



รายงานการวิจัย

เรื่อง

การพัฒนาวิธีการตรวจสอบปริมาณสารประกอบฟีนอลิกในช็อคโกแลต
ด้วยเทคนิคสเปกโตรสโคปีอินฟราเรดย่านใกล้
Rapid method development for phenolic compounds in chocolate
using near infrared spectroscopy

ชื่อผู้วิจัย

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. โสภาค สอนไ

Assist. Prof. Sopark Sonwai, Ph.D.

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อรุณศรี ลีจිරจำเนียร

Assist. Prof. Arunsri Leejeerajumnean, Ph.D.

นางสาววรรณวรา อัสวานุวัตร

Mrs. Wanwara Asawanuwat

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก

สถาบัน วิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยศิลปากร ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2557

ปีที่ดำเนินการเสร็จ พ.ศ. 2559



Research Report

Rapid method development for phenolic compounds in chocolate
using near infrared spectroscopy

การพัฒนาวิธีการตรวจสอบปริมาณสารประกอบฟีนอลิกในช็อกโกแลตด้วยเทคนิคสเปกโตรสโกปีอินฟราเรด
ย่านใกล้

Researchers

Assist. Prof. Sopark Sonwai, Ph.D.

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. โสภาค สอนไ

Assist. Prof. Arunsri Leejeerajumnean, Ph.D.

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อรุณศรี ลีจีระจำเริญ

Ms. Wanwara Asawanuwat

นางสาววรรณวรา อัสวานูวัตร

This research is financially supported by
Silpakorn University Research and Development Institute
(Fiscal Year 2014)

Year of completion: 2016

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากสถาบันวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยศิลปากร ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2557 ผู้วิจัยต้องขอขอบพระคุณภาควิชาเทคโนโลยีอาหาร คณะวิศวกรรมศาสตร์และเทคโนโลยีอุตสาหกรรม มหาวิทยาลัยศิลปากรได้ให้การสนับสนุนเครื่องมือและสถานที่ตลอดระยะเวลาดำเนินงานวิจัย

ชื่อโครงการ การพัฒนาวิธีการตรวจสอบปริมาณสารประกอบฟีนอลิกในช็อกโกแลตด้วยเทคนิคสเปกโตร-สโคปีอินฟราเรดย่านใกล้

- ชื่อผู้วิจัย
1. ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. โสภาค สอนไฉ (หัวหน้าโครงการ)
ภาควิชาเทคโนโลยีอาหาร คณะวิศวกรรมศาสตร์และเทคโนโลยีอุตสาหกรรม
มหาวิทยาลัยศิลปากร
 2. ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อรุณศรี ลีจิระจำเริญ (ผู้ร่วมวิจัย)
ภาควิชาเทคโนโลยีอาหาร คณะวิศวกรรมศาสตร์และเทคโนโลยีอุตสาหกรรม
มหาวิทยาลัยศิลปากร
 3. นางสาววรรณวรา อัครานวัตร (ผู้ร่วมวิจัย)
ภาควิชาเทคโนโลยีอาหาร คณะวิศวกรรมศาสตร์และเทคโนโลยีอุตสาหกรรม
มหาวิทยาลัยศิลปากร

แหล่งทุนอุดหนุนการวิจัย งบประมาณแผ่นดินประจำปี 2557
สถาบันวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยศิลปากร

ปีที่เสร็จ พ.ศ. 2559

ประเภทการวิจัย การวิจัยประยุกต์

สาขาวิชา (อ้างอิงตามวช.) สาขาเกษตรศาสตร์และชีววิทยา

บทคัดย่อ

ช็อกโกแลต (chocolate) เป็นอาหารประเภทขนมหวานที่มีสารประกอบฟีนอลิก (phenolic compounds) ปริมาณมาก งานวิจัยนี้มีจุดมุ่งหมายเพื่อพัฒนาวิธีวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกที่สำคัญในช็อกโกแลต คือสารโมเลกุลเดี่ยวในกลุ่มคาเทชิน (catechins) ได้แก่ คาเทชิน (catechin) และอีพิกคาเทชิน (epicatechin) โดยใช้เทคนิคสเปกโตรสโคปีอินฟราเรดย่านใกล้แบบฟูเรียร์ทรานส์ฟอร์ม (Fourier transform-near infrared spectroscopy, FT – NIRS) เปรียบเทียบกับค่าจริงจากวิธีมาตรฐานคือเทคนิควิเคราะห์ปริมาณสารประกอบอินทรีย์ในสถานะของเหลวสมรรถนะสูง (High performance liquid chromatography, HPLC) ที่มีอุปกรณ์ตรวจวัดสารชนิดเรืองแสง (fluorescence detector) พบว่าอีพิกคาเทชินมีปริมาณมากกว่าคาเทชิน สารทั้งสองชนิดมีปริมาณมากที่สุดในดาร์คช็อกโกแลต (dark chocolate) ช็อกโกแลตนม (milk chocolate) และช็อกโกแลตขาว (white chocolate) ตามลำดับ สมการแคลิเบรชันที่พัฒนาขึ้นเหมาะสำหรับการนำไปใช้ในงานวิจัยและสามารถนำไปประยุกต์ใช้ได้ในงานทั่วไป (คาเทชิน $R^2 = 0.880$, อีพิกคาเทชิน $R^2 = 0.892$) ปริมาณสารทั้งสองชนิดที่ได้จากการทำนายไม่แตกต่างจากปริมาณจริงที่วิเคราะห์ได้จากวิธีมาตรฐานอย่างมีนัยสำคัญที่ความเชื่อมั่น 95% นอกจากนี้ปริมาณโกโก้แมสที่ระบุบนฉลากบรรจุภัณฑ์มีความสัมพันธ์เชิงเส้นกับปริมาณรวมของสารทั้งสองชนิด ($R^2 = 0.6895$) ผู้บริโภคที่ต้องการเลือกซื้อช็อกโกแลตเพื่อสุขภาพสามารถประมาณปริมาณสารประกอบฟีนอลิกที่สำคัญในช็อกโกแลตได้อย่างคร่าวๆ ได้จากร้อยละสัดส่วนของโกโก้แมสที่ระบุบนฉลากบรรจุภัณฑ์

คำสำคัญ : ช็อกโกแลต, เทคนิคสเปกโตรสโคปีอินฟราเรดย่านใกล้, สารประกอบฟีนอลิก, คาเทชิน, อีพิกคาเทชิน

Research Title: Rapid method development for phenolic compounds in chocolate using near infrared spectroscopy

Researcher: Assist. Prof. Sopark Sonwai, Ph.D. (Project Leader)
Department of Food Technology,
Faculty of Engineering and Industrial Technology,
Silpakorn University

Researcher: Assist. Prof. Arunsri Leejeerajumnean, Ph.D. (Co-Researcher)
Department of Food Technology,
Faculty of Engineering and Industrial Technology,
Silpakorn University

Researcher: Ms. Wanwara Asawanuwat (Co-Researcher)
Department of Food Technology,
Faculty of Engineering and Industrial Technology,
Silpakorn University

Research Grants: Fiscal Year 2014
Research and Development Institute, Silpakorn University

Year of completion: 2016

Type of research: Applied Research

Subjects (based NRCT): Agriculture and Biology

Abstract

Chocolate is a confectionary which contains a significant amount of phenolic compounds. The object of this study was to develop the quantified assay of dominant monomeric catechins (catechin and epicatechin) in chocolates by Fourier transform-near infrared spectroscopy (FT – NIRS) compared with high performance liquid chromatography (HPLC) method with fluorescence detector. Epicatechin contents were higher than catechin contents in all chocolate samples. Dark chocolates presented the highest contents of both analytes, followed by milk and white chocolates. The developed equations for both analytes could be used for research and general application (catechin $R^2 = 0.880$, epicatechin $R^2 = 0.892$). The FT – NIRS results exhibited no significant mean difference with the reference method at 95% confidence. A linear relationship between the sum of analytes and cocoa mass content on their labels was found ($R^2 = 0.6895$). The sum of catechin and epicatechin contents was roughly reflected by the percentage of cocoa mass.

Keywords: Chocolates, FT – NIRS, Phenolic compounds, Catechin, Epicatechin

สารบัญ

	หน้า
ปกใน	ก
กิตติกรรมประกาศ.....	ค
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	จ
สารบัญ	ฉ
สารบัญตาราง	ช
สารบัญภาพ	ณ
บทที่	
1 บทนำ.....	
ความสำคัญ และที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย.....	1
วัตถุประสงค์ในการทำวิจัย	1
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	1
ขอบเขตของการวิจัย.....	1
การทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง.....	2
ซ็อกโกแลต.....	2
ประวัติและความเป็นมา.....	2
การผลิตซ็อกโกแลต	2
สารประกอบฟีนอลิกในซ็อกโกแลต	4
เทคนิค HPLC	5
เทคนิคสเปกโตรสโกปีอินฟราเรดย่านใกล้.....	7
หลักการ	7
เครื่องมือและอุปกรณ์สเปกโตรสโกปีอินฟราเรดย่านใกล้.....	10
เครื่องสเปกโตรมิเตอร์.....	11
ระบบการวัด.....	13
การปรับแต่งสเปกตรัมก่อนการวิเคราะห์	14
ขั้นตอนการวิเคราะห์ข้อมูลจากสเปกตรัมอินฟราเรดย่านใกล้.....	22
เทคนิคสเปกโตรสโกปีอินฟราเรดย่านใกล้กับการวิเคราะห์สารคาเทชินในซ็อกโกแลต.....	29
2 คำสำคัญของโครงการวิจัย.....	30
3 เนื้อเรื่อง.....	31
ทฤษฎี สมมติฐาน และกรอบแนวความคิดของงานวิจัย.....	31
วิธีดำเนินการวิจัย.....	31
ประเภทตัวอย่างและการเตรียมตัวอย่าง	31
ประเภทตัวอย่าง	31

สารบัญ (ต่อ)

บทที่		หน้า
3	เนื้อเรื่อง.....	
	การเตรียมตัวอย่าง.....	31
	การตรวจวัดสเปกตรัม.....	31
	การตรวจวัดค่าทางเคมีด้วยวิธีมาตรฐาน.....	32
	สารเคมี.....	32
	อุปกรณ์และเครื่องมือ.....	32
	การตรวจวัดปริมาณคาเทชินและอีพิกาทะชิน.....	32
	การคำนวณปริมาณสารในตัวอย่าง.....	34
	การสร้างสมการแคลิเบรชัน.....	35
4	ผลการวิจัยและวิจารณ์.....	35
	เทคนิคสเปกโตรสโคปีอินฟราเรดย่านใกล้.....	35
	ปริมาณสารคาเทชินและอีพิกาทะชินเปรียบเทียบกับปริมาณโกล์แมนส์ที่ระบุบนฉลาก.....	41
5	สรุป อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ.....	44
6	บรรณานุกรม.....	45
	ภาคผนวก.....	
	ภาคผนวก ก. ตัวอย่างซีอคโกแลตในงานวิจัย.....	51
	ภาคผนวก ข. ตัวอย่างซีอคโกแลตในงานวิจัย.....	54
	ภาคผนวก ค. ค่าทางเคมีจากวิธีมาตรฐาน.....	56
	ภาคผนวก ง. ข้อมูลสมการแคลิเบรชันและการทวนสอบ.....	59
	ประวัติผู้วิจัย.....	66

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	ชนิดและส่วนผสมของช็อคโกแลต	3
2	พืชหรือแถบที่ปรากฏในเส้นสเปกตรัมในช่วงการดูดกลืนที่สำคัญ.....	10
3	การสร้างสมการแคลิเบรชัน.....	23
4	การแปลความหมายค่าสัมประสิทธิ์การพิจารณา	27
5	แนวทางการอธิบายความสามารถของสมการแคลิเบรชันด้วยค่า RPD.....	29
6	เวลาที่สารใช้ในการเคลื่อนที่ผ่านคอลัมน์	34
7	ปริมาณคาเทชินและอีพิกาทะชินจากกลุ่มตัวอย่างที่ใช้สร้างสมการแคลิเบรชันและการทวนสอบ.....	38
8	ค่าที่ได้จากการทำนายเปรียบเทียบกับค่าจากวิธีมาตรฐานของปริมาณคาเทชินและอีพิกาทะชิน	38
9	ค่าทางสถิติของผลการวิเคราะห์	40
10	ปริมาณสารคาเทชินและอีพิกาทะชินเฉลี่ยในดาร์กช็อคโกแลต ช็อคโกแลตนม และช็อคโกแลตขาว	41
11	ค่าทางเคมีจากวิธีมาตรฐานของคาเทชินและอีพิกาทะชิน.....	57
12	ข้อมูลสมการแคลิเบรชันของคาเทชิน.....	60
13	ข้อมูลการทวนสอบสมการแคลิเบรชันของคาเทชิน	62
14	ข้อมูลสมการแคลิเบรชันของอีพิกาทะชิน	63
15	ข้อมูลการทวนสอบสมการแคลิเบรชันของอีพิกาทะชิน	65

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	โครงสร้างของคาเทชินที่สำคัญ	5
2	การยืดแบบสมมาตร และแบบไม่สมมาตรของพันธะระหว่างอะตอม	8
3	การงอในระนาบ และการงอนอกระนาบของพันธะระหว่างอะตอม	8
4	การเปลี่ยนแปลงระดับพลังงานการสั่นแบบโอเวอร์โทนของโมเลกุลเมื่อถูกคลื่นรังสีอินฟราเรด ย่านใกล้.....	9
5	องค์ประกอบเครื่องสเปกโตรมิเตอร์อินฟราเรดย่านใกล้	11
6	หลักการของอินเทอร์เฟียโรมิเตอร์แบบ Michealson.....	12
7	ระบบการวัดของเทคนิคสเปกโตรสโคปีอินฟราเรดย่านใกล้.....	13
8	สเปกตรัมที่ได้รับผลกระทบแบบเบสไลน์ออฟเซต และแบบเบสไลน์ชิฟต์เชิงเส้น	15
9	ขนาดของเซกเมนต์และขนาดของช่องห่างที่กำหนดในสเปกตรัมเพื่อคำนวณค่าอนุพันธ์	16
10	สเปกตรัมเดิม และอนุพันธ์อันดับหนึ่งของสเปกตรัม	17
11	สเปกตรัมเดิม และอนุพันธ์อันดับสองของสเปกตรัม	18
12	สเปกตรัมที่ได้รับผลกระทบจากการกระเจิงแสง	19
13	สเปกตรัมเดิมที่ได้รับผลกระทบแบบคูณ และสเปกตรัมหลังการปรับแก้การกระเจิงแบบพหุคูณ	20
14	การแปลงข้อมูลสเปกตรัมด้วยเทคนิคการแปลงฟูเรียร์	22
15	ความสัมพันธ์ของสมการถดถอยเชิงเส้นอย่างง่าย	24
16	การสร้างตัวแปรใหม่ที่เรียกว่า ปัจจัย หรือองค์ประกอบหลัก	25
17	สเปกตรัมก่อนการปรับแต่งของสารคาเทชินบริสุทธิ์	30
18	สเปกตรัมก่อนการปรับแต่งของดาร์คช็อคโกแลต ช็อคโกแลตนม และช็อคโกแลตขาว.....	36
19	regression coefficient plot ของสมการแคลิเบรชันที่สร้างด้วยการถดถอยกำลังสองน้อยที่สุด บางส่วนของคาเทชิน และอีพิกคาเทชิน	37
20	ความสัมพันธ์ระหว่างค่าที่ได้จากวิธีมาตรฐานกับค่าที่ทำนายได้จากเทคนิคสเปกโตรสโคปีอินฟราเรด ย่านใกล้ของคาเทชิน และอีพิกคาเทชิน.....	39
21	กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างร้อยละของโกโก้แมสที่ระบุบนบรรจุภัณฑ์กับปริมาณรวมของ คาเทชินและอีพิกคาเทชิน ปริมาณอีพิกคาเทชิน และปริมาณคาเทชิน	42
22	กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณคาเทชินกับปริมาณอีพิกคาเทชิน	43
23	ปริมาณโกโก้แมสที่ระบุบนฉลากบรรจุภัณฑ์ของดาร์คช็อคโกแลตแต่ละยี่ห้อ.....	52
24	ปริมาณโกโก้แมสที่ระบุบนฉลากบรรจุภัณฑ์ของช็อคโกแลตนมและช็อคโกแลตขาวแต่ละยี่ห้อ.....	53
25	ขั้นตอนการสร้างสมการแคลิเบรชัน	55
26	ขั้นตอนการทวนสอบสมการแคลิเบรชัน.....	55

1. บทนำ

1.1 ความสำคัญ และที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

ช็อกโกแลตเป็นผลิตภัณฑ์อาหารประเภทขนมหวานที่ได้รับความนิยมไปทั่วโลก รวมถึงประเทศไทย ช็อกโกแลตมีส่วนผสมหลักที่สำคัญคือโกโก้แมส (cocoa mass) เนยโกโก้ (cocoa butter) นมผง และน้ำตาล โดยโกโก้แมสนั้นผลิตจากผลโกโก้ เป็นส่วนผสมที่ทำให้เกิดสีน้ำตาลในช็อกโกแลตและถือว่าเป็นส่วนผสมที่สำคัญที่สุดในช็อกโกแลตในแง่ของทางโภชนาการ ทั้งนี้เพราะว่าองค์ประกอบที่ทำให้เกิดสีน้ำตาลเหล่านั้นหลายชนิดเป็นสารประกอบฟีนอลิกที่มีคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระที่มีประสิทธิภาพสูง งานวิจัยหลายชิ้นได้แสดงให้เห็นว่าการรับประทานช็อกโกแลตในปริมาณที่พอเหมาะนั้นให้ประโยชน์แก่ร่างกาย (Beckett, 2008) ซึ่งสารประกอบ ฟีนอลิกที่มีอยู่มากในช็อกโกแลตนั้นคือสารในกลุ่มฟลาโวนอยด์ ที่โดดเด่นคือสารโอมิเลกุลเดี่ยว ได้แก่ คาเทชิน และอีพิคาเทชิน ปัจจุบันผู้บริโภคให้ความใส่ใจด้านสุขภาพมากขึ้น หลายคนหันมาบริโภคช็อกโกแลตเพราะต้องการได้รับสารประกอบฟีนอลิกที่มีประโยชน์ เพื่อตอบสนองความต้องการของผู้บริโภค ผู้ผลิตช็อกโกแลตหลายรายจึงผลิตช็อกโกแลตที่มีปริมาณของโกโก้แมสแตกต่างกันไปออกมาจำหน่าย ซึ่งช็อกโกแลตที่มีปริมาณโกโก้แมสเพิ่มขึ้นก็จะมีปริมาณของสารฟีนอลิกเพิ่มขึ้น การวัดปริมาณสารประกอบฟีนอลิกในผลิตภัณฑ์ช็อกโกแลตสามารถทำได้โดยใช้วิธีการทางเคมี เช่น HPLC ที่มีอุปกรณ์ตรวจวัดสารชนิดเรืองแสง (Langer และคณะ, 2011 และ Shumow และ Bodor, 2011) แต่ข้อจำกัดของวิธีทางเคมี คือ ต้องทำลายตัวอย่าง การเตรียมตัวอย่างและการวิเคราะห์ใช้เวลาานาน รวมถึงมีค่าใช้จ่ายเรื่องสารเคมี ดังนั้นเทคนิคสเปกโตรสโกปีอินฟราเรด ย่านใกล้ (Near Infrared Spectroscopy, NIRS) ซึ่งกำลังได้รับความนิยมสำหรับนำมาใช้ในการวิเคราะห์เกี่ยวกับผลิตภัณฑ์อาหารเนื่องจากสามารถวิเคราะห์ตัวอย่างได้โดยไม่ทำให้ตัวอย่างได้รับความเสียหาย ใช้สารเคมีน้อยหรือไม่ใช้เลย และสามารถวิเคราะห์ผลได้อย่างรวดเร็ว จึงเป็นวิธีการวิเคราะห์ที่น่าสนใจสำหรับการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกที่สำคัญในช็อกโกแลต

1.2 วัตถุประสงค์ในการทำวิจัย

1. เพื่อตรวจวัดสเปกตรัมของช็อกโกแลตด้วยสเปกโตรสโกปีอินฟราเรดย่านใกล้
2. เพื่อตรวจวัดปริมาณสารประกอบฟีนอลิกที่สำคัญในช็อกโกแลตด้วยวิธีทางเคมี
3. เพื่อศึกษาการสร้างแบบจำลองที่เหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์สารประกอบฟีนอลิกในช็อกโกแลตด้วยเทคนิคสเปกโตรสโกปีอินฟราเรดย่านใกล้

1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. เผยแพร่ผลงานในวารสารวิชาการ/การประชุมวิชาการ โดยมีหน่วยงานที่นำผลการวิจัยไปใช้คือ หน่วยงานวิจัยของรัฐ/เอกชนและหน่วยงานการศึกษา
2. เป็นการสร้างนักวิจัยจากนักศึกษาระดับปริญญาตรี/ปริญญาโทที่จะมาเป็นผู้ช่วยวิจัย

1.4 ขอบเขตของการวิจัย

1. ศึกษาในช็อกโกแลตประเภทดาร์กช็อกโกแลต ช็อกโกแลตนม และช็อกโกแลตขาว

2. วิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิก คือ คาเทชินโมเลกุลเดี่ยวที่สำคัญในช็อคโกแลต ได้แก่ คาเทชินและอีพิคาเทชิน

1.5 การทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

ช็อคโกแลต

ประวัติและความเป็นมา

มีหลักฐานระบุการนำเมล็ดโกโก้มาบริโภคครั้งแรกเมื่อราว 4,000 ปีก่อน โดยชนชาติแรกที่ค้นพบคือชนเผ่าพื้นเมืองในทวีปอเมริกา (Powis และคณะ, 2008 และ Crown และ Hurst, 2009) และมีหลักฐานกล่าวถึงชนเผ่ามายาที่อาศัยอยู่ในประเทศเม็กซิโกในปัจจุบันว่า เมื่อปี ค.ศ. 600 ชนพื้นเมืองปลูกต้นโกโก้เพื่อใช้เมล็ดแทนเงินตราและใช้เป็นเครื่องบูชา ทั้งยังนำเมล็ดโกโก้ไปคั่วและผสมเป็นเครื่องดื่มที่ให้รสขม เรียกว่า chocolatl ในปี ค.ศ. 1528 เม็กซิโกถูกยึดครองโดยสเปน ชาวสเปนจึงนำเมล็ดโกโก้กลับไปยังประเทศของตนเอง และปรับปรุงการดื่มโดยเติมน้ำตาลลงเพื่อลดความขมจากเมล็ดโกโก้ แต่ก็ยังไม่เป็นที่แพร่หลายมากนัก ในปี ค.ศ. 1615 เมื่อสเปนสิ้นสุดความเป็นมหาอำนาจ ความลับของโกโก้ก็แพร่กระจายไปทั่วยุโรป การดื่ม chocolatl กลายเป็นธรรมเนียมนิยมในราชสำนักฝรั่งเศส และเริ่มเป็นที่รู้จักในประเทศอังกฤษเมื่อปี ค.ศ. 1660 มีร้านกาแฟจำนวนมากที่จำหน่าย chocolatl ด้วย

เครื่องดื่ม chocolatl ในสมัยแรกไม่เป็นที่นิยม เนื่องจากมีรสชาติขมลิ้น ลักษณะเป็นฟองสกปรก และย่อยยาก จนกระทั่งปี ค.ศ. 1828 Conrad J. Van Houten นักประดิษฐ์ชาวดัตช์คิดค้นเครื่องมือบีบอัดไขมันจากเมล็ดโกโก้ และปรับปรุงคุณภาพโกโก้ด้วยสารละลายต่างทำให้เป็นเครื่องดื่มที่มีลักษณะดีขึ้นและย่อยได้ง่ายมากขึ้น ในปี ค.ศ. 1847 Joseph Storrs Fry และบุตรชาย ได้ผลิตช็อคโกแลตแท่งขึ้นเป็นครั้งแรก โดยใช้ส่วนผสมจากโกโก้แมสหรือโกโก้ลิเควอร์ (cocoa liquor) เนยโกโก้ และน้ำตาล ในปี ค.ศ. 1875 Daniel Peters ได้รวมอุตสาหกรรมนมกับอุตสาหกรรมช็อคโกแลตเข้าไว้ด้วยกัน และเริ่มผลิตช็อคโกแลตนมภายใต้เครื่องหมายการค้าเนสท์เล่ (Nestlé) และในปี ค.ศ. 1880 Rodolph Lindt คิดค้นวิธีคอนชิง (conching) ทำให้ช็อคโกแลตมีผิวมันเรียบเนียนได้เป็นครั้งแรก ถือได้ว่าเป็นบิดาของการผลิตช็อคโกแลตสมัยใหม่ (สุวรรณ, 2543)

การผลิตช็อคโกแลต

1. ส่วนผสมสำคัญในการผลิตช็อคโกแลต

1) น้ำตาล ต้องใช้น้ำตาลทรายขาวเม็ดเล็กละเอียด ขนาดเล็กกว่า 30 ไมโครเมตร เพื่อให้ช็อคโกแลตมีเนื้อสัมผัสเรียบเนียน ช็อคโกแลตบางสูตรมีน้ำตาลเป็นองค์ประกอบถึงร้อยละ 50 หรือมากกว่า

2) โกโก้แมส มีไขมันอยู่ร้อยละ 54 – 55 จะใช้ในดาร์กช็อคโกแลตและช็อคโกแลตนมในปริมาณร้อยละ 12 – 40 ของส่วนผสมทั้งหมด ปริมาณความชื้นโกโก้แมสจะขึ้นอยู่กับขั้นตอนการคั่วเมล็ดโกโก้เริ่มต้น ถ้าคั่วโดยไม่กระเทาะเปลือกจะมีความชื้นสูงกว่าการคั่วเฉพาะเนื้อ ปริมาณความชื้นจะส่งผลต่อสมบัติการไหล (rheology) ของช็อคโกแลต เนื่องจากอยู่ในรูปที่เป็นน้ำอิสระ (free water)

3) ผลิตภัณฑ์จากนม ทำหน้าที่ให้กลิ่นรสกับช็อคโกแลต นิยมใช้นมผงเต็มอัตราร (full cream milk powder) หรือนมผงพร่องมันเนย (skim milk powder, SMP) ใช้ร่วมกับน้ำมันเนย (butter oil)

4) เนยโกโก้ (cocoa butter) เป็นส่วนที่ได้จากการบีบอัดเอาน้ำมันจากโกโก้แมส มีจุดหลอมเหลวที่ใกล้เคียงกับอุณหภูมิร่างกาย ทำให้ช็อกโกแลตมีคุณภาพทางประสาทสัมผัสที่ดี

5) เลซิธิน (lecithin) หรืออิมัลซิไฟเออร์ (Emulsifier) ชนิดอื่น

6) กลีเซอริน

7) อื่นๆ เช่น มิลค์ครัมบ์ (milk crumb) ไขมันทดแทนเนยโกโก้ (CBE, CBS)

2. ขั้นตอนการผลิตช็อกโกแลตที่สำคัญ

1) การผสมส่วนผสมให้เข้ากัน (primary mixing) โดยการนำองค์ประกอบต่างๆ จากที่กล่าวมาในข้างต้น มาผสมที่อัตราส่วนต่างๆ ตามชนิด รสชาติ และคุณสมบัติที่ต้องการของผลิตภัณฑ์ช็อกโกแลต ตัวอย่างดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ชนิดและส่วนผสมของช็อกโกแลต

ชนิดของช็อกโกแลต	ส่วนผสมเป็นร้อยละ				
	น้ำตาล	เนยโกโก้	ส่วนของแข็งที่ได้จากนม	โกโก้แมส	เลซิธินและกลีเซอริน
ช็อกโกแลตนม (milk chocolate)	50.0	21.0	16.5	12.0	0.5
ช็อกโกแลตธรรมดา (dark chocolate หรือ plain chocolate)					
- แบบหวาน (sweet)	48.0	9.7	1.7	40.0*	0.6
- แบบหวานเล็กน้อย (semi sweet)	48.0	9.7	1.7	40.0*	0.6
- แบบขม (bitter)	48.0	9.7	1.7	40.0*	0.6
ช็อกโกแลตขาว (white chocolate)	50.9	27.6	20.9	-	0.4

หมายเหตุ สามารถปรับปริมาณโกโก้แมสเพื่อให้ได้รสชาติที่ต่างกัน

ที่มา: สุวรรณ (2543)

2) การบดส่วนผสมให้ละเอียด (refining) ใช้การบด 2 ครั้ง คือ การบดหยาบและบดละเอียด การบดหยาบครั้งแรกใช้เครื่องบดแบบลูกกลิ้งคู่ เป็น pre – refining ส่วนผสมที่ได้จะมีลักษณะเนื้อสัมผัสคล้ายทรายเปียก มีขนาดอนุภาค 140 – 180 ไมโครเมตร และเข้าสู่ขั้นตอนการบดละเอียดโดยใช้ลูกกลิ้งชุดจำนวน 5 ลูก ขนาดอนุภาคจะลดลงเหลือประมาณ 30 ไมโครเมตรโดยเฉลี่ย

3) การทำคอนชิง (conching) คือการทำให้ช็อกโกแลตที่ได้จากขั้นตอนการบดซึ่งอยู่ในลักษณะเป็นเกล็ดละเอียดกึ่งแห้งกึ่งเปียก ไม่คงรูป ให้กลายเป็นของเหลวที่ไหลได้ที่อุณหภูมิเหนือจุดหลอมเหลวของเนยโกโก้ โดยอุปกรณ์ที่นิยมกันมากคือ Frisse conche วัสดุตัวถังทำด้วยเหล็ก (mild steel) มีแจ็กเก็ตหุ้ม หล่อด้วยน้ำร้อน อุณหภูมิไม่เกิน 70 องศาเซลเซียส ซึ่งจะทำให้ช็อกโกแลตมีอุณหภูมิประมาณ 60 องศาเซลเซียส (หากอุณหภูมิสูงกว่านี้จะทำให้เกิดปฏิกิริยาเมลลาร์ดในช็อกโกแลต)

4) การลดและเพิ่มอุณหภูมิ (tempering) เป็นการลดและเพิ่มอุณหภูมิเพื่อทำให้ช็อกโกแลตแข็งตัวในรูปแบบผลึก β ที่ผลึกมีความเสถียรมากที่สุด ซึ่งเป็นผลึกแบบที่ต้องการให้เกิดในผลิตภัณฑ์ ส่งผลต่อคุณภาพทางประสาทสัมผัส

5) การขึ้นรูปช็อกโกแลต

5.1) การหล่อลงในแม่พิมพ์ แบ่งออกได้เป็น 3 แบบย่อย

- หล่อเป็นแท่งตัน (solid moulding) หล่อเป็นแผ่นหนา บาง ตามต้องการ มักทำร่องให้หักออกเป็นชิ้นเล็กได้สะดวก

- หล่อเป็นถ้วยเพื่อใส่ไส้ (shell moulding) ใส่ช็อคโกแลตลงในพิมพ์และนำไปให้ความเย็น เมื่อบางส่วนแข็งตัวแล้วจึงเทช็อคโกแลตส่วนที่ยังเหลวออก และหยอดไส้ต่างๆ ลงไปแทนที่ เช่น ครีมฟองดองต์ คาราเมลเหลว หรือช็อคโกแลตเหลวรสอื่น

- หล่อเป็นรูปกลวง (hollow moulding) เช่น ไซอิสเตอร์ เป็นต้น

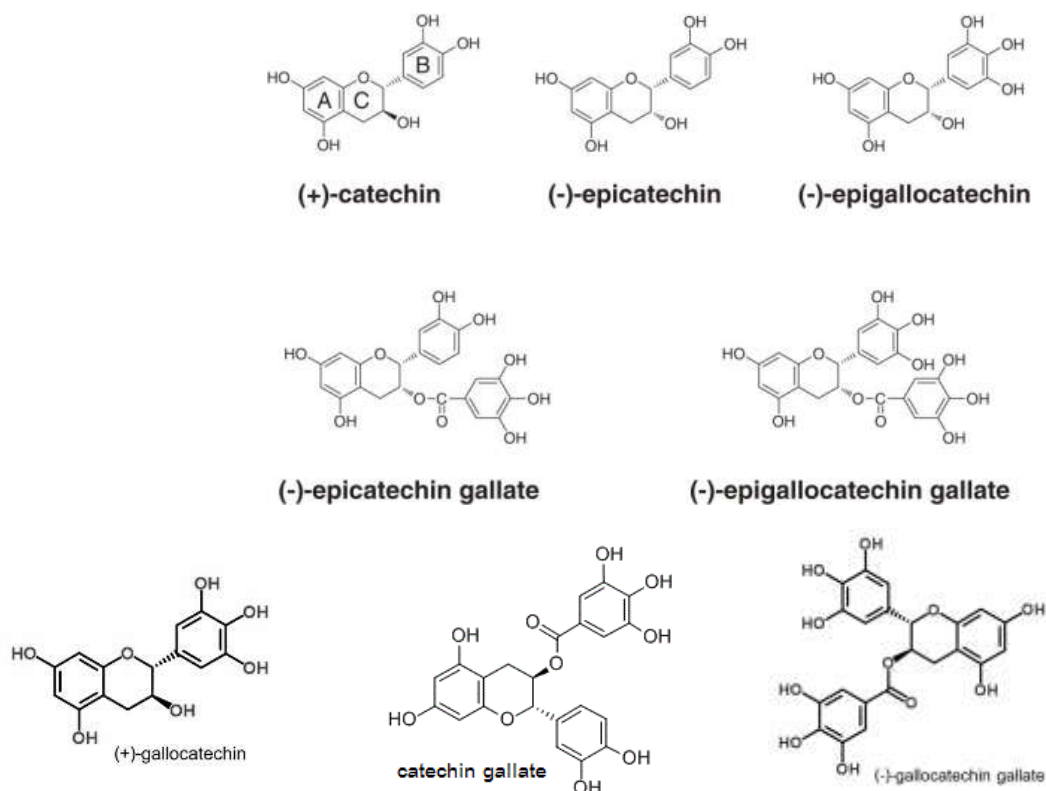
5.2) การเคลือบวัสดุแกนด้วยช็อคโกแลต แบ่งออกได้เป็น 2 แบบย่อย

- การชุบเคลือบ (dipping) ส่วนมากจะใช้กับวัสดุแกนขนาดใหญ่หรือรูปร่างไม่สมมาตร การชุบเคลือบแบบนี้ทำได้ทีละชิ้นโดยใช้มือ

- การอาบชุบเคลือบ (enrobing) เป็นลักษณะการเคลือบที่ทำในอุตสาหกรรม โดยการปล่อยช็อคโกแลตเหลวลงมาเป็นสายผ่าน วัสดุแกนจะเลื่อนผ่านด้วยสายพาน

สารประกอบฟีนอลิกในช็อคโกแลต

สารประกอบฟีนอลิก บางครั้งเรียกว่าฟีนอล เป็นกลุ่มของสารเคมีที่ประกอบด้วยหมู่ไฮดรอกซิล (-OH) เกาะอยู่กับวงแหวนอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน แม้ว่าสารประกอบฟีนอลิกจะมีความคล้ายกับแอลกอฮอล์ (alcohol) แต่สารประกอบฟีนอลิกมีคุณสมบัติที่เด่นและไม่สามารถจัดอยู่ในกลุ่มของแอลกอฮอล์ได้เนื่องจากมีความเป็นกรดค่อนข้างสูง ออกซิเจนจับอยู่กับวงแหวนอะโรมาติกอย่างแน่นหนาและออกซิเจนเกาะอยู่กับไฮโดรเจนด้วยพันธะอย่างหลวมๆ สารประกอบฟีนอลิกในพืชมีหลายชนิด เช่น ฟีนอล (phenols) กรดฟีนอล (phenolic acids) แทนนิน (tannins) ลิกนิน (lignins) ฟลาโวนอยด์ เป็นต้น สารประกอบฟีนอลิกเป็นสารประกอบเชิงเคมีธรรมชาติพบมากในผลไม้ สมุนไพร เครื่องเทศ และธัญพืช เช่น องุ่น ขิง กานพลู ขมิ้น พริกไทย งา ฯลฯ โดยสารประกอบฟีนอลิกที่สำคัญกลุ่มหนึ่ง คือ คาเทชิน เป็นสารที่อยู่ในกลุ่มฟลาโวนอล (flavanols, flavan-3-ol) ซึ่งเป็นกลุ่มย่อยของฟลาโวนอยด์ คาเทชินเป็นสารที่พบได้ในเหล้าองุ่น ไบเบอรี่ เปลือกของต้นสน และมีมากที่สุดในใบชาสด นอกจากนี้ในโกโก้และช็อคโกแลตก็มีปริมาณคาเทชินสูงเช่นกัน คาเทชินมีสูตรทางเคมีคือ $C_{15}H_{14}O_6$ มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 290.28 กรัมต่อโมล สามารถละลายได้เล็กน้อยในน้ำเย็น และละลายได้มากในน้ำร้อน แอลกอฮอล์ กรดน้ำส้ม (glacial acetic acid) และอะซิโตน (acetone) ไม่ละลายในเบนซีน (benzene) คลอโรฟอร์ม (chloroform) และปิโตรเลียม อีเทอร์ (petroleum ether)



ภาพที่ 1 โครงสร้างของคาเทชินที่สำคัญ

ที่มา: Suzuki และคณะ (2012), ChemicalBook (n.d.), ChemSpider (n.d.(a)) และ ChemSpider (n.d.(b))

คาเทชินที่พบในพืชมีหลายโครงสร้างด้วยกัน (ภาพที่ 1) เช่น คาเทชิน อีพิกาเทชิน แกลโลคาเทชิน (gallocatechin) อีพิกัลโลคาเทชิน (epigallocatechin) คาเทชินแกลเลต (catechin gallate) แกลโลคาเทชินแกลเลต (gallocatechin gallate) อีพิกาเทชินแกลเลต (epicatechin gallate) และอีพิกัลโลคาเทชินแกลเลต (epigallocatechin gallate) เป็นต้น

คาเทชินเป็นสารที่มีประโยชน์มาก นับตั้งแต่ช่วยป้องกันไม่ให้อาหารบูดเสียไปจนถึงการช่วยยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง โดยมีสรรพคุณยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ และเป็นสารต้านออกซิเดชันหรือสารต้านอนุมูลอิสระที่มีประสิทธิภาพสูง (Liebert และคณะ, 1999) มีงานวิจัยรายงานว่าผู้ที่รับประทานดาร์กช็อกโกแลต 10 กรัมต่อวันเป็นประจำมีความดันโลหิตต่ำกว่าผู้ที่ไม่ได้รับประทานหรือรับประทานน้อยกว่าปริมาณดังกล่าว และยังช่วยลดความเสี่ยงที่ก่อให้เกิดโรคหลอดเลือดหัวใจอุดตัน (Manach และคณะ, 2005; Buijsse และคณะ, 2006 และ Schroeter และคณะ, 2006)

เทคนิค HPLC

เครื่อง HPLC เป็นเครื่องมือวิเคราะห์สารอินทรีย์ที่ไม่ระเหย (Non-Volatile Organic Compounds) หรือระเหยได้บางส่วน (Semi-Volatile Organic Compounds) โดยอาศัยหลักการเคลื่อนที่ขององค์ประกอบในสารที่ต้องการวิเคราะห์ในอัตราเร็วที่แตกต่างกัน ซึ่งสารที่ต้องการวิเคราะห์จะเคลื่อนที่เข้าสู่คอลัมน์ที่อยู่ในเครื่อง HPLC

ด้วยเฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) ซึ่งเป็นตัวทำละลายอินทรีย์ผสม สารดังกล่าวจะเคลื่อนที่ไปบนเฟสคงที่ (stationary phase) ซึ่งเป็นสารที่บรรจุอยู่ในคอลัมน์ องค์ประกอบในสารที่ต้องการวิเคราะห์จะมีความสามารถด้านการละลายในตัวทำละลายอินทรีย์ที่แตกต่างกัน ทำให้สารถูกแยกออกเป็นส่วนๆ และเคลื่อนที่เข้าสู่อุปกรณ์ตรวจวัด (detector) ก่อนจะแสดงผลออกมาเป็นโครมาโตแกรม (chromatogram) โดยสารแต่ละส่วนจะมีระยะเวลาอยู่ในคอลัมน์ (retention time) เฉพาะตัว การวิเคราะห์ผลจะนำพื้นที่ใต้กราฟขององค์ประกอบที่ต้องการวิเคราะห์มาคำนวณผลเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน (calibration curve) จะทำให้ทราบปริมาณองค์ประกอบในสารตัวอย่างได้ (ภาควิชาวิศวกรรมสิ่งแวดล้อม คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, ม.ป.ป.)

อุปกรณ์ตรวจวัดเป็นอุปกรณ์ภายในเครื่อง HPLC ที่มีความสำคัญ ทำหน้าที่ตรวจวัดสารที่แยกออกมาจากคอลัมน์ อุปกรณ์ตรวจวัดมีหลากหลายชนิด เช่น

1. **อุปกรณ์ตรวจวัดชนิดอัลตราไวโอเล็ต (ultra violet visible detector)** วัดสารที่ดูดกลืนแสง
2. **อุปกรณ์ตรวจวัดชนิดแถวลำดับไดโอด (diode array detector)** วัดสารที่สามารถดูดกลืนแสง ตรวจสอบโครมาโตแกรมเพื่อระบุชนิดของสาร ตรวจสอบความบริสุทธิ์ (purity) ของสาร
3. **อุปกรณ์ตรวจวัดชนิดไฟฟ้าเคมี (electrochemical detector)** วัดสารที่มีการเปลี่ยนแปลงทางไฟฟ้าที่เกิดจากปฏิกิริยาเคมี เช่น ปฏิกิริยาออกซิเดชัน-รีดักชัน (oxidation-reduction reaction)
4. **อุปกรณ์ตรวจวัดชนิดเรืองแสง (fluorescence detector)** วัดสารที่เรืองแสง

สารประกอบฟีนอลิกที่มีในซ็อกโกแลตเป็นสารชีวภาพชนิดหนึ่งซึ่งสามารถใช้เทคนิค HPLC ร่วมกับอุปกรณ์ตรวจวัดหลายชนิด เช่น อุปกรณ์ตรวจวัดชนิดอัลตราไวโอเล็ต (Natsume และคณะ, 2000 และ De Taeye และคณะ, 2014) อุปกรณ์ตรวจวัดชนิดแถวลำดับไดโอด (Álvarez และคณะ, 2012) อุปกรณ์ตรวจวัดชนิดเรืองแสง (Langer และคณะ, 2011 และ Shumow และ Bodor, 2011) จากงานวิจัยของ Donovan และคณะ (1999) ระบุว่าอุปกรณ์ตรวจวัดสารชนิดเรืองแสงมีความไว (sensitivity) และมีความสามารถในการคัดแยกเฉพาะ (selectivity) ที่ดีกว่าอุปกรณ์ตรวจวัดชนิดอัลตราไวโอเล็ตและชนิดไฟฟ้าเคมีโดยสามารถตรวจวัดปริมาณสารคาเทชินและอีพิกาทะซินได้ต่ำสุดถึง 3 นาโนกรัม

เทคนิค HPLC ร่วมกับอุปกรณ์ตรวจวัดชนิดเรืองแสง อาศัยหลักการเรืองแสงของสารตัวอย่างเมื่อถูกกระตุ้นด้วยแสงอัลตราไวโอเล็ต (ultra violet light) จากแหล่งกำเนิดแสง โดยแสงที่ใช้ในการกระตุ้น (excitation) จะใช้ที่ความยาวคลื่นจำเพาะกับตัวอย่างแต่ละชนิด และแสงที่ตัวอย่างมีการปล่อยกลัออกมา (emission) ก็จะถูกตรวจวัดที่ความยาวคลื่นจำเพาะที่ความยาวคลื่นเดียวกัน ตัวอย่างที่เหมาะสมสำหรับอุปกรณ์ตรวจวัดชนิดนี้ คือ สารชีวภาพ เลือด ปัสสาวะ เป็นต้น (แมน และอมร, 2534)

Langer และคณะ (2011) ได้ทำการศึกษาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกในซ็อกโกแลตจำนวน 15 ยี่ห้อ แบ่งเป็นซ็อกโกแลตขาวและซ็อกโกแลตนมชนิดละ 1 ยี่ห้อ และดาร์คซ็อกโกแลต 12 ยี่ห้อที่มีฉลากระบุปริมาณโกโก้ ร้อยละ 39 – 72 ใช้เทคนิค HPLC ที่มีอุปกรณ์ตรวจวัดสารชนิดเรืองแสง พบว่า อีพิกาทะซินเป็นฟลาโวนอลโมเลกุลเดี่ยวที่มีปริมาณมากที่สุดในผลิตภัณฑ์จากโกโก้ ค่ารองลงมาคือโมเลกุลไดเมอร์ (dimers) และไตรเมอร์ (trimers) คละกัน อีพิกาทะซินมีปริมาณเฉลี่ย 0.0 ± 0.0 มิลลิกรัม/100 กรัมของซ็อกโกแลตขาว 10.00 ± 1.3 มิลลิกรัม/100 กรัมของซ็อกโกแลตนม และ 29.8 ± 2.6 ถึง 269.7 ± 20.2 มิลลิกรัม/100 กรัมของดาร์คซ็อกโกแลต ซึ่งสารโมเลกุลเดี่ยวมีปริมาณเป็นหนึ่งในสามถึงครึ่งหนึ่งของปริมาณฟลาโวนอลทั้งหมด และสารที่เป็นพอลิเมอร์มีประมาณร้อยละ 10 ของปริมาณฟลาโวนอลทั้งหมด โดยปริมาณฟลาโวนอลทั้งหมดมีค่าเท่ากับ 40.6 ± 9.3 มิลลิกรัม/100 กรัม

ของช็อคโกแลตนม และมีค่าอยู่ระหว่าง 93.5 ± 8.1 ถึง 792.8 ± 27.0 มิลลิกรัม/100 กรัมของดาร์คช็อคโกแลต สอดคล้องกับงานวิจัยของ Shumow และ Bodor (2011) ที่ระบุผลการวิเคราะห์ปริมาณฟลาวานอลโมเลกุลเดี่ยวที่สำคัญในช็อคโกแลต ได้แก่ คาเทชิน และอีพิกาทะชิน ในตัวอย่างช็อคโกแลตนมและดาร์คช็อคโกแลตที่ได้รับมาจากหน่วยงาน National Confectioners Association (NCA) ในประเทศสหรัฐอเมริกา ใช้การวิเคราะห์ทางเคมีด้วยเทคนิค HPLC ร่วมกับอุปกรณ์ตรวจวัดชนิดเรืองแสง พบว่าอีพิกาทะชินมีปริมาณมากกว่าคาเทชิน ซึ่งดาร์คช็อคโกแลตมีปริมาณเฉลี่ยของคาเทชินและอีพิกาทะชินมากกว่าช็อคโกแลตนม ค่าสัมประสิทธิ์ร้อยละของความแปรปรวน (The percent coefficient of variation, %CV) ของชุดตัวอย่างในงานวิจัยนี้มีค่าอยู่ในช่วงระหว่างร้อยละ 7 – 15

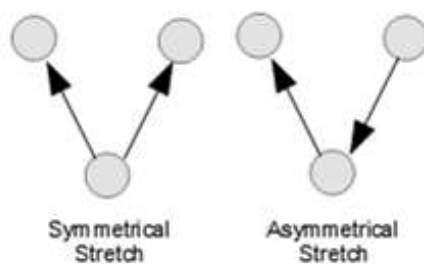
การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกที่สำคัญในช็อคโกแลตด้วยวิธีทางเคมีเช่นงานวิจัยที่กล่าวมา เป็นวิธีที่ใช้กันอย่างแพร่หลายและมีประสิทธิภาพในงานวิจัย แต่ไม่สะดวกต่อการนำไปใช้ในอุตสาหกรรมผลิตช็อคโกแลต เนื่องจากต้องทำลายตัวอย่างเพื่อใช้ในการวิเคราะห์ มีค่าใช้จ่ายเรื่องสารเคมี อีกทั้งต้องใช้เวลาอย่างมากสำหรับการเตรียมตัวอย่างก่อนการวิเคราะห์ จึงไม่เหมาะหากต้องทำการวิเคราะห์เป็นประจำ ดังนั้นเทคนิคสเปกโตรสโคปีอินฟราเรดย่านใกล้ ซึ่งกำลังได้รับความนิยมสำหรับนำมาใช้ในการวิเคราะห์เกี่ยวกับผลิตภัณฑ์อาหารเนื่องจากสามารถวิเคราะห์ตัวอย่างได้โดยไม่ทำให้ตัวอย่างได้รับความเสียหาย ใช้สารเคมีน้อยหรือไม่ใช้เลย วิเคราะห์ผลได้อย่างรวดเร็วทั้งการวิเคราะห์เชิงปริมาณและเชิงคุณภาพ และสามารถนำผลวิเคราะห์ที่ได้ในครั้งแรกเป็นข้อมูลอ้างอิงใช้ทำนายปริมาณสารคาเทชินและอีพิกาทะชินของตัวอย่างในอนาคตได้อีกด้วย เทคนิคสเปกโตรสโคปีอินฟราเรดย่านใกล้จึงเป็นวิธีการวิเคราะห์ที่น่าสนใจสำหรับการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกที่สำคัญทั้งสองชนิดในช็อคโกแลต (Karoui และ Baerdemaeker, 2007; Álvarez และคณะ, 2012 และ Krähmer และคณะ, 2015)

เทคนิคสเปกโตรสโคปีอินฟราเรดย่านใกล้

หลักการ

รังสีอินฟราเรดย่านใกล้ (NIR radiation) เป็นรังสีคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้าที่จัดอยู่ในรังสีอินฟราเรด (IR radiation) มีพลังงาน 48 – 150 กิโลจูลต่อโมล ในช่วงเลขคลื่น $12500 - 4000 \text{ cm}^{-1}$ หรือในช่วงความยาวคลื่น 800 – 2500 นาโนเมตร โมเลกุลที่จะเกิดอันตรกิริยากับรังสีแม่เหล็กไฟฟ้าในช่วงเลขคลื่นและที่ความยาวคลื่นดังกล่าว จะต้องเป็นโมเลกุลที่ประกอบด้วยพันธะไฮโดรเจน X-H (X = C, N, O, S) ทฤษฎีกลศาสตร์ควอนตัมอธิบายว่าพันธะเคมี (chemical bond) ภายในโมเลกุลที่ประกอบขึ้นเป็นสสารต่างๆ จะมีการสั่น (vibration) ตลอดเวลา ซึ่งเป็นการสั่นในสถานะพื้น (vibrational ground state) ที่มีค่าความถี่จำเพาะแตกต่างกันในแต่ละชนิดโมเลกุล ซึ่งการสั่นในลักษณะนี้เกิดจากการสั่นของพันธะตามธรรมชาติ เรียกว่า การสั่นแบบพื้นฐาน (fundamental vibration) มี 2 แบบ คือ การยืด (stretching) และการงอหรือการผิดรูป (bending หรือ deformation) มีรายละเอียดดังนี้

1. การยืด เป็นการสั่นที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงความยาวพันธะระหว่างอะตอม เป็นได้ทั้งแบบสมมาตร (symmetric stretching) และแบบไม่สมมาตร (asymmetric stretching) ดังภาพที่ 2

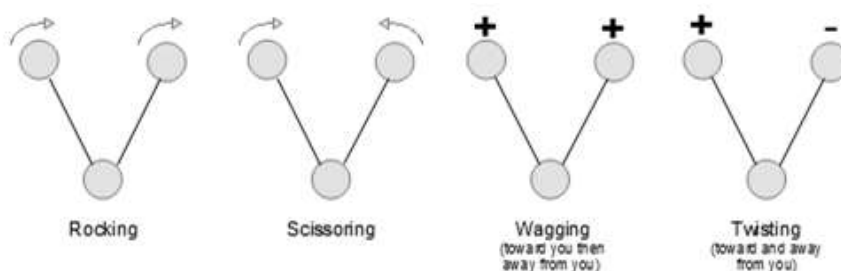


ภาพที่ 2 การยืดแบบสมมาตรและแบบไม่สมมาตรของพันธะระหว่างอะตอม

ที่มา: McGrosky (n.d.)

2. การงอหรือการผิดรูป เป็นการสั่นที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงมุมระหว่างสองพันธะ แบ่งตามลักษณะการงอที่สำคัญได้ 2 แบบ ได้แก่ การงอในระนาบ (In-plane) และการงอนอกระนาบ (Out-of-plane) ดังภาพที่ 3

- 1) การงอในระนาบ คือ การงอแบบโคลง (rocking) และการงอแบบกรรไกร (scissoring)
- 2) การงอนอกระนาบ คือ การงอแบบกระดิก (wagging) และการงอแบบบิด (twisting)



ภาพที่ 3 การงอในระนาบและการงอนอกระนาบของพันธะระหว่างอะตอม

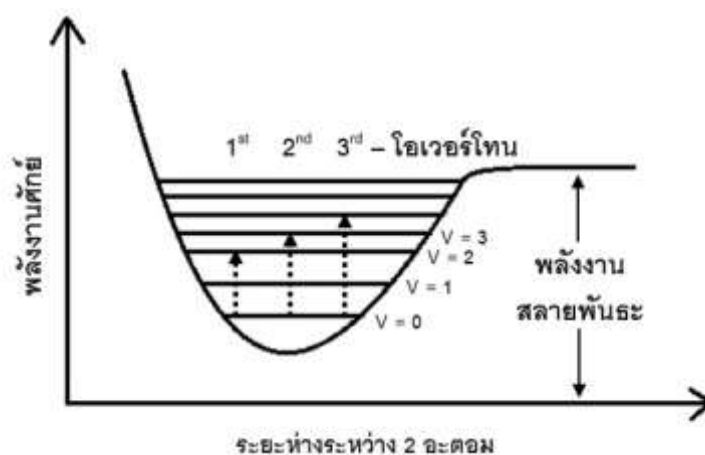
ที่มา: McGrosky (n.d.)

ถ้าโมเลกุลเกิดอันตรกิริยากับรังสีอินฟราเรดย่านใกล้ จะดูดกลืนรังสีที่มีความถี่ตรงกับค่าความถี่จำเพาะ โมเลกุลจะเกิดการเปลี่ยนแปลงระดับชั้นพลังงานจากการสั่นในสถานะพื้นไปเป็นการสั่นในสถานะกระตุ้น (vibrational excited state) และจะต้องคายพลังงานออกมาในรูปความร้อนเพื่อกลับสู่การสั่นในสถานะพื้นอีกครั้ง เรียกปรากฏการณ์นี้ว่า แทรนซิชัน (transition)

โมเลกุลที่จะสามารถดูดกลืนรังสีอินฟราเรดย่านใกล้ได้ พลังงานของรังสีที่โมเลกุลดูดกลืนเข้าไปจะต้องมีค่าเท่ากับผลต่างของระดับพลังงานที่ทำให้เกิดปรากฏการณ์ทรานซิชัน และโมเลกุลต้องเป็นแบบไออาร์แอ็กทีฟ (IR-active) หมายถึง โมเลกุลที่มีอะตอมต่างกัน ซึ่งพลังงานที่ดูดกลืนเข้าไปในโมเลกุลชนิดนี้ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโมเมนต์ขั้วคู่ (dipole moment) ส่วนโมเลกุลที่มีอะตอมเหมือนกัน เช่น N_2 , O_2 เป็นต้น ไม่สามารถเกิดการเปลี่ยนแปลงโมเมนต์ขั้วคู่ได้ เรียกว่า ไออาร์อินแอ็กทีฟ (IR-inactive) กรณีที่โมเลกุลมีอะตอมต่างกัน แต่การสั่นไม่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโมเมนต์ขั้วคู่ ก็จัดว่าโมเลกุลนั้นเป็นแบบ ไออาร์อินแอ็กทีฟ ซึ่งจะพบได้ในโมเลกุลที่มีการสั่นแบบยืดในลักษณะสมมาตร และการสั่นลักษณะดังกล่าวจะไม่ทำให้เกิดพีค (peak) หรือแถบ (band) ขึ้นในเส้น

สเปกตรัม (spectrum) ที่ได้จากการทำอันตรกิริยาระหว่างโมเลกุลกับรังสีอินฟราเรดย่านใกล้ ซึ่งฟิสิกหรือแถบที่ปรากฏให้เห็นในเส้นสเปกตรัมเกิดจากการสั่น 2 รูปแบบ คือ การสั่นแบบยืดในลักษณะไม่สมมาตรและการงอ ซึ่งการงอทั้งแบบในระนาบและแบบนอกระนาบจะซ้อนทับกัน ทำให้มองเห็นเป็นฟิสิกเดียว เรียกปรากฏการณ์นี้ว่า ดับเบิลดีเจเนอเรชัน (double degeneration)

เมื่อโมเลกุลดูดกลืนรังสีอินฟราเรดย่านใกล้ จะเกิดการสั่นแบบโอเวอร์โทน (overtone vibration) ทำให้เกิดการเปลี่ยนระดับพลังงานการสั่นจากสถานะพื้น ($v_0 \rightarrow v_1$) ไปยังสถานะกระตุ้น ($v_0 \rightarrow v_n$, $n = 2, 3, \dots$ ขึ้นไป) จะได้ฟิสิกที่เรียกว่าแถบโอเวอร์โทน มีลักษณะความเข้มฐานกว้าง ดังภาพที่ 4



ภาพที่ 4 การเปลี่ยนแปลงระดับพลังงานการสั่นแบบโอเวอร์โทนของโมเลกุล เมื่อดูดกลืนรังสีอินฟราเรดย่านใกล้

ดัดแปลงจาก: ศุมาพร (2552)

การสั่นแบบโอเวอร์โทน คือ การเปลี่ยนแปลงระดับพลังงานการสั่นจากสถานะพื้น ($v_0 \rightarrow v_1$) ไปยังสถานะกระตุ้นมากกว่าเท่าตัว ได้แก่ โอเวอร์โทนอันดับหนึ่ง ($v_0 \rightarrow v_2$) โอเวอร์โทนอันดับสอง ($v_0 \rightarrow v_3$) และโอเวอร์โทนอันดับสาม ($v_0 \rightarrow v_4$)

เมื่อโมเลกุลในสสารมีการดูดกลืนรังสีอินฟราเรดย่านใกล้ ในโมเลกุลหนึ่งอาจมีพันธะระหว่างอะตอมมากกว่า 1 พันธะ ทำให้การสั่นเกิดขึ้นหลายชนิดพร้อมกัน การสั่นที่ต่างชนิดกันอาจรวมกันได้ เรียกการสั่นในลักษณะนี้ว่า การสั่นแบบรวมหรือแบบคอมบิเนชัน (combination vibration)

เส้นสเปกตรัมที่วัดได้จากเทคนิคสเปกโตรสโคปีอินฟราเรดย่านใกล้ประกอบด้วยฟิสิกที่ซ้อนทับกันของการดูดกลืนพลังงานที่ทำให้โมเลกุลเกิดการสั่นทั้งแบบโอเวอร์โทนและคอมบิเนชัน โดยเฉพาะพันธะของโมเลกุล O-H และ C-H ที่มีการดูดกลืนรังสีอินฟราเรดย่านใกล้อย่างมาก (Osborne, 2000; Golc และคณะ, 2003) ฟิสิกหรือแถบที่ปรากฏในเส้นสเปกตรัมในช่วงการดูดกลืนที่สำคัญ แสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 พีคหรือแถบที่ปรากฏในเส้นสเปกตรัมในช่วงการดูดกลืนที่สำคัญ

ความยาวคลื่น (นาโนเมตร)	โมเลกุล และชนิดพีค/แถบ
800 – 1100	N-H (โอเวอร์โทนอันดับสอง) C-H (โอเวอร์โทนอันดับสาม)
1100 – 1300	C-H (โอเวอร์โทนอันดับสอง)
1300 – 1420	C-H (คอมบินเนชัน)
1420 – 1600	N-H (โอเวอร์โทนอันดับหนึ่ง) O-H (โอเวอร์โทนอันดับหนึ่ง)
1600 – 1800	C-H (โอเวอร์โทนอันดับหนึ่ง)
1800 – 2200	N-H (คอมบินเนชัน) O-H (คอมบินเนชัน)
2200 – 2500	C-H (คอมบินเนชัน)

ที่มา: ศุมาพร (2552)

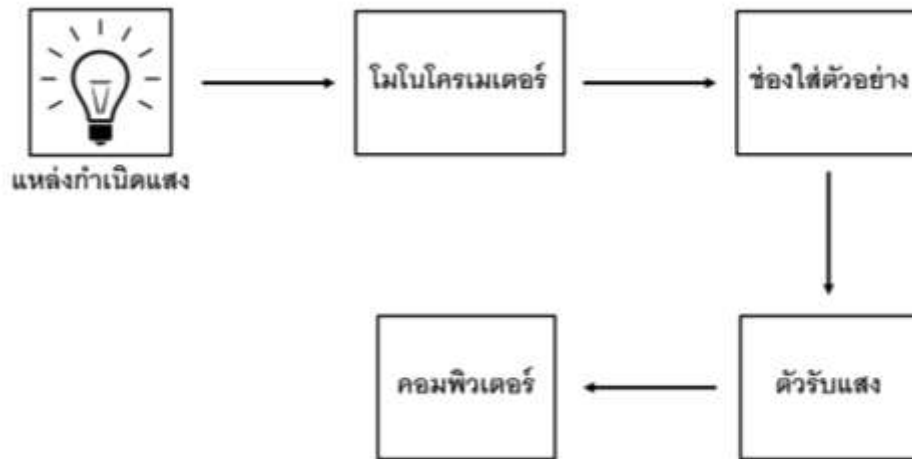
การสั่นในสถานะพื้นมีค่าการดูดกลืนที่มากกว่าโอเวอร์โทนถึง 10 – 100 เท่าตัว โอเวอร์โทนอันดับหนึ่งจะมีค่าการดูดกลืนสูงที่สุด รองลงมาคือโอเวอร์โทนอันดับสอง และสาม ตามลำดับ สำหรับพีคหรือแถบของโอเวอร์โทนอันดับสามขึ้นไปจะมีค่าการดูดกลืนต่ำมาก จึงไม่สามารถมองเห็นพีคหรือแถบของการดูดกลืนในเส้นสเปกตรัมได้

เครื่องมือและอุปกรณ์สเปกโตรสโกปีอินฟราเรดย่านใกล้

องค์ประกอบของเครื่องสเปกโตรมิเตอร์อินฟราเรดย่านใกล้ (NIR spectrometer) ประกอบด้วยแหล่งกำเนิดแสง (light source) อุปกรณ์แยกแสงออกเป็นแต่ละความยาวคลื่นหรือโมโนโครเมเตอร์ (monochromator) ช่องใส่ตัวอย่าง (sample cell) ตัวรับแสง (detector or sensor) และคอมพิวเตอร์ ดังภาพที่ 5 (ศิริลักษณ์ และอนุพันธ์, 2552) มีรายละเอียด ดังนี้

1. แหล่งกำเนิดแสง เป็นหลอดไฟทังสเตนฮาโลเจน มีความยาวคลื่น 360 – 2600 นาโนเมตร ซึ่งครอบคลุมช่วงความยาวคลื่นของรังสีอินฟราเรดย่านใกล้ (800 – 2500 นาโนเมตร) (ปานมนัส, 2556)

2. โมโนโครเมเตอร์ ทำหน้าที่แยกแสงออกเป็นแต่ละความยาวคลื่น เพื่อใช้แสงที่แยกได้ส่องไปที่ตัวอย่าง และวัดค่าความเข้มของแสงที่สะท้อนหรือส่องผ่านตัวอย่างออกมา เปรียบเทียบกับความเข้มแสงที่ส่องเข้าไป จะได้ค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างที่แต่ละความยาวคลื่น (ศิริลักษณ์ และอนุพันธ์, 2552)



ภาพที่ 5 องค์ประกอบเครื่องสเปกโตรมิเตอร์อินฟราเรดย่านใกล้
ดัดแปลงจาก: ศิวลักษณ์ และอนุพันธ์ (2552)

3. ช่องใส่ตัวอย่าง มีหลากหลายรูปแบบขึ้นอยู่กับชนิดและลักษณะของตัวอย่างเพื่อให้เหมาะสมกับการวัดสเปกตรัมของรังสีอินฟราเรดย่านใกล้ นอกจากนี้ยังมีอุปกรณ์ใส่ตัวอย่างไว้สำหรับบรรจุตัวอย่างก่อนวางที่ช่องใส่ตัวอย่าง เช่น อุปกรณ์ใส่ตัวอย่างเป็นผง อุปกรณ์ใส่ตัวอย่างสำหรับของเหลว อุปกรณ์วางผลไม้ เป็นต้น

4. ตัวรับแสง ทำหน้าที่ตรวจวัดความเข้มแสงที่สะท้อนหรือส่องผ่านออกมาจากตัวอย่าง ซึ่งทำจากวัสดุต่างกันขึ้นอยู่กับช่วงคลื่นที่ต้องการตรวจวัด เช่น ช่วงคลื่น 350 – 1100 นาโนเมตร ใช้ซิลิกอน (Silicon, Si) ช่วง 1100 – 2500 นาโนเมตร ใช้เลดซัลไฟต์ (Lead sulphide, PbS) หรืออินเดียมแกลเลียมอาร์เซไนด์ (Indium Gallium Arsenide, InGaAs) ช่วงแสงที่มองเห็นได้และช่วงอินฟราเรดย่านใกล้ (400 – 2600 นาโน-เมตร) ใช้เลดซัลไฟต์ในลักษณะประกบคู่กับซิลิกอนโฟโตไดโอด (Silicon photodiodes) (ปานมนัส, 2556)

5. คอมพิวเตอร์ เป็นอุปกรณ์ที่ใช้ในการป้อนข้อมูล กำหนดการทำงานของระบบ ประมวลผล และแสดงผลเป็นเส้นสเปกตรัมที่ได้จากการวิเคราะห์

เครื่องสเปกโตรมิเตอร์

เครื่องสเปกโตรมิเตอร์มีหลายประเภท ซึ่งแต่ละประเภทมีความแตกต่างกันในด้านราคา ความสามารถ ขนาด และข้อจำกัดด้านการใช้งาน เป็นต้น มีรายละเอียดดังนี้

1. เครื่องสเปกโตรมิเตอร์แบบฟิลเตอร์เชิงแสง (optical filter) ภายในเครื่องประกอบด้วยชุดแผ่นกรองแสง โดยแผ่นกรองแสงนี้ยอมให้แสงผ่านได้แค่บางช่วงคลื่นเท่านั้น ถ้าจะเปลี่ยนช่วงคลื่นต้องเปลี่ยนแผ่นกรองแสงให้ตรงกับช่วงคลื่นที่ต้องการ เครื่องสเปกโตรมิเตอร์ประเภทนี้มีราคาถูก ใช้ได้เฉพาะงานที่ออกแบบให้เหมาะสมกับแต่ละเครื่องเท่านั้น ไม่สามารถพัฒนาให้เหมาะกับการใช้งานได้หลากหลาย ขนาดของเครื่อง ความถูกต้องแม่นยำ และความเสถียรขึ้นอยู่กับการออกแบบเครื่อง

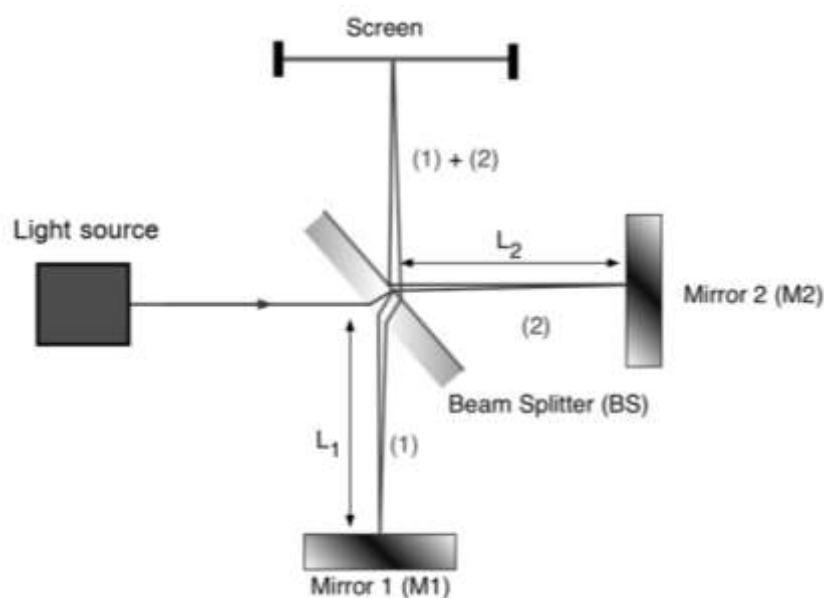
2. เครื่องสเปกโตรมิเตอร์แบบเกรตติงเคลื่อนที่ (moving grating) ภายในเครื่องมีเกรตติงทำหน้าที่เป็นโมโนโครเมเตอร์หรือตัวแยกแสงออกเป็นแต่ละความยาวคลื่น เกรตติงมีลักษณะเป็นปีกรูปโค้ง ผิวมีรอยหยักคล้ายขั้นบันได ความละเอียดในการแยกแสงขึ้นอยู่กับจำนวนรอยหยัก เครื่องสเปกโตรมิเตอร์ประเภทนี้มีราคาปานกลาง

ข้อดีคืออิทธิพลจากคลื่นรบกวน (noise) มีค่าต่ำ แต่มีข้อจำกัดคือค่าการดูดกลืนที่วัดได้เป็นค่าอย่างหยาบ ความเสถียรต่ำ เครื่องมีขนาดใหญ่และไม่ทนทาน เหมาะสำหรับการใช้งานในห้องปฏิบัติการ

3. เครื่องสเปกโตรมิเตอร์แบบแถวลำดับไดโอด (diode arrays) ใช้เกรตติ่งเป็นโมโนโครเมเตอร์ เช่นเดียวกับแบบเกรตติ่งเคลื่อนที่ และใช้ตัวรับแสงแบบแถวลำดับไดโอด ซึ่งมีลักษณะเป็นแผงยาว ติดตั้งเรียงกันเป็นแถว เครื่องสเปกโตรมิเตอร์ประเภทนี้มีราคาถูก ข้อดีคือมีขนาดเล็ก สามารถดัดแปลงให้เป็นเครื่องขนาดพกพา (portable NIR spectrometer) ใช้งานได้อย่างสะดวก มีความทนทาน สามารถตรวจวัดได้อย่างรวดเร็ว แต่ค่าที่ได้ไม่เสถียรมาก ความละเอียดอยู่ในระดับปานกลาง อิทธิพลจากคลื่นรบกวนมีค่าสูง

4. เครื่องสเปกโตรมิเตอร์แบบอคูสโตออปติกทูนเนเบิลฟิลเตอร์ (acousto-optic tunable filters, AOTF) แตกต่างจากเครื่องสเปกโตรมิเตอร์แบบอื่นๆ ใช้เสียงความถี่สูงหรืออัลตราซาวด์ (ultrasound) ทำให้ความหนาแน่นของตัวกลางแสงเกิดการเปลี่ยนแปลง ซึ่งทำให้เกิดดัชนีการหักเหของแสงเปลี่ยนแปลงตามไปด้วย โดยเครื่องสเปกโตรมิเตอร์ประเภทนี้มีราคาสูง ข้อดีคืออิทธิพลจากคลื่นรบกวนมีค่าต่ำ เครื่องมีความทนทาน และสามารถตรวจวัดได้อย่างรวดเร็ว อีกทั้งสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในระบบสุญญากาศได้ สำหรับความละเอียดของค่าการดูดกลืนและความเสถียรขึ้นอยู่กับการออกแบบเครื่อง

5. เครื่องสเปกโตรมิเตอร์แบบฟูเรียร์ทรานฟอร์ม (Fourier transform, FT) อาศัยหลักการของอินเทอร์เฟียโรมิเตอร์แบบ Michealson (principle of Michealson interferometer) จากภาพที่ 6 แสงจากแหล่งกำเนิดแสงจะถูกแยกออกเป็น 2 ลำแสงด้วยตัวแยกแสง (beam splitter, BS) ลำแสงแรกจะเดินทางไปชนกับกระจกอยู่กับที่ (fixed mirror, M1) ลำแสงที่สองจะเดินทางไปชนกับกระจกเคลื่อนที่ (moving mirror, M2) ก่อนที่ทั้งสองลำแสงจะสะท้อนกลับมารวมกัน



ภาพที่ 6 หลักการของอินเทอร์เฟียโรมิเตอร์แบบ Michealson

ที่มา: Boeglin (2015)

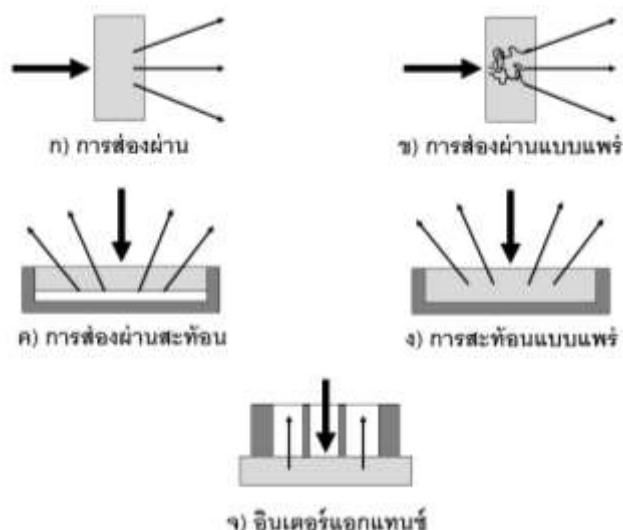
จากภาพที่ 6 ถ้าระยะห่างระหว่างตัวแยกแสงกับกระจกอยู่กับที่เท่ากับระยะห่างของตัวแยกแสงกับกระจกเคลื่อนที่ ผลรวมของคลื่นสัญญาณจะเสริมกันสูงสุด แต่ถ้าระยะห่างไม่เท่ากัน คลื่นสัญญาณอาจเสริมหรือหักล้างกัน และนำไปแปลงสัญญาณแบบฟูเรียร์ก็จะได้สเปกตรัมแสดงผลลัพธ์ ซึ่งสเปกโตรมิเตอร์ประเภทนี้มีราคาสูง ข้อดีคืออิทธิพลจากคลื่นรบกวนมีค่าต่ำ ความถูกต้องแม่นยำและความเสถียรมีค่าสูงมาก อีกทั้งยังสามารถทำการเทียบมาตรฐานกับเครื่องสเปกโตรมิเตอร์อื่นได้ง่าย ข้อจำกัดคือเครื่องมีขนาดใหญ่ เหมาะสำหรับการใช้งานในห้องปฏิบัติการและระดับอุตสาหกรรม

ระบบการวัด

ระบบการวัด (measurement modes) ของเทคนิคสเปกโตรสโคปีอินฟราเรดย่านใกล้ แต่ละระบบมีความเหมาะสมที่แตกต่างกันไปตามลักษณะตัวอย่างและการใช้งาน ปัจจุบันระบบการวัดที่นิยมมากที่สุดมีทั้งสิ้น 5 ระบบ ได้แก่ การส่องผ่าน (transmittance) การส่องผ่านแบบแพร่ (diffuse transmittance) การส่องผ่านสะท้อน (transflectance) การสะท้อนแบบแพร่ (diffuse reflectance) และอินเตอร์แอคแทนซ์ (interactance) (ศิริลักษณ์ และอนุพันธ์, 2552 และ Huang และคณะ, 2008) มีรายละเอียดดังนี้

1. การส่องผ่าน นิยมใช้กับตัวอย่างที่เป็นของเหลว อุปกรณ์ใส่ตัวอย่างเป็นหลอดควอทซ์ (quartz cuvette cell) ที่มีความหนาตั้งแต่ 1 – 50 มิลลิเมตร ซึ่งความหนาของหลอดใส่ตัวอย่างจะเป็นระยะทางที่แสงเดินทางผ่านตัวอย่าง โดยด้านหนึ่งของตัวอย่างเป็นแหล่งกำเนิดแสง และอีกด้านหนึ่งเป็นตัวรับแสงทำหน้าที่ตรวจวัดความเข้มแสงหลังเดินทางผ่านตัวอย่าง (ภาพที่ 7ก) (ศิริลักษณ์ และอนุพันธ์, 2552) นอกจากนี้ยังมี การใช้ระบบการวัดแบบส่องผ่านในตัวอย่างที่เป็นของแข็ง เพื่อใช้อธิบายคุณภาพภายในตัวอย่าง เช่น ปริมาณน้ำตาล ปริมาณกรดในผลไม้ที่มีเปลือกหนา เช่น แมนดาริน และส้ม เป็นต้น (Kawano และคณะ, 1993; Miyamoto และคณะ, 1998 และ Cayuela, 2008)

2. การส่องผ่านแบบแพร่ ระบบการวัดคล้ายกับการส่องผ่าน แสงจะชนกับอนุภาคในตัวอย่างก่อนที่จะเดินทางผ่านออกมาและถูกตรวจวัดความเข้มแสงด้วยตัวรับแสง (ภาพที่ 7ข)



ภาพที่ 7 ระบบการวัดของเทคนิคสเปกโตรสโคปีอินฟราเรดย่านใกล้
ดัดแปลงจาก: ศิริลักษณ์ และอนุพันธ์ (2552) และ รณฤทธิ์ (2558)

3. การส่องผ่านสะท้อน แสงจะเดินทางผ่านตัวอย่าง ก่อนจะชนเข้ากับฉนวนและเกิดการสะท้อนกลับมาที่ตัวรับแสง ระบบการวัดนี้แสงจะเดินทางผ่านตัวอย่างเป็นสองเท่าของระบบวัดอื่น (ภาพที่ 7ค) (ศิวลักษณ์ และอนุพันธ์, 2552)

4. การสะท้อนแบบแพร่ หรือบางครั้งเรียกว่าการสะท้อน (reflectance) นิยมใช้กับตัวอย่างที่เป็นของแข็ง แสงจะเดินทางไปตัวอย่าง เกิดการดูดกลืน และสะท้อนกลับมาที่ตัวรับแสง ข้อดีของระบบการวัดนี้คือตรวจวัดได้ง่ายกว่า ความเข้มแสงของการสะท้อนมากกว่าความเข้มแสงของระบบการวัดแบบส่องผ่าน แต่มีข้อจำกัดเกี่ยวกับลักษณะและความหนาของผิวตัวอย่าง เช่น เปลือกผลไม้ ซึ่งอาจมีผลต่อการดูดกลืนและการสะท้อน (Fu และคณะ, 2007) (ภาพที่ 7ง)

5. อินเตอร์แอคแทนซ์ ใช้อุปกรณ์ที่เป็นหัววัด ประกอบด้วยใยแก้วนำแสงหรือไฟเบอร์ออปติก (fiber optics) มีตัวรับแสงอยู่ในหัววัดเดียวกัน วิธีการวัดจะต้องวางตัวอย่างให้สัมผัสกับหัววัด โดยใช้มุมการวัด 90 องศา แสงที่สะท้อนกลับออกมาโดยไม่ถูกดูดกลืนจะไม่ถูกวัด (สวนทางกับแสงที่เดินทางไปตัวอย่าง) มีเฉพาะแสงที่ผ่านการดูดกลืนจากตัวอย่างเท่านั้นที่จะถูกวัดด้วยตัวรับแสง (ภาพที่ 7จ) (ศิวลักษณ์ และอนุพันธ์, 2552)

การปรับแต่งสเปกตรัมก่อนการวิเคราะห์

เส้นสเปกตรัมที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคสเปกโตรสโคปีอินฟราเรดย่านใกล้มีความสัมพันธ์ระหว่างแกน X ซึ่งแสดงช่วงเลขคลื่น (wavenumber) หรือความยาวคลื่น (wavelength) กับแกน Y ซึ่งแสดงค่าการดูดกลืน (absorbance) เส้นสเปกตรัมอาจมีความแปรปรวนจากปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับตัวอย่างและการวิเคราะห์ และมีเทคนิคการลดผลกระทบจากปัจจัยดังกล่าว มีรายละเอียดดังนี้

1. ปัจจัยที่มีผลต่อค่าสเปกตรัม

1) ความชื้นในตัวอย่าง

แม้ตัวอย่างที่ทำการวิเคราะห์จะเป็นตัวอย่างชนิดเดียวกัน แต่ถ้ามีความชื้นต่างกัน ตัวอย่างที่มีความชื้นสูงกว่าจะดูดกลืนแสงมากกว่า เนื่องจากน้ำเป็นสารที่มีประสิทธิภาพในการดูดกลืนแสง มีสเปกตรัมการดูดกลืนที่ความยาวคลื่น 2 ค่า คือ 1450 และ 1940 นาโนเมตร การดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นดังกล่าวส่งผลต่อเส้นสเปกตรัมที่ความยาวคลื่นข้างเคียง เหมือนกับเป็นการดึงเส้นสเปกตรัมในย่านความยาวคลื่นนั้นให้มีค่าการดูดกลืนแสงเพิ่มขึ้น หมายถึงเส้นสเปกตรัมจะแสดงผลที่มีค่ามากกว่าความเป็นจริง

2) ขนาดอนุภาค

ตัวอย่างที่มีอนุภาคขนาดเล็กจะดูดกลืนแสงน้อยกว่าตัวอย่างชนิดเดียวกันที่มีอนุภาคขนาดใหญ่ เพราะตัวอย่างที่มีอนุภาคขนาดเล็กจะมีช่องว่างระหว่างอนุภาคน้อยกว่า เมื่อแสงเดินทางผ่านเข้าไปภายในตัวอย่างจะชนกับอนุภาคที่เรียงชิดติดกันและสะท้อนกลับออกมา โดยระยะทางที่แสงเดินทางเข้าไปในตัวอย่อย่างที่มีอนุภาคขนาดเล็กจะสั้นกว่าตัวอย่างที่มีอนุภาคขนาดใหญ่ ทำให้ดูดกลืนแสงได้น้อยกว่า

3) ขนาดตัวอย่าง

ในระบบการวัดแบบส่องผ่าน ขนาดของตัวอย่างมีความสัมพันธ์กับระยะทางที่แสงเดินทางผ่านตัวอย่าง เช่น ค่าการดูดกลืนแสงของผลส้มที่มีขนาดแตกต่างกัน แม้จะมีค่าทางเคมีเหมือนกัน แต่ผลที่มีขนาดใหญ่จะดูดกลืนแสงได้มากกว่าผลขนาดเล็ก เพราะมีระยะทางที่แสงเดินทางผ่านมากกว่านั่นเอง

4) อุณหภูมิ

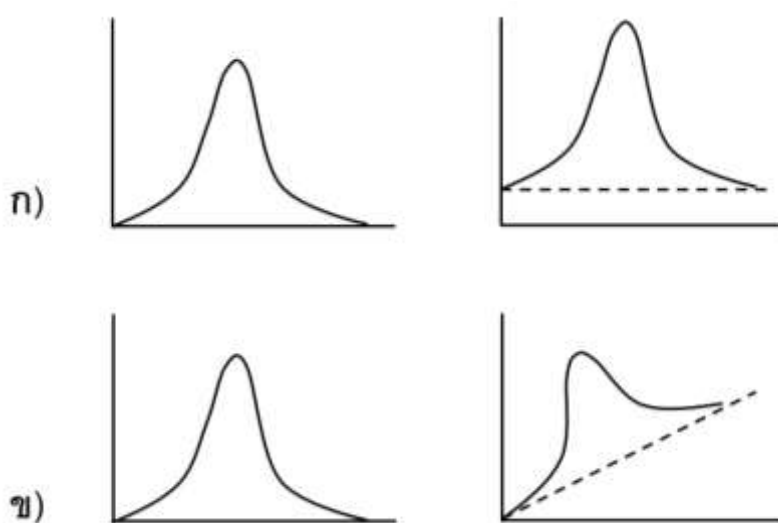
อุณหภูมิเป็นปัจจัยที่มีผลต่อตัวอย่างที่มีน้ำเป็นองค์ประกอบ เมื่อตัวอย่างมีอุณหภูมิสูงขึ้น โมเลกุลของน้ำจะมีการสั่นมากขึ้น ค่าการดูดกลืนแสงที่ปรากฏในเส้นสเปกตรัมก็จะมีค่าสูงขึ้นตามไปด้วย ดังนั้นการควบคุมอุณหภูมิของตัวอย่างจึงมีความสำคัญต่อความถูกต้องแม่นยำของการวิเคราะห์

5) ปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับพื้นผิว

ผิวหน้าของตัวอย่างชนิดเดียวกันที่มีความเรียบแตกต่างกันจะให้ผลวิเคราะห์ที่ต่างกัน โดยตัวอย่างที่มีผิวหน้าเรียบจะมีการสะท้อนแสงที่ผิวมากกว่า ส่งผลให้ค่าการดูดกลืนแสงน้อยกว่าตัวอย่างที่มีผิวหน้าขรุขระ

2. เทคนิคการลดผลกระทบจากปัจจัยที่มีต่อสเปกตรัม

เส้นสเปกตรัมที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคสเปกโตรสโคปีอินฟราเรดย่านใกล้จะมีลักษณะแถบ การดูดกลืนของแต่ละเลขคลื่นหรือความยาวคลื่นที่ซ้อนทับกัน (overlapping) และเส้นสเปกตรัมอาจได้รับผลกระทบจากการกระเจิงแสงอันเนื่องมาจากปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับตัวอย่างและการวิเคราะห์ที่ได้กล่าวมาแล้ว ในหัวข้อก่อนหน้านี้ทำให้เกิดการเลื่อนขึ้นของเส้นสเปกตรัมในแนวตั้ง (ตามแนวแกน Y) เรียกว่า เบสไลน์ออฟเซต (baseline offset) (ภาพที่ 8ก) หรือเส้นสเปกตรัมเกิดการเอียงขึ้นไปทางด้านขวาที่เลขคลื่นหรือความยาวคลื่นสูงขึ้น เรียกว่า เบสไลน์ชิฟต์เชิงเส้น (linear baseline shift) (ภาพที่ 8ข) ซึ่งปัญหาเหล่านี้อาจทำให้ผลวิเคราะห์ที่ได้มีความคลาดเคลื่อน ดังนั้นเทคนิคการลดผลกระทบจากปัจจัยที่มีต่อสเปกตรัมจึงมีความจำเป็นเพื่อลดความคลาดเคลื่อนดังกล่าว



ภาพที่ 8 สเปกตรัมที่ได้รับผลกระทบแบบเบสไลน์ออฟเซต (ก) และแบบเบสไลน์ชิฟต์เชิงเส้น (ข)

ดัดแปลงจาก: อนุพันธ์ (2552)

1) การแปลงค่าด้วยวิธีอนุพันธ์ (derivative transformation)

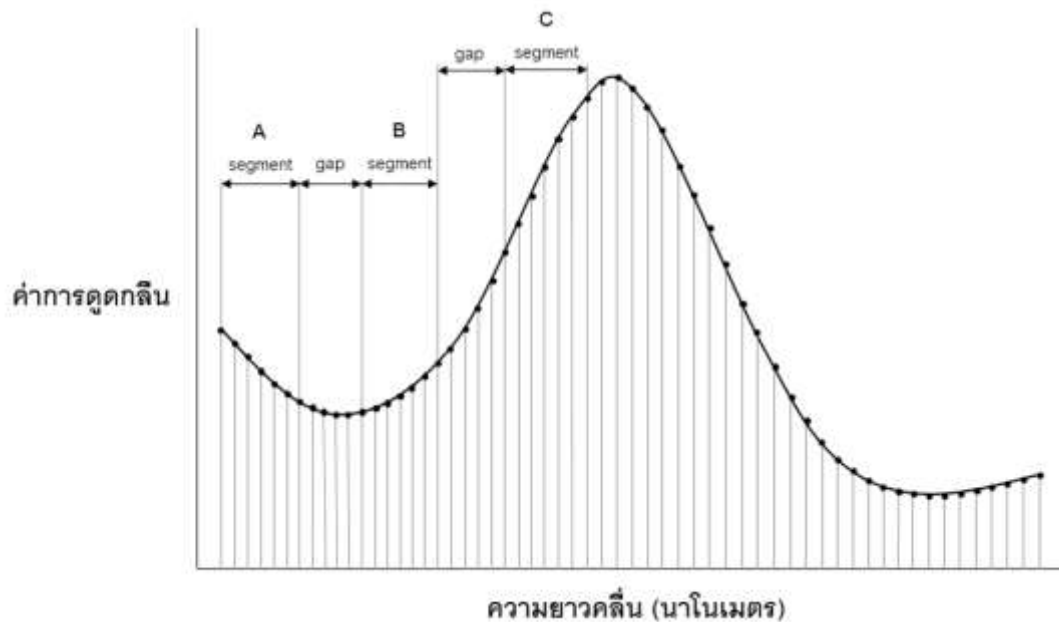
การแปลงค่าอนุพันธ์ของเส้นสเปกตรัมใช้ในการแก้ปัญหาแถบการดูดกลืนที่ซ้อนทับกัน การเกิดเบสไลน์ออฟเซต และเบสไลน์ชิฟต์เชิงเส้น ปกตินิยมแปลงเป็นค่าอนุพันธ์อันดับหนึ่ง (first derivative) หรืออนุพันธ์อันดับ

สอง (second derivative) ซึ่งอนุพันธ์แต่ละอันดับมีวิธีการคำนวณ ผลลัพธ์ และข้อจำกัดที่แตกต่างกัน มีรายละเอียดดังนี้

การแปลงค่าอนุพันธ์อันดับหนึ่ง ก่อนการคำนวณต้องกำหนดขนาดของเซกเมนต์ (segments) และขนาดของช่องว่าง (gap size) จากภาพที่ 9 เป็นตัวอย่างการคำนวณ แบ่งเส้นสเปกตรัมให้แต่ละจุดห่างกัน 2 นาโนเมตร ขนาดของเซกเมนต์เท่ากับ 12 นาโนเมตร และขนาดของช่องว่างเป็น 10 นาโนเมตร เริ่มต้นจากการหาค่าเฉลี่ยของเซกเมนต์แรกจากเส้นสเปกตรัมทั้ง 7 จุด จะได้ค่า A เป็นตัวแทนของเซกเมนต์ที่หนึ่ง และทำอย่างเดียวกันกับเซกเมนต์ถัดไป จะได้ค่า B เป็นตัวแทนของเซกเมนต์ที่สอง นำค่า A หักลบออกจากค่า B ตามสมการ

$$\text{อนุพันธ์อันดับหนึ่ง} = B - A$$

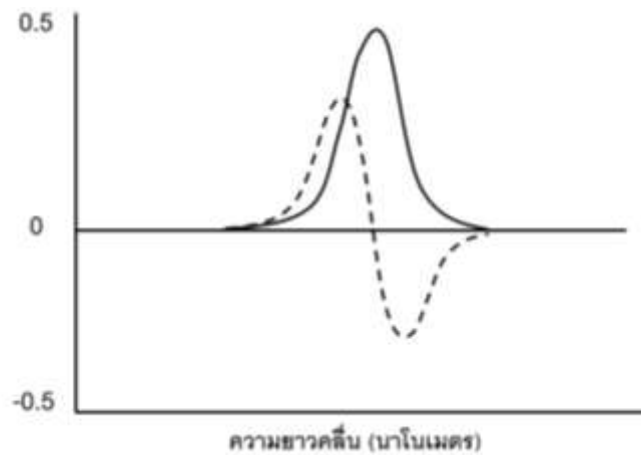
โดย A และ B เป็นค่าเฉลี่ยของสเปกตรัมของเซกเมนต์ที่อยู่ติดกัน และมีช่วงเซกเมนต์เท่ากัน



ภาพที่ 9 ขนาดของเซกเมนต์และขนาดของช่องว่างที่กำหนดในสเปกตรัมเพื่อคำนวณค่าอนุพันธ์
ดัดแปลงจาก: อนุพันธ์ (2552)

นำผลลัพธ์ที่ได้ไปแทนค่าสเปกตรัมที่จุดแรกของเซกเมนต์ที่หนึ่ง การคำนวณจะทำต่อเนื่องกันไปทุกเซกเมนต์ตลอดความยาวคลื่นทั้งหมด จากนั้นขยับเซกเมนต์ไปทางขวาหนึ่งจุด (จากตัวอย่างคือ 2 นาโนเมตร) แล้วคำนวณซ้ำจนเสร็จสมบูรณ์

การแปลงค่าอนุพันธ์อันดับหนึ่งจะให้เส้นสเปกตรัมที่มีค่าความชันตรงกับจุดยอดของเส้นสเปกตรัมเดิม (ภาพที่ 10) ใช้ได้ผลดีกับตัวอย่างที่มีขนาดและการกระจายตัวของอนุภาคที่สม่ำเสมอ



ภาพที่ 10 สเปกตรัมเดิม (เส้นทึบ) และอนุพันธ์อันดับหนึ่งของสเปกตรัม (เส้นประ)
ดัดแปลงจาก: อนุพันธ์ (2552)

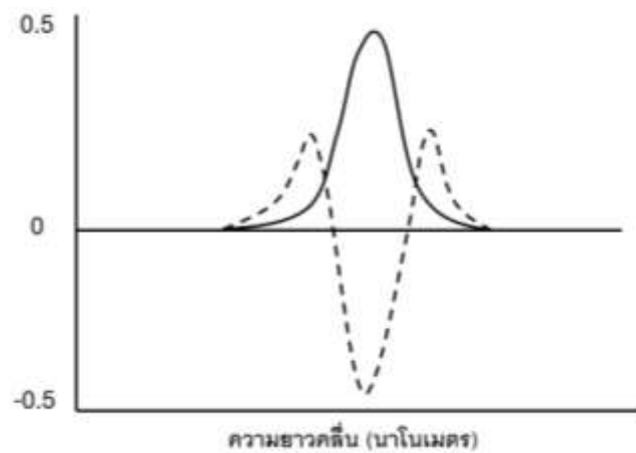
สำหรับการแปลงค่าอนุพันธ์อันดับสอง คือ การคำนวณผลลบของอนุพันธ์อันดับหนึ่งที่เชกเมนต์อยู่ติดกัน
ดังสมการ

$$\begin{aligned}\text{อนุพันธ์อันดับสอง} &= \text{อนุพันธ์อันดับหนึ่งแรก} - \text{อนุพันธ์อันดับหนึ่งถัดมา} \\ &= (B - A) - (C - B) \\ &= 2B - A - C\end{aligned}$$

โดย A, B และ C เป็นค่าเฉลี่ยของสเปกตรัมของเชกเมนต์ที่อยู่ติดกัน และมีช่วงเชกเมนต์เท่ากัน

การคำนวณคล้ายกับการหาอนุพันธ์อันดับหนึ่ง ต่างกันที่การหาจุดแรกของอนุพันธ์อันดับสองต้องหาค่าเฉลี่ยของสเปกตรัมในช่วงที่สามหรือค่า C (ภาพที่ 9) ผลลัพธ์สุดท้ายจากสมการด้านบนนำไปแทนค่าสเปกตรัมจุดแรกของเชกเมนต์ที่หนึ่ง การคำนวณจะทำต่อเนื่องกันไปทุกเชกเมนต์ตลอดความยาวคลื่นทั้งหมด จากนั้นขยับเชกเมนต์ไปทางขวาหนึ่งจุด (จากตัวอย่างคือ 2 นาโนเมตร) แล้วคำนวณซ้ำจนเสร็จสมบูรณ์

การแปลงค่าอนุพันธ์อันดับสอง จะให้เส้นสเปกตรัมที่มีจุดยอดตรงกับจุดยอดของเส้นสเปกตรัมเดิม โดยเป็นจุดยอดในลักษณะกลับหัว (ภาพที่ 11) ใช้ได้ผลดีกับตัวอย่างที่มีขนาดอนุภาคแตกต่างกันผสมผสานกันอยู่ภายในตัวอย่าง



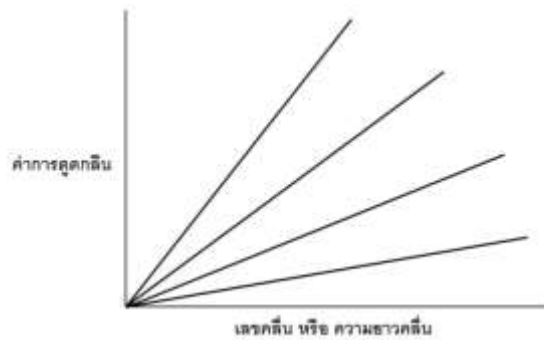
ภาพที่ 11 สเปกตรัมเดิม (เส้นทึบ) และอนุพันธ์อันดับสองของสเปกตรัม (เส้นประ)
ดัดแปลงจาก: อนุพันธ์ (2552)

เมื่อเปรียบเทียบภาพที่ 10 และ 11 จะพบว่าอนุพันธ์อันดับสองสามารถแก้ปัญหาที่เกิดจากการซ้อนทับกันของแถบการดูดกลืนได้ดีกว่าอนุพันธ์อันดับหนึ่ง เนื่องจากสามารถแยกจุดยอดที่เหลื่อมซ้อนกันออกมาได้ชัดเจนกว่า นอกจากนี้อนุพันธ์อันดับสองยังสามารถแก้ปัญหาเบสไลน์ชิพต์เชิงเส้นได้อีกด้วย เพราะอนุพันธ์อันดับสองของเส้นตรงมีค่าเป็นศูนย์ ส่วนอนุพันธ์อันดับหนึ่งเหมาะสำหรับใช้แก้ปัญหาเบสไลน์ออฟเซต และสามารถแก้ปัญหาอื่นๆ ได้เช่นเดียวกันกับการทำอนุพันธ์อันดับสองแต่มีความชัดเจนน้อยกว่า

แม้อนุพันธ์อันดับที่สูงกว่าจะสามารถแก้ปัญหาได้ดีกว่า แต่มีข้อเสียคือสเปกตรัมที่ได้จะมีสัญญาณรบกวนมากขึ้นตามไปด้วย เนื่องจากสัญญาณรบกวนมักจะปรากฏเป็นจุดยอดเล็กๆ บนเส้นสเปกตรัม การทำอนุพันธ์ทำให้จุดยอดเล็กๆ นั้นแยกจากกันชัดเจนขึ้น นอกจากนี้การทำอนุพันธ์อันดับที่สูงกว่าอันดับสองให้ผลเป็นเส้นสเปกตรัมที่แตกต่างกับเส้นสเปกตรัมเดิมมาก แปรผลเทียบกับเส้นสเปกตรัมเดิมได้ยาก จึงไม่นิยมใช้ในเทคนิคสเปกโตรสโคปีอินฟราเรดย่านใกล้

2) การปรับแก้การกระเจิงแบบพหุคูณ (multiplicative scatter correction, MSC)

สเปกตรัมที่ได้จากการวัดด้วยระบบการวัดแบบส่องผ่านและสะท้อนแบบแพร่จะได้รับผลกระทบจากการกระเจิงแสง (scattered light) เพราะความไม่สม่ำเสมอของอนุภาคในตัวอย่าง ทำให้ความเข้มโดยรวมของสเปกตรัมเปลี่ยนไป เสมือนว่าสเปกตรัมถูกทำให้หมุนรอบจุดที่ความยาวคลื่นต่ำสุดของสเปกตรัม หรือเรียกว่าผลกระทบแบบคูณ (multiplicative effect) ถ้าสมมติให้สเปกตรัมเป็นเส้นตรงที่ได้รับผลกระทบจากการกระเจิงแสง เส้นตรงจะถูกหมุนไป ดังภาพที่ 12



ภาพที่ 12 สเปกตรัมที่ได้รับผลกระทบจากการกระเจิงแสง

ดัดแปลงจาก: อนุพันธ์ (2552)

การปรับแก้การกระเจิงแบบพหุคูณเป็นวิธีทางคณิตศาสตร์ที่ทำให้สเปกตรัมแต่ละเส้นหมุนเข้าใกล้เส้นสเปกตรัมเฉลี่ยของตัวอย่างทั้งหมดให้มากที่สุด โดยขั้นแรกจะต้องนำสเปกตรัมทั้งหมดของตัวอย่างมาเฉลี่ยเพื่อให้ได้สเปกตรัมเฉลี่ยก่อน จากนั้นนำค่าการดูดกลืนแสงของแต่ละความยาวคลื่นของแต่ละตัวอย่างมาหาความสัมพันธ์กับค่าการดูดกลืนแสงของสเปกตรัมเฉลี่ยของตัวอย่างทั้งหมดทุกความยาวคลื่น จะได้เส้นตรงที่มีค่าความชันไม่เท่ากับหนึ่ง ถ้าตัวอย่างใดมีสเปกตรัมเหมือนกับสเปกตรัมเฉลี่ย ความชันจะมีค่าเท่ากับหนึ่ง

ขั้นตอนการหมุนสเปกตรัมแต่ละเส้นให้เข้าใกล้เส้นสเปกตรัมเฉลี่ยทำได้โดยหาค่าคงที่ค่าหนึ่งมาลบออกจากเส้นสเปกตรัมเพื่อลดผลกระทบจากการเลื่อนตัวของเส้นสเปกตรัม และหาค่าคงที่อีกค่าหนึ่งมาหารค่าการดูดกลืนแสงทุกความยาวคลื่นเพื่อปรับความชันของเส้นสเปกตรัมที่เปลี่ยนไป นั้นหมายถึงปรับค่าการดูดกลืนแสงให้เพิ่มขึ้นหรือลดลงเป็นสัดส่วนเพื่อให้มีค่าตรงกับเส้นสเปกตรัมเฉลี่ย ค่าคงที่ดังกล่าวคำนวณได้จากสมการวิเคราะห์ความถดถอย (regression) ดังนี้

$$x_{iw} = a_i + b_i \bar{x}_w \text{ เมื่อ } w = 1, \dots, p$$

โดย x_{iw} คือ ค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่าง i ที่ความยาวคลื่น w ในตัวอย่างที่มี p ความยาวคลื่น

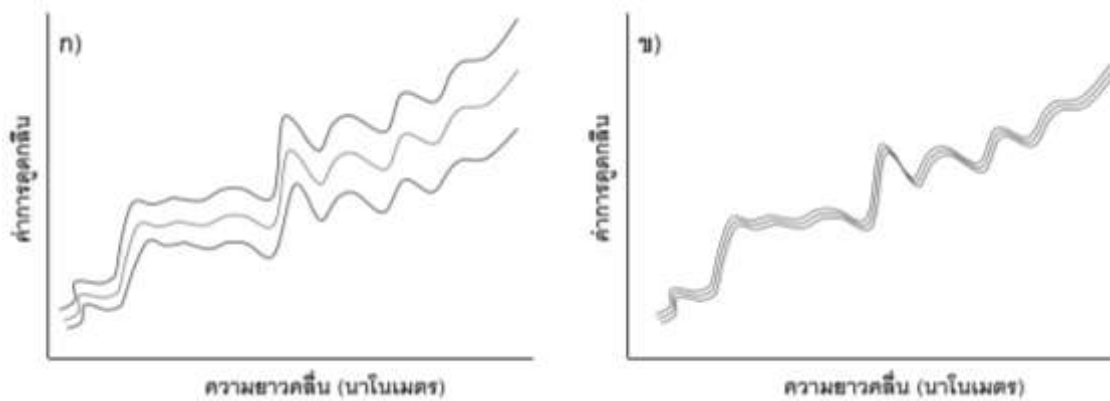
$\bar{x}_w$ คือ ค่าเฉลี่ยค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น w ของตัวอย่างทั้งหมด

a_i และ b_i คือ ค่าคงที่สำหรับสมการความถดถอยของตัวอย่าง i

แต่ละตัวอย่างจะได้ค่า a_i และ b_i ที่แตกต่างกัน ค่าคงที่ทั้งสองค่าจะนำมาใช้คำนวณค่าสเปกตรัมใหม่
ดังนี้

$$x_{i,MSC} = \frac{(x_{iw} - a_i)}{b_i} \text{ เมื่อ } w = 1, \dots, p$$

ตัวอย่างสเปกตรัมที่ปรับแก้ด้วยวิธีการกระเจิงแบบพหุคูณแสดงดังภาพที่ 13 สเปกตรัมที่ถูกปรับแก้จะเหมือนกับถูกหมุนให้เข้ามาใกล้กับสเปกตรัมเฉลี่ย รูปร่างของสเปกตรัมที่ได้จะแตกต่างกับสเปกตรัมที่ได้จากการทำอนุพันธ์ โดยสเปกตรัมหลังการปรับแก้ด้วยวิธีการกระเจิงแบบพหุคูณจะมีรูปร่างไม่ต่างจากเส้นสเปกตรัมเดิมมากนัก



ภาพที่ 13 สเปกตรัมเดิมที่ได้รับผลกระทบแบบคูณ (ก) และสเปกตรัมหลังการปรับแก้การกระเจิงแบบพหุคูณ (ข)
ดัดแปลงจาก: อนุพันธ์ (2552)

ข้อจำกัด คือ ถ้าใช้การปรับแก้การกระเจิงแบบพหุคูณกับสเปกตรัมตัวอย่างเพื่อสร้างสมการวิเคราะห์ ตัวอย่างก็จะต้องใช้การปรับแก้กับกลุ่มตัวอย่างที่จะนำมาประเมินค่าทางเคมีในอนาคตด้วย และเส้นสเปกตรัมเฉลี่ยต้องเป็นเส้นเดียวกัน

3) วิธีปรับความแปรปรวนให้เป็นมาตรฐาน (standard normal variate, SNV) และการปรับแนวโน้ม (Detrending)

สเปกตรัมจากตัวอย่างที่ถูกวิเคราะห์ด้วยวิธีการสะท้อนแบบแพร่จะมีความแตกต่างกัน เนื่องจากได้รับผลกระทบจากการกระเจิงแสง และขนาดของการกระเจิงแสงขึ้นอยู่กับความยาวคลื่นแสง ขนาดอนุภาค การกระจายตัวของอนุภาค และดัชนีหักเหของตัวอย่าง ดังนั้นตลอดช่วงของเส้นสเปกตรัมจึงเกิดการกระเจิงแสงไม่เท่ากัน โดยทั่วไปเส้นสเปกตรัมที่ได้รับผลกระทบจากการกระเจิงแสงจะมีการเลื่อนตัวตามแนวตั้ง มีการหมุนของเส้นสเปกตรัม หรือทำให้เส้นสเปกตรัมมีความโค้งเพิ่มขึ้น ซึ่งผลกระทบจากการกระเจิงแสงจะพบมากที่สุดช่วงปลายของเส้นสเปกตรัมหรือที่ความยาวคลื่นสูง ทำให้เห็นเป็นสเปกตรัมในลักษณะปากแตร ดังภาพที่ 13ก

วิธีการกำจัดผลกระทบจากการกระเจิงแสงออกจากเส้นสเปกตรัม นอกจากการทำอนุพันธ์และการปรับแก้การกระเจิงแบบพหุคูณ ยังสามารถใช้วิธีปรับความแปรปรวนให้เป็นมาตรฐานซึ่งจะให้ผลลัพธ์คล้ายคลึงกับการปรับแก้การกระเจิงแบบพหุคูณ แต่มีความแตกต่างกันที่วิธีนี้ไม่ต้องใช้เส้นสเปกตรัมเฉลี่ยเป็นสเปกตรัมอ้างอิง ทำได้โดยปรับแก้ค่าการดูดกลืนให้เป็นมาตรฐานเดียวกัน (normalization) โดยปรับแก้ให้ค่าเฉลี่ยของสเปกตรัมมีค่าเป็นศูนย์ด้วยการนำค่าเฉลี่ยของสเปกตรัมของตัวอย่างนั้นๆ มาลบออกจากค่าการดูดกลืนแสงที่แต่ละความยาวคลื่นตลอดช่วง และปรับแก้ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานให้เท่ากับหนึ่งโดยนำค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานที่คำนวณได้จากค่าการดูดกลืนแสงตลอดช่วงของเส้นสเปกตรัมมาหารค่าการดูดกลืนแสงที่แต่ละความยาวคลื่น ดังสมการต่อไปนี้

$$A_{i(SNV)} = \frac{(A_i - \bar{a}_i)}{\sqrt{\frac{\sum_{j=1}^p (A_{i,j} - \bar{a}_i)^2}{(p-1)}}$$

โดย A_i คือ ค่าการดูดกลืนแสงที่แต่ละความยาวคลื่นของตัวอย่าง i

$\bar{a}_i$ คือ ค่าเฉลี่ยของสเปกตรัมของตัวอย่าง i

$A_{i,j}$ คือ ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น j จากทั้งหมด p ความยาวคลื่นของตัวอย่าง i

ค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานจะคำนวณมาจากการดูดกลืนแสงของเส้นสเปกตรัมแต่ละเส้น ที่ต้องการปรับแก้ของตัวอย่างนั้นๆ เองโดยอิสระ เมื่อปรับแก้แล้วจะได้เส้นสเปกตรัมคล้ายคลึงกับภาพที่ 13ข

การปรับแนวโน้มนำมาจากการปรับความแปรปรวนให้เป็นมาตรฐานเพื่อลดความโน้มเอียงของเส้นสเปกตรัม ซึ่งการปรับแนวโน้มนำมาจากการปรับความแปรปรวนให้เป็นมาตรฐานเท่านั้น ไม่สามารถนำมาใช้เพียงลำพังวิธีเดียว ผลที่ได้จากการปรับแนวโน้มนำมาคือลดผลกระทบจากเบสไลน์ชิฟต์เชิงเส้นและช่วยเน้นยอดสเปกตรัมให้เด่นชัดขึ้น แต่โดยทั่วไปวิธีการปรับความแปรปรวนให้เป็นมาตรฐานอย่างเดียวก็เพียงพอสำหรับการกำจัดผลกระทบจากการกระเจิงแสงออกจากเส้นสเปกตรัม

4) การปรับค่าเป็นมาตรฐาน (normalization)

เป็นวิธีทางคณิตศาสตร์ที่นำมาใช้กำจัดความแปรปรวนในเส้นสเปกตรัม โดยนำค่าการดูดกลืนแสงอ้างอิงหรืออาจเป็นค่าการดูดกลืนแสงที่มากที่สุดมาลบออกจากค่าการดูดกลืนแสงในสเปกตรัมเดียวกันที่ความยาวคลื่นอื่นๆ ทั้งหมด หรืออาจนำค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นอ้างอิงมาหารค่าการดูดกลืนแสงที่แต่ละความยาวคลื่น ดังสมการต่อไปนี้

การปรับค่าเป็นมาตรฐานด้วยการลบ

$$A'_{\lambda i} = A_{\lambda i} - A_{\lambda*}$$

การปรับค่าเป็นมาตรฐานด้วยการหาร

$$A'_{\lambda i} = \frac{A_{\lambda i}}{A_{\lambda*}}$$

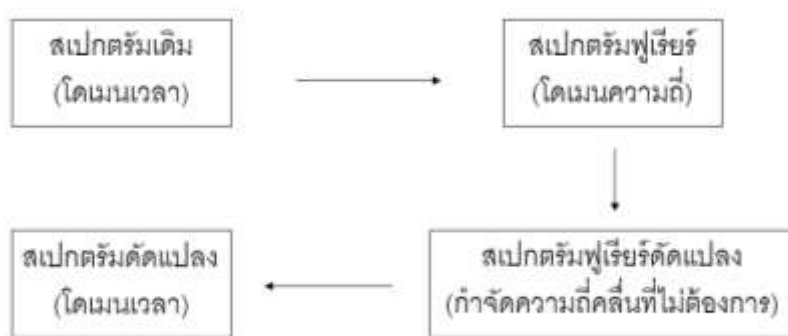
โดย $A_{\lambda i}$ คือ ค่าการดูดกลืนแสงที่แต่ละความยาวคลื่นของสเปกตรัมเดิม

$A_{\lambda*}$ คือ ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นอ้างอิง

วิธีการปรับแก้การกระเจิงแบบพหุคูณที่กล่าวมาแล้วก็เป็นการปรับค่าให้เป็นปกติเช่นกัน และสามารถนำค่าอ้างอิงมาลบและหารได้ในคราวเดียวกัน ดังนั้น ในปัจจุบันวิธีการปรับค่าเป็นมาตรฐานจึงไม่นิยมนำมาใช้ เนื่องจากการลบและการหารต้องทำแยกกันทีละขั้นตอน ทำให้ยุ่งยากต่อการคำนวณ

5) การแปลงฟูเรียร์ (Fourier transform)

สเปกตรัมที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคสเปกโตรสโคปีอินฟราเรดย่านใกล้สามารถทำการแปลงฟูเรียร์ได้เพื่อกำจัดความถี่ที่ไม่ต้องการ ส่วนใหญ่เป็นความถี่ที่เกิดจากสัญญาณรบกวน โดยสเปกตรัมที่มีลักษณะเป็นโดเมนเวลา (time domain) หมายถึงมีแกนอนเป็นความยาวคลื่น และมีแกนตั้งเป็นค่าการดูดกลืนแสง จะถูกแปลงเป็นโดเมนความถี่ (frequency domain) หมายถึงมีแกนอนเป็นความถี่คลื่น (wave frequency) และมีแกนตั้งเป็นขนาดคลื่น (wave height) เรียกว่า สเปกตรัมฟูเรียร์ (Fourier spectrum) หลังจากนั้นกำจัดความถี่ที่ไม่ต้องการออก จะได้เป็นสเปกตรัมฟูเรียร์ดัดแปลง (modified Fourier spectrum) ก่อนจะนำไปแปลงกลับเป็นสเปกตรัมที่เป็นโดเมนเวลาอีกครั้ง เรียกว่า สเปกตรัมดัดแปลง (modified spectrum) ขั้นตอนเป็นตามภาพที่ 14



ภาพที่ 14 การแปลงข้อมูลสเปกตรัมด้วยเทคนิคการแปลงฟูเรียร์

ดัดแปลงจาก: Hruschka (1990)

เทคนิคการลดผลกระทบจากปัจจัยที่มีต่อสเปกตรัมอาจเลือกใช้ได้มากกว่าหนึ่งวิธี โดยคำนึงถึงปัญหาที่พบในเส้นสเปกตรัม แต่ไม่ควรเลือกใช้เทคนิคที่แก้ปัญหาและให้ผลลัพธ์ลักษณะเดียวกัน สเปกตรัมที่ดีคือสเปกตรัมที่สามารถนำไปสร้างสมการที่มีประสิทธิภาพในการประเมินค่าทางเคมีของตัวอย่างในอนาคตได้ใกล้เคียงที่สุด (อนุพันธ์, 2552) ซึ่งขั้นตอนการวิเคราะห์และสร้างสมการจากสเปกตรัมจะกล่าวถึงในหัวข้อลำดับถัดไป

ขั้นตอนการวิเคราะห์ข้อมูลจากสเปกตรัมอินฟราเรดย่านใกล้

หลังการปรับแต่งสเปกตรัม ข้อมูลจากเส้นสเปกตรัมจะถูกนำมาเปรียบเทียบกับผลวิเคราะห์ที่ได้จากวิธีมาตรฐาน (reference method) เช่น การวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC เป็นต้น โดยเรียกการเปรียบเทียบข้อมูลในลักษณะนี้ว่า เคมีเมตริก (chemometrics) จากนั้นข้อมูลจากทุกตัวอย่างจะถูกแบ่งออกเป็น 2 ส่วน คือ ส่วนที่จะนำไปสร้างเป็นสมการแคลิเบรชัน (calibration model) เพื่อใช้ในการทำนายองค์ประกอบในตัวอย่างที่ต้องการทราบชนิดหรือปริมาณ และส่วนที่จะนำไปสร้างเป็นสมการเพื่อใช้ในการทวนสอบสมการแคลิเบรชัน (validation) มีรายละเอียดดังนี้

1. การสร้างสมการแคลิเบรชัน

สมการแคลิเบรชันใช้ในการทำนายองค์ประกอบในตัวอย่างได้ทั้งเชิงปริมาณและเชิงคุณภาพ นิยมใช้จำนวนข้อมูลจาก 60 ตัวอย่างขึ้นไป การสร้างสมการแคลิเบรชันสามารถเลือกทำได้จาก 2 วิธีหลัก คือ วิธีการเลือกความยาวคลื่น (wavelength selection method) หรือวิธีใช้สเปกตรัมทั้งหมด (full-spectrum method) ซึ่งแต่ละวิธีต้องอาศัยวิธีทางสถิติเพื่อสร้างสมการแคลิเบรชัน ดังตารางที่ 3

ตารางที่ 3 การสร้างสมการแคลิเบรชัน

วิธีหลัก	วิธีการเลือกความยาวคลื่น	วิธีใช้สเปกตรัมทั้งหมด
วิธีทางสถิติ	วิธีการถดถอยเชิงเส้นอย่างง่าย	การถดถอยโดยใช้องค์ประกอบหลัก
	การถดถอยเชิงพหุคูณ	การถดถอยกำลังสองน้อยที่สุดบางส่วน

ที่มา: ธงชัย และปิติพร (2552)

1) วิธีการเลือกความยาวคลื่น

เป็นการคัดเลือกการดูดกลืนของสเปกตรัมบางช่วงคลื่นที่มีความสัมพันธ์กับองค์ประกอบที่วิเคราะห์ได้จากวิธีมาตรฐาน เช่น ปริมาณน้ำในตัวอย่างมีความสัมพันธ์กับการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 1940 และ 2310 นาโนเมตร (Osborn และคณะ, 1993) การคัดเลือกความยาวคลื่นนิยมเลือกจากเอกสารอ้างอิงที่แสดงการดูดกลืนแสงของตัวอย่างแต่ละชนิด

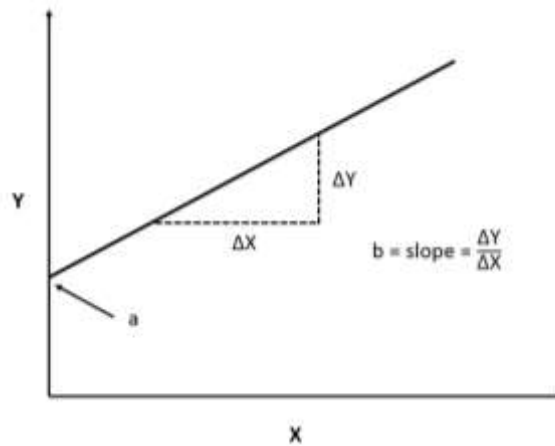
เมื่อเลือกความยาวคลื่นที่สัมพันธ์กับองค์ประกอบที่ต้องการวิเคราะห์ได้แล้ว ขั้นตอนต่อไปคือการเลือกใช้วิธีทางสถิติในการสร้างสมการแคลิเบรชัน ได้แก่ วิธีการถดถอยเชิงเส้นอย่างง่าย (simple linear regression) และการถดถอยเชิงพหุคูณ (multiple linear regression)

วิธีการถดถอยเชิงเส้นอย่างง่าย หรือการถดถอยเชิงเส้นเทอมเดียว (single term linear regression) ประกอบด้วยตัวแปรอิสระ (X) ซึ่งเป็นค่าตัวแปรที่ได้มาจากการดูดกลืนแสง และตัวแปรตาม (Y) ซึ่งเป็นค่าตัวแปรที่ได้มาจากการวิเคราะห์ด้วยวิธีมาตรฐาน อย่างละ 1 ตัว โดยตัวแปรทั้งสองมีความสัมพันธ์เชิงเส้นตรง ดังสมการ

$$Y = a + bX$$

โดย a คือ ค่าคงที่ ณ จุดตัดแกน Y เมื่อ X มีค่าเท่ากับ 0

b คือ ค่าความชันของกราฟ



ภาพที่ 15 ความสัมพันธ์ของสมการถดถอยเชิงเส้นอย่างง่าย

ดัดแปลงจาก: ธงชัย และปิติพร (2552)

ค่า a และ b สามารถคำนวณได้จาก

$$a = \frac{\sum_{i=1}^n Y_i}{n} - b \frac{\sum_{i=1}^n X_i}{n}$$

และ

$$b = \frac{\sum XY - \frac{\sum X \sum Y}{n}}{\left[\sum X^2 - \frac{(\sum X)^2}{n} \right]}$$

โดย n คือ จำนวนตัวอย่าง

แต่ในทางปฏิบัติ สารในตัวอย่างอาหารมักมีการดูดกลืนรังสีอินฟราเรดย่านใกล้ที่หลายความยาวคลื่น ทำให้มีตัวแปรอิสระในสมการมากกว่า 1 ตัว ($X_s = X_1, X_2, \dots, X_p$) และมีตัวแปรตาม (Y) ซึ่งเป็นค่าที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยวิธีมาตรฐาน 1 ตัว ดังนั้นการถดถอยเชิงพหุคูณที่แสดงรูปแบบสมการซับซ้อนและมีความละเอียดมากกว่าจึงสามารถนำมาใช้ทำนายหาปริมาณสารที่ต้องการวิเคราะห์ได้ดีกว่าการถดถอยเชิงเส้นอย่างง่าย ดังรูปแบบสมการต่อไปนี้

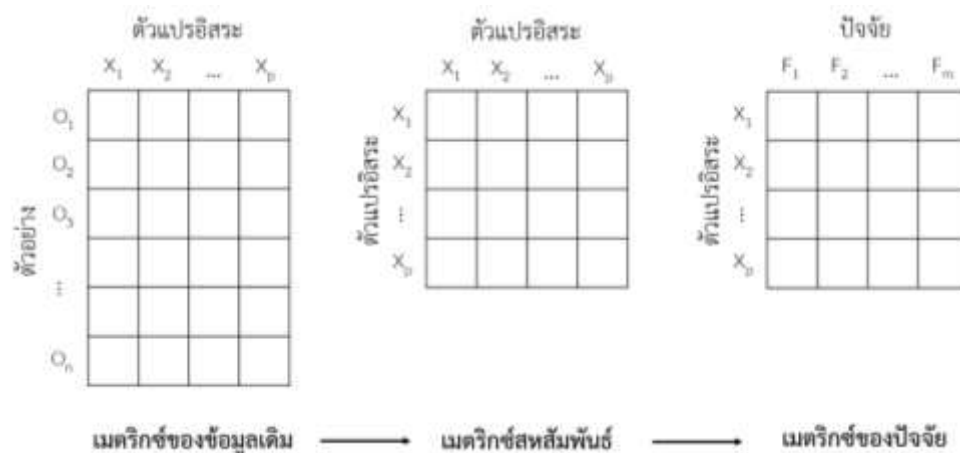
$$Y = a + b_1X_1 + b_2X_2 + \dots + b_pX_p$$

การถดถอยเชิงพหุคูณเหมาะสำหรับตัวอย่างที่ทราบความยาวคลื่นที่สัมพันธ์กับองค์ประกอบที่ต้องการวิเคราะห์ หากไม่ทราบจะต้องเสียเวลามากในการคัดเลือกความยาวคลื่น อีกทั้งความยาวคลื่นที่เลือกอาจมีความสัมพันธ์หรือการทับซ้อนกับความยาวคลื่นอื่นๆ ทำให้เกิดปัญหาความซ้ำซ้อนของตัวแปรในสมการ ปัญหาดังกล่าวทำให้ได้ค่าจากการทำนายที่ไม่ถูกต้อง อาจได้ค่าที่สูงกว่าหรือต่ำกว่าค่าจากการวิเคราะห์ด้วยวิธีมาตรฐานซึ่งเป็นค่าที่แท้จริง การใช้ข้อมูลทั้งหมดที่มีในทุกความยาวคลื่นของสเปกตรัมเป็นหนทางหนึ่งในการแก้ปัญหาดังกล่าว

2) วิธีการวิเคราะห์โดยใช้สเปกตรัมทั้งหมด

การใช้สเปกตรัมทั้งหมดในการวิเคราะห์ข้อมูลช่วยให้ไม่ต้องมีการคัดเลือกความยาวคลื่น และลดปัญหาความยาวคลื่นที่เลือกอาจมีความสัมพันธ์หรือการทับซ้อนกับความยาวคลื่นอื่นๆ แต่การวิเคราะห์โดยใช้ทุกความยาวคลื่นของสเปกตรัมทำให้ตัวแปรอิสระมากเกินไป ดังนั้นจึงต้องใช้วิธีทางสถิติเพื่อจัดกลุ่มตัวแปรที่มีความเกี่ยวข้องกัน และทำการสร้างตัวแปรใหม่ วิธีทางสถิติที่นิยมใช้คือ การถดถอยโดยใช้องค์ประกอบหลัก (principal components regression, PCR) และการถดถอยกำลังสองน้อยที่สุดบางส่วน (partial least square regression, PLSR)

การถดถอยโดยใช้องค์ประกอบหลัก เป็นวิธีทางสถิติวิธีหนึ่งสำหรับการวิเคราะห์ตัวแปรหลายตัว (multivariate analysis) เริ่มจากการวิเคราะห์องค์ประกอบหลัก (principal components analysis, PCA) ของตัวแปรอิสระ (X_i) ที่เป็นข้อมูลจากสเปกตรัมเพื่อลดจำนวนตัวแปรเดิมลงโดยสร้างตัวแปรใหม่ที่เรียกว่า ปัจจัย (factors) หรือองค์ประกอบหลัก (principal components, PC) ซึ่งอธิบายได้จากภาพที่ 16



ภาพที่ 16 การสร้างตัวแปรใหม่ที่เรียกว่า ปัจจัย หรือองค์ประกอบหลัก

ดัดแปลงจาก: Kachigan (1986)

จากภาพที่ 16 สมมติว่ามีตัวอย่างทั้งหมด n ตัวอย่าง ($O_1, O_2, \dots, O_n$) และมีตัวแปรอิสระที่เป็นความยาวคลื่นที่เกี่ยวข้องทั้งสิ้น p ตัวแปร ($X_1, X_2, \dots, X_p$) เมื่อนำตัวแปรอิสระทั้งหมดมาจัดกลุ่มความสัมพันธ์แบบเมตริกซ์สหสัมพันธ์ (correlation matrix) และสร้างความสัมพันธ์เป็นผลรวมเชิงเส้นเพื่อนำมาสร้างปัจจัย ($F_1, F_2, \dots, F_m$) โดยคุณระหว่งค่าตัวแปรอิสระเดิมที่ได้จากสเปกตรัมกับค่าน้ำหนักปัจจัย (factor loading ได้แก่ $w_{11}, w_{12}, \dots, w_{mp}$) ดังสมการต่อไปนี้

$$F_1 = w_{11}X_1 + w_{12}X_2 + w_{13}X_3 + \dots + w_{1p}X_p$$

$$F_2 = w_{21}X_1 + w_{22}X_2 + w_{23}X_3 + \dots + w_{2p}X_p$$

$$\dots\dots\dots$$

$$\dots\dots\dots$$

$$\dots\dots\dots$$

$$F_m = w_{m1}X_1 + w_{m2}X_2 + w_{m3}X_3 + \dots + w_{mp}X_p$$

จากภาพที่ 16 และสมการในข้างต้น แสดงให้เห็นว่าจำนวนปัจจัยหรือองค์ประกอบหลักมีจำนวนน้อยกว่าจำนวนตัวแปรเดิม (จำนวนปัจจัยที่สร้างขึ้นใหม่อาจมีเท่ากับจำนวนตัวแปรเดิม แต่ไม่สามารถมีจำนวนมากกว่าได้)

หลังจากทำการลดตัวแปรอิสระเดิมจากข้อมูลสเปกตรัมแล้ว นำค่าของปัจจัยที่สร้างขึ้นมาหาความสัมพันธ์กับตัวแปรตาม (Y) ซึ่งเป็นข้อมูลที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยวิธีมาตรฐาน และสร้างสมการแคลิเบรชันโดยใช้หลักการของการถดถอยเชิงพหุคูณ

นอกจากวิธีการถดถอยโดยใช้องค์ประกอบหลักแล้ว ยังมีการถดถอยกำลังสองน้อยที่สุดบางส่วนซึ่งเป็นวิธีการวิเคราะห์ตัวแปรหลายตัวและลดจำนวนตัวแปรเช่นเดียวกัน แตกต่างกันในวิธีการถดถอยโดยใช้องค์ประกอบหลัก คำนวณปัจจัยที่สร้างขึ้นจะมีความเกี่ยวข้องกับข้อมูลตัวแปรเดิมจากสเปกตรัมเท่านั้น ต้องนำค่าน้ำหนักปัจจัยไปหาความสัมพันธ์กับตัวแปรตาม โดยการสร้างสมการถดถอยอีกครั้งจึงจะสามารถนำไปใช้ในการทำนายค่าตัวแปรตามของตัวอย่างในอนาคตได้ ในขณะที่วิธีการถดถอยกำลังสองน้อยที่สุดบางส่วน ขั้นตอนการจัดกลุ่มลดจำนวนตัวแปรเพื่อสร้างตัวแปรใหม่ มีการนำข้อมูลตัวแปรตามเข้ามาร่วมสร้างตัวแปรใหม่ โดยผลลัพธ์จะรวมกับค่าน้ำหนักปัจจัยด้วย ทำให้ไม่จำเป็นต้องแยกไปสร้างสมการถดถอยอีก วิธีการถดถอยกำลังสองน้อยที่สุดบางส่วนจึงเป็นวิธีทางสถิติที่สามารถทำได้อย่างรวดเร็ว และนิยมใช้กับการวิเคราะห์ข้อมูลจากสเปกตรัมที่ได้จากเทคนิคอินฟราเรดย่านใกล้

2. การทวนสอบสมการแคลิเบรชัน

หลังจากได้สมการแคลิเบรชันแล้ว ขั้นตอนต่อไปคือการทวนสอบว่าสมการนั้นสามารถนำมาใช้ทำนายตัวอย่างในอนาคตได้หรือไม่ โดยใช้กลุ่มตัวอย่างที่สุ่มมาอีกกลุ่มหนึ่ง (อย่างน้อย 20 ตัวอย่าง) เป็นตัวแทนของกลุ่มตัวอย่างในอนาคต เรียกว่า กลุ่มทดสอบ (test set) นำมาตรวจวัดสเปกตรัมด้วยเครื่องสเปกโตรสโคปีอินฟราเรดย่านใกล้ นำค่าการดูดกลืนแสงของความยาวคลื่นที่เกี่ยวข้องไปแทนค่าในสมการแคลิเบรชัน และให้ค่าทำนายที่ได้ (predicted value) เป็นชุดข้อมูลในแกน Y หลังจากนั้นนำตัวอย่างไปวิเคราะห์ด้วยวิธีมาตรฐาน และให้ข้อมูลจากค่าจริง (actual value) เป็นชุดข้อมูลในแกน X

ในกรณีที่ตัวอย่างมีจำนวนน้อยสามารถใช้ตัวอย่างเดียวกับตัวอย่างที่ใช้สร้างสมการแคลิเบรชัน เรียกการทดสอบในลักษณะนี้ว่า การทดสอบความแม่นยำภายในกลุ่ม หรือ ครอสแวลิดชัน (cross validation) ซึ่งจะให้ผลการทดสอบที่มีความน่าเชื่อถือน้อยกว่าการใช้กลุ่มทดสอบ

3. ค่าทางสถิติ

ค่าทางสถิติที่ใช้บ่งบอกว่าสมการแคลิเบรชันและการทวนสอบมีประสิทธิภาพ มีดังนี้

1) สัมประสิทธิ์การพิจารณา (coefficient of determination, R^2) แสดงความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปรอิสระกับตัวแปรตาม จะมีค่าอยู่ระหว่าง 0 ถึง 1 ถ้ามีค่าเข้าใกล้ 1 หมายถึงตัวแปรทั้งสองมีความสัมพันธ์แบบแปรผัน

ตรง ในทางตรงข้ามถ้ามีค่าเข้าใกล้ 0 แสดงว่าตัวแปรทั้งสองไม่มีความสัมพันธ์กันในเชิงเส้นตรง ค่าสัมประสิทธิ์การพิจารณาสามารถแปลความหมายได้ตามตารางที่ 4

ตารางที่ 4 การแปลความหมายค่าสัมประสิทธิ์การพิจารณา

ค่าสัมประสิทธิ์การพิจารณา	การแปลความหมาย
ถึง 0.25	ไม่ควรใช้ในการทำนาย
0.26 – 0.49	ความสัมพันธ์ไม่ดีพอ
0.50 – 0.64	การทำนายเพื่อการแบ่งระดับปริมาณอย่างหยาบ (rough screening)
0.66 – 0.81	การทำนายเพื่อการแบ่งระดับปริมาณ หรือการประมาณเบื้องต้น (screening)
0.83 – 0.90	การทำนายเพื่องานวิจัย (research) และงานทั่วไป
0.92 – 0.96	การทำนายเพื่อการประกันคุณภาพ (quality assurance)
มากกว่า 0.98	ทุกงาน (any application)

ที่มา: Williams (2001)

2) ค่าความผิดพลาดมาตรฐานของสมการแคลิเบรชัน (standard error of calibration, SEC) เป็นค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation, SD) ของผลต่างระหว่างค่าจากวิธีมาตรฐานกับค่าจากการทำนายด้วยเทคนิคสเปกโตรสโคปี คำนวณได้จากสมการต่อไปนี้

$$SEC = \sqrt{\frac{\sum(X - Y)^2}{n_c - p - 1}}$$

โดย X คือ ค่าจากวิธีมาตรฐาน

Y คือ ค่าจากการทำนายด้วยเทคนิคสเปกโตรสโคปี

n_c คือ จำนวนตัวอย่างในกลุ่มแคลิเบรชัน

p คือ จำนวนความยาวคลื่นหรือจำนวนปัจจัยที่เกี่ยวข้อง

3) ค่าความผิดพลาดเฉลี่ยระหว่างค่าจริงกับค่าจากการทำนาย (bias) ในชุดตัวอย่างที่ใช้ในการทวนสอบสมการแคลิเบรชัน ค่า bias ใช้ในการวัดความแม่นยำโดยรวมของสมการแคลิเบรชัน คำนวณได้จากสมการต่อไปนี้

$$Bias = \frac{\sum(X - Y)}{n_v}$$

โดย n_v คือ จำนวนตัวอย่างที่ใช้ในการทดสอบ

4) ค่าความผิดพลาดมาตรฐานของการทำนาย (Standard error of prediction, SEP) เป็นค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของผลต่างระหว่างค่าจากวิธีมาตรฐานกับค่าจากการทำนายด้วยเทคนิคสเปกโตรสโคปีอินฟราเรดย่านใกล้ จากกลุ่มตัวอย่างที่ใช้ในการทดสอบสมการแคลิเบรชัน คำนวณได้จากสมการต่อไปนี้

$$SEP = \sqrt{\frac{\sum[(X - Y) - bias]^2}{n_v - 1}}$$

5) ค่าเฉลี่ยความผิดพลาดกำลังสองของการทำนาย (Root mean square error of the prediction, RMSEP) แสดงประสิทธิภาพโดยรวมของสมการแคลิเบรชัน เป็นผลรวมของค่า SEP กับค่า bias คำนวณได้จากสมการต่อไปนี้

$$RMSEP^2 \approx SEP^2 + bias^2$$

หรือ

$$RMSEP = \sqrt{\frac{\sum(X - Y)^2}{n_v}}$$

6) อัตราส่วนของค่าความผิดพลาดมาตรฐานของการทำนายต่อค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Ratio of Standard error of Prediction to Standard Deviation, RPD) เป็นอัตราส่วนระหว่าง SD ของตัวอย่างกลุ่มทดสอบกับ SEP ($RPD = SD/SEP$) ใช้บอกความแม่นยำและประสิทธิภาพของสมการแคลิเบรชัน การประเมินความสามารถของสมการแคลิเบรชันด้วยค่า RPD อธิบายได้จากตารางที่ 5

ตารางที่ 5 แนวทางการอธิบายความสามารถของสมการแคลิเบรชันด้วยค่า RPD

ค่า RPD	การคัดแยกกลุ่มตัวอย่าง	การประยุกต์ใช้เพื่อการวิเคราะห์เชิงปริมาณ
0.0 – 2.3	แย่มาก (very poor)	ไม่แนะนำให้ใช้
2.4 – 3.0	ไม่ดีพอ (poor)	การแบ่งระดับปริมาณอย่างหยาบ (very rough screening)
3.1 – 4.9	ปานกลาง (fair)	การแบ่งระดับปริมาณ (screening)
5.0 – 6.4	ดี (good)	การควบคุมคุณภาพ (quality control)
6.5 – 8.0	ดีมาก (very good)	การควบคุมกระบวนการ (process control)
8.1 ขึ้นไป	ยอดเยี่ยม (excellent)	ทุกงาน (any application)

ที่มา: Williams (2001)

7) การตรวจสอบนัยสำคัญของค่าความผิดพลาดเฉลี่ยในการทำนาย เป็นการตรวจสอบว่าค่าที่ได้จากการทำนายแตกต่างจากค่าจริงที่ได้จากวิธีมาตรฐานอย่างมีนัยสำคัญหรือไม่ คำนวณได้จากสมการดังต่อไปนี้

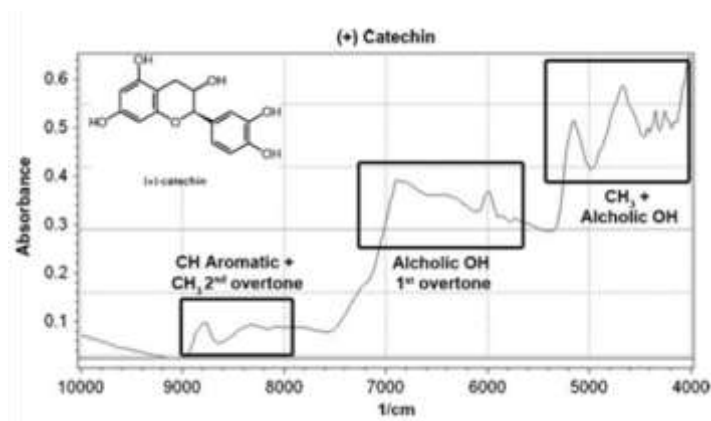
$$t = \frac{\sqrt{n_v} \times bias}{SEP}$$

หากค่าสัมบูรณ์ t มีค่าน้อยกว่า 2 หมายถึง ค่าผิดพลาดเฉลี่ยในการทำนายมีค่าน้อยมาก และไม่มีนัยสำคัญ หรือค่าที่ทำนายได้จากสมการแคลิเบรชันไม่แตกต่างจากค่าจริงที่ได้จากวิธีมาตรฐานอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95% (รณฤทธิ์, 2552)

ในทางปฏิบัติขั้นตอนเลือกวิธีการปรับแต่งสเปกตรัมที่เหมาะสม การแบ่งตัวอย่างเพื่อการสร้างสมการแคลิเบรชันและทำการทวนสอบ การทำเคโมเมตริก และการคำนวณค่าทางสถิติต่างๆ สามารถทำได้โดยโปรแกรมสำเร็จรูป เช่น NIRFlex NIRCal OPUS เป็นต้น

เทคนิคสเปกโตรสโคปีอินฟราเรดย่านใกล้กับการวิเคราะห์สารคาเทชินในช็อคโกแลต

สารคาเทชินบริสุทธิ์แสดงสเปกตรัมก่อนการปรับแต่งจากเทคนิคสเปกโตรสโคปีอินฟราเรดย่านใกล้แบบฟูเรียร์ทรานฟอร์ม ดังภาพที่ 17 มีสเปกตรัมแสดงการดูดกลืน 3 ช่วงที่สำคัญเช่นเดียวกับสารประกอบฟีนอลิกส่วนใหญ่ ได้แก่ เลขคลื่นช่วง $5000 - 4000 \text{ cm}^{-1}$ แสดงแถบคอมบิเนชันของ CH_3 และ CH_2 (4400 และ 4300 cm^{-1} ตามลำดับ) แถบคอมบิเนชันของ OH ($4850 - 2000 \text{ cm}^{-1}$) และแถบการงอแบบโอเวอร์โทนอันดับสองของ OH (4200 cm^{-1}) ช่วง $7000 - 6000 \text{ cm}^{-1}$ แสดงแถบโอเวอร์โทนอันดับหนึ่งของหมู่แอลกอฮอล์ (alcoholic group) กับพันธะไฮโดรเจนภายในและระหว่างโมเลกุล และช่วง $9000 - 8000 \text{ cm}^{-1}$ แสดงแถบโอเวอร์โทนอันดับสองของหมู่เมทิล (methyl group) และยังมีความสัมพันธ์กับวงแหวนอะโรมาติก CH (Bedini และคณะ, 2012)



ภาพที่ 17 สเปกตรัมก่อนการปรับแต่งของสารคาเทชินบริสุทธิ์

ที่มา: Bedini และคณะ (2012)

Bedini และคณะ (2012) ใช้เทคนิคสเปกโตรมิเตอร์แบบฟูเรียร์ทรานฟอร์มเปรียบเทียบกับวิธีทางเคมีในการวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกในผลิตภัณฑ์เบเกอรี่ประเภทต่างๆ จำนวน 11 ชนิดที่มีส่วนผสมของโกโก้และช็อกโกแลต สร้างสมการแคลิเบรชันโดยวิธีคำนวณแบบการถดถอยกำลังสองน้อยที่สุดบางส่วน ($R^2_{cal} = 0.96$) และทำการทวนสอบด้วยวิธีครอสแวลิดชัน ($R^2_{val} = 0.96$) สอดคล้องกับงานวิจัยของ Krämer และคณะ (2015) ที่ทำการวิเคราะห์โกโก้ซึ่งเป็นวัตถุดิบสำหรับทำผลิตภัณฑ์ช็อกโกแลต โดยใช้เทคนิคเทคนิคสเปกโตรมิเตอร์แบบฟูเรียร์ทรานฟอร์ม หลังการปรับแต่งสเปกตรัมด้วยเทคนิควิธีปรับความแปรปรวนให้เป็นมาตรฐาน (สารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด) การปรับแก้การกระเจิงแบบพหุคูณ (อีพิกาทะชิน) และใช้วิธีคำนวณแบบการถดถอยกำลังสองน้อยที่สุดบางส่วน พบว่าเทคนิคดังกล่าวสามารถสร้างสมการแคลิเบรชัน ($R^2_{cal} = 0.95 - 0.98$) และทำการทวนสอบด้วยวิธีครอสแวลิดชัน ($R^2_{val} = 0.88 - 0.93$) ได้อย่างถูกต้องแม่นยำ

งานวิจัยส่วนใหญ่ศึกษาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกในเมล็ดโกโก้หรือผงโกโก้ซึ่งเป็นวัตถุดิบในการผลิตช็อกโกแลต หรือผลิตภัณฑ์ที่มีช็อกโกแลตเป็นส่วนผสม งานวิจัยนี้จึงสนใจศึกษาการใช้เทคนิคสเปกโตรสโคปีแบบฟูเรียร์ทรานฟอร์มในการวัดปริมาณสารประกอบฟีนอลิกจำพวกคาเทชินและอีพิกาทะชินในผลิตภัณฑ์ช็อกโกแลตโดยตรง เปรียบเทียบกับวิธีทางเคมีคือ HPLC ที่มีอุปกรณ์ตรวจวัดสารชนิดเรืองแสง ทั้งนี้เพื่อให้ได้กรรมวิธีทางเลือกในการวัดค่าปริมาณสารประกอบฟีนอลิกในผลิตภัณฑ์ช็อกโกแลตหลากหลายสูตร ที่สามารถทำได้โดยไม่ต้องทำลายตัวอย่าง รวดเร็ว และไม่มีความยุ่งยากในการใช้งาน

2. คำสำคัญของโครงการวิจัย

ช็อกโกแลต (chocolate), เทคนิคสเปกโตรสโคปีอินฟราเรดย่านใกล้ (near infrared spectroscopy), สารประกอบฟีนอลิก (phenolic compound), คาเทชิน (catechin), อีพิกาทะชิน (epicatechin)

3. เนื้อเรื่อง

3.1 ทฤษฎี สมมติฐาน และกรอบแนวความคิดของงานวิจัย

ปัญหาสำคัญของการวัดปริมาณของสารสำคัญในผลิตภัณฑ์ช็อกโกแลตและผลิตภัณฑ์อาหารชนิดอื่นๆ ด้วยวิธีการทางเคมีคือมีความยุ่งยาก ดังนั้นหากสามารถวัดปริมาณสารสำคัญดังกล่าวได้โดยไม่ทำให้ตัวอย่างได้รับความเสียหาย และวิเคราะห์ผลได้อย่างรวดเร็วทั้งการวิเคราะห์เชิงปริมาณและเชิงคุณภาพ จะเป็นประโยชน์อย่างมากต่อกระบวนการและขั้นตอนการผลิตในระดับอุตสาหกรรม

3.2 วิธีดำเนินการวิจัย

วิธีวิจัยดัดแปลงจาก Shumow และ Bodor (2011) และ Krämer และคณะ (2015) มีรายละเอียดและขั้นตอนดังนี้

ประเภทตัวอย่างและการเตรียมตัวอย่าง

ประเภทตัวอย่าง

ช็อกโกแลต 3 ประเภท ทั้งหมด 86 ตัวอย่าง แบ่งเป็น ดาร์คช็อกโกแลต 42 ตัวอย่าง ช็อกโกแลตนม 40 ตัวอย่าง และช็อกโกแลตขาว 4 ตัวอย่าง ซื้อจากร้านสะดวกซื้อและห้างสรรพสินค้าในกรุงเทพมหานคร จังหวัดนนทบุรี และนครปฐม และบางส่วนซื้อจากห้างสรรพสินค้าในประเทศอังกฤษ อิตาลี และแคนาดา

การเตรียมตัวอย่าง

ละลายช็อกโกแลตปริมาณ 60 กรัมในบีกเกอร์ที่แช่อยู่ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 50 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 นาที หากเป็นช็อกโกแลตที่มีการเติมส่วนผสมอื่นๆ เช่น ถั่วชนิดต่างๆ ให้แยกส่วนผสมนั้นออก และเทใส่ลงในพิมพ์ซิลิโคน (เส้นผ่านศูนย์กลางและความหนา 2.5 และ 1.5 เซนติเมตร ตามลำดับ) โดยไม่มีการทำเทมเปอร์িং ทำให้ช็อกโกแลตแข็งตัวโดยนำเข้าตู้ควบคุมอุณหภูมิ (IPP-300, MEMMERT, Germany) ที่ 13 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที แกะช็อกโกแลตที่แข็งตัวออกจากพิมพ์ วางลงบนภาชนะสุญญากาศ และนำเข้าตู้ควบคุมอุณหภูมิที่ 18 องศาเซลเซียสจนครบ 24 ชั่วโมง

การตรวจวัดสเปกตรัม

ตรวจวัดสเปกตรัมของช็อกโกแลตตัวอย่างด้วยเครื่องสเปกโตรมิเตอร์แบบ FT-NIR (MPA, Bruker, Germany) ที่เลขคลื่นช่วง $12500 - 4000 \text{ cm}^{-1}$ (800 - 2500 นาโนเมตร) ใช้ระบบการวัดแบบสะท้อนกลับที่ resolution 8 cm^{-1} สแกนตัวอย่าง 32 ครั้ง และห่อตัวอย่างที่ผ่านการวัดสเปกตรัมแล้วด้วยฟิล์มพลาสติกสำหรับห่ออาหาร เก็บในถุงพลาสติกสุญญากาศจนกว่าจะทำการวิเคราะห์ทางเคมี

การตรวจวัดค่าทางเคมีด้วยวิธีมาตรฐาน

ตรวจสอบปริมาณสารในกลุ่มคาเทชิน ได้แก่ คาเทชิน และอีพิกาทะชิน ด้วยวิธีทางเคมีคือ HPLC ที่มีอุปกรณ์ตรวจวัดสารชนิดการเรืองแสง ดัดแปลงจากกรรมวิธีของ Shumow และ Bodor (2011) มีรายละเอียดและขั้นตอนดังนี้

สารเคมี

1. สารมาตรฐาน: Catechin hydrate, purity $\geq 98.95\%$ และ Epicatechin hydrate, purity $\geq 99.65\%$ (Chengdu Biopurify Phytochemicals, China)
2. สารเคมี (เกรด HPLC) ได้แก่ อะซิโตนไนไตรล์ (Acetonitrile) เฮกเซน (Hexane) อะซิโตน (Acetone) และกรดอะซิติกเข้มข้น (Acetic acid glacial)
3. น้ำกลั่น (deionized water)
4. ตัวทำละลายสำหรับการสกัด (extraction solvent) เตรียมจากอะซิโตน น้ำกลั่น และกรดอะซิติกเข้มข้น ในอัตราส่วน 70: 29.5: 0.5

อุปกรณ์และเครื่องมือ

1. เครื่อง HPLC (SHIMADZU, LC-20A, Japan) และอุปกรณ์ตรวจวัดสารชนิดเรืองแสง (SHIMADZU, RF-20A prominence fluorescence detector, Japan)
2. C₁₈ chromatography column (Phenomenex, Luna, USA, 250 × 3.0 mm)
3. เครื่องแก้ว (เกรด A) ได้แก่ ปิเปต (ขนาด 1 – 10 มิลลิลิตร) ขวดปรับปริมาตร (ขนาด 20 และ 1000 มิลลิลิตร) ปีกเกอร์ (ขนาด 100 และ 250 มิลลิลิตร) และกระบอกตวง (ขนาด 100 มิลลิลิตร)
4. เครื่องชั่ง (S-4002, Denver, USA)
5. เครื่องแยกสารแบบหมุนเหวี่ยง (SORVALL RC-6, Kendro, USA)
6. หลอดหมุนเหวี่ยงแบบพลาสติก ขนาด 50 มิลลิลิตร และฝาปิดแบบสุญญากาศ
7. เครื่องเขย่าสาร (vortex mixer)
8. อ่างน้ำแบบอัลตราโซนิก (275DAE, Crest Ultrasonics, USA)
9. หลอดแก้วไซริงค์ ขนาด 5 มิลลิลิตร
10. ตัวกรองสารจากไซริงค์แบบไนลอน ขนาด 0.45 ไมโครเมตร
11. ลูกแก้วระบายความร้อน (glass beads)
12. ขวด vial สีชา แบบฝาเกลียว ขนาด 4 มิลลิลิตร
13. ตู้ดูดควัน

การตรวจวัดปริมาณคาเทชินและอีพิกาทะชิน

1. ปริมาณสารที่ฉีดต่อครั้ง 10 ไมโครลิตร
2. อัตราการไหล 1 มิลลิลิตร/นาที

3. ตรวจวัดตัวอุปกรณ์ตรวจวัดสารชนิดเรืองแสง (excitation ที่ 280 นาโนเมตร และ emission ที่ 315 นาโนเมตร)
4. อุณหภูมิที่ใช้ในการวิเคราะห์ (column temperature) 40 องศาเซลเซียส
5. สารมาตรฐาน
 - 1) คาเทชิน ความเข้มข้น 5, 1, 0.5, 0.1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร
 - 2) อีพิกาทะชิน ความเข้มข้น 50, 10, 5, 1, 0.5, 0.1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร
6. ขั้นตอนการสกัดไขมันออกจากตัวอย่างช็อคโกแลต
ตัวอย่างช็อคโกแลต (คารัคช็อคโกแลต = 1 กรัม, ช็อคโกแลตนมหรือช็อคโกแลตขาว = 2 กรัม) บดละเอียด และใส่ลงในหลอดหมุนเหวี่ยงขนาด 50 มิลลิลิตร ตีคนลากให้ชัดเจน เติมน้ำ 30 มิลลิลิตร และปิดฝาให้แน่นเขย่าให้ตัวอย่างละลายเป็นเนื้อเดียวกัน นำไปเหวี่ยงแยกนาน 5 นาที ที่ 4,570 รอบต่อนาที และรินน้ำออกจากตัวอย่างทันที ทำซ้ำอีกครั้ง และเปิดฝาหลอดหมุนเหวี่ยงให้ตัวทำละลายระเหยในตู้ดูดควัน
7. ขั้นตอนการเตรียมสารสกัดคาเทชินและอีพิกาทะชินจากตัวอย่างช็อคโกแลต
ใส่ลูกแก้วระบายความร้อนลงในหลอดหมุนเหวี่ยงที่มีตัวอย่างช็อคโกแลตที่แห้งและผ่านการสกัดไขมันออกแล้ว เติมตัวทำละลายสำหรับการสกัดที่เตรียมไว้ปริมาตร 9 มิลลิลิตร และเขย่าเพื่อทำให้ตัวอย่างที่เกาะกันกระจายตัวออก แช่หลอดหมุนเหวี่ยงลงในอ่างน้ำอัลตราโซนิกที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที โดยใช้ค่ากำลังระดับ 9 เขย่าทุก 5 – 10 นาที นำไปเหวี่ยงแยกนาน 5 นาที ที่ 4,570 รอบต่อนาที รินส่วนใสใสลงในขวดปริมาตรขนาด 20 มิลลิลิตร ทำซ้ำและเก็บส่วนใสจากการสกัดครั้งที่สองลงในขวดปริมาตรใบเดียวกัน ปรับปริมาตรด้วยตัวทำละลายสำหรับการสกัด กรองตัวอย่างปริมาตร 1 มิลลิลิตร และเก็บในขวด vial
8. ตัวทำละลายเคลื่อนที่
 - ตัวทำละลาย A: 0.2% กรดอะซิติกในน้ำ (เติมกรดอะซิติก 2 มิลลิลิตรลงในน้ำปริมาตร 1 ลิตร)
 - ตัวทำละลาย B: 0.2% กรดอะซิติกในอะซิโตนไนโตรล์ (เติมกรดอะซิติก 2 มิลลิลิตรลงในอะซิโตนไนโตรล์ปริมาตร 1 ลิตร)
9. เวลาที่สารใช้ในการเคลื่อนที่ผ่านคอลัมน์ เป็นไปตามตารางที่ 6

ตารางที่ 6 เวลาที่ใช้ในการเคลื่อนที่ผ่านคอลัมน์

เวลา (นาที)	%ตัวทำละลาย B
0	5
30	30
31	80
35	80
36	5
40 (สิ้นสุด)	5

ที่มา: Shumow และ Bodor (2011)

คอลัมน์โครมาโตกราฟที่มีความสามารถในการแยกสารคาเทชินและอีพิกาทะชินแตกต่างกัน การใช้ตัวทำละลายเคลื่อนที่ A และ B ร่วมกันโดยมีการเปลี่ยนแปลงสัดส่วนไปตามเวลา (Gradient Elution) ดังตารางที่ 6 เป็นการเพิ่มประสิทธิภาพและความสามารถของคอลัมน์ในการแยกสารคาเทชินและอีพิกาทะชินออกจากสารประกอบชนิดอื่น (Shumow และ Bodor, 2011)

การคำนวณปริมาณสารในตัวอย่าง

1. กราฟความเข้มข้นมาตรฐาน (calibration curve)

พล็อตกราฟหาสมการเชิงเส้น เพื่อหาความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารมาตรฐาน (แกน X) กับพื้นที่ใต้กราฟที่ได้จากโครมาโตแกรมของสารมาตรฐาน (แกน Y) ที่ทุกความเข้มข้น โดยค่า R^2 ควรมีค่ามากกว่า 0.9990

2. การคำนวณปริมาณสารในตัวอย่าง

นำพื้นที่ใต้กราฟที่ได้จากโครมาโตแกรมของตัวอย่างมาแทนค่าลงในสมการเชิงเส้นจากกราฟความเข้มข้นมาตรฐานจะได้ความเข้มข้นของสารสกัดจากตัวอย่าง จากนั้นนำค่าที่ได้มาคำนวณหาปริมาณสารทั้งสองชนิดในตัวอย่างช็อคโกแลต คำนวณได้จากสมการของ Shumow และ Bodor (2011) ดังต่อไปนี้

$$\text{ปริมาณสารในตัวอย่าง (ไมโครกรัม/กรัม)} = \frac{\text{ความเข้มข้นของสารสกัด (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)} \times \text{ปริมาตรสารสกัดทั้งหมด (มิลลิลิตร)}}{\text{น้ำหนักตัวอย่างเริ่มต้น (กรัม)}}$$

โดย ปริมาตรสารสกัดทั้งหมด คือ ปริมาตรสารสกัดในขวดปรับปริมาตร เท่ากับ 20 มิลลิลิตร

น้ำหนักตัวอย่างเริ่มต้น คือ น้ำหนักช็อคโกแลตที่ใส่ลงในหลอดหมุนเหวี่ยง (กรัม)

จากนั้นนำปริมาณสารในตัวอย่างช็อคโกแลตเปลี่ยนหน่วยจากไมโครกรัมต่อกรัม เป็นมิลลิกรัมต่อกรัม การเปลี่ยนหน่วยจากไมโครกรัมเป็นมิลลิกรัม ทำได้โดย

$$\text{มิลลิกรัม} = \text{ไมโครกรัม} / 1000$$

งานวิจัยนี้มีจุดมุ่งหมายเพื่อวิเคราะห์ปริมาณสารคาเทชินและอีพิกาทะชินในตัวอย่างช็อคโกแลต เพื่อนำไปใช้ในอุตสาหกรรมสำหรับการระบุปริมาณสารดังกล่าว เป็นการเพิ่มมูลค่าให้กับสินค้าและเพิ่มความน่าสนใจในกลุ่มผู้บริโภคที่ใส่ใจสุขภาพ ดังนั้นปริมาณสารทั้งสองชนิดในตัวอย่างช็อคโกแลตที่รายงานในงานวิจัยนี้จึงมีหน่วยเป็นมิลลิกรัมต่อกรัม ซึ่งเป็นหน่วยที่ผู้บริโภครู้จักและมีความคุ้นเคย

การสร้างสมการแคลิเบรชัน

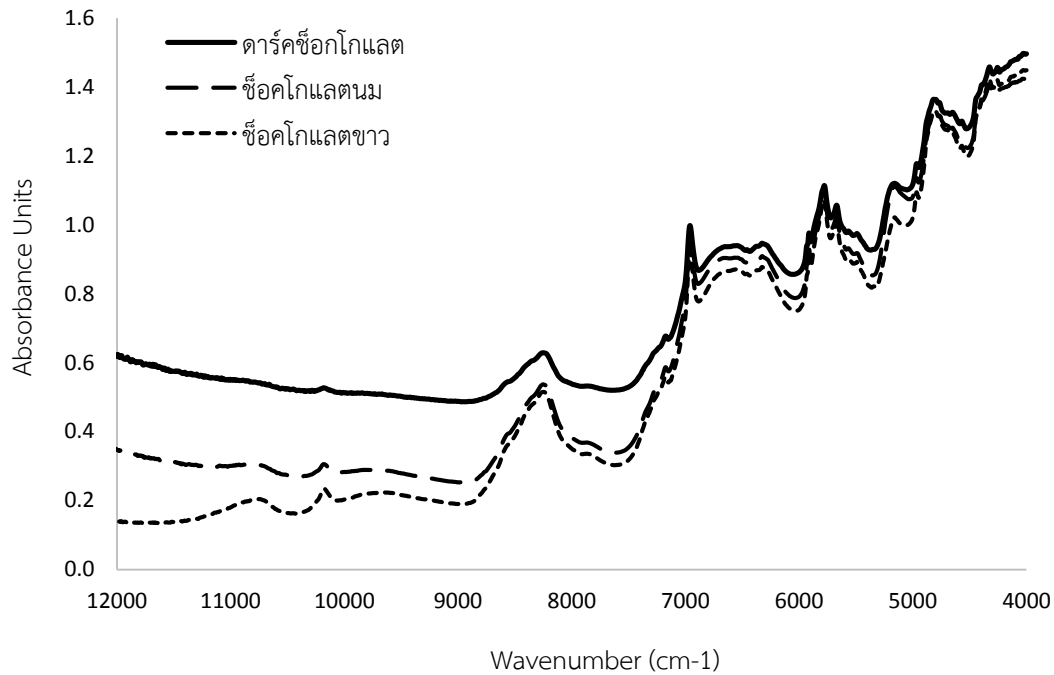
ในการสร้างสมการเทียบมาตรฐาน แบ่งกลุ่มตัวอย่างออกเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ใช้สำหรับสร้างสมการแคลิเบรชันจำนวน 65 ตัวอย่าง และกลุ่มที่ใช้สำหรับการทวนสอบความแม่นยำของสมการจำนวน 21 ตัวอย่าง ปรับแต่งสเปกตรัมด้วยการทำอนุพันธ์อันดับหนึ่ง และปรับความแปรปรวนให้เป็นมาตรฐาน ใช้เทคนิคเคโมเมตริก ระหว่างข้อมูลสเปกตรัมกับค่าที่ได้จากการวิเคราะห์ทางเคมีด้วยวิธีถดถอยกำลังสองน้อยที่สุดบางส่วนด้วยโปรแกรม OPUS (Bruker, Germany)

ค่าทางสถิติที่ระบุในหัวข้อที่ 2.3.6.3 ได้แก่ R^2 , SEC, bias, SEP, RMSEP, RPD และการตรวจสอบนัยสำคัญของค่าความผิดพลาดเฉลี่ยในการทำนาย จะถูกนำมาใช้ในการประเมินประสิทธิภาพของสมการแคลิเบรชันและความถูกต้องแม่นยำจากการทวนสอบ

4. ผลการวิจัยและวิจารณ์

4.1 เทคนิคสเปกโตรสโคปีอินฟราเรดย่านใกล้

เส้นสเปกตรัมก่อนการปรับแต่งของช็อคโกแลตทั้ง 3 ชนิด ได้แก่ ดาร์กช็อคโกแลต ช็อคโกแลตนม และช็อคโกแลตขาว (ภาพที่ 18) สอดคล้องกับสเปกตรัมก่อนการปรับแต่งของเมล็ดโกโก้ซึ่งเป็นวัตถุดิบที่ใช้ในการผลิตช็อคโกแลต (Teye และคณะ, 2013 และ Krämer และคณะ, 2015) และสอดคล้องกับสเปกตรัมของคาเทชินบริสุทธิ์จากงานวิจัยของ Bedini และคณะ (2012) ในภาพที่ 17 พบว่ามีสเปกตรัมที่ช่วงเลขคลื่นที่สำคัญในลักษณะเดียวกัน



ภาพที่ 18 สเปกตรัมก่อนการปรับแต่งของดาร์คซีอ็อกโกแลต ซีอ็อกโกแลตนม และซีอ็อกโกแลตขาว

หลังปรับแต่งสเปกตรัมด้วยการทำอนุพันธ์อันดับหนึ่งและปรับความแปรปรวนให้เป็นมาตรฐาน และใช้เทคนิคเคโมเมตริกหาค่าที่ได้ออกจากการวิเคราะห์ทางเคมีด้วยวิธีถดถอยกำลังสองน้อยที่สุดบางส่วน พบว่าสเปกตรัมมีเลขคลื่นที่เกี่ยวข้องกับคาเทชิน 3 ช่วง ได้แก่ $9403.8 - 7498.4$, $6102.1 - 5774.2$ และ $4424.2 - 4246.8 \text{ cm}^{-1}$ และเกี่ยวข้องกับอีพิกาทะชิน 3 ช่วง ได้แก่ $9403.8 - 7498.4$, $6102.1 - 5774.2$ และ $4601.6 - 4424.2 \text{ cm}^{-1}$ ช่วงเลขคลื่นที่ใกล้เคียงกันของสารทั้งสองชนิดเนื่องจากคาเทชินและอีพิกาทะชินเป็นอนุพันธ์รูปแบบหนึ่งของสารในกลุ่มคาเทชินซึ่งล้วนมีความสัมพันธ์กับโมเลกุล O-H และ C-H (Bedini และคณะ, 2012) เมื่อเปรียบเทียบโครงสร้างทางเคมีของคาเทชินและอีพิกาทะชินที่เกี่ยวข้องกับการดูดกลืนรังสีสเปกโตรสโคปีอินฟราเรดย่านใกล้ในช่วงเลขคลื่นดังกล่าว พบว่าเลขคลื่นช่วง $9000 - 8000 \text{ cm}^{-1}$ แสดงแถบโอเวอร์โทนอันดับสองของวงแหวนอะโรมาติก CH โมเลกุล CH_2 และ CH เลขคลื่นช่วง $7000 - 6000 \text{ cm}^{-1}$ แสดงแถบการยืดแบบโอเวอร์โทนอันดับหนึ่งของหมู่แอลกอฮอล์ วงแหวนอะโรมาติก CH และโมเลกุล CH_2 เลขคลื่นช่วง $5000 - 4000 \text{ cm}^{-1}$ แสดงแถบการดูดกลืนแบบคอมบิเนชันของ OH และแถบการงอแบบโอเวอร์โทนอันดับสองของ OH (Burns และ Ciurczak, 2007 และ Bedini และคณะ, 2012)

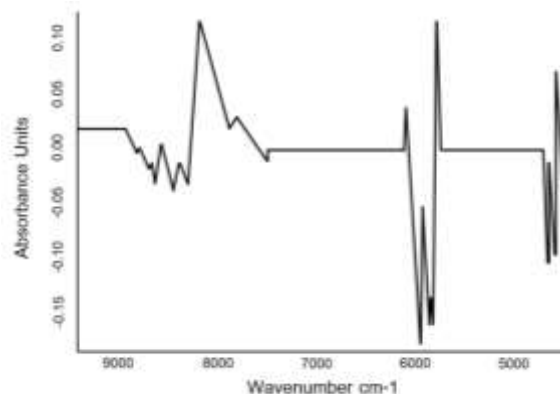
จากภาพที่ 18 สเปกตรัมมีการซ้อนทับกันที่การดูดกลืนหลายช่วงเลขคลื่น และได้รับผลกระทบจากการกระเจิงแสง จึงปรับแต่งสเปกตรัมด้วยการทำอนุพันธ์อันดับหนึ่งและปรับความแปรปรวนให้เป็นมาตรฐานเพื่อลดอิทธิพลดังกล่าว ใช้เทคนิคเคโมเมตริกในการเปรียบเทียบระหว่างข้อมูลสเปกตรัมกับค่าที่ได้จากการวิเคราะห์ทางเคมีด้วยวิธีถดถอยกำลังสองน้อยที่สุดบางส่วน

การสร้างสมการแคลิเบรชันด้วยวิธีการถดถอยกำลังสองน้อยที่สุดบางส่วนทำได้โดยการจัดกลุ่มตัวแปรอิสระหรือค่าการดูดกลืนแสง และนำมาหาความสัมพันธ์กับตัวแปรตามหรือค่าจริงจากวิธีมาตรฐาน จะได้ตัวแปรที่

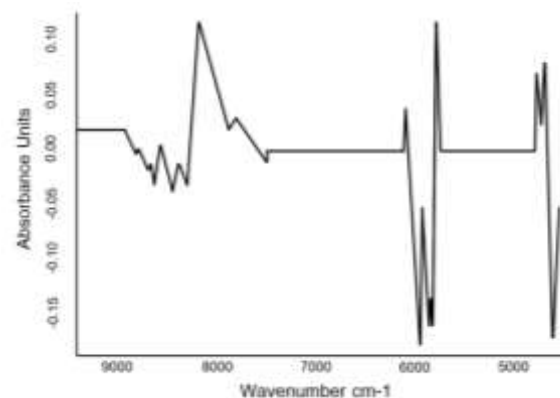
เกี่ยวข้องซึ่งนำมาใช้ในการสร้างสมการแคลิเบรชันเพื่อทำนายปริมาณสารทั้งสองชนิด โดยงานวิจัยนี้มีจำนวนตัวแปรทั้งหมด 9 ตัว จำนวนตัวแปรที่เหมาะสมคือต้องมีจำนวนไม่เกินหนึ่งในหกของจำนวนตัวอย่างที่ใช้สำหรับสร้างสมการแคลิเบรชัน หากมีตัวแปรมากกว่าจำนวนดังกล่าวจะทำให้เกิดปรากฏการณ์ที่จุดข้อมูลเข้าใกล้เส้นเป้าหมายมากกว่าความเป็นจริง (over-fitting) แต่หากตัวแปรมีจำนวนน้อยกว่าจำนวนนั้นมากจะเกิดปรากฏการณ์ที่จุดข้อมูลกระจายจากเส้นเป้าหมายผิดจากความเป็นจริง (under-fitting) (Kemsley, 1998 และ Westad และ Marini, 2015) ทั้งนี้การกำหนดจำนวนตัวแปรควรพิจารณาพร้อมกับค่าทางสถิติอื่นๆ เพื่อให้ได้สมการแคลิเบรชันที่มีความถูกต้องแม่นยำ

การดูตกเส้นที่ช่วงเลขคลื่นที่กล่าวมาในข้างต้นมีความสัมพันธ์กับ regression coefficient plot ซึ่งแสดงช่วงเลขคลื่นที่มีอิทธิพลต่อสมการแคลิเบรชันที่สร้างด้วยการถดถอยกำลังสองน้อยที่สุดบางส่วน คาเทชินมีช่วงเลขคลื่นที่เกี่ยวข้อง ได้แก่ $9403.8 - 7498.4$, $6102.1 - 5774.2$ และ $4424.2 - 4246.8 \text{ cm}^{-1}$ (ภาพที่ 19ก) และเกี่ยวข้องกับอีพิกาคาเทชิน 3 ช่วง ได้แก่ $9403.8 - 7498.4$, $6102.1 - 5774.2$ และ $4601.6 - 4424.2 \text{ cm}^{-1}$ (ภาพที่ 19ข) สารทั้งสองชนิดมีช่วงเลขคลื่นใกล้เคียงกันเนื่องจากคาเทชินและอีพิกาคาเทชินเป็นอนุพันธ์รูปแบบหนึ่งของสารในกลุ่มคาเทชิน

ก)



ข)



ภาพที่ 19 regression coefficient plot ของสมการแคลิเบรชันที่สร้างด้วยการถดถอยกำลังสองน้อยที่สุดบางส่วนของคาเทชิน (ก) และอีพิกาคาเทชิน (ข)

ปริมาณคาเทชินและอีพิกาทะชินที่ได้จากการทำนายด้วยเทคนิคสเปกโตรสโคปีอินฟราเรดย่านใกล้แบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ใช้สำหรับสร้างสมการแคลิเบรชันจำนวน 65 ตัวอย่าง และกลุ่มที่ใช้สำหรับการทวนสอบความแม่นยำของสมการจำนวน 21 ตัวอย่าง (ตารางที่ 7) พบว่าสารแต่ละชนิดจาก 2 กลุ่มตัวอย่างมีปริมาณ ปริมาณเฉลี่ย และค่า SD ใกล้เคียงกัน

ตารางที่ 7 ปริมาณคาเทชินและอีพิกาทะชินจากกลุ่มตัวอย่างที่ใช้สร้างสมการแคลิเบรชันและการทวนสอบ

	กลุ่มตัวอย่างที่ใช้สร้างสมการแคลิเบรชัน (มก./ก. ช็อคโกแลต)			กลุ่มตัวอย่างที่ใช้ทวนสอบ (มก./ก. ช็อคโกแลต)		
	ปริมาณ	ปริมาณเฉลี่ย	SD	ปริมาณ	ปริมาณเฉลี่ย	SD
คาเทชิน	-0.038 – 0.441	0.127	0.104	0.029 – 0.283	0.124	0.082
อีพิกาทะชิน	-0.149 – 2.170	0.630	0.579	0.000 – 1.682	0.554	0.447

นอกจากนี้ปริมาณคาเทชินและอีพิกาทะชินในช็อคโกแลตที่ได้จากการทำนายด้วยเทคนิคสเปกโตรสโคปีอินฟราเรดย่านใกล้แบบฟูเรียร์ทรานฟอร์มยังมีค่าใกล้เคียงกับปริมาณของสารทั้งสองชนิดที่วิเคราะห์ได้จากเทคนิค HPLC ซึ่งเป็นวิธีมาตรฐาน ดังตารางที่ 8

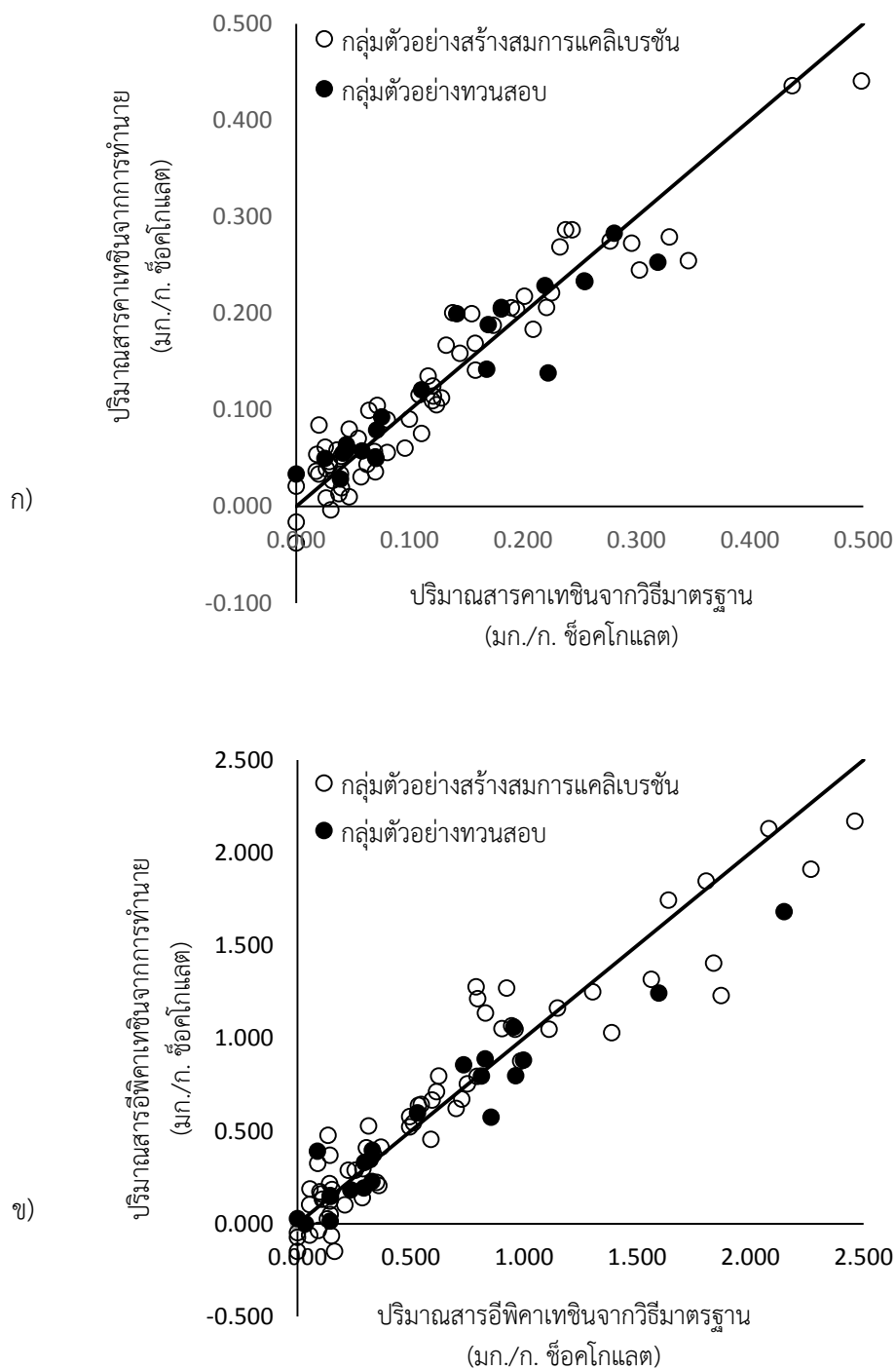
ตารางที่ 8 ค่าที่ได้จากการทำนายเปรียบเทียบกับค่าจากวิธีมาตรฐานของปริมาณคาเทชินและอีพิกาทะชิน

	ค่าจากวิธีมาตรฐาน (มก./ก. ช็อคโกแลต)			ค่าจากการทำนาย (มก./ก. ช็อคโกแลต)		
	ปริมาณ	ปริมาณเฉลี่ย	SD	ปริมาณ	ปริมาณเฉลี่ย	SD
คาเทชิน	0.000 – 0.498	0.126	0.104	-0.038 – 0.441	0.126	0.099
อีพิกาทะชิน	0.000 – 2.462	0.623	0.592	-0.149 – 2.170	0.612	0.548

จากตารางที่ 8 แสดงให้เห็นประสิทธิภาพและความแม่นยำของการทำนายปริมาณสารในตัวอย่างด้วยเทคนิคสเปกโตรสโคปีอินฟราเรดย่านใกล้แบบฟูเรียร์ทรานฟอร์ม โดยเฉพาะสารคาเทชินที่ปริมาณเฉลี่ยจากทั้งสองเทคนิคมีค่าเท่ากัน เนื่องจากตัวอย่างช็อคโกแลตที่ใช้ในงานวิจัยนี้มีปริมาณโกโก้แมสตั้งแต่ร้อยละ 0 – 88 ทำให้ปริมาณสารทั้งสองชนิดจากแต่ละตัวอย่างมีความแตกต่างกันมาก ค่า SD จากการวิเคราะห์ด้วยวิธีมาตรฐานและการทำนายจึงมีค่าสูง เช่นเดียวกับปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดในเมล็ดโกโก้ที่มีการเก็บรักษาไว้นาน 0 – 21 วัน ก่อนนำมาหมักเพื่อให้ได้กลิ่นรสที่เหมาะสม ตรวจสอบด้วยเทคนิคสเปกโตรสโคปีอินฟราเรดย่านใกล้แบบฟูเรียร์ทรานฟอร์ม Sunoj และคณะ (2016) พบว่าค่าเฉลี่ยจากการวิเคราะห์ด้วยวิธีมาตรฐานและการทำนายใกล้เคียงกัน (11.08 และ 11.15 มิลลิกรัม/กรัม เมล็ดโกโก้ ตามลำดับ) และมีค่า SD สูงเนื่องจากสารดังกล่าวมีปริมาณลดลงในระหว่างการเก็บรักษา (2.41 และ 2.29 มิลลิกรัม/กรัม เมล็ดโกโก้ ตามลำดับ)

ค่าที่ทำนายได้จากสเปกตรัมมีความสัมพันธ์กับค่าที่ได้จากวิธีมาตรฐาน จากภาพที่ 20 แสดงจุดข้อมูลจากกลุ่มตัวอย่างที่ใช้สำหรับสร้างสมการแคลิเบรชันจำนวน 65 ตัวอย่าง และกลุ่มที่ใช้สำหรับการทวนสอบความแม่นยำ

ของสมการจำนวน 21 ตัวอย่างที่กระจายรอบเส้นเป้าหมาย (target line, $R^2 = 1$) และมีค่าทางสถิติดังที่แสดงในตารางที่ 9



ภาพที่ 20 ความสัมพันธ์ระหว่างค่าที่ได้จากวิธีมาตรฐานกับค่าที่ทำนายได้จากเทคนิคสเปกโตรสโคปีอินฟราเรด ย่านใกล้ของคาเทชิน (ก) และอีพิกาทะชิน (ข)

ค่า R^2 ของคาเทชินและอีพิกาทะชินแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าทางเคมีกับค่าจากการทำนายด้วยเทคนิคสเปกโตรสโคปีอินฟราเรดย่านใกล้ ค่าที่ได้จากการทดลองอยู่ระหว่าง 0.880 – 0.922 (ตารางที่ 9) แต่การรายงานค่าและการแปลผลนิยมใช้ค่า R^2 ของกลุ่มตัวอย่างทวนสอบเนื่องจากเป็นตัวแทนของกลุ่มตัวอย่างในอนาคต ดังนั้นเมื่อแปลความหมายจากตารางที่ 3 พบว่าสมการแคลิเบรชันสามารถนำไปประยุกต์ใช้ได้ในงานทั่วไป สอดคล้องกับงานวิจัยของ Krähmer และคณะ (2015) และ Sunoj และคณะ (2016) ค่า R^2 ของสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดและอีพิกาทะชินสามารถนำไปประยุกต์ใช้ได้ในลักษณะใกล้เคียงกัน

ตารางที่ 9 ค่าทางสถิติของผลการวิเคราะห์

	สมการแคลิเบรชัน			การทวนสอบสมการแคลิเบรชัน				
	R^2_{cal}	SEC	R^2_{val}	SEP	bias	RMSEP	RPD	SD
คาเทชิน	0.922	0.033	0.880	0.032	-0.000468	0.0315	2.88	0.093
อีพิกาทะชิน	0.898	0.21	0.892	0.17	0.0437	0.174	3.16	0.54

ค่า SEC, SEP, RMSEP และ bias แสดงความคลาดเคลื่อนของการทำนาย ซึ่งค่าดังกล่าวของสารทั้งสองชนิดมีค่าน้อยมาก (ตารางที่ 9) สอดคล้องกับงานวิจัยของ Álvarez และคณะ (2012) Bedini และคณะ (2012) Krähmer และคณะ (2015) และ Sunoj และคณะ (2016) โดยค่า bias สามารถเป็นได้ทั้งค่าบวกและค่าลบ ถ้าเป็นค่าบวกมีความหมายว่าแบบจำลองมีค่าจากวิธีมาตรฐานมากกว่าจากการทำนาย แต่ถ้าเป็นค่าลบความหมายจะเป็นในทางตรงกันข้าม หากค่า bias มีค่ามาก (ทั้งทางบวกและทางลบ) หมายถึงค่าที่ได้จากการทำนายมีความแปรปรวนอย่างมีนัยสำคัญกับค่าที่ได้จากวิธีมาตรฐาน (Cantor และคณะ, 2011)

ค่า RPD ของคาเทชินและอีพิกาทะชินเท่ากับ 2.88 และ 3.16 ตามลำดับ (ตารางที่ 9) เมื่อแปลความหมายจากตารางที่ 4 พบว่าสามารถนำไปประยุกต์ใช้ได้ไม่ด้นัก แต่เมื่อพิจารณาค่า SD พบว่ามีค่าสูงกว่าค่า SEP เพียงเล็กน้อย ดังนั้นค่า RPD ซึ่งเป็นอัตราส่วนระหว่างค่า SD กับ SEP จึงมีค่าไม่สูงมาก โดยค่า RPD เท่ากับ 2.5 – 3.0 ก็อาจแสดงถึงการวิเคราะห์ที่แม่นยำ ถ้า SD มีค่าเพียง 0.4 – 0.5 (ปานมนัส, 2556)

เมื่อตรวจสอบค่าความผิดพลาดเฉลี่ยของการทำนาย พบว่า ค่าสัมบูรณ์จากการคำนวณ ของสารคาเทชินและอีพิกาทะชินเท่ากับ 0.0716 และ 1.1643 ตามลำดับ หากค่าดังกล่าวมีค่าน้อยกว่า 2 หมายถึง ค่าผิดพลาดเฉลี่ยในการทำนายมีค่าน้อยมาก และไม่มีนัยสำคัญ หรือค่าที่ทำนายได้จากสมการแคลิเบรชันไม่แตกต่างจากค่าจริงที่ได้จากวิธีมาตรฐานอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95% (รณฤทธิ์, 2552) ดังนั้น สมการแคลิเบรชันที่พัฒนาขึ้นเหมาะสำหรับการใช้ในงานวิจัยและสามารถนำไปประยุกต์ใช้ได้ในงานทั่วไป (คาเทชิน $R^2 = 0.880$, อีพิกาทะชิน $R^2 = 0.892$)

ข้อจำกัดของการสร้างสมการแคลิเบรชันโดยใช้วิธีถดถอยกำลังสองน้อยที่สุดบางส่วนด้วยโปรแกรม OPUS ระบบจะไม่แสดงผลลัพธ์เป็นสมการ หากจะนำสมการแคลิเบรชันที่พัฒนาขึ้นไปใช้ต้องทำการถ่ายโอนสมการจากโปรแกรมที่ใช้สร้างสมการขึ้น และเครื่องสเปกโตรมิเตอร์ที่จะใช้งานในอนาคตต้องมีการทำมาตรฐาน (standardization) กับเครื่องที่เคยใช้วัดค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างที่ใช้สร้างสมการ ซึ่งจะทำให้การดูดกลืนที่ช่วง

ความยาวคลื่นของทั้งสองเครื่องเหมือนกัน โดยมีวิธีการปรับหรือแก้ไขเฉพาะในแต่ละบริษัทผู้ผลิตเครื่องมือ สามารถสอบถามขั้นตอนดังกล่าวได้จากบริษัทผู้ผลิต (รณฤทธิ์, 2552) นอกจากนี้ปริมาณสารที่สนใจในตัวอย่างจากเทคนิคสเปกโตรสโคปีอินฟราเรดย่านใกล้เป็นค่าจากการทำนายที่ได้จากการวัดค่าการดูดกลืนแสงของพันธะเคมีในตัวอย่างก่อนนำค่าการดูดกลืนแสงไปแทนค่าในสมการแคลิเบรชันที่วิเคราะห์ได้ ไม่ใช่ปริมาณจริงดังเช่นค่าจากวิธีมาตรฐานซึ่งมีความถูกต้องแม่นยำสูง ดังนั้นการนำค่าที่ได้จากการทำนายไปใช้ควรพิจารณาพร้อมกับค่าทางสถิติอื่นๆ

สมการแคลิเบรชันที่ดี ควรครอบคลุมความแปรปรวนของตัวอย่างให้มากที่สุด ดังนั้นจึงควรมีการปรับปรุงสมการแคลิเบรชันอย่างน้อยปีละครั้ง โดยนำข้อมูลสเปกตรัมและค่าจริงที่ได้จากวิธีมาตรฐานของตัวอย่างกลุ่มใหม่มาใส่เพิ่มเติม เพื่อให้สมการแคลิเบรชันสามารถทำนายปริมาณสารของตัวอย่างกลุ่มใหม่ได้อย่างถูกต้องแม่นยำ และมีประสิทธิภาพ (รณฤทธิ์, 2552)

4.2 ปริมาณสารคาเทชินและอีพิกาทะชินเปรียบเทียบกับปริมาณโกโก้แมสที่ระบุบนฉลาก

อีพิกาทะชินเป็นสารคาเทชินโมเลกุลเดี่ยวที่พบในช็อกโกแลตมากกว่าคาเทชินซึ่งเป็นสารในกลุ่มเดียวกันจากตารางที่ 10 เมื่อพิจารณาปริมาณคาเทชินและอีพิกาทะชินในดาร์กช็อกโกแลตและช็อกโกแลตนม พบว่าปริมาณสารอีพิกาทะชินมีปริมาณมากกว่าคาเทชิน 2 – 6 เท่า

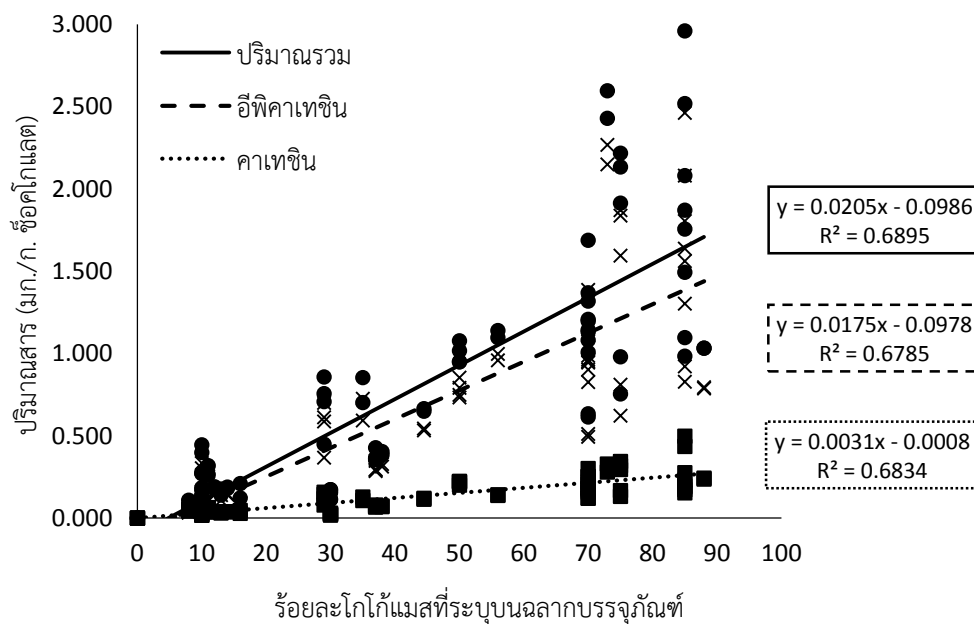
ตารางที่ 10 ปริมาณสารคาเทชินและอีพิกาทะชินเฉลี่ยในดาร์กช็อกโกแลต ช็อกโกแลตนม และช็อกโกแลตขาว

ประเภทของ ช็อกโกแลต	ปริมาณคาเทชินเฉลี่ย $\pm$ SD (มก./ก. ช็อกโกแลต)	ปริมาณอีพิกาทะชินเฉลี่ย $\pm$ SD (มก./ก. ช็อกโกแลต)
ดาร์กช็อกโกแลต (โกโก้แมส 29-88%)	0.080 $\pm$ 0.000 ถึง 0.498 $\pm$ 0.002	0.369 $\pm$ 0.000 ถึง 2.462 $\pm$ 0.079
ช็อกโกแลตนม (โกโก้แมส 8-38%)	0.018 $\pm$ 0.001 ถึง 0.128 $\pm$ 0.001	0.034 $\pm$ 0.000 ถึง 0.725 $\pm$ 0.000
ช็อกโกแลตขาว (โกโก้แมส 0%)	ไม่พบ	ไม่พบ

ผลการวิเคราะห์ในข้างต้นสอดคล้องกับงานวิจัยของ Cooper และคณะ (2008) ที่ระบุว่าอัตราส่วนระหว่างอีพิกาทะชินกับคาเทชินเท่ากับ 1:0.39 สำหรับช็อกโกแลตขาวซึ่งไม่มีโกโก้แมสเป็นส่วนผสมจึงไม่พบสารดังกล่าวทั้งสองชนิดเช่นเดียวกันกับงานวิจัยของ Langer และคณะ (2011)

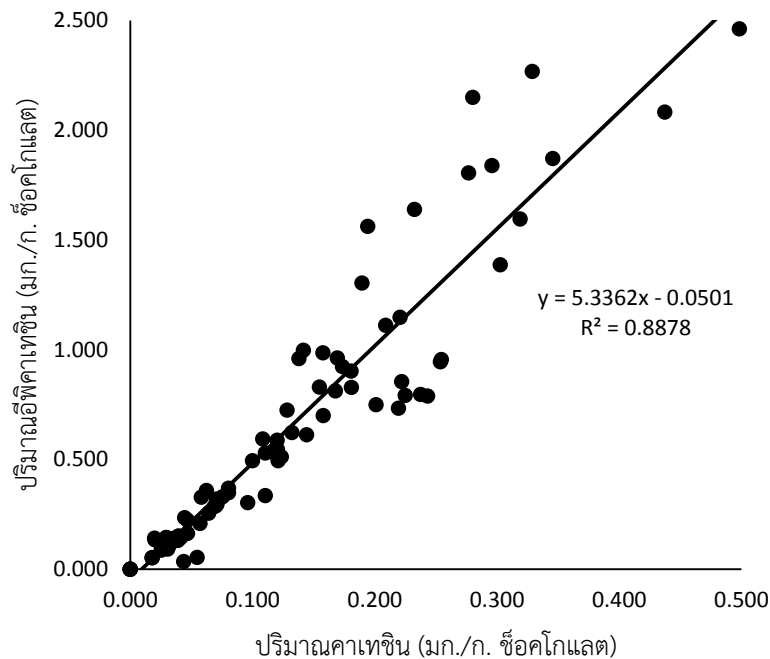
นอกจากนี้งานวิจัยของ Alañón และคณะ (2016) รายงานว่าอีพิกาทะชินเป็นสารในกลุ่มฟลาโวนอลที่มีปริมาณมากที่สุดในช็อกโกแลต คิดเป็นร้อยละ 32.9 ในขณะที่ปริมาณคาเทชินมีปริมาณร้อยละ 13.6 โดยปริมาณอีพิกาทะชินสามารถใช้ทำนายปริมาณรวมของสารประกอบฟีนอลิกในช็อกโกแลตได้อย่างแม่นยำ เมื่อโกโก้แมสซึ่งเป็นส่วนประกอบหลักในผลิตภัณฑ์ช็อกโกแลตมีปริมาณเพิ่มขึ้น ปริมาณคาเทชินและอีพิกาทะชินก็มีค่าเพิ่มขึ้นเช่นเดียวกัน (ตารางที่ 10) เนื่องจากโกโก้แมสซึ่งเป็นส่วนผสมสำคัญที่ให้สีน้ำตาลในช็อกโกแลต ส่วนผสมดังกล่าวมีไขมันเป็นองค์ประกอบร้อยละ 54 – 55 (สุวรรณ, 2543) กล่าวคือเป็นส่วนที่ไม่มีไขมันอยู่ร้อยละ 45 – 46 โดยส่วนที่ไม่มีไขมันเป็นองค์ประกอบที่มีสารประกอบฟีนอลิกปริมาณมาก เพราะสารประกอบฟีนอลิกเป็นไฮโดรฟิลิก

(hydrophilic) หรือส่วนที่ชอบน้ำ และมีแนวโน้มที่จะพบสารดังกล่าวในองค์ประกอบที่ไม่มีไขมันของโกโก้และช็อคโกแลต (Miller และคณะ, 2006) โดยปริมาณจริงและร้อยละที่ระบุบนฉลากบรรจุภัณฑ์ของโกโก้แมสที่เป็นส่วนประกอบในผลิตภัณฑ์ช็อคโกแลตมีความสัมพันธ์เชิงเส้นกับส่วนที่ไม่มีไขมัน ($R^2 = 0.9148$ และ 0.755 ตามลำดับ) (Alañón และคณะ, 2016) ดังนั้นเมื่อใช้โกโก้แมสเป็นส่วนประกอบในผลิตภัณฑ์เพิ่มขึ้น สารประกอบฟีนอลิกจึงมีปริมาณเพิ่มขึ้นเช่นเดียวกัน สอดคล้องกับผลวิเคราะห์ที่แสดงความสัมพันธ์เชิงเส้นระหว่างร้อยละของโกโก้แมสที่ระบุบนฉลากบรรจุภัณฑ์กับปริมาณคาเทชิน ปริมาณอีพิกาทะชิน และปริมาณรวมของสารทั้งสองชนิด ดังภาพที่ 21



ภาพที่ 21 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างร้อยละของโกโก้แมสที่ระบุบนบรรจุภัณฑ์กับปริมาณรวมของคาเทชินและอีพิกาทะชิน (●) ปริมาณอีพิกาทะชิน (x) และปริมาณคาเทชิน (■)

ตัวอย่างช็อคโกแลตที่นำมาใช้ในงานวิจัยนี้มีจำนวน 86 ตัวอย่าง และมีจำนวน 6 ตัวอย่างที่ไม่ระบุปริมาณร้อยละโกโก้แมสบนฉลากบรรจุภัณฑ์ สำหรับตัวอย่างที่มีการระบุปริมาณส่วนประกอบดังกล่าว ร้อยละของโกโก้แมสที่ระบุบนฉลากบรรจุภัณฑ์มีแนวโน้มแปรผันตรงกับปริมาณคาเทชิน ($R^2 = 0.6834$) ปริมาณอีพิกาทะชิน ($R^2 = 0.6785$) และปริมาณรวมของสารทั้งสองชนิด ($R^2 = 0.6895$) ผลวิเคราะห์ดังกล่าวสอดคล้องกับงานวิจัยของ Miller และคณะ (2006) และ Cooper และคณะ (2008) ที่ระบุว่าปริมาณโกโก้แมสที่ระบุบนฉลากบรรจุภัณฑ์มีความสัมพันธ์กับปริมาณรวมของสารทั้งสองชนิด ($R^2 = 0.680$) และ Vinson และ Motisi (2015) รายงานว่าปริมาณโกโก้แมสในช็อคโกแลตที่มีวางจำหน่ายในท้องตลาดมีความสัมพันธ์เชิงเส้นกับปริมาณรวมของสารทั้งสองชนิดเช่นเดียวกันกับความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ ($R^2 = 0.6789$) นอกจากนี้ยังพบความสัมพันธ์เชิงเส้นระหว่างปริมาณคาเทชินกับปริมาณอีพิกาทะชิน ($R^2 = 0.8878$) ดังภาพที่ 22



ภาพที่ 22 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณคาเทชินกับปริมาณอีพิคาเทชิน

จากภาพที่ 22 ผลการวิเคราะห์ดังกล่าวไม่สอดคล้องกับงานวิจัยส่วนหนึ่งของ Alañón และคณะ (2016) ที่รายงานว่าค่าสัมประสิทธิ์แสดงความสัมพันธ์เชิงเส้นระหว่างปริมาณสารทั้งสองชนิดในตัวอย่างช็อกโกแลตมีค่าค่อนข้างต่ำ ($R^2 = 0.456$) สาเหตุที่ผลวิเคราะห์ไม่สอดคล้องกันอาจเป็นเพราะงานวิจัยดังกล่าวใช้ช็อกโกแลตจำนวน 41 ตัวอย่างที่มีปริมาณโกโก้แมสร้อยละ 20 – 90 แต่งานวิจัยนี้ใช้ 80 ตัวอย่างที่มีโกโก้แมสร้อยละ 0 – 88 จำนวนตัวอย่างที่มากกว่าและมีปริมาณโกโก้แมสที่หลากหลายมากกว่าส่งผลต่อการกระจายของข้อมูล และทำให้ค่า R^2 ที่ได้แตกต่างกัน

ช็อกโกแลตขาวเป็นช็อกโกแลตชนิดเดียวที่ไม่พบปริมาณคาเทชินและอีพิคาเทชิน (ตารางที่ 10) หากเปลี่ยนวิธีวิเคราะห์จากเทคนิค HPLC เป็นเทคนิคสเปกโตรโฟโตเมตรี (spectrophotometry) ซึ่ง Pimentel และคณะ (2010) ใช้เป็นวิธีวิเคราะห์ปริมาณฟลาโวนอยด์และปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดในตัวอย่างช็อกโกแลต ช็อกโกแลตขาวจะพบปริมาณสารในกลุ่มฟลาโวนอยด์ เนื่องจากวานิลลิน (vanillin) ซึ่งเป็นสารให้กลิ่นรสของวานิลลาที่เป็นส่วนผสมหนึ่งในช็อกโกแลตมีโครงสร้างทางเคมีเป็นวงแหวนฟีนอลคล้ายกับโครงสร้างคาเทชินและฟลาวานอล (Sarkar และ Howarth, 1976 และ Sun และคณะ, 1998) ดังนั้น ถ้าเลือกใช้เทคนิคดังกล่าวในการวิเคราะห์ปริมาณฟลาโวนอยด์หรือปริมาณสารในกลุ่มฟลาวานอล เช่น คาเทชิน และอีพิคาเทชิน จะทำให้ผลวิเคราะห์คลาดเคลื่อนจากความเป็นจริง

จากข้อมูลที่กล่าวมาในข้างต้นแสดงให้เห็นว่าช็อกโกแลตเป็นอาหารประเภทขนมหวานที่มีสารประกอบฟีนอลิกซึ่งมีประโยชน์ต่อร่างกายอยู่ปริมาณมาก การรับประทานช็อกโกแลตปริมาณมาก (25 กรัมต่อวัน) ในระยะยาวจะส่งผลต่อน้ำหนักตัวที่เพิ่มขึ้น แต่การรับประทานในปริมาณที่เหมาะสม (6 กรัมต่อวัน) สามารถลดความดันโลหิตโดยไม่มีผลต่อน้ำหนักตัว (Desch และคณะ, 2010) และลดปริมาณไขมันไม่ดี (LDL cholesterol) ในเลือดได้อีกด้วย (Mursu และคณะ, 2004) แม้จะมีเนยโกโก้และน้ำตาลซึ่งเป็นส่วนผสมหลักที่ให้พลังงานสูงในช็อกโกแลต แต่เนยโกโก้

สามารถถูกดูดซึมในร่างกายได้น้อยกว่าไขมันชนิดอื่น (Kubow, 1996) เนยโกโก้ประกอบด้วยกรดไขมันหลัก 3 ชนิด ได้แก่ กรดปาลมิติค (palmitic acid) กรดสเตียริก (stearic acid) และกรดโอเลอิก (oleic acid) (สุวรรณ, 2543) โดยกรดโอเลอิกเป็นกรดไขมันชนิดไม่อิ่มตัวที่มีประโยชน์ต่อร่างกาย การใช้เนยโกโก้เป็นไขมันในช็อกโกแลตจึงมีประโยชน์ด้านสุขภาพมากกว่าการใช้ไขมันชนิดอื่น นอกจากนี้การเพิ่มปริมาณโกโก้แมสเป็นการลดสัดส่วนการใช้ น้ำตาลเป็นส่วนผสมในช็อกโกแลต ทำให้สามารถลดผลกระทบด้านพลังงานและปัญหาน้ำหนักตัวที่เพิ่มขึ้นจากการ บริโภคช็อกโกแลต (Pimental และคณะ, 2010) ดาร์คช็อกโกแลตจึงนับเป็นช็อกโกแลตที่อุดมด้วยคุณประโยชน์จาก สารต้านอนุมูลอิสระ เนื่องจากมีโกโก้แมสเป็นส่วนผสมในปริมาณมาก สามารถรับประทานทดแทนขนมหวานที่ไม่มี ประโยชน์ และให้พลังงานน้อยกว่าช็อกโกแลตนม (Sørensen และคณะ, 2011)

อีพิคาเทชินเป็นสารโพลีฟีนอลในกลุ่มคาเทชินที่มีปริมาณมากที่สุดในช็อกโกแลต นอกจากปริมาณสาร ดังกล่าวมีแนวโน้มแปรผันตรงกับปริมาณโกโก้แมสในผลิตภัณฑ์ ปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับเมล็ดโกโก้ เช่น สายพันธุ์หรือ แหล่งที่ปลูก ก็สามารถทำให้ปริมาณอีพิคาเทชิน ปริมาณสารประกอบฟีนอลิก และความสามารถในการเป็นสารต้าน อนุมูลอิสระมีความแตกต่างกัน (Othman และคณะ, 2007) สำหรับผลิตภัณฑ์จากโกโก้ Cambrai และคณะ (2010) ระบุว่าวัตถุดิบที่มาจากแหล่งปลูกต่างกันจะทำให้ผลิตภัณฑ์สุดท้ายแตกต่างกัน ในระหว่างการหมักซึ่งเป็นขั้นตอนหนึ่ง ของกระบวนการหลังการเก็บเกี่ยวเมล็ดโกโก้ เป็นขั้นตอนที่ทำให้เมล็ดโกโก้มีกลิ่นรสที่เหมาะสม ประเทศเอกวาดอร์ใช้ ระยะเวลาหมักนาน 3 วัน และประเทศในแถบแอฟริกาตะวันตกใช้ระยะเวลาหมักนาน 5 วัน แต่จะทำให้ปริมาณอี พิกาเทชินลดลงประมาณร้อยละ 10 จากปริมาณเริ่มต้น โดยช่วง 2 – 3 วันแรกของการหมัก อีพิคาเทชินในเมล็ดโกโก้ จะมีปริมาณลดลงอย่างรวดเร็ว (Kim และ Keeney, 1984 และ Wollgast และ Anklam, 2000) ปริมาณที่ลดลงของ สารประกอบฟีนอลิกในเมล็ดโกโก้ขึ้นอยู่กับระยะเวลาการเก็บรักษาผลโกโก้ (cocoa pods) ก่อนเข้าสู่ขั้นตอนการ หมัก ระยะเวลาการเก็บที่นานส่งผลให้ความหนาแน่นของเปลือกหุ้มเมล็ดลดลง ทำให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันได้ง่าย ระยะเวลาการเก็บรักษาที่นานกว่าจึงส่งผลต่อการลดลงของสารประกอบฟีนอลิกมากกว่า (Sunoj และคณะ, 2016) นอกจากนี้ขั้นตอนอัลคาไลเซชัน (alkalization) ซึ่งกำจัดรสเปรี้ยว (acidic taste) และช่วยพัฒนารสของโกโก้แมสหรือ ผงโกโก้ให้ดีขึ้นจากสีเข้มดำกลายเป็นสีน้ำตาลแดงโดยใช้สารละลายต่าง เช่น แคลเซียมไฮดรอกไซด์ แอมโมเนียม คาร์บอเนต ร่วมกับการให้ความร้อน (สุวรรณ, 2543) ขั้นตอนนี้ส่งผลต่อการลดลงของปริมาณสารประกอบฟีนอลิก ปริมาณฟลาโวนอล และความสามารถด้านการต้านอนุมูลอิสระในโกโก้และผลิตภัณฑ์ (Gu และคณะ, 2006 และ Miller และคณะ, 2008)

ผลิตภัณฑ์ช็อกโกแลตที่นำมาเป็นตัวอย่างในงานวิจัยนี้มีร้อยละส่วนผสมของโกโก้แมส เนยโกโก้ น้ำตาล และนมผง (มีเฉพาะในช็อกโกแลตนม และช็อกโกแลตขาว) ที่แตกต่างกัน ถึงแม้ว่าผู้ผลิตช็อกโกแลตบางรายใช้โกโก้ แมสเป็นส่วนองค์ประกอบในปริมาณที่เท่ากัน แต่ปริมาณคาเทชินและอีพิคาเทชินที่วิเคราะห์ได้อาจแตกต่างกัน เนื่องจากปริมาณสารประกอบฟีนอลิกขึ้นอยู่กับแหล่งที่ปลูกโกโก้ สภาพการผลิตในระหว่างการหมักและการทำแห้ง เมล็ดโกโก้ กระบวนการอัลคาไลเซชัน รวมถึงกระบวนการผลิตช็อกโกแลต (Gu และคณะ, 2006; Cooper และคณะ, 2007 และ Alañón และคณะ, 2016)

5. สรุปผลการวิจัย/ข้อเสนอแนะ

อีพิคาเทชินเป็นสารคาเทชินโพลีฟีนอลเดียวที่พบในช็อกโกแลตมากกว่าคาเทชินซึ่งเป็นสารในกลุ่มเดียวกัน โดยปริมาณคาเทชินและอีพิคาเทชินในดาร์คช็อกโกแลตมีมากกว่าในช็อกโกแลตนม และไม่พบในช็อกโกแลตขาว การ

ใช้เทคนิคสเปกโตรสโคปีอินฟราเรดย่านใกล้แบบฟูเรียร์ทรานฟอร์ม ปรับแต่งสเปกตรัมด้วยการทำอนุพันธ์อันดับหนึ่ง และปรับความแปรปรวนให้เป็นมาตรฐาน เปรียบเทียบข้อมูลที่ได้จากสเปกตรัมกับค่าจริงจากการวิเคราะห์ทางเคมี ด้วยวิธีถดถอยกำลังสองน้อยที่สุดบางส่วน เป็นวิธีที่พัฒนาขึ้นเพื่อใช้ในการทำนายปริมาณคาเทชินและอีพิกาทะชิน ในช็อคโกแลตที่สามารถทำได้อย่างรวดเร็ว ถูกต้องแม่นยำ และไม่ทำลายตัวอย่าง เหมาะสำหรับนำไปประยุกต์ใช้ใน ระดับอุตสาหกรรมเพื่อสร้างจุดเด่นและเพิ่มมูลค่าสินค้า นอกจากนี้ปริมาณสารทั้งสองชนิดมีแนวโน้มแปรผันตรงกับ ปริมาณโกโก้แมสที่ใช้เป็นส่วนผสมในผลิตภัณฑ์ ผู้บริโภคสามารถประมาณปริมาณสารทั้งสองชนิดอย่างคร่าวๆ ได้จาก ร้อยละของโกโก้แมสที่ระบุบนฉลากบรรจุภัณฑ์ แต่ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับเมล็ดโกโก้และกระบวนการ ผลิตช็อคโกแลต

นอกจากสารคาเทชินโมเลกุลเดี่ยวอย่างคาเทชินและอีพิกาทะชินแล้ว ช็อคโกแลตยังมีองค์ประกอบอื่นๆ ที่น่าสนใจ เช่น ความชื้น ไขมัน สารในกลุ่มเมทิลแซนทีน (คาเฟอีน ทีโอโบรมีน และทีโอฟีลีน) เป็นต้น ซึ่งงานวิจัย ส่วนใหญ่ใช้เทคนิคสเปกโตรสโคปีอินฟราเรดย่านใกล้ศึกษาองค์ประกอบดังกล่าวในเมล็ดโกโก้และผงโกโก้ซึ่งเป็น วัตถุดิบในการผลิตช็อคโกแลต งานวิจัยเหล่านั้นจึงมีประโยชน์กับอุตสาหกรรมที่ต้องการคัดเลือกวัตถุดิบสำหรับการ ผลิตช็อคโกแลต แต่กระบวนการผลิตส่งผลให้ปริมาณสารต่างๆ เปลี่ยนแปลงไป ทำให้ผลิตภัณฑ์สุดท้ายไม่ได้มีปริมาณ สารเหล่านั้นเท่ากับในวัตถุดิบเริ่มต้น ดังนั้นการใช้เทคนิคสเปกโตรสโคปีอินฟราเรดย่านใกล้ศึกษาองค์ประกอบ ของช็อคโกแลตที่มีวางจำหน่ายในท้องตลาดเป็นการสร้างมาตรฐาน สร้างภาพลักษณ์ที่ดี เพิ่มมูลค่าให้สินค้า และเป็น ทางเลือกให้กับผู้บริโภคที่ใส่ใจดูแลสุขภาพ

6. บรรณานุกรม

- ปานมนัส ศิริสมบุญ. 2556. ศูนย์วิจัยเนียร์อินฟราเรดสเปกโตรสโคปีสำหรับผลผลิตทางการเกษตรและ อาหาร (ออนไลน์), เข้าถึงได้จาก: http://www.nirsresearch.com/NP-21763-ความรู้เกี่ยวกับเนียร์อินฟราเรดสเปกโตรสโคปี_nirs_knowledge.html (29/6/2559)
- ภาควิชาวิศวกรรมสิ่งแวดล้อม คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. ม.ป.ป. High Performance Liquid Chromatography, HPLC (ออนไลน์), เข้าถึงได้จาก <http://www.env.eng.chula.ac.th/?q=content/high-performance-liquid-chromatography-hplc> (2/8/2559)
- แม่น อมรสิทธิ์ และอมร เพชรสม. 2534. หลักการและเทคนิคการวิเคราะห์เชิงเครื่องมือ. โรงพิมพ์ชวนพิมพ์. กรุงเทพฯ.
- รณฤทธิ์ ฤทธิ์ธรม. 2552. การสร้างระบบ NIR สำหรับการวิเคราะห์ประจำวัน. หน้า 7-1 – 7-16. เทคโนโลยีอินฟราเรดย่านใกล้ในอุตสาหกรรมเกษตร. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- รณฤทธิ์ ฤทธิ์ธรม. ม.ป.ป. Instrumentation of NIR. เอกสารประกอบการสอนวิชาสเปกโตรสโคปีอินฟราเรดย่านใกล้. ภาควิชาวิศวกรรมอาหาร คณะวิศวกรรมศาสตร์ กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- ศิวลักษณ์ ปฐวิรัตน์ และอนุพันธ์ เทอดวงศ์วรกุล. 2552. เครื่องมือและอุปกรณ์สเปกโตรสโคปีอินฟราเรดย่านใกล้. หน้า 3-1 – 3-19. เทคโนโลยีอินฟราเรดย่านใกล้ในอุตสาหกรรมเกษตร. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

- ศุมาพร เกษมสำราญ. 2552. หลักการพื้นฐานของสเปกโตรสโคปีอินฟราเรดย่านใกล้. หน้า 2-1 – 2-23. เทคโนโลยีอินฟราเรดย่านใกล้ในอุตสาหกรรมเกษตร. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- สุวรรณา สุภิमारส. 2543. เทคโนโลยีการผลิตลูกกวาดและช็อคโกแลต. สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. กรุงเทพฯ.
- อนุพันธ์ เทอดวงศ์วรกุล. 2552. การปรับแต่งสเปกตรัมก่อนการวิเคราะห์. หน้า 5-1 – 5-23. เทคโนโลยีอินฟราเรดย่านใกล้ในอุตสาหกรรมเกษตร. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- Alañón, M.E., Castle, S.M., Siswanto, P.J., Cifuentes-Gómez, T. and Spencer, J.P.E. 2016. Assessment of flavanol stereoisomers and caffeine and theobromine content in commercial chocolates. *Food chemistry*. 208: 177-184.
- Álvarez, C., Perez, E., Cros, E., Lares M., Assemat, S., Boulanger, R. and Davrieux, F. 2012. The use of near infrared spectroscopy to determine the fat, caffeine, theobromine and [-]-epicatechin contents in unfermented and sun-dried beans of Criollo cocoa. *Journal of Near Infrared Spectroscopy*. 20: 307-315.
- Beckett, S. T. 2008. *The Science of Chocolate*. The Royal Society of Chemistry. Cambridge. England.
- Bedini, A., Zanolli, V., Zanardi S., Bersellini, U., Dalcanale, E. and Suman, M. 2012. Rapid and Simultaneous Analysis of Xanthines and Polyphenols as Bitter Taste Markers in Bakery Products by FT-NIR Spectroscopy. *Food Anal. Methods*. 6: 17–27.
- Blanco, M. and Villarroya, I. 2002. NIR spectroscopy: a rapid response analytical tool. *Trends in Analytical Chemistry*. 4: 240-250.
- Boeglin, W. U. 2015. Wanda (Online), Available: http://wanda.fiu.edu/teaching/courses/Modern_lab_manual/michelson.html (23/5/2016)
- Buijsse, B., Feskens, E.J., Kok, F.J. and Kromhout, D. 2006. Cocoa intake, blood pressure, and cardiovascular mortality: the Zutphen Elderly Study. *Archives of internal medicine*, 166(4): 411-417.
- Burns, D.A. and Ciurczak, E.W. (eds.) 2007. *Handbook of near-infrared analysis*. 3rd ed. CRC press. Boca Raton.
- Cambrai, A., Marcic, C., Morville, S., Sae Houer, P., Bindler, F. and Marchioni, E. 2010. Differentiation of chocolates according to the cocoa's geographical origin using chemometrics. *Journal of agricultural and food chemistry*. 58(3): 1478-1483.
- Cantor, S.L., Hoag, S.W., Ellison, C.D., Khan, M.A. and Lyon, R.C. 2011. NIR spectroscopy applications in the development of a compacted multiparticulate system for modified release. *AAPS PharmSciTech*. 12: 262–278.

- Cayuela, J. A. 2008. Vis-NIR soluble solids prediction in intact oranges (*Citrus sinensis* L.) cv. Valencia Late by reflectance. *Postharvest Biology and Technology*. 47: 75–80.
- ChemicalBook. n.d. ChemicalBook (catechin gallate) (online), Available:
http://www.chemicalbook.com/ProductChemicalPropertiesCB6476036_EN.htm
(29/9/2014)
- ChemSpider. n.d.(a). ChemSpider (galocatechin) (online), Available:
<http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.58594.html?rid=8d40e820-cb28-4997-bf88-9a675dfa28f6> (29/9/2014)
- ChemSpider. n.d.(b). ChemSpider (galocatechin gallate) (online), Available:
<http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.172662.html?rid=62dd8f02-37b3-4111-bdf3-7128c1374a80> (29/9/2014)
- Cooper, K.A., Campos-Giménez, E., Jiménez Alvarez, D., Nagy, K., Donovan, J. L. and Williamson, G. 2007. Rapid reversed phase ultra-performance liquid chromatography analysis of the major cocoa polyphenols and inter-relationships of their concentrations in chocolate. *Journal of agricultural and food chemistry*. 55(8): 2841-2847.
- Cooper, K.A., Campos-Gimenez, E., Jimenez Alvarez, D., Rytz, A., Nagy, K. and Williamson, G. 2008. Predictive relationship between polyphenol and nonfat cocoa solids content of chocolate. *J. Agric. Food Chem.* 56: 260–265.
- Crown, P.L. and Hurst, W.J. 2009. Evidence of Cacao Use in the Prehispanic American Southwest. *Proc Natl Acad Sci USA*. 106(7): 2110-2113.
- De Taeye, C., Kankolongo Cibaka, M.L., Jerkovic, V. and Collin, S. 2014. Degradation of (–)-epicatechin and procyanidin B2 in aqueous and lipidic model systems. First evidence of “chemical” flavan-3-ol oligomers in processed cocoa. *Journal of agricultural and food chemistry*. 62(36): 9002-9016.
- Desch, S., Kobler, D., Schmidt, J., Sonnabend, M., Adams, V., Sareban, M., Eitel, I., Blüher, M., Schuler, G. and Thiele, H. 2010. Low vs. higher-dose dark chocolate and blood pressure in cardiovascular high-risk patients. *American journal of hypertension*. 23(6): 694-700.
- Donovan, J.L., Luthria, D.L., Stremple, P. and Waterhouse, A.L. 1999. Analysis of (+)-catechin, (–)-epicatechin and their 3'-and 4'-O-methylated analogs: A comparison of sensitive methods. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*. 726(1): 277-283.

- Fu, X., Ying, Y., Lu, H. and Xu, X. 2007. Comparison of diffuse reflectance and transmission mode of visible-near infrared spectroscopy for detecting brown heart of pear. *Journal of Food Engineering*. 83: 317–323.
- Golic, M., Walsh, K. and Lawson, P. 2003. Short-wavelength near-infrared spectra of sucrose, glucose, and fructose with respect to sugar concentration and temperature. *Applied spectroscopy*. 57(2): 139-145.
- Gu, L., House, S. E., Wu, X., Ou, B., and Prior, R. L. 2006. Procyanidin and catechin contents and antioxidant capacity of cocoa and chocolate products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 54(11): 4057-4061.
- Hruschka, W. 1990. Data Analysis: Wavelength Selection Methods. pp. 35-36. In William, P. and Norris, K. (eds.) *Near-Infrared Technology in the Agricultural and Food Industries*. American Association of cereal Chemists, Inc.
- Huang, H., Yu, H., Xu, H. and Ying, Y. 2008. Near infrared spectroscopy for on/in-line monitoring of quality in foods and beverages: A review. *Journal of Food Engineering*. 87(3): 303-313.
- Karoui, R. 2007. A review of the analytical methods coupled with chemometric tools for the determination of the quality and identity of dairy products. *Food Chemistry*. 102: 621-640.
- Kawano, S., Fujiwara, T. and Iwamoto, M. 1993. Non-destructive determination of sugar content in 'Satsuma' mandarins using NIRS transmittance. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science*. 62: 465–470.
- Kemsley, E.K., 1998. Case studies. pp. 110–164. In Kemsley, E.K. (ed.) *Discriminant Analysis and Class Modelling of Spectroscopic Data*. Wiley. UK.
- Kim, H. and Keeney, P.G. 1984. (-)-Epicatechin Content in Fermented and Unfermented Cocoa Beans. *Journal of Food Science*. 49(4): 1090-1092.
- Krähmer, A., Engel, A., Kadow, D., Ali, N., Umaharan, P., Kroh, L.W. and Schulz, H. 2015. Fast and neat – Determination of biochemical quality parameters in cocoa using near infrared spectroscopy. *Food Chemistry*. 181: 152–159.
- Kubow, S. 1996. The influence of positional distribution of fatty acids in native, interesterified and structure-specific lipids on lipoprotein metabolism and atherogenesis. *The Journal of nutritional biochemistry*. 7(10): 530-541.

- Langer, S., Marshall, L.J., Day, A.J. and Morgan, M.R.A. 2011. Flavanols and Methylxanthines in Commercially Available Dark Chocolate: A Study of the Correlation with Nonfat Cocoa Solids. *J. Agric. Food Chem.* 59: 8435–8441.
- Liebert, M., Licht, U., Buhm, V. and Bitsch, R. 1999. Antioxidant properties and total phenolic content of green and black tea under different brewing conditions. *European Food Research and Technology.* 208: 217-220.
- Manach, C., Mazur, A. and Scalbert, A. 2005. Polyphenols and prevention of cardiovascular diseases. *Current opinion in lipidology.* 16(1): 77-84.
- McGrosky, D. T. n.d. Satori Seal (Online). Available: http://www.satoriseal.com/technical/technical_articles/compound_identification_in_quality_control.htm (17/5/2016)
- Miller, K. B., Stuart, D. A., Smith, N. L., Lee, C. Y., Mchale, N. L. and Flanagan, J. A., et al. 2006. Antioxidant activity and polyphenol and procyanidin contents of selected commercially available cocoa-containing and chocolate products in the United States. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 54: 4062–4068.
- Miller, K.B., Hurst, W.J., Payne, M.J., Stuart, D.A., Apgar, J., Sweigart, D.S. and Ou, B. 2008. Impact of alkalization on the antioxidant and flavanol content of commercial cocoa powders. *Journal of agricultural and food chemistry.* 56(18): 8527-8533.
- Miyamoto, K., Kawauchi, M., and Fukuda, T. 1998. Classification of high acid fruits by PLS using the near infrared transmittance spectra of intact Satsuma mandarins. *Journal of Near Infrared Spectroscopy.* 6(1–4): 267–271.
- Mursu, J., Voutilainen, S., Nurmi, T., Rissanen, T.H., Virtanen, J.K., Kaikkonen, J., Nyyssönen, K. and Salonen, J.T. 2004. Dark chocolate consumption increases HDL cholesterol concentration and chocolate fatty acids may inhibit lipid peroxidation in healthy humans. *Free Radical Biology and Medicine.* 37(9): 1351-1359.
- Natsume, M., Osakabe, N., Yamagishi, M., Takizawa, T., Nakamura, T., Miyatake, H., Hatano, T. and Yoshida, T. 2000. Analyses of polyphenols in cacao liquor, cocoa, and chocolate by normal-phase and reversed-phase HPLC. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry.* 64(12): 2581-2587.
- Osborne, B.G., Fearn, T. and Hindle, P.H. 1993. *Practical NIR spectroscopy with applications in food and beverage analysis.* Longman scientific and technical.
- Osborne, B.G. 2000. *Near-infrared spectroscopy in food analysis.* Encyclopedia of analytical Chemistry, BRI Australia Ltd. Australia.

- Othman, A., Ismail, A., Ghani, N.A. and Adenan, I. 2007. Antioxidant capacity and phenolic content of cocoa beans. *Food Chemistry*. 100(4): 1523-1530.
- Pimentel, F.A., Nitzke, J.A., Klipel, C.B. and Jong, E.V. 2010. Chocolate and red wine – A comparison between flavonoids content. *Food Chemistry*. 120: 109 – 112.
- Powis, T.G., Hurst, W.J., Rodriguez, M.C., Ortiz, C.P., Blake, M., Cheetham, D., Coe, M.D. and Hodgson, J.G. 2008. The Origins of Cacao Use in Mesoamerica. *Mexicon*. 30(2): 35-38.
- Sarkar, S. K. and Howarth, R. E. 1976. Specificity of the vanillin test for flavanols. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 24(2): 317–320.
- Schroeter, H., Heiss, C., Balzer, J., Kleinbongard, P., Keen, C. L., Hollenber, N. K., Sies, H., et al. 2006. (-)-Epicatechin mediated beneficial effects of flavanol-rich cocoa on vascular function in human. *Proceedings of the National academy of Sciences of the United States of America*. 103: 1024–1029.
- Shumow, L. and Bodor, A. 2011. An industry consensus study on an HPLC fluorescence method for the determination of ($\pm$)-catechin and ($\pm$)-epicatechin in cocoa and chocolate products. *Chemistry Central Journal*. 5: 39
- Sørensen, L.B. and Astrup, A. 2011. Eating dark and milk chocolate: a randomized crossover study of effects on appetite and energy intake. *Nutrition & diabetes*. 1(12): e21.
- Sun, B., Ricardo-Da-Silva, J. M. and Spranger, I. 1998. Critical factors of vanillin assay for catechins and proanthocyanidins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 46: 4267–4274.
- Sunoj, S., Igathinathane, C. and Visvanathan, R. 2016. Nondestructive determination of cocoa bean quality using FT-NIR spectroscopy. *Computers and Electronics in Agriculture*. 124: 234-242.
- Suzuki, Y., Miyoshi, N. and Isemura, M. 2012. Health-promoting effects of green tea. *Proceedings of the Japan Academy, Series B*. 88(3): 88-101.
- Teye, E., Huang, X., Dai, H. and Chen, Q. 2013. Rapid differentiation of Ghana cocoa beans by FT-NIR spectroscopy coupled with multivariate classification. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. 114: 183-189.
- Vinson, J.A. and Motisi, M.J., 2015. Polyphenol antioxidants in commercial chocolate bars: Is the label accurate?. *Journal of Functional Foods*. 12: 526-529.
- Westad, F. and Marini, F. 2015. Validation of chemometric models – a tutorial. *Anal. Chim. Acta*. 893: 14–24.
- Williams, P.C., 2001. Implementation of near-infrared technology. *Near-infrared technology in the agricultural and food industries*. 2: 163-165.
- Wollgast, J. and Anklam, E. 2000. Review on polyphenols in *Theobroma cacao*: changes in composition during the manufacture of chocolate and methodology for identification and quantification. *Food Research International*. 33(6): 423-447.

ภาคผนวก ก.
ตัวอย่างข้อบกพร่องในงานวิจัย

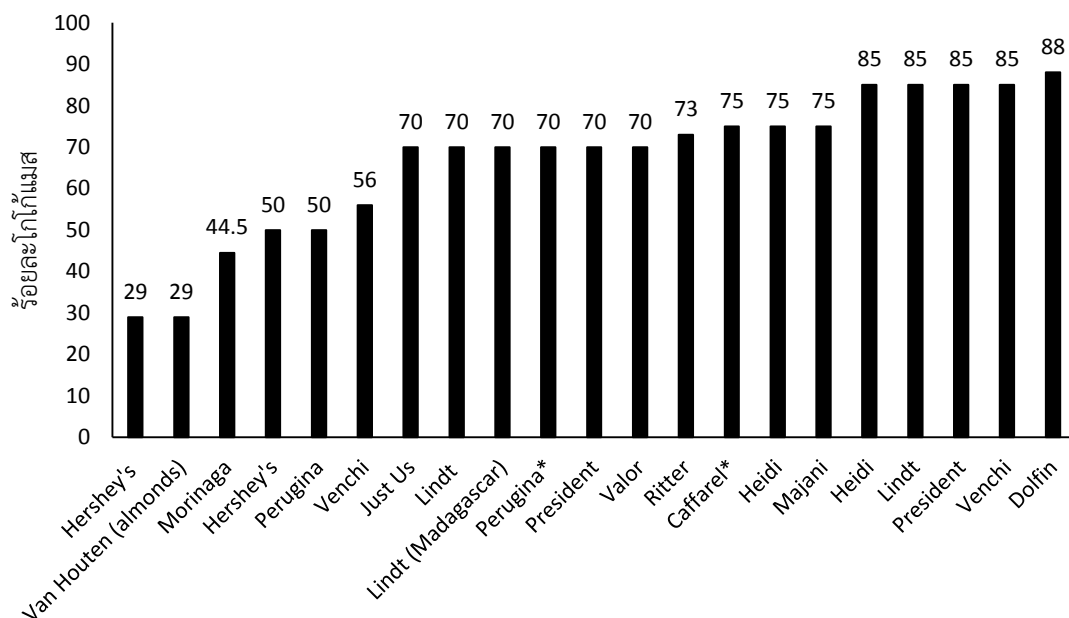
ตัวอย่างช็อคโกแลตในงานวิจัย

ช็อคโกแลต 3 ประเภท ทั้งหมด 86 ตัวอย่าง แบ่งเป็น

1. ดาร์คช็อคโกแลต 42 ตัวอย่าง จาก 22 ยี่ห้อ แต่ละยี่ห้อใช้เป็น 1 – 2 ตัวอย่าง ผลการบรรจุภัณฑ์ระบุว่าปริมาณโกโก้แมสเป็นส่วนผสมร้อยละ 29 – 88 (ภาพที่ 22) โดยมี 1 ยี่ห้อที่ไม่ระบุปริมาณโกโก้แมส คือ Cadbury

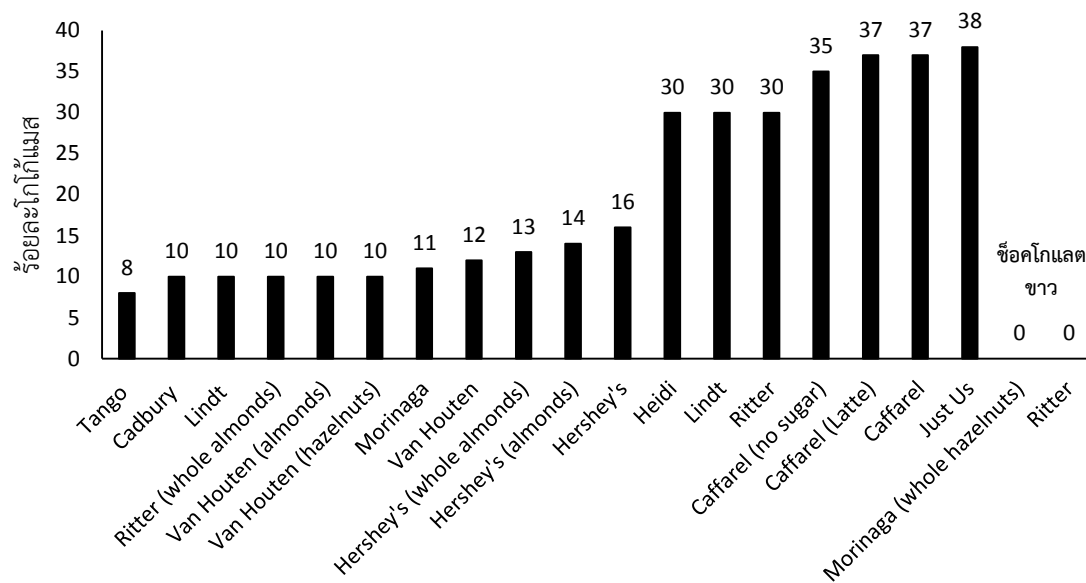
2. ช็อคโกแลตนม 40 ตัวอย่าง จาก 20 ยี่ห้อ แต่ละยี่ห้อใช้เป็น 2 ตัวอย่าง ผลการบรรจุภัณฑ์ระบุว่าปริมาณโกโก้แมสเป็นส่วนผสมร้อยละ 8 – 38 (ภาพที่ 22) โดยมี 2 ยี่ห้อที่ไม่ระบุปริมาณโกโก้แมส คือ Hershey's และ Perugina

3. ช็อคโกแลตขาว 4 ตัวอย่าง จาก 2 ยี่ห้อ แต่ละยี่ห้อใช้เป็น 2 ตัวอย่าง ไม่มีโกโก้แมสเป็นส่วนผสม (ภาพที่ 23)



ยี่ห้อดาร์คช็อคโกแลต

ภาพที่ 23 ปริมาณโกโก้แมสที่ระบุบนฉลากบรรจุภัณฑ์ของดาร์คช็อคโกแลตแต่ละยี่ห้อ (*n=1)

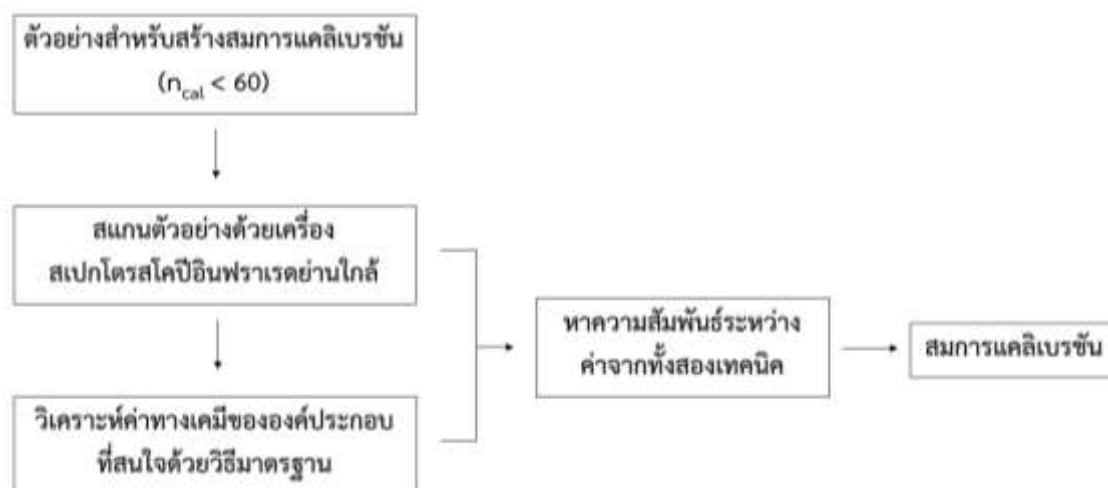


ยี่ห้อช็อคโกแลตนมและช็อคโกแลตขาว

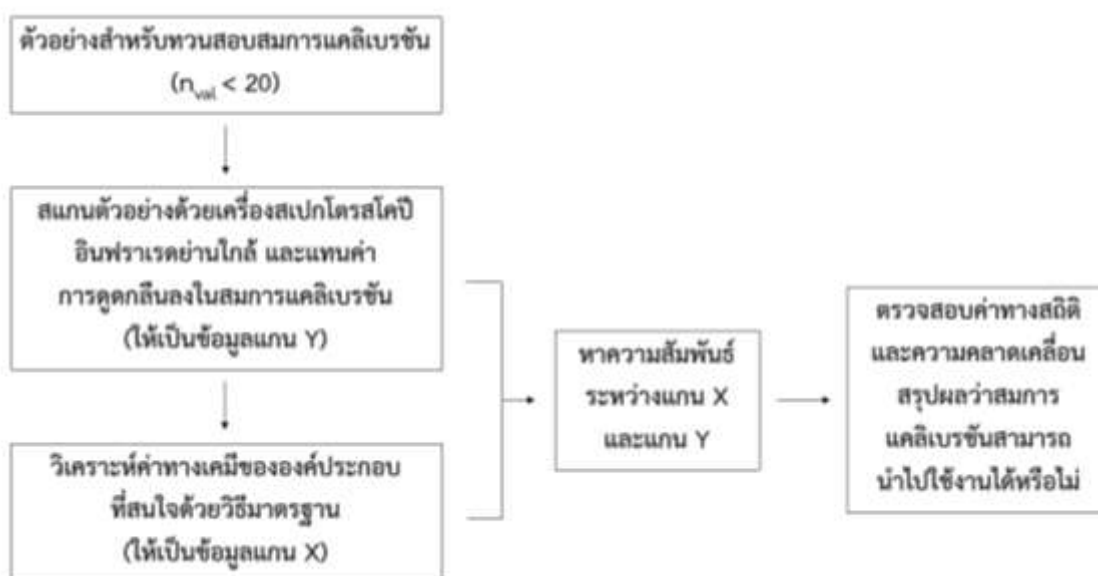
ภาพที่ 24 ปริมาณโกโก้แมสที่ระบุบนฉลากบรรจุภัณฑ์ของช็อคโกแลตนมและช็อคโกแลตขาวแต่ละยี่ห้อ

ภาคผนวก ข.

ขั้นตอนการสร้างสมการแคลิเบรชันและการทวนสอบ



ภาพที่ 25 ขั้นตอนการสร้างสมการแคลิเบรชัน



ภาพที่ 26 ขั้นตอนการทดสอบสมการแคลิเบรชัน

ภาคผนวก ค.
ค่าทางเคมีจากวิธีมาตรฐาน

ตารางที่ 11 ค่าทางเคมีจากวิธีมาตรฐานของคาเทชินและอีพิกาทะชิน (เรียงตามลำดับพญชนะในแต่ละประเภท)

ประเภท	ชื่อยี่ห้อ (ตัวอย่างที่)	ร้อยละของ โกโก้แมส	ส่วนผสมอื่น/ รายละเอียดเพิ่มเติม	ปริมาณสาร (มก./ก. ช็อคโกแลต)					
				คาเทชิน	SD	อีพิกาทะชิน	SD	รวม	SD
ดาร์ค	Cadbury (1)	ไม่ระบุ		0.100	0.001	0.495	0.001	0.595	0.002
ช็อคโกแลต	Cadbury (2)	ไม่ระบุ		0.111	0.000	0.529	0.001	0.640	0.001
	Caffarel (1)	75		0.346	0.001	1.872	0.001	2.217	0.001
	Dolfin (1)	88		0.243	0.000	0.789	0.001	1.033	0.001
	Dolfin (2)	88		0.238	0.000	0.796	0.001	1.034	0.001
	Heidi (1)	75		0.168	0.000	0.812	0.008	0.980	0.005
	Heidi (2)	75		0.132	0.000	0.623	0.000	0.755	0.001
	Heidi (1)	85		0.174	0.001	0.923	0.002	1.097	0.002
	Heidi (2)	85		0.155	0.000	0.829	0.001	0.984	0.001
	Hershey's (1)	29		0.120	0.001	0.588	0.001	0.709	0.002
	Hershey's (2)	29		0.080	0.000	0.369	0.000	0.449	0.001
	Hershey's (1)	50		0.222	0.000	0.855	0.000	1.077	0.001
	Hershey's (2)	50		0.201	0.000	0.750	0.000	0.951	0.001
	Just Us (1)	70		0.254	0.007	0.955	0.024	1.209	0.031
	Just Us (2)	70		0.254	0.008	0.945	0.030	1.199	0.035
	Lindt (1)	70	โกโก้จากมาร์ดากัสการ์	0.121	0.000	0.495	0.001	0.616	0.001
	Lindt (2)	70	โกโก้จากมาร์ดากัสการ์	0.124	0.001	0.511	0.004	0.635	0.005
	Lindt (1)	70		0.181	0.000	0.828	0.000	1.009	0.001
	Lindt (2)	70		0.181	0.000	0.902	0.001	1.083	0.002
	Lindt (1)	85		0.233	0.000	1.639	0.000	1.872	0.001
	Lindt (2)	85		0.277	0.007	1.806	0.005	2.082	0.011
	Majani (1)	75		0.319	0.000	1.595	0.003	1.914	0.004
	Majani (2)	75		0.296	0.003	1.838	0.010	2.134	0.014
	Morinaga (1)	44.5		0.120	0.000	0.546	0.001	0.666	0.002
	Morinaga (2)	44.5		0.116	0.000	0.534	0.000	0.651	0.001
	Perugina (1)	50		0.219	0.002	0.733	0.011	0.953	0.010
	Perugina (2)	50		0.225	0.004	0.792	0.001	1.017	0.005
	Perugina (1)	70		0.303	0.000	1.387	0.001	1.690	0.002
	President (1)	70		0.158	0.007	0.986	0.011	1.144	0.019
	President (2)	70		0.169	0.005	0.963	0.029	1.133	0.035
	President (1)	85		0.194	0.000	1.562	0.023	1.757	0.020
	President (2)	85		0.190	0.003	1.304	0.032	1.494	0.037
	Ritter (1)	73		0.329	0.000	2.268	0.001	2.597	0.001
	Ritter (2)	73		0.280	0.000	2.150	0.001	2.430	0.002
	Van Houten (1)	29	ถั่วอัลมอนต์	0.144	0.000	0.613	0.000	1.369	0.007
	Van Houten (2)	29	ถั่วอัลมอนต์	0.158	0.001	0.700	0.000	1.320	0.012
	Venchi (1)	56		0.138	0.001	0.960	0.015	0.757	0.001
	Venchi (2)	56		0.142	0.002	0.998	0.009	0.858	0.002
	Venchi (1)	85		0.498	0.002	2.462	0.079	1.098	0.015
	Venchi (2)	85		0.437	0.004	2.082	0.040	1.140	0.012

ตารางที่ 11 ค่าทางเคมีจากวิธีมาตรฐานของคาเทชินและอีพิกาทะชิน (เรียงตามลำดับพหุคูณในแต่ละประเภท)

ประเภท	ชื่อยี่ห้อ (ตัวอย่างที่)	ร้อยละของ โกโก้แมส	ส่วนผสมอื่น/ รายละเอียดเพิ่มเติม	ปริมาณสาร (มก./ก. ช็อคโกแลต)					
				คาเทชิน	SD	อีพิกาทะชิน	SD	รวม	SD
ช็อคโกแลต นม	Cadbury (1)	10		0.110	0.006	0.335	0.011	0.445	0.017
	Cadbury (2)	10		0.096	0.000	0.304	0.002	0.400	0.003
	Caffarel (1)	37	สูตรลาเต้ (Latte)	0.069	0.000	0.286	0.004	0.355	0.004
	Caffarel (2)	37	สูตรลาเต้ (Latte)	0.071	0.001	0.296	0.004	0.367	0.006
	Caffarel (1)	35	ไม่มีน้ำตาล	0.128	0.001	0.726	0.000	0.854	0.002
	Caffarel (2)	35	ไม่มีน้ำตาล	0.108	0.001	0.594	0.006	0.702	0.007
	Caffarel (1)	37		0.080	0.001	0.349	0.004	0.429	0.005
	Caffarel (2)	37		0.070	0.000	0.292	0.001	0.362	0.002
	Heidi (1)	30		0.030	0.000	0.144	0.001	0.174	0.002
	Heidi (2)	30		0.029	0.000	0.144	0.000	0.173	0.001
	Hershey's (1)	ไม่ระบุ		0.070	0.000	0.289	0.001	0.359	0.002
	Hershey's (2)	ไม่ระบุ		0.070	0.007	0.320	0.016	0.391	0.022
	Hershey's (1)	13	ถั่วอัลมอนต์เต็มเมล็ด	0.036	0.003	0.141	0.010	0.177	0.014
	Hershey's (2)	13	ถั่วอัลมอนต์เต็มเมล็ด	0.032	0.002	0.109	0.004	0.141	0.006
	Hershey's (1)	14	ถั่วอัลมอนต์	0.040	0.001	0.149	0.005	0.189	0.006
	Hershey's (2)	14	ถั่วอัลมอนต์	0.039	0.000	0.143	0.000	0.182	0.001
	Hershey's (1)	16		0.031	0.001	0.092	0.005	0.123	0.005
	Hershey's (2)	16		0.047	0.004	0.164	0.012	0.210	0.016
	Just Us (1)	38		0.071	0.002	0.314	0.003	0.386	0.005
	Just Us (2)	38		0.075	0.003	0.330	0.013	0.405	0.016
	Lindt (1)	10		0.018	0.000	0.053	0.002	0.071	0.002
	Lindt (2)	10		0.018	0.001	0.053	0.002	0.071	0.003
	Lindt (1)	30		0.026	0.000	0.089	0.002	0.115	0.003
	Lindt (2)	30		0.025	0.000	0.088	0.002	0.113	0.002
	Morinaga (1)	11		0.057	0.000	0.209	0.002	0.266	0.001
	Morinaga (2)	11		0.064	0.006	0.255	0.008	0.319	0.014
	Perugina (1)	ไม่ระบุ		0.062	0.002	0.359	0.009	0.421	0.011
	Perugina (2)	ไม่ระบุ		0.058	0.001	0.329	0.008	0.387	0.007
	Ritter (1)	10	ถั่วอัลมอนต์เต็มเมล็ด	0.047	0.000	0.224	0.000	0.271	0.001
	Ritter (2)	10	ถั่วอัลมอนต์เต็มเมล็ด	0.044	0.001	0.235	0.002	0.280	0.002
	Ritter (1)	30		0.020	0.000	0.142	0.001	0.162	0.002
	Ritter (2)	30		0.020	0.001	0.134	0.005	0.154	0.004
	Tango (1)	8		0.055	0.002	0.054	0.003	0.109	0.005
	Tango (2)	8		0.044	0.000	0.034	0.000	0.078	0.001
	Van Houten (1)	10	ถั่วฮาเซลนัท	0.027	0.003	0.099	0.000	0.126	0.004
	Van Houten (2)	10	ถั่วฮาเซลนัท	0.026	0.002	0.104	0.004	0.130	0.006
	Van Houten (1)	10	ถั่วอัลมอนต์	0.039	0.002	0.132	0.000	0.171	0.002
	Van Houten (2)	10	ถั่วอัลมอนต์	0.041	0.003	0.145	0.001	0.186	0.003
	Van Houten (1)	12		0.038	0.000	0.142	0.004	0.180	0.004
	Van Houten (2)	12		0.040	0.000	0.152	0.003	0.191	0.003
ช็อคโกแลต ขาว	Morinaga (1)	0		0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
	Morinaga (2)	0		0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
	Ritter (1)	0	ถั่วฮาเซลนัทเต็มเมล็ด	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
	Ritter (2)	0	ถั่วฮาเซลนัทเต็มเมล็ด	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

ภาคผนวก ง.

ข้อมูลสมการแคลิเบรชันและการทวนสอบ

ข้อมูลสมการแคลิเบรชันและการทวนสอบ

คาเทชิน

ตารางที่ 12 ข้อมูลสมการแคลิเบรชันของคาเทชิน

ประเภท	ชื่อยี่ห้อ (ตัวอย่างที่)	ร้อยละของ โกโก้แมส	ส่วนผสมอื่น/ รายละเอียดเพิ่มเติม	ปริมาณสาร (มก./ก. ช็อคโกแลต)	
				ค่าจากวิธีมาตรฐาน	ค่าจากการทำนาย
ดาร์คช็อคโกแลต	Cadbury (1)	ไม่ระบุ		0.100	0.091
	Caffarel (1)	75		0.346	0.255
	Dolfin (1)	88		0.243	0.287
	Dolfin (2)	88		0.238	0.287
	Heidi (2)	75		0.132	0.167
	Heidi (1)	85		0.174	0.188
	Heidi (2)	85		0.155	0.200
	Hershey's (1)	29		0.120	0.110
	Hershey's (2)	29		0.080	0.090
	Hershey's (2)	50		0.201	0.218
	Just Us (2)	70		0.254	0.234
	Lindt (1)	70	โกโก้จากมาร์ดากัสการ์	0.121	0.115
	Lindt (2)	70	โกโก้จากมาร์ดากัสการ์	0.124	0.105
	Lindt (2)	70		0.181	0.205
	Lindt (1)	85		0.233	0.269
	Lindt (2)	85		0.277	0.275
	Majani (2)	75		0.296	0.273
	Morinaga (1)	44.5		0.120	0.125
	Morinaga (2)	44.5		0.116	0.135
	Perugina (2)	50		0.225	0.221
	Perugina (1)	70		0.303	0.245
	President (1)	70		0.158	0.169
	President (1)	85		0.194	0.204
	President (2)	85		0.190	0.206
	Ritter (1)	73		0.329	0.279
	Valor (1)	70		0.221	0.206
	Valor (2)	70		0.209	0.184
	Van Houten (1)	29	ถั่วอัลมอนต์	0.144	0.159
	Van Houten (2)	29	ถั่วอัลมอนต์	0.158	0.141
	Venchi (1)	56		0.138	0.201
	Venchi (1)	85		0.498	0.441
	Venchi (2)	85		0.437	0.436

ตารางที่ 12 ข้อมูลสมการแคลิเบรชันของคาเทชิน (ต่อ)

ประเภท	ชื่อยี่ห้อ (ตัวอย่างที่)	ร้อยละของ โกโก้แมส	ส่วนผสมอื่น/รายละเอียด เพิ่มเติม	ปริมาณสาร (มก./ก. ช็อคโกแลต)	
				ค่าจากวิธีมาตรฐาน	ค่าจากการทำนาย
ช็อคโกแลตนม	Cadbury (1)	10		0.110	0.076
	Cadbury (2)	10		0.096	0.061
	Caffarel (1)	37	สูตรลาเต้ (Latte)	0.069	0.057
	Caffarel (1)	35	ไม่มีน้ำตาล	0.128	0.113
	Caffarel (2)	35	ไม่มีน้ำตาล	0.108	0.116
	Caffarel (1)	37		0.080	0.056
	Heidi (1)	30		0.030	0.043
	Heidi (2)	30		0.029	0.047
	Hershey's (1)	ไม่ระบุ		0.070	0.036
	Hershey's (1)	16		0.031	-0.003
	Hershey's (2)	16		0.047	0.010
	Hershey's (1)	14	ถั่วอัลมอนต์	0.040	0.019
	Hershey's (1)	13	ถั่วอัลมอนต์เต็มเมล็ด	0.036	0.058
	Hershey's (2)	13	ถั่วอัลมอนต์เต็มเมล็ด	0.032	0.027
	Just Us (1)	38		0.071	0.105
	Lindt (1)	10		0.018	0.037
	Lindt (2)	10		0.018	0.054
	Lindt (1)	30		0.026	0.061
	Morinaga (1)	11		0.057	0.031
	Morinaga (2)	11		0.064	0.100
	Perugina (1)	ไม่ระบุ		0.062	0.044
	Ritter (1)	10	ถั่วอัลมอนต์เต็มเมล็ด	0.047	0.080
	Ritter (1)	30		0.020	0.034
	Ritter (2)	30		0.020	0.085
	Tango (1)	8		0.055	0.071
	Van Houten (1)	10	ถั่วอัลมอนต์	0.039	0.034
	Van Houten (1)	10	ถั่วฮาเซลนัท	0.027	0.039
	Van Houten (2)	10	ถั่วฮาเซลนัท	0.026	0.009
	Van Houten (1)	12		0.038	0.013
	Van Houten (2)	12		0.040	0.052
ช็อคโกแลตขาว	Ritter (1)	0	ถั่วฮาเซลนัทเต็มเมล็ด	0.000	0.021
	Morinaga (1)	0		0.000	-0.038
	Morinaga (2)	0		0.000	-0.016

ตารางที่ 13 ข้อมูลการทวนสอบสมการแคลิเบรชันของคาเทชิน

ประเภท	ชื่อยี่ห้อ (ตัวอย่างที่)	ร้อยละของ โกโก้แมส	ส่วนผสมอื่น/รายละเอียด เพิ่มเติม	ปริมาณสาร (มก./ก. ช็อคโกแลต)	
				ค่าจากวิธีมาตรฐาน	ค่าจากการทำนาย
ดาร์คช็อคโกแลต	Cadbury (2)	ไม่ระบุ		0.111	0.121
	Heidi (1)	75		0.168	0.142
	Hershey's (1)	50		0.222	0.138
	Just Us (1)	70		0.254	0.233
	Lindt (1)	70		0.181	0.206
	Majani (1)	75		0.319	0.253
	Perugina (1)	50		0.219	0.229
	President (2)	70		0.169	0.189
	Ritter (2)	73		0.280	0.283
	Venchi (2)	56		0.142	0.200
ช็อคโกแลตนม	Caffarel (2)	37	สูตรลาเต้ (Latte)	0.071	0.079
	Caffarel (2)	37		0.070	0.051
	Hershey's (2)	14	ถั่วอัลมอนต์	0.039	0.029
	Hershey's (2)	ไม่ระบุ		0.070	0.050
	Just Us (2)	38		0.075	0.093
	Lindt (2)	30		0.025	0.050
	Perugina (2)	ไม่ระบุ		0.058	0.058
	Ritter (2)	10	ถั่วอัลมอนต์เต็มเมล็ด	0.044	0.064
	Tango (2)	8		0.044	0.058
	Van Houten (2)	10	ถั่วอัลมอนต์	0.041	0.055
ช็อคโกแลตขาว	Ritter (2)	0	ถั่วฮาเซลนัทเต็มเมล็ด	0.000	0.034

อีพิคาเทชิน

ตารางที่ 14 ข้อมูลสมการแคลิเบรชันของอีพิคาเทชิน

ประเภท	ชื่อยี่ห้อ (ตัวอย่างที่)	ร้อยละของ โกโก้แมส	ส่วนผสมอื่น/ รายละเอียดเพิ่มเติม	ปริมาณสาร (มก./ก. ช็อคโกแลต)	
				ค่าจากวิธีมาตรฐาน	ค่าจากการทำนาย
ดาร์คช็อคโกแลต	Cadbury (1)	ไม่ระบุ		0.495	0.578
	Caffarel (1)	75		1.872	1.230
	Dolfin (1)	88		0.789	1.277
	Dolfin (2)	88		0.796	1.214
	Heidi (1)	85		0.923	1.271
	Heidi (2)	75		0.623	0.797
	Heidi (2)	85		0.829	1.136
	Hershey's (1)	29		0.588	0.455
	Hershey's (2)	29		0.369	0.413
	Hershey's (2)	50		0.750	0.754
	Just Us (2)	70		0.945	1.067
	Lindt (1)	70	โกโก้จากมาร์ตาคัสการ์	0.495	0.522
	Lindt (2)	70	โกโก้จากมาร์ตาคัสการ์	0.511	0.545
	Lindt (2)	70		0.902	1.052
	Lindt (1)	85		1.639	1.744
	Lindt (2)	85		1.806	1.847
	Majani (2)	75		1.838	1.405
	Morinaga (1)	44.5		0.546	0.643
	Morinaga (2)	44.5		0.534	0.638
	Perugina (2)	50		0.792	0.795
	Perugina (1)	70		1.387	1.030
	President (1)	70		0.986	0.877
	President (1)	85		1.562	1.317
	President (2)	85		1.304	1.250
	Ritter (1)	73		2.268	1.912
	Valor (1)	70		1.148	1.163
	Valor (2)	70		1.111	1.049
	Van Houten (1)	29	ถั่วอัลมอนต์	0.613	0.713
	Van Houten (2)	29	ถั่วอัลมอนต์	0.700	0.621
	Venchi (1)	56		0.960	1.048
	Venchi (1)	85		2.462	2.170
	Venchi (2)	85		2.082	2.130

ตารางที่ 14 ข้อมูลสมการแคลิเบรชันของอีพิคาเทชิน (ต่อ)

ประเภท	ชื่อยี่ห้อ (ตัวอย่างที่)	ร้อยละของ โกโก้แมส	ส่วนผสมอื่น/ รายละเอียดเพิ่มเติม	ปริมาณสาร (มก./ก. ช็อคโกแลต)	
				ค่าจากวิธีมาตรฐาน	ค่าจากการทำนาย
ช็อคโกแลตนม	Cadbury (1)	10		0.335	0.375
	Cadbury (2)	10		0.304	0.411
	Caffarel (1)	35	ไม่มีน้ำตาล	0.726	0.673
	Caffarel (2)	35	ไม่มีน้ำตาล	0.594	0.667
	Caffarel (1)	37	สูตรลาเต้ (Latte)	0.286	0.140
	Caffarel (1)	37		0.349	0.224
	Heidi (1)	30		0.144	0.050
	Heidi (2)	30		0.144	0.153
	Hershey's (1)	ไม่ระบุ		0.289	0.298
	Hershey's (1)	13	ถั่วอัลมอนต์เต็มเมล็ด	0.141	0.216
	Hershey's (2)	13	ถั่วอัลมอนต์เต็มเมล็ด	0.109	0.132
	Hershey's (1)	14	ถั่วอัลมอนต์	0.149	-0.064
	Hershey's (1)	16		0.092	-0.035
	Hershey's (2)	16		0.164	-0.149
	Just Us (1)	38		0.314	0.528
	Lindt (1)	10		0.053	-0.060
	Lindt (2)	10		0.053	0.104
	Lindt (1)	30		0.089	0.326
	Morinaga (1)	11		0.209	0.102
	Morinaga (2)	11		0.255	0.289
	Perugina (1)	ไม่ระบุ		0.359	0.206
	Ritter (1)	10	ถั่วอัลมอนต์เต็มเมล็ด	0.224	0.288
	Ritter (1)	30		0.142	0.369
	Ritter (2)	30		0.134	0.478
	Tango (1)	8		0.054	0.188
	Van Houten (1)	10	ถั่วฮาเซลนัท	0.099	0.173
	Van Houten (2)	10	ถั่วฮาเซลนัท	0.104	0.160
	Van Houten (1)	10	ถั่วอัลมอนต์	0.132	0.026
	Van Houten (1)	12		0.142	0.123
	Van Houten (2)	12		0.152	0.184
ช็อคโกแลตขาว	Ritter (1)	0	ถั่วฮาเซลนัทเต็มเมล็ด	0.000	-0.048
	Morinaga (1)	0		0.000	-0.148
	Morinaga (2)	0		0.000	-0.074

ตารางที่ 15 ข้อมูลการทวนสอบสมการแคลิเบรชันของอีพิคาเทซิน

ประเภท	ชื่อยี่ห้อ (ตัวอย่างที่)	ร้อยละของ โกโก้แมส	ส่วนผสมอื่น/ รายละเอียดเพิ่มเติม	ปริมาณสาร (มก./ก. ช็อคโกแลต)	
				ค่าจากวิธีมาตรฐาน	ค่าจากการทำนาย
ดาร์คช็อคโกแลต	Cadbury (2)	ไม่ระบุ		0.529	0.598
	Heidi (1)	75		0.812	0.796
	Hershey's (1)	50		0.855	0.574
	Just Us (1)	70		0.955	1.060
	Lindt (1)	70		0.828	0.889
	Majani (1)	75		1.595	1.243
	Perugina (1)	50		0.733	0.857
	President (2)	70		0.963	0.798
	Ritter (2)	73		2.150	1.682
	Venchi (2)	56		0.998	0.882
ช็อคโกแลตนม	Caffarel (2)	37	สูตรลาเต้ (Latte)	0.296	0.332
	Caffarel (2)	37		0.292	0.192
	Hershey's (2)	14	ถั่วอัลมอนต์	0.143	0.015
	Hershey's (2)	ไม่ระบุ		0.320	0.345
	Just Us (2)	38		0.330	0.396
	Lindt (2)	30		0.088	0.391
	Perugina (2)	ไม่ระบุ		0.329	0.228
	Ritter (2)	10	ถั่วอัลมอนต์เต็มเมล็ด	0.235	0.183
	Tango (2)	8		0.034	0.000
	Van Houten (2)	10	ถั่วอัลมอนต์	0.145	0.147
ช็อคโกแลตขาว	Ritter (2)	0	ถั่วฮาเซลนัทเต็มเมล็ด	0.000	0.029

ประวัติผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการ: ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. โสภาค สอนไ

Assist. Prof. Sopark Sonwai, Ph.D.

ตำแหน่งทางวิชาการ: ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.

สาขาวิชาการที่มีความเชี่ยวชาญพิเศษ:

- การผลิตช็อกโกแลตและช็อกโกแลตเคลือบทนอุณหภูมิสูงสำหรับการใช้งานในประเทศและเพื่อการส่งออก
- การผลิตไขมันทดแทนเนยโกโก้จากไขมันจากเมล็ดพืชชนิดต่างๆ (มะม่วง, กระบอง, เงาะ เป็นต้น) เพื่อใช้ในการผลิตช็อกโกแลต
- การศึกษาการตกผลึกแยกลำดับส่วน (fractionation) น้ำมันจากเมล็ดพืช เพื่อใช้ในการผลิตช็อกโกแลต มาการีนและสเปรด
- การดัดแปลงโครงสร้างโมเลกุลของไตรกลีเซอไรด์ในน้ำมันจากเมล็ดพืชด้วยการใช้เอนไซม์ (enzymatic interesterification) เพื่อใช้ในการผลิตช็อกโกแลต มาการีน ช็อกเทนนิ่ง และสเปรด
- การผลิตไขมันแข็งจากน้ำมันพืชในรูปของ oleogel (หรือ organogel) โดยใช้ plant waxes, oryzanol และ ethylcellulose เพื่อใช้ทดแทนไขมันอิ่มตัวหรือไขมันทรานส์ในช็อกโกแลต มาการีน ช็อกเทนนิ่ง และสเปรด

หน่วยงานที่สังกัด: ภาควิชาเทคโนโลยีอาหาร คณะวิศวกรรมศาสตร์และเทคโนโลยีอุตสาหกรรม
มหาวิทยาลัยศิลปากร

สถานที่ติดต่อ: ภาควิชาเทคโนโลยีอาหาร คณะวิศวกรรมศาสตร์และเทคโนโลยีอุตสาหกรรม
มหาวิทยาลัยศิลปากร

เบอร์โทรศัพท์: 0-3421-9364-6 ต่อ 25314

โทรสาร: 0-3427-2194

E-mail: ssonwai@gmail.com

ผลงานวิจัย เช่น

Sopark Sonwai, Pawitchaya Podchong and Dérick Rousseau (2017). Crystallization kinetics of cocoa butter in the presence of sorbitan esters. Food Chemistry. 214, 497-506.

Pimwalan Ornlai-ied, Sopark Sonwai and Sawang Lertthirasuntorn (2016). Trans-free margarine fat by enzymatic interesterification of rice bran oil and hard palm stearin. Food Science and Biotechnology 25(3) 673-680.

ผู้ร่วมวิจัย: ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อรุณศรี ลีจีระจำเนียร
Assist. Prof. Arunsri Leejeerajumnean, Ph.D.

ตำแหน่งทางวิชาการ: ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.

สาขาวิชาการที่มีความเชี่ยวชาญพิเศษ:

- Food quality in microbiology and chemistry
- Volatile compounds or flavor in foods

หน่วยงานที่สังกัด: ภาควิชาเทคโนโลยีอาหาร คณะวิศวกรรมศาสตร์และเทคโนโลยีอุตสาหกรรม
มหาวิทยาลัยศิลปากร

สถานที่ติดต่อ: ภาควิชาเทคโนโลยีอาหาร คณะวิศวกรรมศาสตร์และเทคโนโลยีอุตสาหกรรม
มหาวิทยาลัยศิลปากร

เบอร์โทรศัพท์: 0-3421-9364-6 ต่อ 25314

โทรสาร: 0-3427-2194

E-mail: arunsri@su.ac.th

ผลงานวิจัย เช่น

Boonchai Pimnak and Arunsri Leejeerajumnean. 2010. Citric acid encapsulation using spray drying method and application in seasoning powder. FIAC 2010. 17-18 June, Bangkok, Thailand. (Poster presentation)

Banthita Pingsopa, Sirikorn Anantasa, Phimchanok Jaturapiree and Arunsri Leejeerajumnean. 2010. Purification and characterization of alpha-amylase produced from Bacillus subtilis TNCC 001409 using coconut meal as substrate. FIAC 2010, 17-18 June, Bangkok, Thailand (Oral Presentation)

Angsana Suwanrathaphoom, Phawida Panyawan, Phimrata Kausang and Arunsri Leejeerajumnean. 2010. Comparison of microbial reduction contaminated sweet basil by using ozoned water and weak acids. FIAC 2010. 16-17 June, Bangkok, Thailand (Poster presentation)

(ลงชื่อ)

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. โสภาค สอนไว)

หัวหน้าโครงการวิจัย

วันที่...8... เดือน...กพ.... พ.ศ. ..2560..