รายงานเรื่องเต็มผลการทดลองที่สิ้นสุด ปีงบประมาณ 2555

1. ชุดโครงการ วิจัยและพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

2. โครงการวิจัย การพัฒนาระบบการตรวจวิเคราะห์พืชและปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

กิจกรรม การวิจัยและพัฒนาวิธีวิเคราะห์ เพื่อให้ได้วิธีใหม่ที่รวดเร็ว แม่นยำ ปลอดภัย และรักษาสิ่งแวดล้อม

กิจกรรมย่อย พัฒนาวิธีวิเคราะห์หาคุณสมบัติเชิงเคมี และเชิงกายภาพของปัจจัยการผลิตโดยใช้เทคโนโลยีเนียร์อินฟราเรดสเปกโตรสโกปี

3. ชื่อการทดลอง ศึกษาวิธีวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนในเมล็ดพืชโดยเทคนิค NIRS

The Study of Protein Analysis method in Grain Crop by Near Infrared Spectroscopy

4. คณะผู้ดำเนินงาน

หัวหน้าการทดลอง	นางจิติมา ยถาภูธานนท์	สังกัด	กลุ่มวิจัยเกษตรเคมี สปผ.
ผู้ร่วมงาน	นายจุลศักดิ์ บุญรัตน์	สังกัด	กลุ่มวิจัยเกษตรเคมี สปผ.
	น.ส.สุภานันท์ จันทร์ประอบ	สังกัด	กลุ่มวิจัยเกษตรเคมี สปผ.

5. บทคัดย่อ

งานทดลองนี้มีวัตถุประสงค์ในการพัฒนาวิธีวิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจนหรือปริมาณโปรตีนในเมล็ดถั่วเหลือง ที่ให้ผลวิเคราะห์ที่รวดเร็ว ถูกต้องแม่นยำ ปลอดภัยจากสารเคมี และตัวอย่างไม่ถูกทำลาย โดยใช้เทคนิคคลื่นแสงอินฟราเรดย่านใกล้ Near Infrared Spectroscopy (NIRS) ทำการศึกษาเบื้องต้นเพื่อประเมินค่าปริมาณโปรตีนในเมล็ดถั่วเหลือง ซึ่งใช้หลักการหาความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับค่าที่วิเคราะห์ทางเคมีที่ได้จากห้องปฏิบัติการ เมล็ดถั่วเหลือง จำนวน 156 ตัวอย่าง ถูกสแกนด้วยเครื่องสเปกโตรมิเตอร์คลื่นแสงอินฟราเรดย่านใกล้ โดยวัดสเปคตร้าในช่วงจำนวนคลื่นแสงต่อเซนติเมตร ตั้งแต่ 4000 – 12500 cm^{-1} การวิเคราะห์การถดถอยแบบพาร์เชียลลีส์ทสแควร์ (PLS regression) ถูกนำมาใช้ในการคำนวณสมการคาร์เบรชั่น

ผลการวิเคราะห์ทางเคมีด้วยวิธีมาตรฐานของห้องปฏิบัติการด้วยวิธี Kjeldahl method พบว่า กลุ่มตัวอย่างที่ใช้ในการสร้างสมการ Calibration และ Validation มีค่าการกระจายตัวของข้อมูล (Range, R) เท่ากับ 33.86 – 47.19 และ 35.70 – 45.69 เปอร์เซ็นต์ ค่าเฉลี่ย 40.61 เปอร์เซ็นต์ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Standard deviation, SD) เท่ากับ 2.82 และ 2.59 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

ผลการประเมินปริมาณโปรตีนในเมล็ดถั่วเหลือง โดยใช้เทคนิค NIRS พบว่าได้สมการที่ใช้ในการทำนายผลระดับปริมาณโปรตีนในเมล็ดถั่วเหลือง สมการที่ได้มีค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (Coefficient of Determination, R^2) เท่ากับ 0.89 ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานในการทำนายปริมาณโปรตีนในกลุ่ม calibration set (SEC) เท่ากับ 0.7439 เปอร์เซ็นต์ ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานในการทำนายปริมาณโปรตีนใน

กลุ่ม validation set (SEP) เท่ากับ 1.0851 เปอร์เซ็นต์ สมการนี้มีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (R) สูง และมีค่า SEC หรือ SEP ต่ำ ซึ่งต่ำกว่าค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของการวิเคราะห์ทางเคมีในห้องปฏิบัติการหรือ SD (2.82) แสดงว่า สมการนี้สามารถใช้ประเมินค่าโปรตีนในเมล็ดถั่วเหลือง ได้อย่างมีประสิทธิภาพ ตำแหน่งความยาวคลื่นที่มีค่า Regression coefficient สูงอยู่ที่จำนวนคลื่นแสงต่อเซนติเมตร (Wavenumber) 5988 และ 5155 cm^{-1} ซึ่งสัมพันธ์กับโปรตีนในเมล็ดถั่วเหลือง

ผลการวิจัยที่ได้นำเทคนิค NIR Spectroscopy มาใช้ พบว่า สามารถใช้ประเมินหาปริมาณโปรตีนในเมล็ดถั่วเหลือง ได้อย่างมีประสิทธิภาพ จำนวนคลื่นแสงที่เหมาะสมในการประเมินอยู่ในช่วง ตั้งแต่ 9091-4003 cm^{-1}

คำนำ

ถั่วเหลืองเป็นพืชไร่เศรษฐกิจที่มีความมั่นคงทางอาหารของประเทศรองจากข้าว การใช้ประโยชน์หลักจากเมล็ดถั่วเหลืองในประเทศไทยเป็นการใช้ประโยชน์จากปริมาณโปรตีน ไม่ว่าจะใช้เป็นอาหารสำหรับคน สัตว์ และอุตสาหกรรม ซึ่งในปัจจุบันถั่วเหลืองยังมีโปรตีนในเมล็ดต่ำ โดยพันธุ์เชียงใหม่ 60 ที่เกษตรกรนิยมปลูก มีปริมาณโปรตีนในเมล็ดประมาณ 38-40% (สมศักดิ์, 2543) การพัฒนาคุณภาพของถั่วเหลืองซึ่งเป็นแหล่งโปรตีนจากพืชที่สำคัญและมีคุณค่าทางโภชนาการสูง และพัฒนาคุณภาพของเมล็ดถั่วเหลืองให้มีปริมาณโปรตีนสูงกว่า 40% เป็นหนึ่งในแผนแม่บทการพัฒนาถั่วเหลืองเพื่อเพิ่มมูลค่าการผลิต และเพิ่มคุณภาพทางโภชนาการ สถาบันวิจัยพืชไร่และพืชทดแทนพลังงาน ร่วมกับกลุ่มวิจัยเกษตรเคมี สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร ได้ดำเนินการ ในโครงการปรับปรุงพันธุ์ถั่วเหลืองเพื่อให้มีปริมาณโปรตีนในเมล็ดสูง โดยการวิจัยและพัฒนาแบบบูรณาการ เพื่อทำให้เกษตรกรมีรายได้เพิ่มขึ้น และสนับสนุนการผลิตตามแผนยุทธศาสตร์ของประเทศ

เทคนิค Near Infrared Spectroscopy (NIR Spectroscopy) เป็นเทคนิคที่ใช้กันอย่างแพร่หลาย เทคนิคนี้เป็นวิธีที่ให้ความถูกต้อง แม่นยำ ใช้เวลาสั้น ไม่ใช้สารเคมี ตัวอย่างไม่ถูกทำลาย สามารถใช้ประเมินได้เฉพาะองค์ประกอบที่เป็นอินทรีย์สารเท่านั้น เช่น ปริมาณแป้ง ปริมาณโปรตีนในข้าวสาลี ความชื้นเมล็ด เป็นต้น โดยใช้หลักการหาความสัมพันธ์การดูดซับแสงในช่วง Near Infrared คือ 800-2500 nm หรือ 4000 – 12500 cm^{-1} ของสารที่ต้องการประเมิน และการวิเคราะห์สารที่ต้องการจากห้องปฏิบัติการ เพราะสารแต่ละชนิดเมื่อได้รับแสงจะมีคุณสมบัติในการดูดซับแสงได้ไม่เท่ากัน เมื่อตัวอย่างดูดซับแสง NIR จะทำให้โมเลกุลของสารเกิดการสั่นและดูดซับพลังงานที่แตกต่างกัน และนำค่าการดูดซับแสงมาวิเคราะห์ผล จะสามารถประเมินลักษณะที่ต้องการได้ (เทคโนโลยีอินฟราเรดย่านใกล้และการประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรม.2555) ทั้งวิธีการนี้เป็นวิธีประเมินที่ไม่ทำลายตัวอย่าง และใช้เวลาสั้นกว่าการวิเคราะห์จากห้องปฏิบัติการ ทราบผลภายใน 2-3 นาที ให้ผลวิเคราะห์ถูกต้อง แม่นยำ วิธีการนี้ได้ใช้กันอย่างแพร่หลาย เช่นการประเมินค่า ปริมาณโปรตีนในข้าว ข้าวสาลี เป็นต้น

ในการปรับปรุงพันธุ์ถั่วเหลืองเพื่อให้ได้ถั่วเหลืองพันธุ์ดีพันธุ์ใหม่ที่มีโปรตีนในเมล็ดถั่วสูงขึ้นนี้ ในขั้นตอนการคัดเลือกสายพันธุ์โปรตีนสูงในรุ่นต่างๆ จะต้องทำการวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนในเมล็ดด้วยวิธี Kjeldahl [AOAC 1970] ในห้องปฏิบัติการทางเคมี ที่ผ่านขั้นตอนการ อบ บด และใช้กรดเข้มข้นในการย่อย กลั่น ทราบผลใช้เวลาประมาณไม่น้อยกว่า 24 ชั่วโมง การวิเคราะห์ทางเคมีเพื่อหาปริมาณโปรตีนนี้เป็นวิธีการที่ยุ่งยาก ต้องใช้

สารเคมีที่มีอันตรายต่อผู้ปฏิบัติงานและสิ่งแวดล้อม ใช้เวลานานในการวิเคราะห์ งานทดลองนี้มีวัตถุประสงค์ในการพัฒนาวิธีวิเคราะห์เพื่อลดขั้นตอนการวิเคราะห์ และลดการใช้สารเคมี โดยใช้เทคนิคคลื่นแสงอินฟราเรดย่านใกล้ Near Infrared Spectroscopy ซึ่งเป็นเทคโนโลยีหนึ่งที่ใช้ประโยชน์อย่างแพร่หลาย เพื่อให้ได้ทางเลือกของวิธีวิเคราะห์โปรตีนในเมล็ดพืช ที่มีความรวดเร็วทราบผลภายใน 2-3 นาที ปลอดภัย และไม่ต้องทำลายเมล็ดถั่วสายพันธุ์นั้นๆ สามารถเก็บเมล็ดพันธุ์ไปปรับปรุงพันธุ์ในรุ่นต่อๆไป

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. เครื่องแก้วและวัสดุวิทยาศาสตร์
    - Volumetric flask ขนาด 250, 2,000 มิลลิลิตร
    - Erlenmeyer flask ขนาด 125, 250 มิลลิลิตร
    - Volume pipette ขนาด 10 มิลลิลิตร
    - บิกเกอร์ ขนาด 50, 250 มิลลิลิตร
    - กระดาษ B2
2. สารเคมี
    - H_2SO_4 (96 % AR grade)
    - K_2SO_4 และ $CuSO_4$
    - สารละลาย 40% NaOH (w/v) AR grade
    - Mixed indicator (methyl red และ bromcresol green)
    - สารละลาย 0.4% H_3BO_3 (w/v)
    - Na_2CO_3 (AR grade)
    - สารละลาย 0.01 N HCl
3. เครื่องมือวิทยาศาสตร์
    - เครื่อง NIR spectrophotometer
    - เครื่องชั่งทศนิยม 3 ตำแหน่ง
    - เครื่องกลั่นแบบ semi-micro distillation

วิธีการ

ดำเนินการ 8 ขั้นตอนดังนี้

1. การเตรียมตัวอย่างถั่วเหลือง เพื่อใช้ในงานทดลอง

เตรียมตัวอย่างถั่วเหลือง ที่มีปริมาณโปรตีน ตั้งแต่ 33.86 – 47.19 เปอร์เซ็นต์ (มีปริมาณโปรตีน ต่ำ กลาง สูง ที่กระจายตัวและครอบคลุมค่าของตัวอย่างในอนาคต จำนวน 156 ตัวอย่าง แบ่งตัวอย่างเป็นตัวอย่างเป็น 2 ส่วน สำหรับวิเคราะห์ทางเคมีโดยวิธี Kjeldahl และวิธี NIR โดยแผ่หรือกระจายตัวอย่างทั้งหมดบนแผ่น

พลาสติกที่สะอาด และผสมคลุกเคล้ากันแบ่งตัวอย่างเป็น 4 ส่วน นำ 2 ส่วนที่อยู่ตรงข้ามมาคลุกเคล้ากันแล้วแบ่งเป็น 2 ส่วนเพื่อเป็นตัวแทนของตัวอย่าง สำหรับตัวอย่างที่จะวิเคราะห์ทางเคมี นำไปอบที่อุณหภูมิ 60-65 ^{0}C 48 ชั่วโมง นำตัวอย่างที่อบจนแห้งแล้วบดด้วยเครื่องบดสเตนเลส (stainless) ร่อนตัวอย่างที่บดแล้วผ่านตะแกรงขนาด 40 mesh เขียนป้ายหมายเลขตัวอย่าง ทุกตัวอย่างมีการเตรียมให้มีสภาพใกล้เคียงกันให้มากที่สุด เป็นการลด Sample error ให้เหลือน้อยที่สุดตัวอย่างจะถูกเก็บรักษาในห้องที่มีอุณหภูมิเดียวกับเครื่องตรวจวัดคลื่นแสงอินฟราเรดย่านใกล้ (NIRs spectroscopy) ก่อนการตรวจวัดสเปคตรัม

2. วิเคราะห์ทางเคมีหาปริมาณโปรตีนด้วยวิธีมาตรฐานของห้องปฏิบัติการ Kjeldahl [AOAC 1970]

- ชั่งเมล็ดถั่วที่บดแล้ว 1.000 กรัมใส่ในกระดาษ B2 ใส่ลงในหลอดสำหรับย่อย
- เติม catalyst K_2SO_4 กับ $CuSO_4$ ประมาณ 3 กรัม และเติมH_2SO_4เข้มข้น 30 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วย Vortex mixer ที่ 600 รอบต่อนาที ทิ้งไว้ข้ามคืน
- นำไปย่อยในเครื่องย่อย จนกระทั่งสารละลายในหลอดใสเป็นสีเขียว
- ดูดสารละลายที่ผ่านการย่อยแล้ว 10 มิลลิลิตร ใส่ในเครื่องกลั่นชนิด semi-micro distillation เติม 40% NaOH 5 มิลลิลิตร นำ Erlenmeyer flask ขนาด 125 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุสารละลาย 0.3% H_3BO_3 ปริมาตร 20 มิลลิลิตร เติมอินดิเคเตอร์ 2-3 หยด นำไปวางใต้ก้าน condenser โดยให้ปลายก้าน condenser จุ่มอยู่ใต้สารละลาย เปิดระบบกลั่น ใช้เวลากลั่นประมาณ 10 นาที
- นำสารละลายที่ได้จากการกลั่นมาไทเทรตด้วยสารละลายมาตรฐาน 0.01 N HCl บันทึกปริมาตรสารละลายกรดที่ใช้ โดยดูจุดยุติจากสารละลายสีเขียวเริ่มเป็นสีชมพูอ่อน
- ทำ blank โดยใช้กระดาษ B2
- ทำทั้งหมด 2 ครั้ง ได้วิธีละ 14 ซ้ำ
- นำค่าที่ได้ไปคำนวณตามสมการ

$$\text{ปริมาณไนโตรเจน \%} = \frac{N \times (a-b) \times 250 \times 100 \times 14}{1000 \times 10 \times wt}$$

N = ความเข้มข้นของ HCl

a = ปริมาตร HCl ที่ใช้ไทเทรต ตัวอย่าง

b = ปริมาตร HCl ที่ใช้ไทเทรต blank

wt = น้ำหนักตัวอย่าง (g)

3. วัดสเปคตรัมของถั่วเหลือง ด้วยเครื่อง NIR Spectrometer วัดค่าการดูดซับแสง โดยใช้ เทคนิค NIR Spectroscopy แบบวิธีสะท้อน (Reflectance) สร้างและปรับปรุงสมการโดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป NIRCal ของเครื่อง NIR (Buchi NIRFlex N-500, Switzerland) ถั่วเหลืองถูกนำมาใช้ในการตรวจวัด NIR สเปคตรัม โดยเทตัวอย่างเมล็ดถั่วเหลือง ใส่ลงใน Petridis ให้มีความหนาประมาณ 1 เซนติเมตร โดยตรวจวัดในช่วงคลื่นแสงต่อ

เซนติเมตร ตั้งแต่ 4000 – 12500 cm^{-1} เพื่อเก็บสเปคตรัมโดย scan ตัวอย่างละ 3 ซ้ำ เพื่อให้ได้สเปคตรัมที่มีข้อมูลเกิดจากถั่วเหลืองที่วัดให้มากที่สุด และไม่มีข้อมูลการสะท้อนแสงที่ไม่เกี่ยวข้องกับค่าที่ต้องการวัด พร้อมกรอกค่าวิเคราะห์ทางเคมี ลงในสเปคตรัมของแต่ละตัวอย่าง

4. การสร้างสมการเทียบมาตรฐาน (Calibration) เพื่อทำนายค่าทางเคมีที่ต้องการโดยสร้าง Calibration พร้อมกับเลือก Calibration ที่เหมาะสมไปใช้งานโดยใช้ความสัมพันธ์ระหว่างค่า Absorbance กับปริมาณสาร โดยหาความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปร เพื่อหาสมการมาใช้ในการทำนายผล และตรวจสอบความแม่นยำของสมการเทียบมาตรฐาน (Validation) ทำการ Validate โดยใช้กลุ่มตัวอย่าง นอกกลุ่ม Calibration

5. พัฒนาสมการที่จะนำไปประเมินค่าโปรตีนในตัวอย่างถั่วเหลือง โดยการปรับแต่งข้อมูลที่เลือกใช้วิธีการวิเคราะห์ถดถอยกำลังสองน้อยที่สุดบางส่วน Partial Least Square (PLS) regression แก้ไข Slope/Bias ของสมการทำนาย

6. ทำการหาประสิทธิภาพของ Calibration ที่สร้างขึ้น โดยการหาแหล่ง Error ของการวิเคราะห์ หาค่าผิดพลาดจากการวิเคราะห์หาค่าอ้างอิง (Lab Error หรือ SEL) ของวิธีวิเคราะห์ทางเคมี ซึ่งค่า SEL นี้จะนำไปใช้ในการประเมินประสิทธิภาพของ Calibration ที่สร้างขึ้น

7. ทดสอบและปรับปรุงสมการทำนายด้วยกลุ่มตัวอย่างใหม่ แก้ไขปรับปรุงสมการ เพื่อให้ได้ผลการวิเคราะห์ที่ถูกต้อง แม่นยำยิ่งขึ้น

8.สรุปและเขียนรายงาน

ระยะเวลาและสถานที่ดำเนินการ

ระยะเวลา เดือนตุลาคม 2553 - กันยายน 2555 ระยะเวลา 2 ปี

สถานที่ทำการทดลอง

ห้องปฏิบัติการกลุ่มวิจัยเกษตรเคมี สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร กรมวิชาการเกษตร

ผลการดำเนินงานและวิจารณ์

ตัวอย่างถั่วเหลืองและการตรวจสอบค่าการกระจายของค่าวิเคราะห์ทางเคมี

ตัวอย่างถั่วเหลืองจำนวน 156 ตัวอย่าง ที่มีปริมาณโปรตีน ตั้งแต่ 33.86 – 47.19 เปอร์เซ็นต์ ถั่วเหลืองที่ใช้ในงานทดลองนี้เป็นถั่วเหลือง ในโครงการปรับปรุงพันธุ์ถั่วเหลืองโปรตีนสูง โครงการเทคโนโลยีการผลิตถั่วเหลืองโปรตีนสูง ของสถาบันวิจัยพืชไร่ ที่บูรณาการงานปรับปรุงพันธุ์กับงานตรวจวิเคราะห์โปรตีนในห้องปฏิบัติการ เพื่อทำการคัดเลือกสายพันธุ์ในรุ่นต่างๆ ตามขั้นตอนการปรับปรุงพันธุ์ เป็นถั่วเหลืองสายพันธุ์กลายจากการฉายรังสี ถั่วเหลืองสายพันธุ์ก้าวหน้า ถั่วเหลืองสายพันธุ์ดีเด่น จากแปลงเปรียบเทียบเบื้องต้น เปรียบเทียบมาตรฐาน และเปรียบเทียบในไร่เกษตรกร ของจังหวัด เชียงใหม่ ลพบุรี และสุโขทัย การตรวจสอบค่าการกระจายของค่าวิเคราะห์ทางเคมีด้วยวิธีมาตรฐาน Kjeldahl [A.O.A.C. 1970]. ของกลุ่มตัวอย่างถั่วเหลืองที่ใช้ในการสร้างสมการ Calibration และ Validation วัดการกระจายของข้อมูลโดยหาค่าพิสัย (Range) ที่มีปริมาณ

อินทรียวัตถุระหว่างค่าสูงสุด และค่าต่ำสุด ค่าเฉลี่ย (Average) และส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Standard Deviation : SD) ผลการวัดค่าการกระจายของข้อมูลแสดงในตารางที่ 1 พบว่า กลุ่มตัวอย่างที่ใช้ในการสร้างสมการ Calibration และ Validation มีค่าพิสัย 33.86 – 47.19 และ 35.70 – 45.69 เปอร์เซ็นต์ ค่าเฉลี่ย 40.61 เปอร์เซ็นต์ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน 2.82 และ 2.59 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

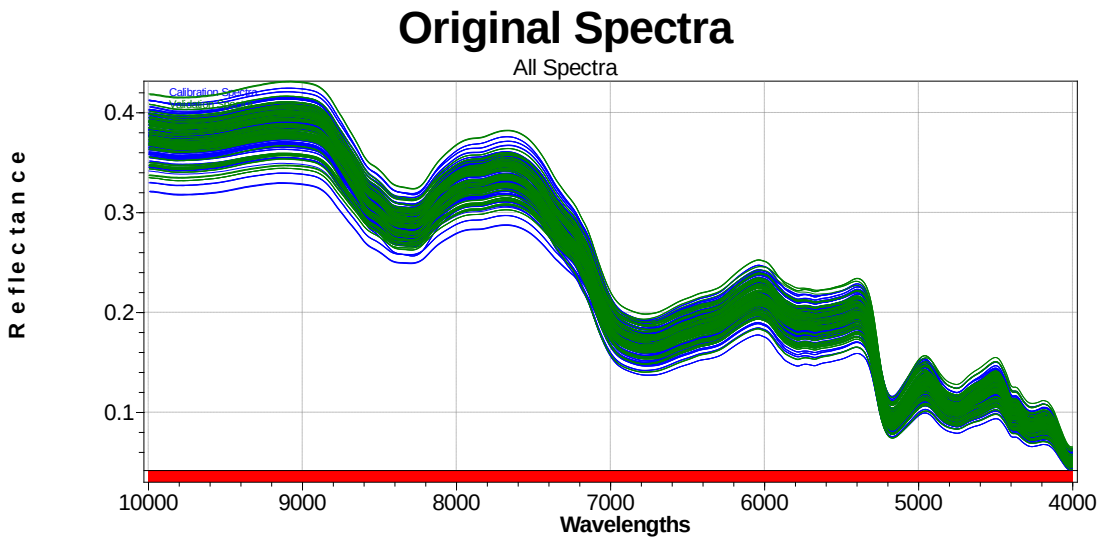
สมการ	จำนวนตัวอย่าง	พิสัย	ค่าเฉลี่ย	SD	หน่วย
Calibration	104	33.86 – 47.19	40.61	2.82	%
Validation	52	35.70 – 45.69	40.61	2.59	%

ตารางที่ 1 ตรวจสอบค่าการกระจายของค่าวิเคราะห์ทางเคมีด้วยวิธีมาตรฐานของปริมาณโปรตีนในกลุ่มตัวอย่างถั่วเหลือง ที่ใช้ในการสร้างสมการ Calibration และ Validation

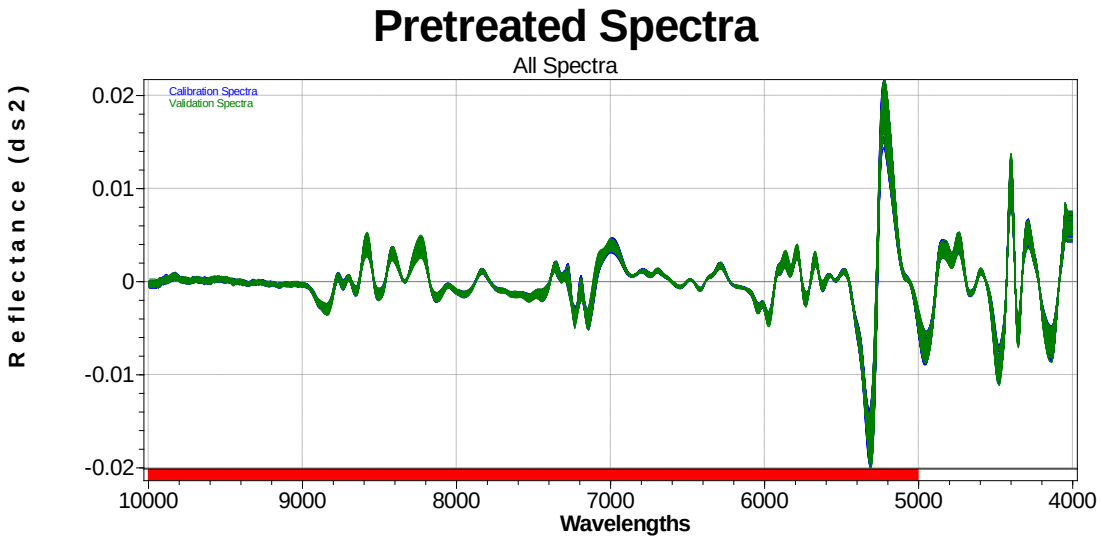
ผลการประเมินปริมาณโปรตีนในถั่วเหลือง โดยใช้เทคนิค Near Infrared Spectroscopy

การตรวจวัดสเปคตรัมของถั่วเหลือง

ตัวอย่างถั่วเหลือง ที่มีปริมาณโปรตีนต่างๆกัน ถูกนำมาตรวจวัด NIR สเปคตรัม โดยตรวจวัดที่ช่วงคลื่นแสงต่อเซนติเมตร ตั้งแต่ 4000 – 12500 cm^{-1} พบว่า ค่าการดูดกลืนแสง (log1/R) ของถั่วเหลือง แสดงให้เห็นเป็นสเปคตรัมเริ่มต้นของถั่วเหลือง แบ่งตามปริมาณโปรตีน (ภาพที่ 1) และในการวิเคราะห์มีการปรับแต่งสเปคตรัมโดยใช้วิธี Second derivative pre-treatment การทำ Second derivative spectra ของถั่วเหลืองแสดงในภาพที่ 2 ผลการทดลองแสดงถึงช่วงการดูดกลืนคลื่นแสงที่สำคัญของโปรตีน ได้แก่ ช่วงดูดกลืนแสงที่จำนวนคลื่นแสงต่อเซนติเมตร 5988 และ 5155 cm^{-1} จากผลการทดลองสามารถอธิบายได้อย่างชัดเจนถึงช่วงการดูดกลืนแสงของโปรตีนซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Osborne et al. (1993) และ Jilie et al. (2007)



ภาพที่ 1 สเปคตรัมเริ่มต้นของถั่วเหลือง แบ่งตามปริมาณโปรตีนต่างๆกัน ตรวจวัดที่ช่วงคลื่นแสงต่อเซนติเมตร ตั้งแต่ 4000-10000 cm^{-1}



ภาพที่ 2 สเปคตรัมของการทำเดอริเวทีฟ ลำดับที่สอง (Second derivative spectra) ของถั่วเหลือง แบ่งตามปริมาณโปรตีนต่างๆกัน (b) ลูกศรชี้ช่วงการดูดกลืนแสงของโปรตีน (5988 และ 5155 cm^{-1})

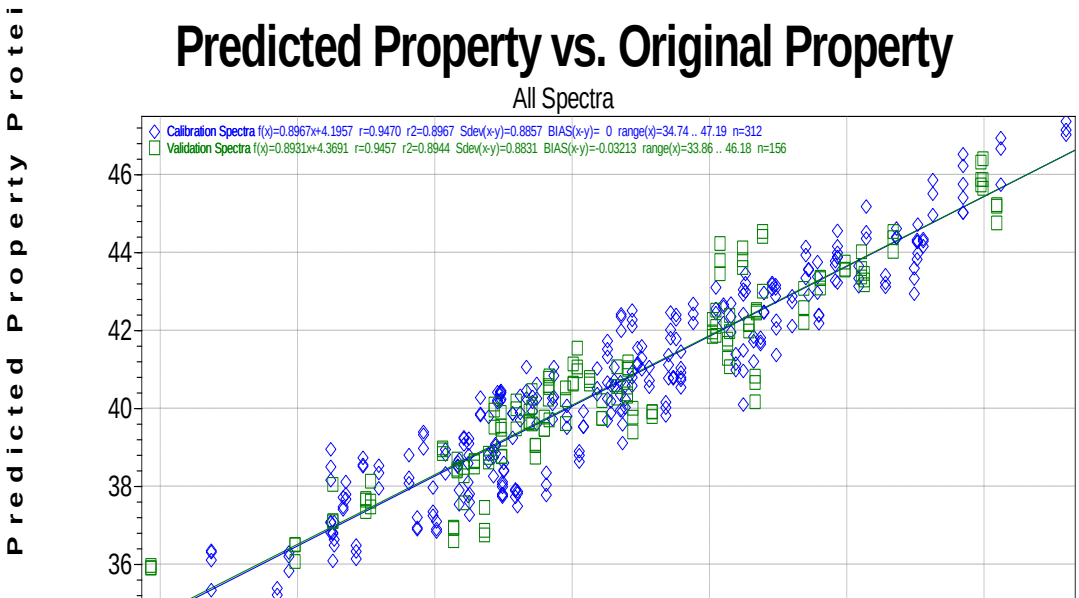
สมการประเมินปริมาณโปรตีนในถั่วเหลือง (Calibration equation)

ผลการสร้างสมการถดถอยเพื่อทำนายปริมาณโปรตีนของตัวอย่างถั่วเหลือง ในกลุ่ม calibration set และกลุ่ม validation set แสดงในตารางที่ 2 ซึ่งพบว่าผลการปรับแต่งสเปคตรัมของทั้งสองวิธีให้ความแม่นยำของสมการใกล้เคียงกัน โดยสมการจาก original spectra ของถั่วเหลือง ที่ความยาวคลื่น 9091-4003 cm^{-1} จะมีค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (Coefficient of Determination, R^2) เท่ากับ 0.89, ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานในการทำนายปริมาณโปรตีนในกลุ่ม calibration set (SEC) เท่ากับ 0.7439 เปอร์เซ็นต์ มีปัจจัย (F) ที่เกี่ยวข้อง 8 ปัจจัย ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานในการทำนายปริมาณโปรตีนในกลุ่ม validation set (SEP) เท่ากับ 1.0851 เปอร์เซ็นต์ มีปัจจัย (F) ที่เกี่ยวข้อง 8 ปัจจัย จากสมการ จะเห็นว่า ช่วงคลื่นแสง 10000-5000 cm^{-1} เหมาะสมที่จะใช้ในการประเมินปริมาณโปรตีนในถั่วเหลือง โดยมีค่า SEC และค่า SEP ต่ำกว่าค่า SD (2.82) จากการวิเคราะห์โปรตีนในห้องปฏิบัติการ แสดงว่า สมการทำนายนี้สามารถใช้ประเมินค่าโปรตีนได้อย่างมีประสิทธิภาพ

ตารางที่ 2 ผลการปรับแต่งสเปคตรัมในการสร้างสมการ Calibration ของปริมาณโปรตีนในถั่วเหลือง ด้วยวิธี Partial least square regression (PLSR)

ช่วงคลื่นแสง (cm^{-1})	การปรับแต่งสเปคตรัม ด้วยเทคนิคทางคณิตศาสตร์	R^2	SEC	SEP	Bias	F
9091-4003	สเปคตรัมเริ่มต้น (Original)	0.8967	0.7439	1.0851	0.0421	8
9091-4003	สเปคตรัมเดอริเวทีฟลำดับที่สอง (Second derivative)	0.8944	0.8857	0.8831	0.0321	8

การปรับแต่งสเปคตรัมโดย การทำ Second derivative spectra ของถั่วเหลืองที่แสดงในภาพที่ 2 แสดงถึงช่วงการดูดซับคลื่นแสงที่สำคัญของโปรตีน ได้แก่ ช่วงดูดซับแสงที่จำนวนคลื่นแสงต่อเซนติเมตร 5988 และ 5155 cm^{-1} ซึ่งที่จำนวนคลื่นแสงนี้มีความสัมพันธ์สูงกับปริมาณโปรตีน ดังนั้นการเลือกช่วงความยาวคลื่นที่เหมาะสมในการสร้างสมการทำนายจะทำให้สามารถใช้ข้อมูลสเปคตรัมที่จำเป็นในการทำนายค่าปริมาณโปรตีนได้อย่างแม่นยำ ผลการทำนายปริมาณโปรตีนในถั่วเหลือง โดยใช้สมการที่สร้างในตัวอย่างกลุ่ม calibration set และ validation set แสดงในภาพที่ 2



ภาพที่ 2 สมการเทียบมาตรฐาน (Calibration) และทดสอบความแม่นยำของสมการเทียบมาตรฐาน (Validation) แสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าปริมาณโปรตีนในถั่วเหลือง โดยเทคนิค NIRS และค่าวิเคราะห์ทางเคมีด้วยวิธีมาตรฐานของห้องปฏิบัติการ

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

การพัฒนาระบบการตรวจสอบความแม่นยำถูกต้องสูงด้วยเทคนิค NIR สำหรับการวิเคราะห์โปรตีนในถั่วเหลือง ควรจะกำหนดให้วัดสเปคตร้าในช่วงจำนวนคลื่นแสงต่อเซนติเมตร ตั้งแต่ 9091-4003 cm^{-1} โดยจะต้องมีการปรับแต่งสเปคตรัมด้วย การทำ Second derivative และคำนวณด้วยวิธี PLS calibration สามารถใช้ในการประเมินหาปริมาณโปรตีนในถั่วเหลืองได้อย่างมีประสิทธิภาพ และได้เทคนิคการวิเคราะห์โปรตีนในถั่วเหลือง ที่สามารถลดขั้นตอนการวิเคราะห์ และเป็นทางเลือกในการวิเคราะห์ อีกทั้งวิธีนี้เป็นวิธีประเมินที่ใช้เวลาสั้นกว่าการวิเคราะห์ทางเคมีในห้องปฏิบัติการ NIR เป็นเทคนิคที่สามารถทำนายค่าทางเคมีได้อย่างรวดเร็วทราบผลภายในเสี้ยววินาที ให้ผลวิเคราะห์ที่มีความถูกต้อง แม่นยำ ประหยัดเวลา ลดต้นทุนในการใช้สารเคมี และรักษาสิ่งแวดล้อม และสามารถพัฒนาผลงานวิจัยนี้ในการคัดเลือกหรือตรวจสอบคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ได้โดยไม่ต้องทำลายเมล็ดพันธุ์นั้นๆ ก่อให้เกิดประโยชน์แก่วงการพัฒนาและปรับปรุงพันธุ์พืชให้ได้พันธุ์ดี พันธุ์ใหม่ต่อไป

เอกสารอ้างอิง

เทคโนโลยีอินฟราเรดย่านใกล้และการประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรม.2555. สถาบันวิจัยและค้นคว้าและพัฒนาผลิตภัณฑ์ทางการเกษตรและอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ISBN 978-616-278-009-7 กรุงเทพฯ.

สมศักดิ์ ศรีสมบุญ. 2543. งานวิจัยและพัฒนาพันธุ์ถั่วเหลืองในประเทศไทย. สถาบันวิจัยพืชไร่ กรมวิชาการเกษตร. 77 หน้า.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (A.O.A.C.), Official Methods of Analysis, Eleventh Edition, Benjamin Franklin Station Washington, D.C. (1970). pp. 1015.

Osborne, B.G. T. Fearn and P.H. Hindle 1993. Practical NIR Spectroscopy with Applications in Food and Beverage Analysis. Longman Scientific and Technical, Harlow, UK

Jilie K. and Shaoning Y.U., Fourier Transform Infrared Spectroscopic of Protein Secondary StructuresActa Biochimica et Biophysica Sinica 2007, 39(8): 549–559