

การตรวจสอบแคปไซซินในพริกแบบรวดเร็วด้วยเทคนิคสเปกโทรสโกปีอินฟราเรดย่านใกล้ Rapid Determination of Capsaicin in Chili using Near Infrared Spectroscopy

รติพร เอกตาแสง¹ จริยา เกวียนวงศ์¹ ปราโมทย์ คูวิจิตรจารู¹ และ บุศราภรณ์ มหาโยธี¹
Ratiporn Ektasaeng¹, Chariya Kwianwong¹, Pramote Khuwijitjaru¹ and Busarakorn Mahayothee¹

Abstract

Pungency is a crucial index for identifying the standard of chili. Capsaicinoids, which have a major component of capsaicin, provide this spicy heat. Recently, most conventional methods used to determine the capsaicin in samples required amount of time for analysis, multistage sample preparation and highly trained personnel. Therefore, the objective of this research was to study the proper sample preparation for rapid determination of capsaicin in fresh chili using a near infrared spectroscopy. In this study, 96 chili samples from 8 varieties at 5 different maturity stages were used. The reference analysis of capsaicin content using high performance liquid chromatography (HPLC) was performed. Samples were prepared from two different methods for analysis NIR measurements, in the first method the samples were ground, and in the second one the samples were extracted by 99.90% ethanol. Both set of samples were analyzed using NIR measurements in wavelength regions 800-2500 nm. Reflectance and transreflectance mode of measurements were applied for ground sample and sample extracted, respectively. Then, the correlations between capsaicin content and spectra were built by using partial least squares regression analysis. It was found that ground sample was a proper sample preparation for NIR measurement to predict the capsaicin contents in fresh chili with a maximum coefficient of determination (R^2) of 0.9713, less root mean square error of prediction (RMSEP) of 0.535 mg/g fresh weigh and a high ratio of standard deviation of reference data in validation set to standard error of prediction (RPD) with a value of 6.08.

Keywords: capsaicinoids, capsaicin, chili, near-infrared spectroscopy

บทคัดย่อ

ความเผ็ดร้อนเป็นดัชนีที่สำคัญที่ใช้ในการกำหนดมาตรฐานของพริก โดยความเผ็ดร้อนเกิดจากสารกลุ่มแคปไซซินอยด์ (capsaicinoids) ส่วนใหญ่ประกอบด้วยแคปไซซิน (capsaicin) ในปัจจุบันการวิเคราะห์สารแคปไซซินใช้วิธีการที่ใช้ระยะเวลาสั้น มีการเตรียมตัวอย่างหลายขั้นตอนและต้องใช้ผู้ปฏิบัติการที่มีความชำนาญ งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการเตรียมตัวอย่างพริกที่เหมาะสมในการตรวจสอบปริมาณแคปไซซินด้วยวิธีแบบรวดเร็วโดยใช้เทคนิคสเปกโทรสโกปีอินฟราเรดย่านใกล้ โดยศึกษาในตัวอย่างพริก 8 สายพันธุ์ที่มีระดับความเผ็ดร้อนแตกต่างกัน 5 ระดับทั้งหมด 96 ตัวอย่าง วิเคราะห์ปริมาณแคปไซซินในตัวอย่างด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง โดยในแต่ละตัวอย่างวัดสเปกตรัมจากตัวอย่างที่เตรียมแตกต่างกัน 2 วิธี ได้แก่ ตัวอย่างปั่นละเอียดและสารสกัดที่ได้จากการสกัดพริกปั่นละเอียดด้วยเอทานอลร้อยละ 99.90 โดยวัดสเปกตรัมในช่วงความยาวคลื่น 800-2500 นาโนเมตร วัดตัวอย่างปั่นละเอียดโดยใช้รูปแบบการสะท้อน (reflectance) วัดตัวอย่างสารสกัดโดยใช้รูปแบบการส่องผ่านแล้วสะท้อนกลับ (transreflectance) จากนั้นนำข้อมูลปริมาณแคปไซซินและข้อมูลเส้นสเปกตรัมมาหาความสัมพันธ์ด้วยวิธีการถดถอยกำลังสองน้อยที่สุดบางส่วน (partial least squares, PLS) และสร้างสมการทำนายด้วยวิธี Test set ผลการศึกษาพบว่า การเตรียมตัวอย่างแบบปั่นละเอียดเป็นวิธีการเตรียมตัวอย่างที่เหมาะสมในการตรวจสอบปริมาณสารแคปไซซินด้วยเทคนิค สเปกโทรสโกปีอินฟราเรดย่านใกล้ โดยให้ค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (coefficient of determination, R^2) เท่ากับ 0.9713 ค่าความคลาดเคลื่อนในการทำนาย (root mean square error of prediction, RMSEP) เท่ากับ 0.535 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักสด และอัตราส่วนระหว่างส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานกับค่าความผิดพลาดมาตรฐานการทำนาย (ratio of standard deviation of reference data in validation set to standard error of prediction, RPD) เท่ากับ 6.08

คำสำคัญ: แคปไซซินอยด์ แคปไซซิน พริก เทคนิคสเปกโทรสโกปีอินฟราเรดย่านใกล้

¹ภาควิชาเทคโนโลยีอาหาร คณะวิศวกรรมศาสตร์และเทคโนโลยีอุตสาหกรรม มหาวิทยาลัยศิลปากร นครปฐม 73000

¹Department of Food Technology, Faculty of Engineering and Industrial Technology, Silpakorn University, Nakhon Pathom 73000

คำนำ

พริกมีความสำคัญต่อเศรษฐกิจของประเทศ ในปี พ.ศ. 2557 ประเทศไทยส่งออกพริกและผลิตภัณฑ์แปรรูปจากพริก ปริมาณ 48,651.55 ตัน คิดเป็นมูลค่า 2,520.90 ล้านบาท (สำนักงานส่งเสริมและจัดการสินค้าเกษตร, 2558) ตลาดที่สำคัญในการส่งออกได้แก่ สิงคโปร์ และมาเลเซีย ความเผ็ดของพริกแต่ละสายพันธุ์มีความแตกต่างกันมาก พริกจึงถูกนำไปใช้ประโยชน์ได้แพร่หลาย การซื้อขายพริกจะใช้ความเผ็ดร้อนเป็นดัชนีการกำหนดมาตรฐาน (Pearson, 1976) ซึ่งความเผ็ดร้อนในพริกมาจากสารกลุ่ม แคปไซซินอยด์ (capsaicinoids) โดยมีแคปไซซิน (capsaicin) เป็นองค์ประกอบหลักร้อยละ 61 (Salzer *et al.*, 1975)

วิธีที่นิยมใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณแคปไซซินในปัจจุบันจะใช้เทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) ซึ่งวิธี HPLC นี้ยังมีข้อจำกัดใน การเตรียมตัวอย่างหลายขั้นตอน การใช้สารเคมี ค่าใช้จ่ายในการตรวจวิเคราะห์สูง และต้องใช้ผู้ปฏิบัติการที่มีความรู้และความชำนาญ ดังนั้นการศึกษาความเป็นไปได้ในการติดตามปริมาณแคปไซซินในพริกจึงมีสำคัญต่ออุตสาหกรรมที่ใช้พริกเป็นวัตถุดิบ เทคนิคสเปกโทรสโกปีอินฟราเรดย่านใกล้ (Near infrared spectroscopy, NIRS) จึงมีความน่าสนใจในการนำมาวิเคราะห์ปริมาณแคปไซซินในพริก เนื่องจากเป็นวิธีที่ไม่ใช้สารเคมี มีการเตรียมตัวอย่างที่ไม่ยุ่งยาก และรวดเร็ว งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์การศึกษาการเตรียมตัวอย่างพริกที่เหมาะสมในการตรวจสอบปริมาณแคปไซซินด้วยเทคนิค NIRS

อุปกรณ์และวิธีการ

1. วัตถุดิบ

พริกสด 8 สายพันธุ์ ได้แก่ พริกหยวก พริกขี้หนูสวน พริกหอม พริกจินดา พริกชี้ฟ้า พริกกระเหรียง พริกยอดสน และพริกชุปเปอร์ฮอต ที่มีระดับความเผ็ดร้อนแตกต่างกัน โดยพิจารณาจากสีผิวของผลพริก ซึ่งจากตลาดปทุมมงคล จังหวัดนครปฐม ทั้งหมด 96 ตัวอย่าง

2. วิธีการทดลอง

นำตัวอย่างพริก 8 สายพันธุ์ประกอบด้วย พริกหยวก พริกขี้หนูสวน พริกหอม พริกจินดา พริกชี้ฟ้า พริกกระเหรียง พริกยอดสนและ พริกชุปเปอร์ฮอต ที่มีระดับความเผ็ดร้อนแตกต่างกัน 5 ระดับทั้งหมด 96 ตัวอย่าง บดด้วยเครื่องปั่นผสม Moulinex Optiblend รุ่น AAW9 จนมีลักษณะเป็นเนื้อเดียว (paste) ซึ่งพริกที่ผ่านการบดจนเป็นเนื้อเดียวน้ำหนัก 6 กรัม ใส่ petri dish ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 3 เซนติเมตร โดยไม่ให้เกิดฟองอากาศ นำไปวัดสเปกตรัมด้วยเครื่อง FT-NIR spectrophotometer รุ่น MPA (บริษัท Bruker Optics, Germany) ความยาวคลื่น 800-2500 นาโนเมตร รูปแบบการวัดแบบสะท้อนกลับ (reflectance) จากนั้นนำพริกบดมาสกัดแคปไซซินด้วยเอทานอล สารสกัดแคปไซซินจะถูกแบ่งเป็นสองส่วนสำหรับวัดสเปกตรัมรูปแบบการส่องผ่านแล้วสะท้อนกลับ (transflectance) และวิเคราะห์ปริมาณแคปไซซินด้วยเทคนิค HPLC ใช้เมทานอลต่อน้ำอัตราส่วน 70 ต่อ 30 เป็นสารละลายเคลื่อนที่ (mobile phase) อัตราการเคลื่อนตัวของสารละลายเคลื่อนที่ (flow rate) 1 มิลลิลิตรต่อนาที คอลัมน์ (column) Reverse-phase C18 stable bond ควบคุมอุณหภูมิคอลัมน์ 30 องศาเซลเซียส ความยาวคลื่นที่ใช้ตรวจสอบแคปไซซินคือ 280 นาโนเมตร และฉีดตัวอย่างปริมาตร 10 ไมโครลิตร (Chin *et al.*, 2011) จากนั้นนำข้อมูลปริมาณแคปไซซินและข้อมูลเส้นสเปกตรัมมาหาความสัมพันธ์ด้วยวิธีการถดถอยกำลังสองน้อยที่สุดบางส่วน (partial least squares, PLS) และสร้างสมการทำนายด้วยวิธี Test set แบ่งกลุ่มตัวอย่างเป็นกลุ่ม calibration set สำหรับสร้างสมการเทียบมาตรฐาน และ validation set ใช้สำหรับทดสอบความแม่นยำของสมการ โดยใช้โปรแกรม OPUS เวอร์ชัน 7.2.139.1294

ผล

การวิเคราะห์ปริมาณแคปไซซินด้วยเทคนิค HPLC จากตัวอย่างพริก 8 พันธุ์ที่ใช้ในการศึกษา ที่มีระดับความเผ็ดร้อนแตกต่างกันทั้งหมด 96 ตัวอย่าง โดยพบว่าพริกที่มีปริมาณแคปไซซินมากที่สุดคือพริกหอมสีแดงคือ 141.68 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัมตัวอย่างสด และพริกที่พบปริมาณแคปไซซินน้อยที่สุดคือพริกหยวกสีเขียวเท่ากับ 2.18 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัมตัวอย่างสด ค่าปริมาณแคปไซซินอยู่ในช่วง 2.18-141.68 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัมตัวอย่างสด (Figure 1)

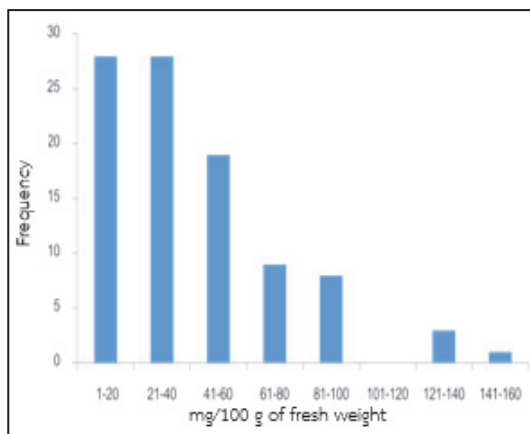


Figure 1 Histogram of capsaicin concentrations that were used in this study

สเปกตรัมจากการวัดค่าการดูดกลืนแสงจากตัวอย่างพริกบด 4 พันธุ์ แสดงใน Figure 2A จะเห็นว่าสเปกตรัมมีลักษณะเป็นพีกกว้าง (broad band) และมีการเลื่อนขึ้นของสเปกตรัมตามแนวแกน Y (baseline shift effect) เนื่องจากพริกบดมีน้ำเป็นองค์ประกอบเฉลี่ยร้อยละ 79.27 ซึ่งน้ำเป็นองค์ประกอบที่มีค่าการดูดกลืนแสงสูง จึงทำให้น้ำไปบดบังพีกของแคปไซซินที่สนใจ โดยพีกของน้ำจะดูดกลืนที่ความยาวคลื่น 1440 นาโนเมตร และ 1940 นาโนเมตร (Osborne *et al.*, 1993) สเปกตรัมจากการวัดค่าการดูดกลืนแสงจากสารสกัดแคปไซซินแสดงใน Figure 2B พบว่าตำแหน่งการดูดกลืนแสงของน้ำก็จะมิพบทาบลดลง และไม่พบ baseline shift effect และพบพีกที่ตำแหน่ง 2308 นาโนเมตร เป็นการดูดกลืนของ C-H combination ตรงกับงานวิจัยของ Osborne *et al.* (1993) พบค่าการดูดกลืนแสงของเอทานอลที่ตำแหน่ง 2308 นาโนเมตร

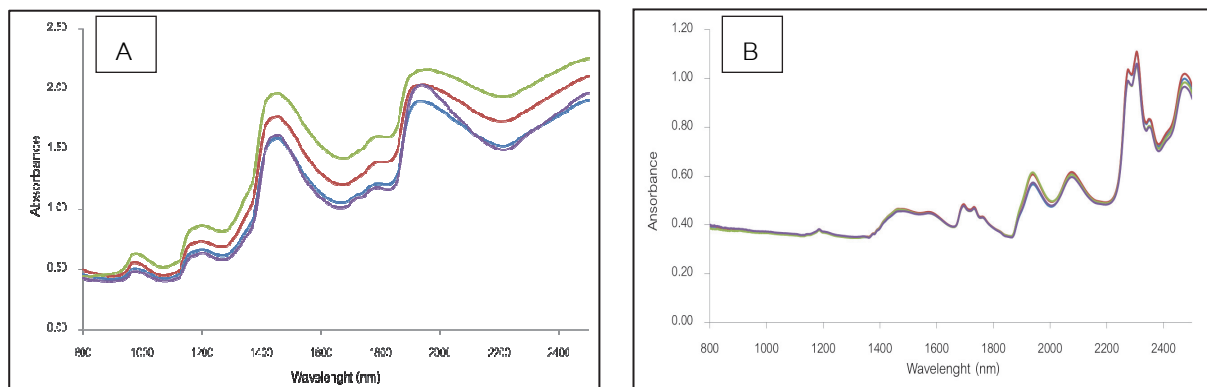


Figure 2 NIR spectra of chili paste (A) and ethanol extracted solution (B)

จากการสร้างสมการการทำนายที่ด้วยเทคนิค PLS จากการเตรียมตัวอย่าง 2 แบบ เพื่อทำนายปริมาณแคปไซซิน พบว่าสมการที่ให้ค่า R² RMSEP และ RPD ที่ดีที่สุดในกลุ่มทวนสอบคือสมการทำนายที่สร้างจากการเตรียมตัวอย่างแบบ paste ปรับแต่งสเปกตรัมด้วยวิธี Standard Normal Variate (SNV) ที่ช่วงความยาวคลื่น 1062.5-1836.1 นาโนเมตร และ 2167.7-2396.9 นาโนเมตร (Table 1)

Table 1 Statistic values of calibration and validation models built from different types of sample.

Sample	N	Pretreatment	Calibration (60%)		Validation (40%)			
			R ²	RMSEE (ppm)	R ²	RMSEP (ppm)	Bias	RPD
paste	96	SNV	0.9555	0.08	0.9713	0.05	-0.0114	6.08
extracted	96	1 st derivative+MSC	0.7120	0.20	0.8453	0.13	0.0120	2.55

สำหรับแผนภาพการกระจายของสมการทวนสอบของการเตรียมตัวอย่างแบบ paste แสดงใน Figure 3A จะพบว่าข้อมูลมีแนวโน้มไปทางเดียวกับเส้น target line และแผนภาพการกระจายของสมการทวนสอบของการเตรียมตัวอย่างแบบสารสกัดแสดงใน Figure 3B จะพบว่าข้อมูลมีแนวโน้มไปทางเดียวกับเส้น target line แต่พบว่าข้อมูลส่วนใหญ่มีการกระจายออกจากเส้น target line ทำให้ค่าผิดพลาดมาตรฐานในการทำนายสูงกว่าการเตรียมตัวอย่างแบบพริกบด

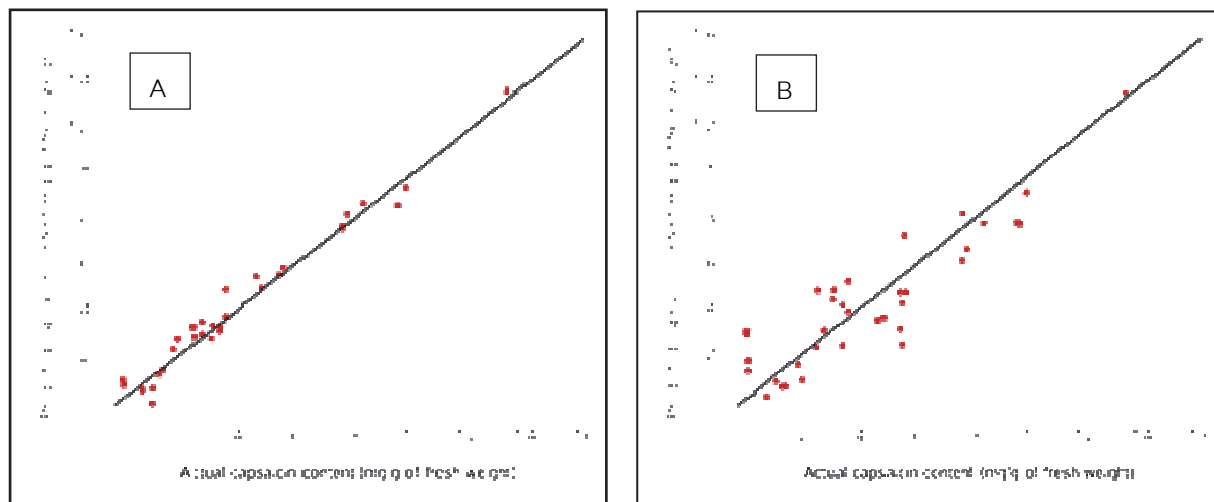


Figure 3 Scattering plot of validation model of paste (A) and ethanol extracted solution (B)

วิจารณ์ผล

การเตรียมตัวอย่างแบบพริกบด (paste) สามารถสร้างสมการเทียบมาตรฐานทำนายปริมาณแคปไซซินได้แม่นยำกว่าการเตรียมตัวอย่างแบบสารสกัด ซึ่งอาจเกิดเนื่องจากการเตรียมตัวอย่างแบบสารสกัดมีการปรับปริมาตรสารสกัดสุดท้ายด้วยเอทานอลเป็น 50 มิลลิลิตร ทำให้ปริมาณแคปไซซินในตัวอย่างสารสกัดมีความเข้มข้นน้อยกว่าแบบพริกบด

สรุป

เทคนิค NIRS สามารถตรวจสอบแคปไซซินในเชิงปริมาณได้ในช่วงที่ความเข้มข้น 2.18-141.68 มิลลิกรัม/100 กรัมตัวอย่างสด โดยการเตรียมตัวอย่างแบบพริกบดมีความแม่นยำดีกว่าการเตรียมตัวอย่างแบบสารสกัด

เอกสารอ้างอิง

- สำนักส่งเสริมและจัดการสินค้าเกษตร. 2558. รายงานสถานการณ์พริก. [ระบบออนไลน์].
 แหล่งที่มา: http://www.agriman.doae.go.th/home/news/year%202015/022_chilli.pdf. (25 มิถุนายน 2558).
- Chin, M. S., R. R. Sharma-Shivappa and J. L. Cotter. 2011. Solvent extraction and quantification of capsaicinoids from *Capsicum chinense*. Food and Bioproducts Processing 89: 340-345.
- Osborne, B., T. Fearn and P. H. Hindle. 1993. Practical NIR Spectroscopy with Applications in Food and Beverage Analysis. Longman Singapore Publisher (Pte) Ltd, Singapore. 277 p.
- Pearson, D. 1976. The Chemical Analysis of Foods. Churchill. London. 575 p.
- Salzer, U. J., G. Haarmann and G. Reimer. 1975. Analytical evaluation oils from seasonings. Flavour 6(4): 206-210.