้ำมันในน้ำ

เพื่อศึกษาผลของสารสกัดบัวบกต่อความคงตัวของอิมัลชัน ทำการละลายสารสกัดบัวบกผง (ภาคผนวก ก) กับเอทานอลให้มีความเข้มข้นร้อยละ 5.0 โดยน้ำหนัก จากนั้นนำสารละลายสารสกัดปริมาณร้อยละ 10 โดยน้ำหนัก ผสมกับน้ำมันร้อยละ 90 โดยน้ำหนัก ที่มี PGPR เข้มข้นร้อยละ 2.0 โดยน้ำหนักอิมัลชัน นำของผสมมาทวนอย่างสม่ำเสมอ 5 นาที แล้วนำมาปั่นผสมโดยใช้เครื่องโฮโมจิไนซ์แบบมือถือที่ความเร็ว 13,500 รอบต่อนาที นาน 2 นาที หลังจากนั้นนำมาผ่านเครื่องโฮโมจิไนซ์ความดันสูงหนึ่งรอบที่ความดัน 3000 psi (1st stage 300 psi และ 2nd stage 2,700 psi) แล้วนำอิมัลชันเชิงเดี่ยวเอทานอลในน้ำมันดังกล่าว ปริมาตรร้อยละ 5.0 โดยน้ำหนัก ผสมกับสารละลายโซเดียมแคซิเนต (ร้อยละ 2.0 โดยน้ำหนัก) ปริมาตรร้อยละ 95.0 โดยน้ำหนัก ทวนอย่างสม่ำเสมอ 5 นาที นำของผสมดังกล่าวมาปั่นผสมโดยใช้เครื่องโฮโมจิไนซ์แบบมือถือที่ความเร็ว 13,500 รอบต่อนาที นาน 2 นาที หลังจากนั้นนำมาผ่านเครื่องโฮโมจิไนซ์ความดันสูงหนึ่งรอบที่ความดัน 3000 psi (1st stage 300 psi และ 2nd stage 2,700 psi) เก็บอิมัลชันไว้ในตู้ความดันสูง 25 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง ตรวจสอบความคงตัวต่อการแยกชั้น ขนาดอนุภาคของหยดเอทานอลในน้ำมัน วิเคราะห์โครงสร้างระดับจุลภาค และประสิทธิภาพการห่อหุ้ม

3. ผลของสภาวะแวดล้อมต่อความคงตัวของอิมัลชันชนิดเอทานอลในน้ำมันในน้ำ

3.1 ผลของการให้ความร้อน

นำอิมัลชันเชิงซ้อนเอทานอลในน้ำมันในน้ำที่มีปริมาณอิมัลชันเชิงเดี่ยวเอทานอลในน้ำมัน (เอทานอลร้อยละ 10 และ PGPR ร้อยละ 2.0) ร้อยละ 5.0 โดยน้ำหนัก ในสภาวะที่มีและไม่มีสารสกัดบัวบก (ร้อยละ 5.0 โดยน้ำหนัก) โดยใช้โซเดียมแคซิเนตร้อยละ 2.0 โดยน้ำหนัก เป็นอิมัลซิฟายเออร์ ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลองขนาด 16×160 มิลลิเมตร แล้วนำไปให้ความร้อนโดยการแช่ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 30, 45, 60, 75 และ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที หลังจากนั้นนำมาทำให้เย็นทันทีด้วยน้ำเย็น นาน 10 นาที เก็บตัวอย่างไว้ในตู้ควบคุมอุณหภูมิที่ 25 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง ก่อนนำไปตรวจสอบความคงตัวต่อการแยกชั้น วัดการกระจายตัวและขนาดอนุภาคของหยदन้ำมัน และวิเคราะห์โครงสร้างระดับจุลภาค

3.2 ผลของการแช่แข็ง

นำอิมัลชันเชิงซ้อนเอทานอลในน้ำมันในน้ำที่มีปริมาณอิมัลชันเชิงเดี่ยวเอทานอลในน้ำมัน (เอทานอลร้อยละ 10 และ PGPR ร้อยละ 2.0) ร้อยละ 5.0 โดยน้ำหนัก ในสถานะที่มีและไม่มี สารสกัดบวบก (ร้อยละ 5.0 โดยน้ำหนัก) โดยใช้โซเดียมแคซิเนตร้อยละ 2 โดยน้ำหนัก เป็น อิมัลซิฟายเออร์ ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลองพลาสติกขนาด 16×100 มิลลิเมตร นำไปแช่แข็งที่อุณหภูมิ -18 องศาเซลเซียส นาน 22 ชั่วโมง จากนั้นนำมาทำการละลายที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง (1 รอบการแช่แข็งและการทำละลาย) ทำการวิเคราะห์ตัวอย่าง ในรอบที่ 2 และ 3 เหมือนการทดลองก่อนหน้านี้ จากนั้นเก็บตัวอย่างในตู้ควบคุมอุณหภูมิที่ 25 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง ก่อนนำไปตรวจสอบความคงตัวต่อการแยกชั้น วัดการกระจายตัวและขนาดอนุภาคของหยดน้ำมัน และวิเคราะห์โครงสร้างระดับจุลภาค

3.3 ผลของการปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง (พีเอช)

นำอิมัลชันเชิงซ้อนเอทานอลในน้ำมันในน้ำที่มีปริมาณอิมัลชันเชิงเดี่ยวเอทานอลในน้ำมัน (เอทานอลร้อยละ 10 และ PGPR ร้อยละ 2.0) ร้อยละ 5.0 โดยน้ำหนัก ในสถานะที่มีและไม่มี สารสกัดบวบก (ร้อยละ 5.0 โดยน้ำหนัก) โดยใช้โซเดียมแคซิเนตร้อยละ 2 โดยน้ำหนัก เป็น อิมัลซิฟายเออร์ มาทำการปรับค่าพีเอชโดยการเติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ และ/หรือ สารละลายกรดไฮโดรคลอริกที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ (0.1-1.0 โมลาร์) ปริมาตรของสารละลาย โซเดียมไฮดรอกไซด์ และ/หรือ สารละลายกรดไฮโดรคลอริกที่ใช้ไม่เกิน 1 มิลลิลิตร เพื่อให้ อิมัลชันมีค่าพีเอชเท่ากับ 3, 4, 5, 6, 7 และ 8 หลังจากนั้นนำอิมัลชันดังกล่าวปริมาตร 10 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลองขนาด 16×160 มิลลิเมตร แล้วเก็บตัวอย่างในตู้ควบคุมอุณหภูมิที่ 25 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง ก่อนนำไปตรวจสอบความคงตัวต่อการแยกชั้น วัดการกระจายตัว และขนาดอนุภาคของหยดน้ำมัน และวิเคราะห์โครงสร้างระดับจุลภาค

3.4 ผลของการเติมสารละลายโซเดียมคลอไรด์

นำอิมัลชันเชิงซ้อนเอทานอลในน้ำมันในน้ำที่มีปริมาณอิมัลชันเชิงเดี่ยวเอทานอลในน้ำมัน (เอทานอลร้อยละ 10 และ PGPR ร้อยละ 2.0) ร้อยละ 5.0 โดยน้ำหนัก ในสถานะที่มีและไม่มี สารสกัดบวบก (ร้อยละ 5.0 โดยน้ำหนัก) โดยใช้โซเดียมแคซิเนตร้อยละ 2 โดยน้ำหนัก เป็น

อิมัลซิฟายเออร์ มาเติมสารละลายโซเดียมคลอไรด์ ให้มีความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์เท่ากับ 0, 50, 100, 200 และ 500 มิลลิโมลาร์ โดยหลังจากเติมสารละลายโซเดียมคลอไรด์ กวนของผสมอย่างสม่ำเสมอ 5 นาที แล้วนำอิมัลชันปริมาตร 10 มิลลิลิตรใส่ในหลอดทดลองขนาด 16×160 มิลลิเมตร เก็บตัวอย่างไว้ในตู้ควบคุมอุณหภูมิที่ 25 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง ก่อนนำไปตรวจสอบความคงตัวต่อการแยกชั้น วัดการกระจายตัวและขนาดอนุภาคของหยดน้ำมัน และวิเคราะห์โครงสร้างระดับจุลภาค

4. วิธีการวัดและวิเคราะห์คุณสมบัติต่างๆ

4.1 ขนาดและการกระจายตัวของอนุภาคอิมัลชัน

ตรวจวัดขนาดและการกระจายตัวของอนุภาคอิมัลชัน โดยดัดแปลงจากวิธีการของ Surh *et al.* (2007) ทำการวัดขนาดของอิมัลชันด้วยเครื่องวัดขนาดอนุภาค (Zetasizer Nano-ZS Instruments) โดยทำการเจือจางอิมัลชันที่ระดับ 10 เท่า ด้วยตัวกลางของการกระจาย โดยสำหรับอิมัลชันเชิงเดี่ยวใช้ mineral oil และสำหรับอิมัลชันเชิงซ้อนใช้น้ำกลั่น ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกันด้วยเครื่องผสมสารที่ความเร็ว 200-3,000 รอบต่อนาที นาน 20 วินาที จากนั้นใส่ตัวอย่างอิมัลชันที่เจือจางแล้วปริมาตร 1.25 มิลลิลิตร ลงใน DTS-0012 disposable sizing cuvette ทำการวัดที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส โดยวิเคราะห์หาขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางเฉลี่ยของขนาดอนุภาคโดยใช้หลักการกระเจิงของแสงแบบพลวัต (dynamic light scattering) คำนวณโดยใช้สมการสโตกส์และไอสไตน์ (Stokes-Einstein equation) ขนาดอนุภาคมีความสัมพันธ์กับความเร็วในการเคลื่อนที่แบบบราวน์-เนียน (Brownian motion) รายงานเป็นค่าเฉลี่ยของเส้นผ่าศูนย์กลางที่ยึดตาม Cumulants mean หรือเรียกว่า Z-average (Malvern Instruments, 2004)

4.2 โครงสร้างระดับจุลภาคของอิมัลชัน

นำตัวอย่างอิมัลชันเชิงเดี่ยวชนิดเอทานอลในน้ำมัน 1 มิลลิลิตร มาผสมกับสีย้อมคริสตัลไวโอเลตปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร (ร้อยละ 0.01 ในเอทานอล) เขย่าผสมให้เข้ากัน ทำการตรวจสอบโครงสร้างระดับจุลภาคของอิมัลชัน โดยนำอิมัลชันที่ได้ย้อมสีแล้วมาเจือจาง 200 เท่า ส่วนอิมัลชันเชิงซ้อนชนิดเอทานอลในน้ำมันในน้ำไม่ได้ทำการเจือจาง จากนั้นหยดอิมัลชันลงบนแผ่นสไลด์และปิดทับด้วยแผ่นกระจก (cover glass) แล้วส่องดูโครงสร้างของอิมัลชันโดยใช้

กล้องจุลทรรศน์แบบแสงส่องผ่าน (light optical microscope) (Axiolab[®], Carl Zeiss Ple Ltd, Germany) โดยใช้เลนส์วัตถุที่กำลังขยาย 10× และ 40× เพื่อทำการปรับความเข้มของแสงให้ได้ภาพที่คมชัด และทำการบันทึกภาพด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป Image-Pro Plus version 6.0

4.3 ความขุ่นของอิมัลชัน

คู่อิมัลชันบริเวณส่วนล่าง (~ 1 เซนติเมตร จากก้นหลอด) จากอิมัลชันในหลอดทดลอง (~ 6.7 เซนติเมตร) มาเจือจาง 200 เท่าด้วยตัวกลางของการกระจาย โดยสำหรับอิมัลชันเชิงเดี่ยวใช้ mineral oil และสำหรับอิมัลชันเชิงซ้อนใช้น้ำกลั่น ทำการวัดโดยการใส่ตัวอย่างอิมัลชันที่เจือจางแล้วปริมาตร 1.25 มิลลิลิตร ลงใน cuvette นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงของอนุภาคกระจายด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (Spectrophotometer) ที่ความยาวคลื่น 500 นาโนเมตร บันทึกค่าดูดกลืนแสง และคำนวณค่าความขุ่น (เซนติเมตร⁻¹) โดยดัดแปลงจากวิธีของ Pearce and Kinsella (1978) จากสูตร $T = 2.303A$ โดยที่ T คือ ค่าความขุ่น และ A คือ ค่าการดูดกลืนแสง

4.4 ความหนืดของอิมัลชัน

วัดความหนืดของตัวอย่างอิมัลชันด้วยเครื่องรีโอมิเตอร์ชนิดหมุน (rotational rheometer; Physica MCR 301, Anton Paar) การเปลี่ยนความเร็วของการหมุน (spindle rotational speed) หมายถึงการเพิ่มอัตราการเฉือน (shear rate) ซึ่งจะมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของความหนืด นำตัวอย่างอิมัลชันปริมาตร 20 มิลลิลิตร ใส่ลงในกระบอกวัดแบบเดี่ยว (single gap-measuring cylinder : CC27) ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของ cup และ bob เท่ากับ 28.92 และ 26.66 มิลลิเมตร ตามลำดับ ทำการวัดโดยเพิ่มอัตราการเฉือน (shear rate) 2-150 วินาที⁻¹ ควบคุมอุณหภูมิระหว่างการวัดที่ 25 ± 0.3 องศาเซลเซียส สังเกตและบันทึกค่าความหนืด

4.5 ประสิทธิภาพการห่อหุ้ม

หาประสิทธิภาพในการห่อหุ้มโดยดัดแปลงจากวิธีการของ Surh *et al.* (2007) โดยการนำอิมัลชันเชิงซ้อนที่เติมสารสกัดบัวบกที่ความเข้มข้นร้อยละ 5.0 โดยน้ำหนักมาเหวี่ยงแยกด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยง (Refrigerate centrifuge, Sorvall RC 5C Plus Superspeed Centrifuge) ที่ความเร็วรอบ 14,000 รอบต่อนาทีนาน 30 นาที นำส่วนของสารละลายมาปรับค่าพีเอชให้ได้ประมาณ 4 แล้ว

กรองผ่านแผ่นกรอง (membrane disk) เส้นผ่าศูนย์กลาง 0.45 ไมโครเมตร เพื่อให้ได้สารละลายใส จากนั้นดูดสารละลายใสปริมาตรประมาณ 1.25 มิลลิลิตร ใส่ลงใน cuvette นำไปวัดการดูดกลืนแสง ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (Spectrophotometer) ที่ความยาวคลื่น 330 นาโนเมตร เพื่อหาปริมาณสารสกัดบวบกในส่วนเฟสน้ำชั้นนอกของอิมัลชัน โดยปริมาณของสารสกัดบวบกหาได้จากกราฟมาตรฐาน (ภาคผนวก ข) รายงานประสิทธิภาพการห่อหุ้ม โดยคำนวณค่าร้อยละผลได้ (% Yield) จากสูตร

$$\% \text{ Yield} = 100 \times [1 - [(C_e/C_i - C_e) \times (1 - \phi_{\text{EOW}}) / (\phi_{\text{EO}} \phi_{\text{EOW}})]]$$

โดย C_i คือ ความเข้มข้นของสารสกัดบวบกส่วนเฟสใน (internal aqueous phase), C_e คือ ความเข้มข้นของสารสกัดบวบกส่วนเฟสนอก (external aqueous phase), ϕ_{EO} คือ ร้อยละสัดส่วนโดยปริมาตรของเอทานอลในส่วนอิมัลชันชนิดเอทานอลในน้ำมัน และ ϕ_{EOW} คือ ร้อยละสัดส่วนโดยปริมาตรของเอทานอลในน้ำมันในส่วนอิมัลชันชนิดเอทานอลในน้ำมันในน้ำ

5. การวางแผนการทดลองและการวิเคราะห์ทางสถิติ

การวิเคราะห์ทางสถิติจากการวางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized design, CRD) ทำการวิเคราะห์ความแปรปรวนของผลการทดลองโดยใช้ ANOVA (Analysis of variance) และเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของข้อมูลโดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SPSS version 12

ผลและวิจารณ์

1. ผลของชนิดและความเข้มข้นของอิมัลซิฟายเออร์ต่อความคงตัวและคุณสมบัติของอิมัลชันเชิงเดี่ยวเอทานอลในน้ำมัน (Ethanol-in-oil emulsion)

1.1 ผลของชนิดอิมัลซิฟายเออร์

จากทฤษฎีของ Bancroft (Bancroft's rule) ได้อธิบายการเกิดอิมัลชันไว้ว่า วัสดุภาคที่อิมัลซิฟายเออร์ละลายได้ดีจะทำหน้าที่เป็นวัสดุภาคต่อเนื่องในระบบอิมัลชัน โดยหากอิมัลซิฟายเออร์ละลายน้ำได้ดีกว่าน้ำมัน จะทำให้เกิดอิมัลชันชนิดน้ำมันในน้ำ ในทางตรงกันข้าม หากอิมัลซิฟายเออร์ละลายในน้ำมันได้ดีกว่าน้ำ จะทำให้เกิดอิมัลชันชนิดน้ำในน้ำมัน (McClements, 2005) การทดลองนี้ต้องการเตรียมอิมัลชันเอทานอลในน้ำมัน ดังนั้นอิมัลซิฟายเออร์ที่นำมาศึกษาจึงควรละลายในน้ำมันได้ดีกว่าน้ำ การทดลองนี้จึงศึกษาผลของชนิดอิมัลซิฟายเออร์ ได้แก่ เลซิทีน, Decaglycerol mono-oleate (DGMO) และ Polyglycerol polyricinoleate (PGPR) ซึ่งมีค่า HLB 7.0 12.9 และ 3.0 ตามลำดับ ต่อความคงตัวของอิมัลชันเชิงเดี่ยวเอทานอลในน้ำมัน ที่เตรียมโดยใช้ความเข้มข้นของเอทานอลร้อยละ 10 และอิมัลซิฟายเออร์ร้อยละ 1.0 โดยน้ำหนัก พบว่าอิมัลชันที่เตรียมโดยใช้ เลซิทีน ไม่มีความคงตัวต่อการแยกชั้นเมื่อเก็บไว้นาน 1 วัน ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ในขณะที่อิมัลชันที่เตรียมโดยใช้ DGMO และ PGPR เป็นอิมัลซิฟายเออร์นั้น อิมัลชันมีลักษณะเป็นของเหลวสีขาว คล้ายนม เป็นเนื้อเดียวกันมีความคงตัวไม่เกิดการแยกชั้น หลังจากเก็บที่สภาวะเดียวกัน (ภาพที่ 7) ถ้าพิจารณาตามหลักทฤษฎีของ Bancroft อิมัลซิฟายเออร์ที่มีค่า hydrophilic-lipophilic balance หรือ HLB ต่ำ (3-6) จะสามารถใช้เตรียมอิมัลชันน้ำในน้ำมัน หรือเอทานอลในน้ำมันที่มีความคงตัว ส่วนอิมัลซิฟายเออร์ที่มีค่า HLB สูง (8-18) จะสามารถใช้เตรียมอิมัลชันน้ำมันในน้ำที่มีความคงตัว สำหรับอิมัลซิฟายเออร์ที่ใช้ในการทดลองนี้ ข้อมูลจากตัวแทนจำหน่ายระบุว่า เลซิทีน มีค่า HLB ประมาณ 7 ซึ่งไม่สามารถทำให้อิมัลชันเอทานอลในน้ำมันคงตัวได้ แม้เลซิทีนจะสามารถละลายได้ในน้ำมัน ส่วน DGMO ที่มีค่า HLB ประมาณ 12.9 นั้น ผลการทดลองควรจะเป็นไปในทิศทางเดียวกันกับเลซิทีนคือ ไม่สามารถใช้เตรียมอิมัลชันเอทานอลในน้ำมันที่มีความคงตัวได้ แต่ผลการทดลองที่ได้กลับตรงกันข้าม อย่างไรก็ตาม ผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับงานวิจัยก่อนหน้านี้ ที่ศึกษาผลของเลซิทีนและ DGMO ต่อความคงตัวของอิมัลชันเอทานอลในน้ำมันซึ่งรายงานว่าการใช้เลซิทีนไม่สามารถเตรียมอิมัลชันเอทานอลในน้ำมันที่มีความคงตัวได้ โดยอิมัลชันจะแยกชั้นอย่างสมบูรณ์ภายใน 1 วัน แต่อิมัลชันที่เตรียมด้วย DGMO มีความคงตัว

นานกว่า 3 เดือนก่อนเกิดการแยกชั้นอย่างสมบูรณ์ (Xu *et al.*, 2001a) ซึ่งทฤษฎีของ Bancroft ไม่สามารถนำมาอธิบายกลไกของ DGMO ที่ทำให้อิมัลชันเอทานอลในน้ำมันคงตัวได้ ทั้งนี้เนื่องจาก DGMO ไม่มีคุณสมบัติในการลดแรงตึงผิวระหว่างเอทานอลกับน้ำมัน แต่ DGMO จะเกิดการจับตัวกัน (aggregate) เป็นชั้นฟิล์มที่บริเวณผิวสัมผัส ซึ่งทำให้อิมัลชันมีความคงตัว และชะลอการรวมตัวกันของหยดเอทานอลได้ (Xu *et al.*, 2001b)

ส่วน PGPR ซึ่งเป็นอิมัลซิฟายเออร์ที่นิยมใช้เตรียมอิมัลชันน้ำในน้ำมันที่มีความคงตัว นั้น มีค่า HLB ประมาณ 3 และสามารถละลายได้ดีในน้ำมัน จึงสามารถเตรียมอิมัลชันเอทานอลในน้ำมันที่มีความคงตัวได้ตามทฤษฎีของ Bancroft อย่างไรก็ตาม กลไกการทำให้อิมัลชันเอทานอลในน้ำมันคงตัวของ PGPR ยังไม่มีการศึกษาอย่างชัดเจน แต่เนื่องจาก PGPR เป็นอิมัลซิฟายเออร์ชนิดที่ไม่มีประจุ และไม่มีคุณสมบัติการลดแรงตึงผิวระหว่างผิวสัมผัสของเอทานอลกับน้ำมันเช่นเดียวกับ DGMO (Klinkesorn and Raudant, 2010) จึงคาดว่า PGPR ทำให้อิมัลชันเอทานอลในน้ำมันคงตัวได้ด้วยกลไกเดียวกัน เมื่อพิจารณาอิมัลชันเอทานอลในน้ำมันที่เตรียมด้วย DGMO และ PGPR พบว่าอิมัลชันที่เตรียมด้วย DGMO มีลักษณะอิมัลชันที่ใสกว่าอิมัลชันที่เตรียมด้วย PGPR ซึ่งจากการวัดค่าความขุ่นของอิมัลชันทั้งสองพบว่า อิมัลชันที่เตรียมด้วย DGMO และ PGPR มีค่าความขุ่นเท่ากับ 43.6 และ 313.6 ตามลำดับ จากทฤษฎีของ Mie (Mie's theory) สำหรับการกระเจิงแสงของอนุภาคตัวถูกกระจายทรงกลม (dispersed spherical particle) กล่าวว่าพื้นที่บริเวณผิวสัมผัส (interfacial area) ของอิมัลชันมีค่าเป็นสองเท่าของค่าความขุ่น (Pearce and Kinsella, 1978) ด้วยเหตุนี้ อิมัลชันที่ทำให้คงตัวด้วย PGPR ที่มีค่าความขุ่นสูงกว่าจึงมีพื้นที่ผิวสัมผัสมากกว่าอิมัลชันที่เตรียมด้วย DGMO ด้วย และเนื่องจากความคงตัวของอิมัลชันมีความสัมพันธ์กับพื้นที่ผิวสัมผัส ดังนั้นจึงกล่าวได้ว่าอิมัลชันที่เตรียมด้วย PGPR มีความคงตัวมากกว่าอิมัลชันที่เตรียมด้วย DGMO นอกจากนี้จากการศึกษาผลของระดับการเกิดโพลีเมอร์ (degree of polymerization) ในโมเลกุลของอิมัลซิฟายเออร์ต่อความคงตัวของอิมัลชันเอทานอลในน้ำมัน พบว่าอิมัลซิฟายเออร์ที่มีระดับการเกิดโพลีเมอร์สูงสามารถทำให้อิมัลชันมีความคงตัวได้ดีกว่าจากการสร้างผิวสัมผัสที่มีความหนาและแข็งแรงกว่าอิมัลซิฟายเออร์ที่มีระดับการเกิดโพลีเมอร์ต่ำ (Xu *et al.*, 2002) ซึ่งจากโครงสร้างโมเลกุลของ PGPR มีขนาดใหญ่กว่า DGMO ดังนั้นอิมัลชันเอทานอลในน้ำมันที่เตรียมด้วย PGPR จึงน่าจะมี ความคงตัวมากกว่าเมื่อเวลาผ่านไป

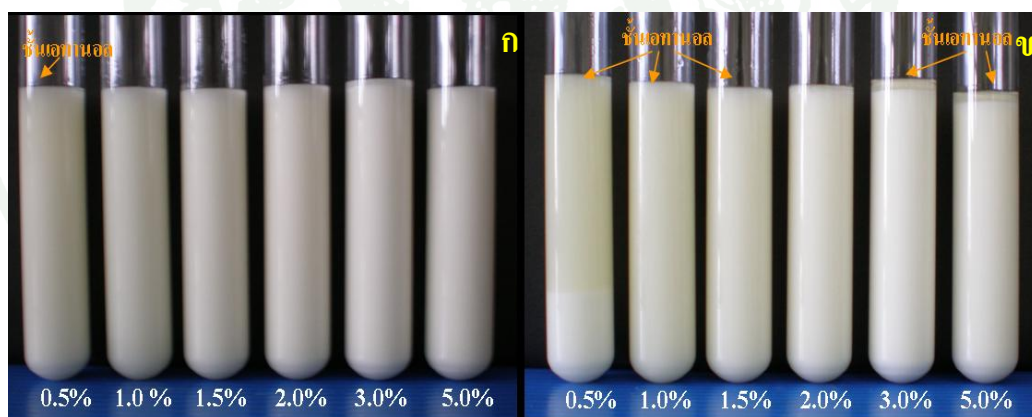


ภาพที่ 7 อิมัลชันเอทานอลในน้ำมันที่ทำให้คงตัวด้วยเลซิthin (lecithin) Decaglycerol mono-oleate (DGMO) และ Polyglycerol polyricinoleate (PGPR) ที่ความเข้มข้นร้อยละ 1.0 โดยน้ำหนักหลังจากเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 วัน

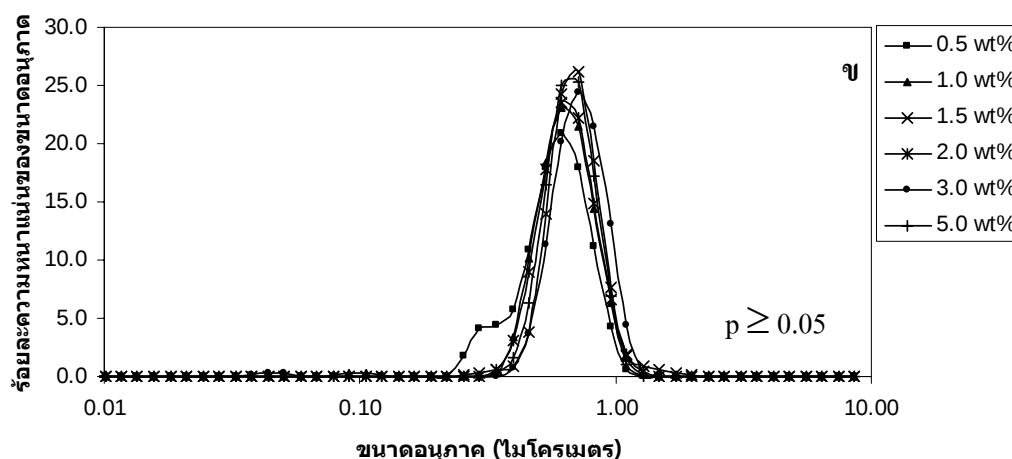
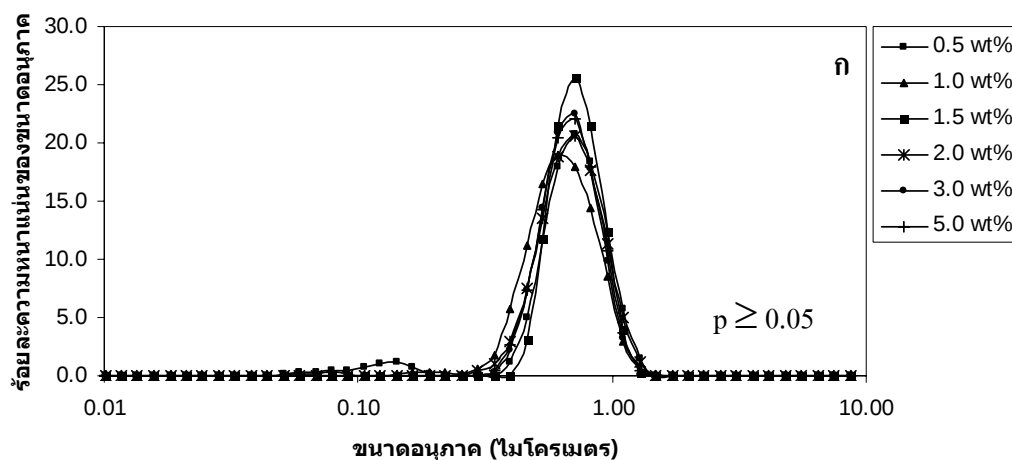
1.2 ผลของความเข้มข้นอิมัลซิฟายเออร์

จากผลการทดลองข้างต้นได้เลือก PGPR เป็นอิมัลซิฟายเออร์ที่ใช้เตรียมอิมัลชันเพื่อศึกษาผลของความเข้มข้นอิมัลซิฟายเออร์ต่อคุณสมบัติและความคงตัวของอิมัลชันเอทานอลในน้ำมัน โดยเตรียมอิมัลชันเอทานอลในน้ำมันที่มีความเข้มข้นของเอทานอลร้อยละ 10 และอิมัลซิฟายเออร์ร้อยละ 0.5 -5.0 โดยน้ำหนัก ทำการตรวจสอบความคงตัวต่อการแยกชั้น วัดขนาดและการกระจายตัวของอนุภาคเอทานอล และวิเคราะห์โครงสร้างระดับจุลภาคของอิมัลชันพบว่าอิมัลชันที่เตรียมโดยใช้ PGPR ที่ทุกความเข้มข้นมีความคงตัวต่อการแยกชั้นหลังจากเก็บไว้นาน 1 วัน ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ยกเว้นที่ความเข้มข้น PGPR ร้อยละ 0.5 โดยน้ำหนัก (ภาพที่ 8ก) สังเกตเห็นชั้นของเอทานอลบนผิวหน้าของอิมัลชัน ผลที่ได้สอดคล้องกับผลการวัดการกระจายตัวอนุภาคที่เป็นการกระจายตัวแบบ bimodal distribution (ภาพที่ 9) ทั้งนี้เนื่องจากที่ความเข้มข้นของ PGPR ระดับนี้ มีปริมาณของ PGPR ไม่เพียงพอที่จะหุ้มอนุภาคของเอทานอลไว้ได้อย่างสมบูรณ์ จึงส่งผลทำให้มีส่วนของอนุภาคเอทานอลบางส่วน สามารถที่จะเกิดการรวมตัวกันทำให้ขนาดของอนุภาคใหญ่ขึ้นและเคลื่อนที่มารวมตัวกันเป็นชั้นอยู่ด้านบนของอิมัลชันส่งผลให้อิมัลชันเสียความคงตัว (Su *et al.*, 2006) เมื่อเก็บอิมัลชันไว้นาน 7 วัน พบว่า อิมัลชันที่เตรียมด้วย PGPR ทุกความเข้มข้นไม่มีความคงตัว โดยสังเกตเห็นชั้นของเอทานอลบนผิวหน้าของอิมัลชัน

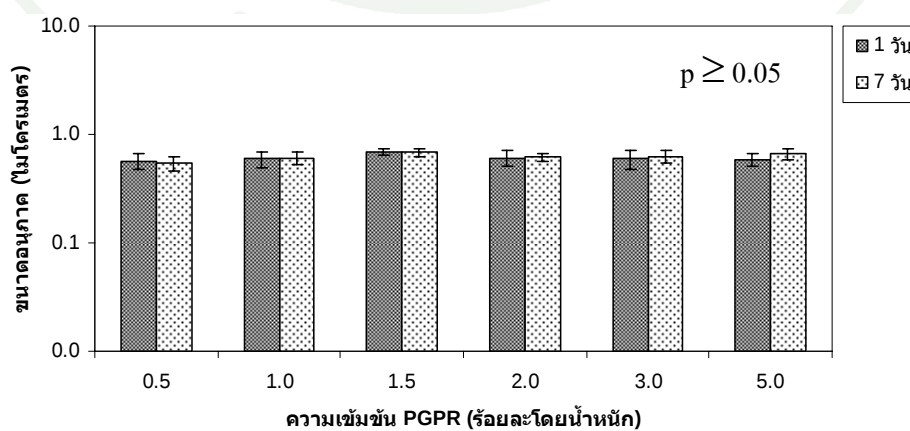
ยกเว้นที่ร้อยละ 2.0 โดยน้ำหนัก ความไม่คงตัวของอิมัลชันที่ความเข้มข้นน้อยกว่าร้อยละ 2.0 เมื่อเก็บนานขึ้น อาจเนื่องจากปริมาณอิมัลซิไฟเออร์ที่ไม่มากเพียงพอต่อการห่อหุ้มอนุภาคเอทานอล รวมทั้งความหนืดของอิมัลชันที่น้อยจึงไม่สามารถชะลอหรือยับยั้งการเคลื่อนที่มารวมตัวกันของอนุภาคเอทานอลได้ (Xu *et al.*, 2001a) ส่วนอิมัลชันที่เตรียมโดยใช้ PGPR ที่ความเข้มข้นมากกว่าร้อยละ 2.0 โดยน้ำหนัก อิมัลชันดังกล่าวไม่มีความคงตัวต่อการแยกชั้นเมื่อเก็บไว้นาน 7 วัน ทั้งนี้เนื่องจาก PGPR ซึ่งเป็นสารอิมัลซิไฟเออร์ชนิด amphiphilic molecule สามารถเกิดไมเซลล์ (micelles) และ liquid crystalline ได้จากกระบวนการ self-association ที่ความเข้มข้นสูง ซึ่งกระบวนการดังกล่าวจะส่งผลกระทบต่อคุณลักษณะของผิวสัมผัส และความคงตัวของอิมัลชัน ดังนั้นความไม่คงตัวของอิมัลชันที่ความเข้มข้นสูง (ร้อยละ 3-5 โดยน้ำหนัก) อาจจะเนื่องจาก polydispersity aggregates และการเกิด higher-ordered self-assembly (Xu *et al.*, 2001a) ซึ่งความไม่คงตัวดังกล่าวจะส่งผลกระทบต่อการกระจายตัวและขนาดอนุภาคเอทานอลในอิมัลชัน แต่จากผลการทดลองพบว่ารูปแบบการกระจายตัวและขนาดอนุภาคในอิมัลชัน (~ 0.6 ไมโครเมตร) ไม่มีการเปลี่ยนแปลงหลังเก็บไว้นาน 7 วัน ($p \leq 0.05$; ภาพที่ 9-10) เช่นเดียวกับลักษณะอนุภาคเอทานอล (อนุภาคสีม่วง) ที่สังเกตได้จากกล้องจุลทรรศน์ที่มีความสม่ำเสมอ และมีขนาดไม่เกิน 1 ไมโครเมตร (ภาพที่ 11)



ภาพที่ 8 อิมัลชันเอทานอลในน้ำมันที่ทำให้คงตัวด้วย PGPR ความเข้มข้นร้อยละ 0.5–5.0 โดยน้ำหนักหลังจากที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 วัน (ก) และ 7 วัน (ข)

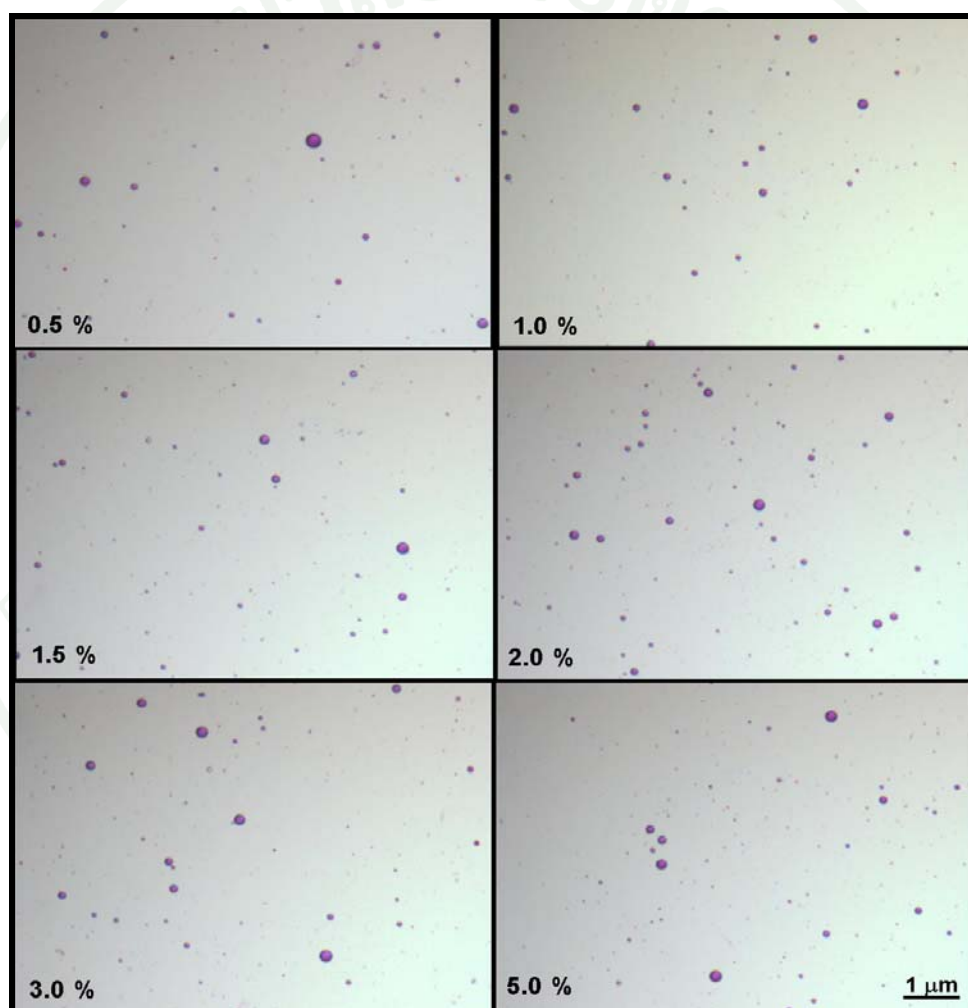


ภาพที่ 9 การกระจายตัวของอนุภาคในอิมัลชันเอทานอลในน้ำมันที่ทำให้คงตัวด้วย PGPR หลังจากการเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 วัน (ก) และ 7 วัน (ข)



ภาพที่ 10 ขนาดอนุภาคเอทานอลในอิมัลชันเอทานอลในน้ำมันที่ทำให้คงตัวด้วย PGPR หลังจากการเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 วันและ 7 วัน

ทั้งนี้อาจจะเนื่องจากในขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างเพื่อวัดขนาดอนุภาคมีการเจือจางตัวอย่างเพื่อลดปัญหาการเกิด multiple scattering ระหว่างการวัดค่า จึงอาจทำให้เอทานอลกลับมาเกิดเป็นอิมัลชันได้อีก ทั้งนี้เนื่องจากค่าแรงตึงผิวระหว่างเอทานอลกับน้ำมันมีค่าน้อย (น้อยกว่า 2.5 mN/m) การให้พลังงานเพียงเล็กน้อยก็สามารถทำให้เอทานอลแตกตัวเป็นหยดเล็กๆ แล้วเกิดเป็นอิมัลชันได้อีก (Xu *et al.*, 2001b) ด้วยเหตุนี้จึงทำให้ไม่เห็นความแตกต่างของขนาดอนุภาคเอทานอลที่วัดได้



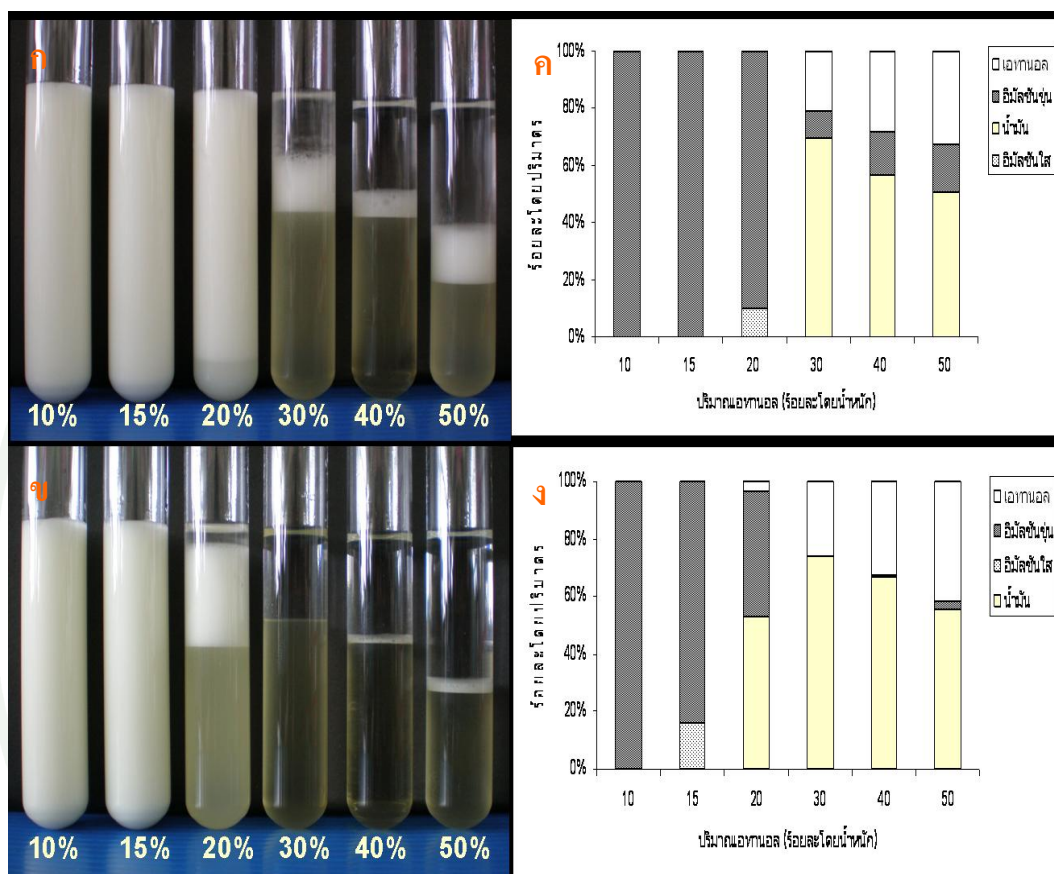
ภาพที่ 11 โครงสร้างระดับจุลภาคของอิมัลชันเอทานอลในน้ำมันที่ทำให้คงตัวด้วย PGPR ร้อยละ 0.5 – 5.0 โดยน้ำหนัก และเอทานอลร้อยละ 10 โดยน้ำหนัก หลังจากการเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 วัน หยดเอทานอล (ethanol droplet) แสดงเป็นสีม่วง

2. ผลของปริมาณเอทานอลต่อความคงตัวและคุณสมบัติของอิมัลชันเชิงเดี่ยวชนิดเอทานอลในน้ำมัน (Ethanol-in-oil emulsion)

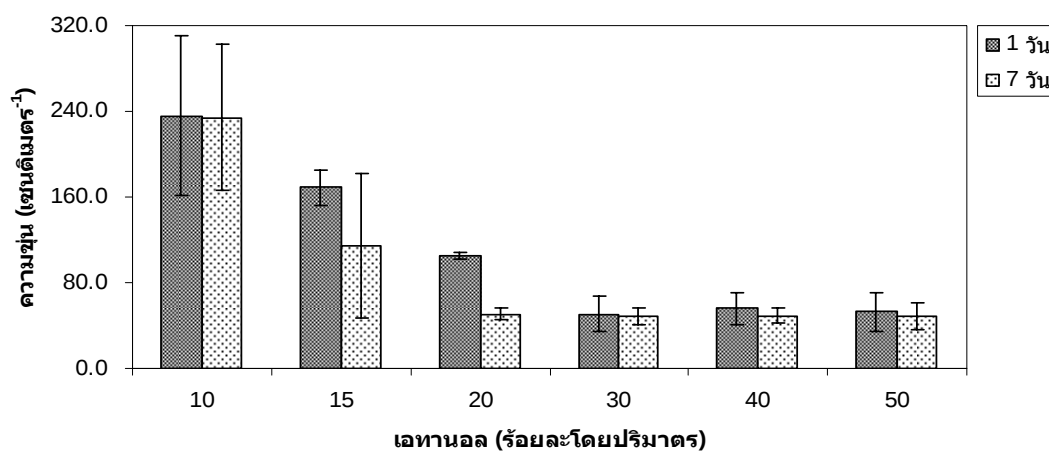
การทดลองนี้ศึกษาผลของปริมาณเอทานอล (ร้อยละ 10-50 โดยน้ำหนัก) ต่อความคงตัวของอิมัลชันเชิงเดี่ยวชนิดเอทานอลในน้ำมันโดยใช้ PGPR เข้มข้นร้อยละ 2.0 โดยน้ำหนักเป็นอิมัลซิฟายเออร์ ทำการสังเกตความคงตัวต่อการแยกชั้น วัดค่าความขุ่น และวิเคราะห์โครงสร้างระดับจุลภาคของอิมัลชัน ผลการทดลองพบว่า อิมัลชันที่เตรียมโดยใช้ปริมาณเอทานอลร้อยละ 10 และ 15 โดยน้ำหนัก มีความคงตัวต่อการแยกชั้นหลังเก็บตัวอย่างอิมัลชันดังกล่าวไว้ในอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส นาน 1 วัน ในขณะที่อิมัลชันที่เตรียมโดยใช้ปริมาณเอทานอลร้อยละ 20 โดยน้ำหนัก สังเกตเห็นลักษณะอิมัลชันในสับริเวณก้นหลอด ส่วนอิมัลชันที่เตรียมโดยใช้ปริมาณเอทานอลร้อยละ 30-50 โดยน้ำหนัก อิมัลชันเสียความคงตัวเกิดการแยกชั้นโดยมีเอทานอลแยกอยู่ด้านบนและน้ำมันอยู่ด้านล่าง (ภาพที่ 12ก) และเมื่อเก็บตัวอย่างอิมัลชันไว้นาน 7 วัน อิมัลชันดังกล่าวเกิดการแยกชั้นอย่างสมบูรณ์ (ภาพที่ 12ข) ส่วนอิมัลชันที่ใช้ปริมาณเอทานอลร้อยละ 10 โดยน้ำหนัก ยังคงมีความคงตัว ไม่เกิดการแยกชั้น ลักษณะปรากฏของอิมัลชันเป็นของเหลว สีขาวคล้ายนม ในขณะที่อิมัลชันที่เตรียมโดยใช้ปริมาณเอทานอลร้อยละ 15 โดยน้ำหนัก อิมัลชันเสียความคงตัวโดยสังเกตเห็นส่วนอิมัลชันในสับริเวณก้นหลอดร้อยละ 16.11 ของอิมัลชันทั้งหมด (ภาพที่ 12ง) ซึ่งผลการทดลองสอดคล้องกับผลการวัดค่าความขุ่น (ภาพที่ 13) ซึ่งค่าความขุ่นของอิมัลชันที่เตรียมโดยใช้เอทานอลร้อยละ 10 โดยน้ำหนัก ไม่เปลี่ยนแปลงหลังเก็บอิมัลชันไว้นาน 7 วัน ($p > 0.05$) ในทางตรงกันข้าม อิมัลชันที่เตรียมโดยใช้เอทานอลร้อยละ 20-50 โดยน้ำหนัก ความขุ่นมีค่าลดลง ($p \leq 0.05$) แสดงถึงความไม่คงตัวของอิมัลชัน (Pearce and Kinsella, 1978) ทำนองเดียวกันกับลักษณะอนุภาคของเอทานอลที่สังเกตจากกล้องจุลทรรศน์ ซึ่งมีขนาดอนุภาคใหญ่ขึ้นและไม่สม่ำเสมอเมื่อปริมาณเอทานอลเพิ่มขึ้น (ภาพที่ 14)

ความไม่คงตัวของอิมัลชันเอทานอลในน้ำมันที่ความเข้มข้นของเอทานอลร้อยละ 20-50 โดยน้ำหนัก อาจจะเนื่องจากหลายสาเหตุ ประการแรกเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของเอทานอลเป็นการเพิ่มปริมาณของตัวถูกระเจาในขณะที่ปริมาณอิมัลซิฟายเออร์มีค่าคงที่ ทำให้ปริมาณของอิมัลซิฟายเออร์ไม่เพียงพอที่จะหุ้มอนุภาคเอทานอลไว้ได้หมด จึงเกิดการรวมตัวกันของอนุภาคเอทานอลแล้วเกิดการแยกชั้นขึ้น ประการที่สองปริมาณเอทานอลที่เพิ่มขึ้นทำให้อิมัลซิฟายเออร์เกิด aggregate ได้น้อยลงทำให้ฟิล์มที่เกิดบริเวณผิวสัมผัสไม่แข็งแรงเพียงพอต่อการทำให้อิมัลชันคงตัว (Xu et al., 2001a) ประการสุดท้ายการเพิ่มปริมาณเอทานอลทำให้ความหนืดของวัตถุดิบต่อเนื่องมี

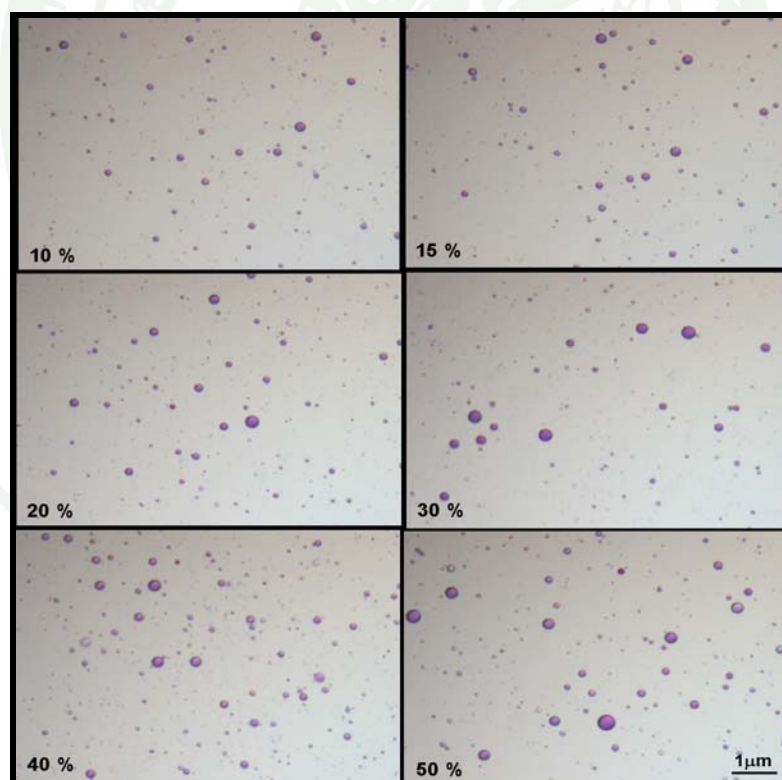
ค่าลดลง การชะลอหรือยับยั้งการเคลื่อนที่มารวมตัวกันของอนุภาคหยดน้ำมันทั้งระหว่างการไฮโดรจีไนซ์และการเก็บรักษาลดลง ส่งผลให้อิมัลชันไม่มีความคงตัว (Sun and Gunasekaran, 2009; Xu *et al.*, 2001a)



ภาพที่ 12 อิมัลชันเอทานอลในน้ำมันที่ทำให้คงตัวด้วย PGPR (ร้อยละ 2.0 โดยน้ำหนัก) และความเข้มข้นเอทานอลต่างๆ (ร้อยละ 10-50 โดยน้ำหนัก) หลังจากเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 วัน (ก และ ค) 7 วัน (ข และ ง)



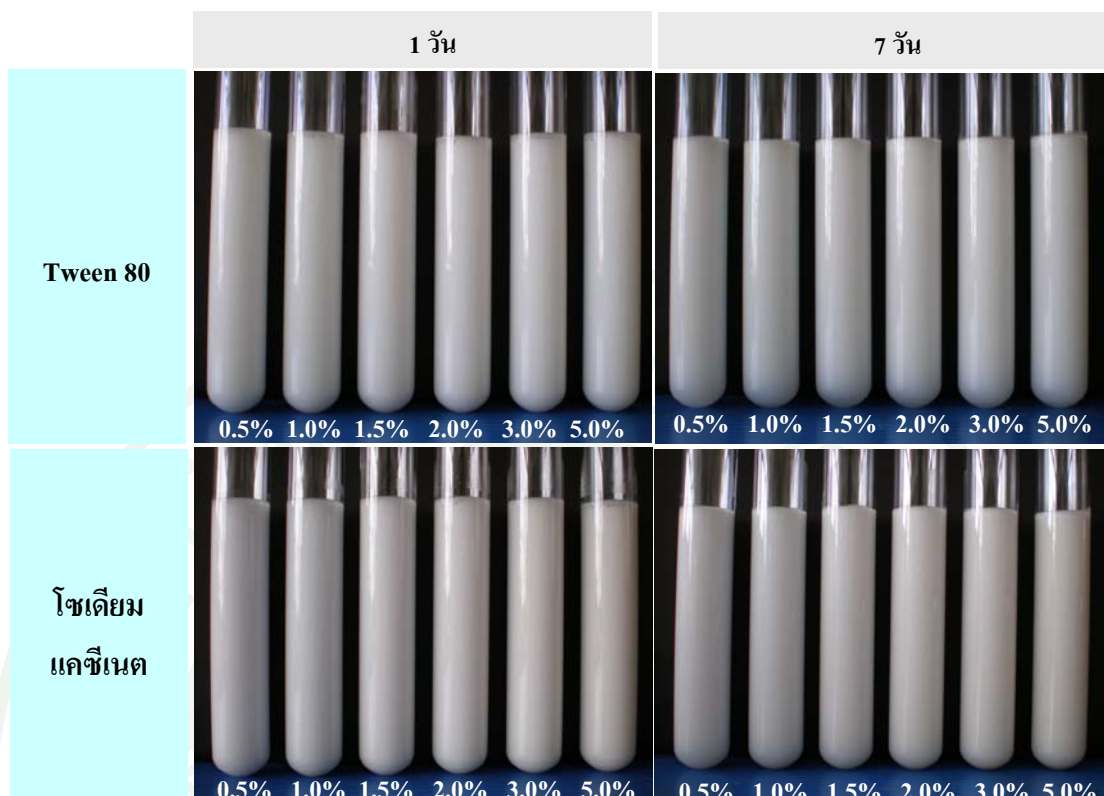
ภาพที่ 13 ค่าความขุ่นของอิมัลชันเอทานอลในน้ำมันที่ทำให้คงตัวด้วย PGPR (ร้อยละ 2.0 โดยน้ำหนัก) และความเข้มข้นเอทานอลต่าง ๆ (ร้อยละ 10-50 โดยน้ำหนัก) หลังจากการเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 วัน และ 7 วัน



ภาพที่ 14 โครงสร้างระดับจุลภาคของอิมัลชันเอทานอลในน้ำมันที่ทำให้คงตัวด้วย PGPR (ร้อยละ 2.0 โดยน้ำหนัก) และความเข้มข้นเอทานอลต่าง ๆ (ร้อยละ 10-50 โดยน้ำหนัก) หลังจากการเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 วัน

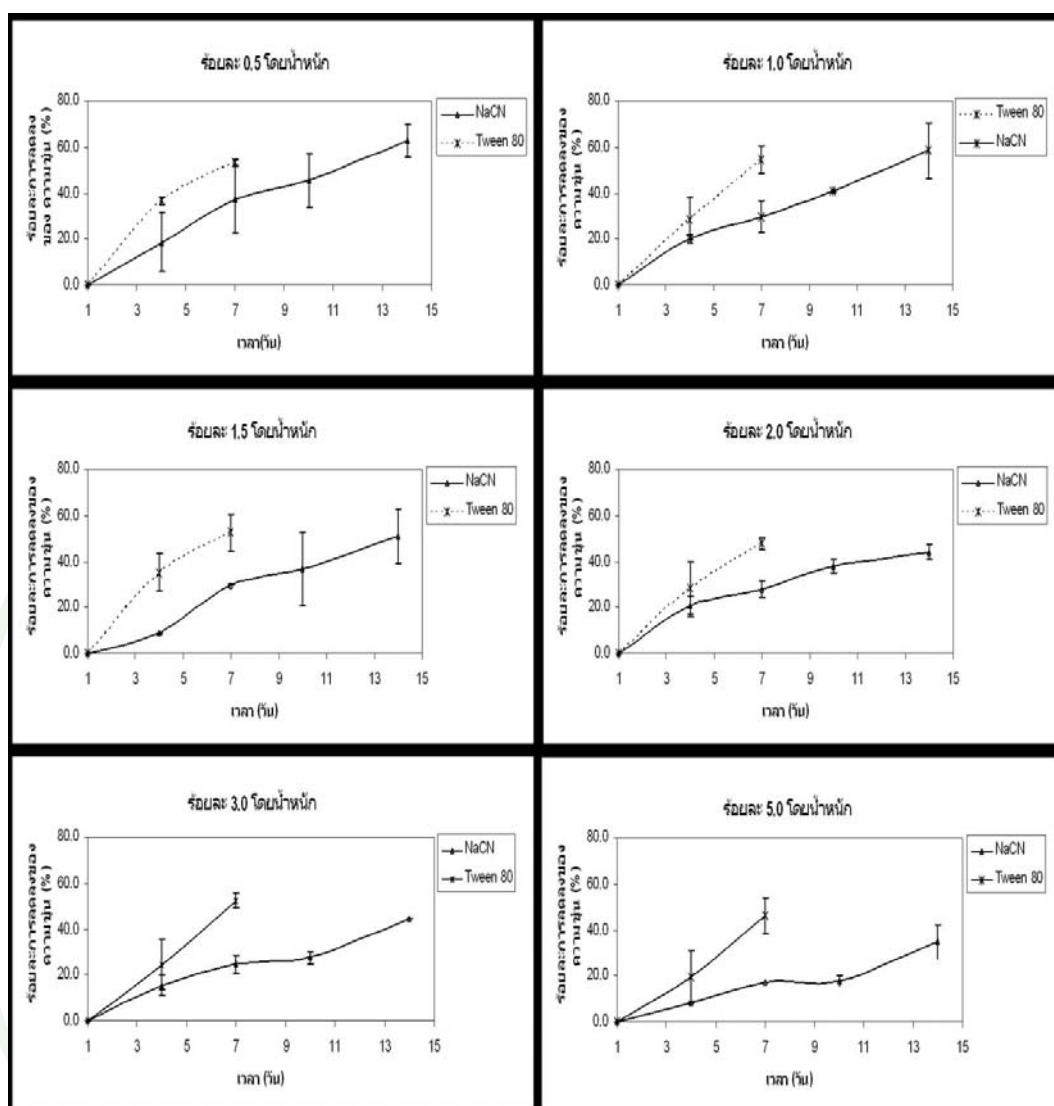
3. ผลของชนิดและความเข้มข้นของอิมัลซิฟายเออร์ต่อความคงตัวและคุณสมบัติของอิมัลชัน เชิงซ้อนชนิดเอทานอลในน้ำมันในน้ำ (Ethanol-in-oil-in-water emulsion)

การทดลองนี้ศึกษาผลของชนิดและความเข้มข้นของอิมัลซิฟายเออร์ต่อความคงตัวของอิมัลชันเชิงซ้อนโดยใช้อิมัลซิฟายเออร์สองชนิด ได้แก่ Polyoxyethylene sorbitan mono-oleate (Tween 80) และ โซเดียมแคซิเนต ที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 0.5-5.0 โดยน้ำหนัก เตรียมอิมัลชันเชิงซ้อนโดยใช้ความเข้มข้นของอิมัลชันเชิงเดี่ยวร้อยละ 2.5 โดยน้ำหนัก ตรวจสอบความคงตัวต่อการแยกชั้น วัดค่าความขุ่น ขนาดและการกระจายตัวของอนุภาค และวิเคราะห์โครงสร้างระดับจุลภาคของอิมัลชัน อิมัลชันที่เตรียมได้โดยใช้อิมัลซิฟายเออร์ทั้งสองชนิดที่ทุกระดับความเข้มข้นมีลักษณะ เป็นของเหลว สีขาว คล้ายนม มีความคงตัวไม่เกิดการแยกชั้นเมื่อเก็บไว้นาน 7 วัน (ภาพที่ 15) อย่างไรก็ตาม ระบบอิมัลชันมีการเปลี่ยนแปลงอยู่ตลอดเวลา และความคงตัวของอิมัลชันมีความสัมพันธ์กับค่าความขุ่น นั่นคืออิมัลชันที่มีความคงตัวค่าความขุ่นจะไม่เปลี่ยนแปลงตามเวลา (Pearce and Kinsella, 1978) ดังนั้นจึงวัดค่าความขุ่นของตัวอย่างอิมัลชันที่เวลาต่างๆ เพื่อใช้เป็นดัชนีบอกความคงตัวของอิมัลชันเชิงซ้อนเอทานอลในน้ำมันในน้ำ ผลการทดลอง พบว่าค่าความขุ่นของทุกตัวอย่างอิมัลชันมีค่าลดลง โดยอิมัลชันที่เตรียมจาก Tween 80 ที่ทุกระดับความเข้มข้น ค่าความขุ่นมีแนวโน้มลดลงมากกว่าอิมัลชันที่เตรียมจากโซเดียมแคซิเนตเมื่อเก็บอิมัลชันนาน 7 วัน ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส (ภาพที่ 16) ซึ่งแสดงว่าอิมัลชันที่เตรียมโดยใช้ Tween 80 เป็นอิมัลซิฟายเออร์เมื่อระยะเวลาผ่านไปจะเสถียรความคงตัวได้ง่ายกว่าอิมัลชันที่เตรียมโดยใช้โซเดียมแคซิเนต ทั้งนี้เนื่องจาก Tween 80 เป็นอิมัลซิฟายเออร์ที่มีโมเลกุลขนาดเล็ก หลังจากการเตรียมอิมัลชัน โมเลกุลอิมัลซิฟายเออร์จะถูกดูดซับที่ผิวสัมผัสและสร้างชั้นฟิล์มบริเวณผิวสัมผัสที่บางกว่าเมื่อเทียบกับโซเดียมแคซิเนตที่มีโมเลกุลขนาดใหญ่ ซึ่งสามารถสร้างชั้นฟิล์มผิวสัมผัสที่หนา โดยชั้นผิวสัมผัสที่หนาจะสามารถป้องกันการเกาะกลุ่ม หรือการรวมตัวของอนุภาคน้ำมันในอิมัลชันได้ดีกว่าชั้นผิวสัมผัสที่บาง เนื่องจากผิวสัมผัสที่หนาของโซเดียมแคซิเนตจะมี steric repulsion ระหว่างอนุภาคที่สูงกว่า นอกจากนี้ชั้นฟิล์มผิวสัมผัสที่สร้างโดยโซเดียมแคซิเนตยังมีคุณสมบัติเป็น visco-elastic film ซึ่งเมื่อถูกดูดซับบริเวณผิวสัมผัสแล้วจะหลุดออกได้ยาก จึงทำให้อิมัลชันมีความคงตัวต่อการเก็บรักษาที่ดีกว่า Tween 80 ซึ่งเป็นอิมัลซิฟายเออร์โมเลกุลขนาดเล็กที่ไม่สามารถสร้าง visco-elastic film รอบอนุภาคน้ำมันได้ (Bos and Vliet, 2001; McClements, 2005)



ภาพที่ 15 อิมัลชันเชิงซ้อนเอทานอลในน้ำมันในน้ำที่ทำให้คงตัวด้วย Tween 80 และ โซเดียมแคลซีเนต ที่ความเข้มข้นต่างๆ หลังจากเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็น เวลา 1 วัน และ 7 วัน

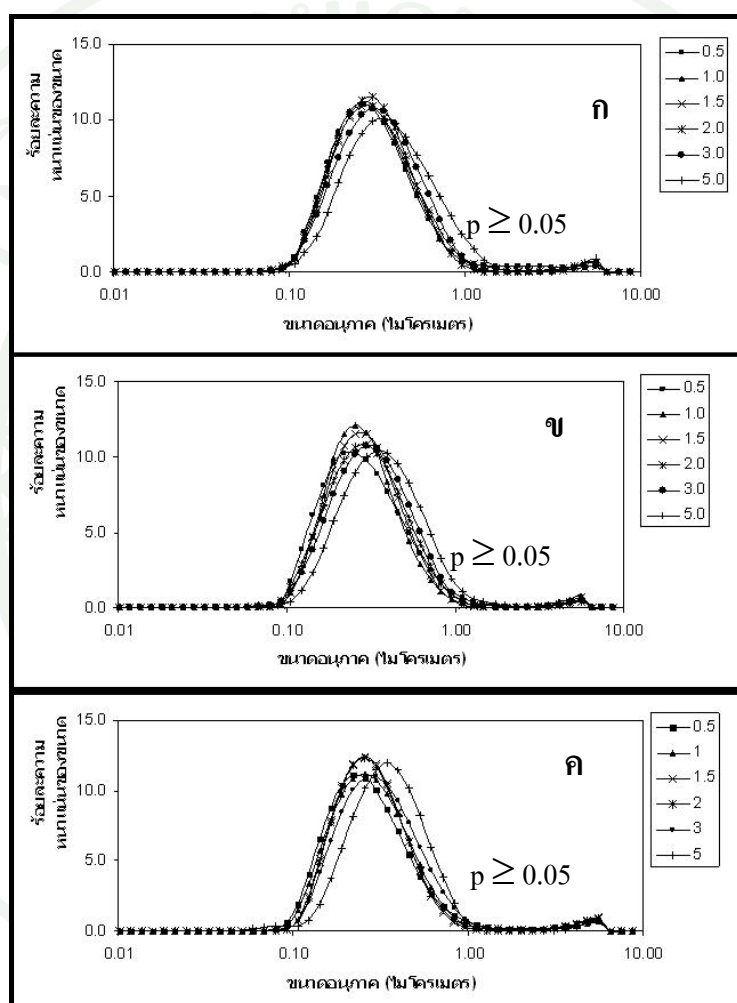
จากผลการทดลองข้างต้น จึงนำอิมัลชันเชิงซ้อนเอทานอลในน้ำมันในน้ำที่ทำให้คงตัวด้วย โซเดียมแคลซีเนต มาศึกษาผลของความเข้มข้นอิมัลซิฟายเออร์ (ร้อยละ 0.5-5.0 โดยน้ำหนัก) ต่อ ความคงตัวของอิมัลชันหลังเก็บนาน 14 วัน ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ผลการวัดค่าความขุ่น พบว่า ค่าความขุ่นในอิมัลชันที่เตรียมโดยใช้ความเข้มข้นโซเดียมแคลซีเนตต่ำจะลดลงเร็วกว่า อิมัลชันที่เตรียมด้วยโซเดียมแคลซีเนตความเข้มข้นสูง (ภาพที่ 16) นั่นคือ เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ โซเดียมแคลซีเนตอิมัลชันมีความคงตัวต่อการแยกชั้นมากขึ้น ทั้งนี้เนื่องจากเมื่อโปรตีนในอิมัลชันมี ความเข้มข้นมากขึ้นปริมาณโปรตีนที่ถูกดูดซับและปริมาณโปรตีนในวัฏภาคน้ำจะเพิ่มขึ้น ทำให้อิมัลชันมีความหนาแน่นเพิ่มขึ้น และวัฏภาคน้ำมีความหนืดเพิ่มขึ้น ทำให้อิมัลชันมีความ คงตัวต่อการแยกชั้นมากขึ้น (Sun and Gunasekaran, 2009)



ภาพที่ 16 ค่าความขุ่นที่ลดลงของอิมัลชันเอทานอลในน้ำมันในน้ำที่ทำให้คงตัวด้วย Tween 80 และ โซเดียมแคซิเนต ที่ความเข้มข้นต่างๆ หลังจากเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส นาน 7 และ 14 วัน

เมื่อพิจารณาการกระจายตัวของอนุภาคอิมัลชันชนิดเอทานอลในน้ำมันในน้ำที่เตรียมจาก โซเดียมแคซิเนต ที่ช่วงความเข้มข้นร้อยละ 0.5 – 5.0 โดยน้ำหนัก แสดงการกระจายตัวแบบ bimodal distribution แสดงถึงมีอนุภาคทั้งช่วงขนาดเล็กและใหญ่ในระบบเดียวกัน (ภาพที่ 17) โดย อิมัลชันที่เตรียมจากโซเดียมแคซิเนตร้อยละ 1.5-2.0 โดยน้ำหนักมีการกระจายตัวที่สม่ำเสมอว่า ความเข้มข้นอื่นๆ หลังเก็บอิมัลชันไว้นาน 14 วัน สำหรับขนาดอนุภาคน้ำมัน พบว่ามีแนวโน้มใหญ่ ขึ้นเมื่อเพิ่มความเข้มข้นโซเดียมแคซิเนตโดยเฉพาะที่ความเข้มข้นร้อยละ 5.0 โดยน้ำหนัก

(ตารางที่ 5) อย่างไรก็ตาม ขนาดอนุภาคน้ำมันในอิมัลชันที่ทุกความเข้มข้นโซเดียมแคซิเนตไม่เปลี่ยนแปลงหลังเก็บอิมัลชันนาน 14 วัน ($p > 0.05$) โดยมีอนุภาคเฉลี่ยประมาณ 0.3 ไมโครเมตร ซึ่งจากผลการวัดขนาดอนุภาคน้ำมันในอิมัลชัน สามารถสรุปได้ว่าค่าความขุ่นที่ลดลงในอิมัลชัน อาจจะเนื่องมาจากอนุภาคน้ำมันเกิดการเกาะกลุ่มกัน (flocculation) มากกว่าเกิดการรวมตัวกัน (coalescence) (McClements, 2005)



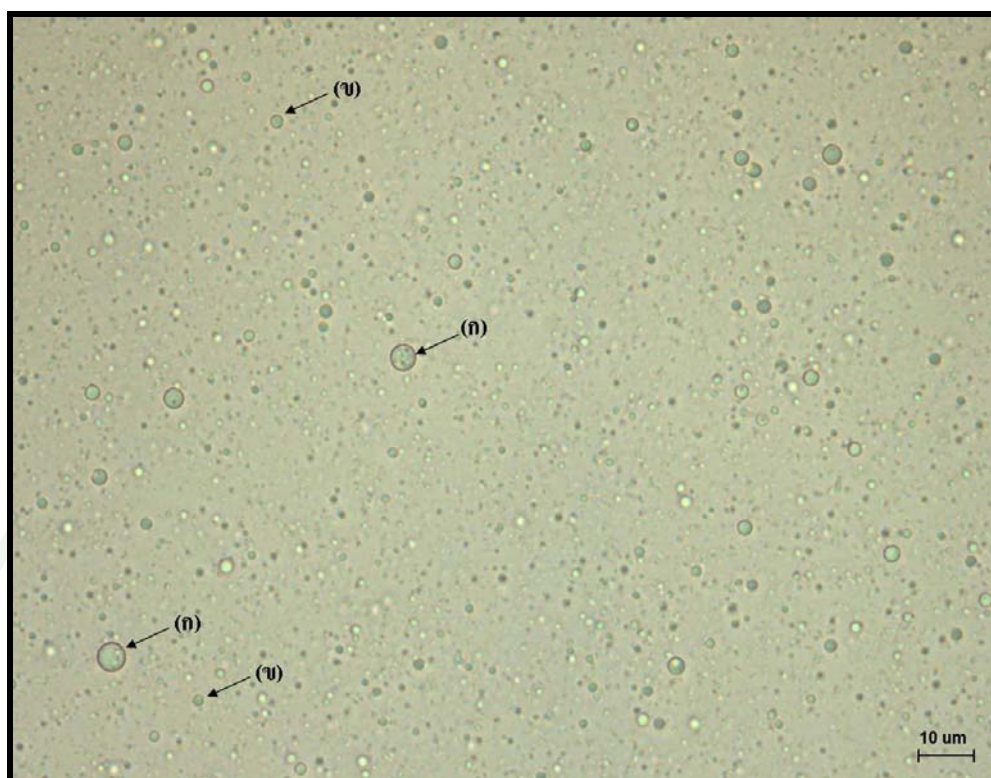
ภาพที่ 17 การกระจายตัวของอนุภาคในอิมัลชันเอทานอลในน้ำมันในน้ำที่ทำให้คงตัวด้วย โซเดียมแคซิเนตที่ความเข้มข้นต่างๆ หลังจากเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส นาน 1 วัน (ก), 7 วัน (ข) และ 14 วัน (ค)

ตารางที่ 5 ขนาดอนุภาคเฉลี่ยของอิมัลชันเชิงซ้อนเอทานอลในน้ำมันในน้ำที่เตรียมโดยใช้โซเดียมแคซิเนตความเข้มข้นต่างๆ

ความเข้มข้น (ร้อยละโดยน้ำหนัก)	ระยะเวลา (วัน)/ ขนาดอนุภาคเฉลี่ย (ไมโครเมตร)		
	1	7	14
0.5	0.27±0.00 ^{Ba}	0.26±0.00 ^{Aa}	0.25±0.00 ^{Aa}
1.0	0.27±0.00 ^{Ba}	0.27±0.00 ^{ABb}	0.26±0.00 ^{Ab}
1.5	0.28±0.01 ^{Aab}	0.27±0.00 ^{Ab}	0.26±0.00 ^{Ab}
2.0	0.28±0.01 ^{Bab}	0.27±0.00 ^{ABb}	0.27±0.00 ^{Ac}
3.0	0.29±0.01 ^{Ab}	0.29±0.01 ^{Ac}	0.28±0.00 ^{Ad}
5.0	0.33±0.04 ^{Ac}	0.33±0.00 ^{Ad}	0.32±0.00 ^{Ae}

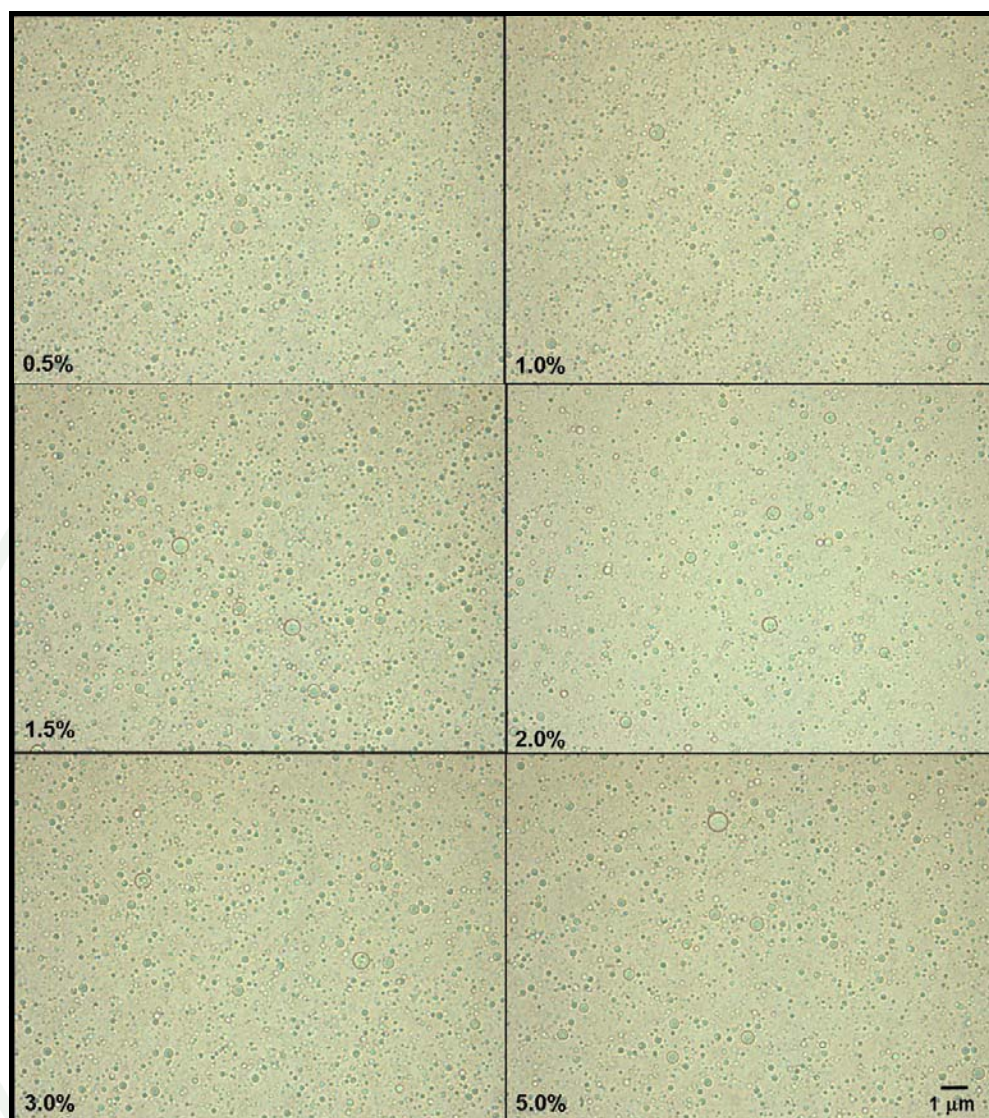
หมายเหตุ ตัวอักษร A-B หมายถึง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) ที่ระยะเวลาเดียวกัน (แนวนอน) เรียงตัวอักษรจากค่าน้อยไปมาก
ตัวอักษร a-d หมายถึง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) ที่ความเข้มข้นเดียวกัน (แนวตั้ง) เรียงตัวอักษรจากค่าน้อยไปมาก

ลักษณะโครงสร้างระดับจุลภาคของอิมัลชันชนิดเอทานอลในน้ำมันในน้ำ (ภาพที่ 18) สังเกตเห็นอนุภาคของเอทานอลในน้ำมันและอนุภาคน้ำมันกระจายตัวอยู่ในส่วนของวัฏภาคน้ำ ซึ่งแสดงถึงลักษณะของอิมัลชันเชิงซ้อนเอทานอลในน้ำมันในน้ำและอิมัลชันน้ำมันในน้ำ เมื่อสังเกตโครงสร้างและการกระจายตัวระดับจุลภาคของอิมัลชันเชิงซ้อนที่เตรียมโดยใช้โซเดียมแคซิเนตที่ความเข้มข้นต่างๆ (ร้อยละ 0.5 – 5.0 โดยน้ำหนัก) พบว่าที่ทุกความเข้มข้นมีลักษณะโครงสร้างและการกระจายตัวไม่แตกต่างกัน อนุภาคเอทานอล (สีม่วง) ขนาดเล็กกระจายตัวอยู่ในอนุภาคน้ำมันและอนุภาคน้ำมันกระจายตัวอยู่ในวัฏภาคต่อเนื่องของน้ำ (ภาพที่ 19) โดยมีขนาดอนุภาคเฉลี่ยไม่เกิน 1 ไมโครเมตร (ตารางที่ 5)



ภาพที่ 18 โครงสร้างระดับจุลภาคของอิมัลชันเชิงซ้อนเอทานอลในน้ำมันในน้ำ (ก);
อนุภาคเอทานอลในน้ำมัน (หยดเอทานอลสีม่วงขนาดเล็กกระจายตัวอยู่ในหยด
น้ำมันสีฟ้า), (ข); อนุภาคน้ำมัน (สีฟ้า)

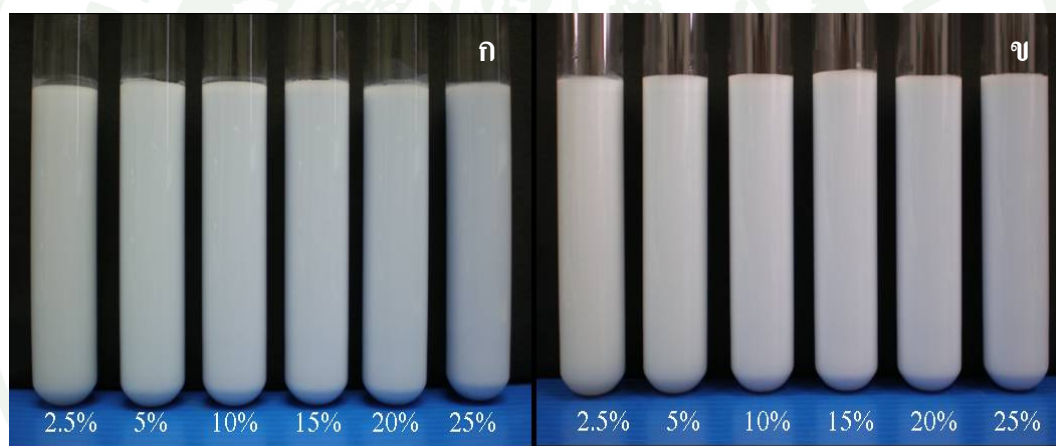
จากผลความคงตัวต่อการแยกชั้น (ภาพที่ 15) และการกระจายตัวของขนาดอนุภาค (ภาพที่ 17) ความเข้มข้นของโซเดียมแคซิเนตที่เหมาะสมสำหรับการเตรียมอิมัลชันเอทานอลในน้ำมันในน้ำสำหรับงานวิจัยนี้คือร้อยละ 2.0 โดยน้ำหนัก ซึ่งเป็นความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถเตรียมอิมัลชันที่มีความคงตัวที่ดี อย่างไรก็ตามเพื่อยืนยันผลว่าที่ระดับความเข้มข้นดังกล่าวโซเดียมแคซิเนตไม่มากเกินไป จึงได้ศึกษาผลของปริมาณอิมัลชันเชิงเดี่ยวต่อความคงตัวของอิมัลชัน เพื่อให้ได้ปริมาณอิมัลชันเชิงเดี่ยวที่เหมาะสมที่สามารถเตรียมอิมัลชันเชิงซ้อนที่มีความคงตัวโดยใช้โซเดียมแคซิเนตที่ระดับความเข้มข้นดังกล่าว



ภาพที่ 19 โครงสร้างระดับจุลภาคของอิมัลชันเอทานอลในน้ำมันในน้ำที่ทำให้ตัวด้วย โซเดียมแคซิเนตความเข้มข้นต่างๆ หลังจากเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 วัน

4. ผลของปริมาณอิมัลชันเชิงเดี่ยวชนิดเอทานอลในน้ำมันต่อความคงตัวและคุณสมบัติของอิมัลชันเชิงซ้อนชนิดเอทานอลในน้ำมันในน้ำ (Ethanol-in-oil-in-water emulsion)

การทดลองนี้ศึกษาผลของปริมาณอิมัลชันเชิงเดี่ยว (เอทานอลร้อยละ 10 โดยน้ำหนัก และ PGPR ร้อยละ 2.0 โดยน้ำหนัก) ที่ความเข้มข้นร้อยละ 2.5-25.0 โดยน้ำหนัก ต่อความคงตัวของอิมัลชันเชิงซ้อนชนิดเอทานอลในน้ำมันในน้ำที่ใช้โซเดียมแคซิเนตร้อยละ 2.0 โดยน้ำหนักเป็นอิมัลซิฟายเออร์ หลังตรวจสอบความคงตัวต่อการแยกชั้น วัดค่าความขุ่น ขนาดและการกระจายตัวของอนุภาค และวิเคราะห์โครงสร้างระดับจุลภาคของอิมัลชัน ผลการทดลองพบว่าอิมัลชันที่เตรียมโดยใช้อิมัลชันเชิงเดี่ยวเอทานอลในน้ำมันที่ทุกระดับความเข้มข้นมีความคงตัวต่อการแยกชั้น เมื่อเก็บไว้นาน 7 วันที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส (ภาพที่ 20)



ภาพที่ 20 อิมัลชันเชิงซ้อนเอทานอลในน้ำมันในน้ำ ที่ทำให้คงตัวด้วยโซเดียมแคซิเนต (ร้อยละ 2.0 โดยน้ำหนัก) และความเข้มข้นอิมัลชันเชิงเดี่ยวต่างๆ หลังเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 วัน (ก) และ 7 วัน (ข)

อย่างไรก็ตาม หากอิมัลชันมีความคงตัวที่ดี ค่าความขุ่นของอิมัลชันไม่ควรเปลี่ยนแปลงหรือเปลี่ยนแปลงน้อยเมื่อเวลาผ่านไป ดังนั้นผู้ทดลองจึงทำการวัดค่าความขุ่นของตัวอย่างอิมัลชันที่เวลาต่างๆ ผลการทดลองพบว่า เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของอิมัลชันเชิงเดี่ยว ค่าความขุ่นของอิมัลชันเชิงซ้อนเอทานอลในน้ำมันในน้ำมีค่าเพิ่มขึ้น ($p \leq 0.05$; ตารางที่ 6) เนื่องจากแสงเมื่อส่องผ่านอิมัลชัน ถ้าแสงส่วนใหญ่จะเกิดการกระเจิง (scattered) โดยอนุภาคน้ำมัน ทำให้ไม่สามารถทะลุผ่านอิมัลชันได้ จึงทำให้อิมัลชันมีลักษณะขุ่นโดยค่าความขุ่นจะเพิ่มขึ้นเมื่ออิมัลชันมีความเข้มข้น

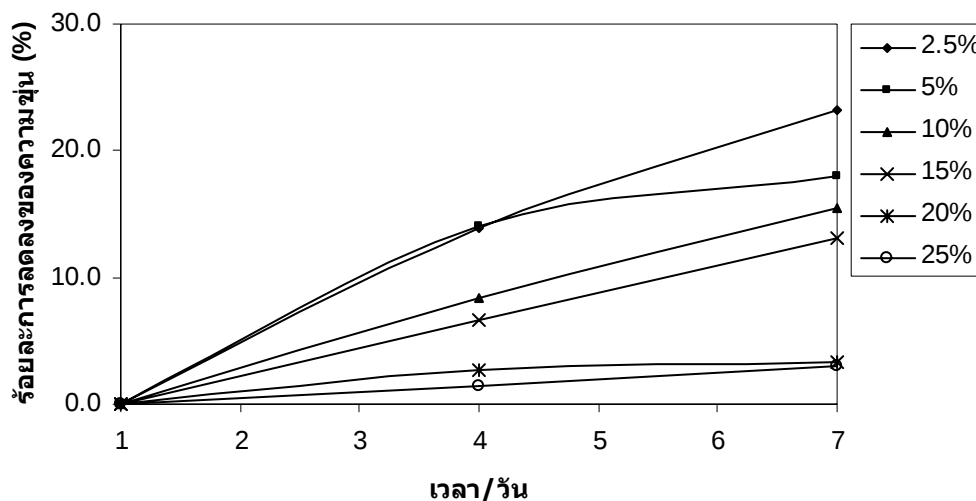
ตารางที่ 6 ค่าความขุ่น (เซนติเมตร⁻¹) ของอิมัลชันเชิงซ้อนเอทานอลในน้ำมันในน้ำที่ปริมาณอิมัลชันเชิงเดี่ยวเอทานอลในน้ำมันความเข้มข้นต่างๆ

เวลา (วัน)	ปริมาณอิมัลชันเชิงเดี่ยว (ร้อยละ โดยน้ำหนัก)					
	2.5	5.0	10.0	15.0	20.0	25.0
1	163.74±33.77 ^{Ab}	326.68±19.01 ^{Bb}	602.58±17.96 ^{Cc}	783.81±21.54 ^{Db}	863.97±16.09 ^{Eb}	944.81±3.59 ^{Fc}
4	140.94±10.11 ^{Aab}	280.97±2.66 ^{Bb}	551.91±7.58 ^{Cb}	732.01±47.20 ^{Dab}	840.36±1.86 ^{Ea}	931.79±10.11 ^{Fb}
7	125.74±1.06 ^{Aa}	267.84±0.27 ^{Ba}	508.96±37.76 ^{Ca}	681.57±44.81 ^{Da}	835.07±6.12 ^{Ea}	916.02±3.86 ^{Fa}

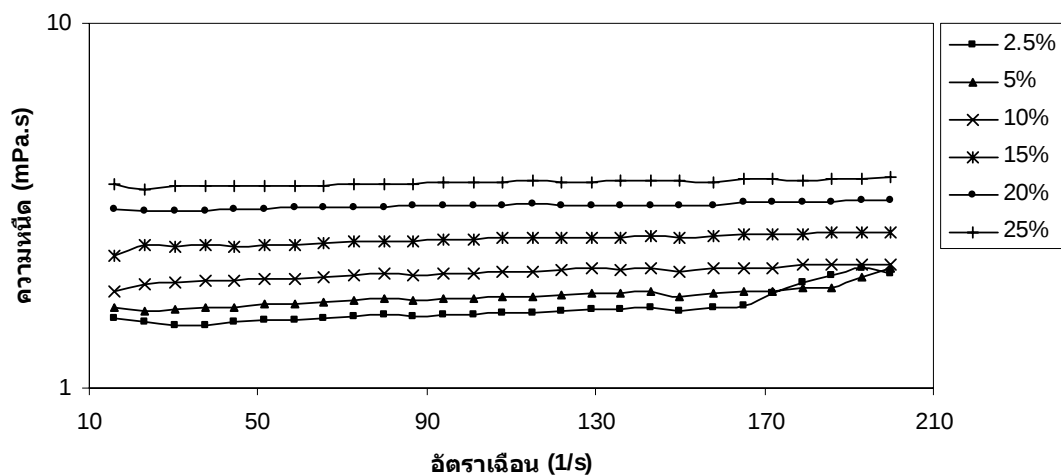
หมายเหตุ ตัวอักษร A-F หมายถึง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) ที่ระยะเวลาเดียวกัน (แนวนอน) เรียงตัวอักษรจากค่าน้อยไปมาก

ตัวอักษร a-c หมายถึง มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) ที่ปริมาณอิมัลชันเชิงเดี่ยวเดียวกัน (แนวตั้ง) เรียงตัวอักษรจากค่าน้อยไปมาก

ของวิทยาศาสตร์ถูกกระจายมากขึ้น (Chanamai and McClements, 2001; Pearce and Kinsella, 1978) การเพิ่มความเข้มข้นของอิมัลชันเชิงเดี่ยวเป็นการเพิ่มปริมาณวิทยาศาสตร์น้ำมันซึ่งเป็นวิทยาศาสตร์ถูกกระจายในอิมัลชันเชิงซ้อนเอทานอลในน้ำมันในน้ำ ดังนั้นค่าความขุ่นของอิมัลชันจึงเพิ่มขึ้นตามปริมาณอิมัลชันเชิงเดี่ยว เมื่อเก็บอิมัลชันเชิงซ้อนที่ทุกระดับความเข้มข้นของอิมัลชันเชิงเดี่ยวไว้นาน 7 วัน ความขุ่นของอิมัลชันมีค่าลดลง ($p \leq 0.05$) โดยอิมัลชันเชิงซ้อนที่เตรียมจากอิมัลชันเชิงเดี่ยวความเข้มข้นสูงอัตราการลดลงของความขุ่นช้ากว่าที่ความเข้มข้นอิมัลชันเชิงเดี่ยวต่ำๆ (ภาพที่ 21) ซึ่งการลดลงของค่าความขุ่นจะเร็วที่สุดสำหรับอิมัลชันเชิงซ้อนที่เตรียมจากอิมัลชันเชิงเดี่ยวร้อยละ 2.5 โดยน้ำหนัก ดังนั้นอิมัลชันเชิงซ้อนที่เตรียมโดยใช้อิมัลชันเชิงเดี่ยวสูงจึงมีความคงตัวต่อการแยกชั้นสูงกว่า ทั้งนี้เนื่องจากอิมัลชันที่มีความเข้มข้นน้ำมันสูง อนุภาคน้ำมันจะจับตัวกันแน่น (close packing) และทำให้เกิดอันตรกิริยาระหว่างกันของอนุภาคน้ำมัน ส่งผลให้อิมัลชันมีความหนืดเพิ่มขึ้น (McClements, 2005; Sun and Gunasekaran, 2009) ซึ่งสอดคล้องกับผลการวัดค่าความหนืดของตัวอย่างอิมัลชันในการทดลองนี้ (ภาพที่ 22) ค่าความหนืดที่เพิ่มขึ้นของอิมัลชันจึงสามารถชะลอและยับยั้งการเคลื่อนที่มาจับตัวหรือรวมตัวกันของอนุภาคน้ำมัน ทำให้อิมัลชันมีความคงตัวต่อการแยกชั้น

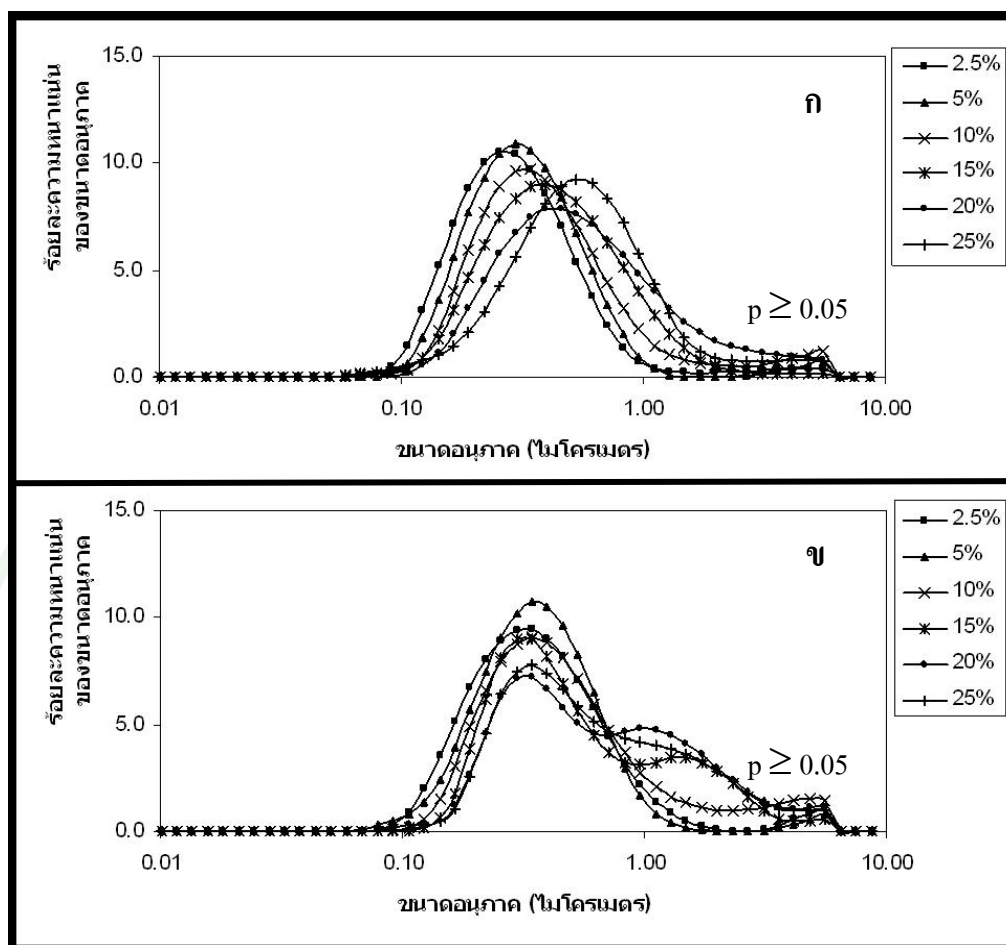


ภาพที่ 21 การลดลงของค่าความขุ่นของอิมัลชันเชิงซ้อนเอทานอลในน้ำมันในน้ำที่ทำให้คงตัวด้วยโซเดียมแคซิเนต (ร้อยละ 2.0 โดยน้ำหนัก) และปริมาณอิมัลชันเชิงเดี่ยวเอทานอลในน้ำมันต่างๆ หลังเก็บตัวอย่างไว้ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน



ภาพที่ 22 ค่าความหนืดของอิมัลชันเชิงซ้อนเอทานอลในน้ำมันในน้ำ ที่ทำให้คงตัวด้วย โซเดียมเคซีนเนต (ร้อยละ 2.0 โดยน้ำหนัก) และความเข้มข้นอิมัลชันเชิงเดี่ยวต่างๆ หลังเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 วัน

เมื่อพิจารณาการกระจายตัวของอนุภาคน้ำมันในอิมัลชันพบว่า ที่ทุกความเข้มข้นของอิมัลชันเชิงเดี่ยวการกระจายตัวของอนุภาคในอิมัลชันเชิงซ้อนชนิดเอทานอลในน้ำมันในน้ำแสดงการกระจายตัวแบบ bimodal distribution เมื่อเก็บอิมัลชันไว้ 1 วัน ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส แต่หลังจากเก็บอิมัลชันไว้นาน 7 วัน อิมัลชันเชิงซ้อนที่มีปริมาณอิมัลชันเชิงเดี่ยวตั้งแต่ร้อยละ 10 โดยน้ำหนัก แสดงการกระจายตัวของอนุภาคอิมัลชันแบบ polymodal distribution คือขนาดอนุภาคมีการกระจายตัวในช่วงกว้าง มีขนาดอนุภาคไม่สม่ำเสมอ (ภาพที่ 23) ส่วนขนาดของอนุภาคอิมัลชันเชิงซ้อนมีแนวโน้มใหญ่ขึ้นเมื่อปริมาณอิมัลชันเชิงเดี่ยวที่ใช้เตรียมเพิ่มขึ้น (ตารางที่ 7) สอดคล้องกับงานวิจัยก่อนหน้า (Sun and Gunasekaran, 2009) ทั้งนี้เนื่องจากที่ปริมาณอิมัลชันเชิงเดี่ยวสูงขึ้น ปริมาณโซเดียมเคซีนเนตอาจไม่มากพอที่จะหุ้มและสร้างชั้นผิวสัมผัสที่แข็งแรงรอบอนุภาคน้ำมัน จึงทำให้เกิดการเกาะกลุ่มกันของอนุภาคน้ำมันในอิมัลชัน



ภาพที่ 23 การกระจายตัวของอนุภาคอิมัลชันเชิงซ้อนชนิดเอทานอลในน้ำมันในน้ำ ที่ทำให้คงตัวด้วยโซเดียมแคซิเนต (ร้อยละ 2.0 โดยน้ำหนัก) และความเข้มข้นอิมัลชันเชิงเดี่ยวต่างๆ หลังจากเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 วัน (ก) และ 7 วัน (ข)

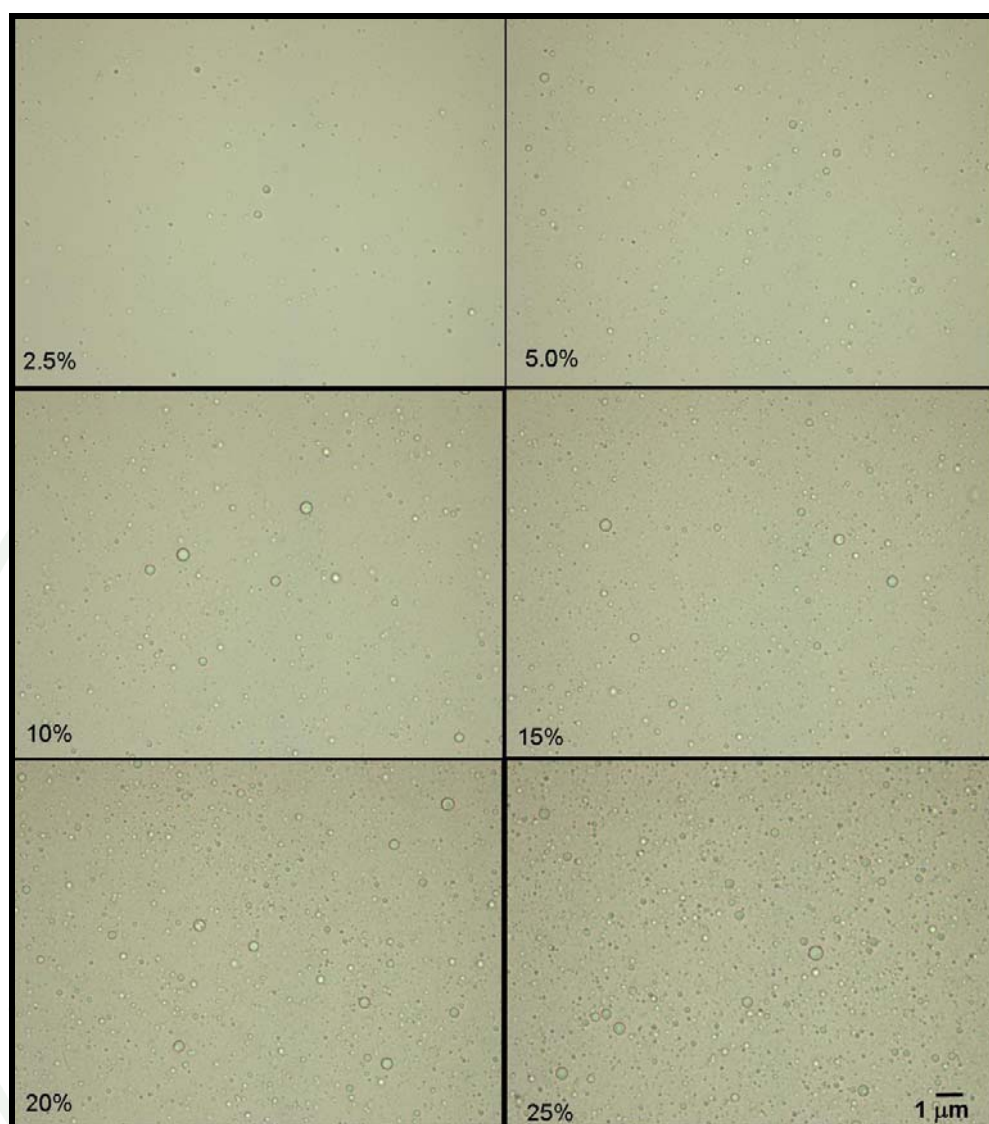
เมื่อพิจารณาโครงสร้างระดับจุลภาคของอิมัลชันเชิงซ้อนเอทานอลในน้ำมันในน้ำที่เตรียมโดยใช้อิมัลชันเชิงเดี่ยวความเข้มข้นต่าง ๆ (ร้อยละ 2.5 – 25 โดยน้ำหนัก) พบว่าอนุภาคน้ำมันมีความหนาแน่นเพิ่มขึ้นและมีขนาดอนุภาคใหญ่ขึ้นเมื่อปริมาณอิมัลชันเชิงเดี่ยวเพิ่มขึ้น (ภาพที่ 24) ซึ่งสอดคล้องกับการวัดค่าความขุ่น และขนาดอนุภาคก่อนหน้า (ตารางที่ 6 และ 7)

จากผลการทดลองทั้งหมดดังกล่าวข้างต้น สามารถสรุปได้ว่าปริมาณอิมัลชันเชิงเดี่ยวร้อยละ 5 โดยน้ำหนัก เหมาะสมในการเตรียมอิมัลชันเชิงซ้อนเอทานอลในน้ำมันในน้ำโดยใช้โซเดียมแคซิเนตเป็นอิมัลซิฟายเออร์ที่ความเข้มข้นร้อยละ 2.0 โดยน้ำหนัก

ตารางที่ 7 ขนาดอนุภาคเฉลี่ยของอิมัลชันเชิงซ้อนเอทานอลในน้ำมันในน้ำที่เตรียมโดยใช้ปริมาณอิมัลชันเชิงเดี่ยวเอทานอลในน้ำมันความเข้มข้นต่างๆ

ความเข้มข้น (ร้อยละ โดยน้ำหนัก)	ระยะเวลา/ ขนาดอนุภาคเฉลี่ย (ไมโครเมตร)	
	1 วัน	7 วัน
2.5	0.27 ± 0.01^{Aa}	0.32 ± 0.05^{Ba}
5.0	0.30 ± 0.00^{Aa}	0.33 ± 0.02^{Ba}
10.0	0.35 ± 0.02^{Ab}	0.39 ± 0.06^{Bb}
15.0	0.37 ± 0.01^{Ab}	0.41 ± 0.04^{Bbc}
20.0	0.46 ± 0.08^{Ac}	0.48 ± 0.09^{Bd}
25.0	0.47 ± 0.07^{Bc}	0.46 ± 0.05^{Acd}

หมายเหตุ ตัวอักษร A-B หมายถึง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) ที่ความเข้มข้นเดียวกัน (แนวนอน) เรียงตัวอักษรจากค่าน้อยไปมาก
ตัวอักษร a-d หมายถึง มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) ที่ระยะเวลาเดียวกัน (แนวตั้ง) เรียงตัวอักษรจากค่าน้อยไปมาก



ภาพที่ 24 โครงสร้างระดับจุลภาคของอิมัลชันเอทานอลในน้ำมันในน้ำที่ทำให้คงตัวด้วย โซเดียมแคซิเนต (ร้อยละ 2.0 โดยน้ำหนัก) และความเข้มข้นอิมัลชันเชิงเดี่ยวต่างๆ หลังจากเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 วัน

5. ผลของสารสกัดบัวบกต่อความคงตัวของอิมัลชันเชิงซ้อนเอทานอลในน้ำมันในน้ำ และประสิทธิภาพการห่อหุ้ม

การทดลองนี้ศึกษาการเติมสารสกัดบัวบกต่อความคงตัวของอิมัลชันเชิงซ้อนชนิดเอทานอลในน้ำมันในน้ำ โดยทำการเตรียมอิมัลชันเชิงเดี่ยวเอทานอลในน้ำมันที่ปริมาณเอทานอลร้อยละ 10 โดยน้ำหนักและมีสารสกัดบัวบกเข้มข้นร้อยละ 5.0 โดยน้ำหนัก หลังจากนั้นนำอิมัลชันเชิงเดี่ยวร้อยละ 5.0 โดยน้ำหนัก มาเตรียมเป็นอิมัลชันเชิงซ้อนโดยใช้โซเดียมแคซิเนตร้อยละ 2.0 โดยน้ำหนัก เป็นอิมัลซิไฟเออร์ ตรวจสอบความคงตัวต่อการแยกชั้น ขนาดและการกระจายตัวของอนุภาค และโครงสร้างระดับจุลภาคของอิมัลชัน พบว่า อิมัลชันเชิงเดี่ยวที่ไม่มีสารสกัดบัวบกเป็นของเหลว สีขาว คล้ายนม ในขณะที่อิมัลชันอิมัลชันเชิงเดี่ยวที่มีสารสกัดบัวบกมีลักษณะเป็นของเหลว สีเขียวอ่อนจากสีของสารสกัดบัวบก และอิมัลชันเชิงซ้อนที่มีและไม่มีสารสกัดบัวบกเป็นของเหลว สีขาว คล้ายนม อย่างไรก็ตาม ทั้งอิมัลชันเชิงเดี่ยวกับอิมัลชันเชิงซ้อน ที่มีและไม่มีสารสกัดบัวบก ต่างก็มีความคงตัว ไม่แยกชั้น เมื่อเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 วัน (ภาพที่ 25)



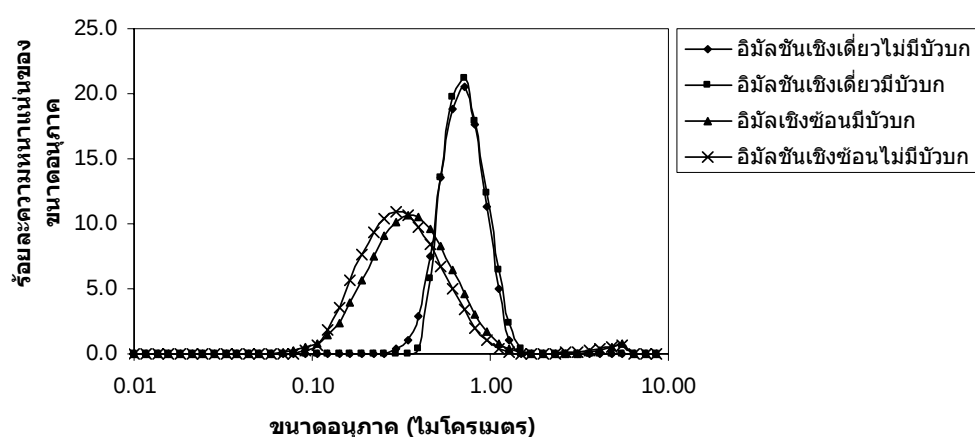
ภาพที่ 25 อิมัลชันเชิงเดี่ยวเอทานอลในน้ำมัน (ก, ข) และอิมัลชันเชิงซ้อนเอทานอลในน้ำมันในน้ำ (ค, ง) ที่ไม่มี (ก, ค) และมี (ข, ง) สารสกัดบัวบกหลังเก็บที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 วัน

ตารางที่ 8 ขนาดอนุภาคเฉลี่ยของอิมัลชันเชิงเดี่ยวและเชิงซ้อนที่เตรียมโดยใส่และไม่ใส่สารสกัดบัวบก

ตัวอย่าง	ขนาดอนุภาคเฉลี่ย (ไมโครเมตร)
อิมัลชันเชิงเดี่ยวไม่มีสารสกัดบัวบก	0.61 ± 0.10^b
อิมัลชันเชิงเดี่ยวมีสารสกัดบัวบก	0.66 ± 0.06^b
อิมัลชันเชิงซ้อนไม่มีสารสกัดบัวบก	0.33 ± 0.04^a
อิมัลชันเชิงซ้อนมีสารสกัดบัวบก	0.33 ± 0.02^a

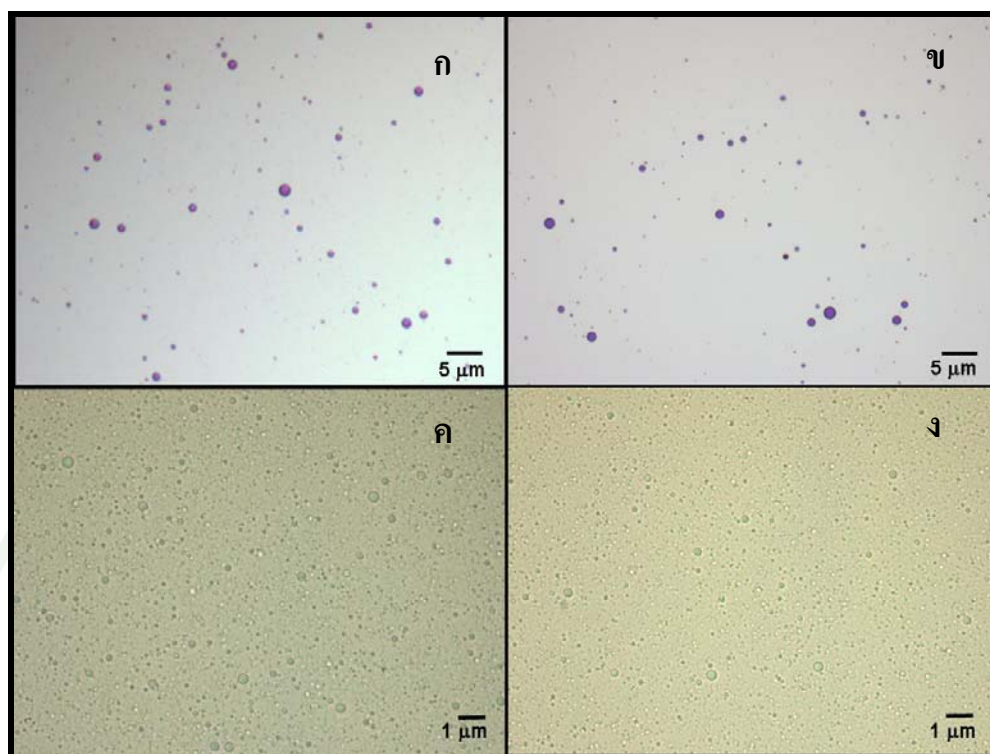
หมายเหตุ ตัวอักษร a-b หมายถึง มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) ที่แต่ละชนิดอิมัลชัน(แนวตั้ง) เรียงตัวอักษรจากค่าน้อยไปมาก

เมื่อพิจารณาขนาดอนุภาคและการกระจายตัวของอิมัลชันพบว่า การเติมสารสกัดบัวบกไม่มีผลต่อขนาดของอิมัลชันเชิงเดี่ยวและอิมัลชันเชิงซ้อน (ตารางที่ 8 และ ภาพที่ 26)



ภาพที่ 26 การกระจายตัวของขนาดอนุภาคของอิมัลชันเชิงเดี่ยวเอทานอลในน้ำมัน และอิมัลชันเชิงซ้อนเอทานอลในน้ำมันในน้ำ หลังจากเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 วัน

เมื่อพิจารณาโครงสร้างและการกระจายตัวของอิมัลชันพบว่า การเติมสารสกัดบัวบกไม่มีผลต่อขนาดของอิมัลชันเชิงเดี่ยวเอทานอลในน้ำมันและอิมัลชันเชิงซ้อนเอทานอลในน้ำมันในน้ำ (ภาพที่ 27) ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองก่อนหน้านี้



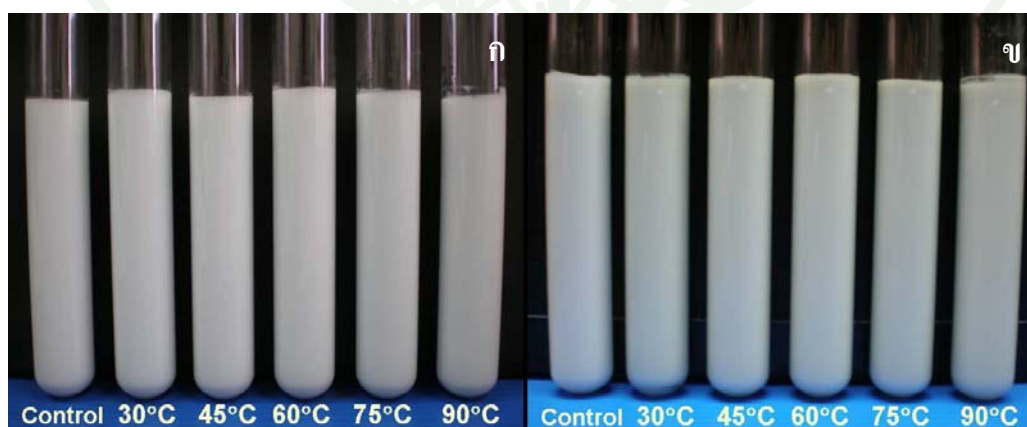
ภาพที่ 27 โครงสร้างระดับจุลภาคของอิมัลชันเชิงเดี่ยวเอทานอลในน้ำมันที่ไม่มี (ก) และมีสารสกัดบัวบก (ข) และอิมัลชันเชิงซ้อนเอทานอลในน้ำมันในน้ำที่ไม่มี (ค) และมีสารสกัดบัวบก (ง) หลังจากเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 วัน

การศึกษาประสิทธิภาพในการห่อหุ้มสารสกัดบัวบกของระบบอิมัลชันเชิงซ้อนชนิดเอทานอลในน้ำมันในน้ำ พบว่าระบบอิมัลชันดังกล่าวมีประสิทธิภาพในการห่อหุ้มสารสกัดสูงถึงร้อยละ 97.08 แสดงให้เห็นถึงประสิทธิภาพที่ดีในการห่อหุ้มสารของระบบ ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Su *et al.* (2006) ที่สามารถผลิตอิมัลชันเชิงซ้อนน้ำในน้ำมันในน้ำที่คงตัวและมีประสิทธิภาพในการห่อหุ้มสารได้มากกว่าร้อยละ 90 ทั้งนี้ระบบอิมัลชันเอทานอลในน้ำมันในน้ำมีประสิทธิภาพการห่อหุ้มที่ดี อาจเนื่องมาจากระบบดังกล่าวเป็นระบบที่ซับซ้อนจึงเป็นการยากที่อนุภาคเอทานอลที่กระจายตัวอยู่ในเฟสด้านใน (internal phase) จะหลุดออกมาในส่วนของน้ำเฟสนอก เพราะมีน้ำมันเป็นตัวป้องกันการหลุดออกมาของเอทานอล

6. ผลของสภาวะแวดล้อมต่อความคงตัวและคุณสมบัติของอิมัลชันเชิงซ้อนชนิดเอทานอลในน้ำมันในน้ำ

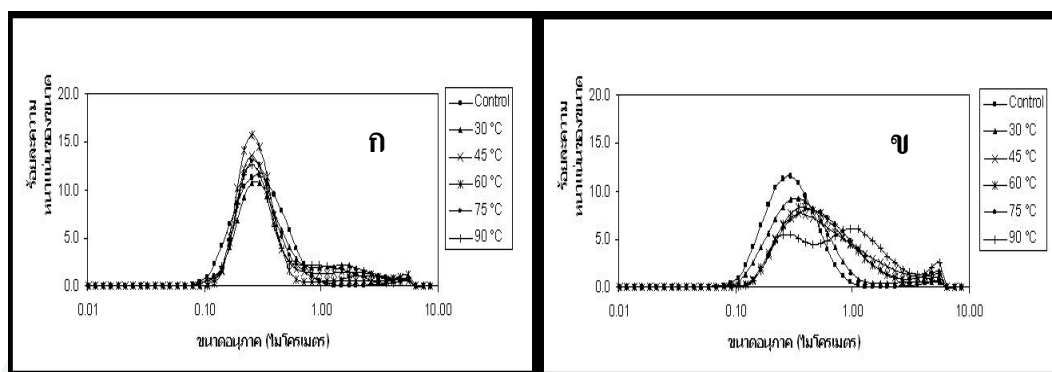
6.1 ผลของการให้ความร้อน

ผลของการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 30-90 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที ต่อความคงตัวของอิมัลชันเชิงซ้อน (อิมัลชันเชิงเดี่ยวร้อยละ 5.0 และ โซเดียมแคซิเนตร้อยละ 2.0 โดยน้ำหนัก) พบว่า อิมัลชันทั้งที่มีและไม่มีสารสกัดบัวบกมีความคงตัวต่อการแยกชั้นที่ทุกอุณหภูมิ (ภาพที่ 28) ซึ่งผลการทดลองความคงตัวต่อการแยกชั้นสอดคล้องกับผลการกระจายตัวและขนาดของอนุภาคหยดน้ำมัน (ภาพที่ 29 และ ตารางที่ 9) รวมถึงลักษณะโครงสร้างระดับจุลภาคของอิมัลชัน (ภาพที่ 30 และ 31) และสอดคล้องกับงานวิจัยก่อนหน้านี้ (Livney *et al.*, 2003; Srinivasan *et al.*, 2002) ที่รายงานว่าอิมัลชันที่ทำให้คงตัวด้วยโซเดียมแคซิเนตมีความคงตัวต่อการเกาะกลุ่มและการรวมตัวของอนุภาคระหว่างการให้ความร้อนที่อุณหภูมิต่ำกว่า 121 องศาเซลเซียส โดยปกติอิมัลชันที่ทำให้คงตัวด้วยโปรตีนที่มีโครงสร้างเป็น globular จะไม่คงตัวต่อการให้ความร้อน เนื่องจากโปรตีนจะเกิดการคลายเกลียวที่อุณหภูมิสูง (มากกว่า 30 องศาเซลเซียส) หมู่ฟังก์ชันของโปรตีน เช่น non-polar และ sulfhydryl ที่อยู่ในถูกปลดปล่อยออกมา ส่งผลให้เกิด attractive interaction ระหว่างโมเลกุลโปรตีนที่ดูดซับทั้งบนผิวอนุภาคน้ำมันอนุภาคเดียวกันหรือต่างอนุภาค ทำให้อิมัลชันเสียความคงตัว แต่เนื่องจากแคซิเนตมีลักษณะโครงสร้างเป็น flexible protein จึงมีความคงตัวต่อการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างเนื่องจากความร้อน (McClements, 2004)



ภาพที่ 28 อิมัลชันเชิงซ้อนเอทานอลในน้ำมันในน้ำที่ไม่มี (ก) และมี (ข) สารสกัดบัวบก หลังผ่านการให้ความร้อนที่ 30-90 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที

การกระจายตัวของอนุภาคในอิมัลชันดังกล่าวหลังผ่านกระบวนการให้ความร้อนมีลักษณะเป็น polydispersed (ภาพที่ 29) ส่วนขนาดอนุภาคของน้ำมันในอิมัลชันที่มีสารสกัดบัวบกหลังให้ความร้อนที่อุณหภูมิ (30-90 องศาเซลเซียส) มีขนาดใหญ่กว่าอิมัลชันที่ไม่มีสารสกัด (ตารางที่ 9)



ภาพที่ 29 ผลของการให้ความร้อนต่อการกระจายตัวของขนาดอนุภาคของอิมัลชันเชิงซ้อนชนิดเอทานอลในน้ำมันในน้ำที่ไม่มีสารสกัดบัวบก (ก) และมีสารสกัดบัวบก (ข)

ตารางที่ 9 ขนาดอนุภาคเฉลี่ยของอิมัลชันเชิงซ้อนที่เตรียมโดยใส่และไม่ใส่สารสกัดบัวบก หลังผ่านการให้ความร้อนที่อุณหภูมิต่างๆ

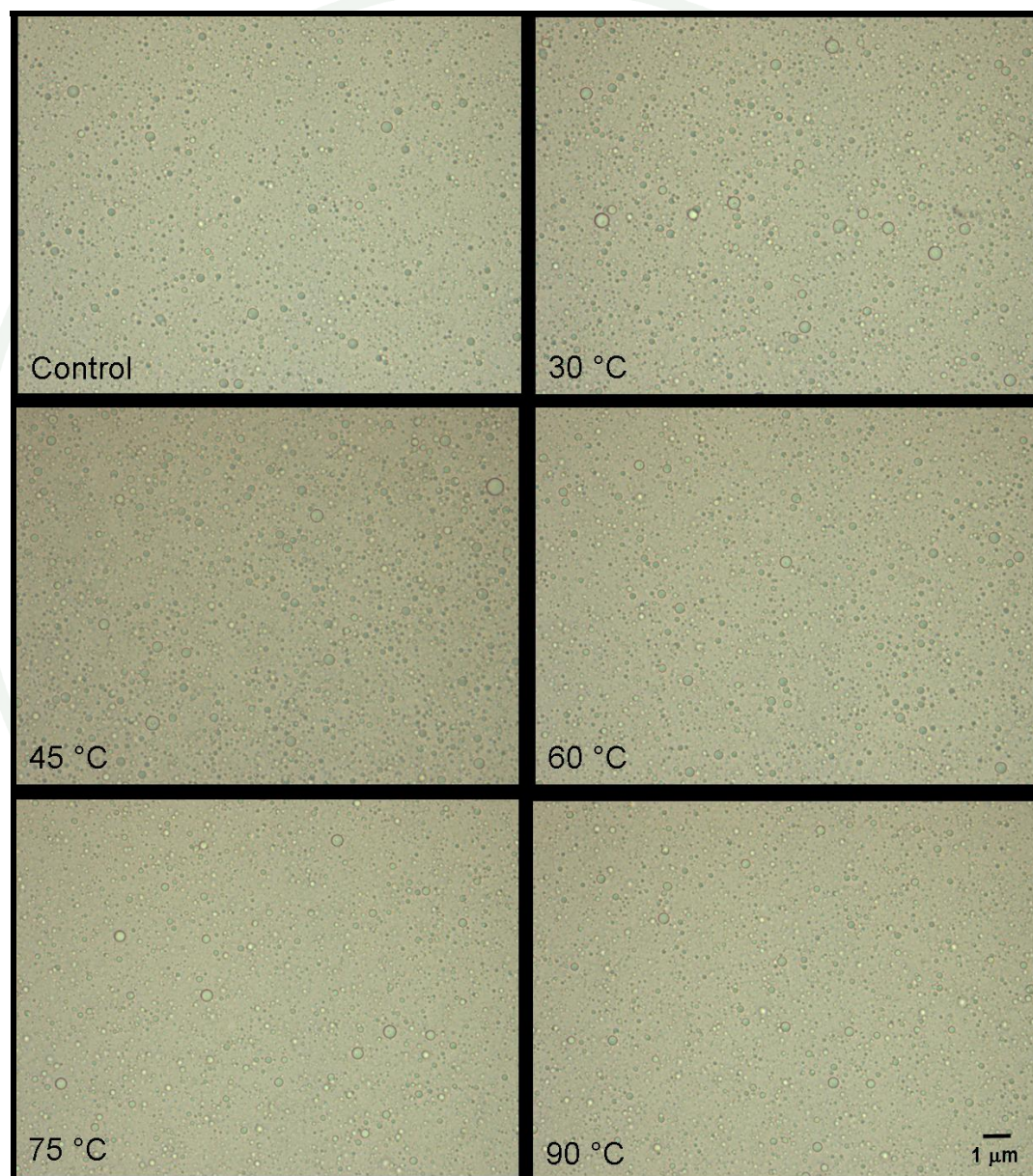
อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	ขนาดอนุภาคเฉลี่ย (ไมโครเมตร)	
	ไม่มีสารสกัดบัวบก	มีสารสกัดบัวบก
ควบคุม	0.32±0.04 ^{Abc}	0.33±0.01 ^{Aa}
30°C	0.35±0.08 ^{Ac}	0.52±0.07 ^{Bc}
45°C	0.29±0.04 ^{Aab}	0.47±0.04 ^{Bb}
60°C	0.26±0.01 ^{Aa}	0.46±0.01 ^{Bb}
75°C	0.27±0.01 ^{Aa}	0.47±0.05 ^{Bb}
90°C	0.29±0.04 ^{Aab}	0.60±0.08 ^{Bd}

หมายเหตุ ตัวอักษร A-B หมายถึง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) ที่อุณหภูมิ

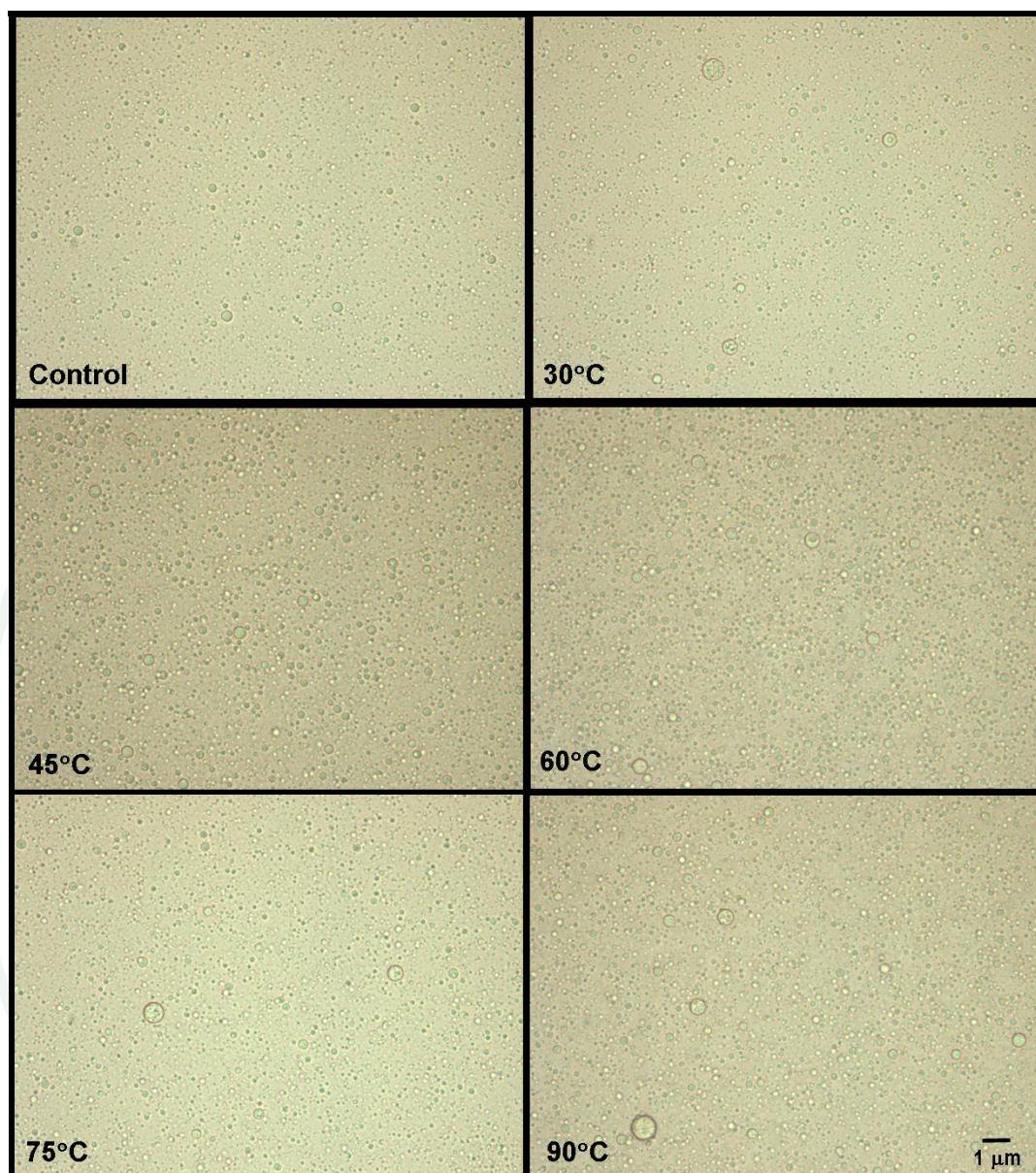
เดียวกัน (แนวนอน) เรียงตัวอักษรจากค่าน้อยไปมาก

ตัวอักษร a-d หมายถึง มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) ที่ไม่มีและมีการสกัดบัวบกเดียวกัน (แนวตั้ง) เรียงตัวอักษรจากค่าน้อยไปมาก

เมื่อพิจารณาลักษณะโครงสร้างจุลภาคของอิมัลชันเชิงซ้อนชนิดเอทานอลในน้ำมันในน้ำ พบว่า อิมัลชันยังคงลักษณะเป็นอิมัลชันเชิงซ้อนอยู่ (ภาพที่ 30 และ 31) กล่าวคือ ยังมีอนุภาคของเอทานอลกระจายตัวอยู่ในวัฏภาคน้ำมัน และอนุภาคของน้ำมันที่มีเอทานอลสามารถกระจายตัวอยู่ในวัฏภาคน้ำ แสดงว่าระบบอิมัลชันสามารถที่จะกักเก็บสารสกัดในเอทานอลไว้ในระบบได้



ภาพที่ 30 ผลของการให้ความร้อนต่อโครงสร้างระดับจุลภาคของอิมัลชันเชิงซ้อนชนิดเอทานอลในน้ำมันในน้ำที่ไม่มีสารสกัดบัวบก

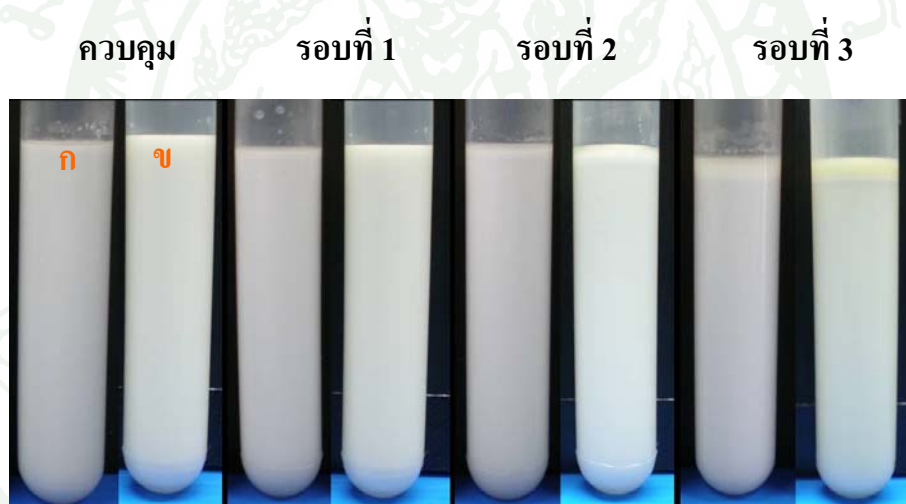


ภาพที่ 31 ผลของการให้ความร้อนต่อโครงสร้างระดับจุลภาคของอิมัลชันเชิงซ้อนชนิดเอทานอลในน้ำมันในน้ำที่มีสารสกัดบัวบก

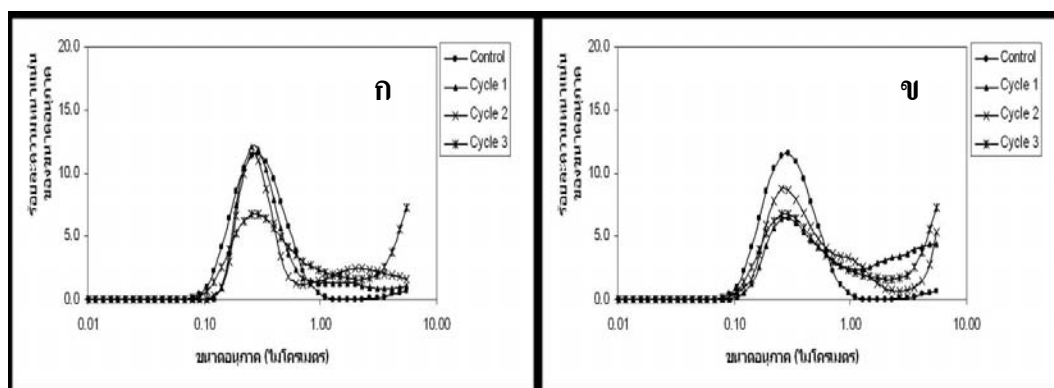
จากผลของอุณหภูมิในการให้ความร้อน อิมัลชันเชิงซ้อนมีความคงตัวที่ดี ไม่เกิดการแยกชั้น และยังไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างระดับจุลภาค จึงมีความเหมาะสมที่จะนำไปใช้ในอุตสาหกรรมอาหารที่มีการให้ความร้อนสูงในระดับการพาสเจอร์ไรซ์ เป็นต้น

6.2 ผลของการแช่แข็งและทำละลาย

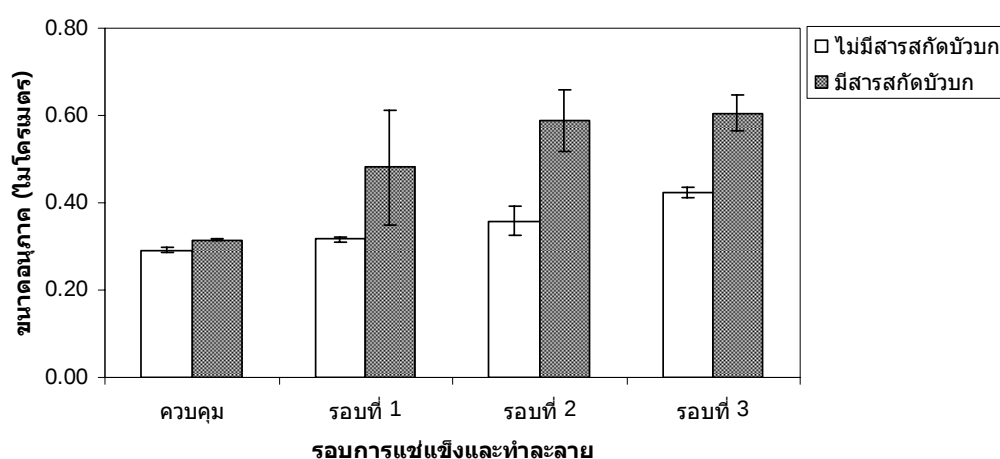
ผลของการแช่แข็งและทำละลายต่อความคงตัวของอิมัลชันเชิงซ้อน (อิมัลชันเชิงซ้อน ร้อยละ 5.0 และโซเดียมแคซิเนตร้อยละ 2.0 โดยน้ำหนัก) โดยนำไปแช่แข็งที่อุณหภูมิ -18 องศาเซลเซียส นาน 22 ชั่วโมง จากนั้นทำละลายที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง พบว่า อิมัลชันทั้งที่มีและไม่มีสารสกัดบัวบกมีความคงตัวต่อการแช่เยือกแข็งหนึ่งรอบ โดยอิมัลชันเริ่มเสียความคงตัวต่อการแยกชั้นในรอบการแช่เยือกแข็งรอบที่สอง และอิมัลชันเสียความคงตัวต่อการแยกชั้นมากขึ้นหลังผ่านการแช่เยือกแข็งรอบที่สาม (ภาพที่ 32) การกระจายตัวของอนุภาคในอิมัลชันมีการกระจายตัวแบบ bimodal หลังการแช่เยือกแข็งหนึ่งรอบ และการกระจายตัวเป็นแบบ polydispersed เมื่อผ่านการแช่เยือกแข็งรอบที่สองและสาม (ภาพที่ 33) ซึ่งสอดคล้องกับขนาดอนุภาคที่มีแนวโน้มใหญ่ขึ้น (ภาพที่ 34) และลักษณะโครงสร้างทางจุลภาคของอิมัลชัน (ภาพที่ 35)



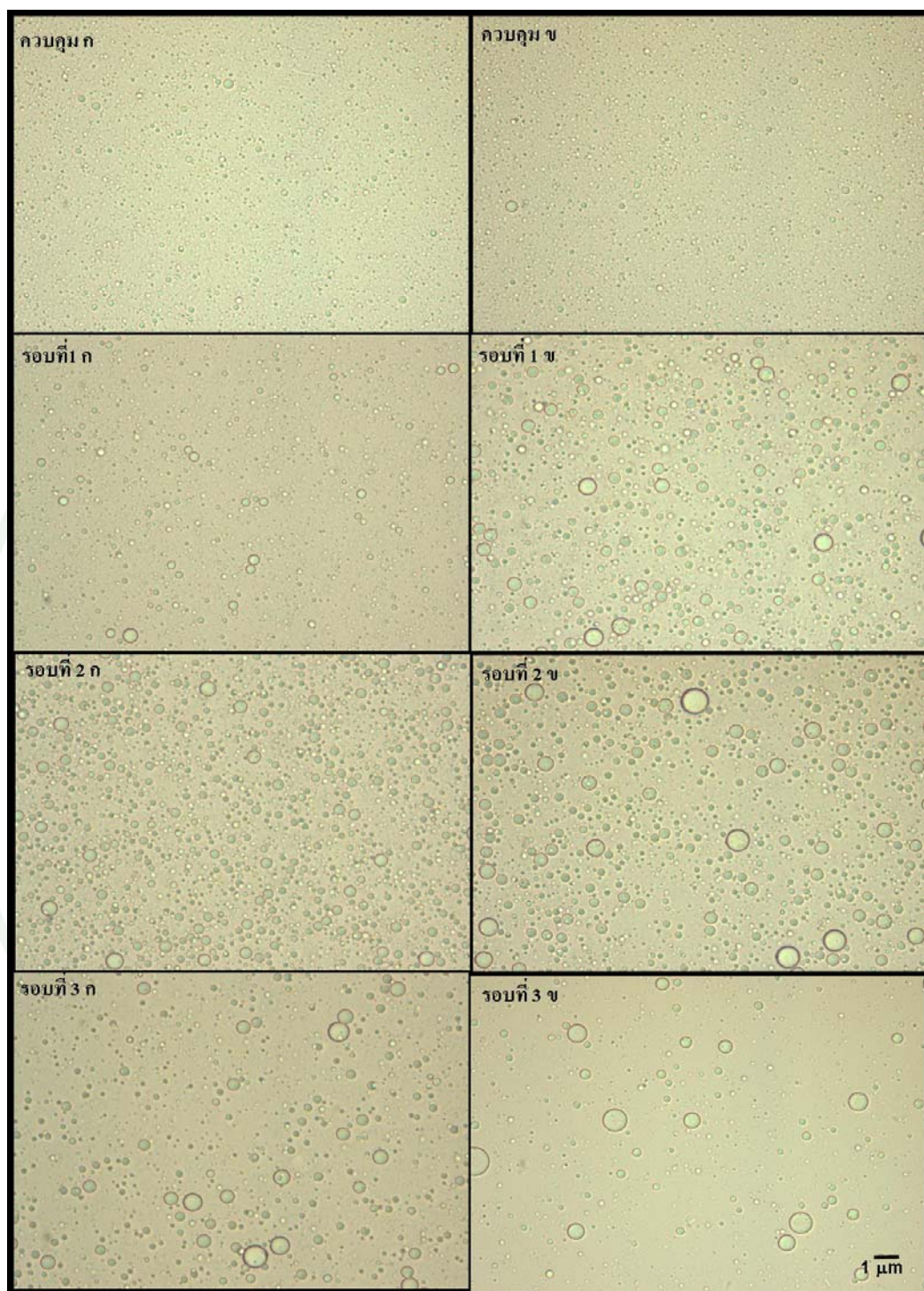
ภาพที่ 32 อิมัลชันเชิงซ้อนเอทานอลในน้ำมันในน้ำที่ไม่มีสารสกัดบัวบก (ก) และมีสารสกัดบัวบก (ข) หลังผ่านการแช่แข็งที่อุณหภูมิ -18 องศาเซลเซียส นาน 22 ชั่วโมง และทำละลายที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง



ภาพที่ 33 การกระจายตัวของขนาดอนุภาคของอิมัลชันเชิงซ้อนชนิดเอทานอลในน้ำมันในน้ำที่ไม่มีสารสกัดบัวบก (ก) และมีสารสกัดบัวบก (ข) หลังผ่านการแช่แข็งที่อุณหภูมิ -18 องศาเซลเซียส นาน 22 ชั่วโมง และทำลายที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง



ภาพที่ 34 ผลของการแช่เยือกแข็งต่อขนาดของอนุภาคของอิมัลชันเชิงซ้อนชนิดเอทานอลในน้ำมันในน้ำ



ภาพที่ 35 โครงสร้างระดับจุลภาคของอิมัลชันเชิงซ้อนเอทานอลในน้ำมันในน้ำที่ไม่มีสารสกัด
บัวบก (ก) และมีสารสกัดบัวบก (ข) หลังผ่านการแช่แข็งที่อุณหภูมิ -18 องศา
เซลเซียส นาน 22 ชั่วโมง และทำละลายที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง

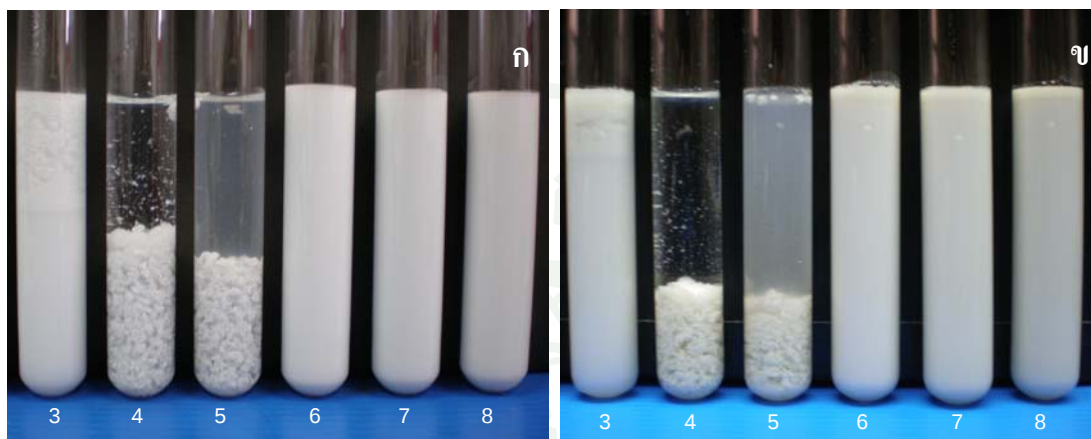
อิมัลชันหลังผ่านการแช่เยือกแข็งแล้วทำละลายจะไม่มี ความคงตัวเนื่องจากสาเหตุหลายประการ โดยประการแรกอิมัลชันเสียความคงตัวเนื่องจากเกิด partial coalescence จากการที่ฟล็อกไวมันที่เกิดขึ้นในอนุภาคน้ำมันอนุภาคหนึ่งแทงทะลุผ่านผิวสัมผัสส่วนที่เป็นน้ำมันเหลวของอีกอนุภาคน้ำมัน ทำให้เกิดการรวมตัวกันของอนุภาคน้ำมัน ประการที่สองฟล็อกน้ำแข็งที่เกิดขึ้นในวัฏภาคต่อเนื่องทำให้อนุภาคน้ำมันอยู่ใกล้กัน ส่งผลให้อนุภาคมีโอกาสรวมตัวกันได้ง่ายขึ้น และการเกิดฟล็อกน้ำแข็งยังทำให้ ionic strength ของวัฏภาคต่อเนื่องที่เหลือนี้อาจเพิ่มขึ้น ซึ่งทำให้ electrostatic repulsion ระหว่างอนุภาคน้ำมันลดลง ประการสุดท้ายฟล็อกน้ำแข็งที่เกิดขึ้นอาจจะแทงทะลุเข้าไปในอนุภาคน้ำมันทำให้ชั้นฟิล์มที่ผิวสัมผัสเสียหายอิมัลชันจึงเสียความคงตัว (McClements, 2004) ซึ่งความคงตัวต่อการแช่เยือกแข็งของอิมัลชันที่ทำให้คงตัวด้วยโปรตีนจะดีกว่าอิมัลชันที่ทำให้คงตัวด้วยอิมัลซิไฟเออร์ที่มีโมเลกุลขนาดเล็ก จากผลการทดลองอิมัลชันมีความคงตัวต่อการแช่เยือกแข็งหนึ่งรอบ ทั้งนี้เนื่องจากโซเดียมแคซิเนตเป็นโปรตีนที่มีโมเลกุลใหญ่ และมีโครงสร้างเป็น random coil สามารถเกิดขึ้นฟิล์มผิวสัมผัสที่มีความหนา จึงสามารถป้องกันการแทงทะลุจากฟล็อกน้ำแข็ง และหรือฟล็อกไวมันได้ ทำให้อิมัลชันมีความคงตัวต่อการแช่เยือกแข็ง แต่อย่างไรก็ตามหากทำการแช่เยือกแข็งหลายรอบอิมัลชันก็สามารถสูญเสียความคงตัวได้ ซึ่งสามารถเพิ่มความคงตัวของอิมัลชันต่อการแช่เยือกแข็งได้ด้วยการเติมสาร cryoprotectants เช่น ซูโครส ลงในวัฏภาคต่อเนื่อง (Cramp *et al.*, 2004; Palanuweh and Coupland, 2003)

จากผลของการแช่เยือกแข็งที่อุณหภูมิ -18 องศาเซลเซียส นาน 22 ชั่วโมง และทำละลายที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง อิมัลชันเชิงซ้อนมีความคงตัวไม่เกิดการแยกชั้น และไม่เปลี่ยนแปลงโครงสร้างระดับจุลภาคในรอบที่หนึ่งของการแช่เยือกแข็ง จึงมีความเป็นไปได้ที่จะนำไปใช้ในอุตสาหกรรมอาหารที่มีการแช่เยือกแข็งหรืออาหารแช่เย็น เป็นต้น

6.3 ผลของการปรับค่าพีเอช

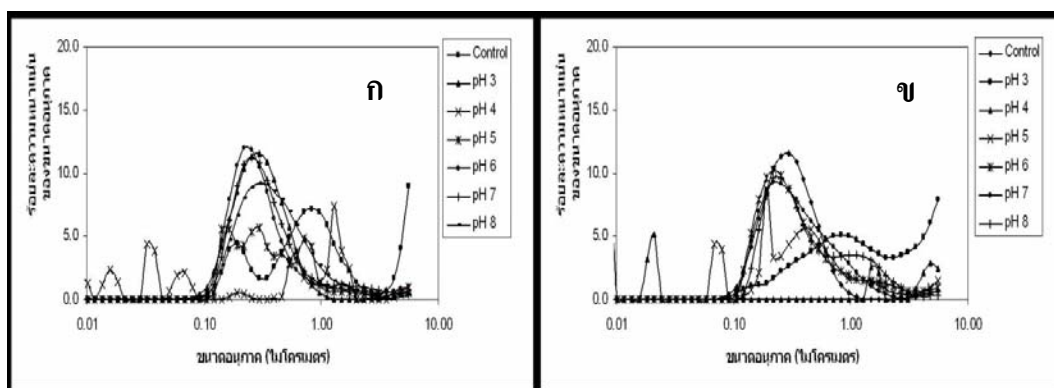
ผลของค่าพีเอชที่ 3.0-8.0 ต่อความคงตัวของอิมัลชันเชิงซ้อน (อิมัลชันเชิงเดี่ยวร้อยละ 5.0 และโซเดียมแคซิเนตร้อยละ 2.0 โดยน้ำหนัก) โดยอิมัลชันเชิงซ้อนที่เตรียมขึ้นมีค่าพีเอชเริ่มต้นประมาณ 7.0 หลังการปรับค่าพีเอช พบว่า อิมัลชันทั้งที่มีและไม่มีสารสกัดบวบกที่ค่าพีเอชช่วง 3.0-5.0 อิมัลชันเสียความคงตัว เกิดการแยกชั้นขึ้น โดยที่พีเอช 4.0 และ 5.0 อิมัลชันเกิดการแยกชั้นเป็นชั้นสารละลายใสด้านบน และตะกอนก้นหลอดอย่างรวดเร็วหลังปรับพีเอช สำหรับที่พีเอช 3.0

อิมัลชันแยกเป็นชั้นครีมซึ่งเป็นส่วนของอนุภาคที่เกิดการเกาะกลุ่มกันอยู่ด้านบนของอิมัลชันที่ยังคงตัวส่วนที่ฟิเอซอื่น (6.0-8.0) อิมัลชันมีความคงตัวต่อการแยกชั้น (ภาพที่ 36)

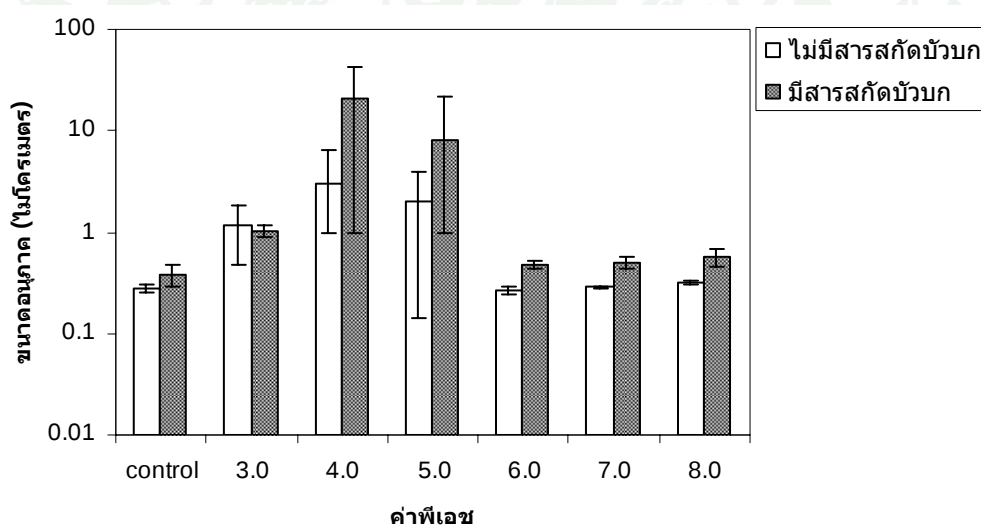


ภาพที่ 36 อิมัลชันเชิงซ้อนชนิดเอทานอลในน้ำมันในน้ำที่ไม่มีสารสกัดบัวบก (ก) และมีสารสกัดบัวบก (ข) หลังผ่านการปรับค่าพีเอชในช่วง 3-8

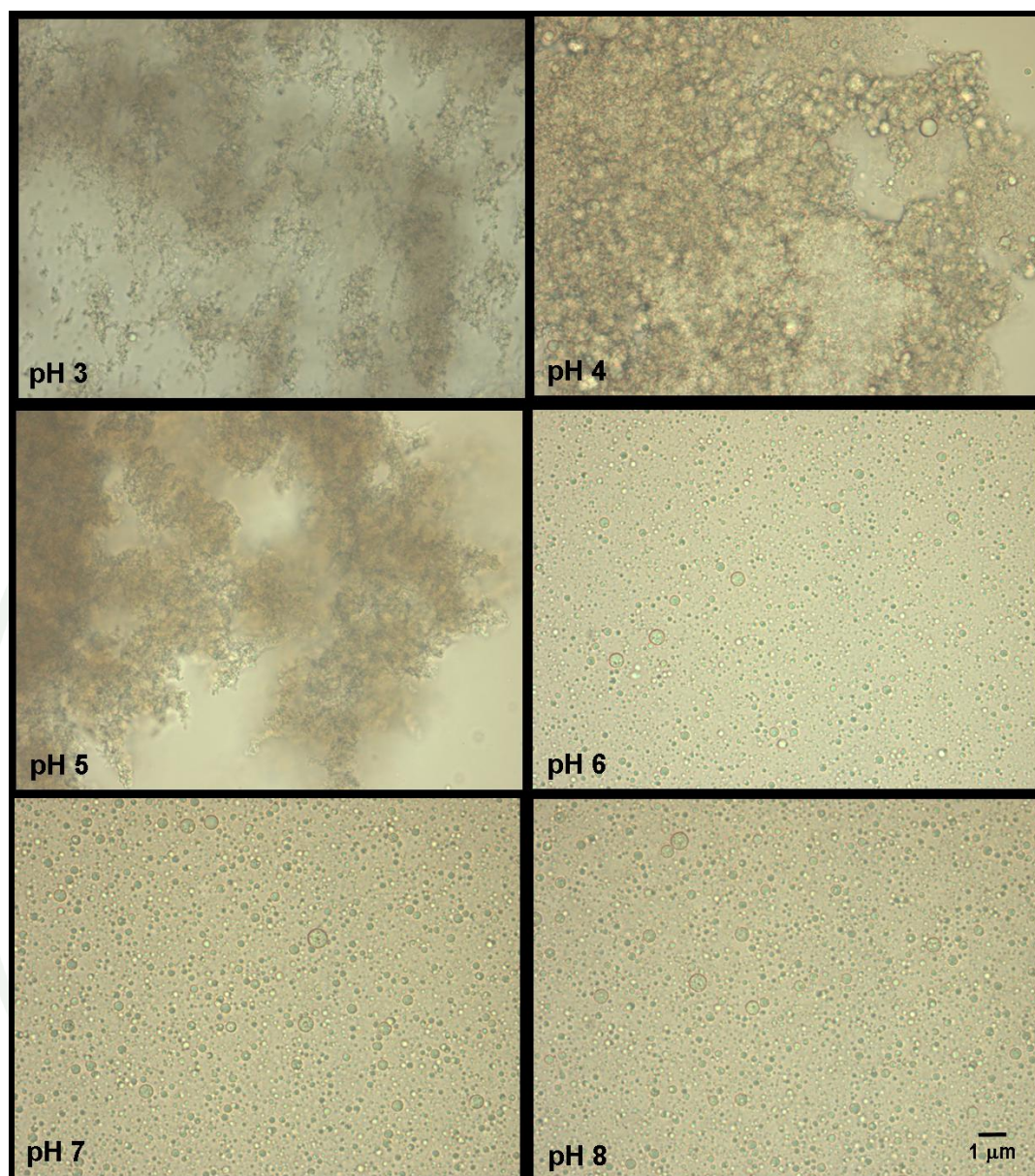
เมื่อสังเกตการกระจายตัวของอนุภาคในอิมัลชันที่พีเอชต่างๆ พบว่า ที่พีเอช 3.0-5.0 อิมัลชันมีการกระจายตัวแบบ polydispersed โดยจะมีการกระจายตัวของอนุภาคขนาดใหญ่เพิ่มมากขึ้น แต่ที่พีเอชสูงกว่า 5.0 อิมัลชันมีการกระจายตัวแบบ bimodal ซึ่งไม่แตกต่างจากอิมัลชันเริ่มต้น (ภาพที่ 37) โดยสอดคล้องกับผลการวัดขนาดอนุภาค (ภาพที่ 38) อิมัลชันที่พีเอช 3.0-5.0 อนุภาคมีขนาดใหญ่ ($p \leq 0.05$) ในขณะที่อิมัลชันที่พีเอชอื่นๆ อิมัลชันมีขนาดอนุภาคไม่แตกต่างจากอิมัลชันเริ่มต้น ($p > 0.05$) ซึ่งผลที่ได้สอดคล้องกับลักษณะ โครงสร้างของอิมัลชันที่วิเคราะห์ได้จากกล้องจุลทรรศน์ (ภาพที่ 39 และ 40) โดยพบว่าอิมัลชันที่มีค่าพีเอช 3.0-5.0 อนุภาคในอิมัลชันมีขนาดใหญ่และมีการรวมตัวกัน ในขณะที่อิมัลชันที่มีค่าพีเอช 6.0-8.0 อนุภาคในอิมัลชันมีการกระจายตัวอย่างสม่ำเสมอ และยังคงสภาพเป็นอิมัลชันเชิงซ้อน



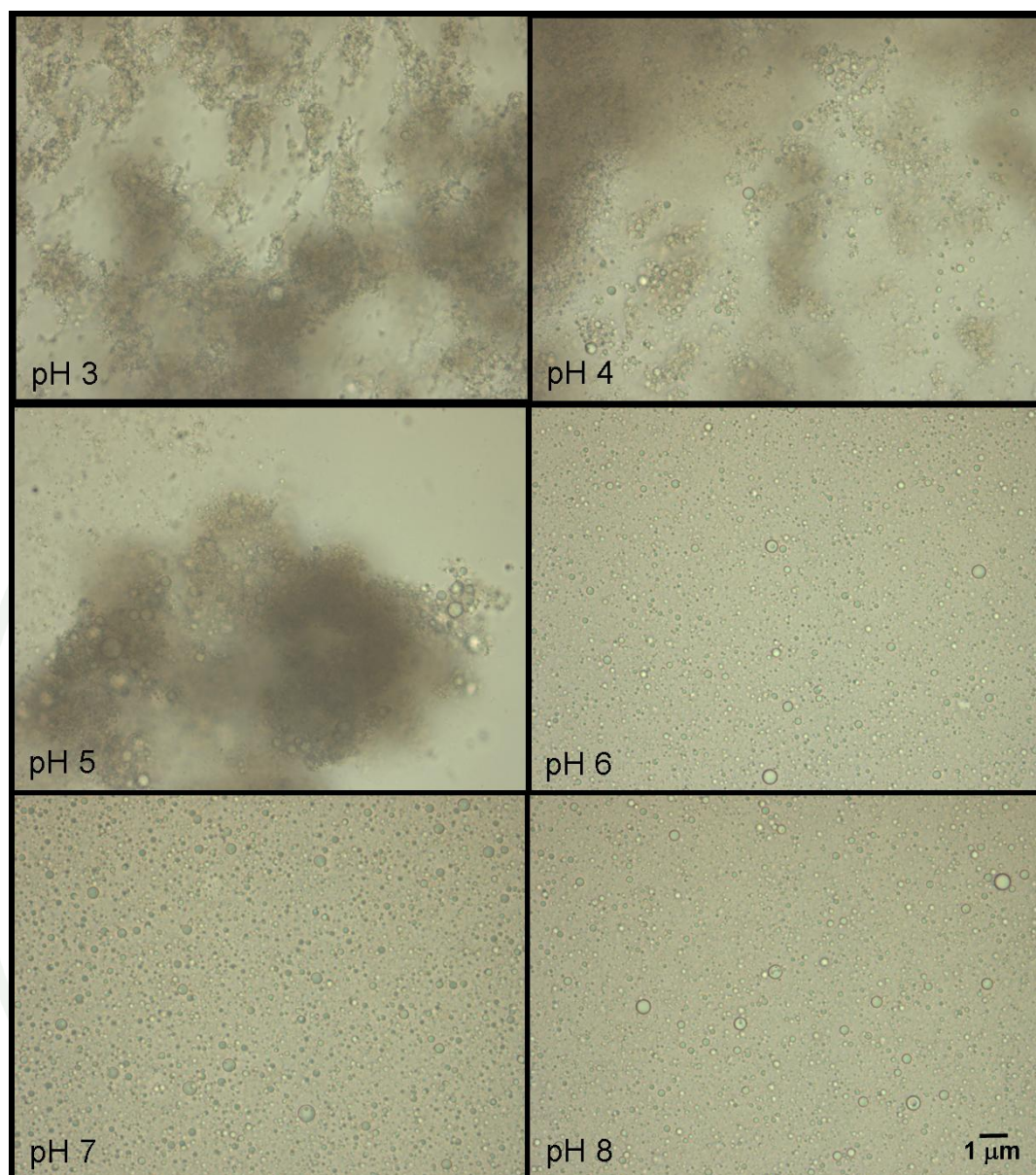
ภาพที่ 37 การกระจายตัวของขนาดอนุภาคของอิมัลชันเชิงซ้อนชนิดเอทานอลในน้ำมันในน้ำที่ไม่มีสารสกัดบัวบก (ก) และมีสารสกัดบัวบก (ข) หลังผ่านการปรับค่าพีเอชในช่วง 3-8



ภาพที่ 38 ขนาดอนุภาคของอิมัลชันเชิงซ้อนชนิดเอทานอลในน้ำมันในน้ำที่ไม่มีสารสกัดบัวบก และมีสารสกัดบัวบกหลังผ่านการปรับค่าพีเอชในช่วง 3-8



ภาพที่ 39 โครงสร้างระดับจุลภาคของอิมิดซันเชิงซ้อนชนิดเอทานอลในน้ำมันในน้ำที่ไม่มีสารสกัดบัวบกหลังการปรับค่าพีเอชในช่วง 3-8



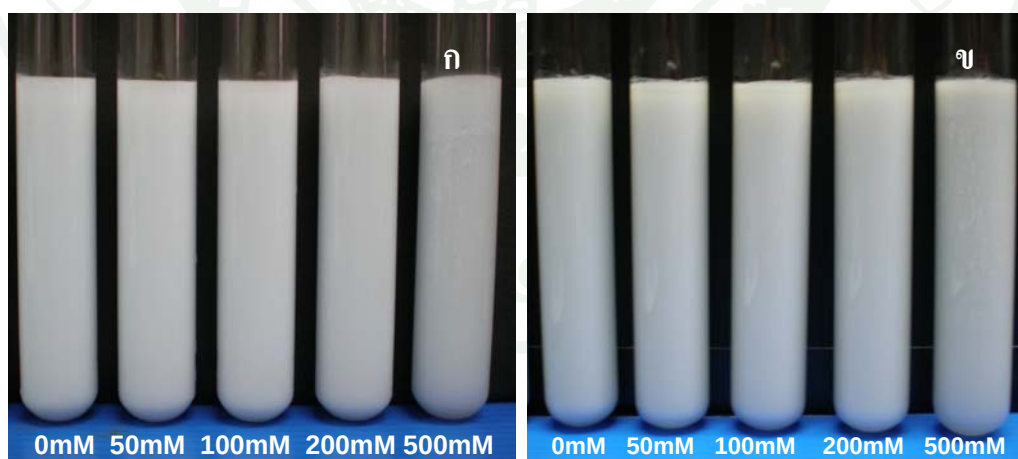
ภาพที่ 40 โครงสร้างระดับจุลภาคของอิมัลชันเชิงซ้อนชนิดเอทานอลในน้ำมันในน้ำที่มีสารสกัดบัวบกหลังการปรับค่าพีเอชในช่วง 3-8

จากผลการทดลอง ความไม่คงตัวของอิมัลชันที่พีเอช 4.0-5.0 เกิดขึ้นเนื่องจากที่พีเอชค่านี้เป็นค่าพีเอชที่ใกล้ค่า pI ของโซเดียมแคซีนซึ่งมีค่าอยู่ในช่วง 3.75-4.00 (Jahaniaval *et al.*, 2000) และ แคซีน ตกตะกอนที่ค่าพีเอช 4.6 ทำให้ประจุของโปรตีนที่ดูดซับอนุภาคไว้มีค่าต่ำ ส่งผลให้ electrostatic repulsion ระหว่างอนุภาคน้ำมันไม่เพียงพอต่อการป้องกันการรวมตัวกันจึงเกิดการแยกชั้น นอกจากนี้ที่พีเอชดังกล่าวอาจจะทำให้โซเดียมแคซีนในวัฏภาคต่อเนื่องสูญเสียการละลาย

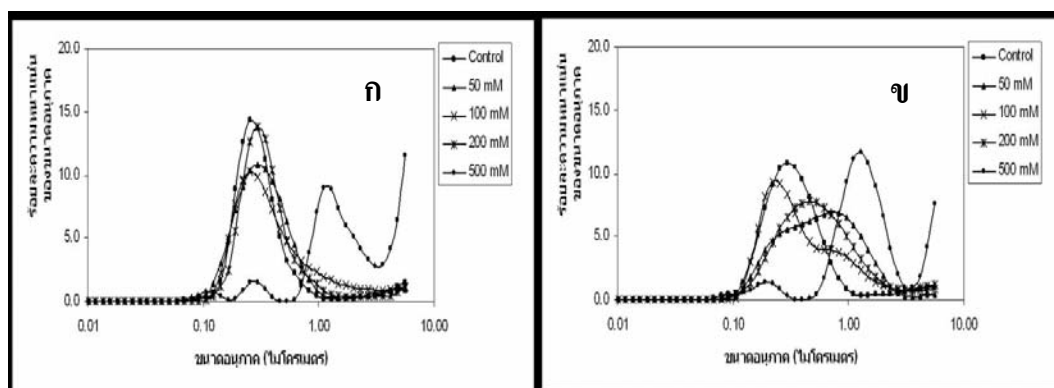
ด้วย ส่วนที่พีเอช 3.0 เนื่องจากระหว่างขั้นตอนการปรับค่าพีเอชนั้นจะต้องปรับผ่าน pI ของแคซีเนต (3.75-4.00) เพื่อให้ได้พีเอชตามต้องการ จึงทำให้อนุภาคบางส่วนเกิดการรวมตัวกันได้ (McClements, 2005; Surh *et al.*, 2006) ซึ่งจากผลการทดลองข้างต้นอิมัลชันที่เตรียมได้น่าจะมีความเหมาะสมในการนำไปใช้ในอุตสาหกรรมอาหารที่มีค่าพีเอชช่วงกลาง เช่น ผลิตภัณฑ์นมบางชนิด เป็นต้น

6.4 ผลของการเติมโซเดียมคลอไรด์

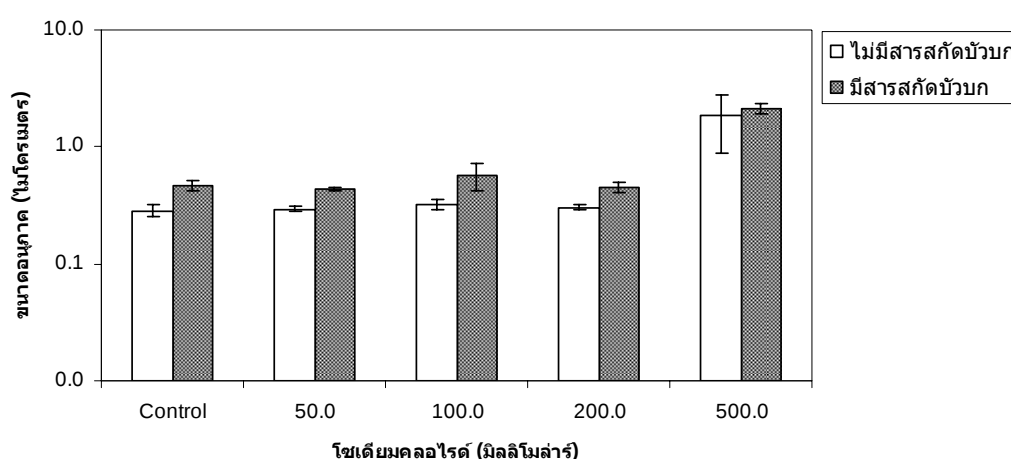
ผลของการเติมโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 0-500 มิลลิโมลาร์ ต่อความคงตัวของอิมัลชันเชิงซ้อน (อิมัลชันเชิงเดี่ยวร้อยละ 5.0 และ โซเดียมแคซีเนตร้อยละ 2.0 โดยน้ำหนัก) พบว่าอิมัลชันทั้งที่มีและไม่มีสารสกัดบับกมีความคงตัวต่อการแยกชั้นในช่วงความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ 0-200 มิลลิโมลาร์ แต่ที่ความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ 500 มิลลิโมลาร์ อิมัลชันเสียความคงตัวต่อการแยกชั้น (ภาพที่ 41) ซึ่งสอดคล้องกับการกระจายตัวและขนาดของอนุภาคอิมัลชัน (ภาพที่ 42 และ 43) โดยอิมัลชันที่เติมโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นไม่เกิน 200 มิลลิโมลาร์ มีการกระจายตัวแบบ bimodal และมีขนาดอนุภาค 0.30 ± 0.03 ไมโครเมตร ที่ไม่แตกต่างกับอิมัลชันเริ่มต้น ($p > 0.05$) แต่อิมัลชันที่เติมโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 500 มิลลิโมลาร์ มีการกระจายตัวแบบ polydispersed และขนาดอนุภาคใหญ่ขึ้น ($\sim 2.01 \pm 0.45$ ไมโครเมตร)



ภาพที่ 41 อิมัลชันเชิงซ้อนชนิดเอทานอลในน้ำมันในน้ำที่ไม่มีสารสกัดบับก (ก) และมีสารสกัดบับก (ข) หลังการเติมโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้นต่างๆ

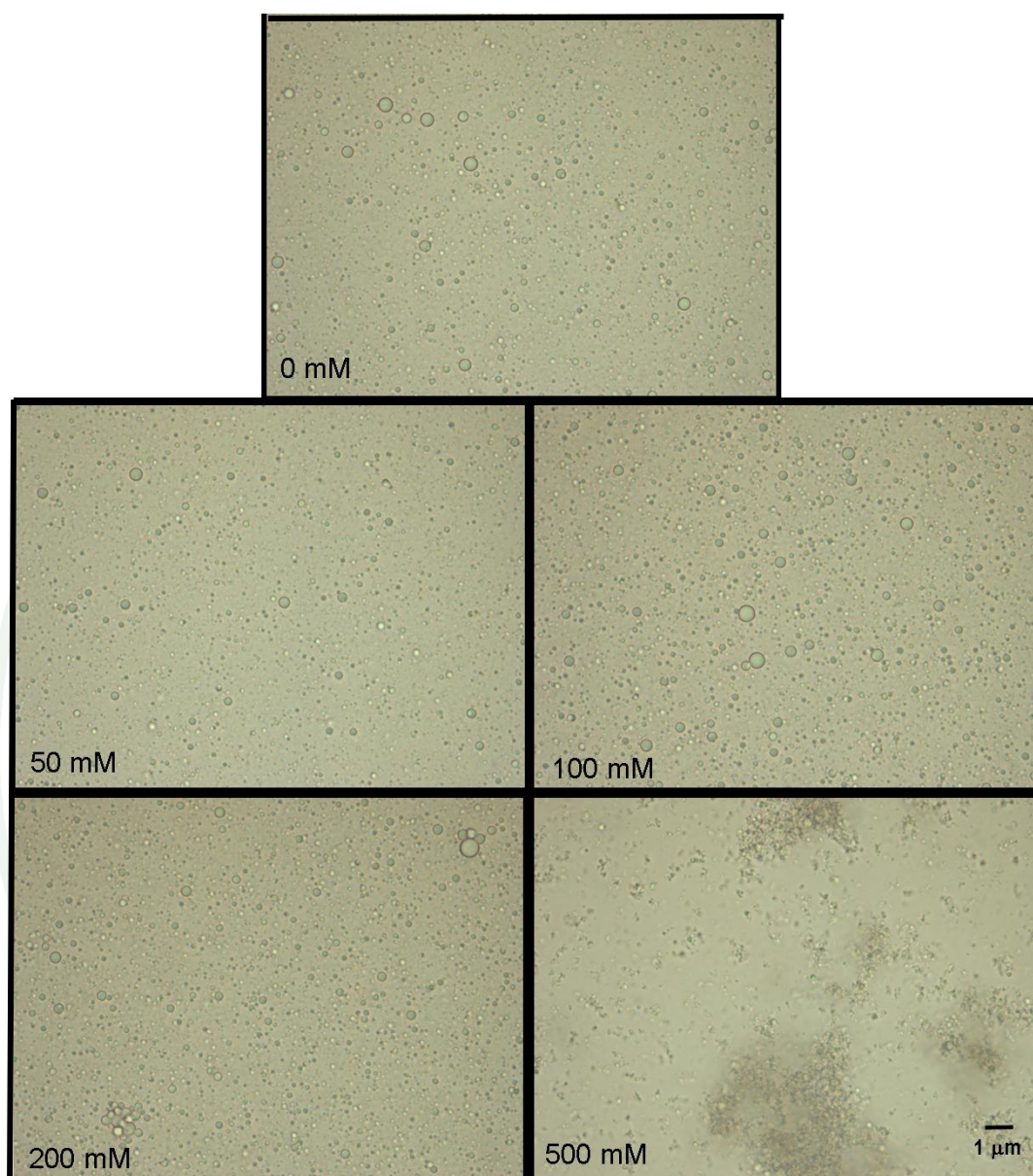


ภาพที่ 42 การกระจายตัวของขนาดอนุภาคของอิมัลชันเชิงซ้อนชนิดเอทานอลในน้ำมันที่ไม่มีสารสกัดบัวบก (ก) และมีสารสกัดบัวบก (ข) หลังการเติมโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้นต่างๆ

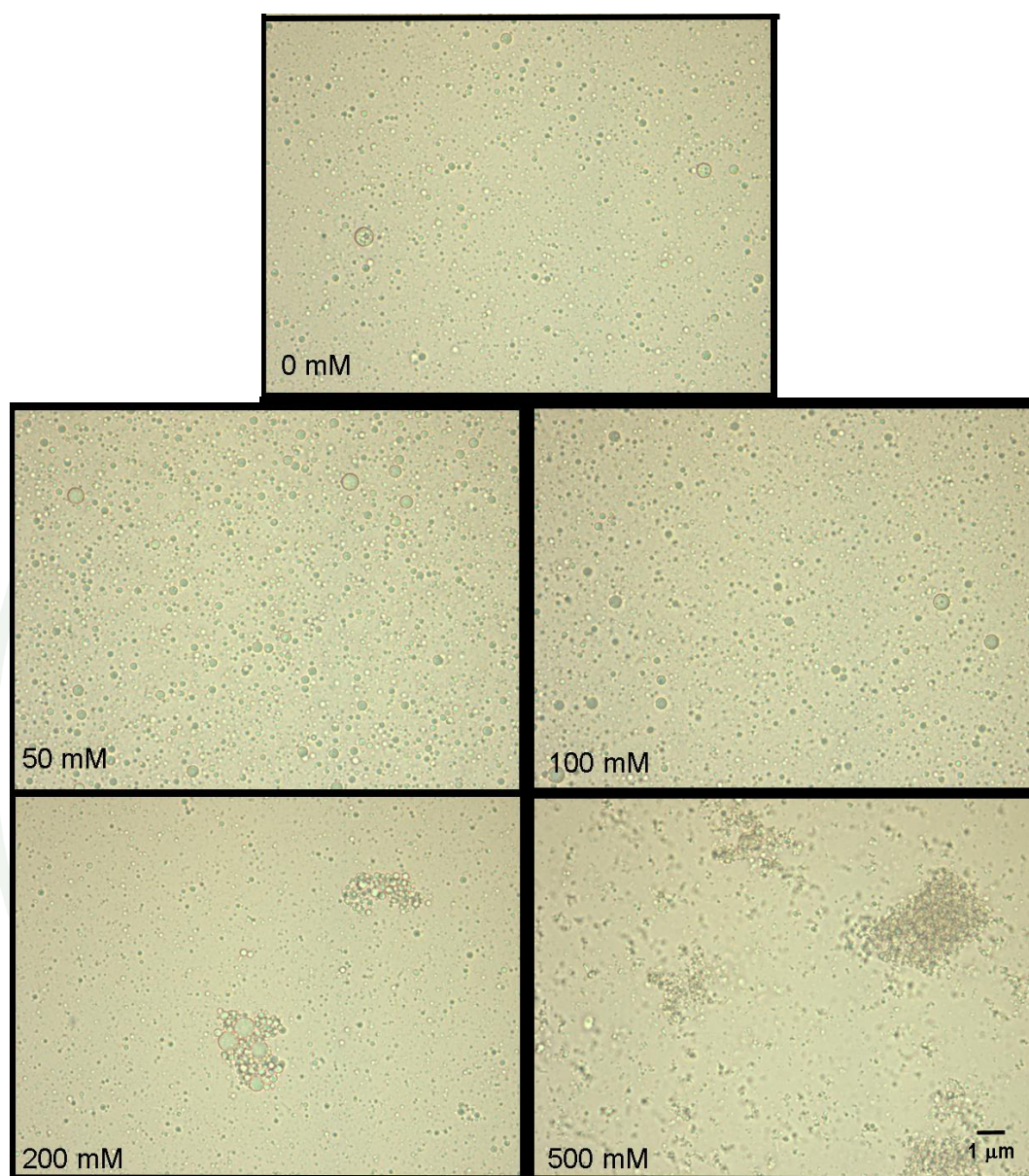


ภาพที่ 43 ขนาดอนุภาคของอิมัลชันเชิงซ้อนชนิดเอทานอลในน้ำมันในน้ำหลังการเติมโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้นต่างๆ

เมื่อพิจารณาโครงสร้างระดับจุลภาคของอิมัลชันเชิงซ้อนชนิดเอทานอลในน้ำมันในน้ำที่ไม่มีสารสกัดบัวบกและมีสารสกัดบัวบก (ภาพที่ 44 และ 45) พบว่าอิมัลชันทั้งสองที่เติมโซเดียมคลอไรด์ 0-100 มิลลิโมลาร์ มีการกระจายตัวสม่ำเสมอ ในขณะที่โซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 200 มิลลิโมลาร์ สังเกตเห็นอนุภาคในอิมัลชันบางส่วนเกิดการเกาะกลุ่มกัน แต่ที่โซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 500 มิลลิโมลาร์ อนุภาคในอิมัลชันเกิดการเกาะกลุ่มกันอย่างชัดเจน (ภาพที่ 44 และ 45)



ภาพที่ 44 โครงสร้างระดับจุลภาคของอิมัลชันเชิงซ้อนเอทานอลในน้ำมันในน้ำที่ไม่มีสารสกัด
บัวบกหลังการเติมโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้นต่างๆ



ภาพที่ 45 โครงสร้างระดับจุลภาคของอิมัลชันเชิงซ้อนเอทานอลในน้ำมันในน้ำที่มีสารสกัด
บัวบกหลังการเติมโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้นต่างๆ

โดยทั่วไปอิมัลชันที่ทำให้คงตัวด้วยโปรตีนนั้น อนุภาคสามารถมีความคงตัวอยู่ได้ด้วยแรงผลักทางไฟฟ้า (electrostatic repulsion) ขนาดของแรงผลักนี้จะมีค่าลดลงเมื่อค่า ionic strength ของวัฏภาคต่อเนื่องรอบอนุภาคเพิ่มขึ้นจากการเติมสารอิเล็กโทรไลต์ หรือเกลือชนิดต่างๆ โดยการลดลงของแรงผลักนี้เกิดเนื่องจากผลของ ion binding ซึ่งเป็นการดูดซับไอออนที่มีประจุตรงกันข้าม

กับประจุบนผิวของอนุภาค การเติมโซเดียมคลอไรด์ในวัฏภาคต่อเนื่องนั้นจะทำให้เกิดไอออนบวกและลบของ Na^+ และ Cl^- ตามลำดับ ประจุบนผิวของอนุภาคที่ทำให้คงตัวด้วยโซเดียมแคซิเนตในงานวิจัยนี้ (พีเอช ~ 7.0) มีค่าเป็นลบ จึงดูดซับไอออนบวก Na^+ และทำให้ความแรงประจุบนผิวอนุภาคลดลง ส่งผลให้อนุภาคในอิมัลชันมีโอกาสรวมตัวกันได้ง่ายขึ้น (McClements, 2005) และ electrostatic screening ซึ่งเป็นการที่ Na^+ ที่อยู่ในเฟสน้ำเป็น counter ion ที่ลดอำนาจแรงผลักระหว่างอนุภาคที่มีประจุลบเหมือนกัน สำหรับที่ความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ต่ำๆ (ไม่เกิน 200 มิลลิโมลาร์) ผลของ electrostatic screening ยังไม่มากพอที่จะทำให้อนุภาคในอิมัลชันเคลื่อนที่มารวมตัวกันได้ จึงทำให้อิมัลชันยังคงมีความคงตัว (Agboola and Dalgleish, 1995) แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ (500 มิลลิโมลาร์) ผลของ electrostatic screening ทำให้ขนาดของแรงผลัทางไฟฟ้าระหว่างประจุไม่แรงพอที่จะผลักให้อนุภาคอยู่ห่างกัน ส่งผลให้อนุภาคในอิมัลชันเคลื่อนที่เข้าหากันและเกิดการรวมตัวกันในที่สุด ซึ่งผลของ electrostatic screening ต่อความคงตัวของอิมัลชันจะเพิ่มขึ้นเมื่อความเข้มข้นและจำนวน valency ของสารอิเล็กโทรไลต์เพิ่มขึ้น (Agboola and Dalgleish, 1995; McClements, 2005)

สรุปและข้อเสนอแนะ

สรุป

การผลิตระบบอิมัลชันเชิงเดี่ยวชนิดเอทานอลในน้ำมันนั้น ชนิดและความเข้มข้นของอิมัลซิฟายเออร์ รวมถึงปริมาณเอทานอลมีผลต่อความคงตัวของอิมัลชัน โดยอิมัลซิฟายเออร์ที่เหมาะสมคือ Polyglycerol polyricinoleate (PGPR) ที่ความเข้มข้นร้อยละ 2.0 โดยน้ำหนัก และปริมาณของเอทานอลร้อยละ 10 โดยน้ำหนัก ส่งผลให้อิมัลชันที่ผลิตได้มีความคงตัว สามารถที่จะนำไปผลิตเป็นอิมัลชันเชิงซ้อนชนิดเอทานอลในน้ำมันในน้ำสำหรับห่อหุ้มสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้

การผลิตอิมัลชันเชิงซ้อนชนิดเอทานอลในน้ำมันในน้ำที่มีความคงตัวนั้น อิมัลซิฟายเออร์ที่เหมาะสมคือ โซเดียมแคซิเนต ที่ความเข้มข้นร้อยละ 2.0 โดยน้ำหนัก โดยใช้ปริมาณอิมัลชันเชิงเดี่ยวชนิดเอทานอลในน้ำมันร้อยละ 5.0 โดยน้ำหนัก ซึ่งระบบอิมัลชันที่คงตัวนี้สามารถห่อหุ้มสารสกัดบัวบกได้อย่างมีประสิทธิภาพ (ประมาณร้อยละ 97)

สภาวะแวดล้อมได้แก่ การให้ความร้อน การแช่แข็ง ค่าความเป็นกรด-ด่าง และปริมาณโซเดียมคลอไรด์ มีผลต่อความคงตัวของระบบอิมัลชัน โดยอิมัลชันมีความคงตัวต่อความร้อน (30-90 องศาเซลเซียส) การแช่แข็ง (1 รอบของการแช่แข็งและการทำละลาย) ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH 6-8) และทนต่อการเติมสารละลายเกลือโซเดียมคลอไรด์ (0-200 มิลลิโมลาร์)

ข้อเสนอแนะ

การผลิตอิมัลชันเชิงซ้อนชนิดเอทานอลในน้ำมันในน้ำสามารถที่จะเพิ่มความคงตัวของอิมัลชันดังกล่าวโดยเพิ่มความหนืดในส่วนของน้ำเฟสนอกเพื่อที่จะสามารถลดการเคลื่อนที่ชนกันระหว่างอนุภาคของอิมัลชันซึ่งเป็นสาเหตุหลักที่ทำให้อิมัลชันเสียความคงตัว โดยที่ในการเพิ่มความคงตัวของระบบอิมัลชันขึ้นนั้น อาจต้องขึ้นอยู่กับความพึงพอใจของผู้บริโภคและชนิดของผลิตภัณฑ์อาหารที่จะนำไปประยุกต์

ระบบอิมัลชันที่เตรียมได้สามารถนำไปประยุกต์เป็นระบบห่อหุ้มสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สามารถละลายได้ในเอทานอล แต่โครงสร้างและคุณสมบัติของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพแต่ละชนิดมีความแตกต่างกันซึ่งจะส่งผลกระทบต่อความคงตัวของระบบอิมัลชันได้ ดังนั้นจึงควรมีการศึกษาโครงสร้างและคุณสมบัติของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ เพื่อใช้เป็นแนวทางในการหาวิธีที่เหมาะสมสำหรับเพิ่มความคงตัวของระบบอิมัลชันดังกล่าว

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

- ดวงจันทร์ เกรียงสุวรรณ. 2546. พืชผักผลไม้ไทยมีคุณค่าเป็นทั้งอาหารและยา. สารความรู้ทางการเกษตร. แหล่งที่มา: http://natres.psu.ac.th/radio/radio_article/radio45-46/45-460032.htm, 10 มิถุนายน 2553.
- นิธิยา รัตนานนท์. 2551. เคมี่อาหาร. พิมพ์ครั้งที่ 3. โอเดียนสโตร์, กรุงเทพฯ.
- นฤมล น้อยหอย. 2551. ผลของตัวทำละลายที่ใช้สกัดและการแปรรูปต่อคุณสมบัติการต้านออกซิเดชันและสารประกอบกลุ่มไตรเทอร์ปีนในบัวบก (*Centella asiatica* (Linn.) Urban). วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- เทพกัญญา ตันติโยทัย. 2545. ผลของอิมัลซิฟายเออร์และแทนแทนกัมต่อความคงตัวของอิมัลชันชนิดน้ำมันในน้ำและการนำไปใช้ในอาหาร. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- ปัทมา ทิพย์จรวุฒิ. 2546. สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ คุณค่าจากทรัพยากรชีวภาพของไทย. เทคโนโลยีชีวภาพปริทรรศน์ 1(5): 33-34.
- ปาริฉัตร หงสประภาส. 2545. เคมี่กายภาพของอาหาร: คอลลอยด์ อิมัลชัน และเจล. มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ, กรุงเทพฯ.
- พิมพ์พร ลีลาพรพิสิฐ. 2540. อิมัลชันทางเครื่องสำอาง. โอเดียนสโตร์, กรุงเทพฯ.
- วันดี กฤษณพันธ์. 2541. สมุนไพรน่ารู้. พิมพ์ครั้งที่ 3. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพฯ.
- สุพัตรา สุนทรเสถียร. 2543. การใช้อิมัลชันระบบน้ำในน้ำมันในการผลิตซ็อกโกแลตทนความร้อน. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

- Agboola, S.O. and D.G. Dalgleish. 1995. Calcium-induced destabilization of oil-in-water emulsions stabilized by caseinate or by β -lactoglobulin. **Journal of Food Science**. 60(2): 399-404.
- Aoki, T., E.A. Decker and D.J. McClements. 2005. Influence of environmental stresses on stability of O/W emulsions containing droplets stabilized by multilayered membranes produced by a layer-by-layer electrostatic deposition technique. **Food Hydrocolloids**. 19(2): 209-220.
- Asakawa, Y., R. Matsuda and T. Takemoto. 1982. Mono- and sesquiterpenoids from hydrocotyle and *Centella* species. **Phytochemistry**. 21: 2590-2592.
- Babu. T.D., G. Kuttan and J. Padikkala. 1995. Cytotoxic and anti-tumour properties of certain taxa of Umbelliferae with special reference to *Centella asiatica* (L.) Urban. **Journal of Ethnopharmacology**. 48: 53-57.
- Bader, G., V. Wray, U. Just and K. Hiller. 1998. Enzymatic hydrolysis of the cytotoxic triterpenoid glycoside virgaureasaponin. **Phytochemistry**. 49: 153-156.
- Belitz, H.D. and W. Grosch. 1999. **Food Chemistry**. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, New York.
- Bhattacharyya, S.C. 1956a. Constituents of *Centella asiatica*: part I. Examination of the Ceylonese variety. **Journal of the Indian Chemical Society**. 33(8): 579-586.
- _____. 1956b. Constituents of *Centella asiatica*: part III. Examination of the Indian variety. **Journal of the Indian Chemical Society**. 33(8): 893-898.
- Bos. M.A. and T.V. Vliet. 2001. Interfacial rheological properties of adsorbed protein layers and surfactants: a review. **Advances in Colloid and Interface Science**. 91: 437-471.

- Chanamai, R. and D.J. McClements. 2001. Prediction of emulsion color from droplet characteristics: dilute monodisperse oil-in-water emulsion. **Food Hydrocolloids**. 15: 83-91.
- Choi, J.H., D.H. Kim, W.J. Sung, and S.K. Oh. 1982. Kinetic studies on the thermal degradation of ginsenosides in ginseng extract. **Hanguk Sikip'um Kwahakhoe Chi**. 14: 197-202.
- Coupland, J.N. and D.J. McClements. 1996. Lipid oxidation in food emulsions. **Trends in Food Science and Technology**. 7(3): 83-91.
- Cramp G.L., A.M. Docking., S. Ghosh. and N.J. Coupland. 2004. On the stability of oil-in-water emulsions to freezing. **Food Hydrocolloids**. 18: 899-905.
- Dickinson, E. 1992. **An Introduction to Food Colloids**. Oxford University Press, Oxford.
- Dickinson, E., M. Golding. and M.J.W. Povey. 1997. Creaming and flocculation of oil-in-water emulsions containing sodium caseinate. **Journal of Colloid and Interface Science**. 185: 515-529.
- Dziezak J.D. 1988. Microencapsulation and encapsulated ingredients. **Food Technology**. 42: 136-151.
- Garti, N. 1997. Double emulsions—scope, limitations and new achievements. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**. 123-124: 233-246.
- Guzey, D., H.J. Kim and D.J. McClements. 2004. Factors influencing the production of O/W emulsions stabilized by β -lactoglobulin-pectin membranes. **Food Hydrocolloids**. 18(6): 967-975.

- _____, D. and D.J. McClements. 2006. Formation, stability and properties of multilayer emulsions for application in the food industry. **Advances in Colloid and Interface Science**. 128-130: 227-248
- Hamid, A.A., Z.M. Shah, R. Muse and S. Mohamed. 2002. Characterisation of antioxidative activities of various extracts of *Centella asiatica* (L) Urban. **Food Chemistry**. 77(4): 465-469.
- Harborne, J.B. 1983. **Phytochemical Method: A Guide to Modern Techniques of Plant Analysis**. 2nd ed. Chapman and Hall Ltd, New York.
- Inamdar, P.K., A.B. Yeole, A.B. Ghogare and N.J. de Souza. 1996. Determination of biologically active constituents in *Centella asiatica*. **Journal of Chromatography A**. 742: 127-130.
- Jahaniaval, F., Y. Kakuda., V. Abraham and M.F. Marcone. 2000. Soluble protein fractions from pH and heat treated sodium caseinate: physicochemical and functional properties. **Food Research International**. 33: 637-647.
- Jia, G. and X. Lu. 2008. Enrichment and purification of madecassoside and asiaticoside from *Centella asiatica* extracts with macroporous resins. **Journal of Chromatography A**. 1193: 136-141.
- Kim, C.K., Y.Y. Hwang, J.Y. Chang, H.G. Choi, S.J. Lim and M.K. Lee. 2001. Development of a novel dosage form for intramuscular injection of titrated extract of *Centella asiatica* in a mixed micellar system. **International Journal of Pharmaceutics**. 220: 141-147.
- Klinkesorn, U., and G. Roudaut. 2010. Influence of polyglycerol polyricinoleate and sodium caseinate on interfacial properties of ethanol-oil interface, p. 208. **International Conference on Agriculture and Agro-Industry (ICAAI2010) Food, Health and Trade**. Mae Fah Luang University, Chaing Rai.

Kormin, S. 2005. **The Effect of Heat Processing on Triterpene Glycosides and Antioxidant Activity of Herbal Pegaga (*Centella asiatica* L. Urban) Drink.** M.E. Thesis, Technological University of Malaysia.

Livney, Y.D.M. Corredig and D.G. Dalgleish. 2003. Influence of thermal processing on the properties of dairy colloids. **Current Opinion in Colloid and Interface Science**: (8) 359-364.

Malvern Instruments. 2004. **Zetasizer Nano Series User Manual.** Malvern Instruments Ltd. England.

Marquez A.L., A. Medrano., L.A. Panizzolo. and J.R. Wagner. 2010. Effect of calcium salts and surfactant concentration on the stability of water-in-oil (w/o) emulsions prepared with polyglycerol poliricinoleate. **Journal of Colloid and Interface Science**. 341: 101-108.

McClements, D.J. 2000. Comments on viscosity enhancement and depletion flocculation by polysaccharides. **Food Hydrocolloids**. 14: 173-177.

_____. 2004. Protein stabilized emulsion. **Current Opinion in Colloid and Interface Science**. 9: 305-313.

_____. 2005. **Food Emulsions: Principles, Practice, and Techniques.** CRC Press LLC., Florida.

_____, E.A. Decker. and J. Weiss. 2007. Emulsion-based delivery systems for lipophilic bioactive components. **Journal of Food Science**. 72(8) R109-R124.

Moreau, L., H.J. Kim, E.A. Decker and D.J. McClements. 2003. Production and characterization of oil-in-water emulsions containing droplets stabilized by beta-lactoglobulin–pectin membranes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 51(22):6612–7.

- Muangnoi, C. 2007. **Bioaccessibility, Cellular Uptake, and Angiotensin I Converting Enzyme (ACE) Inhibitory Activity of Triterpenoids from *Centella asiatica* (Linn.) Urban.** M.S. Thesis, Mahidol University.
- Nakajima, M., H. Nabetani, S. Ichikawa and Q.Y. Xu. 2003. Functional emulsions. **US Patent 6,538,019.**
- Ogawa, S., E.A. Decker and D.J. McClements. 2003. Influence of environmental conditions on the stability of oil in water emulsions containing droplets stabilized by lecithin-chitosan membranes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 51: 5522-5527.
- Paranuwech, J. and J.N. Couplad. 2003. Effect of surfactant type on the stability of oil-in-water emulsions to dispersed phase crystallization. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**. 223: 251-262.
- Park, B.C., K.O. Bosire, E.S. Lee, Y.S. Lee and J.A. Kim. 2004. Asiatic acid induces apoptosis in SK-MEL-2 human melanoma. **Cancer Letters**. 218(1): 81-90.
- Pearce, K.N and J.E. Kinsella. 1978. Emulsifying properties of protein: evaluation of a turbidimetric technique. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 26(3): 716-723.
- Poli, G., G. Leonarduzzi, F. Biasi and E. Chiarpotto. 2004. Oxidative stress and cell signaling. **Current Medical Chemistry**. 11: 1163-1182.
- Pramongkit, K. 1997. **Active Constituents of *Centella asiatica* (Linn.) Urban in Thailand.** M. S. Thesis, Mahidol University.
- Rao, P.S. and T.R. Seshadri. 1969. Variation in the chemical composition of Indian samples of *Centella asiatica*. **Current Science**. 38(4): 77.

- Rastogi, R.P., B. Sarkar and M.L. Dhar. 1960. Chemical examination of *Centella asiatica* Linn.:part I. Isolation of the chemical constituents. **Journal of Sciencetific & Industrial Research B.** 19(7): 252-257.
- Sing, B. and R.P. Rastogi. 1969. A reinvestigation of triterpenes of *Centella asiatica*. **Phytochemistry.** 8: 917-921.
- Somchit, M.N., M.R. Sulaiman, A. Zuraini, L. Samsuddin, N. Somchit, D.A. Israf and S. Moin. 2004. Antinociceptic and antiinflammatory effect of *Centella asiatica*. **Indian Journal of Pharmacology.** 36: 377-380.
- Srinivasan, M., H. Singh. and P.A. Munro. 2002. Formation and stability of sodium caseinate emulsions: influence of retorting (121°C for 15 min) before or after emulsification . **Food Hydrocolloids.** 16: 153-160.
- Su, J., J. Flanagan, Y. Hemar and H. Singh. 2006. Synergistic effects of polyglycerol ester of polyricinoleic acid and sodium caseinate on the stabilisation of water–oil–water emulsions. **Food Hydrocolloids.** 20: 261-268.
- Sugiura, S., M. Nakajima, K. Yamamoto, S. Iwamoto, T. Oda, M. Satake and M. Seki. 2004. Preparation characteristics of water-in-oil-in-water multiple emulsions using microchanel emulsification. **Journal of Colloid and Interface Science.** 270: 221-228.
- Sun, C. and S. Gunasekaran. 2009. Effect of protein concentration and oil-phase volume fraction on the stability and rheology of menhaden oil-in-water emulsions stabilized by whey protein isolate with xanthan gum. **Food Hydrocolloids.** 23: 165-174.
- Surh, J., G.T. Vladislavljevic, S. Mun and D.J. McClements. 2007. Preparation and characterization of water/oil and water/oil/water emulsions containing biopolymer-gelled water droplets. **Journal of Agricultural and Food Chemistry.** 55(1): 175-184.

- Thanasukarn, P., R. Pongsawatmanit and D.J. McClements. 2006. Utilization of layer-by-layer deposition technique to improve freeze-thaw stability of oil-in-water emulsions. **Food Research International**. 39: 721-729.
- van der Graaf, S., C.G.P.H. Schroen and R.M. Boom. 2005. Preparation of double emulsions by membrane emulsification- a review. **Journal of Membrane Science** 251: 7-15.
- Vogel, H.G., N. de Souza and A. D'Sa. 1990. Effect of terpenoids isolated from *Centella asiatica* on granuloma tissue. **Acta Therapeutica Sinica**. 16: 285-298.
- Walstra, P. and T. van Vliet. 2007. Dispersed Systems: Basic Consideration, pp 783-848. In S. Damodaran, K.L. Parkin and O.R. Fennema., eds. **Food Chemistry**. CRC Press, New York.
- Wilson, R., B.J. Van Schie and D. Howes. 1998. Overview of the preparation, use and biological studies on polyglycerol polyricinoleate (PGPR). **Food and Chemical Toxicology**. 36: 711-718
- Xu, Q., M. Nakajima, H. Nabetani, S. Ichikawa and X. Liu. 2001a. The ethanol content and emulsifying agent concentration on the stability of vegetable oil-ethanol emulsions. **Journal of the American Oil Chemists Society**. (78)12: 1185-1190.
- _____, Q., M. Nakajima, H. Nabetani, S. Ichikawa and X. Liu. 2001b. Effect of the dispersion behavior of a nonionic surfactant on surface activity and emulsion stability. **Journal of Colloid and Interface Science**. 242: 443-449.
- _____, Q., M. Nakajima, H. Nabetani, S. Ichikawa and X. Liu. 2002. Factors affecting the properties of ethanol-in-oil emulsions. **Food Science and Technology Research**. 8(1): 36-41.





วิธีการสกัดและเตรียมสารสกัดบวบผง

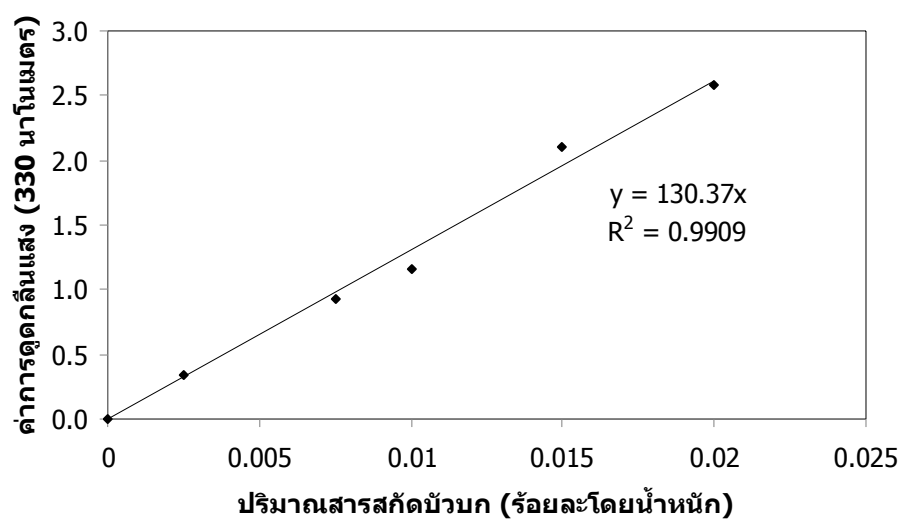
เตรียมสารสกัดบวบตามวิธีของนฤมล (2551) โดยนำบวบส่วนใบและก้านที่ผ่านการล้างแบบเยือกแข็ง (Freeze dryer, Dura-Top™ MP, FTS SYSTEMS, USA) บดให้ละเอียดด้วยเครื่องบดละเอียด (Blender, VA-M11L, Hitachi, Tokyo, Japan) จากนั้นนำตัวอย่าง 2 กรัม ใส่ลงในตัวทำละลายเอทานอล 80 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ปั่นผสมด้วยเครื่องปั่นผสมแบบมือถือเป็นเวลา 2 นาที แล้วผสมตัวอย่างให้เข้ากันโดยเครื่องสั่นสะเทือนด้วยระบบคลื่นเสียง (ultra sonicator) ที่ความถี่ 35 กิโลเฮิร์ตซ์ เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำไปเหวี่ยงด้วยเครื่องเหวี่ยงแยกแบบควบคุมอุณหภูมิที่ความเร็วรอบ 11,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ทำการสกัดตัวอย่างบวบ 2 รอบ เก็บส่วนใสไว้ แล้วปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 50 มิลลิลิตร ด้วยเอทานอล 80 เปอร์เซ็นต์ ทำการระเหยเอทานอลที่ความดัน 175 มิลลิบาร์ ด้วยเครื่องระเหยแบบสุญญากาศ แล้วมาทำแห้งด้วยวิธีทำแห้งแบบเยือกแข็ง (Freeze dryer, Heto model FD2.5, Heto Lab Equipment Manufacturers, Denmark) จากนั้นนำมาบดให้เป็นผงเก็บไว้ในโถสุญญากาศ



ภาพผนวกที่ ก1 ลักษณะบวบสด (ก) สารสกัดบวบก่อนทำแห้ง (ข) และสารสกัดบวบหลังทำแห้ง (ค)



ภาคผนวก ข
กราฟมาตรฐานสารสกัดบัวบก



ภาพผนวกที่ ข1 กราฟมาตรฐานสารสกัดบัวบก

ประวัติการศึกษา และการทำงาน

ชื่อ-นามสกุล	นายศรายุทธ ดวงแก้ว
วัน เดือน ปี ที่เกิด	15 มิถุนายน 2526
สถานที่เกิด	อำเภอบางปลาม้า จังหวัดสุพรรณบุรี
ประวัติการศึกษา	วิทยาศาสตรบัณฑิต (วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร) มหาวิทยาลัยราชภัฏสวนดุสิต
ตำแหน่งหน้าที่การงานปัจจุบัน	-
สถานที่ทำงานปัจจุบัน	-
ผลงานดีเด่นและรางวัลทางวิชาการ	-
ทุนการศึกษาที่ได้รับ	-