

การประเมินองค์ประกอบในใบชาโดยเทคนิคสเปกโตรสโกปีอินฟราเรดย่านใกล้ Evaluation of Tea Leaf Components by Near Infrared Spectroscopy

นฤเทพ เวชภิบาล¹ และ จารุวรรณ บางแวก¹
Naruthep Wechpibal¹ and Charuwan Bangwaek¹

Abstract

The Near Infrared Spectroscopy (NIRS) shows promise in carrying out the quality determination for agricultural products because of its fast and accurate technique. It can be employed as a replacement of time-consuming chemical method. In this experiment the contents of three components, epigallocatechin-3-gallate (EGCG), caffeine (Caf) and epigallocatechin (EGC) in tea leaves were predicted by NIRS. One hundred ground tea leaf samples were loaded in standard cup and measured the original spectrum by NIRSystems 6500 with the transportation module and reflectance mode in wavelength region from 800 nm to 2500 nm. The contents of ground tea leaves were determined by high performance liquid chromatograph (HPLC) method. Partial least squares regression (PLSR) was used to develop the calibration equation. The correlation coefficient (R) of EGCG, Caf and EGC from calibration model were 0.954, 0.938 and 0.938 mg/kg, respectively. The standard error of calibration (SEC) of EGCG, Caf and EGC were 6.973, 2.762 and 7.606 mg/kg, respectively. The standard error of prediction (SEP) of EGCG, Caf and EGC were 8.224, 2.907 and 8.099 mg/kg, respectively. The results showed that the calibration equations obtained from the experiment had high values of R and low values of SEC and SEP which indicated a good correlation between reference values and NIRS predicted values. Therefore, these results suggested that NIRS could be applied for the rapid determination of tea leaf components.

Keywords: near infrared spectroscopy (NIRS), component, tea leaves

บทคัดย่อ

เทคนิคสเปกโตรสโกปีอินฟราเรดย่านใกล้ (NIRS) เป็นวิธีการวิเคราะห์ตัวอย่างวิธีหนึ่งที่ถูกนำมาใช้กับผลิตภัณฑ์ทางการเกษตรหลายชนิดเนื่องจากเป็นเทคนิคตรวจวิเคราะห์ที่รวดเร็ว และถูกต้อง สามารถที่จะนำมาใช้ทดแทนการวิเคราะห์ทางเคมีที่ใช้เวลานาน ในการทดลองนี้เทคนิค NIRS ถูกนำมาใช้ในการทำนายปริมาณสารสำคัญจำนวน 3 ชนิด ได้แก่ อีพิกัลโลคาเทชิน 3-галเลต (Epigallocatechin-3-gallate; EGCG) คาเฟอีน (Caf) และอีพิกัลโลคาเทชิน (EGC) ในใบชา โดยบรรจุตัวอย่างใบชาบดละเอียด จำนวน 100 ตัวอย่างในเซลล์บรรจุตัวอย่างชนิด standard cup นำไปวัดสเปกตรัมด้วยเครื่อง NIRSystems 6500 ด้วยชุดอุปกรณ์ transportation module ในช่วงความยาวคลื่น 800-2500 นาโนเมตร โดยวัดการสะท้อนกลับของแสง (reflectance) บนสเปกโตรมิเตอร์ดั้งเดิม และวิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญในใบชาโดยเทคนิคโครมาโทกราฟีแบบของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC) นำค่าที่ได้มาสร้างสมการทำนายด้วยเทคนิค Partial Least Squares Regression (PLSR) ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (R) ของสาร EGCG, Caf และ EGC เท่ากับ 0.954, 0.938 และ 0.938 mg/kg ตามลำดับ ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานในการทำนายปริมาณสารสำคัญในกลุ่มสร้างสมการ (SEC) ของสาร EGCG, Caf และ EGC เท่ากับ 6.973, 2.762 และ 7.606 mg/kg ตามลำดับ ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานในการทำนายปริมาณองค์ประกอบในกลุ่มทดสอบสมการ (SEP) ของสาร EGCG, Caf และ EGC เท่ากับ 8.224, 2.907 และ 8.099 mg/kg ตามลำดับ จากผลการทดลองพบว่าสมการที่ได้ให้ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์สูง และให้ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานในกลุ่มสร้างสมการ และกลุ่มทดสอบสมการต่ำ ซึ่งแสดงให้เห็นถึงความสัมพันธ์ที่ระหว่างค่าอ้างอิง กับค่าที่ทำนายได้ ดังนั้นจึงสามารถใช้เทคนิค NIRS ตรวจหาปริมาณองค์ประกอบในใบชาได้

คำสำคัญ: สเปกโตรสโกปีอินฟราเรดย่านใกล้, องค์ประกอบ, ใบชา

¹ กองวิจัยและพัฒนาวิทยาการหลังการเก็บเกี่ยวและแปรรูปผลิตผลเกษตร กรมวิชาการเกษตร กรุงเทพฯ 10900

¹ Postharvest and Processing Research and Development Division, Department of Agriculture, Bangkok 10900

คำนำ

ปัจจุบันชา (*Camellia sinensis*) เป็นพืชเศรษฐกิจชนิดหนึ่งที่ปลูกกันมากในจังหวัดเชียงราย เชียงใหม่ น่าน และแม่ฮ่องสอน ชาที่ปลูกทางการค้าส่วนใหญ่เป็นชา ใน 2 กลุ่มสายพันธุ์คือ ชาอัสสัม และชาจีน ชาที่ปลูกในประเทศจะปลูกเพื่อนำใบชาไปผลิตเป็นชาใบแห้ง 3 ประเภท คือ ชาเขียว ชาอู่หลง และชาดำ (ธีรพงษ์ และคณะ, 2555) ซึ่งชาทุกชนิดสามารถทำได้จากชาต้นเดียวกันแต่ผ่านกรรมวิธีแตกต่างกันออกไป ใบชาอุดมไปด้วยสารคาเฟอีน (Caffeine) และสารพอลิฟีนอล (polyphenol) ซึ่งสารพอลิฟีนอลที่มักพบในชาได้แก่ อีพิแกลโลคาเทชิน (Epigallocatechin; EGC) และอีพิแกลโลคาเทชิน 3-แกลเลต (Epigallocatechin-3-gallate; EGCG) สารพอลิฟีนอลในใบชามีสมบัติเป็นโชนเภสัชสามารถออกฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ ซึ่งช่วยกำจัดอนุมูลอิสระที่เป็นพิษต่อร่างกายช่วยให้สุขภาพดีขึ้นป้องกันการเกิดมะเร็ง ช่วยลดระดับไขมันในเลือด ลดการเกิดหลอดเลือดแข็งตัว (arthrosclerosis) ลดระดับน้ำตาลในเลือด ช่วยในการเพิ่มการเผาผลาญพลังงาน และไขมันซึ่งมีผลต่อการลดน้ำหนัก รักษาสุขภาพช่องปาก เสริมสร้างกระดูกและฟันให้แข็งแรง ยับยั้งแบคทีเรียที่ทำให้ฟันผุ ลดอัตราการเสี่ยงจากการเป็นโรคหัวใจ ชะลอภาวะแก่ก่อนวัย (anti-aging) ช่วยกระตุ้นให้ระบบประสาท และร่างกายทำงานได้อย่างมีประสิทธิภาพ เพิ่มความยืดหยุ่นกล้ามเนื้อหัวใจและขยายผนังหลอดเลือด ช่วยให้ร่างกายรู้สึกสดชื่น กระปรี้กระเปร่า และลดอาการตึงเครียดจากการทำงานหนักเนื่องจากคาเฟอีน และมีฤทธิ์ในการช่วยล้างพิษออกจากร่างกาย (detoxicating potential) เป็นต้น (ศิริธร, 2557) ปัจจุบันการประเมินองค์ประกอบที่อยู่ในชาสามารถใช้เทคนิค HPLC ซึ่งเป็นวิธีที่ให้ผลการวิเคราะห์ที่แม่นยำ และถูกต้อง แต่พบว่าเป็นวิธีที่ใช้ระยะเวลาในการวิเคราะห์นาน ใช้ผู้วิเคราะห์ที่มีประสบการณ์ และค่าใช้จ่ายสูง (Kim *et al.*, 2007) Near Infrared Spectroscopy (NIRS) เป็นเทคนิคที่ถูกใช้ประเมินปริมาณสารสำคัญในใบชาที่ได้รับความนิยมเพิ่มมากขึ้นในปัจจุบัน ข้อดีของเทคนิค NIRS คือการเตรียมตัวอย่างเพียงเล็กน้อย ให้ผลการวิเคราะห์ที่รวดเร็วและน่าเชื่อถือ ไม่ใช้สารเคมีหรือทิ้งสารตกค้าง ทำให้ไม่ก่อให้เกิดมลพิษต่อสิ่งแวดล้อม (Iwamoto *et al.*, 1995) แต่การประเมินองค์ประกอบสารสำคัญในใบชาด้วยเทคนิค NIRS นั้นต้องสร้างสมการเทียบมาตรฐานที่มีความแม่นยำเพื่อที่จะสามารถทำนายปริมาณสารสำคัญในใบชาได้อย่างถูกต้อง และทดแทนวิธีการวิเคราะห์ในห้องปฏิบัติการได้

อุปกรณ์และวิธีการ

สุ่มเลือกซื้อตัวอย่างชาจากแหล่งจำหน่ายในจังหวัดเชียงราย เชียงใหม่ และกรุงเทพฯ จำนวนอย่างน้อย 100 ตัวอย่าง จากนั้นนำตัวอย่างไปบดให้ละเอียด และอบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง แล้วเก็บไว้ในโถดูดความชื้นเพื่อรอการวิเคราะห์ โดยนำตัวอย่างชาบดละเอียดที่เตรียมไว้บรรจุในเซลล์บรรจุตัวอย่างชนิด standard cup นำไปวัดสเปกตรัมด้วยเครื่อง NIRSystems 6500 ด้วยชุดอุปกรณ์ transportation module ในช่วงความยาวคลื่น 800-2500 นาโนเมตร โดยวัดการสะท้อนกลับของแสง (reflectance) และนำตัวอย่างไปวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีในห้องปฏิบัติการ สกัดโดยวิธีดัดแปลง ISO (2006) และประเมินปริมาณสารสำคัญในใบชาโดยเทคนิคโครมาโทกราฟีแบบของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC) นำค่าที่ได้มาสร้างสมการทำนายด้วยเทคนิค Partial Least Squares Regression (PLSR) โดยใช้โปรแกรม The Unscrambler® version 9.7 (Camo, Oslo, Norway) และสร้างสมการความสัมพันธ์ระหว่างสเปกตรัมที่วัดได้จากเครื่อง NIRSystems 6500 กับองค์ประกอบสารสำคัญในใบชาที่วัดได้จากห้องปฏิบัติการ

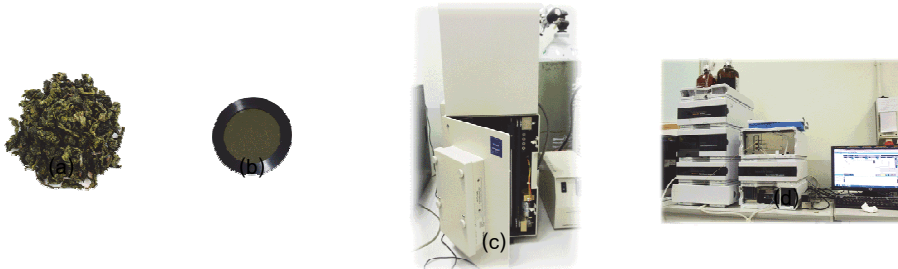


Figure 1 Tea leaves (a) were ground and packed in the standard cup (b) and measured the original spectrum by NIRSystems 6500 (c) with the transportation module and reflectance mode in wavelength region from 800 nm to 2500 nm. and analyzed compounds by HPLC (d)

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

ผลการทดลองพบว่า องค์ประกอบสารในใบชาจำนวน 3 ชนิด ได้แก่ EGCG, EGC และ Caf ที่วิเคราะห์ทางเคมีจากห้องปฏิบัติการ มีปริมาณค่าเฉลี่ยเป็น 74.262, 57.730 และ 37.804 มก./กก. ตามลำดับ (Table 1) เมื่อวัดสเปกตรัมตัวอย่างใบชาจากแหล่งจำหน่ายต่างๆ ที่บรรจุใน standard cup ด้วยเครื่อง NIRSystems 6500 ในช่วงความยาวคลื่น 800-2500 นาโนเมตร จะพบสเปกตรัมดั้งเดิม (original spectrum) แสดงใน Figure 2 พบพีกที่ความยาวคลื่นที่มีค่าการดูดซับแสง 1690 1725 2326 และ 2350 นาโนเมตร ซึ่งมีความสัมพันธ์กับพันธะ -CH₃, CH₂, CH₂, และ CH₂ ตามลำดับ ที่มักพบมากในสารคาเฟอีนในใบชา ในขณะที่ตำแหน่งการดูดซับแสงที่ 1920 และ 2140 นาโนเมตร จะมีความสัมพันธ์กับพันธะ -OH และ HC=CH ตามลำดับ ที่มีความสัมพันธ์กับสารพอลิฟีนอล (polyphenol) ที่มักพบในใบชาเช่นกัน (Lee *et al.*, 2014)

Table 1 Characteristics of tea samples used for model construction by NIRS

Compounds	No. of samples	Compound contents (mg/kg)		
		Minimum	Maximum	Average
1.Epigallocatechin Gallate (EGCG)	134	7.796	127.010	74.262
2.Epigallocatechin (EGC)	262	6.998	111.583	57.730
3.Caffein (Caf)	297	23.469	58.172	37.804

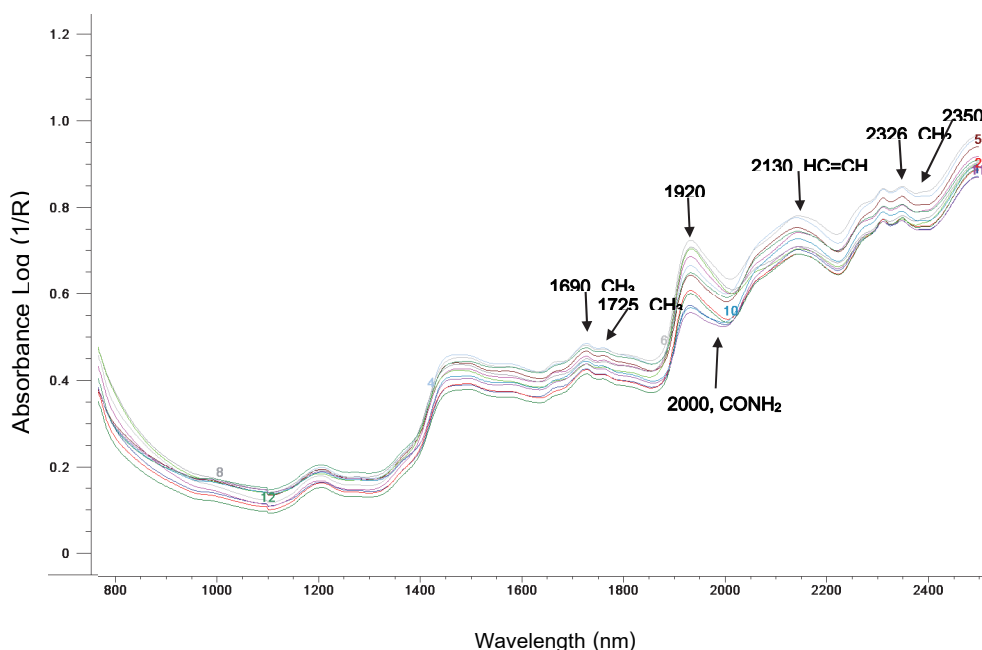


Figure 2 Original spectrum of tea samples in wavelength range 800 – 2500 nm.

การสร้างสมการเทียบมาตรฐานปริมาณองค์ประกอบของสารสำคัญในใบชาด้วยเทคนิค Partial Least Squares Regression (PLSR) ทำการวิเคราะห์แบบ Full cross-validation โดยการใช้สเปกตรัมดั้งเดิม (original spectrum) ที่ความยาวคลื่นช่วง 800-2500 นาโนเมตร พบว่า ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (R) ของสาร EGCG, Caf และ EGC เท่ากับ 0.954, 0.938 และ 0.938 mg/kg ตามลำดับ ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานในการทำนายปริมาณสารสำคัญในกลุ่มสร้างสมการ (SEC) ของสาร EGCG, Caf และ EGC เท่ากับ 6.973, 2.762 และ 7.606 mg/kg ตามลำดับ ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานในการทำนายปริมาณปริมาณองค์ประกอบในกลุ่มทดสอบสมการ (SEP) ของสาร EGCG, Caf และ EGC เท่ากับ 8.224, 2.907 และ 8.099 mg/kg ตามลำดับ ค่าเฉลี่ยของผลต่างระหว่างค่าที่ได้จากวิธีอ้างอิงกับค่าที่ได้จาก NIRS (averages of difference between actual and NIR values, Bias) ของสาร EGCG, Caf และ EGC เท่ากับ -0.039, 0.001 และ -0.024 mg/kg ตามลำดับ ปัจจัยที่เกี่ยวข้อง (Factor, F) ของสาร EGCG, Caf และ EGC เท่ากับ 9, 8 และ 8 ปัจจัย และ ค่า

ความคลาดเคลื่อน (Standard deviation, SD) ของสาร EGCG, Caf และ EGC เท่ากับ 23.316, 7.981 และ 20.170 mg/kg (Table 2) เมื่อพิจารณาจากค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (R) ซึ่งจะแสดงให้เห็นถึงความสัมพันธ์ของข้อมูล 2 ชุดที่มีต่อกัน พบว่าค่าอ้างอิงที่วัดโดยเทคนิค HPLC กับค่าที่ทำนายโดย NIRS มีความสัมพันธ์ที่ดี ให้ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์สูง ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานในกลุ่ม SEC และกลุ่ม SEP ต่ำ (Figure 3) ซึ่งแสดงให้เห็นถึงความสัมพันธ์ที่ตรงระหว่างค่าอ้างอิง และค่าที่ทำนายได้ ทำให้สมการที่ได้มีความแม่นยำ เหมาะสมที่จะนำไปใช้ในการประเมินองค์ประกอบสารสำคัญในใบชาโดยเทคนิค NIRS ได้

Table 2 Results of PLSR calibration for component determinations in tea leaves.

Compounds	Wavelength (nm)	No. of samples	R	SEC (mg/kg)	SEP (mg/kg)	Bias (mg/kg)	F	SD (mg/kg)
1.Epigallocatechin Gallate (EGCG)	800-2500	134	0.954	6.973	8.224	-0.039	9	23.316
2.Caffein (Caf)	800-2500	297	0.938	2.762	2.907	0.001	8	7.981
3.Epigallocatechin (EGC)	800-2500	262	0.938	7.606	8.099	-0.024	8	20.170

R: Coefficient of correlation, SEC: Standard error of calibration, SEP: Stand error of prediction, Bias: The average difference between actual value and NIRS value, F: The number of factors used in the calibration equation and SD: Standard deviation of average

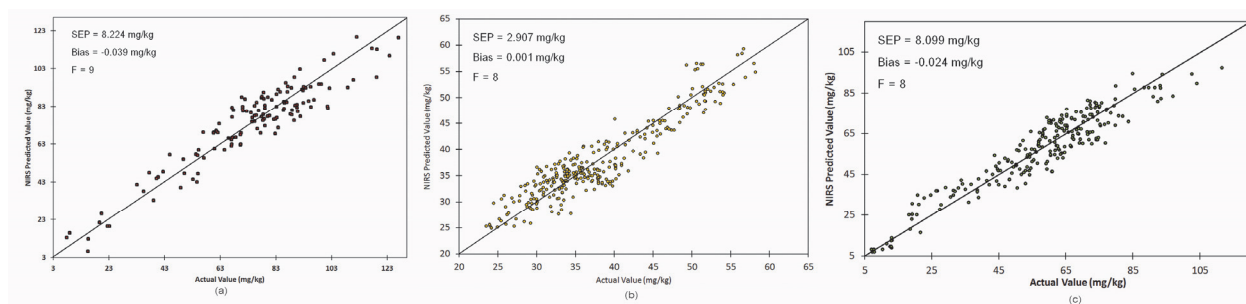


Figure 3 Scatter plots of Epigallocatechin Gallate (a), Caffein (b) and Epigallocatechin (c) contents in tea leaves determined by HPLC (X-axis) vs. by NIRS (Y-axis).

สรุป

เทคนิคสเปกโตรสโกปีอินฟราเรดย่านใกล้ (NIRS) เป็นเทคนิคที่สามารถตรวจหาปริมาณองค์ประกอบสารสำคัญในใบชาได้ โดยใช้ช่วงคลื่น 800 – 2500 นาโนเมตร และใช้สเปกตรัมดั้งเดิม (original spectrum) ซึ่งสามารถนำมาใช้ทดแทนการวิเคราะห์ทางเคมีได้

เอกสารอ้างอิง

ธีรพงษ์ เทพรถน์, กาญจนา พลอยศรี และอนัญญา เอกพันธ์. 2555. องค์ประกอบของกรดไขมันในน้ำมันเนื้อเมล็ดชาอัสสัมของไทย. วารสารวิทยาศาสตร์ มช. 40 (4): 1225- 1235.

ศิริธร ศิริอมพรรณ. 2557. สารต้านอนุมูลอิสระในอาหาร. โอเดียนสโตร์, กรุงเทพฯ. 272 หน้า

International Organization for Standardization (ISO). 2006. Determination of substances characteristic of green and black tea—part 2: content of catechins in green tea—method using high-performance liquid chromatography. *ISO 14502-2:2005/Cor. 1:2006(E)*

Iwamoto, M., S. Kawano and Y. Ozaki. 1995. An overview of research and development of near infrared spectroscopy in Japan. *Journal of Near Infrared Spectroscopy* 3: 179-189.

Kim, K.S., S.H. Park and M.G. Choung. 2007. Nondestructive determination of oil content and fatty acid composition in perilla seeds by near-infrared spectroscopy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55: 1679–1685.

Lee, M.S., Y.S. Hwang, J. Lee and M.G. Choung. 2014. The characterization of caffeine and nine individual catechins in the leaves of green tea (*Camellia sinensis* L.) by near-infrared reflectance spectroscopy. *Food Chemistry* 158: 351–357.