

การวัดปริมาณสารคอร์ไดเซปินในดอกเห็ดถั่งเช่าสีทองโดยใช้เทคนิค Near Infrared Spectroscopy  
Determination of Cordycepin Concentration in *Cordyceps militaris* Fruiting Bodies by Near Infrared Spectroscopy

ณัฐพงษ์ สิงห์ภูงา<sup>1</sup> รณฤทธิ์ ฤทธิธรณ<sup>3</sup> นุชนาฏ ภักดี<sup>1</sup> บุญส่ง แสงอ่อน<sup>1,2</sup> และพีระศักดิ์ ฉายประสาธ<sup>1,2</sup>  
Natthapong Singpoonga<sup>1</sup>, Ronnarit Rittiron<sup>4</sup>, Nuchanat Phakdee<sup>1</sup>, Boonsong Seang-on<sup>1,2</sup> and Peerasak Chaiprasart<sup>1,2</sup>

Abstract

The objective of this study was to evaluate the ability of near-infrared spectroscopy (NIRS) to predict cordycepin concentration in the fruiting body of *Cordyceps militaris*. The regression models were developed using partial least squares (PLS) regressions with two preprocess methods, namely constant offset elimination (COE) and vector normalization (SNV), which overcame the baseline problems. It was found that the NIRS system, when used on chopped fresh fruiting bodies, provided the highest accuracy in determining the cordycepin contents. The optimum model for determining cordycepin concentration was obtained from COE spectrum which provided coefficient of determination of prediction ( $R^2_p$ ), root mean square error of prediction (RMSEP), standard error of prediction (SEP), bias and residual predictive deviation (RPD) values were 0.98, 277.0 mg kg<sup>-1</sup>, 181.56 mg kg<sup>-1</sup>, -1.05 mg kg<sup>-1</sup> and 8.9, respectively.

**Keywords:** *Cordyceps militaris*, cordycepin, near infrared spectroscopy (NIRS)

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความเป็นไปได้ในการนำเทคนิค Near Infrared Spectroscopy (NIRS) มาทำนายปริมาณสารคอร์ไดเซปินในดอกเห็ดถั่งเช่าสีทอง ทำการออกแบบจำลองเพื่อสร้างสมการและทดสอบสมการด้วยเทคนิค Partial Least Squares Regression (PLSR) ที่มีกระบวนการปรับแต่งสเปกตรัม 2 วิธี คือ constant offset elimination (COE) และ vector normalization (SNV) จากการทดลองพบว่า แบบจำลองที่ดีที่สุดสำหรับทำนายปริมาณสารคอร์ไดเซปินสร้างจากการปรับแต่งสเปกตรัมด้วยวิธีการ COE ในตัวอย่างดอกเห็ดถั่งเช่าสีทองที่สับละเอียด โดยให้ค่า coefficient of determination of prediction ( $R^2_p$ ) เท่ากับ 0.98, ค่า root mean square error of prediction (RMSEP) เท่ากับ 277 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม, ค่า standard error of prediction (SEP) เท่ากับ 181.56 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม, ค่าความผิดพลาดเฉลี่ยในการทำนาย (bias) เท่ากับ -1.05 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และค่า residual predictive deviation (RPD) เท่ากับ 8.9

**คำสำคัญ:** เห็ดถั่งเช่าสีทอง สารคอร์ไดเซปิน เทคนิคสเปกโทรสโกปีอินฟราเรดย่านใกล้

คำนำ

เห็ดถั่งเช่าสีทอง (*Cordyceps militaris*) ถูกนำมาใช้เป็นยาสมุนไพรเพื่อบำรุงร่างกายและรักษาโรคในแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ สารออกฤทธิ์ที่สำคัญของเห็ดถั่งเช่าสีทองคือ สารคอร์ไดเซปิน (Cordycepin) ปัจจุบันการวัดปริมาณสารคอร์ไดเซปินในเห็ดถั่งเช่าสีทองส่วนใหญ่จะวิเคราะห์โดยเครื่อง HPLC (High-performance liquid chromatography) (Huang *et al.*, 2009) ซึ่งเป็นวิธีที่ค่อนข้างยุ่งยาก ซับซ้อน ใช้เวลานาน และมีการทำลายตัวอย่าง เทคนิคเนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปี (Near Infrared Spectroscopy; NIRS) ใช้หลักการการสร้างสมการจากค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (Coefficient of correlation, R) ระหว่างค่าการดูดซับแสง Near Infrared ที่ส่องผ่านวัตถุที่ต้องการวิเคราะห์จำนวนหนึ่งและค่าที่วิเคราะห์จากห้องปฏิบัติการ เมื่อได้สมการที่มีค่าความสัมพันธ์สูง ค่าความคลาดเคลื่อนในการประเมิน (SEP) ต่ำ จึงนำสมการที่ได้ไปใช้ทำนายค่าของตัวอย่างแทนการวิเคราะห์ในห้องปฏิบัติการ (Osborne *et al.*, 1993) ข้อได้เปรียบของ NIRS คือ เป็นวิธีทดสอบที่ไม่ทำลายตัวอย่าง ตรวจวิเคราะห์รวดเร็ว ประหยัดเวลา และปลอดภัย สามารถใช้ทดแทนการวิเคราะห์ทางเคมีได้ มีรายงานความสำเร็จในการประเมินหาปริมาณสารอาร์จินีน (arginine) ในเส้นใยเห็ดถั่งเช่าสีทอง (Xie *et al.*, 2015) อย่างไรก็ตามยังไม่

<sup>1</sup> สาขาวิทยาศาสตร์ทางการเกษตร คณะเกษตรศาสตร์ทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยนเรศวร พิษณุโลก 65000

<sup>1</sup> Faculty of Agriculture Natural Resources and Environment, Naresuan University, Phitsanulok 65000

<sup>2</sup> สถาบันวิจัยเพื่อความเป็นเลิศทางวิชาการด้านเทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยว มหาวิทยาลัยนเรศวร พิษณุโลก 65000

<sup>2</sup> Postharvest Technology Research Institute, Naresuan University, Phitsanulok 65000

<sup>3</sup> ภาควิชาวิศวกรรมอาหาร คณะวิศวกรรมศาสตร์ กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ รัตนบุรี 73140

<sup>3</sup> Faculty of Engineering at Kamphaeng Saen, Kasetsart University, Kamphaeng Saen Campus, Nakhon Pathom 73140

มีรายงานใดที่ทำการประเมินหาปริมาณสารคอร์โดเซปินในส่วนที่เป็นดอกเห็ด (stroma) ดังนั้นผู้วิจัยจึงสนใจที่จะนำเทคนิค NIRS มาประยุกต์ใช้ในการประเมินหาปริมาณสารคอร์โดเซปินในดอกเห็ดดังกล่าว เพื่อเป็นทางเลือกในการตรวจวิเคราะห์ปริมาณสารดังกล่าวทดแทนการตรวจวิเคราะห์โดยวิธี HPLC

## อุปกรณ์และวิธีการ

### 1. การเตรียมตัวอย่างและวัดสเปกตรัม

ทำการเพาะเลี้ยงเห็ดถั่งเช่าสีทอง (*C. militaris*) ให้เจริญเติบโตเป็นดอกเห็ดในสูตรที่แตกต่างกันเพื่อให้ได้ปริมาณของคอร์โดเซปินที่มีความแตกต่างกันในหลายระดับ ได้จำนวนตัวอย่างทั้งหมดจำนวน 39 ตัวอย่าง เตรียมตัวอย่างในวิธีที่แตกต่างกัน 2 วิธี คือ วิธีที่ 1 การวิเคราะห์ในดอกสดโดยไม่ทำลายดอกเห็ด วิธีที่ 2 การวิเคราะห์ในดอกสดที่ผ่านการสับเป็นชิ้นเล็กๆ หลังจากนั้นนำไปวัดสเปกตรัมด้วยเครื่อง Near Infrared Spectrometer (NIRS) ยี่ห้อ Bruker รุ่น Matrix-F duplex ประเทศเยอรมนี ในช่วงเลขคลื่น (wavenumber) 12500-3500  $\text{cm}^{-1}$  (ความยาวคลื่นเท่ากับ 700-2500 นาโนเมตร)

### 2. การวิเคราะห์สารคอร์โดเซปินด้วยวิธีมาตรฐาน

วิเคราะห์ปริมาณสารคอร์โดเซปินด้วยเครื่อง HPLC ตามวิธีการของ Huang *et al.* (2009) ที่มีการดัดแปลงเล็กน้อย คำนวณปริมาณสารในหน่วย มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ( $\text{mg kg}^{-1}$ )

### 3. การสร้างสมการทำนาย

นำข้อมูลสเปกตรัมของเห็ดถั่งเช่าสีทองมาหาความสัมพันธ์กับค่าที่วิเคราะห์โดยวิธีมาตรฐาน HPLC โดยการสร้างสมการทำนายด้วยวิธี Partial least squares regression (PLSR) โดยอาศัยโปรแกรม OPUS version 7.2 (ประเทศเยอรมนี) ก่อนการสร้างสมการจะทำการปรับแต่งสเปกตรัม 2 วิธี คือ วิธี constant offset elimination (COE) และวิธี vector normalization (SNV) เปรียบเทียบกับสเปกตรัมที่ไม่มีการปรับแต่ง (no preprocessing) แบ่งข้อมูลออกเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มตัวอย่างที่ใช้ในการสร้างสมการ (calibration set) จำนวน 20 ตัวอย่าง และกลุ่มตัวอย่างที่ใช้ทดสอบประสิทธิภาพของสมการ (validation set) จำนวน 19 ตัวอย่าง แล้วทำการพิสูจน์แบบจำลองโดยวิธี Test set validation

## ผล

### 1. Spectrum ของเห็ดถั่งเช่าสีทอง

จากสเปกตรัมของเห็ดถั่งเช่าสีทองในรูปแบบที่เป็นดอกสด (Figure 1a) และดอกสดที่ถูกสับละเอียด (Figure 1b) มีการดูดซับคลื่นที่เลขคลื่นใกล้เคียงกัน คือที่ 10253, 8384, 6904 และ 5188  $\text{cm}^{-1}$  สำหรับตัวอย่างรูปแบบเห็ดสด และที่เลขคลื่น 10246, 8392, 6919 และ 5137  $\text{cm}^{-1}$  สำหรับดอกสดที่ถูกสับละเอียด จากทฤษฎีการดูดกลืนแสงพบว่า เป็นตำแหน่งการดูดกลืนของน้ำ คาร์โบไฮเดรต และโปรตีน (Siesler *et al.*, 2002) ซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักในเห็ดถั่งเช่าสีทอง เมื่อทำการปรับแต่งสเปกตรัมเพื่อลดการเบี่ยงเบนโดยวิธี constant offset elimination (COE) และวิธี vector normalization (SNV) โดยอาศัยโปรแกรม OPUS version 7.2 พบว่า ให้ผลในลักษณะเดียวกันในทั้ง 2 รูปแบบของตัวอย่าง โดยเส้นสเปกตรัมของเห็ดถั่งเช่าสีทองที่มีการปรับแต่งสเปกตรัมโดยวิธี COE จะถูกปรับแบบเชิงเส้นเพื่อให้ค่า Y ที่ต่ำสุด คือ มีค่าเท่ากับศูนย์ ทำให้การขยับขึ้นของเบสไลน์เชิงเส้นลดลงเพียงเล็กน้อย (Figure 1c) ส่วนวิธี SNV พบว่า จะทำให้ความสูงของแถบการดูดซับลดลงแต่โครงสร้างข้อมูลของเส้นสเปกตรัมยังคงอยู่ (Figure 1d)

### 2. สมการทำนายปริมาณสารคอร์โดเซปิน

ผลการสร้างสมการดัง Scatter plots (Figure 2) จากรูปแสดงการเปรียบเทียบค่าที่ทำนายและค่าจริงของปริมาณสารคอร์โดเซปินในกลุ่ม Validation set ของตัวอย่างเห็ดถั่งเช่าสีทองทั้ง 2 รูปแบบ พบว่า แบบจำลองที่ดีที่สุดสำหรับทำนายปริมาณสารคอร์โดเซปินของตัวอย่างที่เป็นดอกสดสร้างจากเส้นสเปกตรัมที่มีการปรับแต่งโดยวิธี SNV ได้ค่า coefficient of determination of calibration ( $R^2_p$ ) = 0.97, ค่า tandard Error of Prediction (SEP) = 386.83  $\text{mg kg}^{-1}$  ค่า Residual predictive deviation (RPD) = 6.54 และค่าความผิดพลาดเฉลี่ย (bias) = 86.30  $\text{mg kg}^{-1}$  ค่าทำนายปริมาณสารคอร์โดเซปินอยู่ใกล้เส้น Target line บ่งบอกถึงการทำนายได้อย่างแม่นยำ

สำหรับแบบจำลองที่ดีที่สุดสำหรับทำนายปริมาณสารคอร์โดเซปินของตัวอย่างที่เป็นดอกสดสับละเอียดสร้างจากเส้นสเปกตรัมที่มีการปรับแต่งโดยวิธี COE ได้ค่า  $R^2_p$  = 0.98, ค่า SEP = 283.69  $\text{mg kg}^{-1}$ , ค่า RPD = 8.09 และค่าความผิดพลาดเฉลี่ย (bias) = -1.05  $\text{mg kg}^{-1}$  ค่าทำนายปริมาณสารคอร์โดเซปินอยู่ใกล้เส้น target line บ่งบอกถึงการทำนายได้อย่างแม่นยำ

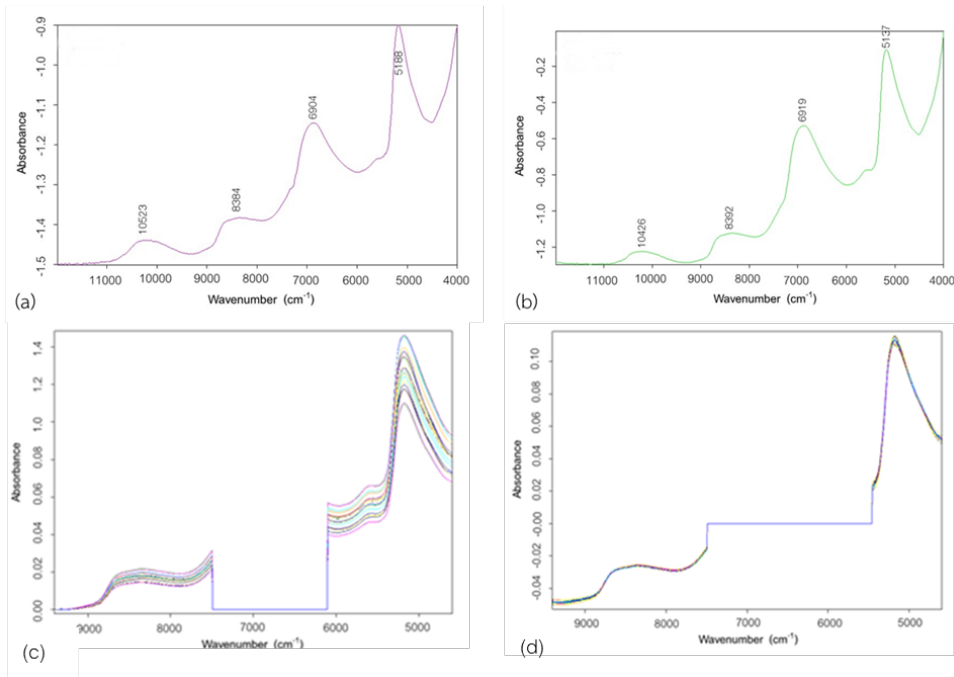


Figure 1 NIR Spectra of *Cordyceps militaris* (a) from average original spectrum of fresh fruiting bodies (b) from average original spectrum of chopped fresh fruiting bodies (c) from chopped fresh fruiting bodies using constant offset elimination (COE) (d) from chopped fresh fruiting bodies using vector normalization (SNV)

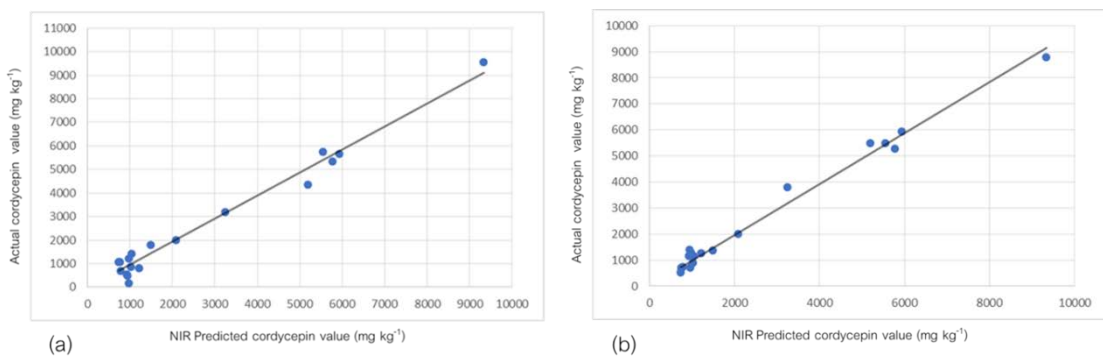


Figure 2 Scatter plots of actual and NIR predicted cordycepin concentration of validation set from two samples preparation; namely, (a) fresh fruiting bodies (b) chopped fresh fruiting bodies

### 3. การทดสอบสมการกับกลุ่มตัวอย่าง

เมื่อทำการทดสอบความแม่นยำของสมการทั้งสองสมการกับตัวอย่างเห็ดถึงเช่าสีทองกลุ่มใหม่จำนวน 10 ตัวอย่าง พบว่า สมการที่สามารถทำนายปริมาณสารคอร์ไดเซปินได้ใกล้เคียงกับวิธีมาตรฐาน HPLC มากที่สุด คือ แบบจำลองที่ดีที่สุดสำหรับทำนายปริมาณสารคอร์ไดเซปินของตัวอย่างที่เป็นดอกสดสับละเอียดสร้างจากเส้นสเปกตรัมที่มีการปรับแต่งโดยวิธี COE

**Table 1** The predicted values of cordycepin concentration using the new sample (n=10) test set based on the optimally-established equations of two sample forms and actual values determined by HPLC.

Sample test	Cordycepin concentration using the HPLC method (mg kg <sup>-1</sup> )	Cordycepin concentration using NIR method (mg kg <sup>-1</sup> )	
		Fresh fruiting bodies	Chopped fresh fruiting bodies
1	6,249.79	11,302.33	6,270.76
2	5,719.98	12,175.00	5,253.70
3	3,777.77	6,043.80	4,416.10
4	4,308.65	10,575.66	4,565.96
5	3,510.89	8,799.03	4,457.20
6	5,214.33	8,714.43	5,755.06
7	3,984.07	11,363.00	3,558.70
8	5,237.84	8,995.96	5,042.56
9	9,081.82	9,355.56	4,696.36
10	6,157.45	10,337.03	6,156.26

### วิจารณ์ผล

แบบจำลองของสมการที่ดีที่สุดสำหรับทำนายปริมาณสารคอร์ไดเซปินสร้างจากสเปกตรัมที่วัดจากดอกเห็ดสดสับละเอียดและมีการปรับแต่งสเปกตรัมโดยวิธี COE โดยให้ผลการทำนายสารคอร์ไดเซปินใกล้เคียงกับวิธีมาตรฐาน HPLC มากที่สุด ซึ่งวิธีดังกล่าวอาจทำให้สามารถลดอิทธิพลเกี่ยวกับความสม่ำเสมอของตัวอย่าง หรือความแน่นเนื้อของตัวอย่างสดที่มีผลต่อค่าดูดกลืนแสงที่อาจเบี่ยงเบนไป โดยมีค่า RPD เท่ากับ 8.90 ซึ่งอยู่ในระดับสูงและสามารถนำไปประยุกต์ใช้ได้ทุกงาน (รณฤทธิ์, 2555) เมื่อพิจารณา ค่า Regression coefficient ของสมการดังกล่าว พบว่า เลขคลื่นหลักที่มีอิทธิพลต่อการสร้างสมการทำนายสารคอร์ไดเซปินได้แก่ 8868, 7723, 7101 และ 6741 cm<sup>-1</sup> ซึ่งเป็นช่วงคลื่นที่เกี่ยวข้องกับสารประกอบทางเคมีกลุ่มของโปรตีนและน้ำตาล (Siesler *et al*, 2002) ซึ่งเป็นส่วนประกอบโครงสร้างหลักของสารอะดีโนซีนและคอร์ไดเซปิน

### สรุปผลการทดลอง

เครื่อง Near Infrared Spectrometer (NIRS) แบบตั้งโต๊ะสามารถนำไปใช้วัดปริมาณสารคอร์ไดเซปินแทนการวิเคราะห์แบบเดิมโดยวิธี HPLC ได้อย่างมีประสิทธิภาพ สามารถช่วยลดขั้นตอนที่ยุ่งยากในการเตรียมตัวอย่างและลดระยะเวลาในการวิเคราะห์ผลได้เร็วขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการเตรียมตัวอย่างในรูปแบบอื่นๆ

### คำขอขอบคุณ

ขอขอบคุณโครงการพัฒนานักวิจัยและงานวิจัยเพื่ออุตสาหกรรม สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย ร่วมกับบริษัท ตั้งเจ้าทองคำ จำกัด ที่ให้การสนับสนุนเงินทุนวิจัย และขอขอบคุณสถานวิจัยเพื่อความเป็นเลิศทางวิชาการด้านเทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยว และห้องปฏิบัติการกลาง คณะเกษตรศาสตร์ทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยนเรศวร สำหรับอุปกรณ์และเครื่องมือในการดำเนินการวิจัยครั้งนี้

### เอกสารอ้างอิง

- รณฤทธิ์ ฤทธิ์รณ. 2555. การสร้างระบบ NIR สำหรับการวิเคราะห์ประจำวัน. น. 152. ใน วารุณี ธนะแพทย์, สุมาพร เกษมสำราญ, ศิวลักษณ์ ปรูวีรัตน์, อนุพันธ์ เทอดวงศ์วรกุล และรณฤทธิ์ ฤทธิ์รณ. เทคโนโลยีอินฟราเรดย่านใกล้และการประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรม. สถาบันค้นคว้าและพัฒนาผลผลิตทางการเกษตร และ คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- Huang, L., Q. Li, Y. Chen, X. Wang and X. Zho. 2009. Determination and analysis of cordycepin and adenosine in products of *Cordyceps* spp. African Journal of Microbiology Research 3(12) : 957-961.
- Osborne, B.G., T. Fearn and P.H. Hindle. 1993. Practical NIR Spectroscopy with Applications in Food and Beverage Analysis. Longman Scientific & Technical, Singapore. p. 29.
- Siesler, H.W., Y. Ozaki, S. Kawata, H.M. Heis. 2002. Near-Infrared Spectroscopy. Principles, Instruments, Applications. WILEY-VCH Verlag GmbH. p. 361.
- Xie, C., N. Xu, Y. Shao and Y. He. 2015. Using FT-NIR spectroscopy technique to determine arginine content in fermented *Cordyceps sinensis* mycelium. Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy 149: 971-977.