

ระบบการวิเคราะห์ปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระ (สารประกอบฟีนอล) และปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ทั้งหมดของผลฝรั่งอย่างแม่นยำด้วยเทคนิค NIRs

A High Accuracy System for Analysis of Antioxidant (Phenolics) and Total Soluble Solids Content in Guava Fruits by NIRs Technique

ดลพร ชานานิรมิตผล<sup>1</sup>, รณฤทธิ์ ฤทธิธรม<sup>1</sup> และ เกียรติศักดิ์ ไทยพงษ์<sup>2</sup>  
Dollaphon Chananimritphon<sup>1</sup>, Ronnarit Rittiron<sup>1</sup> and Kriengsak Thaipong<sup>2</sup>

Abstract

Guava has many nutrients and antioxidants that may possibly prevent the development of cancer. To determine those chemical attributes, conventional analysis has some drawbacks such as time-consuming and costliness. Therefore, the objective of this research was to develop a system for accurate determination of the antioxidant (phenolics) content and total soluble solids (TSS) content by near infrared spectroscopy (NIRs) technique. The comparison of accuracy for NIRs system developed by using intact fruits and juice of 68 guava cultivars was observed. The spectra of intact guava were measured by portable spectrometer in wavelength region of 700 -1050 nm and FT-NIR spectrometer in the region of 900-2500 nm whereas spectra of juice were acquired by FT-NIR spectrometer with a specially designed sample cell for solution. The results found that the developed sample cell could be used for spectral acquisition of juice in the long wavelength region, where this system gave the best result. The calibration equation for phenolics content yielded a correlation coefficient (R) of 0.92, root mean square error of estimation (RMSEE) of 2.88 mg/100 g, root mean square error of prediction (RMSEP) of 2.63 mg/100 g and bias -0.05 mg/100 g. The TSS calibration equation showed an R of 0.99, RMSEE of 0.18 %Brix, RMSEP of 0.22 %Brix and bias of 0.05 %Brix. Furthermore, the calibration equations developed from the intact fruits were sufficiently accurate to determine both contents. Using the paired t-test of all developed equations, there was not significant difference between NIR predicted values and actual values analyzed by standard methods at 95% confidence.

**Keywords:** guava, near infrared, phenolic

บทคัดย่อ

ฝรั่งเป็นผลไม้ที่มีสารอาหารมากมายหลายชนิดและยังมีสารต้านอนุมูลอิสระที่ช่วยในการต้านการเกิดของโรคมะเร็ง ปัจจุบันวิธีที่ใช้ในการวิเคราะห์ต้องใช้เวลาและค่าใช้จ่ายสูง ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงต้องการสร้างระบบเพื่อวิเคราะห์ปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระ (สารประกอบฟีนอล) และปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ทั้งหมดของผลฝรั่ง อย่างแม่นยำและ รวดเร็วด้วยเทคนิค near infrared spectroscopy (NIRs) โดยทำการเปรียบเทียบความแม่นยำของระบบที่ได้จากการวัดสเปกตรัมของฝรั่งที่เป็นผลฝรั่ง และน้ำฝรั่ง ซึ่งใช้ฝรั่งสายพันธุ์ในเชิงการค้า และสายพันธุ์ลูกผสม ทั้งหมดรวม 68 สายพันธุ์ ฝรั่งที่มีลักษณะเป็นผลจะถูกนำไปวัดสเปกตรัมด้วยเครื่องสเปกโตรมิเตอร์แบบพกพา ที่ช่วงความยาวคลื่น 700-1050 nm และเครื่อง FT-NIR spectrometer ที่ช่วงความยาวคลื่น 900-2500 nm สำหรับตัวอย่างที่เป็นน้ำฝรั่งจะถูกวัดด้วยเครื่อง FT-NIR spectrometer ที่มีการพัฒนาเซลล์ใส่ตัวอย่างเฉพาะสำหรับวัดสารละลาย จากผลการทดลองพบว่าเซลล์ใส่ตัวอย่าง ที่พัฒนาสามารถวัดสเปกตรัมของน้ำฝรั่งซึ่งให้ข้อมูลค่าการดูดกลืนในช่วงความยาวคลื่นยาวที่สามารถนำไปสร้างสมการเทียบมาตรฐานทำนายองค์ประกอบได้อย่างแม่นยำที่สุด โดยสมการเทียบมาตรฐานทำนายปริมาณสารประกอบฟีนอลทั้งหมด มีค่า correlation coefficient (R) 0.92, root mean squares error of estimation (RMSEE) 2.88 mg/100 g, root mean squares error of prediction (RMSEP) 2.63 mg/100 g และค่าความผิดพลาดเฉลี่ย (bias) -0.05 mg/100 g และสมการเทียบมาตรฐานทำนายปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ทั้งหมด มีค่า R 0.99, RMSEE 0.18 %Brix, RMSEP 0.22 %Brix และค่า bias 0.05 %Brix

<sup>1</sup> ภาควิชาวิศวกรรมอาหาร คณะวิศวกรรมศาสตร์ กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน นครปฐม 73140

<sup>1</sup> Department of Food Engineering, Faculty of Engineering at Kamphaengsaen, Kasetsart University, Nakhon Pathom 73140

<sup>2</sup> ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน นครปฐม 73140

<sup>2</sup> Department of Horticulture, Faculty of Agriculture at Kamphaengsaen, Kasetsart University, Nakhon Pathom 73140

อย่างไรก็ดีสมการเทียบมาตรฐานที่พัฒนาจากสเปกตรัมของผลฝรั่งก็ยังสามารถใช้นำมาทำนาย ปริมาณองค์ประกอบข้างต้นด้วยความแม่นยำที่ดี จากผลการทดสอบทางสถิติพบว่า สมการเทียบมาตรฐานทั้งของผลฝรั่ง และ น้ำฝรั่งทั้งหมดที่สร้าง สามารถทำนายปริมาณองค์ประกอบไม่แตกต่างจากค่าจริงอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

**คำสำคัญ:** ฝรั่ง, อินฟราเรดย่านใกล้, ฟีนอล

### คำนำ

ฝรั่งเป็นผลไม้ที่มีคุณค่าทางอาหารและยังมีสารต้านอนุมูลอิสระที่ช่วยในการต้านการเกิดของโรคมะเร็ง จึงทำให้ได้รับความสนใจเป็นอย่างมากจากผู้บริโภค นักวิจัย รวมถึงผู้ประกอบการ ปัจจุบันการวิเคราะห์สารอาหารโดยทั่วไปยังใช้การวิเคราะห์ทางเคมีซึ่งต้องใช้เวลาและค่าใช้จ่ายของสารเคมีมาก อีกทั้งยังต้องอาศัยผู้เชี่ยวชาญในการตรวจสอบ ดังนั้นการวิเคราะห์แบบไม่ทำลายจึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่จะช่วยแก้ปัญหาดังกล่าวได้

เทคนิคสเปกโทรสโกปีย่านใกล้อินฟราเรด (near infrared spectroscopy หรือ NIRs) เป็นวิธีการตรวจสอบคุณภาพแบบไม่ทำลายวิธีหนึ่งที่มีศักยภาพสูง ถูกนำมาใช้เพื่อการวิเคราะห์หาปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ทั้งหมดในผลไม้หลายชนิด อาทิ ส้ม ท้อ มะม่วง และฝรั่ง เป็นต้น ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงต้องการสร้างระบบเพื่อวิเคราะห์ปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระชนิดสารประกอบฟีนอล (phenolics) และปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ทั้งหมดของผลฝรั่ง อย่างแม่นยำและรวดเร็วด้วยเทคนิค NIRs

### อุปกรณ์และวิธีการ

#### การเตรียมตัวอย่างผลฝรั่ง

สุ่มเก็บผลฝรั่งจำนวน 143 ผล จาก 68 สายพันธุ์ในระยะเก็บเกี่ยว ทั้งสายพันธุ์ที่จำหน่ายในท้องตลาด และสายพันธุ์ลูกผสม ในช่วงเดือน มกราคม-สิงหาคม พ.ศ.2552 จากแปลงภาควิชาพืชสวน คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน

#### การวัดสเปกตรัม

ก่อนการวัดสเปกตรัมผลฝรั่งและน้ำฝรั่งจะถูกควบคุมอุณหภูมิที่ 22 องศาเซลเซียส ผลฝรั่งจะถูกวัดสเปกตรัมด้วยเครื่องสเปกโทรมิเตอร์แบบพกพา (FANTEC FQA-NIRGUN, Japan) ที่ช่วงความยาวคลื่น 700-1050 nm (Integration time 30 millisecond) ในระบบการวัดแบบ interaction และเครื่อง FT-NIR spectrometer (Bruker Optics Vector22/N, Germany) ที่ช่วงความยาวคลื่น 900-2500 nm ในระบบการวัดแบบ reflection (resolution 16 cm<sup>-1</sup>, sample scan time 32s) สำหรับตัวอย่างที่เป็นน้ำฝรั่งจะถูกวัดด้วยเครื่อง FT-NIR ที่มีการพัฒนาเซลล์ใส่ตัวอย่างเฉพาะสำหรับวัดสารละลาย ดัง Figure 1 ที่ช่วงความยาวคลื่น 900-2500 nm ในระบบการวัดแบบ transflection (resolution 16 cm<sup>-1</sup>, sample scan time 32s)

#### การพัฒนาเซลล์ใส่ตัวอย่างสำหรับวัดสเปกตรัมสารละลาย

เนื่องจากไม่มีเซลล์ใส่ตัวอย่างสำหรับการวัดสเปกตรัมของน้ำฝรั่งด้วยเครื่อง FT-NIR แบบ top window ในช่วงความยาวคลื่นยาว ดังนั้นจึงได้ออกแบบและสร้างเซลล์ใส่ตัวอย่างขึ้นมาใหม่จากอะลูมิเนียมเนื่องจากมีราคาถูก ซึ่งอะลูมิเนียมที่ใช้มีความยาว 45.00 mm ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 40.00 mm บริเวณพื้นที่ผิวหน้าที่จะต้องสัมผัสกับตัวอย่างมีระยะความลึกลงไปเท่ากับ 0.20 mm ดัง Figure 1

#### การวิเคราะห์ค่าทางเคมี

วัดปริมาณ TSS โดยใช้เครื่อง digital refractometer (Atago PR-32  $\alpha$ , Japan) ในหน่วย %Brix และวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลทั้งหมดด้วยวิธี Folin Ciocalteu-based โดยประยุกต์ตามวิธีการของ Swain and Hillis (1959) ในหน่วย mg/100 g

#### การสร้างสมการเทียบมาตรฐาน

แบ่งกลุ่มตัวอย่างออกเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่ม calibration ใช้สร้างสมการ และกลุ่ม validation ใช้สำหรับการทดสอบความแม่นยำของสมการ จากนั้นนำข้อมูลสเปกตรัมมาหาความสัมพันธ์กับค่าทางเคมีด้วยวิธี multiple linear regression (MLR) ด้วยโปรแกรม Ca Maker และวิธี partial least square regression (PLS) ด้วยโปรแกรม OPUS 6.5 ซึ่งก่อนสร้างสมการต้องทำการปรับแต่งสเปกตรัมเพื่อลดสัญญาณรบกวน (noise) และอิทธิพลอื่น ๆ ภายนอกที่ไม่สามารถควบคุมได้ออกไป

**ผล**

**1. การทดสอบเซลล์ใส่ตัวอย่างสำหรับวัดสเปกตรัมน้ำฝรั่งที่พัฒนาขึ้น**

ทดสอบเซลล์ใส่ตัวอย่างที่พัฒนาขึ้นโดยการวัดสเปกตรัมของน้ำฝรั่ง พบว่า peak ที่ได้มีค่าการดูดกลืนที่ชัดเจนในช่วง 900-2500 nm ซึ่งมีข้อมูลเพียงพอสามารถนำไปสร้างสมการเทียบมาตรฐานได้



Figure 1 A specially designed sample cell for solution

**2. สเปกตรัมของฝรั่ง**

สเปกตรัมของผลฝรั่งที่วัดด้วยเครื่อง FQA-NIRGUN ที่ช่วงความยาวคลื่น 700-1050 nm พบว่ามีการดูดกลืนของน้ำ ซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักของผลฝรั่งที่มีความยาวคลื่น 970 nm และสเปกตรัมของผลฝรั่งที่วัดด้วยเครื่อง FT-NIR ที่ช่วงความยาวคลื่น 900-2500 nm ที่ตำแหน่งความยาวคลื่น 970, 1194, 1450 และ 1940 nm นอกจากนี้ยังสังเกตเห็นเส้นสเปกตรัมที่วัดได้จากทั้งสองเครื่อง มีการยกตัวเป็นขั้น (baseline shift) เนื่องจากการกระเจิงแสง (scattering) ที่ผิวฝรั่งและความแตกต่างของความหนาแน่นเนื้อ ทำให้ค่าการดูดกลืนเบี่ยงเบนไป

สำหรับสเปกตรัมของน้ำฝรั่งที่วัดด้วยเครื่อง FT-NIR พบว่าเส้นสเปกตรัมมีการดูดกลืนในลักษณะเป็น peak สูงยอดแหลมที่มีความยาวคลื่น 1450 และ 1940 nm ซึ่งเป็นตำแหน่งการดูดกลืนของน้ำเนื่องจากมีองค์ประกอบของน้ำเป็นส่วนใหญ่ นอกจากนี้ยังสังเกตเห็นการกระเจิงแสงที่เกิดจากอนุภาคแขวนลอยที่อยู่ในน้ำฝรั่ง

ดังนั้นก่อนการสร้างสมการทำนายเทียบมาตรฐานของฝรั่งจะต้องทำการปรับแต่งสเปกตรัมก่อน เพื่อลดอิทธิพลที่ทำให้สเปกตรัมเกิดการเบี่ยงเบนไปดังที่กล่าวมาในข้างต้น

**3. สมการเทียบมาตรฐาน**

ผลการสร้างสมการเทียบมาตรฐานแสดงดัง Table 1 พบว่า สมการเทียบมาตรฐานทำนายปริมาณองค์ประกอบที่สร้างจากสเปกตรัมของน้ำฝรั่งให้ผลการทำนายที่แม่นยำที่สุด

Table 1 Results of calibration and validation for determining phenolics and TSS content of guava fruits of juice

Parameter	Sample	Region (nm)	Pretreatment	R <sup>a</sup>	SEC <sup>b</sup>	SEP <sup>d</sup>	Bias <sup>f</sup>	RPD <sup>g</sup>
					RMSEE <sup>c</sup>	RMSEP <sup>e</sup>		
Phenolics (mg/100 g)	Intact	700-1050	1st <sup>h</sup>	0.85	4.06 <sup>SEC</sup>	4.46 <sup>SEP</sup>	-0.30	1.38
	Intact	900-2500	2nd <sup>i</sup>	0.76	4.36 <sup>RMSEE</sup>	4.52 <sup>RMSEP</sup>	0.32	1.52
	Juice	900-2500	1st	0.92	2.88 <sup>RMSEE</sup>	2.63 <sup>RMSEP</sup>	-0.05	2.31
TSS (%Brix)	Intact	700-1050	2nd	0.96	0.76 <sup>SEC</sup>	0.83 <sup>SEP</sup>	-0.20	2.41
	Intact	900-2500	1st + SNV <sup>j</sup>	0.93	0.94 <sup>RMSEE</sup>	0.73 <sup>RMSEP</sup>	-0.07	2.76
	Juice	900-2500	MSC <sup>k</sup>	0.99	0.18 <sup>RMSEE</sup>	0.22 <sup>RMSEP</sup>	0.05	9.16

<sup>a</sup> Correlation coefficient

<sup>b</sup> Standard error of calibration

<sup>c</sup> Root mean square error of estimation

<sup>d</sup> Standard error of prediction

<sup>e</sup> Root mean square error of prediction

<sup>f</sup> Mean value of deviation

<sup>g</sup> Ratio of standard error of performance to standard deviation

<sup>h</sup> First derivative

<sup>i</sup> Second derivative

<sup>j</sup> Vector normalization

<sup>k</sup> Multiplicative scatter correction

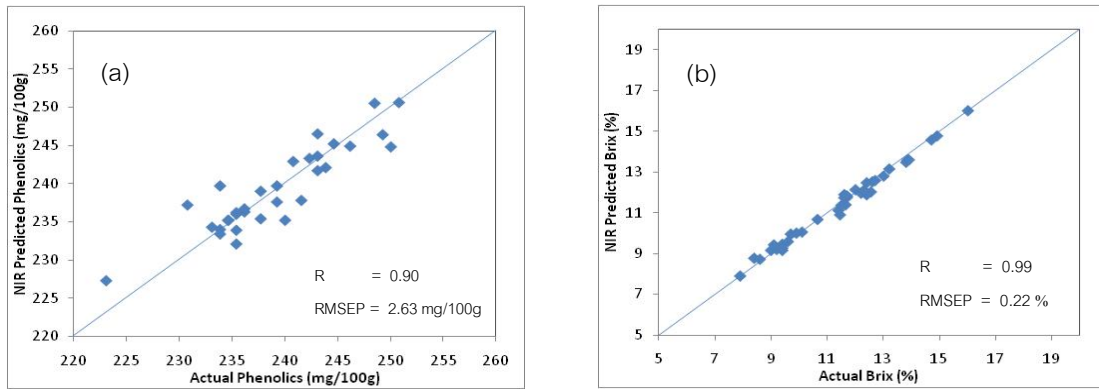


Figure 2 Scatter plots of actual (mg/100g) and predicted values of (a) phenolics content (b) total soluble solids (TSS) content for guava juice in validation set by FT-NIR spectrometer

ผลการทดสอบสมการเทียบมาตรฐานแสดงดัง scatter plots (Figure 2) แสดงการเปรียบเทียบค่าจริงกับค่าทำนายของปริมาณองค์ประกอบจากระบบ NIRs ในกลุ่มตัวอย่าง validation set สังเกตค่าทำนายของปริมาณสารประกอบฟีนอลและปริมาณ TSS ของน้ำฝรั่ง อยู่ใกล้กับเส้นทแยงมุม (target line) บ่งบอกค่าการทำนายใกล้เคียงกับค่าจริง

### วิจารณ์ผล

จากผลการวิเคราะห์ข้อมูลจะเห็นว่าสมการเทียบมาตรฐานของน้ำฝรั่งให้ผลการทำนายที่ดีที่สุด ทั้งนี้เนื่องจากน้ำฝรั่งมีลักษณะเป็นสารละลายทำให้สเปกตรัมไม่มีอิทธิพลของความหนาแน่นเนื้อและการกระเจิงแสงที่ผิวของผลฝรั่งเข้ามาเกี่ยวข้อง ประกอบกับใช้เซลล์ใส่ตัวอย่างที่พัฒนา ทำให้สเปกตรัมมีข้อมูลการดูดกลืนที่ดี อีกทั้งช่วงความยาวคลื่นที่ใช้ในการวัดสเปกตรัมของน้ำฝรั่งเป็นช่วงคลื่นยาว ซึ่งสามารถดูดกลืนองค์ประกอบต่าง ๆ ได้สูงกว่าช่วงคลื่นสั้น

เมื่อพิจารณาค่าสัมประสิทธิ์การถดถอย (regression coefficient) ที่ตำแหน่งความยาวคลื่นต่าง ๆ ของสมการเทียบมาตรฐานทำนายปริมาณสารประกอบฟีนอลที่ดีที่สุด พบตำแหน่งการดูดกลืนที่มีอิทธิพลในสมการที่ 2191 nm สอดคล้องกับค่าการดูดกลืนของ gallic acid ซึ่งถือเป็นองค์ประกอบหลักของสารประกอบฟีนอลที่ความยาวคลื่น 2190 nm และจากผลของค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (R) บ่งบอกประสิทธิภาพของสมการสามารถนำไปใช้ในการทำนายเพื่องานวิจัยได้

สำหรับสมการเทียบมาตรฐานทำนายปริมาณ TSS ที่ดีที่สุด เมื่อพิจารณาค่าสัมประสิทธิ์การถดถอย พบว่าตำแหน่งการดูดกลืนที่ 1432 nm มีความสำคัญสอดคล้องกับค่าการดูดกลืนของน้ำตาล sucrose ที่ความยาวคลื่น 1440 nm (William and Norris, 2001) และจากผลของค่า R บ่งบอกถึงประสิทธิภาพของสมการสามารถนำไปใช้ทั้งควบคุมคุณภาพและงานวิจัยได้

อย่างไรก็ตามสมการเทียบมาตรฐานที่พัฒนาจากสเปกตรัมของผลฝรั่งก็ยังสามารถใช้ทำนาย ปริมาณองค์ประกอบข้างต้นด้วยความแม่นยำที่ดี จากผลการทดสอบ paired t-test ของสมการเทียบมาตรฐานทั้งของผลฝรั่งและน้ำฝรั่งทั้งหมดที่สร้างขึ้นพบว่า ค่าทำนายปริมาณองค์ประกอบด้วยวิธี NIRs ไม่แตกต่างจากค่าจริงอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

### สรุป

เซลล์ใส่ตัวอย่างสำหรับใช้วัดสารละลายที่ได้พัฒนาขึ้นสามารถใช้วัดสเปกตรัมของน้ำฝรั่งซึ่งให้ข้อมูลค่าการดูดกลืนในช่วงความยาวคลื่นยาว และสามารถนำไปสร้างสมการเทียบมาตรฐานทำนายปริมาณสารประกอบฟีนอลและปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมดได้อย่างแม่นยำที่สุด

### เอกสารอ้างอิง

- Swain, T. and W.E. Hillis. 1959. The phenolic constituents of *Prunus domestica*. I.—The quantitative analysis of phenolic constituents. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 10: 63–68.
- William, P. and K. Norris. 2001. *Near Infrared Technology in the Agricultural and Food Industries*. 2<sup>nd</sup> ed. American Association of Cereal Chemists, Inc., USA. 296p.