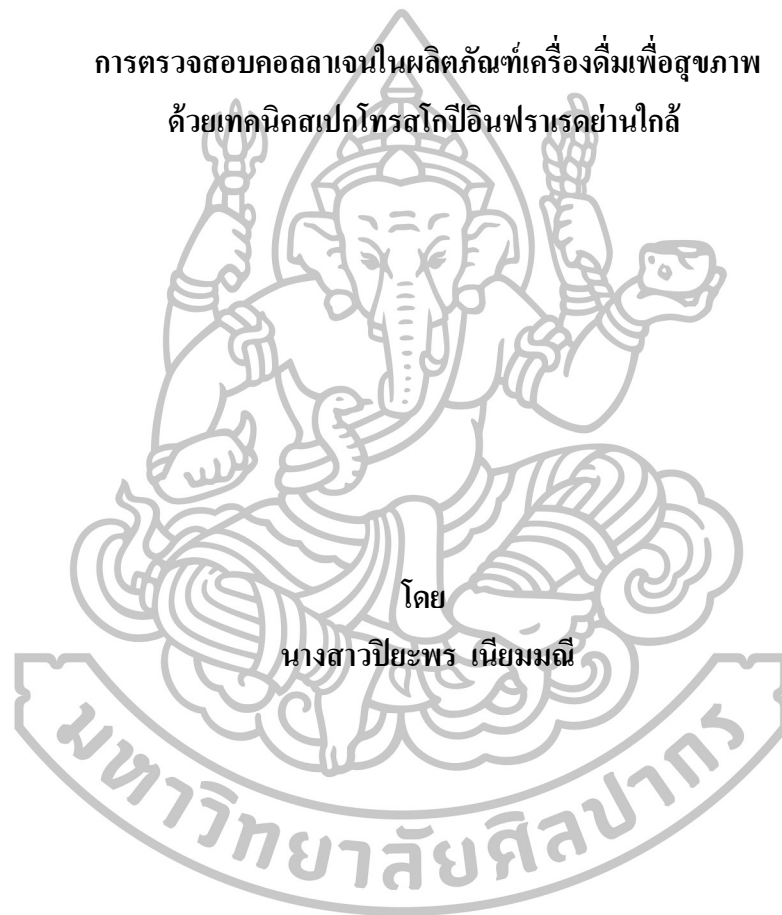




การตรวจสอบคอลลาเจนในผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มเพื่อสุขภาพ
ด้วยเทคนิคสเปกโทรสโกปีอินฟราเรดย่านใกล้



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเทคโนโลยีอาหาร

ภาควิชาเทคโนโลยีอาหาร

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร

ปีการศึกษา 2559

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร

การตรวจสอบคอลลาเจนในผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มเพื่อสุขภาพ
ด้วยเทคนิคสเปกโทรสโกปีอินฟราเรดย่านใกล้



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีอาหาร
ภาควิชาเทคโนโลยีอาหาร
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร
ปีการศึกษา 2559
ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร

**THE DETERMINATION OF COLLAGEN IN FUNCTIONAL DRINK
USING NEAR-INFRARED SPECTROSCOPY**



A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree

Master of Science Program in Food Technology

Department of Food Technology

Graduate School, Silpakorn University

Academic Year 2016

Copyright of Graduate School, Silpakorn University

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร อนุมัติให้วิทยานิพนธ์เรื่อง “ การตรวจสอบคอลลาเจนในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางค์เพื่อสุขภาพด้วยเทคนิคสเปกโทรสโกปีอินฟราเรดย่านใกล้ ” เสนอโดยนางสาวปิยะพร เนียมมณี เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีอาหาร

.....
(รองศาสตราจารย์ ดร.ปานใจ ธารทัศน์วงศ์)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่.....เดือน..... พ.ศ.....

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.บุศราภรณ์ มหาโยธี

คณะกรรมการตรวจสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปราโมทย์ คูวิจิตรจารุ)

...../...../.....

..... กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.รณฤทธิ์ ฤทธิธรรณ)

...../...../.....

..... กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.บุศราภรณ์ มหาโยธี)

...../...../.....



56403211 : สาขาวิชาเทคโนโลยีอาหาร

คำสำคัญ : เครื่องดื่มเพื่อสุขภาพ คอลลาเจน ไฮดรอกซีโพรลีน วิธีตรวจสอบแบบไม่ทำลาย

ปิยะพร เนียมมณี : การตรวจสอบคอลลาเจนในผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มเพื่อสุขภาพด้วยเทคนิคสเปกโทรสโกปีอินฟราเรดย่านใกล้. อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ : ผศ.ดร.บุศราภรณ์ มหาโยธี. 171 หน้า.

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความเป็นไปได้ในการตรวจสอบปริมาณคอลลาเจนในผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มเพื่อสุขภาพด้วยเทคนิคสเปกโทรสโกปีอินฟราเรดย่านใกล้ (Near Infrared Spectroscopy, NIRS) โดยแบ่งการศึกษาออกเป็น 3 ขั้นตอน ได้แก่ (1) การศึกษาความเป็นไปได้ในการใช้เทคนิค NIRS ในการติดตามปริมาณคอลลาเจนในสารละลายคอลลาเจนที่เตรียมจากคอลลาเจนทางการค้า จำนวน 110 ตัวอย่าง (2) การศึกษาอิทธิพลของวัตถุดิบอาหาร ได้แก่ น้ำตาลซูโครส วิตามินซี โซเดียมเบนโซเอท และ ซิงค์กลูโคเนต ต่อการวัดปริมาณคอลลาเจนด้วยเทคนิค NIRS ในสารละลายคอลลาเจนที่เตรียมจากคอลลาเจนทางการค้า จำนวน 630 ตัวอย่าง และ (3) การศึกษาความเป็นไปได้ของการใช้เทคนิค NIRS ในการติดตามปริมาณคอลลาเจนในตัวอย่างผลิตภัณฑ์น้ำผลไม้เสริมคอลลาเจนที่มีวางจำหน่ายภายในประเทศ จำนวน 114 ตัวอย่าง ทำการวัดสเปกตรัมในช่วง $12500-4000\text{ cm}^{-1}$ ด้วยรูปแบบการวัดแบบส่องผ่านสะท้อนกลับ ที่ค่าความสามารถในการแยกพิค 8 cm^{-1} และจำนวนครั้งของการสแกนตัวอย่าง 32 ครั้ง ควบคุมอุณหภูมิของตัวอย่างก่อนการวัดสเปกตรัมที่ 30 ± 1 องศาเซลเซียส ซึ่งเป็นอุณหภูมิที่ใช้ในการขนส่งและเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ทำการวัดสเปกตรัมตัวอย่างละ 3 ซ้ำของทั้ง 3 การศึกษา ในการศึกษาที่ 1 และ 2 สร้างสมการหาความสัมพันธ์ระหว่างข้อมูลสเปกตรัมเฉลี่ยกับปริมาณคอลลาเจนที่เตรียมได้ ด้วยวิธีการถดถอยกำลังสองน้อยที่สุดบางส่วน (PLSR) พบว่าการศึกษาความเป็นไปได้ในการใช้เทคนิค NIRS ในการติดตามปริมาณคอลลาเจนในสารละลายคอลลาเจน โดยปรับแต่งสเปกตรัมของสารละลายคอลลาเจนด้วยวิธีอนุพันธ์อันดับสอง พบพิคของคอลลาเจนในช่วงเลขคลื่น $7486-6896, 5500-4998$ และ $4701-3999\text{ cm}^{-1}$ ซึ่งมีตำแหน่งพิคที่ตรงกับการวัดสเปกตรัมคอลลาเจนผง ในการศึกษาอิทธิพลของวัตถุดิบอาหารต่อการวัดปริมาณคอลลาเจนด้วยเทคนิค NIRS ในสารละลายคอลลาเจน พบว่าวัตถุดิบอาหารชนิดที่ศึกษาที่ความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสร้อยละ 10 วิตามินซีร้อยละ 0.10 โซเดียมเบนโซเอท 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร และซิงค์กลูโคเนตร้อยละ 0.10 ไม่ส่งผลต่อการสร้างสมการเทียบมาตรฐานคอลลาเจน แต่จะทำให้ตำแหน่งการดูดกลืนแสงของคอลลาเจนเบี่ยงเบนไปเล็กน้อย ในการศึกษาส่วนที่ 3 เมื่อวัดสเปกตรัมตัวอย่างเครื่องดื่มแล้วจะนำตัวอย่างเครื่องดื่มไปวิเคราะห์คุณภาพทางเคมีเบื้องต้นและปริมาณคอลลาเจนด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงที่ต่อกับตัวตรวจวัดสัญญาณชนิดฟลูออเรสเซนส์ จากนั้นสร้างสมการหาความสัมพันธ์ระหว่างข้อมูลสเปกตรัมเฉลี่ยกับค่าทางเคมี ด้วยวิธีการถดถอยกำลังสองน้อยที่สุดบางส่วน (PLSR) พบว่าสมการที่เหมาะสมที่ให้ค่าการทำนายที่ดีที่สุดมีค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (coefficients of determination, R^2) เท่ากับ 0.973 ค่าความคลาดเคลื่อนในการทำนาย (root mean square error of prediction, RMSEP) เท่ากับ 3,510 มิลลิกรัมต่อลิตร และมีค่าสัดส่วนระหว่างส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานกับค่าความผิดพลาดมาตรฐานในการทำนายของกลุ่มทดสอบสมการ (RPD) เท่ากับ 6.13 โดยมีร้อยละความถูกต้องของการทำนายเท่ากับร้อยละ 80 แต่ยังคงให้ค่าความผิดพลาดในการทำนายที่สูง เมื่อนำค่าทางเคมีที่วิเคราะห์ไปคำนวณหาค่า standard error of laboratory (SEL) มีค่าเท่ากับ 12,221.62 mg/L ซึ่งมีค่ามากกว่าค่าความคลาดเคลื่อนของการวิเคราะห์ด้วย NIRS (SEP) โดยสมการเทียบมาตรฐานของผลิตภัณฑ์น้ำผลไม้เสริมคอลลาเจน มีค่าเท่ากับ 3,574 mg/L พบว่า มีค่า SEL ที่สูงกว่า SEP เนื่องจากวัตถุดิบที่ใช้ในการสกัดคอลลาเจนที่ต่างชนิดกันและเมื่อสร้างสมการเทียบมาตรฐานด้วยวิธี MLR ของตัวอย่างผลิตภัณฑ์น้ำผลไม้เสริมคอลลาเจน พบว่า ให้ค่าการทำนายที่ดี ด้วยการใช้เลขคลื่นจำนวน 9 เลขคลื่น ได้แก่ 7351, 7166, 5303, 5191, 4971, 4968, 4748, 4451 และ 4215 cm^{-1} โดยให้ประสิทธิภาพของการทำนาย แสดงค่า R^2 เท่ากับ 0.939 RMSECV เท่ากับ 6697 และ Bias เท่ากับ 31.2 แต่สมการนี้ยังให้ค่าความคลาดเคลื่อนที่สูง เนื่องจากปริมาณคอลลาเจนในตัวอย่างเครื่องดื่มยังไม่หลากหลาย สามารถปรับปรุงสมการได้โดยการเพิ่มจำนวนตัวอย่างเพื่อทำให้สมการทำนายมีประสิทธิภาพที่ดีขึ้น

ภาควิชาเทคโนโลยีอาหาร

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร

ลายมือชื่อนักศึกษา.....

ปีการศึกษา 2559

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์.....

56403211 : MAJOR : FOOD TECHNOLOGY

KEY WORD : FUNCTIONAL DRINK, COLLAGEN, HYDROXYPROLINE, NON-DESTRUCTIVE

PIYAPORN NEAMMANEE : THE DETERMINATION OF COLLAGEN IN FUNCTIONAL DRINK
USING NEAR-INFRARED SPECTROSCOPY. THESIS ADVISOR : ASST.PROF.BUSARAKORN MAHAYOTHEE, Ph.D..
171 pp.

The aim of this research was the feasibility of Near Infrared Spectroscopy (NIRS) for collagen content determination in commercial functional drinks. This research was divided into three parts. Part one was to study the feasibility of NIRS for determining collagen solution which was prepared by commercial collagen from a total of 110 samples. Part two was to study the influences of food additive on collagen solution determining by NIRS for example, sugar, ascorbic acid, zincgluconate and sodiumbenzoate from a total of 630 samples which was prepared by commercial collagen. Part three was to study the feasibility of NIRS for collagen content determination in commercial functional drinks in the country from a total of 114 samples. All samples were measured using NIRS in the region of 12500-4000 cm^{-1} and using transmittance mode at 8 cm^{-1} resolution and were scanned 32 times. Prior to spectral measurements, the temperature of the samples was adjusted to $30 \pm 1^\circ\text{C}$ which used for transporting and storing products for 1 hour. The samples of three parts were measured the spectra in triplicate. Part one and Part two, calibration models obtained from partial least squares (PLS) regression using the average spectral data and actual collagen content in prepared sample solutions. In Part one, it was found that second derivative spectra at wavenumber of 7486-6896, 5500-4998 and 4701-3999 cm^{-1} were related to the peak that found in raw spectra of collagen powder. In Part two, the addition of sugar 10%, ascorbic acid 0.1%, sodiumbenzoate 1,000 mg/L and zincgluconate 0.1% did not affect calibration models. On the other hand, the absorption of collagen position was slightly refracted. In Part three, the samples were taken to determine the chemical quality content and collagen content by High Performance Liquid Chromatography (HPLC) equipped with fluorescence detector. Moreover, calibration model was developed by applying partial least squares (PLS) regression using the average spectra data and reference measurement of collagen content. The optimum model for predicting collagen content in commercial functional drinks was showed the coefficients of determination (R^2) = 0.973, root mean square error of prediction (RMSEP) = 3,510 mg/L and Ratio of standard error of prediction to standard deviation (RPD) = 6.13 and 80 percentage of accuracy and gave a high error of prediction. After that, the chemical data were analyzed the standard error of the laboratory (SEL)=12,221.62 mg/L, which was higher than the NIRS analysis error (SEP)=3,574 mg/L because the raw materials were used to extract collagen from different sources. Multiple linear regression (MLR) was used to develop the calibration model using the full cross-validation method. The performance of calibration model shows $R^2=0.939$, RMSECV=6,697 mg/L and Bias=31.2 by using wavenumber of the 7351, 7166, 5303, 5191, 4971, 4968, 4748, 4451 and 4215 cm^{-1} . However, this model gave a high error of prediction because the collagen content was not various. Thus, the model could be improved to be more accuracy by increasing the number of samples.

Department of Food Technology

Graduate School, Silpakorn University

Student's signature

Academic Year 2016

Thesis Advisor's signature.....

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สามารถสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.บุศราภรณ์ มหาโยธี ที่กรุณาให้คำแนะนำ แนวทางในการทำงานวิจัย พร้อมทั้งข้อเสนอแนะในการแก้ไขปัญหา ปรับปรุงให้งานวิจัยนี้มีความถูกต้องและสมบูรณ์ ตลอดจนความดูแล การดำเนินงานวิจัย จนสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากเงินงบประมาณแผ่นดินประจำปี 2557 ผ่านสถาบันวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยศิลปากร ภายใต้ชุดโครงการวิจัย เรื่อง “การพัฒนาวิธีตรวจสอบอย่างรวดเร็วเพื่อวิเคราะห์สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ” โครงการย่อยเรื่อง นวัตกรรมตรวจสอบแอลคาร์นิทีนและคอลลาเจนในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางด้วยเครื่องสเปกโตรสโกปีอินฟราเรดย่านใกล้ เลขที่ SURDI 57/02/02.02 ผู้วิจัยขอขอบพระคุณเป็นอย่างสูง

ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปราโมทย์ คุวิจิตรจรัส ประธานกรรมการสอบ ที่ให้คำแนะนำ ความช่วยเหลือและคำปรึกษาในเรื่องการวิเคราะห์ข้อมูล การวิเคราะห์ค่าทางเคมี และวิธีการวิเคราะห์ HPLC ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.รณฤทธิ์ ฤทธิธรม ที่ให้เกียรติเป็นกรรมการผู้ทรงคุณวุฒิภายนอก รวมทั้งความรู้ความเข้าใจเรื่องเทคนิค NIRS และให้คำแนะนำด้านการวิเคราะห์ผล NIRS

ขอขอบพระคุณ อาจารย์ ดร.ศราวุธ ภูไพจิตรกุล ที่ให้คำปรึกษาในด้านการวิเคราะห์ผล NIRS และขอขอบพระคุณ อาจารย์ หิรัญรัตน์ สุวรรณนที ที่ให้ความช่วยเหลือและให้คำปรึกษาด้านวิธีการวิเคราะห์ปริมาณคอลลาเจนด้วยเทคนิคโครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC)

ขอขอบคุณ ศูนย์บริการประกันคุณภาพอาหาร สถาบันคั้นคว่ำและพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหาร ที่ให้ความอนุเคราะห์ ให้คำปรึกษาและชี้แนะวิธีการวิเคราะห์ปริมาณคอลลาเจน

ขอขอบพระคุณ คณาจารย์ภาควิชาเทคโนโลยีอาหาร คณะวิศวกรรมศาสตร์และเทคโนโลยีอุตสาหกรรม มหาวิทยาลัยศิลปากร ที่ให้ความรู้พื้นฐานและประสิทธิ์ประสาทความรู้ต่างๆ แก่ผู้วิจัยตลอดระยะเวลาที่ศึกษา และขอขอบคุณ นักวิทยาศาสตร์และเจ้าหน้าที่ประจำภาควิชาเทคโนโลยีอาหารทุกท่าน ที่อำนวยความสะดวกในการใช้เครื่องมือวิทยาศาสตร์ และดำเนินงานธุรการ

ขอขอบคุณ นางสาวณิชชฎา เนียมมณี ที่คอยช่วยเหลือในการเตรียมตัวอย่างและอุปกรณ์ในการวิจัยนี้ และขอขอบพระคุณบุคคลในครอบครัวที่ให้โอกาสในการศึกษานี้ ตลอดจนให้กำลังใจ และสนับสนุนการศึกษาของผู้วิจัยเสมอมา

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ฅ
สารบัญภาพ.....	ฐ
บทที่	
1 บทนำ.....	1
1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย.....	1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย.....	3
1.3 สมมติฐานของงานวิจัย.....	4
1.4 ขอบเขตของงานวิจัย.....	4
2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	6
2.1 คอลลาเจน.....	9
2.1.1 โครงสร้างของคอลลาเจน.....	9
2.1.2 วัตถุประสงค์ที่ใช้ในการสกัดคอลลาเจน.....	10
2.1.3 วิธีที่ใช้ในการสกัดคอลลาเจน.....	11
2.1.4 วิธีการวิเคราะห์ปริมาณคอลลาเจน.....	12
2.2 การผลิตเครื่องตีผสมคอลลาเจน.....	15
2.3 เทคนิคสเปกโทรสโกปีอินฟราเรดย่านใกล้.....	17
2.4 การประยุกต์ใช้เทคนิค NIRS ในการวิเคราะห์สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ.....	21
2.4.1 การใช้เทคนิค NIRS ในการวิเคราะห์ตัวอย่างที่เป็นของเหลว.....	22
2.4.2 เทคนิคที่ใช้ในการสร้างสมการเทียบมาตรฐาน.....	24
2.5 อิทธิพลขององค์ประกอบที่ซับซ้อนในอาหารต่อการวัดสเปกตรัมด้วยเทคนิค NIRS.....	26
3 วิธีดำเนินการวิจัย.....	32
3.1 วัตถุประสงค์.....	32
3.1.1 วัตถุประสงค์และอุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย.....	32

บทที่	หน้า
3.1.2 สารเคมี.....	32
3.1.3 เครื่องมือ	33
3.2 วิธีการทดลอง.....	34
3.2.1 การศึกษาความเป็นไปได้ในการใช้เทคนิคสเปกโทรสโกปีอินฟราเรด ย่านใกล้ในการติดตามปริมาณคอลลาเจนในสารละลายคอลลาเจนที่มี ความบริสุทธิ์ร้อยละ 95.10.....	35
3.2.1.1 การเตรียมตัวอย่าง.....	35
3.2.1.2 การวัดสเปกตรัมสารละลายคอลลาเจนด้วยเครื่องสเปกโทรสโกปี อินฟราเรดย่านใกล้	36
3.2.1.3 การปรับแต่งสเปกตรัม.....	37
3.2.1.4 การสร้างสมการเทียบมาตรฐาน.....	38
3.2.1.5 การทดสอบประสิทธิภาพของสมการเทียบมาตรฐาน.....	39
3.2.1.6 การวัดสเปกตรัมคอลลาเจนผงด้วยเครื่องสเปกโทรสโกปี อินฟราเรดย่านใกล้	39
3.2.2 การศึกษาอิทธิพลของวัตถุเจือปนอาหารต่อการวัดปริมาณคอลลาเจน ด้วยเทคนิคสเปกโทรสโกปีอินฟราเรดย่านใกล้ในสารละลายคอลลาเจน ที่มีความบริสุทธิ์ร้อยละ 95.10.....	41
3.2.2.1 การเตรียมตัวอย่าง.....	41
3.2.2.2 การวัดสเปกตรัมสารละลายคอลลาเจนที่มีการเติมวัตถุเจือปนอาหาร ด้วยเครื่องสเปกโทรสโกปีอินฟราเรดย่านใกล้	43
3.2.2.3 การปรับแต่งสเปกตรัม.....	43
3.2.2.4 การสร้างสมการเทียบมาตรฐาน.....	43
3.2.2.5 การทดสอบประสิทธิภาพของสมการเทียบมาตรฐาน.....	44
3.2.2.6 การวัดสเปกตรัมวัตถุเจือปนอาหารผงด้วยเครื่องสเปกโทรสโกปี อินฟราเรดย่านใกล้	44
3.2.3 การศึกษาความเป็นไปได้ของการใช้เทคนิคสเปกโทรสโกปีอินฟราเรดย่าน ใกล้ในการติดตามปริมาณคอลลาเจนในตัวอย่างผลิตภัณฑ์น้ำผลไม้เสริม คอลลาเจนที่มีวางจำหน่ายในท้องตลาด	45

บทที่	หน้า
3.2.3.1	45
3.2.3.1.1	45
3.2.3.2	47
3.2.3.3	47
3.2.3.4	49
3.2.3.5	49
3.2.3.6	50
3.2.3.7	51
3.2.3.7.1	51
3.2.3.7.2	51
3.2.3.7.3	52
4	53
4.1	53
4.1.1	53
4.1.2	55
4.1.3	56
4.2	63
4.2.1	63
4.2.1.1	63
4.2.1.2	71

บทที่	หน้า
4.2.2 การสร้างสมการเทียบมาตรฐาน	76
4.3 การศึกษาความเป็นไปได้ของการใช้เทคนิคสเปกโทรสโกปีอินฟราเรดย่านใกล้ ในการติดตามปริมาณคอลลาเจนในตัวอย่างผลิตภัณฑ์น้ำผลไม้เสริมคอลลาเจน ที่มีวางจำหน่ายในท้องตลาด	100
4.3.1 สุ่มเก็บตัวอย่างผลิตภัณฑ์น้ำผลไม้เสริมคอลลาเจนที่มีจำหน่ายในประเทศ....	100
4.3.2 วิเคราะห์คุณลักษณะทางเคมีเบื้องต้นของเครื่องดื่มน้ำผลไม้ที่มีการเสริม คอลลาเจนที่วางจำหน่ายในประเทศ.....	102
4.3.3 ลักษณะสเปกตรัมของผลิตภัณฑ์น้ำผลไม้เสริมคอลลาเจนที่มีจำหน่ายใน ประเทศ.....	106
4.3.4 การสร้างสมการเทียบมาตรฐาน	109
4.3.4.1 การสร้างสมการเทียบมาตรฐานด้วยวิธี PLSR.....	109
4.3.4.2 การสร้างสมการเทียบมาตรฐานด้วยวิธี Multiple Linear Regression (MLR).....	117
สรุปผลการทดลอง	122
รายการอ้างอิง	123
ภาคผนวก.....	139
ภาคผนวก ก.....	140
ภาคผนวก ข.....	145
ภาคผนวก ค.....	157
ภาคผนวก ง.....	160
ประวัติผู้วิจัย.....	171

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1	แนวทางการอธิบายความสามารถของสมการเทียบมาตรฐานด้วยค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (coefficient of correlation, R) หรือค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (coefficient of determination, R ²)..... 20
2	แนวทางการอธิบายความสามารถของสมการเทียบมาตรฐานด้วยค่าสัดส่วนระหว่างค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของค่าทางเคมีและค่าความผิดพลาดมาตรฐานในการทำนายของกลุ่มตัวอย่างที่ใช้ในการตรวจสอบสมการ (standard error of prediction, SEP) (RPD)..... 20
3	งานวิจัยที่แสดงถึงความสามารถของการใช้เทคนิค NIRS ในการวิเคราะห์สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ..... 28
4	การเตรียมตัวอย่างสารละลายคอลลาเจนที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน จาก stock solution 10,000 มิลลิกรัมต่อลิตร..... 35
5	ปริมาณวัตถุดิบอาหารที่เติมในสารละลายคอลลาเจนเพื่อเป็นระบบจำลอง..... 41
6	การสุ่มตัวอย่างเครื่องดื่มน้ำผลไม้ที่มีการเสริมคอลลาเจนสำหรับการศึกษา..... 46
7	ค่าสถิติของสารละลายคอลลาเจนสำหรับสร้างสมการและสำหรับทวนสอบสมการด้วยเทคนิค NIRS..... 57
8	ค่าทางสถิติของสมการทำนายปริมาณคอลลาเจนในสารละลายคอลลาเจนด้วยเทคนิค NIRS..... 58
9	การเปรียบเทียบค่าจริงและค่าทำนายของปริมาณคอลลาเจนในน้ำผลไม้เสริมคอลลาเจนที่จำหน่ายในท้องตลาด ด้วยสมการสารละลายคอลลาเจนที่เหมาะสมที่สุด..... 62
10	ค่าสถิติของแบบจำลองที่ศึกษาอิทธิพลของวัตถุดิบอาหารสำหรับสร้างสมการเทียบมาตรฐานและทวนสอบสมการด้วยเทคนิค NIRS..... 78
11	ค่าทางสถิติของแบบจำลองที่ศึกษาอิทธิพลของน้ำตาลซูโครสต่อการวัดคอลลาเจนด้วยเทคนิค NIRS..... 81
12	ค่าทางสถิติของแบบจำลองที่ศึกษาอิทธิพลของวิตามินซีต่อการวัดคอลลาเจนด้วยเทคนิค NIRS..... 85
13	ค่าทางสถิติของแบบจำลองที่ศึกษาอิทธิพลของโซเดียมเบนโซเอตต่อการวัดคอลลาเจนด้วยเทคนิค NIRS..... 89

ตารางที่	หน้า
14	ค่าทางสถิติของแบบจำลองที่ศึกษาอิทธิพลของซิงค์กลูโคเนตต่อการวัดคอลลาเจนด้วยเทคนิค NIRS..... 93
15	ค่าทางสถิติของแบบจำลองที่ศึกษาอิทธิพลของน้ำตาลซูโครส วิตามินซี โซเดียมเบนโซเอท และซิงค์กลูโคเนตต่อการวัดคอลลาเจนด้วยเทคนิค NIRS..... 96
16	การเปรียบเทียบค่าจริงและค่าทำนายของปริมาณคอลลาเจนในน้ำผลไม้เสริมคอลลาเจนที่จำหน่ายในท้องตลาด ด้วยสมการสารถลายคอลลาเจนมาตรฐานที่ทำการเติมวัตถุเจือปนอาหารที่เหมาะสมที่สุด.....99
17	ลักษณะปรากฏของผลิตภัณฑ์น้ำผลไม้เสริมคอลลาเจนที่ใช้ในการศึกษา..... 101
18	คุณลักษณะทางเคมีเบื้องต้นของผลิตภัณฑ์น้ำผลไม้ที่มีการเสริมคอลลาเจนที่ใช้ในการศึกษา..... 103
19	คุณลักษณะทางเคมีเบื้องต้นของผลิตภัณฑ์น้ำผลไม้ที่มีการเสริมคอลลาเจนที่ใช้ในการศึกษา..... 104
20	ค่าสถิติของผลิตภัณฑ์น้ำผลไม้เสริมคอลลาเจน สำหรับสร้างสมการและสำหรับทวนสอบสมการด้วยเทคนิค NIRS..... 110
21	ค่าทางสถิติของสมการทำนายปริมาณคอลลาเจนในผลิตภัณฑ์น้ำผลไม้จำนวน 114 ตัวอย่าง..... 112
22	ค่าทางสถิติของสมการทำนายปริมาณคอลลาเจนในผลิตภัณฑ์น้ำผลไม้จำนวน 109 ตัวอย่าง..... 113
23	การเปรียบเทียบค่าจริงและค่าการทำนายปริมาณคอลลาเจนในผลิตภัณฑ์น้ำผลไม้ด้วยสมการที่เหมาะสมที่สุด..... 116
24	การเลือกเลขคลื่นในการสร้างสมการเทียบมาตรฐานด้วยวิธี MLR..... 119
25	ค่าจุดตัดแกน y (intercept) และค่าสัมประสิทธิ์ของเลขคลื่นที่เลือกใช้ในการสร้างสมการเทียบมาตรฐานด้วยวิธี MLR..... 119
26	สภาวะสำหรับการวิเคราะห์หาปริมาณคอลลาเจนด้วย HPLC..... 153
27	พื้นที่ใต้กราฟของสารมาตรฐาน 4-ไฮดรอกซีโปรลีน ที่ความเข้มข้นต่างๆ..... 154
28	การตรวจสอบความแม่นยำของสมการเทียบมาตรฐานผลิตภัณฑ์น้ำผลไม้เสริมคอลลาเจน..... 158

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	โครงสร้างของวิตามินซี.....	7
2	โครงสร้างของไฮดรอกซีเบนโซเอท.....	7
3	โครงสร้างของซิงค์กลูโคเนต.....	8
4	โครงสร้างของน้ำตาลซูโครส.....	8
5	โครงสร้างของโมเลกุลคอลลาเจนที่เป็นเส้นใย (fibrillar collagen).....	9
6	สูตรโครงสร้างของไฮดรอกซีโพรลีน.....	13
7	โครมาโตแกรมผลการวิเคราะห์ 4-ไฮดรอกซีโพรลีน โดยใช้ NBD-Cl ในการเตรียม อนุพันธ์.....	13
8	สูตรโครงสร้างทางเคมีของ 4-คลอโร-7-ไนโตรเบนโซฟูราแซน (NBD-Cl).....	14
9	ปฏิกิริยาการเกิดอนุพันธ์ระหว่างไฮดรอกซีโพรลีนกับ NBD-Cl.....	14
10	กระบวนการผลิตน้ำผลไม้.....	16
11	ส่วนประกอบของระบบ FT-NIR (รุ่น MPA S/N2197, Bruker Germany).....	18
12	สเปกตรัมที่ผ่านการปรับแต่งด้วยวิธีปรับเรียบของน้ำเบียร์.....	23
13	การวัดสเปกตรัมตัวอย่างสารละลายคอลลาเจนโดยวางอุปกรณ์ในระบบสะท้อน ผ่านตัวอย่าง.....	36
14	ขั้นตอนการสร้างสมการเทียบมาตรฐานสารละลายคอลลาเจน.....	37
15	การวัดสเปกตรัมตัวอย่างคอลลาเจนผงด้วยระบบสะท้อนกลับ.....	40
16	แผนผังการเติมวัตถุเจือปนอาหารลงในสารละลายคอลลาเจน จำนวนรวม 630 ตัวอย่าง.....	42
17	ขั้นตอนการสร้างสมการเทียบมาตรฐานของผลิตภัณฑ์น้ำผลไม้เสริมคอลลาเจนที่มี วางจำหน่ายในท้องตลาด.....	48
18	ตัวอย่างสเปกตรัมการดูดกลืนแสง NIRS ของสารละลายคอลลาเจนที่ความเข้มข้น ต่างๆ กัน.....	54
19	ตัวอย่างสเปกตรัมการดูดกลืนแสง NIRS ของสารละลายคอลลาเจน ที่ความเข้มข้น ต่างๆ กัน ที่ผ่านการปรับแต่งด้วยอนุพันธ์อันดับสอง.....	55
20	สเปกตรัมคอลลาเจน.....	56
21	สัมประสิทธิ์การถดถอยของสารละลายคอลลาเจนที่ไม่ผ่านการปรับแต่งสเปกตรัม.....	59

ภาพที่	หน้า
22	การกระจายตัวของค่าปริมาณคอลลาเจนในสารละลายคอลลาเจน ที่ได้จากการสร้าง สมการเทียบมาตรฐานและทวนสอบสมการด้วยเทคนิค NIRS..... 60
23	การกระจายตัวของปริมาณคอลลาเจนในสารละลายคอลลาเจน..... 60
24	สเปกตรัมสารละลายน้ำตาลซูโครส..... 64
25	สเปกตรัมน้ำตาลซูโครส..... 64
26	สเปกตรัมสารละลายน้ำตาลซูโครสจากเอกสารอ้างอิง (ก) สเปกตรัมดั้งเดิม (ข) สเปกตรัมที่ปรับแต่งด้วยอนุพันธ์อันดับสอง..... 65
27	สเปกตรัมสารละลายวิตามินซี..... 66
28	สเปกตรัมวิตามินซี..... 66
29	สเปกตรัมวิตามินซีจากเอกสารอ้างอิง..... 67
30	สเปกตรัมสารละลายซิงค์กลูโคเนต..... 68
31	สเปกตรัมซิงค์กลูโคเนต..... 68
32	สเปกตรัมสารละลายโซเดียมเบนโซเอท..... 69
33	สเปกตรัมโซเดียมเบนโซเอท..... 70
34	สเปกตรัมของสารละลายชนิดต่างๆ ที่ปรับแต่งด้วยวิธีอนุพันธ์อันดับสอง..... 71
35	สเปกตรัมสารละลายคอลลาเจน 500 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่เติมน้ำตาลซูโครสที่ความ เข้มข้นแตกต่างกัน..... 72
36	สเปกตรัมสารละลายคอลลาเจน 500 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่เติมวิตามินซีที่ความเข้มข้น แตกต่างกัน..... 73
37	สเปกตรัมสารละลายคอลลาเจน 500 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่เติมซิงค์กลูโคเนตที่ความ เข้มข้นแตกต่างกัน..... 74
38	สเปกตรัมสารละลายคอลลาเจน 500 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่เติมโซเดียมเบนโซเอทที่ ความเข้มข้นแตกต่างกัน..... 75
39	สเปกตรัมของสารละลายคอลลาเจนที่เติมวัตถุเจือปนอาหารชนิดต่างๆที่ปรับแต่ง ด้วยวิธีอนุพันธ์อันดับสอง..... 76
40	สเปกตรัมการดูดกลืนแสง NIRS ของสารละลายคอลลาเจนเทียบกับสารละลาย น้ำตาลซูโครส ที่ปรับแต่งสเปกตรัมด้วยวิธีอนุพันธ์อันดับสอง..... 77

ภาพที่	หน้า
41	การกระจายตัวของปริมาณคอลลาเจนในสารละลายคอลลาเจนที่เติมวัตถุเจือปน อาหาร (ก) น้ำตาลซูโครส (ข) วิตามินซี (ค) โซเดียมเบนโซเอท (ง) ซิงค์กลูโคเนต และ (จ) รวมทุกตัว..... 80
42	การกระจายตัวของค่าปริมาณคอลลาเจนในสารละลายคอลลาเจนกับอิทธิพลของ น้ำตาลซูโครส ที่ได้จากการสร้างสมการเทียบมาตรฐานและสมการทวนสอบ ด้วยเทคนิค NIRS..... 82
43	สัมประสิทธิ์การถดถอยของสารละลายคอลลาเจนกับอิทธิพลของน้ำตาลซูโครส ที่ ผ่านการปรับแต่งด้วยวิธี SNV..... 83
44	สเปกตรัมการดูดกลืนแสง NIRS ของสารละลายคอลลาเจนเทียบกับสารละลาย วิตามินซี ที่ปรับแต่งสเปกตรัมด้วยวิธีอนุพันธ์อันดับสอง..... 84
45	การกระจายตัวของค่าปริมาณคอลลาเจนในสารละลายคอลลาเจนกับอิทธิพลของ วิตามินซี ที่ได้จากการสร้างสมการเทียบมาตรฐานและสมการทวนสอบด้วย เทคนิค NIRS..... 86
46	สัมประสิทธิ์การถดถอยของสารละลายคอลลาเจนกับอิทธิพลของวิตามินซีที่ผ่าน การปรับแต่งด้วยวิธี SNV..... 87
47	สเปกตรัมการดูดกลืนแสง NIRS ของสารละลายคอลลาเจนเทียบกับสารละลาย โซเดียมเบนโซเอท ที่ปรับแต่งสเปกตรัมด้วยวิธีอนุพันธ์อันดับสอง..... 88
48	การกระจายตัวของค่าปริมาณคอลลาเจนในสารละลายคอลลาเจนกับอิทธิพลของ โซเดียมเบนโซเอท ที่ได้จากการสร้างสมการเทียบมาตรฐานและสมการ ทวนสอบด้วยเทคนิค NIRS..... 90
49	สัมประสิทธิ์การถดถอยของสารละลายคอลลาเจนกับอิทธิพลของโซเดียมเบนโซเอท ที่ผ่านการปรับแต่งด้วยวิธี SNV..... 91
50	สเปกตรัมการดูดกลืนแสง NIRS ของสารละลายคอลลาเจนเทียบกับสารละลาย ซิงค์กลูโคเนตที่ปรับแต่งสเปกตรัมด้วยวิธีอนุพันธ์อันดับสอง..... 92
51	การกระจายตัวของค่าปริมาณคอลลาเจนในสารละลายคอลลาเจนกับอิทธิพลของ ซิงค์กลูโคเนตที่ได้จากการสร้างสมการเทียบมาตรฐานและสมการทวนสอบ ด้วยเทคนิค NIRS..... 94
52	สัมประสิทธิ์การถดถอยของสารละลายคอลลาเจนกับอิทธิพลของซิงค์กลูโคเนตที่ ไม่ผ่านการปรับแต่งสเปกตรัม..... 95

ภาพที่	หน้า
53	การกระจายตัวของค่าปริมาณคอลลาเจนในสารละลายคอลลาเจนกับอิทธิพลของ น้ำตาลซูโครส วิตามินซี โซเดียมเบนโซเอท และซิงค์กลูโคเนต ที่ได้จากการ สร้างสมการเทียบมาตรฐานและสมการทวนสอบด้วยเทคนิค NIRS..... 97
54	สัมประสิทธิ์การถดถอยของสารละลายคอลลาเจนกับอิทธิพลของน้ำตาลซูโครส วิตามินซี โซเดียมเบนโซเอท และซิงค์กลูโคเนต ที่ผ่านการปรับแต่งด้วย วิธี MSC..... 98
55	ปริมาณคอลลาเจนที่วิเคราะห์ได้จากวิธี HPLC เทียบกับปริมาณคอลลาเจนที่ระบุ บนฉลากบรรจุภัณฑ์..... 105
56	ตัวอย่างสเปกตรัมของผลิตภัณฑ์น้ำผลไม้เสริมคอลลาเจนที่ใช้ในการศึกษา..... 107
57	สเปกตรัมผลิตภัณฑ์น้ำผลไม้เสริมคอลลาเจนที่ปรับแต่งด้วยวิธีอนุพันธ์อันดับสอง..... 108
58	การกระจายตัวของปริมาณคอลลาเจนในผลิตภัณฑ์น้ำผลไม้เสริมคอลลาเจน..... 111
59	สัมประสิทธิ์การถดถอยของสารละลายคอลลาเจนในผลิตภัณฑ์น้ำผลไม้ที่ผ่านการ ปรับแต่งด้วยวิธี SNV..... 114
60	การกระจายตัวของค่าปริมาณคอลลาเจนในผลิตภัณฑ์น้ำผลไม้ที่ได้จากการสร้าง สมการเทียบมาตรฐานและสมการทวนสอบด้วยเทคนิค NIRS..... 115
61	ค่า X-loading ของแบบจำลองคอลลาเจนในผลิตภัณฑ์น้ำผลไม้ด้วยเทคนิค สเปกโทรสโกปีอินฟราเรดย่านใกล้..... 117
62	สัมประสิทธิ์การถดถอยของสมการทำนายปริมาณคอลลาเจนในผลิตภัณฑ์น้ำผลไม้ ในช่วงคลื่น $12500-4000\text{ cm}^{-1}$ 118
63	กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณคอลลาเจนที่วัดได้จริงกับปริมาณ คอลลาเจนที่ทำนายได้ด้วยวิธี MLR..... 121
64	เครื่อง Digital refractometer..... 146
65	เครื่องวัดสี (Tintometer) ที่ใช้ในการวัดเครื่องดื่มที่มีการเสริมคอลลาเจน..... 147
66	การวางเครื่องมือและตัวอย่างของเครื่องวัดสี..... 147
67	เครื่อง Brookfield Viscometer..... 148
68	ภาชนะใส่ตัวอย่างและหัว probe ชนิด UL ที่ใช้ในการวัดความหนืดผลิตภัณฑ์น้ำ ผลไม้เสริมคอลลาเจน..... 148
69	อุณหภูมิและเวลาที่ใช้ในการย่อยตัวอย่างด้วยเครื่อง Autoclave..... 152
70	กราฟมาตรฐานสาร 4-ไฮดรอกซีโพรลีน..... 154

ภาพที่	หน้า
71	โครมาโตแกรมผลการวิเคราะห์ 4-ไฮดรอกซีโพรลีน โดยใช้ NBD-Cl ในการเตรียม อนุพันธ์ในตัวอย่างผลิตภัณฑ์น้ำผลไม้เสริมคอลลาเจน.....156
72	กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณคอลลาเจนที่วัดได้จริงกับปริมาณ คอลลาเจนที่ทำนายได้ที่ช่วงความเข้มข้นต่ำ..... 159
73	กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณคอลลาเจนที่วัดได้จริงกับปริมาณ คอลลาเจนที่ทำนายได้ที่ช่วงความเข้มข้นสูง..... 159



บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

ตลาดวิตามินและผลิตภัณฑ์เสริมอาหารในประเทศไทยเติบโตเฉลี่ยสูง คิดเป็นร้อยละ 11.0 ต่อปี โดยในปี พ.ศ. 2555 มีมูลค่า 35,390 ล้านบาท และเพิ่มขึ้นเป็น 53,810 ล้านบาท ในปี พ.ศ. 2559 โดยผลิตภัณฑ์เสริมอาหารมีส่วนแบ่งทางการตลาดสูงที่สุด คือร้อยละ 86.4 ด้วยมูลค่า 46,503 ล้านบาท รองลงมาคือ วิตามินและเกลือแร่ ร้อยละ 11.6 ด้วยมูลค่า 6,225 ล้านบาท (สถาบันอาหาร กระทรวงอุตสาหกรรม, 2560) ประกอบกับผู้ผลิตพัฒนาผลิตภัณฑ์ใหม่เข้าสู่ตลาดอย่างต่อเนื่อง เพื่อเพิ่มความหลากหลายให้กับผลิตภัณฑ์ โดยเฉพาะผลิตภัณฑ์ที่ดีต่อสุขภาพ เช่น น้ำผลไม้ น้ำตาลต่ำ หรือมีส่วนผสมของไฟเบอร์ วิตามินซี และหนึ่งในส่วนผสมที่มีความโดดเด่นในอุตสาหกรรมการผลิตผลิตภัณฑ์เพื่อสุขภาพ ได้แก่ คอลลาเจน (Bilek และ Bayram, 2015) โดยคอลลาเจนมีข้อดีในเชิงอุตสาหกรรมคือ มีลักษณะเป็นผง ง่ายต่อการนำไปผสมเป็นวัตถุดิบในอาหาร อีกทั้งมีการกระจายตัวสูง ความหนืดน้อย มีความสามารถในการละลายน้ำสูง มีลักษณะใส และใช้เป็นอิมัลซิฟายเออร์ จึงนิยมนำมาใช้ในผลิตภัณฑ์เครื่องดื่ม

โดยทั่วไปร่างกายมนุษย์และสัตว์ประกอบไปด้วยโปรตีนร้อยละ 25 ในรูปคอลลาเจน เมื่ออายุมากขึ้นคอลลาเจนจะเสื่อมสลาย ทำให้ชั้นผิวหนังยุบตัว อันเป็นสาเหตุของความเหี่ยวย่นและริ้วรอย รวมถึงการเกิดปัญหาข้อเสื่อม กระดูกเสื่อม (Iwai และคณะ, 2005) ดังนั้นจึงมีการศึกษาที่ชี้ให้เห็นว่าการรับประทานคอลลาเจนปริมาณ 10 กรัมต่อวัน ช่วยลดอาการปวดข้อได้ (Moskowitz, 2000; Benito- Ruiz และคณะ, 2009; Walrand และคณะ, 2008) สามารถลดริ้วรอยเหี่ยวย่น (Tanaka และคณะ, 2009) และปรับปรุงผิวให้ดีขึ้น (Matsumoto, 2006; Zague, 2008) นอกจากนี้ยังมีการศึกษาอื่นๆ ที่แสดงให้เห็นว่าการรับประทานอาหารที่อุดมไปด้วยคอลลาเจนสามารถช่วยปรับปรุงกระบวนการเมตาบอลิซึมของกระดูกได้ (Guillerminet และคณะ, 2010; Koyama และคณะ, 2001) ลดอาการปวดในผู้ป่วยโรคข้อเข่าและข้อสะโพกเสื่อมโดยการเพิ่มความเข้มข้นของไฮดรอกซีโพรลีนในเลือด (Moskowitz, 2000) และป้องกันโรคกระดูกพรุน (Bonjour, 2005) ด้านการเป็นส่วนผสมของผลิตภัณฑ์อาหาร การใช้คอลลาเจน ที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำในช่วง 2000-5000 ดาลตัน (Da) จะช่วยป้องกันการตกตะกอนและปัญหาการจับในเครื่องดื่มได้ (Moskowitz, 2000)

คอลลาเจนสามารถทำปฏิกิริยากับพอลิแซ็กคาไรด์และแทนนิน ส่งผลให้คุณลักษณะทางประสาทสัมผัสทางด้านรสชาติของผลิตภัณฑ์ลดลง เนื่องจากรสชาติของแทนนิน ทั้งนี้กฎหมายอาหารยังไม่มีข้อกำหนดสำหรับการใช้ปริมาณคอลลาเจนในผลิตภัณฑ์อาหาร อย่างไรก็ตามการเติมคอลลาเจนร้อยละ 2-30 ในอาหารเหลวจะให้ผลในด้านลักษณะปรากฏที่ดี เนื่องจากคุณสมบัติการเป็นอิมัลซิฟายเออร์ จึงช่วยลดปัญหาการตกตะกอนในเครื่องดื่มได้ แต่ถ้าความเข้มข้นมากกว่าร้อยละ 30 ส่งผลให้ความหนืดในเครื่องดื่มเพิ่มสูงขึ้น ส่งผลเสียต่อคุณภาพของผลิตภัณฑ์ ดังนั้นการเติมคอลลาเจนในเครื่องดื่มสามารถเพิ่มคุณค่าทางโภชนาการได้และช่วยปรับปรุงลักษณะปรากฏของเครื่องดื่มให้ดีขึ้นได้ (Bilek และ Bayram, 2015)

ดังนั้นเพื่อเป็นการเพิ่มความมั่นใจให้กับอุตสาหกรรมผู้ผลิต และที่สำคัญผู้บริโภคได้รับข้อมูลที่ถูกต้อง น่าเชื่อถือ และเป็นประโยชน์ต่อการพิจารณาเลือกซื้อ จึงจำเป็นต้องมีการตรวจวิเคราะห์คอลลาเจนในผลิตภัณฑ์อาหาร รวมทั้งในผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มภาชนะบรรจุปิดสนิท ได้แก่ เครื่องดื่มเพื่อสุขภาพต่างๆที่กำลังได้รับความนิยมอย่างแพร่หลาย ซึ่งวิธีการที่ใช้ในการตรวจวิเคราะห์คอลลาเจนในปัจจุบัน ได้แก่ การใช้สเปกโทรโฟโตมิเตอร์ หรือเทคนิคที่เรียกว่า Colorimetric method (AOAC, 2000) และการใช้เทคนิคโครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง ชนิดดูดกลืนแสงอุลตราไวโอเลต (HPLC-FLD) (Dai และคณะ, 2014) แม้วิธีการดังกล่าวจะให้ผลการวิเคราะห์ที่ถูกต้องแม่นยำ แต่ต้องใช้เวลาในการเตรียมตัวอย่างมาก มีค่าใช้จ่ายของสารเคมีและใช้เครื่องมือที่มีราคาค่อนข้างสูง ต้องทำลายตัวอย่าง อีกทั้งยังต้องใช้ผู้ที่มีความชำนาญในการตรวจสอบ ดังนั้นการตรวจวิเคราะห์ด้วยเทคนิคสเปกโทรสโกปีอินฟราเรดย่านใกล้ (Near Infrared Spectroscopy, NIRS) จึงเป็นอีกหนึ่งทางเลือกที่ช่วยลดปัญหาดังกล่าวได้ในระยะยาว

ในปัจจุบันมีการศึกษาการใช้เทคนิค NIRS ในการตรวจติดตามสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ได้แก่ Bai และคณะ (2014) ใช้เทคนิค NIRS ในการติดตามปริมาณแอนโทไซยานินในบลูเบอร์รี่ 100 ตัวอย่าง พบว่าเทคนิคนี้มีความสามารถในการทำนายค่าต่างๆ ได้ดี เนื่องจากให้ค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (coefficients of determination, R^2) และค่าความผิดพลาดมาตรฐานในการทำนายของกลุ่มตัวอย่างทวนสอบสมการเทียบมาตรฐาน (standard error of prediction, SEP) อยู่ในเกณฑ์ที่ดี โดยมี R^2 ในช่วง 0.87-0.92 และ SEP ในช่วง 20-25 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม ตามลำดับ Liu และคณะ (2015) ใช้เทคนิค NIRS ในการควบคุมคุณภาพของใบแปะก๊วย เนื่องจากนิยมใช้เป็นส่วนผสมในสมุนไพรจีนและเป็นสารปรุงแต่งในอาหารเพื่อสุขภาพ พบว่า เทคนิค NIR สามารถทำนายปริมาณฟลาโวนอลไกลโคไซด์ ให้ค่า R^2 เท่ากับ 0.93 และมี SEP เท่ากับ 9.01% นอกจากนี้ Shi และคณะ (2012) ใช้เทคนิค NIRS ในการติดตามปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมดในใบแปะก๊วยสด จำนวน 120 ตัวอย่าง ที่ช่วงเลขคลื่น $10000-4000\text{ cm}^{-1}$ พบว่าให้ค่า R^2 เท่ากับ 0.89 และ ค่าความคลาดเคลื่อนในการทำนาย (root mean square error of prediction, RMSEP) เท่ากับ 3.0 มิลลิกรัมต่อกรัม

Carames และคณะ (2016) ใช้เทคนิค NIRS ในการติดตามปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดและ แอนโทไซยานินในน้ำองุ่น พบว่าให้ค่า RMSEP ต่ำ เท่ากับ 4.44 มิลลิกรัมต่อ 100 มิลลิลิตร เป็นต้น

รวมถึงมีการใช้เทคนิค NIRS ในการติดตามปริมาณกรดอะมิโนและโปรตีน ได้แก่ Gonzalez-Martin และคณะ (2009) ใช้เทคนิค NIRS ในการติดตามปริมาณกรดอะมิโนไฮดรอกซีโพรลีนในไส้กรอกหมู และไส้กรอกวัว ซึ่งกรดอะมิโนไฮดรอกซีโพรลีน ถูกใช้เป็นเกณฑ์ในการประเมินปริมาณคอลลาเจน โดยสมการทำนายที่ได้มีค่า R^2 และ SEP เท่ากับ 0.772 และ 0.05% ตามลำดับ นอกจากนี้ Ingle และคณะ (2016) ใช้เทคนิค NIRS ในการติดตามปริมาณโปรตีนในเวย์โปรตีนจำนวน 20 ตัวอย่าง ซึ่งมีปริมาณโปรตีนอยู่ในช่วง 22-90% วัดตัวอย่างด้วยระบบสะท้อนกลับ พบพีคการดูดกลืนที่ 8424 (C-H), 6684 (N-H), 5973 (C-H), 5737 (C-H), 5050 (N-H), 4866 (ROH หรือ N-H) และ 4614 (N-H) cm^{-1} และจะเห็นพีคการดูดกลืนที่มากขึ้นเมื่อมีปริมาณโปรตีนเพิ่มขึ้น ซึ่งคุณสมบัติการดูดกลืนเหล่านี้สอดคล้องกับพันธะภายในโครงสร้างโปรตีน มีค่าความถูกต้องของสมการทำนาย โดยให้ค่า R^2 เท่ากับ 0.986 ค่าความผิดพลาดมาตรฐานในการทำนายของกลุ่มตัวอย่างสร้างสมการเทียบมาตรฐาน (Standard Error of Calibration, SEC) เท่ากับ 3%

จะเห็นได้ว่าเทคนิค NIRS มีความเป็นไปได้ที่จะใช้ในการตรวจสอบคอลลาเจนในผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มเพื่อสุขภาพแต่ยังไม่มีการศึกษาในเรื่องนี้ ซึ่งผลจากการวิจัยน่าจะเป็นประโยชน์และเป็นความรู้ใหม่สู่ทั้งภาควิชาการและอุตสาหกรรม

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

- 1) เพื่อศึกษาความเป็นไปได้ในการใช้เทคนิคสเปกโทรสโกปีอินฟราเรดย่านใกล้ในการติดตามปริมาณคอลลาเจนในสารละลายคอลลาเจน ที่เตรียมจากคอลลาเจนทางการค้าที่มีความบริสุทธิ์ร้อยละ 95.10
- 2) เพื่อศึกษาอิทธิพลของวัตถุดิบอาหารต่อการวัดปริมาณคอลลาเจนด้วยเทคนิคสเปกโทรสโกปีอินฟราเรดย่านใกล้ในสารละลายคอลลาเจน ที่เตรียมจากคอลลาเจนทางการค้า ที่มีความบริสุทธิ์ร้อยละ 95.10
- 3) เพื่อศึกษาความเป็นไปได้ของการใช้เทคนิคสเปกโทรสโกปีอินฟราเรดย่านใกล้ในการติดตามปริมาณคอลลาเจนในตัวอย่างผลิตภัณฑ์น้ำผลไม้เสริมคอลลาเจนที่มีวางจำหน่ายในท้องตลาด

1.3 สมมติฐานของงานวิจัย

โครงสร้างของคอลลาเจนประกอบด้วยโมเลกุล C, H, N และ O ซึ่งมีความจำเพาะต่อการดูดกลืนของรังสี NIRS จึงมีความเป็นไปได้ที่จะใช้เทคนิคนี้ ในการติดตามปริมาณคอลลาเจนในผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มเพื่อสุขภาพได้

1.4 ขอบเขตของงานวิจัย

1. การศึกษานี้แบ่งการทดลองเป็น 3 ขั้นตอน

1.1 ศึกษาความเป็นไปได้ในการใช้เทคนิค NIRS ในการติดตามปริมาณคอลลาเจนในสารละลายคอลลาเจน ที่เตรียมจากคอลลาเจนทางการค้า ที่มีความบริสุทธิ์ร้อยละ 95.10

1.2 ศึกษาอิทธิพลของวัตถุดิบอาหาร ได้แก่ น้ำตาลซูโครส วิตามินซี โซเดียมเบนโซเอต และ ซิงค์กลูโคเนต ต่อการวัดปริมาณคอลลาเจนด้วยเทคนิค NIRS ในสารละลายคอลลาเจน ที่เตรียมจากคอลลาเจนทางการค้า ที่มีความบริสุทธิ์ร้อยละ 95.10

1.3 ศึกษาความเป็นไปได้ของการใช้เทคนิค NIRS ในการติดตามปริมาณคอลลาเจนในตัวอย่างผลิตภัณฑ์น้ำผลไม้เสริมคอลลาเจนที่มีวางจำหน่ายในท้องตลาด

2. จำนวนตัวอย่างที่ศึกษาในแต่ละขั้นตอน ไม่น้อยกว่า 100 ตัวอย่าง เพื่อความแม่นยำในการสร้างสมการเทียบมาตรฐาน

3. วัดสเปกตรัมด้วยเทคนิค NIRS โดยควบคุมอุณหภูมิของตัวอย่างให้ตรงกับที่วางจำหน่าย ในภาคอุตสาหกรรม (อุณหภูมิห้อง) ซึ่งจะสามารถนำเทคนิคนี้ไปประยุกต์ใช้ได้จริง โดยวัดสเปกตรัมในช่วงเลขคลื่น $12500-4000\text{ cm}^{-1}$

4. การศึกษาขั้นตอนที่ 1.3 วิธีมาตรฐาน (reference method) ที่ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณคอลลาเจน คือการใช้เครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงที่ต่อกับตัวตรวจวัดสัญญาณชนิดฟลูออเรสเซนส์ (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) ดัดแปลงจากวิธีของ Vazquez-Ortiz และคณะ (2005)

5. สร้างแบบจำลองที่เหมาะสมในการทำนายคอลลาเจนในผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มน้ำผลไม้เสริมคอลลาเจน โดยนำค่าปริมาณคอลลาเจนที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC และค่าที่ได้จากการวัดด้วยเทคนิค NIRS มาวิเคราะห์ผลโดยการสร้างสมการทำนาย และทวนสอบสมการทำนายที่สร้างขึ้น ด้วยวิธี PLS ด้วยโปรแกรม OPUS 7.2.139.1294

6. สร้างแบบจำลองที่เหมาะสมในการทำนายคอลลาเจนในผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มน้ำผลไม้เสริมคอลลาเจน โดยนำค่าปริมาณคอลลาเจนที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC และค่าที่ได้จากการวัดด้วยเทคนิค NIRS มาวิเคราะห์ผลโดยการสร้างสมการทำนาย และทวนสอบสมการทำนายที่สร้างขึ้น

- ขึ้น ด้วยวิธี Multiple Linear Regression (MLR) ด้วยโปรแกรม the unscambler
7. คัดเลือกความยาวคลื่นที่เหมาะสมในการสร้างสมการทำนาย (select wavelength) จากกราฟสัมประสิทธิ์การถดถอย (regression coefficient)



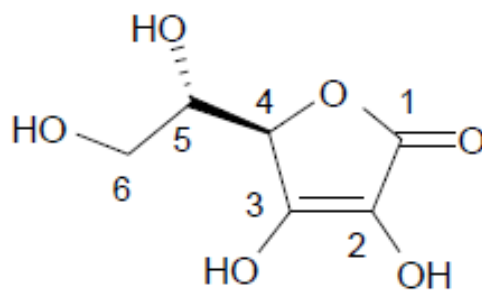
บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

เครื่องต้มเพื่อสุขภาพเป็นเครื่องต้มที่มีการเติมสารที่เป็นประโยชน์ต่อร่างกายลงในผลิตภัณฑ์ เพื่อตอบสนองความต้องการของผู้บริโภคในด้านการป้องกันโรค เช่น โรคหัวใจและหลอดเลือด โรคทางเดินอาหารและโรคกระดูก นอกจากนี้ยังรวมถึง การมีสุขภาพดี ความสวยงาม ควบคุมน้ำหนัก ช่วยเผาผลาญไขมัน รวมถึงรสชาติและความสะดวกในการรับประทาน (Bilek และ Bayram, 2015) ส่วนผสมที่นำมาเพิ่มเติมลงในเครื่องต้ม ได้แก่ แอลกลูตาไทโอน (L-glutathione) แอลคาร์นิทีน (L-carnitine) โคเอนไซม์คิวเทน (co-enzyme Q10) ซอยเปปไทด์ (soy peptide) วิตามินซี (vitamin C) และคอลลาเจน (collagen) เป็นต้น (สถาบันอาหาร กระทรวงอุตสาหกรรม, 2556)

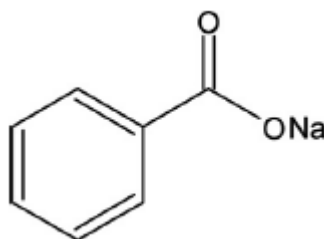
โดยขั้นตอนการผลิตจะผสมส่วนประกอบต่างๆ ได้แก่ น้ำตาลซูโครสหรือสารให้ความหวาน ซิงค์กลูโคเนต วิตามินซี และโซเดียมเบนโซเอท ให้เป็นเนื้อเดียวกัน จากนั้นนำไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ก่อนบรรจุลงขวด และทำการพาสเจอร์ไรส์ที่ 95 องศาเซลเซียส ด้วยหม้อต้มแบบใช้ไอน้ำ (steam jacket mixing) (Bilek และ Bayram, 2015)

ส่วนประกอบดังกล่าวเป็นส่วนที่มีการเติมลงในอุตสาหกรรมเครื่องต้ม โดยกรดเป็นส่วนประกอบสำคัญอย่างหนึ่งของเครื่องต้ม มีหน้าที่สำคัญ ได้แก่ ให้รสขื่นและเปรี้ยว กระตุ้นให้เกิดความพอใจในการรับรส ช่วยเพิ่มความหวานของน้ำตาล และเป็นตัวช่วยเสริมการถนอมรักษาเครื่องต้ม การใช้กรดในเครื่องต้มค่อนข้างสะดวก ปริมาณที่ใช้ไม่มากนัก โดยกรดที่นิยมผสมในเครื่องต้ม ได้แก่ วิตามินซีหรือวิตามินซี แสดงโครงสร้างดังภาพที่ 1 นอกจากนี้ยังทำหน้าที่ป้องกันและระงับการเกิดออกซิเดชัน ดังนั้นจะช่วยทำให้กลิ่นรสของเครื่องต้มคงตัวอยู่ได้นาน แม้ว่าวิตามินซีจะช่วยรักษาในด้านคุณค่าของเครื่องต้มแต่จะไม่ช่วยเสริมสี กลิ่น และรสของเครื่องต้ม (Rodriguez-Bernaldo และคณะ, 2009) ปริมาณที่แนะนำให้บริโภคต่อวันคือ 100–200 มิลลิกรัมต่อวัน (Malegori และคณะ, 2016)



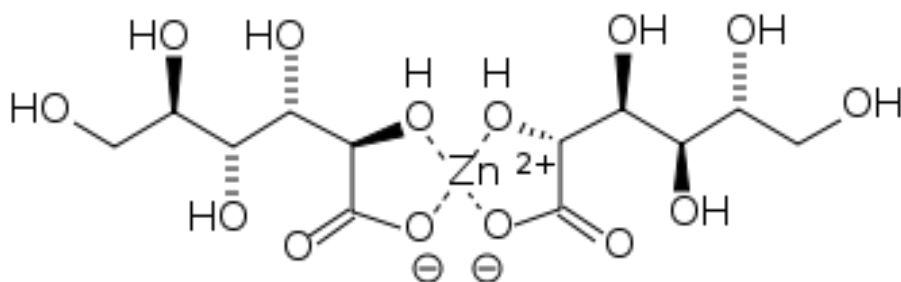
ภาพที่ 1 โครงสร้างของวิตามินซี
ที่มา: Liu และคณะ (2006)

นอกจากนี้มีการเติมโซเดียมเบนโซเอทซึ่งเป็นสารกันเสียในเครื่องดื่ม แสดงโครงสร้างดังภาพที่ 2 ปริมาณที่ใช้อยู่ในช่วง 100-1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งเป็นปริมาณที่มีการอนุญาตให้เติมกันทางการค้า ซึ่งการใช้โซเดียมเบนโซเอทที่ความเข้มข้นต่ำมีผลยับยั้งการเจริญของยีสต์ รา และแบคทีเรีย แต่ถ้าเติมในปริมาณที่มากเกินไปจะมีผลอย่างมีนัยสำคัญต่อกลิ่นและรสชาติของเครื่องดื่ม โดยเฉพาะในน้ำผลไม้ และมีการเติมซิงค์กลูโคเนต แสดงโครงสร้างดังภาพที่ 3 ซึ่งเป็นตัวช่วยควบคุมให้กระบวนการต่างๆ ในร่างกายดำเนินไปได้อย่างมีประสิทธิภาพ และคอยช่วยซ่อมบำรุงระบบเอนไซม์และเซลล์ต่างๆ (Mareta และ Sandstead, 2006) โดยมีปริมาณที่อนุญาตให้ใช้ได้คือ 15 มิลลิกรัมต่อวัน (สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา, 2549)



ภาพที่ 2 โครงสร้างของโซเดียมเบนโซเอท
ที่มา: Zhang และ Ma (2013)

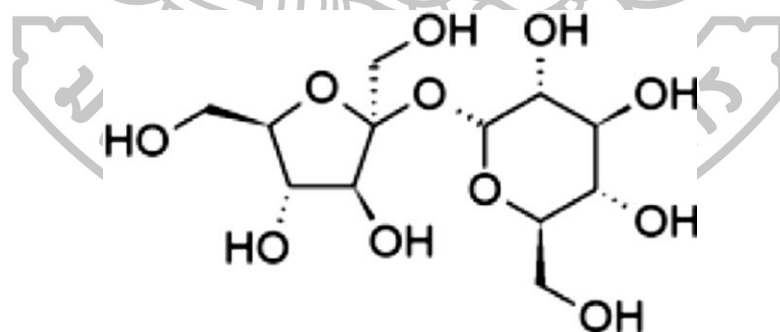
กรดเบนโซอิกและเกลือเบนโซเอท มีประสิทธิภาพสูงที่สุดที่ช่วงความเป็นกรด-ด่าง 2.5-4.0 และมีประสิทธิภาพสูงในรูปของกรดที่ไม่แตกตัวจึงเหมาะที่จะใช้กับผลิตภัณฑ์อาหารที่มีความเป็นกรดสูงหรือมีความเป็นกรด-ด่างต่ำ ตัวอย่างเช่น เครื่องดื่มชนิดต่างๆ น้ำผลไม้ และน้ำหวาน (วีรยา, 2552)



ภาพที่ 3 โครงสร้างของซิงค์กลูโคเนต

ที่มา: Mareta และ Sandstead (2006)

น้ำตาลเป็นองค์ประกอบของเครื่องดื่มที่มีความสำคัญมาก นอกจากจะเป็นสารให้ความหวานให้รสชาติแก่เครื่องดื่มแล้ว ยังทำให้เกิดสมดุลของรสชาติอื่นๆ ที่มีในเครื่องดื่มอย่างเช่น รสเปรี้ยว เค็ม และขม นอกจากนี้ยังเป็นสารให้ความหนืด ให้น้ำหนัก และในระดับความเข้มข้นสูงขึ้นไปถึงระดับหนึ่ง น้ำตาลยังทำหน้าที่ระงับการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์โดยแรงออสโมติกอีกด้วย โดยน้ำตาลซูโครสเป็นน้ำตาลที่ใช้กันมากและแพร่หลายที่สุดในอุตสาหกรรมอาหารต่างๆ ไป ซึ่งส่วนมากได้มาจากอ้อยและหัวบีท เป็นผลิตภัณฑ์ที่บริสุทธิ์ร้อยละ 99.8 (Lu และคณะ, 2017) แสดงโครงสร้างดังภาพที่ 4



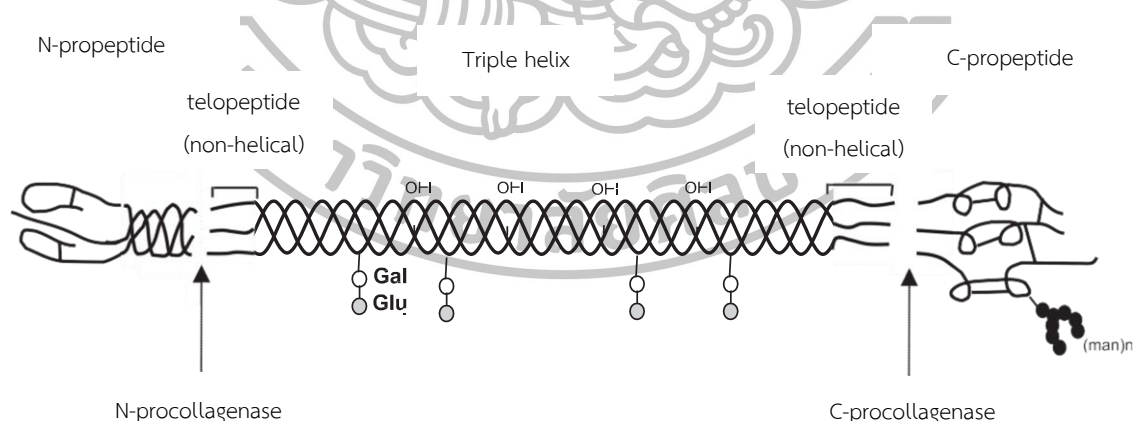
ภาพที่ 4 โครงสร้างของน้ำตาลซูโครส

ที่มา: Momeni และคณะ (2017)

2.1 คอลลาเจน

2.1.1 โครงสร้างของคอลลาเจน

คอลลาเจนเป็นกลุ่มของโปรตีนที่มีองค์ประกอบหน่วยย่อยคือกรดอะมิโน ที่เรียงต่อกันด้วยพันธะเปปไทด์ (peptide bond) คอลลาเจนเป็นสายโพลีเปปไทด์ 3 เส้นพันกัน (triple helix) โดยจะหมุนเป็นเกลียวขวา (right-hand helix) ดังภาพที่ 5 และจะมีพันธะไฮโดรเจนเชื่อมระหว่างสายโพลีเปปไทด์แต่ละเส้น (Zhou และคณะ, 2016; Pal และ Suresh, 2016; Pal และคณะ, 2015; Gómez-Guillén และคณะ, 2011) โดยภายในสายโพลีเปปไทด์แต่ละสายเกิดจากการรวมกันของกรดอะมิโน (G-X-Y)_n โดย G คือ ไกลซีน (Glycine: Gly) เป็นองค์ประกอบร้อยละ 33 X คือโพรลีน (Proline: Pro) ประมาณร้อยละ 10 และ Y คือไฮดรอกซีโพรลีน (Hydroxyproline: Hyp) มีประมาณร้อยละ 14 (Lin และ Kuan, 2010; Shoulders และ Raines, 2009; Gelse และคณะ, 2003) โดยไฮดรอกซีโพรลีนเป็นโพรลีนที่มีการเติมหมู่ไฮดรอกซิล (-OH) ซึ่งอาศัยเอนไซม์และโคแฟกเตอร์ คือวิตามินซี (ascorbic acid) เป็นตัวช่วยให้เกิดปฏิกิริยาในกระบวนการสร้างคอลลาเจนไฟเบอร์ ซึ่งคอลลาเจนเป็นโปรตีนชนิดเดียวที่อุดมไปด้วยไฮดรอกซีโพรลีน มีมากถึงร้อยละ 14 ของคอลลาเจนในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม และไฮดรอกซีโพรลีนเองจะไม่พบในโปรตีนชนิดอื่นๆ ดังนั้นไฮดรอกซีโพรลีนจึงมักเป็นตัวบ่งชี้ปริมาณคอลลาเจนในตัวอย่างอาหาร (Lareu และคณะ, 2010)



ภาพที่ 5 โครงสร้างของโมเลกุลคอลลาเจนที่เป็นเส้นใย (fibrillar collagen)

ที่มา: Gelse และคณะ (2003)

คอลลาเจนเป็นโปรตีนหลักที่พบประมาณร้อยละ 30 ในสัตว์มีกระดูกสันหลัง (Liu และคณะ, 2015; Lin และ Kuan, 2010; Chen และคณะ, 2016; Pal และ Suresh, 2016) โดยพบว่าปัจจุบันคอลลาเจนถูกแบ่งออกเป็น 29 ชนิด (Liu และคณะ, 2012; Hu และคณะ, 2016; Shoulders และ

Raines, 2009; Kozłowska และคณะ, 2015) ได้แก่ คอลลาเจนชนิดที่ 1 2 3 5 และ 11 เป็นคอลลาเจนเส้นใย คอลลาเจนชนิดที่ 4 เป็นเยื่อคอลลาเจนที่ประกอบไปด้วยเส้นใยคอลลาเจนบางๆ และโพลีแซ็กคาไรด์พบได้ในเนื้อเยื่อผิวหนัง ส่วนคอลลาเจนชนิดที่ 6 เป็นคอลลาเจนไมโครไฟเบอร์ พบได้ในกระดูกอ่อน รก ปอด และผนังหลอดเลือด เป็นต้น แต่ชนิดของคอลลาเจนที่พบมากที่สุด คือคอลลาเจนชนิดที่ 1 และคอลลาเจนชนิดที่ 3 พบได้ในกระดูก ผิวหนังชั้นนอกสุด เอ็นกล้ามเนื้อและผนังหลอดเลือด (Gelse และคณะ, 2003; Nagai และคณะ, 2008) สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้อย่างกว้างขวาง เช่น อุตสาหกรรมอาหาร ผลิตภัณฑ์อาหารเสริมเพื่อสุขภาพ อุตสาหกรรมยา และการใช้ประโยชน์ทางการแพทย์ (Kozłowska และคณะ, 2015; Gómez-Guillén และคณะ, 2011; Liang และคณะ, 2014a; Pal และคณะ, 2015)

โดยมีการศึกษาประโยชน์ของคอลลาเจนทางด้านอุตสาหกรรมยาและทางการแพทย์พบว่า การรับประทานคอลลาเจนปริมาณ 10 กรัมต่อวัน ช่วยลดอาการปวดข้อได้ (Moskowitz, 2000; Benito-Ruiz และคณะ, 2009; Walrand และคณะ, 2008) สามารถลดริ้วรอยเหี่ยวย่น (Tanaka และคณะ, 2009) และปรับปรุงผิวให้ดีขึ้น (Zague, 2008) นอกจากนี้ช่วยปรับปรุงกระบวนการเมตาบอลิซึมของกระดูกได้ (Guillerminet และคณะ, 2010; Koyama และคณะ, 2001) ลดอาการปวดในผู้ป่วยโรคข้อเข่าและข้อสะโพกเสื่อม และป้องกันโรคกระดูกพรุน (Bonjour, 2005)

นอกจากนี้มีการศึกษาประโยชน์การใช้คอลลาเจนในอุตสาหกรรมอาหารและผลิตภัณฑ์อาหารเสริมเพื่อสุขภาพ พบว่า การใช้คอลลาเจน ที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำจะช่วยป้องกันการตกตะกอนและปัญหาการขุ่นในเครื่องดื่มได้ (Moskowitz, 2000) ทั้งนี้กฎหมายอาหารยังไม่มีข้อกำหนดสำหรับการใช้ปริมาณคอลลาเจนในผลิตภัณฑ์อาหาร อย่างไรก็ตามการเติมคอลลาเจนมากกว่าร้อยละ 30 ส่งผลให้ความหนืดในเครื่องดื่มเพิ่มสูงขึ้น (Bilek และ Bayram, 2015)

2.1.2 วัตถุดิบที่ใช้ในการสกัดคอลลาเจน

วัตถุดิบที่ใช้ในการสกัดคอลลาเจนมีความหลากหลาย ซึ่งวัตถุดิบที่ใช้ส่วนใหญ่ คือ หนังและกระดูกจากวัว สุกร และสัตว์ปีก แต่ในระยะเวลาหลายปีที่ผ่านมาได้มีการระบาดของโรควัวบ้า โรคปากและเท้าเปื่อย นอกจากนี้ยังมีโรคไข้หวัดนกที่ระบาดในสัตว์ปีก และคอลลาเจนจากหมูไม่สามารถใช้เป็นส่วนประกอบของอาหารสำหรับผู้บริโภคบางศาสนาได้ (Liu และคณะ, 2015) จึงมีการหาแหล่งวัตถุดิบต่างๆ อีกมากมายที่สามารถนำมาผลิตคอลลาเจนได้ โดยเฉพาะสัตว์น้ำ ซึ่งเป็นแหล่งของคอลลาเจนที่น่าสนใจ เช่น หนังปลาสด กระเพาะปลา ครีบ เกล็ดและก้างปลา ซึ่งมีปริมาณคอลลาเจนอยู่สูง (Niu และคณะ, 2013; Yang และคณะ, 2007) ดังนั้นผลิตภัณฑ์พลอยได้ (by-product) จาก

อุตสาหกรรมแปรรูปสัตว์น้ำ จึงสามารถใช้เป็นทางเลือกใหม่สำหรับการสกัดคอลลาเจนได้ (Kittiphattanabawon และคณะ, 2005; Kozłowska และคณะ, 2015)

2.1.3 วิธีที่ใช้ในการสกัดคอลลาเจน

การสกัดคอลลาเจนสามารถทำได้หลายวิธี ซึ่งโดยทั่วไปแล้วจะเริ่มต้นจากการนำหนังสัตว์ กระดูกสัตว์ หรือเกล็ดปลา มาล้างทำความสะอาด ลดขนาด จากนั้นกำจัดโปรตีนบริเวณผิวหนัง และกำจัดส่วนอื่นๆ ที่ไม่ใช่โปรตีนคอลลาเจน เช่น แคลเซียม ไขมัน เม็ดสี เป็นต้น แล้วจึงทำให้คอลลาเจนที่มีอยู่ละลายออกมา ด้วยวิธีต่างๆ เช่น การใช้เกลือ กรด เอนไซม์ร่วมกับกรด และเทคนิคอัลตราซาวด์ เป็นต้น

การสกัดคอลลาเจนโดยใช้เกลือ เช่น โซเดียมคลอไรด์ (0.15-2 M) ซึ่งวิธีนี้ไม่ค่อยได้รับความนิยมในการสกัดคอลลาเจน โดย Liang และคณะ (2014b) และ Wang และคณะ (2014b) สกัดคอลลาเจนจากหนังและกระดูกอ่อนปลาสดด้วยโซเดียมคลอไรด์ 0.45 M อัตราส่วน 1 ต่อ 100 (มวลต่อปริมาตร) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง กวนเบาๆ อย่างต่อเนื่อง

การสกัดคอลลาเจนโดยการใช้กรด เช่น กรดอะซิติก 0.5 M นอกจากนี้สามารถใช้กรดอินทรีย์ (organic acid) ได้แก่ กรดคลอโรอะซิติก (chloroacetic acid) กรดซิตริก (citric acid) และกรดแลคติก (lactic acid) หรือกรดอนินทรีย์ (inorganic acid) ได้แก่ กรดไฮโดรคลอริก (hydrochloric acid) ซึ่งการสกัดโดยการใช้กรดเป็นที่นิยม เนื่องจากให้ประสิทธิภาพในการสกัดที่ดีกว่าการใช้เกลือ (Kittiphattanabawon และคณะ, 2005) มีหลายงานวิจัยที่สกัดคอลลาเจนจากผลิตภัณฑ์พลอยได้ โดยใช้กรดอะซิติก ได้แก่ หนังปลา (Pal และคณะ, 2015; Wang และคณะ, 2014a; 2014b; 2014c) เกล็ด (Chuaychan และคณะ, 2015; Matmaroh และคณะ, 2011) กระเพาะปลา (Wu และคณะ, 2016) กระดูกอ่อน (Liang และคณะ, 2014a; 2014b) กระดูก (Duan และคณะ, 2009) ครีบ (Mahboob, 2015) และหัวปลา (Jeevithan และคณะ, 2015) โดยจะสกัดที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง

การสกัดคอลลาเจนโดยใช้เอนไซม์ที่สภาวะความเป็นกรด (pH 2-3) (Liu และคณะ, 2015) ซึ่งการสกัดโดยการใช้เอนไซม์ที่สภาวะความเป็นกรดจะได้คอลลาเจนที่มีขนาดโมเลกุลเล็กกว่าการสกัดโดยใช้กรดเพียงอย่างเดียวและสามารถเพิ่มผลตอบแทนของการสกัดได้ ซึ่งเอนไซม์ที่นิยมใช้ได้แก่ เปปซิน (pepsin) ทริปซิน (trypsin) และคอลลาจีเนส (collagenase)

นอกจากนี้มีการใช้เทคนิคอัลตราซาวด์ที่ 20 กิโลเฮิร์ตซ์ (kHz) และแอมพลิจูด (amplitude) ที่ใช้ร้อยละ 20-80 เพื่อใช้ในการปรับปรุงอัตราผลตอบแทนของการสกัด (Kim และคณะ, 2013; Ran และ Wang, 2014; Yang และคณะ, 2013) ในการสกัดโดยใช้อัลตราซาวด์จะต้องแช่ตัวอย่างใน กรดอะซิติกเป็นเวลา 12 ชั่วโมง จากนั้นถูกสกัดด้วยอัลตราโซนิก ซึ่งอัตราผลตอบแทนของคอลลาเจน ขึ้นอยู่กับแอมพลิจูดและระยะเวลาในการอัลตราโซนิก (Pal และ Suresh, 2016)

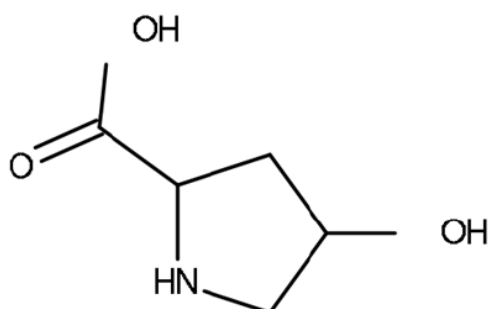
จากนั้นจึงนำไปตกตะกอนโดยใช้เกลือที่ความเข้มข้นต่างๆ ทำให้แห้ง และลดขนาดเพื่อทำ เป็นผง (Wolf และคณะ, 2009)

2.1.4 วิธีการวิเคราะห์ปริมาณคอลลาเจน

วิธีการตรวจวัดปริมาณคอลลาเจนโดยทั่วไปใช้เทคนิคสเปกโทรสโกปี อาศัยการวัดปริมาณ ของไฮดรอกซีโพรลีนซึ่งสูตรโครงสร้างแสดงดังภาพที่ 6 (Colgrave และคณะ, 2008) เนื่องจาก คอลลาเจนมีองค์ประกอบของกรดอะมิโนไฮดรอกซีโพรลีนในปริมาณสูงแตกต่างจากโปรตีนส่วนอื่นๆ โดยการทำให้ปฏิกิริยาออกซิเดชัน (oxidation) เปลี่ยนรูปไฮดรอกซีโพรลีนเป็น Pyrrole-2- carboxylic acid (Hofman และคณะ, 2011) และ ใช้ p-dimethylaminobenzaldehyde (DMBA) เป็นตัวติด ฉลากกรดอะมิโนที่น่าสนใจ ซึ่งจะสามารถตรวจวัดปริมาณของสีที่เกิดขึ้นได้ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโต มิเตอร์ ที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร ซึ่งจะคล้ายกับการวิเคราะห์หาปริมาณไฮดรอกซีโพรลีนที่ เป็นที่ยอมรับตามมาตรฐานสากล ปัจจุบัน คือ AOAC (2000) ซึ่งเป็นการวิเคราะห์ปริมาณคอลลาเจน เฉพาะในเนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ ซึ่งจะต้องย่อยตัวอย่างคอลลาเจนให้อยู่ในรูปกรดอะมิโน ด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้นหรือซัลฟูริกเข้มข้น ที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียสเป็นระยะเวลา 16 ชั่วโมง นำไปทำปฏิกิริยากับสารคลอรามินที (chloramine-T) จะได้สารผลิตภัณฑ์ที่มีสีม่วงแดง จากนั้นวัดปริมาณสีที่เกิดขึ้นด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่น 560 นาโนเมตร เพื่อ วิเคราะห์หาปริมาณไฮดรอกซีโพรลีน จากนั้นจึงนำไปคำนวณเป็นปริมาณสารคอลลาเจนต่อไป ซึ่ง เรียกเทคนิคนี้ว่า colorimetric method แต่วิธีการนี้ยังมีข้อจำกัดด้านเวลาในการเตรียมตัวอย่าง ต้องใช้เวลานานและการควบคุมสภาวะในการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันให้คงที่เป็นไปได้ยาก

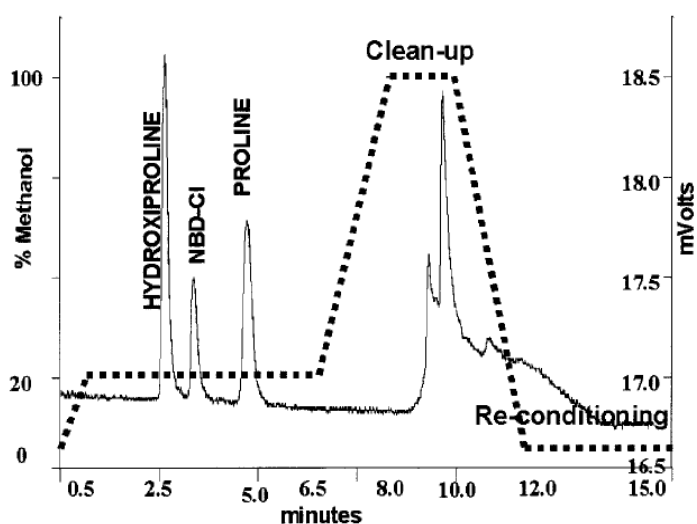
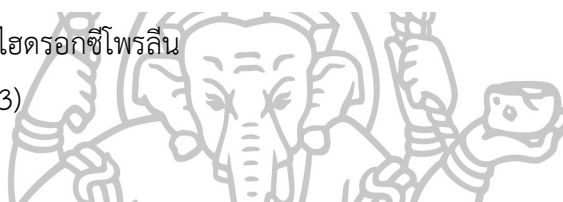
นอกจากนี้ Vazquez-Ortiz และคณะ (2005) วิเคราะห์ปริมาณคอลลาเจน โดยการย่อย คอลลาเจนด้วยกรด ตามวิธีของ AOAC (2000) และ Sobral และคณะ (2001) และทำให้กรดอะมิโน เกิดปฏิกิริยาอนุพันธ์หรือ derivatization แบบ pre-column ด้วย 4-คลอโร-7-ไนโตรเบนโซฟูราเซน (NBD-Cl) ซึ่งสามารถแยกโดยใช้โครมาโทกราฟีแบบผันกลับด้วยคอลัมน์ C18 และตรวจวัด ด้วยตัว ตรวจวัดสัญญาณชนิดฟลูออเรสเซนส์ (fluorescence detector) โดยมีความยาวคลื่นที่ให้พลังงาน กับสารหรือ excitation เท่ากับ 465 นาโนเมตร และความยาวคลื่นที่สารดูดกลืนหรือ emission

เท่ากับ 535 นาโนเมตร โดยโครมาโตแกรมของผลการวิเคราะห์ 4-ไฮดรอกซีโพรลีน โดยใช้ NBD-Cl ในการเตรียมอนุพันธ์แสดงดังภาพที่ 7



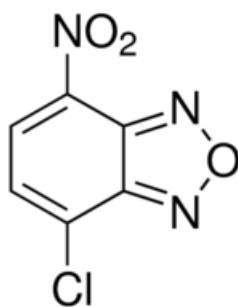
ภาพที่ 6 สูตรโครงสร้างของไฮดรอกซีโพรลีน

ที่มา: Afara และคณะ (2013)



ภาพที่ 7 โครมาโตแกรมผลการวิเคราะห์ 4-ไฮดรอกซีโพรลีน โดยใช้ NBD-Cl ในการเตรียมอนุพันธ์
ที่มา: Vazquez-Ortiz และคณะ (2005)

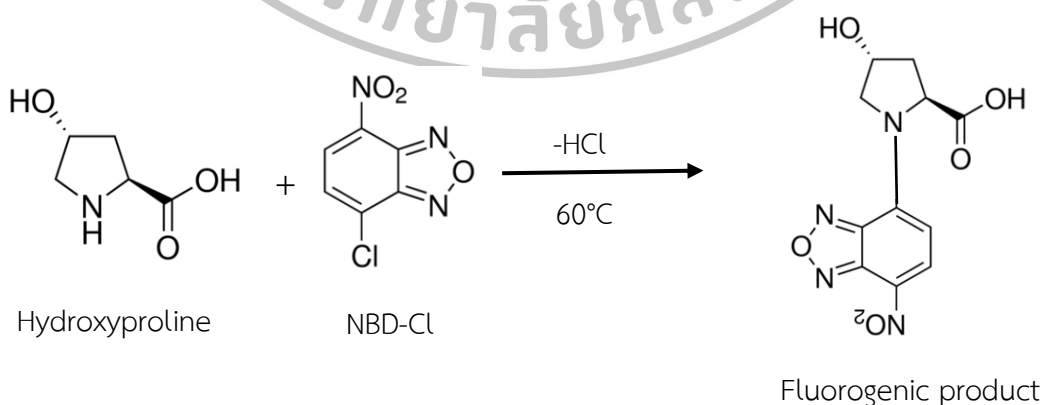
4-คลอโร-7-ไนโตรเบนโซฟูราเซน (NBD-Cl) เป็นสารที่รู้จักกันแพร่หลายในการทำอนุพันธ์กับสารที่มีโครงสร้างมีหมู่เอมีน (amine group) มีสูตรโครงสร้างแสดงดังภาพที่ 8 ซึ่งมีความสามารถในการทำปฏิกิริยากับหมู่เอมีนปฐมภูมิ (primary amine) และหมู่เอมีนทุติยภูมิ (secondary amine) ที่ก่อให้เกิดผลิตภัณฑ์เรืองแสงที่มีความคงตัว (Annenkov และคณะ, 2015; Maroulis และคณะ, 2008)



ภาพที่ 8 สูตรโครงสร้างทางเคมีของ 4-คลอโร-7-ไนโตรเบนโซฟุราแซน (NBD-Cl)
ที่มา: Annenkov และคณะ (2015)

โดยกลไกการเกิดปฏิกิริยาระหว่างไฮดรอกซีโพรลีนกับ NBD-Cl ใช้ปฏิกิริยาแทนที่แบบนิวคลีโอฟิลิก (nucleophilic substitution) ในสภาวะเบส ได้อนุพันธ์ที่มีสีเหลือง โครงสร้างทางเคมีสามารถเรืองแสงได้ เนื่องจากโครงสร้างของอนุพันธ์ที่เกิดขึ้นมีลักษณะเป็นวงแหวนอะโรมาติก (aromatic rings) และในโครงสร้างไม่มีหมู่ฮาโลเจน (halogen) ซึ่งมีความไวต่อการเกิดปฏิกิริยาเคมีสูง

การเกิดปฏิกิริยาระหว่างไฮดรอกซีโพรลีนกับ NBD-Cl แสดงดังภาพที่ 9 เกิดจากอะตอมของไนโตรเจนในหมู่เอมีนของไฮดรอกซีโพรลีนมีสภาพขั้วเป็นลบและมีความไวในการเกิดปฏิกิริยาสามารถเกิดปฏิกิริยากับคาร์บอนตำแหน่งที่ 4 ในโครงสร้างของ NBD-Cl ซึ่งมีความชอบประจุลบ (electrophile) จากนั้นอะตอมคลอรีนที่อยู่กับคาร์บอนตำแหน่งที่ 4 หลุดออกไป เรียกหมู่นี้ว่า หมู่หลุดออก (leaving group) ซึ่งอนุพันธ์ที่ได้สามารถเกิดการเรืองแสงได้

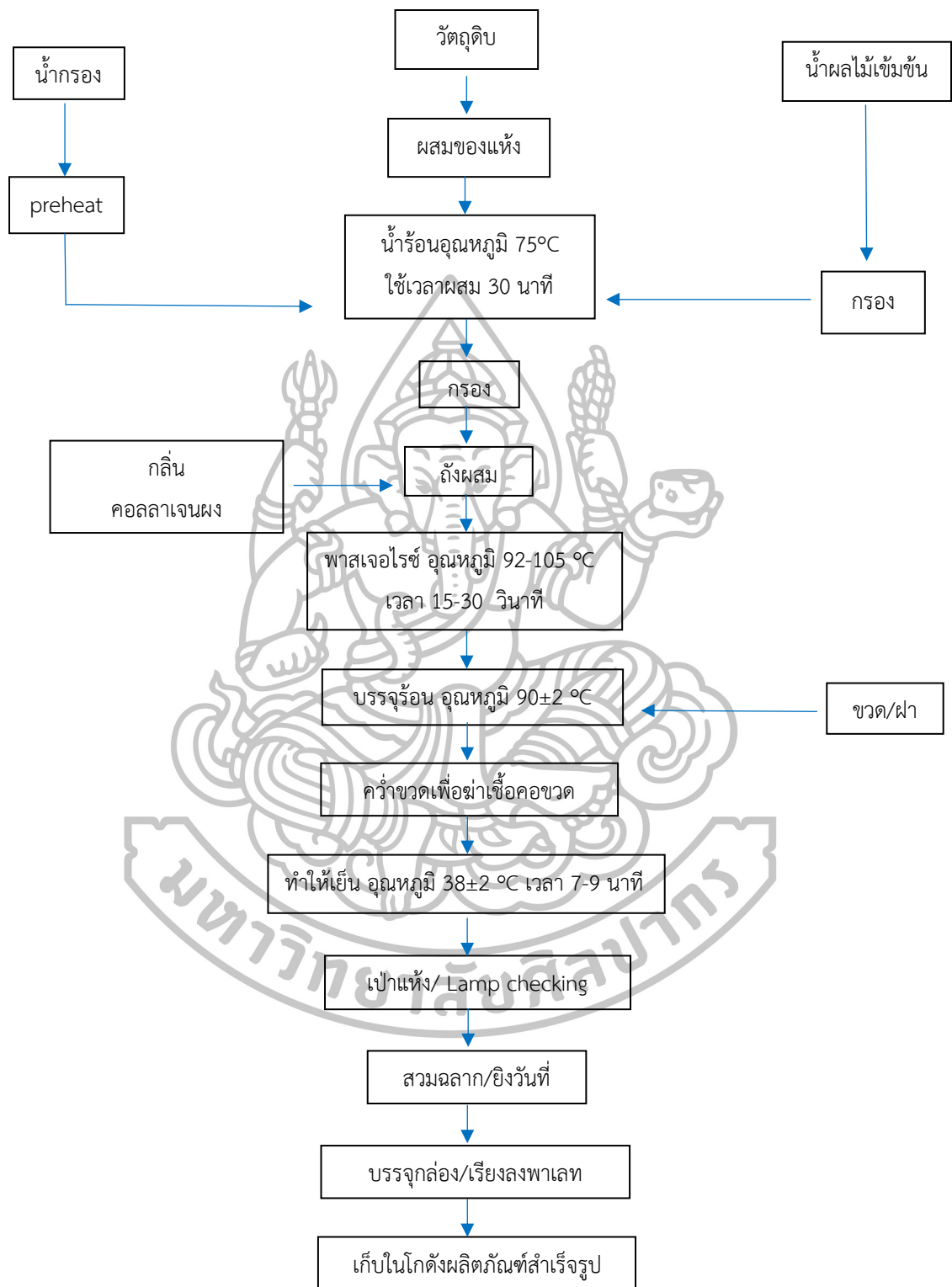


ภาพที่ 9 ปฏิกิริยาการเกิดอนุพันธ์ระหว่างไฮดรอกซีโพรลีนกับ NBD-Cl
ที่มา: Maroulis และคณะ (2008)

2.2 การผลิตเครื่องดื่มเสริมคอลลาเจน

ผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มประเภทน้ำผลไม้ได้รับความนิยมจากผู้บริโภคเป็นอย่างมาก เนื่องจากน้ำผลไม้ประกอบด้วยวิตามิน และส่วนประกอบต่างๆ ที่เป็นประโยชน์ต่อสุขภาพ ซึ่งน้ำผลไม้ที่ผู้บริโภคนิยม ได้แก่ น้ำส้ม น้ำฝรั่งรวม น้ำแอปเปิ้ล และน้ำองุ่น เป็นต้น นอกจากนี้ มีน้ำสตอร์วเบอร์รี่และน้ำทับทิม ที่มีฤทธิ์ในการต้านสารอนุมูลอิสระ (Arend และคณะ, 2017; Aaby และคณะ, 2012; Scalzo และคณะ, 2005) มีฤทธิ์ต้านการอักเสบ ป้องกันสารก่อมะเร็ง มีฤทธิ์ยับยั้งการกลายพันธุ์ ช่วยปกป้องระบบหัวใจและหลอดเลือด ช่วยปกป้องระบบประสาทส่วนกลางและลดเบาหวานชนิดที่ 2 (Beaulieu และ Obando-Ulloa, 2017; Basu และ Penugonda, 2009; Del Rio และคณะ, 2013; Johanningsmeier และ Harris, 2011)

นอกจากนี้ผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มประเภทน้ำผลไม้ยังมีการเติมสารที่เป็นประโยชน์ต่อร่างกาย เช่น คอลลาเจน ลงในผลิตภัณฑ์ในด้านการป้องกันโรคและบำรุงผิวพรรณ เป็นต้น โดยกระบวนการผลิตน้ำผลไม้เสริมคอลลาเจน มีกระบวนการผลิตเริ่มจากวัตถุดิบหลัก คือน้ำผลไม้เข้มข้น ส่วนมากจะนำเข้าจากต่างประเทศ ผ่านการแช่แข็งที่อุณหภูมิ -10 องศาเซลเซียส ในห้องเย็นเป็นเวลา 3 เดือน เมื่อจะทำการผลิต จะนำน้ำผลไม้แช่แข็งมาละลายที่อุณหภูมิห้อง ก่อนนำไปผสมกับส่วนผสมแห้ง จากนั้นส่วนผสมจะถูกแยกละลายในถังผสมขนาดเล็ก ก่อนส่งไปยังถังผสมไฟฟ้าขนาดใหญ่ ส่วนผสมต่างๆ จะถูกผสมให้เป็นเนื้อเดียวกันกับน้ำกรองและน้ำเชื่อมเป็นเวลา 30 นาที หลังจากนั้นจึงเติม สี กลิ่น รส และส่วนประกอบอื่นๆ เช่น คอลลาเจน แล้วจึงเข้าสู่ระบบพาสเจอร์ไรซ์ เพื่อทำลายจุลินทรีย์ก่อโรคที่อุณหภูมิระหว่าง 92-105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15-30 วินาที จากนั้นบรรจุร้อนที่อุณหภูมิ 82-84 องศาเซลเซียส ลงขวดพลาสติกใส (Poly Ethylene Terephthalate, PET) (Spinelli และคณะ, 2010; Manfredi และ Vignali, 2015) และถูกทำให้เย็นทันที เพื่อป้องกันการไหม้ของน้ำตาลและการสลายตัวของสี วิตามิน และคอลลาเจน โดยเฉพาะคอลลาเจน สามารถสลายตัวได้ เนื่องจากสายโพลีเปปไทด์ 3 เส้นพันกัน (triple helix) ของโครงสร้างคอลลาเจนไม่คงตัวต่อความร้อน เมื่อโครงสร้างนี้ถูกความร้อน ความร้อนจะไปทำลายพันธะไฮโดรเจน (hydrogen bond) ระหว่างสายโพลีเปปไทด์ และถ้าความร้อนนั้นสูงมากๆ จะส่งผลให้เกิดการแตกหักของพันธะเปปไทด์ที่ทำหน้าที่เชื่อมกรดอะมิโนในโปรตีน (Wu และคณะ, 2017; Usha และ Ramasami, 2004; Privalov และ Tiktopulo, 1970) นอกจากนี้ ปริมาณกรดอะมิโนไฮดรอกซีโพรลีนก็ส่งผลต่อความคงตัวของความร้อนของโครงสร้างคอลลาเจนเช่นกัน เนื่องมาจากการเชื่อมต่อของโมเลกุลน้ำระหว่างหมู่ไฮดรอกซิล (hydroxyl group, -OH) และหมู่คาร์บอนิล (carbonyl group, -C=O-) ในสายโซ่หลัก (Nagai และคณะ, 2008) จากนั้นจึงติดฉลาก ยิงวันที่ บรรจุลงกล่อง และเก็บในโกดังผลิตภัณฑ์สำเร็จรูปที่อุณหภูมิห้อง (Rahim และ Raman, 2015) แสดงดังภาพที่ 10



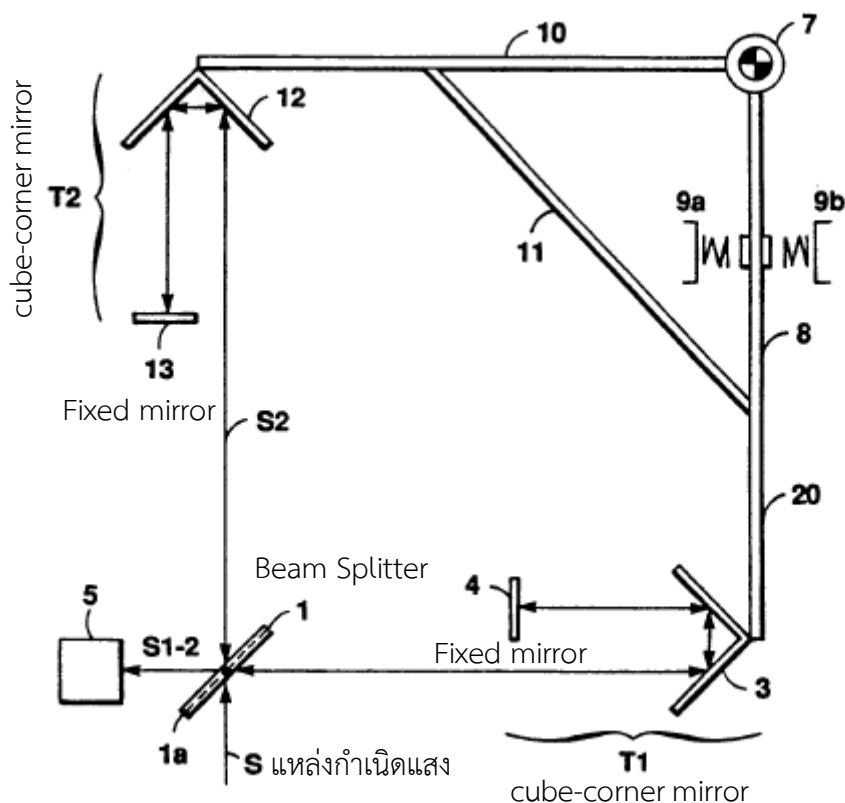
ภาพที่ 10 กระบวนการผลิตน้ำผลไม้
ที่มา: Rahim และ Raman (2015)

2.3 เทคนิคสเปกโทรสโกปีอินฟราเรดย่านใกล้

เทคนิคสเปกโทรสโกปีอินฟราเรดย่านใกล้ (Near Infrared Spectroscopy, NIRS) เป็นวิธีการวัดและวิเคราะห์รังสีคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้าในช่วงความยาวคลื่นระหว่าง 800-2500 นาโนเมตร ($12500-4000\text{ cm}^{-1}$) เป็นเทคนิคที่ใช้วิเคราะห์สารได้ทั้งเชิงปริมาณและเชิงคุณภาพ สามารถประยุกต์ใช้ได้ตั้งแต่การตรวจสอบคุณภาพวัตถุดิบไปจนถึงการตรวจสอบและปรับปรุงคุณภาพของผลิตภัณฑ์ที่ได้ โดยใช้เทคนิคทางคณิตศาสตร์ร่วมกับวิธีการทางเคมีกับโปรแกรมคอมพิวเตอร์ในการวิเคราะห์สารที่สนใจ (Huang และคณะ, 2008) โดยอาศัยการสร้างความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงจากการวัดด้วยเครื่อง NIRS กับปริมาณองค์ประกอบด้วยวิธีมาตรฐาน (reference or standard method) ที่แสดงผลในรูปแบบกราฟที่เรียกว่า สเปกตรัม โดย NIRS มีข้อได้เปรียบหลายประการ ได้แก่ เป็นวิธีทดสอบที่ไม่ทำลายตัวอย่าง รวมทั้งวิธีการเตรียมตัวอย่างไม่ยุ่งยากและใช้ตัวอย่างในปริมาณน้อย ประหยัดระยะเวลา เชื่อถือได้และปลอดภัย ใช้ทดแทนการวิเคราะห์ทางเคมีได้ในระยะยาว สามารถลดต้นทุนการผลิตได้ อีกทั้งยังไม่ต้องใช้สารเคมีในการเตรียมตัวอย่าง ดังนั้นจึงเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม ในการวิเคราะห์แต่ละครั้งสามารถนำมาวิเคราะห์เพื่อทำนายค่าต่างๆได้หลายค่าในเวลาเดียวกัน อีกทั้งยังสามารถคัดแยกสินค้าให้มีคุณภาพสูง เพื่อสร้างมาตรฐานสินค้าทางการเกษตรให้สูงขึ้นได้ (Osborne, 2007; Liu และคณะ, 2011; Pasquini, 2003; Xiaowei และคณะ, 2014)

เทคนิคสเปกโทรสโกปีอินฟราเรดย่านใกล้ อาศัยการตรวจวัดปริมาณแสงที่ถูกดูดกลืนในพันธะของโมเลกุลสารตัวอย่าง โดยเมื่อแสงส่องผ่านเข้าไปยังตัวอย่างไม่ว่าจะเป็นสารละลายหรือวัตถุสารจะเกิดการดูดกลืนแสงในช่วงอินฟราเรดย่านใกล้ ทำให้โมเลกุลของสารเกิดการสั่นที่ความถี่สูงในการสั่นของพันธะต่างๆ เช่น O-H, C-H, N-H และ C=H เป็นต้น ซึ่งเป็นโมเลกุลหลักของสารอินทรีย์ โดยการสั่นนั้นจะเกิดขึ้นในช่วงความยาวคลื่นแตกต่างกันไป ซึ่งเป็นค่าเฉพาะของแต่ละหมู่ฟังก์ชัน ดังนั้นเมื่อโมเลกุลได้รับรังสีอินฟราเรดที่มีความยาวคลื่นตรงกับพันธะในโมเลกุลจะเกิดการสั่นและดูดกลืนรังสีไว้ ทำให้มีพลังงานมากกว่าปกติ จากเดิมที่โมเลกุลอยู่ในสภาวะพื้น (vibration ground state) เมื่อได้รับพลังงานเพิ่มมากขึ้นจะอยู่ในสภาวะกระตุ้นแบบข้ามชั้น (Excited vibration level) อย่างไรก็ตามเมื่อโมเลกุลกลับสู่สภาวะพื้นก็จะปล่อยพลังงานที่รับเพิ่มเข้าไปออกมาในรูปพลังงานความร้อน ซึ่งปริมาณการดูดกลืนพลังงานแสงจะเป็นไปตามกฎของเบียร์-แลมเบิร์ต (Beer-Lambert) พลังงานของคลื่นแสงเมื่อผ่านเข้าไปในตัวอย่งจะถูกดูดกลืนไว้โดยองค์ประกอบทางเคมีในตัวอย่าง ความเข้มข้นของแสงที่ผ่านออกมาโดยทั่วไปจะเป็นสัดส่วนกับจำนวนหรือปริมาณขององค์ประกอบทางเคมีนั้น ที่มีอยู่ในตัวอย่าง (Nicolai และคณะ, 2007) ด้วยเหตุนี้จึงทำให้เทคนิค NIRS สามารถวิเคราะห์สารประกอบอินทรีย์ที่มีหมู่ C, H, O และ N เป็นองค์ประกอบได้

โดยภาพที่ 11 แสดงส่วนประกอบของระบบ NIRS ประกอบไปด้วยแหล่งกำเนิดแสง (light source) ที่เป็นหลอดทังสเตนฮาโลเจน (tungsten halogen Lamp) มีความยาวคลื่นในช่วง 800-2500 นาโนเมตร จากนั้นแสงจะเดินทางไปยัง Beam Splitter เพื่อแยกแสงออกเป็น 2 ทิศทาง โดยลำแสงทั้งสองทิศทางจะเกิดการสะท้อนภายในกระจก 3 ชั้น ที่เรียกว่า cube-corner mirror ซึ่งเคลือบด้วย เทลลูเรียม ไดออกไซด์ (TeO_2) และการสะท้อนดังกล่าวจะทำให้เกิดการแทรกสอดของแสง จากนั้นแสงทั้งสองทิศทางจะมารวมตัวกันแล้วเข้าสู่ตัวอย่าง ซึ่งบริเวณที่วัดตัวอย่างจะมีอุปกรณ์ที่เรียกว่า Integrating Sphere ซึ่งทำหน้าที่รวบรวมแสงที่ออกมาจากตัวอย่าง แล้วเข้าสู่ตัวตรวจวัดสัญญาณ (detector) โดยเครื่อง MPA จะมีตัวตรวจวัดสัญญาณ 2 ตัว ตัวแรกเป็นตัวตรวจวัดสัญญาณชนิด Indium Gallium Arsenide (InGaAs) เหมาะสำหรับของเหลว และตัวตรวจวัดสัญญาณชนิด Lead sulphide (PbS) เหมาะสำหรับของแข็ง จากนั้นจะเข้าสู่คอมพิวเตอร์ที่มีโปรแกรมรองรับต่อไป



ภาพที่ 11 ส่วนประกอบของระบบ FT-NIR (รุ่น MPA S/N2197, Bruker Germany)

ที่มา: Simon และคณะ (1994)

โดยรังสี NIR ในช่วงความยาวคลื่น $12500-9090 \text{ cm}^{-1}$ เป็นช่วงคลื่นสั้นซึ่งมีพลังงานสูงสามารถทะลุทะลวงเข้าไปในตัวอย่างได้ 5-10 มิลลิเมตร และช่วงความยาวคลื่น $9090-4000 \text{ cm}^{-1}$

เป็นช่วงคลื่นยาวจะมีพลังงานต่ำกว่าสามารถทะลุทะลวงตัวอย่างได้ 1-3 มิลลิเมตร (Nicolai และคณะ, 2007)

ระบบการวัดด้วยเทคนิค NIRS ที่นิยมใช้กันในปัจจุบันมี 4 แบบ ได้แก่ แบบส่องผ่าน (transmittance) แบบสะท้อนกลับ (reflectance) แบบส่องผ่านสะท้อนกลับ (transflectance) และแบบอินเตอร์แอคแทนซ์ (Interactance) (Pasquini, 2003; Reich, 2005)

สำหรับพีคของการดูดกลืนแสงในช่วง NIR นั้น มักจะมีลักษณะเป็นพีคที่กว้างเตี้ย (broad bands) และมีลักษณะพีคเหลื่อมซ้อนกัน (overlapping peaks) หรืออาจจะเรียกว่าเป็นแถบของการดูดกลืนแสง (absorption band) เนื่องจากเกิดการรวมตัวกันแบบโอเวอร์โทนและสเปกตรัมเกิดการรวมกันของการสั่นที่มีรูปแบบต่างกัน (combination) หรือการที่พีคของการดูดกลืนแสงหลายอันรวมกันแบบพหุคูณ (multiple of bands) ซึ่งทำให้สเปกตรัมที่ได้นั้นยากต่อการวิเคราะห์ (Nicolai และคณะ, 2007)

ดังนั้นจึงมีการใช้เทคนิคทางคณิตศาสตร์ร่วมกับวิธีการทางเคมี (chemometrics) เป็นการวิเคราะห์ความถดถอยรวมกับการปรับแต่งสเปกตรัม (pretreatment) ก่อนการวิเคราะห์ เพื่อกำจัดอิทธิพลที่หลงเหลืออยู่ทำให้ค่าสเปกตรัมที่ได้เปลี่ยนแปลงไป ได้แก่ วิธีการปรับแก้การกระเจิงแบบผลคูณ (multiplicative scatter correction, MSC) และ วิธีการปรับความแปรปรวนให้เป็นมาตรฐานและการปรับแนวโน้ม (Standard Normal Variate; SNV และ Detrending) สามารถลดหรือกำจัดอิทธิพลของการกระเจิงของแสงที่เกิดจากการยกตัวของเส้นสเปกตรัมทั้งเส้น (baseline offsets) และใช้ NIRS แบบวัดการสะท้อนกลับของแสง (diffuse reflectance) (Reich, 2005; Cen และ He, 2007)

นอกจากนี้วิธีการหาค่าอนุพันธ์ (derivative) สามารถแก้ปัญหาพีคที่มีฐานกว้างเนื่องจากการซ้อนทับกันของพีคและอิทธิพลจากการยกตัวของเส้นสเปกตรัม (baseline shift) ที่เกิดจากการกระเจิงแสง (scattering light) ซึ่งทำให้สเปกตรัมเบี่ยงเบนไป ทั้งนี้มีสาเหตุมาจากขนาดของตัวอย่างไม่สม่ำเสมอและการกระจายตัวของตัวอย่าง หรือการใช้วิธีการหาค่าอนุพันธ์ (derivative) ร่วมกับการปรับเรียบ (smoothing) เพื่อกำจัดสัญญาณรบกวนออกจากสเปกตรัม (Cen และ He, 2007)

จากนั้นสเปกตรัมที่ได้จากการบันทึกด้วยเครื่อง NIRS ภายหลังจากปรับแต่งสเปกตรัมแล้วกับองค์ประกอบในตัวอย่างที่วิเคราะห์ด้วยวิธีมาตรฐานจะถูกนำมาสร้างความสัมพันธ์ ด้วยการวิเคราะห์ถดถอยแบบหลายตัวแปร (multivariate regression) ซึ่งวิธีการวิเคราะห์เชิงปริมาณที่นิยมมากที่สุดในการวิเคราะห์ NIR ปัจจุบัน คือการถดถอยกำลังสองน้อยที่สุดบางส่วน (Partial Least Square Regression; PLSR) และการถดถอยโดยใช้องค์ประกอบหลัก (Principle Component Regression; PCR) เพื่อสร้างเป็นแบบจำลองเทียบมาตรฐาน (Calibration set) และตรวจสอบความแม่นยำของสมการมาตรฐานที่สร้างขึ้น (Validation set) ด้วยการทดสอบแบบภายนอก (external

validation) เมื่อได้สมการเทียบมาตรฐานที่เหมาะสมที่สุดแล้ว จะประเมินความสามารถของสมการเทียบมาตรฐาน โดยอธิบายได้จากค่าทางสถิติ R หรือ R^2 และค่า RPD ซึ่งเป็นสัดส่วนระหว่างค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของค่าทางเคมีและค่า SEP ของตัวอย่างในกลุ่มทดสอบความแม่นยำของสมการเทียบมาตรฐาน แสดงดังตารางที่ 1 และตารางที่ 2

ตารางที่ 1 แนวทางการอธิบายความสามารถของสมการเทียบมาตรฐานด้วยค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (coefficient of correlation, R) หรือค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (coefficient of determination, R^2)

R	R^2	ประสิทธิภาพของสมการทำนาย
± 0.5	0.25	ไม่ควรใช้ในการทำนาย
± 0.51-0.70	0.26-0.49	ความสัมพันธ์ไม่ดีพอ
± 0.71-0.80	0.50-0.64	สามารถใช้คัดเลือกเบื้องต้นได้
± 0.81-0.90	0.65-0.81	สามารถใช้ในการคัดเลือกหรือประมาณค่าเบื้องต้น
± 0.91-0.95	0.82-0.90	สามารถใช้ตรวจสอบคุณภาพได้
± 0.96-0.98	0.92-0.96	สามารถใช้ในงานประกันคุณภาพได้
± 0.99 ขึ้นไป	0.98 ขึ้นไป	สามารถใช้ได้กับทุกงาน

ที่มา: William (2007)

ตารางที่ 2 แนวทางการอธิบายความสามารถของสมการเทียบมาตรฐานด้วยค่าสัดส่วนระหว่างค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของค่าทางเคมีและค่าความผิดพลาดมาตรฐานในการทำนายของกลุ่มตัวอย่างที่ใช้ในการตรวจสอบสมการ (standard error of prediction, SEP) (RPD)

ค่า RPD	การคัดแยกกลุ่มตัวอย่าง	การประยุกต์ใช้เพื่อวิเคราะห์เชิงปริมาณ
0.0-2.3	แย่มาก (very poor)	ไม่แนะนำให้ใช้ (not recommended)
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: William (2007)

2.4 การประยุกต์ใช้เทคนิค NIRS ในการวิเคราะห์สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ

ปัจจุบันเทคนิค NIRS สามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการตรวจสอบผลิตผลทางการเกษตรและอุตสาหกรรมเกษตร (Nicolai และคณะ, 2007) อุตสาหกรรมยา (Reich, 2005) นอกจากนี้ยังมีการประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมอาหารและเครื่องดื่ม (Cen และ He, 2007; Huang และคณะ, 2008) เนื่องจากสามารถวิเคราะห์ตัวอย่างได้โดยไม่ต้องทำลายตัวอย่างและรวดเร็ว เช่น Ncama และคณะ (2017) และ Torres และคณะ (2017) ใช้เทคนิค NIRS ในการติดตามคุณลักษณะทางกายภาพและคุณลักษณะทางด้านประสาทสัมผัสในผลไม้ตระกูลส้ม Munera และคณะ (2017) ใช้เทคนิค NIRS ในการติดตามคุณภาพผลลูกพลับ และ Nordey และคณะ (2017) ใช้เทคนิค NIRS ในการติดตามคุณภาพภายในของผลมะม่วง

สำหรับการประยุกต์ใช้เทคนิค NIRS ในการวิเคราะห์สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพและความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของผลิตภัณฑ์อาหารและเครื่องดื่มนั้น พบว่า Redaelli และคณะ (2016) ใช้เทคนิค NIRS ในการติดตามความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระทั้งหมดในแป้งข้าวโพดพบว่า เทคนิค NIRS มีประสิทธิภาพในการประเมินค่าเบื้องต้นในโรงงานอุตสาหกรรมได้ ขณะที่ Caramés และคณะ (2016) ใช้เทคนิค NIRS ในการติดตามปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดและปริมาณสารแอนโทไซยานินทั้งหมดในน้ำองุ่น ผลการศึกษาพบว่าสมการทำนายปริมาณสารประกอบฟีนอลิกมีประสิทธิภาพดี ให้ค่า RMSEP เท่ากับ 0.37 มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อมิลลิลิตร และสมการทำนายปริมาณสารแอนโทไซยานิน ให้ค่า RMSEP ที่ต่ำ เท่ากับ 4.44 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม

Fernandez-Navales และคณะ (2009) และ Cozzolino และคณะ (2004) ใช้เทคนิค NIRS ในการติดตามปริมาณสารแทนนิน และสาร Malvidin-3-glucoside ในไวน์แดง โดยผลที่ได้พบว่าเทคนิคนี้มีความสามารถในการทำนายค่าต่างๆ ได้ดี เนื่องจากให้ค่า R^2 และ SEP อยู่ในเกณฑ์ที่ดี Chen และคณะ (2009) ใช้เทคนิค NIRS ในการติดตามปริมาณคาเทชินในชาเขียว ด้วยระบบการวัดแบบสะท้อนกลับ ที่ช่วงเลขคลื่น $10000-4000\text{ cm}^{-1}$ สร้างสมการทำนายด้วยวิธี PLSR พบว่าให้ค่า R^2 ของปริมาณอีพิแกลโลคาเทชิน (epigallocatechin, EGC) เท่ากับ 0.985 อีพิกคาเทชิน (epicatechin, EC) เท่ากับ 0.959 อีพิแกลโลคาเทชินแกลเลต (epigallocatechin gallate, EGCG) เท่ากับ 0.976 และอีพิกคาเทชินแกลเลต (epicatechin gallate, ECG) เท่ากับ 0.976 ซึ่งเป็นค่าที่สูงสมการจึงมีความน่าเชื่อถือ

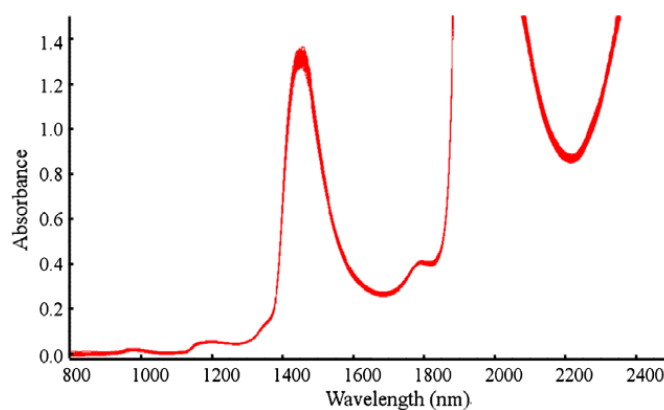
Krähmer และคณะ (2015) ศึกษาการใช้เทคนิค NIRS ในการทำนายคุณสมบัติด้านชีวเคมีในโกโก้ ที่ช่วงคลื่น 12500-3600 cm^{-1} สร้างสมการเทียบมาตรฐานด้วยวิธี PLSR พบว่าให้ค่าการทำนายองค์ประกอบต่างๆ ในโกโก้ที่สูง โดยมีค่า R^2 อยู่ในช่วง 0.82-0.93 และมีค่า RMSECV อยู่ในช่วง 0.14-0.75

Deák และคณะ (2015) ใช้เทคนิค NIRS ในการติดตามปริมาณแคโรทีนอยด์ (Carotenoids) ในน้ำมะเขือเทศ ที่ช่วงเลขคลื่น 10526-6060 cm^{-1} และ 10526-7692 cm^{-1} ด้วยระบบการวัดแบบสะท้อนกลับ พบว่าให้ค่า R^2_{CV} เท่ากับ 0.75 และค่า RMSECV เท่ากับ 6.88 ไมโครกรัมต่อกรัม Escuredo และคณะ (2013) และ Tahir และคณะ (2016a) ใช้เทคนิค NIRS ในการติดตามปริมาณสารในกลุ่มฟีนอลิก ฟลาโวนอยด์ แคโรทีนอยด์ ในน้ำผึ้ง และในขณะเดียวกัน Tahir และคณะ, (2016b) ศึกษาการใช้เทคนิค NIRS ในการติดตามปริมาณสารประกอบฟีนอลทั้งหมด ปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ และความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระในกระเจียบด้วยเช่นกัน พบว่าให้ค่า R^2 อยู่ในช่วง 0.85-0.91 และ RMSECV ในช่วง 0.08-0.33

นอกจากนี้ Zhang และคณะ (2004) ใช้เทคนิค NIRS ในการติดตามปริมาณความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระในชาเขียว และ Moncada และคณะ (2013) ใช้เทคนิค NIRS ในการติดตามปริมาณวิตามินอีและคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระในควินัว นอกจากนี้ยังมีงานอื่นๆ อีกมากที่ใช้เทคนิค NIRS ในการทำนายสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ แสดงดังตารางที่ 3

2.4.1 การใช้เทคนิค NIRS ในการวิเคราะห์ตัวอย่างที่เป็นของเหลว

การวิเคราะห์ตัวอย่างที่เป็นของเหลวด้วยเทคนิค NIRS มักจะเลือกใช้ระบบการวัดแบบส่องผ่าน (transmittance) ตัวอย่างที่เป็นสารละลายมักจะบรรจุในภาชนะควอตซ์หรือแก้วที่มีทางเดินแสงอยู่ในช่วง 1-50 มิลลิเมตร และเนื่องจากการดูดกลืนแสงจะลดลง (molar absorptivity) เมื่อใช้วัดในช่วงความยาวคลื่นสั้น ดังนั้นจึงต้องใช้ตัวอย่างที่มีความหนา แต่หากใช้วัดในช่วงความยาวคลื่นยาว พบว่า การดูดกลืนของน้ำจะสูงมาก ในตัวอย่างที่มีน้ำเป็นองค์ประกอบ ดังนั้นจึงต้องใช้ตัวอย่างที่มีความบาง เช่น การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลในน้ำเบียร์ โดยใช้ระบบการวัดแบบส่องผ่าน ที่ช่วงความยาวคลื่น 12500-4000 cm^{-1} โดยนำตัวอย่างบรรจุลงควอตซ์ที่มีความหนา 1 มิลลิเมตร ภายใต้สภาวะที่อุณหภูมิห้อง ที่ช่วงความยาวคลื่น 12500-5405 cm^{-1} และ 4878-4255 cm^{-1} โดยจะไม่นำช่วงความยาวคลื่น 5405-4878 cm^{-1} และ 4255-4000 cm^{-1} มาใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาล เนื่องจากว่าเป็นช่วงที่มีการดูดกลืนน้ำสูง (Xie และคณะ, 2009; Xie และคณะ, 2011) แสดงสเปกตรัมดังภาพที่ 12 ในขณะที่ Shao และ He (2007) ศึกษาการใช้เทคนิค NIRS ในการติดตามคุณภาพภายในของน้ำเบียร์ด้วยระบบการส่องผ่านเช่นกัน



ภาพที่ 12 สเปกตรัมที่ผ่านการปรับแต่งด้วยวิธีปรับเรียบของน้ำเบียร์รี
ที่มา: Xie และคณะ (2009)

เช่นเดียวกับ Cozzolino และคณะ (2004) ใช้เทคนิค NIRS ตรวจสอบปริมาณสาร Malvidin-3-glucoside และปริมาณแทนนินในไวน์แดง และ Martelo-Vidal และ Vázquez (2014) ใช้เทคนิค NIRS ในการทำนายปริมาณสารประกอบโพลีฟีนอลิกในไวน์แดง ด้วยระบบการวัดแบบส่องผ่านเช่นกัน ซึ่งจะเห็นได้ว่าการวัดสเปกตรัมตัวอย่างที่เป็นของเหลว นิยมใช้รูปแบบการวัดแบบส่องผ่าน แต่ไม่สามารถนำข้อมูลในช่วงความยาวคลื่นยาวมาวิเคราะห์ได้ เนื่องจากมีการดูดกลืนน้ำมาก (over absorption) โดยเฉพาะวัตถุบดทางการเกษตร อาหารสด และน้ำผลไม้ ส่งผลให้การศึกษาดูดกลืนสารที่สนใจยากขึ้น เนื่องจากการดูดกลืนของสารที่สนใจน้อยมากเมื่อเทียบกับปริมาณน้ำและฟีดของน้ำไปบดบัง ดังนั้นสเปกตรัมการดูดกลืนของน้ำจะถูกตัดออก เพื่อให้ปรากฏฟีดของสารต่างๆ และจำแนกสเปกตรัมขององค์ประกอบในตัวอย่างได้

ดังนั้นจึงมีการศึกษาระบบการวัดในรูปแบบส่องผ่านและสะท้อน (transflectance) ซึ่งจะมีอุปกรณ์ที่เรียกว่า ตัวสะท้อน (reflector) ที่ช่วยควบคุมความหนาของตัวอย่าง หรือมี physical pathlength ที่น้อยกว่า 1 มิลลิเมตร ทำให้สามารถนำข้อมูลมาใช้ในการวิเคราะห์ได้ตลอดทั้งช่วงคลื่น

โดย Downey และ Kelly (2003) ใช้เทคนิค NIRS ในการติดตามการปลอมปนของน้ำแอปเปิ้ลในน้ำสตรอว์เบอร์รี่และน้ำราสเบอร์รี่เข้มข้น โดยใช้ระบบส่องผ่านและสะท้อน (transflectance) ที่มีตัวกำหนดความหนาของตัวอย่าง 0.1 มิลลิเมตร และ Caramés และคณะ (2016) ใช้เทคนิค NIRS ในการติดตามปริมาณสารประกอบฟีนอลทั้งหมดและปริมาณสารแอนโทไซยานินทั้งหมดในน้ำองุ่น ซึ่งใช้ระบบการวัดเดียวกัน

Alamar และคณะ (2016) ใช้เทคนิค NIRS ในการประเมินคุณภาพ (ความชื้น ปริมาณกรด ปริมาณน้ำตาล ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ ค่าความเป็นกรด ด่าง และปริมาณวิตามินซี) ในฝรั่งและ

เนื้อเสาวรสแซ่แข็ง วัดสเปกตรัมในช่วง $10000-4000\text{ cm}^{-1}$ และสร้างสมการเทียบมาตรฐานด้วยวิธี PLSR พบว่าให้ค่าความผิดพลาดของการทำนายที่ต่ำ และมีค่า R^2 มากกว่า 0.70 ซึ่งสามารถนำเทคนิคนี้มาประยุกต์ใช้ในการตรวจสอบคุณภาพของตัวอย่างดังกล่าวได้

Caramès และคณะ (2017) ใช้เทคนิค NIRS ในการควบคุมคุณภาพเนกต้าฝรั่งและเนกต้ามะม่วงหิมพานต์ ได้แก่ ปริมาณกรด ปริมาณน้ำตาล ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ ค่าความเป็นกรดต่าง และปริมาณวิตามินซี แสดงค่า RMSEP ในสมการทำนายคุณภาพเนกต้าฝรั่ง โดยสมการทำนาย ปริมาณกรดเท่ากับร้อยละ 0.024 น้ำตาลทั้งหมดเท่ากับร้อยละ 0.315 ปริมาณของแข็งที่ละลายได้เท่ากับ 0.301°Brix ความเป็นกรด-ต่าง เท่ากับ 0.107 และวิตามินซีเท่ากับ 7.44 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม สำหรับสมการทำนายเนกต้ามะม่วงหิมพานต์ ให้สมการทำนายปริมาณกรดเท่ากับร้อยละ 0.025 น้ำตาลทั้งหมดเท่ากับร้อยละ 0.60 ความเป็นกรด-ต่าง เท่ากับ 0.123 และวิตามินซีเท่ากับ 4.80 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม

จากงานวิจัยที่กล่าวมาข้างต้น แสดงให้เห็นว่าสามารถประยุกต์ใช้เทคนิค NIRS ในการวิเคราะห์คุณภาพตัวอย่างน้ำผลไม้และเครื่องดื่มในอุตสาหกรรมได้ เนื่องจากให้ค่าความแม่นยำในการทำนายสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สูง ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้ที่จะนำเทคนิค NIRS มาใช้ในงานวิจัยนี้ได้

2.4.2 เทคนิคที่ใช้ในการสร้างสมการเทียบมาตรฐาน

สำหรับการสร้างสมการทำนายเชิงปริมาณในปัจจุบันนิยมใช้เทคนิค multiple linear regression (MLR) เช่น Shafie และคณะ (2015) ใช้เทคนิค NIRS ในการติดตามวัตถุแห้ง (Dry matter) ในกวี โดยเปรียบเทียบวิธีที่ใช้ในการสร้างสมการเทียบมาตรฐานทั้งหมด 4 แบบ ได้แก่ การใช้วิธี MLR โดยเลือก 1 เลขคลื่นที่มีความสัมพันธ์กับวัตถุแห้ง กับการใช้วิธี MLR โดยเลือกเลขคลื่นทั้งหมด 6 เลขคลื่น มาใช้ในการสร้างสมการ เปรียบเทียบกับวิธี PLS ที่ใช้ 81 เลขคลื่นมาสร้างสมการ กับการใช้วิธี PLS แบบใช้เลขคลื่นทั้งช่วงมาสร้างสมการ พบว่า สมการทำนายที่ใช้วิธี MLR โดยเลือกใช้ 6 เลขคลื่นให้ค่า RMSEP ที่ต่ำที่สุด และเลขคลื่นที่สัมพันธ์กับวัตถุแห้งคือ 15384, 12500, 12269, 11299, 10869 และ 10752 cm^{-1} นอกจากนี้ Liu และคณะ (2015) ใช้เทคนิค NIRS ในการติดตามปริมาณของแข็งที่ละลายได้ ในผลไม้ 3 ชนิด ได้แก่ แอปเปิ้ล ลูกแพร์ และพีช โดยเปรียบเทียบวิธีที่ใช้ในการสร้างสมการเทียบมาตรฐานทั้งหมด 3 แบบ คือใช้วิธี PLS ที่ช่วงเลขคลื่น $20000-9900\text{ cm}^{-1}$ และ $11904-10869\text{ cm}^{-1}$ และวิธี MLR โดยเลือก 3 เลขคลื่น ได้แก่ 11415, 11235 และ 11111 cm^{-1} พบว่าสมการทำนายที่ใช้วิธี PLS ให้ค่า R^2 เท่ากับ 0.97 และ RMSEP เท่ากับ 0.45 และสมการทำนายที่ใช้วิธี MLR ให้ค่า R^2 เท่ากับ 0.96 และ RMSEP เท่ากับ 0.46 พบว่าทั้งสองวิธีให้ค่าความแม่นยำของการทำนายที่ไม่แตกต่างกัน

partial least square regression (PLSR) (Ncama และคณะ, 2017; Nordey และคณะ, 2017) หรือจะเป็นการเลือกเฉพาะช่วงความยาวคลื่นที่มีความสัมพันธ์กับองค์ประกอบที่มีภายในตัวอย่างที่ต้องการศึกษา ซึ่งวิธีดังกล่าวเป็นวิธีที่มีการใช้กันมากที่สุดในปัจจุบัน โดย Viegas และคณะ (2016) ใช้เทคนิค NIRS ในการติดตามปริมาณสารแอนโทไซยานินทั้งหมดและปริมาณสารประกอบฟีนอลทั้งหมดในชมพู โดยสร้างสมการด้วยวิธี PLS ร่วมกับการปรับแต่งสเปกตรัมด้วยอนุพันธ์อันดับสอง พบว่า สมการทำนายให้ค่า R^2 เท่ากับ 0.940 และ RMSEP เท่ากับ 22.18

Khodabakhshian และคณะ (2017) ใช้เทคนิค NIRS ในการตรวจสอบคุณลักษณะภายในของทับทิม สร้างสมการเทียบมาตรฐานด้วยวิธี PLS ในช่วงเลขคลื่นตั้งแต่ $25000-9090\text{ cm}^{-1}$ ร่วมกับการปรับแต่งสเปกตรัมด้วยวิธีต่างๆ พบว่า สมการเทียบมาตรฐานที่ปรับแต่งสเปกตรัมด้วยวิธี MSC และ SNV ให้ผลดีที่สุด ในการตรวจสอบปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด ค่าความเป็นกรด ต่างและปริมาณกรด โดยมี R^2 เท่ากับ 0.93 0.84 และ 0.94 RMSEC เท่ากับ 0.22 0.06 และ 0.25 RPD เท่ากับ 6.40 4.95 และ 5.35 ตามลำดับ

Soltanikazemi และคณะ (2016) ใช้เทคนิค NIRS ในการตรวจสอบค่าคุณภาพและปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมดในน้ำมัลเบอร์รี่ สร้างสมการทำนายด้วยวิธี PLS โดยจะเลือกช่วงเลขคลื่นทั้งหมดมาใช้ในการสร้างสมการ และวิธี GA-PLS โดยใช้ 31 เลขคลื่นในการสร้างสมการ พบว่า ทั้ง 2 วิธีให้ค่าความแม่นยำที่ไม่แตกต่างกัน

นอกจากนี้ยังมีเทคนิคอื่นๆ ที่นำมาประยุกต์ใช้ในการสร้างสมการเทียบมาตรฐาน ได้แก่ MPLS (Núñez-Sánchez และ คณะ, 2016) iPLS GA-PLS และ iSPA-PLS (Mariani และ คณะ, 2015) iSPA-PLS LS-SVM MC-UVE-PLS และ MC-UVE-LS-SVM (Han และคณะ, 2017) ซึ่งวิธีดังกล่าวพัฒนาขึ้นโดยการใช้ MATLAB version R2016a และ R software

2.5 อิทธิพลขององค์ประกอบที่ซับซ้อนในอาหารต่อการวัดสเปกตรัมด้วยเทคนิค NIRS

เครื่องตี๋มในท้องตลาดมักมีการเติมวัตถุเจือปนอาหารต่างๆ และสารที่เป็นประโยชน์ ซึ่งองค์ประกอบต่างๆ ของเครื่องตี๋มจะขึ้นอยู่กับชนิดของเครื่องตี๋ม โดยมีน้ำเป็นส่วนประกอบหลักสำคัญ ทำหน้าที่เป็นตัวประสานส่วนประกอบอื่นๆ เข้าด้วยกัน นอกจากนี้ยังมีสารให้รสหวาน รสเปรี้ยว และสารให้กลิ่นรสอื่นๆ ประกอบกับสารที่เสริมให้คุณลักษณะของเครื่องตี๋มเป็นไปตามลักษณะที่ต้องการอย่างสมบูรณ์ รวมไปถึงแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ สารให้กลิ่น สี สารให้เนื้อ หรือสารที่ให้ความหนืดแก่เครื่องตี๋ม

ทั้งนี้ คุณภาพของเครื่องตี๋มขึ้นอยู่กับชนิดและปริมาณของส่วนประกอบเหล่านี้เป็นสำคัญ ปัจจัยที่มีผลต่อคุณภาพของเครื่องตี๋มมีหลายอย่าง เช่น รสชาติ กลิ่น ความหนืด เนื้อสัมผัส และสี ซึ่งองค์ประกอบดังกล่าวข้างต้นอาจส่งผลต่อการวัด NIRS เนื่องจากมีส่วนประกอบดังกล่าว มีหมู่ -OH และ C=O อยู่ในโครงสร้าง เช่นเดียวกับในคอลลาเจน ที่ประกอบไปด้วยกรดอะมิโน 3 ชนิดเรียงต่อกัน ได้แก่ โกลซีน โพรลีน และไฮดรอกซีโพรลีน มีหมู่ -NH -OH และ C=O อยู่ในโครงสร้างเช่นกัน ซึ่งอาจทำให้เกิดการคาบเกี่ยวกันของหมู่ฟังก์ชัน ดังเช่นงานวิจัยของ Subedi และคณะ (2012a) ใช้เทคนิค NIRS ในการติดตามความเป็นกรดจากการไทเทรตในสารละลายกรดซิตริก โดยแบ่งเป็น 3 ส่วนการทดลอง ส่วนที่ 1 เตรียมสารละลายกรดซิตริกที่ความเข้มข้นต่างๆ กัน ได้แก่ 0.0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0, 2.5, 5.0, 10.0, 15.0 และ 20.0 น้ำหนักต่อปริมาตร (w/v) วัดสเปกตรัมด้วยเครื่อง NIR system 6500 ที่ช่วงความยาวคลื่น 25000-4000 cm^{-1} ด้วยระบบส่องผ่าน บรรจุสารละลายกรดซิตริกในภาชนะควอตซ์ที่ความหนา 2 มิลลิเมตร และภาชนะแก้วที่มีความหนา 10 มิลลิเมตร ส่วนที่ 2 นำสารละลายกรดซิตริกในส่วนที่ 1 มาเติมซูโครสร้อยละ 10, 13 และเติมน้ำส้ม ซึ่งมีซูโครสเป็นส่วนประกอบร้อยละ 12.7 โดยกำหนดให้มีความหนาตัวอย่าง 27 มิลลิเมตร วัดสเปกตรัมที่ช่วงคลื่น 25000-9090 cm^{-1} ส่วนที่ 3 นำสารละลายกรดซิตริกมาวัดสเปกตรัมด้วยระบบส่องผ่านร่วมกับการใช้ fibre-optic พบว่าให้สัมประสิทธิ์การถดถอยของสมการที่ปรับแต่งสเปกตรัมด้วยอนุพันธ์อันดับสองเหมือนกันทั้งในสารละลายกรดซิตริก สารละลายกรดซิตริกที่เติมซูโครส และสารละลายกรดซิตริกที่เติมน้ำส้ม นอกจากนี้การวัดความเข้มข้นของกรดซิตริกในสารละลายด้วยระบบส่องผ่านให้ค่า RMSECV เท่ากับ 0.17% ในช่วง 9090-4000 cm^{-1} และ 0.39% ในช่วงคลื่นสั้น แต่พบว่าให้ค่าเพิ่มขึ้นเป็น 0.79% ในองค์ประกอบที่ซับซ้อน (น้ำส้ม) ในช่วงคลื่นสั้นเช่นกัน

เช่นเดียวกับ Subedi และคณะ (2012b) ใช้เทคนิค NIRS ในการติดตามความเป็นกรดจากการไทเทรต (TTA) ในมะนาวและลูกพีช ด้วยระบบอินเตอร์แอกแทนซ์ ในช่วงความยาวคลื่นสั้นพบว่าให้ค่าการทำนาย TTA ในลูกพีชไม่ดีเนื่องจาก เป็นผลไม้ที่มีความเป็นกรดต่ำ ส่วนค่าการทำนาย TTA ในมะนาวให้ค่าการทำนายที่ดีในมะนาวหั่นชิ้น และให้ค่าการทำนายที่ลดลงสำหรับมะนาวทั้งผล เนื่องมากจากการกระเจิงของแสงผ่านเนื้อเยื่อผลไม้เมื่อเทียบกับการส่องผ่านในตัวอย่างของเหลว



ตารางที่ 3 งานวิจัยที่แสดงถึงความสามารถของการใช้เทคนิค NIRS ในการวิเคราะห์สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ

ผลิตภัณฑ์	คุณลักษณะ	จำนวนตัวอย่าง	ความยาวคลื่น (nm) หรือเลขคลื่น (cm ⁻¹)	ระบบการวัด	การวิเคราะห์ข้อมูล	ค่าความแม่นยำ	อ้างอิง
เมล็ดข้าว	ปริมาณสารประกอบฟีนอลทั้งหมด ฟลาโวนอยด์ ความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ	264	1100-2498	แบบสะท้อนกลับ	PCA	R ² = 0.714 SEP= 69.35	Zhang และคณะ (2008)
						R ² = 0.276 SEP= 14.08	
						R ² = 0.693 SEP= 0.40	
				PLS	R ² = 0.693 SEP= 47.10		
					R ² = 0.331 SEP= 13.55		
					R ² = 0.822 SEP= 0.280		
ชาออยบอส (ชาแดง)	สารประกอบฟีนอลิก ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด ความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระทั้งหมด	340	1100-2500	แบบส่องผ่าน	PLS	R ² = 0.370 SEP= 17.49	Manley และคณะ (2006)
						R ² = 0.210 SEP= 44.97	
						R ² = 0.460 SEP= 112.63	
						R ² = 0.829 SEP= 0.28	
องุ่น	ปริมาณสารแอนโทไซยานินทั้งหมด	579	4000-10000	สะท้อนแบบแปร	iSPA-PLS	R ² = 0.650-0.890	Mariani และคณะ (2015)
						RMSEP= 7.55-9.35	

ตารางที่ 3 งานวิจัยที่แสดงถึงความสามารถของการใช้เทคนิค NIRS ในการวิเคราะห์สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ (ต่อ)

ผลิตภัณฑ์	คุณลักษณะ	จำนวน ตัวอย่าง	ความยาวคลื่น (nm) หรือเลขคลื่น (cm ⁻¹)	ระบบการวัด	การวิเคราะห์ ข้อมูล	ค่าความแม่นยำ	อ้างอิง
ไวน์องุ่น	ปริมาณสารแอนโทไซยานิน	50	928-1695	แบบสะท้อน กลับ	SVR PLSR	R ² = 0.941 RMSEP= 0.0046 R ² = 0.841 RMSEP= 0.0129	Chen และคณะ (2015)
แอปเปิ้ล	ความสามารถในการเป็นสารต้าน อนุมูลอิสระทั้งหมด ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ ทั้งหมด	92	6267-4173 10000-4000	fibre optic probe สะท้อนแบบ แพร่	PLS	R ² = 0.850 SEP= 0.13 R ² = 0.760 SEP= 0.55	Schmutzler และ Huck (2016)
มัลเบอร์รี่	ปริมาณสารแอนโทไซยานิน ทั้งหมด ความสามารถในการเป็นสารต้าน อนุมูลอิสระ	180	380-1030	แบบสะท้อน กลับ	PLSR LS-SVM	R ² = 0.959 RPD= 4.96 R ² = 0.995 RPD= 14.26	Huang และคณะ (2017)

ตารางที่ 3 งานวิจัยที่แสดงถึงความสามารถของการใช้เทคนิค NIRS ในการวิเคราะห์สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ (ต่อ)

ผลิตภัณฑ์	คุณลักษณะ	จำนวนตัวอย่าง	ความยาวคลื่น (nm) หรือเลขคลื่น (cm ⁻¹)	ระบบการวัด	การวิเคราะห์ข้อมูล	ค่าความแม่นยำ	อ้างอิง
มะเขือเทศราชินี อบแห้ง	ไลโคปีน ปริมาณกรดทั้งหมด ปริมาณน้ำตาล ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด	92	800–2500	แบบสะท้อนกลับ	PLSR	R ² = 0.919 RMSEP= 18.6	Ding และ คณะ (2016)
						R ² = 0.814 RMSEP= 0.22	
						R ² = 0.975 RMSEP= 1.21	
					RBF-NN	R ² = 0.904 RMSEP= 0.12	
						R ² = 0.939 RMSEP= 16.1	
						R ² = 0.880 RMSEP= 0.18	
กาแฟบด	กรดกาเฟอิก ค่าเฟอีน คาเทชิน กรดคลอโรจีนิก ทีโอฟิลลีน	61	10000-4000	แบบสะท้อนกลับ	PLS	R ² = 0.922 RMSEP= 32.40	Magalhães และคณะ (2016)
						R ² = 0.945 RMSEP= 655.00	
						R ² = 0.877 RMSEP= 4.40	
						R ² = 0.708 RMSEP= 352.00	
						R ² = 0.845 RMSEP= 38.50	

ตารางที่ 3 งานวิจัยที่แสดงถึงความสามารถของการใช้เทคนิค NIRS ในการวิเคราะห์สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ (ต่อ)

ผลิตภัณฑ์	คุณลักษณะ	จำนวนตัวอย่าง	ความยาวคลื่น (nm) หรือเลขคลื่น (cm ⁻¹)	ระบบการวัด	การวิเคราะห์ข้อมูล	ค่าความแม่นยำ	อ้างอิง
ข้าวบาร์เลย์	ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด	135	1100-2500	แบบสะท้อนกลับ	PLS	R ² = 0.934 RMSEP= 149.43	Han และคณะ (2017)
					LS-SVM	R ² = 0.948 RMSEP= 140.68	
กรดพี คูมาริก		165			MC-UVE-PLS	R ² = 0.948 RMSEP= 139.57	
					MC-UVE-LS-SVM	R ² = 0.949 RMSEP= 138.54	
						R ² = 0.958 RMSEP= 0.12	
						R ² = 0.940 RMSEP= 0.15	
						R ² = 0.953 RMSEP= 0.13	
						R ² = 0.961 RMSEP= 0.12	



บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 วัตถุประสงค์

3.1.1 วัตถุประสงค์และอุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย

ในการศึกษาครั้งนี้ใช้คอลลาเจนทางการค้า ความบริสุทธิ์ร้อยละ 95.10 โดยซื้อมาจากบริษัท คอสมิก คอนคอร์ด์ คอร์ปอเรชั่น จำกัด เตรียมตัวอย่างสำหรับการศึกษาในตอนต้นที่ 1 เรื่องการศึกษาความเป็นไปได้ในการใช้เทคนิค NIRS ในการติดตามปริมาณคอลลาเจนในสารละลายคอลลาเจน ที่เตรียมจากคอลลาเจนทางการค้า ที่มีความบริสุทธิ์ร้อยละ 95.10 และตอนที่ 2 เรื่องการศึกษาอิทธิพลของวัตถุดิบอาหาร ได้แก่ น้ำตาลซูโครส วิตามินซี โซเดียมเบนโซเอท และ ซิงค์กลูโคเนต ต่อการวัดปริมาณคอลลาเจนด้วยเทคนิค NIRS ในสารละลายคอลลาเจน ที่เตรียมจากคอลลาเจนทางการค้า ที่มีความบริสุทธิ์ร้อยละ 95.10 และสุ่มซื้อผลิตภัณฑ์น้ำผลไม้เสริมคอลลาเจนจำนวน 9 ยี่ห้อ จากร้านค้าปลีกภายในประเทศ จำนวนตัวอย่างรวมทั้งหมด 114 ตัวอย่าง สำหรับใช้ในการศึกษาตอนที่ 3 เรื่องการศึกษาความเป็นไปได้ของการใช้เทคนิค NIRS ในการติดตามปริมาณคอลลาเจนในตัวอย่างผลิตภัณฑ์น้ำผลไม้เสริมคอลลาเจนที่มีวางจำหน่ายในท้องตลาด

3.1.2 สารเคมี

1. น้ำกลั่น (Distillated Water, VUNIQUE, Thailand)
2. กรดไฮโดรคลอริก (Hydrochloric acid, QRëC, New Zealand) เกรด 37%
3. เมทานอล (Methanol HPLC grade, RCI Labscan, Thailand)
4. อะซิโตนไนไตรล์ (Acetonitrile HPLC grade, RCI Labscan, Thailand)
5. โซเดียมไฮดรอกไซด์ (Sodium hydroxide, Merck, Germany)
6. โพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ (Potassium hydroxide (KOH), Ajax Finechem, Australia)
7. กรดบอริก (Boric acid, Ajax Finechem, Austral

8. โซเดียม ฟอสเฟต โมโนเบสิก (Sodium phosphate monobasic ($\text{NaH}_2\text{PO}_4\cdot\text{H}_2\text{O}$), Carlo Erba Reagent, USA)
9. สารมาตรฐานทรานส์-4-ไฮดรอกซี-แอล-โพรลีน (trans-4-Hydroxy-L-proline $\geq 99\%$, Fluka, China)
10. สารอนุพันธ์ 4-คลอโร-7-ไนโตรเบนโซฟูราแซน (4-chloro -7-nitrobenzofurazan (NBD-Cl), Sigma-Aldrich, Austria)
11. สารคอลลาเจนที่ซื้อมาทางการค้า (ยี่ห้อ Colla 1000D, บริษัท คอสมิก คอนคอร์ด คอร์ปอเรชั่น จำกัด, ประเทศไทย)
12. น้ำตาลซูโครส (บริษัท น้ำตาลมิตรผล จำกัด, ประเทศไทย)
13. กรดแอสคอร์บิก (บริษัท เคมีภัณฑ์ คอร์ปอเรชั่น จำกัด, ประเทศไทย)
14. โซเดียมเบนโซเอท (บริษัท เคมีภัณฑ์ คอร์ปอเรชั่น จำกัด, ประเทศไทย)
15. ซิงค์กลูโคเนต (บริษัท รวมเคมี 1986 จำกัด, ประเทศไทย)

3.1.3 เครื่องมือ

1. เครื่องสเปกโทรสโกปีอินฟราเรดย่านใกล้แบบ FT-NIR Spectrometer (รุ่น MPA S/N 2197, บริษัท Bruker, Germany)
2. เครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (High Performance Liquid Chromatography) (Shimadzu model RF-20A prominence fluorescence, degassing unit (DGU-20A3R); LC- 20AD, Japan; heating box model T-120D, Thailand)
3. เครื่อง Ultrasonic (รุ่น 360D, บริษัท Advance Ceramics Technology, Malaysia)
4. เครื่องวัดปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ (Digital refractometer) (รุ่น Pal 1, Atago, Japan)
5. เครื่องวัดความเป็นกรด – ด่าง (pH meter) (รุ่น PHM 210, Metro Lab Co., Ltd. France)
6. เครื่องวัดความหนืดแบบดิจิตอล (ยี่ห้อ Brookfield รุ่น DV2T, Brookfield Engineering Laboratories, USA)
7. เครื่องวัดสี (Tintometer) (ยี่ห้อ Lovibond® รุ่น SV 100, Tintometer, Germany)

8. เครื่องชั่งน้ำหนักละเอียด 4 ตำแหน่ง (Digital balance รุ่น BP 221S, Sartorius, Germany)
9. เครื่องชั่งน้ำหนักแบบตัวเลข แบบทศนิยม 2 ตำแหน่ง (Digital balance, TE 3102S Sartorius, Germany)
10. หม้อนึ่งฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ (Autoclave) (ยี่ห้อ TOMY รุ่น Autoclave SS-325, TOMY SEIKO, Tokyo, Japan)
11. เครื่องกวนสารละลาย (magnetic stirrer) (ยี่ห้อ CAT รุ่น Topolino, IKA, Germany)
12. เครื่องเขย่าสารละลาย (Vortex mixer) (Vortex-Genie2, รุ่น G560E, Scientific Industries, USA)
13. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water bath) (รุ่น MEM-1 WNB 7, ยี่ห้อ MEMMERT, Germany)
14. เครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุน (Rotary evaporator) (รุ่น RV 10 B S99, IKA, Malaysia)
15. คอลัมน์ Luna C18 (2) 5 ไมโครเมตร 100 อังสตรอม ขนาด 250x4.6 มิลลิเมตร (Phenomenex, Torrance, USA)
16. NIR sample cup ใช้ petri dish (Duran, steriplan, Germany) ขนาด 100 มิลลิเมตร x 15 มิลลิเมตร
17. NIR sample cell สำหรับวัดตัวอย่างที่เป็นของเหลว มี path length 0.2 มิลลิเมตร

3.2 วิธีการทดลอง

ในการศึกษานี้แบ่งการศึกษาออกเป็น 3 ส่วนการทดลอง ได้แก่ (1) การศึกษาความเป็นไปได้ในการใช้เทคนิคสเปกโทรสโกปีอินฟราเรดย่านใกล้ในการติดตามปริมาณคอลลาเจนในสารละลายคอลลาเจนที่มีความบริสุทธิ์ร้อยละ 95.10 (2) การศึกษาอิทธิพลของวัตถุเจือปนอาหารต่อการวัดปริมาณคอลลาเจนด้วยเทคนิค สเปกโทรสโกปีอินฟราเรดย่านใกล้ในสารละลายคอลลาเจนที่มีความบริสุทธิ์ร้อยละ 95.10 และ (3) การศึกษาความเป็นไปได้ของการใช้เทคนิคสเปกโทรสโกปีอินฟราเรดย่านใกล้ในการติดตามปริมาณคอลลาเจนในตัวอย่างผลิตภัณฑ์น้ำผลไม้เสริมคอลลาเจนที่มีวางจำหน่ายในท้องตลาด ซึ่งมีรายละเอียดการศึกษาดังนี้

3.2.1 การศึกษาความเป็นไปได้ในการใช้เทคนิคสเปกโทรสโกปีอินฟราเรดย่านใกล้ในการติดตามปริมาณคอลลาเจนในสารละลายคอลลาเจนที่มีความบริสุทธิ์ร้อยละ 95.10

3.2.1.1 การเตรียมตัวอย่าง

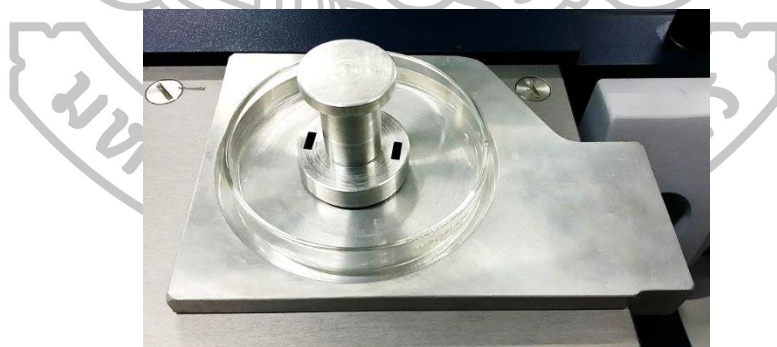
ในการศึกษานี้ทำการเตรียมตัวอย่างสารละลายคอลลาเจนจำนวน 110 ตัวอย่าง โดยนำสารคอลลาเจนทางการค้า ที่มีความบริสุทธิ์ร้อยละ 95.10 (ยี่ห้อ Colla 1000 D, บริษัท คอสมิก คอนคอร์ต คอร์ปอเรชั่น จำกัด) มาละลายในน้ำกลั่นให้มีความเข้มข้น 10,000 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อเป็น stock solution โดยชั่งคอลลาเจน 10 กรัมละลายในน้ำกลั่น 1 ลิตร จากนั้น เตรียมสารละลายคอลลาเจนที่มีความเข้มข้นแตกต่างกันในช่วง 500-9,000 มิลลิกรัมต่อลิตร จาก stock solution จะได้สารละลายคอลลาเจนที่มีความเข้มข้นต่างกันซึ่งเป็นความเข้มข้นของคอลลาเจน อยู่ในช่วงที่มีการเติมในเครื่องตีมน้ำผลไม้เสริมคอลลาเจนที่จำหน่ายในประเทศ แสดงรายละเอียดดังตารางที่ 4

ตารางที่ 4 การเตรียมตัวอย่างสารละลายคอลลาเจนที่มีความเข้มข้นแตกต่างกัน จาก stock solution 10,000 มิลลิกรัมต่อลิตร

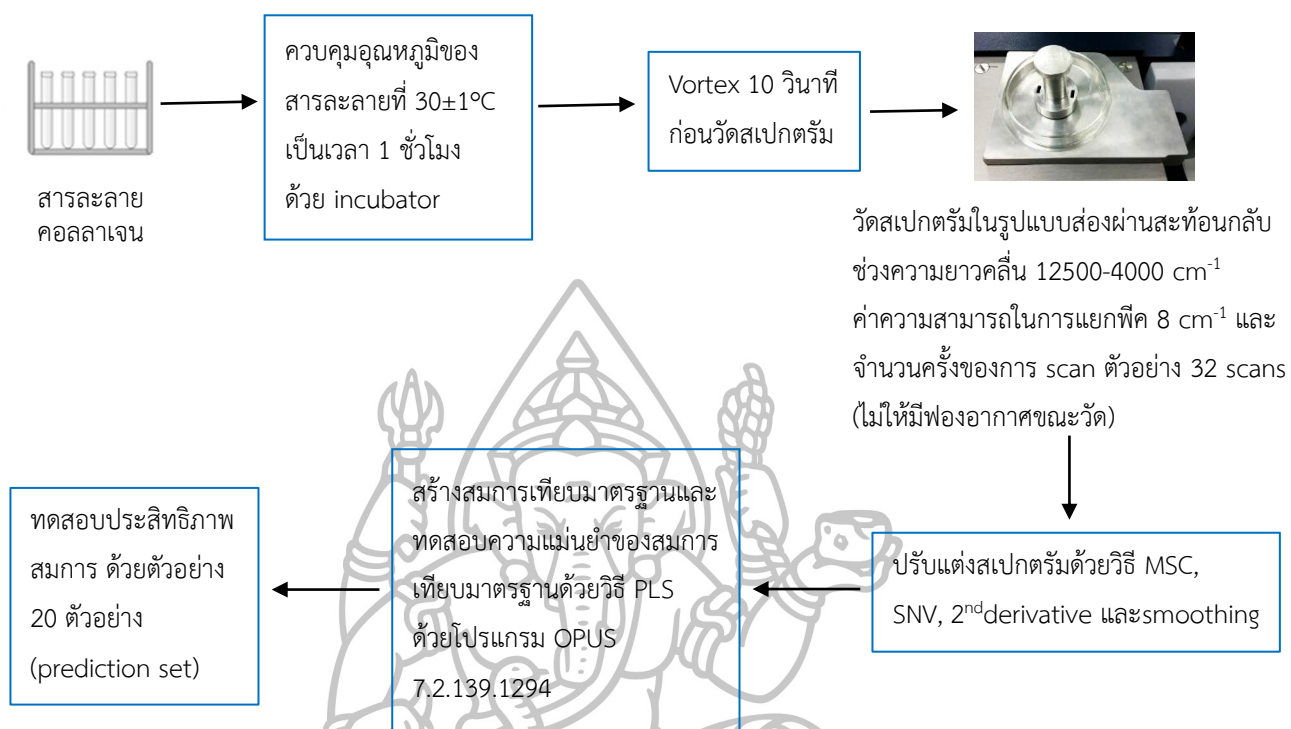
ตัวอย่างสารละลายคอลลาเจน (mg/L)	สารคอลลาเจนทางการค้า (g)	สารละลาย stock solution (ml)	น้ำกลั่น (ml)	จำนวนตัวอย่าง
500	-	0.5	9.5	10
1,000	-	1	9	10
2,000	-	2	8	10
3,000	-	3	7	10
4,000	-	4	6	10
5,000	-	5	5	10
6,000	-	6	4	10
7,000	-	7	3	10
8,000	-	8	2	10
9,000	-	9	1	10
10,000 (stock solution)	10	-	1,000	10
			รวม	110

3.2.1.2 การวัดสเปกตรัมสารละลายคอลลาเจนด้วยเครื่องสเปกโทรสโกปีอินฟราเรดย่านใกล้

นำตัวอย่างที่เตรียมได้จากข้อ 3.2.1.1 มาทำการวัดสเปกตรัมด้วยเครื่องสเปกโทรสโกปีอินฟราเรดย่านใกล้ (FT-NIR spectrometer รุ่น MPA) โดยก่อนการวัดสเปกตรัมตัวอย่างสารละลายคอลลาเจนต้องควบคุมอุณหภูมิของสารละลายที่ 30 ± 1 องศาเซลเซียส ซึ่งเป็นอุณหภูมิที่ใช้ในการขนส่งและเก็บรักษาตามภาคอุตสาหกรรม เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ด้วย incubator จากนั้น ปิเปตสารละลายคอลลาเจน ปริมาตร 10 มิลลิลิตร (ml) ลงบนจานแก้วกลมขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 100 มิลลิเมตร (mm) สูง 15 มิลลิเมตร (mm) และวางทับด้วยตัวสะท้อน (reflector) เพื่อเป็นการควบคุมความหนาของตัวอย่างให้มีความหนาหรือ physical pathlength เท่ากับ 0.2 มิลลิเมตร (mm) บริเวณกลางจานแก้ว และในขณะที่วางตัวสะท้อนจะต้องระวังไม่ให้เกิดฟองอากาศขณะวัด แสดงดังภาพที่ 13 โดยวัดตัวอย่างที่ความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ แล้วใช้ค่าเฉลี่ยข้อมูลสเปกตรัมที่ได้จากการวัดทั้ง 3 ครั้ง เป็นตัวแทนข้อมูลสเปกตรัมของตัวอย่างนั้นๆ วัดสเปกตรัมในรูปแบบการวัดแบบส่องผ่านสะท้อนกลับ (transflectance) ช่วงความยาวคลื่น 800-2500 นาโนเมตรหรือมีเลขคลื่น $12500-4000 \text{ cm}^{-1}$ ที่ค่าความสามารถในการแยกพีค หรือ resolution 8 cm^{-1} และจำนวนครั้งของการ scan ตัวอย่างหรือ sample scan time 32 ครั้ง แสดงการวัดสเปกตรัมสารละลายคอลลาเจนดังภาพที่ 14



ภาพที่ 13 การวัดสเปกตรัมตัวอย่างสารละลายคอลลาเจนโดยวางอุปกรณ์ในระบบสะท้อนผ่านตัวอย่าง



ภาพที่ 14 ขั้นตอนการสร้างสมการเทียบมาตรฐานสารละลายคอลลาเจน

3.2.1.3 การปรับแต่งสเปกตรัม

ก่อนทำการวิเคราะห์ข้อมูลต้องทำการปรับแต่งเส้นสเปกตรัม (pretreatment) ก่อนเพื่อลดสัญญาณรบกวน (noise) และอิทธิพลอื่นๆ ภายนอกที่ไม่สามารถควบคุมได้ โดยวิธีปรับแต่งสเปกตรัมที่ใช้ ได้แก่

- (1) การปรับแก้การกระเจิงแบบผลคูณ (multiplicative scatter correction, MSC)
- (2) การปรับความแปรปรวนให้เป็นมาตรฐาน และการปรับแนวโน้ม (standard normal variate, SNV)
- (3) อนุพันธ์อันดับหนึ่ง (first derivative, 1st derivative)
- (4) อนุพันธ์อันดับสอง (second derivative, 2nd derivative)
- (5) การปรับเรียบ (smoothing) แบบซาวิตสกี-โกลเลย์ (Savitzky-Golay, SG) หรือ
- (6) ใช้หลายวิธีร่วมกัน

3.2.1.4 การสร้างสมการเทียบมาตรฐาน

สร้างสมการเทียบมาตรฐานด้วยโปรแกรม OPUS Version 7.2.139.1294 โดยการนำสเปกตรัมที่ได้จากข้อ 3.2.1.3 มาแบ่งกลุ่มตัวอย่างออกเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ใช้ในการสร้างสมการเทียบมาตรฐาน (Calibration set) โดยตัวอย่างในกลุ่มนี้จะต้องมีความหลากหลายครอบคลุมตัวอย่างที่คาดว่าจะพบในอนาคต จากนั้นตรวจสอบประสิทธิภาพของสมการเทียบมาตรฐาน (Validation set) เป็นกลุ่มที่ 2 เพื่อเป็นการเลือกสมการเทียบมาตรฐานที่มีความเหมาะสมมากที่สุด แบบทดสอบภายนอก (test set) ในอัตราส่วน 70 ต่อ 30 โดยตัวอย่างในกลุ่ม Calibration set จะต้องมีความกว้างเพียงพอครอบคลุมตัวอย่างในกลุ่ม Validation set และต้องมีจำนวนมากกว่า และจะแบ่งกลุ่มตัวอย่างด้วยการเรียงลำดับค่าทางเคมีจากน้อยไปมาก จากนั้นกำหนดสามตัวอย่างแรกและสามตัวอย่างสุดท้ายเป็นกลุ่ม Calibration set ส่วนตัวอย่างที่เหลือให้สลับสัดส่วนตัวอย่างตามต้องการ โดยในการสร้างสมการเทียบมาตรฐานด้วยโปรแกรม OPUS Version 7.2.139.1294 เลือกใช้ฟังก์ชันการหาความสัมพันธ์ที่เหมาะสมที่สุดด้วยฟังก์ชันอัตโนมัติ (optimize) เพื่อเป็นแนวทางในการตรวจสอบช่วงคลื่นและเทคนิคการปรับแต่งข้อมูลสเปกตรัมที่มีประสิทธิภาพ โดยใช้วิธีการถดถอยกำลังสองน้อยที่สุดบางส่วน (Partial Least Square Regression, PLSR) และเลือกช่วงความยาวคลื่นที่ให้ผลในการสร้างสมการเทียบมาตรฐานที่เหมาะสมที่สุด โดยเลือกความยาวคลื่นให้ครอบคลุมกับองค์ประกอบที่ต้องการหาให้มากที่สุดหรือเลือกจากความยาวคลื่นอ้างอิงที่บ่งบอกถึงช่วงความยาวคลื่นที่คาดว่าจะมีความสัมพันธ์กับค่าที่จะทำการวิเคราะห์

พิจารณาประสิทธิภาพของสมการจากค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (Coefficient of correction) หรือ R^2 และ RPD (Ratio of standard error of prediction to standard deviation) ที่สูง ค่าความผิดพลาดมาตรฐานในการทำนายของกลุ่มตัวอย่างสร้างสมการเทียบมาตรฐาน (Standard Error of Calibration) หรือ SEC และ ค่าความผิดพลาดมาตรฐานในการทำนายของกลุ่มตัวอย่างทวนสอบสมการเทียบมาตรฐาน (Standard Error of Prediction) หรือ SEP ที่ต่ำ นอกจากนี้ยังมีจำนวนตัวแปร (PLS factor) และค่าความคลาดเคลื่อนเฉลี่ยหรือ bias ซึ่งค่าที่ได้สามารถคำนวณได้จากสมการในภาคผนวก ก

ซึ่งการสร้างสมการเทียบมาตรฐานนี้ เพื่อให้ทราบลักษณะสเปกตรัมของสารละลายคอลลาเจน และเพื่อที่จะศึกษาอิทธิพลของความเข้มข้นที่แตกต่างกัน

3.2.1.5 การทดสอบประสิทธิภาพของสมการเทียบมาตรฐาน

ทำการทดสอบประสิทธิภาพของสมการเทียบมาตรฐานด้วยตัวอย่างน้ำผลไม้เสริมคอลลาเจน จำนวน 20 ตัวอย่าง (prediction set) ซึ่งเป็นตัวอย่างที่ซื้อใหม่จากท้องตลาด โดยมีตัวอย่าง E2500 จำนวน 3 ขวด E3000 จำนวน 4 ขวด D2000 จำนวน 4 ขวด A2000 จำนวน 5 ขวด I5000 จำนวน 2 ขวด และ H5000 จำนวน 2 ขวด โดยก่อนวัดสเปกตรัมตัวอย่างที่ซื้อใหม่จะทำการควบคุมอุณหภูมิของสารละลายที่ 30 ± 1 องศาเซลเซียส ซึ่งเป็นอุณหภูมิที่ใช้ในการขนส่งและเก็บรักษาตามภาคอุตสาหกรรม เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ด้วย incubator จากนั้น ปิเปตสารละลายคอลลาเจน ปริมาตร 10 มิลลิลิตร (ml) ลงบนจานแก้วกลมขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 100 มิลลิเมตร (mm) สูง 15 มิลลิเมตร (mm) และวางทับด้วยตัวสะท้อน (reflector) และวัดสเปกตรัมเหมือนข้อ 3.2.1.2 โดยในการทดสอบประสิทธิภาพการทำนายจะพิจารณาจากค่าระยะห่างมาหาลาโนบิสเฉลี่ย (Average Mahalanobis Distance) ถ้าพบว่าเกินขีดจำกัดของค่านี้ ตัวอย่างนั้นก็จะเป็น Outlier และค่าความคลาดเคลื่อน (%error) ที่ต่ำ แสดงการคำนวณ %error ดังภาคผนวก ก

3.2.1.6 การวัดสเปกตรัมคอลลาเจนผงด้วยเครื่องสเปกโทรสโกปีอินฟราเรดย่านใกล้

นำผงคอลลาเจนทางการค้า เกล็ดบนจานแก้วกลมที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 100 มิลลิเมตร (mm) สูง 15 มิลลิเมตร (mm) ให้เต็มจานแก้ว โดยไม่มีการกดอัด จากนั้นปาดผงคอลลาเจนส่วนเกินออก และต้องระวังไม่ให้กดอัดตัวอย่าง จากนั้นจะวัดสเปกตรัมทั้งหมด 5 จุด โดยการหมุนจานแก้ว แล้วใช้ค่าเฉลี่ยข้อมูลสเปกตรัมที่ได้จากการวัดทั้ง 5 ครั้ง เป็นตัวแทนข้อมูลสเปกตรัมของตัวอย่างนั้นๆ วัดสเปกตรัมในรูปแบบการวัดแบบสะท้อนกลับ (reflectance) ช่วงเลขคลื่น $12500\text{-}4000\text{ cm}^{-1}$ ที่ค่าความสามารถในการแยกพีค หรือ resolution 32 cm^{-1} และจำนวนครั้งของการ scan ตัวอย่าง หรือ sample scan time 64 ครั้ง แสดงการวัดสเปกตรัมสารละลายคอลลาเจน ดังภาพที่ 15



ภาพที่ 15 การวัดสเปกตรัมตัวอย่างคอลลอยด์ด้วยระบบสะท้อนกลับ



3.2.2 การศึกษาอิทธิพลของวัตถุเจือปนอาหารต่อการวัดปริมาณคอลลาเจนด้วยเทคนิคสเปกโทรสโกปีอินฟราเรดย่านใกล้ในสารละลายคอลลาเจนที่มีความบริสุทธิ์ร้อยละ

95.10

ในการผลิตน้ำผลไม้เพื่อสุขภาพทั่วไปจะมีการเติมวัตถุเจือปนอาหาร เพื่อวัตถุประสงค์ต่างๆ เช่น ยืดอายุการเก็บรักษา เสริมสี กลิ่น และรสของเครื่องดื่ม รวมไปถึงรักษาคุณค่าของเครื่องดื่ม เป็นต้น

ทั้งนี้วัตถุเจือปนอาหารที่นิยมเติมลงในน้ำผลไม้เพื่อสุขภาพทั่วไปสามารถสังเกตได้จากฉลากของผลิตภัณฑ์ที่มีในท้องตลาดได้แก่ น้ำตาลซูโครส วิตามินซี โซเดียมเบนโซเอท และ ซิงค์กลูโคเนต ทั้งนี้วัตถุเจือปนอาหารชนิดต่างๆ อาจแสดงอิทธิพลต่อการวัดสเปกตรัมคอลลาเจนในผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มด้วยเทคนิคสเปกโทรสโกปีอินฟราเรดย่านใกล้ ดังนั้นการศึกษานี้จึงได้ศึกษาอิทธิพลของสารดังกล่าว โดยมีรายละเอียดดังนี้

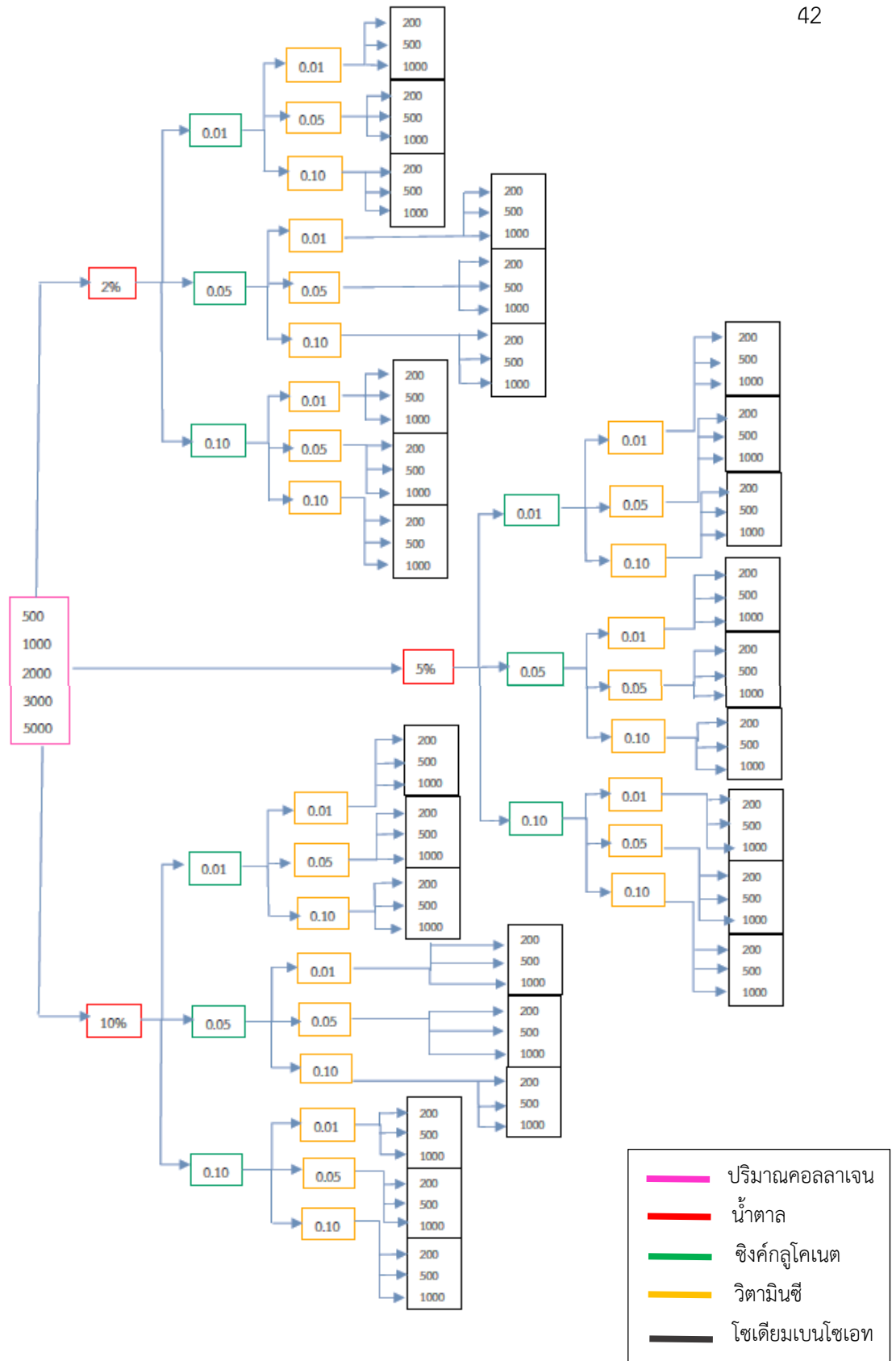
3.2.2.1 การเตรียมตัวอย่าง

จากการเตรียมสารละลาย stock solution คอลลาเจน ในขั้นตอนการศึกษาที่ 1 นำสารละลายคอลลาเจนในช่วง 500-5,000 mg/L มาเติมวัตถุเจือปนอาหาร รวมจำนวนตัวอย่างทั้งหมด 630 ตัวอย่าง โดยวัตถุเจือปนอาหารที่ศึกษา ในการศึกษาครั้งนี้ทั้งหมด 4 ชนิด ได้แก่ น้ำตาลซูโครส วิตามินซี โซเดียมเบนโซเอท และ ซิงค์กลูโคเนต โดยเติมวัตถุเจือปนอาหารแต่ละชนิดที่ 3 ระดับความเข้มข้นลงในสารละลายคอลลาเจนที่เตรียมได้จากข้างต้น แสดงรายละเอียดการเติมวัตถุเจือปนอาหารดังภาพที่ 16 และปริมาณวัตถุเจือปนอาหารที่เติม แสดงดังตารางที่ 5

โดยเติมวัตถุเจือปนอาหารแต่ละชนิด เพื่อเสริมรสชาติให้กับเครื่องดื่ม ป้องกันและระงับการเกิดออกซิเดชัน ทำให้กลิ่นรสของเครื่องดื่มคงตัวอยู่ได้นาน เพื่อยับยั้งการเจริญของยีสต์ รา และแบคทีเรีย หรือเพื่อเสริมคุณค่าของเครื่องดื่ม เป็นต้น

ตารางที่ 5 ปริมาณวัตถุเจือปนอาหารที่เติมในสารละลายคอลลาเจนเพื่อเป็นระบบจำลอง

วัตถุเจือปนอาหาร	ปริมาณที่เติม		
น้ำตาลซูโครส (%)	2	5	10
วิตามินซี (%)	0.01	0.05	0.10
โซเดียมเบนโซเอท (mg/L)	200	500	1,000
ซิงค์กลูโคเนต (%)	0.01	0.05	0.10



ภาพที่ 16 แผนผังการเติมวัตถุดิบอาหารลงในสารละลายคอลลาเจน จำนวนรวม 630 ตัวอย่าง

3.2.2.2 การวัดสเปกตรัมสารละลายคอลลาเจนที่มีการเติมวัตถุเจือปนอาหารด้วยเครื่องสเปกโทรสโกปีอินฟราเรดย่านใกล้

นำตัวอย่างที่เตรียมได้จากข้อ 3.2.2.1 ดังภาพที่ 16 มาทำการวัดสเปกตรัมสารละลายคอลลาเจนที่มีการเติมวัตถุเจือปนอาหารด้วยเทคนิค NIRS เช่นเดียวกับข้อที่ 3.2.1.2 นอกจากนี้ยังทำการวัดสเปกตรัมของสารละลายวัตถุเจือปนอาหารด้วยวิธีเดียวกัน

3.2.2.3 การปรับแต่งสเปกตรัม

ก่อนทำการวิเคราะห์ข้อมูลต้องทำการปรับแต่งเส้นสเปกตรัม (pretreatment) ก่อน เพื่อลดสัญญาณรบกวน (noise) และอิทธิพลอื่นๆ ภายนอกที่ไม่สามารถควบคุมได้ โดยวิธีปรับแต่งสเปกตรัมที่ใช้ เช่นเดียวกับข้อ 3.2.1.3 เพื่อศึกษาการปรับแต่งสเปกตรัมด้วยวิธีต่างๆ กัน ต่อการสร้างสมการเทียบมาตรฐาน

3.2.2.4 การสร้างสมการเทียบมาตรฐาน

สร้างสมการเทียบมาตรฐานด้วยโปรแกรม OPUS Version 7.2.139.1294 โดยการนำสเปกตรัมที่ได้จากข้อ 3.2.2.3 มาแบ่งกลุ่มตัวอย่างออกเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ใช้ในการสร้างสมการเทียบมาตรฐาน (Calibration set) โดยตัวอย่างในกลุ่มนี้จะต้องมีความหลากหลายครอบคลุมตัวอย่างที่คาดว่าจะพบในอนาคต จากนั้นตรวจสอบประสิทธิภาพของสมการเทียบมาตรฐาน (Validation set) เป็นกลุ่มที่ 2 เพื่อเป็นการเลือกสมการเทียบมาตรฐานที่มีความเหมาะสมมากที่สุด แบบทดสอบภายนอก (test set) ในอัตราส่วน 70 ต่อ 30 โดยตัวอย่างในกลุ่ม Calibration set จะต้องมีค่าทางเคมีที่กว้างเพียงพอครอบคลุมตัวอย่างในกลุ่ม Validation set และต้องมีจำนวนมากกว่า และจะแบ่งกลุ่มตัวอย่างด้วยการเรียงลำดับค่าทางเคมีจากน้อยไปมาก จากนั้นกำหนดสามตัวอย่างแรกและสามตัวอย่างสุดท้ายเป็นกลุ่ม Calibration set ส่วนตัวอย่างที่เหลือให้สลับสัดส่วนตัวอย่างตามต้องการ โดยในการสร้างสมการเทียบมาตรฐานด้วยโปรแกรม OPUS Version 7.2.139.1294 เลือกใช้ฟังก์ชันการหาความสัมพันธ์ที่เหมาะสมที่สุดด้วยฟังก์ชันอัตโนมัติ (optimize) เพื่อเป็นแนวทางในการตรวจสอบช่วงคลื่นและเทคนิคการปรับแต่งข้อมูลสเปกตรัมที่มีประสิทธิภาพ โดยใช้วิธีการถดถอยกำลังสองน้อยที่สุดบางส่วน (Partial Least Square Regression, PLSR) และเลือกช่วงความยาวคลื่นที่ให้ผลในการสร้างสมการเทียบมาตรฐานที่เหมาะสมที่สุด โดยเลือกความยาวคลื่น

ให้ครอบคลุมกับองค์ประกอบที่ต้องการทำให้มากที่สุดหรือเลือกจากความยาวคลื่นอ้างอิงของวัตถุเจือปนอาหาร ที่บ่งบอกถึงช่วงความยาวคลื่นที่คาดว่าจะมีความสัมพันธ์กับค่าที่จะทำการวิเคราะห์

พิจารณาประสิทธิภาพของสมการจากค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (Coefficient of correction) หรือ R^2 และ RPD (Ratio of standard error of prediction to standard deviation) ที่สูง ค่าความผิดพลาดมาตรฐานในการทำนายของกลุ่มตัวอย่างสร้างสมการเทียบมาตรฐาน (Standard Error of Calibration) หรือ SEC และ ค่าความผิดพลาดมาตรฐานในการทำนายของกลุ่มตัวอย่างทวนสอบสมการเทียบมาตรฐาน (Standard Error of Prediction) หรือ SEP ที่ต่ำ นอกจากนี้ยังมีจำนวนตัวแปร (PLS factor) และค่าความคลาดเคลื่อนเฉลี่ยหรือ bias ซึ่งค่าที่ได้สามารถคำนวณได้จากสมการในภาคผนวก ก

3.2.2.5 การทดสอบประสิทธิภาพของสมการเทียบมาตรฐาน

ทำการทดสอบประสิทธิภาพของสมการเทียบมาตรฐานด้วยตัวอย่างน้ำผลไม้เสริมคอลลาเจน จำนวน 20 ตัวอย่าง (prediction set) ซึ่งเป็นตัวอย่างที่ซื้อใหม่จากท้องตลาด โดยใช้ตัวอย่างเดียวกับการศึกษาขั้นตอนที่ 1 โดยก่อนวัดสเปกตรัมตัวอย่างที่ซื้อใหม่จะทำการควบคุมอุณหภูมิของสารละลายที่ 30 ± 1 องศาเซลเซียส ซึ่งเป็นอุณหภูมิที่ใช้ในการขนส่งและเก็บรักษาตามภาคอุตสาหกรรม เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ด้วย incubator จากนั้น บีบสารละลายคอลลาเจน ปริมาตร 10 มิลลิลิตร (ml) ลงบนจานแก้วกลมขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 100 มิลลิเมตร (mm) สูง 15 มิลลิเมตร (mm) และวางทับด้วยตัวสะท้อน (reflector) และวัดสเปกตรัมเหมือนข้อ 3.2.1.2 โดยในการทดสอบประสิทธิภาพการทำนายจะพิจารณาจากค่าระยะห่างมาหาลาโนบิสเฉลี่ย (Average Mahalanobis Distance) ถ้าพบว่าเกินขีดจำกัดของค่านี้ ตัวอย่างนั้นก็จะเป็น Outlier และค่าความคลาดเคลื่อน (%error) ที่ต่ำ แสดงการคำนวณ %error ดังภาคผนวก ก

3.2.2.6 การวัดสเปกตรัมวัตถุเจือปนอาหารผงด้วยเครื่องสเปกโทรสโกปีอินฟราเรดย่านใกล้

ผงวัตถุเจือปนอาหารทั้ง 4 ชนิด ได้แก่ น้ำตาลซูโครส วิตามินซี โซเดียมเบนโซเอท และซิงค์กลูโคเนต นำวัตถุเจือปนอาหารแต่ละชนิดมาวัดสเปกตรัม โดยเทลงบนจานแก้วกลมที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 100 มิลลิเมตร (mm) สูง 15 มิลลิเมตร (mm) ให้เต็มจานแก้ว โดยไม่มีการกดอัด จากนั้นปาดผงวัตถุเจือปนอาหารส่วนเกินออก และต้องระวังไม่ให้กดอัดตัวอย่าง จากนั้นจะวัด

สเปกตรัมทั้งหมด 5 จุด โดยการหมุนจานแก้ว แล้วใช้ค่าเฉลี่ยข้อมูลสเปกตรัมที่ได้จากการวัดทั้ง 5 ครั้ง เป็นตัวแทนข้อมูลสเปกตรัมของตัวอย่างนั้นๆ วัดสเปกตรัมในรูปแบบการวัดแบบสะท้อนกลับ (reflectance) ช่วงเลขคลื่น $12500-4000\text{ cm}^{-1}$ ที่ค่าความสามารถในการแยกฟีด หรือ resolution 32 cm^{-1} และจำนวนครั้งของการ scan ตัวอย่าง หรือ sample scan time 64 ครั้ง

3.2.3 การศึกษาความเป็นไปได้ของการใช้เทคนิคสเปกโทรสโกปีอินฟราเรดย่านใกล้ในการติดตามปริมาณคอลลาเจนในตัวอย่งผลิตภัณท์น้ำผลไม้เสริมคอลลาเจนที่มีวางจำหน่ายในท้องตลาด

3.2.3.1 สุ่มเก็บตัวอย่างผลิตภัณท์น้ำผลไม้เสริมคอลลาเจนที่มีจำหน่ายในประเทศ

สุ่มเก็บตัวอย่างเครื่องดื่มน้ำผลไม้ที่มีการเสริมคอลลาเจนที่วางจำหน่ายในประเทศ ซึ่งมีการเสริมปริมาณคอลลาเจนจากยี่ห้อต่างๆ 9 ยี่ห้อ วันที่หมดอายุที่แตกต่างกัน จำนวน 114 ตัวอย่าง และรหัสตัวอย่าง แสดงรายละเอียดดังตารางที่ 6 ทั้งนี้ปริมาณคอลลาเจนที่แสดงในตารางที่ 6 เป็นปริมาณที่บริษัทผู้ผลิตแสดงค่าไว้ที่ฉลากบรรจุภัณท์ ชื่อตัวอย่างมาในช่วงเดือนพฤษภาคม-มิถุนายน 2559 จากนั้นรับนำตัวอย่างไปยังห้องปฏิบัติการ ภาควิชาเทคโนโลยีอาหาร คณะวิศวกรรมศาสตร์และเทคโนโลยีอุตสาหกรรม มหาวิทยาลัยศิลปากร ควบคุมอุณหภูมิ 30 ± 5 องศาเซลเซียส เพื่อทำการศึกษาต่อไป

ตารางที่ 6 การสุ่มตัวอย่างเครื่องตึมน้ำผลไม้ที่มีการเสริมคอลลาเจนสำหรับการศึกษา

ยี่ห้อ	วันที่หมดอายุ	ปริมาณคอลลาเจน* (mg/L)	จำนวน ตัวอย่างที่สุ่ม	รหัสตัวอย่าง	ขนาดบรรจุภัณฑ์ (ml)
A	04/12/15, 24/02/17	4,444	20	A2000	450
B	22/04/17	4,857	15	B1700	350
C	11/03/17, 19/03/17	5,479	15	C2000	365
D	21/12/16 28/03/17	7,143	5	D2000	280
E	21/04/17	7,576	15	E2500	330
E	01/04/17, 10/05/17	9,091	20	E3000	330
E	31/05/17	80,000	5	E4000	50
F	10/05/17	10,000	4	F1000	100
G	20/02/17, 29/03/17	66,667	5	G8000	120
H	-/-/2017	100,000	5	H5000	50
I	-/-/2019	111,111	5	I5000	45

*ปริมาณคอลลาเจนที่ระบุบนฉลากบรรจุภัณฑ์ (มิลลิกรัมต่อลิตร)

3.2.3.2 วิเคราะห์คุณลักษณะทางเคมีเบื้องต้นของผลิตภัณฑ์น้ำผลไม้ที่มีการเสริมคอลลาเจนที่วางจำหน่ายในประเทศ

ในการศึกษานี้จะทำการวิเคราะห์คุณลักษณะทางเคมีเบื้องต้นของเครื่องดื่มน้ำผลไม้ที่มีการเสริมคอลลาเจนที่วางจำหน่ายในประเทศ ก่อนนำไปวัดสเปกตรัมด้วยเครื่องสเปกโทรสโกปีอินฟราเรดย่านใกล้และวิเคราะห์คุณสมบัติทางเคมีด้วยเครื่อง HPLC แสดงรายละเอียดการวิเคราะห์ดังนี้

(1) ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด (Total soluble solids, TSS) โดยใช้มาตรดัชนีหักเห โดยสอบเทียบเครื่องมือด้วยน้ำกลั่น ก่อนใช้งานทุกครั้ง จากนั้นนำตัวอย่างเครื่องดื่มที่มีการเสริมคอลลาเจนมา มาหยดลงบน Digital refractometer กวัดตัวอย่าง และบันทึกค่า

(2) ค่าความเป็นกรด - ด่าง โดยใช้เครื่องวัดความเป็นกรด - ด่าง (pH meter)

นำตัวอย่างเครื่องดื่มที่มีการเสริมคอลลาเจนมาวัดค่า pH ด้วยเครื่องวัดความเป็นกรดต่าง (pH meter) โดยก่อนใช้งานทุกครั้งต้องสอบเทียบเครื่องมือด้วย pH 4 7 และ 10 จากนั้นจะใช้ตัวอย่าง 30 มิลลิลิตร ใส่ลงในบีกเกอร์ และนำหัว probe จุ่มลงในตัวอย่างให้ท่วม บันทึกค่า

(3) ค่าสี โดยใช้เครื่อง Tintometer นำตัวอย่างเครื่องดื่มที่มีการเสริมคอลลาเจน วัดค่าสี (L^* , a^* , b^* , C^* และ h°) ด้วยเครื่อง Tintometer โดยรายละเอียดแสดงในภาคผนวก ข

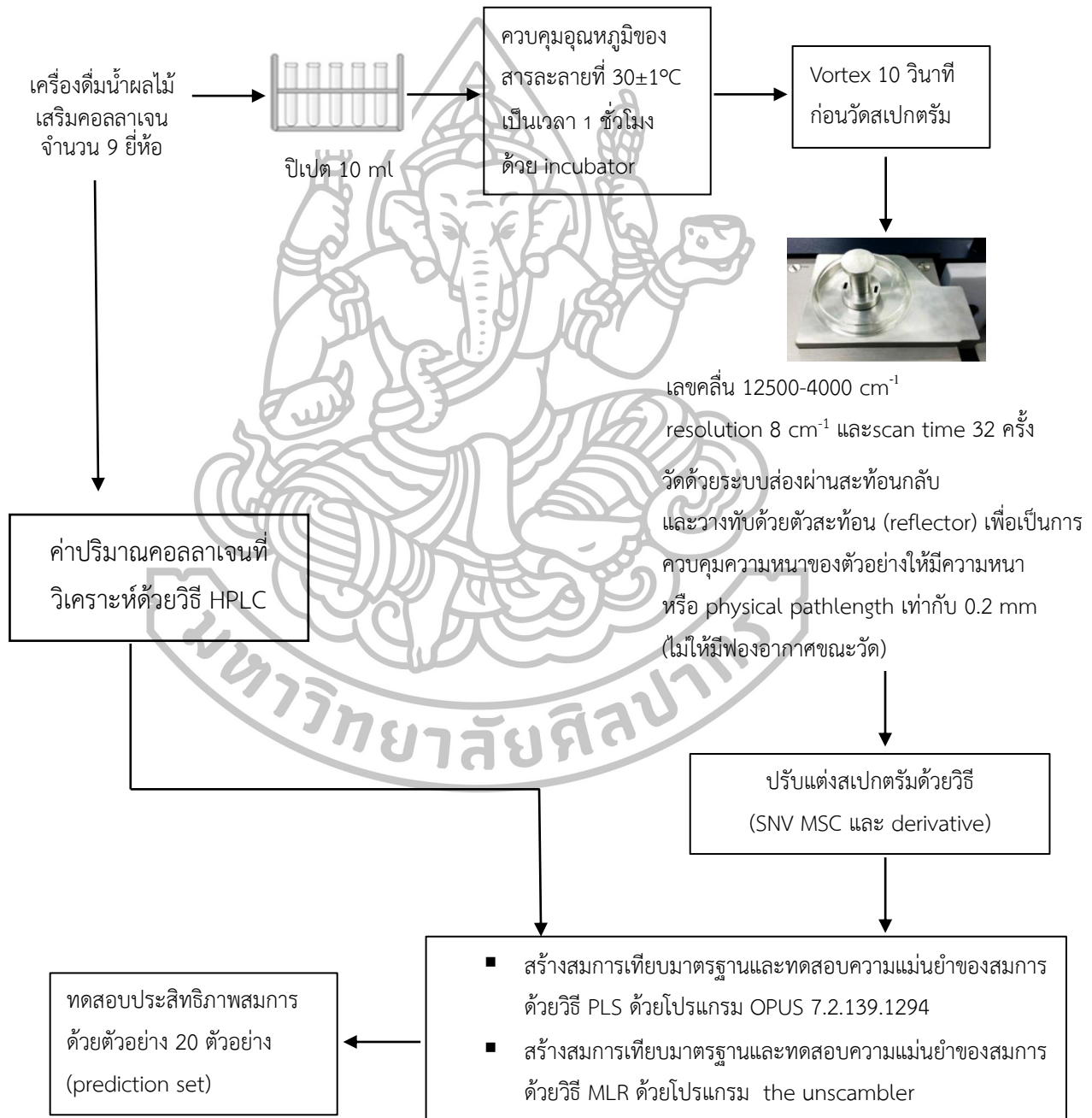
(4) ค่าความหนืด โดยใช้เครื่อง Brookfield Viscometer

นำตัวอย่างเครื่องดื่มที่มีการเสริมคอลลาเจน วัดค่าความหนืด โดยใช้เครื่อง Viscometer Brookfield โดยจะใช้ตัวอย่าง 16 มิลลิลิตร ใส่ลงในภาชนะใส่ตัวอย่าง แสดงในภาคผนวก ข จากนั้นนำหัว probe ชนิด UL ใส่ในตัวอย่าง วัดค่า และบันทึกค่า

3.2.3.3 การวัดสเปกตรัมเครื่องดื่มน้ำผลไม้เสริมคอลลาเจนด้วยเครื่องสเปกโทรสโกปีอินฟราเรดย่านใกล้

นำตัวอย่างผลิตภัณฑ์น้ำผลไม้เสริมคอลลาเจนที่มีวางจำหน่ายในท้องตลาด มาวัดสเปกตรัมด้วยเครื่องสเปกโทรสโกปีอินฟราเรดย่านใกล้ ควบคุมอุณหภูมิของเครื่องดื่มที่ 30 ± 1 องศาเซลเซียส ก่อนการวัดสเปกตรัม ซึ่งเป็นอุณหภูมิที่ใช้ในการขนส่งและเก็บรักษาตามภาคอุตสาหกรรม เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ด้วย incubator จากนั้น ปิเปตสารละลายคอลลาเจน ปริมาตร 10 มิลลิลิตร (ml) ลงบนจานแก้วกลมขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 100 มิลลิเมตร (mm) สูง 15 มิลลิเมตร (mm) และวางทับด้วยตัวสะท้อน (reflector) เพื่อเป็นการควบคุมความหนาของตัวอย่างให้มีความหนาหรือ physical pathlength เท่ากับ 0.2 มิลลิเมตร (mm) บริเวณกลางจานแก้ว และในขณะที่วางตัวสะท้อนจะต้องระวังไม่ให้เกิดฟองอากาศขณะวัด โดยวัดตัวอย่างที่ความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ แล้วใช้ค่าเฉลี่ยข้อมูล

สเปกตรัมที่ได้จากการวัดทั้ง 3 ครั้ง เป็นตัวแทนข้อมูลสเปกตรัมของตัวอย่างนั้นๆ วัดสเปกตรัมในรูปแบบการวัดแบบส่องผ่านสะท้อนกลับ (transflectance) ช่วงเลขคลื่น 12500-4000 cm^{-1} ที่ค่าความสามารถในการแยกพีค หรือ resolution 8 cm^{-1} และจำนวนครั้งของการ scan ตัวอย่าง หรือ sample scan time 32 ครั้ง และขั้นตอนการสร้างสมการเทียบมาตรฐานของน้ำผลไม้เสริมคอลลาเจนที่มีวางจำหน่ายในท้องตลาด แสดงดังภาพที่ 17



ภาพที่ 17 ขั้นตอนการสร้างสมการเทียบมาตรฐานของผลิตภัณฑ์น้ำผลไม้เสริมคอลลาเจนที่มีวางจำหน่ายในท้องตลาด

3.2.3.4 การปรับแต่งสเปกตรัม

ก่อนทำการวิเคราะห์ข้อมูลต้องทำการปรับแต่งเส้นสเปกตรัม (pretreatment) ก่อนเพื่อลดสัญญาณรบกวน (noise) และอิทธิพลอื่นๆ ภายนอกที่ไม่สามารถควบคุมได้ โดยวิธีปรับแต่งสเปกตรัมที่ใช้ เช่นเดียวกับข้อ 3.2.1.3 เพื่อศึกษาการปรับแต่งสเปกตรัมด้วยวิธีต่างๆ กัน ต่อการสร้างสมการเทียบมาตรฐาน

3.2.3.5 การสร้างสมการเทียบมาตรฐาน

สร้างสมการเทียบมาตรฐานด้วยโปรแกรม OPUS Version 7.2.139.1294 โดยการนำสเปกตรัมที่ได้จากข้อ 3.2.3.4 และค่าองค์ประกอบทางเคมีของเครื่องดื่มน้ำผลไม้เสริมคอลลาเจน มาตรวจสอบค่าความผิดพลาดจากการทดลองซึ่งเป็นข้อมูลที่ไม่สอดคล้องกับความเป็นจริง เพื่อลดความคลาดเคลื่อนในสร้างสมการ จากนั้นจึงแบ่งกลุ่มตัวอย่างออกเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ใช้ในการสร้างสมการเทียบมาตรฐาน (Calibration set) โดยตัวอย่างในกลุ่มนี้จะต้องมีความหลากหลายครอบคลุมตัวอย่างที่คาดว่าจะพบในอนาคต จากนั้นตรวจสอบประสิทธิภาพของสมการเทียบมาตรฐาน (Validation set) เป็นกลุ่มที่ 2 เพื่อเป็นการเลือกสมการเทียบมาตรฐานที่มีความเหมาะสมมากที่สุด แบบทดสอบภายนอก (test set) ในอัตราส่วน 70 ต่อ 30 โดยตัวอย่างในกลุ่ม Calibration set จะต้องมีค่าทางเคมีที่กว้างเพียงพอครอบคลุมตัวอย่างในกลุ่ม Validation set และต้องมีจำนวนมากกว่า แบ่งกลุ่มตัวอย่างด้วยการเรียงลำดับค่าทางเคมีจากน้อยไปมาก จากนั้นกำหนดสามตัวอย่างแรกและสามตัวอย่างสุดท้ายเป็นกลุ่ม Calibration set ส่วนตัวอย่างที่เหลือให้สลับสัดส่วนตัวอย่างตามต้องการ โดยในการสร้างสมการเทียบมาตรฐานด้วยโปรแกรม OPUS Version 7.2.139.1294 เลือกใช้ฟังก์ชันการหาความสัมพันธ์ที่เหมาะสมที่สุดด้วยฟังก์ชันอัตโนมัติ (optimize) เพื่อเป็นแนวทางในการตรวจสอบช่วงคลื่นและเทคนิคการปรับแต่งข้อมูลสเปกตรัมที่มีประสิทธิภาพ โดยใช้วิธีการถดถอยกำลังสองน้อยที่สุดบางส่วน (Partial Least Square Regression, PLSR) และเลือกช่วงความยาวคลื่นที่ให้ผลในการสร้างสมการเทียบมาตรฐานที่เหมาะสมที่สุด โดยเลือกความยาวคลื่นให้ครอบคลุมกับองค์ประกอบที่ต้องการหาให้มากที่สุดหรือเลือกจากความยาวคลื่นอ้างอิงของวัตถุเจือปนอาหาร ที่บ่งบอกถึงช่วงความยาวคลื่นที่คาดว่าจะมีความสัมพันธ์กับค่าที่จะทำการวิเคราะห์

นอกจากนี้สร้างสมการเทียบมาตรฐานด้วยวิธี Multiple Linear Regression (MLR) โดยใช้โปรแกรม The Unscrambler (CAMO, Oslo, Norway) ซึ่งเป็นวิธีการคัดเลือกความยาวคลื่นที่มีความสัมพันธ์กับตัวแปรตามที่จะทำนาย โดยเลือกความยาวคลื่นจากการวัดสเปกตรัมสารบริสุทธิ์ทั้ง

แบบสารละลายและแบบผงร่วมกับความยาวคลื่นจากเอกสารอ้างอิง ที่บ่งบอกถึงช่วงความยาวคลื่นที่ คาดว่าน่าจะมีความสัมพันธ์กับค่าที่นำมาวิเคราะห์ โดยแสดงรายละเอียดขั้นตอนการสร้างสมการ เทียบมาตรฐานด้วยวิธี MLR ดังภาคผนวก ง

พิจารณาประสิทธิภาพของสมการจากค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (Coefficient of correction) หรือ R^2 และ RPD (Ratio of standard error of prediction to standard deviation) ที่สูง ค่าความผิดพลาดมาตรฐานในการทำนายของกลุ่มตัวอย่างสร้างสมการเทียบมาตรฐาน (Standard Error of Calibration) หรือ SEC และ ค่าความผิดพลาดมาตรฐานในการทำนายของกลุ่ม ตัวอย่างทวนสอบสมการเทียบมาตรฐาน (Standard Error of Prediction) หรือ SEP ที่ต่ำ นอกจากนี้ ยังมีจำนวนตัวแปร (PLS factor) และค่าความคลาดเคลื่อนเฉลี่ยหรือ bias ซึ่งค่าที่ได้สามารถคำนวณ ได้จากสมการในภาคผนวก ก

จากนั้นจึงทำการตรวจสอบค่าความผิดพลาดมาตรฐานในการทำนายของกลุ่มตัวอย่างทวน สอบสมการ (SEP) ที่ได้ด้วยค่า unexplained error confidence limits (UECLs, TUE) ซึ่งสามารถ คำนวณได้จาก F-test ค่า SEP ที่ได้ควรมีค่าน้อยกว่าค่า TUE ตามมาตรฐาน ISO 12099 ตรวจสอบ ค่าความผิดพลาดเฉลี่ยในการทำนาย (bias) โดยการเปรียบเทียบค่าทางเคมีหรือค่าที่วิเคราะห์ได้จาก วิธีมาตรฐานกับค่าที่ทำนายได้จากสมการทำนายด้วยการทดสอบแบบจับคู่ (pair t-test) ตามสูตรที่ แสดงไว้ในภาคผนวก ก โดยค่า bias ที่ได้ต้องมีค่าน้อยกว่า T_b ซึ่งหมายถึงค่าที่ทำนายได้จากสมการ ทำนายไม่แตกต่างจากค่าทางเคมีอย่างมีนัยสำคัญ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% หรือ P น้อยกว่าหรือ เท่ากับ 0.05 และตรวจสอบค่าความชัน (slope) พิจารณา t_{obs} โดย ค่า t_{obs} ที่ได้น้อยกว่าค่า t -value โดยค่าความชันที่ดีที่สุดควรมีค่าเท่ากับ 1 เพื่อให้ได้สมการที่มีความแม่นยำต่อการนำไปใช้ วิเคราะห์ได้ดีที่สุด

3.2.3.6 การทดสอบประสิทธิภาพของสมการเทียบมาตรฐาน

ทำการทดสอบประสิทธิภาพของสมการเทียบมาตรฐานด้วยตัวอย่างน้ำผลไม้เสริมคอลลา เจน จำนวน 20 ตัวอย่าง (prediction set) ซึ่งเป็นตัวอย่างที่ซื้อใหม่จากท้องตลาด โดยใช้ตัวอย่าง เดียวกับการศึกษาขั้นตอนที่ 1 โดยก่อนวัดสเปกตรัมตัวอย่างที่ซื้อใหม่จะทำการควบคุมอุณหภูมิ ของสารละลายที่ 30 ± 1 องศาเซลเซียส ซึ่งเป็นอุณหภูมิที่ใช้ในการขนส่งและเก็บรักษาตาม ภาควัตถุศาสตร์เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ด้วย incubator จากนั้น ปิเปตสารละลายคอลลาเจน ปริมาตร 10 มิลลิลิตร (ml) ลงบนจานแก้วกลมขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 100 มิลลิเมตร (mm) สูง 15 มิลลิเมตร (mm) และวางทับด้วยตัวสะท้อน (reflector) และวัดสเปกตรัมเหมือนข้อ 3.2.1.2 โดยใน

การทดสอบประสิทธิภาพการทำนายจะพิจารณาจากค่าระยะห่างมาหาลาโนบิสเฉลี่ย (Average Mahalanobis Distance) ถ้าพบว่าเกินขีดจำกัดของค่านี้ ตัวอย่างนั้นก็จะเป็น Outlier และค่าความคลาดเคลื่อน (%error) ที่ต่ำ แสดงการคำนวณ %error ดังภาคผนวก ก

3.2.3.7 วิเคราะห์ปริมาณคอลลาเจนในตัวอย่างผลิตภัณฑ์น้ำผลไม้เสริมคอลลาเจนที่มีวางจำหน่ายในท้องตลาดด้วยเครื่อง High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

3.2.3.7.1 การเตรียมตัวอย่าง

ชั่งตัวอย่างประมาณ 5.0000 ± 0.0010 กรัม ด้วยเครื่องชั่งละเอียด 4 ตำแหน่ง ใส่ในขวดสีชา ปริมาตร 25 มิลลิลิตร ที่มีฝาปิด เพื่อป้องกันการสัมผัสกับอากาศ จากนั้นเติม 6 M HCl 5 มิลลิลิตร เขย่าเบาๆ ให้เข้ากันด้วย Vortex mixer เป็นเวลา 10 วินาที แล้วนำไปย่อยด้วย Autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นนำสารละลาย ตัวอย่างที่ผ่านการย่อย มาระเหยตัวทำละลาย ด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 150 rpm เป็นเวลา 10 นาที จนสารละลายแห้งสนิท นำสารละลายที่แห้ง แล้วมาปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น (Distilled Water) 5 มิลลิลิตร ด้วยขวดปรับปริมาตร 5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน และกรองสารละลายด้วย Nylon Syringe Filter ขนาด 13 มิลลิลิตร 0.22 ไมโครเมตร (μm) เก็บส่วนเสของตัวอย่างไว้ เพื่อใช้ในการวิเคราะห์ต่อไป

3.2.3.7.2 การทำอนุพันธ์ตัวอย่าง

นำสารละลายส่วนเสจากข้างต้น ปิเปตสารละลาย 1,250 ไมโครลิตร จากนั้นเจือจางให้เป็น 5 มิลลิลิตร ด้วย 0.4 M Borate buffer pH 10.4 จากนั้น ปิเปต 250 ไมโครลิตร ของสารละลาย ตัวอย่าง ผสมกับ 250 ไมโครลิตร ของ 0.2% 4-chloro-7-nitrobenzofurazan (NBD-Cl) ผสมให้เข้ากัน นำไปให้ความร้อนที่ 60 ± 1 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นหยุดปฏิกิริยา โดยเติม 50 ไมโครลิตร 1 M HCl จากนั้นทำให้เย็นทันทีที่ 0 ± 1 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที กรองสารละลาย ด้วย Nylon Syringe Filter ขนาด 13 มิลลิลิตร 0.22 ไมโครเมตร แล้วนำสารละลายปริมาตร 10 ไมโครลิตร มาวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC

3.2.3.7.3 การวิเคราะห์ปริมาณคอลลาเจนในตัวอย่างผลิตภัณฑ์น้ำผลไม้เสริมคอลลาเจนด้วย HPLC

การวิเคราะห์ปริมาณคอลลาเจนในตัวอย่างผลิตภัณฑ์น้ำผลไม้เสริมคอลลาเจนด้วยเครื่อง High Performance Liquid Chromatography (HPLC) จะใช้คอลัมน์ C18 และใช้เฟสเคลื่อนที่แบบผสม (Gradient) โดยใช้เฟสเคลื่อนที่ A เป็นโพแทสเซียม ไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (potassium dihydrogen phosphate) pH 7.8 และเฟสเคลื่อนที่ B เป็น เมทานอล (Methanol) : อะซิโตไนไตรล์ (Acetonitrile) : น้ำกลั่น ในอัตราส่วน 45 : 40 : 15 (v/v/v) อุณหภูมิคอลัมน์ 30 องศาเซลเซียส และอัตราการไหล 0.8 มิลลิลิตรต่อนาที (ml/min) โดยมีความยาวคลื่นที่ให้พลังงานกับสาร (excitation wavelengths) ที่ 465 นาโนเมตร และความยาวคลื่นที่สารดูดกลืน (emission wavelengths) ที่ 535 นาโนเมตร ตรวจวัด ด้วยตัวตรวจวัดสัญญาณชนิดฟลูออเรสเซนส์ โดยใช้เวลาในการวิเคราะห์ 65 นาทีต่อตัวอย่าง และคำนวณปริมาณคอลลาเจน โดยหาอัตราส่วนพื้นที่ที่พิกเทียบ กับกราฟมาตรฐาน ตามวิธีของ Vazquez-Ortiz และคณะ (2005) และ Prockop และ Udenfriend (1960) แสดงรายละเอียดดังภาคผนวก ข



บทที่ 4

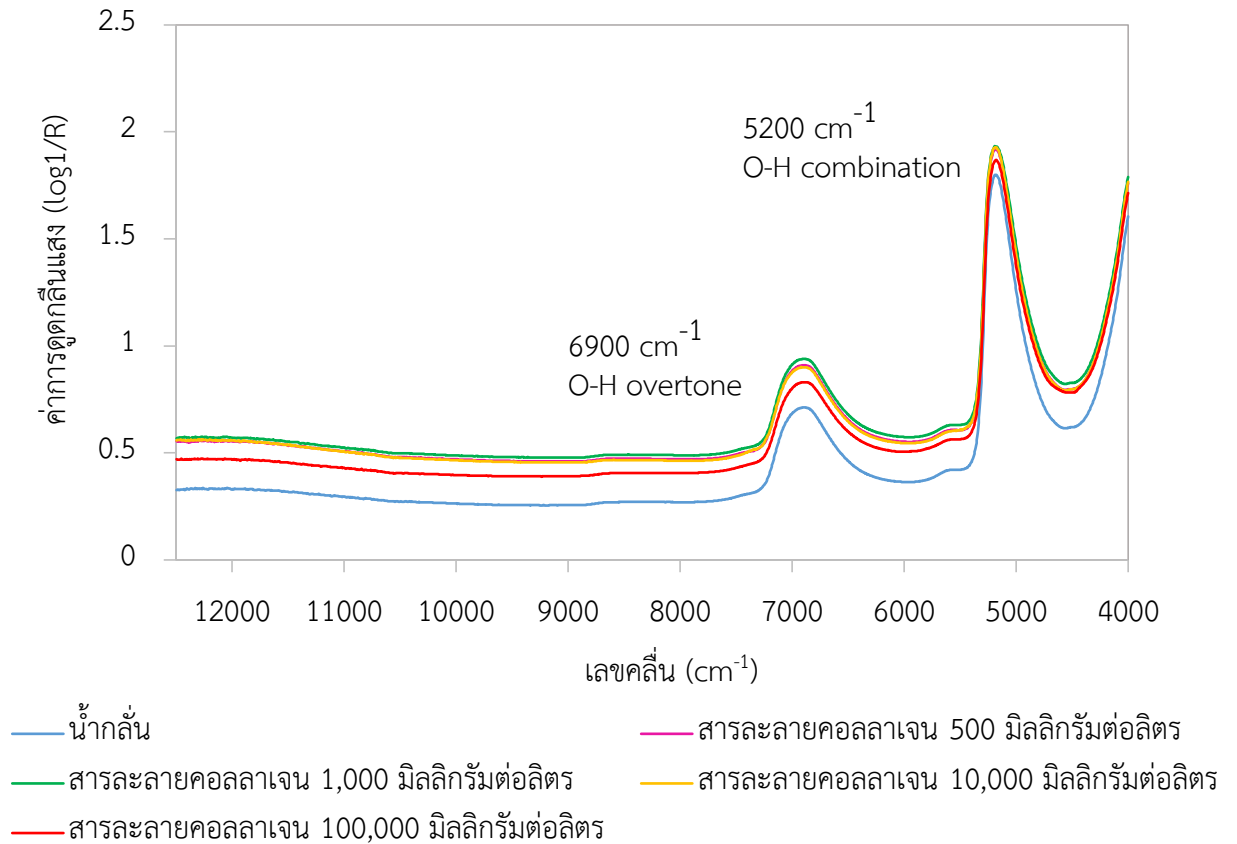
ผลการทดลองและวิจารณ์ผล

4.1 การใช้เทคนิคสเปกโทรสโกปีอินฟราเรดย่านใกล้ในการติดตามปริมาณคอลลาเจนในสารละลายคอลลาเจนที่มีความบริสุทธิ์ร้อยละ 95.10

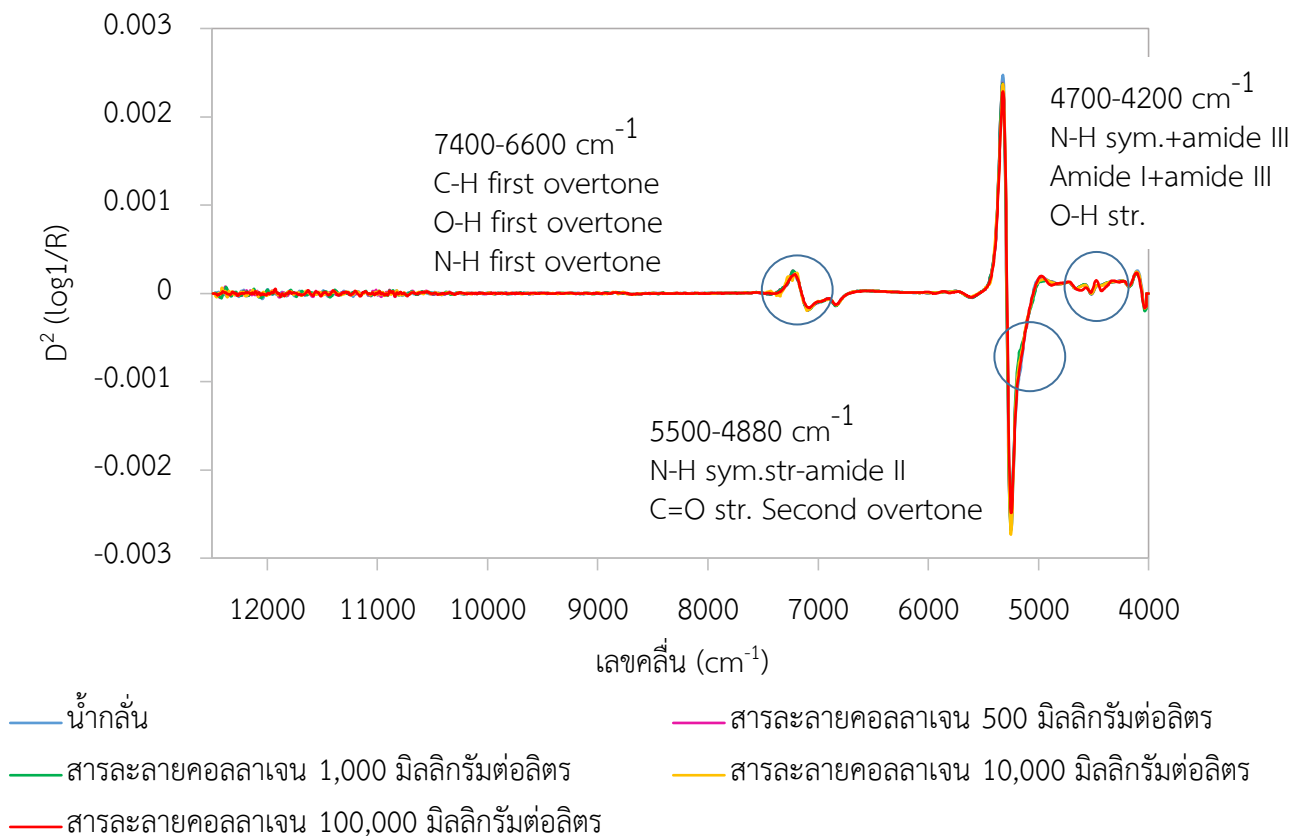
4.1.1 ลักษณะสเปกตรัมของสารละลายคอลลาเจน

ตัวอย่างสเปกตรัมของสารละลายคอลลาเจนที่มีความเข้มข้นต่างๆ แสดงดังภาพที่ 18 พบว่า สเปกตรัมของสารละลายคอลลาเจนที่มีความเข้มข้นต่างๆ มีลักษณะคล้ายกัน และคล้ายกับสเปกตรัม น้ำกลั่น โดยพบพีคการดูดกลืนแสงที่ชัดเจนอยู่ที่เลขคลื่น 6900 และ 5200 cm^{-1} ซึ่งตำแหน่งดังกล่าว แสดงข้อมูลสำคัญที่เกี่ยวข้องกับการสั่นแบบโอเวอร์โทนอันดับหนึ่งของพันธะ O-H และคอมบิเนชันของพันธะ O-H (Rodriguez-Saona และคณะ, 2001; Xie และคณะ, 2009) ที่เป็นลักษณะเฉพาะของโมเลกุลของน้ำ เนื่องจากน้ำสามารถดูดกลืนคลื่นรังสี NIRS ได้สูง จึงส่งผลให้ตัวอย่างที่มีน้ำเป็นองค์ประกอบในจำนวนมาก มีสเปกตรัมการดูดกลืนคลื่น NIRS ที่เด่นชัดจากโมเลกุลของน้ำ (Bünings-Pfaue, 2003) และเมื่อทำการปรับแต่งสเปกตรัมที่ได้ด้วยวิธีอนุพันธ์อันดับสอง (second derivative) เพื่อทำให้ยอดพีคมีลักษณะที่ชัดเจนแสดงดังภาพที่ 19 จะเห็นลักษณะของสเปกตรัมมีความแตกต่างกันในช่วงเลขคลื่น $4700-4200\text{ cm}^{-1}$, $5500-4880\text{ cm}^{-1}$ และ $7400-6600\text{ cm}^{-1}$ ซึ่งช่วงดังกล่าวมีความสัมพันธ์กับการดูดกลืนของพันธะ N-H C-H และ O-H คอมบิเนชัน ซึ่งแสดงถึงพันธะภายในโครงสร้างของกรดอะมิโน นอกจากนี้มีความสัมพันธ์กับการดูดกลืนของโอเวอร์โทนอันดับที่สองของพันธะ C=O พันธะ O-H และ N-H และมีความสัมพันธ์กับการดูดกลืนของโอเวอร์โทนอันดับที่หนึ่งของพันธะ O-H และ N-H (Osborne และคณะ, 1993) ซึ่งมีความสอดคล้องกับสเปกตรัมคอลลาเจนดังภาพที่ 20 แสดงพีคการดูดกลืนของคอลลาเจนที่เลขคลื่น 4396 , 4485 , 4592 , 4868 , 4975 , 5135 , 5402 , 5767 , 5883 , 6035 , 6658 , 8448 และ 9721 cm^{-1} นอกจากนี้ยังสอดคล้องกับงานวิจัยของ Prevolnik และคณะ (2011) ใช้เทคนิค NIRS ในการติดตามปริมาณกรดอะมิโนอิสระในแฮม โดยพบเลขคลื่นที่มีความสัมพันธ์กับการสั่นของพันธะ N-H ของโครงสร้างกรดอะมิโน ได้แก่ $6849-6369$ และ $5000-4587\text{ cm}^{-1}$ และ Fernández และคณะ (2008) พบพีคการดูดกลืนขององค์ประกอบ

โปรตีน เปปไทด์ และกรดอะมิโน ซึ่งสัมพันธ์กับพันธะ N-H และเอไมด์ ที่เลขคลื่น 7042, 6250, 5000 และ 4545 cm^{-1}



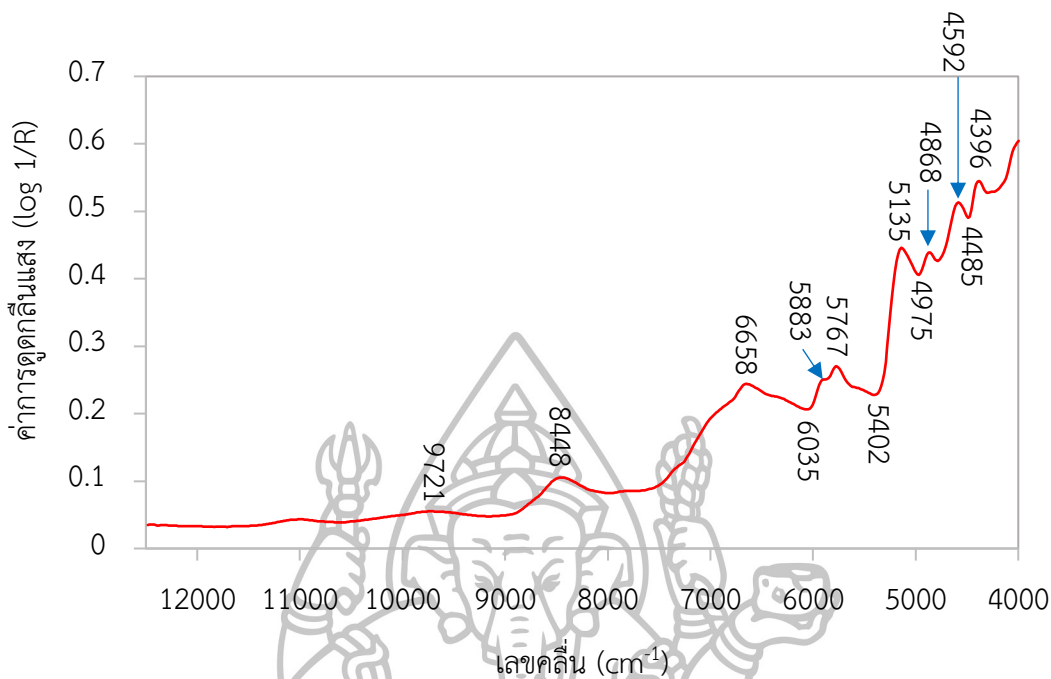
ภาพที่ 18 ตัวอย่างสเปกตรัมการดูดกลืนแสง NIRS ของสารละลายคอลลาเจนที่ความเข้มข้นต่างๆ กัน



ภาพที่ 19 ตัวอย่างสเปกตรัมการดูดกลืนแสง NIRS ของสารละลายคอลลาเจน ที่ความเข้มข้นต่างๆ กัน ที่ผ่านการปรับแต่งด้วยอนุพันธ์อันดับสอง

4.1.2 ลักษณะสเปกตรัมของคอลลาเจนผง

ตัวอย่างสเปกตรัมคอลลาเจนผงแสดงดังภาพที่ 20 จะเห็นว่าสเปกตรัมมีการดูดกลืนแสงที่ชัดเจนกว่าสเปกตรัมสารละลายคอลลาเจน โดยจะพบพีคการดูดกลืนแสงที่ชัดเจนที่เลขคลื่น 4396, 4485, 4592, 4779, 4868, 4975, 5135, 5402, 5767, 5883, 6035, 6658, 8448 และ 9721 cm^{-1} ซึ่งมีความสัมพันธ์กับพันธะ C=O, C-H, O-H, N-H และ เอไมด์ ที่มีในโครงสร้างคอลลาเจน และสอดคล้องกับงานวิจัยของ Ingle และคณะ (2016) ใช้เทคนิค NIRS ในการติดตามปริมาณโปรตีนในเวย์โปรตีน พบพีคการดูดกลืนที่ 8424 (C-H), 6684 (N-H), 5973 (C-H), 5737 (C-H), 5050 (N-H), 4866 (ROH หรือ N-H) และ 4614 (N-H) cm^{-1} ซึ่งคุณสมบัติการดูดกลืนเหล่านี้สอดคล้องกับพันธะภายในโครงสร้างโปรตีน ซึ่งสัมพันธ์กับโครงสร้างคอลลาเจนเช่นกัน



ภาพที่ 20 สเปกตรัมคอลลาเจน

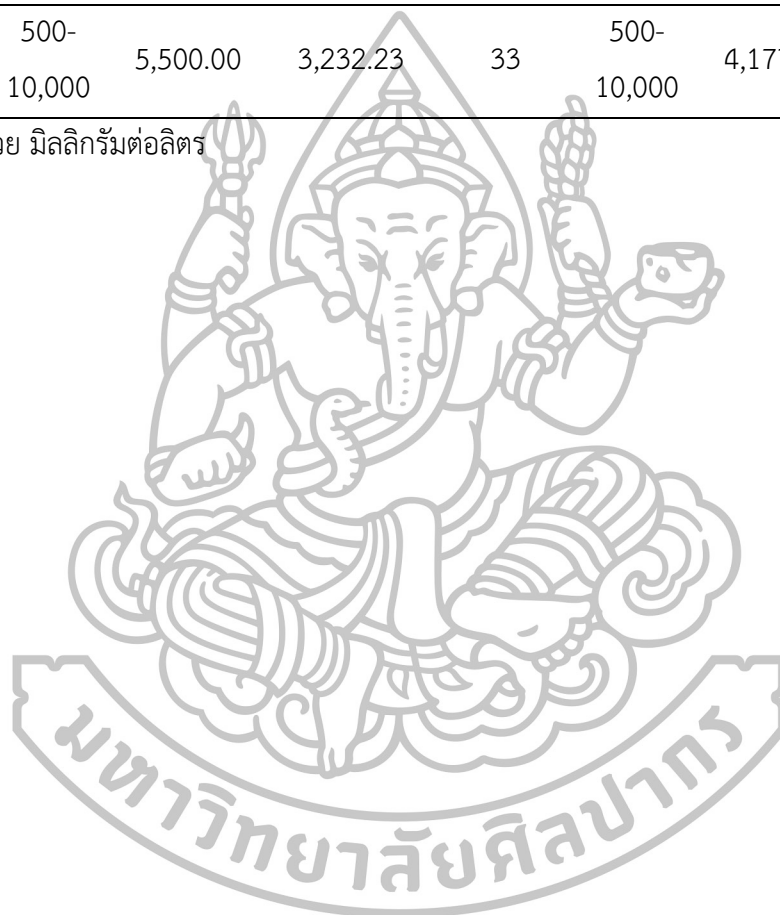
4.1.3 การสร้างสมการเทียบมาตรฐาน

ค่าสถิติของสารละลายคอลลาเจนสำหรับสร้างสมการและทวนสอบสมการเทียบมาตรฐานมีความเข้มข้นอยู่ในช่วง 500-10,000 มิลลิกรัมต่อลิตร แสดงดังตารางที่ 7 และจากตารางที่ 8 แสดงค่า R^2 , RMSEC, RMSEP, Bias, RPD และจำนวนปัจจัยที่เกี่ยวข้องของสมการทำนายค่าด้วยเทคนิค NIRS โดยในการศึกษานี้เลือกช่วงในการสร้างสมการจากสารละลายคอลลาเจน โดยเมื่อนำสเปกตรัมสารละลายคอลลาเจน มาปรับแต่งด้วยวิธีอนุพันธ์อันดับสอง จะเห็นความแตกต่างของสเปกตรัมในช่วง 7486-6896, 5500-4998 และ 4701-3999 cm^{-1} โดยสมการเทียบมาตรฐานที่เหมาะสมที่สุดในการศึกษานี้ ได้แก่ สมการที่ไม่ผ่านการปรับแต่งสเปกตรัม ซึ่งให้ค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (R^2) เท่ากับ 0.976 ค่าความคลาดเคลื่อนในการทำนาย (RMSEP) เท่ากับ 474 มิลลิกรัมต่อลิตร ค่าความคลาดเคลื่อนเฉลี่ย (bias) เท่ากับ 155 มิลลิกรัมต่อลิตร ค่าสัดส่วนระหว่างส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานกับค่าความผิดพลาดมาตรฐานในการทำนายของกลุ่มทวนสอบสมการ (RPD) เท่ากับ 6.94 และมีปัจจัยที่เกี่ยวข้อง 9 ปัจจัยตามลำดับ ซึ่งโดยทั่วไปการเลือกสมการที่เหมาะสมที่สุดจะเลือกจากสมการที่ให้ค่าการทำนายในชุดของการทวนสอบที่ดีที่สุด (Keawsorn และ Sirisomboon, 2014)

ตารางที่ 7 ค่าสถิติของสารละลายคอลลาเจนสำหรับสร้างสมการและสำหรับทวนสอบสมการด้วย
เทคนิค NIRS

จำนวน ตัวอย่าง	สมการเทียบมาตรฐาน (70%)			จำนวน ตัวอย่าง	สมการทวนสอบ (30%)		
	ค่าต่ำสุด- ค่าสูงสุด*	ค่าเฉลี่ย	ส่วนเบี่ยงเบน มาตรฐาน		ค่าต่ำสุด- ค่าสูงสุด*	ค่าเฉลี่ย	ส่วนเบี่ยงเบน มาตรฐาน
77	500- 10,000	5,500.00	3,232.23	33	500- 10,000	4,177.41	2,491.81

*หน่วย มิลลิกรัมต่อลิตร



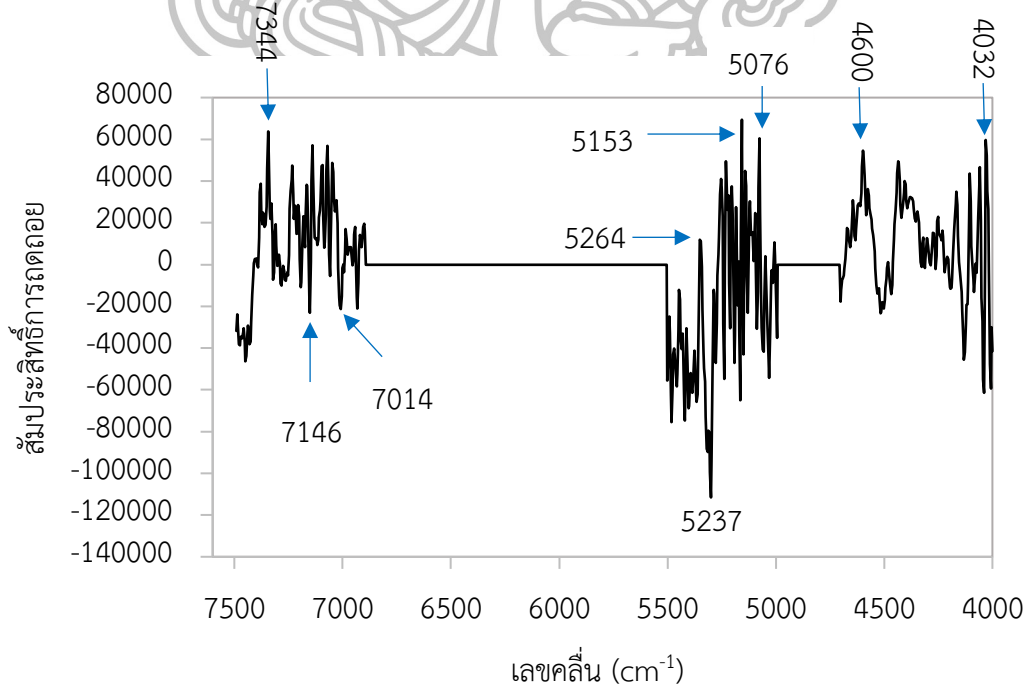
ตารางที่ 8 ค่าทางสถิติของสมการทำนายปริมาณคอลลาเจนในสารละลายคอลลาเจนด้วยเทคนิค NIRS

ช่วงเลขคลื่น (cm ⁻¹)	การปรับแต่งสเปกตรัม	PLS factor	สมการเทียบมาตรฐาน (70%)		สมการทวนสอบ (30%)			RPD
			R ²	RMSEE (mg/L)	R ²	RMSEP (mg/L)	Bias	
6476-5446*	SNV	4	0.981	435	0.981	442	-13.7	7.32
7502-5446*	SNV	6	0.993	266	0.985	376	-64.8	8.30
46001-4246		8	0.947	526	0.977	437	-95.4	6.74
4701-3999	สเปกตรัมที่ไม่ผ่านการปรับแต่ง	8	0.947	526	0.977	437	-95.4	6.74
	SNV	6	0.956	677	0.957	621	286	5.44
	MSC	6	0.956	677	0.950	652	199	4.70
7486-6896	สเปกตรัมที่ไม่ผ่านการปรับแต่ง	9	0.987	373	0.976	474	155	6.94
5500-4998	ปรับแต่ง							
4701-3999	SNV	5	0.942	768	0.966	587	77.9	5.48

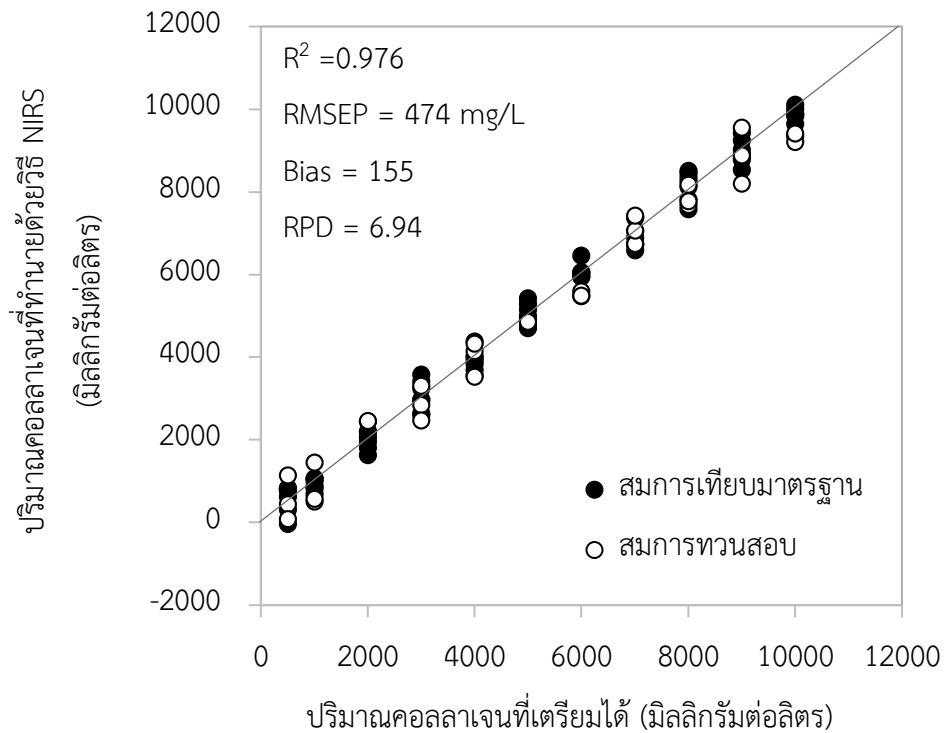
หมายเหตุ: R²: coefficients of determination, RMSEE: root mean square error of estimation, RMSEP: root mean square error of prediction, RPD: ratio of standard deviation of reference data in validation set to SEP, MSC: multiplicative scatter correction SNV: Standard Normal Variate และ * หมายถึง สมการที่ได้จากการ optimize

ภาพที่ 21 แสดงค่าสัมประสิทธิ์การถดถอย (regression coefficient) ของสารละลายคอลลาเจนที่ไม่ผ่านการปรับแต่งสเปกตรัม ซึ่งค่า regression coefficient ถูกใช้เป็นพื้นฐานในการตรวจสอบความยาวคลื่นหรือเลขคลื่นที่มีความสำคัญต่อแบบจำลอง (X-variable) ในการทำนายตัวแปรตาม (Y) ซึ่งถ้า regression coefficient มีค่าสูงซึ่งถึงความสำคัญของอิทธิพลความยาวคลื่นนั้นต่อแบบจำลองอย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งจากภาพที่ 21 จะสังเกตเห็นตัวแปรที่มีอิทธิพลและความสำคัญต่อแบบจำลองอยู่ที่เลขคลื่น 7344, 7014, 7146, 5237, 5264, 5487, 5153, 5076, 4730, 4600, 4432, 4252, 4172, 4062, 4040 และ 4032 cm^{-1} ซึ่งสอดคล้องกับการดูดกลืนของการสั่นพันธะ O-H C-H N-H และเอไมด์ ที่มีความสัมพันธ์กับกรดอะมิโนและโปรตีนในโครงสร้างคอลลาเจน (Osborne และคณะ, 1993)

จากภาพที่ 22 แสดงการกระจายตัวของค่าปริมาณคอลลาเจนในสารละลายคอลลาเจนที่ได้จากการสร้างสมการเทียบมาตรฐานและสมการทวนสอบด้วยเทคนิค NIRS พบว่ามีความสัมพันธ์ที่ดีในเชิงเส้นตรงข้อมูลมีการกระจายตัวใกล้เคียงเส้นทแยงมุม (target line) บ่งบอกถึงการทำนายได้อย่างถูกต้อง โดย Zornoza และคณะ (2008) เสนอแนะว่า ค่า R^2 มากกว่า 0.90 และ RPD มากกว่า 3 แบบจำลองให้ค่าการทำนายที่ดี ซึ่งสามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการทำนายคอลลาเจนที่ใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตเครื่องดื่มเพื่อสุขภาพได้ในอุตสาหกรรม

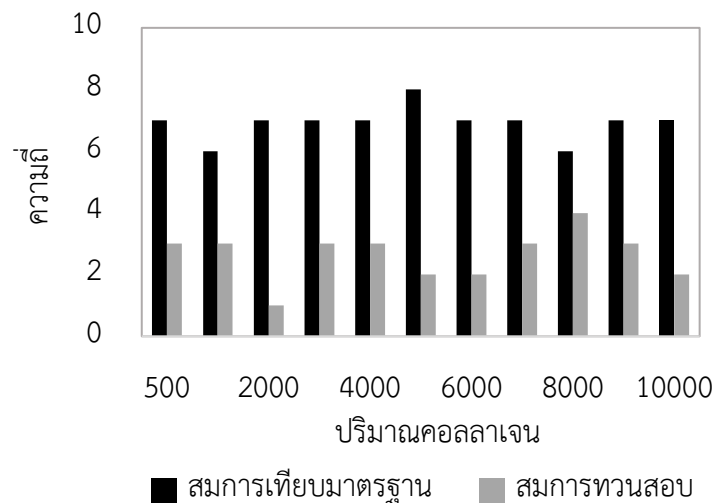


ภาพที่ 21 สัมประสิทธิ์การถดถอยของสารละลายคอลลาเจนที่ไม่ผ่านการปรับแต่งสเปกตรัม



ภาพที่ 22 การกระจายตัวของค่าปริมาณคอลลาเจนในสารละลายคอลลาเจน ที่ได้จากการสร้างสมการเทียบมาตรฐานและทวนสอบสมการด้วยเทคนิค NIRS

สมการเทียบมาตรฐานที่สร้างขึ้นจากข้อมูลปริมาณคอลลาเจนในสารละลายมาตรฐานที่วิเคราะห์ได้ แสดงการกระจายตัวของข้อมูลดังภาพที่ 23 พบว่าข้อมูลมีการกระจายตัวอย่างสม่ำเสมอ ทำให้สมการเทียบมาตรฐานที่สร้างขึ้นให้ผลการทำนายที่แม่นยำ ซึ่งสอดคล้องกับค่า R^2 กับ RPD ที่สูง และค่า SEC ที่ต่ำ



ภาพที่ 23 การกระจายตัวของปริมาณคอลลาเจนในสารละลายคอลลาเจน

แต่เมื่อนำตัวอย่างผลิตภัณฑ์น้ำผลไม้เสริมคอลลาเจนที่มีวางจำหน่ายในท้องตลาดมาทำนายด้วยสมการสารละลายคอลลาเจน พบว่า ไม่สามารถทำนายได้ เนื่องจากมีองค์ประกอบภายในตัวอย่างที่ต่างกัน เมื่อพิจารณาจากขีดจำกัดของค่าระยะห่างมาหาลาโนบิสเฉลี่ย (Average Mahalanobis Distance) คือ ความแตกต่างระหว่างสเปกตรัมของตัวอย่างกับค่าเฉลี่ยของทุกสเปกตรัมในกลุ่มสมการเทียบมาตรฐาน โดยการคำนวณจะพิจารณาบนพื้นฐานการกระจายของสเปกตรัมในกลุ่มสมการเทียบมาตรฐานทั้งหมด ซึ่งจะต้องคำนวณค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ถ้าพบว่าเกินขีดจำกัดก็จะเป็น Outlier และจากการศึกษาครั้งนี้ พบว่าตัวอย่างผลิตภัณฑ์น้ำผลไม้เสริมคอลลาเจนที่นำมาทำนายมีค่าระยะมาหาลาโนบิสเฉลี่ยเกินขีดจำกัด โดยสามารถสังเกตจากร้อยละความคลาดเคลื่อนเฉลี่ยที่สูงมาก ถึงร้อยละ 558.96 แสดงดังตารางที่ 9 และแสดงวิธีการคำนวณดังภาคผนวก ก



ตารางที่ 9 การเปรียบเทียบค่าจริงและค่าทำนายของปริมาณคอลลาเจนในน้ำผลไม้เสริมคอลลาเจนที่
จำหน่ายในท้องตลาด ด้วยสมการสารถลายคอลลาเจนที่เหมาะสมที่สุด

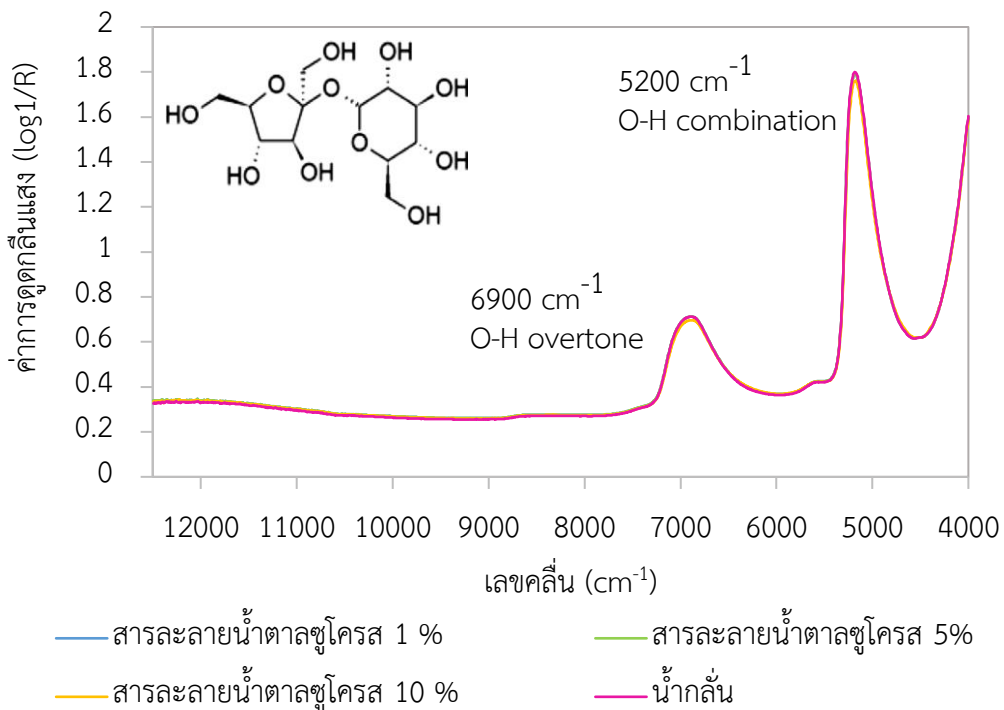
รหัสตัวอย่าง	ค่าจาก HPLC (mg/L)	ค่าทำนาย (mg/L)	ค่าความคลาดเคลื่อน (%)
E 2500	7,358.83	30,822.00	318.84
E 2500	7,631.08	31,655.00	314.82
E 2500	6,832.46	32,453.00	374.98
E 3000	8,589.62	42,236.00	391.71
E 3000	9,567.76	42,601.00	345.26
E 3000	10,540.23	42,262.00	300.96
E 3000	10,795.67	40,610.00	276.17
D 2000	8,479.10	27,774.00	227.56
D 2000	7,488.83	28,702.00	283.26
D 2000	8,701.97	28,121.00	223.16
D 2000	5,324.39	60,395.00	1,034.31
A 2000	5,559.34	60,562.00	989.37
A 2000	3,112.83	60,776.00	1,852.43
A 2000	4,460.97	61,107.00	1,269.81
A 2000	4,804.04	62,432.00	1,199.57
A 2000	3,847.76	62,338.00	1,520.11
I 5000	98,666.92	134,340.00	36.16
I 5000	86,087.14	135,570.00	57.48
H 5000	79,547.64	120,820.00	51.88
H 5000	57,526.49	121,530.00	111.26
ค่าเฉลี่ย	21,746.15	61,355.30	558.96

4.2 การศึกษาอิทธิพลของวัตถุดิบอาหารต่อการวัดปริมาณคอลลาเจนด้วยเทคนิคสเปกโทรสโกปีอินฟราเรดย่านใกล้ในสารละลายคอลลาเจนที่มีความบริสุทธิ์ร้อยละ 95.10

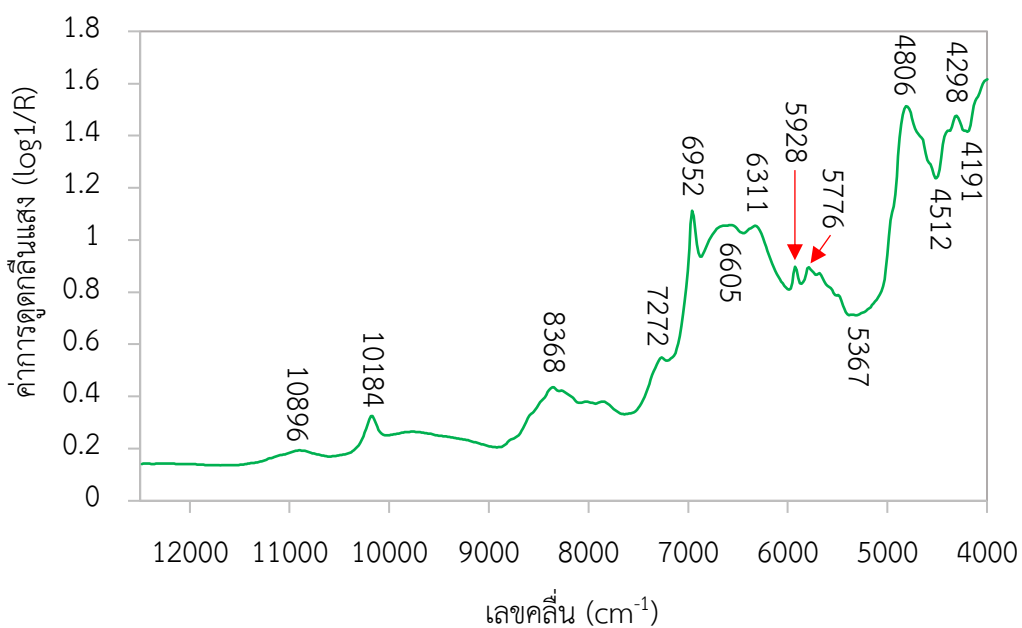
4.2.1 ลักษณะสเปกตรัมของสารละลายคอลลาเจนที่ทำการเติมวัตถุดิบอาหาร

4.2.1.1 สารละลายและผงวัตถุดิบอาหารบริสุทธิ์

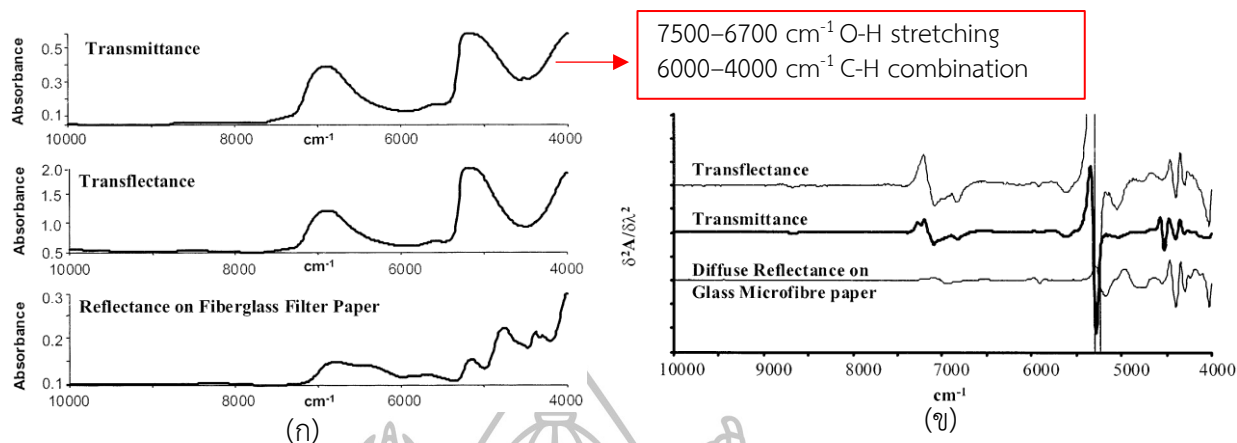
ตัวอย่างสเปกตรัมของสารละลายวัตถุดิบอาหารที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน ดังแสดงดังภาพที่ 24, 27, 30 และ 32 พบว่า สเปกตรัมสารละลายน้ำตาลซูโครส (ภาพที่ 24) ที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน มีลักษณะสเปกตรัมที่คล้ายกันและคล้ายกับสเปกตรัมของน้ำกลั่น พบพีคการดูดกลืนแสงที่ชัดเจนอยู่ที่บริเวณ 6900 และ 5200 cm^{-1} ซึ่งตำแหน่งนี้มีความสัมพันธ์กับการสั่นแบบโอเวอร์โทนอันดับหนึ่งของพันธะ O-H และคอมบิเนชันของพันธะ O-H (Rodriguez-Saona และคณะ, 2001; Xie และคณะ, 2009) ของโมเลกุลของน้ำ และสอดคล้องกับสเปกตรัมสารละลายน้ำตาลซูโครส ดังงานวิจัยของ Rodriguez-Saona และคณะ (2001) (ภาพที่ 26) ซึ่งแสดงลักษณะพีคที่คล้ายกัน พบพีคที่ชัดเจนคือ พีคน้ำเช่นกัน และเมื่อวัดสเปกตรัมของน้ำตาลซูโครส (ของแข็ง) พบการดูดกลืนที่เลขคลื่น $4191, 4298, 4512, 4806, 5367, 5776, 5928, 6311, 6605, 6952, 7272, 8368, 10184$ และ 10896 cm^{-1} (ภาพที่ 25) โดยเลขคลื่นดังกล่าวมีความสอดคล้องกับการดูดกลืนของน้ำตาลซูโครสและแป้ง (Osborne และคณะ, 1993)



ภาพที่ 24 สเปกตรัมสารละลายน้ำตาลซูโครส

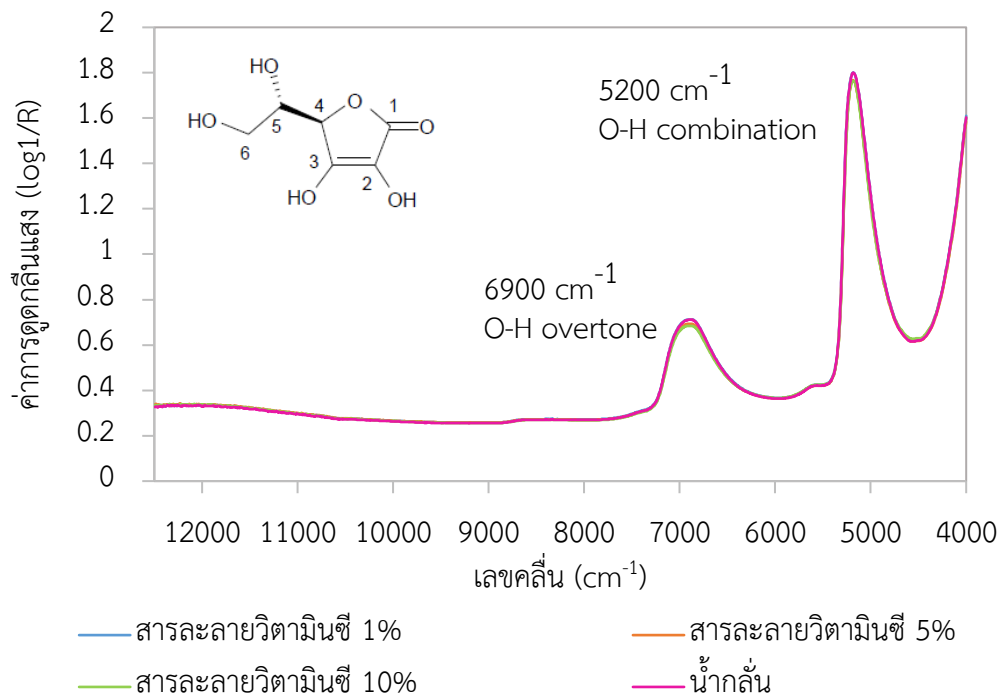


ภาพที่ 25 สเปกตรัมน้ำตาลซูโครส

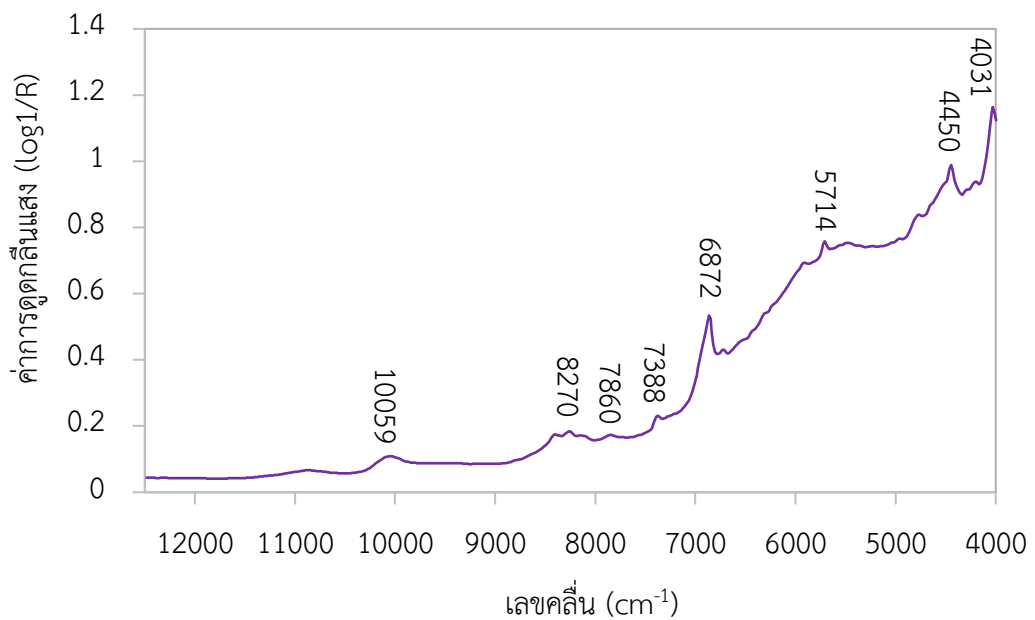


ภาพที่ 26 สเปกตรัมสารละลายน้ำตาลซูโครสจากเอกสารอ้างอิง (ก) สเปกตรัมดั้งเดิม (ข) สเปกตรัมที่ปรับแต่งด้วยอนุพันธ์อันดับสอง

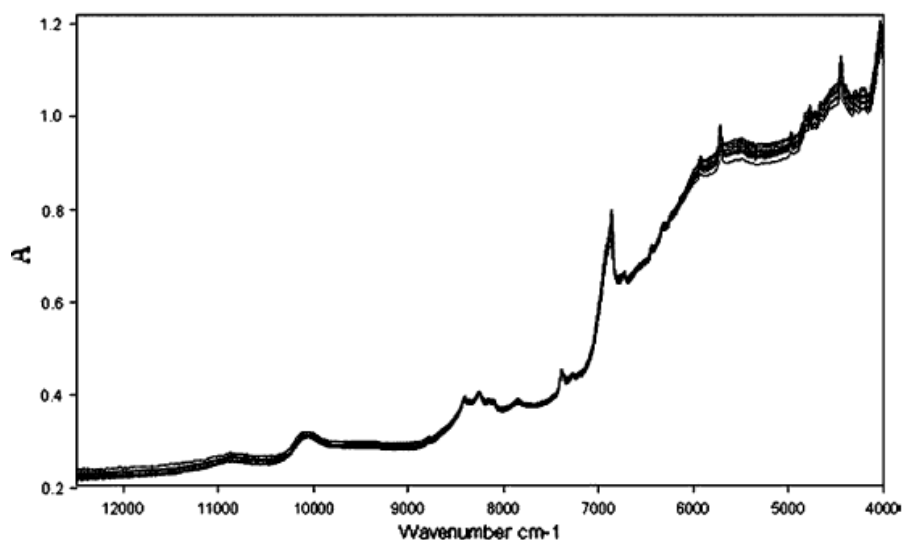
สเปกตรัมสารละลายวิตามินซี แสดงดังภาพที่ 27 ที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน มีลักษณะสเปกตรัมที่คล้ายกันและคล้ายกับสเปกตรัมของน้ำกลั่น เนื่องจากพืคน้ำมีลักษณะกว้างเตี้ย ทำให้ไม่สามารถเห็นพีคอื่นได้อย่างชัดเจน พบพีคการดูดกลืนแสงที่ชัดเจนอยู่ที่บริเวณ 6900 และ 5200 cm⁻¹ ซึ่งตำแหน่งนี้มีความสัมพันธ์กับการสั่นแบบโอเวอร์โทนอันดับหนึ่งของพันธะ O-H และคอมบิเนชันของพันธะ O-H (Osborne และคณะ, 1993) นอกจากนี้เมื่อวัดสเปกตรัมวิตามินซีผง ดังภาพที่ 28 พบว่า ให้ลักษณะสเปกตรัมที่คล้ายกับงานวิจัยของ Liu และคณะ (2006) ดังภาพที่ 29 พบการดูดกลืนที่เลขคลื่น 4031, 4450, 5714, 6872, 7388, 7860, 8270 และ 10059 cm⁻¹ โดยเลขคลื่นดังกล่าวมีความสอดคล้องกับการดูดกลืนของพันธะ O-H str. second overtone และ C-H str. second overtone ของโครงสร้างวิตามินซี (Osborne และคณะ, 1993)



ภาพที่ 27 สเปกตรัมสารละลายวิตามินซี

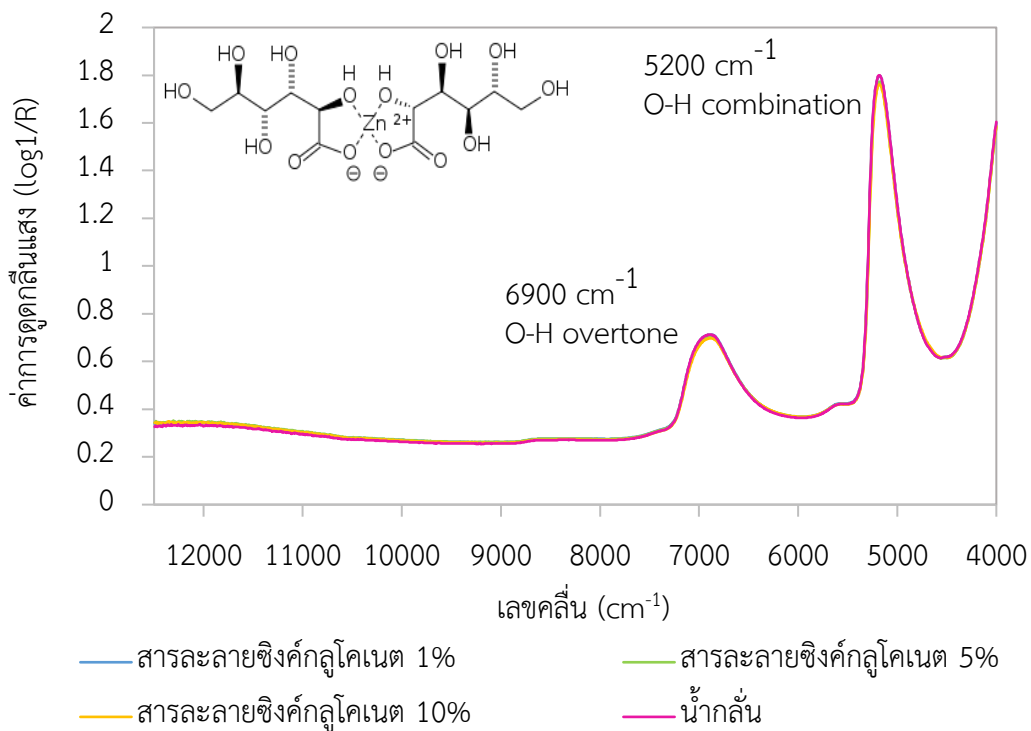


ภาพที่ 28 สเปกตรัมวิตามินซี

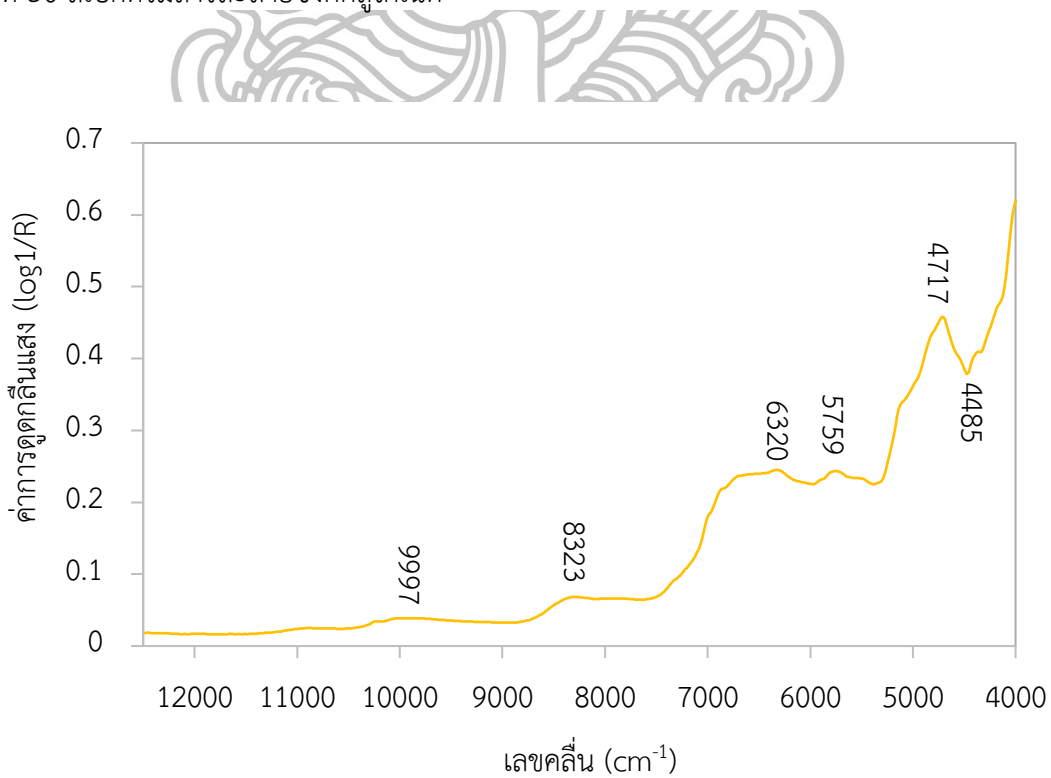


ภาพที่ 29 สเปกตรัมวิตามินซีจากเอกสารอ้างอิง

สเปกตรัมสารละลายซิงค์กลูโคเนต แสดงดังภาพที่ 30 พบว่า สเปกตรัมสารละลายซิงค์กลูโคเนต ที่ความเข้มข้นแตกต่างกันมีลักษณะคล้ายกัน และคล้ายกับสเปกตรัมน้ำกลั่น โดยพีคน้ำที่มีขนาดใหญ่ไปบดบังพีคขององค์ประกอบอื่นๆ ทำให้ไม่สามารถเห็นองค์ประกอบอื่นๆได้ พบพีคการดูดกลืนแสงที่ชัดเจนอยู่ที่บริเวณ 6900 และ 5200 cm^{-1} ซึ่งตำแหน่งนี้มีความสัมพันธ์กับการสั่นแบบโอเวอร์โทนอันดับหนึ่งของพันธะ O-H และคอมบิเนชันของพันธะ O-H (Osborne และคณะ, 1993) นอกจากนี้เมื่อวัดสเปกตรัมของซิงค์กลูโคเนต (ของแข็ง) ดังภาพที่ 31 พบการดูดกลืนที่เลขคลื่น 4485 , 4717 , 5759 , 6320 , 8323 และ 9997 cm^{-1} มีความสอดคล้องกับการดูดกลืนของพันธะ C-H str. second overtone O-H str. first overtone และ second overtone ในโครงสร้างซิงค์กลูโคเนต (Osborne และคณะ, 1993)

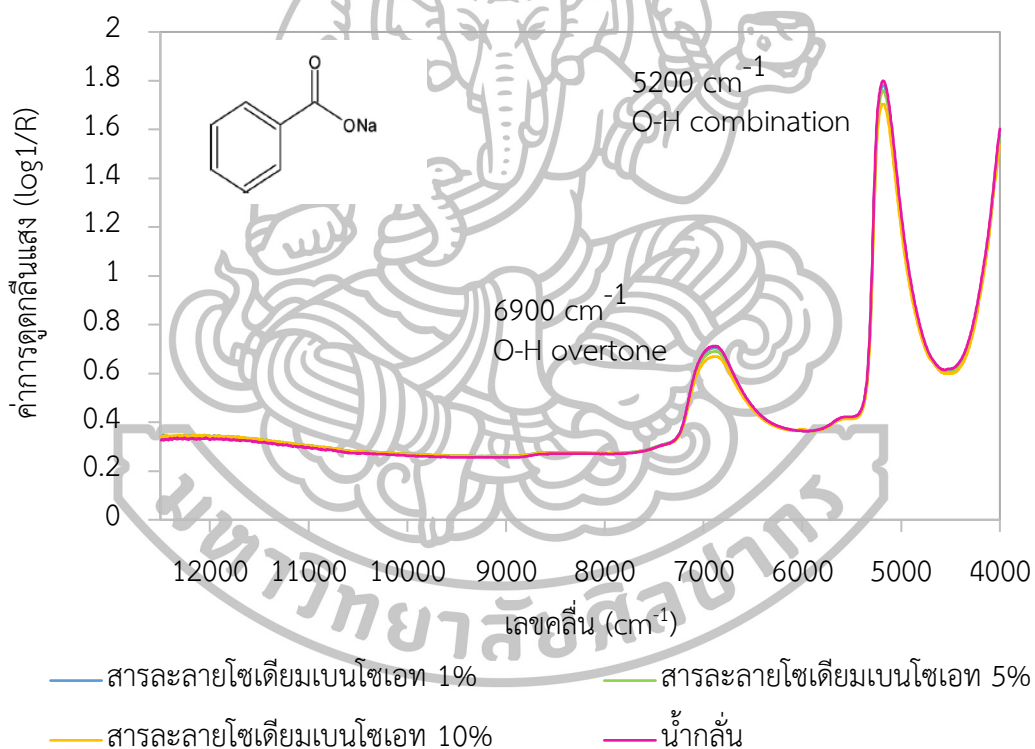


ภาพที่ 30 สเปกตรัมสารละลายซิงค์กลูโคเนต

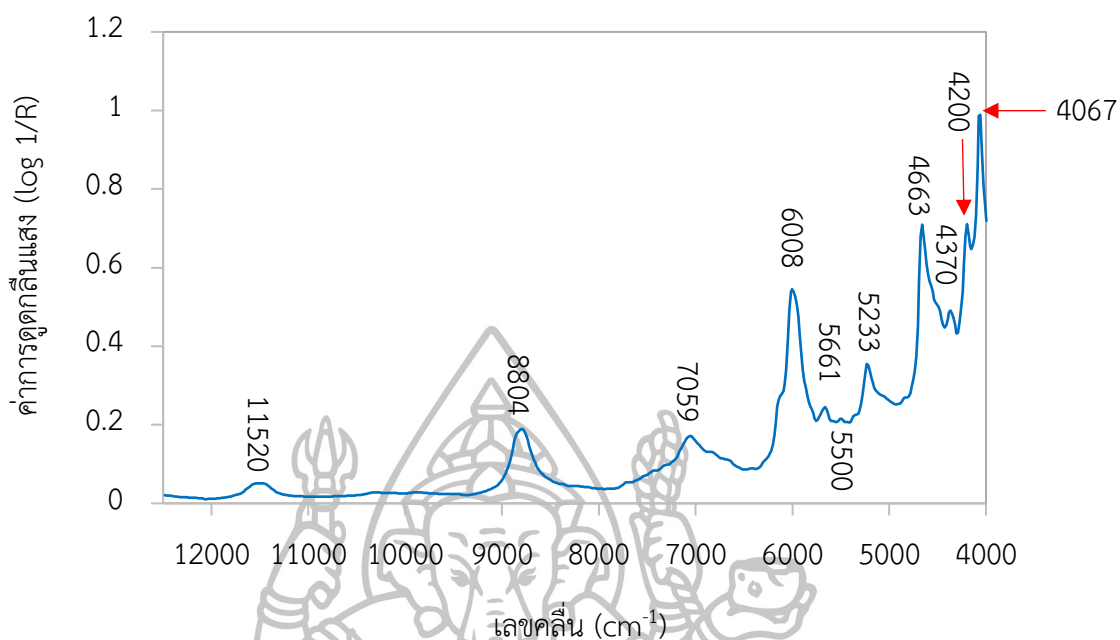


ภาพที่ 31 สเปกตรัมซิงค์กลูโคเนต

สเปกตรัมสารละลายโซเดียมเบนโซเอท แสดงดังภาพที่ 32 พบว่า สเปกตรัมสารละลายโซเดียมเบนโซเอท ที่ความเข้มข้นแตกต่างกันมีลักษณะคล้ายกัน และคล้ายกับสเปกตรัมน้ำกลั่น โดยพบพีคการดูดกลืนแสงที่ชัดเจนอยู่ที่บริเวณ 6900 และ 5200 cm^{-1} ซึ่งตำแหน่งนี้มีความสัมพันธ์กับการสั่นแบบโอเวอร์โทนอันดับหนึ่งของพันธะ O-H และคอมบิเนชันของพันธะ O-H (Osborne และคณะ, 1993) นอกจากนี้เมื่อวัดสเปกตรัมโซเดียมเบนโซเอท (ของแข็ง) ดังภาพที่ 33 พบพีคการดูดกลืนที่ตำแหน่ง $4067, 4200, 4370, 4663, 5233, 5500, 5661, 6008, 7059, 8804$ และ 11520 cm^{-1} ซึ่งตำแหน่งดังกล่าวมีความสัมพันธ์กับการดูดกลืนของพันธะ O-H def. second overtone, O-H str. First overtone, C-H str. และ first overtone และ C-O str. ในโครงสร้างของโซเดียมเบนโซเอท (Osborne และคณะ, 1993)

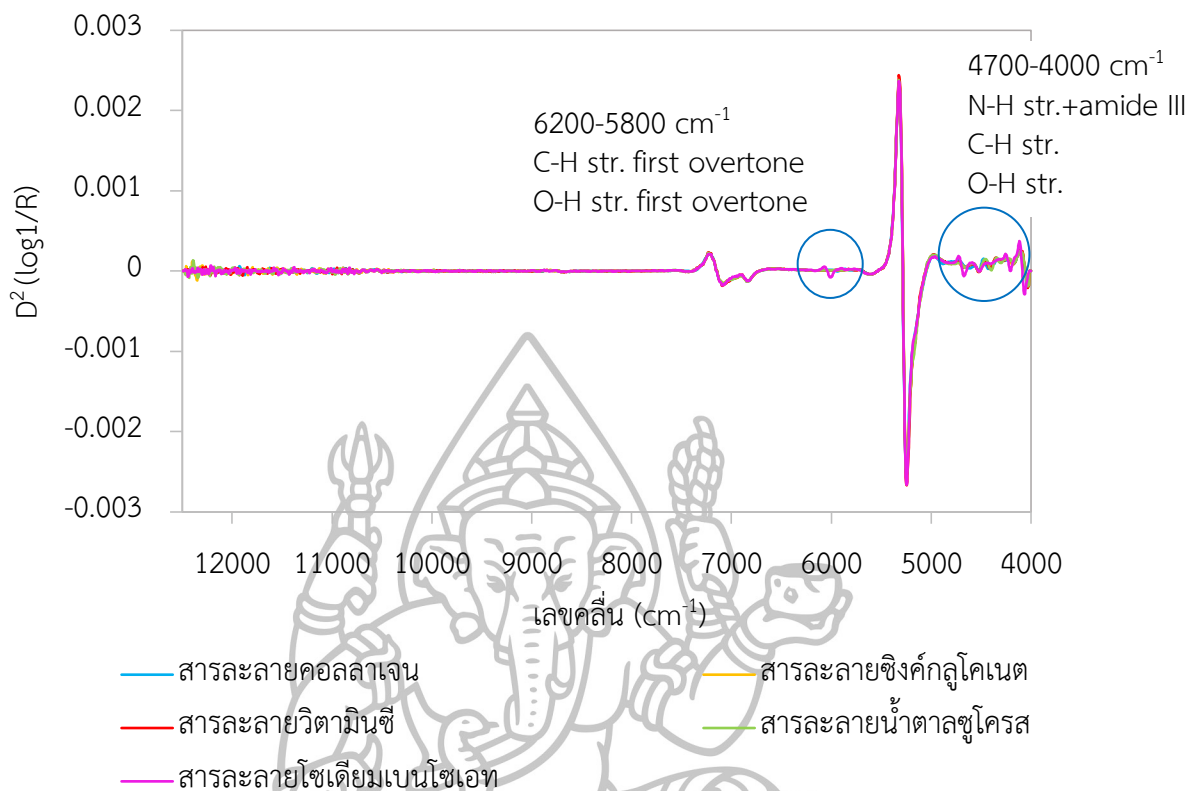


ภาพที่ 32 สเปกตรัมสารละลายโซเดียมเบนโซเอท



ภาพที่ 33 สเปกตรัมโซเดียมเบนโซเอท

เมื่อปรับแต่งสเปกตรัมสารละลายวัตถุเจือปนอาหารชนิดต่างๆ ด้วยวิธีอนุพันธ์อันดับสอง แสดงดังภาพที่ 34 พบว่าให้ลักษณะสเปกตรัมที่ต่างกันที่ช่วงเลขคลื่น $4700-4000\text{ cm}^{-1}$ มีความสัมพันธ์กับการดูดกลืนของพันธะ N-H str.+amide III, C-H str. และ O-H str. ที่มีในโครงสร้างคอลลาเจน และช่วงเลขคลื่น $6200-5800\text{ cm}^{-1}$ มีความสัมพันธ์กับการดูดกลืนของพันธะ O-H str. first overtone และ C-H str. first overtone ที่มีในโครงสร้างวัตถุเจือปนอาหาร (Osborne และคณะ, 1993)

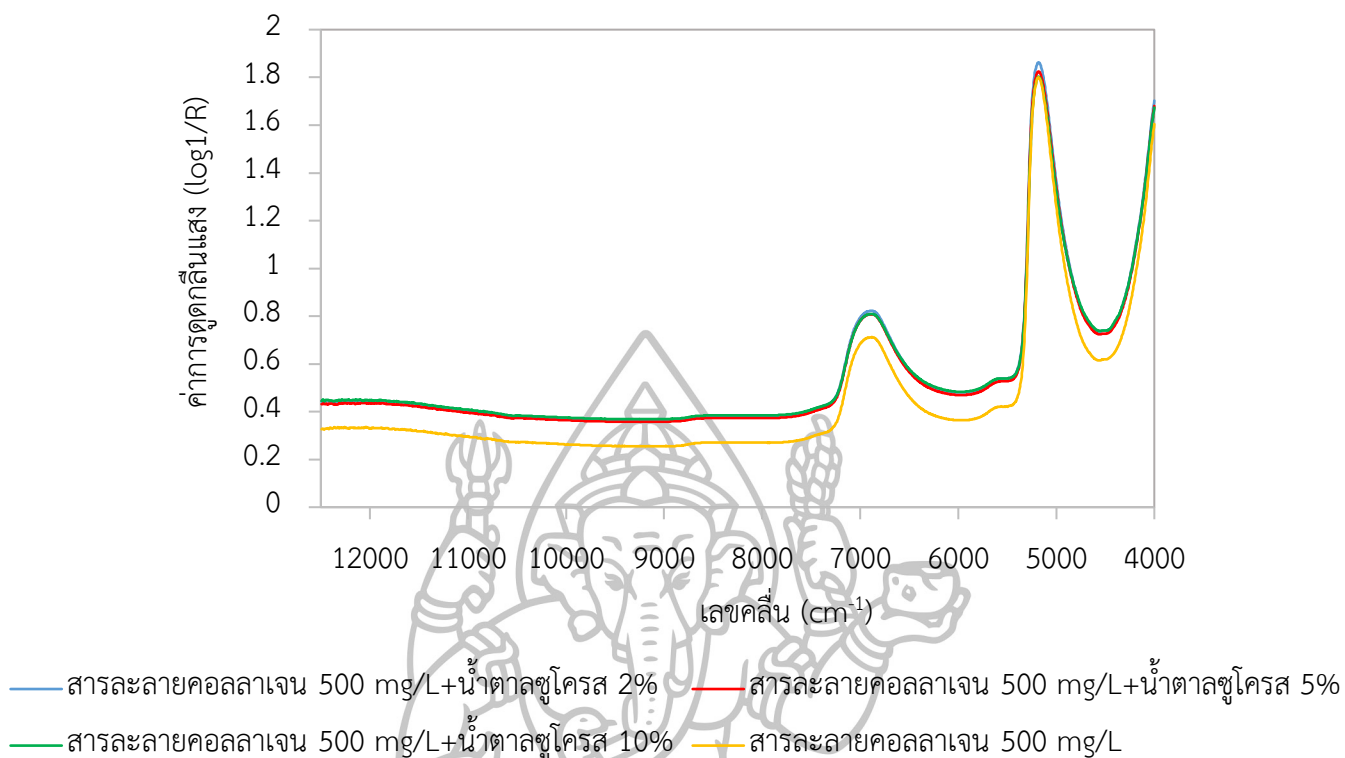


ภาพที่ 34 สเปกตรัมของสารละลายชนิดต่างๆ ที่ปรับแต่งด้วยวิธีอนุพันธ์อันดับสอง

4.2.1.2 สารละลายคอลลาเจนที่ทำการเติมวัตถุเจือปนอาหาร

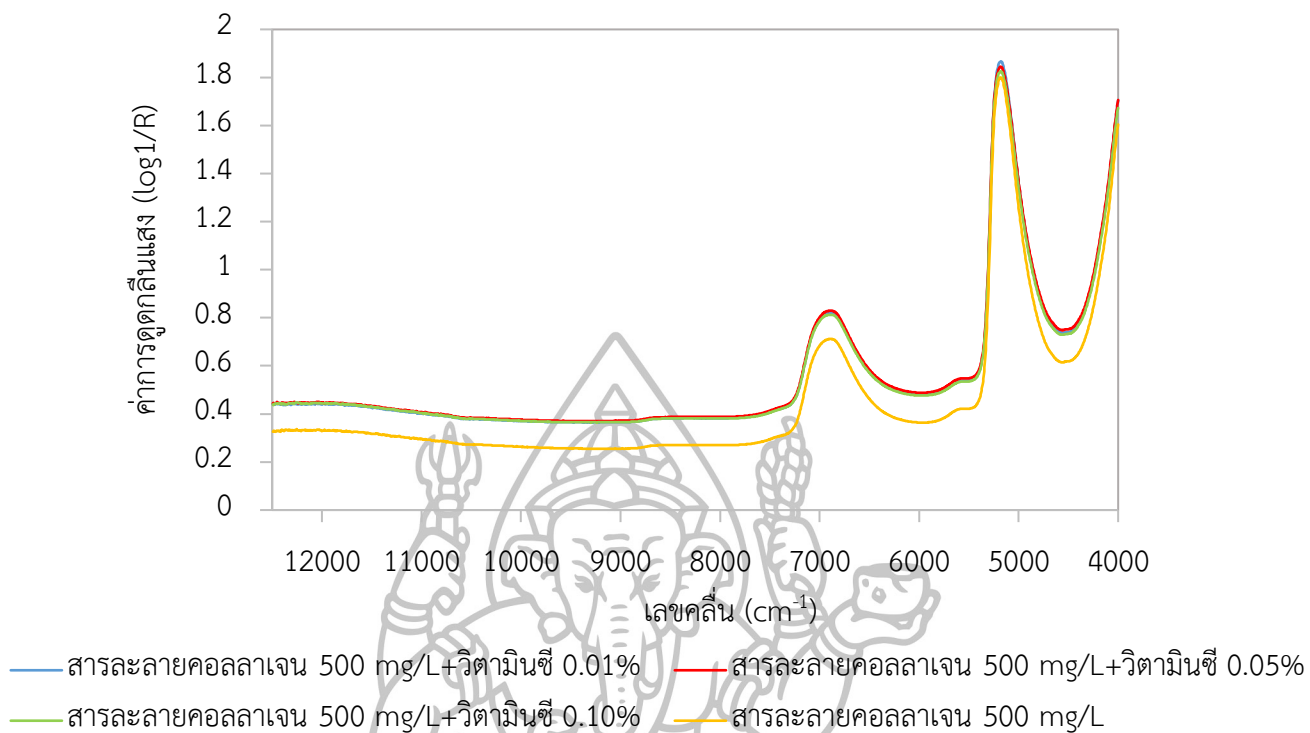
สเปกตรัมของสารละลายคอลลาเจนที่ทำการเติมวัตถุเจือปนอาหาร วัดสเปกตรัมในช่วงเลขคลื่น 12500-4000 cm^{-1} แสดงดังภาพที่ 35, 36, 37 และ 38

ภาพที่ 35 พบว่าสเปกตรัมของสารละลายคอลลาเจนที่เติมน้ำตาลซูโครสความเข้มข้นต่างๆ กันมีลักษณะคล้ายกัน และคล้ายกับสารละลายคอลลาเจน พบการดูดกลืนที่ชัดเจนที่บริเวณ 7200-6900 cm^{-1} มีความสัมพันธ์กับการดูดกลืนของหมู่ -OH (Nicolai และคณะ, 2007; Omar และคณะ, 2012a; Omar และคณะ, 2012b) ในขณะเดียวกันที่บริเวณ 5200-4900 cm^{-1} ซึ่งเป็นช่วงคลื่นยาว มีความสัมพันธ์กับการดูดกลืนของพันธะ C-H และ O-H (Büning-Pfaue, 2003; Oliveira และคณะ, 2014) Segtnan และ Isaksson (2002) พบพิคการดูดกลืนของน้ำตาลซูโครสที่เลขคลื่น 6756, 6329, 5717, 4716, 4358 และ 4291 cm^{-1} Tewari และคณะ (2003) พบการดูดกลืนในช่วงเลขคลื่น 6060-5740 cm^{-1} และ 4650-4350 cm^{-1} มีความสัมพันธ์กับการดูดกลืนของน้ำตาลซูโครสเช่นกัน



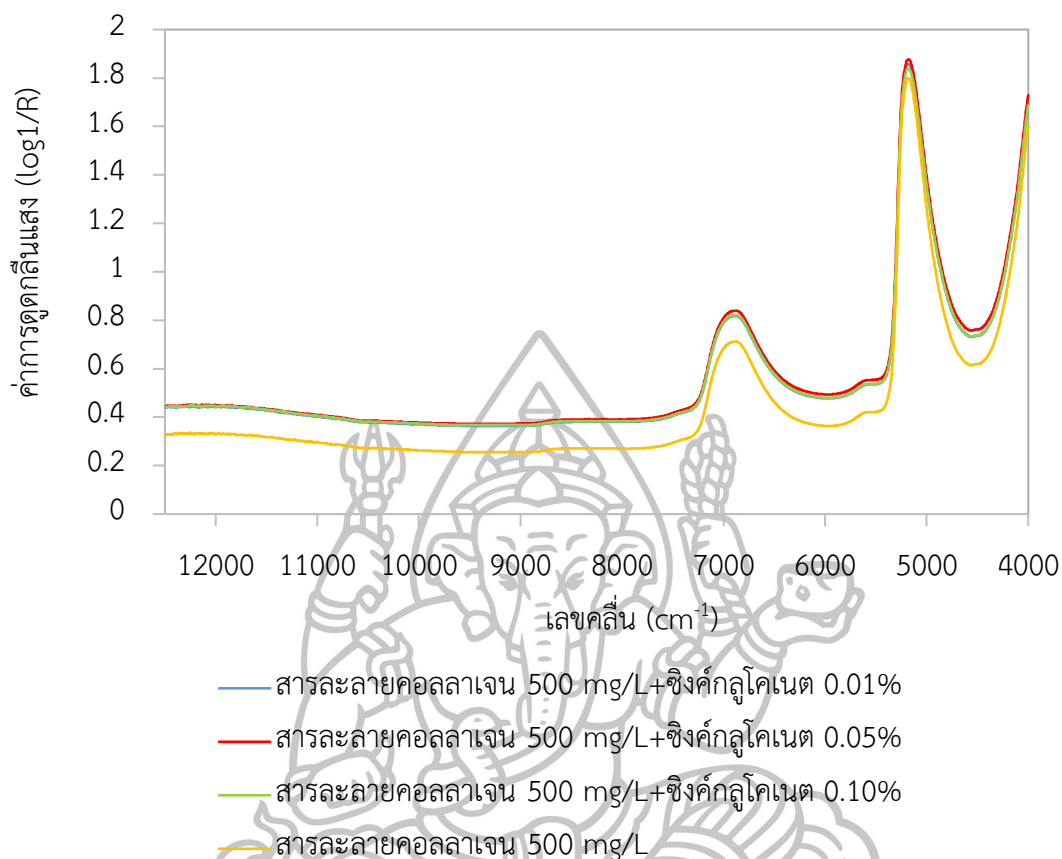
ภาพที่ 35 สเปกตรัมสารละลายคอลลาเจน 500 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่เติมน้ำตาลซูโครสที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน

ภาพที่ 36 พบว่าสเปกตรัมของสารละลายคอลลาเจนที่เติมวิตามินซีที่ความเข้มข้นต่างๆ กัน มีลักษณะคล้ายกัน และคล้ายกับสารละลายคอลลาเจน โดยพบการดูดกลืนที่ชัดเจนบริเวณ 7200-6900 cm⁻¹ เช่นเดียวกัน ซึ่งมีความสัมพันธ์กับการดูดกลืนของหมู่ -OH และที่บริเวณ 5200-4900 cm⁻¹ มีความสัมพันธ์กับการดูดกลืนของพันธะ C-H และ O-H เนื่องจากสารละลายคอลลาเจนที่เติมวัตถุเจือปนอาหารมีน้ำเป็นองค์ประกอบหลัก ซึ่งพืคน้ำมีลักษณะเป็นพีคที่กว้างเตี้ยและมีลักษณะเหลื่อมซ้อนกันกับวัตถุเจือปนอาหาร จึงไม่สามารถเห็นพีคเหล่านั้นได้อย่างชัดเจน ซึ่งการดูดกลืนในลักษณะนี้สามารถพบได้ในสเปกตรัมการดูดกลืนแสง NIRS ของน้ำเบียร์ (Xie และคณะ, 2009) นอกจากนี้ยังพบในเนกต้าฝรั่งและเนกต้ามะม่วงหิมพานต์ (Caramés และคณะ, 2017) และ Malegori และคณะ (2016) พบพีคการดูดกลืนที่เลขคลื่น 7200-6700 cm⁻¹ ซึ่งมีความสัมพันธ์กับวิตามินซี



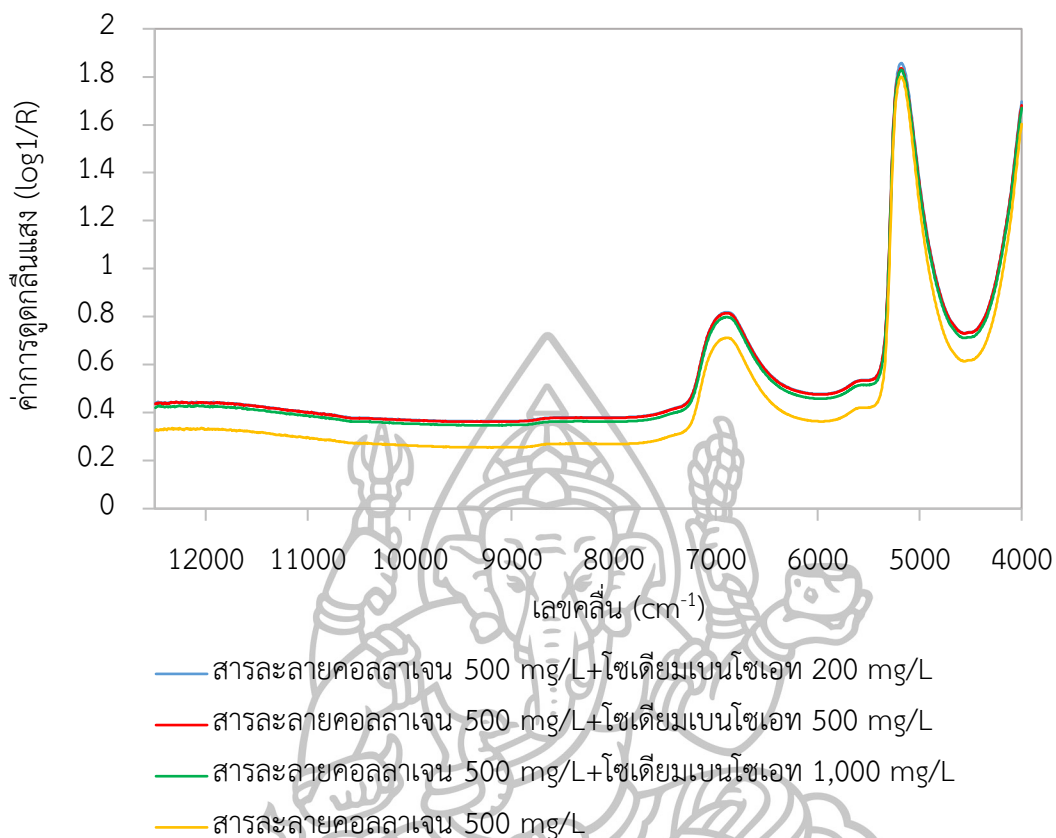
ภาพที่ 36 สเปกตรัมสารละลายคอลลาเจน 500 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่เติมวิตามินซีที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน

ภาพที่ 37 พบว่าสเปกตรัมของสารละลายคอลลาเจนที่เติมซิงค์กลูโคเนตที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน มีลักษณะคล้ายกับสารละลายคอลลาเจน มีการดูดกลืนของพีดน้ำที่ชัดเจนในช่วงเลขคลื่น 7200-6900 cm⁻¹ สัมพันธ์กับการดูดกลืนของหมู่ -OH ที่ช่วงคลื่น 5200-4900 cm⁻¹ สัมพันธ์กับการดูดกลืนของพันธะ C-H และ O-H เนื่องจากซิงค์เป็นกรดอนินทรีย์จึงไม่พบการดูดกลืนด้วยรังสี NIRS แต่เมื่อสร้างพันธะกับโมเลกุลของน้ำตาล จึงทำให้วัดการดูดกลืนของซิงค์กลูโคเนตได้ โดยการดูดกลืนก็จะสัมพันธ์กับโมเลกุลของน้ำตาล



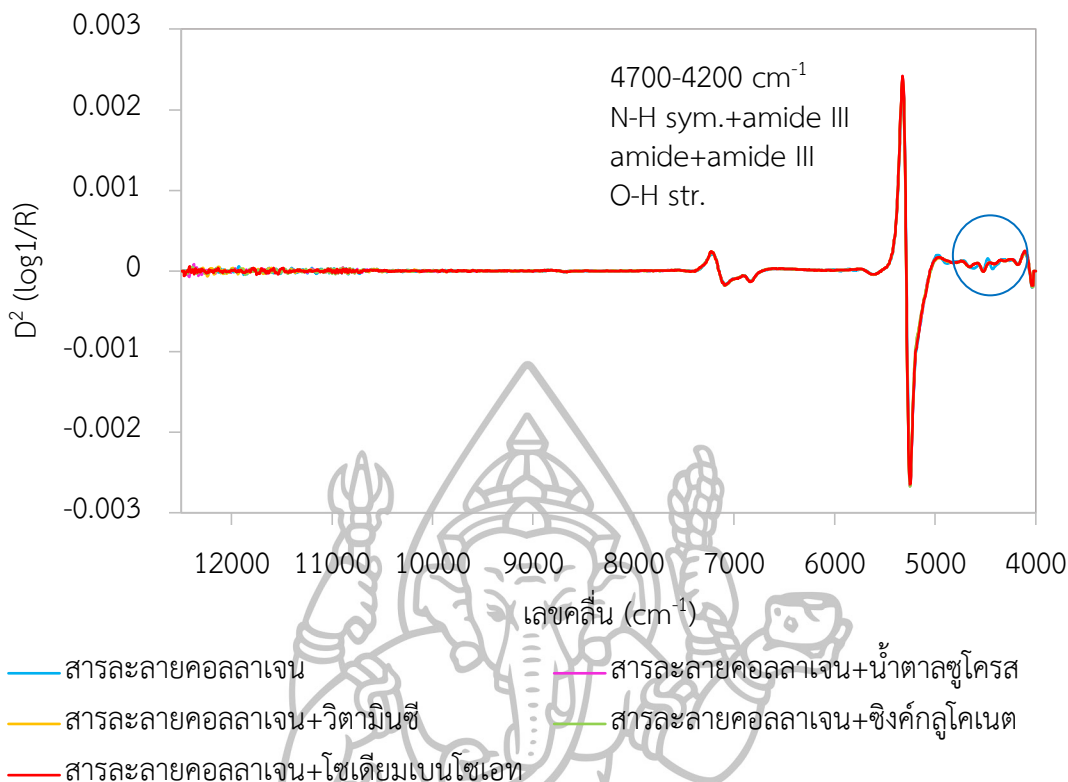
ภาพที่ 37 สเปกตรัมสารละลายคอลลาเจน 500 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่เติมชิงค์กลูโคเนตที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน

ภาพที่ 38 พบว่าสเปกตรัมของสารละลายคอลลาเจนที่เติมโซเดียมเบนโซเอทที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน มีลักษณะสเปกตรัมคล้ายกับสารละลายคอลลาเจน และจะพบการดูดกลืนของน้ำที่บริเวณเลขคลื่น 7200-6900 cm⁻¹ และบริเวณเลขคลื่น 5200-4900 cm⁻¹ ซึ่งมีความสัมพันธ์กับการดูดกลืนของพันธะ C-H และ O-H โดยโซเดียมเบนโซเอทเป็นสารจำพวกเกลือโซเดียมกับกรดเบนโซอิก ซึ่งโครงสร้างหลักเป็นวงแหวนอะโรมาติก โดยมีตำแหน่งการดูดกลืนที่เลขคลื่น 8748, 7057, 6915 และ 5934 cm⁻¹ (Osborne และคณะ, 1993)



ภาพที่ 38 สเปกตรัมสารละลายคอลลาเจน 500 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่เติมโซเดียมเบนโซเอทที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน

เนื่องจากสารละลายวัตถุเจือปนอาหารมีน้ำเป็นองค์ประกอบหลักจึงทำให้ไม่สามารถมองเห็นพีคของวัตถุเจือปนอาหารได้ ดังนั้นจึงต้องทำการปรับแต่งสเปกตรัมด้วยวิธีอนุพันธ์อันดับสอง เพื่อแยกจุดยอดที่เหลื่อมซ้อนกันในสเปกตรัมออกจากกัน และลดผลกระทบที่ทำให้สเปกตรัมมีขนาดเพิ่มขึ้นตลอดช่วงความยาวคลื่น นอกจากนี้การใช้อนุพันธ์อันดับสองยังให้ผลดีกับตัวอย่างที่มีขนาดอนุภาคต่างๆ ผสมผสานอยู่ แสดงดังภาพที่ 39 ซึ่งจะเห็นว่าสเปกตรัมของสารละลายคอลลาเจน และสเปกตรัมสารละลายคอลลาเจนที่เติมวัตถุเจือปนอาหารให้ลักษณะสเปกตรัมที่แตกต่างกันในช่วงคลื่นยาว ซึ่งเป็นช่วงคลื่นที่มีความสามารถในการดูดกลืนพันธะสูงหรือมี molar absorptivity สูง จึงทำให้เห็นพีคมีความแตกต่างกันมากในช่วงนี้

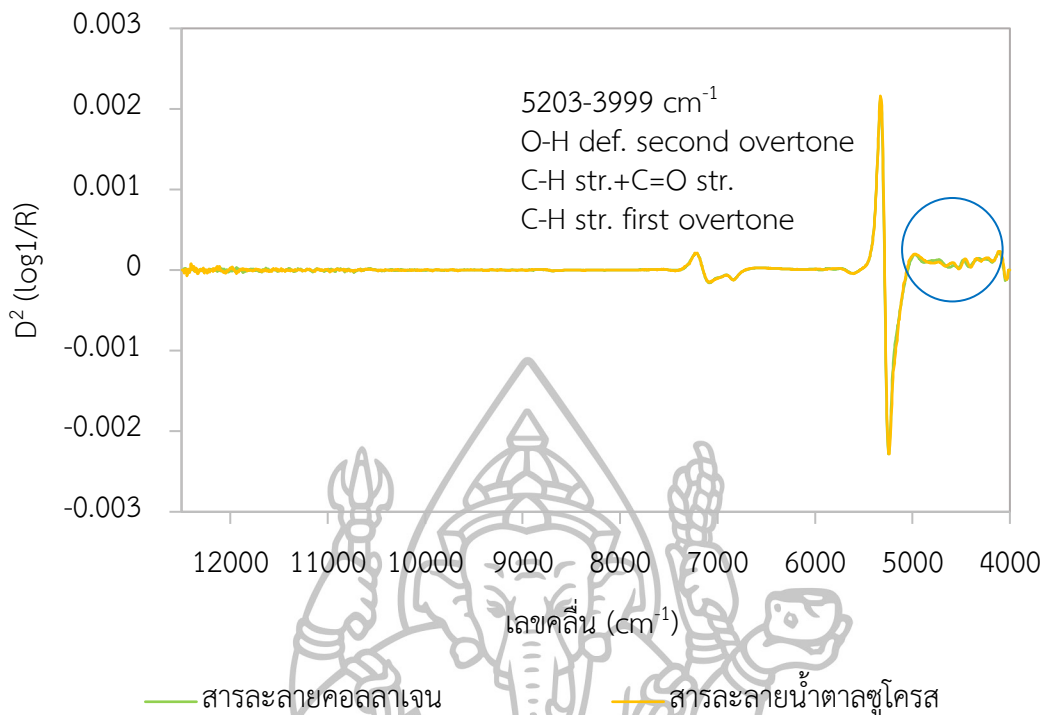


ภาพที่ 39 สเปกตรัมของสารละลายคอลลาเจนที่เติมวัตถุเจือปนอาหารชนิดต่างๆที่ปรับแต่งด้วยวิธีอนุพันธ์อันดับสอง

4.2.2 การสร้างสมการเทียบมาตรฐาน

ค่าสถิติของสารละลายคอลลาเจนที่ทำการเติมวัตถุเจือปนอาหาร สำหรับสร้างสมการเทียบมาตรฐานและทวนสอบสมการด้วยเทคนิค NIRS แสดงดังตารางที่ 10 ผลการสร้างสมการเทียบมาตรฐานในการศึกษาอิทธิพลของวัตถุเจือปนอาหารแต่ละชนิดได้แก่ น้ำตาล วิตามินซี โซเดียมเบนโซเอท และ ซิงค์กลูโคเนต และองค์ประกอบโดยรวม ต่อการวัดสเปกตรัมคอลลาเจน แสดงรายละเอียดดังนี้

สำหรับการสร้างสมการเทียบมาตรฐานเพื่อศึกษาอิทธิพลของน้ำตาลในสารละลายคอลลาเจน แสดงดังตารางที่ 11 โดยในการศึกษานี้ ทำการเปรียบเทียบสเปกตรัมสารละลายคอลลาเจนกับสเปกตรัมสารละลายน้ำตาลซูโครสที่ปรับแต่งสเปกตรัมด้วยวิธีอนุพันธ์อันดับสอง แสดงดังภาพที่ 40 พบว่า ช่วง $5203\text{-}3999\text{ cm}^{-1}$ ให้ลักษณะสเปกตรัมที่ต่างกัน ซึ่งช่วงดังกล่าวมีความสัมพันธ์กับการดูดกลืนของน้ำตาล มีความสอดคล้องกับสเปกตรัมน้ำตาลซูโครสดังภาพที่ 25 และ 26 (ข) และสอดคล้องกับงานวิจัยของ Oliveira และคณะ (2014) พบว่าที่เลขคลื่น $5411\ 4728\ 4721$ และ 4370 cm^{-1} มีความสัมพันธ์กับการดูดกลืนองค์ประกอบของ กลูโคส ฟรุคโตส และซูโครสในเสาวรส



ภาพที่ 40 สเปกตรัมการดูดกลืนแสง NIRS ของสารละลายคอลลาเจนเทียบกับสารละลายน้ำตาลซูโครสที่ปรับแต่งสเปกตรัมด้วยวิธีอนุพันธ์อันดับสอง

การสร้างสมการเทียบมาตรฐานพบว่า สมการที่เหมาะสมที่สุดคือ สมการการที่ผ่านการปรับแต่งสเปกตรัมด้วยวิธี SNV ที่ช่วงคลื่น $5203-3999\text{ cm}^{-1}$ โดยทำให้ค่า R^2 ในกลุ่มเทียบมาตรฐานเพิ่มขึ้นจาก 0.924 เป็น 0.935 ซึ่งช่วงคลื่นดังกล่าวเป็นช่วงที่มีความสัมพันธ์กับพันธะ N-H และหมู่เอไมด์ของโครงสร้างกรดอะมิโนด้วยเช่นกัน ดังนั้นจากการศึกษานี้จะเห็นได้ว่า สารละลายคอลลาเจนที่เติมวัตถุเจือปนอาหารต่าง ๆ เป็นตัวรบกวนที่เติมน้ำตาลซูโครสความเข้มข้นแตกต่างกัน พบว่าน้ำตาลซูโครสไม่มีผลต่อการทำนายปริมาณคอลลาเจน เมื่อสังเกตจากโครงสร้างน้ำตาล น้ำตาลมีส่วนวงแหวนต่อกับออกซิเจน ซึ่งต่างจากวงแหวนของกรดอะมิโนไฮดรอกซีโพรลีนที่เป็นตัวบ่งชี้ปริมาณคอลลาเจน นอกจากนี้ น้ำตาลไม่มีหมู่ N-H อยู่ในโครงสร้าง ทำให้สามารถตรวจวัดคอลลาเจนได้โดยไม่มีอิทธิพลของน้ำตาลเข้ามารบกวน แต่ในช่วงคลื่นดังกล่าวเป็นช่วงที่มีความสัมพันธ์กับการดูดกลืนของพันธะ C-H และ O-H เป็นหลัก จึงช่วยส่งเสริมประสิทธิภาพการทำนายของสมการให้สูงขึ้นได้ (Rungpichayapichet และคณะ, 2015) โดยช่วงความยาวคลื่น $5203-3999\text{ cm}^{-1}$ ที่รวมการดูดกลืนของน้ำตาล จะให้ผลการทำนายที่สูงกว่าช่วง $4701-3999\text{ cm}^{-1}$

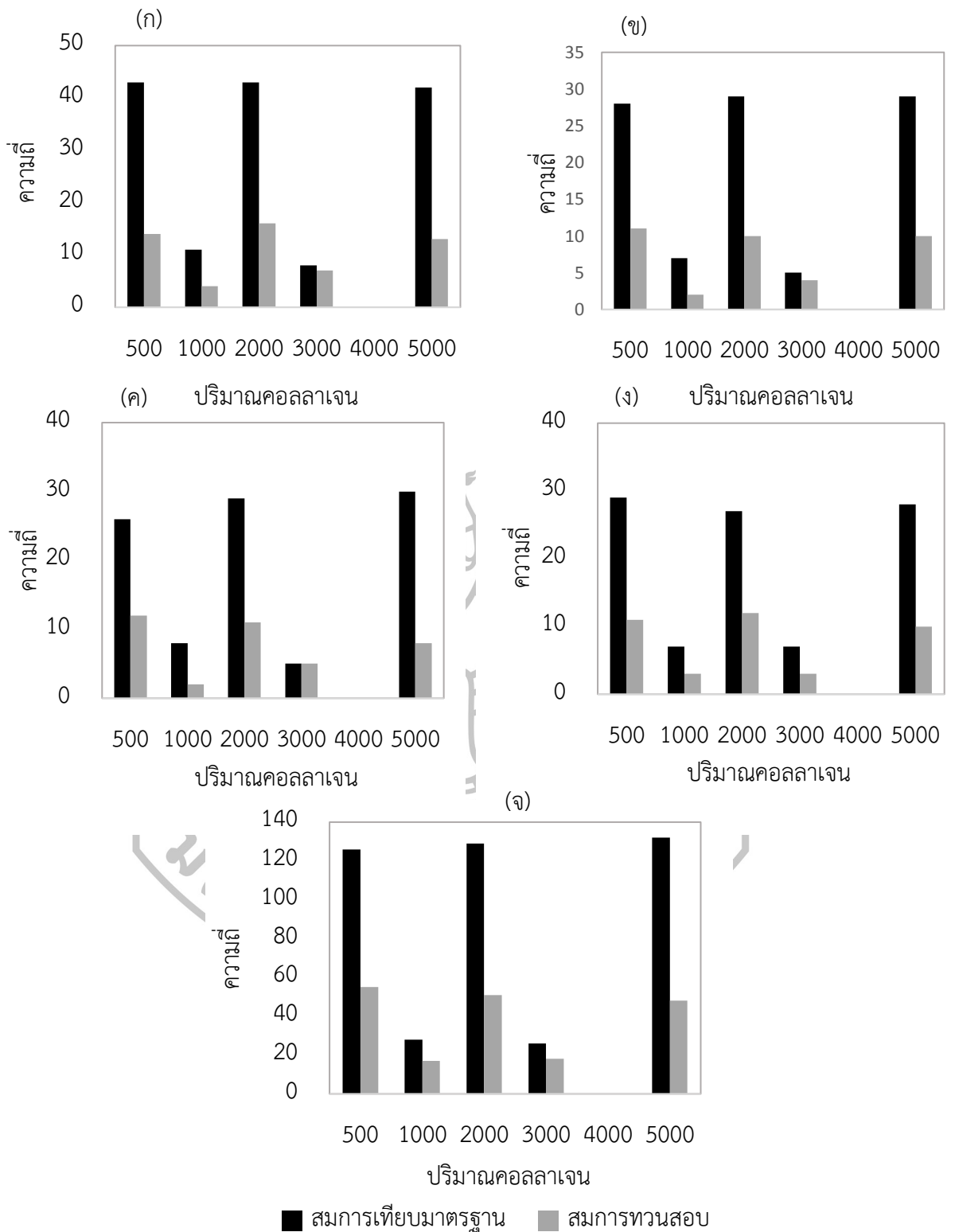
ตารางที่ 10 ค่าสถิติของแบบจำลองที่ศึกษาอิทธิพลของวัตถุดิบอาหารสำหรับสร้างสมการเทียบมาตรฐานและทวนสอบสมการด้วยเทคนิค NIRS

วัตถุดิบอาหาร	สมการเทียบมาตรฐาน (70%)				สมการทวนสอบ (30%)			
	จำนวน ตัวอย่าง	ค่าต่ำสุด-ค่าสูงสุด (มิลลิกรัมต่อลิตร)	ค่าเฉลี่ย	ส่วนเบี่ยงเบน มาตรฐาน	จำนวน ตัวอย่าง	ค่าต่ำสุด-ค่าสูงสุด (มิลลิกรัมต่อลิตร)	ค่าเฉลี่ย	ส่วนเบี่ยงเบน มาตรฐาน
น้ำตาลซูโครส	147	500-5,000	2,397.95	1,795.10	63	500-5,000	2,412.05	1,752.01
วิตามินซี	98	500-5,000	2,438.77	1,808.15	42	500-5,000	2,355.26	1,770.28
โซเดียมเบนโซเอท	98	500-5,000	2,489.79	1,810.59	42	500-5,000	2,153.84	1,698.11
ซิงค์กลูโคเนต	98	500-5,000	2,413.26	1,800.66	42	500-5,000	2,269.23	1,693.04
รวมทุกองค์ประกอบ	441	500-5,000	2,464.85	1,802.90	189	500-5,000	2,259.77	1,729.89



ภาพที่ 41 แสดงข้อมูลการกระจายตัวของปริมาณคอลลาเจนในสารละลายคอลลาเจน ที่เติม วัตถุเจือปนอาหารชนิดต่างๆ (ก) น้ำตาลซูโครส (ข) วิตามินซี (ค) โซเดียมเบนโซเอท (ง) ซิงค์กลูโคเนต และ (จ) รวมทุกตัว ในกลุ่มสมการเทียบมาตรฐานและทวนสอบสมการ ซึ่งจะเห็นได้ว่าข้อมูลมีการกระจายตัวไม่ค่อยสม่ำเสมอ ทำให้มีผลต่อการสร้างสมการเทียบมาตรฐาน โดยค่าทางเคมีที่ได้จากการวิเคราะห์ต้องมีการกระจายตัวอย่างสม่ำเสมอจึงจะทำให้สมการเทียบมาตรฐานให้ผลการทำนายที่แม่นยำ ดังนั้นข้อมูลจึงต้องมีจำนวนมากและมีกระจายครอบคลุมตัวอย่างในอนาคต รวมทั้งต้องมีความถี่ที่ใกล้เคียงกันจึงจะทำให้สมการเทียบมาตรฐานที่สร้างขึ้นมีความสัมพันธ์กันสูง





ภาพที่ 41 การกระจายตัวของปริมาณคอลลาเจนในสารละลายคอลลาเจนที่เติมวัตถุเจือปนอาหาร (ก) น้ำตาลซูโครส (ข) วิตามินซี (ค) โซเดียมเบนโซเอท (ง) ซิงค์กลูโคเนต และ (จ) รวมทุกตัว

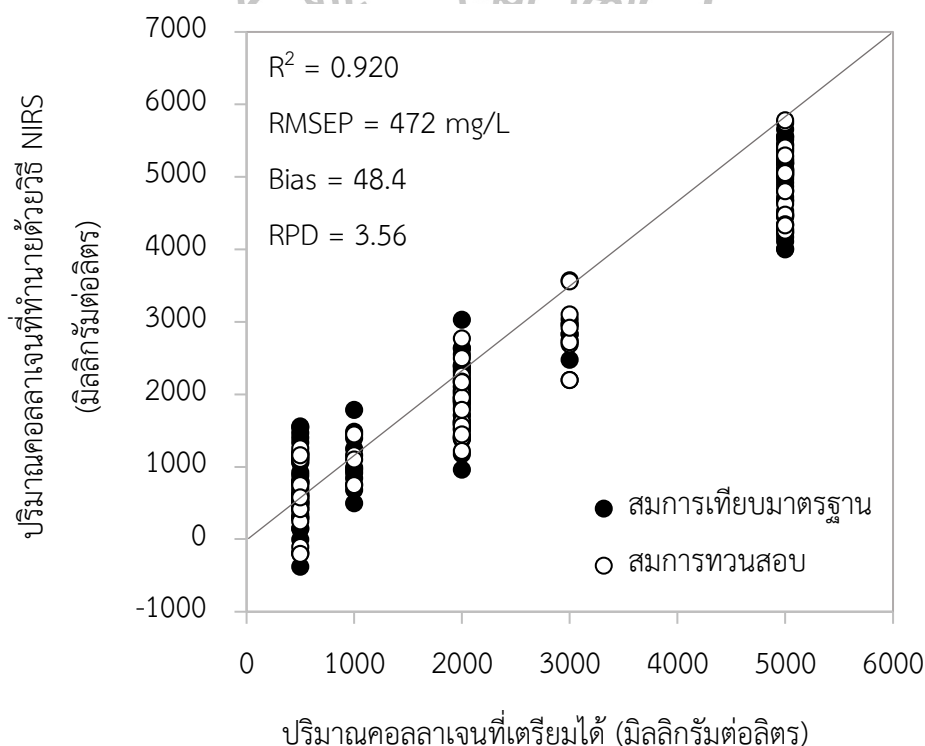
ตารางที่ 11 ค่าทางสถิติของแบบจำลองที่ศึกษาอิทธิพลของน้ำตาลซูโครสต่อการวัดคอลลาเจนด้วยเทคนิค NIRS

วัตถุเจือปนอาหาร	ช่วงเลขคลื่น (cm ⁻¹)	การปรับแต่ง สเปกตรัม	PLS factor	สมการเทียบมาตรฐาน (70%)		สมการทดสอบความแม่นยำ (30%)			RPD
				R ²	RMSEE (mg/L)	R ²	RMSEP (mg/L)	Bias	
น้ำตาลซูโครส	9403-5446*	SNV	7	0.937	459	0.940	425	25.3	4.1
	4601-4246	สเปกตรัมที่ไม่ผ่าน การปรับแต่ง	9	0.898	590	0.910	521	34.4	3.34
	4701-3999	SNV	8	0.911	549	0.927	467	64.5	3.74
		MSC	8	0.911	549	0.927	467	65	3.74
	5203-3999	สเปกตรัมที่ไม่ผ่าน การปรับแต่ง	10	0.924	510	0.918	480	85.1	3.56
		SNV	9	0.935	471	0.920	472	48.4	3.56
		MSC	9	0.934	474	0.917	480	57.7	3.51

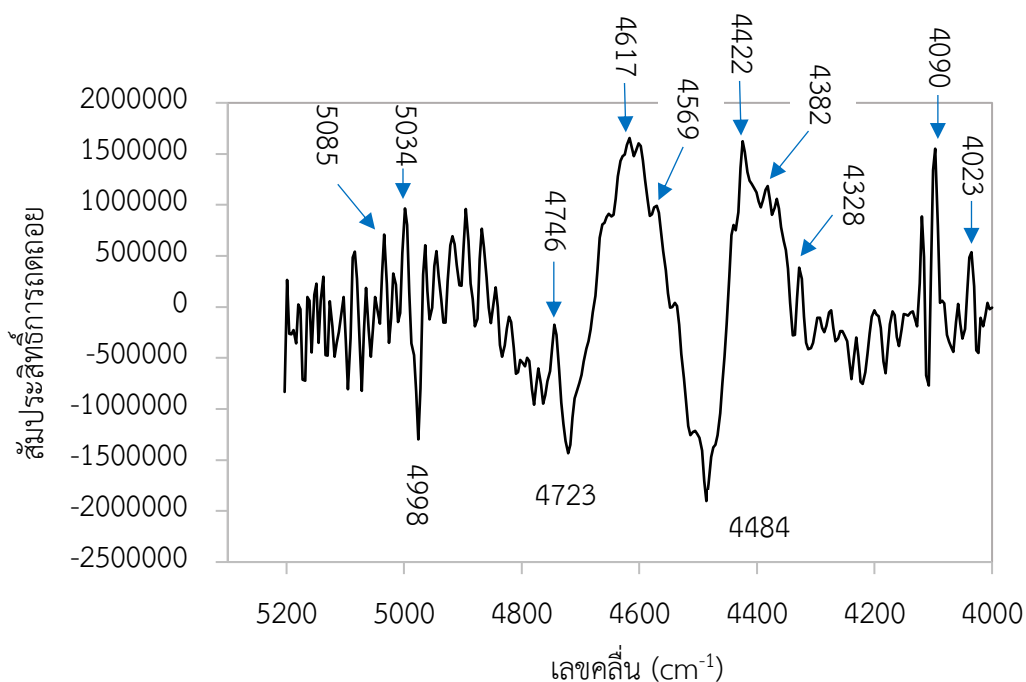
หมายเหตุ: R²: coefficients of determination, RMSEE: root mean square error of estimation, RMSEP: root mean square error of prediction, RPD: ratio of standard deviation of reference data in validation set to SEP, MSC: multiplicative scatter correction SNV: Standard Normal Variate และ * หมายถึง สมการที่ได้จากการ optimize

จากภาพที่ 42 แสดงการกระจายตัวของค่าปริมาณคอลลาเจนในสารละลายคอลลาเจนกับอิทธิพลของน้ำตาลซูโครส ที่ได้จากการสร้างสมการเทียบมาตรฐานและสมการทวนสอบด้วยเทคนิค NIRS และภาพที่ 43 แสดงค่าสัมประสิทธิ์การถดถอย (regression coefficient) ของสารละลายคอลลาเจนกับอิทธิพลของน้ำตาลซูโครส ที่ผ่านการปรับแต่งด้วยวิธี SNV ซึ่งจะสังเกตเห็นตัวแปรที่มีอิทธิพลและความสำคัญต่อแบบจำลองอยู่ที่เลขคลื่น 4023, 4036, 4093, 4328, 4422, 4484, 4382, 4569, 4599, 4617, 4723, 4746, 4779, 4833, 4867, 4869, 4998, 4976, 5034, 5085, 5171, 5074 และ 5094 cm^{-1} ซึ่งสอดคล้องกับการดูดกลืนของการสั่นพันธะ O-H C-H N-H และเอไมด์ที่มีความสัมพันธ์กับกรดอะมิโนและโปรตีนในโครงสร้างคอลลาเจน (Osborne และคณะ, 1993)

จากภาพที่ 43 สามารถคัดเลือกเลขคลื่นเฉพาะที่มีความสัมพันธ์กับการดูดกลืนแสงของโครงสร้างคอลลาเจนได้ และสามารถลดค่าใช้จ่ายเพื่อใช้ในการพัฒนาเครื่องมือต่อไปในอนาคต

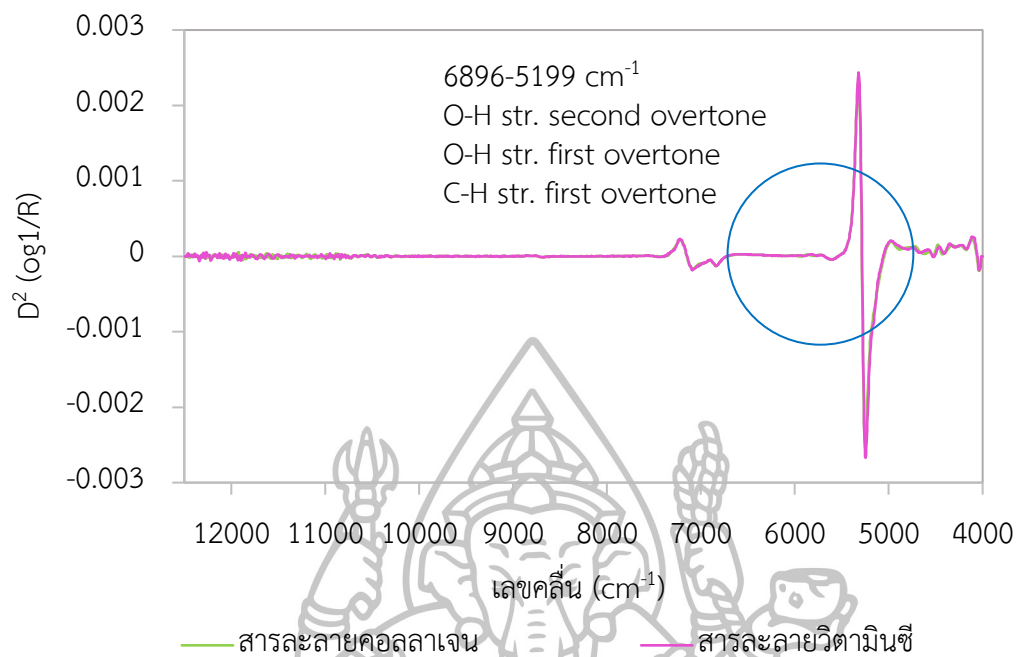


ภาพที่ 42 การกระจายตัวของค่าปริมาณคอลลาเจนในสารละลายคอลลาเจนกับอิทธิพลของน้ำตาลซูโครส ที่ได้จากการสร้างสมการเทียบมาตรฐานและสมการทวนสอบด้วยเทคนิค NIRS



ภาพที่ 43 สัมประสิทธิ์การถดถอยของสารละลายคอลลาเจนกับอิทธิพลของน้ำตาลซูโครส ที่ผ่านการปรับแต่งด้วยวิธี SNV

สำหรับการสร้างสมการเทียบมาตรฐานเพื่อศึกษาอิทธิพลของวิตามินซีในสารละลายคอลลาเจน แสดงตารางที่ 12 โดยในการศึกษานี้ ทำการเปรียบเทียบสเปกตรัมสารละลายคอลลาเจนกับสารละลายวิตามินซี ที่ปรับแต่งสเปกตรัมด้วยวิธีอนุพันธ์อันดับสอง แสดงดังภาพที่ 44 พบว่า ช่วง $6896-5199 \text{ cm}^{-1}$ ให้ลักษณะสเปกตรัมที่ต่างกัน ซึ่งช่วงเลขคลื่นดังกล่าวมีความสัมพันธ์กับการดูดกลืนของวิตามินซี สอดคล้องกับสเปกตรัมวิตามินซี ดังภาพที่ 28 และ 29 นอกจากนี้ยังสอดคล้องกับงานวิจัยของ Malegori และคณะ (2016) พบพีคการดูดกลืนที่เลขคลื่น $7200-6700 \text{ cm}^{-1}$ ซึ่งมีความสัมพันธ์กับวิตามินซี และงานวิจัยของ Liu และคณะ (2006) พบพีคที่มีความสัมพันธ์กับโครงสร้างของวิตามินซี ที่เลขคลื่น $6920, 6860, 6720 \text{ cm}^{-1}$ ในการสร้างสมการเทียบมาตรฐาน พบว่า สมการที่เหมาะสมที่สุดคือ สมการที่ผ่านการปรับแต่งสเปกตรัมด้วยวิธี SNV ที่ช่วงคลื่น $6896-5199$ และ $4701-3999 \text{ cm}^{-1}$ โดยให้ค่า R^2 ในกลุ่มสมการทำนายเท่ากับ 0.930 RMSEP เท่ากับ 464 Bias เท่ากับ 42.4 และมี RPD เท่ากับ 3.81 ตามลำดับ ซึ่งช่วงเลขคลื่น $6896-5199$ มีความสัมพันธ์กับพันธะ O-H ที่มีในโครงสร้างวิตามินซี



ภาพที่ 44 สเปกตรัมการดูดกลืนแสง NIRS ของสารละลายคอลลาเจนเทียบกับสารละลายวิตามินซี ที่ปรับแต่งสเปกตรัมด้วยวิธีอนุพันธ์อันดับสอง

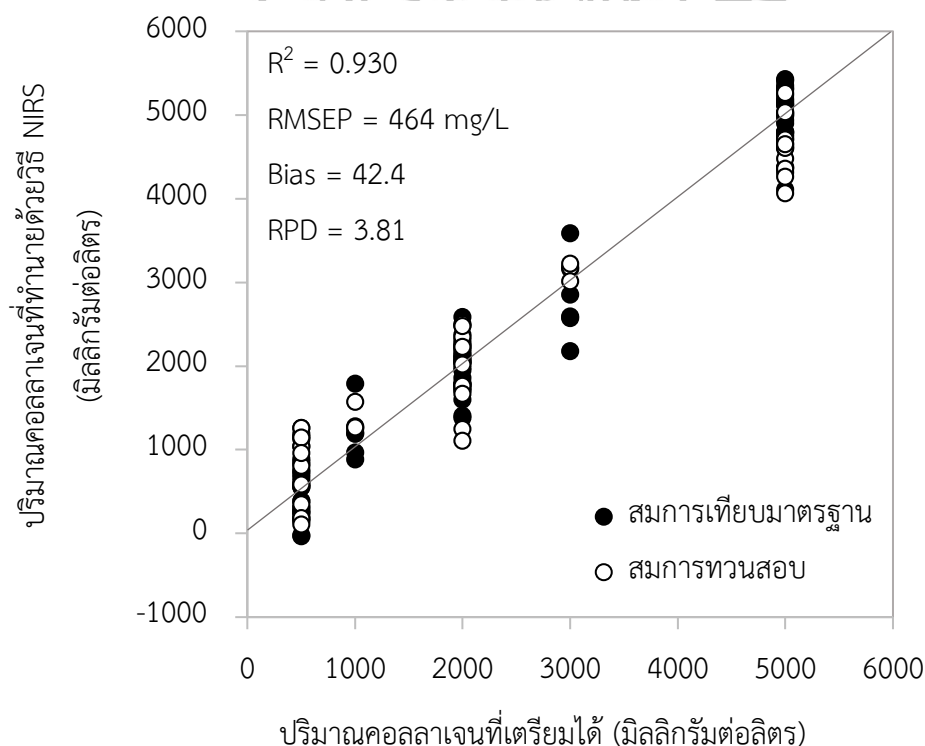


ตารางที่ 12 ค่าทางสถิติของแบบจำลองที่ศึกษาอิทธิพลของวิตามินซีต่อการวัดคอลลาเจนด้วยเทคนิค NIRS

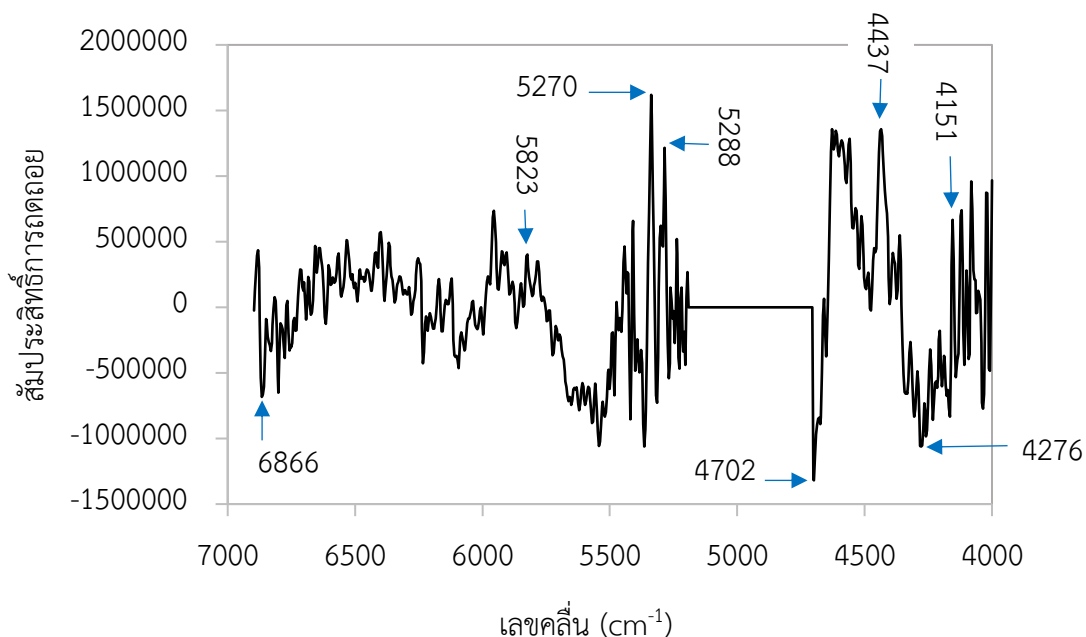
วัตถุเจือปน อาหาร	ช่วงเลขคลื่น (cm ⁻¹)	การปรับแต่งสเปกตรัม	PLS factor	สมการเทียบมาตรฐาน (70%)			สมการทดสอบความแม่นยำ (30%)			
				R ²	RMSEE (mg/L)	RPD	R ²	RMSEP (mg/L)	Bias	
วิตามินซี	6102-4246*	1 st derivative+MSC	9	0.947	436		0.952	382	42.5	4.59
	4701-3999	สเปกตรัมที่ไม่ผ่านการ ปรับแต่ง	8	0.871	676		0.901	539	52.6	3.20
		SNV	8	0.874	661		0.922	485	2.35	3.60
		MSC	6	0.874	661		0.922	485	3.27	3.60
		สเปกตรัมที่ไม่ผ่านการ ปรับแต่ง	9	0.932	494		0.909	529	-87.7	3.37
	6896-5199	ปรับแต่ง	9	0.963	363		0.930	464	42.4	3.81
	4701-3999	SNV	9	0.963	363		0.930	464	42.4	3.81
		MSC	9	0.962	369		0.925	485	88.6	3.73

หมายเหตุ: R²: coefficients of determination, RMSEE: root mean square error of estimation, RMSEP: root mean square error of prediction, RPD: ratio of standard deviation of reference data in validation set to SEP, MSC: multiplicative scatter correction SNV: Standard Normal Variate และ * หมายถึง สมการที่ได้จากการ optimize

จากภาพที่ 45 แสดงการกระจายตัวของค่าปริมาณคอลลาเจนในสารละลายคอลลาเจนกับอิทธิพลของวิตามินซีที่ได้จากการสร้างสมการเทียบมาตรฐานและสมการทวนสอบด้วยเทคนิค NIRS และภาพที่ 46 แสดงค่าสัมประสิทธิ์การถดถอย (regression coefficient) ของสารละลายคอลลาเจนกับอิทธิพลของวิตามินซีที่ผ่านการปรับแต่งด้วยวิธี SNV ซึ่งจะสังเกตเห็นตัวแปรที่มีอิทธิพลและความสำคัญต่อแบบจำลองอยู่ที่เลขคลื่น 4702, 4276, 4036, 5270, 5960, 6884, 6866, 5823, 5540, 5340, 5288, 4437, 4151, และ 4081 cm^{-1} ซึ่งสอดคล้องกับการดูดกลืนของการสั่นพันธะ N-H และเอไมด์ ของโครงสร้างกรดอะมิโนและโปรตีน และการสั่นของพันธะ C-H และ O-H ที่เป็นส่วนประกอบในโครงสร้างกรดอะมิโน ที่มีความสัมพันธ์กับกรดอะมิโนและโปรตีนในโครงสร้างคอลลาเจน (Osborne และคณะ, 1993)



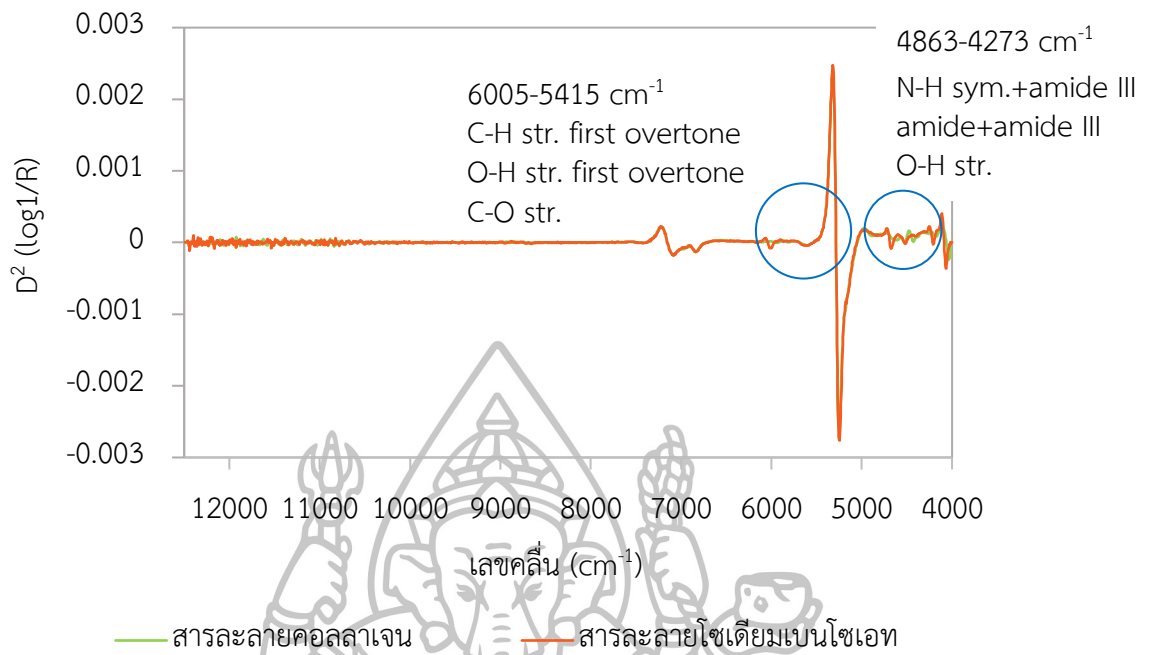
ภาพที่ 45 การกระจายตัวของค่าปริมาณคอลลาเจนในสารละลายคอลลาเจนกับอิทธิพลของวิตามินซีที่ได้จากการสร้างสมการเทียบมาตรฐานและสมการทวนสอบด้วยเทคนิค NIRS



ภาพที่ 46 สัมประสิทธิ์การถดถอยของสารละลายคอลลาเจนกับอิทธิพลของวิตามินซีที่ผ่านการปรับแต่งด้วยวิธี SNV

สำหรับการสร้างสมการเทียบมาตรฐานเพื่อศึกษาอิทธิพลของโซเดียมเบนโซเอทในสารละลายคอลลาเจน แสดงดังตารางที่ 13 โดยในการศึกษานี้ ทำการเปรียบเทียบสเปกตรัมสารละลายคอลลาเจนกับสารละลายโซเดียมเบนโซเอทที่ปรับแต่งสเปกตรัมด้วยวิธีอนุพันธ์อันดับสอง แสดงดังภาพที่ 47 พบว่าในช่วงเลขคลื่น 6005-5415 และ 4863-4273 cm⁻¹ มีสเปกตรัมที่ต่างกัน ซึ่งเลขคลื่นดังกล่าว มีความสัมพันธ์กับการดูดกลืนของพันธะ C-H และ O-H โดยเกลือเบนโซเอทมีโครงสร้างหลักเป็นวงแหวนอะโรมาติก โดยมีตำแหน่งการดูดกลืนที่เลขคลื่น 5934 cm⁻¹ (Osborne และคณะ, 1993)

การสร้างสมการเทียบมาตรฐานที่เหมาะสมที่สุดคือ สมการที่ผ่านการปรับแต่งสเปกตรัมด้วยวิธี SNV ที่ช่วงคลื่น 6005-5415 และ 4863-4273 cm⁻¹ โดยให้ค่า R² ในกลุ่มสมการทำนายเท่ากับ 0.927 RMSEP เท่ากับ 445 Bias เท่ากับ 41.1 และมี RPD เท่ากับ 3.73 ตามลำดับ



ภาพที่ 47 สเปกตรัมการดูดกลืนแสง NIRS ของสารละลายคอลลาเจนเทียบกับสารละลายไซเตียมเบนโซเอทที่ปรับแต่งสเปกตรัมด้วยวิธีอนุพันธ์อันดับสอง

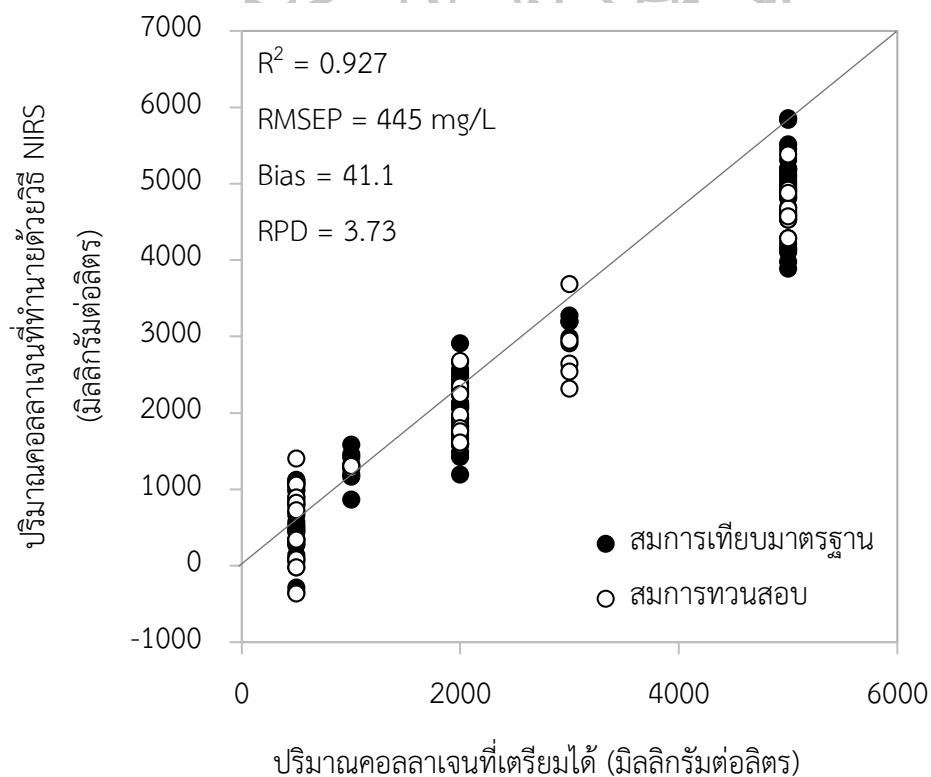


ตารางที่ 13 ค่าทางสถิติของแบบจำลองที่ศึกษาอิทธิพลของโซเดียมเบนโซเอตต่อการวัดคอลลาเจนด้วยเทคนิค NIRS

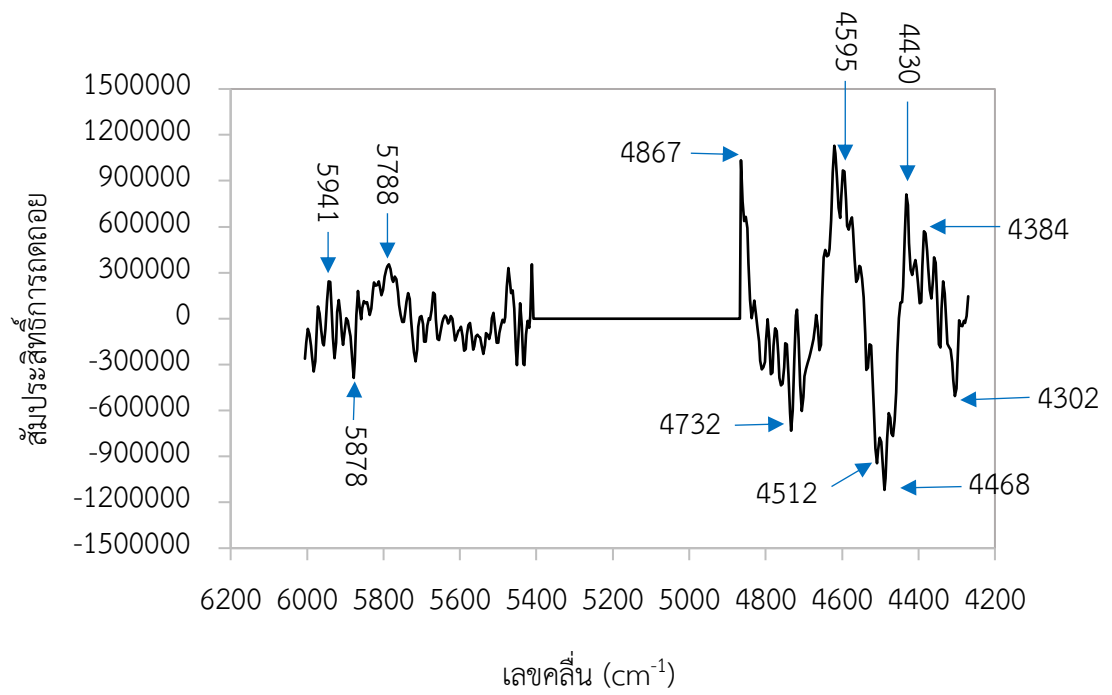
วัตถุเจือปน อาหาร	ช่วงเลขคลื่น (cm ⁻¹)	การปรับแต่ง สเปกตรัม	PLS factor	สมการเทียบมาตรฐาน (70%)		สมการทดสอบความแม่นยำ (30%)			RPD
				R ²	RMSEE (mg/L)	R ²	RMSEP (mg/L)	Bias	
โซเดียม เบนโซเอต	9403-5446*	SNV	7	0.980	265	0.947	383	-89.5	4.50
	4601-4246								
	4700-3999	สเปกตรัมที่ไม่ผ่าน การปรับแต่ง	7	0.882	645	0.852	664	-111	2.64
		SNV	5	0.864	685	0.846	679	-85.3	2.57
	6005-5415	MSC	5	0.864	685	0.848	658	-124	2.62
		สเปกตรัมที่ไม่ผ่าน การปรับแต่ง	7	0.939	461	0.936	417	22.2	3.96
		SNV	5	0.940	454	0.927	445	41.1	3.73
		MSC	5	0.954	398	0.921	464	-0.07	3.57

หมายเหตุ: R²: coefficients of determination, RMSEE: root mean square error of estimation, RMSEP: root mean square error of prediction, RPD: ratio of standard deviation of reference data in validation set to SEP, MSC: multiplicative scatter correction SNV: Standard Normal Variate และ * หมายถึง สมการที่ได้จากการ optimize

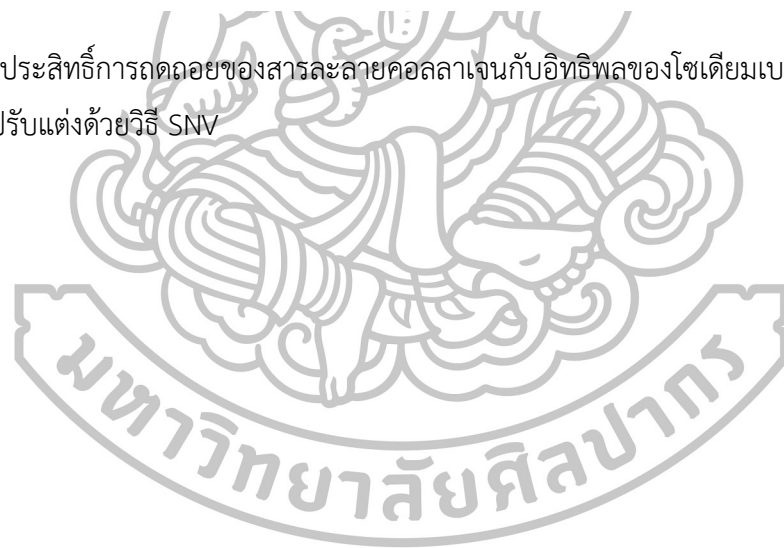
จากภาพที่ 48 แสดงการกระจายตัวของค่าปริมาณคอลลาเจนในสารละลายคอลลาเจนกับอิทธิพลของโซเดียมเบนโซเอทที่ได้จากการสร้างสมการเทียบมาตรฐานและสมการทวนสอบด้วยเทคนิค NIRS และภาพที่ 49 แสดงค่าสัมประสิทธิ์การถดถอย (regression coefficient) ของสารละลายคอลลาเจนกับอิทธิพลของโซเดียมเบนโซเอทที่ผ่านการปรับแต่งด้วยวิธี SNV ซึ่งจะสังเกตเห็นตัวแปรที่มีอิทธิพลและความสำคัญต่อแบบจำลองอยู่ที่เลขคลื่น 4302, 4337, 4357, 4384, 4430, 4468, 4512, 4595, 4619, 4867, 4732, 5473, 5878, 5981, 5941 และ 5788 cm^{-1} ซึ่งสอดคล้องกับการดูดกลืนของการสั่นพันธะ O-H C-H N-H และเอไมด์ ที่มีความสัมพันธ์กับกรดอะมิโนและโปรตีนในโครงสร้างคอลลาเจน (Osborne และคณะ, 1993) ด้วยการสั่นของพันธะสารในแต่ละเลขคลื่นเฉพาะ ทำให้สามารถเลือกเลขคลื่นที่เกี่ยวข้องกับสารต่างๆ ที่มีอยู่ในตัวอย่างและนำมาสร้างสมการเพื่อทำนายได้



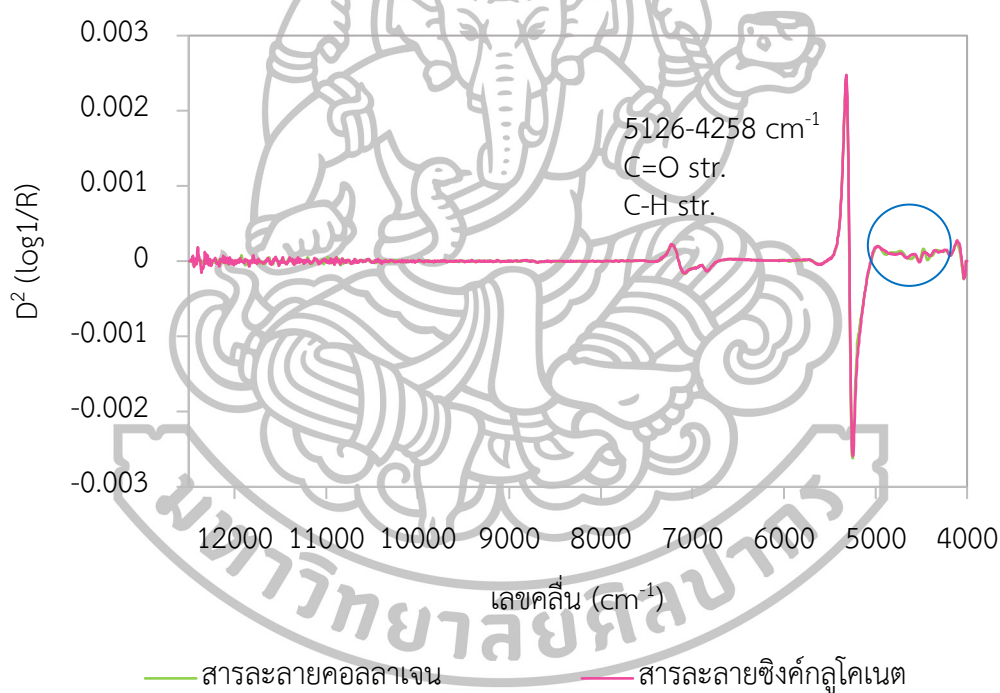
ภาพที่ 48 การกระจายตัวของค่าปริมาณคอลลาเจนในสารละลายคอลลาเจนกับอิทธิพลของโซเดียมเบนโซเอทที่ได้จากการสร้างสมการเทียบมาตรฐานและสมการทวนสอบด้วยเทคนิค NIRS



ภาพที่ 49 สัณฐานการดูดกลืนอินฟราเรดของสารละลายคอลลาเจนกับอิทธิพลของโซเดียมเบนโซเอทที่ผ่านการปรับแต่งด้วยวิธี SNV



สำหรับการสร้างสมการเทียบมาตรฐาน เพื่อศึกษาอิทธิพลของซิงค์กลูโคเนตในสารละลายคอลลาเจน แสดงดังตารางที่ 14 ทำการเปรียบเทียบสเปกตรัมสารละลายคอลลาเจนกับสารละลายซิงค์กลูโคเนตที่ปรับแต่งสเปกตรัมด้วยวิธีอนุพันธ์อันดับสอง แสดงดังภาพที่ 50 พบว่าในช่วงเลขคลื่น 5126-4258 cm^{-1} มีสเปกตรัมที่ต่างกัน ซึ่งช่วงเลขคลื่นดังกล่าว มีความสัมพันธ์กับการดูดกลืนของพันธะ C-H และ O-H โดยการดูดกลืนของซิงค์กลูโคเนตจะใกล้เคียงกับบริเวณของน้ำตาล เนื่องจากซิงค์สร้างพันธะกับโมเลกุลของน้ำตาลจึงทำให้วัดการดูดกลืนของซิงค์กลูโคเนตได้ และการสร้างสมการเทียบมาตรฐานที่เหมาะสมที่สุดคือ สมการที่ไม่ผ่านการปรับแต่งสเปกตรัมในช่วงคลื่น 5126-4258 cm^{-1} โดยให้ค่า R^2 ในกลุ่มสมการทำนายเท่ากับ 0.932 RMSEP เท่ากับ 448 Bias เท่ากับ 5.53 และมี RPD เท่ากับ 3.85 ตามลำดับ



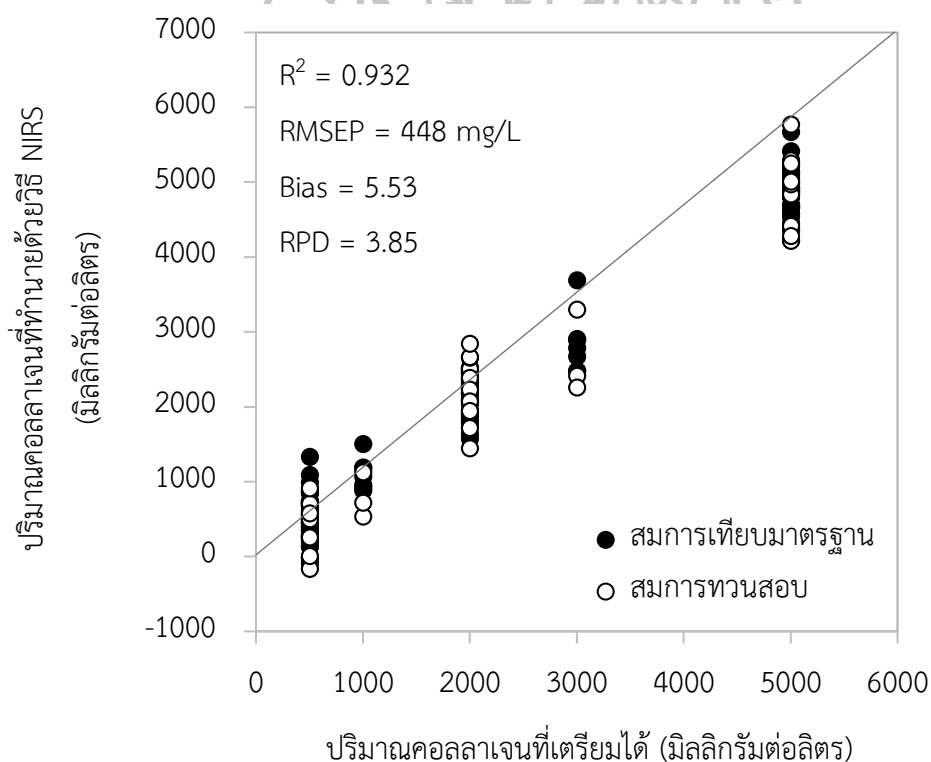
ภาพที่ 50 สเปกตรัมการดูดกลืนแสง NIRS ของสารละลายคอลลาเจนเทียบกับสารละลายซิงค์กลูโคเนตที่ปรับแต่งสเปกตรัมด้วยวิธีอนุพันธ์อันดับสอง

ตารางที่ 14 ค่าทางสถิติของแบบจำลองที่ศึกษาอิทธิพลของซิงค์กลูโคเนตต่อการวัดคอแลนเจนด้วยเทคนิค NIRS

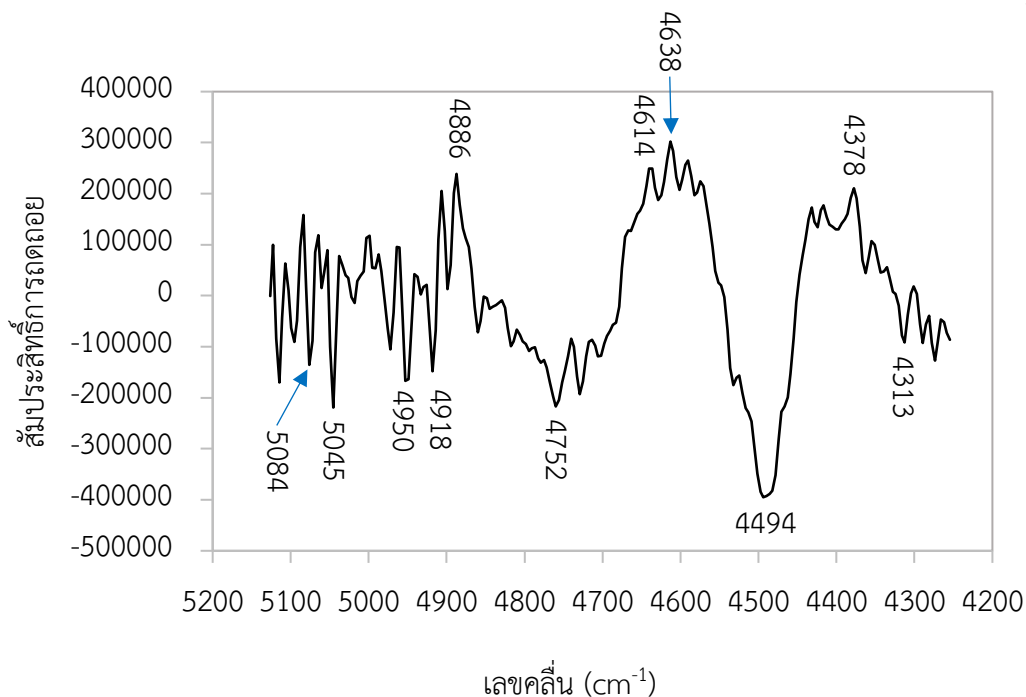
วัตถุเจือปนอาหาร	ช่วงเลขคลื่น (cm ⁻¹)	การปรับแต่ง สเปกตรัม	PLS		สมการเทียบมาตรฐาน (70%)		สมการทดสอบความแม่นยำ (30%)		RPD
			factor	R ²	RMSEE (mg/L)	R ²	RMSEP (mg/L)	Bias	
ซิงค์กลูโคเนต	9403-5446*	SNV	10	0.980	263	0.947	383	-14.3	4.36
	4601-4246								
	4700-4000	สเปกตรัมที่ไม่ผ่าน การปรับแต่ง	10	0.945	445	0.923	497	-13.7	3.61
		SNV	7	0.938	464	0.910	529	-22.4	3.35
	5126-4258	สเปกตรัมที่ไม่ผ่าน การปรับแต่ง	9	0.966	346	0.932	448	5.53	3.85
		SNV	7	0.960	372	0.928	441	-61.7	3.77
MSC		7	0.960	374	0.928	442	-59.6	3.76	

หมายเหตุ: R²: coefficients of determination, RMSEE: root mean square error of estimation, RMSEP: root mean square error of prediction, RPD: ratio of standard deviation of reference data in validation set to SEP, MSC: multiplicative scatter correction SNV: Standard Normal Variate และ * หมายถึง สมการที่ได้จากการ optimize

จากภาพที่ 51 แสดงการกระจายตัวของค่าปริมาณคอลลาเจนในสารละลายคอลลาเจนกับอิทธิพลของซิงค์กลูโคเนต ที่ได้จากการสร้างสมการเทียบมาตรฐานและสมการทวนสอบด้วยเทคนิค NIRS และภาพที่ 52 แสดงค่าสัมประสิทธิ์การถดถอย (regression coefficient) ของสารละลายคอลลาเจนกับอิทธิพลของซิงค์กลูโคเนตที่ไม่ผ่านการปรับแต่งสเปกตรัม ซึ่งจะสังเกตเห็นตัวแปรที่มีอิทธิพลและความสำคัญต่อแบบจำลองอยู่ที่เลขคลื่น 5123, 5116, 5084, 5045, 4973, 4952, 4963, 4918, 4906, 4886, 4760, 4638, 4614, 4590, 4572, 4494, 4431, 4378 และ 4313 cm^{-1} ซึ่งสอดคล้องกับการดูดกลืนของการสั่นพันธะ N-H ของโครงสร้างโปรตีนและ CONH₂ กับเอไมด์ของโครงสร้าง CONH CONH₂ และโปรตีน พันธะ C-H ของโครงสร้าง CH₃ และ CH₂ ซึ่งมีความสัมพันธ์กับโครงสร้างคอลลาเจน (Osborne และคณะ, 1993)



ภาพที่ 51 การกระจายตัวของค่าปริมาณคอลลาเจนในสารละลายคอลลาเจนกับอิทธิพลของซิงค์กลูโคเนตที่ได้จากการสร้างสมการเทียบมาตรฐานและสมการทวนสอบด้วยเทคนิค NIRS



ภาพที่ 52 สัมประสิทธิ์การดูดกลืนของสารละลายคอลลาเจนกับอิทธิพลของซิงค์กลูโคเนตที่ไม่ผ่านการปรับแต่งสเปกตรัม

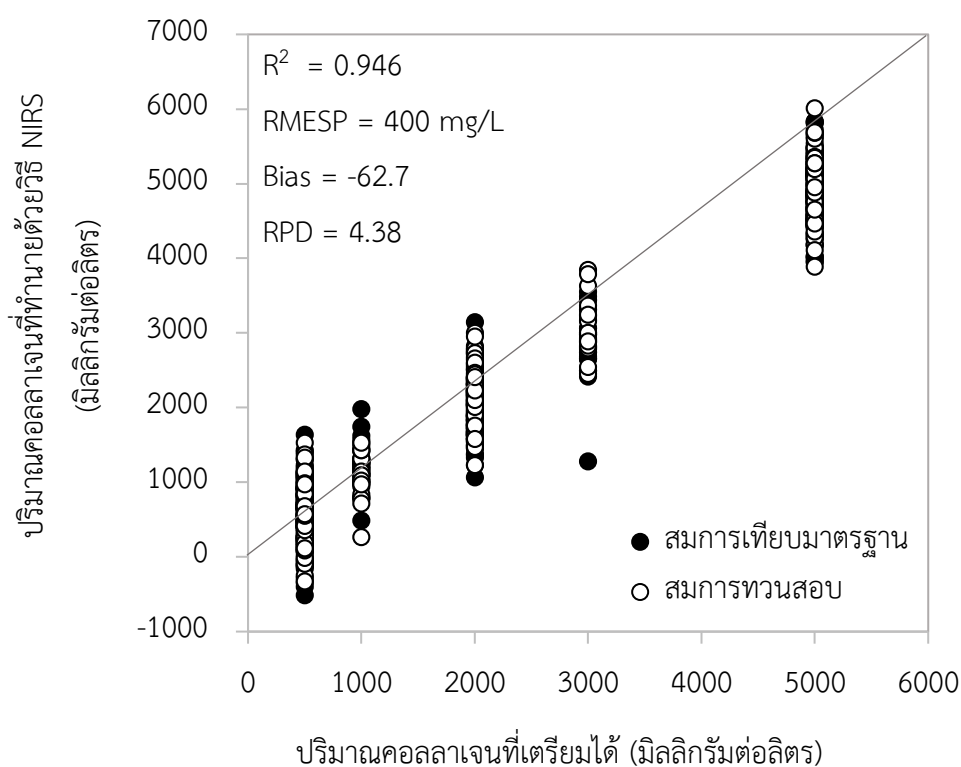
สำหรับการสร้างสมการเทียบมาตรฐานเพื่อศึกษาอิทธิพลของรวม น้ำตาลซูโครส วิตามินซี โซเดียมเบนโซเอท ซิงค์กลูโคเนตในสารละลายคอลลาเจน แสดงดังตารางที่ 15 พบว่าสมการเทียบมาตรฐานที่เหมาะสมที่สุดคือ สมการที่ผ่านการปรับแต่งสเปกตรัมด้วยวิธี MSC ที่ช่วงคลื่น 7000-4000 cm⁻¹ ซึ่งเป็นช่วงคลื่นยาว มีค่าการดูดกลืนของพันธะทางเคมีสูง โดยให้ค่า R² ในกลุ่มสมการทำนายเท่ากับ 0.946 RMSEP เท่ากับ 400 Bias เท่ากับ -62.7 และมี RPD เท่ากับ 4.38 ตามลำดับ

ตารางที่ 15 ค่าทางสถิติของแบบจำลองที่ศึกษาอิทธิพลของน้ำตาลซูโครส วิตามินซี โซเดียมเบนโซเอท และซิงค์กลูโคเนตต่อการวัดคอลลาเจนด้วยเทคนิค NIRS

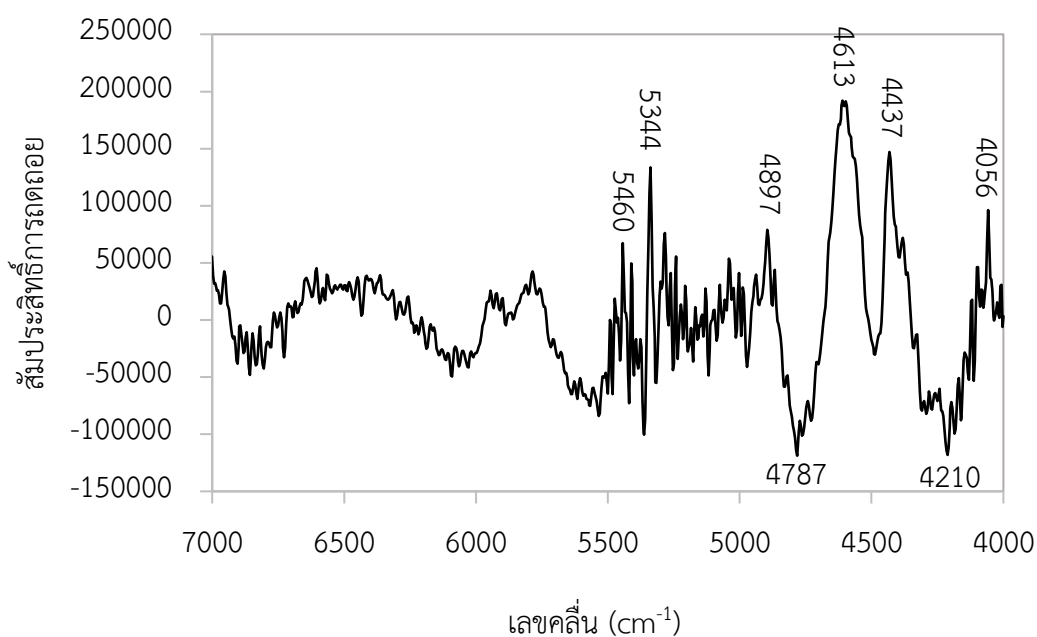
วัตถุเจือปนอาหาร	ช่วงเลขคลื่น (cm ⁻¹)	การปรับแต่ง สเปกตรัม	PLS factor	สมการเทียบมาตรฐาน (70%)		สมการทดสอบความแม่นยำ (30%)			
				R ²	RMSEE (mg/L)	R ²	RMSEP (mg/L)	Bias	RPD
	9403-5446*	SNV	10	0.980	263	0.947	383	-14.3	4.36
	4601-4246								
รวม น้ำตาล วิตามินซี โซเดียม เบนโซเอท	12493-3999	สเปกตรัมที่ไม่ผ่าน การปรับแต่ง	10	0.825	762	0.797	761	-56.1	2.23
		SNV	10	0.929	484	0.872	612	-18.8	2.81
ซิงค์กลูโคเนต	7000-4000	สเปกตรัมที่ไม่ผ่าน การปรับแต่ง	10	0.912	545	0.918	496	-82.0	3.54
		SNV	10	0.950	405	0.945	402	-66	4.34
		MSC	10	0.951	405	0.946	400	-62.7	4.38

หมายเหตุ: R²: coefficients of determination, RMSEE: root mean square error of estimation, RMSEP: root mean square error of prediction, RPD: ratio of standard deviation of reference data in validation set to SEP, MSC: multiplicative scatter correction SNV: Standard Normal Variate และ * หมายถึง สมการที่ได้จากการ optimize

จากภาพที่ 53 แสดงการกระจายตัวของค่าปริมาณคอลลาเจนในสารละลายคอลลาเจนกับอิทธิพลของน้ำตาลซูโครส วิตามินซี โซเดียมเบนโซเอท และซิงค์กลูโคเนต ที่ได้จากการสร้างสมการเทียบมาตรฐานและสมการทวนสอบด้วยเทคนิค NIRS และภาพที่ 54 แสดงค่าสัมประสิทธิ์การถดถอย (regression coefficient) ของสารละลายคอลลาเจนกับอิทธิพลของน้ำตาล วิตามินซี โซเดียมเบนโซเอท และซิงค์กลูโคเนต ที่ผ่านการปรับแต่งสเปกตรัมด้วยวิธี MSC ซึ่งจะสังเกตเห็นตัวแปรที่มีอิทธิพลและความสำคัญต่อแบบจำลองอยู่ที่เลขคลื่น 4056, 4113, 4210, 4434, 4613, 4787, 4897, 5281 และ 5460 cm^{-1} ซึ่งสอดคล้องกับการดูดกลืนของการสั่นพันธะ O-H C-H เอไมด์ และ N-H ของโครงสร้าง CONHR CONH₂ ROH ของกรดอะมิโนและโปรตีน (Osborne และคณะ, 1993)



ภาพที่ 53 การกระจายตัวของค่าปริมาณคอลลาเจนในสารละลายคอลลาเจนกับอิทธิพลของน้ำตาลซูโครส วิตามินซี โซเดียมเบนโซเอท และซิงค์กลูโคเนต ที่ได้จากการสร้างสมการเทียบมาตรฐานและสมการทวนสอบด้วยเทคนิค NIRS



ภาพที่ 54 สัมประสิทธิ์การดูดซับอินฟราเรดของสารละลายคอลลาเจนกับอิทธิพลของน้ำตาลซูโครส วิตามินซี โซเดียมเบนโซเอท และซิงค์กลูโคเนต ที่ผ่านการปรับแต่งด้วยวิธี MSC

นอกจากนี้เมื่อนำตัวอย่างผลิตภัณฑ์น้ำผลไม้เสริมคอลลาเจนที่มีวางจำหน่ายในท้องตลาดมา ทำนายด้วยสมการสารละลายคอลลาเจนที่ทำการเติมวัตถุเจือปนอาหาร เพื่อให้มีความคล้ายกับ เครื่องดื่มที่มีจำหน่ายในท้องตลาด พบว่า ไม่สามารถทำนายได้เช่นกัน เนื่องจากเครื่องดื่มที่วาง จำหน่าย นอกจากมีการเติมวัตถุเจือปนอาหารแล้ว ยังมีการเติมสี กลิ่น และสารให้ความชุ่ม ส่งผลให้มี องค์ประกอบภายในตัวอย่างที่ต่างกัน และเมื่อพิจารณาจากขีดจำกัดของค่าระยะห่างมาหาลาโนบิส เฉลี่ย (Average Mahalanobis Distance) คือ ความแตกต่างระหว่างสเปกตรัมของตัวอย่างกับ ค่าเฉลี่ยของทุกสเปกตรัมในกลุ่มสมการเทียบมาตรฐาน โดยการคำนวณจะพิจารณาบนพื้นฐานการ กระจายของสเปกตรัมในกลุ่มสมการเทียบมาตรฐานทั้งหมด ซึ่งจะต้องคำนวณค่าเฉลี่ยและค่า เบี่ยงเบนมาตรฐาน ถ้าพบว่าเกินขีดจำกัดก็จะเป็น Outlier และจากการศึกษานี้พบว่าตัวอย่าง ผลิตภัณฑ์น้ำผลไม้เสริมคอลลาเจนที่นำมาทำนายมีค่าระยะห่างมาหาลาโนบิสเฉลี่ยเกินขีดจำกัด จะเห็นได้ จากค่าร้อยละความคลาดเคลื่อนเฉลี่ย ที่มีค่าสูงร้อยละ 122.97 ซึ่งมีค่าร้อยละความคลาดเคลื่อนเฉลี่ย ที่น้อยกว่าการศึกษาที่ 1 แสดงว่า ตัวอย่างมีองค์ประกอบภายในที่ใกล้เคียงกันมากขึ้น แสดงดังตาราง ที่ 16

ตารางที่ 16 การเปรียบเทียบค่าจริงและค่าทำนายของปริมาณคอลลาเจนในน้ำผลไม้เสริมคอลลาเจน
ที่จำหน่ายในท้องตลาด ด้วยสมการสารถละลายคอลลาเจนที่ทำการเติมวัตถุเจือปนอาหารที่
เหมาะสมที่สุด

รหัสตัวอย่าง	ค่าจาก HPLC (mg/L)	ค่าทำนาย (mg/L)	ค่าความคลาดเคลื่อน (%)
E 2500	7,358.83	9,050.80	22.99
E 2500	7,631.08	8,424.10	10.39
E 2500	6,832.46	8,426.30	23.33
E 3000	8,589.62	14,649.00	53.11
E 3000	9,567.76	14,635.00	38.85
E 3000	10,540.23	15,235.00	41.12
E 3000	10,795.67	15,210.00	79.38
D 2000	8,479.10	12,711.00	69.73
D 2000	7,488.83	12,765.00	46.69
D 2000	8,701.97	12,609.00	136.82
D 2000	5,324.39	17,230.00	209.93
A 2000	5,559.34	16,482.00	429.49
A 2000	3,112.83	16,920.00	279.29
A 2000	4,460.97	17,246.00	258.99
A 2000	4,804.04	16,767.00	335.76
A 2000	3,847.76	16,617.00	83.16
I 5000	98,666.92	149,820.00	74.03
I 5000	86,087.14	151,210.00	90.09
H 5000	79,547.64	84,648.00	47.15
H 5000	57,526.49	86,811.00	129.19
ค่าเฉลี่ย	21,746.15	34,873.31	122.97

4.3 การศึกษาความเป็นไปได้ของการใช้เทคนิคสเปกโทรสโกปีอินฟราเรดย่านใกล้ในการติดตามปริมาณคอลลาเจนในตัวอย่างผลิตภัณฑ์น้ำผลไม้เสริมคอลลาเจนที่มีวางจำหน่ายในท้องตลาด

4.3.1 สุ่มเก็บตัวอย่างผลิตภัณฑ์น้ำผลไม้เสริมคอลลาเจนที่มีจำหน่ายในประเทศ





ก่อนทำการศึกษาการใช้เทคนิคสเปกโทรสโกปีอินฟราเรดย่านใกล้ ในการตรวจสอบคอลลาเจน จะทำการสังเกตลักษณะปรากฏและภาพถ่ายแสดงดังตารางที่ 17 ซึ่งตัวอย่างแต่ละยี่ห้อที่สุ่มมาเป็นเครื่องดื่มชนิดพร้อมดื่มและเครื่องดื่มชนิดสกัดเข้มข้นที่มีจำหน่ายในประเทศไทย เมื่อวิเคราะห์ค่าสีด้วยวิธีการทางสถิติพบว่า สามารถแบ่งสีของผลิตภัณฑ์ได้เป็น 9 ระดับ ได้แก่ สีขาวใส สีขาวใสและมีของแข็งแขวนลอย สีขาวใสอมเหลือง สีขาวใสอมชมพู สีชมพูเข้ม สีเหลืองใส สีเหลืองอมส้ม สีเหลืองอมน้ำตาล และสีม่วงเข้ม เป็นต้น โดยส่วนมากผลิตภัณฑ์ชนิดพร้อมดื่มจะมีสีขาวใส หรือสีขาวเหลือง เนื่องจากใช้น้ำองุ่นขาวหรือน้ำแอปเปิ้ลในการผลิต และเครื่องดื่มเข้มข้นจะมีสีที่เข้มกว่า เนื่องจากเป็นน้ำผลไม้สกัดเข้มข้น เช่น น้ำองุ่นแดง หรือบางชนิดอาจมีการเติมสีผสมอาหาร เป็นต้น



ตารางที่ 17 ลักษณะปรากฏของผลิตภัณฑ์น้ำผลไม้เสริมคอลลาเจนที่ใช้ในการศึกษา

รหัสตัวอย่าง	ลักษณะปรากฏ	ภาพถ่ายตัวอย่าง
A2000	สีขาวใสอมเหลือง	
B1700	สีขาวใสและมีของแข็งแขวนลอย	
C2000	สีขาวใสและมีของแข็งแขวนลอย	
D2000	สีขาวใสและมีของแข็งแขวนลอย	
E2500	สีขาวใสอมชมพู	
E3000	สีขาวใสอมชมพู	
E4000	สีเหลืองใส	

ตารางที่ 17 ลักษณะปรากฏและภาพถ่ายของผลิตภัณฑ์น้ำผลไม้เสริมคอลลาเจนที่ใช้ในการศึกษา
(ต่อ)

รหัสตัวอย่าง	ลักษณะปรากฏ	ภาพถ่ายตัวอย่าง
F1000	สีชมพูเข้ม	
G8000	สีเหลืองอมส้มและมีของแข็งแขวนลอย	
H5000	สีม่วงเข้มและมีของแข็งแขวนลอย	
I5000	สีเหลืองอมน้ำตาลและมีของแข็งแขวนลอย	

4.3.2 วิเคราะห์คุณลักษณะทางเคมีเบื้องต้นของเครื่องดื่มน้ำผลไม้ที่มีการเสริมคอลลาเจนที่วางจำหน่ายในประเทศ

เมื่อนำผลิตภัณฑ์น้ำผลไม้ที่มีการเสริมคอลลาเจนมาวัดค่าคุณภาพ พบว่าผลิตภัณฑ์น้ำผลไม้ที่มีการเสริมคอลลาเจนมีค่าปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำทั้งหมด อยู่ในช่วง 4.84-25.1 องศาบริกซ์ ($^{\circ}\text{Brix}$) มีค่าความเป็นกรด-ด่าง อยู่ในช่วง 3.22-4.65 ซึ่งประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 144 (พ.ศ. 2535) เรื่อง อาหารในภาชนะบรรจุที่ปิดสนิท จัดอาหารในภาชนะบรรจุที่ปิดสนิทเป็นอาหารควบคุมเฉพาะ กำหนดให้มีค่าความเป็นกรด-ด่าง ตั้งแต่ 4.6 ลงมา เพื่อควบคุมการเจริญของยีสต์และเชื้อรา และจากการวิเคราะห์ค่าความหนืดในผลิตภัณฑ์น้ำผลไม้เสริมคอลลาเจนพบว่า ตัวอย่าง E4000, H5000 และ I5000 มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($P \leq 0.05$) โดยตัวอย่าง H5000 ให้ค่าความหนืดที่มากที่สุด เท่ากับ 8.24 เซนติพอยส์ (Centipoise) เนื่องจากเป็นเครื่องดื่มชนิดสกัด

เข้มข้น และมีของแข็งแขวนลอยอยู่ในตัวอย่าง และตัวอย่าง A2000, B2000, C2000, E2500 และ E3000 ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($P>0.05$) เนื่องจากเป็นเครื่องตีเมล็ดพร้อมตีที่มีความชื้นหนืดน้อย นอกจากนี้ค่าความหนืดที่เพิ่มขึ้นมีความสอดคล้องกับปริมาณคอลลาเจนที่เติมลงในเครื่องตี แสดงรายละเอียดดังตารางที่ 18

ตารางที่ 18 คุณลักษณะทางเคมีเบื้องต้นของผลิตภัณฑ์น้ำผลไม้ที่มีการเสริมคอลลาเจนที่ใช้ในการศึกษา

รหัสตัวอย่าง	จำนวนตัวอย่าง	คุณลักษณะทางเคมีเบื้องต้น		
		ปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำทั้งหมด (องศาบริกซ์)	ความเป็นกรด-ด่าง	ความหนืด (เซนติพอยส์, cps)
A2000	3	12.10±0.16	3.22±0.01	2.32±0.02 ^e
B1700	3	9.69±0.07	4.22±0.01	2.28±0.02 ^e
C2000	3	7.77±0.13	3.80±0.02	2.25±0.00 ^e
D2000	3	4.84±0.05	4.22±0.03	2.39±0.01 ^{de}
E2500	3	5.73±0.06	4.02±0.01	2.29±0.01 ^e
E3000	3	7.46±0.13	4.04±0.05	2.35±0.01 ^e
E4000	3	17.90±0.05	4.32±0.00	2.70±0.06 ^c
F1000	3	11.30±0.08	3.48±0.00	2.46±0.02 ^{cde}
G8000	3	10.80±0.37	4.14±0.01	2.66±0.04 ^{cd}
H5000	3	24.90±0.13	4.08±0.01	8.24±0.51 ^a
I5000	3	25.10±0.20	4.65±0.15	3.84±0.13 ^b

*โดยตัวอักษร a, b, c, d และ e หมายถึง ตัวอักษรที่แตกต่างกันแสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p\leq 0.05$) เปรียบเทียบในคอลัมน์เดียวกัน

จากการวิเคราะห์ค่าความสว่าง (L^*) ในผลิตภัณฑ์น้ำผลไม้ที่มีการเสริมคอลลาเจน พบว่าตัวอย่าง E2500, E3000, E4000, F1000, G8000, H5000 และ I5000 มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($P\leq 0.05$) ส่วนตัวอย่าง A2000, C2000 และ D2000 ให้ค่าความสว่างสูงที่สุดและไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) เนื่องจากทั้งสามตัวอย่างเป็นเครื่องตีที่ผลิตจากน้ำองุ่นขาว แสดงดังตารางที่ 19 ซึ่งค่าสีที่ปรากฏในแต่ละผลิตภัณฑ์เป็นไปตามชนิดของน้ำผลไม้แต่ละ

ยี่ห่อใช้ในการผลิต เช่น น้ำอุ่นขาว น้ำสตรอว์เบอร์รี่ และน้ำสับปะรด เป็นต้น เช่นเดียวกับการวิเคราะห์ค่าสีแดง (a^*) ค่าสีเหลือง (b^*) ความอิมตัวของสี (C^*) และค่ามุมของสี (h°)

ตารางที่ 19 คุณลักษณะทางเคมีเบื้องต้นของผลิตภัณฑ์น้ำผลไม้ที่มีการเสริมคอลลาเจนที่ใช้ในการศึกษา

รหัสตัวอย่าง	จำนวนตัวอย่าง	คุณลักษณะทางเคมีเบื้องต้น				
		L^*	a^*	b^*	C^*	h°
A2000	15	59.1±0.20 ^a	1.4±0.10 ^h	3.6±0.50 ^h	3.9±0.40 ^{gh}	69.4±3.40 ^d
B1700	15	58.3±0.20 ^{bc}	2.0±0.10 ^f	4.1±0.30 ^h	4.6±0.20 ^g	63.6±1.80 ^e
C2000	15	59.1±0.10 ^a	1.9±0.00 ^{fg}	1.9±0.20 ⁱ	2.7±0.10 ^h	45.0±3.30 ^g
D2000	15	58.8±0.30 ^{ab}	0.9±0.20 ⁱ	8.1±0.60 ^g	8.1±0.60 ^f	83.6±1.40 ^b
E2500	15	57.7±0.40 ^c	0.9±0.10 ⁱ	12.5±2.10 ^e	12.5±2.10 ^e	85.7±0.80 ^a
E3000	15	54.3±2.00 ^d	1.6±1.00 ^{gh}	20.9±3.50 ^d	20.9±3.60 ^c	86.0±1.70 ^a
E4000	15	44.4±0.40 ^e	7.0±0.40 ^e	43.7±0.40 ^a	44.3±0.40 ^a	80.9±0.50 ^c
F1000	4	37.6±0.30 ^f	33.2±0.60 ^a	27.1±0.40 ^c	42.8±0.30 ^b	39.2±0.80 ^h
G8000	5	25.9±1.70 ^g	22.5±0.30 ^b	38.0±2.00 ^b	44.2±1.70 ^a	59.3±1.50 ^f
H5000	5	8.3±0.40 ⁱ	18.7±0.60 ^c	7.5±0.30 ^g	20.1±0.50 ^c	21.8±1.30 ⁱ
I5000	5	16.1±0.80 ^h	13.7±0.90 ^d	10.8±1.10 ^f	17.5±1.30 ^d	38.2±2.00 ^h

*โดยตัวอักษร a, b, c, d, e, f, g, h และ i หมายถึง ตัวอักษรที่แตกต่างกันแสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) เปรียบเทียบในคอลัมน์เดียวกัน

โดย L^* แสดงค่าความมืด-สว่าง มีค่าอยู่ระหว่าง 0 - 100

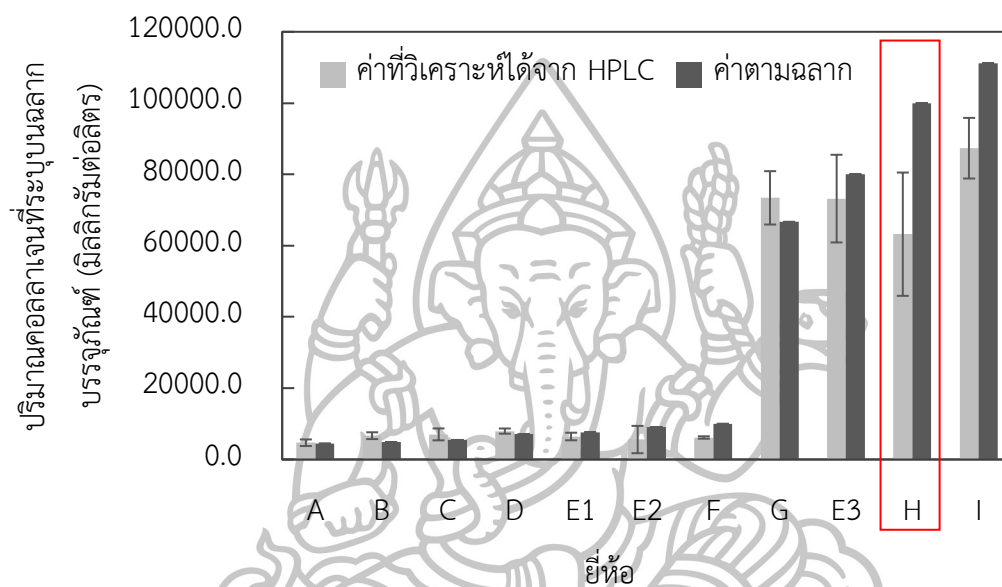
a^* แสดงค่าสีแดง เมื่อ a^* เป็น +

a^* แสดงค่าสีเขียว เมื่อ a^* เป็น -

b^* แสดงค่าสีเหลือง เมื่อ b^* เป็น +

b^* แสดงค่าสีน้ำเงิน เมื่อ b^* เป็น -

จากการศึกษาการวิเคราะห์ปริมาณคอลลาเจนในเครื่องต้มเพื่อสุขภาพ จำนวน 114 ตัวอย่าง โดยอาศัยการเกิดปฏิกิริยากับ NBD-Cl ภายใต้สภาวะที่เป็นเบส เพื่อให้ได้สารอนุพันธ์ที่สามารถเกิดการเรืองแสงได้ จากนั้นแยกสารที่สนใจโดยใช้เทคนิค HPLC และตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ตามมาตรฐาน AOAC (1993) แสดงผลดังภาพที่ 55



ภาพที่ 55 ปริมาณคอลลาเจนที่วิเคราะห์ได้จากวิธี HPLC เทียบกับปริมาณคอลลาเจนที่ระบุบนฉลากบรรจุภัณฑ์

จากภาพที่ 55 พบว่า ยี่ห้อ H มีค่าปริมาณคอลลาเจนแตกต่างกันมาก ระหว่างค่าที่วิเคราะห์ได้จากวิธี HPLC เทียบกับปริมาณคอลลาเจนที่ระบุบนฉลากบรรจุภัณฑ์ เมื่อเทียบกับยี่ห้ออื่นๆ เนื่องจากชนิดของคอลลาเจนที่ใช้ ซึ่งมีผลมาจากวัตถุดิบที่ใช้ในการสกัดคอลลาเจน สัตว์แต่ละชนิดจะมีองค์ประกอบของกรดอะมิโนที่แตกต่างกัน ซึ่งองค์ประกอบของกรดอะมิโนในคอลลาเจนจะมีผลต่อสมบัติทางเคมีกายภาพของคอลลาเจน เช่น สมบัติการละลาย ความสามารถในการเกิดพันธะข้ามและความคงตัวต่อความร้อน ซึ่งปริมาณไฮดรอกซีโพรลีนมีความสัมพันธ์กับความคงตัวต่อความร้อนของคอลลาเจน เนื่องจากไฮดรอกซีโพรลีนจะช่วยให้โครงสร้างของโทรโปคอลลาเจนมีความคงตัวมากขึ้น ดังนั้นคอลลาเจนจากสัตว์บก เช่น สุกร โค จะมีความคงตัวต่อความร้อนที่สูงกว่าคอลลาเจนจากสัตว์น้ำ นอกจากนี้ปริมาณไฮดรอกซีโพรลีนยังขึ้นอยู่กับสภาพแวดล้อมที่ปลาอาศัยอยู่ โดยคอลลาเจนจากปลาที่อยู่ในเขตน้ำเย็นจะมีปริมาณไฮดรอกซีโพรลีนที่ต่ำกว่าและมีความคงตัวต่อความร้อนที่ต่ำกว่าปลาเขตน้ำอุ่น (Wasswa และคณะ, 2007)

ผลการพัฒนาการวิเคราะห์ปริมาณคอลลาเจนในเครื่องต้มเพื่อสุขภาพ มีประสิทธิภาพดี พบว่าที่ระดับความเข้มข้นของสารมาตรฐาน 4-ไฮดรอกซีโพรลีน 20 mg/L, 50 mg/L และ 80 mg/L พบ % Recovery เฉลี่ยเท่ากับ 87.49 85.06 และ 90.67 ตามลำดับ

นอกจากนี้ให้ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (Correlation coefficient, r) มีค่าเท่ากับ 0.9993 ซึ่งมีความมากกว่าเกณฑ์การยอมรับคือ 0.995 และการพิสูจน์ขีดจำกัดของการตรวจพบ (Limit of detection, LOD) พบว่ามีค่าเท่ากับ 4.96 mg/L (น้อยกว่า LOD หมายถึง ตรวจไม่พบ) และขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณ (Limit of quantitation, LOQ) พบว่ามีค่าเท่ากับ 13.17 mg/L ($4.9 < \text{ผลที่วิเคราะห์} < 13.1$ หมายถึง พบแต่รายงานผลไม่ได้) (Miller และ Miller, 1988; Huber, 1999)

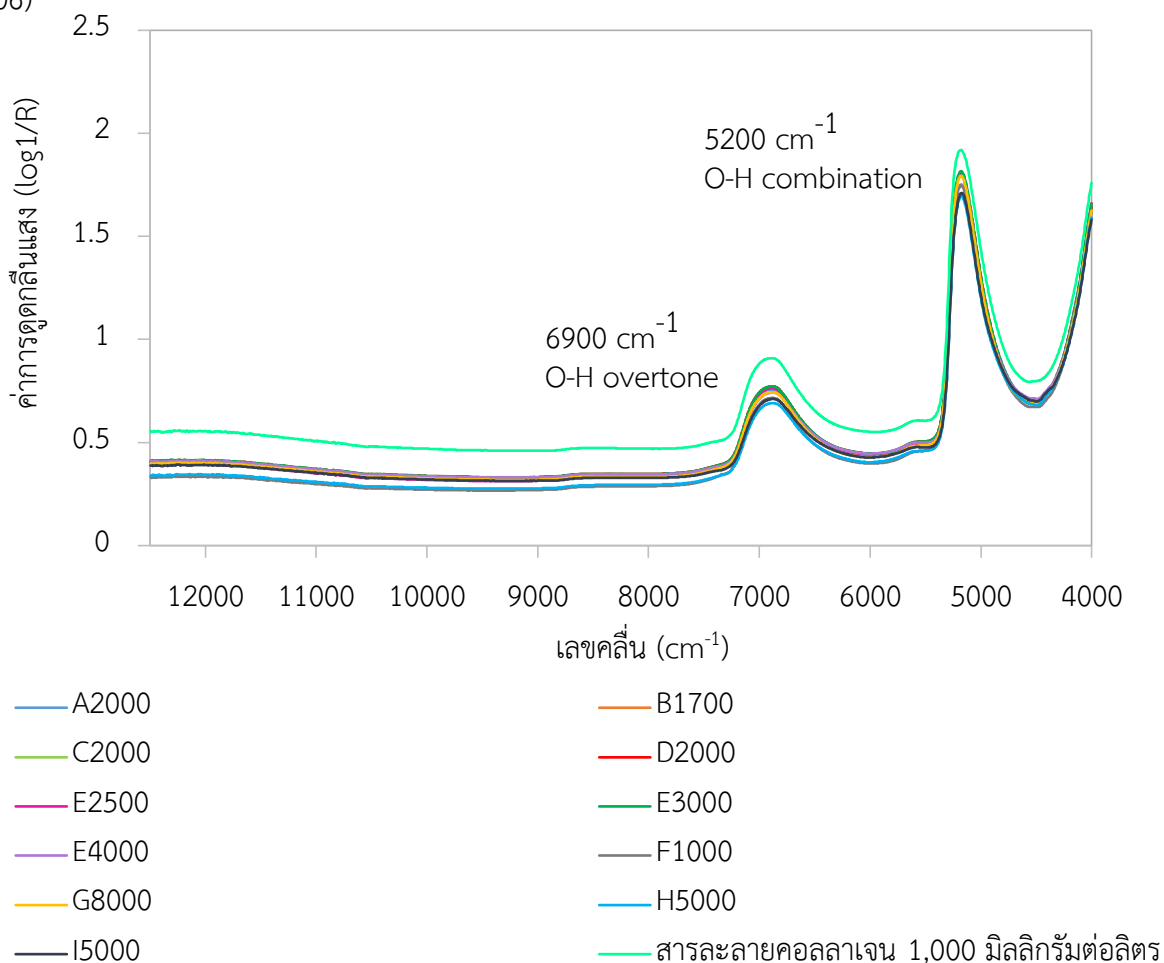
จากนั้นนำค่าทางเคมีที่วิเคราะห์ไปคำนวณหาค่า standard error of laboratory (SEL) แสดงการคำนวณดังภาคผนวก ก เพื่อหาความคลาดเคลื่อนของการวิเคราะห์ค่าทางเคมี พบว่าค่าความคลาดเคลื่อนของการวิเคราะห์ค่าทางเคมี มีค่าเท่ากับ 12,221.62 mg/L ซึ่งมีความมากกว่าค่าความคลาดเคลื่อนของการวิเคราะห์ด้วย NIRS โดยสมการเทียบมาตรฐานของผลิตภัณฑ์น้ำผลไม้เสริมคอลลาเจนที่มีจำนวนตัวอย่าง 114 และ 109 ตัวอย่างที่เหมาะสมที่สุด มีค่าเท่ากับ 3,574 และ 2,266 mg/L ตามลำดับ เนื่องจากคอลลาเจนที่ใช้เป็นวัตถุดิบอาหารจะต้องผ่านการย่อยให้มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ เพื่อป้องกันการตกตะกอนและปัญหาการชุนในเครื่องต้ม ทั้งนี้ไม่สามารถมองเห็นสายคอลลาเจนได้ด้วยตาเปล่า จึงวัดค่าความหนืดและค่าความชุนของตัวอย่าง พบว่า ให้ค่าการทำซ้ำที่ต่างกันจึงอาจทำให้ค่า SEL ของการวิเคราะห์ทางเคมี มีค่ามากกว่า NIRS

4.3.3 ลักษณะสเปกตรัมของผลิตภัณฑ์น้ำผลไม้เสริมคอลลาเจนที่มีจำหน่ายในประเทศ

ลักษณะสเปกตรัมของผลิตภัณฑ์น้ำผลไม้เสริมคอลลาเจนแต่ละยี่ห้อที่มีลักษณะสเปกตรัมที่คล้ายกันและคล้ายกับสารละลายคอลลาเจน แสดงดังภาพที่ 56 เมื่อพิจารณาสเปกตรัมจะพบว่าสเปกตรัมมีความเด่นชัดที่เกิดจากการดูดกลืนของน้ำที่ความยาวคลื่น 6900 cm^{-1} มีความสัมพันธ์กับโอเวอร์โทนอันดับหนึ่งของพันธะ O-H (first overtone) และ 5200 cm^{-1} มีความสัมพันธ์กับคอมบิเนชันของ O-H (combination) (Caramês และคณะ, 2017; Rodriguez-Saona และคณะ, 2001) ซึ่งเป็นลักษณะของพีคที่พบได้ในตัวอย่างที่มีน้ำเป็นองค์ประกอบ เช่น เครื่องต้ม เป็นต้น และด้วยอิทธิพลของน้ำ ทำให้ไม่สามารถเห็นพีคอื่นได้อย่างชัดเจน เนื่องจากเป็นพีคที่มีขนาดใหญ่ไปบดบังพีคขององค์ประกอบอื่นๆ ส่งผลให้การจำแนกองค์ประกอบทางเคมีนั้นเป็นไปได้ยาก ดังนั้นก่อนทำการสร้างสมการเทียบมาตรฐาน จึงจำเป็นต้องมีการใช้วิธีการทางคณิตศาสตร์ เพื่อช่วยในการปรับแต่งสเปกตรัมก่อนการวิเคราะห์ เพื่อทำให้เกิดการแยกพีค หรือองค์ประกอบอื่นๆ ที่เราสนใจออกมาด้วย

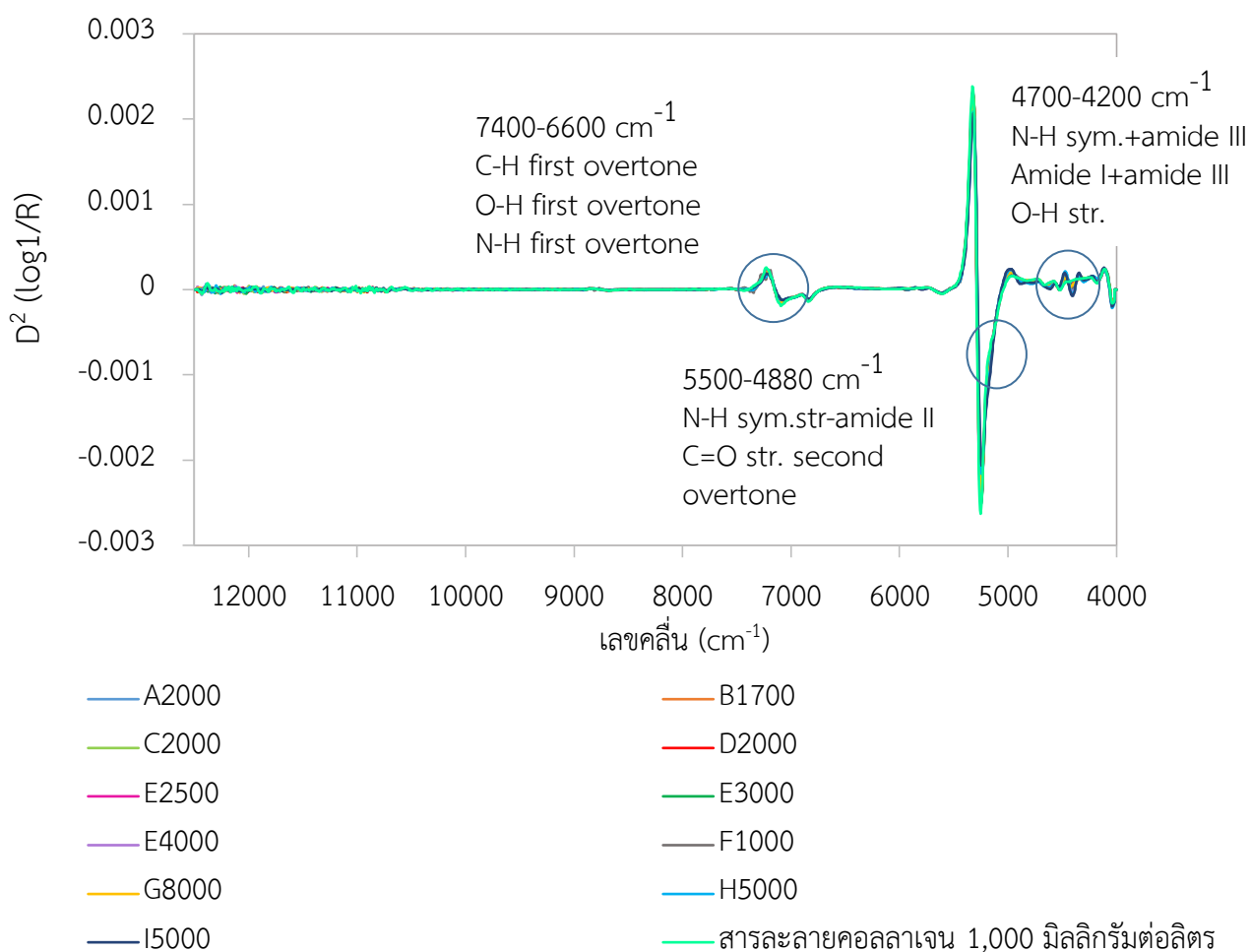
วิธีการอนุพันธ์อันดับที่สอง ซึ่งวิธีนี้ช่วยให้สเปกตรัมเห็นพีคที่ชัดเจนมากขึ้น โดยที่ตำแหน่งพีคนั้นยังเหมือนเดิม แต่พีคจะมีลักษณะกลับหัว (อนุพันธ์, 2552; Nicolai และคณะ, 2007) สเปกตรัมที่ผ่านการปรับแต่งด้วยอนุพันธ์อันดับที่สองของผลิตภัณฑ์น้ำผลไม้เสริมคอลลาเจน แสดงดังภาพที่ 57

โดยตัวอย่างผลิตภัณฑ์น้ำผลไม้เสริมคอลลาเจนที่สุ่มมานั้น เป็นตัวอย่างเครื่องดื่มในภาชนะบรรจุปิดสนิทที่มีช่วงค่าที่ครอบคลุมปริมาณคอลลาเจนที่ต่ำสุดและสูงสุดที่มีจำหน่ายในท้องตลาด ซึ่งกลุ่มตัวอย่างที่ดีจะต้องมีตัวอย่างทั้งในปัจจุบันและตัวอย่างที่จะนำมาวิเคราะห์ในอนาคตมีค่าครอบคลุมปริมาณทั้งต่ำสุดและสูงสุดของตัวอย่าง โดยจะต้องมีการสุ่มตัวอย่างที่ถูกต้องเพียงพอเพื่อเป็นตัวแทนของตัวอย่างในกลุ่มนั้นๆ ซึ่งถือเป็นขั้นตอนที่สำคัญที่จะได้สมการทำนายปริมาณองค์ประกอบทางเคมีที่ดี นอกจากนี้ควรพิจารณาวิธีวิเคราะห์ทางเคมี ซึ่งควรเป็นวิธีที่เป็นมาตรฐานและมีความแม่นยำเพื่อให้ได้ข้อมูลที่ถูกต้อง เนื่องจากส่งผลกระทบต่อสมการที่สร้างต่อไป (Ozaki และคณะ, 2006)



ภาพที่ 56 ตัวอย่างสเปกตรัมของผลิตภัณฑ์น้ำผลไม้เสริมคอลลาเจนที่ใช้ในการศึกษา

จากการศึกษาปริมาณคอลลาเจนในสารละลายมาตรฐาน สารละลายคอลลาเจนที่มีการเติมวัตถุเจือปนอาหาร และผลิตภัณฑ์น้ำผลไม้เสริมคอลลาเจน พบว่า ทั้งสเปกตรัมของสารละลายคอลลาเจน สารละลายคอลลาเจนที่เติมวัตถุเจือปนอาหาร และผลิตภัณฑ์น้ำผลไม้เสริมคอลลาเจนที่ไม่ได้ผ่านการปรับแต่งสเปกตรัม มีลักษณะคล้ายกัน ทั้งช่วงคลื่นสั้นและช่วงคลื่นยาว โดยจะเห็นพีคที่ได้มีการดูดกลืนของพีคที่ชัดเจน โดยพีคดังกล่าวเป็นพีคที่เกิดจากการดูดกลืนของน้ำ ซึ่งพบได้ทั่วไปในตัวอย่างที่มีน้ำเป็นองค์ประกอบหลัก ดังนั้น เพื่อลดอิทธิพลดังกล่าวและแยกพีคอื่นๆ ที่ถูกบดบังให้ชัดเจนขึ้นได้ด้วยการหาความชันของสเปกตรัมแบบอนุพันธ์อันดับสองพบว่า สารละลายคอลลาเจนและวัตถุเจือปนอาหารให้ลักษณะพีคที่ต่างกัน โดยเฉพาะช่วงคลื่นยาวจะสังเกตเห็นได้ชัดเจน แต่เมื่อเปรียบเทียบสารละลายคอลลาเจนที่เติมวัตถุเจือปนอาหารและผลิตภัณฑ์น้ำผลไม้เสริมคอลลาเจนพบว่าให้ลักษณะที่คล้ายกัน



ภาพที่ 57 สเปกตรัมผลิตภัณฑ์น้ำผลไม้เสริมคอลลาเจนที่ปรับแต่งด้วยวิธีอนุพันธ์อันดับสอง

4.3.4 การสร้างสมการเทียบมาตรฐาน

4.3.4.1 การสร้างสมการเทียบมาตรฐานด้วยวิธี PLSR

ตารางที่ 20 แสดงข้อมูลทางสถิติของผลิตภัณฑ์น้ำผลไม้เสริมคอลลาเจน โดยแบ่งเป็น 2 กลุ่ม คือกลุ่มสมการเทียบมาตรฐานและกลุ่มสมการทวนสอบ โดยมีค่าอยู่ในช่วง 1,418.47-98,666.90 มิลลิกรัมต่อลิตร ตารางที่ 21 และ 22 แสดงค่าทางสถิติของสมการทำนายปริมาณคอลลาเจนในผลิตภัณฑ์น้ำผลไม้ ด้วยวิธีการถดถอยกำลังสองน้อยที่สุดบางส่วน (PLSR) พบว่า สมการที่เหมาะสมที่สุด สำหรับทำนายปริมาณคอลลาเจนในผลิตภัณฑ์น้ำผลไม้ด้วยเครื่อง NIRS ได้มาจากการพัฒนาสเปกตรัมด้วยวิธี SNV ที่ช่วงคลื่น 7486-6896, 5500-4998 และ 4701-3999 cm^{-1} โดยมีค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (R^2) เท่ากับ 0.973 ค่าความคลาดเคลื่อนในการทำนาย (RMSEP) เท่ากับ 3,510 mg/L ค่าความคลาดเคลื่อนเฉลี่ย (bias) เท่ากับ 13.1 ค่าสัดส่วนระหว่างส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานกับค่าความผิดพลาดมาตรฐานในการทำนายของกลุ่มทวนสอบสมการ (RPD) เท่ากับ 6.13 และมีปัจจัยที่เกี่ยวข้อง 8 ปัจจัยตามลำดับ

นอกจากนี้ เมื่อทำการตัดตัวอย่าง ยี่ห้อ H ซึ่งเป็นยี่ห้อที่มีความแตกต่างระหว่างค่าทางเคมีที่วิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC และค่าปริมาณคอลลาเจนที่ระบุบนฉลากบรรจุภัณฑ์มาก ดังภาพที่ 55 พบว่า สมการเทียบมาตรฐานมีค่าความคลาดเคลื่อนในการทำนายเท่ากับ 2,260 mg/L ซึ่งมีค่าน้อยลงเมื่อเทียบกับสมการข้างต้น โดยสมการนี้สามารถตรวจวัดตัวอย่างได้แม่นยำที่มีปริมาณคอลลาเจนมากกว่า 2,500 mg/L และแสดงการตรวจสอบความแม่นยำของสมการเทียบมาตรฐานผลิตภัณฑ์น้ำผลไม้เสริมคอลลาเจนดังกล่าว ค

แต่เนื่องจากสมการมีค่าในช่วงความเข้มข้นต่ำกระจุกตัวกันอยู่บริเวณล่างกราฟ และเครื่องตีความช่วงความเข้มข้นสูงมีกลุ่มตัวอย่างที่น้อยกว่า จึงทำให้มีค่า RMSEE และ RMSEP สูง ดังนั้นสามารถปรับปรุงสมการได้ โดยการเก็บค่าที่วิเคราะห์เพิ่มเติม เพื่อทำให้สมการที่ได้มีประสิทธิภาพมากขึ้น จากผลที่ได้ชี้ให้เห็นว่ามีความเป็นไปได้ที่จะวัดปริมาณคอลลาเจนในผลิตภัณฑ์เครื่องตีความโดยใช้เทคนิค NIRS และสามารถสรุปได้ว่าจากตัวอย่างทุกชนิด พบว่ามีปริมาณคอลลาเจนไม่เกิน 10 กรัม ซึ่งปริมาณคอลลาเจนไฮโดรไลเซตที่ควรบริโภคกำหนดให้ไม่เกิน 10 กรัมต่อวัน (Food and drug administration, 1999)

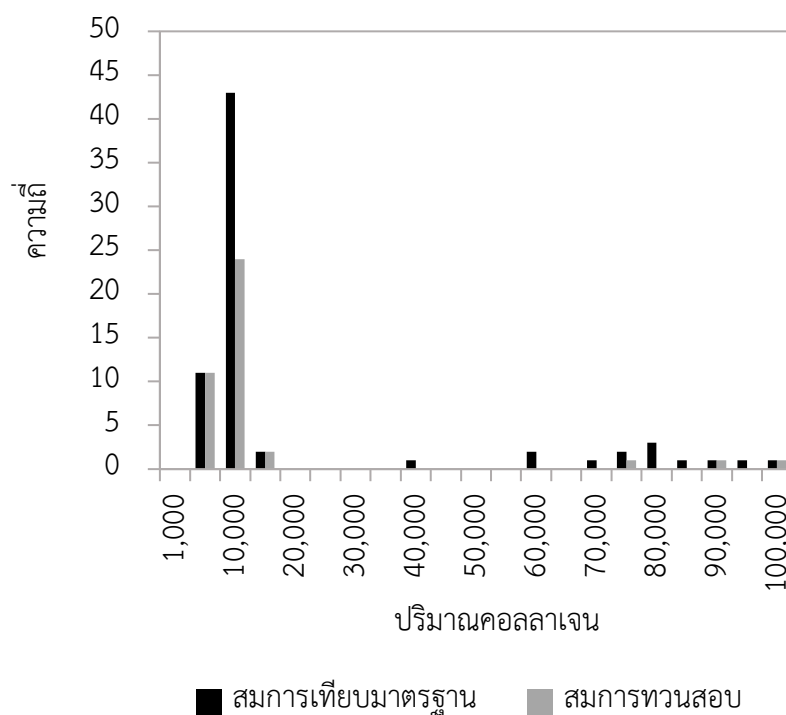
ตารางที่ 20 ค่าสถิติของผลิตภัณฑ์น้ำผลไม้เสริมคอลลาเจน สำหรับสร้างสมการและสำหรับทวนสอบสมการด้วยเทคนิค NIRS

จำนวนตัวอย่างทั้งหมด	กลุ่มตัวอย่าง	จำนวนตัวอย่าง	ค่าเฉลี่ย	ค่าต่ำสุด-ค่าสูงสุด*	ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน
114	สมการเทียบมาตรฐาน (70%)	82	16,951.98	1,418.47-98,666.90	26,344.24
	สมการทวนสอบ (30%)	32	13,838.84	2,001.52-80,562.20	21,902.26
109	สมการเทียบมาตรฐาน (70%)	81	16,179.20	1,418.47-98,666.90	25,725.22
	สมการทวนสอบ (30%)	28	9,096.80	2,001.52-72,810.40	13,851.41

*หน่วย มิลลิกรัมต่อลิตร



จากผลการทดลอง สมการที่ได้ให้ผลการทำนายปริมาณคอลลาเจนในผลิตภัณฑ์น้ำผลไม้เสริมคอลลาเจนได้ไม่แม่นยำนัก ทั้งนี้เนื่องจากปริมาณคอลลาเจนที่สุ่มมาในท้องตลาดทั้งหมดในประเทศที่นำมาสร้างสมการเทียบมาตรฐานไม่มีการกระจายตัวอย่างสม่ำเสมอ แสดงดังภาพที่ 58 ดังนั้นจึงต้องมีการเพิ่มจำนวนตัวอย่างเพื่อให้มีค่าการวิเคราะห์ที่กระจายครอบคลุม รวมทั้งต้องมีความถี่ที่ใกล้เคียง จึงจะทำให้สมการเทียบมาตรฐานที่สร้างขึ้นมามีความสัมพันธ์กันสูง



ภาพที่ 58 การกระจายตัวของปริมาณคอลลาเจนในผลิตภัณฑ์น้ำผลไม้เสริมคอลลาเจน

ตารางที่ 21 ค่าทางสถิติของสมการทำนายปริมาณคอลลาเจนในผลิตภัณฑ์น้ำผลไม้ จำนวน 114 ตัวอย่าง

ช่วงเลขคลื่น (cm ⁻¹)	การปรับแต่งสเปกตรัม	PLS factor	สมการเทียบมาตรฐาน (70%)		สมการทดสอบความแม่นยำ (30%)			RPD
			R ²	RMSEE (mg/L)	R ²	RMSEP (mg/L)	Bias	
12500-4000	SNV	3	0.951	5,980	0.931	5,013	-371	3.83
7486-6896	สเปกตรัมที่ไม่ผ่านการปรับแต่ง	7	0.972	4,640	0.957	5,650	-876	4.88
5500-4998	SNV	8	0.986	3,230	0.973	3,510	13.1	6.13
4701-3999	MSC	6	0.981	3,780	0.965	4,700	148	5.41
7000-4000	สเปกตรัมที่ไม่ผ่านการปรับแต่ง	7	0.984	3,430	0.972	4,230	109	6.01
	SNV	5	0.980	3,800	0.975	4,040	-423	6.42
	MSC	5	0.980	3,800	0.966	4,620	-864	5.60

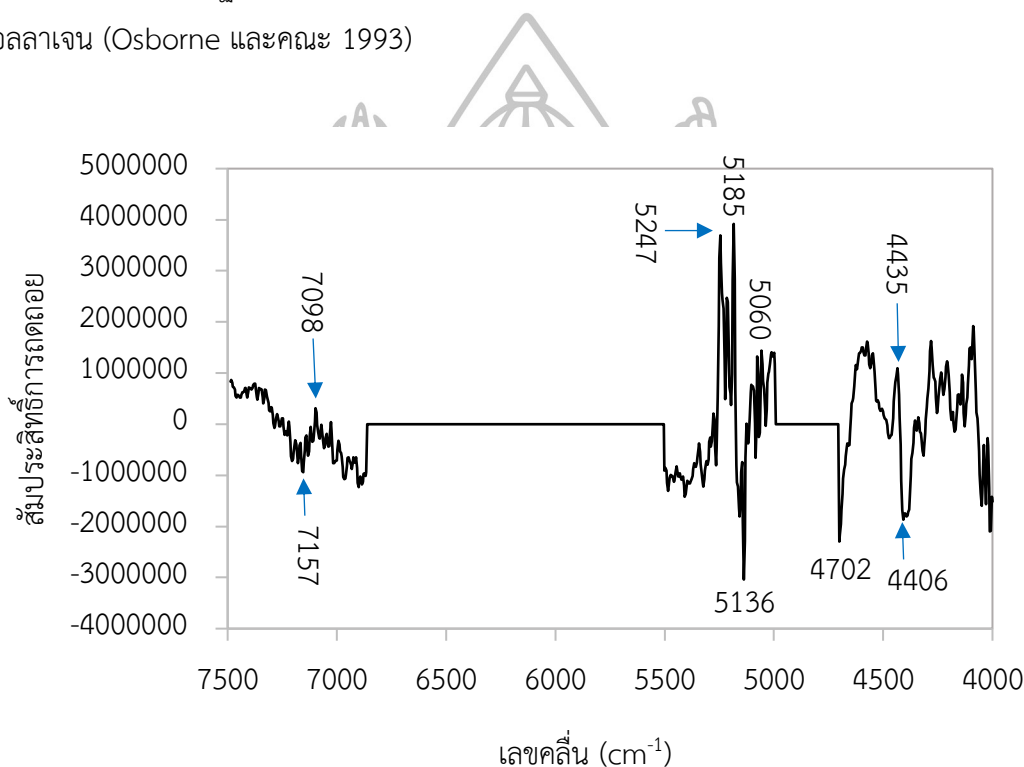
หมายเหตุ: R²: coefficients of determination, RMSEE: root mean square error of estimation, RMSEP: root mean square error of prediction, RPD: ratio of standard deviation of reference data in validation set to SEP, MSC: multiplicative scatter correction และ SNV: Standard Normal Variate

ตารางที่ 22 ค่าทางสถิติของสมการทำนายปริมาณคอลลาเจนในผลิตภัณฑ์น้ำผลไม้ จำนวน 109 ตัวอย่าง

ช่วงเลขคลื่น (cm ⁻¹)	การปรับแต่งสเปกตรัม	PLS factor	สมการเทียบมาตรฐาน (70%)		สมการทดสอบความแม่นยำ (30%)			RPD
			R ²	RMSEE (mg/L)	R ²	RMSEP (mg/L)	Bias	
12500-4000	SNV	8	0.990	2,600	0.923	3,690	-286	3.62
7486-6896	สเปกตรัมที่ไม่ผ่านการปรับแต่ง	10	0.989	2,770	0.971	2,260	434	6.08
5500-4998	SNV	8	0.989	2,830	0.972	2,260	403	6.11
4701-3999	MSC	6	0.985	3,180	0.966	2,500	478	5.52
7000-4000	สเปกตรัมที่ไม่ผ่านการปรับแต่ง	10	0.992	2,460	0.963	2,530	82.3	5.26
	SNV	7	0.985	3,220	0.968	3,620	-28.3	5.61
	MSC	8	0.990	2,590	0.963	2,530	85.3	5.26

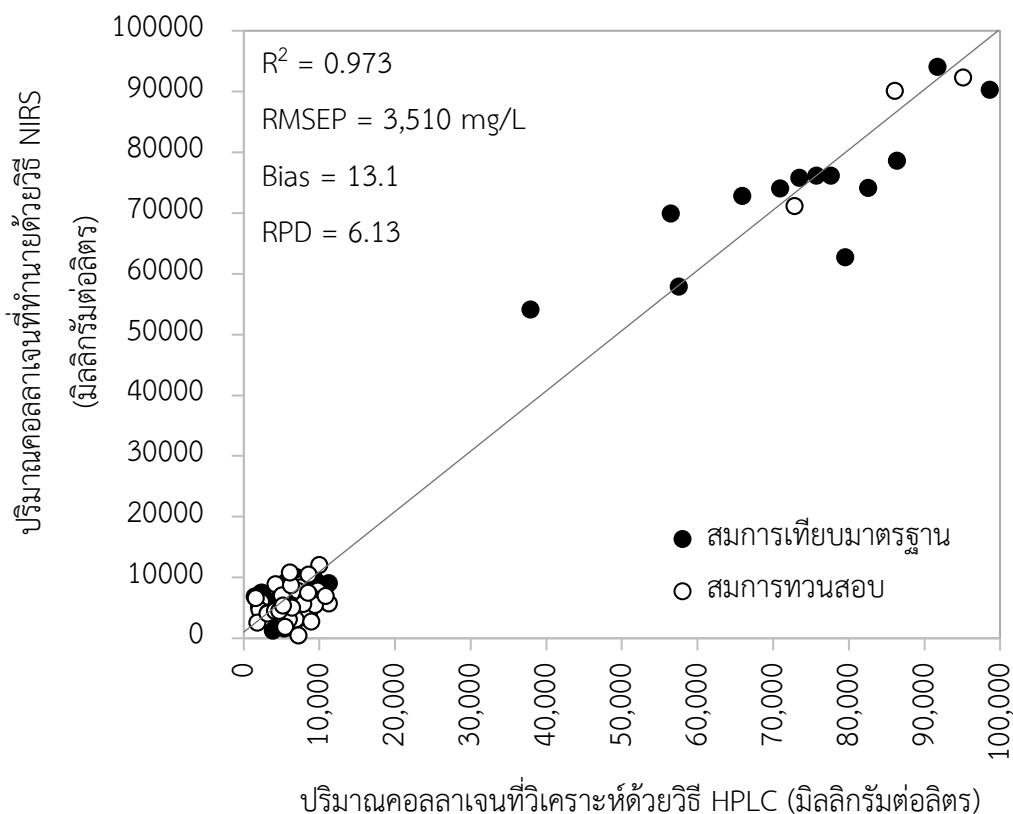
หมายเหตุ: R²: coefficients of determination, RMSEE: root mean square error of estimation, RMSEP: root mean square error of prediction, RPD: ratio of standard deviation of reference data in validation set to SEP, MSC: multiplicative scatter correction และ SNV: Standard Normal Variate

ผลการทดสอบ paired t-test ของสมการเทียบมาตรฐานของตัวอย่างจำนวน 114 ตัวอย่าง และสมการเทียบมาตรฐานของตัวอย่างจำนวน 109 ตัวอย่าง พบว่าค่าปริมาณคอลลาเจนในผลิตภัณฑ์น้ำผลไม้เสริมคอลลาเจน ที่ทำนายด้วยวิธี NIRS ไม่แตกต่างจากค่าปริมาณคอลลาเจนจริง อย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยสมการทำนายปริมาณคอลลาเจนที่สร้างด้วยวิธี PLSR จะแสดง regression coefficient ของสมการที่พัฒนาขึ้น แสดงดังภาพที่ 59 ซึ่งมีเลขคลื่นที่มีอิทธิพลต่อสมการเทียบมาตรฐาน ซึ่งสอดคล้องกับตำแหน่งโปรตีนและกรดอะมิโนซึ่งเป็นโครงสร้างของคอลลาเจน (Osborne และคณะ 1993)



ภาพที่ 59 สัมประสิทธิ์การถดถอยของสารละลายคอลลาเจนในผลิตภัณฑ์น้ำผลไม้ที่ผ่านการปรับแต่งด้วยวิธี SNV

จากภาพที่ 60 จะเห็นได้ว่าค่าทำนายปริมาณคอลลาเจนที่ได้นั้น อยู่ใกล้เส้นทแยงมุม (target line) บ่งบอกถึงการทำนายได้อย่างถูกต้อง และแม่นยำ นอกจากนี้จะเห็นได้ว่าลักษณะการกระจายจุดบนกราฟการกระจาย (scatter plots) มีกลุ่มของข้อมูลส่วนมากกระจุกตัวอยู่บริเวณด้านล่างกราฟ เนื่องจากตัวอย่างเครื่องดื่มผสมคอลลาเจนในท้องตลาดมีการเติมคอลลาเจนส่วนมากที่ความเข้มข้นใกล้เคียงกันอยู่ในช่วง 1,000-3,000 มิลลิกรัมต่อหนึ่งหน่วยบริโภค และเครื่องดื่มผสมคอลลาเจนชนิดสกัดเข้มข้นจะมีการเติมปริมาณคอลลาเจนอยู่ในช่วง 4,000 –8,000 มิลลิกรัมต่อหนึ่งหน่วยบริโภคและจะมีราคาสูงกว่าชนิดแรก



ภาพที่ 60 การกระจายตัวของค่าปริมาณคอแลนในผลิตภัณฑ์น้ำผลไม้ที่ได้จากการสร้างสมการเทียบมาตรฐานและสมการทวนสอบด้วยเทคนิค NIRS

นอกจากนี้เมื่อนำตัวอย่างผลิตภัณฑ์น้ำผลไม้เสริมคอแลนที่มีวางจำหน่ายในท้องตลาดมาทำนายด้วยสมการที่เหมาะสมที่สุด สำหรับทำนายปริมาณคอแลนในผลิตภัณฑ์น้ำผลไม้ พบว่าสามารถทำนายตัวอย่างกลุ่มใหม่ในท้องตลาดได้ เนื่องจากตัวอย่างมีองค์ประกอบภายในที่คล้ายกัน และเมื่อพิจารณาจากขีดจำกัดของค่าระยะห่างมาหาลาโนบิสเฉลี่ย (Average Mahalanobis Distance) พบว่าตัวอย่างผลิตภัณฑ์น้ำผลไม้เสริมคอแลนที่นำมาทำนายมีค่าระยะมาหาลาโนบิสเฉลี่ยต่ำกว่าขีดจำกัด แสดงดังตารางที่ 23

จากตารางที่ 23 เมื่อนำตัวอย่างกลุ่มใหม่มาทำนายด้วยสมการเทียบมาตรฐานที่เหมาะสมที่สุด พบว่า ตัวอย่างมีค่าความคลาดเคลื่อนเฉลี่ยร้อยละ 17 ซึ่งถือว่ามีค่าที่สูง กล่าวคือสมการมีร้อยละความถูกต้องของการทำนายเท่ากับร้อยละ 80 ดังนั้นจึงต้องลดค่าความคลาดเคลื่อนของสมการดังกล่าวด้วยการเพิ่มช่วงของตัวอย่าง เพื่อให้ข้อมูลมีการกระจายมากขึ้น ซึ่งจะช่วยให้สมการที่พัฒนาขึ้นมีความแม่นยำและน่าเชื่อถือมากขึ้น

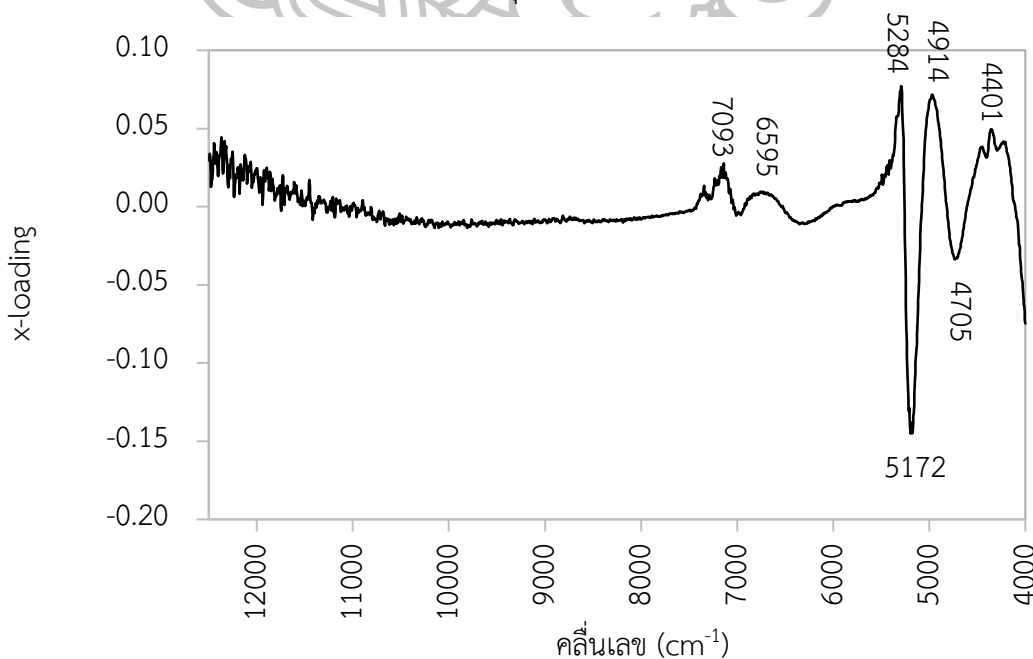
ตารางที่ 23 การเปรียบเทียบค่าจริงและค่าการทำนายปริมาณคอลลาเจนในผลิตภัณฑ์น้ำผลไม้ด้วย
สมการที่เหมาะสมที่สุด

รหัสตัวอย่าง	ค่าจาก HPLC (mg/L)	ค่าทำนาย (mg/L)	ค่าความคลาดเคลื่อน (%)
E 2500	7,358.83	7,398.30	0.54
E 2500	7,631.08	8,000.10	4.84
E 2500	6,832.46	4,433.90	35.11
E 3000	8,589.62	10,433.00	21.46
E 3000	9,567.76	9,386.90	1.89
E 3000	10,540.23	8,396.80	20.34
E 3000	10,795.67	6,912.20	35.97
A 2000	8,479.10	7,450.60	12.13
A 2000	7,488.83	7,564.60	1.01
A 2000	8,701.97	7,381.00	15.18
A 2000	5,324.39	4,285.00	19.52
A 2000	5,559.34	4,041.90	27.30
A 2000	3,112.83	2,480.80	20.30
D 2000	4,097.60	4,487.80	9.52
D 2000	5,439.77	6,530.90	20.06
D 2000	4,125.47	5,583.50	35.34
I 5000	91,719.77	94,079.00	2.57
I 5000	98,666.92	90,273.00	8.51
H 5000	68,681.76	56,510.00	17.72
H 5000	80,562.24	56,374.00	30.02
ค่าเฉลี่ย	22,663.80	20,100.20	17.00

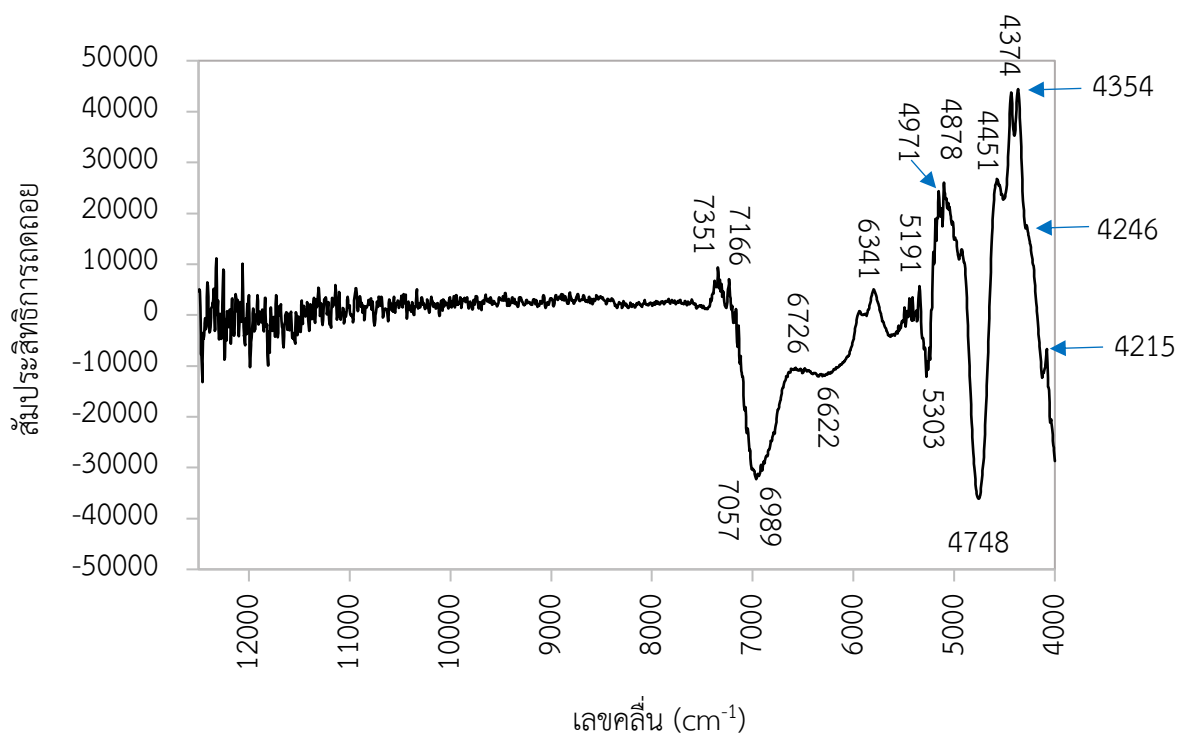
4.3.4.2 การสร้างสมการเทียบมาตรฐานด้วยวิธี Multiple Linear Regression (MLR)

กราฟ X-loading ของผลิตภัณฑ์น้ำผลไม้เสริมคอลลาเจน แสดงดังภาพที่ 61 โดยแสดงเลขคลื่นที่มี X-loading สูง ซึ่งแสดงอิทธิพลที่สำคัญต่อเลขคลื่นนั้น ซึ่งสอดคล้องกับค่าสัมประสิทธิ์การถดถอย ซึ่งแสดงดังภาพที่ 62 จากนั้นจะทำการคัดเลือกเลขคลื่นที่สำคัญมาใช้ในการวิเคราะห์ด้วยวิธี MLR

ในการศึกษานี้เลือกใช้เลขคลื่นจำนวน 18 เลขคลื่น โดยพิจารณาเลขคลื่นสำคัญจากกราฟสัมประสิทธิ์การถดถอยร่วมกับเลขคลื่นอ้างอิงจากหนังสือหรือเปรียบเทียบกับสเปกตรัมขององค์ประกอบที่ต้องการศึกษาที่เป็นสารบริสุทธิ์ ซึ่งเลขคลื่นทั้งหมดที่เลือกมาเป็นเลขคลื่นที่มีความสัมพันธ์กับพันธะ C-H, O-H, C=O และ N-H ซึ่งอยู่ในโครงสร้างกรดอะมิโนที่เป็นส่วนประกอบของคอลลาเจน แสดงดังตารางที่ 24 จากนั้นนำเลขคลื่นจำนวน 18 เลขคลื่นไปวิเคราะห์ด้วยวิธี MLR จากนั้นเลขคลื่นจะถูกตัดออกอย่างเป็นระบบ ด้วยการกำจัดเลขคลื่นที่มีความสำคัญน้อยที่สุดออกด้วยวิธี forward-backward elimination ซึ่งเป็นการกำจัดเลขคลื่นออกอย่างเป็นขั้นตอนจนกว่าจะเหลือจำนวนเลขคลื่นน้อยที่สุดและเพียงพอที่จะทำนายปริมาณคอลลาเจนในผลิตภัณฑ์น้ำผลไม้เสริมคอลลาเจนได้ ซึ่งสังเกตจาก การลดลงของค่า R^2 ในกลุ่มสร้างสมการเทียบมาตรฐาน และการเพิ่มขึ้นของ RMSECV ในขณะที่ลดจำนวนเลขคลื่นแต่ละชุด แสดงดังตารางที่ 25



ภาพที่ 61 ค่า X-loading ของแบบจำลองคอลลาเจนในผลิตภัณฑ์น้ำผลไม้ด้วยเทคนิคสเปกโทรสโกปีอินฟราเรดย่านใกล้



ภาพที่ 62 สัมประสิทธิ์การถดถอยของสมการทำนายปริมาณคอลลาเจนในผลิตภัณฑ์น้ำผลไม้ ในช่วงคลื่น $12500-4000\text{ cm}^{-1}$

ตารางที่ 24 แสดงการเลือกเลขคลื่นที่ใช้ในการสร้างสมการเทียบมาตรฐานด้วยวิธี MLR โดยดูจากค่า X-loading ซึ่งมีทั้งหมด 18 เลขคลื่น ได้แก่ 4215, 4246, 4354, 4374, 4451, 4748, 4878, 4968, 4971, 5191, 5303, 6341, 6622, 6726, 6989, 7057, 7166 และ 7351 cm^{-1} จากนั้นนำเลขคลื่นทั้งหมด มาวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of variance, ANOVA) จนกว่าจะเหลือจำนวนเลขคลื่นน้อยที่สุดและเพียงพอที่จะทำนายปริมาณคอลลาเจน แต่ทั้งนี้ต้องดูการสั้นของพันธะภายในโมเลกุลควบคู่กันด้วยในการเลือกสมการทำนาย

ตารางที่ 24 การเลือกเลขคลื่นในการสร้างสมการเทียบมาตรฐานด้วยวิธี MLR

เลขคลื่น 12500-4000 cm^{-1}	จำนวนเลขคลื่นที่เลือกออก	สมการเทียบ มาตรฐาน		Cross validation		
		R^2	RMSEC	R^2	RMSECV	Bias
18*	-	0.962	5,331	0.935	6,962	19.86
9*	4246 4354 4374 4948 6341 6588 6726 6989 7058	0.955	5,765	0.939	6,697	31.2
5*	4968 4971 7166 7351	0.941	6,625	0.929	7,260	4.24
4*	4215	0.940	6,673	0.929	7,254	4.66

18* คือ 4215, 4246, 4354, 4374, 4451, 4748, 4878, 4968, 4971, 5191, 5303, 6341,

6622, 6726, 6989, 7057, 7166 และ 7351 cm^{-1}

9* คือ 4215, 4451, 4748, 4878, 4971, 5191, 5303, 7166 และ 7351 cm^{-1}

5* คือ 4215, 4451, 4748, 5191 และ 5303 cm^{-1}

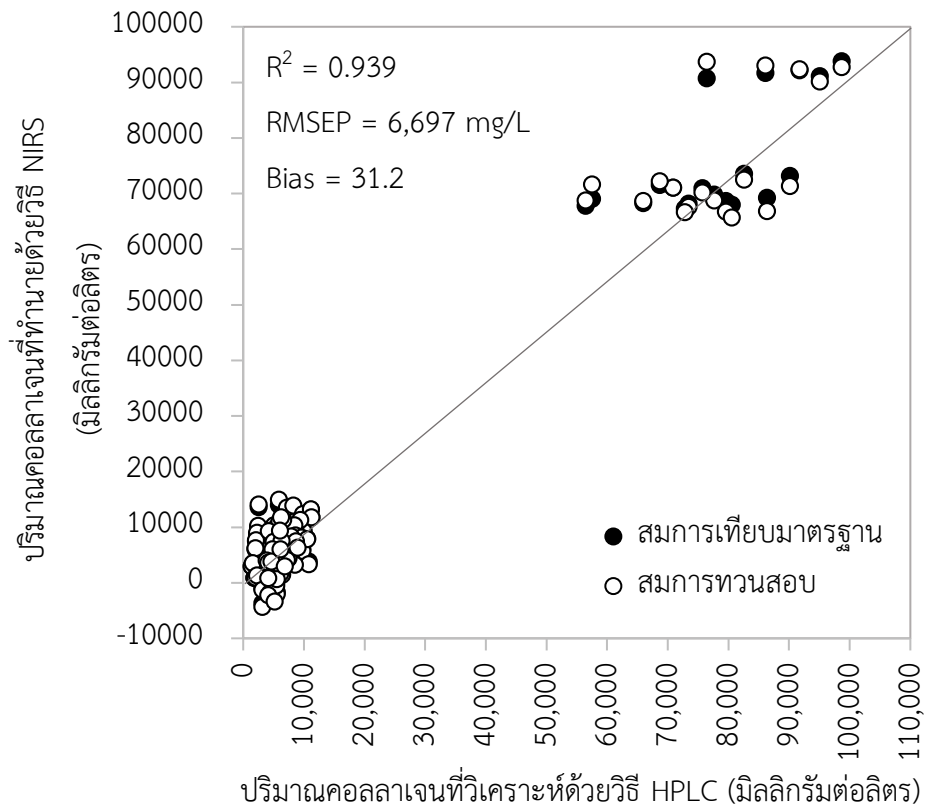
4* คือ 4451, 4748, 5191 และ 5303 cm^{-1}

ตารางที่ 25 ค่าจุดตัดแกน y (intercept) และค่าสัมประสิทธิ์ของเลขคลื่นที่เลือกใช้ในการสร้างสมการเทียบมาตรฐานด้วยวิธี MLR

เลขคลื่น 12500-4000 cm^{-1}	coefficient
$R^2_c = 0.955$	
intercept	-2.81×10^5
7351	-2.91×10^5
7166	1.40×10^6
5303	-2.49×10^6
5191	5.09×10^5
4971	3.65×10^6
4968	-3.31×10^6
4748	-3.94×10^6
4451	2.39×10^6
4215	2.16×10^6

R^2_c : coefficient of determination

สมการเทียบมาตรฐานในการทำนายปริมาณคอลลาเจนในน้ำผลไม้และสัมประสิทธิ์ของแต่ละตัวแปร แสดงดังสมการต่อไปนี้ สมการคอลลาเจน (mg/L) = $-28100000 - 29100000A_{7351} + 140000000A_{7166} - 2490000000A_{5303} + 509000000A_{5191} + 365000000A_{4971} - 331000000A_{4968} - 394000000A_{4748} + 239000000A_{4451} + 216000000A_{4215}$ โดย A_x คือ ค่าของการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น $X \text{ cm}^{-1}$ จากสมการดังกล่าวจะเห็นว่าตัวแปรที่สัมพันธ์กับการดูดกลืนแสงของกรดอะมิโนที่อยู่ในโครงสร้างคอลลาเจนทั้ง 9 ตำแหน่ง ซึ่งเป็นตำแหน่งใกล้เคียงกับการดูดกลืนแสงของการสั่นแบบโอเวอร์โทนอันดับที่สองของ C=O การสั่นของพันธะ O-H และการสั่นของพันธะ N-H และเอไมด์ ซึ่งเป็นหมู่ฟังก์ชันที่มีในกรดอะมิโนไฮดรอกซีโพรลีน ซึ่งเป็นตัวบ่งชี้ปริมาณคอลลาเจนในตัวอย่าง สาเหตุที่ค่าการดูดกลืนแสงของคอลลาเจนในตัวอย่างผลิตภัณฑ์น้ำผลไม้เสริมคอลลาเจนมีตำแหน่งเบี่ยงเบนไป เนื่องจากการดูดกลืนแสงขององค์ประกอบอื่นๆ ทางเคมีร่วมด้วย เช่น น้ำ น้ำตาล สารแต่งกลิ่นรส และสีผสมอาหาร เป็นต้น และจากการทดสอบ paired t-test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% พบว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ระหว่างค่าคอลลาเจนที่วิเคราะห์ได้ที่จริงและค่าคอลลาเจนที่ทำนายได้ด้วยเทคนิค NIRS แต่อย่างไรก็ตาม เมื่อพิจารณาชุดข้อมูล พบว่า ตัวอย่างผลิตภัณฑ์น้ำผลไม้เสริมคอลลาเจนมีค่าทางเคมีที่กระจุกตัวและมีช่วงห่างของค่าทางเคมีที่กว้าง แสดงดังภาพที่ 63 ทำให้สมการข้างต้นมีความผิดพลาดที่ได้จากการทำนายสูง สมการนี้จึงไม่สามารถทำนายกลุ่มตัวอย่างเครื่องดื่มที่มีความเข้มข้นต่ำได้ แต่สามารถใช้ในการทำนายคอลลาเจนในผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มน้ำผลไม้เสริมคอลลาเจนได้ในช่วงความเข้มข้นสูง ซึ่งมีผลต่อการสร้างสมการและการนำไปประยุกต์ใช้จริง การเพิ่มจำนวนของตัวอย่างและการหาตัวอย่างที่มีค่ากระจายเพิ่มมากขึ้นจะช่วยสร้างสมการที่มีความแม่นยำเพิ่มขึ้นได้



ภาพที่ 63 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณคอแลนที่วัดได้จริงกับปริมาณคอแลนที่ทำนายได้ด้วยวิธี MLR



บทที่ 5

สรุปผลการทดลอง

จากการศึกษาพบว่า เทคนิคสเปกโทรสโกปีอินฟราเรดย่านใกล้มีความเป็นไปได้ในการติดตามปริมาณคอลลาเจนในผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มเพื่อสุขภาพ และสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมได้ โดยค่าทางสถิติในการทำนายปริมาณคอลลาเจน จากเทคนิค NIRS ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับค่าที่ได้จากการวิเคราะห์ทางเคมีด้วยเทคนิค HPLC ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้ในการนำเทคนิค NIRS นี้ มาใช้ทำนายปริมาณคอลลาเจนในเครื่องดื่มเพื่อสุขภาพที่มีวางจำหน่ายในท้องตลาดแทนการวิเคราะห์ทางเคมีโดยวิธีมาตรฐานด้วยเครื่อง HPLC

อย่างไรก็ตามวิธีการวิเคราะห์คอลลาเจนด้วย HPLC ยังให้ค่าความคลาดเคลื่อนของการวิเคราะห์ที่สูงกว่าวิธี NIRS เนื่องจาก NIRS สามารถวิเคราะห์หมู่ฟังก์ชันของคอลลาเจนได้โดยตรง แต่เนื่องด้วยยังไม่มีวิธีวิเคราะห์ที่เป็นมาตรฐานได้รับการยอมรับระดับสากล สำหรับทดสอบคอลลาเจนที่เป็นสารเติมแต่งอาหาร ที่มีการเติมลงในเครื่องดื่มเพื่อสุขภาพ ซึ่งปัจจุบันวิธีที่ได้รับการยอมรับวิธีเดียวที่ใช้ในการทดสอบคอลลาเจนคือ AOAC ปี 2000 ซึ่งเป็นการวิเคราะห์ปริมาณกรดอะมิโนไฮดรอกซีโพรลีน ในเนื้อหมูและผลิตภัณฑ์ โดยการคำนวณปริมาณกรดอะมิโนไฮดรอกซีโพรลีน และคูณปัจจัย 8 ซึ่งวิธีดังกล่าวอาจยังไม่ครอบคลุมตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์จริง

โดยวิธีวิเคราะห์คอลลาเจนจำเป็นต้องมีการพัฒนาอย่างต่อเนื่อง เพื่อให้ได้ผลการวิเคราะห์ที่ดี มีความน่าเชื่อถือและจำเพาะต่อการวิเคราะห์มากที่สุด

รายการอ้างอิง

- สถาบันอาหาร กระทรวงอุตสาหกรรม. 2560. ตลาดวิตามินและผลิตภัณฑ์เสริมอาหารในประเทศไทย. [ออนไลน์]. เข้าถึงเมื่อวันที่ 21 มีนาคม 2560. เข้าถึงได้จาก <http://fic.nfi.or.th>
- สถาบันอาหาร กระทรวงอุตสาหกรรม. 2556. ตลาดเครื่องดื่มฟังก์ชันนัลในประเทศไทย. [ออนไลน์]. เข้าถึงเมื่อวันที่ 21 เมษายน 2559. เข้าถึงได้จาก <http://fic.nfi.or.th>
- สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา. 2549. “ประกาศสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา. เรื่อง ข้อกำหนดการใช้ส่วนประกอบที่สำคัญของผลิตภัณฑ์เสริมอาหารชนิดวิตามินและแร่ธาตุ.” 1 มิถุนายน.
- วีรยา การพานิช. 2552. กรดเบนโซอิก; วัตถุกันเสียที่นิยมใช้ในอาหาร สถาบันโภชนาการ มหาวิทยาลัยมหิดล. [ออนไลน์]. เข้าถึงเมื่อวันที่ 5 เมษายน 2560. เข้าถึงได้จาก <http://www.thaitox.org/media/upload/file/Benzoic-Acid.pdf>.
- อนุพันธ์ เทอดวงศ์วรกุล. 2552. การปรับแต่งสเปกตรัมก่อนการวิเคราะห์. ใน เทคโนโลยีอินฟราเรดย่านใกล้ในอุตสาหกรรมเกษตร. กรุงเทพฯ. หน้า 1-23.
- Aaby, K., Mazur, S., Nes, A. and Skrede, G. 2012. Phenolic compounds in strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.) fruits: Composition in 27 cultivars and changes during ripening. *Food Chemistry*. 132(1): 86-97.
- Afara, I., Sahama, T. and Oloyede, A. 2013. Near infrared for non-destructive testing of articular cartilage. In *Nondestructive Testing of Materials and Structures* (pp. 399-404). Springer, Netherlands.
- Alamar, P.D., Caramês, E.T., Poppi, R.J. and Pallone, J.A. 2016. Quality evaluation of frozen guava and yellow passion fruit pulps by NIR spectroscopy and chemometrics. *Food Research International*. 85: 209-214.
- Annenkov, V.V., Verkhovina, O.N., Shishlyannikova, T.A. and Danilovtseva, E.N. 2015. Application of 4-chloro-7-nitrobenzo-2-oxa-1, 3-diazole in analysis: fluorescent dyes and unexpected reaction with tertiary amines. *Analytical Biochemistry*. 486: 5-13.
- Arend, G.D., Adorno, W.T., Rezzadori, K., Di Luccio, M., Chaves, V.C., Reginatto, F.H. and Petrus, J.C.C. 2017. Concentration of phenolic compounds from strawberry (*Fragaria X ananassa* Duch) juice by nanofiltration membrane. *Journal of Food Engineering*. 201: 36-41.

- AOAC. 1993. Peer Verified Methods Program, Manual on Policies and Procedures, Arlington, VA, Nov. Gaithersburg, Md.
- AOAC. 2000. Official Methods of Analysis of AOAC International. 17th ed. Maryland: USA. Gaithersburg, Md.
- Bai, W., Yoshimura, N. and Takayanagi, M. 2014. Quantitative analysis of ingredients of blueberry fruits by near infrared spectroscopy. *Journal of Near Infrared Spectroscopy*. 22: 357-365.
- Basu, A. and Penugonda, K. 2009. Pomegranate juice: a heart-healthy fruit juice. *Nutrition Reviews*. 67(1): 49-56.
- Beaulieu, J.C. and Obando-Ulloa, J.M. 2017. Not-from-concentrate pilot plant 'Wonderful' cultivar pomegranate juice changes: Volatiles. *Food Chemistry*. 229: 553-564.
- Benito-Ruiz, P., Camacho-Zambrano, M.M., Carrillo-Arcenales, J.N., Mestanza-Peralta, M.A., Vallejo-Flores, C.A., Vargas-López, S.V. and Zurita-Gavilanes, L.A. 2009. A randomized controlled trial on the efficacy and safety of a food ingredient, collagen hydrolysate, for improving joint comfort. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*. 60(2), 99-113.
- Bilek, S.E. and Bayram, S.K. 2015. Fruit juice drink production containing hydrolyzed collagen. *Journal of Functional Foods*. 14: 562-569.
- Bonjour, J.P. 2005. Dietary protein: An essential nutrient for bone health. *Journal of the American College of Nutrition*. 24: 526-536.
- Büning-Pfaue, H. 2003. Analysis of water in food by near infrared spectroscopy. *Food Chemistry*. 82: 107-115.
- Caramês, E.T., Alamar, P.D., Poppi, R.J. and Pallone, J.A.L. 2017. Quality control of cashew apple and guava nectar by near infrared spectroscopy. *Journal of Food Composition and Analysis*. 56: 41-46.
- Caramês, E.T., Alamar, P.D., Poppi, R.J. and Pallone, J.A.L. 2016. Rapid assessment of total phenolic and anthocyanin contents in grape juice using infrared spectroscopy and multivariate calibration. *Food Analytical Methods*. 1-7.

- Cen, H. and He, Y. 2007. Theory and application of near infrared reflectance spectroscopy in determination of food quality. *Journal of Food Science and Technology*. 18(2): 72-83.
- Chen, J., Li, L., Yi, R., Xu, N., Gao, R. and Hong, B. 2016. Extraction and characterization of acid-soluble collagen from scales and skin of tilapia (*Oreochromis niloticus*). *LWT-Food Science and Technology*. 66: 453-459.
- Chen, S., Zhang, F., Ning, J., Liu, X., Zhang, Z. and Yang, S. 2015. Predicting the anthocyanin content of wine grapes by NIR hyperspectral imaging. *Food Chemistry*. 172: 788-793.
- Chen, Q., Zhao, J., Chaitep, S., and Guo, Z. 2009. Simultaneous analysis of main catechin contents in green tea (*Camellia sinensis* (L.)) by Fourier transform near infrared reflectance (FT-NIR) spectroscopy. *Food Chemistry*. 113: 1272-1277.
- Chuaychan, S., Benjakul, S. and Kishimura, H. 2015. Characteristics of acid-and pepsin soluble collagens from scale of seabass (*Lates calcarifer*). *LWT-Food Science and Technology*. 63(1): 71-76.
- Cozzolino, D., Kwiatkowski, M.J., Parker, M., Cynkar, W.U., Damberg, R.G., Gishen, M. and Herderich, M.J. 2004. Prediction of phenolic compounds in red wine fermentations by visible and near infrared spectroscopy. *Analytica Chimica Acta*. 513(1): 73-80.
- Colgrave, M.L., Allinghama, P.G. and Jones, A. 2008. Hydroxyproline quantification for the estimation of collagen in tissue using multiple reaction monitoring mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. 1212: 150-153.
- Dai, Z., Wu, Z., Jia, S. and Wu, G. 2014. Analysis of amino acid composition in proteins of animal tissues and foods as pre-column o-phthalaldehyde derivatives by HPLC with fluorescence detection. *Journal of Chromatography B*. 964: 116-127.
- Deák, K., Szigedi, T., Pék, Z., Baranowski, P. and Helyes, L. 2015. Carotenoid determination in tomato juice using near infrared spectroscopy. *International Agrophysics*. 29(3): 275-282.

- Del Rio, D., Rodriguez-Mateos, A., Spencer, J.P., Tognolini, M., Borges, G. and Crozier, A. 2013. Dietary (poly) phenolics in human health: structures, bioavailability, and evidence of protective effects against chronic diseases. *Antioxidants and Redox Signaling*. 18(14): 1818-1892.
- Ding, X., Guo, Y., Ni, Y. and Kokot, S. 2016. A novel NIR spectroscopic method for rapid analyses of lycopene, total acid, sugar, phenols and antioxidant activity in dehydrated tomato samples. *Vibrational Spectroscopy*. 82: 1-9.
- Downey, G. and Kelly, J.D. 2003. Detection and quantification of apple adulteration in diluted and sulphited strawberry and raspberry purées using visible and near infrared spectroscopy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 52(2): 204–209.
- Duan, R., Zhang, J., Du, X., Yao, X. and Konno, K. 2009. Properties of collagen from skin, scale and bone of carp (*Cyprinus carpio*). *Food Chemistry*. 112(3): 702–706.
- Escuredo, O., Seijo, M.C., Salvador, J. and González-Martín, M.J. 2013. Near infrared spectroscopy for prediction of antioxidant compounds in the honey. *Food Chemistry*. 141: 3409–3414.
- Food and drug Administration. 1999. Food. [ออนไลน์]. เข้าถึงเมื่อวันที่ 25 มีนาคม 2559. เข้าถึงได้จาก <http://www.fda.gov>.
- Fernández, B., Andres, S., Prieto, N., Mantecón, A.R. and Giraldez, F.J. 2008. Prediction of chemical composition of sugar beet pulp by near infrared reflectance spectroscopy. *Journal of Near Infrared Spectroscopy*. 16(2): 105.
- Fernandez-Novales, J., Lopez, Ml., Sanchez, M.T., and Morales, J. and Gonzalez-Caballero, V. 2009. Shortwave-near infrared spectroscopy for determination of reducing sugar content during grape ripening, winemaking, and aging of white and red wines. *Food Research International*. 42: 285-291.
- Gelse, K., Poschl, E. and Aigner, T. 2003. Collagens-structure, function and biosynthesis. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 55(12): 1531-1546.

- Guillerminet, F., Beaupied, H., Fabien-Soulé, V., Tomé, D., Benhamou, C.L., Roux, C. and Blais, A. 2010. Hydrolyzed collagen improves bone metabolism and biomechanical parameters in ovariectomized mice: an *in vitro* and *in vivo* study. *Bone*. 46(3): 827-834.
- González-Martín, M.I., Bermejo, C.F., Hierro, J.M.H. and Sánchez González, C.I. 2009. Determination of hydroxyproline in cured pork sausages and dry cured beef products by NIRS technology employing a fibre-optic probe. *Food Control*. 20: 752–755.
- Gómez-Guillén, M.C., Giménez, B., López-Caballero, M.E. and Montero, M.P. 2011. Functional and bioactive properties of collagen and gelatin from alternative sources: A review. *Food Hydrocolloids*. 25(8): 1813–1827.
- Han, Z., Cai, S., Zhang, X., Qian, Q., Huang, Y., Dai, F. and Zhang, G. 2017. Development of predictive models for total phenolics and free p-coumaric acid contents in barley grain by near-infrared spectroscopy. *Food Chemistry*. 227: 342-348.
- Hofman, K., Hall, B., Cleaver, H. and Marshall, S. 2011. High-throughput quantification of hydroxyproline for determination of collagen. *Analytical Biochemistry*. 417: 289–291.
- 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: 303–313.
- Huang, L., Zhou, Y., Meng, L., Wu, D. and He, Y. 2017. Comparison of different CCD detectors and chemometrics for predicting total anthocyanin content and antioxidant activity of mulberry fruit using visible and near infrared hyperspectral imaging technique. *Food Chemistry*. 224: 1-10.
- Huber, L. 1999. *Validation and Qualification in Analytical Laboratories* (Vol. 547). Buffalo Grove: Interpharm Press. Taylor and Francis Group, LLC.
- Hu, J., Li, T., Liu, X. and Liu, D. 2016. Seasonal variation of acid soluble collagens extracted from the swim bladders and skins of bighead carp (*Hypophthalmichthys nobilis*) and grass carp (*Ctenopharyngodon idella*). *Food Bioscience*. 15: 27–33.

- Ingle, P.D., Christian, R., Purohit, P., Zarraga, V., Handley, E., Freel, K. and Abdo, S. 2016. Determination of protein content by NIR spectroscopy in protein powder mix products. *Journal of AOAC International*. 99(2): 360-363.
- Iwai, K., Hasegawa, T., Taguchi, Y., Morimatsu, F., Sato, K., Nakamura, Y. and Ohtsuki, K. 2005. Identification of food-derived collagen peptides in human blood after oral ingestion of gelatin hydrolysates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 53(16): 6531-6536.
- Jeevithan, E., Bao, B., Zhang, J., Hong, S. and Wu, W. 2015. Purification, characterization and antioxidant properties of low molecular weight collagenous polypeptide (37 kDa) prepared from whale shark cartilage (*Rhincodon typus*). *Journal of Food Science and Technology*. 52(10): 6312-6322.
- Johanningsmeier, S.D. and Harris, G.K. 2011: Pomegranate as a functional food and nutraceutical source. *Annual Review of Food Science and Technology*. 2: 181-201.
- Kaewsorn, K. and Sirisomboon, P. 2014. Determination of the gamma-aminobutyric acid content of germinated brown rice by near infrared spectroscopy. *Journal of Near Infrared Spectroscopy*. 22(1): 45-54.
- Khodabakhshian, R., Emadi, B., Khojastehpour, M., Golzarian, M.R. and Sazgarnia, A. 2017. Non-destructive evaluation of maturity and quality parameters of pomegranate fruit by visible/near infrared spectroscopy. *International Journal of Food Properties*. 20(1): 41-52.
- Kittiphattanabawon, P., Benjakul, S., Visessanguan, W., Nagai, T. and Tanaka, M. 2005. Characterisation of acid-soluble collagen from skin and bone of bigeye snapper (*Priacanthus tayenus*). *Food Chemistry*. 89: 363-372.
- Kim, H.K., Kim, Y.H., Park, H.J. and Lee, N.H. 2013. Application of ultrasonic treatment to extraction of collagen from the skins of sea bass *Lateolabrax japonicus*. *Fisheries Science*. 79(5): 849-856.

- Koyama, Y.I., Hirota, A., Takahara, H., Kuwaba, K., Kusubata, M., Matsubara, Y. and Kasugai, S. 2001. Ingestion of gelatin has differential effect on bone mineral density and body weight in protein undernutrition. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*. 47(1): 84-86.
- Kozłowska, J., Sionkowska, A., Skopinska-Wisniewska, J. and Piechowicz, K. 2015. Northern pike (*Esox lucius*) collagen: Extraction, characterization and potential application. *International Journal of Biological Macromolecules*. 81: 220–227.
- 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.
- Lareu, R.R., Zeugolis, D.I., Abu-Rub, M., Pandit, A. and Raghunath, M. 2010. Essential modification of the Sircol Collagen Assay for the accurate quantification of collagen content in complex protein solutions. *Acta Biomaterialia*. 6: 3146–3151.
- Liang, Q., Wang, L., He, Y., Wang, Z., Xu, J. and Ma, H. 2014a. Hydrolysis kinetics and antioxidant activity of collagen under simulated gastrointestinal digestion. *Journal of Functional Foods*. 11: 493–499.
- Liang, Q., Wang, L., Sun, W., Wang, Z., Xu, J. and Ma, H. 2014b. Isolation and characterization of collagen from the cartilage of Amur sturgeon (*Acipenser schrenckii*). *Process Biochemistry*. 49(2): 318–323.
- Lin, Y.K. and Kuan, C.Y. 2010. Development of 4-hydroxyproline analysis kit and its application to collagen quantification. *Food Chemistry*. 119: 1271-1277.
- Liu, H., Xiang, B. and Qu, L. 2006. Structure analysis of ascorbic acid using near-infrared spectroscopy and generalized two-dimensional correlation spectroscopy. *Journal of Molecular Structure*. 794(1): 12-17.
- Liu, X., Tao, L., Du, W., Jin, Y. and Wu, Y. 2015. Quality control of *Ginkgo biloba* leaves by real time release testing in combination with near infrared spectroscopy. *Journal of Near Infrared Spectroscopy*. 23(6): 381-389.
- Liu, R., Qi, S., Lu, J. and Han, D. 2015. Measurement of soluble solids content of three fruit species using universal near infrared spectroscopy models. *Journal of Near Infrared Spectroscopy*. 23(5): 301-309.

- Liu, F., He, Y., Wang, L. and Sun, G. 2011. Detection of organic acids and pH of fruit vinegars using near-infrared spectroscopy and multivariate calibration. *Journal of Food Bioprocess Technology*. 4: 1331-1340.
- Liu, D.S., Liang, L., Regenstein, J.M. and Zhou, P. 2012. Extraction and characterization of pepsin-solubilised collagen from fins, scales, skins, bones and swim bladders of bighead carp (*Hypophthalmichthys nobilis*). *Food Chemistry*. 133: 1441-1448.
- Liu, D., Zhanga, X., Li, T., Yang, H., Zhang, H., Regenstein, J.M. and Zhou, P. 2015. Extraction and characterization of acid-and pepsin-soluble collagens from the scales, skins and swim-bladders of grasscarp (*Ctenopharyngodon idella*). *Food Bioscience*. 9: 68-74.
- Lu, Y., Thomas, L. and Schmidt, S. 2017. Differences in the thermal behavior of beet and cane sucrose sources. *Journal of Food Engineering*. 201: 57-70.
- Magalhães, L.M., Machado, S., Segundo, M.A., Lopes, J.A. and Páscoa, R.N. 2016. Rapid assessment of bioactive phenolics and methylxanthines in spent coffee grounds by FT-NIR spectroscopy. *Talanta*. 147: 460-467.
- Malegori, C., Grassi, S., Marques, E.J.N., de Freitas, S.T. and Casiraghi, E. 2016. Vitamin C distribution in acerola fruit by near infrared hyperspectral imaging. *Journal of Spectral Imaging*. 5(1): a6.
- Manley, M., Joubert, E. and Botha, M. 2006. Quantification of the major phenolic compounds, soluble solid content and total antioxidant activity of green rooibos (*Aspalathus linearis*) by means of near infrared spectroscopy. *Journal of Near Infrared Spectroscopy*. 14(4): 213-222.
- Manfredi, M. and Vignali, G. 2015. Comparative life cycle assessment of hot filling and aseptic packaging systems used for beverages. *Journal of Food Engineering*. 147: 39-48.
- Mareta, W. and Sandstead, H.H. 2006. Zinc requirements and the risks and benefits of zinc supplementation. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*. 20: 3-18.

- Maroulis, M., Monemvasios, I., Vardaka, E. and Rigas, P. 2008. Determination of domoic acid in mussels by HPLC with post-column derivatization using 4-chloro-7-nitrobenzo-2-oxa-1, 3-diazole (NBD-Cl) and fluorescence detection. *Journal of Chromatography B*. 876(2): 245-251.
- Mariani, N.C.T., de Almeida Teixeira, G.H., de Lima, K.M.G., Morgenstern, T.B., Nardini, V. and Júnior, L.C.C. 2015. NIRS and iSPA-PLS for predicting total anthocyanin content in jaboticaba fruit. *Food Chemistry*. 174: 643-648.
- Martelo-Vidal, M.J. and Vázquez, M. 2014. Determination of polyphenolic compounds of red wines by UV-VIS-NIR spectroscopy and chemometrics tools. *Food Chemistry*. 158: 28-34.
- Matsumoto, H. 2006. Clinical effects of fish type I collagen hydrolysate on skin properties. *ITE Letter*. 7: 386-390.
- Mahboob, S. 2015. Isolation and characterization of collagen from fish waste material skin, scales and fins of *Catla catla* and *Cirrhinus mrigala*. *Journal of Food Science and Technology*. 52(7): 4296-4305.
- Matmaroh, K., Benjakul, S., Prodpran, T., Encarnacion, A.B. and Kishimura, H. 2011. Characteristics of acid soluble collagen and pepsin soluble collagen from scale of spotted golden goatfish (*Parupeneus heptacanthus*). *Food Chemistry*. 129(3): 1179-1186.
- Miller, J.C. and Miller, J.N. 1988. *Statistics for Analytical Chemistry*. John Wiley and Sons, New York, NY.
- Momeni, L., Mahmodian, S., Shareghi, B., Saboury, A.A. and Farhadian, S. 2017. The functional and structural stabilization of trypsin by sucrose. *International Journal of Biological Macromolecules*. 99: 343-349.
- Moncada, G.W., Martín, M.I.G., Escuredo, O., Fischer, S. and Míguez, M. 2013. Multivariate calibration by near infrared spectroscopy for the determination of the vitamin E and the antioxidant properties of quinoa. *Talanta*. 116: 65-70.
- Moskowitz, R.W. 2000. Role of collagen hydrolysate in bone and joint disease. *Seminars in Arthritis and Rheumatism*. 30(2): 87-99.

- Munera, S., Besada, C., Aleixos, N., Talens, P., Salvador, A., Sun, D.W. and Blasco, J. 2017. Non-destructive assessment of the internal quality of intact persimmon using colour and VIS/NIR hyperspectral imaging. *LWT-Food Science and Technology*. 77: 241-248.
- Nagai, T., Suzuki, N. and Nagashima, T. 2008. Collagen from common minke whale (*Balaenoptera acutorostrata*) unesu. *Food Chemistry*. 111: 296–301.
- Ncama, K., Opara, U.L., Tesfay, S.Z., Fawole, O.A. and Magwaza, L.S. 2017. Application of Vis/NIR spectroscopy for predicting sweetness and flavour parameters of ‘Valencia’ orange (*Citrus sinensis*) and ‘Star Ruby’ grapefruit (*Citrus x paradisi* Macfad). *Journal of Food Engineering*. 193: 86-94.
- Nicolai, B.M., Beullens, K., Bobelyn, E., Peirs, A., Saeys, W., Theron, K.I. and Lammertyn, J. 2007. Nondestructive measurement of fruit and vegetable quality by means of NIR spectroscopy: A review. *Postharvest Biology and Technology*. 46: 99–118.
- Niu, L., Zhou, X., Yuan, C., Bai, Y., Lai, K., Yang, F. and Huang, Y. 2013. Characterization of tilapia (*Oreochromis niloticus*) skin gelatin extracted with alkaline and different acid pretreatments. *Food Hydrocolloids*. 33: 336–341.
- Nordey, T., Joas, J., Davrieux, F., Chillet, M. and Léchaudel, M. 2017. Robust NIRS models for non-destructive prediction of mango internal quality. *Scientia Horticulturae*. 216: 51-57.
- Núñez-Sánchez, N., Martínez-Marín, A.L., Polvillo, O., Fernández-Cabanás, V.M., Carrizosa, J., Urrutia, B. and Serradilla, J.M. 2016. Near Infrared Spectroscopy (NIRS) for the determination of the milk fat fatty acid profile of goats. *Food Chemistry*. 190: 244-252.
- Oliveira, G.A., Castilhos, F., Renard, C.M.G.C. and Bureau, S. 2014. Comparison of NIR and MIR spectroscopic methods for determination of individual sugars, organic acids and carotenoids in passion fruit. *Food Research International*. 60: 154-162.
- Omar, A.F., Atan, H. and MatJafri, M.Z. 2012a. NIR spectroscopic properties of aqueous acids solutions. *Molecules*. 17(6): 7440-7450.

- Omar, A.F., Atan, H. and MatJafri, M.Z. 2012b. Peak response identification through near-infrared spectroscopy analysis on aqueous sucrose, glucose, and fructose solution. *Spectroscopy Letters*. 45(3): 190-201.
- Osborne, B.G., Fearn, T. and Hindle, P.H. 1993. *Practical NIR Spectroscopy with Applications in Food and Beverage Analysis*. 2nd. Longman Scientific and Technical. UK.
- Osborne, B.G. 2007. Flours and breads. *Near Infrared Spectroscopy in Food Science and Technology*. 281-295.
- Ozaki, Y., McClure, W.F. and Christy, A.A. (Eds.). 2006. *Near-Infrared Spectroscopy in Food Science and Technology*. John Wiley and Sons, Inc. New Jersey.
- Pal, G.K. and Suresh, P.V. 2016. Sustainable valorisation of seafood by-products: Recovery of collagen and development of collagen-based novel functional food ingredients. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*. 37: 201–215.
- Pal, G.K., Nidheesh, T. and Suresh, P.V. 2015. Comparative study on characteristics and in vitro fibril formation ability of acid and pepsin soluble collagen from the skin of catla (*Catla catla*) and rohu (*Labeo rohita*). *Food Research International*. 76: 804–812.
- Pasquini, C. 2003. Near infrared spectroscopy: Fundamentals, practical aspects and analytical applications. *Journal of the Brazilian Chemical Society*. 14(2): 198-219.
- Prevolnik, M., Škrlep, M., Janeš, L., Velikonja-Bolta, S., Škorjanc, D. and Čandek-Potokar, M. 2011. Accuracy of near infrared spectroscopy for prediction of chemical composition, salt content and free amino acids in dry-cured ham. *Meat Science*. 88: 299–304.
- Privalov, P.L. and Tiktopulo, E.I. 1970. Thermal conformational transformation of tropocollagen. I. Calorimetric study. *Biopolymers*. 9(2): 127-139.
- Prockop, D.J. and Udenfriend, S. 1960. A specific method for the analysis of hydroxyproline in tissues and urine. *Analytical Biochemistry*. 1(3): 228-239.
- Rahim, R. and Raman, A.A.A. 2015. Cleaner production implementation in a fruit juice production plant. *Journal of Cleaner Production*. 101: 215-221.

- Ran, X.G. and Wang, L.Y. 2014. Use of ultrasonic and pepsin treatment in tandem for collagen extraction from meat industry by-products. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 94(3): 585-590.
- Redaelli, R., Alfieri, M. and Cabassi, G. 2016. Development of a NIRS calibration for total antioxidant capacity in maize germplasm. *Talanta*. 154: 164-168.
- Rodriguez-Saona, L.E., Fry, F.S., McLaughlin, M.A. and Calvey, E.M. 2001. Rapid analysis of sugars in fruit juices by FT-NIR spectroscopy. *Carbohydrate Research*. 336(1): 63-74.
- Rodríguez-Bernaldo, A., Fernández-Arias, M. and López-Hernández, J. 2009. A screening method for the determination of ascorbic acid in fruit juices and soft drinks. *Food Chemistry*. 116: 509-512.
- Reich, G. 2005. Near-infrared spectroscopy and imaging: Basic principles and pharmaceutical applications. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 57: 1109-1143.
- Rungpichayapichet, P., Mahayothee, B., Khuwijitjaru, P., Nagle, M. and Müller, J. 2015. Non-destructive determination of β -carotene content in mango by near-infrared spectroscopy compared with colorimetric measurements. *Journal of Food Composition and Analysis*. 38: 32-41.
- Scalzo, J., Politi, A., Pellegrini, N., Mezzetti, B. and Battino, M. 2005. Plant genotype affects total antioxidant capacity and phenolic contents in fruit. *Nutrition*. 21(2): 207-213.
- Segtnan, V.H. and Isaksson, T. 2000. Evaluating near infrared techniques for quantitative analysis of carbohydrates in fruit juice model systems. *Journal of Near Infrared Spectroscopy*. 8(2): 109-116.
- Schmutzler, M. and Huck, C.W. 2016. Simultaneous detection of total antioxidant capacity and total soluble solids content by Fourier transform near-infrared (FT-NIR) spectroscopy: a quick and sensitive method for on-site analyses of apples. *Food Control*. 66: 27-37.
- Shafie, K.A., Künnemeyer, R., McGlone, A., Talele, S. and Vetrova, V. 2015. An optimised six-wavelength model for predicting kiwifruit dry matter. *Journal of Near Infrared Spectroscopy*. 23(2): 103-109.

- Shao, Y. and He, Y. 2007. Nondestructive measurement of the internal quality of bayberry juice using Vis/NIR. *Journal of Food Engineering*. 79: 1015–1019.
- Shi, J.Y., Zou, X.B., Zhao, J.W. and Holmes, M. 2012. Near infrared quantitative analysis of total flavonoid content in fresh *Ginkgo biloba* leaves based on different wavelength region selection methods and partial least squares regression. *Journal of Near Infrared Spectroscopy*. 20(2): 295-305.
- Shoulders, M.D. and Raines, R.T. 2009. Collagen structure and stability. *Annual Review of Biochemistry*. 78: 929-958.
- Simon, A., Gast, J. and Keens, A. 1994. U.S. Patent No. 5,309,217. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.
- Sobral, P.J.A., Menegalli, F.C., Hubinger, M.D. and Roques, M.A. 2001. Mechanical, water vapor barrier and thermal properties of gelatin based edible films. *Food Hydrocolloids*. 15(4-6): 423–432.
- Soltanikazemi, M., Abdanan Mehdizadeh, S. and Heydari, M. 2016. Non-destructive evaluation of the internal fruit quality of black mulberry (*Morus nigra* L.) using visible-infrared spectroscopy and genetic algorithm. *International Journal of Food Properties*. 1-11.
- Spinelli, A.C.N., Sant'Ana, A.S., Pacheco-Sanchez, C.P. and Massaguier, P.R. 2010. Influence of the hot-fill water-spray-cooling process after continuous pasteurization on the number of decimal reductions and on *Alicyclobacillus acidoterrestris* CRA 7152 growth in orange juice stored at 35° C. *International Journal of Food Microbiology*. 137(2): 295-298.
- Subedi, P.P., Walsh, K.B. and Hopkins, D.W. 2012a. Assessment of titratable acidity in fruit using short wave near infrared spectroscopy. Part A: establishing a detection limit based on model solutions. *Journal of Near Infrared Spectroscopy*. 20: 449-457.
- Subedi, P.P., Walsh, K.B. and Hopkins, D.W. 2012b. Assessment of titratable acidity in fruit using short wave near infrared spectroscopy. Part B: intact fruit studies. *Journal of Near Infrared Spectroscopy*. 20(4): 459-463.

- Tewari, J., Mehrotra, R. and Irudayaraj, J. 2003. Direct near infrared analysis of sugar cane clear juice using a fibre-optic transmittance probe. *Journal of Near Infrared Spectroscopy*. 11(5): 351-356.
- Tahir, H.E., Xiaobo, Z., Tinting, S., Jiyong, S. and Mariod, A.A. 2016a. Near-Infrared (NIR) Spectroscopy for rapid measurement of antioxidant properties and discrimination of Sudanese honeys from different botanical origin. *Food Analytical Methods*. 9:2631–2641.
- Tahir, H.E., Xiaobo, Z., Jiyong, S., Mariod, A.A. and Wiliam, T. 2016b. Rapid determination of antioxidant compounds and antioxidant activity of Sudanese Karkade (*Hibiscus sabdariffa* L.) using near infrared spectroscopy. *Food Analytical Methods*. 9:1228–1236.
- Tanaka, M., Koyama, Y.I. and Nomura, Y. 2009. Effects of collagen peptide ingestion on UV-B-induced skin damage. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. 73(4): 930-932.
- Torres, I., Pérez-Marín, D., De la Haba, M.J. and Sánchez, M.T. 2017. Developing universal models for the prediction of physical quality in citrus fruits analysed on-tree using portable NIRS sensors. *Biosystems Engineering*. 153: 140-148.
- Usha, R. and Ramasami, T. 2004. The effects of urea and n-propanol on collagen denaturation: using DSC, circular dichroism and viscosity. *Thermochimica Acta*. 409(2): 201-206.
- Vazquez-Ortiz, F.A, Moron-Fuenmayor, O.E. and Gonzalez-Mendez, N.F. 2005. Hydroxyproline measurement by HPLC: Improved method of total collagen determination in meat samples. *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies*. 27(17): 2771-2780.
- Viegas, T.R., Mata, A.L., Duarte, M.M. and Lima, K.M. 2016. Determination of quality attributes in wax jambu fruit using NIRS and PLS. *Food Chemistry*. 190: 1-4.
- Walrand, S., Chiotelli, E., Noirt, F., Mwewa, S. and Lassel, T. 2008. Consumption of a functional fermented milk containing collagen hydrolysate improves the concentration of collagen-specific amino acids in plasma. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 56(17): 7790-7795.

- Wang, H., Liang, Y., Wang, H., Zhang, H., Wang, M. and Liu, L. 2014a. Physical-chemical properties of collagens from skin, scale, and bone of grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*). *Journal of Aquatic Food Product Technology*. 23(3): 264–277.
- Wang, L., Liang, Q., Chen, T., Wang, Z., Xu, J. and Ma, H. 2014b. Characterization of collagen from the skin of Amur sturgeon (*Acipenser schrenckii*). *Food Hydrocolloids*. 38: 104–109.
- Wang, S., Zhao, J., Chen, L., Zhou, Y. and Wu, J. 2014c. Preparation, isolation and hypothermia protection activity of antifreeze peptides from shark skin collagen. *LWT-Food Science and Technology*. 55(1): 210–217.
- Wasswa, J., Tang, J. and Gu, X. 2007. Utilization of fish processing by-products in the gelatin industry. *Food Reviews International*. 23(2): 159–174.
- Wolf, K.L., Sobral, P.J.A. and Telis, V.R.N. 2009. Physicochemical characterization of collagen fibers and collagen powder for self-composite film production. *Food Hydrocolloids*. 23: 1886–1894.
- Williams, P. 2007. Grains and seeds. *Near-Infrared Spectroscopy in Food Science and Technology*. 165–217.
- Wu, X., Cai, L., Cao, A., Wang, Y., Li, T. and Li, J. 2016. Comparative study on acid-soluble and pepsin-soluble collagens from skin and swim bladder of grass carp (*Ctenopharyngodon idella*). *Journal of Science and Food Agriculture*. 96: 815–821.
- Wu, X., Liu, Y., Liu, A. and Wang, W. 2017. Improved thermal-stability and mechanical properties of type I collagen by crosslinking with casein, keratin and soy protein isolate using transglutaminase. *International Journal of Biological Macromolecules*. 98: 292–301.
- Xiaowei, H., Xiaobo, Z., Jiewen, Z., Jiyong, S., Xiaolei, Z. and Holmes, M. 2014. Measurement of total anthocyanins content in flowering tea using near infrared spectroscopy combined with ant colony optimization models. *Food Chemistry*. 164: 536–543.
- Xie, L., Ye, X., Liu, D. and Ying, Y. 2009. Quantification of glucose, fructose and sucrose in bayberry juice by NIR and PLS. *Food Chemistry*. 114(3): 1135–1140.

- Xie, L., Ye, X., Liu, D. and Ying, Y. 2011. Prediction of titratable acidity, malic acid, and citric acid in bayberry fruit by near-infrared spectroscopy. *Food Research International*. 44(7): 2198-2204.
- Yang, H., Wang, Y., Jiang, M., Oh, J., Herring, J. and Zhou, P. 2007. 2-Step optimization of the extraction and subsequent physical properties of channel catfish (*Ictalurus punctatus*) skin. *Journal of Food Science*. 72: 188-195.
- Yang, M., Guo, Z., YU, Q. and Li, R. 2013. Ultrasonic-assisted extraction of collagen. *Journal of Gansu Agricultural University*. 3: 024.
- Zague, V. 2008. A new view concerning the effects of collagen hydrolysate intake on skin properties. *Archives of Dermatological Research*. 300(9): 479-483.
- Zhang, M.H., Luypaert, J., Pierna, J.F., Xu, Q.S. and Massart, D.L. 2004. Determination of total antioxidant capacity in green tea by near-infrared spectroscopy and multivariate calibration. *Talanta*. 62(1): 25-35.
- Zhang, C., Shen, Y., Chen, J., Xiao, P. and Bao, J. 2008. Nondestructive prediction of total phenolics, flavonoid contents, and antioxidant capacity of rice grain using near-infrared spectroscopy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 56(18): 8268-8272.
- Zhang, G. and Ma, Y. 2013. Spectroscopic studies on the interaction of sodium benzoate, a food preservative, with calf thymus DNA. *Food Chemistry*. 141(1): 41-47.
- Zhou, C., Li, Y., Yu, X., Yang, H., Ma, H., Yagoub, A.E.A., Cheng, Y., Hu, J. and Out, P.N.Y. 2016. Extraction and characterization of chicken feet soluble collagen. *LWT-Food Science and Technology*. 74: 145-153.
- Zornoza, R., Guerrero, C., Mataix-Solera, J., Scow, K.M., Arcenegui, V. and Mataix-Beneyto, J. 2008. Near infrared spectroscopy for determination of various physical, chemical and biochemical properties in Mediterranean soils. *Soil Biology and Biochemistry*. 40(7): 1923-1930.





การวิเคราะห์และคำนวณความถูกต้องของสมการมาตรฐาน

1. Residuals (error)

$$e_i = \hat{y}_i - y_i$$

เมื่อ y_i คือ ค่าที่ได้จากวิธีมาตรฐาน

\hat{y}_i คือ ค่าที่ได้จากการทำนายด้วยสมการ

2. Standard error of calibration (SEC)

$$SEC = \left[\frac{\sum d_i^2}{n_c - p - 1} \right]^{1/2}$$

เมื่อ n_c คือ จำนวนของตัวอย่างในกลุ่ม calibration set

p คือ จำนวน terms หรือจำนวนตัวแปรที่ใช้ในการสร้างสมการเทียบมาตรฐาน

3. Bias (systematic error)

สามารถเกิดขึ้นได้เนื่องจากการเปลี่ยนตัวอย่างใหม่ที่ไม่เคยพบในสมการเทียบมาตรฐาน การเปลี่ยนแปลงของเครื่องมือการวิเคราะห์ทางเคมี หรือการเปลี่ยนแปลงกระบวนการผลิต การเตรียมตัวอย่าง ค่า bias คำนวณได้จาก

$$\bar{e} = \frac{1}{n} \sum e_i$$

เมื่อ n คือ จำนวนตัวอย่าง

e_i คือ ค่า residual

Bias เป็น + หากค่าที่ได้จากการทำนายมีค่าต่ำกว่าค่ามาตรฐาน

4. การตรวจสอบ bias (pair t-test)

การตรวจสอบค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของค่า bias สามารถทำได้โดยการใช้ t-test โดยคำนวณค่า bias confidence limits (BCLs), T_b ซึ่งเป็นขีดจำกัดการยอมรับหรือปฏิเสธประสิทธิภาพการทำนายของสมการคำนวณตามสูตรคือ

$$T_b = \pm \frac{t_{(1-\alpha/2)} \times SEP}{\sqrt{n}}$$

เมื่อ α คือ probability of making a type I error, 5%

n คือ จำนวนตัวอย่างในกลุ่มทวนสอบ

t คือ t-value for two-tailed test with deg. of freedom associated SEP

5. Coefficient of determination (R^2)

$$R^2 = \left[1 - \frac{\sum_{i=1}^N (Y_{Ti} - Y_{Pi})^2}{\sum_{i=1}^N (Y_{Ti} - Y_m)^2} \right]$$

เมื่อ Y_{Ti} คือ ค่าที่ได้จากวิธีมาตรฐาน

Y_{Pi} คือ ค่าที่ได้จากสมการทำนาย

Y_m คือ ค่าเฉลี่ยที่ได้จากวิธีมาตรฐาน

6. Standard error of prediction (SEP)

$$SEP = \left[\frac{\sum (d_i - \text{bias})^2}{n_v - 1} \right]^{1/2}$$

เมื่อ n_v คือ จำนวนตัวอย่างในชุดข้อมูลสำหรับตรวจสอบสมการ

d_i คือ ค่าความแตกต่างระหว่างค่าคุณลักษณะทางเคมีที่ได้จากการทำนายด้วยสมการทำนายกับค่าที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยวิธีมาตรฐาน

7. Ratio of standard deviation of reference data in validation set to SEP (RPD)

$$RPD = \frac{SD_{val}}{SEP}$$

8. The unexplained error confidence limits (UECL_c) (F-test, ratio of 2 variances)

- SEP checking

$$T_{UE} = SEC \sqrt{F_{(\alpha, V, M)}}$$

$$SEC = \sqrt{\frac{\sum e_i^2}{n_c - p - 1}}$$

เมื่อ T_{UE} คือ The unexplained error confidence limit (UECL_c)

α คือ probability of making a type I error, 5%

V คือ n-1 (degree of freedom associated with SEP)

M คือ $n_c - p - 1$ (degree of freedom associated with SEC)

$SEP < T_{UE}$; SEP is accepted (at 95% confidence)

- Slope checking

$$T_{obs} = |b - 1| \sqrt{\frac{S_y^2 (n - 1)}{S_{res}^2}}$$

$$S_{res} = \sqrt{\frac{\sum (y_i - a + b\hat{y}_i)^2}{n - 2}}$$

- เมื่อ S_y^2 คือ variance of the n predicted values
 S_{res} คือ residual standard deviation
 a คือ intercept
 b คือ slope

9. การคำนวณร้อยละความคลาดเคลื่อน (% error)

$$\% \text{ error} = \frac{\text{diff}}{\text{ค่าจริง}} \times 100$$

- เมื่อ diff คือ ค่าความแตกต่างระหว่างค่าจริงที่วิเคราะห์ด้วยวิธีมาตรฐานและค่าทำนายที่ได้จากการวัดด้วยเทคนิค NIRS

10. Standard error of the laboratory (SEL) (สำหรับการวิเคราะห์ 2 ซ้ำ)

$$SEL = \left[\frac{\sum_i (x_1 - x_2)^2}{n} \right]^{1/2}$$

- เมื่อ $x_1 - x_2$ คือ ผลต่างระหว่างค่าทางเคมีที่วิเคราะห์ซ้ำของตัวอย่าง i
 n คือ จำนวนตัวอย่างทั้งหมด



ภาคผนวก ข

มหาวิทยาลัยศิลปากร

การวิเคราะห์คุณลักษณะทางเคมีเบื้องต้นและค่าทางเคมีของผลิตภัณฑ์
เครื่องดื่มเพื่อสุขภาพเสริมคอลลาเจน

1. การวิเคราะห์ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด (total soluble solids, TSS)

โดยใช้มาตรฐานนี้ หักเห โดยนำตัวอย่างเครื่องดื่มที่มีการเสริมคอลลาเจนมา มาหยดลงบน Digital refractometer (ภาพที่ 64) และบันทึกค่า



ภาพที่ 64 เครื่อง Digital refractometer

2. การวิเคราะห์ค่าความเป็นกรด - ด่าง

โดยใช้เครื่องวัดความเป็นกรด - ด่าง (pH meter) นำตัวอย่างเครื่องดื่มที่มีการเสริมคอลลาเจนมาวัดค่า pH ด้วยเครื่องวัดความเป็นกรดด่าง (pH meter) โดยจะใช้ตัวอย่าง 10 มิลลิลิตรใส่ลงในบีกเกอร์ และนำหัว probe จุ่มลงในตัวอย่างให้ท่วม บันทึกค่า

3. การวิเคราะห์ค่าสี

โดยใช้เครื่อง Tintometer นำตัวอย่างเครื่องดื่มที่มีการเสริมคอลลาเจน วัดค่าสี (L^* , a^* , b^* , C^* และ h°) ด้วยเครื่อง Tintometer โดยจะใช้ตัวอย่างใส่ลงในคิวเวท และบันทึกค่าดังภาพที่ 65



ภาพที่ 65 เครื่องวัดสี (Tintometer) ที่ใช้ในการวัดเครื่องดื่มที่มีการเสริมคอลลาเจน

ขั้นตอนการใช้งานเครื่องวัดสีสำหรับตัวอย่างที่เป็นของเหลวเริ่มจาก

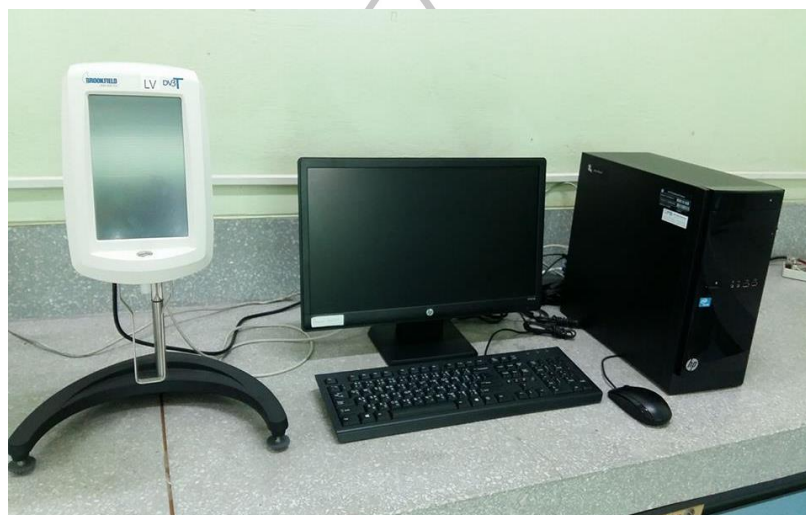
1. เปิดเครื่องโดยการกดปุ่มด้านข้างของเครื่องมือค้างไว้
2. จากนั้น calibration เครื่องมือทุกครั้งที่ใช้ โดยการเลื่อนแถบด้านหลังเครื่อง เพื่อเปิดช่องแสง แล้วกดปุ่มด้านข้างเครื่องค้างไว้เพื่อให้เครื่อง calibrate
3. เทตัวอย่างลงในคิวเวท ปริมาตร 3 มิลลิลิตร
4. เปิดช่องแสงด้านหลังเครื่อง วางเครื่องมือและตัวอย่างลงในอุปกรณ์ดังภาพที่ 66 แล้วกดปุ่มด้านข้างเครื่อง เพื่อทำการวัด โดยทำการกดวัด 3 ครั้ง จากนั้นบันทึกค่าที่ได้จากการเฉลี่ย



ภาพที่ 66 การวางเครื่องมือและตัวอย่างของเครื่องวัดสี

4. การวิเคราะห์ค่าความหนืด

โดยใช้เครื่อง Brookfield Viscomer นำตัวอย่างเครื่องดื่มที่มีการเสริมคอลลาเจน วัดค่าความหนืด โดยใช้เครื่อง Brookfield Viscomer ดังภาพที่ 67 โดยจะใช้ตัวอย่าง 16 มิลลิลิตร ใส่ลงในภาชนะใส่ตัวอย่าง จากนั้นนำหัว probe ชนิด UL ใส่ในตัวอย่าง วัดค่า และบันทึกค่า แสดงดังภาพที่ 68



ภาพที่ 67 เครื่อง Brookfield Viscometer



ภาพที่ 68 ภาชนะใส่ตัวอย่างและหัว probe ชนิด UL ที่ใช้ในการวัดความหนืดผลิตภัณฑ์น้ำผลไม้เสริมคอลลาเจน

ขั้นตอนการใช้เครื่องเริ่มจาก

1. ปรับลูกน้ำ ให้อยู่ที่จุดกึ่งกลางของกรอบ เพื่อตั้งเครื่องให้สมดุล
2. ก่อนเปิดเครื่องให้ถอด guard ที่เครื่องวัด
3. เปิด switch ซึ่งอยู่ด้านหลังฐานของเครื่องทางขวามือ
4. เปิดโปรแกรมคอมพิวเตอร์ RC จากนั้นกด next ที่เครื่อง Brookfield จนถึงหน้า configure viscosity test จากนั้นกดเครื่องหมายรูปบ้าน แล้วเลือก external mode เลือก communication แล้วไปที่ port เลือก com 3 เลือก connect และเลือก dashboard
5. ต่ออุปกรณ์เข้ากับเครื่อง เช่น UL Adapter ใช้ปริมาตร 16 มิลลิลิตร (ความหนืดต่ำ น้อยกว่า 15 cp)
6. ใส่ตัวอย่างให้เรียบร้อย (ใส่ตัวอย่างปริมาตร 16 มิลลิลิตร จุ่มเข็มลงในตัวอย่างจนถึงระดับขีด Mark ที่กึ่งกลางเข็ม โดยใช้มือด้านหนึ่งจับแกนของมอเตอร์ให้นิ่ง ต่อเข็มเข้ากับแกนของมอเตอร์หมุนตามเข็มนาฬิกาจนแน่น)
7. กด new ที่หน้า test จากนั้นเลือก spindle เลือก LV1-3 (ตามเบอร์ที่หัววัดนั้นๆ)
8. จุ่มตัววัดอุณหภูมิ
9. กำหนด speed เพื่อกำหนดความเร็วรอบในการหมุน โดยจะต้องกำหนดค่าเริ่มต้นที่ค่าน้อยๆ ก่อน เช่น 10 rpm แล้วกด set speed อีกครั้ง เพื่อให้เครื่องบันทึก การเลือกความเร็วรอบในการหมุนควรจะให้ค่าใกล้ 100 % TORQUE (ความเร็วรอบสูงสุดที่ใช้จะมีค่าไม่เกิน 250 rpm) ตั้งอุณหภูมิตามเครื่อง เลือกบันทึกข้อมูลแบบ multiple point กำหนดความถี่ในการแสดงข้อมูล เช่น 30 วินาที หรือ 1 นาที จากนั้นกำหนดเวลาในการวัด (end) เลือก collect point at step end เมื่อกำหนดค่าต่างเรียบร้อยแล้ว กด run เพื่อเริ่มวัดตัวอย่าง
10. การเปลี่ยนความเร็วรอบ ให้กลับไปทำตามข้อ 9 ใหม่ การเปลี่ยนความเร็วรอบจะต้องเพิ่มค่าครั้งละน้อยๆ เช่น 10 rpm จนกว่าค่า torque จะมีค่าเข้าใกล้หรือเท่ากับ 100%
 - ถ้าค่า TORQUE ขึ้น error แสดงว่าใช้ความเร็วรอบมากเกินไปต้องลดความเร็วรอบลง
 - ถ้าค่า TORQUE มีค่าต่ำ ทั้งที่ตั้งค่าความเร็วรอบ (rpm) สูงสุดแล้ว แสดงว่าเข็มที่ใช้ไม่เหมาะสม ให้เปลี่ยนหัวเข็มใหม่ หลังจากนั้น ทำตามขั้นตอนที่ 7 ใหม่อีกครั้ง เพื่อเลือกหัววัดที่เหมาะสม
11. เมื่อวัดตัวอย่างเสร็จ ให้นำตัวอย่างออก เลือก return แล้วกด OK แล้วจะปรากฏหน้า main menu แล้วปิด switch ซึ่งอยู่ด้านหลังฐานของเครื่องทางขวามือ และปิดโปรแกรมที่เครื่องคอมพิวเตอร์ ทำความสะอาดเครื่องมือและอุปกรณ์ให้เป็นระเบียบและถูกต้อง

5. การวิเคราะห์ปริมาณคอลลาเจน ด้วยวิธี HPLC (ดัดแปลงจาก Vazquez-Ortiz และคณะ, 2005)

การเตรียมสารเคมี

การเตรียม 6 M HCl ตวงกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 37% ปริมาตร 49.69 มิลลิลิตร จากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นในขวดปรับปริมาตร (Volumetric Flask) ขนาด 100 มิลลิลิตร

การเตรียม 1 M HCl ตวงกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 37% ปริมาตร 8.28 มิลลิลิตร จากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นในขวดปรับปริมาตร (Volumetric Flask) ขนาด 100 มิลลิลิตร

การเตรียม 1 M NaOH ปริมาตร 100 มิลลิลิตร โดยชั่ง NaOH หนัก 4.00 กรัม ลงในบีกเกอร์ เติมน้ำ ละลายสารลงในบีกเกอร์ขนาด 100 มิลลิลิตร กวนจนสารละลายหมด จากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นในขวดปรับปริมาตร (Volumetric Flask) ขนาด 100 มิลลิลิตร

การเตรียมสัดส่วนของเฟสเคลื่อนที่

การเตรียม 0.053 M Sodium dihydrogen phosphate ($\text{NaH}_2\text{PO}_4\text{-H}_2\text{O}$) pH 7.8 ปริมาตร 1 ลิตร โดยชั่ง $\text{NaH}_2\text{PO}_4\text{-H}_2\text{O}$ หนัก 7.3135 กรัม ลงในบีกเกอร์ เติมน้ำกลั่น ละลายสารลงในบีกเกอร์ขนาด 1,000 มิลลิลิตร และเติมน้ำกลั่นเพิ่มลงให้ได้ประมาณ 800 มิลลิลิตร ปรับ pH ให้ได้ 7.8 ด้วย 4 M Potassium hydroxide (KOH) จากนั้นเทสารละลายที่ได้ลงในขวดปรับปริมาตรขนาด 1,000 มิลลิลิตร และปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น

การเตรียม 4 M Potassium hydroxide (KOH) 250 มิลลิลิตร โดยชั่ง KOH หนัก 56.1056 กรัม ลงในบีกเกอร์ขนาด 250 มิลลิลิตร กวนจนสารละลายหมด จากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นในขวดปรับปริมาตร (Volumetric Flask) ขนาด 250 มิลลิลิตร

เฟสเคลื่อนที่แบบ Gradient เฟสเคลื่อนที่ A : potassium dihydrogen phosphate pH 7.8

เฟสเคลื่อนที่ B : MeOH : ACN : น้ำกลั่น ในอัตราส่วน 45 : 40 : 15 (v/v/v)

จากนั้นกรองโมบายเฟสด้วย Nylon filter membranes ขนาด 47 มิลลิลิตร 0.22 μm

การเตรียมสารทำอนุพันธ์ (เก็บที่ 4 °C)

การเตรียม 0.4 M Borate buffer pH 10.4 ประกอบด้วย Boric acid 2.47 กรัม ลงในบีกเกอร์ขนาด 100 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่น 80 มิลลิลิตร กวนจนสารละลายหมด ปรับ pH ให้ได้ 9.3 ด้วย 4 M Potassium hydroxide (KOH) แล้วถ่ายสารละลายที่ได้ลงในขวดปรับปริมาตร (Volumetric flask) ขนาด 100 มิลลิลิตร และปรับปริมาตรให้ได้ด้วยน้ำกลั่น

การเตรียม 0.2% 4-chloro-7-nitrobenzofurazan (NBD-Cl) ในเมทานอล โดยชั่ง NBD-Cl 0.02 กรัม ลงในขวดปรับปริมาตรขนาด 10 มิลลิลิตร เติมเมทานอล (HPLC grade) ปรับปริมาตรให้ได้ 10 มิลลิลิตร

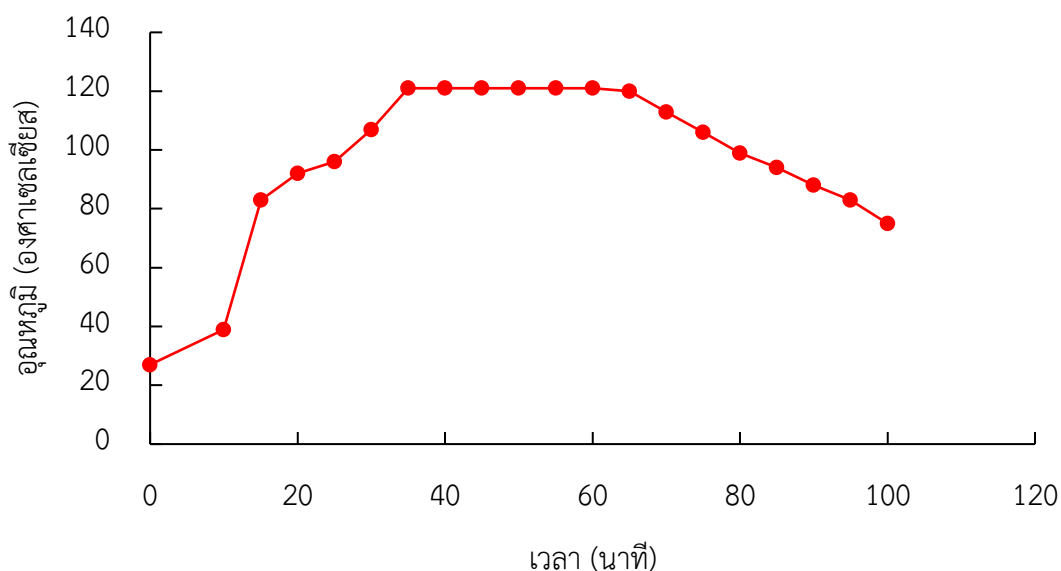
การเตรียมสารละลายคอลลาเจน

การเตรียมสารมาตรฐาน 4-ไฮดรอกซีโพรลีน ซึ่งสารมาตรฐาน 4-Hydroxyproline ด้วยเครื่องชั่งละเอียดทศนิยม 4 ตำแหน่ง จำนวน 0.1000 ± 0.0005 กรัม ละลายและปรับปริมาตรในขวดปรับปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น (Distilled Water) (pH 7.0) ให้ได้ความเข้มข้น 1,000 mg/L

การเตรียมสารมาตรฐาน โดยการเปิดสารละลาย Stock solution ปริมาตร 50 100 200 500 800 และ 1,000 ไมโครลิตร ลงในขวดปรับปริมาตรขนาด 10 มิลลิลิตร แต่ละขวดปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น จะได้สารมาตรฐาน 4-ไฮดรอกซีโพรลีน ความเข้มข้น 5 10 20 50 80 และ 100 mg/L ตามลำดับ

การเตรียมตัวอย่าง

ชั่งตัวอย่างประมาณ 5.0000 ± 0.0010 กรัม ด้วยเครื่องชั่งละเอียด 4 ตำแหน่ง ใส่ในขวดสีชา ปริมาตร 25 มิลลิลิตร ที่มีฝาปิด เพื่อป้องกันการสัมผัสกับอากาศ จากนั้นเติม 6 M HCl 5 มิลลิลิตร เขย่าเบาๆ ให้เข้ากันด้วย Vortex mixer เป็นเวลา 10 วินาที แล้วนำไปย่อยด้วย Autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที แสดงอุณหภูมิและเวลาที่ใช้ในการย่อยตัวอย่าง ดังภาพที่ 69 ทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง นำสารละลายตัวอย่างที่ผ่านการย่อย มาระเหยตัวทำละลายด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 150 rpm เป็นเวลา 10 นาที จนสารละลายแห้งสนิท นำสารละลายที่แห้งแล้วมาปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น 5 มิลลิลิตร ด้วยขวดปรับปริมาตร 5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน และกรองสารละลายด้วย Nylon Syringe Filter ขนาด 13 มิลลิลิตร 0.22 ไมโครเมตร (μm) เก็บส่วนใสของตัวอย่างไว้ เพื่อใช้ในการวิเคราะห์ต่อไป



ภาพที่ 69 อุณหภูมิและเวลาที่ใช้ในการย่อยตัวอย่างด้วยเครื่อง Autoclave

การทำอนุพันธ์ตัวอย่าง

นำสารละลายส่วนใสจากข้างต้น ปิเปตสารละลาย 1,250 ไมโครลิตร จากนั้นเจือจางให้เป็น 5 มิลลิลิตร ด้วย 0.4 M Borate buffer pH 10.4 จากนั้น ปิเปต 250 ไมโครลิตร ของสารละลายตัวอย่าง ผสมกับ 250 ไมโครลิตร ของ 0.2% 4-chloro-7-nitrobenzofurazan (NBD-Cl) ผสมให้เข้ากัน นำไปให้ความร้อนที่ 60 ± 1 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นหยุดปฏิกิริยา โดยเติม 50 ไมโครลิตร 1 M HCl จากนั้นทำให้เย็นทันทีที่ 0 ± 1 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที กรองสารละลายด้วย Nylon Syringe Filter ขนาด 13 มิลลิลิตร 0.22 ไมโครเมตร แล้วนำสารละลายปริมาตร 10 ไมโครลิตร มาวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC ตามสภาวะตั้งตารางที่ 26

ตารางที่ 26 สภาวะสำหรับการวิเคราะห์หาปริมาณคอลลาเจนด้วย HPLC

ตัวแปร	สภาวะที่เหมาะสม
คอลัมน์	คอลัมน์ Luna C18 (2) 100 อังสตรอม ขนาด 250x4.6 มิลลิเมตร (column, Phenomenex, Torrance, USA)
ความยาวคลื่นที่ให้พลังงานกับสาร	465 นาโนเมตร
ความยาวคลื่นที่สารดูดกลืน	535 นาโนเมตร
ประเภทของเครื่องตรวจวัด	fluorescence detector
อุณหภูมิที่ทดสอบ	30 องศาเซลเซียส
ปริมาตรของสารที่ฉีดเข้าเครื่อง	10 ไมโครลิตร (μl)
อัตราการไหล	0.8 มิลลิลิตรต่อนาที (mL/min)
ระยะเวลาในการฉีด	65 นาที (min)
สัดส่วนของเฟสเคลื่อนที่	เฟสเคลื่อนที่ A : โฟแทสเซียม ไดไฮโดรเจนฟอสเฟต pH 7.8 เฟสเคลื่อนที่ B : เมทานอลต่ออะซีโตนไตรลต่อน้ำกลั่น ในอัตราส่วน 45 : 40 : 15 (v/v/v)

การตรวจสอบความแม่นยำของวิธีวิเคราะห์

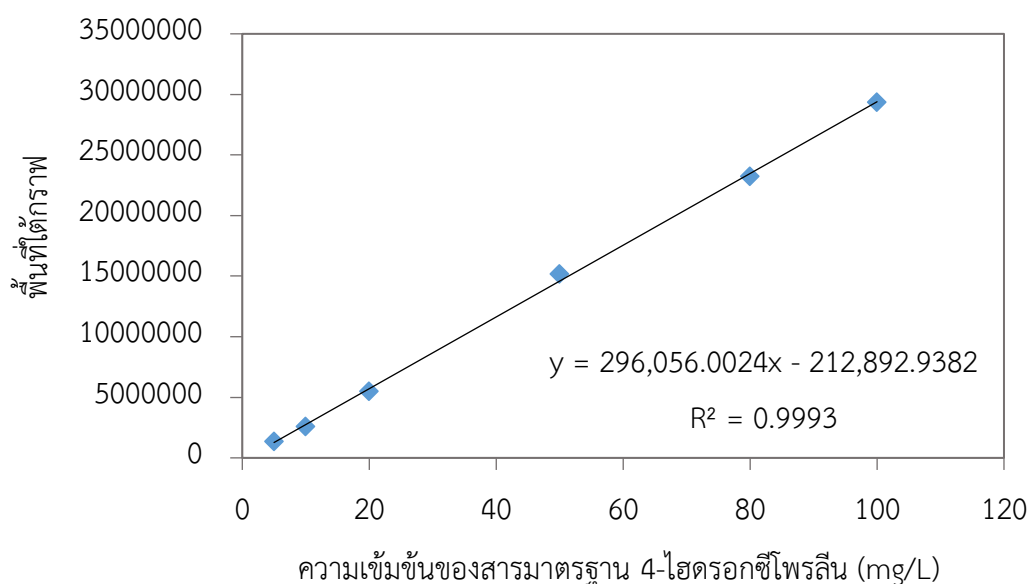
การพิสูจน์ช่วงของการวัด (Working Range) และ ความเป็นเส้นตรง (Linearity) โดยเตรียมสารละลายมาตรฐานความเข้มข้นอย่างน้อย 6 ระดับ ความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ นำไปวิเคราะห์แบบ pre-column HPLC และวัดสัญญาณหรือ พื้นที่ใต้กราฟ (peak area) ด้วยเครื่องตรวจวัดแบบ Fluorescent detector จากนั้นหาความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงระหว่างพื้นที่ใต้กราฟ (แกน y) และความเข้มข้น (แกน x) สร้างกราฟมาตรฐาน แสดงดังภาพที่ 70

ประเมินความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐาน โดยการคำนวณหาค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (Correlation coefficient, r) ซึ่งค่าที่ได้ควรเข้าใกล้ 1 และ ภาพที่ 71 แสดงโครมาโตแกรมผลการวิเคราะห์ 4-ไฮดรอกซีโปรลีน โดยใช้ NBD-Cl และการเตรียมอนุพันธ์ ในตัวอย่างเครื่องต้มในภาชนะบรรจุปิดสนิทที่ผสมคอลลาเจน

ตารางที่ 27 แสดงความเข้มข้นของสารมาตรฐานในช่วงความเข้มข้น 5 10 20 50 80 และ 100 mg/L ตามลำดับ นำมาวิเคราะห์หาปริมาณ โดยเทียบระยะเวลาที่พบสาร (Retention time) เดียวกัน เพื่อยืนยันว่าเป็นสารชนิดเดียวกัน โดยทำการวิเคราะห์ความเข้มข้นละ 2 ซ้ำ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าพื้นที่ใต้กราฟ (Peak area) ของสารมาตรฐานแต่ละความเข้มข้นมีความเที่ยงที่อยู่เกณฑ์การยอมรับ

ตารางที่ 27 พื้นที่ใต้กราฟของสารมาตรฐาน 4-ไฮดรอกซีโพรลีน ที่ความเข้มข้นต่างๆ

ความเข้มข้นสาร มาตรฐาน (mg/L)	พื้นที่ใต้กราฟ (Peak Area)			SD	%RSD
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ค่าเฉลี่ย		
5	5.811	4.809	5.310	0.709	13.345
10	8.539	10.284	9.411	1.234	13.107
20	19.160	19.374	19.267	0.151	0.786
50	52.865	51.069	51.967	1.270	2.443
80	80.357	78.030	79.194	1.646	2.078
100	97.017	102.686	99.852	4.008	4.014



ภาพที่ 70 กราฟมาตรฐานสาร 4-ไฮดรอกซีโพรลีน

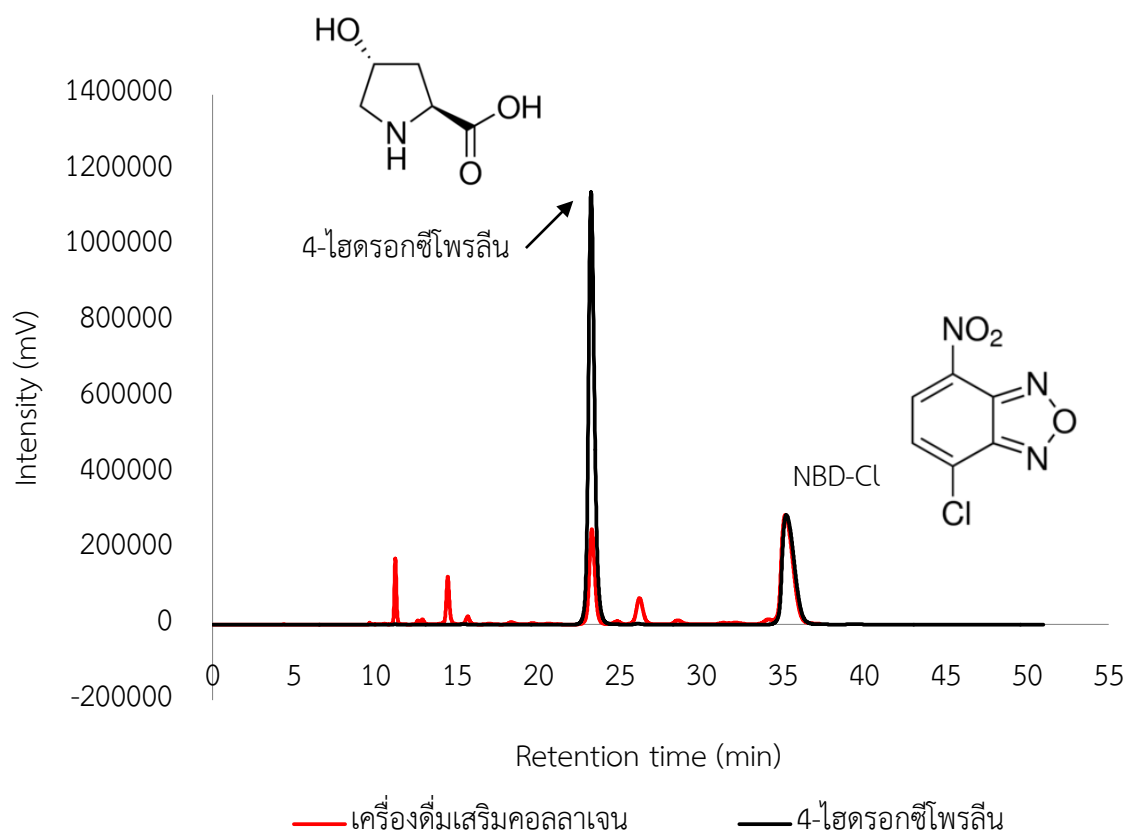
จากสมการเส้นตรง $y = 296,056X - 212,892$ พบว่าค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (Correlation coefficient, r) มีค่าเท่ากับ 0.9993 ซึ่งมีค่ามากกว่าเกณฑ์การยอมรับคือ 0.995 ดังนั้นช่วงของการวิเคราะห์ (Working Range) ที่มีความเป็นเส้นตรง (Linearity) ในช่วงของการใช้งานสารมาตรฐาน 5-100 mg/L

พิสูจน์ความแม่นยำ (Accuracy) โดยคัดเลือกตัวอย่างเครื่องดื่มในภาชนะบรรจุปิดสนิท มาวิเคราะห์หาปริมาณคอลลาเจน (C_2 : unspiked sample) เติมน้ำมาตรฐาน 4-ไฮดรอกซีโพรลีน ที่ทราบความเข้มข้น 20, 50 และ 80 mg/L (C_3) วิเคราะห์หาปริมาณคอลลาเจน ความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ (C_1 : spiked sample) แล้วคำนวณค่าเฉลี่ยโดยนำ % Recovery ที่ได้มาเปรียบเทียบกับเกณฑ์การยอมรับของตามมาตรฐาน AOAC (1993) คำนวณ % Recovery ดังนี้

$$\% \text{ Recovery} = \frac{(C_1 - C_2)}{C_3} \times 100$$

พบว่าหลังจากที่เติมน้ำละลายมาตรฐาน 4-ไฮดรอกซีโพรลีน ที่ระดับความเข้มข้น 20, 50 และ 80 (ต่ำ กลาง และสูง) ลงในตัวอย่างที่เป็นเครื่องดื่มในภาชนะบรรจุปิดสนิท และนำมาวิเคราะห์หาเปอร์เซ็นต์การคืนกลับ (% Recovery) พบว่าที่ระดับความเข้มข้นของสารมาตรฐาน 4-ไฮดรอกซีโพรลีน 20 mg/L, 50 mg/L และ 80 mg/L พบ % Recovery เฉลี่ยเท่ากับ 87.49 85.06 และ 90.67 ตามลำดับ ซึ่งอยู่ในช่วงเกณฑ์การยอมรับ คือ 80-110% ที่ระดับของสารที่สนใจไม่เกิน 100 mg/L จึงสามารถสรุปได้ว่าวิธีการวิเคราะห์นี้มีความแม่นยำในช่วงของการใช้งานสารมาตรฐาน 5-100 mg/L





ภาพที่ 71 โครมาโตแกรมผลการวิเคราะห์ 4-ไฮดรอกซีโพรลีน โดยใช้ NBD-Cl ในการเตรียมอนุพันธ์
ในตัวอย่างผลิตภัณฑ์น้ำผลไม้เสริมคอลลาเจน





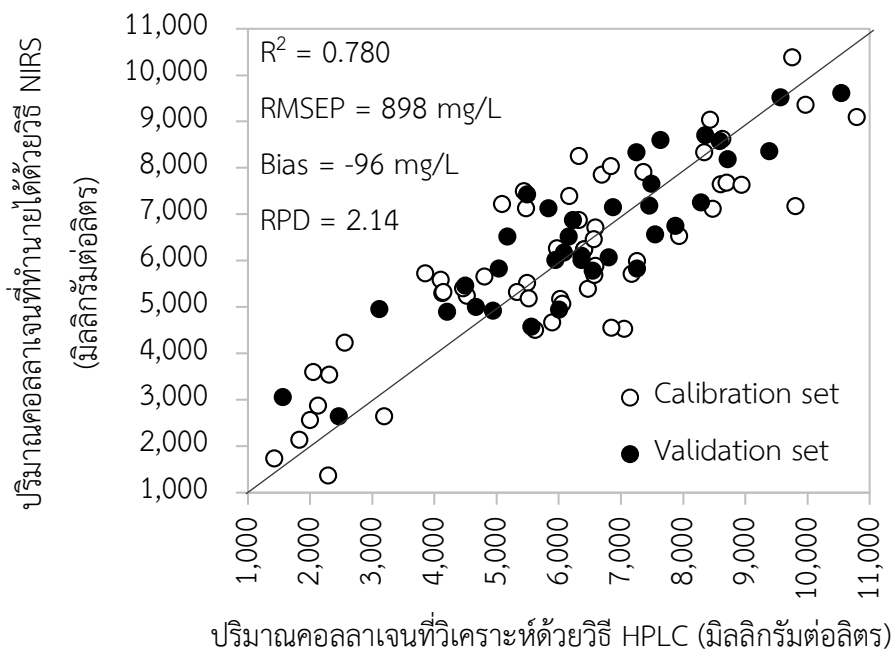
ภาคผนวก ค

ตรวจสอบความแม่นยำของสมการเทียบมาตรฐาน

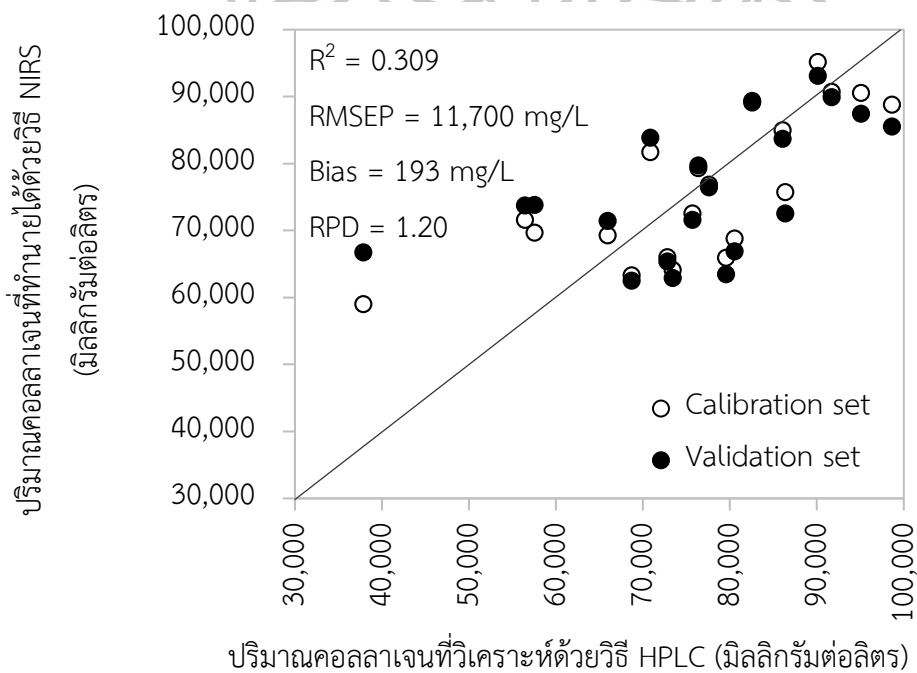
เมื่อทำการตรวจสอบความแม่นยำของสมการทำนายตามมาตรฐาน ISO 12099 ได้แก่ การตรวจสอบ Bias SEP และ Slope โดยตรวจสอบค่าความผิดพลาดเฉลี่ยในการทำนาย (bias) โดยการเปรียบเทียบค่าทางเคมีหรือค่าที่วิเคราะห์ได้จากวิธีมาตรฐานกับค่าที่ทำนายได้จากสมการทำนายด้วยการทดสอบ pair t-test ตามสูตรที่แสดงไว้ในภาคผนวก ก โดยค่า bias ที่ได้ต้องมีค่าน้อยกว่า T_b ซึ่งหมายถึงค่าที่ทำนายได้จากสมการทำนายไม่แตกต่างจากค่าทางเคมีอย่างมีนัยสำคัญ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% หรือ P น้อยกว่าหรือเท่ากับ 0.05 พิจารณาค่าความผิดพลาดมาตรฐานในการทำนายของกลุ่มตัวอย่างทวนสอบสมการ (SEP) ซึ่งการตรวจสอบค่า unexplained error confidence limits (UECLs, TUE) คำนวณได้จาก F-test โดยค่า SEP ที่ได้ควรมีค่าน้อยกว่าค่า TUE และตรวจสอบค่าความชัน (slope) ของกราฟการกระจาย ตามสูตรในภาคผนวก ก พิจารณาค่า t_{obs} โดยค่า t_{obs} ที่ได้ต้องน้อยกว่าค่า t-value โดยค่าความชันที่ดีที่สุดควรมีค่าเท่ากับ 1 เพื่อให้ได้สมการที่มีความแม่นยำต่อการนำไปใช้วิเคราะห์ได้ดีที่สุด ดังตารางที่ 28

ตารางที่ 28 การตรวจสอบความแม่นยำของสมการเทียบมาตรฐานผลิตภัณฑ์น้ำผลไม้เสริมคอลลาเจน

สมการ	bias checking	SEP checking	Slope checking	ความสามารถในการนำไปใช้จริง
114 ตัวอย่าง	✓	✓	✓	✓
109 ตัวอย่าง	✓	✓	✓	✓
ช่วงความเข้มข้นต่ำ	✓	✓	✓	✓
ช่วงความเข้มข้นสูง	✓	✓	✓	✓



ภาพที่ 72 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณคอแลเจนที่วัดได้จริงกับปริมาณคอแลเจนที่ทำนายได้ที่ช่วงความเข้มข้นต่ำ

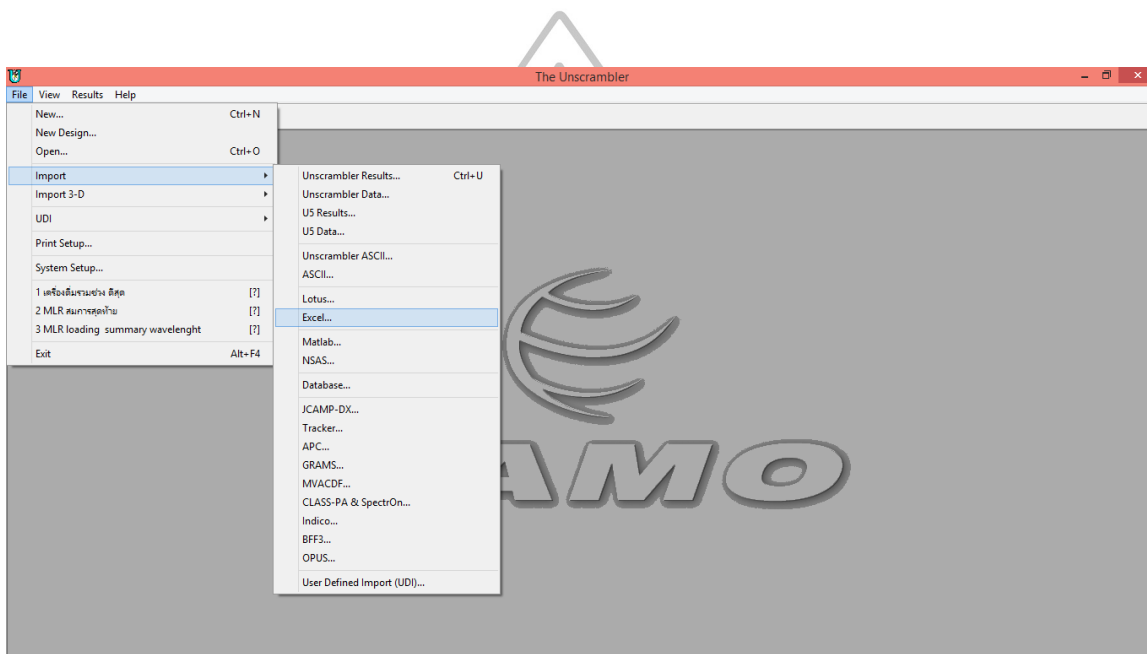


ภาพที่ 73 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณคอแลเจนที่วัดได้จริงกับปริมาณคอแลเจนที่ทำนายได้ที่ช่วงความเข้มข้นสูง

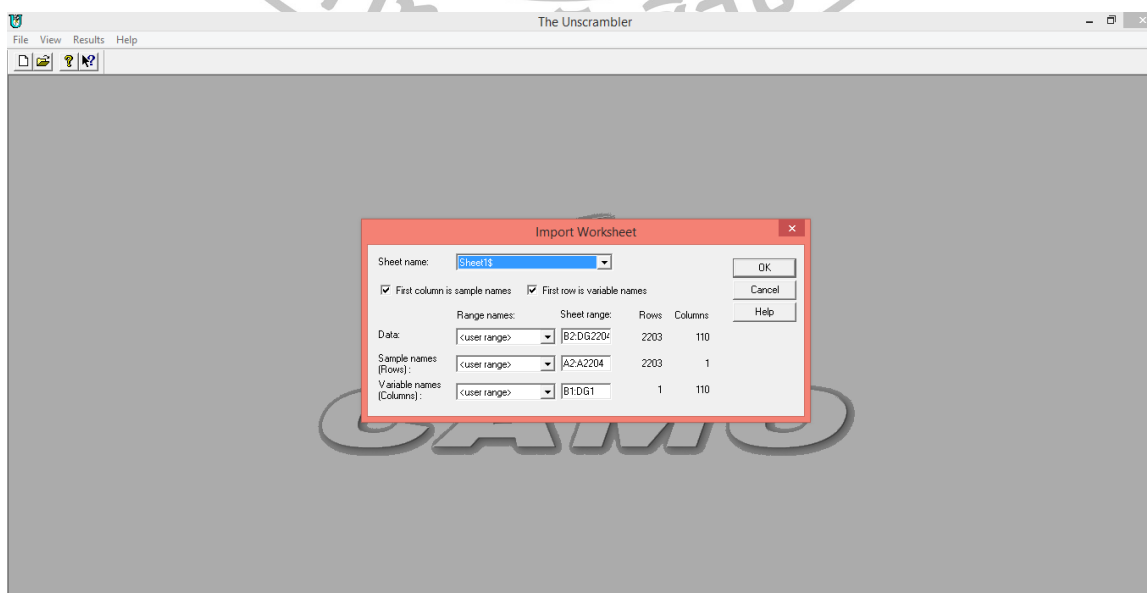


ขั้นตอนการสร้างสมการเทียบมาตรฐานด้วยวิธี MLR

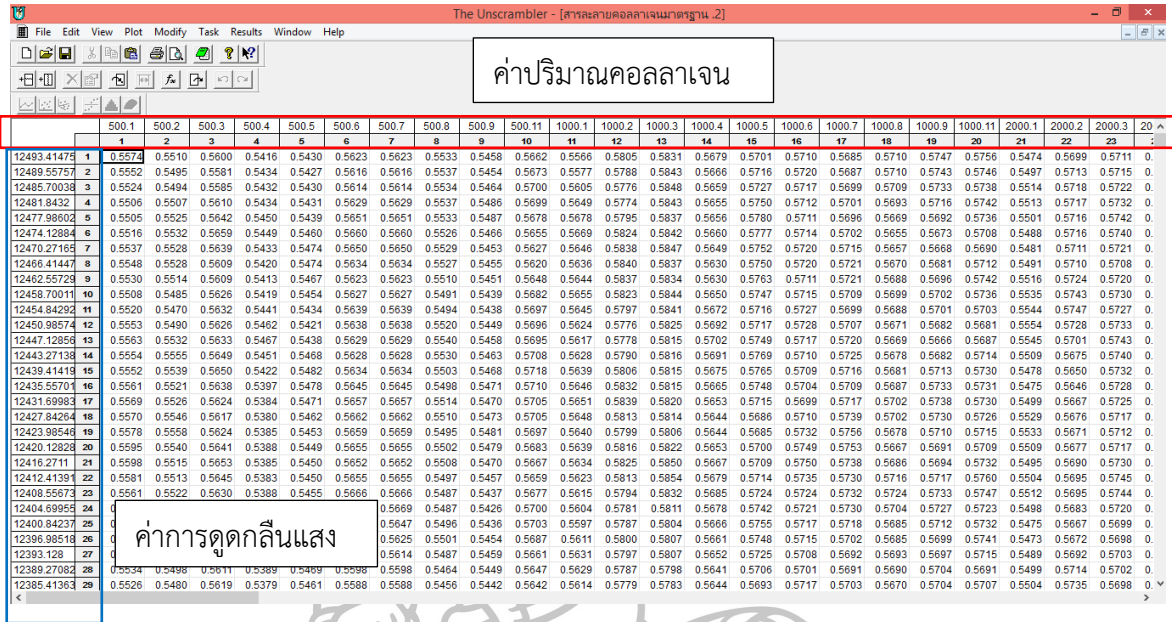
1. เรียงข้อมูลค่าการดูดกลืนแสงให้อยู่ในไฟล์ excel เดียวกัน จากนั้น save ไฟล์เป็น excel 2003
2. เปิดโปรแกรม The Unscrambler (Camo, Oslo, Norway) โหลดไฟล์ excel โดยเลือกที่ flie → import → excel ดังภาพ



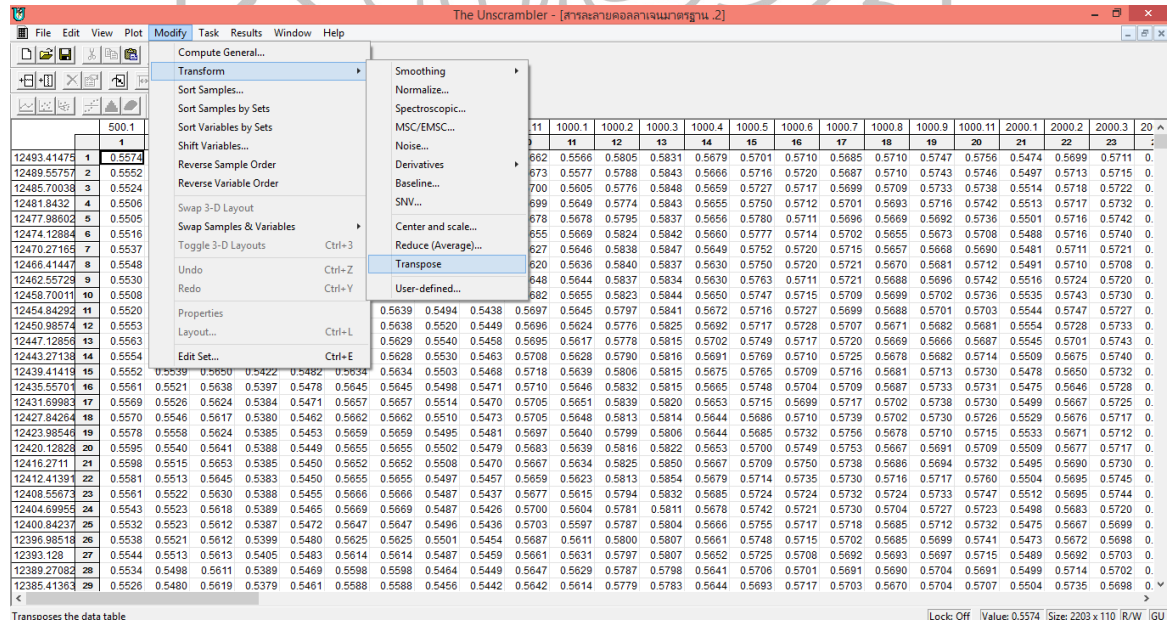
3. จากนั้นจะขึ้นหน้าต่างเหมือนดังภาพที่ แล้วกด ok



4. เมื่อกด ok แล้ว จะแสดงเป็นหน้าต่างดังภาพ โดยจะแสดงเป็นค่าปริมาณคอลลาเจนที่แต่ละเลขคลื่น (แกนนอน) และค่าการดูดกลืนแสง (แกนตั้ง)



5. กลับแกน โดยไปที่ modify → transform → transpose เพื่อสลับแกนนอนและแกนตั้ง



6. หน้าต่างที่กลับแกนเรียบร้อยแล้วแสดงดังภาพ เพื่อที่จะกรอกค่าทางเคมี

The screenshot shows the 'The Unscrambler' software window. The title bar reads 'The Unscrambler - [สสารหลายคอลจากขนาดฐาน_2]'. The menu bar includes File, Edit, View, Plot, Modify, Task, Results, Window, and Help. Below the menu is a toolbar with various icons. The main area is a data table with 28 columns and 20 rows. The columns are numbered 1 through 28, and the rows are numbered 500.1 through 2000.9. Each cell in the table contains a numerical value, such as 0.5574 in the first cell of the first row. At the bottom of the window, there is a status bar with the text 'Lock: Off Value: 0.5574 Size: 110 x 2203 R/W IGU'.

7. โดยขั้นตอนนี้จะทำการกรอกค่าทางเคมีในคอลัมน์สุดท้าย โดยจะคลิกขวาที่คอลัมน์สุดท้าย และเลือก Insert Variable

The screenshot shows the 'The Unscrambler' software window. The title bar reads 'The Unscrambler - [สสารหลายคอลจากขนาดฐาน_2]'. The menu bar includes File, Edit, View, Plot, Modify, Task, Results, Window, and Help. Below the menu is a toolbar with various icons. The main area is a data table with 20 columns and 20 rows. The columns are numbered 2181 through 2200, and the rows are numbered 500.1 through 2000.9. Each cell in the table contains a numerical value, such as 1.4551 in the first cell of the first row. A context menu is open over the last column (2200), showing options like 'Insert Variable', 'Delete', 'Split Category Variable', 'Adjust Width', 'Layout...', and 'Properties...'. At the bottom of the window, there is a status bar with the text 'Lock: Off Value: 0.5574 Size: 110 x 2203 R/W IGU'.

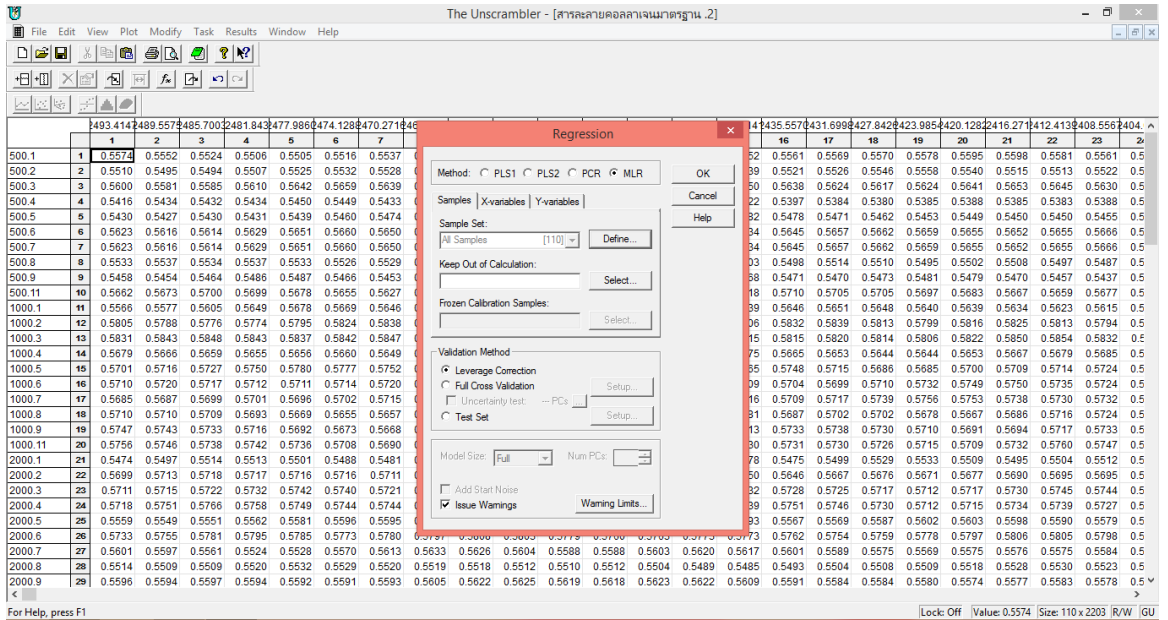
8. จะได้ตารางดังภาพ จากนั้นทำการกรอกข้อมูลทางเคมีได้ทัน

The screenshot shows a data table in The Unscrambler software. The table has 29 rows (labeled 500.1 to 2000.9) and 22 columns (labeled 1 to 22). The data consists of numerical values for each cell. A red box highlights the rightmost columns of the table.

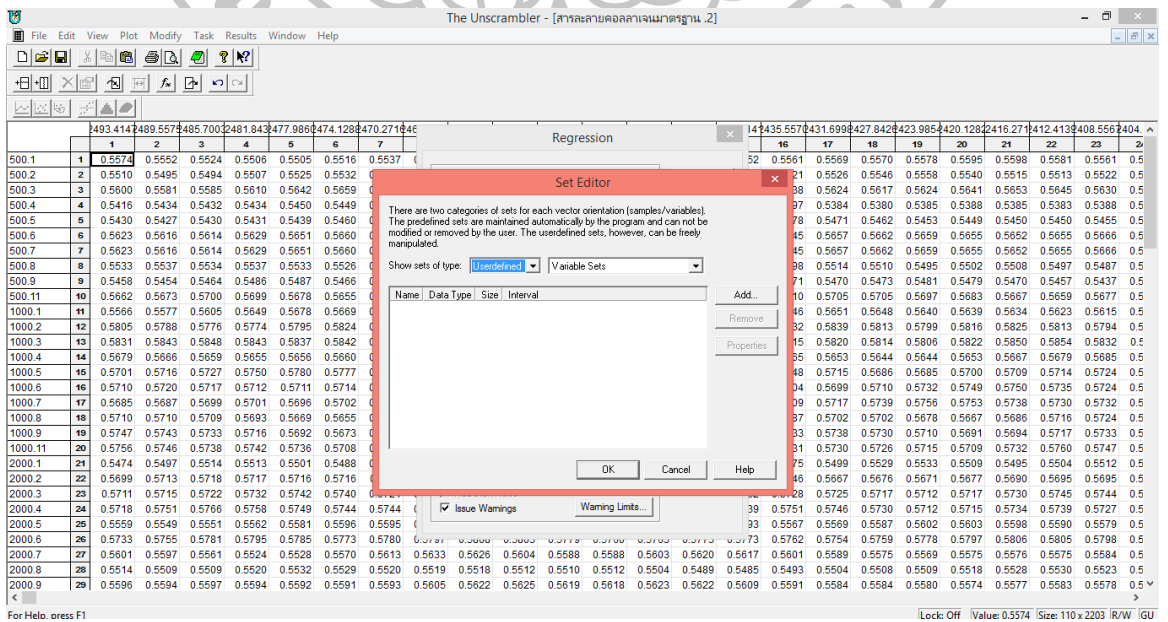
9. เมื่อมีค่าการดูดกลืนแสงและค่าทางเคมีแล้ว จะสร้างสมการเทียบมาตรฐาน โดยไปที่ Task และเลือก Regression

The screenshot shows the 'Task' menu in The Unscrambler software, with 'Regression...' selected. Below the menu, a data table is visible with 29 rows (labeled 500.1 to 2000.9) and 22 columns (labeled 1 to 22). The data consists of numerical values for each cell. A red box highlights the 'Regression...' option in the menu.

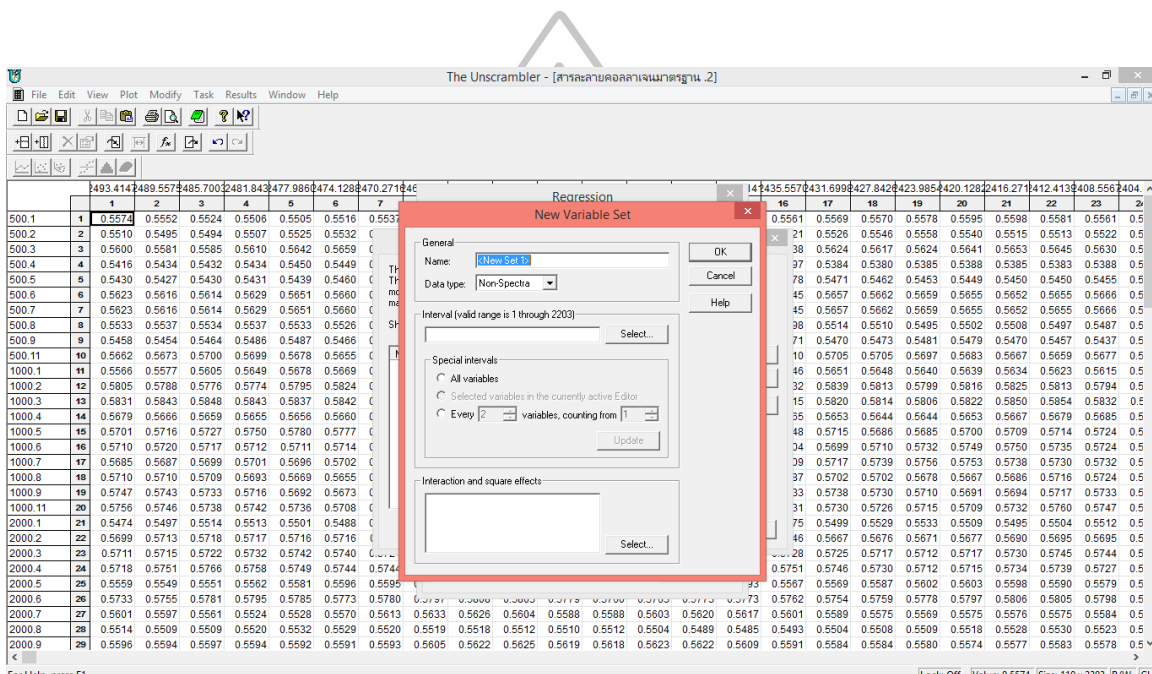
10. แสดงหน้าต่างดังภาพ จากนั้น กดเลือกการสร้างสมการแบบ MLR จากนั้นจะกำหนดค่า X-variables และ Y-variables โดย X-variables จะเป็นค่าการดูดกลืนแสง และ Y-variables เป็นค่าทางเคมี



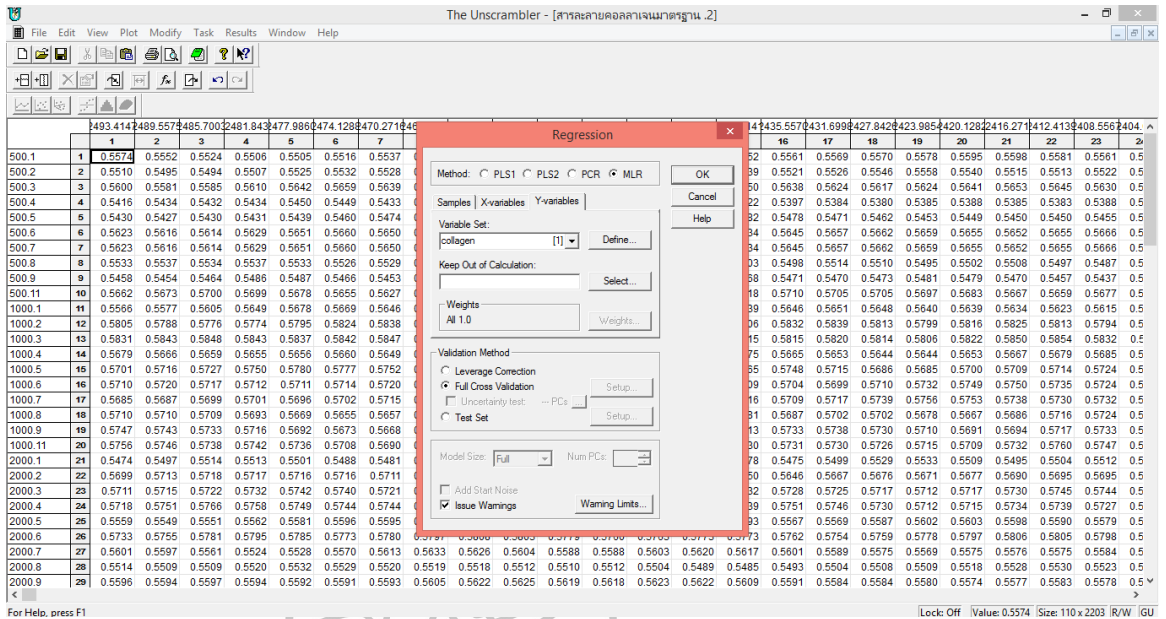
11. กำหนดค่า X-variables และ Y-variables โดยกดที่ Define จะแสดงหน้าต่างดังภาพ



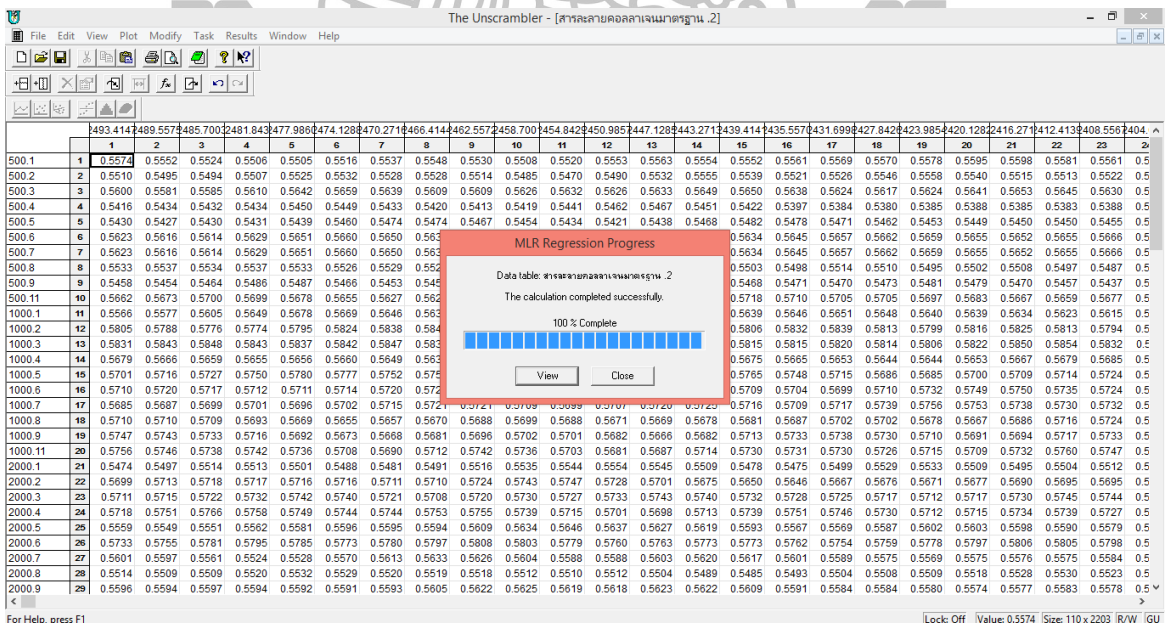
12. จากนั้นกด Add เพื่อกรอกข้อมูล X-variables และ Y-variables โดยจะกรอกค่าที่ช่อง Interval โดยในการเลือกค่า X- variables จะต้องทำการคัดเลือกความยาวคลื่นที่มีความสัมพันธ์กับตัวแปรตามที่จะทำนาย โดยพิจารณาเลขคลื่นสำคัญจากกราฟสัมประสิทธิ์การถดถอยร่วมกับเลขคลื่นอ้างอิงจากหนังสือหรือเปรียบเทียบกับสเปกตรัมขององค์ประกอบที่ต้องการศึกษาที่เป็นสารบริสุทธิ์ เมื่อกรอกค่าดังกล่าวเรียบร้อยแล้วกด ok จากนั้นจะกรอกค่า Y- variables (ค่าทางเคมี) โดยทำเหมือนข้อ 11



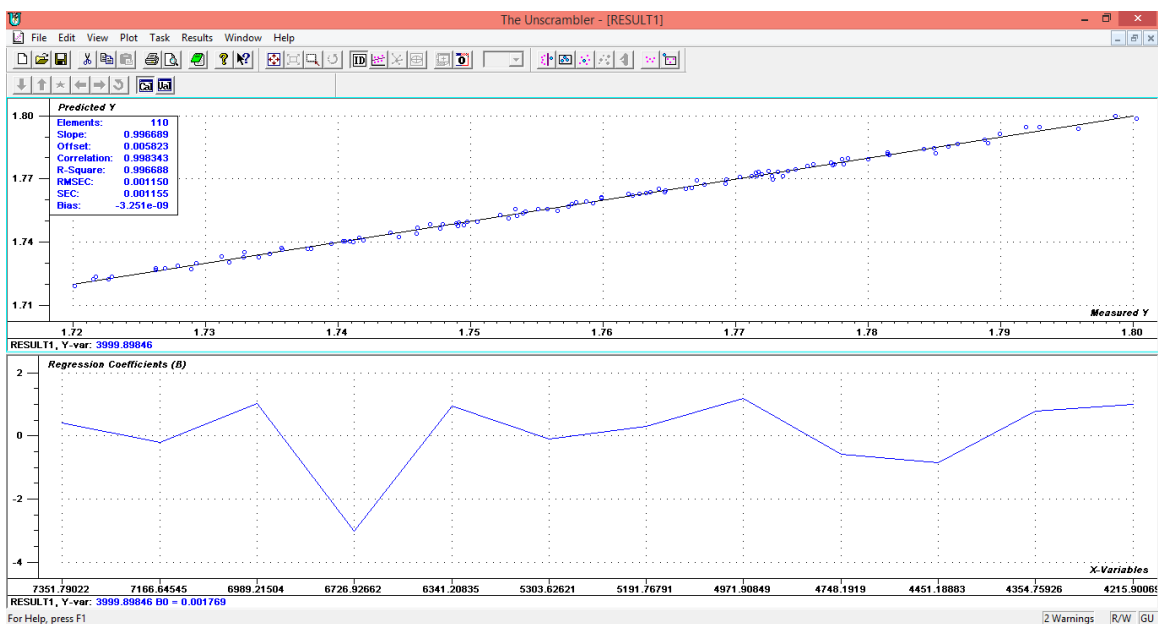
13. เมื่อกรอกข้อมูล X-variables และ Y-variables แล้วจะเลือก Validation method โดยในการศึกษานี้เลือกใช้ Full-cross validation จากนั้น กด ok



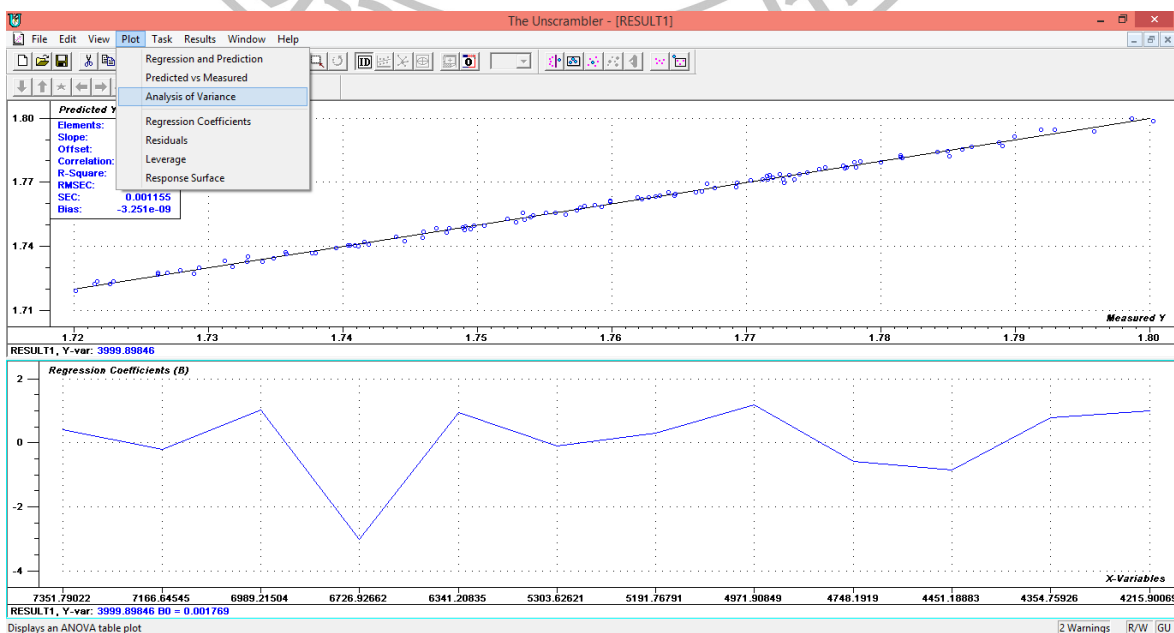
14. เมื่อกด ok แล้วจะแสดงหน้าต่างดังภาพ จากนั้นกด view



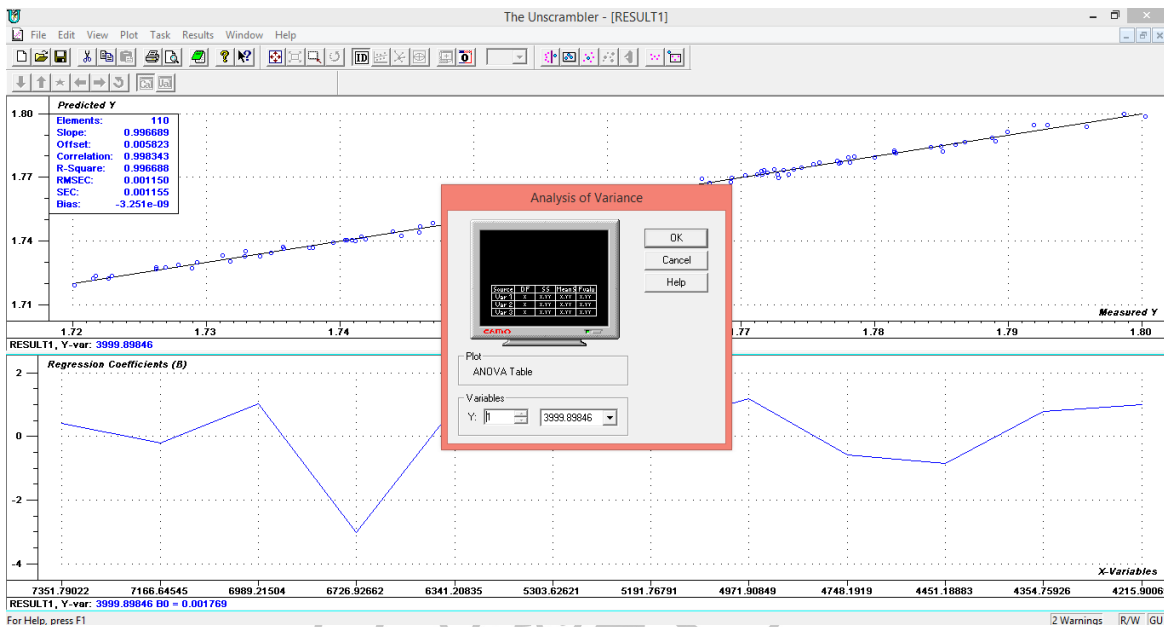
15. แสดงหน้าต่างดังภาพ โดยจะแสดงเป็นสมการและ regression coefficient



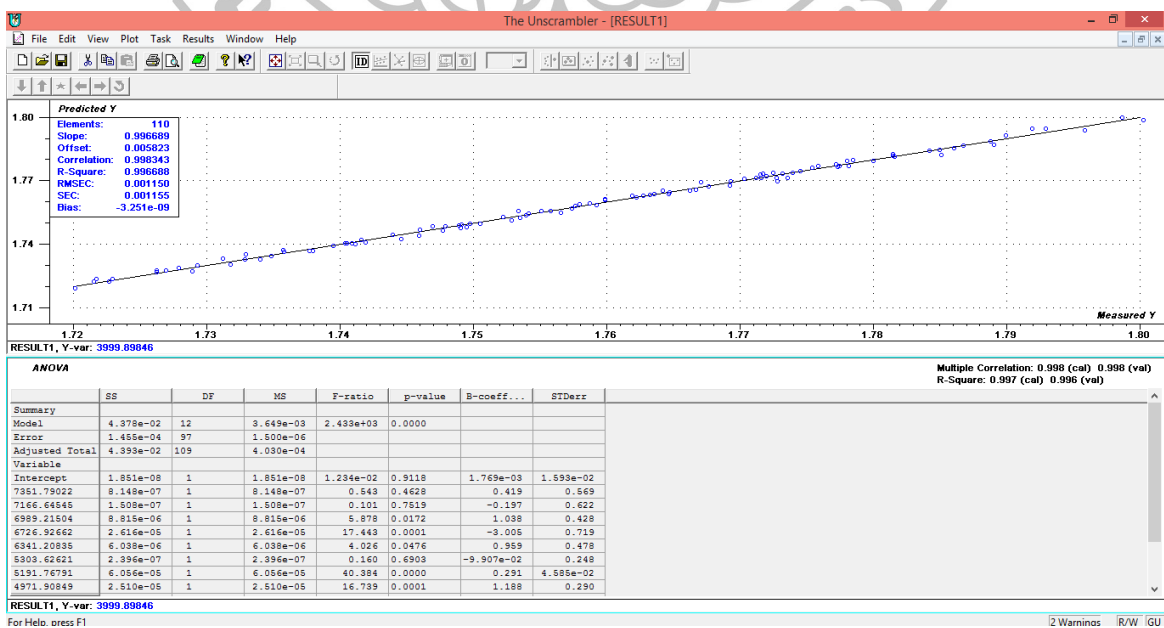
16. จากนั้นเลขคลื่นจะถูกตัดออกอย่างเป็นระบบ ด้วยการกำจัดเลขคลื่นที่มีความสำคัญน้อยที่สุดออกด้วยวิธี forward-backward elimination ซึ่งเป็นการกำจัดเลขคลื่นออกอย่างเป็นขั้นตอนจนกว่าจะเหลือจำนวนเลขคลื่นน้อยที่สุดและเพียงพอที่จะทำนายปริมาณคอลลาเจนได้ โดยไปที่ Plot เลือก Analysis of variance



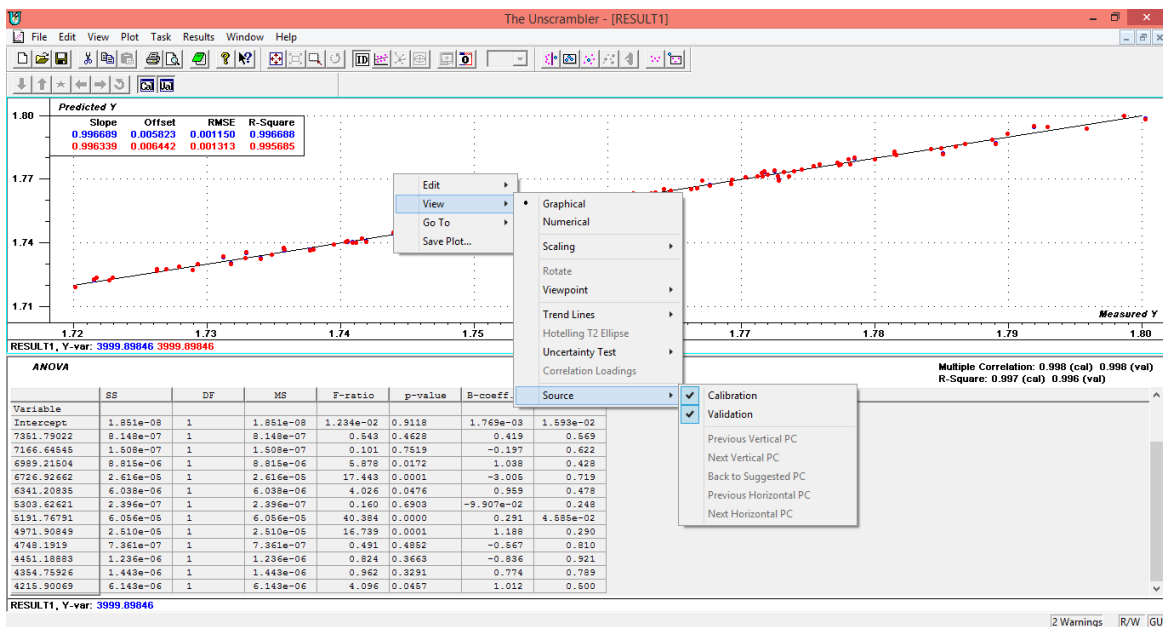
17. แสดงหน้าต่างดังภาพ จากนั้นกด ok



18. แสดงตาราง ANOVA จากนั้นเลือกเลขคลื่นที่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ออก ($p > 0.05$) จนเหลือเลขคลื่นที่มีอิทธิพลสูงสุดในการสร้างสมการ



19. จากนั้นนำเลขคลื่นที่เหลือ ไป RUN ตามข้อ 13 จนกว่าจะเหลือเลขคลื่นที่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($p \leq 0.05$) สามารถดูค่าทางสถิติของกลุ่ม Calibration และ Validation ได้โดย คลิกขวา กด View และไปที่ source ดังภาพ



ประวัติผู้วิจัย

ชื่อ-สกุล (ภาษาไทย) นางสาวปิยะพร เนียมมณี
 (ภาษาอังกฤษ) MISS PIYAPORN NEAMMANEE

ที่อยู่ 35 หมู่ที่ 1 ตำบลตลาดจินดา อำเภอสามพราน จังหวัดนครปฐม
 รหัสไปรษณีย์ 73110

ประวัติการศึกษา

พ.ศ. 2555 สำเร็จการศึกษาปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต
 สาขาวิชาเทคโนโลยีอาหาร คณะวิศวกรรมศาสตร์และเทคโนโลยี
 อุตสาหกรรม มหาวิทยาลัยศิลปากร

พ.ศ. 2556 ศึกษาต่อระดับปริญญาโท
 สาขาวิชาเทคโนโลยีอาหาร คณะวิศวกรรมศาสตร์และเทคโนโลยี
 อุตสาหกรรม บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร

การนำเสนอผลงาน

ปิยะพร เนียมมณี บุศราภรณ์ มหาโยธี และ ปราโมทย์ คุวิจิตรจารุ. 2559. การศึกษาความเป็นไปได้ในการตรวจสอบคอลลาเจนในสารละลายและระบบจำลองด้วยเทคนิคสเปกโทรสโกปีอินฟราเรดย่านใกล้. โครงการประชุมวิชาการ บัณฑิตศึกษาระดับชาติและนานาชาติ ครั้งที่ 6 เรื่อง “สหวิทยาการสร้างสรรค์เพื่อการพัฒนาที่ยั่งยืน” 11-12 กรกฎาคม 2559, ณ ศูนย์สันสกฤตศึกษา มหาวิทยาลัยศิลปากร เขตทวีวัฒนา กรุงเทพฯ (ภาคบรรยาย)