

การวัดปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมดในน้ำกระเจี๊ยบและน้ำผลหม่อน
ด้วยเทคนิคสเปกโทรสโกปีอินฟราเรดย่านใกล้

Quantification of Total Anthocyanins in Roselle and Mulberry Juices by Near Infrared Spectroscopy

คณางค์ ลิขิตวิวัฒน์¹ กมลวัลย์ แดงมาดี¹ ปราโมทย์ คูวิจิตรจารู¹ และบุศราภรณ์ มหาโยธี¹
Kakanang Likitwivat¹, Kamonwan Dangmadee¹, Pramote Khuwijitjaru¹ and Busarakorn Mahayothee¹

Abstract

In this research, near infrared spectroscopy for total anthocyanins content analysis was investigated. Roselle juice (100 samples) and mulberry juice (99 samples) were prepared by homogenizing fresh roselle sepals and mulberry fruits with distilled water at the sample to water ratio of 1:1 w/v and then diluted to get 20 different concentrations. After that, the samples were measured for the absorbance at the wavenumber from 12500 to 4000 cm^{-1} using a transreflectance mode. The samples were also analyzed for total anthocyanins contents using pH differential method. It was found that total anthocyanins of roselle and mulberry juices were in ranges of 8.85 - 454.38 and 3.00 - 98.35 mg/L, respectively. The relationship between the obtained spectra and chemical data was developed using partial least square regression. The best prediction model for roselle juice detained R^2 , RMSEP, bias and RPD of 0.96, 20.70 mg/L, -6.40 mg/L and 5.35, respectively while those for mulberry juice were 0.99, 2.91 mg/L, -0.20 mg/L and 8.36, respectively. In addition, statistics of the best model for combined data of roselle and mulberry juices were 0.94, 25.10 mg/L, 0.86 mg/L and 4.02, respectively.

Keywords: beverage, total anthocyanins, near infrared spectroscopy

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้ได้ศึกษาการใช้เทคนิค สเปกโทรสโกปีอินฟราเรดย่านใกล้ สำหรับวิเคราะห์ปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมดในน้ำกระเจี๊ยบและน้ำผลหม่อน โดยน้ำกระเจี๊ยบจำนวน 100 ตัวอย่าง และน้ำผลหม่อน จำนวน 99 ตัวอย่าง ถูกเตรียมจากดอกกระเจี๊ยบและผลหม่อนสดที่ถูกปั่นละเอียดโดยมีอัตราส่วนของตัวอย่างต่อน้ำกลั่นเท่ากับ 1:1 น้ำหนักต่อปริมาตร และนำมาเจือจางให้ได้ความเข้มข้น 20 ระดับ จากนั้นนำตัวอย่างไปวัดการดูดกลืนแสงในช่วงเลขคลื่น 12500-4000 cm^{-1} ด้วยการวัดแบบส่องผ่านสะท้อนกลับ และวิเคราะห์ปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมดด้วยวิธี pH differential พบว่าตัวอย่างน้ำกระเจี๊ยบและน้ำผลหม่อนมีปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมดอยู่ในช่วง 8.85 - 454.38 และ 3.00 - 98.35 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ เมื่อหาความสัมพันธ์ระหว่างข้อมูลสเปกตรัมที่ได้กับค่าวิเคราะห์ทางเคมี โดยใช้วิธีการถดถอยกำลังสองน้อยที่สุดบางส่วน (PLSR) พบว่าสมการการทำนายที่ดีที่สุดของปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมดในน้ำกระเจี๊ยบมีค่า R^2 , RMSEP, bias และ RPD เท่ากับ 0.96, 20.70 มิลลิกรัมต่อลิตร, -6.40 มิลลิกรัมต่อลิตร และ 5.35 ตามลำดับ ส่วนในน้ำผลหม่อนให้ค่า 0.99, 2.91 มิลลิกรัมต่อลิตร, -0.20 มิลลิกรัมต่อลิตร และ 8.36 ตามลำดับ และเมื่อสร้างสมการรวมจากข้อมูลของน้ำกระเจี๊ยบและน้ำผลหม่อนให้ค่า 0.94, 25.10 มิลลิกรัมต่อลิตร, 0.86 มิลลิกรัมต่อลิตร และ 4.02 ตามลำดับ

คำสำคัญ: เครื่องดื่ม, แอนโทไซยานินทั้งหมด, สเปกโทรสโกปีอินฟราเรดย่านใกล้

คำนำ

ดอกกระเจี๊ยบและผลหม่อนเป็นพืชที่มีปริมาณแอนโทไซยานินในปริมาณสูง เช่น cyanidin-3-glucoside ซึ่งเป็นสารที่สามารถแสดงฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน จึงนิยมนำไปทำเป็นเครื่องดื่มเพื่อสุขภาพ ทั้งนี้แสง อุณหภูมิ ออกซิเจน และค่าความเป็นกรด-ด่าง ส่งผลต่อความคงตัวของแอนโทไซยานิน (Khoo *et al.*, 2017) ในปัจจุบันการวิเคราะห์ปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมดนิยมใช้วิธี pH differential (Lee *et al.*, 2005) โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง UV-Vis spectrophotometer ซึ่งเป็นวิธีที่ต้องใช้การสกัดสารตัวอย่างใช้เวลานานในการวิเคราะห์ และมีค่าใช้จ่ายด้านสารเคมี จากผลงานวิจัยที่ผ่านมาได้มีการใช้เทคนิคสเปกโทรสโกปีอินฟราเรดย่านใกล้ในการทำนายปริมาณแอนโทไซยานินในผลบลูเบอร์รี่ (Bai *et al.*, 2014) ดอกชา (Xiaowei *et*

¹ภาควิชาเทคโนโลยีอาหาร คณะวิศวกรรมศาสตร์และเทคโนโลยีอุตสาหกรรม มหาวิทยาลัยศิลปากร นครปฐม 73000

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

al., 2014) ผลพุดรา (Guo et al., 2016) และกะหล่ำปลีม่วง (Oliveira et al., 2018) เป็นต้น นอกจากนี้ Caramés et al. (2016) ยังพบว่า NIRS สามารถทำนายปริมาณแอนโทไซยานินในน้ำองุ่นโดยให้ค่า R^2 และ RMSEP เท่ากับ 0.96 และ 0.37 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ แต่ยังไม่มีการศึกษาการใช้ NIRS ในน้ำกระเจี๊ยบและน้ำผลหม่อน ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการใช้ NIRS ในการวิเคราะห์ปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมดในน้ำกระเจี๊ยบ และน้ำผลหม่อน และศึกษาความเป็นไปได้ในการสร้างสมการทำนายรวมจากข้อมูลของน้ำกระเจี๊ยบและน้ำผลหม่อนด้วย

อุปกรณ์และวิธีการ

1. การเตรียมตัวอย่าง

ดอกกระเจี๊ยบพันธุ์ชูดาน จากจังหวัดศรีสะเกษ และผลหม่อนพันธุ์เกษตรกำแพงแสน 42 จากจังหวัดนครปฐม ถูกปั่นละเอียดโดยมีอัตราส่วนของตัวอย่างต่อน้ำกลั่นเท่ากับ 1:1 น้ำหนักต่อปริมาตร จากนั้นกรองน้ำกระเจี๊ยบผ่านผ้าขาวบางชั้น 2 ชั้น จำนวน 2 รอบ ได้เป็นน้ำกระเจี๊ยบ stock solution และนำน้ำผลหม่อนกรองผ่านกระดาษกรอง Whatman No.4 ได้น้ำผลหม่อน stock solution จากนั้นนำไปเจือจางให้ได้ความเข้มข้นต่างๆ กัน 20 ระดับ (Table 1) โดยปรับให้ได้ปริมาตร 50 มิลลิลิตร

2. การวัดสเปกตรัมด้วยเทคนิคสเปกโทรสโกปีอินฟราเรดย่านใกล้

นำตัวอย่างน้ำกระเจี๊ยบ 100 ตัวอย่าง และน้ำผลหม่อน 99 ตัวอย่าง ที่มีปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมดที่แตกต่างกันที่เตรียมได้ดัง Table 1 มา ตัวอย่างละ 10 มิลลิลิตร เพื่อวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโทรสโกปีอินฟราเรดย่านใกล้ (MPA, Bruker Optik, Germany) ที่เลขคลื่น $12500 - 4000 \text{ cm}^{-1}$ ความละเอียดในการเก็บข้อมูล 16 cm^{-1} และจำนวนครั้งในการสแกน 32 ครั้ง โดยใช้รูปแบบการวัดแบบส่องผ่านสะท้อนกลับ (transflectance) ข้อมูลสเปกตรัมที่ได้นำไปผ่านการปรับแต่งด้วยวิธีต่างๆ ได้แก่ 1st derivative, 2nd derivative, standard normal variate (SNV) และ multiplicative scatter correction (MSC)

3. การวิเคราะห์ปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมดโดยวิธี pH differential method

ตัวอย่างที่ผ่านการวัดสเปกตรัมถูกนำมาวิเคราะห์ปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมดด้วยเทคนิค pH differential ตามวิธีของ Lee et al. (2005) โดยบีบตัวอย่างปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลองและเติมสารละลายผสม เมทานอล 40% ต่อกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 37% อัตราส่วน 98:2 (v/v) จำนวน 2.5 มิลลิลิตร แล้วผสมด้วยเครื่อง vortex เป็นเวลา 10 วินาที จากนั้นนำไปเข้าอ่างอัลตราโซนิกที่ระดับ 9 ที่อุณหภูมิ 25 ± 1 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที แล้วนำไปเขย่าต่อที่อุณหภูมิห้องด้วยเครื่องเขย่า ที่ความเร็วรอบ 180 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที และผสมให้เข้ากันอีกครั้งด้วยเครื่อง vortex เป็นเวลา 10 วินาที ก่อนนำไปหมุนเหวี่ยงด้วยเครื่องแยกสารแบบหมุนเหวี่ยง (Universal 16, Hettich, USA) ที่ความเร็วรอบ 5000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นบีบสารละลายส่วนใสที่สกัดได้ใส่ในขวดสีชาสำหรับภาควิเคราะห์ในขั้นตอนต่อไป บีบสารสกัดจำนวน 0.3 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองจากนั้นเจือจางด้วยสารละลายบัฟเฟอร์โพแทสเซียมคลอไรด์ ที่มี pH 1.0 ปริมาตร 2.7 มิลลิลิตร และเจือจางด้วยสารละลายบัฟเฟอร์โซเดียมอะซิเตทไตรไฮเดรตที่มี pH 4.5 ปริมาตร 2.7 มิลลิลิตร ก่อนนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (GENESYS 10S, Thermo Fisher Scientific, USA) ที่ความยาวคลื่น 520 และ 700 นาโนเมตร โดยใช้ น้ำกลั่นเป็น Blank

4. การสร้างสมการเทียบมาตรฐานและสมการทวนสอบในการทำนายปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมด

หลังจากได้ข้อมูลสเปกตรัมที่ผ่านการปรับแต่งและข้อมูลปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมดแล้ว นำข้อมูลทั้งสองที่ได้มาหาความสัมพันธ์เพื่อสร้างสมการทำนายที่เหมาะสม โดยสร้างสมการสำหรับน้ำกระเจี๊ยบ น้ำผลหม่อน และสมการรวมจากข้อมูลของน้ำกระเจี๊ยบและน้ำผลหม่อน (combined data) โดยใช้โปรแกรม OPUS ด้วยเทคนิค partial least square regression (PLSR) ซึ่งตัวอย่างที่ถูกนำมาวิเคราะห์ข้อมูลถูกแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มได้แก่กลุ่มตัวอย่างที่ใช้ในการสร้างสมการ (calibration) และกลุ่มตัวอย่างที่ใช้ทวนสอบสมการ (validation) ในสัดส่วน 70 ต่อ 30 และสร้างสมการทำนายด้วยวิธี test set validation

ผล

1. สเปกตรัมที่ได้จากการวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโทรสโกปีอินฟราเรดย่านใกล้

ตัวอย่างเส้นสเปกตรัมที่ได้จากการวัดน้ำกระเจี๊ยบ และน้ำผลหม่อน stock solution และตัวอย่างที่ผ่านการเจือจางแสดงดัง Figure 1 ซึ่งพบว่ามีการดูดกลืนที่บริเวณเลขคลื่น 5883 และ 8771 cm^{-1} ซึ่งสัมพันธ์กับการสั่นแบบ second

overtones และ combination ของพันธะ -OH ซึ่งแสดงถึงพันธะภายในโมเลกุลของน้ำ ที่เป็นองค์ประกอบหลักของน้ำ กระเจี๊ยบและน้ำผลหม่อน และพีคการดูดกลืนที่บริเวณเลขคลื่น 5555 cm^{-1} ซึ่งสัมพันธ์กับการสั่นของวงแหวนเบนซีน (Oliveira *et al.*, 2018)

2. ค่าทางสถิติแสดงปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมดของน้ำกระเจี๊ยบและน้ำผลหม่อนที่ศึกษา

น้ำดอกกระเจี๊ยบปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมดอยู่ในช่วง 8.85 - 454.38 มิลลิกรัมต่อลิตร และน้ำผลหม่อนมีปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมดอยู่ในช่วง 3.00 - 98.35 มิลลิกรัมต่อลิตร (Table 2)

3. สมการเทียบมาตรฐานและสมการทำนาย

ในการศึกษาความเป็นไปได้ในการวิเคราะห์ปริมาณแอนโทไซยานินในน้ำกระเจี๊ยบและน้ำผลหม่อนด้วยเทคนิค NIRS พบว่าสมการทำนายปริมาณแอนโทไซยานินที่ได้จากตัวอย่างน้ำผลไม้แต่ละชนิดและสมการรวมจากข้อมูลของทั้งสองชนิด (combined data) ให้ค่า R^2 มากกว่า 0.90 ทุกสมการ ดัง Table 3 เมื่อเปรียบเทียบค่า RMSEP ของสมการน้ำดอกกระเจี๊ยบและน้ำผลหม่อนพบว่าสมการของน้ำกระเจี๊ยบให้ค่า RMSEP ที่สูง ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากการกรองน้ำกระเจี๊ยบด้วยผ้าขาวบาง อาจทำให้ยังมีอนุภาคขนาดเล็กของกระเจี๊ยบแขวนลอยอยู่ส่งผลต่อการกระเจิงแสงของตัวอย่าง นอกจากนี้จะเห็นว่าข้อมูลทางเคมีที่วิเคราะห์ได้นั้นปริมาณแอนโทไซยานินในน้ำกระเจี๊ยบมีช่วงกว้าง อาจส่งผลต่อค่าความคลาดเคลื่อน เมื่อสร้างสมการทำนายรวมระหว่างน้ำกระเจี๊ยบและน้ำผลหม่อนค่า RMSEP ที่ได้ก็มีค่าสูงเช่นกัน อย่างไรก็ตามเมื่อทดสอบสมการแล้วพบว่าสมการไม่น่ามีนัยสำคัญ และมีความสัมพันธ์กันมาก (Figure 2)

วิจารณ์ผลการทดลอง

จากการสร้างสมการทำนายปริมาณแอนโทไซยานินในน้ำกระเจี๊ยบและน้ำผลหม่อนพบว่า NIRS สามารถอธิบายค่าทางเคมีได้ดี แม้ว่าสมการของน้ำกระเจี๊ยบให้ค่า RMSEP ที่สูง และยังคงผลให้สมการรวมระหว่างน้ำกระเจี๊ยบและน้ำผลหม่อนมีค่า RMSEP สูงก็ตาม แต่เมื่อทำการทดสอบตามวิธีของ ISO 21543: 2006 พบว่าสมการมีความหมายเหมาะสมสามารถใช้งานได้ อย่างไรก็ตามการเตรียมตัวอย่างที่เหมาะสมยิ่งขึ้นอาจจะช่วยปรับปรุงสมรรถนะของ NIRS ในการทำนายค่าแอนโทไซยานินได้

Table 1 Preparation for roselle and mulberry juices

Sample	Stock solution (mL)	N
Roselle juice	2.5, 5, 7.5, 10, 12.5, ..., 50	100
Mulberry juice	2.5, 5, 7.5, 10, 12.5, ..., 50	99

Table 2 Statistics of total anthocyanins contents in roselle and mulberry juices (mg/L)

Sample	N	Min	Max	Mean	SD
Roselle juice	100	8.85	454.38	169.03	114.85
Mulberry juice	99	3.01	98.36	44.68	26.48

Table 3 Statistic parameters of total anthocyanins contents in roselle mulberry juices and combined data

Sample type	Pre treatment	Wavenumber (cm^{-1})	Calibration set (70%)			Validation set (30%)			
			R^2	RMSEC (mg/L)	RPD	R^2	RMSEP (mg/L)	RPD	Bias
Roselle juice	1 st derivative+MSC	4852.3-4242.9	0.96	23.7	4.74	0.96	20.7	5.53	-6.40
Mulberry juice	2 nd derivative	9403.8-5446.3 4428-4242.9	0.98	3.62	7.97	0.99	2.91	8.36	-0.20
Combined data	1 st derivative+SNV	7506.1-4242.9	0.93	26.9	3.75	0.94	25.1	4.02	0.86

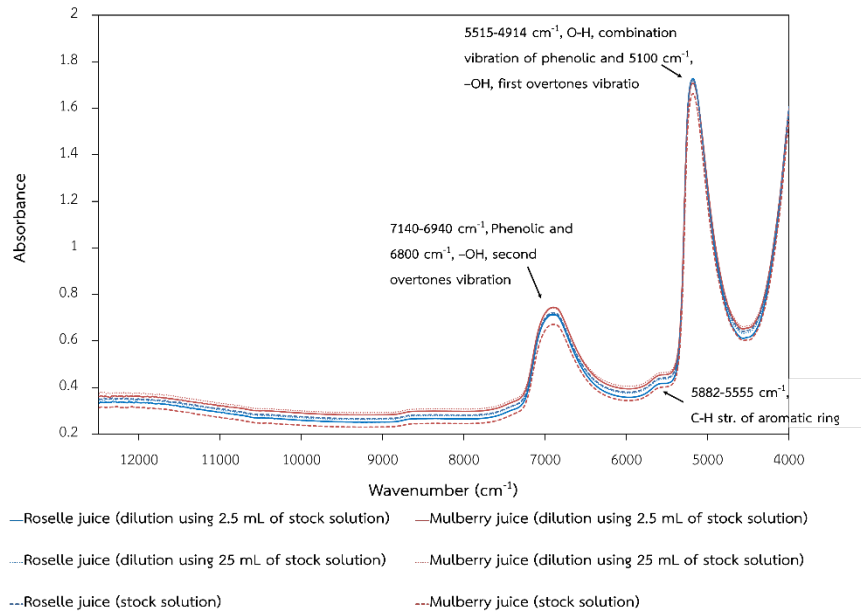


Figure 1 Raw spectra of roselle and mulberry juices at different concentrations of anthocyanins contents

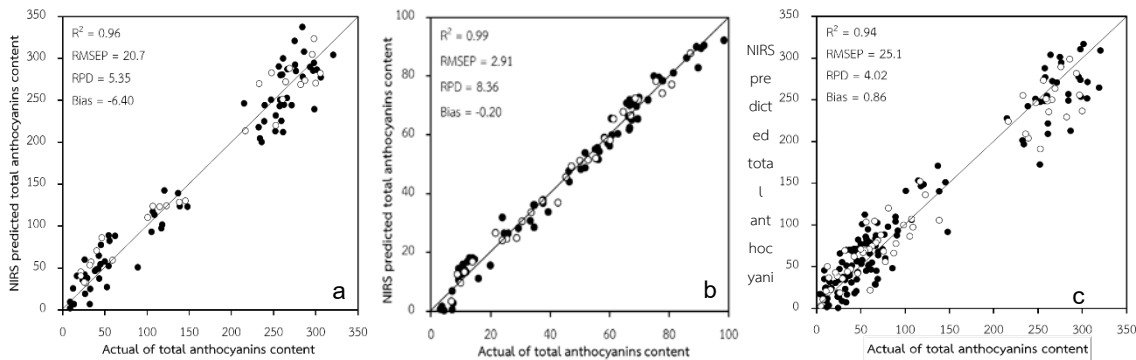


Figure 2 Scatter plot of total anthocyanins content for (a) roselle juice (b) mulberry juice and (c) combined data. Closed and open symbols represent calibration data set and validation set, respectively.

สรุปผลการทดลอง

เทคนิคสเปกโทรสโกปีอินฟราเรดย่านใกล้ มีความเป็นไปได้ในการนำมาใช้ในการติดตามปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมดในน้ำผลไม้ที่มีความเข้มข้นต่างๆ ได้ดีกว่าน้ำกระเจี๊ยบหากพิจารณาจากค่า RMSEP

เอกสารอ้างอิง

Caramés, E. T., P. D. Alamar, R.J. Poppi and J.A.L. Pallone. 2017. Rapid assessment of total phenolic and anthocyanin contents in grape juice using infrared spectroscopy and multivariate calibration. *Food Analytical Methods* 10: 1609–1615.

Oliveira, I. R. N., J.V. Roque, M.P. Maia, P.C. Stringheta and R.F. Teofilo. 2018. New strategy for determination of anthocyanins, polyphenols and antioxidant capacity of *Brassica oleracea* liquid extract using infrared spectroscopies and multivariate regression. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 194: 172–180.

Guo, Y., Y. Ni and S. Kokot. 2016. Evaluation of chemical components and properties of the jujube fruit using near infrared spectroscopy and chemometrics. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 153: 79-86.

Khoo, H. E., A. Azlan, S.T. Tang and S.M. Lim. 2017. Anthocyanidins and anthocyanins: Colored pigments as food, pharmaceutical ingredients, and the potential health benefits. *Food & Nutrition Research* 61(1): 1-21.

Lee, J., R.W. Durst and R.E. Wrolstad. 2005. Determination of total monomeric anthocyanin pigment content of fruit juices, beverages, natural colorants, and wines by the pH differential method: Collaborative study. *Journal of AOAC International* 88(5): 1269-1278.

Xiaowei, H., Z. Xiaobo, S. Jiewen, Z. Xiaolei and M. Holmes. 2014. Measurement of total anthocyanins content in flowering tea using near infrared spectroscopy combined with ant colony optimization models. *Food Chemistry* 164: 536-543.