

การพัฒนาวีธีการตรวจสอบปริมาณสารประกอบฟีนอลิกในช็อกโกแลตด้วย เทคนิคสเปกโตรสโคปีอินฟราเรดย่านใกล้

Rapid Method Development for Phenolic Compounds in Chocolate Using Near Infrared Spectroscopy

วรรณวรา อัสวานูวัตร (Wanwara Asawanuwat)¹* ดร.โสภาค สอนไว (Dr.Sopark Sonwai)**

บทคัดย่อ

ช็อกโกแลต (chocolate) เป็นอาหารประเภทขนมหวานที่มีสารประกอบฟีนอลิก (phenolic compounds) ปริมาณมาก งานวิจัยนี้มีจุดมุ่งหมายเพื่อพัฒนาวีธีวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกที่สำคัญในช็อกโกแลต คือสารโมเลกุลเดี่ยวในกลุ่มคาเทชิน (catechins) ได้แก่ คาเทชิน (catechin) และอีพิคาเทชิน (epicatechin) โดยใช้เทคนิคสเปกโตรสโคปีอินฟราเรดย่านใกล้แบบฟูเรียร์ทรานส์ฟอร์ม (Fourier transform-near infrared spectroscopy, FT-NIRS) เปรียบเทียบกับค่าจริงจากวิธีมาตรฐานคือเทคนิควิเคราะห์ปริมาณสารประกอบอินทรีย์ในสถานะของเหลวสมรรถนะสูง (High performance liquid chromatography, HPLC) ที่มีอุปกรณ์ตรวจวัดสารชนิดเรืองแสง (fluorescence detector) พบว่า อีพิคาเทชินมีปริมาณมากกว่าคาเทชิน สารทั้งสองชนิดมีปริมาณมากที่สุดในดาร์กช็อกโกแลต (dark chocolate) ช็อกโกแลตนม (milk chocolate) และช็อกโกแลตขาว (white chocolate) ตามลำดับ สมการแคลิเบรชันที่พัฒนาขึ้นเหมาะสำหรับการนำไปใช้ในงานวิจัยและสามารถนำไปประยุกต์ใช้ได้ในงานทั่วไป (คาเทชิน $R^2 = 0.880$ อีพิคาเทชิน $R^2 = 0.892$) และปริมาณโกโก้แมสที่ระบุบนฉลากบรรจุภัณฑ์มีความสัมพันธ์เชิงเส้นกับปริมาณรวมของสารทั้งสองชนิด ($R^2 = 0.6895$) ดังนั้นผู้บริโภคสามารถประมาณปริมาณสารประกอบฟีนอลิกที่สำคัญในช็อกโกแลต อย่างคร่าวๆ ได้จากร้อยละสัดส่วนของโกโก้แมสที่ระบุบนฉลากบรรจุภัณฑ์

ABSTRACT

Chocolate is a confectionary which contains 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 content was higher than catechin in all chocolate samples. Dark chocolates presented the highest contents of both analytes, followed by milk and white chocolates. The developed equations of both analytes could be used for research and general application (catechin $R^2 = 0.880$, epicatechin $R^2 = 0.892$). 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 content was roughly reflected by the percentage of cocoa mass. Consumers can choose chocolate bars based on the label.

คำสำคัญ: ช็อกโกแลต สเปกโตรสโคปีอินฟราเรดย่านใกล้ สารประกอบฟีนอลิก

Keywords: Chocolate, FT – NIRS, Phenolic compounds

¹ Correspondent author: wanwara.asa@gmail.com

* นักศึกษา หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีอาหาร คณะวิศวกรรมศาสตร์และเทคโนโลยีอุตสาหกรรม มหาวิทยาลัยศิลปากร

** ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ภาควิชาเทคโนโลยีอาหาร คณะวิศวกรรมศาสตร์และเทคโนโลยีอุตสาหกรรม มหาวิทยาลัยศิลปากร



บทนำ

ช็อกโกแลตเป็นผลิตภัณฑ์อาหารประเภทขนมหวานที่เป็นที่รู้จักและได้รับความนิยมทั่วโลก รวมถึงประเทศไทย ช็อกโกแลตมีส่วนผสมที่สำคัญคือโกโก้แมส (cocoa mass) เนยโกโก้ (cocoa butter) นมผงและน้ำตาล [1] โดยโกโก้แมสนั้นผลิตจากผลโกโก้ เป็นส่วนผสมที่ทำให้เกิดสีน้ำตาลในช็อกโกแลตและถือว่าเป็นส่วนผสมที่สำคัญที่สุดในช็อกโกแลตในแง่โภชนาการ ทั้งนี้เพราะองค์ประกอบที่ทำให้เกิดสีน้ำตาลเหล่านั้นเป็นสารประกอบฟีนอลิกที่มีคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระที่มีประสิทธิภาพสูง มีงานวิจัยระบุว่า การรับประทานช็อกโกแลตในปริมาณที่พอเหมาะนั้นให้ประโยชน์แก่ร่างกาย [2] ซึ่งสารประกอบฟีนอลิกที่มีอยู่มากในช็อกโกแลตคือสารในกลุ่มฟลาโวนอล (flavonols) ซึ่งเป็นสารกลุ่มย่อยของฟลาโวนอยด์ (flavonoids) ที่โดดเด่นคือสารคาเทชินโมเลกุลเดี่ยว ได้แก่ คาเทชินและอีพิกาทะชิน ปัจจุบันผู้บริโภคให้ความใส่ใจด้านสุขภาพมากขึ้น หลายคนหันมาบริโภคช็อกโกแลตเพราะต้องการได้รับสารประกอบฟีนอลิกที่มีประโยชน์ เพื่อตอบสนองความต้องการของผู้บริโภค ผู้ผลิตช็อกโกแลตหลายรายจึงผลิตช็อกโกแลตที่มีปริมาณของโกโก้แมสแตกต่างกันไปออกมาจำหน่าย ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระและปริมาณสารฟีนอลิกในช็อกโกแลตมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเมื่อปริมาณโกโก้ที่เป็นส่วนประกอบเพิ่มขึ้น [3] การวัดปริมาณสารประกอบฟีนอลิกในผลิตภัณฑ์ช็อกโกแลตสามารถทำได้โดยใช้วิธีการทางเคมี เช่น HPLC ที่มีอุปกรณ์ตรวจวัดสารชนิดเรืองแสง [3-4] แต่ข้อจำกัดของวิธีทางเคมี คือ ต้องทำลายตัวอย่าง การเตรียมตัวอย่างและการวิเคราะห์ใช้เวลานาน รวมถึงมีค่าใช้จ่ายเรื่องสารเคมี ดังนั้นเทคนิค FT-NIRS ซึ่งกำลังได้รับความนิยมสำหรับนำมาใช้ในการวิเคราะห์เกี่ยวกับผลิตภัณฑ์อาหารเนื่องจากสามารถวิเคราะห์ตัวอย่างได้โดยไม่ทำลายตัวอย่างได้รับความเสียหาย ใช้สารเคมีน้อยหรือไม่ใช้เลย และสามารถวิเคราะห์ผลได้อย่างรวดเร็ว จึงเป็นวิธีการวิเคราะห์ที่น่าสนใจสำหรับการตรวจสอบปริมาณสารประกอบฟีนอลิกที่สำคัญในช็อกโกแลต

เทคนิค FT - NIRS ร่วมกับวิธีคำนวณแบบการถดถอยกำลังสองน้อยที่สุดบางส่วน (partial least square regression, PLSR) เป็นวิธีการสร้างสมการแคลิเบรชัน (calibration model) ที่ได้รับความนิยมมากที่สุดวิธีหนึ่ง เนื่องจากเป็นสามารถวิเคราะห์ตัวอย่างหลายตัวและลดจำนวนตัวแปรได้อย่างรวดเร็ว โดยมีการนำข้อมูลตัวแปรอิสระที่เป็นข้อมูลจากสเปกตรัมของตัวอย่าง และตัวแปรตามซึ่งเป็นข้อมูลที่ไดจากการวิเคราะห์ด้วยวิธีมาตรฐาน เข้ามาร่วมสร้างตัวแปรใหม่ด้วย และผลลัพธ์จะรวมกับค่าน้ำหนักปัจจัย (factor loading) ทำให้ไม่จำเป็นต้องแยกไปสร้างสมการถดถอยเหมือนในการคำนวณแบบการถดถอยโดยใช้องค์ประกอบหลัก (principal components regression, PCR) เทคนิคดังกล่าวถูกนำมาใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกในผลิตภัณฑ์เบเกอรี่ที่มีส่วนผสมของโกโก้และช็อกโกแลต พบว่าสามารถสร้างสมการแคลิเบรชัน และทำการทวนสอบด้วยการทดสอบความแม่นยำภายในกลุ่มหรือการครอสแวลิดชัน (cross validation) ได้ถูกต้องและแม่นยำ [5] สอดคล้องกับการวิเคราะห์โกโก้ซึ่งเป็นวัตถุดิบสำหรับทำผลิตภัณฑ์ช็อกโกแลต หลังการปรับแต่งสเปกตรัมด้วยเทคนิควิธีปรับความแปรปรวนให้เป็นมาตรฐาน (สารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด) การปรับแก้การกระเจิงแบบพหุคูณ (อีพิกาทะชิน) และใช้วิธีคำนวณแบบ PLSR พบว่าเทคนิคดังกล่าวสามารถสร้างสมการแคลิเบรชัน ($R^2_{cal} = 0.95 - 0.98$) และทำการทวนสอบด้วยวิธีครอสแวลิดชัน ($R^2_{val} = 0.88 - 0.93$) ได้ถูกต้องและแม่นยำเช่นเดียวกัน [6]

งานวิจัยส่วนใหญ่ศึกษาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกในเมล็ดโกโก้หรือผงโกโก้ซึ่งเป็นวัตถุดิบในการผลิตช็อกโกแลต หรือผลิตภัณฑ์ที่มีโกโก้เป็นส่วนผสม ดังนั้นงานวิจัยนี้มีจุดมุ่งหมายเพื่อพัฒนาเทคนิค FT - NIRS เพื่อวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกจำพวกคาเทชินโมเลกุลเดี่ยว ได้แก่ คาเทชิน และอีพิกาทะชิน ในช็อกโกแลต โดยตรงเปรียบเทียบกับวิธีทางเคมีคือ HPLC ที่มีอุปกรณ์ตรวจวัดสารชนิดเรืองแสง ทั้งนี้เพื่อให้ได้กรรมวิธีทางเลือกใน

การวัดค่าปริมาณสารประกอบฟีนอลิกในผลิตภัณฑ์ซ็อกโกแลตหลากหลายสูตรที่สามารถทำได้โดยไม่ต้องทำลายตัวอย่าง รวดเร็ว และไม่มี ความยุ่งยากในการใช้งาน

วัสดุ และวิธีวิจัย

ชนิดตัวอย่าง

ซ็อกโกแลต 3 ชนิด ทั้งหมด 86 ตัวอย่าง แบ่งเป็นคาร์คซ็อกโกแลต 42 ตัวอย่าง ซ็อกโกแลตนม 40 ตัวอย่าง และซ็อกโกแลตขาว 4 ตัวอย่าง ซื้อมาจากร้านสะดวกซื้อและห้างสรรพสินค้าในกรุงเทพมหานคร จังหวัดนนทบุรี และ นครปฐม และบางส่วนซื้อมาจากห้างสรรพสินค้าในประเทศอิตาลีและแคนาดา

วิธีวิจัย

การตรวจวัดสเปกตรัม

ตรวจวัดสเปกตรัมของตัวอย่างซ็อกโกแลตด้วยเครื่องสเปกโตรมิเตอร์แบบฟูเรียร์ทรานฟอร์ม (MPA, Bruker, Germany) ที่เลขคลื่นช่วง $12500 - 4000 \text{ cm}^{-1}$ ใช้ระบบการวัดแบบสะท้อนกลับที่ resolution 8 cm^{-1} สแกนตัวอย่าง 32 ครั้ง ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส และห่อตัวอย่างที่ผ่านการวัดสเปกตรัมแล้วด้วยฟิล์มพลาสติกสำหรับห่ออาหาร เก็บในถุงพลาสติกสุญญากาศจนกว่าจะทำการวิเคราะห์ทางเคมี

การตรวจวัดค่าทางเคมีด้วยวิธีมาตรฐาน

ตรวจสอบปริมาณสารในกลุ่มคาเทชิน ได้แก่ คาเทชิน และอีพิคาเทชิน ของตัวอย่างซ็อกโกแลตหลังการตรวจวัดสเปกตรัมด้วยวิธีทางเคมีคือ HPLC (SHIMADZU, LC-20A, Japan) ที่มีอุปกรณ์ตรวจวัดสารชนิดเรืองแสง (SHIMADZU, RF-20A prominence fluorescence detector, Japan) และคำนวณปริมาณสารในตัวอย่างซ็อกโกแลตตามกรรมวิธีของ [4]

การสร้างสมการแคลิเบรชันและการทวนสอบ

แบ่งกลุ่มตัวอย่างออกเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ใช้สำหรับสร้างสมการแคลิเบรชันจำนวน 65 ตัวอย่าง และกลุ่มที่ใช้สำหรับการทวนสอบความแม่นยำของสมการจำนวน 21 ตัวอย่าง ปรับแต่งสเปกตรัมด้วยการทำอนุพันธ์อันดับหนึ่ง และปรับความแปรปรวนให้เป็นมาตรฐาน ใช้เทคนิคเคโมเมตริกกระหว่างข้อมูลสเปกตรัมกับค่าที่ได้จากการวิเคราะห์ทางเคมีด้วยวิธี PLSR ด้วยโปรแกรม OPUS 7.2 (Bruker, Germany)

ค่าทางสถิติ

ค่าทางสถิติที่ใช้บ่งบอกว่าสมการแคลิเบรชันและการทวนสอบมีประสิทธิภาพ มีดังนี้

1. สัมประสิทธิ์การพิจารณา (coefficient of determination, R^2) แสดงความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปรอิสระกับตัวแปรตาม จะมีค่าอยู่ระหว่าง 0 ถึง 1 ถ้ามีค่าเข้าใกล้ 1 หมายถึงตัวแปรทั้งสองมีความสัมพันธ์แบบแปรผันตรง ในทางตรงข้ามถ้ามีค่าเข้าใกล้ 0 แสดงว่าตัวแปรทั้งสองไม่มีความสัมพันธ์กันในเชิงเส้นตรง

2. ค่าความผิดพลาดมาตรฐานของสมการแคลิเบรชัน (standard error of calibration, SEC) เป็นค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation, SD) ของผลต่างระหว่างค่าจากวิธีมาตรฐานกับค่าจากการทำนายด้วยเทคนิค FT – NIRS 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) สำหรับชุดตัวอย่างที่ใช้ในการทวนสอบสมการแคลิเบรชัน ค่า bias ใช้ในการพิจารณาความแม่นยำโดยรวมของสมการแคลิเบรชัน คำนวณได้จากสมการต่อไปนี้

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

- โดย n_v คือ จำนวนตัวอย่างที่ใช้ในการทวนสอบ

4. ค่าความผิดพลาดมาตรฐานของการทำนาย (Standard error of prediction, SEP) เป็นค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของผลต่างระหว่างค่าจากวิธีมาตรฐานกับค่าการทำนายจากสเปกตรัมด้วยเทคนิค FT – NIRS ของกลุ่มตัวอย่างที่ใช้ในการทวนสอบสมการแคลิเบรชัน 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

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

6. อัตราส่วนของค่าความผิดพลาดมาตรฐานของการทำนายต่อค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Ratio of Standard error of Prediction to Standard Deviation, RPD) เป็นอัตราส่วนระหว่างค่า SD ของตัวอย่างกลุ่มทวนสอบกับค่า SEP ($RPD = SD/SEP$) ใช้บอกความแม่นยำและประสิทธิภาพของสมการแคลิเบรชัน

ผลการวิจัย

เทคนิคสเปกโตรสโคปีอินฟราเรดย่านใกล้

สเปกตรัมก่อนการปรับแต่งจากเทคนิค FT-NIRS ของซ็อกโกแลตทั้ง 3 ประเภท ได้แก่ ดาร์กซ็อกโกแลต ซ็อกโกแลตนม และซ็อกโกแลตขาว จำนวน 86 ตัวอย่าง แสดงดังภาพที่ 1 หลังปรับแต่งสเปกตรัมด้วยการทำอนุพันธ์อันดับหนึ่งและปรับความแปรปรวนให้เป็นมาตรฐาน และใช้เทคนิคเคโมเมตริกซ์ระหว่างข้อมูลสเปกตรัมกับค่าที่ได้จากการวิเคราะห์ทางเคมีด้วยวิธี PLSR พบว่า regression coefficient plot ซึ่งแสดงแถบการดูดกลืนในช่วงเลขคลื่นที่มีอิทธิพลต่อ

สมการแคลิเบรชัน เกี่ยวข้องกับคาเทชิน 3 ช่วง ได้แก่ 9403.8–7498.4, 6102.1–5774.2 และ 4424.2–4246.8 cm^{-1} (ภาพที่ 2ก) และเกี่ยวข้องกับอีพิคาเทชิน 3 ช่วง ได้แก่ 9403.8–7498.4, 6102.1–5774.2 และ 4601.6–4424.2 cm^{-1} (ภาพที่ 2ข)

ปริมาณเฉลี่ยของคาเทชินและอีพิคาเทชินในช็อคโกแลตที่ได้จากการทำนายด้วยเทคนิค FT – NIRS ปรับแต่งสเปกตรัมก่อนการวิเคราะห์ด้วยการทำอนุพันธ์อันดับหนึ่งและปรับความแปรปรวนให้เป็นมาตรฐาน มีค่า 0.126 และ 0.612 มิลลิกรัม/กรัม ช็อคโกแลต ตามลำดับ ใกล้เคียงกับปริมาณเฉลี่ยของสารทั้งสองชนิดที่วิเคราะห์ได้จากเทคนิค HPLC ซึ่งเป็นวิธีมาตรฐาน ดังตารางที่ 1 โดยปริมาณสารทั้งสองชนิดที่ได้จากการทำนายไม่แตกต่างจากปริมาณจริงที่วิเคราะห์ได้จากวิธีมาตรฐานอย่างมีนัยสำคัญที่ความเชื่อมั่น 95%

ค่าที่ทำนายได้จากสเปกตรัมมีความสัมพันธ์กับค่าที่ได้จากวิธีมาตรฐาน จากภาพที่ 3 แสดงจุดข้อมูลจากกลุ่มที่ใช้สำหรับสร้างสมการแคลิเบรชันจำนวน 65 ตัวอย่าง และกลุ่มที่ใช้สำหรับการทดสอบความแม่นยำของสมการจำนวน 21 ตัวอย่างที่กระจายรอบเส้นเป้าหมาย (target line, $R^2 = 1$)

จากตารางที่ 2 ค่า R^2 ของคาเทชินและอีพิคาเทชินแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าทางเคมีกับการทำนายจากเทคนิค FT – NIRS ค่าที่ได้จากการทดลองนี้มีค่าอยู่ระหว่าง 0.880 – 0.922 ค่า SEC, SEP, RMSEP และ bias แสดงความคลาดเคลื่อนของการทำนาย ซึ่งค่าดังกล่าวของสารทั้งสองชนิดมีค่าน้อยมาก นอกจากนี้ค่า RPD ของคาเทชินและอีพิคาเทชินเท่ากับ 2.88 และ 3.16 ตามลำดับ

ปริมาณสารคาเทชินและอีพิคาเทชินเปรียบเทียบกับปริมาณโกโก้แมสที่ระบุบนฉลาก

อีพิคาเทชินเป็นสารโมเลกุลเดี่ยวในกลุ่มคาเทชินที่พบมากที่สุดในการช็อคโกแลต และมีปริมาณมากกว่าคาเทชินซึ่งเป็นสารในกลุ่มเดียวกัน เมื่อพิจารณาปริมาณคาเทชินและอีพิคาเทชินในคาร์คช็อคโกแลตและช็อคโกแลตนม พบว่าอีพิคาเทชินมีปริมาณมากกว่าคาเทชิน 2 – 6 เท่า (ตารางที่ 3) ซึ่งขึ้นอยู่กับปริมาณโกโก้แมสที่เป็นองค์ประกอบในผลิตภัณฑ์ สำหรับช็อคโกแลตขาวซึ่งไม่มีโกโก้แมสเป็นส่วนผสมจึงไม่พบสารดังกล่าวทั้งสองชนิด

ปริมาณโกโก้แมสที่ผู้ผลิตช็อคโกแลตระบุบนฉลากบรรจุภัณฑ์มีความสัมพันธ์เชิงเส้นกับปริมาณรวมของคาเทชินและอีพิคาเทชิน ปริมาณอีพิคาเทชิน และคาเทชิน ($R^2 = 0.6895$, 0.6785 และ 0.6834 ตามลำดับ) ดังภาพที่ 4 นอกจากนี้ปริมาณคาเทชินยังมีความสัมพันธ์เชิงเส้นกับปริมาณอีพิคาเทชิน ($R^2 = 0.8878$) ดังภาพที่ 5

สรุป

การใช้เทคนิค FT-NIRS ปรับแต่งสเปกตรัมด้วยการทำอนุพันธ์อันดับหนึ่งและปรับความแปรปรวนให้เป็นมาตรฐาน เปรียบเทียบข้อมูลสเปกตรัมกับค่าที่ได้จากการวิเคราะห์ทางเคมีด้วยวิธี PLSR เป็นวิธีที่พัฒนาขึ้นเพื่อใช้ในการทำนายปริมาณสารคาเทชินและอีพิคาเทชินในช็อคโกแลตที่สามารถทำได้อย่างรวดเร็วและถูกต้องแม่นยำ สารประกอบฟีนอลิกในกลุ่มคาเทชินโมเลกุลเดี่ยวที่พบมากที่สุดในการช็อคโกแลต คือ อีพิคาเทชิน โดยปริมาณคาเทชินและอีพิคาเทชินในคาร์คช็อคโกแลตมีมากกว่าในช็อคโกแลตนม และช็อคโกแลตขาว ปริมาณสารทั้งสองชนิดมีความสัมพันธ์เชิงเส้นกับปริมาณโกโก้แมสที่ใช้เป็นส่วนผสมในผลิตภัณฑ์ ผู้บริโภคสามารถประมาณปริมาณสารทั้งสองชนิดอย่างคร่าวๆ ได้จากร้อยละของโกโก้แมสที่ระบุบนฉลากบรรจุภัณฑ์ แต่ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับเมล็ดโกโก้และกระบวนการผลิตช็อคโกแลต



อภิปรายผล

เทคนิคสเปกโตรสโกปีอินฟราเรดย่านใกล้

คาเทชินและอีพิกาทะชินเป็นอนุพันธ์รูปแบบหนึ่งของสารในกลุ่มคาเทชิน ช่วงเลขคลื่นของสารทั้งสองชนิดจึงใกล้เคียงกัน ซึ่งล้วนมีความสัมพันธ์กับโมเลกุล OH และ CH สารประกอบฟีนอลิกส่วนใหญ่มีสเปกตรัมแสดงการดูดกลืน 3 ช่วงที่สำคัญ ได้แก่ เลขคลื่นช่วง $5000-4000\text{ cm}^{-1}$ (แถบคอมบิเนชันของ CH_3 และ CH_2 ที่ 4400 และ 4300 cm^{-1} ตามลำดับ แถบคอมบิเนชันของ OH ที่ $4850-2000\text{ cm}^{-1}$ และแถบโอเวอร์โทนอันดับสองการงอของ OH ที่ 4200 cm^{-1}) ช่วง $7000-6000\text{ cm}^{-1}$ แสดงแถบโอเวอร์โทนอันดับหนึ่งของหมู่แอลกอฮอล์ (alcoholic group) กับพันธะไฮโดรเจนภายในและระหว่างโมเลกุล และช่วง $9000-8000\text{ cm}^{-1}$ แสดงแถบโอเวอร์โทนอันดับสองของหมู่เมทิล (methyl group) และยังมีความสัมพันธ์กับวงแหวนอะโรมาติก CH [5]

ตารางที่ 1 แสดงให้เห็นประสิทธิภาพและความแม่นยำของการทำนายปริมาณสารในตัวอย่างด้วยเทคนิค FT-NIRS โดยเฉพาะสารคาเทชินที่ปริมาณเฉลี่ยจากการทำนายเท่ากับปริมาณเฉลี่ยจากวิธีมาตรฐาน ตัวอย่างช็อคโกแลตที่ใช้ในงานวิจัยนี้มีปริมาณโกโก้เมสตั้งแต่ร้อยละ 0-88 ทำให้ปริมาณสารทั้งสองชนิดจากแต่ละตัวอย่างมีความแตกต่างกันมาก ค่า SD จากการวิเคราะห์ด้วยวิธีมาตรฐานและการทำนายจึงมีค่าสูง เช่นเดียวกับปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดในเมล็ดโกโก้ที่มีการเก็บรักษาไว้นาน 0-21 วันก่อนนำมาหมักเพื่อให้ได้กลิ่นรสที่เหมาะสม ตรวจสอบด้วยเทคนิคเดียวกัน พบว่าค่าเฉลี่ยจากการวิเคราะห์ด้วยวิธีมาตรฐานและการทำนายใกล้เคียงกัน (11.08 และ 11.15 มิลลิกรัม/กรัม เมล็ดโกโก้ ตามลำดับ) และมีค่า SD สูงเนื่องจากสารดังกล่าวมีปริมาณลดลงในระหว่างการเก็บรักษา (2.41 และ 2.29 มิลลิกรัม/กรัม เมล็ดโกโก้ ตามลำดับ) [7]

ค่า R^2 ของคาเทชินและอีพิกาทะชินแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าจากวิธีมาตรฐานกับค่าการทำนายจากเทคนิค FT-NIRS ค่าที่ได้จากการทดลองนี้มีค่าอยู่ระหว่าง 0.880 - 0.922 (ตารางที่ 2) ซึ่งสามารถนำไปประยุกต์ใช้ได้ในงานทั่วไปและนำไปใช้ในงานประกันคุณภาพ [8] สอดคล้องกับงานวิจัยของ [6-7] ค่า R^2 ของสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดและอีพิกาทะชินสามารถนำไปประยุกต์ใช้ได้ในลักษณะใกล้เคียงกัน

ค่า SEC, SEP, RMSEP และ bias แสดงความคลาดเคลื่อนของการทำนาย ซึ่งค่าดังกล่าวของสารทั้งสองชนิดมีค่าน้อยมาก (ตารางที่ 2) สอดคล้องกับงานวิจัยของ [5-6, 7, 9] โดยค่า bias สามารถเป็นได้ทั้งค่าบวกและค่าลบ ถ้าเป็นค่าบวกมีความหมายว่าแบบจำลองมีค่าจากวิธีมาตรฐานมากกว่าจากการทำนาย แต่ถ้าเป็นค่าลบความหมายจะเป็นในทางตรงกันข้าม หากค่า bias มีค่ามาก (ทั้งทางบวกและทางลบ) หมายถึงค่าที่ได้จากการทำนายมีความแปรปรวนอย่างน้อยที่สำคัญกับค่าที่ได้จากวิธีมาตรฐาน [10]

ค่า RPD ของคาเทชินและอีพิกาทะชินเท่ากับ 2.88 และ 3.16 ตามลำดับ (ตารางที่ 2) พบว่าสมการแคลิเบรชันสามารถนำไปประยุกต์ใช้ได้ไม่ด้นัก [9] 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 [11]

นอกจากค่าทางสถิติที่กล่าวมาในข้างต้น จำนวนตัวแปรที่เกี่ยวข้องซึ่งนำมาคำนวณหาปริมาณสารทั้งสองชนิดก็มีความสำคัญเช่นกัน โดยงานวิจัยนี้มีจำนวนตัวแปรทั้งหมด 9 ตัว จำนวนตัวแปรที่เหมาะสมคือต้องมีจำนวนไม่เกินหนึ่งในหกของจำนวนตัวอย่างที่ใช้สร้างสมการแคลิเบรชัน หากมีตัวแปรมากกว่าจำนวนดังกล่าวจะทำให้เกิดปรากฏการณ์ที่จุดข้อมูลเข้าใกล้เส้นเป้าหมายมากกว่าความเป็นจริง (over-fitting) แต่หากตัวแปรมีจำนวนน้อยกว่าจำนวนนั้นมากจะเกิดปรากฏการณ์ที่จุดข้อมูลกระจายจากเส้นเป้าหมายผิดจากความเป็นจริง (under-fitting) [12-13]

ทั้งนี้การกำหนดจำนวนตัวแปรควรพิจารณาร่วมกับค่าทางสถิติอื่นๆ เพื่อให้ได้สมการแคลิเบรชันที่มีความถูกต้องแม่นยำ

ปริมาณสารคาเทชินและอีพิกาทะชินเปรียบเทียบกับปริมาณโกล์แมสที่ระบุบนฉลาก

อีพิกาทะชินเป็นสารโมเลกุลเดี่ยวในกลุ่มคาเทชินที่พบมากที่สุดในช็อกโกแลต และมีปริมาณมากกว่าคาเทชินซึ่งเป็นสารในกลุ่มเดียวกัน (ตารางที่ 3) สอดคล้องกับงานวิจัยของ [14] ระบุว่าอัตราส่วนระหว่างอีพิกาทะชินกับคาเทชินเท่ากับ 1:0.39 สำหรับช็อกโกแลตขาวซึ่งไม่มีโกล์แมสเป็นส่วนผสมจึงไม่พบสารดังกล่าวทั้งสองชนิด หากเปลี่ยนวิธีวิเคราะห์จากเทคนิค HPLC เป็นเทคนิคสเปกโตรโฟโตเมตรี (spectrophotometry) ซึ่ง [15] ใช้เป็นวิธีวิเคราะห์ปริมาณฟลาโวนอยด์และปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด ช็อกโกแลตขาวจะพบปริมาณสารในกลุ่มฟลาโวนอยด์เนื่องจากวานิลลิน (vanillin) ซึ่งเป็นสารให้กลิ่นรสของวานิลลาที่เป็นส่วนผสมหนึ่งในช็อกโกแลต มีโครงสร้างทางเคมีเป็นวงแหวนฟีนอลคล้ายกับโครงสร้างของคาเทชินและฟลาวานอล [16-17] ดังนั้น ถ้าเลือกใช้เทคนิคดังกล่าววิเคราะห์ปริมาณฟลาโวนอยด์หรือปริมาณสารในกลุ่มฟลาวานอล เช่น คาเทชิน และอีพิกาทะชิน จะทำให้ผลการวิเคราะห์คลาดเคลื่อนจากความเป็นจริง

เมื่อโกล์แมสมีปริมาณเพิ่มขึ้น ปริมาณคาเทชินและอีพิกาทะชินก็มีค่าเพิ่มขึ้นเช่นเดียวกัน (ตารางที่ 3) เนื่องจากโกล์แมสซึ่งเป็นส่วนผสมสำคัญที่ให้สีน้ำตาลในช็อกโกแลต โกล์แมสมีไขมันเป็นองค์ประกอบร้อยละ 54–55 [1] กล่าวคือเป็นส่วนที่ไม่มีไขมันอยู่ร้อยละ 45–46 โดยส่วนที่ไม่มีไขมันเป็นองค์ประกอบที่มีสารประกอบฟีนอลิกปริมาณมาก เพราะสารประกอบฟีนอลิกเป็นไฮโดรฟิลิก (hydrophilic) หรือส่วนที่ชอบน้ำ และมีแนวโน้มที่จะพบสารดังกล่าวในองค์ประกอบที่ไม่มีไขมันของโกล์แมสและช็อกโกแลต [18]

จากภาพที่ 4 ร้อยละโกล์แมสที่ระบุบนฉลากบรรจุภัณฑ์มีความสัมพันธ์เชิงเส้นกับปริมาณรวมของคาเทชินและอีพิกาทะชิน ($R^2 = 0.6895$) สอดคล้องกับงานวิจัยของ [14, 18] รายงานว่าปริมาณโกล์แมสในช็อกโกแลตมีความสัมพันธ์กับปริมาณรวมของสารทั้งสองชนิดเช่นเดียวกัน ($R^2 = 0.680$)

ปริมาณคาเทชินมีความสัมพันธ์เชิงเส้นกับปริมาณอีพิกาทะชิน (ภาพที่ 5) ผลการวิเคราะห์ดังกล่าวไม่สอดคล้องกับงานวิจัยส่วนหนึ่งของ [19] ที่รายงานว่าค่าสัมประสิทธิ์แสดงความสัมพันธ์เชิงเส้นระหว่างปริมาณสารทั้งสองชนิดในตัวอย่างช็อกโกแลตมีค่าค่อนข้างต่ำ ($R^2 = 0.456$) สาเหตุที่ผลวิเคราะห์ไม่สอดคล้องกันอาจเป็นเพราะงานวิจัยดังกล่าวใช้ตัวอย่างจำนวน 41 ตัวอย่าง (โกล์แมสร้อยละ 20–90) แต่งานวิจัยนี้มีตัวอย่างที่ระบุปริมาณส่วนประกอบดังกล่าวจำนวน 80 ตัวอย่าง (โกล์แมสร้อยละ 0–88) จำนวนตัวอย่างที่มากกว่าและมีปริมาณโกล์แมสที่หลากหลายมากกว่าส่งผลต่อการกระจายของข้อมูล และทำให้ค่า R^2 ที่ได้แตกต่างกัน

ผลิตภัณฑ์ช็อกโกแลตที่นำมาเป็นตัวอย่างในงานวิจัยนี้มีร้อยละของส่วนผสมจากโกล์แมส เนยโกโก้ น้ำตาล และนมผง (มีเฉพาะในช็อกโกแลตนม และช็อกโกแลตขาว) ที่แตกต่างกัน แม้ว่าผู้ผลิตช็อกโกแลตบางรายใช้โกล์แมสเป็นส่วนผสมในปริมาณที่เท่ากัน แต่ปริมาณคาเทชินและอีพิกาทะชินที่วิเคราะห์ได้อาจแตกต่างกัน เนื่องจากปริมาณสารประกอบฟีนอลิกขึ้นอยู่กับแหล่งที่ปลูกโกโก้ สภาพการผลิตในระหว่างการหมักและการทำแห้งเมล็ดโกโก้ กระบวนการอัลคาไลเซชัน รวมถึงกระบวนการผลิตช็อกโกแลต [19-20, 21]



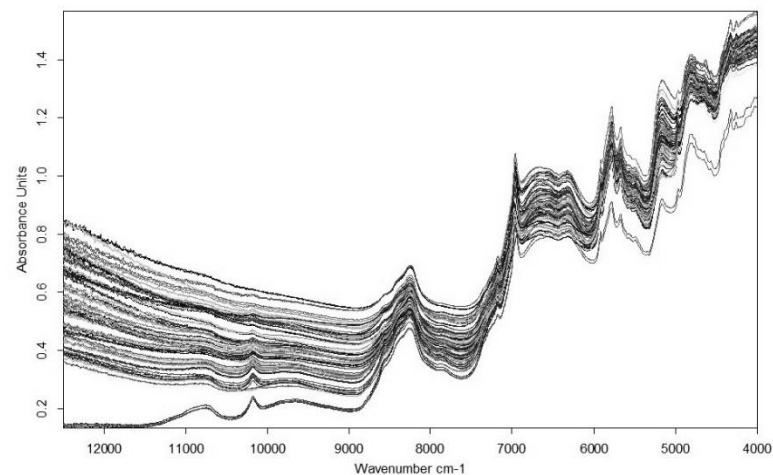
กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากสถาบันวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยศิลปากร ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2557 ผู้วิจัยต้องขอขอบพระคุณภาควิชาเทคโนโลยีอาหาร คณะวิศวกรรมศาสตร์และเทคโนโลยีอุตสาหกรรม มหาวิทยาลัยศิลปากรที่ได้ให้การสนับสนุนเครื่องมือและสถานที่ตลอดระยะเวลาดำเนินงานวิจัย

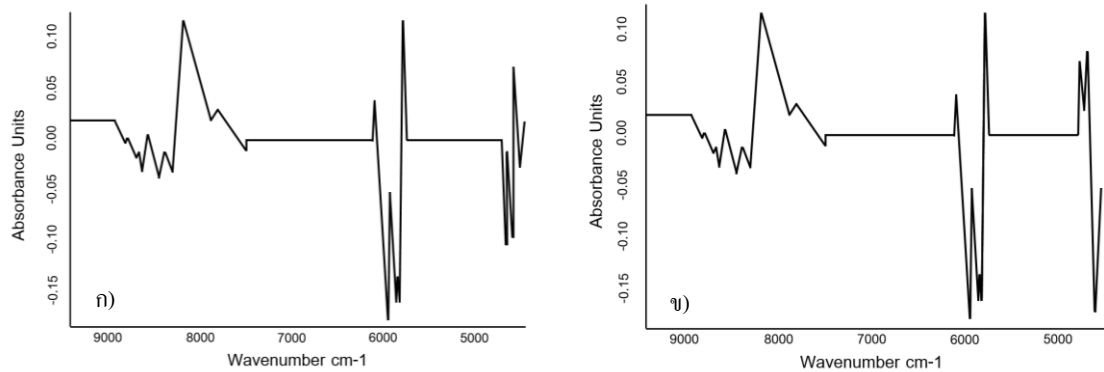
เอกสารอ้างอิง

1. Supimarod S. Technology of Confectionery and Chocolate. Bangkok: Chula Press; 2000. Thai.
2. Desch S, Kobler D, Schmidt J, Sonabend M, Adams V, Sareban M, Eitel I, Blüher M, Schuler G, Thiele H. Low vs. higher-dose dark chocolate and blood pressure in cardiovascular high-risk patients. American journal of hypertension. 2010; 23(6): 694-700.
3. Langer S, Marshall LJ, Day AJ, Morgan MR. Flavanols and methylxanthines in commercially available dark chocolate: a study of the correlation with nonfat cocoa solids. Journal of agricultural and food chemistry. 2011; 59(15): 8435-8441.
4. Shumow L, Bodor A. 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. 2011; 5(1):1.
5. Bedini A, Zanolli V, Zanardi S, Bersellini U, Dalcaneale E, Suman M. Rapid and simultaneous analysis of xanthines and polyphenols as bitter taste markers in bakery products by FT-NIR spectroscopy. Food Analytical Methods. 2013; 6(1): 17-27.
6. Krämer A, Engel A, Kadow D, Ali N, Umaharan P, Kroh LW, Schulz H. Fast and neat-Determination of biochemical quality parameters in cocoa using near infrared spectroscopy. Food chemistry. 2015; 181: 152-9.
7. Sunoj S, Igathinathane C, Visvanathan R. Nondestructive determination of cocoa bean quality using FT-NIR spectroscopy. Computers and Electronics in Agriculture. 2016; 124: 234-242.
8. Williams PC. Implementation of near-infrared technology. Near-infrared technology in the agricultural and food industries. 2001; 2: 143-167.
9. Álvarez C, Pérez E, Cros E, Lares M, Assemat S, Boulanger R, Davrieux F. 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. 2012; 20(2): 307-315.
10. Cantor SL, Hoag SW, Ellison CD, Khan MA, Lyon RC. NIR spectroscopy applications in the development of a compacted multiparticulate system for modified release. AAPS PharmSciTech. 2011; 12(1): 262-278.
11. Sirisomboon P. Technology Near Infrared Spectroscopy for Agricultural Products and Foodstuffs [Internet]. 2013 [updated 2013 Jan 28; cited 2016 May 29]. Available from: <http://www.nirsresearch.com/>. Thai.
12. Kemsley EK. Discriminant analysis and class modelling of spectroscopic data. Chichester, UK: Wiley; 1998.
13. Westad F, Marini F. Validation of chemometric models—a tutorial. Analytica chimica acta. 2015; 893: 14-24.

14. Cooper KA, Campos-Giménez E, Jiménez Alvarez D, Rytz A, Nagy K, Williamson G. Predictive relationship between polyphenol and nonfat cocoa solids content of chocolate. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2008; 56(1): 260-265.
15. Pimentel FA, Nitzke JA, Klipel CB, de Jong EV. Chocolate and red wine—A comparison between flavonoids content. *Food Chemistry*. 2010; 120(1): 109-112.
16. Sarkar SK, Howarth RE. Specificity of the vanillin test for flavanols. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 1976; 24(2): 317-320.
17. Sun B, Ricardo-da-Silva JM, Spranger I. Critical factors of vanillin assay for catechins and proanthocyanidins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 1998; 46(10): 4267-4274.
18. Miller KB, Stuart DA, Smith NL, Lee CY, McHale NL, Flanagan JA, et al. 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*. 2006; 54(11): 4062-4068.
19. Alañón ME, Castle SM, Siswanto PJ, Cifuentes-Gómez T, Spencer JP. Assessment of flavanol stereoisomers and caffeine and theobromine content in commercial chocolates. *Food chemistry*. 2016; 208: 177-184.
20. Cooper KA, Campos-Giménez E, Jiménez Alvarez D, Nagy K, Donovan JL, Williamson G. 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*. 2007; 55(8): 2841-2847.
21. Gu L, House SE, Wu X, Ou B, Prior RL. Procyanidin and catechin contents and antioxidant capacity of cocoa and chocolate products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2006; 54(11): 4057-4061.



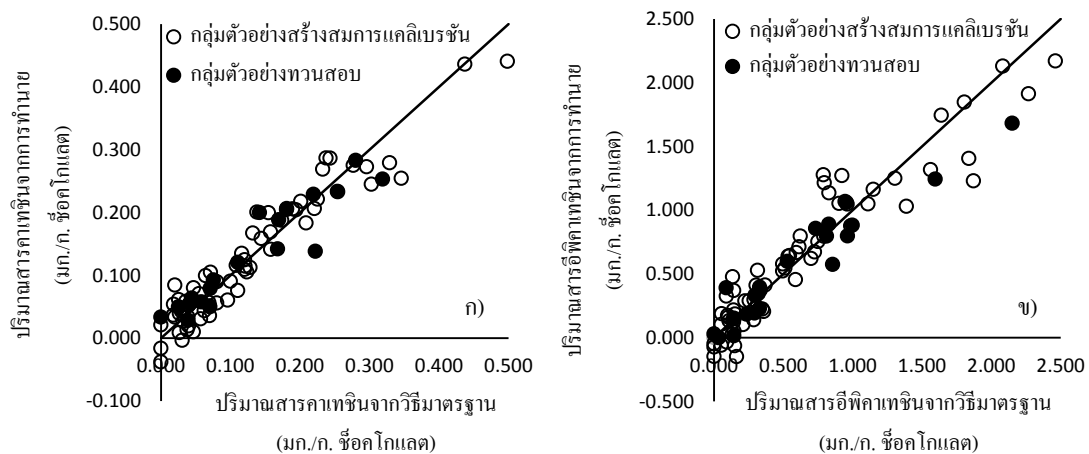
ภาพที่ 1 สเปกตรัมก่อนการปรับแต่งของคาร์คช็อคโกแลต ช็อคโกแลตนม และช็อคโกแลตขาว จำนวน 86 ตัวอย่าง ด้วยเทคนิค FT – NIRS



ภาพที่ 2 regression coefficient plot ของสมการแคลิเบรชันที่สร้างด้วยการถดถอยกำลังสองน้อยที่สุดบางส่วนของคาเทชิน (ก) และอีพิคาเทชิน (ข)

ตารางที่ 1 ค่าที่ได้จากการทำนายเปรียบเทียบกับค่าจากวิธีมาตรฐานของปริมาณคาเทชินและอีพิคาเทชิน

	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
อีพิคาเทชิน	0.000 – 2.462	0.623	0.592	-0.149 – 2.170	0.612	0.548



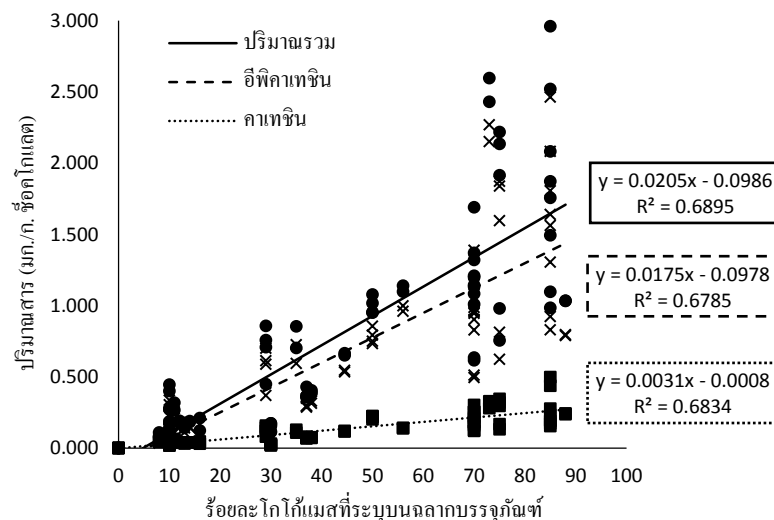
ภาพที่ 3 ความสัมพันธ์ระหว่างค่าที่ได้จากวิธีมาตรฐานกับค่าที่ทำนายได้จากเทคนิค FT – NIRS ของคาเทชิน (ก) และอีพิคาเทชิน (ข)

ตารางที่ 2 ค่าทางสถิติของผลการวิเคราะห์

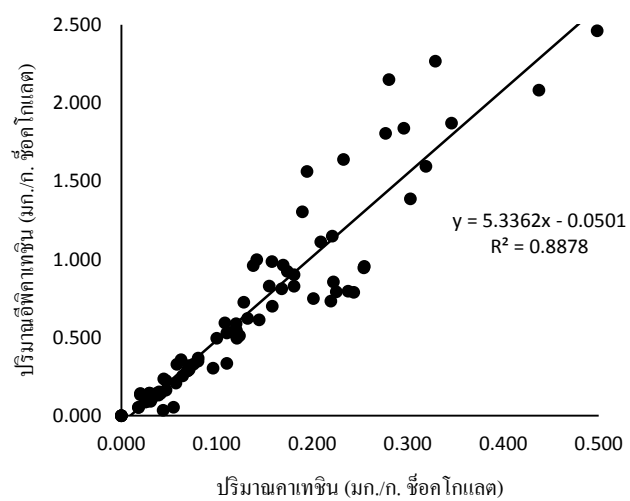
	สมการแคลิเบรชัน			การทวนสอบสมการแคลิเบรชัน				
	R^2_{cal}	SEC	R^2_{val}	SEP	Bias	RMSEP	RPD	SD
คาเทชิน	0.922	0.033	0.880	0.032	-0.0005	0.032	2.88	0.093
อีพิกาทะชิน	0.898	0.210	0.892	0.172	0.0437	0.174	3.16	0.543

ตารางที่ 3 ปริมาณสารคาเทชินและอีพิกาทะชินเฉลี่ยในคาร์กช็อคโกแลต ช็อคโกแลตนม และช็อคโกแลตขาว

ประเภทของ ช็อคโกแลต	ปริมาณคาเทชินเฉลี่ย $\pm$ SD (มก./ก. ช็อคโกแลต)	ปริมาณอีพิกาทะชินเฉลี่ย $\pm$ SD (มก./ก. ช็อคโกแลต)
คาร์กช็อคโกแลต (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
ช็อคโกแลตนม (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
ช็อคโกแลตขาว (โกโก้แมส 0%)	ไม่พบ	ไม่พบ



ภาพที่ 4 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างร้อยละของโกโก้แมสที่ระบุบนบรรจุภัณฑ์กับปริมาณรวมของคาเทชินและอีพิกาทะชิน (●) ปริมาณอีพิกาทะชิน (×) และปริมาณคาเทชิน (■)



ภาพที่ 5 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณคาเฟอีนกับปริมาณอีพิคาเทชิน