การวิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญในใบชาเขียว โดยเทคนิค Near Infrared Spectroscopy

Analysis of Tea Components by Near Infrared Spectroscopy Technique

นฤเทพ เวชภิบาล[1] และ จารุวรรณ บางแวก[1]

Naruthep Wechpibal[1] and Charuwan Bangwaek[1]

[1] กองวิจัยและพัฒนาวิทยาการหลังการเก็บเกี่ยวและแปรรูปผลิตผลเกษตร กรมวิชาการเกษตร กรุงเทพฯ

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

.....

Abstract

The Near Infrared Spectroscopy (NIRS) shows promise in carrying out the non-destructive quality determination for agricultural products because of its fast and accurate technique. It can be employed as a replacement of time-consuming chemical method. The contents of ten components (caffeine; Caf, catechin; C, gallic acid; GA, gallocatechin; GC, catechin gallate; CG, gallocatechin gallate; GCG, epicatechin; EC, epicatechin-3-gallate; ECG, epigallocatechin; EGC and epigallocatechin-3-gallate; EGCG) in tea leaves were predicted by NIRS. Grinded tea leaf samples were randomized and measured the spectrum by NIRSystems 6500 in wavelength region from 400 nm to 2500 nm. The contents of ground tea leaves were determined by High Performance Liquid Chromatograph (HPLC) method and conducted from October 2013 to September 2015 at Postharvest and Processing Research and Development Division, Bangkok. The average contents of each 10 compounds; Caf, C, GA, GC, CG, GCG, EC, ECG, EGC and EGCG were 37.804, 11.722, 10.207, 13.999, 8.237, 8.116, 20.202, 26.027, 57.730 and 74.262 ppm, respectively. Partial least squares regression (PLSR) was used to develop the calibration equation for prediction. The correlation coefficient (R) of ECG, EGCG, EC, C, Caf, EGC, GC, GA, CG and GCG from calibration model were 0.976, 0.954, 0.952, 0.939, 0.938, 0.938, 0.918, 0.888, 0.866 and 0.863 ppm, respectively. The standard error of calibration (SEC) of ECG, EGCG, EC, C, Caf, EGC, GC, GA, CG and GCG were 3.483, 6.973, 2.236, 1.429, 2.762, 7.606, 1.515, 1.417, 1.399 and 1.330 ppm, respectively. The standard error of prediction (SEP) of ECG, EGCG, EC, C, Caf, EGC, GC, GA, CG and GCG were 3.997, 8.224, 2.477, 1.570, 2.907, 8.099, 1.630, 1.518, 1.490 and 1.375 ppm, respectively. The results were found that the calibration equations from obtained experiment had high values of R and low values of SEC and SEP which were indicating a good correlation

between reference values and NIRS predicted values. Therefore, these results suggest that NIRS could be applied for the rapid determination of ten component contents in tea leaves.

Keywords : Near Infrared Spectroscopy (NIRS), components, tea leaves , High Performance Liquid Chromatograph, Partial least squares regression

บทคัดย่อ

เทคนิค Near Infrared Spectroscopy (NIRS) เป็นวิธีการวิเคราะห์ตัวอย่างแบบไม่ทำลายวิธีหนึ่งที่ถูกนำมาใช้กับผลิตผลทางการเกษตรหลายชนิดเนื่องจากเป็นเทคนิคตรวจวิเคราะห์ที่รวดเร็ว และถูกต้อง สามารถที่จะนำมาใช้ทดแทนการวิเคราะห์ทางเคมีที่ใช้เวลานาน เทคนิค NIRS ถูกนำมาใช้ในการทำนายปริมาณสารสำคัญจำนวน 10 ชนิด ได้แก่ คาเฟอีน (Caf), คาเทชิน (Catechin; C), กรดแกลลิค (GA), แกลโลคาเทชิน (GC), คาเทชินแกลแลต (CG), แกลโลคาเทชินแกลเลต (GCG), อิพิคาเทชิน (EC), อิพิคาเทชิน 3-แกลเลต (ECG), อิพิแกลโลคาเทชิน (EGC) และอิพิแกลโลคาเทชิน 3-แกลเลต (Epigallocatechin-3-gallate; EGCG) ในใบชา โดยทำการสุ่มตัวอย่างใบชาบดละเอียดมาวัดสเปกตรัมด้วยเครื่อง NIRSystems 6500 ในช่วงความยาวคลื่น 400-2500 นาโนเมตร และวิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญในใบชาโดยเทคนิคโครมาโทกราฟเหลวความดันสูง (HPLC) ในระหว่างเดือนตุลาคม 2556 ถึง กันยายน 2558 ณ กองวิจัยและพัฒนาวิทยาการหลังการเก็บเกี่ยวและแปรรูปผลิตผลเกษตร กรุงเทพฯ ปริมาณโดยเฉลี่ยของสารสำคัญทั้ง 10 ชนิด (Caf, C, GA, GC, CG, GCG, EC, ECG, EGC และ EGCG) เท่ากับ 37.804, 11.722, 10.207, 13.999, 8.237, 8.116, 20.202, 26.027, 57.730 และ 74.262 ppm ตามลำดับ นำค่าที่ได้มาสร้างสมการทำนายด้วยเทคนิค partial least squares regression (PLSR) ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (R) ของสาร ECG, EGCG, EC, C, Caf, EGC, GC, GA, CG and GCG เท่ากับ 0.976, 0.954, 0.952, 0.939, 0.938, 0.938, 0.918, 0.888, 0.866 และ 0.863 ppm ตามลำดับ ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานในการทำนายปริมาณสารสำคัญในกลุ่ม calibration (SEC) ของสาร ECG, EGCG, EC, C, Caf, EGC, GC, GA, CG และ GCG เท่ากับ 3.483, 6.973, 2.236, 1.429, 2.762, 7.606, 1.515, 1.417, 1.399 และ 1.330 ppm ตามลำดับ ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานในการทำนายปริมาณปริมาณสารสำคัญในกลุ่ม validation (SEP) ของสาร ECG, EGCG, EC, C, Caf, EGC, GC, GA, CG และ GCG เท่ากับ 3.997, 8.224, 2.477, 1.570, 2.907, 8.099, 1.630, 1.518, 1.490 และ 1.375 ppm ตามลำดับ จากผลการทดลองพบว่าสมการที่ได้ให้ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์สูงและให้ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานในกลุ่ม calibration และกลุ่ม validation ต่ำ ซึ่งแสดงให้เห็นถึงความสัมพันธ์ที่ดีระหว่างค่าอ้างอิง และค่าที่ทำนายได้ ดังนั้นจึงสามารถใช้เทคนิค NIRS ตรวจหาปริมาณสารสำคัญทั้ง 10 ชนิดในใบชาได้

คำหลัก : Near Infrared Spectroscopy (NIRS), สารสำคัญ, ใบชา, High Performance Liquid Chromatograph, Partial least squares regression (PLSR)

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 ชาถูกจัดประเภทตามกระบวนการแปรรูป หลังจากการเก็บเกี่ยวใบของชาจะถูกทิ้งให้สลดและบ่ม โดยทำให้เอนไซม์ในใบชาเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันกับออกซิเจนในอากาศ ใบชาจะมีสีเข้มขึ้น คลอโรฟิลล์ในใบชาจะแตกตัว กลายเป็นสารแทนนินให้รสฝาด ต่อจากนั้นต้องหยุดการทำงานของเอนไซม์ โดยใช้ความร้อนเพื่อให้หยุดปฏิกิริยาออกซิเดชัน จากการศึกษาพบว่า ใบชาอุดมไปด้วยสารคาเฟอีน (Caffeine; Caf) และสารพอลิฟีนอล (polyphenol) ซึ่งสารพอลิฟีนอลที่มักพบในชาได้แก่ คาเทชิน (Catechin; C), กรดแกลลิค (Gallic acid; GA), แกลโลคาเทชิน (Gallocatechin; GC), คาเทชินแกลแลต (Catechin gallate; CG), แกลโลคาเทชินแกลเลต (Gallocatechin gallate; GCG), อิพิคาเทชิน (Epicatechin; EC), อิพิคาเทชิน 3-แกลเลต (Epicatechin-3-gallate; ECG), อิพิแกลโลคาเทชิน (Epigallocatechin; EGC) และอิพิแกลโลคาเทชิน 3-แกลเลต (Epigallocatechin-3-gallate; EGCG) (Figure 1) สารพอลิฟีนอลในชาเขียวมีสมบัติเป็นโภชนเภสัชสามารถออกฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ ซึ่งช่วยกำจัดอนุมูลอิสระที่เป็นพิษต่อร่างกายช่วยให้สุขภาพดีขึ้นป้องกันการเกิดมะเร็ง ช่วยลดระดับไขมันในเลือด ลดการเกิดหลอดเลือดแข็งตัว (arthrosclerosis) ลดระดับน้ำตาลในเลือด ช่วยในการเพิ่มการเผาผลาญพลังงาน และไขมันซึ่งมีผลต่อการลดน้ำหนัก รักษาสุขภาพช่องปาก เสริมสร้างกระดูกและฟันให้แข็งแรง ยับยั้งแบคทีเรียที่ทำให้ฟันผุ ลดอัตราการเสี่ยงจากการเป็นโรคหัวใจ ชะลอภาวะแก่ก่อนวัย (anti-aging) ช่วยกระตุ้นให้ระบบประสาท และร่างกายทำงานได้อย่างมีประสิทธิภาพ เพิ่มความยืดหยุ่นกล้ามเนื้อหัวใจและขยายผนังหลอดเลือด ช่วยให้ร่างกายรู้สึกสดชื่น

กระปรี้กระเปร่า และลดอาการตึงเครียดจากการทำงานหนักเนื่องจากคาเฟอีน ยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมัน (lipid oxidation) ป้องกันการเกิดกลิ่นหืนในอาหารได้ด้วย และมีฤทธิ์ในการช่วยล้างพิษออกจากร่างกาย (detoxicating potential) เป็นต้น (ศิริธร, 2557) ปัจจุบันนี้การวิเคราะห์สารสำคัญที่อยู่ในชาสามารถใช้เทคนิคโครมาโทกราฟเหลวความดันสูง (High Performance Liquid Chromatograph; HPLC) และเทคนิคแคปิลลารีอิเล็กโตรโฟรีซีส (Capillary Electrophoresis; CE) แม้ว่าวิธีการนี้จะให้ผลการวิเคราะห์ที่แม่นยำ และถูกต้อง แต่พบว่าเป็นวิธีที่ใช้ระยะเวลาในการวิเคราะห์นาน ใช้ผู้วิเคราะห์ที่มีประสบการณ์ ค่าใช้จ่ายสูง และเป็นทำลายตัวอย่าง (Kim *et al*., 2007) Near Infrared Spectroscopy (NIRS) เป็นเทคนิคที่ถูกใช้ประเมินปริมาณสารสำคัญในชาแบบไม่ทำลายผลิตผล (nondestructive) ซึ่งเป็นวิธีการประเมินคุณภาพที่ได้รับความนิยมเพิ่มมากขึ้นในปัจจุบัน เทคนิค NIRS เป็นเทคนิคบนพื้นฐานของการดูดกลืนแสงย่านใกล้อินฟราเรดของสารประกอบอินทรีย์และน้ำ เมื่อคลื่นแสงมาจากแหล่งกำเนิดแสง (light source) จะส่องมายังวัตถุ หรือสารละลายบนตัวอย่าง จะทำให้โมเลกุลของสารตัวอย่างเกิดการสั่นสะเทือน และดูดกลืนแสง ส่วนแสงที่เหลือจะมีการสะท้อน และส่องผ่านจากตัวอย่างไปยังถึงตัวรับแสง (NIR detector) ซึ่งตัวรับแสงจะส่งสัญญาณสู่คอมพิวเตอร์ จากนั้นคอมพิวเตอร์จะแปลงสัญญาณ NIR Spectrum มาทำการวิเคราะห์ข้อมูลทางเคมี ซึ่งวิเคราะห์ทั้งเชิงปริมาณ และคุณภาพ (พจนา และคณะ, 2556) ข้อดีของเทคนิคนี้คือการเตรียมตัวอย่างเพียงเล็กน้อย ให้ผลการวิเคราะห์ที่รวดเร็วและน่าเชื่อถือ โดยไม่ทำลายตัวอย่าง ไม่ใช้สารเคมีหรือทิ้งสารตกค้าง ทำให้ไม่ก่อให้เกิดมลพิษต่อสิ่งแวดล้อม (Iwamoto *et al*., 1995*)* แต่การวิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญในใบชาด้วยเทคนิค NIRS นั้นต้องสร้างสมการเทียบมาตรฐานที่มีความแม่นยำเพื่อที่จะสามารถทำนายปริมาณสารสำคัญในใบชาได้อย่างถูกต้อง และทดแทนวิธีการวิเคราะห์ในห้องปฏิบัติการได้

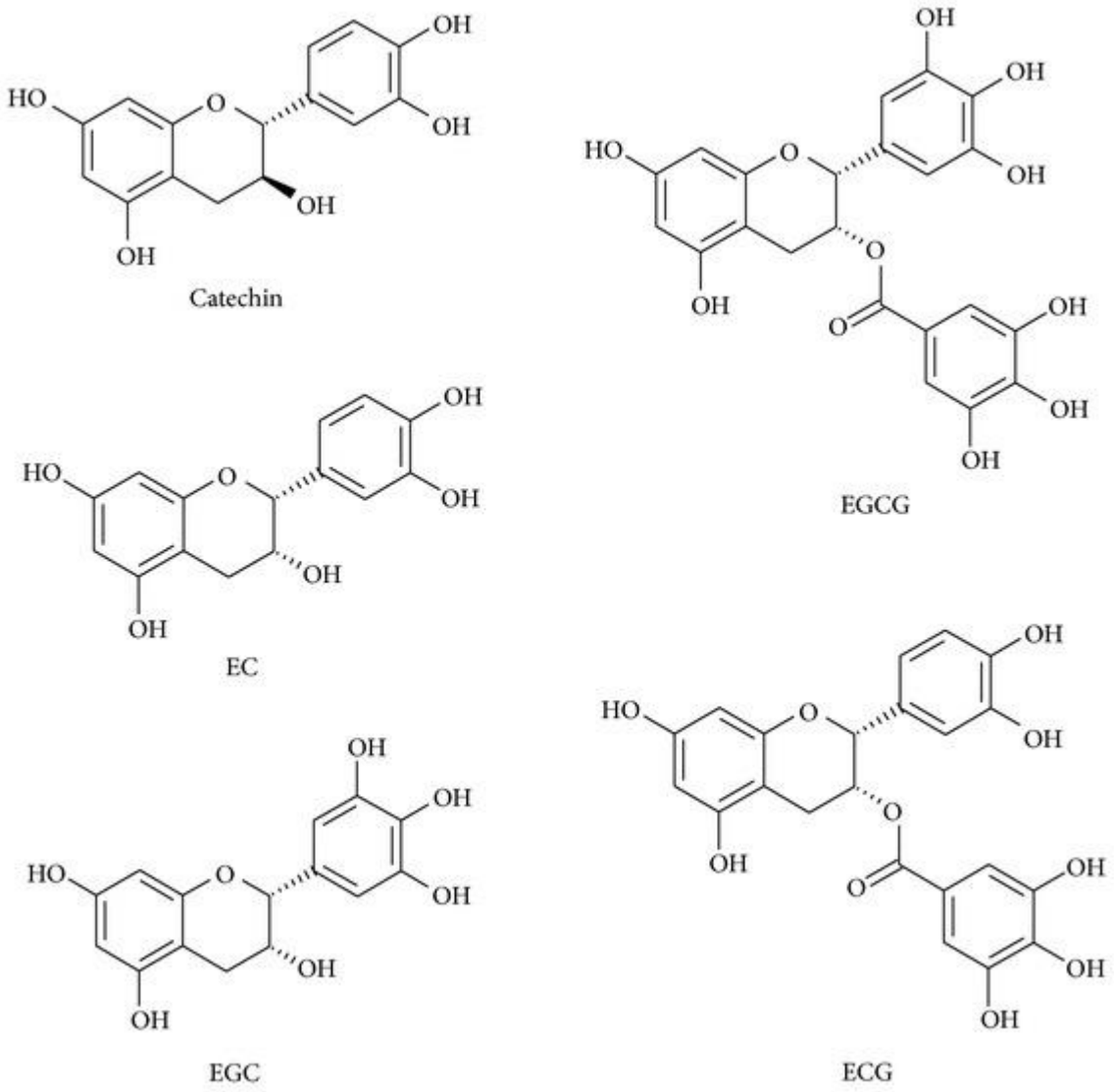

Figure 1 Chemical structures of major components; epigallocatechin gallate (EGCG), epicatechin gallate (ECG), epicatechin (EC), epigallocatechin (EGC), and catechin present in tea leaves. (Rusak *et al*., 2008)

วัตถุประสงค์

เพื่อนำเทคนิค NIRS ประยุกต์ใช้ประเมินปริมาณสารสำคัญในใบชาเขียวทดแทนวิธีการวิเคราะห์ในห้องปฏิบัติการ

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. เครื่อง Near Infrared Spectroscopy จากบริษัท FOSS รุ่น 6500
2. ตัวอย่างชา จำนวน 450 ตัวอย่าง
3. เครื่อง HPLC
4. เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง
5. เซลล์บรรจุตัวอย่างสำหรับเมล็ดธัญพืช โปรแกรม The Unscrambler® version 7.6 (CAMO, Oslo, Norway)
6. สารมาตรฐาน จำนวน 10 ชนิด
    - 6.1 คาเทชิน Catechin (C)
    - 6.2 กรดแกลลิค (Gallic Acid; GA)
    - 6.3 แกลโลคาเทชิน gallocatechin (GC)
    - 6.4 catechin gallate (CG)
    - 6.5 gallocatechin gallate (GCG)
    - 6.6 อิพิคาเทชิน epicatechin (EC)
    - 6.7 อิพิคาเทชิน 3-แกลเลต epicatechin-3-gallate (ECG)
    - 6.8 อิพิแกลโลคาเทชิน epigallocatechin (EGC)
    - 6.9 อิพิแกลโลคาเทชิน 3-แกลเลต epigallocatechin-3-gallate (EGCG)
    - 6.10 คาเฟอีน (Caffeine; Caf)

วิธีการ

1. รวบรวมตัวอย่างชาเขียวที่จำหน่ายจากแหล่งต่างๆ ในจังหวัดเชียงราย เชียงใหม่ และกรุงเทพฯ จำนวน 450 ตัวอย่าง
2. สร้างเส้นมาตรฐานหรือกราฟมาตรฐาน (standard curve หรือ calibration curve) ของสารสำคัญ จำนวน 10 ชนิด ได้แก่ สารคาเฟอีน (caffeine) และสารกลุ่มคาเทชินส์ (catechins) เช่น catechin (C), gallic acid (GA), gallocatechin (GC), catechin gallate (CG), gallocatechin gallate (GCG), epicatechin (EC), epicatechin-3-gallate (ECG), epigallocatechin (EGC) แ ล ะ

epigallocatechin-3-gallate (EGCG) โดยทำการเตรียมความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานที่ความเข้มข้นต่างๆ กัน อย่างน้อย 5 ความเข้มข้นๆ ละ 3 ซ้ำ โดยความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานจะครอบคลุมความเข้มข้นของสารละลายตัวอย่างชาที่จะนำมาวิเคราะห์

3. ทำการฉีดสารละลายมาตรฐานเข้าไปในเครื่องโครมาโตกราฟีแบบของเหลวแรงดันสูง (HPLC) โดยใช้คอลัมน์รีเวอร์สเฟส ซี-18 (Reverse phase column C18) และตัวตรวจวัดยูวี (UV detector) เพื่อนำความสูงของพีคมาสร้างเป็นเส้นมาตรฐานระหว่างความสูงของพีคกับความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน
4. นำตัวอย่างชาเขียวที่เก็บรวบรวมมา บดให้ละเอียดนาน 10 วินาที ด้วยเครื่องบดกาแฟ
5. ชั่งตัวอย่างชาบดละเอียดหนัก 2.000 กรัม แล้วนำมาสกัดด้วยเมทานอล 70 เปอร์เซ็นต์ปริมาตร 80 มิลลิลิตร แล้วต้มในน้ำร้อนที่อุณหภูมิ 80 ± 2 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที และสกัดจากตัวอย่างแรกอีกครั้ง (รวมเป็นจำนวน 2 ครั้ง)
6. หลังจากอุณหภูมิสารละลายตัวอย่างลดลง ให้นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,500 rpm นาน 10 นาที แล้วดูดชั้นของเหลว (liquid phase) ใส่ในขวดปรับปริมาตร 250 มิลลิลิตร จากนั้นจึงปรับปริมาตรให้เป็น 250 มิลลิลิตรด้วยเมทานอล 70 เปอร์เซ็นต์
7. ก่อนฉีดเข้าเครื่อง HPLC ให้กรองสารละลายตัวอย่างผ่านตัวกรองขนาด 0.45 ไมโครเมตร โดยใช้สภาวะ (condition) การแยกสารเหมือนกันกับการฉีดสารละลายมาตรฐาน
8. แบ่งตัวอย่างชาเขียวบดละเอียดไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง Near Infrared Spectroscopy ที่ความยาวคลื่น 400 – 2500 นาโนเมตร โดยวัดการสะท้อนกลับของแสง (reflectance)
9. นำ spectra ต้นแบบ (original spectra) ที่ได้ หรืออาจทำการแปลงผลข้อมูลเพื่อลดผลกระทบจากปัจจัยต่างๆ เช่น noise หรือ errors จากการวัดที่ปรากฏใน spectrum นำข้อมูลที่ได้ทั้งหมดมาวิเคราะห์เปรียบเทียบเพื่อหาวิธีที่ดีที่สุด สร้างสมการถดถอยเชิงเส้น ด้วยเทคนิค partial least square regression (PLSR) จากโปรแกรมสำเร็จรูป The Unscrambler (Camo, Oslo, Norway) ด้วยการวิเคราะห์ตัวอย่างทั้งหมดแบบ Full cross validation
10. ทำการคัดเลือกสมการโดยพิจารณาค่า Standard Error of Calibration (SEC) และค่า Correlation Coefficient (R) ตรวจสอบความแม่นยำของสมการที่สร้างขึ้นโดยเปรียบเทียบค่า Standard Error of Prediction (SEP) และ Bias เพื่อประเมินโดยใช้ข้อมูลในส่วนที่ไม่ได้ใช้ในการทำสมการ
11. นำสมการที่ได้ไปประยุกต์ใช้กับผลิตภัณฑ์จากชา และเผยแพร่ให้แก่หน่วยงานที่เกี่ยวข้องเพื่อใช้เป็นทางเลือกในการวัดปริมาณสารสำคัญในใบชาต่อไป

เวลา ตุลาคม 2556 – กันยายน 2558

สถานที่ กองวิจัยและพัฒนาวิทยาการหลังการเก็บเกี่ยวและแปรรูปผลิตผลเกษตร

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

คุณสมบัติของตัวอย่างที่ใช้ในการทำสมการ

ตัวอย่างชาที่บดละเอียด จำนวน 420 ตัวอย่าง ถูกนำมาทดลองในห้องปฏิบัติการเพื่อหาปริมาณสารสำคัญโดยวิธีดัดแปลง ISO (2006) เพื่อใช้ทำสมการสำหรับประเมินปริมาณสารสำคัญ จำนวน 10 ชนิด ได้แก่ คาเฟอีน (Caffeine; Caf) คาเทชิน (Catechin; C), กรดแกลลิค (Gallic acid; GA), แกลโลคาเทชิน (Gallocatechin; GC), คาเทชินแกลแลต (Catechin gallate; CG), แกลโลคาเทชินแกลเลต (Gallocatechin gallate; GCG), อิพิคาเทชิน (Epicatechin; EC), อิพิคาเทชิน 3-แกลเลต (Epicatechin-3-gallate; ECG), อิพิแกลโลคาเทชิน (Epigallocatechin; EGC) และอิพิแกลโลคาเทชิน 3-แกลเลต (Epigallocatechin-3-gallate; EGCG) ในใบชา (Table 1)

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

Compounds	No. of samples	Compound contents (ppm)		
		Min	Max	Average
1.Gallic Acid (GA)	270	5.652	16.187	10.207
2.Gallocatechin (GC)	225	5.097	22.178	13.999
3.Epigallocatechin (EGC)	262	6.998	111.583	57.730
4.Catechin (C)	180	5.385	22.019	11.722
5.Caffein (Caf)	297	23.469	58.172	37.804
6.Epicatechin (EC)	179	5.649	39.114	20.202
7.Epigallocatechin Gallate (EGCG)	134	7.796	127.010	74.262

8.Gallocatechin Gallate (GCG)	291	5.097	14.115	8.116
9.Epicatechin Gallate (ECG)	151	5.502	72.786	26.027
10.Catechin Gallate (CG)	307	5.523	13.434	8.237

ค่าการดูดซับแสงที่ความยาวคลื่นต่างๆ ของตัวอย่างชา

ค่าการดูดซับแสง (absorbance) ที่ความยาวคลื่นต่างๆ ของชาซึ่งมีปริมาณสารสำคัญ จำนวน 10 ชนิด (Caf, C, GA, GC, G, GCG, EC, ECG, EGC และ EGCG) แสดงใน Figure 2 ความยาวคลื่นที่มีค่าการดูดซับแสง 1690 1725 2326 2350 และ 2000 นาโนเมตร ซึ่งมีความสัมพันธ์กับพันธะ $-CH_3$, CH_2, CH_2, CH_2 และ $CONH_2$ ตามลำดับ ที่มักพบมากในสารคาเฟอีนในใบชา ในขณะที่ความยาวคลื่นที่มีค่าการดูดซับแสง 1920 และ 2140 นาโนเมตร ซึ่งมีความสัมพันธ์กับพันธะ -OH และ HC=CH ตามลำดับ โดยมีความสัมพันธ์กับสารพอลิฟีนอล (polyphenol) ที่มักพบในใบชาเช่นกัน (Lee *et al., 2014)*

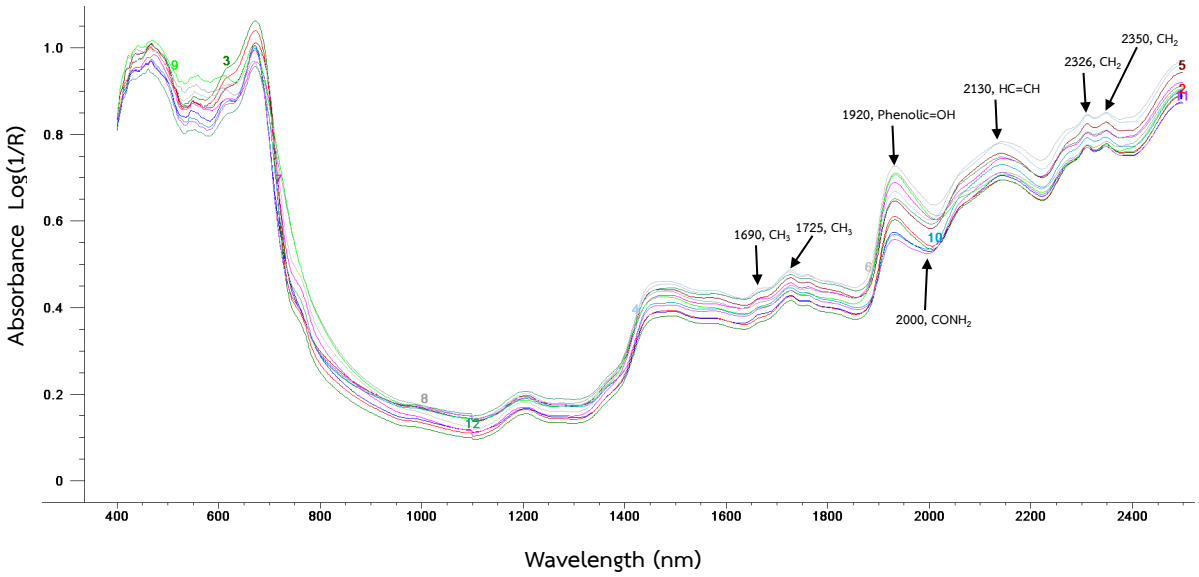

Figure 2 Original spectrum of tea samples in wavelength range 400 – 2500 nm.

การทำ Calibration ด้วย Partial Least Square Regression

จากการทำ calibration สารสำคัญในใบชาแต่ละชนิด ด้วยวิธี Partial Least Square Regression (PLSR) ทำการวิเคราะห์แบบ Full cross-validation โดยการใช้สเปกตรัมดังเดิม (original spectrum) ที่ความยาวคลื่นช่วง 400-2500 นาโนเมตร พบว่า

กรดแกลลิค (GA) มีค่าสัมประสิทธ์สหสัมพันธ์ (Coefficient of correlation, R) เท่ากับ 0.888 ในขณะที่ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานในกลุ่มสร้างสมการ (Standard error of calibration, SEC) เท่ากับ 1.417 ppm

ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานในกลุ่มทดสอบสมการ (Standard error of prediction, SEP) เท่ากับ 1.518 ppm ค่าเฉลี่ยของผลต่างระหว่างค่าที่ได้จากวิธีอ้างอิงกับค่าที่ได้จาก NIRS (averages of difference between actual and NIR values, Bias) เท่ากับ 0.001 ppm ปัจจัยที่เกี่ยวข้อง (Factor, F) จำนวน 9 ปัจจัย และค่าความคลาดเคลื่อน (Standard deviation, SD) 3.081 ppm (Table 2, Figure 3)

สารแกลโลคาเทชิน (GC) มีค่า R, SEC, SEP, Bias, F และ SD เท่ากับ 0.918, 1.513 ppm, 1.630 ppm, 0.001 ppm, 9 และ 3.822 ppm ตามลำดับ (Table 2, Figure 4)

สารอิพิแกลโลคาเทชิน (EGC) มีค่า R, SEC, SEP, Bias, F และ SD เท่ากับ 0.938, 7.606 ppm, 8.099 ppm, -0.024 ppm, 8 และ 20.170 ppm ตามลำดับ (Table 2, Figure 5)

สารคาเทชิน (C) มีค่า R, SEC, SEP, Bias, F และ SD เท่ากับ 0.939, 1.429 ppm, 1.570 ppm, -0.004 ppm, 9 และ 4.159 ppm ตามลำดับ (Table 2, Figure 6)

สารคาเฟอีน (Caf) มีค่า R, SEC, SEP, Bias, F และ SD เท่ากับ 0.938, 2.762 ppm, 2.907 ppm, 0.001 ppm, 8 และ 7.981 ppm ตามลำดับ (Table 2, Figure 7)

สารอิพิคาเทชิน (EC) มีค่า R, SEC, SEP, Bias, F และ SD เท่ากับ 0.952, 2.236 ppm, 2.477 ppm, -0.007 ppm, 9 และ 7.301 ppm ตามลำดับ (Table 2, Figure 8)

สารอิพิแกลโลคาเทชิน 3-แกลเลต (EGCG) มีค่า R, SEC, SEP, Bias, F และ SD เท่ากับ 0.954, 6.973 ppm, 8.224 ppm, -0.039 ppm, 9 และ 23.316 ppm ตามลำดับ (Table 2, Figure 9)

สารแกลโลคาเทชินแกลเลต (GCG) มีค่า R, SEC, SEP, Bias, F และ SD เท่ากับ 0.863, 1.330 ppm, 1.375 ppm, 0.006 ppm, 8 และ 2.633 ppm ตามลำดับ (Table 2, Figure 10)

สารอิพิคาเทชิน 3-แกลเลต (ECG) มีค่า R, SEC, SEP, Bias, F และ SD เท่ากับ 0.976, 3.483 ppm, 3.997ppm, -0.002 ppm, 9 และ 15.956 ppm ตามลำดับ (Table 2, Figure 11)

และสารคาเทชินแกลแลต (CG) มีค่า R, SEC, SEP, Bias, F และ SD เท่ากับ 0.866, 1.399 ppm, 1.490 ppm, 0.009 ppm, 10 และ 2.797 ppm ตามลำดับ (Table 2, Figure 12)

เมื่อพิจารณาจากค่าสัมประสิทธ์สหสัมพันธ์ (R) ซึ่งจะแสดงให้เห็นถึงความสัมพันธ์ของข้อมูล 2 ชุดที่มีต่อกัน พบว่าสามารถแบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่ม โดยกลุ่มที่ 1 มีค่า R ที่มากกว่า 0.90 (GC, CG, EGC, C, Caf, EC, EGCG และ ECG) แสดงว่าค่าอ้างอิงที่วัดโดยเทคนิค HPLC กับค่าที่ทำนายโดย NIRS มีความสัมพันธ์ที่ดี และสมการมีความแม่นยำ เหมาะสมที่จะนำไปใช้ในการทำนายปริมาณสารสำคัญในชา (Lee *et al., 2014)* และกลุ่มที่ 2 มีค่า R น้อยกว่า 0.90 (GA, GCG และ CG) ชี้ให้เห็นว่าสมการดังกล่าวเหมาะสำหรับการคัดเลือกแบ่งกลุ่ม และประมาณค่า (screening and approximate work) (Williams, 2007) ซึ่งโดยทั่วไปแล้วสารสำคัญทั้ง 3 ชนิด (GA, GCG และ CG) จะมีปริมาณค่อนข้างน้อยในใบชาเมื่อเปรียบเทียบกับสารในกลุ่มที่ 1 จึงจำเป็นต้องเพิ่มจำนวนตัวอย่างที่มีความหลากหลายมากขึ้น เพื่อเป็นการพัฒนาสมการให้สามารถนำไปใช้ในการทำนายสารสำคัญในใบชาได้อย่างแม่นยำต่อไป แต่อย่างไรก็ตามโดยภาพรวมจะพบว่า สมการที่ได้ให้ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์สูง และให้ค่าความ

คลาดเคลื่อนมาตรฐานในกลุ่ม calibration และกลุ่ม validation ต่ำ ซึ่งแสดงให้เห็นถึงความสัมพันธ์ที่ดีระหว่างค่าอ้างอิง และค่าที่ทำนายได้

สรุปผลการทดลอง

จากการศึกษาพบว่า เทคนิค Near Infrared Spectroscopy (NIRS) เป็นเทคนิคการตรวจหาปริมาณสารสำคัญทั้ง 10 ชนิดในใบชาได้ โดยใช้ช่วงคลื่น 400 – 2500 นาโนเมตร และใช้สเปกตรัมดังเดิม (original spectrum) ซึ่งสามารถนำมาใช้ทดแทนการวิเคราะห์ทางเคมีได้

เอกสารอ้างอิง

ธีรพงษ์ เทพกรณ์ กาญจนา พลอยศรี และอนัญญา เอกพันธ์. 2555. องค์ประกอบของกรดไขมันในน้ำมันเนื้อเมล็ดชาอัสสัมของไทย. วารสารวิทยาศาสตร์ มข. 40 (4): 1225- 1235.

พจนา สีมันตร บุบผา คงสมัย พรศิริ เลี้ยงสกุล และชรินรัตน์ กาฬภักดี. 2556. การใช้เนียร์อินฟราเรดรีเฟลคแตนสเปคโตรสโคปีทำนายองค์ประกอบของโปรตีนในข้าวโพดข้าวเหนียว. ว. วิทย. กษ. 44 : 3 (พิเศษ) : 410-413

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*

Rusak, G., D. Komes, S. Likić, D. Horžić and M. Kovač. 2008. Phenolic content and antioxidative capacity of green and white tea extracts depending on extraction conditions and the solvent used. *Food Chemistry*. 110(4):852–858.

Williams, P., 2007. Near-infrared Technology - Getting the Best out of Light. Edition 5.0. A Short Course in the Practical Implementation of Near-Infrared Spectroscopy for the User. PDK Grain, Nanaimo, Canada, pp. (5-1)-(5-17).

ภาคผนวก

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

Compounds	Wavelength (nm)	No. of samples	R	SEC (ppm)	SEP (ppm)	Bias (ppm)	F	SD (ppm)
1.Gallic Acid (GA)	400-2500	270	0.888	1.417	1.518	0.001	9	3.081
2.Gallocatechin (GC)	400-2500	225	0.918	1.513	1.630	0.001	9	3.822
3.Epigallocatechin (EGC)	400-2500	262	0.938	7.606	8.099	-0.024	8	20.170
4.Catechin (C)	400-2500	180	0.939	1.429	1.570	-0.004	9	4.159
5.Caffein (Caf)	400-2500	297	0.938	2.762	2.907	0.001	8	7.981
6.Epicatechin (EC)	400-2500	179	0.952	2.236	2.477	-0.007	9	7.301
7.Epigallocatechin Gallate (EGCG)	400-2500	134	0.954	6.973	8.224	-0.039	9	23.316
8.Gallocatechin Gallate (GCG)	400-2500	291	0.863	1.330	1.375	0.006	8	2.633
9.Epicatechin Gallate (ECG)	400-2500	151	0.976	3.483	3.997	-0.002	9	15.956
10.Catechin Gallate (CG)	400-2500	307	0.866	1.399	1.490	0.009	10	2.797

R: Coefficient of correlation

F: The number of factors used in the calibration equation

SEC: Standard error of calibration

SEP: Stand error of prediction;

Bias: The average difference between actual value and NIRS value

SD: Standard deviation of average

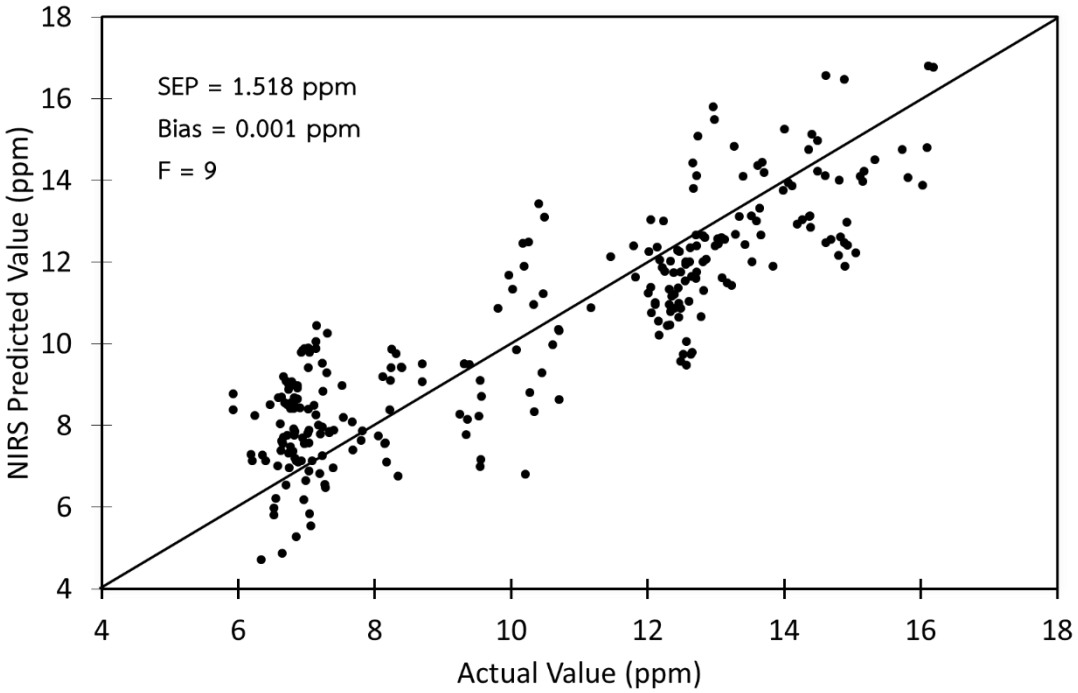

Figure 3. Scatter plot of Gallic Acid (GA) content in tea leaves determined by HPLC (X-axis) vs. by NIRS (Y-axis).

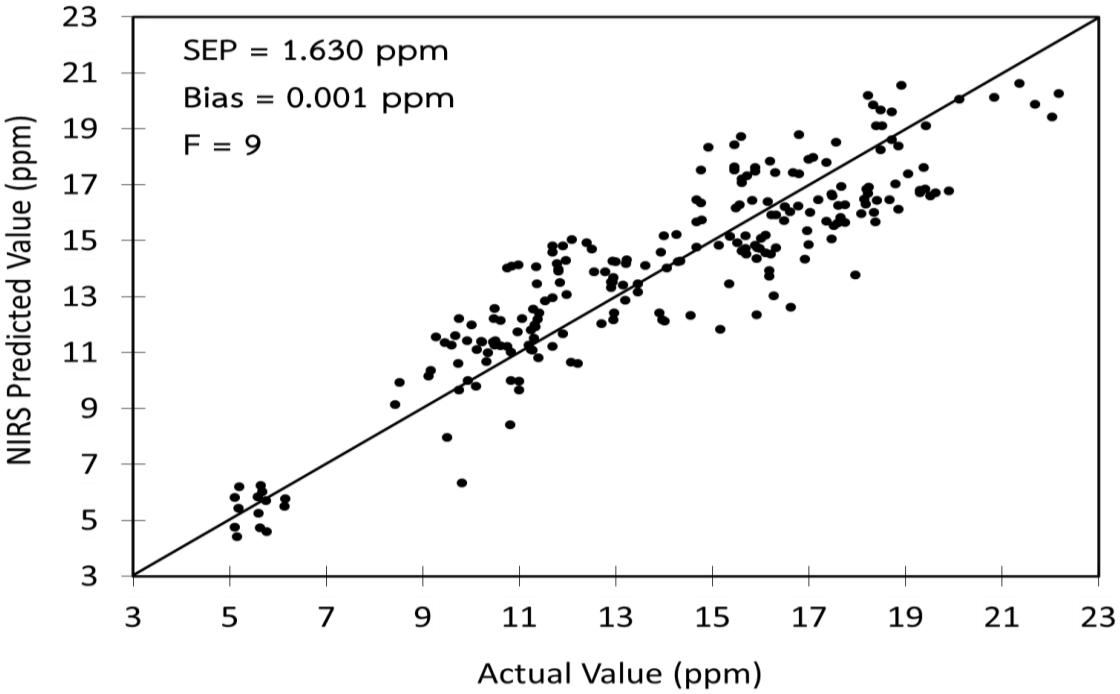

Figure 4. Scatter plot of Gallocatechin (GC) content in tea leaves determined by HPLC (X-axis) vs. by NIRS (Y-axis).

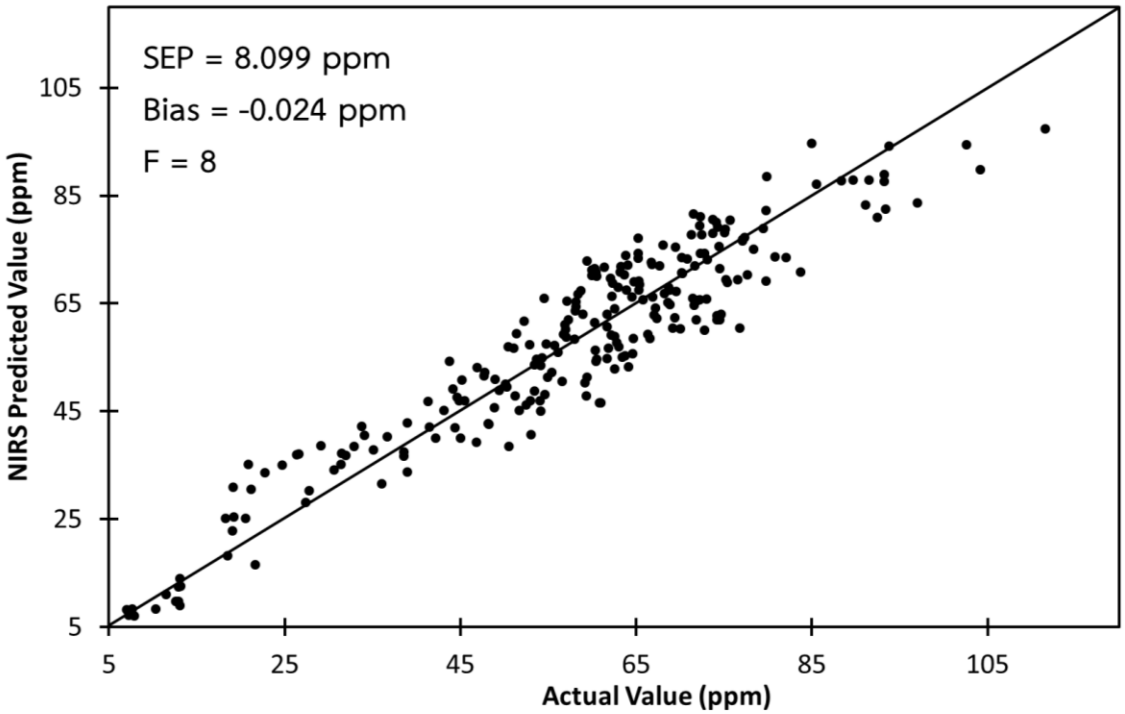

Figure 5. Scatter plot of Epigallocatechin (EGC) content in tea leaves determined by HPLC (X-axis) vs. by NIRS (Y-axis).

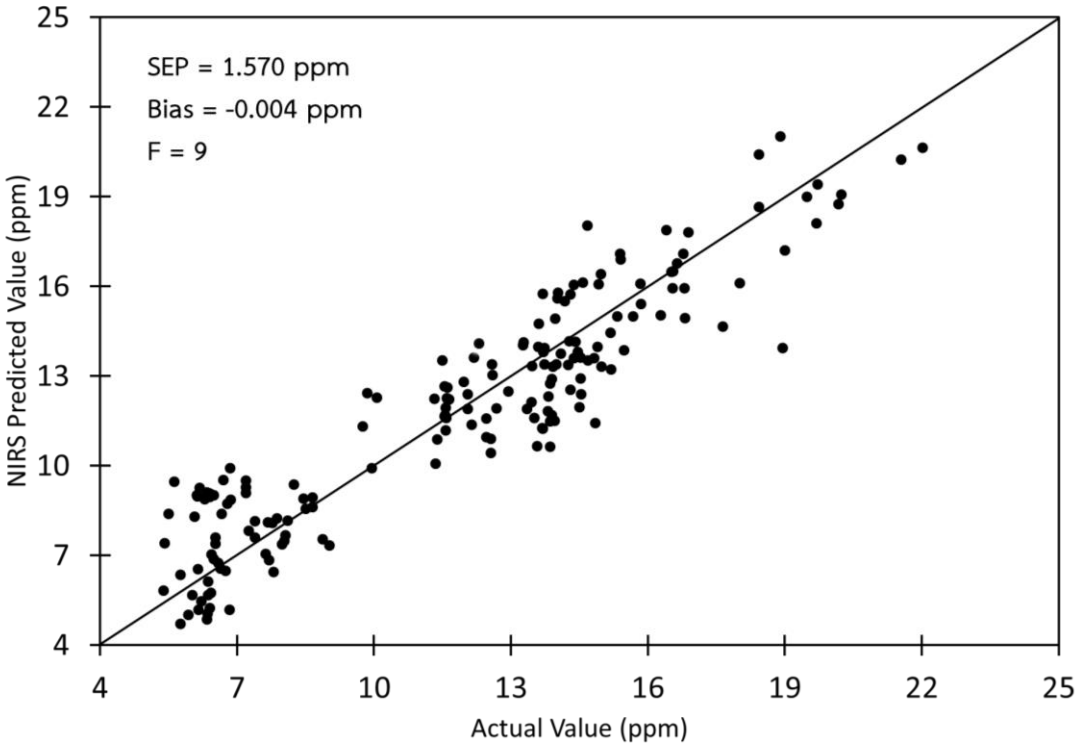

Figure 6. Scatter plot of Catechin (C) content in tea leaves determined by HPLC (X-axis) vs. by NIRS (Y-axis).

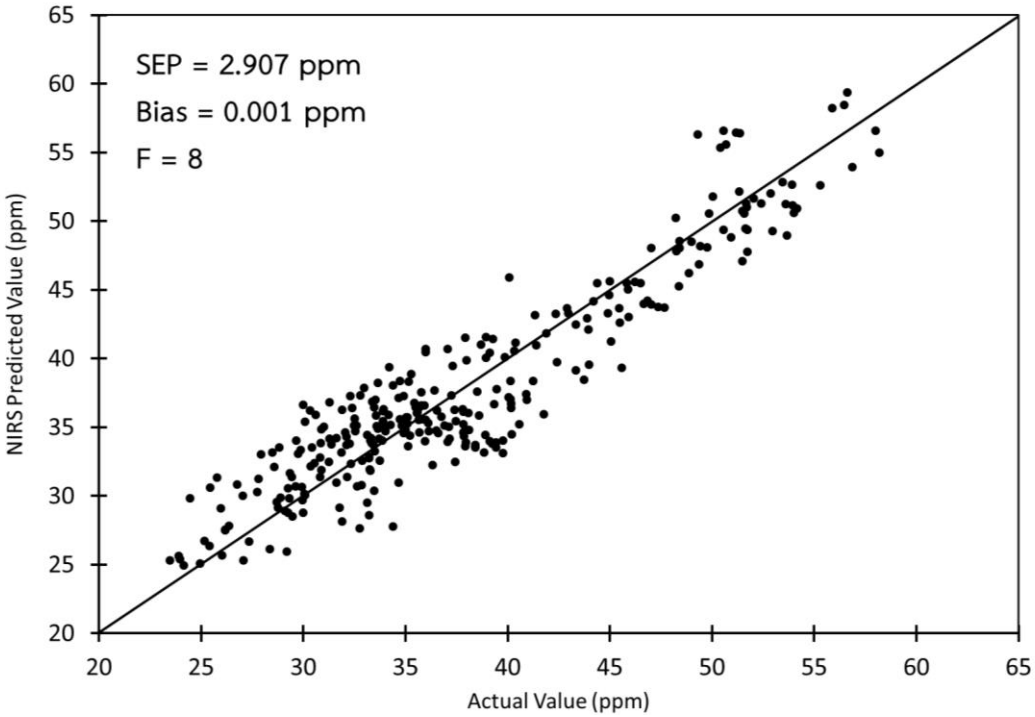

Figure 7. Scatter plot of Caffein (Caf) content in tea leaves determined by HPLC (X-axis) vs. by NIRS (Y-axis).

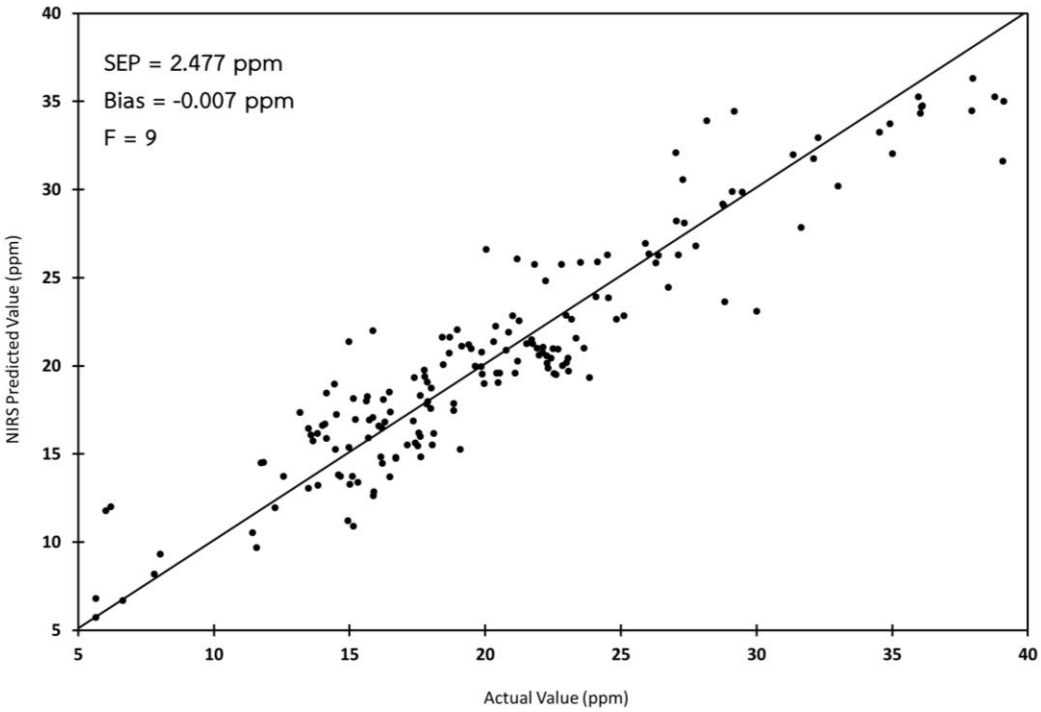

Figure 8. Scatter plot of Epicatechin (EC) content in tea leaves determined by HPLC (X-axis) vs. by NIRS (Y-axis).

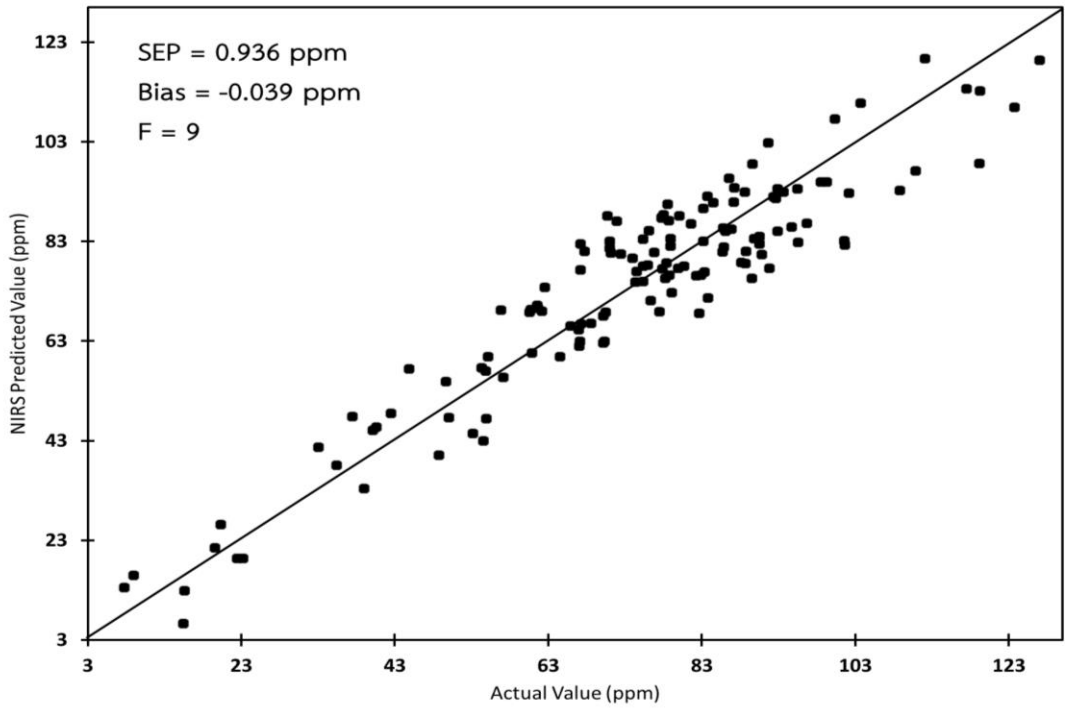

Figure 9. Scatter plot of Epigallocatechin Gallate (EGCG) content in tea leaves determined by HPLC (X-axis) vs. by NIRS (Y-axis).

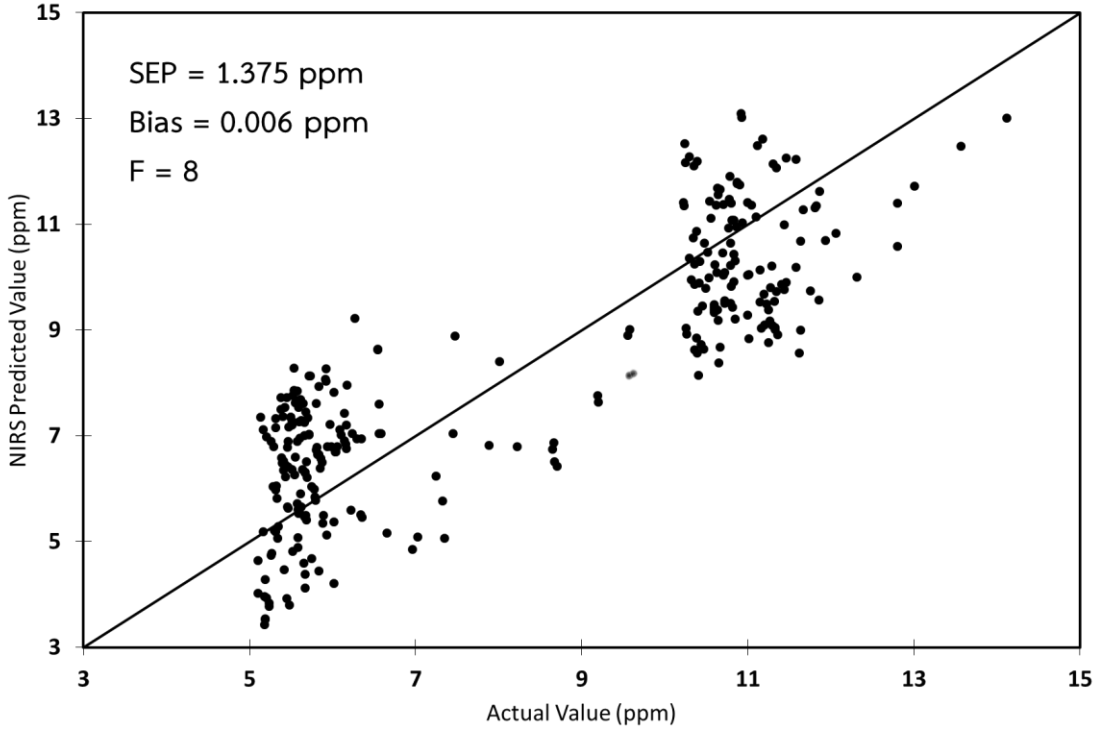

Figure 10. Scatter plot of Gallocatechin Gallate (GCG) content in tea leaves determined by HPLC (X-axis) vs. by NIRS (Y-axis).

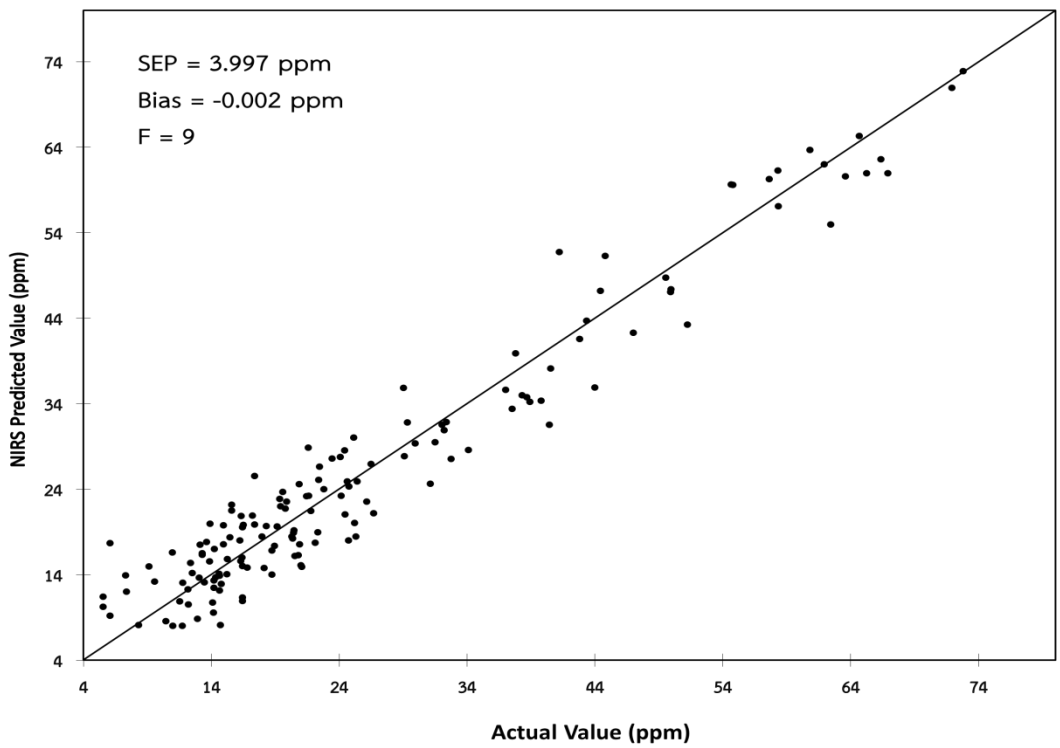

Figure 11. Scatter plot of Epicatechin Gallate (ECG) content in tea leaves determined by HPLC (X-axis) vs. by NIRS (Y-axis).

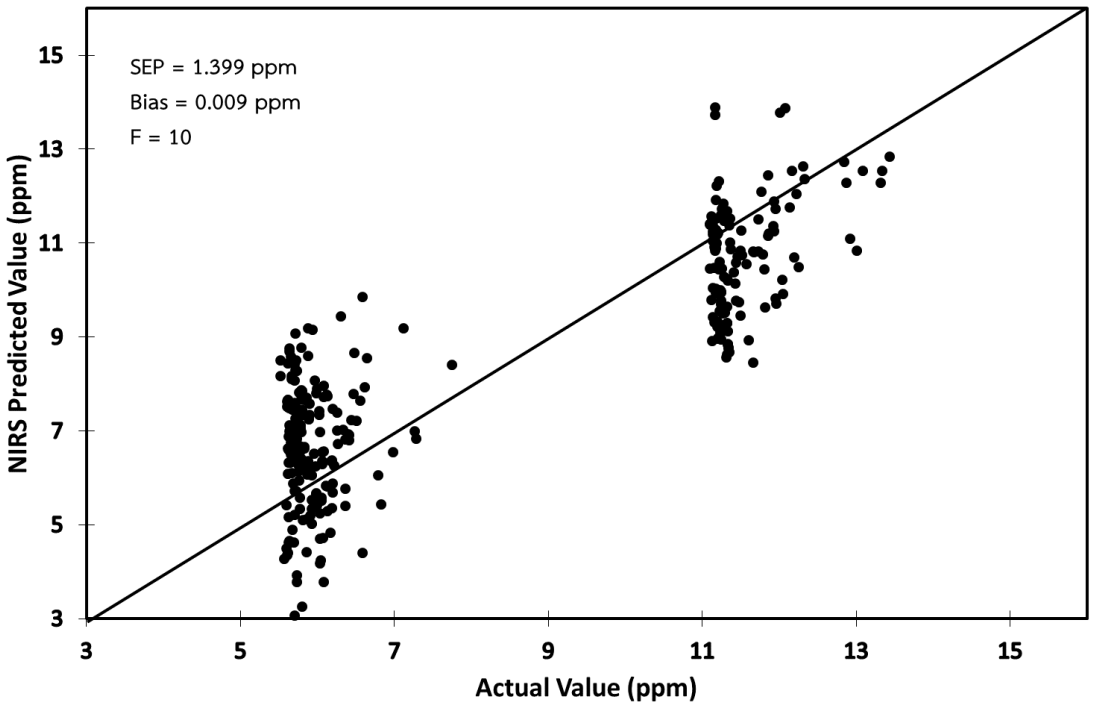

Figure 12. Scatter plot of Catechin Gallate (CG) content in tea leaves determined by HPLC (X-axis) vs. by NIRS (Y-axis).